

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Α. ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΕΙΟΥ

**ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΟΥ
ΓΟΝΙΔΙΟΥ p21 ΑΠΟ ΤΟ ΠΡΟ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟ
ΜΟΡΙΟ CHOP ΚΑΤΑ ΤΟ ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ
ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

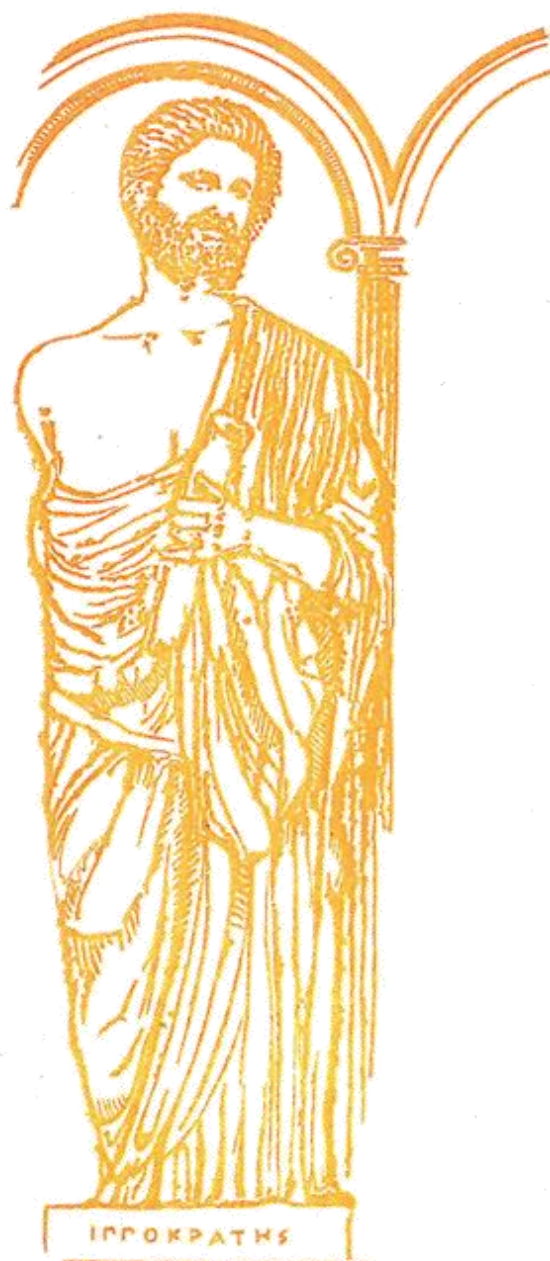
ΜΙΧΑΗΛΙΔΟΥ ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2014



ΕΘΜΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ
ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ
ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΜΕΣΘΑΙ
ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ ΤΑΥΤΗΣ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗ
ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΩΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-
ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΣΙΝ ΑΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΚΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓ-
ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΠΡΟΪΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ
ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ
ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΕΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΙΣΙΝ ΕΓΚΕΚΑΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΕΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΥΔΕΝΙ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΟΥΔ' ΑΝΑΜΕΣΙ ΔΕ ΙΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΕΣΙΝ,
ΟΥ ΔΟΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ, ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙ-
ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΦΗΜΕΣΟΜΑΙ ΣΥΜΕΟΥΛΗΝ ΤΟΙΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ
ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΠΡΩΤΟΝ ΘΘΟΡΙΟΝ ΔΟΣΩ, ΑΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ
ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ, ΟΥ ΤΕΜΕΩ
ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΑΘΙΣΝΤΑΣ, ΕΙΣΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ
ΠΡΗΒΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΤΑΣΙΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ
ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΙ ΤΟ ΕΣΤΙΝ ΠΡΟΣ ΤΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ-
ΗΣ ΚΑΙ ΘΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΡΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ
ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΕΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ
ΔΟΥΛΩΝ, ΑΔΕ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΪΔΩ Η ΑΚΟΥΩΣ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ
ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑ-
ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΣΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-
ΑΥΤΑ, ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ
ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΝ ΕΡΓΑΤΑΣΘΑΙ ΚΑΙ Ε ΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΣΑ-
ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ'
ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΟΡΚΟΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΘΕΑΣ, ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΟΥΣΤΥΡΑΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣΩ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΑΥΤΗΝ ΕΔΩ ΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΜΕΝ ΕΚΕΙΝΟΝ, Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΕΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΙΣΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΜΩ ΚΟΙΝΩΝΟΝ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ, ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΕΙΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΝ ΑΝΑΓΚΗΝ, ΚΑΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΓΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΕΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗΝ ΚΑΙ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΠΑΡΕΧΩ ΔΕ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ, ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΟΡΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΥΠΟΛΟΙΠΟΥΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΑΣ, ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΚΑΙ ΕΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΔΩΣΕΙ ΟΡΚΟΝ ΣΥΜΦΩΝΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ ΔΕ ΆΛΛΟΝ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΔΕ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΝ ΑΓΩΓΗΝ ΠΡΟΣ ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ, ΘΑ ΠΡΟΛΑΜΒΑΝΩ ΔΕ ΒΛΑΒΗΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑΝ, ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΓΩ ΜΟΥ ΣΗΤΗΡΟΝ, ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΟΙΑΥΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΩΣΑΥΤΩΣ ΟΥΤΕ ΕΙΣ ΕΓΚΥΟΝ ΓΥΝΑΙΚΑ ΘΑ ΔΩΣΩ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΝ, ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΩ ΔΕ ΤΟΝ ΒΙΟΝ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟΝ ΑΓΝΟΝ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΑΚΟΜΗ ΔΕ ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΩ ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΠΕΜΠΩ ΕΙΣ ΑΓΓΡΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥΣ, ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΔΙΑ ΤΟ ΕΡΓΟΝ ΤΟΥΤΟ, ΕΙΣ ΟΣΑΤ ΔΕ ΟΙΚΙΑΣ ΜΕΤΑΒΑΙΝΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΡΧΩΜΑΙ ΠΡΟΣ ΒΟΗΘΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ, ΑΠΕΧΩΜΕΝ ΠΑΣΗΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΣ ΔΙΑΦΘΟΡΑΣ ΓΑΙ ΣΑΤΚΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ Η ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΝ Η ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΝ ΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΩΝ ΆΛΛΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΕΙΣ ΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗΝ ΤΟΥΣ ΖΩΗΝ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕΝΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΟΥΝ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΆΛΛΟΥΣ, ΘΑ ΚΡΑΤΩ ΜΥΣΤΙΚΑ ΠΙΣΤΕΥΩΝ ΟΤΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ, ΕΦ' ΟΣΟΝ ΜΕΝ ΔΟΙΠΟΝ ΤΗΡΩ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΑΠΟΓΛΑΥΩ ΚΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ, ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΟΣ ΕΞΑΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ' ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΤΟΥΤΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΕΩΣ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

14-9-2008

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

10-4-2009

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΕΙΟΥ Α.

ΚΙΑΡΗΣ Ι.

ΠΗΠΕΡΗ Χ.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

3-11-2009

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΘΕΜΑΤΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

9/4/2014

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ Α΄ ΠΡΟΟΔΟΥ:

28-6-2010

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ Β΄ ΠΡΟΟΔΟΥ:

23-7-2012

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ Γ΄ ΠΡΟΟΔΟΥ:

28-2-2014

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ :

16-5-2014

Η έγκριση της παρούσας διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



*Στον σύζυγο μου,
για την αμέριστη υποστήριξη*

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΜΙΧΑΗΛΙΔΟΥ ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΟΥ

Επώνυμο : Μιχαηλίδου[
Όνομα : Χρυσοβαλάντου
Εθνικότητα : ΚΥΠΡΙΑΚΗ
Ημερομηνία γέννησης : 28 ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΥ 1983
Διεύθυνση : ΝΕΑΠΟΛΕΩΣ 24 ΜΑΡΟΥΣΙ,
15123
Οικογενειακή κατάσταση Έγγαμη
Τηλέφωνο [1] : 210-6851525
Τηλέφωνο [2] : 6970101480
E-mail : chmichail@med.uoa.gr

Εκπαιδευτική Πορεία

- 2008-σήμερα Υποψήφια Διδάκτωρ στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Θέμα διατριβής: «ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ p21 ΑΠΟ ΤΟ ΠΡΟ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟ ΜΟΡΙΟ CHOP ΚΑΤΑ ΤΟ ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ» (Επιβλέπων Καθ. Α.Γ. Παπαβασιλείου)
- 2007-2008 Επιστημονικός συνεργάτης στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 2004 Ιούν. Πτυχιούχος του Τμήματος Βιολογίας του Τμήματος Θετικών Επιστημών Πανεπιστημίου Κρήτης με βαθμό πτυχίου “Λίαν Καλώς” (7,26)
- 2003 Φεβ.-Δεκ. Εκπόνηση Πτυχιακής εργασίας στο Εργαστήριο Ανοσοβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Θέμα Διπλωματικής Εργασίας “Expression of HLA-DO in trophoblasts” Τμήμα Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 2000 Σεπτ. Προπτυχιακές σπουδές στο Τμήμα Βιολογίας του Τμήματος Θετικών Επιστημών Πανεπιστημίου Κρήτης

Μετεκπαίδευση

2008 Ιουλ.

Θερινό σχολείο Προσανατολισμού και Ενημέρωσης στις τελευταίες εξελίξεις στην Έρευνα και την Τεχνολογία το οποίο πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Βραβεία και διακρίσεις

2012 Μάιος

Έπαινος καλύτερης εργασίας βασικής έρευνας με τίτλο «Μελέτη του ER- stress στη καρκινογένεση και η σχέση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21 με το αποπτωτικό μόριο CHOP»

Χ. Μιχαηλίδου, Α. Παπαβασιλείου, Ι. Κιαρης
Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
(Ιατρική Εταιρεία αθηνών. Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο)

Μάρτιος 2012

Βραβείο για την καλύτερη αναρτημένη ανακοίνωση
«Η διερεύνηση του ρόλου του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21/waf1 κατά το «stress» του ενδοπλασματικού δικτύου.»

Χ. Μιχαηλίδου, Α. Παπαβασιλείου, Ι. Κιαρης
Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
(21^ο Συνεδρίου ΗΜΕΡΕΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ)

Υποτροφίες

2010-2013

Χορήγηση Υποτροφίας στα πλαίσια του έργου ΕΠΕΑΕΚ II Υποτροφία «Ηράκλειτος: Υποτροφίες έρευνας με προτεραιότητα στη βασική έρευνα» (Υπουργείο Παιδείας και Θρησκευμάτων) για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής

Ξένες γλώσσες

- Αγγλικά (*General Certificate of Education (GCE O'Level)*)
- Γαλλικά (βασικές γνώσεις)
- Τούρκικα (βασικές γνώσεις)

Υπολογιστές

- ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ECDL
- PC Operating Systems (Windows XP, Vista, Windows 7)
- MS Office (Word, Excel, Power Point), Internet applications – software

Άλλες γνώσεις

- ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΗΣ ΕΠΑΡΚΕΙΑΣ ΔΕΥΤΕΡΟΒΑΘΜΙΑΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ (Υπουργείο Παιδείας και Θρησκευμάτων)
- *Certificate of Education (GCE O'Level)* στη Λογιστική
- *General Certificate of Education (GCE O'Level)* στα Μαθηματικά

Διδακτική Εμπειρία

- 2005-2008 Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιολογίας σε Δημόσια Σχολεία της Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης Κύπρου (Υπουργείο Παιδείας και Πολιτισμού)
- 2009-2013 Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιολογίας σε Δημόσια Σχολεία της Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης Ελλάδας (Υπουργείο Παιδείας και Θρησκευμάτων)
- 2010-2014 Επιστημονικές Διαλέξεις στα πλαίσια του προγράμματος σεμιναρίων του Εργαστηρίου Βιοχημείας

Τεχνικές

κυτταροκαλλιέργειες, απομόνωση πρωτογενών κυττάρων, τεχνικές επιμόλυνσης, χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), σήμανση με ραδιενεργό ισότοπο, ανοσοαποτύπωση (Western blot, ανοσοκατακρήμνιση), ανοσοφθορισμός, ανοσο-ενζυμικές δοκιμασίες (ELISA), ανοσοϊστοχημεία, μοριακές τεχνικές (απομόνωση DNA/RNA, RT-PCR, real time PCR), CHIP Assay, κυτταρομετρία ροής, χειρισμός πειραματοζώων

Δημοσιεύσεις

- **Mihailidou C**, Papavassiliou AG, Kiaris H. A crosstalk between p21 and UPR-induced transcription factor C/EBP homologous protein (CHOP) linked to type 2 diabetes. Biochimie. **(99)**, 19–27 (2013).
- **Mihailidou C**, Papazian I, Papavassiliou AG, Kiaris H. CHOP-dependent regulation of p21/waf1 during ER stress. Cell Physiol Biochem. **25(6)**,761-6 (2010).
- Papadimitriou L, Morianos I, **Michailidou V**, Dionyssopoulou E, Vassiliadis S, Athanassakis I. Characterization of intracellular HLA-DR, DM and DO profile in K562 and HL-60 leukemic cells. Mol. Immunol **45(15)**,3965-73 (2008)
- Ranella A, Vassiliadis S, Mastora C, **Michailidou V** , Dionyssopoulou E, Athanassakis I. Constitutive intracellular expression of human leukocyte antigen (HLA)-DO and HLA-DR but not HLA-DM in trophoblast cells. Hum Immunol **66(1)**, 43-55 (2005).

Ανακοινώσεις

- 2012 Μάιος **«Μελέτη του ER- stress στη καρκινογένεση και η σχέση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21 με το αποπτωτικό μόριο CHOP»**
X. Μιχαηλίδου, Α. Παπαβασιλείου, Ι. Κιαρης
Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
Ιατρική Εταιρεία Αθηνών. Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο
- 2012 Απρίλιος **« Η ρύθμιση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21/waf1 από τον μεταγραφικό παράγοντα CHOP /GADD153 υπό συνθήκες «stress» του ενδοπλασματικού δικτύου.»**
X. Μιχαηλίδου, Α. Παπαβασιλείου, Ι. Κιαρης
Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
18^ο συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας 2012
- 2012 Μάρτιος **“CHOP-dependent regulation of p21/waf1 underlines the transition from the pro-survival to the pro- apoptotic activity of ER stress response.”**
Chrysovalantou G Michailidou, Athanasios G Papavassiliou, Hippokratris Kiaris
Intrinsically disordered proteins University of York, UK
- 2012 Μάρτιος **Η διερεύνηση του ρόλου του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21/waf1 κατά το «stress» του ενδοπλασματικού δικτύου.»**
X. Μιχαηλίδου, Α. Παπαβασιλείου, Ι. Κιαρης
Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
21^ο Συνεδρίου ΗΜΕΡΕΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Συμμετοχή σε επιστημονικές εταιρείες

- Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας
- Member of the Cyprus Association of Biologists
- Member of the Greek Society for Biochemistry and Molecular Biology

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Φτάνοντας στην περάτωση της διδακτορικής διατριβής, τότε μόνο συνειδητοποιείς την συνολική πορεία και τους ανθρώπους που την επηρέασαν. Σε αυτούς τους ανθρώπους θέλω να αναφερθώ και να τους ευχαριστήσω θερμά για την σημαντική βοήθεια που μου πρόσφεραν στα διάφορα στάδια αυτής της πορείας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διευθυντή του εργαστηρίου και επιστημονικό υπεύθυνο της διατριβής, τον Καθ. Α. Παπαβασιλείου, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Αν. Καθ. Ι. Κιάρη και την Επικ Καθ. Χ. Πιπέρη.

Θέλω να εκφράσω ξεχωριστά τις θερμές μου ευχαριστίες στον Αν. Καθ. Ι. Κιάρη υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του οποίου εκπονήθηκε η συγκεκριμένη διατριβή. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου όλα αυτά τα χρόνια, για την οικονομική υποστήριξη και ιδιαίτερα την ψυχολογική στήριξη του, σε κρίσιμες στιγμές. Σε εκείνον οφείλω την διάπλαση του επιστημονικού μου χαρακτήρα και τον ευχαριστώ θερμά. Ελπίζω ότι η συνεργασία μας θα συνεχιστεί.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω για την βοήθειά τους την Λέκτορα κ. Ι. Χατζηστάμου, την Επικ. Καθ. Ε. Κασσή, την Αν. Καθ. Σ. Κουλοχέρη, την Αν. Καθ. Έ. Μπάσδρα, την Δρ. Έλενα Φαρμάκη, Δρ Ελιάνα Σπηλιώτη, Δρ Χρήστο Αδαμόπουλο, Δρ Τζίνα Νταλαγιώργη και όλους τους επιστημονικούς συνεργάτες του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στην φίλη μου κ. Μίνα Ντεζέ για την υπομονή, τη στήριξη, την κατανόηση και την αγάπη της καθώς στάθηκε δίπλα μου κατά τον τελευταίο χρόνο της διατριβής μου.

Ιδιαίτερη αναφορά θα ήθελα να κάνω στον σύζυγο μου κ. Άρη Σταυρόπουλο για την ηθική στήριξη που μου παρέχει όλα τα αυτά τα χρόνια της διατριβής. Χωρίς την εμπιστοσύνη και την στηριξή του είμαι βέβαιη ότι τίποτα από αυτά που κατάφερα μέχρι τώρα δεν θα ήταν δυνατό!

Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι ένα μεγάλο μέρος της συγκεκριμένης διατριβής πραγματοποιήθηκε από το ερευνητικό χρηματοδοτούμενο έργο «Ηράκλειτος-II», το οποίο χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και από Εθνικούς πόρους.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

v

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

viii

Περίληψη

xvii

Summary

xix

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή

1

1.1 Στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου (ΕΔ)

2

1.1.1 Λειτουργία ενδοπλασματικού δικτύου

2

1.1.2 Στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου: Ανισορροπία μεταξύ της κυτταρικής ζήτησης σε νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες και της χωρητικότητας του ΕΔ.

4

1.1.3 Απόκριση έναντι στο στρες του ΕΔ από ενδοκυττάρια σηματοδοτικές αντιδράσεις (UPR, Unfolded Protein Response)

5

1.1.4 Μονοπάτια σηματοδότησης στην απόκριση του στρες του ΕΔ

7

1.2.Οξειδωτικό στρες

12

1.2.1 Στρες ενδοπλασματικού δικτύου και Οξειδωτικό στρες

12

1.3 Στρες ενδοπλασματικού δικτύου και παθολογικές καταστάσεις

13

1.3.1 Στρες του ΕΔ και απόπτωση

13

1.3.2 Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου και Διαβήτης

16

1.3.3 Το 'stress' του ενδοπλασματικού δικτύου εμπλέκεται στην απόπτωση των β κυττάρων.

18

1.4 Εμπλοκή του στρες του ΕΔ στην ινσουλινοαντίσταση (IR)

20

1.4.1 Εμπλοκή του στρες του ΕΔ στην μη φυσιολογική σηματοδότηση της ινσουλίνης στον διαβήτη τύπου 2

20

1.4.2 Ρόλος του στρες του ΕΔ στον λιπώδη ιστό κατά την ινσουλινοαντίσταση

21

1.4.3 Ρόλος του στρες του ΕΔ στο ήπαρ κατά την ινσουλινοαντίσταση

23

1.4.4 Ρόλος του στρες του ΕΔ στους σκελετικούς μύες κατά την ινσουλινοαντίσταση

24

1.5 Πιθανός μηχανισμός μετάπτωσης των κυττάρων από την προ-επιβιωτική στην προ-αποπτωτική απόκριση του ενδογενούς αντισταθμιστικού μηχανισμού (UPR).

25

1.6 Κυτταρικός κύκλος, κυκλίνες, κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες και οι αναστολείς τους.

26

1.6.1 Ανακάλυψη της p21

28

1.6.2 Ρύθμιση των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών και του αναστολέα p21

29

1.6.3 Σχέση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21 και του διαβήτη τύπου 2

29

1.6.4 Υπερέκφραση του p21 δρα ως ανασταλτικός παράγονας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των β κυττάρων.

31

1.6.5 Υπερέκφραση της p21 σε νησίδια παγκρέατος μύς βελτιώνει την αποκατάσταση της λειτουργίας των β κυττάρων μετά από επαγόμενου διαβήτη μέσω στρεπτοζοτοκίνης (STZ).

31

1.6.6 Ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και προγονικών δεικτών στα παγκρεατικά νησίδια μυός σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τη p21	32
1.6.7 Συνέκφραση ενδοκρινών ορμονών σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τη p21.	33
1.6.8 Η βιολογική σημασία της p21 σε σχέση με την διαβητική νεφροπάθεια.	33
1.7. Η επαγωγή της έκφρασης του CHOP επάγει το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Συσχέτιση του με τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.	34
1.7.1. Δομή και Ιδιότητες του CHOP	34
1.7.2 Το Πρότυπο Έκφρασης του CHOP	35
1.7.3 Ο ρόλος του CHOP σε συνθήκες στρες ενδοπλασματικού δικτύου	35
1.7.4 CHOP και Διαβήτης	37
1.7.5 Πειραματικό μοντέλο διαγονιδιακών μυών eIF2a με ομοζυγωτία Ser51Ala στον σακχαρώδη διαβήτη.	38
1.7.6 Ρόλος της απουσίας του CHOP στο ετερόζυγο μεταλλαγμένο Ser51Ala eIF2a πειραματικό μοντέλο.	38
1.7.7 Ρόλος του CHOP μετά από επαγωγή διαβήτη τύπου 2 σε πειραματικό μοντέλο με χρήση στρεπτοζοτοκίνη και με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (HFD).	40
1.7.8 Επίδραση της μετάλλαξης CHOP σε Lepi ^{db/db} ποντίκια	40
1.7.9 Απουσία CHOP προστατεύει τα β κύτταρα από το οξειδωτικό στρες το οποίο σχετίζεται στενά με το στρες του ΕΔ	41
1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	43

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματόζωα- Χειρισμοί και πειραματικές διαδικασίες	45
2.1.1 Διαχείριση πειραματόζωων, διασταυρώσεις	45
2.1.2 Προσδιορισμός γονοτύπου ποντικών (chop, p53, p21)	46
2.1.3 Χορήγηση φαρμάκων σε πειραματικά μοντέλα μυών	47
2.1.4 Λήψη αίματος από την ουρά ποντικών	48
2.1.5 Μέτρηση βάρους πειραματόζωων (Body weight)	48
2.1.6 Δοκιμασία Ανοχής Γλυκόζης	48
2.1.7 Δοκιμασία Αντίστασης στην Ινσουλίνη	49
2.1.8 Θυσίες και λήψη ιστών από τα ποντίκια	49
2.2 Κυτταροκαλλιέργειες	50
2.2.1 Απομόνωση πρωτογενών κυττάρων (MEFS)	51
2.2.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων	52
2.2.3 Κυτταρική διέγερση με γλυκόζη	52
2.2.4 Κλωνογονική Δοκιμασία (Clonogenic Assay)	53
2.3 Απομόνωση πρωτεϊνών	53
2.3.1 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford	53
2.4 Αποτύπωση Western (Western Blot)	54
2.4.1 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση	54
2.4.2. Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting)	56
2.5 Απομόνωση ολικού κυτταρικού RNA	60
2.5.1 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα	60

2.5.2 RT-PCR (Reverse Transcription PCR)	61
2.5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	62
2.5.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	65
2.6. ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ <i>IN VITRO</i> ΚΑΙ <i>IN VIVO</i>	66
2.6.1 <i>IN VITRO</i>	66
2.6.1.1 Έλεγχος δέσμωσης πυρηνικών πρωτεϊνών σε τμήματα DNA που αντιστοιχούν σε θέσεις δέσμωσης μεταγραφικών παραγόντων. Ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP)	69
2.6.2 <i>IN VIVO</i>	69
2.6.2.1 Αντίδραση συγκόλλησης μορίων DNA - Ligation	69
2.6.2.2 Μετασχηματισμός στελέχους E. coli με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (transformation)	70
2.6.2.3 Καλλιέργεια/ Πολλαπλασιασμός των μετασχηματισμένων κυττάρων	72
2.6.2.4 Ανασυνδυασμένο Πλασμιδιακό DNA-Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με στήλες καθαρισμού	72
2.6.2.5 Έλεγχος προϊόντων καθαρισμού πλασμιδίων	73
2.6.2.6 Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας λουσιφεράσης.	73
2.7 Ιστολογική επεξεργασία	74
2.7.1 Χρώση του παγκρεατικού ιστού με Αιματοξυλίνη/Ηωσίνη (H&E)	74
2.7.2 Ανοσοϊστοχημεία	75
2.8 Δοκιμασίες μέτρησης ρυθμού πολλαπλασιασμού κυττάρων	77
2.8.1 Δοκιμασία με χρήση χρωστικής Trypan Blue	79
2.8.2 Δοκιμασία MTT	80
2.9 Διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA ή siRNA	81
2.9.1 Αποσιώπηση του γονιδίου του αναστολέα p21 με τη χρήση της τεχνολογίας παρεμβολής	81
2.10 Στατιστική ανάλυση	82
ΚΕΦΑΛΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1 Μελέτη του τρόπου ρυθμίσης των επιπέδων της p21 από το στρες του ΕΔ	84
3.1.1 Μελέτη του τρόπου ρυθμίσης των επιπέδων της p21 από το στρες του ΕΔ <i>in vitro</i>	84
3.1.2 Η μείωση της έκφρασης της p21, ανεξάρτητη από την αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος.	85
3.1.3 Ρύθμιση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21 από το προ-αποπτωτικό γονίδιο CHOP, κατά το στρες του ΕΔ.	87
3.1.4 Μελέτη του τρόπου ρυθμίσης των επιπέδων της p21 από το στρες του ΕΔ <i>in vivo</i> .	90
3.2. Ο προ-αποπτωτικός παράγοντας CHOP ρυθμίζει την p21 σε μεταγραφικό επίπεδο	93
3.2.1. Μεταγραφική ρύθμιση της p21 από τον προ-αποπτωτικό παράγοντα CHOP	93
3.2.2. Ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας της p21 σε διαμολυσμένα κύτταρα με το πλασμίδιο L1R1-Luc με ταυτόχρονη χορήγηση του νικαμυκίνης	96
3.2.3. Διερεύνηση της μεταγραφικής ρύθμισης της p21 από τον προ-αποπτωτικό παράγοντα CHOP στα β παγκρεατικά κύτταρα	98

παράγοντα CHOP	
3.2.4. Φυσική αλληλεπίδραση του υποκινητή της p21 και του μεταγραφικού παράγοντα CHOP	100
3.3 Μελέτη επίδρασης της p21 που προκαλείται από το στρες του ΕΔ στην απόπτωση	102
3.3.1. Αποκατάσταση της ευαισθησίας σε κύτταρα ελλειματικά για το CHOP στην τουνικαμυκίνη, μέσω καταστολής της έκφρασης της p21/waf1	102
3.3.2. Ρόλος της p21 στην βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από επίδραση TUN και DOX	104
3.3.3. Συνέπειες της καταστολής της έκφρασης των επιπέδων του CHOP στην απόπτωση	105
3.3.4. Συνέπειες της μείωσης της p21 στα β παγκρεατικά κύτταρα στην διαδικασία της απόπτωσης	106
3.3.5 Καταστολή της έκφρασης της p21 σε HIT-T15 κύτταρα υπό την επίδραση υψηλής γλυκόζης (25mM)	107
3.3.6. Υψηλή έκφραση της p21 στα HIT-T15: Αναστολή των επιπτώσεων από το στρες του ΕΔ	109
3.4 Σημασία της p21 στους παθογενετικούς μηχανισμούς του διαβήτη τύπου 2	111
3.4.1 Γενετική απαλοιφή του γονιδίου p21, οδηγεί στην ευαισθητοποίηση πειραματικών μοντέλων στο διαβήτη	111
3.4.1.1 Απουσία της έκφρασης της p21 μειώνει την παραγωγή ινσουλίνης	114
3.4.2 Η σημασία της εξωγενούς αύξησης της p21 μέσω <i>nutlin -3a</i> στον επαγόμενο διαβήτη. Διακοπή της απόπτωσης και προστασία από τον διαβήτη	115
3.4.2.1 Εξωγενής αύξηση της p21 μέσω <i>nutlin -3a</i> σε πειραματικά μοντέλα μυών	
3.4.2.2 Υπερέκφραση της p21 σε πάγκρεας μυός <i>nutlin -3a</i> βελτιώνει την αποκατάσταση της λειτουργίας των β κυττάρων μετά από επαγόμενο διαβήτη, μέσω υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά διαίτας (HFD) με ζαχαρούχο νερό	
3.4.2.3 Ιστολογικές και βιοχημικές αναλύσεις στα παγκρέατα διαβητικών μυών μέσω STZ και διαβητικών μυών μέσω STZ και ταυτόχρονης χορήγησης <i>nutlin -3a</i>	116
	120
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	124
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	142

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε καταστάσεις παρατεταμένου και έντονου 'stress' το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) ενεργοποιεί ένα σύνθετο βιοχημικό μονοπάτι απόκρισης γνωστό ως UPR (Unfolded Protein Response) κατά το οποίο, το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. Σε στρεσογόνες συνθήκες του ΕΔ επάγεται ο μεταγραφικός παράγοντας *chop*/*GADD153* ενεργοποιώντας γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση. Από την άλλη πλευρά, παράγοντες όπως η *p21/waf1* προστατεύουν το κύτταρο αποτρέποντάς το από την απόπτωση, μέσω της καθήλωσής του στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Ένα θεμελιώδες ερώτημα σχετικά με την απόφαση για την επιβίωση ή μη των κυττάρων, είναι ποιά σηματοδοτικά μονοπάτια του UPR διαδραματίζουν ρόλο σε αυτή τη μετάβαση αλλά και πώς ρυθμίζεται το UPR. Για το σκοπό αυτό, έχει ιδιαίτερη σημασία να καταλάβουμε ποιό είναι οι βασικοί αισθητήρες των αποκρίσεων αυτών και πώς αυτές οι αποκρίσεις ενσωματώνονται στο κυτταρικό μηχανισμό κάνοντας τον βραχυπρόθεσμα ή μακροπρόθεσμα, κατά το στρες του ΕΔ, προστατευτικό ή προ-αποπτωτικό της επιβίωσης των κυττάρων. Στη συγκεκριμένη διατριβή αξιολογήθηκε τόσο ο ρόλος του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p21/waf1* όσο και η πιθανή ρύθμιση του, από τον μεταγραφικό παράγοντα *chop*/*GADD153* υπό συνθήκες στρες του ΕΔ.

Η φαρμακολογική επαγωγή του στρες του ΕΔ με τουνικαμυκίνη ή με υπερέκφραση του *chop*/*GADD153* προκαλεί καταστολή των μεταγραφικών και μεταφραστικών επιπέδων της *p21*. Το *chop*/*GADD153* επάγεται από το παρατεταμένο 'stress' του ΕΔ προκαλώντας μείωση των επιπέδων της *p21*, πρωτεΐνη απαραίτητη ώστε να οδηγηθούν τα κύτταρα σε απόπτωση. Η καταστολή της *p21/waf1* φαίνεται να αποκαθιστά την ευαισθησία των κυττάρων που δεν εκφράζουν το *chop* στην τουνικαμυκίνη συγκριτικά με τα αγρίου τύπου κύτταρα. Αυτό το αποτέλεσμα, τουλάχιστον εν μέρει, αποδεικνύει ότι προκειμένου το *chop* να επάγει αποτελεσματικά την απόπτωση απαιτείται καταστολή της *p21*. Σειρά πειραμάτων με χρήση κυττάρων σε καλλιέργεια έδειξαν ότι πράγματι το *chop* ρυθμίζει μεταγραφικά την ενεργότητα του υποκινητή της *p21* με άμεσο τρόπο καθώς έχει τη δυνατότητα να συνδέεται μαζί του ειδικά σε συνθήκες στρες του ΕΔ.

Υποδεικνύεται, λοιπόν, ότι το *CHOP* σχετίζεται με την αντι-αποπτωτική δράση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p21/waf1* κατά τη διάρκεια 'stress' του ΕΔ. Το *p21/waf1* εμπλέκεται στη ρύθμιση του ενδογενή αντισταθμιστικού κυτταρικού μηχανισμού (UPR) μέσω αναστολής της επαγόμενης απόπτωσης. Επομένως, η μελέτη

προσθέτει δεδομένα για το ρόλο της p21 το οποίο ρυθμίζεται από το chop/GADD153 στη μετάβαση από τη επιβιωτική στην προ-αποπτωτική κατάσταση.

Η διαταραχή της ισορροπίας αυτής σχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις, όπως ο διαβήτης. Στο πλαίσιο του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (T2D), ενεργοποιείται κυτταρικός θάνατος διαμεσολαβούμενος από το μόριο CHOP, που είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με δυσλειτουργία του παγκρέατος. Η γενετική απαλοιφή του γονιδίου p21 αυξάνει την ευαισθητοποίηση πειραματικών μοντέλων στο διαβήτη που προκαλείται από δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, ενώ φαρμακολογική διέγερση της έκφρασης της p21 σε διαβητικά πειραματόζωα μέσω nutlin-3a, έχει ως συνέπεια την επαναφορά των αγρίου τύπου όχι των p21 knockout μωών από την υπεργλυκαιμία που προκαλείται από τον επαγόμενο διαβήτη μέσω δίαιτας πλούσια σε λιπαρά ή με στρεπτοζοτοκίνη, την αποκατάσταση της λειτουργίας του παγκρέατος αλλά και την διευκόλυνση της διατήρησης της ομοιόστασης της γλυκόζης.

Τα ευρήματα αυτά αναγάγουν την p21 ως διαμορφωτή του επαγόμενου στρες του ΕΔ μέσω CHOP το οποίο σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο και παράλληλα υποδηλώνουν ότι, η διέγερση της δραστηριότητας της p21 μπορεί να είναι επωφελής για τη διαχείριση του σακχαρώδη διαβήτη καθώς και άλλων καταστάσεων στις οποίες το στρες του ΕΔ ενοχοποιείται για τον κυτταρικό θάνατο.

ABSTRACT

The accumulation of unfolded and misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) causes stress that has been designated as ER stress. Cells respond to ER stress by initiating a biochemical response that is designated as unfolded protein response (UPR) and which in its early stages or in mild ER stress is pro-survival while during prolonged or intense ER stress becomes pro-apoptotic. ER stress is involved in the pathogenesis of various diseases, including diabetes, at which the increased demands for insulin production and secretion, induces ER stress in the pancreatic beta cells. Ultimately the beta cells die of ER stress-associated apoptosis compromising pancreatic function and glucose homeostasis. The transcription factor CHOP (CCAAT/enhancer binding protein) is instrumental for induction of ER stress-related apoptosis. p21/waf1 is an established tumor suppressor, however, it also exhibits a pro-survival function as it protects from induction of apoptosis. Despite though our increased understanding of the mechanisms governing apoptosis triggered by ER stress, the transition from the pro-survival towards the pro-apoptotic mode of the unfolded protein response (UPR) remains poorly understood.

Here we show that during prolonged ER stress caused by tunicamycin, an antibiotic promoting ER- stress, CHOP suppresses in vitro and in vivo the expression of p21/waf1, a cell cycle regulator with strong anti-apoptotic activity. This effect, at least in part, is the direct consequence of CHOP action on p21 promoter, as indicated by reporter and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. This suppression of p21 levels was independent of p53 that is the major transcriptional regulator of p21, but could be reproduced by forced expression of CHOP. Consistently with these findings, siRNA-mediated inhibition of p21 levels restored the sensitivity of CHOP-deficient cells to tunicamycin. Our findings indicate that CHOP relieves the anti-apoptotic activity of p21 during ER stress. Thus, p21 is implicated in the regulation of the UPR by inhibiting the induction of apoptosis.

Accordingly, our study provides hints for understanding the role of CHOP in ER stress-mediated apoptosis since malfunction of this homeostatic mechanism has been implicated in a variety of common diseases such as diabetes. Our results predict that genetic ablation of p21 will render mice more sensitive to the disease. In order to test this hypothesis, p21-deficient mice and wild type controls were fed with HFD and high sucrose in drinking water. p21-deficient mice were more sensitive to T2D

development and exhibited a delayed response in glucose homeostasis as indicated by glucose tolerance tests. Administration of nutlin-3a was sufficient to restore pancreatic function and to reduce the glucose levels in the wild type diabetic mice but not in p21KO mice. A second group of experimental animals became diabetic by a combination of streptozotocin (STZ) and high fat diet (HFD). Under these conditions only a fraction of the pancreatic beta cells is damaged, increasing the load for insulin production to the remaining surviving islets, ultimately causing ER stress and T2D. A cohort of these animals, after diabetes induction was confirmed, received nutlin-3a. Nutlin-3a is a small molecule inhibitor of MDM2-p53 interaction that stabilizes p53 and ultimately elevates p21 levels. Administration of nutlin-3a was sufficient to restore pancreatic function and to reduce the glucose levels in the diabetic mice. Our results are consistent with recent findings suggesting that nutlin-3a treatment concomitantly with STZ administration inhibits diabetes and that conditional expression of p21 in the islet cells of transgenic mice causes increased pancreatic cell regeneration and suggest that activation of p21 expression is beneficial for the management of T2D.

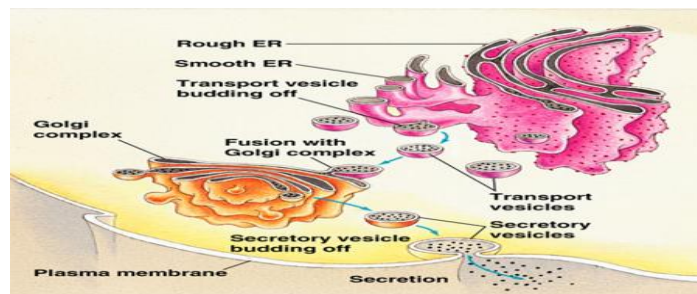
Collectively, we identified p21 as a target of CHOP transcription factor. Interference with p21 activity during ER stress may be beneficial in conditions in which modulation of cells' sensitivity to apoptosis is desired.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου (ΕΔ)

1.1.1 Λειτουργία ενδοπλασματικού δικτύου

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) αποτελεί τη θέση σύνθεσης των περισσότερων συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς επίσης και εκείνων που προορίζονται να εξαχθούν από τα κύτταρα (εκκριτική πορεία) (Breckenridge *et al.*, 2003, Rao *et al.*, 2004, Schroder and Kaufman *et al.*, 2005) (Σχήμα 1). Στο ενδοπλασματικό δίκτυο περιέχεται υψηλή συγκέντρωση Ca^{2+} λόγω της ενεργής μεταφοράς ιόντων ασβεστίου που συντελείται από το κυτταρόπλασμα μέσω της Ca^{2+} -ΑΤΡάσης (Hammadi *et al.*, 2013). Στον αυλό αυτού του υποκυτταρικού διαμερίσματος επικρατεί ένα ιδιαίτερος ισχυρό οξειδωτικό περιβάλλον, σημαντικό τόσο για την δημιουργία των δισουλφιδικών δεσμών όσο και για τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε, ότι για τη σωστή αναδίπλωση και μεταφορά των πρωτεϊνών στο ενδοπλασματιστικό δίκτυο συμβάλλει η ύπαρξη μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών συνοδών (chaperone proteins), όπως η Grp78 (78 kDa glucose-regulated protein) ή αλλιώς BiP (Binding immunoglobulin protein) (Σχήμα 1) και η Grp94 (94 kDa glucose-regulated protein), που σταθεροποιούν τα ενδιάμεσα παράγωγα των αντιδράσεων αναδίπλωσης (Πίνακας 1), (Fewell *et al.* 2001; Gething and Sambrook, 1999; Ma and Hendershot, 2004; Orrenius *et al.*, 2003; Rizzuto *et al.*, 2004). Επιπλέον, χαρακτηριστική λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου είναι η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών μέσω της ομοιοπολικής πρόσδεσης μικρών πλευρικών αλυσίδων ολιγοσακχαριτών, η οποία πραγματοποιείται από κατάλληλα ένζυμα (Ellgaard *et al.*, 1999; Voeltz *et al.*, 2002). Η λειτουργία των αντιδράσεων αναδίπλωσης στο ΕΔ βρίσκεται υπό τον έλεγχο τόσο περιβαλλοντικών, όσο γενετικών και μεταβολικών παραγόντων.



Σχήμα 1. Σύνθεση πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) με προορισμό την κυτταρική μεμβράνη, καθώς επίσης και πρωτεϊνών που προορίζονται για εκκριτική πορεία (Zhou Y *et al.*, 2011).

Οι πρωτεΐνες που πρόκειται να υποστούν επεξεργασία στο ΕΔ εισέρχονται αρχικά σε αυτό μέσω ενός πρωτεϊνικού συμπλέγματος μετακίνησης που ονομάζεται Sec 61 translocon complex. Οι περισσότερες υφίστανται N-γλυκοζυλίωση, αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο OST (oligosaccharide transferase). Το OST συνδέεται με το δίαυλο εισόδου των πρωτεϊνών στο ΕΔ και στη συνέχεια με τη δράση γλυκοσιδασών ή της UGGT (UDP-glucose: glycoprotein glycosyltransferase) προκύπτει μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία αλληλεπιδρά με δύο λεκτίνες, την καλνεξίνη (CNX) και την καλρετικουλίνη (CRT), (**Πίνακας 1**), οι οποίες συνδέονται με την ERp57, μια οξειδοαναγωγάση που καταλύει το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Όταν η γλυκοπρωτεΐνη απελευθερώνεται από το σύστημα CNX/CRT, υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία από γλυκοσιδάσες. Σε αυτό το στάδιο γίνεται εκ νέου έλεγχος από την UGGT (ή τη BiP αν πρόκειται για μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη). Στην περίπτωση που η πρωτεΐνη έχει λάβει τη σωστή διαμόρφωση εισέρχεται στη συσκευή Golgi. Αν όχι, μπορεί να εισέλθει και πάλι στο σύστημα CNX/CRT. Ωστόσο, πρωτεΐνες που αποτυγχάνουν οριστικά να αποκτήσουν σωστή δομή ακόμα και μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους CNX/CRT προωθούνται στο κυτταρόπλασμα για απομάκρυνση με την ERAD (Endoplasmic Reticulum-associated protein degradation) μέσω μιας διαδικασίας στην οποία συμμετέχουν πρωτεΐνες όπως οι EDEM (ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein) και Derlin (Anelli *et al.*, 2008; Marciniak *et al.*, 2006). Αναλυτικότερα αναφέρεται ότι, η ERAD αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς του συστήματος ποιοτικού ελέγχου του ΕΔ για τη διατήρηση της ομοιόστασης στο ΕΔ και περιλαμβάνει τρεις βασικές διαδικασίες: 1) την αναγνώριση των μη- ή λανθασμένα-αναδιπλωμένων πρωτεϊνών που πρέπει να οδηγηθούν προς αποδόμηση στο κυτταρόπλασμα, 2) τη μεταφορά τους από το ΕΔ στο κυτταρόπλασμα και 3) την αποδόμηση τους από το πρωτεάσωμα (Ushioda *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2010). Η αναγνώριση των υποστρωμάτων προς αποδόμηση και η σύνδεσή τους με τις μοριακές συνοδούς (chaperones) κατά την ERAD σχετίζεται με την έκθεση υδρόφοβων καταλοίπων ή ολιγοσακχαριδίων που είναι συνδεδεμένα στο αμινοτελικό άκρο (Tsai *et al.*, 2010). Επισημαίνεται ότι πριν από τη μεταφορά τους οι πρωτεΐνες υφίστανται μερικό ξεδίπλωμα και αναγωγή των δισουλφιδικών τους δεσμών με συμμετοχή, πιθανά

στη διαδικασία αυτή, των BiP και PDI (protein disulfide isomerase) (**Πίνακας 1**), (Anelli *et al.*, 2008).

Πίνακας 1. Εντοπισμός μοριακών συνοδών, ενζύμων αναδίπλωσης και η λειτουργία τους

(Ni & Lee, 2007)

Πρωτεΐνη	Εντοπισμός	Λειτουργία
GRP78/BiP	Αυλός του ΕΔ Μεμβράνη του ΕΔ Επιφάνεια κυττάρου Πυρήνας	Μοριακός συνοδός Δέσμευση Ca ²⁺ Αισθητήρας του στρες του ΕΔ Ρυθμιστής του UPR Αντιαποπτωτική δράση
GRP94/GRP96	Αυλός του ΕΔ Επιφάνεια κυττάρου	Μοριακός συνοδός Δέσμευση Ca ²⁺ Αντιαποπτωτική δράση Ανοσία όγκου
PDI	Αυλός του ΕΔ Επιφάνεια κυττάρου	Κατάλυση του σχηματισμού δισουλφιδικού δεσμού
Καλνεξίνη	Μεμβράνη του ΕΔ Επιφάνεια κυττάρου	Μοριακός συνοδός Αναδίπλωση γλυκοπρωτεϊνών
Καλρετικουλίνη	Αυλός του ΕΔ Κυτοσόλιο Επιφάνεια κυττάρου	Μοριακός συνοδός Δέσμευση Ca ²⁺ Αναδίπλωση γλυκοπρωτεϊνών

1.1.2 Στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου: Ανισορροπία μεταξύ της κυτταρικής ζήτησης σε νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες και της χωρητικότητας του ΕΔ.

Είναι πλέον σαφές ότι, ένας μεγάλος αριθμός ερεθισμάτων, μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία του ΕΔ διαταράσσοντας την ομοιόσταση του, μέσω μεταβολών στη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου και οξειδοαναγωγικής κατάστασης, υποξίας, διατροφικής/ενεργειακής στέρησης (σάκχαρο/ γλυκόζη), ιογενών λοιμώξεων, χρόνιων φλεγμονών και υψηλών επιπέδων λίπους ή χοληστερόλης. Επιπλέον, στη συσσώρευση μη- αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ συμβάλλει η έκφραση πρωτεϊνών με γενετικές μεταλλάξεις, ο υπερβολικός όγκος πρωτεϊνών στο ΕΔ αλλά και διαταραχές στη μετα-μεταφραστική τροποποίηση (γλυκοζυλίωση). Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, η συσσώρευση αυτή προκαλεί την εμφάνιση στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Μεγάλος αριθμός παθολογικών καταστάσεων όπως ο διαβήτης, έχουν συνδεθεί με το στρες ενδοπλασματικού δικτύου. Σημαντικά στοιχεία δείχνουν ότι το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου είναι ένας σημαντικός

μηχανισμός που συνδέει την παχυσαρκία, την αντίσταση στην ινσουλίνη και την ανοχή στη γλυκόζη (Kaufman *et al.*, 2002). Η απάντηση του κυττάρου, είναι μια ενδοκυτταρική σειρά ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών αντιδράσεων που ονομάζονται συνολικά UPR.

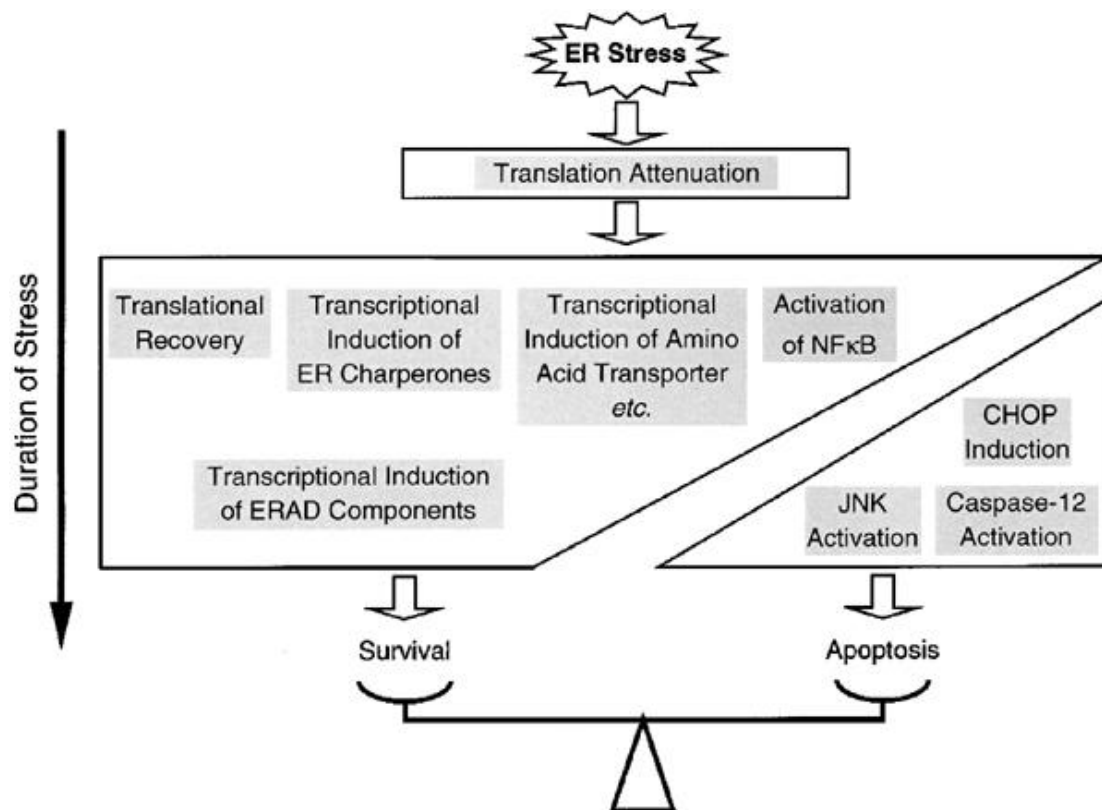
1.1.3 Απόκριση έναντι στο στρες του ΕΔ από ενδοκυτταρικές σηματοδοτικές αντιδράσεις (UPR, Unfolded Protein Response)

Παράλληλα με τα παραπάνω αναφέρεται ότι, η συσσώρευση των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ είναι τοξική, προκαλεί την εμφάνιση του στρες του ΕΔ και η απάντηση του κυττάρου πυροδοτεί μια σειρά ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών αντιδράσεων που ονομάζονται συνολικά UPR.

Πιο συγκεκριμένα, το UPR παρέχει ένα μηχανισμό με τον οποίο τα κύτταρα μπορούν ταχύτατα να προσαρμοστούν στο υπερβολικό φορτίο των πρωτεϊνών που απαιτούν αναδίπλωση ή στη συσσώρευση μη-αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ. Η προσαρμογή αυτή απαιτεί ρύθμιση σε πολλά επίπεδα: στη γονιδιακή έκφραση, τη μεταγραφή, τη μετάφραση, τη μεταφορά πρωτεϊνών στο ΕΔ αλλά και την αποικοδόμηση μέσω ERAD των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Αξίζει να σημειωθεί ότι απαιτείται συντονισμένη ρύθμιση όλων αυτών των διαδικασιών προκειμένου να επιτευχθεί τόσο αποκατάσταση της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών όσο και της ομοιόστασης του ΕΔ και τελικά της φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου. Αν δεν αντιμετωπιστεί το πρόβλημα με επιτυχία μέσα σε ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ή αν συνεχίζεται η διαταραχή, τότε η χρόνια ενεργοποίηση του UPR οδηγεί σε ενεργοποίηση των αποπτωτικών μηχανισμών για την απομάκρυνση του κυττάρου (Marciniak *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2010). Το UPR ανακουφίζει το ΕΔ από το στρες ασκώντας δράση σε τρία επίπεδα: α) αναστέλλοντας τη γενική πρωτεϊνική σύνθεση, β) επάγοντας την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για τις μοριακές συνοδούς του ΕΔ με σκοπό την αύξηση της ικανότητας αναδίπλωσης του ΕΔ και την αποφυγή σχηματισμού τοξικών συσσωματωμάτων, και γ) αυξάνοντας την έκφραση συστατικών της ERAD προκειμένου να αυξηθεί η απομάκρυνση των μη-αναδιπλωμένων πρωτεϊνών από το ΕΔ. Με τον τρόπο αυτό το UPR επηρεάζει το μεταβολισμό πρωτεϊνών, λιπιδίων και αμινοξέων και τελικά την τύχη του ίδιου του κυττάρου (Ushioda *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011), (**Σχήμα 2**).

Το παρατεταμένο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου βλάπτει σοβαρά τις λειτουργίες του ενδοπλασματικού δικτύου (**Σχήμα 2**). Επιπλέον, η απόπτωση είναι απαραίτητη όχι μόνο για την αφαίρεση των κυττάρων που απειλούν την ακεραιότητα του οργανισμού αλλά και για την κατάλληλη ανάπτυξη και διαφοροποίηση αυτών. Υπάρχουν τρία γνωστά μονοπάτια απόπτωσης που προκαλούνται από το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Το πρώτο από αυτά είναι η μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου CHOP, που σταματάει την ανάπτυξη και επάγει βλάβη στο DNA (ομόλογη πρωτεΐνη C/EBP/GADD153, growth arrest and DNA damage-inducible gene 153, ένα μέλος της οικογένειας C/EBP των παραγόντων μεταγραφής). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης CHOP μόλις που ανιχνεύονται υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά αυξάνονται έντονα ως απόκριση στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (Ron *et al.*, 1992). Το δεύτερο αποπτωτικό μονοπάτι είναι η ενεργοποίηση της cJUN αμινοτελικής κινάσης (Urano *et al.*, 2000). Το τρίτο αποπτωτικό μονοπάτι είναι η ενεργοποίηση της εντοπισμένης στο ενδοπλασματικό δίκτυο πρωτεάσης κυστεΐνης, caspase-12 (Nakagawa *et al.*, 2000), (**Σχήμα 2**).

Σε συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων, η απόφαση μεταξύ θανάτου και προσαρμογής στο στρες του ΕΔ εξαρτάται περισσότερο από την ένταση της ενεργοποίησης των αισθητήρων του UPR παρά από τα ειδικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται (Rutkowski *et al.*, 2006). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι είτε υπό ήπιο είτε υπό ισχυρό στρες όλοι οι αισθητήρες του UPR ενεργοποιούνται και δύνανται να οδηγήσουν στην επαγωγή τόσο προ-αποπτωτικών όσο και αντι-αποπτωτικών παραγόντων (**Σχήμα 2**).



Σχήμα 2 Απόκριση έναντι στο stress του ενδοπλασματικού δικτύου.

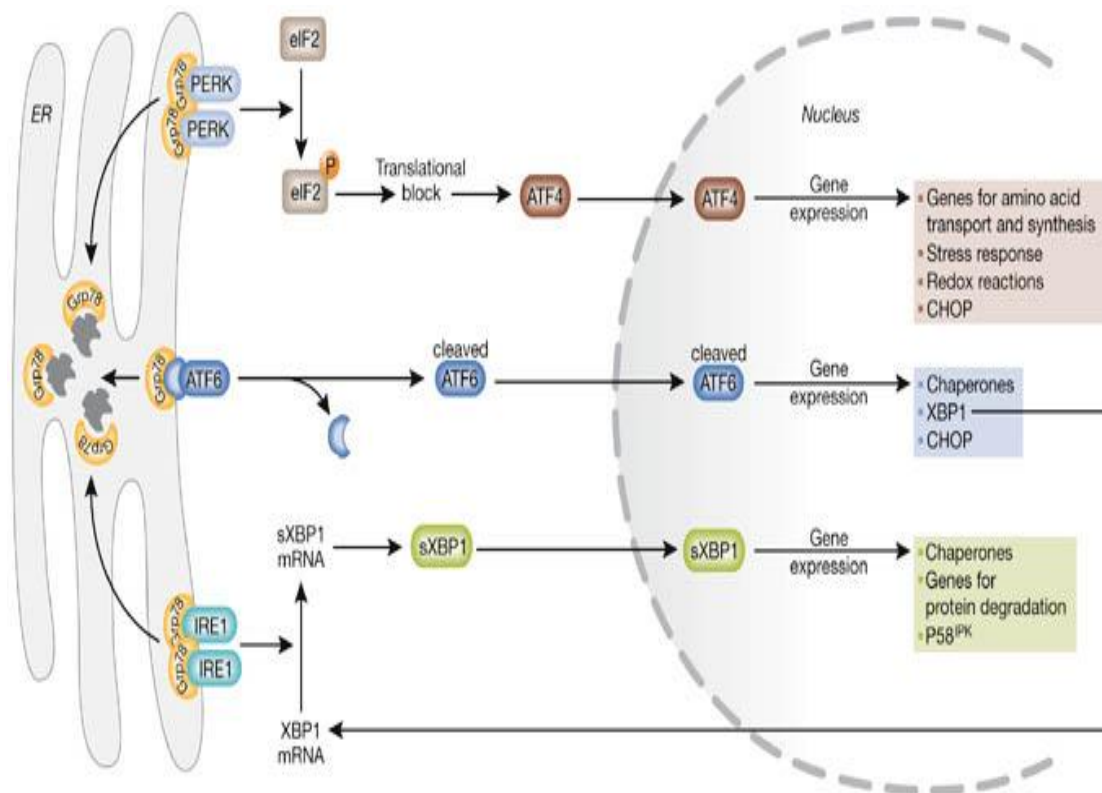
Η συσσώρευση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ ενεργοποιεί τέσσερις αποκρίσεις. Α) Επαγωγή μεταγραφής των συνοδών πρωτεϊνών του ΕΔ οι οποίες αυξάνουν την ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και εμποδίζουν τη συσσωμάτωσή τους. Β) Διακοπή της μετάφρασης η οποία μειώνει την πρωτεϊνική σύνθεση και εμποδίζει τη συσσώρευση των μη σωστά διαμορφωμένων πρωτεϊνών. Γ) Η αποδόμηση των μη σωστά διαμορφωμένων πρωτεϊνών μέσω του συστήματος του πρωτεασώματος Δ) Η αδυναμία επαναφοράς της ομοιοστάσης και των λειτουργιών του ΕΔ, επάγει κυτταρικό θάνατο συνήθως με την μορφή της απόπτωσης.

(Προσαρμογή από S Oyadomari and M Mori, 2004)

1.1.4 Μονοπάτια σηματοδότησης στην απόκριση του στρες του ΕΔ

Επισημαίνοντας τις δράσεις της UPR κρίνεται απαραίτητη η αναφορά των μηχανισμών που χρησιμοποιεί. Αναλυτικότερα ενεργοποιούνται τρεις διαμεμβρανικοί μεσολαβητές σήματος, οι οποίοι εκφράζονται σταθερά σε όλους τους οργανισμούς (μετάζωα). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και οι τρεις αυτοί παράγοντες βρίσκονται σε ανενεργή μορφή με το τμήμα του μορίου τους που βρίσκεται μέσα στο ΕΔ να είναι συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη BiP. Σε περίπτωση στρες του ΕΔ, η BiP αποσυνδέεται από τους τρεις 'αισθητήρες' του UPR, με αποτέλεσμα την

ενεργοποίηση τους. Για το λόγο αυτό, η BiP θεωρείται διαγνωστικός δείκτης του στρες του ΕΔ. Έχουν αναγνωριστεί τρεις διαφορετικές ομάδες μονοπατιών μεταγωγής σήματος του στρες του ΕΔ. Κάθε ομάδα ορίζει ένα ξεχωριστό μονοπάτι της UPR που διαμεσολαβείται από τους πρωτεϊνικούς υποδοχείς PERK (protein kinase RNA, PKR-like ER kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor-6) και IRE1 (Inositol-Requiring-Protein 1). Σε κάθε περίπτωση, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη αντιλαμβάνεται την κατάσταση της αναδίπλωσης πρωτεϊνών στον αυλό του ΕΔ και μεταδίδει την πληροφορία δια μέσου της μεμβράνης του ΕΔ στο κυττόςόλιο (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Η μεταγωγή σήματος σε συνθήκες στρες ενδοπλασματικού δικτύου

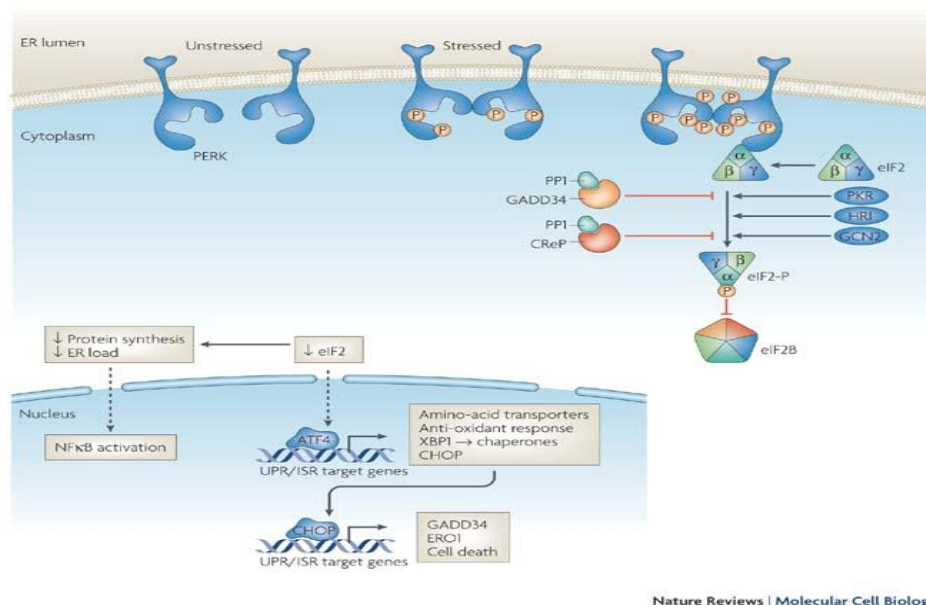
Σε φυσιολογικές συνθήκες η πρωτεΐνη συνοδός Grp78 δένεται στο άμινο-τελικό άκρο των IRE1, PERK και ATF6 αναστέλλοντας την ενεργοποίησή τους. Η συνάθροιση μη-ή λάθος αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο προκαλεί την απελευθέρωση των IRE1, PERK και ATF6 από την Grp78. Η IRE1 και η PERK ολιγομερίζονται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Η δράση ενδοριβονουκλεάσης της IRE1 προκαλεί την επαγωγή της XBP-1, που επάγει γονίδια για την αναδίπλωση ή την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Ο ολιγομερισμός της PERK προκαλεί την φωσφορυλίωση του eIF2α και την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η επαγωγή του ATF4 προκαλεί την επαγωγή γονιδίων για τη ρύθμιση της ομοιόστασης του ενδοπλασματικού δικτύου. Η απομάκρυνση της Grp78 από τον ATF6 επιτρέπει τη μεταφορά του στο σύστημα Golgi, όπου και σχάζεται. Η ενεργή μορφή του μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που περιλαμβάνονται στο UPR.

(Toru Hosoi & Koichiro Ozawa, 2010)

Σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα PERK

Το PERK είναι μία κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία ενεργοποιείται μετά την απομάκρυνση της πρωτεΐνης συνοδού Grp78 (BiP), ολιγομερίζεται, ενεργοποιεί την περιοχή κινάσης της και αυτοφωσφορυλιώνεται. Στη συνέχεια, φωσφορυλιώνεται ο παράγοντας eIF2 από το PERK, αναστέλλοντας έτσι τη σύνθεση των πρωτεϊνών αλλά και τη μείωση της συσσώρευσης νέων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αν και το ενεργοποιημένο PERK προκαλεί την αναστολή της σύνθεσης νέων πρωτεϊνών, η αναστολή αυτή δεν είναι γενική. Ορισμένα γονίδια που περιέχουν εξειδικευμένες ρυθμιστικές αλληλουχίες, παρά την γενική αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, είναι δυνατόν να συνεχίσουν να μεταφράζονται για τη σωστή λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου (Schroder and Kaufman, 2005). Από τα γονίδια αυτά το καλύτερα μελετημένο είναι αυτό που προκαλεί την επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα ATF4. Πρόκειται για μεταγραφικό παράγοντα που προωθεί την επιβίωση του οργανισμού με την επαγωγή γονιδίων που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό αμινοξέων, τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και την έκκριση πρωτεϊνών (Harding *et al.*, 2003). Ωστόσο ο ATF4 προκαλεί και την επαγωγή και προαποπτωτικών γονιδίων, όπως το CHOP (C/EBP homologous protein) και το GADD43. Η πρωτεΐνη CHOP είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ελέγχει γονίδια που κωδικοποιούν συστατικά τα οποία εμπλέκονται στην απόπτωση. Έτσι, αν και το PERK έχει προστατευτικό ρόλο όσον αφορά το στρες στο ΕΔ, μπορεί επίσης να συμβάλλει στην

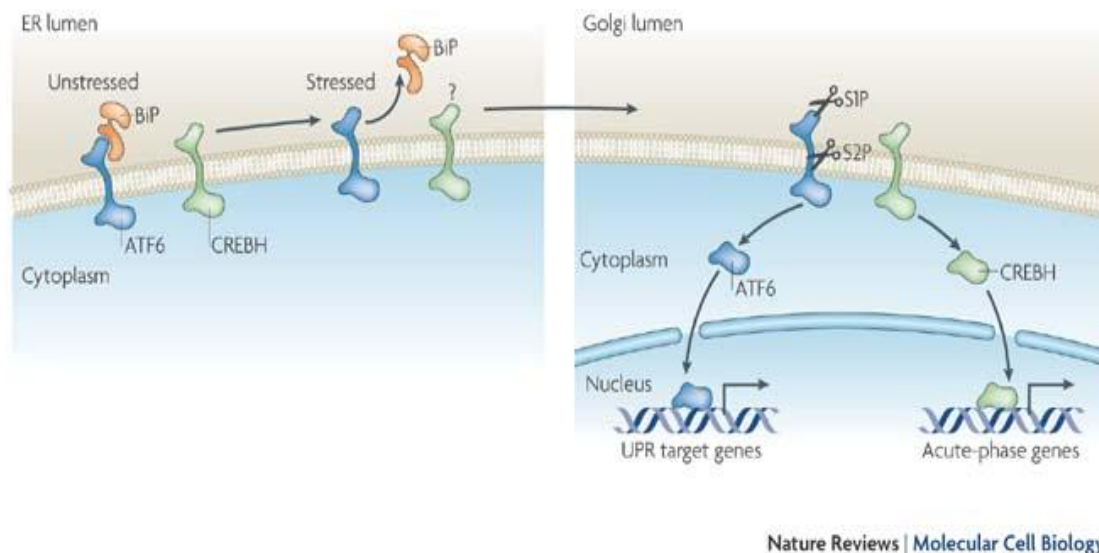
επαγωγή μονοπατιών κυτταρικού θανάτου. Ο δυσλειτουργικός αυτός χαρακτήρας του PERK φαίνεται να ρυθμίζεται στο επίπεδο φωσφορυλίωσης του eIF2a. Το γονίδιο GADD43 παράγει μια πρωτεΐνη η οποία προσελκύει την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) με αποτέλεσμα την αποφωσφορυλίωση του eIF2a-P και αναστροφή της μείωσης της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Ρυθμίζοντας τα επίπεδα του GADD43 επιτυγχάνεται ο συντονισμός της φωσφορυλίωσης του eIF2a, προστατεύοντας έτσι το κύτταρο από το στρες και αποτρέποντας τα αποπτωτικά σήματα (Schroder and Kaufman, 2005), (Σχήμα 4).



Σχήμα 4 Σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα PERK (Ron & Walter, 2007)

Σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα ATF6

Αντίθετα με το PERK, η απομάκρυνση της Grp78 από το αμινο-τελικό άκρο του ATF6 επιτρέπει τη μεταφορά του στο σύστημα Golgi, όπου υφίσταται πρωτεόλυση από δύο πρωτεάσες την S1P (Site 1 Protease) και την S2P (Site 2 Protease) που διαδοχικά αφαιρούν την κυτταροπλασματική και την διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης αντίστοιχα. Έπειτα, το αμινοτελικό κομμάτι του ATF6 μεταφέρεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων στόχων του UPR (Ye *et al.*, 2000), (Σχήμα 5).

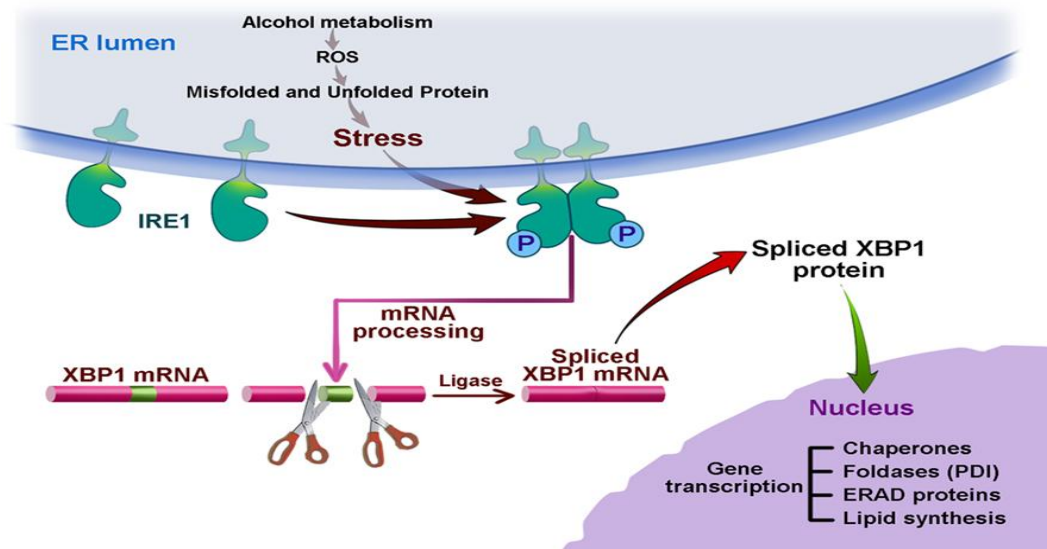


Σχήμα 5 Σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα ATF6

(Ron & Walter, 2007)

Σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα IRE1

Ο τρίτος παράγοντας που ενεργοποιείται με διμερισμό είναι η κινάση IRE1α (inositol-requiring kinase 1). Η κινάση αυτή, ενεργοποιώντας τον μεταγραφικό παράγοντα XBP1 (X-box binding protein 1) (Calfon *et al.*, 2002), καθοδηγεί την ενεργοποίηση πολλών γονιδίων-στόχων της UPR, που κωδικοποιούν για παράγοντες που συμμετέχουν στην ERAD, με σημαντικότερη αυτών την EDEM (**Σχήμα 6**), (Colgan *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2010). Σημειώνεται ότι ο ATF6 αυξάνει την έκφραση του XBP1 (Yoshida *et al.*, 2000). Όλοι αυτοί οι παράγοντες διευκολύνουν την απομάκρυνση των πρωτεϊνών με οριστικά λανθασμένη αναδίπλωση από το ΕΔ (Ushioda *et al.*, 2008). Ειδικά η οδός IRE1α/XBP1 έχει προταθεί και σαν παράγοντας που συμμετέχει στη διαφοροποίηση κυτταρικών τύπων που εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης (Malhotra & Kaufman., 2007). Σε αυτές τις περιπτώσεις φαίνεται ότι η αλλαγή στην πρωτεϊνοσύνθεση στο ΕΔ που επάγει το UPR, ιδιαίτερα μάλιστα όταν αυτή είναι παρατεταμένη, μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή στο φαινότυπο του κυττάρου και συγκεκριμένα σε αποδιαφοροποίησή του (Marciniak *et al.*, 2006; Tsai *et al.*, 2010). Παράλληλα με αυτό αναφέρεται ότι, η πολυπλοκότητα του UPR με συμμετοχή διαφορετικών «αισθητήρων» του στρες του ΕΔ και ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων, να δηλώνει την επαγωγή της έκφρασης διαφορετικών ομάδων γονιδίων ανάλογα με την διάρκεια ή την ένταση του στρες (Tsai *et al.*, 2010), (**Σχήμα 6**).



Σχήμα 6. Σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα IRE1

(Ron & Walter, 2007)

1.2.Οξειδωτικό στρες

1.2.1 Στρες ενδοπλασματικού δικτύου και Οξειδωτικό στρες

Είναι πλέον επιστημονικά τεκμηριωμένο ότι, το στρες του ΕΔ και η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) συνδέονται, ωστόσο οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους συνδέονται δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Αναντίρρητο είναι το γεγονός ότι, η σωστή λειτουργία του ΕΔ εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση που επικρατεί σε αυτό. Σε αντίθεση με το κυτταρόπλασμα που διατηρεί αναγωγικό περιβάλλον, στο ΕΔ επικρατεί οξειδωτικό περιβάλλον με υψηλή αναλογία οξειδωμένης προς ανηγμένης γλουταθειόνης (GSSG/GSH). Ο λόγος αυτός αποτελεί δείκτη της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου και ενώ στο κυτταρόπλασμα είναι >50:1, στο ΕΔ κυμαίνεται μεταξύ 1:1 και 3:1. Οι οξειδωτικές αυτές συνθήκες επάγουν το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών, οι οποίοι, όπως προαναφέρθηκε, είναι απαραίτητοι για τη ωρίμανση, τη σταθεροποίηση και τη λειτουργία των πρωτεϊνών που εισέρχονται στο ΕΔ. Στο σημείο αυτό είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι, ο σχηματισμός των δισουλφιδικών δεσμών ελέγχεται από την οικογένεια των οξειδοαναγωγασών του ΕΔ που περιλαμβάνει πολλά μέλη όπως τα PDI, ERp57, ERp72, PDIR, PDIP και P5. Πιο συγκεκριμένα, τα κατάλοιπα κυστεΐνης στο PDI στο ενεργό κέντρο αυτών των πρωτεϊνών δέχονται ηλεκτρόνια από το υπόστρωμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με αποτέλεσμα την οξείδωση του υποστρώματος και την

αναγωγή του ενεργού κέντρου. Σημαντικό ρόλο σε αυτή την αντίδραση διαδραματίζει η οξειδωση του υποστρώματος και η αναγωγή του ενεργού κέντρου. Προς την κατεύθυνση αυτή «οδηγεί» η οξειδάση 1 του ER (ERO1). Παράλληλα, η μεταφορά αυτή των ηλεκτρονίων οδηγεί στην αναγωγή του μοριακού οξυγόνου και στο σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου. Έχει υπολογιστεί ότι περίπου 25% των ROS που παράγονται στο κύτταρο προέρχονται από αυτή τη διαδικασία (Malhotra *et al.*, 2010). Έτσι, η ίδια η λειτουργία του ΕΔ αποτελεί αιτία οξειδωτικού στρες ενώ πιθανά το ίδιο ισχύει και για τη συσσώρευση μη –αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, χωρίς όμως οι σχετικοί μηχανισμοί να έχουν διαλευκανθεί (Ushioda *et al.*, 2008). Οι ROS πάντως που παράγονται με τον τρόπο αυτό, μπορούν οι ίδιες να προκαλέσουν λανθασμένη αναδίπλωση και να εμποδίσουν την έκκριση πρωτεϊνών. Η επαγωγή της απάντησης του UPR στο οξειδωτικό στρες αποτελεί προσαρμοστικό μηχανισμό για την επιβίωση του κυττάρου και τη διατήρηση της λειτουργικότητας του (Malhotra & Kaufman, 2007) αλλά μπορεί ωστόσο να οδηγήσει και στο θάνατο του (Marciniak *et al.*, 2006).

Ένας άλλος μηχανισμός συσχέτισης του στρες του ΕΔ με το οξειδωτικό στρες, αφορά το ασβέστιο. Και τα δυο αυτά είδη στρες προκαλούν την απελευθέρωση ασβεστίου από το ΕΔ. Η αύξηση όμως του κυτταροπλασματικού ασβεστίου μπορεί να επάγει την παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια. Μεγάλες συγκεντρώσεις ROS στα μιτοχόνδρια προκαλούν μεγαλύτερη απελευθέρωση ασβεστίου από το ΕΔ και καθώς η αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου φθίνει, ο φαύλος αυτός κύκλος αποτελεί απειλή για την επιβίωση του κυττάρου. Με βάση τα δεδομένα αυτά γενετική ή χημική παρέμβαση για την ελάττωση των ROS θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανή οδό για την πρόληψη ή τη θεραπεία των ασθενειών που σχετίζονται με την αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Marciniak *et al.*, 2006).

1.3 Στρες ενδοπλασματικού δικτύου και παθολογικές καταστάσεις

1.3.1 Στρες του ΕΔ και απόπτωση

Όπως προαναφέρθηκε, η αρχική επίπτωση από την ενεργοποίηση του UPR είναι η προσαρμογή του οργανισμού στο νέο περιβάλλον του και η επαναφορά του ενδοπλασματικού δικτύου σε φυσιολογική λειτουργία. Οι προσαρμοστικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν την επαγωγή γονιδίων που είναι υπεύθυνοι για την αύξηση της ικανότητας αναδίπλωσης των πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, την αύξηση του ρυθμού αποικοδόμησης των πρωτεϊνών μέσω του πρωτεασώματος

(ERAD: ER-Associated-Degradation) αλλά και την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης για την μείωση των εισερχόμενων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Brodsky and McCracken, 1999; Ma and Hendershot, 2002; McCracken and Brodsky, 1996; Yoshida *et al.*, 2003; Wu and Kaufman, 2006). Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι το έντονο και παρατεταμένο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου προκαλεί τελικά τη μετατροπή της UPR από μία προ-επιβιωτική/ προσαρμοστική (prosurvival/adaptive) σε μία προ-αποπτωτική διαδικασία (Schroder & Kaufman, 2005). Η πρόκληση απόπτωσης από το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου περιλαμβάνει μονοπάτια κυτταρικού θανάτου είτε μέσω της οδού των μιτοχονδρίων είτε με άλλους δρόμους. Τα προαποπτωτικά σήματα που προκαλεί το ενδοπλασματικό δίκτυο περιλαμβάνουν συνήθως την επαγωγή του μεταγραφικού προαποπτωτικού παράγοντα chop/GADD153, την απελευθέρωση Ca^{2+} , την αρνητική ρύθμιση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 και την ενεργοποίηση των ASK1/JNK από την IRE1 (Malhotra and Kaufman, 2007).

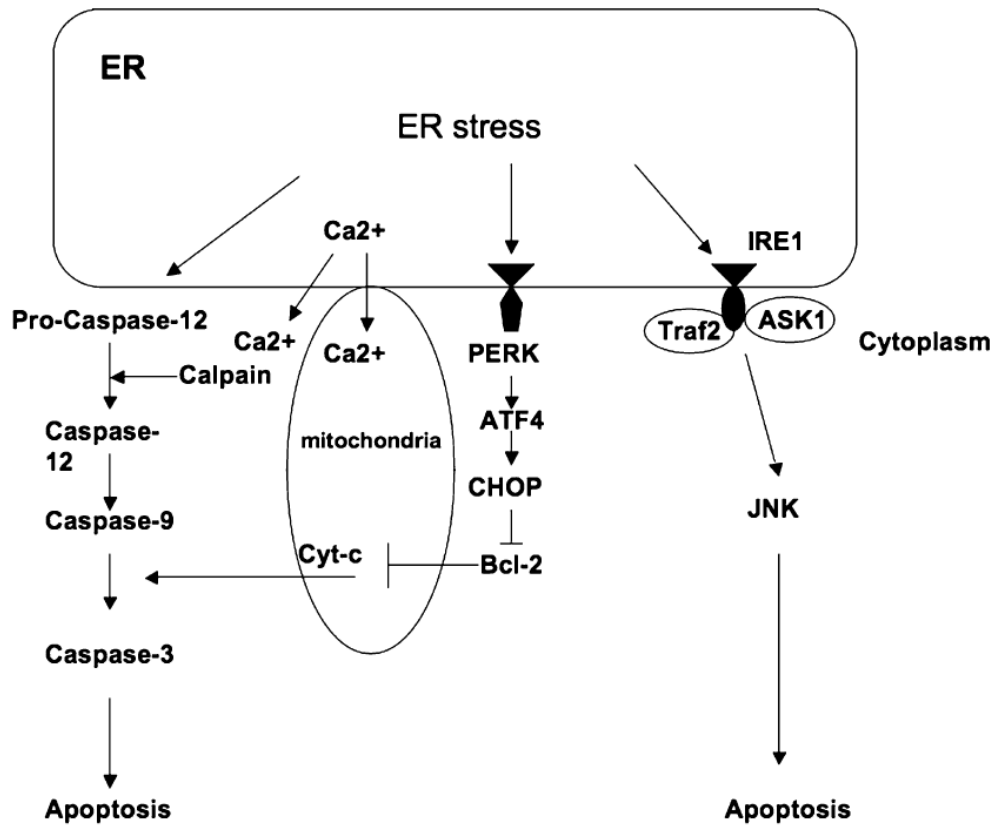
Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες κυστεΐνης που βρίσκονται στο κύτταρο με τη μορφή ανενεργών πρόδρομων μορίων ή ζυμογόνων και στη συνέχεια υφίστανται πρωτεόλυση ώστε να σχηματιστούν οι ενεργές μορφές των ενζύμων που επάγουν την απόπτωση. Στα ποντίκια η πρώτη κασπάση που χαρακτηρίστηκε ως σημαντική στο πλαίσιο της επαγόμενης μέσω του στρες του ΕΔ απόπτωσης, είναι η κασπάση-12. Συγκεκριμένα, κύτταρα από ποντίκια χωρίς κασπάση-12 είναι μερικώς ανθεκτικά στην απόπτωση μέσω του στρες του ΕΔ, αλλά υφίστανται κανονική απόπτωση με την επίδραση άλλων θανατηφόρων ερεθισμάτων (Nakagawa *et al.*, 2000). Μετά την ενεργοποίηση της κασπάσης-12 στο ΕΔ, η ίδια προκαλεί πρωτεολυτική ενεργοποίηση της κασπάσης-9 και αυτή με τη σειρά της, της κασπάσης-3 (Morishima, Nakanishi, Takenouchi, Shibata, & Yasuhiko, 2002), (**Σχήμα 7**). Η ενεργοποίηση της κασπάσης-9 μέσω του στρες του ΕΔ μπορεί να πραγματοποιηθεί απουσία της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, το οποίο στηρίζει την ύπαρξη ενός μονοπατιού απόπτωσης ανεξάρτητου από αυτό που εξαρτάται από το μιτοχόνδριο (Rao, Castro-Obregon *et al.*, 2002), (**Σχήμα 7**).

Επιπλέον, η ενεργοποίηση των κασπασών πραγματοποιείται επίσης μέσω των αισθητήρων της UPR και συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία κατέχει ο υποδοχέας PERK μέσω ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων ATF4 και CHOP (J. H. Lin, Li, Zhang, Ron, & Walter, 2009). Η απώλεια του γονιδίου *CHOP* σε κύτταρα ποντικών, οδηγεί σε μείωση της

απόπτωσης μέσω του στρες του ΕΔ (Zinszner *et al.*, 1998) ενώ η υπερέκφραση της πρωτεΐνης CHOP επάγει την απόπτωση στις κυτταρικές σειρές (McCullough, Martindale, Klotz, Aw, & Holbrook, 2001). Το CHOP μπορεί να ευαισθητοποιήσει τα κύτταρα στην απόπτωση μέσω καταστολής του αντι-αποπτωτικού παράγοντα Bcl-2 και επαγωγής του Bim, το οποίο είναι ένα προαποπτωτικό μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 (McCullough *et al.*, 2001; Puthalakath *et al.*, 2007), (Σχήμα 7). Ο υποδοχέας PERK επιπλέον συμμετέχει σε μια αντι-αποπτωτική απόκριση μέσω φωσφορυλίωσης του Nrf2, ενός μεταγραφικού παράγοντα που επάγει την επιβίωση του κυττάρου κατά το στρες του ΕΔ (Cullinan *et al.*, 2003).

Ο υποδοχέας IRE1 εμπλέκεται επίσης στην απόπτωση μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού των κινασών JNK (c-Jun N-terminal Kinase) με μηχανισμό ανεξάρτητο από αυτό της ενεργοποίησης του XBP1. Ο IRE1 σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τα Traf2 και ASK1 (apoptosis signal regulating kinase-1), το οποίο φωσφορυλιώνει τη JNK και ενεργοποιεί το αποπτωτικό μονοπάτι σε νευρώνες που εκτέθηκαν σε στρες του ΕΔ λόγω παρουσίας υψηλών επιπέδων πολυγλουταμινικών πρωτεϊνών (Nishitoh *et al.*, 2002), (Σχήμα 7). Συνεπώς, ο IRE1 εμπλέκεται σε δύο αποκρίσεις, ενεργοποίηση των JNK και μάτισμα του XBP1, οι οποίες ανεξάρτητα μπορούν να έχουν αντίθετη συμβολή στη ρύθμιση της απόπτωσης μέσω του στρες του ΕΔ. Σειρά πειραμάτων τα οποία έχουν διεξαχθεί σε ανθρώπινα κύτταρα έδειξε ότι το μάτισμα του XBP1 εξασθενεί σε προχωρημένα στάδια του στρες του ΕΔ, όταν επάγεται η απόπτωση και ότι η υπερέκφραση του ενεργοποιημένου XBP1 προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση (J. H. Lin *et al.*, 2007).

Σε πολλές μορφές απόπτωσης παρατηρείται απελευθέρωση ασβεστίου από το ΕΔ. Οι τοπικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ΕΔ και μιτοχονδρίων μπορούν να διευκολύνουν τη μεταφορά ασβεστίου στα μιτοχόνδρια, το οποίο αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό ρύθμισης της απόπτωσης (Σχήμα 7). Για την επαγωγή της απόπτωσης απαιτούνται οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, Bak και Bax οι οποίες ενεργοποιούνται από ποικίλα ερεθίσματα συμπεριλαμβανομένου, το στρες του ΕΔ και παράλληλα ρυθμίζουν τόσο την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων από τα μιτοχόνδρια όσο και την απελευθέρωση ασβεστίου από το ΕΔ (Scorrano *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2001). Επιπλέον, παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι Bax και Bak δεσμεύονται στον IRE1 και είναι απαραίτητες για το αποτελεσματικό μάτισμα του mRNA του XBP1 κατά τη διάρκεια του στρες του ΕΔ, ανεξάρτητα από την προ-αποπτωτική τους δράση στα μιτοχόνδρια (Hetz *et al.*, 2006).



Σχήμα 7. Μηχανισμοί επαγωγής απόπτωσης από το στρες του ΕΔ (Rasheva & Domingos, 2009)

1.3.2 Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου και Διαβήτης

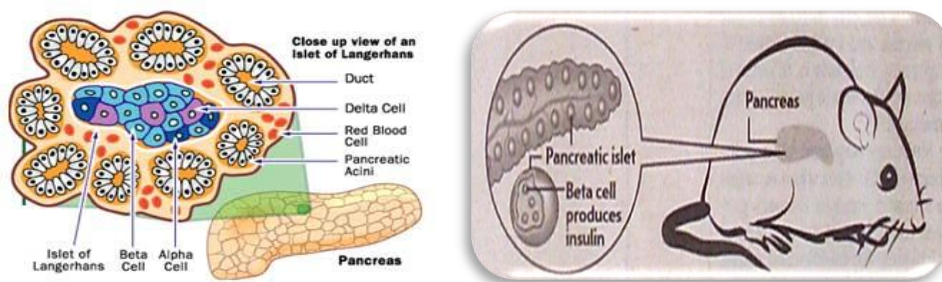
Η απόπτωση που επάγεται από το χρόνια στρες του ΕΔ σχετίζεται με πολλές παθολογικές ασθένειες, φαινομενικά άσχετες μεταξύ τους, όπως ο διαβήτης, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, η αθηροσκλήρωση, το πολλαπλό μυέλωμα και διάφορα είδη καρκίνου (Anelli *et al.*, 2008; Marciniak *et al.*, 2006; Malhotra & Kaufman., 2007; Tsai *et al.*, 2010). Έχει παρατηρηθεί μάλιστα ότι η παρεμπόδιση της απόπτωσης οδηγεί σε καθυστέρηση στην πρόοδο των ασθενειών αυτών (Anelli *et al.*, 2008). Οι ασθένειες που σχετίζονται με το στρες του ΕΔ και την UPR αφορούν κυρίως ιστούς με έντονη σύνθεση εξωκυττάρων πρωτεϊνών. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (T2D) είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα. Θα πρέπει να τονιστεί, ωστόσο, ότι το βασικό αιτιολογικό χαρακτηριστικό του T2D είναι η μειωμένη ικανότητα απόκρισης των περιφερικών ιστών στην ινσουλίνη όσον αφορά στην απορρόφηση και το μεταβολισμό της γλυκόζης (ινσουλινοαντοχή) (Σχήμα 8). Οι συνεχώς μεταβαλλόμενες απαιτήσεις για την σύνθεση ινσουλίνης ανάλογα με τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα καθιστούν τα β - κύτταρα του παγκρέατος εξαρτώμενα από την

σηματοδότηση της UPR και επομένως εξαιρετικά ευαίσθητα σε μεταβολές της ομοιόστασης του ΕΔ και της οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Απουσία ή ανεπάρκεια των «αισθητήρων» του στρες του ΕΔ και ειδικά του PERK και των πρωτεϊνών που επάγονται από αυτόν τον μοριακό συνοδό, έχει βρεθεί ότι είναι υπεύθυνος για πολλούς τύπους διαβήτη (Anelli *et al.*, 2008). Το UPR φαίνεται επίσης ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα και στην περιφερική αντίσταση στην ινσουλίνη (Marciniak *et al.*, 2006).



Σχήμα 8. Προτεινόμενο μοντέλο παθογένειας του διαβήτη τύπου 2. (Προσαρμογή από Joslin *et al.*, 2005)

Διερευνώντας το διαβήτη, θα ήταν παράλειψη να μην γίνει αναφορά στα νησίδια του Langerhans που αποτελούν περίπου το 2% του βάρους του ενήλικου ανθρώπινου παγκρέατος. Πρόκειται για πολυκυτταρικά συσσωματώματα στα οποία διακρίνονται διάφοροι τύποι κυττάρων, που ταξινομούνται παρακάτω με βάση τη φθίνουσα κατά τον πληθυσμό τους σειρά: τα *κύτταρα β* (που εκκρίνουν ινσουλίνη, και αποτελούν το 70-80% των κυττάρων) (Σχήμα 9), τα *κύτταρα α* (που εκκρίνουν γλυκαγόνη και αποτελούν το 15-20% των κυττάρων), τα *κύτταρα PP* (που εκκρίνουν το παγκρεατικό πολυπεπίδιο και αποτελούν το 15-20% των κυττάρων) και τα *κύτταρα δ* (που εκκρίνουν σωματοστατίνη η οποία ασκεί ανασταλτικό έλεγχο στην έκκριση τόσο της γλυκαγόνης, όσο και της ινσουλίνης και αποτελούν το 5-10% των κυττάρων). Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν τα *κύτταρα ghrelin* (που εκκρίνουν ghrelin και αποτελούν το 1% των κυττάρων) (Wierup *et al.*, 2002). Η αρχιτεκτονική των νησιδίων διαφέρει μεταξύ των ειδών και μεταξύ των περιοχών του παγκρέατος (Nugent *et al.*, 2008).



Σχήμα 9 . Νησίδια του Langerhans (αριστερό πάνελ), β κύτταρα του παγκρέατος τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ινσουλίνης (δεξιό πάνελ).

1.3.3 Το ‘stress’ του ενδοπλασματικού δικτύου εμπλέκεται στην απόπτωση των β κυττάρων

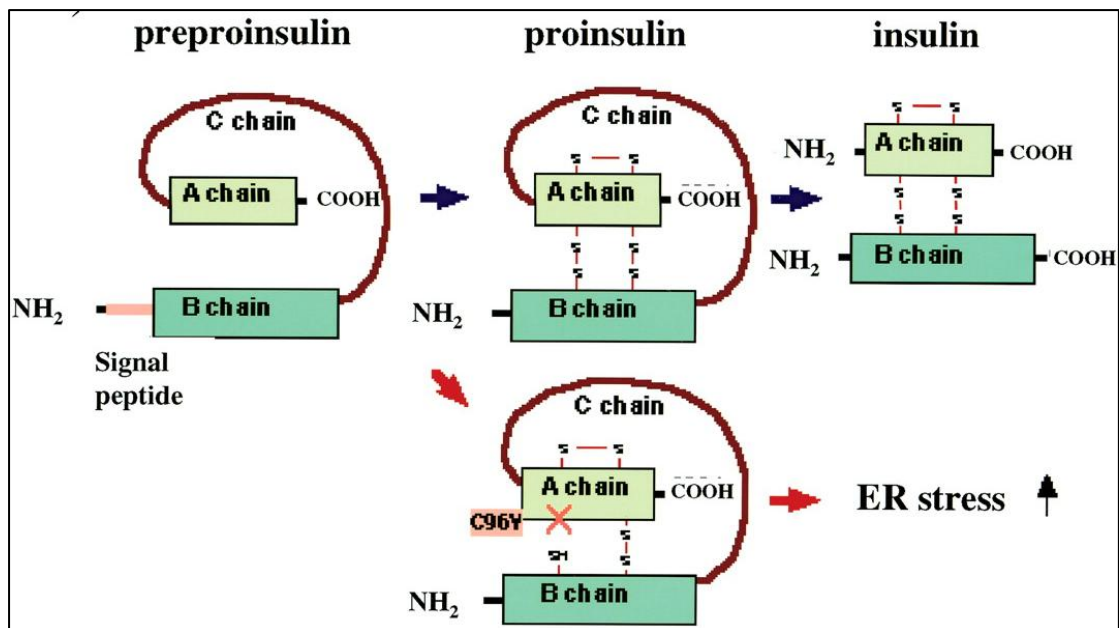
Ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των β κυττάρων είναι η υψηλή ανάπτυξη του ενδοπλασματικού τους δικτύου, που ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την έκκριση ινσουλίνης. Οι πρωτεΐνες του ‘stress’ του ενδοπλασματικού δικτύου, συμπεριλαμβανομένης της Ire1 (Inositol Requiring 1), PERK και BiP εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα β κύτταρα του παγκρέατος και αυτή η κατάσταση πιθανόν να απεικονίζει το γεγονός ότι τα β κύτταρα συμμετέχουν ιδιαίτερα στην πρωτεϊνική έκκριση. Το γεγονός αυτό ενισχύει την πεποίθηση ότι η υψηλή έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών θα μπορούσε να είναι απαραίτητη για τον αυστηρό ποιοτικό έλεγχο των εκκρινόμενων πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της ινσουλίνης στα β κύτταρα. Η υψηλού βαθμού διαταραχή στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο, ωστόσο η ευαισθησία του ενδοπλασματικού δικτύου προς το ‘stress’ διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο. Επιπλέον, πρόσφατα αποτελέσματα μελετών έχουν αποκαλύψει ότι τα β κύτταρα του παγκρέατος αντιπροσωπεύουν έναν από τους πιο ευαίσθητους ιστούς έναντι στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, με την απόπτωση των β κυττάρων να αποτελεί πιθανή αιτία του διαβήτη (Araki *et al.*, 2003).

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρικές σειρές αλλά και σε μοντέλα ζώων, έχουν δείξει ότι το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου καταστέλλει την ινσουλινοεξαρτώμενη μεταγωγή σημάτων γεγονός που αποτελεί ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της αντίστασης της ινσουλίνης σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο (Ozcan *et al.*, 2004). Πιο συγκεκριμένα, πειραματικές διεργασίες σε κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου επάγει την πρόωρη αποδόμηση των μορίων mRNA της ινσουλίνης (Pirot *et al.*, 2007). Παράλληλα με αυτό επισημαίνεται ότι, σε τομές παγκρέατος από ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, η

έκφραση των πρωτεϊνών που χαρακτηρίζουν το 'stress' του ενδοπλασματικού δικτύου είναι ιδιαίτερα αυξημένη, ενισχύοντας έτσι την πεποίθηση ότι το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου συμβαίνει σε διαβητικές καταστάσεις και ενοχοποιείται για την απόπτωση των β κυττάρων (Laybutt *et al.*, 2007).

Η μεγαλύτερη απόδειξη συσχέτισης του διαβήτη με το 'stress' του ενδοπλασματικού δικτύου είναι το διαβητικό πρότυπο μοντέλο μύος, Akita mouse, που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία με μειωμένη μάζα β κυττάρων και παχυσαρκία. Η γενετική ανάλυση αποκάλυψε ότι μια μετάλλαξη στο γονίδιο της ινσουλίνης 2 (Ins2) (Cys96Tyr) είναι υπεύθυνη για το διαβητικό φαινότυπο σε αυτό το μυ. Πρόκειται για μετάλλαξη που αλλάζει την κυστεΐνη σε τυροσίνη στο μόριο της προ-ινσουλίνης με αποτέλεσμα να διασπά τον σχηματισμό ενός δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ των αλυσίδων A και B, αλλάζοντας έτσι τη διαμόρφωση του μορίου. Στο **Σχήμα 6** φαίνεται το μόριο της προ-ινσουλίνης σε φυσιολογικές καταστάσεις και το μόριο της προ-ινσουλίνης στο μοντέλο μύος Akita mouse.

Αναλυτικότερα, ο μύς έχει δύο γονίδια ινσουλίνης (Ins1 και Ins2) με τα αλληλόμορφα της Ins2 να αντιπροσωπεύσουν την πλειοψηφία της συνολικής ινσουλίνης στους μύες. Αν και οι ετερόγυζοι μύες Akita αναπτύσσουν βαριάς μορφής διαβήτη, οι μεταλλαγμένοι μύες που στερούνται είτε το γονίδιο της Ins1 είτε της Ins2, δεν αναπτύσσουν διαβήτη. Επομένως, ο φαινότυπος των μυών Akita όχι μόνο απεικονίζει την παραγωγή της μη λειτουργικής ινσουλίνης αλλά μάλλον δείχνει ότι η μετάλλαξη της ινσουλίνης των μυών Akita ασκεί δραματική σημαντική ρόλο στη δυσλειτουργία των β κυττάρων. Στα πειραματόζωα αυτά, όταν έγινε καταστολή του γονιδίου Chop βρέθηκε ότι μειώθηκε η ευαισθησία τους σε διαβήτη λόγω μειωμένης απόπτωσης στα β κύτταρα του παγκρέατος. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι το 'stress' του ενδοπλασματικού δικτύου μπορεί να προκαλέσει απόπτωση και να οδηγήσει στην ανάπτυξη διαβήτη σε ζώα οργανισμό, χρησιμοποιώντας τον μυ Akita ως ένα καλό πρότυπο ανάπτυξης διαβήτη μέσω του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (Yoshioka *et al.*, 1997), (**Σχήμα10**).



Σχήμα 10 Μετάλλαξη της ινσουλίνης στο ποντίκι *Akita*.

Στο ΕΔ, η προ-προ-ινσουλίνη ωριμάζει σε προ-ινσουλίνη από την απομάκρυνση της αλληλοχίας σηματοδότη και διαμορφώνονται οι δεσμοί δισουλφιδίου μεταξύ των αλυσίδων Α και Β. Στο μν *Akita*, η μετάλλαξη στο γονίδιο της ινσουλίνη 2, αντικατέστησε την κυστεΐνη σε τυροσίνη στη θέση 96, αποκλείοντας τον σχηματισμό ενός δισουλφιδικού δεσμού αλλάζοντας τη διαμόρφωση του μορίου. Αυτή η μεταλλαγμένη ινσουλίνη προκαλεί το 'stress' του ενδοπλασματικού δικτύου που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο.

(Araki *et al.*, 2003)

1.4 Εμπλοκή του στρες του ΕΔ στην ινσουλινοαντίσταση (IR)

1.4.1 Εμπλοκή του στρες του ΕΔ στην μη φυσιολογική σηματοδότηση της ινσουλίνης στον διαβήτη τύπου 2

Η ινσουλινοαντίσταση (IR) είναι μια παθολογική κατάσταση η οποία προκύπτει όταν η μεταγωγή σήματος που επάγεται από την ινσουλίνη διαταράσσεται, αναγκάζοντας τα β -κύτταρα του παγκρέατος να παράγουν περισσότερη ινσουλίνη, με σκοπό να ανταποκριθούν στις ανάγκες του σώματος και να διατηρήσουν την ομοιόσταση της γλυκόζης. Η ινσουλίνη ρυθμίζει την πρόσληψη γλυκόζης από τους ιστούς και τις συγκεντρώσεις των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Η IR εμφανίζεται στους κύριους ιστούς-στόχους της ινσουλίνης, οι οποίοι είναι ο λιπώδης ιστός, το ήπαρ και οι μύες. Στον λιπώδη ιστό, η ινσουλίνη μειώνει τη λιπόλυση, μειώνοντας την έξοδο ελεύθερων λιπαρών οξέων από αυτόν. Στο ήπαρ, η ινσουλίνη μειώνει τη γλυκονεογένεση και τη γλυκογονόλυση και άρα τη παραγωγή γλυκόζης από αυτό,

ενώ στους μύες αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης επάγοντας τη μετάθεση των GLUT-4 υποδοχέων στην πλασματική μεμβράνη. Όταν το πάγκρεας αδυνατεί να ανταποκριθεί στις αυξημένες απαιτήσεις για έκκριση ινσουλίνης η υπεργλυκαιμία κάνει πλέον την εμφάνισή της, συνοδευόμενη από διαταραχή και αύξηση των επιπέδων των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Zeyda M *et al.* 2009). Η απόκριση στρες του ΕΔ έχει ενοχοποιηθεί έντονα στην παθογένεση του διαβήτη (Flamment *et al.*, 2012). Το στρες του ΕΔ επηρεάζει τη δράση της ινσουλίνης στο ήπαρ, τους σκελετικούς μύες και στο λιπώδη ιστό, καθώς και τη λειτουργία και τη μάζα των παγκρεατικών βήτα κυττάρων (Hotamisligil *et al.*, 2012).

1.4.2 Ρόλος του στρες του ΕΔ στον λιπώδη ιστό κατά την ινσουλινοαντίσταση

Η ινσουλίνη είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της βιολογίας του λιπώδους ιστού και τα λιποκύτταρα είναι από τους πιο υψηλά ανταποκρινόμενους στην ινσουλίνη κυτταρικούς τύπους. Η κύρια λειτουργία του λευκού λιπώδους ιστού είναι η αποθήκευση τριγλυκεριδίων σε περιόδους θετικού ισοζυγίου ενέργειας, καθώς και η διάσπαση αυτών όταν απαιτείται παροχή ενέργειας στον οργανισμό. Αν και παλαιότερα επικρατούσε η άποψη ότι ο λιπώδης ιστός είναι ένας παθητικός αποθηκευτικός ιστός, σήμερα γνωρίζουμε ότι επιτελεί και σημαντική ενδοκρινολογική δράση. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο λιπώδης ιστός παράγει ποικίλες πρωτεΐνες, τις λεγόμενες λιποκίνες, που έχουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων (Gregor MF *et al.* 2007). Στα βιολογικά αυτά μόρια περιλαμβάνονται η λεπτίνη, η αδιπονεκτίνη, η ρεζιστίνη, ο αναστολέας ενεργοποίησης πλασμισμινογόνου (PAI-I), ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α), and CC-chemokine ligand 2 (CCL2) και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) (Arslan N *et al.* 2010). Κάποιες από αυτές τις λιποκίνες έχουν αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες όπως η αδιπονεκτίνη, ενώ άλλες έχουν προ-φλεγμονώδεις ιδιότητες όπως η λεπτίνη, ο TNF-α και η IL-6 (Tilg H *et al.* 2006). Αυτές οι προ-φλεγμονώδεις λιποκίνες προκαλούν οξείδωση και στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο μπορεί επίσης να προκαλέσει αντίσταση στην ινσουλίνη και στους περιφερικούς ιστούς. Αποτελεί σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον, η μελέτη μιας άμεσης σύνδεσης μεταξύ στρες του ΕΔ και της σηματοδότησης της ινσουλίνης στα λιπώδη κύτταρα (Xu *et al.*, 2010).

Το στρες του ΕΔ μειώνει την έκκριση των λιποκινών και κατά συνέπεια μειώνει την σηματοδότηση και την λειτουργικότητα ινσουλίνης στα 3T3-L1 (πρωτογενή λιποκύτταρα μυός) χωρίς όμως να αναστέλλει τη μεταφορά της γλυκόζης

(Pfaffenbach *et al.*, 2010). Σε πειραματικά μοντέλα μυών μετά από έκθεση σε δίαιτα πλούσια σε λιπαρά επάγονται φλεγμονώδη μονοπάτια, συμβάλλοντας στη χρόνια φλεγμονή και δυσλειτουργία του ΕΔ. Συμπερασματικά από μεταβολική άποψη το ΕΔ αντιλαμβάνεται τις αλλαγές στη ροή μεταβολιτών εσωτερικά του κυττάρου και αντιδρά ανάλογα. Συγκεκριμένα, στα λιποκύτταρα η αύξηση των λιποκινών και των ελεύθερων λιπαρών οξέων λειτουργούν ως σήμα για το στρες του ΕΔ επάγοντας φλεγμονώδεις διαδικασίες στα 3T3-L1 λιποκύτταρα.

Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι κατά το στρες του ΕΔ στον λιπώδη ιστό, μειώνεται η έκφραση του λιπιδίου perilipin A με αποτέλεσμα να αυξάνεται η λιπόλυση, στα λιπώδη κύτταρα. Οι συνέπειες του στρες του ΕΔ κατά την λιπόλυση στα λιπώδη κύτταρα δεν μπορεί να αναστραφεί από τις ακόλουθες κινάσες, JNK: Jun N-terminal Κινάση, ERK, P38MAPK: Mitogen- activated πρωτεϊνική κινάση P38, και PKC (πρωτεϊνική κινάση C) καθώς συνήθως εμπλέκονται στην αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης της ινσουλίνης (Deng *et al.*, 2012). Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν έναν κρίσιμο ρόλο του στρες του ΕΔ στη διαμόρφωση των φλεγμονωδών αποκρίσεων στα λιποκύτταρα.

Επαγωγείς του στρες του ΕΔ ενισχύουν την μείωση των επιπέδων έκκρισης τόσο της λεπτίνης όσο και της αδιπονεκτίνης καθώς ενισχύουν την έκκριση της IL-6 (Xu *et al.*, 2010). Η μείωση της έκφρασης του disulfide-bond A oxidoreductase-like protein (DsbA-L) αποδυναμώνει την αναδίπλωση και τον πολυμερισμό της αδιπονεκτίνης, που οδηγεί σε στρες του ΕΔ (Liu *et al.*, 2008, Zhou *et al.*, 2010). Επιπρόσθετα το στρες του ΕΔ μέσω της επαγωγής του CHOP, μειώνει την ρεζιστίνη (ορμόνη του λιπώδους ιστού) η οποία παρουσιάζει αυξημένη συγκέντρωση στα παχύσαρκα ποντίκια, η οποία διαταράσσει τον μεταβολισμό της γλυκόζης, προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη και αναστολή της λιπογένεσης (Lefterova *et al.*, 2009).

Πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι η hyperhomocysteine (HHcy) προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη στο λιπώδη ιστό που με τη σειρά της προάγει την αντίσταση στην ινσουλίνη. Η ομοκυστεΐνη (Hcy), είναι ένα θειούχο αμινοξύ, το οποίο σχηματίζεται από τη μετατροπή της μεθειονίνης σε κυστεΐνη. Συνήθως μεταβολίζεται ταχέως μέσω 1 ή 2 οδών: 1. βιταμίνη B12 η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγέννηση της μεθειονίνης, ή 2. βιταμίνη B6 η οποία μετατρέπει την Hcy σε κυστεΐνη. Έτσι, τα χαμηλά επίπεδα αυτών των βιταμινών συνδέονται με υπερ- ομοκυστεϊναιμία (Hhcy). Αύξηση της συγκέντρωσης της Hcy στο πλάσμα μπορεί να προκύψει από διάφορες αιτίες: (i) γενετικά ελαττώματα στα ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της

Hcy (ii) διατροφικές ελλείψεις σε βιταμίνες, και (iii) χρόνιες παθήσεις/ασθένειες (π.χ. η παχυσαρκία, σακχαρώδης διαβήτης και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια) και από φάρμακα. Ποικίλοι επαγωγείς του στρες του ΕΔ αυξήθηκαν στο λιπώδη ιστό καθώς και στα ποντίκια που εκφράζουν την HHcy. Η HHcy ενεργοποιεί την JNK (Jun N-terminal Κινάση) και συμβάλλει στην αντίσταση της ινσουλίνης με την αναστολή της ενεργότητας της πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB). Επιπλέον, η JNK ενεργοποιεί την c-Jun και το p65, η οποία ενυψύουν την μεταγραφή των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (Li *et al.*, 2013). Συλλογικά αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το στρες του ΕΔ εμπλέκεται στη δυσλειτουργία του λιπώδους ιστού προωθώντας την ινσουλινοαντίσταση (IR).

1.4.3 Ρόλος του στρες του ΕΔ στο ήπαρ κατά την ινσουλινοαντίσταση

Το ήπαρ είναι η κύρια περιοχή της *de Novo* λιπογένεσης, η οποία επιτρέπει τη σύνθεση λιπαρών οξέων από περίσσεια υδατανθράκων. Τα ηπατικά κύτταρα είναι οι κύριοι βασικοί παράγοντες της λιπογένεσης και του μεταβολισμού της γλυκόζης. Διάφορα στοιχεία έχουν δείξει ότι το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου εμπλέκεται στη σύνθεση λιπαρών οξέων και στον μεταβολισμό της χοληστερόλης (Hotamisligil *et al.*, 2010). Η SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein 1) ρυθμίζει γονίδια για την προώθηση της σύνθεσης των λιπαρών οξέων και της λιπογένεσης και ενεργοποιείται από το στρες του ΕΔ. Κάτω από συνθήκες που επάγουν το στρες του ΕΔ, η SREBP-1c αποδεσμεύεται από το BiP και έπειτα μεταφέρεται από το ΕΔ στη συσκευή Golgi. Εκεί υφίσταται πρωτεόλυση από δύο πρωτεάσες του Golgi, αρχικά από την S1P (Site 1 Protease) και στη συνέχεια από την S2P (Site 2 Protease) σε μια ενδομεμβρανική περιοχή, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση στο κυτοσόλιο τμήματος της SREBP-1c. Στη συνέχεια, το κομμάτι SREBP-1c μεταφέρεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή των γονιδίων σύνθεσης λιπαρών οξέων. Έκκριση μειωμένης VLDL (πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης) και αυξημένη ενεργοποίηση SREBP-1c σε συνδυασμό με μειωμένη οξείδωση των λιπιδίων προκαλεί επιδείνωση της λιπογένεσης και έτσι, αρχίζει ένας φαύλος κύκλος που οδηγεί σε στεάτωση (Basseri *et al.*, 2012).

Το μονοπάτι σηματοδότησης του IRE1 δε περιλαμβάνει το συνηθισμένο καταρράκτη φωσφορυλιώσεων και ενεργοποίησης κινασών καθώς το μοναδικό γνωστό υπόστρωμα του IRE1 είναι η ίδια η πρωτεΐνη IRE1. Ο IRE1 κόβει το πρόδρομο μόριο mRNA του XBP1 δύο φορές, με αποτέλεσμα να απομακρύνεται ένα παρεμβαλλόμενο κομμάτι ή ιντρόνιο. Το 5' και 3' άκρο του mRNA στη συνέχεια

ενώνονται, δημιουργώντας ένα ματισμένο (spliced) mRNA το οποίο με τη σειρά του κωδικοποιεί γονίδια τα οποία εμπλέκονται στη σύνθεση των λιπαρών οξέων στα ηπατοκύτταρα. Μάλιστα, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα ποντίκια XBP1 knockout ανέπτυξαν στεάτωση όταν τους χορηγήθηκε τροφή πλούσια σε λιπαρά (Lee *et al.*, 2007). Επιπλέον, η επαγωγή του στρες του ΕΔ μέσω του νουκλεοσπαστικού έδειξε μια αξιοσημείωτη απορύθμιση των βασικών μεταβολικών ενζύμων λιπιδίων συμπεριλαμβανομένου του C/EBPα. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι, η χορήγηση του νουκλεοσπαστικού σε ποντίκια ελλειματικά για το ATF6, IRE1, p58IK αντίστοιχα έδειξε έλλειψη της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του μεταβολισμού σε σύγκριση με ποντίκια αγρίου τύπου. Ωστόσο υπερέκφραση του CHOP μετά από χορήγηση του νουκλεοσπαστικού διατηρεί την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό και παρουσιάζουν μειωμένη ηπατική στεάτωση σε σύγκριση με τους αγρίου τύπου μύες που εκτίθενται σε δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Έτσι το CHOP διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της έκφρασης γονιδίων του μεταβολισμού μετά από παρατεταμένο στρες του ΕΔ και λειτουργεί ως ένα πιθανός μεσολαβητής των προαποπτωτικών και προ-φλεγμονωδών μονοπατιών σηματοδότησης (Oyadomari *et al.*, 2008).

1.4.4 Ρόλος του στρες του ΕΔ στους σκελετικούς μύες κατά την ινσουλινοαντίσταση

Συνέπεια των υψηλών επιπέδων των λιπαρών οξέων (fatty acids) που κυκλοφορούν στους μύες προκαλούν αντίσταση στην ινσουλίνη όπου σταδιακά οδηγεί στον διαβήτη τύπου 2. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (free fatty acids, FFAs) διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο καθώς επάγουν διπλά αρνητική ανάδραση στην έκκριση και τη δράση της ινσουλίνης και αυξάνουν την παραγωγή της ηπατικής γλυκόζης σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Παραγωγή λιπιδίων όπως η διακυλογλυκερόλη (DAG), ακυλίωση λιπαρών οξέων (fatty acyl-CoA) και τα ceramides τροποποιούν την απόκριση στην ινσουλίνη και κατά συνέπεια οδηγούν σε ελαττωματικό μεταβολισμό της γλυκόζης και σε αντίσταση στην ινσουλίνη (Kraegen *et al.*, 2008). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου φαίνεται να είναι ένας από τους κύριους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη δράση των ελεύθερων λιπαρών οξέων και προκαλείται από την αντίσταση στην ινσουλίνη (Ozcan *et al.*, 2004). Αυξημένη συσσώρευση ceramides αναφέρθηκε για την αντίσταση ινσουλίνης στον σκελετικούς μύες των τρωκτικών (Turinsky *et al.*,

1991; Kim *et al.*, 2001) και στους μύες των παχύσαρκων ασθενών οι οποίοι παρουσιάζουν ινσουλινοαντίσταση (Adams *et al.*, 2004). Φαίνονται να είναι οι πιο ισχυροί αναστολείς της σηματοδότησης της ινσουλίνης στα μυϊκά κύτταρα (Gault *et al.*, 2010). Κορεσμένα λιπαρά οξέα όπως είναι το παλμιτικό οξύ στα μυϊκά κύτταρα επάγει την βιοσύνθεση κεραμιδίων στον ενδοπλασματικό δίκτυο (Rieusset *et al.*, 2012). Αυξημένα επίπεδα των κεραμιδίων αναστέλλουν το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης μέσω της απενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB) διαμεσολαβούμενο από μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και την protein phosphatase 2A (PP2A) (Turban *et al.*, 2011). Μελέτες έχουν αναφέρει ότι το στρες του ΕΔ διαμεσολαβεί στην επαγωγή ινσουλινοαντίστασης μέσω του παλμιτικού στους μύες. Αυτό έχει αποδειχθεί από την έκθεση των human primary myotubes, myotubes (C2C12) (Rieusset *et al.*, 2012) ή L6 myotubes (Kamagate *et al.*, 2010) σε παλμιτικό το οποίο ήταν ικανό να διεγείρει στρες του ΕΔ. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν *in vivo* από αρουραίους που τρέφονται με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (HFD) (Rieusset *et al.*, 2012). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η ινσουλινοαντίσταση στους μύες μπορεί να συνδέεται άρρηκτα με την ενεργοποίηση του στρες του ΕΔ.

1.5 Πιθανός μηχανισμός μετάπτωσης των κυττάρων από την προ-επιβιωτική στην προ-αποπτωτική απόκριση του ενδογενούς αντισταθμιστικού μηχανισμού (UPR)

Είναι πλέον αναμφισβήτητο ότι, η απόπτωση των κυττάρων επάγεται κάτω από ισχυρό στρες του ΕΔ. Αντίθετα, τα κύτταρα που εκτίθενται σε ήπιο στρες μπορούν να προσαρμοστούν και να επιβιώσουν κάτω από αυτές τις συνθήκες, ακόμα και για μεγάλες περιόδους (Rutkowski *et al.*, 2006). Σε συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων, η απόφαση μεταξύ θανάτου και προσαρμογής στο στρες του ΕΔ εξαρτάται περισσότερο από την ένταση της ενεργοποίησης των αισθητήρων του UPR παρά από τα ειδικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται (Rutkowski *et al.*, 2006). Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη διατριβή έδειξαν ότι η πρωτεΐνη p21, που είναι και ο κύριος ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου, παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάπτωση του κυττάρου από την προ-επιβιωτική στην προ-αποπτωτική φάση. Συγκεκριμένα, αύξηση των επιπέδων της p21 προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου και αναστολή της απόπτωσης με σκοπό τη διευκόλυνση του προ-επιβιωτικού

ρόλου του UPR στα αρχικά στάδια στρες του ΕΔ. Αντίθετα, καταστολή της p21 εξαρτώμενη από το μεταγραφικό παράγοντα CHOP φαίνεται ότι είναι απαραίτητη προϋπόθεση προκειμένου να γίνει επαγωγή της απόπτωσης σε συνθήκες έντονου στρες (Mihailidou, Papavassiliou, & Kiaris, 2010).

1.6 Κυτταρικός κύκλος, κυκλίνες, κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες και οι αναστολείς τους

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από μια άριστα ενορχηστρωμένη ακολουθία γεγονότων που οδηγεί στον πολλαπλασιασμό, στην κυτταρική γήρανση ή στην απόπτωση. Τα κύτταρα καθώς διέρχονται μέσα από τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, αναπτύσσονται μέσω των αλληλεπιδράσεων διαφόρων κυκλινών και των αντίστοιχων εξαρτώμενων κινασών. Το όνομα κυκλίνη προέρχεται από το γεγονός ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες αρχικά ταυτοποιήθηκαν ως μόρια που συσσωρεύονται και αποικοδομούνται σε διακριτά χρονικά σημεία (κυκλικά) του κυτταρικού κύκλου σε εμβρυικά κύτταρα αυγών θαλάσσιας ανεμώνης (Evans T. *et al.* 1983).

Σήμερα υπάρχουν αρκετές αναγνωρισμένες τάξεις ή τύποι κυκλινών οι οποίες ενεργοποιούνται σε διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου. Οι κυκλίνες D και E συνδέονται με την μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (Slingerland J. *et al.* 2000; Sherr CJ. *et al.* 1994).

Η ταυτοποίηση των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών CDKs (Cyclin Dependent Kinases) επιτεύχθηκε με τη μελέτη αντίστοιχων μεταλλαγών που επηρεάζουν τους ρυθμούς αύξησης των ζυμομυκήτων (Nurse P. *et al.* 1980; Nurse P. *et al.* 1975). Η ταξινόμησή τους στην κατηγορία των κινασών βασίστηκε στην παρατήρηση της αύξησης της ποσότητας των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών μετά από ένεση CDKs σε ωοκύτταρα διαφόρων οργανισμών (Doree M. *et al.*, 1983; Maller J. *et al.*, 1977) Η CDK1 ήταν η πρώτη κυκλινοεξαρτώμενη κινάση που βρέθηκε να επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο ελέγχοντας τον ρυθμό εισόδου του κυττάρου στη φάση της μίτωσης (Nurse P. *et al.*, 1980; Gautier J. *et al.*, 1988). Παρόλο που τα επίπεδά της διατηρούνται σταθερά καθόλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, η CDK1 είναι καταλυτικά ενεργή μόνο κατά τη διάρκεια της μίτωσης πιθανόν λόγω μεταμεταφραστικής τροποποίησης (Sherr CJ. *et al.*, 1993). Αργότερα ανακαλύφθηκε η ανθρώπινη CDK1 και πιστοποιήθηκε η ρύθμιση της δράσης της με φωσφορυλίωση

καθώς και με την επίδραση αναστολέα κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (Alkarain A. *et al.*, 2004).

Ανάμεσα στις πιο σημαντικές κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες οι οποίες ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο είναι οι CDK4 και CDK6, που εμφανίζουν και δομικές ομοιότητες, καθώς και η CDK2. Με την επίδραση μιτογόνων σημάτων, κύτταρα σε ηρεμία εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο και αυξάνουν την σύνθεση αρχικά της κυκλίνης D και κατοπιν της κυκλίνης E κατά τη διάρκεια της φάσης G1 (Lew DJ *et al.*, 1991). Στη συνέχεια οι κυκλίνες D συνδέονται με τις κινάσες CDK4 και CDK6 (Meyerson M. *et al.*, 1994) και οι κυκλίνες E συνδέονται με την κινάση CDK2 (Dulic V. *et al.*, 1992; Koff A. *et al.*, 1992). Τα συμπλέγματα κυκλινών και κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών εισέρχονται στον πυρήνα όπου υφίστανται φωσφορυλίωση από μια άλλη κινάση την CDK-Activating Kinase (Sherr CJ *et al.*, 1999). Τα ενεργοποιημένα πλέον σύμπλοκα φωσφορυλιώνουν με τη σειρά τους διάφορες πρωτεΐνες-μέλη της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος όπως pRB, p107 και p130. Οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες του ρετινοβλαστώματος απενεργοποιούνται και δεν προσδένονται στους μεταγραφικούς παράγοντες E2F οι οποίοι είναι επομένως ελεύθεροι να επάγουν την έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζουν την είσοδο του κυττάρου στην S φάση (Malumbres M. *et al.*, 2001). Επιπρόσθετα, τα συμπλέγματα των κυκλινών-κινασών ελέγχουν τον διπλασιασμό των κεντροσωματίων (Fisk HA *et al.*, 2001; Okuda M. *et al.*, 2000) και την μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις ιστόνες (Ewen ME *et al.*, 2000), παρεμβαίνουν δηλαδή ρυθμιστικά σε δύο διαδικασίες κομβικής σημασίας για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

Οι αναστολείς των συμπλεγμάτων κυκλινών και κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών μπορούν να τροποποιήσουν τον κυτταρικό κύκλο περιορίζοντας ή καταστέλλοντας την καταλυτική ενεργότητα (φωσφορυλίωση) των συγκεκριμένων κινασών. Υπάρχουν δύο κατηγορίες αναστολέων:

- Η πρώτη κατηγορία που ονομάζεται πρωτεϊνική οικογένεια INK4 περιλαμβάνει τους αναστολείς p15INK4B (CDKN2B) (Hannon GJ *et al.* 1994), p16INK4A (CDKN2A) (Serrano M *et al.* 1993), p18INK4C (CDKN2C) (Guan KL *et al.* 1994) and p19INK4D (CDKN2D) (Hirai H *et al.* 1995). Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες προσδένονται ειδικά στις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες CDK4 και CDK6 με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η σύνδεσή τους με τις κυκλίνες D.

- Η δεύτερη κατηγορία που ονομάζεται πρωτεϊνική οικογένεια αναστολέων κινασών KIPs(kinase inhibitor proteins) περιλαμβάνει τους αναστολείς p21CIP1/WAF1 (CDKN1A) (Harper JW *et al.*, 1993; el-Deiry WS *et al.*, 1993), p27KIP1 (CDKN1B) (Toyoshima H *et al.* 1994) and p57KIP2 (CDKN1C) (Matsuoka S. *et al.*, 1995).

Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες αναστέλλουν τα συμπλέγματα των κυκλινών A, E αλλά και D (Sherr CJ *et al.*, 1999; Harper JW *et al.*,1993) με τις αντίστοιχες κινάσες.

Οι αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών διαδραματίζουν αποφασιστικό ρόλο ελέγχου στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Για παράδειγμα, αποτρέπουν την αντιγραφή και την μεταβίβαση κατεστραμμένου DNA στα θυγατρικά κύτταρα προωθώντας την επιδιόρθωσή του ή τον κυτταρικό θάνατο εάν αυτή δεν είναι δυνατή.

1.6.1 Ανακάλυψη της p21

Κατά την περίοδο 1992-1993 αρκετές ερευνητικές ομάδες ταυτοποίησαν την p21 χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές. Οι Xiong και η ομάδα τους, πρώτοι το 1992 σε μια προσπάθεια να εντοπίσουν ρυθμιστές των συμπλεγμάτων κυκλινών και κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, ανακάλυψαν μια πρωτεΐνη MB 21kDa άγνωστης λειτουργίας η οποία προσδένεται στις κυκλίνες D1 ή D3, στην κυκλινοεξαρτώμενη κινάση CDK2 και σε μια άλλη πρωτεΐνη το PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) με αποτέλεσμα να συγκροτείται ένα τετραμερές (Xiong Y *et al.*1992). Το επόμενο έτος η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η p21 είναι ένας καθολικός αναστολέας των συμπλόκων κυκλινών και κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (Xiong Y *et al.*1993).

Την ίδια χρονική περίοδο δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες δημοσίευσαν την κλωνοποίηση του γονιδίου p21. Οι el-Deiry και η ομάδα τους κλωνοποίησαν το αντίστοιχο γονίδιο, το χαρτογράφησαν στη θέση 6p21.2, έδειξαν ότι παρουσιάζει ογκοκατασταλτική δράση σε πειραματικά μοντέλα και αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο της πρωτεΐνης p53. Με βάση τα συγκεκριμένα ευρήματα το ονόμασαν p21WAF1 (Wild-type p53 Activated Fragment 1). Οι Harper και συν. χρησιμοποιώντας ένα διωβριδικό σύστημα ζυμομύκητα για να μελετήσουν τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τα συμπλέγματα της κινάσης CDK2, ανακάλυψαν ένα ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη p21 και το ονόμασαν CIP1

(CDK-Interacting Protein 1) (Harper JW *et al.* 1993). Κατά συνέπεια καθιερώθηκε η ονομασία p21WAF1 /CIP1.

1.6.2 Ρύθμιση των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών και του αναστολέα p21

Η υπερέκφραση της p21 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό σε κύτταρα θηλαστικών. Έχει βρεθεί ότι το πυρηνικό κλάσμα της πρωτεΐνης p21 ευθύνεται για την αναστολή της δραστηριότητας όλων των συμπλεγμάτων κυκλινών και κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (Zhou BP *et al.*, 2001) ενώ με πειράματα λειτουργικής χαρτογράφησης του αντίστοιχου γονιδίου έχει αποκαλυφθεί ότι μια N- τελική περιοχή της πρωτεΐνης, διαφορετική από τη θέση πρόσδεσης στο PCNA, ασκεί τον ανασχετικό-ρυθμιστικό αυτό ρόλο. (Goubin F *et al.*, 1995). Διάφορες ερευνητικές εργασίες καταδεικνύουν ότι υπάρχει ποικιλία υποστρωμάτων για την p21 ανάλογα με το σύστημα και το είδος των κυττάρων που μελετώνται. Για παράδειγμα αναστέλλεται η λειτουργικότητα, των συμπλόκων κυκλίνης A ή E με την CDK2 κινάση (Gu Y *et al.*, 1993), αλλά και των συμπλόκων κυκλίνης D1 ή D2 με την CDK4 κινάση (Harper JW *et al.*, 1993).

1.6.3 Σχέση μεταξύ του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21 και του διαβήτη τύπου 2

Η ικανότητα της p21 να ρυθμίζει τόσο τον κυτταρικό κύκλο όσο και την επαγωγή σημάτων έναντι του μηχανισμού απόπτωσης (Gartel *et al.*, 2002) σε συνδυασμό με τα στοιχεία που αποδεικνύουν τον ρόλο της p21 στη διατήρηση της λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων (Cheng *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2009) ώθησε αρκετούς ερευνητές να διερευνήσουν τη σύνδεση μεταξύ του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21 και του διαβήτη τύπου 2.

Η έναρξη του οξειδωτικού στρες κατά τη διάρκεια του διαβήτη βοήθησε στην αξιολόγηση του ρόλου της p21 και την σύνδεση του με την τοξικότητα της γλυκόζης. Η έννοια της τοξικότητας της γλυκόζης, η οποία αφορά στην χρόνια έκθεση σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης, αποτελεί την κύρια παθογόνο αιτία που οδηγεί το κύτταρο σε τοξικά φαινόμενα. Οι μηχανισμοί, μέσω των οποίων η χρόνια υπεργλυκαιμία βλάπτει τα κύτταρα, αποτελούν αντικείμενο κλινικής και εργαστηριακής έρευνας. Μελέτες που αφορούν την χρόνια υπεργλυκαιμία πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρικές σειρές, σε απομονωμένα νησίδια, καθώς και σε πειραματικά μοντέλα ζώων.

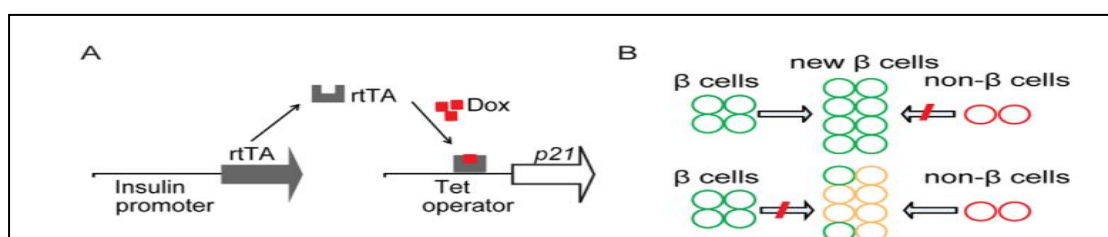
Αναλυτικότερα επισημαίνεται ότι, τα απομονωμένα νησίδια από παγκρεατικά β κύτταρα αρουραίου υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με H_2O_2 για την επαγωγή οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, σε Zucker επιμύες (diabetic fatty rats) υπερεκφράστηκε η p21, μέσω ενός αδενοϊού, στα νησίδια β κυττάρων του παγκρέατος. Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου και στα δύο πειράματα έδειξε αυξημένη έκφραση του mRNA της p21, ενώ τα κύτταρα έχαναν την ικανότητα τους να εκκρίνουν ινσουλίνη με συνέπεια την μείωση των επιπέδων του mRNA της ινσουλίνης. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν ότι η υπερέκφραση της κινάσης p21, η οποία μπορεί να επάγεται από το οξειδωτικό στρες, ευθύνεται τόσο για την ελαττωματική έκφραση γονιδίων ινσουλίνης τα οποία ευθύνονται για τη μείωση της έκκρισης ινσουλίνης όσο και για τη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Κατά συνέπεια η επαγωγή της p21 πιθανώς εμπλέκεται ενεργά στην τοξικότητα της γλυκόζης των β κυττάρων (Kaneto *et al.*, 1999).

In vitro πειράματα σε p21 knockout πειραματόζωα έδειξαν ότι νησίδια από παγκρεατικά β κύτταρα ποντικού τα οποία εκτέθηκαν σε μιτογόνα φάρμακα εμφάνισαν υψηλότερα ποσοστά σύνθεσης DNA σε σύγκριση με τα πειραματόζωα που εκφράζουν την p21, εύρημα που είναι απολύτως σύμφωνο με τον ανασταλτικό ρόλο της p21 στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (Kaneto *et al.* 1999). Ωστόσο, *in vivo* μελέτες που διεξήχθησαν από την ίδια ερευνητική ομάδα απέδειξαν ότι σε p21-knockout ποντίκια η λειτουργία και ο ρυθμός αντιγραφής των β κυττάρων, καθώς επίσης και η ομοιόσταση της γλυκόζης δεν αλλοιώνονται σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου (wild type) ποντίκια. Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι είτε η p21 δεν ενεργεί από μόνο του για την παύση του κυτταρικού κύκλου στα β κύτταρα, είτε ότι η λειτουργία της p21 γίνεται σε συνδιασμό με μια άλλη πρωτεΐνη που μπορεί να αντικαταστήσει την απώλεια της p21 στα β κύτταρα *in vivo* (Cozar-Castellano *et al.*, 2006). Το ενδιαφέρον όμως σε αυτή τη μελέτη, είναι ότι τα ποντίκια που υπολείπονταν του γονιδίου p21, εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα ινσουλίνης σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου, γεγονός που καταλήγει σε δυσλειτουργία των β κυττάρων, για τα οποία ωστόσο δεν είχε γίνει ακόμα σχετική κλινική μελέτη. Σύμφωνα με τα παραπάνω, αναντίρρητο είναι το γεγονός ότι, η ανεπάρκεια σε p21 μπορεί να ευαισθητοποιήσει τους μύες στις βλαβερές συνέπειες του στρες του ΕΔ σε επίπεδα χαμηλότερα από εκείνα που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ομοιόσταση της γλυκόζης. Κάτι τέτοιο βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με πρόσφατα ευρήματα που δείχνουν ότι σε πειραματόζωα και κύτταρα ελλειμματικά ως προς το p53, έχουν

μειωμένα επίπεδα p21 καθιστώντας τα πιο ευαίσθητα στο στρες του ΕΔ (Kiaris *et al.*, 2012).

1.6.4 Υπερέκφραση της p21 δρα ως ανασταλτικός παράγονας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των β κυττάρων

Ο πολλαπλασιασμός των β κυττάρων είναι ένας πολύ σημαντικός δείκτης για την δυναμική φύση της μάζας των β ώριμων κυττάρων (Yesil *et al.*, 2008). Παρόλο που η p21 λειτουργεί ως αναστολέας της προόδου του κυτταρικού κύκλου, η απουσία της στα νησίδια δεν φέρεται να έχει καμία επίδραση τόσο στη μάζα των νησίδων όσο και στο μεταβολισμό της γλυκόζης (Vetere *et al.*, 2002). Για να προσδιοριστεί εάν η p21 συμβάλλει στην απόπτωση των β κυττάρων που σχετίζεται με το διαβήτη τύπου 2, εξετάστηκε η επίδραση της p21 στα παγκρεατικά β κύτταρα μέσω μίας άλλης εναλλακτικής προσέγγισης. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι συνέπειες της υπερέκφρασης της p21 στον πολλαπλασιασμό των β κυττάρων, χρησιμοποιώντας ένα επαγωγίμο σύστημα με βάση την τετρακυκλίνη (Insulin-rtTA/TET-p21). Σε αυτό το σύστημα η p21 ελέγχεται από τον υποκινητή RIPII – rtTA (Σχήμα 11). Ως εκ τούτου, μετά την χορήγηση αδριαμυκίνης (Dox) προκλήθηκε υπερέκφραση της p21 στα νησίδια των β κυττάρων, η οποία μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των β κυττάρων. Χρόνια χορήγηση δοξκυκλίνης σε αυτά τα πειραματόζωα, αύξησε τα επίπεδα γλυκόζης και τελικά προκάλεσε διαβήτη που προφανώς συνδεόταν με την μείωση της περιεκτικότητας σε β κύτταρα και την παραγωγή ινσουλίνης (Yang *et al.*, 2009).



Σχήμα 11. Α. Υπερέκφραση της p21 με βάση την τετρακυκλίνη (Insulin-rtTA/TET-p21), Β. Χορήγηση Dox προκάλεσε υπερέκφραση της p21 και ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των β κυττάρων.

1.6.5 Υπερέκφραση της p21 βελτιώνει την αποκατάσταση της λειτουργίας των β κυττάρων μετά από επαγόμενου διαβήτη μέσω στρεπτοζοτοκίνης (STZ)

Παράλληλα με τα παραπάνω, στην ίδια μελέτη αξιολογήθηκε, η αποκατάσταση της λειτουργίας των β κυττάρων μετά από χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης για επαγωγή διαβήτη (STZ). Η STZ έχει στοχευμένη τοξικότητα σε

παγκρεατικά β κύτταρα και είναι γνωστό ότι επάγει ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη, προκαλώντας βλάβη στα β κύτταρα των πειραματοζώων στα οποία χορηγείται (Graham *et al.*, 2011). Επιτεύχθηκε επαγωγή διαβήτη χρησιμοποιώντας μία και μόνη υψηλή δόση *STZ*, η οποία επιτυχώς προκάλεσε τοξικότητα στα παγκρεατικά β κύτταρα οδηγώντας τελικά σε διαβήτη. Μία δόση της *STZ*, συγκέντρωσης 200 mg/kg, χορηγήθηκε ενδο-περιτοναϊκά σε ποντίκια κατά την όγδοη ημέρα της θεραπείας τους με *DOX*, όπου έπειτα μετρήθηκαν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Απροσδόκητα, στα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν την p21 έγινε άμεση αποκατάσταση της λειτουργίας των β κυττάρων μετά από την επήρεια της τοξικότητας της *STZ*. Παράλληλα, στα ποντίκια που υπερέκφραζαν την p21 παρατηρήθηκε αύξηση του βάρους τους καθώς και επίτευξη φυσιολογικής ομοιόστασης της γλυκόζης στο αίμα σε σύγκριση με τα πειραματόζωα αγρίου τύπου. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι καταστέλλεται ο αυτοδιπλασιασμός των β -κυττάρων στα πειραματόζωα αγρίου τύπου μετά από χορήγηση *STZ*, ενώ αντίθετα όταν τα πειραματόζωα υπερεκφράζουν την p21 η τοξικότητα που προκαλείται στα νησίδια από *STZ* μπορεί εκ νέου να ενεργοποιήσει εναλλακτικούς μηχανισμούς για την αναγέννηση β κυττάρων του παγκρέατος (Yang *et al.*, 2009).

1.6.6 Ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και προγονικών δεικτών στα κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν την p21

Πραγματοποιήθηκαν μορφομετρικές αναλύσεις προκειμένου να καθοριστούν ποιά κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων είναι υπεύθυνα για την αναγέννηση των β κυττάρων. Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίστηκε ένα δίκτυο που αποτελείται από μεταγραφικούς παράγοντες Ngn3 (ax4, Arx, Nkx2.2, NeuroD1 και Pax6) και από πιθανούς προγονικούς δείκτες CD133 και c- Met, οι οποίοι βρέθηκαν να εκφράζονται στα παγκρεατικά νησίδια των διαγονιδιακών πειραματοζώων που υπερεκφράζουν την p21 μετά από χορήγηση *STZ*, ουσία που χρησιμοποιείται για να προκληθεί τραυματισμός των νησιδίων. Ωστόσο, η έκφραση των πιο πάνω γονιδίων δεν ήταν ανιχνεύσιμη στα παγκρεατικά νησίδια των πειραματοζώων αγρίου τύπου μετά από χορήγηση *STZ* αλλά ήταν ανιχνεύσιμη στα διαγονιδιακά πειραματικό μοντέλο το οποίο υπερέκφραζε την p21. Αυτά τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν ότι η ενεργοποίηση των προγονικών κυττάρων θα μπορούσε να επιτευχθεί σε συνθήκες

όπου αναστέλλεται ο αυτοπολλαπλασιασμός των β κυττάρων (Yang *et al.*, 2009), το οποίο απεικονίζει τον κρίσιμο ρόλο της p21 στη λειτουργία των β κυττάρων.

1.6.7 Συνέκφραση ενδοκρινικών δεικτών σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τη p21

Μετά την χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης, τα επίπεδα των ενδοκρινικών δεικτών γλυκαγόνης, ινσουλίνης και σωματοστατίνης αυξήθηκαν (Yang *et al.*, 2009), ενώ κατά την πρόιμη ανάπτυξη του παγκρέατος νέα διαφοροποιημένα ενδοκρινή κύτταρα εκφράζουν αυθόρμητα ινσουλίνη, γλυκαγόνη και σωματοστατίνη (Alpert *et al.*, 1988; Polak *et al.*, 2000). Τα προγονικά κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων των διαγονιδιακών ποντικίων που υπερεκφράζουν την p21, στα οποία χορηγήθηκε *STZ* συνεκφράζουν ινσουλίνη, γλυκαγόνη και σωματοστατίνη σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα διαγονιδιακά ποντίκια χωρίς την *STZ*. Ως εκ τούτου η αιτία της αναγέννησης των β -κυττάρων στα ώριμα παγκρεατικά νησίδια μπορεί να είναι από την επαγόμενη από *STZ* εμφάνιση του διαβήτη με συνέπεια την ενεργοποίηση πρόωρων αναπτυξιακών οδών στο πάγκρεας (Yang *et al.*, 2009).

1.6.8 Η βιολογική σημασία της p21 σε σχέση με την διαβητική νεφροπάθεια

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί τη συχνότερη αιτία χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Από το 1969 είχε παρατηρηθεί ότι η πάχυνση της βασικής μεμβράνης των τριχοειδών αγγείων αποτελεί χαρακτηριστική αλλοίωση στο διαβητικό ασθενή και αυξάνεται παράλληλα με την ηλικία αλλά και τη χρονική διάρκεια του διαβήτη (Williamson *et al.*, 1969). Η πάχυνση αυτή της βασικής μεμβράνης αφορά το σύνολο των τριχοειδών αγγείων του διαβητικού ασθενή. Ωστόσο, είναι κλινικά σημαντική, κυρίως στο επίπεδο του νεφρού και του αμφιβληστροειδή. Στα φυσιολογικά σπειράματα, τα τριχοειδή διατάσσονται ομοιόμορφα γύρω από το μεσαγγειακό άξονα, ο οποίος περιλαμβάνει τα μεσαγγειακά κύτταρα και τη μεσαγγειακή ουσία. Στη διαβητική νεφροπάθεια, παρατηρείται αποδιοργάνωση των σπειραμάτων, υπερτροφία του μεσαγγειακού άξονα και ελάττωση του αριθμού των μεσαγγειακών κυττάρων. Οπότε η νεφρική μεσαγγειακή υπερτροφία των κυττάρων έχει επισημανθεί ως ένα χαρακτηριστικό της διαβητικής νεφροπάθειας, καθώς και ως ένα κομβικό σημείο στη απόκριση στο στρες ή στη νεφρική βλάβη και χαρακτηρίζεται από αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η p21 ελέγχει την πρόοδο του

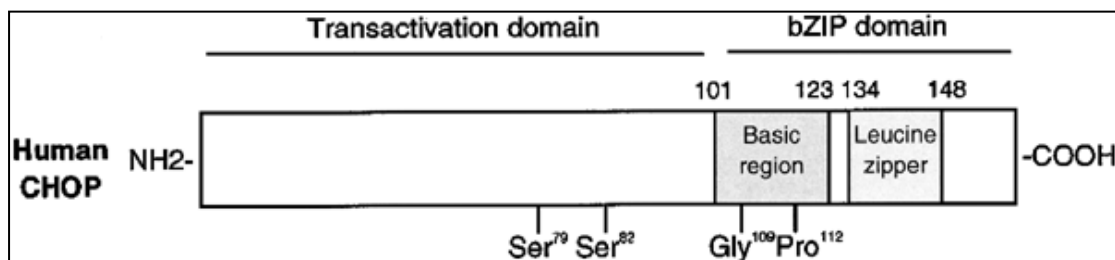
κυτταρικού κύκλου και επηρεάζει την αντιγραφή του DNA, επιτρέποντας ταυτόχρονα την πρωτεϊνική σύνθεση να συνεχιστεί, θεωρήθηκε ότι η p21 ίσως εμπλέκεται στη νεφρική μεσαγγειακή υπερτροφία. Αναστολή της p21 από το phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide (ODN) μειώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης p21 στα ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα (Mesangial Cells). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε τον παράγοντα IGF2 ο οποίος κωδικοποιεί το mRNA του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα 2, δεσμευτικής πρωτεΐνης 2 (IGF2BP2, insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2) και ρυθμίζει την μετάφραση του αυξητικού παράγοντα ινσουλίνης-2, IGF2 (Insulin Growth Factor 2, IGF2). Ο IGF2 εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση των κυττάρων και στη δράση της ινσουλίνης. Επιπλέον, το antisense p21 ODN προκαλεί καταστολή του IGF1 το οποίο επάγει την p21 στα μεσεγγυματικά κύτταρα με αποτέλεσμα την μείωση της υπερτροφίας. Αυτά τα δεδομένα προτείνουν ότι η εξωγενής μείωση των επιπέδων της p21 μπορεί τελικά να αποδειχθεί χρήσιμη στη θεραπεία των υπερτροφικών παθήσεων (Fan *et al.*, 2004).

1.7. Αύξηση της έκφρασης του CHOP επάγει το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Συσχέτιση του με τον σακχαρώδη διαβήτη

1.7.1. Δομή και Ιδιότητες του CHOP

Το CHOP είναι μία πρωτεΐνη 29 kDa με 169 (ανθρώπινα) ή 168 (τροφικά) αμινοξικά κατάλοιπα. Αρχικά χαρακτηρίστηκε ως μέλος των C/EBPs (CCAAT/enhancer binding proteins) και αποτελεί τον κυρίαρχο καταστολέα των C/EBPs. Το CHOP είναι γνωστό και ως GADD153 (growth arrest- and DNA damage inducible gene 153). Πρόκειται για μία ομάδα γονιδίων που επάγονται από το γενοτοξικό στρες αλλά και από σήματα παύσης της κυτταρικής αύξησης. Οι C/EBPs συγκροτούν μία οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε πολλές διαφορετικές φυσιολογικές διαδικασίες, όπως ανοσοποιητικές λειτουργίες, κυτταρική διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμός. Δομικά, η πρωτεΐνη CHOP αποτελείται από δύο λειτουργικές περιοχές, μία αμινοτελική περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης, μία καρβοξυτελική περιοχή bZIP (basic-leucine zipper) η οποία αποτελεί την περιοχή σύνδεσης του DNA και μία περιοχή διμερισμού φερμουάρ λευκίνης. Στη βασική περιοχή εδράζονται συντηρημένα κατάλοιπα γλυκίνης (109) και προλίνης (112), τα οποία είναι

απαραίτητα για τη σύνδεση με το consensus του C/EBP. Τα δύο κατάλοιπα σερίνης (79 και 82) που είναι στην μεταγραφική περιοχή φωσφορυλιώνονται από την p38 MAP κινάση, απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση (Σχήμα 12), (Oyadomari *et al* 2004).



Σχήμα 12. Δομή του CHOP

(Oyadomari *et al.*, 2004)

1.7.2 Το Πρότυπο Έκφρασης του CHOP

Γενικά το CHOP εκφράζεται παντού σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Ωστόσο, επάγεται σημαντικά από διαταραχές που προκαλούν στρες. Το CHOP είναι παρόν στο κυττοσόλιο σε φυσιολογικές συνθήκες, ενώ σε συνθήκες στρες επάγεται και συσσωρεύεται στον πυρήνα. Αρχικά προσδιορίστηκε για τα γονίδια που επάγονται από γενotoξικό στρες, με ακτινοβολία UV και με αλκυλιωτικούς παράγοντες όπως μεθυλ-μεθανοσουλφονικά άλατα (MMS) και γι' αυτό ονομάστηκε GADD153. Η έλλειψη θρεπτικών όπως η στέρηση γλυκόζης και αμινοξέων οδηγεί σε επαγωγή του CHOP. Η στέρηση γλυκόζης επάγει στρες του ΕΔ, πιθανώς μέσω αναστολής της πρωτεϊνικής γλυκοζυλίωσης. Άλλοι ισχυροί επαγωγείς του CHOP είναι η τουνικαμυκίνη που μπλοκάρει την γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών, η thapsigargin η οποία προωθεί το στρες του ΕΔ με εξάντληση των αποθεμάτων ασβεστίου στο ΕΔ και η διθειοθρεϊτόλη που εμποδίζει τον σχηματισμό των δισουλφιδικών δεσμών. Επίσης, τα MMS επηρεάζουν την σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών με αλκυλίωση των κυστεϊνών των πρωτεϊνών στο ΕΔ και όχι με καταστροφή του DNA. Όλα τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η επαγωγή του CHOP ανταποκρίνεται περισσότερο στο στρες του ΕΔ από ό,τι στη βλάβη του DNA. (Oyadomari *et al.*, 2004).

1.7.3 Ο ρόλος του CHOP σε συνθήκες στρες ενδοπλασματικού δικτύου

Όπως έχει προαναφερθεί η πρωτεΐνη CHOP/GADD153 είναι γνωστή από την επαγωγή της σε συνθήκες διακοπής του κυτταρικού κύκλου, από βλάβες στο DNA ή από το στρες ενδοπλασματικού δικτύου. Ωστόσο χρησιμοποιείται ως

χαρακτηριστικός δείκτης της κατάστασης του ενδοπλασματικού δικτύου, γιατί η επαγωγή της είναι πιο ευαίσθητη υπό συνθήκες στρες αυτού (Zinszner *et al.*, 1998). Έχει αναφερθεί ότι τα κύτταρα που δεν είχαν CHOP ήταν καλύτερα προστατευμένα από την απόπτωση που προκαλούσε το στρες ενδοπλασματικού δικτύου (Zinszner *et al.*, 1998). Αναλυτικότερα επισημαίνεται ότι, η απόκριση αυτού του υποκυτταρικού διαμερίσματος σε συνθήκες στρες περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των PERK, ATF6 και IRE1 με την πρωτεΐνη CHOP να επάγεται και από τους τρεις αυτούς μηχανισμούς, ιδιαίτερα όμως επάγεται μετά την ενεργοποίηση της κινάσης PERK (Ma *et al.*, 2002; Ron and Habener, 2002). Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του CHOP αποτελεί η θετική ρύθμισή του μέσω της φωσφορυλίωσης από την κινάση p38. Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός πρόκλησης απόπτωσης από το CHOP δεν έχει προσδιοριστεί, η CHOP φαίνεται να μπορεί να αναστείλλει την επαγωγή αντι-αποπτωτικών γονιδίων, όπως το Bcl-2 ή να επάγει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον μηχανισμό της απόπτωσης, όπως τα γονίδια που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες Gadd34, Ero1, Dr5 (death receptor 5) και Trb3 (Tribbles homolog 3). Η Gadd34 προκαλεί την αποφωσφορυλίωση του eIF2, αυξάνει την πρωτεϊνοσύνθεση και τελικά προκαλεί μεγάλη συσσώρευση πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η κατάσταση αυτή τελικά οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο (Novoa *et al.*, 2001). Η Ero1 επάγει μία οξειδάση του ΕΔ που αυξάνει την οξειδωτική ικανότητα του ενδοπλασματικού δικτύου (Marciniak *et al.*, 2004) και η Dr5 ενεργοποιεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια κασπασών μέσω της έκφρασης επιφανειακών υποδοχέων (Yamaguchi and Wang, 2004).

Μία διαφορετική υπόθεση για την πρόκληση απόπτωσης από το CHOP περιλαμβάνει την αρνητική ρύθμιση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 (McCullough *et al.*, 2001). Στην περίπτωση υπερέκφρασης των αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2 έχει παρατηρηθεί αναστολή της απόπτωσης που προκαλεί το στρες ενδοπλασματικού δικτύου (Morishima *et al.*, 2004). Αντίθετα τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 προσελκύονται στην επιφάνεια του ΕΔ και ενεργοποιούν την κασπάση-12 σε συνθήκες στρες του ΕΔ. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες Bax και Bak είναι παρούσες τόσο στην μιτοχονδριακή μεμβράνη όσο και στο ΕΔ (Scorrano *et al.*, 2003). Σε συνθήκες στρες ενδοπλασματικού δικτύου, οι Bax και Bak ολιγομερίζονται και προκαλούν την απελευθέρωση Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα. Αυξημένες ποσότητες Ca^{2+} μπορούν να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο μέσω των κασπασών αλλά και ανεξάρτητα από αυτές (Scorrano *et al.*, 2003). Σε *in vitro*

πειράματα έχει παρατηρηθεί ότι αυξημένες ποσότητες Ca^{2+} ενεργοποιούν μία εξειδικευμένη πρωτεάση που ρυθμίζεται από την παρουσία Ca^{2+} , την m-καλπαΐνη, η οποία ενεργοποιεί την προκασπάση-12 (Nakagawa *et al.*, 2000). Ωστόσο, σε πρόσφατες μελέτες αποδείχθηκε ότι η πρόκληση απόπτωσης από το CHOP εξαρτάται από την χρόνο έκθεσης στο ερέθισμα που προκαλεί το στρες ενδοπλασματικού δικτύου. Σύμφωνα με το συμπέρασμα αυτό, η έκθεση σε ήπιο ερέθισμα για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να οδηγήσει σε προσαρμογή των κυττάρων στις συνθήκες αυτές, αποικοδομώντας το mRNA και την πρωτεΐνη CHOP (Rutkowski *et al.*, 2006).

1.7.4 CHOP και Διαβήτης

Στο διαβήτη τύπου II, μειωμένη δράση της ινσουλίνης, η οποία συνδέεται συχνά με την παχυσαρκία και την έλλειψη σωματικής άσκησης, είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην εξέλιξη της νόσου. Υπεργλυκαιμία εμφανίζεται όταν τα β κύτταρα αποτυγχάνουν να αντισταθμίσουν την αυξημένη ζήτηση για έκκριση ινσουλίνης. Υπερφόρτωση των β -κυττάρων σε συνθήκες, όπως η υπεργλυκαιμία, η παχυσαρκία και η μακροχρόνια θεραπεία με σουλφονουλιδίες οδηγεί σε δυσλειτουργία των β κυττάρων και απόπτωση μέσω μιας διαδικασίας που αναφέρεται ως «εξάντληση των β -κυττάρων». Στην παρούσα διατριβή, «καλλιεργήθηκε» η υπόθεση ότι μία ανισορροπία μεταξύ της ζήτησης για την έκκριση ινσουλίνης και της ικανότητας έκκρισης των β κυττάρων προκαλεί στρες του ΕΔ και οδηγεί, τελικά, σε απόπτωση. Ιδιαίτερα σημαντική είναι και η μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο πρότυπο μοντέλο μύος Akita, που όπως προαναφέρθηκε, φέρει μια γενετική μετάλλαξη στο γονίδιο ινσουλίνης και οδηγεί στο μη φυσιολογικό σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών και στη μη φυσιολογική διαμόρφωση της ινσουλίνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο, καταλήγοντας σε βαριάς μορφή διαβήτη (Yoshioka *et al.*, 1997), (βλέπε 1.3.3). Αν και οι ετερόγυζοι μύες Akita αναπτύσσουν βαριάς μορφής διαβήτη, οι γονιδιακά τροποποιημένοι μύες που στερούνται είτε το γονίδιο της Ins1 ή της Ins2, δεν αναπτύσσουν διαβήτη. Βρέθηκε ότι απουσία του CHOP, καθυστερεί σημαντικά η έναρξη της νόσου στους ετερόγυζους μύες Akita. Η παρατήρηση αυτή, έμμεσα υποδεικνύει ότι η προοδευτική υπεργλυκαιμία σε Akita ποντίκια προκαλείται μέσω επαγωγής της απόπτωσης διαμεσολαβούμενης από το CHOP. Δεδομένου ότι η απουσία του γονιδίου CHOP δεν μπορεί να καθυστερήσει την έναρξη της νόσου σε ομόζυγους μύες Akita, είναι προφανές ότι διαφορετικές οδοί εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία. Συνολικά, αυτές οι μελέτες υπογραμμίζουν τον σημαντικό ρόλο που

διαδραματίζεται από τις πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου στο φαινόμενο της τοξικότητας της γλυκόζης.

1.7.5 Πειραματικό μοντέλο διαγονιδιακών μυών eIF2a με ομοζυγωτία Ser51Ala στον σακχαρώδη διαβήτη.

Η συσσώρευση μη σωστών αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) οδηγεί στην μείωση της μετάφρασης του mRNA μέσω της άμεσης φωσφορυλίωσης της α υπομονάδας του ρυθμιστή της έναρξης της μεταφραστικής μηχανής του mRNA του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης 2 (eIF2a) στο κατάλοιπο Ser51. Ο σακχαρώδης διαβήτης σχετίζεται με την απώλεια της δράσης του PERK. Πιθανολογείται ότι οφείλεται σε μια μεταγεννητική απώλεια των β κυττάρων μέσω του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου που προκύπτει απρό τη μη ορθή ρύθμιση στην απόκριση των μη σωστών αναδιπλούμενων πρωτεϊνών στο ΕΔ. (Shi *et al.*, 1998). Η απουσία PERK μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στις φυσιολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το στρες του ΕΔ (Scheuner *et al.*, 2001).

Για να διερευνήσουμε τον ρόλο της φωσφορυλίωσης του eIF2a, δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά ποντίκια eIF2a με ομοζυγωτία Ser51Ala. Μύες με ομόζυγη μετάλλαξη στη φωσφορυλίωση του eIF2a (Ser51Ala) επέδειξαν έναν νεογνικό θανατηφόρο φαινότυπο που σχετίζεται με τη συσσώρευση λάθος αναδιπλούμενων πρωτεϊνών καθώς και με ανεπάρκεια στη μεταφορά των πρωτεϊνών. Παράλληλα με αυτό, χαρακτηρίζονταν από οξειδωτικό στρες το οποίο σχετίζεται με μιτοχονδριακές βλάβες, με μειωμένη έκφραση του UPR, και τέλος με ελαττωματική γλυκονεογένεση που συνεπάγεται σοβαρή ανεπάρκεια των β-κυττάρων. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το UPR έχει έναν ευρύτερο ρόλο στη διατήρηση της λειτουργίας των πρωτεϊνών στο ΕΔ και ότι είναι απαραίτητη για την *in vivo* διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης. (Back *et al.*, 2009).

1.7.6 Ρόλος της απουσίας του CHOP στο ετερόζυγο μεταλλαγμένο Ser51Ala eIF2a πειραματικό μοντέλο

Παρόλο που τα ετερόζυγα eIF2a^{S/A} πειραματόζωα δεν εκδηλώνουν απόπτωση στα β κύτταρα, μετά από συγκεκριμένη διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (45%), αναπτύσσουν διαβήτη ο οποίος χαρακτηρίζεται από αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα μετά από νηστεία, δυσανεξία στη γλυκόζη και ελαττωμένος αριθμός των β-κυττάρων. Πειραματικά αποτελέσματα κατέδειξαν ότι η

ελαττωματική έκκριση ινσουλίνης οφείλεται στον αυξημένο ρυθμό της μετάφρασης της γλυκόζης που σχετίζεται με το UPR. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην διάταση του διαμερίσματος του ΕΔ, και στην παρατεταμένη σύνδεση, της μη σωστής αναδιπλούμενης προ-ινσουλίνης με τον μοριακό συνοδό BiP ενώ συνδέεται και με τη μειωμένη περιεκτικότητα σε εκκριτικά κοκκία (Song & Scheuner *et al.*, 2008).

Αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι η ρύθμιση της μετάφρασης του mRNA μέσω φωσφορυλίωσης του eIF2α είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της λειτουργικής ακεραιότητας του ενδοπλασματικού δικτύου (Song & Scheuner *et al.*, 2008). Πιο συγκεκριμένα, ενώ η φωσφορυλίωση του eIF2 αναστέλλει τη μετάφραση, για την μεταγραφική επαγωγή της πλειοψηφίας του στρες του ΕΔ απαιτούνται γονίδια που συνδέονται με το UPR, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που κωδικοποιούν για τις ρυθμιζόμενες από γλυκόζη πρωτεΐνες, όπως GRP78/BiP, ERp72, GRP94, και CHOP. Η έκφραση του CHOP είναι αυξημένη στα β κύτταρα τόσο των διαβητικών επιμύων όσο και των ανθρώπων. Η διάταση του ΕΔ και ο κυτταρικός θάνατος των β κυττάρων σε ομόζυγες νησίδες eIF2α^{Ser51Ala} ήταν εμφανής, οπότε είναι ασφαλής η διεξαγωγή του συμπεράσματος ότι υπάρχουν περιβαλλοντικά ερεθίσματα που επάγουν φωσφορυλίωση του eIF2α, που είναι θεμελιώδης για την επιβίωση των β κυττάρων (Laybutt *et al.*, 2005). Η ανάγκη των βήτα κυττάρων για eIF2α φωσφορυλίωση δεν διαμεσολαβείται από το mRNA του ATF4, συμπέρασμα που διεξάγεται από το γεγονός ότι στα ποντίκια που στερούνται ATF4 δεν έχουν παρατηρηθεί ελαττώματα στο γλυκαιμικό τους έλεγχο.

Όπως έχει προαναφερθεί τα β κύτταρα από ποντίκια με ομόζυγη eIF2α^{Ser51Ala} υπέστησαν απόπτωση, η οποία εν μέρει σηματοδοτείται από τον προ-αποπτωτικό παράγοντα CHOP. Ωστόσο, τα CHOP knockout ποντίκια με μεταλλάξεις eIF2α^{Ser51Ala} υποδεικνύουν την αύξηση της κυτταρικής μάζας, τη βελτίωση της λειτουργίας των β κυττάρων καθώς και τη δυσανεξία στη γλυκόζη, συνθήκη, που δεν παρατηρείται στα παγκρεατικά νησίδια από ποντίκια eIF2α^{Ser51Ala} αγρίου τύπου (Song & Scheuner *et al.*, 2008). Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων προκύπτει το συμπέρασμα ότι, το CHOP εμπλέκεται στην απόπτωση των β κυττάρων. Αδιαμφισβήτητα στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι, το CHOP δεν είναι το μοναδικό σήμα θανάτου που προκαλείται από το στρες του ΕΔ. Απώλεια του CHOP αποτρέπει την απόπτωση των β κυττάρων και βελτιώνει την λειτουργία τους, μέσω της πρόληψης της οξειδωτικής βλάβης και της διατήρησης της ομοιόστασης του ΕΔ (Song & Scheuner *et al.*, 2008)

Σε διαφορετικό πείραμα που πραγματοποιήθηκε, σε ποντίκια $eIF2\alpha^{s/s}$ και σε ποντίκια $eIF2\alpha^{s/A}$ από τα οποία απουσίαζε το CHOP, τράφηκαν με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (45%) για 35 έως 41 εβδομάδες. Εξετάστηκε η μάζα του σώματος, η ανοχή στη γλυκόζη και τα επίπεδα της ινσουλίνης του ορού. Σε αυτό το πειραματικό μοντέλο η απώλεια του CHOP οδηγεί σε αυξημένη παχυσαρκία και διατήρηση του αριθμού των λειτουργικών β κυττάρων, ως συνέπεια της πρόληψης στη δυσανεξία στη γλυκόζη (Song & Scheuner *et al.*, 2008). Καταληκτικά, λοιπόν, επισημαίνεται ότι, τα προαναφερθέντα συμπεράσματα υποδεικνύουν τη σπουδαιότητα του ρόλου του CHOP στην εξαρτώμενη απόπτωση στα β κύτταρα στο διαβήτη.

1.7.7 Ρόλος του CHOP μετά από επαγωγή διαβήτη τύπου 2 σε πειραματικό μοντέλο με χρήση στρεπτοζοτοκίνη και με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (HFD)

Σε αγρίου τύπου και CHOP knockout ποντίκια χορηγήθηκε STZ και ταυτόχρονα τράφηκαν με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (60% HF) για 5-6 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε μύες αγρίου τύπου η μάζα των β -κυττάρων του παγκρέατος μειώθηκε ενώ παράλληλα ανέπτυξαν υπεργλυκαιμία. Αντίθετα τα CHOP knockout ποντίκια παρουσίασαν βελτίωση της λειτουργίας των β κυττάρων και διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης. Τα αποτελέσματα στο πιο πάνω πειραματικό μοντέλο υποδεικνύει την σημαντική εμπλοκή του προ-αποπτωτικού παράγοντα CHOP στην ανάκτηση της λειτουργίας των β κυττάρων μετά από μη γενετικό διαβήτη τύπου 2 (Song & Scheuner *et al.*, 2008).

1.7.8 Επίδραση της μετάλλαξης του CHOP σε $LepR^{db/db}$ ποντίκια

Στην βιβλιογραφία χρησιμοποιούνται ευρέως μοντέλα μυών διαβήτη τύπου 2 και πιο συγκεκριμένα γενετικά τροποποιημένα στο μόριο της λεπτίνης και στον υποδοχέα της. Ο λιπώδης ιστός, από τον οποίο παράγεται η ορμόνη λεπτίνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ob*, εκφράζει μια πρωτεΐνη 16kDa, η οποία ονομάστηκε *ob* πρωτεΐνη ή λεπτίνη (από τα ελληνικά *leptos* που σημαίνει λεπτός). Η λεπτίνη ανάλογα με τις αποθήκες λίπους, χρησιμεύει στη διαβίβαση σημάτων για την κατάσταση του ενεργειακού κορεσμού του σώματος στο κεντρικό νευρικό σύστημα προκειμένου να κατασταλλεί η εισαγωγή τροφής και να επιτραπούν οι ενεργειακές δαπάνες. Ωστόσο, τα επίπεδα λεπτίνης μειώνονται κατά τη διάρκεια της πείνας, όταν

μειώνονται οι αποθήκες λίπους για να υποστηρίξουν τις βασικές ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού. Αντίθετα, αυξάνονται κατά τη διάρκεια κορεσμού πρόσληψης τροφής όπου οι αποθήκες λίπους αναπληρώνονται (Margetic *et al.*, 2002).

Είναι γνωστό ότι, η ινσουλίνη διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων της λεπτίνης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερινσουλιναίμια αύξησε τις συγκεντρώσεις λεπτίνης πλάσματος και την έκφραση γονιδίων στα τρωκτικά και στους ανθρώπους (Koorpmans *et al.*, 1998). Επίσης βρέθηκε ότι οι υποδοχείς λεπτίνης εκφράζονται στα παγκρεατικά β κύτταρα των νησιδίων, προτείνοντας ότι η λεπτίνη επηρεάζει την έκκριση ινσουλίνης σε αυτά τα κύτταρα. Η λεπτίνη έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζει την έκκριση ινσουλίνης σε απομονωμένα νησίδα επίμυος και ανθρώπου (Kulkarni *et al.*, 1997). Προφανώς δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι, υπάρχει μια σύνδεση μεταξύ της λεπτίνης και της ινσουλίνης για τη ρύθμιση της ομοιόστασης της ενέργειας, παρόλο που ως προς αυτό παρατηρείται διχογνωμία λόγω των αποτελεσμάτων των μελετών.

Οι μύες Ob/Ob (μονογονιδιακό μοντέλο παχυσαρκίας – έλλειψη λεπτίνης) και Db/db (μονογονιδιακό μοντέλο παχυσαρκίας – αντίσταση στη λεπτίνη) χαρακτηρίζονται από διαταραχές, όπως μη-ινσουλίνο-εξαρτώμενο διαβήτη με σοβαρή αντίσταση ινσουλίνης, υποθερμία και μη ανεκτικότητα στο κρύο, στειρότητα αλλά και μείωση της άλιπης μάζας σώματος (Margetic *et al.*, 2002). Συσσωρευμένα επίπεδα των δεικτών της UPR εντοπίστηκαν στα νησίδα των db/db πειραματόζωων (Laybutt *et al.*, 2007; Yusta *et al.*, 2006). Προκειμένου να διερευνηθεί αν το CHOP εμπλέκεται στην διατήρηση της λειτουργίας των β κυττάρων, μελετήθηκαν ετερόζυγα για τη λεπτίνη ποντίκια καθώς και ποντίκια ανεπαρκή στη λεπτίνη. Απουσία CHOP στα leptin-null ποντίκια ενισχύουν την έκφραση της UPR και την απόκριση των αντι-οξειδωτικών δεικτών και παράλληλα μειώνεται η έκφραση των προ-αποπτωτικών γονιδίων. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί σε καθυστερημένη ανοχή γλυκόζης, αυξημένο πολλαπλασιασμό των β κυττάρων και πρόληψη της β κυτταρικής απόπτωσης (Song & Scheuner *et al.*, 2008).

1.7.9 Απουσία CHOP προστατεύει τα β κύτταρα από το οξειδωτικό στρες το οποίο σχετίζεται στενά με το στρες του ΕΔ

Νησίδα από CHOP knockout ή αγρίου τύπου ποντίκια υπέστησαν αγωγή με *τουνικαμυκίνη* για να αναστείλουν την N-συνδεδεμένη γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών για την προώθηση του στρες του ΕΔ. Αυτά τα πειράματα έδειξαν ότι στα

νησίδια αγρίου τύπου, υπήρξε μια αύξηση στην οξειδωτική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων (Song & Scheuner *et al.*, 2008). Εναλλακτικά, η επεξεργασία των νησιδίων στα αγρίου τύπου και στα CHOP knockout ποντίκια με H₂O₂, έδειξε συγκρίσιμες ποσότητες της οξειδωτικής βλάβης στα νησίδια των β-κυττάρων τόσο στα αγρίου τύπου όσο και στα CHOP knockout ποντίκια (Song & Scheuner *et al.*, 2008). Κατά συνέπεια, απουσία CHOP μειώνεται η οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από την UPR στο ΕΔ, αλλά όχι το γενικό οξειδωτικό στρες. Αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι η διαγραφή του CHOP βελτιώνει τη λειτουργία των β κυττάρων και εμποδίζει την απόπτωση με την ταυτόχρονη βελτίωση της ικανότητας του ΕΔ για την παραγωγή σωστά αναδιπλούμενων πρωτεϊνών (Song & Scheuner *et al.*, 2008).

1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ταυτοποίηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν τη μετάπτωση της UPR από την ομοιοστατική στην προαποπτωτική της λειτουργία είναι θεμελιώδους σημασίας για την κατανόηση της απόκρισης του κυττάρου στο στρες του ΕΔ και με εφαρμογή σε διάφορες παθήσεις που σχετίζονται με αυτή όπως ο διαβήτης. Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήσαμε το ρόλο της p21 στο στρες του ΕΔ, με έμφαση στη ρύθμισή της από το μεταγραφικό παράγοντα CHOP. Στη συνέχεια διερευνήσαμε το πώς η φαρμακολογική ή γενετική τροποποίηση της έκφρασης της p21 επιδρά στην ανάπτυξη του διαβήτη σε πειραματόζωα.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματόζωα- Χειρισμοί και πειραματικές διαδικασίες.

2.1.1 Διαχείριση πειραματόζωων, διασταυρώσεις

Τα πειραματόζωα (μύες) που χρησιμοποιήθηκαν στεγάστηκαν υπό τις προβλεπόμενες συνθήκες σε περιβάλλον σχετικής υγρασίας $55\pm 5\%$, θερμοκρασίας $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ και εναλλαγής σκότους/φωτός κάθε 12 ώρες. Οι κλωβοί φύλαξης είχαν τις κατάλληλες διαστάσεις, έφεραν υπόστρωμα από κοινό ροκανίδι ξύλου, την απαιτούμενη ποσοτικά και ποιοτικά τροφή καθώς και νερό βρύσης. Αποφεύχθηκε η εκτροφή πολλών μυών στον ίδιο κλωβό, ιδιαίτερα στην περίπτωση των αρσενικών, λόγω αυξημένης επιθετικότητας μεταξύ τους αλλά και για λόγους υγιεινής. Επισκέψεις δύο φορές την εβδομάδα ήταν αρκετές για την παρακολούθηση των διασταυρώσεων και της υγείας των ζώων.

Οι μύες φτάνουν στην ηλικία αναπαραγωγής αρκετά νωρίς στις 8-10 εβδομάδες. Στους θηλυκούς μύες ένας οιστρικός κύκλος διαρκεί 4 μέρες και ο οίστρος διαρκεί για 14 ώρες. Θηλυκά τα οποία στεγάζονται χωρίς την ύπαρξη αρσενικού τείνουν να μην εμφανίζουν οιστρικό κύκλο. Αν εισαχθεί αρσενικός στην αποικία θα προκαλέσει συγχρονισμό των οιστρικών κύκλων. Για να διαπιστωθεί αν υπήρξε ζευγάρωμα μπορεί να παρατηρηθεί για 12-14 ώρες μετά από αυτό ένα «βύσμα πήξης» στον κόλπο του θηλυκού. Ένας πιο αξιόπιστος αλλά και πολύπλοκος τρόπος είναι ο μικροσκοπικός εντοπισμός σπερματοζωαρίων σε υγρό με το οποίο εκπλένεται ο κόλπος. Η εγκυμοσύνη διαρκεί για 18-21 μέρες και τα νεογνά γεννιούνται τυφλά και άτριχα. Είναι περίπου 6-12 σε αριθμό ανά γέννα και μπορούν να απογαλακτιστούν στις 21 μέρες ζωής. Ο απογαλακτισμός δεν θα πρέπει να γίνεται μετά την 28η μέρα.

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πειραματικά μοντέλα ποντικών με έλλειψη του γονιδίου chop, με έλλειψη του γονιδίου p21, με έλλειψη του γονιδίου p53 καθώς και φυσιολογικά ποντίκια που εξέφραζαν το πλήρες γονιδίωμα, τα C57BL/6. Η προμήθεια των πειραματόζωων έγινε από την εταιρεία Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, www.jax.org). Σε αυτή τη μελέτη, τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν θηλυκού φύλου και ηλικίας 5-6 εβδομάδων. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, κάθε πειραματόζωο φυλασσόταν σε ξεχωριστό κλουβί. Η δίαιτα που λάμβαναν πριν την έναρξη των πειραμάτων ήταν η τυπική, χωρίς λιπαρά (standard chow diet 1324 TPF, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG) και στη

συνέχεια τα p21KO και C57BL/6 εκτέθηκαν σε δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (40%) για 4 εβδομάδες. Κάθε ομάδα περιείχε πέντε με έξι ποντίκια. Οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν την 8^η εβδομάδα καθώς επίσης οι μετρήσεις αναφοράς έγιναν πριν την έκθεση των ποντικών στη δίαιτα (μηδενική εβδομάδα). Οι πειραματικές μελέτες διεξήχθησαν σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, τη συνθήκη του Ελσίνκι και το πρωτόκολλο προστασίας και ορθής μεταχείρισης των ζώων το οποίο έχει λάβει την έγκριση της επιτροπής πειραματόζωων της Πειραματική Χειρουργική της Ιατρικής Σχολής Αθηνών.

Για την εξαγωγή εμβρυϊκών ινοβλαστών χρησιμοποιήθηκαν έμβρυα από έγκυο θηλυκό ποντίκι 13-14 ημερών ετερόζυγο για το γονίδιο p53 το οποίο διασταυρώθηκε με ετερόζυγο για το γονίδιο p53 αρσενικό και για το γονίδιο CHOP το οποίο διασταυρώθηκε με ετερόζυγο για το γονίδιο CHOP αρσενικό.

Ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western έγινε στους ακόλουθους ιστούς: καρδιά, πνεύμονας, ήπαρ, πάγκρεας και σπλήνα από ποντίκια chopKO, p21KO, p53KO καθώς και τα αγρίου τύπου C57BL/6. Για τον ανοσοϊστοχημικό προσδιορισμό της ινσουλίνης στο πάγκρεας, απομονώθηκε το ήπαρ από ενήλικα ποντίκια αγρίου τύπου και ποντίκια p21KO.

2.1.2 Προσδιορισμός γονότυπου ποντικών (chop, p53, p21)

Η διαδικασία της εύρεσης του γονότυπου των ενήλικων ή εμβρύων μυών περιλαμβάνει αρχικά την εξαγωγή DNA από μικρό τμήμα ιστού (τμήμα ουράς μήκους 4-6mm για τα ενήλικα ζώα και τμήμα από το έμβρυο στην περίπτωση απομόνωσης εμβρυϊκών ινοβλαστών) και κατόπιν την ενίσχυση του DNA με κατάλληλους εκκινητές μέσω PCR.

Οι μύες 20 έως 30 ημέρες μετά τη γέννησή τους, διαχωρίζονται σε αρσενικά και θηλυκά, επισημαίνονται με αριθμημένα μεταλλικά σκουλαρίκια και αποκόπτεται από το κάθε άτομο ένα τμήμα μήκους 4-6mm από το τέλος της ουράς, το οποίο τοποθετείται σε πλαστικό φιαλίδιο τύπου eppendorf των 1,5ml. Ακολουθεί απομόνωση DNA και ανάλυση γονότυπου μέσω PCR.

Απομόνωση DNA από ουρές ποντικών για εύρεση γονοτύπου

Υλικά

- Διάλυμα λύσης:
50mM KCl
10mM TrisHCl (pH 8,3)
2,5mM MgCl₂x6H₂O
0,45% v/v NP-40
0,45% v/v Tween-20
- Πρωτεΐνάση K (Invitrogen)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Στο δείγμα του ιστού προστίθεται 180μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και 5μl πρωτεΐνάσης K και τα δείγματα επώάζονται στους 56°C για 16-18ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης προκύπτει ένα διάλυμα που περιέχει το DNA, το οποίο υποβάλλεται σε θέρμανση στους 80°C σε θερμομαντική συσκευή thermo-block με σκοπό να αδρανοποιηθεί η πρωτεΐνάση K. Στο τελικό στάδιο τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13000rpm για 10 λεπτά προκειμένου να καταβυθιστούν τα παραπροϊόντα της πέψης. Από το υπερκείμενο στο οποίο βρίσκεται το DNA χρησιμοποιείται 1μl για ενίσχυση με PCR.

2.1.3 Χορήγηση φαρμάκων σε πειραματικά μοντέλα μυών.

Η *αδριαμυκίνη (Doxorubicin, Sigma)* χορηγήθηκε σε ποντίκια μέσω ενδοπεριτοναϊκής ένεσης σε συγκέντρωσεις 1 mg/kg, 2 mg/kg και 4 mg/kg, αντίστοιχα, ενώ στη ομάδα των μαρτύρων χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά διαλύτης DMSO για 24 ώρες. Η *τουνικαμυκίνη (tunicamycin, Sigma)* χορηγήθηκε σε ποντίκια μέσω ενδοπεριτοναϊκής ένεσης σε συγκέντρωση 500ng/kg, ενώ στη ομάδα των μαρτύρων χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά διαλύτης DMSO για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα. Το *nutlin -3a (Sigma)* χορηγήθηκε σε ποντίκια μέσω ενδοπεριτοναϊκής ένεσης σε συγκέντρωση 4 mg/kg, ενώ στη ομάδα των μαρτύρων χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά διαλύτης DMSO για 1, 6 και 24 ώρες. Η *στρεπτοζοτοκίνη* χορηγήθηκε σε ποντίκια μέσω ενδοπεριτοναϊκής ένεσης σε συγκέντρωσεις 1 mg/kg, 2

mg/kg και 4 mg/kg, αντίστοιχα, ενώ στη ομάδα των μαρτύρων χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά διαλύτης Citrate buffer για 24 ώρες.

2.1.4 Λήψη αίματος από την ουρά ποντικών

Περιγραφή μεθοδολογίας

Πριν από κάθε λήψη αίματος τα ποντίκια έμπαιναν σε νηστεία για 6 ώρες. Για την λήψη του αίματος, τα ποντίκια ακινητοποιήθηκαν στις ειδικές θήκες και με ένα νυστέρι γινόταν μια μικρή τομή στο άκρο της ουράς. Η καλύτερη αιμοληψία για την συλλογή της απαραίτητης ποσότητας αίματος εξασφαλιζόταν με μαλάξεις στην ουρά των ποντικών. Μετά την λήψη, ακολουθούσε ο καυτηριασμός της ουράς των ποντικών για να αποφευχθεί περαιτέρω αιμορραγία.

2.1.5 Μέτρηση βάρους πειραματόζωων (Body weight)

Για την μέτρηση του βάρους των ποντικών χρησιμοποιήθηκε ζυγαριά ακριβείας και ένα μεγάλο πλαστικό διάφανο δοχείο για την τοποθέτησή τους και μετέπειτα ζύγιση τους. Η μετρήσεις γίνονταν ανά βδομάδα ξεκινώντας από την τέταρτη εβδομάδα γέννησης τους. Ο μέσος όρος των μετρήσεων ποντικών και αντίστοιχα των φυσιολογικών στην κάθε εβδομάδας μέτρηση καταχωρούνται και στην συνέχεια αναλύονται σε πρόγραμμα για την εξαγωγή διαγραμμάτων.

2.1.6 Δοκιμασία Ανοχής Γλυκόζης

Υλικά

- Γλυκόμετρο (Accu-Chek Aviva, Roche)
- Ταινίες μέτρησης σακχάρου (Accu-Chek Aviva, Roche)
- Γλυκόζη (Glucose, G-7021, Sigma, USA)
- 10X PBS pH7.4 (800 ml dd H₂O + 80 g NaCl + 2 g KCl + 14.4 g Na₂HPO₄ + 2.4 g KH₂PO₄)
- 1X PBS pH7.4 (50 ml PBS 10X + 450 ml dd H₂O)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα δεξτρόζης συγκέντρωσης 12.5mg/50ml 1X PBS. Τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε 5-6 ώρες νηστείας και ακολούθως μετρήθηκαν τα βασικά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η μέτρηση των επιπέδων της γλυκόζης έγινε σε

μια σταγόνα αίματος από την ουρά του ποντικού χρησιμοποιώντας ένα γλυκόμετρο. Στη συνέχεια, 200 μl γλυκόζης ανά 25 g σωματικού βάρους του ποντικού, ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά στα ποντίκια και μετρήθηκαν τα επίπεδα της γλυκόζης στα 0, 30, 60, 90, 120 λεπτά μετά την χορήγηση.

2.1.7 Δοκιμασία Αντίστασης στην Ινσουλίνη

Υλικά

- Γλυκόμετρο (Accu-Chek Aviva, Roche)
- Ταινίες μέτρησης σακχάρου (Accu-Chek Aviva, Roche)
- Ινσουλίνη (Humulin Regular, Lilly, ΦΑΡΜΑΣΕΡΒ-ΛΙΛΛΥ Α.Ε.Β.Ε.)
- 10X PBS pH7.4 (800 ml dd H₂O + 80 g NaCl + 2 g KCl + 14.4 g Na₂HPO₄ + 2.4 g KH₂PO₄)
- 1X PBS pH7.4 (50 ml PBS 10X + 450 ml dd H₂O)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Αρχικά, παρασκευάστηκε αραιωμένο διάλυμα ινσουλίνης συγκέντρωσης 0.125u/ml σε 1X PBS. Στα ποντίκια μετρήθηκαν τα βασικά επίπεδα της γλυκόζης του αίματος ύστερα από νηστεία 6 ωρών. Στη συνέχεια, τους χορηγήθηκαν, ενδοπεριτοναϊκά, 150 μl ινσουλίνης/25g σωματικού βάρους ποντικού και μετρήθηκαν τα επίπεδα της γλυκόζης στα 15, 30, 60, 120 λεπτά μετά την χορήγηση της ινσουλίνης.

2.1.8 Θυσίες και λήψη ιστών από τα ποντίκια

Υλικά

- 4.6. Διαιθυλαιθέρας (P0440521, SDS, Specialiste des Solvants, Carlo Erba)
- 4.7. Ισοφλουράνη (AErranne Isoflurane, USP, NDC 10019-773-40, Baxter, USA)
- 4.8. Σωληνάκια συλλογής αίματος (Microtubes for pediatric blood collection CB1000, Sarstedt, D-51588 Numbrecht, Germany)
- 4.9. 70% αιθανόλη (Ethanol, K43147583 209, Merck, Germany) (70ml αιθανόλης 100% + 30 ml ddH₂O)
- 4.10. 1X PBS pH 7.4

- 4.11. 10% φορμόλη (10ml φορμόλης 100% + 90 ml ddH₂O)
- 4.12. Πλαστικά σωληνάκια 1.5 ml (Reaction Tubes, 616 201, Greiner Bio-One)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Για την απομόνωση ολικού αίματος χορηγήθηκε στα ποντίκια αναισθησία με ενδοπεριτοναϊκή ένεση μίγματος κεταμίνης (87mg/kg)-ξυλαζίνης (13mg/kg) και ακολούθησε λήψη αίματος από την καρδιά μέσω του φλεβικού κόλπου (περίπου 600-800 μl). Ο ορός διαχωρίστηκε μέσω φυγοκέντρησης στα 3000rpm για 10 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης παραλαμβάνετε ο ορός με πιπέτα και αποθηκεύεται σε eppendorf 1,5 ml στους -200C. Έπειτα, τα ναρκωμένα ποντίκια υποβάλλονται σε ευθανασία με σπονδυλική μετατόπιση. Μετά τον ψεκάσμό της κοιλιακής χώρας του θανατωμένου ποντικιού με διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης 70%, η περιοχή αυτή ανοίγεται με χειρουργικό ψαλίδι. Ακολούθως, με νυστέρι σχίζεται προσεκτικά το περιτόναιο και στη συνέχεια αφαιρούνται οι ιστοί χωρίς να τραυματιστούν, αποκόβοντάς τους από τα αγγεία και τους συνδέσμους που τα συγκρατούν. Οι ιστοί ξεπλένονται σε τρυβλίο με διάλυμα PBS 1X και κόβονται σε μικρότερα τμήματα, τα οποία ψύχονται άμεσα σε παγωμένο λουτρό μεθανόλης και τοποθετούνταν στους -80 °C για μελλοντική χρήση. Ένα μέρος των ιστών των ποντικών φυλάγονται σε 10% διάλυμα φορμόλης για την πραγματοποίηση ιστολογικών αναλύσεων.

2.2 Κυτταροκαλλιέργειες

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά ανθρώπινης προέλευσης: A549 (επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς κυτταρικές σειρές, εμβρυϊκοί ινοβλάστες από ποντίκια (MEFs) με γονότυπους MEFs chop+/+, MEFs chop -/-, MEFs p53 +/+, MEFs p53-/-, MEFs p21 +/+, MEFs p21-/. Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν σε κατάλληλο θάλαμο στείρων συνθηκών (θάλαμος νηματικής ροής) και με βάση τους προβλεπόμενους κανόνες υγιεινής και ασφάλειας. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε πλαστικές φλάσκες επιφανείας 75cm², σε επωαστικό κλίβανο με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 37°C, υγρασίας 95% και 5% CO₂, παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) εμπλουτισμένου με 10% εμβρυϊκού ορού βοός (FBS, Fetal Bovine Serum), 100U/ml πενικιλίνη, 100μg/ml στρεπτομυκίνη και 0,25μg/ml αμφοτερικίνη B.

2.2.1 Απομόνωση πρωτογενών κυττάρων (MEFS)

Υλικά

- Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (L-γλουταμίνη, 4,5g/L D-γλυκόζη, πυροσταφυλικό νάτριο, Gibco)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (εμβρυϊκός ορός βοός που περιέχει αυξητικούς παράγοντες, Gibco)
- Antibiotic/Antimycotic (100X) (10000U/ml πενικιλίνη, 10000μg/ml στρεπτομυκίνη και 25μg/ml αμφοτερικίνη B, Gibco)
- Trypsin-EDTA (0,5% w/v θρυψίνη και 0,53mM EDTA, Gibco)
- PBS 1X (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄ x 7H₂O, Gibco)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Για την απομόνωση εμβρυϊκών ινοβλαστών μυών θυσιάζεται έγκυο θηλυκό ποντίκι 13-14 ημερών από διασταύρωση p53^{+/-}-X p53^{+/-} και chop^{+/-}-X chop^{+/-}. Υπό στείρες συνθήκες και με χρήση αποστειρωμένων εργαλείων απομονώνονται τα έμβρυα από τον εμβρυϊκό σάκο και τοποθετούνται σε τρυβλίο με PBS 1X. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε κατάλληλο θάλαμο διαχείρισης κυττάρων όπου κάθε έμβρυο καθαρίζεται από τα υπολείμματα του εμβρυακού σάκου και διαχωρίζονται τα σπλάγχνα και το κεφάλι. Μέρος του εμβρύου φυλάσσεται σε φιαλίδιο τύπου erpendorf για την εύρεση του γονοτύπου ενώ το υπόλοιπο τεμαχίζεται με αποστειρωμένο νυστέρι μέχρι να μετατραπεί σε μία παχύρρευστη μάζα. Η μάζα αυτή χωρίζεται σε δύο μέρη, καθένα από τα οποία τοποθετείται σε ένα πηγάδι μικροπλάκας καλλιέργειας 24-θέσεων με 0,5ml διαλύματος θρυψίνης-EDTA και επωάζεται για 20 με 30 λεπτά στους 37°C. Κατόπιν το υγρό μείγμα μεταφέρεται σε ένα άλλο πηγάδι της ίδιας μικροπλάκας όπου προστίθεται και 1ml θρεπτικού υλικού, καθώς και στο πηγάδι με τη μάζα. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε έμβρυο. Την επόμενη ημέρα το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με φρέσκο έτσι ώστε να απομακρυνθούν τμήματα και υπολείμματα ιστών καθώς και νεκρά κύτταρα. Η αλλαγή επαναλαμβάνεται όσες φορές χρειαστεί. Μετά την εύρεση του γονοτύπου, διατηρούμε τα κύτταρα από ένα ομόζυγο μεταλλαγμένο p53^{-/-}, chop^{-/-}, και ένα ομόζυγο φυσιολογικό έμβρυο p53^{+/+}, chop^{+/+}. Όταν τα κύτταρα καλύψουν την επιφάνεια του πηγαδιού μεταφέρονται σε πηγάδι μικροπλάκας καλλιέργειας 6-θέσεων και στη συνέχεια σε φλάσκα

καλλιέργειας. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ινοβλάστες που χρησιμοποιούνται στις πειραματικές δοκιμασίες απαιτείται να είναι μικρής γενιάς (μικρός αριθμός διαδοχικών διαιρέσεων) γιατί όταν καλλιεργούνται για μακρό χρονικό διάστημα συσσωρεύουν μεταλλάξεις με αποτέλεσμα την εξαγωγή λανθασμένων συμπερασμάτων.

2.2.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα τα οποία καλλιεργούνται σε στερεό υπόστρωμα, αφήνονται να αναπτυχθούν μέχρι να καλύψουν το 70-80% της επιφάνειας του τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας, κατάσταση κατά την οποία η ανάπτυξή τους δεν επηρεάζεται από την έλλειψη χώρου. Σε πολλά είδη κυττάρων, όταν παρατηρείται έλλειψη χώρου, αναστέλλεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και τροποποιούνται οι μεταβολικές τους διαδικασίες με τρόπο και αποτελέσματα που δεν έχουν πλήρως διασαφηνιστεί (contact inhibition). Επομένως η ανακαλλιέργεια πρέπει να γίνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα, ανάλογα με το είδος της κυτταρικής σειράς, έτσι ώστε να διασφαλίζεται ο κατάλληλος αριθμός των κυττάρων για πειράματα, αλλά και η ομαλή τους ανάπτυξη. Η αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμά είναι δυνατή με μηχανικό τρόπο ή με ενζυμική δράση. Κατά την τελευταία περίπτωση συνήθως χρησιμοποιείται διάλυμα θρυψίνης, το οποίο διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων μεταξύ τους αλλά και με το στερεό τους υπόστρωμα. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων, λοιπόν, αποσκοπεί στη διατήρηση του απαραίτητου προς μελέτη βιολογικού υλικού.

2.2.3 Κυτταρική διέγερση με γλυκόζη.

Με σκοπό την απομόνωση πρωτεΐνης μετά από διέγερση απουσία ή παρουσία αυξανόμενης συγκεντρώσης γλυκόζης, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια HIT-T15 κυττάρων σε τριβλία 6 πηγαδιών με αρχική πυκνότητα 4×10^6 κυττάρων ανά πηγάδι για διάστημα 30', 60', 90', 6h, 12h, 24h, 48h ωρών. Ακολούθησε ξέπλυμα και επώσεις των κυττάρων με δισανθρακικό ρυθμιστικό διάλυμα Krebs-Ringer (Krebs-Ringer Phosphate Buffer, KRPB) για 30 λεπτά κάθε φορά στους 37°C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατικές επώσεις των ωρών που αναφέραμε πιο πάνω απουσία ή παρουσία γλυκόζης, υπό συνθήκες αυξανόμενων συγκεντρώσεων γλυκόζης μεταξύ

0.5 mM και 25 mM. Ακολούθησε περισυλλογή της πρωτεΐνης και ανοσοαποτύπωση των δεικτών του στρες του ΕΔ.

2.2.4 Κλωνογονική Δοκιμασία (Clonogenic Assay)

Η δοκιμασία κλωνογονικής επιβίωσης μετρά την τοξικότητα της θεραπείας επί κυττάρων σε ένα ευρύ φάσμα δόσεων. Ο τύπος του κυττάρου που μετράται εξαρτάται από τη δοκιμασία, όπως τα καρκινικά κύτταρα για την τοξικότητα ή φυσιολογικά κύτταρα για παρενέργειες. Η τιμή της αποτίμησης προσδιορίζει την ικανότητα των κυττάρων να αναπαράγονται και να σχηματίσουν κλώνους.

2.3 Απομόνωση πρωτεϊνών

2.3.1 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο Bradford

Αρχή της μεθόδου

Το αντιδραστήριο της Αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται για την εύκολη και με ακρίβεια ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών σε διάλυμα. Το αντιδραστήριο περιέχει χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινο διάλυμα όπου έχει μέγιστη απορρόφηση στα 450nm. Το χρώμα της ουσίας αυτής αλλάζει διαδοχικά μετά την προσθήκη διαδοχικών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 595nm.

Υλικά

- Αντιδραστήριο Bradford: Χρωστική G-250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (Quick Start Bradford Dye Reagent 1x, Biorad)
- Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (BSA) σε συγκέντρωση 1mg/ml

Περιγραφή μεθοδολογίας

Για να γίνει η ποσοτικοποίηση μιας πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα, αρχικά κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία δημιουργείται με το προσδιορισμό της BSA σε διάφορες συγκεντρώσεις. Έτσι για την καμπύλη βαθμονόμησης παρασκευάζονται διαλύματα του 1ml με 100ug/ml, 250ug/ml, 500ug/ml, 750ug/ml κι 1mg/ml BSA σε dH₂O. Σε 20ul των παραπάνω αραιώσεων προστίθενται από 980ul Biorad protein assay αραιωμένο 5 φορές με dH₂O και

μετράται η απορρόφηση των διαλυμάτων στα 595nm. Παράλληλα, ακολουθείται η ίδια διαδικασία και για το άγνωστο δείγμα. Από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία σχεδιάζεται με βάση την απορρόφηση των διαλυμάτων της BSA, υπολογίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος σε mg/ml.

2.4 Αποτύπωση Western (Western Blot)

2.4.1 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Αρχή της μεθόδου

Κατά την τεχνική αυτή η διαφορετική θέση μετανάστευσης της κάθε πρωτεΐνης από το σημείο εκκίνησης, με τελικό αποτέλεσμα το διαχωρισμό μίγματος πρωτεϊνών, οφείλεται κυρίως στο μοριακό μέγεθος της κάθε πρωτεΐνης. Οι περισσότερες πρωτεΐνες συνδέουν ένα σταθερό ποσό SDS στο κάθε αμινοξύ με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιούνται οι διαφορές ως προς το ηλεκτρικό φορτίο της κάθε πρωτεΐνης και να παραμένουν διαφορές μόνο ως προς τα μέγεθος τους. Έτσι το μοριακό μέγεθος είναι ο κύριος συντελεστής διαχωρισμού του μίγματος των πρωτεϊνών στην SDS-PAGE.

Υλικά

- Διάλυμα ακρυλαμίδιου-δισακρυλαμίδιου 30%w/v (Biorad)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού Tris-HCl 1,5M pH 8,8
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης Tris-HCl 0,5M pH 6,8
- N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθανο-1,2-διαμίνη (TEMED) (Sigma)
- Υπερθειϊκό αμμώνιο (AmmoniumPerSulfate-APS) 0,1g/ml
- Διάλυμα θειοδωδεκυλικού νατρίου (SDS) 10%w/v
- Αποδιατακτικό διάλυμα SDS 5x (150mM Tris, 6% SDS, 0.3% μπλε της βρωμοφαινόλης, 30% γλυκερόλη και 15% β-μερκαπτοαιθανόλη)
- Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas)
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης :
 - 25mM Tris
 - 192mM γλυκίνη
 - 1% SDS

Περιγραφή μεθοδολογίας

Η συσκευή και όλα τα εξαρτήματα που πρόκειται να έρθουν σε επαφή με το πήκτωμα πλένονται με απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια καθαρίζονται με 70% αιθανόλη. Κατασκευάζεται γυάλινη μήτρα με τις πλάκες για την τοποθέτηση των πηκτωμάτων. Η μια πλάκα τοποθετείται πάνω στην άλλη με τη βοήθεια πλαστικών ελασμάτων πάχους 1.5mm και έτσι δημιουργείται η μήτρα στην οποία θα τοποθετηθεί το διάλυμα του ακρυλαμιδίου. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού και τοποθετείται προσεκτικά στη γυάλινη μήτρα. Το διάλυμα των πηκτωμάτων απαερώνονται πριν την προσθήκη του APS και TEMED. Το πήκτωμα (**Πίνακας 1**) πολυμερίζεται για 30 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου.

Κατόπιν παρασκευάζεται το πήκτωμα επιστοιβαξης το οποίο προστίθεται πάνω Στο πήκτωμα διαχωρισμού και έχει ύψος περίπου 2cm. Αμέσως μετά τοποθετείται ειδική οδοντωτή κτένα με 10-12 εσοχές που θα σχηματίσουν τις θέσεις για την τοποθέτηση των δειγμάτων. Μετά το πολυμερισμό και του πηκτώματος συμπίεσης, με προσοχή, αφαιρείται η οδοντωτή κτένα έτσι ώστε να παραμείνουν οι θέσεις εναποθέτησης των δειγμάτων. Στη συνέχεια προσαρμόζονται οι γυάλινες πλάκες με το πήκτωμα στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθενται 500ml διαλύματος ηλεκτροδίων. Απομακρύνονται οι φυσαλίδες αέρα από την κάτω επιφάνεια του πηκτώματος διαχωρισμού. Όγκος δείγματος που περιέχει περί τα 50μg πρωτεΐνης αναμιγνύεται με ίσο όγκο διαλύματος δείγματος (1 x Sample Buffer) και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 90oC για 5 λεπτά για να αποδιαταχθούν τα μόρια πρωτεΐνης (σπάσουν οι δισουλφιδικοί δεσμοί). Κατόπιν τα δείγματα τοποθετούνται στα φρεάτια του πηκτώματος. Στην ακρινή θέση του πηκτώματος τοποθετούμε πρότυπο διάλυμα δεικτών μοριακού βάρους. Η συσκευή συνδέεται με πηγή συνεχούς ρεύματος σταθερής έντασης 120 volt. Τα δείγματα διατρέχουν κατακόρυφα το πήκτωμα και η ηλεκτροφόρηση τερματίζεται όταν η μπλε χρωστική των δειγμάτων φτάσει στο κάτω άκρο του πηκτώματος διαχωρισμού.

Πίνακας 1. Σύσταση των πηκτών διαχωρισμού και επιστοίβαξης

	Πηκτή διαχωρισμού 12%	Πηκτή επιστοίβαξης 5%
30% ακρυλαμιδίου- Δισακρυλαμιδίου	4 ml	0,83 ml
1,5M Tris pH 8,8	2,5ml	-
0,5M Tris pH 6,8	-	2,5ml
ddH ₂ O	3,3ml	1,57ml
10% SDS	100μl	50μl
TEMED	10μl	5μl
APS (0,1g/ml)	100μl	50μl

2.4.2 Ανοσοαποτύπωση

Αρχή της μεθόδου

Το 1979, ο Towbin και συνεργάτες περιέγραψαν μια μέθοδο μεταφοράς πρωτεϊνών από πήκτωμα ακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος. Μετά τον διαχωρισμό του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με SDS-PAGE, είναι δυνατό να ανιχνεύσουμε συγκεκριμένες πρωτεΐνες έναντι των οποίων έχουμε ειδικά αντισώματα.

Μια μέθοδος εμφάνισης είναι απαραίτητη για να μπορέσουμε να δούμε το σύμπλοκο πρωτεΐνης αντισώματος που ψάχνουμε. Η μέθοδος που ευρέως χρησιμοποιείται είναι η μέθοδος της χημειοφωταύγειας και είναι η χημική αντίδραση που λαμβάνει μέρος μεταξύ ενός ενζύμου (π.χ. HRP, AP) και ενός αντίστοιχου υποστρώματος, με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell της BIORAD και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες όπως περιγράφονται από τους κατασκευαστές.

Υλικά

- Πρωτογενή Αντισώματα:
antibodies GADD153 (F-168): sc-575 Santa Cruz (1:50), p53 Antibody (C-19): sc-1311 Santa Cruz (1:500), Santa Cruz, p21 (F-5) sc-6246 (1:200), Anti Actin, clone C4 MAB1501 Millipore (1:2000), Bip Antibody (# 3183) Cell Signaling (1:1000), GRP 94 Antibody (H-212): sc-11402 Santa Cruz (1:500), anti-insulin rabbit polyclonal H-86 (Santa Cruz Biotechnology, SC-9168), (1:500)
- Δευτερογενή αντισώματα :
goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005)
goat anti-rabbit IgG-HRP (sc-2030)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBST pH 7,5 :
20mM Tris (Sigma)
150mM NaCl
0,05% Tween-20
- Διάλυμα μεταφοράς :
25mM Tris (Sigma)
192mM γλυκίνη (Sigma)
20% μεθανόλη (Sigma)
- Διάλυμα γάλακτος (0% λιπαρά) 5% σε TBST ρυθμιστικό διάλυμα
- ECL Kit (Pierce): Χημειοφωταυγές υπόστρωμα για την υπεροξειδάση, με το οποίο εμποτίζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε αναλογία 125μl ανά 1cm² μεμβράνης. Παρασκευάζεται με την ανάμιξη ίσων όγκων (1ml) σταθερού διαλύματος υπεροξειδάσης και διαλύματος ενίσχυσης.
- Διαλύματα εμφάνισης (developer) και μονιμοποίησης (fixer) φωτογραφικού φιλμ (Sigma)
- Φωτογραφικό φιλμ (KODAK)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Μετά τον διαχωρισμό σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου των πρωτεϊνών, ετοιμάζουμε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς το οποίο και ψύχουμε μέχρι να το χρησιμοποιήσουμε. Στη συνέχεια κόβουμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης καθώς και 4

κομμάτια διηθητικού χάρτου Whattman No3 στις διαστάσεις του πηκτώματος και εξισορροπούμε με επώαση σε διάλυμα μεταφοράς για 15 λεπτά με ήπια ανακίνηση.

Κατόπιν στοιβάζουμε με τη σειρά (sandwich) τα ακόλουθα στην πλευρά της καθόδου της κασέτας μεταφοράς:

- Σπόγγο διαβρεγμένο με διάλυμα μεταφοράς
- 2 χαρτιά Whattman No3
- Πήκτωμα (gel)
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης
- 2 χαρτιά Whattman No3
- Σπόγγο διαβρεγμένο με διάλυμα μεταφοράς

Αφού αφαιρέσουμε τυχόν φυσαλίδες, κλείνουμε την κασέτα μεταφοράς και την τοποθετούμε μέσα στο ειδικό δοχείο με το διάλυμα που θα πραγματοποιηθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος. Στη συνέχεια τοποθετούμε τη συσκευή στους 4oC όπου και εφαρμόζουμε ρεύμα σταθερής έντασης 100 Volt (360mA) για 90 λεπτά. Μετά το πέρας της μεταφοράς βάζουμε το πήκτωμα και τη νιτροκυτταρίνη με ειδικά αντιδραστήρια-διαλύματα για να επιβεβαιώσουμε την επιτυχή μεταφορά.

Χρώση νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau-S για έλεγχο επιτυγχούς μεταφοράς πρωτεϊνών

Διάλυμα χρώσης (500ml):

- 475ml d. H₂O
- 0.5gr Ponceau-S dye

μέχρι το τελικό όγκο των 500ml.

Μετά την παρασκευή του το διάλυμα διηθείται και φυλάσσεται σε γυάλινο σκεύος σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα αποχρωματισμού:

- Χρησιμοποιείται διάλυμα φωσφορικών (PBS)

Σε γυάλινο δοχείο τοποθετούνται περίπου 100ml διαλύματος Ponceau-S και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ήπια ανακίνηση για 15 second σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν μαζεύουμε το διάλυμα και εφόσον εμφανιστούν πρωτεϊνικές

ζώνες-επάρματα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένουμε με διάλυμα αποχρωματισμού μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό της μεμβράνης. Η ένταση της χρώσης των ζωνών είναι ενδεικτικά ανάλογη με το ποσό της πρωτεΐνης που έχει αποτυπωθεί στη μεμβράνη. Οι μεμβράνες της νιτροκυτταρίνης μετά τον πλήρη αποχρωματισμό τους μπορούν να φυλαχτούν στους 4⁰C.

Ανίχνευση πρωτεϊνών με αντισώματα (Immunodetection)

Εφόσον η μεταφορά έχει επιτευχθεί σε ικανοποιητικό βαθμό, συνεχίζουμε με το στάδιο της ανοσοανίχνευσης με ειδικά αντισώματα. Καλύπτουμε τις μη ειδικές θέσεις δέσμησης του αντισώματος επωάζοντας με διάλυμα 5% αποβουτυρωμένου γάλατος σε TBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ξεπλένουμε δύο φορές με περίσσεια TBS-Tween20 0.1% για 10 λεπτά με ήπια ανάδευση.

Επωάζουμε με ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης στόχο στην επιθυμητή συγκέντρωση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια απομακρύνουμε την περίσσεια αντισώματος που δεν συνδέθηκε με την πρωτεΐνη στόχο πλένοντας όπως προηγουμένως. Επωάζουμε με 2ο αντίσωμα ειδικό έναντι του 1ου, συνδεδεμένο με ένζυμο HRP και επωάζουμε όπως και προηγουμένως. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο της πλύσης και ετοιμάζουμε τα αντιδραστήρια της χημειοφωταύγειας που θα μας βοηθήσουν να ανιχνεύσουμε την πρωτεΐνη μας. Χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο kit της ECL Pierce και ακολουθώντας τις οδηγίες της εταιρίας δουλεύουμε ως ακολούθως: Επωάζουμε τη νιτροκυτταρίνη για 1 λεπτό με τα εμφανιστικά διαλύματα χωρίς ανάδευση. Στεγνώνουμε την περίσσεια των διαλυμάτων ακουμπώντας τη νιτροκυτταρίνη σε απορροφητικό χαρτί και την τυλίγουμε σε διάφανη ζελατίνα και τοποθετείται σε κασέτα εμφάνισης. Εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ (ο χρόνος έκθεσης ποικίλλει ανάλογα με το πρωτογενές αντίσωμα) και ακολουθεί εμφάνιση του φιλμ με επώαση πρώτα στο διάλυμα εμφάνισης και έπειτα στο διάλυμα μονιμοποίησης και τέλος έκπλυση με απιονισμένο νερό. Για την ημι-ποσοτική ανάλυση του σήματος από τα δείγματα που επεξεργάστηκαν, τα φιλμ σαρώνονται και κατόπιν αναλύονται με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Image J).

2.5.1 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα

Υλικά

- Αντιδραστήριο Trizol (Invitrogen)
- Χλωροφόρμιο (Merck)
- Ισοπροπανόλη (Merck)
- Αιθανόλη 75%
- Νερό επεξεργασμένο με DEPC (Diethyl-Pyrocabonate)

Περιγραφή μεθοδολογίας

1. Ομογενοποίηση

Για τη λύση των κυττάρων προστίθεται 1ml Trizol ανά 10cm² επιφάνειας καλλιέργειας κυττάρων απευθείας στο τριβλίο με τα κύτταρα. Μετά από επαναλαμβανόμενες αναδεύσεις με την πιπέτα, το διάλυμα μεταφέρεται σε φιαλίδιο τύπου erpendorf.

2. Διαχωρισμός φάσης

Προσθήκη 0,2ml χλωροφορμίου ανά 1ml Trizol. Ακολουθεί έντονη ανακίνηση για 15-30 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά. Προκειμένου να γίνει ο διαχωρισμός των φάσεων τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 14000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Το RNA παραμένει στην ανώτερη υδατική φάση.

3. Καταβύθιση του RNA

Η υδατική φάση μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάκι και προσθέτονται 0,5ml ισοπροπανόλης, ακολουθεί ισχυρή ανάδευση, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C.

4. Έκπλυση του RNA

Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης απομακρύνεται και το ίζημα που μένει περιέχει το RNA. Ακολουθεί πλύση με 1ml 75% αιθανόλη, ανακίνηση ώστε να αποκολληθεί το ίζημα από τον πάτο του σωληναρίου και φυγοκέντρηση στα 10000rpm για 5 λεπτά στους 4°C.

5. Διαλυτοποίηση του RNA

Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου με ανοιχτό καπάκι για 5-10 λεπτά και στη συνέχεια αναδιαλύεται σε 30μl νερού επεξεργασμένου με DEPC.

2.5.2 RT-PCR (Reverse Transcription PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρησιμοποίηση ειδικών εναρκτήριων αλληλουχιών για το γονίδιο του οποίου θέλουμε να μελετήσουμε την έκφραση, ώστε από το mRNA του να δημιουργηθεί το συμπληρωματικό του DNA (cDNA) με τη βοήθεια κατάλληλων ενζύμων. Το τμήμα του δίκλωνου DNA που δημιουργείται ενισχύεται στην συνέχεια με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και αναλύεται κατάλληλα. Χρησιμοποιήθηκε το ολοκληρωμένο σύστημα αντιδραστηρίων (kit) OneStep RT-PCR της εταιρίας QIAGEN.

Υλικά

- Διάλυμα τυχαίων εκκινητών σε συγκέντρωση 300ng/μl
- Δείγματα ολικού RNA με συγκέντρωση 0,4ng/μl έως 1000ng/μl
- Μείγμα dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) με συγκέντρωση 2,5mM στο καθένα
- Ρυθμιστικό διάλυμα 5X
- Αναστολέας ριβονουκλεάσης (RNase inhibitor) με συγκέντρωση 40U/μl
- Αντίστροφη μεταγραφάση AMV με συγκέντρωση 200U/μl

Περιγραφή μεθοδολογίας

Χρησιμοποίηση 250 ng ολικού RNA για την πραγματοποίηση κάθε αντίδρασης RT-PCR. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε τελικό όγκο 25 μl.

- Ανάμιξη σε σωληνάριο κατάλληλο για την πραγματοποίηση αντιδράσεων PCR, των αντιδραστηρίων με τη σειρά και τις ποσότητες που αναγράφονται στον **πίνακα 2**. Οι εναρκτήριες αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον **πίνακα 2**.
- Μεταφορά των σωληναρίων σε μηχανήμα εκτέλεσης αντιδράσεων PCR (PCR cycler).
- Επώαση των δειγμάτων στους 500 °C για 30 min προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφή και η παραγωγή μονόκλωνου cDNA.
- Επώαση των δειγμάτων στους 950C για 15 min προκειμένου να πραγματοποιηθεί να απενεργοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφάση, να ενεργοποιηθεί η HotStarTaq Dna πολυμεράση και να αποδιαταχθεί το cDNA με τη μήτρα του.
- Ακολουθεί η σύνθεση της δεύτερης αλυσίδας cDNA και η επέκτασή του. Τα δείγματα επωάζονται στους 940C για 1 min προκειμένου να πραγματοποιηθεί η

αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται σε κατάλληλη θερμοκρασία για 30 sec προκειμένου να πραγματοποιηθεί η επανασύνδεση των εναρκτηρίων αλληλουχιών με το συμπληρωματικό τμήμα του cDNA. Τέλος, τα δείγματα επωάζονται στους 720C για 1 min προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός και η επιμήκυνση των εναρκτηρίων αλληλουχιών. Οι συνθήκες των αντιδράσεων που χρησιμοποιήθηκαν για το p21 και την GAPDH φαίνονται στον **πίνακα 2**.

- Επώαση των δειγμάτων στους 720C για 10 min προκειμένου να πραγματοποιηθεί η τελική επιμήκυνση τυχόν ημιτελών τμημάτων.

Πίνακας 2. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων RT-PCR.		
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Rnase free H ₂ O μέχρι τελικού όγκου 25 μl	X μl	
Ρυθμιστικό διάλυμα 5X	5 μl	1X
Διάλυμα νουκλεοτιδίων (10 mM)	1 μl	400 μM
Νοσηματική εναρκτήρια αλληλουχία	25 pmol	0,6 μM
Αντινοσηματική εναρκτήρια αλληλουχία	25 pmol	0,6 μM
Enzyme mix	1 μl	0,1 u/μl
250 ng RNA	Y μl	
Τελικός όγκος	25 μl	

2.5.3 ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA, καθώς και για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA εισάγοντας παράλληλα σε αυτό θέσεις για πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού, προκειμένου να κλωνοποιηθεί σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση μιας θερμοάντοχης DNA πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο, για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Προκειμένου να δράσει η πολυμεράση, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάζονται κατάλληλα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, (εκκινητές), τα οποία και καθορίζουν τα άκρα της ακολουθίας που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε.

Υλικά

- Εκκινητές (primers), αρχικής συγκέντρωσης 5μM (Sigma)
- Taq DNA πολυμεράση (GoTaq® Flexi DNA polymerase) σε συγκέντρωση 5U/μl, μη ανασυνδιασμένη, τροποποιημένη μορφή της Taq DNA πολυμεράσης η οποία δεν έχει 5' → 3' εξονουκλεοτιδική δραστηριότητα (Promega)
- 25mM MgCl₂ (Promega)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 5X Green GoTaq® Flexi Buffer 5X (Promega)
- dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) σε αρχική συγκέντρωση 2mM (Promega)

Η τεχνική της PCR γίνεται σε τρία στάδια:

Στάδιο 1ο: Αποδιάταξη

Το δίκλωνο μόριο του DNA αποδιάτασσεται με θέρμανση σε 90oC-95oC. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργούνται δυο μονόκλωνες αλυσίδες και το τμήμα που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί για τα επόμενα στάδια. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, σταματούν όλες οι ενζυμικές δραστηριότητες, όπως για παράδειγμα, η επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας.

Στάδιο 2ο :Υβριδισμός

Η θερμοκρασία στο στάδιο αυτό μειώνεται στους 50-75°C και τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, (εκκινητές), υβριδίζονται με το εκμαγείο συμπληρωματικά, με δεσμούς υδρογόνου. Η επιλογή της θερμοκρασίας υβριδισμού είναι πολύ σημαντική και εξαρτάται από τη σύσταση καθώς και από το μήκος των εκκινητών. Αν η επιλεγμένη θερμοκρασία δεν είναι η σωστή, είναι δυνατό να μην παραχθούν προϊόντα ή να παραχθούν παραπροϊόντα.

Στάδιο 3ο: Πολυμερισμός

Στο στάδιο αυτό η DNA πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την μονόκλωνη αλυσίδα και αναγνωρίζοντας την ελεύθερη –OH ομάδα, συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα, προσθέτοντας νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του εκκινητή. Η σύνθεση του DNA συνεχίζεται έως ότου οι δυο νεοσυντιθέμενες αλυσίδες επιμηκυνθούν τόσο ώστε να περιέχουν περισσότερα νουκλεοτίδια από το επιθυμητό τμήμα του DNA. Η διάρκεια του πολυμερισμού εξαρτάται από το μήκος της πολλαπλασιαζόμενης ακολουθίας. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι θερμοάντοχη, ώστε να είναι λειτουργική στις υψηλές θερμοκρασίες των προηγούμενων σταδίων. Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 20-30 φορές και παράγονται 2n μόρια DNA, όπου n είναι ο αριθμός των διεξαγόμενων κύκλων. Στο τέλος των κύκλων, το μίγμα της αντίδρασης παραμένει στους 72° C για 5 min, ώστε να συνεχιστεί ο πολυμερισμός (Innis et al., 1990). Τα συστατικά του μίγματος της αντίδρασης φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Σύσταση μίγματος PCR	
ddH ₂ O	10,6μl
MgCl ₂ (25mM)	1,2μl
Buffer (5x)	4μl
dNTPs (2mM)	2μl
Primers (5μM)	1μl
Taq polymerase (5U/μl)	0,2μl
DNA	1μl
Σύνολο	20μl

Τα αντιδραστήρια αναδεύονται με τη βοήθεια μικροπιπέτας για να εξασφαλίσουμε την ομοιόμορφη κατανομή του ενζύμου ενώ όλη η διαδικασία διεξάγεται σε θερμοκρασία 40C (πάγος) για να αποφύγουμε πρόωμη έναρξη της αντίδρασης. Τα υλικά διατηρούνται στους -20oC. Οι συνθήκες της αντίδρασης (θερμοκρασία και διάρκεια κάθε σταδίου καθώς και ο αριθμός των κυκλικών επαναλήψεων) διαφοροποιούνται ανάλογα με την νουκλεοτιδική αλληλουχία που ενισχύεται, όπως απεικονίζεται στους Πίνακες 4&5.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4	chop	p53	p21
Αποδιάταξη των αλυσίδων του υποστρώματος DNA	95°C / 30sec	95°C / 30sec	95°C / 30sec
Υβριδισμός των εκκινητών	54°C / 30sec	58°C / 30sec	60°C / 30sec
Επιμήκυνση των εκκινητών και αντιγραφή του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί	72°C / 30sec	72°C / 60sec	72°C / 70sec
Μέγεθος προϊόντος	79bp	470bp(p53 ^{+/+}) 600bp(p53 ^{-/-})	490bp
Αριθμός κυκλικών επαναλήψεων	30	33	35

ΠΙΝΑΚΑΣ 5	hactin	hp21
Αποδιάταξη των αλυσίδων του υποστρώματος DNA	95 °C / 30sec	95 °C / 30sec
Υβριδισμός των εκκινητών	59 °C / 30sec	57 °C / 30sec
Επιμήκυνση των εκκινητών και αντιγραφή του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί	72 °C / 30sec	72 °C / 50sec
Μέγεθος προϊόντος	223bp	361bp
Αριθμός κυκλικών επαναλήψεων	28	32

2.5.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Αρχή της μεθοδολογίας

Τα προϊόντα της τεχνικής PCR διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Η επιλογή της συγκέντρωσης της αγαρόζης καθορίζεται από το μέγεθος των τμημάτων DNA που θα διαχωριστούν και συγκεκριμένα, η συγκέντρωσή της είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού βάρους των τμημάτων DNA.

Υλικά

- Αγαρόζη (Invitrogen)
- Διάλυμα TBE 10X (Tris, βορικό οξύ και δινάτριο EDTA) pH 8
- 10 mg/ml διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma)
- Διάλυμα φόρτωσης (loading buffer, Promega)
- Δείκτης μοριακών βαρών του DNA (DNA ladder, Promega): 100bp ή 1kb

Περιγραφή μεθοδολογίας

Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης συγκέντρωσης 2% διαλύονται 2g αγαρόζης σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X TBE και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι τη θερμοκρασία βρασμού ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται για λίγο σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml. Το διάλυμα τοποθετείται στο εκμαγείο της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφού τοποθετηθούν τα ειδικά χτενάκια που δημιουργούν τις θέσεις προσθήκης του δείγματος, αφήνεται να πήξει σε χαμηλή θερμοκρασία. Φορτώνονται τα δείγματα του DNA (προϊόντα PCR, πλασμιδιακό ή γενωμικό DNA) μαζί με διάλυμα φόρτωσης αν χρειάζεται. Παράλληλα με τα δείγματα DNA φορτώνεται και δείκτης μοριακών βαρών. Στη συνέχεια η συσκευή συνδέεται με τροφοδοτικό ηλεκτρικού ρεύματος. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι θερμοκρασία δωματίου, 100 Volts, 30 mA, 30 λεπτά. Οι ζώνες του DNA είναι ορατές χάρη στο βρωμιούχο αιθίδιο που παρεμβalλόμενο ανάμεσα στους κλώνους του DNA γίνεται ορατό με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ *IN VITRO* ΚΑΙ *IN VIVO*.

2.6.1 *IN VITRO*

2.6.1.1. Έλεγχος δέσμευσης πυρηνικών πρωτεϊνών σε τμήματα DNA που αντιστοιχούν σε θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP)

Για κάθε υπό μελέτη περίπτωση καλλιεργούμε σε 1-3 (20cm) πιάτα, 2.5×10^6 κύτταρα σε 25ml DMEM με 10%FBS και μεγαλώνουμε έως ότου τα κύτταρα καλύψουν το 60% της επιφάνειας κάθε πιάτου. Μονιμοποιούμε τα κύτταρα προσθέτοντας 1/10 του όγκου διάλυμα φορμαλδεΐδης 10% [φτιάχνεται διαλύοντας φορμαλδεΐδη 37% (σε τελική συγκέντρωση 10%) σε διάλυμα 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 50mM HEPES pH 8.0] απευθείας στο θρεπτικό υλικό. Κουνάμε τα πιάτα για να γίνει το διάλυμα ομογενές και επωάζουμε για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σταματάμε την αντίδραση προσθέτοντας γλυκίνη σε τελική συγκέντρωση 0.125M. Ανακατεύουμε καλά και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Σ' αυτό το βήμα το θρεπτικό αλλάζει χρώμα προς το κίτρινο λόγω της μεταβολής του pH του διαλύματος. Πλένουμε τα κύτταρα τρεις φορές με κρύο PBS και μετά τα ξύνουμε και τα φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά. Επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 5-10 ml διάλυμα λύσης (0.25% Triton X-100, 0.5% NP-40, 10mM EDTA, 0.5mM EGTA, 10mM Tris pH 8.0, 1mM PMSF) και επωάζουμε στον πάγο για 10 λεπτά ανακατεύοντας το διάλυμα κατά διαστήματα. Πελετάρουμε τους πυρήνες και τους επαναδιαλύουμε σε 5-10ml 0.2M NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 10mM Tris pH 8.0, 1mM PMSF. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και πελετάρουμε τους πυρήνες. Επαναδιαλύουμε σε 2-4ml 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 10mM Tris pH 8.0, 1mM PMSF. Δρούμε με υπερήχους στο διάλυμα με επαναλήψεις συνολικής διάρκειας 250-300 δευτερόλεπτα. Στα ενδιάμεσα διαστήματα παγώνουμε καλά τα δείγματα. Ελέγχουμε τα δείγματα τρέχοντας 20μl από κάθε δείγμα σε 1.3 % πήκτωμα αγαρόζης. Η καλώς σπασμένη χρωματίνη οφείλει να δώσει ένα εκτεταμένο smear από DNA. Το μέσο μέγεθος χρωματίνης οφείλει να είναι 400-600bp. Απομακρύνουμε τις κυτταρικές μεμβράνες φυγοκεντρώντας σε υψηλές στροφές για 10 λεπτά. Προσθέτουμε στα δείγματα sarcosyl σε τελική συγκέντρωση 0.5% και επωάζουμε αναδεύοντας σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Προσθέτουμε CsCl ~0.568gr/ml και το επαναδιαλύουμε ζεσταίνοντας στους 37°C. Τοποθετούμε σε ανοικτό SW55 ρότορα, πλαστικά δοχεία (Beckman 1.2'' x 2'',

#326819) και φυγοκεντρούμε στις 40.000 στροφές για 36-48 ώρες. Μετά την υπερφυγοκέντρωση στο δοχείο παρατηρείται ένα λευκό δαχτυλίδι από μεμβράνες. Τα συμπλέγματα DNA-πρωτεΐνης πρέπει να τοποθετούνται κάτω από το δαχτυλίδι. Αφαιρούμε σταδιακά μικρά τμήματα της υδατικής φάσης και τα κρατάμε χωριστά. Επιβεβαιώνουμε την ύπαρξη συμπλόκων DNA-πρωτεΐνης σε κάθε μέρος που αφαιρέθηκε τρέχοντας 30μl σε 1% πήκτωμα αγαρόζης. Ελέγχουμε για φθορισμό λόγω της ύπαρξης DNA. Ενώνουμε τα μέρη του διαλύματος που φέρουν τα σύμπλοκα και επιδρούμε με διαπίδυση για 16 ώρες εναντίον διαλύματος 10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 5% γλυκερόλη. Χρησιμοποιούμε 1Lt διαλύματος διαπίδυσης με μία ενδιάμεση αλλαγή. Μετά τη διαπίδυση φωτομετρούμε τα δείγματα στα 260nm και σε 2M NaCl. Πραγματοποιούμε ανοσοκατακρήμιση στα 500μl χρησιμοποιώντας 20μg χρωματίνης σε διάλυμα RIPA (1% Triton X-100, 0.1% DOC, 140mM NaCl, 1mM PMSF) και 10μg από το αντίσωμα που μας ενδιαφέρει. Επωάζουμε για 16 ώρες στο ψυγείο αναδεύοντας. Κατά τη διάρκεια του προηγούμενου βήματος επωάζουμε κολώνα Protein A ή G για 16 ώρες στο ψυγείο με 100μg/ml DNA από σπέρμα σολομού, και σε διάλυμα RIPA. Μετά ενώνουμε την κολώνα Protein A/G με την ανοσοκατακρημισμένη χρωματίνη (χρωματίνη + αντίσωμα /RIPA) και επωάζουμε με ανάδευση στο ψυγείο για 3 ώρες. Πλένουμε 7 φορές την κολώνα με την ανοσοκατακρημισμένη χρωματίνη με διάλυμα RIPA που περιέχει 500mM NaCl αντί για 140mM και 100μg/ml tRNA από ζύμη. Μετά τα πλυσίματα επαναδιαλύουμε την κολώνα σε 100μl διάλυμα TE (10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA) με 0.5% SDS και proteinase K 200μg/ml τελική συγκέντρωση. Επωάζουμε στους 55°C για τρεις ώρες και 16 ώρες στους 65°C. Καθαρίζουμε τα δείγματα με φαινόλη και χλωροφόρμιο και κατακρημνίζουμε με αιθανόλη και 20μg γλυκογόνο για κάθε δείγμα. Επαναδιαλύουμε τις πελέτες σε 50μl διάλυμα TE pH 7.5. Για ανάλυση χρησιμοποιούμε 5μl από κάθε ανοσοκατακρημισμένη χρωματίνη ενώ χρησιμοποιούμε και αντίστοιχη ποσότητα από DNA χρωματίνης που δεν έχει υποστεί ανοσοκατακρήμιση για σύγκριση. Ακολουθεί ανάλυση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και τρέξιμο σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων.

Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές για τον υποκινητή του γονιδίου, για την κωδική περιοχή και την 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου.

Primer	Sequence	Product length
p21 prom_chop binding site_ forward	5'- TACGGGCTATGTGGGGAGTA -	206

1	3'	
p21 prom_chop binding site_ reverse 1	3'-GGAAGGAGGGAATTGGAGAG -5'	
p21 prom_CHOP binding site_ forward 2	5'- CTGCAACCACAGGGATTCT - 3'	271
p21 prom_CHOP binding site_ reverse 2	3'- AGAAGCACCTGGAGCACCTA - 5'	
p21 prom_p53 binding site_ forward	5'- CCCACAGCAGAGGAGAAAGA 3'	227
p21 prom_p53 binding site_ reverse	3'-TCTGTGCCTGAAACATTTGC -5	

2.6.2 IN VIVO

2.6.2.1 Αντίδραση συγκόλλησης μορίων DNA - Ligation

Αρχή της μεθόδου

Τμήματα DNA με προεξέχοντα ή με τυφλά άκρα μετά από τη δράση περιοριστικών ενδονουκλεασών ενώνονται με τη χρήση ειδικού ενζύμου ανάλογα την περίπτωση.

A. Με χρήση της μεγάλης υπομονάδας Klenow της πολυμεράσης I του DNA της E.coli. Το ένζυμο είναι ικανό παρουσία δεοξυ-νουκλεοτιδίων να «γεμίζει» 5' υπολειπόμενα άκρα που αφήνουν οι περιοριστικές πέψεις των περισσότερων ενζύμων. Επίσης εκμεταλλευόμενοι την 3'→5' εξωνουκλεολυτική δράση του ίδιου ενζύμου μπορούμε να «φάμε» 3' υπολειπόμενα άκρα, παραλείποντας τη χρήση δεοξυνουκλεοτιδίων απ'την αντίδραση.

B. Στις αντιδράσεις συγκόλλησης (ligation) δύο μορίων DNA με προεξέχοντα άκρα χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο λιγάση του βακτηριοφάγου T4.

Υλικά

- T4 DNA Ligase (New England Biolabs)
- DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (New England Biolabs)
- T4 DNA Ligase Reaction Buffer (New England Biolabs)
- NEBuffer 2 (New England Biolabs)
- dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) σε αρχική συγκέντρωση 1mM (Invitrogen)

Περιγραφή μεθοδολογίας

A. Η αντίδραση πραγματοποιείται στο ρυθμιστικό διάλυμα NEBuffer 2 (New England Biolabs), παρουσία 0,1mM μίγματος δεόξυ-νουκλεοτιδίων (dNTPs) ,

και 150u/ml ενζύμου. Το μίγμα της αντίδρασης επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολουθεί θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 70 °C.

B. Για την αντίδραση συγκόλλησης προσθέτονται τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα σε φιαλίδιο τύπου erpendorf 1,5ml (Πίνακας 7) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Πίνακας 7. Σύσταση μίγματος ligation

Μίγμα ligation	
ddH ₂ O	μέχρι τα 10μl
T4 DNA Ligase Buffer(10X)	1μl
Vector DNA (3 kb)*	50 ng
Insert DNA (1 kb)*	50 ng
T4 DNA Ligase	1μl
Σύνολο	10μl

Ο χρόνος επώασης της αντίδρασης δοκιμάστηκε σε διάφορες συνθήκες:

- i) 8 ώρες στους 16°C,
- ii) 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου,
- iii) 16 ώρες στους 4 °C.

*Υποδηλώνεται ότι χρησιμοποιείται αναλογία 3:1.

Ως αρνητικοί μάρτυρες πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις όπου περιείχαν μόνο το Vector DNA είτε μόνο Insert DNA και διατηρώντας τις εκάστοτε συνθήκες και τα αντιδραστήρια ίδια.

Τέλος έγινε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.20 και τα βακτήρια επιστρώθηκαν σε προθερμασμένο τρυβλίο με στέρεο θρεπτικό υλικό Luria-Bertani medium (LB) Agar με την προσθήκη αμπικιλίνης τελικής συγκέντρωσης 100μg/ml και επώαση στους 37°C για 16 ώρες.

2.6.2.2 Μετασχηματισμός στελέχους *E. coli* με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (transformation)

Ο έλεγχος *in vivo* της δραστηρότητας γίνεται με διαμόλυνση κυττάρων με πλασμίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο luciferase κάτω από τον έλεγχο θέσεων δέσμευσης του υπό μελέτη μεταγραφικού παράγοντα. Το πλασμίδιο παραλαμβάνεται έτοιμο από το εμπόριο και αναπαράγεται με μετασχηματισμό.

Αρχή Μεθόδου:

Τα περισσότερα είδη βακτηρίων έχουν την ιδιότητα να προσλαμβάνουν και να ενσωματώνουν DNA μόρια από το θρεπτικό υλικό στο οποίο καλλιεργούνται. Τις περισσότερες των περιπτώσεων όμως το «ξένο» DNA αποδομείται κατά την ενσωμάτωσή του στο βακτηριδιακό γονιδίωμα. Σε άλλες περιπτώσεις όμως και υπό κατάλληλες συνθήκες μπορεί να ενσωματωθεί επιτυχώς, ιδιαίτερα όταν το DNA είναι πλασμιδιακό. Όλα τα βακτήρια δεν έχουν την ίδια ικανότητα μετασχηματισμού τους για την πρόσληψη πλασμιδιακού DNA και ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμά τους. Το 1972 (Cohen *et al.*, 1972) παρατήρησε ότι τα ιόντα Ca^{+2} σε διαλύματα όπως $CaCl_2$, έχουν την ιδιότητα να αλλάζουν την ικανότητα των *E. coli* κυττάρων να προσλαμβάνουν πλασμιδιακό DNA. Ο λόγος για τον οποίο το ρυθμιστικό διάλυμα άλατος ($CaCl_2$) επιτυγχάνει την αποτελεσματικότερη ενσωμάτωση του πλασμιδιακού DNA στα βακτηριακά κύτταρα δεν είναι μέχρι σήμερα πλήρως κατανοητός. Φαίνεται ότι προκαλεί την κατακρήμνιση του DNA το οποίο συσσωρεύεται στην εξωτερική επιφάνεια της βακτηριακής μεμβράνης. Επιπλέον μπορεί να αλλάζει την διαπερατότητα της μεμβράνης του βακτηρίου και έτσι το πλασμιδιακό DNA να εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Η πλήρης ενσωμάτωσή του φαίνεται ότι επιτυγχάνεται με την προσωρινή αλλαγή της θερμοκρασίας ανάπτυξης του βακτηρίου από τους $37^{\circ}C$ στους $42^{\circ}C$. Για την παραλαβή μεγάλων ποσοτήτων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* των στελεχών DH5α (competent cells) τα οποία παραλλάβαμε έτοιμα από το εμπόριο. Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε ως εξής:

□ Σε παγόλουτρο, αποψύχουμε ένα φιαλίδιο επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* (1 φιαλίδιο : ~20μl competent cells).

- Προσθέτουμε 10-50ng DNA (ανασυνδυνασμένο πλασμίδιο).
- Αναμιγνύουμε καλά με βοήθεια πιπέτας Gilson 20μl.
- Επωάζουμε στον πάγο για 30 λεπτά.
- Μεταφέρουμε για 2 λεπτά σε θερμοκρασία 42oC.
- Μεταφέρουμε για 2 λεπτά στον πάγο.
- Επωάζουμε για 1-2 ώρες στους 37oC με προσθήκη 1 ml θρεπτικού υλικού LBroth (1% τρυπτόνη, 0.5% εκχύλισμα ζύμης, 1% NaCl).
- Φυγοκεντρούμε στις 1.200 x g για 5 λεπτά και επαναιώρηση του ιζήματος μετασχηματισμένων κυττάρων και καλλιέργειά τους σε τρυβλίο με L-broth και 1.5% άγαρ παρουσία αμπικιλίνης.
- Επωάζουμε για ~16 ώρες στους 37oC.

2.6.2.3 Καλλιέργεια/ Πολλαπλασιασμός των μετασχηματισμένων κυττάρων

Από το τρυβλίο απομονώνονται 1-2 αποικίες και εμβολιάζονται αρχικά σε 5ml LB θρεπτικού υλικού παρουσία αμπικιλίνης (100μg/ml), αντιβιοτικού το οποίο αποτελεί τη βάση επιλογής του βακτηρίου που φέρει το πλασμιδιακό DNA. Ακολουθεί επώαση για 8 ώρες στους 37 °C σε ανακινούμενο επωαστήρα. Στη συνέχεια 1ml από την 8-ωρη καλλιέργεια εμβολιάζεται σε 250 ml L-broth πάλι παρουσία αμπικιλίνης και ακολουθεί επώαση στους 37 °C σε ανακινούμενο επωαστήρα.

2.6.2.4 Ανασυνδυνασμένο Πλασμιδιακό DNA-Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με στήλες καθαρισμού

Η απομόνωση των ανασυνδυνασμένων πλασμιδίων από την καλλιέργεια των *E. coli* επιδεκτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε με NucleoBond Plasmid DNA Purification kit της εταιρίας Macherey-Nagel (MN). Η μέθοδος χρησιμοποιεί κατάλληλο αλκαλικό λυτικό διάλυμα με SDS για τη λύση των κυττάρων και ειδικές στήλες με ρητίνη ιοντοανταλλαγής για την παραλλαγή του πλασμιδιακού DNA. Η σύνθεση του λυτικού διαλύματος επιτυγχάνει την αποδιάταξη τόσο του χρωμοσωμικού όσο και του πλασμιδιακού DNA. Ο διαχωρισμός των δύο ειδών του DNA επιτυγχάνεται με την προσθήκη Potassium acetate στις στήλες καθαρισμού, το οποίο προάγει την κατακρήμνιση του χρωμοσωμικού DNA και των κυτταρικών

θραυσμάτων από τις στήλες ιοντοανταλλαγής. Επιπλέον εξουδετερώνει το αλκαλικό περιβάλλον του λυτικού διαλύματος και έτσι το πλασμιδιακό DNA το οποίο δεν κατακρημνίζεται αλλά συγκρατείται από τη ρητίνη της στήλης παίρνει την αρχική υπερελικωμένη (supercoiled) δομή του. Στη συνέχεια το πλασμιδιακό μόριο DNA εκλύεται καθαρό και ελεύθερο προσμίξεων από τη στήλη με διαδοχικές πλύσεις με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η μέθοδος έχει εφαρμογή για την απομόνωση πλασμιδίων με μέγεθος 3-10kb.

2.6.2.5. Έλεγχος προϊόντων καθαρισμού πλασμιδίων

Ο ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων πιστοποιήθηκε μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού ειδικά για τα συγκεκριμένα πλασμίδια. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και ελέγχθηκε ο αριθμός και το μέγεθος των DNA θραυσμάτων με αντιστοίχιση με ειδικούς μοριακούς δείκτες DNA στο πήκτωμα της αγαρόζης (Ready Load™ 100bp DNA Ladder, Gibco BRL).

2.6.2.6. Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας λουσιφεράσης.

Αρχή της μεθόδου

Ο έλεγχος της έκφρασης από τα κύτταρα των υπό μελέτη πλασμιδίων, έγινε με το kit της Promega “Luciferase Reporter Gene Assay”. Η μέθοδος βασίζεται στη ιδιότητα της λουσιφεράσης να καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση της λουσιφερίνης παρουσία ATP. Αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης είναι η εκπομπή φωτός σε μήκος κύματος 562nm.

Υλικά

Luciferase Assay System 100 assays (Promega)

- 1 vial Luciferase Assay Substrate (lyophilized)
- 10ml Luciferase Assay Buffer
- 30ml Luciferase Cell Culture Lysis Reagent, 5X

Περιγραφή της μεθόδου

Έτσι, αφού απομονώσουμε από τα κύτταρα που διαμολύνουμε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, σε σωληνάρια τύπου erpendorf προστίθεται το υπόστρωμα της λουσιφεράσης, η λουσιφερίνη. Εφόσον στα δείγματά μας υπάρχει λουσιφεράση που έχει εκφραστεί από τα κύτταρα που διαμολύνουμε, αυτή θα αντιδράσει με το υπόστρωμά της και θα παραχθεί φως στα 562nm. Στη συνέχεια, με τη χρήση ειδικού λουμινόμετρου (Turner Desighns DT20/20) ανιχνεύουμε αυτή την εκπομπή του φωτός της αντίδρασης. Η έκφραση του γονιδίου είναι ανάλογη της ενεργότητας της λουσιφεράσης και κατα επέκταση ανάλογη της εκπομπής φωτός στα 562nm. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης για κάθε δείγμα ανάγεται ανα mg ολικού ποσού πρωτεΐνης που υπολογίζεται με βάση πρότυπη καμπύλη δειγμάτων αναφοράς (standards). Οι μονάδες μέτρησης της ενεργότητας είναι οι σχετικές μονάδες φωτός (RLU: Relative Light Units).

2.7 Ιστολογική επεξεργασία

2.7.1 Χρώση του παγκρεατικού ιστού με Αιματοξυλίνη/Ηωσίνη (H&E)

Αρχή της μεθόδου

Τμήμα του παγκρέατος λήφθηκε από την φορμόλη και σταθεροποιήθηκε με παραφίνη για περαιτέρω ιστολογικές αναλύσεις. Τα δείγματα του παγκρεατικού ιστού επεξεργάστηκαν με χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (H&E) προκειμένου να αξιολογηθεί η μικροσκοπική μορφολογία τους. Η μέθοδος χρώσης των ιστών με Αιματοξυλίνη/ηωσίνη χρησιμοποιείται ευρέως στην ιστολογία και στις ιατρικές διαγνώσεις όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις βιοψίας όπου υπάρχει υποψία καρκίνου. Με την μέθοδο αυτή μπορεί να ελεγχθεί η μορφολογία των κυττάρων ή των ιστών με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου και να δοθεί μια γενική εκτίμηση της εικόνας του ιστού. Η αιματοξυλίνη προσδένεται σε νουκλεϊκά οξέα και με αυτό τον τρόπο μπορεί να χρωματίζει τους πυρήνες και τα ριβοσώματα των κυττάρων με μπλε χρώμα. Αντίθετα, η ηωσίνη προσδένεται στις πρωτεΐνες και χρωματίζει το κυτταρόπλασμα με ροζ χρώμα και τα ερυθροκύτταρα με έντονο κόκκινο.

Υλικά

□ Ξυλόλη (Xyleen, 4055.9005 J.T. Baker)

- Κατιούσα βαθμίδωση αλκοολών (96%, 80%, 70%)
- Αιματοξυλίνη (Papanicolaou's solution 1a Harris' hematoxylin solution, Merck HX121778)
- 1% οξινισμένη αλκοόλη (50ml 70% αιθανόλη + 1ml HCl)
- Διάλυμα λιθίου (1.54g lithium carbonate + 100ml ddH₂O)
- Ηωσίνη (Eosin Y 1% Alcoholic, Biostain Code: RRSP37-E)
- Ανιούσα βαθμίδωση αλκοολών (70%, 80%, 96%, 100%)
- Διηθητικό χαρτί

Πειραματική πορεία

Αρχικά, οι τομές των ηπάτων αφέθηκαν στον κλίβανο στους 60ο για 20 λεπτά και στη συνέχεια μέσα στον κλίβανο εμβαπτίστηκαν τρεις φορές για 5 λεπτά σε ξυλόλη. Έπειτα, ενυδατώθηκαν σε κατιούσα βαθμίδωση αλκοολών (96%, 80%, 70%) κάνοντας 7 εμβυθίσεις για 2 λεπτά σε καθεμία και ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης. Ακολούθως, οι τομές εμβαπτίστηκαν σε αιματοξυλίνη (χρώση των πυρήνων) για 15 δευτερόλεπτα και ακολούθησε πλύση με νερό βρύσης για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, η περίσσεια της αιματοξυλίνης απομακρύνθηκε με μια γρήγορη εμβάπτιση σε οξινισμένη αλκοόλη και η αιματοξυλίνη σταθεροποιήθηκε στον ιστό με 4 εμβυθίσεις σε διάλυμα λιθίου από 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό. Έπειτα, οι τομές ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης, έγιναν 60 εμβυθίσεις σε διάλυμα ηωσίνης (χρώση κυτταροπλάσματος) και ξεπλύθηκαν και πάλι με νερό βρύσης. Ακολούθησε αφυδάτωση των τομών στην ανιούσα βαθμίδωση αλκοολών (70%, 80%, 96%, 100%) με 10 εμβυθίσεις στην καθεμία και στεγνώθηκαν γρήγορα σε διηθητικό χαρτί. Τέλος, οι τομές εμβαπτίστηκαν τρεις φορές για 5 λεπτά σε κρύα ξυλόλη και επικολλήθηκαν οι καλυπτρίδες.

2.7.2 Ανοσοϊστοχημεία

Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ειδική αναγνώριση της επιθυμητής πρωτεΐνης από πολυκλωνικό αντίσωμα σε ιστοτεμάχια. Το πρώτο αντίσωμα αναγνωρίζεται ειδικά από δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με την HRP και με την προσθήκη του υποστρώματος διαμινο-βενζιδίνη (3,3'-Diaminobenzidine,

DAB) και το σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος είναι δυνατή η τοπολογική αναγνώριση της πρωτεΐνης στόχου στον ιστό.

Υλικά

- Ξυλόλη
- Αιθανόλη 100% (v/v), 96% (v/v), 70% (v/v)
- Διάλυμα PBS 1X: NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ x 7H₂O ή x 2H₂O 8mM
- Διάλυμα 5% BSA σε PBS
- anti-insulin rabbit polyclonal H-86 (Santa Cruz Biotechnology, SC-9168)
- SuperPicTure™ Polymer Detection Kit (Invitrogen) (δεύτερο αντίσωμα, συζευγμένο με HRP και τα υλικά για ανάπτυξη του χρωμογόνου)
- Μέσο στερέωσης

Περιγραφή μεθοδολογίας

1η μέρα

1. Αποπαραφινοποίηση-Ενυδάτωση:

Αρχικά τοποθετούμε τις αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές στους 60 0C για 30' έτσι ώστε να λιώσει η παραφίνη. Στη συνέχεια, οι πλάκες εμβαπτίζονται στα παρακάτω διαλύματα για συγκεκριμένο κάθε φορά χρόνο:

ΕΥΛΟΛΗ 1:	10' → αποπαραφίνωση
ΕΥΛΟΛΗ 2:	10' → αποπαραφίνωση
ΑΛΚΟΟΛΗ 100% 1:5'	→ ενυδάτωση
ΑΛΚΟΟΛΗ 100% 2:5'	→ ενυδάτωση
ΑΛΚΟΟΛΗ 95%: 5'	→ ενυδάτωση
ΑΛΚΟΟΛΗ 70%: 5'	→ ενυδάτωση
ΑΛΚΟΟΛΗ 50%: 5'	→ ενυδάτωση
d H ₂ O:	5' → ενυδάτωση
PBS:	15' → προετοιμασία για Blocking

2. Δέσμευση των μη ειδικών θέσεων:

Στη συνέχεια οι τομές επωάζονται σε διάλυμα ορού στο οποίο έχει παραχθεί το δευτερογενές αντίσωμα, για 30'. Αυτό γίνεται για να καλυφθούν όλες οι μη ειδικές θέσεις που θα μπορούσαν να αναγνωριστούν ως επίτοποι από το πρωτογενές αντίσωμα (στην πραγματικότητα καλύπτονται τόσο οι ειδικές όσο και οι μη ειδικές θέσεις αλλά στη συνέχεια το πρωτογενές αντίσωμα ανταγωνίζεται ισχυρά τα συστατικά του ορού και προσδένεται στις ειδικές θέσεις). Το διάλυμα του ορού

περιέχει 5% BSA (Bovine Serum Albumin). Ακολούθως απομακρύνουμε το διάλυμα του ορού από τις τομές. Ακολουθεί πλύση σε PBS για 15 λεπτά.

3. Πρώτο αντίσωμα:

Επιάζουμε τις τομές με το πρωτογενές πολυκλωνικό αντίσωμα anti-insulin διαλυμένο σε PBS. Η επώαση γίνεται στους 4 °C O/N. Το ανοσοϊστοχημικό control μένει O/N στους 4 °C με το Blocking Normal Serum. Ακολουθεί πλύση με PBS για 15 λεπτά.

2η μέρα

4. Δεύτερο αντίσωμα:

Προσθήκη του δεύτερου αντισώματος, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά. Ακολουθεί πλύση με PBS για 15 λεπτά.

5. Προσθήκη υποστρώματος:

Έκθεση του ιστού στο διάλυμα του DAB χρωμογόνου για 5 λεπτά. Πλύση με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.

6. Συμπληρωματική χρώση:

Χρώση με αιματοξυλίνη για περίπου 1 λεπτό ώστε να χρωματιστούν οι πυρήνες των κυττάρων με μπλε-μωβ χρώμα. Πλύση με απεσταγμένο νερό για 3 λεπτά.

7. Αφυδάτωση του ιστού:

Διαδοχικές πλύσεις με: αιθανόλη 70% (v/v), 96% (v/v), 100% (v/v) και ξυλόλη 2 φορές, καθεμία διάρκειας 5 λεπτών.

8. Μονιμοποίηση:

Προσθήκη μέσου στερέωσης και εφαρμογή της καλυπτρίδας, προκειμένου να παρατηρηθεί ο ιστός στο μικροσκόπιο.

2.8 Δοκιμασίες μέτρησης ρυθμού πολλαπλασιασμού κυττάρων

2.8.1 Δοκιμασία με χρήση χρωστικής Trypan Blue

Αρχή της μεθόδου

Η δοκιμασία αποκλεισμού κυττάρων μέσω χρώσης αποτελεί μια απλή και ταχεία μέθοδο προσδιορισμού της βιωσιμότητας κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα. Βασίζεται στην αρχή ότι τα ζωντανά κύτταρα διαθέτουν ακέραιη κυτταρική μεμβράνη η οποία αποκλείει την είσοδο συγκεκριμένων χρωστικών όπως η Trypan Blue (Κυανούν του Τρυπανίου), ενώ τα νεκρά κύτταρα επιτρέπουν την είσοδο της χρωστικής. Επομένως σύμφωνα με τη δοκιμασία αυτή, ένα ζωντανό κύτταρο θα έχει διαυγές κυτταρόπλασμα ενώ ένα νεκρό θα έχει μπλε κυτταρόπλασμα.

Υλικά

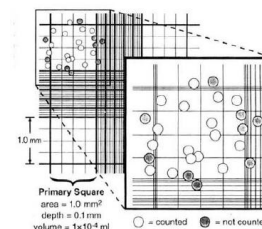
- Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (Gibco)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)
- Antibiotic/Antimycotic (100X) (Gibco)
- PBS 1X (Gibco)
- Trypsin-EDTA (Gibco)
- Trypan Blue (Gibco)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Τα κύτταρα αφού αποκολληθούν από μικροπλάκα καλλιέργειας 12-θέσεων χρησιμοποιώντας διάλυμα θρυψίνης, αραιώνονται με θρεπτικό υλικό, μεταφέρονται σε σωλήνες τύπου erpendorf όγκου 1,5ml και φυγοκεντρώνονται στις 1500rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 100μl θρεπτικού. Από το κυτταρικό εναιώρημα λαμβάνονται 10μl και αναμιγνύονται με 10μl διαλύματος Trypan Blue και τοποθετούνται σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer όπου μετρούνται τα ζωντανά κύτταρα στο μικροσκόπιο.

Μέτρηση κυττάρων σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Κάθε μια από αυτές έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2.5 μm, που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του εάν τα κύτταρα θα θεωρηθούν



ότι βρίσκονται μέσα ή έξω από πλέγμα. Επίσης κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0.1mm χαμηλότερα από δύο ράχες» στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια.

2.8.2 Δοκιμασία MTT

Αρχή της μεθόδου

Η δοκιμή MTT είναι μια μέθοδος μέτρησης της βιωσιμότητας των κυττάρων και χρησιμοποιείται είτε για έλεγχο του πολλαπλασιασμού είτε για δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας. Το MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-υλο)-2,5 διφαινυλο βρωμιούχο tetrazolium] είναι μια ουσία που διασπάται από όλα τα ζωντανά και μεταβολικά ενεργά μιτοχόνδρια των κυττάρων για να παραγάγει ένα σκούρο μπλε προϊόν φορμαζάνης, του οποίου η ένταση είναι ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων που είναι παρόντα στην καλλιέργεια

Υλικά

- Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (Gibco)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)
- Antibiotic/Antimycotic (100X) (Gibco)
- PBS 1X (Gibco)
- Διάλυμα εργασίας
 - 250ml DMEM phenol red free (Gibco)
 - 1ml NaHCO₃ 7,5% w/v
 - 2,5ml NEA (Gibco)
 - 2,5ml HEPES 1M (Gibco)
 - 2,5mg L-γλουταμίνη (Sigma)

- 5 mg/ml Thiazolyl blue C₁₈H₁₆N₅SBr (MTT) (Sigma)
- Ισοπροπανόλη (Merck)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Τα κύτταρα επιστρώνονται σε πηγάδια μικροπλάκας καλλιέργειας 96-θέσεων, με αρχική πυκνότητα 5000 κύτταρα/πηγάδι σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Μετά από 8 ώρες το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και προστίθεται θρεπτικό υλικό χωρίς ορό FBS και τα κύτταρα επώάζονται για 16 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, προστίθεται ο ορός ποντικών και στα δείγματα μάρτυρες προστίθεται FBS. 48 ώρες αργότερα, το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνεται, ακολουθεί πλύση των κυττάρων με PBS και προσθήκη 100μl διαλύματος MTT (παρασκευάζεται με προσθήκη 0,05g αντιδραστηρίου MTT σε 8ml διαλύματος εργασίας και 2ml PBS). Μετά την επώαση 3 ωρών στους 37°C, απομακρύνεται το υπερκείμενο των κυττάρων, διαλυτοποιούνται οι κρύσταλλοι φορμαζάνης με 100μl ισοπροπανόλης και μετράται η οπτική πυκνότητα (απορρόφηση) σε μήκος κύματος δοκιμής 550nm (OD_{550nm}) και μήκος κύματος αναφοράς 690nm (OD_{690nm}) με φωτόμετρο Hitachi U-2000.

2.9 Διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA ή siRNA

Αρχή της μεθόδου

Η διαμόλυνση κυττάρων με λιποσώματα είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή γενετικού υλικού σε ένα κύτταρο. Τα λιποσώματα είναι συνθετικά ανάλογα της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας της κυτταρικής μεμβράνης, τα οποία μπορούν να συντηχθούν με αυτήν απελευθερώνοντας το γενετικό υλικό στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα συστατικά αυτά περιέχουν ένα μέρος των φυσικών χαρακτηριστικών των φωσφολιπιδίων που περιλαμβάνουν την παρουσία υδρόφοβων και υδρόφιλων περιοχών σε κάθε μόριο οι οποίες επιτρέπουν τον σχηματισμό σφαιρικών λιποσωμάτων σε υδατικές συνθήκες. Παρουσία DNA ή RNA, τα λιποσώματα είναι ικανά να αλληλεπιδρούν με τα νουκλεϊκά οξέα και να τα εγκλείουν δημιουργώντας έτσι ένα αποτελεσματικό σύστημα μεταφοράς. Το φορτίο, η σύσταση και η δομή των λιποσωμάτων, καθορίζει την συγγένεια του δημιουργούμενου συμπλόκου με την κυτταρική μεμβράνη. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, το λιποσωματικό σύμπλοκο είναι ικανό να αλληλεπιδρά με την κυτταρική μεμβράνη, η

οποία επιτρέπει την πρόσληψη του μέσω ενδοκυττάρωσης και την επακόλουθη απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα.

Υλικά

- Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen)
- siRNA p21 (Santa Cruz)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (Gibco)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)
- Antibiotic/Antimycotic (100X) (Gibco)
- PBS 1X (Gibco)

Περιγραφή μεθοδολογίας

Τα κύτταρα επιστρώνονται σε πηγάδια μικροπλάκας καλλιέργειας 6-θέσεων σε κατάλληλο αριθμό ώστε την επόμενη μέρα να καλύπτουν περίπου το 90% της επιφάνειας του πηγαδιού. 24 ώρες αργότερα, το θρεπτικό τους υλικό απομακρύνεται και αφού γίνει πλύση με PBS προστίθεται σε αυτά θρεπτικό με FBS αλλά χωρίς αντιβιοτικό. Στη συνέχεια αναμιγνύονται το πλασμιδιακό DNA/siRNA με κατάλληλη συγκέντρωση Lipofectamine, όπως προτείνεται από το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, σε θρεπτικό DMEM χωρίς την προσθήκη ορού και αντιβιοτικού. Το μείγμα αφού επωαστεί για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προστίθεται στα κύτταρα. 24 ώρες αργότερα το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και προστίθεται νέο πλήρες θρεπτικό. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα συλλέγονται για απομόνωση πρωτεϊνών ή RNA.

2.9.1 Αποσιώπηση του γονιδίου του αναστολέα p21 με τη χρήση της τεχνολογίας παρεμβολής

Περιγραφή της μεθόδου

Η καταστολή της p21 σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού MEFs επιτεύχθηκε με μικρό παρεμποδίζων ριβονουκλεινικό οξύ (siRNA) με αλληλουχία. CCUAAAUUAGUAGGACGGUtt (5' 3') (Ambion, Texas USA), το οποίο εισήλθε στο εσωτερικό των κυττάρων με φορείς κατιονικά λιποσώματα (Lipofectamin 2000, Invitrogen CA USA). Μια μέρα πριν την διαμόλυνση, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε

τρυβλία 6 θέσεων με 2ml θρεπτικού υλικού δίχως αντιβιοτικά ώστε να είναι 40% κορεσμένα κατά την ημέρα της διαμόλυνσης. Την ημέρα του πειράματος, 5 ή 15nM siRNA διαλυτοποιήθηκαν σε 0.25ml θρεπτικού υλικού Optimem-1 (Invitrogen CA USA) δίχως ορό και 5μl Lipofectamin 2000 σε ίδια ποσότητα υλικού Optimem-1. Μετά από επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, αναμείχθηκαν το Lipofectamin και το siRNA, συνεπώασθησαν για 30 λεπτά και τοποθετήθηκαν στα κύτταρα. Μετά από διάστημα 48 ωρών ελέγχθηκε ο βαθμός καταστολής της έκφρασης της p21 στον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο (σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού MEFs) με την διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

2.10 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα, εκτελεσμένα εις τριπλούν. Η στατιστική επεξεργασία των *in vitro* αποτελεσμάτωνπραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Student's t-test. Οι συγκρίσεις (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα) έγιναν μεταξύ της κάθε πειραματικής ομάδας και το αντίστοιχου μάρτυρα. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

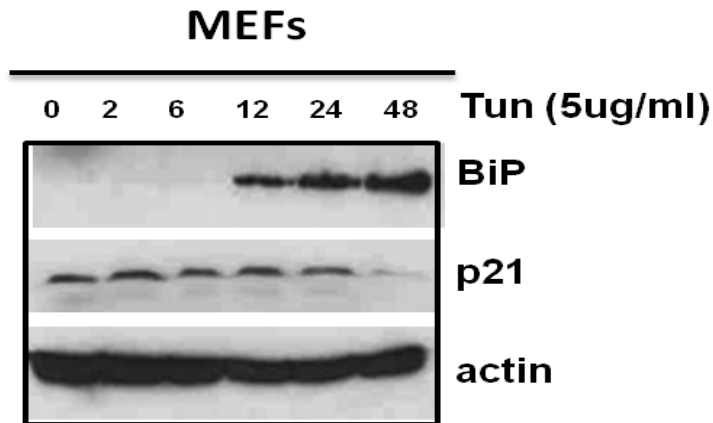
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μελέτη του τρόπου ρύθμισης των επιπέδων της p21 από το στρες του ΕΔ

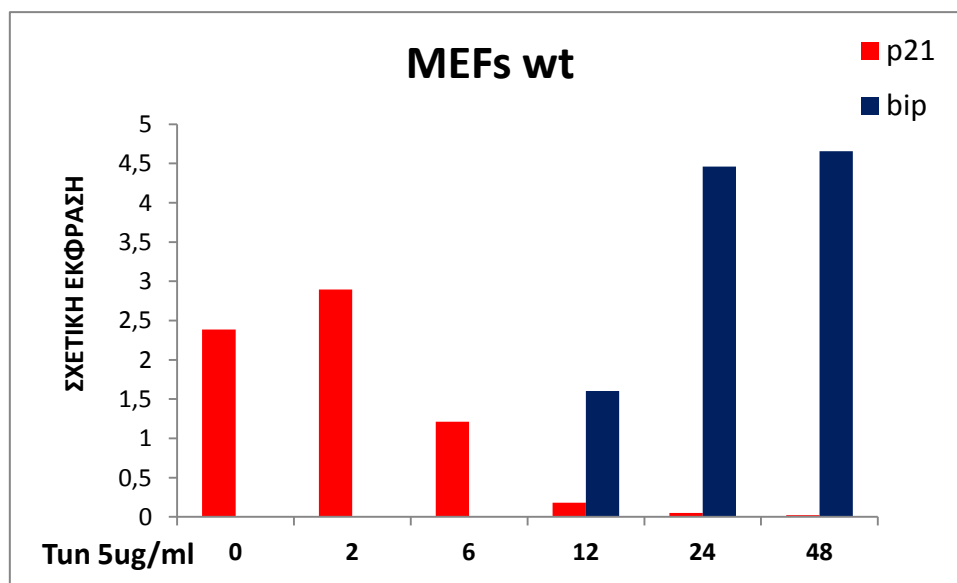
3.1.1 Μελέτη του τρόπου ρύθμισης των επιπέδων της p21 από το στρες του ΕΔ *in vitro*

Στην παρούσα διατριβή, αρχικά ελέγχθηκε εάν και κατά πόσο το στρες του ΕΔ ρυθμίζει την έκφραση της p21. Για το σκοπό αυτό, εμβρυικοί ινοβλάστες μυών αγρίου τύπου (MEFs wt) εκτέθηκαν σε τουνικαμυκίνη που είχε συγκέντρωση 5μg/ml. Πρόκειται για φάρμακο αναστολέα της γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται ευρέως για τη φαρμακολογική πρόκληση στρες στο ΕΔ (Fang, Mkrtchian *et al.*, 1997). Για να παρατηρηθεί κατά πόσο η παρατεταμένη επίδραση της τουνικαμυκίνης μπορεί να επηρεάσει την έκφραση της p21, χορηγήθηκε στα κύτταρα τουνικαμυκίνη για 24 ώρες. Έπειτα, κύτταρα ινοβλαστών αγρίου τύπου καλλιεργήθηκαν, λύθηκαν, απομονώθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά οι πρωτεΐνες τους. Στη συνέχεια τα πρωτεϊνικά δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 12% και κατόπιν μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ώστε να ακολουθηθεί η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης (βλέπε § 2.4). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διαδικασία αυτή έδειξαν ότι μειώνεται η έκφραση της p21 υπό την επίδραση της τουνικαμυκίνης στο επιλεγμένο χρονικό διάστημα των 24 ωρών (**Σχήμα 13^Α**).

A.



B.



Σχήμα 13 Α. Επαγωγή της BiP από την TUN όπως ανιχνεύτηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ινοβλάστες MEFs. **Β.** Η έκφραση της p21 και της BiP υπολογίζεται ως πυκνότητα της ζώνης της p21 που κανονικοποιείται με την πυκνότητα της ζώνης της ακτίνης.

Κατόπιν υπολογίστηκε ο λόγος της έκφρασης της p21 /έκφραση της ακτίνης. Η ακτίνη επιλέχθηκε ως μέσο κανονικοποίησης των ποσοτήτων της υπο εξέτασης πρωτεΐνης στα δείγματα, γιατί αποτελεί μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, που χρησιμοποιείται ευρέως ως εσωτερικός δείκτης ελέγχου. Στο **Σχήμα 13^Β**, φαίνονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις πειραματικές τιμές. Επισημαίνεται ότι η

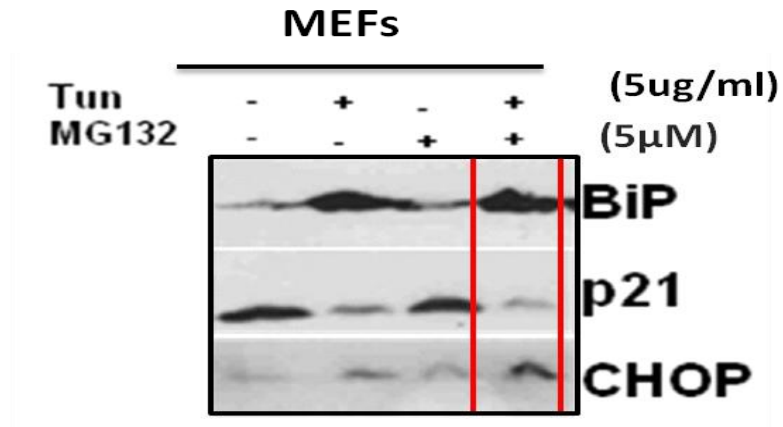
επαγωγή της BiP υποδηλώνει ότι τα κύτταρα υπέστησαν στρες του ΕΔ. Κάτι τέτοιο προτείνει ότι τόσο οι στρεσογόνες συνθήκες στο ΕΔ όσο και η δραστηριότητα της UPR αναστέλλουν ιδιαίτερα την έκφραση της p21. Με βάση αυτά τα στοιχεία, υποδηλώνεται ότι στα κύτταρα που υπέστησαν στρες στο ΕΔ, υπάρχει εμφανής μείωση της έκφρασης της p21.

3.1.2. Η μείωση της έκφρασης της p21, ανεξάρτητη από την αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος

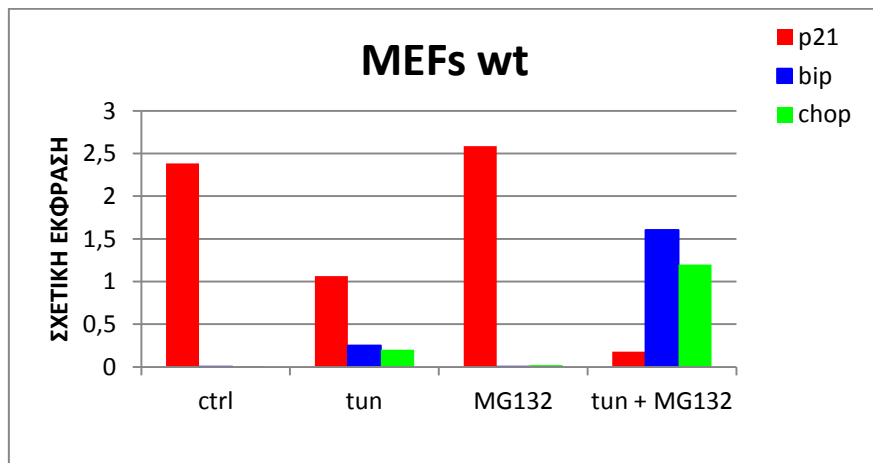
Με στόχο να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος της p21, εξετάστηκε αν η καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής, προκύπτει από την αποικοδόμησή της μέσω του πρωτεασώματος. Είναι κοινός τόπος ότι το πρωτεάσωμα αποτελείται από πρωτεάσες, που αποδομούν τις πρωτεΐνες σε βραχέα πεπτίδια (Murata S *et al.*, 2009). Έχοντας αυτό ως δεδομένο, επιδράσαμε σε εμβρυικούς ινοβλάστες μυών αγρίου τύπου, με τον αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 σε συγκέντρωση 5μΜ. Το πεπτιδίο MG132 επιλέχθηκε γιατί αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς αναστολείς με ευρεία εργαστηριακή χρήση. Στο *Σχήμα 14^A*, η έκφραση της p21 δεν μεταβάλλεται υπό την επίδραση του πεπτιδίου MG132 (5μΜ) για το χρονικό διάστημα των 24 ωρών, αποτέλεσμα που επιβεβαιώνεται και από την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων που δείχνει ότι τα επίπεδα της p21 παραμένουν αυξημένα υπό την επίδραση αυτού του αναστολέα του πρωτεασώματος (*Σχήμα 14^B*).

Στη συνέχεια, ακολούθησε μελέτη των επιπέδων της p21, με ταυτόχρονη έκθεση των ιδίων κυττάρων σε τουνικαμυκίνη και σε MG132. Η πειραματική διαδικασία έδειξε μείωση των επιπέδων έκφρασης της p21, αποτελέσματα που βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με την υπόθεση μας, ότι το στρες του ΕΔ καταστέλλει την έκφραση της p21, καθώς η διαφορική ρύθμιση των επιπέδων αυτής είναι ανεξάρτητη του πρωτεασώματος.

A.



B.



Σχήμα 14Α. Επαγωγή της BiP, του CHOP και μείωση της p21 από τη TUN όπως ανιχνεύτηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ινοβλάστες MEFs αγρίου τύπου. **B.** Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων αυτών (κανονικοποίηση μέσω επιπέδων ακτίνης, actin) φαίνεται στο κάτω τμήμα του σχήματος.

3.1.3 Ρύθμιση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21 από το προ-αποπτωτικό γονίδιο CHOP, κατά το στρες του ΕΔ.

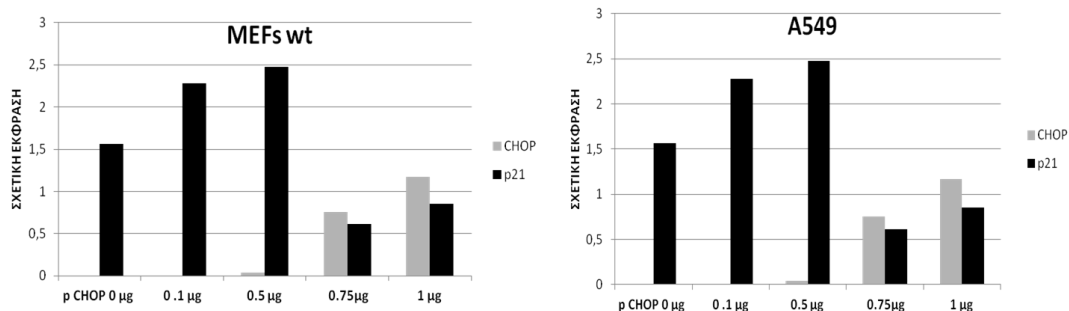
Προκειμένου να εξεταστεί εάν η καταστολή της έκφρασης της p21 επάγει το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, εξετάσαμε το επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης CHOP/GADD153 που αποτελεί δείκτη αυτού. Αναλυτικότερα επισημαίνεται ότι, η πρωτεΐνη CHOP/GADD153 αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμμετέχουν στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, με χαρακτηριστικές λειτουργίες όπως επαγωγή της απόπτωσης αλλά και την διακοπή της ανάπτυξης.

Επιπλέον, η πρωτεΐνη CHOP/GADD153 είναι γνωστή στη βιβλιογραφία, και σαν γονίδιο 153 που επάγει την καταστροφή του DNA (growth arrest and DNA damage-inducible gene 153, GADD153) (Oyadomari *et al.*, 2004). Προκειμένου να προσδιοριστεί αν εμπλέκεται η πρωτεΐνη CHOP στη ρύθμιση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων με φορέα έκφρασης που περιέχει το cDNA του CHOP σε διαδοχικές συγκεντρώσεις 100ng, 500ng 750ng και 1000ng αντίστοιχα. Κατόπιν αυτού, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων υποβλήθηκαν σε ανοσοαποτύπωση για την ανίχνευση των p21, CHOP/GADD153 και της ακτίνης όπως φαίνεται στο **Σχήμα 15^A**. Έπειτα, υπολογίστηκε ο λόγος της έκφρασης της p21/έκφραση της ακτίνης, και της έκφρασης του CHOP/έκφραση της ακτίνης έτσι ώστε να γίνει η κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών ποσοτήτων (**Σχήμα 15^B**). Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού οδηγούν στην υπόθεση ότι τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης CHOP προκαλούν εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της p21.

A.



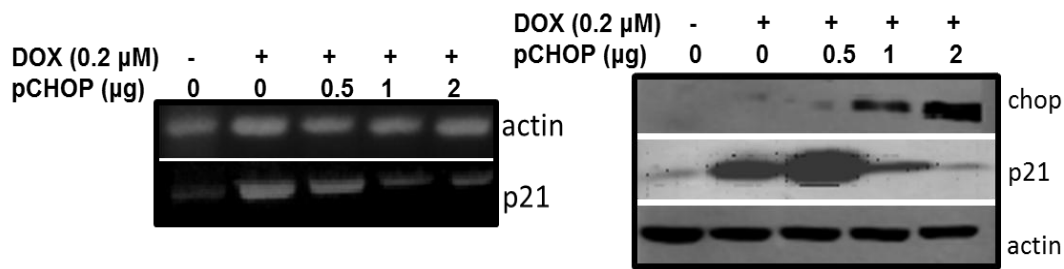
B.



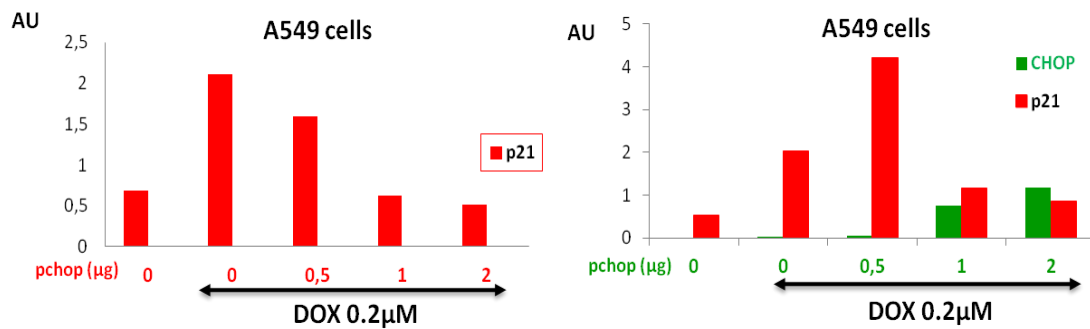
Σχήμα 15. Α. Ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western της έκφρασης των πρωτεϊνών p21 και CHOP μετά από διαμόλυνση των κυττάρων MEFs αγρίου τύπου και των κυττάρων A549 με CHOP-rcDNA3 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, όπως αναγράφεται στο πάνω μέρος του σχήματος. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. **Β.** Η ποσοτικοποίηση των ζωνών φαίνεται στο κάτω τμήμα του σχήματος.

Συνοψίζοντας, τα μέχρι τώρα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι φαρμακολογική επαγωγή του στρες του ΕΔ με τουνικαμυκίνη, προκαλεί καταστολή των επιπέδων της p21 και ταυτόχρονη επαγωγή της CHOP. Ενισχύοντας την παραπάνω πεποίθηση επισημαίνεται ότι, παρατήρηθηκε αντίστοιχη καταστολή της p21 και έπειτα από εξωγενή έκφραση του CHOP. Δεδομένου ότι η έκφραση της p21 απουσία γενοτοξικού στρες είναι μόνο οριακά ανιχνεύσιμη, τα κύτταρα A549 (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα,) εκτέθηκαν στο χημειοθεραπευτικό φάρμακο *αδριαμυκίνη* (*doxorubicin, DOX*) σε συγκέντρωση 0,2 μM το οποίο διεγείρει την έκφραση της p21 μέσω p53-εξαρτώμενου μηχανισμού. Το *Doxorubicin* προσδένεται απευθείας στο DNA μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ζευγαριών βάσεων στην έλικα του DNA. Το *Doxorubicin* αναστέλλει επίσης την επιδιόρθωση του DNA με το να καταστέλλει την τοποϊσομεράση II. Η δράσεις του αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την καταστολή της σύνθεσης DNA και RNA και το κομμάτιασμα του DNA. Όπως φαίνεται στο σχήμα 16, η ημιποσοτική ανάλυση μέσω RT-PCR (βλέπε § 2.5) στα κύτταρα A549, που βρίσκονταν υπό την επίδραση του φαρμάκου *αδριαμυκίνη* και με ταυτόχρονη διαμόλυνση των κυττάρων με CHOP-rcDNA3.1 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, προτείνει ότι η μείωση στα επίπεδα του mRNA της p21 από το CHOP, οφείλεται στην ισχυρή ενεργοποίηση της έκφρασης της p21 που συμβαίνει από το *DOX* (μέσω ενός p53 εξαρτώμενου τρόπου) και αντικαθίσταται από το CHOP.

A.



B.



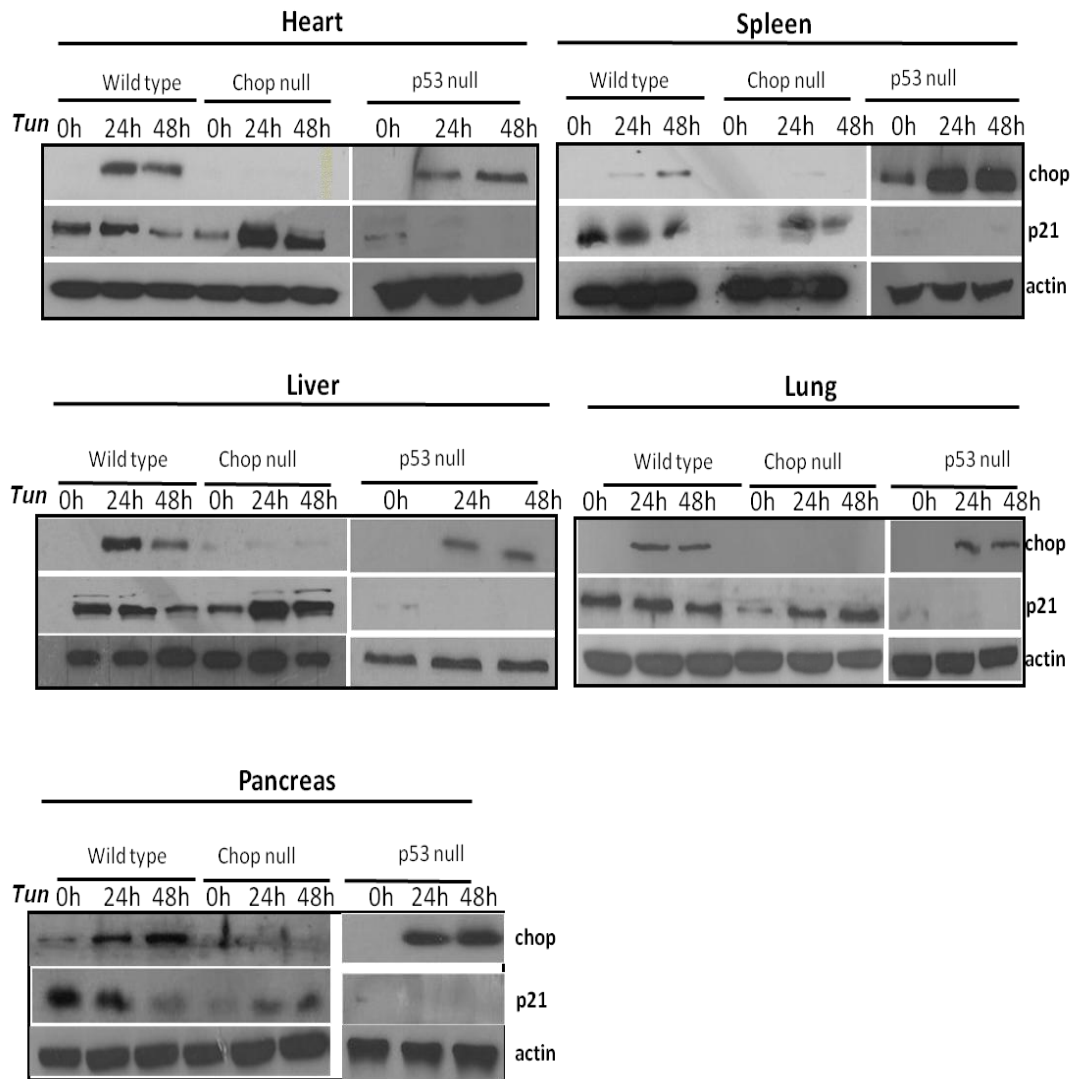
Σχήμα 16 Α. Ρύθμιση της έκφρασης της p21 από το στρες του ΕΔ. Ημιοσοτική ανάλυση μέσω RT-PCR μετά από επίδραση DOX σε κύτταρα A549 (αριστερά). Το cDNA που ανακτήθηκε από τα A549 ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών στους 25 κύκλους. Τα προϊόντα της PCR διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης με EtBr. Η ανοσοαποτύπωση Western (δεξιά τμήμα) της εκφράσεως της p21 σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα, A549 μετά από διαμόλυνση των κυττάρων A549 με CHOP-*pcDNA3.1* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, όπως αναγράφεται στο πάνω μέρος του σχήματος. Επαγωγή της p21 έγινε μετά από χορήγηση του φαρμάκου αδριαμυκίνη (doxorubicin, DOX). Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας **B.** Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων αυτών (κανονικοποίηση μέσω επιπέδων ακτίνης, actin) φαίνεται στο κάτω τμήμα του σχήματος.

3.1.4 Μελέτη του τρόπου ρύθμισης των επιπέδων της p21 από το στρες του ΕΔ *in vivo*

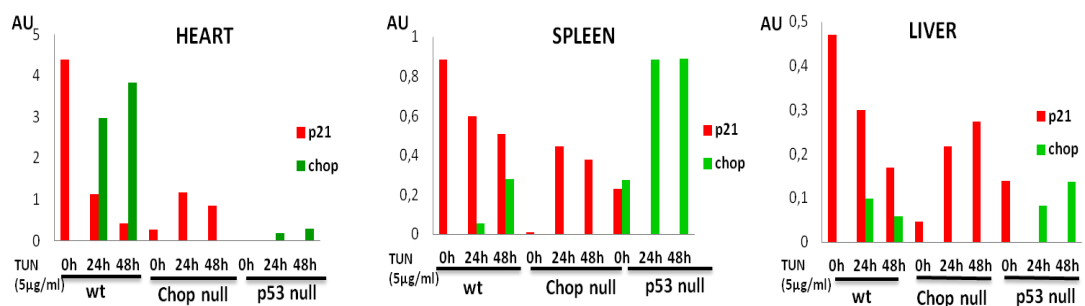
Ακολούθως, εξετάστηκε *in vivo* η πιθανότητα ρύθμισης της p21 από την τουνικαμυκίνη. Αποδείχθηκε, ότι η επίδραση TUN σε ιστούς όπως σπλήνα, ήπαρ, καρδιά πνεύμονες και πάγκρεας προκάλεσε ιδιαίτερη μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα της p21 (Σχήμα 17^A). Οι συγκεκριμένοι ιστοί υπέστησαν στρες στο ΕΔ, όπως προκύπτει από την επαγωγή της BiP, προτείνοντας ότι το στρες σε αυτό το

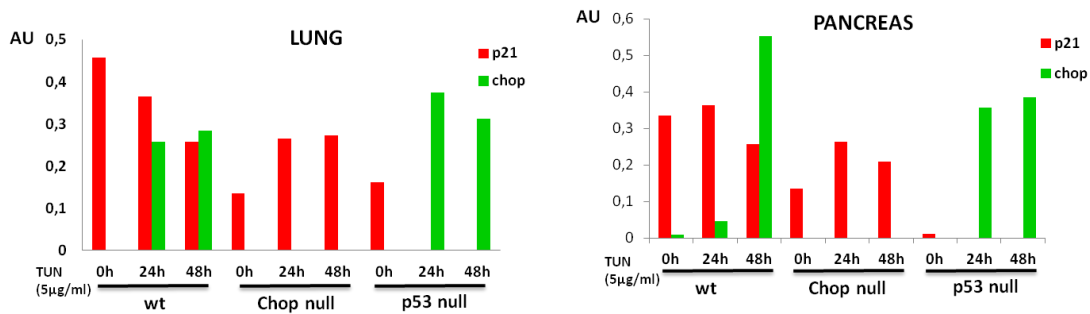
υποκυτταρικό διαμέρισμα και τελικά η ενεργοποίηση της UPR, καταστέλλει την έκφραση της p21. Σε πειραματόζωα που απουσιάζει το CHOP, το στρες του ΕΔ όχι μόνο δεν αναστέλλει τα επίπεδα της p21, αλλά προκαλεί αύξηση στην έκφραση της. Έτσι, το στρες του ΕΔ προκαλεί ταυτόχρονα μία CHOP-εξαρτώμενη μείωση στους μύες αγρίου τύπου καθώς και CHOP ανεξάρτητη επαγωγή των επιπέδων της p21 στους μύες ελλειματικούς για το CHOP, *in vivo* (Σχήμα 17^{A,B}). Μια υπόθεση γι' αυτό, είναι ότι η ενσωμάτωση των δύο αυτών τρόπων έναντι της ρύθμισης της p21 *in vivo*, μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της p21 στα πρώτα στάδια ή κατά τη διάρκεια ήπιου στρες του ΕΔ, όταν δηλαδή τα επίπεδα του CHOP δεν έχουν αυξηθεί επαρκώς. Ωστόσο, όταν τα επίπεδα του CHOP αυξηθούν ακολουθεί καταστολή της p21 στα επόμενα στάδια του έντονου και παρατεταμένου στρες του ΕΔ. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η απουσία του γονιδίου p53 δεν επηρέασε την επαγόμενη από τουνικαμυκίνη καταστολή της p21, επιβεβαιώνοντας ότι η τελευταία αυτή ρύθμιση είναι ανεξάρτητη της p53.

A.



B.

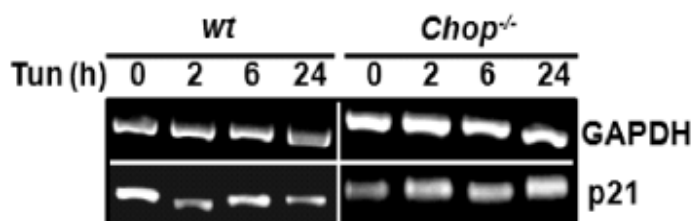




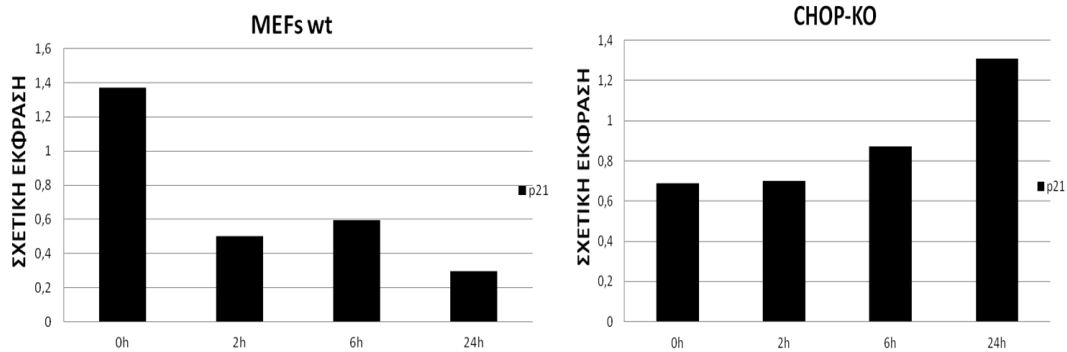
Σχήμα 17 Α. Ανίχνευση μέσω ανοσοαποτόπωσης κατά Western της έκφρασης των p21 και CHOP σε ιστούς όπως σπλήνα, ήπαρ, καρδιά, πνεύμονες και πάγκρεας σε πειραματόζωα αγρίου τύπου, CHOPKO και p53KO μετά από επίδραση τουνικαμικίνης για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα, σε συγκεντρώση (500 ng/g body weight). Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. **Β.** Η ποσοτικοποίηση των ζωνών φαίνεται στο κάτω τμήμα του σχήματος.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε εμβρυικούς ινοβλάστες MEFs θετικούς για το CHOP και σε MEFs χωρίς το CHOP χορηγήθηκε τουνικαμικίνη σε χρονικά διαστήματα 2, 6 και 24 ωρών. Ακολούθως μελετήσαμε τα επίπεδα της p21 σε επίπεδο RNA (μέσω ημιποσοτικού RT-PCR), όπως φαίνεται στο **Σχήμα 18**. Τα μειωμένα επίπεδα της p21 επιβεβαιώνουν την καταστολή της έκφρασης της p21 στα αγρίου τύπου (MEFs), ενώ σημειώνεται ελάχιστα αυξημένη μεταβολή της έκφρασης της p21 σε MEFs ελλεμματικούς για το CHOP μετά από 2 ώρες χορήγησης τουνικαμικίνης υπό συνθήκες στρες στο ΕΔ. Συνάγεται επομένως το συμπέρασμα ότι κατά τη παρατεταμένη διάρκεια χορήγησης τουνικαμικίνης, επικρατεί καταστολή των επιπέδων της πρωτεΐνης p21 στους ινοβλάστες αγρίου τύπου. Αντίθετα, σε ινοβλάστες που στερούνταν το γονίδιο CHOP όχι μόνο δεν ήταν εφικτή η κατασταλτική επίδραση της τουνικαμικίνης στα επίπεδα του mRNA της p21, προκάλεσε αυξημένη έκφραση των επιπέδων της, υπονοώντας ρύθμιση της p21 σε ένα μεταφραστικό πλέον επίπεδο.

Α.



B.



Σχήμα 18. Α. Ανάλυση της έκφρασης του mRNA της p21 μέσω ημιποσοτικής RT-PCR μετά από επίδραση TUN σε κύτταρα ινοβλαστών MEFs θετικούς για το CHOP και σε MEFs χωρίς το CHOP. Το cDNA που ανακτήθηκε από τα κύτταρα, ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα ζεύγη εκκινήτων. Τα προϊόντα της PCR διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αгарόζης με EtBr (άνω τμήμα). **Β.** Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων αυτών έγινε μέσω επιπέδων GAPDH (κάτω τμήμα).

Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν την πολύπλοκη ρύθμιση της p21 μέσω του CHOP. Δηλαδή με την απουσία ή κατά τη διάρκεια ήπιου στρες του ΕΔ, το CHOP προκαλεί επαγωγή της έκφρασης της p21, ενώ κατά τη διάρκεια έντονου στρες του ΕΔ, το CHOP καταστέλλει σημαντικά την έκφραση της p21. Σε πρώτη φάση ενεργοποιείται η προ-επιβιωτική δράση της UPR (unfolded protein response), ενώ σε δεύτερη φάση ενεργοποιείται η προ-αποπτωτική του δράση και η μετάπτωση αυτή χαρακτηρίζεται αρχικά από αύξηση και στη συνέχεια από μείωση της έκφρασης της p21.

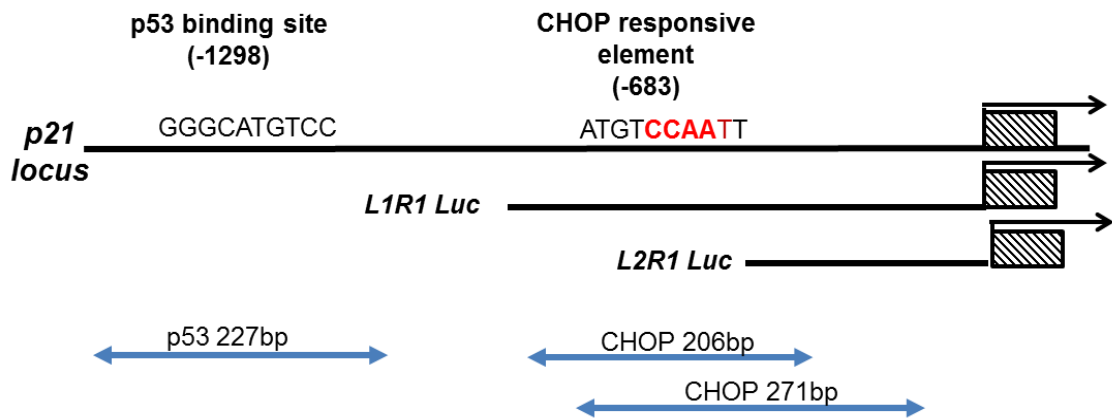
3.2. Ο προ-αποπτωτικός παράγοντας CHOP ρυθμίζει την p21 σε μεταγραφικό επίπεδο

3.2.1 Μεταγραφική ρύθμιση της p21 από τον προ-αποπτωτικό παράγοντα CHOP

Δεδομένου του ρόλου του CHOP στην επαγωγή της απόπτωσης και της αντιαποπτωτικής ενεργότητας της p21 θελήσαμε να μελετήσουμε αν η p21 αλληλεπιδρά φυσικά με τον μεταγραφικό παράγοντα CHOP.

Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκε η διαφορική ρύθμιση της p21 σε συνθήκες στρες του ΕΔ, ελέγχοντας την άμεση επίδραση του CHOP στον υποκινητή της p21. Λαμβάνοντας υπόψιν την ύπαρξη συντηρημένης αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη CHOP (CHOP binding site) στη θέση -683bp περίπου του υποκινητή της p21, ακολουθήθηκε η παρακάτω πειραματική διαδικασία. Υποκλωνοποιήσαμε τον υποκινητή της p21 σε ειδικό πλασμίδιο που ήδη φέρει το κλωνοποιημένο γονίδιο της λουσιφεράσης. Εκτός από την υποκλωνοποίηση ολόκληρου του υποκινητή της p21, μεγέθους περίπου 703bp, είχε γίνει ήδη και υποκλωνοποίηση τμήματος του υποκινητή που χαρακτηρίζεται από έλλειψη ώστε να μην περιλαμβάνεται η αλληλουχία πρόσδεσης του CHOP, μεγέθους περίπου 395bp (*Σχήμα 19*). Είναι γνωστό ότι η p53 είναι στόχος διαφόρων μετα- μεταφραστικών τροποποιήσεων, κυρίως της φωσφορυλίωσης, η οποία είναι σημαντική για την ενεργοποίηση και την απενεργοποίηση μέσω στερεοδιατακτικών αλλαγών που επιδρούν στην ειδική πρόσδεση στο DNA. Πρόσφατα αποτελέσματα, ωστόσο, δείχνουν πως η p21/Waf1 έχει διακριτές λειτουργίες ανεξάρτητα από τη p53. Έτσι, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι επιπτώσεις της p53 στη ρύθμιση της p21 κατά τη διάρκεια του στρες του ΕΔ, η θέση δέσμευσης της p53 δεν είχε συμπεριληφθεί στη κατασκευή πλασμιδίων του υποκινητή της p21. Τα παραπάνω σχεδιάστηκαν με βάση τις περιοχές του υποκινητή της p21 που αποτελούν θέση δέσμευσης του CHOP και περιοχές στις οποίες δεσμεύεται η p53, όπως φαίνεται στο *Σχήμα 19*.

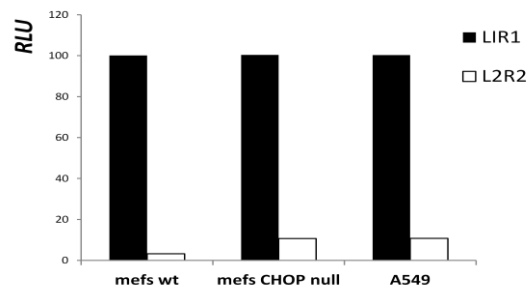
Σχήμα 19 Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών του υποκινητή της p21 που δείχνει τη θέση δέσμευσης του CHOP σε σύγκριση με τη θέση δέσμευσης της p53. Υποδεικνύονται τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που φέρουν τις ρυθμιστικές περιοχές του υποκινητή της p21 παρουσία pL₁R₁-pGL3 ή απουσία pL₂R₁-pGL3 της συντηρημένης αλληλουχίας που αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη CHOP (CHOP binding site). Προηγήθηκε υποκλωνοποίηση του υποκινητή της p21 σε ειδικό πλασμίδιο (pGL3) που ήδη φέρει το κλωνοποιημένο γονίδιο της λουσιφεράσης



Τα πλασμίδια αυτά (**Σχήμα 19**) χρησιμοποιήθηκαν για την παροδική διαμόλυνση κυττάρων ινοβλαστών αγρίου τύπου (MEFs wt), καρκινικών κυττάρων πνεύμονα (A549), ινοβλαστών αγρίου τύπου ελλειμματικών για το CHOP (**Σχήμα 20**) και σε HIT-T15 (ινσουλινοπαράγωγα παγκρεατικά β κύτταρα από νησίδα μυός), (**Σχήμα 23**) σε συνδυασμό με πλασμίδιο που φέρει το cDNA του γονιδίου CHOP με παράλληλη επίδραση του αντιβιοτικού τουνικαμυκίνης (**Σχήμα 21**).

Προσδιορισμός της ενεργότητας λουσιφεράσης (βλέπε § 2.6.2.6) κατέληξε σε αυξημένη ενεργότητα του υποκινητή της p21 παρουσία του πλασμιδίου που ήταν υποκλωνοποιημένος ο υποκινητής της p21, ενώ παρατηρήθηκε χαμηλή ενεργότητα της p21 στο πλασμίδιο που δεν περιλαμβάνεται η αλληλουχία πρόσδεσης του CHOP, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 20**. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων αυτών, πραγματοποιήθηκε παράλληλα διαμόλυνση με πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης από τον οργανισμό Renilla σε κάθε περίπτωση (**Σχήμα 20**). Ωστόσο, λήφθηκε υπόψη το γεγονός ότι ενώ η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (firefly) εκφράζεται σε μεταβλητά επίπεδα ανάλογα με τα επίπεδα ενεργότητας του υπό μελέτη υποκινητή, η λουσιφεράση από τη Renilla εκφράζεται στα κύτταρα σταθερά υπό τον έλεγχο του υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού (CMV). Κατά συνέπεια,

αξιολογείται ο λόγος μονάδων λουσιφεράσης Firefly/Renilla, αποσβένοντας τυχόν μεταβολές στο ποσοστό επιμόλυνσης των κυττάρων, στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης της λουσιφεράσης κλπ.

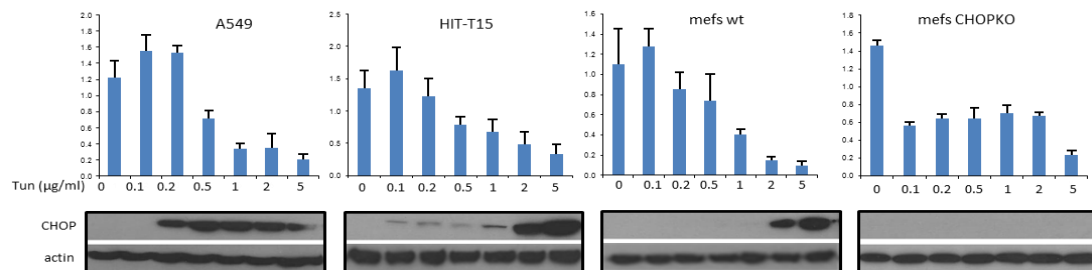


Σχήμα 20 Δραστικότητα λουσιφεράσης του L_1R_1 -Luc (που περιέχει την θέση πρόσδεσης CHOP) και η L_2R_1 -Luc (που δεν περιέχει την θέση πρόσδεσης CHOP). Οι τιμές της λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν σε 100% για το καθένα από αυτά τα πλασμίδια.

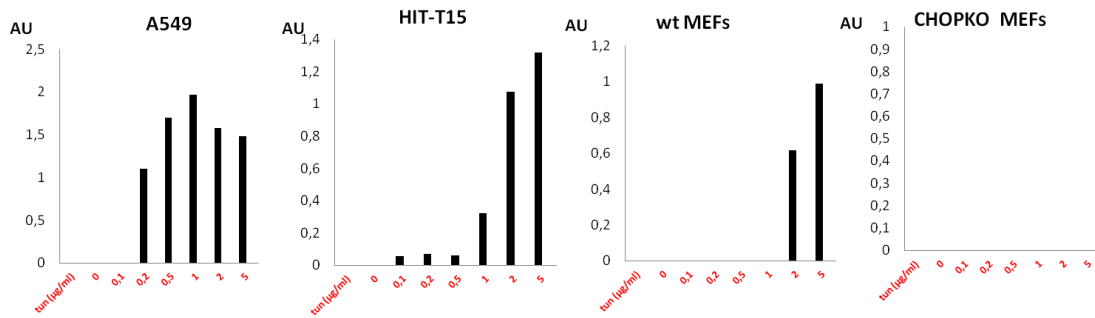
3.2.2. Ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστικότητας της p21 σε διαμολυσμένα κύτταρα με το πλασμίδιο L_1R_1 -Luc με ταυτόχρονη χορήγηση τουνικαμυκίνης

Σε κύτταρα ινοβλαστών αγρίου τύπου (MEFs wt), καρκινικών κυττάρων πνεύμονα (A549), ινοβλαστών αγρίου τύπου ελλειμματικών για το CHOP και σε HIT-T15 (ινσουλινοπαράγωγα παγκρεατικά β κύτταρα από νησίδα μύος) σε συνδυασμό με πλασμίδιο που φέρει το cDNA του γονιδίου CHOP (L_1R_1 -Luc) έγινε επίδραση του αντιβιοτικού τουνικαμυκίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στο **Σχήμα 21**.

A.



B.

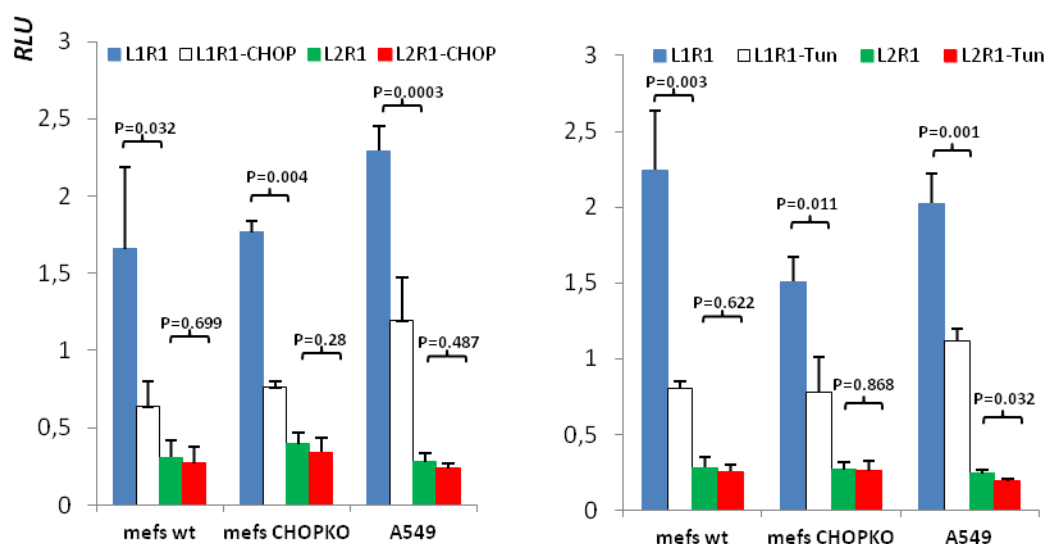


Σχήμα 21. Α. Δραστικότητα λουσιφεράσης του $L1R1-Luc$ (που περιέχει την θέση πρόσδεσης CHOP) μετά τη χορήγηση τουνικαμυκίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις όπως αναγράφονται στο σχήμα (άνω πάνελ). Ακολουθεί ανοσοσοαποτύπωση για την πρωτεΐνη CHOP για την κάθε κυτταρική σειρά ξεχωριστά (κάτω πάνελ). **Β.** Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης έγινε μέσω των επιπέδων της ακτίνης .

Έχει παρατηρηθεί ότι η συγκέντρωση τουνικαμυκίνης 0,1μg/ml επάγει την παραγωγή της λουσιφεράσης, που στα συγκεκριμένα πειράματα είναι ο δείκτης της μεταγραφικής δραστικότητας της p21, σε σχέση με τα κύτταρα που δεν τους έχει χορηγηθεί τουνικαμυκίνη, όπως παριστάνεται στο **Σχήμα 21^A**, (άνω πάνελ). Ακολούθως, διαπιστώθηκε ότι όσο αυξανόταν περαιτέρω η συγκέντρωση της τουνικαμυκίνης, παρατηρήθηκε μια εξαρτώμενη μείωση της επαγωγής της λουσιφεράσης στις κυτταρικές σειρές MEFs, HIT-T15 και σε A549 κύτταρα. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι στη κυτταρική σειρά που είναι ελλειμματική για το CHOP παρατηρήθηκε καθολική μείωση της ενεργότητας της λουσιφεράσης για το γονίδιο p21. Στις συγκεκριμένες συνθήκες, κατά την ανοσοαποτύπωση, τα επίπεδα CHOP ήταν ελαφρώς αυξημένα στις χαμηλές συγκεντρώσεις τουνικαμυκίνης αλλά είχαν μεγιστοποιηθεί όταν η τουνικαμυκίνη προστέθηκε στις συγκεντρώσεις 2 και 5 μg/ml, σε MEFs άγριου τύπου και στα κύτταρα HIT-T15 (**Σχήμα 21^A** κάτω πάνελ). Στα κύτταρα A549 η ευαισθησία στην τουνικαμυκίνη, όπως απεικονίζεται κατά την επαγωγή των επιπέδων του CHOP, ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με τις κυτταρικές σειρές που αναφέραμε παραπάνω, φτάνοντας στην μέγιστη επαγωγή του CHOP όταν η συγκέντρωση τουνικαμυκίνης είναι μόλις 0,5μg/ml. Έτσι, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το ήπιο στρες του ΕΔ διεγείρει την έκφραση της p21, ενώ το έντονο στρες του ΕΔ καταστέλλει την μεταγραφή της p21. Υποθέτοντας ότι κατά τη διάρκεια ήπιου στρες του ΕΔ, η εμπλοκή του CHOP είναι ελάχιστη, τα ευρήματα αυτά είναι συνεπή με τα αποτελέσματα της τουνικαμυκίνης σε συνθήκες *in vivo*, σύμφωνα με τα

οποία το CHOP, απουσίας ή κατά τη διάρκεια ήπιου στρες παίζει θετικό μάλλον, παρά αρνητικό ρόλο στην έκφραση της p21 (Σχήμα 17).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αναστέλλεται δραστικά η δραστικότητα της λουσιφεράσης στα κύτταρα ινοβλαστών αγρίου τύπου (MEFs wt), καρκινικών κύτταρων πνεύμονα (A549), HIT-T15 κύτταρα και ινοβλαστών ελλειμματικών για το CHOP, όταν γίνει έκθεση των κυττάρων αυτών στη τουνικαμυκίνη σε συγκέντρωση 5μg/ml (Σχήμα 22 δεξιό πάνελ). Παρατηρήθηκε επίσης, ότι μειώνεται η δραστικότητα αυτής, όταν τα κύτταρα διαμολύνονται με πλασμίδιο που φέρει το cDNA του CHOP (Σχήμα 22 αριστερό πάνελ). Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε, ότι όταν οι συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές διαμολύνονται με πλασμίδιο που δεν φέρει τη συντηρημένη αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη CHOP (L_2R_1 -Luc), η δραστικότητα της λουσιφεράσης δεν μεταβάλλεται αισθητά (Σχήμα 22, αριστερό και δεξιό πάνελ).

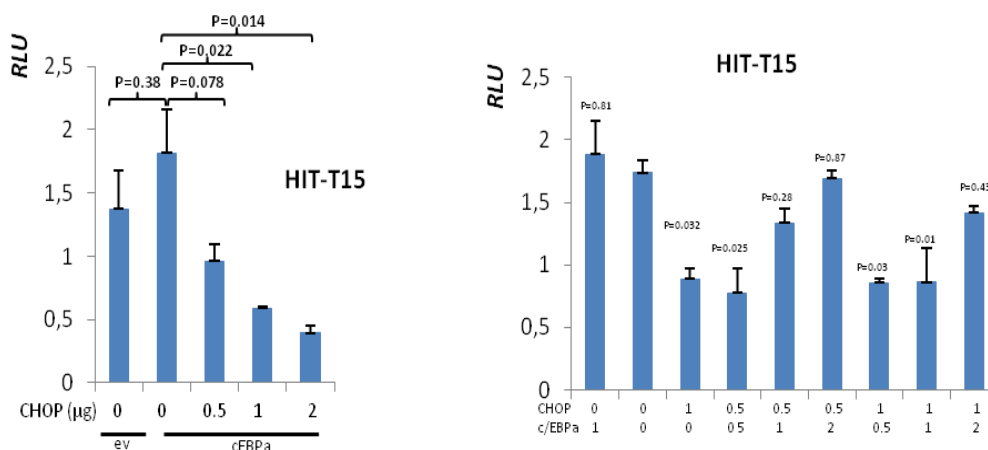


Σχήμα 22 Δραστικότητα λουσιφεράσης του L_1R_1 -Luc (που περιέχει την θέση πρόσδεσης CHOP) και η L_2R_1 -Luc (που δεν περιέχει την θέση πρόσδεσης CHOP) μετά τη διαμόλυνση CHOP (αριστερό πάνελ) ή έκθεση σε τουνικαμυκίνη (δεξιό πάνελ). Η δραστικότητα του L_2R_1 ήταν σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη των L_1R_1 . Οι τιμές της λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν σε 100% για το καθένα από αυτά τα πλασμίδια για τους αντίστοιχους ελέγχους, διαμόλυνσης με το πλασμίδιο του CHOP ή έκθεσης σε τουνικαμυκίνη.

Συνοψίζοντας, ως τώρα δείξαμε πως ο μεταγραφικός παράγοντας CHOP ρυθμίζει την p21 σε άμεσο μεταγραφικό επίπεδο, και συγκεκριμένα συμβάλλει στην καταστολή της p21 μέσω του CHOP σε κύτταρα MEFs, CHOP-null και σε A549.

3.2.3. Διερεύνηση της μεταγραφικής ρύθμισης της p21 από τον προ-αποπτωτικό παράγοντα CHOP στα β παγκρεατικά κύτταρα

Προκειμένου να μελετηθεί λοιπόν, περαιτέρω η ρύθμιση της p21 από το CHOP, εξετάστηκε αν η συγκεκριμένη ρύθμιση ισχύει και για τα HIT-T15 (ινσουλινοπαράγωγα παγκρεατικά β κύτταρα από νησίδα μυός).



Σχήμα 23 Δραστικότητα λουσιφεράσης του L_1R_1 -Luc (που περιέχει την θέση πρόσδεσης CHOP) μετά τη διαμόλυνση του πλασμιδίου C/EBPα (σταθερή συγκέντρωση 1μg) και την ταυτόχρονη διαμόλυνση του πλασμιδίου CHOP σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις όπως αναγράφονται στο σχήμα (αριστερό πάνελ) και διαμόλυνση του πλασμιδίου C/EBPα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις καθώς και την ταυτόχρονη διαμόλυνση του πλασμιδίου CHOP σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις όπως αναγράφονται στο σχήμα (δεξιό πάνελ). Οι τιμές της λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν σε 100% για το καθένα από αυτά τα πλασμίδια.

Γνωρίζουμε ότι οι C/EBPs αποτελούν οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται σε CCAAT ενισχυτές και ανήκουν στην κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων που σχηματίζουν φερμουάρ λευκίνης (leucine zipper), αφού περιέχουν μια βασική καρβοξυτελική περιοχή (bZIP) πλούσια σε λευκίνη. Ο C/EBPα είναι πλειοτροπικός μεταγραφικός παράγοντας, που ενεργοποιεί πολλά γονίδια.

Οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις του CHOP προκάλεσαν στα κύτταρα HIT-T15, μια δόσοεξαρτώμενη μείωση στη διέγερση της δραστικότητας λουσιφεράσης που προκαλείται παρουσία του πλασμιδίου C/EBPα, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 23**, (αριστερό διάγραμμα). Αντίθετα, αυξανόμενες ποσότητες του πλασμιδίου του C/EBPα μηδένισαν τις ανασταλτικές επιδράσεις του CHOP στο **Σχήμα 23**, (δεξιό διάγραμμα). Συνεπώς, η συνέκφραση αυξανόμενων ποσοτήτων C /EBPα (0-2000 ng) μαζί με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του πλασμιδίου CHOP είχε ως αποτέλεσμα την

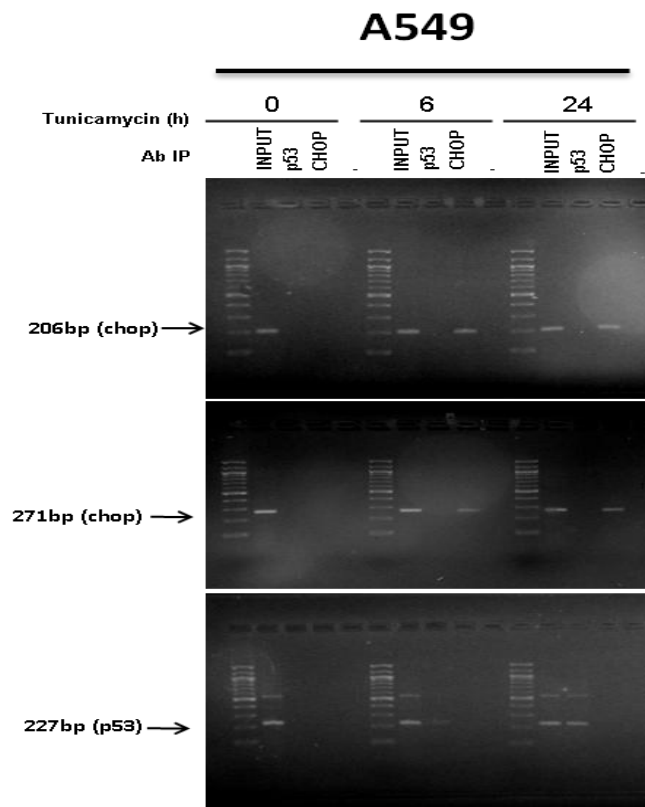
αυξανόμενη μεταγραφική ενεργότητα του L₁R₁-Luc (*Σχήμα 23, δεξιό διάγραμμα*). Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που έχουμε σχετικά με την αύξηση των επιπέδων της p21 σε ιστούς από πειραματόζωα από τα οποία απουσιάζει το γονίδιο CHOP (*Σχήμα 17^A*), παρά το γεγονός ότι στα reporter assays, χρησιμοποιώντας ινοβλάστες MEFs ελλειματικούς για το CHOP, μετά από έκθεση των κυττάρων στην τουνικαμυκίνη, παρουσιάστηκε μείωση της ενεργότητας του υποκινητή της p21 (*Σχήμα 23*). Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται σε εναλλακτικούς μηχανισμούς που μπορεί να συνεισφέρουν στην ρύθμιση της έκφρασης της p21 όπως για παράδειγμα να εμφανίζουν διαφορετική ρύθμιση ανάλογη του ιστού που εξετάζεται. Επιπλέον λόγοι που μπορούν να εξηγήσουν αυτή τη διαφορά είναι ότι το συγκεκριμένο πείραμα απεικονίζει τη μεταγραφική ενεργοποίηση, ενώ η ανάλυση πρωτεϊνών (*Σχήμα 17^A*) απεικονίζει την μεταγραφική ρύθμιση.

3.2.4. Φυσική αλληλεπίδραση του υποκινητή της p21 και του μεταγραφικού παράγοντα CHOP

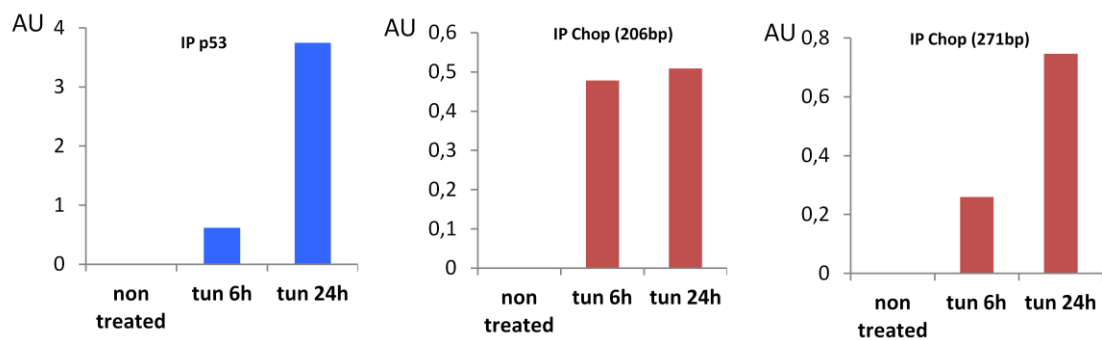
Ενώ τα προηγούμενα πειράματα αποσκοπούσαν στη διερεύνηση της πιθανής ρυθμιστικής δυναμικής του CHOP στην p21, δεν αποδεικνύουν ότι πράγματι CHOP και υποκινητής της p21 αλληλεπιδρούν φυσικά. Προκειμένου να διαλευκανθεί, στο σημείο αυτό, εφαρμόσαμε την μεθοδολογία της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (βλέπε § 2.6.1), ώστε να αποδειχθεί αν πράγματι υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση στη συγκεκριμένη θέση, και ότι η αλληλεπίδραση αυτή είναι ισχυρότερη σε συνθήκες όπου έχει προκληθεί φαρμακολογικά στρες του ΕΔ. Σημειώνουμε ότι πρόκειται για συμπληρωματική προσέγγιση των προηγούμενων καθώς ενώ οι προηγούμενες αποτελούν λειτουργικές δοκιμασίες που πιστοποιούν αν υφίσταται ρύθμιση, η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης αποτελεί δομική μελέτη που διερευνά την ύπαρξη ή μη φυσικής αλληλεπίδρασης.

Είναι βιβλιογραφικά τεκμηριωμένο το γεγονός, ότι υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ της p53 και της p21. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης χρησιμοποιώντας χρωματίνη παρασκευασμένη από A549 κύτταρα κατεργασμένα με TUN για διαφορετικά χρονικά διαστήματα κάθε φορά, με τη χρήση αντισώματος για CHOP το οποίο ανοσοκατακρημνίζει το σύμπλοκο χρωματίνης-CHOP και αντισώμα για p53 το οποίο ανοσοκατακρημνίζει το σύμπλοκο χρωματίνης-p53 (θετικός μάρτυρας).

A.



B.



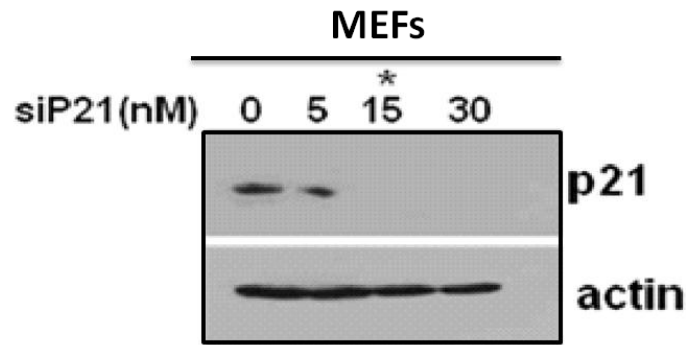
Σχήμα 24 **A.** Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης πραγματοποιήθηκαν σε A549 κύτταρα μετά την προσθήκη TUN για τα υποδεικνύμενα χρονικά διαστήματα, χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των υποδεικνύμενων πρωτεϊνών. Ακολούθησαν ημιποσοτικές αντιδράσεις PCR στο ανοσοκατακρημνισμένο ή στο 1% του αρχικού υλικού χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για τον p21 υποκινητή. Για την ανίχνευση της πρόσδεσης του CHOP, χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη oligονουκλεοτιδίων ενώ η p53 ενισχύθηκε ως θετικός μάρτυρας. **B.** Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων αυτών φαίνεται στο κάτω τμήμα του σχήματος

Όπως δείχνει το **σχήμα 24^A**, όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε τουνικαμυκίνη, το CHOP αλληλεπιδρά φυσικά με τον υποκινητή της p21. Για τη χρήση ενός θετικού μάρτυρα για την δοκιμασία ChIP, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα ειδικό για την p53. Όπως προαναφέρθηκε, η p21 είναι μεταγραφικός στόχος της p53 και έτσι αναμενόταν να αλληλεπιδρά φυσικά με την p53, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και πειραματικά. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αλληλεπίδραση της p53 με την p21 γιατί ήταν πιο έντονη στα κύτταρα που υφίστανται στρες του ΕΔ, μέσω τουνικαμυκίνης, κάτι που φαίνεται στο **Σχήμα 24^A**.

3.3 Μελέτη επίδρασης της p21 που προκαλείται από το στρες του ΕΔ στην απόπτωση

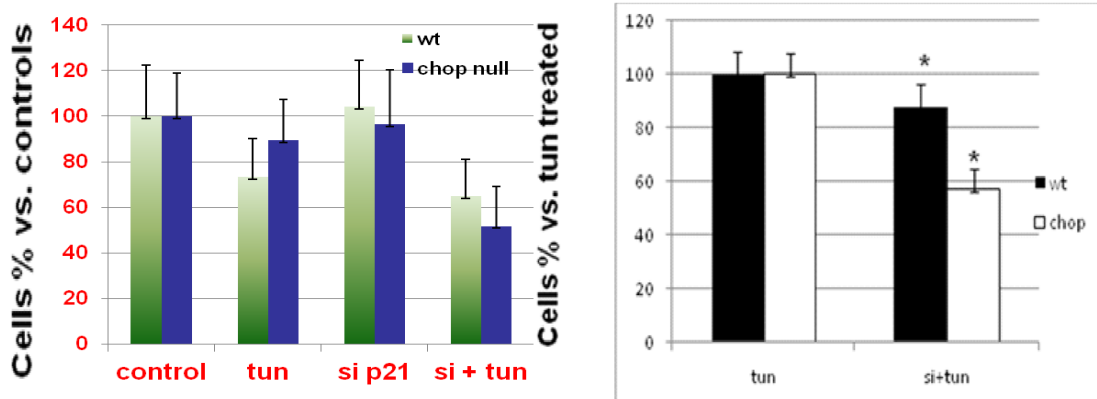
3.3.1. Αποκατάσταση της ευαισθησίας σε κύτταρα ελλειμματικά για το CHOP στην τουνικαμυκίνη, μέσω καταστολής της έκφρασης της p21/waf1

Προκειμένου να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο η p21 εμπλέκεται στις βιολογικές δράσεις του μεταγραφικού παράγοντα CHOP, πραγματοποιήθηκε μείωση της p21 μέσω της RNAi τεχνολογίας. Σύμφωνα με αυτήν, μικρά δίκλιωνα μόρια RNA, τα siRNAs, εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου με τη βοήθεια λιπόφιλων μορίων, με αποτέλεσμα τη μείωση της συσσώρευσης του συγκεκριμένου mRNA-στόχου. Αναλυτικότερα επισημαίνεται ότι, χρησιμοποιήθηκε siRNA αλληλουχία, ειδικά σχεδιασμένη έναντι της p21, ώστε να κατασταλεί η μετάφραση του mRNA. Ινοβλάστες MEFs διαμολύνθηκαν με siRNA (βλέπε § 2.9.1) έναντι της p21 και μετά από 48 ώρες επώασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0nM, 5nM, 15nM και 30 nM), ακολουθήθηκε απομόνωση πρωτεΐνης και ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου επιλέχθηκε η συγκέντρωση με την επιτυχέστερη αποσιώπηση της p21 (**Σχήμα 25**).



Σχήμα 25. Ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western της έκφρασης της πρωτεΐνης p21, σε κύτταρα MEFs αγρίου τύπου μετά από siRNA για την p21. Οι συγκεντρώσεις του siRNA αναγράφονται στο πάνω τμήμα του σχήματος. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας.

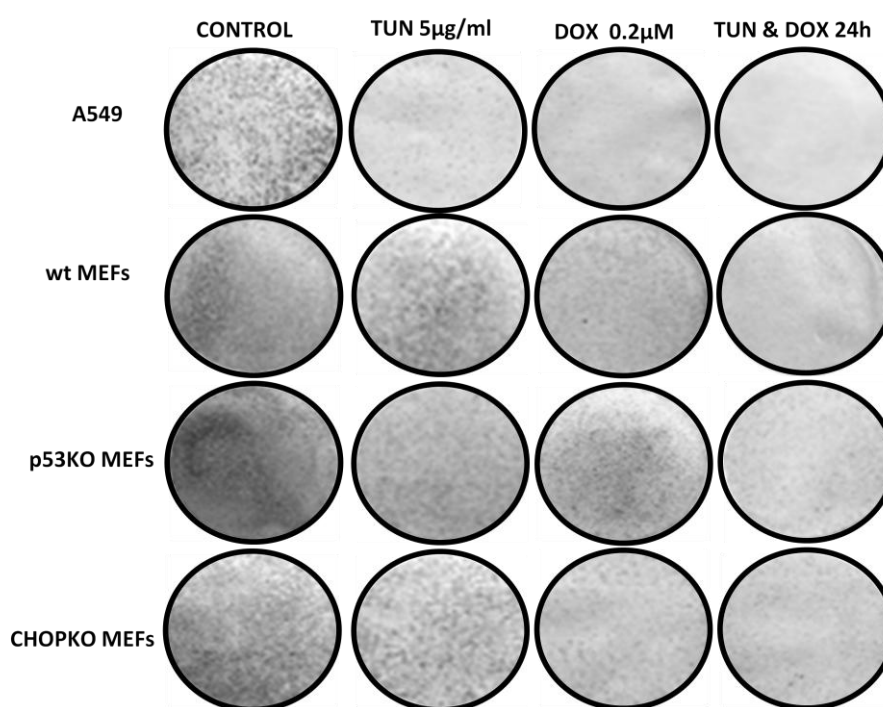
Προκειμένου να διερευνηθεί η φυσιολογική σημασία του CHOP το οποίο όπως αναφέρθηκε παραπάνω επάγεται από παρατεταμένο στρες του ΕΔ και προκαλεί μείωση των επιπέδων της p21, συνθήκη απαραίτητη για να οδηγηθούν τα κύτταρα σε απόπτωση, εξετάστηκαν οι συνέπειες της μείωσης της έκφρασης της p21 στη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από επίδραση TUN. Η μείωση αυτή έδειξε ότι αποκαταστάθηκε η ευαισθησία των κυττάρων ελλειμματικών για το CHOP στη TUN, προτείνοντας ότι η p21 προσδίδει αντίσταση στον φαρμακευτικό αυτόν παράγοντα (Σχήμα 26).



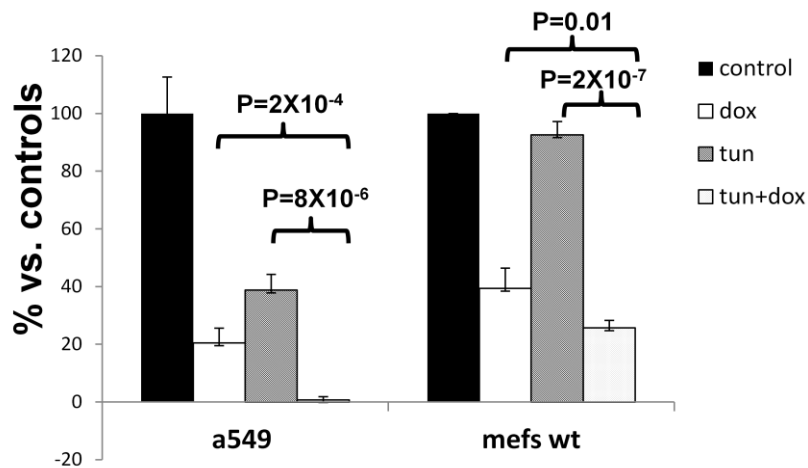
Σχήμα 26. Η p21 αποκαθιστά την ευαισθησία των κυττάρων ελλειμματικών για το CHOP μετά από έκθεση σε TUN. Οι δοκιμασίες βιωσιμότητας πραγματοποιήθηκαν σε τριπλά δείγματα και οι μέσες τιμές των τυπικών αποκλίσεων φαίνονται στο σχήμα. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω του Student's T-test.

3.3.2. Ρόλος της p21 στην βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από επίδραση TUN και DOX

Προκειμένου να διερευνηθεί η φυσιολογική σημασία της ενεργοποίησης της p21 από το DOX και η απενεργοποίηση της p21 από την TUN εξετάστηκε αν υπάρχει συνέργεια της p21 μετά από επίδραση DOX και TUN στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αποδείχθηκε ότι υπάρχει ευαισθησία των ινοβλαστών (MEFs) αγρίου τύπου και στα A549 στη TUN, και ακόμη μεγαλύτερη ευαισθησία στο DOX, σύμφωνα με την κλωνογονική δοκιμασία επιβίωσης (Σχήμα 27). Επιπλέον, σε ινοβλάστες που απουσιάζει το CHOP είδαμε ότι τα κύτταρα είναι ανθεκτικά στην τουνικαμυκίνη και ευαίσθητα στο DOX. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα σε ινοβλάστες που απουσιάζει το γονίδιο p53 τόσο στη TUN όσο και στο DOX. Ωστόσο, και στις 4 κυτταρικές σειρές που μελετήσαμε είδαμε ότι παρουσία TUN και DOX μειώνεται πολύ έντονα η βιωσιμότητα των κυττάρων. Συνεπώς, αξιολογώντας τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι υπάρχει συνέργεια μεταξύ TUN και DOX, κάτι που οπτικοποιείται και στο Σχήμα 28.

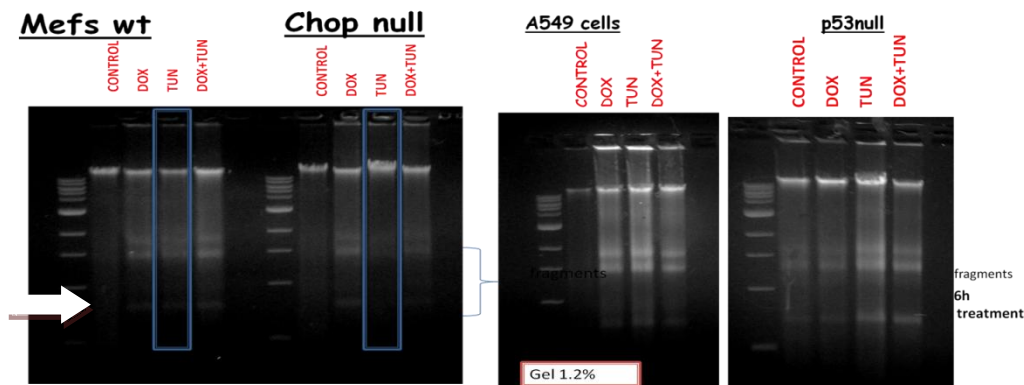


Σχήμα 27. Η τουνικαμυκίνη ενισχύει τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα της αδριαμυκίνης (DOX) όπως προκύπτει από κλωνογονική δοκιμασία επιβίωσης σε κύτταρα A549, ινοβλάστες αγρίου τύπου, ινοβλάστες που απουσιάζει το p53 και ινοβλάστες που απουσιάζει το CHOP.



Σχήμα 28. Γραφική παρουσίαση του αριθμού των αποικιών. Οι δοκιμασίες βιωσιμότητας πραγματοποιήθηκαν σε τριπλά δείγματα και οι μέσες τιμές των τυπικών αποκλίσεων φαίνονται στο σχήμα. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω του Student's T-test, ενώ στο πάνω τμήμα του σχήματος αναγράφονται οι τιμές P.

3.3.3. Συνέπειες της καταστολής της έκφρασης των επιπέδων του CHOP στην απόπτωση



Σχήμα 29. Αποπτωτική κατάτμηση DNA σε κύτταρα A549, ινοβλάστες αγρίου τύπου, p53-KO και CHOP-KO.

Η αποπτωτική κατάτμηση DNA είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό της απόπτωσης, που αποτελεί έναν τύπο προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση των ενδογενών ενδονουκλεασών με επακόλουθη διάσπαση του DNA σε χρωματίνη ενδοπυρηνοσωματική τα θραύσματα της οποίας είναι περίπου 180 ζευγών βάσεων (bp) και πολλαπλάσια αυτών (360, 540,

κλπ.). Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της απόπτωσης, για παράδειγμα, μέσω της δοκιμασίας laddering DNA.

Για την επαγωγή απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε αρχικά η *TUN* και το χημειοθεραπευτικό φάρμακο *DOX*. Ακολουθήθηκε η ανάλυση με ηλεκτροφόρηση. Για το σκοπό αυτό καλλιέργειες A549, MEFs, CHOP-KO και p53-KO κυττάρων επωάσθηκαν με *TUN*, *DOX* ξεχωριστά ή ταυτόχρονα για 6 ώρες. Η κατάτμηση είναι ενδεικτική των κυττάρων που βρίσκονται σε απόπτωση (Daniel PT *et al.*, 1999). Όπως παρουσιάζεται και στο σχήμα 29, τα κύτταρα που οδηγούνται σε απόπτωση έχουν κατατμηθεί δημιουργώντας μικρότερα θραύσματα (βέλος στο *σχήμα 29*) όπως φαίνεται μετά το πέρασμα των 6 ωρών επώασης των κυττάρων με τουνικαμυκίνη. Παράλληλα το *DOX* δημιουργεί θραύσματα σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν εκτός από την κυτταρική σειρά CHOP-KO, υποδεικνύοντας ότι απουσία του CHOP η τουνικαμυκίνη δεν είναι ικανή να οδηγήσει τα κύτταρα σε απόπτωση.

3.3.4. Συνέπειες της μείωσης της p21 στα β παγκρεατικά κύτταρα στην διαδικασία της απόπτωσης

Είναι γνωστό ότι τα παγκρεατικά βήτα κύτταρα εμπλέκονται σημαντικά στην παθογένεια και των δύο κύριων μορφών διαβήτη, του διαβήτη τύπου 1 και του διαβήτη τύπου 2 ενώ η χρόνια υπεργλυκαιμία που παρατηρείται, προσβάλλει τη λειτουργία και τη δομή διαφόρων οργάνων. Στο διαβήτη τύπου 2, η έκθεση των βήτα κυττάρων στις υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης οδηγεί σε τοξικά αποτελέσματα, που καλούνται γενικά ως «τοξικότητα της γλυκόζης» (Robertson *et al.* 2004). Έχουν προταθεί πολλοί μηχανισμοί προκειμένου να εξηγηθεί η τοξικότητα της γλυκόζης, συμπεριλαμβανομένου του οξειδωτικού stress (Robertson 2004), την ελαττωματική έκκριση ινσουλίνης (Zraika *et al.* 2006, Bertuzzi *et al.* 1998), την μειωμένη έκφραση γονιδίων ινσουλίνης (Briaud *et al.* 1999) και την απόπτωση των βήτα κυττάρων (Butler *et al.* 2003).

Η πρόσφατη ανάπτυξη των προσεγγίσεων των συστημάτων της βιολογίας, έχει προσφέρει περισσότερες πληροφορίες για τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παθογένεια του διαβήτη (Sparre *et al.* 2005; Sundsten *et al.* 2009). Έχουν αποκαλυφθεί διαφορές στο επίπεδο έκφρασης των πρωτεϊνών στα καλλιεργημένα βήτα κύτταρα και στα απομονωμένα νησίδια υπό την επίδραση της υψηλής γλυκόζης

(AhmedandBergsten 2005; Dowlingetal 2006). Πολλές από αυτές τις διαφορικά εκφρασμένες πρωτεΐνες έχει βρεθεί ότι αποτελούν συστατικά του ενδοπλασματικού δικτύου (Dowlingetal 2006; Metzetal 2006).

Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια του διαβήτη, το στρες του ΕΔ σχετίζεται με την απόπτωση, φαινόμενο συνυφασμένο με την δυσλειτουργία των νησίδων του παγκρέατος, οδηγούμαστε εύλογα στην υπόθεση ότι τα αποτελέσματά μας είναι άμεσα συνυφασμένα με τη διαχείριση του διαβήτη. Συγκεκριμένα, η επαγωγή της έκφρασης της p21 μπορεί να αναστείλει τον αποπτωτικό μηχανισμό των βήτα κυττάρων του παγκρέατος και την αποκατάσταση της λειτουργίας τους *in vivo*.

3.3.5 Καταστολή της έκφρασης της p21 σε HIT-T15 κύτταρα υπό την επίδραση υψηλής γλυκόζης (25mM)

Οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι τώρα στις αλλαγές που υφίσταται το πρωτέωμα των κυττάρων, έχουν περιορισθεί σε απομονωμένα νησίδια παγκρέατος. (Ahmed and Bergsten 2005), στην MIN-6 κυτταρική σειρά, μια ευρέως χρησιμοποιημένη σειρά (Dowling et al 2006) και στην INS-1, μια παγκρεατική κυτταρική σειρά επίμυος (Fernandez et al 2008). Οι μελέτες αυτές έχουν προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες όσον αφορά στις ποσοτικές αλλαγές της έκφρασης των πρωτεϊνών που προκαλούνται από την επίδραση της υψηλής γλυκόζης και που πιθανόν ενοχοποιούνται για τις επιβλαβείς επιπτώσεις της.

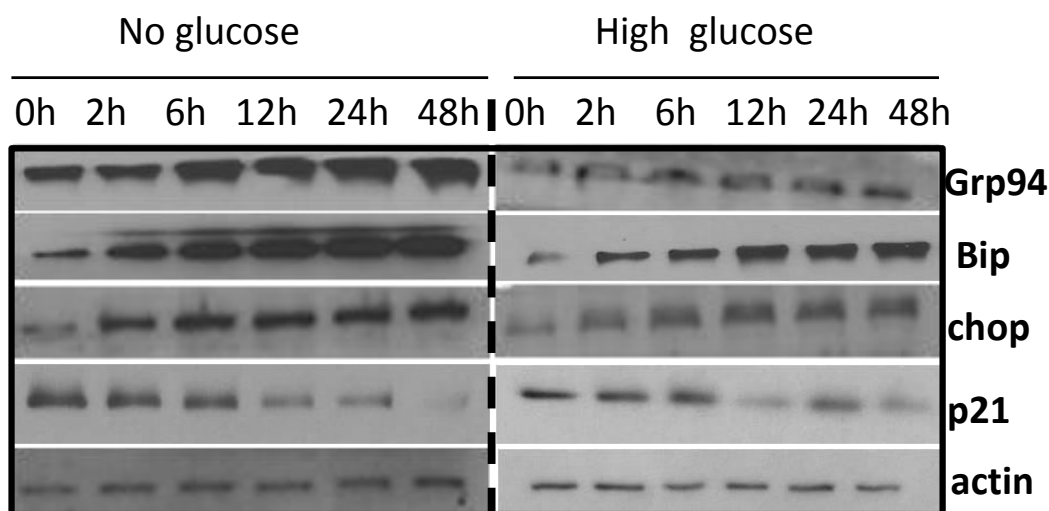
Με σκοπό την μελέτη των επιπτώσεων αυξανόμενων συγκεντρώσεων γλυκόζης στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης και την κυτταρική επιβίωση σε ινσουλινο-παράγωγα β-κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν παγκρεατικά β-κύτταρα της κυτταρικής σειράς HIT-T15 από νησίδια μύος. Παρατηρήθηκε ότι σε καλλιέργεια προχωρημένης γενιάς υπό την επίδραση υψηλής γλυκόζης, τα κύτταρα έχαναν την ικανότητα τους να εκκρίνουν ινσουλίνη και παράλληλα μειώνονταν τα επίπεδα του mRNA αυτής. Η κατάσταση αυτή μπορούσε να αποφευχθεί αν τα κύτταρα καλλιεργούνταν υπό την επίδραση χαμηλής γλυκόζης (Robertson et al 2004, Matsuoka et al 1997).

Από τις πρωτεΐνες που παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση υπό την επίδραση της υψηλής γλυκόζης, επιλέξαμε να εστιάσουμε την μελέτη μας στην πρωτεΐνη p21, λόγω της σπουδαιότητας των πληροφοριών που θα προκύψουν. Ένα από τα πρώτα πειράματα που πρέπει να πραγματοποιηθεί είναι να επιβεβαιωθεί η αλλαγή στην

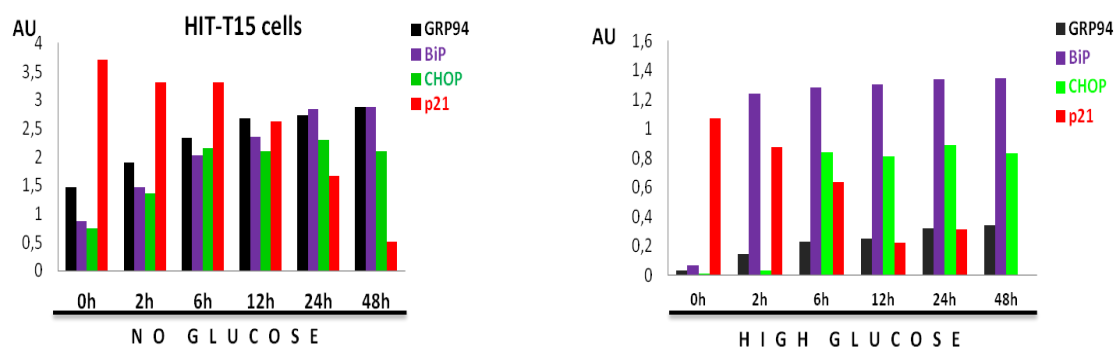
έκφραση της p21 όταν απουσιάζει η γλυκόζη αλλά και όταν αυτή βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση.

Προκειμένου λοιπόν, να εξαχθεί συμπέρασμα ως προς αυτό, καλλιεργήθηκαν πρωτεϊνικά δείγματα από HIT-T15 κύτταρα απουσία γλυκόζης και παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αυτής (25mM), για 30' (μικρό χρονικό διάστημα) έως και 48 ώρες (μεγάλο χρονικό διάστημα). Ως συγκέντρωση ελέγχου γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν τα 0.8mM, αφού σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει η συγκέντρωση αυτή θεωρείται η βέλτιστη για την έκκριση ινσουλίνης σε φυσιολογικές καταστάσεις (Poitout et al 1995). Τα χρονικά διαστήματα των 30' και των 48 ωρών επιλέχθηκαν για να δούμε κατά πόσο η παρατεταμένη επίδραση της υψηλής γλυκόζης μπορεί να επηρεάσει την έκφραση της p21. Περιληπτικά αναφέρεται ότι, τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από 2 μέρες καλλιέργειας, λύθηκαν, απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες και ποσοτικοποιήθηκαν. Κατόπιν 50μg πρωτεΐνης από HIT-T15 κύτταρα που καλλιεργήθηκαν υπό απουσία γλυκόζης, κανονική γλυκόζη (0.8mM) και αντίστοιχα υψηλή γλυκόζη (25mM) υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση και έγινε ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος.

A.



B.



Σχήμα 30 A. Ανάλυση στυπώματος western σε HIT-T15 παρουσία υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης 25mM (δεξιό πάνελ) καθώς και στέρησης γλυκόζης (αριστερό πάνελ) στο θραπευτικό υλικό ανάπτυξης των κυττάρων για τους συγκεκριμένους χρόνους όπως αναγράφονται στο σχήμα. Εδώ φαίνεται η επαγωγή του στρες του ΕΔ από συγκεκριμένες πρωτεΐνες με τις οποίες σχετίζεται και ταυτόχρονη καταστολή της p21. **B.** Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας του κάθε δείγματος για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων κατά την ποσοτική ανάλυση των επιπέδων της κάθε πρωτεΐνης.

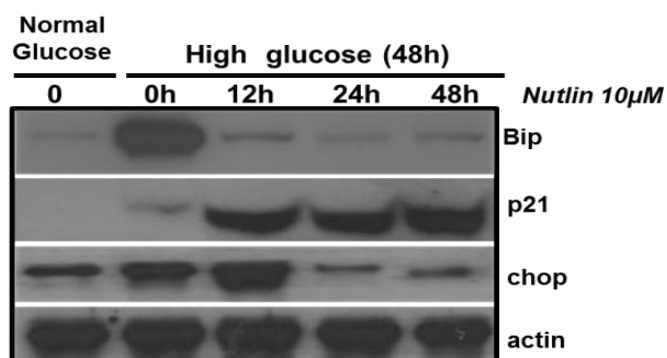
Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης δείχνουν μείωση στην έκφραση της p21 υπό την επίδραση της υψηλής γλυκόζης. Αυτή η μείωση παρατηρείται ήδη στο διάστημα των 6 ωρών. Η μείωση στην έκφραση της p21 γίνεται εμφανέστερη και στατιστικά σημαντική στο διάστημα των 24 και 48 ωρών, όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 30**^{A, B}. Επιπλέον τα HIT-T15 κύτταρα, καλλιεργήθηκαν απουσία γλυκόζης και παρουσίασαν παρόμοια πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της p21 και των υπολοίπων δεικτών του στρες του ΕΔ. Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι η καταστολή της έκφρασης της p21 σε συνθήκες χαμηλής και υψηλής γλυκόζης, μειώνει τα κυτταρικά επίπεδα της ινσουλίνης.

3.3.6. Υψηλή έκφραση της p21 στα HIT-T15: Αναστολή των επιπτώσεων από το στρες του ΕΔ

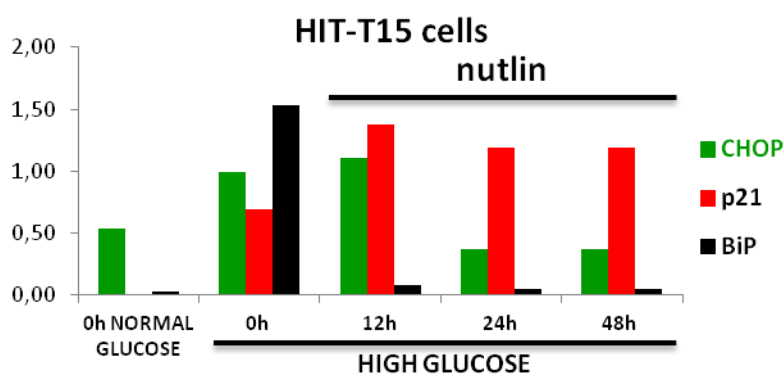
Είναι, πλέον, επιβεβαιωμένο ότι η παρατεταμένη καλλιέργεια των κυττάρων HIT-T15 σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης επάγει απόπτωση με ένα μηχανισμό που προκαλεί στρες στο ΕΔ. Θεωρήσαμε αναγκαίο, λοιπόν, να εξετάσουμε εάν οι επιπτώσεις που προκαλεί η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης μπορούν να ανασταλούν

από την φαρμακολογική επαγωγή της p21. Για το σκοπό αυτό κύτταρα HIT-T15 εκτέθηκαν σε υψηλή γλυκόζη (28mM) για 0, 12, 24 και 48 ώρες υπό την παρουσία και απουσία του φαρμακευτικού παράγοντα *nutlin -3a* (10mM) (Σχήμα 30^Α). Το *Nutlin -3a* είναι ένα μικρό μόριο αναστολέας της αλληλεπίδρασης MDM2-p53 που σταθεροποιεί τη p53 και τελικά ανεβάζει τα επίπεδα της p21. Έπειτα, ακολούθησε μελέτη της έκφρασης σημαντικών συστατικών της UPR, όπως των μοριακών συνοδών, BiP, GRP94, του μεταγραφικού παράγοντα CHOP, και του ογκοκατασταλτικού p21 μετά από επίδραση *nutlin -3a*.

A.



B.



Σχήμα 31 **A.** Επαγωγή της p21 από το *Nutlin -3a* όπως ανιχνεύτηκε μέσω ανοσοαποτίπωσης κατά Western σε HIT-T15 κύτταρα. **B.** Η ποσοτικοποίηση των ζωνών φαίνεται στο κάτω τμήμα του σχήματος.

Για την κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών ποσοτήτων και τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, υπολογίστηκε ο λόγος της έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήσαμε προς την έκφραση της ακτίνης.

Αυτά τα πειράματα έδειξαν ότι σε συνθήκες αυξημένης γλυκόζης με ταυτόχρονη παρουσία *nutlin -3a* ενεργοποιείται η έκφραση της p21 με p53-

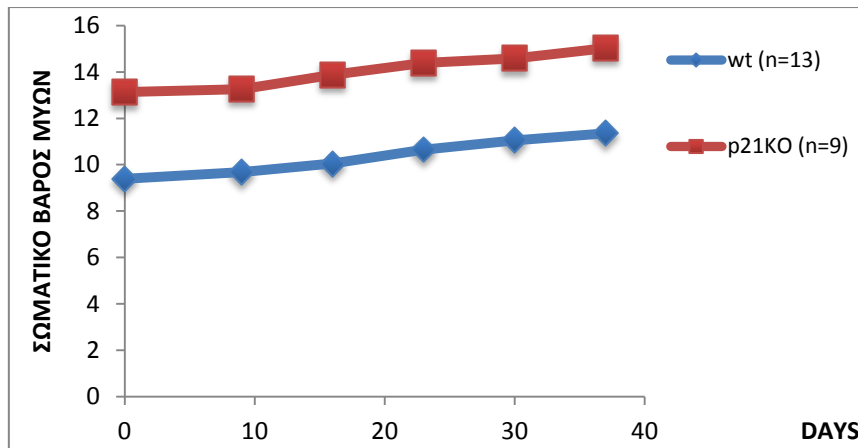
εξαρτώμενο μηχανισμό και ουσιαστικά η αυξημένη έκφραση του p21 απαλλάσσει τα κύτταρα από το στρες του ΕΔ, όπως αποδεικνύεται από την αναστολή της έκφρασης της BiP και του CHOP (*Σχήμα 30^{A,B}*).

3.4 Σημασία της p21 στους παθογενετικούς μηχανισμούς του διαβήτη τύπου 2

3.4.1 Γενετική απαλοιφή του γονιδίου p21, οδηγεί στην ευαισθητοποίηση πειραματικών μοντέλων στο διαβήτη

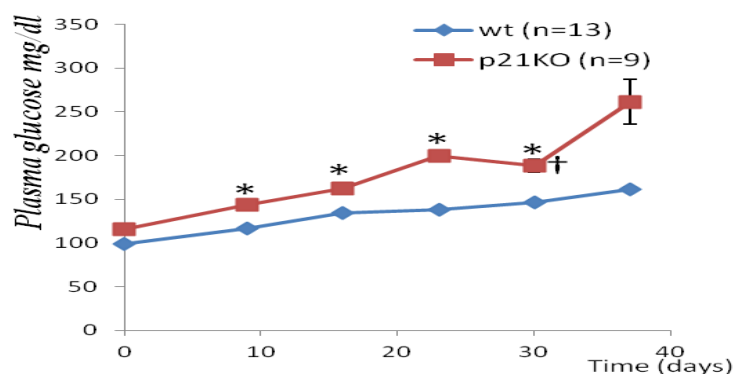
Δεδομένου ότι η έκφραση της p21 μειώνεται υπό την επίδραση υψηλής γλυκόζης, κρίνεται αναγκαίο να επιβεβαιωθεί περαιτέρω η ισχύς της παρατήρησης αυτής, και για το σκοπό αυτό ακολούθησε μελέτη της έκφρασης της p21 σε διαβητικά πειραματικά μοντέλα. Οι μελέτες που διεξήχθησαν πραγματοποιήθηκαν στο πρότυπο μοντέλο C57BL/6 και στα p21 knock-out ποντίκια, ηλικίας 4 έως 5 εβδομάδων. Τα συγκεκριμένα πειραματικά μοντέλα υποβλήθηκαν σε δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (40% HFD) και σε πόσιμο νερό πλούσιο σε σουκρόζη 10%, για χρονική διάρκεια 4 εβδομάδων.

Προκειμένου να μελετηθούν οι επιπτώσεις της απουσίας έκφρασης της p21 στην αύξηση σωματικού βάρους των πειραματόζων, ελεγχόταν το σωματικό βάρος των p21KO και C57BL/6 μυών για μια συνολική περίοδο τεσσάρων εβδομάδων. Όπως αναμενόταν, τα p21KO ποντίκια παρουσίασαν μικρή αύξηση του σωματικού τους βάρους κατά τη διάρκεια του πειράματος. Στην 1η εβδομάδα, τα p21 knock-out ποντίκια είχαν μέσο όρο σωματικού βάρους 11g (3% αύξηση), στην 2η εβδομάδα το βάρος τους ήταν 12g, ενώ στην 4η εβδομάδα αυξήθηκε περαιτέρω στα 14g (20% αύξηση). Τα C57BL/6 ποντίκια έδειξαν παρόμοια αύξηση στο σωματικό τους βάρος κατά τη διάρκεια του πειράματος, όπως φαίνεται στο *Σχήμα 32*.



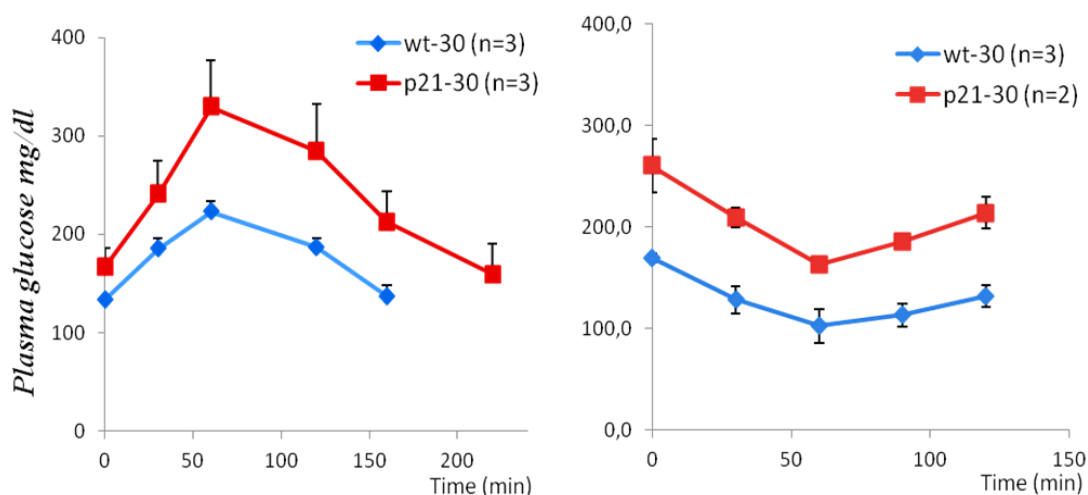
Σχήμα 32. Διάγραμμα καταγραφής σωματικού βάρους μυών C57BL/6 (wt) καθώς και p21KO μυών, μετά από δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (40% HFD) και με πόσιμο νερό, πλούσιο σε σουκρόζη 10%.

Στις 2 ομάδες των πειραματόζωων μετρήθηκαν τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας στο πλάσμα με τη χρήση ειδικού μηχανήματος αλλά και ταινιών μέτρησης των επιπέδων γλυκόζης από σταγόνα αίματος που προερχόταν από την ουρά του μυ, από την μηδενική εβδομάδα μέχρι και την πέμπτη εβδομάδα. Για την πρώτη ομάδα των C57BL/6 (1^η εβδ.average 117 mg/dl, 2^η εβδ.average 134 mg/dl, 3^η εβδ.average 137 mg/dl, 4^η εβδ.average 146 mg/dl, 5^η εβδ.average 161 mg/dl) για την δεύτερη ομάδα των p21KO (1^η εβδ.average 143 mg/dl, 2^η εβδ.average 162 mg/dl, 3^η εβδ.average 199 mg/dl, 4^η εβδ.average 188 mg/dl, 5^η εβδ.average 261 mg/dl), όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 33**. Είναι προφανές, ότι τα p21KO πειραματόζωα αναπτύσσουν διαβήτη με πολύ πιο αυξημένους ρυθμούς σε σχέση με τα αγρίου τύπου πειραματόζωα.



Σχήμα 33. Διάγραμμα μέτρησης συγκέντρωσης γλυκόζης μυών C57BL/6 (wt) καθώς και p21KO μυών, μετά από δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (40% HFD) και με νερό πλούσιο σε σουκρόζη 10%.

Για να ελέγξουμε στα p21KO και C57BL/6 ποντίκια, τη διαταραχή στην ομοιόσταση της γλυκόζης του πλάσματος, πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες ανοχής στη γλυκόζη (GTT) και ευαισθησίας στην ινσουλίνη (IST). Τα p21KO ποντίκια έδειξαν μια σημαντική επιδείνωση στην ικανότητα τους να απομακρύνουν την γλυκόζη του πλάσματος στο τεστ ανοχής της γλυκόζης και στο να αποκρίνονται στην ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της ινσουλίνης, σε σχέση με τα C57BL/6 ποντίκια όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 34**.

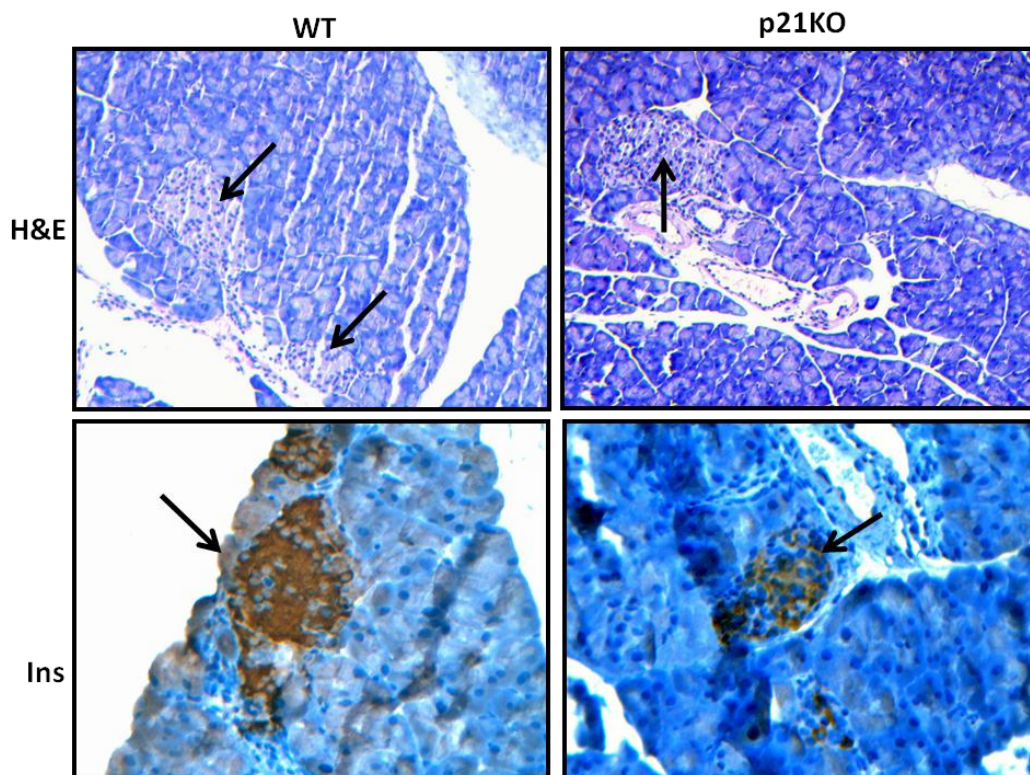


Σχήμα 34. Δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη (αριστερό διάγραμμα) και δοκιμασία αντίστασης στην ινσουλίνη (δεξί διάγραμμα) στους διαβητικούς p21KO και C57BL/6 μύες.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 35**, χρώση του παγκρέατος των C57BL/6 και p21KO ποντικίων, που έλαβαν δίαιτα πλούσια σε λιπαρά για 4 εβδομάδες με σακχαρούχο νερό που περιείχε 10% σουκρόζη, με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (H&E) (βλέπε § 2.7.1) έδειξε ότι τα παγκρέατα των p21KO ποντικίων παρουσιάζουν διαταραχή στην μικροσκοπική μορφολογία τους. Πιο συγκεκριμένα τα παγκρέατα των C57BL/6 είχαν περισσότερες σε αριθμό και υπερπλαστικές νησίδες σε σχέση με τα p21KO πειραματόζωα τα οποία παρουσίασαν αξιοσημείωτη συρρίκνωση των νησίδων τους.

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε ανοσοιστοχημεία (βλέπε § 2.7.2) σε τομές παραφίνης από πάγκρεας θηλυκών μυών, C57BL/6 και των p21KO, ηλικίας 5 εβδομάδων. Κατά την πειραματική αυτή διαδικασία, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ειδικό για την ανίχνευση της ινσουλίνης. Έπειτα, οι τομές χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη, ενώ η αλληλεπίδραση πρώτου και δεύτερου αντισώματος ανιχνεύθηκε

με τη χρήση 3, 3'- διαμινοβενζιδίνης (DAB) δίνοντας ένα καφέ χρώμα, όπου αυτή συνέβαινε (Σχήμα 35).

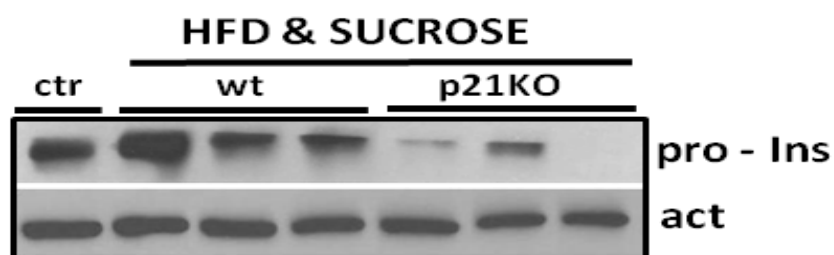


Σχήμα 35. Ιστολογικές αναλύσεις των παγκρεάτων των C57BL/6 και των p21KO μετά από δίαιτα πλούσια σε λιπάρια και με σακχαρούχο νερό (10% σουκρόζη). Χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (H&E) (άνω πάνελ) και ανοσοϊστοχημική χρώση (κάτω πάνελ) στα παγκρέατα των C57BL/6 και των p21KO την 5η εβδομάδα του πειράματος.

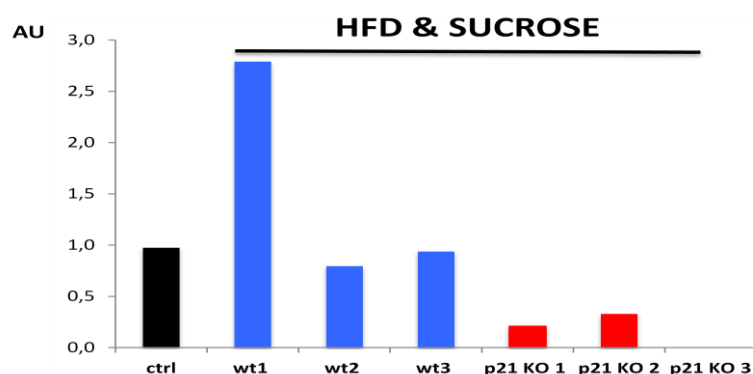
3.4.1.1 Απουσία της έκφρασης της p21 μειώνει την παραγωγή ινσουλίνης

Η ανοσοϊστοχημεία, έδωσε μια πρώτη εικόνα σχετικά με την παρουσία της ινσουλίνης στα νησίδια του παγκρέατος των C57BL/6 και των p21KO μύων. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση στον παγκρεατικό ιστό, ενώ δε θα μπορούσε να παραληφθεί ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της ινσουλίνης και με αντίσωμα έναντι της ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός δείκτης ελέγχου (βλέπε § 2.4). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 36 της ανοσοαποτύπωσης, η έκφραση της ινσουλίνης είναι πιο αυξημένη στα C57BL/6 σε σχέση με τα p21KO πειραματόζωα. Για να πραγματοποιηθεί κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών ποσοτήτων, υπολογίστηκε ο λόγος της έκφρασης της Ins/έκφραση της ακτίνης, και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

A.



B.



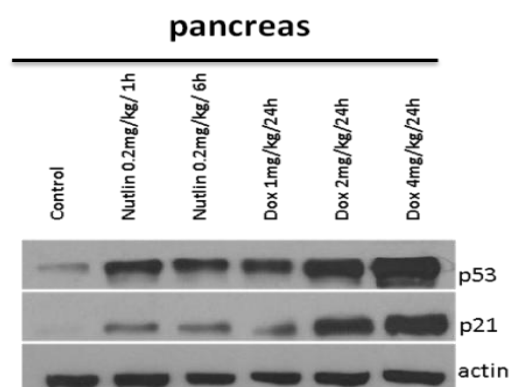
Σχήμα 36 A. Η ανοσοαποτύπωση της *Ins* και της β-ακτίνης πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας πρωτεϊνικό εκχύλισμα από τον παγκρεατικό ιστό ο οποίος εκτέθηκε, ή όχι, σε *nutlin -3a*. B. Η ποσοτικοποίηση των ζωνών φαίνεται στο κάτω τμήμα του σχήματος.

3.4.2 Η σημασία της εξωγενούς αύξησης της p21 μέσω *nutlin -3a* στον επαγόμενο διαβήτη. Διακοπή της απόπτωσης και προστασία από τον διαβήτη

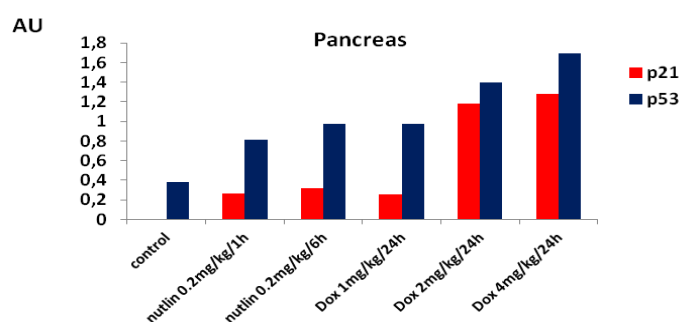
3.4.2.1 Εξωγενής αύξηση της p21 μέσω *nutlin -3a* σε πειραματικά μοντέλα μυών

Εφόσον το *Nutlin -3a* και το *DOX* διαμεσολαβούν στην βλάβη του DNA και οδηγούν σε ενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 (Lowe et al., 1994), διερευνήθηκε η ενεργοποίηση της p53 κατά την επίδραση *DOX*, μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων της ίδιας αλλά και του μεταγραφικού της στόχου p21 (el-Deiry et al., 1993). Τα αυξημένα επίπεδα της p21 και της p53 (Σχήμα 37) επιβεβαιώνουν ότι τα κύτταρα υπέστησαν γενετοξικό στρες μέσω του φαρμάκου *DOX* με επακόλουθη ενεργοποίηση της p53 και του μεταγραφικού της στόχου p21.

A.



B.

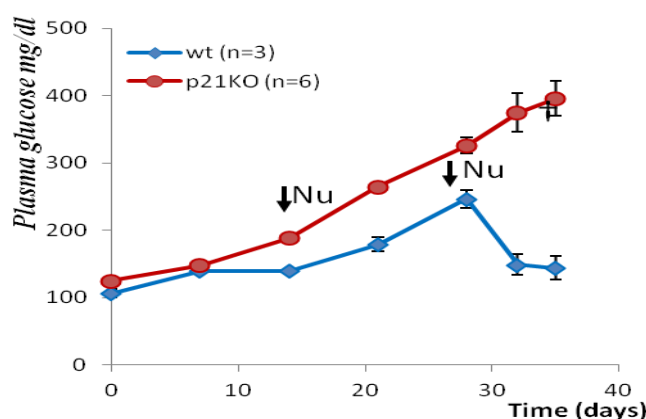


Σχήμα 37. Α. Επαγωγή της p53 και της p21 από το DOX και από το Nutlin -3a όπως ανιχνεύτηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ιστούς από πάγκρεας μών αγρίου τύπου. Β. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων αυτών έγινε μέσω επιπέδων της ακτίνης.

3.4.2.2 Υπερέκφραση της p21 σε πάγκρεας μύος *nutlin -3a* βελτιώνει την αποκατάσταση της λειτουργίας των β κυττάρων μετά από επαγόμενο διαβήτη, μέσω υψηλής περιεκτικότητας σε δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (HFD) με νερό πλούσιο σε σουκρόζη 10%

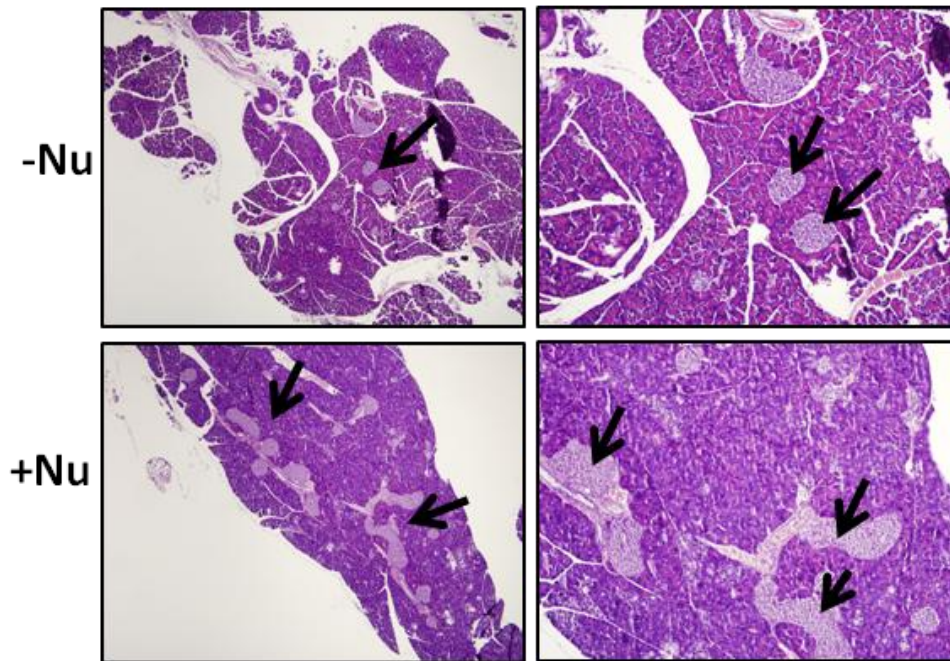
Στην επόμενη ομάδα πειραμάτων μελετήσαμε την συμβολή της p21 στο διαβήτη, καθώς όπως προαναφέρθηκε αποτελεί βασικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου. Παρόλο που η p21 λειτουργεί ως αναστολέας της προόδου του κυτταρικού κύκλου και εμπλέκεται ενεργά στην τοξικότητα της γλυκόζης των β κυττάρων (Kaneto *et al.*, 1999), εξετάστηκε η επίδραση της p21 στα παγκρεατικά β -κύτταρα από μία άλλη εναλλακτική προσέγγιση. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι συνέπειες της υπερέκφρασης της p21 στον διαβήτη. Ως εκ τούτου, μετά την χορήγηση *nutlin -3a* προκλήθηκε υπερέκφραση της p21 στα νησίδια των β κυττάρων (**Σχήμα 37**). Για να

μελετήσουμε τις επιδράσεις της υπερέκφρασης της p21, τοποθετήσαμε θηλυκά ποντίκια με έλλειψη του p21 (p21^{-/-}) και ποντίκια αγρίου τύπου C57BL/6, ηλικίας 5 έως 6 εβδομάδων σε δίαιτα πλούσια σε λιπαρά με νερό πλούσιο σε σουκρόζη (10%) για 4 εβδομάδες. Στα C57BL/6 ποντίκια που τους χορηγήθηκε *nutlin -3a* σε συγκέντρωση 4 mg/kg με 5 καθημερινές ενέσεις (υπερέκφραση της p21) έγινε άμεση επίτευξη της φυσιολογικής ομοιόστασης της γλυκόζης στο αίμα, όχι όμως και στα p21KO (Σχήμα 38). Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν το θετικό ρόλο του *nutlin-3a* στο διαβήτη και αποδεικνύουν ότι η ενεργότητά του αυτή, απαιτεί φυσιολογική έκφραση της p21 (Σχήμα 38).



Σχήμα 38. Διάγραμμα μέτρησης συγκέντρωσης γλυκόζης στα διαβητικά ποντίκια p21KO και C57BL/6 μετά από χορήγηση *nutlin -3a*.

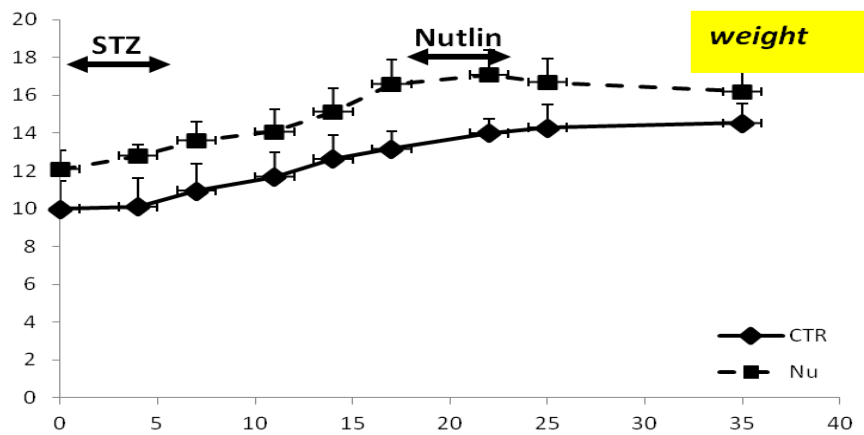
Χρώση του παγκρέατος με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (H&E) των διαβητικών C57BL/6 μυνών, που έλαβαν δίαιτα πλούσια σε λιπαρά έδειξε, ότι τα αγρίου τύπου διαβητικά ποντίκια που υπέστησαν αγωγή με *nutlin -3a* εμφάνισαν μεγαλύτερο αριθμό υπερπλαστικών νησιδίων σε σχέση με τα αγρίου τύπου διαβητικά ποντίκια που δεν υπέστησαν αγωγή με *nutlin -3a* (Σχήμα 39).



Σχήμα 39. Ιστολογικές αναλύσεις του παγκρεάτων των διαβητικών C57BL/6, που έλαβαν δίαιτα πλούσια σε λιπαρά, απουσία ή παρουσία nutlin -3a.

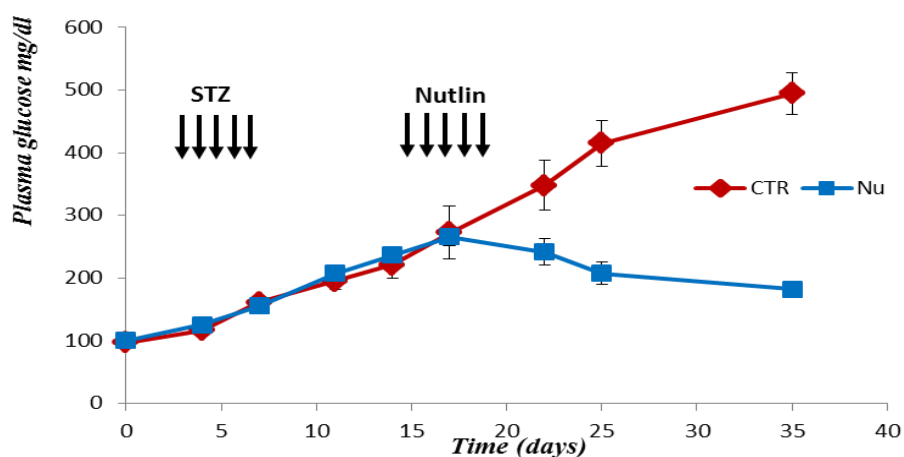
Μεταγενέστερες μελέτες οδήγησαν σε ένα μοντέλο σακχαρώδους διαβήτη επαγόμενου από στρεπτοζοτοκίνη σε μύες, ακολουθούμενο από δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (HFD). Κατά το πρώτο στάδιο του πειράματος στους μύες προκλήθηκε πειραματικός σακχαρώδης διαβήτης με τη χρήση στρεπτοζοτοκίνης και ελέγχθηκε το επίπεδο της νόσου με τη χρήση ειδικού μηχανήματος αλλά και ταινιών μέτρησης των επιπέδων γλυκόζης από σταγόνα αίματος που προερχόταν από την ουρά του μυ. Η χρήση της στρεπτοζοτοκίνης (τοξικός παράγοντας ως προς τα κύτταρα Langherhans του παγκρέατος) πραγματοποιήθηκε με 5 διαδοχικές ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις στο κάθε ένα από τα πειραματόζωα σε αναλογία 50 mg/kg βάρους σώματος. Η ενδεδειγμένη ποσότητα για κάθε δόση στρεπτοζοτοκίνης σε κάθε ένα από τα ζώα με βάση το ακριβές βάρος τους, διαλύθηκε σε μικρό όγκο (0,5ml) ισότονου διαλύματος (0,9%) χλωριούχου νατρίου. Ο πειραματικός σακχαρώδης διαβήτης διαπιστώθηκε στους μύες μέσω της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα κάθε πειραματόζωου. Μια ομάδα (2^η) από αυτά τα πειραματόζωα, μετά την επαγωγή διαβήτη, έλαβε *nutlin -3a*. Το *nutlin -3a* χορηγήθηκε σε συγκέντρωση 4 mg/kg σε 5 καθημερινές ενέσεις.

Κάθε ένα πειραματόζωο, ζυγίζοταν και καταγραφόταν το ακριβές βάρος του με τη βοήθεια ζυγαριάς ακριβείας (**Σχήμα 40**).



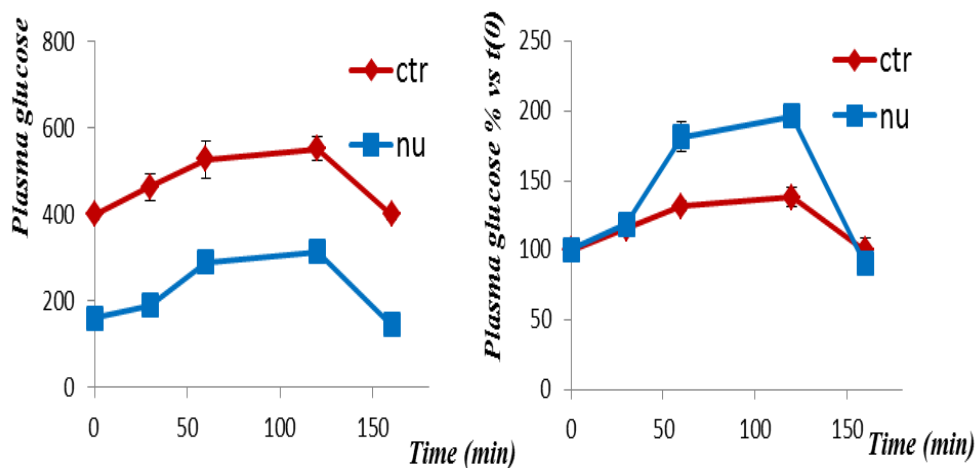
Σχήμα 40. Διάγραμμα καταγραφής σωματικού βάρους διαβητικών μωών καθώς και διαβητικών μωών με χορήγηση *nutlin* -3a.

Από την μηδενική εβδομάδα μέχρι και την τρίτη εβδομάδα και οι 2 ομάδες των πειραματόζωων είχαν παρόμοια επίπεδα γλυκόζης νηστείας στο πλάσμα, για την πρώτη ομάδα (1^η εβδ. average 97mg/dl, 2^η εβδ. average 116mg/dl, 3^η εβδ. average 161mg/dl) για την δεύτερη ομάδα (1^η εβδ. average 100mg/dl, 2^ηεβδ. average 125mg/dl 3^η εβδ. average 155mg/dl) για τα C57BL/6 ποντίκια). Στην 4η εβδομάδα του πειράματος, τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας των διαβητικών C57BL/6 ποντικών ήταν 414mg/dl ενώ των διαβητικών C57BL/6 ποντικών μετά από χορήγηση *nutlin* -3a ήταν 207 mg/dl ($p < 0,05$), (Σχήμα 41).



Σχήμα 41. Διάγραμμα μέτρησης συγκέντρωσης γλυκόζης διαβητικών μωών καθώς και διαβητικών μωών με χορήγηση *nutlin* -3a.

Για να ελέγξουμε αν η υπερέκφραση της p21 που έγινε μέσω *nutlin -3a* σε πειραματόζωα διαβητικά, μετά από χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης, επηρεάζει τη διαταραχή της ομοιόστασης της γλυκόζης πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη (GTT).



Σχήμα 41. Δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη. Α. Τα στοιχεία εκφράζονται ως μέση τιμή από 3 μύες ± τυπική απόκλιση. Τα αποτελέσματα ήταν στατιστικώς σημαντικά με $*p < 0.05$ (αριστερό πάνελ). **Β.** Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ποσοστό επί τοις εκατό, όπου η έκφραση της γλυκόζης αντιστοιχεί σε ποσοστό 100%.

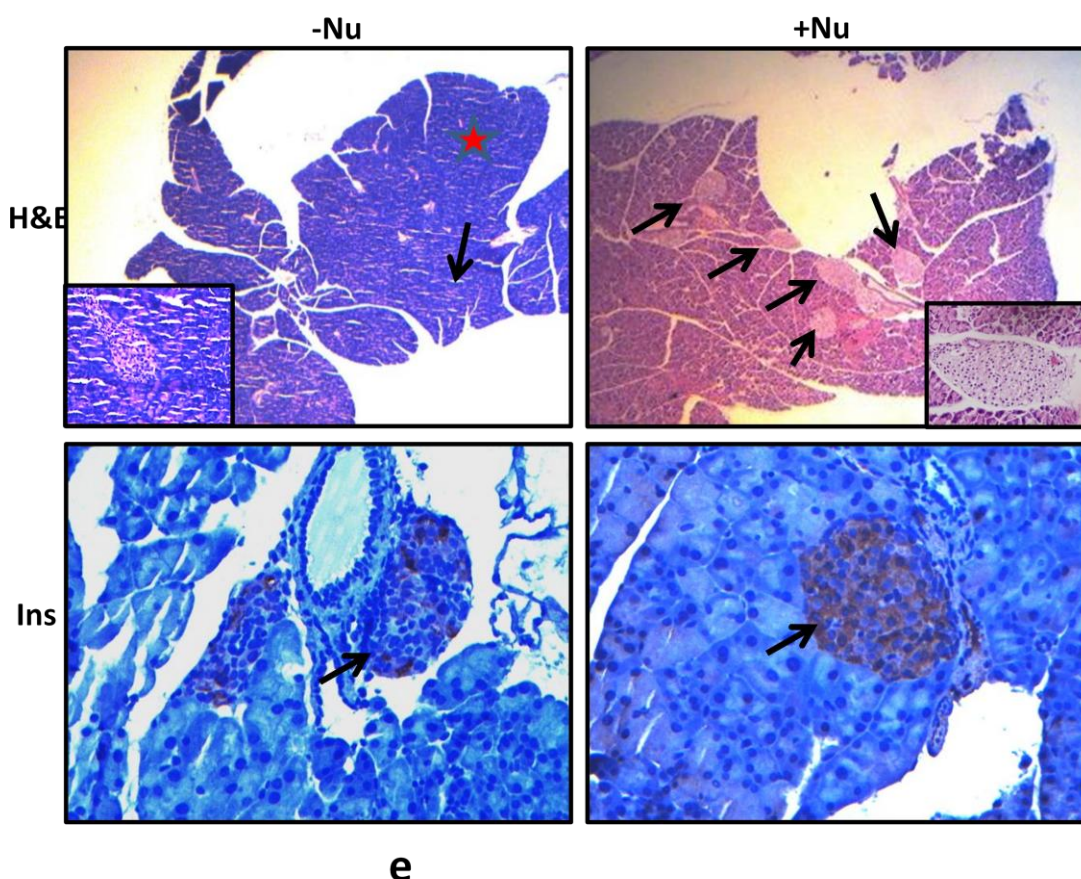
Παρατηρείται, λοιπόν, ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης μειώνεται σε διαβητικούς μύες που τους έχει χορηγηθεί *nutlin -3a*. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η μείωση της γλυκόζης που παρατηρείται στους διαβητικούς αγρίου τύπου μύες που τους έχει χορηγηθεί *nutlin -3a* είναι μοναδική και συγκεκριμένη (Σχήμα 41).

3.4.2.3 Ιστολογικές αναλύσεις στα παγκρέατα διαβητικών μυών μέσω STZ και διαβητικών μυών μέσω STZ και ταυτόχρονης χορήγησης *nutlin -3a*

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι, η p21 βρέθηκε να μειώνεται σε παγκρεατικά βήτα κύτταρα υπό την επίδραση υψηλής γλυκόζης, μελετήθηκε η έκφραση της ινσουλίνης στο πάγκρεας μυών μετά από υπερέκφραση της p21. Προς

διερεύνηση αυτού, πραγματοποιήθηκε ανοσοιστοχημεία σε τομές παραφίνης από πάγκρεας θηλυκών μυών, C57BL/6, ηλικίας 5 εβδομάδων. Στην ανοσοιστοχημεία χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ειδικό που ανιχνεύει την ινσουλίνη. Οι τομές χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη, ενώ η αλληλεπίδραση πρώτου και δεύτερου αντισώματος ανιχνεύεται με τη χρήση 3, 3'- διαμινοβενζιδίνης (DAB) δίνοντας ένα καφέ χρώμα όπου εκτελείται η αντίδραση αυτή.

Στο **Σχήμα 42**, με μωβ χρώμα απεικονίζονται οι πυρήνες των κυττάρων που βρίσκονται στο εξωκρινές τμήμα του παγκρέατος. Στην αριστερή και δεξιά άκρη του σχήματος που περιβάλλονται από ένα τετράγωνο, βρίσκεται ένα νησίδιο (ενδοκρινές τμήμα παγκρέατος) ενώ στα από κάτω τμήματα φαίνονται τα νησίδια μεγεθυμένα με φακό 40x. Τα αγρίου τύπου διαβητικά ποντίκια εμφάνισαν μειωμένο αριθμό υποπλαστικών νησιδίων, ενώ τα διαβητικά ποντίκια που υπέστησαν αγωγή με *nutlin-3a-3*, εμφανίζεται μεγαλύτερος αριθμός υπερπλαστικών νησιδίων.

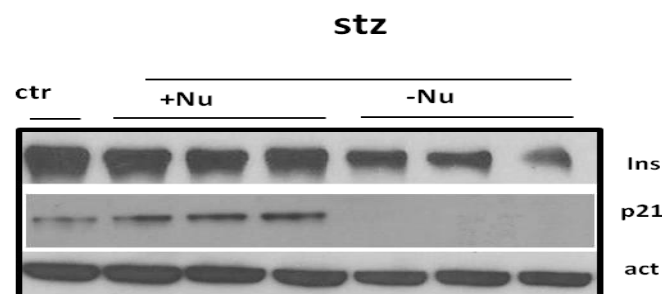


Σχήμα 42. Ιστολογικές αναλύσεις του παγκρέατος των C57BL/6, μετά από χορήγηση STZ και απουσία ή παρουσία *Nutlin-3a*. Χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (H&E) (άνω πάνελ) και ανοσοιστοχημική χρώση (κάτω πάνελ) στα παγκρέατα των C57BL/6 και των *p21 knock-out* την 5η εβδομάδα του πειράματος.

Είναι σαφές ότι η ινσουλίνη εκφράζεται στα παγκρεατικά νησίδια πιο έντονα στους διαβητικούς μύες μετά από χορήγηση *nutlin -3a* συγκριτικά με τους διαβητικούς μύες, απουσία *nutlin -3a*.

Παρόλα αυτά, η ανοσοιστοχημεία έδωσε μια πρώτη εικόνα σχετικά με την έντονη παρουσία της ινσουλίνης στα νησίδια του παγκρέατος μετά από υπερέκφραση της p21. Προκειμένου όμως να επιβεβαιωθεί περαιτέρω αυτό το αποτέλεσμα, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση στον παγκρεατικό ιστό. Κατόπιν έγινε απομόνωση και προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών και στη συνέχεια επιπλέον ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της ινσουλίνης και με αντίσωμα έναντι της ακτίνης (εσωτερικός δείκτης ελέγχου). Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 43^A** της ανοσοαποτύπωσης, η έκφραση της ινσουλίνης αυξάνεται σημαντικά στο πάγκρεας στο οποίο έχει γίνει χορήγηση *nutlin -3a*. Κατόπιν υπολογίστηκε ο λόγος της έκφρασης της Ins/έκφραση της ακτίνης, έτσι ώστε να γίνει η κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών ποσοτήτων και στη συνέχεια έγινε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

A.



Σχήμα 43 A. Η ανοσοαποτύπωση της Ins, p21 και της β-ακτίνης πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας πρωτεϊνικό εκχύλισμα από τον παγκρεατικό ιστό ο οποίος εκτέθηκε ή όχι σε *nutlin -3a*.

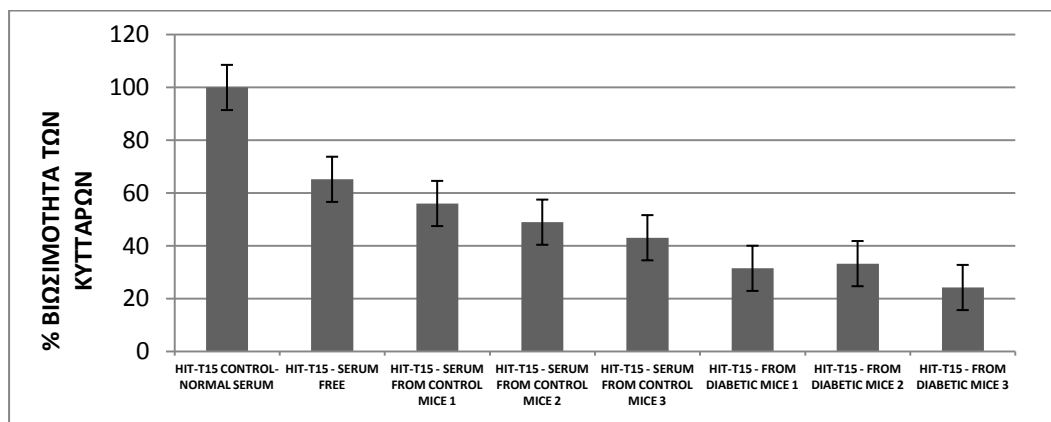
B.



Σχήμα 43B. Η έκφραση της *Ins* υπολογίζεται ως η πυκνότητα των ζωνών που κανονικοποιούνται με τη ζώνη της β -ακτίνης.

Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο διάγραμμα που απεικονίζονται στο **Σχήμα 43^B**, όπου παρατηρείται αύξηση της έκφρασης της p21 και της *Ins* στον παγκρεατικό ιστό. Αυτό είναι μια σημαντική παρατήρηση, δεδομένου ότι το ενδοκρινές τμήμα αλλά και το εξωκρινές τμήμα του παγκρέατος διαθέτει κύτταρα με πολύ υψηλή ανάπτυξη ενδοπλασματικού δικτύου. Στα πειράματα όμως που προηγήθηκαν φάνηκε σαφώς ότι η εξωγενής υπερέκφραση της p21 μέσω *nutlin -3a* αυξάνει σημαντικά την έκφραση των επιπέδων της ινσουλίνης, αποτέλεσμα που προτείνει πιθανή και συγκεκριμένη λειτουργία στα νησίδα του παγκρέατος.

Δε θα μπορούσε στο σημείο αυτό να μην καλλιεργηθεί εύλογα η υπόθεση ότι ένας ανάλογος μιτογόνος παρακρινικός μηχανισμός που σχετίζεται με τη δράση της p21 θα μπορούσε να λειτουργεί και *in vivo* κατά τη διάρκεια της χορήγησης στρεπτοζοτοκίνης στα πειραματόζωα. Προκειμένου να ερευνηθεί αυτή η υπόθεση, χορηγήθηκε σε ποντίκια αγρίου τύπου στρεπτοζοτοκίνη σε πέντε διαδοχικές ημερήσιες ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις. Πέντε ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας απομονώθηκε ο ορός, από τον οποίο αφαιρέθηκε η γλυκόζη μέσω ειδικών στηλών, και ακολούθησε *in vitro* καλλιέργεια κυττάρων HIT-T15 με αυτόν. Ο ορός που απομονώθηκε από τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε στρεπτοζοτοκίνη επέφερε αναστολή στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HIT-T15 σε σχέση με τον ορό από ποντίκια χωρίς καμία χορήγηση **Σχήμα 44**. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με τα αντίστοιχα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος που αναφέρει μείωση του πολλαπλασιασμού των β κυττάρων με την επίδραση στρεπτοζοτοκίνης.



Σχήμα 44. Ο αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε με την μέθοδο MTT 48 ώρες μετά την προσθήκη του ορού στα κύτταρα HIT-T15.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το στρες του ΕΔ αποτελεί έναν από τους πλέον ενδιαφέροντες τομείς έρευνας τελευταία λόγω της πιθανολογούμενης συσχέτισής του με γεγονότα σημαντικά για τον κύκλο ζωής του κυττάρου και γενικότερα με την μοίρα του. Το είδος αυτού του στρες εμφανίζεται όταν η ικανότητα του ενδοπλασματικού δικτύου για την αναδίπλωση πρωτεϊνών και για την αναγνώριση και επιλογή των πρωτεϊνών εκείνων που είναι πιθανά κυτταροτοξικές και πρέπει να απομακρυνθούν στο κυτταρόπλασμα για αποδόμηση, υπερβαίνει τις δυνατότητές του, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στο ΕΔ μη- ή λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Anelli *et al.*, 2008; Marciniak *et al.*, 2006). Πρόκειται για ένα ιδιαίτερα περίπλοκο φαινόμενο το οποίο παρεμβαίνει σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες και απαρτίζεται από πολλά μονοπάτια. Η αυστηρή διαταραχή στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο και κατά συνέπεια στο στρες του ΕΔ. Στο σημείο αυτό αξίζει να επισημανθεί ότι η ευαισθησία προς το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο. Πρόσφατα συμπεράσματα μελετών έχουν αποκαλύψει ότι τα β κύτταρα αντιπροσωπεύουν έναν από τους πιο ευαίσθητους ιστούς έναντι στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και η απόπτωση αυτών μπορεί να είναι μια αιτία εμφάνισης του διαβήτη (Araki *et al.*, 2003). Πιο συγκεκριμένα στο φαινόμενο αυτό συμμετέχει ο προ-αποπτωτικός παράγοντας CHOP (GADD153) που είναι ένα μέλος της οικογένειας C/EBP των bZIP μεταγραφικών παραγόντων και επάγεται σε συνθήκες στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ), (Oyadomari *et al.*, 2002; Oyadomari *et al.*, 2004). Κατά τη διάρκεια του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, η CHOP-εξαρτώμενη απόπτωση θέτει σε κίνδυνο τη συνολική λειτουργικότητα των β παγκρεατικών κυττάρων όπως αποδεικνύεται από το γεγονός ότι τα CHOP-null ποντίκια είναι πιο ανθεκτικά στο διαβήτη σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου, λόγω μειωμένης ικανότητας απόπτωσης (Vassilev *et al.*, 2004; el-Deiry *et al.*, 1993). Η συγκεκριμένη πειραματική διαπίστωση, απεικονίζει τη συμβολή του CHOP στην απόπτωση, στη ρύθμιση του στρες του ΕΔ αλλά και στην εμπλοκή του στην παθογένεια του διαβήτη. Υπό αυτές τις συνθήκες ενεργοποιείται ένας ενδογενής αντισταθμιστικός κυτταρικός μηχανισμός του οποίου η φυσιολογική λειτουργία είναι αρχικά να βοηθήσει το κύτταρο να ανταποκριθεί στις συνθήκες στρες μεταβάλλοντας το προφίλ της μεταγραφής –μετάφρασής του. Αντίθετα σε συνθήκες παρατεταμένου και έντονου στρες του ΕΔ, το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. Ο μηχανισμός αυτός

σχετίζεται με τον ενδογενές πρόγραμμα κυτταρικής 'αυτοκτονίας', απαραίτητο για την φυσιολογική ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών, την ομοιοστάση των ιστών, την άμυνα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών και τελικά με την ανάπτυξη της νόσου του διαβήτη (Laybutt *et al.*, 2007).

Πληθώρα πειραματικών αποτελεσμάτων σε μοριακό επίπεδο, έδειξε ότι υπερβολική έκφραση της p21, είναι υπεύθυνη για την ανάκτηση της λειτουργίας των β κυττάρων του επαγόμενου από στρεπτοζοτοκίνη (STZ) διαβήτη. Η ικανότητα της p21 να ρυθμίζει τόσο τον κυτταρικό κύκλο όσο και την επαγωγή σημάτων έναντι του μηχανισμού απόπτωσης (Gartel *et al.*, 2002), σε συνδυασμό με τα στοιχεία που αποδεικνύουν τον ρόλο της p21 στη διατήρηση της λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων (Cheng *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2009), ώθησε αρκετούς ερευνητές να διερευνήσουν τη σύνδεση μεταξύ του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21 και του διαβήτη (Yang *et al.*, 2009).

Η επικρατούσα άποψη είναι ότι ο διαβήτης οφείλεται στη σταδιακή μείωση της μάζας των β -κυττάρων λόγω αυξημένης κυτταρικής απόπτωσης. Η διατήρηση της μάζας των β -κυττάρων είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ νεογέννησης, πολλαπλασιασμού και απόπτωσης των κυττάρων. Υπό διαβητικές συνθήκες η ισορροπία αυτή μετατοπίζεται προς όφελος της κυτταρικής απόπτωσης με αποτέλεσμα την σταδιακή μείωση της μάζας των β -κυττάρων στα παγκρεατικά νησίδια του Lagerhans. Έχειδειχθεί ότι μάζα των β -κυττάρων κατά τα τελικά στάδια της νόσου μπορεί να είναι μειωμένη έως και 50% (Yang *et al.*, 2009). Επιπρόσθετα η χρόνια υπεργλυκαιμία προκαλεί δυσλειτουργία και απόπτωση των β -κυττάρων μέσω πληθώρας μηχανισμών οι οποίοι συλλογικά αναφέρονται ως τοξικότητα της γλυκόζης (Yang *et al.*, 2009). Οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την διεργασία αυτή δεν είναι πλήρως κατανοητοί.

Δεδομένου του αποφασιστικού ρόλου του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21 στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, ο οποίος αποτελείται από μια άριστα ενορχηστρωμένη ακολουθία γεγονότων που οδηγεί στον πολλαπλασιασμό, στην κυτταρική γήρανση ή στην απόπτωση, στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ο τρόπος επαγωγής της μετάπτωσης του στρες του ΕΔ στην προαποπτωτική κατάσταση, εστιάζοντας στην πιθανή ρύθμιση της p21 από το μεταγραφικό παράγοντα CHOP. Για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα δεδομένα αυτά στην κατανόηση των φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού και στην παθογένεια της νόσου του διαβήτη, αποτελεί πρωτεύουσα σημασία η κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο

ρυθμίζεται η απόπτωση, ώστε να γίνει εφικτή η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών που θα ενισχύουν την ανθεκτικότητα των β -κυττάρων στην απόπτωση και παράλληλα την ικανότητα τους για παραγωγή ινσουλίνης.

Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις παρατηρήσεις μελετήσαμε τον τρόπο ρύθμισης των επιπέδων της p21 από το στρες του ΕΔ. Σε εμβρυικούς ινοβλάστες από ποντίκια (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) καθώς και σε κύτταρα A549 (επιθηλιακά κύτταρα από καρκίνο του πνεύμονα του ανθρώπου) χορηγήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου τουνικαμυκίνης (αναστολέας της γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών, επαγωγέας στρες του ΕΔ) (Mahoney *et al.*, 1979) και μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της p21 τόσο σε επίπεδο RNA (με ημιποσοτικό RT-PCR) όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης (ανοσοαποτύπωση). Η παρούσα μελέτη προτείνει ότι φαρμακολογική επαγωγή του στρες του ΕΔ με τουνικαμυκίνη προκαλεί καταστολή των επιπέδων της p21 και ταυτόχρονα επαγωγή του CHOP (Virrey *et al.*, 2008). Πιο συγκεκριμένα, στο εν λόγω πείραμα η ικανοποιητική επαγωγή στρες του ΕΔ επιβεβαιώθηκε με την ταυτοποίηση της αύξησης των επιπέδων της πρωτεΐνης – συνοδού BiP, τα επίπεδα της οποίας θεωρούνται διαγνωστικά για το κατά πόσο ένα κύτταρο τελεί υπό συνθήκες στρες του ΕΔ (Bertolotti *et al.*, 2000) έπειτα από χορήγηση της τουνικαμυκίνης.

Με στόχο να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος της p21, εξετάστηκε αν η καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής, προκύπτει από την αποικοδόμησή της μέσω του πρωτεασώματος. Αποτελέσματα μελετών έχουν αποκαλύψει ότι η πρωτεΐνη CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein) επάγει την έκφραση του υποδοχέα θανάτου 5 (DR5) το οποίο επάγει τον πρωτεοσωμικό αναστολέα, το πεπτιδίο MG132 (Vassilev *et al.*, 2004). Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι η μείωση της έκφρασης της p21 είναι ανεξάρτητη από την αποικοδόμηση της μέσω του πρωτεασώματος, μελετήθηκαν τα επίπεδα της p21, παρουσία του αναστολέα του πρωτεασώματος (MG132) σε εμβρυικούς ινοβλάστες μυών (MEFs). Διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της έκφρασης της p21 παραμένουν αυξημένα υπό την επίδραση του αναστολέα του πρωτεασώματος. Επιπρόσθετα με ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων σε τουνικαμυκίνη και σε MG132 παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της p21. Τα αποτελέσματα στα προαναφερθέντα πειράματα αποτελούν σοβαρή ένδειξη ότι η καταστολή της έκφρασης της p21 οφείλεται κατά αποκλειστικότητα στο στρες του ΕΔ και είναι ανεξάρτητη της δράσης του πρωτεασώματος.

Επιπροσθέτως σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε επαγωγή της πρωτεΐνης CHOP μέσω της δράσης της τουνικαμυκίνης, η οποία ενισχύθηκε από τον αναστολέα πρωτεασώματος MG132, γεγονός που συνάδει με το δυναμικό ρόλο του πρωτεασώματος που σχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης του CHOP. Συνεπώς, οι αναστολείς πρωτεασώματος παρέχουν μια αποτελεσματική θεραπεία γιατί μέσω της αντικαρκινικής δράσης τους επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη. Η δράση τους αυτή συντελείται μέσω επαγωγής της απόπτωσης διαμεσολαβούμενης της απορρύθμισης της κανονισμένης καταστροφής των pro-growth πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου (Yoshida T *et al.*, 2005).

Το γεγονός αυτό μας θέτει το ερώτημα αν η αναστολή της έκφρασης της p21 μετά από χορήγηση τουνικαμυκίνης, συμπίπτει με την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου CHOP.

Με στόχο να διερευνήσουμε πειραματικά αυτή την υπόθεση αρχικά μελετήσαμε τη ρύθμιση της p21 από το CHOP σε συνθήκες στρες του ΕΔ. Είναι γνωστό ότι το CHOP ενεργοποιείται από το στρες του ΕΔ μέσω του μεταγωγέα PERK και μετά από παρατεταμένο στρες επάγει την απόπτωση (Wang *et al.*, 1996; Harding HP *et al.*, 2000; Zinszner *et al.*, 1998). Αυτή η παρατήρηση, σε συνδυασμό με την αντι-αποπτωτική δράση της p21 οδήγησε στην υπόθεση ότι το CHOP μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση της p21. Προκειμένου να προσδιοριστεί αν εμπλέκεται η πρωτεΐνη CHOP στη ρύθμιση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων με φορέα έκφρασης που περιέχει το cDNA του CHOP και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της p21. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν καταστολή της p21 και έπειτα από εξωγενή έκφραση του CHOP. Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, έχουν δείξει ότι φαρμακολογική επαγωγή του στρες του ΕΔ με τουνικαμυκίνη, προκαλεί καταστολή των επιπέδων της p21 και ταυτόχρονη επαγωγή της CHOP. Ενισχύοντας την παραπάνω πεποίθηση επισημαίνεται ότι παρατηρήθηκε αντίστοιχη καταστολή της p21 και έπειτα από εξωγενή έκφραση του CHOP.

Δεδομένου ότι η έκφραση της p21 απουσία γενοτοξικού στρες είναι μόνο οριακά ανιχνεύσιμη, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μας τα κύτταρα A549 (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα), εκτέθηκαν στον χημειοθεραπευτικό φάρμακο αδριαμυκίνη (*doxorubicin*, DOX), σε αυξανόμενη ποσότητα, μετά από διαμόλυνση των κυττάρων A549 με το πλασμίδιο CHOP-pcDNA3.1. Όσον αφορά την αδριαμυκίνη, πρέπει να σημειωθεί ότι πρόκειται για ένα

χημικοθεραπευτικό φάρμακο, που ανήκει στην οικογένεια των ανθρακυκλινών, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως στην θεραπεία ποικίλων μορφών καρκίνου. Ο τρόπος δράσης της αδριαμυκίνης συνοψίζεται στην επαγωγή μιας απόκρισης, στην βλάβη του DNA (DNA damage response, DDR), που διεκπεραιώνεται μέσω της ικανότητας αλληλεπίδρασης με το DNA και της δημιουργίας ελευθέρων ριζών ROS (reactive oxygen species) που οδηγούν στην αναστολή της δράσης της τοποϊσομεράσης II (Gewirtz, 1999). Η αναστολή αυτή είναι υπεύθυνη για την παραγωγή δίκλωνων σπασιμάτων στο DNA, τα οποία αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA, καθώς και πρωτεΐνες που ελέγχουν τόσο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και τον κυτταρικό θάνατο. Με βάση τα αποτελέσματα μας η αύξηση των επιπέδων της p21, μέσω p53-εξαρτώμενου μηχανισμού, που προκαλείται από την *αδριαμυκίνη*, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τόσο τα επίπεδα του mRNA της p21 όσο και τα επίπεδα πρωτεΐνης, μειώνονται από τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα CHOP, αντικαθιστώντας την ισχυρή ενεργοποίηση της p21 από το *DOX* που προκαλείται από την p53. Η επαγωγή των επιπέδων της p21 από την *αδριαμυκίνη* υποδεικνύει ότι ο παραπάνω μηχανισμός αποκτά φυσιολογική σημασία και συμφωνεί με την λειτουργία μιας απόκρισης με προστατευτικό χαρακτήρα για το κύτταρο, η οποία ενεργοποιεί την p21. Συμπερασματικά, επισημαίνεται ότι η παρούσα μελέτη τεκμηρίωσε το γεγονός ότι η p21 επάγεται από την χορήγηση του αντικαρκινικού φάρμακου *αδριαμυκίνη* και μάλιστα με τρόπο εξαρτώμενο του γονιδίου p53.

Σε συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων, η απόφαση μεταξύ θανάτου και προσαρμογής στο στρες του ΕΔ εξαρτάται αρχικά περισσότερο από την ένταση της ενεργοποίησης των αισθητήρων του UPR παρά από τα ειδικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται (Rutkowski *et al.*, 2006). Με δεδομένο ότι, είτε κάτω από ήπιο είτε από ισχυρό στρες όλοι οι αισθητήρες του UPR ενεργοποιούνται και οδηγούν στην επαγωγή είτε προ-αποπτωτικών είτε αντι-αποπτωτικών παραγόντων τίθεται το ερώτημα το κατά πόσον η διαφορική ρύθμιση της p21 συμβάλλει στη προ-επιβιωτική δράση του UPR. Μια απόπειρα διερεύνησης του συγκεκριμένου προβληματισμού, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, αποτελεί η μελέτη της επίδρασης του στρες του ΕΔ μέσω του *αδριαμυκίνης* στην ρύθμιση των επιπέδων της p21 *in vivo*. Από τα πειραματικά αποτελέσματα φάνηκε ότι η επίδραση της *TUN* σε ιστούς όπως σπλήνα, ήπαρ, καρδιά, πνεύμονες και πάγκρεας από ποντίκια αγρίου τύπου προκάλεσε ιδιαίτερη καταστολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα της p21.

Είναι επιστημονικά αποδεδειγμένο ότι η απώλεια του γονιδίου CHOP σε κύτταρα μυών οδηγεί σε μείωση της απόπτωσης μέσω του στρες του ΕΔ (Song *et al.*, 2008). Επιπλέον, έχει τεκμηριωθεί ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης CHOP επάγει την απόπτωση σε κυτταρικές σειρές (McCullough *et al.*, 2001). Το CHOP μπορεί να ευαισθητοποιήσει τα κύτταρα στην απόπτωση μέσω καταστολής του αντι-αποπτωτικού παράγοντα Bcl-2 και επαγωγής του Bim, το οποίο είναι ένα προ-αποπτωτικό μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 (McCullough *et al.*, 2001; Puthalakath *et al.*, 2007). Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη τον ρόλο του CHOP στο στρες του ΕΔ που σχετίζεται με την απόπτωση (Yoshida *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 1996) αναρωτηθήκαμε αν αυτή η καταστολή της p21 *in vivo*, είναι CHOP -εξαρτώμενη. Πειραματικά μοντέλα μυών ελλειμματικά για το γονίδιο του CHOP ενέθηκαν με *Tun* και στη συνέχεια αξιολογήθηκαν τα επίπεδα της p21. Είναι σπουδαίας σημασίας το γεγονός ότι, όχι μόνο δεν παρατηρήθηκε μείωση του p21, αλλά καταγράφηκε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης p21. Μολονότι η πρωτεΐνη CHOP παρέμεινε μη ανιχνεύσιμη εν απουσία τουνικαμυκίνης, είναι κατανοητό ότι τα χαμηλά επίπεδα του CHOP, κάτω από τα όρια ανίχνευσης των δοκιμασιών μας, ήταν επαρκή για να ρυθμίσουν την έκφραση της p21. Τα συμπεράσματά μας αυτά επιβεβαιώθηκαν πλήρως και από τα αποτελέσματα της έρευνας των Ron D και συνεργατών το 2004, οι οποίοι με τη χρήση μικροσυστοιχιών, αξιολόγησαν τις συνέπειες της τουνικαμυκίνης στους εμβρυϊκούς πρωτογενείς ινοβλάστες μυών (MEFs) όπου παρατήρησαν μείωση των επιπέδων της p21 σε αγρίου τύπου ινοβλάστες αλλά όχι σε ινοβλάστες ελλειμματικούς για το CHOP.

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα συνηγορούν σε μια σύνθετη ρύθμιση της p21 από το CHOP σύμφωνα με την οποία, στην απουσία ή πιθανώς κατά τη διάρκεια ήπιου στρες του ΕΔ, το CHOP επιδρά αυξητικά στην έκφραση της p21, ενώ αντίθετα κατά τη διάρκεια έντονου και παρατεταμένου στρες του ΕΔ, το CHOP εμφανώς καταστέλλει την έκφραση της p21. Ο μηχανισμός αυτός αρχικά είναι σύμφωνος με την προ-επιβιωτική δράση, ενώ η κατασταλτική δράση του CHOP διευκολύνει την προ-αποπτωτική δράση του ενδογενή αντισταθμιστικού μηχανισμού των λάθος αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Επιπρόσθετα για να εξακριβωθεί αν το στρες του ΕΔ, που όπως αποδείξαμε σχετίζεται άμεσα με την καταστολή της p21, δεν είναι p53-εξαρτώμενο, χρησιμοποιήσαμε πειραματικά μοντέλα μυών στα οποία απουσίαζε το γονίδιο p53. Τα συγκεκριμένα πειραματικά μοντέλα ενέθηκαν με *τουνικαμυκίνη*, διαδικασία που

κατέληξε σε μείωση της p21. Γνωρίζοντας ότι απουσία της p53 διεγείρει τη p21 μετά από γενετοξικό στρες (el-Deiry *et al.*, 1993), προκύπτει εύλογα το συμπέρασμα ότι, η καταστολή της p21 που σχετίζεται με το στρες του ΕΔ δεν είναι p53-εξαρτώμενη.

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα που περιγράφηκαν έχουν ληφθεί χρησιμοποιώντας είτε εμβρυϊκούς ινοβλάστες μυός, είτε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα. Με στόχο την πληρέστερη κατανόηση της βιολογικής σημασίας των πειραματικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν κρίθηκε αναγκαία η επιβεβαίωση και επέκταση αυτών σε κύτταρα παγκρεατικής προέλευσης που συνδέονται άρρηκτα με το διαβήτη. Προς αυτήν την κατεύθυνση, για τις *in vitro* μελέτες μας χρησιμοποιήσαμε HIT-T15 κύτταρα νησιδίων του παγκρέατος, τα οποία αντιπροσωπεύουν ένα ευρέως αποδεκτό μοντέλο για τη μελέτη της λειτουργίας των βήτα κυττάρων κατά τη διάρκεια του διαβήτη (Skelin., *et al* 1993). Επισημαίνεται ότι τα κύτταρα αυτά αποκρινόμενα στη γλυκόζη εκφράζουν ινσουλίνη. Με τον τρόπο αυτό, διατηρούνται οι ενδογενείς και φυσιολογικοί λειτουργικοί μηχανισμοί για τη ρύθμιση της δραστηριότητας των βήτα κυττάρων.

Πιο συγκεκριμένα, μελετώντας την κυτταρική σειρά HIT-T15, παρατηρήθηκε ότι υπό την επίδραση χαμηλής ή υψηλής γλυκόζης σε καλλιέργεια κυττάρων προχωρημένης γενιάς και σε συνθήκες που προκαλούν στρες του ΕΔ, τα επίπεδα της έκφρασης της p21 αναστέλλονται. Επιπρόσθετα, χορήγηση με *nutlin -3a*, που όπως έχει αποδειχθεί ενεργοποιεί την έκφραση της p21 μέσω ενός p53-εξαρτώμενου μηχανισμού (el-Deiry *et al.*, 1993, Vassilev *et al.*, 2004), ουσιαστικά απαλλάσσει τα κύτταρα από το στρες του ΕΔ, γεγονός που αποδεικνύεται από την αναστολή της έκφρασης της BiP και του CHOP.

Συνοψίζοντας, διαπιστώσαμε σοβαρές ενδείξεις πως τα επίπεδα της πρωτεΐνης p21 εμφανίζουν μια αντίστροφη σχέση με τα επίπεδα της πρωτεΐνης CHOP τόσο σε συνθήκες *in vivo* όσο και *in vitro*. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται αν λάβει κανείς υπόψη ότι τα επίπεδα της p21 υφίστανται δραματική μείωση μετά από την αυξανόμενη έκφραση του CHOP από το επίπεδο του κυττάρου (στην καλλιέργεια ινοβλαστών, A549 και HIT-T15 κυττάρων), και τελικά στο επίπεδο του οργανισμού (*in vivo*).

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί, ότι καταγράφηκε μερική επαγωγή στα επίπεδα της πρωτεΐνης p21, αλλά όχι στο mRNA αυτής, μετά από διαμόλυνση κυττάρων με πλασμίδιο έκφρασης του CHOP σε μικρότερες συγκεντρώσεις, γεγονός που υποδηλώνει μετά-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης της p21.

Τα αποτελέσματά μας μπορούν πιθανόν να εξηγηθούν εξετάζοντας τη ρύθμιση της p21 από τον προ-αποπτωτικό παράγοντα CHOP σε μεταγραφικό επίπεδο. Αποτελεί αναμφισβήτητο γεγονός ότι η μεταγραφή γονιδίων, ως απάντηση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, επιτυγχάνεται με διακριτούς μηχανισμούς. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι, οι μεταγραφικοί ενεργοποιητές προσδένονται σειριακά στα ρυθμιστικά τους στοιχεία και αυτό οδηγεί σε μια καθορισμένη σειρά στρατολόγησης τόσο των παραγόντων που αλλάζουν τη δομή της χρωματίνης όσο και των γενικών μεταγραφικών παραγόντων (Cosma 2002). Αυτές οι διαφορές σχετίζονται με διαφορετικές βιολογικές ανάγκες για κάθε γονιδιακό προϊόν. Σε αυτό το κομμάτι της διατριβής εξετάζεται αν η συγκεκριμένη αλληλουχία αναγνώρισης από το CHOP, παίζει πράγματι σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της p21 από το CHOP.

Προς την κατεύθυνση αυτή, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού για το αν η διαφορική αυτή ρύθμιση της p21 οφείλεται στην άμεση επίδραση του CHOP στον υποκινητή της p21. Εκτός από την υποκλωνοποίηση ολόκληρου του υποκινητή της p21 πραγματοποιήθηκε και υποκλωνοποίηση τμήματος του υποκινητή ο οποίος χαρακτηρίζεται από έλλειψη της αλληλουχίας πρόσδεσης του CHOP. Αφού κατασκευάστηκαν τα πλασμίδια, χρησιμοποιήθηκαν για την παροδική επιμόλυνση κυττάρων σε συνδυασμό με αυξανόμενες δόσεις του πλασμιδίου που φέρει το cDNA του γονιδίου CHOP και σε επόμενο πείραμα με τη φαρμακολογική επαγωγή του στρες του ΕΔ από τουνικαμυκίνη. Έπειτα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ενεργότητας λουσιφεράσης, η οποία είναι ανάλογη και με τα επίπεδα ενεργοποίησης του υποκινητή της p21. Δεδομένου ότι η p53 είναι ο κύριος ρυθμιστής της μεταγραφής της p21 και λαμβάνοντας υπόψη ότι η p53 μπορεί να αλληλεπιδράσει με τους αισθητήρες του UPR κατά το στρες του ΕΔ, το τμήμα του υποκινητή που χρησιμοποιήθηκε δεν περιέχει τη θέση πρόσδεσης της p53. Έτσι, λοιπόν, η πιθανή δράση της p53 στο στρες του ΕΔ που σχετίζεται με την μεταγραφική ρύθμιση της p21 είχε μειωθεί σημαντικά.

Με δεδομένο ότι κάτω από βραχυπρόθεσμες στρεσογόνες συνθήκες που διαδραματίζονται στο ΕΔ το UPR έχει προστατευτικό και προ- επιβιωτικό ρόλο, τίθεται το ερώτημα το πως μεταβάλλεται η μεταγραφική δραστηριότητα της p21 σε ήπιες συνθήκες στρες του ΕΔ. Οπότε μελετήσαμε την επίδραση της μεταγραφικής δραστηριότητας της p21 σε διαμολυσμένα κύτταρα με το πλασμίδιο L1R1-Luc (πλασμίδιο που είναι υποκλωνοποιημένος ολόκληρος ο υποκινητής της p21) με ταυτόχρονη χορήγηση τουνικαμυκίνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Από τα

πειραματικά αποτελέσματα φάνηκε ότι η πιο μικρή συγκέντρωση τουνικαμυκίνης (0,1μg/ml) επάγει την παραγωγή της λουσιφεράσης, που είναι ο δείκτης της μεταγραφικής δραστηριότητας της p21 σε σχέση με τα κύτταρα που δεν τους έχει χορηγηθεί τουνικαμυκίνη.

Ακολούθως, διαπιστώθηκε ότι όσο αυξανόταν περαιτέρω η συγκέντρωση της τουνικαμυκίνης, παρατηρήθηκε μια εξαρτώμενη μείωση της επαγωγής της λουσιφεράσης στις κυτταρικές σειρές MEFs, HIT-T15 και A549. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι στη κυτταρική σειρά που είναι ελλειμματική για το CHOP παρατηρήθηκε καθολική μείωση της ενεργότητας της λουσιφεράσης για το γονίδιο p21.

Περαιτέρω πειράματα με το πλασμίδιο έκφρασης του CHOP και συγκέντρωσης τουνικαμυκίνης 5μg/ml κατέστειλαν σημαντικά την δραστηριότητα της λουσιφεράσης και κατά συνέπεια την δράση του υποκινητή της p21. Κατά την ολοκλήρωση αυτού του τμήματος της πειραματικής διαδικασίας προέκυψε το συμπέρασμα ότι πράγματι ο μεταγραφικός παράγοντας CHOP ρυθμίζει την p21 σε άμεσο μεταγραφικό επίπεδο, και συγκεκριμένα συμβάλλει στην καταστολή της p21 μέσω της έκφρασης του CHOP, σε MEFs, σε A549 καθώς και σε HIT-T15 κύτταρα. Απροσδόκητα, μετά από χορήγηση *TUN*, στα κύτταρα ινοβλαστών από τα οποία απουσιάζει το γονίδιο CHOP, παρουσιάστηκε μείωση της δραστηριότητας του υποκινητή της p21 η οποία παρόλο που ήταν λιγότερο έντονη από εκείνη που παρατηρήθηκε στα αγρίου τύπου, ήταν ακόμη ανιχνεύσιμη. Δεδομένης της διέγερσης της έκφρασης της p21 από την *TUN* σε ιστούς από πειραματόζωα ελλειμματικά για το γονίδιο CHOP, αυτή η μείωση της δραστηριότητας του υποκινητή της p21 σε CHOP - null κύτταρα είναι πιθανό να οφείλεται σε κάποιο εναλλακτικό μηχανισμό, που μπορεί να συμβάλλει στη ρύθμιση της έκφρασης της p21. Επιπρόσθετοι λόγοι που μπορούν να εξηγήσουν αυτή την διαφορά είναι ότι οι δοκιμασίες στον υποκινητή της p21 απεικονίζουν μεταγραφική ενεργοποίηση, ενώ η ανάλυση ανοσοστυπώματος απεικονίζει την μετα-μεταγραφική ρύθμιση.

Εδώ και μερικές δεκαετίες, μελέτες καταδεικνύουν ότι η ανασταλτική δράση του CHOP στη μεταγραφή των γονιδίων συμβαίνει, τουλάχιστον εν μέρει, λόγω του ανταγωνισμού του με C/EBP μέλη της οικογένειας (Ron *et al.*, 1992; Timchenko., *et al.*, 1996). Είναι πιθανόν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας C/EBPα διεγείρει την μεταγραφή της p21 μέσω της πρόσδεσης με CCAAT ρυθμιστικά στοιχεία (Chinery *et al.*, 1997; Cram *et al.*, 1998) και μετατοπίζονται από το CHOP κατά τη διάρκεια του

στρες του ΕΔ με αποτέλεσμα την μείωση της μεταγραφής της p21. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, ο υποκινητής της p21 που δεν περιέχει την αλληλουχία CCAAT, μειώνει σημαντικά την αρχική δραστικότητα του υποκινητή της p21 και καταργεί τις ανασταλτικές δράσεις του CHOP και της *TUN* στην μεταγραφή των MEFs, A549, και CHOP null κυττάρων. Παράλληλα με αυτό επισημαίνεται ότι, οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις του CHOP προκάλεσαν μια δοσοεξαρτώμενη μείωση στην έκφραση της δραστικότητας λουσιφεράσης σε κύτταρα HIT-T15 που προκαλείται από το C/EBPα ενώ αυξανόμενες ποσότητες του C/EBPα κατάργησαν τις ανασταλτικές επιδράσεις του CHOP. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί απόλυτα με την αύξηση των επιπέδων της p21 σε ιστούς από μύες όπου απουσιάζει το CHOP. Ωστόσο στις δοκιμασίες του υποκινητή της p21 χρησιμοποιώντας ινοβλάστες που δεν εκφράζουν το CHOP, παρατηρήθηκε μικρή μείωση της δραστικότητας του υποκινητή της p21 μετά την έκθεση των κυττάρων στην τουνικαμυκίνη.

Αξιολογώντας τα συμπεράσματα αυτά και βασιζόμενοι στην αποδεδειγμένη πιθανή ρυθμιστική δυναμική της p21 από το CHOP προκύπτει εύλογα το ερώτημα αν το CHOP και ο υποκινητής της p21 αλληλεπιδρούν φυσικά. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης, η οποία απέδειξε ότι πράγματι το CHOP αλληλεπιδρά με τον υποκινητή της p21 υπό συνθήκες φαρμακολογικής πρόκλησης στρες του ΕΔ. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί, ότι αυτή η πειραματική διαδικασία είναι μόνο συμπληρωματική των προηγούμενων καθώς ενώ οι πρότερες αποτελούν λειτουργικές δοκιμασίες που πιστοποιούν αν υφίσταται ρύθμιση, οι τελευταίες είναι δοκιμασίες δομικές που διερευνούν την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μετά από πρόκληση στρες, παρέχοντας έτσι ασφαλέστερα συμπεράσματα.

Είναι γεγονός ότι η p53 αποτελεί κεντρική πρωτεΐνη ενός σημαντικού ρυθμιστικού δικτύου. Κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα μεγέθους 53kD ο οποίος θεωρείται ο κύριος ρυθμιστής της απόκρισης του κυττάρου σε στρες προερχόμενο από παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA, υποξία, αλλά και από ενεργοποιημένα ογκογονίδια και άλλους γενετοξικούς παράγοντες. Η ενεργοποίηση της προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή απόπτωση μέσω της πρόσδεσης της σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές περιοχές των υποκινητών γονιδίων προκαλώντας επαγωγή ή καταστολή της δραστηριότητάς τους. Επιπλέον, η p53 αποτελεί στόχο διαφόρων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, κυρίως φωσφορυλίωσης, η οποία είναι σημαντική για την ενεργοποίηση και την

απενεργοποίηση μέσω στερεοδιατακτικών αλλαγών οι οποίες επηρεάζουν την ειδική πρόσδεση στο DNA.

Το ρυθμιστικό δίκτυο στο οποίο συμμετέχει το p53 είναι ιδιαίτερα περίπλοκο όπως και τα γονίδια τα οποία ενεργοποιεί για να εκτελέσουν τη λειτουργία του. Ένα από αυτά τα γονίδια-στόχους της p53 είναι η p21/Waf1, που όπως προαναφέρθηκε αποτελεί μέλος της οικογένειας KIP/CIP των αναστολέων των εξαρτώμενων από κυκλίνες, κινασών (CDK-cyclin dependent kinase), η ενεργοποίηση των οποίων είναι η κύρια αιτία για τη διακοπή της κυτταρικής ανάπτυξης. Πρόσφατα αποτελέσματα ωστόσο δείχνουν πως η p21/Waf1, ανεξάρτητα από την p53, έχει διακριτές λειτουργίες.

Ως έλεγχος για την δοκιμασία ChIP πραγματοποιήθηκε ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα ειδικό για την p53. Η p21 όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι καθιερωμένος στόχος της μεταγραφικής ρύθμισης της p53 και έτσι αναμένεται να αλληλεπιδρά φυσικά με τη p53 σε δομικές δοκιμασίες (el-Deiry., *et al* 1993). Πράγματι, πειραματικά αποτελέσματα απέδειξαν ότι η p53 αλληλεπιδρά φυσικά με τον p21 υποκινητή. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει ενδιαφέρον, γιατί ήταν πιο έντονη στα κύτταρα που υφίστανται στρες του ΕΔ. Έτσι, τόσο το CHOP όσο και η p53, κατά τη διάρκεια του στρες του ΕΔ προσδένονται στον p21 υποκινητή γεγονός που υποδηλώνει ότι τα επίπεδα της p21 αντικατοπτρίζουν το συνδυαστικό αποτέλεσμα της δράσης αυτών των δύο αντίθετων ρυθμιστών της p21. Απουσία της p53, η έκφραση της p21 παύει κατά τη διάρκεια του στρες ΕΔ, δεδομένου ότι η ανασταλτική δράση του CHOP δεν ανταγωνίζεται τις δράσεις της p53 στην έκφραση της p21. Το γεγονός αυτό είναι σύμφωνο με τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας οι οποίες δείχνουν ότι η απουσία της p53 ευαισθητοποιεί κύτταρα στο στρες του ΕΔ *in vitro* και *in vivo* και είναι συνεπείς στον ρόλο προ-επιβίωσης για την p53 κατά τη διάρκεια στρες του ΕΔ (Mihailidou *et al.*, 2010; Dioufa *et al.*, 2012).

Με την ολοκλήρωση των προαναφερθέντων πειραμάτων έχουμε διερευνήσει και μελετήσει το μοριακό μηχανισμό με το οποίο ο μεταγραφικός παράγοντας CHOP ρυθμίζει αρνητικά την πρωτεΐνη p21. Παραμένει όμως άγνωστη η φυσιολογική σημασία των αποτελεσμάτων αυτών και η πιθανή συσχέτιση της p21 με την απόπτωση που προκαλεί το παρατεταμένο στρες του ΕΔ. Όπως ήδη αναφέρθηκε προηγούμενα, πιστεύουμε ότι το CHOP το οποίο επάγεται από παρατεταμένο στρες Zinszner *et al.*, 1998) του ΕΔ προκαλεί μείωση των επιπέδων της p21, πρωτεΐνη απαραίτητη για την απόπτωση των κυττάρων. Η υπόθεση αυτή ελέγχθηκε ως εξής:

χορηγήσαμε σε κύτταρα MEFs καθώς και σε MEFs από τους οποίους απουσιάζει το γονίδιο CHOP, *τουνικαμυκίνη* προκειμένου να γίνει επαγωγή στρες του ΕΔ και στη συνέχεια απόπτωση. Τα αποτελέσματα έδειξαν σαφέστατα ότι απουσία CHOP, η p21 εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα και η απόπτωση ήτανε λιγότερο αποτελεσματική. Στη συνέχεια στα κύτταρα αυτά είχε κατασταλεί η έκφραση του γονιδίου p21^{waf1-cip1} με χρήση της τεχνολογίας si-RNA προκειμένου να γίνει καταστολή της p21, και έτσι πετύχαμε αποκατάσταση της ευαισθησίας των ινοβλαστών στην *τουνικαμυκίνη*, σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά των ινοβλαστών άγριου τύπου. Ενισχύεται με αυτόν τον τρόπο ακόμη περισσότερο η υπόθεση μας και σε λειτουργικό επίπεδο.

Όπως προαναφέρθηκε, η απόπτωση είναι μια θεμελιώδης και πολύπλοκη βιολογική διαδικασία, απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης των πολυκύτταρων οργανισμών. Προκειμένου να διερευνηθεί η φυσιολογική σημασία της ενεργοποίησης της p21 από το *DOX* και η απενεργοποίηση της p21 από την *TUN* εξετάστηκε αν υπάρχει συνέργεια της p21 μετά από επίδραση *DOX* και *TUN* στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αποδείχθηκε ότι υπάρχει ευαισθησία των ινοβλαστών άγριου τύπου και στα κύτταρα A549 στην *τουνικαμυκίνη*, και ακόμη μεγαλύτερη ευαισθησία στο *DOX*, σύμφωνα με την κλωνογονική δοκιμασία επιβίωσης και με την δοκιμασία της αποπτωτικής κατάπτωσης του DNA. Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών αυτών είναι σε πλήρη συμφωνία με τα ευρήματά μας τα οποία συνηγορούν στο ότι σε κύτταρα που απουσιάζει το CHOP είναι ανθεκτικά στην *τουνικαμυκίνη* και ευαίσθητα στο *DOX*. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα σε ινοβλάστες που απουσιάζει το γονίδιο p53 τόσο στη *TUN* όσο και στο *DOX*. Ωστόσο, στις κυτταρικές σειρές που μελετήσαμε είδαμε ότι παρουσία *TUN* και *DOX* μειώνεται πολύ έντονα η βιωσιμότητα των κυττάρων. Συνεπώς, αξιολογώντας τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι η *τουνικαμυκίνη* ενισχύει τις κυτταροτοξικές επιδράσεις της *αδριαμυκίνης*.

Συνυπολογίζοντας τις παρούσες ενδείξεις και τα προηγούμενα αποτελέσματα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η CHOP-εξαρτώμενη καταστολή της p21 κατά τη διάρκεια στρες του ΕΔ είναι πιθανό να εμπλέκεται στην παθογένεια του διαβήτη τύπου 2 (T2D). Η συσχέτιση των πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου με τις διαβητικές καταστάσεις στηρίζεται στο γεγονός ότι το ενδοπλασματικό δίκτυο εμφανίζεται να συμμετέχει αποφασιστικά στη λειτουργία των β κυττάρων και αυτό γιατί ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των β κυττάρων είναι το υψηλά

αναπτυγμένο ενδοπλασματικό δίκτυο το οποίο είναι απαραίτητο για την σωστή διαμόρφωση της ινσουλίνης, το "πακετάρισμα" και την έκκριση.

Η δυσλειτουργία των β κυττάρων είναι ένα βασικό στοιχείο στην ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 2 και η τοξικότητα γλυκόζης είναι μία από τις κρίσιμες συνιστώσες της. Η έννοια της τοξικότητας γλυκόζης, η οποία οφείλεται στην χρόνια έκθεση σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης, αποτελεί την κύρια παθογόνο αιτία που οδηγεί το κύτταρο σε τοξικά φαινόμενα με αποτέλεσμα να προσβάλλεται η λειτουργία και η δομή διαφόρων οργάνων. Οι μηχανισμοί, με τους οποίους η χρόνια υπεργλυκαιμία βλάπτει τα κύτταρα, αποτελεί αντικείμενο κλινικής και εργαστηριακής έρευνας. Τα αποτελέσματα της τοξικότητας της γλυκόζης εστιάζονται κυρίως στην ελαττωματική βιοσύνθεση της ινσουλίνης καθώς και στην επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι και η μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο πρότυπο μοντέλο μυός Akita, που όπως προαναφέρθηκε, φέρει μια γενετική μετάλλαξη στο γονίδιο ινσουλίνης και οδηγεί στο μη φυσιολογικό σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών και συνεπώς στη μη φυσιολογική διαμόρφωση της ινσουλίνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο, καταλήγοντας σε βαριά μορφή διαβήτη (Yoshioka *et al* 1997). Συνολικά, αυτές οι μελέτες υπογραμμίζουν τον κρίσιμο ρόλο που διαδραματίζεται από τις πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου στο φαινόμενο της τοξικότητας της γλυκόζης.

Πιο συγκεκριμένα σε μελέτες κυτταρικών σειρών, όπως κύτταρα HIT- T15, παρατηρήθηκε απώλεια της ικανότητας έκκρισης ινσουλίνης όταν σε καλλιέργεια προχωρημένης γενιάς επέδρασαν υψηλά επίπεδα γλυκόζης. Η κατάσταση αυτή μπορούσε να αποφευχθεί αν τα κύτταρα καλλιεργούνταν υπό την επίδραση χαμηλής γλυκόζης. (Robertson *et al.*, 2004).

Μια σειρά από πειράματα *in vitro* πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να αξιολογηθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων HIT -T15 κατά τη διάρκεια του στρες του ΕΔ που προκαλείται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της p21 και του CHOP . Όπως ήταν αναμενόμενο η διέγερση της έκφρασης της p21 με τη βοήθεια του *nutlin -3a* μπλόκαρε τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο που επάγεται από το CHOP το οποίο επάγει στρες του ΕΔ.

Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα μας προέβλεπαν ότι η απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p21, θα καταστήσει τα ποντίκια πιο ευαίσθητα στην παθογένεια του διαβήτη. Προκειμένου, λοιπόν, να διερευνηθεί αυτή η υπόθεση τα συγκεκριμένα πειραματικά μοντέλα C57BL/6 και p21-KO ποντίκια υποβλήθηκαν σε

δίαιτα πλούσια σε λιπαρά (40% HFD, High Fat Diet) και σε νερό πλούσιο σε σουκρόζη 10%. Αυτή η δίαιτα μιμείται τις συνθήκες που προκαλούν την παχυσαρκία και προδιαθέτουν στην ανάπτυξη του T2D στον άνθρωπο. Τα πειραματικά ευρήματα κατέδειξαν ότι τα p21-ελλειμματικά ποντίκια ήταν πιο ευαίσθητα στην ανάπτυξη του T2D και επιπλέον έδειξαν μία καθυστερημένη ανταπόκριση τόσο στην ομοιοστάση της γλυκόζης, όσο και στην ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της ινσουλίνης, όπως υποδεικνύεται από δοκιμές ανοχής γλυκόζης (GTT) και ευαισθησίας στην ινσουλίνη (IST).

Ιστολογική εξέταση των παγκρεάτων των C57BL/6 και p21KO μυών με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (H&E), μετά από την πλούσια σε λιπαρά δίαιτα, έδειξε ότι τα παγκρέατα των p21KO μυών παρουσιάζουν διαταραχή στην μικροσκοπική μορφολογία τους. Πιο συγκεκριμένα τα παγκρέατα των C57BL/6 είχαν περισσότερες και υπερπλαστικές νησίδες σε σχέση με τα p21KO πειραματόζωα τα οποία παρουσίασαν αξιοσημείωτη συρρίκνωση των νησίδων του παγκρέατος. Πειραματική διαδικασία με την ανοσοϊστοχημική χρώση με τον δείκτη ινσουλίνης, επιβεβαίωσε τα ανωτέρω αποτελέσματα. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση στον παγκρεατικό ιστό με αντίσωμα έναντι της ινσουλίνης. Από τη διαδικασία αυτή, διαπιστώθηκε ότι μείωση της έκφρασης της p21 μειώνει την παραγωγή ινσουλίνης.

Στην επόμενη ομάδα πειραμάτων εξετάστηκαν οι συνέπειες της υπερέκφρασης της p21 στον διαβήτη. Ως εκ τούτου, μετά την χορήγηση *nutlin -3a* προκλήθηκε υπερέκφραση της p21 στα νησίδια των β κυττάρων. Το φάρμακο *Nutlin -3a* είναι ένα μικρό μόριο το οποίο καταλαμβάνει, στην επιφάνεια του μορίου Mdm2, την υδροφοβική θέση πρόσδεσης του p53 με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η σύνδεση του p53 και του Mdm-2. Με τον τρόπο αυτό αυξάνονται τα επίπεδα p21 (Vassilev *et al.*, 2004). Στα C57BL/6 ποντίκια που τους χορηγήθηκε *nutlin -3a* (υπερέκφραση της p21) έγινε άμεση επίτευξη της φυσιολογικής ομοιοστάσης της γλυκόζης σε σύγκριση με τα πειραματόζωα που είναι ελλειμματικά για το γονίδιο p21. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι καταστέλλεται ο αυτοδιπλασιασμός των β -κυττάρων στα πειραματόζωα αγρίου τύπου, ενώ αντίθετα όταν τα πειραματόζωα υπερεκφράζουν τη p21 η τοξικότητα που προκαλείται στο πάγκρεας όταν εκτίθεται σε δίαιτα πλούσια σε λιπαρά μπορεί εκ νέου να ενεργοποιήσει εναλλακτικούς μηχανισμούς για την αναγέννηση β -κυττάρων του παγκρέατος. Αυτό είναι σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα της χρώσης των παγκρεάτων με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (H&E) των C57BL/6 και p21KO ποντικίων, που έλαβαν δίαιτα πλούσια σε λιπαρά. Έδειξε, ότι τα

αγρίου τύπου διαβητικά ποντίκια που υπέστησαν αγωγή με *nutlin-3a* εμφάνισαν μεγαλύτερο αριθμό υπερπλαστικών νησιδίων σε σχέση με αγρίου τύπου διαβητικά ποντίκια τα οποία δεν υπέστησαν αγωγή με *nutlin-3a*.

Για τη διεξαγωγή επόμενης ομάδας πειραμάτων, τα πειραματόζωα έγιναν διαβητικά με ένα συνδυασμό στρεπτοζοτοκίνης (STZ) και υψηλής περιεκτικότητας διαίτας σε λιπαρά (High Fat Diet). Υπό τις συνθήκες αυτές μόνο ένα ποσοστό των παγκρεατικών βήτα κυττάρων είναι κατεστραμμένο με αποτέλεσμα την αύξηση του φορτίου για την παραγωγή της ινσουλίνης στις υπόλοιπες παγκρεατικές νησίδες που έχουν επιβιώσει, προκαλώντας τελικά στρες του ΕΔ και T2D (Papa *et al.*, 2012). Μια ομάδα από αυτά τα πειραματόζωα, μετά την επαγωγή διαβήτη, έλαβε *nutlin-3a*. Η ημερήσια χορήγηση του *nutlin-3a* μετά την επαγωγή του διαβήτη ήταν επαρκής για την αποκατάσταση της λειτουργίας του παγκρέατος και την μείωση των επιπέδων της γλυκόζης σε διαβητικούς μύες.

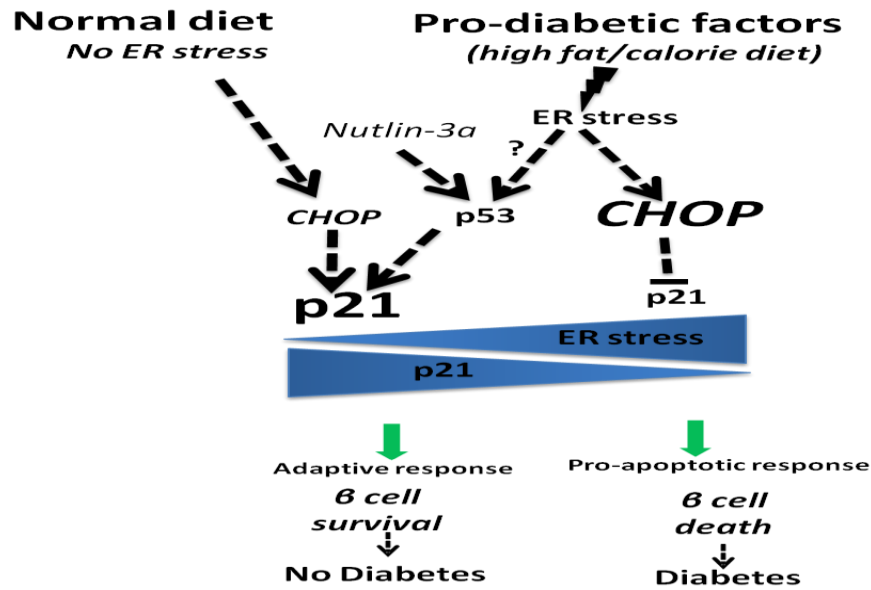
Ιστολογικές αναλύσεις του παγκρέατος των πειραματόζωων έδειξε ότι ενώ τα αγρίου τύπου διαβητικά ποντίκια εμφάνισαν μειωμένο αριθμό υποπλαστικών νησιδίων, τα διαβητικά ποντίκια που υπέστησαν αγωγή με *nutlin-3a* εμφανίζουν μεγαλύτερο αριθμό υπερπλαστικών νησιδίων. Επιπλέον, η έκφραση της ινσουλίνης ήταν σημαντικά υψηλότερη στα πειραματόζωα μετά από χορήγηση *nutlin-3a* σε σύγκριση με τα πειραματόζωα που έλαβαν φυσιολογικό ορό. Δοκιμασία ανοχής της γλυκόζης σε διαβητικά πειραματόζωα έδειξε ότι το *nutlin-3a* αποκαθιστά την ρύθμιση της γλυκόζης σε σύγκριση με τα διαβητικά πειραματόζωα, στα οποία δεν τους έχει χορηγηθεί *nutlin-3a*. Τα αποτελέσματά μας είναι συνεπή με πρόσφατα ευρήματα τα οποία δείχνουν ότι η αγωγή με *nutlin-3a* μαζί με ταυτόχρονη χορήγηση STZ για επαγωγή διαβήτη αναστέλλει τις συνέπειες του διαβήτη και ότι η αυξημένη έκφραση της p21 σε διαγονιδιακά ποντίκια προκαλεί αυξημένη παγκρεατική αναγέννηση των κυττάρων (Secchiero *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2009). Επίσης υποδεικνύεται ότι η ενεργοποίηση της έκφρασης της p21 είναι ευεργετική για την διαχείριση του διαβήτη.

Καταληκτικά επισημαίνεται ότι τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, προτείνουν ότι το στρες του ΕΔ γενικότερα ενοχοποιείται για την τοξικότητα της γλυκόζης. Η πειραματική διαδικασία επικεντρώθηκε κυρίως στην CHOP, μία πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου με δράση αποπτωτική και στην πρωτεΐνη p21 που ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο. Τόσο η πρωτεΐνη CHOP όσο και η p21 διαφοροποιούνται με την επίδραση της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε β κυτταρικές

σειρές (*in vitro*) και σε διαβητικά ζώα (*in vivo*), ενώ περαιτέρω μελέτη ανέδειξε την p21 ως μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της ινσουλίνης σε επίπεδο μετα-μεταφραστικό. Τέλος η p21 δρα προστατευτικά έναντι στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου αποτρέποντας τις επιζήμιες συνέπειες του (**Σχήμα 45**). Η κατανόηση του μηχανισμού δράσης της p21 πιθανά να συμβάλλει στην μερική αποσαφήνιση της τοξικότητας της γλυκόζης, προσφέροντας νέους θεραπευτικούς στόχους στην αντιμετώπιση του διαβήτη. Η εξασφάλιση λοιπόν, μέσω ενός φαρμάκου ή ενός συστήματος, της διατήρησης της έκφρασης της p21 σε διαβητικές καταστάσεις, όπως αναφέρουμε το *nutlin -3a* στην παρούσα διατριβή θα προστάτευε την βιοσύνθεση της ινσουλίνης στα φυσιολογικά επίπεδα και θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων και πιο αποτελεσματικών κλινικών μεθόδων στην αντιμετώπιση των μεταβολικών διαταραχών.

Συνοψίζοντας τις σκέψεις μας και τα αποτελέσματα μας, μπορούμε να ξεκινήσουμε από την πάγια γνώση ότι όταν ένα β κύτταρο προσλαμβάνει γλυκόζη, παράγεται ινσουλίνη. Όταν, όμως, έχουμε χρόνια έκθεση σε υψηλή γλυκόζη τότε επάγεται το οξειδωτικό 'στρες', η λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου προσβάλλεται και η παραγωγή ινσουλίνης μειώνεται. Τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής προτείνουν ότι η πρωτεΐνη p21 εμπλέκεται με τη τοξικότητα της γλυκόζης, προτείνοντας την ως ένα υποθετικό κρίσιμο μόριο για τη βιοσύνθεση ινσουλίνης και προσφέροντας μια νέα εναλλακτική οδό μέσω της οποίας η υψηλή γλυκόζη μπορεί να εξασθενίσει τη λειτουργία των β κυττάρων. Παράλληλα μελετήσαμε την πρωτεΐνη CHOP της οποίας η αποπτωτική της δράση ενισχύει τον κυτταρικό θάνατο των β κυττάρων.

Γενικότερα η καλύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η γλυκόζη επηρεάζει τα συστατικά του ενδοπλασματικού δικτύου μπορεί να αποτελέσει "κλειδί" στην αντιμετώπιση του διαβήτη και καθώς όλες οι μελέτες στο διαβήτη έχουν εστιαστεί στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της δυσλειτουργίας των β κυττάρων, αυτή η μελέτη μπορεί να προσθέσει ακόμα ένα κομμάτι στο 'παζλ' της πολυπαραγοντικής νόσου που λέγεται διαβήτης.



Σχήμα 45. Σχηματική αναπαράσταση ήπιου στρες του ΕΔ, εν όψει των συνεπειών του στην επιβίωση των β κυττάρων. Προδιαβητικοί παράγοντες, όπως η υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά διαίτα και η υψηλή σε θερμίδες διαίτα προκαλεί στρες του ΕΔ το οποίο καταστέλλει την p21 μέσω μηχανισμών εξαρτώμενων από το CHOP. Η CHOP-εξαρτώμενη καταστολή της p21 θέτει σε κίνδυνο την παγκρεατική λειτουργία και διευκολύνει την ανάπτυξη του διαβήτη. Φαρμακολογική διέγερση της p21 μέσω nutlin-3a, διευκολύνει την επιβίωση των β κυττάρων, την εύρυθμη λειτουργία του παγκρέατος και είναι ευεργετική για τη διαχείριση του διαβήτη. Επίσης υποδεικνύεται και η ανεξάρτητη από το CHOP επαγωγή της έκφρασης της p21 κατά τη διάρκεια του στρες του ΕΔ.

Τέλος, τα πρωτότυπα πειραματικά ευρήματα της συγκεκριμένης διατριβής είναι τα εξής:

- 1.** Το «στρες» του ενδοπλασματικού δικτύου ρυθμίζει τα επίπεδα της p21
- 2.** Το έντονο και παρατεταμένο «στρες» του ενδοπλασματικού δικτύου μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της p21
- 3.** Η δράση της p21 ρυθμίζεται από τον προ-αποπτωτικό παράγοντα CHOP
- 4.** Ο μεταγραφικός παράγοντας CHOP ρυθμίζει την p21 σε επίπεδο μεταγραφής
- 5.** Γενετική τροποποίηση της έκφρασης της p21 επάγει την ανάπτυξη του διαβήτη στα πειραματόζωα μέσω υψηλής περιεκτικότητα σε λιπαρά διαίτα
- 6.** Φαρμακολογική επαγωγή της p21: Αναστολή της απόπτωσης των β-κυττάρων και προστασία από τον διαβήτη

Βιβλιογραφία

- Adams, J.M. et al., 2004. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes*, 53, pp.25–31.
- Ahmed, M. & Bergsten, P., 2005. Glucose-induced changes of multiple mouse islet proteins analysed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Diabetologia*, 48, pp.477–485.
- Alkarain, A., Jordan, R. & Slingerland, J., 2004. p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 9, pp.67–80.
- Alpert, S., Hanahan, D. & Teitelman, G., 1988. Hybrid insulin genes reveal a developmental lineage for pancreatic endocrine cells and imply a relationship with neurons. *Cell*, 53, pp.295–308.
- Andralojc, K.M. et al., 2009. Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia*, 52, pp.486–493.
- Anelli, T. & Sitia, R., 2008. Protein quality control in the early secretory pathway. *The EMBO journal*, 27, pp.315–327.
- Araki, E., Oyadomari, S. & Mori, M., 2003. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 228, pp.1213–1217.
- Arslan, N., Erdur, B. & Aydin, A., 2010. Hormones and cytokines in childhood obesity. *Indian pediatrics*, 47, pp.829–839.
- Back, S.H. et al., 2009. Translation Attenuation through eIF2?? Phosphorylation Prevents Oxidative Stress and Maintains the Differentiated State in ?? Cells. *Cell Metabolism*, 10, pp.13–26.
- Basseri, S. & Austin, R.C., 2012. Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: Mechanisms and therapeutic potential. *Biochemistry Research International*.
- Bernard, C. et al., 1999. Neogenesis vs. apoptosis As main components of pancreatic beta cell ass changes in glucose-infused normal and mildly diabetic adult rats. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13, pp.1195–1205.
- Bertolotti, A. et al., 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology*, 2, pp.326–332.
- Boden, G., Chen, X. & Iqbal, N., 1998. Acute lowering of plasma fatty acids lowers basal insulin secretion in diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes*, 47, pp.1609–1612.
- Breckenridge, D.G. et al., 2003. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *The Journal of cell biology*, 160, pp.1115–1127.
- Brodsky, J.L. & McCracken, A.A., 1999. ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Seminars in cell & developmental biology*, 10, pp.507–513.
- Calfon, M. et al., 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415, pp.92–96.

Chinery, R. et al., 1997. Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal cancer: a p53-independent induction of p21WAF1/CIP1 via C/EBPbeta. *Nature medicine*, 3, pp.1233–1241.

Colgan, S.M., Hashimi, A.A. & Austin, R.C., 2011. Endoplasmic reticulum stress and lipid dysregulation. *Expert reviews in molecular medicine*, 13, p.e4.

Cozar-Castellano, I., Haught, M. & Stewart, A.F., 2006. The cell cycle inhibitory protein p21cip is not essential for maintaining beta-cell cycle arrest or beta-cell function in vivo. *Diabetes*, 55, pp.3271–3278.

Cram, E.J. et al., 1998. Role of the CCAAT/enhancer binding protein-alpha transcription factor in the glucocorticoid stimulation of p21waf1/cip1 gene promoter activity in growth-arrested rat hepatoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 273, pp.2008–2014.

Daniel, P.T. et al., 1999. Detection of genomic DNA fragmentation during apoptosis (DNA ladder) and the simultaneous isolation of RNA from low cell numbers. *Analytical biochemistry*, 266, pp.110–115.

Delarue, J. & Magnan, C., 2007. Free fatty acids and insulin resistance. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 10, pp.142–148.

Deng, J. et al., 2012. Lipolysis Response to Endoplasmic Reticulum Stress in Adipose Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287, pp.6240–6249.

Dioufa, N. et al., 2012. p53 antagonizes the unfolded protein response and inhibits ground glass hepatocyte development during endoplasmic reticulum stress. *Experimental Biology and Medicine*, 237, pp.1173–1180.

Dorée, M., Peaucellier, G. & Picard, A., 1983. Activity of the maturation-promoting factor and the extent of protein phosphorylation oscillate simultaneously during meiotic maturation of starfish oocytes. *Developmental biology*, 99, pp.489–501.

Draetta, G.F., 1994. Mammalian G1 cyclins. *Current Opinion in Cell Biology*, 6, pp.842–846.

Dulić, V., Lees, E. & Reed, S.I., 1992. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 257, pp.1958–1961.

el-Deiry, W.S. et al., 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, pp.817–825.

Ellgaard, L., Molinari, M. & Helenius, A., 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 286, pp.1882–8.

Engin, F. & Hotamisligil, G.S., 2010. Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: an emerging therapeutic approach for metabolic diseases. *Diabetes, obesity & metabolism*, 12 Suppl 2, pp.108–115.

Evans, T. et al., 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33, pp.389–396.

Ewen, M.E., 2000. Where the cell cycle and histones meet. *Genes & development*, 14, pp.2265–2270.

Fang, C., Mkrтчian, S., & Ingelman-Sundberg, M. 1997 Combination of direct DNA sequencing with degenerate primer-mediated PCR and 5'-/3'-RACE to screen novel cDNA sequences. *Biotechniques*, 23, 52, 54, 56, 58.

- Fernandez, C. et al., 2008. Metabolomic and proteomic analysis of a clonal insulin-producing beta-cell line (INS-1 832/13). *Journal of proteome research*, 7, pp.400–411.
- Fewell, S.W. et al., 2001. The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annual review of genetics*, 35, pp.149–191.
- Fisk, H.A. & Winey, M., 2001. The mouse Mps1p-like kinase regulates centrosome duplication. *Cell*, 106, pp.95–104.
- Flamment, M. et al., 2012. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23, pp.381–390.
- Gartel, A.L. & Tyner, A.L., 2002. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Molecular cancer therapeutics*, 1, pp.639–649.
- Gault, C.R., Obeid, L.M. & Hannun, Y.A., 2010. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Advances in experimental medicine and biology*, 688, pp.1–23.
- Gautier, J. et al., 1988. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell*, 54, pp.433–439.
- Gething, M.J. & Sambrook, J., 1992. Protein folding in the cell. *Nature*, 355, pp.33–45.
- Gewirtz, D.A., 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57, pp.727–741.
- Goubin, F. & Ducommun, B., 1995. Identification of binding domains on the p21Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Oncogene*, 10, pp.2281–2287.
- Graham, M.L. et al., 2011. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comparative medicine*, 61, pp.356–60.
- Gregor, M.F. & Hotamisligil, G.S., 2007. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *Journal of Lipid Research*, 48, pp.1905–1914.
- Gu, Y., Turck, C.W. & Morgan, D.O., 1993. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature*, 366, pp.707–710.
- Hammadi, M. et al., 2013. Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27, pp.1600–9.
- Hannon, G.J. & Beach, D., 1994. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, 371, pp.257–261.
- Harding, H.P. et al., 2000. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular cell*, 5, pp.897–904.
- Harding, H.P. et al., 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell*, 11, pp.619–633.
- Harper, J.W. et al., 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75, pp.805–816.

- Hirai, H. et al., 1995. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Molecular and cellular biology*, 15, pp.2672–2681.
- Hong, H. et al., 2009. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*, 460, pp.1132–1135.
- Hotamisligil, G.S., 2010. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell*, 140, pp.900–917.
- Kaneto, H. et al., 1999. Oxidative stress induces p21 expression in pancreatic islet cells: possible implication in beta-cell dysfunction. *Diabetologia*, 42, pp.1093–1097.
- Kaufman, R.J., 2002. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 110, pp.1389–1398.
- Keen, H., 1972. Joslin's Diabetes Mellitus. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 65, pp.742–743.
- Kim, J.K. et al., 2001. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, pp.7522–7527.
- Koff, A. et al., 1992. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science (New York, N.Y.)*, 257, pp.1689–1694.
- Koopmans, S.J. et al., 1998. Effect of hyperinsulinemia on plasma leptin concentrations and food intake in rats. *The American journal of physiology*, 274, pp.E998–E1001.
- Kulkarni, R.N. et al., 1997. Compiled by Cornelia Usborne. *German History*, 15, pp.251–255.
- Kulkarni, R.N. et al., 1999. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic β cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*, 96, pp.329–339.
- Laybutt, D.R. et al., 2007. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50, pp.752–763.
- Lee, H.K. et al., 2007. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)*, 315, pp.1398–1401.
- Lefterova, M.I. et al., 2009. Endoplasmic reticulum stress regulates adipocyte resistin expression. *Diabetes*, 58, pp.1879–1886.
- Lew, D.J., Dulić, V. & Reed, S.I., 1991. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell*, 66, pp.1197–1206.
- Li, X., Zhang, K. & Li, Z., 2011. Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective. *Journal of hematology & oncology*, 4, p.8.
- Li, Y. et al., 2013. Hyperhomocysteinemia promotes insulin resistance by inducing endoplasmic reticulum stress in adipose tissue. *The Journal of biological chemistry*, 288, pp.9583–92.
- Liu, M. et al., 2008. A disulfide-bond A oxidoreductase-like protein (DsbA-L) regulates adiponectin multimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, pp.18302–18307.

- Ma, Y. et al., 2002. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *Journal of Molecular Biology*, 318, pp.1351–1365.
- Mahoney, W.C. & Duksin, D., 1979. Biological activities of the two major components of tunicamycin. *The Journal of biological chemistry*, 254, pp.6572–6576.
- Malhotra, J.D. & Kaufman, R.J., 2007. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxidants & redox signaling*, 9, pp.2277–2293.
- Malhotra, J.D. et al., 2008. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, pp.18525–18530.
- Maller J, Wu M, Gerhart JC. 1977. Changes in protein phosphorylation accompanying maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Biol*;58: pp295–312.
- Malumbres M, Barbacid M. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*, 1, pp222–231.
- Marciniak, S. & Ron, D., 2006. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Disease. *Physiological Reviews*. Available at:
- Marciniak, S.J. et al., 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & development*, 18, pp.3066–3077.
- Margetic, S. et al., 2002. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 26, pp.1407–1433.
- Matsuoka, M. et al., 1994. Activation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by mouse MO15-associated kinase. *Molecular and cellular biology*, 14, pp.7265–7275.
- McCracken, A.A. & Brodsky, J.L., 1996. Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *The Journal of cell biology*, 132, pp.291–298.
- McCullough, K.D. et al., 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology*, 21, pp.1249–1259.
- Meyerson, M. & Harlow, E., 1994. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Molecular and cellular biology*, 14, pp.2077–2086.
- Mihailidou C, Papazian I, Papavassiliou AG, Kiaris H., 2010. CHOP-dependent regulation of p21/waf1 during ER stress. *Cell. Physiol. Biochem*, 25, pp761–766.
- Morishima, N. et al., 2004. Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 279, pp.50375–50381.
- Murata, S., Yashiroda, H. & Tanaka, K., 2009. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10, pp.104–115.
- Nakagawa, T. & Yuan, J., 2000. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *The Journal of cell biology*, 150, pp.887–894.

- Ni, M. & Lee, A.S., 2007. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Letters*, 581, pp.3641–3651.
- Novoa, I. et al., 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *The Journal of cell biology*, 153, pp.1011–1022.
- Nugent, D.A., Smith, D.M. & Jones, H.B., 2008. A review of islet of Langerhans degeneration in rodent models of type 2 diabetes. *Toxicologic pathology*, 36, pp.529–551.
- Nurse, P. & Thuriaux, P., 1980. Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 96, pp.627–637.
- Nurse, P., 1975. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*, 256, pp.547–551.
- Okuda, M. et al., 2000. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*, 103, pp.127–140.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B. & Nicotera, P., 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4, pp.552–565.
- Oyadomari S, Mori M., 2004 Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*, 11, pp.381–389.
- Oyadomari, S. et al., 2008. Dephosphorylation of Translation Initiation Factor 2?? Enhances Glucose Tolerance and Attenuates Hepatosteatosis in Mice. *Cell Metabolism*, 7, pp.520–532.
- Ozcan, U. et al., 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science (New York, N.Y.)*, 306, pp.457–461.
- Papa, F.R., 2012. Endoplasmic reticulum stress, pancreatic β -cell degeneration, and diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, p.a007666. .
- Peng, G. et al., 2011. Oleate blocks palmitate-induced abnormal lipid distribution, endoplasmic reticulum expansion and stress, and insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology*, 152, pp.2206–2218.
- Pfaffenbach, K.T. et al., 2010. Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 298, pp.E1027–E1035.
- Pirot, P. et al., 2007. Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs. *Diabetologia*, 50, pp.1006–1014.
- Polak, M. et al., 2000. Early pattern of differentiation in the human pancreas. *Diabetes*, 49, pp.225–232.
- Puthalakath, H. et al., 2007. ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell*, 129, pp.1337–1349.
- Rao, R. V et al., 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *The Journal of biological chemistry*, 277, pp.21836–21842.
- Rieusset, J. et al., 2012. Reduction of endoplasmic reticulum stress using chemical chaperones or Grp78 overexpression does not protect muscle cells from palmitate-

induced insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417, pp.439–445.

Rizzuto, R., Duchen, M.R. & Pozzan, T., 2004. Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2004, p.re1.

Robertson, R.P., 2004. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *The Journal of biological chemistry*, 279, pp.42351–42354.

Ron, D. & Habener, J.F., 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes & development*, 6, pp.439–453.

Rutkowski, D.T., Arnold, S.M., Miller, C.N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K.M., Mori, K., Sadighi, Rutkowski, D.T. et al., 2006. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biology*, 4, pp.2024–2041.

Scheuner, D. et al., 2001. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Molecular cell*, 7, pp.1165–1176.

Schröder, M. & Kaufman, R.J., 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annual review of biochemistry*, 74, pp.739–789.

Scorrano, L. et al., 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 300, pp.135–139.

Secchiero, P. et al., 2013. The MDM2 inhibitor *Nutlin -3a-3* attenuates streptozotocin-induced diabetes mellitus and increases serum level of IL-12p40. *Acta diabetologica*, 50, pp.899–906.

Serrano, M., Hannon, G.J. & Beach, D., 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366, pp.704–707.

Sherr, C.J. & Roberts, J.M., 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*, 13, pp.1501–1512.

Shi, Y. et al., 1998. Identification and Characterization of Pancreatic Eukaryotic Initiation Factor 2 α -Subunit Kinase, PEK, Involved in Translational Control. *Molecular and cellular biology*, 18, pp.7499–7509.

Skelin, M., Rupnik, M. & Cencic, A., 2010. Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *Altex*, 27, pp.105–13.

Slingerland, J. & Pagano, M., 2000. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *Journal of cellular physiology*, 183, pp.10–17.

Song, B. et al., 2008. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 118, pp.3378–3389.

T. Cheng, N. Rodrigues, H.M. Shen, Y.G. Yang, D. Dombkowski, M. Sykes, et al., Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21(cip1/waf1), *Science*. 287 (2000) 1804–1808.

T.W. Fawcett, J.L. Martindale, K.Z. Guyton, T. Hai, and N.J. Holbrook, Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP- responsive-element-binding

protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate McCullough, K.D. et al., 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology*, 21, pp.1249–1259.

Tilg, H. & Moschen, A.R., 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature reviews. Immunology*, 6, pp.772–783.

Timchenko NA, Wilde M, Nakanishi M, Smith JR, Darlington GJ., 1996 CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein. *Genes Dev.*;10, pp.804–815.

Toyoshima, H. & Hunter, T., 1994. p27, A novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, 78, pp.67–74.

Tsai, Y.C. & Weissman, A.M., 2010. The Unfolded Protein Response, Degradation from the Endoplasmic Reticulum, and Cancer. *Genes & Cancer*, 1, pp.764–778.

Turban, S. & Hajduch, E., 2011. Protein kinase C isoforms: Mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Letters*, 585, pp.269–274.

Turinsky, J., Bayly, B.P. & O'Sullivan, D.M., 1991. 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in rat liver and skeletal muscle in vivo. *The American journal of physiology*, 261, pp.E620–E627.

Urano, F. et al., 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science (New York, N.Y.)*, 287, pp.664–666.

Urano, F. et al., 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science (New York, N.Y.)*, 287, pp.664–666.

Ushioda, R. & Nagata, K., 2011. The endoplasmic reticulum-associated degradation and disulfide reductase ERdj5. *Methods in Enzymology*, 490, pp.235–258.

Vassilev, L.T. et al., 2004. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science (New York, N.Y.)*, 303, pp.844–848.

Vetere, A. & Wagner, B.K., 2012. Chemical Methods to Induce Beta-Cell Proliferation. *International Journal of Endocrinology*, 2012, pp.1–8.

Voeltz, G.K., Rolls, M.M. & Rapoport, T.A., 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO reports*, 3, pp.944–950.

Wang XZ, Lawson B, Brewer JW, Zinszner H, Sanjay A, Mi LJ, Boorstein R, Kreibich G, Wang, X.Z. et al., 1996. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Molecular and cellular biology*, 16, pp.4273–4280.

Williamson JR, Vogler NJ, Kilo C., 1969. Estimation of vascular basement membrane thickness. Theoretical and practical considerations. *Diabetes*; 18, pp. 567-578.

Wolins, N.E., Brasaemle, D.L. & Bickel, P.E., 2006. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Letters*, 580, pp.5484–5491.

Wu, J. & Kaufman, R.J., 2006. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell death and differentiation*, 13, pp.374–384.

- Wu, J. et al., 2007. ATF6?? Optimizes Long-Term Endoplasmic Reticulum Function to Protect Cells from Chronic Stress. *Developmental Cell*, 13, pp.351–364.
- Xiong, Y. et al., 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 366, pp.701–704.
- Xiong, Y., Zhang, H. & Beach, D., 1992. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell*, 71, pp.505–514.
- Xu, L., Spinass, G.A. & Niessen, M., 2010. ER stress in adipocytes inhibits insulin signaling, represses lipolysis, and alters the secretion of adipokines without inhibiting glucose transport. *Hormone and Metabolic Research*, 42, pp.643–651.
- Y.-P. Fan, R.H. Weiss., 2004. Exogenous attenuation of p21(Waf1/Cip1) decreases mesangial cell hypertrophy as a result of hyperglycemia and IGF-1, *J. Am. Soc. Nephrol*, 15, pp. 575–584.
- Yamaguchi, H. & Wang, H.-G., 2004. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 279, pp.45495–45502.
- Yang, J. et al., 2009. P21cip-overexpression in the mouse?? cells leads to the improved recovery from streptozotocin-induced diabetes. *PLoS ONE*, 4.
- Yesil, P. & Lammert, E., 2008. Islet dynamics: a glimpse at beta cell proliferation. *Histology and histopathology*, 23, pp.883–895.
- Yoshida, H. et al., 2000. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Molecular and cellular biology*, 20, pp.6755–6767.
- Yoshida, T. et al., 2005. Proteasome inhibitor MG132 induces death receptor 5 through CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein. *Cancer research*, 65, pp.5662–5667.
- Yoshioka, M. et al., 1997. A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes*, 46, pp.887–894.
- Yusta, B. et al., 2006. GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell metabolism*, 4, pp.391–406.
- Zeyda, M. & Stulnig, T.M., 2007. Adipose tissue macrophages. *Immunology Letters*, 112, pp.61–67.
- Zhou, B.P. et al., 2001. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature cell biology*, 3, pp.245–252.
- Zhou, L. et al., 2010. DsbA-L alleviates endoplasmic reticulum stress-induced adiponectin downregulation. *Diabetes*, 59, pp.2809–2816.
- Zhou, Y. et al., 2011. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. *Nature medicine*, 17, pp.356–365.
- Zinszner, H. et al., 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & development*, 12, pp.982–995.

