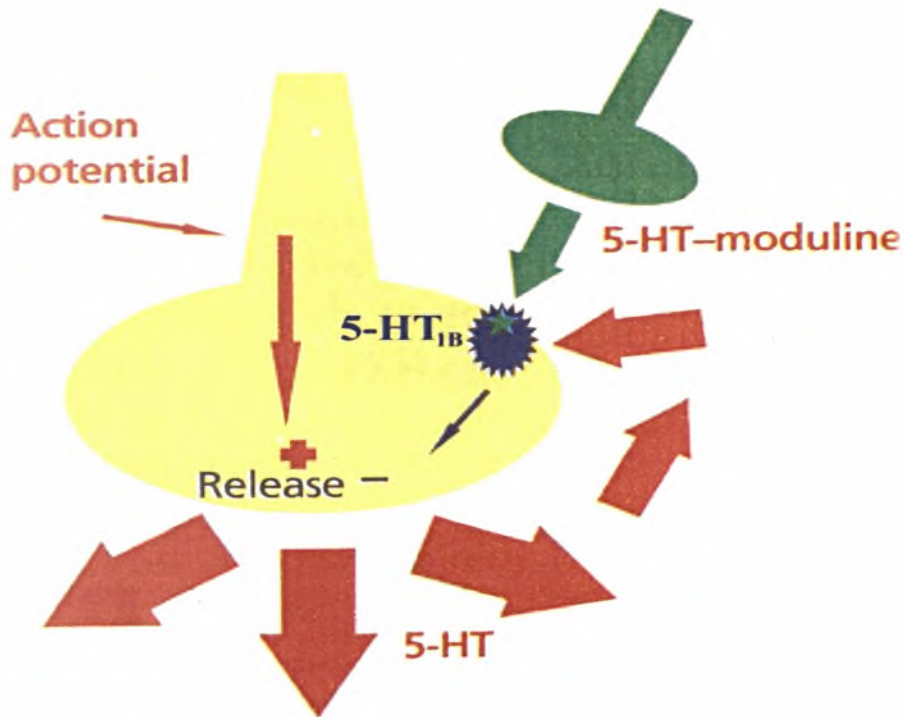


5-HT moduline, ΕΝΑ ΝΕΟ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΟ  
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΜΟΡΙΟΥ  
ΤΟΥ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ  
ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΑΠΑΔΟΝΤΑ ΜΑΡΙΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΔΙΔΑΣΚΩΝ

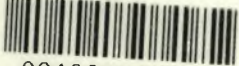
ΖΙΦΑ ΑΙΜΙΛΙΑ



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

Αριθ. Εισ.: 4663/1  
Ημερ. Εισ.: 14/10/2005  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2005  
ΠΑΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



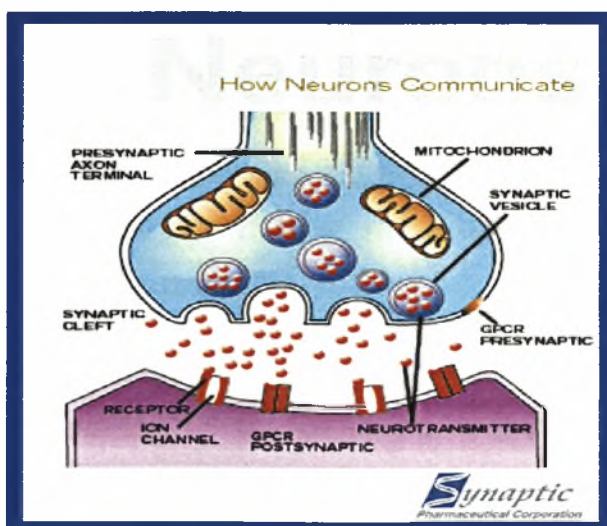
004000087876

# 1. Εισαγωγή

- **Νευροδιαβιβαστές: Η Σεροτονίνη**

Οι πληροφορίες τις οποίες μεταφέρει ένας νευρώνας είναι κωδικουμένες σε ηλεκτρικά σήματα που διατρέχουν τον νευράξονα και την νευρική απόληξη. Στη σύναψη, τα σήματα αυτά μεταφέρονται στην άλλη πλευρά της συναπτικής σχισμής από έναν ή περισσότερους χημικούς αγγελιοφόρους. Για να επιτελέσουν διαβιβαστική λειτουργία, τα μόρια αυτά πρέπει να προσδεθούν σε μεμβρανικούς υποδοχείς. Μετά την πρόσδεση των μορίων διαβιβαστή, ο υποδοχέας παράγει ηλεκτρικά ή μεταβολικά σήματα στο μετασυναπτικό κύτταρο.

Οι χημικοί αγγελιοφόροι είναι συσσωρευμένοι σε κυστίδια στο εσωτερικό του προσυναπτικού νευρώνα. Σε πρώτη προσέγγιση, μπορούμε να ορίσουμε ως διαβιβαστή μια ουσία που απελευθερώνεται από έναν νευρώνα σε μια σύναψη και που επηρεάζει ένα άλλο κύτταρο, είτε έναν άλλο νευρώνα ή ένα κύτταρο κάποιου οργάνου με συγκεκριμένο τρόπο. Παρόλα αυτά για να γίνει μια ουσία δεκτή ως διαβιβαστής θα πρέπει πρώτον να συντίθεται στον νευρώνα και να απελευθερώνεται σε επαρκείς ποσότητες από την προσυναπτική απόληξη, δεύτερον να μιμείται ακριβώς τη δράση του ενδογενώς εκκρινόμενου διαβιβαστή όταν αυτός χορηγηθεί εξωγενώς και τρίτον να υπάρχει ειδικός μηχανισμός απομάκρυνσης αυτής από τη θέση δράσης της (τη συναπτική σχισμή).



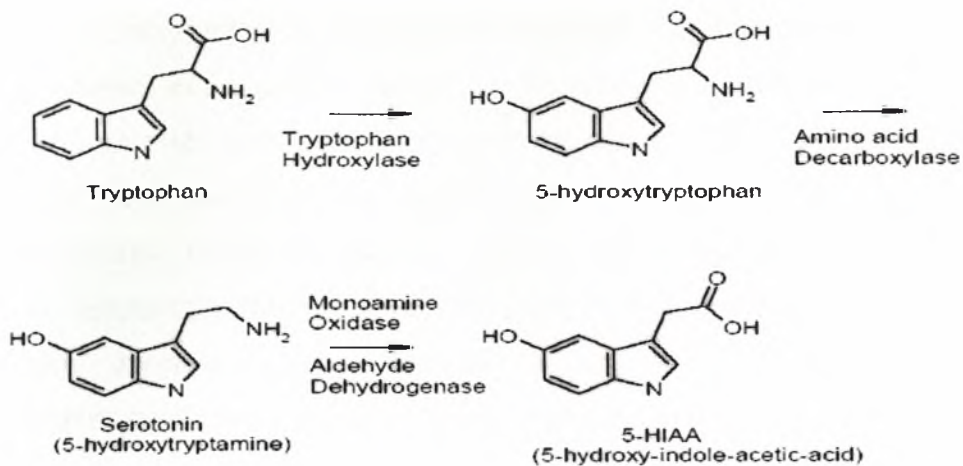
**Εικόνα 1.1. Σύναψη νευρώνων και απελευθέρωση του διαβιβαστή.**

Στην εικόνα φαίνεται η αποθήκευση του διαβιβαστή σε κυστίδια προσυναπτικά, η έκκριση του στη συναπτική σχισμή και η πρόσδεση αυτού στους διάφορους τύπου υποδοχείς στο μετασυναπτικό νευρώνα καθώς και στους προσυναπτικούς υποδοχείς που ρυθμίζουν την απελευθέρωση του.

Το νευρικό σύστημα χρησιμοποιεί δύο κύριες κατηγορίες χημικών ουσιών για τη μετάδοση σημάτων, τα νευροδραστικά πεπτίδια και τους μικρομοριακούς νευροδιαβιβαστές. Δέκα μικρομοριακές ουσίες θεωρούνται ως νευροδιαβιβαστές ανάμεσα τους η ακετυλοχολίνη, οι βιογενείς αμίνες όπως η ντοπαμίνη, η νοραδρεναλίνη, η αδρεναλίνη, η σεροτονίνη και η ισταμίνη, αμινοξέα όπως το γ-αμινοβουτυρικό οξύ, η γλυκίνη και το γλουταμινικό καθώς και η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Οι περισσότερες είναι αμίνες εκτός του ATP, ενώ αποτελούν φορτισμένα μικρά μόρια που σχηματίζονται σε βραχείες βιοσυνθετικές οδούς και συντίθενται από πρόδρομα μόρια που παράγονται από τα υδατανθρακικά υποστρώματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού.

Όσον αφορά τους νευροδιαβιβαστές και τα ένζυμα που καταλύουν τη σύνθεση τους αυτά βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Τα ένζυμα αυτά συντίθενται σε ελεύθερα πολυριβωσώματα του κυτταρικού σώματος και κατανέμονται σε ολόκληρο το νευρώνα μέσω της αξονοπλασματικής ροής. Δεδομένου ότι αυτά τα βιοσυνθετικά ένζυμα κατανέμονται σε ολόκληρο το κύτταρο, οι μικρομοριακοί διαβιβαστές είναι δυνατόν να σχηματισθούν σε όλα τα σημεία του νευρώνα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι διαβιβαστές είναι δυνατόν να συντεθούν στις νευρικές απολήξεις όπου και απελευθερώνονται.

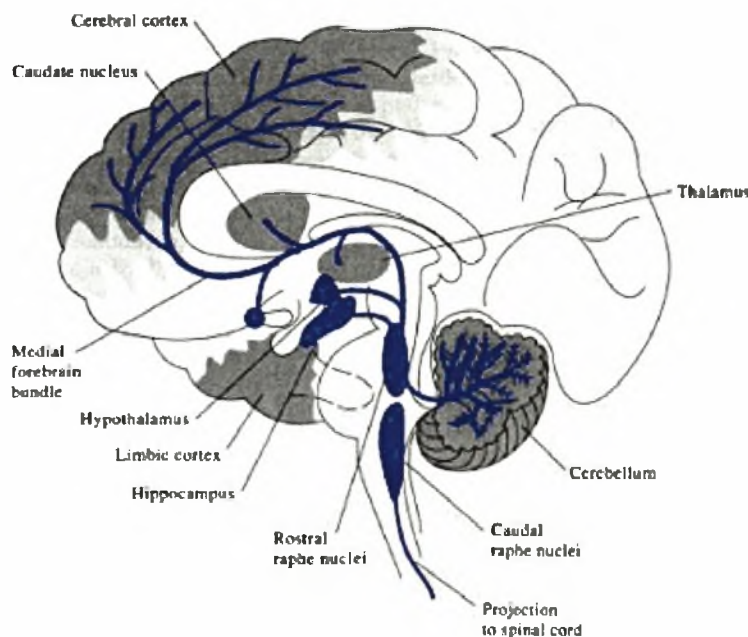
Ένας από τους σημαντικότερους νευροδιαβιβαστές με σημαντική νευρορυθμιστική δράση χάρη στην οποία συμμετέχει στο συντονισμό και την προσαρμογή της απάντησης του εγκεφάλου σε δεδομένα ερεθίσματα είναι η σεροτονίνη (5-υδροξυτρυπταμίνη, 5-HT). Η αντίδραση σύνθεσης της 5-HT με βάση το αμινοξύ τρυπτοφάνη καταλύεται από την υδροξυλάση της τρυπτοφάνης και την αποκαρβοξυλάση της 5-υδροξυτρυπτοφάνης ενώ ο μεταβολισμός της από μια μονοαμινοξειδάση σε 5-υδροξυινδολο-οξεικό οξύ.



Εικόνα 1.2. Σύνθεση και μεταβολισμός της σεροτονίνης.

Η ανατομική και μορφολογική οργάνωση του σεροτονινεργικού συστήματος συμφωνεί με το ρυθμιστικό ρόλο της 5-HT η οποία δρα μέσω πολλών υποδοχέων τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Το σεροτονινεργικό σύστημα σχετίζεται με φυσιολογικές λειτουργίες όπως ο ύπνος, η θερμορύθμιση, η μάθηση και η μνήμη, η συμπεριφορά και οι βιολογικοί ρυθμοί αλλά και με παθολογικές καταστάσεις όπως το άγχος, η κατάθλιψη, η επιθετικότητα, η σχιζοφρένεια, η ημικρανία και ο αλκοολισμός.

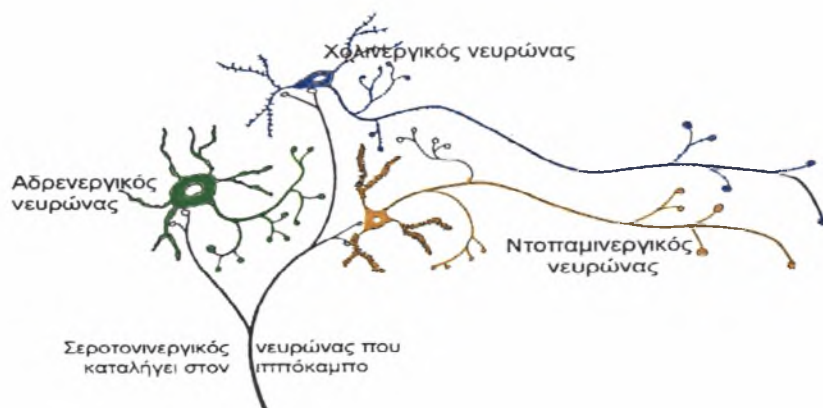
Τα σώματα των σεροτονεργικών νευρώνων είναι συγκεντρωμένα μόνο στη ραφή αλλά και πανταχού παρόν με σεροτονινεργικές απολήξεις.



Εικόνα 1.3. Σχηματική αναπαράσταση των 5-HT μονοπατιών στον εγκέφαλο.

Η δράση της σεροτονίνης όμως όπως προαναφέρθηκε, δεν περιορίζεται μόνο στο κεντρικό νευρικό σύστημα αλλά και σε περιφερικούς ιστούς όπου και εντοπίζονται πολλοί από τους υποδοχείς της. Η πρόσδεση της σεροτονίνης στους υποδοχείς της είναι αυτή που επιτρέπει τον προσδιορισμό της πορείας των καθοδικών σεροτονινεργικών νευρώνων από το νωτιαίο μυελό στα περιφερικά όργανα (απαγωγοί νευρώνες) καθώς και το αντίθετο (προσαγωγοί νευρώνες). Μερικά από τα περιφερικά συστήματα όπου ασκείται η δράση της είναι κυρίως το καρδιοαναπνευστικό (λείος μυς αγγείων, μυοκαρδιακά κύτταρα), το πεπτικό (κυρίως το τμήμα του εντέρου), και τα νεφρά (κυρίως τα νεφρικά σωληνάκια).

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.



**Εικόνα 1.4. Η 5-HT σαν νευρορυθμιστής αλληλεπιδρώντας με άλλους νευρώνες.**

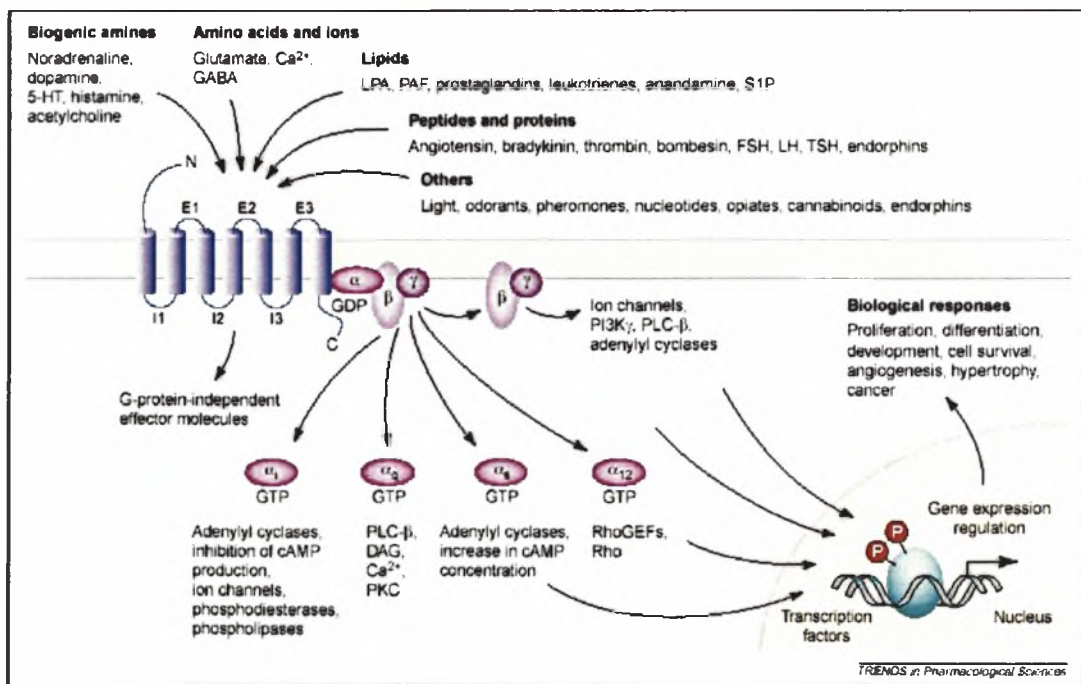
Στην εικόνα διακρίνεται σεροτονινεργικός νευρώνας που μέσω των συνάψεων που δημιουργεί με άλλους ρυθμίζει την απελευθέρωση και άλλων νευροδιαβιβαστών όπως η ντοπαμίνη, η νοραδρεναλίνη και η ακετυλοχολίνη.

Γενικά, οι δράσεις της 5-HT σε ένα νευρώνα καθορίζονται από τρεις κύριους μηχανισμούς: σύνθεση και έκκριση αυτής από την προσυναπτική απόληξη, το μεταβολισμό της από ένζυμα όπως η μονοαμινοξειδάση και επαναπρόσληψη της από τη συναπτική σχισμή μέσω του μεταφορέα σεροτονίνης που εντοπίζεται προσυναπτικά και του οποίου η δράση ρυθμίζεται από ιόντα  $K^+$ ,  $Na^+$  και  $Cl^-$  καθώς και από τη δράση ΑΤΡασών που καθορίζουν τη συγκέντρωση αυτών των ιόντων στη σχισμή.



Όσον αφορά τους υποδοχείς της σεροτονίνης, προσδιορίστηκαν μετά από φαρμακολογικές μελέτες σύνδεσης με εξειδικευμένους αγωνιστές, ανοσοχημικές μεθόδους καθώς και μελέτες ενεργοποίησης συγκεκριμένων μονοπατιών διακυτταρικής επικοινωνίας. Επομένως, προέκυψαν και αναγνωρίστηκαν οι 5-HT<sub>1</sub> (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B/1D</sub>, 5-HT<sub>1E-1F</sub>), 5-HT<sub>2</sub> (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>), 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5A-B</sub>, 5-HT<sub>6</sub> και 5-HT<sub>7</sub>.

Από τους παραπάνω οι 5-HT<sub>1</sub> (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B/1D</sub>, 5-HT<sub>1E-1F</sub>), 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5A-B</sub>, 5-HT<sub>6</sub> και 5-HT<sub>7</sub> έχουν 7 διαμεμβρανικές περιοχές, είναι συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες και εκτός των 5-HT<sub>1</sub> που είναι αρνητικά συνδεδεμένοι με την αδενυλική κυκλάση, οι υπόλοιποι την ενεργοποιούν αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωση του cAMP ενδοκυτταρικά. Η ομάδα των 5-HT<sub>2</sub> είναι επίσης υποδοχείς συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνη η οποία όμως ενεργοποιεί την φωσφολιπάση C (PLC) που παράγει την τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP<sub>3</sub>) και την διακυλογλυκερόλη (DAG) η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου ενδοκυτταρικά. Τέλος, ο μοναδικός τύπος σερετονινεργικού υποδοχέα που αποτελεί κανάλι ιόντων είναι ο 5-HT<sub>3</sub> που είναι ένα πενταμερές υπομονάδων (2α,β,γ,δ) και οι διαμεμβρανικές του περιοχές έχουν τη μορφή α-ελίκων.

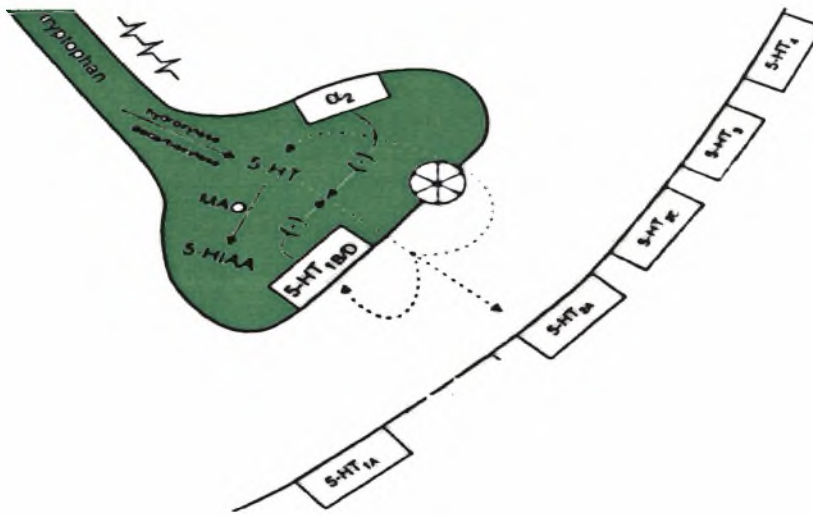


**Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση των GPCRs υποδοχέων της 5-HT.**

Στην εικόνα φαίνεται η ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών καθώς και οι αντίστοιχες επιδράσεις σε κυτταρικό (cAMP, PKC, αύξηση Ca<sup>2+</sup>, φωσφοδιεστεράσες) και γονιδιακό επίπεδο (μεταγραφή γονιδίων).



Από τους προηγούμενους τύπους σεροτονινεργικών υποδοχέων που εντοπίζονται κυρίως μετασυναπτικά στους νευρώνες τόσο του κεντρικού όσο και του περιφερικού νευρικού συστήματος οι  $5\text{-HT}_{1B/1D}$  και  $5\text{-HT}_{1A}$  αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτοϋποδοχέων. Φαρμακολογικές μελέτες σύνδεσης ραδιενεργών εξειδικευμένων αγωνιστών καθώς και ανοσοχημικές μέθοδοι έχουν δείξει υψηλή ομολογία μεταξύ των δύο υποδοχέων, παρόμοια κατανομή σε περιφερικούς ιστούς μια και ο  $5\text{-HT}_{1D}$  δεν εντοπίζεται σε μεγάλη συγκέντρωση στον εγκέφαλο, και λειτουργική ομοιότητα εφόσον και οι δύο ελέγχουν την απελευθέρωση της 5-HT. Τελικά, μετά από κλωνοποίηση αυτών αποδείχθηκε ότι στον άνθρωπο τα γονίδια των  $5\text{-HT}_{1B/1D}$  εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα (στα 6q13 και 1p34.3-36.3 αντίστοιχα) και επομένως πρόκειται για διαφορετικούς υποδοχείς.

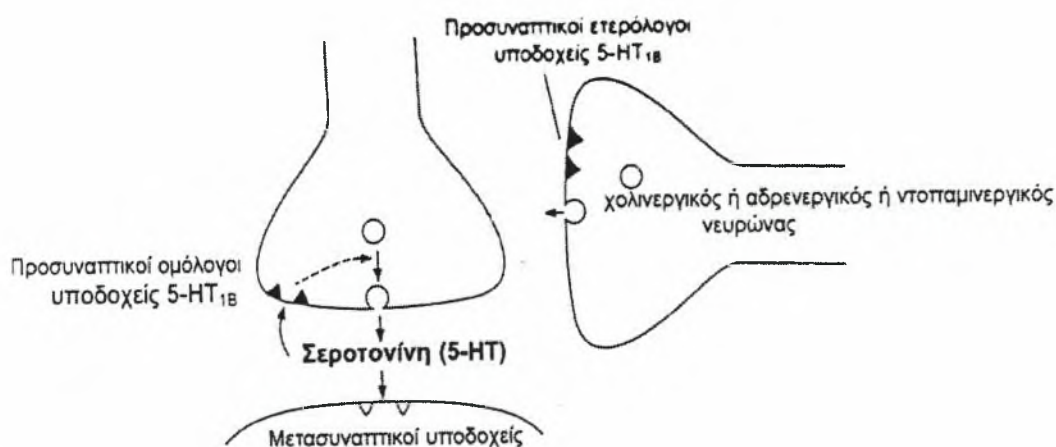


**Εικόνα 1.6.** Σχηματική αναπαράσταση της θέσης των υποδοχέων  $5\text{-HT}_{1B/1D}$  προσυναπτικά και των υπολοίπων μετασυναπτικά.

Ο  $5\text{-HT}_{1B}$  είναι ένας GPCR υποδοχέας συνδεδεμένος αρνητικά με την αδενυλική κυκλάση, με άμεση συνέπεια την μείωση των επιπέδων του cAMP και αρνητικό έλεγχο σε διαύλους ιόντων ασβεστίου και καλίου γεγονός που ρυθμίζει την έκκριση της 5-HT από την προσυναπτική απόληξη. Εφόσον ο  $5\text{-HT}_{1B}$  μπορεί να είναι και ετεροϋποδοχέας, να εντοπίζεται δηλαδή σε μη σεροτονινεργικούς νευρώνες, μπορεί να ρυθμίζει έτσι την απελευθέρωση άλλων νευροδιαβιβαστών όπως η ντοπαμίνη, το γλουταμινικό, η νορεπινεφρίνη και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Αυτό μπορεί

να καταστεί δυνατό είτε με την ενεργοποίηση των νευρώνων (γλουταμινεργικοί) είτε με την αναστολή αυτών (GABAνεργικοί).

Ο υποδοχέας  $5\text{-HT}_{1B}$  είναι αυτός για τον οποίο πρόσφατα έχει βρεθεί ένα ενδογενές νευροδραστικό πεπτίδιο (LSAL) που όταν προσδεθεί σε αυτόν τροποποιεί τη δράση του και αναστέλλει την έκκριση της 5-HT στη συναπτική σχισμή. Αυτός είναι ένας από τους λόγους που αποτελεί μια ενδιαφέρουσα περίπτωση μελέτης τόσο στον εγκέφαλο όσο και στην καρδιά όπου η επίδραση της 5-HT είναι αξιοσημείωτη.



**Εικόνα 1.7.** Οι  $5\text{-HT}_{1B}$  σαν αυτοϋποδοχείς και ετεροϋποδοχείς στη προσυναπτική απόληξη σεροτονινεργικού και μη νευρώνα.

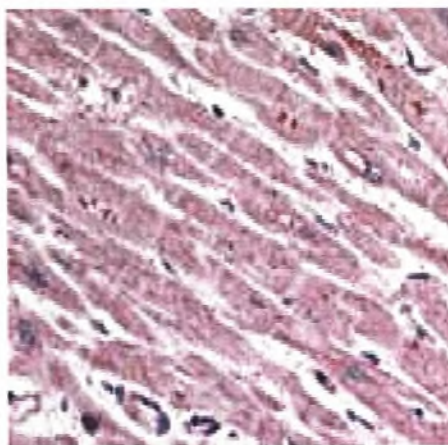
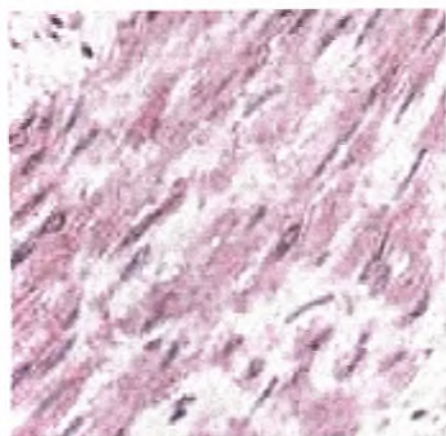
### • Σεροτονινεργικοί Υποδοχείς Και Περιφερικοί Ιστοί

Οι προαναφερόμενοι υποδοχείς εντοπίζονται και σε περιφερικά όργανα και καθορίζουν τη δράση της 5-HT σε αυτά. Για παράδειγμα, στους πνεύμονες προκαλείται αγγειοσυστολή που μπορεί να οδηγήσει σε πνευμονική υπέρταση λόγω ενεργοποίησης των υποδοχέων  $5\text{-HT}_{1B/1D}$  και  $5\text{-HT}_{1A}$  που εντοπίζονται στα κύτταρα του λείου μυός των πνευμονικών αρτηριών. Στην εντερική κοιλότητα η ενεργοποίηση των  $5\text{HT}_3$  και των  $5\text{-HT}_4$  που βρίσκονται σε απολήξεις του πνευμονογαστρικού νεύρου (κρανιακό νεύρο που ξεκινά από το εγκεφαλικό στέλεχος και καταλήγει στην καρδιά) προκαλεί ναυτία και εμετό και επηρεάζει την κινητικότητα του εντέρου. Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί η ενεργοποίηση των  $5\text{-HT}_4$  στα επινεφρίδια που διεγείρει την έκκριση αλδοστερόνης. Τέλος, οι  $5\text{-HT}_{1F}$  και  $5\text{-HT}_{2B}$  εντοπίζονται στα νεφρικά

σωληνάρια και η δράση της σεροτονίνης εκεί σχετίζεται με τη συστολή της ουροδόχου κύστης.

- **Ο Υποδοχέας 5-HT<sub>1B</sub> Και Η Δράση Του Στην Καρδιά**

Όπως προαναφέρθηκε μία από τις σημαντικότερες περιφερικές δράσεις του σεροτονινεργικού συστήματος αφορά το καρδιαγγειακό σύστημα. Το καρδιαγγειακό σύστημα αποτελείται από την καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία. Σε γενικές γραμμές η καρδιά αποτελείται από τέσσερα διαμερίσματα από τα οποία τα δύο μεγαλύτερα ονομάζονται κοιλίες και τα δύο μικρότερα κόλποι. Ο δεξιός κόλπος και η δεξιά κοιλία δέχονται το χρησιμοποιημένο αίμα από το σώμα και το στέλνουν μέσω της πνευμονικής αρτηρίας στους πνεύμονες, ενώ ο αριστερός κόλπος και η αντίστοιχη κοιλία παραλαμβάνουν το οξυγονωμένο αίμα και τροφοδοτούν τους ιστούς μέσω της αορτής. Το αγγειακό σύστημα αποτελείται από αγγεία με διαφορετικές ιδιότητες από τα οποία τα σημαντικότερα είναι οι αρτηρίες και οι φλέβες. Όλα όμως έχουν ένα κοινό δομικό χαρακτηριστικό, μια λεία μονοκυττάρια στοιβάδα από ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία επικαλύπτουν την εσωτερική επιφάνεια των αγγείων (αυτή που βρίσκεται σε άμεση επαφή με το αίμα). Εκτός από τα τριχοειδή που αποτελούνται μόνο από ενδοθήλιο τα υπόλοιπα αγγεία φέρουν επιπρόσθετες στοιβάδες από συνδετικό ιστό και λείο μυ. Σε αυτά τα κύτταρα του λείου μυός των αγγείων, της στεφανιαίας αρτηρίας που τροφοδοτεί με αίμα το μυοκάρδιο, της πνευμονικής αρτηρίας αλλά και στα μυοκαρδιακά κύτταρα της κοιλίας και των βαλβίδων έχει ανιχνευθεί η έκφραση των 5-HT<sub>1B</sub> υποδοχέων και έχει εξεταστεί η δράση της 5-HT .



**Εικόνα 1.8.** Η κατανομή του 5-HT<sub>1B</sub> υποδοχέα στο λείο μυ των αγγείων της καρδιάς (αριστερά) και σε τμήμα της καρδιάς (δεξιά).

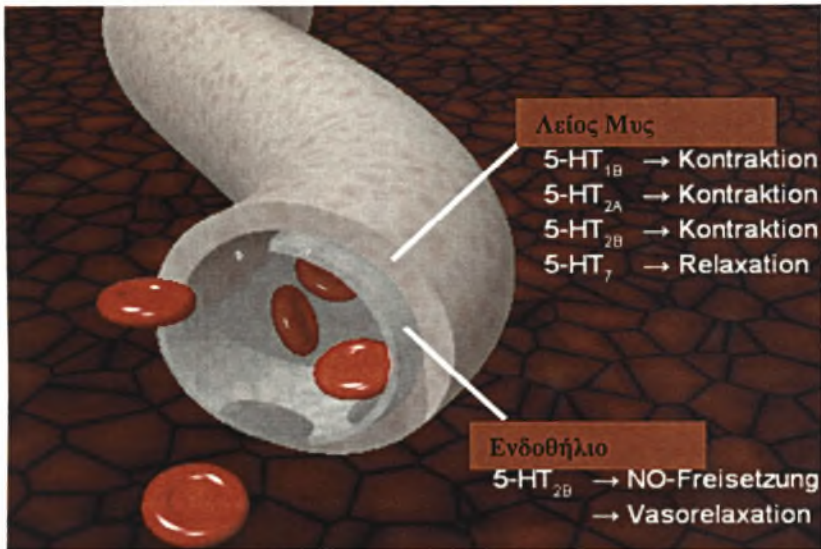
Στην εικόνα με μπλε διακρίνεται ο εντοπισμός του 5-HT<sub>1B</sub> στα αγγεία και σε κύτταρα της καρδιάς. Η βαφή έγινε με παραφίνη μετά από χρήση αντισωμάτων εξειδικευμένων για το συγκεκριμένο υποδοχέα στην ανθρώπινη καρδιά. Τα αντισώματα προέρχονται από κουνέλια στα οποία έγινε ανοσοποίηση με τη χρήση πεπτιδίων που προσδένονται ειδικά στον 5-HT<sub>1B</sub>.

Γενικά η δράση της σεροτονίνης στην καρδιά έχει θετική χρονοτρόπο (ρύθμιση του καρδιακού ρυθμού) και ιονοτρόπο (ρύθμιση της ικανότητας συστολής της καρδιάς) δράση. Η κύρια επίδραση της αφορά τους λείους μυς των αγγείων στα οποία μπορεί να προκαλέσει μεταβολή της αρτηριακής ακτίνας (συστολή ή διαστολή) ανάλογα με την αρχική κατάσταση (φυσιολογική ή παθολογική) στην οποία βρίσκονται. Αυτό επιτυγχάνεται είτε δρώντας απευθείας στο λείο μυ των αρτηριών είτε διαμέσου των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στα τριχοειδή πάλι στην καρδιά φαίνεται πως η 5-HT αυξάνει με κάποιο τρόπο την διαπερατότητα τους.

Ανάλυση mRNA για την έκφραση σεροτονινεργικών υποδοχέων σε αγγεία της καρδιάς έδειξε ότι μόνο πέντε από τους δεκατρείς γνωστούς GPCRs υποδοχείς σεροτονίνης εκφράζονται σε αυτά: 5-HT<sub>1B/1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>4</sub> και 5-HT<sub>7</sub>. Η πρόσδεση της 5-HT στους 5-HT<sub>1B</sub> στην πνευμονική και στεφανιαία αρτηρία της επιτρέπει να δρα όχι μόνο σαν αγγειοσυσταλτικός αλλά και μιτωτικός παράγοντας προωθώντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του λείου μυός. Πειράματα σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις μετταλοκορτικοειδών και αλάτων που επιφέρουν υψηλή αρτηριακή πίεση, έδειξαν ανιούσα ρύθμιση του 5-HT<sub>1B</sub> υποδοχέα στα τοιχώματα των αγγείων της καρδιάς. Αυτό το γεγονός σε συνδυασμό με την προκαλούμενη αγγειοσυστολή δηλώνει πως ο 5-HT<sub>1B</sub> υποβοηθά την διατήρηση της αυξημένης αρτηριακής πίεσης. Επίσης, βρέθηκε ότι χορήγηση ενός ειδικού για τον 5-HT<sub>1B</sub> αγωνιστή (sumatriptan) σε ανθρώπους, προκαλεί καθόλου ή πολύ μικρή συστολή των στεφανιαίων αρτηριών, γεγονός που παρουσία



ενός οπουδήποτε αγγειοδραστικού παράγοντα που εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν παρατηρείται. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω αύξησης της απελευθέρωσης των ενδοκυττάρων ιόντων ασβεστίου, σαν αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μηχανισμού αυτού του αγγειοδραστικού παράγοντα. Επομένως, η μείωση της διαμέτρου των αγγείων μπορεί να οφείλεται σε συνδυασμένη δράση του 5-HT<sub>1B</sub> και άλλων υποδοχέων που γειτονεύουν με αυτούς.



**Εικόνα 1.9.** Σχηματική αναπαράσταση αρτηρίας και σύνοψη των αποτελεσμάτων της ενεργοποίησης των σεροτονινεργικών υποδοχέων στο ενδοθήλιο και στο λείο μυ των αγγείων.

Στην εικόνα φαίνεται ότι ενεργοποίηση των 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> και 5-HT<sub>2A</sub> στο λείο μυ οδηγεί σε συστολή ενώ του 5-HT<sub>7</sub> σε χαλάρωση της αρτηρίας. Στο ενδοθήλιο ενεργοποίηση του 5-HT<sub>2B</sub> αντίθετα έχει σαν συνέπεια την διαστολή της αρτηρίας.

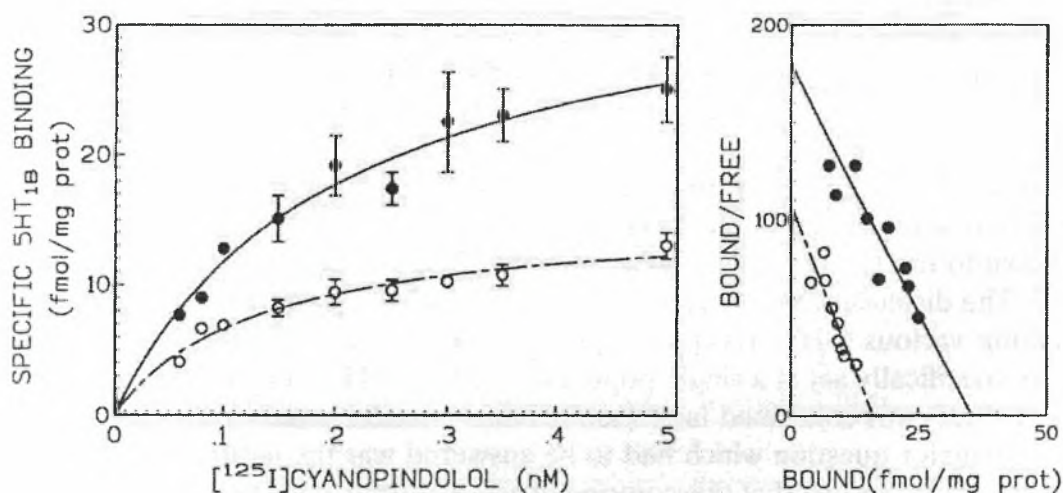
Πρόσφατα έχει βρεθεί η έκφραση του 5-HT<sub>1B</sub> και στις τέσσερις καρδιακές βαλβίδες (κολποκοιλιακές και μηνοειδείς). Αυτό πραγματοποιήθηκε με εξαγωγή και απομόνωση DNA από καρδιές ατόμων-δεκτών σε διαδικασίες μεταμόσχευσης, εφαρμογή της μεθόδου της αντίστροφης PCR (RT-PCR, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) και ειδικούς για το γονίδιο του 5-HT<sub>1B</sub> εκκινητές. Η φυσιολογική του λειτουργία μπορεί να σχετίζεται με την ικανότητα των καρδιακών βαλβίδων να ανοιγοκλείνουν φροντίζοντας έτσι για τη ομαλή ροή του αίματος στην καρδιά.

Τέλος, μελέτες που αφορούν την παρουσία του 5-HT<sub>1B</sub> στα κύτταρα της κοιλίας περιλαμβάνουν την παρασκευή ενός ανασυνδυασμένου αδενοϊού του οποίου η εισαγωγή σε αυτά τα κύτταρα επιτρέπει την υπερέκφραση του 5-HT<sub>1B</sub>. Περαιτέρω ενεργοποίηση του με ειδικό αγωνιστή έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός

επανορθωτικού ρεύματος  $K^+$ , όμοιο με αυτό που προκαλεί η ενεργοποίηση των μουσκαρινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης.

- **Το Νευροπεπτίδιο LSAL Και Ο  $5\text{-HT}_{1B}$  Υποδοχέας**

Η υπόθεση ότι ένας ενδογενής συνδέτης ρυθμίζει τη δραστηριότητα των  $5\text{-HT}_{1B}$  υποδοχέων αρχικά παρουσιάστηκε το 1981 ωστόσο ο τελικός χαρακτηρισμός αυτού του παράγοντα επετεύχθη πρόσφατα. Ένα ενδογενές νευροπεπτίδιο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε από εγκεφαλικό ομογενοποίηση θηλαστικών (βοδιού και αρουραίου). Πρόκειται για ένα τετραπεπτίδιο, leucine-serine-alanine-leucine (LSAL) που ονομάστηκε  $5\text{-HT-moduline}$  και αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς  $5\text{-HT}_{1B}$  ως αλλοστερικός μη συναγωνιστικός τροποποιητής καθώς προσδένεται σε μια άλλη θέση από αυτή της  $5\text{-HT}$  ανάστροφα και με υψηλή συγγένεια ( $K_D < 1\text{nM}$ ). Με αυτό τον τρόπο προκαλεί μεταβολές στη διαμόρφωση του υποδοχέα και οδηγεί σε διαφορετική κυτταρική απόκριση.



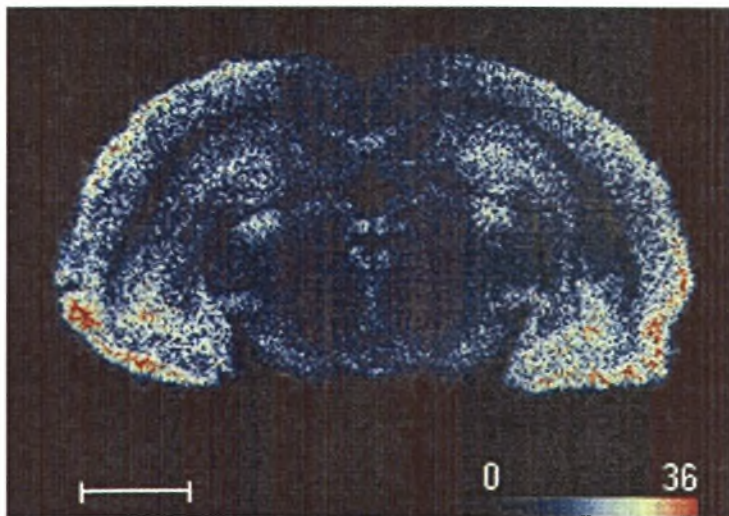
**Εικόνα 1.10. Μη συναγωνιστική αλληλεπίδραση του LSAL με τους  $5\text{-HT}_{1B}$ .**

Στην εικόνα φαίνεται μία καμπύλη κορεσμού για τους  $5\text{-HT}_{1B}$  με τα αντίστοιχα διαγράμματα που δηλώνουν τη μέγιστη πρόσδεση ενός ανταγωνιστή ( $[^{125}\text{I}]$  Cyanopindolol) απουσία -●- ή παρουσία -○- LSAL. Το πείραμα δείχνει ότι η αλληλεπίδραση δεν αντιστοιχεί σε ανταγωνιστικό μηχανισμό δράσης αλλά περιγράφει ένα μη συναγωνιστικό μηχανισμό εφόσον το μέγιστο ποσό πρόσδεσης ( $B_{max}$ ) φαίνεται να μειώνεται παρουσία LSAL αλλά δεν επηρεάζεται η σταθερά της συγγένεια αποδέσμευσης ( $K_D$ ).



Η παρουσία αυτού του πεπτιδίου 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. Επίσης, το πεπτίδιο απελευθερώνεται από τα συναπτοσώματα με  $K^+/Ca^+$  εξαρτώμενο μηχανισμό, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι πρόκειται για ένα νέο νευροδιαβιβαστή.

Πρόκειται για μια πολύ εξειδικευμένη αλληλεπίδραση με τους  $5-HT_{1B}$  η οποία δεν επηρεάζει κανέναν άλλο σεροτονινεργικό ή μη σεροτονινεργικό υποδοχέα. Επίσης, δεν αλληλεπιδρά με τους μεταφορείς της 5-HT. Μελέτες σύνδεσης με ραδιοσημασμένη 5-HT-moduline έδειξαν ότι η κατανομή των θέσεων σύνδεσης του πεπτιδίου συμπίπτει απόλυτα με αυτή των  $5-HT_{1B}$  υποδοχέων ενώ η ραδιοσήμανση απουσιάζει εντελώς από τα  $5-HT_{1B}$  knock-out ποντίκια. Επίσης, πειράματα με χορήγηση αγωνιστή του  $5-HT_{1B}$  δείχνει πως η δράση του LSAL γίνεται αισθητή μόνο παρουσία αυτού του ειδικού αγωνιστή. Αντίθετα, η δική του και μόνο παρουσία δεν επαρκεί για να μειωθεί σημαντικά η έκκριση σεροτονίνης.

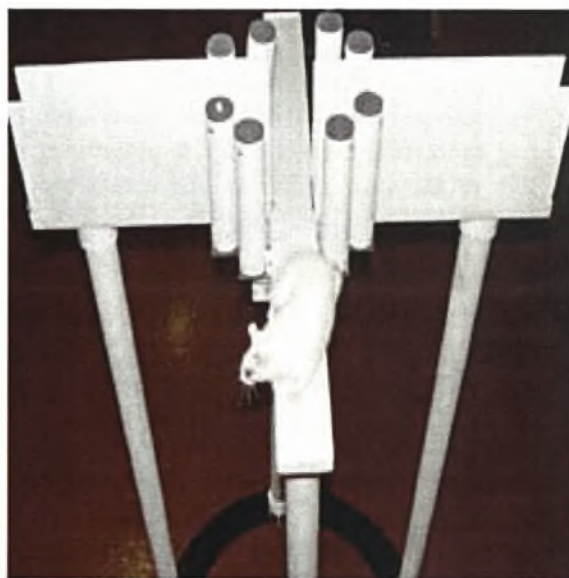
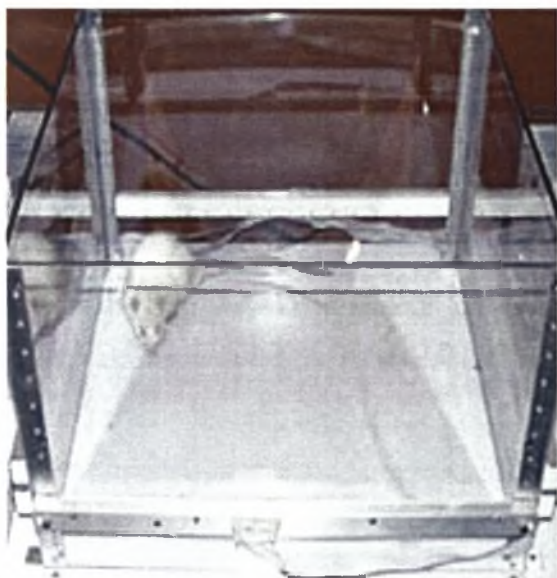


**Εικόνα 1.11.** Ψηφιακό αυτοραδιογράφημα της ραδιενεργά σημασμένης LSAL σε περιοχή εγκεφάλου αρουραίου με ανάλυση  $\beta$ - imager.

Στην εικόνα διακρίνεται η κατανομή του LSAL σε 5-HT και μη νευρώνες. Η πρόσδεση της παρουσιάζει τη ίδια ετερογενή κατανομή με αυτή των  $5-HT_{1B}$  στον εγκέφαλο. Μια τέτοια εικόνα απουσιάζει από  $5-HT_{1B}$  knock-out ποντίκια. Με κόκκινο διακρίνονται οι σημασμένες θέσεις πρόσδεσης του LSAL.

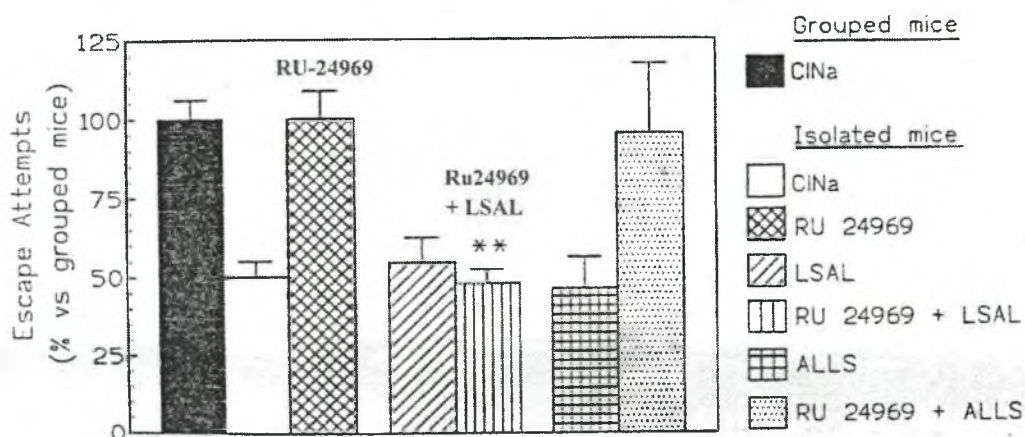
- **Λειτουργικές Ιδιότητες Του LSAL**

Με την πρόσδεση του LSAL στον 5-HT<sub>1B</sub> παρεμποδίζεται η σύνδεση του υποδοχέα με τη G<sub>i</sub> 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<sub>1B</sub> αγωνιστής σε tests συμπεριφοράς που πραγματοποιούνται με ποντίκια (social interaction tests). Αυτά τα tests εξετάζουν είτε την επίδραση της χορήγησης αγωνιστών και LSAL στην κινητική δραστηριότητα των ποντικών (Open Field Locomotor Activity Test) είτε την ερευνητική τους ικανότητα κάτω από καταστάσεις άγχους με την χορήγηση LSAL (Elevated Plus Maze Test).



**Εικόνα 1.12. Social interaction tests με ποντίκια.**

Απεικόνιση των μέσων που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση είτε ενός Open Field Locomotor Activity Test (αριστερά) είτε ενός Elevated Plus Maze Test (δεξιά). Και οι δύο τεχνικές μετρούν είτε το χρόνο μετακίνησης του ποντικού είτε το χρόνο παραμονής του στα ανοιχτά άκρα του «σταυρού».

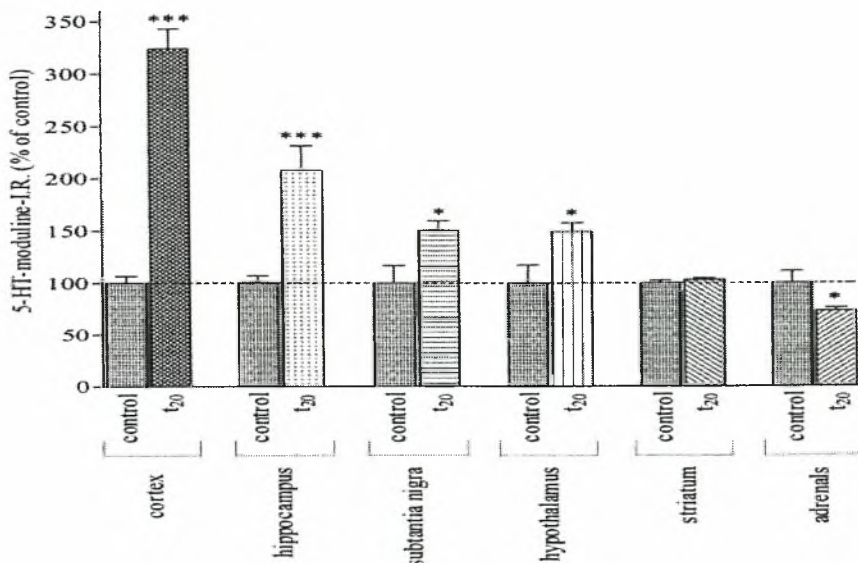


**Εικόνα 1.13. Social interaction tests σε ομαδοποιημένα και μη ποντίκια παρουσία και απουσία LSAL και ενός αγωνιστή των 5-HT<sub>1B</sub>, RU 24969.**

Στο παραπάνω ραβδόγραμμα φαίνεται ότι τα απομονωμένα ποντίκια παρουσιάζουν μειωμένη κινητική συμπεριφορά που χαρακτηρίζεται από μείωση της ερευνητικής τους ικανότητας παρουσία (4<sup>η</sup> στήλη) και απουσία LSAL (2<sup>η</sup> στήλη). Η ένεση του RU 24969 στα απομονωμένα ποντίκια απουσία LSAL (3<sup>η</sup> στήλη) επαναφέρει την κινητική δραστηριότητα των ποντικών σε φυσιολογικά επίπεδα ενώ παράλληλα με τη δράση του LSAL τη μειώνει αρκετά, γεγονός που αποδεικνύει πως το LSAL δρα αγχολυτικά στα ποντίκια (μειώνοντας την έκκριση 5-HT). Στις δύο τελευταίες στήλες χρησιμοποιήθηκε ένα τετραπεπτιδίο αντίστροφο του LSAL, το ALLS, για επιβεβαίωση λήψης σωστών αποτελεσμάτων με το LSAL (εσωτερικό control).

Η εμπλοκή της 5-HT-moduline σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις (άγχος, κατάθλιψη) προσδιορίστηκε από διάφορες πειραματικές παρατηρήσεις, 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 καθώς επίσης είναι καλά τεκμηριωμένο το γεγονός ότι η αύξηση της δραστηριότητας της σεροτονίνης είναι στενά συνδεδεμένη με τη δημιουργία του άγχους. Η υπόθεση ότι η 5-HT-moduline παίζει ένα ρόλο σε αυτόν τον μηχανισμό προτάθηκε με βάση την παρατήρηση σε πειράματα (μέτρηση του LSAL με ανταγωνιστική dot-Elisa χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα) ότι οξύ stress ακινησίας και χορήγηση i.c.v της 5-HT-moduline απευαισθητοποιεί τους 5-HT<sub>1B</sub> υποδοχείς. Οι αλλαγές των επιπέδων του τετραπεπτιδίου στις διάφορες εγκεφαλικές περιοχές οφείλονται σε τροποποιήσεις στο ρυθμό σύνθεσης, επεξεργασίας και αποδόμησης του. Συμπερασματικά, ιδιαίτερα στην περιοχή του υποθαλάμου, η οποία εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του σεροτονινεργικού και ενδοκρινικού συστήματος μέσω του υποθαλαμικού-υποφυσιακού-επινεφριδιακού

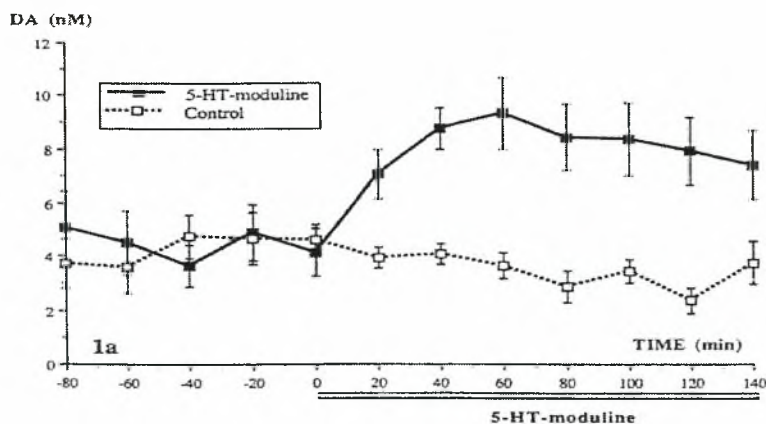
άξονα, η στρεσογόνος διέγερση προκαλεί αλλαγή στην απελευθέρωση πολλών νευροπεπτιδίων όπως η ουσία P. Με τον ίδιο τρόπο θα μπορούσε και το LSAL να συμμετέχει στην απόκριση του οργανισμού σε στρεσογόνες καταστάσεις.



**Εικόνα 1.14. Η αύξηση του LSAL μετά από έντονο stress.**

Στο ραβδόγραμμα φαίνεται η συγκέντρωση επί % του LSAL σε διάφορες εγκεφαλικές περιοχές (φλοιός, ιππόκαμπος, φαία ουσία, υποθάλαμος, ραβδωτό σώμα και επινεφρίδια) μετά το τέλος της επίδρασης 20 min έντονου stress. Σε κάθε περίπτωση δίνεται και το ποσοστό της συγκέντρωσης του τετραπεπτιδίου κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.

Αυτός λοιπόν ο μηχανισμός της αλληλεπίδρασης του LSAL με τους 5-HT<sub>1B</sub> επιτρέπει στη σεροτονίνη να εμπλέκεται σε τόσες διαφορετικές λειτουργίες, δηλαδή με τόσους διαφορετικούς νευροδιαβιβαστές ώστε να συμμετέχει στη λεπτή ρύθμιση της δραστηριότητας του κεντρικού νευρικού συστήματος σε δεδομένα ερεθίσματα.



**Εικόνα 1.15. Η 5-HT moduline αυξάνει την απελευθέρωση της ντοπαμίνης.**

Στο διάγραμμα διακρίνεται η απελευθέρωση της ντοπαμίνης απουσία και παρουσία LSAL. Είναι ξεκάθαρη η αύξηση της συγκέντρωσης της μετά τη δράση του ενδογενούς τετραπεπτιδίου στους ετερόλογους 5-HT<sub>1B</sub>.

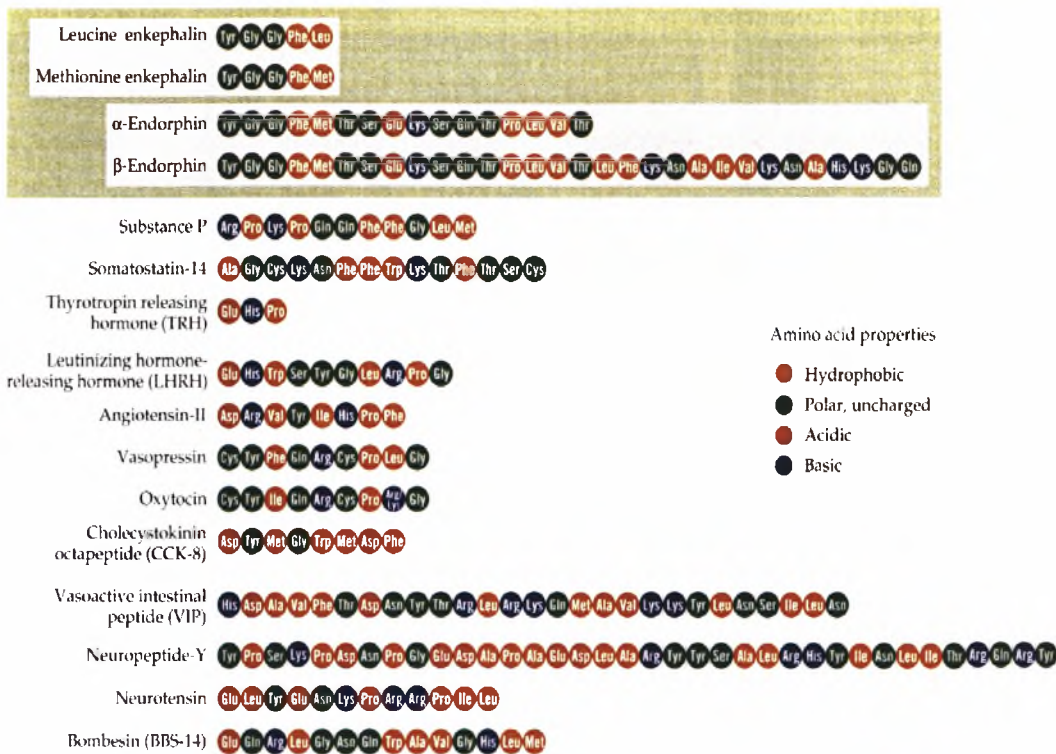


- **Νευροπεπτίδια Και Πρόδρομα Μόρια**

Ένα από τα πλέον σημαντικά κριτήρια που πρέπει να πληρεί το LSAL για να θεωρηθεί νευροδιαβιβαστής είναι να παράγεται από ένα πρόδρομο μόριο όπως τα περισσότερα νευροπεπτίδια. Άλλωστε σκοπός αυτής της μελέτης είναι να βρεθεί η πρόδρομη πρωτεΐνη από την οποία με πρωτεολυτική επεξεργασία από τα κατάλληλα ένζυμα προκύπτει το LSAL.

Τα νευροδραστικά πεπτίδια είναι παράγωγα εκκρινόμενων πρωτεϊνών οι οποίες σχηματίζονται στο κυτταρικό σώμα. Τα πολυπεπτίδια αυτά αποτελούν τα πρώιμα προπεπτίδια τα οποία στη συνέχεια θα διασπαστούν με τη βοήθεια πρωτεολυτικών ενζύμων στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Ακολούθως, 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 νευροπεπτίδια εντοπίζονται σε κάθε κατηγορία νευρών όπως στα αισθητήρια νεύρα (ουσία P, καλσιτονίνη, νευροκινίνη), στα σωματικά κινητικά νεύρα, στα νεύρα που συμμετέχουν στην αντίληψη του πόνου (ενδορφίνες,εγκεφαλίνες, δυνορφίνες), στα νεύρα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (νευροτενσίνη, γαστρίνη, χολοκυστοκινίνη, PAKAP). 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, αγγειοπιεσίνη, σωματοστατίνη, ωχρινοποιητική ορμόνη και απελευθερωτική ορμόνη της θυρεοτροπίνης). Συνήθως, τα νευροδραστικά πεπτίδια δρουν μέσω υποδοχέων συνδεδεμένων με G πρωτεΐνες και έχουν περισσότερο ρυθμιστική δράση στους μετασυναπτικούς νευρώνες.



**Εικόνα 1.16. Αμινοξική αλληλουχία μερικών νευροπεπτιδίων που προέρχονται από πρόδρομα μόρια.**

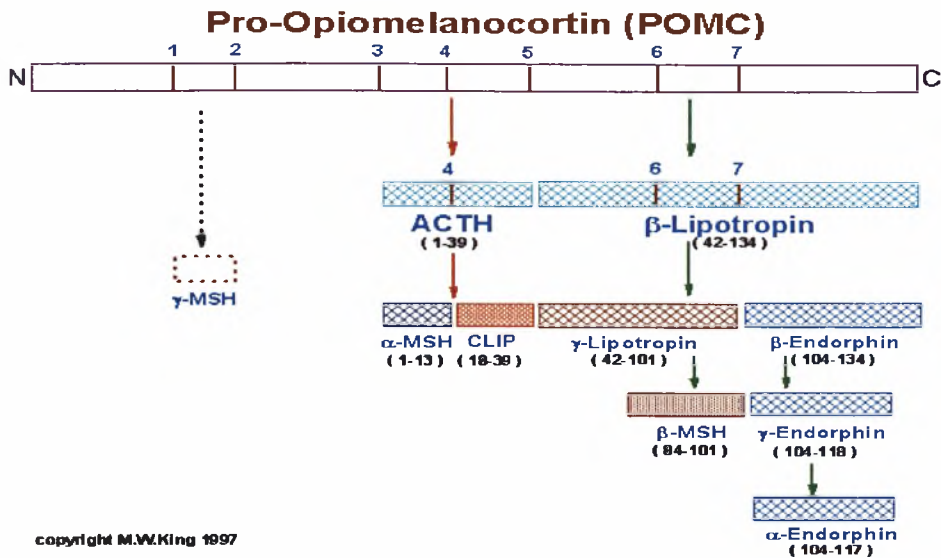
Στην εικόνα διακρίνονται οι εγκεφαλίνες, οι ενδορφίνες, η ουσία P, η αγγειοτενσίνη, η βασοπρεσσίνη, η χολοκυστοκινίνη, το νευροπεπτίδιο Y και η νευροτενσίνη.

Τις περισσότερες φορές, πολλά διαφορετικά νευροδραστικά πεπτίδια κωδικεύονται από ένα μόνο συνεχές mRNA, το οποίο μεταγράφεται σε ένα μεγάλο πρωτεϊνικό πρόδρομο ή πολυπρωτεΐνη. Τα προ-νευροπεπίδια μπορούν να περιέχουν στην αλληλουχία τους:

*1) πολλά διαφορετικά πεπτίδια με διακριτές δραστηριότητες*

Παράδειγμα αποτελεί το πρόδρομο μόριο της προοπιομελανοκορτίνης (POMC), το οποίο μετά από επεξεργασίες όπως η γλυκοσυλίωση, η ακετυλίωση και η πρωτεόλυση, παράγει 8 δραστικά πεπτίδια (η αδρενοκορτικοτροπική ορμόνη (ACTH), η β-λιποτροπίνη (β-LPH), η α,β,γ-μελανοτροπίνη (α,β,γ-MSH), το πεπτίδιο ενδιάμεσου λοβού (CLIP), η γ-λιποτροπίνη και η β-ενδορφίνη).

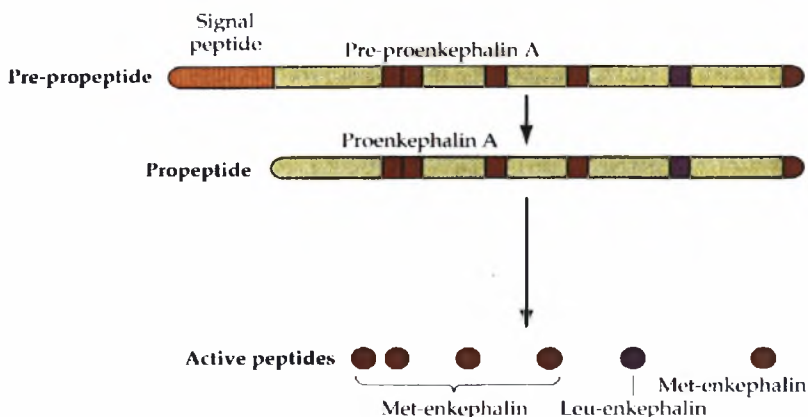




**Εικόνα 1.17. Επεξεργασία του πρόδρομου μορίου POMC.**

Στην εικόνα καταδεικνύονται οι θέσεις «κοπής» από τους αριθμούς 1-7 και αποτελούνται από τις αλληλουχίες Arg-Lys, Lys-Arg or Lys-Lys. Η αδρενοκορτικοτροπική ορμόνη (ACTH) και η β-λιποτροπίνη (β-LPH) είναι προϊόντα στα κορτικοτροφικά κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης κάτω από την επίδραση της κορτικοτροπίνης (CRH). Η α-μελανοτροπίνη (α-MSH), το πεπτίδιο 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.

Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί η pre-pro-νοσισεπτίνη (PPNOC) η οποία με πρωτεόλυση δίνει μεταξύ άλλων πεπτιδίων και τη νοσισεπτίνη η οποία εκκρίνεται από τους νευρώνες σαν απόκριση στο αίσθημα του πόνου. Ακόμη μία πρόδρομη πρωτεΐνη η pre-pro-εγκεφαλίνη μπορεί μετά από επεξεργασία με ενδοπεπτιδάσες να δώσει 2 ενεργά πεπτίδια τη Met-εγκεφαλίνη και την Leu-εγκεφαλίνη.



**Εικόνα 1.18. Επεξεργασία του πρόδρομου μορίου της pre-pro-εγκεφαλίνης.**

Στην εικόνα φαίνεται το πρόδρομο μόριο των εγκεφαλινών που τελικά δίνει πέντε μόρια Met-εγκεφαλίνης και ένα μόριο Leu-εγκεφαλίνης που αποτελούν και τα δραστικά νευροπεπτίδια.

## 2) Πολλά αντίγραφα του ίδιου πεπτιδίου

Παράδειγμα αποτελεί το πρόδρομο μόριο της Phe-Met-Arg-Phe (FMRF-amide) που συντίθεται από τους νευρώνες της *Aplysia* και περιέχει 28 αντίγραφα του τετραπεπτιδίου στην αλληλουχία του.

## 3) Μόνο ένα βιολογικά ενεργό πεπτίδιο

Παράδειγμα αποτελεί το πρόδρομο μόριο της αυξητικής ορμόνης.

Τα ένζυμα που λειτουργούν για τη μετατροπή και ωρίμανση πρόδρομων νευροπεπτιδίων ονομάζονται μετατροπάσες προπρωτεϊνών (preprotein convertases-PCs). Έχουν αναγνωρισθεί και μελετηθεί επτά μέχρι σήμερα εκ των οποίων οι PC1 και PC2 βρίσκονται ειδικά σε νευρικά και ενδοκρινικά κύτταρα και έχει δείχθει ότι δρουν στην ωρίμανση πολλών πεπτιδορμονών μεταξύ των οποίων και νευροπεπτίδια όπως η TRH. Τα ένζυμα αυτά είναι οι ενδοπεπτιδάσες που υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς καρβοξυτελικά βασικών αμινοξέων κυρίως της αργινίνης-λυσίνης.

Η ρύθμιση της σύνθεσης και της απελευθέρωσης των πεπτιδίων από τους πεπτιδεργικούς νευρώνες αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης των πεπτιδίων. Η ρύθμιση αυτή μπορεί να συμβεί τόσο στο επίπεδο μεταγραφής των γονιδίων των προπεπτιδίων όσο και σε κυτταρικό. Σε γονιδιακό επίπεδο 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. Σε κυτταρικό επίπεδο το παράδειγμα της POMC είναι χαρακτηριστικό. Η πρωτεΐνη 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.

Με βάση επομένως όσα γνωρίζουμε για τα πρόδρομα πεπτίδια και την επεξεργασία που υφίστανται καθώς και το φυσιολογικό και λειτουργικό ρόλο του LSAL προχωρήσαμε στην προσπάθεια ανεύρεσης του πρόδρομου μορίου του σημαντικού όπως φαίνεται αυτού νευροπεπτιδίου.

## **2. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 1. Ομογενοποίηση ιστού

1. Εγκέφαλος και περιφερικοί ιστοί (επινεφρίδια, συκώτι, πνεύμονες, καρδιά, νεφρά) 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 <sub>2</sub> O	8.7 ml
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>10 ml</b>

Τα διαλύματα stock παρασκευάζονται ως εξής:

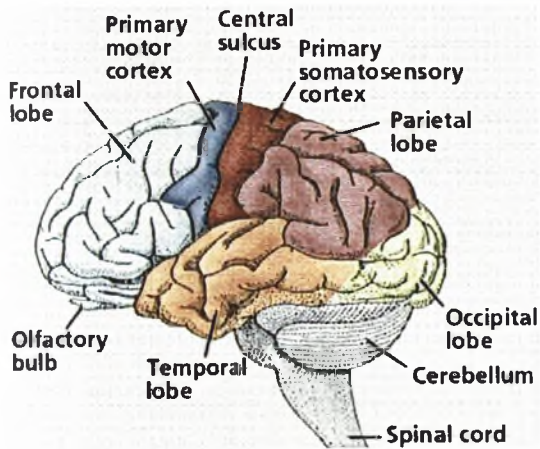
**PMSF (0.1M):** Διαλύονται 17,4 mg PMSF σε 1 ml ισοπροπανόλης

**EDTA (0.5M):** Προστίθενται σε 186,1 gr disodium ethylenediaminetetraacetate•2H<sub>2</sub>O σε 800 ml δισ απεσταγμένου H<sub>2</sub>O και αναδεύονται καλά. Το pH ρυθμίζεται με NaOH στο 8,0.

**PBS 10x:** Διαλύονται 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.44 gr NaHPO<sub>4</sub> σε 800 ml δισ απεσταγμένου H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται με HCl στο 7.4. Προστίθεται δισ απεσταγμένο H<sub>2</sub>O μέχρι το 1 lt.

Πιο συγκεκριμένα:

- ο εγκέφαλος διαλύεται σε 2 ml διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 20 mg/ml.
- Τα επινεφρίδια διαλύονται σε 1 ml διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 18 mg/ml.
- Τμήμα του συκωτιού σε 2 ml διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 45 mg/ml.
- Ο πνεύμονας σε 2 ml διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 25,5 mg/ml.
- Τμήμα της καρδιάς σε 2 ml διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 24 mg/ml.
- Τμήμα των νεφρών σε 2 ml διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 38 mg/ml.



**Adrenal Gland**

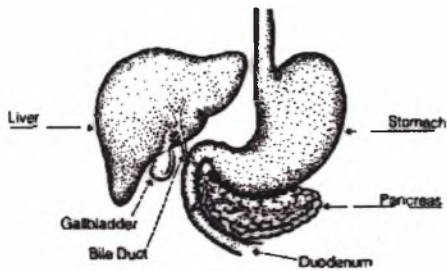
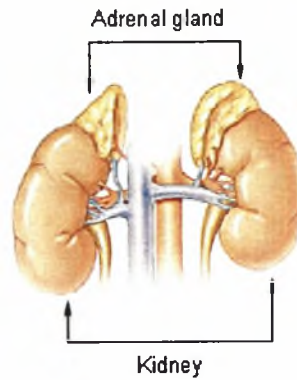
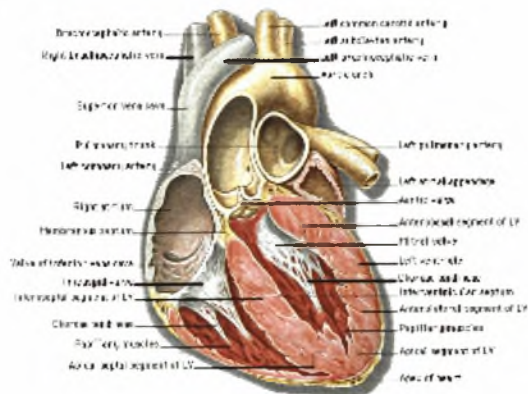
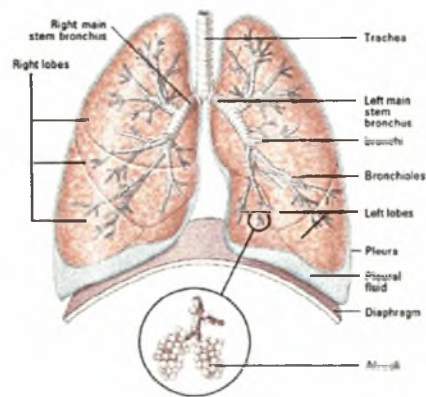


Figure 3

The Liver, Gallbladder, and Pancreas



Εικόνα 2.1. Σχηματική απεικόνιση εγκεφάλου, επινεφριδίων, συκωτιού, πνευμόνων, καρδιάς και νεφρών.

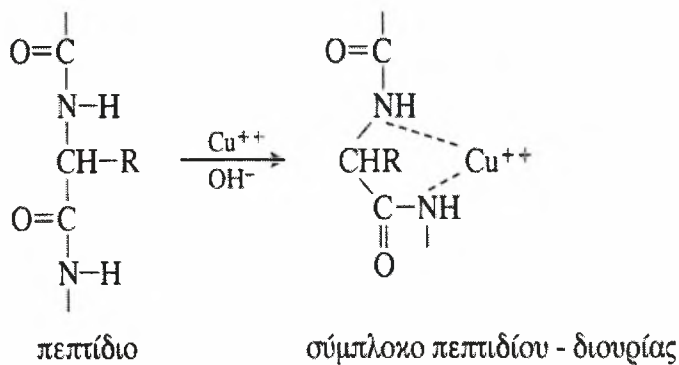
2. Επώαση του ομογενοποιημένου για 20 min στους 4°C.
3. Φυγοκέντρηση σε eppendorfs για 15 min στα 1200g και σε θερμοκρασία 4°C. Λαμβάνεται το υπερκείμενο ενώ το ίζημα φυλάσσεται στους 4°C (αφού πρώτα εξετάστηκε η δραστηκότητά του).
4. Το υπερκείμενο του φλοιού και του ιππόκαμπου κλασματοποιείται ανά 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 2.2). Πιο συγκεκριμένα, η εμφάνιση χρώματος είναι το αποτέλεσμα της αναγωγής των ιόντων  $\text{Cu}^{2+}$  σε  $\text{Cu}^+$  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 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 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 αμινιξέων, τυροσίνης και τρυπτοφάνης .





**Εικόνα 2.2:** Αντίδραση διουρίας. Οι πεπτιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών όταν αντιδράσουν με αραιό διάλυμα θειικού 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  $\lambda_{\text{max}}=750 \text{ nm}$ .

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 σε NaOH 1N. Το ομογενοποίημα 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 αραιώσης 1/100) + 50 μl NaOH (τελική αραιώση 1/1000)

Οι παραπάνω αραιώσεις πραγματοποιούνται εις διπλούν.

#### ▪ 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
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>50 ml</b>

2. Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας αναδεύεται καλά στο vortex.
3. Επώαση 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Προσθήκη 100 μl αντιδραστηρίου Folin 1:3 (1 ml αντιδραστήριο Folin σε 2 ml H<sub>2</sub>O) 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. Σχεδιάσμος της καμπύλης αναφοράς.

Τα διαλύματα stock παρασκευάζονται ως εξής:

**C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub> 10%:** 1 gr C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub> σε 10 ml H<sub>2</sub>O

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 %:** 2 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> σε 10 ml H<sub>2</sub>O

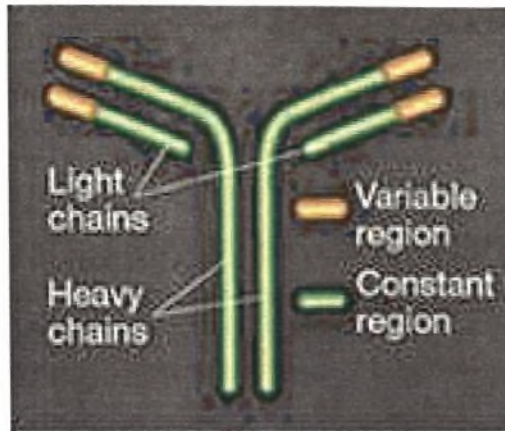
#### ▪ Υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών

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. Ανοσοκατακρήμιση

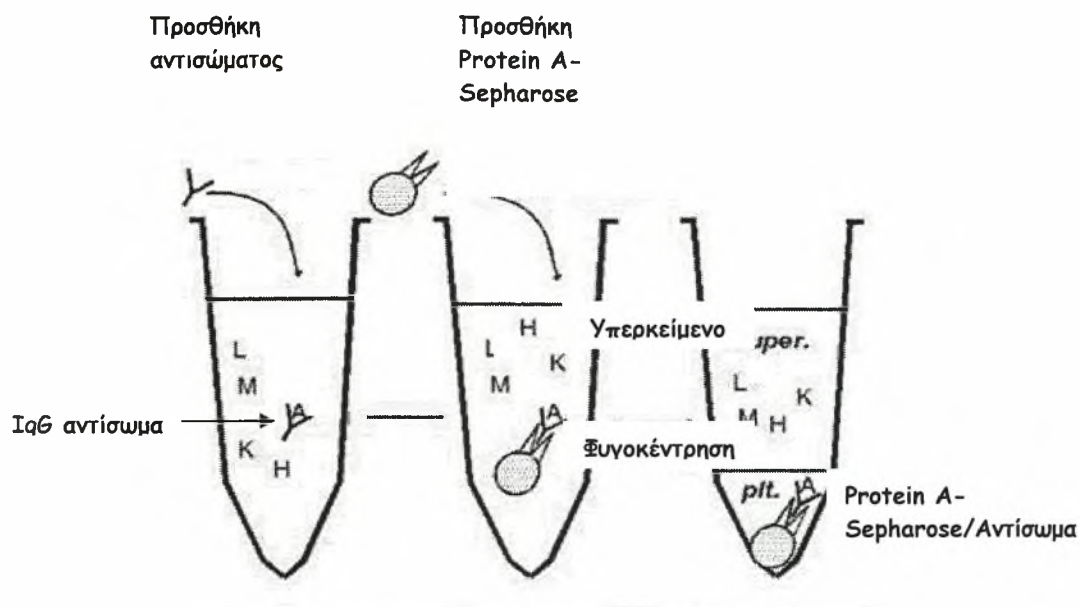
#### ▪ Αρχή της Μεθόδου

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 κατακρήμισης όπου το αντιγόνο και το αντίσωμα αναμιγνύονται σε ένα διάλυμα. Όπως είναι γνωστό, κάθε ανοσοσφαιρίνη διαθέτει δύο περιοχές εξειδικευμένης πρόσδεσης του αντιγόνου (Fab).



**Εικόνα 2.3: 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.



**Εικόνα 2.4: Ανοσοκατακρήμνιση.**

Σε ένα μίγμα πρωτεϊνών (L,M,K,H,A) προστίθεται αντίσωμα IgG που αναγνωρίζει και δεσμεύει τις ειδικές για αυτό πρωτεΐνες. Εν συνεχεία, προστίθεται η πρωτεΐνη A- Sepharose στην επιφάνεια της οποίας προσδένεται το αντίσωμα και δημιουργείται το σύμπλοκο πρωτεΐνη A- αντίσωμα- αντιγόνου το οποίο με φυγοκέντρηση κατακρημνίζεται. 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 μl ομογενοποιημένου ιστού διαλύονται σε 500 μl 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 μl
SDS 10%	500 μl
β-μερκαπτοαιθανόλη 100% v/v	500 μl
Δις απεσταγμένο H <sub>2</sub> O	3750 μl
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>5 ml</b>

2. Βράσιμο στους 100°C για 5 min. Έτσι, επιτυγχάνεται η μετουσίωση των πρωτεϊνών.
3. Το παραπάνω διάλυμα προεπώζεται 1h στους 4°C παρουσία 120 µl Protein-A-Sepharose (0,01 gr protein-A-Sepharose σε 100 µl H<sub>2</sub>O) .
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 µl) τοποθετείται σε erpendorf. Στη συνέχεια, προστίθενται σε αυτό 5-6 µl 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 <sub>2</sub> O	3895 µl
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>5 ml</b>

6. Τα δείγματα επωάζονται 1h στους 4°C με ανακίνηση παρουσία 20-40 µl protein-A-Sepharose σε κάθε erpendorf. Με αυτόν τον τρόπο, το σύμπλοκο αντισώματος-πρωτεΐνης δεσμεύεται στην protein-A-Sepharose.
7. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται 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 φυγοκέντρωση (10,000g x 1min 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 $\mu$ l
Tween 10% v/v	50 $\mu$ l
δισ απεσταγμένο H <sub>2</sub> O	4700 $\mu$ l
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>5 ml</b>

**Tris**

Tris 200 mM pH 7.4	250 $\mu$ l
δισ απεσταγμένο H <sub>2</sub> O	4750 $\mu$ l
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>5 ml</b>

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

Tris 200 mM pH 7.4	250 $\mu$ l
SDS 10% w/v	200 $\mu$ l
γλυκερόλη 100% v/v	100 $\mu$ l
μπλε της βρωμοφαινόλης 0,1% w/v	100 $\mu$ l
μερκαπτοαιθανόλη 100% v/v	100 $\mu$ l
δισ απεσταγμένο H <sub>2</sub> O	250 $\mu$ l
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>1 ml</b>

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 πηκτή 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 ( $f$ ).

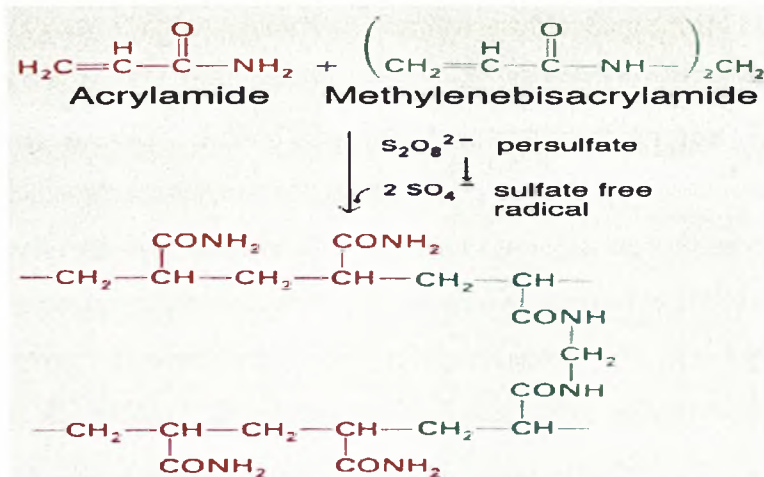
$$U = Ez/f \quad (1)$$

Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πηκτή κυρίως για δύο λόγους: 1) η πηκτή καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις θερμοκρασίας-απαραίτητη προϋπόθεση για σωστό διαχωρισμό 2) η πηκτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα δια μέσου της πηκτής ενώ τα μεγάλα μόρια παραμένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα από την πηκτή.

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 Ν,Ν'-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 Ν,Ν'-μεθυλενο-δισ ακρυλαμιδίου (του απαραίτητου αντιδραστηρίου δια τις διασυνδέσεις) στον πολυμερισμό για το σχηματισμό της πηκτής.

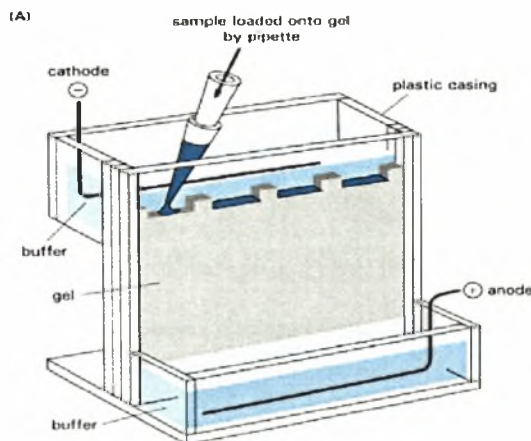
Με άλλα λόγια, το μέγεθος των πόρων του πολυμερούς που προκύπτει είναι συνάρτηση του βαθμού του πολυμερισμού, ο οποίος ποικίλει ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των μονομερών. Η αντίδραση πολυμερισμού αρχίζει με την προσθήκη του υπερθεϊκού αμμωνίου (APS: ammonium persulfate) που δημιουργεί ελεύθερες

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:



Εικόνα 2.5: 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.

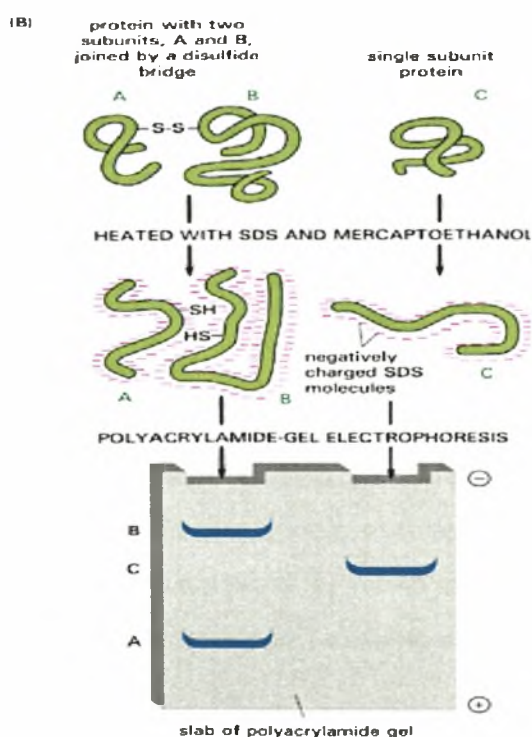


Εικόνα 2.6: Συσκευή ηλεκτροφόρησης πηκτών πολυακρυλαμιδίου.

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 δωδεκακυλοθειϊκό 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 λογαριθμικώς από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης.



Εικόνα 2.7: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

- **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<sub>2</sub>O, διηθείται και συμπληρώνεται με H<sub>2</sub>O μέχρι τα 100 ml.

**Tris 1.5 M, pH 8.8 :** 5,449 gr Tris base σε 30ml H<sub>2</sub>O.

**Tris 1 M pH 6.8 :** 6,05 gr Tris base σε 50ml H<sub>2</sub>O.

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

**Ammonium persulfate 10%:** Το υπερθειικό αμμώνιο παρασκευάζεται κάθε εβδομάδα, 0,1 gr ammonium persulfate σε 1 ml H<sub>2</sub>O.

**TEMED:** Το TEMED (Sigma) όπως και το υπερθειικό 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 <sub>2</sub> O	990 ml
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>1 lt</b>

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.



<b>Resolving Gel 8%</b>	<b>10 ml</b>	<b>20 ml</b>	<b>30 ml</b>	<b>40 ml</b>	<b>50 ml</b>
H <sub>2</sub> 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

<b>Resolving Gel 10%</b>	<b>10 ml</b>	<b>20 ml</b>	<b>30 ml</b>	<b>40 ml</b>	<b>50 ml</b>
H <sub>2</sub> 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

<b>Stacking Gel 5%</b>	<b>1 ml</b>	<b>2 ml</b>	<b>3 ml</b>	<b>5 ml</b>	<b>10 ml</b>
H <sub>2</sub> 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

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 H<sub>2</sub>O. 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 φορμαλδεΐδη η οποία ανάγει τα ιόντα αργύρου και συντελεί στο σχηματισμό αδιάλυτου μεταλλικού αργύρου (καφέ χρώμα). Η προηγούμενη αναγωγή προωθείται από τις πρωτεΐνες της πηκτής. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται έχει ως εξής:

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

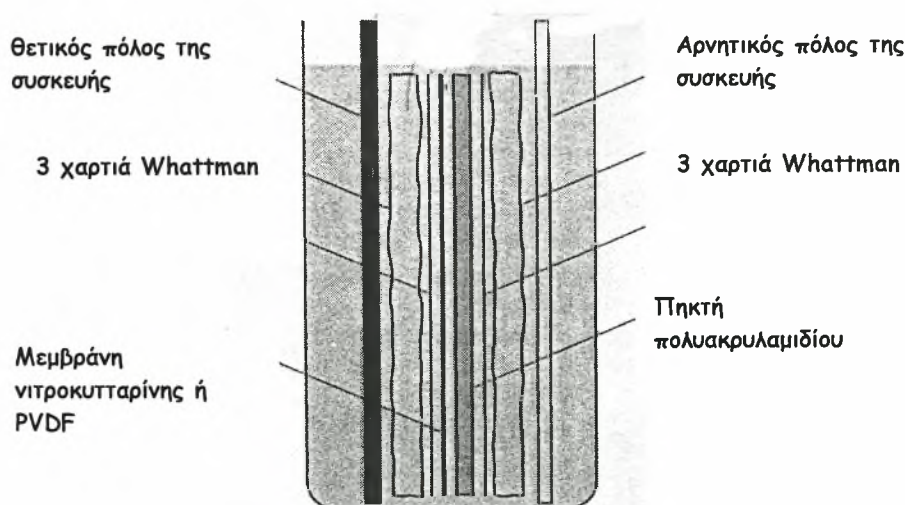
Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5H<sub>2</sub>O 0,04gr = 40mg τα διαλύω σε 1000μl

Η πηκτή διατηρείται σε διάλυμα μεθανόλης/ H<sub>2</sub>O για αρκετό καιρό.

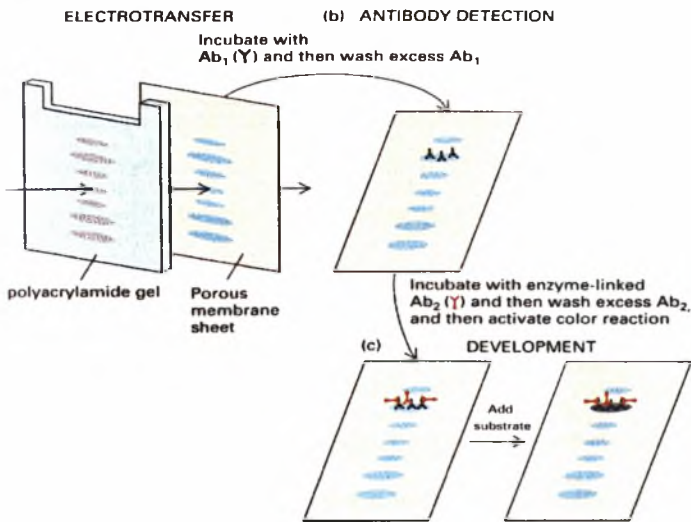
## 6. Western Blotting

### • 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 επώάζεται 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.



**Εικόνα 2.8:** Διάταξη των διάφορων υλικών στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς. Αρχικά τοποθετούνται 3 χαρτιά Whattman, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF, η πηκτή πολυακρυλαμιδίου και τέλος 3 χαρτιά Whattman. Υπό την επίδραση του ηλεκτρικού ρεύματος, οι πρωτεΐνες της πηκτής μεταφέρονται στη μεμβράνη με κατεύθυνση προς το θετικό πόλο.



### Εικόνα 2.9: Western Blot.

Η διαδικασία της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF, η επώαση της με  $1^0$  και  $2^0$  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  $2-8^0$  C θερμοκρασία χρησιμοποιούνται:

Tris base	4,5 gr
γλυκίνη	21.3 gr
μεθανόλη 100%	300 ml
Δις απεσταγμένο $H_2O$	1,2 lt
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>1,5 lt</b>

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 H<sub>2</sub>O 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 <sub>2</sub> O	45 ml
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>50 ml</b>



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 αποιονισμένο H <sub>2</sub> O	18 ml
PBS 10x	2 ml
Tween 20 0.01%	20-μl
Προάνοσος ορός ή πολυκλωνικού αντισώματος αντι-5HT-moduline	10 μl
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>20 ml</b>

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 <sub>2</sub> O	675 ml
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>750 ml</b>

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 <sub>2</sub> O	675 ml
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>750 ml</b>

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 <sub>2</sub> O	90 ml
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>100 ml</b>

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.

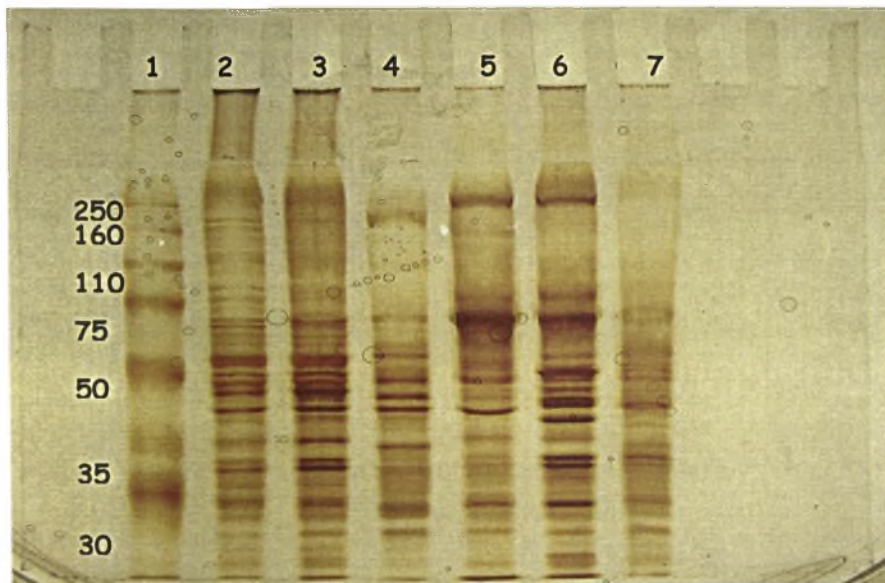
- **Αρχή της μεθόδου ανίχνευσης με το σύστημα ECL**

Ένα από τα πιο κατανοητά και καλά μελετημένα συστήματα είναι αυτό της HRP (Horseradish-peroxidase)-υπεροξειδάσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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 χημειοφωταύγεια 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**

- Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών διάφορων εγκεφαλικών περιοχών και περιφερικών ιστών (επινεφρίδια, συκώτι, καρδιά, πνεύμονες, νεφρά)

Οι ιστοί μετά την ομογενοποίηση τους σε διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών, τη διάλυσή τους σε loading buffer και βρασμό στους 100<sup>0</sup> C ηλεκτροφορούνται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, με σκοπό να βρεθεί εκείνη η συγκέντρωση στην οποία οι επιθυμητές πρωτεΐνες διαχωρίζονται καλύτερα.



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

RPN800 Φλοιός Παρεγκ. Συκ. Πνεύμ. Καρδιά Νεφρά

**Εικόνα 3.1.** Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εγκεφαλικών περιοχών και περιφερικών ιστών.

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.

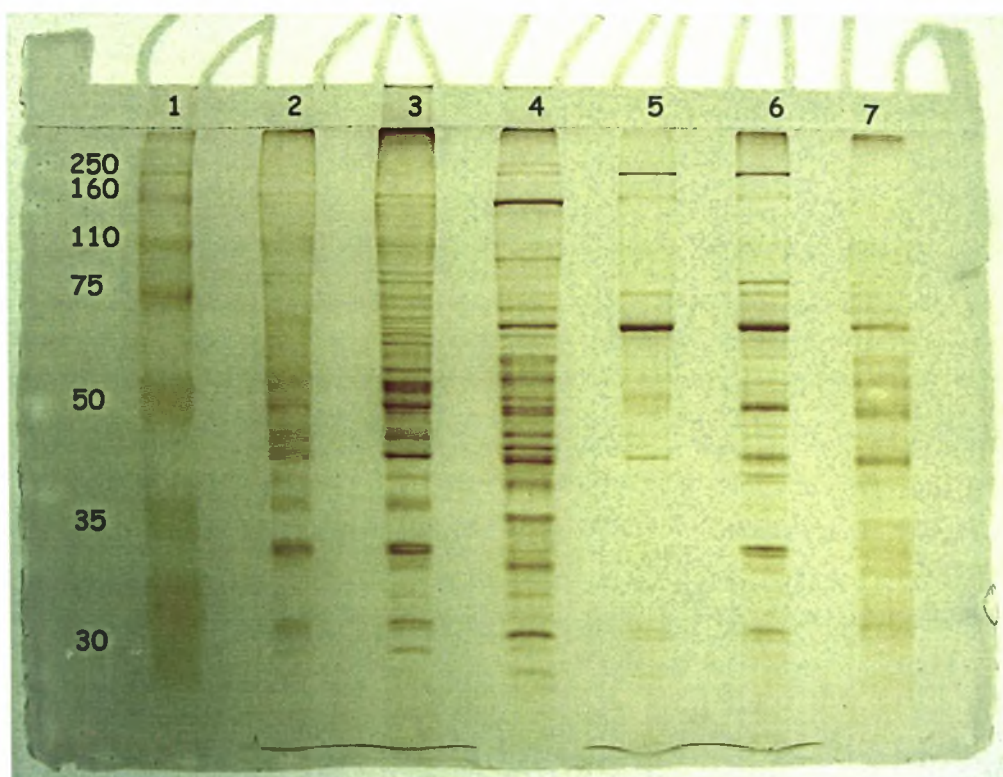
Διαδρομή 3: Παρεγκεφαλίδα τελικής συγκέντρωσης 9 μg πρωτεϊνών. Τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 500 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 5 μl.

Διαδρομή 4: Συκώτι τελικής συγκέντρωσης 2 μg πρωτεϊνών. Τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 500 μl loading buffer από τα οποία τα 50 μl επαναδιαλύθηκαν σε 450 μl loading . Φορτώθηκαν τα 4 μl.

Διαδρομή 5: Πνεύμονας τελικής συγκέντρωσης 7 μg πρωτεϊνών. Τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 950 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 7 μl.

Διαδρομή 6: Καρδιά τελικής συγκέντρωσης 6 μg πρωτεϊνών. Τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 950 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 5 μl.

Διαδρομή 7: Νεφρά τελικής συγκέντρωσης 3 μg πρωτεϊνών. Τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 500 μl loading buffer από τα οποία τα 50 μl επαναδιαλύθηκαν σε 350 μl loading . Φορτώθηκαν τα 6 μl.



RPN800 Παρεγκ. Φλοιός Συκ. Πνευμ. Καρδιά Νεφρά

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

**Εικόνα 3.2.** Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εγκεφάλου και περιφερικών ιστών.

Διαδρομή 1: Marker Rainbow RPN800 6 μl.

Διαδρομή 2: Παρεγκεφαλίδα: τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 500 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 8 μl.

Διαδρομή 3: Εγκεφαλικός φλοιός: τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 950 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 10 μl.

Διαδρομή 4: Συκώτι: τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 500 μl loading buffer από τα οποία τα 50 μl επαναδιαλύθηκαν σε 450 μl loading . Φορτώθηκαν τα 30 μl.

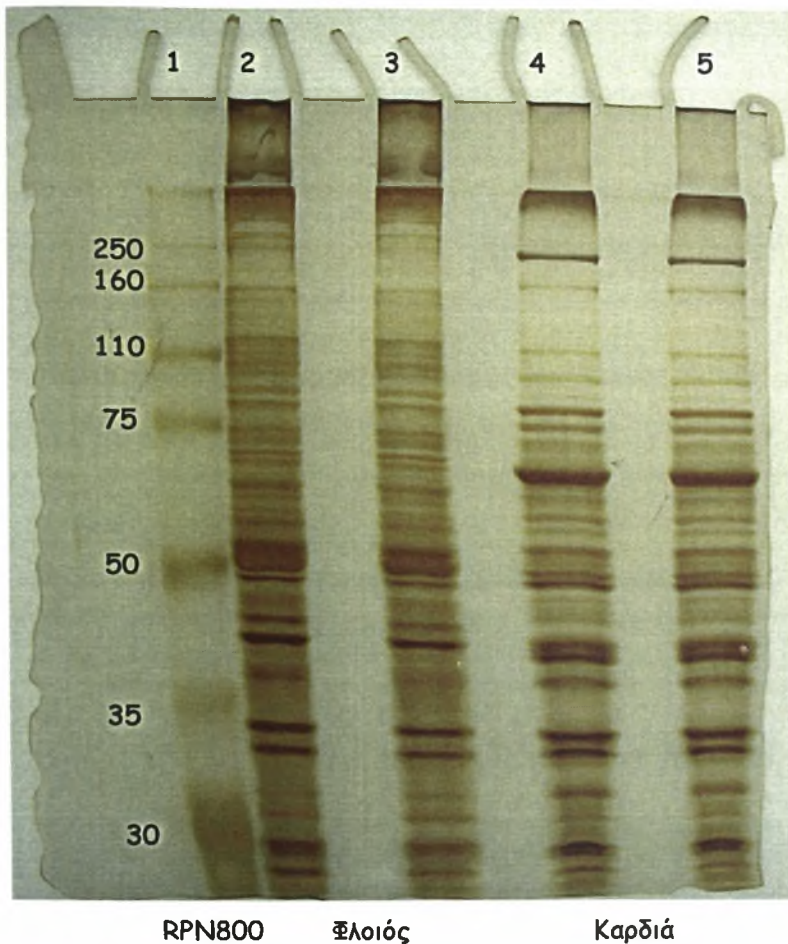
Διαδρομή 5: Πνεύμονας: τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 950 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 10 μl.

Διαδρομή 6: Καρδιά: τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 950 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 10 μl.

Διαδρομή 7: Νεφρά: τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 500 μl loading buffer από τα οποία τα 50 μl επαναδιαλύθηκαν σε 350 μl loading . Φορτώθηκαν τα 30 μl.

✘ Οι τελικές συγκεντρώσεις όλων των παραπάνω ιστών είναι περίπου 12 μg πρωτεϊνών.





- 10% Gel (διαστάσεων 20x20) SDS-πολυακρυλαμιδίου
- 74mV, 25 mA: Stacking gel
- 200mV, 35mA: Resolving gel
- Διάρκεια: 4.30 h

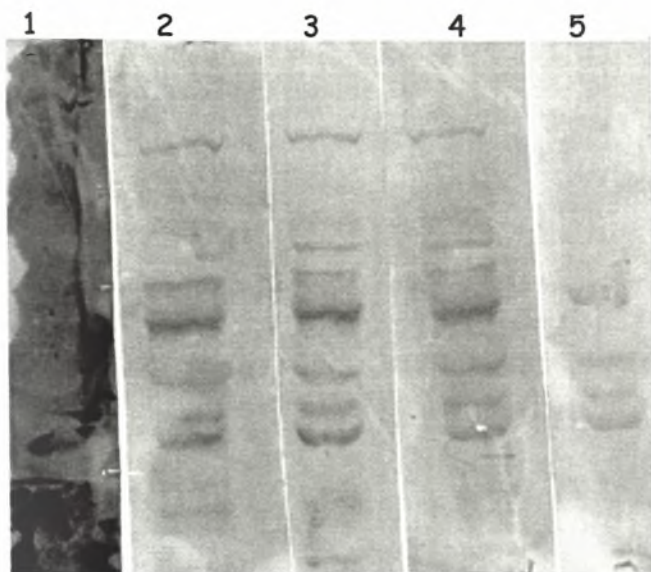
**Εικόνα 3.3.** Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εγκεφαλικού φλοιού και καρδιάς.

Διαδρομή 1: Marker Rainbow RPN800 6 μλ.

Διαδρομές 2,3: Εγκεφαλικός φλοιός τελικής συγκέντρωσης 20 μg πρωτεϊνών. Τα 100 μl ιστού διαλύθηκαν σε 250 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 5 μl.

Διαδρομές 4,5: Καρδιά τελικής συγκέντρωσης 20 μg πρωτεϊνών. Τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 950 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 20 μl.

Πριν όμως προχωρήσουμε στην ανάλυση των πρωτεϊνών στην καρδιά αλλά και στον εγκέφαλο και 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 3.4.** Western Blot 4  $\mu$ l του αντισώματος και του προάνοσου ορού με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του LSAL.

Διαδρομή 1: Επώαση εγκεφαλικού φλοιού τελικής συγκέντρωσης 80  $\mu$ g με προάνοσο ορό.

Διαδρομή 2: Επώαση εγκεφαλικού φλοιού τελικής συγκέντρωσης 80  $\mu$ g με αντίσωμα.

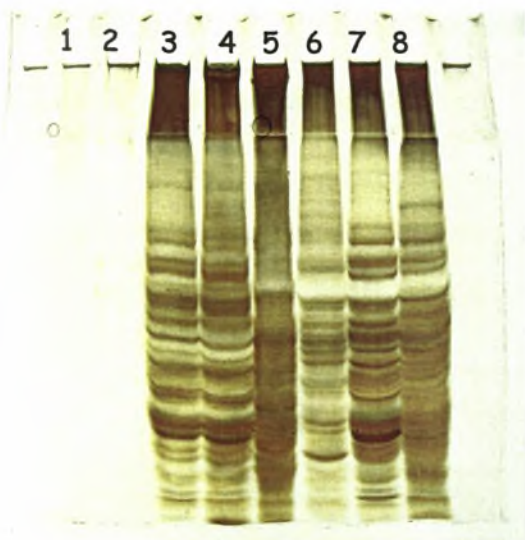
Διαδρομή 3: Επώαση εγκεφαλικού φλοιού τελικής συγκέντρωσης 80  $\mu$ g με αντίσωμα και LSAL τελικής συγκέντρωσης  $10^{-6}$  M (800  $\mu$ l από διάλυμα 6 mg LSAL σε 1 ml  $H_2O$ ).

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

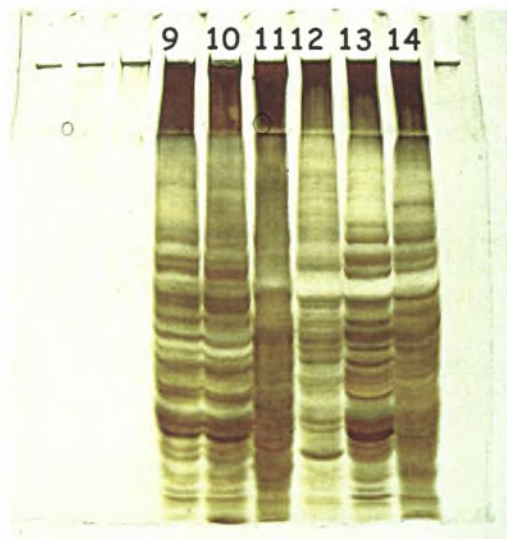
Διαδρομή 5: Επώαση εγκεφαλικού φλοιού τελικής συγκέντρωσης 80  $\mu$ g με αντίσωμα και LSAL τελικής συγκέντρωσης  $10^{-3}$  M (8  $\mu$ l από την αραιώση των 10  $\mu$ l του αρχικού διαλύματος+90  $\mu$ l  $H_2O$ ).

- **Western Blot των πρωτεϊνών των περιφερικών ιστών**

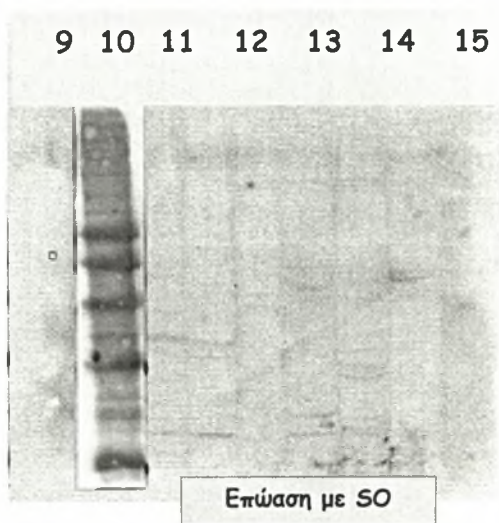
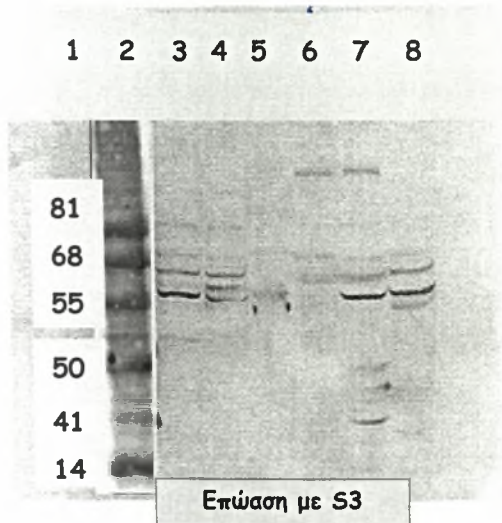
Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία εντοπισμού της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου και να επιτευχθεί ο διαχωρισμός της από τις υπόλοιπες, πραγματοποιήθηκε μεταφορά των πρωτεϊνών των διαφόρων ιστών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης ή PVDF. Αυτές αφού επώαστηκαν αρχικά με την κατάλληλη συγκέντρωση αντι-LSAL αντισώματος και προάνοσου ορού και στη συνέχεια με το δεύτερο αντίσωμα που προσδένει στο πρώτο και φέρει το κατάλληλο ένζυμο, εκτίθενται σε ειδικό φίλμ στο υπεριώδες. Το αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας ήταν ορατές μπάντες που εντοπίστηκαν στην περιοχή μεταξύ 50 και 75 kDa του μάρτυρα των μοριακών βαρών. Αυτό όπως φαίνεται παρακάτω ισχύει για ιστούς όπως ο φλοιός και η παρεγκεφαλίδα καθώς και για περιφερικούς όπως η καρδιά και τα νεφρά.



β.I.



- 10% Gels (διαστάσεων 10x10) SDS-πολυακρυλαμιδίου (μετά το Transfer για 3 h στα 400 mA)
- 100mV, 65 mA
- Διάρκεια: 1.40 h



Εικόνα 3.5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ιστών εγκεφάλου και περιφερικών και μεταφορά σε μεμβράνη PVDF για Western Blot.

Διαδρομή 1: Rainbow RPN800 4 μl.

Διαδρομές 2: Marker Trial 1,2 μl.

Διαδρομές 3,9: Παρεγκεφαλίδα τελικής συγκέντρωσης 67 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν 15 μl.

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

Διαδρομές 5,11: Συκώτι τελικής συγκέντρωσης 72 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν 6 μl.

Διαδρομές 6,12: Πνεύμονας τελικής συγκέντρωσης 70 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν 10 μl.

Διαδρομές 7,13: Καρδιά τελικής συγκέντρωσης 67 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν 10 μl.

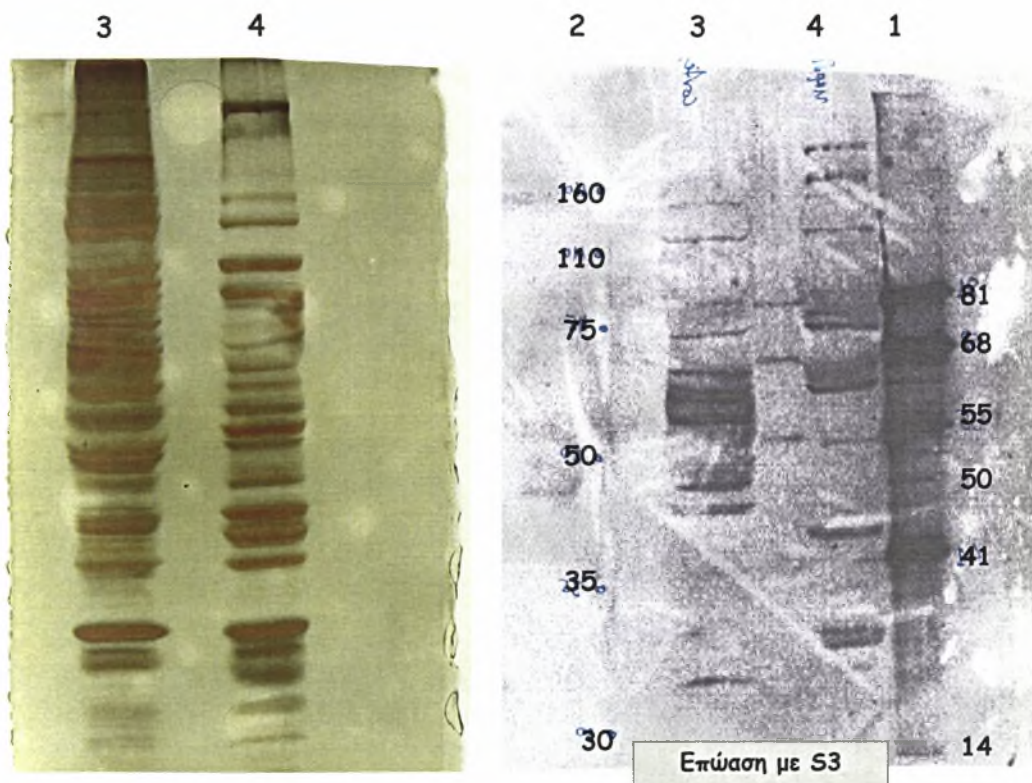
Διαδρομές 8,14: Νεφρά τελικής συγκέντρωσης 64 μg πρωτεϊνών. Φορτώθηκαν 6 μl.

✘ Όλοι οι ιστοί είναι των 50 μl τα οποία διαλύθηκαν σε 130μl loading buffer.



✘ Οι διαδρομές 3,4,5,6,7,8 επώαστηκαν με 10 μl αντι-LSAL αντισώματος (S3)/20 ml διαλύματος ενώ οι διαδρομές 10,11,12,13,14,15 με 10 μl προάνοσου ορού (S0)/20 ml διαλύματος.

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.



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

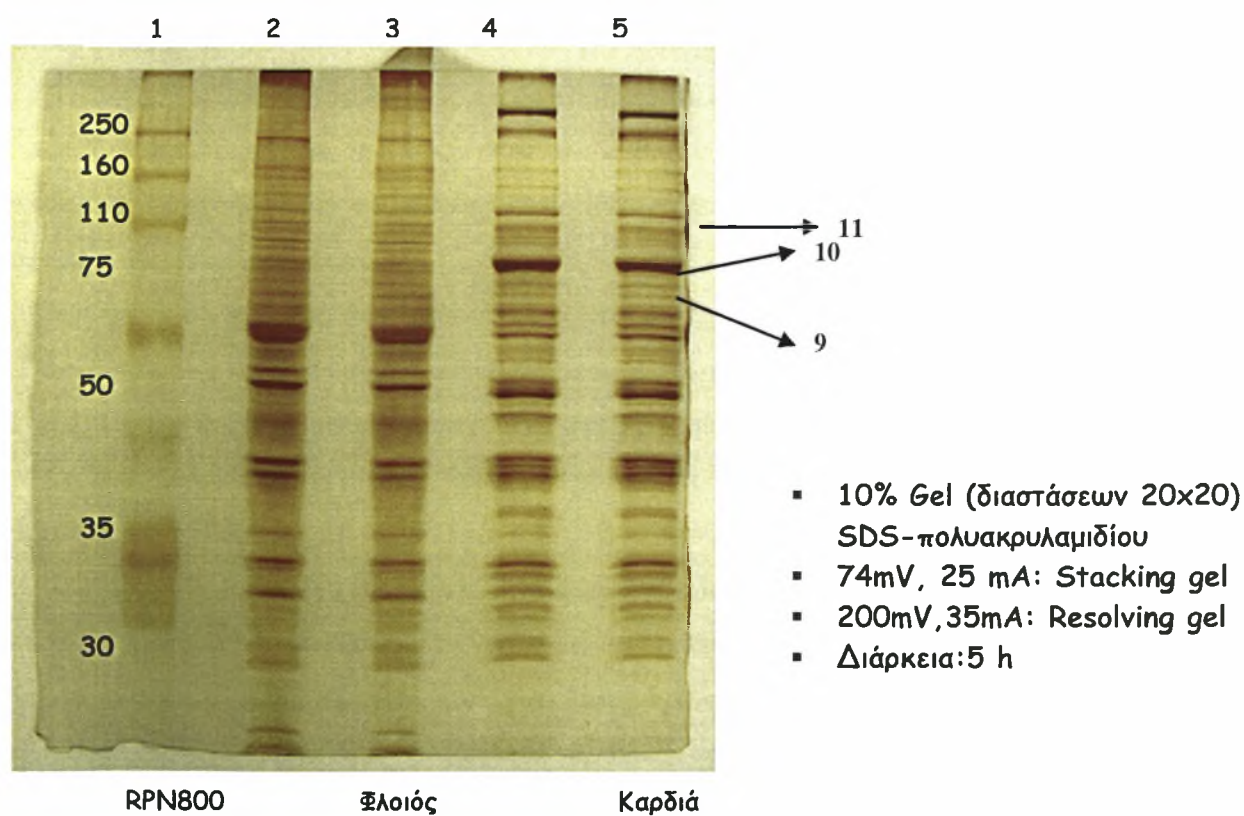
**Εικόνα 3.6.** Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εγκεφαλικού φλοιού και καρδιάς και μεταφορά σε μεμβράνη PVDF για Western Blot.

Διαδρομή 1: Rainbow RPN800 6 μl.

Διαδρομή 3: Εγκεφαλικός φλοιός τελικής συγκέντρωσης 80 μg πρωτεϊνών. Τα 100 μl ιστού διαλύθηκαν σε 250 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 20 μl.

Διαδρομή 4: Καρδιά τελικής συγκέντρωσης 80 μg πρωτεϊνών. Τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 130 μl loading buffer. Φορτώθηκαν 10 μl.

Με βάση τα παραπάνω πειράματα το προφίλ ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών του φλοιού προσομοιάζει αυτό της καρδιάς και τα αποτελέσματα από το Western Blot δείχνουν επίσης ένα έντονο σήμα στην περιοχή 50-75 kDa. Αυτό σε συνδυασμό με την επίδραση της σεροτονίνης και των υποδοχέων της μεταξύ των οποίων και ο 5-HT<sub>1B</sub> στην καρδιά, μας οδήγησε στην παρασκευή ενός gel από το οποίο θα μπορούσαμε να κόψουμε κάποιες μπάντες πρωτεϊνών που αντιστοιχούν στην περιοχή που έχει ανιχνευθεί από το πολυκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιούμε μετά από μεταφορά αυτών είτε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης είτε σε PVDF. Στη συνέχεια αυτές οι μπάντες τοποθετούνται σε ειδικό μηχάνημα σπεκτρομετρίας μάζας το οποίο αναλύει τις πρωτεΐνες και με βάση τις κορυφές των αμινοξέων που περιέχουν τις αναγνωρίζει ή δίνει στοιχεία ικανά να οδηγήσουν σε περαιτέρω αναγνώρισής τους.



**Εικόνα 3.7.** Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εγκεφαλικού φλοιού και καρδιάς.

Διαδρομή 1: Rainbow RPN800 5 μl.

Διαδρομές 2,3: Εγκεφαλικός φλοιός τελικής συγκέντρωσης 20 μg πρωτεϊνών. Τα 100 μl ιστού διαλύθηκαν σε 250 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 5 μl.

Διαδρομές 4,5: Καρδιά τελικής συγκέντρωσης 20 μg πρωτεϊνών. Τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 950 μl loading buffer. Φορτώθηκαν 20 μl.

✘ Οι μπάντες 9,10,11 που έχουν σημειωθεί είναι αυτές που έχουν κοπεί και αναλυθεί με σπεκτρομετρία μάζας.



Από τις παραπάνω μπάντες πρωτεϊνών οι 9 και 10 με ανάλυση των αμινοξέων τους έδωσαν ισοένζυμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης και μια heat-shock πρωτεΐνη αντίστοιχα. Η μπάντα 11 αντιστοιχεί σε μια πρωτεΐνη 460 αμινοξέων και μοριακού βάρους 51.272 Da που αποτελεί το πρόδρομο μόριο της αιμοπηξίνης στον αρουραίο. Αυτή η πρωτεΐνη φέρει στην αλληλουχία της το LSAL που περιβάλλεται από τα αμινοξέα προλίνη/γλυκίνη upstream και λευκίνη/σερίνη downstream. Το πρόδρομο μόριο μετά από έρευνα στη βάση δεδομένων για πρωτεΐνες ([www.expasy.org/Swiss-Prot](http://www.expasy.org/Swiss-Prot)), βρέθηκε να εμφανίζει περιορισμένες θέσεις κοπής από περιοριστικά ένζυμα (κυρίως πρωτεάσες) που να μπορούν να δώσουν λειτουργικά πεπτίδια. Πιο συγκεκριμένα στην περιοχή που εμφανίζεται το τετραπεπτίδιο LSAL βρέθηκαν να το «κόβουν» εκατέρωθεν δύο διαφορετικά ένζυμα, η πρωτεϊνάση K και η θερμολυσίνη. Περαιτέρω έρευνα ίσως αποδείξει πως το τετραπεπτίδιο που μας ενδιαφέρει εμπεριέχεται σε μια μεγαλύτερη αλληλουχία που προκύπτει από την πρόδρομη πρωτεΐνη μετά από πρωτεολυτική επεξεργασία. Τέλος, μελέτη αποτελεσμάτων για πρωτεΐνες που περιέχουν το LSAL στον αλγόριθμο BLASTP έδειξε την ύπαρξη 91 από αυτές, αρκετές από τις οποίες είναι άγνωστης λειτουργίας και πιθανώς να σχετίζονται με το νευροπεπτίδιο.

Παρόμοιες έρευνες στο διαδίκτυο έδειξαν ότι υπάρχει το ανάλογο πρόδρομο μόριο της αιμοπηξίνης και στον άνθρωπο και μάλιστα η αλληλουχία του (462 α.α.) φέρει το LSAL. Η αιμοπηξίνη που προκύπτει από επεξεργασία αυτού με σερινοπρωτεάσες είναι μια β-γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος 439 α.α με τεταρτοταγή δομή που αποτελείται κυρίως από α-έλικες και β-πτυχωτά φύλλα. Το γονίδιο της χαρακτηρίζεται από δέκα επαναλαμβανόμενες μονάδες και 9 ιντρόνια συμμετρικά κατενεμημένα ενώ εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 στην περιοχή p15.4-15.5. Εξίσου χαρακτηριστική είναι η γλυκοσυλίωση του αμινοτελικού της άκρου με Ο-ολιγοσακχαρίτες καθώς και ο μεγάλος αριθμός τρυπτοφάνης που περιέχει. Η λειτουργία της αφορά κυρίως την εξειδικευμένη πρόσδεση της στην αίμη και την μεταφορά αυτής στα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος για αποδόμηση και αποθήκευση του σιδήρου.

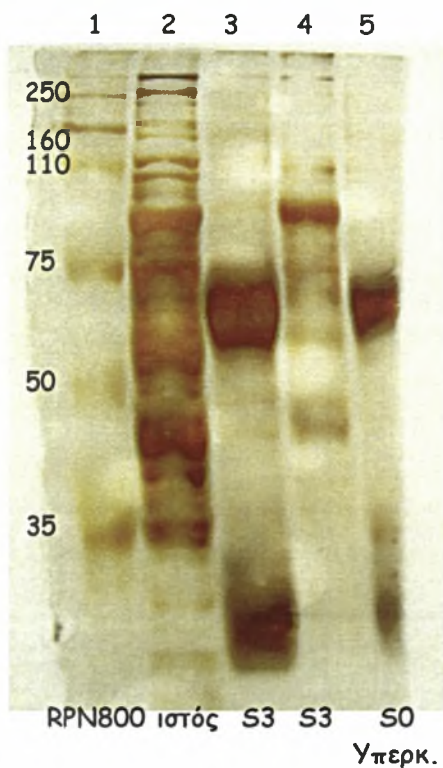
MARVLGAPVA LGLWSLCWSL AIATPLPPTS AHGNVAEGET KPDPDVTERC SDGWSFDATT  
60  
LDDNGTMLFF KGEFVWKSHK WDRELISERW KNFPSPVDAA FRQGHNSVFL IKGDKVWVYP  
120  
PEKKEKGYPK LLQDEFPGIP SPLDAAVECH RGECQAEGVL FFQGDREWFV DLATGTMKER  
180  
SWPAVGNCSA ALRWLGRYYC FQGNQFLRFD PVRGEVPPRY PRDVRDYFMP CPGRGHGHRN  
240  
GTGHGNSTHH GPEYMRCSPH LVLSALTSND HGATYAFSGT HYWRDLTSDR GWSWPIAHQ  
300  
WPQGPSAVDA AFSWEEKLYL VQGTQVYVFL TKGGYTLVSG YPKRLEKEVG TPHGIILDSV  
360  
DAAFICPGSS RLHIMAGRRL WWLDLKSGAQ ATWTELPWPH EKVDGALCME KSLGPNSCSA  
420  
NGPGLYLIHG PNLVYCYSDVE KLNAAKALPQ PQNVTSLGTC TH  
462

**Εικόνα 3.8.** Η αμινοξική αλληλουχία του προδρόμου μορίου της αιμοπηξίνης στον άνθρωπο.

- **Προσδιορισμός συνθηκών ανοσοκατακρήμνισης στην καρδιά**

Στη συνέχεια προσπαθήσαμε να διαχωρίσουμε την επιθυμητή πρωτεΐνη από τις υπόλοιπες που εμφανίζονται στην ίδια περίπου περιοχή μοριακού βάρους στην καρδιά, με ανοσοκατακρήμνιση. Με αυτό τον τρόπο αυξάνουμε την ειδικότητα των πειραμάτων εφόσον ο ιστός επωάζεται με αντίσωμα πριν την μεταφορά των πρωτεϊνών του σε φίλτρο μεμβράνης για Western Blot.

Η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης περιλαμβάνει την πρόσδεση της πρωτεΐνης στο anti-LSAL αντίσωμα το οποίο με τη σειρά του δημιουργεί δεσμούς με την Protein A Sepharose και υπάρχει σαν ίζημα στο δείγμα. Αυτό το ίζημα στη συνέχεια διαλύεται σε loading buffer και βράζεται προκειμένου να αποσυνδεθεί η ειδική πρωτεΐνη από το αντίσωμα.



- 10% Gel (διαστάσεων 20x20) SDS-πολυακρυλαμιδίου
- 74mV, 25 mA: Stacking gel
- 200mV, 35mA: Resolving gel
- Διάρκεια: 6 h

**Εικόνα 3.9.** Ηλεκτροφόρηση του anti-LSAL αντισώματος (S3) και του προάνοσου ορού (S0) μετά την προσθήκη 50 μl Protein A και του υπερκειμένου του S3.

Διαδρομή 1: Rainbow RPN800 6 μl.

Διαδρομή 2: Καρδιά τελικής συγκέντρωσης 20 μg πρωτεϊνών. Τα 50 μl ιστού διαλύθηκαν σε 950 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 20 μl.

Διαδρομή 3,5: Anti-LSAL και προάνοσος ορός αντίστοιχα μετά από κατακρήμνιση με 50 μl Protein A (10 μl S3/S0 + 1ml αποδιατακτικού διαλύματος + 2 ml διαλύματος ανοσοκατακρήμνισης overnight). Το τελικό ίζημα διαλύεται σε 60 μl loading buffer. Φορτώθηκαν τα 20 μl.

Διαδρομή 4: Μετά την κατακρήμνιση του S3 με την Protein A, το βράσιμο και την 1<sup>η</sup> φυγοκέντρηση προστέθηκαν 20 μl loading buffer στο υπερκείμενο. Φορτώθηκαν τα 20 μl.

Παρά το γεγονός ότι έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες με την ανοσοκατακρήμνιση τα αποτελέσματα δεν είναι ικανοποιητικά. Αντίθετα προσομοιάζουν την εικόνα του παραπάνω gel για αυτό και δεν προχωρήσαμε την έρευνα για την απομόνωση του πρόδρομου μορίου με την τεχνική αυτή και ασχοληθήκαμε με τα αποτελέσματα που είχαμε με τη μέθοδο του Western Blot του ιστού της καρδιάς.

## 4. Συζήτηση

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα της anti-5-HT-moduline σε τεχνικές ανοσοκατακρήμνισης και Western Blot με σκοπό την ανεύρεση του πρόδρομου μορίου του προαναφερθέντος νευροπεπτιδίου στους περιφερικούς ιστούς και κυρίως στην καρδιά αρουραίων. Οι μπάντες που ανιχνεύθηκαν με το σύστημα ECL «κόπηκαν» και στάλθηκαν για ανάλυση της αλληλουχίας τους με σπεκτρομετρία μάζας. Τα αποτελέσματα για την καρδιά περιλαμβάνουν αλληλουχίες πρωτεϊνών μεταξύ των οποίων και μία, το πρόδρομο μόριο της αιμοπηξίνης, που περιέχει την αλληλουχία του LSAL. Απαιτείται όμως περαιτέρω έρευνα στις βάσεις δεδομένων πρωτεϊνών έτσι ώστε να εξεταστεί τελικά εάν αυτό το πρόδρομο μόριο που προσδένεται στην αίμη μεταφέροντας την στα ηπατοκύτταρα, συνδέεται με κάποιο τρόπο με το νευροπεπτίδιο που δρα στους 5-HT<sub>1B</sub> υποδοχείς και τροποποιεί την απελευθέρωση της 5-HT. Πέραν όμως αυτού θα πρέπει να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνικών ζωνών για τον εντοπισμό της επιθυμητής πρωτεΐνης, για αυτό και η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος και το ισοηλεκτρικό σημείο) αποτελεί μια ενδιαφέρουσα προοπτική.

Η εύρεση της αλληλουχίας της πρόδρομης πρωτεΐνης από την οποία προέρχεται η 5-HT-moduline είναι ιδιαίτερα σημαντική για πολλούς λόγους. Πρώτον, θα επιτρέψει την μελέτη της σύνθεσης, επεξεργασίας και έκκρισης του βιοδραστικού πεπτιδίου LSAL, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα μελέτης της επίδρασης φαρμακευτικών προϊόντων σε οποιοδήποτε από αυτά στάδια. Επιπρόσθετα, η μελέτη της αλληλουχίας των αμινοξέων της πρόδρομης πρωτεΐνης θα μπορούσε να αποκαλύψει πιθανά τμήματα που προκύπτουν από την επεξεργασία της με ενδοπεπτιδάσες ή άλλες πρωτεάσες και αποτελούν νευροδραστικά πεπτίδια που επιδρούν σε νευρώνες του κεντρικού αλλά και περιφερικού συστήματος. Επιπλέον, η απομόνωση του γονιδίου της θα έχει σαν αποτέλεσμα το χαρακτηρισμό των νευρώνων του σεροτονινεργικού και όχι μόνο, συστήματος, στους οποίους επιδρά η 5-HT-moduline τόσο στον εγκέφαλο όσο και σε περιφερικούς ιστούς. Πιο συγκεκριμένα θα εντοπιστούν οι νευρώνες που ευθύνονται για τη σύνθεση και απελευθέρωση του πεπτιδίου και θα μελετηθούν καλύτερα οι φυσιολογικές ή τυχόν παθολογικές καταστάσεις καθώς και οι μοριακοί μηχανισμοί που επιβάλουν και εξειδικεύουν την δράση του.

Όπως έχει ήδη τονιστεί η 5-HT-moduline είναι ο πρώτος ενδογενής αλλοστερικός τροποποιητής που δε δρα μέσω ενός δικού του υποδοχέα αλλά μέσω του 5-HT<sub>1B</sub>, ενός GPCR υποδοχέα της σεροτονίνης. Με αυτό τον τρόπο, απενεργοποιεί άμεσα τους υποδοχείς και ελέγχει όχι μόνο την απελευθέρωση της 5-HT αλλά και άλλων νευροδιαβιβαστών. Αυτός είναι ένας καινούριος μηχανισμός νευρορύθμισης του οποίου η μελέτη έχει ως σκοπό:

1. Την κατανόηση των διαφορετικών δραστηριοτήτων που εμφανίζει το σεροτονινεργικό σύστημα σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου και περιφερικών οργάνων. Με αναφορά στην ανατομική (πολυδιακλαδισμένοι νευρώνες με πολλά κυστίδια κατά μήκος των νευραξόνων ) και μορφολογική του οργάνωση (πολύ συγκεντρωτικό με απολήξεις σε όλον τον εγκέφαλο και σε περιφερικούς ιστούς), η ικανότητα του να επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τις αποκρίσεις κεντρικών και περιφερικών ιστών αποτελεί αντικείμενο μελέτης.

2. Την διερεύνηση νευροπαθολογικών καταστάσεων οι οποίες επηρεάζονται άμεσα από την συγκέντρωση της 5-HT που απελευθερώνεται από τους νευρώνες αλλά και την δράση της σε αυτούς. Οι μοριακοί μηχανισμοί που δημιουργούν αυτές τις νευροψυχιατρικές καταστάσεις δεν σχετίζονται μόνο με την αύξηση ή ελάττωση κάποιου νευροδιαβιβαστή αλλά αφορούν την δυσλειτουργία των μηχανισμών ρύθμισης περισσότερων από ενός νευροδιαβιβαστών. Η 5-HT είναι από τους σημαντικότερους νευρορυθμιστές στον εγκέφαλο. Όπως έχει αποδειχθεί σε πολλές βιοχημικές έρευνες η 5-HT επηρεάζει τα συστήματα απελευθέρωσης άλλων νευροδιαβιβαστών (ντοπαμίνη, γλουταμινικό). Έτσι συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες με αποτέλεσμα η λανθασμένη ρύθμιση της να οδηγεί σε πλήθος συμπτωμάτων που χαρακτηρίζουν ασθένειες όπως η κατάθλιψη, το άγχος κ.α.. Συνεπώς, η ύπαρξη ενός νέου μηχανισμού ρύθμισης του σεροτονινεργικού συστήματος που θα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό απ την δράση της 5-HT-moduline μπορεί να οδηγήσει στην πληρέστερη κατανόηση των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τέτοιου είδους ασθένειες.

3. Την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών σκευασμάτων 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 διακρίνονται για τις πολλές παρενέργειες. Έτσι, η ανάπτυξη συνθετικών ουσιών που θα παρεμβαίνουν στην σύνθεση και δράση της 5-HT-moduline και συνεπώς στην απελευθέρωση της 5-



ΗΤ θα έχει σημαντική φαρμακευτική αξία μελλοντικά. Για να πραγματοποιηθεί κάτι τέτοιο όμως θα πρέπει να βρεθεί πρώτα το πρόδρομο μόριο αυτού του νευροπεπτιδίου.

## **5. Βιβλιογραφία**

### **Βιβλία:**

- 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<sup>η</sup> 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<sup>η</sup> 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<sub>1B</sub> 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<sub>1B</sub> as well as 5-HT<sub>1D</sub> 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
- C.Mollereau, M.J.Simons, P.Soularue, F.Liners, G.Vassael, J.C.Meunier, M.Parmentier, 1996. Structure, tissue distribution and chromosomal localization of the prepronociceptin gene, Neurobiology, vol.93, p.8666-8670
- M.Mori, M.Fujino, 2004. Urotensin II-related peptide, the endogenous ligand for the Urotensin II receptor in the rat brain, Elsevier Science, Peptides, vol.25, p.1815-1818
- G.J.Dockray, 2004. Gastrin, Elsevier Science, Best practice and research clinical endocrinology and metabolism, vol.18, p.555-568
- K.B.Thor, M.Blitz-Siebert, C.J.Helke, 2003. Autoradiographic localization of 5-HT<sub>1</sub> 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
- N.Takahashi, Y. Takahashi, F.W.Putman,1984. Complete amino acid sequence of human hemopexin, the heme binding protein of serum, *Biochemistry*, vol.82, p.73-77
- Abenhaim L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, Kurz X, Higenbottam T, Oakley C, Wouters E, Aubier M, Simonneau G, Begaud B, 1996. Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med*. Vol.335, p. 609-616.
- Eddahibi S, Adnot S., 2002. Anorexigen-induced pulmonary hypertension and the serotonin (5-HT) hypothesis: lessons for the future in pathogenesis. *Respir Res*, vol.3, p. 9-13.
- B. Rondelet, R. Van Beneden, F. Kerbaul, S. Motte, P. Fesler, K. McEntee, S. Brimiouille, J-M. Ketelslegers and R. Naeije, 2003. Expression of the serotonin 1b receptor in experimental pulmonary hypertension, *Respiratory Journal*, vol.22, p. 408-412
- Eddahibi S, Morrell N, d'Ortho MP, Naeije R, Adnot S., 2002. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, vol.20, p.1559–1572
- MacLean M, Herve P, Eddahibi S, Adnot S., 2000. 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol*, vol. 131, p.161–168
- Ghavami A, Baruscotti M, Robinson RB, Hen R, 1997. Adenovirus-mediated expression of 5-HT<sub>1B</sub> receptors in cardiac ventricle myocytes; coupling to inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels, *Eur J Pharmacol*, vol.340, p.259-66
- Amy KL Banes<sup>1</sup> and Stephanie W Watts, 2003. Arterial expression of 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors during development of DOCA-salt hypertension, *BMC Pharmacol*, vol.3
- Heath D, Edwards JE, 1958. The pathology of pulmonary vascular disease: a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries, with special reference to congenital cardiac septal defects, *Circulation*, vol.18, p.533–547
- Morecroft I, Heeley RP, Prentice HM, Kirk A, MacLean MR, 1999. 5-HT receptors mediating contraction in human small pulmonary arteries: importance of the 5-HT<sub>1B</sub> receptor., *Br J Pharmacol*, vol.128, p.730–734

#### Sites από Internet:

- [www.brainexplorer.com](http://www.brainexplorer.com)
- [www.sciencebrain.com](http://www.sciencebrain.com)
- [www.google.com](http://www.google.com)
- [www.OUCH.com](http://www.OUCH.com)
- [www.natureheart.com](http://www.natureheart.com)
- [www.EuropeanRespiratoryJournal.com](http://www.EuropeanRespiratoryJournal.com)
- [www.CardiovascularJournal.com](http://www.CardiovascularJournal.com)
- [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)