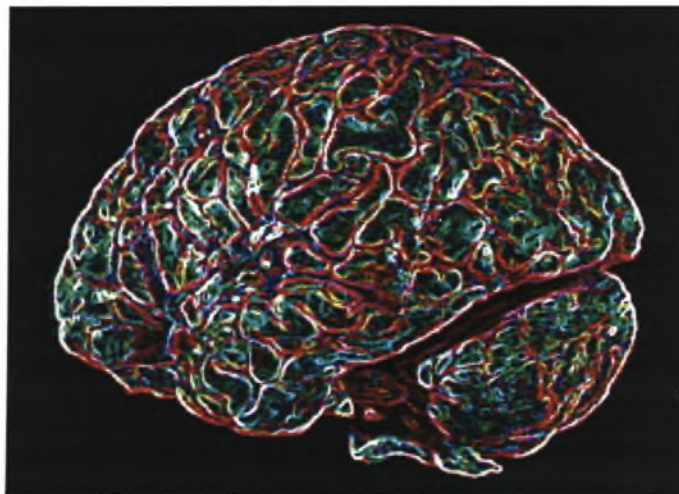


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

5-HT-MODULINE,ΕΝΑ ΝΕΟ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟ

Ταυτοποίηση του προδρόμου μορίου του σε ιστούς του Κεντρικού
Νευρικού Συστήματος



Διπλωματική εργασία

Λιάκου Ζωή

Υπεύθυνος Διδάσκων

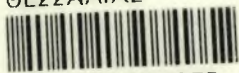
Ζήφα Αιμιλία



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4664/1
Ημερ. Εισ.: 14/10/2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΛΙΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

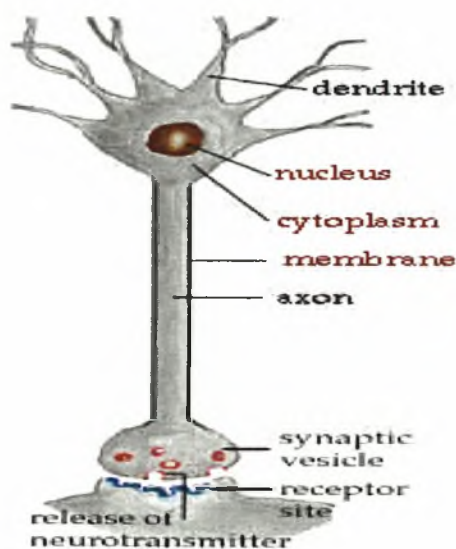


004000087875

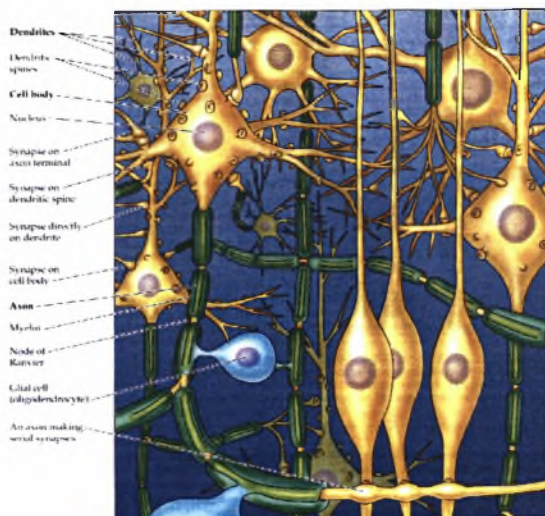
1. Εισαγωγή

Ένας διαβιβαστής ορίζεται ως μια ουσία που συντίθεται και απελευθερώνεται από ένα νευρώνα σε μια σύναψη, σε ποσότητες επαρκείς, έτσι ώστε να επηρεάζει έναν άλλο νευρώνα (μετασυναπτικό νευρώνα) ή ένα κύτταρο κάποιου οργάνου με συγκεκριμένο τρόπο. Η συναπελευθέρωση διαφόρων νευροδραστικών ουσιών σε κατάλληλους μετασυναπτικούς υποδοχείς επιτρέπει μια εκπληκτική ποικιλία μεταφοράς πληροφοριών στην κάθε σύναψη.

Το νευρικό σύστημα χρησιμοποιεί δύο κύριες κατηγορίες χημικών ουσιών για τη μετάδοση σημάτων, τους μικρομοριακούς νευροδιαβιβαστές (ακετυλοχολίνη, σεροτονίνη, ντοπαμίνη, νοραδρεναλίνη, αδρεναλίνη, γλυκίνη, γλουταμικό, ασπαρτικό οξύ, GABA) και τα νευροπεπτίδια, τα οποία είναι βραχείες αλυσίδες αμινοξέων μικρού μοριακού βάρους (4-30 κατάλοιπα).



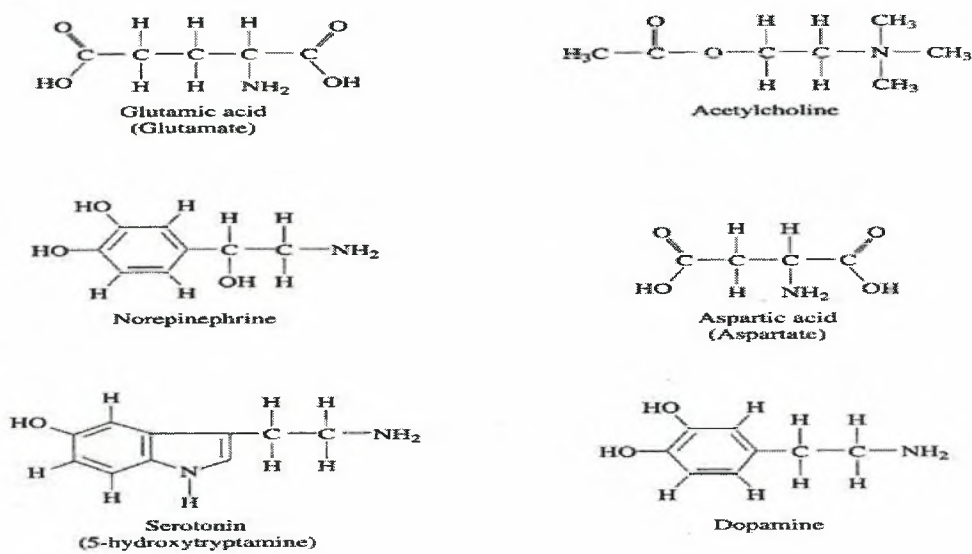
Εικ.1.1 Σχηματική αναπαράσταση ενός νευρώνα.



Εικ.1.2 Σχηματική αναπαράσταση συνάψεων μεταξύ διάφορων νευρώνων.

Με σπάνιες εξαιρέσεις, τα ένζυμα που καταλύουν τη σύνθεση των νευροδιαβιβαστών βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Τα ένζυμα αυτά συντίθενται σε ελεύθερα πολυριβωσώματα του κυτταρικού σώματος και κατανέμονται σε ολόκληρο τον νευρώνα μέσω της βραδείας αξονοπλασματικής ροής. Δεδομένου ότι αυτά τα βιοσυνθετικά ένζυμα κατανέμονται σε ολόκληρο το κύτταρο, οι νευροδιαβιβαστές είναι δυνατόν να σχηματισθούν σε όλα τα σημεία του νευρώνα. Και, πράγμα ακόμη

πιο σημαντικό, οι διαβιβαστές είναι δυνατόν να συντεθούν στις νευρικές απολήξεις όπου και απελευθερώνονται.



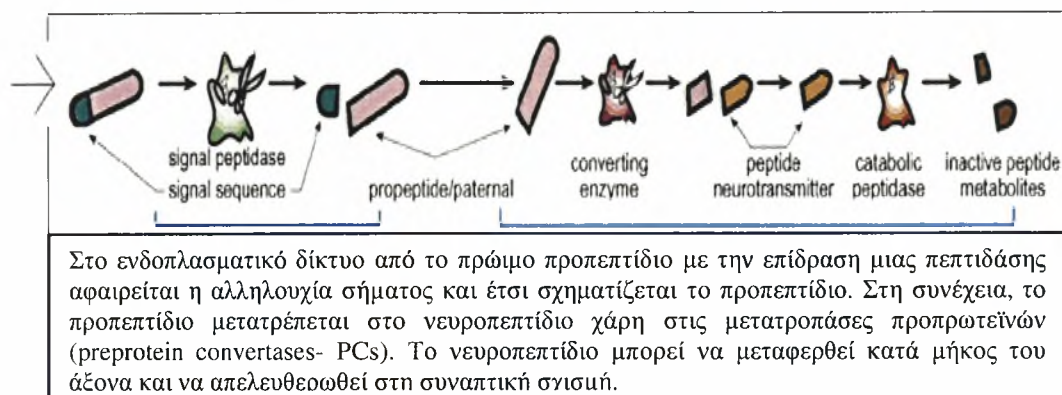
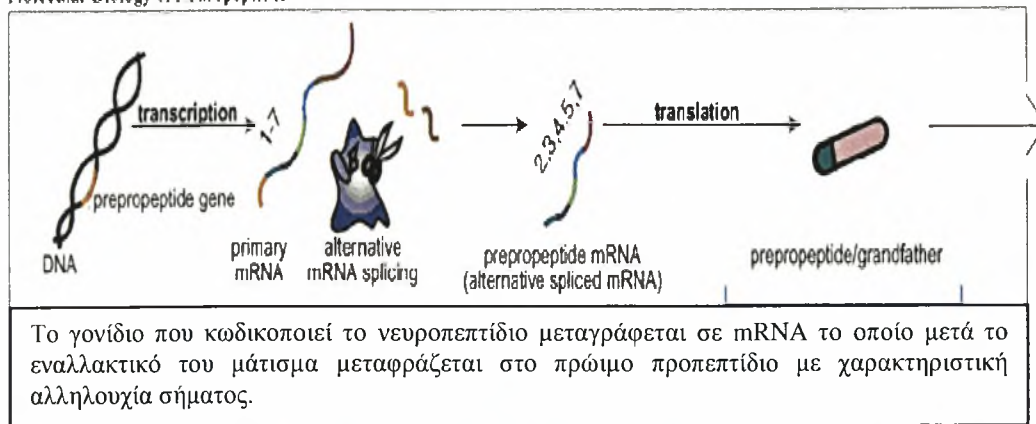
Εικ. 1.3 Χημική δομή των κυριότερων διεγερτικών νευροδιαβιβαστών του νευρικού συστήματος.

Τα νευροπεπτίδια εντοπίζονται σε κάθε κατηγορία νευρώνων όπως στα αισθητήρια νεύρα (ουσία P, CGRP: calcitonin gene-related peptide), στα σωματικά κινητικά νεύρα, στα νεύρα που συμμετέχουν στην αντίληψη του πόνου (ενδορφίνες), στα νεύρα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (νευροκίνη A, GRP: gastrin related peptide, PAKAP). Περισσότερα από 50 μικρά πεπτίδια έχουν φαρμακολογική δράση στους νευρώνες. Τα πεπτίδια αυτά προκαλούν αναστολή ή διέγερση ή και τα δύο όταν εφαρμόζονται στους κατάλληλους νευρώνες-στόχους. Ορισμένα από τα πεπτίδια αυτά είχαν χαρακτηριστεί στο παρελθόν ως ορμόνες με γνωστούς στόχους εκτός εγκεφάλου (αγγειοτασίνη και γαστρίνη) ή ως νευροενδοκρινικά προϊόντα (ωκυτοκίνη, αγγειοπεσίνη, σωματοστατίνη, ωχρινοποιητική ορμόνη και απελευθερωτική ορμόνη της θυρεοτροπίνης). Τα πεπτίδια αυτά, εκτός της ορμονικής τους δράσης σε ορισμένους ιστούς, λειτουργούν και ως διαβιβαστές εάν απελευθερωθούν κοντά στο σημείο δράσης τους. Συνήθως, τα νευροπεπτίδια δρουν μέσω υποδοχέων συνδεδεμένων με G πρωτεΐνες και έχουν περισσότερο ρυθμιστική δράση στους μετασυναπτικούς νευρώνες.

Παρά το γεγονός ότι η ποικιλία των νευροπεπτιδίων είναι τεράστια, αυτοί οι χημικοί αγγελιοφόροι, ως κατηγορία, έχουν κοινή κυτταρική βιολογία. Μια προφανής

γενίκευση είναι ότι τα νευροπεπτίδια σχηματίζουν οικογένειες. Έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 10 τέτοιες οικογένειες, τα μέλη των οποίων αποτελούνται από μακρές αλληλουχίες με παρόμοια αμινοξέα. Για να προσδιοριστεί ο τρόπος με τον οποίο τα πεπτίδια αυτά σχετίζονται μεταξύ τους, συγκρίνονται οι αμινοξικές αλληλουχίες τους ή οι αλληλουχίες των νουκλεοτιδικών βάσεων των γονιδίων που τα κωδικοποιούν. Κατά την αποκλίνουσα εξέλιξη, το προγονικό γονίδιο, από το οποίο προήλθαν οι διάφορες οικογένειες νευροπεπτιδίων ή μέρος του (ένα εξόνιο) διπλασιάστηκε τουλάχιστον μία φορά. Κάθε αντίγραφο του γονιδίου είναι επιρρεπής σε μεταλλάξεις που οδηγούν σε αλλαγές της αμινοξικής ακολουθίας. Ο αριθμός των μεταλλάξεων εξαρτάται από το χρονικό διάστημα και τη συχνότητα των μεταλλάξεων. Τελικώς, τα δύο αντίγραφα του προγονικού γονιδίου θα τροποποιηθούν έτσι ώστε να παράγουν δύο σχετικές πλην όμως διαφοροποιημένες ομάδες πεπτιδίων.

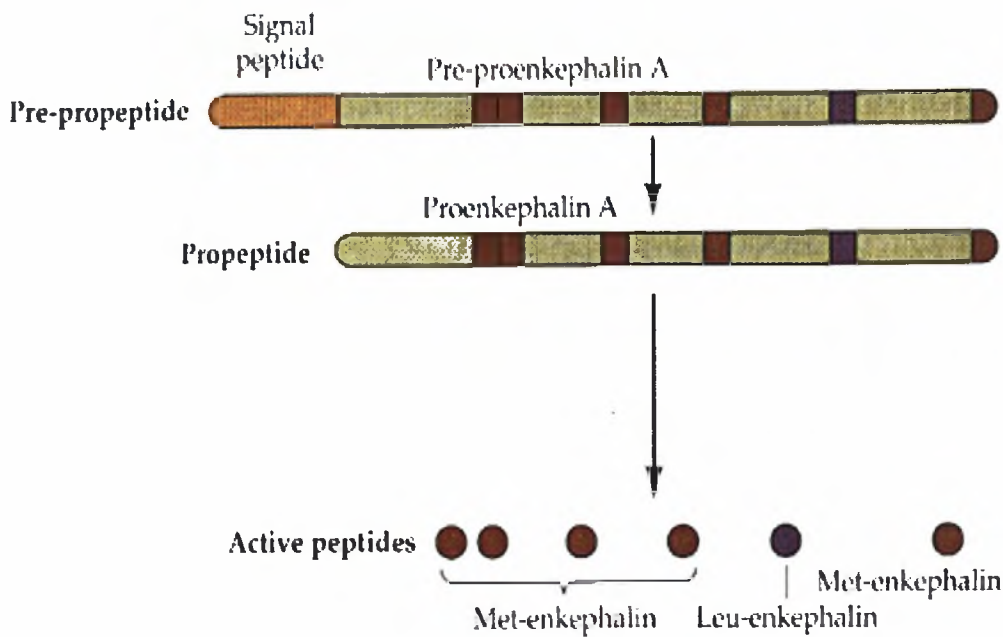
Τα νευροπεπτίδια προέρχονται από εκκρινόμενες πρωτεΐνες, οι οποίες σχηματίζονται στο κυτταρικό σώμα. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια των νευροδραστικών πεπτιδίων μεταγράφονται σε mRNAs που αφήνουν τον πυρήνα και δρουν ως εκμαγείο για τη σύνθεση των πολυπεπτιδίων στα ριβοσώματα του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου. Τα πολυπεπτίδια αυτά αποτελούν τα πρώιμα προπεπτίδια τα οποία στη συνέχεια θα διασπαστούν με τη βοήθεια πρωτεολυτικών ενζύμων στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Ακολουθώντας, τα προπεπτίδια συσκευάζονται μέσα σε εκκριτικά κυστίδια από τη συσκευή Golgi. Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας, επέρχεται κατάτμηση των προπεπτιδίων σε βιολογικά ενεργά πεπτίδια που μεταφέρονται στις απολήξεις μέσω της ταχείας νευραξονικής μεταφοράς. Τα ένζυμα που λειτουργούν για τη μετατροπή και ωρίμανση πρόδρομων νευροπεπτιδίων ονομάζονται μετατροπάσες προπρωτεϊνών (preprotein convertases- PCs) ή αλλιώς σερινοπρωτεάσες, διότι όλα έχουν στο καταλυτικό τους κέντρο ένα κατάλοιπο σερίνης, της οποίας η υδροξυλομάδα συμμετέχει στην αντίδραση διάσπασης. Πιο συγκεκριμένα, είναι ενδοπεπτιδάσες που υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς στα καρβοξυτελικά άκρα βασικών αμινοξέων. Έχουν αναγνωρισθεί και μελετηθεί επτά μέχρι σήμερα εκ των οποίων οι PC1 (preprotein convertase 1) και PC2 (preprotein convertase 2). Τα προηγούμενα ένζυμα βρίσκονται ειδικά σε νευρικά και ενδοκρινικά κύτταρα και έχει δειχθεί ότι δρουν στην ωρίμανση πολλών πεπτιδορμονών μεταξύ των οποίων και νευροπεπτίδια όπως η TRH (thyrotropin releasing hormone).



Εικ.1.4 Η σύνθεση ενός νευροπεπτιδίου από το πρόδρομο μόριο του.

Η παραγωγή νευροδραστικών πεπτιδίων από ένα μεγάλο πρόδρομο μόριο μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να λειτουργήσει ως ενισχυτικός μηχανισμός αφού είναι δυνατόν να παραχθούν περισσότερα από ένα αντίγραφα του ίδιου πεπτιδίου από μία πολυπρωτεΐνη. Παραδείγματα υπάρχουν στην οικογένεια των οπιοειδών πεπτιδίων: πολλά διαφορετικά πεπτίδια με δραστηριότητα οπιοειδούς περιέχουν την ίδια αλληλουχία αμινοξέων, Tyr-Gly-Phe. (Τα οπιοειδή πεπτίδια προέρχονται από τρία διαφορετικά πρόδρομα μόρια, καθένα από τα οποία είναι προϊόν ενός διαφορετικού γονιδίου).

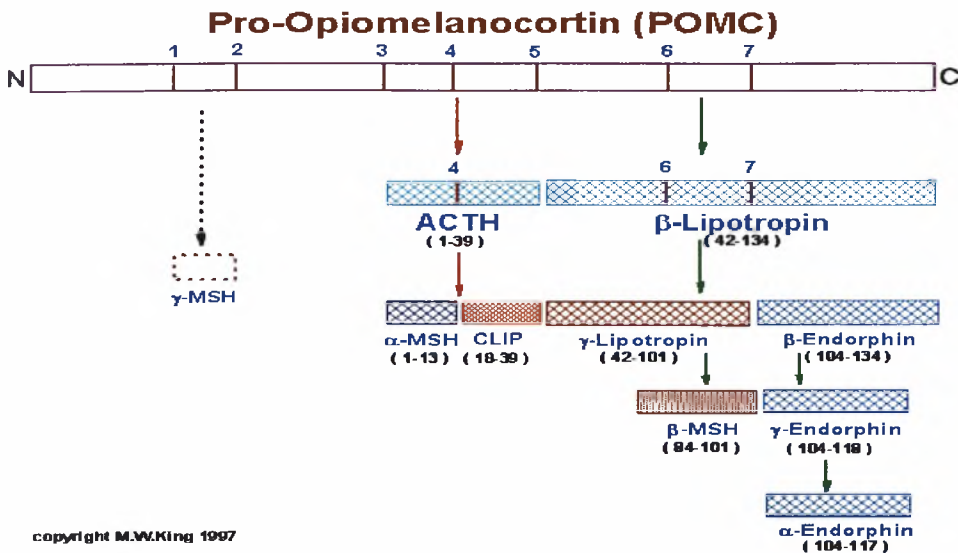
Ένα άλλο παράδειγμα είναι το πρόδρομο μόριο της γλυκαγόνης το οποίο περιέχει δύο αντίγραφα της ορμόνης αυτής. Σε άλλες περιπτώσεις, οι βιολογικοί σκοποί είναι πιο πολύπλοκοι, δεδομένου ότι το ίδιο πρόδρομο μόριο μπορεί να δημιουργήσει πεπτίδια τα οποία έχουν παρόμοιες είτε ανταγωνιστικές λειτουργικές ιδιότητες. Τέλος, ένα άλλο παράδειγμα είναι το πρόδρομο μόριο της Phe-Met-Arg-Phe (FMRF-amide) που συντίθεται από τους νευρώνες της *Aplysia* περιέχει 28 αντίγραφα του τετραπεπτιδίου στην αλληλουχία του.



Εικ1.5 Δομή του πρόδρομου μορίου των οπιοειδών. Πρωτεολυτική διάσπαση του παράγει τα ενεργά πεπτίδια Met-enkephalin και Leu-enkephalin.

Επιπρόσθετα, τα προ-νευροπεπτίδια μπορούν να περιέχουν στην αλληλουχία τους πολλά διαφορετικά πεπτίδια με διακριτές δραστηριότητες, π.χ η προοπιομελανοκορτίνη (POMC) περιέχει την ACTH, τη β-λιποτροπίνη, τη β-ενδορφίνη και την α-MSH αλλά και μόνο ένα βιολογικά ενεργό πεπτίδιο, π.χ η proCRH.

Η επεξεργασία είναι κρίσιμο στάδιο για τον καθορισμό των πεπτιδίων που θα απελευθερωθούν τελικά από έναν πεπτιδεργικό νευρώνα. Νευρώνες με το ίδιο γονίδιο που κωδικεύει την πολυπρωτεΐνη μπορούν να απελευθερώσουν διαφορετικά νευροπεπτίδια λόγω των διαφορών στον τρόπο επεξεργασίας του πρόδρομου μορίου. Ένα παράδειγμα είναι η προοπιομελανοκορτίνη (POMC), ένας από τους τρεις κλάδους της οικογένειας των οπιοειδών. Το ίδιο mRNA της POMC απαντά στον πρόσθιο και στο διάμεσο λοβό της υπόφυσης, στον υποθάλαμο και σε διάφορες άλλες περιοχές του εγκεφάλου καθώς και στον πλακούντα και στο έντερο, αλλά από τους διαφορετικούς αυτούς ιστούς παράγονται και απελευθερώνονται διαφορετικά πεπτίδια.



Εικ.1.6 Δομή της POMC. Οι θέσεις «κοπής» καταδεικνύονται από τους αριθμούς 1-7 και αποτελούνται από τις αλληλουχίες Arg-Lys, Lys-Arg or Lys-Lys. Η αδενοκορτικοτροπική ορμόνη (ACTH) και η β-λιποτροπίνη (β-LPH) είναι προϊόντα της πρόσθιας υπόφυσης κάτω από την επίδραση της κορτικοτροπίνης (CRH). Η α-μελανοτροπίνη (α-MSH), το πεπτιδίο ενδιάμεσου λοβού (CLIP), η γ-λιποτροπίνη και η β-ενδορφίνη είναι προϊόντα τα οποία παράγονται στον ενδιάμεσο λοβό της υπόφυσης από την επίδραση της ντοπαμίνης. Οι α-,β-,γ-MSH αναφέρονται σαν μελανοτροπίνες. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις κάτω από κάθε ορμόνη αντιστοιχούν τα αμινοξέα στην POMC. Οι λειτουργίες των γ-MSH, β-LPH και CLIP δεν είναι ακόμα ξεκάθαρες.

Είναι ακόμα άγνωστο πώς επιτυγχάνεται η διαφορετική επεξεργασία, αλλά μελέτες υποδηλώνουν ότι υπάρχουν δύο πιθανοί μηχανισμοί: δύο νευρώνες ενδέχεται να επεξεργάζονται με διαφορετικό τρόπο την ίδια πολυπρωτεΐνη αφού κάθε κύτταρο περιέχει πρωτεάσες με διαφορετική εξειδίκευση στο εσωτερικό των ενδοκυτταρικών μεμβρανικών συστημάτων και των κυστιδίων του ή οι δύο νευρώνες μπορεί να περιέχουν τις ίδιες πρωτεάσες, αλλά κάθε κύτταρο ενδέχεται να γλυκοσυλιώνει την κοινή πολυπρωτεΐνη σε διαφορετικά σημεία, προστατεύοντας έτσι από τη διάσπαση διαφορετικές περιοχές του πολυπεπτιδίου.

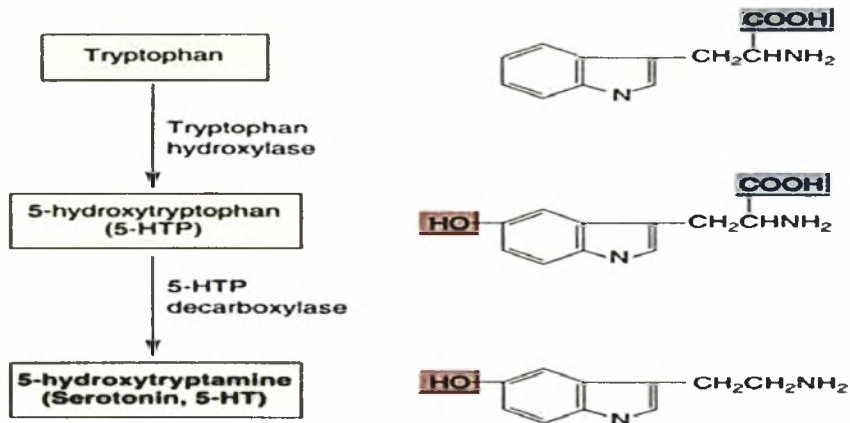
Η ρύθμιση της σύνθεσης και της απελευθέρωσης των πεπτιδίων από τους πεπτιδεργικούς νευρώνες μπορεί να συμβεί και στη μεταγραφή των γονιδίων των προπεπτιδίων, γιατί αφενός μεν καθορίζει αν το γονίδιο θα εκφραστεί ή όχι από ένα νευρώνα και αφετέρου ελέγχει την έκφραση του γονιδίου, επιτρέποντας στο νευρώνα να απαντήσει κατάλληλα στο μήνυμα που δέχτηκε. Έχουν βρεθεί πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι ελέγχουν τους προαγωγείς των προπεπτιδικών γονιδίων, σημαντικότεροι από τους οποίους είναι ο CREB (cAMP Response Element

Binding Protein) που ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων των υποθαλαμικών πεπτιδίων και ο CREM που την αναστέλλει. Η ανακάλυψη των μεταγραφικών αυτών παραγόντων επέτρεψε στη συνέχεια να προσδιοριστούν τα ερεθίσματα που ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων των πεπτιδίων όπως για παράδειγμα το οξύ stress που ελέγχει την έκφραση του NPY.

Το σεροτονινεργικό σύστημα στο Κ.Ν.Σ

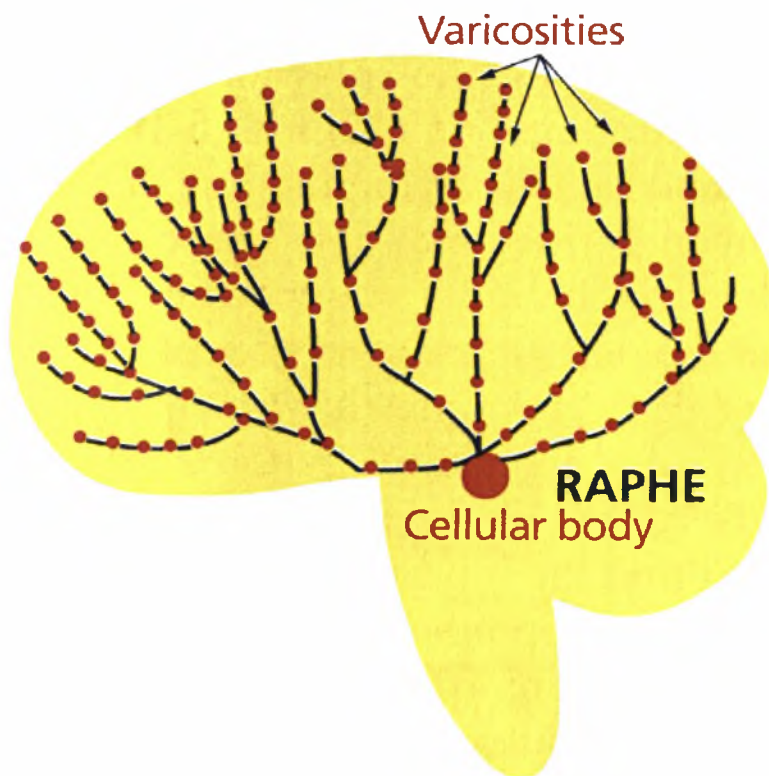
Η σεροτονίνη (5-υδροξυτρυπαμίνη, 5-HT) είναι ένας νευροδιαβιβαστής με σημαντική νευρορυθμιστική δράση χάρη στην οποία συμμετέχει στο συντονισμό και την προσαρμογή της απάντησης του εγκεφάλου σε δεδομένα ερεθίσματα. Ανήκει χημικά στις βιογενείς αμίνες (ντοπαμίνη, νορεπινεφρίνη, ισταμίνη) οι οποίες συντίθενται από αμινοξέα και περιέχουν μια αμινομάδα (R-NH₂). Πιο συγκεκριμένα, η L-τρυπτοφάνη, ένα απαραίτητο αμινοξύ, αφού εισέλθει στον σεροτονινεργικό νευρώνα, υδροξυλιώνεται από την υδροξυλάση της τρυπτοφάνης. Το προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης, η 5-υδροξυτρυπτοφάνη, αποκαρβοξυλιώνεται από τις αποκαρβοξυλάσες των αρωματικών αμινοξέων. Η σεροτονίνη που παράγεται αρχικά αποθηκεύεται σε κυστίδια και απελευθερώνεται με εξωκύττωση, όταν ο νευρώνας διεγερθεί. Το ένζυμο μονοαμινική οξειδάση είναι υπεύθυνο για την διάσπαση της σεροτονίνης σε 5-υδροξυ-ιντολο-ακεταλδεΐδη και τελικά σε 5-υδροξυ-ιντολοξικό οξύ (μέσω της αλκευδοδεϋδρογονάσης). Η μονοαμινική οξειδάση παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης της 5-HT.

Η 5-HT επηρεάζει ποικίλες λειτουργίες όπως ο έλεγχος της όρεξης, η πρόσληψη τροφής, η ρύθμιση του βάρους και της θερμοκρασίας, η έκκριση ορμονών, η αντίληψη του πόνου, η διάθεση, η καρδιαγγειακή λειτουργία, η συμπεριφορά, η επιθετικότητα, η ρύθμιση του ύπνου, οι κινητικές δυνατότητες, η συστολή των μυών, η μάθηση κ.α. Επίσης, συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις όπως η κατάθλιψη, το άγχος, οι κρίσεις πανικού, η σχιζοφρένεια, η παχυσαρκία, η υπέρταση, η ημικρανία, η ναυτία κ.α



Εικ.1.7 Η σύνθεση της 5-HT από την τρυπτοφάνη.

Η ανατομική και μορφολογική οργάνωση του σεροτονινεργικού συστήματος συμφωνεί με τον ευρύ ρυθμιστικό ρόλο της 5-HT. Πρόκειται για ένα πολύ συγκεντρωτικό σύστημα με τα σώματα των σεροτονινεργικών νευρώνων συγκεντρωμένα μόνο στους ραχιαίους και κεντρικούς πυρήνες της ραφής αλλά και πανταχού παρόν με σεροτονινεργικές απολήξεις σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου. Η ύπαρξη δε ενός μεγάλου αριθμού κυστιδίων (varicosities) κατά μήκος των νευραξόνων (έως 500.000/νευράξονα) αυξάνουν κατά πολύ τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης των λιγοστών σεροτονινεργικών νευρώνων (160,000) με τα δισεκατομμύρια νευρώνων που υπάρχουν στον εγκέφαλο.

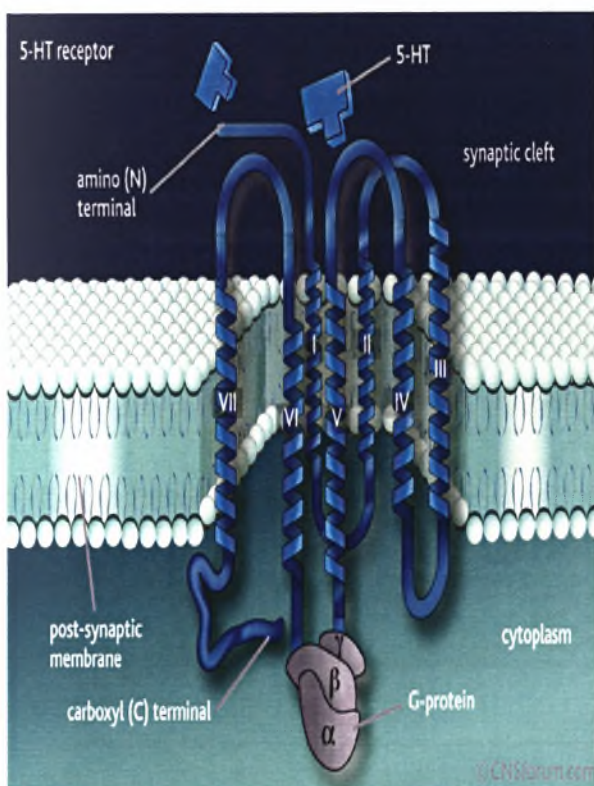


Εικ.1.8 Το σεροτονινεργικό σύστημα στον εγκέφαλο. Τα σώματα των νευρώνων που περιέχουν 5-HT εντοπίζονται στους κεντρικούς και ραχιαίους πυρήνες της ραφής. Διακρίνονται ο μεγάλος αριθμός κυστιδίων (varicosities) κατά μήκος των νευραξόνων.

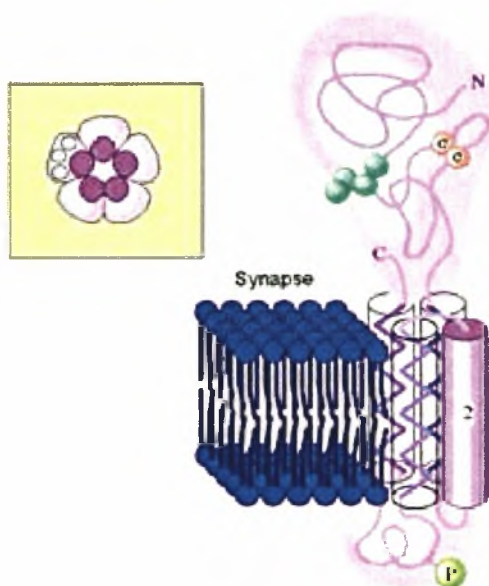
Κατηγορίες υποδοχέων σεροτονίνης στον εγκέφαλο

Η 5-HT παίζει σημαντικό ρόλο σε μια μεγάλη ποικιλία λειτουργιών χάρη στην αλληλεπίδραση της με τους διαφορετικούς της υποδοχείς. Οι 5-HT υποδοχείς κατηγοριοποιούνται σε 7 κύριες και διακριτές οικογένειες (5-HT1-7) ενώ έχουν αναγνωριστεί αρκετές υποκατηγορίες αυτών. Τουλάχιστον 15 υποκατηγορίες έχουν κλωνοποιηθεί. Η κατηγοριοποίηση επιτυγχάνεται μετά από μελέτη της κατανομής τους στους διάφορους ιστούς χάρη στα προφίλ πρόσδεσης ραδιοσημασμένων προσδετών, της ηλεκτροφυσιολογίας τους, των σηματοδοτικών μονοπατιών που ακολουθούν, της μοριακής βιολογίας και φαρμακολογίας τους. Η αφθονία των 5-HT υποδοχέων τελικά μπορεί να επιτρέψει την καλύτερη κατανόηση των πολύπλοκων διαδικασιών στις οποίες συμμετέχει η 5-HT.

Έξι από τις επτά κύριες οικογένειες ανήκουν στους υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs) με τις 7 χαρακτηριστικές διαμεμβρανικές περιοχές (5-HT1, 5-HT2, 5-HT4-7) ενώ οι 5-HT3 υποδοχείς είναι διάυλοι ιόντων που ελέγχονται από νευροδιαβιβαστή.



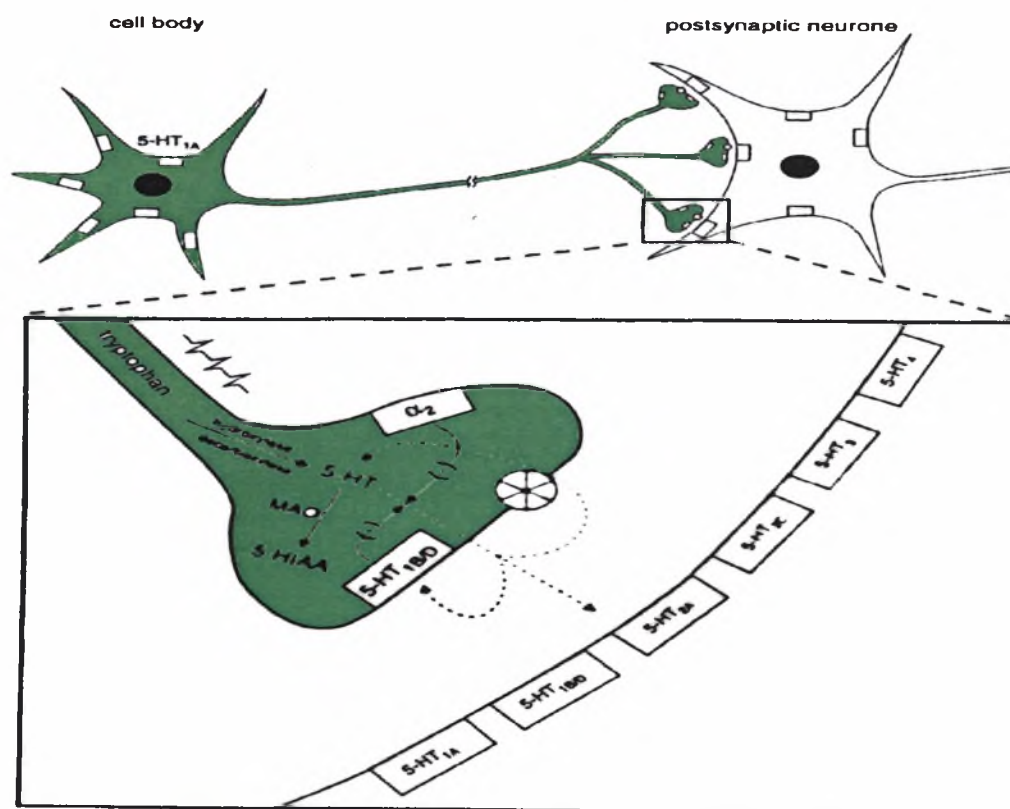
Εικ.1.9 Σχηματική αναπαράσταση της δομής των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs). Διακρίνονται οι επτά χαρακτηριστικές διαμεμβρανικές τους περιοχές



Εικ1.10. Σχηματική αναπαράσταση της υπομονάδας των 5-HT3 υποδοχέων. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι πενταμερείς. Ο προσδέτης (με πράσινο χρώμα) αλληλεπιδρά με τη χαρακτηριστική θηλιά Cys (με πορτοκαλί) που βρίσκεται σε απόσταση από τον πόρο του καναλιού.

	5-HT ₁	5-HT ₂	5-HT ₃	5-HT ₄	5-HT ₅	5-HT ₆	5-HT ₇
Subtypes	5-HT _{1A} , 5-HT _{1B} , 5-HT _{1D} , 5-HT _{1E} , 5-HT _{1F}	5-HT _{2A} , 5-HT _{2B} , 5-HT _{2C}	5-HT _{3A} , 5-HT _{3B}		5-HT _{5A} , 5-HT _{5B}		
Major signalling pathway	cAMP↓	IP ₃ ↑	Ion channel	cAMP↑	cAMP?	cAMP↑	cAMP↑

Εικ.1.11 Οι υποκατηγορίες και ο δεύτερος αγγελιοφόρος του σηματοδοτικού μονοπατιού που ακολουθούν οι 7 κατηγορίες των 5-HT υποδοχέων.

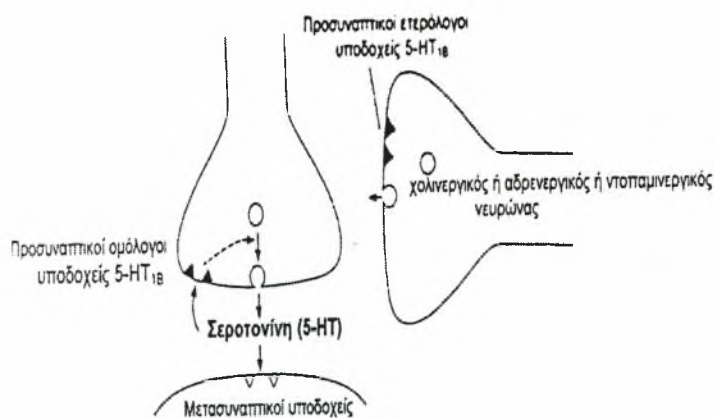


Εικ. 1.12 Σχηματικά αναπαράσταση μιάς σεροτονινεργικής σύναψης. Διακρίνονται οι μετασυναπτικοί υποδοχείς της 5-HT (5-HT₃, 5-HT_{4,6,7}, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1E,F}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}), οι προσυναπτικοί υποδοχείς 5-HT_{1B}, 5-HT_{1A}, ο μεταφορέας 5-HT και τα ένζυμα βιοσύνθεσης της 5-HT.

Οι 5-HT_{1B} υποδοχείς στον εγκέφαλο

Οι 5-HT₁ υποδοχείς λειτουργούν κυρίως ως ανασταλτικοί υποδοχείς και συνδέονται με τις G_α_i/G_α_o πρωτεΐνες. Η σύνδεση τους έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της δραστηριότητας της αδενυλικής κυκλάσης και την επακόλουθη μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του cAMP. Οι 5-HT₁ υποδοχείς αποτελούνται από πέντε υποκατηγορίες, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} και 5-HT_{1F}.

Οι υποδοχείς 5-HT_{1B} χάρη σε πειράματα αυτοραδιογραφίας στα οποία χρησιμοποιήθηκε [³H]-5HT εντοπίστηκαν σε μεγάλη πυκνότητα στα βασικά γάγγλια (ειδικά σε μέλαινα ουσία, ωχρό σωματίο, ωχρή σφαίρα), στους ραχιαίους και κοιλιακούς πυρήνες της ραφής, σε περιοχές του πρόσθιου εγκεφάλου (ραβδωτό σώμα) και στον ιππόκαμπο. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον 5-HT_{1B} υποδοχέα στον άνθρωπο και στον ποντικό βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9. Ο 5-HT_{1B} βρίσκεται στις αξονικές απολήξεις των σεροτονινεργικών νευρώνων ως προσυναπτικός αυτοϋποδοχέας και ρυθμίζει τα εξωκυτταρικά επίπεδα 5-HT με μηχανισμούς αρνητικής ανατροφοδότησης. Ο 5-HT_{1B} υποδοχέας αναστέλλει την έκκριση 5-HT στη σύναψη με το να εμποδίζει την εισροή ιόντων ασβεστίου. Αυξημένα επίπεδα ασβεστίου ενδοκυτταρικά είναι απαραίτητα για την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή. Οι υποδοχείς 5-HT_{1B} παίζουν έναν ιδιαίτερο ρόλο και ως ετεροϋποδοχείς σε μη σεροτονινεργικές απολήξεις ρυθμίζοντας την απελευθέρωση άλλων νευροδιαβιβαστών όπως της ακετυλοχολίνης, της ντοπαμίνης και της νοραδρεναλίνης.



Εικ. 1.13 Οι 5-HT_{1B} υποδοχείς. Εντοπίζονται προσυναπτικά στους σεροτονεργικούς νευρώνες. Όταν ενεργοποιηθούν μειώνουν τη συγκέντρωση της 5-HT στη συναπτική σχισμή. Επίσης, εντοπίζονται σε μη σεροτονεργικούς νευρώνες ρυθμίζοντας την απελευθέρωση άλλων νευροδιαβιβαστών

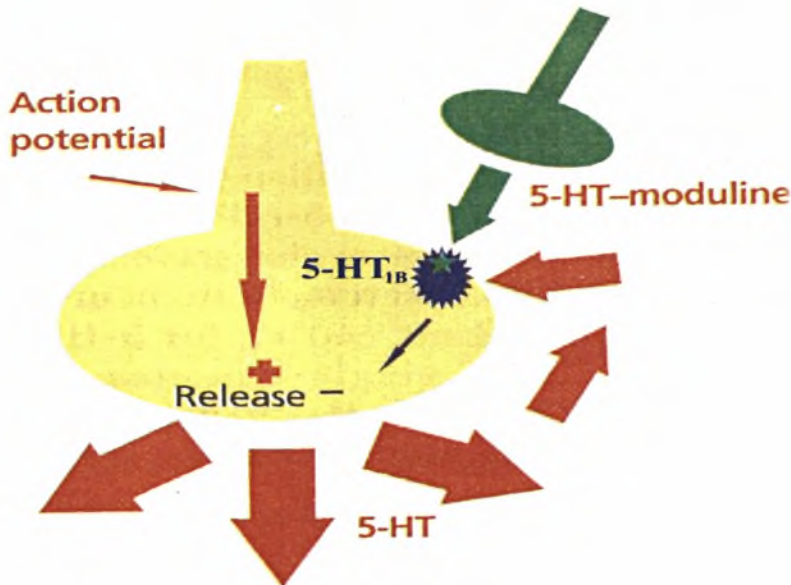
Σε μια προσπάθεια να χαρακτηριστεί ο ρόλος των 5-HT_{1B} υποδοχέων στη συμπεριφορά, δημιουργήθηκαν 5-HT_{1B} knock-out (KO) ποντίκια τα οποία στη συνέχεια συμμετείχαν σε μια σειρά πειραμάτων. Τα 5-HT_{1B} KO δεν παρουσίασαν υπερκινητικότητα όταν τους χορηγήθηκε ένας αγωνιστής των 5-HT_{1A/1B}, ο RU 24969, πράγμα που έδειξε ότι η συγκεκριμένη επίδραση επιτυγχάνεται μέσω των 5-

HT_{1B} υποδοχέων. Επίσης, όταν ήρθαν αντιμέτωπα με έναν εισβολέα, τα απομονωμένα 5-HT_{1B} ΚΟ ποντίκια επιτέθηκαν σε αυτόν πιο γρήγορα και με μεγαλύτερη ένταση συγκρινόμενα με τα ποντίκια αγρίου τύπου. Έτσι, υπάρχει συμμετοχή των 5-HT_{1B} υποδοχέων στη ρύθμιση της επιθετικότητας. Τέλος, παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα άγχους και ακινησίας σε τεστ συμπεριφοράς όπως το forced swim test και το tail suspension τεστ.

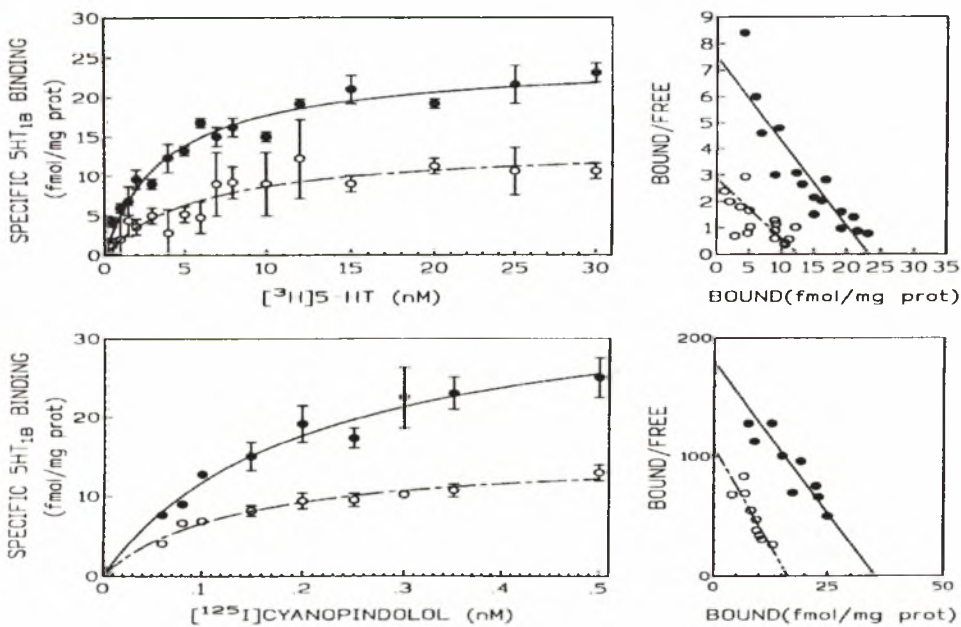
Απομόνωση ενός ενδογενούς ρυθμιστή των 5-HT_{1B} υποδοχέων

Η υπόθεση ότι ένας ενδογενής συνδέτης ρυθμίζει τη δραστηριότητα των 5-HT_{1B} υποδοχέων, οι οποίοι μερικώς ελέγχουν την απελευθέρωση της 5-HT από τις νευρωνικές απολήξεις, αρχικά παρουσιάστηκε το 1981. Ωστόσο ο τελικός χαρακτηρισμός αυτού του παράγοντα επετεύχθη πρόσφατα. Ένα ενδογενές νευροπεπτίδιο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε από εγκεφαλικό ομογενοποίημα βοδιού και αρουραίου με χρωματογραφικές τεχνικές HPLC. Σε κάθε βήμα καθαρισμού όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν για την ικανότητα τους να αναστείλουν την πρόσδεση της [³H]-5-HT στους 5-HT_{1B} υποδοχείς. Το ενεργό κλάσμα αναλύθηκε με NMR (Nuclear Magnetic Resonance) και βρέθηκε επίσης η αμινοξική του αλληλουχία. Πρόκειται για ένα τετραπεπτίδιο, leucine-serine-alanine-leucine (LSAL) που ονομάστηκε 5-HT-moduline.

Η 5-HT-moduline αλληλεπιδρά ειδικά και μη συναγωνιστικά με αλλοστερικό τρόπο (μείωση B_{max} χωρίς μείωση K_D) προκαλώντας μεταβολές στη διαμόρφωση του των 5-HT_{1B} υποδοχείς σε nanomolar συγκεντρώσεις και αυτό οδηγεί στην απευαισθητοποίηση των υποδοχέων. Η ειδική πρόσδεση έχει K_d = 0.77 nM και B_{max} = 0.26 dpm/mm². Γνωρίζουμε ότι οι 5-HT_{1B} αυτουποδοχείς παρουσιάζουν ανασταλτική επίδραση στην απελευθέρωση της 5-HT. Έτσι, η 5-HT-moduline τελικά αυξάνει την απελευθέρωση της 5-HT.



Εικ.1.14 Απεικόνιση του σημείου και τρόπου δράσης της 5-HT-moduline. Η 5-HT-moduline προσδένεται αλλοστερικά στους προσυναπτικούς 5-HT_{1B} υποδοχείς και τους απεναισθητοποιεί με αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης της 5-HT.

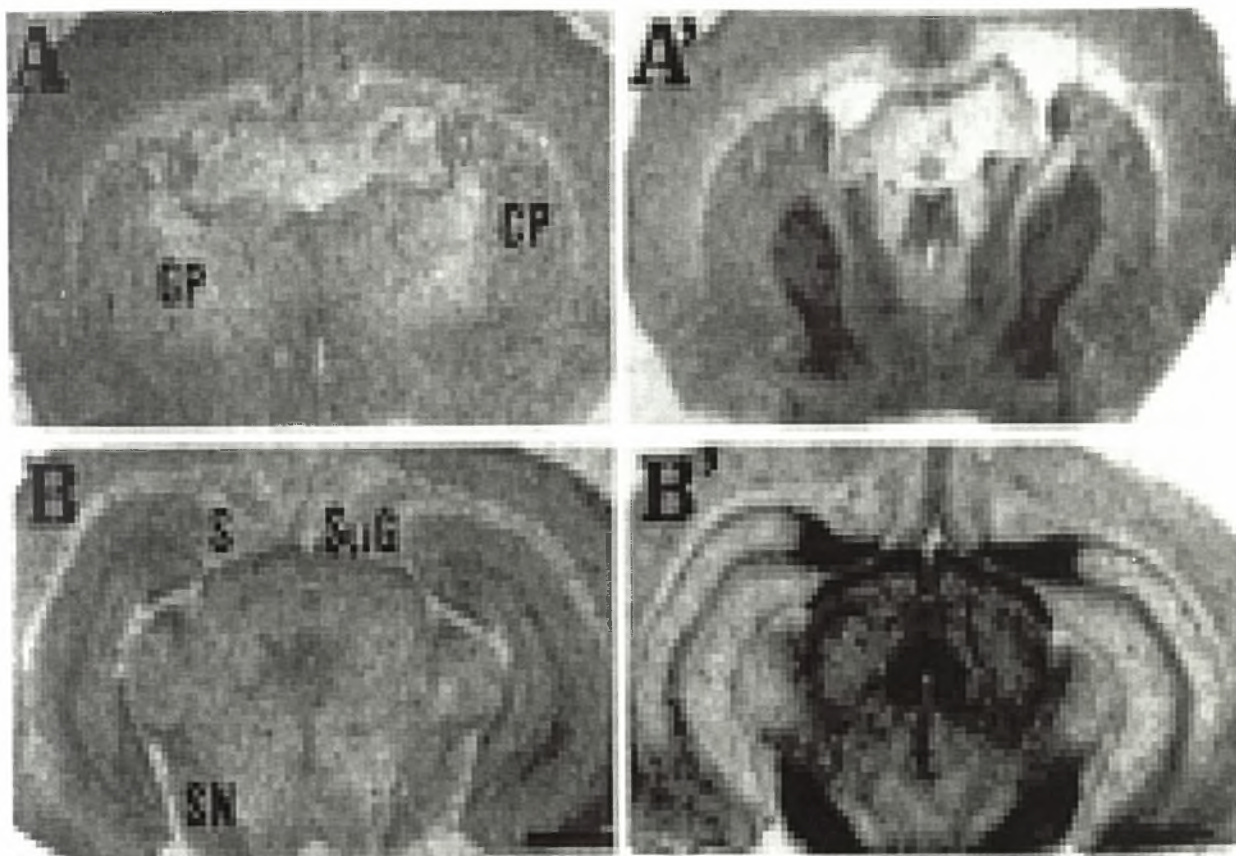


Εικ. 1.15 Μοριακή αλληλεπίδραση της 5-HT-moduline με τους 5-HT_{1B} υποδοχείς. πρόσδεση του αγωνιστή [³H]5-HT και ανταγωνιστή [¹²⁵I]cyanopindolol στους 5-HT_{1B} υποδοχείς. Οι εγκεφαλικές μεμβράνες επώαστηκαν 60min στους 37⁰C σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις [¹²⁵I]cyanopindolol απουσία (●-●)και παρουσία (○-○) 5-HT-moduline (1nM).

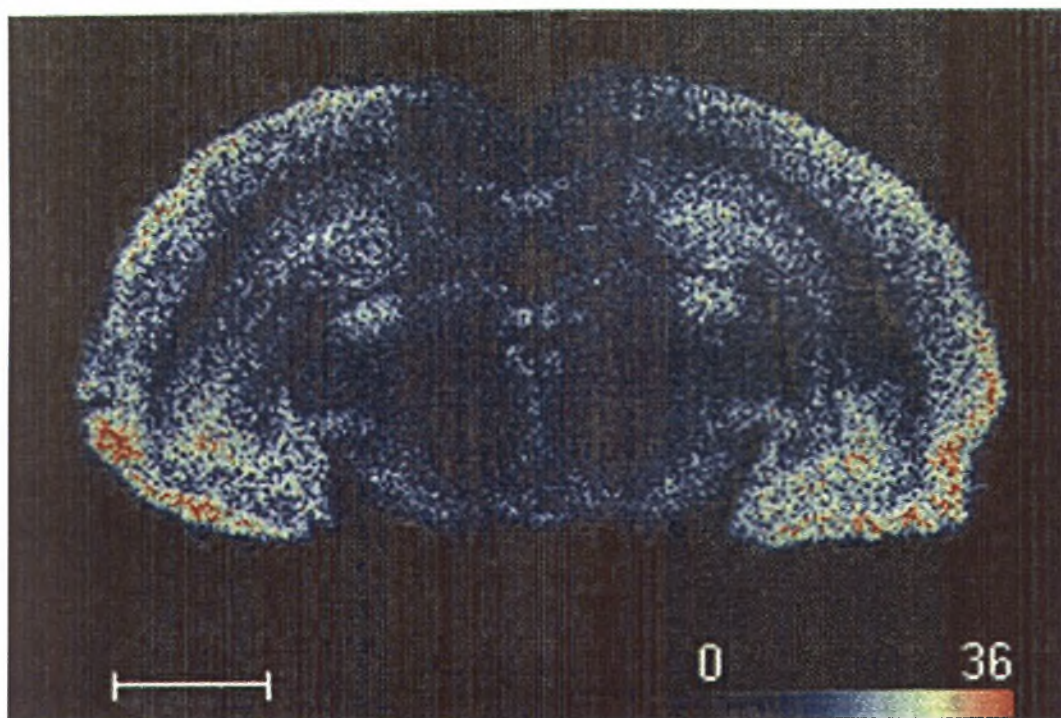
Η αλληλεπίδραση της 5-HT-moduline με τους 5-HT_{1B} είναι εξειδικευμένη και δεν επηρεάζει κανέναν άλλο σεροτονινεργικό ή μη σεροτονινεργικό υποδοχέα όπως οι 5-HT_{1A}, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₆, 5-HT₇, α και β αδρενεργικοί υποδοχείς,

χολινεργικοί, ντοπαμινεργικοί D₂. Επίσης, δεν αλληλεπιδρά με τους μεταφορείς της 5-HT οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την επαναπρόσληψη της 5-HT από τη συναπτική σχισμή. Η ειδικότητα της αλληλεπίδρασης της 5-HT-moduline σχετίζεται με τη χημική του δομή αφού διάφορα παράγωγα του (Ac-LSAL, LSAL-NH₂, ALLS) δεν προσδένονται στους 5-HT_{1B}.

Μελέτες σύνδεσης με ραδιοσημασμένη [³H]-5-HT-moduline έδειξαν ότι η κατανομή των θέσεων σύνδεσης του πεπτιδίου (φλοιός, οδοντωτή έλικα , CA1-CA3 περιοχές ιππόκαμπου, αμυγδαλή, βασικά γάγγλια και πυρήνες του υποθάλαμου) συμπίπτει απόλυτα με αυτή των 5-HT_{1B} υποδοχέων ενώ η ραδιοσήμανση απουσιάζει εντελώς από τα 5-HT_{1B} knock-out ποντίκια .



Εικ1.16 Σύγκριση της κατανομής των θέσεων πρόσδεσης της [³H]-5-HT-moduline και των 5-HT_{1B} υποδοχέων σε τμήματα εγκεφάλου ποντικού. Τα αυτοραδιογράμματα δείχνουν τη συνολική πρόσδεση της [³H]-5-HT-moduline και του [¹²⁵I]cyanopindolol στα βασικά γάγγλια (A and A') και στο μεσεγκέφαλο (B and B'), αντίστοιχα. CPu, caudate putamen κερκοφόρο κέλυφος; GP, globus pallidus ωχρή σφαίρα; S, subiculum, υπόθεμα ιππόκαμπου; SN, substantia nigra, μέλαινα ουσία; SuG, superficial gray layer of the superior colliculus, επιφανειακή φαιά ουσία του άνω τετράδυμου.



Εικ.1.17 Ψηφιακό αυτοραδιόγραμμα της $[^3\text{H}]\text{LSAL}$ σε τμήμα μεσεγκεφάλου ποντικού, με ανάλυση β -imager. Με κόκκινο διακρίνεται η $[^3\text{H}]\text{LSAL}$.

Λειτουργικές ιδιότητες της 5-HT-moduline

Το σύστημα δεύτερου μηνύματος, η κυτταρική απόκριση των $5\text{-HT}_{1\text{B}}$ υποδοχέων καθώς και η επίδραση της 5-HT-moduline *in vivo* εξετάστηκαν για να προσδιοριστούν οι λειτουργικές ιδιότητες του τετραπεπτιδίου.

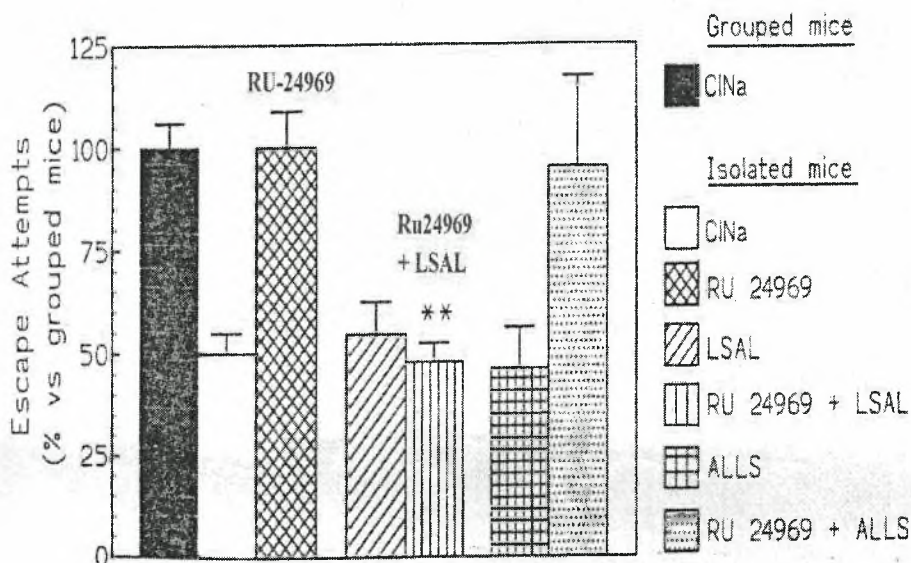
Η ενεργοποίηση των $5\text{-HT}_{1\text{B}}$ υποδοχέων και η επακόλουθη σύνδεση με την G_i πρωτεΐνη οδηγεί σε αναστολή της δράσης της αδενυλικής κυκλάσης. Σε CHO κύτταρα στα οποία εισήχθη το γονίδιο των $5\text{-HT}_{1\text{B}}$ υποδοχέων παρουσία του $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$, η προσθήκη ενός αγωνιστή των $5\text{-HT}_{1\text{B}}$ υποδοχέων είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της σύνδεσης της G_i πρωτεΐνη με τους υποδοχείς. Η προσθήκη 5-HT-moduline ήταν ικανή να αντιστρέψει το προηγούμενο αποτέλεσμα. Έτσι, κάτω από αυτές τις πειραματικές συνθήκες η 5-HT-moduline δρα ως ανταγωνιστής των $5\text{-HT}_{1\text{B}}$ υποδοχέων.

Η κυτταρική επίδραση των $5\text{-HT}_{1\text{B}}$ υποδοχέων προσδιορίστηκε χάρη στην ικανότητα των αγωνιστών τους να μειώνουν την απελευθέρωση της 5-HT στη σύναψη. Η 5-HT-moduline αντέστρεψε το ανασταλτικό αποτέλεσμα ενός $5\text{-HT}_{1\text{B}}$ αγωνιστή στην K^+ προκαλούμενη απελευθέρωση της 5-HT.

Οι ανταγωνιστικές ιδιότητες της 5-HT-moduline στους $5\text{-HT}_{1\text{B}}$ υποδοχείς επιβεβαιώθηκαν και από μελέτες συμπεριφοράς. Είναι γνωστό ότι η εκδήλωση κοινωνικής συμπεριφοράς περιλαμβάνει τη δράση των $5\text{-HT}_{1\text{B}}$ υποδοχέων. Στο social interaction test, η συμπεριφορά ενός ποντικού το οποίο ήταν απομονωμένο για 9

ημέρες συγκρίνεται με τη συμπεριφορά ενός ποντικίου control το οποίο παρέμεινε στην υπόλοιπη ομάδα. Τα απομονωμένα πειραματόζωα παρουσιάζουν κοινωνική ανεπάρκεια στη συμπεριφορά τους η οποία χαρακτηρίζεται από μείωση στην δραστηριότητα εξερεύνησης. Η χορήγηση ενός αγωνιστή των 5-HT_{1B} υποδοχέων (RU24.969) επαναφέρει σε φυσιολογικά πλαίσια τη συμπεριφορά των ποντικίων. Η χορήγηση 5-HT-moduline (50 μg) σε κοινωνικά απομονωμένα πειραματόζωα αντιστρέφει την επίδραση ενός αγωνιστή των 5-HT_{1B} υποδοχέων αλλά δεν έχει καμία επίδραση από μόνη της. Έτσι, η 5-HT-moduline και in vivo παρουσιάζει ανταγωνιστικές ιδιότητες στους 5-HT_{1B} υποδοχείς.

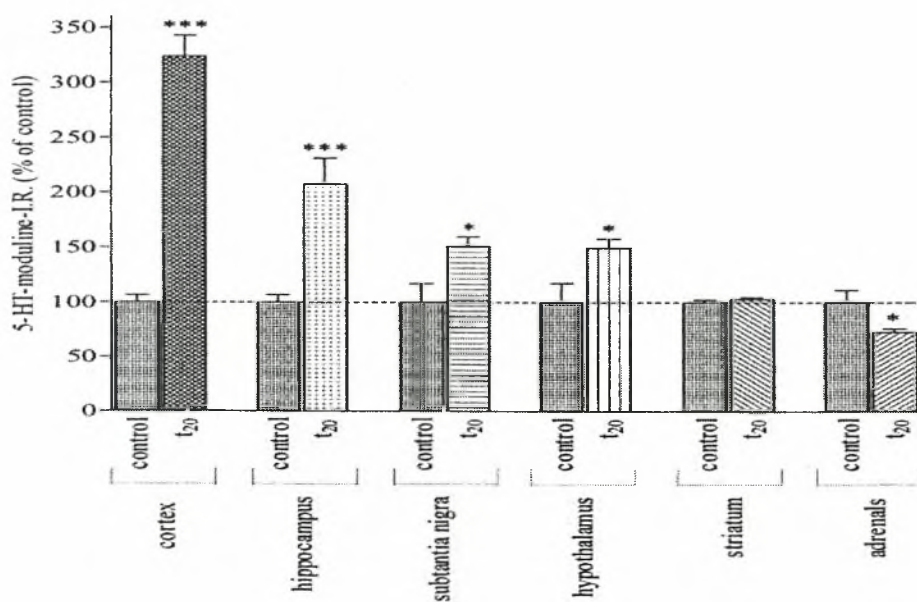
Συμπερασματικά, η σύνδεση της 5-HT-moduline στους 5-HT_{1B} υποδοχείς οδηγεί στην απενεργοποίηση τους. Πιο συγκεκριμένα, παρεμποδίζεται η σύνδεση του υποδοχέα με τη G_i πρωτεΐνη, η δράση της 5-HT στην παραγωγή cAMP, η ανασταλτική δράση της 5-HT στη απελευθέρωση της από τα συναπτοσώματα και τέλος η εμφάνιση της συμπεριφοράς που προκαλεί ένας 5-HT_{1B} αγωνιστής σε απομονωμένα ποντίκια.



Εικ.1.18 Επίδραση της 5-HT-moduline στη συμπεριφορά πειραματόζωων. Ποντίκια υποβλήθηκαν στο τεστ κοινωνικής αλληλεπίδρασης. Ο αγωνιστής των 5-HT_{1B} υποδοχέων, RU-24969 (4mg/Kg, intra-peritoneal) χορηγήθηκε 30min πριν το τεστ και 5-HT-moduline (50μg, icv) 45min πριν το τεστ. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό του αριθμού των προσπαθειών απόδρασης σε σχέση με αυτό των μη απομονωμένων ποντικίων.

Αποδείχτηκε με τεχνικές μικροδιάλυσης, ότι το οξύ stress ακινησίας σε ποντίκια γρήγορα απευαισθητοποιεί τους 5-HT_{1B} υποδοχείς και οδηγεί σε αύξηση της

έκκρισης της 5-HT. Με βάση την αλληλεπίδραση της 5-HT-moduline με τους 5-HT_{1B} υποδοχείς, οι πειραματιστές υπέθεσαν ότι το πεπτίδιο μπορεί, έστω εν μέρει, να είναι υπεύθυνο για την παρατηρούμενη αύξηση της 5-HT. Αυτή η υπόθεση υποστηρίχτηκε από πειράματα τα οποία έδειξαν ότι i.c.v χορήγηση 5-HT-moduline σε ποντίκι απευαισθητοποίησε τους 5-HT_{1B} υποδοχείς στη μέλαινα ουσία, όπως μετά από στρεσογόνο ερέθισμα. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε το περιεχόμενο διάφορων ιστών σε 5-HT-moduline σε ποντίκια μετά από οξύ και χρόνια stress ακινησίας. Η ποσοτικοποίηση του πεπτιδίου έγινε χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα anti-5-HT-moduline σε μελέτη dot-ELISA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 20 min μετά από την έναρξη του stress, τα επίπεδα της 5-HT-moduline αυξήθηκαν σε φλοιό, σε ιππόκαμπο, σε μέλαινα ουσία και σε υποθάλαμο κατά φθίνουσα σειρά.. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το stress ακινησίας αυξάνει διαφορετικά το περιεχόμενο των ιστών σε 5-HT-moduline. Τα υψηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκαν μετά από 20 min και σταδιακά επέστρεψαν σε τιμές control κατά τα τελευταία 20 min του περιορισμού των πειραματόζωων. Μία ώρα μετά το τέλος της περιόδου stress, τα επίπεδα 5-HT-moduline σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν βρίσκονταν σε τιμές control, και αυτές οι τιμές διατηρήθηκαν και μετά από 4 ώρες.



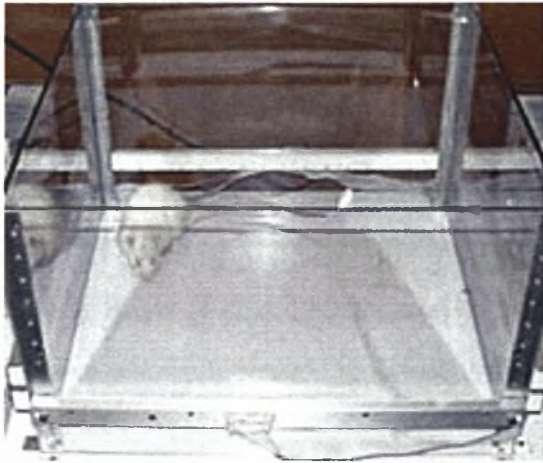
Εικ. 1.19 Επίδραση stress ακινησίας 20 min σε συγκέντρωση 5-HT-moduline σε φλοιό, ιππόκαμπο, υποθάλαμο, μέλαινα ουσία, ραβδωτό σώμα και επινεφρίδια. Ο προσδιορισμός του περιεχομένου των ιστών σε 5-HT-moduline είτε σε μη στρεσορισμένα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν ως control είτε σε ποντίκια που υποβλήθηκαν σε stress ακινησίας έγινε με τεχνικές dot-ELISA.

Οι παραλλαγές του περιεχομένου των ιστών σε 5-HT-moduline κατά τη διάρκεια του stress ακινησίας μπορεί να αντιστοιχεί σε διαφορές του ρυθμού σύνθεσης, τροποποίησης και αποικοδόμησης του πεπτιδίου. Η ετερογένεια της αύξησης της 5-HT-moduline που παρατηρείται στα διαφορετικά τμήματα του εγκεφάλου, μετά από ένα στρεσογόνο ερέθισμα, δείχνει ότι η απόκριση του CNS στο stress περιλαμβάνει αυτές τις περιοχές. Οι προσαρμοστικοί μηχανισμοί για την αντιμετώπιση του stress απαιτούν διαφορετικές αλληλεπιδράσεις του σεροτονινεργικού συστήματος με ποικίλες λειτουργίες που εντοπίζονται στις συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου όπως η κινητική δραστηριότητα της μέλαινας ουσίας, οι γνωστικές λειτουργίες του ιπόκαμπου, η έκκριση ορμονών από τον υποθάλαμο.

Τέλος, χορήγηση αντισώματος αντι-5HT-moduline έχει αγχολυτική δράση στο μοντέλο elevated plus maze, στο οποίο τα πειραματόζωα τοποθετούνται σε κατασκευή με τέσσερις βραχίονες, οι δύο μόνο από τους οποίους έχουν τοιχώματα. Σε αυτό το τεστ μετριέται ο χρόνος που περνάει το ποντίκι στους ανοιχτούς και κλειστούς βραχίονες. Συνήθως, το στρεσαρισμένο πειραματόζωο όταν εισαχθεί σε άγνωστο περιβάλλον, προτιμά την περιοχή των κλειστών βραχιόνων. Άλλα τεστ συμπεριφοράς που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του άγχους στα ποντίκια είναι το τεστ open field, light-dark box και το τεστ marble burying. Γενικά, τα πειραματόζωα όταν βρεθούν σε νέο περιβάλλον (αιτία stress), προτιμούν να περνούν περισσότερο χρόνο στην περίμετρο της περιοχής και όχι στο κέντρο της (open field), να κινούνται σε σκοτεινές περιοχές (light-dark box) και να θάβουν αντικείμενα που θεωρούν απειλητικά (marble burying).



Εικ.1.20 Το τεστ συμπεριφοράς elevated plus maze. Μετριέται ο χρόνος που περνά το πειραματόζωο σε κάθε βραχίονα. ($t_{\text{ανοιχτός βραχίονας}}$ / $t_{\text{ανοιχτός βραχίονας}} + t_{\text{κλειστός βραχίονας}}$). Το στρεσαρισμένο πειραματόζωο προτιμά την περιοχή των κλειστών βραχιόνων.



Εικ. 1.21 Το τεστ open field. Τα ποντίκια τοποθετούνται σε ανοιχτό κουτί όπου μετρείται και αναλύεται η κινητική δραστηριότητα του πειραματόζωου (απόσταση που διανύεται, ταχύτητα, συνολική δραστηριότητα, διακριτές κινήσεις).

5-HT-moduline: νέος νευροδιαβιβαστής;

Για να γίνει αποδεχτός ο ρόλος της 5-HT-moduline ως νευροδιαβιβαστή, θα πρέπει να διαθέτει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.

Ένα πρώτο χαρακτηριστικό είναι η ετερογενής κατανομή του πεπτιδίου στον εγκεφαλικό ιστό. Η παρουσία της 5-HT-moduline στον εγκέφαλο μελετήθηκε με ανοσοϊστοχημεία. Παρήχθη ένα εξειδικευμένο πολυκλωνικό αντίσωμα ενάντια στη 5-HT-moduline και η ανοσοσήμανση που παρατηρήθηκε σε εγκεφαλικές τομές ποντικού υποδεικνύει ότι το πεπτίδιο βρίσκεται σε νευρώνες με ετερογενή κατανομή στον εγκέφαλο. Η συγκέντρωση της 5-HT-moduline σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τεστ ELISA: υποθάλαμος>ιππόκαμπος>φλοιός>μέλαινα ουσία>ραβδωτό σώμα>παρεγκεφαλίδα. Το γεγονός ότι σε αυτές τις περιοχές εντοπίζονται οι 5-HT_{1B} υποδοχείς έρχεται σε συμφωνία με την υπόθεση ότι η 5-HT-moduline ρυθμίζει τη δραστηριότητα αυτών των υποδοχέων.

Επίσης, το πεπτίδιο απελευθερώνεται από τα συναπτοσώματα με K^+/Ca^+ εξαρτώμενο μηχανισμό, πράγμα το οποίο δείχνει ότι προέρχεται από διεγερμένο νευρώνα, χαρακτηριστικό όλων των νευροδιαβιβαστών. Το πεπτίδιο καταβολίζεται γρήγορα σε ομογενοποίηση εγκεφαλικού ιστού από ενδοπεπτιδάσες που οδηγούν στη δημιουργία δύο διπεπτιδίων (Leu-Ser) και (Ala-Leu).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό που θα πρέπει να διαθέτει η 5-HT-moduline, τέλος είναι το αν προέρχεται από ένα πρόδρομο μόριο όπως τα υπόλοιπα νευροπεπτίδια. Στη παρούσα εργασία, χρησιμοποιώντας το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-5-HT-moduline σε τεχνικές Western blotting και ανοσοκατακρήμνισης για περιοχές του εγκεφάλου (φλοιός, παρεγκεφαλίδα, ιππόκαμπος) έγιναν προσπάθειες για την ανίχνευση και απομόνωση του πρόδρομου μορίου της 5-HT-moduline.

2. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Ομογενοποίηση ιστού

1. Διάφορες περιοχές του εγκεφάλου (φλοιός, ιππόκαμπος, παρεγκεφαλίδα) καθώς και ολόκληρος ο εγκέφαλος αρουραίων Wistar 2-3 μηνών ομογενοποιούνται στους 4°C με ομογενοποιητή από Teflon σε διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών που περιέχει PBS 1x, PMSF (2mM), EDTA (2mM) και Igepal 0.5% v/v. Το διάλυμα παρασκευάζεται την τελευταία στιγμή στους 4°C ως εξής:

PMSF (0.1M)	200 μl
EDTA (0.5M)	40 μl
Igepal CA-630 100% v/v	50 μl
PBS 10x	1 ml
δισ απεσταγμένο H ₂ O	8.7 ml
Συνολικός όγκος	10 ml

Τα διαλύματα stock παρασκευάζονται ως εξής:

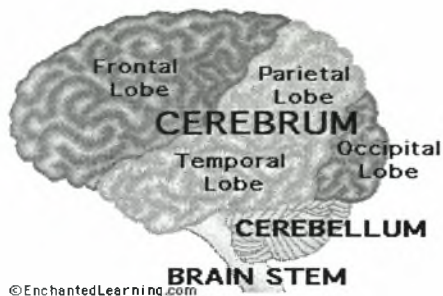
PMSF (0.1M): Διαλύονται 17,4 mg PMSF σε 1 ml ισοπροπανόλης

EDTA (0.5M): Προστίθενται σε 186,1 gr disodium ethylenediaminetetra-acetate•2H₂O σε 800 ml δισ απεσταγμένου H₂O και αναδεύονται καλά. Το pH ρυθμίζεται με NaOH στο 8,0.

PBS 10x: Διαλύονται 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.44 gr NaHPO₄ σε 800 ml δισ απεσταγμένου H₂O. Το pH ρυθμίζεται με HCl στο 7.4. Προστίθεται δισ απεσταγμένο H₂O μέχρι το 1 lt.

Πιο συγκεκριμένα:

- ο εγκέφαλος διαλύεται σε 2 ml διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 20 mg/ml.
- ο φλοιός διαλύεται σε 2 ml διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 14 mg/ml.
- ο ιππόκαμπος σε 500 μl διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 14 mg/ml.
- η παρεγκεφαλίδα σε 1 ml διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 16,5 mg/ml.



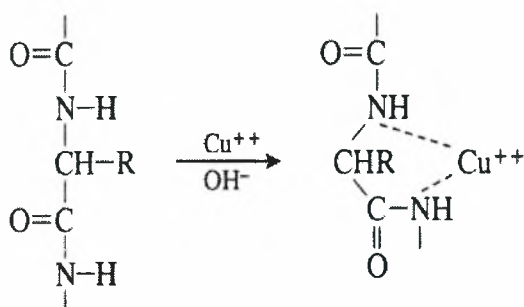
Εικ.2.1 Δομή του εγκεφάλου. Διακρίνονται οι περιοχές του φλοιού και της παρεγκεφαλίδας. Πιο συγκεκριμένα, ο φλοιός διαιρείται σε τέσσερις ανεξάρτητους ανατομικά λοβούς με εξειδικευμένες λειτουργίες: τον μετωπικό, τον βρεγματικό, τον ινιακό και τον κροταφικό.

2. Επώαση του ομογενοποιημένου για 20 min στους 4°C.
3. Φυγοκέντρηση σε erpendorfs για 15 min στα 1200g και σε θερμοκρασία 4°C. Λαμβάνεται το υπερκείμενο ενώ το ίζημα φυλάσσεται στους 4°C (αφού πρώτα εξετάστηκε η δραστηριότητά του).
4. Το υπερκείμενο του φλοιού και του ιππόκαμπου κλασματοποιείται ανά 100 μl ενώ της παρεγκεφαλίδας ανά 50 μl και αποθηκεύονται όλα στους -80°C.
5. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που περιέχει το υπερκείμενο προσδιορίζεται με τη μέθοδο του *Lowry et al* (1951).

2. Μέτρηση πρωτεϊνών κατά Lowry

▪ Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος του *Lowry et al* (1951) αποτελεί μία από τις μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών σε ένα άγνωστο διάλυμα και βασίζεται στο σχηματισμό χρώματος. Αρχικά δύο ή περισσότεροι πεπτιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών αντιδρούν με αραιό διάλυμα θεικού χαλκού σε αλκαλικό περιβάλλον, σχηματίζοντας εσωτερικά σύμπλοκα με χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα (Εικόνα 2.1). Πιο συγκεκριμένα, η εμφάνιση χρώματος είναι το αποτέλεσμα της αναγωγής των ιόντων Cu^{2+} σε Cu^+ στο σύμπλοκο του ατόμου του χαλκού και τεσσάρων ατόμων αζώτου, δύο από κάθε αλυσίδα πεπτιδίου. Επειδή απαιτούνται μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης (1-20 mg), η μέθοδος αυτή γίνεται πιο ευαίσθητη (ανίχνευση έως και 5 μg πρωτεΐνης) με τη προσθήκη του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu. Τα φωσφορομολυβδαινικά και τα φωσφοροβολφραμικά άλατα που αποτελούν τα ενεργά συστατικά του αντιδραστήριου Folin ανάγονται κατά 75% από τα σύμπλοκα πρωτεϊνών με τον χαλκό και κατά 25% από τα κατάλοιπα τυροσίνης και τρυπτοφάνης χάνοντας 1-3 άτομα οξυγόνου. Η παραπάνω αναγωγή έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ιώδους χρώματος, το οποίο ανιχνεύεται σε $\lambda_{\text{max}}=750$ nm και εξαρτάται εν μέρει από της συγκεντρώσεις των αρωματικών αμινιξίων, τυροσίνης και τρυπτοφάνης .



Εικόνα 2.3 Αντίδραση διουρίας. Οι πεπτιδικό δεσμοί των πρωτεϊνών όταν αντιδράσουν με αραιό διάλυμα θειϊκού χαλκού σε αλκαλικό περιβάλλον σχηματίζουν εσωτερικά σύμπλοκα με χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα.

▪ Προετοιμασία Πρότυπης Καμπύλης μέτρησης με διάλυμα αλβουμίνης ορού (BSA)

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του αγνώστου δείγματος απαιτείται η κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Έτσι, παρασκευάζονται εις διπλούν διαφορετικές συγκεντρώσεις αλβουμίνης βοείου ορού (BSA) (από 0,1 mg/ml έως 0,5 mg/ml) σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα και μετρούνται οι απορροφήσεις τους με φασματοφωτόμετρο σε $\lambda_{max}=750 \text{ nm}$.

Τελική συγκέντρωση BSA σε mg/ml	0	0,1	0,05	0,1	0,15	0,2	0,3	0,5
BSA 1 mg/ml (μl)	-	-	-	10	15	20	30	50
BSA 0.1 mg/ml (μl)	-	10	50	-	-	-	-	-
NaOH 1N (μl)	100	90	50	90	85	80	70	50
Συνολικός όγκος	100	100	100	100	100	100	100	100

Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα (BSA) 10 mg/ml. Το διάλυμα αυτό αραιώνεται σε NaOH 1N:

- 10 φορές για να έχουμε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml (1ml BSA (10mg/ml) + 9ml NaOH 1N)
- 100 φορές, (100 μl του διαλύματος 1 mg/ml σε 900 μl NaOH 1N) για να έχουμε τελική συγκέντρωση 0,1 mg/ml.

Η καμπύλη αναφοράς σε συγκέντρωση (1mg/ml) μέσα σε διάλυμα NaOH. Για τις συγκεντρώσεις 0.01M & 0.05M χρησιμοποιούμε την αλβουμίνη συγκέντρωσης 0.1mg/ml (100μl BSA + 900μl NaOH).

▪ Προετοιμασία Πρωτεϊνών του Δείγματος

Για την μέτρηση των πρωτεϊνών του δείγματος χρησιμοποιούνται 4 διαφορετικές αραιώσεις εις διπλούν σε NaOH 1N. Το ομογενοποίηση αρχικά αραιώνεται σε 1/10 (100 μl + 900 μl NaOH). Στη συνέχεια, το αρχικό αυτό διάλυμα αραιώνεται ως εξής:

- E1 50 μl αρχικού διαλύματος + 50 μl NaOH (τελική αραιώση 1/20)
- E2 20 μl αρχικού διαλύματος + 80 μl NaOH (τελική αραιώση 1/50)
- E3 10 μl αρχικού διαλύματος + 90 μl NaOH (τελική αραιώση 1/100)
- E4 50 μl (από E3:διάλυμα αραιώσεως 1/100) + 50 μl NaOH (τελική αραιώση 1/1000)

▪ Πειραματική Διαδικασία Μέτρησης Πρωτεϊνών

1. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 1 ml Διαλύματος A ($C_4H_4KNaO_6$ 0.01%, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01%, Na_2CO_3 2 %) το οποίο παρασκευάζεται ως εξής:

$C_4H_4KNaO_6$ 10%	500 μl
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01%	125 μl
Na_2CO_3 20 %	4.8 ml
Δις απεσταγμένο H_2O	45 ml
Συνολικός όγκος	50 ml

2. Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας αναδεύεται καλά στο vortex.
3. Επώαση 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 100 μl αντιδραστήριου Folin 1:3 (1 ml αντιδραστήριο Folin σε 2 ml H_2O) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
5. Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας αναδεύεται καλά στο vortex.
6. Επώαση 30 min στο σκοτάδι.
7. Μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων σε φασματοφωτόμετρο στα 750 nm.
8. Σχεδιάσμός της καμπύλης αναφοράς

Τα διαλύματα stock παρασκευάζονται ως εξής:

$C_4H_4KNaO_6$ 10%: 1 gr $C_4H_4KNaO_6$ σε 10 ml H_2O

Na_2CO_3 20 %: 2 gr Na_2CO_3 σε 10 ml H_2O

▪ Υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών

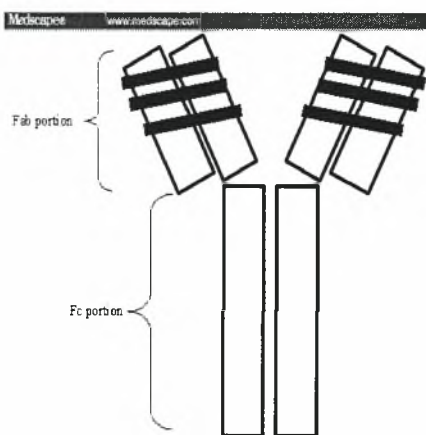
Η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς έχει τη μορφή $y=ax+b$ όπου x η συγκέντρωση σε mg/ml και y η απορροφητικότητα στα 750 nm. Για κάθε τιμή του y

στα αραιωμένα δείγματα (E1-E4) υπολογίζεται η τιμή του x , η οποία πολλαπλασιάζεται με την αραιώση που πραγματοποιήθηκε. Από τις τέσσερις τιμές που θα προκύψουν λαμβάνεται ο μέσος όρος των τιμών των οποίων η απορροφητικότητα βρίσκεται στο μέσον περίπου της καμπύλης.

3. Ανοσοκατακρήμνιση

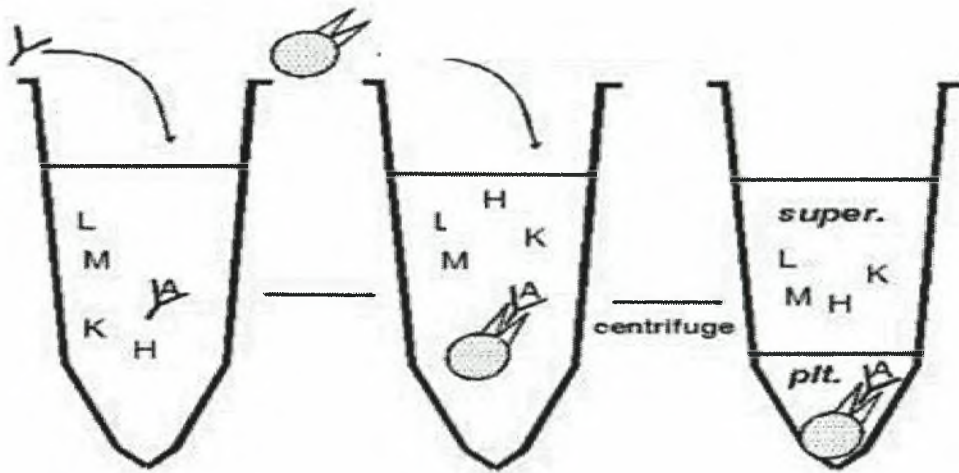
▪ Αρχή της Μεθόδου

Μία από τις πρώτες παρατηρήσεις αντιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος ήταν η ικανότητα τους να καθιζάνουν όταν συνδυάζονται σε ισοδύναμες ή σχεδόν ισοδύναμες αναλογίες. Αυτό καταδεικνύεται στην κλασική αντίδραση κατακρήμνισης όπου το αντιγόνο και το αντίσωμα αναμιγνύονται σε ένα διάλυμα. Όπως είναι γνωστό, κάθε ανοσοσφαιρίνη διαθέτει δύο περιοχές εξειδικευμένης πρόσδεσης του αντιγόνου (Fab).



Εικ.2.4: Δομή αντισώματος. Διακρίνονται οι περιοχές F_C και F_{ab} οι οποίες είναι εξειδικευμένες για την πρόσδεση ενός αντιγόνου.

Όταν το αντιγόνο προσδεθεί σε αυτές τις περιοχές, δημιουργούνται μεγάλου μεγέθους σύμπλοκα αντισώματος-αντιγόνου τα οποία είναι αδιάλυτα και καθιζάνουν. Εάν μια συγκεκριμένη ποσότητα αντιγόνου ή αντισώματος επωαστεί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του άλλου συστατικού, μπορεί να προσδιοριστεί η καλύτερη δυνατή αναλογία αντισώματος-αντιγόνου για τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Εάν το αντίσωμα δεν είναι ικανό να αλληλεπιδράσει και να δημιουργήσει σύμπλοκα με το προς εξέταση αντιγόνο στο βαθμό που απαιτείται, εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί η πρωτεΐνη A του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*. Αυτή η πρωτεΐνη είναι γνωστή για την μεγάλη συγγένεια πρόσδεσης που διαθέτει για της ανοσοσφαιρίνες και συνδέεται ειδικά στις περιοχές F_C των ανοσοσφαιρινών IgG πολλών θηλαστικών. Πιο συγκεκριμένα, ένα μόριο πρωτεΐνης A με *Sepharose* που αποτελεί το αδιάλυτο μέσο στο οποίο ακινητοποιείται η πρωτεΐνη A, έχει την ικανότητα δέσμευσης δύο μορίων IgG.



Εικ. 2.5 Ανοσοκατακρήμνιση: Το αντίσωμα προσδένεται στο ειδικό για αυτό αντιγόνο. Η πρωτεΐνη A που προστίθεται στο διάλυμα προσδένεται στις περιοχές F_C του αντισώματος και έτσι δημιουργείται το σύμπλοκο πρωτεΐνη A-αντίσωμα-αντιγόνο το οποίο με φυγοκέντρηση κατακρημνίζεται. Έτσι, στο ίζημα που λαμβάνεται, υπάρχει η ειδική για το αντίσωμα πρωτεΐνη ενώ στο υπερκείμενο βρίσκονται οι μη ειδικές πρωτεΐνες που δεν αναγνωρίζονται από το αντίσωμα.

▪ Πειραματική διαδικασία

1. 100 μ l ομογενοποιημάτος εγκεφαλικού φλοιού διαλύονται σε 500 μ l ρυθμιστικού διαλύματος αποδιάταξης που περιέχει Tris 10 mM pH 7.4, SDS 1% και β -μερκαπτοαιθανόλη 10%. Τα 5 ml αυτού του διαλύματος παρασκευάζονται ως εξής:

Tris 200 mM, pH 7.4	250 μ l
SDS 10%	500 μ l
β -μερκαπτοαιθανόλη 100% v/v	500 μ l
Δις απεσταγμένο H_2O	3750 μ l
Συνολικός όγκος	5 ml

2. Βράσιμο στους 100°C για 5 min. Έτσι, επιτυγχάνεται η μετουσίωση των πρωτεϊνών.
3. Το παραπάνω διάλυμα προεπωάζεται 1h στους 4°C παρουσία 120 μ l Protein-A-Sepharose (0,01 gr protein-A-Sepharose σε 100 μ l H_2O).
4. Το δείγμα φυγοκεντρείται 1min στα 10,000g στους 4°C. Η protein-A-Sepharose κατακρημνίζεται ως ίζημα με όποια μη ειδική για το αντίσωμα πρωτεΐνη έχει πιθανώς δεσμεύσει.
5. Το υπερκείμενο που λαμβάνεται (500 μ l) τοποθετείται σε erpendorf. Στη συνέχεια, προστίθενται σε αυτό 5-6 μ l προάνοσου ορού ή πολυκλωνικού

αντισώματος αντι-5HT-moduline και 1 ml διαλύματος ανοσοκατακρήμνισης τελικής συγκέντρωσης Tris 150 mM pH 7.4, NaCl 225 Mm, EDTA 0.2 mM, PMSF 0.2 Mm, Igepal CA-630 0.5 % v/v το οποίο παρασκευάζεται ως εξής:

Tris 200 mM pH 7.4	250 μl
NaCl 1.5 M	750 μl
EDTA 0.5 M	15 μl
PMSF 0.1 M	15 μl
Igepal 100% v/v	75 μl
δισ απεσταγμένο H ₂ O	3895 μl
Συνολικός όγκος	5 ml

6. Τα δείγματα επωάζονται 1h στους 4°C με ανακίνηση παρουσία 20-40 μl protein-A-Sepharose σε κάθε erppendorf. Με αυτόν τον τρόπο, το σύμπλοκο αντισώματος-πρωτεΐνης δεσμεύεται στην protein-A-Sepharose.
7. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στα 10,000g για 1 min στους 4°C. Έτσι, το σύμπλοκο αντισώματος- ειδικής πρωτεΐνης -protein-A-Sepharose κατακρημνίζεται ως ίζημα.
8. Το υπερκείμενο απομακρύνεται ενώ το ίζημα ξεπλένεται 2 φορές με 1 ml διαλύματος Tris-Tween και μια φορά με 1 ml διαλύματος Tris 10 mM pH 7.4 ενώ μετά από κάθε ξέπλυμα ακολουθεί φυγοκέντρηση (10,000g x 1 min x 4°C). Έτσι, απομακρύνονται από το ίζημα ό,τι δεν έχει δεσμευτεί στην Protein-A-Sepharose, εκτός του σύμπλοκου ανοσοσφαιρινών-ειδικών πρωτεϊνών. Τα παραπάνω διαλύματα παρασκευάζονται ως εξής:

Tris-Tween

Tris 200 mM pH 7.4	250 μl
Tween 10% v/v	50 μl
δισ απεσταγμένο H ₂ O	4700 μl
Συνολικός όγκος	5 ml

Tris

Tris 200 mM pH 7.4	250 μl
δισ απεσταγμένο H ₂ O	4750 μl
Συνολικός όγκος	5 ml

9. Προστίθεται στο ίζημα 25 ή 60 μl διαλύματος της ηλεκτροφόρησης (loading buffer) που περιέχει Tris 50 mM pH 7.4, SDS 2%, γλυκερόλη 10%, μπλε της βρωμοφαινόλης 0,01% και β-μερκαπτοαιθανόλη 10%. Το loading buffer παρασκευάζεται ως εξής:

Tris 200 mM pH 7.4	250 μ l
SDS 10% w/v	200 μ l
γλυκερόλη 100% v/v	100 μ l
μπλε της βρωμοφαινόλης 0,1% w/v	100 μ l
μερκαπτοαιθανόλη 100% v/v	100 μ l
δix απεσταγμένο H ₂ O	250 μ l
Συνολικός όγκος	1 ml

10. Τα δείγματα βράζουν για 5 min στους 100°C. Σε αυτό το στάδιο, το σύμπλοκο αντισώματος- ειδικής πρωτεΐνης -protein-A-Sepharose αποδιατάσσεται καθώς επίσης οι πρωτεΐνες αποδεσμεύονται από το αντίσωμα.
11. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 10,000g για 1 min στους 4°C. Μέρος του υπερκειμένου, το οποίο περιέχει τις ειδικές για το αντίσωμα πρωτεΐνες και το ίδιο το αντίσωμα, φορτώνεται σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου και ηλεκτροφορείται στα 100mV για περίπου 1,30- 2h.

4. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

▪ Αρχή της Μεθόδου

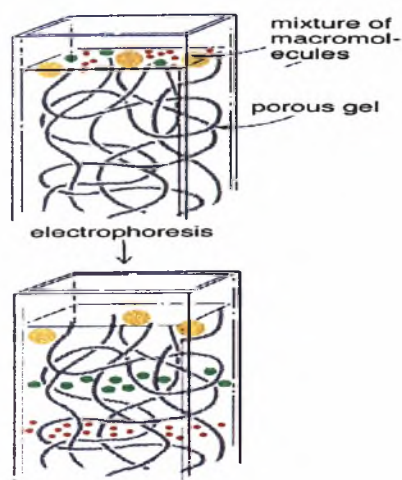
Ηλεκτροφόρηση είναι η διεργασία κατά την οποία φορτισμένα μόρια όπως DNA, RNA και πρωτεΐνες κινούνται σε ηλεκτρικά πεδία μέσα σε διαλύματα ή πηκτές. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης έχει αναπτυχθεί πάρα πολύ και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ή ταυτοποίηση όλων των βιολογικών μορίων. Τεράστιες εφαρμογές της ηλεκτροφόρησης σε πηκτές έχουμε κυρίως κατά τον καθαρισμό πρωτεϊνών.

Η ταχύτητα μετακίνησης (U) της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και τον συντελεστή τριβής (f).

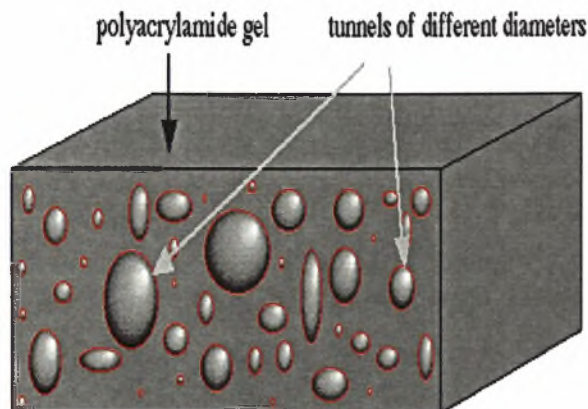
$$U = Ez/f \quad (1)$$

Η ηλεκτροστατική δύναμη Ez που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής fU που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου. Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πηκτική κυρίως για δύο λόγους: 1) η πηκτική καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις θερμοκρασίας-απαραίτητη ροϋπόθεση για σωστό διαχωρισμό 2) η πηκτική λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτικής μετακινούνται εύκολα δια μέσου της

πηκτής ενώ τα μεγάλα μόρια παραμένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα από την πηκτή.



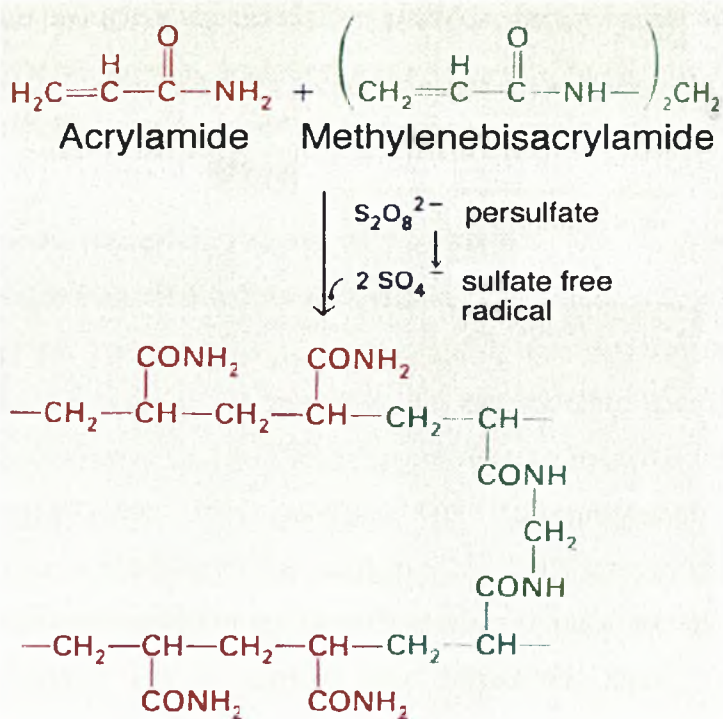
Εικ.2.6: Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πορώδη πηκτή πολυακρυλαμιδίου



Εικ.2.7 Πόροι διαφορετικής διαμέτρου σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Το μέγεθος των πόρων του πολυμερούς ποικίλει ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των μονομερών ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλενο-δισ ακρυλαμιδίου.

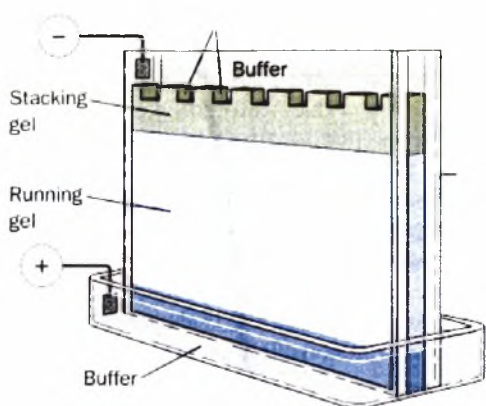
Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό βάρος και το φορτίο τους. Τα πηκτώματα του πολυακρυλαμιδίου δημιουργούνται με πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του N,N'-μεθυλενο-δισ ακρυλαμιδίου. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου είναι προτιμητέες για ηλεκτροφόρηση γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα. Επίσης, το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί εύκολα με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλενο-δισ ακρυλαμιδίου (του απαραίτητου αντιδραστηρίου δια τις διασυνδέσεις) στον πολυμερισμό για το σχηματισμό της πηκτής.

Με άλλα λόγια, το μέγεθος των πόρων του πολυμερούς που προκύπτει είναι συνάρτηση του βαθμού του πολυμερισμού, ο οποίος ποικίλει ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των μονομερών. Η αντίδραση πολυμερισμού αρχίζει με την προσθήκη του υπερθειικού αμμωνίου (APS: ammonium persulfate) που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες : $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2SO_4^{\bullet-}$ που μαζί με το φωτοχημικό καταλύτη N,N' τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) διαδίδονται στο σύστημα πολυμερισμού σύμφωνα με την αντίδραση:



Εικ.2.8 Αντίδραση σχηματισμού μιας πηκτής πολυακρυλαμιδίου.

Επίσης, μια πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από την πηκτή διαχωρισμού (Resolving gel) και την πηκτή επιστοίβαξης (Stacking gel) με τη διαφορά ότι η πρώτη διαθέτει μικρότερο μέγεθος πόρων και διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το μοριακό τους μέγεθος ενώ η δεύτερη με μεγαλύτερο μέγεθος πόρων συγκεντρώνει κατά μήκος της όλες τις πρωτεΐνες.

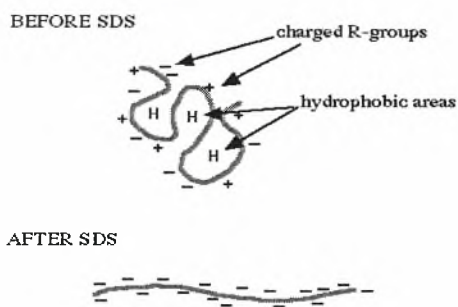


Εικ.2.9 Συσκευή ηλεκτροφόρησης πηκτών πολυακρυλαμιδίου.

Σε μια ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνθήκες αποδιάταξης οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν κυρίως βάση της μάζας τους. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου με το δωδεκακυλοθειικό νάτριο (SDS:Sodium Dodecyl Sulfate), το οποίο είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μια φυσικής πρωτεΐνης, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της καθαρότητας διάφορων παρασκευασμάτων, το χαρακτηρισμό

υπομονάδων μιας πρωτεΐνης και την εύρεση μοριακών βαρών πρωτεϊνικών αλυσίδων. Η μέθοδος αυτή είναι γρήγορη, ευαίσθητη και έχει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα.

Το πρωτεϊνικό παρασκεύασμα αντιδρά κατ'αρχάς με περίσσεια μερκαπτοαιθανόλης ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$) και SDS. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, οι γέφυρες $-\text{S}-\text{S}-$ που υπάρχουν στις πρωτεΐνες ανάγονται και τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά δύο αμινοξέα, που δίνει στο σύμπλοκο του SDS με αποδιατεγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης. Οι περισσότερες πρωτεΐνες συνδέουν SDS με την ίδια συγγένεια (1,4 gr SDS/gr πρωτεϊνών). Οι ανιονικές αποδιαταγμένες πρωτεΐνες διαχωρίζονται στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου σε περιβάλλον που περιέχει SDS. Συμπερασματικά, το SDS δίνει σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου της πρωτεΐνης προς τη μάζα της πρωτεΐνης και με βάση το λόγο αυτού και το μέγεθος των πόρων της πηκτής κινούνται και διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες. Συνεπώς, η κινητικότητα του SDS-πρωτεΐνης εξαρτάται λογαριθμικά από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης.



Εικ.2.10 Αποδιάταξη πρωτεϊνών παρουσία δωδεκακυλοθειϊκό νατρίου, SDS. Το SDS ως ανιονικό απορρυπαντικό καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης.

▪ Παρασκευή Διαλυμάτων που Χρησιμοποιούνται στην Ηλεκτροφόρηση

Acrylamide mix 30%: Ετοιμάζεται 30% διάλυμα ακρυλαμίδης ζυγίζοντας 29 gr σκόνης ακρυλαμίδης και 1 gr σκόνης του αντιδραστηρίου N,N' - μεθύλενο-δισ ακρυλαμίδιο. Το μίγμα διαλύεται σε 60 ml απιονισμένου H_2O , διηθείται και συμπληρώνεται με H_2O μέχρι τα 100 ml.

Tris 1.5 M, pH 8.8 : 5,449 gr Tris base σε 30ml H_2O .

Tris 1 M pH 6.8 : 6,05 gr Tris base σε 50ml H_2O .

SDS 10%: Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος SDS 10% (w/v) διαλύονται 10 gr SDS σε 90 ml H_2O . Το διάλυμα θερμαίνεται στους 68°C και το pH ρυθμίζεται με σταγόνες HCl στο 7,2.

Ammonium persulfate 10%: Το υπερθειϊκό αμμώνιο παρασκευάζεται κάθε εβδομάδα, 0,1 gr ammonium persulfate σε 1 ml H₂O.

TEMED: Το TEMED (Sigma) όπως και το υπερθειϊκό αμμώνιο προστίθενται τελευταία για να αρχίσει ο πολυμερισμός.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης : Περιέχει Tris 25 mM, γλυκίνη 250mM, SDS 10% με pH 8,3. Το διάλυμα παρασκευάζεται ως εξής:

Tris base	3 gr
Γλυκίνη (Sigma)	18.8 gr
SDS 10%	10 ml
δισ απεσταγμένο H ₂ O	990 ml
Συνολικός όγκος	1 lt

Resolving Gel 8%	10 ml	20 ml	30 ml	40 ml	50 ml
H ₂ O	4.6 ml	9.3 ml	13.9 ml	18.5 ml	23.2 ml
Acrylamide mix 30%	2.7 ml	5.3 ml	8 ml	10.7 ml	13.3 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	5 ml	7.5 ml	10 ml	12.5 ml
SDS 10%	100 μl	200 μl	300 μl	400 μl	500 μl
Ammonium persulfate 10%	100 μl	200 μl	300 μl	400 μl	500 μl
TEMED	6 μl	12 μl	18 μl	24 μl	30 μl

Resolving Gel 10%	10 ml	20 ml	30 ml	40 ml	50 ml
H ₂ O	4 ml	7,9 ml	11.9 ml	15.9 ml	19,8 ml
Acrylamide mix 30%	3,3 ml	6,7 ml	10 ml	13,3ml	16,7 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	5 ml	7.5 ml	10 ml	12.5 ml
SDS 10%	100 μl	200 μl	300 μl	400 μl	500 μl
Ammonium persulfate 10%	100 μl	200 μl	300 μl	400 μl	500 μl
TEMED	4 μl	8 μl	12 μl	16 μl	20 μl

Stacking Gel 5%	1 ml	2 ml	3 ml	5 ml	10 ml
H ₂ O	680 μl	1.4 ml	2.1 ml	3.4 ml	6.8 ml
Acrylamide mix 30%	170 μl	330 μl	500 μl	830 μl	1.7 ml
Tris 1 M pH 6.8	130 μl	250 μl	380 μl	630 μl	1.25 ml
SDS 10%	10 μl	20 μl	30 μl	50 μl	100 μl
Ammonium persulfate 10%	10 μl	20 μl	30 μl	50 μl	100 μl
TEMED	1 μl	2 μl	3 μl	5 μl	10 μl

Τα παραπάνω αντιδραστήρια τοποθετούνται με τη σειρά που αναφέρονται ενώ στην συσκευή ηλεκτροφόρησης πρώτα τοποθετείται το Resolving gel (πηκτή διαχωρισμού) όπου και πήζει σε 30 min (ακρυλαμίδιο 8 %) και 45 min (ακρυλαμίδιο 10%) και στη συνέχεια το Stacking gel (πηκτή στοίβαξης) το οποίο πήζει σε 30 min.

Απαραίτητη είναι η προσθήκη ισοπροπανόλης μετά από το Resolving gel για την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων που θα επηρεάσουν αργότερα τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών στην πηκτή. Η ισοπροπανόλη απομακρύνεται μετά την πήξη της πηκτής η οποία στη συνέχεια ξεπλένεται με δις απεσταγμένο H₂O.

Η πηκτή βάφεται με Silver ή Coomassie ακολουθώντας τα στάδια που περιγράφονται παρακάτω.

5. SILVER STAINING

- **Αρχή της μεθόδου**

Η χρώση με νιτρικό άργυρο αποτελεί την πιο ευαίσθητη μέθοδο (όριο ανίχνευσης: 0,2-0,6 ng πρωτεϊνών) για μόνιμη και ορατή χρώση των πρωτεϊνών σε μια πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Απαραίτητοι παράγοντες για την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων είναι τα υψηλής ποιότητας αντιδραστήρια και η τήρηση ακριβών χρονικών ορίων στη διαδικασία. Στη χρώση με νιτρικό άργυρο, η πηκτή κορεννύεται με διαλυτά ιόντα αργύρου και φορμαλδεΰδη η οποία ανάγει τα ιόντα αργύρου και συντελεί στο σχηματισμό αδιάλυτου μεταλλικού αργύρου (καφέ χρώμα). Η προηγούμενη αναγωγή προωθείται από τις πρωτεΐνες της πηκτής.

1. FIX 100ml	50ml Methanol 12ml Acetic Acid 50μl HCOH 37% (φορμαλδεϋδη) 38ml H ₂ O	2h
2. WASH 300ml	150ml Ethanol 150ml H ₂ O	3 x 100ml x 20min
3. PRETREAT 100 ml	0,02gr Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O 100ml H ₂ O	1min
4. RINSE	H ₂ O	3 x 20sec
5. IMPREGNATE 100ml	0,2gr AgNO ₃ 74μl HCOH 37% (φορμαλδεϋδη) 100ml H ₂ O	20 min
6. RINSE	H ₂ O	2 x 20sec
7. DEVELOP 100ml	7,072gr Na ₂ CO ₃ 50μl HCOH 37% (φορμαλδεϋδη) 0,4mg Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O 100ml H ₂ O	10 min
8. RINSE	H ₂ O	2 x 2min
9. STOP 100ml	50ml Methanol 12ml Acetic Acid 38ml H ₂ O	10min
10. WASH 100ml	50ml Methanol 50ml H ₂ O	Μπορούμε να το αφήσουμε για καιρό στους 4°C

$Na_2S_2O_3 \times 5H_2O$ 0,04gr = 40mg τα διαλύω σε 1000μl

0.4mg υπάρχουν σε 10μl

Η πηκτή διατηρείται σε διάλυμα μεθανόλης/ H₂O για αρκετό καιρό.

6. Χρώση με Coomassie

Η χρωστική Coomassie είναι μια συνθετική ετεροκυκλική οργανική χρώση που προσδένεται μη ειδικά σε όλες τις πρωτεΐνες.. Αν και δεν είναι πολύ ευαίσθητη όπως η χρώση με νιτρικό άργυρο, το Coomassie και τα παράγωγα του βρίσκουν εφαρμογή ευρέως λόγω ευκολιάς της χρήσης τους. Το Coomassie προσδένεται στις πρωτεΐνες της πηκτής με ένα σχεδόν στοιχειομετρικό τρόπο. Η χρώση με Coomassie περιλαμβάνει και στάδιο αποχρωματισμού της πηκτής με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας της μη προσδεδεμένης χρωστικής. Σε όξινο περιβάλλον, το Coomassie

όταν προσδένεται σε πρωτεϊνικά μόρια, εμφανίζει χρώμα μπλε. Άλλες χρήσεις του Coomassie εκτός από τη χρώση των πηκτών, περιλαμβάνουν την ανίχνευση των λιπιδίων σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και της πρόσληψης νερού από τις ρίζες των φυτών. Το διάλυμα Coomassie παρασκευάζεται ως εξής:

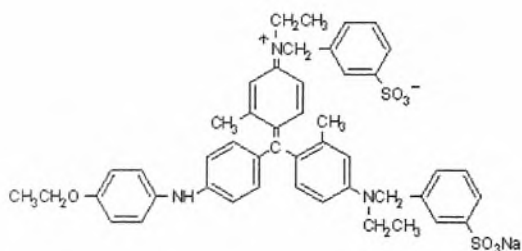
Coomassie-G (0.05%)	0.1 gr
Methanol 40%	80 ml
Acetic acid 10% (προσθήκη μετά από 20 min)	20 ml
δισ απεσταγμένο H ₂ O	100 ml
Συνολικός όγκος	200 ml

Η πηκτή παραμένει στο παραπάνω διάλυμα για 30 min με ήπια ανακίνηση.

Το διάλυμα Destaining solution παρασκευάζεται ως εξής:

Methanol 30%	150 ml
Acetic acid 10%	50 ml
δισ απεσταγμένο H ₂ O	300 ml
Συνολικός όγκος	500 ml

Το παραπάνω διάλυμα χρησιμοποιείται με διαδοχικά πλυσίματα των 100 περίπου ml κάθε 30 min έως ότου αρχίζει να αποχρωματίζεται η πηκτή και να διαφαίνονται οι μπάντες των πρωτεϊνών.



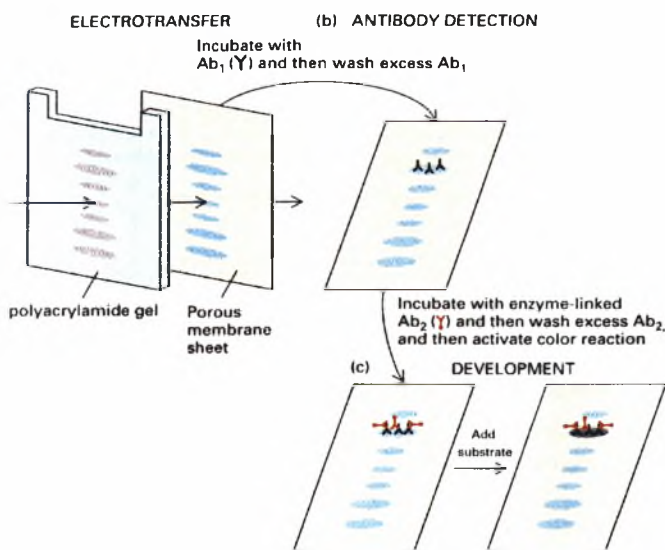
Εικ.2.12 Χημική δομή του Coomassie-Brilliant Blue-G-250.

7. Western Blotting

• Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την ηλεκτρομεταφορά και αποτύπωση των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών από μια πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μια πορώδη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με πολυκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι το οποίο και δεσμεύεται στις πρωτεΐνες που αναγνωρίζει ειδικά.. Αυτό το αντίσωμα αναγνωρίζεται και συνδέεται με ένα δεύτερο αντίσωμα (Horseradish-peroxidase-labelled), το οποίο αναγνωρίζει αντισώματα κουνελιού. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με κάποιο ένζυμο όπως

υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση, το οποίο όταν επωαστεί με το κατάλληλο υπόστρωμα (μία φωτεινή ουσία) εκπέμπει ακτινοβολία που κάνει ορατή την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.



Εικ.2.13 Western Blot. Η διαδικασία της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF, η επώαση της με 1^ο και 2^ο αντίσωμα που φέρει ειδικό ένζυμο που επιτρέπει την ανίχνευση των πρωτεϊνών με το σύστημα ECL.

▪ **Πειραματική διαδικασία**

1. Μετά το τέλος της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης το gel τοποθετείται για 10 min σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς που περιέχει: Tris 25 Mm, γλυκίνη 190 mM και μεθανόλη 14,5 % (όταν χρησιμοποιούνται μεμβράνες PVDF). Όταν χρησιμοποιούνται μεμβράνες νιτροκυτταρίνης ECL η περιεκτικότητα της μεθανόλης ανέρχεται σε 20 %. Για την παρασκευή 1,5 lt διαλύματος με pH 8,3 σε 2-8^ο C θερμοκρασία χρησιμοποιούνται:

Tris base	4,5 gr
γλυκίνη	21.3 gr
μεθανόλη 100%	300 ml
Δις απεσταγμένο H ₂ O	1,2 lt
Συνολικός όγκος	1,5 lt

2. Η μεμβράνη είτε πρόκειται για νιτροκυτταρίνη είτε για PVDF πρέπει να κοπεί στις διαστάσεις του gel προκειμένου να γίνει η μεταφορά. Στην περίπτωση της νιτροκυτταρίνης αυτή τοποθετείται στο διάλυμα μεταφοράς για 5 min. Στην περίπτωση της PVDF αρχικά πρέπει να βυθιστεί σε μεθανόλη για 10 sec, στην συνέχεια σε H₂O για 5 min και τελικά στο διάλυμα μεταφοράς για 10 min.
3. Ακόμα πρέπει να κοπούν 6 χαρτιά Whattman 3MM με διαστάσεις όμοιες με αυτές του gel τα οποία και βυθίζονται για 5 min στο διάλυμα μεταφοράς.

4. Η διαδικασία συνεχίζεται με τα 3 εμποτισμένα χαρτιά Whattman να τοποθετούνται σε πλήρη στοίχιση μεταξύ τους προς το θετικό πόλο της κατασκευής στην οποία και θα λάβει χώρα η μεταφορά. Ακολουθεί η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF, η πηκτή πολυακρυλαμίδης και τα υπόλοιπα 3 χαρτιά Whattman. Παράλληλα για την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων που θα επηρεάσουν τη μεταφορά των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται μια γυάλινη πιπέτα Pasteur με την οποία τα παραπάνω στρώματα που δημιουργήθηκαν πιέζονται κατά μήκος.

5. Η συσκευή ηλεκτρο-μεταφοράς που βρίσκεται στο ψυγείο (4°C) περιέχει το διάλυμα μεταφοράς και ένα μαγνητικό αναδευτήρα που εμποδίζει την καθίζηση της γλυκίνης του διαλύματος κατά τη διάρκεια της μεταφοράς.

6. Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται προς τη μεμβράνη για περίπου 3 h στα 400 mA.

7. Μετά το τέλος της μεταφοράς, η πηκτή μεταφέρεται σε τριβλίο για να βαφεί με Silver Staining προκειμένου να ελεγχθεί το ποσοστό μεταφοράς. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS-blotto 1x για 1,5 h. Για την παρασκευή 50 ml του παραπάνω διαλύματος απαιτούνται:

PBS 10X	5 ml
άπαχο γάλα σε σκόνη	2 gr
Δις απεσταγμένο H ₂ O	45 ml
Συνολικός όγκος	50 ml

Καθώς η μεμβράνη επωάζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με ήπια ανακίνηση σε αυτό το διάλυμα, η αλβουμίνη του γάλακτος συνδέεται με τις μη ειδικές για το αντίσωμα πρωτεΐνες της μεμβράνης γεγονός που θα οδηγούσε σε εσφαλμένα θετικά αποτελέσματα.

8. Η μεμβράνη επωάζεται όλη τη νύχτα με 5-13 μl αντισώματος αντι-5HT-moduline ή προάνοσου ορού, σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1x και Tween 20 0.01%. Για την παρασκευή 20 ml του παραπάνω διαλύματος απαιτούνται:

δις απιονισμένο H ₂ O	18 ml
PBS 10x	2 ml
Tween 20 0.01%	20-μl
Προάνοσος ορός ή πολυκλωνικού αντισώματος αντι-5HT-moduline	10 μl
Συνολικός όγκος	20 ml

10. Η μεμβράνη μετά την επώαση ξεπλένεται 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PBS-Tween 20 0.1% από 250 ml σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανακίνηση. Για την παρασκευή 750 ml αυτού του διαλύματος χρησιμοποιούνται:

PBS 10x	75 ml
Tween 20 100%	750 ml
H ₂ O	675 ml
Συνολικός όγκος	750 ml

11. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα PBS 1x και ξεπλένεται σε όγκους των 250 ml PBS για 3 φορές. Για την παρασκευή 750 ml του παραπάνω διαλύματος απαιτούνται:

PBS 10x	75 ml
H ₂ O	675 ml
Συνολικός όγκος	750 ml

12. Η μεμβράνη τοποθετείται σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS-blotto 1x για 1,5 h. Για την παρασκευή των 100 ml απαιτούνται:

PBS 10X	10 ml
άπαχο γάλα σε σκόνη	5 gr
H ₂ O	90 ml
Συνολικός όγκος	100 ml

13. Στη συνέχεια, η μεμβράνη ξεπλένεται σε 250 ml ρυθμιστικού PBS 1x για 5 min.

14. Τελικά το φίλτρο αποστέλλεται στο Fleming όπου και μετά από επώαση με ένα δεύτερο αντίσωμα, συνήθως HRP (Horseradish-peroxidase-labelled) συνδεδεμένο με υπεροξειδάση, ανιχνεύονται οι πρωτεΐνες που έχουν αναγνωρισθεί από αυτό με το σύστημα ECL.

- **Αρχή της μεθόδου ανίχνευσης με το σύστημα ECL**

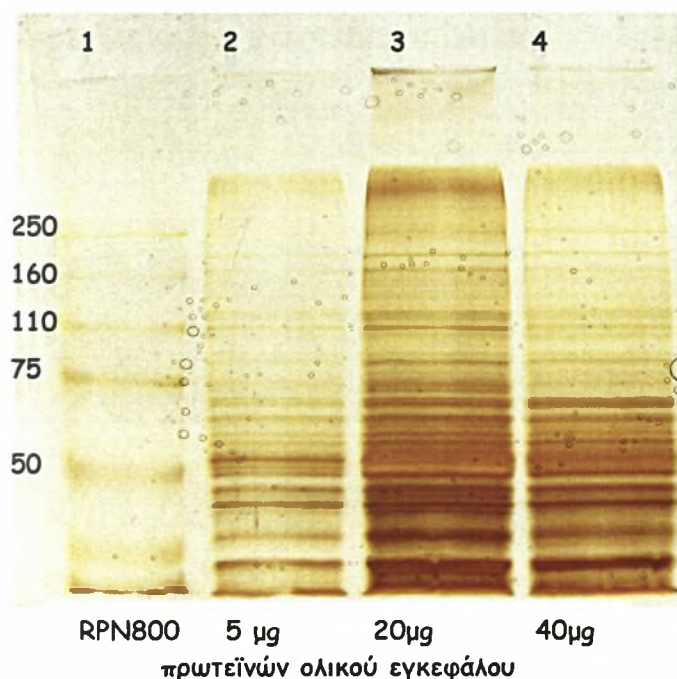
Ένα από τα πιο κατανοητά και καλά μελετημένα συστήματα είναι αυτό της HRP (Horseradish-peroxidase)-υπεροξειδάσης του H₂O₂ (ένζυμο που είναι συνδεδεμένο στο δεύτερο αντίσωμα με το οποίο επωάζεται η μεμβράνη) που καταλύει την οξείδωση της φωτεινής ουσίας (luminol) σε αλκαλικές συνθήκες. Αμέσως μετά την οξείδωση η φωτεινή ουσία βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου και αργότερα θα επιστρέψει στην θεμελιώδη ενεργειακή της κατάσταση μέσω εκπομπής ακτινοβολίας. Αυξημένη χημειοφωταύγεια επιτυγχάνεται με οξείδωση της ουσίας από την υπεροξειδάση παρουσία χημικών επιταχυντών όπως οι φαινόλες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του εκπεμπόμενου φωτός κατά 100 περίπου φορές και επιμήκυνση του χρόνου εκπομπής της ακτινοβολίας. Η παραγόμενη από την προηγούμενη επαυξημένη αντίδραση χημειοφωταύγειας ακτινοβολία κορυφώνεται μετά από 5-20 min και μειώνεται αργά με ρυθμό περίπου

60 min . Το μέγιστο μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι στα 428 nm το οποίο και ανιχνεύεται με μικρή έκθεση σε ένα ευαίσθητο υπεριώδες φιλμ αυτοραδιογραφίας όπως το Hyperfilm ECL.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1: Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εγκεφάλου και περιογών αυτού (εγκεφαλικός φλοιός και παρεγκεφαλίδα)

Οι ιστοί μετά την ομογενοποίηση τους σε διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών, τη διάλυσή τους σε loading buffer και βρασμό στους 100⁰ C ηλεκτροφορούνται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, με σκοπό να βρεθεί εκείνη η συγκέντρωση στην οποία οι μπάντες διαχωρίζονται καλύτερα.



- 8% 10x10 cm Gel SDS-πολυακρυλαμιδίου
- 100 mV, 33 mA
- Διάρκεια: 1.30 h

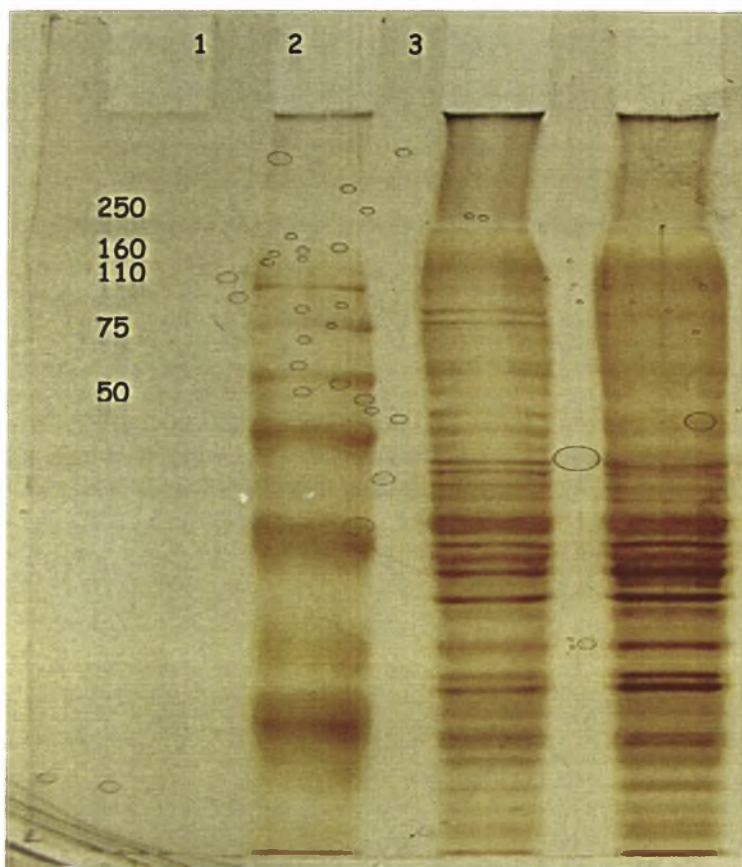
Εικόνα 3.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εγκεφαλικού ιστού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Διαδρομή 1: Marker Rainbow RPN800 3 µl.

Διαδρομή 2: 5 µg πρωτεϊνών ολικού εγκεφάλου. Τα 100 µl ιστού (2mg πρωτεϊνών) διαλύθηκαν σε 1 ml loading buffer από τα οποία τα 2,5 µl επαναδιαλύθηκαν σε 20 µl loading. Φορτώθηκαν τα 20 µl.

Διαδρομή 3: 20 µg πρωτεϊνών ολικού εγκεφάλου. Τα 100 µl ιστού (2mg πρωτεϊνών) διαλύθηκαν σε 1 ml loading buffer από τα οποία τα 10 µl επαναδιαλύθηκαν σε 20 µl loading . Φορτώθηκαν τα 20 µl.

Διαδρομή 4: 40 μg πρωτεϊνών ολικού εγκέφαλου. Τα 100 μl ιστού (2mg πρωτεϊνών) διαλύθηκαν σε 1 ml loading buffer από τα οποία τα 20 μl επαναδιαλύθηκαν σε 20 μl loading . Φορτώθηκαν τα 30 μl.



- 10% 10x10 cm Gel SDS-πολυακρυλαμιδίου
- 100 mV, 34,8 mA
- Διάρκεια: 2 h

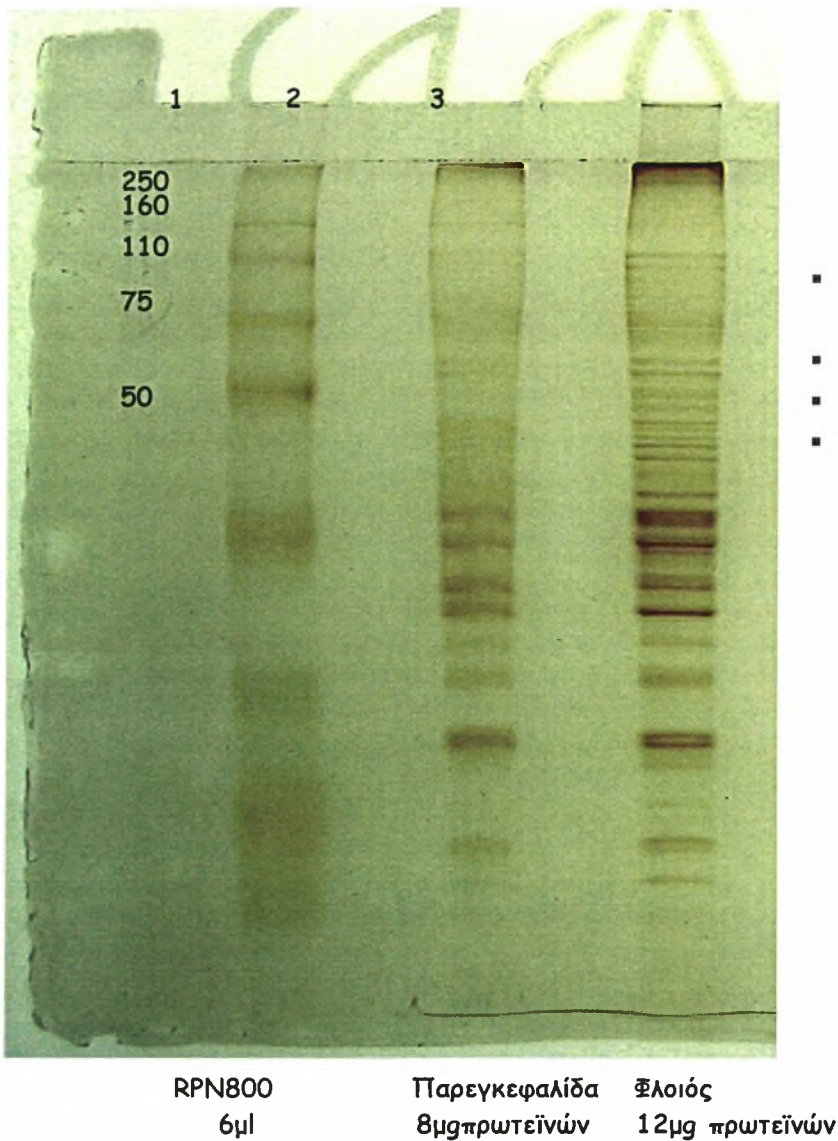
RPN800 Φλοιός παρεγκεφαλίδα
2,5 μl 5μgπρωτεϊνών 9μgπρωτεϊνών

Εικόνα 3.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εγκεφαλικού φλοιού και παρεγκεφαλίδας.

Διαδρομή 1: Marker Rainbow RPN800 2,5 μl.

Διαδρομή 2: Εγκεφαλικός φλοιός τελικής συγκέντρωσης 5 μg πρωτεϊνών. Τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 950 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 3 μl.

Διαδρομή 3: Παρεγκεφαλίδα τελικής συγκέντρωσης 9 μg πρωτεϊνών. Τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 500 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 5 μl.



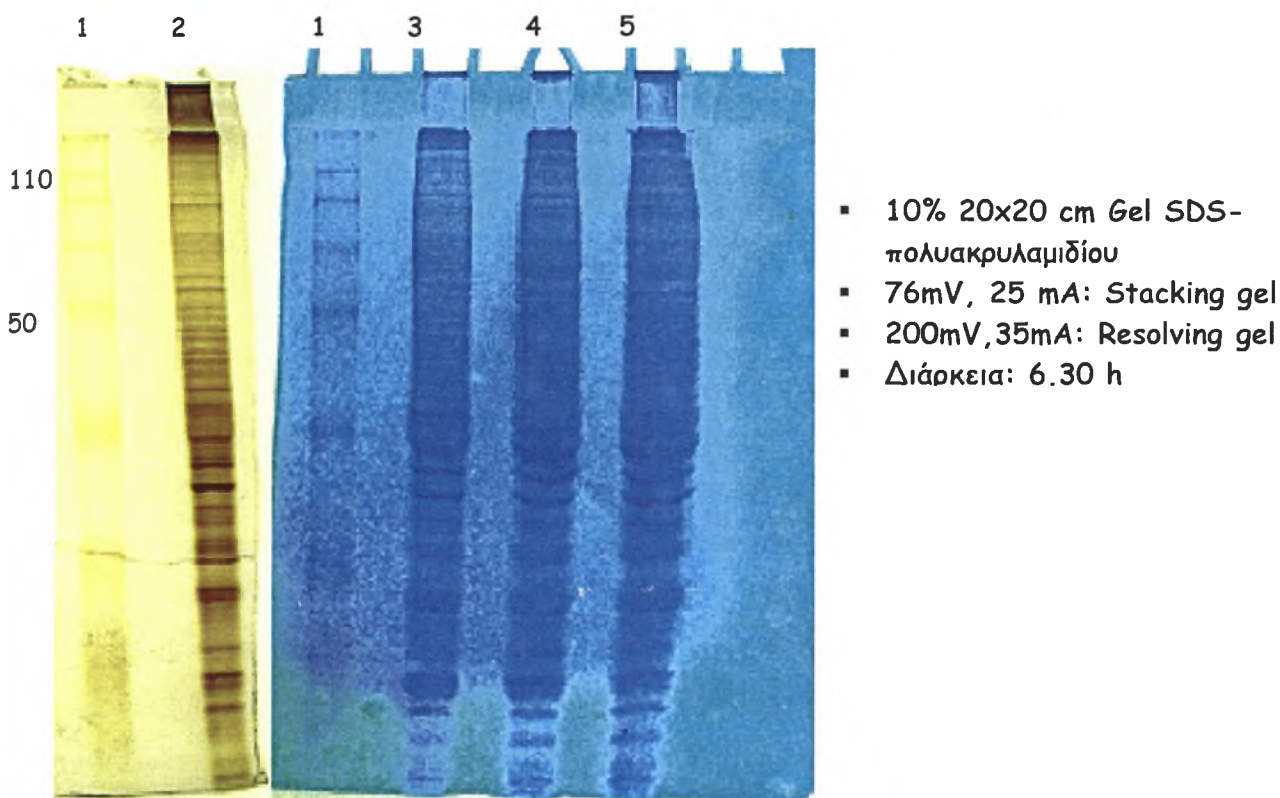
- 10% Gel 20x20 cm SDS-πολυακρυλαμιδίου
- 76mV, 25 mA: Stacking gel
- 200mV, 35mA: Resolving gel
- Διάρκεια: 5.30 h

Εικόνα 3.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εγκεφαλικού φλοιού και παρεγκεφαλίδας

Διαδρομή 1: Marker Rainbow RPN800 6 μl.

Διαδρομή 2: Παρεγκεφαλίδα τελικής συγκέντρωσης 12 μg πρωτεϊνών. Τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 500 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 8 μl.

Διαδρομή 3: Εγκεφαλικός φλοιός τελικής συγκέντρωσης 12 μg πρωτεϊνών. Τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 950 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 10 μl.



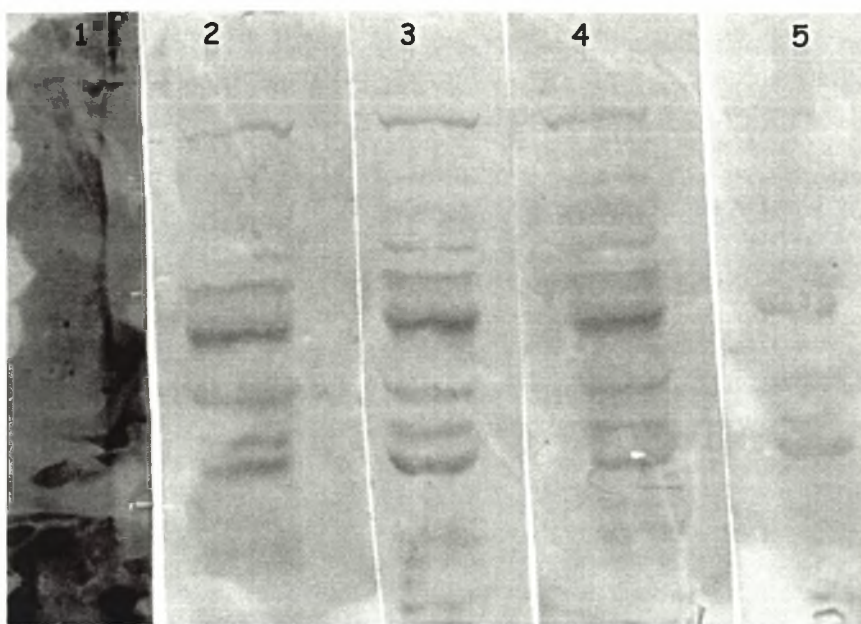
RPN800 Φλοιός RPN800 80µg 90µg 160µg prot φλοιού
 4 µl 20µg 10 µl.

Εικόνα 3.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εγκεφαλικού φλοιού σε διάφορες συγκεντρώσεις και βαφή με δείκτη Coomassie Brilliant Blue και Silver Staining.

Διαδρομή 1: Marker Rainbow RPN800 4 και 10 µl.

Διαδρομή 2,3,4,5: Εγκεφαλικός φλοιός τελικής συγκέντρωσης 20,80,90,160 µg πρωτεϊνών. Τα 100 µl ιστού διαλύθηκαν σε 250 µl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 5,20,30,40 µl αντίστοιχα.

❖ Προκειμένου να προσδιοριστεί η καθαρότητα και εξειδίκευση του πολυκλωνικού anti-LSAL αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των ανοσοαποτυπώσεων και ανοσοκατακρημνίσεων οργανώθηκε ένα πείραμα στο οποίο αυξανόμενες συγκεντρώσεις του τετραπεπτιδίου LSAL επώαστηκαν με το αντίσωμα. Το αποτέλεσμα όπως φαίνεται και στα αποτελέσματα του παρακάτω πειράματος ήταν ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του τετραπεπτιδίου εξασθενεί και το αντίστοιχο σήμα στο φίλτρο PVDF. Επομένως, το αντίσωμα παρουσιάζει τον αναμενόμενο κορεσμό σε μεγάλη συγκέντρωση του LSAL.



Εικόνα 3.5. Western Blot 4 μl του αντισώματος και του προάνοσου ορού με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του LSAL.

Διαδρομή 1: Επώαση εγκεφαλικού φλοιού τελικής συγκέντρωσης 80 μg με προάνοσο ορό.

Διαδρομή 2: Επώαση εγκεφαλικού φλοιού τελικής συγκέντρωσης 80 μg με αντίσωμα.

Διαδρομή 3: Επώαση εγκεφαλικού φλοιού τελικής συγκέντρωσης 80 μg με αντίσωμα και LSAL τελικής συγκέντρωσης 10^{-6} M (800 μl από διάλυμα 6 mg LSAL σε 1 ml H_2O).

Διαδρομή 4: Επώαση εγκεφαλικού φλοιού τελικής συγκέντρωσης 80 μg με αντίσωμα και LSAL τελικής συγκέντρωσης 10^{-5} M (8 μl από διάλυμα 6 mg LSAL σε 1 ml H_2O).

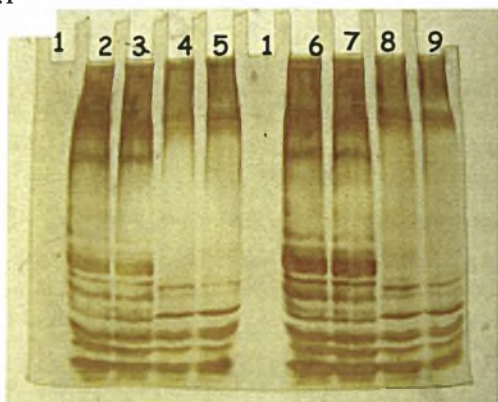
Διαδρομή 5: Επώαση εγκεφαλικού φλοιού τελικής συγκέντρωσης 80 μg με αντίσωμα και LSAL τελικής συγκέντρωσης 10^{-3} M (8 μl από την αραιώση των 10 μl του αρχικού διαλύματος+90 μl H_2O).

2: Western Blot των πρωτεϊνών διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου

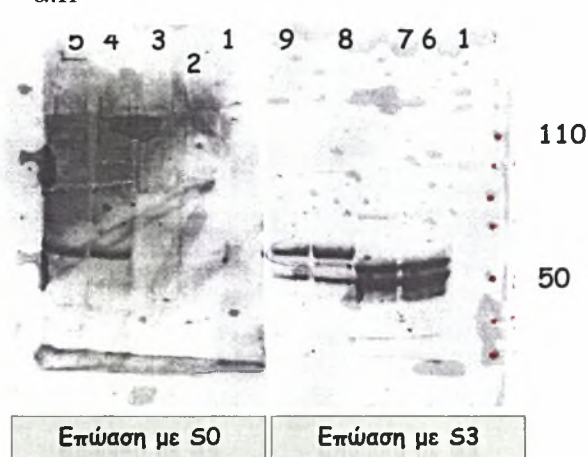
Πραγματοποιήθηκε μεταφορά των πρωτεϊνών των διαφόρων διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης ή PVDF. Αυτές αφού επώαστηκαν αρχικά με την κατάλληλη συγκέντρωση αντι-LSAL αντισώματος και προάνοσου ορού και στη συνέχεια με το δεύτερο αντίσωμα εκτέθηκαν σε ειδικό φιλμ στο υπεριώδες. Το αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας ήταν ορατές μπάντες που εντοπίστηκαν λίγο πιο πάνω από τα 50 kDa του μάρτυρα των μοριακών βαρών. Η αξιοπιστία του

αποτελέσματος αλλά και ο καλύτερος διαχωρισμός της επιθυμητής πρωτεΐνης, με σκοπό την επεξεργασία αυτής με τη μέθοδο της σπεκτρομετρίας μαζών, εξασφαλίστηκε με την επανάληψη του πειράματος σε gels μεγαλύτερων διαστάσεων.

α.Ι



α.ΙΙ



- 8% 10x10 cm Gels (μετά το Transfer για 3 h στα 400 mA) SDS-πολυακρυλαμιδίου
- 100 mV, 64 mA
- Διάρκεια: 2.15 h

Εικόνα 3.9. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εγκεφαλικού φλοιού, ιππόκαμπου και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης. Όπως διακρίνεται το αντι-LSAL πολυκλωνικό αντίσωμα δίνει σήμα σύμφωνα με το μάρτυρα μοριακών βαρών λίγο πάνω από τα 50 kD σε φλοιό και ιππόκαμπο.

α. Διαδρομή 1: Rainbow RPN800 6 μl.

Διαδρομές 2,6: Εγκεφαλικός φλοιός τελικής συγκέντρωσης 100 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν τα 25 μl.

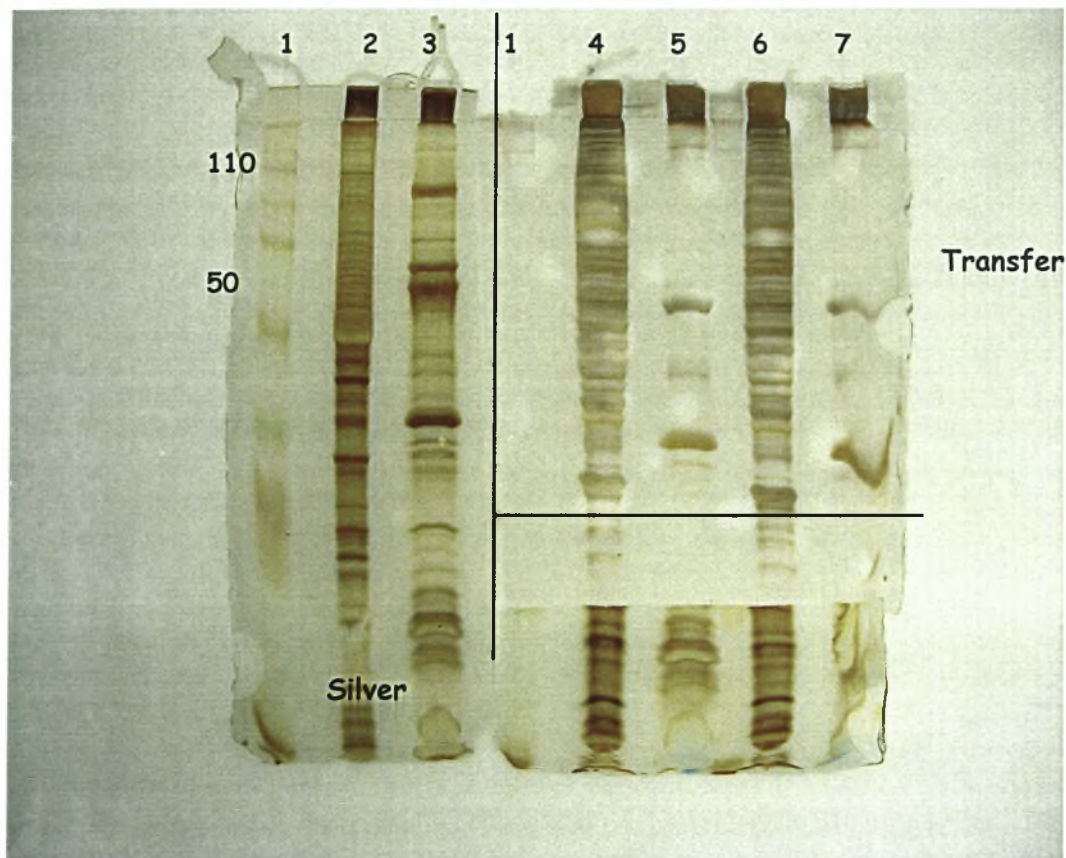
Διαδρομές 3,7: Ιππόκαμπος τελικής συγκέντρωσης 100 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν τα 25 μl.

Διαδρομές 4,8: Ίζημα εγκεφαλικού φλοιού μετά την ομογενοποίηση τελικής συγκέντρωσης 65 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν τα 25 μl.

Διαδρομές 5,9: Ίζημα ιππόκαμπου μετά την ομογενοποίηση τελικής συγκέντρωσης 65 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν τα 25 μl.

- ❖ Όλοι οι ιστοί και τα ιζήματα είναι των 100 μl τα οποία διαλύθηκαν σε 250 μl loading buffer.

- ❖ Οι διαδρομές 2,3,4,5 επωάστηκαν με 13 μl αντι-LSAL αντισώματος (S3)/25 ml διαλύματος ενώ οι διαδρομές 6,7,8,9 με 13 μl προάνοσου ορού (S0)/25 ml διαλύματος.
- ❖ Το gel μετά την ηλεκτροφόρηση και το transfer βάφτηκε με χρώση Silver.



- 10% 20x20 cm Gel (μετά το Transfer για 3 h στα 400 mA) SDS-πολυακρυλαμιδίου
- 74mV, 25 mA: Stacking gel
- 200mV, 35mA: Resolving gel
- Διάρκεια: 5 h

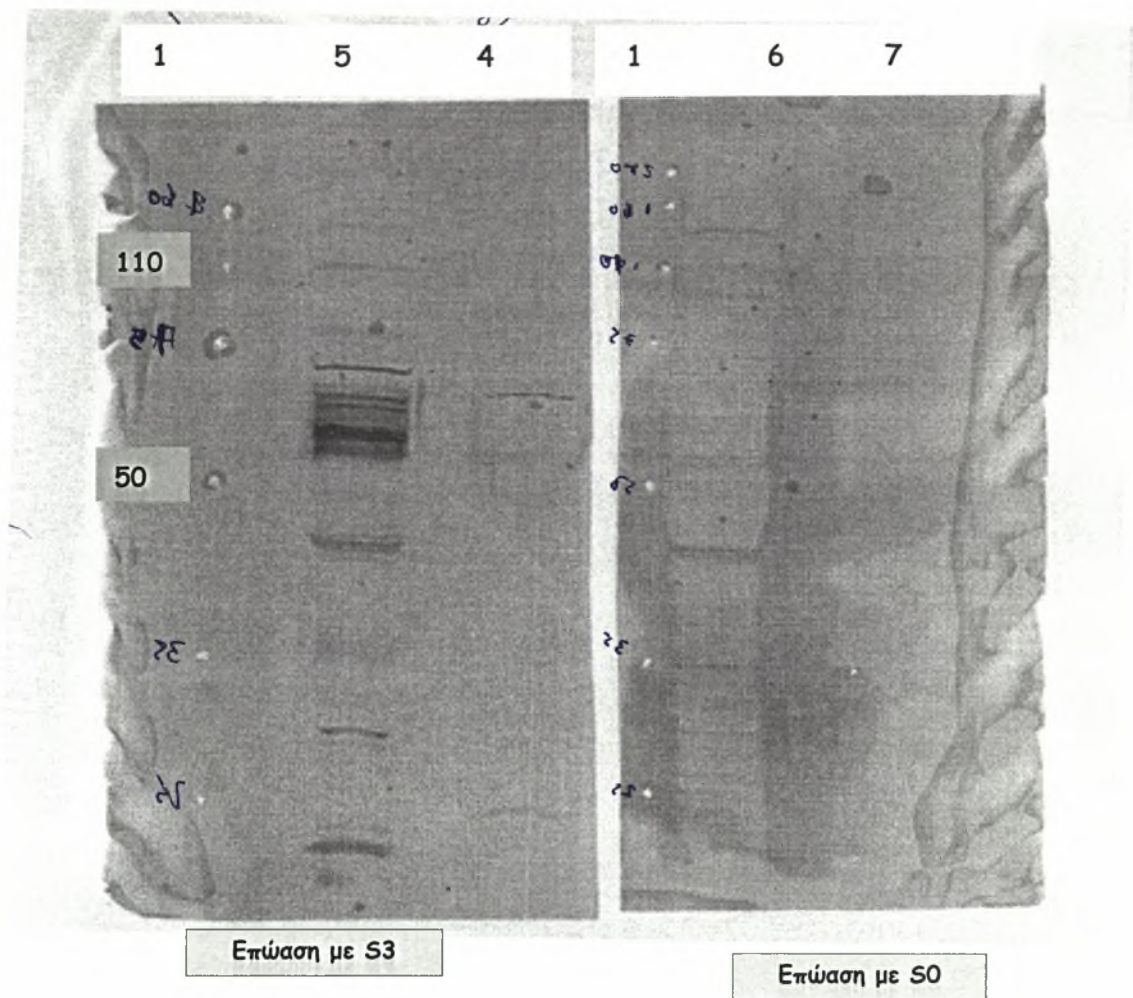
Εικόνα 3.10. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εγκεφαλικού φλοιού και επινεφριδίων και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για Western Blot.

Διαδρομή 1: Rainbow RPN800 10 μl.

Διαδρομές 2,3: Εγκεφαλικός φλοιός και επινεφρίδια τελικής συγκέντρωσης 47 και 160 μg πρωτεϊνών αντίστοιχα. Φορτώθηκαν τα 12 και 40 μl αντίστοιχα .

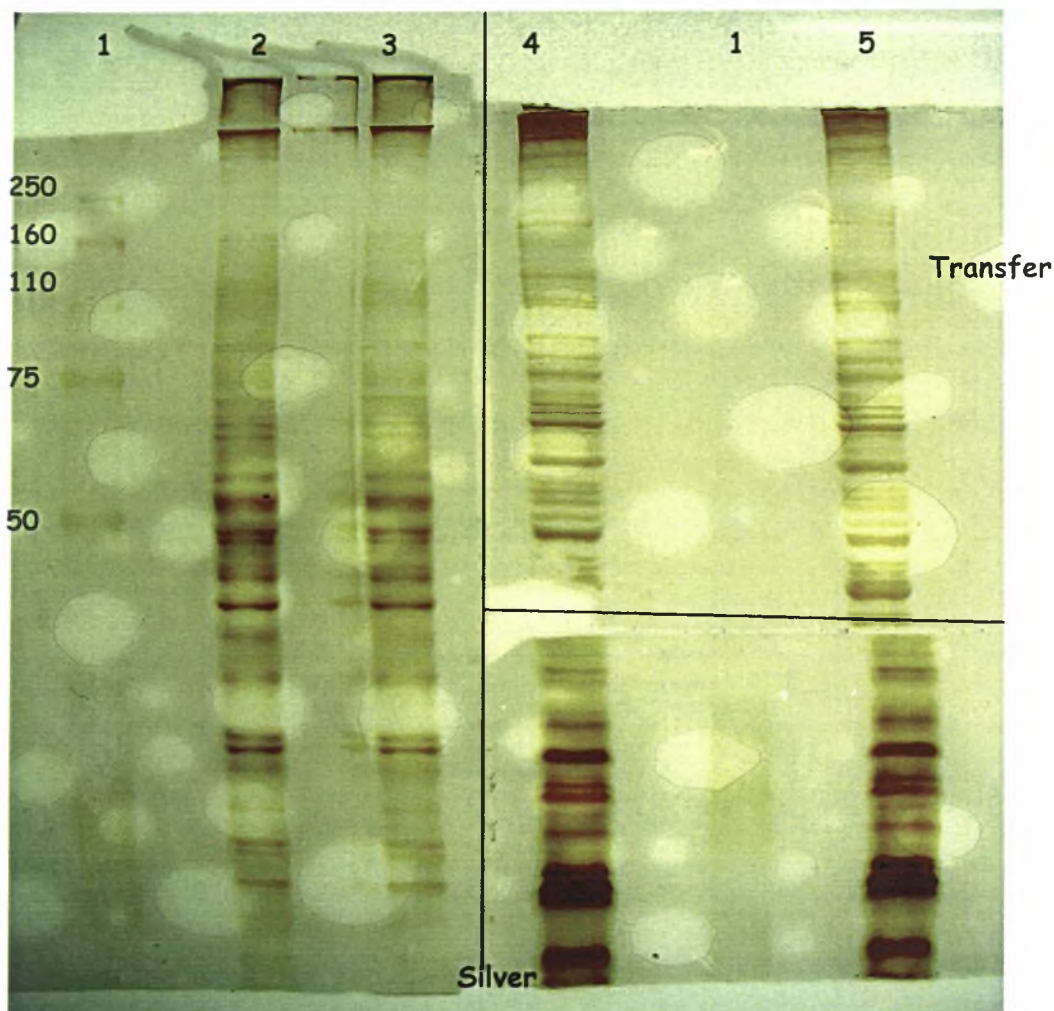
Διαδρομές 4,6: Εγκεφαλικός φλοιός τελικής συγκέντρωσης 160 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν 40 μl.

Διαδρομές 5,7: Επινεφρίδια τελικής συγκέντρωσης 250 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν 60 μl.



Εικ.3.11 Western Blot πρωτεϊνών εγκεφαλικού φλοιού και επινεφριδίων. Το πολυκλωνικό αντι-LSAL αντίσωμα δίνει σήμα μόνο στο φλοιό στις ζώνες που διακρίνονται στην εικόνα ανάμεσα στα 50 και στα 75 kD.

- ❖ Όλοι οι ιστοί είναι των 100 μl τα οποία διαλύθηκαν σε 250 μl loading buffer.
- ❖ Οι διαδρομές 4,5 επώαστηκαν με 10 μl αντι-LSAL αντισώματος (S3)/20 ml διαλύματος ενώ οι διαδρομές 6,7 με 10 μl προάνοσου ορού (S0)/20 ml διαλύματος.



- 10% 20x20 cm Gel (μετά το Transfer για 3 h στα 400 mA)
SDS-πολυακρυλαμιδίου
- 74mV, 25 mA: Stacking gel
- 196mV, 35mA: Resolving gel
- Διάρκεια: 5,30 h

Εικόνα 3.11. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εγκεφαλικού φλοιού και μεταφορά σε μεμβράνη PVDF για Western Blot. Αυξήθηκε η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης με σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των πρωτεϊνών.

Διαδρομή 1: Rainbow RPN800 4 και 12 μ l.

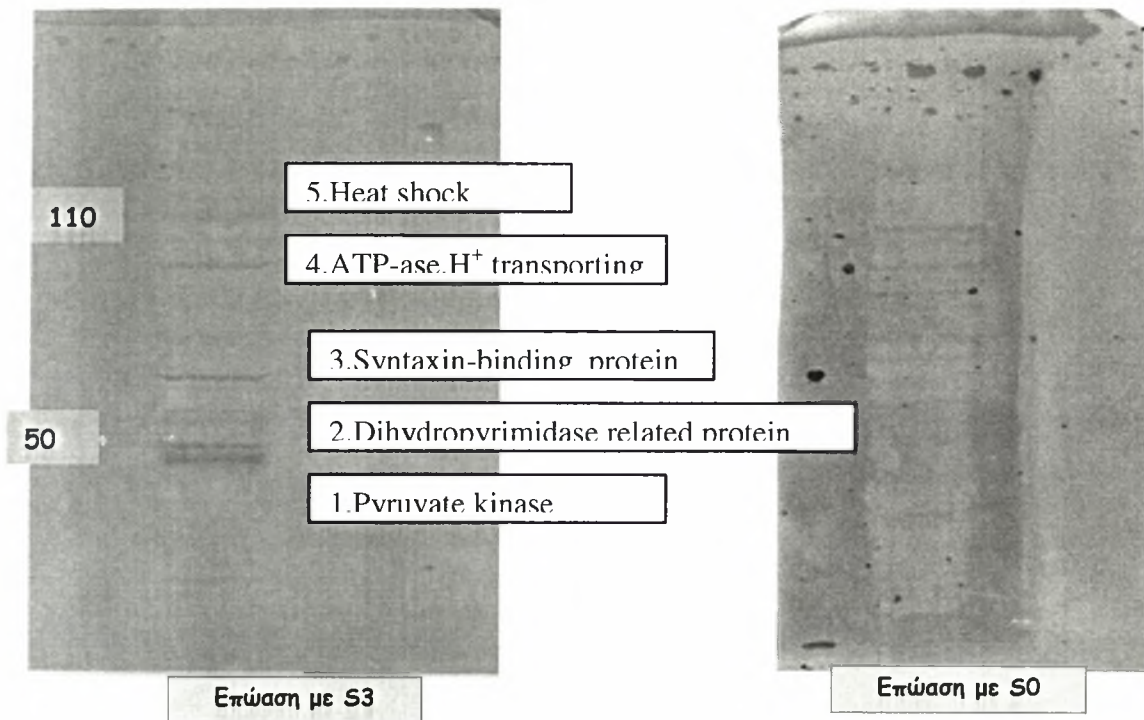
Διαδρομές 2,3: Εγκεφαλικός φλοιός τελικής συγκέντρωσης 20 μ g πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν τα 5 μ l .

Διαδρομές 4,5: Εγκεφαλικός φλοιός τελικής συγκέντρωσης 80 μ g πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν 20 μ l.

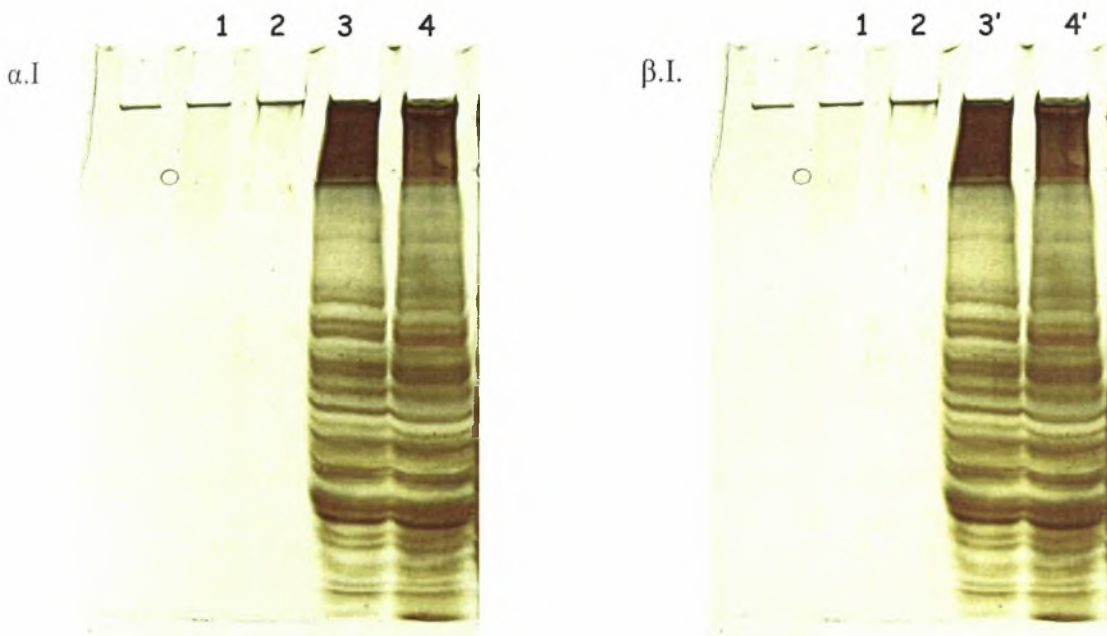
❖ Όλοι οι ιστοί είναι των 100 μ l τα οποία διαλύθηκαν σε 250 μ l loading buffer.

- ❖ Το gel μετά την ηλεκτροφόρηση και το transfer βάφτηκε με χρώση Silver
- ❖ Η διαδρομή 4 μετά τη μεταφορά σε μεμβράνη PVDF επώαστηκε με 10 μl αντι-LSAL αντισώματος (S3)/20 ml διαλύματος ενώ η διαδρομή 5 με 10 μl προάνοσου ορού (S0)/20 ml διαλύματος

4 1



Εικ.3.12 Western Blot πρωτεϊνών εγκεφαλικού φλοιού. Το πολυκλωνικό αντι-LSAL αντίσωμα δίνει σήμα στις ζώνες που διακρίνονται στην εικόνα ανάμεσα στα 50 και στα 75 kD. Οι προηγούμενες ζώνες κόπηκαν και στάλθηκαν για ανάλυση της αμινοξικής τους αλληλουχίας με σπεκτρομετρία μαζών.



- 2 10% 10x10cm Gels (μετά το Transfer για 3 h στα 400 mA) SDS-πολυακρυλαμιδίου
- 100mV, 65 mA
- Διάρκεια:1.40 h

Εικόνα 3.12. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ιστών εγκεφάλου και παρεγκεφαλίδας και μεταφορά σε μεμβράνη PVDF για Western Blot.

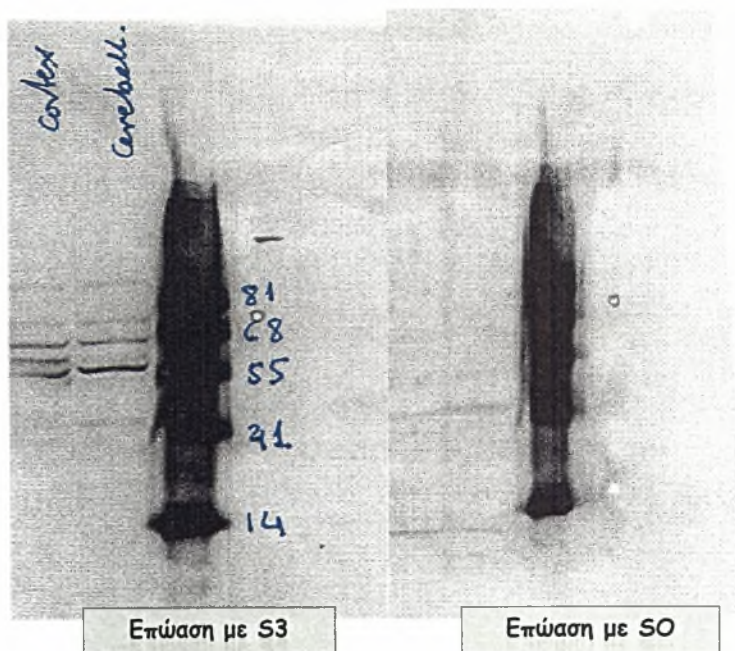
Διαδρομή 1: Rainbow RPN800 4 μl.

Διαδρομές 2: Marker Trial 1,2 μl.

Διαδρομές 3,10: Παρεγκεφαλίδα τελικής συγκέντρωσης 67 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν 15 μl.

Διαδρομές 4,11: Εγκεφαλικός φλοιός τελικής συγκέντρωσης 66 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν 10 μl.

- ❖ Όλοι οι ιστοί είναι των 50 μl τα οποία διαλύθηκαν σε 130μl loading buffer.
- ❖ Το gel μετά την ηλεκτροφόρηση και το transfer βάφτηκε με χρώση Silver
- ❖ Οι διαδρομές 3,4 μετά τη μεταφορά σε μεμβράνη PVDF επώαστηκαν με 10 μl αντι-LSAL αντισώματος (S3)/20 ml διαλύματος ενώ οι διαδρομές 3',4' με 10 μl προάνοσου ορού (S0)/20 ml διαλύματος.



Εικόνα 3.12. Western Blot πρωτεϊνών εγκεφαλικού φλοιού και παρεγκεφαλίδας. Όπως φαίνεται στην εικόνα η παρεγκεφαλίδα δίνει παρόμοιο σήμα με τον φλοιό δηλαδή εμφανίζονται οι ζώνες μεταξύ 50 και στα 75 kD

Διαδρομή 1: Rainbow RPN800 4 μl.

Διαδρομές 2: Marker Trial 1,2 μl.

Διαδρομές 3,10: Παρεγκεφαλίδα τελικής συγκέντρωσης 67 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν 15 μl.

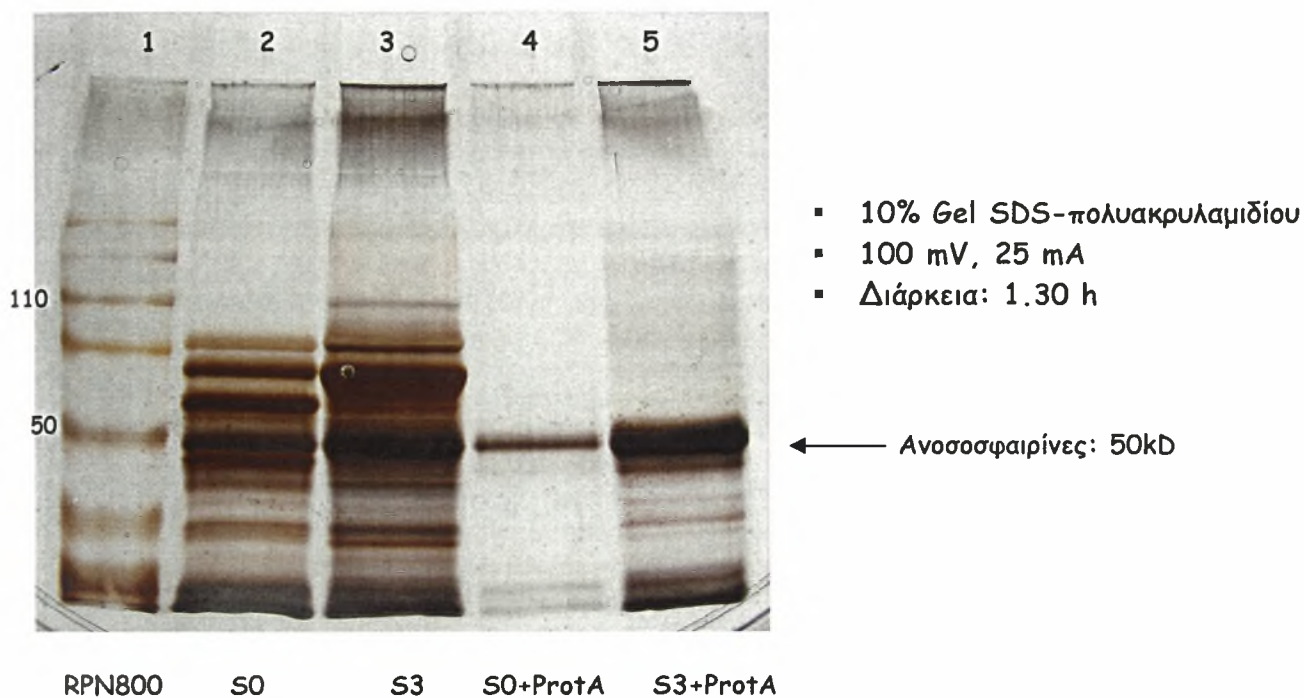
Διαδρομές 4,11: Εγκεφαλικός φλοιός τελικής συγκέντρωσης 66 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν 10 μl.

3: Προσδιορισμός συνθηκών ανοσοκατακρήμνισης στον εγκέφαλο

Τα παρακάτω πειράματα πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό των συνθηκών της ανοσοκατακρήμνισης. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε η κατάλληλη συγκέντρωση για την Protein A-Sepharose και ο συνολικός όγκος του loading buffer.

1. Η Protein A έχει την ιδιότητα να συνδέει τις ανοσοσφαιρίνες. Προκειμένου να προσδιορίσουμε την ποσότητα της Protein-A ικανής να κατακρατήσει όλες τις ανοσοσφαιρίνες του αντισώματος που χρησιμοποιούμε στην ανοσοκατακρήμνιση, προσθέσαμε 20μl (Εικ.3.1), 30μl (Εικ.3.2) ή 40μl (Εικ.3.3) ProteinA 50%v/v. Μόνο στην περίπτωση των 40μl, όλες οι ανοσοσφαιρίνες ήταν στο ίζημα (Εικ.3.3, διαδρομή 3) ενώ δεν παίρναμε ανοσοσφαιρίνες στο υπερκείμενο (Εικ.3.3, διαδρομή 2).
2. Επίσης παρατηρήσαμε ότι όταν στο τελικό ίζημα 30μl ProtA-αντισώματος προσθέταμε 25μl loading buffer, μετά από θέρμανση στους 100°C και φυγοκέντρηση,

το σύμπλοκο Protein-A-αντισώματος δεν αποδιατασσόταν πλήρως. Μετά από επαναδιάλυση της ProtA σε loading buffer και βρασμό στους 100°C, συνεχίσαμε να παίρνουμε ανοσοσφαιρίνες (Εικ. 3.2, διαδρομές 7 και 8).

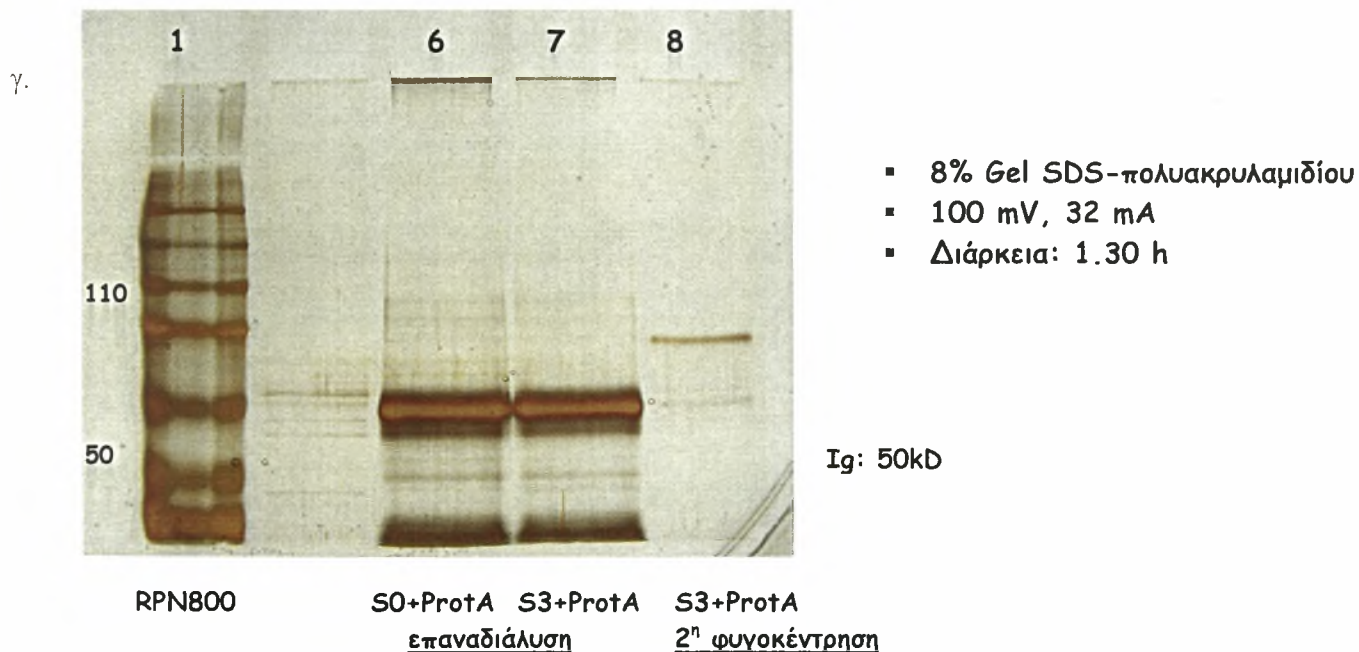
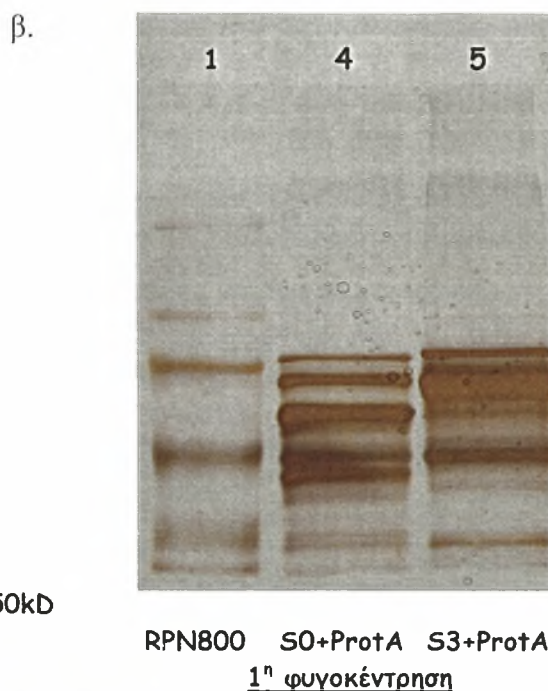
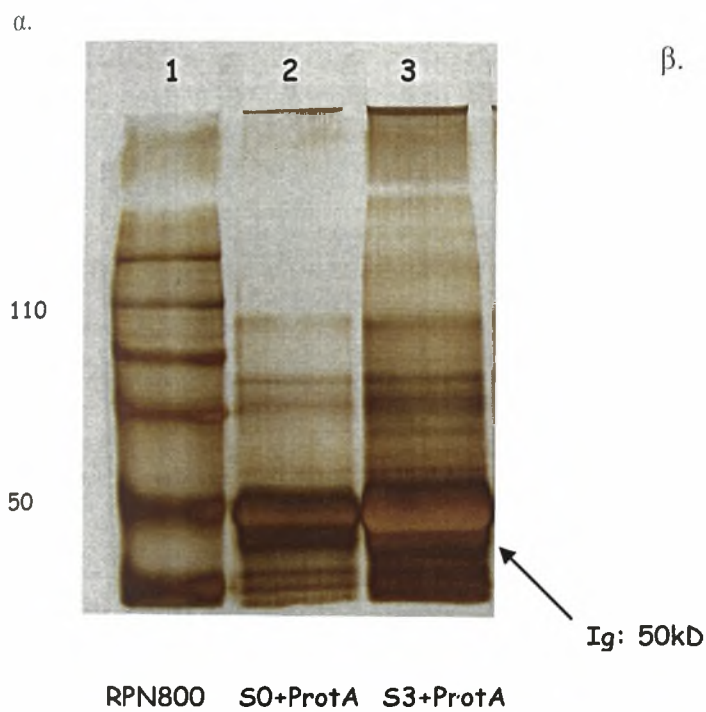


Εικόνα 3.5. Ηλεκτροφόρηση του αντι-LSAL αντισώματος (S3) και του προάνοσου ορού (S0) χωρίς (2, 3) και με την προσθήκη 20 μl Protein A-Sepharose (4,5).

Διαδρομή 1: Marker Rainbow RPN800 3,5 μl.

Διαδρομές 2, 3: Προάνοσος ορός και αντι-LSAL αντίσωμα αντίστοιχα μετά από διάλυση 2 μl του καθενός σε 600 μl loading buffer. Φορτώθηκαν 20 μl.

Διαδρομές 4, 5: Προάνοσος ορός και αντι-LSAL αντίσωμα αντίστοιχα μετά από κατακρήμνιση με **20 μl Protein A-Sepharose** (5 μl S3/S0 + 500 μl αποδιατακτικού διαλύματος + 1 ml διαλύματος ανοσοκατακρήμνισης overnight). Το τελικό ίζημα ProtA-αντισώματος διαλύθηκε σε 25μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 20μl.



Εικόνα 3.6. Ηλεκτροφόρηση του αντι-LSAL αντισώματος (S3) και του προάνοσου ορού (S0) μετά την προσθήκη 30 μ l Protein A-Sepharose (2, 3), των αντίστοιχων υπερκειμένων (4, 5) και του εναπομείναντος ιζήματος επαναδιαλυμένου σε loading buffer (6, 7).

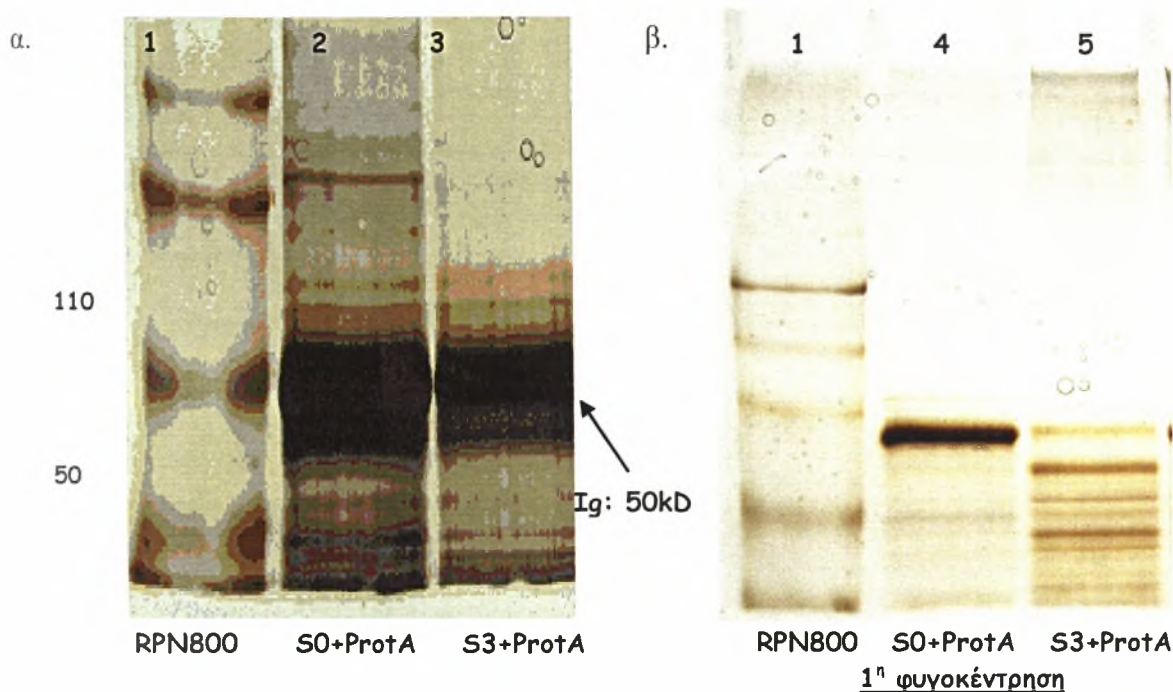
α. Διαδρομή 1: Marker Rainbow RPN800 3 μ l.

Διαδρομές 2, 3: Προάνοσος ορός και αντι-LSAL αντίσωμα αντίστοιχα μετά από κατακρήμνιση με 30 μ l Protein A-Sepharose (5 μ l S3/S0 + 500 μ l αποδιατακτικού διαλύματος + 1 ml διαλύματος ανοσοκατακρήμνισης overnight). Το τελικό ίζημα ProtA-αντισώματος διαλύθηκε σε 25 μ l loading. Φορτώθηκαν τα 20 μ l.

β. Διαδρομές 4, 5: Μετά την κατακρήμνιση του S0 και S3 overnight με την ProteinA, το βράσιμο και την 1^η φυγοκέντρηση, προστέθηκαν 20 μl loading buffer στα υπερκείμενα. Φορτώθηκαν τα 20 μl.

γ. Διαδρομές 6, 7: Τα εναπομείναντα ιζήματα των διαδρομών 2,3 επαναδιαλύθηκαν σε 50 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 25 μl.

Διαδρομή 8: Μετά την κατακρήμνιση του S3 overnight με την ProteinA, το βράσιμο και την 2^η φυγοκέντρηση, προστέθηκαν 20 μl loading buffer στο υπερκείμενο. Φορτώθηκαν τα 20 μl.



- 8% Gel SDS-πολυακρυλαμιδίου
- 100 mV, 31 mA
- Διάρκεια: 2 h

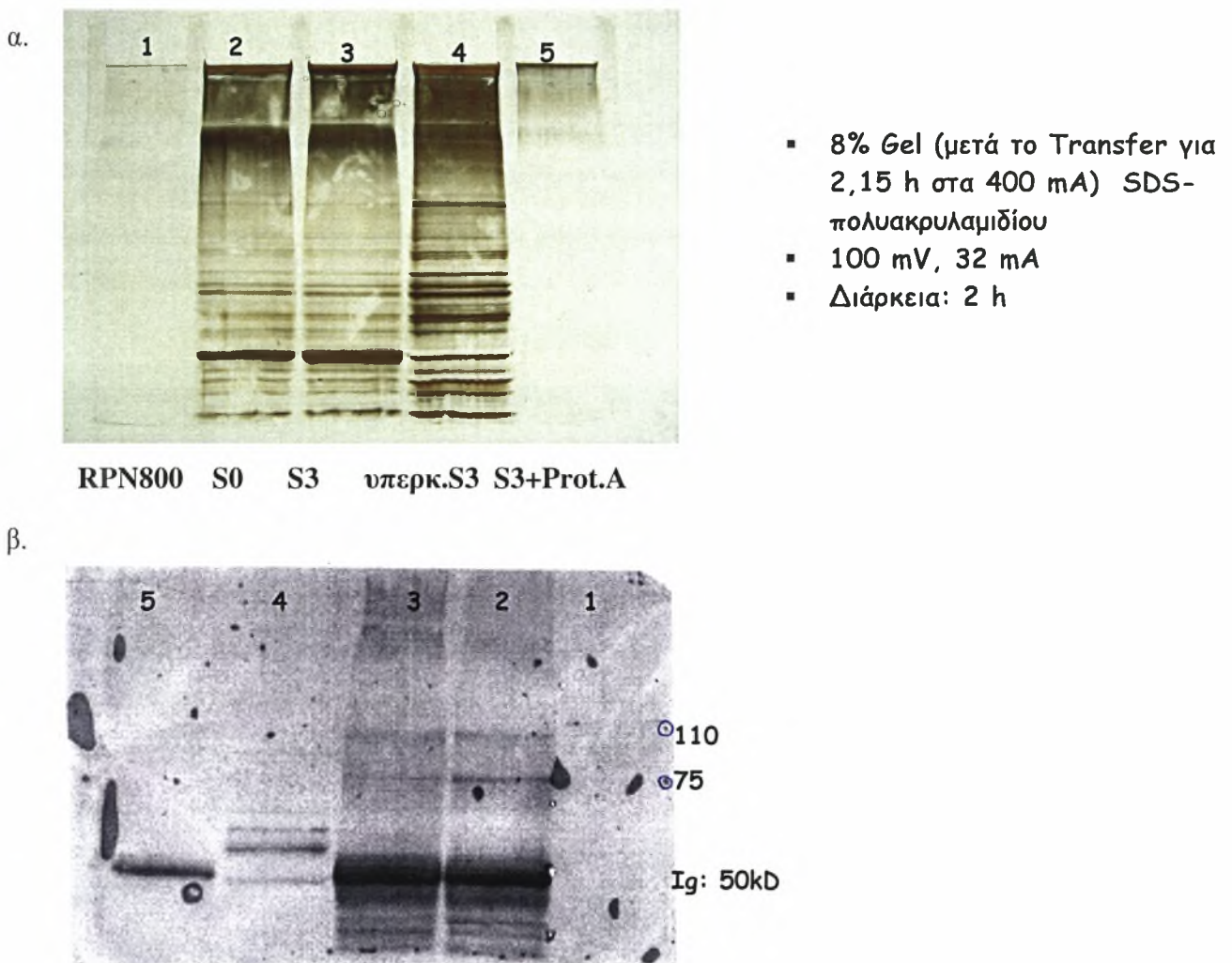
Εικόνα 3.7. Ηλεκτροφόρηση του αντι-LSAL αντισώματος (S3) και του προάνοσου ορού (S0) μετά την προσθήκη 40 μl Protein A-Sepharose (2, 3) και των αντίστοιχων υπερκειμένων (4, 5). Πιο συγκεκριμένα:

α. Διαδρομή 1: Rainbow RPN800 3 μl.

Διαδρομές 2, 3: Προάνοσος ορός και αντι-LSAL αντίσωμα αντίστοιχα μετά από κατακρήμνιση με **40 μl Protein A-Sepharose** (5 μl S3/S0 + 500 μl αποδιατακτικού διαλύματος + 1 ml διαλύματος ανοσοκατακρήμνισης overnight). Το τελικό ίζημα ProtA-αντισώματος διαλύθηκε σε **60 μl loading buffer**. Φορτώθηκαν τα 30 μl.

β. Διαδρομές 4, 5: Μετά την κατακρήμνιση του S0 και S3 overnight με την ProteinA, το βράσιμο και την 1^η φυγοκέντρηση, προστέθηκαν 20 μl loading buffer στα υπερκείμενα. Φορτώθηκαν τα 20 μl.

Προκειμένου να ελεγχθεί πιο ειδικά η ύπαρξη ή όχι της επιθυμητής πρωτεΐνης μετά την ανοσοκατακρήμνιση έγινε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και πραγματοποιήθηκε Western Blot μετά από επώαση με 10 μl αντι-LSAL αντισώματος (S3).



Εικόνα 3.8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εγκεφαλικού ιστού και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για Western Blot μετά από επώαση με 10 μl αντισώματος σε 20ml διαλύματος (PBS 10x, Tween 10% v/v, H₂O). Σήμα διακρίνεται και στο υπερκείμενο της πρώτης φυγοκέντρησης, πράγμα το οποίο δείχνει ότι ποσότητα της πρωτεΐνης που αναγνωρίζει το αντίσωμα δεν κατακρημνίστηκε με την Prot.A.

α. Διαδρομή 1: Rainbow RPN800 5 μl.

Διαδρομές 2, 3: Ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών εγκεφαλικού ιστού τελικής συγκέντρωσης 20 mg με **40 μl Protein A-Sepharose** και 6 μl προάνοσου ορού (S0) και αντι-LSAL αντισώματος (S3) αντίστοιχα. Φορτώθηκαν τα 30 μl μετά από διάλυση του τελικού ιζήματος της ανοσοκατακρήμισης σε **60 μl loading buffer**.

Διαδρομή 4: Μετά την κατακρήμιση του S3 overnight με την Protein A, το βράσιμο και την 1^η φυγοκέντρηση, προστέθηκαν 20 μl loading buffer στο υπερκείμενο. Φορτώθηκαν τα 30 μl.

Διαδρομή 5: Το εναπομένον ίζημα της διαδρομής 3 επαναδιαλύθηκε σε 60 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 30 μl.

β. Το φίλτρο της νιτροκυτταρίνης μετά από έκθεση στο υπεριώδες με το σύστημα ECL. Στις διαδρομές 2,3 φαίνεται ορατό σήμα στην περιοχή των ανοσοσφαιρινών ενώ παράλληλα παρατηρούνται και κάποιες μπάντες λίγο πιο πάνω από τα 50 kDa στις διαδρομές 4,5, γεγονός που σημαίνει πως η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει πιθανόν να υπάρχει στο υπερκείμενο ή και στο τελικό ίζημα που προκύπτει από την ανοσοκατακρήμιση.

Συζήτηση

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το anti-5-HT-moduline πολυκλωνικό αντίσωμα σε τεχνικές ανοσοκατακρήμισης και Western blotting. Οι ζώνες που έδωσαν σήμα κόπηκαν και στάλθηκαν για ανάλυση της αλληλουχίας τους. Επειδή στην αλληλουχία των πρωτεϊνών που βρέθηκαν δεν εντοπίστηκε αυτούσια η αλληλουχία LSAL αλλά τμήμα της εικάζεται ότι η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση στο τμήμα του εγκεφάλου που εξετάστηκε (φλοιός), ποσότητα που δεν επαρκεί για την ανάλυση με τη φασματογραφία μαζών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα πρωτεΐνες με παρόμοιο μοριακό βάρος και μεγαλύτερη συγκέντρωση στον ιστό να επικαλύπτουν στην ανάλυση την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Μία προσέγγιση για να επιλυθεί το προηγούμενο πρόβλημα είναι η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων για να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνικών ζωνών.

Συμπερασματικά, η εύρεση της αλληλουχίας της πρόδρομης πρωτεΐνης από την οποία προέρχεται η 5-HT-moduline είναι μια προοπτική ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα για πολλούς λόγους. Πρώτον, θα επιτρέψει την μελέτη σύνθεσης, ωρίμανσης και απελευθέρωσης του βιοδραστικού πεπτιδίου LSAL, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα φαρμακευτικής επέμβασης σε οποιοδήποτε από αυτά στάδια. Επίσης, η απομόνωση του γονιδίου θα επιτρέψει το χαρακτηρισμό του κεντρικού συστήματος της 5-HT-moduline. Με αλλά λόγια, θα δοθεί η δυνατότητα εντοπισμού των νευρώνων που

είναι υπεύθυνοι για τη σύνθεση και απελευθέρωση του και μελέτης των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν την απόκριση σε εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα. Επιπρόσθετα, η μελέτης της αλληλουχίας των αμινοξέων της πρόδρομης πρωτεΐνης θα μπορούσε να φέρει στο φως και άλλα βιοδραστικά νευροπεπτίδια ικανά να επηρεάζουν υποδοχείς GPCRs και έτσι να μπορούν να προσαρμόζουν τη δραστηριότητα του εγκεφάλου σε εξωτερικά ερεθίσματα.

Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι η 5-HT-moduline όντας ο πρώτος ενδογενής αλλοστερικός τροποποιητής που δε δρα μέσω ενός δικού του υποδοχέα αλλά μέσω GPCRs ρυθμίζει άμεσα απενεργοποιώντας τους 5-HT_{1B} υποδοχείς την απελευθέρωση της 5-HT και άλλων νευροδιαβιβαστών . Αυτός είναι ένας καινούριος μηχανισμός νευρορύθμισης του οποίου η μελέτη μπορεί να βοηθήσει σημαντικά:

α) στην κατανόηση των διαφορετικών δραστηριοτήτων που εμφανίζει το σεροτονινεργικό σύστημα σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Δεδομένης της μορφής του (πολύ συγκεντρωτικό με απολήξεις σε όλον τον εγκέφαλο) και των νευρώνων του (πολυδιακλαδισμένοι με πολλά κυστίδια κατά μήκος των νευραξόνων), η δυνατότητα του να επηρεάζει διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου με διαφορετικό τρόπο αποτελεί αντικείμενο μελέτης.

β) Στην κατανόηση νευροπαθολογικών καταστάσεων οι οποίες επηρεάζονται άμεσα από την συγκέντρωση της 5-HT. Το πρόβλημα των νευροψυχιατρικών καταστάσεων δεν είναι απλό πρόβλημα αύξησης ή ελάττωσης κάποιου νευροδιαβιβαστή αλλά δυσλειτουργία των μηχανισμών ρύθμισης περισσότερων από ενός νευροδιαβιβαστών. Η 5-HT είναι ο σημαντικότερος νευρορυθμιστής στον εγκέφαλο. Όπως έχει δειχθεί από πολλές βιοχημικές και φυσιολογικές έρευνες επηρεάζει τα συστήματα απελευθέρωσης άλλων νευροδιαβιβαστών. Εμπλέκεται έτσι σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες με αποτέλεσμα η δυσλειτουργία της να οδηγεί σε πλήθος συμπτωμάτων που χαρακτηρίζουν τις νευροψυχιατρικές ασθένειες. Συνεπώς, η εύρεση ενός νέου μηχανισμού ρύθμισης του σεροτονινεργικού συστήματος μπορεί να οδηγήσει στην πληρέστερη κατανόηση των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τέτοιου είδους ασθένειες.

γ) Στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων για τις νευροψυχιατρικές ασθένειες. Τα σημαντικότερα φάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της κατάθλιψης είναι οι αναστολείς επαναπρόσληψης της 5-HT (Prozac), οι οποίοι δρουν όμως με μεγάλη καθυστέρηση και με πολλές παρενέργειες. Συνεπώς, η ανάπτυξη συνθετικών ουσιών που θα παρεμβαίνουν στην σύνθεση και

δράση της 5-HT-moduline και συνεπώς στην απελευθέρωση της 5-HT θα έχει σημαντική φαρμακευτική αξία.

- Νευροεπιστήμη και Συμπεριφορά, Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1999
- Φυσιολογία του Ανθρώπου, Ν.Γελαδάς-Μ.Τσακόπουλος, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, 8^η έκδοση, 2001
- Φαρμακολογία, Page-Curtis-Sutter-Walker-Hoffman, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, 2000
- Neuroscience: Exploring the brain, Bear M.F., Connors B.W.,and Paradiso M., Williams and Wilkins,1996
- Biological Psychology, M.Rosenzweig, S.Breedlove and A.Leiman, 3^η έκδοση, Sinauer Associates, 2002

Άρθρα:

- O.Massot, J.C.Rousselle, B.Grimaldi, I.Cloez-Tayarani, M.P.Fillion, M.Plantefol, A.Bonnin, N.Prudhomme, G.Fillion, 1998. Molecular, Cellular and Physiological Characteristics of 5-HT-moduline, a novel endogenous modulator of 5-HT_{1B} receptor subtype, Annals of the N.Y. Academy of Sciences, vol.861, p.174-182.
- I.Cloez-Tayarani, A.Cardona, H.Sarhan, J.C.Rousselle, O.Massot, L.Edelman, G.Fillion, 1998. Mapping of 5-HT-moduline binding sites in guinea pig brain by film and digital autoradiography, Elsevier Science, Brain Research, vol.798, p.311-315
- J.C.Rousselle, M.Plantefol, M.P.Fillion, O.Massot, P.J.Pauwels, , G.Fillion, 1998. Specific interaction of 5-HT-moduline with human 5-HT_{1B} as well as 5-HT_{1D} receptors expressed in transfected cultured cells, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol., vol.358, p. 279-286
- A.Bonnin, B.Grimaldi, M.P.Fillion, G.Fillion, 1999. Acute stress induces a differential increase of 5-HT-moduline tissue content in various rat brain areas, Elsevier Science, Brain Research, vol.825, p.152-160
- R.Nichols,2002. The discovery of novel neuropeptides takes flight, Genome Biology, vol.1032
- M.N.Sherwood, L.S.Krueckl, J.E.McRory, 2000. The origin and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/Glucagon superfamily, The Endocrine Society, p.619-670
- K.B.Thor, M.Blitz-Siebert, C.J.Helke,2003. Autoradiographic localization of 5-HT₁ binding sites in autonomic areas of the rat dorsomedial medulla oblongata, Synapse, vol.10, p.217-227
- J.Witta, M.Palkovits, J.Rosenberg, M.B.Cox, 2004. Distribution of nociceptin/orphanin FQ in adult human brain, Elsevier Science, Brain Research, vol.997, p.24-29
- J.P.H.Burbach, 2002. Regulation of gene promoters of hypothalamic peptides, Frontiers in Neuroendocrinology, vol.23, p.342-369
- K.Shimada, Y.Matsuhita, K.Wakabayashi, M.Takahashi, A.Matsubara, Y.Iijima, K.Tanzawa, 1995. Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA, Biochemical and Biophysical research communications, vol.207, p807-812

Sites από Internet:

- www.brainexplorer.com
- www.sciencebrain.com
- www.google.com
- www.OUCH.com
- www.pubmed.com