



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ
ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ ΣΕ ΚΑΡΔΙΑΚΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ**

ΕΛΕΝΗ ΤΣΙΟΥΡΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ
ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ ΣΕ ΚΑΡΔΙΑΚΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ**

ΕΛΕΝΗ ΤΣΙΟΥΡΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΙ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ Ι

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ
ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ ΣΕ ΚΑΡΔΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ**

ΕΛΕΝΗ ΤΣΙΟΥΡΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ (ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ): ΓΑΪΤΑΝΑΚΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ,
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ (ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ): ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΔΙΔΩ, ΑΝΑΠΛ.
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ΓΑΪΤΑΝΑΚΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
- ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΔΙΔΩ, ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
- ΣΚΟΡΙΛΑΣ ΑΝΔΡΕΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΘΗΝΑ 2017

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Διασυστημικής Φυσιολογίας, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού Και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με τίτλο: «Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική», κατά το ακαδημαϊκό έτος 2015-2016.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα μου, Καθηγήτρια Γαϊτανάκη Αικατερίνη, για την καθημερινή καθοδήγηση και υποστήριξη, σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, εκφράζω ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στη συνεπιβλέπουσα της ερευνητικής εργασίας, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βασιλακοπούλου Διδώ και στον διευθυντή του Προγράμματος, Καθηγητή Σκορίλα Ανδρέα, που μου έκανε τη τιμή να είναι μέλος της εξεταστικής επιτροπής.

Τέλος, ευχαριστώ τα μέλη Δ.Ε.Π και Ε.ΔΙ.Π του τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, και τις συναδέλφους Μαυροειδή Παναγιώτα και Σαμαρά Αθηνά για την συμπαράστασή τους.

ΙΔΙΑΙΤΕΡΕΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τη βαθειά μου ευγνωμοσύνη στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας Ευκαρυωτικών Οργανισμών Βασιλακοπούλου Διδώ, για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την ερευνητική μου εργασία παρέχοντας μου τα αντισώματα για την υπό μελέτη πρωτεΐνη, καθώς και για την καθοδήγησή της και τις εποικοδομητικές της παρατηρήσεις από τη στιγμή της ανάθεσης της εργασίας έως και την ολοκλήρωσή της.

Ακόμα, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου – Νευροβιολογίας Ευθυμιόπουλου Σπύρο, για την προσφορά του ζεύγους εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ερευνητική εργασία.

Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας Σκορίλα Ανδρέα, καθώς ένα μεγάλο μέρος των πειραμάτων της ερευνητικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του.

Τέλος, ευχαριστώ την υποψήφια Διδάκτορα Κλάδη Αθηνά, για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθεια της στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Περιεχόμενα

ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ	I
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	IV
ΙΔΙΑΙΤΕΡΕΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	v
Πίνακας συντμήσεων	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1.1. Η ΠΡΟΔΡΟΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ	16
1.1.1. Ιστορική ανασκόπηση.....	16
1.1.2. Το γονίδιο της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς.....	16
1.1.3. Η Πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς.....	17
1.1.4. Ισομορφές της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς.....	20
1.1.5. Η επεξεργασία της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς.....	23
1.2. ΤΟ Β-ΑΜΥΛΟΕΙΔΕΣ	26
1.2.1. Ο όρος του αμυλοειδούς	26
1.2.2. Η υπόθεση του καταρράκτη του αμυλοειδούς στην νόσο του Alzheimer....	27
1.3. ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	29
1.3.1. Το οξειδωτικό στρες-μηχανισμός και επιπτώσεις στα κύτταρα.....	29
1.3.2. Οξειδωτικό στρες και στρες ενδοπλασματικού δικτύου	30
1.3.3. Οι ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες ως διαμεσολαβητές της απάντησης του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες.....	32
1.3.3. Η συμβολή του οξειδωτικού στρες στην εκδήλωση της νόσου του Alzheimer	33
1.3.4. Η συμβολή του οξειδωτικού στρες σε παθήσεις του μυοκαρδίου	36
ΣΚΟΠΟΣ.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
2.1. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	41
2.1.1. Αναλώσιμα υλικά και αντιδραστήρια.....	41
2.1.2. Διαλύματα καλλιέργειας κυττάρων.....	43
2.1.3. Ειδικά διαλύματα.....	44
2.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ H9C2	48
2.2.1. Εισαγωγικά στοιχεία.....	48
2.2.2. Πειραματικό πρότυπο - Κυτταρική σειρά καρδιακών μυοβλάστων (H9c2).....	48
2.2.3. Διατήρηση στείρων συνθηκών στο χώρο των κυτταροκαλλιέργειών.....	49
2.2.4. Απενεργοποίηση του ορού εμβρύου βοός.....	50
2.2.5. Διατήρηση κυττάρων σε καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	50
2.2.6. Διατήρηση κυττάρων στο υγρό άζωτο και ανάκτηση κυττάρων.....	51
2.2.7. Επιδράσεις ουσιών.....	52

2.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟ ΙΣΤΟ	52
2.4. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ BRADFORD	53
2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ SDS-ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (SDS-PAGE)	54
2.6. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOTTING)	57
2.6.1. Μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη	57
2.6.2.Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνικών αντιγόνων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (immunoblotting)	58
2.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ	60
2.8. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (RNA)	61
2.9. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	61
2.9.1. Ηλεκτροφόρηση RNA-Ποιοτικός έλεγχος RNA	61
2.9.2. Ηλεκτροφόρηση DNA-Ανάλυση προϊόντος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε πήκτωμα αγαρόζης.....	62
2.10. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ	63
2.11. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	64
2.12. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	66
2.13. ΧΡΗΣΗ ΛΟΓΙΣΜΙΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ-ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	68
3.1. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ	69
3.1.1. Ανίχνευση της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς με τη μέθοδο του ανοσοαποτυπώματος κατά Western σε καρδιακό ιστό Χορδωτού.....	69
3.1.2. Ανίχνευση θραυσμάτων της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε κύτταρα H9c2, παρουσία H ₂ O ₂	70
3.1.3. Ανίχνευση θραυσμάτων της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς και ενεργοποίηση ERK1/2 έπειτα από επίδραση με τον παράγοντα PMA	72
3.1.4. Ανίχνευση θραυσμάτων της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς και ενεργοποίηση ERK1/2 σε κύτταρα H9c2, έπειτα από επίδραση με διαφορετικές συγκεντρώσεις PMA	75
3.1.5. Ανίχνευση θραυσμάτων της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε κύτταρα H9c2 έπειτα από επίδραση με PMA, παρουσία αναστολέων των MAPKs.....	77
3.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ H9C2	79
3.2.1. Έλεγχος έκφρασης του γονιδίου της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε κύτταρα H9c2, έπειτα από επίδραση με H ₂ O ₂	79

3.2.2. Έλεγχος έκφρασης του γονιδίου της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε κύτταρα H9c2, έπειτα από επίδραση με τον παράγοντα PMA	80
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	83
Βιβλιογραφία	95
Περίληψη	108
Abstract.....	110

Πίνακας συντμήσεων

ΣΥΝΤΜΗΣΗ	ΑΓΓΛΙΚΟΣ ΟΡΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΟΡΟΣ
ABAD	Aβ-binding alcohol dehydrogenased	Δεσμευόμενη στο β-αμυλοειδές αλκοολική αφυδρογονάση
Aβ, Aβ ₄₀ , Aβ ₄₂	amyloid-β , amyloid-β of 40 amino-acids, amyloid-β of 42 amino-acids	β-αμυλοειδές (Aβ πεπτίδια) , β-αμυλοειδές 40 αμινοξικών καταλοίπων, β-αμυλοειδές 42 αμινοξικών καταλοίπων
AD	Alzheimer's disease	Νόσος του Alzheimer (NA)
ADAM 17	A Disintegrin And Metalloproteinase 17	Δισιντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεϊνάση 17, έχει λειτουργία ενδοπεπτιδάσης
Alu	(Alu) <i>Arthrobacter luteus</i> element	Στοιχείο <i>Alu</i> (μεταθετό στοιχείο)
AP	Alkaline Phospatase	Αλκαλική φωσφατάση
AP-1, AP-4	Activator Protein -1, Activator Protein -4	Πρωτεΐνη ενεργοποιητής-1 (μεταγραφικός παράγων), Πρωτεΐνη ενεργοποιητής-4 (μεταγραφικός παράγων)
APH-1	Anterior PHarynx-defective 1	«Πρόσθιος φάρυγγας ελλατωματικός»-1 Πρωτεΐνη-μέλος του συμπλόκου της γ-σεκρετάσης
APP, APP ₆₉₅ , APP ₇₅₁ , APP ₇₇₀	Amyloid Precursor Protein, Amyloid Precursor Protein of 695 aminoacids, Amyloid Precursor Protein of 751 aminoacids, Amyloid Precursor Protein Of 770 aminoacids	Πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς, Πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς 695 αμινοξικών καταλοίπων, Πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς 751 αμινοξικών καταλοίπων, Πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς 770 αμινοξικών καταλοίπων
APS	Ammonium PerSulfate	υπερθεικό αμμώνιο

AICD	Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain	Ενδοκυττάρια επικράτεια της Πρόδρομου πρωτεΐνης του β-αμυλοειδούς
ASK-1/ MAP3K5	apoptosis signal-regulatory kinase	Κινάση ρύθμισης σημάτων σχετιζόμενα με απόπτωση
BACE-1	β-site APP cleavage enzyme 1	Πρωτεάση β-θέσης της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς
BAX (Bax)	Bcl-2-associated X protein	Πρωτεΐνη συνδεόμενη με τη πρωτεΐνη Bcl2, σχηματίζει ένα ετεροδιμερές λειτουργώντας προ-αποπτωτικά
BCL2 (Bcl2)	B-cell lymphoma 2	«Λέμφωμα Β-κυττάρων 2», Πρωτεΐνη με ρόλο ανάσχεσης της απόπτωσης
bp	base pairs	Ζεύγη βάσεων
BSA	bovine serumalbumin	αλβουμίνη ορού βοδιού
C-	Carboxyl group/C-terminal	Καρβοξυλική ομάδα/καρβοξυτελικό άκρο
Ca ²⁺	Calcium ion	Ιόν ασβεστίου
CAT	catalase	καταλάση
cDNA	complementary DNA	Συμπληρωματικό DNA
c/EBP	CCAAT/enhancer binding protein	πρωτεΐνη ενίσχυτης πρόσδεσης στην αλληλουχία CCAAT
CHO	Chinese Hamster Ovary	επιθηλιακή κυτταρική σειρά που προέρχεται από την ωοθήκη του κινέζικου χάμστερ ,
CHOP/ GADD153	c/EBP homology protein/ growth arrest and DNA damage-inducible protein 153	ομόλογος με c/EBP –πρωτεΐνη/ επαγόμενη από παύση αύξησης και βλάβη του DNA πρωτεΐνη 153
CNS	Central Nervous System	Κεντρικό νευρικό σύστημα
COS-7	CV-1 in Origin with SV40 genes, Cell line derived from the kidney of the African Green Monkey	Κυτταρική σειρά ινοβλαστών πιθήκου-όμοιοι με ανθρώπου
CTF99/ C99	Carboxyl-Terminal Fragment 99	Καρβοξυτελικό άκρο 99 αμινοξικών καταλοίπων της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς - προϊόν δράσης της γ-σεκρετάσης
CTF83/ C83	Carboxyl-terminal fragment 83	Καρβοξυτελικό άκρο 83 αμινοξικών καταλοίπων της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς
CVD	CardioVascular Diseases	Καρδιαγγειακές παθήσεις
CypD	cyclophin D	Κυκλοφίνη D
DEPC-H ₂ O	Diethyl pyrocarbonate /diethyl dicarbonate (IUPAC name) -	Διαιθυλο πυροκαρβονική κατεργασία του νερού που το

	treated water	καθιστά απηλλαγμένο από ριβονουκλεάσες
DAG	diacylglycerol	διακυλογλυκερόλη
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων που αναπτύχθηκε από τον Harry Eagle και βελτιστοποιήθηκε από τον Renato Dulbecco
DMSO	Dimethyl sulfoxide	διμεθυλοσουλφοξείδιο
DRP1 (Drp)	dynamin-related protein 1	Συνδεδεμένη στη δυναμίνη πρωτεΐνη-1, GTPάση που ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή σχάση
dH ₂ O ₂	Distilled water	Απεσταγμένο νερό
dNTPs	Deoxyribose Nucleoside Triphosphates	Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια
ECL	Enhanced ChemiLuminescence	ενισχυμένη χημειοφωταύγεια
EDEM	ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein	Πρωτεΐνη ενίσχυσης της αποικοδόμησης ΕΔ-όμοια με α -μοννοσιδάση
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
ER	Endoplasmic Reticulum	Ενδοπλασματικό δίκτυο
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation	κυτταρικό μονοπάτι το οποίο στοχεύει μη ορθά πτυχωμένες πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου για ουβικιτινίωση και μετέπειτα αποδόμηση από το πρωτεάσωμα
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase	Ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια σήματα πρωτεϊνική κινάση
ERO1	ER Oxidoreductin 1	οξειδάση 1 του ΕΔ
FBS	Fetal Bovine Serum	Ορός εμβρύου βοός
FIS1(Fis1)	Mitochondrial fission 1 protein	Πρωτεΐνη σχάσης μιτοχονδρίου 1
GSH	Glutathione	γλουταθειόνη
GTP	Guanosine TriPhosphate	τριφωσφορική γουανοσίνη
HCL	hydrogen chloride	Υδροχλωρικό οξύ
H9c2	Cell line , origin embryonic rat Heart/myocardium	Κυτταρική σειρά, μυοβλάστες καρδιάς αρουραίου
HD	Huntington's Disease	νόσος του Huntington
HIF	Hypoxia-Inducible Factor	Παράγοντας - επαγόμενος από υποξία
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	Υπεροξειδίο του υδρογόνου
HRE	Hypoxia-Responsive Element	Αποκρινόμενο-στην-υποξία στοιχείο
HRP	Horse raddish peroxidase	Υπεροξειδάση του άγριου ραπανιού
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	φωσφοριβοσυλτρανσφεράση υποξανθίνης-γουανίνης

IL-1β	Interleukin 1 beta	Ιντερλευκίνη 1-β
IP3	Inositol trisphosphate / inositol 1,4,5-trisphosphate/triphosphoinosito	Τριφωσφορική ινοσιτόλη
IRE1/ IREN 1	inositol-requiring ER-to-nucleus signal kinase 1	κινάση σερίνης/θρεονίνης με ενεργότητα ενδονουκλεάσης, απαιτούσα ινοσιτόλη κινάση μεταγωγής σήματος από ΕΔ στον πυρήνα
JNK	c-JUN N-terminal Kinase	κινάσες μέλη των MAP κινασών, φωσφορυλιώνουν το μεταγραφικό παράγοντα c-Jun εντός της αμινοτελικής περιοχής του
kb	kilobases	Κιλοβάσεις (10 ³ βάσεις)
kD(kDa)	kiloDaltons	κιλοΝτάλτονς(10 ³ Ντάλτονς)
KPI	Kunitz protease inhibitor	αναστολέας πρωτεασών τύπου Kunitz
LEs, EEs, REs	Late endosomes, early endosomes, recycling endosomes	Πρώιμα ενδοσώματα, Όψιμα ενδοσώματα, ενδοσώματα ανακύκλωσης
MAPK	Mitogen-Activated Protein kinase	Ενεργοποιούμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση
MAP	Microtubule-Associated Protein	Συνδεόμενη με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη
MEK/MKK	MAPK Kinase	Κινάση των MAP κινασών
mg	milligram	Χιλιοστό του γραμμαρίου
mM	milli Molarity	Χιλιοστομοριακότητα
M-MLV RT	Moloney murine Leukemia Virus reverse transcriptase	Αντίστροφη μεταγραφή που απομονώνεται από ιό της λευχαιμίας ποντικού Moloney
ml	milli little	Χιλιοστό του λίτρου
miR-101, miR-153	microRNA-101, microRNA-153	μικρα (20-24 νουκλεοτιδίων) μη-κωδικοποιούντα μόρια ριβοσυλονουκλεοτιδικού οξέος που εμπλέκονται στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε πολυκύτταρους οργανισμούς
mRNA	messenger RNA	Αγγελιαφόρο ριβονουκλεοτιδικό οξύ
NAC	N-Acetyl Cysteine	N-ακετυλο κυστεΐνη
NcT	NicasTrin	Νικαστρίνη ,πρωτεΐνη του συμπλόκου της γ-σεκρετάσης
NH ₂ -/N-	Amine group/N-terminal	Αμινομάδα/αμινοτελικό άκρο
·O ₂ -	Superoxide anion	ανιόν του υπεροξειδίου
·OH	hydroxyl radical	ρίζα υδροξυλίου
OX-2	Orexin receptor-2	Υποδοχέας ορεξίνης-2 ,ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών

p3	peptide 3	πεπτίδιο 3
PARP	Poly(ADP-Ribose) polymerase	Πολυ (ADP-ριβόζη) πολυμεράση
PBS	Phosphate Buffer Saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
PCR	Polymerase Chain Reaction	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PD+	PD plus	Προσθήκη αναστολέα PD98056
PDI	Protein Disulfide Isomerase	ισομεράση πρωτεϊνικών δισουλφιδίων
PERK	PKR-like ER Kinase	οι πρωτεΐνες αισθητήρες του ΕΔ
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase	Κινάση της φωσφατιδιλινοσιτόλης3
PKC	Protein Kinase C	πρωτεϊνική κινάσης C
PLC-γ	PhosphoLipase C-γ	ΦωσφολιπάσηC-ισομορφή γ
PMA	4β-phorbol 12-myristate 13-acetate	4β-φορβολο-12-μυριστικός 13-οξικό εστέρας
PS-1, PS-2	PreSenilin-1, PreSenilin-2	πρεσενιλίνη 1-καταλυτική υπομονάδα της γ-σεκρετάσης, PreSenilin-2
QBI-HEK 293 A	Human Embryonic Kindey	κυτταρική σειρά που προέρχεται ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα
Ras (RAS)	Rat sarcoma	«Σάρκωμα αρουραίου»-Οικογένεια πρωτεϊνών σηματοδότησης
Raf (RAF)	Rapidly accelerated fibrosarcoma	«Ταχείας εξέλιξης ινοσάρκωμα», οικογένεια πρωτεϊνών με ενεργότητα κινάσης σερίνης-θρεονίνης
rRNA	ribosomal RiboNucleic Acid	ριβονουκλεοτιδικό οξύ των ριβοσωμάτων
SB+	SB plus	Προσθήκη αναστολέα SB203580
SP	Senile Plaques	«γεροντικές»/αμυλοειδείς πλάκες
SP+	SP plus	Προσθήκη αναστολέα SP600125
S1P, S2P	Site1Protease, Site2Protease	Πρωτεάση θέσης 1, πρωτεάση θέσης 2
ROS	Reactive Oxygen Species	δραστικές μορφές οξυγόνου
RSS	RNA Storage Solution	διαλύμα συντήρησης RNA
RT-PCR	Reverse transcription - polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής
S1 / MBTPS1	Site-1 protease /Membrane-bound transcription factor	Πρωτεάση θέσης-1 /παράγοντας μεταγραφής μεμβρανοσυνδεδεμένος- θέσης-1
sAPPα,	soluble Amyloid Precursor Protein α,	διαλυτό θραύσμα της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς μετά τη

sAPPβ	soluble Amyloid Precursor Protein β	πέψη της α-σεκρετάσης, διαλυτό θραύσμα της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς μετά τη πέψη της β-σεκρετάσης
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis	πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία του αποδιατακτικού παράγοντα, δωδεκυλοθειικό νάτριο
SOD	Superoxide Dismutase	Υπεροξειδική δισμουτάση
solAPPtruncs/ sAPPf	Soluble APP truncated/ Soluble APP full length	Διαλυτή εκκρινόμενη Πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς
<i>Taq</i> polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> polymerase	Τακ πολυμεράση (από το θερμοφιλικό βακτήριο <i>Thermus aquaticus</i>)
TBE	Tris-Borate-Ethylenediaminetetraacetic acid	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris /HCl, βορικό οξύ και προσθήκη Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος
TBS	Tris-Buffered Saline	Ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (pK _a =8,06 στους 25 ° C)
TBS-T	Tris-Buffered Saline with Tween 20	Ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων με προσθήκη του απορρυπαντικού Tween 20(pK _a = 8,06 στους 25 ° C)
TEMED	TetraMethylethylEneDiamin	τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη
TGN	Trans-Golgi Network	σύμπλεγμα trans-Golgi
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha	Παράγοντας νέκρωσης όγκου-α
TRI	Trizol	Τράιζολ- φαινόλη θειοκυανικού -
TSS	transcription start site	θέση έναρξης μετάγραφης
UPR	Unfolded Protein Response	Απόκριση σε μη ορθά πτυχωμένες πρωτεΐνες
V	Volt	Βολτ-μονάδα μέτρησης ηλεκτρικής τάσης
XBP-1	X-box Binding Protein-1	Προσδένουσα στην αλληλουχία “X-box” πρωτεΐνη-1, παράγοντας μεταγραφής που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων σημαντικών για την ορθή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την απόκριση στο κυτταρικό στρες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

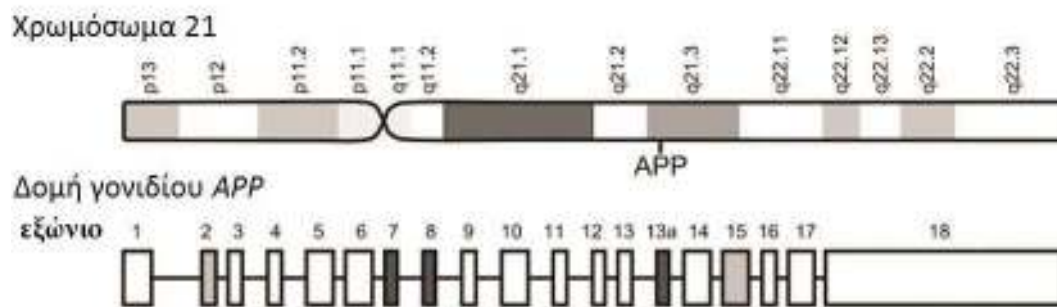
1.1. Η ΠΡΟΔΡΟΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ

1.1. Ιστορική ανασκόπηση

Η Πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (Amyloid Precursor Protein, APP) ανακαλύφθηκε το 1987 από διαφορετικές ομάδες επιστημόνων [1-3] και έκτοτε έχει μελετηθεί εκτενώς για το ρόλο της κυρίως στη νόσο του Alzheimer (NA) [4] - ένα νευροεκφυλιστικό νόσημα με σημαντικές επιπτώσεις στις νοητικές ικανότητες του ατόμου. Έως και σήμερα ο φυσιολογικός ρόλος της APP δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Η αιγυματική της λειτουργία επισημαίνεται από το γεγονός ότι παρόλο που πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 770 αμινοξέων, το όνομα της προέρχεται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 39-43, που συνιστούν το λειτουργικό β-αμυλοειδές (Aβ) και προκύπτουν από πρωτεόλυση της πρόδρομης πρωτεΐνης APP. Το συγκεκριμένο πεπτίδιο συναντάται υπό μορφή χαρακτηριστικών εξοκυττάρων σχηματισμών στους εγκεφάλους ατόμων που πάσχουν από τη νόσο του Alzheimer. Στη βιβλιογραφία, αυτοί οι σχηματισμοί συναντώνται με τον όρο «αμυλοειδικές ή γεροντικές πλάκες», καθώς τα περιστατικά διάγνωσης NA αυξάνονται στα άτομα ηλικίας 65 ετών και άνω [5].

1.1.2. Το γονίδιο της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς

Στον άνθρωπο, η APP κωδικοποιείται από το γονίδιο *APP*, μήκους 240 kb. Το γονίδιο *APP* εδράζεται στο χρωμόσωμα 21 (21q21.3) και εμπεριέχει 18 εξώνια (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1 Δομή του γονιδίου *APP*. Προσαρμογή και τροποποίηση από [4].

Αν και οι μηχανισμοί που ελέγχουν την έκφραση του *APP* γονιδίου παραμένουν ασαφείς, η ανάλυση της αλληλουχίας του υποκινητή APP υποδηλώνει

ότι το γονίδιο ανήκει στην κατηγορία των ιδιοστατικών γονιδίων (housekeeping genes). Ο υποκινητής του στερείται τυπικών συναινετικών αλληλουχιών TATA και CAAT, αλλά έχει υψηλή περιεκτικότητα σε GC και η έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου ρυθμίζεται από ένα ισχυρό στοιχείο εκκινητή (INR) γύρω από την κύρια θέση έναρξης της μεταγραφής (transcription start site -TSS) +1 [6]. Επιπλέον, ο υποκινητής περιέχει αλληλουχίες για την πρόσδεση ενός μεγάλου αριθμού μεταγραφικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των περιοχών SP-1, AP-1 και AP-4, ενός στοιχείου θερμικού σοκ και δύο επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες τύπου-Alu [7,8]. Η παρουσία των περιοχών SP-1, AP-1 και AP-4 στον υποκινητή APP, οι οποίες ρυθμίζουν την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μίτωση όπως επίσης και την κυτταρική διαφοροποίηση, υποδηλώνει ότι η APP έχει λειτουργία/ες που σχετίζονται με την ανάπτυξη ή ωρίμανση των κυττάρων.

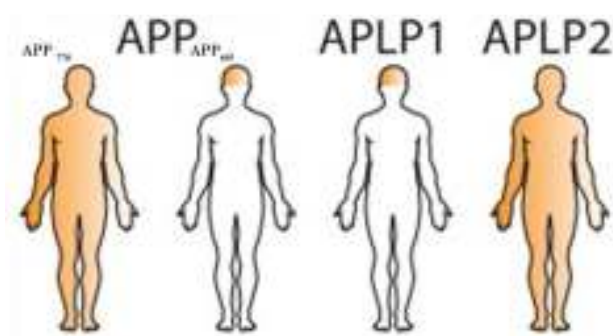
Παρανοηματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *APP* ευθύνονται για την πρόιμη εκδήλωση της νόσου του Alzheimer αλλά και ο διπλασιασμός του *APP* στις περιπτώσεις τρισωμίας 21 οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα του Αβ πεπτιδίου και σε πρόιμη συσσώρευση του σε αμυλοειδικές πλάκες στον εγκέφαλο, μια διαδικασία που στα άτομα με σύνδρομο Down ξεκινάει από τα 40 κιόλας έτη [9]. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τις επιπτώσεις πολυμορφισμών στις ρυθμιστικές ακολουθίες του γονιδίου που προδιαθέτουν στην εκδήλωση της νόσου [10].

1.1.3. Η Πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς

Η APP ανήκει εξελικτικά και δομικά σε μια συντηρημένη υπεροικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, με ένα μικρό, ενδοκυτταρικό, καρβοξυτελικό άκρο και ένα μεγάλο, εξωκυττάριο, αμινοτελικό άκρο. Το μικρό καρβοξυτελικό άκρο δεν διαθέτει προφανή ομολογία με άλλους τύπους πρωτεϊνών αλλά είναι υψηλά συντηρημένο στα μελή της οικογένειας APP και χρησιμεύει ως περιοχή για πολυάριθμες λειτουργικές αλληλεπιδράσεις (συζητούνται παρακάτω). Το αμινοτελικό άκρο είναι λιγότερο συντηρημένο μεταξύ των μελών της οικογένειας APP και μπορεί να περιλαμβάνει επικράτειες με μεγάλη ποικιλία λειτουργιών [11]. Η APP εκφράζεται σε μια ποικιλία ιστών [12] και οργάνων. Συγκεκριμένα, αναλύσεις κατά

Northern έχουν αποδείξει ότι το ενδογενές mRNA της APP εκφράζεται σε υψηλότερα ποσοστά στα νευρικά κύτταρα του ΚΝΣ, στους νεφρούς και τους πνεύμονες, και λιγότερο στη καρδιά και το ήπαρ (Εικόνα 1.2). Η έκφραση της επάγεται από διαφορετικούς παράγοντες, όπως οι αυξητικές ορμόνες και οι κυτοκίνες [6] (συζητούνται παρακάτω).

Πρωτεΐνες APP έχουν εντοπιστεί σε διαφορετικούς οργανισμούς (από τον οργανισμό μοντέλο, νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans*, έως και τον άνθρωπο). Ωστόσο, δεν έχουν παρατηρηθεί μέλη της οικογένειας APP σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, φυτά και ζύμες. Με αυτή την έννοια, η εμφάνιση και η πορεία εξέλιξης της οικογένειας των πρωτεϊνών APP φαίνεται να συμπίπτει με την εξέλιξη του νευρικού συστήματος [13], αλλά επίσης συμπίπτει και με άλλα γεγονότα, όπως την εμφάνιση των υποδοχέων των λιποπρωτεϊνών [14]. Στα θηλαστικά η οικογένεια APP αποτελείται από την ίδια την APP και τις όμοιες με την APP- (APP-like)-πρωτεΐνες (APLP1 και APLP2) (Εικόνα 1.2). Στη *Drosophila melanogaster* και στο *C.elegans*, οι ομόλογες APP πρωτεΐνες έχουν ονομαστεί APPL και APL-1, αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο είναι ακόμη το γεγονός ότι, αν και η οικογένεια αποτελείται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με παρόμοια δομή και μεμβρανικό εντοπισμό, τα πεπτίδια Αβ μπορούν να προκύψουν αποκλειστικά και μόνο από την πρωτεΐνη APP.



Εικόνα 1.2 Σχηματική αναπαράσταση της ιστοειδικής έκφρασης των isoμορφών της APP και όμοιων με APP-πρωτεϊνών (APLP1 και APLP2) στον άνθρωπο. Προσαρμογή και τροποποίηση από [12].

Οι λειτουργίες της APP μπορούν να γίνουν πολύ καλύτερα αντιληπτές στο επίπεδο του ιστού, παρά στο κυτταρικό και ενδοκυτταρικό επίπεδο [14]. Αρχικά, η

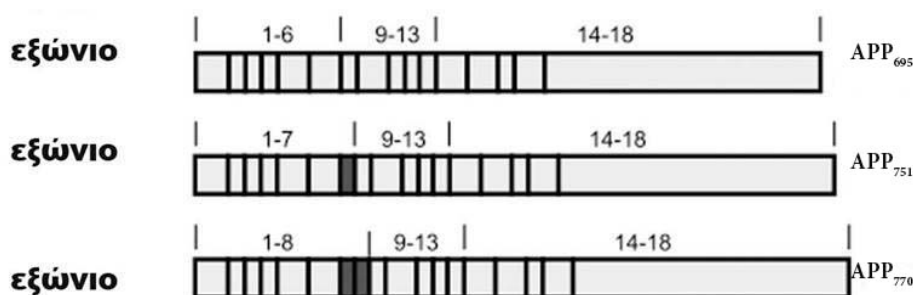
APP θεωρείται ότι έχει λειτουργία υποδοχέα λόγω της ιδιόμορφης δομής της και της διαμεμβρανικής της τοπολογίας [1], στην πραγματικότητα, είναι μία μεγάλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη που υπό φυσιολογικές συνθήκες παίζει σημαντικό ρόλο στην νευρική ανάπτυξη και επιδιόρθωση, καθώς και στην διακυτταρική επικοινωνία στον εγκέφαλο, με βασικούς άξονες λειτουργίας την κυτταρική προσκόλληση και την κυτταρική σηματοδότηση [15]. Πιστεύεται επίσης ότι εμπλέκεται στην ανάπτυξη των νευρικών βλαστικών κυττάρων, την επιβίωση των νευρώνων, την έκφυση των νευρικών απολήξεων και την αποκατάσταση των νευρώνων. Τα διαθέσιμα στοιχεία προτείνουν ότι η APP αλληλεπιδρά τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά για να ρυθμίσει ποικίλους μηχανισμούς σηματοδότησης [12]. Πιο συγκεκριμένα, η φυσιολογική λειτουργία της APP συνδέεται άμεσα με την κυτταρική προσκόλληση των νευρώνων στον εγκέφαλο, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό των νευρικών κυττάρων και την μορφογένεση του νευρικού ιστού του εγκεφάλου. Έχει αποδειχθεί ότι, η δραστηριότητα προσκόλλησης της APP σε μεταναστευτικά κύτταρα συνοδεύεται από νευριτογόνο δραστηριότητα σε στατικούς, ανώριμους νευρώνες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [16]. Εκτός όμως από αυτή τη ρυθμιστική λειτουργία, η APP είναι επίσης σημαντική για το επόμενο στάδιο της νευρωνικής μορφογένεσης, το σχηματισμό λειτουργικών συνάψεων μεταξύ των νευρώνων. Πρόσφατες μελέτες βασισμένες σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα έχουν δείξει ότι όλα τα μέλη της APP οικογένειας είναι σημαντικά για το σχηματισμό, τη διατήρηση και την πλαστικότητα των συνάψεων του Κεντρικού και του Περιφερικού Νευρικού Συστήματος. Από την άλλη πλευρά, *in vitro* μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη σημασία της APP για τη μορφολογική και ηλεκτροφυσιολογική ωριμότητα συγκεκριμένων συνάψεων [17].

Κατά τη γήρανση, μία κατεστραμμένη μορφή της πρωτεΐνης μπορεί να καταστρέψει τα νευρικά κύτταρα, οδηγώντας στη νόσο του Alzheimer (NA). Η αλλοίωση ή η αποτυχία της συναπτικής διαβίβασης είναι αυτή που προκαλεί την απώλεια της γνωστικής ικανότητας στη NA. Αυτό ενισχύει την άποψη που υποστηρίζει ότι η γνωστική δυσλειτουργία στη νόσο οφείλεται όχι μόνο στην ύπαρξη των Αβ πεπτιδίων αλλά και στην διατάραξη των φυσιολογικών λειτουργιών των APP/APLP ολοπρωτεϊνών ή πρωτεολυτικών θραυσμάτων τους [18].

1.1.4. Ισομορφές της Προδρομίου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς

Κατά τη διάρκεια της μεταγραφής, το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του γονιδίου *APP* μπορεί να οδηγήσει σε ισομορφές της APP (**Εικόνα 1.3**). Οι μεγάλες ισομορφές της APP έχουν 770, 751 ή 695 αμινοξικά κατάλοιπα. Οι ισομορφές APP₇₅₁ και APP₆₉₅ είναι αποτέλεσμα της συνένωσης από τα εξώνια 7 και/ή 8. Μερικές λιγότερο κοινές παραλλαγές ματίσματος έχουν επίσης αναφερθεί, όπως L-APP, η οποία στερείται το εξώνιο 15 [19] και η ισομορφή APP₆₃₉, η οποία στερείται των εξώνων 2, 7 και 8 [20].

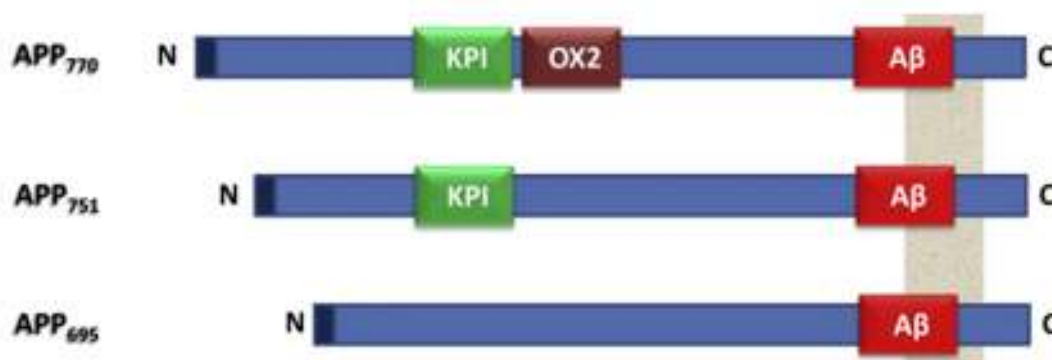
κύρια μετάγραφα του γονιδίου *APP*



Εικόνα 1.3 Δομή των *APP* mRNA. Εναλλακτικό μάτισμα του *APP* mRNA στα εξώνια 7,8 (σκούρο γκρι) μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση των ισομορφών APP₆₉₅, APP₇₅₁ και APP₇₇₀. Τα εξώνια 2 και 15 (ανοιχτό γκρι) ματίζονται στις ισομορφές APP₆₃₉ και L-APP, αντίστοιχα. Προσαρμογή και τροποποίηση από [4].

Οι τρεις κύριες ισομορφές της APP (APP₆₉₅, η APP₇₅₁ και η APP₇₇₀) έχουν μια μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή με πολλαπλές περιοχές πρόσδεσης, μια μικρή διαμεμβρανική περιοχή και μια ακόμη μικρότερη ενδοκυτταρική περιοχή, η οποία διαθέτει περιοχές πρόσδεσης για πολλές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση. Συγκρίνοντας τις ισομορφές μεταξύ τους (**Εικόνα 1.4**) [21], διαπιστώνεται ότι η APP₇₇₀ περιέχει μια επικράτεια με δράση αναστολέα πρωτεασών τύπου Kunitz (KPI επικράτεια) καθώς και μια επικράτεια OX-2 μεγέθους 19 αμινοξέων. Στην APP₆₉₅ δεν εντοπίζονται οι επικράτειες KPI και OX-2, ενώ στην APP₇₅₁ δεν συναντάται η επικράτεια OX-2. Στον εγκέφαλο εκφράζεται κυρίως η ισομορφή APP₆₉₅, και μάλιστα στους νευρώνες σε υψηλά ποσοστά σε σχέση με τις άλλες δύο ισομορφές. Στον άνθρωπο, στην περιοχή του φλοιού η αναλογία των

mRNAs είναι περίπου η ακόλουθη: APP₇₇₀/APP₇₅₁/APP₆₉₅ = 1:10:20, παρόλο που παρατηρούνται διακυμάνσεις ανά περιοχή [22].



Εικόνα 1.4 Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών APP ισομορφών με έμφαση στις διαφορετικές επικράτειες των προτεϊνών αυτών. Προσαρμογή και τροποποίηση από [21].

Οι ισομορφές της APP φαίνεται να έχουν διαφορετική έκφραση κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του εγκεφάλου. Τόσο το χρονικό και το ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης, όσο και η μετα-μεταφραστική επεξεργασία (processing) της APP φαίνεται να ρυθμίζονται από ποικίλους παράγοντες συμπεριλαμβανομένων ορμονών, αναπτυξιακών παραγόντων και ιντερλευκινών [23,24]. Η ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου *APP* περιέχει συναινετικές αλληλουχίες (consensus sites) που αναγνωρίζονται από το μεταγραφικό παράγοντα SP1 (Specificity Protein-1) [25]. Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν μόρια microRNA, που συνιστούν μικρά, μη κωδικοποιούντα RNA που αλληλεπιδρώντας με το mRNA-στόχο οδηγούν σε καταστολή της μετάφρασης ή αποσταθεροποίηση του μεταγράφου [26]. Τα μόρια αυτά φαίνεται να εμπλέκονται στην ρύθμιση της έκφρασης της APP και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εκφύλιση των νευρώνων. Πιο συγκεκριμένα, τα miR-101 και miR-153 φάνηκε να καταστέλλουν την έκφραση της APP σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, επισημαίνοντας τη σχέση τους με την παθολογία των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων [27].

Η επεξεργασία των APP ισομορφών των αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων διέπεται από μηχανισμούς παρόμοιους με αυτούς που λαμβάνουν χώρα στα νευρικά κύτταρα για την παράγωγή των Aβ πεπτιδίων και των διαλυτών μορφών της APP [28]. Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλο για τη μελέτη της APP στον εγκέφαλο. Πιο

συγκεκριμένα, κατά τη μετάβαση από την κανονική προς την ήπια γνωστική εξασθένηση στη ΝΑ, έχει επανειλημμένα παρατηρηθεί μια μικρή αλλά στατιστικά σημαντική μετατόπιση στην αναλογία των ισομορφών της APP στα αιμοπετάλια, από τις μεγαλύτερες στις μικρότερες ισομορφές. Η αναλογία αυτή έχει προταθεί για τη χρήση της ως βιοδείκτης στη διάγνωση και πρόγνωση της νόσου [29].

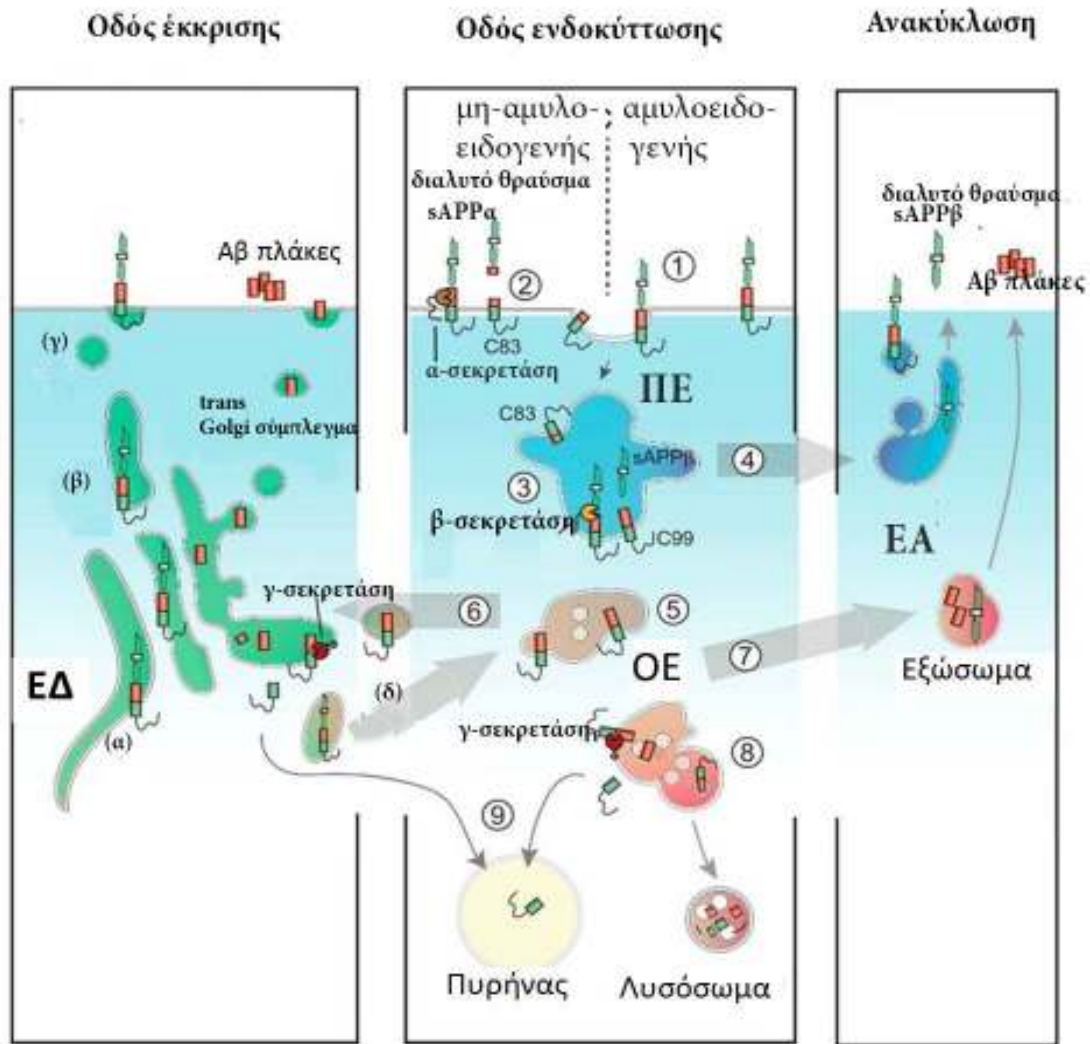
Επιπρόσθετα, ο μη φυσιολογικός μεταβολισμός της APP στο πάγκρεας συνδέεται με το διαβήτη τύπου II και επιδημιολογικά δεδομένα προτείνουν μια σχέση μεταξύ του διαβήτη και της ΝΑ, που μάλιστα αναφέρεται στη σύγχρονη βιβλιογραφία σαν διαβήτη τύπου III [30].

Παρόλο που η APP στα διαφορετικά είδη χαρακτηρίζεται από μια σχετικά καλά συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία, στα τρωκτικά εμφανίζεται διαφοροποίηση κατά τρία αμινοξέα (η αργινίνη 5 υποκαθίσταται από γλυκίνη, η τυροσίνη 10 υποκαθίσταται από φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη 13 υποκαθίσταται από αργινίνη). Οι υποκαταστάσεις αυτές, καθιστούν τα τρωκτικά λιγότερο επιρρεπή στο σχηματισμό ολιγομερών Αβ. Πρόσφατα, δείχθηκε ο σημαντικός ρόλος του αμινοξέος της ιστιδίνης 13 στην πρόσδεση ιόντων ψευδαργύρου (Zn^{2+}), λειτουργία απαραίτητη για την έναρξη του σχηματισμού ινιδίων β-αμυλοειδούς [31]. Εξαιτίας της διαφοράς αυτής στη δομή του Αβ πεπτιδίου στα τρωκτικά, τα πειραματικά μοντέλα της ΝΑ απαιτούν υπερέκφραση της ανθρώπινης APP πρωτεΐνης ή/και άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην παθολογία της νόσου του Alzheimer στον άνθρωπο. Το γεγονός αυτό επιφέρει μερικούς περιορισμούς στην εξαγωγή ορθών συμπερασμάτων από τη χρήση ποντικών και αρουραίων για τη πλήρη κατανόηση της παθολογίας της νόσου στον άνθρωπο [32].

1.1.5. Η επεξεργασία της Πρόδρομου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς

Η APP συντίθεται στα πολυσώματα και υπόκειται σε N-γλυκοζυλίωση στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) (Εικόνα 1.5). Από τη στιγμή που γλυκοζυλιώνεται η APP μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi. Το σύμπλεγμα Golgi, είναι το δεύτερο σημαντικό σημείο μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων της APP, συμπεριλαμβανομένων O- και N- γλυκοζυλίωσεων και φωσφορυλίωσεων [33]. Μεγάλο μέρος της ώριμης APP αποθηκεύεται στο σύμπλεγμα Golgi και στο σύμπλεγμα trans-Golgi (TGN), ενώ περίπου το 10% μεταφέρεται μέσω κινεσινών στα TGN κυστίδια στους δενδρίτες και τους άξονες [34].

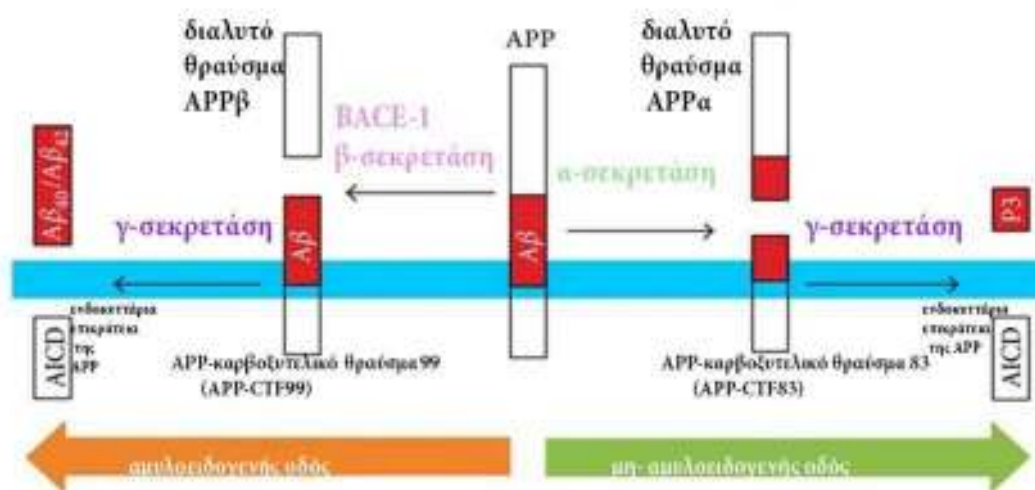
Το Αβ πεπτίδιο προκύπτει από διαδοχικές πρωτεολυτικές διασπάσεις της Πρόδρομου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς. Το μόριο Αβ είναι υδρόφοβο, περιέχει 39 έως 43 αμινοξικά κατάλοιπα και περιλαμβάνει τα 28 αμινοξέα που εντοπίζονται έξω ακριβώς από την κυτταροπλασματική μεμβράνη συν τα πρώτα 12 με 14 [35].



Εικόνα 1.5 Διακίνηση και επεξεργασία της APP. Η APP συντίθεται στο ΕΔ (α) και μεταφέρεται μέσω του συμπλέγματος trans-Golgi (TGN) (β) προς τη πλασματική μεμβράνη [ΠΜ] (γ) ή τα ενδοσώματα (δ). Η πλήρους μήκους APP μπορεί να ενδοκυττωθεί από την ΠΜ (1) ή να διασπαστεί από την α-σεκρετάση (2) για να απελευθερωθεί ένα διαλυτό θραύσμα- sAPPα - στον εξωκυττάριο χώρο και να παραχθεί ένα θραύσμα 83 αμινοξέων - C83 - που θα ενδοκυττωθεί. Στα πρώιμα ενδοσώματα (ΠΕ), η πλήρους μήκους APP κόβεται από τη β-σεκρετάση για την παραγωγή ενός θραύσματος 99 αμινοξέων - C99- και του διαλυτού θραύσματος sAPPβ (3). Η πλήρους μήκους APP και το διαλυτό θραύσμα που δημιουργήθηκαν στα ενδοσώματα, μπορούν να ανακυκλωθούν στη πλασματική μεμβράνη μέσω των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης (ΕΑ) (4) ή μπορούν να μεταφερθούν στα όψιμα ενδοσώματα (ΟΕ) (5). Από τα όψιμα ενδοσώματα αυτά τα θραύσματα μπορούν στη συνέχεια να μεταφερθούν στο trans Golgi σύμπλεγμα (6), να οδηγηθούν προς εξωκύττωση (7), ή να οδηγηθούν στο λυσόσωμα για αποικοδόμηση (8). Προσαρμογή και τροποποίηση από [12].

Οι πρωτεΐνες APP μπορούν να υποβληθούν σε μια μεγάλη ποικιλία από πρωτεολυτικές διασπάσεις οι οποίες πραγματοποιούνται από ένζυμα ή σύμπλοκα ενζύμων με δράση α-, β- και γ-σεκρετάσης. Τα ένζυμα με δράση α-σεκρετάσης ανήκουν στην οικογένεια των μεταλλοπρωτεασών ADAM 17 [36] και δρουν στην πλασματική μεμβράνη (ΠΜ). Η δράση της β-σεκρετάσης έχει ταυτοποιηθεί στη β-θέση του ενζύμου BACE1 (τύπου I μεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των ασπартυλο - πρωτεασών). Η BACE1 είναι η κύρια β-σεκρετάση και μπορεί να

διασπάσει την APP στα πρώιμα ενδοσώματα (early endosomes - EEs) [37], ενδεχομένως, ανάλογα με τον βαθμό οξίνισης κατά την ωρίμανση αυτών των οργανιδίων. Τέλος η γ -σεκρετάση εδρεύει στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), στο σύμπλεγμα Golgi όπως και στην επιφάνεια των κυττάρων. Η γ -σεκρετάση είναι ένα διαμεμβρανικό σύμπλοκο που αποτελείται από την πρεσενιλίνη 1 (PS1), την πρεσενιλίνη 2 (PS2), την νικαστρίνη (NcT), και το APH-1 (anterior pharynx-defective 1) [38].



Εικόνα 1.6 Διάγραμμα επεξεργασίας της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς. Η διαμεμβρανική APP (η μεμβράνη παρουσιάζεται με γαλάζιο χρώμα) μπορεί να υποβληθεί σε επεξεργασία μέσω 2 οδών: την αμυλοειδογενή οδό και τη μη-αμυλοειδογενή οδό. Προσαρμογή και τροποποίηση από [39].

Η APP μπορεί να υποβληθεί σε πέψη μέσα από την κυρίαρχη μη αμυλοειδογενή οδό [39] (**Εικόνα 1.5 και 1.6**), στην οποία η α -σεκρετάση πέπτει την APP στα 83 αμινοξέα από το C-τελικό άκρο της APP, και παράγει μια μεμβρανική CTF από 83 αμινοξικά κατάλοιπα και ένα μεγάλο N-τελικό διαλυτό θραύσμα (sAPP α) που απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο. Το CT θραύσμα στη συνέχεια διασπάται από τη γ -σεκρετάση με την παραγωγή ενός θραύσματος μικρού μεγέθους που ονομάζεται p3 (**Εικόνα 1.6**). Στη μη-αμυλοειδογενή οδό, η διάσπαση α -σεκρετάσης πραγματοποιείται στην αλληλουχία A β και έτσι εμποδίζεται ο σχηματισμός A β πεπτιδίων. Αντίθετα, στην αμυλοειδογενή οδό, η πρώτη πέψη της APP πραγματοποιείται από τη β -σεκρετάση στο 99^ο αμινοξύ από το C-τελικό άκρο, παράγοντας το διαλυτό θραύσμα sAPP β , το οποίο απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο και μια εναλλακτική CTF από 99 αμινοξέα (C99) που παραμένει

στη μεμβράνη. Η περαιτέρω πέψη του C99 μέσω της γ -σεκρετάσης οδηγεί στην απελευθέρωση του Αβ πεπτιδίου ή μίγμα Αβ πεπτιδίων με μήκος από 39 έως και 43 αμινοξέα. Κυρίαρχο πεπτίδιο είναι το Αβ₄₀, ωστόσο πιο τοξικό είναι το πεπτίδιο Αβ₄₂ που είναι πιο ινδογόνο και αποτελεί το κύριο συστατικό του αμυλοειδικού φορτίου στην νόσο του Alzheimer [40]. Με αυτόν τον τρόπο το παραγόμενο πεπτίδιο Αβ₄₂ μέσω της β και γ διάσπασης της πρωτεΐνης, αποτελεί - είτε με τη μορφή διαλυτών ολιγομερών είτε σαν αδιάλυτα ινίδια - το κύριο αμυλοειδές φορτίο της νόσου. Μια πληθώρα γενετικών παραγόντων, που είτε κληρονομούνται με αυτοσωμικό κυρίαρχο χαρακτήρα είτε εμφανίζονται σαν αλληλόμορφα γονίδια που προδιαθέτουν αλλά δεν προκαλούν τη νόσο από μόνα τους οδηγεί σε υψηλή παραγωγή, ελαττωμένη πρωτεόλυση ή ελαττωματική εκκαθάριση του πεπτιδίου Αβ₄₂, το οποίο τελικά οδηγεί μέσα από ποικίλους μοριακούς μηχανισμούς στο θάνατο του κυττάρου [41]. Ενδιαφέρον είναι, ότι πλήρους μήκους APP με άθικτη την κυτταροπλασματική περιοχή απεδείχθη να υπάρχει σε διαλυτή μορφή (sAPPf) [42,43], η ύπαρξη της οποίας επιβεβαιώθηκε πρόσφατα σε ανθρώπινο εγκεφαλονωτιαίο υγρό [44].

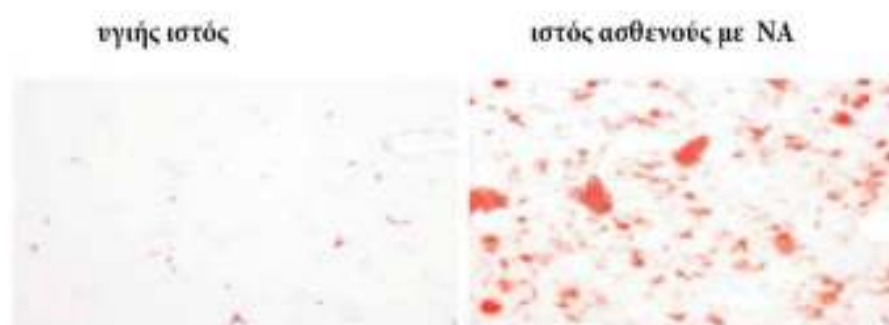
1.2. ΤΟ β -ΑΜΥΛΟΕΙΔΕΣ

1.2.1. Ο όρος του αμυλοειδούς

Ως αμυλοειδές περιγράφουμε την ινώδη, αδιάλυτη, κρυσταλλική πρωτεΐνη που εναποτίθεται σε όργανα και ιστούς. Το αμυλοειδές είναι αδιάλυτο και η δευτεροταγής δομή του χαρακτηρίζεται κύρια από δομή β -πτυχωτού φύλλου. Ο όρος αμυλοειδές προήλθε από μια εσφαλμένη διαπίστωση του Rudolf Virchow, ο οποίος, οδηγούμενος από ιστοπαθολογικές αναλύσεις, θεώρησε ότι οι χαρακτηριστικές ινώδεις δομές που χρωματίζονταν στις τεχνικές χρώσης με βάση το ιώδιο, ήταν άμυλο (**Εικόνα 1.7**) [45]. Για μια μακρά περίοδο η επιστημονική κοινότητα διαφωνούσε για το αν οι εναποθέσεις αυτές είναι λιπώδους προέλευσης ή συσσωματώματα υδατανθράκων. Εντέλει, το 1859 αποδείχθηκε ότι επρόκειτο για εναποθέσεις πρωτεϊνικού υλικού. Σε αντίθεση με τις άλλες ινώδεις πρωτεΐνες, το

αμυλοειδές δεν έχει σαφή δομικό, στηρικτικό ή κινητικό ρόλο, αλλά συνδέεται με την παθολογία μιας ομάδας ασθενειών γνωστών ως «αμυλοειδώσεις».

Σαν αμυλοείδωση περιγράφεται ένα ετερογενές σύνολο διαταραχών που συνδέονται με την εναπόθεση πρωτεΐνης σε μια μη φυσιολογική, ινώδη μορφή. Το ευρύ φάσμα των νόσων που συνδέονται με την εναπόθεση αμυλοειδούς περιλαμβάνει την νόσο του Alzheimer, το διαβήτη τύπου II και τις μεταδοτικές σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες. Η αμυλοείδωση μπορεί να είναι κληρονομική ή επίκτητη, εντοπισμένη ή συστημική.



Εικόνα 1.7 Χρώση ιστών με το ερυθρό του Congo. Διακρίνονται οι αμυλοειδείς εναποθέσεις στον παθολογικό ιστό (θανόντος ασθενούς με νόσο του Alzheimer). Προσαρμογή και τροποποίηση από Hidalgo et al., 2006.

Οι διάφορες μορφές εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια στη σύστασή τους και τα πεπτίδια από τα οποία αποτελούνται σε μεγαλύτερο ποσοστό είναι αυτά που χρησιμεύουν για την ταξινόμησή τους. Παρόλη την ετερογένεια που υπάρχει στις πρόδρομες πρωτεΐνες των αμυλοειδών, όλα τα ινίδια έχουν αξιοσημείωτα παρόμοια διαμόρφωση και έχουν πολλές κοινές φυσικοχημικές ιδιότητες, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε δομή β-πτυχωτού φύλλου. Τα ινίδια αμυλοειδούς, που σχηματίζονται από διαλυτές πρωτεΐνες υπό φυσιολογικές συνθήκες, σχηματίζουν αδιάλυτες ίνες που είναι ανθεκτικές στην αποικοδόμηση. Ο σχηματισμός τους επιφέρει παθογένεια και κάθε ασθένεια χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη πρωτεΐνη ή πεπτίδιο που συσσωματώνεται. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται 31 μη σχετιζόμενες πρωτεΐνες που αναφέρονται από την επιτροπή ονοματολογίας της Διεθνούς Εταιρείας αμυλοείδωσης (International Society of Amyloidosis) ότι προκαλούν αμυλοείδωση [46,47].

1.2.2. Η υπόθεση του καταρράκτη του αμυλοειδούς στην νόσο του Alzheimer

Όπως προαναφέρθηκε, η εναπόθεση των αμυλοειδών είναι αιτία παθογένεσης σοβαρών ασθενειών. Το θραύσμα της APP, γνωστό σαν β-αμυλοειδές (Αβ), είναι το κύριο συστατικό των αμυλοειδικών πλακών που εντοπίζονται σε ασθενείς με ΝΑ [48]. Παρόμοιοι σχηματισμοί, που αποτελούνται από συσσωματώματα πρωτεϊνών, εντοπίζονται σε μερικές μορφές άνοιας με εντοπισμό σωματίων Lewy (Lewy Body Dementia) και μυοσίτιδες από έγκλειστα σωματίδια. Επιπλέον, το πεπτίδιο Αβ μπορεί να αποτελεί συστατικό που επενδύει τα αγγεία του εγκεφάλου στις περιπτώσεις εγκεφαλικής αμυλοειδούς αγγειοπάθειας. Οι πλάκες αυτές αποτελούνται από συνασπισμούς διαταγμένων ινιδίων, που ονομάζονται ινίδια αμυλοειδούς. Η πτύχωση αυτή αποτελεί κοινό γνώρισμα και άλλων πρωτεϊνοπαθειών, όπως για παράδειγμα των νόσων των prion [49].

Καθώς η παραγωγή του Αβ φαίνεται να εξαρτάται τόσο από τα επίπεδα της APP όσο και από παράγοντες που εμπλέκονται στην επεξεργασία της, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην σύνδεση της έκφρασης του *APP* γονιδίου με την ΝΑ. Υπερέκφραση της APP σχετίζεται με συσσώρευση Αβ πεπτιδίων μετά από σοβαρούς τραυματισμούς στο κεφάλι, και η υπερέκφραση αλληλόμορφων του *APP* με παρανοηματικές μεταλλαγές σε μύες οδηγεί σε παρόμοιο φαινότυπο με αυτόν της νόσου στον άνθρωπο [50]. Το πεπτίδιο Αβ αποτελεί το κύριο συστατικό του αμυλοειδούς που εντοπίζεται στο εγκεφαλικό παρέγχυμα και στα αγγεία. Δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως πως το β-αμυλοειδές συγκεντρώνεται στο ΚΝΣ και οδηγεί στην παθογένεια των κυττάρων. Μια πιθανή εκδοχή είναι η θεωρία της «Υπόθεσης του καταρράκτη του αμυλοειδούς» (Amyloid Cascade hypothesis), που καθιστά το σχηματισμό του Αβ πεπτιδίου ως την έναρξη ενός καταρράκτη γεγονότων που οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου [51]. Τα Αβ πεπτίδια συσσωματώνονται αυθόρμητα και εναποτίθενται ως διαλυτά ολιγομερή, ινίδια και τελικά σε αμυλοειδικές/αμυλοειδείς πλάκες (SP, senile plaques). Οι δομές αυτές ευθύνονται για τη δημιουργία οξειδωτικού στρες, για την επαγωγή δραστηριότητας των αστροκυττάρων-στηρικτικά κύτταρα του νευρικού συστήματος - τα οποία είναι σε θέση να εναποθέτουν πρωτεογλυκάνες γύρω από τα συσσωματώματα του πεπτιδίου Αβ, ενδεχομένως στην προσπάθεια απομόνωσης αυτού του νευροτοξικού πεπτιδίου και στην παρεμπόδιση των βλαβερών για τον οργανισμό αποτελεσμάτων του. Η αλυσίδα αυτών των γεγονότων οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο των νευρικών κυττάρων [52]. Η συσσωμάτωση του Αβ θεωρείται ο πρωταρχικός παράγοντας

νευροτοξικότητας και μάλιστα τα ολιγομερή Αβ είναι η πλέον τοξική μορφή. Επιπλέον, η απόπτωση που επάγεται από το Αβ μέσω της αλληλεπίδρασης με τους επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς και τις κασπάσες επίσης θεωρείται ότι επιβαρύνει τη δυσλειτουργία του νευρικού συστήματος [53].

1.3. ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

1.3.1. Το οξειδωτικό στρες-μηχανισμός και επιπτώσεις στα κύτταρα

Τα αίτια των καταστρεπτικών ιδιοτήτων του οξυγόνου ήταν άγνωστα πριν από τη δημοσίευση της θεωρίας των Gershman et al το 1954, σύμφωνα με την οποία η τοξικότητα του οξυγόνου οφείλονται σε μερικώς αναχθείσες μορφές οξυγόνου [54]. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) είναι χημικά είδη με βάση το οξυγόνο που χαρακτηρίζονται από υψηλή δραστικότητα και διαθέτουν διαφορετικές δομές μεταξύ των οποίων, οι ελεύθερες ρίζες, όπως το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-), τα ανιόντα υδροξυλίου (OH^-), οι ρίζες αλκυλίων ($RO\bullet$) και διάφορες άλλες μορφές οι οποίες είναι είτε οξειδωτικοί παράγοντες και/είτε μετατρέπονται πολύ εύκολα σε ενεργές ρίζες όπως το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), το όζον (O_3), και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2).

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα και μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα. Πρόκειται για μορφές με ιδιαίτερα μεγάλη σημασία στην προέλευση της ζωής και τη βιολογική εξέλιξη, που προσδίδουν ευεργετικές ιδιότητες στους οργανισμούς. Οι ρίζες οξυγόνου εμπλέκονται σε πολλές βιοχημικές διεργασίες των κυττάρων όπως η μεταγωγή σήματος, η γονιδιακή έκφραση και η ρύθμιση της δραστηριότητας της γουανυλικής κυκλάσης [55].

Το υπεροξειδίο του αζώτου (NO) συνιστά ένα ιδιαίτερα σημαντικό μόριο σηματοδότησης που ρυθμίζει τη χάλαση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων των λείων μυικών ινών, την προσκόλληση των λευκοκυττάρων, τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, την αγγειογένεση, τη θρόμβωση, τον αγγειακό τόνο και την αιμοδυναμική [56].

Το ανθρώπινο σώμα παράγει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και άλλα είδη ελεύθερων ριζών σαν προϊόντα πολλών φυσιολογικών και βιοχημικών αντιδράσεων. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται κυρίως στο σώμα κυρίως λόγω του αερόβιου μεταβολισμού. Συγχρόνως, αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως η γλουταθειόνη, η αργινίνη, η κιτροουλίνη, η ταυρίνη, η κρεατίνη, το σελήνιο, ο ψευδάργυρος, η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, η βιταμίνη A και οι πολυφαινόλες του τσαγιού προσπαθούν να διατηρήσουν το ισοζύγιο παραγωγής ROS και εξουδετέρωσης τους. Η δράση των αντιοξειδωτικών ενισχύεται περαιτέρω με αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η δεσμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση, η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης που ασκούν συνεργιστική δράση στην απομάκρυνση των βλαβερών ROS [57]. Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μια μη φυσιολογική κατάσταση που επηρεάζει τα βιολογικά συστήματα. Αναφέρεται στη διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να ανταπεξέλθει στα επίπεδα των ROS, να αποτρέψει την επιβλαβή τους επίπτωση και να αποκαταστήσει τις προκύπτουσες επιζήμιες δράσεις τους. Οι ROS είναι δυνητικά βλαβερές για τα περισσότερα κυτταρικά συστατικά καθώς προκαλούν εκτεταμένες οξειδωτικές βλάβες στα λιπίδια των μεμβρανών, στο DNA και στις πρωτεΐνες. Κατά συνέπεια, το οξειδωτικό στρες ενοχοποιείται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων.

1.3.2. Οξειδωτικό στρες και στρες ενδοπλασματικού δικτύου

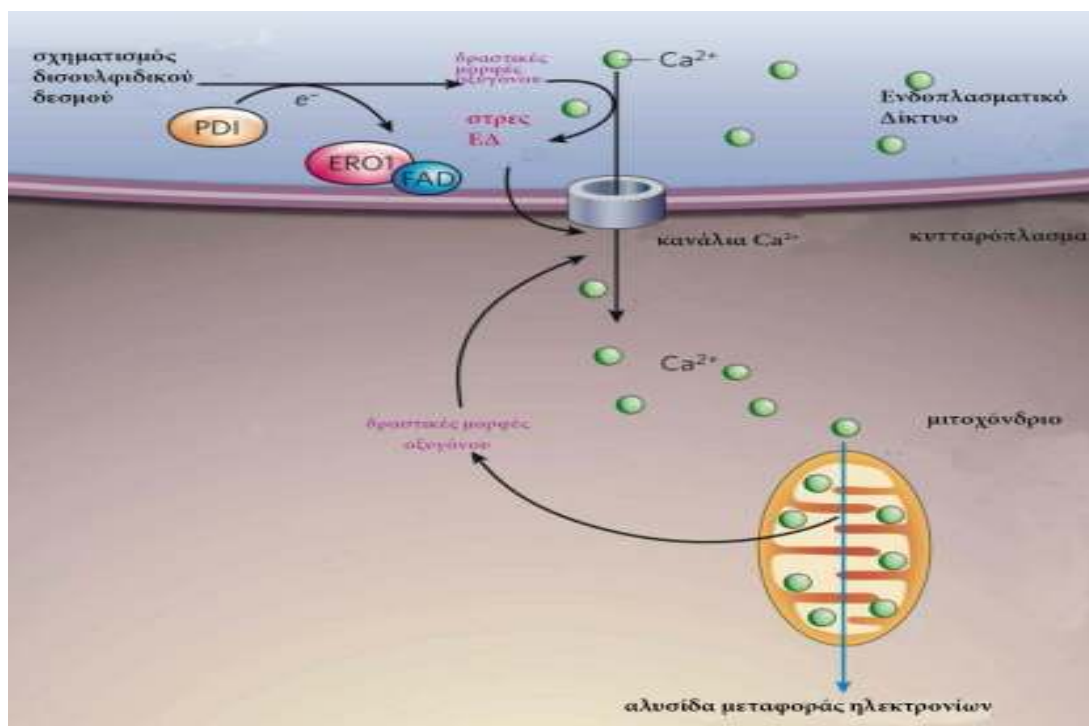
Είναι πλέον επιστημονικά αποδεδειγμένο πως το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) συνδέονται, εάν και οι μοριακοί μηχανισμοί με τους πραγματοποιείται αυτό δεν είναι πλήρως κατανοητοί [58].

Είναι βέβαιο, ότι η σωστή λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του. Σε αντίθεση με το κυτταρόπλασμα που διατηρεί αναγωγικό το περιβάλλον του, στο ΕΔ επικρατεί οξειδωτικό περιβάλλον με σημαντική διαφορά του λόγου της οξειδωμένης προς την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSSG/GSH). Οι οξειδωτικές αυτές συνθήκες βοηθούν το

σηματισμό ενδομοριακών και διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών, οι οποίοι, είναι απαραίτητοι για τη σταθεροποίηση και τη λειτουργία των πρωτεϊνών που εισέρχονται στο ΕΔ [59]. Ο σχηματισμός των δισουλφιδικών δεσμών ελέγχεται από την οικογένεια των οξειδοαναγωγασών του ΕΔ που περιλαμβάνει πολλά μέλη όπως τη PDI (protein disulfide isomerase), τις ERp57, ERp72, την PDIR, την PDIP και την P5. Σημαντικό ρόλο στην αντίδραση σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών διαδραματίζει η οξείδωση του υποστρώματος και η αναγωγή του ενεργού κέντρου του ενζύμου PDI. Η ισομεράση PDI δέχεται άμεσα τα ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα την οξείδωση των καταλοίπων κυστεΐνης και το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Στη συνέχεια η οξειδάση 1 του ΕΔ (ERO1) χρησιμοποιεί μια αντίδραση εξαρτώμενη από φλαβίνη για να μεταφέρει ηλεκτρόνια από την ισομεράση PDI στο μοριακό οξυγόνο, οξειδώνοντας τη PDI [60]. Η μεταφορά αυτή των ηλεκτρονίων οδηγεί στην αναγωγή του μοριακού οξυγόνου και στο σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Έχει υπολογιστεί ότι περίπου 25% των δραστικών μορφών οξυγόνου που παράγονται στο κύτταρο προέρχονται από αυτή τη διαδικασία. Έτσι, η λειτουργία του ΕΔ προκαλεί οξειδωτικό στρες (ή οξειδωτική καταπόνηση) ενώ πιθανά το ίδιο ισχύει και για τη συσσώρευση μη ορθά πτυχωμένων πρωτεϊνών, χωρίς όμως οι σχετικοί μηχανισμοί να έχουν διαλευκανθεί. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου που παράγονται με τον τρόπο αυτό, μπορούν να προκαλέσουν μη φυσιολογική πτύχωση και να εμποδίσουν την έκκριση πρωτεϊνών. Η επαγωγή της απόκρισης σε μη φυσιολογικά πτυχωμένες πρωτεΐνες στο οξειδωτικό στρες αποτελεί προσαρμοστικό μηχανισμό για την επιβίωση του κυττάρου και τη διατήρηση της λειτουργικότητας του αλλά μπορεί ωστόσο να οδηγήσει και στο θάνατο του [61].

Ένας άλλος μηχανισμός συσχέτισης του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου με το οξειδωτικό στρες, αφορά το ιόν του ασβεστίου (Ca²⁺) (**Εικόνα 1.8**). Και τα δυο αυτά είδη στρες προκαλούν την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από το ΕΔ. Η αύξηση όμως του κυτταροπλασματικού ασβεστίου επάγει την παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια. Μεγάλες συγκεντρώσεις ROS στα μιτοχόνδρια προκαλούν ακόμα μεγαλύτερη απελευθέρωση ασβεστίου από το ΕΔ και καθώς η αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου φθίνει, ο φαύλος αυτός κύκλος αποτελεί απειλή για την επιβίωση του κυττάρου. Με βάση τα δεδομένα αυτά, γενετική ή χημική παρέμβαση για την ελάττωση των ROS θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανή οδό για την πρόληψη ή τη

θεραπεία των ασθενειών που σχετίζονται με τη μη φυσιολογική πτύχωση των πρωτεϊνών [62].



Εικόνα 1.8 Ο ρόλος των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) και των δραστικών μορφών οξυγόνου στην διαδικασία ορθής πτύχωσης των πρωτεϊνών. Η πρωτεϊνική πτύχωση είναι μία οξειδωτική διαδικασία που δημιουργεί δραστικές μορφές οξυγόνου οι οποίες μπορούν να στοχεύσουν συνοδούς πρωτεΐνες και κανάλια ιόντων ασβεστίου οδηγώντας στην απελευθέρωση από το ΕΔ στο κυτταρόπλασμα. Τα ιόντα που απελευθερώνεται από το ΕΔ συγκεντρώνεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, διαταράσσοντας την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, οδηγώντας έτσι στην παραγωγή περισσότερων δραστικών μορφών οξυγόνου. Οι παραχθείσες αυτές δραστικές μορφές οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια μπορούν να επιδεινώσουν περαιτέρω την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από το ΕΔ με αποτέλεσμα τη συσσώρευση τους σε τοξικό επίπεδο. Προσαρμογή και τροποποίηση από [62].

1.3.3. Οι ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες ως διαμεσολαβητές της απάντησης του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες

Σε κυτταρικό επίπεδο, η οξειδωτική καταπόνηση προκαλεί ένα ευρύ φάσμα απαντήσεων που κυμαίνονται από τον πολλαπλασιασμό, την παύση του κυτταρικού κύκλου έως και τον κυτταρικό θάνατο. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα που παρατηρείται μπορεί να διαφέρει σημαντικά από τον ένα τύπο κυττάρου στον άλλο, καθώς και σε σχέση με το είδος της καταπόνησης, το μέγεθος ή / και της διάρκειας αυτής. Ανεξαρτήτως του τελικού αποτελέσματος, η απάντηση του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες αποτελεί τη συνισταμένη ποικιλίας ενδοκυττάρων οδών

σηματοδότησης που πυροδοτούνται, αλλάζοντας φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του κυττάρου, εν μέρει μέσω της διαφοροποίησης της γονιδιακής έκφρασης.

Κάποιες από αυτές τις οδούς συνιστούν τα μονοπάτια σηματοδότησης των ενεργοποιημένων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (MAPKs). Τα μέλη της υπεροικογένειας των MAPKs είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης, η ενζυμική δραστηριότητα των οποίων επάγεται με διπλή φωσφορυλίωση της αμινοξικής ακολουθίας, θρεονίνη-X-τυροσίνη (όπου X μπορεί να είναι το γλουταμινικό οξύ, η γλυκίνη ή η προλίνη), γνωστή ως βρόχος ενεργοποίησης (activation loop). Η ταυτότητα του X αμινοξέος καθορίζει τη ταξινόμηση των μελών της οικογένειας, σε τρεις επιμέρους υποοικογένειες: τις ρυθμιζόμενες από εξωκυττάρια σήματα, ERKs (extracellular signal-regulated kinase), τις p38 MAPK, και τις κινάσες του καρβοξυτελικού άκρου του μεταγραφικού παράγοντα JUN, JNKs (c-Jun NH₂-terminal kinase). Οι MAPKs διαμεσολαβούν τις επιδράσεις τους μέσω φωσφορυλίωσης ενός ευρέος φάσματος πρωτεϊνών τελεστών, μεταξύ αυτών άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, (MAPKAPKs) ,μεταγραφικών παραγόντων και πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού [63].

1.3.3. Η συμβολή του οξειδωτικού στρες στην εκδήλωση της νόσου του Alzheimer

Η μέση διάρκεια ζωής του ανθρώπου έχει παραταθεί σημαντικά, στο εγγύς μέλλον, αναμένεται συνεχής αύξηση του προσδόκιμου ζωής. Η γήρανση είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου και της νόσου του Alzheimer [64,65]. Η νόσος του Alzheimer και η ισχαιμική βλάβη του εγκεφάλου χαρακτηρίζονται από εκτεταμένες λειτουργικές διαταραχές του ανθρώπινου εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένης της άνοιας [66]. Μερικές υποθέσεις υποδεικνύουν ότι τα γερασμένα νευρικά κύτταρα έχουν αυξημένη ευαισθησία, δεδομένου ότι η ηλικία τους συμπίπτει με αυτή των ανθρώπων στους οποίους ανήκουν [67]. Από την άλλη πλευρά, πολλές ασθένειες του νευρικού συστήματος ξεκινούν με τους ίδιους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ανάπτυξη

και την εξέλιξη αυτών των ασθενειών. Όπως προαναφέρθηκε η συσσώρευση και η συσσωμάτωση ορισμένων πρωτεϊνών μπορεί να έχει τοξική δράση, μπορεί να καταστείλει την λειτουργία των νευρικών κυττάρων και να προκαλέσει το θάνατο τους [68]. Τμήματα της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς και η υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνη Tau παίζουν καθοριστικό ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου και τη νόσο του Alzheimer [69].

Η πρωτεΐνη Tau είναι μια φωσφοπρωτεΐνη, ανήκει στην ομάδα των MAP (Microtubule-associated protein) πρωτεϊνών που αφθονούν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η tau σταθεροποιεί τους νευρωνικούς μικροσωληνίσκους και προωθεί τη νευρωνική ανάπτυξη. Ανταγωνίζεται με την κινητήρια πρωτεΐνη κινεσίνη για τη δέσμευση των μικροσωληνίσκων, και αναστέλλει την αξονική μεταφορά. Οι ενδοκυττάριας νευροϊνιδικές αλλοιώσεις (ινιδικά-αθροίσματα) που παρατηρούνται στη νόσο του Alzheimer σχηματίζονται από την υπερφωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνη tau. Πιο συγκεκριμένα, όταν η Tau φωσφορυλιώνεται χάνει τη συγγένειά της για τους μικροσωληνίσκους, συναθροίζεται στο κύτταρο και σχηματίζει τις χαρακτηριστικές αλλοιώσεις. Η φωσφορυλίωση αυτή έχει δειχθεί ότι διαμεσολαβείται από μέλη της υπεροικογένειας των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (Mitogen-Activated Protein Kinases/MAPKs) JNK, p38 και ERK [70].

Επίσης, το οξειδωτικό στρες θεωρείται βασικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου του Alzheimer [71]. ROS όπως το ανιόν υπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$), η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) είναι τυπικοί ενεργοποιητές των JNK και p38 σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν στη νόσο του Alzheimer [72,73]. Τα ενεργοποιημένα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPK θεωρείται ότι συμβάλλουν στην παθογένεση της νόσου μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως:

1. την επαγωγή της απόπτωσης στους νευρώνες [74]
2. τη μεταγραφική και ενζυματική ενεργοποίηση των β - και γ -σεκρετασών [75]
3. αλλά και τη φωσφορυλίωση και τη σταθεροποίηση της APP από τις JNKs, ένα από τα σημαντικότερα βήματα στη έναρξη της νόσου [76].

Είναι γνωστό ότι οι ASK-1 (apoptosis signal-regulatory kinase) και MAP3K που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια JNK και p38 ενεργοποιούνται σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες [77]. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, είναι γνωστό ότι το ασκορβικό οξύ, η υπεροξειδική δισμουτάση και η καταλάση, αναστέλλουν την ενεργοποίηση των p38 MAPK και JNKs από ROS σε καρδιές αμφιβίων [78] που έχουν υποστεί υπερθερμία [79]. Ο διμερισμός της APP, επάγει την ενεργοποίηση του ASK1-MKK6-p38 σηματοδοτικού μονοπατιού [80] (**Εικόνα 1.10Α**).

Επιπλέον, τα συσσωματώματα των Aβ₄₂ πεπτιδίων επάγουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων, τα οποία στη συνέχεια παράγουν ROS και κυτοκίνες (TNF-α και IL-1β), μόρια τα οποία επάγουν τα μονοπάτια MAPK (**Εικόνα 1.10Β**).

Κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες, οι JNK και p38 ενεργοποιούνται και διεγείρουν την έκφραση του γονιδίου της β-σεκρετάσης, εάν και οι ERK1/2 ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση της β-σεκρετάσης (**Εικόνα 1.10Γ**). Η γ-σεκρετάση ενεργοποιείται ειδικά από τα μόρια ιντερφερόνη-γ, IL-1β ή TNF-α και αυτή η επαγομένη από κυτοκίνες ενεργοποίηση της γ-σεκρετάσης βρέθηκε να αναστέλλεται από καταστολείς των JNK και να ενισχύεται από ιδιοσυστατικά ενεργή μορφή της MEKK1 [81]. Ως εκ τούτου τα στοιχεία δείχνουν ότι τα MAPK σηματοδοτικά μονοπάτια συμβάλουν στην παθογένεση της νόσου μέσω της ρύθμισης της απόπτωσης, τον έλεγχο της μεταγραφής των βασικών ενζύμων επεξεργασίας της APP, και της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης των πρωτεϊνών APP και tau [82].



Εικόνα 1.10 Οι ρόλοι των MAPKs στην παθογένεια της νόσου του Alzheimer (NA). (A) Ο διμερισμός της APP, διαμεσολαβούμενος από τα τμήματα Aβ της πρωτεΐνης, ενεργοποιεί τον καταρράκτη ASK1-MKK6-p38, ο οποίος οδηγεί στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau και τη δημιουργία νευροϊνδικών αλλοιώσεων. Η JNK εμπλέκεται στη φωσφορυλίωση και σταθεροποίηση της APP. (B) Σύσσωματώματα των Aβ42 θραυσμάτων επάγουν την ενεργοποίηση των μακροφάγων, τα οποία στη συνέχεια παράγουν ROS και κυτοκίνες (TNF-α και IL-1β), μόρια τα οποία επάγουν την ενεργοποίηση των JNK και p38 μονοπατιών. Τα μονοπάτια αυτά μπορεί να αποτελούν τη βάση επαγωγής του θανάτου νευρώνων. (Γ) Το οξειδωτικό στρες οδηγεί στην ενεργοποίηση των JNK και p38 κινάσης, αυτές με τη σειρά τους αυξάνουν την έκφραση του γονιδίου της β-σεκρετάσης. Σε αντίθεση, οι ERK1/2 ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση της β-σεκρετάσης. Προσαρμογή και τροποποίηση από [82].

1.3.4. Η συμβολή του οξειδωτικού στρες σε παθήσεις του μυοκαρδίου

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις είναι από τις βασικότερες αιτίες παθογένειας και θανάτου. Αυτή ακριβώς η επίπτωση τους στη δημόσια υγεία είναι ο βασικός λόγος για τον οποίο αποτελούν αντικείμενο έντονης έρευνας. Το καρδιαγγειακό σύστημα είναι ένα από κυτταρικά ομοιοστατικά συστήματα των οποίων η λειτουργικότητα επηρεάζεται από τις βλάβες που προκαλεί το οξειδωτικό στρες. Ο καρδιακός μυς αποδεικνύεται πιο ευπαθής καθώς χαρακτηρίζεται από μικρό βαθμό κυτταρικής διαίρεσης. Έτσι οι βλάβες από την οξειδωτική καταπόνηση συσσωρεύονται, γεγονός που επιβαρύνεται από την έντονη οξειδωτική καταπόνηση του καρδιακού μυός λόγω της έντονης και διαρκούς λειτουργίας του, καθόλη τη διάρκεια της ζωής [83]. Η επίπτωση του οξειδωτικού στρες έχει αποδειχθεί σε πολυάριθμες ασθένειες, όπως στην αθηροσκλήρωση, στην καρδιακή ανεπάρκεια και στην ισχαιμία¹ του

¹ Ο όρος ισχαιμία αναφέρεται στη διαταραχή του ισοζυγίου ανάμεσα στο ποσοστό του οξυγόνου που προσφέρεται στον καρδιακό μυ και στο ποσοστό που απαιτείται για τη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας.

μυοκαρδίου [84]. Ειδικότερα, μία από τις κυριότερες εκδηλώσεις οξειδωτικού στρες στην καρδιά είναι η ισχαιμία και η επακόλουθη επαναιμάτωση. Η ισχαιμία του μυοκαρδίου είναι υπεύθυνη για την στηθάγχη, την ασταθή στηθάγχη, την εμφάνιση δύσπνοιας, την ισχαιμική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας της καρδιάς και την εμφάνιση αρρυθμιών. Η καρδιακή ανακοπή που επακολουθεί, είναι μία από τις κύριες αιτίες θανάτου και αναπηρίας στο δυτικό κόσμο.

Ο μυς της καρδιάς είναι ένας σχηματισμός πλούσιος σε μιτοχόνδρια, που πρέπει να συστέλλεται ρυθμικά, συνεχώς και ακατάπαυστα. Στον ιστό αυτόν επιτελείται ταχύτατη οξείδωση υποστρωμάτων, με ταυτόχρονη σύνθεση ATP ώστε να μπορεί να ανταποκριθεί στις μεγάλες ενεργειακές ανάγκες του μυοκαρδίου. Ο μεγάλος αριθμός των μιτοχονδρίων εξασφαλίζουν τα απαραίτητα ένζυμα για την διεξαγωγή της οξειδωτικής φωσφορλίωσης. Λόγω της συνεχούς λειτουργίας του καρδιακού μυός απαιτείται αρκετή ενέργεια για αυτό και δεν εντοπίζονται αποθέματα γλυκογόνου ή λιπιδίων στα καρδιακά μυοκύτταρα. Το μυοκάρδιο αποτελεί μοναδική περίπτωση, καθώς μπορεί να συσπάται ακόμη και όταν απονευρωθεί, αρκεί να του παρέχεται η κατάλληλη ποσότητα οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. Αυτό οφείλεται στον ενδογενή καρδιακό ρυθμό (λόγω του βηματοδότη). Ο ρυθμός μεταδίδεται σε όλο το μυοκάρδιο με τη μορφή εκπολώσεων της κυτταρικής μεμβράνης διαμέσου των κυττάρων, μέσω ειδικών δομών, των χασματοσυνδέσεων. Κύριο συστατικό των χασματοσυνδέσεων είναι η πρωτεΐνη κονεξίνη. Τα καρδιακά μυοκύτταρα είναι κύτταρα με δομή υψηλής οργάνωσης, προϊόν εξέλιξης προς εξυπηρέτηση των υψηλών ενεργειακών απαιτήσεων της καρδιάς. Πρόκειται για κύτταρα πλούσια σε μυοϊνίδια (50% του συνολικού όγκου) και μιτοχόνδρια (30% του συνολικού όγκου). Η σύσταση των σαρκομεριδίων βασίζεται σε ινίδια ακτίνης και μυοσίνης. Η βράχυνση του σαρκομεριδίου είναι αυτή που επιτρέπει τη σύσπαση, αφού ολισθήσουν τα νημάτια ακτίνης κατά μήκος των νηματίων μυοσίνης. Η ολίσθηση επιτυγχάνεται χάρη στις γέφυρες που χρησιμεύουν στην ένωση των ινιδίων μεταξύ τους. Τα σαρκομερίδια βρίσκονται διατεταγμένα από τη μια άκρη του καρδιακού μυοκυττάρου, σε σειρά, και σχηματίζουν το μυοϊνίδιο.

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών στον καρδιακό μυ είναι χαμηλή υπό φυσιολογικές συνθήκες. Συνήθως η παραγωγή τους αφορά μια «διαρροή» που παρατηρείται από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου. Το καρδιακό μυοκύτταρο αποκρίνεται σε χαμηλά επίπεδα ROS μετατρέποντας τα σε

λιγότερο δραστικά μόρια (H_2O_2), μέσω της δράσης της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (Superoxide Dismutase ή SOD). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μετατρέπεται μετέπειτα σε νερό είτε μέσω της δράσης καταλάσης (Catalase ή CAT) είτε μέσω της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης [85]. Αντιθέτως, σε καταστάσεις ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, τα επίπεδα των ROS σημειώνουν σημαντική αύξηση η οποία προέρχεται από διάφορες πηγές. Αυτές περιλαμβάνουν την διατάραξη της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στο μιτοχόνδριο, την οξειδάση του NADPH, τη συνθάση του NO, την οξειδάση της ξανθίνης, τη μονοοξυγενάση του κυτοχρώματος P450, την μονοοξυγενάση και την κυκλοοξυγενάση. Επιπροσθέτως, το κυτταρικό αντιοξειδωτικό δυναμικό εξαντλείται κατά την ισχαιμία (και την επαναιμάτωση) καθώς παρατηρείται χαμηλή δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και CAT. Η σοβαρότητα της φθοράς στο καρδιακό μυοκύτταρο κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση κυμαίνεται ανάμεσα σε αναστρέψιμα επίπεδα ή και θανάσιμα. Η αναλογία αυτή εξαρτάται από τα επίπεδα των αντιδράσεων των βιομορίων του κυττάρου με τα ROS.

Μέλη της υπεροικογένειας των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (MAPKs), JNK, p38 και ERK, παίζουν καθοριστικό ρόλο στις παθήσεις της καρδιάς. Κεντρικό ρόλο στους ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς που ευθύνονται για την υπερτροφία ²- αύξηση μεγέθους των καρδιακών μυοκυττάρων ως απόκριση στο κατάλληλο ερέθισμα - του μυοκαρδίου, διαδραματίζουν οι κινάσες ERKs [86]. Διέγερση των καρδιακών μυοκυττάρων με αγωνιστές που επάγουν την υπερτροφία όπως οι φορβολεστέρες [87], η ενδοθηλίνη, η αγγειοτενσίνη και η νορεπινεφρίνη ενεργοποιεί τις ERKs [88]. Επιπλέον, η επιμόλυνση των καρδιακών μυοκυττάρων με ιδιοστατική έκφραση πρωτεϊνών του μονοπατιού των ERKs προκαλεί τις χαρακτηριστικές αλλαγές στη γονιδιακή ρύθμιση και τη μορφολογία των κυττάρων [89]. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, όπου η έκφραση της MAP κινάσης φωσφατάσης 1 -αρνητικός ρυθμιστής της δραστηριότητας των MAP κινάσεων - αναστέλλει την υπερτροφία του μυοκαρδίου *in vitro* και *in vivo* [90]. Οι υποοικογένειες των JNKs και p38 MAPK συμμετέχουν επίσης στην εκδήλωση καρδιακής υπερτροφίας. Παράγοντες που επάγουν την υπερτροφία και

² Καρδιακή υπερτροφία, στα αρχικά στάδια, είναι μέρος μιας αντισταθμιστικής απόκρισης σε εξωτερικά στρεσογόνους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της μηχανικής καταπόνησης και του οξειδωτικού στρες.

κινητοποιούν τις JNKs και p38 MAPK, περιλαμβάνουν την αγγειοτενσίνη και τη μηχανική καταπόνηση.

Επίσης, οι JNKs και p38 MAPK διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ισχαιμία, με πολλές μελέτες σε πειραματικά μοντέλα να αποδεικνύουν τη συμμετοχή τους στη συγκεκριμένη απόκριση [91, 92, 93]. Ειδικότερα, σε μελέτες των Bogoyevitch και των συνεργατών του [94], εξακριβώθηκε η ενεργοποίηση των JNKs κατά τον επανεμποτισμό της καρδιάς, η οποία είχε προηγουμένως υποβληθεί σε ισχαιμία. Αντίθετα, η p38 MAPK διαπιστώθηκε ότι ενεργοποιείται τόσο κατά την επίδραση ισχαιμίας, όσο και κατά τον επακόλουθο επανεμποτισμό [95]. Στις συγκεκριμένες σηματοδοτικές οδούς είναι πιθανό να συμμετέχουν ROS, που παράγονται κατά την επανοξυγόνωση της καρδιάς. Προσομοίωση των συνθηκών αυτών με την επίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου, σε απομονωμένη καρδιά, αλλά και σε καλλιέργειες καρδιακών μυοκυττάρων επάγει την ενεργοποίηση των ERKs, JNKs και p38 MAPKs. Παρά το γεγονός ότι η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του Ras-Raf-MEK-ERK μονοπατιού σηματοδότησης μπορεί να οδηγήσει όπως είδαμε στην υπερτροφία του μυοκαρδίου, ωστόσο αναστέλλοντας αυτό το μονοπάτι μπορεί να καταστήσει τις καρδιές πιο ευάλωτες στο στρες και να οδηγήσει τα κύτταρα στο θάνατο [96]. Καθώς αναστολείς των Ras, Raf-1, και MEK1 αναπτύσσονται σήμερα, ως αντικαρκινικά φάρμακα, οι ενδεχόμενες αρνητικές επιπτώσεις των φαρμάκων αυτών στην καρδιά οφείλει η επιστημονική κοινότητα να παρακολουθήσει με προσοχή.

Στην περίπτωση των JNKs, αυτές έχουν τόσο αντι-αποπτωτικό ρόλο όσο και προ-αποπτωτικό σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Μέσω της χρήσης ενός προσφάτως δημιουργημένου αναστολέα, η JNK δραστηριότητα φάνηκε να παίζει καθοριστικό ρόλο στην απόπτωση μυοκυττάρων μετά από ισχαιμία [97]. Σε αντίθεση, ένας αριθμός άλλων μελετών αποδεικνύει τον κρίσιμο ρόλο των JNK στην επιβίωση των μυοκυττάρων [98,99]. Όπως και για τις JNKs έτσι και για τις κινάσες p38, ο ρόλος τους είναι εξαιρετικά αμφιλεγόμενος. Σε πολλές μελέτες, η αναστολή της δράσης της p38 μειώνει τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε καρδιακά μυοκύτταρα που έχουν υποβληθεί σε ισχαιμία [100,101]. Ωστόσο, άλλη μελέτη έδειξε ότι αναστολή της p38 οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση [102]. Οι υποκείμενος μηχανισμός που διέπει τη διαφορική λειτουργία του p38 παραμένει ένας γρίφος.

ΣΚΟΠΟΣ

Αυξανόμενος αριθμός μελετών υποστηρίζει μια ισχυρή συσχέτιση των καρδιαγγειακών παθήσεων (cardiovascular disease ή CVD) και της νόσου του Alzheimer [103,104-106]. Αρκετοί παράγοντες, όπως η υποξία, η ύπαρξη συσσωματωμάτων β- αμυλοειδούς και το οξειδωτικό στρες έχουν προταθεί ως σημεία σύνδεσης μεταξύ της ΝΑ και των καρδιαγγειακών παθήσεων. Και οι δύο ασθένειες μπορούν να θεωρηθούν ως αγγειακές διαταραχές λόγω της έλλειψης βέλτιστης ροής αίματος στον εγκέφαλο και την καρδιά [107-109]. Αφενός, πληθώρα ερευνών έχει ως αντικείμενο την εμπλοκή του οξειδωτικού στρες στην παθογένεια του μυοκαρδίου. Αφετέρου, η συμμετοχή της οξειδωτικής καταπόνησης στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου του Alzheimer αξιολογείται ως μείζονος βαρύτητας. Εντούτοις, τα πειραματικά δεδομένα για την έκφραση της APP στην καρδιά είναι πολύ περιορισμένα.

Βασιζόμενοι σε εκτενή αναζήτηση στη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία θελήσαμε να ελέγξουμε πειραματικά την ύπαρξη της APP σε καρδιακά μυοκύτταρα θηλαστικού (κυτταρική σειρά H9c2) και να διερευνήσουμε την έκφραση της τόσο μεταγραφικά όσο και μεταφραστικά. Σκοπός μας ήταν η διασαφήνιση των αλλαγών στη δημιουργία θραυσμάτων της APP στην απόκριση των καρδιακών μυοκυττάρων κατά το οξειδωτικό στρες. Συγκεκριμένα, για την επίτευξη αυτού του στόχου, χρησιμοποιώντας αντισώματα που αναγνωρίζουν περιοχές της APP στο καρβοξυτελικό άκρο, στο αμινοτελικό άκρο και στη περιοχή του Αβ πεπτιδίου, πραγματοποιήθηκε επίδραση με H₂O₂ σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Για την διερεύνηση του υποκείμενου σηματοδοτικού μηχανισμού, πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων με την χρήση του ενεργοποιητή της PKC και ERK1/2, φορβολεστέρα PMA, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις και χρόνους επίδρασης, καθώς πλήθος ερευνών έχουν ήδη συσχετίσει την ενεργοποίηση της PKC και του οξειδωτικού στρες [133]. Παράλληλα, ερευνήσαμε την έκφραση του γονιδίου APP υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Τέλος, στη προσπάθεια να συμβάλουμε ώστε να γίνει καλύτερα κατανοητή η εμπλοκή του οξειδωτικού στρες και κυτταρικής σηματοδότης στη διαδικασία της επεξεργασίας (processing) της APP στα καρδιακά μυοκύτταρα θηλαστικού, κρίθηκε σκόπιμη η πραγματοποίηση πειραμάτων με την προσθήκη χημικών αναστολέων των MAP κινασών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

2.1.1. Αναλώσιμα υλικά και αντιδραστήρια

Τα κοινά αντιδραστήρια του εργαστηρίου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας και προέρχονταν από τις εταιρίες Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Merck (Darmstadt, Germany) και Appllichem (Darmstadt, Germany).

Τα τρυβλία και οι φιάλες καλλιέργειας κυττάρων ήταν της εταιρίας Sigma-Aldrich. Η αλβουμίνη ορού βοός (BSA) (κλάσμα V) ήταν από την εταιρεία Appllichem (Darmstadt, Germany). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford, χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Biorad Protein assay της εταιρίας Biorad Laboratories (Hercules, California, USA). Το μίγμα δεικτών γνωστού μοριακού βάρους για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Prestained molecular marker) ήταν της προμηθεύτριας εταιρίας New England Biolabs (Beverly, MA, USA). Η νιτροκυτταρίνη [Parablot NCP Nitrocellulose (0.45 μm)] που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών ήταν της εταιρείας Scheirel και Schuell (Keene, NH, USA), καθώς και η χρωστική Ponceau S, που χρησιμοποιήθηκε για την χρώση των πρωτεϊνών επί της νιτροκυτταρίνης ήταν της εταιρία Sigma-Aldrich. Το διάλυμα περοξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και το PMA που χρησιμοποιήθηκαν στις επιδράσεις των κυττάρων ήταν της εταιρείας Merk και Appllichem GmbH, αντιστοίχως. Το DMSO ήταν της εταιρίας Sigma-Aldrich. Επίσης, οι αναστολείς SP600125 και PD98059 προμηθεύτηκαν από την εταιρία Cardiochem-Novabiochem (La Jolla, CA, USA). Ο αναστολέας SB203580 ήταν από την εταιρία Alexis Bichemicals (Lausen, Switzerland).

Στην ανάλυση κατά Western χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα 275 που αναγνωρίζει το καρβόξυ-τελικό άκρο της APP (αντιορός κουνελιού), σε αραίωση 1 προς 500, το αντίσωμα 347 (αντιορός κουνελιού) που αναγνωρίζει το πεπτιδίο Αβ, σε αραίωση 1 προς 250, καθώς και το αντίσωμα 348 (αντιορός κουνελιού) που αναγνωρίζει το αμινοτελικό άκρο της APP, σε αραίωση 1 προς 250. Όλα τα αντισώματα για τους επιτόπους της APP ήταν μια ευγενική προσφορά της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Βιοχημείας Ευκαρυωτικών Οργανισμών ΕΚΠΑ

Βασιλακοπούλου Διδώ. Επίσης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα Phospho-p44/p42 MAPK (πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι, αναγνωρίζει τις ισομορφές ERK1 και ERK2, διπλά φωσφορυλιωμένες στα κατάλοιπα θρεονίνη 202 και τυροσίνη 204 (Cell Signaling Technology), σε αραίωση 1 προς 1000.

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με περοξειδάση του άγριου ραπανιού, που αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G κουνελιού (goat anti-rabbit Ig G) της Dako (Clostrup, Denmark)- σε αραίωση 1 προς 5.000- καθώς και δευτερογενές αντίσωμα (αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G κουνελιού)-σε αραίωση 1 προς 5000- συζευγμένο ομοιοπολικά με αλκαλική φωσφατάση –(ευγενική προσφορά της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Βιοχημείας Ευκαρυωτικών Οργανισμών ΕΚΠΑ Βασιλακοπούλου Διδώ).

Στη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. χρησιμοποιήθηκε το μίγμα αντιδραστηρίων της εταιρίας Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden) που περιέχει το περοξειδίο του υδρογόνου, τη λουμινόλη και τον ενισχυτή.

Για την ενίσχυση του μεταγράφου του γονιδίου *APP*, του είδους *Rattus norvegicus*, καταχωρημένο στην NCBI τράπεζα αλληλουχιών (GenBank) με αριθμό πρόσβασης (accession nos.), NM_019288.2, που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη 770 αμινοξικών καταλοίπων, χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εκκινητών που ενισχύουν μια αλληλουχία μήκους 149 ζευγών βάσεων (2184^ο νουκλεοτίδιο-2332^ο νουκλεοτίδιο) (**Εικόνα 6.1**) -(ευγενική προσφορά του Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου – Νευροβιολογίας ΕΚΠΑ Ευθυμίου Σπύρου)

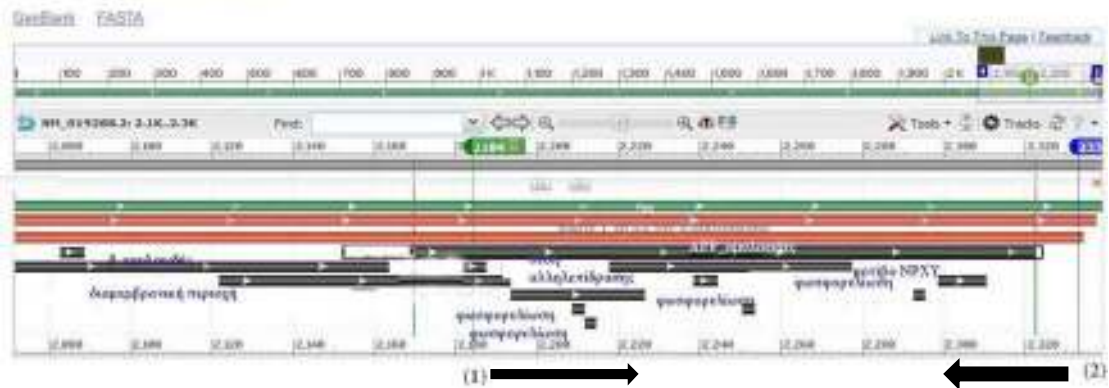
Νοηματικός εκκινητής:

5'- ATCTGAATTCAAGAAGAAACAGTACACATCCATTC-3'

Αντινοηματικός εκκινητής:

5' -TCACGATCCCAGTTCTGCATCTGCTCAAAG-3' ,

Rattus norvegicus Πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (APP), m RNA
NCBI Αλληλουχία Αναφοράς NM_019288.2



Εικόνα 2.1 Σχηματική αναπαράσταση μέρους της αλληλουχίας του μεταγράφου του γονιδίου *APP*. Με τη μορφή βελών απεικονίζονται οι θέσεις ομολογίας νοηματικού εκκινητή (1) και αντινοηματικού εκκινητή (2) (χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων GenBank).

Για την ανίχνευση του μεταγράφου *HPRT* του είδους *Rattus norvegicus*, NM_012583.2, χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εκκινητών - οι συγκεκριμένοι εκκινητές ενισχύουν μια αλληλουχία μήκους 151 ζευγών βάσεων - (ευγενική προσφορά του Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας ΕΚΠΑ Σκορίλα Ανδρέα):

Νοηματικός εκκινητής:

5'- TGGAAAGGGTGTTTATTCCTCAT -3'

Αντινοηματικός εκκινητής:

5'- ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA -3'

Το μήκος των υπό ανάλυση τμημάτων DNA εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας το μάρτυρα, GeneRuler 50bp (Fermenta S, LifeScience Inc., USA).

2.1.2. Διαλύματα καλλιέργειας κυττάρων

Θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας

Για τη διατήρηση και την ανάπτυξη των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία, το κύριο θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων ήταν το Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), με σύσταση 4500 mg/L D-γλυκόζη, εμπλουτισμένο με 10% (v/v) ορό εμβρύου βοός (FBS) (PAA Laboratories GmbH), ο οποίος είχε απενεργοποιηθεί πριν την πρώτη χρήση. Επιπλέον, για τη εξασφάλιση των βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης των κυττάρων απαιτείται η παρουσία L-γλουταμίνης (584 mg/L), στο θρεπτικό μέσο και

προσθήκη μείγματος αντιβιοτικών το οποίο περιέχει πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (100 IU/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη). Μετά την προετοιμασία του, το πλήρες πλέον θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σφραγισμένο στους 4°C.

Διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS)

Κατά τη διάρκεια της ανακαλλιέργειας των κυττάρων απαραίτητο βήμα είναι η έκπλυση τους. Στο βήμα αυτό χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) με pH 7.4, το οποίο στερείται ιόντων Ca^{2+} και Mg^{2+} (Πίνακας 2.1) , ώστε να μην παρεμποδιστεί η δράση του παγκρεατικού ενζύμου τρυψίνη.

Πίνακας 2.1 Σύσταση διαλύματος PBS 10×

NaCl	137 mM
KCl	27 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

Διάλυμα τρυψίνης10×/EDTA

Για την αποκόλληση των κυττάρων από τη φιάλη καλλιέργειας χρησιμοποιείται διάλυμα τρυψίνης/EDTA [0,05%-0,02% (w/v)] (PAA Laboratories GmbH, Germany) αραιωμένο 1:10 σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS10×. Το χηλικό αντιδραστήριο EDTA έχει την ικανότητα να δεσμεύει τα όποια κατάλοιπα δισθενών ιόντων και έτσι να αποτρέπει την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια όπου πολλαπλασιάζονται.

Διάλυμα συντήρησης κυττάρων στο υγρό άζωτο - [Freezing Buffer (Πίνακας 2.2)]

Πίνακας 2.2 Σύσταση Freezing Buffer

FBS	90% (v/v)
DMSO	10% (v/v)

2.1.3. Ειδικά διαλύματα

Διάλυμα λύσης κυττάρων (Πίνακας 2.3)

Πίνακας 2.3 Σύσταση διαλύματος λύσης κυττάρων (RIPA Buffer)

Nonidet P-40 (NP-40)	1,0% (w/w)
Διοξυχολικό νάτριο	1,0% (w/v)
SDS	0,1% (w/v)
NaCl	150 mM
Φωσφορικό νάτριο, pH 7.2	10 mM
EDTA	2 mM
Φθωριούχο νάτριο (NaF)	50 mM
Διενυδρο ορθοβαναδικό νάτριο (Na₃VO₄·2H₂O)	0,2 mM
απροτίνη	100 U/ml

Διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων- [Laemmli Buffer 4× (Πίνακας 2.4)]

Πίνακας 2.4 Σύσταση διαλύματος κατεργασίας δειγμάτων, Laemmli Buffer 4×

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris/ HCl pH 6.8	330 mM
γλυκερόλη	13% (v/v)
10% (w/v) διάλυμα SDS	1% (v/v)
Μπλε της βρωμοφαινόλης	0,005 % (w/v)
β-μερκαπτοαιθανόλη	355 mM
dH₂O	Μέχρι συμπλήρωση

Διάλυμα αφαίρεσης αντισωμάτων από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Πίνακας 2.5)

Πίνακας 2.5 Σύσταση διαλύματος αφαίρεσης αντισωμάτων από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Tris/HCl pH 6.8	330 mM
β-μερκαπτοαιθανόλη	100 mM
Διάλυμα SDS 10% (w/v)	30% (v/v)
dH₂O	Μέχρι συμπλήρωση

Διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων (Πίνακας 2.6)

Πίνακας 2.6 Σύσταση διαλύματος δέσμευσης μη ειδικών θέσεων

αλβουμίνη ορού βοός (BSA) ή γάλα χωρίς λιπαρά σε σκόνη	1% (w/v) ή 5% (w/v)
διάλυμα TBS-T 10×	10% (v/v)
dH ₂ O	Μέχρι συμπλήρωση

Διάλυμα TBS 10× (Πίνακας 2.7)

Πίνακας 2.7 Σύσταση διαλύματος TBS 10×

Tris / HCl, pH 7.6	20 mM
NaCl	137 mM
dH ₂ O	Μέχρι συμπλήρωση

Διάλυμα TBS-T (Πίνακας 2.8)

Πίνακας 2.8 Σύσταση διαλύματος TBS-T

Διάλυμα TBS 10×	10% (v/v)
Tween-20	0,05% (v/v)
dH ₂ O	Μέχρι συμπλήρωση

Διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού (Πίνακας 2.9)

Πίνακας 2.9 Σύσταση διαλύματος πηκτώματος διαχωρισμού [10% (w/v) πολυακρυλαμίδης]

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris / HCl, pH 8.8 150 mM	25% (v/v)
Διάλυμα ακρυλαμίδη /bis- ακρυλαμίδη [30%(w/v)/0,8% (w/v)]	25% (v/v)
Διάλυμα 10% (w/v) SDS	1% (v/v)
Διάλυμα 10% (w/v) APS	1% (v/v)
TEMED	0,1% (v/v)
dH ₂ O	Μέχρι συμπλήρωση

Διάλυμα πηκτώματος επιστοιβάξης (Πίνακας 2.10)

Πίνακας 2.10 Σύσταση διαλύματος πηκτώματος διαχωρισμού

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris / HCl, pH 6.8 100 mM	25% (v/v)
Διάλυμα ακρυλαμίδη /bis- ακρυλαμίδη [30%(w/v)/0,8% (w/v)]	10% (v/v)
Διάλυμα 10% (w/v) SDS	1%(v/v)
Διάλυμα 10% (w/v) APS	1% (v/v)
TEMED	0,1% (v/v)
dH₂O	Μέχρι συμπλήρωση

Διάλυμα ηλεκτροδίων 10× (Πίνακας 2.11)

Πίνακας 2.11 Σύσταση διαλύματος ηλεκτροδίων

Tris / HCl	250 mM
γλυκίνη	192 mM
10% (w/v) SDS	1% (v/v)

Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη (Πίνακας 2.12)

Πίνακας 2.12 Σύσταση διαλύματος μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη

Διάλυμα ηλεκτροδίων 10×	10% (v/v)
μεθανόλη	20% (v/v)
dH₂O	Μέχρι συμπλήρωση

Διάλυμα TBE 1× (Πίνακας 2.13)

Πίνακας 2.13 Σύσταση διαλύματος TBE1×

Tris-HCl pH 8.3	89 mM
βορικό οξύ	89 mM
EDTA	2 mM
DEPC-H₂O	Μέχρι συμπλήρωση

2.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ H9c2

2.2.1. Εισαγωγικά στοιχεία

Προκειμένου να αποκομιστεί, όσο το δυνατόν, μεγαλύτερος όγκος πληροφορίας για έναν ανεξάρτητο κυτταρικό τύπο, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι διατήρησης των κυττάρων σε καλλιέργεια. Έτσι, επιτρέπεται μεγάλος αριθμός πειραματικών χειρισμών που είναι δύσκολο να εφαρμοστούν σε επίπεδο οργανισμού ή απομονωμένου οργάνου. Από την άλλη πλευρά, παρουσιάζει και μειονεκτήματα, με κυριότερο την απουσία της ρύθμισης από παράγοντες που εκκρίνονται από άλλους ιστούς του ίδιου οργανισμού. Παρόλα αυτά, τα δεδομένα που έχουν προκύψει από πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες έχουν βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση των κυτταρικών διεργασιών και αρκετά έχουν επιβεβαιωθεί σε πειράματα στο επίπεδο του οργάνου ή του οργανισμού. Οι καλλιέργειες των κυττάρων μπορούν να διακριθούν στις πρωτογενείς και τις δευτερογενείς. Στις πρωτογενείς τα κύτταρα προετοιμάζονται από τον ιστό ενός οργανισμού, ενώ οι δευτερογενείς προέρχονται από τις πρωτογενείς. Επίσης, υπάρχουν και οι κυτταρικές σειρές που αποτελούνται από παραλλαγμένα κύτταρα, με ανεξάντλητη ικανότητα πολλαπλασιασμού και τα οποία σταματούν να διαιρούνται όταν σχηματίζουν μονοκύτταρη στοιβάδα στην επιφάνεια ανάπτυξής τους .

2.2.2. Πειραματικό πρότυπο - Κυτταρική σειρά καρδιακών μυοβλάστων (H9c2)

Για την ολοκλήρωση των πειραματικών διαδικασιών της συγκεκριμένης επιστημονικής μελέτης χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά H9c2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) με αριθμό προϊόντος CRL-1446. Πρόκειται για κλώνο της πρωτογενούς κυτταρικής σειράς που απομονώθηκε πρώτα από τους B.

Kimes και B. Brandt. Αντιπροσωπεύει καρδιακό ιστό εμβρύου αρουραίου του είδους *Rattus norvegicus*. Μεταξύ των υποδοχέων που εκφράζονται στη κυτταρική μεμβράνη είναι αυτός της ακετυλοχολίνης, γεγονός που οδήγησε στο να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για την *in vitro* δοκιμασία φαρμάκων σε μελέτες παθογένειας του μυοκαρδίου. Τα καρδιακά μυοκύτταρα νεογνών αρουραίου H9c2 διατηρούν τα χαρακτηριστικά μεταγωγής σήματος στο μυοκάρδιο ενήλικου ζώου και χρησιμοποιούνται ευρέως ως πειραματικό μοντέλο προκειμένου να μελετηθούν μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που ενεργοποιούνται από στρεσογόνα ερεθίσματα στην καρδιά.

2.2.3. Διατήρηση στειρών συνθηκών στο χώρο των κυτταροκαλλιεργειών

Για την ομαλή διατήρηση και ανάπτυξη των κυττάρων απαραίτητη κρίνεται η τήρηση αυστηρού πρωτοκόλλου υγιεινής καθ' όλη τη διάρκεια χειρισμού των κυτταροκαλλιεργειών. Ο λόγος του υψηλού επιπέδου αποστείρωσης είναι η επιθυμία αποφυγής επιμόλυνσης των κυτταροκαλλιεργειών μας από βακτήρια ή μύκητες. Η διατήρηση των ασηπτικών συνθηκών επιτυγχάνεται με μία πληθώρα μεθόδων. Πρωτίστως, στο χώρο όπου φυλάσσονται τα κύτταρα, υπάρχει θάλαμος νηματικής ροής³ (Laminar Flow), στον οποίον και διεξάγεται ο χειρισμός των κυττάρων. Επιπροσθέτως, στο εσωτερικό του θαλάμου ενεργοποιείται λαμπτήρας υπεριώδους ακτινοβολίας για χρονικό διάστημα 30 λεπτών. Επιπλέον, στο δωμάτιο των κυτταροκαλλιεργειών υπάρχει δεύτερο σύστημα ακτινοβολίας UV. Κάτι τέτοιο κρίνεται απαραίτητο σε όλους τους χώρους όπου επιβάλλονται παρόμοια πρωτόκολλα ασηψίας καθώς η υπεριώδης ακτινοβολία καταστρέφει το γενετικό υλικό των μικροοργανισμών μέσω σχηματισμού διμερών πυριμιδίνης και παρεμπόδιση του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου. Παράλληλα, το νερό που χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της υγρασίας του κλιβάνου⁴ είναι πάντα αποστειρωμένο, ενώ γίνεται απολύμανση του εσωτερικού του κλιβάνου με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v) επί εβδομαδιαίας βάσης. Τέλος, κάθε αντικείμενο που

³ Πρόκειται για ειδική κατασκευή ενός είδους θαλάμου εξοπλισμένου με ειδικούς ηθμούς (φίλτρα) υψηλής απόδοσης που είναι ικανοί να συγκρατούν το 99,97% των σωματιδίων διαμέτρου 0.3μm καθώς και με λαμπτήρα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας για την αποστείρωση πριν από κάθε χειρισμό.

⁴ Ειδικός κλιβανός σταθερής θερμοκρασίας 37 βαθμών Κελσίου, ο οποίος τροφοδοτείται με αέριο διοξείδιο του άνθρακα σε ποσοστό 5% .

έρχεται σε επαφή με τις καλλιέργειες αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο⁵. Η αποστείρωση με τη χρήση του αυτόκαυστου πραγματοποιείται στους 121° C για σαράντα λεπτά υπό πίεση 1,1 kp/cm².

2.2.4. Απενεργοποίηση του ορού εμβρύου βοός

Ο ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) αποτελεί πηγή απαραίτητων συστατικών (αυξητικοί παράγοντες) για την επιβίωση των κυττάρων *in vitro*. Προστίθεται στο θρεπτικό μέσο αφού προηγουμένως απενεργοποιηθεί η δράση των πρωτεϊνών συμπληρώματος που περιέχει με την εφαρμογή υψηλής θερμότητας (56°C για 30 λεπτά). Μετά τη θέρμανση, έπεται η διήθηση του ορού από ειδικά φίλτρα με μέγεθος πόρων 0,2 μm με τη βοήθεια αντλίας κενού και η διατήρησή του σε φιαλίδια στους -20 °C.

2.2.5. Διατήρηση κυττάρων σε καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια κυττάρων

Οι συνθήκες διατήρησης σε καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς H9c2 είναι σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO₂ και σχετική υγρασία 95%. Για την διατήρηση των κυττάρων σε καλλιέργεια χρησιμοποιούνται φιάλες καλλιέργειας μεγέθους T-75 και για την διεξαγωγή των πειραμάτων, τρυβλία διαμέτρου 60 mm. Μετά την λεπτομερή παρατήρηση της καλλιέργειας, αποφασίζεται η αλλαγή του πλήρους θρεπτικού μέσου κάθε δύο με τρεις ημέρες και η ανακαλλιέργεια όποτε η κάλυψη του τάπητα της φιάλης καλλιέργειας αγγίζει το 80%. Τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας της ανακαλλιέργειας παρουσιάζονται ακολούθως:

1. Αναρρόφηση και απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας.
2. Εκπλύσεις (2-3) με αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) 1×
3. Προσθήκη 1,0- 1,5ml διαλύματος τρυψίνης-EDTA στη φιάλη καλλιέργειας και τοποθέτηση της φιάλης καλλιέργειας στους 37°C για 1-2 λεπτά.

⁵ Πρόκειται για ειδική συσκευή αποστείρωσης αντικειμένων με χρήση κορεσμένου ατμού υπό πίεση, που υπερβαίνει σε θερμοκρασία τους 100 βαθμούς Κελσίου.

4. Παρατήρηση των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο ώστε να επιβεβαιωθεί πως ο πληθυσμός έχει αποκολληθεί πλήρως από το τοίχωμα τις φιάλη καλλιέργειας.
5. Προσθήκη 3,5ml πλήρους θρεπτικού υλικού 10%(v/v) FBS και επακόλουθες αναδεύσεις με πιπέττα των πέντε ml ώστε να αποκολληθούν τελείως τα κύτταρα και να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα.
6. Ακολουθεί η διαδικασία τις ανακαλλιέργειας αφαιρώντας τα 3,0 ml του εναιωρήματος και μεταγγίζοντας τα 2,0 ml σε νέα φιάλη καλλιέργειας. Οι δύο πληθυσμοί κυττάρων εμπλουτίζονται με πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας 10% (v/v) FBS μέχρι τελικό όγκο 10 ml και επανατοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο.

2.2.6. Διατήρηση κυττάρων στο υγρό άζωτο και ανάκτηση κυττάρων

Η συντήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα πραγματοποιείται σε ιδιαίτερα χαμηλές θερμοκρασίες, οι οποίες επιτυγχάνονται με τη χρήση υγρού αζώτου (-196°C). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται ένα θρεπτικό μέσο (freezing buffer) . Αν και το DMSO που εμπεριέχεται στο θρεπτικό μέσο συντήρησης επιδρά αρνητικά στα κύτταρα καθώς γίνεται τοξικό και μπορεί να τα καταστρέψει, η παρουσία του σε χαμηλές συγκεντρώσεις κρίνεται απαραίτητη ώστε να εξασφαλιστεί η προστασία των κυτταρικών μεμβρανών από τους κρυστάλλους νερού. Για τη φύλαξη των κυττάρων είναι απαραίτητη προϋπόθεση ο πληθυσμός να βρίσκεται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Τα κύτταρα αποκολλούνται από τη φιάλη καλλιέργειας τους με τη διαδικασία της τρυψινοποίησης όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο εδάφιο 2.2.5 και αφού προστεθεί ο απαραίτητος όγκος θρεπτικού ώστε να απενεργοποιηθεί η τρυψίνη τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στους 25°C για 15 λεπτά στις 2500g. Εν συνεχεία και μετά την αφαίρεση του υπερκειμένου, το ίζημα (pellet) κυττάρων επαναιωρείται στο ειδικό διάλυμα (freezing buffer) και φυλάσσεται σε κρυοφιαλίδιο (cryovial) για 24 ώρες στους -20°C. Την επομένη, το κρυοφιαλίδιο μεταφέρεται στους -80°C για 24 ώρες όταν και τελικά τοποθετείται στο υγρό άζωτο. Η προοδευτική μείωση της θερμοκρασίας ακολουθείται με σκοπό την ομαλή μετάβαση των κυττάρων από τη θερμοκρασία δωματίου σε θερμοκρασία -196°C.

Για την ανάκτηση των κυττάρων από το υγρό άζωτο ακολουθείται η εξής πορεία: Ανάκτηση του φιαλιδίου από το υγρό άζωτο και άμεση τοποθέτηση αυτού σε

υδατόλουτρο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C. Με αυτό τον τρόπο, η τήξη των κρυστάλλων νερού γίνεται αστραπιαία και άρα λιγότερο επιζήμια για την ανάπτυξη των κυττάρων. Εν συνεχεία, γίνεται προσθήκη του περιεχομένου σε φιάλη καλλιέργειας με πλήρες θρεπτικό μέσο και 15% (v/v) FBS και τοποθέτηση αυτής στον επωαστικό κλίβανο. Μετά το πέρας των πρώτων τεσσάρων ωρών, γίνεται παρατήρηση των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο. Εάν έχει προσκολληθεί στον πυθμένα της φιάλης καλλιέργειας επαρκής πληθυσμός κυττάρων, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο που περιέχει ακόμα υπολείμματα από το DMSO, νεκρά κύτταρα και αποπτωτικούς παράγοντες. Προστίθεται εκ νέου θρεπτικό μέσο με την ίδια περιεκτικότητα σε ορό για τις επόμενες 24-48 ώρες οπότε και επαναφέρουμε τις συνθήκες συνθήκες περιεκτικότητας σε FBS, 10% (v/v).

2.2.7. Επιδράσεις ουσιών

Πριν τη κάθε επίδραση, τα κύτταρα υποβάλλονται σε συνθήκες στέρησης ορού για τουλάχιστον οχτώ ώρες. Η κάθε επίδραση γίνεται μετά το πέρας του απαιτούμενου χρόνου υπό συνθήκες στέρησης ορού και για τους χρόνους που απαιτεί ο εκάστοτε πειραματικός σχεδιασμός. Στη σειρά πειραμάτων όπου ελέγχεται η επίδραση αναστολέα σε σχέση με αυτή του αγωνιστή, πραγματοποιείται προσθήκη για μισή ώρα του εκάστοτε αναστολέα και έπειτα η επίδραση του αγωνιστή. Όλα τα πειράματα ολοκληρώνονται με τη μεταφορά των τρυβλίων από τον κλίβανο σε πάγο ώστε να τερματιστούν όλες οι αντιδράσεις. Ακολουθεί η προετοιμασία των δειγμάτων για την περαιτέρω ανάλυσή τους.

2.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟ ΙΣΤΟ

Για την εκχύλιση των πρωτεϊνών από το βιολογικό υλικό - ιστό ή κύτταρα- και ανάλυση αυτών χρησιμοποιούνται ειδικά διαλύματα λύσης, τα οποία προκαλούν τη δομική καταστροφή των μεμβρανών, με συνέπεια την απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου στο διάλυμα. Κατά τη διάσπαση των κυττάρων απελευθερώνονται πρωτεάσες και φωσφατάσες, Έτσι, κρίνεται απαραίτητο είναι απαραίτητο το διάλυμα λύσης να περιέχει αναστολείς αυτών των ενζύμων. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών από τα άθικτα κύτταρα και τις μεμβράνες πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση, κατά την οποία οι πρωτεΐνες παραλαμβάνονται

στο υπερκείμενο. Συγκεκριμένα, μετά την καλλιέργεια των κυττάρων στα τρυβλία και την επίδραση με τις διαφορετικές ουσίες πραγματοποιείται μεταφορά των τρυβλίων στο πάγο, όπου και απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί διάβρεξη των κυττάρων 2-3 φορές με κρύο, μη αποστειρωμένο PBS και σχολαστική απομάκρυνση του. Εν συνεχεία, με τη χρήση πιπέτας, 100μl διαλύματος λύσης R.I.P.A και 0,5% (v/v) Triton X-100 (μη ιοντικό απορρυπαντικό). Μετά από επίδραση μικρής διάρκειας, τα κύτταρα συλλέγονται από την επιφάνεια της καλλιέργειας με τη χρήση ειδικού πλαστικού συλλέκτη (scraper) με απαλές κυκλικές κινήσεις. Εν συνεχεία, το διάλυμα μεταφέρεται σε σωλήνα (ependorf), και παραμένει στον πάγο για 15 λεπτά. Η παρουσία του Triton X-100 προκαλεί τη διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών, κάτι που υποβοηθείται περαιτέρω, μηχανικά, με τη χρήση εμβόλου που προσαρμόζει στον πυθμένα του σωλήνα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 g για 5 λεπτά στους 4°C, υπολογισμός της ποσότητας ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford, προσθήκη 0,33 μερών όγκου διαλύματος κατεργασίας δειγμάτων (Laemml Buffer/sample buffer 4x) και βρασμός των δειγμάτων για 3 λεπτά.

Για την απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από ιστό, 4 μg ιστού τοποθετούνται σε σωλήνα eppendorf. Εν συνεχεία, προστίθενται 300μl διαλύματος λύσης και αναμένουμε για 15 λεπτά. Ακολούθως, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12000 g για 5 λεπτά, στους 4°C. Τέλος, γίνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών, η προσθήκη διαλύματος κατεργασίας 1/3 του όγκου δείγματος (sample buffer4x) [110] και ο βρασμός των δειγμάτων για 3 λεπτά.

Στη πλειοψηφία των πειραμάτων τόσο η λύση των κυττάρων, η απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών όσο και η προετοιμασία των δειγμάτων για την περαιτέρω ανάλυσή τους έγινε με 100μl διαλύματος κατεργασίας δειγμάτων 3x.

2.4. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ BRADFORD

Η δοκιμασία Bradford συνιστά μια φασματοσκοπική αναλυτική μέθοδο. Βασίζεται στη μετατόπιση στο φάσμα απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Πρόκειται για μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο [127]. Κάτω από όξινες συνθήκες, η κόκκινη μορφή της χρωστικής μετατρέπεται σε μπλε μορφή, όταν δεσμεύεται με την πρωτεΐνη που θα προσδιοριστεί. Οι ιοντικές και υδρόφοβες

αλληλεπιδράσεις της χρωστικής με τη πρωτεΐνη δημιουργούν μια σταθερή ιονική μορφή της χρωστικής, που απορροφά στα 595 nm, σε αντίθεση με τη μη δεσμευμένη μορφή της, με ένα μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm. Εκμεταλλευόμενοι αυτή τη μετατόπιση μπορούμε να εξάγουμε ένα μέτρο της ποσότητας πρωτεΐνης στο δείγμα. καθώς η αύξηση της οπτικής πυκνότητας στα 595 nm είναι ανάλογη με την ποσότητα της δεσμευμένης χρωστικής, και έτσι με την ποσότητα της πρωτεΐνης που υπάρχει στο δείγμα. Η διαδικασία για την δοκιμασία Bradford είναι πολύ εύκολη και απλή. Απαιτείται ένα στάδιο όπου το αντιδραστήριο Bradford προστίθεται σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με το δείγμα. Μετά από καλή ανάμιξη, το χρώμα του μίγματος αλλάζει σχεδόν αμέσως σε ένα μπλε χρώμα και η οπτική πυκνότητα μπορεί να αναγνωστεί στα 595 nm χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο. Ο συνολικός χρόνος που χρειάζεται για να δημιουργήσει και να ολοκληρώσει τη δοκιμασία είναι κάτω από 30 λεπτά. Η όλη πειραματική δοκιμασία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Η δοκιμασία Bradford μπορεί να μετρήσει ποσότητες πρωτεΐνης της τάξης των μg [111]. Ακολουθεί η διαδικασία της δοκιμασίας Bradford:

1. Παρασκευή μιας σειράς προτύπων διαλυμάτων πρωτεΐνης (χρησιμοποιείται διάλυμα stock BSA, 20 μg/ml), αυξανόμενης ποσότητας.
2. Προσθήκη του αντιδραστήριου Coomassie Brilliant Blue G-250 (1ml), σε κάθε σωλήνα (ependorf) και στους σωλήνες των άγνωστων δειγμάτων.
3. Ανάμειξη με δίνη, ή αναστροφή και αναμονή 5 λεπτών
4. Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 595 nm, χρησιμοποιώντας ως τυφλό (blank) σωλήνα ο οποίος δεν περιέχει πρωτεΐνη.
5. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς από την οπτική πυκνότητα (OD) των προτύπων έναντι της ποσότητας.
6. Υπολογισμός συντελεστού απόσβεσης.
7. Προσδιορισμός των ποσοτήτων πρωτεΐνης των άγνωστων δειγμάτων.

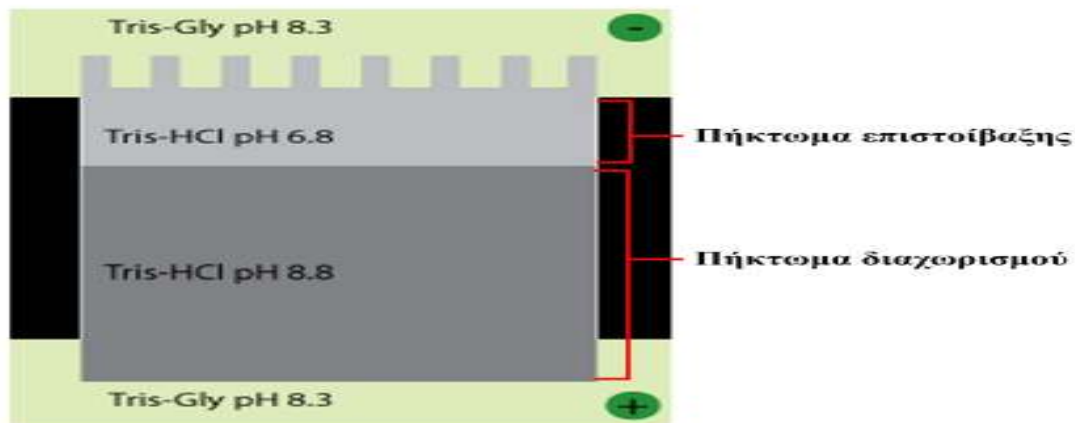
2.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ SDS-ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται συνήθως σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ειδικότερα, στην παρούσα ερευνητική εργασία, εφαρμόστηκε η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες, παρουσία του ιοντικού απορρυπαντικού SDS [112]. Σε δείγματα που

προκύπτουν είτε από απλή ομογενοποίηση είτε από κλασμάτωση προστίθεται το διάλυμα κατεργασίας το οποίο, μαζί με το βρασμό, προκαλεί την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Το SDS και η β-μερκαπτοαιθανόλη είναι υπεύθυνοι για τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Το SDS είναι ένα αρνητικά φορτισμένο απορρυπαντικό, το οποίο προσδένεται ισχυρά στις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών, φορτίζοντάς τα αρνητικά, με συνέπεια το ξεδίπλωμά τους σε επιμήκεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη είναι ένας αναγωγικός παράγοντας που διασπάει τους δισουλφιδικούς δεσμούς στα πρωτεϊνικά μόρια. Ο συνδυασμός και των δύο έχει ως αποτέλεσμα τον αποχωρισμό των πολυπεπτιδικών αλυσίδων των πρωτεϊνών που αποτελούνται από πολλές υπομονάδες, αλλά και την καταστροφή των συνδέσεων μεταξύ διαφορετικών πρωτεϊνών ή πρωτεϊνών και λιπιδικών μορίων. Όλα τα σύμπλοκα πρωτεΐνης-SDS αποκτούν τελικά την ίδια διαμόρφωση και έχουν την ίδια αναλογία φορτίου μάζας, διαφέροντας μόνο στο μέγεθος. Με αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατός ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε πηκτώματα SDS-πολυακρυλαμίδης με βάση το μοριακό τους βάρος (οι μεγάλοι μοριακοί βάρους πρωτεΐνες κινούνται πιο αργά σε σχέση με αυτές που έχουν μικρό μοριακό βάρος) [111].

Το πήκτωμα διαχωρισμού σχηματίζεται ανάμεσα σε δυο γυάλινες πλάκες και δημιουργείται από τον πολυμερισμό μονομερών ακρυλαμίδης παρουσία μικρότερων ποσοτήτων Α,Α'-μεθυλενο-διδ-ακρυλαμίδης που λειτουργεί ως διασυνδεδετικός παράγοντας. Τα μονομερή ακρυλαμίδης πολυμερίζονται σε μακριές αλυσίδες και στα σημεία που εισέρχεται το Λ',N'-μεθυλενο-διδ-ακρυλαμίδιο δημιουργείται ένα νέο σημείο επέκτασης της αλυσίδας, οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό ενός τρισδιάστατου πλέγματος. Ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης επιτυγχάνεται με την προσθήκη υπερθειικού αμμωνίου (APS) και Ν,Ν,Ν',Ν'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (Tetramethylethylenediamine - TEMED). Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση ακρυλαμίδης και διδ-ακρυλαμίδης και ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών υπό μελέτη, αυτό μπορεί να ρυθμιστεί για να επιτευχθεί ο καλύτερος διαχωρισμός. Για τους σκοπούς αυτής της εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα διαχωρισμού των οποίων η συγκέντρωση ακρυλαμίδης ήταν 10% (w/v), 12% (w/v) και 15% (w/v). Σε αυτού του είδους την ηλεκτροφόρηση, πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού σχηματίζεται ένα δεύτερο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, που ονομάζεται πήκτωμα επιστοίβαξης. Το πήκτωμα αυτό έχει μεγάλο μέγεθος πόρους, αφού η συγκέντρωση ακρυλαμίδης είναι 5%

(w/v), και έχει πιο όξινο pH (6.8) σε σχέση με το πήκτωμα διαχωρισμού (8.8). Η λειτουργία αυτού του πηκτώματος είναι η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού δείγματος σε μια ευδιάκριτη ομοιόμορφη ζώνη και η ταυτόχρονη είσοδος όλων των πρωτεϊνών στο πήκτωμα διαχωρισμού. Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, παρασκευάζεται το διάλυμα για το πήκτωμα διαχωρισμού το οποίο τοποθετείται ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες. Πριν πολυμεριστεί, προστίθεται στην κορυφή του μία στοιβάδα απιονισμένο νερό, ώστε να ευθυγραμμιστεί η επιφάνειά του. Μόλις ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, το επιπλέον νερό αφαιρείται από την επιφάνεια του πηκτώματος διαχωρισμού με τη βοήθεια χαρτιού Whatman, και, ακολούθως, προστίθεται το διάλυμα του πηκτώματος επιστοίβαξης. Παράλληλα, τοποθετείται ειδική «χτένα» για το σχηματισμό των θέσεων που θα τοποθετηθούν τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα. Μόλις πολυμεριστεί και το πήκτωμα επιστοίβαξης, οι γυάλινες πλάκες απομακρύνονται από τη συσκευή στήριξης και τοποθετούνται στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης, η οποία γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων. Στη συνέχεια, τα δείγματα βράζονται για 3 λεπτά, τοποθετούνται με τη βοήθεια μικροσύριγγας τύπου Hamilton στις θέσεις που έχουν σχηματιστεί στο πήκτωμα και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 110 V. Η πορεία της ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται με τη βοήθεια της χρωστικής (μπλε της βρωμοφαινόλης) που περιέχεται στο διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων και τερματίζεται όταν η χρωστική φτάσει στο τέλος του πηκτώματος. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι σε μία θέση του πηκτώματος τοποθετείται και ένα μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, που χρησιμοποιούνται σαν δείκτες για την πορεία της ηλεκτροφόρησης. Επίσης, αυτές χρησιμεύουν και για να αναγνωρίζεται ευκολότερα μια πρωτεΐνη του δείγματος της οποίας γνωρίζουμε το μοριακό βάρος, ή να προσδιορίζεται, κατά προσέγγιση, το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης όταν αυτό δεν είναι γνωστό (**Εικόνα 2.2**).



Εικόνα 2.2 Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS - πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE. Προσαρμογή και τροποποίηση από [113].

2.6. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOTTING)

2.6.1. Μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη

Το ανοσοαποτύπωμα κατά Western είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία ανοσοχημικού προσδιορισμού. Η χρήση της επιτρέπει την αναγνώριση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης-στόχου σε ένα πολύπλοκο μείγμα πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, ένα πρωτεϊνικό μείγμα διαχωρίζεται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (sodium dodecyl sulfate, SDS), ενός αποδιατακτικού παράγοντα. Εν συνεχεία, οι πρωτεϊνικές ζώνες μεταφέρονται σε κατάλληλη μεμβράνη. Ακολούθως, πραγματοποιείται ο εντοπισμός της πρωτεΐνης- στόχου πάνω στη μεμβράνη με το πρωτογενές αντίσωμα. Τα ανοσοσύμπλοκα αναγνωρίζονται από δεύτερο αντίσωμα, ειδικό για τη σταθερή περιοχή του πρωτογενούς αντισώματος, το οποίο είναι συζευγμένο ομοιοπολικά με ένζυμο. Τέλος, η προσθήκη του υποστρώματος του ενζύμου δημιουργεί ορατό προϊόν στην θέση του ανοσοσυμπλόκου [114]. Ακολουθούν τα στάδια της μεθοδολογίας. Οι πρωτεΐνες, μετά το διαχωρισμό τους σε πήκτωμα SDS-PAGE, μπορούν να μεταφερθούν με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου και να ακινητοποιηθούν επάνω σε ειδικές μεμβράνες, όπως είναι η νιτροκυτταρίνη, διατηρώντας το πρότυπο διαχωρισμού τους. Σε αντίθεση με τα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, οι ακινητοποιημένες στη μεμβράνη πρωτεΐνες είναι εύκολα προσβάσιμες σε ποικίλους προσδέτες, όπως είναι τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση αντίστοιχων αντιγόνων και οι λεκτίνες που ανιχνεύουν γλυκοπρωτεΐνες και μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Μία διαδεδομένη μέθοδος ηλεκτροφορητικής μεταφοράς πρωτεϊνών είναι αυτή της ημίξηρης (semidry)

μεταφοράς. Σύμφωνα με αυτήν τη μέθοδο, το πήκτωμα και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετούνται ανάμεσα σε δύο στοίβες χαρτιών φιλτραρίσματος (Whatman) εμποτισμένων με το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, οι οποίες βρίσκονται σε απ' ευθείας επαφή με ηλεκτρόδια (πόλους) από γραφίτη, που έχουν τη μορφή πλάκας. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει την κοπή της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης και 8 χαρτιών Whatman N_o3 (ανά μεμβράνη) στις διαστάσεις που έχει το πήκτωμα διαχωρισμού και την επίδραση όλων αυτών για 20 λεπτά με το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Με το ίδιο διάλυμα διαβρέχεται και το πήκτωμα διαχωρισμού για 10 λεπτά, καθώς και οι πόλοι της συσκευής μεταφοράς. Ανάμεσα στους πόλους, τοποθετούνται από την άνοδο προς την κάθοδο και με τη σειρά που αναφέρονται: 4 χαρτιά Whatman, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα διαχωρισμού και άλλα 4 χαρτιά Whatman, φροντίζοντας να μην παγιδευτούν φουσαλίδες αέρα ανάμεσά τους. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 12V για 60 λεπτά.

2.6.2. Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνικών αντιγόνων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (immunoblotting)

Με τη μέθοδο αυτή, οι πρωτεΐνες - στόχοι, που έχουν μεταφερθεί σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, μπορούν να ανιχνευτούν με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται συνήθως έμμεσα, χρησιμοποιώντας αρχικά ένα ειδικό αντίσωμα που έχει δημιουργηθεί έναντι συγκεκριμένου επιτόπου της υπό μελέτη πρωτεΐνης (πρωτογενές αντίσωμα), το οποίο προσδένεται σε αυτήν επάνω στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, ενώ στη συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα (δευτερογενές αντίσωμα), συζευγμένο με ένα ένζυμο, αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης που μελετάται γίνεται με εντοπισμό του δευτερογενούς αντισώματος με κατάλληλη μέθοδο. Μία τέτοια μέθοδος ανίχνευσης είναι αυτή της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL - Enhanced ChemiLuminescence). Η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας βασίζεται στο φαινόμενο της φωταύγειας, που ορίζεται ως η εκπομπή φωτός από ένα μόριο καθώς αυτό χάνει ενέργεια όταν βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση. Κατά τη χημειοφωταύγεια μία χημική αντίδραση προκαλεί τη διεγερση για αυτήν την εκπομπή φωτός. Ένα από τα γνωστότερα συστήματα για την παραγωγή χημειοφωταύγειας είναι αυτό της υπεροξειδάσης του άγριου ραπανιού (horse radish peroxidase - HRP) /

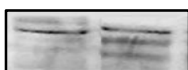
υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) που καταλύει την οξειδωση της λουμινόλης σε αλκαλικές συνθήκες. Αμέσως μετά την οξειδωσή της, η λουμινόλη βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και κατόπιν μεταπίπτει στη βασική, μέσω της εκπομπής φωτός. Κατά την ενισχυμένη χημειοφωταύγεια η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία χημικών ενισχυτών, όπως οι φαινόλες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής φωτός κατά 1000 φορές και την παράταση της διάρκειας αυτής της εκπομπής. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία μπορεί να αποτυπωθεί με έκθεση σε κατάλληλο φωτογραφικό φιλμ. Η ανάλυση κατά Western περιλαμβάνει αρχικά την επώαση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, με διάλυμα, Το βήμα αυτό αποσκοπεί στο να καλυφθούν θέσεις πάνω στη μεμβράνη στις οποίες μπορεί τυχαία να δεσμευθεί μία πρωτεΐνη, οπότε η πρόσδεση των αντισωμάτων που θα ακολουθήσει γίνεται πολύ πιο ειδικά. Μετά από δύο πεντάλεπτες εκπλύσεις με διάλυμα TBS-T, η μεμβράνη επώάζεται για περίπου 18 ώρες (ολονύκτια), στους $4^{\circ}C$, υπό ανάδευση, σε διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος. Το τελευταίο περιέχει το ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης-στόχου, κατάλληλα αραιωμένο, σε διάλυμα 5% BSA σε TBS-T. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 4 εκπλύσεις των 5 λεπτών με TBS-T και η μεμβράνη επώάζεται για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση, με το δευτερογενές αντίσωμα. Ύστερα από τέσσερις πεντάλεπτες εκπλύσεις σε TBS-T, ακολουθεί η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το μίγμα αντιδραστηρίων της εταιρίας Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden) που περιέχει το υπεροξειδίο, τη λουμινόλη και τον ενισχυτή. Τα αντιδραστήρια αναμειγνύονται κατάλληλα 10 λεπτά πριν τη χρήση και η μεμβράνη επώάζεται για 1 λεπτό με το μίγμα, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, η μεμβράνη τοποθετείται μέσα σε ειδική μεμβράνη, όπου και εκτίθεται σε κάμερα.

Ως εναλλακτική μέθοδο ανίχνευσης, χρησιμοποιήθηκε δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο, αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase, AP). Η προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος έχει σαν αποτέλεσμα τη παραγωγή ενός έγχρωμου ιζήματος στη θέση του αντιγόνου – στόχου. (- μια ευγενική προσφορά της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Βιοχημείας Ευκαρυωτικών Οργανισμών ΕΚΠΑ Βασιλακοπούλου Διδώ).

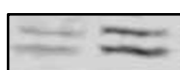
Στην **εικόνα 2.3A,B** παρατίθεται ανάλυση κατά Western δειγμάτων που αντιστοιχούν στις δύο διαφορετικές μεθόδους ανοσοεντόπισης - ανίχνευσης.

A.**B.**

Μάρτυρας Επίδραση



Μάρτυρας Επίδραση



Εικόνα 2.3 Ανοσοαποτύπωμα κατά Western για το αντιγόνο του Αβ-πεπτιδίου, δύο δειγμάτων ίδιας ποσότητας πρωτεΐνης με διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης. (A) Ανίχνευση των ανοσοσυμπλόκων με μέθοδο εμφάνισης, σύστημα αλκαλικής φωσφατάσης και χρωματική αντίδραση (B) Ανίχνευση των ανοσοσυμπλόκων με σύστημα περοξειδάσης (HRP)-ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) .

Μετά την δοκιμασία κατά Western, τα αντισώματα που έχουν δεσμευτεί στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης μπορούν να αποκολληθούν από αυτήν, εμβαπτίζοντας τη μεμβράνη σε ειδικό διάλυμα αφαίρεσης αντισώματος (Sttipping Buffer), στους 37°C για 1 ώρα. Με αυτό το τρόπο η μεμβράνη μπορεί να υποστεί νέο κύκλο δοκιμασίας χρησιμοποιώντας άλλο πρωτογενές αντίσωμα.

2.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ

Για τη διαδικασία της εκχύλισης του ολικού RNA, πραγματοποιείται η συλλογή των κυττάρων με 1,0 ml φαινόλης [αντιδραστηρίου trizol (Ambion, Aystin, TX, USA)]. Εν συνεχεία, προσθέτουμε 0,2ml χλωροφορμίου και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Το πρώτο αυτό στάδιο επώασης, απαιτείται προκειμένου να αναδιαταχτούν οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, να ελαχιστοποιηθεί η διαλυτότητα του DNA στη φαινόλη και να επιτευχθεί αποτελεσματικός διαχωρισμός της υδατικής από την οργανική φάση. Κατόπιν, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στους 4°C για 15 λεπτά στις 12000g. Έτσι προκύπτουν τρεις φάσεις με την ανώτερη υδατική αυτή του RNA, τη μεσόφαση που σχηματίζεται το DNA και την κατώτερη οργανική, στην οποία περιέχονται οι πρωτεΐνες. Ακολουθεί η συλλογή της ανώτερης υδατικής φάσης σε νέο αποστειρωμένο eppendorf των 2ml. Εν συνεχεία, προσθέτουμε 500×10^{-3} ml ισοπροπανόλης και μετά από ήπια ανάδευση , ακολουθεί επώαση του δείγματος για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση στους 4°C για 8 λεπτά στις 12000g . Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 1ml αιθανόλης 75% (v/v), αναδεύουμε και φυγοκέντρουμε

το δείγμα στους 4°C για 5 λεπτά στις 12000g. Τέλος, απορρίπτεται και πάλι το υπερκείμενο και το ίζημα RNA που προκύπτει διαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος συντήρησης RNA (Storage Solution, RSS, Ambion Inc.) (χρησιμοποιήθηκαν όγκοι 12×10^{-3} ml έως 20×10^{-3} ml). Το διάλυμα RSS, συνδυάζει δύο χαρακτηριστικά που ελαχιστοποιούν την υδρόλυση των βάσεων του RNA: i) το χαμηλό pH (pH 6.4) και ii) το κιτρικό νάτριο που δρα ως χηλικός παράγοντας δεσμεύοντας τα δισθενή ιόντα.

2.8. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (RNA)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του RNA γίνεται φωτομετρικά στα 260 nm. Οπτική πυκνότητα ίση με 1 αντιστοιχεί σε 40μg/ml μονόκλωνου νουκλεοτιδίου. Ο προσδιορισμός του βαθμού καθαρότητας του απομονωθέντος RNA, γίνεται με βάση το λόγο των OD που λαμβάνονται στα 260nm και στα 280nm, $\lambda = OD_{260nm}/OD_{280nm}$ (όπου OD_{260nm} αντιπροσωπεύει την οπτική πυκνότητα του δείγματος στα 260nm και OD_{280nm} αντιπροσωπεύει την οπτική πυκνότητα δείγματος στα 280 nm).

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του αντιδραστηρίου TRI (TRIZOL), το εύρος τιμών του λόγου λ που αντανακλά ικανοποιητική καθαρότητα του απομονωμένου RNA, κυμαίνεται μεταξύ 1.8 και 2.0. Στην περίπτωση που ο λόγος λ λαμβάνει τιμές μικρότερες του 1.6, το εκχύλισμα περιέχει υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 2.2 φανερώνουν τη παρουσία ποσότητας DNA.

2.9. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

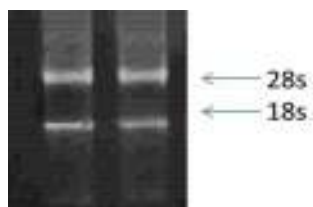
2.9.1. Ηλεκτροφόρηση RNA-Ποιοτικός έλεγχος RNA

Κατά τον έλεγχο της ποιότητας του RNA που απομονώνεται, γίνεται ανάλυση του RNA σε πήκτωμα αгарόζης. Το RNA μεταναστεύει στο πήκτωμα διανύοντας απόσταση που βρίσκεται σε γραμμική σχέση με το λογάριθμο του μοριακού του βάρους. Για την αποφυγή των ριβονουκλεασών, οι οποίες μέσα σε λίγα λεπτά μπορούν να καταστρέψουν το RNA, χρησιμοποιούνται υλικά κατεργασμένα με DEPC (diethylpyrocarbonate). Τα γυαλικά και τα διαλύματα επωάζονται για 8 ώρες

με 0.1% DEPC στους 37°C και την επόμενη ημέρα αποστειρώνονται ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα DEPC. Η ίδια διαδικασία εφαρμόστηκε και για την ηλεκτροφόρηση προϊόντων αντιδράσεων RT-PCR .

Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1.5% (w/v) απαιτείται ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1×. Ακολούθως, τα δείγματα RNA (1μg) με προσθήκη 5×10⁻³ml διαλύματος χρώσης [RNA loading dye solution 2x, φορμαμίδιο 95%(w/v), SDS 0,025% (w/v), μπλε της της βρωμοφαινόλης 0,025% (w/v), κυανό του ξυλενίου, 0,025%(w/v), βρωμιούχο αιθίδιο 0,025% (w/v)DEPC-H₂O (μέχρι συμπλήρωση)] τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις επί του πηκτώματος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με εφαρμογή τάσης 50V, σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5×, για περίπου 45 λεπτά. Τέλος το πήκτωμα μεταφέρεται και εκτίθεται σε φωτογραφικό φίλμ, σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Στο RNA πήκτωμα αγαρόζης παρατηρούμε τα ριβοσωμικά RNAs (rRNAs), που συνιστούν το 80% του συνολικού RNA. Ουσιαστικά εμφανίζονται 2 ζώνες, μία για το 28 s και μία για το 18 s. Σε μια χαρακτηριστική εικόνα RNA καλής ποιότητας πρέπει να παρατηρούνται αυτές οι δύο ζώνες καθαρά και το πάχος της ζώνης που αντιστοιχεί στο 28s να είναι διπλάσια αυτής του 18s (**Εικόνα 2.4**) .



Εικόνα 2.4 Ανάλυση ποιότητας RNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Δίνεται έμφαση στην παρουσία δυο διακριτών ζωνών (οι οποίες αντιστοιχούν στις 28s και 18s του rRNA).

2.9.2. Ηλεκτροφόρηση DNA-Ανάλυση προϊόντος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση DNA είναι μία γρήγορη μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης του DNA, κυρίως σε δείγματα που περιέχουν μικρές ποσότητες (250 ng/ml). Ο προσδιορισμός γίνεται με βάση την ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται από το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο είναι δεσμευμένο πάνω στο DNA.

Καθώς το ποσό του φθορισμού είναι ανάλογο της συνολικής μάζας του DNA, η συγκέντρωση μπορεί να υπολογιστεί συγκρίνοντας την ένταση φθορισμού του

δείγματος με την ένταση που εκπέμπει ένα δείγμα γνωστής συγκέντρωσης. Η ελάχιστη συγκέντρωση που μπορεί να προσδιοριστεί με τη μέθοδο αυτή είναι 1-5ng DNA. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία τεχνική που επιτρέπει το διαχωρισμό, το χαρακτηρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Τα πηκτώματα αγαρόζης φτιάχνονται αφού πρώτα διαλύσουμε με θέρμανση την αγαρόζη μέσα σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Όταν αυτό γίνει διαυγές χύνουμε το μίγμα στην μήτρα και περιμένουμε να στερεοποιηθεί. Η αγαρόζη πήζοντας δημιουργεί ένα δίκτυο του οποίου η πυκνότητα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αγαρόζης. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα άκρα του πηκτώματος, το DNA, το οποίο είναι αρνητικά φορτισμένο, κινείται προς την άνοδο. Σε πηκτώματα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων μπορούν να διαχωριστούν τμήματα DNA μεγέθους από 200bp έως 50kb. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται συνήθως σε οριζόντιο επίπεδο υπό ηλεκτρικό πεδίο σταθερής τάσης.

Στη συγκεκριμένη μελέτη ακολουθήθηκε η παρακάτω πορεία:

Η αγαρόζη διαλύεται σε διάλυμα 0,5× TBE με βρασμό και στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml. Η στερεοποίηση του πηκτώματος γίνεται σε γυάλινη επιφάνεια συγκεκριμένων διαστάσεων. Οι θέσεις υποδοχείς των δειγμάτων DNA σχηματίζονται με τη βοήθεια ειδικής μήτρας που τοποθετείται στη συσκευή πριν την οριστική πήξη του πηκτώματος. Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται διάλυμα χρωστικής [DNA loading dye solution 6x, 95% (w/v) φορμαμίδιο, 0.025%(w/v) SDS, 0.025% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,025% w/v κυανό του ξυλενίου, 0.025% (w/v) βρωμιούχο αιθίδιο και 0,5mM EDTA. 12 μl από κάθε δείγμα τοποθετούνται στους ειδικούς υποδοχείς επί του πηκτώματος, με τη βοήθεια μικροπιπέττας. Η ανάλυση των δειγμάτων γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό σταθερή ένταση ρεύματος 125mA, σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5×, για 45 λεπτά.

2.10. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, αποτελείται από δύο διακριτά στάδια. Στο πρώτο στάδιο γίνεται ανάμειξη όγκου ολικού RNA που αντιστοιχεί σε $2,00 \times 10^{-3}$ mg, με $1,00 \times 10^{-3}$ ml oligo-

dTs (100μM) και το διάλυμα συμπληρώνεται με DEPC-H₂O μέχρι τελικό όγκο 12,5×10⁻³ml. Ακολουθεί επώαση στους 70°C για 5 λεπτά και γρήγορη μεταφορά των μιγμάτων στους 4°C, μετά το πέρας της επώασης. Κατά το στάδιο αυτό, αποδιατάσσονται οι ανώτερες δομές που μπορεί να περιέχει το RNA λόγω συμπληρωματικότητας και πραγματοποιήθηκε η πρόσδεση των μορίων εκκινητών, oligo-dTs στην 3' poly-A ουρά των mRNA μεταγράφων.

Στο δεύτερο στάδιο, προστίθενται στο μίγμα 4.0×10⁻³ml μίγματος αντίδρασης RT (Πίνακας 2.14) και επωάζεται στο θερμικό κυκλοποιητή για 55 λεπτά στους 37°C (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου) και 15 λεπτά στους 70°C (τερματισμός της αντίδρασης). Το τελευταίο στάδιο τερματισμού της αντίδρασης πραγματοποιείται για τη μη αντιστρεπτή αποδιάταξη της αντίστροφης μεταγραφάσης μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του cDNA, καθώς σε αντίθετη περίπτωση τα μόρια του ενζύμου παραμένουν προσδεδεμένα με το νεοσυντιθέμενο cDNA, παρεμποδίζοντας έτσι τη μετέπειτα ενίσχυση αλληλουχιών με PCR. Τα δείγματα cDNA που προκύπτουν είτε φυλάσσονται στους -20°C είτε αναλύονται άμεσα.

Πίνακας 2.14 Σύσταση μίγματος αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής

Tris-HCl pH 8,3	50 mM
KCl	75 mM
MgCl₂	3 mM
DDT	10 mM
RT-BUFFER⁶	20% (v/v)
μεταγραφάση M-MLV RT⁷	200 Units/ml

2.11. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR, είναι μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση ενός τμήματος DNA που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο περιοχές γνωστής αλληλουχίας. Αυτό επιτρέπει την ανίχνευση ακόμα και μορίων DNA που βρίσκονται σε πολύ μικρή συγκέντρωση σε ένα βιολογικό δείγμα. Η PCR

⁶ Invitrogen

⁷ [Moloney murine Leukemia Virus reverse transcriptase(Finnzymes Oy, Espoo, Finland)]

στηρίζεται στη δημιουργία από μια DNA πολυμεράση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA κατά την 5'—»3' κατεύθυνση, χρησιμοποιώντας ως μήτρα μια μονόκλωνη αλυσίδα DNA. Σημαντικό ρόλο στην αντίδραση διαδραματίζουν δύο ολιγονουκλεοτίδια που λειτουργούν ως εκκινητές (primers) αυτής που καταλύεται από την DNA πολυμεράση. Η τυπική PCR πραγματοποιείται σε τρία βήματα

- Αποδιάταξη
- Επέκταση
- Επαναδιάταξη

Ειδικότερα, η θέρμανση χωρίζει το δίκλωνο DNA, οι δύο εκκινητές εφαρμόζονται σε μοριακή περίσσεια και η DNA πολυμεράση αντιγράφει το DNA. Στο τέλος η αργή ψύξη επαναδιατάσει τους δύο κλώνους. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται προέρχεται από το θερμοφιλικό βακτήριο *Thermus aquaticus* και έχει την ιδιότητα να μην αδρανοποιείται στους 95 °C και επομένως δεν απαιτείται η ανανέωση της ποσότητας του ενζύμου σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η αντίδραση περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Αποδιάταξη του DNA με θέρμανση στους 95 °C
- Πρόσδεση του ζεύγους των ολιγονουκλεοτιδίων - εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA (annealing). Η θερμοκρασία σύνδεσης συνήθως είναι χαμηλότερη κατά 5 °C από τη θερμοκρασία τήξης των ολιγονουκλεοτιδίων.
- Επιμήκυνση του ανασυνδυασμένου ολιγονουκλεοτιδίου από την Taq πολυμεράση στους 72 °C για 1 λεπτό ανά 1kb DNA.

Οι κύκλοι αποδιάταξης, σύνδεσης και επιμήκυνσης επαναλαμβάνονται για 25-30 φορές. Τα προϊόντα του DNA που δημιουργήθηκαν σε κάθε κύκλο χρησιμοποιούνται σαν μήτρα για τον επόμενο κύκλο. Το αποτέλεσμα είναι η εκθετική συσσώρευση του επιλεγμένου τμήματος DNA [114].

Στη παρούσα εργασία προκειμένου να ενισχύσουμε την επιθυμητή αλληλουχία ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

(όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας ΕΚΠΑ, Ανδρέα Σκορίλα).

Οι συνθήκες PCR για τη μελέτη του γονιδίου *APP* ήταν: 95° C για 2 λεπτά , αποδιάταξη στους 95° C για 30 δευτερόλεπτα, πρόσδεση εκκινητών στους 66° C για 30 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση στους 72° C για 1 λεπτό και τελική επιμήκυνση στους 72° C για 5 λεπτά. Οι κύκλοι αποδιάταξης, σύνδεσης και επιμήκυνσης επαναλαμβάνονται για 40 φορές.

Οι συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν για το μετάγραφο του γονιδίου *HPRT* ήταν: αρχική αποδιάταξη στους 95° C για 2 λεπτά , αποδιάταξη στους 95° C για 30 δευτερόλεπτα, σύνδεση εκκινητών στους 60,5° C για 30 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση στους 72° C για 1 λεπτό και τελική επιμήκυνση στους 72° C για 5 λεπτά . Οι κύκλοι αποδιάταξης, σύνδεσης και επιμήκυνσης επαναλαμβάνονται για 36 φορές

Στον **πίνακα 2.15** παρατίθεται η σύσταση του μίγματος της αντίδρασης PCR.

Πίνακας 2.15 Σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR

dNTPs	0,20 mM
Taq πολυμεράση⁸	1,25 Units/ml
5× reaction buffer⁹	10% (v/v)
MgCl₂	1,50 mM
νοηματικός εκκινητής	1 μM
αντινοηματικός εκκινητής	1 μM

Ως αρνητικός μάρτυρας (negative control), σε κάθε αντίδραση PCR, χρησιμοποιήθηκε δείγμα χωρίς την παρουσία εκμαγείου cDNA.

2.12. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου της Rharmacia Biotech Inc (NJ,USA). Για την απομόνωση ολικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος Jouan BR4i της εταιρίας Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Επιπλέον, για την οπτικοποίηση των ανοσοσυμπλόκων, κατά την ανάλυση κατά Western, χρησιμοποιήθηκε το όργανο Fruochem 880 της εταιρίας Alpha Innotech (Alva, U.K). Στον ποσοτικό προσδιορισμό RNA χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο NanoDrop 1000 της

⁸ GoTaq Flexi DNA polymerase της Promega (Maddison,USA)

⁹ Promega

εταιρίας Thermo Scientific. Τέλος, στις αντιδράσεις PCR έγινε χρήση του θερμικού κυκλοποιητή, Mastercycle pro, της εταιρίας Eppendorf International (Germany).

2.13. ΧΡΗΣΗ ΛΟΓΙΣΜΙΚΩΝ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ-ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια διαφόρων λογισμικών. Το ImageJ χρησιμοποιήθηκε για την πυκνομέτρηση των ανοσοαποτυπωμάτων και το λογισμικό Graph Pad Software (SanDiego, CA) για την προσαρμογή των αποτελεσμάτων σε διαγράμματα. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το photoshop (Adobe) και το power point (Microsoft) για την επεξεργασία των παραχθέντων εικόνων.

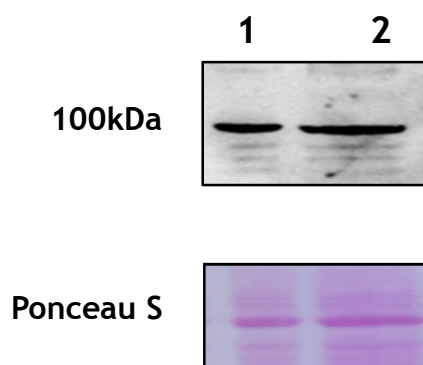
Στη παρούσα ερευνητική εργασία, οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα. Για τη σύγκριση της μέσης τιμής μεταξύ ομάδων με την ομάδα αναφοράς (control), έγινε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Graph Pad Prism 6 (Graph Pad Prism 6 software, SanDiego, CA). Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε ο στατιστικός έλεγχος Student's paired t test (ζευγαρωτές παρατηρήσεις) για τη σύγκριση μεταξύ δύο ομάδων. Σε κάθε περίπτωση, στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι διαφορές για τις οποίες $p < 0,05$. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν τα διαδικτυακά λογισμικά Primer designing tool (NCBI) και BLAST (NCBI) για την εύρεση της θέση πρόσδεσης των εκκινητών στις νουλεοτιδικές αλληλουχίες του γονιδίου *APP* και *HPRT*, αλλά και την εύρεση της θερμοκρασίας τήξης (T_m) κάθε εκκινητή. Για την ανίχνευση μοτίβων και επικρατειών στις πρωτεϊνικές αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων Pfam (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>). Η ανάλυση αλληλουχιών και η εύρεση της μεταξύ τους ομοιότητας πραγματοποιήθηκε με τη στοίχιση των ακολουθιών. κατά ομάδες με τη μέθοδο T-Coffee.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ

3.1.1. Ανίχνευση της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς με τη μέθοδο του ανοσοαποτυπώματος κατά Western σε καρδιακό ιστό Χορδωτού

Στο παρόν πείραμα έγινε χρήση του αντισώματος 275, αντίσωμα που αναγνωρίζει το καρβόξυ-τελικό άκρο της APP. Αρχικά, χρησιμοποιώντας ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών από καρδιακό ιστό Χορδωτού (αμφιβίου), του είδους – (*Rana ridibunda*), έγινε ανίχνευση της APP με την τεχνική του ανοσοαποτυπώματος κατά Western. Συγκεκριμένα αναλύθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση δύο δείγματα ολικής πρωτεΐνης, ένα συνολικής ποσότητας πρωτεϊνών 70μg και το δεύτερο διπλάσιας ποσότητας πρωτεϊνών, 140μg. Μετά την ανάλυση των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος, χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE) 10%(w/v), έγινε ανίχνευση του καρβοξυ-τελικού άκρου με το παραπάνω αντίσωμα. Ανιχνεύθηκε ένα τμήμα με μοριακό βάρος 100kDa, τμήμα που περιέχει καρβοξυ-τελικό άκρο της APP. Επίσης, παρατηρήθηκαν αρκετά τμήματα μικρότερου μοριακού βάρους και στα δύο δείγματα τα οποία εμφάνισαν μικρότερης έντασης σήματα (**Εικόνα 3.1**).

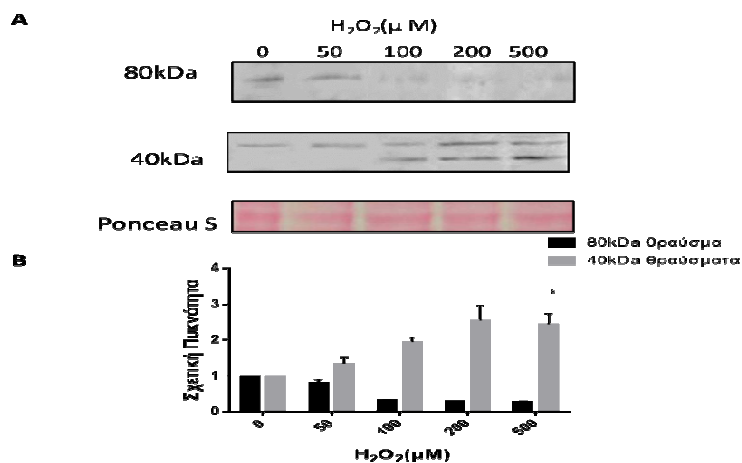


Εικόνα 3.1 Ανίχνευση της APP σε εκχύλισμα πρωτεϊνών καρδιακού ιστού χορδωτού (*Rana ridibunda*) με ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Η επιβεβαίωση φόρτωσης διπλάσιας ποσότητας ολικής πρωτεΐνης του δείγματος 2 σε σχέση με το δείγμα 1 έγινε με χρήση της χρωστικής Ponceau S στη μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης

3.1.2. Ανίχνευση θραυσμάτων της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε κύτταρα H9c2, παρουσία H₂O₂

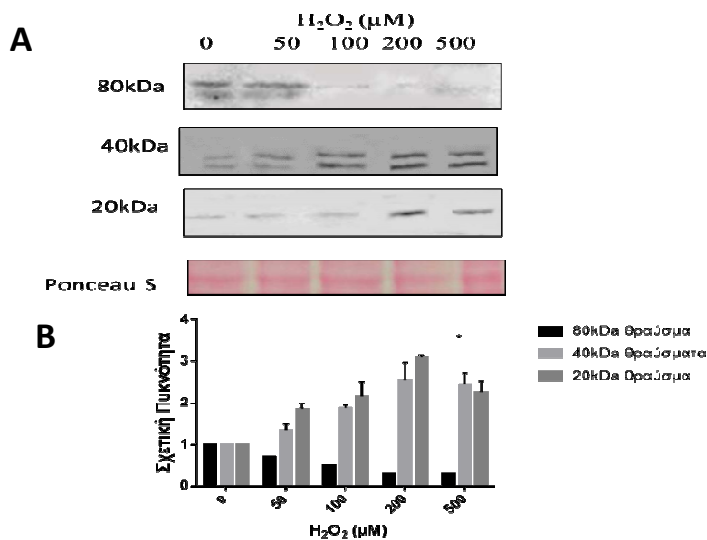
Για την διερεύνηση της δημιουργίας θραυσμάτων της APP υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης (οξειδωτικό στρες), τα κύτταρα εκτέθηκαν σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Η χρήση του H₂O₂ επιστρατεύεται συχνά σε πειραματικά πρωτόκολλα με σκοπό την προσομοίωση συνθηκών οξειδωτικής καταπόνησης [131, 132].

Στην παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε να ελέγξουμε τις αλλαγές που προκαλούνται στη δημιουργία θραυσμάτων της APP σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα εκτέθηκαν για 30 λεπτά στην παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων H₂O₂, που κυμαίνονταν από 50 έως 500μM. Επιθυμώντας να διερευνήσουμε την ύπαρξη θραυσμάτων μετά από αύξηση των δόσεων του H₂O₂, απομονώσαμε ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών με χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, και 30 μl πρωτεΐνης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 10% (w/v). Παρατηρήσαμε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του H₂O₂ υπήρξε μείωση στα επίπεδα του θραύσματος με μοριακό βάρος στα 80kDa ενώ αυξάνονται παρουσιάζοντας μέγιστο από τα 200μM H₂O₂ τα θραύσματα των 40kDa (**Εικόνα 3.2**). Η επίδραση με H₂O₂ είχε ως αποτέλεσμα της αύξηση των θραυσμάτων της APP κάτι που αναγνωρίστηκε χάρη στο ειδικό για το πεπτίδιο Αβ, αντίσωμα 347 (αντιορός κουνελιού έναντι Αβ πεπτιδίου). Επίσης, παρατηρήθηκε μέγιστο αυτών των θραυσμάτων σε συγκέντρωση H₂O₂ ίση με 200μM ενώ δεν ήταν εφικτό να καταλήξουμε προς τα πιο άκρο έγινε η επεξεργασία (αμινοτελικό άκρο ή καρβοξυτελικό άκρο) (**Εικόνα 3.2**). Να σημειωθεί πως τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% (w/v) και 15% (w/v) πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) χωρίς να ανιχνευτούν θραύσματα σε χαμηλότερα μοριακά βάρη.



Εικόνα 3.2 Ανίχνευση θραυσμάτων της APP, έπειτα από επίδραση για 30 λεπτά με διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂. (A) Ανάλυση κατά Western για το Αβ πεπτίδιο. Η επιβεβαίωση ισοφόρτωσης των διαφορετικών δειγμάτων έγινε με χρήση της χρωστικής Ponceau S στη μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης. (B): Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων πυκνομέτρησης των ζωνών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα ανεξάρτητων πειραμάτων, **P*<0,05 σε σχέση με τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς (κύτταρα χωρίς την επίδραση H₂O₂)

Θέλοντας να ανιχνεύσουμε όλο το πλήθος των θραυσμάτων της APP, αποφασίσαμε να αλλάξουμε το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Καταλήξαμε στην χρήση διαλύματος κατεργασίας δειγμάτων με σκοπό την καλύτερη αποδιάταξη των πρωτεϊνών και την ανίχνευση όσο το δυνατόν μεγαλύτερου αριθμού θραυσμάτων. Η ανάλυση των πρωτεϊνών (30μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κάθε δείγμα) πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 12% (w/v) και 15% (w/v). Με αυτό τον τρόπο καταφέραμε να εντοπίσουμε ακόμη ένα θραύσμα στα 20 kDa (**Εικόνα 3.3**) κάτι το οποίο δεν ήταν εφικτό με το προηγούμενο πειραματικό σχεδιασμό. Παρατηρήσαμε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του H₂O₂ παρουσιάζεται σημαντική αύξηση του θραύσματος με μοριακό βάρος στα 40 kDa συγκέντρωση, στην συγκέντρωση των 200 μM, ενώ η έκφρασή του παραμένει αυξημένη και στη συγκέντρωση των 500 μM (2,45±0,33 φορές σε σχέση με τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς, *P*< 0,05). Για τις ίδιες συγκεντρώσεις, το θραύσμα των 20 kDa αυξάνει την έκφραση του, ενώ των 80 kDa καθίσταται μη ορατό.



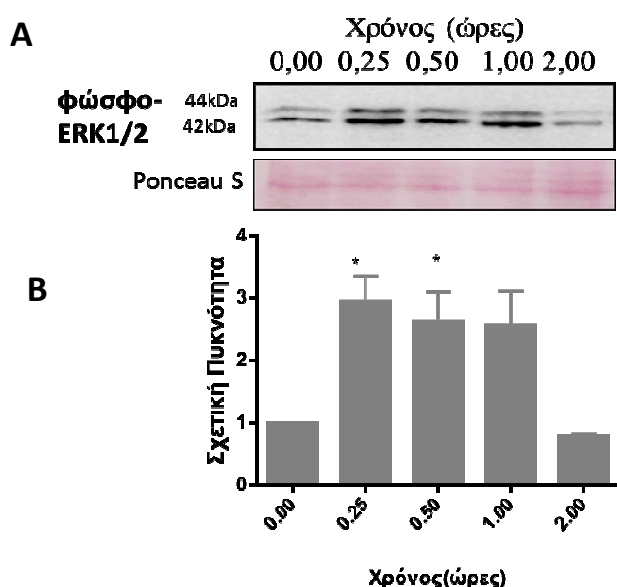
Εικόνα 3.3 Ανίχνευση θραυσμάτων της APP μετά από επίδραση με H₂O₂ για 30 λεπτά και για τις συγκεντρώσεις που αναγράφονται. (A) Ανάλυση κατά Western για το Aβ πεπτίδιο. Η επιβεβαίωση ισοφόρτωσης των διαφορετικών δειγμάτων έγινε με χρήση της χρωστικής Ponceau S στη μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης. (B): Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων πυκνομέτρησης των ζωνών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα ανεξάρτητων πειραμάτων, **P*<0,05 σε σχέση με τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς (κύτταρα χωρίς την επίδραση του H₂O₂).

3.1.3. Ανίχνευση θραυσμάτων της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς και ενεργοποίηση ERK1/2 έπειτα από επίδραση με τον παράγοντα PMA

Αρχικά, έγινε επίδραση των κυττάρων με συγκέντρωση 1μM PMA για διαφορετικά χρονικά διαστήματα με σκοπό να διερευνησουμε εάν πρόκειται για ένα χρονοεξαρτώμενο φαινόμενο. Πραγματοποιήθηκε επίδραση των κυττάρων για 0,25, 0,50, 1,00 και 2,00 ώρες και μετά την παρασκευή των δειγμάτων, τα δείγματα (30 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος) ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% (w/v) SDS-PAGE. Τέλος, εξετάστηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των δύο κύριων ισομορφών της ERK, μεγέθους 42 kDa και 44 kDa (p-ERK-1 και p-ERK-2, αντίστοιχα).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **εικόνα 3.4** και δείχνουν ότι τα επίπεδα ενεργοποίησης των p-ERK1/2 παρουσιάζουν μία έντονη αύξηση στα πρώτα 15 λεπτά της επίδρασης με τον παράγοντα PMA (2,95±0,48 φορές σε σχέση με τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς, *P*<0,05). Το 95 % διάστημα εμπιστοσύνης για τη διαφορά των μέσων όρων κυμάνθηκε από 0,64 έως 3,25. Στη συνέχεια τα επίπεδα παραμένουν υψηλά με στατιστικά σημαντική διαφορά και στη μισή ώρα (2.63±0.41 φορές σε σχέση με τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς, *P*<0,05). Για την επόμενη μία ώρα τα επίπεδα παραμένουν υψηλά ενώ η πτώση εμφανίζεται καθώς τα επίπεδα

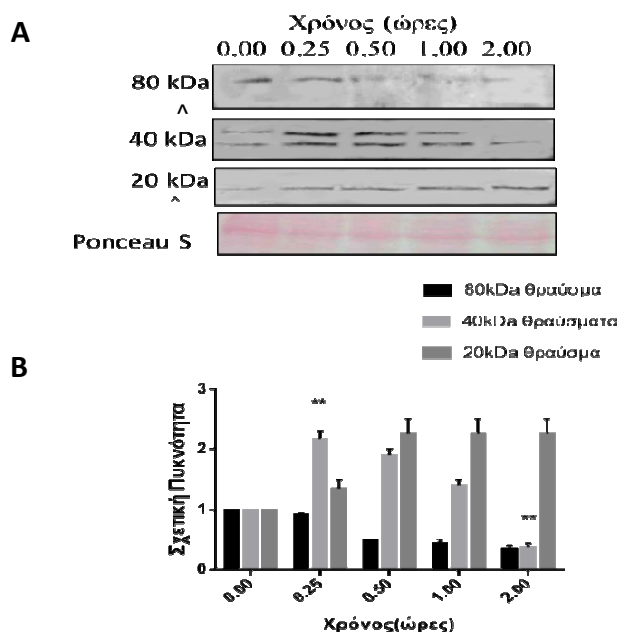
φωσφορυλίωσης των ERK προσεγγίζουν αυτά του δείγματος αναφοράς κατά τις 2 ώρες επίδρασης (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4 Χρονικό πρότυπο ενεργοποίησης των ERK1/2, παρουσία του παράγοντα PMA και για τα χρονικά διαστήματα που αναγράφονται. (A) Ανάλυση κατά Western για τις φωσφορυλιωμένες ισομορφές της ERK. Η επιβεβαίωση ισοφόρτωσης των διαφορετικών δειγμάτων έγινε με χρήση της χρωστικής Ponceau S στη μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης. (B) Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων πυκνόμετρησης ζωνών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα ανεξάρτητων πειραμάτων. * $P < 0,05$, σε σχέση με τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς (κύτταρα χωρίς την επίδραση του παράγοντα PMA).

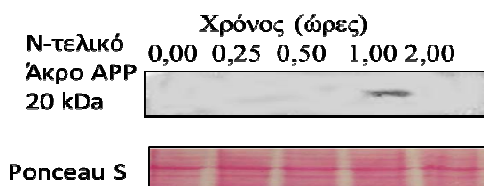
Για τις ίδιες πειραματικές συνθήκες (1 μ M PMA - για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα), διερευνήθηκε η δημιουργία θραυσμάτων της APP με αντίσωμα έναντι του Α β , έναντι του αμινο-τελικού άκρου καθώς και του καρβοξυ-τελικού άκρου της APP. Μετά από την ηλεκτροφόρηση 30 μ l πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κάθε δείγμα, σε 12% (w/v) και 15% (w/v) SDS-PAGE, η ανάλυση των αποτελεσμάτων του ανοσοαποτυπώματος κατά Western παρουσιάζεται στην εικόνα 3.5 και δείχνει την παρουσία θραυσμάτων τόσο στα 80 kDa και 40 kDa όσο και στα 20kDa. Παρατηρήθηκε πως το μικρό θραύσμα (20 kDa) ανιχνεύεται σε μεγαλύτερο χρόνο επίδρασης, κατά τον οποίο μειώνονται τα επίπεδα των θραυσμάτων των 40 kDa και 80 kDa. Ειδικότερα, ο στατιστικός έλεγχος έδειξε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση των θραυσμάτων των 40 kDa ($2,17 \pm 0,13$ φορές σε σχέση με τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς, $P < 0,01$). Η παρατηρηθείσα αύξηση είναι σε αντιστοιχία με το χρονικό πρότυπο ενεργοποίησης των ERK1/2. Κατόπιν,

παρατηρήθηκε σταδιακή μείωσή τους στις δύο ώρες επίδρασης με το PMA ($0,41 \pm 0,08$ φορές σε σχέση με τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς, $P < 0,01$).



Εικόνα 3.5 Ανίχνευση θραυσμάτων της APP παρουσία PMA στα χρονικά διαστήματα που αναγράφονται. (A) Ανάλυση κατά Western θραυσμάτων της APP, παρουσία 1μM PMA, για το πεπτιδίο Αβ. Η επιβεβαίωση ισοφόρτωσης των διαφορετικών δειγμάτων έγινε με χρήση της χρωστικής Ponceau S στη μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης. (^): αντιπροσωπευτική εικόνα επαναλαμβανόμενων πειραμάτων για την κάθε επίδραση. (B) Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων πυκνομέτρησης των ζωνών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα ανεξάρτητων πειραμάτων. ** $P < 0,01$, σε σχέση με τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς (κύτταρα χωρίς την επίδραση του PMA).

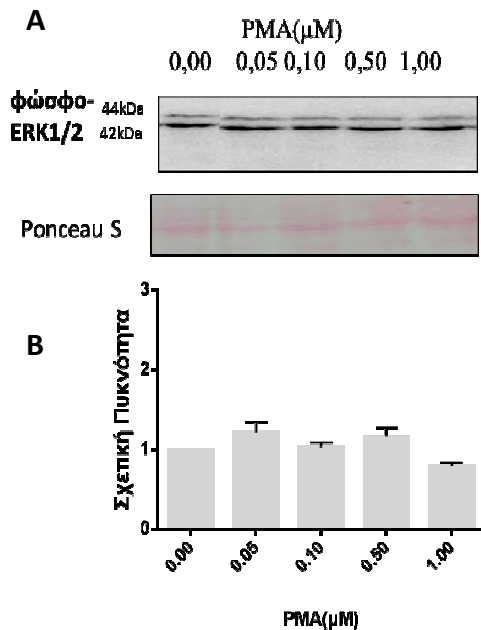
Επίσης, χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του καρβοξυ-τελικού και του αμινο-τελικού θραύσματος της APP, στις ίδιες συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω, διαπιστώθηκε πως το καρβοξυ-τελικό θραύσμα δεν ανιχνεύεται ενώ το αμινο-τελικό ανιχνεύεται στα 20 kDa μετά από 1 ώρα επίδρασης με τον παράγοντα PMA (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6 Ανίχνευση θραυσμάτων της APP παρουσία PMA στα χρονικά διαστήματα που αναγράφονται. Ανάλυση κατά Western θραυσμάτων της APP για το NH₂-τελικό άκρο της, παρουσία 1μM PMA. Η επιβεβαίωση ισοφόρτωσης των διαφορετικών δειγμάτων έγινε με χρήση της χρωστικής Ponceau S στη μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης.

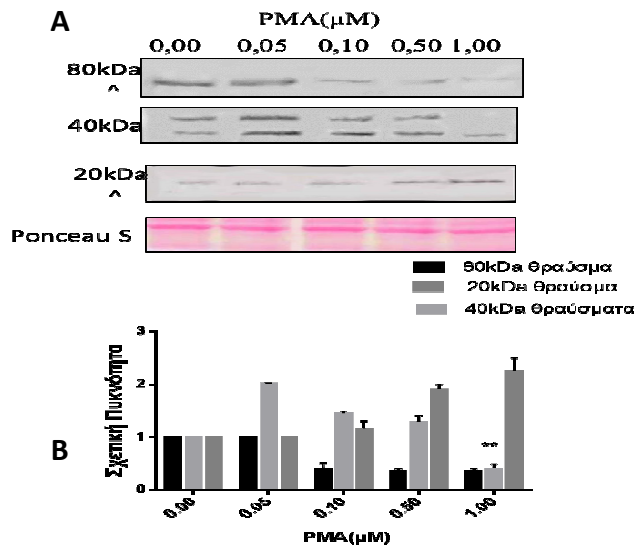
3.1.4. Ανίχνευση θραυσμάτων της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς και ενεργοποίηση ERK1/2 σε κύτταρα H9c2, έπειτα από επίδραση με διαφορετικές συγκεντρώσεις PMA

Επιπροσθέτως, εκτός της μελέτης για την χρονοεξαρτώμενη σχέση της επίδρασης του PMA στη δημιουργία θραυσμάτων τα APP και ενεργοποίησης των ERK1/2, έγινε μελέτη της σχέσης των επιπέδων τόσο της φωσφορυλίωσης των ισομορφών ERK1/2 όσο και θραυσματοποίησης της APP με την αύξηση της συγκέντρωσης του παράγοντα PMA. Οι συγκεντρώσεις του PMA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,05μM, 0,10μM, 0,50μM και 1,00μM. Πρωτεϊνικό εκχυλίσμα (30μl) από κάθε δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε 12% (w/v) SDS-PAGE και αναλύθηκε κατά Western. Μετά την ανάλυση κατά Western, διαπιστώθηκε πως σε όλες τις παραπάνω συγκεντρώσεις του παράγοντα PMA οι δύο ισομορφές της ERK (ERK-1 και ERK-2) παραμένουν σε βασικά επίπεδα κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται από την ποσοτικοποίηση και τη δημιουργία των διαγραμμάτων (**Εικόνα 3.7**). Η έρευνα μας υποστηρίζει πως η επίδραση για 2 ώρες έχει ήδη πυροδοτήσει σηματοδοτικά γεγονότα καθοδικά των ERK ήδη από την πρώτη ώρα της επίδρασης με τον παράγοντα PMA.



Εικόνα 3.7 Πρότυπο ενεργοποίησης των ERK1/2 μετά από επίδραση με τον παράγοντα PMA σε συγκεντρώσεις που αναγράφονται. (A) Ανάλυση κατά Western για τις φωσφοριωμένες isoμορφές της ERK, έπειτα από επίδραση με διαφορετικές συγκεντρώσεις του παράγοντα PMA για 2 ώρες. Η επιβεβαίωση ισοφόρτωσης των διαφορετικών δειγμάτων έγινε με χρήση της χρωστικής Ponceau S στη μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης. (B) Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων πυκνομέτρησης των ζωνών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα ανεξάρτητων πειραμάτων, σε σχέση με τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς (κύτταρα χωρίς την επίδραση του PMA)

Κατά την ανάλυση κατά Western για την ανίχνευση των θραυσμάτων της APP για τον επίτοπο του Αβ πεπτιδίου, παρουσιάζεται μία αύξηση των θραυσμάτων των 40 kDa, στα 0,05 μ M, ενώ ακολουθείται φθίνουσα πορεία για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις (**Εικόνα 3.8**). Συγκεκριμένα, η μελέτη με διαφορετικές συγκεντρώσεις PMA για 2 ώρες έδειξε πως με την αύξηση της συγκέντρωσης του ενεργοποιητή PMA μειώνεται αναλογικά το θραύσμα των 80 kDa ενώ μετά τα 0,50 μ M φαίνεται η μείωση και του θραύσματος των 40 kDa με στατιστικά σημαντική μείωση στην επίδραση του 1 μ M ($0,41 \pm 0,08$ φορές σε σχέση με τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς, $P < 0,01$). Το θραύσμα των 20 kDa αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης ενώ το αμινο-τελικό άκρο δεν ανιχνεύεται .



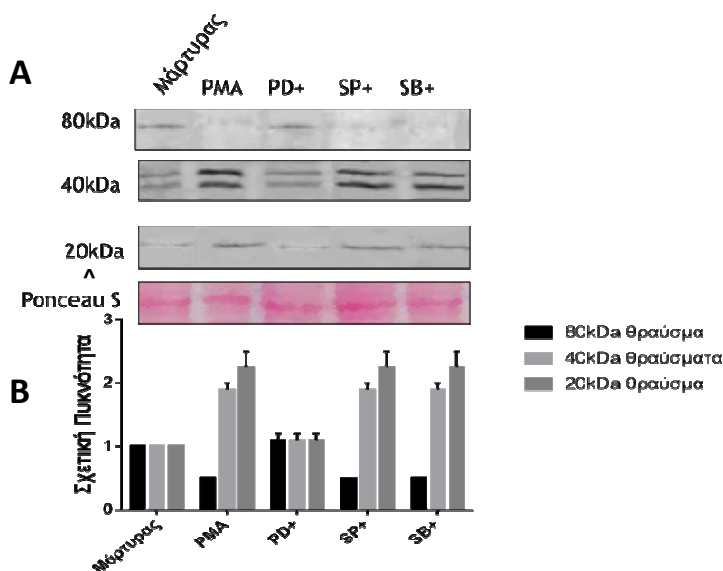
Εικόνα 3.8 Ανίχνευση θραυσμάτων της APP μετά από επίδραση με τον παράγοντα PMA για 2 ώρες και στις συγκεντρώσεις που αναγράφονται. (A) Ανάλυση κατά Western των θραυσμάτων της APP για το πεπτίδιο Αβ. Η επιβεβαίωση ισοφόρτωσης των διαφορετικών δειγμάτων έγινε με χρήση της χρωστικής Ponceau S στη μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης. (^): αντιπροσωπευτική εικόνα επαναλαμβανόμενων πειραμάτων για την κάθε επίδραση. (B) Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων πυκνομέτρησης ζωνών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα ανεξάρτητων πειραμάτων. ** $P < 0,01$, σε σχέση με τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς (κύτταρα χωρίς την επίδραση του PMA).

3.1.5. Ανίχνευση θραυσμάτων της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε κύτταρα H9c2 έπειτα από επίδραση με PMA, παρουσία αναστολέων των MAPKs.

Τα παραπάνω αποτελέσματα μας οδήγησαν σε μια νέα σειρά πειραμάτων, όπου θελήσαμε να διερευνήσουμε τη συμμετοχή συγκεκριμένων κινασών στην δημιουργία θραυσμάτων της APP μετά από επίδραση με τον παράγοντα PMA. Στο συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό, πραγματοποιήθηκε επίδραση με τον ενεργοποιητή PMA, ενώ δοκιμάστηκε και η προ-επίδραση τους με μία σειρά αναστολέων των μελών των MAPK (p-38,p-ERKs και JNKs), για μισή ώρα. Οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο PD98059 (αναστολέας των ERK1/2, σε συγκέντρωση 25μM), ο SB203580 (αναστολέας της p38 MAPK,σε συγκέντρωση 10μM) σε και ο SP600125 (αναστολέας JNKs, σε συγκέντρωση 10μM).

Πιο συγκεκριμένα, ο αναστολέας PD98059 είναι ένα μόριο που αναστέλλει ισχυρά και ειδικά τις κινάσες MAPKK, MEK1 και MEK2. Ο PD98059 (PD+) προσδένεται στην ανενεργή MAPKK και εμποδίζει την ενεργοποίηση της από τους ενεργοποιητές που βρίσκονται ανοδικά αυτής, όπως για παράδειγμα ο c-Raf, λειτουργώντας αποτρεπτικά στην ενεργοποίηση των ERK1/2. Ο SB203580 (SB+) είναι επίσης ένας ισχυρός, ειδικός και αναστρέψιμος αναστολέας πρωτεϊνών και

φαίνεται να καταστέλλει το μονοπάτι p38. Τέλος, ο αναστολέας SP600125 (SP+) είναι ένα μόριο που σχετίζεται με την αναστολή της δράσης αυξητικών παραγόντων η οποίοι σχετίζονται με το μονοπάτι των JNKs, καθώς το ενεργοποιούν. Έτσι, προηγήθηκε η επίδραση για 30 λεπτά με τους αναστολείς και κατόπιν έγινε επίδραση με τον ενεργοποιητή PMA σε συγκέντρωση 1 μM για 30 λεπτά. Ακολούθησε η λύση των κυττάρων, η προετοιμασία ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων (30 μl ολικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών) σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE) 12% (w/v) και 15% (w/v). Κατά την ανάλυση κατά Western χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα 347 (αντιορός κουνελιού), το οποίο αναγνωρίζει τον επίτοπο του Αβ πεπτιδίου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **εικόνα 3.9** και δείχνουν πως τα επίπεδα των θραυσμάτων μεγαλύτερου μοριακού βάρους, στα 80 kDa, μειώνονται μετά την επίδραση με 1 μM PMA ενώ αντίθετα αυξάνονται τα θραύσματα των 40 kDa και 20 kDa, σε σχέση με το μάρτυρα. Η παρουσία του PD98059 (PD+) αντιστρέφει τη δράση του PMA. Αντίθετα, τόσο ο αναστολέας SP600125 (SP+) όσο και ο αναστολέας SB203580 (SB+) δεν είχαν κάποια επίδραση (**Εικόνα 3.9**). Επιπροσθέτως, έγινε επίδραση των κυττάρων και με τον διαλύτη των αναστολέων, DMSO, ώστε να εξακριβωθεί η όποια συμμετοχή του δημιουργία των θραυσμάτων.



Εικόνα 3.9 Επίδραση αναστολέων των MAPKs [PD98059 (PD+), SP600125 (SP+) και SB203580 (SB+)] στη δημιουργία των θραυσμάτων της APP. (A) Ανάλυση κατά Western των θραυσμάτων της APP έπειτα από επίδραση με PMA παρουσία αναστολέων των MAPKs, για το Αβ πεπτίδιο. (^): αντιπροσωπευτική εικόνα επαναλαμβανόμενων πειραμάτων για την κάθε επίδραση. Η επιβεβαίωση ισοφόρτωσης των διαφορετικών δειγμάτων έγινε με χρήση της χρωστικής Ponceau S στη μεμβράνη ανοσοοποτύπωσης. (B) Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων πυκνομέτρησης ζωνών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα ανεξάρτητων πειραμάτων, σε σχέση με το μάρτυρα (κύτταρα χωρίς επίδραση).

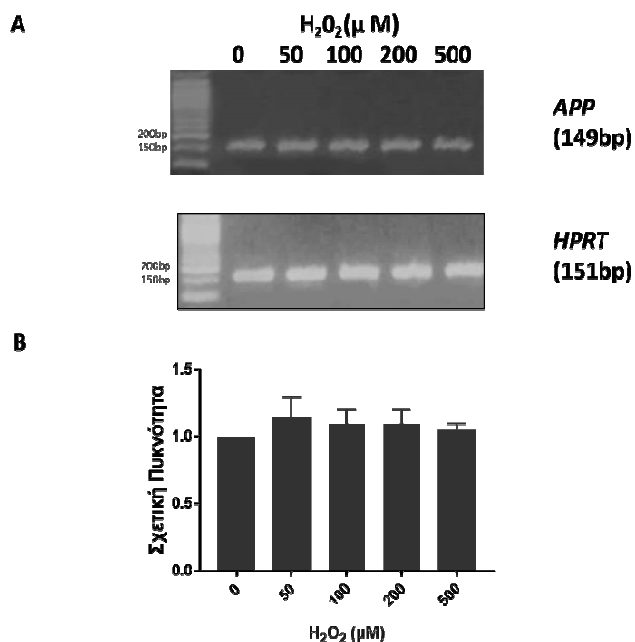
3.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ H9c2

3.2.1. Έλεγχος έκφρασης του γονιδίου της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε κύτταρα H9c2, έπειτα από επίδραση με H₂O₂

Οι προηγούμενες σειρές πειραμάτων είχαν ως αντικείμενο μελέτης τις αλλαγές σε επίπεδο εκφραζόμενων θραυσμάτων της πρωτεΐνης. Η μελέτη βασίστηκε στην υπόθεση πως τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται οι MAPKs στα καρδιακά κύτταρα, αλληλεπιδρούν με την διαδικασία της επεξεργασίας (processing) της και εν τέλει συνεισφέρουν στην τύχη του μορίου (ενδοκύττωση, αποικοδόμηση, έκκριση προς το αμυλοειδικό ή μη αμυλοειδικό μονοπάτι). Ακολουθώντας, γνωρίζοντας πως αυτά τα γεγονότα σηματοδότησης έχουν, πολλές φορές, στόχο να μεταφέρουν το ερέθισμα εντός του πυρήνα, προχωρήσαμε στη διερεύνηση των αλλαγών που επέρχονται σε επίπεδο μεταγραφής του *APP*. Στην παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε να ελέγξουμε αν προκαλούνται αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *APP* σε συνθήκες οξειδωτικού στρες με σκοπό να διαλευκάνουμε εάν αυτές οι αλλαγές συσχετίζονται με την επίδραση των κυττάρων με τον οξειδωτικό παράγοντα H₂O₂. Για τη μελέτη αυτή έγινε επίδραση με διάφορες συγκεντρώσεις H₂O₂ από 50 έως 500μM για 30 λεπτά και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις RT-PCR (συνδυασμός αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης).

Αναλύσαμε τα δείγματα χρησιμοποιώντας πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 3% (w/v). Ακολουθώντας, για τη μελέτη των αλλαγών των επιπέδων έκφρασης του *APP* χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ανάλυσης ImageJ με σκοπό να εξαχθούν οι μεταβολές στην ένταση των ζωνών που φαίνονται στα παραπάνω πηκτώματα. Μετά από μελέτη της έντασης επιτελέστηκε κανονικοποίηση με την ένταση της ζώνης του ενδογενούς ιδιοστατικού γονιδίου της υποξανθινο-γουανινο φωσφοριβοσυλτρανσφεράσης (*HPRT*) σε κάθε δείγμα.

Η παραπάνω ανάλυση κατέδειξε ότι δεν υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *APP* σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (**Εικόνα 3.10**).



Εικόνα 3.10 (A) Ανάλυση της έκφρασης του *APP* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων H_2O_2 για 30 λεπτά με τη χρήση της ημι-ποσοτικής μεθόδου RT-PCR. Η οπτική πυκνότητα κάθε ζώνης υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ. Όλες οι τιμές κανονικοποιήθηκαν ως προς την έκφραση του γονιδίου *HPRT*. **(B)** Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων πυκνομέτρησης ζωνών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα ανεξάρτητων πειραμάτων, σε σχέση με τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς (κύτταρα χωρίς την επίδραση του H_2O_2).

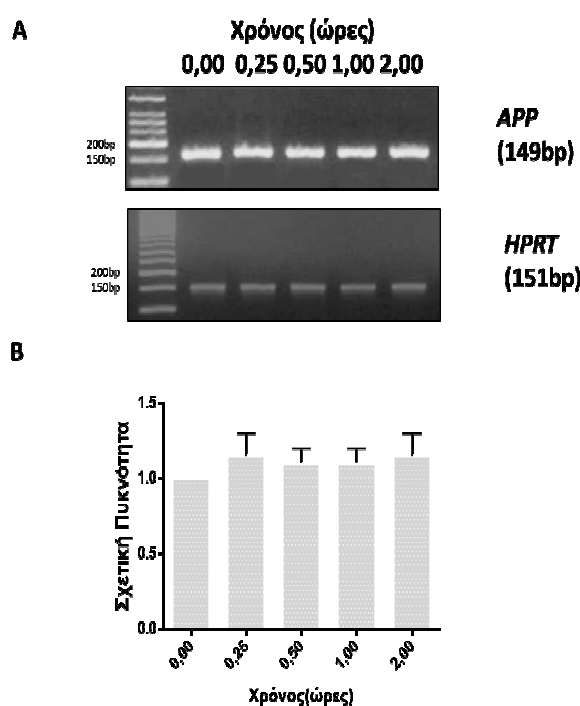
3.2.2. Έλεγχος έκφρασης του γονιδίου της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε κύτταρα H9c2, έπειτα από επίδραση με τον παράγοντα PMA

Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του *APP* πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις RT-PCR (συνδυασμός αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης) σε ολικό RNA. Μελετήσαμε την αλλαγή των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *APP* μετά την επίδραση με τον ενεργοποιητή της PKC, PMA, σε συγκέντρωση $1\mu M$. Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης κρίθηκε σκόπιμη, με σκοπό να διαλευκάνουμε εάν η αλλαγή των επιπέδων τους συσχετίζεται με το χρόνο επίδρασης με τον παράγοντα PMA. Έτσι, μελετήθηκαν δείγματα σε χρονικές περιόδους ενός τετάρτου της ώρας, μισής ώρας, μίας ώρας και δύο ωρών επίδρασης με τον PMA.

Μετά την ενίσχυση του μεταγράφου του γονιδίου *APP* καθώς και του ενδογενούς ιδιοστατικού γονιδίου υποξανθινο-γουανινο-φωσφοριβοσυλτρανσφεράσης (Hydroxanthine-guanine phosphoribosyltransferase ή

HPRT) έγινε ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 3% (w/v). (Εικόνα 3.11).

Στη συνέχεια για τη μελέτη των αλλαγών των επιπέδων έκφρασης του *APP* χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ανάλυσης Image J με σκοπό να εξαχθούν οι μεταβολές στην ένταση των ζωνών που φαίνονται στο πήκτωμα. Μετά από μέτρηση της έντασης της ζώνης επιτελέστηκε κανονικοποίηση με την ένταση της ζώνης του ενδογενούς γονιδίου *HPRT* σε κάθε δείγμα. Τέλος, έγινε κανονικοποίηση με το δείγμα ελέγχου όπου δεν έγινε επίδραση με τον αγωνιστή PMA. Η παραπάνω ανάλυση κατέδειξε τις διαφορές πριν και μετά την επίδραση με τον ενεργοποιητή PMA καθώς και τις αλλαγές που υπάρχουν στις διαφορετικές χρονικές στιγμές. Παρατηρούμε πως τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *APP* δεν επηρεάζονται από την επίδραση με το ενεργοποιητή PMA.



Εικόνα 3.11 (A) Ανάλυση της έκφρασης του *APP* παρουσία 1μM PMA, για τα χρονικά διαστήματα που αναγράφονται, με τη χρήση της ημι-ποσοτικής μεθόδου RT-PCR. Η οπτική πυκνότητα κάθε ζώνης υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ. Όλες οι τιμές κανονικοποιήθηκαν ως προς την έκφραση του γονιδίου *HPRT*. (B). Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων πυκνομέτρησης ζωνών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα ανεξάρτητων πειραμάτων, σε σχέση με τα επίπεδα του δείγματος αναφοράς (κύτταρα χωρίς την επίδραση του PMA)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ομοιοστασία των καρδιακών μυοκυττάρων είναι υπό συνεχή απειλή είτε από περιβαλλοντικούς παράγοντες καταπόνησης είτε από εγγενείς καταστάσεις. Οι πρωτεΐνες των καρδιακών κυττάρων υπόκεινται, συνεπώς, σε αδιάκοπη πίεση, με τη λειτουργία τους να εξαρτάται από τη διατήρηση της σωστής διαμόρφωσης τους. Ένα από τα σημαντικότερα στρεσογόνα ερεθίσματα στα οποία εκτίθονται τα καρδιακά κύτταρα είναι η επίδραση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) π.χ. στην ισχαιμία, την επαναιμάτωση και τις αρρυθμίες. Αποτέλεσμα της μειωμένης παροχής οξυγόνου (υποξία) στο μυοκάρδιο, είναι η παραγωγή ROS. Το οξυγόνο (O_2) ανάγεται σε ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) από τα μιτοχόνδρια στην αντίδραση με την ημι-ανηγμένη ουβικινόνη ($UQ10^{\cdot-}$), καθώς και από τις αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης και τις ειδικές NAD(P)H οξειδάσες [115]. Οι ROS έχουν αποδειχθεί να διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της καρδιακής φυσιολογίας, συμμετέχοντας στην έναρξη αποπτωτικής διαδικασίας ή και στην επιβίωση αλλά και στην υπερτροφία των κυττάρων μέσω ποικίλων μονοπατιών σηματοδότησης [116]. Ερευνητικές προσπάθειες έχουν φέρει στο φως το ρόλο των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών και των πρωτεϊνικών κινασών B και C σε καταρράκτες σηματοδότησης που συμμετέχουν στα καρδιακά νοσήματα [117,118].

Ο Monti και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η ενεργοποίηση της PKC σε κύτταρα της καρδιάς επηρεάζει την ισορροπία του συστήματος ενδοθηλιακής NOS(e NOS)/ROS και οδηγεί σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Διαπιστώθηκε ότι η επιλεκτική αναστολή της PKC δ ή η επιλεκτική αναστολή της PKC ϵ μειώνει την οξειδωτική βλάβη στην καρδιά μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου [119]. Επίσης, η cGMP -εξαρτώμενη κινάση (PKG) και ERK δείχθηκε να έχουν προστατευτική δράση στην καρδιά [120]. Ο Widder και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι η ενεργοποίηση της MAPK p38 και της κινάσης στόχου της, MAPAPK-2, σε αρουραίους με καρδιακή ανεπάρκεια σχετιζόταν άμεσα με την αύξηση της συγκέντρωσης υπεροξειδικού ανιόντος, προτείνοντας ότι η ενεργοποίηση της κινάσης p38 στην καρδιακή δυσλειτουργία, προκαλεί την επαγωγή και ενεργοποίηση NADPH οξειδάσης και την υπερπαραγωγή υπεροξειδικού ανιόντος [121].

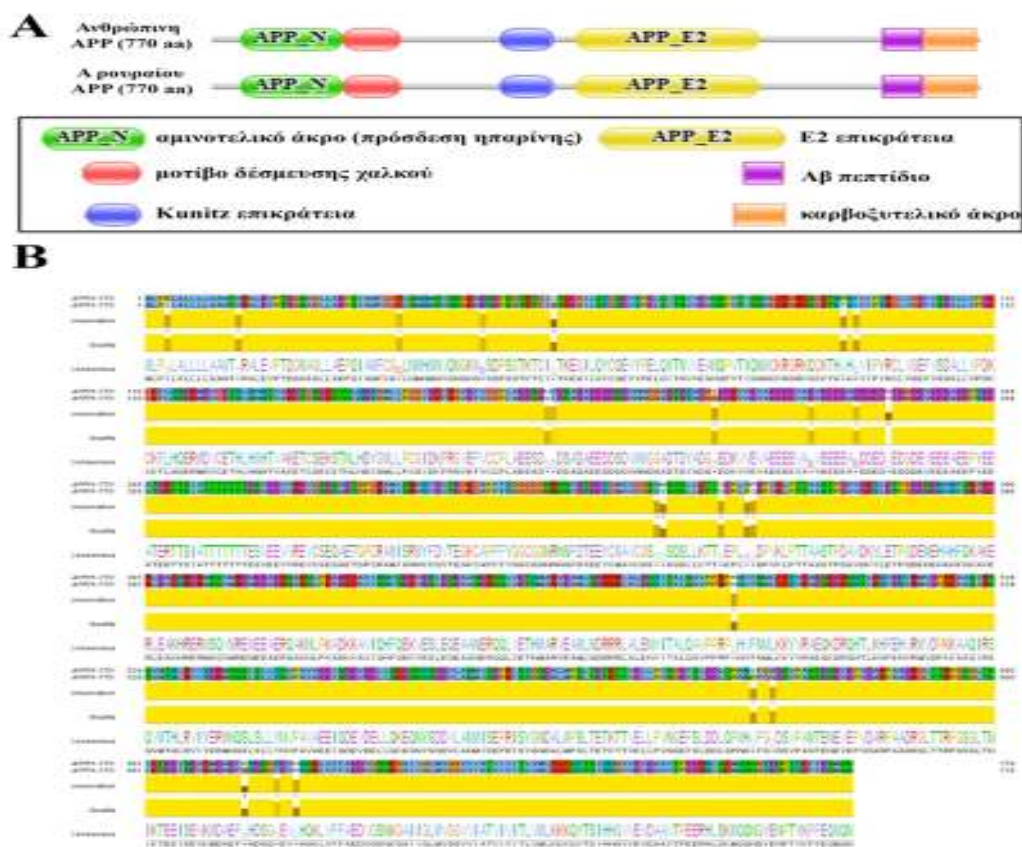
Η καθηγήτρια Γαϊτανάκη και οι συνεργάτες της έδειξαν σε άλλο πειραματικό σύστημα (καρδιά Χορδωτού, αμφιβίου του είδους *Rana ridibunda*) ότι συνθήκες υπερθερμίας διέγειραν την ROS-εξαρτώμενη ενεργοποίηση των JNKs και p38, απότοκος της οποίας ήταν η φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun και της Πρωτεΐνης θερμικού σοκ 27 (Hsp27) με διαφορετικό χρονικό πρότυπο ώστε να συνάγεται και ο διαφορετικός προ ή αντι-αποπτωτικός/ προστατευτικός ρόλος των δύο κινασών [122] ενώ επίδραση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου είχε ως αποτέλεσμα τόσο την ενεργοποίηση των p43 ERK, των p46 και p56 JNKs αλλά και την φωσφορυλίωση p38, MAPKAPK2 και Hsp 27 [123]. Επιπλέον, αντικείμενο μελέτης της ίδιας ερευνητικής ομάδας υπήρξε η αποσαφήνιση των τροποποιήσεων που υποβάλλεται η α -B- κρυσταλλίνη στο οξειδωτικό στρες. Τα ευρήματα τους υπογραμμίζουν τον κρίσιμο ρόλο της συγκεκριμένης Πρωτεΐνης θερμικού σοκ στην πρόωμη απόκριση των καρδιακών μυοκυττάρων (κυτταρική σειρά H9c2) σε στρεσογόνα ερεθίσματα μέσω φωσφορυλίωσης και τη συμμετοχή των p38 MAPK/MSK1 και ιόντων ασβεστίου σε αυτή την απάντηση [124]. Η ίδια ερευνητική ομάδα διαπίστωσε τη συμμετοχή της p38-MAPK στην αντισταθμιστική απόκριση στο οξειδωτικό στρες με την αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου του Κολπικού νατριδιουρητικού πεπτιδίου (ANP) [125].

Το οξειδωτικό στρες θεωρείται, ως ένα βαθμό, υπεύθυνο και για τις κύριες βλάβες στη διαδικασία της γήρανσης καθώς και σε μια πληθώρα σοβαρών παθολογικών καταστάσεων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η αθηροσκλήρυνση και μορφές αμυλοειδώσεων. Η αμυλοείδωση είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει μια μεγάλη ομάδα ασθενειών και δεν αποτελεί ενιαία οντότητα. Γενικότερα, με τα έως σήμερα δεδομένα, ο μόνος τρόπος διάγνωσης της αμυλοείδωσης είναι η μορφολογική εκτίμηση του κυτταρολογικού και του ιστολογικού υλικού. Η πρωτοταγής δομή αυτών των πρωτεϊνών είναι σημαντική για το σχηματισμό των αμυλοειδών, καθώς και για τη θέση εναπόθεσης τους. Έχει επισημανθεί πως αμυλοειδή μπορεί να ανιχνευθούν σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος και στις περισσότερες περιπτώσεις η εμφάνισή τους δεν συνοδεύεται από ύπαρξη συμπτωμάτων.

Η νόσος του Alzheimer είναι μια νευροεκφυλιστική διαταραχή και η πιο συχνή μορφή άνοιας στα ηλικιωμένα άτομα (>65 ετών). Ένας στους 9 ηλικιωμένους στις Ηνωμένες Πολιτείες πάσχει από τη νόσο του Alzheimer και αυτό το ποσοστό

εκτιμάται ότι θα διπλασιαστεί μέχρι το 2050 [126]. Η κλινική εικόνα της νόσου χαρακτηρίζεται από τη διαταραχή του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, το οξειδωτικό στρες, τη φλεγμονή των νευρικών κυττάρων άμεσα σχετιζόμενη με τη συσσώρευση του πεπτιδίου Αβ, την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau και τη δραστική μείωση των επίπεδων της ακετυλοχολίνης [127].

Η Πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς, μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 120 kDa κατά προσέγγιση, ανήκει εξελικτικά και δομικά σε μια συντηρημένη υπεροικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, με τις πρωτεΐνες τόσο στον άνθρωπο όσο και στον αρουραίο (*Rattus norvegicus*), να περιέχουν 97% ταυτόσημων αμινοξικών καταλοίπων (Identities) και 97% παρόμοιων αμινοξικών καταλοίπων (Positives) και να μοιράζονται επίσης όλες τις επικράτειες και τα συντηρημένα μοτίβα (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1 (Α) Σχηματική αναπαράσταση της δομής της APP στον άνθρωπο και στον αρουραίο (για την ανίχνευση μοτίβων και επικρατειών στις πρωτεϊνικές αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων Pfam). (Β) Στοιχισμός των αμινοξικών αλληλουχιών APP του ανθρώπου και αρουραίου (*Rattus norvegicus*) με τη μέθοδο T-Coffee.. Φαίνονται χρωματισμένα (clustalx) τα συντηρημένα κατάλοιπα ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες

Η APP με πλήρες μήκος είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I, η οποία συντίθεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μεταφέρεται στο σύμπλεγμα trans-Golgi. Η φυσιολογική της λειτουργία φαίνεται ότι σχετίζεται τόσο με αναπτυξιακά γεγονότα κατά την πρώιμη φάση ανάπτυξης των οργανισμών όσο και με την συγκρότηση των νευρομυϊκών συνάψεων καθώς και γενικά της συναπτογένεσης. Αν και έχει διερευνηθεί περισσότερο στην νόσο του Alzheimer, είναι κοινός τύπος πως η αμυλοείδωση όπου και να συμβαίνει σχετίζεται άμεσα με τη δημιουργία θραυσμάτων και τη συμμετοχή διαφόρων πρωτεολυτικών ενζύμων σε μία διαδικασία που ονομάζεται επεξεργασία. Βάσει της επικρατούσας υπόθεσης, όπως προαναφέρθηκε, σήμα κατατεθέν της NA είναι η εξωκυττάρια εναπόθεση του β-αμυλοειδούς, ενός πεπτιδίου 40 με 42 αμινοξικών καταλοίπων και μοριακού βάρους 4 kDa, που προκύπτει από την επεξεργασία της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς μετά από διαδοχική πέψη από τις σεκρετάσες β και γ. Το αμυλοειδογενές μονοπάτι οδηγεί στην παραγωγή πεπτιδίων ποικίλου μήκους, εκ των οποίων αυτό μεγέθους 42 αμινοξέων, είναι το βασικό συστατικό των αμυλοειδών εναποθέσεων. Η συσσώρευση του Αβ πεπτιδίου προκαλεί ανοσολογική απόκριση και οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο των νευρικών κυττάρων [128].

Πολύ πρόσφατα, ο Troncone και οι συνεργάτες του έθεσαν το ερώτημα εάν και σε ποίο βαθμό η συσσώματωση του β-Αμυλοειδούς που προκαλεί την προοδευτική γνωστική δυσλειτουργία στη νόσο του Alzheimer επηρεάζει επίσης και τη φυσιολογική λειτουργία της καρδιάς [129]. Οι ερευνητές εξέτασαν δείγματα από τον εγκέφαλο και την καρδιά ασθενών στους οποίους είχε διαγνωστεί NA, για την ύπαρξη Αβ συσσωματωμάτων. Ανίχνευσαν Αβ συσσωματώματα στα καρδιακά μυοκύτταρα τεσσάρων ασθενών (στα δείγματα από υγιή άτομα δεν ανιχνεύτηκαν Αβ συσσωματώματα). Αν και αυτά τα ευρήματα απαιτούν επιβεβαίωση σε δείγματα από μεγαλύτερους πληθυσμούς, υποδεικνύουν ότι η καρδιακή δυσλειτουργία είναι ένας παράγοντας κινδύνου για την απώλεια των γνωστικών λειτουργιών. Καινοτόμες μελέτες τα τελευταία 15 χρόνια έχουν βοηθήσει να κατανοήσουμε τη σχέση μεταξύ της NA και της καρδιακής δυσλειτουργίας:

- Πρώτον, η παρουσία διαλυτών, μη φυσιολογικά πτυχωμένων πρωτεϊνών είναι κοινή στους περισσότερους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, αλλά όχι σε υγιή άτομα [130,131].

- Δεύτερον, είναι γνωστό, ότι οι ασθενείς με τη νόσο του Χάντινγτον (Huntington disease ή HD) - μια νευροεκφυλιστική διαταραχή - διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας [132] και επίσης έχει βρεθεί ότι διαφορετικά μοντέλα ζώων με HD – ποντικού [133] και οικιακής μύγας των φρούτων (*Drosophila melanogaster*) [134] -αναπτύσσουν καρδιομυοπάθειες και αρρυθμίες. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα σαφές εάν οι ασθενείς με NA διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας [135].
- Τρίτον, τόσο στην νόσο του Alzheimer όσο και σε καρδιαγγειακές παθήσεις, έχει αναφερθεί η ενεργοποίηση MAPK σηματοδότησης. Σε μοντέλο ποντικού με NA, τα πεπτίδια Αβ προκάλεσαν απόπτωση νευρικών κυττάρων, εξασθένηση της μνήμης και εμφάνιση νοητικών προβλημάτων άμεσα σχετιζόμενα με την MAPK σηματοδότηση [136].

Αν και πολλά γνωρίζουμε για το «διάλογο» μεταξύ οξειδωτικού στρες και εγκαθίδρυσης του αμυλοειδογενούς μονοπατιού επεξεργασίας της APP στον εγκέφαλο, η πλειοψηφία των επιστημονικών μελετών επικεντρώθηκε και συνεχίζει να επικεντρώνεται κυρίως στην δημιουργία πλακών εξαιτίας των αμυλοειδών στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Μια μελέτη της επεξεργασίας της ενδογενούς APP σε άλλο κυτταρικό τύπο, όχι σε νευρικά κύτταρα, αλλά σε καρδιακά μυοκύτταρα, για πρώτη φορά, μπορεί να συνεισφέρει τόσο όσον αφορά την διαλεύκανση του ρόλου της συγκεκριμένης πρωτεΐνης αλλά και αναφορικά με τους μηχανισμούς που διέπουν τα απαντητικά συμβάντα υπό συνθήκες καταπόνησης σε ετερόκλητους κυτταρικούς πληθυσμούς.

Σε μία πρώτη πειραματική προσέγγιση, διερευνήσαμε την παρουσία της APP σε ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα το οποίο προήλθε από καρδιακό ιστό Χορδωτού (*Rana ridibunda*). Παρατηρήσαμε μία ισχυρή παρουσία της παραπάνω πρωτεΐνης στο συγκεκριμένο ιστό.

Οι ερευνητικές προσπάθειες του εργαστηρίου μας έχουν ως επίκεντρο την διασαφήνιση της σηματοδότησης υπό συνθήκες στρες σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, τόσο σε θηλαστικά όσο και σε αρχαιότερα τάξα, όπως αυτά των αμφιβίων. Λαμβάνοντας υπόψη αυτή την εμπειρία καθώς και τη διαθέσιμη βιβλιογραφία,

επεκτείναμε την ερευνητική μελέτη στην ταυτοποίηση και διερεύνηση της έκφρασης της APP, σε καρδιακά κύτταρα θηλαστικού. Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά H9c2 (αντιπροσωπεύει κύτταρα από καρδιακό ιστό αρουραίου του είδους *Rattus norvegicus*).

Δεδομένου της ισχυρής εμπλοκής του οξειδωτικού στρες στην παθογένεια πολλών καρδιαγγειακών νόσων, με τα αυξημένα επίπεδα ROS να επιφέρουν δυσχερείς επιπτώσεις στη λειτουργία των καρδιακών κυττάρων, ο πρώτος παράγοντας που επιλέχθηκε ήταν η επίδραση των κυττάρων με τον οξειδωτικό παράγοντα H_2O_2 , ενώ μελετήθηκε και ο παράγοντας PMA (4β-φορβολο-12-μυριστικός 13-οξικό φορβολεστέρας). Η επιλογή και των δύο αυτών παραγόντων σχετίζεται με την άποψη πληθώρας μελετών που συνδέουν το οξειδωτικό στρες με την αύξηση των επιπέδων του Αβ [137]. Στην προσπάθεια περαιτέρω διερεύνησης της σχέσης του οξειδωτικού στρες με τα επίπεδα του Αβ πεπτιδίου έγινε επίδραση στα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη με διάφορες συγκεντρώσεις H_2O_2 (50μM, 100μM, 200μM, 500μM) για 30 λεπτά. Διαπιστώσαμε μία δοσοεξαρτώμενη σχέση του H_2O_2 και της αντίχνευσης θραυσμάτων χαμηλών μοριακών βαρών που εμπεριέχουν τον επίτοπο του Αβ. Συμπεραίνουμε πως ο βαθμός του οξειδωτικού στρες βρίσκεται σε άμεση συνάρτηση με τη δημιουργία θραυσμάτων της APP. Παρατηρήσαμε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του H_2O_2 παρουσιάζεται σημαντική αύξηση των θραυσμάτων με μοριακό βάρος στα 20 kDa και 40 kDa. Σε κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος (κυτταρική σειρά SH-SY5Y) έχει καταδειχτεί ότι η επίδραση των κυττάρων με το H_2O_2 επηρεάζει άμεσα την επεξεργασία της APP και την παράγωγή θραυσμάτων μικρού μοριακού βάρους που περιέχουν το Αβ επίτοπο. Οι ερευνητές μελέτησαν την επεξεργασία της πρωτεΐνης όσο και την έκφραση του γονιδίου *APP*, υπό συνθήκες επαγωγής απόπτωσης με την παρατεταμένη επίδραση H_2O_2 (1mM, έως και 20 ώρες). Κατέληξαν στη ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης ενός θραύσματος 5,5 kDa που εμπεριέχει τον επίτοπο του Αβ, με τα πρώτα σημάδια έναρξης της αποπτωτικής διαδικασίας. Παράλληλα, η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης έδειξε μείωση της έκφρασης του γονιδίου από τις πρώτες 8 ώρες της επίδρασης [138]. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσαν και οι ερευνητικές προσπάθειες των Le Blanc και συνεργατών. Ειδικότερα, αντικείμενο της μελέτης τους ήταν η σύνδεση μονοπατιού των κασπασών με πρώιμα γεγονότα έναρξης της απόπτωσης, σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρικών

κυττάρων ανθρώπου. Απέδειξαν την ύπαρξη θραυσμάτων της APP, ένα 3 kDa προς το καρβοξυτελικό άκρο και ένα 6,5 kDa που περιέχει το Αβ πεπτίδιο αλλά όχι το C-τελικό άκρο, αποδίδοντας τη δημιουργία τους στη δράση της κασπάσης-6 και προτείνοντας μία ακόμη συνιστώσα στην επεξεργασία της πρωτεΐνης [139]. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, οι Tan και οι συνεργάτες του μελέτησαν την επίδραση ήπιων συνθηκών οξειδωτικής καταπόνησης (mild Oxidative Stress-mOS) στην επεξεργασία της APP, με την έκθεση των κυττάρων (πρωτογενής καλλιέργεια φλοιϊκών κυττάρων εγκεφάλου ποντικού) σε συγκεντρώσεις H_2O_2 της τάξεως των μM (10 μM έως 40 μM), για 6 ώρες. Παρατήρησαν μια αύξηση του θραύσματος CTFβ παράλληλα με την εντόπιση της BACE-1 σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα (πρώιμα ενδοσώματα) [140]. Ακόμη, οι Shen και οι συνεργάτες, απέδειξαν την εμπλοκή των JNKs στην ενεργοποίηση της γ -σεκρετάσης και την παραγωγή διαλυτού και ενδοκυττάρου Αβ, σε μετασχηματισμένα κύτταρα SH-SY5Y, επιδρώντας για αυξανόμενους χρόνους (10 έως 50 λεπτά) με το H_2O_2 (1,0mM) καθώς και την αύξηση του AICD σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του παράγοντα (0,2 mM και 1,0mM H_2O_2 για 1ώρα) σε εκφράζουσα το θραύσμα C99 κυτταρική σειρά HEK293. Τέλος, οι συγγραφείς προτείνουν την ύπαρξη ενός φαύλου κύκλου μεταξύ ROS-ενεργοποίησης JNKs-παραγωγής Αβ-παραγωγής ROS [141].

Πλήθος ερευνών έχουν ήδη συσχετίσει την ενεργοποίηση της PKC και των ERK1/2 με το οξειδωτικό στρες [142]. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι το οξειδωτικό στρες επάγει την ενεργοποίηση της PKC η οποία με τη σειρά της, ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλιώσεων την PKD (protein kinase D), μία ομάδα πρωτεϊνών που εμπλέκεται σε ποικίλα κυτταρικά μονοπάτια [142]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η PKC συσχετίζεται με την Πρόδρομο πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς και πιο συγκεκριμένα ότι η PKC διεγείρει την έκκριση sAPP α , ενεργοποιώντας την α -σεκρετάση [143] μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα Αβ, κάτι που παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου του Alzheimer [143,144]. Ο ρόλος της PKC στην επεξεργασία της APP ενισχύεται επίσης από το γεγονός ότι η ελαττωματική PKC σηματοδότηση είναι ένα από τα πιο συχνά ευρήματα στον εγκέφαλο ασθενών που πάσχουν από τη νόσο του Alzheimer [145]. Ενεργοποιητής της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) αλλά και των ERK1/2 είναι ο εστέρας PMA (4β-φορβολο-12-μυριστικός 13-οξικό φορβολεστέρας). Ο PMA είναι ένας διεστέρας που απομονώνεται από το κροτωνέλαιο. Μελέτες έχουν αποδείξει την εμπλοκή του στην

ανάπτυξη νεοπλασιών [146]. Αποτελεί έναν ισχυρό αλλά και αναστρέψιμο ενεργοποιητή της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), κάτι που βιβλιογραφικά έχει επιτευχθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε συγκεντρώσεις της τάξης των nM. Η δράση του PMA ως ενεργοποιητή της PKC έχει αποδοθεί στην ομοιότητα του με τη διακυλογλυκερόλη (DAG), η οποία είναι ένας φυσικός ενεργοποιητής της PKC¹⁰ [147]. Έτσι, το PMA χρησιμοποιήθηκε σε μία απόπειρα κατευθυνόμενου χειρισμού της επεξεργασίας της APP και διασαφήνισης της συμμετοχής των ERK1/2 σε αυτήν την επεξεργασία. Προσπαθώντας, αρχικά να μελετήσουμε την επίδραση του παράγοντα PMA σε σχέση με το χρόνο τόσο στην ενεργοποίηση των ERK1/2 όσο και στην επεξεργασία της APP, εφαρμόσαμε τέσσερεις διαφορετικούς χρόνους επίδρασης (0,25 ώρες, 0,50 ώρες, 1,00 ώρα, 2,00 ώρες). Παρατηρήσαμε πως ο εστέρας (PMA), όπως άλλωστε υποστηρίζεται και βιβλιογραφικά, επάγει την φωσφορυλίωση των ERK1/2 (φωσφορυλιωμένες στα κατάλοιπα θρεονίνη 202 και τυροσίνη 204). Ακόμη, διαπιστώθηκε η εμφάνιση ραγδαίας αύξησης των επιπέδων φωσφορυλίωσης των ERK1/2 μετά από 15 λεπτά επίδρασης με τον παράγοντα PMA, κάτι που δείχνει την χρονοεξαρτώμενη δράση του παράγοντα PMA. Η συγκεκριμένη αυξητική τάση αν και μικρότερη σε ένταση συνεχίζεται και για την πρώτη ώρα της επίδρασης ενώ διαπιστώθηκε πτωτική πορεία των επιπέδων των φωσφο-ERK1/2 στους μετέπειτα χρόνους επίδρασης. Η αύξηση αυτή συμφωνεί απόλυτα και με τις επόμενες παρατηρήσεις που έγιναν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης. Με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων για τα διαφορετικά θραύσματα που προκύπτουν κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας της APP, δείξαμε πως και η δημιουργία θραυσμάτων που εμπεριέχουν το Αβ πεπτίδιο εμφανίζουν το ίδιο χρονικό πρότυπο με εκείνο των φωσφο-ERK1/2 μετά από επίδραση με 1μM PMA. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα ανίχνευσης των θραυσμάτων στα 40 kDa μετά από 15 λεπτά επίδρασης σημειώνουν αύξηση και ακολουθούν πτωτική πορεία στους ύστερους χρόνους επίδρασης. Επίσης, θραύσμα που περιέχει το αντιγόνο του αμινοτελικού άκρου της APP παρουσίασε την μέγιστη εμφάνιση του σε ύστερους χρόνους, μετά τη πρώτη ώρα επίδρασης, ενώ είχε εξαφανιστεί- προφανώς κατακερματίστηκε- στις δύο ώρες επίδρασης. Ως μία απόπειρα ερμηνείας του φαινομένου, προτείνουμε πως ο ενεργοποιητής συνέβαλε

¹⁰ Η PKC ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών οι οποίες συμμετέχουν στον έλεγχο της λειτουργίας διαφόρων άλλων πρωτεϊνών μέσω της φωσφορυλίωσης υδροξυλομάδων σερίνης και θρεονίνης. Η ενεργοποίηση των PKC σχετίζεται με σήματα τα οποία οφείλονται σε αυξημένα επίπεδα διακυλογλυκερόλης και ιόντων ασβεστίου (Ca²⁺) με τις PKC να κατέχουν έναν βασικό ρόλο σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια.

στην ανακύκλωση της APP από την πλασματική μεμβράνη προς τα μονοπάτια της αποικοδόμησης εντός του κυττάρου. Σε αντίθεση, έρευνα σε κυτταρική σειρά QBI293 (μετασηματισμένη κυτταρική σειρά νεφρικών εμβρυικών κυττάρων ανθρώπου με σταθερή έκφραση της ανθρώπινης APP₆₉₅) καταδεικνύει μια αύξηση των επιπέδων έκφρασης της APP και δημιουργίας του Aβ₄₀ παρουσία PMA (1 μM για 36 ώρες) και προτείνει ένα διαφορετικό μηχανισμό που θέλει την παρατεταμένη ενεργοποίηση της PKC να επηρεάζει την έκφραση της πρωτεΐνης στο επίπεδο της μεταγραφής. Οι ίδιοι οι συγγραφείς απέδωσαν την ανακάλυψη στην παράμετρο του χρόνου [149].

Στη συνέχεια μελετήθηκε η μεταβολή των παραπάνω πρωτεϊνών μετά από επίδραση με διαφορετικές συγκεντρώσεις PMA (0,05μM, 0,10μM, 0,50μM, 1,00μM) για 2 ώρες. Η συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων έγινε στην προσπάθεια συσχέτισης της συγκέντρωσης του PMA και των μεταβολών που υφίστανται τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των ERK και η δημιουργία θραυσμάτων της APP. Διαπιστώθηκε πως δεν υπάρχει σχέση ανάμεσα στη συγκέντρωση του PMA και τα επίπεδα των φώσφο-ERK1/2 καθώς δεν μεταβάλλονται σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Αντίθετα, παρατηρήθηκε αύξηση στη δημιουργία των θραυσμάτων της APP, μικρού μοριακού βάρους, αναλογικά με την επιδρούσα συγκέντρωση, χωρίς την εμφάνιση του θραύσματος με το αντιγόνο του αμινοτελικού άκρου, για καμία επίδραση διάρκειας δύο ωρών, ίσως καθώς ο χρόνος ανακύκλωσης καθορίζεται στη πρώτη ώρα επίδρασης. Από τα παραπάνω πειράματα συμπεραίνουμε ότι η μεταβολές στην ανίχνευση των θραυσμάτων της APP είναι εξαρτώμενες της συγκέντρωσης του PMA. Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν ότι η επαγομένη έκφραση της APP είναι αποτέλεσμα της δράση του μονοπατιού PKC-ERK1/2.

Θέλοντας να ελέγξουμε και να διασαφηνίσουμε το ρόλο των ERK1/2 (και γενικότερα των MAP κινασών) στην επεξεργασία της APP, έγινε έκθεση των κυττάρων στο PMA και ταυτόχρονα δοκιμάστηκε και η επίδραση τους με μία σειρά αναστολέων (είχε προηγηθεί η προσθήκη του εκάστοτε αναστολέα για μισή ώρα) των μελών των MAPKs (p38, ERKs και JNKs). Από το παραπάνω πείραμα έγινε αντιληπτό ότι η ταυτόχρονη επίδραση με τον PMA και του αναστολέα PD98059 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του PMA- φαινοτύπου, με το πρότυπο ανίχνευσης των θραυσμάτων της APP υπό αυτές τις συνθήκες να είναι όμοιο με το δείγμα στο οποίο δεν είχε χορηγηθεί ο ενεργοποιητής. Το αποτέλεσμα ενισχύει την υπόθεση που θέλει

την ERK1/2-εξαρτώμενη επεξεργασία της APP στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Δεν παρατηρήθηκαν τα ίδια αποτελέσματα με τους υπόλοιπους αναστολείς. Το εύρημα αυτό πιθανόν σχετίζεται με τα μονοπάτια που καταστέλλουν οι άλλοι αναστολείς τα οποία πιθανόν να ρυθμίζονται από το Αβ πεπτίδιο και όχι να ρυθμίζουν τα επίπεδα αυτού. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το μονοπάτι JNK για το οποίο έχει αποδειχθεί από μελέτες ότι ενεργοποιείται από το πεπτίδιο Αβ [150]. Τα συμπεράσματά μας έρχεται να ενισχύσει η μελέτη των Desdouits-Magnen και συνεργατών σε κυτταρική σειρά PC12-M1 και σε μετασηματισμένες με την ανθρώπινη APP₇₅₁, κυτταρικές σειρές COS-7 (-ινοβλάστες πιθήκου) και CHO (κύτταρα ωοθήκης κινεζικού χάμστερ). Αναλυτικότερα, με τη χρήση του ίδιου μορίου αναστολέα PD98059, διεξήγαγαν μια έρευνα της επεξεργασίας της APP, καταλήγοντας στην συμμετοχή των ERK1/2 στην έκκριση sAPPα και στην παράλληλη ύπαρξη μιας ανεξάρτητης από τη PKC-ERK1/2 οδού για την έκκριση Αβ και sAPPα [151].

Τέλος, η μελέτη της επίδρασης του PMA στη έκφραση του γονιδίου *APP* έδειξε πως ο συγκεκριμένος ενεργοποιητής δεν πυροδοτεί την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου. Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα και μετά την επίδραση με H₂O₂. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως οι αλλαγές που παρατηρούνται συμβαίνουν μετά τη μετάφραση, πιθανότατα κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας και πιθανόν να μην έχουν καμία σχέση με το έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου.

Από τα παραπάνω συνάγεται πως τα πεπτιδικά προϊόντα της επεξεργασίας της APP προέρχονται από ποικίλα μεταβολικά μονοπάτια. Ακόμη, καθίσταται πρόδηλο το γεγονός πως το είδος του ερεθίσματος, ο κυτταρικός τύπος και ο πειραματικός σχεδιασμός είναι καθοριστικοί παράγοντες.

Η παρατήρηση του ρόλου της ενεργοποίησης των ERK1/2 στη δημιουργία θραυσμάτων της APP στα καρδιακά μυοκύτταρα και όχι στην παραγωγή Αβ πεπτιδίου θα μπορούσε να συσχετιστεί με το ρόλο των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών στην ενορχήστρωση της απάντησης σε στρεσογόνους παράγοντες στην καρδιά. Τα καρδιακά μυοκύτταρα ως διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία έχουν χάσει την ικανότητα για διαίρεση κατά την περιγεννητική περίοδο, αποκρίνονται στο οξειδωτικό στρες με μηχανισμούς που εμπλέκουν επαγωγή προσαρμοστικών αντιοξειδωτικών παραγόντων, υπερτροφία ή

κυτταρικό θάνατο. Το γεγονός αυτό συμβάλλει στην καρδιακή αναδιαμόρφωση. Οι αλλαγές που παρατηρούνται κατά την διαδικασία αυτή σχετίζονται με έκκριση ουσιών όπως προ φλεγμονωδών κυτταροκινών και νευροορμονικών παραγόντων οι οποίοι ενεργοποιούν υποκείμενα σηματοδοτικά μονοπάτια με τελικό σκοπό την μεταβολή στην γονιδιακή έκφραση με επανέκφραση γονιδίων. Οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν κινάσες όπως οι MAPKs. Συγκεκριμένα, μελέτες της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου μας απέδειξαν πως ένζυμο το οποίο έχει αντιοξειδωτικό ρόλο έναντι του οξειδωτικού στρες, η οξυγενάση της αίμης 1 (HOX-1) βρέθηκε να αυξάνεται τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και mRNA, παρουσία προ-οξειδωτικού παράγοντα, σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2. Παρουσία αναστολέων των JNKs (SP600125), p38 MAPK (SB203580) και MSK 1 (H89), διαπιστώθηκε αναστολή της παραπάνω απόκρισης. Αποτελέσματα τα οποία καταδεικνύουν την εμπλοκή των JNKs και p38 MAPK/MSK1, στη μεταγωγή του σήματος του οξειδωτικού στρες με την έκφραση του ενζύμου HOX-1, προάγοντας πιθανά την κυτταρική επιβίωση και διασφαλίζοντας την ομοιόσταση [152]. Ο κυτταροπροστατευτικός ρόλος HOX-1 και της κυκλοξυγενάσης 2 (COX-2) έχει βρεθεί και σε άλλους τύπους κυττάρων [153]. Ειδικότερα, σε σκελετικούς μυοβλάστες C2 δείχτηκε ότι το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε μια χρόνο- και δόσο-εξαρτώμενη απόκριση των HOX-1 και COX-2 σε επίπεδο πρωτεϊνικού μορίου αλλά και γονιδιακής έκφρασης, με τις ERK1/2, p38 MAPK να μεσολαβούν στην απόκριση αυτή [153].

Ένας σημαντικός τελεστής στη ρύθμιση των HOX-1 και COX-2 είναι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB, ο οποίος απεδείχθη να ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από MSK1 (υπόστρωμα των ERK1/2 και p38 MAPK) ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες σε κυτταρική σειρά σκελετικών μυοβλαστών [154]. Ακόμη, σε μελέτη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου μας απεδείχθη η επαγόμενη από το υπεροξειδίου του υδρογόνου αύξηση της έκφρασης του Παράγοντα πρώιμης αύξησης (Egr-1), mRNA όσο και πρωτεΐνης-, η οποία μειώθηκε σημαντικά παρουσία αναστολέων ERKs και JNKs (PD98059 και SP600125, αντίστοιχα). Επιπλέον, πειράματα ανοσοκυτταροχημείας κατέδειξαν τον καθοριστικό ρόλο των ERKs και JNKs και στην επαγόμενη από το υπεροξειδίου του υδρογόνου συσσώρευση του Egr-1 στον πυρήνα. Αποτελέσματα τα οποία αναδεικνύουν την εμπλοκή των ERKs και

JNKs στην επαγόμενη από το οξειδωτικό στρες απόκριση του Egr-1 σε επίπεδο μεταγραφής, μετάφρασης και σε ότι αφορά την υποκυτταρική του κατανομή [155].

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν την ύπαρξη APP θραυσμάτων τόσο σε καρδιακά κύτταρα θηλαστικού όσο και αμφιβίου (Χορδωτού). Επίσης, υποδεικνύουν ότι η επεξεργασία της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς είναι άμεσα εξαρτωμένη από την οξειδωτική καταπόνηση του κυττάρου αλλά και από την ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK1/2. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες χρειάζονται προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την επεξεργασία της πρωτεΐνης.

Σε μία προσπάθεια να προτείνουμε διαφορετικές προσεγγίσεις αναφορικά με ένα θέμα βασικής έρευνας όπως το συγκεκριμένο, πειράματα με τη τεχνική της ανοσοκυτταροχημείας θα μπορούσαν να προσφέρουν στη διασαφήνιση του κυτταρικού εντοπισμού αυτών των θραυσμάτων. Επίσης, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί το σύστημα επανεμποτισμού σε απομονωμένη καρδιά θηλαστικού, με τη συσκευή Langendorff, για την μελέτη της επεξεργασίας της APP με στόχο την καλύτερη προσομοίωση των *in vivo* συνθηκών .

Βιβλιογραφία

1. Kang, J., Lemaire, H.G, Unterbeck, A., Salbaum, J.M, Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Müller-Hill, B., 1987, The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, **325**, 733–6.
2. Robakis, N.K., Ramakrishna, N., Wolfe, G. and Wisniewski, H.M., 1987, Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 4190–4.
3. Tanzi, R.E, Gusella, J.F, Watkins, P.C, Bruns, G.A, St. George-Hyslop, P., Van Keuren, M.L., Patterson, D. Pagan, D.M, and Kurnit, Neve, R.L., 1987, Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*, **235**, 880–4.
4. Dawkins, E. and Small, D.H., 2014, Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J. Neurochem*, **129**, 756–69.
5. Price, D.L. and Sisodia, S.S., 1994, Cellular and molecular biology of Alzheimer's disease and animal models. *Annu. Rev. Med.*, **45**, 435–46.
6. Theuns, J., and Van Broeckhoven, C., 2000, Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes: implications for susceptibility. *Hum. Mol. Genet.*, 2000, **9**, 2383–94.
7. Izumi, R., Yamada, T., Yoshikai, S., Sasaki, H., Hattori, M., a Sakaki Y., 1992, Positive and negative regulatory elements for the expression of the Alzheimer's disease amyloid precursor-encoding gene in mouse. *Gene*. Mar 15; **112(2)**:189–95.
8. Quitschke WW, Goldgaber D., 1992, The amyloid beta-protein precursor promoter. A region essential for transcriptional activity contains a nuclear factor binding domain. *J Biol Chem.*, **267(24)**:17362–8.
9. Wisniewski, K.E., Wisniewski, H.M. and Wen, G.Y., 1985, Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol*. **17**, 278–82.
10. Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F. and Fidani, L., 1999, Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, **349**,704–6.
11. Barrett, P.J., Song, Y., Van Horn, W.D., Hustedt, E.J., Schafer, J.M., Hadziselimovic, A., Beel, A.J., Charles, R. and Sanders C., 2012, The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science*, **336**, 1168–71.

12. van der Kant, R. and Goldstein, L.S.B., 2015, Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia. *Dev. Cell.* 2015 **32**, 502–15.
13. Shariati, S.A.M., De Strooper, B., 2013, Redundancy and divergence in the amyloid precursor protein family. *FEBS Lett.* 587, 2036–45.
14. Gralle, M. and Ferreira, S.T., 2007, Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog. Neurobiol.*, **82**, 11–32.
15. Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger S, Merdes, G, Paro, R., Masters, C., Müller, U.C., Kins, S. and Beyreuther, K., 2005, Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J.* 24, 3624–34.
16. Qiu, W.Q, Ferreira, A., Miller, C., Koo, E.H. and Selkoe, D.J., 1995, Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *J. Neurosci. Off J. Soc. Neurosci.* **15**, 2157–67.
17. Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H.A. and Herms, J., 2006, Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **26**, 7212–21.
18. Müller, U.C., Zheng, H., 2012, Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **2**, a006288.
19. Tanzi, R.E., McClatchey, A.I., Lamperti, E.D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J.F. and Neve, R.L., 1988, Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature*, **331**, 528–30.
20. Tang, K., Wang, C., Shen, C., Sheng, S., Ravid, R. and Jing, N., 2003, Identification of a novel alternative splicing isoform of human amyloid precursor protein gene, APP639. *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 102–8.
21. Nalivaeva, N.N. and Turner, A.J., 2013, The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett.*, **587**, 2046–54.
22. Tanaka, S., Shiojiri, S., Takahashi, Y., Kitaguchi, N., Ito, H., Kameyama, M., Kimura, J., Nakamura, S. and Ueda, K., 1989, Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 1406–14.
23. Lahiri, D.K. and Nall, C., 1995, Promoter activity of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein is up-regulated by growth factors, phorbol ester, retinoic acid and interleukin-1. *Mol. Brain. Res.*, **32**, 233–40.

24. Thakur, M.K. and Mani, S.T., 2005, Estradiol regulates APP mRNA alternative splicing in the mice brain cortex. *Neurosci. Lett.*, **381**, 154–7.
25. Brock, B., Basha, R., DiPalma, K., Anderson, A., Harry GJ, Rice DC, Lahiri, D.K. and Zawia, N.H., 2008, Co-localization and distribution of cerebral APP and SP1 and its relationship to amyloidogenesis. *J. Alzheimers Dis.*, **13**, 71–80.
26. Salta, E. and De Strooper, B., 2012, Non-coding RNAs with essential roles in neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.*, **11**, 189–200.
27. Long, J.M. and Lahiri, D.K., 2011, MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid- β precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **404**, 889–95.
28. Li, Q.X., Fuller, S.J., Beyreuther, K. and Masters, C.L., 1999, The amyloid precursor protein of Alzheimer disease in human brain and blood. *J. Leukoc. Biol.*, **66**, 567–74.
29. Zainaghi, I.A., Talib, L.L., Diniz, B.S., Gattaz, W.F. and Forlenza O.V., 2012, Reduced platelet amyloid precursor protein ratio (APP ratio) predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.*, **119**, 815–9.
30. Vignini, A., Giulietti, A., Nanetti, L., Raffaelli, F., Giusti, L., Mazzanti, L. and Provinciali, L., 2013, Alzheimer's disease and diabetes: new insights and unifying therapies. *Curr. Diabetes Rev.*, **9**, 218–27.
31. Hong, L., Carducci, T.M., Bush, W.D. and Dudzik, C.G, Millhauser G.L. and Simon J.D., 2010, Quantification of the Binding Properties of Cu²⁺ to the Amyloid Beta Peptide: Coordination Spheres for Human and Rat Peptides and Implication on Cu²⁺-Induced Aggregation. *J. Phys. Chem. B.*, **114**, 11261–71.
32. De Strooper, B., Simons, M., Multhaup, G., Van Leuven, F., Beyreuther, K. and Dotti, C.G., 1995, Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence. *EMBO J.*, **14**, 4932–8.
33. Lai, A., Sisodia, S.S. and Trowbridge, I.S., 1995, Characterization of Sorting Signals in the β -Amyloid Precursor Protein Cytoplasmic Domain. *J. Biol. Chem.*, **270**, 3565–73.
34. Kamal, A., Almenar-Queralt, A., LeBlanc, J.F., Roberts, E.A. and Goldstein, 2001, L.S. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature*, **414**, 643–8.
35. Lorenzo, A. and Yankner, B.A., 1994, Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 12243–7.
36. Cavallucci, V., D'Amelio, M. and Cecconi, F., 2012, A β toxicity in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.*, **45**, 366–78.

37. Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P. and Simon, K., 2006, Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 11172–7.
38. Pająk, B., Kania, E. and Orzechowski, A., 2016, Killing Me Softly: Connotations to Unfolded Protein Response and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 1805304.
39. Robakis, N.K., Vassilacopoulou, D., Efthimiopoulos, S., Sambamurti, K., Refolo, L.M. and Shioi, J., 1993, Cellular Processing and Proteoglycan Nature of Amyloid Precursor Proteins. *Ann. N.Y Acad. Sci.*, **695**, 132–8.
40. Younkin, S.G., 1998, The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J. Physiol. Paris*, **92**, 289–92.
41. Reddy, P.H., Manczak, M., Mao, P., Calkins, M.J., Reddy, A.P. and Shirendeb, U., 2010, Amyloid-beta and mitochondria in aging and Alzheimer's disease: implications for synaptic damage and cognitive decline. *J. Alzheimer's Dis.*, **2**, 499-512.
42. Tezapsidis, N., Li, H.C., Ripellino, J.A., Efthimiopoulos, S., Vassilacopoulou, D., Sambamurti, K., Toneff, T., Yasothornsrikul, S., Hook, V.Y.H. and Robakis, N.K., 1998, Release of nontransmembrane full-length Alzheimer's amyloid precursor protein from the luminal surface of chromaffin granule membranes. *Biochemistry* **37**, 1274-1282
43. Efthimiopoulos, S., Vassilacopoulou, D., Ripellino, J.A., Tezapsidis, N. and Robakis, N.K., 1996, Cholinergic agonists stimulate secretion of soluble full-length amyloid precursor protein in neuroendocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 8046–50.
44. Cuchillo-Ibañez, I., Lopez-Font, I., Boix-Amorós, A., Brinkmalm, G., Blennow, K., Molinuevo, J-L. and Sáez-Valero, Jal., 2015, Heteromers of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid. *Mol. Neurodegener.*, **10**, 2
45. Hidalgo, J., Penkowa, M., Espejo, C., Martínez-Cáceres, E.M, Carrasco, J., Quintana A, Molinero, A., Florit, S., Giralt, M. and Ortega-Aznar, A., 2006, Expression of metallothionein-I,-II, and-III in Alzheimer disease and animal models of neuroinflammation. *Exp. Biol. Med.*, **231**, 1450–1458.
46. Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M.J. and Westermarck, P., 2014, Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid*. **21**,221–4.
47. Pepys, M.B., 2001, Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis. *Philos Trans. R. Soc. Lond. Ser. B.*, **356**, 203–11.
48. Sun, X., Chen, W.D. and Wang, Y.D. (2015) β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4588032> (τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2016)

49. Soto, C., 1999, Alzheimer's and prion disease as disorders of protein conformation: implications for the design of novel therapeutic approaches. *J Mol Med Berl Ger.* **77**, 412–8.
50. van Leuven, F., 2000, Single and multiple transgenic mice as models for Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.*, **61**, 305–12.
51. Karran, E., Mercken, M. and Strooper, B.D., 2011, The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 698–712.
52. Shioi, J, Pangalos, M.N., Ripellino, J.A., Vassilacopoulou, D., Mytilineou, C., Margolis, R.U. and Robakis, N.K, 1995, The Alzheimer amyloid precursor proteoglycan (appican) is present in brain and is produced by astrocytes but not by neurons in primary neural cultures. *J. Biol. Chem.*, **270**, 11839–44.
53. Hardy, J. and Selkoe, D.J., 2002, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **297**, 353–6.
54. Gerschman, N.R, Gilbert, D.L., Nye, S.W, Dwyer, P. and Fenn, W.O., 1954, Oxygen poisoning and x-irradiation A mechanism in common, *Science.*, **119**, 623–626.
55. McCord, J.M., 2000, The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.*, **108**, 652
56. Zheng M, and Storz, G., 2000, Redox sensing by prokaryotic transcription factors., *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 1–6
57. Uday, B., Dipak, D. and Ranajit, B. K., 1990, Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis, *Curr. Sci.*, **77**, 658–666
58. Urrea, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D. and Hetz, C., 2013, When ER stress reaches a dead end. *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 3507–17.
59. Li, G., Mongillo, M. and Chin, K.T., Harding, H., Ron, D., Marks, A.R. and Tabas, J., 2009, Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Cell. Biol.*, **186**, 783–92.
60. Tu, B.P. and Weissman, J.S., 2002, The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell.*, **10**, 983–94.
61. Malhotra, J.D. and Kaufman, R.J., 2007, Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 2277–93.
62. Malhotra, J.D., Miao, H., Zhang, K., Wolfson, A., Pennathur, S., Pipe, S.W. and Kaufman, R.J., 2008, Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 18525–30.

63. Martinale, J. I. and Holbrook N.J., 2002, Cellular Response to Oxidative Stress: Signaling for Suicide and Survival, *J. Cell. Physiol.*, **192**, 1-15
64. De la Torre, J.C., 2002, Vascular basis of Alzheimer's pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **977**, 196–215.
65. Zekry, D., Duyckaerts, C., Moulias, R., Belmin, J., Geoffre, C. and Herrmann. F., 2002, Degenerative and vascular lesions of the brain have synergistic effects in dementia of the elderly. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **103**, 481–7.
66. Pinkston, J.B., Alekseeva, N. and González -Toledo, E., 2009, Stroke and dementia. *Neurol. Res.*, **31**, 824–31.
67. Popa-Wagner, A., 2007, Alzheimer's disease pathological factors in ischemic aged brain. *Ischemia–reperfusion Pathw. Alzheimer's Dis. Nova Sci. Publ. Inc. N. Y.*, 51–84.
68. Dietrich, H.H., Xiang, C., Han, B.H., Zipfel, G.J. and Holtzman, D.M., 2010, Soluble amyloid- β , effect on cerebral arteriolar regulation and vascular cells. *Mol. Neurodegener.*, **25**, 15.
69. Wen, Y, Yang, S.H, Liu, R., Perez, E.J., Brun-Zinkernagel, A.M. and Koulen, P., 2007, Cdk5 is involved in NFT-like tauopathy induced by transient cerebral ischemia in female rats. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1772**, 473–83.
70. Wang, J.Z. and Liu, F., 2008, Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog. Neurobiol.*, **85**, 148–75.
71. Praticò, D., 2008, Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol. Sci.*, **29**, 609–15.
72. Tabner, B.J, El-Agnaf, O.M.A., Turnbull, S., German, M.J., Paleologou, K.E. and Hayashi, Y., 2005, Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. *J. Biol. Chem.*, **280**, 35789–92.
73. Zhu, X., Lee, H., Raina, A.K., Perry, G. and Smith, M.A., 2002, The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals*, **11**, 270–81.
74. Hashimoto, Y., Tsuji, O., Niikura T., Yamagishi, Y, Ishizaka, M. and Kawasumi M., 2003, Involvement of c-Jun N-terminal kinase in amyloid precursor protein-mediated neuronal cell death. *J. Neurochem.*, **84**, 864–77.
75. Shen, C., Chen, Y., Liu, H., Zhang, K., Zhang, T. and Lin, A., 2008, Hydrogen peroxide promotes A β production through JNK-dependent activation of gamma-secretase. *J. Biol. Chem.*, **283**, 17721–30.
76. Colombo, A., Bastone, A., Ploia, C., Scip, A., Salmona, M. and Forloni, G., 2009, JNK regulates APP cleavage and degradation in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.*, **33**, 518–25.

77. Sekine, Y., Takeda, K. and Ichijo, H., 2006, The ASK1-MAP kinase signaling in ER stress and neurodegenerative diseases. *Curr. Mol. Med.*, **6**, 87–97.
78. Gaitanaki, C., Papatriantafyllou, M, Stathopoulou K., and Beis I., 2006, Effects of various oxidants and antioxidants on the p38-MAPK signaling pathway in the perfused amphibian heart. *Mol. Cell. Biochem.*, **291**, 107–17.
79. Gaitanaki, C., Mastri, M., Aggeli, I-K.S and Beis, I., 2008, Differential roles of p38-MAPK and JNKs in mediating early protection or apoptosis in the hyperthermic perfused amphibian heart. *J. Exp. Biol.*, **211**, 2524–32.
80. Peel, A.L., Sorscher, N., Kim, J.Y., Galvan, V., Chen, S., and Bredesen. D.E., 2004, Tau phosphorylation in Alzheimer’s disease: potential involvement of an APP-MAP kinase complex. *Neuromolecular Med.*, **5**, 205–18.
81. Liao, Y.F, Wang B.J, Cheng H.T, Kuo, L.H. and Wolfe MS., 2004, Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway. *J. Biol. Chem.*, **49**, 523–32.
82. Kim, E.K. and Choi E.J.,2010, Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*, **1802**, 396–405.
83. Crossman, D.C. 2004, The pathophysiology of myocardial ischaemia. *Heart*. 2004, **90**, 576–80.
84. Tsutsui, H., Kinugawa, S., Matsushima, S., Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **301**, 2181-2190.
85. Raedschelders, K., Ansley, D.M. and Chen, D.D.Y., 2012, The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol. Ther.*, **133**, 230–55.
86. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3808829 (τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2016)
87. Bogoyevitch, M.A., 2000, Signalling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.*, **45**, 826–42.
88. Aggeli, I.K.S., Gaitanaki C., Lazou, A. and Beis I., 2001, Activation of multiple MAPK pathways (ERKs, JNKs, p38-MAPK) by diverse stimuli in the amphibian heart. *Mol. Cell. Biochem.*, **221**, 63–9.
89. Yamazaki, T. and Yazaki, Y., 2000, Molecular basis of cardiac hypertrophy. *Z. Kardiol.*, **89**, 1–6.
90. Sugden, P.H., 1999, Signaling in Myocardial Hypertrophy. *Circ. Res.*, **84**, 633–46.

91. Bueno, O.F, De Windt, L.J, Lim, H.W, Tymitz, K.M, Witt, S.A and Kimball, T.R., 2001, The dual-specificity phosphatase MKP-1 limits the cardiac hypertrophic response in vitro and in vivo. *Circ. Res.*, **88**, 88–96.
92. Armstrong, S.C., 2004, Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*, **61**, 427–36.
93. Hreniuk, D., Garay, M., Gaarde, W., Monia, B.P., McKay, R.A. and Cioffi, C.L., 2001, Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 1, but not c-Jun N-terminal kinase 2, suppresses apoptosis induced by ischemia/reoxygenation in rat cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.*, **59**, 867–874.
94. Ferrandi, C., Ballerio, R., Gaillard, P., Giachetti, C., Carboni, S. and Vitte, P.A., 2004, Inhibition of c-Jun N-terminal kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and infarct size after myocardial ischemia and reperfusion in anaesthetized rats. *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 953–60.
95. Bogoyevitch, M.A., Gillespie-Brown J., Ketterman, A.J, Fuller, S.J, Ben-Levy, R. and Ashworth, A., 1996, Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/ERK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ. Res.*, **79**, 162–73.
96. Bueno, O.F. and Molkentin, J.D., 2002, Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ. Res.*, **91**, 776–81.
97. Kyoji, S., Otani, H., Matsuhisa, S., Akita, Y., Tatsumi, K. and Enoki C., 2006, Opposing effect of p38 MAP kinase and JNK inhibitors on the development of heart failure in the cardiomyopathic hamster. *Cardiovasc.*, **69**, 888–98.
98. Shao, Z., Bhattacharya, K., Hsich, E., Park, L., Walters, B. and Germann, U., 2006, c-Jun N-terminal kinases mediate reactivation of Akt and cardiomyocyte survival after hypoxic injury *in vitro* and *in vivo*. *Circ. Res.*, **98**, 111–8.
99. Ma, X.L., Kumar, S., Gao, F., Loudon, C.S., Lopez, BL and Christopher, T.A., 1999, Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, **99**, 1685–91.
100. Ren, J., Zhang, S, Kovacs A, Wang Y, Muslin AJ., 2005, Role of p38 alpha MAPK in cardiac apoptosis and remodeling after myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **38**, 617–23.
101. Nishida, K., Yamaguchi, O., Hirotani, S., Hikoso, S., Higuchi, Y. and Watanabe, T., 2004, p38 alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 10611–20.
102. Stampfer, M.J., 2006, Cardiovascular disease and Alzheimer's disease: common links. *J. Intern. Med.*, **260**, 211–23.

103. Rusanen, M., Kivipelto, M., Quesenberry, C.P, Zhou J and Whitmer, R.A., 2011, Heavy smoking in midlife and long-term risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch. Intern. Med.*, **171**, 333–9.
104. Karch, C.M., Cruchaga, C. and Goate, A., 2014, Alzheimer's Disease Genetics: From the bench to the clinic. *Neuron*, **2**, 11–26.
105. Liu, G., Yao L, Liu J, Jiang, Y., Ma, G. and Chen, Z., 2014, Cardiovascular disease contributes to Alzheimer's disease: evidence from large-scale genome-wide association studies. *Neurobiol. Aging*, **35**, 786–92.
106. Sun, X., He, G., Qing H, Zhou W, Dobie F, Cai F., 2006, Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18727–32.
107. Leto, L. and Feola, M., 2014, Cognitive impairment in heart failure patients. *J. Geriatr. Cardiol.*, **11**, 316–28.
108. Justin, B.N, Turek, M. and Hakim, AM.,2013, Heart disease as a risk factor for dementia. *Clin. Epidemiol.*, **5**, 135–45.
109. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell J., 2000, Membrane Proteins. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21570 (τελευταία επίσκεψη Αύγουστος 1016)
110. Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–5.
111. Burcu, O., Dinçer, A., Habib, O. and Zihnioglu, F., 2007, "Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **70**, 709–711
112. Charette, S.J., Lambert, H., Nadeau, P.J and Landry J., 2010, Protein quantification by chemiluminescent Western blotting: Elimination of the antibody factor by dilution series and calibration curve. *J. Immunol. Methods*. **353**, 148–50.
113. <http://bitesizebio.com/580/how-sds-page-works> (τελευταία επίσκεψη Νοέμβριος 2016)
114. Σκορίλας, Α. ΑΡΧΕΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ, Συμμετρία, Αθήνα, 2009, σελ.101, 123, 135
115. Dröge, W., 2002, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev.*, **82**, 47-95
116. Wang, J, Martindale, L., Liu, Y. and Holbrook, N. J. 1998, The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival, *Biochem. J.*, **333**, 291–300 ΚΑΙ
117. Bolli, R., and Marban E., 1999, Molecular and cellular Mechanism of myocardial stunning, *Physiol. Rev.*,**2**, 609-34.

118. Afanas'ev, I., 2011, ROS and RNS Signaling in Heart Disorders: Could Antioxidant Treatment Be Successful? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2011, Article ID 293769
119. Monti, M., Donnini, S., Giachetti, A., Mochly-Rosen, D. and Ziche, M., 2010, deltaPKC inhibition or epsilonPKC activation repairs endothelial vascular dysfunction by regulating eNOS post-translational modification. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **48**, 746-56
120. Xu, Z.1., Ji, X. and Boysen, P.G., 2003, Exogenous nitric oxide generates ROS and induces cardioprotection: involvement of PKG, mitochondrial K⁺/ATP channels, and ERK. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **286**, 1433-4012
121. Widder, J., Behr, T., Fraccarollo, D., Hu, K., Galuppo, P., Tas, P. Angermann, C.E., Ertl, G. and Bauersachs, J., 2004, Vascular endothelial dysfunction and superoxide anion production in heart failure are p38 MAP kinase-dependent, *Cardiovasc. Res.*, **63**, 161-7
122. Gaitanaki, C., Mastri, M., Aggeli, I.-K.S. and Beis I. 2008, Differential roles of p38-MAPK and JNKs in mediating early protection or apoptosis in the hyperthermic perfused amphibian heart. *J. Exp. Biol.*, **211**, 2524-32
123. Gaitanaki, C., Stathopoulou, K., Stavridou, C. and Beis, I., 2003, Oxidative stress stimulates multiple MAPK signalling pathways and phosphorylation of the small HSP27 in the perfused amphibian heart. *J. Exp. Biol.*, **206**, 2759-69.
124. Aggeli, I.-K. S., Beis, I. and Gaitanaki, C., 2008, Oxidative stress and calpain inhibition induce alpha B-crystallin phosphorylation via p38-MAPK and calcium signalling pathways in H9c2 cells. *Cell Signal.*, **20**, 1292-302
125. Gaitanaki, C., Kalpachidou, T., Aggeli, I.- K. S, Papazafiri, P., and Beis., I., 2007, CoCl₂ induces protective events via the p38-MAPK signalling pathway and ANP in the perfused amphibian heart. *J. Exp. Biol.*, **210**, 2267-77.
126. Jensen, B.C. and Willis, MS., 2016, The Head and the Heart. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **68**, 2408-11.
127. Mendiola-Precoma, J., Berumen, L.C., Padilla, K., Garcia-Alcocer, G., 2016, Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *BioMed Res. Int.*, e2589276.
128. Mozaffarian, D., Benjamin, E.J., Go, A.S., Arnett, D.K. and Blaha, M.J., 2016, Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association., *Circulation*, **133**, e38-360
129. Troncone, L., Luciani, M., Coggins, M., Wilker, E.H, Ho, C.-Y.. and Codispoti, K.E., 2016, Aβ Amyloid Pathology Affects the Hearts of Patients With Alzheimer's Disease: Mind the Heart. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **68**, 2395-407.
130. Sandri, M. and Robbins, J., 2014, Proteotoxicity: an underappreciated pathology in cardiac disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **71**, 3-10.

131. McLendon, P.M. and Robbins, J., 2015, Proteotoxicity and Cardiac Dysfunction. *Circ. Res.*, **116**, 1863–82.
132. Mielcarek, M., 2015, Huntington's disease is a multi-system disorder. *Rare Dis Austin Tex.*, **3**, e1058464.
133. Mielcarek, M., Inuabasi, L., Bondulich, M.K, Muller, T., Osborne, G.F. and Franklin, S.A., 2014, Dysfunction of the CNS-Heart Axis in Mouse Models of Huntington's Disease. *PLOS Genet.*, **10**, e1004550.
134. Melkani, G.C., Trujillo, A.S, Ramos, R., Bodmer., R., Bernstein, S.I. and Ocorr, K., 2013, Huntington's Disease Induced Cardiac Amyloidosis Is Reversed by Modulating Protein Folding and Oxidative Stress Pathways in the *Drosophila* Heart. *PLOS Genet.*, **9**,1004024.
135. Cermakova, P., Johnell, K., Fastbom, J., Garcia-Ptacek, S., Lund, L.H., Winblad, B. , Eriksson, M. and Religa, D., 2015, Cardiovascular Diseases in ~30,000 Patients in the Swedish Dementia Registry. *J. Alzheimers Dis.*, **48**, 949–58.
136. Lee, Y.K., Choi, I.S., Ban, J.O., Lee, H.J., Lee, U.S. and Han, S.B., 2011, 4-O-methylhonokiol attenuated β -amyloid-induced memory impairment through reduction of oxidative damages via inactivation of p38 MAP kinase. *J. Nutr. Biochem.*, **22**, 476–86.
137. Lauren, K., Tanja, S., Christopher, K., Swami, H. E., Dröse, S., Occhipinti, A, Haass, C., Reichert, A., Palmiter, H. and Müller, W.E., 2012, Mitochondrion-Derived Reactive Oxygen Species Lead to Enhanced Amyloid Beta Formation, *Antioxidants & Redox Signaling*, **16**, 1421-1433.
138. Zhang, L., Zhao, B., Yew, D.T., Kusiak, J.W. and Roth, G.S., 1997, Processing of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein during H₂O₂-Induced Apoptosis in Human Neuronal Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 845–8.
139. LeBlanc, A., Liu, H., Goodyeri, C., Bergeron, C. and Hammond J.,1999, Caspase-6 Role in Apoptosis of Human Neurons, Amyloidogenesis, and Alzheimer's Disease, *J. Biol. Chem.*, **274**, 23426-36.
140. Tan, J.L., Li, Q. X., Ciccotosto, G.D., Crouch, P.J., Culvenor J.G., White, A.R and Evin, G., 2013, Mild Oxidative Stress Induces Redistribution of BACE1 in Non-Apoptotic Conditions and Promotes the Amyloidogenic Processing of Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein. *PLOS ONE*, **8**, 10.1371
141. Shen, C.1., Chen, Y., Liu, H., Zhang, K., Zhang, T., Lin, A. and Jing, N., 2008, Hydrogen peroxide promotes A β production through JNK-dependent activation of gamma-secretase, *J. Biol. Chem.*, **283**, 17721-30
142. Cosentino-Gomes, D., Rocco-Machado, N. and Meyer-Fernandes, J. R., 2012, Cell Signaling through Protein Kinase C Oxidation and Activation, *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 10697–10721.

143. Racchi, M., M. Mazzucchelli, A. Pascale, M. Sironi, and S. Govoni, 2003, Role of Protein Kinase C α in the Regulated Secretion of the Amyloid Precursor Protein. *Molecular Psychiatry*, **8**, 209–216.
144. Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H. and Xu, H., 2011, APP processing in Alzheimer's disease. *Mol. Brain.*, **4**, 3.
145. Pascale, A., Govoni, S. and Battaini, F., Age-Related Alteration of PKC, a Key Enzyme in Memory Processes: Physiological and Pathological Examples. *Molecular Neurobiology*, **16**, 49–62.
146. Lee, H.W., Ahn, D.H, Crawley, S.C., Li, J.D., Gum, J.R. and Basbaum, C.B., 2002, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Up-regulates the Transcription of MUC2 Intestinal Mucin via Ras, ERK, and NF- κ B. *J. Biol. Chem.*, **277**, 32624–31.
148. Wang, Q.J., 2006, PKDA at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol. Sci.*, **27**, 317–23.
149. LeBlanc, A.C., Koutroumanis, M. and Goodyer, C.G., 1998, Protein kinase C activation increases release of secreted amyloid precursor protein without decreasing A β production in human primary neuron cultures. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, **18**, 2907–13.
149. Herbst-Robinson, K.J., Liu, L., James, M., Yao, Y., Xie, S.X. and Brunden, K.R., 2015, Inflammatory Eicosanoids Increase Amyloid Precursor Protein Expression via Activation of Multiple Neuronal Receptors. *Sci. Rep.*, **5**, 1828-6.
150. Kadowaki, H., Nishitoh, H., Urano, F., Sadamitsu, C., Matsuzawa, A. and Takeda K., 2005, Amyloid beta induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death Differ.*, **1**, 19–24.
151. Desdouits-Magnen, J., Desdouits, F., Takeda, S., Syu, L.J., Saltiel, A.R. and Buxbaum, J.D., 1998, Regulation of secretion of Alzheimer amyloid precursor protein by the mitogen-activated protein kinase cascade. *JNeurochem.*, **70**, 524–30.
152. Aggeli, I.- K. S., Gaitanaki, C. and Beis, I., 2006, Involvement of JNKs and p38-MAPK/MSK1 pathways in H₂O₂-induced upregulation of heme oxygenase-1 mRNA in H9c2 cells. *Cell Signal*, **18**, 1801-12.
153. Aggeli, I.-K.S., Kefaloyianni, E., Beis, I. and Gaitanaki, C., 2010, HOX-1 and COX-2: Two differentially regulated key mediators of skeletal myoblast tolerance under oxidative stress., *Free Radic. Res.*, **44**, 679-93.
154. Kefaloyianni, E., Gaitanaki, C. and Beis, I., 2006, ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts, *Cell. Signal.*, 2006 **18**, 2238-51.

155. Aggeli, I.-K. S., Beis, I. and Gaitanaki, C., 2010, ERKs and JNKs mediate hydrogen peroxide-induced Egr-1 expression and nuclear accumulation in H9c2 cells. *Physiol. Res.*, 59, 443–54.

Περίληψη

Ταυτοποίηση και διερεύνηση της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε καρδιακά κύτταρα θηλαστικών. Συσχέτιση του προτύπου έκφρασης με συνθήκες οξειδωτικού στρες

Ελένη Τσιούρη

Η νόσος του Alzheimer (NA) είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας, χαρακτηρίζεται από τη διαταραχή του αίματο-εγκεφαλικού φραγμού, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, το οξειδωτικό στρες, τη φλεγμονή των νευρικών κυττάρων άμεσα σχετιζόμενη με τη συσσώρευση/συσσωμάτωση του πεπτιδίου Αβ, την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau και η δραστική μείωση των επίπεδων της ακετυλοχολίνης. Αυξανόμενος αριθμός μελετών υποστηρίζει μια ισχυρή συσχέτιση των καρδιαγγειακών παθήσεων (cardiovascular disease ή CVD) και της νόσου του Alzheimer. Αρκετοί παράγοντες, όπως η υποξία, η συσσώρευση/συσσωμάτωση του πεπτιδίου Αβ και το οξειδωτικό στρες έχουν προταθεί ως σημεία σύνδεσης μεταξύ της NA και των καρδιαγγειακών παθήσεων.

Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί, είτε στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού, είτε στη ρύθμιση του μεταβολισμού και επεξεργασίας/processing της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP) προς το μη-αμυλοειδογενές μονοπάτι. Στα πλαίσια αυτά, αποφασίσαμε να διερευνήσουμε το πρότυπο έκφρασης της APP με τη χρήση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν κύριες περιοχές της (καρβοξυτελικό άκρο, αμινοτελικό άκρο και της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του Αβ πεπτιδίου) και να το συσχετίσουμε με συνθήκες επαγωγής στρες. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν την ύπαρξη APP θραυσμάτων τόσο σε καρδιακά κύτταρα θηλαστικού όσο και σε καρδιακό ιστό Χορδωτού. Επίσης, υποδεικνύουν ότι η επεξεργασία/processing της Προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς είναι άμεσα εξαρτωμένη από το μέγεθος της οξειδωτικής καταπόνησης. Συγκεκριμένα, σε μια πρώτη σειρά πειραμάτων αποδείξαμε πως η επίδραση των κυττάρων με τον οξειδωτικό παράγοντα H_2O_2 οδηγεί σε σημαντική αύξηση των θραυσμάτων μικρού μοριακού βάρους, που περιέχουν τον επίτοπο του Αβ πεπτιδίου. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας τον ενεργοποιητή της PKC και του σηματοδοτικού

μονοπατιού των ERK1/2, PMA, αποδείξαμε πως υπάρχει άμεση εμπλοκή της συγκεκριμένης MAP κινάσης στην επεξεργασία της APP, προς το αμινοτελικό άκρο αλλά όχι το καρβοξυτελικό. Ακόμη, η ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *APP* με τους προαναφερθείς παράγοντες, H₂O₂ και PMA, παρέμεινε αμετάβλητη. Τέλος, τα συμπεράσματα μας ενισχύθηκαν από ένα νέο κύκλο πειραμάτων, με αναστολείς των κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPKs). Παρατηρήσαμε πως η επεξεργασία της APP είναι εξαρτωμένη από την ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK1/2, εφόσον επαγωγή του μονοπατιού έχει ως αποτέλεσμα αύξηση των θραυσμάτων μικρού μοριακού βάρους, ενώ η παρουσία του ειδικού αναστολέα, PD98059, αναστρέφει τη δημιουργία θραυσμάτων.

Abstract

Identification and investigation of Amyloid Precursor Protein (APP) in mammalian cardiac cells. Association of the expression pattern with conditions of oxidative stress

Helen Tsiouri

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia, is characterized by disruption of the blood-brain barrier, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, inflammation of nerve cells directly associated with the accumulation/aggregation of A β peptide, the hyperphosphorylation of tau protein and the drastic decrease of acetylcholine. A growing number of studies support a strong association of cardiovascular disease (CVD) and Alzheimer's disease. Several factors such as hypoxia, aggregation of A β and oxidative stress have been proposed as the connection points between AD and cardiovascular disease.

The interest of the scientific community has turned either to enhance the antioxidant defenses, or regulate the metabolism and processing of APP to the non-amyloidogenic pathway. In this context, we decided to investigate the expression pattern of APP, using antibodies against major regions of APP (C-terminus, N-terminus and the protein sequence of the Abeta peptide) and to associate it with stress inducing conditions. Our results show the existence of APP fragments in both mammalian cardiac cells and Vertebrate heart tissue. Also suggest that the processing of Amyloid Precursor Protein is directly dependent on the cellular redox status. More precisely, in a first series of experiments, we proved that incubating cardiac cells with the oxidizing agent H₂O₂ leads to a significant increase in low molecular weight fragments, which contain the epitope of the Abeta peptide. Moreover, using the activator of PKC and ERK1 / 2 signal pathway, PMA, we showed the involvement of

the specific MAP kinase into the APP processing, towards the N-terminal domain. Furthermore, the expression of *APP* gene remained unchanged in the presence of both agents, H₂O₂ and PMA. Finally, our conclusions were reinforced by a new round of studies, with inhibitors of Mitogen Activated Protein kinases (MAPKs). We showed that the APP processing is dependent on the activation of ERK 1 / 2, where induction of ERK1 / 2 signaling had an increase of low molecular weight fragments, while the presence of the selective phospo-ERK1/2 inhibitor, PD98059, abolished this fragmentation.