



Διπλωματική Εργασία

**Επιδράσεις μεταλλαγών της αιμοσφαιρίνης στην πρωτεόσταση  
ερυθροκυττάρων κατά τη γήρανση**

Βασιλική Ζωή Αρβανίτη  
ΑΜ: 1113201600004

**Επίβλεψη:** Μ. Χ. Αντωνέλου, Επίκουρη Καθηγήτρια

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αθήνα, Ιούνιος 2021

Αφιερωμένο...

στους παππούδες μου,  
που στάθηκαν σε εμένα και την αδερφή μου σαν δεύτεροι πατέρες  
και τους οποίους χάσαμε το 2019, όταν μόλις ξεκινούσα την διπλωματική μου:

τον Γιώργο Κ. Αρβανίτη,  
έναν άνθρωπο που ξεκίνησε στη ζωή του από το μηδέν ή όπως έλεγε ο ίδιος *«με μία  
κουβέρτα και δύο κουτάλια»*, και έφυγε από τη ζωή πριν προλάβει να δει την τελευταία του  
επιθυμία, την αποφοίτηση των εγγονιών του από το πανεπιστήμιο, να πραγματοποιείται,

τον Απόστολο Χ. Ευταξία,  
ο οποίος μετά από 20 χρόνια πένθους για τον πρόωρο χαμό της μόνης κόρης του και  
μητέρας μου, Ευαγγελίας, και σε ηλικία 93 ετών δήλωνε πως θα ερχόταν στην Αθήνα *«με  
τα πόδια»* την ημέρα της ορκωμοσίας μου.

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Μαριάννας Χ. Αντωνέλου, στο πλαίσιο του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών του τμήματος.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κα. Μαριάννα Χ. Αντωνέλου, για την ευκαιρία που μου έδωσε, επιλέγοντάς με, να συμμετάσχω στην ερευνητική ομάδα της και να εργαστώ πάνω σε ένα θέμα που πλέον αγαπώ. Οι διαλέξεις της ήταν η σπίθα που κίνησε το ενδιαφέρον και την περιέργεια μου για το αντικείμενο αυτής της εργασίας. Ευχαριστώ από καρδιάς για την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει τα τελευταία χρόνια, την καθοδήγηση που μου παρείχε σε κάθε βήμα της συγγραφής αυτής της εργασίας και την στήριξη της όχι μόνο για το διάστημα που υπήρξα φοιτήτρια στο Τμήμα Βιολογίας, αλλά και για την μελλοντική μου εκπαίδευση.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Τομέα μας, κα. Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη για την φιλοξενία στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, αλλά και όλο το προσωπικό του Τομέα για την συνεργασία τους.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στον μεταδιδακτορικό ερευνητή του εργαστηρίου, Δρ. Βασίλη Τζούνακα και την υποψήφια διδάκτορα Αλκμήνη Αναστασιάδη, που με περίσσεια υπομονή μου έμαθαν πώς να δουλεύω στο εργαστήριο, μου μεταβίβασαν τις γνώσεις τους και με βοήθησαν να αναπτύξω την κριτική μου σκέψη. Ευχαριστώ και τους δύο για το όμορφο κλίμα του επικρατούσε στο εργαστήριο, την προθυμία τους να απαντήσουν ξανά και ξανά στις απορίες μου και την καθημερινή καθοδήγηση τους. Ακόμη ευχαριστώ τον Βασίλη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψουμε μαζί στο πλαίσιο των ερευνητικών προγραμμάτων των οποίων είναι υπεύθυνος. Η εμπειρία που μου πρόσφερε ήταν ανεκτίμητη. Τέλος, θα ήθελα να τους ευχαριστήσω, διότι πέρα από εξαιρετικοί συνεργάτες, φίλοι και συν-αναγνώστες, η Αλκμήνη και ο Βασίλης αποτέλεσαν για μένα, ως νέοι επιστήμονες, ένα πολύτιμο πρότυπο.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω για την άριστη συνεργασία τους όλους τους συναδέλφους που δουλέψαμε μαζί, αλλά ιδιαίτερα την συμφοιτήτρια μου Βασιλική Κουρκουβά, με την οποία ξεκινήσαμε μαζί αυτό το ταξίδι, τον συνάδελφο Χρήστο Λιάλια, καθώς και την Μαριάνθη Πεντογιάννη, που αν και σύντομη η συνεργασία μας ήταν ιδιαίτερα ευχάριστη.

Ευχαριστώ πολύ την οικογένειά μου και ειδικά του γονείς μου, Κωνσταντίνο και Σοφία, που μου έδωσαν τα εφόδια και τη στήριξη που χρειάστηκα για να ακολουθήσω τις σπουδές μου στο αντικείμενο που με ενδιαφέρει και αγαπώ, και την πίστη τους σε μένα. Ελπίζω, ως το πρώτο παιδί τους που ολοκληρώνει τις προπτυχιακές σπουδές του, να θέσω ένα υψηλό παράδειγμα για την αδερφή μου Εύα και τον αδερφό μου Γιώργο, που είναι πάντα δίπλα μου.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω εδώ, τα άτομα που μου παρείχαν την μεγαλύτερη συναισθηματική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Ευχαριστώ την Εύα, τη Μυρτώ, τη Σίσσυ, την Αλεξάνδρα, την Κωνσταντίνα και τέλος την Ειρήνη για όλα, από τις ατελείωτες ώρες που διαβάσαμε μαζί έως τις στιγμές που χρειάστηκα περισσότερο την στήριξη και την εμπύχωση που μου δίνετε κάθε μέρα.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά όλους τους εθελοντές αιμοδότες, χωρίς τους οποίους δεν θα ήταν εφικτή η εκπόνηση αυτής της εργασίας.

## Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	3
A. Εισαγωγή.....	7
A1. Ερυθροκύτταρα.....	7
A2. Ερυθροποίηση.....	7
A3. Ερυθροκυτταρική μεμβράνη και σχετιζόμενα πρωτεϊνικά μόρια.....	9
A3.1. Λιπιδική σύσταση.....	9
A3.2. Πρωτεϊνική σύσταση.....	10
A3.2.1. Σημαντικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες.....	10
A3.2.2. Άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες.....	13
A3.2.3. Σκελετικές πρωτεΐνες.....	14
A3.2.4. Πρωτεϊνικά σύμπλοκα μεμβράνης.....	18
A3.2.5. Κυτοσολικές πρωτεΐνες.....	20
A4. Μεταβολισμός ερυθροκυττάρου.....	24
A4.1. Γλυκόλυση.....	25
A4.2. Ρύθμιση της γλυκόλυσης.....	25
A4.3. Κύκλος των φωσφορικών πεντοζών.....	26
A4.4. Μονοπάτι Rapaport – Luebering.....	27
A5. Οξειδοαναγωγική ισορροπία ερυθροκυττάρου.....	27
A5.1. Πηγές ελευθέρων ριζών.....	27
A5.2. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	28
A.5.2.1. Μη ενζυμικά συστήματα.....	28
A5.2.2. Ενζυμικά συστήματα.....	29
A5.3. Συνέπειες οξειδωτικού στρες.....	30
A5.3.1. Οξείδωση Λιπιδίων.....	30
A5.3.2. Οξείδωση Πρωτεϊνών.....	31
A5.3.3. Διαχείριση οξειδωμένων πρωτεϊνών.....	32
A6. Γήρανση.....	33
A6.1. Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες.....	33
A6.2. Μονοπάτι γήρανσης σχετιζόμενο με τη ζώνη 3.....	33
A6.3. Μονοπάτι σχετιζόμενο με τη CD47.....	35
A6.4. Εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης PS.....	36
A6.5. Κυστιδιοποίηση.....	36
A7. Ερυθρόπτωση.....	37
A8. Αποθήκευση.....	38

A8.1. Συνθήκες αποθήκευσης .....	38
A8.2. Αποθηκευτική βλάβη .....	38
A8.3. Υπόβαθρο αιμοδότη .....	40
A8.3.1. Μη γενετικοί / εξωγενείς παράγοντες .....	41
A8.3.2. Γενετικοί / ενδογενείς παράγοντες .....	41
A8.3.3. Το παράδειγμα της β-θαλασσαιμίας .....	42
B. Σκοπός .....	44
Γ. Υλικά και μέθοδοι .....	45
Γ1. Όργανα και συσκευές .....	45
Γ2. Βιολογικό Υλικό .....	45
Γ3. Μέθοδοι .....	45
Γ3.1. Μέτρηση επιπέδων ενδοκυττάρων ROS .....	45
Γ3.2. Μέτρηση πρωτεασωμικών ενεργοτήτων .....	46
Γ3.3. Λευκαφαίρεση με κολώνες κυτταρίνης .....	46
Γ3.4. Απομόνωση ερυθροκυτταρικών μεμβρανών από ολικό αίμα .....	47
Γ3.5. Απομόνωση κυστιδίων .....	48
Γ3.6. Υπολογισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δείγματος .....	49
Γ3.7. Προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση .....	49
Γ3.8. Επίπεδη SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κατά Laemmli .....	50
Γ3.9. Ημίξηρη μεταφορά πρωτεϊνών .....	51
Γ3.10. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Western blotting) .....	51
Γ3.11. Ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνών πηκτωμάτων και φιλμ .....	53
Γ3.12. Μέτρηση των επιπέδων καρβονυλίωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Oxyblot .....	53
Γ3.13 Ανάλυση Βιολογικών Δικτύων .....	53
Δ. Αποτελέσματα .....	55
Δ1. Οξειδωτικό στρες – Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS .....	55
Δ2. Πρωτεασωμικές ενεργότητες .....	56
Δ3. Μεταβολές στην πρωτεϊνική σύσταση της μεμβράνης .....	58
Δ4. Συσχέτιση μεταξύ πρωτεασωμικών ενεργοτήτων και οξειδωτικού στρες κατά την αποθήκευση .....	60
Δ4.1. Αρχή αποθήκευσης .....	60
Δ4.2. Μέσο αποθήκευσης .....	61
Δ4.3. Τέλος αποθήκευσης .....	61
Δ5. Συσχετίσεις παραμέτρων των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών και των κυστιδίων στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου – σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και ετερόζυγων β-θαλασσαιμίας .....	62
Δ5.1. Μάρτυρες .....	64
Δ5.2. Ετερόζυγοι φορείς β-θαλασσαιμίας .....	65

<b>Ε. Συζήτηση</b> .....	68
<b>Περίληψη</b> .....	72
<b>Abstract</b> .....	73
<b>Βιβλιογραφία</b> .....	75

## A. Εισαγωγή

### A1. Ερυθροκύτταρα

Τα ερυθροκύτταρα είναι το πολυπληθέστερο έμμορφο συστατικό του αίματος καθώς και ο πιο άφθονος κυτταρικός τύπος του ανθρώπου. Πρόκειται για μια ομάδα με ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά που είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με την λειτουργία που επιτελούν.

Τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια του ανθρώπου όπως των περισσότερων θηλαστικών είναι απύρρηνα, ενώ στερούνται ακόμη μεμβρανωδών οργανιδίων όπως μιτοχόνδρια, καθώς και ριβοσωμάτων. Το παραπάνω σημαίνει πως το ώριμο ερυθροκύτταρο δεν είναι ικανό να εκτελέσει *de novo* πρωτεϊνοσύνθεση. Επομένως πορεύεται με το πρωτεϊνικό φορτίο που συντέθηκε κατά την ωρίμανση του. Η απώλεια πυρήνα και οργανιδίων εξασφαλίζει την πλήρωση του ερυθροκυττάρου με αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη επιτελεί τη σημαντική λειτουργία της μεταφοράς του O<sub>2</sub> στους ιστούς και είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη στο ερυθροκύτταρο. (Hamasaki & Yamamoto, 2000)

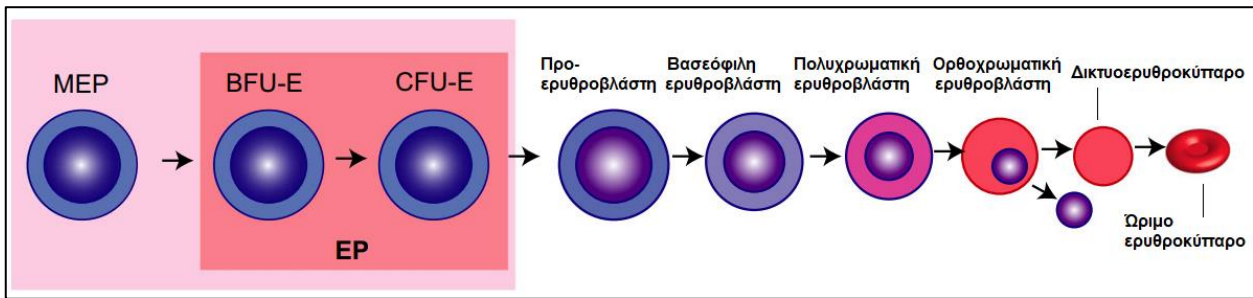
Το σχήμα και οι διαστάσεις του ερυθροκυττάρου παρουσιάζουν, επίσης, μεγάλο ενδιαφέρον. Η μορφή του αποδίδεται με το σχήμα του αμφίκιουλου δίσκου, είναι δηλαδή παχύτερο στην περιφέρεια και λεπτότερο στη μέση. Οι διαστάσεις του κυμαίνονται από 7,5-8,7μm σε διάμετρο και 1,7-2,2μm σε πάχος (Diez-Silva et al., 2010). Το σχήμα αυτό συνεπάγεται υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο, άρα μικρή απόσταση διάχυσης των αερίων και τελικά αποτελεσματικότερη μεταφορά τους. Επιπλέον, το σχήμα αυτό σε συνδυασμό με τον υποκείμενο της μεμβράνης κυτταροσκελετό προσδίδουν στο κύτταρο την μηχανική ανθεκτικότητα και την πλαστικότητα σχήματος που χρειάζεται, ώστε να μην δεχθεί λύση κατά τη διάσχιση των τριχοειδών αγγείων, με διάμετρο μικρότερη από αυτή του ίδιου του κυττάρου. (Pretorius, 2013)

Πέρα, όμως, από την πολύ σημαντική λειτουργία της μεταφοράς του O<sub>2</sub> στους ιστούς και μέρους του CO<sub>2</sub> πίσω στους πνεύμονες, τα ερυθροκύτταρα επιτελούν και άλλες λειτουργίες (Benedik & Hamlin, 2014). Για παράδειγμα, επικοινωνούν με τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω παραγόντων όπως το ATP και το NO και επηρεάζουν την διάμετρο των αγγείων (Allen & Piantadosi, 2006; Jensen, 2009). Παράλληλα, μέσω του CO<sub>2</sub> επηρεάζουν και το pH του αίματος.

### A2. Ερυθροποίηση

Τα ερυθροκύτταρα ελλείπει πυρήνα δεν είναι δυνατό να πολλαπλασιαστούν αλλά και να συνθέσουν πρωτεΐνες. Τα κύτταρα αυτά, λοιπόν, παραμένουν στην κυκλοφορία για περίπου 120 μέρες, στην διάρκεια των οποίων συσσωρεύουν αλλοιώσεις, που τα καθιστούν ανίκανα να επιτελέσουν τις λειτουργίες τους. Η απομάκρυνση τους, όμως, αντισταθμίζεται από την παραγωγή νέων ερυθροκυττάρων, μέσω μίας διαδικασίας γνωστής ως ερυθροποίηση. Κατά την εμβρυική ζωή η ερυθροποίηση πραγματοποιείται στο λεκιθικό ασκό και στην ενήλικη ζωή στο μυελό των οστών (Dzierzak & Philipsen, 2013).

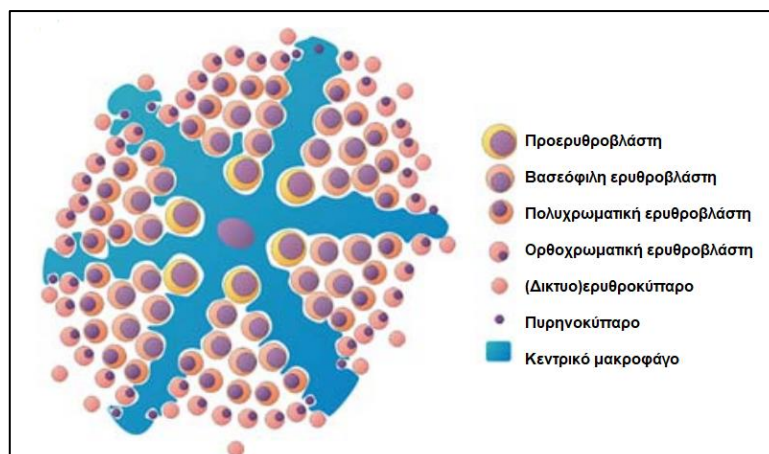
Στον μυελό των οστών η διαδικασία ξεκινά από μια ομάδα πολυδύναμων κυττάρων, τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, που μπορούν να δώσουν γένεση σε μια ποικιλία κυττάρων του αίματος. Τα κύτταρα αυτά στον μυελό έρχονται σε επαφή με διάφορες κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες ή μόρια προσκόλλησης που βοηθούν στην καθοδήγηση των αρχικών κυττάρων στο πεπρωμένο του ερυθροκυττάρου και καθορίζουν τις διαδοχικές αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης των κυτταρικών μορφών που μεσολαβούν έως το σχηματισμό του δικτυοερυθροκυττάρου (Kondo et al., 2003; Nandakumar et al., 2016).



**Εικόνα 1:** Διαδοχικές αλλαγές στην πορεία της ερυθροποίησης. Ανατύπωση από Nandakumar et al., 2016

Κατά την πρώιμη ανάπτυξη από τα βλαστικά κύτταρα προκύπτουν διαδοχικά οι προγονικοί πληθυσμοί BFU-E (burst forming units-erythroid) και CFU-E (culture forming units-erythroid). Τα ονόματα αυτά προκύπτουν από την ικανότητα τους να σχηματίζουν χαρακτηριστικές αποικίες (Dzierzak & Philipsen, 2013). Τα CFU-E αρχίζουν να εμφανίζονται στην επιφάνεια τους τον υποδοχέα της ερυθροποιητίνης. Η ερυθροποιητίνη (EPO) είναι μία ορμόνη που παράγεται στους νεφρούς και είναι καθοριστικό μόριο στην πορεία της διαφοροποίησης των ερυθροκυττάρων. Ταυτόχρονα δρα και ως ρυθμιστής της ποσότητας των ερυθροκυττάρων που παράγονται (Chateaubien et al., 2011). Έχει παρατηρηθεί πως σε περιπτώσεις υποξίας, μη επαρκούς δηλαδή μεταφοράς οξυγόνου, τα επίπεδα ερυθροποιητίνης αυξάνονται και ακολουθεί η παραγωγή περισσότερων ερυθροκυττάρων από το μυελό (Koury & Bondurant, 1990). Οι CFU-E διαφοροποιούνται σε προερυθροβλάστες (Dzierzak & Philipsen, 2013).

Με το στάδιο των προερυθροβλαστών ξεκινά μία σειρά πρόδρομων μορφών που οδηγούν στον σχηματισμό του δικτυοερυθροκυττάρου. Η συγκεκριμένη πορεία λαμβάνει χώρα στις ερυθροβλαστικές νησίδες. Στις νησίδες αυτές συμμετέχουν ένα μακροφάγο με ακτινωτές προεκβολές του κυτταροπλάσματος του και οι αναπτυσσόμενες ερυθροβλάστες στην περιφέρεια αυτού (Chasis, 2006). Οι ερυθροβλάστες περνούν από τα εξής στάδια: προερυθροβλάστη, βασεόφιλη, πολυχρωματική και ορθοχρωματική ερυθροβλάστη, η οποία στο τέλος με αποβολή του πυρήνα της θα δώσει το δικτυοερυθροκύτταρο. Τα παραπάνω ονόματα σχετίζονται με το αποτέλεσμα χρώσης των πρόδρομων αυτών κυτταρικών πληθυσμών. Συγκεκριμένα, η σταδιακή παραγωγή όλο και περισσότερης αιμοσφαιρίνης προκαλεί την μείωση του κυτοσολικού pH. Στο τέλος της διαδικασίας, η ορθοχρωματική ερυθροβλάστη υφίσταται αποπυρήνωση, που ομοιάζει με ένα είδος ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης από την οποία προκύπτει ένα πυρηνοκύτταρο και ένα δικτυοερυθροκύτταρο. Το πρώτο φαγοκυτταρώνεται από το κεντρικό μακροφάγο, ενώ το δεύτερο περνά στην κυκλοφορία (Dzierzak & Philipsen, 2013).



**Εικόνα 2:** Ερυθροβλαστική νησίδα. Ανατύπωση από Dzierzak & Philipsen, 2013



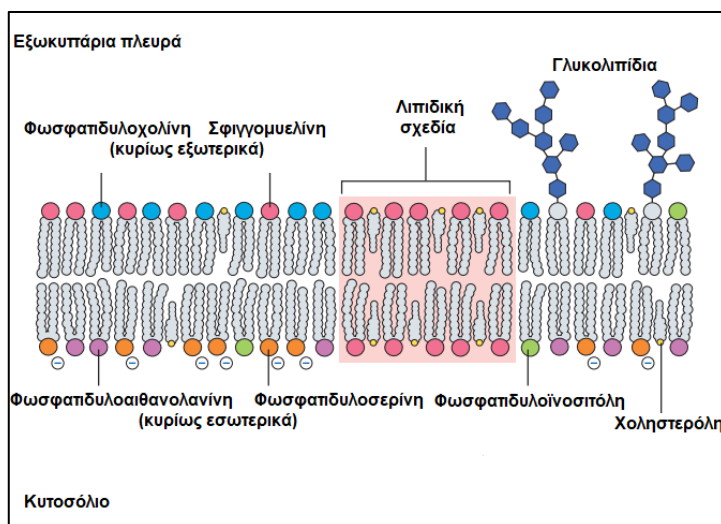
Το δικτυοερυθροκύτταρο καλείται, τέλος, να αποβάλει τα υπόλοιπα κυτταρικά οργανίδια του και να αποδιοργανώσει τα ριβοσώματα του. Η διαδικασία της αποβολής αυτής περιλαμβάνει την δημιουργία εξωκυττάρων κυστιδίων που περικλείουν τα προς απομάκρυνση στοιχεία. Τα στοιχεία αυτά έχουν προηγουμένως πεπτεί μερικώς μέσω αυτοφαγικών οδών, με ελεγχόμενο δηλαδή τρόπο. Πέρα από την παραπάνω λειτουργία η κυστιδιοποίηση εξυπηρετεί έναν ακόμη σκοπό, την αναδιαμόρφωση της μεμβράνης και τελικά την αλλαγή του σχήματος στο αμφίκωλο δίσκο του ώριμου ερυθροκυττάρου (Dzierzak & Philipsen, 2013).

### A3. Ερυθροκυτταρική μεμβράνη και σχετιζόμενα πρωτεϊνικά μόρια

Η ικανότητα του ερυθροκυτταρικής μεμβράνης να εκτείνεται γραμμικά έως και 250% χωρίς αυτό να προκαλεί λύση είναι μοναδική και ευθύνεται στην εκπληκτική αναστρέψιμη παραμορφωσιμότητα της. Όπως σε πολλά βιολογικά φαινόμενα, έτσι και εδώ η λειτουργία είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη δομή. Η δομική οργάνωση της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου παρουσιάζει ενδιαφέρον όχι μόνο λόγω της μοναδικής λιπιδοπρωτεϊνικής σύστασης της, αλλά και λόγω των εκτεταμένων συνδέσεων της με τον υποκείμενο κυτταροσκελετό (Mohandas & Gallagher, 2008)

#### A3.1. Λιπιδική σύσταση

Η χοληστερόλη και τα φωσφολιπίδια αποτελούν τα βασικά δομικά λιπιδικά συστατικά της μεμβράνης. Η αναλογία κατά βάρος των δύο αυτών συστατικών είναι περίπου ίση, αλλά η κατανομή τους είναι κάθε άλλο παρά απλή (Verkleij et al., 1973). Τα τέσσερα πολυπληθέστερα φωσφολιπίδια της μεμβράνης βρίσκονται ανομοιόμορφα καταναμημένα στα δύο φύλλα της διπλοστοιβάδας. Συγκεκριμένα, η φωσφατιδυλοχολίνη και η σφιγγομυελίνη βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην εξωτερική στοιβάδα, η φωσφατιδυλοαιθιθολαμίνη και η φωσφατυδιλοσερίνη στην εσωτερική (Kuypers & Sourene, 2011; Yasin et al., 2003) ενώ οι φωσφατιδυλοινωσιτόλες απαντώνται περισσότερο στην εσωτερική στοιβάδα (Zwaal & Schroit, 1997).



Εικόνα 3: Ασυμμετρία λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Ανατύπωση από Hodgkins, 2020

Η παραπάνω ασυμμετρία φαίνεται να είναι σημαντική και τη σημασία της μαρτυρά η παρουσία μίας σειράς πρωτεϊνών, επιφορτισμένων με την διατήρηση αυτής της κατανομής. Η μεταφορά των φωσφολιπιδίων από τις εξειδικευμένες πρωτεΐνες συντελείται με ή χωρίς παράλληλη κατανάλωση ATP. Σημαντικές πρωτεΐνες σε αυτή τη διαδικασία είναι οι φλιππάσες, οι φλοππάσες και οι σκραμπλάσες. Οι δύο πρώτες ομάδες – φλιππάσες, φλοππάσες- απαιτούν την κατανάλωση ενέργειας καθώς διενεργούν τη μεταφορά λιπιδίων

αντίθετα από την κλίση συγκέντρωσή τους. Οι φλιππάσες μεταφέρουν λιπίδια από την εξωτερική στην εσωτερική στοιβάδα, ενώ οι φλοππάσες εκτελούν την αντίθετη μεταφορά. Η τρίτη κατηγορία, οι σκραμπλάσες, μεταφέρουν λιπίδια και προς τις δύο κατευθύνσεις με φορά προς την πλευρά με τη μικρότερη συγκέντρωση, επομένως χωρίς ενεργειακή κατανάλωση (Pomorski & Menon, 2016).

Η κατανομή των φωσφολιπιδίων δεν έχει μονάχα δομικό ρόλο. Για παράδειγμα η συγκέντρωση της (επεξήγηση συντόμευσης)  $PI_3$  στο εσωτερικό σχετίζεται με την ενεργοποίηση καταρροϊκών σηματοδοτικών μονοπατιών (Zwaal & Schroit, 1997). Απαιτείται, συνεπώς, να βρίσκεται στην κυτοσολική πλευρά. Ακόμη, η φωσφατυδιλοσερίνη, όπως θα εξεταστεί παρακάτω, παίζει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία. Η εξωτερική της λειτουργεί ως σήμα αναγνώρισης για καταστροφή από μακροφάγα (Kuypers & Soupene, 2011).

### **A3.2. Πρωτεϊνική σύσταση**

Παρά την αδυναμία σύνθεσης νέων πρωτεϊνών το ερυθροκύτταρο δεν είναι φτωχό σε πρωτεΐνες. Περιλαμβάνει μάλιστα μια μεγάλη ποικιλία, που αριθμεί πάνω από 2000 πρωτεϊνικά μόρια. Με βάση τη σχέση τους με τη μεμβράνη οι πρωτεΐνες μπορούν να διακριθούν σε διαμεμβρανικές, περιφερειακές, σκελετικές και κυτοσολικές, που δύναται να συνδεθούν με τη μεμβράνη. Κάθε ομάδα περιλαμβάνει σημαντικά μόρια για τη φυσιολογική λειτουργία του ερυθροκυττάρου. (Goodman et al., 2007)

#### **A3.2.1. Σημαντικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες**

Ως διαμεμβρανικές χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες οι οποίες διασχίζουν μία ή περισσότερες φορές την μεμβράνη του ερυθροκυττάρου εκτείνοντας ενδεχομένως επικράτειες μέσα ή έξω από αυτή. Τέτοιες πρωτεΐνες μπορεί να παίζουν ρόλο μεταφορέων μορίων (κανάλια, δίαυλοι), μορίων προσκόλλησης ή ειδικών αντιγόνων, που εκτίθενται στην εξωκυττάρια πλευρά. Στην πρώτη κατηγορία θα μπορούσε κανείς να κατατάξει πρωτεΐνες όπως η Ζώνη 3, ο μεταφορέας γλυκόζης (GLUT-1), διάφορους συμμεταφορείς ιόντων και ATPάσες που διευκολύνουν τη μεταφορά ιόντων, καθώς και τα κανάλια Gardos. Στη δεύτερη ανήκουν μόρια όπως η ICAM (Intercellular Adhesion Molecule 1), οι γλυκοφορίνες ή οι πρωτεΐνες Rhesus (Pasini et al., 2006).

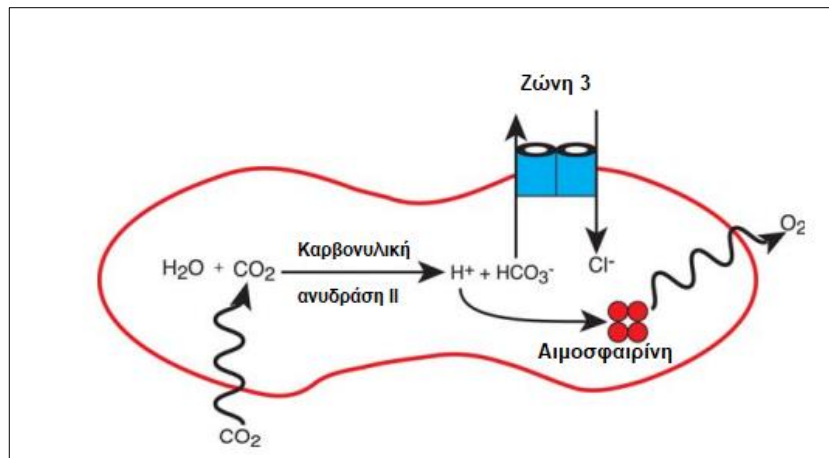
##### **▪ Ζώνη 3 (ανιοντοανταλλάκτης)**

Πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη αποτελούμενη από 911 αμινοξέα, μεταγραφόμενη από το γονίδιο *SLC4A1*. Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται σε αφθονία στο ερυθροκύτταρο με περίπου 1.000.000 αντίγραφα ανά κύτταρο. Τα μόρια αυτά συχνά σχηματίζουν διμερή ή τετραμερή στη μεμβράνη (Bruce, 2006).

Η Ζώνη 3 παρουσιάζει 3 περιοχές με λειτουργικό ενδιαφέρον. Οι περιοχές αυτές είναι: η αμινοτελική περιοχή (aa: 1-402), που βρίσκεται στην κυτοσολική πλευρά της μεμβράνης, η καρβοξυτελική περιοχή (aa: 892-911), που προβάλλει επίσης στο κυτοσόλιο και η περιοχή των αμινοξέων 403-891 που διαπερνά τη μεμβράνη 12-14 φορές (Reithmeier et al., 2016).

Ο κύριος ρόλος της εν λόγω πρωτεΐνης είναι η αποτελεσματική μεταφορά των αερίων στους ιστούς, πράγμα που επιτυγχάνει ανταλλάσσοντας ένα ιόν χλωρίου ( $Cl^-$ ) από το εξωτερικό του κυττάρου με ένα διπτανθρακικό ιόν ( $HCO_3^-$ ) (Walsh & Stewart, 2010). Η δράση αυτή γίνεται καλύτερα κατανοητή εάν αναλογιστούμε πως στο καρβοξυτελικό άκρο της ζώνης 3 συνδέεται η καρβονυλική ανυδράση II. Το ένζυμο αυτό καταλύει την παραγωγή  $HCO_3^-$  και  $H^+$  από  $CO_2$  παρουσία  $H_2O$ . Το  $H_2O$  που χρειάζεται για την αντίδραση εισέρχεται παθητικά

στο κύτταρο από το πλάσμα, ειδικά σε γεινίαση με μεταβολικά ενεργούς ιστούς. Επιπλέον, το  $H^+$  που παράγεται από την καρβονυλική ανυδράση II, συνδέεται με την αιμοσφαιρίνη που φέρει  $O_2$  διευκολύνοντας την απελευθέρωση του στους ιστούς. Η ζώνη 3, λοιπόν, δρα ως μία πρωτεΐνη αισθητήρας, ικανή να αναγνωρίζει τους ενεργούς μεταβολικά ιστούς και να τους τροφοδοτεί ειδικά με  $O_2$  (Badior & Casey, 2018).



**Εικόνα 4:** Η λειτουργία του συμπλόκου της ζώνης 3 και της καρβονυλικής ανυδράσης II. Ανατύπωση από Badior & Casey, 2018

Τα ολιγομερή της ζώνης 3 λειτουργούν, επιπλέον, ως σημείο πυρήνωσης ορισμένων σημαντικών για το κύτταρο πρωτεϊνών (Ferru et al., 2011). Πρώτα απ' όλα, το καρβοξυτελικό κυτοσολικό άκρο προσφέρει μια θέση σύνδεσης για την καρβονυλική ανυδράση, της οποίας ο ρόλος συζητήθηκε παραπάνω. Η εγγύτητα των δύο πρωτεϊνών αυξάνει την αποτελεσματικότητα της ανταλλαγής των αερίων. Μεγαλύτερο, όμως, ενδιαφέρον φαίνεται να παρουσιάζει η αμινοτελική κυτοσολική ουρά της ζώνης 3, που έχει και πολύ μεγαλύτερο μήκος (Lux, 2016). Η ουρά αυτή αποτελεί σημείο σύνδεσης και συσπείρωσης πολλών διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων. Κάποια από αυτά είναι ορισμένα από τα γλυκολυτικά ένζυμα που σχετίζονται άμεσα με το μεταβολισμό (Puchulu-Campanella et al., 2013), μια σειρά πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό (Walsh & Stewart, 2010) συνδέοντάς τον στη μεμβράνη, αλλά ακόμη και η ίδια η αιμοσφαιρίνη. Οι συνδέσεις αυτές δεδομένου του ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν για την ομαλή λειτουργία του ερυθροκυττάρου θα αναπτυχθούν περαιτέρω στη συνέχεια. Τέλος, η ζώνη 3 έχει ενεργό ρόλο και στη γήρανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, καθώς αποτελεί σημείο δημιουργίας νέο-αντιγόνων για την απομάκρυνση γηρασμένων ερυθροκυττάρων (Badior & Casey, 2018).

#### ▪ Γλυκοφορίνες

Οι γλυκοφορίνες είναι μία οικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που φέρουν έντονη γλυκοζυλίωση στο εξωκυττάριο τμήμα τους (Aoki, 2017; Tanner, 1993). Φέρουν δε πολλαπλά μόρια σιαλικού οξέος και για αυτό χαρακτηρίζονται ως σιαλογλυκοπρωτεΐνες. Τα μόρια σιαλικού οξέος προσδίδουν στην επιφάνεια του ερυθροκυττάρου αρνητικό φορτίο που αποτρέπει την συσσωμάτωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων ή την προσκόλληση τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα, εξασφαλίζοντας την ομαλή διακίνησή τους μέσα στα αγγεία (Rogers et al., 1992).

Η οικογένεια των γλυκοφορινών στο άνθρωπο περιλαμβάνει 5 μέλη: τις γλυκοφορίνες GrA, GrB, GrC, GrD, GrE. Οι πρωτεΐνες αυτές συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον διότι πρώτον βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία στην μεμβράνη και δεύτερον παρουσιάζουν αντιγόνα διαφόρων ομάδων αίματος. Συγκεκριμένα, οι GrA, GrB και GrE φέρουν αντιγόνα του

συστήματος MNS, ενώ οι GrC και GrD του συστήματος Gerbich. Οι GrA και GrD απαντώνται συχνά μαζί στη μεμβράνη ως ομο- ή ετεροδιμερή. Όλες εκτός από την GrB φέρουν και κυτοσολική περιοχή (Merry et al., 1986).

Πέρα από την συμβολή τους στο αρνητικό φορτίο του κυττάρου, έχουν περιγραφεί κι άλλοι ρόλοι των γλυκοφορινών. Συγκεκριμένα, οι γλυκοφορίνες C και D (ιδιαίτερα η C) φαίνεται να συμμετέχουν σε ένα από τα σύμπλοκα που συνδέουν τον κυτταροσκελετό στη μεμβράνη βοηθώντας στη διατήρηση του σχήματος του κυττάρου (Reid, 1987), το οποίο θα συζητηθεί παρακάτω. Η γλυκοφορίνη A από την άλλη έχει προταθεί πως λειτουργεί ως μοριακή συνοδός για τη μεταφορά της ζώνης 3 στη μεμβράνη (Aoki, 2017).

#### ▪ Υδατοπορίνη

Η υδατοπορίνη 1 (AQP-1) είναι μια ακόμη άφθονη διαμεμβρανική πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου (Agre, 2006). Συνιστά τετραμερή σύμπλοκα, στο πλαίσιο των οποίων όμως τα μονομερή παραμένουν λειτουργικά ανεξάρτητα (Yool & Campbell, 2012). Αποτελείται από 269 αμινοξέα και σχηματίζει ένα δίαυλο. Το κανάλι του διαύλου σχηματίζεται από 6 α-έλικες, συνδεδεμένες με 5 θηλιές. Το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο βρίσκονται στην κυτοσολική πλευρά. Η δεύτερη και η πέμπτη θηλιά φέρουν μια συντηρημένη περιοχή, ένα μοτίβο NPA (ασπαραγίνη-προλίνη-αλανίνη). Οι περιοχές αυτές βρίσκονται στο εσωτερικό του καναλιού δημιουργώντας μια στένωση (Schenk et al., 2010).

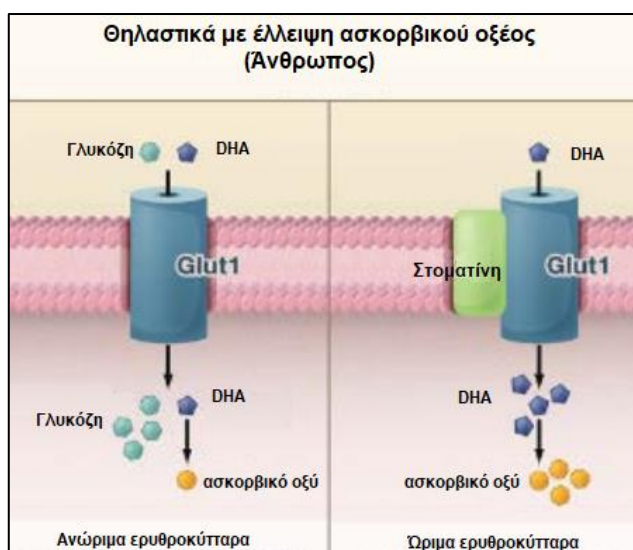
Όπως υποδηλώνει το όνομα της, ο πρωταρχικός ρόλος της είναι η μεταφορά μορίων νερού από και προς το εσωτερικό του κυττάρου (Benga, 2012). Είναι υπεύθυνη για περίπου το 64% της διαπερατότητας του νερού μέσω διάχυσης, ενώ ταυτόχρονα έχει πρωτεύοντα ρόλο σε μετακίνηση νερού λόγω ωσμωτικών αλλαγών (Mathai et al., 1996). Πέρα από το νερό έχει αναφερθεί πως ορισμένα αέρια, όπως το NO (Herrera et al., 2006), το CO<sub>2</sub> (Blank & Ehmke, 2003) ή το O<sub>2</sub> (Echevarría et al., 2007) δύναται επίσης να διαπερνούν τη μεμβράνη διασχίζοντας τον πόρο της υδατοπορίνης.

#### ▪ Μεταφορέας Γλυκόζης

Ο μεταφορέας γλυκόζης (GLUT-1) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 492 αμινοξέων που διαπερνά τη μεμβράνη 12 φορές σχηματίζοντας έναν δίαυλο, υπεύθυνο για την μεταφορά γλυκόζης μέσα στο κύτταρο (MUECKLER, 1994). Τα δύο άκρα εντοπίζονται και σε αυτή την πρωτεΐνη στο κυτταρόπλασμα. Ο μεταφορέας εκφράζεται σε μεγάλα ποσά στην μεμβράνη αποτελώντας έως και το 10% της πρωτεϊνικής μάζας της μεμβράνης (Carruthers et al., 2009).

Η γλυκόζη δεν είναι το μόνο μόριο που μεταφέρεται μέσω του GLUT-1. Το L-αφυδροασκορβικό οξύ (DHA), ένα οξειδωμένο ενδιάμεσο του ασκορβικού οξέος, διαπερνά, επίσης, τη μεμβράνη μέσω του διαύλου. Η γλυκόζη είναι απαραίτητη για την παραγωγή ενέργειας μέσω γλυκόλυσης στο ερυθροκύτταρο, ενώ το DHA αποτελεί σημαντικό ενδιάμεσο, καθώς μετατρέπεται σε ασκορβικό οξύ εντός του κυττάρου. Το ασκορβικό μεταφέρεται στο πλάσμα όπου έχει αντιοξειδωτική δράση, η αντίδραση του με υπεροξειδία το μετατρέπει σε DHA, που εισέρχεται πάλι στο κύτταρο όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Παρά το ότι χρησιμοποιούν τον ίδιο μεταφορέα, η γλυκόζη και το DHA δεν δρουν ανταγωνιστικά (Montel-Hagen et al., 2009). Η ρύθμιση της πρόσληψης των δύο γίνεται μέσω μίας πρωτεΐνης που ονομάζεται στοματίνη. Σύνδεση με στοματίνη, δηλαδή, συνεπάγεται αυξημένη μεταφορά DHA. Τέλος, ο μεταφορέας γλυκόζης φαίνεται να συμμετέχει σε

σύμπλοκο με ορισμένες σκελετικές πρωτεΐνες όπως η αδουσίνη και η δεματίνη, σχηματίζοντας σύμπλοκο ζεύξης με τον κυτταροσκελετό (Khan et al., 2008).



Εικόνα 5: Ρύθμιση του GLUT-1 μέσω της στοματίνης. Ανατύπωση από Troadec & Kaplan, 2008

### A3.2.2. Άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες

#### ▪ Στοματίνη

Η στοματίνη είναι μία μεμβρανοσυνδεόμενη πρωτεΐνη. Αποτελείται από 287 αμινοξικά κατάλοιπα και φέρει μία υδρόφοβη επικράτεια στο αμινοτελικό άκρο και ένα υδρόφιλο τμήμα στο καρβοξυτελικό άκρο. Η πρωτεΐνη αυτή εισέρχεται στην λιπιδική διπλοστοιβάδα αλλά δεν τη διαπερνά και η καρβοξυτελική ουρά προβάλλει στο κυτταρόπλασμα (Salzer et al., 2007).

Στη μεμβράνη η στοματίνη σχηματίζει ολιγομερή και μπορεί να απαντάται συνδεδεμένη με διάφορα μόρια. Μία από τις λειτουργίες στις οποίες συμμετέχει είναι η επιλογή του μεταφερόμενου μορίου του μεταφορέα γλυκόζης GLUT-1, που συζητήθηκε παραπάνω, αλλά ο ρυθμιστικός της ρόλος δεν περιορίζεται σε αυτόν. Έχει βρεθεί πως η στοματίνη έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με άλλα σημαντικά κανάλια (ζώνη 3, υδατοπορίνη 1, αντλία  $Ca^{2+}$ ) ρυθμίζοντάς τα, αλλά και με περιφερικές της μεμβράνης πρωτεΐνες, όπως η συνεξίνη και η σορκίνη, μετά από αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου (Genetet et al., 2017)(Rungaldier et al., 2013). Τέλος, ο εντοπισμός της στοματίνης σε λιπιδικές σχεδίες, υποδηλώνει τη λειτουργία των ολιγομερών της ως θέσεις δημιουργίας παραδοικών πρωτεϊνικών συμπλόκων με κάποιες από τις πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν παραπάνω (Salzer et al., 2007).

#### ▪ CD47

Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη 50kDa η οποία διασχίζει τη μεμβράνη 5 φορές, φέρει ένα κυτοσολικό καρβοξυτελικό άκρο και μία εξωκυττάρια αμινοτελική επικράτεια παρόμοια με εκείνη των ανοσοσφαιρινών (Lindberg et al., 1993),(Brown et al., 2014). Παλαιότερα ήταν γνωστή ως σχετιζόμενη με την ιντεγκρίνη πρωτεΐνη. Κύριος ρόλος της στα ερυθροκύτταρα είναι ως σήμα «do not eat me», σήμα αναγνώρισης του εαυτού. Το παραπάνω επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης της CD47 με τον υποδοχέα SiRPa στην επιφάνεια των μακροφάγων, που δρα ως ανασταλτικό σήμα για τη φαγοκυττάρωση. Αλλαγές στη εξωκυττάρια δομή της πρωτεΐνης ή απουσία της είναι ικανές να προκαλέσουν την απομάκρυνση του ερυθροκυττάρου από την κυκλοφορία, πράγμα που θα συζητηθεί παρακάτω (Oldenborg, 2004).



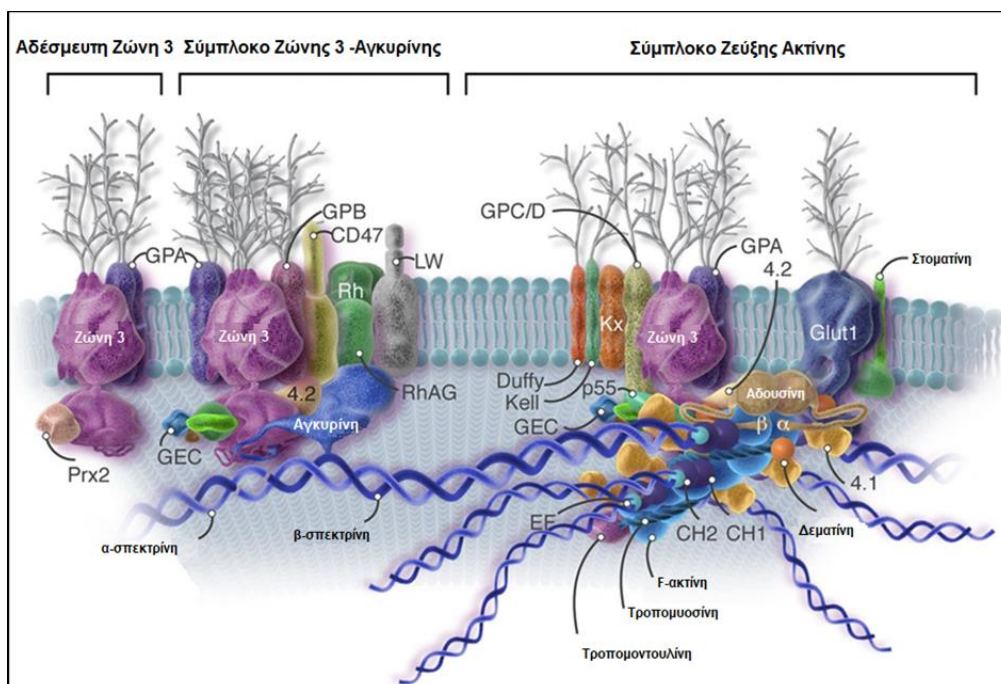
### ▪ Οικογένεια πρωτεϊνών Rh

Η οικογένεια των πρωτεϊνών Rh απαρτίζεται από 3 μέλη. Τα δύο από αυτά φέρουν αντιγόνα του συστήματος Rhesus, και ονομάζονται RhD και RhCE. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες αποτελούνται από 417 αμινοξέα και έχουν βάρος 30kDa. Διαπερνούν τη μεμβράνη 12 φορές και φέρουν αμινοτελικές και καρβοξυτελικές ουρές στο κυτοσόλιο (Avent & Reid, 2000). Η πρωτεΐνη D είναι αυτή που καθορίζει το θετικό ή αρνητικό Rhesus φαινότυπο, καθώς το αντιγόνο D είναι ο τύπος με την υψηλότερη αντιγονικότητα. Η πρωτεΐνη RhCE φέρει ταυτόχρονα 2 αντιγονικούς επιτόπους, έναν στην δεύτερη εξωκυττάρια θηλιά για C/c και έναν στην τέταρτη θηλιά για E/e. Τα δύο μόρια, RhD και RhCE διαφέρουν μόνο σε 30-35 αμινοξέα, αλλά παρά την υψηλή ομολογία τους δεν εκφράζουν τα μεν C/c ή E/e αντιγόνα και τα δε D (Choate, 2018).

Τα αντιγόνα D, C, c, E, e εκφράζονται στην μεμβράνη του ερυθροκυττάρου μόνο εάν συνεκφράζονται με την γλυκοπρωτεΐνη RhAG. Η πρωτεΐνη RhAG είναι κατά 40% όμοια με τις RhD και RhCE. Αποτελείται από 407 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 50kDa. Όπως και οι άλλες διαπερνά τη μεμβράνη 12 φορές και φέρει διακλαδιζόμενες γλυκοζυλιώσεις (Avent & Reid, 2000).

### A3.2.3. Σκελετικές πρωτεΐνες

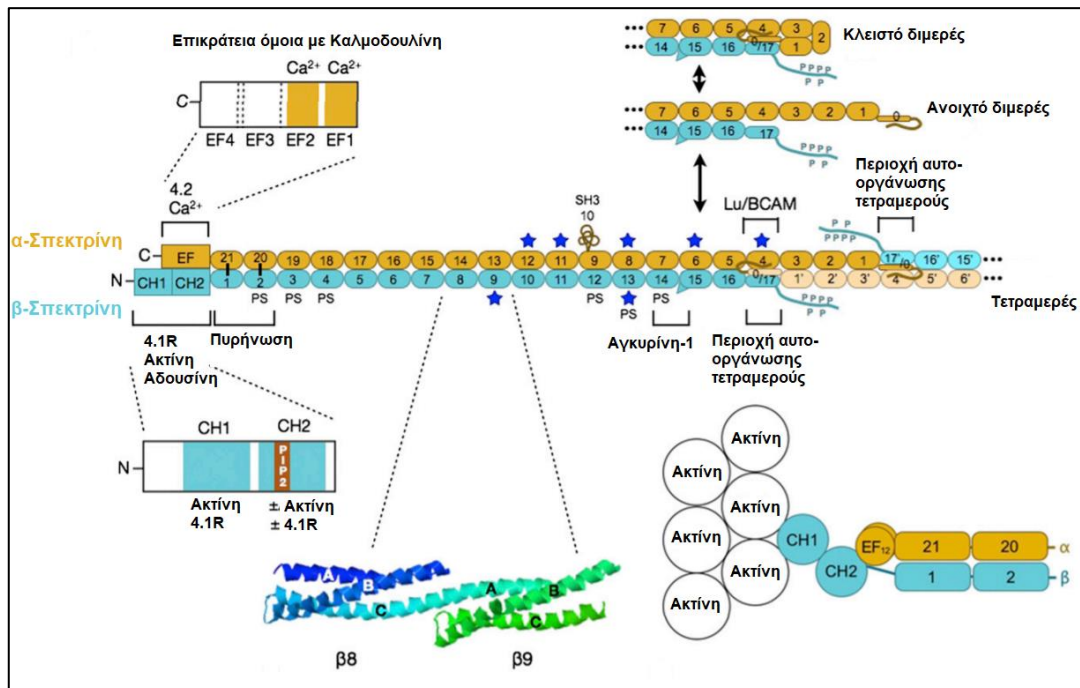
Ο κυτταροσκελετός του ερυθροκυττάρου είναι μία πολύπλοκη υπερμοριακή δομή που σε συνδυασμό με την μεμβράνη προσφέρει στα ερυθροκύτταρα την ανθεκτικότητα και την παραμορφωσιμότητά τους. Οργανώνεται σε ένα ψευδο-εξαγωνικό πλέγμα που σχηματίζεται από τετραμερή μόρια σπεκτρίνης που ενώνονται μεταξύ τους μέσω νηματιών ακτίνης και άλλων συνδετικών πρωτεϊνών, ώστε να σχηματιστεί το δισδιάστατο πλέγμα (Liu et al., 1987). Η σύνδεσή του με την μεμβράνη γίνεται χάρη σε κάθετες αλληλεπιδράσεις μέσω άλλων μορίων, που σχηματίζουν δύο σημαντικά σύμπλοκα, το σύμπλοκο ζώνης 3-αγκυρίνης και το σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης (Lux, 2016). Κάθε τρίγωνο που σχηματίζει το πλέγμα φέρει ένα σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης στην κάθε κορυφή του και ένα σύμπλοκο αγκυρίνης στην κάθε πλευρά του (Gokhin & Fowler, 2016). Τόσο οι παραπάνω πρωτεΐνες ή σύμπλοκα όσο και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις αναλύονται παρακάτω.



Εικόνα 6: Οργάνωση πρωτεϊνών της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού. Ανατύπωση από Lux S.E., 2016

## ▪ Σπεκτρίνη

Η σπεκτρίνη είναι το κύριο δομικό συστατικό του κυτταροσκελετού. Δημιουργεί μεγάλα εύκαμπτα νημάτια που διατάσσονται σε ένα πενταγωνικό ή εξαγωνικό πλέγμα. Η στερεοδιάταξή της είναι πολύπλοκη και ξεκινά με ένα ετεροδιμερές αλυσίδων σπεκτρίνης (α- και β- σπεκτρίνη) με αντιπαράλληλη διάταξη (McGough & Josephs, 1990). Οι δύο αυτές αλυσίδες περιέχουν μία σειρά επαναλήψεων, 21 στην α-σπεκτρίνη και 16 στην β-σπεκτρίνη (Shotton et al., 1979), αριθμημένες από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο (Speicher & Marchesi, 1984; Yan et al., 2016). Η συγκρότηση του διμερούς πραγματοποιείται χάρη σε ισχυρές ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των επαναλήψεων 19 και 20 της α-σπεκτρίνης και των 1 και 2 της β-σπεκτρίνης. Εν συνεχεία, δύο από αυτά τα διμερή απαιτούνται για να σχηματιστεί ένα ετερο-τετραμερές των αλυσίδων, που αποτελεί και το βασικό μόριο από το οποίο δομείται ο κυτταροσκελετός. Το ετερο-τετραμερές σχηματίζεται μέσω πλευρικών αλληλεπιδράσεων των διμερών σε μία τριπλή περιέλιξη, στην οποία συμμετέχουν το αμινοτελικό άκρο της μίας α-αλυσίδας, και τα καρβοξυτελικά άκρα των δύο β-αλυσίδων που χαρακτηρίζονται και ως Α, Β, C. Το άλλο άκρο το διμερούς μπορεί να συμμετάσχει στη συγκρότηση συμπλόκων με άλλες σκελετικές πρωτεΐνες, όπως το σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης (Lux, 2016).



Εικόνα 7: Η αυτό-οργάνωση των νημάτων της σπεκτρίνης. Ανατύπωση από Lux S.E., 2016

## ▪ Αγκυρίνη

Πρόκειται για μία πρωτεΐνη 1881 αμινοξικών καταλοίπων, που σχηματίζει 3 βασικές λειτουργικές περιοχές. Η πρώτη, που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο αποτελείται από μία σειρά 24 επαναλήψεων. Σχηματίζει μία ανοιχτή έλικα και είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της αγκυρίνης σε τετραμερή της ζώνης 3 στη μεμβράνη. Η δεύτερη περιοχή, είναι επιφορτισμένη με την πρόσδεση σε τετραμερή νημάτια σπεκτρίνης του υποκείμενου κυτταροσκελετού. Η σύνδεση πραγματοποιείται σε ένα ειδικό σημείο που δημιουργείται στην αλυσίδα της β-σπεκτρίνης μεταξύ των επαναλήψεων 14 και 15 (Lux, 2016). Τέλος, η τρίτη περιοχή είναι η καρβοξυτελική ουρά που βρίσκεται στο κυτοσόλιο και έχει ρυθμιστικό ρόλο. Ο βασικός της ρόλος, όπως μαρτυρά και το όνομά της είναι η αγκυροβόληση της σπεκτρίνης στην ζώνη 3, δηλαδή του κυτταροσκελετού στη μεμβράνη (Bennett & Baines, 2001).

- **Παλλιδίνη**

Η παλλιδίνη που συχνά αναφέρεται και ως πρωτεΐνη 4.2 απαντάται στο ερυθροκύτταρο με την ισομορφή 72 kDa. Φέρει χαρακτηριστικές τροποποιήσεις που την καθλώνουν στην εσωτερική στοιβάδα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Korsgren et al., 2010). Συγκεκριμένα, φέρει μια μυριστούλίωση σε μία γλυκίνη στο αμινοτελικό άκρο της (Risinger et al., 1992) και μια παλμιτυλίωση στην κυστεΐνη 203 (Das et al., 1994). Η παλλιδίνη αλληλεπιδρά τόσο με τη μεμβράνη όσο και με τον κυτταροσκελετό. Στη μεμβράνη προσδένεται στη ζώνη 3, ενώ στον κυτταροσκελετό στην αγκυρίνη. Το τριμερές αυτό σύμπλοκο συνδέει τον κυτταροσκελετό στην μεμβράνη. Έχει επίσης δειχθεί πως αλληλεπιδρά με το μόριο CD47 που συμμετέχει στο σύμπλοκο Rhesus, προσφέροντας πιθανόν ένα σημείο σύνδεσης με το σύμπλοκο ζώνης 3 και αγκυρίνης. Η σημασία της για την οργάνωση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης φαίνεται να είναι μεγάλη, εφόσον έλλειψη της προκαλεί σφαιροκυττάρωση (Satchwell et al., 2009).

- **Ακτίνη**

Η ακτίνη στα ερυθροκύτταρα απαντάται με τη μορφή κοντών πρωτονηματίων F-ακτίνης. Το κάθε ένα από τα πρωτονημάτια έχει τη δομή μίας διπλής έλικας, αποτελείται δηλαδή από δύο αλυσίδες. Οι αλυσίδες με τη σειρά τους σχηματίζονται από 6-8 μονομερή β-ακτίνης, με κατανάλωση GTP (Velia M. Fowler, 1996). Ο προσανατολισμός τους είναι σχεδόν παράλληλος στη μεμβράνη και τυχαίος (Picart & Discher, 1999), ενώ το μήκος τους παραμένει σταθερό χάρη στη δράση της τροπομυοσίνης. Ταυτόχρονα τα άκρα προστατεύονται από αποπολυμερισμό ή την περεταίρω επιμήκυνση από πρωτεΐνες καλύμματος των άκρων (Velia M. Fowler, 1996).

- **Τροπομυοσίνη**

Η τροπομυοσίνη στο ερυθροκύτταρο βρίσκεται με την μορφή διμερούς των ισομορφών α και γ- τροπομυοσίνης. Το κάθε διμερές δεσμεύει μία από τις δύο αλυσίδες της F-ακτίνης. Η δέσμευση αυτή είναι εξαρτώμενη από ιόντα  $Mg^{2+}$ . Η ράβδος που σχηματίζει το διμερές καλύπτει ακριβώς το μήκος των 6-8 μονομερών της ακτίνης (V. M. Fowler & Bennett, 1984). Το μήκος αυτό μαρτυρά πως η τροπομυοσίνη μαζί με την αδουσίνη και την τροπομοντουλίνη, για την οποία φέρει και θέση σύνδεσης, λειτουργούν ως ένα είδος «μοριακού χάρακα» για τη συγκρότηση των πρωτονηματίων ακτίνης, ενισχύοντας τα τελευταία μετά τη συγκρότηση (An et al., 2007).

- **Τροπομοντουλίνη 1**

Πρόκειται για μία πρωτεΐνη 40,6 kDa, που λειτουργεί ως κάλυμμα για το αργά αναπτυσσόμενο άκρο του πρωτονημάτιου ακτίνης (Yamashiro et al., 2012). Ένα μόριο τροπομοντουλίνης δεσμεύει ταυτόχρονα τα άκρα των δύο αλυσίδων της F-ακτίνης και τα άκρα των διμερών της τροπομυοσίνης (Rao et al., 2014). Η αλληλεπίδραση της με την τροπομοντουλίνη ενισχύει την σταθερότητα των νηματίων (Ursitti & Fowler, 1994).

- **Αδουσίνη**

Η αδουσίνη είναι μία πρωτεΐνη που απαντάται με τη μορφή ετεροδιμερούς α-αδουσίνης (81kDa) και β-αδουσίνης (80kDa), ενώ σπάνια αντί για β- υπάρχει η γ-αδουσίνη. Κάθε μία περιλαμβάνει μία σφαιρική κεφαλή και μία επιμήκη ουρά (Joshi et al., 1991). Στο ερυθροκύτταρο εμφανίζεται σε περίπου 30.000 αντίγραφα όπως και η τροπομοντουλίνη



(Lux, 2016). Σε αντίθεση όμως με αυτή, η αδουσίνη δρα ως κάλυμμα του ταχέως αυξανόμενου άκρου της F-ακτίνης (Hughes & Bennett, 1995).

Η αδουσίνη είναι πολύ σημαντική επίσης λόγω των συνδέσεων μεταξύ πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού αλλά και του κυτταροσκελετού με τη μεμβράνη τις οποίες προωθεί. Συγκεκριμένα, η αδουσίνη στρατολογεί μόρια σπεκτρίνης τα οποία συνδέει με τα πρωτονημάτια ακτίνης. Η στρατολόγηση αυτή ενισχύει την κάλυψη της ακτίνης κατά 10 φορές (Hughes & Bennett, 1995). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές καθίστανται δυνατές χάρη σε μία επικράτεια στο άκρο της κυτοσολικής ουράς της αδουσίνης, που ρυθμίζεται από το ασβέστιο μέσω της καλμοδουλίνης και αποτελεί στόχο πρωτεϊνικών κινασών (X. Li & Bennett, 1996). Παράλληλα, αλληλεπιδρά με τη ζώνη 3 και τον μεταφορέα της γλυκόζης, αγκυροβολώντας το σύμπλοκο σπεκτρίνης-ακτίνης στη μεμβράνη. Η περιοχή σύνδεσής της στη ζώνη 3 βρίσκεται επίσης στις κυτοσολικές ουρές των μονομερών (Anong et al., 2009).

#### ▪ Δεματίνη

Η δεματίνη είναι μία πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού που σχετίζεται με την ακτίνη. Στην μεμβράνη βρίσκεται με τη μορφή τριμερούς. Αποτελείται από δύο πολυπεπτίδια 48kDa και ένα 52 kDa. Η σύνδεσή της με την ακτίνη είναι δυνατή χάρη σε δύο θέσεις δέσμησης, μία στην κεφαλή του μορίου και μία στην ουρά (Rana et al., 1993). Η αναλογία δεματίνης και πρωτονηματίου ακτίνης είναι 1:1 (Lux, 2016).

Ένας ακόμη ρόλος της δεματίνης είναι η ενίσχυση της αλληλεπίδρασης σπεκτρίνης-ακτίνης. Η προώθηση της αλληλεπίδρασης αυτής πραγματοποιείται μέσω πρόσδεσης της δεματίνης στην σπεκτρίνη (Koshino et al., 2012). Έχει βρεθεί πως η πρόσδεση στην σπεκτρίνη ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) (Chen et al., 2013). Τέλος, η δεματίνη έχει την ικανότητα να συνδέεται και στον μεταφορέα γλυκόζης (GLUT-1) δημιουργώντας άλλο ένα σημείο αγκυροβόλησης του κυτταροσκελετού στη μεμβράνη (Khan et al., 2008).

#### ▪ Πρωτεΐνη 4.1 R

Η πρωτεΐνη 4.1 R βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα ως ισομορφή 80kDa. Ο ρόλος της είναι πολύ σημαντικός για την οργάνωση του κυτταροσκελετού. Όσον αφορά στη δομή της, μετά από πέψη με χυμοθρυψίνη έχει βρεθεί πως προκύπτουν τέσσερα θραύσματα, εκ των οποίων τα δύο έχουν μεγάλη λειτουργική σημασία και χαρακτηρίζονται το πρώτο στο αμινοτελικό άκρο ως FERM και το δεύτερο ως περιοχή SABD (Lux, 2016).

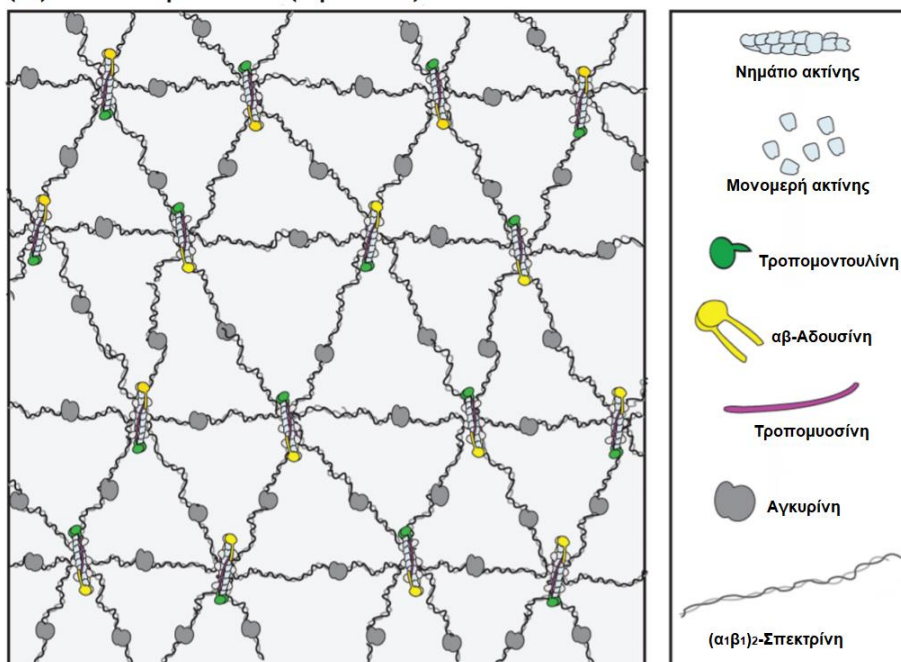
Η περιοχή SABD (spectrin-actin binding domain) έχει μοριακό βάρος 10kDa και αποτελείται από τρεις περιοχές σε σειρά στο ίδιο πολυπεπτίδιο. Η κεντρική περιοχή είναι υπεύθυνη για τη δέσμηση της ακτίνης και εκατέρωθεν αυτής υπάρχουν περιοχές για πρόσδεση σπεκτρίνης. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι εξαιρετικά σημαντικές λόγω του ότι η σπεκτρίνη και η ακτίνη υπό φυσιολογικές συνθήκες έχουν χαμηλή συγγένεια. Η πρωτεΐνη 4.1 R, όμως, δρα ως συνδέτης των δύο, ενισχύοντας τον υπομεμβρανικό σκελετό (Ohanian et al., 1984).

Η περιοχή FERM είναι μία δομική και λειτουργική περιοχή, κοινή σε μία οικογένεια πρωτεϊνών από τις οποίες παίρνει και το όνομά της (4.1/ezrin/radixin/moesin). Η περιοχή οργανώνεται σε τρεις σφαιρικούς λοβούς, που ονομάζονται α, N και C. Στον λοβό α προσδένει τη γλυκοφορίνη C, στον N τη ζώνη 3 και στον λοβό C την πρωτεΐνη p55 (Han et al., 2000). Ανάμεσα στους τρεις λοβούς σχηματίζονται δύο περιοχές οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη δέσμηση της καλμοδουλίνης. Η συσχέτιση αυτών των πρωτεϊνών με την 4.1R βοηθά τη σύνδεση του κυτταροσκελετού στη μεμβράνη (Nunomura et al., 2011).

## ▪ Πρωτεΐνη p55

Η πρωτεΐνη p55 (γνωστή και ως palmitoylated membrane protein) είναι μία παλμιτυλιωμένη πρωτεΐνη, 52,3 kDa η οποία χάρη σε αυτή την τροποποίηση απαντάται στην κυτοσολική πλευρά της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Ruff et al., 1991). Η δομή της περιλαμβάνει περιοχές που χρησιμεύουν στην πρόσδεσή της σε άλλες σκελετικές πρωτεΐνες, όπως η περιοχή PDZ, που δεσμεύεται στην καρβοξυτελική περιοχή της γλυκοφορίνης C, και η περιοχή πρόσδεσης με τον λοβό C της πρωτεΐνης 4.1 R. Άλλες δομικές περιοχές της που έχουν βρεθεί είναι μία συντηρημένη περιοχή SH3 και μία περιοχή με δράση κινάσης στο καρβοξυτελικό της άκρο (A. C. Kim et al., 1996). Η συμμετοχή της στο τριμερές σύμπλοκο με την γλυκοφορίνη C και την πρωτεΐνη 4.1 R είναι καθοριστική για τη σύνδεση σκελετού και μεμβράνης (Marfatia et al., 1994).

### A3.2.4. Πρωτεϊνικά σύμπλοκα μεμβράνης



**Εικόνα 8:** Το ψευδο-εξαγωνικό πλέγμα του κυτταροσκελετού. Ανατύπωση από: Gokhin & Fowler, 2016

## ▪ Σύμπλοκο Rhesus

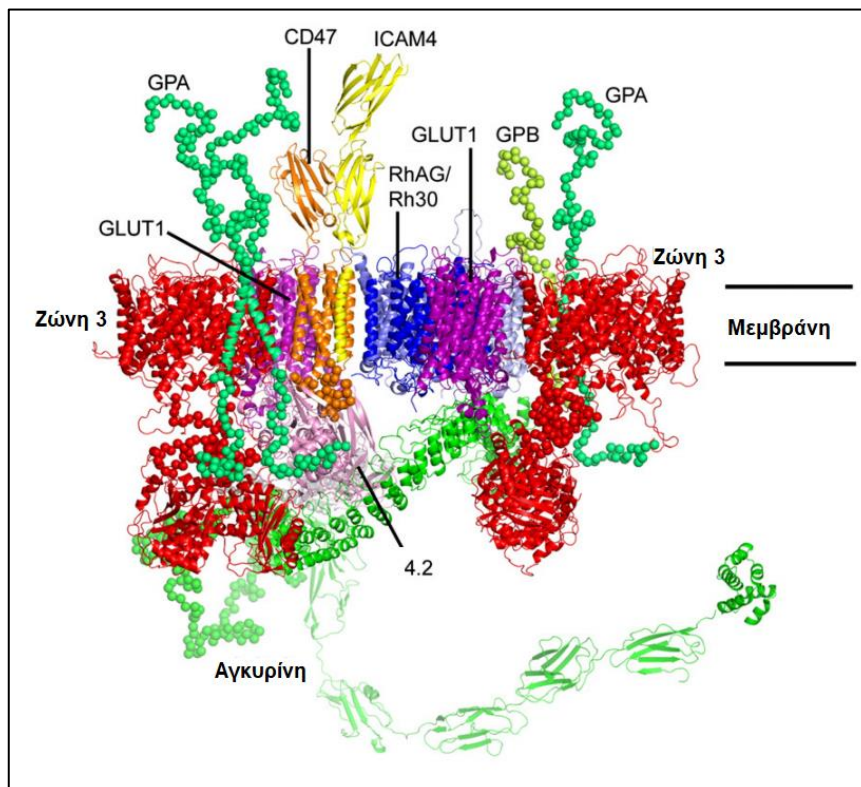
Το σύμπλοκο Rhesus αποτελείται από πρωτεΐνες της οικογένειας Rh, συνήθως δύο μόρια RhAG και 2 RhD ή RhCE, που οργανώνονται σε ένα τετραμερές. Στο μεμβρανικό σύμπλοκο λαμβάνουν ακόμη μέρος ορισμένες βοηθητικές πρωτεΐνες, όπως η πρωτεΐνη LW. Η πρωτεΐνη LW (γνωστή και ως ICAM-4) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που διαπερνά τη μεμβράνη μία φορά και φαίνεται να είναι συνδέτης της β2 ιντεγκρίνης, LFA-1. Μία επιπλέον βοηθητική πρωτεΐνη που συμμετέχει στο σύμπλοκο είναι η CD47 που συζητήθηκε παραπάνω. Έχει βρεθεί πως το σύμπλοκο αλληλεπιδρά ακόμη με τη γλυκοφορίνη B και τη ζώνη 3 (C. Le Van Kim et al., 2006).

## ▪ Σύμπλοκο ζώνης 3 – Αγκυρίνης

Το σύμπλοκο ζώνης 3 – αγκυρίνης που συζητήθηκε παραπάνω πως βρίσκεται στις πλευρές των τριγώνων που σχηματίζονται από τον υπομεμβρανικό σκελετό είναι ένα σημαντικό σύμπλοκο που λαμβάνει μέρος στις κάθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ σκελετού και μεμβράνης. Στο σύμπλοκο όπως είναι αναμενόμενο συμμετέχουν τόσο μεμβρανικές όσο και σκελετικές πρωτεΐνες σε συγκεκριμένες στοιχειομετρικές αναλογίες, οι οποίες είναι δυνατό

να υπολογιστούν από την αφθονία των μορίων στην μεμβράνη (Gokhin & Fowler, 2016; Lux, 2016).

Στο σύμπλοκο της ζώνης 3-αγκυρίνης λοιπόν, συμμετέχει 1 τετραμερές μόριο της ζώνης 3, που δρα ως πυρήνας καθώς οι κυτταροσολικές περιοχές της είναι ικανές να προσδένουν μία ποικιλία μορίων. Στο σύμπλοκο βρίσκονται ορισμένες επιπλέον διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, δηλαδή δύο ετερο- ή ομοδιμερή γλυκοφορίνης A ή B και ένα σύμπλοκο Rhesus. Στοιχεία του κυτταροσκελετού που συμμετέχουν σε αυτό το σύμπλοκο είναι δύο μόρια παλλιδίνης και ένα μόριο αγκυρίνης. Η παλλιδίνη ενώνει την ζώνη 3 με την αγκυρίνη και η αγκυρίνη με τη σειρά της με μόρια σπεκτρίνης. Τέλος, στο σύμπλοκο είναι δυνατή αλλά όχι απαραίτητη η συμμετοχή γλυκολυτικών ενζύμων τα οποία συμπλοκοποιούνται στην αμινοτελική κυτταροσολική ουρά της ζώνης 3. Η σημασία των τελευταίων για το μεταβολισμό θα συζητηθεί παρακάτω (Mankelov et al., 2012).



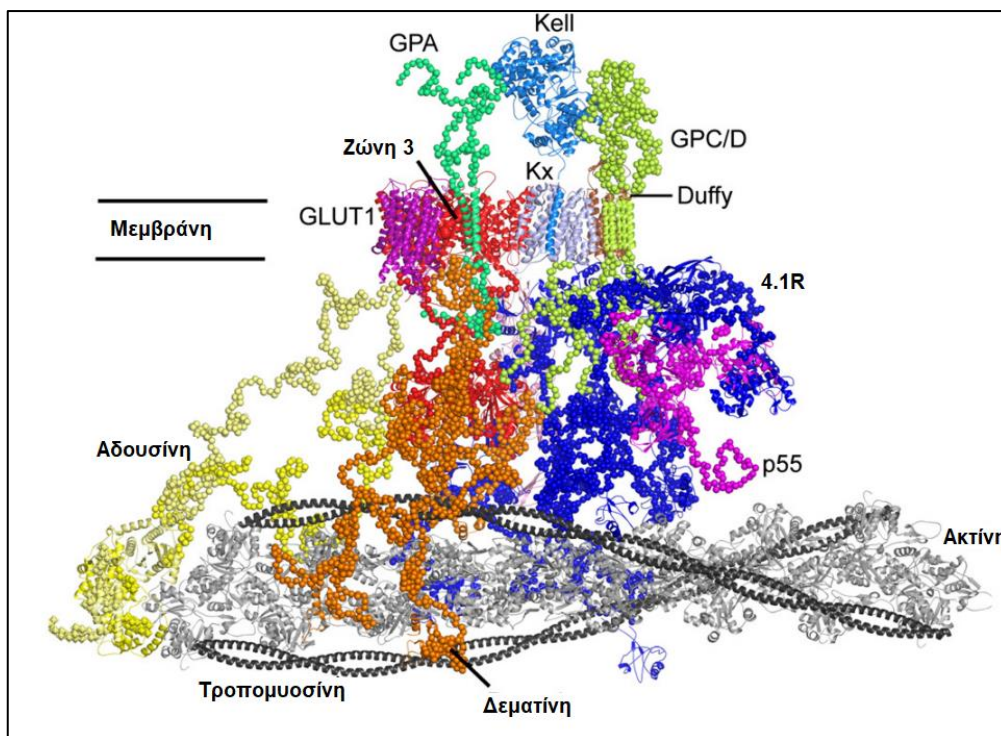
Εικόνα 9: Το σύμπλοκο ζώνης 3 – αγκυρίνης. Ανατύπωση από Mankelov et al., 2012

#### ▪ Σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης

Το σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης είναι ένα πολύπλοκο σύμπλοκο το οποίο βρίσκεται στις κορυφές των τριγώνων που σχηματίζει ο κυτταροσκελετός (Gokhin & Fowler, 2016). Οι συνδέσεις που προσφέρει το σύμπλοκο αυτό είναι σημαντικές και καθίστανται δυνατές μέσω αλληλεπιδράσεων πολλών πρωτεϊνών του σκελετού και της μεμβράνης. Ο ρόλος που εξυπηρετεί όπως και το σύμπλοκο αγκυρίνης είναι η σύνδεση του δισδιάστατου πλέγματος του κυτταροσκελετού στη μεμβράνη.

Στο σύμπλοκο συμμετέχουν από πλευράς του κυτταροσκελετικού πλέγματος έξι μόρια σπεκτρίνης, έξι μόρια πρωτεΐνης 4.1 και ένα μόριο ακτίνης, που σαν υποσύνολο οργανώνουν τον κυτταροσκελετό στη μορφή του εξαγωνικού πλέγματος. Άλλες πρωτεΐνες που απαρτίζουν το σύμπλοκο είναι ένα μόριο αδουσίνης, ένα τριμερές μόριο δεματίνης, ένα μόριο της πρωτεΐνης p55, καθώς και ορισμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως η ζώνη 3, οι γλυκοφορίνες A, C ή D και ο μεταφορέας γλυκόζης (GLUT-1) (Lux, 2016). Οι συνδέσεις

λοιπόν μεταξύ της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού είναι πολλαπλές σε αυτό το σύμπλοκο. Η πρωτεΐνη 4.1 R που μέσω τις περιοχής SABD προσδέει τη σπεκτρίνη και την ακτίνη, ταυτόχρονα είναι ικανή μέσω του λοβού N της περιοχής FERM να συνδέεται με τη ζώνη 3. Αλληλοεπιδρά, επιπλέον, με την γλυκοφορίνη C μέσω του λοβού α της περιοχής FERM (Han et al., 2000). Η αλληλεπίδραση αυτή ισχυροποιείται ακόμη από την πρωτεΐνη p55 η οποία προσδέεται και στις δύο αυτές πρωτεΐνες (Marfatia et al., 1994). Τέλος, οι πρωτεΐνες αδουσίνη και δεματίνη μπορούν να σχηματίζουν ακόμη ένα μικρότερο σύμπλοκο που συνδέει τη μεμβράνη με τον κυτταροσκελετό μέσω του μεταφορέα γλυκόζης (GLUT-1) (Anong et al., 2009).



**Εικόνα 10:** Το σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης. Ανατύπωση από Mankelov et al., 2012

Τα δύο σύμπλοκα, αγκυρίνης και ζεύξης ακτίνης, ανταγωνίζονται για την ζώνη 3 που βρίσκεται στη μεμβράνη. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στο σύμπλοκο αγκυρίνης συμμετέχουν τετραμερή της ζώνης 3, ενώ στο σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης συμμετέχουν ίσως διμερή της. Από αυτό μπορεί κανείς να συμπεράνει πως στην μεμβράνη υπάρχουν τουλάχιστον δύο υποπληθυσμοί ζώνης 3, ένας που συνδέεται με αγκυρίνη και ένας που συνδέεται με πρωτεΐνη 4.1. Τέλος, ένας επιπλέον υποπληθυσμός καθορίζεται από την σύνδεση της ζώνης 3 με την αδουσίνη. Η συμμετοχή της ζώνης 3 παρόλα αυτά, στο σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης δεν είναι στοιχειομετρικά βέβαιη. Η πιο πιθανή εκδοχή είναι πως στο σύμπλοκο συμμετέχουν τρία ή έξι διμερή ζώνης 3 ικανά να αλληλοεπιδράσουν και με τα έξι μόρια 4.1 και σπεκτρίνης (Lux, 2016).

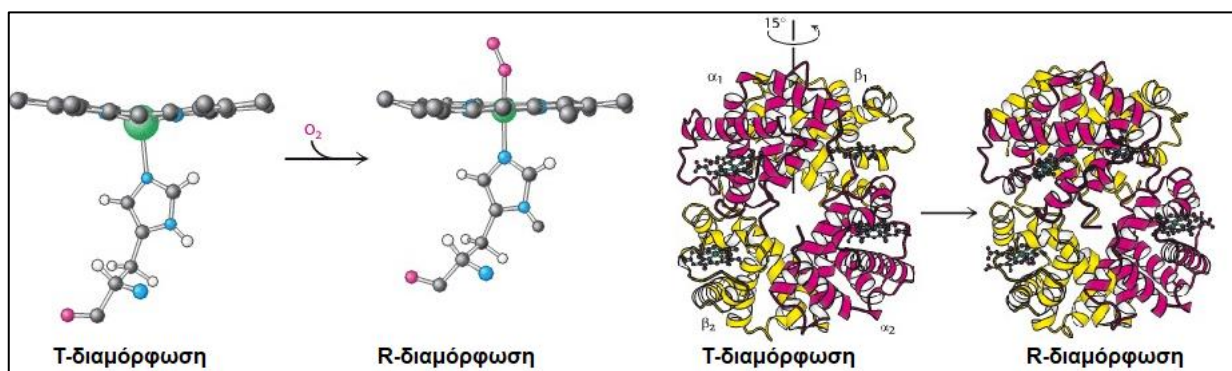
### A3.2.5. Κυτοσολικές πρωτεΐνες

- **Αιμοσφαιρίνη (HbA)**

Η αιμοσφαιρίνη είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου, καθώς αποτελεί έως και το 97% της ολικής πρωτεϊνικής μάζας του. Η δομή της είναι συντηρημένη στο ζωικό βασίλειο. Έχει μοριακό βάρος 67kDa και αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, η κάθε μία 17kDa. Πρόκειται για δύο α αλυσίδες, 141 αμινοξέων και δύο β αλυσίδες, 146 αμινοξέων. Κάθε μία από τις αλυσίδες είναι συνδεδεμένη με μία ομάδα αίμης, που αποτελείται από ένα δακτύλιο πορφυρίνης και ένα άτομο σιδήρου (Perutz et al., 1987).



Το άτομο του σιδήρου φέρει έξι θέσεις δέσμευσης εκ των οποίων οι τέσσερις καταλαμβάνονται από άτομα αζώτου στον πορφυρινικό δακτύλιο. Η πέμπτη αλληλεπιδρά με ένα κατάλοιπο ιστιδίνης της  $\alpha$  ή  $\beta$  αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης. Στην κατάσταση της δεοξυαιμοσφαιρίνης η έκτη θέση παραμένει κενή και η στερεοδιάταξη του σιδήρου και του δακτυλίου της πορφυρίνης σχηματίζει ένα T. Γι' αυτό η μορφή αυτή ονομάζεται T μορφή και ο σίδηρος βρίσκεται ελαφρά εκτός του επιπέδου της πορφυρίνης. Η πρόσδεση οξυγόνου στην έκτη θέση του σιδήρου, αναδιατάσσει το ηλεκτρονιακό του νέφος με αποτέλεσμα ο σίδηρος να εισέρχεται στην κοιλότητα που σχηματίζει ο δακτύλιος, έλκοντας μαζί του τον ιμιαζολικό δακτύλιο του καταλοίπου ιστιδίνης. Η νέα στερεοδιαμόρφωση που προκύπτει ονομάζεται R. Η ιστιδίνη με τη σειρά της προκαλεί αλλαγή της τοπολογίας μίας  $\alpha$ -έλικας στη μία από τις τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες στην οποία συμμετέχει (Berg et al., 2002). Η αλλαγή αυτή επηρεάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ  $\alpha\beta$  αλυσίδων αλλάζοντας την στερεοδιαμόρφωσή τους, ώστε να αυξάνεται η συγγένειά τους για το οξυγόνο. Με τον τρόπο αυτό, η πρόσδεση οξυγόνου σε μία υπομονάδα προωθεί την πρόσδεσή του και στις υπόλοιπες, καθιστώντας αποτελεσματικότερη τη μεταφορά του (Cassoly & Gibson, 1975).



**Εικόνες 11:** Η αλλαγή στη διαμόρφωση της αίμης και της αιμοσφαιρίνης μετά την πρόσδεση ενός μορίου οξυγόνου. Ανατύπωση από Berg et al., 2002

Η αποτελεσματική μεταφορά του οξυγόνου προϋποθέτει επίσης την ικανότητα διάχυσής του προς τους ιστούς (Perutz, 1978). Η ρύθμιση της απελευθέρωσης του οξυγόνου προς τους ιστούς είναι επίσης πολύπλοκη. Σχετίζεται με την μείωση της συγγένειας της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο μέσω διαφόρων μορίων. Κάποια από αυτά είναι το  $\text{CO}_2$ , τα ιόντα  $\text{Cl}^-$  και το 2,3-δισφωφογλυκερινικό οξύ (Mairbäurl & Weber, 2012). Ο ρόλος της αιμοσφαιρίνης στην ρύθμιση της γλυκόλυσης θα αναλυθεί εκτενώς στην παράγραφο που αφορά στο μεταβολισμό.

#### ▪ Υπεροξειρεδοξίνη 2 (Prx2)

Η υπεροξειρεδοξίνη 2 είναι από τις πιο άφθονες κυτοσολικές πρωτεΐνες του ερυθροκυττάρου και αριθμεί 15 εκατομμύρια αντίγραφα στο κύτταρο. Ανήκει στην οικογένεια των υπεροξειρεδοξινών, που έχουν ως στόχο την εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Hall et al., 2009). Συγκεκριμένα, ανήκει στο υποσύνολο των 2-Cys-υπεροξειρεδοξινών λόγω των δύο καταλοίπων κυστεΐνης που συμμετέχουν στη δημιουργία δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ δύο μορίων της πρωτεΐνης, που αποτελούν μέρος ενός διμερούς, όταν αυτά οξειδωθούν. Το ενεργό κέντρο του μορίου, το οποίο βρίσκεται προστατευμένο σε μία κλειστή διαμόρφωση, περιέχει ένα δραστικό κατάλοιπο κυστεΐνης, Cys51. Μετά την οξείδωση του μορίου, με ταυτόχρονη αναγωγή ενός υπεροξειδίου, η στερεοδιάταξη αλλάζει σε μία ανοιχτή διαμόρφωση, την οποία ακολουθεί ο σχηματισμός δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ του καταλοίπου Cys51 και του καταλοίπου Cys172 του δεύτερου μορίου του ομοδιμερούς. Ο δισουλφιδικός δεσμός ανάγεται από την θειορεδοξίνη,

η οποία ανακυκλώνεται από την αναγωγή της θειορεδοξίνης με δότη ηλεκτρονίων το NADPH. Η επανενεργοποίησή της μέσω της θειορεδοξίνης στα ερυθροκύτταρα πραγματοποιείται με χαμηλό ρυθμό (F. M. Low et al., 2007).

Στο κυτοσόλιο η υπεροξειρεδοξίνη 2 απαντάται συχνά με τη μορφή ολιγομερών, συνήθως δεκαμερών, που είναι κατ' ουσία πέντε συμπλοκοποιημένα διμερή που σχηματίζουν έναν δακτύλιο. Όταν κληθούν να αντιμετωπίσουν υπεροξειδία τα διμερή αποσυνδέονται από τη μορφή του δεκαμερούς. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίων η υπεροξειρεδοξίνη είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπισή τους, αλλά σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις μπορεί να οξειδωθεί το ίδιο το μόριο, καθιστώντας το ανίκανο να αναγάγει άλλα υπεροξειδία. Το ερυθροκύτταρο, όμως, διαθέτει κι άλλα αντιοξειδωτικά πρωτεϊνικά μόρια, όπως η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης GPx (Hall et al., 2009).

Οι σημαντικές λειτουργίες με τις οποίες έχει συνδεθεί η υπεροξειρεδοξίνη 2 στο ερυθροκύτταρο είναι πολλές. Αρχικά, τα ερυθροκύτταρα είναι πλήρη αιμοσφαιρίνης και επομένως οξυγόνου, και η πρώτη είναι ικανή να αυτοοξειδώνεται. Η παρουσία της υπεροξειρεδοξίνης 2, λοιπόν, είναι σημαντική για την εξάλειψη των  $O_2^-$  και  $H_2O_2$  που προκύπτουν από αυτή την αυτοοξείδωση (F. M. Low et al., 2008). Επιπλέον, η υπεροξειρεδοξίνη 2 έχει την ικανότητα να συνδέεται στη μεμβράνη για την εξουδετέρωση ορισμένων λιπιδικών υπεροξειδίων που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της μεμβράνης με την αιμοσφαιρίνη (Rocha et al., 2009). Η μετακίνησή της στην μεμβράνη έχει συνδεθεί ακόμη με την προστασία της ζώνης 3 από οξειδωτικά συμβάντα μέσω σύνδεσης με τη αμινοτελική ουρά της (Matte et al., 2013). Άλλες λειτουργίες της που έχουν διερευνηθεί είναι η εξαρτώμενη από ασβέστιο ( $Ca^{2+}$ ) εμπλοκή της στη ρύθμιση της εκροής ιόντων καλίου ( $K^+$ ) μέσω των καναλιών Gardos, αλλά και η δράση της ως μοριακή συνοδός, για την ανάκτηση της λειτουργικής διαμόρφωσης πρωτεϊνών που έχουν δεχθεί οξείδωση. Η τελευταία αυτή λειτουργία διενεργείται από δακτυλίους δεκαμερών και δεν είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται μέσω της καταλυτικής δράσης της υπεροξειρεδοξίνης 2.

#### ▪ **HSP70**

Οι HSP70 είναι μία υποοικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP: Heat Shock Proteins) με μοριακό βάρος 70kDa, που δρουν ως μοριακές συνοδοί μη ή λάθος αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (Kästle & Grune, 2012). Όσον αφορά στη δομή τους, αποτελούνται από μία SBD υπομονάδα (Substrate Binding Domain) στην οποία προσδένεται το υπόστρωμα, και μία NBD υπομονάδα (Nucleotide Binding Domain) όπου δεσμεύει ATP ή ADP για τη ρύθμιση της δράσης. Οι δύο υπομονάδες συνδέονται με μία συντηρημένη αλληλουχία συνδέτη. Η υπομονάδα SBD δεν έχει ειδικότητα για συγκεκριμένο μόριο, αλλά αναγνωρίζει μάλλον γενικότερα μη αναδιπλωμένα μοτίβα πρωτεϊνών, καθιστώντας την HSP70 ικανή να αλληλεπιδρά με μία ποικιλία υποστρωμάτων (Mayer, 2010).

Στα ώριμα ερυθροκύτταρα η τοπολογία της HSP70 είναι υπό φυσιολογικές συνθήκες στο κυτοσόλιο. Έχει, όμως, παρατηρηθεί πως σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες ή άλλων καταπονήσεων μόρια HSP70 μεταναστεύουν στη μεμβράνη. Εκεί αλληλεπιδρούν με στοιχεία του κυτταροσκελετού για τη σταθεροποίησή τους (Gudi & Gupta, 1993). Κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης διαδραματίζει έναν ακόμη σημαντικό ρόλο, καθώς η παρουσία της είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την επιβίωση των ερυθροβλαστών (Hermine et al., 2013).

#### ▪ **Κλαστερίνη**

Πρόκειται για μία πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου που σχηματίζει ετεροδιμερές βάρους 75-80kDa το οποίο συγκρατείται από έναν δισουλφιδικό δεσμό. Η κλαστερίνη απαντάται τόσο στο εσωτερικό όσο και στο εξωτερικό της μεμβράνης αλλά και στο κυτοσόλιο (De Silva et al., 1990). Η κλαστερίνη έχει χαρακτηριστεί ως ένα είδος μοριακής συνοδού που δρα με ανεξάρτητο από το ATP τρόπο. Πιστεύεται πως αλληλεπιδρά με υδρόφοβες περιοχές πρωτεϊνών που έχουν μερικώς αποδιαταχθεί. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι ικανή να αναστείλει την συσσωμάτωση τους. Τέτοια μερικώς αποδιατεταγμένα, μη λειτουργικά μόρια αποτελούν η ζώνη 3, η αιμοσφαιρίνη και άλλες οξειδωμένες πρωτεΐνες (Poon et al., 2000). Η προστατευτική της δράση δεν περιορίζεται, όμως, στην αποφυγή συσσωμάτωσης και της κατακρήμνισης πρωτεϊνών. Επιπλέον, η κλαστερίνη, ή sCLU (secretory clusterin) όπως αναφέρεται εδώ, εμπλέκεται, σε γεγονότα μικροκυστιδιοποίησης, χάρη στα οποία τέτοια μόρια μπορούν να απομακρυνθούν παρατείνοντας τη ζωή του ερυθροκυττάρου. Λόγω της δράσης της σε αυτές τις διαδικασίες που προκαλούνται κατά τη γήρανση και την επίδραση οξειδωτικού στρες, έχει προταθεί ο χαρακτηρισμός της κλαστερίνης ως βιοδείκτη της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του ερυθροκυττάρου (Antonellou et al., 2011).

#### ▪ Καλπαΐνη 1

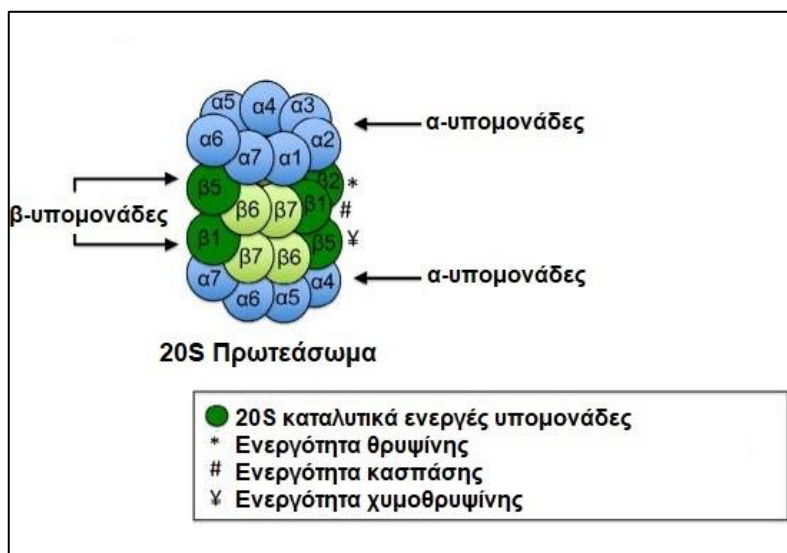
Η πρωτεΐνη αυτή (γνωστή και ως μ-καλπαΐνη) ανήκει σε μία μεγαλύτερη οικογένεια καλπαϊνών. Η συγκεκριμένη κωδικοποιείται από το γονίδιο *Carh1* και είναι η πιο άφθονη στο αιμοποιητικό και κυκλοφορικό σύστημα. Το όνομα της υποδηλώνει τη λειτουργία της. Πρόκειται για μια πρωτεάση κυστεΐνης όμοια με την παπαΐνη που εξαρτάται από το ασβέστιο. Αποτελείται από δύο υπομονάδες: η πρώτη έχει βάρος 80kDa και είναι η καταλυτική περιοχή, ενώ η δεύτερη φέρει μία θέση δέσμευσης ασβεστίου όμοια με αυτή της καλμοδουλίνης και έχει ρυθμιστικό ρόλο (Sorimachi & Suzuki, 2001). Η καλπαΐνη 1, απαντάται απενεργοποιημένη χάρη στη δράση ενός μορίου που ονομάζεται καλπαστατίνη που δρα ως ενδογενής αναστολέας διαφόρων καλπαϊνών (Dantas De Medeiros et al., 2002). Η αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου πυροδοτεί την ενεργοποίησή της που καταλύει την πρωτεόλυση διαφόρων μορίων (Goll et al., 2003). Οι λειτουργίες με τις οποίες έχει συνδεθεί περιλαμβάνουν τον σχηματισμό σωματίων Heinz μετά από πρωτεολυτική διάσπαση μορίων αιμοσφαιρίνης, τη διάσπαση της  $Ca^{2+}$ -ATPάσης στη μεμβράνη, που είναι υπεύθυνη για την εισροή ασβεστίου καθώς και τη διάσπαση της πρωτεϊνικής κινάσης C και επακόλουθη ρύθμιση ορισμένων φωσφορυλιώσεων μεμβρανικών πρωτεϊνών (Wieschhaus et al., 2012).

#### ▪ Πρωτεάσωμα

Το πρωτεάσωμα είναι ένα υπερμοριακό σύμπλοκο με σχήμα κοίλου κυλίνδρου, ρόλος του οποίου είναι η καταστροφή πρωτεϊνών που έχουν δεχθεί αλλοιώσεις και λόγω αυτού έχουν μερικώς ή πλήρως αποδιαταχθεί ή διασπαστεί. Αποτελείται τυπικά από ένα κεντρικό στοιχείο με συντελεστή καθίζησης 20S και βάρος περίπου 750kDa και ένα ή δύο ρυθμιστικά στοιχεία 19S που συνδέονται στα δύο άκρα του 20S για να σχηματιστεί το 26S πρωτεάσωμα. Οι ρυθμιστικές αυτές περιοχές είναι σημαντικές για την αναγνώριση πολυουβικιτινυλιωμένων, σημασμένων δηλαδή για καταστροφή, πρωτεϊνών, και τις οδηγούν στο πρωτεολυτικό τμήμα στο εσωτερικό του 20S κυλίνδρου. Τα 19S στοιχεία περιέχουν υπομονάδες που λειτουργούν ως ATP-άσες για την εκτέλεση των λειτουργιών αυτών και επομένως το 26S πρωτεάσωμα είναι ATP-εξαρτώμενο (Tanaka, 2009).

Το 20S πρωτεάσωμα αποτελείται από δύο ακραίους α-δακτυλίους και δύο κεντρικούς β-δακτυλίους. Ο καθένας περιλαμβάνει επτά υπομονάδες, ώστε τελικά η δομή να είναι α(1-

7),β(1-7),β(1-7),α(1-7). Τρεις από τις επτά υπομονάδες των β-δακτυλίων φέρουν καταλυτικά ενεργά κατάλοιπα θρεονίνης στο αμινοτελικό τους άκρο στα οποία οφείλεται η υδρολυτική τους ικανότητα. Συγκεκριμένα οι υπομονάδες β1, β2 και β5 επιδεικνύουν ενεργότητα κασπάσης, θρυψίνης και χυμοθρυψίνης με ικανότητα να υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς στο καρβοξυτελικό άκρο όξινων, βασικών και υδρόφοβων καταλοίπων, αντίστοιχα. Τα ζεύγη αυτών των τριών ενεργών κέντρων βρίσκονται εντός της κοιλότητας που σχηματίζεται από τους δύο β-δακτυλίους. Από μελέτες κρυσταλλογραφίας έχει βρεθεί πως το κέντρο των α-δακτυλίων είναι σχεδόν εντελώς κλειστό. Η πρόσβαση στον καταλυτικό λοιπόν θάλαμο είναι περιορισμένη λόγω της έκτασης των αμινοτελικών ουρών των υπομονάδων των α-δακτυλίων προς το εσωτερικό (Rousseau & Bertolotti, 2018).



**Εικόνα 12:** Η δομή και οι ενεργότητες του 20S πρωτεασώματος. Ανατύπωση από Raynes et al., 2016

Πολλές μελέτες έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη υπομονάδων του πρωτεασώματος στα ερυθροκύτταρα (Pasini et al., 2006),(Low et al., 2002) καθώς και την ύπαρξη συνδέσεων πρωτεϊνών με ουβικιτίνη, αφού η ίδια η σπεκτρίνη μπορεί να μεταφέρει μόρια ουβικιτίνης σε διάφορα υποστρώματα (Chang et al., 2005). Πρόσφατα μία μελέτη έφερε στο φως πληροφορίες για την λειτουργικότητα των πρωτεασωμάτων στα ερυθροκύτταρα. Ειδικότερα βρέθηκε πως στα ερυθροκύτταρα απαντώνται λειτουργικά 20S ενζυμικά στοιχεία σε περίπου δέκα φορές μεγαλύτερη αφθονία από ότι τα 26S ολοένζυμα (Neelam et al., 2011). Το παραπάνω φαίνεται να εξηγεί την ασυμφωνία μεταξύ παλαιότερων μελετών που δε μπορούσαν να συμφιλώσουν την εύρεση πρωτεασωμικών υπομονάδων με πρωτεωμική προσέγγιση (Goodman et al., 2007) με τα χαμηλά επίπεδα ATP-εξαρτώμενης αποικοδόμησης πρωτεϊνών στα ερυθροκύτταρα(Speiser & Etlinger, 1982).

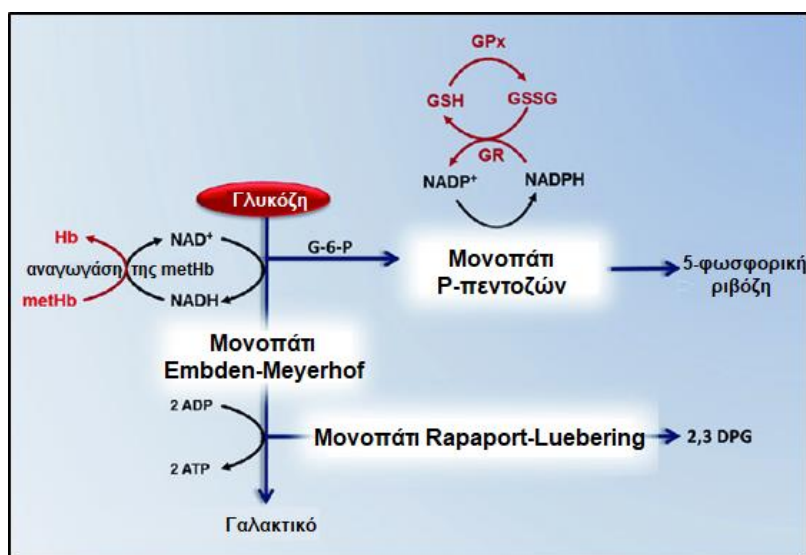
Η παρουσία της περίσσειας των ATP-ανεξάρτητων 20S σε σχέση με τα 26S πιθανά σχετίζεται με την ικανότητα των πρώτων να παραμένουν ενεργά υπό την επίδραση οξειδωτικού στρες, αφού ακόμη και σε ήπιες συνθήκες αυτού, το ενζυμικό σύστημα της ουβικιτινυλίωσης απενεργοποιείται (Reinheckel et al., 1998). Επομένως τα 20S είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τα ερυθρά αιμοσφαίρια, διότι είναι «καλύτερα προσαρμοσμένα» στο περιβάλλον ενός κυττάρου που φέρει μεγάλες ποσότητες  $O_2$  και  $Fe^{2+}$ , που όπως θα εξετασθεί παρακάτω προκαλούν την παραγωγή δραστικών ριζών.

#### **A4. Μεταβολισμός ερυθροκυττάρου**

Αν και η εκπλήρωση του ρόλου του ερυθροκυττάρου, η μεταφορά δηλαδή των αερίων είναι μία διαδικασία που δεν απαιτεί κατανάλωση ενέργειας, τα ερυθροκύτταρα έχουν ανάγκη



έναν ενεργό μεταβολισμό προκειμένου να διατηρήσουν τη λειτουργικότητά τους. Διαδικασίες στις οποίες το ερυθροκύτταρο επενδύει ενέργεια περιλαμβάνουν την ασυμμετρία της μεμβράνης, την ωσμωτική ισορροπία μέσω ρύθμισης αντλιών ιόντων, τη διαφύλαξη οξειδοαναγωγικής ισορροπίας κ.α. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, τα ερυθροκύτταρα στερούνται μιτοχονδρίων και άλλων οργανιδίων στα οποία επιτελούνται ο κύκλος του Krebs και η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Στα ερυθροκύτταρα, ελλείψει αυτών, η ενέργεια παράγεται αποκλειστικά μέσω τις αναερόβιας οδού της γλυκόλυσης. Άλλα μονοπάτια μεγάλης σημασίας στο ερυθροκύτταρο είναι ο κύκλος των φωσφορικών πεντοζών και το μονοπάτι Rapaport-Luebering (Hess & Solheim, 2016).



**Εικόνα 13:** Αναπαράσταση του μεταβολισμού του ερυθροκυττάρου. Ανατύπωση από Melo et al., 2019

#### A4.1. Γλυκόλυση

Η γλυκόζη εισέρχεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια μέσω του μεταφορέα γλυκόζης (GLUT-1). Περίπου το 90% της γλυκόζης χρησιμοποιείται στο μονοπάτι της γλυκόλυσης. Το πρώτο ένζυμο της πορείας της γλυκόζης, η εξοκινάση, παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για την ενδοκυττάρια γλυκόζη. Η εξοκινάση την φωσφορυλιώνει σε 6-φωσφορική γλυκόζη, γεγονός που ωθεί την γλυκόζη στο εσωτερικό του κυττάρου λόγω μετατόπισης της ισορροπίας των συγκεντρώσεων της εκατέρωθεν του μεταφορέα (Yachie-Kinoshita et al., 2010).

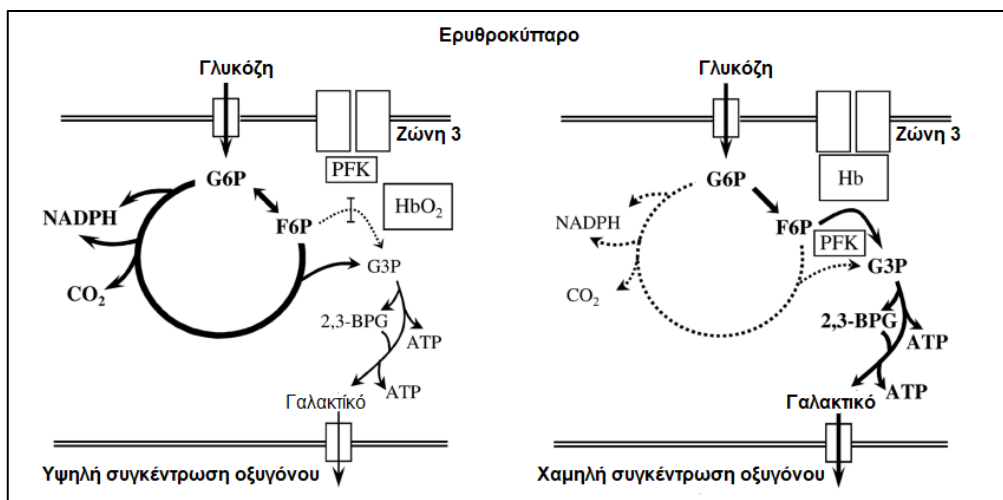
Μέσω της γλυκόλυσης το ερυθροκύτταρο παράγει 2 μόρια ATP τα οποία μπορεί να χρησιμοποιήσει για τις διαδικασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Κατά τη γλυκόλυση παράγεται, επιπλέον NADH, που απαιτείται για την αναγωγή της μεθαιμοσφαιρίνης. Το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης στα ερυθροκύτταρα είναι το γαλακτικό οξύ. Το γαλακτικό δεν συσσωρεύεται στο ερυθροκύτταρο, αλλά εξωτερικεύεται και μέσω του κύκλου Cori, που ολοκληρώνεται στο ήπαρ, μετατρέπεται και πάλι σε γλυκόζη (John R. Hess & Solheim, 2016).

#### A4.2. Ρύθμιση της γλυκόλυσης

Ένα σημαντικό σύμπλοκο για τη ρύθμιση του μεταβολισμού στο ερυθροκύτταρο είναι αυτό που δημιουργείται μεταξύ της αμινοτελικής περιοχής της ζώνης 3 και ορισμένων γλυκολυτικών ενζύμων, όπως η αλδολάση, η φωσφοφρουκτοκινάση (PFK) και η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκερυναλδεΐδης (GAPDH) (Puchulu-Campanella et al., 2013). Η εγγύτητα αυτή μεταξύ των ενζύμων καθιστά τη διαδικασία της γλυκόλυσης πιο αποτελεσματική. Όταν τα ένζυμα βρίσκονται σε σύνδεση με τη ζώνη 3 παραμένουν

ανενεργά, ενώ όταν αποσυνδεθούν ξεκινούν να μεταβολίζουν την γλυκόζη σε γαλακτικό (Lewis et al., 2009).

Η αποσύνδεση τους από την ζώνη 3 είναι οξυγονοεξαρτώμενη. Συγκεκριμένα, τα γλυκολυτικά ένζυμα ανταγωνίζονται τη δεοξυαιμοσφαιρίνη για πρόσδεση στην αμινοτελική ουρά της ζώνης 3. Σε αντίθεση με αυτή, η οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη έχει πολύ χαμηλή συγγένεια για την ζώνη 3. Προκύπτει λοιπόν χάρη σε αυτό ένας μοριακός διακόπτης ευαίσθητος ως προς την κατάσταση οξυγόνωσης του κυττάρου. Επομένως, σε κατάσταση υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου η αιμοσφαιρίνη είναι οξυγονωμένη και δεν συνδέεται με τη ζώνη 3. Τα γλυκολυτικά ένζυμα καταλαμβάνουν τη θέση πρόσδεσης στη ζώνη 3 και η γλυκόζη που εισέρχεται στο ερυθροκύτταρο διοχετεύεται στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι χαμηλή, η αιμοσφαιρίνη είναι αποοξυγονωμένη και η συγγένειά της προς τη ζώνη 3 υψηλή. Τα γλυκολυτικά ένζυμα αποσυνδέονται, ενεργοποιούνται και η γλυκόζη καταναλώνεται από το μονοπάτι της γλυκόλυσης (Castagnola et al., 2010).



**Εικόνα 14:** Η ρύθμιση της γλυκόλυσης μέσω της οξυγονωμένης ή μη αιμοσφαιρίνης  
Ανατύπωση από Castagnola et al., 2010

#### A4.3. Κύκλος των φωσφορικών πεντοζών

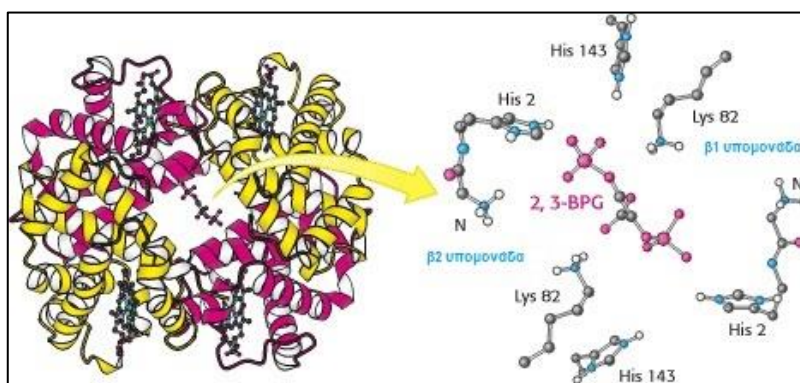
Το υπόλοιπο περίπου 10% της γλυκόζης που εισέρχεται στο κύτταρο κατευθύνεται στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών (Yachie-Kinoshita et al., 2010). Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει δύο τμήματα. Το πρώτο περιλαμβάνει μία σειρά οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, στο οποίο η 6-φωσφορική γλυκόζη μετατρέπεται σε 5-φωσφορική ριβουλόζη. Στα δύο από τα τρία βήματα του τμήματος αυτού πραγματοποιείται παράλληλη μετατροπή του  $\text{NADP}^+$  σε  $\text{NADPH}$ . Η αναγωγική αυτή δύναμη είναι σημαντική για την αντιμετώπιση οξειδωτικών γεγονότων και συγκεκριμένα για την αναγωγή της γλουταθειόνης και ακολούθως άλλων μορίων υπεύθυνων για την προστασία από το οξειδωτικό στρες (Riganti et al., 2012).

Το δεύτερο τμήμα του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών περιλαμβάνει μία σειρά αλληλομετατροπών μορίων σακχάρων. Τα τελικά προϊόντα αυτών είναι η 6-φωσφορική γλυκόζη και η 3-φωσφορική γλυκερυναλδεΐδη. Τα μόρια αυτά αποτελούν ενδιάμεσους μεταβολίτες της πορείας της γλυκόλυσης και άρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν από αυτό το μονοπάτι (Riganti et al., 2012).

#### A4.4. Μονοπάτι Rapoport – Luebering

Το μονοπάτι αυτό έχει ως στόχο την παραγωγή ενός ρυθμιστικού μορίου, του 2,3-διφωσφογλυκερικού οξέος. Πρόκειται για μία διακλάδωση του μονοπατιού της γλυκόλυσης. Το 1,3-διφωσφογλυκερικό που παράγεται στο έκτο βήμα της γλυκόλυσης εισέρχεται στο μονοπάτι Rapoport-Luebering. Σε αυτό, μέσω της δράσης της διφωσφογλυκερικής μούτωσης μετατρέπεται σε 2,3διφωσφογλυκερικό (John R. Hess & Solheim, 2016).

Το μόριο αυτό είναι σημαντικό λόγω της ρυθμιστικής του δράσης, την οποία ασκεί στο μόριο της αιμοσφαιρίνης. Το 2,3-διφωσφογλυκερικό εισέρχεται στην κεντρική κοιλότητα του τετραμερούς  $\alpha_2\beta_2$  της αιμοσφαιρίνης. Εκεί αναπτύσσει ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με δύο κατάλοιπα ιστιδίνης και ένα κατάλοιπο λυσίνης σε κάθε μία από τις δύο  $\beta$  αλυσίδες. Αυτές οι δυνάμεις συγκρατούν την αιμοσφαιρίνη στην T μορφή της και η συγγένεια με το οξυγόνο παραμένει χαμηλή (Berg et al., 2002).



Εικόνα 15: Η θέση που καταλαμβάνει το 2,3διφωσφογλυκερικό στο μόριο της αιμοσφαιρίνης. Ανατύπωση από Berg et al., 2002

#### A5. Οξειδοαναγωγική ισορροπία ερυθροκυττάρου

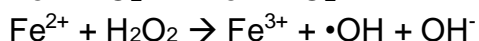
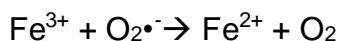
Το ερυθροκύτταρο στη διάρκεια της ζωής του καλείται να αντιμετωπίσει πολλές δοκιμασίες. Μία από τις σημαντικότερες από αυτές είναι η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής του ισορροπίας. Η παραγωγή δραστικών ριζών και η συσσώρευσή τους υποβάλλει το κύτταρο σε οξειδωτικό στρες και οδηγεί σε οξείδωση τόσο πρωτεϊνών όσο και λιπιδίων. Στο ερυθροκύτταρο ειδικά, όπου η απώλεια της ικανότητας της πρωτεϊνοσύνθεσης καθιστά το πρωτεϊνικό φορτίο του πεπερασμένο, η προστασία από τις ελεύθερες ρίζες είναι ύψιστης σημασίας. Για το λόγο αυτό ένα μεγάλο μέρος του πρωτεόματος του ερυθροκυττάρου είναι αφιερωμένο στην αντιοξειδωτική άμυνα (Kuhn et al., 2017).

##### A5.1. Πηγές ελευθέρων ριζών

Αν και η μεταφορά του οξυγόνου ( $O_2$ ) στους ιστούς πραγματοποιείται χωρίς την κατανάλωση ενέργειας, θα μπορούσε κανείς να πει πως τα ερυθροκύτταρα «πληρώνουν το τίμημα» για το οξυγόνο που περιέχουν, καθώς τόσο η αιμοσφαιρίνη όσο και ο σίδηρος της αίμης αποτελούν τις δύο μεγαλύτερες πηγές δραστικών ριζών για το κύτταρο. Συγκεκριμένα, κάθε εικοσιτετράωρο περίπου το 3% της αιμοσφαιρίνης υφίσταται αυτοοξείδωση. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξειδικών ανιόντων  $O_2^{\bullet-}$  και μεθαιμοσφαιρίνης (Johnson et al., 2005).



Ο τρισθενής σίδηρος έχει την ικανότητα να αποσυνδέεται από την μεθαιμοσφαιρίνη. Μέσω της σειράς αντιδράσεων Haber-Weiss ο τρισθενής σίδηρος και το υπεροξειδικό ανιόν μπορούν να παράγουν ρίζες υδροξυλίου. Το δεύτερο βήμα της Haber-Weiss είναι γνωστό και ως αντίδραση Fenton.



Άλλες πηγές ελευθέρων ριζών στο ερυθροκύτταρο περιλαμβάνουν την αντίδραση της αιμοσφαιρίνης με το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), που οδηγεί και πάλι σε απελευθέρωση του σιδήρου, αλλά και την αντίδραση μεταξύ μονοξειδίου του αζώτου ( $\text{NO}$ ) και του υπεροξειδικού ανιόντος, που έχει ως προϊόν το υπεροξεινιτρώδες ανιόν ( $\bullet\text{ONOO}^-$ ) (Kuhn et al., 2017).

## **A5.2. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί**

Το ερυθροκύτταρο είναι εξοπλισμένο με μία ποικιλία αντιοξειδωτικών συστημάτων για να αντιμετωπίσει τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τις παραπάνω διαδικασίες. Τα συστήματα αυτά μπορεί να είναι ενζυμικά ή μη (Kuhn et al., 2017).

### **A.5.2.1. Μη ενζυμικά συστήματα**

Τα συστήματα αυτά αποτελούνται από αναγωγικά μόρια. Μόρια δηλαδή που μπορούν να αντιμετωπίσουν ελεύθερες ρίζες ή να ανάγουν άλλα οξειδωμένα μόρια. Απαντώνται σε οξειδοαναγωγικά ζεύγη, δηλαδή μία ανηγμένη μορφή, που είναι η χρήσιμη μορφή και μία οξειδωμένη μορφή του μορίου, η οποία ανακυκλώνεται.

#### **▪ Γλουταθειόνη**

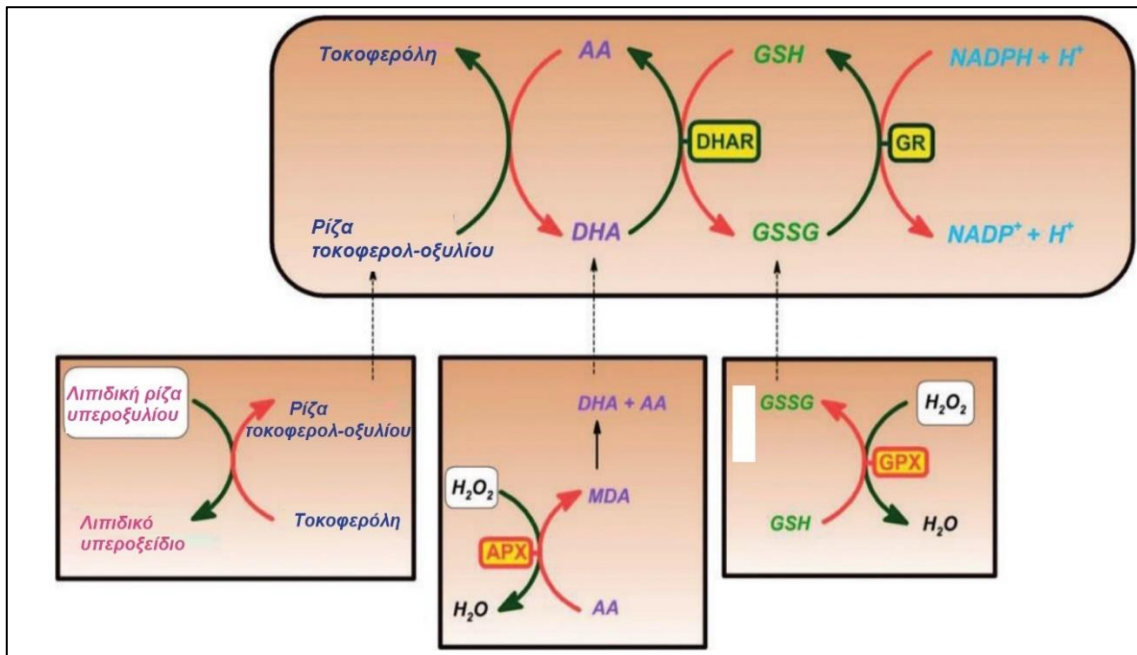
Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο αποτελούμενο από γλουταμινικό, κυστεΐνη και γλυκίνη. Στο ερυθροκύτταρο βρίσκεται κυρίως με την ανηγμένη μορφή (GSH) (Zitka et al., 2012). Ο ρόλος της γλουταθειόνης είναι η εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και η αναγωγή μίας ποικιλίας οξειδωμένων μορίων που συμμετέχουν σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Με τον τρόπο αυτό, μόρια όπως το ασκορβικό οξύ ή η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) ανακυκλώνονται. Η ίδια η γλουταθειόνη ανακυκλώνεται μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης με την κατανάλωση NADPH (Pastore et al., 2003).

#### **▪ Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)**

Το ασκορβικό οξύ συμμετέχει στην αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών που προκύπτουν από οξειδωτικά γεγονότα και στο οξειδοαναγωγικό σύστημα εκατέρωθεν της μεμβράνης. Στο πλαίσιο του τελευταίου, το ασκορβικό εξωτερικεύεται, εμπλουτίζοντας το αντιοξειδωτικό δυναμικό του πλάσματος. Εκεί οξειδώνεται σε αφυδροασκορβικό και επανεισάγεται στο ερυθροκύτταρο μέσω του μεταφορέα της γλυκόζης παρουσία στοματίνης. Η αναγέννηση του ασκορβικού πραγματοποιείται χάρη στη γλουταθειόνη (Pehlivan F.E., 2017).

#### **▪ α-Τοκοφερόλη (βιταμίνη E)**

Η βιταμίνη E από δομικής άποψης αποτελείται από μία υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα και ένα δακτύλιο χρωμανόλης. Το υδροξύλιο του δακτυλίου είναι ικανό να λάβει μέρος σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, ενώ η υδρόφοβη ουρά επιτρέπει στην α-τοκοφερόλη να εισχωρεί στην λιπιδική διπλοστοιβάδα. Εκεί η βιταμίνη E αντιμετωπίζει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Η ανακύκλωσή της γίνεται με τη βοήθεια του ασκορβικού οξέος (May et al., 1998)(Kuhn et al., 2017).

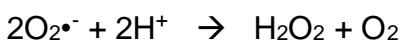


**Εικόνα 16:** Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. (AA:ασκορβικό, DHA:αφυδροασκορβικό, DHAR, αναγωγάση του ημιαφυδροασκορβικού, GSH:γλουταθειόνη, GR:αναγωγάση της γλουταθειόνης, APX: υπεροξειδάση του ασκορβικού, GPX, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης). Ανατύπωση από Pehlivan F.E., 2017

### A5.2.2. Ενζυμικά συστήματα

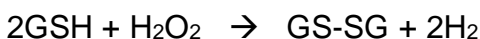
Το μόριο που θέτει σε κίνηση το ενζυμικό μονοπάτι εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών οξυγόνου είναι η υπεροξειδική δισμουτάση 1 (SOD1), που ανήκει στην οικογένεια SOD. Η συγκεκριμένη ισομορφή δεσμεύει χαλκό και ψευδάργυρο (Cu/Zn). Η υπεροξειδική δισμουτάση 1 καταλύει την εξάλειψη του υπεροξειδικού ανιόντος  $O_2^{\cdot-}$ , το οποίο όπως συζητήθηκε παραπάνω παράγεται από την αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης (McCord & Fridovich, 1969).

SOD1

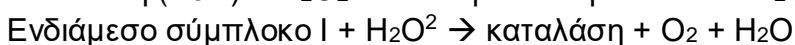
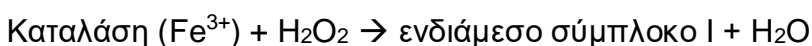


Από την αντίδραση προκύπτει υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το οποίο μετατρέπεται σε νερό και μοριακό οξυγόνο από μία ποικιλία πρωτεϊνικών μορίων. Σε φυσιολογικές συνθήκες έχει βρεθεί πως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) είναι αυτή που εξουδετερώνει το μεγαλύτερο μέρος του  $H_2O_2$  μέσω της αντίδρασης που φαίνεται παρακάτω. Η οξειδωμένη γλουταθειόνη ανακυκλώνεται όπως συζητήθηκε παραπάνω με δότη ηλεκτρονίων το NADPH.

GPX



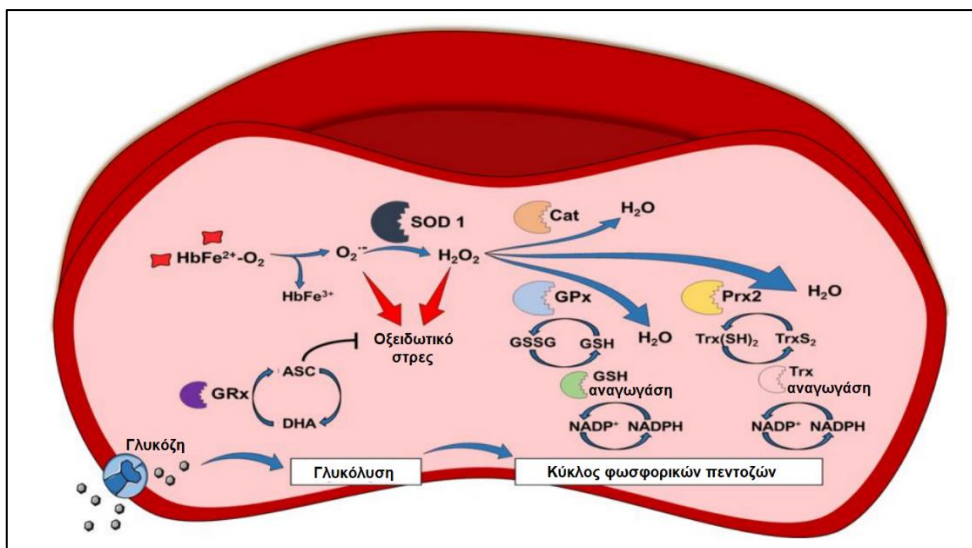
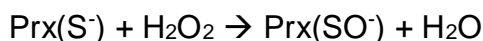
Σε καταστάσεις όμως αυξημένης παραγωγής  $O_2^{\cdot-}$  και επομένως υπεροξειδίου του υδρογόνου, η καταλάση αναλαμβάνει να ανάγει την περίσσειά του σε νερό σε δύο βήματα.



Το τελευταίο σημαντικό ένζυμο που προστατεύει το κύτταρο από οξειδωτικά συμβάντα είναι η υπεροξειρεδοξίνη 2, η δομή της οποίας έχει ήδη συζητηθεί. Η υπεροξειδοξίνη είναι άφθονη και σε θέση να αντιμετωπίσει και οργανικά υπεροξείδια. Η αναγέννησή της όπως



αναφέρθηκε παραπάνω επιτελείται με δότη ηλεκτρονίων τη θειορεδοξίνη, η οποία με τη σειρά της ανακυκλώνεται χάρη στο NADPH (Matte et al., 2013).



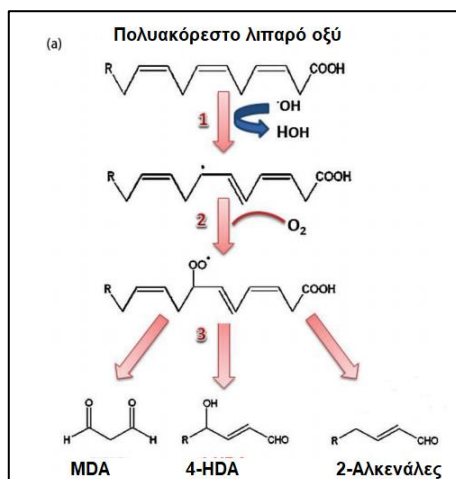
Εικόνα 17: Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. Ανατύπωση από Kuhn et al., 2017

### A5.3. Συνέπειες οξειδωτικού στρες

Οι δραστικές ρίζες (ROS) που παράγονται σε κατάσταση οξειδωτικού στρες μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες στο ερυθροκύτταρο. Η υψηλή συγκέντρωσή τους απειλεί τόσο τη λιπιδική διπλοστοιβάδα όσο και το πρωτεϊνικό φορτίο του κυττάρου με οξείδωση.

#### A5.3.1. Οξείδωση Λιπιδίων

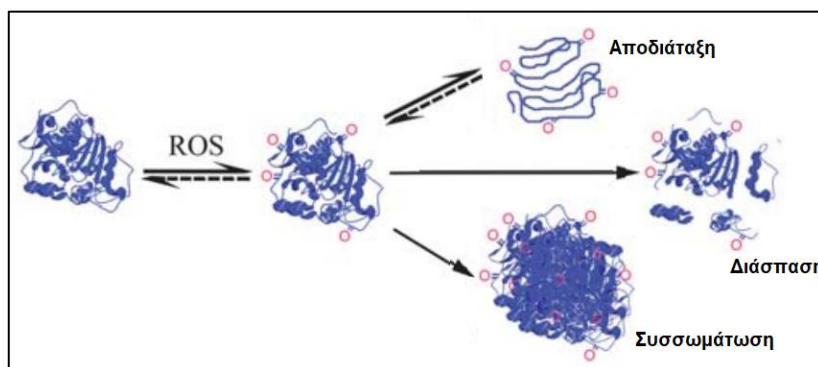
Τα φωσφολιπίδια που απαρτίζουν τη μεμβράνη του ερυθροκυττάρου περιλαμβάνουν κυρίως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, περιέχουν δηλαδή διπλούς δεσμούς και ενδιάμεσες μεθυλικές ομάδες. Ρίζες υπεροξυλίου αντιδρούν με ένα υδρογόνο των μεθυλικών ομάδων παράγοντας νερό και μία ανθρακική ρίζα λιπαρού οξέος, η οποία είναι ασταθής. Οι ρίζες αυτές αμέσως αντιδρούν με μοριακό οξυγόνο δίνοντας ρίζες υπεροξυλίου. Οι προκύπτουσες ρίζες είναι επίσης ασταθείς. Με προσβολή ενός γειτονικού μορίου λιπαρού οξέος της μεμβράνης προκύπτει ένα λιπιδικό υπεροξείδιο και μία νέα ρίζα λιπαρού οξέος. Η νέα ρίζα επαναλαμβάνει τα παραπάνω βήματα (Clemens & Waller, 1987). Τα τελικά προϊόντα της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων είναι ορισμένες δραστικές αλδεΐδες, όπως η μαλονδιαλδεΐδη (MDA). Η μαλονδιαλδεΐδη με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε πρωτεΐνες των οποίων οι πλευρικές αλυσίδες είναι ευάλωτες, με καταστροφικές για το κύτταρο συνέπειες (Basu S., 2007).



Εικόνα 18: Υπεροξειδωση λιπιδίων. Ανατύπωση από (Pehlivan F.E., 2017)

### A5.3.2. Οξειδωση Πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες αποτελούν επίσης στόχο των ελεύθερων ριζών. Οξειδωση μπορεί να παρατηρηθεί τόσο σε πλευρικές ομάδες αμινοξικών καταλοίπων όσο και στον ίδιο τον πεπτιδικό σκελετό με πιθανή διάσπασή του. Τέτοιες αλλαγές συχνά οδηγούν σε καρβονυλικά παράγωγα ή συσσωμάτωση πρωτεϊνών.



Εικόνα 19: Συνέπειες οξειδωσης πρωτεϊνών. Ανατύπωση από Törnvall U., 2010

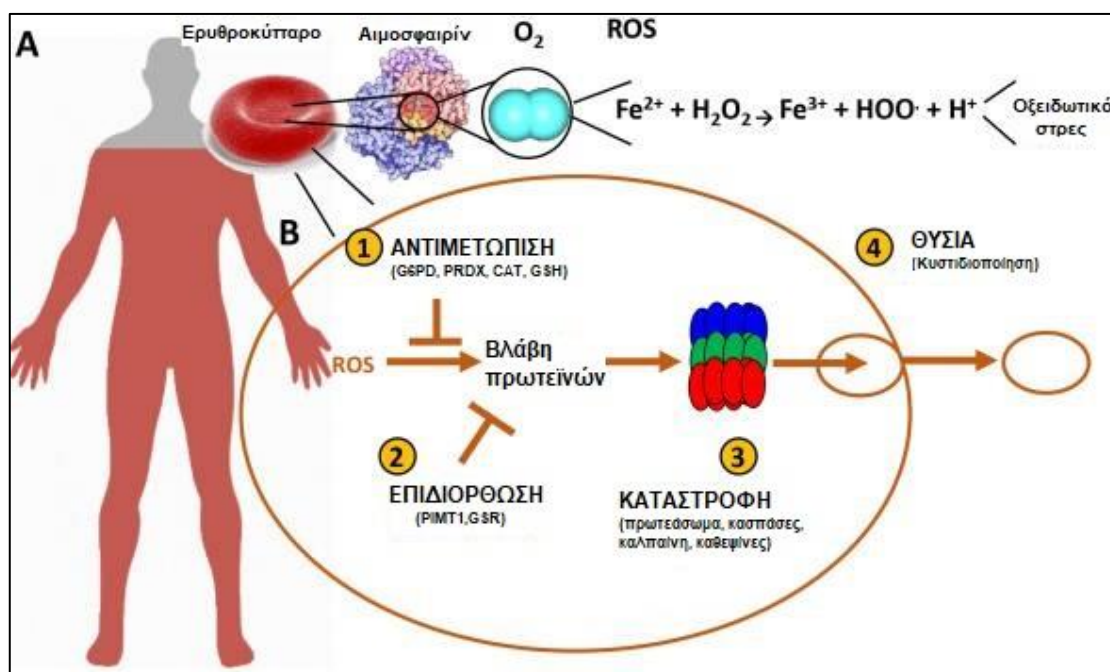
Συγκεκριμένα για τον πεπτιδικό σκελετό, αντίδραση ενός υδροξυλίου με το α-υδρογόνο ενός αμινοξικού καταλοίπου συνεπάγεται την δημιουργία ασταθούς ρίζας αλκυλοϋπεροξειδίου. Ακολουθεί ο σχηματισμός αλκοξυλικών ριζών με την προσθήκη οξυγόνου. Απουσία, όμως, αυτού ελεύθερες ρίζες των ανθρακικών καταλοίπων μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους, είτε βρίσκονται στο ίδιο πεπτιδικό είτε σε διαφορετικά. Τέτοια γεγονότα οδηγούν τελικά στη διάσπαση του πεπτιδικού σκελετού. Ανάλογη διάσπαση μπορεί να επέλθει αν η οξειδωση συμβεί με κέντρο όχι τον α-άνθρακα αλλά τον γ-άνθρακα, αυτόν της πλευρικής δηλαδή αλυσίδας, σε αμινοξέα όπως το γλουταμινικό, το ασπαρτικό ή η προλίνη (Berlett & Stadtman, 1997).

Όσον αφορά στην οξειδωση άλλων πλευρικών ομάδων αυτή διαφοροποιείται μεταξύ των θειούχων και των μη θειούχων αμινοξέων. Τα πρώτα, η κυστεΐνη και η μεθειονίνη, είναι ευαίσθητα σε οξειδωση από διάφορες ROS. Οι οξειδώσεις σε αυτά τα κατάλοιπα είναι αντιστρεπτές. Διαδραματίζουν, μάλιστα, σημαντικό ρόλο στα αντιοξειδωτικά συστήματα, καθώς πολλά αναγωγικά μόρια είναι δραστικά λόγω τέτοιων καταλοίπων και ανακυκλώνονται από άλλα ανηγμένα υποστρώματα χάρη στην αναστρεψιμότητά τους. Στα μη θειούχα αμινοξέα, περιλαμβάνονται αρχικά όσα φέρουν αρωματικούς δακτυλίους, όπως η τρυπτοφάνη, η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη και ετεροκυκλικούς δακτυλίους όπως η ιστιδίνη. Μετά από οξειδωση δίνουν μία ποικιλία προϊόντων με ικανότητα ανάπτυξης δεσμών μεταξύ

απομακρυσμένων καταλοίπων του ίδιου ή διαφορετικών πεπτιδίων. Επιπλέον κάποια από αυτά τα αμινοξέα συμμετέχουν σε ενεργά κέντρα ή άλλες σημαντικές για την πρωτεΐνη περιοχές με αποτέλεσμα η οξειδωσή τους να βλάπτει τη λειτουργικότητα του μορίου. Τέλος, οξειδωση πλευρικών αλυσίδων, όπως λυσίνης ή ασπαραγίνης οδηγεί σε σχηματισμό καρβονυλικών ενώσεων, οι οποίες είναι προϊόντα μη αντιστρεπτής οξειδωσης. Καρβονυλίωση, όμως, πρωτεϊνών δεν προκύπτει μόνο από αντίδραση των παραπάνω καταλοίπων με ROS. Δραστικές αλδεΐδες όπως η μαλονδιαλδεΐδη, της οποίας η παραγωγή συζητήθηκε παραπάνω, μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρβονυλίων και σε πλευρικές αλυσίδες άλλων καταλοίπων (Berlett & Stadtman, 1997).

### A5.3.3. Διαχείριση οξειδωμένων πρωτεϊνών

Η διαχείριση των παραπάνω πρωτεϊνών είναι ζωτικής σημασίας. Το ερυθροκύτταρο αφού δεν μπορεί να αναπληρώσει τις πρωτεΐνες του φέρει διάφορα μόρια για την ελαχιστοποίηση της βλάβης. Σε μία εκτεταμένη έρευνα του πρωτεόματος και των αλληλεπιδράσεων του στο ερυθροκύτταρο, ορισμένοι ερευνητές χαρακτήρισαν μία ομάδα πρωτεϊνών ως σύνολο «Επιδιόρθωσης ή Καταστροφής» (Repair or Destroy) (Goodman et al., 2007). Σε αυτές περιλαμβάνονταν κυρίως πρωτεασωματικές υπομονάδες, πρωτεΐνες επιδιόρθωσης, όπως η L-ισοπροπυλ-μεθυλοτρανσφεράση, και πρωτεΐνες συνοδοί, μεταξύ των οποίων και οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Οι τελευταίες είναι πιθανό να βοηθούν σε περιπτώσεις μερικής αποδιάταξης όπου η βλάβη μπορεί να αντιστραφεί. Το πρωτεάσωμα από την άλλη είναι επιφορτισμένο με την καταστροφή έντονα οξειδωμένων πρωτεϊνών. Έχει μάλιστα δειχθεί πως το 20S πρωτεάσωμα, που όπως συζητήθηκε αποτελεί την μακράν κυρίαρχη μορφή στα ερυθροκύτταρα, είναι όχι μόνο ανθεκτικό το ίδιο στο οξειδωτικό στρες (Reinheckel et al., 1998), αλλά και αποτελεσματικό στην αναγνώριση και καταστροφή πρωτεϊνών που φέρουν αλλοιώσεις που εκθέτουν υδρόφοβα κατάλοιπα (Giulivi et al., 1994) ή άλλες βλάβες που έχουν προκληθεί από οξειδωση (Davies, 2001),(Jung & Grune, 2008).



Εικόνα 20: Βήματα διαχείρισης των οξειδωμένων πρωτεϊνών. Ανατύπωση από D'Alessandro et al., 2019

Όσον αφορά στην τοπολογία, το πρωτεάσωμα εντοπίζεται στο κυτοσόλιο αλλά και σε μεμβράνες ερυθρών αιμοσφαιρίων και εμφανίζει ενεργότητα και στα δύο διαμερίσματα. Πρόσφατα μία μελέτη για την αποθήκευση ερυθροκυττάρων με έλλειψη G6PD, τα οποία είναι επιρρεπή σε οξειδωτικά συμβάντα λόγω ανεπάρκειας αντιοξειδωτικών μηχανισμών,



έδειξε πως πραγματοποιείται αλλαγή στην τοπολογία της δραστηριότητας του πρωτεασώματος. Βρέθηκε πως η ενεργότητα της κασπάσης ( $\beta 1$ ), με την πάροδο της αποθήκευσης και συνεπώς του στρες, ήταν αυξημένη στη μεμβράνη έναντι του κυτοσολίου. Προτάθηκε, λοιπόν, ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο το πρωτεάσωμα μετακινείται στη μεμβράνη ως μηχανισμός άμυνας για την προστασία δηλαδή των πρωτεϊνών της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού που αποτελούν συχνά στόχους οξειδωτικών επιθέσεων. Αποτέλεσμα είναι η αντιμετώπιση και καταστροφή συστατικών που έχουν υποστεί αλλοιώσεις, η προστασία από συσσωματώσεις πρωτεϊνών ή άλλες καταστροφικές για το κύτταρο συνέπειες (Tzounakas et al., 2020).

## **A6. Γήρανση**

Η ζωή ενός τυπικού ερυθροκυττάρου διαρκεί περίπου 120 μέρες. Το γεγονός αυτό προϋποθέτει την ύπαρξη ευαίσθητων μηχανισμών ακριβείας για την αναγνώριση και απομάκρυνση γηρασμένων, υπολειτουργικών ερυθροκυττάρων. Ως γήρανση θα μπορούσε, λοιπόν, να χαρακτηριστεί η χρονοεξαρτώμενη συσώρευση αλλαγών σε μεταβολικό, δομικό και λειτουργικό επίπεδο. Αποτέλεσμα αυτών είναι η φαγοκυττάρωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων κυρίως από τα κύτταρα Kupffer του ήπατος και το σπλήνα. Τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα διακρίνονται από μειωμένη ικανότητα παραμόρφωσης, συρρίκνωση και αύξηση της πυκνότητας, παραγωγή εξοκυττάρων κυστιδίων και τροποποιήσεις της κυτταρικής επιφάνειας, όπως εξωτερίκευση φωσφατυδιλοσερίνης (PS) και δημιουργία νέο-αντιγόνου στη ζώνη 3.

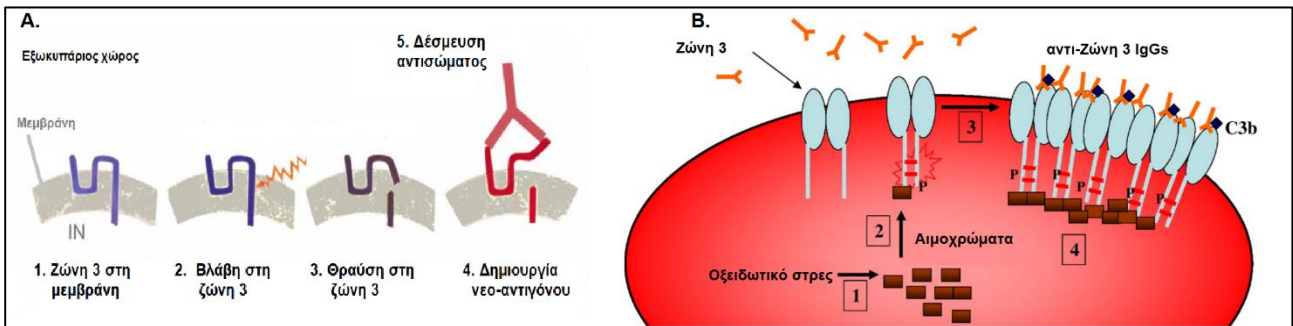
### **A6.1. Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες**

Ο όρος οξειδωτικό στρες περιγράφει την κατάσταση στην οποία περιέρχεται το κύτταρο όταν η παραγωγή δραστικών ριζών γίνεται πιο γρήγορα και σε μεγαλύτερο βαθμό από αυτόν που μπορούν να αντιμετωπίσουν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. Η υπέρμετρη παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) οδηγεί σε οξειδώσεις πρωτεϊνών και λιπιδίων όπως περιγράφεται παραπάνω. Αυτές με τη σειρά τους μπορούν να προκαλέσουν την απενεργοποίηση ενζύμων και άρα διαταραχή του μεταβολισμού ή τη συσσωμάτωση οξειδωμένων παραγώγων και την κατάργηση των φυσιολογικών συνδέσεων μεταξύ πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού και της μεμβράνης (Berlett & Stadtman, 1997). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η οξείδωση της αιμοσφαιρίνης από την οποία παράγονται αιμοχρώματα (Kiefer & Snyder, 2000). Τα αιμοχρώματα είναι ανίκανα να δεσμεύσουν οξυγόνο και επομένως μη λειτουργικά. Οι συνέπειες όμως αυτής της οξείδωσης δεν περιορίζονται εκεί, καθώς όπως θα αναλυθεί παρακάτω, τα αιμοχρώματα μεσολαβούν τον σχηματισμό του νέο-αντιγόνου της ζώνης 3 για απομάκρυνση των κυττάρων από την κυκλοφορία (Badiou & Casey, 2018). Ταυτόχρονα έχει δειχθεί πως σε οξειδωτικό στρες η οξειδωμένη αιμοσφαιρίνη προσδένεται στη σπεκτρίνη, εμποδίζοντας τη διασύνδεσή της με τη ζώνη 3 (Peisach et al., 1975) και άρα διευκολύνει τη συσσωμάτωση της τελευταίας (Rifkind & Nagababu, 2013).

### **A6.2. Μονοπάτι γήρανσης σχετιζόμενο με τη ζώνη 3**

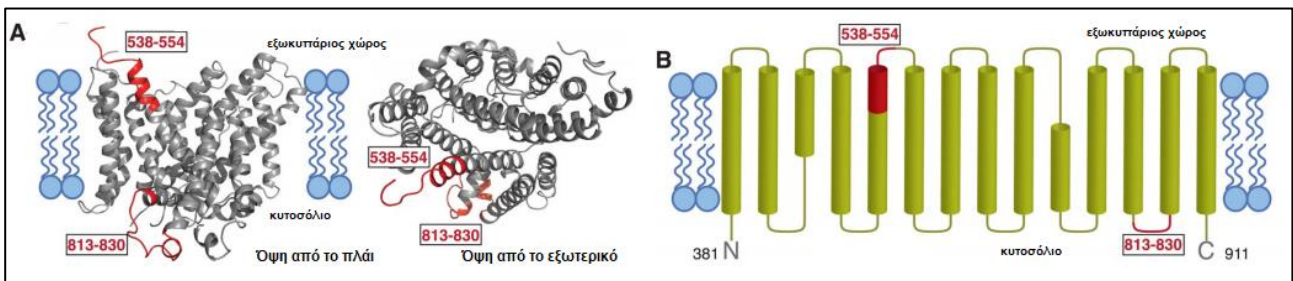
Η απομάκρυνση κυττάρων από την κυκλοφορία από τα μακροφάγα μεσολαβείται από την πρόσδεση αυτόλογων ανοσοσφαιρινών τάξης G (IgGs) σε αντιγόνα γήρατος του ερυθροκυττάρου. Το νέο-αντιγόνο που προκύπτει από την συσσωμάτωση ή/και την θραύση της ζώνης 3 είναι σημαντικό για τη διαδικασία αυτή. Έχει προταθεί πως η πρόσδεση οξειδωμένων αιμοχρωμάτων στην αμινοτελική περιοχή της ζώνης 3, προάγει τη φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης και τον ολιγομερισμό της στη μεμβράνη (Pantaleo et al., 2010). Στη συνέχεια IgGs και πιθανόν θραύσματα C3b του συμπληρώματος προσδένονται σε αντιγόνα παρόντα στα ολιγομερή, σηματοδοτώντας τα κύτταρα για

φαγοκυττάρωση. Όσον αφορά στη θραύση της ζώνης 3, έχει προταθεί πως προκαλείται διάσπαση της ζώνης 3 ως αποτέλεσμα κάποιου οξειδωτικού συμβάντος (πχ. από τα αιμοχρώματα). Δημιουργείται, άρα, μια διαφορετική διαμόρφωση στο εξωκυττάριο τμήμα της που έχει αντιγονική δράση (Bosman G.J., 2013).



**Εικόνα 21:** **A.** Διάσπαση ζώνης 3 μετά από επίδραση οξειδωτικού στρες, και αναγνώριση της από IgGs. Ανατύπωση από: Bosman G.J., 2013. **B.** Συσσωμάτωση ζώνης 3 λόγω σύνδεσης αιμοχρωμάτων, και αναγνώριση από IgGs. Ανατύπωση από: Pantaleo et al., 2008.

Μία σύνθεση των δύο παραπάνω μοντέλων και μελετών της αντιγονικότητας συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων στην αλυσίδα της ζώνης 3 προτείνει ένα ενδιαφέρον σύστημα για τη δημιουργία του νέο-αντιγόνου της ζώνης 3. Σύμφωνα με αυτό, η πρωτεΐνη φέρει δύο αντιγονικές περιοχές. Η πρώτη εντοπίζεται μεταξύ των καταλοίπων 538-554 της τρίτης εξωκυττάριας θηλιάς και η δεύτερη στην περιοχή των αμινοξέων 813-830, που βρίσκεται φυσιολογικά στην έκτη ενδοκυττάρια θηλιά του μορίου. Αρκετό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως εάν η δεύτερη περιοχή μετακινούταν στην εξωκυττάρια πλευρά της μεμβράνης θα γειτνιάζε με τα κατάλοιπα της πρώτης (Badior & Casey, 2018).

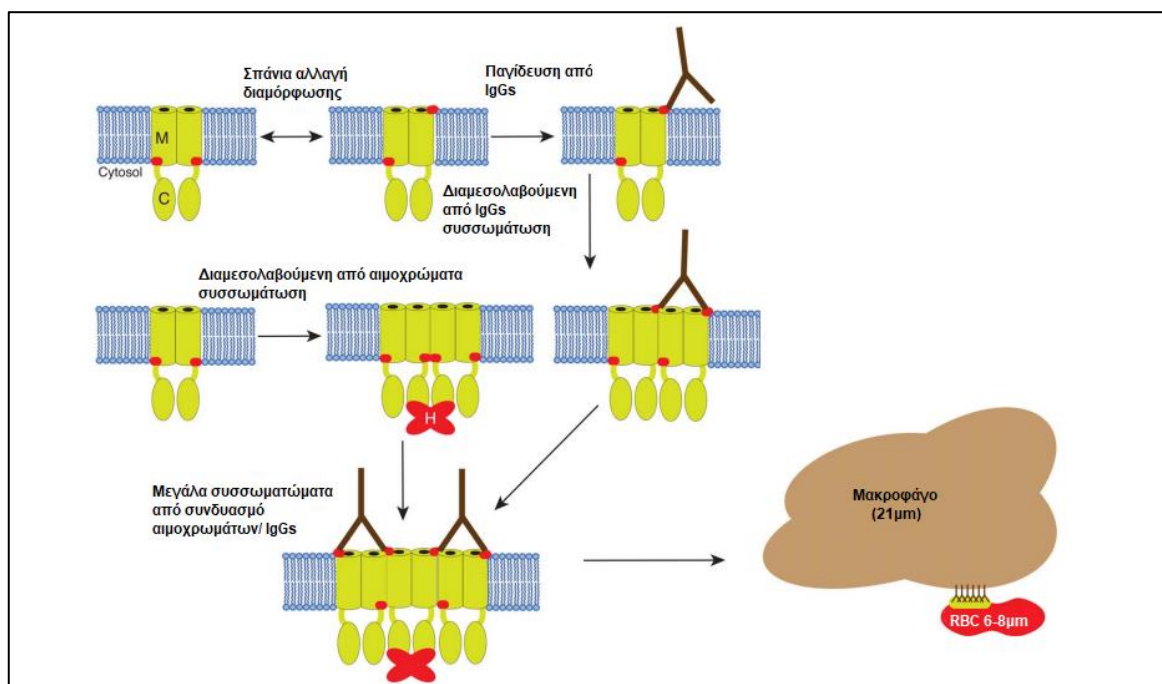


**Εικόνα 22:** Αναπαράσταση των αντιγονικών περιοχών της ζώνης 3. Ανατύπωση από Badior & Casey, 2018

Πράγματι, δομικές μελέτες με τη μεθοδολογία SCAM (Substituted Cysteine Accessibility Method), που χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της δομής διαφόρων διαύλων, έδειξαν πως τα αμινοξέα 815-829 μπορούν να εντοπιστούν και στην εξωκυττάρια πλευρά της διπλοστοιβάδας. Ο εντοπισμός τους και στα δύο διαμερίσματα ίσως συνδέεται με τη λειτουργία της ζώνης 3 ως ανιοντοανταλλάκτης.

Το μοντέλο που προτείνεται λαμβάνοντας υπόψιν τις νέες αυτές πληροφορίες είναι το ακόλουθο: Η ζώνη 3 μπορεί να βρεθεί σε δύο στερεοδιαμορφώσεις. Στην πρώτη που είναι και η συχνότερη σε φυσιολογικές συνθήκες η αντιγονική περιοχή 813-830 είναι εσωτερική, ενώ στη δεύτερη βρίσκεται εκτεθειμένη. Σε λειτουργικά ερυθροκύτταρα η δεύτερη μεταπίπτει στην πρώτη διαμόρφωση. Σε διαφορετική περίπτωση ένα μόριο IgG μπορεί να προσδεθεί στο αντιγόνο που έχει σχηματιστεί από τις πλέον κοντινές περιοχές 538-554 και 813-830. Η πρόσδεση της ανοσοσφαιρίνης αποτρέπει την επιστροφή στην κρυπτική διαμόρφωση. Αυτό αποτελεί το πρώτο βήμα της σήμανσης ενός κυττάρου ως γηρασμένο. Το γεγονός πως τα IgGs μπορούν να δεσμευθούν ταυτόχρονα σε περισσότερα του ενός αντιγόνα οδηγεί σε

συσσωμάτωση μορίων ζώνης 3. Αυτή η συσσωμάτωση προάγεται περαιτέρω από τη δράση των αιμοχρωμάτων στην κυττοσολική πλευρά του μορίου. Ο ολιγομερισμός της ζώνης 3 προκαλεί την πρόσδεση όλο και περισσότερων μορίων IgGs, που μόλις υπερβούν ένα κατώφλι, αναγνωρίζονται από μακροφάγα που απομακρύνουν τα οψωνισμένα κύτταρα από την κυκλοφορία (Badior & Casey, 2018).

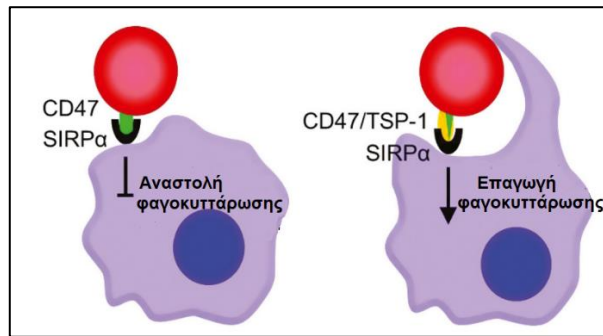


**Εικόνα 23:** Μοντέλο συνεργατικής δράσης των αιμοχρωμάτων και των IgGs για την προώθηση της συσσωμάτωσης και της απομάκρυνσης από μακροφάγα. Ανατύπωση από Badior & Casey, 2018

### A6.3. Μονοπάτι σχετιζόμενο με τη CD47

Η CD47 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που συμμετέχει στο σύμπλοκο Rhesus και το υπερσύμπλοκο της ζώνης 3-αγκυρίνης. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το συγκεκριμένο μόριο φυσιολογικά προσδένεται στον υποδοχέα SIRP-α των φαγοκυττάρων. Η σύνδεση αυτή δρα ως σινιάλο αναστολής της φαγοκυττάρωσης, που συχνά αναφέρεται ως σήμα «do not eat me» (Oldenborg, 2004).

Στα γηρασμένα, όμως, ερυθροκύτταρα, είτε λόγω οξειδωτικών αλλοιώσεων της ίδιας της CD47 είτε λόγω αλλαγών στο σύμπλοκο ζώνης 3-αγκυρίνης, η CD47 τροποποιείται. Συχνά, η τροποποίησή της συνοδεύεται από τη σύνδεσή της με τη θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1). Η συγκρότηση του συμπλόκου CD47/TSP-1 δημιουργεί ένα νέο συνδέτη για τον υποδοχέα SIRP-α. Η σύνδεση αυτών έχει την αντίστροφη επίδραση, και χαρακτηρίζεται ως «eat me» σήμα (Burger et al., 2012). Με τον τρόπο αυτό η πρωτεΐνη CD47 δρα ως ένας μοριακός διακόπτης προστασίας των λειτουργικών και εκκαθάρισης των γηρασμένων ερυθροκυττάρων.



**Εικόνα 24:** Η δράση του CD47 ως διακόπτης της φαγοκυττάρωσης. Ανατύπωση από van Bruggen, 2013

#### A6.4. Εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης PS

Η λιπιδική ασυμμετρία της μεμβράνης είναι ένα χαρακτηριστικό το οποίο το ερυθροκύτταρο διασφαλίζει με τη δράση διαφόρων πρωτεϊνών όπως έχει ήδη αναφερθεί στο υποκεφάλαιο της μεμβράνης. Σημαντικό κομμάτι αυτής της ασυμμετρίας αποτελεί το γεγονός ότι η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) βρίσκεται στο εσωτερικό φύλλο της λιπιδικής διπλοστοιβάδας (Yasin et al., 2003). Έχει δειχθεί πως σε *in vitro* συνθήκες και με επίδραση οξειδωτικών μέσων ενεργοποιείται ένας καταρράκτης που οδηγεί στην εξωτερίκευσή της. Ο καταρράκτης αυτός περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της προκασπάσης 3 σε κασπάση 3, την τροποποίηση της ζώνης 3 και τελικά την έκθεση PS. Δεδομένου του ότι στη γήρανση αφθονούν τα οξειδωτικά γεγονότα πιστεύεται πως μία αντίστοιχη διαδικασία δύναται να συμβαίνει και *in vivo* (Mandal et al., 2002). Ενδείξεις που στηρίζουν αυτή τη θεωρία είναι η ανίχνευση ενεργών κασπασών 3 και 8 σε ερυθροκύτταρα, καθώς και η δημιουργία του συμπλόκου Fas-FasL σε λιπιδικές τους σχεδίες, το οποίο σε εμπύρνα κύτταρα είναι σημαντικό για τον καταρράκτη των κασπασών προμηγύοντας τον θάνατο (Mandal et al., 2005). Υπέρ αυτής της άποψης συνηγορεί επίσης το γεγονός πως οι λιπιδικές μεμβράνες γηρασμένων ερυθροκυττάρων φέρουν μεγαλύτερα ποσοστά φωσφατιδυλοσερίνης από ότι αυτές των νεαρών. Η εξωτερίκευση της PS προκαλεί διέγερση των φαγοκυττάρων και απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων που την εκθέτουν.

#### A6.5. Κυστιδιοποίηση

Η κυστιδιοποίηση αποτελεί μία αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία που λαμβάνει χώρα σε όλα τα ερυθροκύτταρα αλλά επιταχύνεται κατά τη γήρανση. Τα κυστίδια που παράγονται είναι εξωκυττάρια και προκύπτουν άμεσα σε σημεία εκβλάστησης της μεμβράνης. Σκοπός της είναι η απομάκρυνση μη λειτουργικών και οξειδωμένων μορίων από το ερυθροκύτταρο προστατεύοντάς το από πρόωρη απομάκρυνση από την κυκλοφορία (Willekens et al., 2008). Η σύστασή τους περιλαμβάνει μόρια αιμοσφαιρίνης, συσσωματώματα της ζώνης 3 και μόρια μεταφορέα γλυκόζης (GLUT-1) στη μεμβράνη τους, καθώς και μεγάλη αναλογικά ποσότητα της σκελετικής πρωτεΐνης ακτίνη, αλλά παντελή έλλειψη άλλων όπως η αγκυρίνη και η σπεκτρίνη. Ταυτόχρονα, έχουν ανιχνευτεί σε αυτά μόρια που συμμετέχουν σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, όπως υπεροξειρεδοξίνες και θειορεδοξίνη συνδεδεμένα στη μεμβράνη τους, αλλά απουσία υπομονάδων του πρωτεασώματος. (Bosman et al., 2012). Ακόμη, τα κυστίδια που προκύπτουν εκθέτουν φωσφατιδυλοσερίνη, γεγονός που μαρτυρά την καθολικότητα των μηχανισμών εκκαθάρισής από την κυκλοφορία, τόσο για κύτταρα όσο και για κυστίδια. Το ερυθροκύτταρο, όμως, δεν μπορεί επ' άπειρον να απαλλάσσεται από βλαβερά για αυτό μόρια μέσω κυστιδιοποίησης. Στην ουσία χάρη στην παραγωγή των κυστιδίων το κύτταρο λαμβάνει ένα «δάνειο χρόνου». Σε προχωρημένα στάδια της γήρανσης η διαδικασία αυτή οδηγεί σε απώλεια μεμβρανικού υλικού σε τέτοιο βαθμό ώστε να προκαλείται συρρίκνωση και αύξηση της πυκνότητας του κυττάρου με ταυτόχρονη δραματική μείωση της ικανότητας παραμόρφωσής του (Antonellou et al., 2010).





## **A8. Αποθήκευση**

Η μετάγγιση ερυθροκυττάρων είναι μία από τις πιο κοινές θεραπευτικές πρακτικές στον κόσμο. Πραγματοποιείται τακτικά σε χρόνιες ασθένειες και αναιμίες και περιστασιακά σε περιπτώσεις αιμορραγιών, εγχειρήσεων και άλλων έκτακτων καταστάσεων. Η αναγκαιότητα των μεταγγίσεων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού και ασφαλούς συστήματος αποθήκευσης των ερυθροκυττάρων, που συνεχώς βελτιώνεται.

### **A8.1. Συνθήκες αποθήκευσης**

Αν και παλαιότερα η μετάγγιση και επομένως η αποθήκευση ολικού αίματος ήταν κοινή, στις μέρες μας τα ερυθροκύτταρα αποθηκεύονται μόνο τους ύστερα από αφαίρεση των άλλων στοιχείων του αίματος. Η διαδικασία ξεκινά με συλλογή του αίματος μέσα με πλαστικούς ασκούς οι οποίοι περιέχουν αντιπηκτικά/συντηρητικά διαλύματα για την αποφυγή της πήξης και τη διατήρηση των κυττάρων, αντίστοιχα. Το πιο συχνό συντηρητικό διάλυμα είναι το CPD (citrate-phosphate-dextrose). Όπως μαρτυρά το όνομά του το CDP περιέχει: πρώτον κιτρικό οξύ, που χάρη στην ικανότητα του να δεσμεύει ιόντα ασβεστίου αποτελεί παράγοντα αναστολής της πήξης· δεύτερον φωσφορικά, τα οποία αναπληρώνουν την εξάντληση του ATP που παρατηρείται σε αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα· και τρίτον δεξτρόζη, ένα δομικό ανάλογο της γλυκόζης, ρόλος του οποίου είναι η τροφοδότηση του μεταβολισμού των κυττάρων. Συχνά στο CPD προστίθεται αδενίνη, σχηματίζοντας CPD-A. Η αδενίνη χρησιμοποιείται όπως και τα φωσφορικά για την αναπλήρωση του ATP (J. R. Hess, 2006).

Μετά τη συλλογή σε αντιπηκτικό/συντηρητικό διάλυμα ακολουθεί φυγοκέντρηση του αίματος και συλλογή του κλάσματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ο διαχωρισμός των στιβάδων πλάσματος, λευκών και ερυθρών αιμοσφαιρίων που σχηματίζονται διαφέρει ανάλογα με σύστημα ασκών που χρησιμοποιείται. Σημαντικό βήμα στη διαδικασία της παραγωγής μιας μονάδας ερυθροκυττάρων είναι αυτό της λευκαφαίρεσης. Τα λευκά αιμοσφαίρια κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης απελευθερώνουν πλήθος παραγόντων ή ακόμη και πρωτεάσες ή λιπάσες κατά τη λύση τους που προκαλούν βλάβες στα ερυθροκύτταρα. Η απομάκρυνσή τους γίνεται είτε με αφαίρεση του «buffy coat» είτε με φίλτρο λευκαφαίρεσης και οδηγεί στη βελτίωση της ποιότητας του αποθηκευμένου παραγώγου αίματος (J. R. Hess, 2006).

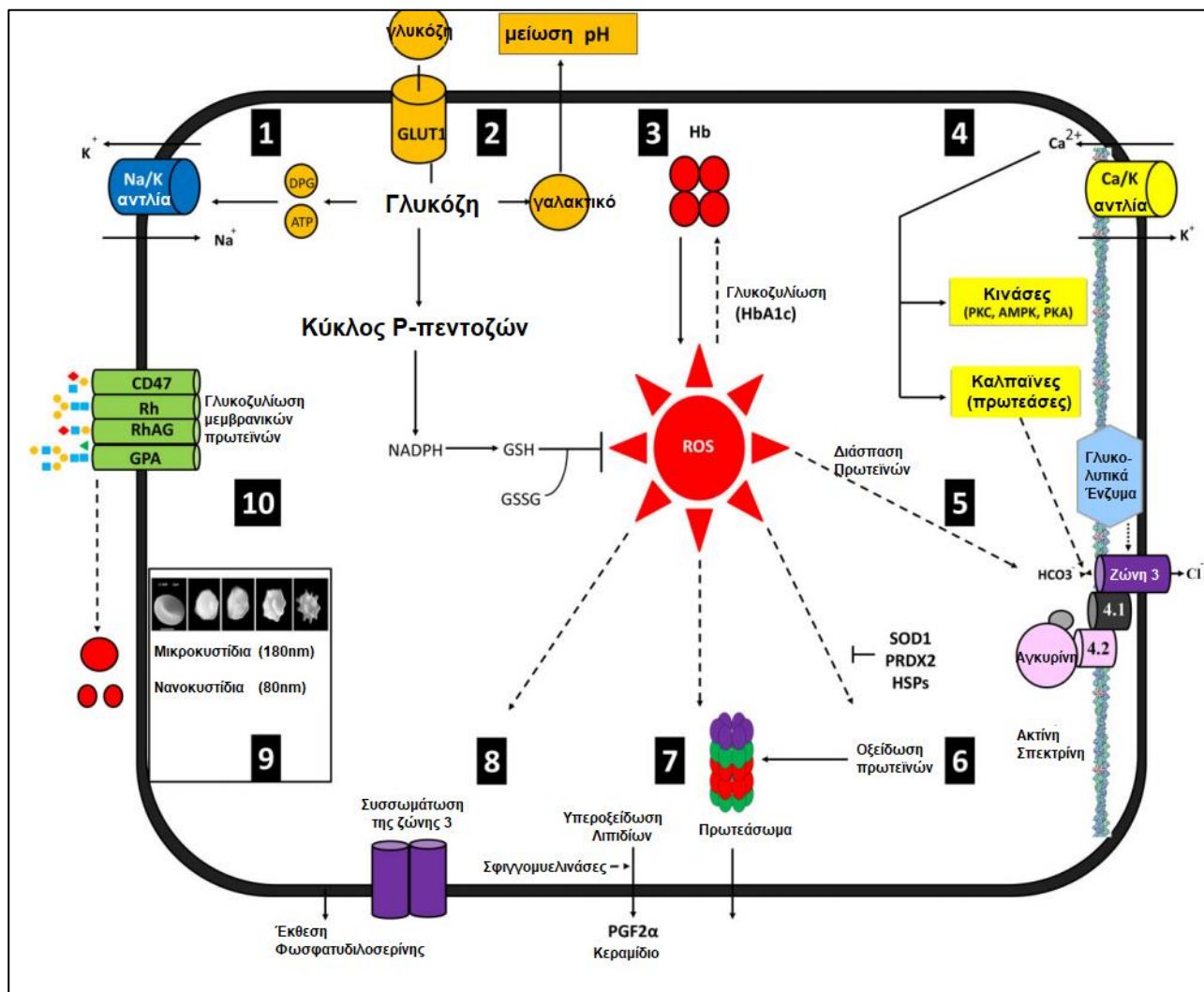
Στο κλάσμα των ερυθροκυττάρων που παραλαμβάνεται προστίθεται ένα διάλυμα θρεπτικών που ονομάζεται προσθετικό διάλυμα. Το πιο κοινό προσθετικό διάλυμα είναι το SAG-M (saline-adenine-glucose-mannitol). Το αλατούχο διάλυμα λειτουργεί ως διαλύτης για τα άλλα συστατικά, αλλά και ως ρυθμιστής του pH, απαραίτητος λόγω της συσσώρευσης μεταβολιτών του ερυθροκυττάρου στο υπερκείμενο του ασκού. Η αδενίνη όπως αναφέρθηκε χρησιμοποιείται για αναπλήρωση του ATP και η γλυκόζη για τη συνέχιση του μεταβολισμού. Και τα δύο αυτά συστατικά βρίσκονται σε περίσσεια. Η μαννιτόλη, αν και σάκχαρο δεν συμμετέχει στο μεταβολισμό, αλλά στην εξουδετέρωση ROS ως αντιοξειδωτικό (Sparrow, 2012) και ως σταθεροποιητής της κυτταρικής μεμβράνης. Η διατήρηση των κυττάρων σε αυτές τις συνθήκες στους 4°C εξασφαλίζει διάρκεια αποθήκευσης έως και έξι εβδομάδες

### **A8.2. Αποθηκευτική βλάβη**

Το σύνολο των φυσικοχημικών αλλαγών που υφίστανται τα ερυθροκύτταρα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους, με αποτέλεσμα την τροποποίηση των ιδιοτήτων τους, ονομάζεται αποθηκευτική βλάβη (storage lesion) (John R. Hess, 2010). Παραδείγματα τέτοιων σημαντικών αλλαγών, οι οποίες ομοιάζουν με αυτές της γήρανσης, είναι τα ακόλουθα τα οποία επιπλέον απεικονίζονται στην εικόνα 27 (D'Alessandro et al., 2015).

1. Η χαμηλή θερμοκρασία αποθήκευσης επηρεάζει αρνητικά την αντλία νατρίου/καλίου ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) με αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό του υπερκειμένου του ασκού με ιόντα  $\text{K}^+$  (Wallas, 1979).
2. Η γλυκόλυση οδηγεί στη μετατροπή της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ το οποίο απελευθερώνεται στο υπερκείμενο και επιφέρει μείωση του pH του μέσου συντήρησης. Ταυτόχρονα, βλάβες σε γλυκολυτικά ένζυμα όπως η φωσφοφρουκτοκινάση οδηγούν στη μείωση της παραγωγής ATP. Στο πρώτο μισό της αποθήκευσης το ATP αναπληρώνεται μέσω της διάσπασης του 2,3 διφωσφογλυκερικού οξέος, το οποίο μετά από το διάστημα αυτό εξαντλείται (Sparrow, 2012). Η έλλειψη ATP επιδεινώνει την ομοιόσταση των κατιόντων που περιγράφεται παραπάνω. Παράλληλα, η διαταραχή της διαδικασίας της γλυκόλυσης οδηγεί στη μειωμένη παραγωγή NADH για την αναγωγή της αιμοσφαιρίνης και άρα στη συσσώρευση μεθαιμοσφαιρίνης. Ταυτόχρονα, η βλάβη ενζύμων όπως η εξοκινάση προκαλεί, επιπλέον, μείωση ροής της γλυκόζης στον κύκλο τον φωσφορικών πεντοζών, επακόλουθη μείωση του NADPH και αδυναμία ανακύκλωσης αντιοξειδωτικών μορίων (Gevi et al., 2012).
3. Η συσσώρευση της μεθαιμοσφαιρίνης οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης ενδοκυττάρων δραστικών ριζών που είναι δυνατό να προκαλέσουν μία πληθώρα οξειδωτικών αλλαγών στις πρωτεΐνες και τα λιπίδια του ερυθροκυττάρου.
4. Παρατηρείται, επίσης, αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου  $\text{Ca}^{2+}$ . Αυτή προκαλεί πρώτον τη διάνοιξη καναλιών  $\text{K}^+$  και δεύτερον την ενεργοποίηση κινασών και πρωτεασών, όπως η ασβεστοεξααρτώμενη καλπαΐνη.
5. Τα παραπάνω ένζυμα προκαλούν μερική πέψη της ζώνης 3 και άλλων σκελετικών πρωτεϊνών. Ταυτόχρονα, η οξείδωση πρωτεϊνών είναι ικανή να προκαλέσει διάσπαση των πεπτιδικών σκελετών των παραπάνω πρωτεϊνών (D'Alessandro et al., 2015).
6. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου, προκαλούν την οξείδωση διαφόρων σημαντικών μορίων προκαλώντας μη αντιστρεπτές τροποποιήσεις όπως η καρβονυλίωση πρωτεϊνών και η υπεροξείδωση λιπιδίων, που εντείνονται από την αδυναμία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και των μοριακών συνοδών να εξουδετερώσουν τις ROS (Kriebardis et al., 2007)(Dumaswala et al., 1999).
7. Η αποθήκευση, επιπλέον, επηρεάζει την καταστροφή πρωτεϊνών από το σύστημα του 20S πρωτεασώματος με τρόπο ανεξάρτητο από το ATP και την παραγωγή κεραμιδίου από σφιγγομυελίνη που οδηγεί στην εξωτερίκευση φωσφατυδιλοσερίνης (Geng et al., 2009).
8. Η αύξηση των ROS είναι επίσης σε θέση να προκαλέσει συσσωμάτωση της ζώνης 3 και δημιουργία προ-αντιγονικών θέσεων οι οποίες μετά τη μετάγγιση ενδέχεται να προκαλέσουν σύνδεση IgGs.
9. Τα παραπάνω οδηγούν σε αλλαγή των ιδιοτήτων της κυτταρικής μεμβράνης και του σχήματος του ερυθροκυττάρου. Συγκεκριμένα, το σχήμα αμφίκοιλου δίσκου μετατρέπεται σε εχινοκυτταρικό με προεκβολές και προοδευτικά σε σφαιροεχινοκύτταρα. Από το στάδιο των τελευταίων και έπειτα η αλλαγή του σχήματος είναι μη αντιστρεπτή, λόγω της μεγάλης απώλειας μεμβρανικού υλικού μέσω κυστιδιοποίησης.
10. Τα παραγόμενα κυστίδια περιέχουν αιμοσφαιρίνη, μεμβρανικές πρωτεΐνες και εξωτερικευμένη PS. Παρότι αυτά τα συστατικά πρέπει να απομακρυνθούν από τα κύτταρα για να εξασφαλίσουν παράταση της επιβίωσής τους, η μετάγγισή τους μπορεί να έχει δυσμενείς συνέπειες. Τέλος, έχει παρατηρηθεί πως κατά τη διάρκεια

της αποθήκευσης, γλυκοσιδάσες απομακρύνουν μόρια σακχάρων από τη μεμβράνη, απώλεια των οποίων αυξάνει τον κίνδυνο προσκόλλησης των μεταγγιζόμενων ερυθροκυττάρων σε ενδοθηλιακά κύτταρα (D'Alessandro et al., 2015).

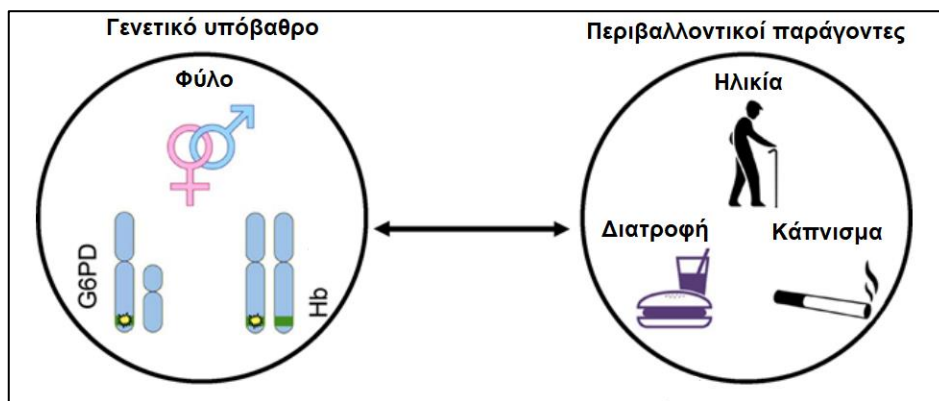


**Εικόνα 26:** Συνοπτική αναπαράσταση των αλλαγών του ερυθροκυττάρου κατά την αποθήκευση. Ανατύπωση από D'Alessandro et al., 2015

### A8.3. Υπόβαθρο αιμοδότη

Η αποθηκευτική βλάβη εκδηλώνεται, όπως φαίνεται παραπάνω, μέσω διαφόρων μονοπατιών κοινών και με τη διαδικασία της *in vivo* γήρανσης των ερυθροκυττάρων. Έχει επομένως, προταθεί πως παράγοντες που επηρεάζουν την ακεραιότητα των μονοπατιών αυτών παίζουν σημαντικό ρόλο και στην αποθηκευτική ικανότητα. Οι παράγοντες αυτοί που επηρεάζουν τη μεταβολική, οξειδοαναγωγική ή μορφολογική ισορροπία εντός του ασκού εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τα χαρακτηριστικά του αιμοδότη, τόσο όσον αφορά στο σύνολο των περιβαλλοντικών παραγόντων, οι οποίοι επιδρούν στη φυσιολογία του, όσο και στο γενετικό υπόβαθρό του. Έτσι, βλάβες ή ιδιαιτερότητες σε μηχανισμούς που επηρεάζουν τη γήρανση αντικατοπτρίζονται αντίστοιχα στην κατάσταση των ερυθροκυττάρων κατά την αποθήκευση (Tzounakas et al., 2016a).





**Εικόνα 27:** Παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα αποθήκευσης ερυθροκυττάρων.  
Ανατύπωση από: (Tzounakas et al., 2016)

### A8.3.1. Μη γενετικοί / εξωγενείς παράγοντες

Μία σειρά μη γενετικών παραγόντων, που περιλαμβάνουν τον τρόπο ζωής και τις συνήθειες του ατόμου είναι σημαντική για την εκτίμηση της αποθηκευτικής ικανότητας των ερυθροκυττάρων του. Παραδείγματα τέτοιων παραγόντων αποτελούν το κάπνισμα, η διατροφή, η άσκηση κλπ.

Πρώτον, το κάπνισμα, το οποίο συνεπάγεται την παρουσία πληθώρας οξειδωτικών μορίων στο αίμα, φαίνεται να επηρεάζει το προφίλ των ερυθροκυττάρων του δότη, καθώς σε σύγκριση με μη καπνιστές, έχει βρεθεί ελαττωμένη ικανότητα παραμόρφωσης (Norton & Rand, 1981) και αύξηση της οσμωτικής και οξειδωτικής αιμόλυσης (R. Li & Chen, 2014) σε άτομα που καπνίζουν. Επιπλέον, έχει βρεθεί, μείωση στη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών μηχανισμών και στη συγκέντρωση της γλουταθειόνης και του ασκορβικού οξέος (Codandabany, 2000). Τα παραπάνω αντανακλώνονται στα υψηλότερα επίπεδα δραστικών ριζών και στην επακόλουθη αύξηση της υπεροξειδωσης λιπιδίων και της καρβονυλίωσης πρωτεϊνών στα κύτταρα των καπνιστών (Colombo et al., 2012).

Δεύτερον, η διατροφή διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο. Κατανάλωση λιπαρών γευμάτων έχει συνδεθεί με μείωση της αντιοξειδωτικής άμυνας (Prior et al., 2007), διαταραχή της παραμορφωσιμότητας (Cazzola et al., 2004) και αποσυντονισμό της ιοντικής ομοιόστασης, μέσω απορρύθμισης της αντλίας  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  στα ερυθροκύτταρα (Luise et al., 1980). Στο ίδιο κλίμα, η κατανάλωση κόκκινου κρασιού σε μικρές ποσότητες είναι ικανή να προσφέρει μία αντιοξειδωτική βοήθεια λόγω των περιεχόμενων πολυφαινολών (Tedesco et al., 2000). Σε χρόνιες παθολογικές καταστάσεις, όμως, όπου λόγω του αλκοόλ παρατηρείται αύξηση της γλυκόζης και προ-οξειδωτικών παραγόντων έχει συσχετισθεί με την αύξηση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στο πλάσμα (Guemouri et al., 1991). Τέλος, η ένταξη της τακτικής, μη εξαντλητικής άσκησης στην καθημερινότητα συνεπάγεται αύξηση της αντοχής των κυττάρων του δότη σε οξειδωτικό στρες, γεγονός που αντιστρέφεται σε περίπτωση έντονης, εξαντλητικής άσκησης (Pingitore et al., 2015).

### A8.3.2. Γενετικοί / ενδογενείς παράγοντες

Η ποικιλότητα των γενετικών χαρακτηριστικών των δοτών καθορίζει ένα μεγάλο μέρος της ποικιλομορφίας που παρατηρείται όσον αφορά στο εύρος των φυσιολογικών χαρακτηριστικών των ερυθροκυττάρων. Το παραπάνω θα μπορούσε να γίνει κατανοητό μέσα από παραδείγματα τέτοιων γενετικών και εγγενών ιδιοτήτων. Η πρώτη παράμετρος της επίδρασης του γενετικού υποβάθρου προκύπτει από τις εξαρτώμενες από το φύλο διαφορές των αιμοδοτών. Είναι γνωστό πως οι γυναίκες παρουσιάζουν διαφορά στις τιμές ορισμένων δεικτών, όπως ο αιματοκρίτης, η συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, το επίπεδο

φυλλικού οξέος (Cafolla et al., 2000) και το επίπεδο ουρικού οξέος στο πλάσμα (Ishizaka et al., 2005). Οι χαμηλότερες αυτές τιμές έχει προταθεί πως συνδέονται με τον χαμηλότερο βαθμό ωσμωτικής, μηχανικής και οξειδωτικής αιμόλυσης (Kanias & Gladwin, 2012) και υπεροξειδωσης λιπιδίων (Rembacz et al., 2012), που παρατηρούνται στις γυναίκες. Επιπλέον, οι θηλυκές ορμόνες του φύλου έχει βρεθεί πως επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων. Για την οιστραδιόλη υπάρχουν έρευνες που προτείνουν πως προωθεί την αναγέννηση της γλουταθειόνης (Massafra et al., 2000), μειώνει την εξάντληση του ATP και ελαττώνει την παραγωγή εξωκυττάρων κυστιδίων (Gustafson et al., 2015). Ακόμη, η προσθήκη προγεστερόνης σε ερυθροκύτταρα στο πλαίσιο έρευνας για την πιθανή προστατευτική της δράση έδειξε μείωση της οσμωτικής ευθραυστότητάς τους.

Η παρουσία επίσης του αντιοξειδωτικού μορίου, ουρικού οξέος, που παρουσιάζει και φυλοεξαρτώμενες διαφορές είναι μία παράμετρος που παρουσιάζει διακύμανση μεταξύ των αιμοδοτών. Το ουρικό οξύ αντιπροσωπεύει έως και 60% της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Becker, 1993). Σε μία μελέτη σύγκρισης δοτών με χαμηλά έναντι μίας ομάδας με υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος στην αρχή της αποθήκευσης το υψηλό ουρικό οξύ συνδέθηκε με μειωμένες τιμές MDA, ενός δείκτη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, ενώ στο δεύτερο μισό αυτής συνδέθηκε με χαμηλότερες τιμές ROS και γενικά λιγότερες μορφολογικές αλλοιώσεις (Tzounakas et al., 2018).

Η σημασία του γενετικού υποβάθρου των αιμοδοτών μπορεί να γίνει καλύτερα κατανοητή στο πλαίσιο της ετερογένειας μεταλλαγών που οδηγούν σε κληρονομικές ασθένειες σχετικές με την φυσιολογία των ερυθροκυττάρων. Τέτοιες μπορεί να είναι μεταλλαγές σε δομικές πρωτεΐνες που οδηγούν σε σφαιροκυττάρωση, μεταλλαγές τις αιμοσφαιρίνης, όπως αυτές των θαλασαιμιών που θα συζητηθούν παρακάτω, ή μεταλλαγές σε σημαντικά ένζυμα για το μεταβολισμό και το οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο του κυττάρου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα του πώς το γενετικό προφίλ του δότη επηρεάζει τη φυσιολογική λειτουργία και αποθήκευση είναι αυτό των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), χαρακτηριστικό που κληρονομείται με φυλοσύνδετο τρόπο. Το παραπάνω ένζυμο συμμετέχει στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών και είναι εξαιρετικά σημαντικό για την παραγωγή NADPH, μορίου απαραίτητου για την αναγωγή της γλουταθειόνης (Luzzatto et al., 2021). Η έλλειψη G6PD έχει ως αποτέλεσμα ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και είναι δυνατό να οδηγήσει σε αιμόλυση ή άλλες συνέπειες όπως η υψηλή καρβονυλίωση και υπεροξειδωση μορίων. Ενδιαφέρον στην περίπτωση των ατόμων με έλλειψη G6PD έχει το γεγονός πως η έκθεση σε χρόνια οξειδωτικό στρες, ίσως τα καθιστά καλύτερους δέκτες μετάγγισης παρά δότες αίματος αφού τα ερυθρά αιμοσφαίριά τους είναι ικανά να ανταπεξέλθουν στην επαφή με αποθηκευμένα κύτταρα των οποίων τα χαρακτηριστικά έχουν τροποποιηθεί λόγω οξειδωτικού στρες κατά την αποθήκευση (Tzounakas et al., 2016a)

### **A8.3.3. Το παράδειγμα της β-θαλασσαιμίας**

Η β-θαλασσαιμία είναι μία ασθένεια της οποίας η γενετική αιτία είναι η μετάλλαξη της β-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης και η επακόλουθη μειωμένη σύνθεσή της. Οφείλει το όνομά της στο γεγονός ότι η συχνότητα της νόσου είναι μεγαλύτερη σε περιοχές γύρω από τη Μεσόγειο και σε άλλες περιοχές που πλήττονται από την ελονοσία, καθώς άτομα ετερόζυγα για κάποια μετάλλαξη της β-θαλασσαιμίας παρουσιάζουν ανθεκτικότητα έναντι του πλασμοδίου. Σε ομόζυγη κατάσταση, η σχετική έλλειψη β-αλυσίδας οδηγεί σε μη επαρκή παραγωγή αιμοσφαιρίνης και αναιμία και απαιτεί την πραγματοποίηση μεταγγίσεων. Οι ετερόζυγοι-φορείς της β-θαλασσαιμίας όμως, υπό την προϋπόθεση πως πληρούν το κριτήριο συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης (12,5 g/dL για τις γυναίκες / 13,5 g/dL για τους άνδρες),

μπορούν να γίνουν τακτικοί αιμοδότες. Το ενδιαφέρον, όσον αφορά στους ετερόζυγους αιμοδότες είναι πως η μεταλλαγή τους οδηγεί στην ανάπτυξη χαρακτηριστικών που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν θετικά ή αρνητικά κατά την αποθήκευση τους σε τράπεζες αίματος (Tzounakas et al., 2016b).

Από τη μία πλευρά, η μειωμένη παραγωγή της β-αλυσίδας και η περίσσεια της αδέσμευτης α-αλυσίδας προκαλούν μειωμένη συγκέντρωση λειτουργικής αιμοσφαιρίνης, αύξηση του οξειδωτικού στρες αλλά και της αιμόλυσης. Οι συνέπειες αυτές έχουν συνδεθεί με την εκδήλωση φυσιολογικών αλλαγών στα ερυθροκύτταρα των φορέων (Rouyer-Fessard et al., 1989). Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων αλλαγών αποτελούν η πρόσδεση της αιμοσφαιρίνης σε σκελετικά στοιχεία, η προβληματική οργάνωση της σπεκτρίνης του κυτταροσκελετού (Lamchiagdhase et al., 1987) και η μείωση της ικανότητας παραμόρφωσης του κυττάρου. Ταυτόχρονα, έχει παρατηρηθεί αυξημένη φωσφορυλίωση της ζώνης 3 (Pantaleo et al., 2010), η οποία βρίσκεται επίσης σε κίνδυνο πρωτεολυτικής τροποποίησης (Ficarra et al., 2009) από την ενεργή κασπάση 3 που έχει βρεθεί στα ερυθροκύτταρα των φορέων (Mandal et al., 2003). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων των ετερόζυγων σε σύγκριση με άλλους αιμοδότες υποδεικνύουν πως οι φορείς της β-θαλασσαιμίας ενδέχεται να είναι προβληματικοί στο θέμα της αποθήκευσης αφού οι αλλαγές που περιγράφηκαν παραπάνω οδηγούν σε επιτάχυνση της εμφάνισης του φαινοτύπου της γήρανσης.

Από την άλλη, όμως, πλευρά, η ετεροζυγωτία για β-θαλασσαιμία έχει συνδεθεί με την αλλαγή στην ομοιόσταση των ιόντων, που έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή συγκέντρωση ιόντων  $K^+$  στο εσωτερικό του ερυθροκυττάρου (Olivieri et al., 1994). Αυτό σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη απουσία άλλων οσμωτικά ενεργών στοιχείων και τη συρρίκνωση του κυττάρου είναι σημαντικό για τη φυσιολογία των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Gunn et al., 1972). Φυσική συνέπεια των παραπάνω είναι η αύξηση της αναλογίας επιφάνειας προς όγκο που επιτρέπει στο κύτταρο να προσαρμόζεται καλύτερα σε ό,τι αφορά στο οσμωτικό του περιβάλλον (Schrier et al., 1989). Το γεγονός αυτό μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο χαρακτηριστικό αυτών των κυττάρων κατά την αποθήκευση ή τη μετάγγιση τους. Παράλληλα, τα κύτταρα αυτών των δοτών έχει βρεθεί πως παρουσιάζουν μικρότερο βαθμό συσσωμάτωσης, που μπορεί επίσης να αποτελέσει ένα πλεονέκτημα. Τέλος, η συνεχής κατάσταση οξειδωτικού στρες την οποία υφίστανται τα ερυθροκύτταρα των φορέων μπορεί να λειτουργεί ευεργετικά μέσω της εντονότερης ενεργοποίησης αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Η αυξημένη δράση αυτών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, που χαρακτηρίζεται από αύξηση του οξειδωτικού στρες, είναι ένας παράγοντας που συνηγορεί υπέρ της καλής αποθηκευτικής ικανότητας των ερυθροκυττάρων των ετερόζυγων φορέων μεταλλαγών τύπου β-θαλασσαιμίας (Tzounakas et al., 2016a).

## **B. Σκοπός**

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της τοπολογίας και της λειτουργίας των πρωτεασωμικών συμπλόκων κατά την αποθήκευση ερυθροκυττάρων σε μονάδες CPD-SAGM. Επιπλέον, η συγκεκριμένη εργασία στοχεύει στη σύγκριση των ερυθροκυττάρων αιμοδοτών, ετερόζυγων για β-θαλασσαιμία και μαρτύρων, ως προς την πρωτεόσταση και την πιθανή διαφορική απόκριση του πρωτεασώματος στο στρες της αποθήκευσης.

## Γ. Υλικά και μέθοδοι

### Γ1. Όργανα και συσκευές

- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraus, κεφαλή #3344
- Φασματοφωτόμετρο (ZEISS)
- Φθορισμόμετρο (BIO-RAD)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (BIO-RAD)
- Κλίβανος
- Ηλεκτρονικός ζυγός (KERN PRS 320-3)
- Ηλεκτρονικό πεχάμετρο
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf, 5410
- Transblot – SDI Semidry Transfer Gel, (BIO-RAD)
- Πιπέτες τύπου Gilson
- Υπερφυγόκεντρος Sorvall, Κεφαλή Ti-70

### Γ2. Βιολογικό Υλικό

Το βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της παρούσας εργασίας προήλθε από εθελοντική αιμοδοσία. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκε αίμα 19 αιμοδοτών, 9 εκ των οποίων ήταν ετερόζυγοι για β-θαλασσαιμία και 10 όχι, όποτε χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Κατά την αιμοδοσία παρασκευάστηκαν μονάδες συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων σε CPD/SAGM, οι οποίες αποθηκεύτηκαν στους 4°C για 42 ημέρες. Εβδομαδιαία έγινε λήψη υλικού για την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών που αναφέρονται παρακάτω. Για τις μετρήσεις σε φρέσκο αίμα έγινε συλλογή αίματος από τους ίδιους αιμοδότες σε σωληνάρια αιμοληψίας που περιείχαν αντιπηκτικό παράγοντα (κιτρικά).

### Γ3. Μέθοδοι

#### Γ3.1. Μέτρηση επιπέδων ενδοκυττάρων ROS

##### Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση των ενδοκυττάρων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) προσδιορίζεται φθορισμομετρικά. Το CMH<sub>2</sub>DCFDA είναι ένα μη φθορίζον μόριο, που χάρει στην λιπόφιλη φύση του είναι ικανό να διαπερνά την πλασματική μεμβράνη. Αφού το αντιδραστήριο εισέλθει στο κύτταρο, υφίσταται επεξεργασία από εστεράσες και οξειδώνεται από τις δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS). Το μόριο που προκύπτει φθορίζει με τα επίπεδα φθορισμού να είναι ανάλογα με αυτά των ROS.

##### Υλικά-Αντιδραστήρια

- CMH<sub>2</sub>DCFDA, Invitrogen DMSO
- PBS 310 mOsm
- Γλυκόζη stock 500mM
- ddH<sub>2</sub>O
- Eppendorf 1,5mL
- ΦθορισμόμετροVersaFluor™, Bio-Rad

##### Πειραματική διαδικασία

Τα δείγματα αραιώνονται με PBS 310 mOsm με στόχο την επίτευξη αρχικής συγκέντρωσης 1mg/mL σε όλα τα δείγματα. Στη συνέχεια, προστίθεται το φθορίζον αντιδραστήριο. Τα δείγματα επωάζονται για 30' σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση, στο σκοτάδι. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20'' σε 1000g και αφαίρεση του υπερκείμενου. Προστίθεται εκ νέου PBS και μετά από σύντομη ανάδευση (vortex) τα δείγματα επωάζονται για 12' σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση, στο σκοτάδι. Ακολουθεί πλύση με PBS και αφαίρεση του υπερκείμενου. Προστίθεται 1mL ddH<sub>2</sub>O για λύση των κυττάρων και έντονο vortex. Τέλος, μετρίεται ο φθορισμός με τη χρήση φθορισμομέτρου (μήκος κύματος διέγερσης: 490nm, μήκος κύματος εκπομπής: 520nm). Για την αναγωγή των μονάδων φθορισμού, εκτελείται στο τέλος της διαδικασίας υπολογισμός της ολικής ποσότητας πρωτεϊνών κατά Bradford (βλέπε παρακάτω).

### **Γ3.2. Μέτρηση πρωτεασωμικών ενεργοτήτων**

#### Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων προσδιορίζεται φθορισμομετρικά. Τα αντιδραστήρια LLVY-AMC, LRR-AMC, LLE-AMC είναι μη φθορίζοντα. Όταν όμως κοπούν από την υπομονάδα με ενεργότητα χυμοθρυψίνης, θρυψίνης και κασπάσης του πρωτεασώματος αντίστοιχα, το AMC (7-αμινο-4-μέθυλοκουμαρίνη) που απελευθερώνεται φθορίζει. Η αλληλουχία του καθενός είναι ειδική για μία μόνο από τις υπομονάδες. Τα επίπεδα του φθορισμού για κάθε ένα από τα πεπτίδια είναι ανάλογα με την δραστηριότητα της αντίστοιχης καταλυτικής υπομονάδας του πρωτεασώματος.

#### Υλικά-Αντιδραστήρια

- Suc-LLVY-AMC
- LLE-AMC
- LRR-AMC
- Διάλυμα Tris-HCl pH=7,5 για LLVY
- Διάλυμα Tris-HCl pH=8 για LLE & LRR
- Φθορισμόμετρο VersaFluor™, Bio-Rad

#### Πειραματική διαδικασία

Δείγμα απομονωμένων μεμβρανών ή κυτοσολίων ερυθρών αιμοσφαιρίων προστίθενται στο κατάλληλο διάλυμα Tris-HCl. Στη συνέχεια, προτίθεται το επιθυμητό πεπτίδιο (LLVY/ LLE/ LRR). Τα δείγματα, ακολούθως, επωάζονται σε κλίβανο για 90' στην περίπτωση του LLVY ή 180' στην περίπτωση των LLE και LRR. Μετά το πέρας της επώασης, προστίθεται παγωμένο διάλυμα Tris-HCl για τον τερματισμό της αντίδρασης. Τα δείγματα αναδεύονται (vortex) και ακολουθεί η μέτρηση των επιπέδων φθορισμού (μήκος κύματος διέγερσης: 360nm, μήκος κύματος εκπομπής: 460nm). Για την αναγωγή των μονάδων φθορισμού, εκτελείται στο τέλος της διαδικασίας υπολογισμός της ολικής ποσότητας πρωτεϊνών κατά Bradford (βλέπε παρακάτω).

### **Γ3.3. Λευκαφαίρεση με κολώνες κυτταρίνης**

#### Αρχή μεθόδου

Οι κολώνες κυτταρίνης, οι οποίες κατασκευάζονται από δύο είδη κυτταρίνης, δημιουργούν ένα είδος φίλτρου με διαφορετικού μεγέθους πόρους. Ολικό αίμα περνά μέσα από τις στήλες αυτές. Τα λευκά αιμοσφαίρια λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους κατακρατούνται από την



στήλη, ενώ τα ερυθρά αιμοσφαίρια διέρχονται από αυτή. Ο διαχωρισμός γίνεται με τη βοήθεια της βαρύτητας.

#### Υλικά-Αντιδραστήρια

- Sigmacell cellulose type 50, SIGMA
- α-cellulose, SIGMA
- PBS Washing solution (310mosm)\*, (5mM PO<sub>4</sub>/150mM NaCl, pH 8.0, 4°C)
- Ριζόχαρτο
- Parafilm
- Σύριγγες 10mL
- Πιπέτες Pasteur
- Σωλήνες φυγοκέντρου
- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraus, κεφαλή #3344

#### Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία ξεκινά με την φυγοκέντρωση ολικού αίματος για 10' σε 1000xg σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο αναρροφάται και απορρίπτεται. Τα κύτταρα που μένουν ως ίζημα, αραιώνονται σε αναλογία 1:4 με διάλυμα PBS. Παράλληλα, για την κατασκευή των στηλών κυτταρίνης, ζυγίζονται 0,2g από κάθε είδος κυτταρίνης και το μείγμα κυτταρινών μεταφέρεται με προσοχή στο εσωτερικό σύριγγας, η οποία έχει στερεωθεί κάθετα μέσα σε σωλήνα και το έμβολο της έχει αφαιρεθεί, η άκρη της δε είναι κλειστή με μικρό κομμάτι parafilm. Η μεταφορά γίνεται αργά ώστε το μείγμα να μην πακεταριστεί έντονα. Το parafilm αφαιρείται και όγκος διαλύματος PBS ίσος με αυτό της στήλης κυτταρίνης προστίθεται με την βοήθεια πιπέτας Pasteur στη σύριγγα. Αφού περάσει όλο από τη στήλη, μεταφέρεται στη σύριγγα ίσος όγκος αραιωμένου ολικού αίματος. Η προσθήκη αίματος επαναλαμβάνεται. Όταν περάσει επιθυμητή ποσότητα αίματος από τις κολώνες κυτταρίνης, το δείγμα που έχει συλλεχθεί μεταφέρεται σε σωλήνες φυγοκέντρου. Ακολουθούν τρεις πλύσεις με διάλυμα PBS, η καθεμία από τις οποίες διαρκεί 10' και πραγματοποιείται σε 1000xg και 4°C.

\* Για την παρασκευή PBS Washing Solution (1x):

8,76g NaCl

100mL 50P<sub>8</sub> σε 1L dH<sub>2</sub>O

Για την παρασκευή Sodium Phosphate Buffer (50P<sub>8</sub>) (10x):

8,90g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 50mM σε 100mL dH<sub>2</sub>O

1,38g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 50mM σε 200mL dH<sub>2</sub>O

Το pH του Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ρυθμίζεται με το NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> μέχρι το pH=8,0.

### **Γ3.4. Απομόνωση ερυθροκυτταρικών μεμβρανών από ολικό αίμα**

#### Αρχή μεθόδου

Η απομόνωση των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών πραγματοποιείται με υπότονη αιμόλυση, δηλαδή ωσμωτική λύση των κυττάρων. Στο διάλυμα λύσης περιέχεται επιπλέον PMSF, ως αναστολέας της πρωτεόλυσης, ενώ για τον ίδιο λόγο η διαδικασία γίνεται στους 4°C. Οι μεμβράνες (ghosts), επιπλέον, είναι σκόπιμο να καθαριστούν από αιμοσφαιρίνη και για το λόγο αυτό πλένονται μέχρι να αποχρωματιστούν.

#### Υλικά-Αντιδραστήρια

- Υπότονο διάλυμα φωσφορικών

- Sodium Phosphate Buffer 50mM (50P8)
- PMSF (Phenyl methyl sulfonyl fluoride)
- Πιπέτες Pasteur
- Σωλήνες φυγοκέντρου
- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraus, κεφαλή #3344

### Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία ξεκινά με φυγοκέντρηση ολικού αίματος για 10' σε 1000xg στους 4°C και ακολούθως αναρρόφηση του πλάσματος/υπερκειμένου. Στη συνέχεια, εκτελούνται τρεις πλύσεις με ισότονο διάλυμα φωσφορικών σε συνθήκες φυγοκέντρησης όπως παραπάνω. Μετά την τελευταία πλύση, προστίθεται υπότονο ρυθμιστικό διάλυμα με PMSF και μετά από επαναδιαλυτοποίηση του ίζηματος με ήπια ανάδευση, οι σωλήνες αφήνονται για 45' σε πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20' σε 19000xg, στην οποία οι μεμβράνες μένουν ως ίζημα, και το υπερκείμενο αναρροφάται και απορρίπτεται. Η διαδικασία συνεχίζεται με πλύσεις με το υπότονο διάλυμα έως ότου το ίζημα των μεμβρανών αποχρωματιστεί.

Στην περίπτωση που έχει προηγηθεί λευκαφαίρεση, η διαδικασία ξεκινά αμέσως μετά τις πλύσεις στο τέλος της λευκαφαίρεσης, με το βήμα της λύσης.

### **Γ3.5. Απομόνωση κυστιδίων**

#### Αρχή μεθόδου

Η απομόνωση των κυστιδίων των ερυθροκυττάρων βασίζεται στο διαφορά μεγέθους και βάρους τους σε σχέση με τα κυτταρικά στοιχεία του αίματος. Επομένως, με φυγοκέντρηση ολικού αίματος σε κατάλληλες στροφές τα κυτταρικά στοιχεία καθιζάνουν ως ίζημα ενώ τα κυστίδια βρίσκονται στο υπερκείμενο. Δεδομένου του μεγέθους των κυστιδίων επιλέγεται φίλτρο με πόρους συγκεκριμένης διαμέτρου, που επιτρέπει στα κυστίδια να περάσουν ενώ σε άλλα συστατικά όχι. Το φιλτραρισμένο υπερκείμενο μπορεί να υποστεί υπερφυγοκέντρηση σε ακόμη υψηλότερες στροφές, όπου τα κυστίδια πλέον καθιζάνουν ως ίζημα το οποίο μπορεί να απομονωθεί με αναρρόφηση του υπερκειμένου.

#### Υλικά-Αντιδραστήρια

- PBS Washing solution (310mosm), (5mM PO<sub>4</sub>/150mM NaCl, pH 8.0)
- Φίλτρα νιτροκυτταρίνης (μέγεθος πόρων 0,8μm)
- Σωλήνες φυγοκέντρησης
- Πιπέτες Pasteur
- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraus, κεφαλή #3344
- Υπερφυγόκεντρος Sorvall, Κεφαλή Ti-70

### Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία ξεκινά με φυγοκέντρηση πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων για 10' στα 1000xg. Το υπερκείμενο, ακολούθως, καθαρίζεται περνώντας από αποστειρωμένα φίλτρα νιτροκυτταρίνης με μέγεθος πόρων 0,8μm. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση του φιλτραρισμένου υπερκειμένου για 1 ώρα στα 37000xg. Το υπερκείμενο αναρροφάται και απορρίπτεται. Το ίζημα των κυστιδίων επαναδιαλυτοποιείται σε διάλυμα PBS. Εκτελούνται δύο ακόμη φυγοκεντρήσεις στις προαναφερθείσες συνθήκες. Στο τέλος της διαδικασίας, η πρωτεϊνική συγκέντρωση των απομονωμένων κυστιδίων προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford (βλέπε παρακάτω).

### **Γ3.6. Υπολογισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δείγματος**

#### Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης ενός δείγματος γίνεται με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκων μεταξύ της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue και των πρωτεϊνών. Αυτή προκαλεί μία μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης, της οποίας η διαφορά είναι μέγιστη στα 595nm, όπου και προσδιορίζεται φωτομετρικά η ένταση του μπλε χρώματος του συμπλόκου. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης άγνωστων δειγμάτων προϋποθέτει την κατασκευή πρότυπης καμπύλης με διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης πρωτεϊνών.

#### Υλικά-Αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο Bradford (Bio-rad)
- Κυψελίδες φασματοφωτομέτρου
- Φασματοφωτόμετρο ZEISS

#### Πειραματική διαδικασία

Ποσότητα 10μL δείγματος ερυθροκυτταρικών μεμβρανών τοποθετούνται σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 790μL υπότονου διαλύματος φωσφορικών. Ακολούθως, προστίθενται 200μL αντιδραστηρίου Bradford. Μετά από ανάδευση (vortex) τα δείγματα αφήνονται να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 25'. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης γίνεται με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου στα 595nm, και η συγκέντρωση υπολογίζεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης.

### **Γ3.7. Προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση**

#### Αρχή μεθόδου

Για την χρήση των δειγμάτων ερυθροκυτταρικών μεμβρανών σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση είναι απαραίτητη η επεξεργασία τους. Η επεξεργασία αυτή περιλαμβάνει τη χρώση τους με ειδικό διάλυμα το οποίο περιέχει SDS-EDTA, γλυκερόλη, β-μερκαπτοαιθανόλη και μπλε της βρωμοφαινόλης. Το SDS και η β-μερκαπτοαιθανόλη συμβάλλουν στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών του δείγματος με το SDS να προσδίδει ταυτόχρονα σε αυτές αρνητικό φορτίο. Η γλυκερόλη συμβάλλει στην αύξηση της πυκνότητας του δείγματος για την καλύτερη μεταφορά του εντός των θέσεων φόρτωσης και το μπλε της βρωμοφαινόλης στην οπτικοποίηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης.

#### Υλικά-Αντιδραστήρια

- SDS-EDTA
- β-μερκαπτοαιθανόλη
- γλυκερόλη
- μπλε της βρωμοφαινόλης
- Eppendorf 1,5mL

#### Πειραματική διαδικασία

Για την παρασκευή του διαλύματος χρώσης του οποίου ο όγκος εξαρτάται από το δείγμα είναι σημαντικό σε κάθε περίπτωση στον τελικό όγκο του διαλύματος χρώσης η αναλογία των όγκων των διαλυμάτων SDS-EDTA, γλυκερόλης, β-μερκαπτοαιθανόλης και μπλε της βρωμοφαινόλης είναι 10:10:5:1. Τα βαμμένα δείγματα τοποθετούνται για 3' σε νερό που

βράζει. Αφού κρυώσουν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ηλεκτροφόρηση ή για να αποθηκευτούν.

### **Γ3.8. Επίπεδη SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κατά Laemmli**

#### Αρχή μεθόδου

Κατά την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κατά Laemmli σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης οι πρωτεΐνες ενός δείγματος διαχωρίζονται με βάση μόνο του μοριακό τους βάρος. Αυτό συμβαίνει διότι στις πρωτεΐνες έχει προσδοθεί αρνητικό φορτίο (SDS) και βρίσκονται σε αποδιατεταγμένη μορφή (SDS, β-μερκαπτοαιθανόλη). Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης διαθέτει πόρους από τους οποίους καλούνται να περάσουν τα διάφορα πρωτεϊνικά μόρια. Η κίνηση των πρωτεϊνών μέσα στο πήκτωμα γίνεται με την εφαρμογή τάσης, που έχει ως αποτέλεσμα οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες να κινούνται προς την άνοδο (θετικό φορτίο). Οι μικρού μοριακού μεγέθους πρωτεΐνες διέρχονται πιο εύκολα μέσω των πόρων, ενώ οι μεγάλοι μοριακού μεγέθους αδυνατούν να περάσουν και για το λόγο αυτό εντοπίζονται πιο κοντά στο σημείο εκκίνησης του δείγματος.

#### Υλικά-Αντιδραστήρια

- Ακρυλαμίδιο – bis-ακρυλαμίδιο (30:0,8 w/v)
- Stacking Gel Buffer: 0,4% SDS (w/v) σε 0,5M Tris HCl, pH 6,8
- Resolving Gel Buffer: 0,4% SDS (w/v) σε 3M Tris HCl, pH 8,8
- 10% Ammonium Persulfate (w/v)
- TEMED
- Running buffer: 17,7mM Tris, 192mM γλυκίνη και 0,1% SDS, pH=8,3
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης BIO-RAD

#### Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία ξεκινά με την παρασκευή των πήκτωμάτων ακρυλαμίδης. Πρώτο παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού. Η σύσταση του είναι η ακόλουθη: 10% διαλύματος ακρυλαμίδης – bis-ακρυλαμίδης (30:0,8 w/v), η συγκέντρωση αυτή είναι καθοριστική για την διακριτική ικανότητα του πήκτωματος, 0,375M διαλύματος Tris/HCl με pH=8,8, 0,1% SDS, 0,025% APS και 0,083% TEMED. Οι πολυμεριστικοί παράγοντες APS και TEMED προστίθεται στο τέλος. Στη συνέχεια, 7,4mL του μείγματος μεταφέρονται ανάμεσα σε κατάλληλα τοποθετημένες γυάλινες πλάκες της συσκευής ηλεκτροφόρησης, όπου ολοκληρώνεται ο πολυμερισμός. Επάνω από το δείγμα του πήκτωματος προστίθεται μικρή ποσότητα νερού, ώστε η ακρυλαμίδα να μην έρχεται σε επαφή με τον αέρα και να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός της.

Αφού το πήκτωμα διαχωρισμού πολυμεριστεί πλήρως, το νερό αφαιρείται με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού. Στη συνέχεια, μεταφέρεται επάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού το μείγμα του πήκτωματος πακεταρίσματος, του οποίου η σύσταση είναι σταθερή και περιλαμβάνει: 3,05% διαλύματος ακρυλαμίδης – bis-ακρυλαμίδης (30:0,8 w/v), 0,127M διαλύματος Tris/HCl με pH=6,8, 0,1% SDS, 0,05% APS και 0,17% TEMED. Το πήκτωμα αυτό εξασφαλίζει πως σε όλα τα δείγματα οι πρωτεΐνες θα αρχίσουν το διαχωρισμό τους από το ίδιο σημείο. Αμέσως μετά την μεταφορά του πήκτωματος πακεταρίσματος, τοποθετείται επάνω από αυτό ένα ειδικό χτένι (από τον κατασκευαστή) που δημιουργεί τις θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων. Όταν τελειώσει ο πολυμερισμός, το χτένι αφαιρείται προσεκτικά και τα πήκτωμα μαζί με τις γυάλινες πλάκες μεταφέρονται σε ειδική υποδοχή

της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Σε κάθε θέση φόρτωσης τοποθετείται η επιθυμητή ποσότητα δείγματος, ενώ σε μία θέση φορτώνονται επίσης 5μL δείκτη μοριακών βαρών.

Για την ηλεκτροφόρηση απαιτείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης να γεμίσει με ενδεδειγμένο όγκο διαλύματος ηλεκτροδίων (running buffer), το οποίο βοηθά στην επίδραση του ηλεκτρικού ρεύματος στις πρωτεΐνες των δειγμάτων. Το διάλυμα αυτό περιέχει 17,7mM Tris, 192mM γλυκίνη και 0,1% SDS, με pH=8,3. Κατά τη ρύθμιση του pH είναι σημαντικό να μην χρησιμοποιείται HCl, καθώς τα ιόντα Cl<sup>-</sup>, μειώνουν την αναλυτική ικανότητα της μεθόδου. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης κλείνει και τα ηλεκτρόδια συνδέονται με ειδική συσκευή εφαρμογής τάσης. Το πακετάρισμα των πρωτεϊνών γίνεται υπό ρεύμα σταθερής έντασης I=20mA και ο διαχωρισμός γίνεται υπό ρεύμα σταθερής έντασης I=35mA.

### **Γ3.9. Ημίξηρη μεταφορά πρωτεϊνών**

#### Αρχή μεθόδου

Πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση κατά Laemmli, μπορούν, χάρη στην εφαρμογή τάσης κάθετα προς την κατεύθυνση της ηλεκτροφόρησης, να μεταφερθούν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης διατηρώντας το ηλεκτροφορητικό πρότυπο διαχωρισμού τους. Ο χαρακτηρισμός ως ημίξηρη έγκειται στο γεγονός ότι η μεταφορά γίνεται ανάμεσα σε χαρτιά Whatmann εμποτισμένα με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, έναντι της υγρής μεταφοράς όπου το σύστημα του πηκτώματος και της νιτροκυτταρίνης βρίσκεται βυθισμένο στο αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα.

#### Υλικά-Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer): 50mM Tris, 40mM γλυκίνη, 0,04% SDS, 20% μεθανόλη, pH~8,3
- Διηθητικό χαρτί Whatmann
- Νιτροκυτταρίνη
- Transblot – SDI Semidry Transfer Gel

#### Πειραματική διαδικασία

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης τα πηκτώματα στα οποία έχει γίνει ο διαχωρισμός αφαιρούνται προσεκτικά, ώστε να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά σε νιτροκυτταρίνη. Διηθητικά χαρτιά Whatmann κατάλληλων διαστάσεων τοποθετούνται σε δοχείο με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, ώστε να εμποτιστούν. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμποτίζεται σε απεσταγμένο νερό. Εντός της ειδικής συσκευής Transblot-SDI Semidry Transfer Gel, συναρμολογείται με την ακόλουθη σειρά η διάταξη της μεταφοράς: έξι εμποτισμένα χαρτιά Whatmann, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, πήκτωμα διαχωρισμού με το σωστό προσανατολισμό και τέλος άλλα έξι εμποτισμένα χαρτιά Whatmann. Η συσκευή κλείνει και το κύκλωμα ολοκληρώνεται με την τοποθέτηση των ηλεκτροδίων σε ειδικό τροφοδοτικό. Ο χρόνος της μεταφοράς είναι περίπου 1 ώρα και 10 λεπτά με εφαρμογή ρεύματος σταθερής τάσης V=20V.

### **Γ3.10. Ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Western blotting)**

#### Αρχή μεθόδου

Το ανοσοαποτύπωμα κατά Western βασίζεται στην μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου είναι πιο εύκολα προσβάσιμες λόγω του επιφανειακού χαρακτήρα της σύνδεσής τους, και στην ανοσοεντόπιση τους με ειδικά για αυτές αντισώματα (πρωτογενή αντισώματα). Εν συνεχεία, αντισώματα ειδικά για τα τις

σταθερές περιοχές των πρωτογενών (δευτερογενή αντισώματα) συνδέονται με τους στόχους τους. Τα δευτερογενή αντισώματα είναι συζευγμένα με κάποιο ένζυμο ικανό να δώσει σήμα όταν η μεμβράνη επωαστεί με το υπόστρωμά του. Στο παρόν πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση του ραπανιού (HRP). Η εμφάνιση του σήματος πραγματοποιήθηκε πάνω σε ειδικά φιλμ με το σύστημα ECL χάρη στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας.

#### Υλικά-Αντιδραστήρια

- Άπαχο αποξηραμένο γάλα (3%)
- PBS-T (Tween, 0,1%)
- ECL
- Ακτινογραφικό φιλμ
- Developer – εμφανιστής (KODAK) D-19
- Fixer – στερεωτής (KODAK)
- Κασέτα εμφάνισης
- Λαβίδα
- Διαφάνειες
- β-μερκαπτοαιθανόλη
- Stripping buffer

#### Πειραματική διαδικασία

Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, όπως περιγράφηκε παραπάνω, η μεμβράνη πρέπει να προετοιμαστεί για την ανοσοεντόπιση. Η διαδικασία ξεκινά με την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων με επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε άπαχο γάλα 3%. Το βήμα αυτό είναι γνωστό ως blocking και εξασφαλίζει την ελαχιστοποίηση της μη-ειδικής σύνδεσης του πρωτογενούς αντισώματος. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Ακολουθούν πλύσεις με διάλυμα PBS-T. Εφόσον, η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος έχει απομακρυνθεί, η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο έχει συζευχθεί με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP). Τόσο το πρωτογενές όσο και το δευτερογενές αραιώνονται στο διάλυμα blocking. Ακολουθούν και πάλι πλύσεις με PBS-T.

Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στη χημειοφωταύγεια και γίνεται με το σύστημα ECL (Enhanced ChemiLuminescence). Η διαδικασία που ακολουθεί λαμβάνει χώρα σε σκοτεινό θάλαμο. Η νιτροκυτταρίνη επωάζεται με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης, τη λουμινόλη. Η λουμινόλη, οξειδώνεται και διεγείρεται. Καθώς τα διεγερμένα ηλεκτρόνια επιστρέφουν στην κατάσταση ηρεμίας τους, εκπέμπεται ενέργεια με τη μορφή φωτονίων. Για την ανίχνευση των φωτονίων αυτών η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης τοποθετείται μέσα σε διαφάνεια και επάνω σε αυτή ένα φιλμ. Το σύστημα αυτό τοποθετείται μέσα σε ειδική κασέτα για συγκεκριμένο χρόνο.

Για την εμφάνιση το φιλμ βυθίζεται σε διάλυμα D-19, στο οποίο εμφανίζονται οι ζώνες στα σημεία όπου το φιλμ έχει προσβληθεί από τα φωτόνια. Το φιλμ, έπειτα, ξεπλένεται με νερό και μεταφέρεται στο διάλυμα fixer, όπου οι ζώνες στερεώνονται.

Η νιτροκυτταρίνη μετά το τέλος της διαδικασίας αυτής φέρει συνδεδεμένα πάνω της τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοεντόπιση. Παρόλα αυτά λόγω της ασθενούς φύσης των αλληλεπιδράσεων, τα αντισώματα αυτά μπορούν να αποκολληθούν



από τη μεμβράνη και η ίδια νιτροκυτταρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για έναν καινούριο κύκλο ανοσοεντόπισης. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται stripping και περιλαμβάνει την επώαση της μεμβράνης με stripping buffer και β-μερκαπτοαιθανόλη για 45' σε κλίβανο στους 60°C. Ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης με PBS. Τέλος, η μεμβράνη στεγνώνεται και μπορεί χρησιμοποιηθεί εκ νέου.

### **Γ3.11. Ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνών πηκτωμάτων και φιλμ**

Τα πηκτώματα καθώς και τα φιλμ σαρώνονται και πυκνομετρούνται με τη βοήθεια του προγράμματος επεξεργασίας εικόνων Gel Analyser. Ο χρήστης ορίζει την περιοχή του υποβάθρου της ζώνης και στη συνέχεια το περίγραμμα της ζώνης. Μετά την αφαίρεση του υποβάθρου υπολογίζεται το άθροισμα της φωτεινότητας όλων των εικονοστοιχείων (pixels) που περιέχονται στη ζώνη και οι τιμές που προκύπτουν επεξεργάζονται με τη βοήθεια του προγράμματος Excel. Για κάθε δείγμα, υπολογίζεται η τιμή της κάθε πρωτεϊνικής ζώνης, το άθροισμα των τιμών όλων των πρωτεϊνών καθώς και η τιμή του λόγου της κάθε πρωτεΐνης προς το άθροισμα αυτό ή προς μια πρωτεΐνη αναφοράς η οποία εμφανίζει σταθερές τιμές ανάμεσα στα δείγματα.

### **Γ3.12. Μέτρηση των επιπέδων καρβονυλίωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Oxyblot**

#### Αρχή μεθόδου

Τα επίπεδα της καρβονυλίωσης πρωτεϊνών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης οξειδωτικής βλάβης πρωτεϊνών. Η μέθοδος Oxyblot βασίζεται στην αντίδραση των καρβονυλικών ομάδων, που προκύπτουν από οξειδωτικά συμβάντα, με το αντιδραστήριο 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH) και το σχηματισμό DNP-παραγώγων τα οποία μπορούν να προσδιοριστούν φασματοφωτομετρικά ή ανοσοχημικά με τη χρήση αντι-δινιτροφαινυλο αντισωμάτων (anti-DNP).

#### Υλικά-Αντιδραστήρια

- β-μερκαπτοαιθανόλη
- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
- Oxyblot detection kit, Millipore

#### Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία ξεκινά με τη διαλυτοποίηση των μεμβρανών ή των κυστιδίων (με 12-15μg πρωτεϊνών) σε διάλυμα 12% SDS. Στη συνέχεια προστίθεται διπλάσια ποσότητα αντιδραστηρίου DNPH και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη διαλύματος ουδετεροποίησης και όλο το μείγμα ανάγεται με β-μερκαπτοαιθανόλη σε τελική συγκέντρωση 5%.

Τα δείγματα των πρωτεϊνών διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση και στη συνέχεια για την ανίχνευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών ακολουθείται η μέθοδος του ανασοαποτυπώματος με χρήση ειδικού αντισώματος (anti-DNP). Μετά την ανίχνευση, υπολογίζεται ο δείκτης καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών (Proteome Carbonylation Index-PCI). Ο δείκτης αυτός αντιστοιχεί στο πηλίκο του σήματος του Oxyblot προς το σήμα μίας πρωτεΐνης ή του αθροίσματος πρωτεϊνών που εμφανίζουν σχετικά σταθερές τιμές ανάλογα στα δείγματα.

### **Γ3.13 Ανάλυση Βιολογικών Δικτύων**

Για την ανάλυση δικτύων πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση συσχέτισης Spearman με στόχο την εύρεση συσχετίσεων μεταξύ παραμέτρων των ερυθροκυττάρων/μεμβράνης και παραμέτρων των εξωκυττάρων κυστιδίων. Πρόκειται για μία δευτερογενή ανάλυση

δεδομένων που προέρχονται από πειράματα που εξετάζουν παραμέτρους αιματολογικές (π.χ. MCH, MCV), πρωτεωμική ή τροποποιήσεις του πρωτεώματος (π.χ. pTYR). Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι συσχετίσεις με  $p < 0,01$ . Για την παρουσίαση των δικτύων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Cytoscape 3.8.2. Ο συντελεστής συσχέτισης  $r$  και συγκεκριμένα η τιμή  $(1/r)$  χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο των αποστάσεων μεταξύ των παραμέτρων στα δίκτυα. Επομένως, δύο παράμετροι που βρίσκονται κοντά στο δίκτυο έχουν υψηλή μεταξύ τους συσχέτιση.

## Δ. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις ενότητες Δ1-Δ4 αφορούν στις μετρήσεις που ελήφθησαν κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας για τα δείγματα των ετερόζυγων για β-θαλασσαιμία και των μαρτύρων. Σε πρώτη φάση, παρατίθενται τα αποτελέσματα που αφορούν στην οξειδωτική κατάσταση των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων. Έπειτα παρουσιάζονται τιμές που αφορούν στις πρωτεολυτικές ενεργότητες του πρωτεασώματος και ακολουθούν αποτελέσματα ανοσοαποτυπωμάτων κατά Western, στα οποία ανιχνεύθηκαν πρωτεΐνες ενδιαφέροντος για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. Στην ενότητα Δ4 εξετάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων και των ενδοκυττάρων ROS, με σκοπό την μελέτη του ρόλου του πρωτεασώματος στην αντιμετώπιση οξειδωτικών γεγονότων στην αρχή, το μέσο και το τέλος της αποθήκευσης. Τέλος, η ενότητα Δ5 είναι αφιερωμένη στα αποτελέσματα της ανάλυσης δικτύων παραμέτρων που αφορούν στη μεμβράνη και τα αποβαλλόμενα εξωκυττάρια κυστίδια την ημέρα 42.

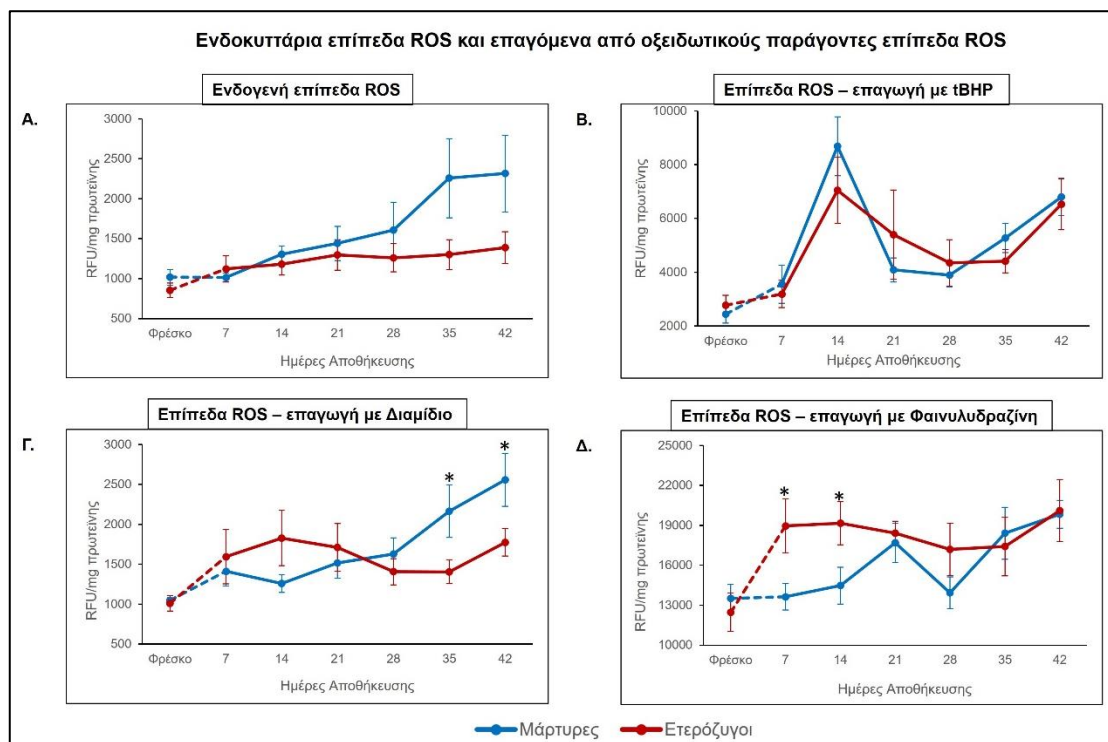
### Δ1. Οξειδωτικό στρες – Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS

Τα επίπεδα των δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) που προέκυψαν με τη χρήση των παραπάνω πρωτοκόλλων αποτελούν ένα μέσο ποσοτικοποίησης του οξειδωτικού στρες, στο οποίο καλούνται να ανταποκριθούν τα κύτταρα των μαρτύρων και των ετερόζυγων για β-θαλασσαιμία κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Η διερεύνηση των επιπέδων τους είναι σημαντική καθώς, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι επιπτώσεις τους στο πρωτεϊνικό φορτίο του ερυθροκυττάρου, είναι πολλαπλές. Η ενεργοποίηση μηχανισμών «Διάσωσης ή Καταστροφής», όπως το πρωτεάσωμα, ως αποτέλεσμα σε αυτού του είδους τις αλλοιώσεις καθιστά την μέτρηση ROS απαραίτητη για τον σκοπό αυτής της εργασίας.

Πιο συγκεκριμένα, η μέτρηση των ενδοκυττάρων ROS χωρίς εξωγενή επαγωγή αποσκοπεί στην εύρεση των επιπέδων των ενδογενών ROS στις δύο ομάδες. Η επίδραση με διάφορους εξωγενείς οξειδωτικούς παράγοντες (tBHP: ποικίλοι στόχοι, διαμίδιο: γλουταθειόνη κλπ, δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, φαινυλδραζίνη: αιμοσφαιρίνη) χρησιμεύει στην διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών σε διάφορα χρονικά διαστήματα κατά την αποθήκευση. Στον παρακάτω πίνακα και διαγράμματα παρουσιάζονται οι τιμές (μέσος όρος και τυπικό σφάλμα) των ενδοκυττάρων ROS για τις τέσσερις προαναφερθείσες συνθήκες για τις δύο ομάδες:

	Ημέρες αποθήκευσης	Φρέσκο Αίμα	7	14	21	28	35	42	
Α.	Ενδοκυττάρια ROS	Μάρτυρες	1018± 97,92	1015± 54,86	1307± 100,8	1440± 212,64	1607± 348,26	2257± 496,48	2315± 479,77
		Ετερόζυγοι	854± 88,60	1121± 164,88	1180± 134,67	1296± 189,15	1260± 176,77	1300± 189,37	1389± 199,02
Β.	Ενδοκυττάρια ROS Επαγόμενα από tBHP	Μάρτυρες	2441± 335,62	3553± 705,24	8685± 1094,86	4084± 453,55	3892± 444,79	5274± 543,32	6806± 691,61
		Ετερόζυγοι	2770± 374,11	3195± 512,26	7043± 1231,42	5400± 1665,53	4348± 864,57	4405± 431,25	6533± 950,76
Γ.	Ενδοκυττάρια ROS Επαγόμενα από διαμίδιο	Μάρτυρες	1045± 35,19	1414± 184,71	1258± 110,34	1514± 188,11	1628± 203,41	2164± 327,29	2557± 322,26
		Ετερόζυγοι	1011± 97,22	1594± 340,40	1828± 346,86	1711± 298,66	1407± 163,88	1405± 146,26*	1774± 172,07*
Δ.	Ενδοκυττάρια ROS Επαγόμενα από φαινυλδραζίνη	Μάρτυρες	13499± 1063,19	13631± 988,52	14473± 1377,11	17689± 1468,69	13929± 1191,31	18408± 1956,66	19839± 1047,71
		Ετερόζυγοι	12472± 1428,13	18961± 2005,34*	19157± 1618,44*	18409± 899,46	17184± 1968,53	17415± 2201,2	20096± 2313,01

**Πίνακας 1:** Τιμές (RFU/mg πρωτεΐνης) ενδοκυττάρων ROS και των επαγόμενων από tBHP, διαμίδιο, φαινυλδραζίνη τιμών (RFU/mg πρωτεΐνης) των ενδοκυττάρων ROS με τις αντίστοιχες τιμές τυπικών σφαλμάτων για μάρτυρες και ετερόζυγους για β-θαλασσαιμία. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0,05$ ) σημειώνονται με αστερίσκο (\*).



**Διάγραμμα 1:** Χρονοεξαρτώμενη απεικόνιση των επιπέδων των ενδοκυττάρων ROS **A.** Χωρίς εξωγενή επαγωγή, **B.** επαγόμενα εξωγενώς από tBHP, **Γ.** επαγόμενα εξωγενώς από διαμίδιο, **Δ.** επαγόμενα εξωγενώς από φαινυλδραζίνη, για μάρτυρες και ετερόζυγους β-θαλασσαιμίας. Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στο τυπικό σφάλμα των μετρήσεων και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0,05$ ) σημειώνονται με αστερίσκο (\*).

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1.A. τα επίπεδα ROS αυξάνονται όσο προχωρά η αποθήκευση, με τις τιμές των μαρτύρων να παρουσιάζουν μεγαλύτερη άνοδο στο δεύτερο μισό της αποθήκευσης σε σχέση με την αυτή των ετερόζυγων. Η προσθήκη tBHP, διαμιδίου και φαινυλδραζίνης προκάλεσε αύξηση των απόλυτων τιμών σε σχέση με τα ROS που μετρήθηκαν χωρίς κάποια εξωγενή επαγωγή. Στην περίπτωση των επαγόμενων από tBHP ROS ακολουθείται μία ανοδική πορεία με τη μέγιστη τιμή να παρατηρείται κατά την ημέρα αποθήκευσης 14 και για τις δύο ομάδες χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η επίδραση με διαμίδιο περιλαμβάνει στην περίπτωση των ετερόζυγων μία αύξηση στο πρώτο μισό την αποθήκευσης και έπειτα μία φθίνουσα τάση με εξαίρεση την ημέρα 42. Στους μάρτυρες, από την άλλη, η αύξηση είναι πιο αργή και συνεχίζει μέχρι το τέλος της αποθήκευσης. Στο τέλος της αποθήκευσης, οι διαφορές των τιμών παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τους ετερόζυγους να έχουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ενδοκυττάρων ROS ( $p < 0,05$ ). Τέλος, η επίδραση με φαινυλδραζίνη, όπως φαίνεται, επέφερε την μεγαλύτερη αύξηση κατά απόλυτη τιμή στα επίπεδα των ενδοκυττάρων ROS από όλους τους παράγοντες. Στην αρχή της αποθήκευσης οι ετερόζυγοι επιδεικνύουν μια πιο απότομη αύξηση των ROS και σχεδόν σταθερά επίπεδα στο δεύτερο μισό αυτής με μικρή αύξηση την ημέρα 42. Οι μάρτυρες επιδεικνύουν μία πιο αργή αύξηση των ROS υπό την επίδραση φαινυλδραζίνης με τα επίπεδα τους να παραμένουν χαμηλότερα από εκείνα των ετερόζυγων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης με εξαίρεση την ημέρα 42.

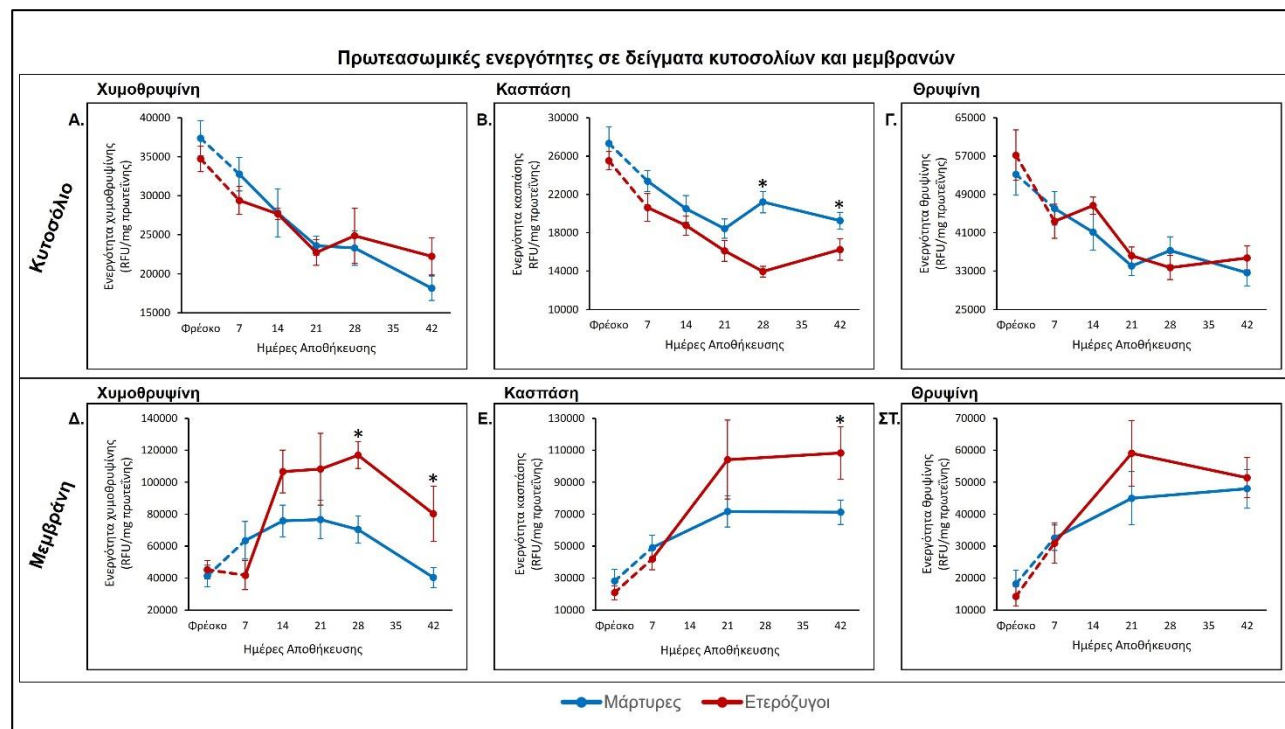
**Δ2. Πρωτεασωματικές ενεργότητες**

Το δεύτερο μέρος των μετρήσεων αφορά στις ενεργότητες του πρωτεασώματος. Η διερεύνηση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας του πρωτεασώματος κατά την αποθήκευση είναι κεντρικής σημασίας στην παρούσα εργασία, διότι προσφέρει μία εικόνα της απομάκρυνσης ή τροποποίησης μορίων που έχουν δεχθεί διάφορες αλλοιώσεις. Η μέτρηση των ενεργοτήτων του πρωτεασώματος τόσο σε δείγματα κυτοσολίου όσο και σε δείγματα απομονωμένων μεμβρανών εξυπηρετεί την αναζήτηση διαφορών στην τοπολογία ή την

δραστηριότητα του πρωτεασωμικών ενεργοτήτων ανάμεσα σε μάρτυρες και ετερόζυγους φορείς β-θαλασσαιμίας.

		Ημέρες αποθήκευσης	Φρέσκο Αίμα	7	14	21	28	42	
Α.	Κυτοσόλιο	Χυμοθρυψίνη	Μάρτυρες	37372± 2261.13	32781 ± 2167.88	27800 ± 3108.41	23589± 1226.67	23298± 2207.26	18146 1580.64
			Ετερόζυγοι	34715± 1652.64	29387± 1804.39	27657± 739.11	22728± 1661.34	24855± 3512.96	22227± 2390.77
Β.		Κασπάση	Μάρτυρες	27314± 1739.28	23389± 1077.24	20505± 1387.39	18429± 1016.89	21197± 1125.98	19269± 881.40
			Ετερόζυγοι	25511± 952.38	20626± 1446.64	18753± 1001.95	16095± 1074.84	13948± 542.02 *	16258± 1128.93 *
Γ.		Θρυψίνη	Μάρτυρες	53204± 4331.98	46086± 3505.15	41106± 3760.23	34034± 1901.37	37254± 2917.41	32634± 2715.00
			Ετερόζυγοι	57180± 5256.29	43377± 3551.44	46651± 1806.85	36209± 1826.14	33757± 2540.18	35749± 2490.59
Δ.	Μεμβράνη	Χυμοθρυψίνη	Μάρτυρες	41344± 6791.93	63615± 11794.9	75769± 9928.66	76684± 12126.44	70376± 8489.82	40353± 6348.36
			Ετερόζυγοι	45208± 5729.08	41765± 9086.94	106673± 13418.7	108206± 22463.43	116956± 8317.36 *	80261± 17263.32 *
Ε.		Κασπάση	Μάρτυρες	28209± 7331.04	49077± 7701.23	-	71630± 9720.59	-	71274± 7692.57
			Ετερόζυγοι	20854± 4339.20	42125± 6883.47	-	104152± 24720.1	-	108241± 16388.97 *
ΣΤ.		Θρυψίνη	Μάρτυρες	18145± 4263.79	32623± 4013.94	-	45006± 8311.48	-	47991± 6035.92
			Ετερόζυγοι	14279± 2974.62	31011± 6249.62	-	59024± 10326.11	-	51450± 6284.91

**Πίνακας 2:** Τιμές (RFU/mg πρωτεΐνης) πρωτεασωμικών ενεργοτήτων στο **κυτοσόλιο**: Α. χυμοθρυψίνη, Β. κασπάση, Γ. θρυψίνη και στη **μεμβράνη**: Δ. χυμοθρυψίνη, Ε. κασπάση, ΣΤ. θρυψίνη, με τις αντίστοιχες τιμές τυπικών σφαλμάτων για μάρτυρες και ετερόζυγους για β-θαλασσαιμία. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p<0,05$ ) σημειώνονται με αστερίσκο (\*).



**Διάγραμμα 2:** Χρονοεξαρτώμενη απεικόνιση των τιμών (RFU/mg πρωτεΐνης) των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων στο **κυτοσόλιο**: Α. χυμοθρυψίνη, Β. κασπάση, Γ. θρυψίνη και στη **μεμβράνη**: Δ. χυμοθρυψίνη, Ε. κασπάση, ΣΤ. θρυψίνη για μάρτυρες και ετερόζυγους για β-θαλασσαιμία. Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στο τυπικό σφάλμα των μετρήσεων και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p<0,05$ ) σημειώνονται με αστερίσκο (\*).

Όπως φαίνεται παραπάνω, μεταξύ των δειγμάτων των μεμβρανών και των κυτοσολίων υπάρχουν διαφορές κατά την αποθήκευση. Στο κυτοσόλιο, οι και οι τρεις πρωτεασωματικές ενεργότητες παρουσιάζουν πτώση με την πάροδο της αποθήκευσης με τρόπο παρόμοιο τόσο στους μάρτυρες όσο και τους ετερόζυγους. Στην περίπτωση της ενεργότητας κασπάσης στο τέλος την αποθήκευσης (ημέρες 28-42) υπήρξε μία αύξηση στις τιμές των μαρτύρων, η οποία είναι στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με τις τιμές των ετερόζυγων. Οι ίδιες ενεργότητες στην μεμβράνη είχαν αρκετά διαφορετική εικόνα και συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 2, επέδειξαν αυξητική πορεία κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Και στις τρεις περιπτώσεις παρατηρήθηκε αύξηση των μέσων τιμών των ετερόζυγων σε σχέση με τους μάρτυρες, η οποία, όμως λόγω μεγάλου εύρους τιμών εντός των ομάδων, χαρακτηρίζεται ως στατιστικά σημαντική μόνο στο τέλος της αποθήκευσης για τις ενεργότητες χυμοθρυψίνης και κασπάσης.

### Δ3. Μεταβολές στην πρωτεϊνική σύσταση της μεμβράνης

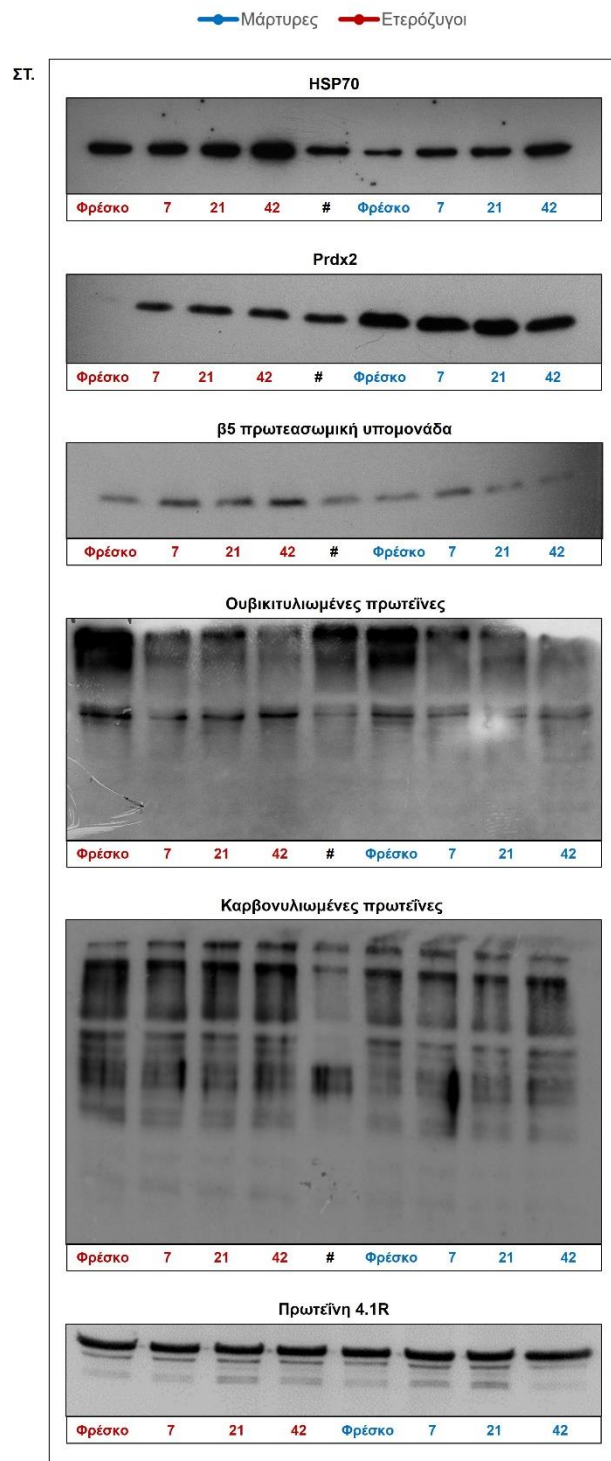
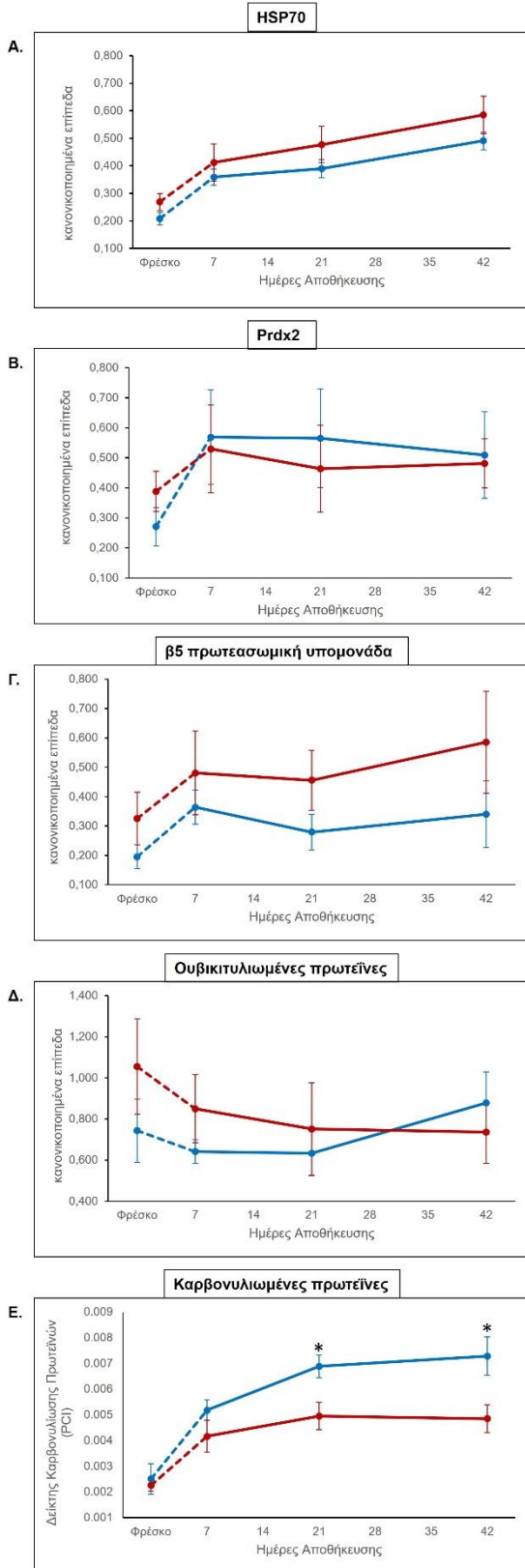
Η εξέταση της πρωτεϊνικής σύστασης της μεμβράνης αποσκοπεί στην εύρεση αλληλεπιδράσεων ή πιθανών μετακινήσεων μορίων κεντρικών σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης προς την ερυθροκυτταρική μεμβράνη, όταν σε αυτή ασκείται παρατεταμένα στρες σε συνθήκες αποθήκευσης. Ο βαθμός σύνδεσης των ακόλουθων πρωτεϊνών, επομένως, στη μεμβράνη λειτουργεί ως ένδειξη της οξειδωτικής πίεσης σε αυτή για τις δύο ομάδες. Συγκεκριμένα, τόσο η μοριακή συνοδός HSP70, όσο και η Prdx2, όπως έχει αναφερθεί, δρουν προστατευτικά στη μεμβράνη, ενώ οι πρωτεΐνες του συστήματος του πρωτεασώματος παρέχουν μία άποψη της αυξημένης ανάγκης για καταστροφή αλλοιωμένων πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Επιπλέον πληροφορίες για το οξειδωτικό στρες που ασκείται στη μεμβράνη προσφέρει ο δείκτης καρβονυλίωσης. Η καρβονυλίωση ως μία μη αντιστρεπτή τροποποίηση λειτουργεί ως μέτρο της οξειδωτικής καταστροφής των συνδεδεμένων στη μεμβράνη πρωτεϊνών. Στον ακόλουθο πίνακα και διάγραμμα παρουσιάζονται οι μεταβολές των κανονικοποιημένων επιπέδων βασικών πρωτεϊνών καθώς και οι τιμές του δείκτη πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης για τις δύο υπό μελέτη ομάδες.

		Ημέρες αποθήκευσης	Φρέσκο Αίμα	7	21	42
Α.	HSP70 συνδεδεμένη στη μεμβράνη	Μάρτυρες	0,208± 0,023	0,359± 0,029	0,390± 0,033	0,491± 0,032
		Ετερόζυγοι	0,269± 0,031	0,412± 0,068	0,477± 0,066	0,585± 0,068
Β.	Prdx2 συνδεδεμένη στη μεμβράνη	Μάρτυρες	0,271± 0,064	0,569± 0,157	0,565± 0,164	0,509± 0,144
		Ετερόζυγοι	0,388± 0,067	0,529± 0,146	0,464± 0,144	0,481± 0,082
Γ.	β5 πρωτεασωματική υπομονάδα συνδεδεμένη στη μεμβράνη	Μάρτυρες	0,195± 0,041	0,364± 0,059	0,279± 0,061	0,340± 0,113
		Ετερόζυγοι	0,325± 0,090	0,480± 0,143	0,456± 0,102	0,585± 0,174
Δ.	Ub Συνδεδεμένη στη μεμβράνη	Μάρτυρες	0,743± 0,153	0,641± 0,058	0,633± 0,108	0,877± 0,153
		Ετερόζυγοι	1,055± 0,231	0,850± 0,165	0,751± 0,225	0,736± 0,153
Ε.	Δείκτης Καρβονυλίωσης Πρωτεϊνών (PCI)	Μάρτυρες	2,510± 0,593	5,185± 0,340	6,889± 0,437	7,284± 0,754
		Ετερόζυγοι	2,250± 0,212	4,167± 0,623	4,951± 0,536 *	4,850± 0,554 *

**Πίνακας 3:** Κανονικοποιημένες τιμές, για μάρτυρες και ετερόζυγους, πρωτεϊνών συνδεδεμένων στη μεμβράνη: **Α.** HSP70, **Β.** Υπεροξειριεδοξίνη (Prdx2), **Γ.** β5 πρωτεασωματική υπομονάδα, **Δ.** ουβικιτίνη (Ub) **Ε.** Τιμές του Δείκτη Καρβονυλίωσης Πρωτεϊνών (PCI) για μάρτυρες και ετερόζυγους β-θαλασσαιμίας. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0,05$ ) σημειώνονται με αστερίσκο (\*).



### Επίπεδα συνδεδεμένων στη μεμβράνη πρωτεϊνών (Western)



**Διάγραμμα 3:** Χρονοεξαρτώμενη απεικόνιση τιμών των κανονικοποιημένων επιπέδων για πρωτεΐνες συνδεδεμένες στη μεμβράνη: **A.** HSP70, **B.** Υπεροξειδεδοξίνη (Prdx2), **Γ.** β5 πρωτεασωμική υπομονάδα, **Δ.** ουβικιτίνη (Ub) **Ε.** Χρονοεξαρτώμενη απεικόνιση του Δείκτη Καρβουλίωσης Πρωτεϊνών (PCI) για μάρτυρες και ετερόζυγους β-θαλασσαιμίας. Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στο τυπικό σφάλμα των μετρήσεων και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0,05$ ) σημειώνονται με αστερίσκο (\*). **ΣΤ.** Ενδεικτικές φωτογραφίες φιλμ

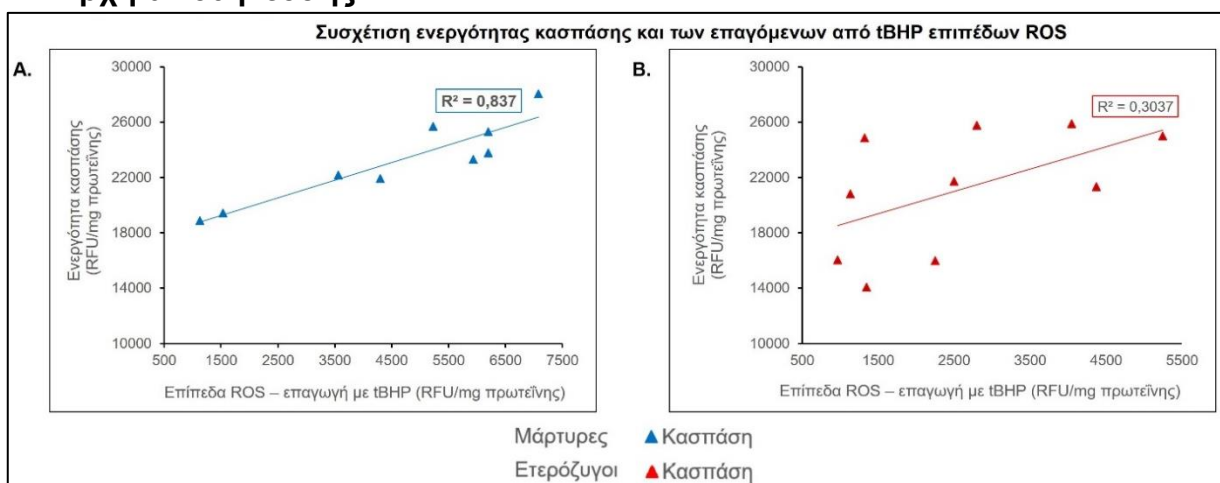
ανοσοαποτυπωμάτων κατά Western. Εικονίζονται από πάνω προς τα κάτω: HSP70, Prdx2, β5 πρωτεασωμική υπομονάδα, ουβικιτίνη, καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες, πρωτεΐνη 4.1R.

Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4A., τα επίπεδα της μεμβρανοσυνδεόμενης HSP70 των ετερόζυγων είναι υψηλότερα από τα αντίστοιχα των μαρτύρων σε όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης, Η β5 πρωτεασωμική υπομονάδα (4Γ.) παρουσιάζει παρόμοια εικόνα με τις διαφορές μεταξύ των 2 ομάδων να είναι μεγαλύτερες. Η σύνδεση στη μεμβράνη για την HSP70 έχει αυξητική πορεία έως και το τέλος της αποθήκευσης, ενώ η β5 υπομονάδα παρουσιάζει μικρή πτώση στο μέσο της αποθήκευσης και στη συνέχεια αύξηση για την ημέρα 42, και στις δύο ομάδες. Παράλληλα, η συνδεδεμένη στη μεμβράνη υπεροξειρεδοξίνη (Διάγραμμα 4B.) αυξάνεται σε συνθήκες αποθήκευσης σε σχέση με το φρέσκο αίμα με τους μάρτυρες να διατηρούν υψηλότερα κατά απόλυτη τιμή επίπεδα καθ' όλη την αποθηκευτική περίοδο σε αντίθεση με το φρέσκο αίμα. Οι τιμές της για τους ετερόζυγους εμφανίζουν μικρή μείωση την ημέρα 21 της αποθήκευσης και αυτές των μαρτύρων την ημέρα 42. Τέλος, τα επίπεδα ουβικιτίνης συνδεδεμένης σε πρωτεΐνες της μεμβράνης, αν και τόσο στο φρέσκο αίμα όσο και κατά το πρώτο μισό της αποθήκευσης ήταν υψηλότερα στα δείγματα των ετερόζυγων, στο δεύτερο μισό σημείωσαν αύξηση στα δείγματα των μαρτύρων και μείωση σε αυτά των ετερόζυγων. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις το εύρος των τιμών μεταξύ των δειγμάτων κάθε ομάδας ήταν υψηλό με αποτέλεσμα οι διαφορές μεταξύ μαρτύρων και ετερόζυγων να μην είναι στατιστικά σημαντικές. Ο δείκτης καρβονυλίωσης πρωτεϊνών (PCI), που παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4E. για τους μάρτυρες είναι υψηλότερος σε όλες τις ημέρες που μετρήθηκαν σε σχέση με τους ετερόζυγους, με τις τιμές στην ημέρα 21 και 42 να είναι επιπλέον στατιστικά σημαντικές. Η αύξηση και των δύο είναι πιο γρήγορη στο πρώτο μισό του χρόνου αποθήκευσης.

#### Δ4. Συσχέτιση μεταξύ πρωτεασωμικών ενεργοτήτων και οξειδωτικού στρες κατά την αποθήκευση

Η αναζήτηση συσχετίσεων μεταξύ των τιμών των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων και της οξειδωτικής κατάστασης των κυττάρων, που δίνεται από τα επίπεδα των ενδοκυττάρων ROS, είναι σημαντική για την μελέτη του ρόλου του πρωτεασώματος στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες και την αναζήτηση διαφορών μεταξύ των δύο ομάδων. Η τιμή του δείκτη R που παρουσιάζεται σε κάθε γράφημα εκφράζει το κατά πόσο η κάθε ενεργότητα εμφανίζει γραμμική συσχέτιση με τα επίπεδα των ενδοκυττάρων ROS.

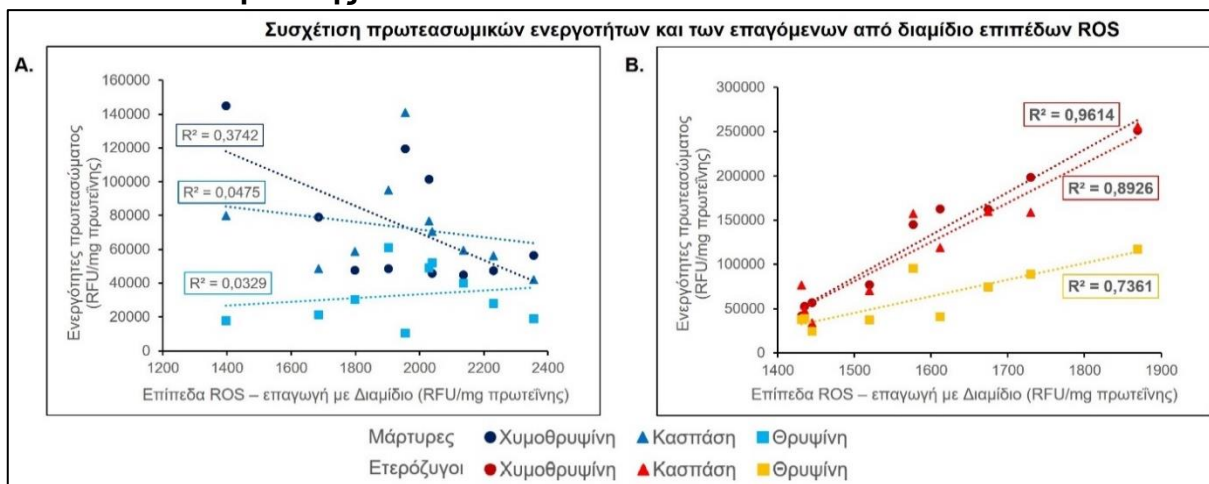
##### Δ4.1. Αρχή αποθήκευσης



**Διάγραμμα 4:** Απεικόνιση της διασποράς των τιμών της κυτοσολικής πρωτεασωμικής ενεργότητας κασπάσης συναρτήσει των επιπέδων των επαγόμενων από tBHP ενδοκυττάρων ROS, στην αρχή της αποθήκευσης (Ημέρα 7) για **A.** τους μάρτυρες και **B.** τους ετερόζυγους για β-θαλασσαιμία.

Παρατηρείται πως στην αρχή της αποθήκευσης οι τιμές των μαρτύρων έχουν μικρότερη διασπορά από ότι αυτές των ετερόζυγων, πιθανόν λόγω χαμηλού αριθμού μετρήσεων. Επομένως, στους μάρτυρες φαίνεται να υπάρχει μία γραμμική συσχέτιση της κυτοσολικής πρωτεασωμικής ενεργότητας κασπάσης με τα ενδογενή επίπεδα ROS, ενώ στους ετερόζυγους ο δείκτης R είναι αρκετά χαμηλότερος, υποδηλώνοντας χαμηλή συσχέτιση των δύο παραμέτρων.

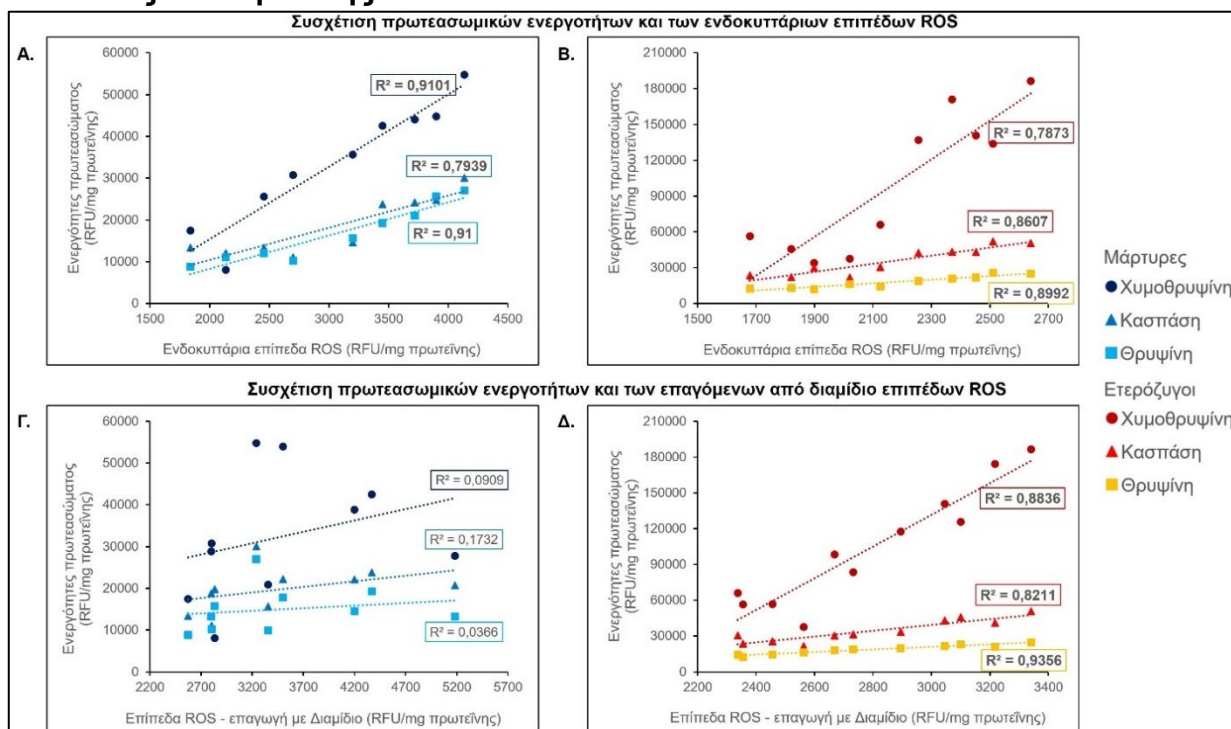
#### Δ4.2. Μέσο αποθήκευσης



**Διάγραμμα 5:** Απεικόνιση της διασποράς των τιμών των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων της μεμβράνης συναρτήσει των επαγόμενων από διαμίδιο επιπέδων των ενδοκυττάρων ROS, στο μέσο της αποθήκευσης (Ημέρα 21) για **A.** τους μάρτυρες και **B.** τους ετερόζυγους για β-θαλασσαιμία.

Στο μέσο της αποθήκευσης οι συσχετίσεις των ενεργοτήτων σε σχέση με τα επαγόμενα από διαμίδιο ROS παρουσιάζουν ενδιαφέρον, διότι μεταξύ των μαρτύρων και των ετερόζυγων παρατηρείται αξιοσημείωτη διαφορά. Συγκεκριμένα, στην ομάδα των ετερόζυγων, και οι τρεις ενεργότητες, καθώς προχωρά η εξάντληση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, εμφάνισαν υψηλή συσχέτιση με τα επίπεδα ROS.

#### Δ4.3. Τέλος αποθήκευσης



**Διάγραμμα 6:** Απεικόνιση της διασποράς των τιμών των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων της μεμβράνης συναρτήσει των επιπέδων των ενδογενών ROS, στο τέλος της αποθήκευσης (Ημέρα 42) για **A.** τους μάρτυρες και **B.** τους ετερόζυγους για β-θαλασσαιμία. Απεικόνιση της διασποράς των τιμών των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων της μεμβράνης συναρτήσει των επιπέδων των επαγόμενων από διαμίδιο ενδοκυττάρων ROS, στο τέλος της αποθήκευσης (Ημέρα 42) για **Γ.** τους μάρτυρες και **Δ.** τους ετερόζυγους για β-θαλασσαιμία.

Την ημέρα 42, η οποία σηματοδοτεί το τέλος της αποθήκευσης, οι τιμές των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων σε μεμβρανικό υλικό συναρτήσει των ενδογενών επιπέδων ROS, τόσο στα δείγματα των μαρτύρων όσο και των ετερόζυγων, παρουσίασαν υψηλές τιμές του δείκτη συσχέτισης. Οι τιμές του δείκτη R κυμαίνονται από 0,78 έως 0,91. Οι συσχετίσεις των ενεργοτήτων με τα επαγόμενα από διαμίδιο επίπεδα ROS την ίδια χρονική στιγμή εμφάνισαν παρόμοια εικόνα με αυτές στο μέσο της αποθήκευσης. Πιο συγκεκριμένα, με την εξάντληση της γλουταθειόνης, στους μάρτυρες, η συσχέτιση ήταν μικρή λόγω της διασποράς των τιμών, ενώ οι πρωτεασωμικές ενεργότητες των ετερόζυγων επέδειξαν αντίθετη εικόνα, υψηλή δηλαδή συσχέτιση με τα ROS που μετρήθηκαν μετά την προσθήκη διαμιδίου.

#### **Δ5. Συσχετίσεις παραμέτρων των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών και των κυστιδίων στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου – σύγκριση μεταξύ μαρτύρων και ετερόζυγων β-θαλασσαιμίας.**

Τα παρακάτω αποτελέσματα ανάλυσης δικτύων, που επικεντρώνονται στο σύστημα του πρωτεασώματος αναδεικνύουν συσχετίσεις μεταξύ πρωτεασωμικών υπομονάδων, ρυθμιστικών ή μη, και συγκεκριμένων φαινοτύπων των κυστιδίων που παράγονται στο τέλος της αποθήκευσης και αντιστρόφως. Η αναζήτηση διαφορών μεταξύ των δικτύων των δύο ομάδων εξυπηρετεί την διερεύνηση του εάν ο ρόλος του πρωτεασώματος στην ομάδα των ετερόζυγων β-θαλασσαιμίας είναι τροποποιημένος λόγω των ιδιοτήτων του φαινοτύπου τους.

Για την καλύτερη κατανόηση των δικτύων ακολουθεί πίνακας με τα πλήρη ονόματα των παραμέτρων που συμμετέχουν σε αυτά. Η σημείωση «V» υποδηλώνει πως η παράμετρος αφορά τα κυστίδια, ενώ απουσία της παραπέμπει σε χαρακτηριστικό των μεμβρανών.

<b>Συντομογραφία παραμέτρου</b>	<b>Όνομα παραμέτρου Αγγλικά</b>
ABCC1	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1
AHCY	Adenosylhomocysteinase
AHSP	Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein
ALB	Albumin
ALDH1A1	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1
ANK1	Ankyrin 1
AP2A1	Adaptor Related Protein Complex 2 Subunit Alpha 1
AP2B1	Adaptor Related Protein Complex 2 Subunit Beta 1
APEH	Acylaminoacyl-Peptide Hydrolase
APOA2	Apolipoprotein A2
APOA4	Apolipoprotein A4
APOB	Apolipoprotein B
AQP1	Aquaporin 1
BLVRB	Biliverdin Reductase B
BPGM	Bisphosphoglycerate Mutase
C3	Complement C3
CA1	Carbonic Anhydrase 1
CA2	Carbonic Anhydrase 2
CAND1	Cullin Associated and Neddylation Dissociated 1

CAST	Calpastatin
CD55	CD55 antigen, decay acceleratating factor (DAF)
CD59	CD59 antigen, protectin
DDI2	DNA Damage Inducible 1 Homolog 2
DIAPH1	Diaphanous Related Formin 1
EIF5A	Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A
ENO1	Enolase 1
EPB42	Erythrocyte Membrane Protein Band 4.2
ESD	Esterase D
EZR	Ezrin
F2	Coagulation Factor II, Thrombin
FGA	Fibrinogen Alpha Chain
FGG	Fibrinogen Gamma Chain
GC	GC Vitamin D Binding Protein
GNAI2	G Protein Subunit Alpha I2
GNAI3	G Protein Subunit Alpha I3
GNAS	G-protein, Alpha Stimulating
GYP A	Glycophorin A
HBA1	Hemoglobin Subunit Alpha 1
HBB	Hemoglobin Subunit Beta
HBD	Hemoglobin Subunit Delta
HBQ1	Hemoglobin Subunit Theta 1
HEBP1	Heme Binding Protein 1
IGHG3	Immunoglobulin Gamma 3, Heavy Constant Chain
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCV	Mean Corpuscular Volume
NME1	NME/NM23 Nucleoside Diphosphate Kinase 1
ORM1	Orosomucoid 1
ORM2	Orosomucoid 2
PARK7	Parkinsonism Associated Deglycase
PEBP1	Phospatidylethanolamine Binding Protein 1
PGD	Phosphogluconate Dehydrogenase
PIP4K2A	Phospatidylinositol-5-Phosphate-4-Kinase Type 2 Alpha
PRDX2	Peroxiredoxin 2
PRDX6	Peroxiredoxin 6
PSMA1	Proteasome 20S Subunit Alpha 1
PSMA2	Proteasome 20S Subunit Alpha 2
PSMA3	Proteasome 20S Subunit Alpha 3
PSMA4	Proteasome 20S Subunit Alpha 4
PSMA5	Proteasome 20S Subunit Alpha 5
PSMA6	Proteasome 20S Subunit Alpha 6
PSMA7	Proteasome 20S Subunit Alpha 7
PSMB1	Proteasome 20S Subunit Beta 1
PSMB2	Proteasome 20S Subunit Beta 2
PSMB3	Proteasome 20S Subunit Beta 3
PSMB4	Proteasome 20S Subunit Beta 4
PSMB5	Proteasome 20S Subunit Beta 5
PSMB7	Proteasome 20S Subunit Beta 7

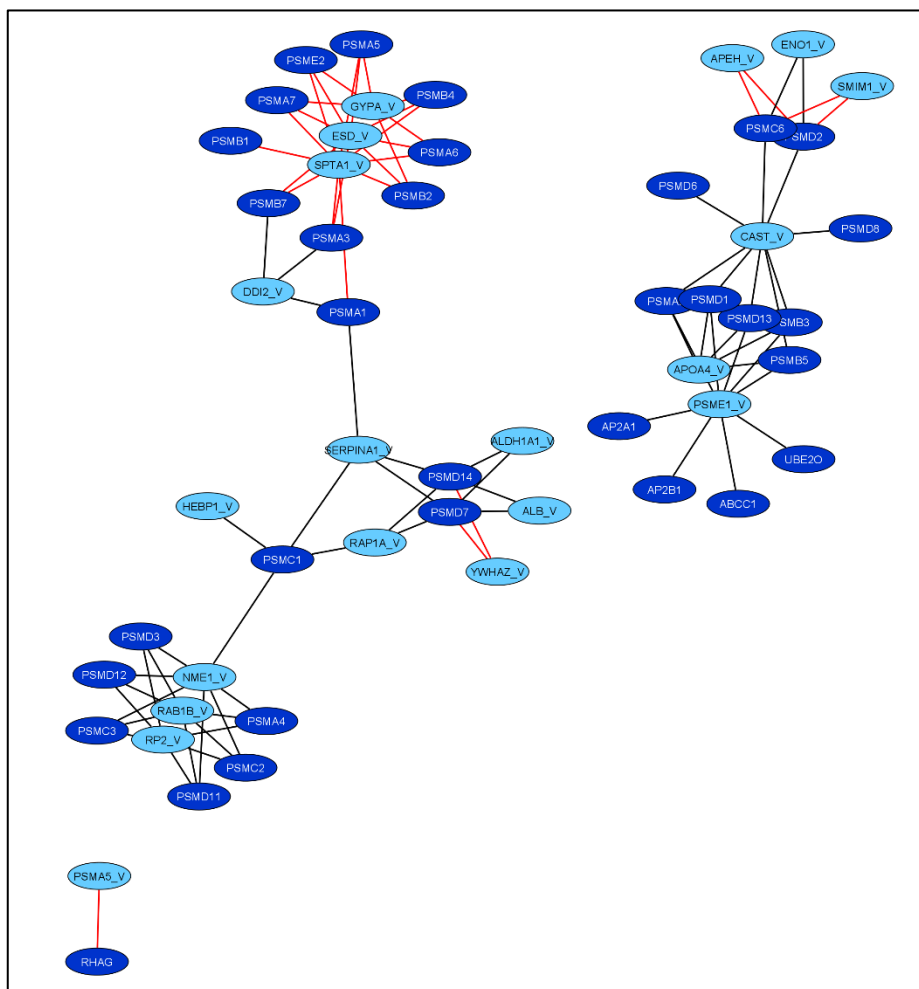
PSMC1	Proteasome 26S Subunit, ATPase 1
PSMC2	Proteasome 26S Subunit, ATPase 2
PSMC3	Proteasome 26S Subunit, ATPase 3
PSMC4	Proteasome 26S Subunit, ATPase 4
PSMC5	Proteasome 26S Subunit, ATPase 5
PSMC6	Proteasome 26S Subunit, ATPase 6
PSMD1	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 1
PSMD2	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 2
PSMD3	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 3
PSMD5	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 5
PSMD6	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 6
PSMD7	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 7
PSMD8	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 8
PSMD11	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 11
PSMD12	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 12
PSMD13	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 13
PSMD14	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 14
PSME1	Proteasome Activator Subunit 1
PSME2	Proteasome Activator Subunit 2
pTyr	Phosphotyrosine Residues
RAB1B	Ras-related protein Rab-1B
RAP1A	Ras-related protein Rap-1A
RDW	Red Cell Distribution Width
RHAG	Rh Associated Glycoprotein
RP2	RP2 Activator of ARL3 GTPase
SELENBP1	Selenium Binding Protein 1
SERPINA1	Serpin Family A Member 1
SLC2A1	Solute Carrier Family 2 Member 1
SLC4A1	Solute Carrier Family 4 Member 1
SMIM1	Small Integral Membrane Protein 1
SOD1	Superoxide Dismutase 1
SPTA1	Spectrin Alpha-1
STOM	Stomatin
TBC1D24	TBC1 Domain Family Member 24
TPI1	Triosephosphate Isomerase 1
TPM1	Tropomyosin 1
TXN	Thioredoxin
UBE2N	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 N
UBE2O	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 O
VAT1	Vesicle Amine Transport 1
VCP	Valosin Containing Protein
YWHAZ	14-3-3 Protein Zeta/Delta

### Δ5.1. Μάρτυρες

Στο παρακάτω δίκτυο για την ομάδα των μαρτύρων παρατηρούνται ορισμένες περιοχές πυρήνωσης. Πρώτον, παρατηρείται μια περιοχή με επίκεντρο την γλυκοφορίνη A (GYPA\_V) και την α αλυσίδα της σπεκτρίνης (SPTA1\_V). Οι πρωτεΐνες αυτές εμφανίζουν αρνητικές τιμές συσχέτισεων με αρκετές πρωτεασωμικές υπομονάδες των ερυθροκυττάρων και



συγκεκριμένα με υπομονάδες του κεντρικού συμπλόκου 20S. Μια δεύτερη περιοχή εντοπίζεται με κέντρο ορισμένες πρωτεΐνες των κυστιδίων, οι οποίες σχετίζονται με GTP-άσες (NME1\_V, RAB1B\_V και RP2\_V). Τα μόρια αυτά παρουσιάζουν θετικές τιμές συσχέτισεων κυρίως με ρυθμιστικές υπομονάδες του πρωτεασώματος που απαντώνται στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων των μαρτύρων. Επιπλέον, φαίνεται πως η υπομονάδα 4 της απολιποπρωτεΐνης A (APOA4\_V) και η ρυθμιστική PSME2\_V των κυστιδίων εμφανίζουν επίσης αρκετές θετικές συνδέσεις με υπομονάδες του πρωτεασώματος ή σχετικές με αυτό πρωτεΐνες, πολλές από τις οποίες μοιράζονται και με την περιεχόμενη στα κυστίδια καλπαστατίνη (CAST\_V). Τέλος, μια ενδιαφέρουσα περιοχή του δικτύου είναι αυτή γύρω από τις ρυθμιστικές πρωτεασωμικές υπομονάδες PMSD14 και PSMD7, οι οποίες συσχετίζονται με το περιεχόμενο των κυστιδίων σε διάφορα πρωτεϊνικά μόρια (θετικά με ALDH1A1\_V, SERPINA\_V, RAP1A\_V, ALB\_V και αρνητικά με YWHAZ\_V), προτείνοντας πιθανόν μια πλειοτροπική επίδραση στον φαινότυπο των κυστιδίων. Συνοψίζοντας, πρωτεΐνες του συστήματος του πρωτεασώματος που βρέθηκαν στην μεμβράνη την ημέρα 42 παρουσιάζουν συσχετίσεις κυρίως με σκελετικά στοιχεία και σχετικά με G-πρωτεΐνες παραμέτρους που ανιχνεύθηκαν στα αποβαλλόμενα κυστίδια.



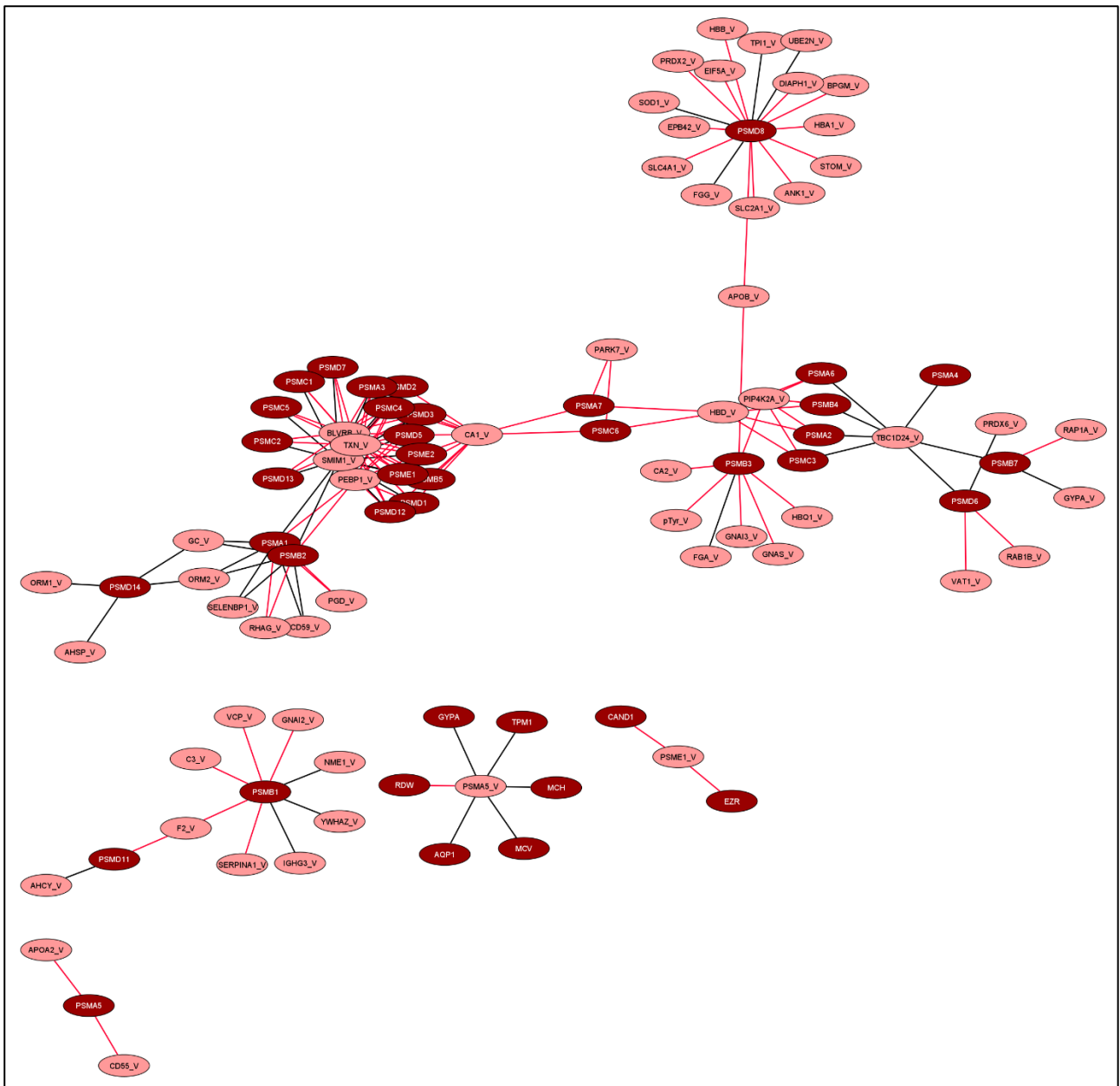
**Διάγραμμα 7:** Απεικόνιση των στατιστικά σημαντικών διασυνδέσεων των πρωτεϊνών των μεμβρανών (σκούρο μπλε) με αυτές των κυστιδίων (ανοιχτό μπλε) στο τέλος της αποθήκευσης (Ημέρα 42) για την ομάδα των μαρτύρων. Η θετική συσχέτιση απεικονίζεται με μαύρη γραμμή, ενώ η αρνητική με κόκκινη.

### Δ5.2. Ετερόζυγοι φορείς β-θαλασσαιμίας

Το δίκτυο που παρατίθεται παρακάτω αναφέρεται στην ομάδα των ετερόζυγων για θαλασσαιμία αιμοδοτών και εμφανίζει αρκετά διαφορετική εικόνα σε σχέση με αυτό των μαρτύρων. Τόσο σε ό,τι αφορά στον αριθμό των στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων γύρω

από το πρωτεάσωμα, όσο και στον τρόπο διασύνδεσης των παραμέτρων της μεμβράνης και των κυστιδίων οι διαφορές είναι αξιοσημείωτες. Η πιο εμφανής περιοχή πυρήνωσης είναι αυτή γύρω από τις κυστιδιακές παραμέτρους TXN\_V, BLVRB\_V, PEBP1\_V, SMIM\_V και CA1\_V. Παρότι αυτές οι παράμετροι συσχετίζονται με τις ίδιες πρωτεασωματικές υπομονάδες είναι πιο χρήσιμο η δικτύωση στην περιοχή αυτή να διαιρεθεί σε τρία σύνολα, δηλαδή ένα με κέντρο την SMIM1\_V, που παρουσιάζει θετικές συσχετίσεις με πολλές πρωτεασωματικές παραμέτρους, ένα δεύτερο που περιλαμβάνει τις διασυνδέσεις της καρβονικής ανυδράσης 1 των κυστιδίων (CA1\_V) με ρυθμιστικές ή μη υπομονάδες του πρωτεασώματος και ένα τρίτο σύνολο που αποτελείται από τις παραμέτρους που συνδέονται με σχετικές με την θειορεδοξίνη και την αναγωγή της φλαβίνης που έχουν κυρίως αρνητικές συσχετίσεις με μόρια που εντοπίστηκαν στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, μία μικρότερη περιοχή πυρήνωσης παρατηρείται γύρω από την δ-αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης των κυστιδίων, η οποία εμφανίζει αρνητικές διασυνδέσεις με πολλές υπομονάδες, κυρίως του 20S πρωτεασωματικού συμπλόκου. Ακριβώς δίπλα, παρατηρείται άλλο ένα κέντρο γύρω από την TBC1D24\_V, μίας πρωτεΐνης που σχετίζεται με GTPάσες. Τέλος, ένα δίκτυο που αξίζει να αναφερθεί είναι αυτό των διασυνδέσεων που αναπτύσσει η πρωτεασωματική υπομονάδα α5 που απαντάται στα κυστίδια με ορισμένες σημαντικές για το σύστημα μεμβράνης και κυτταροσκελετού (GYPA, TPM1 και AQP1), αλλά και με κάποιες αιματολογικές παραμέτρους (RDW, MCH, MCV).

Πέρα, όμως, από πυρήνωση γύρω από κυστιδιακές παραμέτρους, παρατηρούνται και ορισμένες περιοχές στο δίκτυο, όπου μία παράμετρος της μεμβράνης σχετική με το πρωτεάσωμα συνδέεται ακτινωτά με μία πληθώρα πρωτεϊνών των κυστιδίων, υποδηλώνοντας ίσως έναν κεντρικό ρόλο για αυτή την υπομονάδα. Παράδειγμα τέτοιας περιοχής είναι η γύρω από την PSMD8, η οποία συνδέεται ταυτόχρονα με παραμέτρους των κυστιδίων που αφορούν σκελετικά στοιχεία, αντιοξειδωτικά μόρια, αλλά και αιμοσφαιρινικές αλυσίδες. Ένα ακόμη σύνολο που περιλαμβάνει συσχετίσεις με αλυσίδες αιμοσφαιρίνης που απαντώνται στα κυστίδια είναι αυτό με κέντρο την υπομονάδα PSMB3 της μεμβράνης. Η τελευταία εμφανίζει επιπλέον αρνητικές συσχετίσεις με G-πρωτεΐνες που βρέθηκαν στα κυστίδια, καθώς και με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών στα κυστίδια. Τέλος, ένα επιπλέον δίκτυο οργανώνεται γύρω από την υπομονάδα PSMB1, η οποία συνδέεται με διάφορους παράγοντες πήξης των κυστιδίων (C3\_V, F2\_V) με τις πρωτεΐνες SERPINA1\_V και YWHAZ\_V που παρουσιάζουν διαφορετικές συσχετίσεις στο δίκτυο των μαρτύρων, και τέλος με αλυσίδες IgG, οι οποίες λείπουν παντελώς από το δίκτυο των μαρτύρων.



**Διάγραμμα 8:** Απεικόνιση των στατιστικά σημαντικών διασυνδέσεων των πρωτεϊνών των μεμβρανών (σκούρο κόκκινο) με αυτές των κυστιδίων (ανοιχτό κόκκινο) στο τέλος της αποθήκευσης (Ημέρα 42) για την ομάδα των ετερόζυγων για β-θαλασσαιμία. Η θετική συσχέτιση απεικονίζεται με μαύρη γραμμή, ενώ η αρνητική με κόκκινη.

## Ε. Συζήτηση

Το πρωτεάσωμα, ως ένας κύριος πρωτεολυτικός μηχανισμός, εμπλέκεται στην καταστροφή μη λειτουργικών πρωτεϊνών των ερυθροκυττάρων, ειδικά ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες (D'Alessandro et al., 2015, Reinheckel et al., 1998). Δεδομένου αυτού, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, εξετάστηκαν συγκεκριμένες πτυχές της τοπολογίας και της λειτουργίας του. Κατόπιν ανάλυσης των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές των τιμών των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων στα διαμερίσματα του κυτοσολίου και της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων όλων των αιμοδοτών. Συγκεκριμένα, σημειώθηκε μείωση σε όλες τις ενεργότητες στο κλάσμα του κυτοσολίου, ήδη από την αρχή της περιόδου αποθήκευσης. Μία τέτοια αλλαγή θα μπορούσε να ερμηνευτεί είτε ως απενεργοποίηση του συμπλόκου, είτε ως μία μετακίνηση των ενεργών πρωτεασωμάτων στη μεμβράνη. Σε συμφωνία με την δεύτερη ερμηνεία, οι τιμές και των τριών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων που αντιστοιχούν στο κλάσμα των μεμβρανών παρουσίασαν αύξηση κατά την αποθηκευτική περίοδο. Τα παραπάνω δεδομένα συμβαδίζουν με τα ευρήματα μίας πρόσφατης μελέτης που εξέτασε τον ρόλο του πρωτεασώματος σε ομάδες υγιών και G6PD<sup>-</sup> αιμοδοτών, που προτείνει μία χρονοεξαρτώμενη αλλαγή στην τοπολογία του πρωτεασώματος κατά την αποθήκευση (Tzounakas et al., 2020).

Αυτή η μετατόπιση στην μεμβράνη, εξεταζόμενη σε συνδυασμό με την ανίχνευση σε αυτή πολλών πρωτεϊνών, όπως η μοριακή συνοδός HSP70 (Tzounakas et al., 2021a), η υπεροξειδεδοξίνη (Rinalducci et al., 2011) κ.ά., συνηγορούν υπέρ ενός μοντέλου αντιμετώπισης του οξειδωτικού στρες με κέντρο τη μεμβράνη (Bosman G.J., 2016). Έχει προταθεί, ότι η χρονοεξαρτώμενη συσσώρευση ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), η οποία παρατηρήθηκε και στην παρούσα εργασία, δημιουργεί την ανάγκη για προστασία της μεμβράνης. Οι ROS όπως έχει αναφερθεί παραπάνω είναι ικανές να προκαλέσουν μία πληθώρα αλλοιώσεων στο πρωτεϊνικό φορτίο του ερυθροκυττάρου και επομένως στην ακεραιότητα του συστήματος κυτταροσκελετού-μεμβράνης (D'Alessandro et al., 2019). Οι επιπτώσεις αυτές του οξειδωτικού στρες είναι κεντρικές στον σχετικό με την αποθηκευτική βλάβη φαινότυπο (Yoshida et al., 2019). Περαιτέρω στοιχεία που υποστηρίζουν αυτή την ιδέα αποτελούν τα διαφορετικά πρότυπα καρβονυλίωσης, μίας μη-αντιστρεπτής οξειδωτικής τροποποίησης, που έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των δυο διαμερισμάτων (Delobel et al., 2012, Delobel et al., 2016). Επομένως, μια συντονισμένη μετακίνηση μορίων που συμμετέχουν στο σύστημα «Επιδιόρθωσης ή Καταστροφής» θα μπορούσε να αποτελεί τη βάση της ομοιοστάσης του ερυθροκυττάρου κατά την αποθήκευση. Τέλος, το γεγονός ότι οι τιμές των ενεργοτήτων στη μεμβράνη φτάνουν σε μέγιστο ή πλατώ κατά το μέσο της αποθήκευσης, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενη βιβλιογραφία (Tzounakas et al., 2020), θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως μία αρχική μετανάστευση στη μεμβράνη με προστατευτικό ρόλο, ακολουθούμενη από μερική απενεργοποίηση των ίδιων των πρωτεασωμικών συμπλόκων κατά το δεύτερο μισό της αποθήκευσης λόγω συσσώρευσης οξειδωτικών αλλοιώσεων σε αυτά.

Τα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων για β-θαλασσαιμία δοτών, είναι γνωστό πως καλούνται να αντιμετωπίσουν προκλήσεις τόσο *in vivo* όσο και κατά την αποθήκευση, οι οποίες σχετίζονται με το γενετικό τους υπόβαθρο. Ενώ είναι γνωστό πως κατά την αποθήκευση τα ερυθροκύτταρά τους επιδεικνύουν αυξημένη ανθεκτικότητα σε οσμωτική λύση που πιθανόν οφείλεται στο σχήμα τους (Schrier et al., 1989) ή την αλλαγή της λειτουργίας διαύλων ιόντων τους, μία ακόμη σημαντική πτυχή της αποθήκευσης που επηρεάζει την αποθηκευτική τους ικανότητα είναι η αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. Η περίσσεια των α-αλυσίδων αιμοσφαιρίνης και ο περιεχόμενος σίδηρος μετατοπίζουν την οξειδοαναγωγική ισορροπία των κυττάρων, με αποτέλεσμα τα κύτταρα των δοτών αυτών να δέχονται μία παρατεταμένη οξειδωτική πίεση. Συνέπεια αυτής είναι η αυξημένη ανάγκη για αποτελεσματικούς προστατευτικούς μηχανισμούς. Σε σχετική βιβλιογραφία έχει προταθεί πως αυτό το διαρκές,

ήπιο οξειδωτικό στρες *in vivo*, ενδέχεται να είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα έναντι σε οξειδωτικές βλάβες κατά την αποθήκευση (Tzounakas et al., 2016a).

Στη παρούσα εργασία και σε συμφωνία με τα παραπάνω σημειώνεται ότι η ενδογενής παραγωγή ROS κατά το δεύτερο μισό της αποθήκευσης ήταν μικρότερη στην ομάδα των ετερόζυγων, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη ενεργοποίηση ή ετοιμότητα προστατευτικών μηχανισμών (Terán et al., 2020). Επιπλέον, αλλοιώσεις που οφείλονται στη συσσώρευση ROS, όπως η καρβονυλίωση πρωτεϊνών, τα επίπεδα της οποίας εδώ δίνονται από τον Δείκτη Καρβονυλίωσης Πρωτεϊνών, φαίνεται πως στους ετερόζυγους δότες κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα, τα οποία λαμβάνουν στατιστικά σημαντικές τιμές στο τέλος της αποθήκευσης. Μειωμένες επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στην ομάδα των ετερόζυγων έχουν επιπλέον παρατηρηθεί και στην υπεροξειδωση των λιπιδίων σε αιμοδότες ετερόζυγους για β-θαλασσαιμία (Tzounakas et al., 2021b). Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ακόμη, ότι στην ίδια μελέτη τα επίπεδα του μεταβολίτη αλλαντοΐνη, ο οποίος έχει χαρακτηριστεί ως δείκτης οξειδωτικής πίεσης στα ερυθροκύτταρα (Kand'ár & Žáková, 2008), έχουν επίσης βρεθεί χαμηλότερα σε αυτή την ομάδα έναντι των μαρτύρων. Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν πως πράγματι η αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες στη μεμβράνη των ετερόζυγων είναι αποτελεσματικότερη και μετριάξει τις συγκεκριμένες αποθηκευτικές αλλοιώσεις.

Πρόσφατα ευρήματα σχετικά με αλλαγές του μεταβολισμού των ερυθροκυττάρων των ετερόζυγων έδειξαν μία μετατόπιση αυτού προς τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών και αυξημένες τιμές NADPH πριν την αποθήκευση (Tzounakas et al., 2021b). Το γεγονός αυτό αποτελεί μια ισχυρή γραμμή άμυνας έναντι του οξειδωτικού στρες για τα ετερόζυγα για β-θαλασσαιμία άτομα. Η παρουσία ή μετακίνηση, όμως, μίας πληθώρας προστατευτικών στοιχείων, όπως η μοριακή συνοδος HSP70 ή αντιοξειδωτικά μόρια στη μεμβράνη των ετερόζυγων δοτών, σε βαθμό μεγαλύτερο από ό,τι στην ομάδα των μαρτύρων, θα μπορούσε να αποτελεί μία δεύτερη γραμμή άμυνας, η αποτελεσματικότητα της οποίας εξαρτάται από την παραμονή των κυττάρων τους σε μία παρατεταμένη κατάσταση στρες (Tzounakas et al., 2021a). Η θέση του πρωτεασώματος μεταξύ των στρατολογούμενων μηχανισμών είναι αξιοσημείωτη. Η ανίχνευσή του, καθώς και η στατιστικά σημαντική υψηλότερη ενεργότητα χυμοθρυψίνης και κασπάσης στη μεμβράνη των ετερόζυγων, ρίχνουν περαιτέρω φως στο πώς το σύστημα «Επιδιόρθωσης ή Καταστροφής» πρωτεϊνών λειτουργεί στη συγκεκριμένη ομάδα. Η συσχέτιση δε των τιμών των ενεργοτήτων του στη μεμβράνη με τις τιμές των ROS μετά την εξάντληση της γλουταθειόνης, από το μέσο της αποθήκευσης και έπειτα, σε αντίθεση με τους μάρτυρες, υποδεικνύει επίσης πως ενεργά πρωτεασωματικά σύμπλοκα είναι πιθανό να παίζουν κύριο ρόλο στην αντιμετώπιση οξειδωτικών γεγονότων στην ομάδα των ετερόζυγων δοτών.

Μία επιπρόσθετη διαδικασία η οποία αποτελεί μέρος της αποθηκευτικής βλάβης είναι η αποβολή υλικού από τα ερυθροκύτταρα υπό τη μορφή εξωκυττάρων κυστιδίων (Kriebardis et al., 2008, Gao et al., 2013). Παρόλο που 20S πρωτεασωματικά σύμπλοκα έχουν βρεθεί στο υπερκείμενο των ασκών κατά την αποθήκευση (Geng et al., 2009), η περιεκτικότητα των εξωκυττάρων κυστιδίων σε αυτά είναι χαμηλή (Bosman et al., 2012). Εντούτοις, η ανάλυση δικτύων που παρατίθεται παραπάνω και περιλαμβάνει κυρίως δεδομένα πρωτεωμικής σχετικά με το πρωτεάσωμα στη μεμβράνη και τα κυστίδια, είναι μία καλή αρχή για τη διερεύνηση του πώς το σύμπλοκο αυτό επηρεάζει ή αλληλεπιδρά με τα μόρια που απαρτίζουν το πρωτεϊνικό φορτίο των κυστιδίων. Η αυξημένη διασύνδεση παραμέτρων στην ομάδα των ετερόζυγων συνηγορεί υπέρ ενός ίσως πιο κεντρικού ρόλου του πρωτεασώματος στην ρύθμιση του περιεχομένου των κυστιδίων (διαλογή) στο τέλος της αποθήκευσης σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων. Σημαντικές παράμετροι των κυστιδίων που παρουσίασαν κυρίως αρνητικές συσχετίσεις με πρωτεασωματικές υπομονάδες στη μεμβράνη των ετερόζυγων, αλλά όχι σε αυτή των μαρτύρων, περιλαμβάνουν πρωτεΐνες

σχετικές με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, όπως η θειορεδοξίνη και η αναγωγή της φλαβίνης, αλλά και περιεχόμενες στα κυστίδια αλυσίδες αιμοσφαιρίνης και η καρβονυλική ανυδράση. Η αρνητική συσχέτιση στοιχείων του πρωτεασώματος με τις πρώτες θα μπορούσε να είναι μία ένδειξη της προστατευτικής του δράσης και ανταπόκρισης στην οξειδωτική πίεση που δέχεται η ερυθροκυτταρική μεμβράνη των ετερόζυγων. Ακόμη, η σχέση της αιμοσφαιρίνης των κυστιδίων με πρωτεασωμικές υπομονάδες της μεμβράνης των κυττάρων από τα οποία προέρχονται είναι άξια προσοχής, καθώς πρόσφατες αναλύσεις πρωτεωμικής αναφέρουν, πως το περιεχόμενο των κυστιδίων σε αιμοσφαιρίνη και παράμετροι αιμόλυσης παρουσιάζουν αντίστροφα πρότυπα (Tzounakas et al., 2021a). Ο ρόλος του πρωτεασώματος σε μία τέτοια διαδικασία αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω. Αντιθέτως, στην ομάδα των μαρτύρων, οι πρωτεασωμικές υπομονάδες εμφάνισαν αρκετές διασυνδέσεις με σκελετικές πρωτεΐνες και απολιποπρωτεΐνες των κυστιδίων με κυρίως αρνητικές τιμές. Οι συσχετίσεις με κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου, όπου οι μάρτυρες παρουσιάζουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό περισσότερες μη αντιστρεπτές παραμορφώσεις στη μεμβράνη, μπορούν να αντικατοπτρίζουν έναν ακόμη προστατευτικό ρόλο του πρωτεασώματος, σε ό,τι αφορά στην ομοίωση των σκελετικών στοιχείων ή ελλείπει αυτού απομάκρυνσή τους μέσω κυστιδιοποίησης. Τέλος, το διαφορετικό πρότυπο διασύνδεσης παραμέτρων σχετικών με G-πρωτεΐνες μεταξύ των δύο ομάδων, μαρτυρά έναν πιθανά τροποποιημένο ρόλο του πρωτεασώματος στην μεταγωγή σήματος σε αυτές.

Συνοψίζοντας, το πρωτεάσωμα κατά την αποθήκευση τόσο υγιών ερυθροκυττάρων μαρτύρων, όσο και κυττάρων που αντιμετωπίζουν ιδιαίτερες οξειδωτικές δυσκολίες ακολουθεί ένα πρότυπο που υποδεικνύει αλλαγή στην τοπολογία του. Αυτή η ιδιότητα δεν είναι μοναδική για το πρωτεάσωμα, αλλά μάλλον κοινή για πολλά μόρια που προσφέρουν αντιοξειδωτική προστασία ή συντήρηση της ομοιότητας της μεμβράνης μέσω της αναδιαμόρφωσης ή καταστροφής μη λειτουργικών, οξειδωμένων ή συσσωματωμένων πρωτεϊνών. Η διερεύνηση της ακριβούς τοπολογίας και τρόπου σύνδεσης των πρωτεασωμάτων είτε στη μεμβράνη είτε σε στοιχεία του κυτταροσκελετού θα μπορούσε να δώσει περαιτέρω πληροφορίες για πιθανά ρυθμιστικά κέντρα στα οποία οργανώνεται αυτή η μεμβρανο-κεντρική απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Πιθανά βήματα προς αυτή την κατεύθυνση θα ήταν η αναζήτηση ενδείξεων για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, σε πρώτο στάδιο με βιοπληροφορικά μέσα (π.χ. docking) ή έπειτα με στοχευμένο συνεντοπισμό σκελετικών στοιχείων και πρωτεασωμικών υπομονάδων με τη βοήθεια συνεστιακής μικροσκοπίας. Πιο συγκεκριμένα, όμως, για τον έλεγχο της ύπαρξης αυτών των αλληλεπιδράσεων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν κλασικές μέθοδοι απομόνωσης αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών, όπως η συνανοσοκατακρήμνιση ή η μέθοδος TAP (Tandem Affinity Purification), ακολουθούμενες από ανάλυση Western ή φασματομετρία μάζας. Άλλες τεχνικές που θα μπορούσαν να πιστοποιήσουν την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων περιλαμβάνουν την τεχνική FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) με τη χρήση κατάλληλων χρωστικών για τις δύο πρωτεΐνες, ή ακόμη την χρήση του συστήματος δύο υβριδίων σε κύτταρα ζύμης για γνωστές πρωτεΐνες.

Επιπροσθέτως, οι διαφορές μεταξύ των ετερόζυγων για β-θαλασσαιμία και των μαρτύρων, όπως, συγκεκριμένα, οι υψηλότερες τιμές ενεργοτήτων και ανίχνευσης της β5 πρωτεασωμικής υπομονάδας σε δείγματα μεμβρανών των πρώτων σε συνδυασμό με τα χαμηλότερα επίπεδα αλλοιωτικών τροποποιήσεων, όπως η καρβονυλίωση πρωτεϊνών, προσφέρει μία νέα οπτική στην άποψη που θέλει τα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων να αποδίδουν καλύτερα σε συνθήκες αποθήκευσης. Φυσικά, αυτή η ένδειξη για την εμπλοκή του πρωτεασώματος στην καλύτερη αποθηκευτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων από ετερόζυγους δότες, θα πρέπει να εξετασθεί και ως προς τα ενδεχόμενα πλεονεκτήματα που μπορεί να επιφέρει μετά τη μετάγγιση. Συνεπώς, εάν και η έρευνα γύρω από το ρόλο του πρωτεασώματος στη μετάγγιση έχει επικεντρωθεί στο κλάσμα των αιμοπεταλίων και



συγκεκριμένα στο γεγονός ότι επεξεργασία αυτών με αναστολείς πρωτεασώματος οδηγεί σε μειωμένη δημιουργία θρόμβων σε ποντίκια (Gupta et al., 2014), είναι σκόπιμη η περαιτέρω διερεύνηση του πώς τα ερυθροκυτταρικά πρωτεασώματα κάθε ομάδας αιμοδοτών επηρεάζουν το αποτέλεσμα της μετάγγισης. Ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου το υπόβαθρο του δέκτη χαρακτηρίζεται από υψηλό οξειδωτικό στρες ή περιπτώσεις όπου ο δέκτης δέχεται θεραπεία που περιλαμβάνει αναστολείς του πρωτεασώματος θα μπορούσε να αναδειχθεί η πιθανή υπεροχή ή μη ερυθροκυττάρων με τροποποιημένη πρωτεόσταση, όπως αυτά των ετερόζυγων για β-θαλασσαιμία. Τέλος, η μελέτη του τρόπου με τον οποίο οι καταλυτικές ή ρυθμιστικές υπομονάδες των πρωτεασωμικών συμπλόκων συνδέονται με ξεχωριστές πτυχές των φαινοτύπων των κυστιδίων, θα μπορούσε να αποκαλύψει πιθανούς ρόλους του πρωτεασώματος στην διακυτταρική επικοινωνία μέσω αυτών.

## Περίληψη

Τα ερυθροκύτταρα κατά την αποθήκευση τους υφίστανται μία σειρά αλλοιωτικών αλλαγών που αφορούν βιοχημικά και μορφολογικά τους χαρακτηριστικά και αναφέρονται με τον όρο αποθηκευτική βλάβη. Η διατήρηση της λειτουργικότητας του κυττάρου και η διασφάλιση της ακεραιότητας της μεμβράνης του προϋποθέτει την ενεργοποίηση μίας σειράς προστατευτικών μηχανισμών, που έγκεινται στην εξουδετέρωση των ROS, την επιδιόρθωση ή καταστροφή αλλοιωμένων μορίων (π.χ. οξειδωμένες πρωτεΐνες) ή τέλος την «θυσία» αυτών, μέσω κυστιδιοποίησης. Το 20S πρωτεάσωμα, ένα κεντρικό πρωτεολυτικό σύμπλοκο εξοπλισμένο με ενεργότητες κασπάσης, θρυψίνης και χυμοθρυψίνης, το οποίο έχει βρεθεί σε περίπου 20πλάσια αφθονία από το 26S πρωτεάσωμα στα ερυθροκύτταρα, αποτελεί μέρος των μηχανισμών καταστροφής πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη σε αυτά.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της λειτουργίας και της τοπολογίας του πρωτεασώματος στα ερυθροκύτταρα δύο ομάδων αιμοδοτών, η πρώτη αποτελούμενη από 9 ετερόζυγους φορείς β-θαλασσαιμίας και η δεύτερη από 10 αιμοδότες μάρτυρες. Μελετήθηκαν τόσο δείγματα φρέσκου αίματος όσο και αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων σε CPD-SAGM σε εβδομαδιαία βάση μέχρι το τέλος της αποθήκευσης. Σε αυτά μετρήθηκαν τα επίπεδα και τριών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων σε δείγματα κυτοσολίων και μεμβρανών και τα επίπεδα των ενδογενών και επαγόμενων επιπέδων ROS με φθορισμομετρία. Επιπλέον, εκτελέσθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western για την εύρεση πρωτεϊνών σχετιζόμενων με στρες στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων των αιμοδοτών και μέτρηση των επιπέδων των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών στη μεμβράνη με τη μέθοδο Oxyblot. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εστιασμένη στο πρωτεάσωμα ανάλυση και σύγκριση δικτύων συσχετίσεων μεμβρανικών και κυστιδιακών παραμέτρων των δύο ομάδων στο τέλος της αποθήκευσης.

Κατόπιν ανάλυσης των δεδομένων, παρατηρήθηκε στο σύνολο των αιμοδοτών μία χωροεξαρτώμενη αλλαγή στα επίπεδα των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων. Συγκεκριμένα, σημειώθηκε πτώση αυτών στα δείγματα των κυτοσολίων και αύξηση στα δείγματα των μεμβρανών, που μαρτυρά μία μετατόπιση του συμπλόκου προς τη μεμβράνη κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Ακόμη, η ομάδα των ετερόζυγων παρουσίασε υψηλότερες, στατιστικά σημαντικές τιμές ενεργοτήτων χυμοθρυψίνης και κασπάσης στη μεμβράνη στο δεύτερο μισό της αποθήκευσης έναντι των μαρτύρων. Παράλληλα, οι ετερόζυγοι εμφάνισαν υψηλές τιμές συσχέτισης των ενεργοτήτων με τα επαγόμενα από οξειδωτικούς παράγοντες επίπεδα ROS στο μέσο και το τέλος της αποθήκευσης. Οι ενδείξεις για αυξημένη και αποτελεσματική λειτουργία του πρωτεασώματος στην ομάδα αυτή ενισχύονται περαιτέρω από το γεγονός ότι τα επίπεδα καρβονυλίωσης πρωτεϊνών στις μεμβράνες των ετερόζυγων ήταν σημαντικά χαμηλότερα από αυτά των μαρτύρων. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν την πρόταση πως τα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων φορέων β-θαλασσαιμίας είναι πιο αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση της αποθηκευτικής βλάβης χάρη στην ήπια οξειδωτική πίεση που δέχονται *in vivo*. Τέλος, το κομμάτι της εργασίας που αφορούσε τη σύγκριση δικτύων και το πώς κυρίως πρωτεασωμικές παράμετροι της μεμβράνης επηρεάζουν το φαινότυπο των κυστιδίων ανέδειξε διαφορές στο πλήθος και το είδος των διασυνδέσεων. Οι ετερόζυγοι παρουσίασαν αφενός περισσότερες συσχετίσεις και αφετέρου διαφοροποιημένο πρότυπο πυρήνωσης αυτών. Στην ομάδα των μαρτύρων οι περισσότερες διασυνδέσεις αφορούσαν σκελετικά και σχετικά με G-πρωτεΐνες χαρακτηριστικά, ενώ στους ετερόζυγους αφορούσαν διαφορετικές παραμέτρους G-πρωτεϊνών και σκελετικών στοιχείων, αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς αλλά και ορισμένες βασικές αιματολογικές παραμέτρους. Το γεγονός αυτό μαρτυρά πως το πρωτεάσωμα στους

δεύτερους κατέχει έναν κεντρικότερο ρόλο όσον αφορά στη διαδικασία διαλογής πρωτεϊνών κατά την κυστιδιοποίηση.

**Λέξεις κλειδιά:** ερυθροκύτταρο, αποθηκευτική βλάβη, πρωτεόσταση, πρωτεάσωμα, ετερόζυγοι-φορείς β-θαλασσαιμίας

## Abstract

During storage in the cold, the erythrocytes undergo a series of defects and alterations pertinent to their biochemical and morphological characteristics that are collectively referred to as "storage lesion". The safe-keeping of RBC functionality and membrane homeostasis require the activation of protective mechanisms that neutralize ROS, repair or destroy affected molecules (i.e. oxidized proteins) or "sacrifice" these molecules via vesiculation. The 20S proteasome, a supermolecular proteolytic complex, which is equipped with caspase-like, chymothrypsin-like and thrypsin-like activities and has been reported in a 20fold abundance compared to the 26S proteasome in erythrocytes, plays an important role in the disposal of oxidized and misfolded proteins.

The aim of this Bachelor Thesis is the study of the proteasome's function and topology in the erythrocytes of two groups of blood donors, one that consisted of heterozygotes for β-thalassaemia (n=9) and one of controls (n=10). Samples used for assays included both fresh blood and CPD-SAGM units of RBCs, tested on a weekly basis. Proteasomal activities in cytosol and membrane fractions, along with intrinsic and induced ROS levels were measured by fluorescence assays, while immunoblotting and Oxyblot analyses were performed in order to assess differences in the levels of specific stress-related proteins in the RBC membranes. Lastly, a network analysis focused on proteasome components was performed for membrane and vesicle parameters in both groups at the end of the storage period.

After analyzing the collected measurements, an overall fraction-dependent change in all three proteasomal activities was observed; namely a decrease in cytosol samples and an increase in membrane samples that suggest a transfer to the latter during storage. Moreover, the erythrocytes of heterozygotes exhibited significantly higher levels of caspase-like and chymothrypsin-like activities in middle and late storage compared to controls. They also exhibited high values of the  $R^2$  correlation coefficient between proteasomal activities and ROS levels, induced or otherwise, during the second half of storage, contrary to controls. The proteasome's higher efficiency in this group was further corroborated by the fact that the Protein Carbonylation Index's values in the heterozygotes' membranes during the same period were significantly lower than those of controls. These findings support the hypothesis that erythrocytes from heterozygotes for β-thalassaemia cope better with oxidative stress during storage, thanks to the low, sustained oxidative pressure they experience *in vivo*. Finally, the part of this thesis that concerns the networks of membrane and vesicle parameters revealed that heterozygotes exhibit more correlations and a different pattern of hub-formation compared to controls. In the control network, most correlations were noted between proteasomal subunits and skeletal or G-protein-related parameters, while, in the heterozygotes' network, most correlations were observed between the proteasome and a number of anti-oxidant and different skeletal and G-protein-related components, along with some hematological parameters. These differences suggest that

the role of the proteasome in the process of protein sorting for vesiculation might be of higher importance for this group.

**Keywords:** erythrocyte, storage lesion, proteostasis, proteasome, heterozygotes-carriers of beta-thalassaemia

## Βιβλιογραφία

1. Agre, P. (2006). The aquaporin water channels. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(1), 5–13. <https://doi.org/10.1513/pats.200510-109JH>
2. Allen, B. W., & Piantadosi, C. A. (2006). How do red blood cells cause hypoxic vasodilation? The SNO-hemoglobin paradigm. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 291(4). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00310.2006>
3. An, X., Salomao, M., Guo, X., Gratzner, W., & Mohandas, N. (2007). Tropomyosin modulates erythrocyte membrane stability. *Blood*, 109(3), 1284–1288. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-036954>
4. Anong, W. A., Franco, T., Chu, H., Weis, T. L., Devlin, E. E., Bodine, D. M., An, X., Mohandas, N., & Low, P. S. (2009). Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion. *Blood*, 114(9), 1904–1912. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-203216>
5. Antonelou, M. H., Kriebardis, A. G., & Papassideri, I. S. (2010). Aging and death signalling in mature red cells: From basic science to transfusion practice. *Blood Transfusion*, 8(SUPPL. 3), 39–47. <https://doi.org/10.2450/2010.007S>
6. Antonelou, M. H., Kriebardis, A. G., Stamoulis, K. E., Trougakos, I. P., & Papassideri, I. S. (2011). Apolipoprotein J/Clusterin is a novel structural component of human erythrocytes and a biomarker of cellular stress and senescence. *PLoS ONE*, 6(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026032>
7. Aoki, T. (2017). A comprehensive review of our current understanding of red blood cell (RBC) glycoproteins. *Membranes*, 7(4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/membranes7040056>
8. Avent, N. D., & Reid, M. E. (2000). The Rh blood group system: A review. *Blood*, 95(2), 375–387. <https://doi.org/10.1182/blood.v95.2.375>
9. Badior, K. E., & Casey, J. R. (2018). Molecular mechanism for the red blood cell senescence clock. *IUBMB Life*, 70(1), 32–40. <https://doi.org/10.1002/iub.1703>
10. Basu, S. (2007). The enigma of in vivo oxidative stress assessment: Isoprostanes as an emerging target. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*, 51(2), 48–61. <https://doi.org/10.1080/17482970701411642>
11. Becker, B. F. (1993). Towards the physiological function of uric acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(6), 615–631. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90143-1](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90143-1)
12. Benedik, P. S., & Hamlin, S. K. (2014). The Physiologic Role of Erythrocytes in Oxygen Delivery and Implications for Blood Storage. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 26(3), 325–335. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.04.002>
13. Benga, G. (2012). The first discovered water channel protein, later called aquaporin 1: Molecular characteristics, functions and medical implications. *Molecular Aspects of Medicine*, 33(5–6), 518–534. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.06.001>
14. Bennett, V., & Baines, A. J. (2001). Spectrin and ankyrin-based pathways: Metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiological Reviews*, 81(3), 1353–1392. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1353>
15. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Hemoglobin Transports Oxygen*

*Efficiently by Binding Oxygen Cooperatively.*  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22596/>

16. Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress\*. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 272).  
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20313>
17. Blank, M. E., & Ehmke, H. (2003). Aquaporin-1 and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Cl<sup>-</sup> transporter-mediated transport of CO<sub>2</sub> across the human erythrocyte membrane. *Journal of Physiology*, 550(2), 419–429. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.040113>
18. Bosman, G. J. C. G. M. (2013). Survival of red blood cells after transfusion: Processes and consequences. *Frontiers in Physiology*, 4 DEC(December), 1–9.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00376>
19. Bosman, G. J. C. G. M. (2016). The proteome of the red blood cell: An auspicious source of new insights into membrane-centered regulation of homeostasis. In *Proteomes* (Vol. 4, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/proteomes4040035>
20. Bosman, G. J. C. G. M., Lasonder, E., Groenen-Döpp, Y. A. M., Willekens, F. L. A., & Werre, J. M. (2012). The proteome of erythrocyte-derived microparticles from plasma: New clues for erythrocyte aging and vesiculation. *Journal of Proteomics*, 76(286), 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.031>
21. Brown, E., Hooper, L., & Allen, P. M. (2014). A 50-kD Plasma Membrane Protein : Antigen with Associated and Functionally Integrins Physically. 111(6), 2785–2794.
22. Bruce, L. (2006). Mutations in band 3 and cation leaky red cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 36(3), 331–336. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2006.01.008>
23. Burger, P., Hilarius-Stokman, P., De Korte, D., Van Den Berg, T. K., & Van Bruggen, R. (2012). CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood*, 119(23), 5512–5521. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-386805>
24. Cafolla, A., Dragoni, F., Girelli, G., Tosti, M. E., Costante, A., Pastorelli, D., Bedogni, G., & Scott, S. (2000). Folate status in italian blood donors: Relation to gender and smoking. *Haematologica*, 85(7), 694–698.
25. Carruthers, A., DeZutter, J., Ganguly, A., & Devaskar, S. U. (2009). Will the original glucose transporter isoform please stand up! *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 297(4), 836–849.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00496.2009>
26. Cassoly, R., & Gibson, Q. H. (1975). Conformation, co-operativity and ligand binding in human hemoglobin. *Journal of Molecular Biology*, 91(3), 301–313.  
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90382-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90382-4)
27. Castagnola, M., Messana, I., Sanna, M. T., & Giardina, B. (2010). Oxygen-linked modulation of erythrocyte metabolism: State of the art. *Blood Transfusion*, 8(SUPPL. 3), 53–58. <https://doi.org/10.2450/2010.009S>
28. Cazzola, R., Rondanelli, M., Russo-Volpe, S., Ferrari, E., & Cestaro, B. (2004). Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. *Journal of Lipid Research*, 45(10), 1846–1851. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300509-JLR200>
29. Chang, T. L., Kakhniashvili, D. G., & Goodman, S. R. (2005). Spectrin's E2/E3 ubiquitin conjugating/ligating activity is diminished in sickle cells. *American Journal of*



*Hematology*, 79(2), 89–96. <https://doi.org/10.1002/ajh.20351>

30. Chasis, J. A. (2006). Erythroblastic islands: Specialized microenvironmental niches for erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology*, 13(3), 137–141. <https://doi.org/10.1097/01.moh.0000219657.57915.30>
31. Chateauvieux, S., Grigorakaki, C., Morceau, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2011). Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *Biochemical Pharmacology*, 82(10), 1291–1303. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.045>
32. Chen, L., Brown, J. W., Mok, Y. F., Hatters, D. M., & McKnight, C. J. (2013). The allosteric mechanism induced by protein kinase a (PKA) phosphorylation of dematin (band 4.9). *Journal of Biological Chemistry*, 288(12), 8313–8320. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.438861>
33. Choate, J. D. (2018). ABO and Rh Blood Groups. In *Clinical Principles of Transfusion Medicine*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-54458-0.00003-9>
34. Clemens, M. R., & Waller, H. D. (1987). Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 45(2–4), 251–268. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(87\)90068-5](https://doi.org/10.1016/0009-3084(87)90068-5)
35. Codandabany, U. (2000). Erythrocyte lipid peroxidation and antioxidants in cigarette smokers. *Cell Biochemistry and Function*, 18(2), 99–102. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0844\(200006\)18:2<99::AID-CBF855>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0844(200006)18:2<99::AID-CBF855>3.0.CO;2-F)
36. Colombo, G., Rossi, R., Gagliano, N., Portinaro, N., Clerici, M., Annibal, A., Giustarini, D., Colombo, R., Milzani, A., & Dalle-Donne, I. (2012). Red blood cells protect albumin from cigarette smoke-induced oxidation. *PLoS ONE*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029930>
37. D'Alessandro, A., Hansen, K. C., Eisenmesser, E. Z., & Zimring, J. C. (2019). Protect, repair, destroy or sacrifice: A role of oxidative stress biology in inter-donor variability of blood storage? *Blood Transfusion*, 17(4), 281–288. <https://doi.org/10.2450/2019.0072-19>
38. D'Alessandro, A., Kriebardis, A. G., Rinalducci, S., Antonelou, M. H., Hansen, K. C., Papassideri, I. S., & Zolla, L. (2015). An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. *Transfusion*, 55(1), 205–219. <https://doi.org/10.1111/trf.12804>
39. Dantas De Medeiros, T. M., Ortega, K. C., Mion, D., Nonoyama, K., & De Oliveira Barretto, O. C. (2002). Normal erythrocyte calpain I activity on membrane proteins under near-physiological conditions in patients with essential hypertension. *Sao Paulo Medical Journal*, 120(1), 5–8. <https://doi.org/10.1590/s1516-31802002000100002>
40. Das, A. K., Bhattacharya, R., Kundu, M., Chakrabarti, P., & Basu, J. (1994). Human Erythrocyte Membrane Protein 4.2 is Palmitoylated. *European Journal of Biochemistry*, 224(2), 575–580. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00575.x>
41. Davies, K. J. A. (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, 83(3–4), 301–310. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01250-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01250-0)
42. De Silva, H. V., Stuart, W. D., Duvic, C. R., Wetterau, J. R., Ray, M. J., Ferguson, D. G., Albers, H. W., Smith, W. R., & Harmony, J. A. K. (1990). A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 265(22), 13240–13247.

[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)38290-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)38290-0)

43. Delobel, J., Prudent, M., Rubin, O., Crettaz, D., Tissot, J. D., & Lion, N. (2012). Subcellular fractionation of stored red blood cells reveals a compartment-based protein carbonylation evolution. *Journal of Proteomics*, *76*, 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.004>
44. Delobel, J., Prudent, M., Tissot, J. D., & Lion, N. (2016). Proteomics of the red blood cell carbonylome during blood banking of erythrocyte concentrates. *Proteomics - Clinical Applications*, *10*(3), 257–266. <https://doi.org/10.1002/prca.201500074>
45. Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C. T., & Suresh, S. (2010). Shape and biomechanics characteristics of human red blood cells in health and disease. *MRS Bulletin*, *35*(5), 382–388. <https://doi.org/10.1557/mrs2010.571>
46. Dumaswala, U. J., Zhuo, L., Jacobsen, D. W., Jain, S. K., & Sukalski, K. A. (1999). Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: Role of glutathione. *Free Radical Biology and Medicine*, *27*(9–10), 1041–1049. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00149-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00149-5)
47. Dzierzak, E., & Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: Development and differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *3*(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011601>
48. Echevarría, M., Muñoz-Cabello, A. M., Sánchez-Silva, R., Toledo-Aral, J. J., & López-Barneo, J. (2007). Development of cytosolic hypoxia and hypoxia-inducible factor stabilization are facilitated by aquaporin-1 expression. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(41), 30207–30215. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702639200>
49. Ferru, E., Giger, K., Pantaleo, A., Campanella, E., Grey, J., Ritchie, K., Vono, R., Turrini, F., & Low, P. S. (2011). Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood*, *117*(22), 5998–6006. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-317024>
50. Ficarra, S., Tellone, E., Giardina, B., Scatena, R., Russo, A., Misiti, F., Clementi, M. E., Colucci, D., Bellocco, E., Laganà, G., Barreca, D., & Galtieri, A. (2009). Derangement of erythrocytic AE1 in beta-thalassemia by caspase 3: Pathogenic mechanisms and implications in red blood cell senescence. *Journal of Membrane Biology*, *228*(1), 43–49. <https://doi.org/10.1007/s00232-009-9157-5>
51. Föllner, M., Huber, S. M., & Lang, F. (2008). Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life*, *60*(10), 661–668. <https://doi.org/10.1002/iub.106>
52. Fowler, V. M., & Bennett, V. (1984). Erythrocyte membrane tropomyosin. Purification and properties. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(9), 5978–5989. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)91110-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)91110-5)
53. Fowler, V. M. (1996). Regulation of actin filament length in erythrocytes and striated muscle. *Current Opinion in Cell Biology*, *8*(1), 86–96. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(96\)80052-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(96)80052-4)
54. Gao, Y., Lv, L., Liu, S., Ma, G., & Su, Y. (2013). Elevated levels of thrombin-generating microparticles in stored red blood cells. *Vox Sanguinis*, *105*(1), 11–17. <https://doi.org/10.1111/vox.12014>
55. Genetet, S., Desrames, A., Chouali, Y., Ripoché, P., Lopez, C., & Mouro-Chanteloup, I. (2017). Stomatin modulates the activity of the Anion Exchanger 1 (AE1, SLC4A1).

*Scientific Reports*, 7(April), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep46170>

56. Geng, Q., Romero, J., Saini, V., Patel, M. B., & Majetschak, M. (2009). Extracellular 20S proteasomes accumulate in packed red blood cell units. *Vox Sanguinis*, 97(3), 273–274. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.001210.x>
57. Gevi, F., D'Alessandro, A., Rinalducci, S., & Zolla, L. (2012). Alterations of red blood cell metabolome during cold liquid storage of erythrocyte concentrates in CPD-SAGM. *Journal of Proteomics*, 76, 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.012>
58. Giulivi, C., Pacifici, R. E., & Davies, K. J. A. (1994). Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxide-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 311, Issue 2, pp. 329–341). <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1245>
59. Gokhin, D. S., & Fowler, V. M. (2016). Feisty filaments: Actin dynamics in the red blood cell membrane skeleton. *Current Opinion in Hematology*, 23(3), 206–214. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000227>
60. Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiological Reviews*, 83(3), 731–801. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2002>
61. Goodman, S. R., Kurdia, A., Ammann, L., Kakhniashvili, D., & Daescu, O. (2007). The human red blood cell proteome and interactome. *Experimental Biology and Medicine*, 232(11), 1391–1408. <https://doi.org/10.3181/0706-MR-156>
62. Gudi, T., & Gupta, C. M. (1993). hsp 70-Like protein in rhesus erythrocyte cytosol and its interactions with membrane skeleton under heat and pathologic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 268(28), 21344–21350. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)36929-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)36929-7)
63. Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., & Siest, G. (1991). Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clinical Chemistry*, 37(11), 1932–1937. <https://doi.org/10.1093/clinchem/37.11.1932>
64. Gunn, R. B., Silvers, D. N., & Rosse, W. F. (1972). Potassium permeability in - thalassemia minor red blood cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 51(5), 1043–1050. <https://doi.org/10.1172/JCI106895>
65. Gupta, N., Li, W., Willard, B., Silverstein, R. L., & McIntyre, T. M. (2014). Proteasome proteolysis supports stimulated platelet function and thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(1), 160–168. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302116>
66. Gustafson, C. M., Shepherd, A. J., Miller, V. M., & Jayachandran, M. (2015). Age- and sex-specific differences in blood-borne microvesicles from apparently healthy humans. *Biology of Sex Differences*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0028-8>
67. Hall, A., Karplus, P. A., & Poole, L. B. (2009). Typical 2-Cys peroxiredoxins - Structures, mechanisms and functions. *FEBS Journal*, 276(9), 2469–2477.
68. Hamasaki, N., & Yamamoto, M. (2000). Red blood cell function and blood storage. *Vox Sanguinis*, 79(4), 191–197. <https://doi.org/10.1159/000056729>
69. Han, B. G., Nunomura, W., Takakuwa, Y., Mohandas, N., & Jap, B. K. (2000). Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization. *Nature Structural Biology*, 7(10), 871–875. <https://doi.org/10.1038/82819>

70. Hermine, O., Arlet, J. B., Ribeil, J. A., Guillerm, F., Vandekerkhove, J., & Courtois, G. (2013). HSP70 un régulateur de l'érythropoïèse qui détermine le destin des érythroblastes entre mort et différenciation. *Transfusion Clinique et Biologique*, 20(2), 144–147. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2013.03.005>
71. Herrera, M., Hong, N. J., & Garvin, J. L. (2006). Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. *Hypertension*, 48(1), 157–164. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000223652.29338.77>
72. Hess, J. R. (2006). An update on solutions for red cell storage. *Vox Sanguinis*, 91(1), 13–19. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2006.00778.x>
73. Hess, John R. (2010). Red cell changes during storage. *Transfusion and Apheresis Science*, 43(1), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2010.05.009>
74. Hess, John R., & Solheim, B. G. (2016). Red blood cell metabolism, preservation, and oxygen delivery. *Rossi's Principles of Transfusion Medicine*, 97–109. <https://doi.org/10.1002/9781119013020.ch09>
75. Hodgkins, S. R. (2020). Erythrocyte metabolism and membrane structure and function. In *Rodak's Hematology* (Sixth Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-53045-3.00015-5>
76. Hughes, C. A., & Bennett, V. (1995). Adducin: A physical model with implications for function in assembly of spectrin-actin complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(32), 18990–18996. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.32.18990>
77. Ishizaka, N., Ishizaka, Y., Toda, E. I., Nagai, R., & Yamakado, M. (2005). Association between serum uric acid, metabolic syndrome, and carotid atherosclerosis in Japanese individuals. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(5), 1038–1044. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000161274.87407.26>
78. Jensen, F. B. (2009). The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: Oxygen carriers and regulators of local blood flow. *Journal of Experimental Biology*, 212(21), 3387–3393. <https://doi.org/10.1242/jeb.023697>
79. Johnson, R. M., Goyette, G., Ravindranath, Y., & Ho, Y. S. (2005). Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(11), 1407–1417. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.07.002>
80. Joshi, R., Gilligan, D. M., Otto, E., McLaughlin, T., & Bennett, V. (1991). Primary structure and domain organization of human alpha and beta adducin. *Journal of Cell Biology*, 115(3 1), 665–675. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.3.665>
81. Jung, T., & Grune, T. (2008). The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB Life*, 60(11), 743–752. <https://doi.org/10.1002/iub.114>
82. Kand'ár, R., & Žáková, P. (2008). Allantoin as a marker of oxidative stress in human erythrocytes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 46(9), 1270–1274. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.244>
83. Kaniyas, T., & Gladwin, M. T. (2012). Nitric oxide, hemolysis, and the red blood cell storage lesion: Interactions between transfusion, donor, and recipient. *Transfusion*, 52(7), 1388–1392. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03748.x>
84. Kästle, M., & Grune, T. (2012). Interactions of the proteasomal system with chaperones: Protein triage and protein quality control. In *Progress in Molecular*

85. Khan, A. A., Hanada, T., Mohseni, M., Jeong, J. J., Zeng, L., Gaetani, M., Li, D., Reed, B. C., Speicher, D. W., & Chishti, A. H. (2008). Dematin and adducin provide a novel link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(21), 14600–14609. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707818200>
86. Kiefer, C. R., & Snyder, L. M. (2000). Oxidation and erythrocyte senescence. *Current Opinion in Hematology*, *7*(2), 113–116. <https://doi.org/10.1097/00062752-200003000-00007>
87. Kim, A. C., Metzzenberg, A. B., Sahr, K. E., Marfatia, S. M., & Chishti, A. H. (1996). Complete genomic organization of the human erythroid p55 gene (MPP1), a membrane-associated guanylate kinase homologue. *Genomics*, *31*(2), 223–229. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0035>
88. Kondo, M., Wagers, A. J., Manz, M. G., Prohaska, S. S., Scherer, D. C., Beilhack, G. F., Shizuru, J. A., & Weissman, I. L. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for clinical application. *Annual Review of Immunology*, *21*, 759–806. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141007>
89. Korsgren, C., Peters, L. L., & Lux, S. E. (2010). Protein 4.2 binds to the carboxyl-terminal EF-hands of erythroid  $\alpha$ -spectrin in a calcium- and calmodulin-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(7), 4757–4770. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.056200>
90. Koshino, I., Mohandas, N., & Takakuwa, Y. (2012). Identification of a novel role for dematin in regulating red cell membrane function by modulating spectrin-actin interaction. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(42), 35244–35250. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.305441>
91. Koury, M. J., & Bondurant, M. C. (1990). Control of red cell production: the roles of programmed cell death (apoptosis) and erythropoietin. *Transfusion*, *30*(8), 673–674. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1990.30891020321.x>
92. Kriebardis, A. G., Antonelou, M. H., Stamoulis, K. E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L. H., & Papassideri, I. S. (2007). Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *11*(1), 148–155. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00008.x>
93. Kriebardis, A. G., Antonelou, M. H., Stamoulis, K. E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L. H., & Papassideri, I. S. (2008). RBC-derived vesicles during storage: Ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. *Transfusion*, *48*(9), 1943–1953. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01794.x>
94. Kuhn, V., Diederich, L., Keller, T. C. S., Kramer, C. M., Lückstädt, W., Panknin, C., Suvorava, T., Isakson, B. E., Kelm, M., & Cortese-Krott, M. M. (2017). Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxidants and Redox Signaling*, *26*(13), 718–742. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6954>
95. Kuypers, F. A., & Soupene, E. (2011). Phosphatidylserine Exposure in Hemoglobinopathies. *Transmembrane Dynamics of Lipids*, 315–340. <https://doi.org/10.1002/9781118120118.ch15>

96. Lamchiaghase, P., Wilairat, P., Sahaphong, S., Bunyaratvej, A., & Fucharoen, S. (1987). Defective spectrin dimer self- association in thalassemic red cells. *European Journal of Haematology*, 38(3), 246–250. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1987.tb01171.x>
97. Lang, E., Qadri, S. M., & Lang, F. (2012). Killing me softly - Suicidal erythrocyte death. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(8), 1236–1243. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.04.019>
98. Lang, K. S., Lang, P. A., Bauer, C., Durantou, C., Wieder, T., Huber, S. M., & Lang, F. (2005). Mechanisms of suicidal erythrocyte death. In *Cellular Physiology and Biochemistry* (Vol. 15, Issue 5, pp. 195–202). Cell Physiol Biochem Press. <https://doi.org/10.1159/000086406>
99. Lewis, I. A., Campanella, M. E., Markley, J. L., & Low, P. S. (2009). Role of band 3 in regulating metabolic flux of red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18515–18520. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905999106>
100. Li, R., & Chen, X. (2014). Erythrocyte osmotic fragility increases with serum advanced glycated end products in cigarette smokers. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 57(1), 85–92. <https://doi.org/10.3233/CH-131801>
101. Li, X., & Bennett, V. (1996). Identification of the spectrin subunit and domains required for formation of spectrin/adducin/actin complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 271(26), 15695–15702. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.26.15695>
102. Lindberg, F. P., Gresham, H. D., Schwarz, E., & Brown, E. J. (1993). Molecular cloning of integrin-associated protein: An immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in  $\alpha(v)\beta3$ - dependent ligand binding. *Journal of Cell Biology*, 123(2), 485–496. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.2.485>
103. Liu, S. C., Derick, L. H., & Palek, J. (1987). Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *Journal of Cell Biology*, 104(3), 527–536. <https://doi.org/10.1083/jcb.104.3.527>
104. Low, F. M., Hampton, M. B., Peskin, A. V., & Winterbourn, C. C. (2007). Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. *Blood*, 109(6), 2611–2617. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-048728>
105. Low, F. M., Hampton, M. B., & Winterbourn, C. C. (2008). Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(9), 1621–1629. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2081>
106. Low, T. Y., Seow, T. K., & Chung, M. C. M. (2002). Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics*, 2(9), 1229–1239. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200209\)2:9<1229::AID-PROT1229>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200209)2:9<1229::AID-PROT1229>3.0.CO;2-N)
107. Luise, M. De, Blackburn, G. L., & Flier, J. S. (1980). Reduced Activity of the Red-Cell Sodium-Potassium Pump in Human Obesity. *New England Journal of Medicine*, 303(18), 1017–1022. <https://doi.org/10.1056/nejm198010303031801>
108. Lux, S. E. (2016). Anatomy of the red cell membrane skeleton: Unanswered questions. *Blood*, 127(2), 187–199. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-512772>

109. Luzzatto, L., Ally, M., & Notaro, R. (2021). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In *Blood* (Vol. 136, Issue 11, pp. 1225–1240). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000944>
110. Mairbäurl, H., & Weber, R. E. (2012). Oxygen transport by hemoglobin. *Comprehensive Physiology*, 2(2), 1463–1489. <https://doi.org/10.1002/cphy.c080113>
111. Mandal, D., Baudin-Creuz, V., Bhattacharyya, A., Pathak, S., Delaunay, J., Kundu, M., & Basu, J. (2003). Caspase 3-mediated Proteolysis of the N-terminal Cytoplasmic Domain of the Human Erythroid Anion Exchanger 1 (Band 3). *Journal of Biological Chemistry*, 278(52), 52551–52558. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306914200>
112. Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M., & Basu, J. (2005). Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39460–39467. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506928200>
113. Mandal, D., Moitra, P. K., Saha, S., & Basu, J. (2002). Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Letters*, 513(2–3), 184–188. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02294-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02294-9)
114. Mankelaw, T. J., Satchwell, T. J., & Burton, N. M. (2012). Refined views of multi-protein complexes in the erythrocyte membrane. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 49(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2012.03.001>
115. Marfatia, S. M., Lue, R. A., Branton, D., & Chishti, A. H. (1994). In vitro binding studies suggest a membrane-associated complex between erythroid p55, protein 4.1, and glycophorin C. *Journal of Biological Chemistry*, 269(12), 8631–8634. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)37012-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)37012-6)
116. Massafra, C., Gioia, D., De Felice, C., Picciolini, E., De Leo, V., Bonifazi, M., & Bernabei, A. (2000). Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. *Journal of Endocrinology*, 167(3), 447–452. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1670447>
117. Mathai, J. C., Mori, S., Smith, B. L., Preston, G. M., Mohandas, N., Collins, M., Van Zijl, P. C. M., Zeidel, M. L., & Agre, P. (1996). Functional analysis of aquaporin-1 deficient red cells: The colton-null phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 271(3), 1309–1313. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.3.1309>
118. Matte, A., Bertoldi, M., Mohandas, N., An, X., Bugatti, A., Brunati, A. M., Rusnati, M., Tibaldi, E., Siciliano, A., Turrini, F., Perrotta, S., & De Franceschi, L. (2013). Membrane association of peroxiredoxin-2 in red cells is mediated by the N-terminal cytoplasmic domain of band 3. *Free Radical Biology and Medicine*, 55, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.543>
119. May, J. M., Qu, Z. C., & Mendiratta, S. (1998). Protection and recycling of  $\alpha$ -tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 349(2), 281–289. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0473>
120. Mayer, M. P. (2010). Gymnastics of molecular chaperones. *Molecular Cell*, 39(3), 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.012>
121. McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase. *Journal of Biological*



- Chemistry*, 244(22), 6049–6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
122. McGough, A. M., & Josephs, R. (1990). On the structure of erythrocyte spectrin in partially expanded membrane skeletons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(13), 5208–5212. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.13.5208>
  123. Melo, D., Rocha, S., Coimbra, S., & Santos Silva, A. (2019). Interplay between Erythrocyte Peroxidases and Membrane. *Erythrocyte*, 1–20. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83590>
  124. Merry, A. H., Hodson, C., Thomson, E., Mallinson, G., & Anstee, D. J. (1986). The use of monoclonal antibodies to quantify the levels of sialoglycoproteins  $\alpha$  and  $\delta$  and variant sialoglycoproteins in human erythrocyte membranes. *Biochemical Journal*, 233(1), 93–98. <https://doi.org/10.1042/bj2330093>
  125. Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: Past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939–3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
  126. Montel-Hagen, A., Sitbon, M., & Taylor, N. (2009). Erythroid glucose transporters. *Current Opinion in Hematology*, 16(3), 165–172. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328329905c>
  127. MUECKLER, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *European Journal of Biochemistry*, 219(3), 713–725. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18550.x>
  128. Nandakumar, S. K., Ulirsch, J. C., & Sankaran, V. G. (2016). Advances in understanding erythropoiesis: Evolving perspectives. *British Journal of Haematology*, 173(2), 206–218. <https://doi.org/10.1111/bjh.13938>
  129. Neelam, S., Kakhniashvili, D. G., Wilkens, S., Levene, S. D., & Goodman, S. R. (2011). Functional 20s proteasomes in mature human red blood cells. *Experimental Biology and Medicine*, 236(5), 580–591. <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.010394>
  130. Norton, M., & Rand, P. W. (1981). *Decreased Deformability*. 57(4), 671–674.
  131. Nunomura, W., Sasakura, D., Shiba, K., Nakamura, S., Kidokoro, S. I., & Takakuwa, Y. (2011). Structural stabilization of protein 4.1R FERM domain upon binding to apo-calmodulin: Novel insights into the biological significance of the calcium-independent binding of calmodulin to protein 4.1R. *Biochemical Journal*, 440(3), 367–374. <https://doi.org/10.1042/BJ20110676>
  132. Ohanian, V., Wolfe, L. C., John, K. M., Pinder, J. C., Lux, S. E., & Gratzer, W. B. (1984). Analysis of the Ternary Interaction of the Red Cell Membrane Skeletal Proteins Spectrin, Actin, and 4.1. *Biochemistry*, 23(19), 4416–4420. <https://doi.org/10.1021/bi00314a027>
  133. Oldenborg, P. A. (2004). Role of CD47 in erythroid cells and in autoimmunity. *Leukemia and Lymphoma*, 45(7), 1319–1327. <https://doi.org/10.1080/1042819042000201989>
  134. Olivieri, O., De Franceschi, L., Capellini, M. D., Girelli, D., Corrocher, R., & Brugnara, C. (1994). Oxidative damage and erythrocyte membrane transport abnormalities in thalassemias. *Blood*, 84(1), 315–320. <https://doi.org/10.1182/blood.v84.1.315.315>
  135. Pantaleo, A., De Franceschi, L., Ferru, E., Vono, R., & Turrini, F. (2010). Current knowledge about the functional roles of phosphorylative changes of membrane proteins in normal and diseased red cells. *Journal of Proteomics*, 73(3), 445–455.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.08.011>

136. Pantaleo, A., Giribaldi, G., Mannu, F., Arese, P., & Turrini, F. (2008). Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. In *Autoimmunity Reviews* (Vol. 7, Issue 6, pp. 457–462). *Autoimmun Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.03.017>
137. Pasini, E. M., Kirkegaard, M., Mortensen, P., Lutz, H. U., Thomas, A. W., & Mann, M. (2006). In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood*, *108*(3), 791–801. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-007799>
138. Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, *333*(1–2), 19–39. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00200-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00200-6)
139. Pehlivan, F. E. (2017). Vitamin C: An Antioxidant Agent. *Vitamin C*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69660>
140. Peisach, J., Blumberg, W. E., & Rachmilewitz, E. A. (1975). The demonstration of ferrihemochrome intermediates in heinz body formation following the reduction of oxyhemoglobin A by acetylphenylhydrazine. *BBA - Protein Structure*, *393*(2), 404–418. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(75\)90069-0](https://doi.org/10.1016/0005-2795(75)90069-0)
141. Perutz, M. F. (1978). Hemoglobin structure and respiratory transport. *Scientific American*, *239*(6), 92–125. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1278-92>
142. Perutz, M. F., Fermi, G., Luisi, B., Shaanan, B., & Liddington, R. C. (1987). Stereochemistry of Cooperative Mechanisms in Hemoglobin. *Accounts of Chemical Research*, *20*(9), 309–321. <https://doi.org/10.1021/ar00141a001>
143. Picart, C., & Discher, D. E. (1999). Actin protofilament orientation at the erythrocyte membrane. *Biophysical Journal*, *77*(2), 865–878. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)76938-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76938-9)
144. Pingitore, A., Lima, G. P. P., Mastorci, F., Quinones, A., Iervasi, G., & Vassalle, C. (2015). Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*, *31*(7–8), 916–922. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.02.005>
145. Pomorski, T. G., & Menon, A. K. (2016). Lipid somersaults: Uncovering the mechanisms of protein-mediated lipid flipping. *Progress in Lipid Research*, *64*, 69–84. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.08.003>
146. Poon, S., Easterbrook-Smith, S. B., Rybchyn, M. S., Carver, J. A., & Wilson, M. R. (2000). Clusterin is an ATP - Independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry*, *39*(51), 15953–15960. <https://doi.org/10.1021/bi002189x>
147. Pretorius, E. (2013). The adaptability of red blood cells. *Cardiovascular Diabetology*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-63>
148. Prior, R. L., Gu, L., Wu, X., Jacob, R. A., Sotoudeh, G., Kader, A. A., & Cook, R. A. (2007). Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. *Journal of the American College of Nutrition*, *26*(2), 170–181. <https://doi.org/10.1080/07315724.2007.10719599>
149. Puchulu-Campanella, E., Chu, H., Anstee, D. J., Galan, J. A., Tao, W. A., & Low, P. S. (2013). Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the

human red blood cell membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 288(2), 848–858.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.428573>

150. Rana, A. P., Ruff, P., Maalouf, G. J., Speicher, D. W., & Chishti, A. H. (1993). Cloning of human erythroid dematin reveals another member of the villin family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(14), 6651–6655. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6651>
151. Rao, J. N., Madasu, Y., & Dominguez, R. (2014). Mechanism of actin filament pointed-end capping by tropomodulin. *Science*, 345(6195), 463–467. <https://doi.org/10.1126/science.1256159>
152. Raynes, R., Pomatto, L. C. D., & Davies, K. J. A. (2016). Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Molecular Aspects of Medicine*, 50, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.05.001>
153. Reid, E. (1987). *from*. 69(4), 1068–1072.
154. Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K. J. A., & Grune, T. (1998). Comparative resistance of the 20 S and 26 S proteasome to oxidative stress. *Biochemical Journal*, 335(3), 637–642. <https://doi.org/10.1042/bj3350637>
155. Reithmeier, R. A. F., Casey, J. R., Kalli, A. C., Sansom, M. S. P., Alguel, Y., & Iwata, S. (2016). Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(7), 1507–1532. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.030>
156. Rembacz, K. P., Sawicka, E., & Długosz, A. (2012). Role of estradiol in chromium-induced oxidative stress. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 69(6), 1372–1379.
157. Repsold, L., & Joubert, A. M. (2018). Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9405617>
158. Rifkind, J. M., & Nagababu, E. (2013). Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(17), 2274–2283. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4867>
159. Riganti, C., Gazzano, E., Polimeni, M., Aldieri, E., & Ghigo, D. (2012). The pentose phosphate pathway: An antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(3), 421–436. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.006>
160. Rinalducci, S., D'Amici, G. M., Blasi, B., & Zolla, L. (2011). Oxidative stress-dependent oligomeric status of erythrocyte peroxiredoxin II (PrxII) during storage under standard blood banking conditions. *Biochimie*, 93(5), 845–853. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.02.005>
161. Risinger, M. A., Dotimas, E. M., & Cohen, C. M. (1992). Human erythrocyte protein 4.2, a high copy number membrane protein, is N- myristylated. *Journal of Biological Chemistry*, 267(8), 5680–5685. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)42820-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)42820-7)
162. Rocha, S., Costa, E., Coimbra, S., Nascimento, H., Catarino, C., Rocha-Pereira, P., Quintanilha, A., Belo, L., & Santos-Silva, A. (2009). Linkage of cytosolic peroxiredoxin 2 to erythrocyte membrane imposed by hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 43(1), 68–73.

<https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2009.03.002>

163. Rogers, M. E., Williams, D. T., Niththyananthan, R., Rampling, M. W., Heslop, K. E., & Johnston, D. G. (1992). Decrease in erythrocyte glycoprotein sialic acid content is associated with increased erythrocyte aggregation in human diabetes. *Clinical Science*, *82*(3), 309–313. <https://doi.org/10.1042/cs0820309>
164. Rousseau, A., & Bertolotti, A. (2018). Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(11), 697–712. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0040-z>
165. Rouyer-Fessard, P., Garel, M. C., Domenget, C., Guetarni, D., Bachir, D., Colonna, P., & Beuzard, Y. (1989). A study of membrane protein defects and  $\alpha$  hemoglobin chains of red blood cells in human  $\beta$  thalassemia. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(32), 19092–19098. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)47271-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)47271-2)
166. Ruff, P., Speicher, D. W., & Husain-Chishti, A. (1991). Molecular identification of a major palmitoylated erythrocyte membrane protein containing the src homology 3 motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(15), 6595–6599. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.15.6595>
167. Rungaldier, S., Oberwagner, W., Salzer, U., Csaszar, E., & Prohaska, R. (2013). Stomatin interacts with GLUT1/SLC2A1, band 3/SLC4A1, and aquaporin-1 in human erythrocyte membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1828*(3), 956–966. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.030>
168. Salzer, U., Mairhofer, M., & Prohaska, R. (2007). Stomatin: A New Paradigm of Membrane Organization Emerges. *Dynamic Cell Biology*, *1*(1), 20–33.
169. Satchwell, T. J., Shoemark, D. K., Sessions, R. B., & Toye, A. M. (2009). Protein 4.2 : A complex linker. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *42*(3), 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2009.01.005>
170. Schenk, A. D., Hite, R. K., Engel, A., Fujiyoshi, Y., & Walz, T. (2010). Electron Crystallography and Aquaporins. *Methods in Enzymology*, *483*(C), 91–119. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)83005-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)83005-8)
171. Schrier, S. L., Rachmilewitz, E., & Mohandas, N. (1989). Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemic erythrocytes are different: Implication for differences in clinical manifestations. *Blood*, *74*(6), 2194–2202. <https://doi.org/10.1182/blood.v74.6.2194.bloodjournal7462194>
172. Shotton, D. M., Burke, B. E., & Branton, D. (1979). The molecular structure of human erythrocyte spectrin. Biophysical and electron microscopic studies. *Journal of Molecular Biology*, *131*(2), 303–329. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(79\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(79)90078-0)
173. Sorimachi, H., & Suzuki, K. (2001). The Structure of Calpain Recent very rapid developments in genome and EST projects have identified an increasing number of gene products homologous to those that were previously identified by other methods . Calpain is no exception . At the time this rev. *Journal of Biochemistry*, *129*(5), 653–664.
174. Sparrow, R. L. (2012). Time to revisit red blood cell additive solutions and storage conditions: A role for “omics” analyses. *Blood Transfusion*, *10*(SUPPL. 2), 8–12. <https://doi.org/10.2450/2012.003S>
175. Speicher, D. W., & Marchesi, V. T. (1984). Erythrocyte spectrin is comprised of many

homologous triple helical segments. *Nature*, 311(5982), 177–180.

<https://doi.org/10.1038/311177a0>

176. Speiser, S., & Etlinger, J. D. (1982). Loss of ATP-dependent proteolysis with maturation of reticulocytes and erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 257(23), 14122–14127. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)45352-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)45352-0)
177. Tanaka, K. (2009). The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 85(1), 12–36. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.12>
178. Tanner, M. J. A. (1993). 1 The major integral proteins of the human red cell. *Bailliere's Clinical Haematology*, 6(2), 333–356. [https://doi.org/10.1016/S0950-3536\(05\)80149-0](https://doi.org/10.1016/S0950-3536(05)80149-0)
179. Tedesco, I., Russo, M., Russo, P., Iacomino, G., Russo, G. L., Carraturo, A., Faruolo, C., Moio, L., & Palumbo, R. (2000). Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(2), 114–119. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(99\)00080-7](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(99)00080-7)
180. Terán, M. M., Mónaco, M. E., Lazarte, S. S., Haro, C., Ledesma Achem, E., Asensio, N. A., & Issé, B. A. (2020). Genetic Regulation of Redox Balance in  $\beta$ -Thalassemia Trait. *Hemoglobin*, 44(2), 122–127. <https://doi.org/10.1080/03630269.2020.1765794>
181. Törnvall, U. (2010). Pinpointing oxidative modifications in proteins - Recent advances in analytical methods. *Analytical Methods*, 2(11), 1638–1650. <https://doi.org/10.1039/c0ay00375a>
182. Troadec, M. B., & Kaplan, J. (2008). Some Vertebrates Go with the GLO. *Cell*, 132(6), 921–922. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.005>
183. Tzounakas, V. L., Anastasiadi, A. T., Dzieciatkowska, M., Karadimas, D. G., Stamoulis, K., Papassideri, I. S., Hansen, K. C., D'alessandro, A., Kriebardis, A. G., & Antonelou, M. H. (2021). Proteome of stored rbc membrane and vesicles from heterozygous beta thalassemia donors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073369>
184. Tzounakas, V. L., Anastasiadi, A. T., Stefanoni, D., Cendali, F., Bertolone, L., Gamboni, F., Dzieciatkowska, M., Rousakis, P., Vergaki, A., Soulikis, V., Tsitsilonis, O. E., Stamoulis, K., Papassideri, I. S., Kriebardis, A. nastasios G. ., D'Alessandro, A., & Antonelou, M. H. (2021). Beta-thalassemia minor is a beneficial determinant of red blood cell storage lesion. *Haematologica*. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.273946>
185. Tzounakas, V. L., Dzieciatkowska, M., Anastasiadi, A. T., Karadimas, D. G., Vergaki, A., Siourounis, P., Stamoulis, K., Papassideri, I. S., Kriebardis, A. G., D'Alessandro, A., & Antonelou, M. H. (2020). Red cell proteasome modulation by storage, redox metabolism and transfusion. *Blood Transfusion = Trasfusione Del Sangue*. <https://doi.org/10.2450/2020.0179-20>
186. Tzounakas, V. L., Karadimas, D. G., Anastasiadi, A. T., Georgatzakou, H. T., Kazepidou, E., Moschovas, D., Velentzas, A. D., Kriebardis, A. G., Zafeiropoulos, N. E., Avgeropoulos, A., Lekka, M., Stamoulis, K. E., Papassideri, I. S., & Antonelou, M. H. (2018). Donor-specific individuality of red blood cell performance during storage is partly a function of serum uric acid levels. *Transfusion*, 58(1), 34–40. <https://doi.org/10.1111/trf.14379>

187. Tzounakas, V. L., Kriebardis, A. G., Georgatzakou, H. T., Foudoulaki-Paparizos, L. E., Dzieciatkowska, M., Wither, M. J., Nemkov, T., Hansen, K. C., Papassideri, I. S., D'Alessandro, A., & Antonelou, M. H. (2016). Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient subjects may be better “storers” than donors of red blood cells. *Free Radical Biology and Medicine*, *96*, 152–165. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.005>
188. Tzounakas, V. L., Kriebardis, A. G., Papassideri, I. S., & Antonelou, M. H. (2016). Donor-variation effect on red blood cell storage lesion: A close relationship emerges. *Proteomics - Clinical Applications*, *10*(8), 791–804. <https://doi.org/10.1002/prca.201500128>
189. Ursitti, J. A., & Fowler, V. M. (1994). Immunolocalization of tropomodulin, tropomyosin and actin in spread human erythrocyte skeletons. *Journal of Cell Science*, *107*(6), 1633–1639.
190. van Bruggen, R. (2013). CD47 functions as a removal marker on aged erythrocytes. *ISBT Science Series*, *8*(1), 153–156. <https://doi.org/10.1111/voxs.12038>
191. Van Kim, C. Le, Colin, Y., & Cartron, J. P. (2006). Rh proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Reviews*, *20*(2), 93–110. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2005.04.002>
192. Verkleij, A. J., Zwaal, R. F. A., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D., & van Deenen, L. L. M. (1973). The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *BBA - Biomembranes*, *323*(2), 178–193. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90143-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90143-0)
193. Wallas, C. H. (1979). Sodium and Potassium Changes in Blood Bank Stored Human Erythrocytes. *Transfusion*, *19*(2), 210–215. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1979.19279160297.x>
194. Walsh, S. B., & Stewart, G. W. (2010). Anion exchanger 1: Protean function and associations. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *42*(12), 1919–1922. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.08.016>
195. Wieschhaus, A., Khan, A., Zaidi, A., Rogalin, H., Hanada, T., Liu, F., De Franceschi, L., Brugnara, C., Rivera, A., & Chishti, A. H. (2012). Calpain-1 knockout reveals broad effects on erythrocyte deformability and physiology. *Biochemical Journal*, *448*(1), 141–152. <https://doi.org/10.1042/BJ20121008>
196. Willekens, F. L. A., Werre, J. M., Groenen-Döpp, Y. A. M., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., De Pauw, B., & Bosman, G. J. C. G. M. (2008). Erythrocyte vesiculation: A self-protective mechanism? *British Journal of Haematology*, *141*(4), 549–556. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07055.x>
197. Yachie-Kinoshita, A., Nishino, T., Shimo, H., Suematsu, M., & Tomita, M. (2010). A metabolic model of human erythrocytes: Practical application of the E-Cell Simulation Environment. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2010*. <https://doi.org/10.1155/2010/642420>
198. Yamashiro, S., Gokhin, D. S., Kimura, S., Nowak, R. B., & Fowler, V. M. (2012). Tropomodulins: Pointed-end capping proteins that regulate actin filament architecture in diverse cell types. *Cytoskeleton*, *69*(6), 337–370. <https://doi.org/10.1002/cm.21031>
199. Yan, Y., Winograd, E., Viel, A., Cronin, T., Harrison, S. C., & Branton, D. (2016).

*Crystal Structure of the Repetitive Segments of Spectrin* Author ( s ): Y . Yan , E . Winograd , A . Viel , T . Cronin , S . C . Harrison and D . Branton Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : [http://www.jstor.org/s.262\(5142\),2027-2030](http://www.jstor.org/s.262(5142),2027-2030).

200. Yasin, Z., Witting, S., Palascak, M. B., Joiner, C. H., Rucknagel, D. L., & Franco, R. S. (2003). Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: Associations with cell age, density, and hemoglobin F. *Blood*, *102*(1), 365–370. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3416>
201. Yool, A. J., & Campbell, E. M. (2012). Structure, function and translational relevance of aquaporin dual water and ion channels. *Molecular Aspects of Medicine*, *33*(5–6), 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.02.001>
202. Yoshida, T., Prudent, M., & Alessandro, A. D. ' . (2019). Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences. *Blood Transfus*, *17*, 27–52. <https://doi.org/10.2450/2019.0217-18>
203. Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., Trnkova, L., Kruseova, J., Eckschlager, T., & Kizek, R. (2012). Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology Letters*, *4*(6), 1247–1253. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.931>
204. Zwaal, R. F. A., & Schroit, A. J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. In *Blood* (Vol. 89, Issue 4, pp. 1121–1132). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood.v89.4.1121>