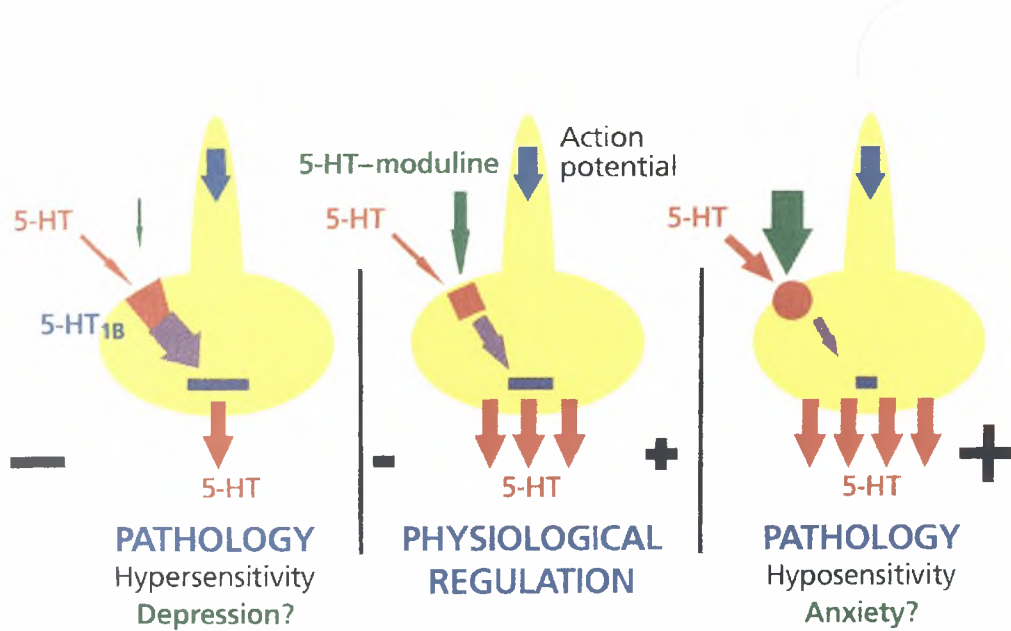




ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ
ΜΟΡΙΟΥ ΤΟΥ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟΥ 5-HT-MODULENE



ΣΚΑΘΑΡΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2006



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

Αριθ. Εισ.: 4741/1
Ημερ. Εισ.: 14-03-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΣΚΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087830

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε
στο εργαστήριο Γενετικής και
Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας υπό την
επίβλεψη της Λέκτορα Νευροβιολογίας
κ. Αιμιλίας Ζίφα.

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

Αιμιλία Ζίφα, Λέκτορας Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας.

Κωνσταντίνος Σταθόπουλος, Επίκουρος Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας.

Μαρία Κοντού, Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας.

Αναγνώριση Βοήθειας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες προς τον κ. Κώστα Σταμάτη και την
κ. Ελένη Ψόχιου για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης των
πειραμάτων στο εργαστήριο γενετικής του τμήματος Βιοχημείας –Βιοτεχνολογίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 5 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 7 |
| Οργάνωση του σεροτονινεργικού συστήματος..... | 8 |
| Η σεροτονίνη..... | 9 |
| Βιοσύνθεση και μεταβολισμός της σεροτονίνης..... | 10 |
| Ταξινόμηση των 5-HT υποδοχέων..... | 10 |
| Ο ρόλος της σεροτονίνης στην κατάθλιψη..... | 13 |
| Ο μεταφορέας της σεροτονίνης, ο γνωστότερος στόχος αντικαταθλιπτικών φαρμάκων..... | 13 |
| Οι 5-HT _{1B} ως θέσεις ρύθμισης έκκρισης σεροτονίνης | 13 |
| Η 5-HT-moduline..... | 14 |
| Υπάρχουν πολλά νευροδραστικά πεπτιδία, τα οποία προέρχονται όλα από πρόδρομα μόρια | 20 |
| | |
| ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 23 |
| Προετοιμασία ιστού..... | 24 |
| Μέτρηση πρωτεϊνών κατά Lowry..... | 24 |
| Κατασκευή πρότυπης καμπύλης BSA..... | 25 |
| Μέτρηση κατά Lowry..... | 26 |
| Επεξεργασία του δείγματος..... | 26 |
| Ανοσοκατακρήμνιση..... | 27 |
| Πειραματική διαδικασία ανοσοκατακρήμνισης..... | 28 |
| SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση..... | 30 |
| Βασικές αρχές της ηλεκτροφόρησης..... | 30 |
| Πειραματική διαδικασία ηλεκτροφόρησης | 32 |
| Αρχή της μεθόδου Silver staining..... | 34 |
| Ανοσοαποτύπωση ή αποτύπωση Western (Western blotting)..... | 35 |
| | |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 40 |
| Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς και υπολογισμός σε άγνωστο δείγμα..... | 41 |
| Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών του δείγματος..... | 42 |
| Ανοσοκατακρήμνιση..... | 43 |
| Προσπάθειες βελτίωσης του προφίλ της ανοσοκατακρήμνισης με προάνοσο ιστό..... | 44 |
| Προσπάθειες βελτίωσης του προφίλ της ανοσοκατακρήμνισης με αντίσωμα LSAL.... | 46 |
| | |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 50 |
| | |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 54 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

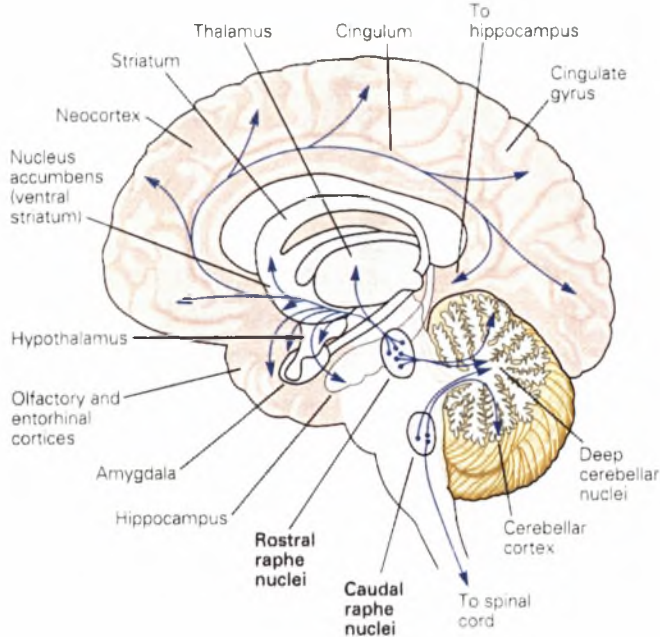
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η 5-HT-moduline είναι ένα ενδογενές τετραπεπτιδίο (Leu-Ser-Ala-Leu), το οποίο αλληλεπιδρά ειδικά και μη συναγωνιστικά, με αλλοστερικό τρόπο, (μείωση B_{max} χωρίς μείωση K_d) με τους 5-HT_{1B} υποδοχείς προκαλώντας αλλαγές στη διαμόρφωσή τους σε nanomolar συγκεντρώσεις και αυτό οδηγεί στην απευαισθητοποίησή τους. Η 5-HT-moduline, όπως και τα υπόλοιπα νευροπεπτιδία, θεωρούμε ότι προέρχεται από ένα βιολογικά αδρανές πρόδρομο μόριο. Χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα anti-5HT-moduline σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης έγινε προσπάθεια αναγνώρισης και απομόνωσης της πρόδρομης πρωτεΐνης μετά από SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και Western blot ανάλυση. Συγκεκριμένα πρωτεΐνες εγκεφαλικού φλοιού αρουραίων τύπου Wistar επώαστηκαν με συγκεκριμένες ποσότητες πολυκλωνικού αντισώματος anti-5HT-moduline χρησιμοποιώντας ως control τις πρωτεΐνες που αναγνωρίζει και δεσμεύει ο μη ανοσοποιημένος ορός. Οι ζώνες που έδινε η κάθε επώαση έγιναν ορατές μετά από SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και βαφή τους με χρώση αργύρου (silver staining). Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν με ηλεκτρομεταφορά σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης το οποίο επώαστηκε με ορισμένη ποσότητα αντισώματος. Ανιχνεύτηκε μια ζώνη πρωτεϊνών στα 110kDa.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οργάνωση του σεροτονινεργικού συστήματος

Το σεροτονινεργικό σύστημα ρυθμίζει ένα μεγάλο αριθμό φυσιολογικών λειτουργιών όπως ο ύπνος, η θερμορύθμιση και ορισμένα πρότυπα συμπεριφοράς. Δυσλειτουργίες αυτού του συστήματος συνδέονται με πολλές νευροψυχιατρικές ανωμαλίες όπως η κατάθλιψη, το άγχος και η επιθετικότητα.



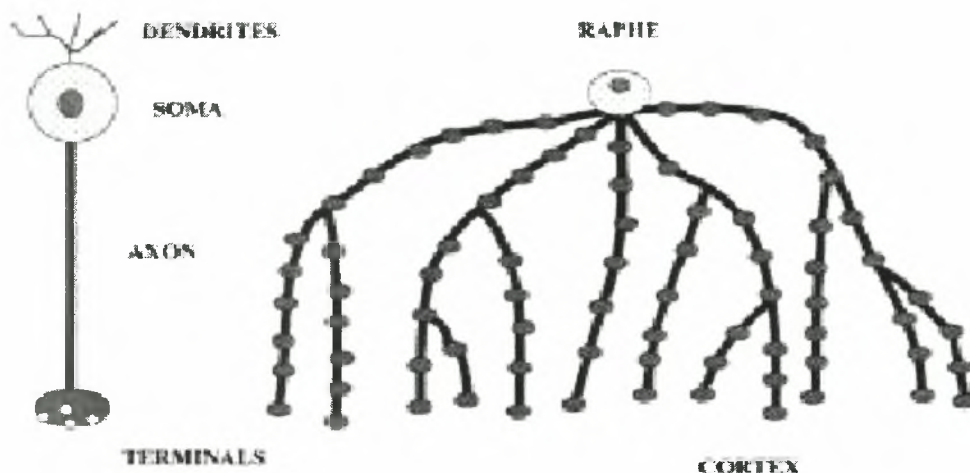
Εικόνα 1.1. Σεροτονινεργικές οδοί.

και pallidus) οι οποίοι προβάλλουν προς το νωτιαίο μυελό και τους ρυχαιούς πυρήνες της (nucleus raphe dorsalis) που προβάλλουν προς την παρεγκεφαλίδα, τα βασικά γάγγλια και τον πρόσθιο εγκέφαλο (Εικόνα 1.1) (Jacobs and Azmitia, 1992).

Ένα μεγάλο ποσοστό των σεροτονινεργικών νευρώνων συγκεκριμένα αυτών που ξεκινούν από τους ρυχαιούς πυρήνες της ραφής είναι σε υψηλό βαθμό δενδροειδείς δημιουργώντας ένα πολύπλοκο νευρωνικό δίκτυο (Mamounas and Molliver, 1988; Tork, 1990; Baumgarten and Grozdanovic, 1997). Οι δενδροειδείς άξονες των νευρώνων έχουν ένα μεγάλο αριθμό κυστιδίων (varicosities), τα οποία μπορούν και απελευθερώνουν σεροτονίνη. Έχει δείχθει ότι ένας και μόνο νευρώνας προβαλλόμενος από τη ραφή στο φλοιό ενός αρουραίου μπορεί να εμφανίσει 500.000 κυστίδια κατά μήκος των νευραξόνων του (Descarries et al., 1990). Μ' αυτόν τον τρόπο η προώθηση ενός δυναμικού ενέργειας κατά μήκος του νευράξονα ενός μοναδικού νευρώνα είναι δυνατό να απελευθερώσει 5-HT από όλα αυτά τα κυστίδια και έτσι να αλληλεπιδράσει ο νευρώνας με μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών στόχων (Εικόνα 1.2).

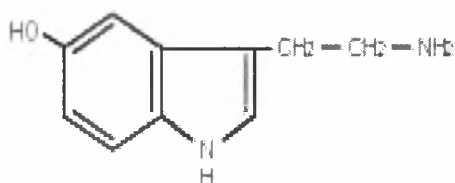
Το κεντρικό σεροτονινεργικό σύστημα είναι δομημένο με τέτοιο τρόπο ώστε να εμφανίζει μεγάλη νευρορυθμιστική δράση. Είναι πολύ συγκεντρωτικό και ταυτόχρονα πανταχού παρόν με μεγάλη ικανότητα να αλληλεπιδρά με άλλα συστήματα νευροδιαβιβαστών. Τα κυτταρικά σώματα των σεροτονινεργικών νευρώνων εντοπίζονται στην περιοχή της ραφής, στους ουραίους πυρήνες της (nucleus raphe obscurus

SEROTONERGIC NEURONES



Εικόνα 1.2. Σχηματική αναπαράσταση των δυο τύπων σεροτονινεργικών νευρώνων: ο ένας τύπος χαρακτηρίζεται από λεπτό ευθύγραμμο νευράξονα που έχει λίγες διακλαδώσεις και μερικά τελικά κομβία, ενώ ο άλλος αντιστοιχεί σε λεπτό νευράξονα με πλούσια δενδροειδή ανάπτυξη εμφανίζοντας ένα μεγάλο αριθμό κυστιδίων (varicosities) κατά μήκος των αξονικών διακλαδώσεων.

Η σεροτονίνη



Εικόνα 1.3. Ο χημικός τύπος της 5-υδροξυτρυπταμίνης (5-HT).

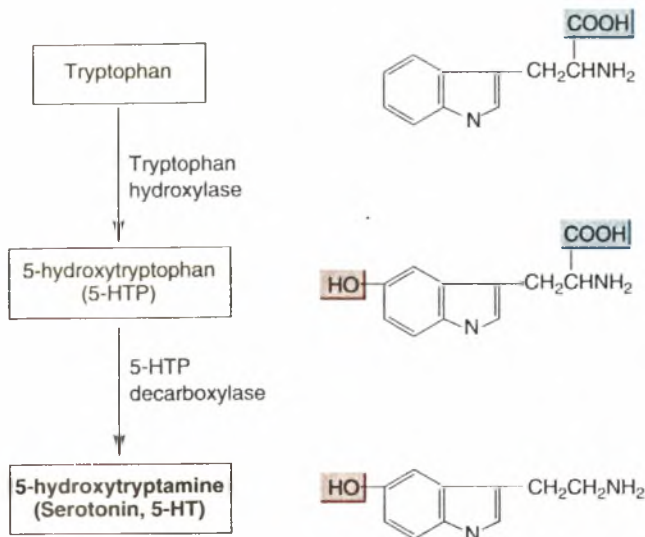
Η πρώτη επιστημονική ένδειξη για την ύπαρξη της σεροτονίνης παρουσιάστηκε το 1884 από τους Stevens και Lee, οι οποίοι ανακάλυψαν μια ουσία στον ορό (serum) του αίματος που προκαλούσε ισχυρή σύσπαση των λείων μυϊκών ινών και την ονόμασαν σεροτονίνη (serum + tonus). Η χημική δομή αυτής της ουσίας αναγνωρίστηκε πολύ αργότερα (*Rapport*, 1948) ως 5-υδροξυ-τρυπταμίνη ή 5-HT. Το 1953 οι Twarog και Page έδειξαν την παρουσία της 5-HT στον εγκέφαλο και λίγο αργότερα αναγνωρίστηκε ο ρόλος της ως νευροδιαβιβαστής του κεντρικού νευρικού συστήματος (*Bogdanski*, 1956).

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η σεροτονίνη παίζει σημαντικό ρόλο σε ένα μεγάλο αριθμό φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων:

Τα φυσιολογικά φαινόμενα είναι : θερμορύθμιση, μνήμη και μάθηση, αίσθηση του πόνου, νευροενδοκρινής ρύθμιση, τροφική συμπεριφορά, σεξουαλική συμπεριφορά, κίνηση, ύπνος.

Τα παθολογικά φαινόμενα είναι : ημικρανία, έμμεσις, αλκοολισμός, άγχος, κατάθλιψη, σχιζοφρένεια, επιθετικότητα, κρίσεις πανικού, αυτισμός, αρρώστια του Alzheimer, αρρώστια του Parkinson, χορεία του Huntington.

Βιοσύνθεση και μεταβολισμός της σεροτονίνης



Εικόνα 1.4. Τα διάφορα στάδια σχηματισμού της 5-υδροξυ-τρυπταμίνης έχοντας σαν αρχικό υπόστρωμα την τρυπτοφάνη.

μόνο το 1% της μετατρέπεται σε 5-HT, ο περιορισμός της τρυπτοφάνης στη διαίτα οδηγεί σε σημαντική ελάττωση των επιπέδων σεροτονίνης στον εγκέφαλο. Το επόμενο βήμα είναι η υδροξυλίωση της τρυπτοφάνης στη θέση 5, που οδηγεί στο σχηματισμό της 5-υδροξυτρυπτοφάνης (5-HTP). Το ένζυμο που καταλύει αυτήν την αντίδραση είναι η υδροξυλάση της τρυπτοφάνης και βρίσκεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση στον εγκέφαλο και στους περισσότερους ιστούς. Σχεδόν αμέσως μόλις σχηματιστεί η 5-HTP αποκαρβοξυλιώνεται παράγοντας σεροτονίνη. Το ένζυμο που καταλύει αυτήν την αντίδραση είναι η 5-HTP αποκαρβοξυλάση. Η μόνη αποτελεσματική οδός για τον καταβολισμό της σεροτονίνης είναι η απαμίνωσή της από τις MAOs (μονοαμινοξειδάσες). Το προϊόν της αντίδρασης είναι η 5-HIAA (5-υδροξυ-ινδολο-οξικό οξύ). Η σύνθεση και ο καταβολισμός της 5-HT είναι πολύ ενεργές διαδικασίες και υπολογίζεται ότι η συνολική ποσότητά της στον οργανισμό αντικαθίσταται κάθε 24h.

Ταξινόμηση των υποδοχέων 5-HT

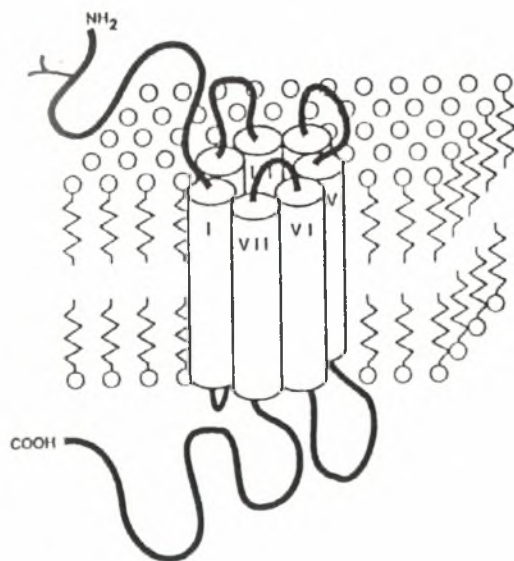
Η ύπαρξη σεροτονινεργικών υποδοχέων στις μεμβράνες ζωικών κυττάρων εδώ και εκατομμύρια χρόνια, πολύ πιο παλιά από τους αδρενοϋποδοχείς ή τους υποδοχείς διαφόρων πεπτιδίων, έδωσε τη δυνατότητα να δημιουργηθούν πολλές μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιούσε την αρχική πρωτεΐνη-υποδοχέα, οδηγώντας σήμερα σ' ένα πολύ μεγάλο αριθμό σεροτονινεργικών υποδοχέων.

Μόνο το 2% της ολικής σεροτονίνης βρίσκεται στον εγκέφαλο. Το 90% βρίσκεται στα εντεροχρωμιόφιλα κύτταρα και το 8% στα αιμοπετάλια. Επειδή όμως η σεροτονίνη δεν μπορεί να περάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, τα σώματα των σεροτονινεργικών νευρώνων της ραφής πρέπει να συνθέτουν τα ίδια 5-HT. Το πρώτο σημαντικό βήμα για τη βιοσύνθεσή της είναι η πρόσληψη του αμινοξέος τρυπτοφάνης. Η τρυπτοφάνη του πλάσματος προέρχεται από τις τροφές και επειδή

Ο αρχικός σκεπτικισμός για τον “απίστευτο” αριθμό των υποδοχέων 5-HT δεν υφίσταται πλέον, εφόσον για όλους τους υποδοχείς έχουν βρεθεί τα αντίστοιχα γονίδια καθώς και η θέση που κατέχουν στα χρωμοσώματα.

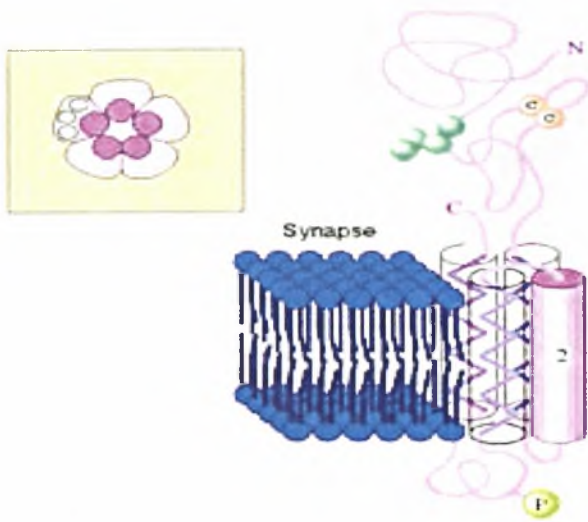
Παρότι η κάθε υποκατηγορία σεροτονινεργικού υποδοχέα δραστηριοποιείται από την 5-HT, οι διαφορές στη δομή κάθε πρωτεΐνης καθώς επίσης και η συγγένεια για διάφορες συνθετικές χημικές ενώσεις έχουν οδηγήσει στην ισχύουσα ταξινόμηση των υποδοχέων 5-HT σε 7 μεγάλες κατηγορίες. Η ταξινόμηση επιτυγχάνεται έπειτα από μελέτες κατανομής τους στους διαφόρους ιστούς, χάρη στο προφίλ πρόσδεσης ραδιοσημασμένων προσδετών, στην ηλεκτροφυσιολογία τους, στα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν και στη φαρμακολογία τους. Παρακάτω ακολουθεί ένας πίνακας με τις διάφορες κατηγορίες υποδοχέων με τους υποτύπους τους, τη θέση εντόπισης σε διάφορους ιστούς, τη συγγένειά τους για τη σεροτονίνη και για το αν βρίσκονται προσυναπτικά ή μετασυναπτικά.

| Κατηγορία | Υπότυπος | Σύστημα μεταγωγής | Εντοπισμός | Συγγένεια για τη 5-HT |
|-------------------|---|--------------------------------|--|-----------------------|
| 5-HT ₁ | 5-HT _{1A} , 5-T _{1B} / 5-HT _{1DB} , 1D _α 5-HT _{1E} , 5-T _{1F} | - AC μέσω G _{i/o} | ΚΝΣ: διάφραγμα, ιππόκαμπος, αμυγδαλή | Υψηλή |
| 5-HT ₂ | 5-HT _{2A} , 5-HT _{2B} (5HT _{2F}) 5-HT _{2C} | +PLC μέσω G _{q/11} | Βασικά γάγγλια, φλοιός, πλακούντας, πνεύμονας, ήπαρ, νεφροί, στομάχι, έντερο | Πολύ Χαμηλή |
| 5-HT ₃ | | Κανάλι ιόντων | Κεντρικό και Περιφερικό Νευρικό Σύστημα | Χαμηλή |
| 5-HT ₄ | | + AC μέσω G _S | Καρδιά, εγκέφαλος, έντερο | Μέση |
| 5-HT ₅ | 5-HT _{5A} 5-HT _{5B} | + AC μέσω G _S | Φλοιός, ιππόκαμπος, νευρογλοιακά κύτταρα | Χαμηλή |
| 5-HT ₆ | | + AC μέσω G _S | Αμυγδαλή, ιππόκαμπος, φλοιός | Υψηλή |
| 5-HT ₇ | | + AC μέσω G _S | Στομάχι, έντερο | Υψηλή |

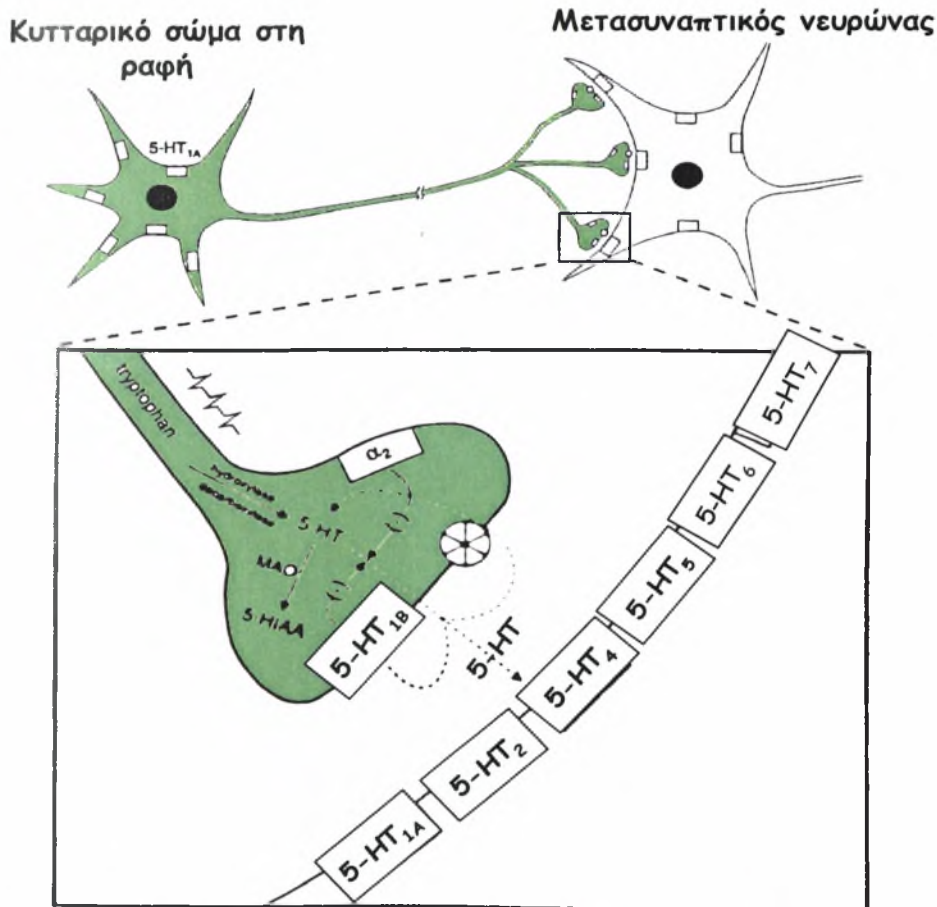


Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση της μορφής των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs). Οι σεροτονεργικοί GPCRs είναι οι 5-HT₁, 2, 4, 5, 6, 7.

Schematic Representation of a Ligand-Gated Ion Channel Subunit



Εικόνα 1.6. Σχηματική αναπαράσταση μιας υπομονάδας των υποδοχέων 5-HT₃. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι πενταμερείς. Διακρίνεται ο προσδέτης με πράσινο χρώμα ο οποίος αλληλεπιδρά με τη χαρακτηριστική θηλιά κυστεΐνης C-C με πορτοκαλί χρώμα, η οποία βρίσκεται σε κάποια απόσταση από τον πόρο του καναλιού.



Εικόνα 1.7. Σχηματική αναπαράσταση μιας σεροτονινεργικής σύναψης. Εμφανίζονται προσυναπτικά οι 5-HT_{1B}, 5-HT_{1A} υποδοχείς, ο μεταφορέας της 5-HT και τα ένζυμα βιοσύνθεσης της 5-HT. Εντοπίζονται μετασυναπτικά οι 5-HT₃, 5-HT_{4,5,6,7}, και 5-HT_{1A}.

Ο ρόλος της σεροτονίνης στην κατάθλιψη

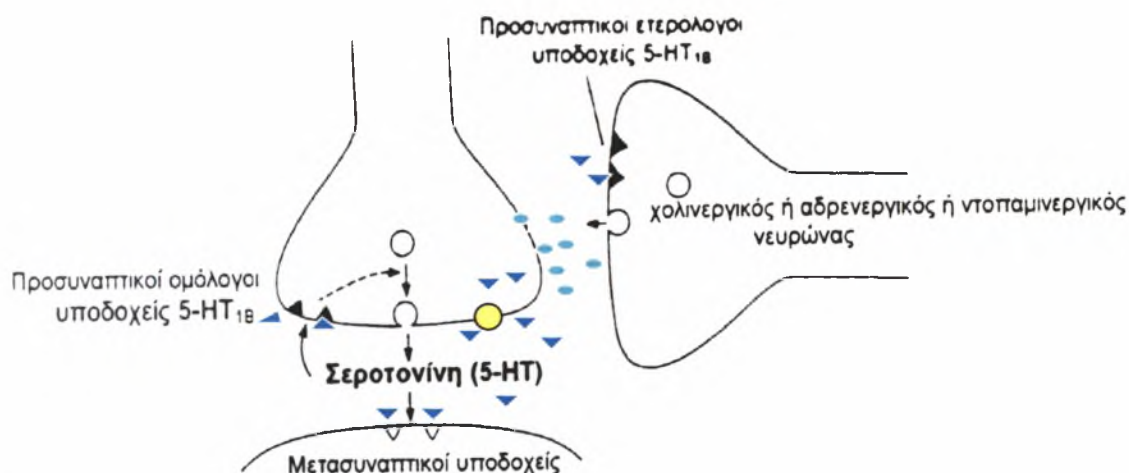
Η σεροτονίνη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην κατάθλιψη. Κύριοι στόχοι αντικαταθλιπτικών φαρμάκων είναι εκείνοι που ρυθμίζουν τη συγκέντρωση της σεροτονίνης στη συναπτική σχισμή, δεδομένου ότι κατά την κατάθλιψη εμφανίζονται μειωμένα επίπεδα σεροτονίνης.

Ο μεταφορέας της σεροτονίνης, ο γνωστότερος στόχος αντικαταθλιπτικών φαρμάκων

Όταν η σεροτονίνη απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή, ένα μέρος της συνδέεται στους μετασυναπτικούς της υποδοχείς, ένα μέρος της καταβολίζεται και ένα πολύ μεγάλο μέρος της επαναπρολαμβάνεται από τον μεταφορέα της σεροτονίνης στον προσυναπτικό νευρώνα. Ο μεταφορέας αυτός ανήκει σε μια κατηγορία μεταφορέων συζευγμένων με ιόντα Na^+/Cl^- . Δεδομένου ότι κατά την κατάθλιψη η συγκέντρωση της σεροτονίνης είναι μειωμένη, η αναστολή του μεταφορέα της σεροτονίνης αναστέλλει την επαναπρόσληψη της και αυξάνει τη συγκέντρωση της σεροτονίνης στη σχισμή. Ο κυριότερος αναστολέας του μεταφορέα της σεροτονίνης είναι η φλουοξετίνη, το γνωστό αντικαταθλιπτικό Prozac.

Οι 5-HT_{1B} υποδοχείς ως θέσεις ρύθμισης έκκρισης σεροτονίνης

Οι 5-HT_{1B} υποδοχείς με πειράματα αυτοραδιογραφίας χρησιμοποιώντας [³H]-5-HT εντοπίστηκαν σε μεγάλο βαθμό στα βασικά γάγγλια, στους ραχιαίους και κοιλιακούς πυρήνες της ραφής, στο ραβδωτό σώμα και στον ιππόκαμπο. Οι υποδοχείς αυτοί βρίσκονται στις αξονικές απολήξεις των σεροτονινεργικών νευρώνων ως προσυναπτικοί αυτοϋποδοχείς και ρυθμίζουν τα επίπεδα της σεροτονίνης στη συναπτική σχισμή μέσω ενός feed-back μηχανισμού. Αναστέλλουν την έκκριση σεροτονίνης στη σύναψη με το να εμποδίζουν την είσοδο ιόντων ασβεστίου. Εντοπίζονται επίσης και ως ετεροϋποδοχείς σε μη σεροτονινεργικές απολήξεις ρυθμίζοντας την απελευθέρωση άλλων νευροδιαβιβαστών (Εικόνα 1.8).

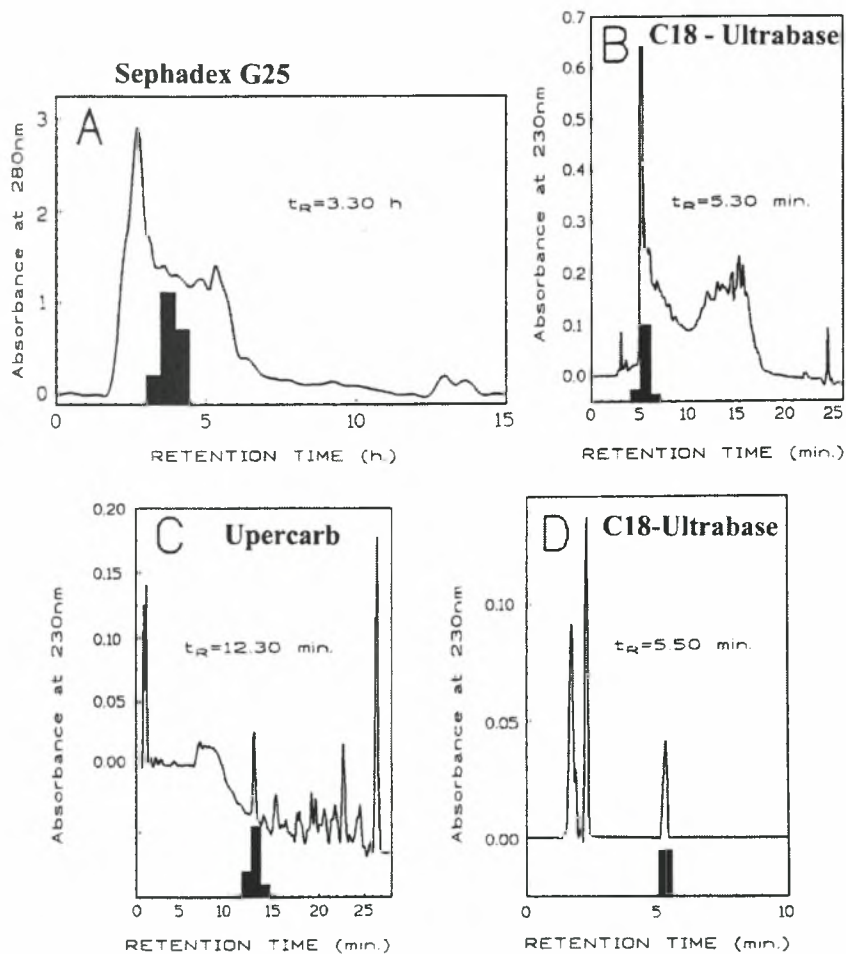


Εικόνα 1.8. 5-HT_{1B} υποδοχείς. Εντοπίζονται προσυναπτικά σε σεροτονινεργικούς νευρώνες και ως προσυναπτικοί ετερόλογος υποδοχείς σε μη σεροτονινεργικούς νευρώνες. Η ενεργοποίησή τους προκαλεί μείωση της 5-HT στη συναπτική σχισμή.

Πειράματα σε 5-HT_{1B} knock out ποντίκια έδειξαν συσχέτιση της επιθετικότητας και έντονου άγχους με την απουσία αυτών των υποδοχέων. Στην περίπτωση της κατάθλιψης, όπου εμφανίζεται μειωμένη συγκέντρωση 5-HT, η απενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών βελτιώνει τα συμπτώματα. Ένας ενδογενής αναστολέας των 5-HT_{1B} υποδοχέων είναι και η 5-HT-moduline.

Η 5-HT-moduline

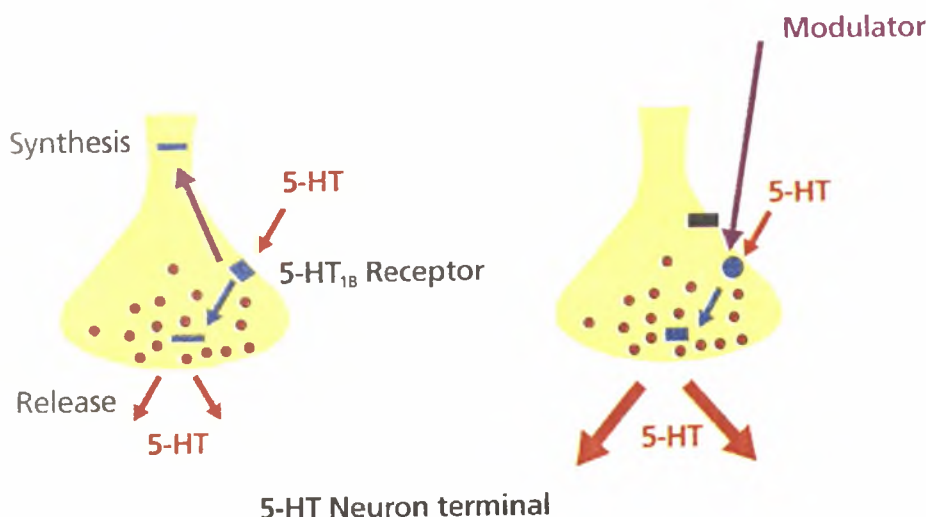
Η υπόθεση ότι ένας ενδογενής προσδέτης μπορεί να ελέγξει την δραστηριότητα των 5-HT₁ υποδοχέων παρουσιάστηκε το 1981 (*Fillion and Fillion, 1981*), ωστόσο ο τελικός χαρακτηρισμός ενός τέτοιου παράγοντα πραγματοποιήθηκε πρόσφατα. Ένα ενδογενές πεπτίδιο καθарίστηκε, απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε από εγκεφαλικά εκχυλίσματα αρουραίων και βοοειδών, με χρωματογραφικές τεχνικές HPLC. Σε κάθε βήμα καθαρισμού όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να αναστείλουν την πρόσδεση της [³H]-5HT στους 5-HT_{1B} υποδοχείς (Εικόνα 1.9). Το ενεργό κλάσμα αναλύθηκε με NMR και βρέθηκε επίσης η αμινοξική του αλληλουχία. Πρόκειται για ένα τετραπεπτίδιο leucine-serine-alanine-leucine (LSAL) που ονομάστηκε 5-HT-moduline.



Εικόνα 1.9. Βήματα καθαρισμού του LSAL με χρήση HPLC.

Δείχθηκε ότι αυτό το πεπτιδίο αλληλεπιδρούσε με τους 5-HT_{1B} υποδοχείς στον αρουραίο, το ποντίκι, το άλογο, το ινδικό χοιρίδιο, τα βοοειδή και στον άνθρωπο. Η αλληλεπίδραση ήταν μη συναγωνιστική και υψηλής συγγένειας (<1nM) και προκαλούσε αλλαγές στην διαμόρφωση της πρωτεΐνης του υποδοχέα (Massot *et al.*, 1996). Η αλληλεπίδραση ήταν πολύ εξειδικευμένη και δεν επηρέαζε άλλους σεροτονινεργικούς και μη υποδοχείς. Επίσης δεν αλληλεπιδρούσε με το μεταφορέα της σεροτονίνης.

Η σύνδεση της 5-HT-moduline στον 5-HT_{1B} υποδοχέα εμποδίζει τη σύνδεση της 5-HT αναστέλλοντας τη δραστηριότητα του: παρεμποδίζεται η σύνδεση του υποδοχέα με τη G_i πρωτεΐνη (Rousselle *et al.*, 1998), η μείωση της παραγωγής cAMP, η ανασταλτική δράση της 5-HT στην απελευθέρωσή της από τα συναπτοσώματα (Massot *et al.*, 1996) και τέλος η εμφάνιση της συμπεριφοράς που προκαλεί ένας 5-HT_{1B} αγωνιστής σε απομονωμένα ποντίκια (Massot *et al.*, 1996).



Εικόνα 1.10. Η υπόθεση της ύπαρξης ενός ενδογενούς ρυθμιστή που επηρεάζει τη δραστηριότητα των 5-HT_{1B} αυτοϋποδοχέων. Η σύνδεση της 5-HT στον 5-HT_{1B} αναστέλλει την απελευθέρωσή της, ενώ αν ο υποδοχέας είναι μπλοκαρισμένος από τον ενδογενή αναστολέα του, η απελευθέρωσή της σεροτονίνης αυξάνει.

Η παρουσία αυτού του πεπτιδίου στον εγκέφαλο μελετήθηκε με ανοσοϊστοχημεία. Παρήχθη ένα πολυκλωνικό αντίσωμα ενάντια στην 5-HT-moduline (Grimaldi *et al.*, 1997) και η ανοσοσήμανση που παρατηρήθηκε σε εγκεφαλικές τομές ποντικού υποδεικνύει ότι το πεπτιδίο βρίσκεται μέσα σε νευρώνες με ετερογενή κατανομή στον εγκέφαλο (Εικόνα 1.11).

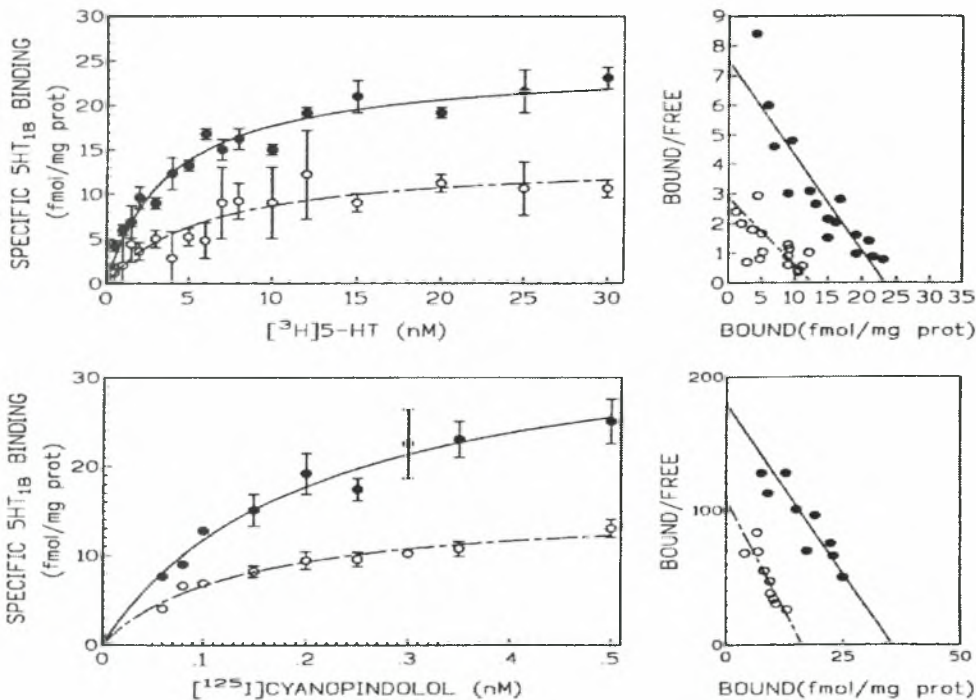


Εικόνα 1.11. Νευρώνας στην ωχρά σφαίρα ποντικίου, ο οποίος εκφράζει τη 5-HT-moduline. Τα βέλη δείχνουν τα κυστίδια κατά μήκος του νευράξονα.

Η συγκέντρωσή της 5-HT-moduline σε περιοχές του εγκεφάλου μετρήθηκε με τεστ ELISA και βρέθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις: υποθάλαμος > ιππόκαμπος > φλοιός > μέλαινα ουσία > ραβδωτό σώμα > παρεγκεφαλίδα.

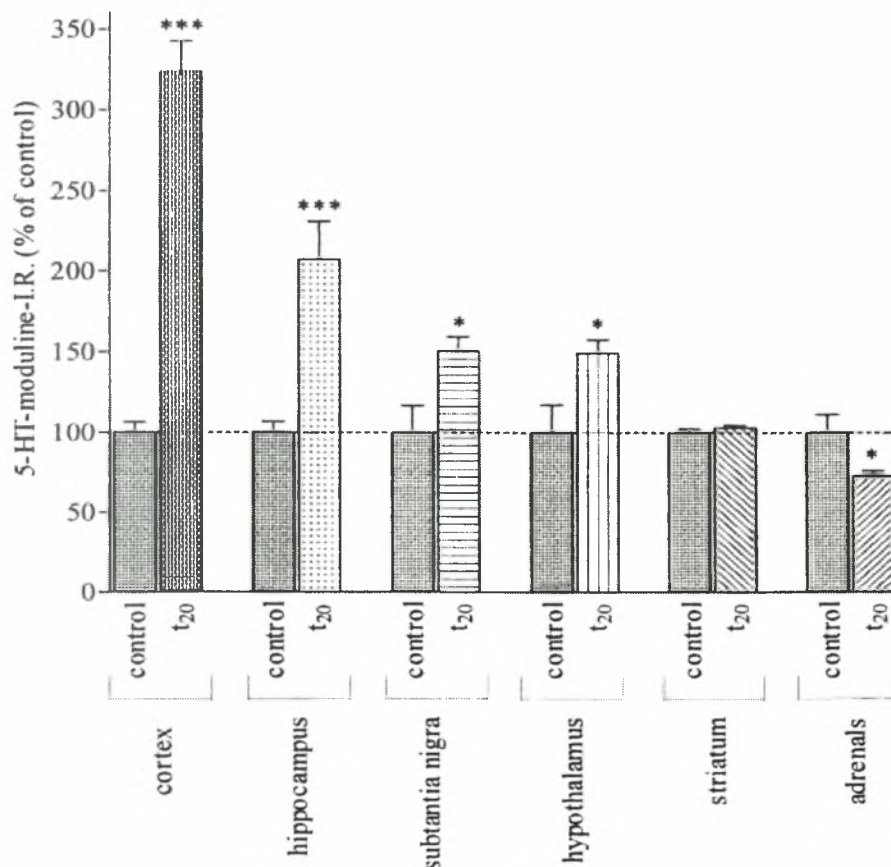
Το πεπτιδίο καταβολίζεται γρήγορα σε ομογενοποίηση εγκεφαλικού ιστού

από ενδοπεπτιδάσες που οδηγούν στη δημιουργία δύο διπεπτιδίων (LeuSer) και (AlaLeu) (Plantefol et al., 1999). Επίσης το πεπτιδίο απελευθερώνεται από τα συναπτοσώματα με K^+/Ca^{2+} εξαρτώμενο μηχανισμό (Massot et al., 1999). Όλες αυτές οι ιδιότητες είναι ισχυρές ενδείξεις ότι η 5-HT-moduline είναι ένας καινούριος νευρορρυθμιστής (νευροδιαβιβαστής), όπως και τα υπόλοιπα γνωστά νευροπεπτιδία. Ωστόσο είναι το πρώτο νευροπεπτιδίο που δρα σαν αλλοστερικός τροποποιητής σε έναν GPCR και όχι στον δικό του υποδοχέα.



Εικόνα 1.12. Μοριακή αλληλεπίδραση της 5-HT-moduline με τους 5-HT_{1B} υποδοχείς. Αναπαρίσταται η πρόσδεση του αγωνιστή [³H]5-HT και του ανταγωνιστή [¹²⁵I]cyanopindolol στους 5-HT_{1B} υποδοχείς. Οι εγκεφαλικές μεμβράνες επώαστηκαν 60min στους 37°C σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του ανταγωνιστή απουσία (●-●) και παρουσία (○-○) της 5-HT-moduline.

Η εμπλοκή της 5-HT-moduline σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις προσδιορίστηκε από διάφορες πειραματικές έρευνες, ωστόσο μια λεπτομερής εξήγηση του ρόλου της χρειάζεται περαιτέρω έρευνα. Πολλά είναι τα παραδείγματα όπου έντονο και οξύ stress αυξάνει την απελευθέρωση της 5-HT σε διάφορες εγκεφαλικές περιοχές, μετρούμενη με μικροδιάλυση (Fujino et al., 2002) καθώς επίσης είναι καλά τεκμηριωμένο το γεγονός ότι η αύξηση της δραστηριότητας της σεροτονίνης είναι στενά συνδεδεμένη με τη δημιουργία του άγχους (Stein and Stahl, 2000 και Fillion, 2000).



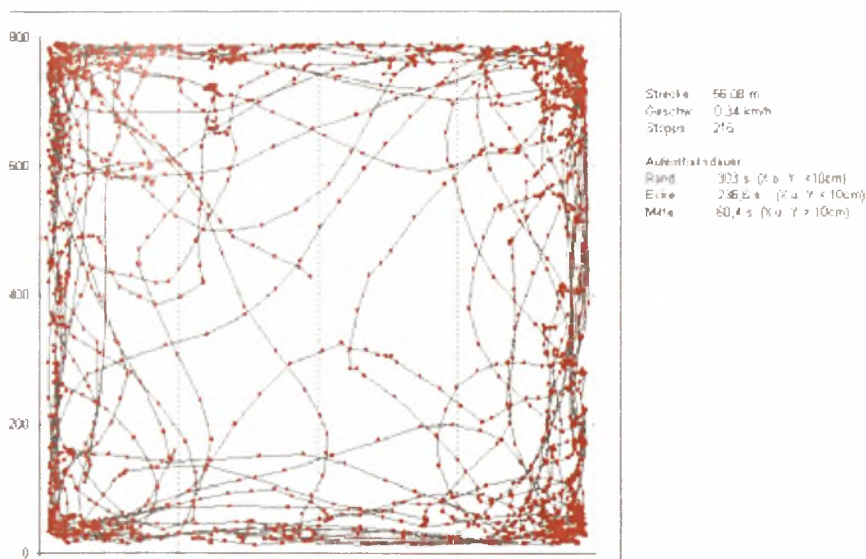
Εικόνα 1.13. Επίδραση stress ακινησίας για 20min στη συγκέντρωση της 5-HT-moduline στο φλοιό, ιππόκαμπο, υποθάλαμο, μέλαινα ουσία, ραβδωτό σώμα και επινεφρίδια. Ο προσδιορισμός των ιστών σε 5-HT-moduline στα πειραματόζωα έγινε με τεχνικές dot-ELISA.

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια έδειξαν ότι i.c.v χορήγηση 5-HT-moduline απευαισθητοποιούσε τους 5-HT_{1B} υποδοχείς στη μέλαινα ουσία, όπως μετά από στρεσογόνο ερέθισμα. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε το περιεχόμενο διαφόρων ιστών σε 5-HT-moduline μετά από χρόνιο και οξύ stress ακινησίας. Η ποσοτικοποίηση του LSAL έγινε χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα anti-5-HT-moduline σε μελέτη dot-ELISA. 20min μετά από την έναρξη του stress, τα επίπεδα του πεπτιδίου αυξήθηκαν σε φλοιό, στον ιππόκαμπο, στη μέλαινα ουσία και στον υποθάλαμο κατά φθίνουσα σειρά. Τα υψηλότερα επίπεδα παρατηρήθηκαν μετά από 20min και σταδιακά επέστρεψαν σε τιμές control κατά τα τελευταία 20min του περιορισμού των πειραματόζωων.

Σε μια άλλη σειρά πειραμάτων χορήγηση αντισώματος αντι-5-HT-moduline έχει αγχολυτική δράση στο μοντέλο elevated-plus maze, στο οποίο τα πειραματόζωα τοποθετούνται σε μια κατασκευή με τέσσερις βραχίονες, οι δύο εκ των οποίων έχουν τοιχώματα. Σ' αυτό το τεστ μετράται ο χρόνος που περνάει το ποντίκι στους ανοικτούς και κλειστούς βραχίονες. Το ποντίκι όταν εισαχθεί στους υπερυψωμένους βραχίονες, λόγω του άγχους που του προκαλείται προτιμά την περιοχή των κλειστών βραχιόνων. Σε άλλα τεστ συμπεριφοράς όπως το open-field τα ποντίκια προτιμούν να περνούν περισσότερο χρόνο στην περιφέρεια της περιοχής, να κινούνται σε σκοτεινές περιοχές. Χορήγηση αντισώματος αντι-5-HT-moduline άρει αυτήν τη συμπεριφορά και περνάει τον ίδιο χρόνο στους ανοικτούς και τους κλειστούς βραχίονες.



Εικόνα 1.14. Το τεστ συμπεριφοράς elevated-plus maze. Μετράται ο χρόνος που περνά το ποντίκι στον ανοικτό βραχίονα προς το χρόνο που περνά στον ανοικτό και κλειστό βραχίονα.

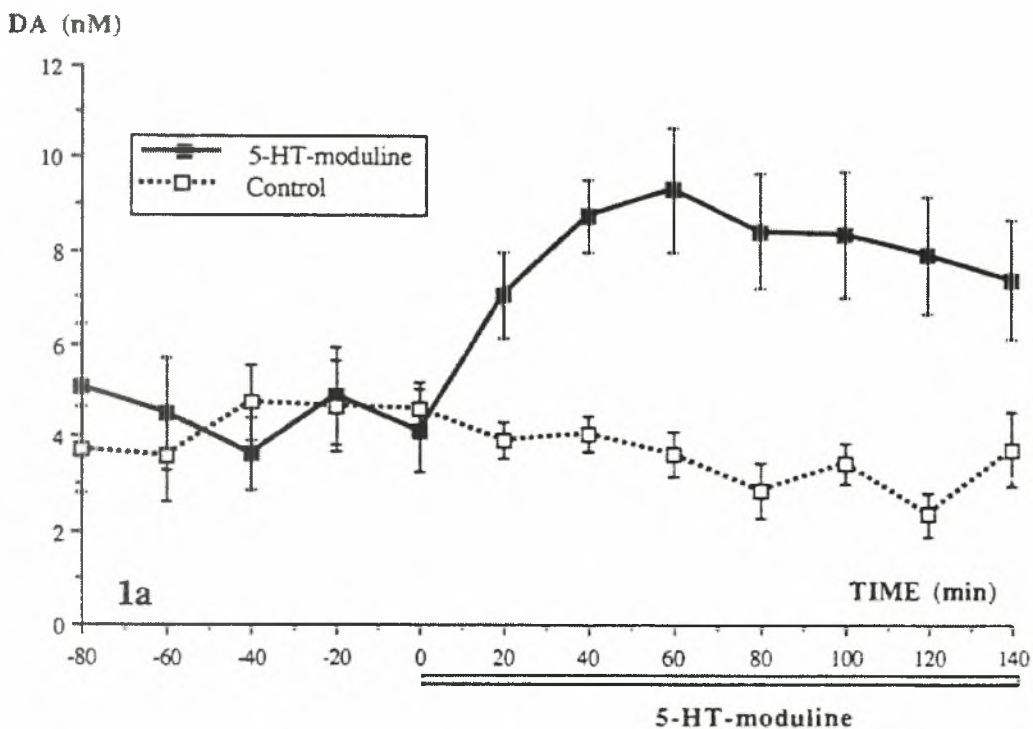


Εικόνα 1.15. Open-field test. Τα ποντίκια τοποθετούνται σε ανοικτό κουτί όπου μετρείται και αναλύεται η κινητική δραστηριότητα του πειραματόζωου όπως η απόσταση που διανύεται, ταχύτητα, συνολική δραστηριότητα, διακριτές κινήσεις.

Η υπόθεση ότι η 5-HT-moduline παίζει ένα ρόλο στον μηχανισμό δημιουργίας άγχους προτάθηκε με βάση τις παρακάτω παρατηρήσεις :

1. Οξύ stress ακινησίας απευαισθητοποιεί τους 5-HT_{1B} υποδοχείς (*Bolanos-Jimenez et al., 1995*).
2. Χορήγηση i.c.v. της 5-HT-moduline απευαισθητοποιεί τους 5-HT_{1B} υποδοχείς (*Seguin et al., 1997*).
3. Οξύ stress (κρύο και ακινησία) αυξάνει τη συγκέντρωση της 5-HT-moduline σε περιοχές όπου απευαισθητοποιούνται οι 5-HT_{1B} (*Bonnin et al., 1999*).
4. Χορήγηση αντισώματος αντι-5-HT-moduline έχει αγχολυτική δράση στο μοντέλο elevated plus maze (*Grimaldi et al., 1999*).

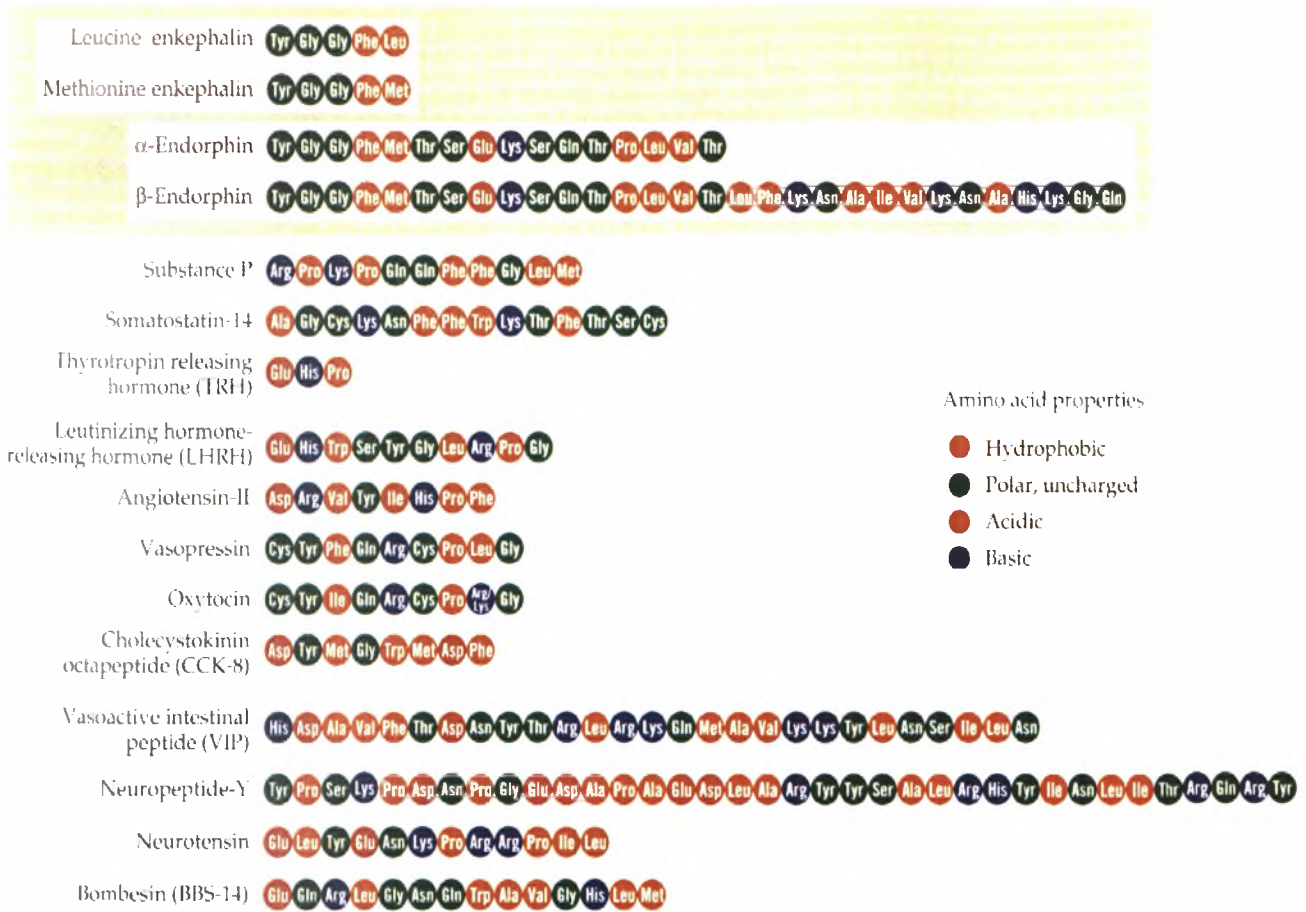
Με άλλα λόγια, η 5-HT-moduline εμφανίζεται σαν ένας ρυθμιστής της σεροτονινεργικής δραστηριότητας, η οποία στη συνέχεια εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών φυσιολογικών αλλά και παθολογικών φαινομένων (*Zifa and Fillion, 1992*). Αλληλεπιδρά δηλ. με τόσες διαφορετικές λειτουργίες, με τόσους διαφορετικούς νευροδιαβιβαστές, ώστε συμμετέχει στη λεπτή ρύθμιση της δραστηριότητας του κεντρικού νευρικού συστήματος σε δεδομένα ερεθίσματα.



Εικόνα 1.16. Σχηματική αναπαράσταση της αύξησης της συγκέντρωσης της ντοπαμίνης (DA) παρουσία της 5-HT-moduline σε σχέση με το control. Παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση 60min μετά την χορήγηση του τετραπεπτιδίου.

Υπάρχουν πολλά νευροδραστικά πεπτίδια, τα οποία προέρχονται όλα από πρόδρομα μόρια

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 είχαν χαρακτηριστεί στο παρελθόν ως ορμόνες, με γνωστούς στόχους εκτός εγκεφάλου (π.χ. αγγειοτασίνη και γαστρίνη) ή ως νευροενδοκρινικά προϊόντα (π.χ. ωκυτοκίνη, αγγειοτασίνη, σωματοστατίνη, ωχρινοποιητική ορμόνη και απελευθερωτική ορμόνη της θυρεοτροπίνης). Τα πεπτίδια αυτά εκτός από την ορμονική τους δράση σε ορισμένους ιστούς, λειτουργούν και ως διαβιβαστές, εάν απελευθερωθούν κοντά στο σημείο δράσης τους.

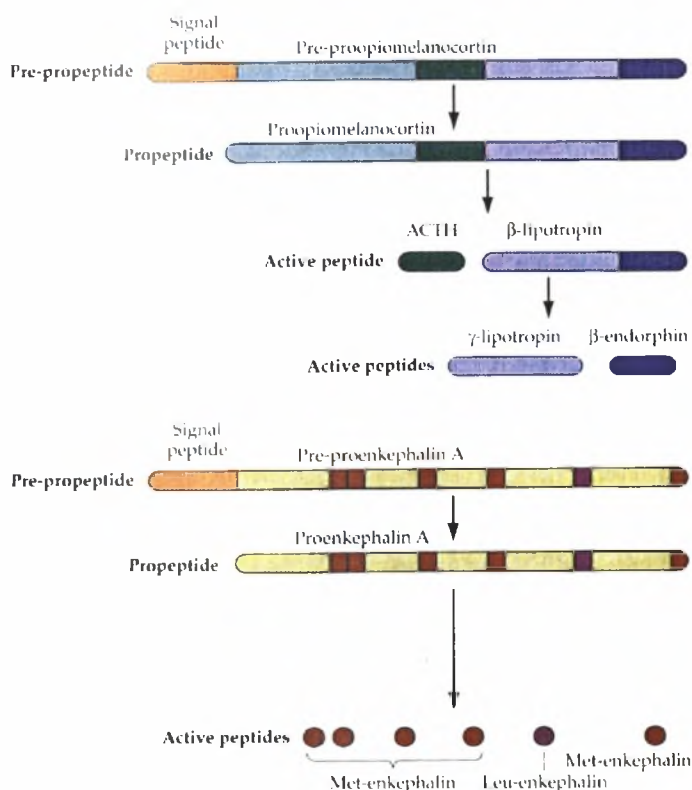


Εικόνα 1.17. Η αλληλουχία διαφόρων νευροδραστικών πεπτιδίων. Με πορτοκαλί φαίνονται τα υδρόφοβα αμινοξέα, με πράσινο τα πολικά μη φορτισμένα, με κόκκινο τα όξινα και με μπλε τα βασικά αμινοξέα.

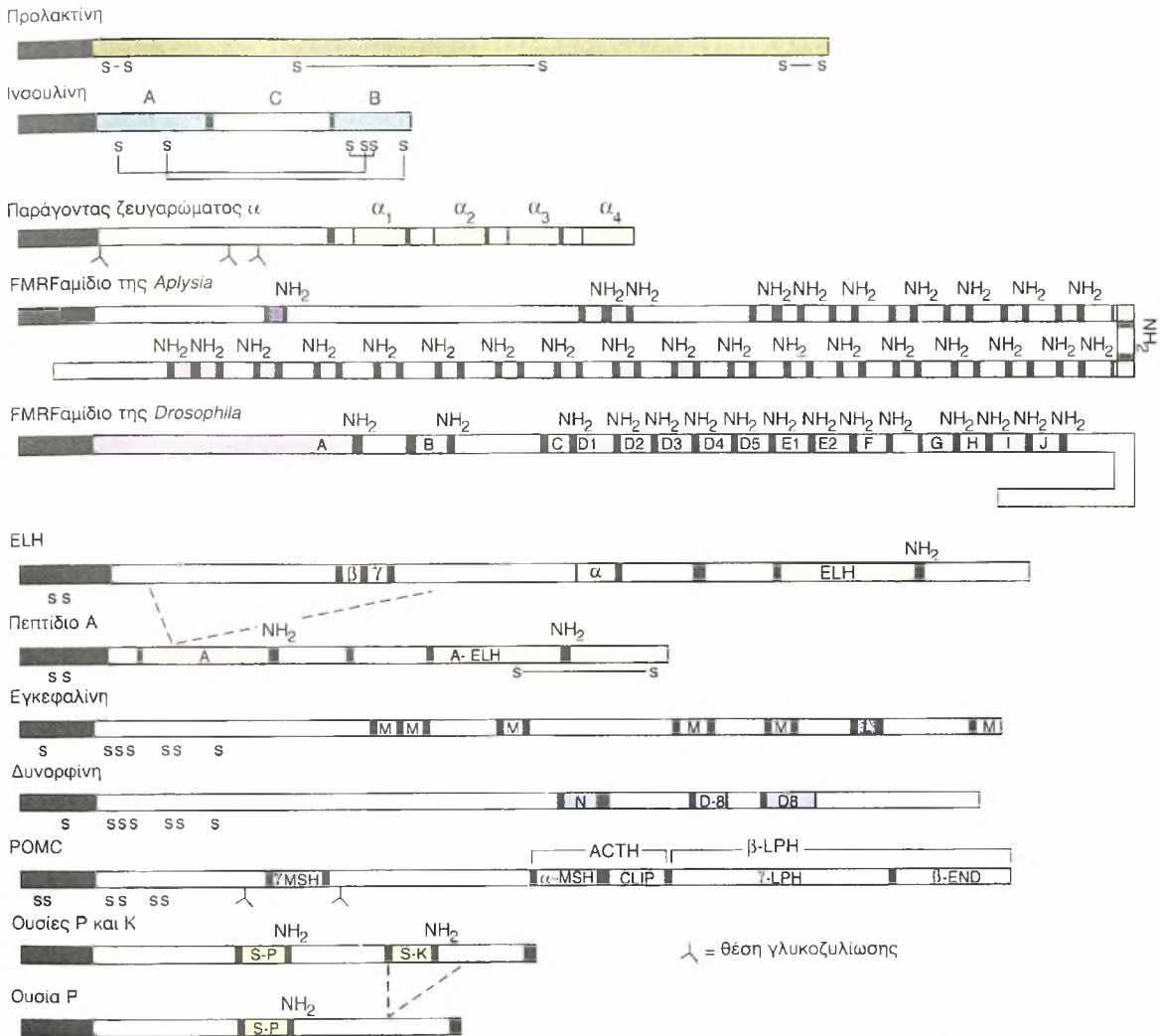
Είναι γνωστό ότι όλα τα νευροπεπτίδια συντίθενται με τη μορφή *μεγάλων πρόδρομων μορίων*, που δεν παρουσιάζουν βιολογική δραστηριότητα και υφίστανται μια σειρά μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων που οδηγούν στην παραγωγή μικρών πεπτιδίων βιολογικά ενεργών. Τα προ-νευροπεπτίδια μπορούν να περιέχουν στην αλληλουχία τους :

- πολλά διαφορετικά πεπτίδια, με διακριτές δραστηριότητες, πχ. η προ-οπιομελανοκορτίνη (POMC) περιέχει την ACTH, τη β-λιποτροπίνη, τη β-ενδορφίνη και την α-MSH (*Nakanishi, 1979*).
- πολλά αντίγραφα του ίδιου πεπτιδίου, πχ. 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 (*Taussig and Scheller, 1986*).
- μόνο ένα βιολογικά ενεργό πεπτίδιο, πχ. η proCRH (*Morrison, 1995*).

Τα ένζυμα που λειτουργούν για τη μετατροπή και ωρίμανση πρόδρομων νευροπεπτιδίων ονομάζονται *μετατροπάσες προπρωτεϊνών* (preprotein convertases-PCs) (*Hallberg and Nyberg, 2003*). Έχουν αναγνωριστεί και μελετηθεί επτά μέχρι σήμερα (*Canaff et al., 1999*) εκ των οποίων οι PC1 και PC2 βρίσκονται ειδικά σε νευρικά και ενδοκρινή κύτταρα και έχει δειχθεί ότι δρουν στην ωρίμανση πολλών πεπτιδορμονών μεταξύ των οποίων και νευροπεπτίδια όπως η TRH (*Friedman et al., 1995*). Τα ένζυμα αυτά είναι ενδοπεπτιδάσες που υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς καρβοξυτελικά βασικών αμινοξέων.



Εικόνα 1.18. Από το πρόδρομο μόριο της *πρε-προοπιομελανοκορτίνης* προκύπτει με υδρολυτική διάσπαση το προπεπτίδιο *προ-οπιομελανοκορτίνη* από το οποίο στη συνέχεια με δεύτερη υδρολυτική διάσπαση απελευθερώνονται το ενεργό πεπτίδιο ACTH και η β-λιποτροπίνη. Η β-λιποτροπίνη δρα ως πρόδρομο μόριο για την απελευθέρωση των ενεργών πεπτιδίων, γ-λιποτροπίνη και β-ενδορφίνη. Από το πρόδρομο μόριο τώρα της *προ-προεγκεφαλίνης A* προκύπτει με άλλη μια υδρολυτική διάσπαση το προπεπτίδιο της *προεγκεφαλίνης A*. Από αυτό απελευθερώνονται τα ενεργά πεπτίδια *Met-εγκεφαλίνη* και *Leu-εγκεφαλίνη*.



Εικόνα 1.19. Δομές διαφόρων προδρόμων νευρο-ορμονών και νευροπεπτιδίων. Κάθε προ-προορμόνη αρχίζει με μια υδρόφοβη αλληλουχία-σήμα (μαύρες ράβδοι). Με σημεία διάσπασης σε εσωτερικά αλκαλικά κατάλοιπα επισημαίνονται με μαύρες διακεκομμένες κατακόρυφες γραμμές στο εσωτερικό της αλληλουχίας. Αναφέρονται οι ονομασίες πολλών δραστικών πεπτιδίων και τα κατάλοιπα κυστεΐνης (S) και σακχάρων κάτω από το σχήμα της εκάστοτε αλληλουχίας.

Επειδή το σεροτονινεργικό σύστημα ρυθμίζει αρκετές φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού και εμπλέκεται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις είναι σημαντικός και συνάμα ελκυστικός ο προσανατολισμός των ερευνών προς προσπάθειες ρύθμισης του συστήματος αυτού. Η ανακάλυψη και αναγνώριση ενδογενών μορίων που έχουν ρυθμιστική δράση στο σεροτονινεργικό σύστημα έχει συνεπώς μεγάλη σημασία. Ένα τέτοιο μόριο είναι και η 5-HT-moduline. Στο πειραματικό μέρος που ακολουθεί γίνεται προσπάθεια απομόνωσης του πρόδρομου μορίου του νευροπεπτιδίου 5-HT-moduline.

ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ

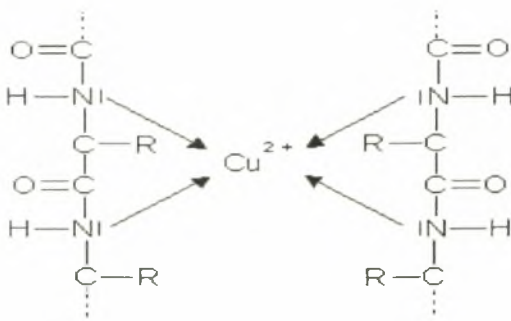
■ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΟΥ

1. Εγκεφαλικός φλοιός αρουραίων Wistar ομογενοποιείται στους 4°C με ομογενοποιητή από τεφλόν (rotter) σε διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών παρουσία PBS 1x, PMSF (2mM), EDTA (2mM) και Igepal CA-630 0.5% (v/v). Το διάλυμα φτιάχνεται την τελευταία στιγμή ως ακολούθως:
 - 200μl PMSF (0.1M) σε αιθανόλη (Fluka Biochemika). Το PMSF αναστέλλει τις πρωτεάσες σερίνης όπως η χυμοτρυψίνη, η τρυψίνη και η θρομβίνη. Δεν αναστέλλει μεταλλοπρωτεάσες όπως τις πρωτεάσες κυστεΐνης και τις πρωτεάσες ασπαραγινικού οξέος.
 - 40μl EDTA (0.5M) (Sigma). Αποτελεί χηλικό παράγοντα που δεσμεύει δισθενή κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} τα οποία χρησιμοποιούνται ως συνένζυμα από διάφορες πρωτεάσες.
 - 50 μl Igepal CA-630 100%(v/v) (Sigma). Αποτελεί μη ιοντικό απορρυπαντικό. Αποτελείται από ethoxylated octylphenol (>99.5% (w/v)), νερό (<0.5% (w/v)), ethylene oxide (<0.0025% (w/v)) και dioxane (<0.0020% (w/v)).
 - 1ml PBS 10x (Sigma). Αποτελεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και αποτελείται από NaCl (1.37M), KCl (26.8mM), Na_2HPO_4 (0.1M), KH_2PO_4 (17.6mM) και HCl (0.1M).
 - 8,7 ml δις απεσταγμένο H_2O .

Συνήθως 2 εγκεφαλικοί φλοιοί ομογενοποιούνται σε 4-5ml του διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών για συγκέντρωση πρωτεϊνών ≈ 20 mg/ml.

2. Επάωση του ομογενοποιημάτος για 20 min στους 4°C.
3. Φυγοκέντρωση σε erppendorfs για 15min στα 12000g και σε θερμοκρασία 4°C. Λαμβάνεται το υπερκείμενο ενώ το ίζημα απομακρύνεται.
4. Το υπερκείμενο κλασματοποιείται ανά 100μl (2mg πρωτεϊνών) και αποθηκεύεται στους -80°C.
5. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που περιέχει το υπερκείμενο προσδιορίζεται με τη μέθοδο του Lowry et al (1951).

■ ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ LOWRY



Εικόνα 2.1. Σύμπλοκο σχηματισμού διουρίας.

Η μέθοδος Lowry et al (1951) αποτελεί μια από τις μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών ενός αγνώστου διαλύματος και βασίζεται στο σχηματισμό χρώματος. Αρχικά πραγματοποιείται μια αντίδραση σχηματισμού διουρίας, κατά την οποία πρωτεΐνες με δύο ή περισσότερους πεπτιδικούς δεσμούς αντιδρούν με αραιό διάλυμα θειικού χαλκού σε αλκαλικό περιβάλλον δίνοντας ένα χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα. Το χρώμα αναπτύσσεται από ένα

σύμπλοκο συναρμογής του ατόμου του χαλκού και τεσσάρων ατόμων αζώτου, δύο από κάθε αλυσίδα πεπτιδίου με αποτέλεσμα τα Cu^{2+} να ανάγονται σε Cu^+ (Εικόνα 2.1). Επειδή απαιτούνται μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης (1-20mg), η μέθοδος γίνεται ακόμη πιο ευαίσθητη (ανίχνευση ως και 5μg πρωτεΐνης) με προσθήκη του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Τα φωσφορομολυβδαινικά και τα φωσφοροβολφραμικά άλατα που αποτελούν τα ενεργά συστατικά του αντιδραστηρίου Folin ανάγονται (κατά 75% από τα σύμπλοκα πρωτεϊνών με τον χαλκό και κατά 25% από τα κατάλοιπα τυροσίνης και τρυπτοφάνης των πρωτεϊνών), χάνοντας 1-3 άτομα οξυγόνου. Η παραπάνω αναγωγή έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη μπλε χρώματος ανιχνεύσιμου σε $\lambda_{\text{max}}=750\text{nm}$. Οι πεπτιδικοί δεσμοί, τα αρωματικά αμινοξέα, τυροσίνη και τρυπτοφάνη καθώς και οι πολικές περιοχές των αλυσίδων των πρωτεϊνών αποκτούν χρωμογόνες ιδιότητες.

Για τη μέτρηση πρωτεϊνών αγνώστου διαλύματος απαιτείται η δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης.

A. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς BSA

Ετοιμάζεται διάλυμα αλβουμίνης βοείου ορού (BSA) συγκέντρωσης **10mg/ml**.

Το διάλυμα αραιώνεται 10 φορές σε NaOH 1N μέχρι τελικής συγκέντρωσης **1mg/ml** (200μl BSA 10mg/ml + 1800μl NaOH 1N).

Παρασκευάζεται διάλυμα BSA συγκέντρωσης **0,1mg/ml** (100μl BSA 1mg/ml + 900μl NaOH 1N).

Ετοιμάζονται εις διπλούν οι διάφορες συγκεντρώσεις της αλβουμίνης, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Δημιουργία πρότυπης καμπύλης BSA

| | | | | | | | | |
|------------------------------|-----|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|
| Συγκέντρωση BSA (mg/ml) | 0 | 0,1 | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,3 | 0,5 |
| Ποσότητα (μl) BSA [1mg/ml] | - | - | - | 10 | 15 | 20 | 30 | 50 |
| Ποσότητα (μl) BSA [0,1mg/ml] | - | 10 | 50 | - | - | - | - | - |
| Ποσότητα (μl) NaOH | 100 | 90 | 50 | 90 | 85 | 80 | 70 | 50 |
| Σύνολο | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

B. Μέτρηση κατά Lowry

1. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις της BSA προσθέτουμε 1ml διαλύματος A το οποίο αποτελείται από:

- 0.01% $C_4H_4KNaO_6$
- 0.01% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- 2% Na_2CO_3

και παρασκευάζεται ως εξής:

- 1ml $C_4H_4KNaO_6$ 10% (w/v).
- 250μl $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 4% (w/v).
- 98,750ml Na_2CO_3 2% (w/v).

2. Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας αναδεύεται καλά στο Vortex.

3. Επώαση 10min σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προσθέτουμε 100μl του αντιδραστηρίου Folin στο 1:3 αραιωμένο σε δις απεσταγμένο H_2O .

5. Ανάδευση στο Vortex.

6. Επώαση 30min στο σκοτάδι.

Τα περιεχόμενα των δοκιμαστικών σωληνών μεταφέρονται σε κυβέτες από πολυστερένιο και ακολουθεί μέτρηση σε σπεκτρόμετρο στα 750nm.

Γ. Επεξεργασία του δείγματος

Για τη μέτρηση των πρωτεϊνών του δείγματος χρησιμοποιούνται τέσσερις διαφορετικές αραιώσεις σε NaOH:

1. Το ομογενοποίηση αρχικά αραιώνεται σε 1/10 (100μl ομογενοποιήματος + 900μl NaOH). Το διάλυμα αυτό αραιώνεται στη συνέχεια (E_1 αραιώση) σε 1/20 προσθέτοντας 50μl αρχικού διαλύματος σε 50μl NaOH.

2. Ακολουθεί δεύτερη αραιώση (E_2) σε 1/50 προσθέτοντας 20μl από το αρχικό αραιωμένο ομογενοποίηση σε 80μl NaOH.

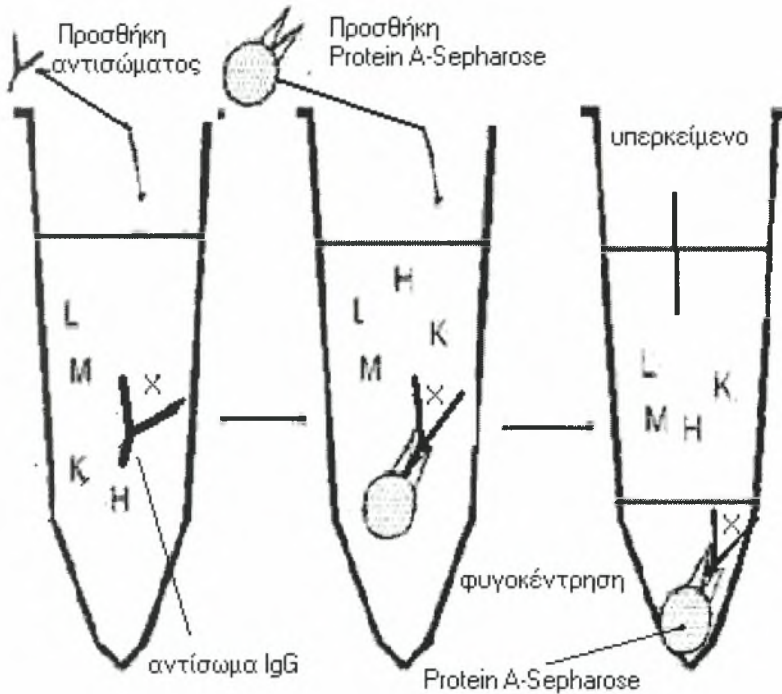
3. Στην E_3 αραιώση 10μl του αρχικού αραιωμένου ομογενοποιήματος αραιώνονται σε 1/100 μέσα σε 90μl διαλύματος NaOH.

4. Στην E_4 αραιώση το ομογενοποίηση αραιώνεται 1/1000 με την προσθήκη 1μl σε 99μl NaOH.

Για τη μέτρηση των πρωτεϊνών προσθέτουμε εις διπλούν σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 100μl από την κάθε αραιώση (E_1 - E_4).

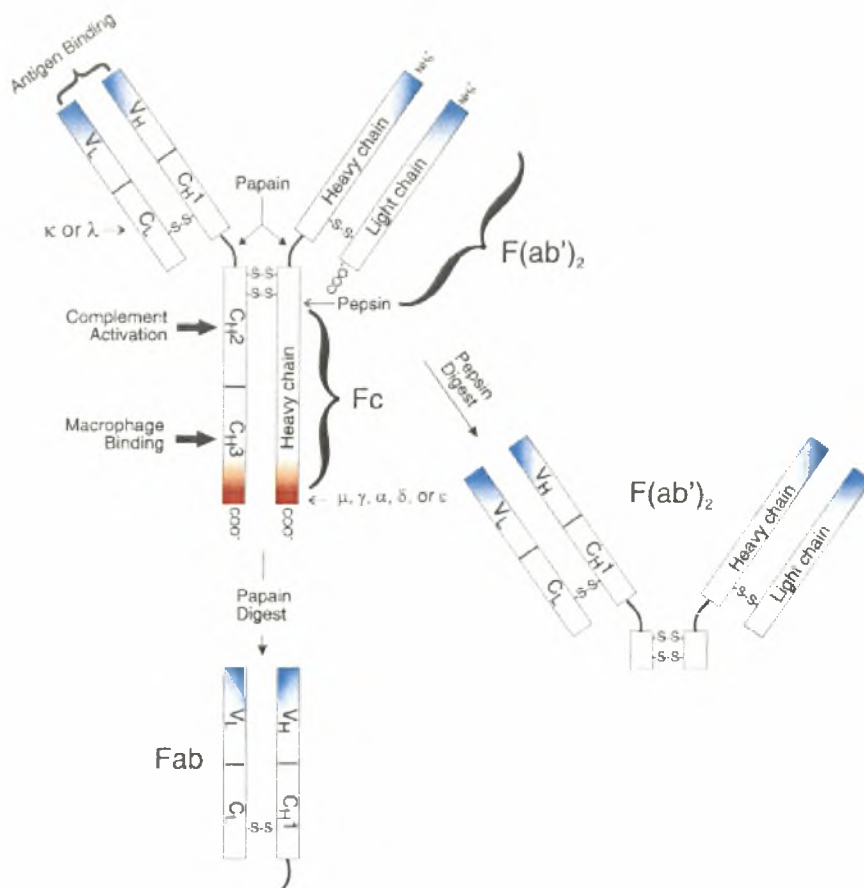
■ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

Η ανοσοκατακρήμνιση αποτελεί μια διαδικασία κατά την οποία πεπτίδια ή πρωτεΐνες που αντιδρούν ειδικά μ' ένα αντίσωμα απομακρύνονται από ένα διάλυμα και εξετάζονται περαιτέρω, πχ για προσδιορισμό της αλληλουχίας της πρωτεΐνης, του μοριακού της βάρους, του ισοηλεκτρικού της σημείου κ.α. Η απομάκρυνση γίνεται με την εισαγωγή μιας αδιάλυτης πρωτεΐνης (Protein A ή Protein G) που συνδέεται ειδικά στο αντίσωμα. Η αδιάλυτη πρωτεΐνη έχει την ικανότητα της ειδικής σύνδεσης στις Fc περιοχές των ανοσοσφαιρινών πολλών θηλαστικών. Ένα μόριο πρωτεΐνης A, δηλαδή της πρωτεΐνης που προέρχεται από ένα στέλεχος του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*, βρίσκεται ακινητοποιημένο σε Sepharose μέσω της CNBr μεθόδου ενεργοποίησης. Ένα μόριο protein A-Sepharose έχει την ικανότητα δέσμευσης δύο μορίων IgG. Αποτελεί ένα πανίσχυρο εργαλείο και έχει χρησιμοποιηθεί για να απομονώσει και να καθαρίσει κλάσεις (μερικές IgM και IgA), υποκλάσεις και τμήματα των ανοσοσφαιρινών από βιολογικά υγρά και μέσα καλλιέργειας κυττάρων.



Εικόνα 2.2. Σχηματική αναπαράσταση της βασικής αρχής της ανοσοκατακρήμνισης.

Σ' ένα μίγμα πρωτεϊνών (L, M, K, H, X) προστίθεται αντίσωμα που αναγνωρίζει και δεσμεύει την πρωτεΐνη X. Εν συνεχεία, προστίθεται η protein A-Sepharose, στην επιφάνεια της οποίας δεσμεύεται το αντίσωμα. Έπειτα από φυγοκέντρωση, το ανοσοσύμπλοκο πρωτεΐνη X-αντίσωμα-protein A-Sepharose κατακρημνίζεται στο πάτο του σωλήνα ως ίζημα.



Εικόνα 2.3. Γενική άποψη της δομής των διαφόρων τάξεων των ανοσοσφαιρινών.

Κάθε αντίσωμα αποτελείται από δύο ελαφριές και δύο βαριές αλυσίδες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Κάθε μία από τις διάφορες κλάσεις τους χαρακτηρίζεται από διαφορετική περιοχή (κ ή λ) ή αλυσίδα (μ, γ, α, δ, ή ε). Μετά από πέψη τους με πεψίνη ή παπαΐνη προκύπτουν τα τμήματα Fab ή F(ab')₂ και Fc. Η protein A-Sepharose συνδέεται στην Fc περιοχή των αντισωμάτων, οπότε η F(ab')₂ περιοχή είναι ελεύθερη για τη σύνδεση του αντιγόνου. Στην παραπάνω εικόνα διακρίνονται και οι θέσεις δέσμευσης του αντιγόνου και των μακροφάγων κυττάρων. 3 mg protein A-Sepharose έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν 20mg ανθρώπινης IgG ανά ml μέσου.

Πειραματική διαδικασία ανοσοκατακρήμνισης

1. 100ml ομογενοποιημάτων (2mg πρωτεϊνών) αναμιγνύονται με 2 ml ενός ρυθμιστικού διαλύματος αποδιάταξης που περιέχει Tris 10mM pH 7.4, SDS 1% και β-μερκαπτοαιθανόλη 10%.

5ml διαλύματος παρασκευάζονται ως εξής :

- 250μl Tris 200mM pH 7.4.
- 500μl SDS 10%.
- 500μl β-μερκαπτοαιθανόλη 100(v/v).
- 3750μl δις απεσταγμένο H₂O.

2. Ακολουθεί βράσιμο στους 100°C για 5min. Επέρχεται μετουσίωση των πρωτεϊνών.
3. Το παραπάνω διάλυμα προεπωάζεται 1h στους 4°C με ανακίνηση παρουσία protein A-Sepharose CL-4B διαλυμένη στο 50% (σε 100μl δις απεσταγμένο H₂O διαλύονται 0.01gr protein A). Για κάθε 500μl (500μgr πρωτεϊνών) προστίθενται 30μl protein A-Sepharose..
4. Μετά την επώαση, το δείγμα φυγοκεντρείται 1min στα 10000g στους 4°C. Η πρωτεΐνη A-Sepharose κατακρημνίζεται ως ίζημα στον πάτο του errendorf με ό,τι μη ειδικό έχει πιθανώς δεσμεύσει.
5. Το υπερκείμενο (500μl) τοποθετείται σε errendorf, όπου επώάζεται με 5-10μl πολυκλωνικού αντισώματος αντι-5HT-moduline ή με 5-10μl προ-άνοσου ορού, μέσα σε 1ml ρυθμιστικού διαλύματος ανοσοκατακρήμνισης τελικής συγκέντρωσης: Tris 150mM pH 7.4, NaCl 225mM, EDTA 0.2mM, PMSF 0.2mM, IGEPAL CA-630 0,5% v/v. Η επώαση διαρκεί όλη τη νύχτα στους 4°C υπό ανακίνηση. Το ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης παρασκευάζεται ως εξής:

| |
|-----------------------------|
| 250μl Tris 200 mM |
| 750μl NaCl 1,5 M |
| 15μl EDTA 0.5 M |
| 15μl PMSF 0.1 M |
| 75μl IGEPAL CA-630 100% v/v |
| 3895μl H ₂ O |

6. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα (1,5ml) προστίθενται 30μl protein A-Sepharose και επώζονται 1h στους 4°C με ανακίνηση. Το αντίσωμα δεσμεύεται πάνω στην protein A-Sepharose.
7. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 10000g για 1min στους 4°C. Το πολυκλωνικό αντίσωμα ενάντια στο LSAL και τα αντισώματα του προάνοσου ορού κατακρημνίζονται ως ίζημα.
8. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, ενώ το ίζημα ξεπλένεται 2 φορές με 1ml διαλύματος Tris-Tween (Tris 10mM pH 7.4, Tween 20 0,1% v/v) και μια φορά με 1ml διαλύματος Tris 10mM pH 7.4. Για την παρασκευή 5ml καθενός από τα παραπάνω διαλύματα απαιτούνται:

Tris-Tween

- 250μl Tris 200mM pH 7.4.
- 50μl Tween 20, 10%(v/v).
- 4700μl δις απεσταγμένο H₂O.

Tris

- 250μl Tris 200mM pH 7.4.
- 4750μl H₂O.

9. Με τα διαδοχικά ξεπλύματα απομακρύνεται από το διάλυμα έπειτα από φυγοκέντριση (10000g, 1min, 4°C) οτιδήποτε δεν έχει δεσμευτεί πάνω στην protein A.
10. Στο ίζημα προστίθενται 25μl ενός διαλύματος ηλεκτροφόρησης (loading buffer) που αποτελείται από Tris 50mM pH 7.4, SDS 2%, γλυκερόλης 10%, μπλε της βρωμοφαινόλης 0,01% και β-μερκαπτοαιθανόλης 10%.
Για την παρασκευή 1ml loading buffer χρησιμοποιούνται:
 - 250μl Tris 200mM pH 7.4
 - 200μl SDS 10%(w/v)
 - 100μl γλυκερόλη 100% (v/v)
 - 100μl μπλε της βρωμοφαινόλης 0,1% (w/v)
 - 100μl β-μερκαπτοαιθανόλη 100% (v/v)
 - 250μl δις απιονισμένο H₂O
11. Τα δείγματα βράζουν για 5min στους 100°C. Οι ανοσοσφαιρίνες αποδεσμεύονται από την πρωτεΐνη A-Sepharose, όπως επίσης αποδεσμεύονται και οι πρωτεΐνες που έχουν αυτές δεσμεύσει.
12. Ακολουθεί φυγοκέντριση των δειγμάτων στα 10000g για 1min στους 4°C. Το υπερκείμενο (20μl) φορτώνεται σε πηκτή πολυακρυλαμιδης και υπόκειται σε ηλεκτροφόρηση (100mV, 2h), ενώ το ίζημα που περιέχει την πρωτεΐνη A-Sepharose απομακρύνεται..

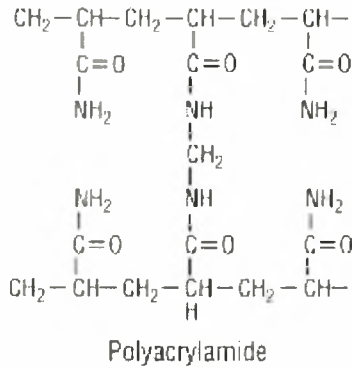
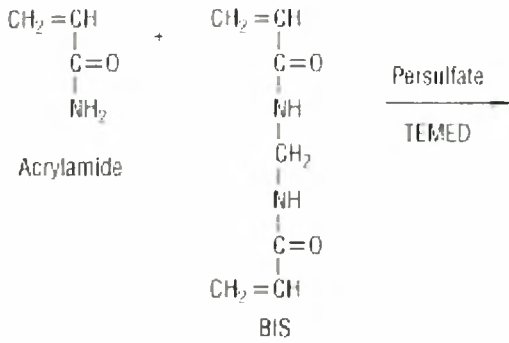
■ SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

A) Βασικές αρχές της ηλεκτροφόρησης

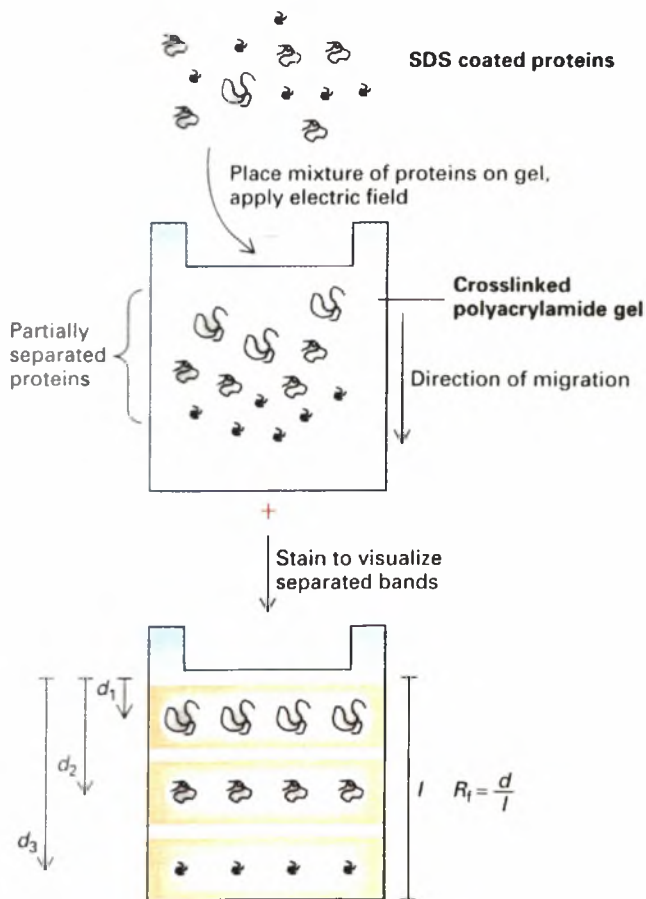
Πραγματοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μέγεθός τους. Οι πρωτεΐνες αρχικά φορτίζονται αρνητικά με τη χρήση του SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (δωδεκυλο-θειικό νάτριο) $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_2\text{O-SO}_3^-]\text{Na}^+$. Αυτό αποτελεί ένα ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο επιπλέον διασπά κάθε δεσμό υδρογόνου και μπλοκάρει πολλές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνικών υπομονάδων. Μ' αυτόν τον τρόπο ξεδιπλώνει τα πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία χάνουν τη δευτεροταγή, τριτοταγή ή τεταρτοταγή τους διαμόρφωση και γίνονται γραμμικά. Οι περισσότερες πρωτεΐνες συνδέουν SDS με την ίδια συγγένεια (1,4gr SDS/gr πρωτεΐνης). Ένα μόριο SDS συνδέεται σε κάθε δύο αμινοξέα.

Στην συνέχεια οι πρωτεΐνες εισάγονται σε μια πηκτή πολυακρυλαμιδίου και κινούνται διαμέσου των πόρων της προς την άνοδο, λόγω της εφαρμογής δυναμικού. Μια πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από την πηκτή διαχωρισμού (Resolving gel) και την πηκτή επιστοιβαξης (Stacking gel) με τη διαφορά ότι η πρώτη διαθέτει μικρότερο μέγεθος πόρων και διαχωρίζει τις πρωτεΐνες σύμφωνα με το μοριακό τους μέγεθος, ενώ η δεύτερη με μεγαλύτερο μέγεθος πόρων συγκεντρώνει κατά μήκος της όλες τις πρωτεΐνες. Χημικά η πηκτή δημιουργείται από το αποτέλεσμα συμπολυμερισμού μονομερών ακρυλαμιδίου με N,N' μεθυλένο-δισ ακρυλαμίδιο. Αυτά τα δύο αντιδραστήρια πολυμερίζονται εύκολα με την

προσθήκη ενός συστήματος που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες. Η ουσία που προκαλεί τη δημιουργία των ελεύθερων ριζών είναι το υπερθειικό αμμώνιο (APS), το οποίο προστίθεται μαζί με τον καταλύτη, N,N' τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) που καταλύει την διάδοση των ελεύθερων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού.



Εικόνα 2.4. Πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου με τη βοήθεια του TEMED και του APS.



Εικόνα 2.5. SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες αρχικά φορτίζονται αρνητικά με τη χρήση του SDS και αφού αποκτήσουν γραμμική μορφή εισάγονται σε μια πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου εκεί με την εφαρμογή δυναμικού κινούνται προς την άνοδο. Μεγαλύτερες σε μέγεθος πρωτεΐνες διανύουν μικρότερη απόσταση απ' ότι μικρότερες. Οι ζώνες γίνονται ορατές μετά από χρώση του gel με κάποια χρωστική.

B) Πειραματική Διαδικασία Ηλεκτροφόρησης

1. Ετοιμάζεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης.
2. Ετοιμάζεται η Resolving (10ml) και η Stacking solution (5ml) για πηκτική διαστάσεων 10x10cm.

| Resolving gel | Για 10ml | 20ml | 30ml | 40ml | 50ml |
|----------------------------|----------|-------|---------|---------|--------|
| 1) H ₂ O | 4.6ml | 9.3ml | 13.9ml | 18,5ml | 23.2ml |
| 2) Acrylamide mix 30% | 2.7ml | 5.3ml | 8ml | 10.7ml | 13.3ml |
| 3) Tris 1.5M pH 8.8 | 2.5ml | 5ml | 7.5ml | 10ml | 12.5ml |
| 4) SDS 10% | 100μl | 0.2ml | 0.3ml | 0.4ml | 0.5ml |
| 5) Ammonium persulfate 10% | 100μl | 0.2ml | 0.3ml | 0.4ml | 0.5ml |
| 6) TEMED | 6μl | 12μl | 0.018ml | 0.024ml | 0.03ml |

| Stacking gel | Για 1ml | 2ml | 3ml | 5ml | 10ml |
|----------------------------|---------|---------|-------|-------|--------|
| 1) H ₂ O | 0.68ml | 1.4ml | 2.1ml | 3.4ml | 6.8ml |
| 2) Acrylamide mix 30% | 0.17ml | 0.33ml | 500μl | 830μl | 1.7ml |
| 3) Tris 1M pH 6.8 | 0.13ml | 0.25ml | 380μl | 630μl | 1.25ml |
| 4) SDS 10% | 0.01ml | 0.02ml | 30μl | 50μl | 0.1ml |
| 5) Ammonium persulfate 10% | 0.01ml | 0.02ml | 30μl | 50μl | 0.1ml |
| 6) TEMED | 0.001ml | 0.002ml | 3μl | 5μl | 0.01ml |

3. Παρασκευή διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροφόρηση.

Διάλυμα ακρυλαμίδης 30%. Ετοιμάζεται 30% διάλυμα ακρυλαμίδης ζυγίζοντας 29gr σκόνης ακρυλαμίδης και 1gr σκόνης του αντιδραστηρίου N,N'-μεθυλενο-δισ ακρυλαμίδιο. Το μίγμα διαλύεται σε 60ml απιονισμένου H₂O, διηθείται και συμπληρώνεται H₂O μέχρι τα 100ml.

Tris 1.5M pH 8,8. Ετοιμάζεται ρυθμιστικό διάλυμα Tris 1,5M pH 8,8 (5,449gr Tris σε 30ml H₂O).

SDS 10%. Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος SDS 10%(w/v) διαλύονται 10gr SDS σε 90ml H₂O. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 70° C και το pH ρυθμίζεται με σταγόνες HCl στο 7.2.

APS. Το υπερθειικό αμμώνιο φτιάχνεται κάθε εβδομάδα ζυγίζοντας 0.1gr APS τα οποία διαλύονται σε 1ml H₂O. Το υπερθειικό αμμώνιο και το TEMED (Sigma) προστίθενται πάντα τελευταία για να αρχίσει ο πολυμερισμός.

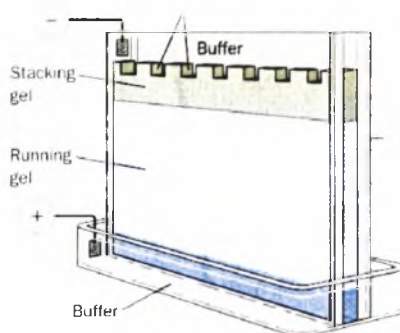
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris(25mM)-γλυκίνης(250mM). Για την παρασκευή 1lt διαλύματος απαιτούνται:

- 3gr Tris base
- 18,8gr γλυκίνη
- 10ml SDS 10%

Συμπληρώνεται με δις απεσταγμένο H₂O μέχρι το 1lt και το pH ρυθμίζεται στο 8.3.

4. Τα διαλύματα προστίθενται με τη σειρά που αναφέρονται το καθένα στον πίνακα.

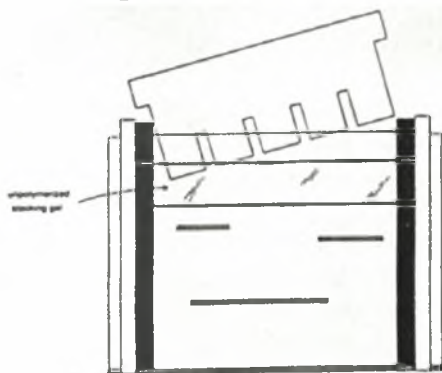
5. Πρώτα τοποθετείται η Resolving solution (30min επώαση) και έπειτα η Stacking solution (30min επώαση).



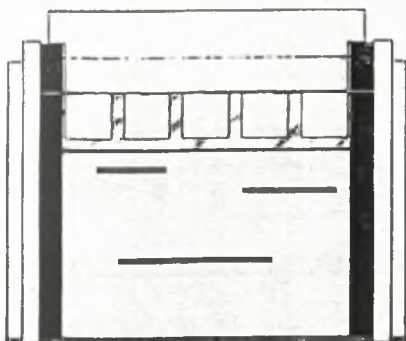
Εικόνα 2.6. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης.

6. Προστίθεται ισοπροπανόλη για την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων.

7. Ετοιμάζεται η Stacking solution τελικού όγκου 5ml σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα.



8. Προσθέτουμε μια ειδική χτένα με 5 ή 10 προεξοχές απ' τις οποίες θα προκύψουν τα "πηγαδάκια" μέσα στα οποία θα φορτωθούν τα δείγματα και ο μάρτυρας.



Εικόνα 2.7. Η εισαγωγή της χτένας στο Stacking gel πριν τον πολυμερισμό του.

9. Τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης η Stacking solution.

10. Επώαση 30min σε θερμοκρασία δωματίου.

Σαν μάρτυρας προσδιορισμού μοριακού βάρους (MB) χρησιμοποιείται ο Rainbow (RPN 800 ή εναλλακτικά RPN 756).

Οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορούνται στα 100mV για 2-2.30h με ηλεκτρική αντίσταση ~30-40 mA.

Το gel βάφεται με Silver staining ακολουθώντας τα βήματα που περιγράφονται παρακάτω.

■ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ SILVER STAINING (HELMUT BLUM, HILDBERG BETER, HANS J CROSS, 1986)

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 κορύνεται 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.

| SILVER STAINING | | |
|--------------------|--|--|
| 1). FIX 100ml | 50ml Methanol 12ml Acetic Acid 50μl HCOH 37% 38μl H ₂ O | Όλη τη νύκτα στους 4°C ή εναλλακτικά 2h σε θερμοκρασία δωματίου. |
| 2). WASH 300ml | 150ml Ethanol 150ml H ₂ O | 3x100mlx20min |
| 3). PRETREAT 100ml | 0.02gr Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O 100ml H ₂ O | 1min |
| 4). RINSE | H ₂ O | 3x20sec |
| 5). IMPREGNATE | 0.2gr AgNO ₃ 74μl HCOH 100ml H ₂ O | 20min |
| 6). RINSE | H ₂ O | 2x2min |
| 7). DEVELOP 100ml | 7.072gr Na ₂ CO ₃ 50μl HCOH 37% 0.4mg Na ₂ SO ₃ ·5H ₂ O 100ml H ₂ O | Μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες. |
| 8). RINSE | H ₂ O | 2x2min |
| 9). STOP 100ml | 50ml Methanol 12ml Acetic Acid 38ml H ₂ O | 10min |
| 10). WASH | 50ml Methanol 50ml H ₂ O | Μπορεί να κρατηθεί αρκετό καιρό στους 4°C. |

Εναλλακτικά χρησιμοποιήσαμε χρώση με το kit silver Stain της εταιρίας Pierce το οποίο περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια.

- 1) Η πηκτή τοποθετείται σε τριβλίο που περιέχει το διάλυμα FIX (50% αιθανόλη, 5% οξικό-οξύ, 45% δις απιονισμένο H₂O) για 1-2h με ανακίνηση.
- 2) Η πηκτή ξεπλένεται με 100ml δις απιονισμένο H₂O 4 φορές από 45min.
- 3) Έπειτα τοποθετείται σε 100μl Silver Working solution, αραιώνοντας 6.67ml σε 93.3ml H₂O για 20min με ανακίνηση.
- 4) Κατόπιν ετοιμάζεται ένα μίγμα τελικού όγκου 100ml από τα διαλύματα Reducer Aldehyde Working Solution και Reducer base Working solution, διαλύοντας 6.65ml από το καθένα σε 86.705ml δις απιονισμένου νερό. Η πηκτή ανακινείται παρουσία του παραπάνω μίγματος για 9-10min.
- 5) Τέλος η πηκτή τοποθετείται για 1-2h σε Stabilizer base Working solution, για το οποίο 2,22ml διαλύματος διαλύονται σε 97.78ml δις απεσταγμένου H₂O. Η χρώση Silver αποκτά τη μέγιστη ευαισθησία στο τελευταίο αυτό διάλυμα. Η πηκτή διατηρείται σε διάλυμα μεθανόλης/δις απεσταγμένο νερό για αρκετό καιρό.

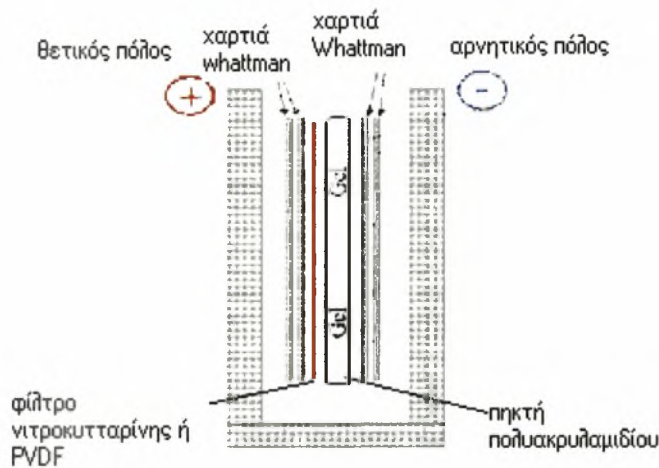
■ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ή ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ WESTERN (WESTERN BLOTTING)

Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την ηλεκτρομεταφορά και αποτύπωση των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών από μια πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μια πορώδη μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης ή PVDF). Εν συνεχεία, η μεμβράνη επώαζεται με αντίσωμα που αναγνωρίζει και δεσμεύει μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζεται και συνδέεται με δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με κάποιο ένζυμο (πχ. υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση), το οποίο όταν επωαστεί με το κατάλληλο υπόστρωμα εκπέμπει ακτινοβολία που κάνει ορατή τη ζώνη που ενδιαφέρει.

1. Μετά το τέλος της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης το gel τοποθετείται για 10 min σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (buffer transfer) που περιέχει Tris 25mM, γλυκίνη 190mM και μεθανόλη 14,5% (όταν χρησιμοποιούνται μεμβράνες PVDF ή 20% όταν χρησιμοποιούνται μεμβράνες νιτροκυτταρίνης ECL). Για την παρασκευή 1,5lt διαλύματος με pH 8.3 και σε θερμοκρασία 4°C χρησιμοποιούνται:
 - 4.5gr Tris base
 - 21.3gr γλυκίνη
 - 217.5ml μεθανόλη 100% και
 - 1282ml H₂O
2. Η κάθε μεμβράνη που χρησιμοποιείται (PVDF ή νιτροκυτταρίνη) χρειάζεται προηγουμένως μια σωστή επεξεργασία. Η μεμβράνη PVDF κόβεται σε διαστάσεις ίδιες μ' αυτές της πηκτής και στη συνέχεια βυθίζεται 1-3sec σε μεθανόλη 100% (μέχρι να γίνει από άσπρη γκρι) και στη συνέχεια στο H₂O 1-2min. Κατόπιν εμποτίζεται στο διάλυμα

της ηλεκτρο-μεταφοράς για 5min. Όταν χρησιμοποιείται μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμποτίζεται 5min σε H₂O και 5min στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτρο-μεταφοράς.

3. Κόβονται 6 χαρτιά Whattman 3MM με διαστάσεις ίδιες μ' αυτές του gel και επωάζονται στο ειδικό διάλυμα ηλεκτρο-μεταφοράς για 10min.
4. Τρία χαρτιά Whattman τοποθετούνται προς το θετικό πόλο σε πλήρη αντιστοιχία μεταξύ τους. Ακολουθεί η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η πηκτή πολυακρυλαμίδης και άλλα τρία χαρτιά Whattman.



Εικόνα 2.8. Διάταξη των στοιχείων της ηλεκτρομεταφοράς. Πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή ώστε η μεμβράνη να βρίσκεται προς το θετικό πόλο, ώστε οι αρνητικά φορτισμένες με SDSπρωτεΐνες να μεταφερθούν προς αυτήν.

Για την αποφυγή φυσαλίδων οι οποίες θα επηρεάσουν την μεταφορά των πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται μια γυάλινη πιπέτα pasteur, συμπιέζοντας κατά μήκος τα διάφορα στρώματα.

5. Η συσκευή ηλεκτρομεταφοράς τοποθετείται στους 4°C στο ψυγείο, και στη βάση της ένας μαγνητικός αναδευτήρας για να εμποδίζει την καθίζηση της γλυκίνης κατά τη διάρκεια της μεταφοράς.
6. Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από την πηκτή προς τη μεμβράνη για 2,5h στα 400mA.
7. Μετά το τέλος της ηλεκτρο-μεταφοράς, η πηκτή βάφεται με Silver staining για να ελεγχθεί το ποσοστό μεταφοράς, ενώ η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μεταφέρεται σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS-blotto 1x για 1,5-2h. Για την παρασκευή 50ml διαλύματος απαιτούνται:
 - 5ml PBS 10x.
 - 2,5 gr άπαχο γάλα σε σκόνη.
 - 45ml δις απεσταγμένο H₂O.
8. Καθώς η μεμβράνη επωάζεται στο PBS-blotto, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με ήπια ανακίνηση, η αλβουμίνη του γάλακτος συνδέεται με τις πρωτεΐνες της μεμβράνης και μ' αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η τυχαία σύνδεση του αντισώματος σε περιοχές πρωτεϊνών που σε αντίθετη περίπτωση θα έδιναν θετικά εσφαλμένα αποτελέσματα.

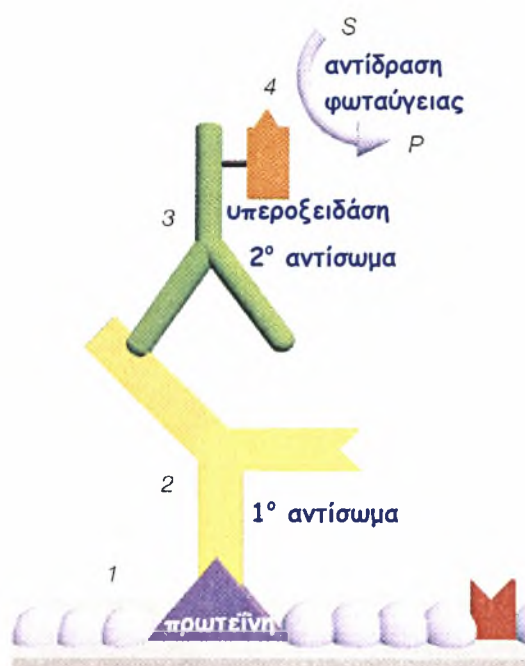
9. Η μεμβράνη τέλος επωάζεται όλη τη νύχτα με 5-10μl αντισώματος αντι-5HT-moduline παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1x και Tween 20 0.01%. Για την παρασκευή 20ml του παραπάνω διαλύματος απαιτούνται:
- 18ml δις απιονισμένο H₂O.
 - 2ml PBS 10x.
 - 20μl Tween 20 10% (v/v).
 - 5-10μl ορό προάνοσο.
10. Μια δεύτερη ακριβώς όμοια μεμβράνη επωάζεται όλη τη νύχτα με 5-10μl μη ανοσοποιημένου από το LSAL ορού παρουσία ρυθμιστικού διάλυμα PBS 1x και Tween 20 0.01%. Για την παρασκευή 20ml διαλύματος χρησιμοποιούνται κατά σειρά:
- 18ml δις απιονισμένο H₂O.
 - 2ml PBS 10x.
 - 20μl Tween 20 10% (v/v).
 - 5-10μl ορός προάνοσος.
11. Το αντίσωμα έναντι στο LSAL και τα αντισώματα του προάνοσου ορού καταλαμβάνουν τις ειδικές θέσεις σύνδεσης εκτοπίζοντας από αυτές τα μόρια της αλβουμίνης.
12. Οι δυο μεμβράνες ξεπλένονται 3 φορές για 10min με 250ml διαλύματος PBS-Tween (PBS 1x, Tween 20 0.1% v/v) σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση. Για την παρασκευή 750ml χρησιμοποιούνται:
- 75ml PBS 10x
 - 750ml Tween 20 100% (v/v) και
 - 675ml H₂O
13. Στη συνέχεια ξεπλένονται 3 φορές από 5min σε 250ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS 1x. Για την παρασκευή 750ml ρυθμιστικού χρησιμοποιούνται:
- 75ml PBS 10x
 - 675ml H₂O
14. Τοποθετούνται σε 100ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS-blotto (PBS 1x) για 1.30h με ήπια ανακίνηση. Για την παρασκευή 100ml ρυθμιστικού απαιτούνται:
- 10ml PBS 10x.
 - 5gr άπαχο γάλα σε σκόνη.
 - 90ml δις απεσταγμένο H₂O.
15. Οι δυο μεμβράνες ξεπλένονται σε 250ml PBS 1x για 5min, για την παρασκευή του οποίου χρησιμοποιούνται 25ml PBS 10x και 275ml H₂O.
16. Στη συνέχεια οι μεμβράνες επωάζονται 1h με 1μl αντισώματος κατσίκας ενάντια στις ανοσοσφαιρίνες IgG κουνελιού, συζευγμένο με υπεροξειδάση.

17. Οι μεμβράνες ξεπλένονται 1 φορά από 15min και 4 φορές από 5min με 250ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS-Tween (PBS 1x, Tween 20 0.1% v/v) σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση. Για την παρασκευή 750ml χρησιμοποιούνται:

- 75ml PBS 10x
- 750ml Tween 20 100%(v/v) και
- 675ml H₂O

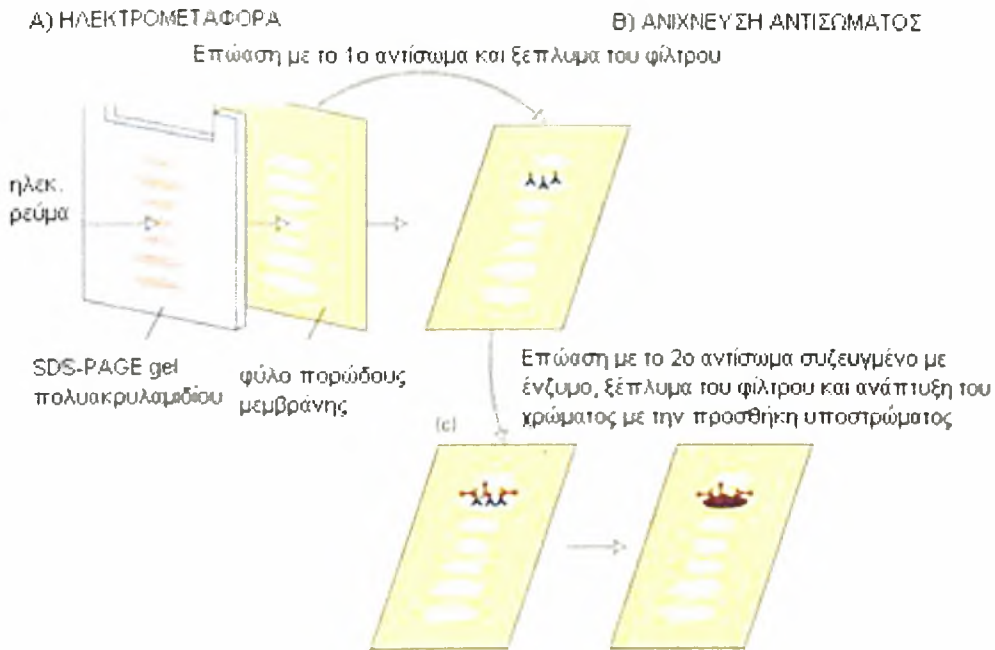
18. **ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ.** Η ανίχνευση γίνεται με το σύστημα χημειοφωταύγειας ECL (Amersham) ως εξής: Αναμιγνύουμε ίσους όγκους από το διάλυμα ανίχνευσης 1 και το διάλυμα ανίχνευσης 2 ώστε να είναι αρκετό για να καλύψει τις μεμβράνες, οι οποίες βρίσκονται σε ένα κομμάτι SaranWrap. Επιάζουμε για 1min σε θερμοκρασία δωματίου.

19.



Εικόνα 2.9. Στην πρωτεΐνη που βρίσκεται πάνω στη μεμβράνη (1) συνδέεται το 1° αντίσωμα ενάντια στην LSAL (2). Στη συνέχεια επιάζουμε με 2° αντίσωμα ενάντια στις ανοσοσφαιρίνες του κουνελιού, το οποίο είναι συνδεδεμένο με μια υπεροξειδάση (3). Παρουσία λουμινόλης και κατάλληλες συνθήκες, η υπεροξειδάση οξειδώνεται και εκπέμπει φως (4).

20. Απομακρύνεται το υγρό από τις μεμβράνες. Στη συνέχεια οι μεμβράνες τοποθετούνται στο phospho-imager, όπου και ανιχνεύεται το φωτεινό σήμα..



Εικόνα 2.10. Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη και ανίχνευση της ζώνης που ενδιαφέρει με διαδοχική επώαση της μεμβράνης με δύο αντισώματα εκ των οποίων το δεύτερο είναι συζευγμένο με κάποιο ένζυμο. Όταν προστίθεται το κατάλληλο υπόστρωμα για το ένζυμο εκπέμπεται ακτινοβολία.

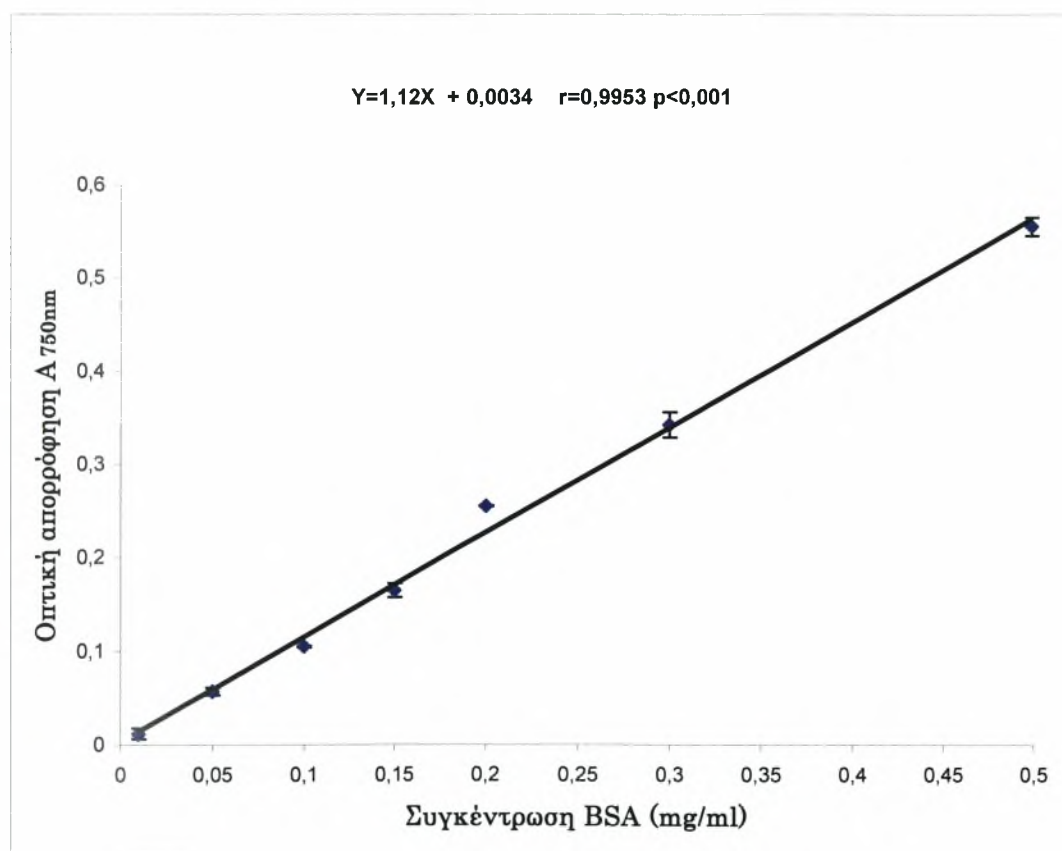
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

■ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ BSA ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΓΝΩΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ

Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναληπτικές μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης διαλυμάτων BSA γνωστής συγκέντρωσης (0.01-0.5mg/ml) σε μήκος κύματος 750nm, από τον μέσο όρο των οποίων κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Πίνακας 3.1. Δεδομένα μετρήσεων οπτικής απορρόφησης διαλυμάτων BSA.

| C_{BSA} (mg/ml) | 1 ^η μέτρηση $A_{750\text{nm}}$ | 2 ^η μέτρηση $A_{750\text{nm}}$ | Μέση τιμή | Τυπική απόκλιση |
|-------------------|--|--|-----------|--------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.01 | 0.0158 | 0.0078 | 0.0118 | 0.005657 |
| 0.05 | 0.054 | 0.0597 | 0.05685 | 0.004031 |
| 0.1 | 0.1043 | 0.1058 | 0.10505 | 0.001061 |
| 0.15 | 0.1597 | 0.1704 | 0.16505 | 0.007566 |
| 0.2 | 0.2558 | 0.2545 | 0.25515 | 0.000919 |
| 0.3 | 0.3518 | 0.3325 | 0.34215 | 0.013647 |
| 0.5 | 0.5618 | 0.5481 | 0.55495 | 0.009687 |



Οι μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων E₁-E₄ που επέστησαν διαδοχικές αραιώσεις αναφέρονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.2. Μετρήσεις οπτικής απορρόφησης αραιωμένων δειγμάτων

| Δείγμα | 1 ^η μέτρηση A ₇₅₀ nm | 2 ^η μέτρηση A ₇₅₀ nm | Μέση τιμή |
|----------------|--|--|-----------|
| E ₄ | 0.0563 | 0.1072 | 0.08175 |
| E ₃ | 0.2634 | 0.2628 | 0.2631 |
| E ₂ | 0.4417 | 0.4516 | 0.44665 |
| E ₁ | 0.7526 | 0.7296 | 0.7411 |

Υπολογισμός συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του δείγματος

Η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς έχει την μορφή $y=ax + b$. Όπου x η συγκέντρωση σε mg/ml και y η απορροφητικότητα στα 750nm.

Αντικαθιστώντας στην εξίσωση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς $Y= 1.12x+ 0.034$, όπου y καθεμία από τη μέση τιμή που αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα υπολογίζεται η τιμή του x. Για την εύρεση της συγκέντρωσης στο αρχικό δείγμα πολλαπλασιάζεται η τιμή του x με τον αριθμό των αραιώσεων που πραγματοποιήθηκαν για κάθε δείγμα. Έτσι για καθένα από τα E₁-E₄ διαμορφώνονται τα παρακάτω αποτελέσματα.

Από τις τέσσερις τιμές που θα προκύψουν λαμβάνεται ο μέσος όρος των τιμών των οποίων η απορροφητικότητα βρίσκεται στο μέσον περίπου της καμπύλης

Πίνακας 3.3. Υπολογισμός της αρχικής συγκέντρωσης σε κάθε αραιώση.

| Δείγμα | Τιμή y | Τιμή x | Τιμή x × αριθμό αραιώσεων | Αρχική Συγκέντρωση (mg/ml) |
|----------------|---------|--------|---------------------------|----------------------------|
| E ₄ | 0.08175 | 0.07 | 0.07×10×10×2 | 14 |
| E ₃ | 0.2631 | 0.23 | 0.23×10×10 | 23 |
| E ₂ | 0.44665 | 0.4 | 0.4×10×5 | 20 |
| E ₁ | 0.7411 | 0.66 | 0.66×10×2 | 13.2 |

Παρατηρώντας την πρότυπη καμπύλης αναφοράς και σύμφωνα με τον πίνακα 2 συμπεραίνεται ότι οι τιμές απορρόφησης των E₃ και E₄ αντιστοιχούν στο μέσον περίπου της καμπύλης. Από τον μέσο όρο των τιμών της αρχικής συγκέντρωσης των δύο αυτών δειγμάτων υπολογίζεται προσεγγιστικά σε 20 mgr/ml η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος.

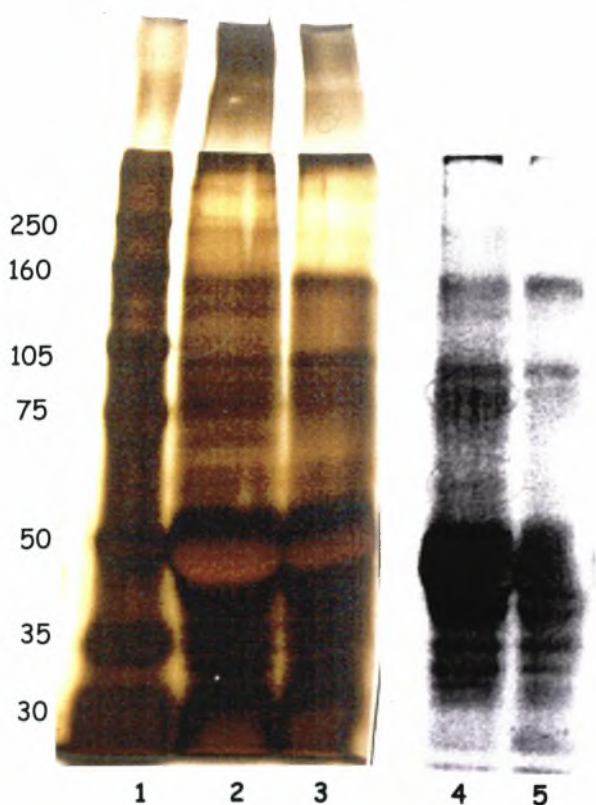
Παρατηρώντας την πρότυπη καμπύλης αναφοράς και σύμφωνα με τον πίνακα 2 συμπεραίνεται ότι οι τιμές απορρόφησης των E₃ και E₄ αντιστοιχούν στο μέσον περίπου της καμπύλης. Από τον μέσο όρο των τιμών της αρχικής συγκέντρωσης των δύο αυτών δειγμάτων υπολογίζεται προσεγγιστικά σε 20 mgr/ml η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος.

■ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

Αρχικά ομογενοποιήθηκε ένας εγκεφαλικός φλοιός αρουραίου Wistar και το υπερκείμενο κλασματοποιήθηκε ανά 100μl και αποθηκεύτηκε στους -20°C . Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών μετρήθηκε κατά Lowry και βρέθηκε ότι 100μl ομογενοποιημάτος περιέχουν 1.5mg πρωτεϊνών.

Στη συνέχεια, 200 μl ομογενοποιημάτος διαλύθηκαν σε 2,5 ml αποδιατακτικού διαλύματος, έβρασαν για 5min στους 100°C και επώαστηκαν παρουσία Protein A-Sepharose στους 4°C για 1h (540μl -300μg prot. ομογενοποιημάτος + 50μl Protein A-Sepharose διαλυμένη στο 50%). Ακολούθησε φυγοκέντριση για 5min στα 500g στους 4°C και το υπερκείμενο παρουσία διαλύματος ανοσοκατακρήμνησης επώαστηκε με το αντισωμα anti-5-HT-moduline ή προ-άνοσο ορό, όλη τη νύκτα στους 4°C με ανακίνηση παρουσία (5μl αντισώματος ανά 500μl-300μg prot. ομογενοποιημάτος+1ml διαλύματος ανοσοκατακρήμνησης).

Τα δείγματα στη συνέχεια επώαστηκαν 1h στους 4°C με ανακίνηση παρουσία 50μl protein A-Sepharose. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 5min στους 4°C στα 500g και τα ιζήματα ξεπλύθηκαν διαδοχικά δυο φορές με Tris-Tween και μια φορά με διάλυμα Tris. Στα ιζήματα προστέθηκαν 25μl loading buffer και φορτώθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 20μl από κάθε δείγμα. Η πηκτή χωρίστηκε στα δύο. Το ένα τμήμα βάφθηκε με χρώση Silver ενώ στο άλλο πραγματοποιήθηκε ηλεκτρομεταφορά για 2h στα 380mA. Η επώαση της μεμβράνης έγινε με 5μl αντισώματος anti-5HT-moduline overnight στους 4°C . Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.

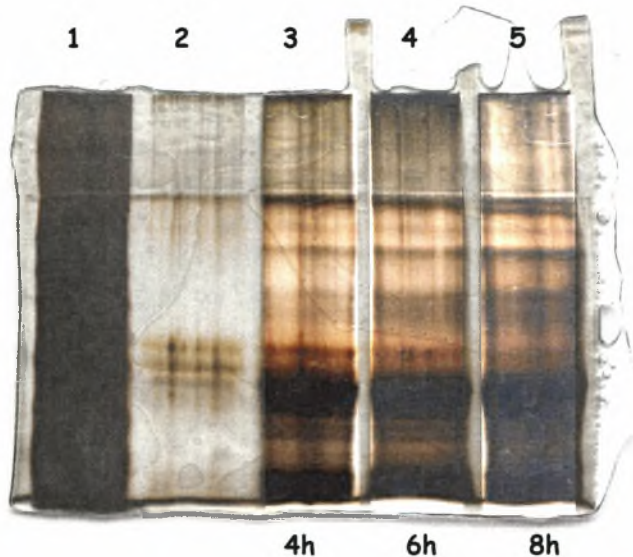


Εικόνα 3.1. (1) Marker Rainbow (2) 300μgρ ιστού που έχουν επωαστεί με 5μl αντισώματος αντι-LSAL (3) 300μgρ ιστού που έχουν επωαστεί με 5μl προ-άνοσου ορού. Τα (4) και (5) είναι όμοια δείγματα με τα 2 και 3, που έχουν υποστεί ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια επώαση με 5μl αντισώματος.

1. Προσπάθειες βελτίωσης του profil της ανοσοκατακρήμνισης με προ-άνοσο ορό

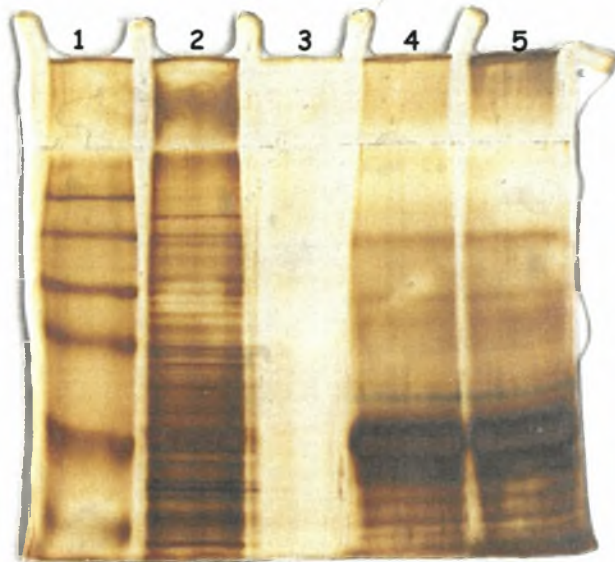
Η ανίχνευση με Western blot έδειξε δύο ζώνες στα 100kDa και 60kDa που δεσμεύονται από το αντίσωμα, αλλά όχι από τον προ-άνοσο ορό. Επειδή το προφίλ της πηκτής δεν επιτρέπει το σαφή διαχωρισμό των ζωνών από τις υπόλοιπες ακολουθεί μια προσπάθεια για την βελτιστοποίηση των συνθηκών.

Πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα γνωστό ως time-course σύμφωνα με το οποίο 250μl ομογενοποιημάτος (682μgr πρωτεϊνών) επώαζονται 4, 6 και 8h αντίστοιχα με 5μl ορό μη ανοσοποιημένο. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων παρατηρείται σε ποιο χρόνο επώασης το background ανάμεσα στα 100kDa και 60kDa είναι λιγότερο έντονο ώστε να μπορούσαμε να διακρίνουμε τη ζώνη που μας ενδιαφέρει. Η ηλεκτροφόρηση διήρκησε 2h (100mV→48mA). Έπειτα από τη βαφή της πηκτής με Silver πήραμε το παρακάτω αποτέλεσμα.



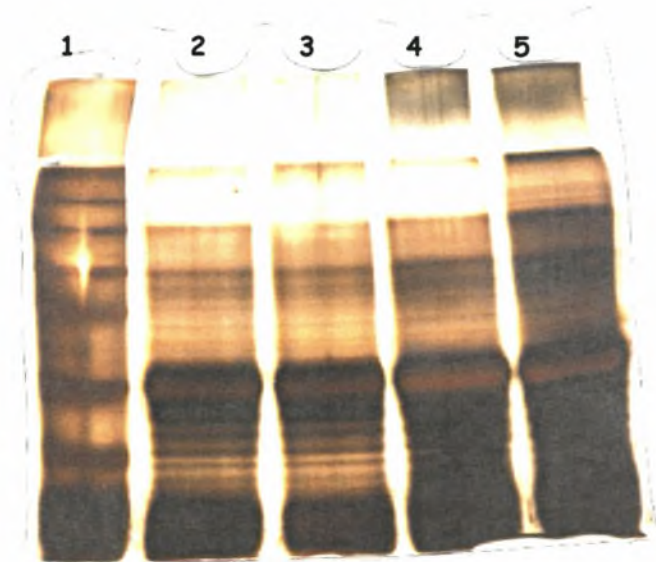
Εικόνα 3.2. 682μgr πρωτεϊνών που επώαστηκαν 4, 6 και 8h (διαδρομές 3, 4 και 5 αντίστοιχα) με 5μl ορό μη ανοσοποιημένο. Στη διαδρομή 1 χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας Rainbow (RPN 800). Βλέπουμε ότι ήδη μετά από επώαση 4h με προ-άνοσο ορό εμφανίζονται ζώνες εκτός των ανοσοσφαιρινών.

Εφόσον ακόμη και με επώαση 4 ωρών με προ-άνοσο ορό στην ανοσοκατακρήμνιση εμφανίζονται ζώνες, επώασαμε 5μl ορό μη ανοσοποιημένο με 30 μl protein A-Sepharose για 1.30h και το ίζημα που προέκυψε από φυγοκέντρηση (1min 10000g) επώαστηκε overnight με 600μg ιστού μήπως βελτιώσουμε το αποτέλεσμα. Συγκριτικά επώασαμε overnight 600μg ιστού (250μl) με 5μl ορό προ-άνοσο και στη συνέχεια προσθέσαμε για 1 ώρα protein A-Sepharose.



Εικόνα 3.3. Διαδρομή 1: ο marker Rainbow. Διαδρομή 2: 10μg ιστού. Διαδρομή 4: 600μg ιστού που έχουν επωαστεί με 5μl ορό προάνοσο όλη την νύχτα. Διαδρομή 5: 600μg ιστού που επώαστηκαν με 5μl ορό προάνοσο, ο οποίος προηγουμένως είχε προεπωαστεί παρουσία **Protein A-Sepharose για 1.30h**. Και στις δύο περιπτώσεις εμφανίζονται οι ίδιες ζώνες.

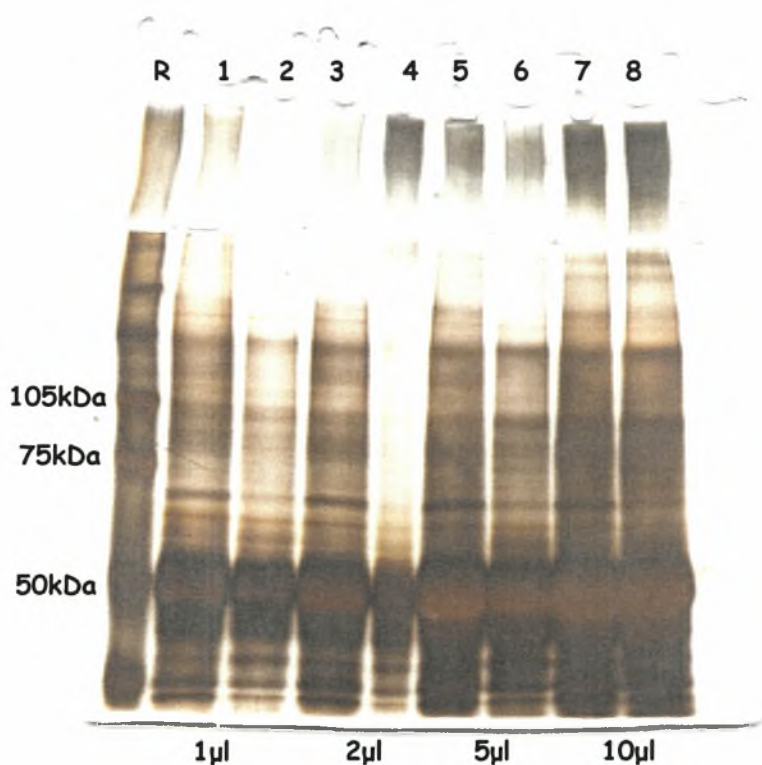
Αλλάξαμε τις συνθήκες φυγοκέντρισης σε 10000g για 1min αντί για 500g για 5min. Επιπλέον στο loading buffer ορισμένων εκ των δειγμάτων προστέθηκαν 25μl DDT 100mM και ο βρασμός δυο εξ αυτών διήρκησε 10min αντί για 5min. 714μgr ιστού (500μl) επώαστηκαν overnight με 5μl μη ανοσοποιημένου ορού. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης (100mV) αυξήθηκε στις 2h. Έπειτα από τη βαφή της πηκτής με χρώση Silver πήραμε το παρακάτω αποτέλεσμα (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4. 714μgr ιστού που επώαστηκαν overnight με 5μl μη ανοσοποιημένου ορού ανά διαδρομή. Στη διαδρομή 1 χρησιμοποιήθηκαν 5μl marker RPN 800. Οι διαδρομές 2 και 4: στο loading buffer έχει προστεθεί DTT και ο τελικός χρόνος βρασμού ανέρχεται στα 5 και 10min αντίστοιχα. Οι διαδρομές 3 και 5: δεν έχει προστεθεί DTT αλλά β-μερκαπτοαιθανόλη, με χρόνο βρασμού 5 και 10min αντίστοιχα. Σ' όλες τις διαδρομές παρατηρούνται ζώνες εκτός των 50kDa όπου υπάρχουν οι ανοσοσφαιρίνες.

2. Προσπάθειες βελτίωσης του profil της ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα αντί-LSAL

Επώαστηκαν 500μg ιστού (500μl) overnight με διαφορετικές ποσότητες αντισώματος αντι-5HT-moduline και προ-άνοσου ορού. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 1, 2, 5 και 10μl. Σκοπός ήταν να βρεθεί η βέλτιστη ποσότητα αντισώματος με την οποία η επώαση του ιστού θα δώσει την πιο ευδιάκριτη ζώνη για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.



Εικόνα 3.5. SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση 500μg ιστού ανά διαδρομή που έχει επωαστεί με 1, 2, 5 και 10μl αντισώματος και ορού προ-άνοσου.

Οι διαδρομές 1-2 επώαστηκαν με 1μl αντίσωμα και ορό αντίστοιχα,

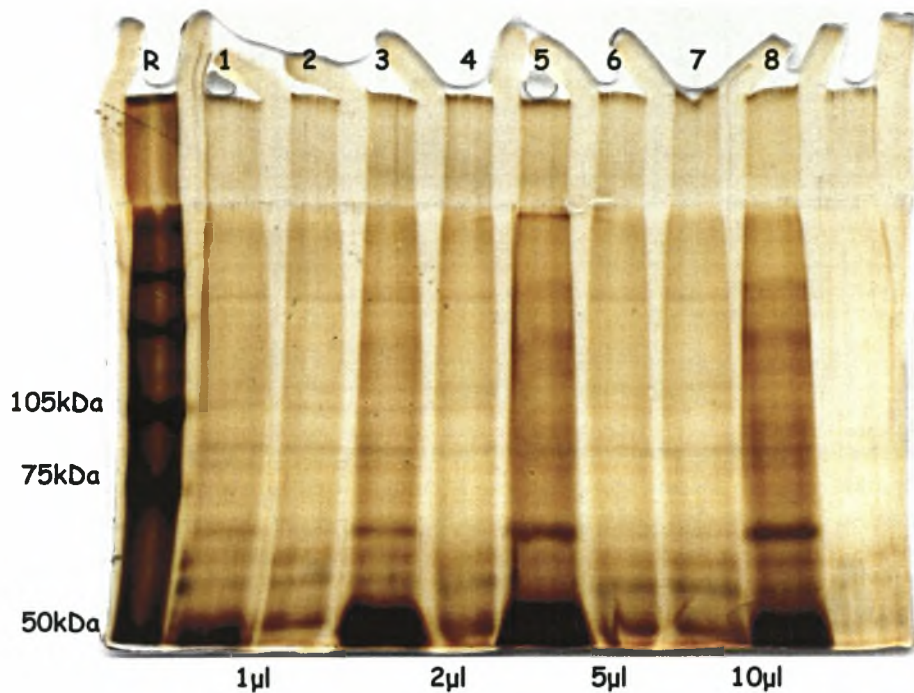
Οι διαδρομές 3-4 επώαστηκαν με 2μl αντίσωμα και ορό αντίστοιχα,

Οι διαδρομές 5-6 επώαστηκαν με 5μl αντίσωμα και ορό αντίστοιχα,

Οι διαδρομές 7-8 επώαστηκαν με 10μl αντίσωμα και ορό αντίστοιχα.

Διακρίνονται διαφορές ανάμεσα στην ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα ή προάνοσο ορό, αλλά δυστυχώς δεν είναι αρκετά ευδιάκριτες ώστε να μπορέσουμε να απομονώσουμε τη ζώνη ή τις ζώνες που διαφέρουν.

Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα αντι-5HT-moduline απομονωμένο από άλλο κουνέλι και άλλος ορός προ-άνοσος. Επίσης αυξήσαμε τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης 3h (100mV→36mA) για να διαχωριστούν καλύτερα οι ζώνες.. Η βαφή της πηκτής έγινε σύμφωνα με το αρχικό πρωτόκολλο silver.

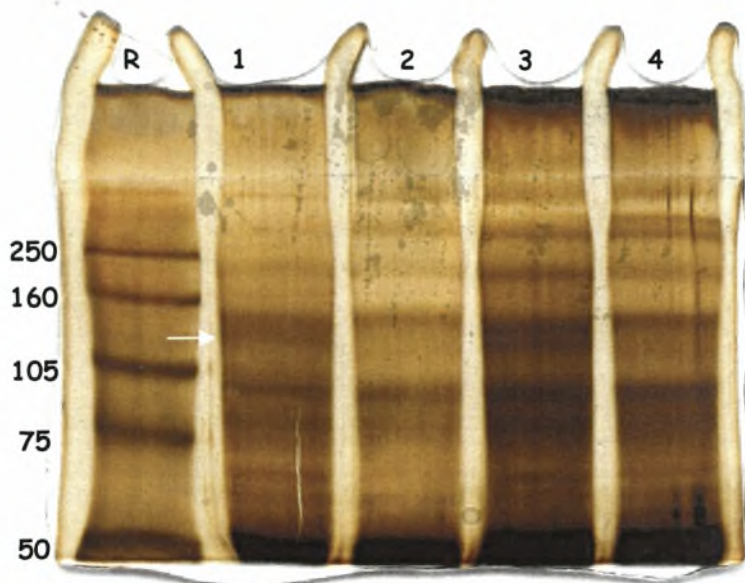


Εικόνα 3.6. SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση 500μg ιστού ανά διαδρομή που έχει επωαστεί με 1, 2, 5 και 10μl αντισώματος και ορού προ-άνοσου, που προέρχονται από άλλα κουνέλια.

Οι διαδρομές 1-2 επώαστηκαν με 1μl αντίσωμα και ορό αντίστοιχα,
Οι διαδρομές 3-4 επώαστηκαν με 2μl αντίσωμα και ορό αντίστοιχα,
Οι διαδρομές 5-6 επώαστηκαν με 5μl αντίσωμα και ορό αντίστοιχα,
Οι διαδρομές 7-8 επώαστηκαν με 10μl αντίσωμα και ορό αντίστοιχα.

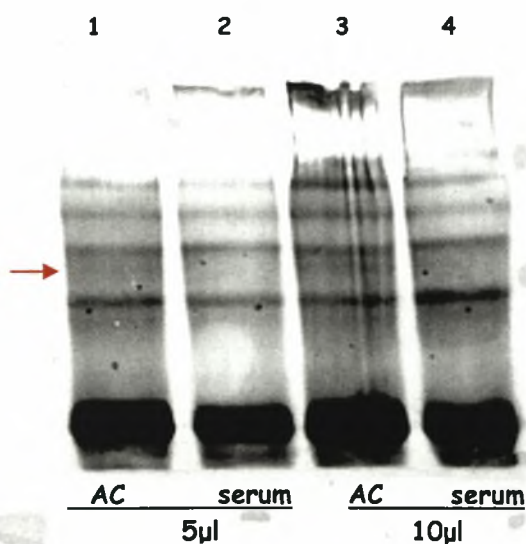
Το αντίσωμα αυτό ήταν λιγότερο ισχυρό από το προηγούμενο γι'αυτό και οι ζώνες που αναγνωρίστηκαν ήταν πιο αχνές.

Στη συνέχεια επώστηκαν 500μg ιστού με 5 και 10μl αντισώματος και προ-άνοσου ορού. Ακολούθησε διπλή ηλεκτροφόρηση για 3.5h (100mV→25mA). Η μια πηκτή βάφεται με Silver (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7. 500μg ιστού που έχουν επωαστεί όλη την νύκτα με 5 και 10μl αντισώματος και ορού μη ανοσοποιημένου. Οι διαδρομές 1 και 3 αναφέρονται σε επώαση 500μg ιστού που πραγματοποιήθηκε με 5 και 10μl αντισώματος αντίστοιχα, ενώ οι 2 και 4 σε επώαση με 5 και 10μl ορού μη ανοσοποιημένου.

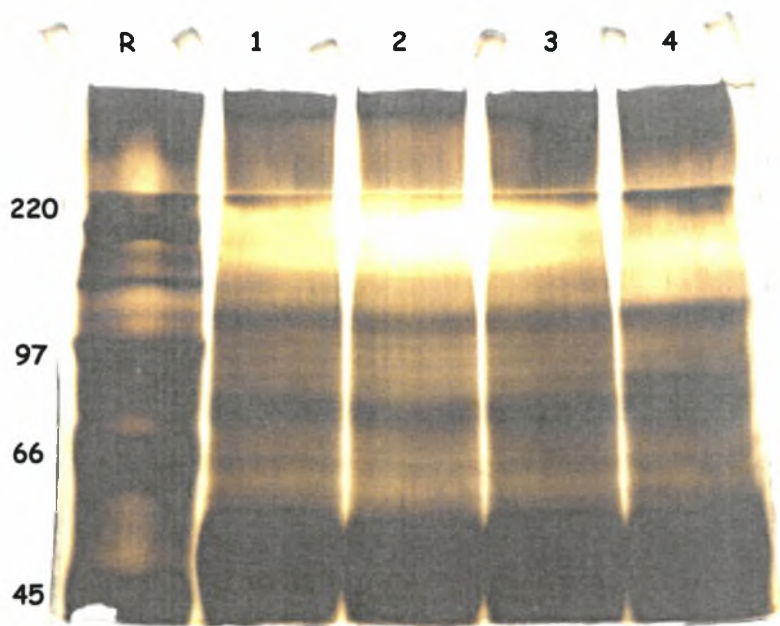
Οι πρωτεΐνες της άλλης όμοιας πηκτής υπέστησαν ηλεκτρομεταφορά για 2.5h στα 400mA σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώστηκε με 10μl αντισώματος όλη νύκτα στους 4°C και η ανίχνευση έγινε με το σύστημα ECL.



Εικόνα 3.8. Western blotting ανάλυση στα 400mA για 2,5h. 500mg ιστού που είχε διαδοχικά επωαστεί με 5 και 10μl αντίσωμα και ορό προ-άνοσο. Η επώαση του φίλτρου έγινε όλη την νύκτα παρουσία 10μl αντισώματος.

Η ζώνη ανάμεσα στα 100 και 120 kDa αν και δεν είναι πολύ καθαρή φαίνεται να μην υπάρχει στην ανοσοκατακρήμνιση με προ-άνοσο ορό, γι' αυτό και προσπαθήσαμε να την ταυτοποιήσουμε.

Για να απομονωθεί, κοπεί και προσδιοριστεί η αλληλουχία της πρωτεϊνικής ζώνης που φαίνεται να ξεχωρίζει ανάμεσα στα 100 και 120 kDa, 500μg ιστού επώαστηκαν με 10μl αντισώματος και με 10μl ορό προ-άνοσο που λειτουργεί ως μάρτυρας για την ανίχνευση της ζώνης. Η επώαση με το αντίσωμα έγινε τρεις φορές για να έχουμε αρκετή ποσότητα πρωτεΐνης (Εικόνα 3.9). Η ηλεκτροφόρηση (100mV→38mA) διήρκησε 3h.



Εικόνα 3.9. 500μg ιστού που επώαστηκαν όλη νύχτα με 10μl αντίσωμα (διαδρομές 1, 2 και 3) και με 10μl ορό προάνοσο. Στη διαδρομή R χρησιμοποιήθηκαν 5μl RPN 756. Στις 3 πρώτες διαδρομές εμφανίζεται γύρω στα 110kD μια ζώνη πρωτεϊνών η οποία δεν υπάρχει στη 4^η διαδρομή.

Η πηκτή στάλθηκε στα εργαστήρια του ινστιτούτου Flemming για την ανάλυση της ζώνης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το κεντρικό νευρικό σύστημα χρησιμοποιεί δυο κατηγορίες χημικών ουσιών για τη μετάδοση του μηνύματος: α) μικρομοριακούς νευροδιαβιβαστές (όπως η ακετυλοχολίνη, η σεροτονίνη, η ντοπαμίνη, η αδρεναλίνη κ.α) και β) νευροπεπτίδια (όπως το νευροπεπτίδιο Υ κ.α). Η σεροτονίνη είναι ένας από τους σημαντικότερους νευροδιαβιβαστές μιας και όπως προαναφέραμε ρυθμίζει αρκετές φυσιολογικές λειτουργίες και εμπλέκεται σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις εκδηλώνοντας τη δράση της στους διάφορους τύπους υποδοχέων. Δυο από τις σημαντικότερες νευροψυχιατρικές ασθένειες με τις οποίες σχετίζεται είναι το άγχος και η κατάθλιψη. Η κατάθλιψη οφείλεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό στα μειωμένα επίπεδα 5-HT στη συναπτική σχισμή ενώ το άγχος στα αυξημένα επίπεδα σεροτονίνης.

Για την αντιμετώπιση τους έχουν αναπτυχθεί διάφορες κατηγορίες φαρμάκων όπως: 1) οι αναστολείς της μονοαμινοοξειδάσης (MAOIs) 2) οι αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης και 3) οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs) που έχουν σαν στόχο το μεταφορέα της. Ωστόσο χαρακτηρίζονται από μειονεκτήματα όπως το ότι δρουν με μεγάλη καθυστέρηση και έχουν πολλές παρενέργειες και αντενδείξεις. Το πρόβλημα των νευροψυχιατρικών ασθενειών δεν αφορά μόνο την αύξηση ή την ελάττωση κάποιου νευροδιαβιβαστή αλλά τη γενικότερη δυσλειτουργία των μηχανισμών ρύθμισης περισσότερων του ενός νευροδιαβιβαστών.

Γι' αυτό το λόγο η έρευνα προσανατολίστηκε προς άλλες κατευθύνσεις. Συγκεκριμένα αναζητήθηκαν ενδογενή μόρια που έχουν ρυθμιστικό ρόλο στο σεροτονινεργικό σύστημα. Δεδομένου ότι το σύστημα αυτό είναι δομημένο με τέτοιο τρόπο ώστε να εμφανίζει μεγάλη νευρορυθμιστική δράση και να επηρεάζει και άλλες νευροδιαβιβάσεις η ρύθμιση αυτή θα περιλαμβάνει και άλλους νευροδιαβιβαστές.

Ένα τέτοιο μόριο είναι και η 5-HT-moduline η οποία είναι ένα τετραπεπτίδιο leu-ser-ala-leu (LSAL) που δρα ως αλλοστερικός τροποποιητής των 5-HT_{1B} υποδοχέων επηρεάζοντας τη σύνδεση τους με το φυσικό συνδέτη τους (5-HT) και αυξάνει τη συγκέντρωση της σεροτονίνης στη συναπτική σχισμή. Οι υποδοχείς 5-HT_{1B} μέσω ενός feed-back μηχανισμού αναστέλλουν την έκκριση σεροτονίνης. Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι ενεργοποίηση των 5-HT_{1B} υποδοχέων μειώνει την επιθετικότητα, αυξάνει το άγχος σε διάφορα πειραματικά μοντέλα, αυξάνει την κινητική δραστηριότητα και οδηγεί σε υποφαγία, υποθερμία και ελάττωση της διάρκειας του ύπνου REM. Τα 5-HT_{1B} knock-out ποντίκια είναι πιο επιθετικά, παρουσιάζουν λιγότερο άγχος σε σχέση με του αγρίου τύπου και καταναλώνουν μεγαλύτερες αλκοόλ και κοκαΐνης σε διάφορα μοντέλα εθισμού.

Όπως όλα τα νευροδραστικά πεπτίδια υποθέσαμε ότι η 5-HT-moduline προέρχεται και αυτή από ένα πρόδρομο μόριο. Το πρώτο σημαντικό βήμα των ερευνητικών προσπαθειών αφορά την αναγνώριση και απομόνωση της πρόδρομης πρωτεΐνης του πεπτιδίου. Έτσι και στην παρούσα εργασία χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα πρωτόκολλα, με τη βοήθεια πολυκλωνικού αντισώματος αντι-5-HT-moduline και έπειτα από προσπάθειες βελτίωσης του προφίλ των ζωνών ανιχνεύτηκε σε εγκεφαλικό φλοιό αρουραίου γύρω στα 110kD η ζώνη της πρόδρομης πρωτεΐνης του πεπτιδίου LSAL. Η

ολοκλήρωση του σημαντικού αυτού έργου περιλαμβάνει περαιτέρω βήματα και τεχνικές που αξίζει να αναφερθούν. Όταν ολοκληρωθεί η εργασία θα έχουμε πλέον τις απαραίτητες γνώσεις για να επέμβουμε σε ορισμένα στάδια, από τη σύνθεση του προδρόμου μορίου έως την ωρίμανση του πεπτιδίου.

Σε επόμενο στάδιο θα πρέπει να βρεθεί η αλληλουχία της πρόδρομης πρωτεΐνης για να μπορέσουν να μελετηθούν οι μηχανισμοί σύνθεσης, ωρίμανσης και απελευθέρωσης του βιοδραστικού πεπτιδίου LSAL. Η μελέτη της αλληλουχίας αυτής θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανακάλυψη και άλλων νευροπεπτιδίων που πιθανώς να έχουν ρυθμιστική δράση στο σεροτονινεργικό ή κάποιο άλλο σύστημα. Είναι γνωστά τα παραδείγματα πολλών πρόδρομων μορίων όπως αυτό της προ-προοπινομελανοκορτινής από το οποίο προκύπτουν με υδρολυτική διάσπαση τέσσερα δραστικά πεπτιδία (ACTH, β-λιποτροπίνη, γ-λιποτροπίνη και β-ενδορφίνη). Επίσης η πρόδρομη πρωτεΐνη πιθανόν να περιέχει μόρια που αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες.

Στη συνέχεια θα παραχθούν αντισώματα ενάντια στην προ-5-HT-moduline από πεπτιδία που θα συντεθούν από περιοχές του πρόδρομου μορίου και θα ενεθούν σε κουνέλι. Τα αντισώματα αυτά θα εξετασθούν για την εξειδίκευσή τους σε σύγκριση με το αντίσωμα έναντι στην 5-HT-moduline και θα χρησιμοποιηθούν για την εύρεση της μορφής με την οποία βρίσκεται η προ-5HT-moduline σε κάθε υποκυτταρικό διαμέρισμα.

Επόμενος στόχος είναι η απομόνωση ανασυνδυασμένης PC1 με συγκεκριμένες τεχνικές, η οποία θα χρησιμοποιηθεί σε *in vitro* μελέτες πρωτεόλυσης της προ-5-HT-moduline. Μ' αυτόν τον τρόπο θα διαπιστωθεί σε ποια και πόσα μέρη διασπάται αυτή.

Τέλος θα κλωνοποιηθεί ο υποκινητής του γονιδίου σε πλασμιδιακό φορέα και θα ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες που συνδέονται στον υποκινητή. Έτσι δίνεται η δυνατότητα να χαρακτηρισθούν ποικίλοι παράγοντες που επάγουν ή αναστέλλουν τη μεταγραφή του γονιδίου.

Η απομόνωση του γονιδίου θα επιτρέψει να χαρακτηριστεί επακριβώς το κεντρικό σύστημα της 5-HT-moduline και θα μπορέσει να μελετηθεί η ύπαρξη μιας πιθανής συσχέτισης ανάμεσα σε μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου και σε ψυχιατρικές ασθένειες. Συγκεκριμένα θα εντοπιστούν οι νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για τη σύνθεση και απελευθέρωση του πεπτιδίου και θα μελετηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη σύνθεση σε απόκριση σε εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα.

Έχει αναφερθεί η σχέση της 5-HT-moduline με το stress. Συγκεκριμένα αυξάνεται η συγκέντρωσή της σε απόκριση στο έντονο και οξύ stress. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην αυξημένη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της προ-5HT-moduline είτε στην ταχύτερη παραγωγή του τελικού πεπτιδίου. Με την ευκαιρία αυτή θα αποσαφηνιστεί πως το stress επηρεάζει γενικά τη γονιδιακή έκφραση.

Ένα άλλο θέμα που θα πρέπει να διευκρινιστεί είναι και η ακριβής θέση σύνδεσης του LSAL στους 5-HT_{1B} υποδοχείς. Μελλοντικά αυτή η θέση σύνδεσης θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο συνθετικών αντικαταθλιπτικών φαρμάκων που να μιμούνται τη δράση του νευροπεπτιδίου.

Σκοπός του παραπάνω έργου είναι η συγκέντρωση όλων των απαραίτητων πληροφοριών για τη μελέτη των μηχανισμών σύνθεσης,

ρύθμισης και ωρίμανσης του πεπτιδίου. Αυτό αφενός μεν θα οδηγήσει στην πληρέστερη κατανόηση του σεροτονινεργικού συστήματος και αφετέρου θα δώσει τη δυνατότητα φαρμακευτικής επέμβασης σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται μ' αυτό.

Η κάθε ασθένεια θα πρέπει να προσεγγίζεται διαφορετικά. Για παράδειγμα η περίπτωση μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής ίσως να οφείλεται εκτός από τη μειωμένη συγκέντρωση 5-HT και σε μειωμένη συγκέντρωση LSAL και να είναι δυνατόν με τη χρήση φαρμακευτικών ουσιών να προκληθεί υπερέκφραση του νευροπεπτιδίου LSAL για να αυξηθεί η συγκέντρωση της σεροτονίνης. Αν πάλι το νευροπεπτιδίο αυξηθεί υπερβολικά ίσως οδηγήσει σε υπέρμετρη αύξηση σεροτονίνης και να προκληθεί άγχος. Γι' αυτό χρειάζεται περαιτέρω μελέτες σε πειραματόζωα ώστε να δοθεί η καλύτερη λύση στο πρόβλημα.

Ο προσδιορισμός των βιοχημικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών της 5-HT-moduline θα ανοίξει νέους δρόμους στην έρευνα της παθοφυσιολογίας του κεντρικού νευρικού συστήματος. Στόχος νέων θεραπευτικών μέσων μπορεί να αποτελέσει το γονίδιο της προ-5-HT-moduline, το mRNA αυτής και η πρόδρομη πρωτεΐνη. Όποιο στάδιο σύνθεσης της 5-HT-moduline και αν επιλεγεί τα πειράματα θα εφαρμοσθούν πρώτα σε οργανισμούς που βρίσκονται χαμηλότερα στην εξελικτική κλίμακα (ποντίκια) και έπειτα στον άνθρωπο. Ήδη αναφέρθηκε η χορήγηση αντισώματος αντι-5-HT-moduline σε ποντίκια στα πειραματικά μοντέλα elevated-plus maze και open field test που είχε αγχολυτική δράση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agnati L.F., Fuxe, K., Zoli, M., Ozini, I., Toffano, G., Ferraguti, F.,** A correlation analysis of the regional distribution of central enkephalin and beta-endorphin immunoreactive terminals and of opiate receptors in adult and old male rats. Evidence for the existence of two main types of communication in the central nervous system: the volume transmission and the wiring transmission. *Acta Physiol. Scand.* 128 (1986) 201-207.
- Agnati L.F., Cortelli, P., Biagini, G., Bjelke, B., Fuxe, K.,** Different classes of volume transmission signals exist in the central nervous system and are affected by metabolic signals, temperature gradients and pressure waves. *Neuroreport* 6 (1994) 9-12.
- Agnati L.F., Bjelke, B., Fuxe, K.,** Volume versus wiring transmission in the brain: a new theoretical frame for neuropsychopharmacology. *Med. Res. Rev.* 15 (1995a) 33-45.
- Agnati L.F., Zoli, M., Stromberg, I., Fuxe, K.,** Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neuroscience* 69 (1995b) 711-726.
- Baumgarten H. G., and Grozdanovic, Z.** Anatomy of central serotonergic projection systems. In: Serotonergic Neurons and 5-HT Receptors in the CNS, *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 129, (1997) Eds. H. G. Baumgarten and M. Goëthert. Springer, London. pp. 41-89.
- Blum, H., Beier H., and H.J. Gross.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.
- Bogdanski Df., Pletscher, A., Brodie, BB., Underfriend, S.,** 1956. Identification and assay of serotonin in brain. *J. Pharmacol. Exp Ther.* May 117 (1): 82-8.
- Bolanos-Jimenez F., Manhaes de Castro, R., Seguin, L., Cloez-Tayarani, I., Monneret, V., Drieu, K., Fillion, G.,** 1995. Effects of stress on the functional properties of pre- and postsynaptic 5-HT_{1B} receptors in the rat brain. *Eur. J. Pharmac.* 294, 531-540.
- Bonnin A., Grimaldi B., Fillion MP, Fillion G.** Acute stress induces a differential increase of 5-HT-moduline (LSAL) tissue content in various rat brain areas. *Brain Research* 825 (1999) 152-160.
- Canaff L., Hugh P. Bennett J., Yu Hou, Nabil G. Seidah and Geoffrey N. Hendy** Parathyroid Hormone Processing by the Proprotein Convertase-7: Comparison with Furin and Assessment of Modulation of Parathyroid Convertase Messenger Ribonucleic Acid Levels by Calcium and 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 140 (1999) 3633-3642.
- Carla Sibella-Arguelles.** The proliferation of human T lymphoblastic cells induced by 5-HT_{1B} receptors activation is regulated by 5-HT-moduline. *Life sciences* 324 (2001) 365-372.
- Descarries, L., Audet, M. A. and Doucet, G.** Morphology of central serotonin neurons. *Ann N Y Acad Sci.* 600 (1990) 81-92.
- Fillion, G., Fillion, M.P.** Modulation of affinity of postsynaptic serotonin receptors by antidepressant drugs. *Nature* 292 (1981) 349-351.
- Fillion, G.,** Potential of 5-HT-moduline as a drug target for affective disorders. *Curr Opin Investig Drugs* 1 (2000) 104-9.
- Friedman TC, Loh YP, Cawley NX, Birch NP, Huang SS, Jackson IMD, Nillni EA.** Processing of pro-thyrotropin-releasing hormone (pro-TRH) by bovine intermediate lobe secretory vesicle membrane PC1 and PC2 enzymes. *Endocrinology* 136 (1995) 4462-4472.
- Fuxe, K., Agnati, L.F., Cintra, A., Andersson, K., Eneroth, P., Harfstrand, A., Zoli, M., Goldstein, M.,** Studies on central D1 receptors role in volume

- transmission, neuroendocrine regulation and release of noradrenaline. *Adv. exp. Med. Biol.* 235 (1988) 83-119.
- Grimaldi, B., Cloez-Tayarani, I., Fillion, M.P., Mazie, J.C., Hen, R., Fillion, G.,** Production and characterization of an antibody directed against the mouse 5-HT_{1B} receptor. *Neurosci. Res.* 24 (1995) 97-101.
- Grimaldi, B., Bonnin, A., Fillion, M. P., Prudhomme N. and Fillion, G.** 5-HT-moduline: a novel endogenous peptide involved in the control of anxiety. *Neuroscience* 93 (1999) 1223-1225
- Grimaldi, B. and G.Fillion.** 5-HT-moduline controls serotonergic activity: implication in neuroimmune reciprocal regulation mechanisms. *Progress in neurobiology* 60 (2001) 1-12.
- Grimaldi B., Fillion M.-P., Bonnin A., Rouselle J. C., Massot O. and G.Fillion.** Immunocytochemical localization of neurons expressing 5-HT-moduline in the mouse brain. *Neuropharmacology*, 36 (1997) 1079-1087.
- Hallberg, M., Nyberg, F.,** Neuropeptide conversion to bioactive fragments-an important pathway in neuromodulation. *Curr Protein Pept Sci* 4 (2003) 31-44.
- Hartig, P.R., Hoyer, D., Humphrey, P.P.A., Martin, G.R.,** Alignment of receptor nomenclature with the human genome. Classification of 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptor subtypes. *Trends Pharmac. Sci.* 17 (1996) 103-105.
- Hoyer, D., Martin, G.,** 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology* 36 (1997) 419-428.
- Jacobs, B.L., Azmitia, E.C.,** Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 72 (1992) 165-229.
- Mamounas, L.A., Molliver, M.E.,** Evidence for dual serotonergic projections to neocortex: Axons from the dorsal and median raphe nuclei are differentially vulnerable to the neurotoxin p-chlor-oamphetamine (PCA). *Exp. Neurol.* 102 (1988) 23-26.
- Massot O, Sarhan H, Cloez-Tayarani I, Fillion MP, Fillion G.** 5-HT_{1B} receptors modulate release of [³H]dopamine from rat striatal synaptosomes *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359 (1999) 40-47.
- Massot, O., Rousselle, J.C., Fillion, M.P., Grimaldi, B., Cloez Tayarani, I., Fugelli, A., Prudhomme, N., Seguin, L., Rousseau, B., Plantefol, M., Hen, R., Fillion, G.** 5-Hydroxytryptamine-moduline, a new endogenous cerebral peptide, controls the serotonergic activity via its specific interaction with 5-hydroxytryptamine receptors. *Mol. Pharmacol.* 50 (1996) 752-762.
- Morrison E., Tomasec P, Linton EA, Lowry PG, Lowenstein PR, Castro MG.,** Expression of biologically active procorticotrophin releasing hormone (proCRH) in stably transfected CHO-K1 cells: characterization of nuclear proCRH. *J Neuroendocrinol.* 7 (1995) 263-272.
- Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang A., Cohen SN, Numa S** Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 278 (1979) 423-427
- Plantefol M., Rousselle J.C Bernardi E, Schoofs AR, Pourrias B., Fillion G.** Endoproteolytic activity in mammalian brain membranes cleaves 5-hydroxytryptamine moduline into dipeptides. *European Journal of Pharmacology* 376 (1999) 109-117.
- Rapport, M.M., Green, A.A., Page, I.H.,** Purification of the substance which is responsible for vasoconstrictor activity of serum. *Fed. Proc.* 6 (1947) 184.
- Rapport, M.M., Green, A.A., Page, I.H.,** Crystalline serotonin. *Science* 108 (1948) 329-330.

- Rousselle, J.C., Plantefol, M., Fillion, M.P., Massot, O., Pauwels, P.J., Fillion, G.,** Specific interaction with human 5-HT_{1B} as well as 5-HT_{1D} receptors expressed in transfected cultured cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 358, (1998) 279–286.
- Seguin L, Seznec J-C, Fillion G.** The endogenous cerebral tetrapeptide 5-HT-moduline reduces in vivo the functional activity of central 5-HT_{1B} receptors in the rat. *Neuroscience resereach* 27 (1997) 277-280.
- Stein and Stahl,** Serotonin and anxiety: current models. *Int Clin Psychopharmacol.* 15 (2000) Suppl 2:S1-6.
- Takeuchi, Y.** Distribution of serotonin neurons in the mammalian brain. In: *Neuronal Serotonin*, (1988) pp. 25-56. Eds. N. N. Osborne and M. Hamon. Wiley, Chichester.
- Taussig, R., Scheller, R.H., Schaefer M., Picciotto M. R., Kreiner R., Kaldany R. R.,** *Aplysia* neurons express a gene encoding multiple FMRFamide neuropeptides. *Cell* 41 (1985) 457-467.
- Zifa, E., Fillion, G.,** 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 44 (1992) 401-458.

Φαρμακολογία Page-Curtis-Sutter-Walker-Hoffman σελ 93-148.

Φυσιολογία Αθ. Σμοκοβίτη σελ 16-26.

Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά, Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1999.