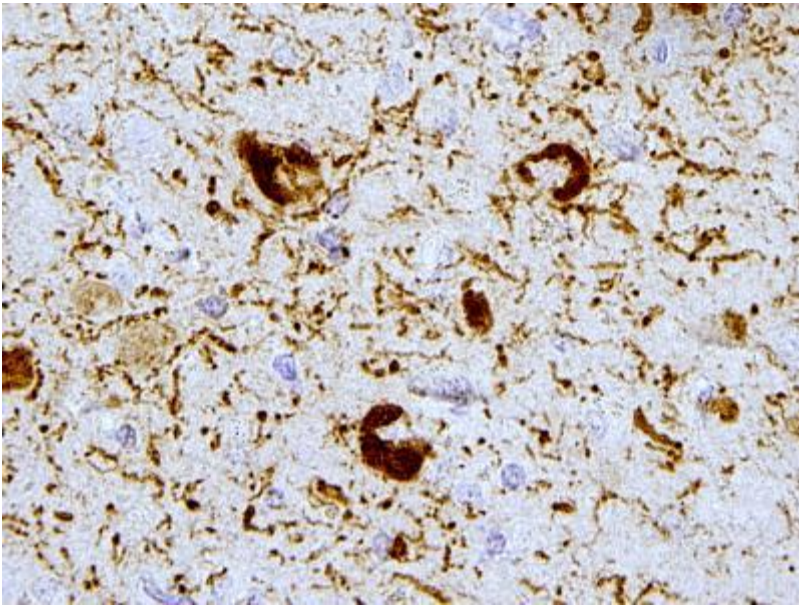




ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Διπλωματική εργασία με θέμα:

Μελέτη της επίδρασης νέων αναστολέων της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης tau στο μονοπάτι Wnt σηματοδότησης



Επιβλέπων
καθηγητής:

Κος Σπύρος
Ευθυμίουπουλος

Της προπτυχιακής φοιτήτριας
Αναστασίας-Κωνσταντίνας
Παπαδοπούλου
Α.Μ. 1113201300104
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων κι
Ανθρώπου

2016-2017

Ευχαριστίες

Πριν από ένα χρόνο, η στιγμή που θα ολοκληρωνόταν αυτό το εγχείρημα φάνταζε τόσο μακρινή. Όταν ξεκινούσαμε δειλά να ερχόμαστε σε επαφή με το εργαστήριο, να μαθαίνουμε τις πρωτόγνωρες για εμάς τεχνικές, αλλά και τα πιθανά μικροπροβλήματα που μπορεί να υπάρχουν σε ένα εργαστήριο, όπως και σε οποιονδήποτε εργασιακό χώρο και να καλούμαστε να φτάσουμε στους στόχους μας, παρά τις όποιες αντιξοότητες... Η πραγματοποίηση μιας διπλωματικής εργασίας μας ωριμάζει, μας καθιστά πιο υπεύθυνους, μας σκληραγωγεί, μας πεισμώνει, μας προετοιμάζει για την πραγματικότητα.

Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Σπύρο Ευθυμιόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, αλλά και να συνεχίσω περαιτέρω. Η αρωγή του ήταν ιδιαίτερα σημαντική για εμένα.

Επιπλέον, θα ήταν πρόπον να ευχαριστήσω την κυρία Σαρλή, που παρασκεύασε τις ουσίες με τις οποίες εργάστηκα και χωρίς αυτές δε θα μπορούσα να πραγματοποιήσω τα πειράματα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω προς τη Μαρία Φερμάνη, η οποία ήταν εκείνη που με μύησε στο εργαστήριο και συμπορευτήκαμε στα πρώτα μου βήματα, ακόμα κι αν θυσίαζε τον ελεύθερο χρόνο της.

Επιθυμώ ακόμα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου Αντώνη Μιρπανάγο κι Ολυμπία Αποκότου για την υγιή κι αρμονική συνεργασία που είχαμε, αλλά και τη Μαρία Πάσχου για την απλόχερη βοήθειά της.

Οφείλω να ευχαριστήσω επίσης την Παναγιώτα Μαυροειδή και την Αθηνά Σαμαρά, των οποίων η παρουσία στο εργαστήριο ήταν σωτήρια, αλλά και τη Γρηγορία Τσάκα, το Χρήστο Μπινίσκο και τη Χρύσα Κάγιου που με τη συνεργασία και την παρέα τους βοήθησαν ώστε να περάσει ευχάριστα αυτός ο χρόνος.

Φυσικά, δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω τους γονείς και τους φίλους μου που μου συμπαραστάθηκαν και με υποστήριξαν ιδίως αυτή τη χρονιά.

“Αυτό δεν είναι το τέλος. Δεν είναι καν η αρχή του τέλους. Ίσως είναι το τέλος της αρχής.”

Winston Churchill

Νάντια Παπαδοπούλου

Περιεχόμενα:

A. Θεωρητικό μέρος.....	4
A1. Η νόσος Alzheimer's.....	4
A1α. Γενική περιγραφή.....	4
A1β. Ιστορική αναδρομή.....	4
A1γ. Κλινικά χαρακτηριστικά και συμπτώματα.....	5
A1δ. Παράγοντες κινδύνου.....	6
A1ε. Παθοφυσιολογία.....	7
A1στ. Πρόληψη.....	11
A1ζ. Καταπολέμηση συμπτωμάτων κι απόπειρα θεραπείας.....	11
A2. Πρωτεΐνη tau.....	12
A2α. Ιδιότητες.....	12
A2β. Ταυπάθειες και σχέση με τη νόσο Alzheimer's.....	14
A2γ. Παθοφυσιολογία.....	14
A3. Μονοπάτια φωσφορυλίωσης της tau.....	16
A3α. Μονοπάτι Wnt σηματοδότησης.....	16
A3β. Συστατικά του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης.....	19
A3βi. Wnts.....	19
A3βii. Frizzled.....	19
A3βiii. LRP5/6.....	20
A3βiv. Dishevelled.....	20
A3βv. Κινάση 3β της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3β).....	20
A3βvi. β-κατενίνη.....	21
A3βvii. Dickkopf-1.....	21
B. Υλικά και μέθοδοι.....	23
B1. Υλικά.....	23
B1α. Κυτταρικές σειρές.....	23
B1β. Πρωτόκολλα παρασκευής διαλυμάτων.....	25
B1γ. Αντισώματα.....	31

B1δ. Ανάλογα γαλλοκυανίνης.....	31
B2. Μέθοδοι.....	35
B2α. Κυτταροκαλλιέργειες.....	35
B2β. Λύση κυττάρων για απομόνωση πρωτεϊνών.....	38
B2γ. Μέθοδος Bradford για ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών.....	39
B2δ. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών σε gel ακρυλαμίδης.....	40
B2ε. Στύπωμα κατά Western (Western blotting).....	44
B2στ. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT.....	49
Γ. Αποτελέσματα.....	51
Δ. Συζήτηση.....	59
Δ1. Τα ανάλογα γαλλοκυανίνης δεν έχουν κυτταροτοξική δράση	59
Δ2. Το θρεπτικό που συνελέγη από τα επιμολυσμένα κύτταρα διαθέτει DKK1...	60
Δ3. Τα περισσότερα ανάλογα γαλλοκυανίνης δεν μεταβάλλουν τα επίπεδα των πρωτεϊνών του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης απουσία DKK1.....	60
Δ4. Παρουσία του αναστολέα DKK1, η επίδραση των αναλόγων γαλλοκυανίνης στα επίπεδα των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης ποικίλλει.....	62
E. Μελλοντικοί στόχοι.....	66
ΣΤ. Αναφορές και Βιβλιογραφία.....	67
Z. Περίληψη.....	75

A. Θεωρητικό μέρος

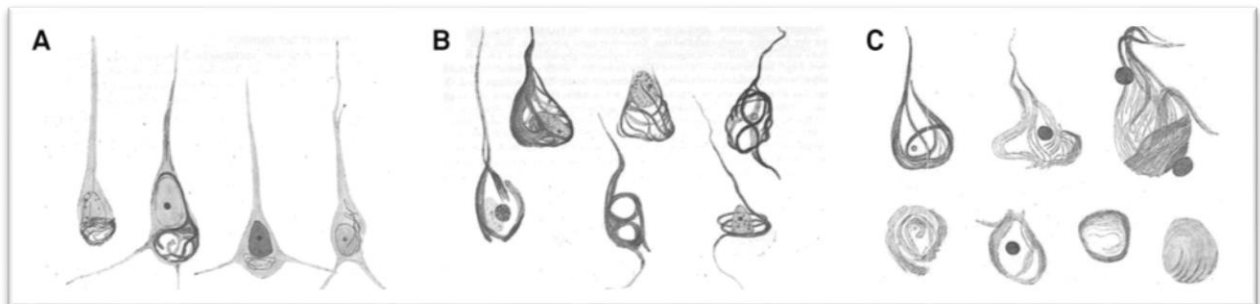
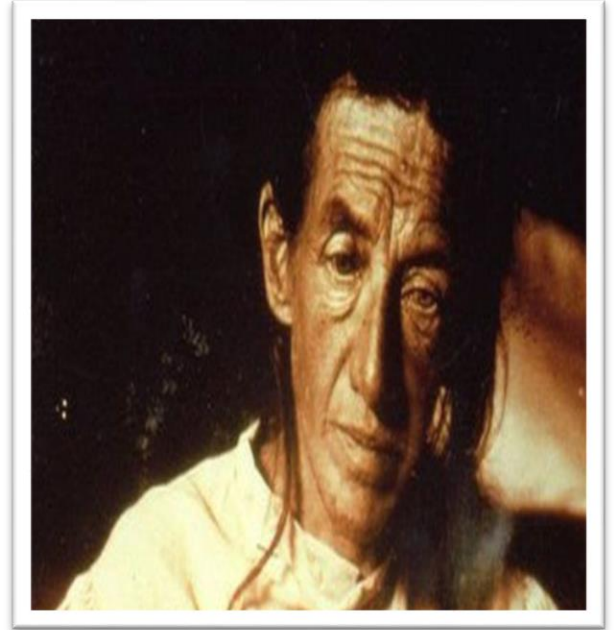
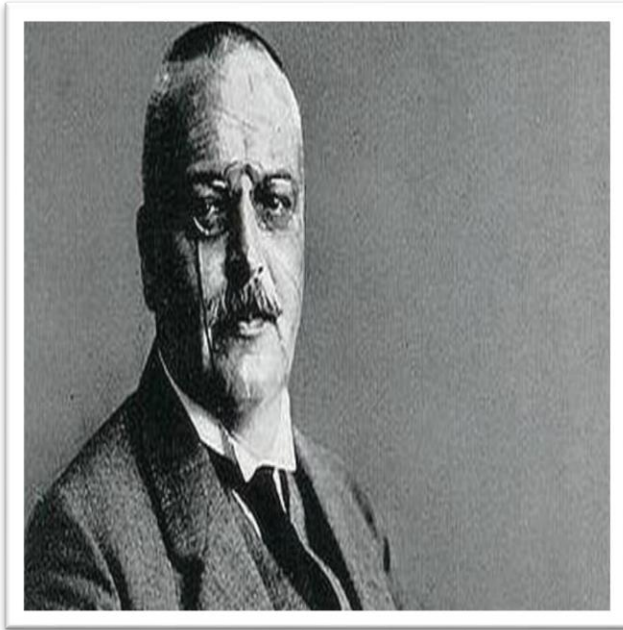
A1. Η νόσος Alzheimer's

A1α. Γενική περιγραφή

Η νευροεκφυλιστική νόσος Αλτσχάιμερς (*Alzheimer's*) είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας, δηλαδή μιας συνθήκης απώλειας μνήμης κι άλλων διανοητικών ικανοτήτων που δημιουργούν προβλήματα στη ζωή και στην καθημερινότητα των πασχόντων, αλλά και των οικείων τους. Σήμερα, αποτελεί την έκτη αιτία θανάτου στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ενώ ανά 66 δευτερόλεπτα ένας άνθρωπος στις Ηνωμένες Πολιτείες αναπτύσσει τη νόσο. Από το 2000 ενώ οι θάνατοι από καρδιακά νοσήματα έχουν περιοριστεί κατά 14%, οι θάνατοι που οφείλονται στην Alzheimer's έχουν αυξηθεί κατά 89% (1). Παγκοσμίως, μέχρι και το 2050, οι ασθενείς με νόσο Alzheimer's φαίνεται να ανέρχονται στα 132 εκατομμύρια, με τους περισσότερους να προέρχονται από χώρες με χαμηλά ή μεσαία εισοδήματα: ιδίως στην Ελλάδα οι ασθενείς με νόσο Alzheimer's υπολογίζονται στους 200.000 (2, 3)

A1β. Ιστορική αναδρομή

Η νόσος Alzheimer's περιγράφηκε αρχικά από το Γερμανό ψυχίατρο Alois Alzheimer, από τον οποίο έλαβε κι αργότερα το όνομά της, ως προγηραντική ή προσενιλική άνοια το 1906. Ο Alzheimer, συνεργαζόμενος με τον Emil Kraepelin, παρακολουθούσε από το 1901 την Auguste D., μια ασθενή που παρουσίαζε προοδευτική απώλεια των νοητικών της λειτουργιών και τελικά απεβίωσε τον Απρίλιο του 1906. Μετά το θάνατό της, του δόθηκε η ευκαιρία να μελετήσει τον εγκέφαλό της με ιστολογικές μεθόδους και συγκρίνοντάς τον με υγιείς παρατήρησε «πολυάριθμες μικρές εστίες σε ανώτερες στοιβάδες, που προσδιορίζονται από τη σάρευση ιδιάζοντος υλικού στο φλοιό», εικόνα που σήμερα αποδίδεται από τον όρο *γηραντικές πλάκες* και «πολύ περίεργες τροποποιήσεις στα νευροϊνίδια», δηλαδή τα νευροϊνιδιακά δεμάτια (*Gerbaldo et al., 1997*).



Εικόνα Α1:

Εικόνα πάνω κι αριστερά: Alois Alzheimer

Εικόνα πάνω και δεξιά: Auguste D., ασθενής του Alzheimer

Κάτω εικόνα: Σκίτσα ιστολογικών παρασκευασμάτων από υλικό από την Auguste D. σημασμένων με την τεχνική Bielschowsky's όπου απεικονίζονται τα δεμάτια στα διάφορα στάδια της νόσου Α. Έναρξη της νόσου, Β. Προχωρημένο στάδιο και C. Τελικό στάδιο

Α1γ. Κλινικά χαρακτηριστικά και συμπτώματα

Όπως προαναφέρθηκε, η νόσος Alzheimer's είναι μια μορφή άνοιας, δηλαδή απώλειας μνήμης και σύμφωνα με τις παρατηρήσεις του Alzheimer, προοδευτικής απώλειας νοητικών λειτουργιών όπως κατανόησης και απρόβλεπτης συμπεριφοράς (Gerbaldo *et al.*, 1997). Στα αρχικά στάδια, η απώλεια μνήμης είναι ήπια, αλλά πλησιάζοντας στα τελικά στάδια τα άτομα αδυνατούν να συνεχίσουν μια συζήτηση και να ανταποκριθούν στο περιβάλλον τους (5). Πώς, όμως, μπορούμε να διακρίνουμε φαινοτυπικά έναν ασθενή με Alzheimer's από κάποιον που πάσχει από κάποια άλλη μορφή άνοιας ή έχει απλώς αδύναμη μνήμη;

Τα πρώτα σημάδια της νόσου είναι ελάχιστο προβλήματα μνήμης, όπως η δυσκολία απομνημόνευσης πρόσφατα γνωστοποιημένων πληροφοριών, συζητήσεις, γεγονότα κι ονόματα περιοχών κι αντικειμένων, αφού όπως είναι γνωστό οι πρώτες περιοχές του εγκεφάλου που πλήττονται από την Alzheimer's είναι οι σχετιζόμενες με τη

μνήμη, αμυγδαλή κι ιππόκαμπος (5, 6). Κατά την εξέλιξη της νόσου κι όσο οι παθολογικές ενδείξεις της εξαπλώνονται στον εγκέφαλο, αυξάνεται η σοβαρότητα των συμπτωμάτων, που πιθανώς να μην είναι εύκολο να αναγνωριστούν από τον ίδιο τον ασθενή, αλλά από οικεία πρόσωπα και περιλαμβάνουν:

- Αποπροσανατολισμό
- Σύγχυση για γεγονότα, χρόνο και τόπο
- Δυσκολία σχεδιασμού και λήψης αποφάσεων
- Προβλήματα στη γλώσσα και στην ομιλία
- Περιορισμένη όρεξη και προβλήματα κατάποσης, που μπορεί να οδηγήσει σε εισπνοή φαγητού εντός των πνευμόνων (aspiration), προκαλώντας συχνά μολύνσεις στο θώρακα
- Προβλήματα μετακίνησης χωρίς βοήθεια ή γενικότερα αυτοεξυπηρέτησης
- Απότομες μεταβολές στη συμπεριφορά και στην προσωπικότητα, που περιλαμβάνουν επιθετικότητα, απαιτητικότητα κι αβάσιμη καχυποψία για άτομα του περιβάλλοντος των ασθενών
- Ψευδαισθήσεις, δηλαδή να βλέπουν και να ακούν κάτι ανύπαρκτο, και παραισθήσεις, δηλαδή να πιστεύουν σε αναληθή στοιχεία
- Κακή διάθεση ή άγχος (5,6)

Η κλινική συμπτωματολογία μπορεί να παρουσιαστεί είκοσι χρόνια μετά την έναρξη των παθολογικών μεταβολών στον εγκέφαλο (Soininen H. et al, 2015). Επίσης, είναι συχνά τα περιστατικά ασθενών με νόσο Alzheimer's που πάσχουν παράλληλα από άλλες σοβαρές νόσους, όπως διαβήτη τύπου 2 ή καρδιαγγειακά νοσήματα, που είναι λογικό να επηρεάζουν την παθογένεια σε μοριακό επίπεδο και να επιβαρύνουν τη συμπτωματολογία και την εξέλιξη της Alzheimer's (Nagamani G. et al, 2015; Martins RN. et al, 2015; Claassen JA., 2015)

Οι πάσχοντες από τη νόσο Alzheimer's έχουν χρόνο ζωής 8 ετών κατά μέσο όρο, αφού γίνουν αντιληπτά τα συμπτώματα από τους οικείους τους, ωστόσο το εύρος επιβίωσης μπορεί να διακυμανθεί από 4 έως 20 έτη, εξαρτώμενο από την ηλικία, αλλά και από άλλους παράγοντες και καταστάσεις υγείας (5)

Α1δ. Παράγοντες κινδύνου

Αν κι οι περισσότερες εικόνες που έρχονται στο μυαλό μας, όταν σκεφτόμαστε ασθενείς που πάσχουν από Alzheimer's είναι αυτές ηλικιωμένων ανθρώπων, η προχωρημένη ηλικία δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνιση της νόσου, αλλά αποτελεί το γνωστότερο παράγοντα κινδύνου, καθώς η πλειονότητα των ασθενών είναι από 65 ετών κι άνω. Ωστόσο, το 5% των ασθενών εμφανίζουν σε νεαρή ηλικία τη νόσο, ήδη από τα 40 ή 50 έτη (5). Η ισχυρή συσχέτιση της νόσου με την αυξημένη ηλικία μάλλον αφορά στη σωρευτική επίδραση διαφορετικών παραγόντων συνδεδεμένων με το πέρασμα του χρόνου, συμπεριλαμβανομένης της γενετικής ευαισθησίας, της κατάθλιψης, της έκθεσης σε τοξίνες κι ηλεκτρομαγνητικά πεδία, αλλά και καρδιαγγειακών παραγόντων, όπως η αυξημένη αρτηριακή πίεση των μεσηλικών, εγκεφαλική και καρδιαγγειακή νόσος, το κάπνισμα, η παχυσαρκία κι ο διαβήτης, αυξάνοντας τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου (Ahmed E. & Abdel M., 2015)

Άλλοι παράγοντες που φαίνεται να αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου είναι η ύπαρξη περιστατικού πάσχοντος στην οικογένεια, που μπορεί να φανερώνει γενετική προδιάθεση, καθώς εκτός της σποραδικής, η Alzheimer's εμφανίζεται και σε κληρονομήσιμη οικογενή μορφή, αλλά και πρότεροι κρανιακοί τραυματισμοί, η έλλειψη σωματικής άσκησης και η κοινωνική απομόνωση (6, 12). Στατιστικά, η νόσος «κάνει μια διάκριση» υπέρ του γυναικείου φύλου, καθώς οι γυναίκες φαίνεται να επηρεάζονται ελαφρώς περισσότερο από τους άνδρες (6). Τα οιστρογόνα, οι ορμόνες που είναι αποκλειστικά υπεύθυνες για την αύξηση και την ανάπτυξη των θηλυκών χαρακτηριστικών, έχουν αναγνωριστεί ως αντιοξειδωτικά σε ποικιλία in vitro κι in vivo μοντέλων. Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό για τη νευροπαθολογία της νόσου Alzheimer's, καθώς συσχετίζεται με το οξειδωτικό στρες, πιθανά λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των μεμβρανών των νευρώνων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι ευπαθή στο οξειδωτικό στρες (Singh M. et al, 2009)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση ότι άτομα με σύνδρομο Down (τρισωμία 21) διατρέχουν υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης Alzheimer's. Πιο συγκεκριμένα, από την ηλικία των 40 ετών ενήλικες με σύνδρομο Down αναπτύσσουν νευροπαθολογία όμοια με αυτή της νόσου Alzheimer's, ενώ σε ηλικία 55-60 ετών, το 70% από αυτούς θα εμφανίσει άνοια. Το ποσοστό αυτό τείνει να αυξάνεται, καθώς μέσα στα τελευταία 30 χρόνια περίπου το προσδόκιμο ζωής για άτομα με σύνδρομο Down έχει διπλασιαστεί κι έτσι έχουν αυξημένες πιθανότητες να παρουσιάσουν νοσήματα σχετικά με την αύξηση της ηλικίας (Wisniewski T. et al, 2015; Griffin WS. & Wilcock DM., 2013; Williams RS. & Lai F., 1989; Wen G. et al, 1985; Mann DM., 1988). Δεδομένου του γεγονότος ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (APP) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 21, η τρισωμία του χρωμοσώματος που αποτελεί τη γενετική βάση του συνδρόμου Down υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να υπερεκφραστεί επηρεάζοντας τη νευρογένεση, τη νευρωνική μετανάστευση και την αύξηση του άξονα (Wang BP. et al, 2014; Hassan BA. & Nicolas M., 2014). Επιπλέον, στο ίδιο χρωμόσωμα εδράζονται τα γονίδια που εκφράζουν κινάσες που φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη tau, όπως η διπλής ειδικότητας ρυθμιζόμενη από φωσφορυλίωση τυροσίνης κινάση 1A (DYRK1A), με αποτέλεσμα η υπερέκφρασή τους να ενισχύει τη φωσφορυλίωση της tau (Liu F. et al, 2008).

Α1ε. Παθοφυσιολογία

Αφού παρατέθηκαν μερικά στοιχεία σχετικά με τους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης νόσου, αλλά και την κλινική εικόνα των ασθενών, στο σημείο αυτό θα αρχίσουμε να προσεγγίζουμε σε μοριακό επίπεδο τα αίτια που οδηγούν στην εκδήλωση αυτών των συμπτωμάτων. Σε γενικά πλαίσια, όπως κάθε νευροεκφυλιστική νόσος, έτσι κι η νόσος Alzheimer's δεν επιτρέπει την ορθή λειτουργία τμημάτων των κυτταρικών «εργοστασίων» και, καθώς η βλάβη εξαπλώνεται σε μεγαλύτερη έκταση εντός του κυττάρου, οδηγεί τελικά στον κυτταρικό θάνατο κι όσα περισσότερα κύτταρα πεθάνουν, τόσο πιο καταστρεπτικές και μη αναστρέψιμες θα είναι οι επιπτώσεις στον εγκέφαλο (5).

Δύο είναι οι βασικές παθολογικές δομές που εντοπίζονται κατά τη μελέτη εγκεφάλων μετά το θάνατο ασθενών με Alzheimer's και τις οποίες αναγνώρισε και σχεδίασε,

όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως, ο Alois Alzheimer, αλλά μετέπειτα μελετήθηκαν λεπτομερώς:

- οι γηραντικές πλάκες και
- τα νευροϊνιδιακά δεμάτια (NFTs).

Οι πλάκες αποτελούν δομές που προκύπτουν από τη μαζική εναπόθεση του β-αμυλοειδούς (Αβ), ενός τμήματος 40 ή 42 αμινοξέων της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP), στα κενά μεταξύ των νευρικών κυττάρων (5, Ahmed E. & Abdel M., 2015). Η κλασική μορφή των γηραντικών πλακών είναι σφαιρικές δομές με κεντρικό πυρήνα ινώδους β-αμυλοειδούς που περιβάλλονται από αποδομούμενα ή δυστροφικά άκρα νευρώνων. Η APP μπορεί να πρωτεολυθεί μέσω δύο μονοπατιών:

- ❖ του μονοπατιού α ή μη αμυλοειδογενούς, που περιλαμβάνει τη δράση της α-εκκριτάσης, χωρίς να παράγει β-αμυλοειδές και
- ❖ του μονοπατιού β ή αμυλοειδογενούς, κατά το οποίο το ένζυμο 1 θραύσης της APP στη θέση β (BACE-1), μια β-εκκριτάση, παράγει μικρά APPβ στον εξοκυττάριο χώρο τα οποία στη συνέχεια θα πρωτεολυθούν περαιτέρω από τη γ-εκκριτάση, ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο με πρεσινιλίνη 1 στον καταλυτικό του πυρήνα, παράγοντας τελικά Αβ και το ενδοκυτταρικό καρβοξυτελικό άκρο της APP (AICD) (LaFerla F.M. & Querfurth H.W., 2010)

Θεωρείται ότι τα πιο τοξικά Αβ₄₀₋₄₂ πεπτίδια προκύπτουν από την αμυλοειδογενή κατεργασία του μορίου APP (Broeckhoven C. & Cruts M., 1998)

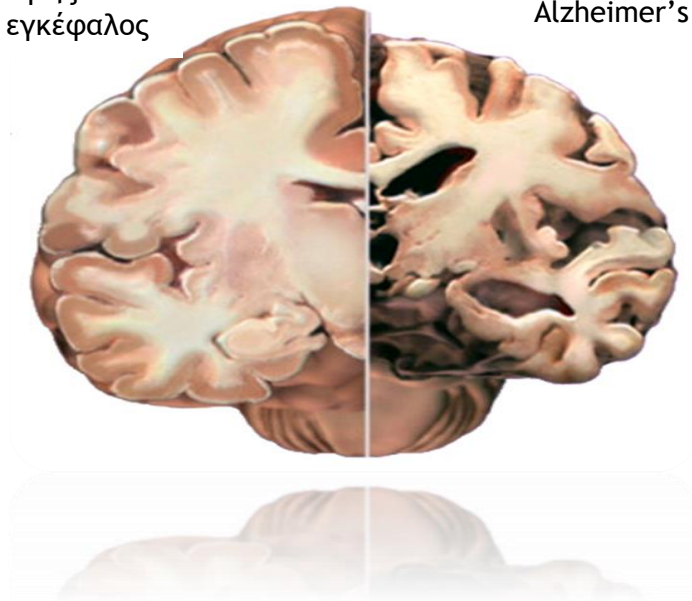
Τα νευροϊνιδιακά δεμάτια σχηματίζονται ενδοκυτταρικά από συσσώρευση ανώμαλα υπερφωσφορυλιωμένων ινιδίων της σχετιζόμενης με τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνης tau σε πυραμιδικούς νευρώνες (Ahmed E. & Abdel M., 2015). Συντίθενται από ζεύγη ελικοειδών νηματίων κι ευθεία νημάτια υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau η συσσώρευση των οποίων προκαλεί καταστρεπτικές επιπτώσεις στη φυσιολογική αρχιτεκτονική του κυτταροσκελετού που ακολούθως οδηγεί σε νευρωνικό θάνατο, διαδικασία η οποία υποστηρίζεται από τη γνωστή ως υπόθεση tau (tau hypothesis) (Ahmed E. & Abdel M., 2015). Η έντονη φωσφορυλίωση της tau και/ή η συσσώρευσή της έχει προταθεί ότι προκαλούνται από την εναπόθεση Αβ (Gotz J. & Ittner LM., 2011), από μεταλλάξεις στο γονίδιο της tau που οδηγούν σε οικογενή νευροεκφυλιστική διαταραχή, τη μετωπιαία άνοια με παρκινσονισμό συνδεδόμενη με το χρωμόσωμα 17 (Hutton M. et al, 1998; Poorkaj P. et al, 1998; van Swieten JC. et al, 1998) και από παθολογική μεταφορά της tau, καθώς της αποδίδεται ρόλος prion (Diamond MI., 2009). Επιπρόσθετα, η παθολογική tau προκαλεί αύξηση στη σταθεροποίηση της ακτίνης που αναστέλλει τη σύνδεση της πρωτεΐνης διαχωρισμού Dyr1 (σχετιζόμενη με τη δυναμίνη πρωτεΐνη) με τα μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα την επιμήκυνση των μιτοχονδρίων και την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (Fulga TA. et al, 2007; Feany MB. et al, 2012)

Αρχικά, η νόσος επηρεάζει την περιοχή CA1 του αμμώνιου κέρατος του υποκάμπου, τον προμετωπιαίο φλοιό και πυραμιδικά κύτταρα του ελάσματος II του ενδορρινικού φλοιού που ελέγχουν τη μνήμη, τη σκέψη και τη γλώσσα (Ahmed E. & Abdel M., 2015). Γενικά, σε εγκεφάλους με Alzheimer's, ο φλοιός συρρικνώνεται, καταστρέφοντας περιοχές σχετιζόμενες με τη σκέψη, το σχεδιασμό και τη μνήμη κι ιδίως την περιοχή του υποκάμπου που σχετίζεται με το σχηματισμό νέων αναμνήσεων και παράλληλα οι γεμάτες με υγρό κοιλότητες του εγκεφάλου (ventricles) μεγεθύνονται (31).

Στην παρούσα εργασία, θα εστιάσουμε στα νευροϊνιδιακά δεμάτια και στη συστατική τους πρωτεΐνη tau.

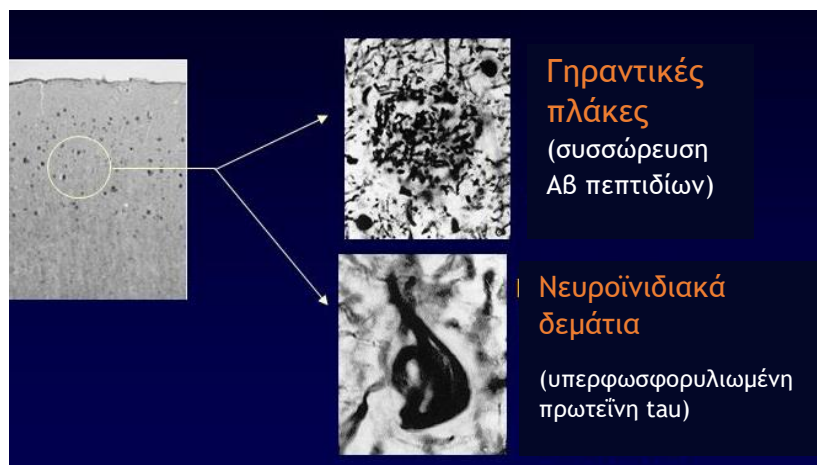
Υγιής
εγκέφαλος

Προχωρημένη
Alzheimer's



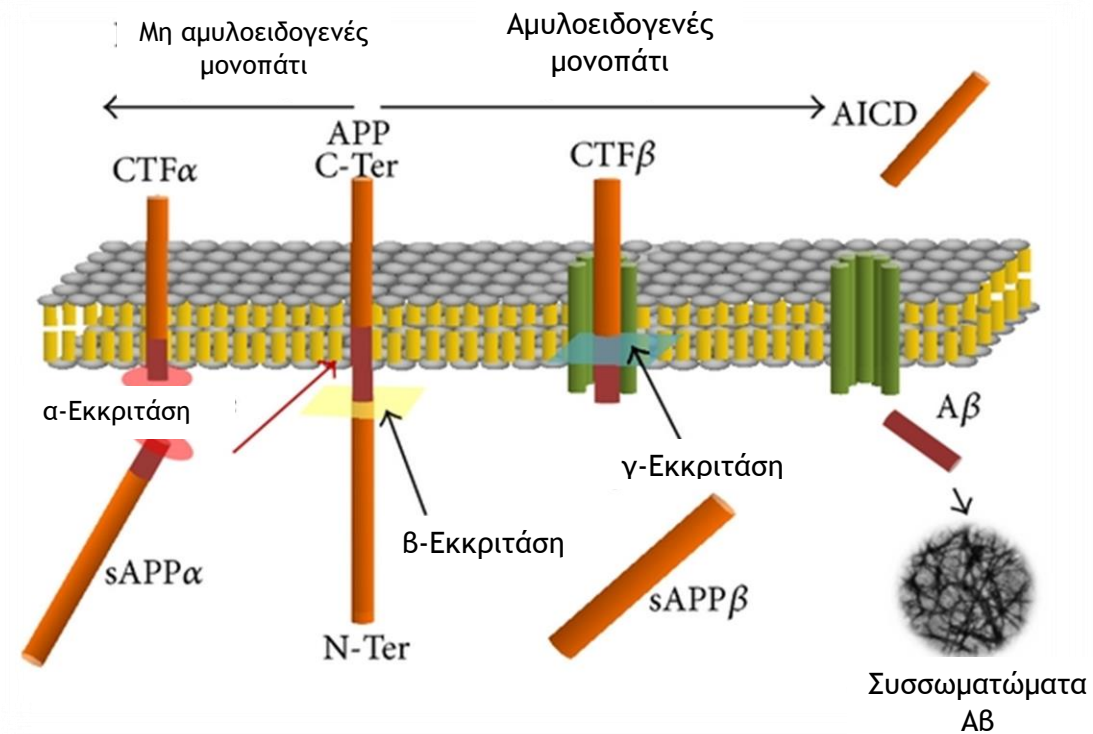
https://www.alz.org/braintour/healthy_vs_alzheimers.asp

Εικόνα Α2: Μορφή υγιούς και προσβεβλημένου εγκεφάλου



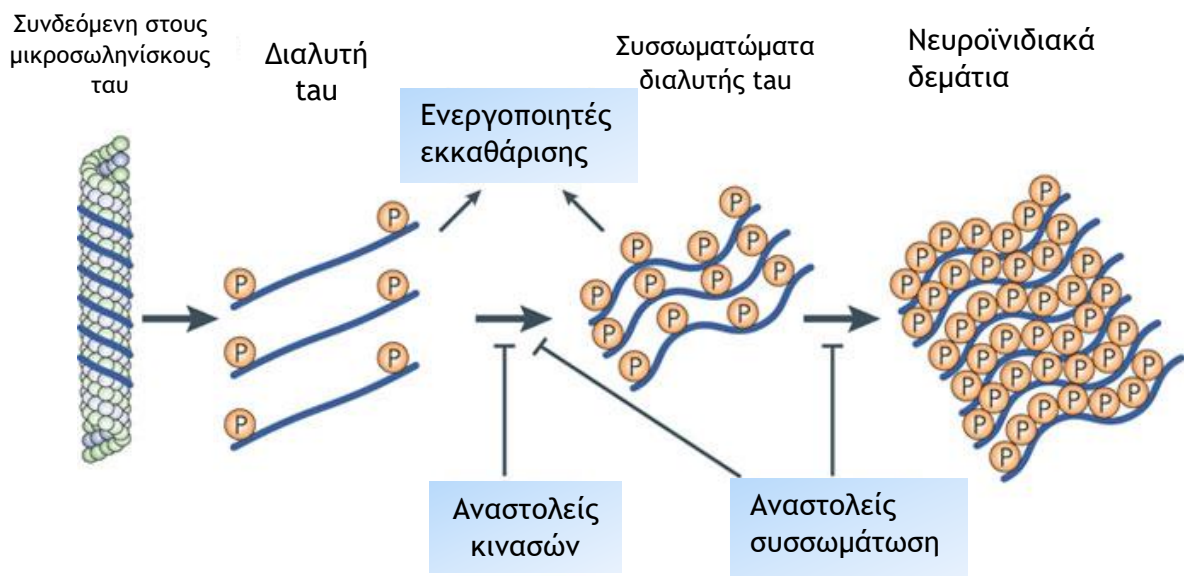
<http://slideplayer.com/slide/6254868/>

Εικόνα Α3: Παθολογικά χαρακτηριστικά Alzheimer's



<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/780179/fig1/>

Εικόνα Α4: Μονοπάτια επεξεργασίας πρόδρομης πρωτεΐνης αμυλοειδούς (APP)



Nature Reviews | Drug Discovery

<http://labiotech.eu/taurx-alzheimer-disease-therapy/>

Εικόνα Α5: Στάδια φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης ταυ και διαδικασία σχηματισμού νευροϊνιδιακών δεματίων

Α1στ. Πρόληψη

Γνωρίζοντας λοιπόν ποια είναι τα βασικά παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, πώς μπορούν να εξελιχθούν και ποιοι οι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, μπορούμε να υποθέσουμε ποιες θα ήταν οι κατάλληλες στρατηγικές πρόληψης. Σύμφωνα με τον καθηγητή Gill Livingston του University College του Λονδίνου, άτομα ηλικίας 45-65 ετών που έχουν καταφέρει να διατηρήσουν καλή ακοή, έχουν περιορισμένο κατά 9% κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η συνέχιση της εκπαίδευσης μετά την ηλικία των 15 ετών και μέχρι και την ενηλικίωση, μειώνει κατά 8% τον κίνδυνο εκδήλωσης της Alzheimer's, καθώς όπως φαίνεται η προσπάθεια απόκτησης νέων γνώσεων δημιουργεί αποθεματικό διέγερσης στον εγκέφαλο, ενισχύοντας την άμυνά του κατά τη γήρανση. Η διακοπή του καπνίσματος μειώνει τον κίνδυνο κατά 5%, ενώ η αντιμετώπιση της κατάθλιψης κατά 4% (12). Άλλες συνήθειες που φαίνεται να μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου είναι:

- ✓ Η λήψη αντιφλεγμονωδών φαρμάκων κι ο περιορισμός της κατανάλωσης αλκοόλ (Ahmed E. & Abdel M., 2015)
- ✓ Η ενασχόληση με υψηλής πολυπλοκότητας νοητικές δραστηριότητες κι η συχνότερη συμμετοχή σε γεγονότα που διεγείρουν το πνεύμα και το σώμα (Tiihonen J. et al, 2013)
- ✓ Η πραγματοποίηση υγιούς κι ισορροπημένης διατροφής κι η αποφυγή της γλουτένης (σιτηρά) και της καζεΐνης (γαλακτοκομικά) (6, 33).

Α1ζ. Καταπολέμηση συμπτωμάτων κι απόπειρα θεραπείας

Δυστυχώς, τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι η νόσος Alzheimer's είναι μια ασθένεια χωρίς θεραπεία (6). Στόχος, λοιπόν, των θεραπευτικών προσεγγίσεων δεν είναι η ίαση των ασθενών, αλλά η επιβράδυνση της επιδείνωσης των συμπτωμάτων ή ανακούφιση από κάποιες από τις πιο επώδυνες εκδοχές τους (5).

Δύο είναι οι κύριοι τύποι φαρμάκων που μπορούν να περιορίσουν παροδικά τα συμπτώματα μνήμης κι άλλες γνωστικές τροποποιήσεις:

- ✚ Αναστολείς χολινεστεράσης, για ήπια έως μέτριας σοβαρότητας Alzheimer's και
- ✚ Ανταγωνιστές υποδοχέων N-μέθυλο-D-ασπαρτικού (NMDA) για σημαντικής σοβαρότητας νόσο (Ahmed E. & Abdel M., 2015)

Οι αναστολείς χολινεστεράσης αποτρέπουν τη θραύση της ακετυλοχολίνης από την ακετυλοχολινεστεράση στο άκρο του νευρώνα, καθώς όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση της ακετυλοχολίνης στον νευρώνα, τόσο καλύτερη η επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων που χρησιμοποιούν την ακετυλοχολίνη ως νευροδιαβιβαστή, σταθεροποιώντας ή και βελτιώνοντας τα συμπτώματα της νόσου (Abdel Moneim A.E., 2014; Abdel Moneim A.E. et al, 2014)

Οι ανταγωνιστές των υποδοχέων NMDA (π.χ. μεμαντίνη) φαίνεται να λειτουργούν μάλλον εμποδίζοντας την περαιτέρω καταστροφή των νευρώνων από το γλουταμικό, τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή του κεντρικού νευρικού συστήματος, που κατά την Alzheimer's εκκρίνεται σε υπερβολικές ποσότητες (Wenk G.L. & Rogawski M.A., 2003)

Μέχρι στιγμής, καμμία από τις ανωτέρω φαρμακευτικές αγωγές δεν έχει κατορθώσει να αναστείλει την πρόοδο της νόσου, αλλά μετριάζουν τα γνωστικά και συμπεριφορικά συμπτώματα των ασθενών (Vellas B. et al, 2011)

Έχει επιχειρηθεί ακόμα η εισαγωγή πλήρους μήκους ανθρώπινης ανασυνδυασμένης tau στη μη φωσφορυλιωμένη της μορφή για ανοσοποίηση αγρίου τύπου ποντικών, ώστε να ληφθεί κατάλληλο αντίσωμα. Ωστόσο, κατά την πρώτη απόπειρα η εισαγωγή της πρωτεΐνης προκάλεσε tau παθολογία, αστρογλίωση κι εγκεφαλομυελίτιδα στα ποντίκια-φορείς, απόρροια πιθανώς του μεγέθους του αντιγόνου (Abramsky O. et al, 2006). Σε μοντέλα ποντικών με νευροϊνιδιακά δεμάτια, τόσο η ενεργός όσο κι η παθητική ανοσοποίηση με πεπτίδια tau φωσφορυλιωμένα στη σερίνη 396 και στη σερίνη 404 (FITC-tau₃₉₆₋₄₀₄) ή με αντίσωμα tau, περιόρισε την tau παθολογία κι ανέστειλε τη γνωστική βλάβη (Sigurdsson EM. et al, 2010; Citron M. et al, 2011).

Πλέον είναι διαθέσιμοι πολλοί τύποι υποστήριξης ατόμων με Alzheimer's, ώστε να μπορούν να ζουν πιο ανεξάρτητα. Αυτοί μπορεί να περιλαμβάνουν αλλαγές στο περιβάλλον του σπιτιού, για να μπορούν να μετακινούνται ευκολότερα και να θυμούνται καθημερινές πράξεις, ψυχολογικές αγωγές, όπως θεραπεία διέγερσης μνήμης, που βοηθούν στην υποστήριξη της μνήμης τους, στις ικανότητες επίλυσης των προβλημάτων τους και στη γλωσσική ικανότητα (6). Πρόσφατα, επιχειρήθηκε και στέφθηκε με επιτυχία μια προσπάθεια εφαρμογής ενός συστήματος «παρακολούθησης» πασχόντων με Alzheimer's που βοήθησε στην αποτελεσματικότερη εφαρμογή στοχευμένων παρεμβάσεων από κλινικούς βάσει των καθημερινών δυσκολιών που αντιμετώπιζαν οι ασθενείς στο περιβάλλον του σπιτιού τους (π.χ. ύπνος, καθημερινή λειτουργικότητα). Μ' αυτό τον τρόπο, οι νοσούντες μπορούν να ανεξαρτητοποιηθούν περισσότερο, καθώς δεν είναι απαραίτητη η διαρκής παρέμβαση ειδικού καταρτισμένου προσωπικού (41)

A2. Πρωτεΐνη tau

A2α. Ιδιότητες

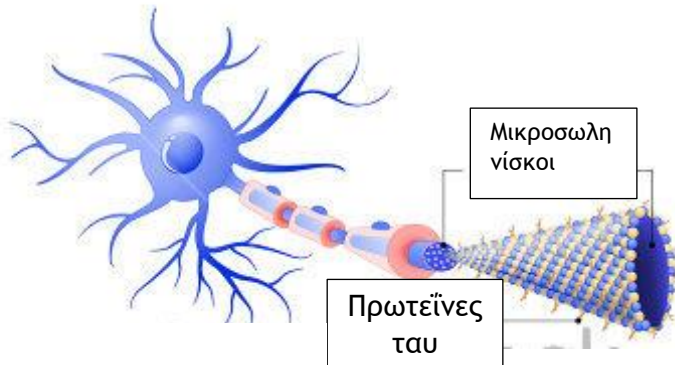
Η πρωτεΐνη tau είναι μια εναλλασσόμενα συρραπτόμενη πρωτεΐνη που προσδένεται σε μικροσωληνίσκους κι εκφράζεται κυρίως στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος (Kirschner MW. et al, 1975; Nunez J. et al, 1980; Nunez J. et al, 1978). Πρόκειται για μια κυτταροσκελετική πρωτεΐνη που σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους και ρυθμίζει την απόφυση των νευριτών. Η αλληλεπίδραση της tau με τους μικροσωληνίσκους επιτυγχάνεται μέσω επαναλαμβανόμενων επικρατειών

πρόσδεσης σε μικροσωληνίσκους που βρίσκονται στο καρβοξυτελικό ήμισυ της tau (Hanger D.P. et al, 2013). Υπάρχουν ισομορφές της tau με τρεις ή τέσσερις επαναλήψεις της συνδεόμενης με μικροσωληνίσκους επικράτειας που παράγονται από εναλλακτική συρραφή του εξωνίου 10 (Crowther RA. et al, 1989) Η tau αλληλεπιδρά επίσης με συστατικά της πλασματικής μεμβράνης μέσω της επικράτειας προβολής του αμινοτελικού άκρου (Lee G. et al, 1995; Brandt R. et al, 2011; Hanger D.P. et al, 2012). Αν κι εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, έχει ανιχνευθεί και στον πυρήνα νευρικών και μη κυττάρων (Loyens A. et al, 2011; Bonnefoy E. et al, 2006; Binder LI. et al, 1990; Binder LI. et al, 1993; Binder LI. et al, 1995; Papasozomenos SCh., 1995; Klein WL. et al, 1995; Binder LI. et al, 1996; Binder LI. et al, 1996; Maccioni RB. et al, 2000; Sciacca FL. et al, 2008). Ακόμα έχει εντοπιστεί σε ριβοσώματα νευρικών κυττάρων (Su Y. & Papasozomenos SC., 1991). Πρωτοανακαλύφθηκε το 1975 (Kirschner M.W. et al, 1975) ως μια πρωτεΐνη που συναπομονώθηκε μαζί με τους μικροσωληνίσκους, μέσω διαδοχικών κύκλων συγκέντρωσης κι αποδόμησης κι ονομάστηκε tau λόγω της ικανότητάς της να επάγει το σχηματισμό σωληνίσκων (tubules).

Το 1977 κατέστη σαφές ότι η tau είναι μια φωσφο-πρωτεΐνη (Kirschner M.W. et al, 1977). Το 1984 δείχθηκε ότι η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης που απομονώθηκε από εγκεφάλους βοοειδών έχει αυξημένη ικανότητα δέσμευσης στους μικροσωληνίσκους και προωθεί εντονότερα τη συγκέντρωσή τους (Cole RD. & Lindwall G., 1984). Η φωσφορυλίωση της tau μειώνει την ικανότητά της να δεσμεύεται και να σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους (Lee V.M. et al, 1993; Yankner B.A. et al, 1995). Ωστόσο, η tau φωσφορυλιώνεται φυσιολογικά κι αυτή η φωσφορυλίωση ρυθμίζει την ικανότητα δέσμευσης στους μικροσωληνίσκους κατά θεσσο-ειδικό τρόπο, δηλαδή η φωσφορυλίωση στις επικράτειες δέσμευσης στους μικροσωληνίσκους καταργεί την ικανότητα δέσμευσης στους μικροσωληνίσκους, ενώ η φωσφορυλίωση των παράπλευρων επικρατειών μειώνει μόνο μερικώς αυτή την ικανότητα (Grundke-Iqbal I. & Iqbal K., 2007; Avila J., 2009; Mandelkow E. et al, 1992). Η μεταφορά της tau στον πυρήνα ρυθμίζεται επίσης από τη φωσφορυλίωσή της (Jimenez J.S. et al, 2014).

Η tau παίζει ρόλο σε διακριτές νευρωνικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένης της πυρήνωσης, του πολυμερισμού, της πολικότητας, της δυναμικής, του διαχωρισμού και της ομαδοποίησης των μικροσωληνίσκων (Buffenstein R. et al, 2015). Κατ' αυτόν τον τρόπο, συμβάλλει στην ακεραιότητα των αξόνων των φυσιολογικών ώριμων νευρώνων (Buee L. et al, 2008)

ΥΓΙΗΣ ΝΕΥΡΩΝΑΣ



<https://www.shutterstock.com/image-vector/alzheimers-disease-change-tau-protein-that-581982592>

Εικόνα Α6: Κατάσταση μικροσωληνίσκων και tau σε υγιή νευρώνα

Α2β. Ταυπάθειες και σχέση με τη νόσο Alzheimer's

Ταυπάθειες ονομάζονται οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η Alzheimer's, που χαρακτηρίζονται από ενδονευρωνικές εγκλείσεις ευθύγραμμων ή ζευγών ελικοειδών νηματιών αδιάλυτης έντονα φωσφορυλιωμένης tau (*Trojanowski J.Q. et al, 2007; Martin T.R. et al, 2007*). Η νόσος Alzheimer's χαρακτηρίζεται από σχεδόν πλήρη ανακατανομή της δεξαμενής της πρωτεΐνης tau από τη δεσμευμένη στους μικροσωληνίσκους κατάσταση μέχρι το συσσωρευμένο στάδιο παίρνοντας τη μορφή παθολογικών άμορφων ολιγομερών και ζευγών ελικοειδών νηματιών (PHFs) (*Wischik C.M. et al, 1991*). Όταν η ανακατανομή φτάσει σε τέτοιο επίπεδο, ώστε να διακόψει την κυτταροσκελετική μεταφορά λόγω της απώλειας της λειτουργίας των μικροσωληνίσκων, οι κυτταροπλασματικές συσσωρεύσεις των ελικοειδών νηματιών γίνονται ορατές ιστολογικά ως νευροϊνιδιακά δεμάτια (*Kirschner M.W. & Drublin D.G., 1986*). Το κατώφλι μεταξύ της προκλινικού σταδίου της νόσου Alzheimer's και της έναρξης των γνωστικών συμπτωμάτων σηματοδοτείται από την αύξηση της NFT παθολογίας κι η συγκέντρωση συσσωματωμάτων φωσφορυλιωμένης tau φαίνεται να είναι ο πρωταρχικός προαγωγός της γνωστικής δυσλειτουργίας (*Goate A.M. et al, 2011*). Η έντονα φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη tau που εντοπίζεται στην Alzheimer's διαθέτει περισσότερες από 40 θέσεις φωσφορυλίωσης, κυρίως σε κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και προλίνης, εκ των οποίων οι περισσότερες αποτελούν υπόστρωμα της πρωτεΐνης κινάση 3 της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3), βασικής υποψήφιας κινάσης για τη φωσφορυλίωση της tau (*Feinstein DL. et al, 2005; Defelipe J. et al, 2012; Anderton B.H. et al, 2007; Noble W. et al, 2009*).

Α2γ. Παθοφυσιολογία

Το κυρίαρχο μοντέλο της σχετικής με τους μικροσωληνίσκους τοξικότητας της tau προτείνει ότι η φωσφορυλίωση της tau προηγείται της αποδέσμευσης της πρωτεΐνης από τους μικροσωληνίσκους που οδηγεί στη συσσώρευση της φωσφορυλιωμένης tau

και τελικά στο σχηματισμό νευροϊνιδιακών δεματίων σε εγκεφάλους με Alzheimer's (*Grundke-Iqbal I. et al, 2009*). Η φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης εντός των μοτίβων KXGS (Lys-Xaa-Gly-Ser) και ιδίως στη θέση 12E8, δηλαδή στην επικράτεια που διαθέτει τα αμινοξικά κατάλοιπα Ser262 και Ser356, της tau επηρέαζε αρνητικά τις αλληλεπιδράσεις της tau με τους μικροσωληνίσκους και μάλιστα η φωσφορυλίωση στην επικράτεια 12E8 προωθούσε τη φωσφορυλίωση επικρατειών-υποστρωμάτων της κινάσης GSK3, όπως οι AT8 και PHF1 (*Johnson G.V. & Dolan P.J., 2010; Leclerc N. et al, 2010*).

Πρωτεΐνες ή/και μακρομοριακά σύμπλοκα που διαφεύγουν της φυσιολογικής ενδοσωμικής ή λυσοσωμικής κατεργασίας θα μπορούσαν να αποτελέσουν ενδογενές υπόστρωμα που θα πυροδοτούσε ή θα αποτελούσε πυρήνα του καταρράκτη παθολογικής συσσώρευσης tau σε εγκεφαλο με τη νόσο Alzheimer's ή άλλες ταυπάθειες (*Harrington C.R. et al, 1997*)

Σ' ένα μοντέλο ταυπάθειας της *Drosophila*, εκφράστηκε tau που δεν ήταν εφικτό να φωσφορυλιωθεί είτε στα μοτίβα KXGS, είτε σε κάποια από τις 11 θέσεις-στόχους της κινάσης GSK3. Παραδόξως, η tau που δεν μπορούσε να φωσφορυλιωθεί στους στόχους της GSK3, αλλά φωσφορυλιωνόταν στα KXGS ήταν πλήρως προσαρτημένη στους μικροσωληνίσκους, και αποτελούσε την πιο τοξική μορφή, ενώ η tau που δεν μπορούσε να φωσφορυλιωθεί στα KXGS, αλλά φωσφορυλιωνόταν στους στόχους της GSK3 ήταν παρούσα στα διαλυτά διαμερίσματα και σχεδόν καθόλου τοξική (*Jackson GR. et al, 2009*). Επομένως, προτείνονται δύο υποθέσεις για την τοξικότητα της tau:

- Η υπόθεση της διαλυτής tau, κατά την οποία η διαλυτή tau είναι τοξικότερη από τις αδιάλυτες συσσωρεύσεις της, που υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η τοξικότητα κι η υπερφωσφορυλίωση διατηρούνται απουσία διακριτών συσσωματωμάτων, ενώ η αδιάλυτη tau λειτουργεί προστατευτικά ως δεξαμενή των παθολογικών διαλυτών μορφών (*Johnson G.V. & Dolan P.J., 2010*) κι
- Η, παλαιότερη και δημοφιλέστερη, υπόθεση της αδιάλυτης tau, σύμφωνα με την οποία τα αδιάλυτα συσσωματώματα που παράγονται έπειτα από την υπερφωσφορυλίωση της tau κι οδηγούν τελικά στο σχηματισμό των νευροϊνιδιακών δεματίων, είναι ένα από τα κυρίαρχα παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer's κι άλλων ταυπαθειών.

Ενώ σχηματισμοί ζευγών ελικοειδών νηματίων εντοπίζονται στο νεοφλοιό ήδη από το στάδιο 2 κατά Braak (η παθολογία εμφανίζεται στην ενδορρινική περιοχή), συσσωρεύσεις διαλυτής υπερφωσφορυλιωμένης tau δεν ανιχνεύονται μέχρι το στάδιο 6 κατά Braak (η παθολογία επηρεάζει τις πρωτογενείς και δευτερογενείς περιοχές του νεοφλοιού και στον ινιακό λοβό φθάνει μέχρι τη ραβδωτή περιοχή), με χρονική απόσταση 30 ετών (*del Tredici K. et al, 2006; McGee M. et al, 2000; Wischik C.M. et al, 2016*). Γενικά, χωροχρονικά, η εξάπλωση της παθολογίας των συσσωρεύσεων της tau ξεκινά από τον ενδορρινικό φλοιό και τον υπομέλανα τόπο, συνεχίζεται στον ιππόκαμπο και καταλήγει σε περιοχές του ισοφλοιού, πορεία που φαίνεται να συνδέεται με τις γνωστικές απώλειες (*del Tredici K. & Braak H., 2011; Braak E. &*

Braak H., 1991; Di Menza C. et al, 1999; Hauw J.J. & Duyckaerts C., 1997; Lipton R.B. et al, 1999).

Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau δεν επηρεάζει απλά τη διαλυτότητά της και τη συγγένειά της με τους μικροσωληνίσκους. Η προσθήκη μιας ηλεκτραρνητικής φωσφορικής ομάδας στην περιοχή δέσμευσης της tau εμπλέκεται και στη δέσμευση της φωσφατάσης σερίνης/θρεονίνης PP2A στην πρωτεΐνη, μειώνοντας το λόγο αποφωσφορυλίωσης/φωσφορυλίωσης κι οδηγώντας έτσι σε περαιτέρω υπερφωσφορυλίωση (*Johnson G.V. & Dolan P.J., 2010*). Ακόμα, η αυξημένη ενεργότητα της κινάσης GSK3 φαίνεται να οδηγεί σε περιορισμό της κινητικότητας των μιτοχονδρίων στους νευρώνες, γεγονός που οδηγεί στην εκδήλωση περαιτέρω δυσλειτουργιών και νευροεκφυλισμού, καθώς η κίνηση των μιτοχονδρίων είναι ιδιάζουσα σημασίας στους νευρώνες λόγω του μεγάλου μήκους των αξόνων και της έντονης πολικότητας κατά μήκος των κυττάρων (*Busciglio J. et al, 2003; Zheng JQ. et al, 2006; Mandelkow E.M. & Thies E., 2007; Brion J.P. et al, 2010; Wang X. & Lovas J.R., 2013*).

Υπάρχουν ενδείξεις από μοντέλα κυττάρων, αλλά και ποντικών που υποστηρίζουν ότι η συσσωρευμένη tau μπορεί να λειτουργήσει ως prion. Οι prions είναι πρωτεϊνικής φύσης μολυσματικοί φορείς χωρίς νουκλεϊκό οξύ που εκφράζουν τη μολυσματική τους ικανότητα καθοδηγώντας τη μετατροπή της φυσιολογικής δομής της πρωτεΐνης στην παθολογική. Η tau φαίνεται να έχει παθολογία τύπου prion, λόγω της διακυτταρικής μεταφοράς ολιγομερών tau που μπορούν να αυτό-προωθηθούν (*Prusiner S.B., 1982; Prusiner S.B. & Cohen F.E., 1998; Legname G. et al, 2004; Diamond M.I. et al, 2009*).

A3. Μονοπάτια φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης tau

Η πρωτεΐνη tau εμπλέκεται σε ένα πλέγμα μονοπατιών, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη πλήρη μελέτη της φωσφορυλίωσής της κατά τη διάρκεια μιας μονοετούς διπλωματικής εργασίας. Επομένως, στόχος της μελέτης μας ήταν ένα από τα κύρια μονοπάτια φωσφορυλίωσης της tau, , στο οποίο κεντρικό ρόλο διαδραματίζει η γνωστή και προαναφερθείσα κινάση GSK3, το μονοπάτι Wnt σηματοδότησης.

A3α. Μονοπάτι Wnt σηματοδότησης

Το μονοπάτι Wnt σηματοδότησης πρωτοανακαλύφθηκε στη *Drosophila* κι ονομάστηκε έτσι, επειδή οι μεταλλάξεις που συσχετιζόνταν μ' αυτό οδηγούσαν σε απώλεια του ιστού των φτερών (wing tissue) (*Chopra V.L. & Sharma R.P., 1976*). Αρχή του μονοπατιού είναι η δέσμευση της πρωτεΐνης-προσδέτη WNT σε υποδοχείς του κυττάρου με αποτέλεσμα την έναρξη ενός καταρράκτη σηματοδότησης. Ωστόσο,

υπάρχουν τρεις εκδοχές του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης, που διαφέρουν ως προς τον προσδέτη Wnt ή/και τους υποδοχείς ή/και τους μεσολαβητές μεταγωγής σήματος:

- a. Το μη-κανονικό μονοπάτι ανεξάρτητο από β-κατενίνη που οδηγεί σε μεταγωγή σήματος μέσω της αμινοτελικής κινάσης c-jun
- b. Το μη κανονικό μονοπάτι ανεξάρτητο από β-κατενίνη που οδηγεί σε μεταγωγή σήματος μέσω κατιόντων ασβεστίου και
- c. Το κανονικό μονοπάτι εξαρτώμενο από β-κατενίνη, το οποίο θα αναλυθεί περαιτέρω (Moon R.T. & Angers S., 2009; Niehrs C., 2012).

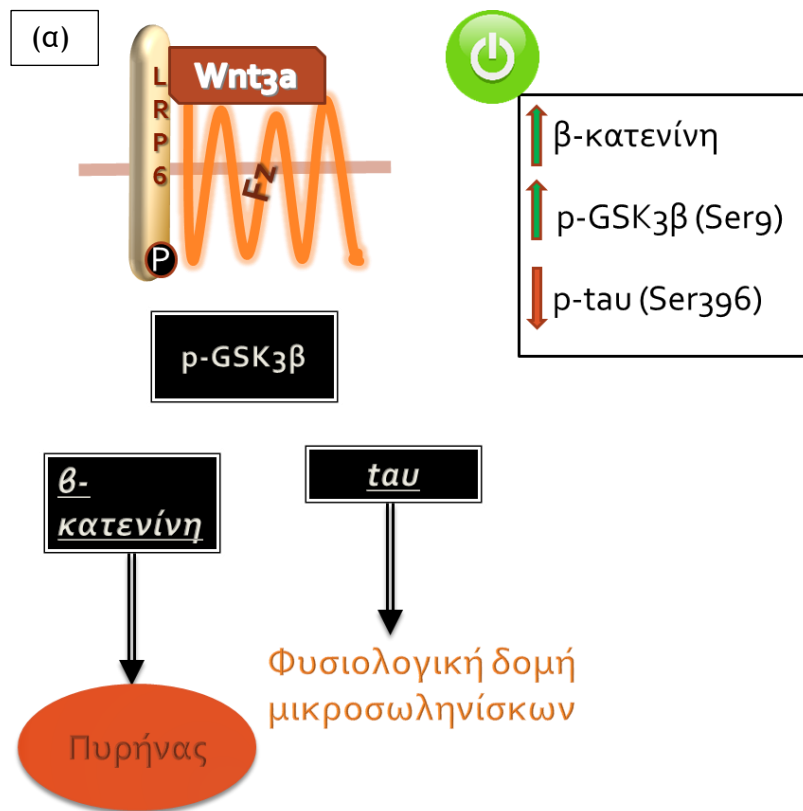
Στα μη κανονικά μονοπάτια σηματοδότησης η μεταγωγή επιτυγχάνεται είτε μέσω μικρών G πρωτεϊνών όπως οι Rho/Rac, που με τη σειρά τους ελέγχουν την επίπεδη κυτταρική πολικότητα μέσω αναδιαμόρφωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης ή μέσω ρύθμισης των ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου, που με τη σειρά τους επηρεάζουν διαφορετικές βιολογικές διαδικασίες (Moon R.T. & Angers S., 2009)

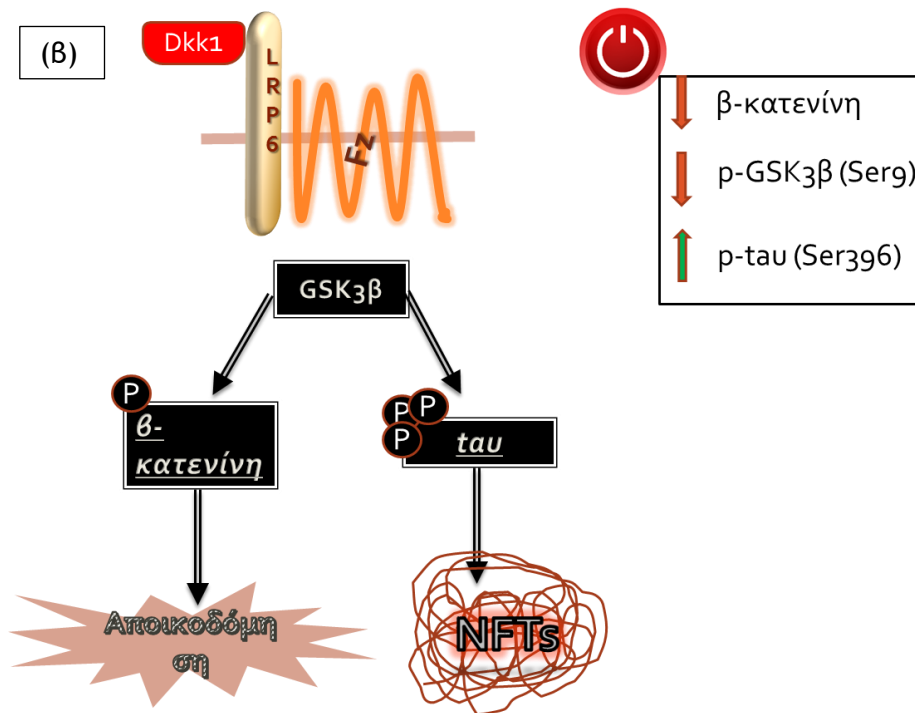
Το κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνης ενεργοποιείται από τη δέσμευση του Wnt προσδέτη στον υποδοχέα της πλασματικής μεμβράνης, Frizzled, σχηματίζοντας στη συνέχεια σύμπλοκο με τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας που σχετίζονται με υποδοχείς LRP5 κι LRP6 (Moon R.T. & Angers S., 2009; Liu Y. & Zhou L., 2015). Έπειτα ενεργοποιείται το σύμπλοκο Dishevelled (Dvl), που με τη σειρά του φωσφορυλιώνει την ενδοκυτταρική περιοχή των λιποπρωτεϊνών LRP, δημιουργώντας μια θέση αγκυροβόλησης για το σύμπλοκο καταστροφής Αξίνης, APC (Adenomatosis Polyposis Coli) και της κινάσης GSK3, και διευκολύνοντας την αποδέσμευση της β-κατενίνης από αυτό. Έτσι, η β-κατενίνη συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, εισέρχεται στον πυρήνα κι ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα T-κυττάρων/ενισχυτή λεμφοειδούς (TCF/LEF), ώστε να μεταγραφούν τα γονίδια στόχοι των Wnt προσδετών, όπως αυτά που κωδικοποιούν την κυκλίνη D1 και την Αξίνη 2 (Wieschaus E. & Tolwinski N.S., 2004; He X. et al, 2009; Moon RT. & Angers S., 2009; Niehrs C., 2012; Kahn M. et al, 2014; Liu Y. & Zhou L., 2015; Frick KM. & Fortress AM., 2015).

Απουσία του κανονικού Wnt προσδέτη, οι συνυποδοχείς LRP δεν είναι φωσφορυλιωμένοι στην ενδοκυτταρική τους επικράτεια, επομένως το σύμπλοκο καταστροφής δεν αναγνωρίζει κάποια θέση αγκυροβόλησης κι επομένως είναι ελεύθερο κι αναγνωρίζει τη β-κατενίνη. Η β-κατενίνη υφίσταται φωσφορυλίωση από την ενεργό κινάση GSK3 που αποτελεί συστατικό του συμπλόκου κι έπειτα στοχοποιείται από την Ε3-λιγάση β-TrCP (πρωτεΐνη που διαθέτει επαναλήψεις β-τρανσντουσίνης) για να οδηγηθεί στο πρωτεάσωμα προς εξαρτώμενη από ουβικιτίνη αποικοδόμηση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνονται τα επίπεδα της β-κατενίνης στο σύνολο του κυττάρου (Wieschaus E. & Tolwinski N.S., 2004; He X. et al, 2009).

Στο νευρικό σύστημα, το μονοπάτι Wnt σηματοδότησης παίζει ρόλο κυρίως στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, ενώ φαίνεται να επηρεάζει και τη μορφογένεση και τη λειτουργία του εγκεφάλου ενηλίκων. Εντοπίζεται να λειτουργεί κυρίως στον υπόκαμπο (Frick KM. & Fortress AM., 2015).

Το κανονικό μονοπάτι Wnt σηματοδότησης ρυθμίζεται αυστηρά από εκκρινόμενους ανταγωνιστές της Wnt σηματοδότησης, όπως η διαλυτή σχετιζόμενη με τον υποδοχέα Frizzled πρωτεΐνη (sFRP), ο παράγοντας Wnt αναστολής (WIF) κι οι πρωτεΐνες Dickkopf (DKK), οι οποίες θα αποτελέσουν αντικείμενο μελέτης μας και θα αναλυθούν εκτενέστερα (Moon RT. & Angers S., 2009; Nusse R. & Clevers H., 2012). Μερικοί απ' αυτούς λειτουργούν αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση των Wnt προσδετών με τους υποδοχείς Frizzled, όπως οι sFRP, κι άλλοι εμπλέκονται στο σχηματισμό ενεργού συμπλόκου υποδοχέα Frizzled-συνυποδοχέα LRP, όπως οι DKK (Sherwood V., 2015).





Εικόνα A7: Κανονικό μονοπάτι Wnt σηματοδότησης κι η αντιστοίχιση της κατάστασής του με τα επίπεδα των μελετώμενων πρωτεϊνών. (α) Ενεργοποιημένο μονοπάτι. (β) Απενεργοποιημένο μονοπάτι

A3β. Συστατικά του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης

A3βi. Wnts

Οι πρωτεΐνες Wnt αποτελούνται από μια οικογένεια 19 διακριτών εκκρινόμενων πρωτεϊνών (Moon RT. & Angers S., 2009; Liu Y. & Zhou L., 2015). Εκκρίνονται ως γλυκοζυλιωμένες ή λιπιδικά τροποποιημένες πρωτεΐνες (Nusse R. et al, 2003; Nusse R. & Logan C.Y., 2004; Basler K. et al, 2006; Takada et al., 2006). Φαίνεται να παίζουν ρόλο στην πλαστικότητα του ιπποκάμπου και στο σχηματισμό μνήμης (Frick KM. & Fortress AM., 2015).

A3βii. Frizzled

Έχουν βρεθεί 10 γονίδια που κωδικοποιούν μέλη της οικογένειας των διαμεμβρανικών υποδοχέων Frizzled που εκφράζονται κατά την πρόιμη προεμφυτευτική ανάπτυξη (Brennan J. et al, 2004; Leyns L. et al, 2007). Όλες οι πρωτεΐνες Frizzled μοιράζονται μια κοινή αρχιτεκτονική, δηλαδή μια συντηρημένη εξωκυτταρική πλούσια σε κυστεΐνη επικράτεια που ακολουθείται από μια επικράτεια με επτά πιθανά διαμεμβρανικά τμήματα (Nathans J. et al, 2016).

A3βiii. LRP5/6

Οι συνυποδοχείς LRP5/6 χαρακτηρίστηκαν αρχικά ως χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες σχετιζόμενες με υποδοχέα (Hess J.F. et al, 1998; Hammond H. et al, 1998). Ο συνυποδοχέας LRP6 μεταγεί το σήμα του κανονικού μονοπατιού μέσω φωσφορυλίωσης της σερίνης και της θρεονίνης στις πέντε επαναλήψεις Προλίνη-Προλίνη-Προλίνη-Σερίνη-Προλίνη (PPPSP) και στις προσκείμενες θέσεις της κινάσης καζεΐνης 1 στην ενδοκυττάρια περιοχή. Η φωσφορυλίωση των περιοχών PPPSP περιλαμβάνει πολλαπλές κινάσες κατευθυνόμενες από προλίνη, συμπεριλαμβανομένης της κινάσης GSK3 και της κυκλίνης Y σ' έναν εξαρτώμενο από το υπόστρωμα τρόπο (He X. et al, 2005; Niehrs C. et al, 2009; Davidson G. et al, 2014).

A3βiv. Dishevelled

Το σύμπλοκο Dishevelled αποτελείται από τρεις καλά ορισμένες επικράτειες:

- Την αμινοτελική DIX επικράτεια, (Dvl κι Αξίνη)
- Την κεντρική PDZ επικράτεια (μετασυναπτική πυκνότητα 95-P, μεγάλοι δίσκοι-D- κι αποφραγμένοι κόμβοι-Z)
- Την καρβοξυτελική DEP επικράτεια (Dvl, Egl-10 και πλεκστρίνη).

Το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με περίπου 80 πρωτεΐνες μέσω αυτών των επικρατειών. Το Dvl μεσολαβεί την ομαδοποίηση των υποδοχέων Frizzled κι LRP6 για το σχηματισμό σωμάτων σηματοδότησης στην πλασματική μεμβράνη και μεταδίδει σήματα εισδοχής που λαμβάνονται από τον υποδοχέα Wnt και φθάνουν μέχρι το σύμπλοκο καταστροφής β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα (Kikuchi A. et al, 1999; Dale T.C. et al, 1999; Niehrs C. et al, 2007; Bienz M. et al, 2007; Woodgett J. et al, 2008).

Η Αξίνη είναι πρωτεΐνη ικρίωματος που αναστέλλει δυναμικά τη φωσφορυλίωση της tau από τη GSK3, πιθανώς απομονώνοντας την GSK από την tau εντός του συμπλόκου Wnt σηματοδότησης, καθώς η Αξίνη δεν έχει την ικανότητα να δεσμεύει την tau (Johnson G.V. et al, 2002).

A3βv. Κινάση β3 της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3β)

Η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3 (GSK3) διαθέτει δύο ισομορφές, την α και τη β. Η GSK3β φωσφορυλιώνει την tau in vitro και η φωσφορυλίωση της tau στη θέση Thr231 εμπλέκεται στην ικανότητάς της να προσδένεται και να σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους (Anderton B.H. et al, 1992; Mandelkow E. et al, 1992; Miller C.C.J. et al, 1994; Lee V.M. et al, 1997; Johnson G.V. & Cho J.H., 2004). Η μεγάλη αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του ασβεστίου οδηγεί σε έντονη αύξηση της εξαρτώμενης από GSK3 φωσφορυλίωσης της tau (Johnson G. & Stoothoff W., 2005). Έχει οριστεί ότι η φωσφορυλίωση της GSK3β στο κατάλοιπο Ser9 αναστέλλει την ενεργότητά της, ενώ η φωσφορυλίωση της στο κατάλοιπο Tyr216 ενισχύει την ενεργότητά της (Johnson G.V. & Jope R.S., 2004).

A3βvi. β-κατενίνη

Η β-κατενίνη είναι γνωστό ότι παίζει ρόλο στη σύνδεση μεταξύ κυττάρων και στη Wnt σηματοδότηση. Σχηματίζει κολλώδεις κόμβους με την α-κατενίνη και την εκαδερίνη στη μεμβράνη και μετατοπίζεται από τη μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα, όπου προωθεί τη μεταγραφική ενεργότητα της κατενίνης, υπό τη ρύθμιση άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών (*Grimaldi A. et al, 1988; Birchmeier W. et al, 2006; Gratton J.P. et al, 2010; Georgiou M. & Baum B., 2011*). Αφού συσσωρευτεί στο κυτταρόπλασμα, είναι απαραίτητο να περάσει στον πυρήνα ώστε να μπορέσει να ολοκληρώσει τη μεταγωγή του μονοπατιού σηματοδότησης κι αυτή η μεταφορά επιτυγχάνεται μετά από ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης της αμινοτελικής κινάσης c-Jun (*Long F. et al, 2008; Jho E.H. et al, 2013*).

Στο μονοπάτι Wnt σηματοδότησης το σύμπλοκο καταστροφής οδηγεί τη β-κατενίνη σε αποικοδόμηση έπειτα από ουβικιτινυλίωση. Ωστόσο, η ουβικιτινυλίωση δεν προάγει πάντα την αποικοδόμηση της β-κατενίνης· η EDD, μια E3 λιγάση που έχει αναγνωριστεί ως συνεργός που προσδέεται στην GSK3β, αλληλεπιδρά άμεσα κι ουβικιτινυλιώνει τη β-κατενίνη χρησιμοποιώντας συνδεόμενες με τη Λυσίνη 11 ή τη Λυσίνη 29 αλυσίδες ουβικιτίνης προωθώντας τελικά τη συσσώρευση και τη σταθεροποίησή της στον πυρήνα κι όχι την αποικοδόμησή της (*Rosin-Arbesfeld R. et al, 2011*).

Γενικά είναι αποδεκτό ότι η δέσμευση του Wnt προσδέτη στον υποδοχέα του διακόπτει την ενεργότητα ικριώματος της Αξίνης, αποτρέποντας τη φωσφορυλίωση της β-κατενίνης από την GSK3. Ωστόσο, έχουν εκφραστεί κι άλλες υποθέσεις όσον αφορά στη σχέση WNT προσδέτη και β-κατενίνης. Μια πρόταση είναι ότι η παρουσία του WNT αναστέλλει την απελευθέρωση φωσφορυλιωμένης β-κατενίνης από το σύμπλοκο καταστροφής προς το πρωτεάσωμα, αποτρέποντας εν συνεχεία την αποικοδόμηση της νεοσυντεθημένης β-κατενίνης. Ένα άλλο μοντέλο προτείνει ότι ο WNT διεγείρει τη διακίνηση των υποδοχέων Frizzled και LRP6 μαζί με τη συσσωρευμένη κινάση GSK3β στον αυλό των πολύπλευρων σωματίων (MVBs) κι έτσι η GSK3β δε θα έχει πρόσβαση στη β-κατενίνη κι επομένως δε θα μπορεί να οδηγήσει στην αποικοδόμησή της (*de Robertis E.M. et al, 2010; Mahmoudi T. et al, 2012; Dunach M. et al, 2014*).

A3βvii. Dickkopf-1

Η οικογένεια Dickkopf κωδικοποιεί εκκρινόμενες πρωτεΐνες μεγέθους 255 έως 350 αμινοξέων κι αποτελείται από τέσσερα βασικά μέλη στα θηλαστικά, τους DKK1-4 (*Kypta R. & Kawano Y., 2003*). Στο μονοπάτι Wnt σηματοδότησης η καρβοξυτελική επικράτεια των DKK αλληλεπιδρά κυρίως με την τρίτη και τέταρτη προπέλα των συνυποδοχέων LRP5/6 κι αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι ικανές κι αναγκαίες για να αναστείλουν τη Wnt σηματοδότηση, εμποδίζοντας το σχηματισμό του απαιτούμενου για τη συνέχιση της μεταγωγής συμπλόκου του υποδοχέα Frizzled και των συνυποδοχέων (*Aaronson S.A. et al, 2001; Sokol S.Y. & Brott B.K., 2002; Niehrs C., 2006*).

Στη νόσο Alzheimer's, τα β-αμυλοειδή πεπτίδια φαίνονται να επάγουν την έκφραση του ανταγωνιστή του κανονικού μονοπατιού Wnt σηματοδότησης, DKK1, στους

νευρώνες (Caruso A. et al, 2004; Salinas P.C. et al, 2012). Έχει παρατηρηθεί, επίσης, ότι ο DKK1 αποδομεί τις διεγερτικές συνάψεις κατά τρόπο παρόμοιο με το Αβ σε καλλιέργειες νευρώνων υποκάμπου (Salinas P.C. et al, 2012). Ενώ ο DKK1 είναι δύσκολα ανιχνεύσιμος σε υγιείς εγκεφάλους, εντοπίζεται σε αυξημένα επίπεδα κατά τη μετά θάνατον μελέτη δειγμάτων εγκεφάλων ασθενών με Alzheimer's και σε εγκεφάλους διαγονιδιακών για τη νόσο ζωικών μοντέλων, γεγονός που πιθανώς να συνδέει τη δυσλειτουργία του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης με την απώλεια συνάψεων στην Alzheimer's (Caruso A. et al, 2004; Grossi C. et al, 2010). Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από την ανίχνευση υψηλών επιπέδων του DKK3, με υψηλή συγγένεια με τον DKK1, στο πλάσμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με Alzheimer's (Kiefer A. et al, 2009). Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση του DKK1 αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας στον υποκάμπο διαγονιδιακών ποντικών παράλληλα με τη μείωση της χωρικής μνήμης εργασίας (Ellwanger K. et al, 2013). Ακόμα, ο DKK1 ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα σε περιοχές με νευροϊνδιακά δεμάτια και δυστροφικούς νευρίτες σε εκφυλιζόμενους νευρώνες σε εγκεφάλους με Alzheimer's (Caruso A. et al, 2004). Έχει ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο ανταγωνιστής του Wnt οδήγησε σε νευροτοξικότητα όταν εγχύθηκε τοπικά σε περιοχές του εγκεφάλου σχετιζόμενες με τη νόσο Alzheimer's ή την εγκεφαλική ισχαιμία, με την οποία συνδέεται επίσης ο DKK1 προκαλώντας νευρωνικό θάνατο (Busceti C.L. et al, 2005; Gianfriddo M. et al, 2006).

Εκτός από τη νόσο Alzheimer's, τα μέλη της οικογένειας DKK κι ιδίως ο DKK1 συνδέονται και με άλλες παθολογικές καταστάσεις, με παράδειγμα την προαναφερθείσα εγκεφαλική ισχαιμία. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει τη μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την p53, γνωστή ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση βλαβών στο DNA και μ' αυτόν τον τρόπο, ο DKK1 είναι δυνατό να προωθεί την ανάπτυξη όγκων (Chen X. et al, 2000; Tsao H. et al, 2006). Έχει δειχθεί επίσης ότι το χρόνιο ήπιο στρες που σχετίζεται με τη βλάβη του υποκάμπου οδηγεί σε υπερέκφραση του DKK1 κι ότι η επαγωγή στρες στον ποντικό περιορίζει τα επίπεδα του DKK1, με αποτέλεσμα τον εκμηδενισμό της απώλειας νευρώνων, αλλά και την αύξηση της νευρογένεσης και της δενδριτικής διακλάδωσης (Nicoletti F. et al, 2011).

Η τροποποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ LRP5 και DKK1 θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο για εύρεση κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης ώστε να ενεργοποιηθεί και να επανέλθει σε λειτουργία το μονοπάτι Wnt σηματοδότησης σε όποια παθολογική κατάσταση υφίσταται βλάβη λόγω της παρουσίας DKK1. Έχει ήδη επιχειρηθεί η στόχευση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του συνυποδοχέα και του ανταγωνιστή μέσω μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά του DKK1, με συνέπεια επίσης την προστασία των συνάψεων από την καταστροφική επίδραση των Αβ. Ωστόσο, η αδυναμία των αντισωμάτων να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό περιορίζει την εφαρμογή της θεραπείας σε δυσλειτουργίες του κεντρικού νευρικού συστήματος (Wang F. et al, 2010; Hampton R. et al, 2011; Salinas P.C. et al, 2012; Sarli V. et al, 2015). Στόχος, λοιπόν, και της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη κι η έρευνα για κάποια πιθανή φαρμακευτική προσέγγιση που θα εμποδίζει την ανασταλτική δράση του DKK1 ως προς τη σηματοδότηση του μονοπατιού WNT

και θα μπορεί να χορηγηθεί για την εξομάλυνση των συμπτωμάτων της νόσου Alzheimer's, μιας διαταραχής του κεντρικού νευρικού συστήματος.

B. Υλικά και μέθοδοι

B1. Υλικά

B1α. Κυτταρικές σειρές

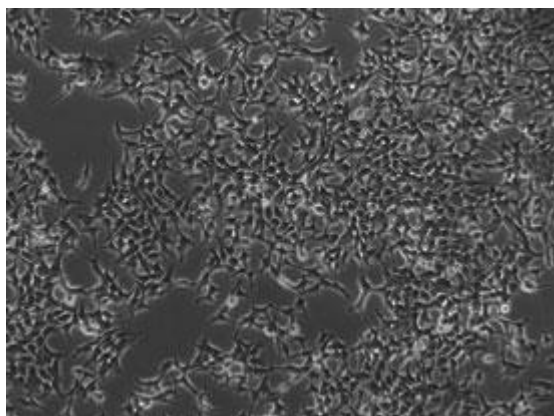
Αν κι υπάρχουν πολλές διαθέσιμες κυτταρικές σειρές διαθέσιμες για καλλιέργεια κι εργαστηριακή επεξεργασία, επελέγησαν 2 κυτταρικές σειρές:

- Τα ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού 293 (Human Embryonic Kidney cells 293, HEK293) και
- Τα κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού Neuro-2-A (N2A)

Η HEK293 είναι μια κυτταρική σειρά που προέρχεται από ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού (HEK) που έχουν αναπτυχθεί σε ιστό. Πρωτοδημιουργήθηκε μετά το μετασχηματισμό και την καλλιέργεια ανθρώπινων εμβρυϊκών κυττάρων νεφρού με εισαγωγή του DNA αδενοϊού, από το Frank Graham του εργαστηρίου του Van der Eb στο Πανεπιστήμιο του Leiden στην Ολλανδία κι ήταν το 293ο πείραμά του, γι' αυτό το λόγο η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά έλαβε αυτό το όνομα. Ο Graham, ο επιστήμονας που επινόησε και τη μέθοδο χρήσης του φωσφορικού ασβεστίου για την πραγματοποίηση διαμόλυνσης κυττάρων με αλλογενές DNA, έλαβε κύτταρα από τον ιστό υγιούς αποβλημένου εμβρύου. Οι νεφροί των εμβρύων αποτελούν ένα ετερογενές μίγμα από σχεδόν όλους τους τύπους σωματικών κυττάρων κι επομένως δεν είναι σαφής ο χαρακτηρισμός τους ως κάποιο συγκεκριμένο τύπο κυττάρου, αλλά προτείνονται η νευρική προέλευση (λόγω της παρουσίας mRNA και προϊόντων γονιδίων που συναντώνται κυρίως στους νευρώνες) αλλά και η ενδοθηλιακή, η επιθηλιακή κι ινοβλαστική φύση.

Αυτή η κυτταρική σειρά είναι δημοφιλής λόγω της ευκολίας με την οποία αναπτύσσονται και διαμολύνονται τα κύτταρα. Χάρη στην υψηλή αποδοτικότητά τους όσον αφορά στη διαμόλυνση χρησιμοποιούνται για την παραγωγή εξωγενών πρωτεϊνών ή ιικών προϊόντων για φαρμακευτικούς και βιοϊατρικούς ερευνητικούς

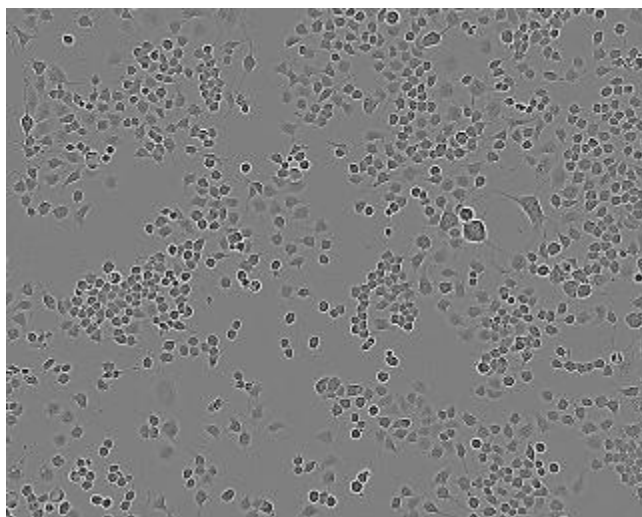
σκοπούς (166). Γι' αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση του ανταγωνιστή DKK1 έπειτα από διαμόλυνση.



<http://www.vib.be/en/news/Pages/Sequence-cells-available-for-entire-research-community.aspx>

Εικόνα B1: Κύτταρα HEK293

Η κυτταρική σειρά N2A προέρχεται από έναν πηγαίο όγκο (νευροβλαστωμα) που αναπτύχθηκε σε αλφικό ποντικό γένους A. Τα κύτταρα παράγουν μια πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων που πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στο σύστημα συστολής δίνοντας αξονοπλασματική ροή στα νευρικά κύτταρα (167). Πρόκειται για κολλώδη αδιαφοροποίητα κύτταρα. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των αποτελεσμάτων των επώασεων που πραγματοποιήθηκαν στα επίπεδα των μελετώμενων πρωτεϊνών του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης.



<http://www.saibou.jp/service/kensaku/detail.php?catalogno=EC89121404-G0>

Εικόνα B2: Κύτταρα N2A

B1β. Πρωτόκολλα παρασκευής διαλυμάτων:

Θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων θηλαστικών:

Οι καρκινικές σειρές HEK293 κι N2A αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο πλούσιο σε γλυκόζη, με L-γλουταμίνη, χωρίς πυροσταφυλικό νάτριο, αποτελούμενο κατά 10% από ορό εμβρύου βοοειδούς (FBS) και κατά 1% από μίγμα αντιβιοτικών στρεπτομυκίνης και πενικιλίνης. Παράγεται σε στείρες συνθήκες και φυλάσσεται στους 4 °C.

Συστατικά θρεπτικού	Ποσότητες για 500mL (mL)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose w/ L-Glutamine w/o Sodium Pyruvate (<i>BioSera</i>)	445
Φιλτραρισμένο Fetal Bovine Serum (<i>Gibco</i>)	50
Penicillin-Streptomycin (<i>BioSera</i>)	5

PBS (1x):

Το διάλυμα PBS 1x χρησιμοποιείται για τις εκπλύσεις των κυτταρικών καλλιιεργειών από τα τοξικά παράγωγα των κυττάρων, αλλά και κατά τη διαδικασία λύσης των κυττάρων, για να καθαριστούν από τα υπολείμματα των ουσιών με τις οποίες επώαστηκαν κι ως διαλύτης σε άλλα διαλύματα, όπως η θρυψίνη 1x. Αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στις κυτταροκαλλιέργειες, παράγεται σε στείρες συνθήκες και φυλάσσεται στους 4 °C, ενώ αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί εκτός κυτταροκαλλιιεργειών, παράγεται σε μη στείρες συνθήκες και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου, 25 °C.

Συστατικά PBS 1x	Ποσότητες για 50mL (mL)
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline 10x (<i>BioSera</i>)	5
dH ₂ O	45

Θρυψίνη (1x):

Το διάλυμα θρυψίνη 1x χρησιμοποιείται για την άρση των κυττάρων από το τρυβλίο και το μοίρασμά τους σε περισσότερα τρυβλία. Παράγεται σε στείρες συνθήκες και φυλάσσεται στους 4 °C.

Συστατικά Θρυψίνης 1x	Ποσότητες για 10mL (mL)
Trypsin-EDTA 10x (<i>Biowest, BioSera</i>)	1
PBS 1x (Sterile)	9

Διάλυμα για πάγωμα κυττάρων (Freezing Buffer):

Το freezing buffer χρησιμοποιείται για να διατηρηθούν τα κύτταρα στο υγρό άζωτο και να μην υποστούν στρες από το ψύχος. Παράγεται σε στείρες συνθήκες και διατηρείται στους -20 °C.

Συστατικά για freezing buffer	Ποσότητες για 10mL (mL)
Φιλτραρισμένο FBS (<i>BioSera</i>)	9
Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (<i>SIGMA</i>)	1

✚ Διάλυμα ουσιών που θα χρησιμοποιηθούν για επώαση:

Τα ανάλογα που παρήχθησαν από την κυρία Βασιλική Σαρλή από το τμήμα Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης βρίσκονται σε στερεή έγχρωμη μορφή. Επομένως, για να χρησιμοποιηθούν, έπρεπε να διαλυθούν σε DMSO. Το DMSO όταν χρησιμοποιείται ως διαλύτης για φαρμακευτικές ουσίες, αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε χαμηλότερη δόση από το σύνηθες, ενώ είναι κι ικανές να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (168). Παρασκευάστηκαν λοιπόν διαλύματα συγκέντρωσης 1000μM βάσει του μοριακού βάρους των αναλόγων και της μάζας των αναλόγων και στη συνέχεια αραιώθηκαν σε 500μM με αποστειρωμένο νερό. Παρασκευάζονται σε στείρες συνθήκες και φυλάσσονται στους 4 °C.

✚ Διάλυμα TNE (2x):

Το διάλυμα TNE χρησιμοποιείται ως συστατικό του διαλύματος λύσης κυττάρων. Παρασκευάζεται σε μη στείρες συνθήκες και φυλάσσεται στους 4 °C.

Συστατικά του διαλύματος TNE 2x	Ποσότητες για 100mL
Tris-HCl (<i>Fisher Scientific</i>)	0,606g
pH 6,8	
NaCl	0,877g
EDTA	0,058g
dH ₂ O	90-100mL

✚ Διάλυμα αναστολέων πρωτεασών (PI):

Το διάλυμα PI χρησιμοποιείται ως συστατικό του διαλύματος λύσης κυττάρων. Παρασκευάζεται σε μη στείρες συνθήκες έπειτα από έντονη ανάδευση και φυλάσσεται στους -20 °C.

Συστατικά του διαλύματος PI	Ποσότητες για 2mL
Αναστολείς πρωτεασών (<i>ThermoScientific</i>)	1 παστίλια
dH ₂ O	2mL

✚ Διάλυμα αναστολέων φωσφατασών (PPI):

Το διάλυμα PPI χρησιμοποιείται ως συστατικό του διαλύματος λύσης κυττάρων. Παρασκευάζεται σε μη στειρές συνθήκες έπειτα από έντονη ανάδευση και φυλάσσεται στους -20 °C.

Συστατικά του διαλύματος PPI	Ποσότητες για 800μL
Αναστολείς φωσφατασών (<i>ThermoScientific</i>)	1 παστίλια
dH ₂ O	800μL

✚ Διάλυμα Triton X-100 10%:

Το διάλυμα Triton 10% χρησιμοποιείται ως συστατικό του διαλύματος λύσης κυττάρων. Παρασκευάζεται σε μη στειρές συνθήκες και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Συστατικά του διαλύματος Triton 10%	Ποσότητες για 50mL
Triton X-100 (<i>MERCK</i>)	5g
dH ₂ O	40-50mL

✚ Διάλυμα λύσης κυττάρων (Lysis Buffer):

Το Lysis Buffer χρησιμοποιείται για τη θραύση της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων και την παραλαβή του κυτταροπλασματικού περιεχομένου. Παρασκευάζεται σε μη στειρές συνθήκες, αμέσως πριν από τη χρήση του και μέχρι και κατά τη διάρκεια της χρήσης του φυλάσσεται σε πάγο.

Συστατικά του Lysis Buffer	Ποσότητες για 1mL
TNE 2x	500μL
dH ₂ O	320μL
Triton 10%	100μL
Διάλυμα PI	40μL
Διάλυμα PPI	40μL

✚ Διάλυμα αλβουμίνης ορού βοοειδούς (BSA) 1mg/mL:

Το διάλυμα BSA 1mg/mL χρησιμοποιείται για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών που περιέχονται στα λύματα των κυττάρων. Παράγεται σε μη στειρές συνθήκες σε αρχική συγκέντρωση 10mg/mL σε ποσότητα 10mL διαλυμένο σε νερό, από τα οποία στη συνέχεια λαμβάνεται 1mL που διαλύεται σε 9mL H₂O (τελική συγκέντρωση 1mg/ml). Φυλάσσεται στους -20 °C.

✚ Διάλυμα Tris-HCl pH 6,8:

Το διάλυμα Tris-HCl pH 6,8 χρησιμοποιείται για την παρασκευή gel ακρυλαμίδης για την ηλεκτροφόρηση και το διάλυμα φόρτωσης. Παράγεται σε μη στειρές συνθήκες και φυλάσσεται στους 4 °C.

Συστατικά διαλύματος Tris-HCl 6,8	Ποσότητες για 1L
Tris Base (<i>Fisher Scientific</i>)	121,16g
HCl	Μέχρι pH 6,8
dH ₂ O	Μέχρι 1L

✚ Διάλυμα Tris-HCl pH 8,8:

Το διάλυμα Tris-HCl pH 8,8 χρησιμοποιείται για την παρασκευή gel ακρυλαμίδης για την ηλεκτροφόρηση. Παρασκευάζεται σε μη στειρές συνθήκες και φυλάσσεται στους 4 °C.

Συστατικά διαλύματος Tris-HCl pH 8,8	Ποσότητες για 1L
Tris Base (<i>Fisher Scientific</i>)	181,65g
HCl	Μέχρι pH 8,8
dH ₂ O	Μέχρι το 1L

✚ Διάλυμα θειικού δωδεκύλιο-νατρίου (SDS) 10%:

Το διάλυμα SDS 10% χρησιμοποιείται για την παρασκευή gel για ηλεκτροφόρηση, διαλύματος φόρτωσης δειγμάτων και διαλύματος Running Buffer 1x. Παρασκευάζεται σε μη στειρές συνθήκες, προτείνεται η χρήση μάσκας λόγω της πτητικότητας της σκόνης και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Συστατικά διαλύματος SDS 10%	Ποσότητες για 100mL
Sodium Dodecyl Sulfate (<i>MERCK</i>)	10g
dH ₂ O	90-100mL

✚ Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS):

Το διάλυμα APS χρησιμοποιείται κατά την παρασκευή για την πήξη των gel για ηλεκτροφόρηση. Παρασκευάζεται σε μη στειρές συνθήκες κι έπειτα από έντονη

Συστατικά διαλύματος APS	Ποσότητες για 10mL
Ammonium Persulfate (<i>SIGMA</i>)	2g
dH ₂ O	10mL

ανάδευση και φυλάσσεται στους -20 °C.

✚ Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων 4x (Sample Buffer 4x):

Το Sample Buffer 4x χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των διαλυμάτων των δειγμάτων που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, ώστε να είναι ορατό το μέτωπο

της ηλεκτροφόρησης. Παράγεται σε μη στείρες συνθήκες και φυλάσσεται και χρησιμοποιείται μόνο στον απαγωγό λόγω των πτητικών βλαβερών ενώσεων που διαθέτει (β-μερκαπτοαιθανόλη).

Συστατικά του Sample Buffer 4x	Συγκεντρώσεις
Tris-HCl pH 6,8	0,33M
SDS	10% w/v
Γλυκερόλη	13% v/v
β-μερκαπτοαιθανόλη	20% v/v
Κυανούν της βρωμοφαινόλης	0,2% w/v
dH ₂ O	Μέχρι τελικού όγκου

✚ Διάλυμα Running Buffer 10x:

Το διάλυμα Running Buffer 10x χρησιμοποιείται ως συστατικό του διαλύματος Running Buffer 1x και του διαλύματος Transfer Buffer. Παρασκευάζεται σε μη στείρες συνθήκες, έπειτα από ανάδευση και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Συστατικά του διαλύματος Running Buffer 10x	Ποσότητες για 1L
Γλυκίνη (<i>AppliChem</i>)	144g
Tris-Base (<i>Fisher Scientific</i>)	30,27g
dH ₂ O	800-1000mL

✚ Διάλυμα Running Buffer 1x:

Το διάλυμα Running Buffer 1x χρησιμοποιείται για τη μεταφορά του ηλεκτρικού ρεύματος στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα. Παρασκευάζεται σε μη στείρες συνθήκες και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Συστατικά του διαλύματος Running Buffer 1x	Ποσότητες για 1L (mL)
dH ₂ O	890
Running Buffer 10x	100
SDS 10%	10

✚ Διάλυμα Transfer Buffer:

Το διάλυμα Transfer Buffer χρησιμοποιείται για τη μεταφορά του ηλεκτρικού ρεύματος κατά τη διαδικασία της μεταφοράς των ηλεκτροφορημένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Παρασκευάζεται σε μη στείρες συνθήκες και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Συστατικά του διαλύματος Transfer Buffer	Ποσότητες για 1L (mL)
dH ₂ O	700
Μεθανόλη	200
Running Buffer 10x	100

✚ Διάλυμα Tween-20 (20%):

Το διάλυμα Tween-20 20% χρησιμοποιείται ως συστατικό για την παρασκευή του διαλύματος TBST. Παρασκευάζεται σε μη στειρές συνθήκες κι έπειτα από έντονη ανάδευση και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Συστατικά του διαλύματος Tween-20 20%	Ποσότητες για 50mL (mL)
dH ₂ O	40
Tween-20 (MERCK)	10

✚ Διάλυμα TBS 10x:

Το διάλυμα TBS 10x χρησιμοποιείται ως συστατικό για την παρασκευή του διαλύματος TBST. Παρασκευάζεται σε μη στειρές συνθήκες και φυλάσσεται σε

Συστατικά του διαλύματος TBS 10x	Ποσότητες για 1L
Tris-Base (Fisher Scientific)	24,2g
NaCl	80g
HCl	Μέχρι pH 7,6
dH ₂ O	Μέχρι το 1L

θερμοκρασία δωματίου.

✚ Διάλυμα TBS-T:

Το διάλυμα TBS-T χρησιμοποιείται ως συστατικό του διαλύματος Blocking Buffer 5% non-fat dry milk και για την έκπλυση των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης. Παρασκευάζεται σε μη στειρές συνθήκες και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Συστατικά του διαλύματος TBS-T	Ποσότητες για 1L (mL)
dH ₂ O	897,5
TBS 10x	100
Tween-20 20%	2,5

✚ Διάλυμα Blocking Buffer 5% non-fat dry milk:

Το διάλυμα Blocking Buffer 5% non-fat dry milk χρησιμοποιείται για τον αποκλεισμό των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Παρασκευάζεται σε μη στειρές συνθήκες, λίγο πριν χρησιμοποιηθεί.

Συστατικά του διαλύματος Blocking Buffer 5%	Ποσότητες για 30mL
Broth Skimmed Milk (Scharlau)	1,5g

TBS-T	30mL
-------	------

✚ Διάλυμα διάλυσης αντισωμάτων 5% και 2%:

Το διάλυμα διάλυσης αντισωμάτων 5% και 2% χρησιμοποιείται για την επώαση των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης με τα κατάλληλα αντισώματα. Το πρωτόκολλο κάθε αντισώματος προτείνει σε τι μέσο θα πρέπει να διαλυθεί, δηλαδή σε γάλα ή σε BSA, αλλά και την ποσότητα του αντισώματος η οποία θα πρέπει να προστεθεί στο διάλυμα, ώστε να αποδώσει καλύτερα η επώαση. Παρασκευάζεται σε μη στερείες συνθήκες και φυλάσσεται στους -20 °C.

B1γ. Αντισώματα

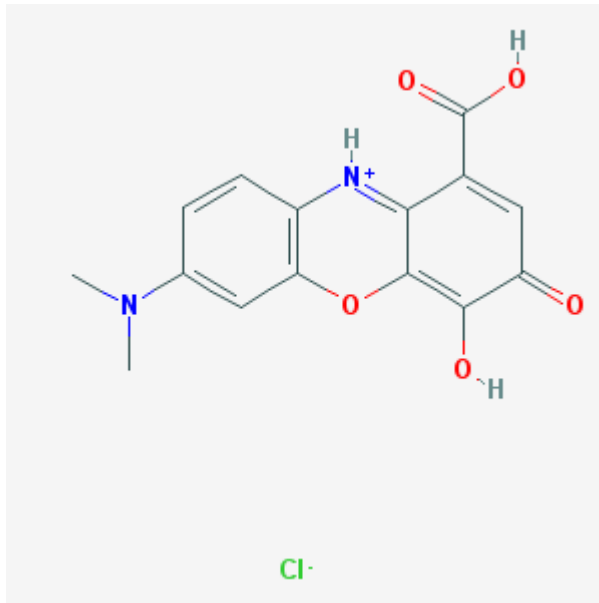
Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- ❖ Rabbit polyclonal Dkk1 (H-120) της Santa Cruz Biotechnology
- ❖ Rabbit anti-Human, Mouse, Rat MAPT/TAU pSer396 της Acris-Antibodies
- ❖ Rabbit anti-Human, Mouse, Rat, Monkey (Zebrafish, Bovine) P-GSK3-beta (S9) της Cell Signaling Technology
- ❖ Rabbit anti-Human, Mouse, Rat catenin-beta-1 της Acris-Antibodies
- ❖ Rabbit anti-Mouse actin beta

Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) της Jackson ImmunoResearch.

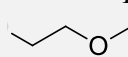
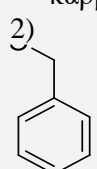

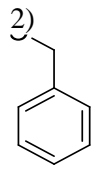
B1δ. Ανάλογα γαλλοκυανίνης:

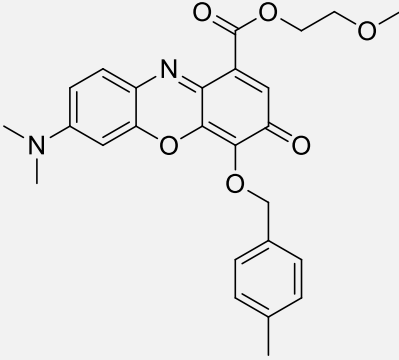
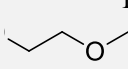
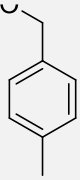
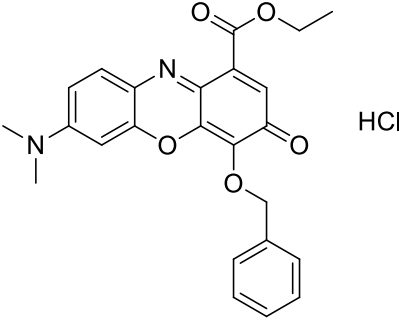


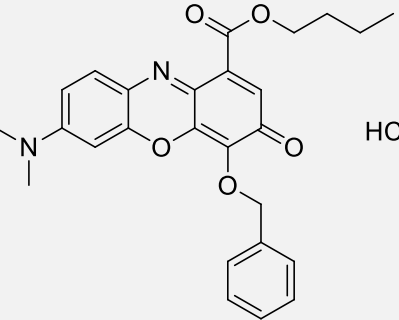
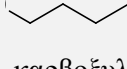

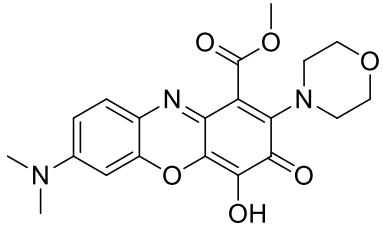
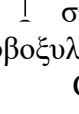
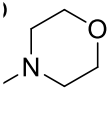
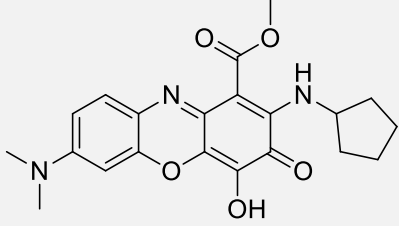
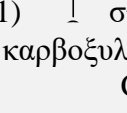
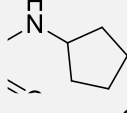
Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για τις επώσεις είναι ανάλογα γαλλοκυανίνης που παρασκευάστηκαν από την κυρία Βασιλική Σαρλή από το Τμήμα Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Ένα μικρό μόριο, η γαλλοκυανίνη (NCI8642) έχει καταγραφεί ως αναστολέας της αλληλεπίδρασης μεταξύ DKK1 και των συνυποδοχέων LRP5 κι LRP6, οδηγώντας τελικά σε αναστολή της ενεργότητας του DKK1 κι επομένως σε επαναφορά του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης σε λειτουργία (Liu P. *et al*, 2005; Bernocco S. *et al*, 2012). Η γαλλοκυανίνη και τα παράγωγά της είναι ικανά να αναστείλουν την επαγόμενη από προσταγλανδίνη φωσφορυλίωση της tau στη σερίνη 396, δημιουργώντας ένα πεδίο έρευνας για μια πιθανή φαρμακευτική τους χρήση κατά της νόσου Alzheimer's κι άλλων ταυπαθειών (Sarli V. *et al*, 2015). Ωστόσο, η μικρομοριακή δραστηριότητά του φαίνεται να μην είναι επαρκής ώστε να έχει αποτελεσματική εφαρμογή *in vivo* (Bernocco S. *et al*, 2012). Γι' αυτό το λόγο, σχηματίστηκαν ανάλογα αυτού του μικρού μορίου με κατάλληλες υποκαταστάσεις ώστε να παρακαμφθούν κάποια εμπόδια για την *in vivo* χρήση τους.

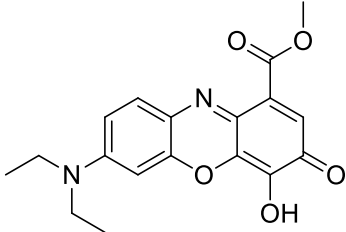



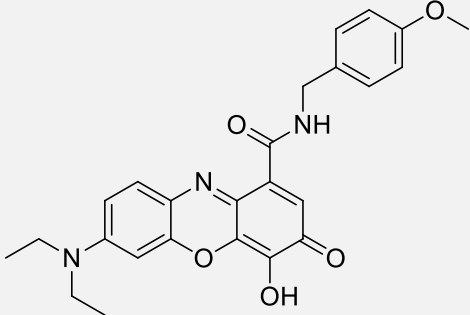



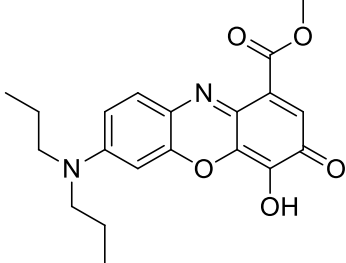



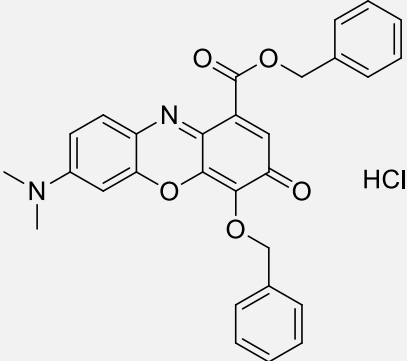




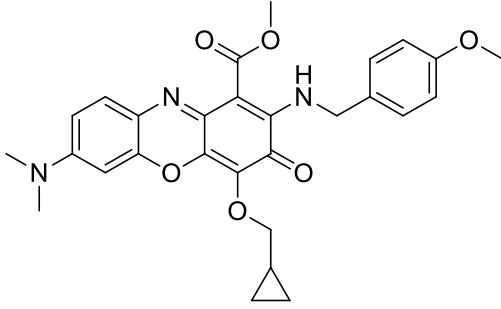



<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gallocyanine>

Εικόνα Β3: Χημική δομή γαλλοκυανίνης

Ανάλογο γαλλοκυανίνης	Δομή	Υποκατάσταση
BS99		1)  στο Η της καρβοξυλομάδας του C1 2)  στο Η της υδροξυλομάδας του C4
BS108		1)  στο Η της καρβοξυλομάδας του C1 2)  στο Η της υδροξυλομάδας του C4

<p>BS111</p>		<p>1)  στο Η της καρβοξυλομάδας του C1</p> <p>2)  στο Η της υδροξυλομάδας του C4</p>
<p>BS117</p>	 <p>HCl</p>	<p>1)  στο Η της καρβοξυλομάδας του C1</p> <p>2)  στο Η της υδροξυλομάδας του C4</p> <p>3) HCl</p>
<p>BS119</p>	 <p>HCl</p>	<p>1)  στο Η της καρβοξυλομάδας του C1</p> <p>2)  στο Η της υδροξυλομάδας του C4</p> <p>3) HCl</p>
<p>ST79</p>		<p>1)  στο Η της καρβοξυλομάδας του C1</p> <p>2)  στο Η του C2</p>
<p>ST81</p>		<p>1)  στο Η της καρβοξυλομάδας του C1</p> <p>2)  στο Η του C2</p>

<p>ST88</p>		<p>1)  στο H της καρβοξυλομάδας του C1</p> <p>2)  στο H του μεθυλίου της αμινομάδας του C7</p> <p>3)  στο H του μεθυλίου της αμινομάδας του C7</p>
<p>ST89</p>		<p>1)  στο H της καρβοξυλομάδας του C1</p> <p>2)  στο H του μεθυλίου της αμινομάδας του C7</p> <p>3)  στο H του μεθυλίου της αμινομάδας του C7</p>
<p>ST100</p>		<p>1)  στο H της καρβοξυλομάδας του C1</p> <p>2)  στο H του μεθυλίου της αμινομάδας του C7</p> <p>3)  στο H του μεθυλίου της αμινομάδας του C7</p>
<p>ST102</p>		<p>1)  στο H της καρβοξυλομάδας του C1</p> <p>2)  στο H της υδροξυλομάδας του C4</p> <p>3) HCl</p>

<p>ST126</p>		<p>1)  στο H της καρβοξυλομάδας του C1</p> <p>2)  στο H του C2</p> <p>3)  στο H της υδροξυλομάδας του C4</p>
---------------------	---	---

B2. Μέθοδοι

B2α. Κυτταροκαλλιέργειες

Ο όρος κυτταροκαλλιέργεια αναφέρεται σε κύτταρα ζώων ή φυτών που έχουν αφαιρεθεί από ιστούς και συνεχίζουν να αναπτύσσονται προμηθευόμενα τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία κι υπό τις κατάλληλες συνθήκες. Στην ουσία, μ' αυτόν τον τρόπο κάθε κύτταρο είναι ικανό να δρα ως ανεξάρτητη μονάδα πολλαπλασιαζόμενο, αυξανόμενο σε μέγεθος, μέχρι να περιοριστεί από κάποιο παράγοντα, όπως η έλλειψη θρεπτικού.

Για την περίπτωση των θηλαστικών, τα κύτταρα που έχουν απομονωθεί πρόσφατα από τους ιστούς για τη χρήση σε κυτταρικές καλλιέργειες αποτελούν τις πρωτογενείς καλλιέργειες μέχρι είτε να πεθάνουν ή να υπο-καλλιεργηθούν μετατρέπόμενα σε συνεχή κυτταρική σειρά. Η συνεχής κυτταρική σειρά μπορεί να διαφέρει από την πρωτογενή καλλιέργεια ως προς τη μορφολογία, τη χρωμοσωμική ποικιλότητα και την ικανότητα να αναπτύσσει όγκους σε ξενιστές με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα.

Κλώνος ονομάζεται ένας ομογενής πληθυσμός, δηλαδή καλλιέργεια κυττάρων γενετικά πανομοιότυπων, που προέρχεται από ένα μόνο μητρικό κύτταρο.

Η μέθοδος των κυτταροκαλλιεργειών βρίσκει εφαρμογή:

- Στην έρευνα της φυσιολογικής λειτουργίας ή βιοχημείας των κυττάρων
- Στη μελέτη του διαδοχικού ή παράλληλου συνδυασμού διάφορων κυτταρικών τύπων για την παραγωγή τεχνητού ιστού
- Στη σύνθεση διαλυμάτων για διαγνωστική, προγνωστική ή θεραπευτική χρήση (biologicals) από μεγάλης κλίμακας κυτταρικές καλλιέργειες
- Στον έλεγχο της επίδρασης ποικίλων χημικών ουσιών ή φαρμάκων σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους.

Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η συνέπεια κι η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων που μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μιας ομάδας (batch) κυττάρων, ενώ το κύριο μειονέκτημα είναι ότι μετά από μια περίοδο συνεχούς ανάπτυξης, τα χαρακτηριστικά των κυττάρων μπορεί να τροποποιηθούν μέχρι και σε μεγάλο βαθμό από τον αρχικό πληθυσμό (171).

✓ Απόψυξη κυττάρων:

Τα κύτταρα είναι εφικτό να φυλάσσονται στο υγρό άζωτο σε θερμοκρασία $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, μειώνοντας στο ελάχιστο το μεταβολισμό τους. Έτσι, προκειμένου να εκκινηθεί μια διαδικασία καλλιέργειας κυττάρων που έχουν διατηρηθεί παγωμένα πρέπει να ακολουθηθούν τα κάτωθεν βήματα:

1. Παραλαβή φιαλιδίου με κύτταρα από το υγρό άζωτο σε πάγο
2. Διατήρηση φιαλιδίου στο υδατόλουτρο θερμοκρασίας $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 min
3. Προσθήκη 1mL θερμασμένου στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ θρεπτικού στο φιαλίδιο κι ανάδευση
4. Αν κριθεί απαραίτητο, φυγοκέντρηση στις 2000-3000 rpm για 5-6min στους $25-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ προκειμένου να απομακρυνθεί το κυτταροτοξικό DMSO και παραλαβή ιζήματος με 1mL θρεπτικού.
5. Προετοιμασία τρυβλίου για προσθήκη κυττάρων εισάγοντας 5mL θρεπτικού σε αυτό και διαχέοντάς το σ' όλη του την επιφάνεια
6. Προσθήκη του διαλύματος κυττάρων και θρεπτικού στο τρυβλίο και κυκλική κίνησή του ώστε να μεταφερθούν τα κύτταρα σ' όλο τον όγκο του θρεπτικού του τρυβλίου
7. Διατήρηση των κυττάρων σε κλίβανο θερμοκρασίας $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, ατμόσφαιρας με περιεκτικότητα 5% σε CO_2 και σχετικής υγρασίας 95%.

✓ Ανακαλλιέργεια κυττάρων:

Τα κύτταρα που διατηρούνται στον κλίβανο είναι αναγκαίο να ανακαλλιεργηθούν όταν καλύπτουν την επιφάνεια του τρυβλίου κατά 90-95%, αν δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για κάποιο άλλο σκοπό, όπως μια επώαση. Ο χρόνος που απαιτείται ώστε τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν σε τέτοιο βαθμό εξαρτάται από την κυτταρική σειρά, την ηλικία/γενιά των κυττάρων, το πλήθος των κυττάρων που εισήχθησαν εξ αρχής στο τρυβλίο κι από τη διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων. Όταν λοιπόν φθάσουν σ' αυτό το βαθμό πληρότητας ακολουθείται η διαδικασία της θρυψινοποίησης.

1. Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου που περιέχεται στο τρυβλίο
2. Προσθήκη 1mL PBS 1x που έχει παρασκευαστεί υπό στείρες συνθήκες στο τρυβλίο και κυκλική κίνηση για να διαχυθεί το PBS σ' όλη την επιφάνεια του τρυβλίου
3. Αφαίρεση του PBS από το τρυβλίο
4. Προσθήκη 1mL θρυψίνης 1x, κυκλική κίνηση για να διαχυθεί η θρυψίνη και τοποθέτηση στον κλίβανο για όσο χρόνο απαιτείται βάσει της ευαισθησίας και της συνάφειας που αναπτύσσουν τα κύτταρα με την επιφάνεια του τρυβλίου

5. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο κι υποβοήθηση άρσης από το τρυβλίο με μηχανική δύναμη
6. Προσθήκη 1mL θρεπτικού για τον τερματισμό της αντίδρασης της θρυψίνης
7. Ανάδευση με χρήση πιπέτας κι έκπλυση του πατώματος του τρυβλίου από τα κύτταρα που δεν έχουν αρθεί
8. Διαμοιρασμός του εναιωρήματος θρεπτικού και κυττάρων σε νέα τρυβλία όπου έχει ήδη εισαχθεί θρεπτικό

✓ Επώσεις:

Όπως προαναφέρθηκε οι κυτταροκαλλιέργειες αποτελούν κατάλληλη μέθοδο για τον έλεγχο της επίδρασης ουσιών σε ορισμένους τύπους κυττάρων. Έτσι, προκειμένου να παρατηρηθεί αν και πώς επιδρούν οι ουσίες που μας ενδιαφέρουν στο μονοπάτι Wnt σηματοδότησης, πραγματοποιήθηκαν δίωρες επώσεις με κάθε ανάλογο μόνο ή παρουσία θρεπτικού εμπλουτισμένου με DKK1. Πριν την εκπόνηση της διαδικασίας, απαιτείται να υπολογιστούν οι κατάλληλοι όγκοι των αντιδραστηρίων που θα χρησιμοποιηθούν.

1. Αφαίρεση θρεπτικού που προϋπήρχε στο τρυβλίο
2. Έκπλυση εναπομείναντος θρεπτικού με PBS
3. Προσθήκη θρεπτικού κι ουσιών στις υπολογισμένες ποσότητες προσεκτικά ώστε να μην αρθούν τα κύτταρα και ταχέως, αν πρόκειται για παράλληλες επώσεις πολλών τρυβλίων, ώστε να παραμείνουν όλες οι επώσεις για σχεδόν τον ίδιο χρόνο μέσα στα τρυβλία
4. Μεταφορά και διατήρηση στον κλίβανο για 2h

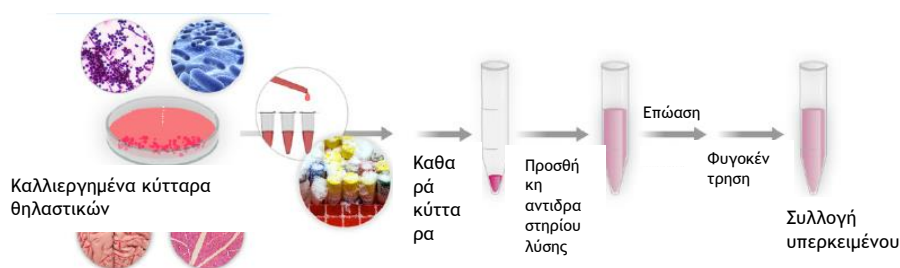
✓ Κατάψυξη κυττάρων:

Όταν δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν τα κύτταρα για κάποια επώαση ή για κάποιο άλλο σκοπό άμεσα, θα ήταν καλύτερο να καταψυχθούν. Για να διατηρηθούν λοιπόν τα κύτταρα σε όσο το δυνατό καλύτερη κατάσταση κατά την ψύξη τους, ρίχνουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα το μεταβολισμό τους, ενώ παράλληλα εισάγεται στο περιβάλλον τους η κρυοπροστατευτική χαμηλής τοξικότητας ουσία DMSO.

1. Εφαρμογή βημάτων 1-7 από τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας κυττάρων
2. Παραλαβή του εναιωρήματος κι εισαγωγή του σε falcons
3. Φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 3min στους 4 °C
4. Απομάκρυνση του υπερκειμένου από τα falcons
5. Αναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε Freezing Buffer
6. Μεταφορά εναιωρήματος σε φιαλίδια (cryovials)
7. Τοποθέτηση στους -20 °C για 1-2h
8. Μεταφορά στους -80 °C overnight
9. Μεταφορά στους -196 °C, δηλαδή στο υγρό άζωτο, όπου μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα

B2β. Λύση κυττάρων για απομόνωση πρωτεϊνών

Αφού τα κύτταρα επώαστηκαν με τις επιθυμητές ουσίες, παραλαμβάνονται και λύνονται, ώστε να απομονωθούν οι πρωτεΐνες που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν. Η λύση των κυττάρων σηματοδοτεί την καταστροφή της πλασματικής μεμβράνης και είναι το πρώτο βήμα για την κλασμάτωση του κυττάρου, την απομόνωση οργανιδίων και την απομάκρυνση και απομόνωση πρωτεϊνών. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται είτε με μηχανικές πιέσεις, όπως το επαναλαμβανόμενο πάγωμα και ξεπάγωμα, οι υπέρηχοι και το φιλτράρισμα ή με τη χρήση ενζύμων ή απορρυπαντικών, όπως επετεύχθη στην παρούσα εργασία. Όπως είναι φυσικό, η λύση των κυττάρων διαταράσσει το προσεκτικά ελεγχόμενο κυτταρικό περιβάλλον, επιτρέποντας σε πρωτεάσες και φωσφατάσες να δρουν μη ελεγχόμενα και οδηγώντας τελικά στην απομόνωση πρωτεϊνών που έχουν αποικοδομηθεί ή έχουν τροποποιηθεί. Για να αποφευχθεί αυτή η ανεπιθύμητη επίδραση, στο Lysis Buffer που χρησιμοποιείται εισάγονται αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών (172, 173).



<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/detergents-cell-lysis-protein-extraction.html>

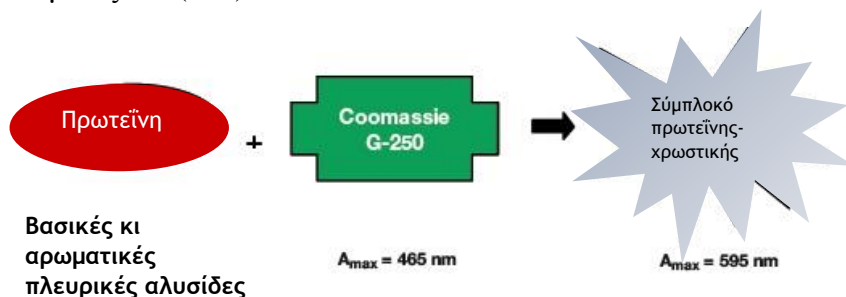
Εικόνα B4: Διαδικασία λύσης κυττάρων

1. Προετοιμασία Lysis Buffer και φύλαξη σε αφρολέξ με πάγο
2. Παραλαβή των τρυβλίων με τις επώσεις από τον κλίβανο και μεταφορά στο αφρολέξ
3. Αφαίρεση του θρεπτικού με τις ουσίες από τα τρυβλία
4. Έκπλυση με 1mL PBS 1x που έχει παρασκευαστεί υπό μη στείρες συνθήκες και προσεκτική αφαίρεση του συνόλου του PBS
5. Επανάληψη βήματος 4
6. Εισαγωγή 100μL Lysis Buffer σε κάθε τρυβλίο
7. Αποκόλληση των κυττάρων από το τρυβλίο με μηχανική δύναμη με τη χρήση ξύστρας (scraper)
8. Παραλαβή του εναιωρήματος και εισαγωγή σε ονοματισμένα eppendorfs
9. Διατήρηση στον πάγο για 30min και ανάδευση στο vortex ανά 10min.
10. Μετά την παρέλευση των 30min, φυγοκέντρηση των eppendorfs στις 13000rpm για 15min σε θερμοκρασία 4 °C.
11. Προσεκτική παραλαβή του υπερκειμένου ώστε να μην επαναδιαλυτοποιηθεί το ίζημα και μεταφορά σε ονοματισμένα eppendorfs και φύλαξη είτε στους -20 °C, αν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν εντός μίας εβδομάδας ή στους -80 °C, αν πρόκειται να φυλαχθούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα

B2γ. Μέθοδος Bradford για ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Μετά τη λύση των κυττάρων, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα, ώστε να φορτωθεί η κατάλληλη ποσότητα δείγματος προς ηλεκτροφόρηση σε κάθε πηγάδι. Για να είναι εφικτή η σχετική μελέτη των ποσοτήτων των εκφραζόμενων πρωτεϊνών, θα πρέπει να φορτωθεί ίση ποσότητα πρωτεϊνών σε κάθε πηγάδι (174).

Η πρωτεϊνική δοκιμασία Bradford είναι μια εύκολη, ευαίσθητη κι ακριβής μέθοδος και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του συνόλου των πρωτεϊνών σ' ένα δείγμα(174, *He F., 2011*). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη δέσμευση των πρωτεϊνικών μορίων στη χρωστική Coomassie σε όξινο περιβάλλον, γεγονός που οδηγεί στην αλλαγή του χρώματος της χρωστικής από καφέ σε μπλε. Στην ουσία, υπολογίζεται η παρουσία των βασικών αμινοξικών καταλοίπων, αργινίνης, λυσίνης κι ιστιδίνης, που συμμετέχουν στο σχηματισμό του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής (*He F., 2011*). Μ' αυτή τη δοκιμασία μπορούν να ποσοτικοποιηθούν πρωτεΐνες σε συγκέντρωση 20-2000μg/mL (174). Είναι σημαντική η απουσία SDS από το πρωτεϊνικό διάλυμα ώστε να μην εμπλακεί στη σύνδεση πρωτεΐνης και χρωστικής (*He F., 2011*). Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι είναι εύκολη, ευαίσθητη, ταχεία και συμβατή με πολλά διαλύματα. Τα μειονεκτήματά της είναι ότι απαιτείται η δημιουργία πρότυπης καμπύλης για κάθε δοκιμασία, συχνά είναι απαραίτητη η διάλυση των δειγμάτων πριν την ανάλυση και στηρίζεται έντονα στη σύσταση των αμινοξέων (174).



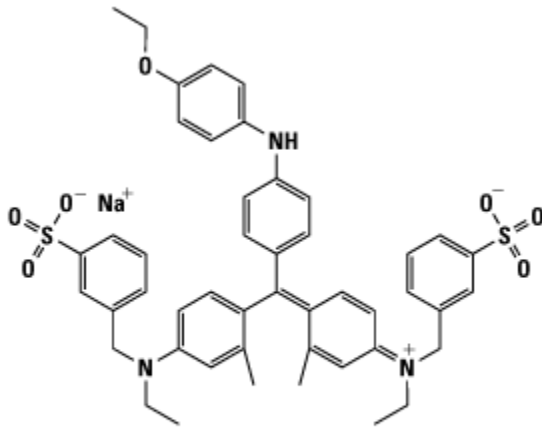
<https://www.news-medical.net/whitepaper/20160218/Standard-Curve-Generation-for-Colorimetric-Assay-in-the-Kinetic-or-Basic-Eppendorf-BioSpectrometerc2ae.aspx>

Εικόνα B5: Η αντίδραση στην οποία βασίζεται η δοκιμασία Bradford

1. Προετοιμασία ενός eppendorf που θα περιέχει 100μL H₂O και θα χρησιμοποιηθεί για το μηδενισμό του φωτομέτρου (τυφλό)
2. Προετοιμασία eppendorfs για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης για την αντιστοίχιση των απορροφήσεων με γνωστής μάζας δείγματα:

Μάζα (μg)	H ₂ O (μL)	BSA 1μg/μL (μL)
2	98	2
4	96	4
8	92	8
12	88	12
16	84	16
20	80	20

3. Προετοιμασία erpendorfs με 1μL από τα δείγματα που προέκυψαν από τη λύση κι 99μL H₂O
4. Εισαγωγή από 1mL χρωστικής Coomassie Brilliant Blue σε κάθε erpendorf κι επώαση για 10min σε σκοτεινό μέρος
5. Φωτομέτρηση διαλυμάτων στα 595nm
6. Βάσει των τιμών της πρότυπης καμπύλης, υπολογισμός των ποσοτήτων που θα πρέπει να προστεθούν από κάθε δείγμα ώστε να φορτωθούν σε όλα τα πηγάδια 50μg πρωτεϊνών.



Χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250

C₄₇H₄₈N₃NaO₇S₂

MB 854.02

<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html>

Εικόνα B6: Χημική δομή Coomassie Brilliant Blue

B2δ. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών σε gel ακρυλαμίδης

Η ηλεκτροφόρηση σε gel είναι μια τεχνική κατά την οποία φορτισμένα μόρια, όπως πρωτεΐνες και DNA, διαχωρίζονται βάσει φυσικών ιδιοτήτων κατά την κινητοποίησή τους από ηλεκτρικό ρεύμα. Οι πρωτεΐνες συνήθως διαχωρίζονται χρησιμοποιώντας gel ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμίδης (PAGE) για να διακριθούν μεμονωμένα πρωτεΐνες από ένα δείγμα ή να εξεταστούν πολλές πρωτεΐνες σε ένα μόνο δείγμα. Όταν συνδυάζεται με την τεχνική Western blot, αποτελεί ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο που παρέχει πληροφορίες για τη μάζα, το φορτίο, την καθαρότητα ή την παρουσία μιας πρωτεΐνης (176). Ο διαχωρισμός σε PAGE παρέχει υψηλή ανάλυση. Προκειμένου να ενισχυθεί το εύρος εφαρμογής της ηλεκτροφόρησης σε PAGE έχουν καθιερωθεί ορισμένες παραλλαγές της μεθόδου που στοχεύουν σε μία μόνο από τις προαναφερόμενες ιδιότητες, όπως η SDS-PAGE, που χρησιμοποιείται από το εργαστήριο και διαχωρίζει τις πρωτεΐνες βάσει μοριακού βάρους. Ο διαχωρισμός βάσει μεγέθους οφείλεται στην δημιουργία πλέγματος πολυακρυλαμίδης του gel, επιτρέποντας τη μετακίνηση πρωτεϊνών συγκεκριμένου μεγέθους. Το εύρος μεγέθους εντός του οποίου μπορούν να διαχωριστούν τα μόρια καθορίζεται από το μέσο μέγεθος των πόρων του gel και στα gel πολυακρυλαμίδης αυτό ελέγχεται μερικά από

τη συγκέντρωση του μονομερούς ακρυλαμίδης. Η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης ορίζεται στο εύρος μεταξύ 4% και 20% όπου είναι κατάλληλες οι μηχανικές ιδιότητες του gel. Σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 4%, το gel θα ήταν πολύ μαλακό και θα έχανε τη φόρμα του, ενώ σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 20% θα ήταν πολύ δύσκαμπτο και θα έτεινε να σπάσει. Τα πλεονεκτήματα των PAGE είναι ότι είναι υδρόφιλα, μη φορτισμένα, χημικά σταθερά και, το βασικότερο, δε συμμετέχει σε καμμία μη ειδική ή ειδική αλληλεπίδραση σύνδεσης με πρωτεΐνες.

Για τη δημιουργία του gel, χρησιμοποιείται διάλυμα ακρυλαμίδης 30% και διαλύματα με κατάλληλο pH κι ο πολυμερισμός διεγείρεται στη συνέχεια από κατάλληλο καταλύτη κι ουσίες «μυητές». Ο καταλύτης είναι συνήθως υπερθεϊκό αμμώνιο, που σε υδατικό περιβάλλον αποσυντίθεται, παράγοντας έτσι ελεύθερες ρίζες κι είναι ικανό να διεγείρει τα ηλεκτρόνια των μυητών. Οι μυητές, π.χ. τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνη (TEMED), παράγουν κατ' αυτόν τον τρόπο ελεύθερες ρίζες, οι οποίες είναι τελικά ικανές να οδηγήσουν σε πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης. Το pH των διαλυμάτων θα πρέπει να είναι μεγαλύτερο από το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών, ώστε να είναι όλες οι πρωτεΐνες αρνητικά φορτισμένες σ' αυτό και να κινούνται προς την άνοδο.

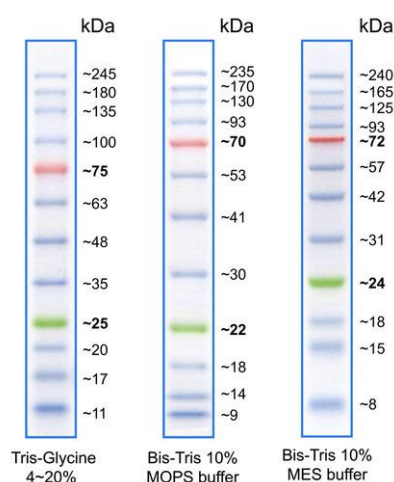
Ανάλογα με το pH των διαλυμάτων που εισάγονται, οι ηλεκτροφορητικές μέθοδοι διαχωρίζονται σε συνεχείς, όπου χρησιμοποιείται διάλυμα ίδιου pH για όλο το gel και στους δύο χώρους όπου βρίσκονται τα ηλεκτρόδια και σε ασυνεχείς, όπου στοιβάζονται δύο gels με διαφορετικό μέγεθος πόρων και τρία διαφορετικά διαλύματα. Στο ασυνεχές σύστημα, που χρησιμοποιείται από το εργαστήριο, το κατώτερο gel είναι το gel ανάλυσης (resolving) και διαθέτει υψηλότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και κατάλληλο μέγεθος πόρων ανάλογα με τις πρωτεΐνες που ηλεκτροφορούνται, ενώ το ανώτερο είναι το gel επιστοιβάξης, που χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη συγκέντρωση ακρυλαμίδης κι επομένως μεγαλύτερους πόρους και pH 6,8. Όσον αφορά στα τρία διαλύματα, αυτά αφορούν στα δύο διαφορετικά διαλύματα των gels και σε ένα τρίτο διάλυμα το οποίο εισάγεται στο χώρο των ηλεκτροδίων, το Running Buffer.

Τα δείγματα των πρωτεϊνών εισάγονται στο ανώτερο σημείο του gel επιστοιβάξης σε κατάλληλα διαμορφωμένα πηγάδια. Μετά την παραγωγή ηλεκτρικού πεδίου από τον πάροχο ενέργειας, τα ιόντα των πρωτεϊνών και του Running Buffer, δηλαδή τα ιόντα γλυκίνης, εισέρχονται στο gel επιστοιβάξης. Επειδή στο pH 6,8 του gel επιστοιβάξης τα περισσότερα ιόντα γλυκίνης βρίσκονται στην αμφιτεριονική (zwitterionic) τους κατάσταση και λίγα μόνο χαρακτηρίζονται από αρνητικό φορτίο, η γλυκίνη έχει μικρή ηλεκτροφορητική κινητικότητα κι επομένως μειωμένη ικανότητα μεταφοράς. Έτσι η τοπική χαμηλή παρουσία των ιόντων θα αυξήσει την ηλεκτρική αντίσταση του μέσου στην περιοχή κι επειδή το ηλεκτρικό ρεύμα θα πρέπει να έχει την ίδια ένταση σ' όλο το χώρο, θα αυξηθεί η τάση βάσει του νόμου του Ωμ. Επομένως, οι πρωτεΐνες θα μεταναστεύουν ταχέως και το μέτωπο των πρωτεϊνών θα συναντήσει το σημείο ένωσης των δύο gels. Επειδή σ' αυτό το σημείο η συγκέντρωση των ιόντων είναι υψηλή, η ηλεκτρική αντίσταση κι η τάση θα είναι χαμηλές, επομένως επιβραδύνεται η μετανάστευση των πρωτεϊνών. Στο gel ανάλυσης το pH είναι 8,8, στο οποίο όλα τα ιόντα γλυκίνης βρίσκονται σε ανιονική μορφή κι έτσι αυξάνεται η ηλεκτροφορητική κινητικότητα της γλυκίνης. Σ' αυτό το gel οι πρωτεΐνες θα διαχωριστούν βάσει του

μεγέθους τους στην περίπτωση της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης. Προκειμένου να παρατηρείται η κινητικότητα του μετώπου της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται χρωστική που εμπεριέχεται στο Sample Buffer κι αναμειγνύεται με το αραιωμένο διάλυμα των πρωτεϊνών.

Στην SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, το SDS οδηγεί στην εξομοίωση των ειδικών φορτίων (λόγου φορτίου προς μάζας) των διαφορετικών πρωτεϊνών, έτσι ώστε ο διαχωρισμός τους να γίνεται μόνο βάσει του μοριακού τους βάρους (176).

Παράλληλα, ηλεκτροφορείται ένα μείγμα πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών (protein ladder) χρωματισμένων με το ίδιο ή με διαφορετικό χρώμα για κάποιες χαρακτηριστικές και χρησιμοποιείται ως πρότυπο ώστε να αναγνωρίσουμε το μοριακό βάρος των επιθυμητών πρωτεϊνών.



<https://www.nippongenetics.eu/en/product/bluestar-prestained-protein-marker-500-%C2%B51/>

Εικόνα Β7: Απόδοση ηλεκτροφορημένου πρωτεϊνικού marker της Nippon Genetics

Για την παρασκευή gels:

1. Ανάμειξη όλων των απαιτούμενων αντιδραστηρίων πλην των APS και TEMED σε falcon βάσει των απαιτούμενων για κάθε συγκέντρωση ποσοτήτων

Resolving gel (7,5mL/σετ τζαμιών)	Stacking gel (2,5mL/σετ τζαμιών)
H₂O	H₂O
Ακρυλαμίδη 30%	Ακρυλαμίδη 30%
Tris-HCl 8,8	Tris-HCl 6,8
SDS 10%	SDS 10%

2. Η

Προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων APS και TEMED μόνο στο διάλυμα για το resolving gel κι ανάδευση στο vortex

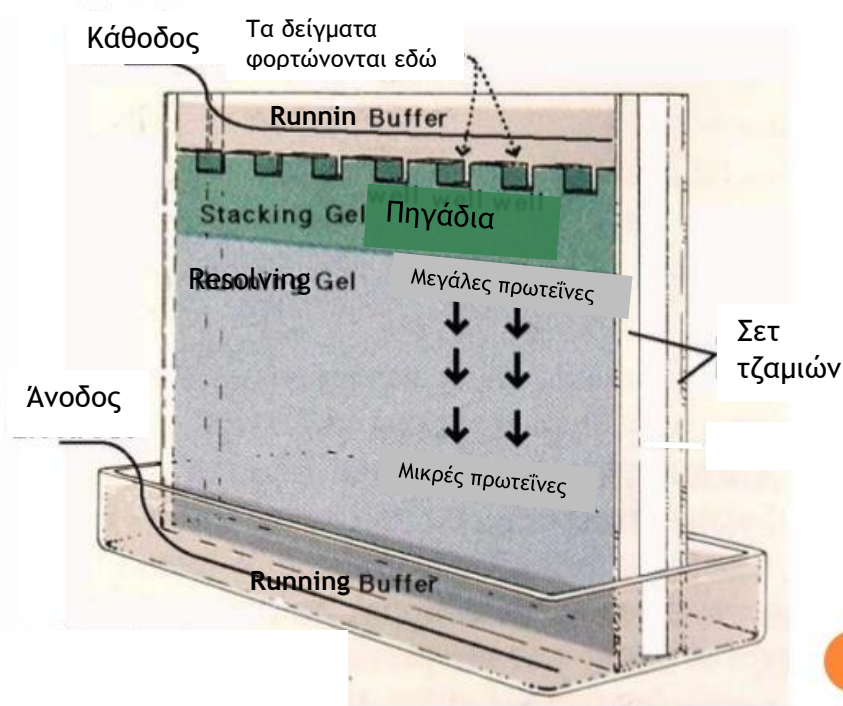
3. Εισαγωγή διαλύματος με γρήγορες και προσεκτικές κινήσεις σε σετ γυάλινων παραλληλεπίπεδων τζαμιών άνισου εμβαδού, κατάλληλων για ηλεκτροφόρηση καθαρών και τοποθετημένων κατά τέτοια διεύθεση, ώστε

το μικρότερου εμβαδού τζάμι να είναι προς τη πλευρά του παρασκευαστή του gel

4. Προσθήκη H₂O με ήπιες κινήσεις πάνω από το διάλυμα του resolving gel, ώστε να μη δημιουργηθούν ανεπιθύμητες φυσαλίδες στη διαχωριστική γραμμή των δύο gels
5. Αναμονή μέχρι τον πολυμερισμό και την πήξη (Ο χρόνος που απαιτείται εξαρτάται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και την ποιότητα των αντιδραστηρίων)
6. Μετά την πήξη, απομάκρυνση του προστεθειμένου H₂O
7. Επανάληψη των βημάτων 2 και 3 για το stacking gel
8. Προτού πήξει, εισαγωγή των κατασκευών που δημιουργούν τις εσοχές που θα χρησιμοποιηθούν ως πηγάδια όπου θα φορτωθούν τα δείγματα
9. Αναμονή μέχρι να πήξει (Απαιτεί λιγότερο χρόνο από το resolving)

Για την ηλεκτροφόρηση:

1. Εισαγωγή των σετ τζαμιών στην κατάλληλη συσκευή για την ηλεκτροφόρηση
2. Προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας Running Buffer 1x ανάμεσα και γύρω από τα σετ τζαμιών
3. Αφαίρεση κατασκευών που σχημάτισαν τα πηγάδια με προσεκτικές κινήσεις ώστε να μη χαλάσει η μορφή του gel
4. Εισαγωγή του protein ladder στην κατάλληλη ποσότητα που προτείνεται από το πρωτόκολλό του με τη χρήση πιπέτας Hamilton
5. Εισαγωγή των μειγμάτων πρωτεϊνών και Sample Buffer 4x στα πηγάδια σε ποσότητα 30μL (κατάλληλη ώστε να είναι ανιχνεύσιμες οι πρωτεΐνες και να μην υπερχειλίζουν τα πηγάδια) με τη χρήση πιπέτας Hamilton, έπειτα από τη θέρμανσή τους για 3min σε θερμαντική πλάκα θερμοκρασίας 100 °C και την ανάδυσή τους στο vortex
6. Σύνδεση της συσκευής με την παροχή ηλεκτρικού ρεύματος και ρύθμιση της τάσης στα 100-130V
7. Αφού το μέτωπο της χρωστικής ξεπεράσει τη διαχωριστική γραμμή μεταξύ των δύο gels, αύξηση της τάσης στα 120-150V
8. Η ηλεκτροφόρηση θα πρέπει να τερματιστεί χειροκίνητα όταν βάσει protein ladder κριθεί ότι η περαιτέρω ηλεκτροφόρηση θα οδηγούσε σε μετανάστευση των πρωτεϊνών στο Running Buffer.



<https://www.slideshare.net/dhaRRamgol/poly-acrylamide-gel-electrophoresis-page>

Εικόνα Β8: Σύστημα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE

Β2ε. Στύπωμα κατά Western (Western blotting)

Γενικά ο όρος στύπωμα (blotting) αναφέρεται στη μεταφορά βιολογικών δειγμάτων από ένα gel σε μια μεμβράνη κι εν συνεχεία στην ανίχνευσή τους στην επιφάνεια της μεμβράνης. Το στύπωμα κατά Western, που διαφορετικά ονομάζεται κι ανοσοστύπωμα, γιατί χρησιμοποιείται αντίσωμα για να ανιχνεύσει ειδικά το αντιγόνο του, εισήχθη από τον Towbin και τους συνεργάτες του το 1979. Μετά την ηλεκτροφόρηση, τα διαχωρισμένα μόρια μεταφέρονται ή στυπώνονται σε δεύτερη επιφάνεια, μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή μια μεμβράνη διφθοριούχου πολυβινυλιδένιου (PVDF). Στη συνέχεια, η μεμβράνη μπλοκάρεται για να αποτραπεί η οποιαδήποτε μη ειδική δέσμευση των αντισωμάτων στην επιφάνεια της μεμβράνης. Το επόμενο βήμα είναι να δοκιμαστούν οι μεταφερθείσες πρωτεΐνες με μίγμα αντισωμάτων, αρχικά με το πρωτογενές αντίσωμα που είναι ειδικό για την πρωτεΐνη-αντιγόνο που μας ενδιαφέρει και μετά με το δευτερογενές που είναι ειδικό για το είδος του ξενιστή του πρωτογενούς αντισώματος κι είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο, που όταν συνδυαστεί με το κατάλληλο υπόστρωμα θα δώσει ανιχνεύσιμο σήμα. Η πιο ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης είναι αυτή που χρησιμοποιεί ένα χημειοφωταγές υπόστρωμα το οποίο όταν αλληλεπιδράσει με το ένζυμο που είναι συζευγμένο με το υπόστρωμα δίνει ως παραπροϊόν φως. Το φως μπορεί να καταγραφεί από όργανα ψηφιακής απεικόνισης που βασίζονται σε κάμερες με διάταξη συζευγμένου φορτίου. Η ένταση του φωτός μπορεί να συσχετιστεί με την αφθονία του αντιγόνου στη μεμβράνη.

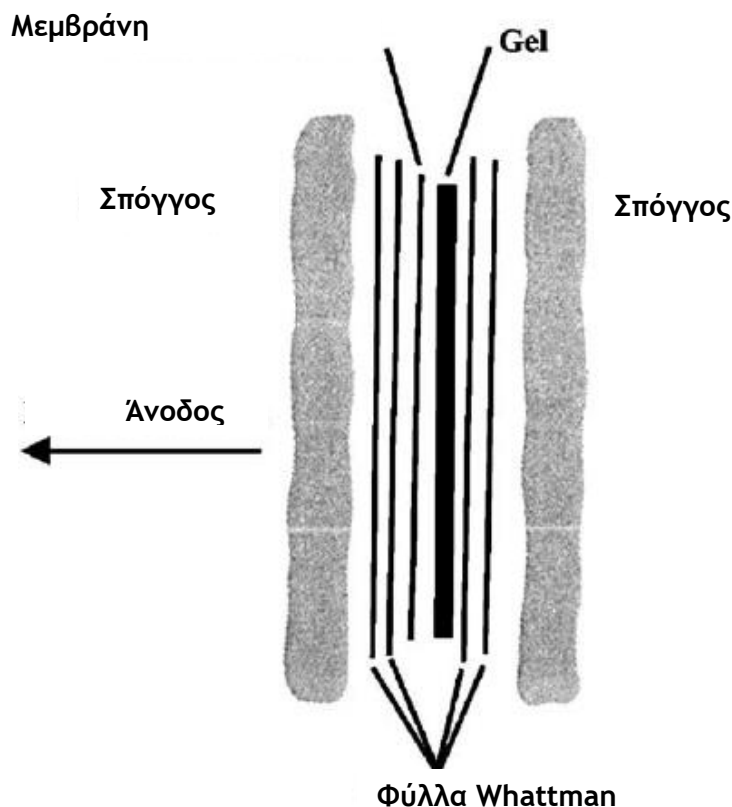
- Μεταφορά πρωτεϊνών στη μεμβράνη:

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel στη μεμβράνη έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μέθοδοι, με πιο κοινή την ηλεκτροεπεξεργασία ή ηλεκτροφορητική μεταφορά λόγω της ταχύτητας και της αποτελεσματικότητας της μεταφοράς. Η ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών συμπεριλαμβάνει την τοποθέτηση ενός gel πολυακρυλαμίδης σε άμεση επαφή με ένα φύλλο νιτροκυτταρίνης κι η δημιουργία «σάντουιτς» μεταξύ δύο ηλεκτροδίων που έχουν βυθιστεί σε άγον διάλυμα. Το «σάντουιτς» περιλαμβάνει σπόγγους και διηθητικό χαρτί Whattman για τη διευκόλυνση της μεταφοράς. Όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο, οι πρωτεΐνες περνούν από το gel στη μεμβράνη, στην επιφάνεια της οποίας προσκολλώνται ισχυρά κι έτσι η μεμβράνη αποτελεί ένα αποτύπωμα του μοτίβου των πρωτεϊνών που ηλεκτροφορήθηκαν στο gel. Τα συστήματα ηλεκτροεπεξεργασίας διακρίνονται στα:

- Ανυδρο
- Ημιάνυδρο και
- Υγρό

Παρότι τα συστήματα a και b είναι ταχύτερα, φαίνεται ότι τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τη βραδύτερη διαδικασία της υγρής ηλεκτροεπεξεργασίας είναι καλύτερα (176).

1. Παρασκευή Transfer Buffer
2. Αφαίρεση gel από το σύστημα της ηλεκτροφόρησης
3. Διάβρεξη όλων των συστατικών των «σάντουιτς» με Transfer Buffer και τοποθέτησή τους κατά την εξής σειρά:
 - Πλαστικό φύλλο κασέτας για συγκράτηση του σάντουιτς
 - Σπόγγος
 - 2 φύλλα Whattman (6,5cm x 9,5cm)
 - Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (6,5cm x 9,5cm)
 - Gel
 - 2 φύλλα Whattman (6,5cm x 9,5cm)
 - Σπόγγος
 - Πλαστικό φύλλο κασέτας για συγκράτηση του σάντουιτς
4. Τοποθέτηση στη συσκευή όπου γίνεται η μεταφορά έτσι ώστε το gel να βρίσκεται από τη πλευρά της καθόδου κι η νιτροκυτταρίνη από την πλευρά της ανόδου
5. Γέμισμα της συσκευής με Transfer Buffer και τοποθέτησή της σε αφρολέξ με πάγο για την αποφυγή της υπερθέρμανσης του συστήματος
6. Σύνδεση με την παροχή ηλεκτρικού ρεύματος όπου έχουν τεθεί οι εξής παράμετροι: 100V και 1h.



https://www.researchgate.net/figure/10879506_fig1_Fig-1-Western-blot-transfer-sandwich-assembly-for-wet-transfer-The-transfer-membrane

Εικόνα Β9: Διάταξη συστήματος για το στάδιο της μεταφοράς

- Μπλοκάρισμα μεμβράνης:

Επειδή η μεμβράνη έχει υψηλή συγγένεια για τις πρωτεΐνες, είναι σημαντικό μετά τη μεταφορά να μπλοκάρουμε την υπόλοιπη επιφάνεια της μεμβράνης για να αποτραπεί η μη ειδική δέσμευση των αντισωμάτων στα επόμενα βήματα. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται για το μπλοκάρισμα πρέπει να βελτιώνει την ευαισθησία της δοκιμασίας μειώνοντας την εμπλοκή του υποβάθρου στο αποτέλεσμα και βελτιώνοντας το λόγο σήματος προς θόρυβο. Κανένας τύπος διαλύματος μπλοκαρίσματος δεν είναι ιδανικός γιατί κάθε ζεύγος αντιγόνου-αντισώματος έχει μοναδικά χαρακτηριστικά .

Μετά από αυτό το βήμα, αλλά κι έπειτα από τις ακόλουθες επώσεις, πραγματοποιούνται εκπλύσεις. Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι η απομάκρυνση εναπομείναντων αντιδραστηρίων και να περιοριστεί το υπόβαθρο, αυξάνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο το λόγο σήματος προς θόρυβο. Τα διαλύματα μπλοκαρίσματος διαθέτουν είτε μόνο κάποιο φυσιολογικό διάλυμα, όπως PBS ή TBS είτε και κάποιο απορρυπαντικό όπως το Tween-20 που βοηθά στην απομάκρυνση του μη ειδικά δεσμευμένου υλικού, ωστόσο είναι επίφοβη η ανάπτυξη μυκήτων σε απορρυπαντικά που έχουν παρασκευαστεί ως αποθέματα (176).

1. Αφαίρεση μεμβρανών νιτροκυτταρίνης από το σύστημα της μεταφοράς

2. Τοποθέτηση των μεμβρανών σε πλαστικά δοχεία όπου έχει εισαχθεί το Blocking buffer με γάλα 5%, 30mL ανά μεμβράνη (Αν διαθέτουμε περισσότερες από μία μεμβράνες, φροντίζουμε ώστε να τοποθετηθούν «πλάτη με πλάτη», δηλαδή έτσι, ώστε η επιφάνεια της μεμβράνης στην οποία έχουν περάσει οι πρωτεΐνες να είναι σε επαφή με το Blocking Buffer κι όχι με την άλλη μεμβράνη)
3. Επώαση υπό ανακίνηση σε shaker σε θερμοκρασία δωματίου για 1h
4. 3 εκπλύσεις με TBS-T διάρκειας 5min η καθεμία

- Επώαση με αντισώματα:

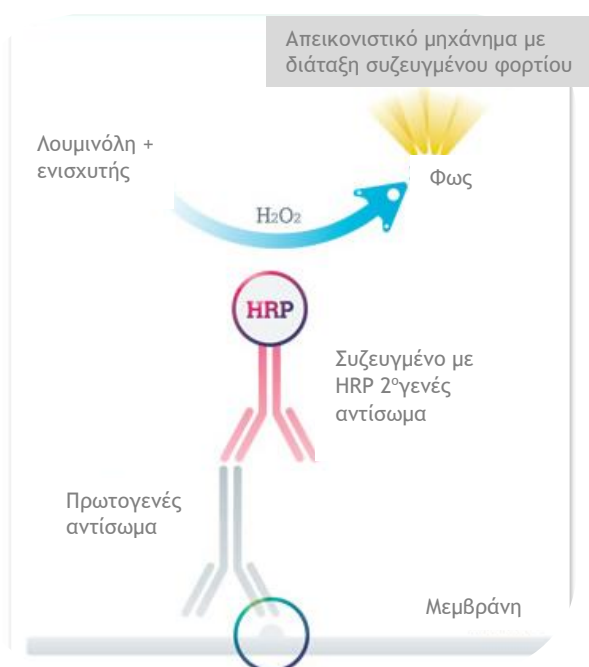
Σ' αυτό το στάδιο, οι μεμβράνες δοκιμάζονται με ένα πρωτογενές αντίσωμα που αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη ή επίτοπο σε μια ομάδα πρωτεϊνών. Η επιλογή των αντισωμάτων γίνεται ανάλογα με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, τα διαθέσιμα στην αγορά αντισώματα και την καταλληλότητα των αντισωμάτων για χρήση στο στύπωμα κατά Western. Επειδή τα πρωτογενή αντισώματα δεν είναι άμεσα ανιχνεύσιμα, η μεμβράνη σε επόμενη φάση επώάζεται και με δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ένζυμο που είναι ειδικό για το είδος των ζώων στο οποίο αναπτύχθηκε το πρωτογενές αντίσωμα. Λόγω του υψηλού κόστους των αντισωμάτων που πωλούνται από τις εταιρείες, τα αντισώματα διαλύονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης του 1l αντισώματος στα 1000l διαλύματος έως και 1:500000. Ακόμα, τα διαλύματα που περιέχουν τα πρωτογενή αντισώματα είναι δυνατό να φυλάσσονται μετά από κάθε χρήση στους -20 °C ώστε να ξαναχρησιμοποιηθούν. Τα πρωτογενή αντισώματα διαλύονται σε μέσο ίδιας συγκέντρωσης με το Blocking Buffer 5% που περιέχει είτε γάλα ή BSA, ενώ τα δευτερογενή αντισώματα διαλύονται σε διάλυμα γάλακτος 2%, ώστε να περιοριστεί και σε αυτή την περίπτωση η ένταση του υποβάθρου (177).

1. Εισαγωγή των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης σε σακουλάκια που περιέχουν το πρωτογενές αντίσωμα κι επώαση για όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight ή 16-18h) σε shaker σε θερμοκρασία 4 °C. Αν υπάρχουν περισσότερες από μία μεμβράνες, ισχύει το σύστημα «πλάτη με πλάτη»
2. Έπειτα από την επώαση, παραλαβή και φύλαξη του πρωτογενούς αντισώματος σε θερμοκρασία -20 °C
3. 3 εκπλύσεις με TBS-T διάρκειας 5min
4. Τοποθέτηση των μεμβρανών σε σακουλάκια με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα κι επώαση για 1h σε shaker σε θερμοκρασία δωματίου
5. Απόρριψη του διαλύματος του δευτερογενούς αντισώματος
6. 3 εκπλύσεις με TBS-T διάρκειας 5min.

- Μέθοδος ανίχνευσης μέσω ηλεκτροπαραγωγικής χημειοφωταύγειας (ECL):

Η μέθοδος ανίχνευσης μέσω ηλεκτροπαραγωγικής χημειοφωταύγειας (ECL), δηλαδή της φωταύγειας που παράγεται κατά τις ηλεκτροχημικές αντιδράσεις σε διαλύματα, χρησιμοποιείται από το 1988. Σ' αυτή το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση χρένου (HRP). Έτσι, αφού δεσμευτεί το αντίσωμα στη μεμβράνη ανιχνεύεται με την αλληλεπίδραση του ενζύμου με κατάλληλο υπόστρωμα που δημιουργεί προϊόν που εκπέμπει φως. Το σήμα χημειοφωταύγειας μπορεί να ανιχνευθεί απεικονίζοντας το στύπωμα σε κάμερα με διάταξη συζευγμένου φορτίου (178). Το διάλυμα που πρόκειται να δώσει την αντίδραση χημειοφωταύγειας αποτελείται από δύο συστατικά διαλύματα, ένα που διαθέτει το υπόστρωμα του ενζύμου, δηλαδή το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), κι ένα που περιέχει τον ενισχυτή του σήματος και λουμινόλη.

Η συσκευή και το αντίστοιχο πρόγραμμα του υπολογιστή που χρησιμοποιούνται είναι το FluorChemTM της Alpha Innotech.



<https://www.crbdiscovery.com/newsletter/MAY.html>

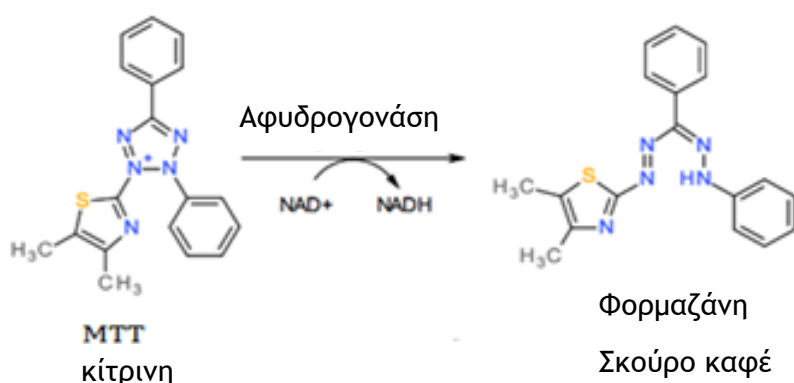
Εικόνα B10: Αντίδραση για παραγωγή χημειοφωταύγειας

1. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε μια βάση
2. Ανάμειξη των δύο αντιδραστηρίων ECL σε eppendorf σε αναλογία 1:1 σε ποσότητα ανάλογη με την επιφάνεια της μεμβράνης και διάβρεξη της μεμβράνης
3. Τοποθέτηση της βάσης στο απεικονιστικό μηχάνημα με την κάμερα με διάταξη συζευγμένων φορτίων
4. Παρατήρηση της διάταξης της μεμβράνης στον Η/Υ κι επιλογή της καταγραφής για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, κατάλληλο για κάθε αντίσωμα
5. Αποθήκευση της απεικόνισης σε μορφή TIFF

- Τα αποτελέσματα πυκνομετρήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος ImageJ.
- Η επεξεργασία των εικόνων έγινε με το πρόγραμμα Photoshop CC.
- Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την εφαρμογή t-test και τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism 6.

B2στ. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT

Η βιωσιμότητα των κυττάρων καθορίζεται συχνά ως ο αριθμός των υγιών κυττάρων σ' ένα δείγμα. Η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT είναι μια χρωματομετρική μέθοδος που βασίζεται στη μεταβολική ικανότητα των κυττάρων να ανάγουν το διαλυτό κίτρινο άλας τετραζολίου 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο βρωμίδιο (MTT) σε αδιάλυτο μπλε προϊόν κρυσταλλικής φορμαζάνης (Mosmann T, 1983). Η ποσότητα της παραγόμενης φορμαζάνης μπορεί να φωτομετρηθεί κι είναι ανάλογη της ποσότητας των βιώσιμων κυττάρων (Filipic M. et al, 2009). Χρησιμοποιείται κυρίως για να καθοριστεί η επίδραση χημικών ρυπαντών ή βιολογικών πρωτεϊνών (Liu Y., 1999; Whitcutt JM., 2005; Paliwal VK. et al, 2010; Wickliffe JK. et al, 2011). Η χρωστική MTT εφαρμόζεται σε κύτταρα που έχουν στρωθεί σε πιάτο με 96 πηγάδια που βρίσκονται στην αυξητική φάση της ανάπτυξής τους, αφού εκτεθούν σε κάποιο φάρμακο.



<http://www.fn-test.com/reagents/mtt-cell-based-proliferation-toxicity-assay-kit/>

Εικόνα B11: Η αντίδραση που αποτελεί τη βάση της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας MTT

1. Έπειτα από τη θρυψινοποίηση, προσμέτρηση των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer
2. Με δεδομένο το γεγονός ότι επιδιώκεται κάθε πηγάδι να διαθέτει 5000 κύτταρα σε συνολικό όγκο ανά πηγάδι 100μL, υπολογισμός όγκου εναιωρήματος που περιέχει τον αριθμό των κυττάρων που επιθυμείται και διάλυση σε θρεπτικό μέσο ώστε να φτάσει στον επιθυμητό τελικό όγκο
3. Στρώσιμο κυττάρων σε πιάτο 96 πηγαδιών
4. Καλλιέργεια κυττάρων για 24h στον κλίβανο

5. Εισαγωγή των προς μελέτη ουσιών στις επιθυμητές συγκεντρώσεις στα πηγάδια, με 3 πηγάδια με την ίδια συγκέντρωση ώστε να ληφθεί ο μέσος όρος των απορροφήσεων και επώαση μιας τριάδας πηγαδιών μόνο με το διαλύτη των μελετώμενων ουσιών και χρήση της ως μάρτυρα
6. Επώαση για 24h με τις ουσίες στον κλίβανο
7. Τέσσερις ώρες πριν την ολοκλήρωση της επώασης προσθήκη 20μL από τη διαλυμένη σε PBS κίτρινη χρωστική MTT σε κάθε πηγάδι κι επώαση για τις επόμενες 4h στον κλίβανο

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ MTT

ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΓΙΑ 10mL

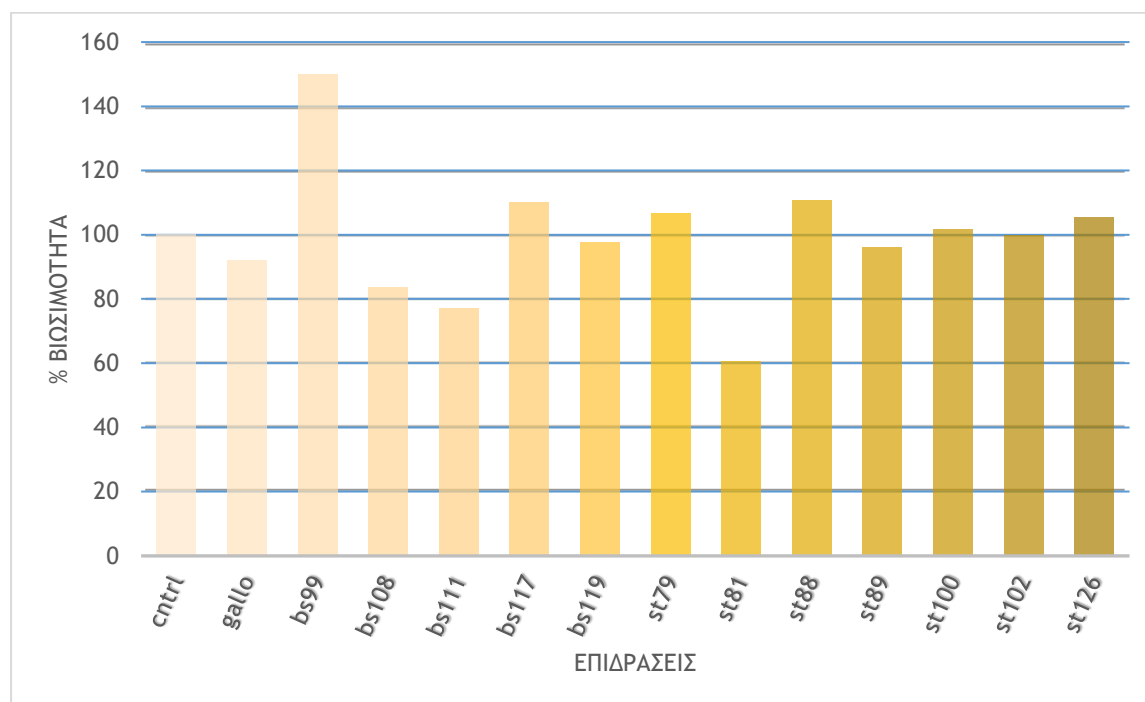
ΧΡΩΣΤΙΚΗ MTT	25mg
ΣΤΕΙΡΟ PBS 1X	10mL

8. Αφαίρεση του πιάτου από τον κλίβανο κι ανατροπή με απότομη κίνηση για την απομάκρυνση των επώασεων και των νεκρών αιωρούμενων κυττάρων
9. Προσθήκη 100μL 0.04% HCl σε ισοπροπανόλη σε κάθε πηγάδι κι ανάδευση του πιάτου
10. Φωτομέτρηση στα 545nm
11. Υπολογισμός της σχετικής επιβίωσης των κυττάρων που έχουν επωαστεί με τις ουσίες προς τα πηγάδια μάρτυρες και καταγραφή της % επιβίωσης

Γ. Αποτελέσματα

Γ1. Έλεγχος αναλόγων για κυτταροτοξική επίδραση

Αρχικά, ελέγξαμε αν οι ουσίες που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν έχουν νευροτοξική δράση με τη δοκιμασία της κυτταροτοξικότητας MTT. Διαπιστώσαμε ότι τα ανάλογα γαλλοκυανίνης που παρήχθησαν δεν είναι νευροτοξικές.



Εικόνα Γ1: Μελέτη της νευροτοξικότητας των χρησιμοποιούμενων ουσιών. Στον άξονα y'γ αναγράφεται η βιωσιμότητα των κυττάρων σε ποσοστό επί τοις εκατό (%) και στον άξονα x'x αναγράφονται οι διαφορετικές ουσίες που παρήχθησαν χρησιμοποιήθηκαν για τις επιδράσεις. Η επίδραση των μελετώμενων ουσιών στην κυτταρική επιβίωση συγκρίνεται με έναν αρνητικό μάρτυρα και με την επίδραση της γαλλοκυανίνης.

Γ2. Έλεγχος επιτυχίας επιμόλυνσης με Dkk1

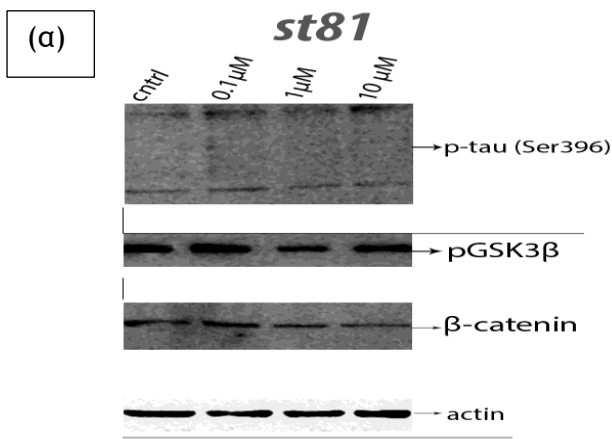
Στη συνέχεια, μετά την καλλιέργεια κυττάρων HEK293 επιμολυσμένων με πλασμίδιο που εκφράζει DKK1 συνελέγη το θρεπτικό ανά 48 ώρες επώασης. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε, ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα και το υπερκείμενο φυλάχθηκε στους -20 °C. Πριν χρησιμοποιηθεί, το θρεπτικό ηλεκτροφορήθηκε και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στύπωμα κατά Western προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία του αναστολέα DKK1 στο θρεπτικό. Για τη σύγκριση ηλεκτροφορήθηκε κι ανοσοστυπώθηκε και θρεπτικό που δεν έχει προέλθει από την επώαση επιμολυσμένων κυττάρων.



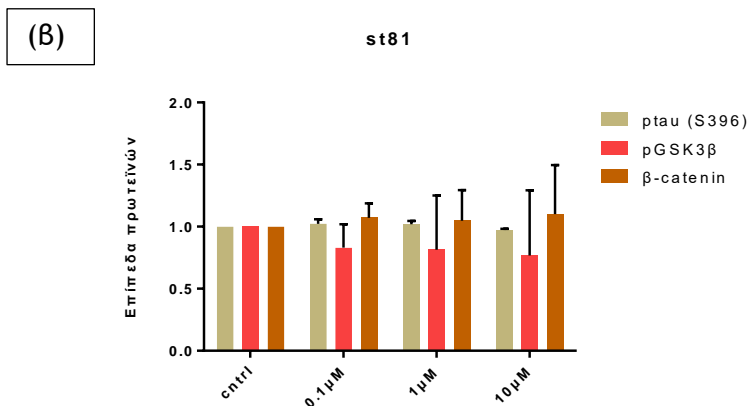
Εικόνα Γ2. Ανοσοστύπωμα κατά Western. Στα αριστερά έχει ηλεκτροφορηθεί θρεπτικό που δεν προέρχεται από επώαση επιμολυσμένων κυττάρων και στα δεξιά θρεπτικό που έχει προέλθει από 48ωρη επώαση κυττάρων επιμολυσμένων με πλασμίδιο που εκφράζει DKK1.

Γ3. Εξέταση δράσης αναλόγων γαλλοκυανίνης απουσία DKK1

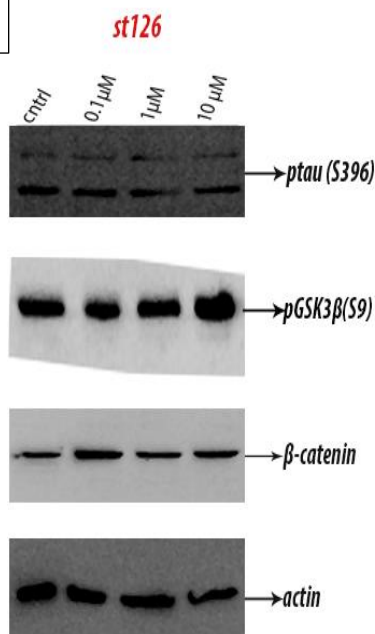
Ακολουθως, ελέγχθησαν τα ανάλογα γαλλοκυανίνης για την επίδραση που έχουν στα επίπεδα των μελετώμενων πρωτεϊνών του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης. Παρακάτω θα παρατεθούν μερικά από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν.



Εικόνα Γ3. (α) Ανοσοστύπωμα κατά Western που αναπαριστά κατά σειρά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 396 πρωτεΐνης tau, της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 9 κινάσης 3β της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3β), της β-κατενίνης και της ακτίνης μετά την επώαση με το ανάλογο st81 σε συγκεντρώσεις 0,1, 1 και 10μM, συγκρινόμενα με τα επίπεδα των πρωτεϊνών άνευ ουσίας (ctrl). (β) Γράφημα που αντιστοιχεί στη στατιστική επεξεργασία 3 επαναλήψεων του πειράματος με το ανάλογο st81. Στον άξονα x'x απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του αναλόγου, στον άξονα y'y τα επίπεδα των πρωτεϊνών και κάθε ράβδος αντιστοιχεί στα επίπεδα έκφρασης μίας πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, όπως καταγράφονται στο υπόμνημα

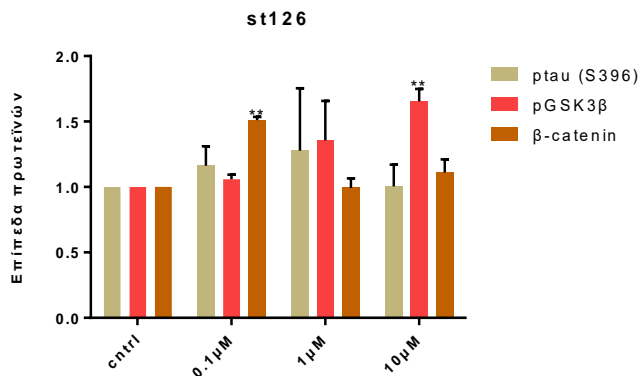


(α)



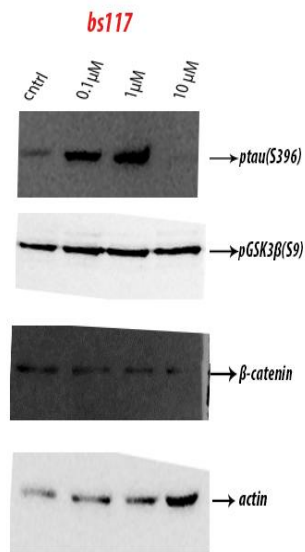
Εικόνα Γ4. (α) Ανοσοστύπωμα κατά Western που αναπαριστά κατά σειρά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 396 πρωτεΐνης tau, της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 9 κινάσης 3β της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3β), της β-κατενίνης και της ακτίνης μετά την επώαση με το ανάλογο st126 σε συγκεντρώσεις 0, 1, 1 και 10 μM, συγκρινόμενα με τα επίπεδα των πρωτεϊνών άνευ ουσίας (ctrl). (β) Γράφημα που αντιστοιχεί στη στατιστική επεξεργασία 3 επαναλήψεων του πειράματος με το ανάλογο st126. Στον άξονα x'x απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του αναλόγου, στον άξονα y'y τα επίπεδα των πρωτεϊνών και κάθε ράβδος αντιστοιχεί στα επίπεδα έκφρασης μίας πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, όπως καταγράφονται στο υπόμνημα.

(β)



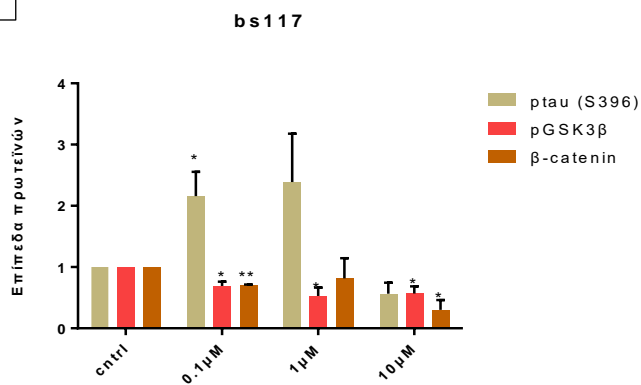
Οι ανωτέρω ουσίες παρουσιάζουν παρόμοιο αποτέλεσμα με τις ουσίες bs99, bs108, bs119, st79, st88, st89 κι st100. Διαφορετικό από τις προηγούμενες κι όμοιο μεταξύ τους αποτέλεσμα παρουσιάζουν τα ανάλογα bs117 κι st102, ενώ για το ανάλογο bs111 δεν υπάρχει σαφής εικόνα όσον αφορά στην επίδρασή του στις μελετώμενες πρωτεΐνες του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης.

(α)



Εικόνα Γ5. (α) Ανοσοστίπωμα κατά Western που αναπαριστά κατά σειρά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 396 πρωτεΐνης tau, της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 9 κινάσης 3β της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3β), της β-κατενίνης και της ακτίνης μετά την επώαση με το ανάλογο bs117 σε συγκεντρώσεις 0,1, 1 και 10μM, συγκρινόμενα με τα επίπεδα των πρωτεϊνών άνευ ουσίας (ctrl). (β) Γράφημα που αντιστοιχεί στη στατιστική επεξεργασία 3 επαναλήψεων του πειράματος με το ανάλογο bs117. Στον άξονα x'x απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του αναλόγου, στον άξονα y'y τα επίπεδα των πρωτεϊνών και κάθε ράβδος αντιστοιχεί στα επίπεδα έκφρασης μίας πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, όπως καταγράφονται στο υπόμνημα

(β)



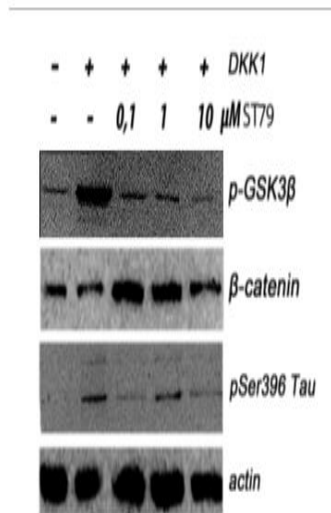
Ανάλογα	Αγωνιστές (G)/Ανταγωνιστές (N) Wnt προσδέτη απουσία Dkk1 (Το «0» δηλώνει ουδέτερη δράση
bs99	0
bs108	0
bs111	N/0/G
bs117	N
bs119	0
st79	0
st81	0
st88	0
st89	0
st100	0
st102	N
st126	G

Πίνακας Γ6: Χαρακτηρισμός των αναλόγων γαλλοκυανίνης όσον αφορά στην επίδρασή τους στα επίπεδα των πρωτεϊνών του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης απουσία DKK1.

Γ4. Μελέτη δράσης αναλόγων γαλλοκυανίνης παρουσία DKK1

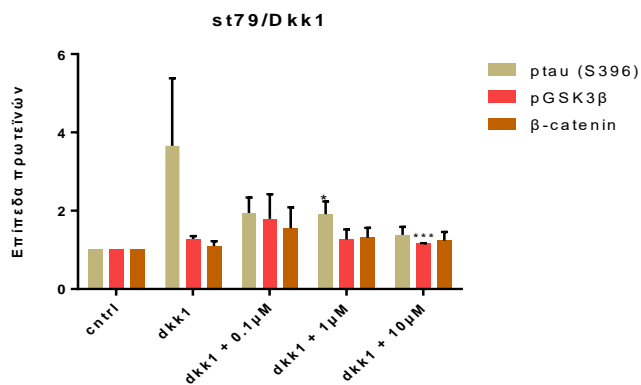
Εφ' όσον διαπιστώθηκε η επίδραση των χορηγούμενων αναλόγων, απουσία του προσδέτη DKK1, το επόμενο βήμα ήταν να ελεγχθεί το αποτέλεσμα της δράσης τους στις πρωτεΐνες του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης παρουσία του αναστολέα DKK1. Γι' αυτό το σκοπό, πραγματοποιήθηκαν συνεπώσεις νευρικών κυττάρων νευροβλαστώματος ποντικού με το θρεπτικό που συλλέχθηκε και στο οποίο διαπιστώθηκε η παρουσία DKK1, σε αναλογία 80% v/v ως προς το συνολικό υλικό επώασης, και κάποιο ανάλογο γαλλοκυανίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις. Παρακάτω, παρατίθενται μερικά χαρακτηριστικά αποτελέσματα.

(α)



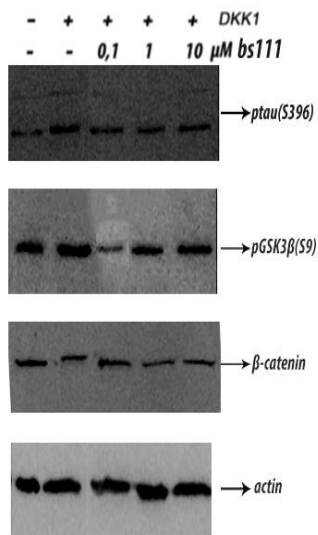
Εικόνα Γ7. (α) Ανοσοστίπωμα κατά Western που αναπαριστά κατά σειρά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 9 κινάσης 3β της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3β), της β-κατενίνης, της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 396 πρωτεΐνης ταυ και της ακτίνης μετά τη συνεπώαση με θρεπτικό με DKK1 και το ανάλογο st79 σε συγκεντρώσεις 0,1, 1 και 10μM, συγκρινόμενα με τα επίπεδα των πρωτεϊνών άνευ ουσίας και παρουσία μόνο θρεπτικού με DKK1. (β) Γράφημα που αντιστοιχεί στη στατιστική επεξεργασία 3 επαναλήψεων του πειράματος με το ανάλογο st79. Στον άξονα x'x απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του αναλόγου, στον άξονα γ'γ τα επίπεδα των πρωτεϊνών και κάθε ράβδος αντιστοιχεί στα επίπεδα έκφρασης μίας πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, όπως καταγράφονται στο υπόμνημα

(β)



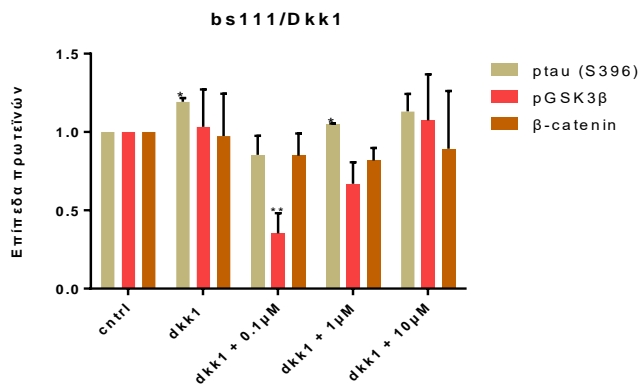
Όμοια αποτελέσματα με την ουσία st79, έχουν τα ανάλογα bs108 κι st81. Επίσης, όμοια μεταξύ τους αποτελέσματα έχουν τα ανάλογα st100, st102, st126 και bs99, ενώ διαφορετική αλλά όμοια μεταξύ τους εικόνα δίνουν και τα ανάλογα bs111, bs117. St88 κι st89. Το ανάλογο bs119 δεν έδωσε σαφή ένδειξη όσον αφορά στην επίδρασή του.

(α)

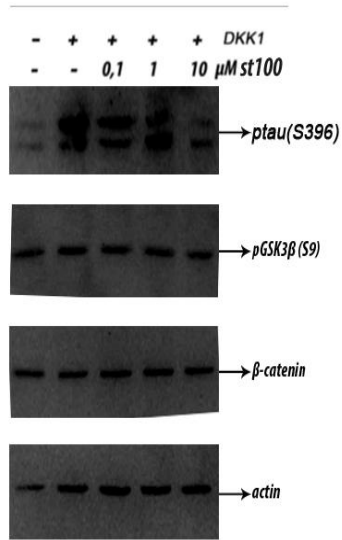


Εικόνα Γ9. (α) Ανοσοστύπωμα κατά Western που αναπαριστά κατά σειρά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 396 πρωτεΐνης tau, της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 9 κινάσης 3β της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3β), της β-κατενίνης και της ακτίνης μετά τη συνεπώαση με θρεπτικό με DKK1 και το ανάλογο bs111 σε συγκεντρώσεις 0,1, 1 και 10μM, συγκρινόμενα με τα επίπεδα των πρωτεϊνών άνευ ουσίας και παρουσία μόνο θρεπτικού με DKK1. (β) Γράφημα που αντιστοιχεί στη στατιστική επεξεργασία 3 επαναλήψεων του πειράματος με το ανάλογο bs111. Στον άξονα x'x απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του αναλόγου, στον άξονα y'y τα επίπεδα των πρωτεϊνών και κάθε ράβδος αντιστοιχεί στα επίπεδα έκφρασης μίας πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, όπως καταγράφονται στο υπόμνημα.

(β)

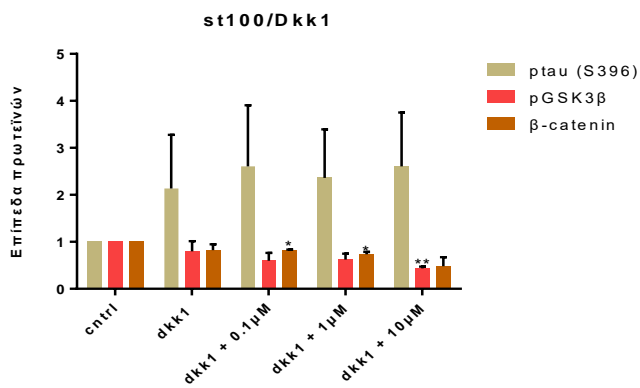


(α)



Εικόνα Γ8. (α) Ανοσοστύπωμα κατά Western που αναπαριστά κατά σειρά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 396 πρωτεΐνης tau, της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 9 κινάσης 3β της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3β), της β-κατενίνης και της ακτίνης μετά τη συνεπέωση με θρεπτικό με DKK1 και το ανάλογο st100 σε συγκεντρώσεις 0,1, 1 και 10μM, συγκρινόμενα με τα επίπεδα των πρωτεϊνών άνευ ουσίας και παρουσία μόνο θρεπτικού με DKK1. (β) Γράφημα που αντιστοιχεί στη στατιστική επεξεργασία 3 επαναλήψεων του πειράματος με το ανάλογο st100. Στον άξονα x'x απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του αναλόγου, στον άξονα y'y τα επίπεδα των πρωτεϊνών και κάθε ράβδος αντιστοιχεί στα επίπεδα έκφρασης μίας πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, όπως καταγράφονται στο υπόμνημα

(β)



Ανάλογα	Αναστολή (A)/Ενίσχυση (E) δράσης DKK1 (Το "0" δηλώνει ουδέτερη δράση)
bs99	E
bs108	A
bs111	0
bs117	0
bs119	A/0
st79	A
st81	A
st88	0
st89	0
st100	E
st102	E
st126	E

Πίνακας Γ10: Χαρακτηρισμός των αναλόγων γαλλοκυανίνης όσον αφορά στην επίδρασή τους στα επίπεδα των πρωτεϊνών του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης παρουσία DKK1.

Δ. Συζήτηση

Δ1. Τα ανάλογα γαλλοκυανίνης δεν έχουν κυτταροτοξική δράση

Προτού χρησιμοποιηθούν τα ανάλογα γαλλοκυανίνης που παρασκευάστηκαν, θα ήταν απαραίτητο να ελεγχθεί η πιθανότητα κυτταροτοξικής δράσης τους. Γι' αυτό το λόγο διεξήχθη η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT για τη μέγιστη συγκέντρωση των αναλόγων που επρόκειτο να χορηγηθεί στα κύτταρα. Όπως κατέστη σαφές από το ραβδόγραμμα (*Εικόνα Γ1*), στο οποίο ο μάρτυρας, που αντιστοιχεί σε κύτταρα που έχουν επωαστεί μόνο με το διαλύτη που χρησιμοποιείται για τη διάλυση των αναλόγων, δηλαδή DMSO, παρουσιάζει 100% βιωσιμότητα, οι περισσότερες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω πειράματα εγγυώνται βιωσιμότητα παρόμοια μ' αυτή του μάρτυρα. Το ανάλογο bs99 φαίνεται μάλιστα ότι είναι ικανό να ενισχύσει τη βιωσιμότητα των κυττάρων στα οποία εισέρχεται. Η ουσία που εμφάνισε τη μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα απέναντι στα νευρικά κύτταρα N2A είναι το ανάλογο st81 που οδήγησε σε θάνατο περίπου το 40% των κυττάρων. Το DMSO ως ωσμωλύτης όταν παρασχεθεί σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 1% v/v αυξάνει σημαντικά την ωσμωμοριακότητα του κυτταροδιαλύματος με αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του κυττάρου κι επακόλουθες επιπτώσεις στο μεταβολισμό και στη σηματοδότηση των κυττάρων (*Haussinger D. et al, 1998*). Επομένως, θα ήταν πρόπον να χρησιμοποιηθούν χαμηλότερες συγκεντρώσεις και να ελεγχθεί η επίδραση αυτού

καθ' αυτού του διαλύτη στα κύτταρα. Από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας MTT κρίνουμε ότι μπορούμε να συνεχίσουμε ασφαλώς την πειραματική μας διαδικασία –ίσως με κάποια επιφύλαξη για το ανάλογο st81- ώστε να εξάγουμε συμπεράσματα για την πιθανή επίδραση των αναλόγων στο μονοπάτι Wnt σηματοδότησης.

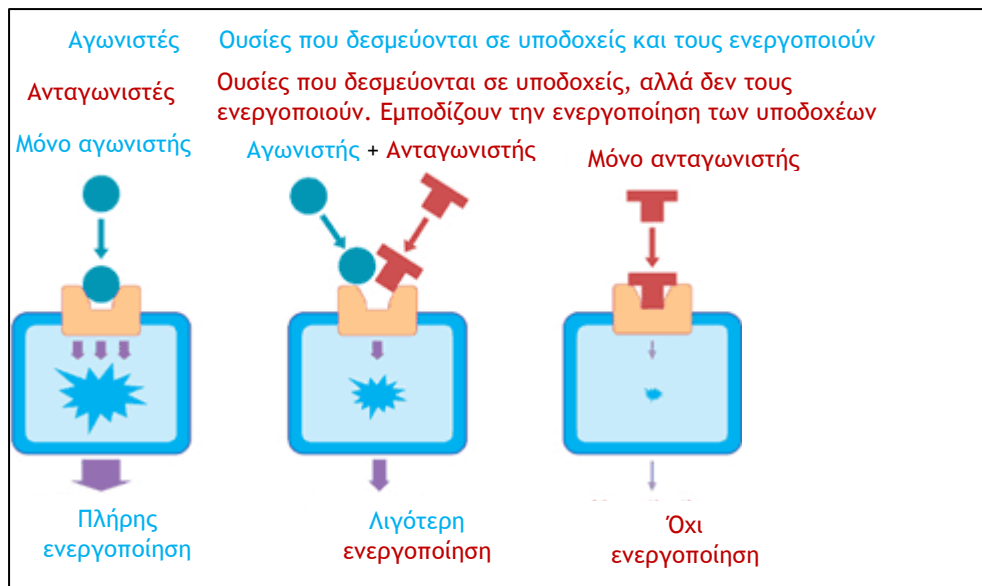
42. Το θρεπτικό που συνελέγη από τα επιμολυσμένα κύτταρα διαθέτει DKK1

Μετά από επιτυχή επιμόλυνση κυττάρων HEK293 με πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο έκφρασης του DKK1 και καλλιέργεια των κυττάρων, συνελέγη το θρεπτικό με το οποίο επωάζονταν οι καλλιέργειες ανά 48 ώρες. Επιβεβαιώθηκε ότι όντως είχε εκκριθεί ο αναστολέας στο εξωκυττάριο περιβάλλον κι επομένως στο θρεπτικό μέσο, με ανοσοστύπωμα κατά Western (*Εικόνα Γ2*). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό με τα ίδια συστατικά, που όμως δεν προερχόταν από την επώαση των προαναφερθέντων κυττάρων.

Το θρεπτικό αυτό χρησιμοποιήθηκε σε επόμενο βήμα για να προσομοιαστούν τεχνητά σε ένα βαθμό οι συνθήκες που επικρατούν σε ορισμένες περιπτώσεις Alzheimer's ή και εγκεφαλικής ισχαιμίας, οπότε έχει διαπιστωθεί ότι επάγεται η έκφραση την πρωτεΐνης DICKKOPF-1 κι ο συνεντοπισμός της με νευροϊνδιακά δεμάτια και δυστροφικούς νευρίτες (*Nicoletti F. et al, 2004; Caricasole A. et al, 2006*).

43. Τα περισσότερα ανάλογα γαλλοκυανίνης δεν μεταβάλλουν τα επίπεδα των πρωτεϊνών του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης απουσία DKK1

Πριν ελέγξουμε το αποτέλεσμα της συνεπώασης των αναλόγων γαλλοκυανίνης και του θρεπτικού με DKK1, ήταν σκόπιμο να διαπιστώσουμε την επίδραση των αναλόγων γαλλοκυανίνης απουσία DKK1. Τα ανάλογα γαλλοκυανίνης που παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν χαρακτηρίζονται ως «αγωνιστές» κι «ανταγωνιστές». Στη φαρμακολογία αυτοί οι όροι αποδίδονται σε προσδέτες ή φάρμακα που προσδένονται σε κάποιον υποδοχέα και μεσολαβούν τη θεραπευτική απόκριση ενεργοποιώντας ή απενεργοποιώντας κάποιο μονοπάτι. «Αγωνιστές» ονομάζονται οι ουσίες που ενεργοποιούν τους υποδοχείς για να παράγουν την επιθυμητή δράση κι «ανταγωνιστές» οι ουσίες που εμποδίζουν τη δράση του αγωνιστή προσδεδεμένες στον υποδοχέα (187). Ωστόσο, δεν έχουν όλα τα μελετώμενα ανάλογα δράση αγωνιστή ή ανταγωνιστή. Πολλές ουσίες εμφάνισαν ουδέτερη δράση, μην επηρεάζοντας τα επίπεδα των μελετώμενων πρωτεϊνών σε σημαντικό βαθμό.



Εικόνα Δ1: Δράση αγωνιστών κι ανταγωνιστών

Έτσι, όπως παραστάθηκε και στον πίνακα Γ6, οι ουσίες bs99, bs108 bs119, st79, st81, st88, st89 κι st100 έχουν ουδέτερη επίδραση στο μονοπάτι Wnt σηματοδότησης, δηλαδή δε φαίνεται να τροποποιούν σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα των μελετώμενων πρωτεϊνών του μονοπατιού.

Αντίθετα, οι ουσίες bs117 κι st102 φαίνεται πως δρουν ως ανταγωνιστές για τον υποδοχέα Frizzled και το συνυποδοχέα LRP6. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 9 κινάσης 3β της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3β), που οδηγεί σε μείωση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της β-κατενίνης και σε αύξηση της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 396 πρωτεΐνης tau. Αν λάβουμε υπ' όψιν τη δομή των αναλόγων bs117 κι st102, παρατηρούμε ότι τα δύο υποκατάστατα της γαλλοκυανίνης διαθέτουν μια ίδια υποκατάσταση στο Η της υδροξυλομάδας του C4, ενώ και στα δύο ανάλογα είναι παρόν το υδροχλωρικό οξύ. Επειδή υπάρχουν πολλά ανάλογα που διαθέτουν την ίδια υποκατάσταση στη συγκεκριμένη θέση, μάλλον ρόλο-κλειδί παίζει το οξύ στο χαρακτηρισμό των ανωτέρω αναλόγων ως ανταγωνιστών. Υπάρχει μόνο ένα ακόμη ανάλογο που συνυπάρχει με HCl, το bs119, το οποίο δε φαίνεται να επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα των μελετώμενων πρωτεϊνών του μονοπατιού. Δεν μπορεί να παραβλεφθεί όμως και το γεγονός ότι το ανάλογο bs108 χαρακτηρίζεται από τις ίδιες αντικαταστάσεις με το ανάλογο bs117, με μόνη διαφορά την παρουσία HCl στη δομή του δεύτερου, διαφορά που δίνει τελικά διαφορετικές ιδιότητες στα ανάλογα. Επομένως, είναι πολύ πιθανό το γεγονός ότι η παρουσία του HCl καθιστά τα ανάλογα ως αρνητικούς ρυθμιστές του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης.

Το ανάλογο st126 φαίνεται να παρουσιάζει δράση αγωνιστή, απουσία DKK1. Επομένως, θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι η παρουσία δύο ογκώδων υποκαταστατών σε παρακείμενες θέσεις, αλλά και τρίτης υποκατάστασης με μικρή αλειφατική ένωση, θα μπορούσε να καθιστά ικανό το μόριο να προκαλέσει αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτά του φυσικού προσδέτη, δηλαδή του WNT.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση του αναλόγου bs111, το οποίο θα χαρακτηριζόταν ως ανταγωνιστής, αν λαμβάναμε υπ' όψιν μόνο τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης tau, ως ουσία με ουδέτερη επίδραση, αν λαμβάναμε υπ' όψιν μόνο τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης GSK3β κι ως αγωνιστής, αν λαμβάναμε υπ' όψιν μόνο τα επίπεδα της β-κατενίνης. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να επισημαίνει ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες που μελετώνται δε ρυθμίζονται μόνο από το μονοπάτι Wnt σηματοδότησης κι έτσι αν το ανάλογο μπορεί να δεσμευτεί και σε κάποιον άλλον υποδοχέα που είναι μέρος ενός άλλου μονοπατιού μεταγωγής σήματος ενεργοποιώντας ή απενεργοποιώντας τον, τότε είναι εφικτό να επηρεάζει κατά διαφορετικό από τον αναμενόμενο τρόπο τα επίπεδα των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος. Ωστόσο, βάσει στατιστικής σημαντικότητας θα τείναμε να χαρακτηρίσουμε το ανάλογο ως ανταγωνιστή.

Δ4. Παρουσία του αναστολέα DKK1, η επίδραση των αναλόγων γαλλοκυανίνης στα επίπεδα των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης ποικίλλει

Προκειμένου να μελετήσουμε την πιθανή επίδραση των αναλόγων γαλλοκυανίνης στα επίπεδα των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν, όταν στο περιβάλλον του κυττάρου είναι παρόντα κι ο αναστολέας DKK1 και κάποιο ανάλογο, πραγματοποιήθηκε συνεπώαση νευρικών κυττάρων νευροβλαστώματος ποντικού N2A με θρεπτικό με DKK1, σε αναλογία 80% v/v ως προς το συνολικό υλικό επώασης, και κάποιο ανάλογο σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, μέχρι 10μM. Τα αποτελέσματα των συνεπώασεων συγκρίθηκαν με κύτταρα-μάρτυρες, τα οποία δεν είχαν υποστεί καμμία επώαση και με κύτταρα που είχαν επωαστεί μόνο με θρεπτικό με DKK1 σε αναλογία 80% v/v ως προς το συνολικό υλικό επώασης, ώστε να δειχθεί το αποτέλεσμα της παρουσίας DKK1 στο περιβάλλον του κυττάρου. Όπως είναι γνωστό, η DKK1 δρα ανασταλτικά για το μονοπάτι Wnt σηματοδότησης, επομένως, αναμενόταν η μείωση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης ανενεργού GSK3β κι ακολούθως η αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau κι η μείωση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της β-κατενίνης, όταν τα κύτταρα επώαστηκαν μόνο με θρεπτικό με DKK1.

Μ' αυτόν τον τρόπο, προσπαθήσαμε να διαπιστώσουμε ποιος από τους δύο προσδέτες έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τον υποδοχέα Frizzled και το συνυποδοχέα LRP6. Η έννοια της συγγένειας αφορά στην ικανότητα του προσδέτη να σχηματίζει συντονισμένους δεσμούς με τον υποδοχέα. Ένας προσδέτης που χαρακτηρίζεται από υψηλή συγγένεια είναι ικανός σε σχετικά μικρή συγκέντρωση να καταλαμβάνει το μέγιστο της επιφάνειας πρόσδεσης του υποδοχέα επάγοντας ή όχι κάποια απόκριση, ενώ ένας προσδέτης χαμηλής συγγένειας θα πρέπει να βρίσκεται σε σχετικά υψηλή συγκέντρωση για να καταλάβει το μέγιστο της επιφάνειας και να επάγει ή όχι απόκριση (188). Οι προσδέτες μπορεί να δρουν ανταγωνιστικά ή μη. Οι ανταγωνιστικοί ανταγωνιστές (competitive antagonists) είναι ουσίες που δεσμεύονται αντιστρεπτά σε υποδοχείς στην ίδια θέση με το φυσικό προσδέτη του υποδοχέα ή με τον ανταγωνιστή και το ποσοστό της ενεργοποίησης του υποδοχέα εξαρτάται από τη

σχετική συγγένεια των μορίων και τη σχετική συγκέντρωσή τους (Swinney DC, 2004). Οι μη ανταγωνιστικοί ανταγωνιστές διακρίνονται σε αυτούς που δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα μη αντιστρεπτά, σε αυτούς που δεσμεύονται σε κάποια αλλοστερική θέση του υποδοχέα, δηλαδή σε περιοχή διαφορετική απ' αυτή στην οποία δεσμεύεται ο φυσικός προσδέτης ή ο αγωνιστής (non-competitive antagonists) και σε αυτούς που δεσμεύονται σε αλλοστερική θέση, αλλά αφού ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας από την πρόσδεση αγωνιστή, π.χ. μεμαντίνη (uncompetitive antagonist) (Armstrong A.W. et al, 2008; Danysz W. et al, 2007). Όταν, λοιπόν, προστεθούν αυτές οι επώσεις στα κύτταρα, θα υπάρχουν τρεις πιθανοί προσδέτες που θα κληθούν να «ανταγωνιστούν» για μια θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα Frizzled και το συνυποδοχέα LRP6:

- ✚ ο Wnt3a, ο φυσικός προσδέτης που δεσμεύεται στο σύμπλοκο του υποδοχέα κι ενεργοποιεί το μονοπάτι Wnt σηματοδότησης
- ✚ ο DKK1, ο αναστολέας που αποδεδειγμένα προσδένεται σε θέση του συνυποδοχέα που εμποδίζει τη συμπλοκοποίησή του με τον υποδοχέα κι απενεργοποιεί το μονοπάτι σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στην Alzheimer's και
- ✚ κάποιο ανάλογο γαλλοκυανίνης, που ελέγχεται αν έχει την ίδια επίδραση με τη γαλλοκυανίνη, η οποία έχει δείχθει ότι εμποδίζει την αλληλεπίδραση DKK1 και συνυποδοχέα ή αν επηρεάζει μέσω διαφορετικών αλληλεπιδράσεων τα επίπεδα των πρωτεϊνών του μονοπατιού που μελετώνται.

Όπως αποτυπώνεται και στον Πίνακα Γ10, μόλις τρεις από τις εξετασθείσες ουσίες φαίνεται ότι έχουν την ικανότητα να αντιστρέψουν την επίδραση του DKK1 στα επίπεδα των μελετώμενων πρωτεϊνών του μονοπατιού, δρώντας ως αναστολείς του αναστολέα DKK1. Αυτό σημαίνει ότι τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ανενεργού GSK3β αυξάνονται, με αποτέλεσμα να μειώνονται και τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης tau και να αυξάνονται τα επίπεδα της β-κατενίνης. Οι ουσίες αυτές είναι οι bs108, st79 κι st81. Τα τρία αυτά ανάλογα διαφέρουν από τη γαλλοκυανίνη κατά μία μικρή αλειφατική αλυσίδα που έχει υποκαταστήσει το Η της καρβοξυλομάδας του C1, το bs108 με ένα αιθύλιο και τα st79 κι st81 με ένα μεθύλιο. Το st79 και το st81 διαθέτουν ακόμα έναν ογκώδη υποκαταστάτη που περιέχει αρωματικό δακτύλιο στο Η του επόμενου άνθρακα του μορίου, του C2. Το bs108 έχει επίσης ογκώδη υποκαταστάτη, αλλά σε διαφορετική θέση, στο Η της υδροξυλομάδας του C4. Επομένως, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι μια μικρή αλειφατική αλυσίδα ως υποκαταστάτης στο Η της καρβοξυλομάδας του C1 και μια ογκώδης διακλάδωση σε κάποια παρακείμενη θέση του μορίου είναι υποκαταστάσεις που ευνοούν τη δραστηριότητα και τη συγγένεια των αναλόγων γαλλοκυανίνης, ώστε να δράσουν ως επαγωγείς για το σύμπλοκο των υποδοχέων του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης. Αξίζει να σημειωθεί επίσης, ότι οι προαναφερθείσες ουσίες είχαν ουδέτερη δράση όταν χορηγήθηκαν απουσία DKK1.

Παρόμοια δομή με τα ανάλογα st79 κι st81 έχει το st126, με τη διαφορά ότι διαθέτει μία ακόμη ογκώδη υποκατάσταση στο Η της υδροξυλομάδας του C4 με τριμελή δακτύλιο. Ωστόσο, αυτό το ανάλογο φαίνεται να έχει δράση αναστολέα ως προς το σχηματισμό του συμπλόκου των υποδοχέων που μελετώνται. Όμως, αξίζει να αναφερθεί ότι απουσία του αναστολέα DKK1, το συγκεκριμένο ανάλογο είχε δράση

αγωνιστή. Συνεπώς, θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι η παρουσία δύο ογκώδων υποκαταστατών σε παρακείμενες θέσεις δεν καθιστά κατάλληλο το ανάλογο για να δράσει ως αναστολέας του αναστολέα DKK1 και να αντιστρέψει την επίδρασή του, αν κι απουσία του φαίνεται να δρα «ευεργετικά» για το μονοπάτι.

Όπως προαναφέρθηκε το ανάλογο bs108 έχει πανομοιότυπη δομή με αυτή του αναλόγου bs117 με τη διαφορά ότι στο δεύτερο είναι παρόν το HCl, γεγονός στο οποίο πιθανώς να οφείλεται η δράση του ως ανταγωνιστή απουσία DKK1. Ωστόσο, τα δύο ανάλογα δεν αποδίδουν την ίδια εικόνα, όταν συνυπάρχουν με DKK1. Ενώ, όμως θα αναμενόταν το bs117 να εξακολουθεί να αναστέλλει το μονοπάτι και παρουσία DKK1, φαίνεται ότι παρουσιάζει ουδέτερη δράση, μην επηρεάζοντας τα επίπεδα των πρωτεϊνών και διατηρώντας τα στα επίπεδα που είχαν στα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με DKK1. Άρα, πιθανώς, παρουσία DKK1 να περιορίζεται η «αρνητική» επίδραση που ασκεί το HCl στη δραστηριότητα των αναλόγων ως αγωνιστών.

Τα άλλα δύο ανάλογα στα οποία είναι παρόν το HCl είναι το bs119 και το st102. Το bs119 ήταν το μοναδικό ανάλογο από τα τρία που συνυπάρχουν με HCl που επέδειξε ουδέτερη δράση απουσία DKK1. Παρουσία DKK1 αυτό το ανάλογο έχει από ουδέτερη επίδραση μέχρι ενισχυτική δράση για το μονοπάτι, καταδεικνύοντας ξανά ότι περιορίζεται η πιθανή δράση του HCl ως αναστολέα της σηματοδότησης. Όσον αφορά στο ανάλογο st102, αυτό διατηρεί τη δράση του ως ανταγωνιστή, αλλά πιθανώς αυτό να μην οφείλεται στην παρουσία HCl, αλλά στο φαινόμενο ότι η παρουσία σε παρακείμενες θέσεις ογκώδων υποκαταστατών δεν ευνοεί την αναστολή του DKK1 από τα ανάλογα.

Αν, λοιπόν, κατατάσσαμε όσα ανάλογα χαρακτηρίστηκαν ως αναστολείς του DKK1 και συμπεριλαμβάνοντας το αμφιβόλου δράσης bs119, σχετικά με την ικανότητά τους να αναστρέφουν τα αποτελέσματα του DKK1 κι επομένως την καταλληλότητά τους για φαρμακευτική χρήση, θα έπρεπε να λάβουμε υπ' όψιν το βαθμό στον οποίο είναι ικανά να περιορίσουν τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης tau, της πρωτεΐνης που είναι ικανή να οδηγήσει σε παθολογικά φαινόμενα. Στον παρακάτω πίνακα, φαίνονται τα ποσοστά μείωσης των επιπέδων της προαναφερθείσας πρωτεΐνης για τις διάφορες συγκεντρώσεις των υποσχόμενων αναλόγων:

Ανάλογα	Συγκέντρωση	% Μείωση κατά μέσο όρο των επιπέδων της ptau
<i>bs108</i>	0,1μM	41,4
	1μM	28,5
	10μM	54,9
<i>(bs119)</i>	0,1μM	58,2
	1μM	16,4
	10μM	30
<i>st79</i>	0,1μM	46,9
	1μM	47,7
	10μM	62,3
<i>st81</i>	0,1μM	29,6
	1μM	30,2
	10μM	42,4

Όπως γίνεται αντιληπτό, το μέγιστο ποσοστό μείωσης επιτυγχάνεται κατά την επώαση των κυττάρων με 10μΜ από το ανάλογο st79. Ωστόσο, η δραστηριότητα των φαρμάκων έγκειται στην ελάχιστη ποσότητα που μπορεί να επιφέρει το βέλτιστο αποτέλεσμα (*Christopoulos A. et al, 2003*). Επομένως, για την ελάχιστη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση το ανάλογο με τη βέλτιστη μείωση είναι το bs119. Αλλά επειδή αμφισβητείται το αν δρα με ουδέτερο τρόπο ή ως αναστολέας, θα στραφούμε στο st79 που έχει την ικανότητα να μειώνει σχεδόν στο μισό τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης tau και πιθανώς να περιορίζει το σχηματισμό νευροϊνδιακών δεματίων. Επόμενο σε φθίνουσα σειρά δραστηριότητας είναι το bs108 και τελευταίο το st81.

Τα ανάλογα bs111, st88 κι st89 εμφανίζουν ουδέτερη επίδραση στα επίπεδα των μελετώμενων πρωτεϊνών του μονοπατιού Wnt σηματοδότησης παράλληλα με την επίδραση του αναστολέα DKK1. Φαίνεται ότι η υποκατάσταση περισσότερων του ενός H σε διαφορετικές θέσεις ταυτόχρονα με μικρές αλειφατικές αλυσίδες, όπως στο st88, δεν ευνοεί τη δράση των αναλόγων ως αναστολέων, όπως φαίνεται κι από το γεγονός ότι το ανάλογο st100 που έχει παρόμοια δομή με το st88 εμφανίζει δράση ενισχυτή του DKK1 στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε. Όμοια, το ανάλογο bs99 διαφέρει μόνο κατά μία μεθυλομάδα από το bs111, ωστόσο το bs99 παρουσιάζει δράση ενισχυτή του DKK1. Το bs111 μόνο στη χαμηλότερη συγκέντρωση φαίνεται να έχει δράση ενισχυτή. Τα υπάρχοντα δεδομένα δεν μπορούν να εξηγήσουν πώς η διαφορά που εντοπίζεται μεταξύ των δύο αναλόγων στις παραπάνω περιπτώσεις οδηγεί το ένα στο να έχει ουδέτερη επίδραση και το άλλο στο να ενισχύει τη δράση του DKK1 στα επίπεδα των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος. Πιθανώς ακόμα και μια μεθυλομάδα να είναι σημαντική για τις ιδιότητες των υποκατεστημένων αναλόγων.

Συνοψίζοντας, θα μπορούσαμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι τα ανάλογα που θα μπορούσαν να αναπτυχθούν για περαιτέρω φαρμακευτική χρήση θα ήταν καλό να υποκατασταθούν ως εξής:

- ❖ Στο H της καρβοξυλομάδας του C1, να προστεθεί μια μικρού μήκους αλειφατική αλυσίδα
- ❖ Στο H του C2, να εισαχθεί κάποιος ογκώδης υποκαταστάτης ή να μη γίνει υποκατάσταση αν υποκατασταθεί το H της υδροξυλομάδας του C4
- ❖ Στο H της υδροξυλομάδας, να μη γίνει υποκατάσταση αν υποκατασταθεί το H του C2 ή να προστεθεί ένας ογκώδης υποκαταστάτης
- ❖ Στα H των μεθυλίων της αμινομάδας του C7, να μη γίνει υποκατάσταση

Ε. Μελλοντικοί στόχοι

Στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας, αλλά και κάθε ερευνητικού έργου είναι η βαθύτερη κατανόηση των βιολογικών συστημάτων, ώστε να μπορέσουν να βρεθούν λύσεις σε προβλήματα και θεραπείες σε ασθένειες που πλήττουν ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού. Έτσι, ιδανικά θα επιδιώκαμε τα αποτελέσματα αυτά να δώσουν έναυσμα για τη στοχευμένη σύνθεση ουσιών κατάλληλων για φαρμακευτική χρήση που θα είναι ικανές να περιορίζουν την παθοφυσιολογία της νόσου Alzheimer's και να ανακουφίζουν τους ασθενείς από μερικά συμπτώματα. Ωστόσο, ακόμα κι αν παραχθούν οι ουσίες που περιορίζουν στο βέλτιστο βαθμό την παθοφυσιολογία σε κυτταρικό επίπεδο, αυτό δεν αρκεί για να θεωρηθεί μια ουσία υποψήφια για χορήγηση ως φάρμακο. Αφού, λοιπόν, εξασφαλιστεί ότι οι υποσχόμενες ουσίες είναι σταθερά μόρια, που μπορούν να συντεθούν εύκολα και να εξελιχθούν, που παρουσιάζουν επιλεκτικά υψηλή συγγένεια για το συγκεκριμένο υποδοχέα-στόχο και που έχουν επιλεκτική λειτουργική δραστηριότητα στα μελετώμενα στοιχεία του κυττάρου, θα πρέπει να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητά τους σε μοντέλα κατάλληλα επιλεγμένων ζώων, η βιοδιαθεσιμότητα, η βιοκατανομή κι ο χρόνος ημιζωής για να δράσουν επαρκώς στον οργανισμό, αλλά κι η πιθανή τοξικότητά τους σε άλλους ιστούς, όπως η καρδιά και σε άλλα οργανίδια, όπως στα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 στα μιτοχόνδρια (Hefti F.F., 2008).

ΣΤ. Αναφορές και βιβλιογραφία:

1. <http://www.alz.org/facts/> (28-7-17)
2. <http://www.ucl.ac.uk/news/news-articles/0717/200717-dementia-lancet-commission> (28-7-17)
3. <http://www.naftemporiki.gr/story/1251276/ekstra-teia-enimerosis-prolipsis-gia-tin-anoia-apo-tin-apostoli> (28-7-17)
4. Maurer K, Volk S, Gerbaldo H, Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet* 1997; 349: 1546-1549
5. http://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp (29-7-17)
6. <http://www.nhs.uk/conditions/Alzheimers-disease/Pages/Introduction.aspx> (29-7-17)
7. Haapasalo A, Pikkarainen M, Soininen H (2015) Alzheimer's disease: a report from the 7th Kuopio Alzheimer symposium. *Neurodegener Dis Manag* 5(5):379–382. doi:10.2217/nmt.15.31
8. Sridhar GR, Lakshmi G, Nagamani G. Emerging links between Type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *World J. Diabetes* 6(5), 744–751 (2015)
9. Verdile G, Fuller SJ, Martins RN. The role of Type 2 diabetes in neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* doi:10.1016/j.nbd.2015.04.008 (2015)
10. Claassen JA. New cardiovascular targets to prevent late onset Alzheimer disease. *Eur. J. Pharmacol.* doi:10.1016/j.ejphar.2015.05.022 (2015)
11. Abdel Moneim, Ahmed E. "Oxidant/Antioxidant Imbalance and the Risk of Alzheimer's Disease." *Current Alzheimer Research* 12.4 (2015): 335–349. PMC. Web. 30 June 2017
12. <http://www.ucl.ac.uk/news/news-articles/0717/200717-dementia-lancet-commission> (29-7-2017)
13. Simpkins, J. W., Perez, E., Wang, X., Yang, S., Wen, Y., & Singh, M. (2009). The Potential for Estrogens in Preventing Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 2(1), 31–49. <http://doi.org/10.1177/1756285608100427>
14. Hartley, D., Blumenthal, T., Carrillo, M., DiPaolo, G., Esralew, L., Gardiner, K., ... Wisniewski, T. (2015). Down syndrome and Alzheimer's disease: Common pathways, common goals. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 11(6), 700–709. <http://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.10.007>
15. Wilcock DM, Griffin WS. Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis. *J Neuroinflammation*. 2013;10:84
16. Lai F, Williams RS. A prospective study of Alzheimer's disease in Down syndrome. *Arch Neurol*. 1989;46:849–53
17. Wisniewski K, Wisniewski H, Wen G. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol*. 1985;17:278–82
18. Mann DM. The pathological association between Down syndrome and Alzheimer disease. *Mech Ageing Dev*. 1988;43:99–136
19. Wang BP, et al. The amyloid precursor protein controls adult hippocampal neurogenesis through GABAergic interneurons. *J. Neurosci*. 2014;34:13314–13325
20. Nicolas M, Hassan BA. Amyloid precursor protein and neural development. *Development*. 2014;141:2543–2548
21. Liu F, et al. Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *FASEB J*. 2008;22:3224–3233
22. Querfurth H.W., LaFerla F.M. Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med*. 2010;362(4):329–344.
23. Cruts M., Van Broeckhoven C. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Ann. Med*. 1998;30(6):560–565
24. Ittner LM, Gotz J. Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12:65–72
25. Hutton M, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 1998;393:702–5
26. Poorkaj P, et al. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol*. 1998;43:815–25
27. Spillantini MG, Crowther RA, Kamphorst W, Heutink P, van Swieten JC. Tau pathology in two Dutch families with mutations in the

- microtubule-binding region of tau. *Am J Pathol.* 1998;153:1359–63
28. Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem.* 2009;284:12845–52
 29. Fulga TA, et al. Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol.* 2007;9:139–48
 30. DuBoff B, Gotz J, Feany MB. Tau promotes neurodegeneration via DRP1 mislocalization in vivo. *Neuron.* 2012;75:618–32
 31. https://www.alz.org/braintour/healthy_vs alzheimers.asp
 32. Tolppanen A.M., Taipale H., Koponen M., Lavikainen P., Tanskanen A., Tiihonen J., et al. Use of existing data sources in clinical epidemiology: Finnish health care registers in Alzheimer's disease research - the Medication use among persons with Alzheimer's disease (MEDALZ-2005) study. *Clin. Epidemiol.* 2013;5:277–285
 33. <http://articles.mercola.com/sites/articles/archive/2013/10/10/stress-alzheimers-disease.aspx> (30-7-17)
 34. Abdel Moneim A.E. Citrus peel extract attenuates acute cyanide poisoning-induced seizures and oxidative stress in rats. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2014;13(4):638–646
 35. El-Khadragy M.F., Al-Olayan E.M., Abdel Moneim A.E. Neuroprotective effects of Citrus reticulata in scopolamine-induced dementia oxidative stress in rats. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2014;13(4):684–690
 36. Rogawski M.A., Wenk G.L. The Neuropharmacological Basis for the Use of Memantine in the Treatment of Alzheimer's Disease. *CNS Drug Rev.* 2003;9(3):275–308
 37. Delrieu J, Piau A, Caillaud C, Voisin T, Vellas B: Managing cognitive dysfunction through the continuum of Alzheimer's disease: role of pharmacotherapy. *CNS Drugs* 2011;25:213-226
 38. Rosenmann H, Grigoriadis N, Karussis D, Boimel M, Touloumi O, Ovadia H, Abramsky O: Tauopathy-like abnormalities and neurologic deficits in mice immunized with neuronal tau protein. *Arch Neurol* 2006;63:1459-1467
 39. Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM: Immunotherapy targeting pathological tau prevents cognitive decline in a new tangle mouse model. *J Neurosci* 2010;30:16559-16566.
 40. Chai X, Wu S, Murray TK, Kinley R, Cella CV, Sims H, Buckner N, Hanmer J, Davies P, O'Neill MJ, Hutton ML, Citron M: Passive immunization with anti-Tau antibodies in two transgenic models: reduction of Tau pathology and delay of disease progression. *J Biol Chem* 2011;286:34457-34467
 41. <http://www.haniotika-nea.gr/lisis-se-provlimata-pou-schetizonte-me-to-alzheimer-ke-tin-ind-iposchonte-nees-technologies/>
 42. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975;72(5):1858–1862
 43. Mareck A, Fellous A, Francon J, Nunez J. Changes in composition and activity of microtubule-associated proteins during brain development. *Nature.* 1980;284(5754):353–355
 44. Francon J, Fellous A, Lennon AM, Nunez J. Requirement for 'factor(s)' for tubulin assembly during brain development. *Eur J Biochem.* 1978;85(1):43–53
 45. Rodríguez-Martín, T., Cuchillo-Ibáñez, I., Noble, W., Nyenya, F., Anderton, B. H., & Hanger, D. P. (2013). Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation. *Neurobiology of Aging*, 34(9), 2146–2157. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.015>
 46. Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA: Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J* 1989, 8:393 e399
 47. Brandt R., Leger J., Lee G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J. Cell Biol.* 1995;131:1327–1340
 48. Gauthier-Kemper A., Weissmann C., Golovyashkina N., Sebo-Lemke Z., Drewes G., Gerke V., Heinisch J.J., Brandt R. The frontotemporal dementia mutation R406W blocks tau's interaction with the membrane in an annexin A2-dependent manner. *J. Cell Biol.* 2011;192:647–661
 49. Pooler A.M., Usardi A., Evans C.J., Philpott K.L., Noble W., Hanger D.P. Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation. *Neurobiol. Aging.* 2012;33:431–438
 50. Sultan A, Nessler F, Violet M, Bégard S, Loyens A, et al. (2011) Nuclear Tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem* 286: 4566–4575

51. Sjöberg MK, Hestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E (2006) Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci* 119: 2025–2034
52. Loomis PA, Howard TH, Castleberry RP, Binder LI (1990) Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 13: 8422–8426
53. Wang Y, Loomis PA, Zinkowski RP, Binder LI (1993) A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau. *J Cell Biol* 121: 257–267
54. Brady RM, Zinkowski RP, Binder LI (1995) Presence of Tau in Isolated Nuclei from Human Brain. *Neurobiol Aging* 16: 479–486
55. Papasozomenos SCh (1995) Nuclear Tau immunoreactivity in presenile dementia with motor neuron disease: a case report. *Clin Neuropath* 14: 100–104
56. Lambert MP, Sabo S, Zhang C, Enam SA, Klein WL (1995) Constitutive Alzheimer's-type tau epitopes in a neuritogenic rat CNS cell line. *Neurobiol Aging* 16: 583–589
57. Thurston VC, Pena P, Pestell R, Binder LI (1996) Nucleolar localization of the microtubule-associated protein tau in neuroblastomas using sense and anti-sense transfection strategies. *Cell Motil Cytoskeleton* 38: 100–110
58. Thurston VC, Zinkowski RP, Binder LI (1996) Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo. *Chromosoma* 105: 20–30
59. Cross DC, Muñoz JP, Hernández P, Maccioni RB (2000) Nuclear and cytoplasmic Tau proteins from human nonneuronal cells share common structural and functional features with brain Tau. *J Cell Biochem* 78: 305–317
60. Rossi G, Dalprà L, Crosti F, Lissoni S, Sciacca FL, et al. (2008) A new function of microtubule-associated protein tau. *Cell cycle* 7: 1788–1794
61. Papasozomenos SC, Su Y (1991) Altered phosphorylation of tau protein in heat-shocked rats and patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4543–4547
62. D.W. Cleveland, S.Y. Hwo, M.W. Kirschner Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly *J. Mol. Biol.*, 116 (1977), pp. 227-247
63. Lindwall G, Cole RD. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem.* 1984;259(8):5301–5305
64. Bramblett G.T., Goedert M., Jakes R., Merrick S.E., Trojanowski J.Q., Lee V.M. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron.* 1993;10:1089–1099
65. Busciglio J., Lorenzo A., Yeh J., Yankner B.A. beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron.* 1995;14:879–888
66. Iqbal K, Grundke-Iqbal I: Developing pharmacological therapies for Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* 2007, 64:2234 e2244
67. Avila J: The tau code. *Front Aging Neurosci* 2009, 1:1
68. Gustke N, Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Meyer HE, Goedert M, Mandelkow E: The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. *FEBS Lett* 1992, 307:199 e205
69. Camero, S., Benítez, M. J., Cuadros, R., Hernández, F., Ávila, J., & Jiménez, J. S. (2014). Thermodynamics of the Interaction between Alzheimer's Disease Related Tau Protein and DNA. *PLoS ONE*, 9(8), e104690. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0104690>
70. Orr, M. E., Garbarino, V. R., Salinas, A., & Buffenstein, R. (2015). Sustained high levels of neuroprotective, high molecular weight, phosphorylated tau in the longest-lived rodent. *Neurobiology of Aging*, 36(3), 1496–1504. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.12.004>
71. Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin ML, Grognet P, Bombois S, Blum D, Delacourte A, Pasquier F, Vanmechelen E, Schraen-Maschke S, Buée L: Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics* 2008; 5:207–24
72. Ballatore C., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007;8:663–672
73. Gallo J.M., Noble W., Martin T.R. RNA and protein-dependent mechanisms in tauopathies: consequences for therapeutic strategies. *Cell Mol. Life Sci.* 2007;64:1701–1714
74. Harrington C.R., Mukaetova-Ladinska E.B., Hills R., Edwards P.C., Montejo de Garcini E., Novak M., Wischik C.M. Measurement of distinct immunochemical presentations of tau protein in Alzheimer disease. *PNAS.* 1991;88:5842–5846. doi: 10.1073/pnas.88.13.5842

75. Holtzman D.M., Morris J.C., Goate A.M. Alzheimer's disease: the challenge of the second century, *Sci. Transl. Med.*, 2011, vol.3pg. 77sr71
76. Chauhan NB, Siegel GJ, Feinstein DL: Propentofylline attenuates tau hyperphosphorylation in Alzheimer's Swedish mutant model Tg2576. *Neuropharmacology* 2005, 48:93 e104
77. Avila J., Leon-Espinosa G., Garcia E., Garcia-Escudero V., Hernandez F., Defelipe J. Tau phosphorylation by GSK3 in different conditions. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2012;2012:578373
78. Hanger D.P., Byers H.L., Wray S., Leung K.Y., Saxton M.J., Seereeram A., Reynolds C.H., Ward M.A., Anderton B.H. Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 2007;282:23645–23654
79. Hanger D.P., Anderton B.H., Noble W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol. Med.* 2009;15:112–119
80. Drubin D.G., Kirschner M.W. Tau protein function in living cells. *J. Cell Biol.* 1986;103:2739–2746. doi: 10.1083/jcb.103.6.2739
81. Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* 2009;118(1):53–69
82. Dolan, P. J., & Johnson, G. V. (2010). The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 13(5), 595–603
83. Bertrand J, Plouffe V, Senechal P, Leclerc N. The pattern of human tau phosphorylation is the result of priming and feedback events in primary hippocampal neurons. *Neuroscience.* 2010;168(2):323–334
84. Wischik C.M., Lai R.Y.K., Harrington C.R. Modelling prion-like processing of tau protein in Alzheimer's disease for pharmaceutical development. In: Avila J., Brandt R., Kosik K.S., editors. *Brain Microtubule Associated Proteins: Modifications in Disease*. Harwood Academic Publishers; Amsterdam, The Netherlands: 1997. pp. 185–241
85. Chatterjee S, Sang TK, Lawless GM, Jackson GR. Dissociation of tau toxicity and phosphorylation: Role of GSK-3 β , MARK and Cdk5 in a *Drosophila* model. *Hum Mol Genet.* 2009;18(1):164–177
86. Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretzschmar, H., & Del Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathologica*, 112(4), 389–404. <http://doi.org/10.1007/s00401-006-0127-z>
87. Mukaetova-Ladinska E.B., Garcia-Sierra F., Hurt J., Gertz H.J., Xuereb J.H., Hills R., Brayne C., Huppert F.A., Paykel E.S., McGee M., et al. Staging of cytoskeletal and b-amyloid changes in human isocortex reveals biphasic synaptic protein response during progression of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 2000;157:623–636. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64573-7
88. Lai, R. Y. K., Harrington, C. R., & Wischik, C. M. (2016). Absence of a Role for Phosphorylation in the Tau Pathology of Alzheimer's Disease. *Biomolecules*, 6(2), 19. <http://doi.org/10.3390/biom6020019>
89. Braak H., Del Tredici K. The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol.* 2011;121:171–181. doi: 10.1007/s00401-010-0789-4
90. Braak H., Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82:239–259. doi: 10.1007/BF00308809
91. Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buée L, Watzet A, Vermersch P, Ghzali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C: The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 1999; 52:1158–65
92. Duyckaerts C, Hauw JJ: Diagnosis and staging of Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18:S33–42
93. Grober E, Dickson D, Sliwinski MJ, Buschke H, Katz M, Crystal H, Lipton RB: Memory and mental status correlates of modified Braak staging. *Neurobiol Aging* 1999; 20:573–9
94. Pigino G, Morfini G, Pelsman A, Mattson MP, Brady ST, Busciglio J. Alzheimer's presenilin 1 mutations impair kinesin-based axonal transport. *J Neurosci.* 2003;23:4499–4508
95. Rui Y, Tiwari P, Xie Z, Zheng JQ. Acute impairment of mitochondrial trafficking by beta-amyloid peptides in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2006;26:10480–10487
96. Thies E, Mandelkow EM. Missorting of tau in neurons causes degeneration of synapses that can be rescued by the kinase MARK2/Par-1. *J Neurosci.* 2007;27:2896–2907

97. Morel M, Authelet M, Dedecker R, Brion JP. Glycogen synthase kinase-3 β and the p25 activator of cyclin dependent kinase 5 increase pausing of mitochondria in neurons. *Neuroscience*. 2010;167(4):1044–1056
98. Lovas, J. R., & Wang, X. (2013). The Meaning of Mitochondrial Movement to a Neuron's Life. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(1), 184–194. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.007>
99. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 1982;216(4542):136–144
100. Cohen FE, Prusiner SB. Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:793–819
101. Legname G, et al. Synthetic mammalian prions. *Science*. 2004;305(5684):673–676
102. Frost B., Jacks R.L., Diamond M.I. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J. Biol. Chem*. 2009;284:12845–12852. doi: 10.1074/jbc.M808759200
103. Sharma RP, Chopra VL. Effect of the wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1976; 48: 461–465
104. Angers S., Moon R. T. (2009) Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 10:468–477
105. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 767–779
106. Zhou, L., & Liu, Y. (2015). Wnt/ β -catenin signalling and podocyte dysfunction in proteinuric kidney disease. *Nature Reviews. Nephrology*, 11(9), 535–545
107. MacDonald B. T., Tamai K., He X.(2009) Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17:9–26
108. Tolwinski N. S., Wieschaus E.(2004) Rethinking WNT signaling. *Trends Genet*. 20:177–181
- 109.
110. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012;149:1192–1205
111. Ring A, Kim YM, Kahn M. Wnt/catenin signaling in adult stem cell physiology and disease. *Stem Cell Rev* 2014; 10: 512–525
112. Fortress AM, Frick KM. Hippocampal Wnt signaling: memory regulation and hormone interactions. *Neuroscientist* 2015; Feb 25. pii: 1073858415574728. [Epub ahead of print]
113. Sherwood V. WNT signaling: an emerging mediator of cancer cell metabolism? *Mol Cell Biol* 2015; 35: 2–10
114. Willert K., Brown J. D., Danenberg E., Duncan A. W., Weissman I. L., Reya T., Yates J. R. 3rd., Nusse R.(2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423:448–452
115. Logan C. Y., Nusse R.(2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 20:781–810 Port F., Basler K.(2010) Wnt trafficking: new insights into Wnt maturation, secretion and spreading. *Traffic* 11:1265–1271
116. Banziger C., Soldini D., Schutt C., Zipperlen P., Hausmann G., Basler K.(2006) Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* 125:509–522
117. Takada R., Satomi Y., Kurata T., Ueno N., Norioka S., Kondoh H., Takao T., Takada S.(2006) Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev. Cell* 11:791–801
118. Lu CC, Robertson EJ, Brennan J. The mouse frizzled 8 receptor is expressed in anterior organizer tissues. *Gene Expr Patterns*. 2004;4:569–572
119. Kemp CR, Willems E, Wawrzak D, Hendrickx M, Agbor Agbor T, Leyns L. Expression of Frizzled5, Frizzled7, and Frizzled10 during early mouse development and interactions with canonical Wnt signaling. *Dev Dyn*. 2007;236:2011–2019
120. Wang, Y., Chang, H., Rattner, A., & Nathans, J. (2016). Frizzled Receptors in Development and Disease. *Current Topics in Developmental Biology*, 117, 113–139. <http://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.11.028>
121. Brown S. D., Twells R. C., Hey P. J., Cox R. D., Levy E. R., Soderman A. R., Metzker M. L., Caskey C. T., Todd J. A., Hess J. F. (1998) Isolation and characterization of LRP6, a novel member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 248:879–888
122. Hey P. J., Twells R. C., Phillips M. S., Yusuke N., Brown S. D., Kawaguchi Y., Cox R., Guochun X., Dugan V., Hammond H., (1998) Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family. *Gene* 216:103–111
123. Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor

- phosphorylation and activation. *Nature*. 2005;438:873–877
124. Davidson G, Shen J, Huang Y-L, Su Y, Karaulanov E, Bartscherer K, Hassler C, Stanek P, Boutros M, Niehrs C. Cell cycle control of wnt receptor activation. *Dev Cell*. 2009;17:788–799
 125. Chen, Q., Su, Y., Wesslowski, J., Hagemann, A. I., Ramialison, M., Wittbrodt, J., ... Davidson, G. (2014). Tyrosine phosphorylation of LRP6 by Src and Fer inhibits Wnt/ β -catenin signalling. *EMBO Reports*, 15(12), 1254–1267. <http://doi.org/10.15252/embr.201439644>
 126. Kishida S., Yamamoto H., Hino S., Ikeda S., Kishida M., Kikuchi A. (1999) DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate β -catenin stability. *Mol. Cell. Biol.* 19:4414–4422
 127. Smalley M. J., Sara E., Paterson H., Naylor S., Cook D., Jayatilake H., Fryer L. G., Hutchinson L., Fry M. J., Dale T. C. (1999) Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF dependent transcription. *EMBO J.* 18:2823–2835
 128. Bilic J., Huang Y. L., Davidson G., Zimmermann T., Cruciat C. M., Bienz M., Niehrs C.(2007) Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 316:1619–1622
 129. Schwarz-Romond T., Metcalfe C., Bienz M. (2007) Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J. Cell Sci.* 120:2402–2412
 130. Zeng X., Huang H., Tamai K., Zhang X., Harada Y., Yokota C., Almeida K., Wang J., Doble B., Woodgett J., (2008) Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135:367–375
 131. W.H. Stoothoff, C.D. Bailey, K. Mi, S.C. Lin, G.V. Johnson Axin negatively affects tau phosphorylation by glycogen synthase kinase 3 β *J. Neurochem.*, 83 (2002), pp. 904-913
 132. Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett*. 1992;147:58–62
 133. Mandelkow EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vandenheede JR, Mandelkow E. Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett*. 1992;314:315–321
 134. Lovestone S, Reynolds CH, Latimer D, Davis DR, Anderton BH, Gallo JM, Hanger D, Mulot S, Marquardt B, Stabel S, Woodgett JR, Miller CCJ. Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol*. 1994;4:1077–1086
 135. Hong M, Chen DC, Klein PS, Lee VM. Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem*. 1997;272:25326–25332
 136. Cho JH, Johnson GVW. Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *J Neurochem*. 2004;88:349–358
 137. William H. Stoothoff, Gail V.W. Johnson, Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Volume 1739, Issue 2, 2005, Pages 280-297, ISSN 0925-4439, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.06.017>
 138. R.S. Jope, G.V. Johnson The glamour and gloom of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) *Trends Biol. Sci.*, 29 (2004), pp. 95-102
 139. Gumbiner B., Stevenson B., Grimaldi A. (1988) The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J. Cell Biol.* 107:1575–1587
 140. Brembeck F. H., Rosario M., Birchmeier W. (2006) Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16:51–59
 141. Thibeault S., Ratureau Y., Oubaha M., Faubert D., Wilkes B. C., Delisle C., Gratton J. P. (2010) S-nitrosylation of β -catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Mol. Cell* 39:468–476
 142. Baum B., Georgiou M. (2011) Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J. Cell Biol.* 192:907–917
 143. Wu X., Tu X., Joeng K. S., Hilton M. J., Williams D. A., Long F. (2008) Rac1 activation controls nuclear localization of β -catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 133:340–353

144. Kim W., Kim M., Jho E.H. (2013) Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem. J.* 450, 9–21
145. Hay-Koren A., Caspi M., Zilberberg A., Rosin-Arbesfeld R. (2011) The EDD E3 ubiquitin ligase ubiquitinates and up-regulates β -catenin. *Mol. Biol. Cell* 22:399–411
146. Taelman V. F., Dobrowolski R., Plouhinec J-L., Fuentealba L. C., Vorwald P. P., Gumper I., Sabatini D. D., De Robertis E. M. (2010). Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* 143, 1136–1148
10.1016/j.cell.2010.11.034
147. Li V. S. W., Ng S. S., Boersema P. J., Low T. Y., Karthaus W. R., Gerlach J. P., Mohammed S., Heck A. J. R., Maurice M. M., Mahmoudi T. et al. (2012). Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 149, 1245–1256
10.1016/j.cell.2012.05.002
148. Vinyoles M., Del Valle-Pérez B., Curto J., Viñas-Castells R., Alba-Castellón L., García de Herreros A., Duñach M. (2014). Multivesicular GSK3 sequestration upon Wnt signaling is controlled by p120-catenin/cadherin interaction with LRP5/6. *Mol. Cell* 53, 444–457
10.1016/j.molcel.2013.12.010
149. Y. Kawano, R. Kypta, Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 2627–2634
150. Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A., Aaronson, S. A. (2001) Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* 3, 683–686
151. B.K. Brott, S.Y. Sokol, Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins, *Mol. Cell Biol.* 22 (2002) 6100–6110.
152. Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene.* 2006;25:7469–7481
153. Caricasole A, Copani A, Caraci F, Aronica E, Rozemuller AJ, Caruso A, et al. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J Neurosci.* 2004;24:6021–6027
154. Purro S.A., Dickins E.M., Salinas P.C. The secreted Wnt antagonist Dickkopf-1 is required for amyloid β -mediated synaptic loss. *J. Neurosci.* 2012;32:3492–3498
155. Rosi M.C., Luccarini I., Grossi C., et al. Increased Dickkopf-1 expression in transgenic mouse models of neurodegenerative disease. *J. Neurochem.* 2010;112:1539–1551
156. Zenzmaier C., Marksteiner J., Kiefer A., et al. Dkk-3 is elevated in CSF and plasma of Alzheimer's disease patients. *J. Neurochem.* 2009;110:653–661
157. Seib D.R., Corsini N.S., Ellwanger K., et al. Loss of Dickkopf-1 restores neurogenesis in old age and counteracts cognitive decline. *Cell Stem Cell.* 2013;12:204–214
158. Cappuccio I., Calderone A., Busceti C. L., et al. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is required for the development of ischemic neuronal death. *Journal of Neuroscience.* 2005;25(10):2647–2657. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5230-04.2005
159. Scali C., Caraci F., Gianfriddo M., et al. Inhibition of Wnt signaling, modulation of Tau phosphorylation and induction of neuronal cell death by DKK1. *Neurobiology of Disease.* 2006;24(2):254–265. doi: 10.1016/j.nbd.2006.06.016
160. Wang, J., Shou, J., Chen, X. (2000) Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene* 19, 1843–1848
161. Yang, G., Zhang, G., Pittelkow, M. R., Ramoni, M., Tsao, H. (2006) Expression profiling of UVB response in melanocytes identifies a set of p53-target genes. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2490–2506
162. Matrisciano F, Busceti CL, Bucci D, Orlando R, Caruso A, Molinaro G, Cappuccio I, Riozzi B, Gradini R, Motolese M, Caraci F, Copani A, Scaccianoce S, Melchiorri D, Bruno V, Battaglia G, Nicoletti F. Induction of the Wnt antagonist Dickkopf-1 is involved in stress-induced hippocampal damage. *PLoS One.* 2011;6(1):e16447
163. H. Glantschnig, R.A. Hampton, P. Lu, J.Z. Zhao, S. Vitelli, L. Huang, P. Haytko, T. Cusick, C. Ireland, S.W. Jarantow, R. Ernst, N. Wei, P. Nantermet, K.R. Scott, J.E. Fisher, F. Talamo, L. Orsatti, A.A. Reszka, P. Sandhu, D. Kimmel, O. Flores, W. Strohl, Z. An, F. Wang, Generation and selection of novel fully human monoclonal antibodies that neutralize Dickkopf-1 (DKK1) inhibitory function in vitro and increase bone mass in vivo, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 40135e40147
164. Glantschnig H., Scott K., Hampton R., et al. A rate-limiting role for Dickkopf-1 in bone

- formation and the remediation of bone loss in mouse and primate models of postmenopausal osteoporosis by an experimental therapeutic antibody. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011;338(2):568–569. doi: 10.1124/jpet.111.181404
165. Mpousis, Spyros & Thysiadis, Savvas & Avramidis, Nikolaos & Katsamakos, Sotirios & Efthimiopoulos, Spiros & Sarli, Vasiliki. (2015). Synthesis and Evaluation of Galloxyanine Dyes as Potential Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease and Related Neurodegenerative Tauopathies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 108. . 10.1016/j.ejmech.2015.11.024
166. <http://www.hek293.com/> (02-08-17)
167. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/89121404?lang=en®ion=GR> (02-08-17)
168. <https://isxys.blogspot.com/2014/08/dmso-dimethyl-sulfoxide.html> (5-8-17)
169. Wu D., Zhang Y., Liu P., et al. Compositions and methods for bone formation and remodeling. US Patent application 2005/0196349 A1
170. Iozzi, S., Remelli, R., Lelli, B., Diamanti, D., Pileri, S., Bracci, L., ... Bernocco, S. (2012). Functional Characterization of a Small-Molecule Inhibitor of the DKK1-LRP6 Interaction. *ISRN Molecular Biology*, 2012, 823875. <http://doi.org/10.5402/2012/823875>
171. "Cell Culture". Retrieved 2006-04-19
172. Thermo Scientific Pierce Cell Lysis Technical Handbook (PDF) (2 ed.). Thermo Scientific
173. <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-cell-lysis-and-protein-extraction.html> (4-8-17)
174. <https://advansta.com/wikis/preparing-samples-for-western-blot-analysis-protein-quantification/>
175. He, F. (2011) Bradford Protein Assay. *Bio-protocol* Bio 101: e45
176. <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-western-blotting.html>
177. http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/c_h07s03.html
178. [http://www.abcam.com/ps/products/133/ab133406/documents/ab133406%20Optiblot%20ECL%20Detect%20Kit%20\(Web\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/133/ab133406/documents/ab133406%20Optiblot%20ECL%20Detect%20Kit%20(Web).pdf)
179. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55–63. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
180. Zegura B, Heath E, Cernosa A, Filipic M. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere*. 2009;75:1453–1460. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.041>
181. Whitcutt JM. The Weaver human cell test for water quality. *S Afr J Sci*.2005;101:383–388
182. Wang S, Yu H, Wickliffe JK. Limitation of the MTT and XTT assays for
183. measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicol In Vitro*. 2011;25:2147–2151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.07.007>
184. Liu Y. Understanding the biological activity of amyloid protein in vitro: From inhibited cellular MTT reduction to altered cellular cholesterol homeostasis. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat*. 1999;23:377–395. [http://dx.doi.org/10.1016/S0278-5846\(99\)00003-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-5846(99)00003-2)
185. Verma A, Prasad KN, Singh AK, Nyati KK, Gupta RK, Paliwal VK. Evaluation of the MTT lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of neurocysticercosis. *J Microbiol Meth*. 2010;81:175–178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.001>
186. Lang, F & Busch, G.L. & Ritter, Markus & Völkl, H & Waldegger, S & Gulbins, Erich & Häussinger, D. (1998). Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanisms. *Physiological reviews*. 78. 247-306.
187. <https://www.omicsonline.org/scholarly/receptor-agonist-antagonist-journals-articles-ppts-list.php>
188. <http://chemistry.tutorvista.com/inorganic-chemistry/binding-affinity.html>
189. Swinney DC (September 2004). "Biochemical mechanisms of drug action: what does it take for success?". *Nature Reviews. Drug*

- Discovery. 3 (9): 801–8. PMID 15340390. doi:10.1038/nrd1500.
190. David E. Golan, ed.-in-chief ; Armen H. Tashjian, Jr., deputy ed. ; Ehrin J. Armstrong, April W. Armstrong, associate (2008). Principles of pharmacology : the pathophysiologic basis of drug therapy (2nd ed.). Philadelphia, Pa., [etc.]: Lippincott Williams & Wilkins. p. 25. ISBN 978-0-7817-8355-2. Retrieved 2012-02-05
191. Parsons CG, Stöffler A, Danysz W (November 2007). "Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse". *Neuropharmacology*. 53 (6): 699–723. PMID 17904591. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.07.013
192. Neubig, RR; Spedding, M; Kenakin, T; Christopoulos, A; International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug, Classification (December 2003). "International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology.". *Pharmacological reviews*. 55 (4): 597–606. PMID 14657418. doi:10.1124/pr.55.4.4
193. Hefti, F. F. (2008). Requirements for a lead compound to become a clinical candidate. *BMC Neuroscience*, 9(Suppl 3), S7. <http://doi.org/10.1186/1471-2202-9-S3-S7>

Z. Περίληψη

Το μονοπάτι Wnt σηματοδότησης το οποίο ενεργοποιείται από προσδέτες Wnt σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας εμπλέκεται σε πληθώρα διεργασιών, όπως στη νευροπροστασία. Κατά την εξέλιξη της νόσου Alzheimer's έχει παρατηρηθεί απενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού εξαιτίας της πρόσδεσης του αναστολέα Dickkopf-1 (Dkk1) στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, που αποτρέπει τη σύνδεση με το προσδέτη Wnt, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της GSK3β και την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau, του κύριου συστατικού των νευροϊνιδιακών δεματίων που εμπλέκονται στην νόσο Alzheimer. Έχει βρεθεί ότι μια μικρή ένωση, η γαλλοκυανίνη, είναι ικανή να αναιρέσει τη δράση του Dkk1, ωστόσο το γεγονός ότι θα πρέπει να χορηγηθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις για να επιτύχει τη δράση της, την καθιστά ακατάλληλη ως πιθανή θεραπευτική εφαρμογή. Στην παρούσα, εργασία, έχει επιχειρηθεί η αναστολή της επίδρασης του Dkk1 στο μονοπάτι Wnt σηματοδότησης με συν-επώαση νευρικών κυττάρων ποντικού με θρεπτικό εμπλουτισμένο με Dkk1 κι ανάλογα της γαλλοκυανίνης που έχουν προκύψει από εισαγωγή διαφορετικών υποκαταστατών στο μόριό της. Αρχικά, με τη χρήση της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας διαπιστώθηκε ότι τα ανάλογα της γαλλοκυανίνης δεν είναι νευροτοξικά. Επίσης, με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western ελέγχθηκε κατά πόσο τα ανάλογα της γαλλοκυανίνης δρουν ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές της σηματοδότησης wnt. Βρέθηκε ότι οι περισσότερες από τις ουσίες που εξετάστηκαν δεν είχαν δράση αγωνιστή ή ανταγωνιστή. Σε επόμενο βήμα, εξετάζουμε την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων των εν λόγω ουσιών στα νευρικά κύτταρα ποντικού παρουσία Dkk1. Ως μελλοντικός στόχος τίθεται η μελέτη της επίδρασης των αναλόγων παρουσία Dkk1 αλλά και του ανταγωνιστικού προσδέτη Wnt-3a που συνδέεται με τους υποδοχείς κι ενεργοποιεί το μονοπάτι.

Abstract:

The Wnt signaling pathway, which is activated by binding of Wnt ligands to transmembrane cell surface receptors, is involved in a plurality of processes, such as neuroprotection. During the development of Alzheimer's disease, deactivation of that pathway has been observed due to the binding of the Dickkopf-1 inhibitor (Dkk1) to the transmembrane receptors, preventing the association of the Wnt ligand and leading to activation of GSK3 β and phosphorylation of tau protein, the main component of neurofibrillary tangles which are involved in Alzheimer's disease. It has been shown that a small compound, galloyanine, is capable of reversing the effect of Dkk1, although the fact that it is successful in high concentrations makes it unsuitable as a potential therapeutic application. In this project, we attempt the inhibition of the effect of Dkk1 on Wnt signaling pathway by co-incubating mouse nerve cells with nutrient medium enriched with Dkk1 and analogs of galloyanine, which have been produced through introduction of different substituents into the molecule. Firstly, using the cytotoxicity assay, we found that the analogs of galloyanine are not neurotoxic. In addition, using the technique of Western immunoblotting we checked whether the analogs of galloyanine act as agonists or antagonists of Wnt signaling. We found that most of them act neither as an agonist nor as an antagonist. To continue, we examine the effect of the analogs of various concentrations on the Wnt signaling pathway in the presence of Dkk1. A prospective target is to study the effect of the substances in the presence of both Dkk1 and Wnt-3a ligand, which binds to the receptors and activates the pathway.