ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

# ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΚΟΥ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΑΚΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΣΤΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΡΟΚΑΡΣΗΣ ΑΝΚΩΝΟΣΗΣ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΜΠΑΡΜΠΑΡΗΣΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΤΡΑ
2009

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Θ. ΦΩΤΣΗΣ

# ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΣΤΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΜΠΑΡΜΠΟΥΤΗ**
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004

**Ημερομηνία αιτήσεως: 19/10/1998**

**Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 9/2/1999**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**
**Γαλάρης Δημήτριος:** Επιβλέπων. Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
**Τσόλας Ορέστης:** Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
**Φράγκου Μαρία:** Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 8/3/1999**

**Ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής: 27/1/2004**

**Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής Επαμεινώνδας Τσιάνος**

**Μέλη της επταμελούς Επιτροπής:**
**Καναβάρος Παναγιώτης:** Μέλος Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Καθηγητής Ανατομίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
**Τσόλας Ορέστης:** Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Ομότιμος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
**Σεφεριάδης Κωνσταντίνος:** Μέλος Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
**Φώτσης Θεόδωρος:** Μέλος Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
**Γαλάρης Δημήτριος:** Επιβλέπων. Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
**Μπάη Μαρία:** Μέλος Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
**Φράγκου Μαρία:** Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

**Βαθμός: Άριστα**

Ε. Τσαγγαλά
Γραμματέας Ιατρικής Σχολής

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

[illegible]

*στην οικογένειά μου*

[illegible]

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ο επιβλέπων της διατριβής ήταν ο Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Δημήτριος Γαλάρης τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την συνεχή καθοδήγηση, τις εύστοχες παρατηρήσεις του και την συμπαράστασή του κατά την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής. Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Μαρία Φράγκου, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής μου, επίσης ευχαριστώ θερμά για το συνεχές ενδιαφέρον της και τις υποδείξεις της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας. Τον επίτιμο καθηγητή κ. Ορέστη Τσόλα μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής επίσης ευχαριστώ θερμά για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ευχαριστώ επίσης τα έτερα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τον καθηγητή Θεόδωρο Φώτση, τον καθηγητή Παναγιώτη Καναβάρο, τον καθηγητή Κωνσταντίνο Σεφεριάδη και την αναπληρώτρια καθηγήτρια Μαρία Μπάη για την βοήθειά τους στην διαδικασία της δοκιμασίας για την παρούσα διδακτορική διατριβή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου της Βιολογικής Χημείας για την άψογη συνεργασία τους και την πολύτιμη βοήθειά τους χωρίς την οποία θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Ιδιαίτερα ευχαριστώ:

Την υποψήφια διδάκτορα Ζωή Μητρογιάννη για την συνεχή συμπαράσταση και το ενδιαφέρον της

Τον υποψήφιο διδάκτορα Πασχάλη-Θωμά Δούλια.

Την κ. Θ. Παπαμαρκάκη, Επίκουρο Καθηγήτρια και τους συνεργάτες της, την διδάκτορα Ζωή Κωρέτσου και τον υποψήφιο διδάκτορα Goran Matix.

Τον κ. Σ. Χριστοφορίδη Λέκτορα και τους συνεργάτες του, την Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα και την υποψήφια διδάκτορα Αμαλία Παπανικολάου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον καθηγητή Παναγιώτη Καναβάρο για το ενδιαφέρον και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά την διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας καθώς και για ευγενική προσφορά των αντισωμάτων έναντι της κασπάσης-8, της Bid και του AIF.

Τον κ. Ε. Κωλέττα Επίκουρο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την βοήθειά του σε όλα τα στάδια της ολοκλήρωσης αυτής της εργασίας καθώς και για την προσφορά των κυτταρικών σειρών Jurkat-puro και Jurkat-Bcl-2.

Τον κ. Γιάννη Σπύρου Αναπληρωτή Καθηγητή στο Πανεπιστήμιο Καρολίνσκα της Σουηδίας για την προσφορά αντισωμάτων για την κασπάση-7 και την κασπάση-9.

Τον υποψήφιο διδάκτορα Άγγελο Σκύρλα για την βοήθειά του στα πειράματα του ανοσοφθορισμού.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Μητρόπολη Ιωαννίνων για την υποτροφία που μου παρείχε από την 01/10/98 μέχρι την 30/09/01.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου, την αδερφή μου και τους φίλους μου για την συνεχή συμπαράσταση και την βοήθεια τους, χωρίς την οποία θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

**ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# ΣΧΗΜΑΤΑ

**Σχήμα 38: Ο ρόλος του $H_2O_2$ στους μοριακούς μηχανισμούς πρόκλησης της απόπτωσης** **120**

AIDS

ATP

APAF-1

ATP

BIT

BSA

C4Q

CAD

CARD

CAT

CHAPS

dATP

DD

DED

DISC

DL

AMO

UTT

EDTA

EGF

ELISA

Eado (I

Fas L

# ΠΙΝΑΚΕΣ

# ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

| | |
|---|---|
| **Ac-DEVD-AMC** | Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-methyl-coumarin, ακέτυλο-ασπαρτικό-γλουταμικό-βαλίνη-ασπαρτικό-5-άμινο-4-μέθυλο-κουμαρίνη |
| **AIDS** | Acquired Immune Deficiency Syndrome, σύνδρομο της επίκτητης ανοσοβιολογικής ανεπάρκειας |
| **AIF** | Apoptosis Inducing Factor, παράγοντας πρόκλησης της απόπτωσης |
| **APAF-1** | Apoptotic-Protease Activating Factor-1, παράγοντας ενεργοποίησης αποπτωτικών πρωτεασών-1 |
| **ATP** | Adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη |
| **BHT** | Butylated hydroxytoluene, βουλυλιωμένο υδροξυτολουένιο |
| **BSA** | Bovine Serum Albumin, αλβουμίνη ορού βοός |
| **C ή Cys** | Cystein, κυστεΐνη |
| **CAD** | Caspase Activated Deoxyribonuclease, δεοξυριβονουκλεάση ενεργοποιούμενη από κασπάσες |
| **CARD** | Caspases Recruitment Domain, περιοχή συνάθροισης κασπασών |
| **CAT** | Catalase, καταλάση |
| **CHAPS** | (3-[(3-cholamidoproyl) dimethylammonio]-1 propanesulfonate), |
| **dATP** | deoxy Adenosine Triphosphate, δεόξυ τριφωσφορική αδενοσίνη |
| **DD** | Death Domain, περιοχή θανάτου |
| **DED** | Death Effector Domain, περιοχή επιτέλεσης θανάτου |
| **DISC** | Death-inducing signaling complex, σύμπλοκο μετάδοσης σημάτων θανάτου |
| **DL** | Death Ligand, υποκαταστάτης θανάτου |
| **ΔΜΟ** | Δραστικές Μορφές Οξυγόνου |
| **DTT** | Dithiotreitol, διθειοθρεϊτόλη |
| **EDTA** | Ethylendiaminetetrtaacetic acid, αιθυλενοδιαμινοτετραΐξικό οξύ |
| **EGF** | Epidermal Growth Factor, επιδερμικός παράγοντας ανάπτυξης |
| **ELISA** | Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός συνδεδεμένος με ένζυμο |
| **Endo G** | Endonuclease G, ενδονουκλεάση G |
| **FasL** | Fas Ligand, υποκαταστάτης του Fas |

| | |
|---|---|
| **FCS** | Fetal Calf Serum, εμβυϊκός ορός μόσχου |
| **FITS** | Fluorescin isothiocyanate, ισοθειοκυανική φλουορεσκίνη |
| **GO** | Glucose Oxidase, οξειδάση της γλυκόζης |
| **GP** | Glutathione Peroxidase, υπεροξειδάση της γλουταθεϊόνης |
| **HEPES** | (N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N-[2-ethane-sulfonic acid], (N-[2-υδροξυαιθυλο] πιπεραζίνη-N-[2-αιθανο-σουλφονικό οξύ] |
| **HO-1** | Heam Oxygenase -1, οξειγονάση της αίμης-1 |
| **Hsp27** | Heat shock protein 32, πρωτεΐνη θερμικού σοκ 27 |
| **Hsp32** | Heat shock protein 32, πρωτεΐνη θερμικού σοκ 32 |
| **IAPs** | Inhibitors of Apoptotic Proteases, Αναστολείς αποπτωτικών Πρωτεασών |
| **ICAD** | Inhibitor of Caspase Activated Deoxyribonuclease, αναστολέας ενεργοποιούμενων από κασπασές δεοξυδιβονουκλεασών . |
| **ICE** | Interleukin -1β converting enzyme, ένζυμο μετατροπής της ιντερλευκίνης–1β |
| **JC-1** | 5,5′, 6, 6′ - tetrachloro - 1,1′,3,3′, - tetraethylbenzimidazolylcarbocyani iodide |
| **IL-1** | Interleukin-1, ιντερλευκίνη-1 |
| **kDa** | kiloDaltons, Μονάδα μοριακής μάζας x $10^3$ |
| **LPS** | Lipopolysacharite, λιποπολυσακχαρίτης |
| **MAPK** | Mitogen-Activated Protein Kinase, κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνο |
| **MB** | Μοριακό Βάρος |
| **MMP** | Mitochondrial Membrane Permeability, διαπερατότητα μιτοχονδριακής μεμβράνης |
| **MTP** | Mitochondrial Transmembrane Potential, διαμεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων |
| **MTT** | 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, 3-[4,5-διμεθυλοθειαζολο–2-υλο]-2,5–διφαινυλο–τετραζολιο βρωμίδιο) |
| **NF-κB** | Nuclear Factor kappa B, πυρηνικός παράγοντας κB |
| **P-40** | Nonidet P-40 (octylphenoxy ethanol), οκτυφαίνυλο αιθανόλη |
| **PAGE** | Polyacrylamide Gel Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση πηκτής ακριλαμιδίου |

| | |
|---|---|
| **PARP** | Poly (ADP-Ribose) Polymerase, πολύ (ADP-ριβόζη) πολυμεράση |
| **PBS** | Phosphate Buffer Saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με άλατα |
| **PDGF** | Platelet-Derived Growth Factor, αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια |
| **PI** | Propidium Iodide, ιωδιούχο προπιδίο |
| **PKC** | Protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C |
| **PMSF** | phenylmethyl sulfonyl fluoride |
| **PRx** | Peroxiredoxines, περοξυδεροξίνες |
| **PS** | phosphatidyl serine, φωσφατίδυλο-σερίνη |
| **PUFA** | Poly unsaturated fatty acids, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα |
| **ROS** | Reactive Oxygen Species, δραστικές μορφές οξυγόνου |
| **ROI** | Reactive Oxygen Intermediates, δραστικά ενδιάμεσα οξυγόνου |
| **RPMI-1640** | Roswell Park Memorial Institute Media RPMI 1640, θρεπτικό υλικό RPMI-1640 |
| **RTKs** | Receptor Tyrosine Kinases, υποδοχείς κινασών τυροσίνης |
| **SAPK** | Stress-activated protein kinase, πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από στρες |
| **SDS** | Sodium Dodecyl Sulfate, δωδεκυλοθειϊκό νάτριο |
| **SOD** | Superoxide Dismutase, δισμουτάση του σουπεροξειδίου |
| **SCGE** | Single Cell Gel Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης |
| **TEMED** | N,N,N´,N´-tetramethylethylenediamine, N,N,N´,N´- τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνη |
| **VDAC** | Voltage-Dependent Anion Channel, κανάλι ανιόντων εξαρτώμενο από το δυναμικό |
| **XO** | Xylenol range, πορτοκαλί της ξυλενόλης |

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Η έρευνα γύρω από την χημεία των ελευθέρων ριζών (free radicals), είχε αναπτυχθεί εδώ και αρκετές δεκαετίες σε τομείς όπως η οργανική χημεία, η συντήρηση των τροφών, οι επιδράσεις ακτινοβολιών, η βιομηχανία χρωμάτων και πλαστικών. Στις Βιολογικές και τις Ιατρικές επιστήμες όμως η σημασία των ελευθέρων ριζών και ειδικότερα αυτών που σχετίζονται με το οξυγόνο εκτιμήθηκε σχετικά πρόσφατα, μετά την ανακάλυψη της συμμετοχής τους σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων σε ανθρώπους, ζώα και φυτά. Μεγάλη ώθηση στην έρευνα γύρω από ρόλο των ελευθέρων ριζών στην Βιολογία και την Ιατρική έδωσε η ανακάλυψη σε κύτταρα αερόβιων οργανισμών της οικογένειας των ενζύμων «δισμουτάσες του σουπεροξειδίου» (Souperoxide Dismutase, SOD) από τους Fridovich και McCord, το 1969 (McCord and Fridovich, 1969a, McCord and Fridovich, 1969b). Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την μετατροπή του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ($H_2O_2$) και $O_2$ (αντίδραση 1), γεγονός που υποδηλώνει ότι ελεύθερες ρίζες παράγονται in vivo και θα πρέπει να εξουδετερωθούν.

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \qquad (1)$$

Σημαντική επίσης συμβολή στην κατανόηση του ρόλου των ελευθέρων ριζών στις βιολογικές επιστήμες, είχε και η ανάπτυξη ειδικών οργάνων (ηλεκτρονικοί παραμαγνητικοί συντονιστές, EPR ή ESR) με τα οποία έγινε δυνατή η άμεση ανίχνευσή τους. Σήμερα θα μπορούσε να ισχυρισθεί κανείς ότι είναι δύσκολο να βρεθεί έστω και ένας κλάδος των Ιατρικών Επιστημών στον οποίο να μην εμπλέκονται με τον έναν ή τον άλλο τρόπο οι ελεύθερες ρίζες. Για παράδειγμα οι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις όπως στην επανοξυγόνωση μετά από μια περίοδο ισχαιμίας (McCord and Turrens, 1994), στη δημιουργία της αθηρωματώδους πλάκας (Parthasarathy et al., 1992, Steinberg, 1997), στις πνευμονικές παθήσεις οι οποίες προκαλούνται από το μολυσμένο περιβάλλον (Louie et al., 1997), στις τοξικές ή και θεραπευτικές ιδιότητες διαφόρων φαρμάκων (Elisaf and Tselepis 2003), στην τοξικότητα που προκαλείται από ακτινοβολίες, σε

χρόνιες φλεγμονώδης παθήσεις όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωριασική αρθρίτιδα και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (Cooke, 1997), σε φωτοοξειδωτικά φαινόμενα στον οφθαλμό κατά την δημιουργία του καταρράκτη, στις ασθένειες Parkinson's και Alzheimer's (Butterfield 1997, Coyle and Puttfarcken, 1993, Lyras et al., 1997) κα. Τέλος υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται στις διαδικασίες μεταγωγής του σήματος στα κύτταρα (signal transduction) σαν δεύτεροι διαμεσολαβητές και ως εκ τούτου παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης, στη γήρανση, στην καρκινογένεση (Forman and Cadenas, 1997, Gower, 1998, Kensler and Teffe, 1986), στο AIDS (Westendorp et al., 1995) καθώς και στην διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Chandra et al., 2000).

### 1.1.1 Τι είναι ελεύθερες ρίζες;

Ο όρος ρίζα στην χημεία συνήθως εκφράζει μια ομάδα ατόμων τα οποία συμπεριφέρονται σαν μια μονάδα, όπως η ρίζα του θειικού ($SO_4^{2-}$) ή η ρίζα του νιτρικού ($NO_3^-$). Στην συγκεκριμένη περίπτωση όμως, έχουμε έναν νέο ορισμό. ***Ελεύθερη ρίζα,*** *ονομάζεται κάθε μόριο ή άτομο το οποίο έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του στοιβάδα, σε αντίθεση με τις μη-ελεύθερες ρίζες οι εξωτερικές στοιβάδες των οποίων καλύπτονται από ζεύγη ηλεκτρονίων με αντίθετη στροφορμή (spin).*

Η παρουσία ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου προσδίδει συνήθως σε αυτές τις ενώσεις μεγάλη δραστικότητα. Τα μόρια αυτά έχουν την τάση να αντιδρούν εύκολα με άλλα μόρια και να αποσπούν κυρίως ηλεκτρόνια για να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στοιβάδα με ζεύγη ηλεκτρονίων και να μετατραπούν σε πιο σταθερές ενώσεις. Η απόσπαση όμως ενός ηλεκτρονίου από μια μη-ελεύθερη ρίζα, την μετατρέπει σε ελεύθερη ρίζα, η οποία με τη σειρά της μπορεί να αντιδράσει με άλλα μόρια και να σχηματίσει νέες ελεύθερες ρίζες. Με τον τρόπο αυτό προκαλούνται αλυσιδωτές αντιδράσεις, οι οποίες αν δεν αντιμετωπισθούν μπορούν να καταστρέψουν όλο το βιολογικό υλικό. Ο τερματισμός των αντιδράσεων των ελευθέρων ριζών μπορεί να επιτευχθεί με δύο τρόπους (Σχήμα 1).

$$R_1^{\cdot} + R_2^{\cdot} \longrightarrow R_1\text{-}R_2 \qquad (2)$$

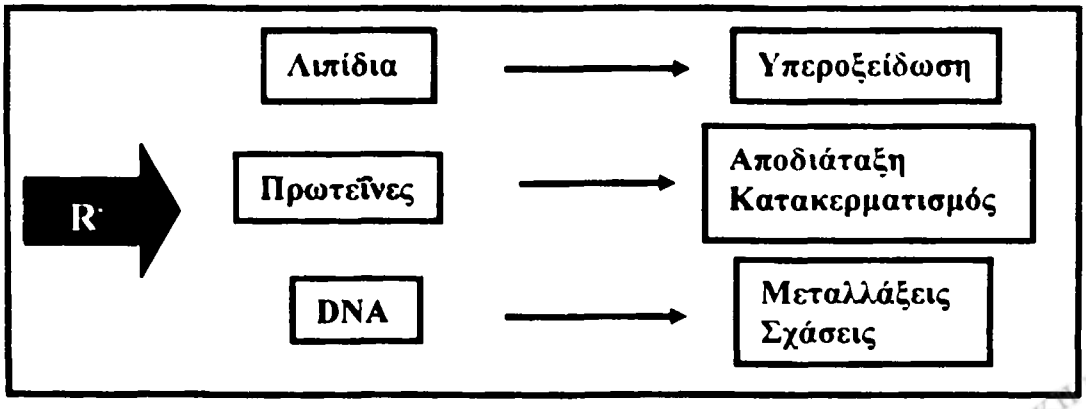
$$R_1^{\cdot} + QH \longrightarrow R_1H + Q^{\cdot} \qquad (3)$$

**Σχήμα 1**: Τερματισμός αλυσιδωτών αντιδράσεων ελευθέρων ριζών

Στην πρώτη περίπτωση (αντίδραση 2), δύο ελεύθερες ρίζες $R_1^{\cdot}$ και $R_2^{\cdot}$ αντιδρούν μεταξύ τους και συνεισφέροντας ένα ηλεκτρόνιο η καθεμιά σχηματίζουν ένα ομοιοπολικό δεσμό. Οι αντιδράσεις αυτές είναι σπάνιες, διότι εξαιτίας της δραστικότητάς τους, οι ελεύθερες ρίζες είναι δύσκολο να βρεθούν σε τέτοιες συγκεντρώσεις που να συναντηθούν και να αντιδράσουν μεταξύ τους. Στη δεύτερη περίπτωση (αντίδραση 3), η ελεύθερη ρίζα $R_1^{\cdot}$ αντιδρά με ένα άλλο μόριο QH και αποσπώντας ένα άτομο $H^{\cdot}$ (ένα πρωτόνιο $H^+$ και ένα ηλεκτρόνιο $e^-$) συμπληρώνει την εξωτερική της στοιβάδα ($R_1H$), σχηματίζοντας μια νέα ελεύθερη ρίζα ($Q^{\cdot}$). Στην περίπτωση αυτή η νέα ελεύθερη ρίζα λόγω της ειδικής της χημικής δομής μπορεί να αποτελέσει εξαίρεση και να μην είναι δραστική, διακόπτοντας έτσι την αλληλουχία των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Οι αντιδράσεις της δεύτερης περίπτωσης είναι οι κατ' εξοχήν υπεύθυνες για την αντιμετώπιση ελευθέρων ριζών που σχηματίζονται στο κύτταρο. Ενώσεις με τέτοιες ιδιότητες είναι η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) και η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) αλλά και ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων που συναντώνται κυρίως στα φυτά και φαίνεται πως παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην προστασία των φυτών αλλά και των ζώων που τρέφονται από αυτά.

### 1.1.2 Συνέπειες από την δημιουργία ελευθέρων ριζών στα κύτταρα

Σε περιπτώσεις που οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται ενδοκυττάρια, μπορούν να αντιδράσουν και να προκαλέσουν τροποποιήσεις σε όλα τα βασικά κυτταρικά συστατικά (σχήμα 2). Οξειδωτική τροποποίηση των βασικών κυτταρικών συστατικών όπως το DNA, οι πρωτεΐνες, οι μεμβράνες κλπ. οδηγούν σε τροποποιήσεις που είναι δυνατόν να επιφέρουν τον κυτταρικό θάνατο.




**Σχήμα 2:** Επιπτώσεις από την αντίδραση ελευθέρων ριζών με βασικά κυτταρικά συστατικά.

### 1.1.2.1 Λιπιδιακή υπεροξείδωση

Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός αντίδρασης των ελευθέρων ριζών στα κύτταρα είναι με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) που βρίσκονται στα φωσφολιπίδια και αποτελούν τα βασικά συστατικά των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών του κυττάρου (Halliwell, 1998). Η δημιουργία μιας ελεύθερης ρίζας στις μεμβράνες, προκαλεί την εκκίνηση μια ακολουθίας αντιδράσεων που οδηγούν στην υπεροξείδωση των λιπιδίων, η οποία συνήθως καλείται «λιπιδιακή υπεροξείδωση». Τα αποτελέσματα της λιπιδιακής υπεροξείδωσης στις μεμβράνες, είναι κυρίως η μείωση της ρευστότητας, η μείωση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού, η αύξηση της διαπερατότητας κυρίως σε μόρια όπως το $Ca^{+2}$ και τα $H^{+}$ και πιθανά η λύση του κυττάρου και η απελευθέρωση των συστατικών τους. Παρατεταμένη λιπιδιακή υπεροξείδωση προκαλεί την ολική καταστροφή των βιολογικών μεμβρανών και τον θάνατο των κυττάρων. Σημαντική προστασία στις μεμβράνες και τις λιποπρωτεΐνες από την δράση των ελευθέρων ριζών παρέχει η λιπόφιλη βιταμίνη Ε ή α-τοκοφερόλη, που διακόπτει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών, αναστέλλοντας την λιπιδιακή υπεροξείδωση.

### 1.1.2.2 Οξείδωση πρωτεϊνών

Σημαντικός στόχος των ελευθέρων ριζών είναι και οι πρωτεΐνες (Davies and Dean, 1997). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προσβάλουν και να τροποποιήσουν τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, με πιο ευαίσθητα την κυστεΐνη, τη μεθειονίνη, την τρυπτοφάνη, την τυροσίνη, τη φαινυλαλανίνη και την ιστιδίνη. Οι επιπτώσεις της δημιουργίας ελευθέρων ριζών σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη εξαρτάται από την περιεκτικότητα της πρωτεΐνης σε αυτά τα αμινοξέα, το πόσο σημαντικά είναι αυτά για την δράση της πρωτεΐνης και από την ικανότητα των κυττάρων να διορθώσουν τις βλάβες στην συγκεκριμένη πρωτεΐνη (Davies, 2003).

Οξειδωτική τροποποίηση ενζύμων, υποδοχέων ή πρωτεϊνών μεταγωγής του σήματος, έχει σαν αποτέλεσμα ανωμαλίες στην γενική λειτουργία του οργανισμού. Επίσης βλάβες σε πρωτεΐνες επιδιόρθωσης της μεταγραφής του DNA έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των μεταλλάξεων. Τέλος οξειδωτικά τροποποιημένες πρωτεΐνες, μπορεί να προκαλέσουν ανοσολογική απόκριση με αποτέλεσμα την δημιουργία αντισωμάτων τα οποία πιθανόν να σχετίζονται με αυτοανοσία.

### 1.1.2.3 Βλάβες στο DNA

Το DNA και το RNA αν και αποτελούν τα βασικότερα συστατικά των κυττάρων, φαίνεται πως είναι λιγότερο προστατευμένα και υπόκεινται πιο εύκολα σε βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται in vivo (Halliwell, 1998). Οξειδωτικές τροποποιήσεις των νουκλεϊκών οξέων οδηγούν σε αναστολή της μεταγραφής και του διπλασιασμού του DNA, προκαλούν μεταλλάξεις και τελικά μπορούν να οδηγήσουν στο θάνατο του κυττάρου. Το ποσοστό των οξειδωτικών βλαβών στο DNA είναι ανιχνεύσιμο ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Υπολογίζεται ότι στο πυρηνικό DNA μια βάση στις 130.000 είναι τροποποιημένη οξειδωτικά. Στο μιτοχονδριακό DNA η βλάβη είναι αρκετά πιο υψηλή, υπολογίζεται περίπου σε μια τροποποιημένη βάση ανά 8.000. Η κύρια πηγή βλαβών στο DNA, πιστεύεται πως είναι οι ρίζες υδροξυλίου (˙OH). Οι ρίζες αυτές είναι πάρα πολύ δραστικές με αποτέλεσμα να μην μπορούν να διαχυθούν αλλά να αντιδρούν με οτιδήποτε βρεθεί δίπλα τους κατά την στιγμή της δημιουργίας τους. Κατά συνέπεια το σημείο της δημιουργίας των ριζών υδροξυλίου (˙OH) καθορίζει και την εξειδίκευση της δράση τους. Για παράδειγμα, αν οι ˙OH σχηματιστούν στο ενδοπλασματικό δίκτυο, είναι απίθανο να διαχυθούν και να προκαλέσουν βλάβη στο πυρηνικό DNA. Οι ˙OH για να προκαλέσουν βλάβη στο DNA είτε πρέπει να δημιουργηθούν πάνω στο DNA είτε αν σχηματιστούν σε άλλα σημεία πρέπει να προκαλέσουν την δημιουργία δευτερευόντων μορίων τα οποία να διαχυθούν ως τον πυρήνα.

Η οξειδωτική τροποποίηση στο DNA, μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από διαφορετικά αποτελέσματα, όπως σχάση των μονών και διπλών αλυσίδων, ανταλλαγή αδελφών χρωματίδων, διασυνδέσεις τύπου DNA-DNA ή DNA-πρωτεΐνης και τροποποιήσεις των βάσεων του DNA (Martinez et al., 2003, Slupphaug et al., 2003). Από τις βάσεις του DNA, οι πιο ευαίσθητες σε οξειδωτικές τροποποιήσεις είναι οι πυριμιδίνες και ειδικά η θυμίνη. Οι τροποποιημένες βάσεις, μπορούν να απομακρυνθούν από το DNA σχηματίζοντας απουρινικές ή απυριμιδινικές θέσεις. Επειδή οι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών με το DNA είναι σχετικά μη ειδικές, και ο φωσφοδιεστερικός δεσμός μπορεί να υποστεί βλάβες. Οι βλάβες αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε σχάση της αλυσίδας σε ορισμένα σημεία και τον σχηματισμό μη τυπικών 3΄ και 5΄ άκρων (μη-3΄-OH και μη-5΄- $PO_4$). Σε περιπτώσεις που η συγκέντρωση ελευθέρων ριζών είναι υψηλή, είναι δυνατόν να προκύψουν σχάσεις στις διπλές αλυσίδες του DNA, που είναι δυσκολότερο να επιδιορθωθούν, σε σχέση με τις σχάσεις στις μονές αλυσίδες. Εκτός από τις επιπτώσεις στις βάσεις και στην πεντόζη, οι ελεύθερες ρίζες

αντιδρούν με τις πυρηνικές πρωτεΐνες, δημιουργώντας νέες ελεύθερες ρίζες οι οποίες πολλές φορές μπορούν να συνδέονται ομοιοπολικά με το DNA (διασυνδέσεις DNA-πρωτεϊνών). Οι διασυνδέσεις αυτές είναι δυνατόν να εμποδίζουν το ξεδίπλωμα της χρωματίνης, την επιδιόρθωση του DNA, και τις διαδικασίες αντιγραφής και μεταγραφής του DNA.

## 1.2 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

### 1.2.1 Γενικά

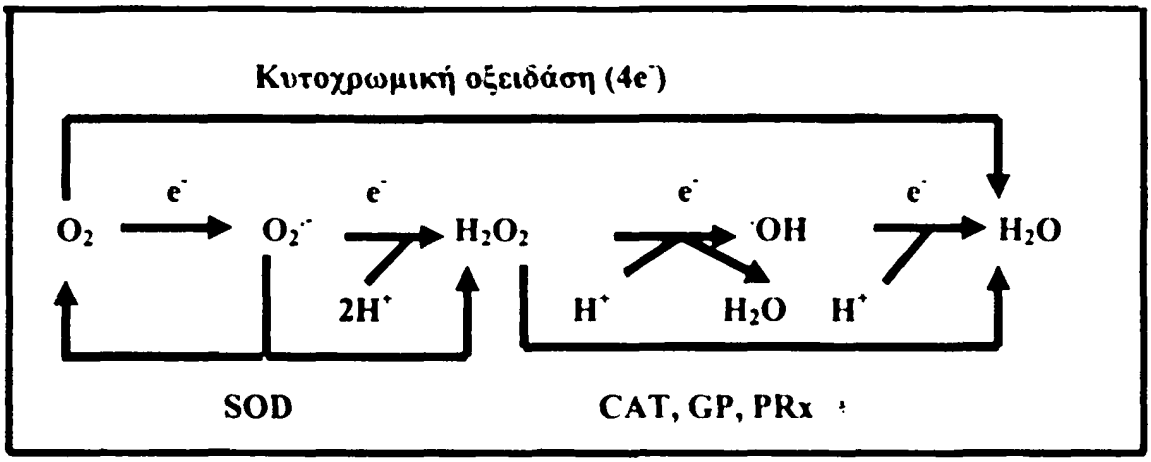
Παρά το γεγονός ότι το οξυγόνο αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα ύπαρξης της ζωής, η αφθονία του στα βιολογικά συστήματα σε συνδυασμό με την ικανότητά του να ανάγεται από μονά ηλεκτρόνια, το καθιστούν τον κυριότερο παράγοντα δημιουργίας ελευθέρων ριζών στις αερόβιες μορφές ζωής. Αυτός ο διπλός ρόλος του οξυγόνου που η κατανόησή του έγινε σχετικά πρόσφατα, συνήθως αποκαλείται το «παράδοξο του οξυγόνου» (Halliwell, 1998).

Ο βασικός ρόλος του $O_2$ στη ζωή είναι να δρα σαν αποδέκτης των ηλεκτρονίων που απελευθερώνονται από τις οξειδωτικές διεργασίες του καταβολισμού. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την φυσιολογική αναγωγή του $O_2$ είναι η κυτοχρωμική οξειδάση που αποτελεί το τελευταίο ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας. Το ένζυμο αυτό λαμβάνει 4 ηλεκτρόνια από 4 μόρια κυτοχρώματος c και τα χρησιμοποιεί για την αναγωγή ενός μορίου $O_2$ προς δύο μόρια $H_2O$ (αντίδραση 4). Το σύμπλοκο της κυτοχρωμικής οξειδάσης έχει 2 μόρια αίμης και δύο μόρια Cu και επιτρέπει την ταυτόχρονη μεταφορά και των τεσσάρων ηλεκτρονίων στο $O_2$ πριν το τελικό προϊόν την αντίδρασης ($H_2O$) αφεθεί ελεύθερο.

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \xrightarrow{\text{κυτοχρωμική οξειδάση}} 2H_2O \qquad (4)$$

Ένα 2% περίπου του προσλαμβανόμενου $O_2$ όμως, ανάγεται ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες με μονά ηλεκτρόνια, όπως φαίνεται στο σχήμα 3. Το αναγωγικό περιβάλλον που επικρατεί στα κύτταρα προσφέρει αρκετές δυνατότητες για την αναγωγή του $O_2$ με ένα ηλεκτρόνιο που οδηγεί στο σχηματισμό του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$), το οποίο είναι μεν ελεύθερη ρίζα αλλά όχι ιδιαίτερα δραστική. Το $O_2^{\cdot -}$ λαμβάνοντας ένα δεύτερο

ηλεκτρόνιο τις περισσότερες φορές από ένα άλλο $O_2^{\cdot-}$ μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ($H_2O_2$) που δεν είναι ελεύθερη ρίζα και είναι σχετικά σταθερή ένωση. Αναγωγή όμως του $H_2O_2$ με ένα ακόμη ηλεκτρόνιο σχηματίζει την ιδιαίτερα δραστική ρίζα υδροξυλίου ($^{\cdot}OH$) που αποτελεί έναν από τους πιο δραστικούς οξειδωτικούς παράγοντες που δημιουργούνται in vivo.




**Σχήμα 3:** Αναγωγή του μοριακού $O_2$ με μονά ηλεκτρόνια

Με τις αντιδράσεις αυτές που συνοψίζονται και στο σχήμα 4, ενδιάμεσα της αναγωγής του $O_2$, όπως η $O_2^{\cdot-}$, η $HO_2^{\cdot}$, το $H_2O_2$ και η $^{\cdot}OH$ σχηματίζονται στους αερόβιους οργανισμούς συνεχώς, ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.

$$O_2 + e^- + H^+ \rightarrow HO_2^{\cdot}$$
$$HO_2^{\cdot} \rightarrow O_2^{\cdot-} + H^+$$
$$O_2^{\cdot-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$
$$H_2O_2 + e^- \rightarrow {}^{\cdot}OH + OH^-$$
$${}^{\cdot}OH + e^- + H^+ \rightarrow H_2O$$

**Σχήμα 4 :** Αντιδράσεις δημιουργίας ενδιάμεσων αναγωγής του $O_2$

Αυξημένη παραγωγή αυτών των ενδιάμεσων μορφών της αναγωγής του οξυγόνου, είναι υπεύθυνη για μια πλειάδα παθολογικών καταστάσεων στους αερόβιους οργανισμούς. Οι ενώσεις αυτές καλούνται συνολικά Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ΔΜΟ, Reactive Oxygen Species, ROS) ή Ενδιάμεσες Μορφές Αναγωγής του Οξυγόνου (Reactive Oxygen

Intermediates, ROI) και οι σημαντικότερες αναφέρονται στον πίνακα 1. Όπως φαίνεται, μερικές μόνο από τις ενώσεις αυτές είναι ελεύθερες ρίζες.

**Πίνακας 1.** Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

| ΕΝΩΣΗ | ΟΝΟΜΑ |
|---|---|
| **Ελεύθερες ρίζες** | |
| $O_2^{\cdot -}$ | Ανιόν σουπεροξειδίου |
| $HO^{\cdot}$ | Ρίζα υδροξυλίου |
| $HO_2^{\cdot}$ | Υδροϋπεροξειδική ρίζα |
| $RO^{\cdot}$ | Ρίζα αλκοξειδίου |
| $ROO^{\cdot}$ | Ρίζα υπεροξειδίου |
| **Μη-ελεύθερες ρίζες** | |
| $H_2O_2$ | Υπεροξείδιο του υδρογόνου |
| ROOH | Οργανικά υπεροξείδια |
| $^1O_2$ | Μονήρες οξυγόνο |
| $O_3$ | Όζον |
| HOCl | Υποχλωριώδες οξύ |
| $ONOO^-$ | Περοξυνιτρώδες |

### 1.2.2 Αμυντικοί μηχανισμοί

Από όσα αναφέρθηκαν μέχρι στιγμής είναι εμφανές ότι η δημιουργία ΔΜΟ στα κύτταρα των αερόβιων οργανισμών είναι συνεχής και λαμβάνει χώρα ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Η συσσώρευση όμως αυτών των ενώσεων θα είχε καταστροφικές για το κύτταρο συνέπειες. Για να καταφέρουν οι αερόβιοι οργανισμοί να επιζήσουν, έχουν αναπτύξει ένα σύστημα αμυντικών μηχανισμών που εξισορροπούν την παραγωγή των ΔΜΟ, απομακρύνοντάς τις μόλις δημιουργηθούν. Υπάρχει δηλαδή μια λεπτή δυναμική ισορροπία ανάμεσα στην δημιουργία και την απομάκρυνση των ΔΜΟ στα κύτταρα που καλείται «οξειδοαναγωγική ισορροπία».

Τα ένζυμα τα οποία συνεργάζονται για την απομάκρυνση των ΔΜΟ είναι κυρίως οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SODs), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP) και οι περοξυρεδοξίνες (PRx) (σχήμα 3).

Η SOD καταλύει την αναγωγή του $O_2^{\cdot-}$ προς $H_2O_2$ σύμφωνα με την αντίδραση 5 (McCord et al., 1969a, McCord et al., 1969b). Αν και η αντίδραση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί και μη ενζυμικά με υψηλή ταχύτητα, η παρουσία του ενζύμου αυξάνει την ταχύτατα της αντίδρασης περισσότερο από 10000 φορές. Επιπλέον η SOD έχει ανιχνευθεί σχεδόν σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, στο κυτταροδιάλυμα σε μια μορφή που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο (CuZn-SOD) και στα μιτοχόνδρια με μια μορφή που περιέχει μαγγάνιο (Mn-SOD). Η υψηλή ταχύτητα της αντίδρασης σε συνδυασμό με την παρουσία της SOD σε όλα τα κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα η συγκέντρωση του $O_2^{\cdot-}$ να είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Έχει υπολογιστεί ότι παρουσία της SOD η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ισορροπίας (steady state) του $O_2^{\cdot-}$ είναι περίπου ίση με $10^{-11}$ M.

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \qquad (5)$$

Μελέτες με ποντίκια στα οποία είχαν απενεργοποιηθεί τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των SODs (knock out τεχνικές), έδειξαν τις σοβαρές επιπτώσεις από την συσσώρευση του $O_2^{\cdot-}$. Για παράδειγμα, η έλλειψη της MnSOD οδηγεί τα ζώα αυτά στο θάνατο τις 10 πρώτες ημέρες της ζωής τους, κυρίως από καρδιακή ανεπάρκεια. Επιπλέον, τα ζώα που επιζούν, εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία στις ΔΜΟ. Η έλλειψη CuZnSOD δεν έχει τόσο σοβαρές επιπτώσεις, αλλά τα ζώα αυτά είναι πιο ευαίσθητα σε οξειδωτικούς παράγοντες. Αντίθετα, η υπερέκφραση της CuZnSOD σε επίμυες, προστατεύει τα ζώα σε συνθήκες αυξημένης δημιουργίας ΔΜΟ. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις εμφανίζονται ανωμαλίες που οφείλονται πιθανά στην αύξηση του $H_2O_2$ που είναι και το προϊόν της αντίδρασης της SOD.

Το $H_2O_2$ που σχηματίζεται κυρίως από την παραπάνω αντίδραση, μπορεί να απομακρυνθεί στη συνέχεια με τη δράση ορισμένων άλλων ενζύμων. Ένα από αυτά, η καταλάση (CAT) καταλύει την αναγωγή του $H_2O_2$ με δύο ηλεκτρόνια προς $H_2O$, σύμφωνα με την αντίδραση 6.

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{CAT} H_2O + O_2 \qquad (6)$$

Η CAT έχει βρεθεί σχεδόν σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, κυρίως σε κυτταρικά οργανίδια που καλούνται υπεροξεισωμάτια (Chance B et al., 1979). Έλλειψη της CAT ή περιορισμένη δραστικότητά της, δεν φαίνεται να έχει σοβαρά αποτελέσματα στους οργανισμούς, πιθανά εξαιτίας της ύπαρξης και άλλων ενζυμικών συστημάτων για την απομάκρυνση του $H_2O_2$.

Τέτοια ένζυμα είναι για παράδειγμα η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP) (Chance et al., 1997), μια σελινιοεξαρτώμενη πρωτεΐνη που εντοπίζεται κυρίως στο κυτταροδιάλυμα και τα μιτοχόνδρια. Το ένζυμο αυτό ανάγει το $H_2O_2$ σε $H_2O$ οξειδώνοντας την γλουταθειόνη (GSH) σε GSSG (αντίδραση 7). Εμφανίζει απόλυτη εξειδίκευση όσον αφορά την γλουταθειόνη αλλά μπορεί να ανάγει διαφορετικά υπεροξείδια όπως είναι τα λιπιδιακά υπεροξείδια, οργανικά υπεροξείδια, υπεροξείδια της χοληστερόλης ακόμη και το περοξυνιτρώδες.

$$H_2O_2 + 2\,GSH \xrightarrow{GP} 2\,H_2O + GSSG \qquad (7)$$

Και τα δύο παραπάνω ένζυμα, η CAT και η GP απαντώνται σε όλους σχεδόν τους ιστούς και πιστεύεται ότι συνεργάζονται με σκοπό την απομάκρυνση του $H_2O_2$. Η CAT απαντάται κυρίως στα υπεροξεισωμάτια ενώ η GP στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια (Meister, 1995). Έτσι τα ένζυμα αυτά θεωρούνται υπεύθυνα για την αποικοδόμηση του $H_2O_2$ στα αντίστοιχα σημεία του κυττάρου. Σε ορισμένα κύτταρα όμως απαντώνται και τα δύο ένζυμα στο κυτταρόπλασμα. Στις περιπτώσεις αυτές πιστεύεται ότι η GP είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση του $H_2O_2$ όταν αυτό βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ όταν βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις απομακρύνεται κυρίως από την CAT (Gaetani, 1995). Ασθενείς με γενετικές ανωμαλίες στο γονίδιο της CAT, δεν εμφανίζουν σοβαρές κλινικές επιπτώσεις, παρά μόνο κάτω από συνθήκες παραγωγής υψηλών συγκεντρώσεων $H_2O_2$. Αντίθετα γενετικές ανωμαλίες που αφορούν την GP είναι πολύ σπάνιες αλλά έχουν πολύ σοβαρές επιπτώσεις.

Λιγότερο γνωστά αλλά εξίσου σημαντικά είναι τα ένζυμα περοξυρεδοξίνες (PRx). Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την αναγωγή του $H_2O_2$ και από την GSH αλλά και από μια σειρά άλλων θειολών, με μια αντίδραση παρόμοια με αυτή της GP (αντίδραση 8) (Rhee, 1999b, Rhee et al., 2001, Chen, 2000).

$$H_2O_2 + 2\,RSH \xrightarrow{PRx} 2\,H_2O + RSSR \qquad (8)$$

Εκτός από τα παραπάνω ένζυμα, το κύτταρο επιστρατεύει και άλλους αμυντικούς μηχανισμούς για την προστασία του από τις ελεύθερες ρίζες και τις ΔΜΟ. Κεντρικό ρόλο σε αυτούς τους μηχανισμούς, φαίνεται να παίζουν μικρομοριακές προστατευτικές ουσίες, όπως οι βιταμίνες C και E, η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, η συμπικινόνη, τα φλαβονοειδή, τα καροτενοειδή, κα. Οι ενώσεις αυτές που καλούνται συνήθως «εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών» (free radical scavengers) έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και να αναστέλλουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις τις οποίες προκαλούν.

Σημαντική συμβολή για την αντιμετώπιση των ελευθέρων ριζών έχουν και οι δεσμευτές μετάλλων, όπως η τρανσφερίνη, η λακτοφερίνη, η φερριτίνη, η αιμοσιδηρίνη, η σερουλοπλασμίνη κτλ. Αυτές οι ενώσεις δεσμεύουν ελεύθερα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης κυρίως Fe και Cu καθώς και ελεύθερης αίμης, με αποτέλεσμα να αναστέλλουν την συμβολή τους σε αντιδράσεις δημιουργίας ελευθέρων ριζών. Για παράδειγμα ελεύθερα ιόντα $Fe^{+2}$ και $Cu^{+}$, αντιδρούν με το $H_2O_2$ αλλά και άλλα οργανικά υπεροξείδια σχηματίζοντας τις πολύ δραστικές ρίζες $HO^{\cdot}$ και $RCO^{\cdot}$. Κατά συνέπεια οι μεταλλοδεσμευτικές ενώσεις αναστέλλουν τις αντιδράσεις δημιουργίας των ριζών αυτών.

Πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν και οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί που έχουν την ικανότητα να διορθώνουν οξειδωτικές τροποποιήσεις στο DNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν συνήθως την αναγνώριση της βλάβης, την απομάκρυνση του τροποποιημένου τμήματος, ή μορίου και τέλος την επιδιόρθωσή του.

### 1.2.3 Οξειδοαναγωγική ισορροπία

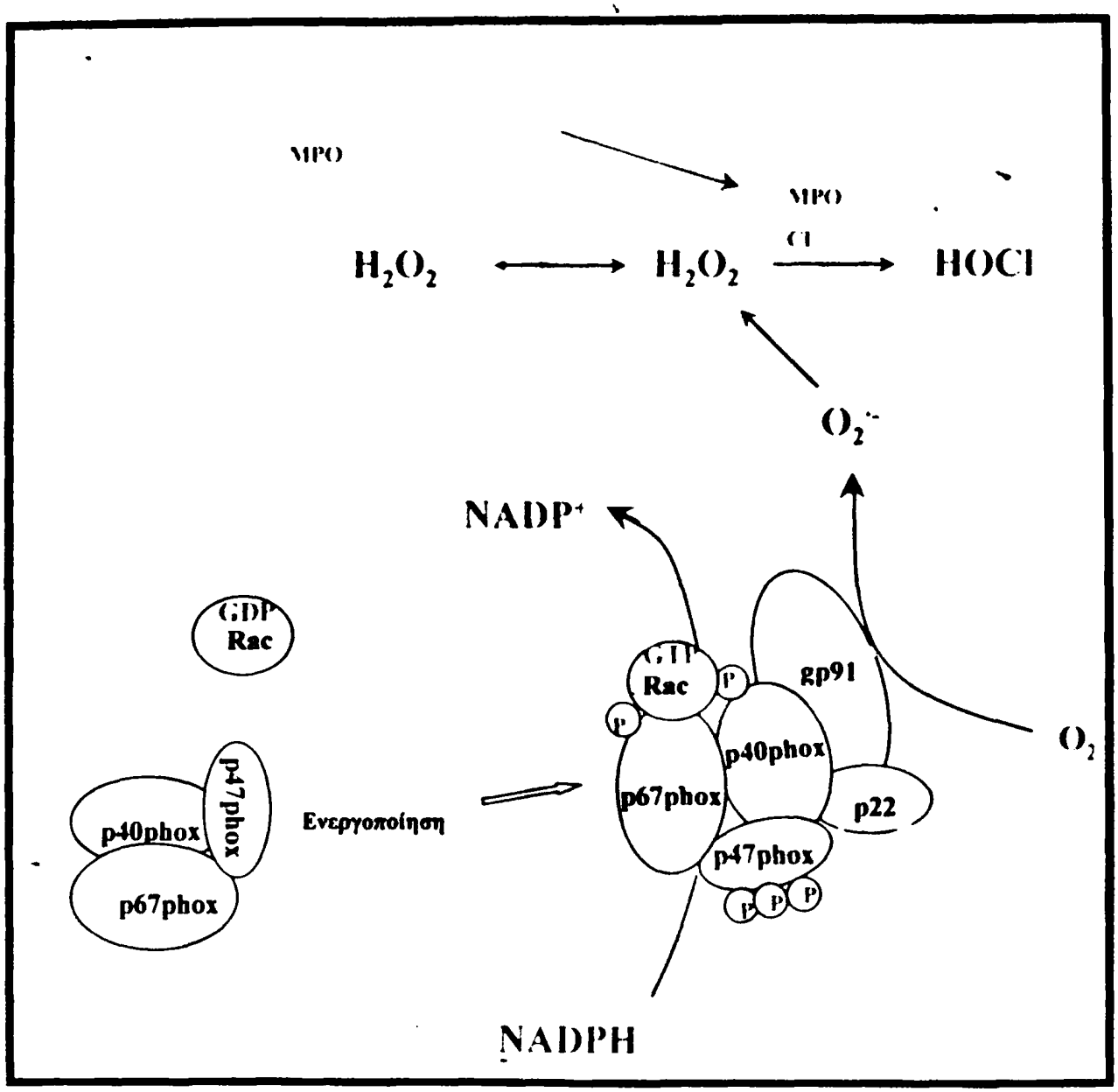
Από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι φανερό ότι ΔΜΟ δημιουργούνται συνέχεια στα κύτταρα ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και απομακρύνονται συνεχώς από αμυντικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Υπάρχει με λίγα λόγια μια λεπτή ισορροπία που

καλείται «οξειδοαναγωγική ισορροπία». Διαφορετικοί τύποι κυττάρων έχουν διαφορετικές ταχύτητες τόσο δημιουργίας όσο και απομάκρυνσης των ΔΜΟ και κατά συνέπεια η οξειδοαναγωγική ισορροπία δεν είναι η ίδια σε διαφορετικά είδη κυττάρων. Αλλά ακόμη και στα ίδια κύτταρα, η ισορροπία αυτή μπορεί να αλλάζει κάτω από ορισμένες συνθήκες. Στις περιπτώσεις που η ισορροπία διαταράσσεται προς όφελος των οξειδωτικών παραγόντων, προκαλείται μια κατάσταση που είναι γνωστή ως οξειδωτικό στρες (Sies, 1985).

### 1.2.3.1 Δημιουργία $O_2^{\cdot-}$ στα φαγοκύτταρα

Αύξηση της δημιουργίας ΔΜΟ στα κύτταρα μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες όπως είναι η επίδραση ακτινοβολιών, η χορήγηση φαρμάκων, ο μεταβολισμός τοξικών ενώσεων κα. Σημαντική πηγή πρόκλησης οξειδωτικού στρες in vivo, θεωρείται η ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων κατά την διάρκεια φλεγμονών. Τα ουδετερόφιλα που αποτελούν τον κυριότερο φαγοκυτταρικό πληθυσμό, αλλά και άλλα επαγγελματικά φαγοκύτταρα όταν διεγείρονται παράγουν σημαντικές ποσότητες $O_2^{\cdot-}$. Λόγω της υψηλής κατανάλωσης οξυγόνου το φαινόμενο αυτό συχνά καλείται «αναπνευστική έκρηξη», ενώ πιο σωστό θα ήταν «οξειδωτική έκρηξη» μιας και το καταναλισκόμενο οξυγόνο δεν χρησιμοποιείται για την αναπνοή. Τα απαραίτητα ηλεκτρόνια για την αναγωγή του $O_2$ προέρχονται από ενδοκυττάριο NADPH. Το $O_2^{\cdot-}$ ανάγεται στη συνέχεια προς $H_2O_2$ είτε από την δράση της SOD είτε μη ενζυμικά. Αυτοί οι δύο παράγοντες όμως, όπως ήδη αναφέρθηκε εμφανίζουν χαμηλή δραστικότητα. Έτσι για να αμυνθούν αποτελεσματικά στους εισβολείς, εκλύονται από κυτταροπλασματικά κυστίδια των φαγοκυττάρων παράγοντες μεταξύ των οποίων και το ένζυμο μυελοπεροξειδάση (MPO) που χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το $H_2O_2$ οξειδώνει ιόντα χλωρίου σε υποχλωριώδες οξύ (HOCl) που είναι αρκετά ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας και συμβάλει στην άμυνα του οργανισμού.

Η αρχική παραγωγή του $O_2^{\cdot-}$, καταλύεται από ένα πολύπλοκο ενζυμικό σύμπλοκο που εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των φαγοκυττάρων και ονομάζεται «NADPH οξειδάση» (σχήμα 5). Η NADPH οξειδάση αποτελείται από 6 κύριες υπομονάδες: δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, τις p22phox και gp91phox που συνδέονται με στοιχειομετρία 1:1 και σχηματίζουν το κυτόχρωμα b558 (Wallach and Segal, 1996). Τέσσερα άλλα συστατικά αυτού του συμπλόκου το p47phox, το p67phox, το p40phox και η χαμηλού μοριακού βάρους




**Σχήμα 5:** Διαγραμματική περιγραφή της δημιουργίας $O_2^{\cdot-}$ από το ένζυμο «NADPH οξειδάση» στην κυτταρική μεμβράνη των φαγοκυττάρων.

G πρωτεΐνη Rac που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του ενζύμου βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και μετατοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη κατά την ενεργοποίηση της οξειδάσης. Μια άλλη G πρωτεΐνη, η Rap1A έχει επίσης προταθεί ότι σχετίζεται με την απενεργοποίηση αυτού του ενζυμικού συμπλόκου. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η NADPH οξειδάση βρίσκεται σε αδρανή μορφή με τις υπομονάδες της να εντοπίζονται όπως αναφέρθηκε παραπάνω στην κυτταρική μεμβράνη αλλά και στο κυτταρόπλασμα. Επαφή ξένων παθογόνων ουσιών με τη μεμβράνη των φαγοκυττάρων συνεπάγεται την απαρχή μιας σειράς αλληλοδιαδοχικών φαινομένων που προκαλούν την φωσφορυλίωση των

κυτταροπλασματικών υπομονάδων, την μεταφορά τους στη μεμβράνη και την δημιουργία της ενεργοποιημένης NADPH οξειδάσης. Στο ενεργό ένζυμο μια β-πτυχωτή επιφάνεια στη δομή του κυτοχρώματος b558 (gp91phox) παίζει ρόλο στην μεταφορά των ηλεκτρονίων ενώ μια έλικα στην p22phox σχετίζεται με την δημιουργία $O_2^-$ (Leusen et al., 2000, Leusen et al., 1996a, Leusen et al., 1996b, Leusen et al., 1995, Leusen et al., 1994). Επίσης οι πρωτεΐνες p47phox, p67phox και Rac παίζουν σημαντικό ρόλο στην δράση οξειδάσης, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι μεταλλάξεις σε αυτές τις πρωτεΐνες περιορίζουν την αντιμικροβιακή ικανότητα των φαγοκυττάρων.

### 1.2.4 Δραστικές μορφές οξυγόνου και μεταγωγή σήματος

Για αρκετές δεκαετίες η έρευνα σχετικά με το οξειδωτικό στρες περιορίστηκε στις επιπτώσεις απότομων αλλαγών της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, που είχαν τοξικές επιπτώσεις για τα κύτταρα και οδηγούσαν στον θάνατο. Η πρόσφατη όμως ανίχνευση μικρών μη τοξικών ποσοτήτων ΔΜΟ στα κύτταρα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες έθεσε το ερώτημα για τους ρόλους που μπορούν να παίξουν αυτοί οι παράγοντες. Σήμερα υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι μικρές αλλαγές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας παίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταγωγή σημάτων στα κύτταρα και σχετίζονται με βασικές λειτουργίες όπως τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο (Irani et al., 1997, Arnold et al., 2001, Joneson and Bar-Sagi, 1998). Με άλλα λόγια τα μόρια που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, δεν είναι απλώς επιβλαβή παραπροϊόντα του μεταβολισμού, αλλά μόρια με σημαντική φυσιολογική σημασία (Rhee, 1999b, Allen and Balin, 1989).

Μικρές αλλαγές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας μπορούν να προκληθούν με διαφορετικούς τρόπους. Τα μιτοχόνδρια όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, αλλά και άλλα κυτταρικά οργανίδια όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο και ο πυρήνας έχουν την ικανότητα να παράγουν χαμηλές ποσότητες ΔΜΟ. Ένζυμα όπως η οξειδάση της ξανθίνης, ή άλλα φλαβοένζυμα καθώς και τα ένζυμα του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέως παράγουν επίσης ΔΜΟ. Η σημαντικότερη όμως πηγή δημιουργίας μικρών ποσοτήτων ΔΜΟ στα κύτταρα, θεωρείται μια οικογένεια ενζύμων (NAD(P)H οξειδάσες), παρόμοιες με την NADPH οξειδάση των φαγοκυττάρων που έχουν εντοπιστεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όλων σχεδόν των κύτταρων (Griendling et al., 1994, Tammariello et al., 2000, Bayraktutan U et al., 2000, Ushio-Fukai et al., 1996, Fukui et al., 1997). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Bayraktutan et al., 2000, Gorlach et al., 2000) και σε ινοβλάστες (Pagano et al.,

1997), έχουν ήδη ταυτοποιηθεί όλα τα συστατικά των ενζύμων αυτών. Οι μηχανισμοί με τους οποίους αυτές οι NAD(P)H οξειδάσες ενεργοποιούνται είναι ακόμη υπό διερεύνηση, αν και έχει υποστηριχθεί ότι η δέσμευση προσδεμάτων σε υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να ενεργοποιήσει τα ένζυμα αυτά. Η δέσμευση προσδεμάτων όπως για παράδειγμα αυξητικών παραγόντων, ορμονών ή κυτταροκινών στους αντίστοιχους υποδοχείς τους προκαλούν την έναρξη μιας σειράς γεγονότων που έχουν σαν αποτέλεσμα την μεταφορά σημάτων από την μεμβράνη στο εσωτερικό του κυττάρου (signal transduction). Τα σήματα αυτά ανάλογα με τον υποδοχέα μπορεί να σχετίζονται με την επιβίωση, την διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό ή ακόμη και με τον θάνατο των κυττάρων. Πρόσφατες παρατηρήσεις έχουν δείξει ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η δέσμευση των προσδεμάτων προκαλεί μια άμεση αλλά παροδική αύξηση ενδοκυττάριων ΔΜΟ. Επιπλέον, οι ίδιες παρατηρήσεις έδειξαν ότι αυτές οι συγκεντρώσεις των ΔΜΟ, σε αρκετές περιπτώσεις ήταν απαραίτητες για την μεταγωγή των σημάτων που προκαλεί η δέσμευση στον υποδοχέα (Irani et al., 1997, Arnold et al., 2001, Joneson and Sagi, 1998). Γρήγορη απομάκρυνση των ΔΜΟ με την προσθήκη αντιοξειδωτικών ενζύμων ή αντιοξειδωτικών ενώσεων είχε σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μεταγωγής του σήματος. Αν και οι μηχανισμοί παραγωγής ΔΜΟ στις περιπτώσεις αυτές είναι υπό διερεύνηση φαίνεται πως σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις ενεργοποιούνται NAD(P)H οξειδάσες που εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Griendling et al., 1994, Tammariello et al., 2000, Bayraktutan et al., 2000).

Οι υποδοχείς κυτταροκινών (cytokine receptor) όπως του TNF-α, της ιντερλευκίνης-1 (IL-1) και της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) είναι από τους πρώτους που αναφέρθηκε ότι οδηγούν στην αύξηση ΔΜΟ σε μη-φαγοκύτταρα (Matsubara and Ziff, 1996, Meiler et al., 1989, Meiler et al., 1999). Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η δέσμευση του προσδέματος στους υποδοχείς αυτούς, αυξάνει την παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ και $H_2O_2$ δια μέσου της ενεργοποίησης NAD(P)H οξειδασών (Meiler et al., 1991, Satriano et al., 1993, Bhunia et al., 1998). Σε λεία μυϊκά κύτταρα για παράδειγμα έχει αναφερθεί ότι ο TNF-α προκαλεί την αύξηση του $O_2^{\cdot -}$ με ενεργοποίηση μιας NADH οξειδάσης (De Keulenaer et al., 1998). Οι κυτταροκίνες μπορούν να προκαλέσουν αύξηση των ΔΜΟ και με άλλους τρόπους. Ο TNF-α για παράδειγμα έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων, αυξάνοντας την παραγωγή ΔΜΟ από αυτά (Schulze-Osthoff et al., 1993, Goossens et al., 1996, Yoshida et al., 1999, Simeonova et al., 1999, Li and Karin, 1998, Chen et al., 1999). Επίσης, ο TNF-α και η IL-1, ενεργοποιούν την οξυγονάση της αίμης -1 (heam oxygenase -1, HO-1) ή Hsp32,

ένα ένζυμο που επάγεται από διάφορα είδη στρες και καταλύει την μετατροπή της αίμης σε χολερυθρίνη με ταυτόχρονη παραγωγή ιόντων σιδήρου και μονοξειδίου του άνθρακα. Πιστεύεται ότι η επαγωγή της HO-1 προκαλεί αύξηση των ΔΜΟ στα κύτταρα, πιθανά μέσω της αύξησης ελευθέρων ιόντων σιδήρου που προέρχονται από τον καταβολισμό της αίμης (Terry et al., 1999). Επιπλέον, οι κυτταροκίνες (Feng et al., 1995, Lajarin et al., 1999) μπορούν να ενεργοποιήσουν την κυκλοοξυγονάση II (ή συνθάση των προσταγλανδινών) προκαλώντας σύνθεση προσταγλανδινών, μια διαδικασία κατά την οποία παράγονται ΔΜΟ, με ένα μηχανισμό που δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί.

Πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι όταν ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες δεσμεύονται στους αντίστοιχους υποδοχείς που έχουν ενδογενή ικανότητα φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases, RTKs), οδηγούν στην ενδοκυττάρια αύξηση ΔΜΟ και ότι αυτό ήταν απαραίτητο για την μεταγωγή του μιτογόνου σήματος. Δύο από τους πιο γνωστούς αυξητικούς παράγοντες, ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF) μετά την δέσμευσή τους στους αντίστοιχους RTKs, προκαλούν την αύξηση της δημιουργίας του $O_2^{\cdot-}$ και του $H_2O_2$ επίσης διαμέσου μιας NAD(P)H οξειδάσης (Abid et al., 2001, Irani et al., 1997, Marumo et al., 1997, Sundaresan et al., 1995, Sundaresan et al., 1996, Tannickal et al., 2000). Άλλες μελέτες επίσης υποστηρίζουν ότι η δέσμευση προσδεμάτων σε υποδοχείς κυτταροκινών σερίνης/θρεονίνης, προκαλούν την αύξηση του $H_2O_2$, στην περίπτωση αυτή όμως ελάχιστα είναι γνωστά για τον τρόπο δημιουργίας του. Σε ανθρώπινους ινοβλάστες πνευμόνων, φαίνεται πως αυτές οι επιπτώσεις οφείλονται στην ενεργοποίηση ενός φλαβονοενζύμου στην επιφάνεια του κυττάρου με ενεργότητα NADH/φλαβοοξειδάσης (Thannickal et al., 1995, Thannickal et al., 1998, Thannickal et al., 2003).

Αύξηση των ΔΜΟ έχει αναφερθεί και στην περίπτωση υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες (G protein-coupled receptors). Προσδέματα που όταν δεσμεύονται στους υποδοχείς τους προκαλούν την σύνδεσή τους με G πρωτεΐνες είναι για παράδειγμα η αγγειοτενσίνη II (Ang II) και η θρομβίνη. Η Ang II, μια από τις πιο ισχυρές αγγειοσυσταλτικές ουσίες διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και επιπλέον προκαλεί και υπερτροφία του μυοκαρδίου. Σε αρκετές μελέτες έχει δειχθεί ότι μπορεί να ενεργοποιήσει την NAD(P)H οξειδάση ορισμένων κυττάρων και να προκαλέσει υπερτροφία κυρίως δια μέσου της αύξησης των ΔΜΟ. Πιστεύεται ότι στην περίπτωση αυτή η ενεργοποίηση της NAD(P)H οξειδάσης οφείλεται κατά κύριο λόγο σε

μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέως, που με την σειρά τους οδηγούν σε αύξηση των ΔΜΟ. Συγκεκριμένα, η αγγειοτενσίνη ΙΙ διεγείρει τη φωσφολιπάση Α2, απελευθερώνοντας αραχιδονικό οξύ από τα φωσφολιπίδια, το οποίο ενεργοποιεί την NAD(P)H οξειδάση, διαμέσου της πρωτεΐνης p22phox. (Zafari et al., 1998, Zafari et al., 1999). Η δράση της θρομβίνης, έχει επίσης δειχθεί ότι εξαρτάται σε πολλές περιπτώσεις από την δημιουργία ΔΜΟ, που προκαλείται από ενεργοποίηση της NAD(P)H οξειδάσης. Η θρομβίνη αυξάνει την έκφραση των πρωτεϊνών p47phox και Rac2 που είναι συστατικά των NAD(P)H οξειδασών, και προκαλεί την μετατόπισή τους στην κυτταρική μεμβράνη (Patterson et al., 1999, Griendling et al., 1994, Pagano et al., 1998, Ushiho-Fukai et al., 2000, Zafari et al., 1998, Zafari et al., 1999, Lee et al., 1998, Lee et al., 1999 ).

### 1.2.4.1 Ενεργοποίηση ενδοκυττάριων πρωτεϊνικών κινασών

Υπάρχουν ενδείξεις ότι ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών C (Protein Kinase C, PKC), επηρεάζεται από αλλαγές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, καθώς και ότι η παρουσία αντιοξειδωτικών παραγόντων αναστέλλει την μεταγωγή σημάτων που εξαρτώνται από αυτές (Gopalakrishna et al., 2000). Η αμινοτελική ρυθμιστική περιοχή των κινασών αυτών είναι πλούσια σε κυστεΐνες που μπορούν να οξειδώνονται εύκολα. Η οξείδωση περιορίζει την ανασταλτική δράση της αμινοτελικής περιοχής και κατά συνέπεια αυξάνει την δράση της PKC. Από την άλλη πλευρά η καρβοξυτελική περιοχή περιέχει επίσης ενεργές κυστεΐνες που είναι στόχοι πολλών αντιοξειδωτικών μορίων με αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργότητας των PKC. Έτσι, οι δύο αυτές περιοχές των PKC αντιδρούν διαφορετικά σε διαφορετικά σήματα. Υποστηρίζεται ότι διάφορα προοξειδωτικά μόρια δρουν εκλεκτικά στην ρυθμιστική περιοχή ενεργοποιώντας την PKC και μεταδίδοντας σήματα που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη όγκων (tumor promotion). Αντίθετα οι αντιοξειδωτικοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, δρουν κυρίως στην καταλυτική περιοχή, και αναστέλλουν τις PKCs περιορίζοντας έτσι την δράση τους σαν επαγωγείς της ανάπτυξης όγκων (Gopalakrishna et al., 2000). Σε αυτή την οξειδοαναγωγική ρύθμιση των PKCs, θα μπορούσε πιθανά να οφείλεται η συσχέτιση των οξειδωτικών παραγόντων με την δημιουργία όγκων καθώς και η προστασία που έχει προταθεί ότι παρέχουν οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες.

Η οικογένεια των MAP κινασών (Mitogen-Activated Protein Kinase) είναι από τις πρώτες που σχετίστηκαν με αλλαγές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Οι ERKs

(Extracellular Signal-Regulated Kinases) αποτελούν μέλη των MAP κινασών και εμπλέκονται στην μεταγωγή σημάτων που ρυθμίζουν την απόκριση του κυττάρου σε αυξητικούς, μιτογόνους, αποπτωτικούς ή στρεσογόνους διεγέρτες (Flohe et al., 1997). Διέγερση από αυξητικούς παράγοντες όπως ο PDGF, προτάθηκε ότι ενεργοποιεί τις ERK1/ERK2 (Sundaresan et al., 1996) δια μέσου της αύξησης του $H_2O_2$.

Η οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από στρες (Stress-Activated Protein Kinase, SAPK), που συμπεριλαμβάνουν την c-Jun N-τελική κινάση (JNKs), και την p38 MAPK, είναι επίσης ευαίσθητες σε αλλαγές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (Kyriakidis and Avruch, 1996). Οι κινάσες αυτές ρυθμίζονται από τις Rho πρωτεΐνες όπως είναι η Rac1 που είναι μικρές GTPάσες. Η ενεργοποίηση των SAPK από το οξειδωτικό στρες, μπορεί να οδηγήσει είτε σε απόπτωση είτε σε πολλαπλασιασμό ανάλογα με την πρωτεΐνη SARK που θα ενεργοποιηθεί. Για παράδειγμα σε ενδοθηλιακά κύτταρα, η αύξηση του $H_2O_2$ οδηγεί σε απόπτωση δια μέσου της ενεργοποίησης των JNKs και του στόχου τους c-Jun (Wang et al., 1999, Verheij et al., 1996), ενώ σε λεία μυϊκά κύτταρα η αύξηση ΔΜΟ από την Ang II οδηγεί σε ενεργοποίηση της p38 MAPK προκαλώντας υπερπλασία (Ushio-Fukai et al., 1998).

Η κινάση κυτταρικής επιβίωσης Akt (πρωτεϊνική κινάση B) είναι επίσης στόχος του οξειδωτικού στρες (Coffer et al., 1998). Σε λεία μυϊκά κύτταρα, η Ang II επάγει την ενεργοποίηση της Akt μέσω της αύξησης του $H_2O_2$ (Ushio-Fukai et al., 1999). Η Akt κινάση δρα μετά από την 3-φωσφατιδυλοινοσιτολική κινάση (PI-3 K), και εμπλέκεται στην μετάδοση αντι-αποπτωτικών σημάτων (Downward, 1998). Σε ενδοθηλιακά κύτταρα, η ενεργοποίηση της Akt (με φωσφορυλίωση) που προκαλείται από στρες προκαλεί καταστολή της απόπτωσης και συνδέεται με προστατευτική δράση (Dimmeler, 1998), ενώ ο VEGF επάγει την ανάπτυξη και επιβίωση (Wu et al., 2000, Fujio and Walsh, 1999, Gerber et al., 1998). Υποστηρίζεται επίσης ότι η Rac-1 είναι στόχος της PI-3 K (Han et al., 1998), που υποδηλώνει την ρύθμιση της NADPH-οξειδάσης από την Akt.

### 1.2.4.2 Ενεργοποίηση του NF-κB

Αν και έχει βρεθεί ότι πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζονται διαμέσου αλλαγών της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (Duval et al., 2003, Jin et al., 2000, Nakamura et al., 1997) ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB, είναι ο καλύτερα μελετημένος. Σε

φυσιολογικές συνθήκες ο NF-κB εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων σε λανθάνουσα κατάσταση, συνδεδεμένος με έναν αναστολέα του IκB, που αποκρύπτει την περιοχή του πυρηνικού εντοπισμού μη επιτρέποντας την μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα (Baeuerle and Henkel, 1994, May and Chosh, 1998). Κεντρικό γεγονός για την ενεργοποίηση του NF-κB είναι η φωσφορυλίωση της οικογένειας των αναστολέων IκB σε συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων της N-τελικής περιοχής. Μετά την φωσφορυλίωση ο IκB γίνεται συνήθως στόχος πολύ-ουμπικουιτινιλίωσης, αναγνωρίζεται από το πρωτεάσωμα 26S (May et al., 1998) και κατακερματίζεται (DiDonato et al., 1997, Mercurino et al., 1997, Manniatis et al., 1997, Woronicz et al., 1997), ενώ ο NF-κB μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου δεσμεύεται σε συγκεκριμένες θέσεις στο DNA σε ρυθμιστικές περιοχές πολλών γονιδίων προκαλώντας την μεταγραφή τους. Η απομάκρυνση του αναστολέα IκB και η επακόλουθη ενεργοποίηση του NF-κB μπορεί να προκληθεί από πολλούς και διαφορετικούς παράγοντες, όπως είναι βακτηριακά και ιϊκά παθογόνα, ανοσολογικές και φλεγμονώδεις κυτοκίνες, παράγοντες που προκαλούν βλάβες στα κύτταρα όπως τα χημειοθεραπευτικά και διάφορα είδη στρες μεταξύ των οποίων και το οξειδωτικό στρες (Baeuerle and Henkel, 1994, May and Chosh, 1998). Η ποικιλία των ερεθισμάτων που ενεργοποιούν τον NF-κB, υποδηλώνει ότι πρόκειται για έναν πολύπλευρο μεταγραφικό παράγοντα και δεν είναι περίεργο ότι ρυθμίζει την μεταγραφή πολλών και διαφορετικών γονιδίων που εμπλέκονται στην ανοσολογική και φλεγμονώδη απόκριση, στον ιϊκό πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση κα (Flohe et al., 1997, Ginn-Pease and Whisler, 1998, Baeuerle, 1998, May and Chosh, 1998, Verma et al., 1995). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν μελέτες σύμφωνα με τις οποίες η ενεργοποίηση του NF-κB επάγει σήματα επιβίωσης, όπως για παράδειγμα την αύξηση της μεταγραφής αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η Bcl-2, η Bcl-X, η c-IAP-1 και η c-IAP-2 (Tamatani et al., 1999, Wang et al., 1998).

Υπάρχουν πολλές αναφορές ότι διαφορετικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες μπορούν να αναστείλουν την ενεργοποίηση του NF-κB, ενώ ενδιάμεσες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ προκαλούν την ενεργοποίησή του με φωσφορυλίωση και αποσύνδεση του IκB από το σύμπλοκο. Επιπλέον, πολλοί από τους παράγοντες που ενεργοποιούν τον NF-κB επάγουν ταυτόχρονα και την αύξηση των ενδοκυττάριων ΔΜΟ (Bonizzi et al., 1996, Bonizzi et al., 1997, Bonizzi et al., 1999). Πιστεύεται λοιπόν ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η ενεργοποίηση του NF-κB ρυθμίζεται από αλλαγές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (Janssen-Heininger et al., 2000). Εφόσον η ενεργοποίηση του NF-κB είναι άμεσα συνδεδεμένη με την φωσφορυλίωση του IκB, τα ερεθίσματα που ενεργοποιούν τον

μεταγραφικό αυτό παράγοντα πρέπει είτε να ενεργοποιούν κάποια κινάση ή εναλλακτικά να απενεργοποιούν κάποια φωσφατάση στην διαδικασία αυτή. Αν και η αποικοδόμηση και απελευθέρωση του IκB από τον NF-κB από ενδιάμεσες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ έχει προταθεί σε πολλές μελέτες (Schenk et al., 1994, Kang et al., 1998, Isael et al., 1992) δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως αν οι ΔΜΟ ενεργοποιούν τις IKKs ή άλλες κινάσες που φωσφορυλιώνουν τον IκB. Οι IKKα και IKKβ που είναι υπεύθυνες για την καταλυτική δράση του συμπλόκου IKK, περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο (activation loop) ένα κατάλοιπο κυστεΐνης που είναι πιθανόν να τροποποιείται από αλλαγές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία. Πιθανά οι τροποποιήσεις αυτές δημιουργούν γέφυρες και πλησιάζουν οι υπομονάδες των IKK με τον NF-κB ώστε να μπορούν να δράσουν φωσφορυλιώνοντας την IκB. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι η ύπαρξη οξειδοαναγωγικά ευαίσθητων μορίων που εμπλέκονται σε κάποιο σημείο στην πορεία της ενεργοποίησης του NF-κB. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η θειοredοξίνη (TRX) που είναι γνωστός αναστολέας της ASK-1 (Apoptosis Signal Regulating Kinase) μιας κινάσης που ανήκει στην οικογένεια των MAP3 κινασών. Η TRX κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεσμεύεται στην N-τελική περιοχή της ASK-1. Η διέγερση με τον TNF-α προκαλεί την αύξηση των ΔΜΟ, που οξειδώνει την TRX με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται από την ASK-1. Το γεγονός αυτό επιτρέπει στην ASK-1 να ολιγομερίζεται και μέσω της πορείας της p38 να ενεργοποιεί τον NF-κB (Liu et al., 2000). Φαίνεται πιθανό ότι και άλλα οξειδοαναγωγικά ευαίσθητα μόρια εκτός από την TRX μπορούν να ρυθμίζουν άλλες κινάσες που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των IKKs. Πρόσφατα, υποστηρίχθηκε ότι αλλαγές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία μπορούν να ενεργοποιήσουν μια άλλη κινάση την $p90^{rsk}$ σε διάφορα κύτταρα. Η κινάση αυτή έχει προταθεί ότι φωσφορυλιώνει την αμινοτελική περιοχή του IκB και κατά συνέπεια θεωρείται πιθανό ότι συνεργάζεται με τις IKKs στην φωσφορυλίωση του IκB.

## 1.3 ΑΠΟΠΤΩΣΗ

### 1.3.1 Τι είναι η απόπτωση;

Ο όρος «απόπτωση» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1972 σε ένα άρθρο ορόσημο από τους Kerr, Wyllie και Currie στο περιοδικό British Journal of Cancer (Kerr et al., 1972). Με τον όρο αυτό οι συγγραφείς περιέγραψαν έναν εναλλακτικό τύπο θανάτου από την νέκρωση η οποία ήταν γνωστή έως τότε. Η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται από

συρρίκνωση των κυττάρων, δημιουργία εξογκωμάτων στην επιφάνειά τους, συμπύκνωση της χρωματίνης και εγκλεισμό των θραυσματοποιημένων συστατικών σε κυστίδια τα οποία τελικά απομακρύνονται από γειτονικά κύτταρα. Από το σημείο αυτό η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος όπως ονομάστηκε στη συνέχεια αναδείχτηκε σε κεντρικό πεδίο έρευνας τόσο στις βιολογικές όσο και στις ιατρικές επιστήμες.

### 1.3.2 Φυσιολογική σημασία της απόπτωσης

Σήμερα, υπάρχουν αρκετές πληροφορίες σχετικά με τον ρόλο της απόπτωσης στα διάφορα στάδια της ζωής (Joza et al., 2002, Jacobson, 1997, Vaux and Korsemeyer, 1999, Rathmell and Thomson, 2002). Η επιβίωση ενός πολυκύτταρου οργανισμού εξαρτάται από την διατήρηση και την ανανέωση των κυττάρων διαφορετικών ιστών (Vaux and Korsemeyer, 1999, Meier et al., 2000), μια διαδικασία που ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ του πολλαπλασιασμού και της απομάκρυνσης των κυττάρων με τη διαδικασία της απόπτωσης. Η απομάκρυνση κυττάρων που εμφανίζουν βλάβες ή που βρίσκονται σε περίσσεια επιτυγχάνεται επίσης με ενεργοποίηση της απόπτωσης (Thompson, 1995, Rathmell and Thomson, 2002, Jacobson, 1997, Vaux and Korsemeyer, 1999). Επιπλέον, δυσλειτουργίες στην διαδικασία αυτή εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων καθώς έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή της κυτταρικής ομοιοστασίας (Meier et al., 2000, Thompson et al., 1995). Στην περίπτωση των λεμφοκυττάρων για παράδειγμα, αυξημένη απόπτωση μπορεί να οδηγήσει σε ανοσοκαταστολή (Rathmell and Thomson, 2002), όπως συμβαίνει στην νόσο του AIDS (Arnoult et al., 2003). Η απόπτωση επίσης έχει θεωρηθεί υπεύθυνη για την πρόκληση νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Hass, 1997) όπως η νόσος του Αλτζχάϊμερ, η νόσος του Πάρκινσον (Hass, 2003) και η σκλήρυνση κατά πλάκας. Αναστολή της απόπτωσης αντίθετα οδηγεί σε υπερσυσσώρευση των κυττάρων και έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη του καρκίνου και την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων (Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome ALPS). (Thompson, 1995, Rathmell and Thomson, 2002, Sartorious et al., 2001, Krammer, 2000, Vaux and Korsemeyer, 1999).

### 1.3.3 Διαφορές απόπτωσης-νέκρωσης

Η απόπτωση διακρίνεται σήμερα από τον κλασικό νεκρωτικό θάνατο από μια σειρά ευδιάκριτων μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών. Αν και δεν είναι πλήρως

κατανοητά τα πρώιμα βιοχημικά γεγονότα που υπαγορεύουν τον τρόπο του κυτταρικού θανάτου, εντούτοις η νέκρωση φαίνεται να είναι αποτέλεσμα οξείας κυτταρικής δυσλειτουργίας ή βλάβης σε κύτταρα ή ιστούς, ως απόκριση σε διάφορα είδη στρες, ή μετά από έκθεση σε τοξικούς παράγοντες και είναι παθητική διαδικασία που ακολουθείται από απότομη μείωση του ενδοκυττάριου ATP. Μορφολογικά η νέκρωση σχετίζεται με δραματική αύξηση του κυτταρικού όγκου, διάρρηξη της πλασματικής μεμβράνης αλλά και άλλων μεμβρανών του κυττάρου και έκχυση των κυτταρικών συστατικών στο μεσοκυττάριο περιβάλλον γεγονός που μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω βλάβη στους ιστούς επηρεάζοντας τα γειτονικά κύτταρα ή προκαλώντας φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

Η απόπτωση αντιθέτως πραγματοποιείται από ένα γενετικά καθορισμένο πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου και είναι ενεργητική διαδικασία. Ο μηχανισμός της απόπτωσης τίθεται σε εφαρμογή από ερεθίσματα που μπορεί να προέρχονται είτε από το εσωτερικό είτε από το εξωτερικό του κυττάρου. Από τα πιο γνωστά αποπτωτικά ερεθίσματα είναι οι οξειδωτικοί παράγοντες, οι θεραπευτικοί παράγοντες (χημειοθεραπευτικά φάρμακα, UV και γ-ακτινοβολία), τα μέλη της οικογένειας του TNF, το ασβέστιο, η στέρηση αναπτυξιακών παραγόντων, οι νευροδιαβιβαστές κα (Thompson, 1995). Σε μοριακό επίπεδο η απόπτωση μπορεί να διαχωριστεί σε τρία μέρη: α) την έναρξη, β) την εκτέλεση και γ) την ολοκλήρωση. Στην φάση της έναρξης, που δεν είναι κοινή για όλα τα ερεθίσματα, προκαλείται η έναρξη βιοχημικών πορειών, που συγκλίνουν στην φάση της εκτέλεσης. Η φάση της εκτέλεσης οδηγεί και στην εμφάνιση της χαρακτηριστικής μορφολογίας της απόπτωσης, που συνίσταται από συρρίκνωση των κυττάρων, αναστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και έκθεση της φωσφατίδυλο-σερίνης προς τον εξωκυττάριο χώρο. Δραματικές είναι και οι αλλαγές στον πυρήνα: ειδικά ένζυμα ενεργοποιούνται και παράγοντες μετατοπίζονται στον πυρήνα με αποτέλεσμα τον κατακερματισμό της χρωματίνης, τη συμπύκνωση του πυρήνα, την πρόκληση ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων και τη θραυσματοποίηση μεγάλης κλίμακας του DNA. Ακολούθως ο κατακερματισμένος πυρήνας με τα κυταροπλασματικά κατάλοιπα σχηματίζουν κυστίδια που περιβάλλονται από μεμβράνη, τα οποία καλούνται αποπτωτικά σωματίδια (apoptotic bodies). Τέλος, τα αποπτωτικά σωματίδια κατά την φάση της ολοκλήρωσης εγκολπώνονται και απομακρύνονται από γειτονικά υγιή κύτταρα, ή από φαγοκύτταρα που αναγνωρίζουν ένα αριθμό σημάτων στην επιφάνεια των «καταδικασμένων» κυττάρων, κυρίως την εξωτερίκευση καταλοίπων της φωσφατίδυλο-σερίνης (PS) στη πλασματική μεμβράνη (Vermes et al., 1995, Martin et al 1995).

### 1.3.4 Μοριακοί μηχανισμοί πρόκλησης της απόπτωσης

Καθοριστικό ρόλο στην κατανόηση του μοριακού μηχανισμού της απόπτωσης έπαιξε το νηματώδες *C. elegans*. Με γενετική αποκρυπτογράφηση των γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό θάνατο, ο Horvits και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι ο φυσιολογικός θάνατος των 131 από τα 1090 κύτταρα που παράγονται κατά την ανάπτυξη του νηματόζωου, ρυθμίζεται από τα προϊόντα τουλάχιστον 3 γονιδίων: των CED-3, CED-4 και CED-9 (Horvitz, 2001, Liu and Hengartner, 1999, Hengartner, 2000). Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν σαν σύμπλοκο, το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεάσης CED-3 μετά από σύνδεση με το CED-4, ενώ η CED-9 δρα αντιαποπτωτικά. Στις αρχές της προηγούμενης δεκαετίας ανακαλύφθηκε ότι η αποπτωτική πρωτεΐνη CED-3 του *C. elegans*, παρουσιάζει αξιοσημείωτη ομοιότητα αλληλουχίας με το ένζυμο μετατροπής της ιντερλευκίνης–1β (interleukin-1β converting enzyme, ICE), μιας πρωτεάσης των θηλαστικών που είναι υπεύθυνη για την πρωτεολυτική ωρίμανση της προ-ιντερλευκίνης-1β (Yuan et al., 1993, Cerretti et al., 1992, Thornberry et al., 1992, Thornberry and Lazebnik, 1998). Ταυτόχρονες μελέτες απέδειξαν την ύπαρξη και άλλων τέτοιων πρωτεασών στα θηλαστικά οι οποίες παίζουν κεντρικό ρόλο στην αποπτωτική διαδικασία (Alnemri et al., 1996, Samali et al., 1999). Οι πρωτεάσες αυτές αποτελούν σήμερα μια ευδιάκριτη οικογένεια πρωτεϊνών που καλούνται κασπάσες. Το όνομα κασπάση (caspase) είναι συναίρεση του cysteine-dependent-aspartate-specific protease, δηλαδή είναι πρωτεάσες που σχάζουν τα υποστρώματά τους σε κατάλοιπα ασπαρτικού οξέως (Stennicke et al., 1998), ενώ η ενεργότητά τους οφείλεται σε μια κυστεΐνη του ενεργού τους κέντρου (Thornberry et al., 1992, Thornberry and Lozebnik, 1998, Lazebnik et al., 1995, Nicholson and Thornberry, 1997). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκάλεσε η παρατήρηση ότι ο μοριακός μηχανισμός της απόπτωσης διατηρείται εξελεκτικά από τη δροσόφιλα ως τα ανώτερα θηλαστικά.

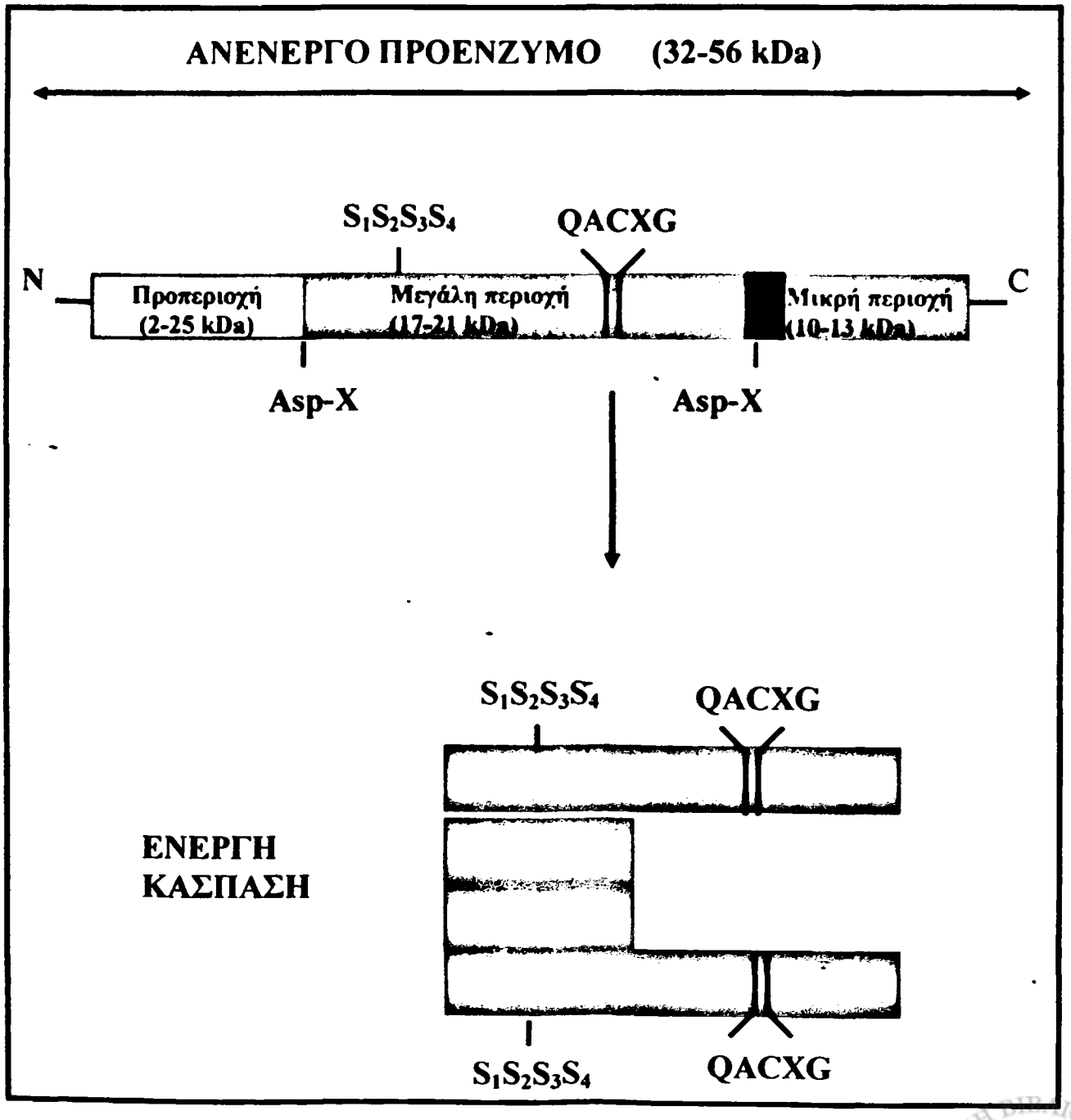
#### 1.3.4.1 Δομή των κασπασών

Η οικογένεια των κασπασών αριθμεί σήμερα 14 μέλη (Joza et al., 2002, Zimmermann et al., 2001), που εκφράζονται συνεχώς, σχεδόν σε όλους τους τύπους κυττάρων των θηλαστικών σαν ανενεργά προένζυμα (ζυμογόνα) (σχήμα 6). Ως απόκριση σε διάφορα αποπτωτικά ερεθίσματα οι κασπάσες σχάζονται πρωτεολυτικά και ενεργοποιούνται. Με ανάλυση της αλληλουχίας και κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ αποδείχτηκε ότι τα μέλη της

οικογένειας των κασπασών, μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά αλλά εμφανίζουν και σημαντικές διαφορές (Wolf et al., 1999, Van De Craen et al., 1997, Humke et al., 1998, Walker et al., 1994, Wilson et al., 1994, Mittle et al., 1997). Κάθε προκασπάση (32-56 kDa) περιέχει τέσσερις περιοχές α) μια αμινοτελική προπεριοχή με μέγεθος που ποικίλει, β) μια μεγάλη περιοχή (17-21 kDa), γ) μια μικρή περιοχή (10-13 kDa) στο καρβοξυτελικό άκρο του ενζύμου και δ) ένα μικρό τμήμα σύνδεσης (linker region) ανάμεσα στις δύο περιοχές (Earnshaw et al., 1999) (σχήμα 6). Κάθε κασπάση περιέχει στην μεγάλη περιοχή ένα διατηρούμενο πενταπεπτίδιο QACXG (Cohen, 1997) που αποτελεί την ενεργή περιοχή του ενζύμου καθώς και μια περιοχή $S_1S_2S_3S_4$ στην οποία δεσμεύεται το υπόστρωμα. Η ωρίμανση των κασπασών περιλαμβάνει πρωτεολυτική σχάση στο καρβοξυτελικό άκρο συγκεκριμένων καταλοίπων ασπαρτικού οξέως, που ακολουθείται συνήθως από την απομάκρυνση της προπεριοχής από την ίδια την κασπάση. Οι ενεργές κασπάσες είναι τετραμερή που αποτελούνται από δύο ταυτόσημα ετεροδιμερή μεγάλης/μικρής υπομονάδας (Walker et al., 1994, Wilson et al., 1994, Mittle et al., 1997, Liang and Fesik, 1997). Μετά την ενεργοποίησή τους δεσμεύουν τα υποστρώματά τους, στην περιοχή $S_1S_2S_3S_4$. Το θετικά φορτισμένο $S_1$ σημείο, δεσμεύεται στο αρνητικά φορτισμένο ασπαρτικό οξύ του υποστρώματος. Το $S_1$ σημείο διατηρείται εξελεκτικά και γι΄ αυτό όλες οι κασπάσες προκαλούν σχάσεις αυστηρά μετά από κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος. Μετά την ενεργοποίηση, η κασπάση προκαλεί ένα καταρράκτη γεγονότων: ενεργοποιεί άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας τα οποία με τη σειρά τους σχάζουν πρωτεολυτικά ένα μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων τους.

Παρά τις ομοιότητές τους οι κασπάσες παρουσιάζουν και σημαντικές διαφορές. Έτσι οι περιοχές S2-S4 διαφορετικών κασπασών ποικίλουν με αποτέλεσμα να έχουν διαφορετική εξειδίκευση δέσμευσης των υποστρωμάτων τους, παρά την απαραίτητη προϋπόθεση για ασπαρτικό οξύ στην θέση P1 (Van de Craen et al., 1997, Humke et al., 1998, Cohen, 1997, Walker et al., 1994, Mittl et al., 1997, Thornbery et al., 1997, Talanian et al., 1997, Nicolson et al., 1997). Με βάση την εξειδίκευση για το υπόστρωμα μπορούν να καταταγούν σε τρεις υποοικογένειες όπως φαίνεται στον πίνακα 2. Οι κασπάσες της ομάδας I που είναι ομόλογες της ICE, (κασπάσες-1, -4, -5 και πιθανά -11, -13, -14) αποκόπτουν τα πρόδρομα μόρια κατά προτίμηση μετά από το μοτίβο WEXD και σχετίζονται με την ωρίμανση των κυτταροκινών (Cohen, 1997, Walker et al., 1994). Οι άλλες δύο ομάδες που είναι ομόλογες της CED-3 σχετίζονται με την αποπτωτική διαδικασία. Συγκεκριμένα η ομάδα II (κασπάσες-3 -6 και -7) προκαλούν σχάσεις μετά από το μοτίβο DEXD και αποτελούν την ομάδα των εκτελεστικών κασπασών, ενώ η ομάδα III (κασπάσες-2, -8, -9 -10 και πιθανά -12) σχάζουν σε

τετραπεπτίδια (I/L/V)EXD που ανήκουν στις εναρκτήριες κασπάσες και προκαλούν την έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας. Επιπροσθέτως, οι κασπάσες παρουσιάζουν διαφορές στο μέγεθος και την αλληλουχία των προπεριοχών. Όπως φαίνεται στο σχήμα 7 η ομάδα των εναρκτήριων κασπασών (III), έχουν μεγάλες προπεριοχές μέχρι και 100 αμινοξέων ενώ η ομάδα των εκτελεστικών κασπασών (II) έχει μικρές προπεριοχές (συνήθως μικρότερες των 20 αμινοξέων).




**Σχήμα 6:** Δομή των κασπασών

### 1.3.4.2 Ενεργοποίηση κασπασών που εμπλέκονται στην απόπτωση

Αν και όλες οι κασπάσες συντίθεται ως ζυμογόνα, ο τρόπος με τον οποίο ενεργοποιούνται δεν είναι κοινός (Joza et al., 2002, Nicholson and Thornberry, 1997, Ashkenazi and Dixit, 1998, Cregan and Martin, 2001, Cryns et al., 1998). Συγκεκριμένα, οι εναρκτήριες κασπάσες (ομάδα III) περιέχουν στις προπεριοχές τους ευδιάκριτα μοτίβα που προάγουν την αλληλεπίδρασή τους με άλλα μόρια, γεγονός που προκαλεί και την ενεργοποίησή τους. Οι προκασπάσες-8 και -10 περιέχουν δύο επαναλαμβανόμενες περιοχές που καλούνται DED (Death Effector Domain) (Hofmann et al., 1997, Boldin et al., 1996, Fernandes et al., 1996, Muzio et al., 1996, Vincenz et al., 1997) και οι προκασπάσες–2 και –9 περιέχουν περιοχές που καλούνται CARD (Caspases Recruitment Domain)(Hofmann et al., 1997, Ashkenazi and Dixit, 1998, Ashkenazi and Dixit, 1999) (πίνακας 2). Οι περιοχές αυτές όπως θα αναφερθεί αναλυτικά στη συνέχεια είναι παρούσες και σε άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου όπως είναι για παράδειγμα η FADD (Fas Associated Death Domain), που περιέχει μια DED περιοχή και μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση της προκασπάσης -8 και ο Apaf-1 που περιέχει μια CARD περιοχή και μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 (Green and Reed, 1998, Chen and Wang, 2002). Η ενεργοποίηση δηλαδή των εναρκτήριων κασπασών προκύπτει από αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις κασπάσες και στις πρωτεΐνες FADD ή Apaf-1. Το αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι ο σχηματισμός πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που καλούνται σύμπλοκα θανάτου, πάνω στα οποία αυτοενεργοποιούνται πρωτεολυτικά οι εναρκτήριες κασπάσες όταν η τοπική τους συγκέντρωση υπερβεί κάποια κρίσιμη τιμή. Η ενεργοποίηση της αρχικής κασπάσης, μπορεί να προκαλέσει στη συνέχεια τον καταρράκτή των κασπασών (Grossmann, 1998, Hirata, 1998), προκαλώντας την πρωτεολυτική σχάση και ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών (ομάδα II) (Li et al., 1997, Rodriguez and Lazebnik, 1999). Οι τελευταίες στερούνται εσωτερικής ενζυματικής δραστικότητας και μπορούν να ενεργοποιηθούν μόνο μετά από σχάση τους από τις αρχικές κασπάσες. Πρώτη ενεργοποιείται η κασπάση-3, και ακολούθως οι κασπάσες –6 και –7, που παίζουν μικρότερο ρόλο στην εκτελεστική φάση της απόπτωσης (Phillips et al., 1997).

**Πίνακας 2: Καασπάσες**

| ΟΝΟΜΑ / (μέγεθος kDa) | ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟ ΟΝΟΜΑ | υποομάδα | Μέγεθος προπεριοχής | Μοτίβο μεγάλης προπεριοχής | Ειδικότητα υποστρώματος | Μέγεθος ενεργών υπομονά-δων | Ενεργοποι-ητές |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Καασπάση-1 (45) | ICE | I | Μεγάλη | CARD | WEHD | | |
| Καασπάση-2 (51) | ICE-1, Need-2 | III | Μεγάλη | CARD | VDVAD | 20/12 | RAID |
| Καασπάση-3 (32) | CPP-32, Yama, Apopain | II | Μικρή | - | DEXD | 17/12 | NA |
| Καασπάση-4 (43) | ICE-2, TX, ICE-rel-II | I | Μεγάλη | CARD | WEHD | | |
| Καασπάση-5 (48) | ICE-rel-III, TY | I | Μεγάλη | CARD | WEHD | | |
| Καασπάση-6 (34) | Mch2 | II | Μικρή | - | | 18/11 | NA |
| Καασπάση-7 (35) | Mch3, ICE-LAP3, CMH-1 | II | Μικρή | - | DEXD | 20/12 | NA |
| Καασπάση-8 (55) | FLICE, MACH, Mch | III | Μεγάλη | DED | | 18/11 | FADD |
| Καασπάση-9 (45) | Mch6, ICE-LAP6 | III | Μεγάλη | CARD | | 17/10 | APAF-1 |
| Καασπάση-10 (55) | Mch4, FLICE2 | III | Μεγάλη | DED | | 17/12 | FADD |
| μκασπάση-11 (42) | mICH-3, mCASP-11 | I | Μεγάλη | ; | ; | | |
| μκασπάση-12 (50) | mcasp-12 | I ; | Μεγάλη | ; | ; | | |
| κασπάση-13 (43) | ERICE | I | Μεγάλη | ; | ; | | |
| κασπάση-14 (30) | | ; | | | ; | | |

### 1.3.4.3 Υποστρώματα κασπασών

Οι εκτελεστικές κασπάσες (ομάδα ΙΙ, πίνακας 2) μετά την ενεργοποίησή τους προκαλούν επιλεκτική πρωτεολυτική σχάση σε εκατοντάδες ενδοκυττάριους στόχους, με αποτέλεσμα την αναστολή των κυτταρικών λειτουργιών και την εμφάνιση του χαρακτηριστικού φαινοτύπου της απόπτωσης. Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι κασπάσες σχάζουν τα υποστρώματά τους και προκαλούν τον κυτταρικό θάνατο δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Από τα υποστρώματα των κασπασών, το πιο γνωστό ίσως είναι η κυτταροπλασματική δεοξυριβονουκλεάση CAD (Caspase Activated Deoxyribonuclease) (Enari et al., 1998, Sakahira et al., 1998, Liu et al., 1997, Nagata et al., 1995), η οποία σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται συνδεδεμένη με τον αναστολέα της ICAD (Inhibitor of Caspase Activated Deoxyribonuclease). Οι ώριμες κασπάσες-3 και -7 έχουν την ικανότητα να σχάζουν και να προκαλούν την απομάκρυνση του αναστολέα ICAD με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται η ενεργή CAD, η οποία στη συνέχεια μετατοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου (σχήμα 7). Εκεί είναι υπεύθυνη για την ενδονουκλεοσωμική σχάση του γενομικού DNA στις περιοχές μεταξύ των νουκλεοσωμάτων σχηματίζοντας θραύσματα που είναι πολλαπλάσια των 180-200 ζευγών βάσεων. Έτσι, η ηλεκτροφόρηση του DNA αυτών των κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης, οδηγεί στην εμφάνιση μιας χαρακτηριστικής εικόνας (ladder pattern) που θεωρήθηκε ως ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά της απόπτωσης.

Η poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) είναι επίσης ένα από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα υποστρώματα των κασπασών (Kaufman et al., 1993). Πρόκειται για μια πυρηνική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 116 kDa, που παίρνει μέρος στην επιδιόρθωση του DNA. Σχάζεται από τις κασπάσες -3 και -7 σε μια περιοχή DEVD↓G (μεταξύ των D και G), προς δύο θραύσματα, 24 kDa (αμιτοτελικό άκρο που περιέχει την περιοχή δεσμεύσεως στο DNA) και 89 kDa (καταλυτική περιοχή). Η σχάση του ενζύμου αυτού έχει προταθεί ότι αναστέλλει την επιδιορθωτική δράση του αλλά ταυτόχρονα σταματά και την κατανάλωση του $NAD^+$ που προκαλείται από την ίδια δράση (Burkle, 2001).

Άλλα γνωστά υποστρώματα των κασπασών-3 και -7 είναι δομικές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού όπως η gelsolin, η φοδρίνη, η ακτίνη, η Cas2 (Mashima et al., 1995, Brancolini et al., 1995, Martin et al., 1995, Crys and Yuan, 1996, Vanags et al., 1996). Η σχάση τους πιθανά είναι υπεύθυνη για τις οξείες μορφολογικές αλλαγές όπως η δημιουργία εξογκωμάτων της μεμβράνης (blebbing), η συρρίκνωση του κυττάρου και ο σχηματισμός αποπτωτικών σωματιδίων. Η σχάση της α-φοδρίνης για παράδειγμα που είναι μια άφθονη

μεμβρανική και κυτταροσκελετική πρωτεΐνη, θεωρήθηκε υπεύθυνη για την εξωτερίκευση της φωσφατίδυλο-σερίνης.

Επίσης οι λαμίνες, δομικές πρωτεΐνες του πυρηνικού φακέλου που εμπλέκονται στην οργάνωση της χρωματίνης, θεωρούνται ως τα κύρια υποστρώματα της κασπάσης 6 (Takahashi et al 1996; Orth et al 1996; Rao et al 1996; Lazebnic et al 1994; Lazebnic et al 1995). Πιθανά η πρωτεόλυση των λαμινών είναι υπεύθυνη για κάποιες από τις αλλαγές του πυρήνα κατά την απόπτωση.

Τέλος υποστρώματα των κασπασών είναι μέλη της Bcl-2 οικογένειας ογκοπρωτεϊνών. Ένα παράδειγμα είναι η σχάση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bid που σχάζεται από την ώριμη κασπάση-8 και απελευθερώνεται το καρβοξυτελικό άκρο της το οποίο εμφανίζει προ-αποπτωτική δράση (Wei et al., 2001).

### 1.3.4.4 Βιοχημικές πορείες ενεργοποίησης των κασπασών

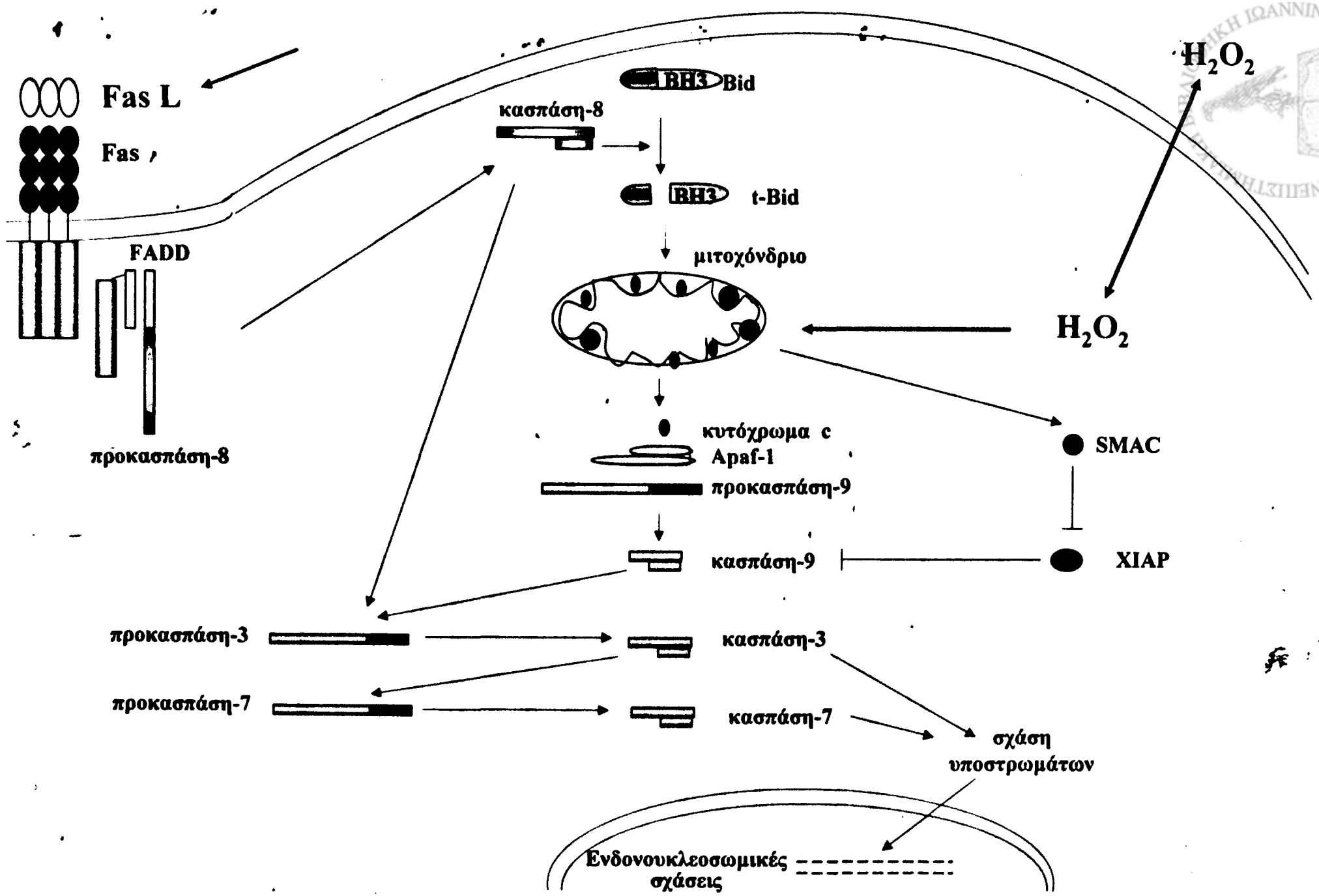
Η ενεργοποίηση των κασπασών προκαλείται κυρίως μέσω δύο βιοχημικών δρόμων: α) την εξωτερική οδό ή οδό του υποδοχέα θανάτου η οποία πυροδοτείται από την δέσμευση των αντίστοιχων προσδεμάτων στους υποδοχείς θανάτου και β) από την εσωτερική οδό στην οποία κεντρικό ρόλο παίζουν τα μιτοχόνδρια γι' αυτό καλείται και οδός του μιτοχονδρίου (Joza et al., 2002) (σχήμα 7).

*Εξωτερική οδός ή οδός του υποδοχέα θανάτου*

Η ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών από την εξωτερική οδό, προκαλείται μετά από την δέσμευση των αντίστοιχων προσδεμάτων στους υποδοχείς του TNF ή των υποδοχέων θανάτου (Death Receptors, DR) όπως αλλιώς αποκαλούνται (Krammer, 2000, Krammer, 1999, Trimmer et al., 2002, Zimmermann et al., 2001). Η οικογένεια αυτή συμπεριλαμβάνει τον Fas/CD95/APO-1/DR2, τον υποδοχέα τύπου 1 του TNF, (TNF-R1/CD120a/DR1, τους υποδοχείς του TNF-α που σχετίζονται με την απόπτωση (TRAIL-R1/APO-2/DR4, TRAIL-R2/DR5/KILLER/TRTCK2) και τον APO-3/LARD/TRAMP/WSL1 /DR3 (Sartorius et al., 2001, Ashkenazi and Dixit, 1999). Το κοινό στοιχείο αυτών των τύπου I διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, είναι η παρουσία ενός διατηρούμενου εξελεκτικά δομικού μοτίβου στο ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό τους άκρο, που καλείται περιοχή θανάτου (Death domain, DD) (Kaufmann et al., 1993, Kaufmann et al., 2001, Joza et al., 2002, Ashkenazi and

Dixit, 2001, Walczak and Sprinck, 2001, Locksley et al., 2001). Επιπλέον, στο εξωκυττάριο τμήμα τους περιέχουν από δύο έως πέντε περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη που παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδρασή τους με τα προσδέματα. Η δέσμευση των προσδεμάτων θανάτου (Death Ligands) (FasL, TNF, TRAIL, APO3L) στους αντίστοιχους υποδοχείς θανάτου, ενεργοποιεί μια ακολουθία γεγονότων που οδηγεί τελικά στον κυτταρικό θάνατο, δια μέσου της ενεργοποίησης των κασπασών.

Από τους παραπάνω υποδοχείς θανάτου, ο πιο καλά χαρακτηρισμένος είναι ο Fas. Ο υποδοχέας Fas εκφράζεται σε διάφορα κύτταρα όπως στα θυμοκύτταρα, στα ενεργοποιημένα Β- και Τ-λεμφοκύτταρα, στα μακροφάγα, στο ήπαρ, στη σπλήνα, στους πνεύμονες, στον εγκέφαλο, στην καρδιά, στους όρχεις, στις ωοθήκες κα. Η έκφρασή του μπορεί επίσης να αυξηθεί από την δράση κυτταροκινών όπως είναι η ιντερφερόνη–γ και ο TNF, αλλά και από την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων. Το πρόσδεμα του Fas, συντίθεται σαν τύπου ΙΙ διαμεμβρανική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 40 kDa, (Nagata and Gonstein, 1995, Suda et al., 1993) ενώ με πρωτεολυτική σχάση που προκαλείται από μεταλλοπρωτεϊνάσες, προκύπτουν και οι αντίστοιχες διαλυτές μορφές του. Από την υπάρχουσα μέχρι σήμερα βιβλιογραφία δεν έχει διευκρινιστεί ποια από αυτές τις δύο μορφές ενεργοποιεί την διαδικασία που οδηγεί στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. (Krammer, 1999, Suda et al., 1997, Schneider et al., 1998, Hohlbaum et al., 2000). Η έκφραση του υποκαταστάτη του Fas, ρυθμίζεται αυστηρά και συχνά επάγεται μόνο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η έκφρασή του περιορίζεται στο ανοσολογικό σύστημα (στα Β-, Τ-λεμφοκύτταρα και στα μακροφάγα, στα κύτταρα φυσικούς φονείς, αλλά και σε μη-ανοσολογικές περιοχές όπως στο νεφρό, στον πνεύμονα, στο έντερο, στον οφθαλμό κα. Η δέσμευση του προσδέματος του Fas (ή αντισωμάτων εναντίον του Fas) διαμέσου των καταλοίπων κυστεΐνης πυροδοτεί τον τριμερισμό του Fas, όπως προκύπτει από κρυσταλλογραφία ακτινών Χ και τον γρήγορο σχηματισμό ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου θανάτου στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης που ονομάζεται DISC (Death-inducing signaling complex) (Kaufmann et al., 1993, Kaufmann et al., 2001). Στο σύμπλοκο αυτό συγκεντρώνεται και ενεργοποιείται η εναρκτήρια κασπάση-8 που προκαλεί στην συνέχεια τον καταρράκτη των κασπασών (σχήμα 7). Η συγκέντρωση της κασπάσης-8 γίνεται δια μέσου της πρωτεΐνης FADD (Fas-associated protein with death domain) ή Mort1 που περιέχει μια περιοχή θανάτου καθώς επίσης και μια Death Effector Domain (DED)(Walczak and Sprinck, 2001). Ο συνδυασμός αυτών των δύο περιοχών επιτρέπει στο FADD να δρα σαν πρωτεΐνη σύνδεσης (adapter), που γεφυρώνει την DD του Fas, με την DED περιοχή που εντοπίζεται στην προπεριοχή της προκασπάσης-8 (Walczak and Sprinck, 2001, Hengartner,




**Σχήμα 7:** Βιοχημικές πορείες ενεργοποίησης των κασπασών

2000, Ashkenazi and Dixit, 1998, Boldin et al., 1996). Και οι δύο αυτές περιοχές του FADD αλληλεπιδρούν με τις αντίστοιχες του Fas και της προ-κασπάσης 8 με ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις. Η προκασπάση–8 αυτό-ενεργοποιείται πρωτεολυτικά πιθανά λόγο της αύξησης της τοπικής της συγκέντρωσης αλλά και της τροποποίησης που υφίσταται πάνω στο σύμπλοκο (Salvesen and Dixit, 1999). Το ώριμο ένζυμο στη συνέχεια απελευθερώνεται από το σύμπλοκο, επιτρέποντας την δέσμευση άλλων μη ενεργοποιημένων μορίων πάνω σε αυτό.

Η σύγκριση διαφορετικών ειδών κυττάρων όσον αφορά τις βιοχημικές πορείες που προκαλούνται από το Fas, ανέδειξε δύο διαφορετικούς τύπους κυττάρων: τα τύπου I και τύπου II κύτταρα. (Scaffidi et al., 1998). Στα κύτταρα τύπου I, η ενεργοποίηση του Fas σχετίζεται με την ενεργοποίηση μεγάλων ποσοτήτων κασπάσης-8 στο σύμπλοκο DISC, η οποία στη συνέχεια, ενεργοποιεί απευθείας τις εκτελεστικές κασπάσες-3 και -7. Σε αντίθεση στα κύτταρα τύπου II, φαίνεται πως η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 δεν επαρκεί για την επαγωγή της απόπτωσης διότι ο σχηματισμός του DISC είναι περιορισμένος. Το αποτέλεσμα είναι να απαιτείται η ενεργοποίηση της οδού του μιτοχονδρίου, που όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια προκαλεί την απόπτωση δια μέσου της ενεργοποίησης της εναρκτήριας κασπάσης-9. Πρόσφατα, προτάθηκε ότι οι συγκεκριμένες αποπτωτικές αλλαγές στα μιτοχόνδρια προκαλούνται από την σχάση που προκαλεί η ώριμη κασπάση-8 στην προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bid, που είναι μέλος της υπεροικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών (Wajant, 2002). Η σχάση της Bid απελευθερώνει την καρβοξυτελική BH3 περιοχή, που δρα στα μιτοχόνδρια και ενεργοποιεί έμμεσα τις εκτελεστές κασπάσες (Honglin et al., 1998).

*Εσωτερική οδός ή οδός του μιτοχονδρίου*

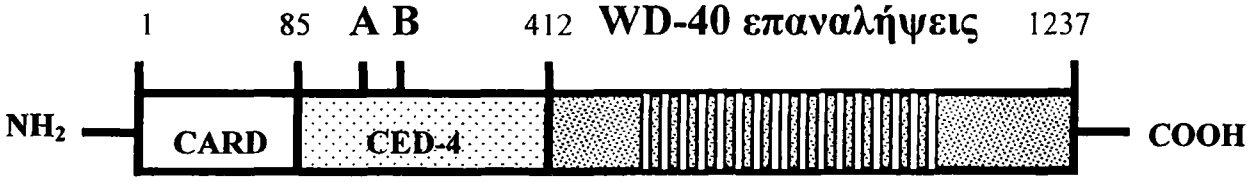
Η πορεία αυτή οδηγεί στην ενεργοποίηση των κασπασών δια μέσου των μιτοχονδρίων. Πολλά ερεθίσματα μπορούν να ενεργοποιήσουν αυτή τη βιοχημική πορεία, όπως για παράδειγμα η καταστροφή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του κυττάρου, η γ-ακτινοβολία, χημειοθεραπευτικά φάρμακα, αλλά ακόμη και ενδοκυττάρια σήματα όπως η μη διορθώσιμη βλάβη στο DNA, τα γλυκοκορτικοειδή, η παραγωγή κεραμιδίων, η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου κα. Το άμεσο αποτέλεσμα αυτών των ερεθισμάτων είναι η αλλαγή της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Κατά την φάση αυτή παρατηρείται συνήθως απώλεια του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων ($\Delta\Psi m$), διόγκωση της μιτοχονδριακής μήτρας, διακοπή του αερόβιου μεταβολισμού και αύξηση του οξειδωτικού στρες (Zoratti et al., 1995). Το αποτέλεσμα είναι να απελευθερώνονται από τον

διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων πρωτεΐνες όπως είναι το κυτόχρωμα c (Green and Reed, 1998), η Smac/DIABLO (Verhagen et al., 2000), ο AIF (Joza et al., 2001) και η ενδονουκλεάση G (Parrish et al., 2001) που ενεργοποιούν την φάση αποικοδόμησης της απόπτωσης και οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Από τους παράγοντες αυτούς το κυτόχρωμα c, όπως θα αναλυθεί λεπτομερώς στη συνέχεια, καθώς επίσης και η πρωτεΐνη Smac/DIABLO εμπλέκονται στην πορεία ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών (σχήμα 7), ενώ αντίθετα ο AIF και η ενδονουκλεάση G, προκαλούν τον κυτταρικό θάνατο ανεξάρτητα από τις κασπάσες και θα εξεταστούν στην επόμενη ενότητα.

Οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους αυξάνει η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης στην απόπτωση, παραμένουν άγνωστοι. Αξιοσημείωτο επίσης είναι ότι υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις, για τον τρόπο που αυξάνει η διαπερατότητα της εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Παρότι έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα (Belzacq et al., 2002, Kroemer and Reed, 2000, Desagher and Martinou, 2000, Brenner, 2000b) η διαλεύκανση αυτής της ερώτησης απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Έχει προταθεί για παράδειγμα ότι η προσωρινή αύξηση της διαπερατότητας της εσωτερικής μεμβράνης μπορεί να προκληθεί είτε με το κλείσιμο ενός καναλιού ιόντων στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου από την Bcl-$x_L$ (Voltage-dependent anion channel, VDAC) που είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης (Vander-Heiden and Thompson, 1999), είτε από το άνοιγμα του μεταφορέα του νουκλεοτιδίου της αδενοσίνης (ANT), την κύρια πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης (Marzo et al., 2001, Brenner, 2000b). Σύμφωνα με αυτές τις υποθέσεις, η επακόλουθη διόγκωση της μιτοχονδριακής μήτρας μπορεί να οδηγήσει σε τοπική ρήξη της εξωτερικής μεμβράνης, προκαλώντας την απελευθέρωση ανεξαιρέτως όλων των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Σε αντίθεση άλλα μοντέλα υποδεικνύουν ως βασικό γεγονός την αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης που οφείλεται στον σχηματισμό μεγάλων καναλιών από την πρωτεΐνη Bax και από ομόλογά της (Satio et al., 2000, Desagher and Martinou, 2000), από την Bax και την VDAC (Shimizu et al., 1999), ή από λιπιδιακούς πόρους (Basanez et al., 1999). Το μέγεθος αυτών των καναλιών στην εξωτερική μεμβράνη είναι τέτοιο ώστε να επιτρέπει την απελευθέρωση μικρών πρωτεϊνών, όπως είναι για παράδειγμα το κυτόχρωμα c.

Το κυτόχρωμα c είναι μια πρωτεΐνη 12.5 kDa, που βρίσκεται ανάμεσα στα σύμπλοκα III (UQH2–αναγωγάση του κυτοχρώματος c) και IV (οξειδάση του κυτοχρώματος c) της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Είναι συνδεδεμένο με ηλεκτροστατικές δυνάμεις στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Στην οξειδοαναγωγική

λειτουργία του κυτοχρώματος c συμμετέχει μια ομάδα αίμης που βρίσκεται στο ενεργό του κέντρο, η οποία εναλλάσσεται μεταξύ της $Fe^{2+}$ (ferrous) και της $Fe^{3+}$ (ferric) μορφής (Kaufmann and Hengartner, 2001). Ο φυσιολογικός ρόλος του κυτοχρώματος c στα μιτοχόνδρια είναι ανεξάρτητος από την αποπτωτική του δράση. Η απελευθέρωσή του όμως από το μιτοχόνδριο και η παρουσία του στο κυτταροδιάλυμα, είναι ουσιώδης για την ενεργοποίηση των κασπασών. Συγκεκριμένα το κυτόχρωμα c παίρνει μέρος στο σχηματισμού ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου θανάτου, που καλείται αποπτώσωμα. Το αποπτώσωμα αποτελείται από τον κυτταροπλασματικό παράγοντα Apaf-1 (Apoptotic-protease activating factor), το κυτόχρωμα c και από την προκασπάση-9 ενώ ο σχηματισμός του in vitro τουλάχιστον, εξαρτάται από την παρουσία dATP ή ATP (Li et al., 1997, Zou et al., 1997). Από *de novo* μελέτες στις οποίες εξετάστηκε ο μηχανισμός δημιουργίας του αποπτωσώματος (Zou et al., 1999, Li et al., 1997, Zou et al., 1997), υποστηρίζεται ότι ο Apaf-1 είναι μια πρωτεΐνη πρόσδεσης (docking protein) των άλλων δύο παραγόντων. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη ομόλογη της CED-4 του *C. elegans*, μοριακού βάρους 130 kDa, που αποτελείται από 3 διαφορετικές περιοχές. (Cecconi, 1999, Cain et al., 2002, Bratton and Cohen, 2001b) (σχήμα 8).




**Σχήμα 8:** Δομή του παράγοντα Apaf-1

Το αμινοτελικό άκρο (85 αμινοξέα) είναι μια περιοχή CARD (Caspase Recruitment Domain), που προκαλεί την σύνδεση με την κασπάση-9. Αυτή ακολουθείται από μια περιοχή 320 αμινοξέων που παρουσιάζει ομολογία με την CED-4, στην οποία περιέχονται περιοχές που καλούνται Walkers A and B boxes. Πάνω σε αυτές φαίνεται πως ο Apaf-1 δεσμεύει τριφωσφωρικά νουκλεοτίδια της αδενίνης. Τέλος το καρβοξυτελικό τμήμα του Apaf-1 αποτελείται από 12 επαναλήψεις WD40, ένα πρωτεϊνικό μοτίβο που θεωρείται ότι παίζει ρόλο σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.

Όταν το κυτόχρωμα c απελευθερωθεί από τα μιτοχόνδρια και βρεθεί στο κυτταρόπλασμα δεσμεύεται γρήγορα στον Apaf-1 (Jiang and Wang, 2000, Acehan et al.,

πολλούς τρόπους και να προκαλεί ή να αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο ανάλογα με την περίπτωση.

Ένα από τα πιο σημαντικά σημεία ρύθμισης των κασπασών είναι η ρύθμιση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το μιτοχόνδριο έχει χαρακτηριστεί σαν το «κουτί της Πανδώρας», καθώς είναι ένα οργανίδιο στο οποίο βρίσκονται προφυλαγμένες πρωτεΐνες που μόλις απελευθερωθούν οδηγούν το κύτταρο στο θάνατο. Δύο από αυτές το κυτόχρωμα c και η SMAC/Diablo που θα αναλυθεί στη συνέχεια, σχετίζονται άμεσα με την ενεργοποίηση των κασπασών. Έτσι, οι παράγοντες που ρυθμίζουν την διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών, μπορούν να ρυθμίζουν ανάλογα και την απόπτωση. Τέτοιοι παράγοντες είναι τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών (Adams and Cory, 1998, Chao and Korsmeyer, 1998). Τα αντιαποπτωτικά μέλη (Bcl-2, Bcl-$X_L$) εντοπίζονται κυρίως στην μιτοχονδριακή μεμβράνη και συντελούν στην σταθεροποίησή της, ενώ αντίθετα τα προαποπτωτικά (Bax, Bak, Bad, Bid κλπ) αυξάνουν την διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Επιπλέον, ο λόγος των αντιαποτωτικών προς τα προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας παίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία.

*Πρωτεΐνες που ρυθμίζουν το σχηματισμό των συμπλόκων θανάτου*

Τα κύτταρα περιέχουν επίσης πρωτεΐνες που μπορούν να ρυθμίζουν τον σχηματισμό των συμπλόκων θανάτου. Η πρωτεΐνη FLIP, για παράδειγμα περιέχει μια DED περιοχή και μπορεί να δεσμεύεται ανταγωνιστικά με την προκασπάση-8 στο DISC σύμπλοκο αλληλεπιδρώντας με την DED περιοχή της πρωτεΐνης FADD. Με τον τρόπο αυτό αναστέλλεται η ενεργοποίηση της προκασπάσης-8. Ορισμένες πρωτεΐνες του θερμικού σοκ, όπως η Hsp90, περιέχουν μια CARD περιοχή με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν απ' ευθείας με την CARD στον Apaf-1, αναστέλλοντας τον σχηματισμό του αποπτωσώματος και την ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 (Pandey et al., 2000). Έχει προταθεί επίσης ότι η Hsp70 και η Hsp27 αναστέλλουν τον σχηματισμό του αποπτωσώματος αλλά οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί παραμένουν προς το παρόν άγνωστοι (Saleh et al., 2000, Beere et al., 2000, Concannon et al., 2001). Πρόσφατα προτάθηκε επίσης ότι η πρωτεΐνη προθυμοσίνη-α, είναι ικανή να αναστέλλει την απόπτωση δρώντας στο επίπεδο του αποπτωσώματος (Jiang et al., 2003).

πολλούς τρόπους και να προκαλεί ή να αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο ανάλογα με την περίπτωση.

Ένα από τα πιο σημαντικά σημεία ρύθμισης των κασπασών είναι η ρύθμιση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το μιτοχόνδριο έχει χαρακτηριστεί σαν το «κουτί της Πανδώρας», καθώς είναι ένα οργανίδιο στο οποίο βρίσκονται προφυλαγμένες πρωτεΐνες που μόλις απελευθερωθούν οδηγούν το κύτταρο στο θάνατο. Δύο από αυτές το κυτόχρωμα c και η SMAC/Diablo που θα αναλυθεί στη συνέχεια, σχετίζονται άμεσα με την ενεργοποίηση των κασπασών. Έτσι, οι παράγοντες που ρυθμίζουν την διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών, μπορούν να ρυθμίζουν ανάλογα και την απόπτωση. Τέτοιοι παράγοντες είναι τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών (Adams and Cory, 1998, Chao and Korsmeyer, 1998). Τα αντιαποπτωτικά μέλη (Bcl-2, Bcl-$X_L$) εντοπίζονται κυρίως στην μιτοχονδριακή μεμβράνη και συντελούν στην σταθεροποίησή της, ενώ αντίθετα τα προαποπτωτικά (Bax, Bak, Bad, Bid κλπ) αυξάνουν την διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Επιπλέον, ο λόγος των αντιαποτωτικών προς τα προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας παίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία.

*Πρωτεΐνες που ρυθμίζουν το σχηματισμό των συμπλόκων θανάτου*

Τα κύτταρα περιέχουν επίσης πρωτεΐνες που μπορούν να ρυθμίζουν τον σχηματισμό των συμπλόκων θανάτου. Η πρωτεΐνη FLIP, για παράδειγμα περιέχει μια DED περιοχή και μπορεί να δεσμεύεται ανταγωνιστικά με την προκασπάση-8 στο DISC σύμπλοκο αλληλεπιδρώντας με την DED περιοχή της πρωτεΐνης FADD. Με τον τρόπο αυτό αναστέλλεται η ενεργοποίηση της προκασπάσης-8. Ορισμένες πρωτεΐνες του θερμικού σοκ, όπως η Hsp90, περιέχουν μια CARD περιοχή με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν απ' ευθείας με την CARD στον Apaf-1, αναστέλλοντας τον σχηματισμό του αποπτωσώματος και την ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 (Pandey et al., 2000). Έχει προταθεί επίσης ότι η Hsp70 και η Hsp27 αναστέλλουν τον σχηματισμό του αποπτωσώματος αλλά οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί παραμένουν προς το παρόν άγνωστοι (Saleh et al., 2000, Beere et al., 2000, Concannon et al., 2001). Πρόσφατα προτάθηκε επίσης ότι η πρωτεΐνη προθυμοσίνη-α, είναι ικανή να αναστέλλει την απόπτωση δρώντας στο επίπεδο του αποπτωσώματος (Jiang et al., 2003).

*Οι πρωτεΐνες IAPs και Smac/Diablo*

Στις περιπτώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, οι καασπάσες ρυθμίζονται σε επίπεδα που προηγούνται της πρωτεολυτικής σχάσης των πρόδρομων μορίων. Ένα άλλο επίπεδο ρύθμισης συμπεριλαμβάνει την ειδική αναστολή των ενεργών καασπασών από φυσικούς αναστολείς, όπως είναι η οικογένεια των αναστολέων πρωτεασών της απόπτωσης (Inhibitors of Apoptotic Proteases (IAPs) που δρουν απ' ευθείας στις καασπάσες και τις αναστέλλουν (Vaux and Silke, 2003, Bratton et al., 2001, Yang et al., 2000). Οι IAPs συναντώνται από τους ιούς και τους μύκητες μέχρι τον άνθρωπο όπου έχουν ταυτοποιηθεί σήμερα 8 διαφορετικά μέλη. Αναστέλλουν εκλεκτικά την ενεργότητα των καασπασών δια μέσου της παρεμπόδισης της δέσμευσης των υποστρωμάτων τους. Η ανθρώπινη IAP που καλείται XIAP έχει διερευνηθεί περισσότερο, και το ενδιαφέρον είναι ότι αναστέλλει κυρίως τις καασπάσες-3, -7, και -9 που ενεργοποιούνται από την μιτοχονδριακή οδό. Αν και οι περισσότεροι αναστολείς των πρωτεασών δρουν προκαλώντας στερική παρεμπόδιση στη σύνδεση των υποστρωμάτων, κανένα μέλος των IAPs δεν δρα με τέτοιους μηχανισμούς. Οι IAPs έχουν προσαρμοστεί ώστε να μπλοκάρουν την πρόσβαση των υποστρωμάτων χωρίς απ' ευθείας σύνδεση στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος (Deveraux et al., 1997, Deveraux et al., 1998, Deveraux and Reed, 1999, Du et al., 2000, Verhagen et al., 2000, Verhagen et al., 2001, Verhagen et al., 2002).

Τέλος, έχει επίσης ανιχνευτεί η ύπαρξη μηχανισμών που αντιτίθενται στα αποτελέσματά των IAPs και με τον τρόπο αυτό συμβάλουν στην ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας. Πρόσφατα, ταυτοποιήθηκε ένα μόριο το οποίο ονομάστηκε Smac (Second mitochondrial activator of caspases) ή Diablo το οποίο απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια και δρα εξουδετερώνοντας την λειτουργία των IAPs (Chai et al., 2000, Ekert et al., 2001).

**1.3.4.6 Ο ρόλος του AIF στην πρόκληση της απόπτωσης**

Η έντονη διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού της απόπτωσης, υπέδειξε την ενεργοποίηση των καασπασών ως το κεντρικό γεγονός της αποπτωτικής διαδικασίας. Στο τέλος της προηγούμενης δεκαετίας, προτάθηκε επιπλέον μια νέα βιοχημική πορεία που οδηγεί σε ένα τύπο θανάτου που δεν εξαρτάται από την ενεργοποίηση των καασπασών. Αυτός ο τύπος θανάτου δεν εμφανίζει χαρακτηριστικά όπως είναι η ενδονουκλεοσωμική σχάση του DNA

που θεωρείται ο πιο χαρακτηριστικός δείκτης της απόπτωσης, επιπλέον δεν προκαλείται διόγκωση των κυττάρων, ούτε και καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών που είναι χαρακτηριστικά του νεκρωτικού θανάτου. Προκαλεί όμως αλλαγές όπως συμπύκνωση του πυρήνα, εξογκώματα της μεμβράνης, εξωτερίκευση της φωσφατίδυλο-σερίνης και πτώση του διαμεμβρανικού μιτοχονδριακού δυναμικού (Δψm). Με λίγα λόγια φαίνεται ότι πρόκειται για μια εναλλακτική πορεία αποπτωτικού θανάτου, που είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση των κασπασών. Η πορεία αυτή προτάθηκε από την ομάδα του Kroemer το 1999 (Joza et al., 1999), ο οποίος ανακάλυψε ότι μια άγνωστη μέχρι τότε μιτοχονδριακή πρωτεΐνη που εντοπίζεται στον διαμεμβρανικό χώρο και ονομάστηκε παράγοντας πρόκλησης της απόπτωσης (Apoptosis-Inducing Factor, AIF) απελευθερώνεται και παίρνει μέρος στην αποικοδόμηση του DNA κατά την απόπτωση.

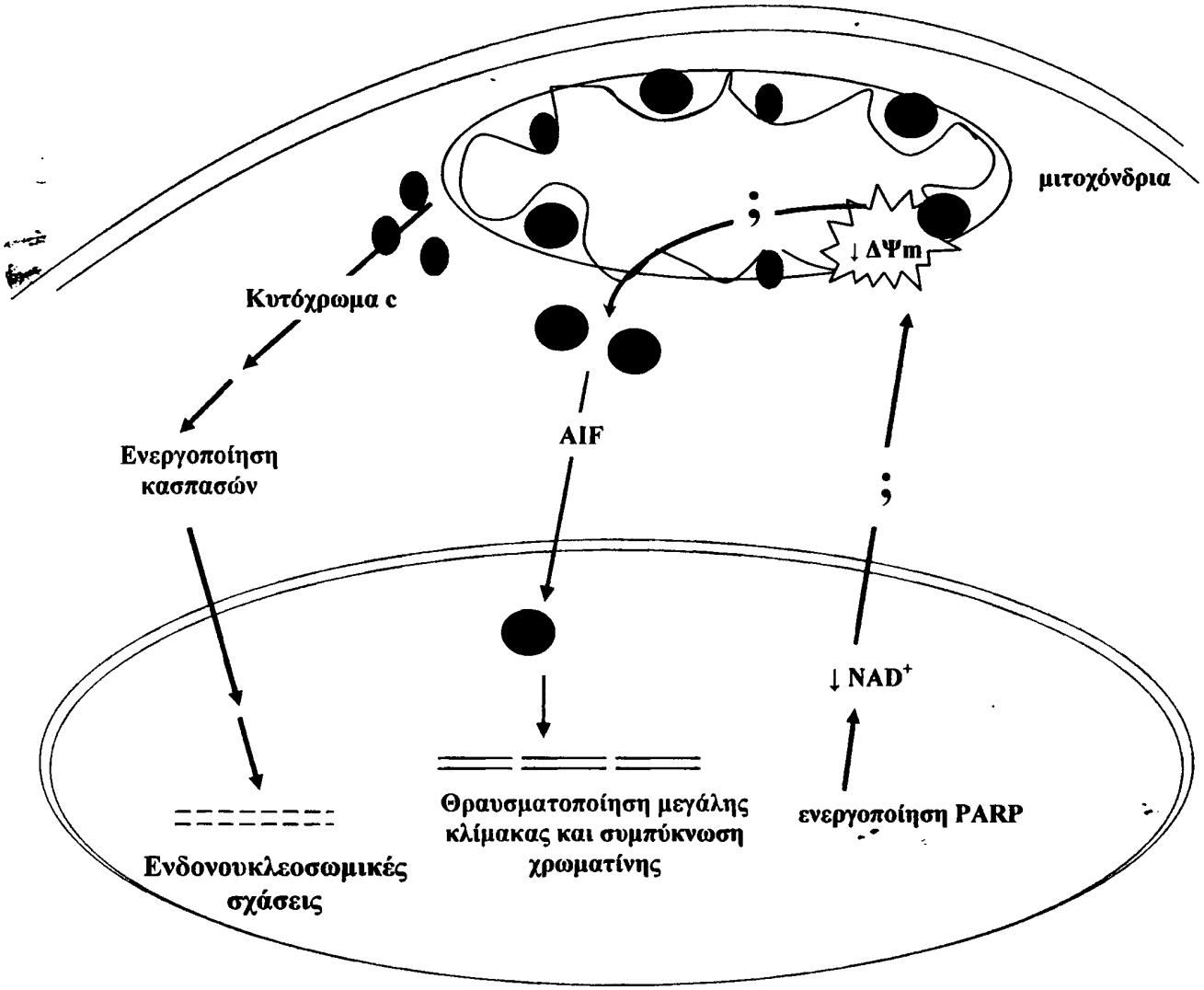
*Φυσιολογικός ρόλος του AIF στα μιτοχόνδρια*

Ανάλυση της αλληλουχίας του, απέδειξε ότι ο AIF είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους ~57 kDa, που στο καρβοξυτελικό άκρο της εμφανίζει ομοιότητα με βακτηριακές οξειδοαναγωγάσες (Susin et al., 1999), καθώς επίσης και με οξειδοαναγωγάσες σε ασπόνδυλα, όπως στα έντομα, τα νηματόζωα, τους μύκητες και τα φυτά (Lorenzo et al., 1999). Αυτό υποδηλώνει ότι το γονίδιο του AIF έχει διατηρηθεί κατά την διάρκεια της φυλογενετικής εξέλιξης. Από τις ευκαριωτικές πρωτεΐνες με γνωστή δράση, ο AIF παρουσιάζει σημαντική ομολογία με αναγωγάσες του ασκορβικού και του ημιδεϋδροασκορβικού οξέως, οι οποίες είναι φλαβοπρωτεΐνες (Lorenzo et al., 1999). Επίσης ο ίδιος ο AIF εμφανίζει δράση οξειδοαναγωγάσης (Marrimar et al., 2001), και NADH οξειδάσης και μπορεί να παράγει ανιόν του σουπεροξειδίου in vitro οξειδώνοντας είτε NADH είτε NADPH. Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι παρουσία του NADH καταλύει την αναγωγή του κυτοχρώματος c (Miramar et al., 2001, Mate et al., 2002). Από τα παραπάνω θεωρείται πιθανόν ο AIF να είναι υπεύθυνος για κάποια οξειδοαναγωγική λειτουργία σε μιτοχονδριακό επίπεδο που ακόμη όμως δεν έχει ταυτοποιηθεί. Δεν έχει ξεκαθαριστεί ακόμη μέχρι σήμερα εάν η περιοχή της οξειδοαναγωγάσης και η περιοχή η υπεύθυνη και για την αποπτωγενή δράση του AIF είναι ανεξάρτητες όπως ακριβώς έχει αναφερθεί και για το κυτόχρωμα c ή εάν πρόκειται για μια περιοχή που περιέχει και τις δύο δράσεις (Susin et al., 1999, Wu et al., 2002, Loeffler et al., 2001). Έτσι υποθέτουμε σήμερα ότι ο AIF μπορεί να έχει διπλή δράση, οξειδοαναγωγάσης που καταλύει την μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του NADH και του

κυτοχρώματος c στον διαμεμβρανικό χώρο και αποπτωγενή παράγοντα που προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο όταν μετατοπίζεται από τα μιτοχόνδρια στο κυτταροδιάλυμα και στον πυρήνα (Loeffler et al., 2000, Lipton and Bossy-Weetze, 2002, Mate et al., 2002, Cregan et al., 2002).

*Απελευθέρωση του AIF από τα μιτοχόνδρια*

Παρά το έντονο ενδιαφέρον, δεν έχει ξεκαθαριστεί ο μοριακός μηχανισμός (ή οι μηχανισμοί) με τον οποίο ο AIF διαφεύγει από τα μιτοχόνδρια αλλά επίσης και για τους στόχους του τόσο στον πυρήνα όσο και σε άλλα σημεία του κυττάρου (Bidere and Senik, 2001). Σε ένα πρόσφατο άρθρο στο περιοδικό Science (Yu et al., 2002) υποστηρίζεται για πρώτη φορά, ότι η απελευθέρωση του AIF είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του πυρηνικού ενζύμου PARP (σχήμα 9). Η PARP-1 εκφράζεται στον πυρήνα και ενεργοποιείται όταν δεσμεύεται σε θραύσματα του DNA. Τότε καταλύει την μετατροπή του $NAD^+$ σε νικοτιναμίδιο και ADP-ριβόζη και προσθέτει μόρια ADP-ριβόζης σε διάφορες πρωτεΐνες στόχους σχηματίζοντας μεγάλες αλυσίδες (Chiarugi and Moskowitz, 2002, Zeigler et al., 2001) και με τον τρόπο αυτό παίρνει μέρος στην επιδιόρθωση του γονιδιώματος. Ως απόκριση σε διάφορα είδη στρες που έχουν τοξική επίδραση στο γονιδίωμα, η ενεργότητα του ενζύμου PARP-1 αυξάνει (Shall et al., 2000). Μαζική ενεργοποίηση της PARP-1 μπορεί να οδηγήσει σε δραματική πτώση του $NAD^+$ και στην συνέχεια του ATP. Σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη, η ενεργοποίηση της PARP-1 και κατ' επέκταση η μείωση των επιπέδων της ενέργειας, αναστέλλει την απόπτωση που είναι ενεργητική διαδικασία και προκαλεί τον θάνατο με νέκρωση (Lee and Shacter, 1999, Lee and Shacter, 2000, Nicotera et al., 2000, Ha and Snyder, 2000, Enguchi et al., 1997, Leist et al., 1997). Από την άλλη πλευρά τελευταία δεδομένα (Yu et al., 2002) υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση της PARP-1 παρά το γεγονός ότι προκαλεί την πτώση του επιπέδου της ενέργειας, μπορεί να οδηγήσει σε ένα αποπτωτικό τύπο θανάτου που είναι ανεξάρτητος από τις κασπάσες. Στην περίπτωση αυτή η μείωση των επιπέδων του $NAD^+$ προκαλεί την μετατόπιση του μιτοχονδριακού αποπτωτικού παράγοντα AIF κατ' αρχάς στο κυτταροδιάλυμα και στη συνέχεια στον πυρήνα. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η ενεργοποίηση αυτού του πυρηνικού ενζύμου προκαλεί την απελευθέρωση ενός μιτοχονδριακού παράγοντα είναι εν πολλοίς άγνωστοι. Φαίνεται πάντως ότι πυροδοτείται ένας καταρράκτης γεγονότων με αποτέλεσμα την πτώση του διαμεμβρανικού δυναμικού ($\Delta\psi m$) που όπως υποστηρίζεται ακολουθείται από την απελευθέρωση του AIF από τα




**Σχήμα 9:** Βιοχημική πορεία του AIF

μιτοχόνδρια (Yu et al., 2002, Susin et al., 1999, Susin et al., 2000, Cande et al., 2002) (σχήμα 9).

Οι απόψεις διίστανται όσον αφορά το ποιος από τους αποπτωτικούς παράγοντες των μιτοχονδρίων απελευθερώνεται πρώτος. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι ως απόκριση σε αποπτωτικά ερεθίσματα μετατοπίζεται ο AIF και παρόλα αυτά ένα σημαντικό ποσοστό των κυττάρων καταφέρνουν να διατηρήσουν το κυτόχρωμα c στα μιτοχόνδρια (Yu et al., 2002, Susin et al., 1999, Douglas et al., 2000a, Douglas et al., 2000b, Ferri et al., 2000a, Ferri et al., 2000b). Επίσης αναφέρεται ότι η απελευθέρωση του AIF από τα μιτοχόνδρια έχει σαν αποτέλεσμα την περαιτέρω μετατόπισή του στον πυρήνα (Cande et al., 2002 b, Loeffler

et al., 2001), καθώς και να οδηγήσει στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c προάγοντας με τον τρόπο αυτό την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Αντίθετα σε άλλα μοντέλα πρόκλησης της απόπτωσης η μετατόπιση του AIF είναι γεγονός που ακολουθεί την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Arnoult et al., 2002). Το πιο πιθανό σε αυτές τις περιπτώσεις είναι ότι η συνεισφορά του AIF ή των κασπασών στον κυτταρικό θάνατο, εξαρτάται πιθανά από τον τύπο του αποπτωτικού ερεθίσματος και από το τύπο των κυττάρων (σχήμα 9).

*Επιπτώσεις από την απελευθέρωση του AIF από τα μιτοχόνδρια*

Η παρουσία του AIF στον πυρήνα (Susin et al., 1999, Ferri et al., 2000a, Daugas et al., 2000a, Daugas et al., 2000b) συνοδεύεται με περιφερειακή συμπύκνωση και πέψη της χρωματίνης σε θραύσματα μοριακού βάρους της τάξης των 50 kbp (Susin et al., 1999, Susin et al., 2000) (σχήμα 9). Παρόλα αυτά, οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους προκαλούνται αυτές οι αλλαγές παραμένουν άγνωστοι. Τρεις πιθανότητες μπορούν να υπάρχουν: α) ο AIF μπορεί να έχει μια δεύτερη κρυφή δράση νουκλεάσης β) η αλληλεπίδραση του AIF με το DNA θα μπορούσε να αυξήσει την επιδεκτικότητα του DNA σε λανθάνουσες νουκλεάσες και γ) ο AIF μπορεί να συναθροίζει και να ενεργοποιεί άλλες νουκλεάσες προκαλώντας έτσι λύση της χρωματίνης (Cande et al., 2002a).

Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι σχεδόν ταυτόχρονα με την παρουσία του AIF στον πυρήνα μετατοπίζεται η φωσφατίδυλο-σερίνη στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης (Susin et al., 1999, Yu et al., 2002, Cande et al., 2002b, Vieira et al., 2000, Zamzami et al., 1999) ένα γεγονός που λειτουργεί σαν μεταδότης σήματος για την αναγνώριση αυτών των κυττάρων από τα φαγοκύτταρα που τα εγκολπώνουν πριν την ρήξη των μεμβρανών και την διαφυγή των συστατικών τους η οποία προκαλεί φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Vermes et al., 2001, Martin et al., 1995). Σε ορισμένες μελέτες έχει υποστηριχθεί ότι η ενεργοποίηση των κασπασών είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την εξωτερίκευση της φωσφατίδυλο-σερίνης στην κυτταρική μεμβράνη (Marzo et al., 2001), ενώ σε άλλες ότι το γεγονός αυτό είναι ανεξάρτητο από τις κασπάσες (Yu et al., 2002, Bidere and Senik, 2001).

Τέλος υπάρχουν διαφορετικές απόψεις για τον ρόλο των κασπασών σε αυτή την πορεία πρόκλησης του θανάτου. Η προεπώαση με αναστολείς κασπασών, σε ορισμένες περιπτώσεις αναστέλλει κάποια από τα παραπάνω γεγονότα (Arnoult et al., 2002, Banki et al.,

1999), ενώ σε άλλες δεν έχει καμιά επίπτωση (Yu et al., 2002, Cande et al., 2002b, Susin et al., 1999, Lorenzo et al., 1999, Daugas et al., 2000a, Susin et al., 2000).

### 1.3.4.7 Μηχανισμοί ρύθμισης της πορείας του AIF

Το πρώτο επίπεδο ρύθμισης και αυτής της πορείας φαίνεται να είναι το μιτοχόνδριο του κυττάρου. Όπως και στην περίπτωση του κυτοχρώματος c και του Smac, η απελευθέρωση του AIF, ρυθμίζεται από τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών, με τα προαποπτωτικά μέλη να αυξάνουν και τα αντιαποπτωτικά να αναστέλλουν της μετατόπιση του AIF στον πυρήνα. Από της στιγμή που ο AIF διαφύγει από τα μιτοχόνδρια ο μοναδικός φυσικός αναστολέας που έχει μέχρι σήμερα ταυτοποιηθεί είναι η πρωτεΐνη του θερμικού σοκ HSP70 (Ravagnar et al., 2001). Οι κασπάσες δεν φαίνεται να παίζουν κανένα ρόλο στην πορεία του AIF, εκτός ίσως από την μετατόπιση της PS, που υπάρχουν διαφορετικές απόψεις.

## 1.4 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η λεπτομερής μελέτη του ρόλου τον οποίο διαδραματίζει το οξειδωτικό στρες γενικότερα και το $H_2O_2$ ειδικότερα στην διαδικασία του κυτταρικού θανάτου. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε μια Τ-λεμφοκυτταρική σειρά (Jurkat cells) και μελετήθηκαν λεπτομερώς οι επιπτώσεις της έκθεσης αυτών των κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$. Το $H_2O_2$ προστέθηκε είτε απ' ευθείας στο καλλιεργητικό υλικό, είτε μέσω του ενζύμου Οξειδάση της Γλυκόζης (GO) η ποσότητα του οποίου καθορίζει και την ταχύτητα της δημιουργίας του $H_2O_2$. Παρατηρήθηκε ότι η συνεχής παραγωγή του $H_2O_2$ στο καλλιεργητικό υλικό όχι μόνο δεν μπορούσε να προκαλέσει την εμφάνιση κάποιων χαρακτηριστικών δεικτών της απόπτωσης, αλλά επιπλέον ανέστειλε την πρόκληση αποπτωτικών πορειών που προκαλείται από άλλα προαποπτωτικά ερεθίσματα. Έτσι, έγινε αρχικά μια προσπάθεια να εντοπιστεί το ακριβές σημείο στο οποίο το $H_2O_2$ δρα αναστέλλοντας αυτές τις βιοχημικές πορείες της απόπτωσης. Στη συνέχεια, στην προσπάθεια να διαλευκανθεί η τύχη αυτών των κυττάρων, παρατηρήθηκε ότι παρά την αναστολή του καταρράκτη των κασπασών και του κατακερματισμού του DNA, τα κύτταρα οδηγούνται σε θάνατο με συρρίκνωση του πυρηνικού τους υλικού. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την άποψη ότι τα κύτταρα αυτά δεν πεθαίνουν με νέκρωση αλλά με κάποιο εναλλακτικό τρόπο αποπτωτικού θανάτου. Τέλος εξετάζεται η πιθανή εμπλοκή του AIF στην πρόκληση του θανάτου από το $H_2O_2$.

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

# 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 2.1 Υλικά

Το θρεπτικό υλικό RPMI 1640 εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, το MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide), το SDS (sodium dodecyl sulfate), η οξειδάση της γλυκόζης (από *Aspergillus niger*, 18,000 units/g), η καταλάση (από ήπαρ βοός) το Triton X-100, το CHAPS (3-[(3-cholamidoproyl) dimethylammonio]-1 propanesulfonate), η διθειοθρεϊτόλη (DTT), η pepstatin A, η leupeptin και το Hoechst 33342 προέρχονται από την Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Ο ορός από έμβρυο βοός (Fetal Calf Serum, FCS), τα πλαστικά για τις ιστοκαλλιέργειες, η αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως, το PMSF (phenylmethyl sulfonyl fluoride), η πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη και η πρωτεϊνάση K προέρχονται από την Gibco BRL (Grant Island, NY, USA). Η απλή αγαρόζη προέρχεται από την Serva GmbH (Heidelberg, Germany). Οι πλάκες μικροσκοπίου από την Menzel-Glaset, η RNάση A από την Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι των αμινοξέων 764-1014 του καρβοξυτελικού άκρου της poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) από την Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA). Η απροτινίνη (aprotinin) από την Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Το μονοκλωνικό αντίσωμα Fas ποντικού (clone DX2) και το υπόστρωμα της καασπάσης-3 Ac-DEVD-AMC από την Calbiochem (Schwalbach, Denmark). Το βρωμιούχο αιθίδιο και το $H_2O_2$ από την Merck (Darmstadt, Germany). Το μονοκλωνικό αντίσωμα για την καασπάση-3 συνδεδεμένο με υπεροξειδάση, το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι του κυτοχρώματος c και το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι του Apaf-1 προέρχονται από την R & D Systems. Τα μονοκλωνικά αντίσωμα αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού και έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συνδεδεμένα με υπεροξειδάση προέρχονται την Amersham Pharmacia Biotech (UK). Το JC-1 (5,5′, 6, 6′ - tetrachloro - 1,1′,3,3′, - tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) από την Molecular Probes (Oregon, USA). Το αντιδραστήριο Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate από την Bio-Rad Laboratories (California, USA). Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης BA-S 83 Reinforced nitrocellulose NC από την Schiecher & Schuell (Dassel, Germany).

## 2.2 Καλλιέργειες κυττάρων

### 2.2.1 Κύτταρα- Συνθήκες καλλιέργειας

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά Jurkat-T (American Type Culture Collection, κλώνος E6-1) που προέρχεται από Τ-λεμφοκύτταρα ασθενούς με οξεία λευχαιμία. Η κυτταρική σειρά αναπτύσσεται σαν εναιώρημα σε θρεπτικό μέσο RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute Media RPMI 1640) με 2 mM L-γλουταμίνη, εμπλουτισμένο με 10% απενεργοποιημένο με θέρμανση ορό από έμβρυο μόσχου (Fetal Calf Serum, FCS). Στο θρεπτικό μέσο προστέθηκαν επίσης και 100 U/ml πενικιλίνης και 100 μg/ml στρεπτομυκίνης για εξασφάλιση της στειρότητας. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστικό θάλαμο (Forma Scientific) στους 37° C και σε ατμόσφαιρα 95% αέρα και 5% $CO_2$.

### 2.2.2 Επιμόλυνση κυττάρων

Η παραγωγή αμφιτροπικών ανασυνδιασμένων ρετροϊών ελαττωματικής αντιγραφής και η επιμόλυνση κυττάρων Jurkat-T έγινε όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Kolettas and Rosenberger, 1998). Αρχικά οικοτροποκοί ανασυνδιασμένοι ρετροϊοί παράγονται με διαμόλυνση οικοτροπικών κυττάρων ΨCRE με ρετροϊικές κατασκευές (constructs) pBabe-puro (πρότυπος φορέας) ή με pBabe-puro$^{Bcl-2}$. Τα διαμολυσμένα κύτταρα επιλέγονται σε 2 μg/ml πουρομυκίνη (pouromycin), συλλέγονται και φιλτάρονται διαμέσου φίλτρου 0.45 μm και προστίθεται Polybrene 8 μg/ml. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιούνται για την επιμόλυνση της αμφίτροπικής σειράς πακεταρίσματος ρετροϊών PA317. Το υπερκείμενο που περιέχει τα ρετροϊκά σωματίδια συλλέγεται, φιλτάρεται και προστίθεται ξανά Polybrene 8 μg/ml. Οι ανασυνδιασμένοι ρετροϊοί Babe-puro και Babe-puro$^{Bcl-2}$ που συλλέγονται από τις καλλιέργειες των PA317 κυττάρων χρησιμοποιούνται για την επιμόλυνση κυττάρων Jurkat. Τα μολυσμένα κύτταρα Jurkat-T συλλέγονται σε 1.5 μg/ml πουρομικίνης για 2 εβδομάδες και στην συνέχεια αναπαράγονται σε μαζικές καλλιέργειες. Τα επιμολυσμένα κύτταρα εξετάζονται για την έκφραση της Bcl-2 με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης.

### 2.2.3 Έκθεση σε $H_2O_2$

Για τα πειράματα της παρούσας μελέτης, κύτταρα Jurkat στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση στα 250 x g, για 10 λεπτά (φυγόκεντρος Megafuge 1.0 R, Heraeus) και επαναιωρήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο σε πυκνότητα 1,5 x $10^6$ κύτταρα ανά ml. Αφού παρέμειναν για μία ώρα κάτω από σταθερές καλλιεργητικές συνθήκες, εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ από 0 έως 6 ώρες.

Το $H_2O_2$ προστέθηκε στην καλλιέργεια άμεσα σε συγκεντρώσεις 0 έως 1 mM ή έμμεσα με την δράση του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης σε συγκεντρώσεις 0 έως 1000 ng ενζύμου/ml. Η οξειδάση της γλυκόζης χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τη γλυκόζη και το $O_2$ και παράγει γλυκονικό οξύ και $H_2O_2$ σύμφωνα με την αντίδραση 9.

$$\text{Γλυκόζη} + O_2 \xrightarrow{\text{Οξειδάση της γλυκόζης}} \text{γλυκονικό οξύ} + H_2O_2 \qquad (9)$$

## 2.3 Μέτρηση της συγκέντρωσης του $H_2O_2$

### 2.3.1 Μέτρηση της συγκέντρωσης του $H_2O_2$ στην καλλιέργεια

Η συγκέντρωση του $H_2O_2$ στην καλλιέργεια μετά την άμεση προσθήκη του μετρήθηκε με την μέθοδο Fox (Nourooz-Zadeh et al., 1994, Nourooz-Zadeh et al., 1997). Η μέθοδος Fox εκτιμά γενικά υδροϋπεροξείδια (ROOH) και κυρίως $H_2O_2$. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην οξείδωση ιόντων δισθενούς σιδήρου ($Fe^{2+}$) προς τρισθενή σίδηρο ($Fe^{3+}$) από ROOH κάτω από όξινες συνθήκες (αντίδραση 10). Στη συνέχεια ο $Fe^{3+}$ δεσμεύεται με το πορτοκαλί της ξυλενόλης (xylenol orange, XO) και σχηματίζει ένα σταθερό έγχρωμο σύμπλοκο που απορροφά στα 560 nm (αντίδραση 11). Οι ρίζες $RO^{\cdot}$ που σχηματίζονται στην αντίδραση 10 μπορούν επίσης να οξειδώσουν το $Fe^{2+}$ (αντίδραση 12). Επιπλέον η RO που σχηματίζεται στην (10) αντιδρά με το XO (αντίδραση 13) και το προϊόν αυτής της αντίδρασης μπορεί να οξειδώσει το $Fe^{2+}$ (αντίδραση 14). Από αυτές τις αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης, ο $Fe^{3+}$ και το έγχρωμο σύμπλοκο $Fe^{3+}$XO σχηματίζονται περίπου σε τριπλάσια συγκέντρωση από τα ROOH του δείγματος. Έτσι ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης είναι 4,3 X $10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$.

$$Fe^{2+} + ROOH \rightarrow Fe^{3} + RO^{\cdot} + OH^{-} \quad (10)$$

$$Fe^{3+} + XO \rightarrow Fe^{3+}XO \quad (11)$$

$$Fe^{2+} + RO^{\cdot} \rightarrow Fe^{3+} + OR^{-} \quad (12)$$

$$XO + RO^{\cdot} \rightarrow XO\,RO^{\cdot} \quad (13)$$

$$Fe^{2+} + XO\,RO^{\cdot} \rightarrow Fe^{3+} + (XO\,RO^{\cdot})^{-} \quad (14)$$

Για την μέτρηση των επιπέδων του $H_2O_2$ στο καλλιεργητικό υλικό 1,5 x $10^5$ κύτταρα, επωάστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ και σε τακτά χρονικά διαστήματα δείγματα κυττάρων φυγοκεντρήθηκαν στα 500 x g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία $4^o$ C.

Το υπερκείμενο (100 μl καλλιεργητικού υλικού) επωάστηκε με 900 μl αντιδραστηρίου Fox (250 μM $Fe(SO_4)_2$, 100 μM XO, 24 mM $H_2SO_4$, 4 mM BHT σε 90 % v/v $CH_3OH$) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως μετρήθηκε η απορρόφηση στα 560 nm (φωτόμετρο MBA 2000, PERKIN ELMER).

### 2.3.2 Μέτρηση του $H_2O_2$ που εκλύεται από την οξειδάση της γλυκόζης

Προσθήκη της οξειδάσης της γλυκόζης στο καλλιεργητικό υλικό παράγει $H_2O_2$ συνεχώς και υπό σταθερό ρυθμό. Το ποσό του $H_2O_2$ που δημιουργείται από την δράση του ενζύμου μετρήθηκε φωτομετρικά. Διάφορες ποσότητες του ενζύμου προστέθηκαν σε διάλυμα PBS που περιείχε 5,0 mM γλυκόζης σε θερμοκρασία $37^o$ C και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 240 nm (φωτόμετρο τύπου MBA 2000, PERKIN ELMER). Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης $\varepsilon_{240}$ είναι 43.6 $M^{-1}cm^{-1}$.

## 2.4 Μέτρηση βιωσιμότητας

### 2.4.1 Trypan blue

Η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης εξετάστηκε με την χρωστική Trypan Blue. Η μέθοδος στηρίζεται στην ανικανότητα των νεκρών κυττάρων να εμποδίζουν την είσοδο της χρωστικής (Gorman et al., 1999). Σαν αποτέλεσμα τα νεκρά κύτταρα εμφανίζονται μπλε σε μικροσκόπιο φωτός σε αντίθεση με τα ζωντανά που φαίνονται φωτεινά και στρογγυλά. Για την εξέταση αυτή, ένας όγκος διαλύματος Trypan Blue (0,2% w/v σε 0,15 M NaCl)

αναμείχθηκε με ίσο όγκο από την καλλιέργεια, μεταφέρθηκε σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer και τα κύτταρα εξετάστηκαν σε απλό μικροσκόπιο (OLYMPUS CK2).

### 2.4.2 Μέτρηση των μεταβολικά ενεργών κυττάρων με την μέθοδο του MTT

Η μέθοδος του MTT (3-[4,5-διμεθυλοθειαζολο – 2 - υλο] - 2,5 – διφαινυλο – τετραζολιο βρωμίδιο), χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μεταβολικής ικανότητας των μιτοχονδρίων και χρησιμεύει σαν δείκτης της βιωσιμότητας των κυττάρων. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε από τον Mosman (Mosman, 1983) και τροποποιήθηκε από τους Denizof και Lang (Denizof and Lang, 1986), στηρίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων και κυρίως μιτοχονδριακών ενζύμων να ανάγουν το MTT σχηματίζοντας ένα αδιάλυτο μπλε παράγωγο της φορμαζάνης. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα μόνο στα μεταβολικά ενεργά κύτταρα.

Οι μετρήσεις έγιναν όπως περιγράφηκε από τον Scudiero και τους συνεργάτες του με μικρές τροποποιήσεις (Scudiero et al., 1998). Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν χωρίς κόκκινο της φαινόλης (phenol red) και δεν εμπλουτίστηκε με FCS. Για την εκτίμηση της βιωσιμότητας, 100 μl καλλιέργειας ($1,5 \times 10^5$ κύτταρα) μεταφέρθηκαν σε τρυβλία ELISA 96 φρεατίων. Σε κάθε φρεάτιο προστέθηκαν 0,9 mg/ml διαλύματος MTT που παρασκευάστηκε στο ίδιο θρεπτικό υλικό λίγο πριν την χρήση του και διηθήθηκε σε φίλτρο Sartorius μέσης διαμέτρου πόρων 0,22 μm. Η επώαση διήρκησε 4 ώρες στους $37^o$ C σε θάλαμο 95% αέρα και 5% $CO_2$. Ακολούθως προστέθηκαν 80 μl διαλύματος 10 % SDS και επωάστηκαν για άλλες 8 ώρες στους $37^o$ C για να διαλυτοποιηθούν οι μπλε κρύσταλλοι της φορμαζάνης. Μετά από έντονη ανάδευση μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα κάθε φρεατίου σε αυτόματο φωτόμετρο ELISA στα 550 nm, με επιδιόρθωση της απορρόφησης στα 690 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που περιείχαν μόνο το θρεπτικό μέσο. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως το % ποσοστό του φθορισμού του δείγματος ως προς το φθορισμό των μαρτύρων.

### 2.5 Ηλεκτροφόρηση DNA μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των βλαβών που προκαλούνται στο DNA μετά από έκθεση των κυττάρων σε $H_2O_2$ ήταν η ηλεκτροφόρηση DNA μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE), που είναι ευρέως γνωστή και ως

comet assay. Η μέθοδος αυτή εκτιμά τις σχάσεις στις μονές αλυσίδες του κυτταρικού DNA. Πρόκειται για μια απλή, γρήγορη και ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο φθορισμομετρικής μικροσκοπίας, με ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό: η βλάβη στο DNA οπτικοποιείται σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Η ανάπτυξη της μεθόδου αποδίδεται προς τιμή στον Singh και τους συνεργάτες του (Singh et al., 1988) αν και πρώτοι οι Ostling και Johanson το 1984 (Ostling and Johanson, 1984) δημοσίευσαν μια παρόμοια μέθοδο για την ανίχνευση βλαβών στο DNA σε κύτταρα που εκτίθενται σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Οι τροποποιήσεις στην μέθοδο που πρότειναν ο Singh και οι συνεργάτες του το 1988 αποτέλεσαν την βάση για την μετέπειτα εξέλιξή της. Από την εμφάνισή της μέχρι σήμερα η μέθοδος έχει υποστεί επιπρόσθετες αλλαγές που αύξησαν σημαντικά την ευαισθησία και την χρησιμότητα της μεθόδου, έτσι με διάφορες τροποποιήσεις είναι δυνατόν να ανιχνευθούν διαφορετικά είδη βλάβης όπως είναι οι σχάσεις στις μονόκλωνες ή δίκλωνες αλυσίδες και η οξείδωση των βάσεων του DNA.

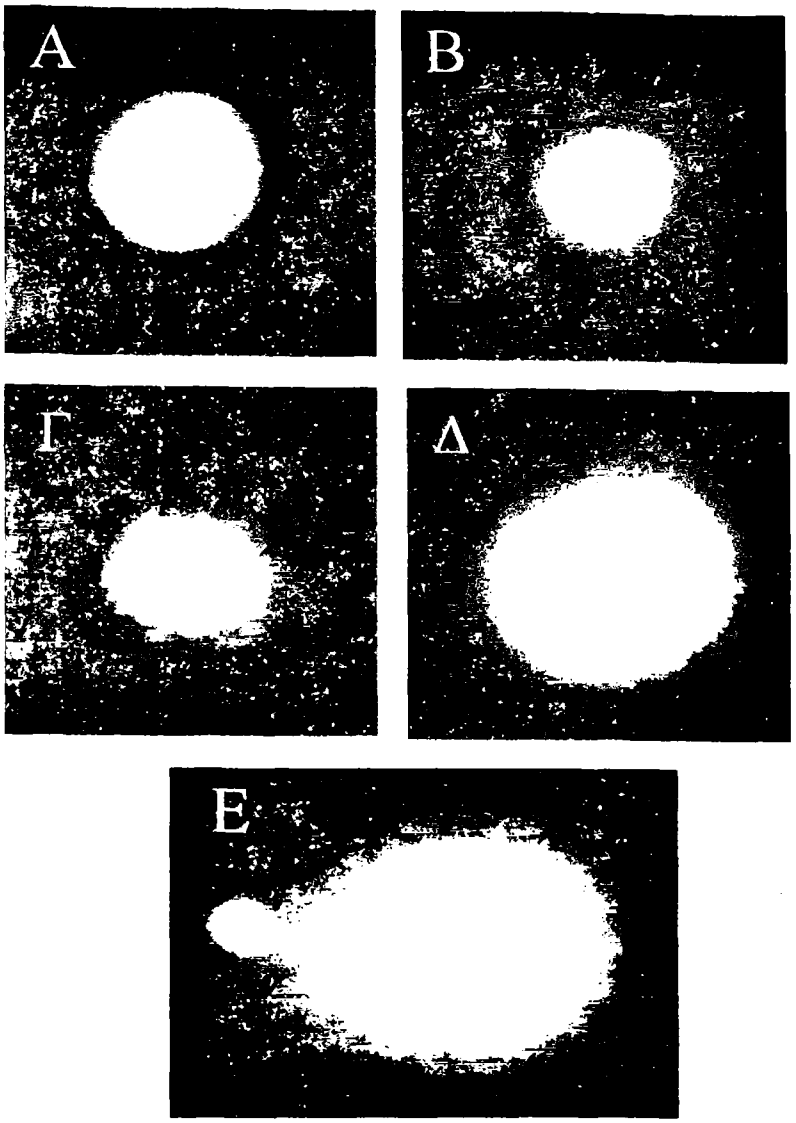
Με την παραλλαγή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη εκτιμούνται σχάσεις στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Επειδή δεν πρόκειται για θραύσματα στις διπλές αλυσίδες του DNA, για να ανιχνευθούν οι σχάσεις αυτές πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων κάτω από ισχυρά αλκαλικές συνθήκες (pH>13). Στις συνθήκες αυτές μετουσιώνεται το DNA (καταστρέφονται οι δεσμοί υδρογόνου και αποδιατάσσεται το δίκλωνο DNA προς σχηματισμό μονόκλωνων μορίων). Η παρουσία σχάσεων στις μονόκλωνες αλυσίδες επιτρέπει την μετατόπισή του DNA προς την άνοδο κατά την ηλεκτροφόρηση με αποτέλεσμα να προκύπτουν σχηματισμοί του DNA που μοιάζουν με κομήτες, από το οποίο προκύπτει και το όνομα της τεχνικής. Μάλιστα, το ποσοστό του DNA που μετατοπίζεται είναι ανάλογο με τον αριθμό των σχάσεων στο DNA. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ανιχνεύονται επίσης και οι απουρινικές ή απυριμιδινικές περιοχές (alkali labile sites) οι οποίες σε υψηλό pH μετατρέπονται σε σχάσεις. Πριν την χρώση και την οπτική παρατήρηση οι δίκλωνες αλυσίδες του DNA που δεν έχουν μετατοπιστεί κατά την ηλεκτροφόρηση επανασχηματίζονται σε pH 7,5. Έτσι, οι σχηματισμοί που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο είναι στην πραγματικότητα «θηλιές» του DNA που απελευθερώνονται από ένα υψηλά υπερσυσπειρωμένο σύμπλοκο DNA-πρωτεϊνών (nucleoids).

### 2.5.1 Πειραματική διαδικασία

Εκατό μl καλλιέργειας που περιείχε 1.5 × $10^5$ κύτταρα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία για ELISA 96 φρεατίων και επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις οξειδάσης της γλυκόζης ή με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ για διάφορους χρόνους (0 έως 360 λεπτά). Αφού ξεπλύθηκαν με ψυχρό διάλυμα PBS στα 500 x g, για 5 λεπτά (Centrifuge 5415 D, eppendorf) επαναιωρήθηκαν σε 100 μl διαλύματος αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης 1% σε διάλυμα PBS που είχε προεπωαστεί στους 37° C. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρους πλάκες μικροσκοπίου που είχαν επιστρωθεί με 1% αγαρόζης φυσιολογικού σημείου τήξεως σε διάλυμα PBS και πάνω από αυτό τοποθετήθηκε μια καλυπτρίδα 2 x 2 cm. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες μεταφέρθηκαν στους 4° C, ώστε να πήξει η αγαρόζη και τα κύτταρα να παγιδευτούν μέσα στο στρώμα της πηκτής. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν για 1 ώρα σε ψυχρό διάλυμα λύσης που περιείχε 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris σε pH 10, 1% Triton X-100 v/v στους 4° C. Η λύση κάτω από αυτές τις συνθήκες απομακρύνει μεγάλο μέρος από τα κυτταρικά συστατικά, αλλά το DNA παραμένει υπερελικομένο και πακεταρισμένο σε μια πυρηνοϊδή δομή (nucleus-like structure). Εν συνεχεία οι αντικειμενοφόρες πλάκες μεταφέρθηκαν σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης 30 εκατοστών που περιείχε ψυχρό αλκαλικό διάλυμα (0,3 M NaOH και 1 mM EDTA) για 40 λεπτά στους 4° C. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στο ίδιο διάλυμα, στα 30 Volts και στα 300 mAmps για 30 λεπτά στους 4° C. Τέλος οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίστηκαν τρεις φορές από 5 λεπτά σε ψυχρό διάλυμα ουδετεροποίησης 0,4 M Tris pH 7,5.

### 2.5.2 Οπτική ανάλυση και μέτρηση

Για την οπτική ανάλυση, πραγματοποιήθηκε χρώση του DNA με 35 μM Hoechst 33342 για 10 λεπτά και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (Axiovert S 100, Zeitz) κάτω από φίλτρο UV και μεγέθυνση X 400. Όπως παρατηρήθηκε η βλάβη δεν ήταν ομοιόμορφη σε όλα τα κύτταρα, τα οποία κατηγοριοποιήθηκαν σε 5 τάξεις (0, 1, 2, 3 και 4) ανάλογα με την έκταση της βλάβης (σχήμα 10). Η τάξη 0 αντιστοιχεί στο ανέπαφο DNA που φαίνεται στρογγυλό και φωτεινό. Στην τάξη 1 αντιστοιχεί το DNA που περιέχει ένα μικρό ποσοστό βλάβης και εμφανίζεται στρογγυλό αλλά πιο διάχυτο από τα νουκλεοτίδια της τάξης 0. Στις τάξεις 2, 3 και 4 η βλάβη στο DNA είναι πιο σημαντική και κατά την ηλεκτροφόρηση ένα




**ιματισμοί του πυρηνικού DNA μετά από ανάλυση με την τεχνική**

-

ση των κυττάρων σε $H_2O_2$ τα κύτταρα αναλύθηκαν όπως αναφέρθηκε Υλικά και Μέθοδοι (2.5.2). Το πυρηνικό DNA μετά από χρώση με ωτογραφήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού. (Α) τάξη 0, (Β) τάξη 1, (Γ) 3, (Ε) τάξη 4.

μέρος του DNA μετακινείται προς την κάθοδο σχηματίζοντας «ουρά» Το ποσοστό του DNA που μετακινείται προς την κάθοδο είναι μικρότερο για την τάξη 2 και αυξάνει για την τάξη 3 και 4. Η οπτική μέτρηση της βλάβης στο κυτταρικό DNA του κάθε δείγματος βασίζεται στην τυχαία καταμέτρηση 100 τέτοιων σχηματισμών στην αντκειμενοφόρο πλάκα και στην κατάταξή τους σε μία από αυτές τις 5 τάξεις. Το % ποσοστό σε κάθε τάξη, πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό της τάξης, δηλαδή το ποσοστό των σχηματισμών DNA στην τάξη 0 πολλαπλασιάζεται επί 0, το ποσοστό στην τάξη 1 πολλαπλασιάζεται επί 1 κλπ. Έτσι το ολικό άθροισμα από 100 σχηματισμούς κυμαίνεται από 0 (όταν το 100% αντιστοιχεί στην τάξη 0) έως 400 (όταν το 100 % των σχηματισμών αντιστοιχεί στην τάξη 4). Με αυτόν τον τρόπο η ολική βλάβη στο DNA του κυτταρικού πληθυσμού μπορεί να εκφραστεί σε αυθαίρετες μονάδες. Κατά την καταμέτρηση πάντα μετακινείται η αντικειμενοφόρος πλάκα με τον ίδιο τρόπο.

## 2.6 Κυτταρομετρία ροής

### 2.6.1 Ανάλυση της περιεκτικότητας των κυττάρων σε DNA

Η ενεργοποίηση ειδικών ενδονουκλεασών (Enari et al., 1998) κατά την απόπτωση έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη θραυσματοποίηση του πυρηνικού DNA προς σχηματισμό μονο- και ολιγο- νουκλεοτιδίων. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση του DNA, μπορεί να ξεχωρίσει ένα πληθυσμό κυττάρων που εμφανίζουν μικρότερη περιεκτικότητα DNA από τα φυσιολογικά κύτταρα, ο οποίος θεωρείται και αποπτωτικός (Ormerod et al., 2002, Ormerod et al., 1993). Η τεχνική που αναφέρεται στην συνέχεια για την μέτρηση της περιεκτικότητας του DNA με κυτταρομετρία ροής περιγράφεται στο βιβλίο 'Techniques in apoptosis, a user 's guide' (Darzynkiewicz et al., 1996).

Κύτταρα Jurkat (1,5 x $10^6$ ανά ml) μονιμοποιήθηκαν με 9 ml ψυχρής αιθανόλης 70% (v/v), για 24 ώρες στους $4^o$ C. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν και στην συνέχεια επαναιωρήθηκαν σε 0,5 ml PBS και προστέθηκε 1 ml διαλύματος εκχύλισης (192 mM $Na_2HPO_4$, 4 mM κιτρικού οξέως, pH 7,8). Ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να εκχυλιστεί από τα κύτταρα το θραυσματοποιημένο, μικρού μοριακού βάρους DNA. Με τον τρόπο αυτό τα αποπτωτικά κύτταρα έχουν μικρότερη περιεκτικότητα σε DNA σε σχέση με τα φυσιολογικά. Μετά από φυγοκέντρηση τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν με 0,3 ml διαλύματος χρώσης (0,7 μg/ml ιωδιούχο προπιδίο (PI), 70 μg/ml RNάση A) και επωάστηκαν για 30 λεπτά

στο σκοτάδι. Τέλος, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 0,2 ml διαλύματος PBS και η περιεκτικότητα των κυττάρων σε DNA αναλύθηκε με κυτταρόμετρο ροής (FACScan, Becton Dickinson).

### 2.6.2 Μέτρηση του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων

Το διαμεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων (Mitochondrial Transmembrane Potential) (Δψm) είναι αποτέλεσμα της ασύμμετρης κατανομής πρωτονίων και άλλων ιόντων στις δύο πλευρές της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Για την εκτίμηση του Δψm, χρησιμοποιούνται συνήθως κατιονικές λιπόφιλες φθορίζουσες ουσίες οι οποίες συσσωρεύονται στην εσωτερική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης εξαιτίας του αρνητικού της φορτίου (Kroemer et al., 1997). Στην παρούσα μελέτη για την εκτίμηση του Δψm χρησιμοποιήθηκε το λιπόφιλο κατιόν JC-1 (5΄,6,6΄ - tetrachloro - 1,1΄,3,3΄ - tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide) και ακολουθήθηκε ή διαδικασία που περιγράφηκε από την Castedo και συνεργάτες (Castedo et al., 2002). Τα κύτταρα (1,5 x $10^6$) επαναιωρήθηκαν σε 0,5 ml διαλύματος PBS και προστέθηκε το JC-1 σε τελική συγκέντρωση 1,0 μM. Τα δείγματα επωάστηκαν για 15 λεπτά στο σκοτάδι ώστε να διαπεράσει το JC-1 τις κυτταρικές μεμβράνες στη συνέχεια παρέμειναν στον πάγο μέχρι την ανάλυσή τους με κυτταρομετρία ροής. Στα φυσιολογικά κύτταρα που το Δψm είναι υψηλό το JC-1 συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια και σχηματίζει J-συσσωματώματα (J-aggregates) που φθορίζουν στο κόκκινο (590 nm) (Smiley et al., 1991). Όταν μειώνεται το Δψm μειώνεται και η συγκέντρωση του JC-1 στα μιτοχόνδρια, το οποίο στην περίπτωση αυτή βρίσκεται στην μονομερή μορφή και φθορίζει στο πράσινο (527 nm).

## 2.7 Μικροσκοπία φθορισμού

### 2.7.1 Μορφολογία του πυρήνα

Στα τελευταία στάδια της απόπτωσης, ο πυρήνας του κυττάρου παρουσιάζει εξογκώματα, ανομοιομορφία, πλήρη θραυσματοποίηση και συρρίκνωση, που θεωρούνται χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές του αποπτωτικού θανάτου. Για την εξέταση της μορφολογίας του πυρήνα σε μικροσκόπιο φθορισμού, 7,5 x $10^5$ κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 0,5 ml διαλύματος PBS και προσκολλήθηκαν σε καλυπτρίδες (2 X 2 cm) που είχαν

προεπωαστεί με διάλυμα 0,4 M πολυ-L-λυσίνης. Μετά την προσκόλληση τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε 4% παραφορμαλδεΰδη σε PBS. Οι αλδεϋδικές ομάδες της παραφολμαδεΰδης εξουδετερώθηκαν με διάλυμα 50 mM $NH_4Cl$ σε PBS. Τέλος έγινε χρώση του DNA με 35 μM Hoechst 33342. Η μορφολογία των πυρήνων εξετάστηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού (Axiovert S 100, Zeizz) σε φίλτρο UV και μεγέθυνση X 400.

### 2.7.2 Διαμεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων

Για την ταυτόχρονη εξέταση του Δψm και της μορφολογίας του πυρήνα με μικροσκόπιο φθορισμού, 1,5 x $10^6$ κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε PBS και επωάστηκαν για 30 λεπτά με 1,5 μM JC-1 και 5 μM Hoechst 33342 στους 37° C. Οι πυρήνες και το Δψm εξετάστηκαν αμέσως σε μικροσκόπιο φθορισμού σε φίλτρο UV και TRITS αντίστοιχα και σε μεγέθυνση X 400.

### 2.7.3 Εντοπισμός της πρωτεΐνης AIF

Για την εξέταση του εντοπισμού του AIF τα κύτταρα (7,5 x $10^5$/ ml) επαναιωρήθηκαν σε 0,5 ml διαλύματος PBS και προσκολλήθηκαν σε καλυπτρίδες (2 X 2 cm) που είχαν προεπωαστεί με 0,4 M πολυ-L-λυσίνης. Μετά την προσκόλληση τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 4% παραφορμαλδεΰδη σε PBS. Για να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις έγινε επώαση για 30 λεπτά με 10% FCS. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάστηκαν για 1 ώρα με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του AIF σε αραίωση 1:10 σε 10% FCS. Μετά από έκπλυση με διάλυμα PBS ακολούθησε επώαση με αντίσωμα αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συνδεδεμένο με FITC. Τέλος έγινε πλύση των κυττάρων και ο εντοπισμός του AIF εξετάστηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού σε φίλτρο FITC.

## 2.8 Εκχύλιση του DNA και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση των σχάσεων στις διπλές αλυσίδες του DNA. Μετά την εκχύλιση το DNA ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης και οπτικοποιούνται οι ζώνες του. Σε αντίθεση με το DNA των φυσιολογικών κυττάρων που δεν μετακινείται κατά την ηλεκτροφόρηση, το DNA των αποπτωτικών κυττάρων το οποίο σχάζεται από ειδικές ενδονουκλεάσες (Enari et al., 1998) εμφανίζει μια χαρακτηριστική μορφή με ευδιάκριτες ζώνες που ονομάζεται 'ladder pattern'. Αντίθετα, στο DNA των

νεκρωτικών κυττάρων προκαλείται τυχαία θραυσματοποίηση και κατά την ηλεκτροφόρηση, τα θραύσματα αυτά μετατοπίζονται στην πηκτή και εμφανίζουν μια συνεχή ζώνη (smear). Έτσι, είναι δυνατόν να διαχωριστεί η ενδονουκλεοσωμική σχάση που είναι χαρακτηριστική του αποπτωτικού θανάτου από την τυχαία σχάση στο DNA που είναι αποτέλεσμα του νεκρωτικού θανάτου.

### 2.8.1 Απομόνωση ολικού DNA

Στην παρούσα μελέτη ολικό κυτταρικό DNA απομονώθηκε σύμφωνα με την μέθοδο που αναφέρεται στο βιβλίο Techniques in apoptosis, a users guide (Wolfe et al., 1996) με μικρές τροποποιήσεις. 6 x $10^6$ κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 500 μl διαλύματος λύσης (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA, 1% SDS, 0,1% NaCl), προστέθηκε διάλυμα 0,6 mg/ml πρωτεϊνάσης K 0,6 mg/ml και ακολούθησε ολονύκτια πέψη στους 37° C υπό ανάδευση. Τα νουκλεϊκά οξέα εκχειλίστηκαν ακολούθως με μίγμα φαινόλης / χλωροφορμίου. Το διάλυμα της φαινόλης παρασκευάστηκε σύμφωνα με την διαδικασία που αναφέρεται στο βιβλίο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Maniatis et al., 1989). Τα δείγματα αναμείχθηκαν με ίσο όγκο μίγματος φαινόλης / χλωροφορμίου και αναδεύτηκαν ήπια για 1 ώρα, το γαλάκτωμα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε στα 16000 x g για 10 λεπτά με αποτέλεσμα να διαχωριστούν η υδατική φάση που περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα από την οργανική φάση, ενώ η ενδιάμεση στοιβάδα περιέχει τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες. Η υδατική φάση συλλέχθηκε και επαναλήφθηκε το προηγούμενο βήμα άλλες δύο φορές ώστε να μην σχηματίζεται η ενδιάμεση πρωτεϊνική στοιβάδα. Ακολούθως αναμίχθηκε με 500 μl χλωροφορμίου και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 16000 x g, ώστε να απομακρυνθεί η φαινόλη που τυχόν παρέμεινε στο δείγμα. Η αποπρωτεϊνωμένη υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέους φυγοκεντρικούς σωλήνες και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίστηκαν με αιθανόλη. Συγκεκριμένα επωάστηκαν ολονύκτια στους –20° C με 2 όγκους ψυχρής απόλυτης αιθανόλης και 1/10 όγκου διαλύματος 3 M οξικού νατρίου pH 5,2. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g για 15 λεπτά στους 4° C και η στοιβάδα που κατακρημνίστηκε ξεπλύθηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες με 70 % ψυχρής αιθανόλης για την απομάκρυνση αλάτων και μικρών οργανικών μορίων. Στην συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και η στοιβάδα που περιείχε το DNA και το RNA αφού ξηράθηκε σε θερμοκρασία δωματίου επαναιωρήθηκε σε διάλυμα Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Τέλος για την απομάκρυνση του RNA τα δείγματα επωάστηκαν στους 37° C για 2 ώρες με 50 μg βρασμένης RNάσης.

### 2.8.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA

Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων (φωτόμετρο MBA 2000, PERKIN ELMER) στην περιοχή του υπεριώδους. Τα νουκλεϊκά οξέα επιδεικνύουν μέγιστη απορρόφηση στα 260 nm η οποία είναι περίπου ανάλογη με τη συγκέντρωση του DNA. Εμπειρικά υπολογίζεται ότι συγκέντρωση DNA ίση με 50 μg/ml έχει $A_{260}$ ίση με 1. Επιπλέον το πηλίκο $A_{260}/A2_{80}$ είναι χαρακτηριστικό για την καθαρότητα του DNA. Υψηλής καθαρότητας DNA απαλλαγμένο από προσμίξεις πρωτεϊνών ή RNA έχει $A_{260}/A_{280}$ ~ 1.8. Μικρότερο πηλίκο αντιστοιχεί σε παρασκεύασμα που περιέχει ανάλογες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, ενώ όταν το πηλίκο είναι ~ 2 το δείγμα περιέχει RNA.

### 2.8.3 Ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης

Για την ηλεκτροφόρηση του DNA, 20 μg αναμίχθηκαν με το διάλυμα φόρτωσης σε αναλογία 5:1 (v/v). Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει 0.02 % μπλε της βρωμοφαινόλης και 40 % γλυκερόλη σε TBE (89 mM Tris, 89 mM Βορικό οξύ, 2.5 μM EDTA pH 8,0). Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων του DNA πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1,8 % σε TBE στην οποία προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml. Η πηκτή αγαρόζης παρασκευάστηκε όπως αναφέρεται αναλυτικά στο βιβλίο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Maniatis et al., 1989). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα TBE σε συνθήκες 5 Volts/cm για περίπου 1 ώρα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εκτίθεται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (302 nm) προκειμένου να γίνουν ορατά τα σύμπλοκα του DNA με το βρωμιούχο αιθίδιο. Η αποθήκευση των αποτελεσμάτων έγινε με φωτογράφηση σε ψηφιακή κάμερα και μεταφορά σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (KODAK Digital Science 1D).

## 2.9 Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

### 2.9.1 Ολικό εκχύλισμα με υπέρηχους

Για την απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε ψυχρό διάλυμα λύσης που περιείχε 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 1% SDS, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5 mM DTT, 1mM PMSF, 10 μg/ml pepstatin και aprotinin και 20 μg/ml leupeptin.

Μετά από 10 λεπτά επώαση στον πάγο, τα κύτταρα λύθηκαν με επίδραση υπέρηχων (BRANSON Digital Sonifier) για 30 δευτερόλεπτα (3 φορές από 10 δεύτερόλεπτα) και βράστηκαν για 10 λεπτά στους 65° C. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g για 20 λεπτά στους 4° C και το υπερκείμενο που αντιστοιχεί στις ολικές πρωτεΐνες του κυττάρου χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του πυρηνικού ενζύμου της PARP με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Western blot).

### 2.9.2 Κυτταροπλασματικό εκχύλισμα

Οι πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος απομονώθηκαν όπως περιγράφηκε από τον Nicholson και τους συνεργάτες (Nicholson et al., 1995). Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε ψυχρό διάλυμα λύσης που περιείχε 10 mM Hepes/KOH, pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.1 % CHAPS, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 μg/ml pepstatin και aprotinin και 20 μg/ml leupeptin. Μετά από επώαση στον πάγο για 20 λεπτά, τα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά και φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g στους 4° C για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο που αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος, χρησιμοποιήθηκε για τον φθορισμομετρικό προσδιορισμό της ενεργότητας των κασπασών και την ανίχνευση των κασπασών -3, -7, -9 , -8 και της πρωτεΐνης Bid με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης.

### 2.9.3 Διαχωρισμός των μιτοχονδριακών και των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών

Το πρώτο βήμα για την απομόνωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών του υδατοδιαλυτού κυτταροπλάσματος είναι ο διαχωρισμός των μιτοχονδρίων από το κυτταρόπλασμα που έγινε σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφηκε από τον Yang και τους συνεργάτες του (Yang et al., 1997). Τα κύτταρα (100 x $10^6$) επαναιωρήθηκαν σε πενταπλάσιο όγκο ψυχρού ισοτονικού με τα μιτοχόνδρια διαλύματος που περιείχε 20 mM Hepes, pH 7,4, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 5 mM DTT, 250 mM σουκρόζη, 1 mM PMSF και 10 μg/ml aprotinin, pepstatin και leupeptin. Διαβιβάστηκαν 20 φορές μέσα από θραυσματοποιητή κυττάρων (EMBL, Mechanical Workshop), μέχρι το 60% τουλάχιστον των κυττάρων να γίνουν θετικά σε Trypan blue. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στα 700 x g, για 6 λεπτά στους 4° C ώστε να απομακρυνθούν τα ανέπαφα κύτταρα και οι πυρήνες. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε περαιτέρω στα 10000 x g για 10 λεπτά στους 4° C. Τα μιτοχόνδρια που καταβυθίζονται κάτω από αυτές τις συνθήκες ξεπλύθηκαν δύο φορές με το ίδιο ισοτονικό διάλυμα και χρησιμοποιήθηκαν για την

απομόνωση των πρωτεϊνών των μιτοχονδρίων όπως αναφέρεται στην συνέχεια. Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των πρωτεϊνών του υδατοδιαλυτού μέρους του κυτταροπλάσματος.

Στην συνέχεια τα μιτοχόνδρια που απομονώθηκαν στο προηγούμενο στάδιο, λύθηκαν με επαναιώρηση για 15 λεπτά σε ψυχρό διάλυμα RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 % Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM PMSF) και τα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά και φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 x g για 20 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του κυτοχρώματος c και της πρωτεΐνης AIF με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης.

Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών στο υδατοδιαλυτό μέρος του κυτταροπλάσματος, το υπερκείμενο των 10000 x g από την απομόνωση των μιτοχονδρίων (~0,5 ml), φυγοκεντρείται περαιτέρω στα 100000 x g για 1 ώρα στους 4° C (Optima™ Ultracentrifuge, Beckman). Στις συνθήκες αυτές καθιζάνουν άλλα οργανίδια του κυττάρου (όπως τα λυσσωσωμάτια τα ριβοσωμάτια τα πολυσωμάτια αλλά και οι μιτοχονδριακές μεμβράνες) και το υπερκείμενο που προκύπτει (S-100 κλάσμα) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του κυτοχρώματος c, και του Apaf-1.

### 2.9.4 Απομόνωση πυρηνικού εκχυλίσματος

Για την απομόνωση των πρωτεϊνών του πυρήνα, ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε από τους Wolgemuth και Hsu (Wolgemuth et al., 1981). 10 x $10^6$ κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 1 ml ψυχρού διαλύματος TITE (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM EDTA, 0.02 % v/v Triton-X) και αφέθηκαν για 5 λεπτά στον πάγο. Τα κύτταρα αναδεύτηκαν ισχυρά και το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετήθηκε πάνω σε 0,4 ml σουκρόζης συγκέντρωσης 10 % σε διάλυμα TITE. Μετά από 5 λεπτά φυγοκέντρηση στα 250 x g, στους 4° C, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και η πυρηνική στοιβάδα που καταβυθίστηκε λύθηκε με επαναιώρηση στο διάλυμα TITE και επώαση για 15 λεπτά στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στα 16000 x g στους 4° C και το υπερκείμενο που αποτελεί τις πρωτεΐνες του πυρήνα χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του AIF.

## 2.10 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα παραπάνω εκχυλίσματα προσδιορίστηκε με την μέθοδο "protein microassay" της Bio-Rad, που βασίζεται στην μέθοδο Bradford. Η μέθοδος στηρίζεται στην μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης από τα 465 nm στα 595 nm όταν το Coomassie Brilliant Blue G-250 δεσμευτεί σε πρωτεΐνες κάτω από όξινες συνθήκες. Αναλυτικά η μέθοδος έχει ως εξής: Σε 800 μl από τα άγνωστα δείγματα πρωτεΐνης προστέθηκαν 200 μl του αντιδραστηρίου της Bio-Rad. Μετά από έντονη ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα άγνωστα δείγματα προσδιορίστηκε με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την οποία χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης από ορό βοός (BSA).

## 2.11 Εξέταση σχηματισμού του αποπτωσώματος

Για την εξέταση του σχηματισμού του αποπτωσώματος, υδατοδιαλυτό μέρος του κυτταροπλάσματος μετά από υπερφυγοκέντρηση στα 100000 x g, (S-100 κλάσμα) μεταφέρθηκε σε φυγοκεντρικούς σωλήνες που περιείχαν 8 ml διαλύματος γραμμικής βαθμίδωσης σουκρόζης 10-50 % σε διάλυμα 10 mM Tris pH 7, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.25 mM PMSF. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 35000 x g για 6 ώρες στους $4^o$ C (U8-70 Ultracentrifuge, BECKMAN). Ακολούθως συλλέχθηκαν 9 κλάσματα του 1 ml τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της πρωτεΐνης Apaf-1 με την τεχνική της ανοσοαπωτύπωσης.

## 2.12 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή δωδεκυλοθειϊκού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου

Οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνθήκες αποδιάταξης της φυσικής δομής τους. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου είναι προϊόντα συνπολυμερισμού του ακρυλαμιδίου ($CH_2$=CH–CO–$NH_2$) και του N,N μεθυλένο-δις-ακρυλαμιδίου ($CH_2$=CH–CO–NH–$CH_2$–NH–CH=$CH_2$) και αποτελούν ηλεκτρικά ουδέτερα, υδρόφιλα, τρισδιάστατα πλέγματα που το μέγεθος των πόρων τους εξαρτάται από την ολική συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός

επιτυγχάνεται μέσω της απελευθέρωσης ελευθέρων ριζών από το υπερθειϊκό αμμώνιο ($(NH_4)_2S_2O_8$, APS) με καταλύτη την N,N,N',N' - τετραμέθυλο - αιθυλοδιαμίνη (TEMED) που καταλύει την διάδοση των ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού. Ο αποδιατακτικός παράγοντας είναι το ανιονικό απορρυπαντικό δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (Sodium-Dodecyl Sulfate, SDS) γι' αυτό και η ηλεκτροφόρηση χαρακτηρίζεται ως ηλεκτροφόρηση σε πηκτή δωδεκυλοθειϊκού νατρίου - πολυακρυλαμιδίου (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE).

Το σύστημα της πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο διαφορετικές πηκτές, την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel ή running gel) και την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel), που παρασκευάστηκαν όπως αναφέρεται αναλυτικά στο βιβλίο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Maniatis et al., 1989). Στην πηκτή επιστοίβαξης γίνεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματος πριν εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού και περιέχει 5% ακρυλαμίδιο (w/v), 0,125 M Tris pH=6,8 και 0,1 % (w/v) APS και SDS. Οι πρωτεΐνες εισέρχονται στη συνέχεια στην πηκτή διαχωρισμού που έχει την απαιτούμενη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Η πηκτή διαχωρισμού περιέχει 8, 10, 12 ή 15% ακρυλαμίδιο (w/v), 0,39 M Tris pH=8,8, 0,1% SDS και APS. Συγκεκριμένα η κασπάση-3, η κασπάση-7, το κυτόχρωμα c και η πρωτεΐνη Bid διαχωρίστηκαν σε πηκτή 15%, η κασπάση-9, η κασπάση-8 και ο AIF σε πηκτή 12%, ο Apaf-1 σε πηκτή 10% και η PARP σε πηκτή 8% SDS-ακρυλαμιδίου.

Τα δείγματα των πρωτεϊνών (50 μg) μεταφέρθηκαν στο σύστημα της πηκτής αφού πρώτα μετουσιώθηκαν με βρασμό επί 3 λεπτά στους 100° C, με το διάλυμα δείγματος. Το διάλυμα δείγματος (0,25 M Tris/HCl pH 6,8, 9,2% SDS, 40% (w/v) γλυκερόλη, 0,2% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης και 100 mM DTT) αναμίχθηκε σε αναλογία 1:3 (v/v) με το πρωτεϊνικό δείγμα και ο βρασμός διευκόλυνε την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών: το DTT ανήγαγε τους δισουλφιδικούς δεσμούς ενώ το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες σε αναλογία περίπου 1,4 g SDS ανά gr πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα όλες οι πρωτεΐνες του δείγματος να εμφανίζουν περίπου το ίδιο αρνητικό φορτίο ανά μονάδα μάζας. Έτσι η ταχύτητα μετατόπισης της πρωτεΐνης στην πηκτή κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου εξαρτάται μόνο από το μοριακό της βάρος.

Εκτός από τα δείγματα τοποθετήθηκε στην πηκτή και μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. Οι πρωτεΐνες αυτές ήταν συνδεδεμένες με διαφορετικές χρωστικές: μυοσίνη 285 kDa (μπλέ), β-γαλακτοσιδάση 145 kDa (τιρκουάζ), αλβουμίνη από ορό βοός 66 kDa (ροζ), αλβουμίνη ωού 45 kDa (κίτρινο), καρβονική ανυδράση 29 kDa (πορτοκαλί),

αναστολέας τρυψίνης 20 kDa (πράσινο), α-λακταλβουμίνη 14.2 kDa (μωβ), απροτινίνη 6.5 kDa (μπλε).

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα που περιέχει 0,025 M Tris, 0,198 M γλυκίνη και 0,1 % SDS, στα 150 Volts για περίπου 1 ώρα (συσκευή MINI – PROTEAN II , BIO-RAD).

## 2.13 Αποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

### 2.13.1 Μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη

Μετά τον ηλεκροφορητικό διαχωρισμό σε πηκτή SDS-πολυακριλαμιδίου, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, η πηκτή και διηθητικό χαρτί Whatman, παρέμειναν για 5 λεπτά στο διάλυμα μεταφοράς (0.025 mM Tris, 0,190 M γλυκίνη, 20% μεθανόλη). Στη συνέχεια η μεμβράνη μεταφέρθηκε πάνω από την πηκτή, τοποθετήθηκαν ανάμεσα από το χαρτί Whatman και όλα μαζί μεταφέρθηκαν σε συσκευή μεταφοράς (MINI TRANS – BLOT ELECTROPHORETIC TRANFER CELL I, BIO – RAD) σχηματίζοντας ένα σάντουιτς με την μεμβράνη να βρίσκεται προς τον θετικό πόλο. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στο διάλυμα μεταφοράς στα 250 mAmp για 4 ώρες ή στα 60 mAmp για 16 ώρες. Το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,45 μm εκτός από την περίπτωση του κυτοχρώματος c που χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη πόρων 0,2 μm.

### 2.13.2 Αποτύπωση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά το πέρας την ηλεκτροφόρησης, η μεμβράνη ξεπλύθηκε μια φορά με PBS. Για να εξεταστεί εάν είχε λάβει χώρα σωστή μεταφορά από την πηκτή στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και αν ίσες ποσότητες δείγματος είχαν φορτωθεί στην πηκτή, έγινε χρώση των πρωτεϊνών με 0.2 % Ponceau S σε 1% οξικό οξύ για 30 δευτερόλεπτα. Η μεμβράνη ξεπλύθηκε με νερό για μερικά δευτερόλεπτα και ελέγχθηκαν οι πρωτεΐνες που μεταφέρθηκαν. Στη συνέχεια αποχρωματίστηκε με PBS και ακολούθησε η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης.

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάστηκε υπό ανατάραξη με διάλυμα δέσμευσης (blocking buffer) που περιείχε 5 % άπαχο γάλα σε TBST (10 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl

και 0,1% Tween-20) εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Η επώαση με το διάλυμα αυτό δεσμεύει όλες οι ελεύθερες θέσεις πάνω στην νιτροκυτταρίνη. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάστηκε επίσης υπό ανατάραξη με ειδικό αντίσωμα έναντι της κάθε πρωτεΐνης σε κατάλληλη αραίωση και σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα ή ολονύκτια στους 4° C. Ακολούθησε επώαση με αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών συνδεδεμένο με υπεροξειδάση κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα:

Για την ανίχνευση των κασπασών-3, -7, -8 και -9, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάστηκε με το διάλυμα δέσμευσης, υπό ανατάραξη για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με υπεροξειδάση έναντι της κασπάσης-3, με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της κασπάσης-7, με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της κασπάσης-8, ή με πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της κασπάσης-9 αντίστοιχα. Τα αντισώματα αραιώθηκαν σε 0.5 % γάλα σε TBST σε συγκέντρωση 0,5 μg/ml εκτός από το αντίσωμα έναντι της κασπάσης-9 που αραιώθηκε σε συγκέντρωση 0,2 μg/ml. Η μεμβράνη ξεπλύθηκε για 20 λεπτά με PBS αλλάζοντας το διάλυμα έκπλυσης κάθε 5 λεπτά.

Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών PARP, Bid, κυτόχρωμα c και AIF η μεμβράνη επωάστηκε με διάλυμα δέσμευσης υπό ανατάραξη για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της PARP σε συγκέντρωση 0,4 μg/ml, με μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της Bid σε συγκέντρωση 0,2 μg/ml με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι του κυτοχρώματος c (0,2 μg/ml) ή με πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του AIF σε συγκέντρωση 0,2 μg/ml αντίστοιχα, στο διάλυμα δέσμευσης. Οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν για 30 λεπτά με TBST αλλάζοντας το διάλυμα έκπλυσης κάθε 5-10 λεπτά.

Για την ανίχνευση του Apaf-1 η μεμβράνη επωάστηκε υπό ανατάραξη με διάλυμα δέσμευσης που περιείχε 2 % άπαχο γάλα σε 10 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl και 0,05% Tween-20 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάστηκε ολονύκτια υπό ανατάραξη με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι του Apaf-1 σε συγκέντρωση 0.5 μg/ml σε 1 % άπαχο γάλα σε 10 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl και 0,05% Tween-20, στους 4° C. Η μεμβράνη ξελύθηκε για 30 λεπτά με το διάλυμα στο οποίο επωάστηκε το αντίσωμα αλλάζοντας το διάλυμα έκπλυσης κάθε 5 λεπτά.

Μετά το πρώτο αντίσωμα ακολούθησε επώαση με αντίσωμα αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού (για την ανίχνευση της κασπάσης-7, της κασπάσης-8, της PARP, του κυτοχρώματος c και του Apaf-1) ή με αντίσωμα αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού

(για την κασπάση-9, την Bid και τον AIF), συνδεδεμένο με υπεροξειδάση. Τα αντισώματα αυτά αραιώθηκαν 1 προς 6000 στο ίδιο διάλυμα που έγινε και η αραίωση του πρώτου αντισώματος. Ακολούθως η μεμβράνη ξεπλύθηκε με τον ίδιο τρόπο που έγινε η έκπλυση του πρώτου αντισώματος.

### 2.13.3 Ανίχνευση πρωτεϊνών με την μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας στηρίζεται στην ανίχνευση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται κατά την αποδιέγερση ενός παραγώγου της λουμινόλης. Η λουμινόλη οξειδώνεται από την υπεροξειδάση παρουσία $H_2O_2$ σε αλκαλικές συνθήκες σύμφωνα με την αντίδραση 15:

$$\text{Λουμινόλη} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{υπεροξειδάση}} \text{παράγωγο λουμινόλης} + N_2 + \text{φως} \qquad (15)$$

Αμέσως μετά την οξείδωση η λουμινόλη βρίσκεται στην διηγερμένη κατάσταση και στην συνέχεια καταλήγει στη θεμελιώδη κατάσταση με εκπομπή φωτεινής ακτινοβολίας. Η εκπομπή της ακτινοβολίας ενισχύεται περίπου 1000 φορές και η διάρκειά της παρατείνεται όταν η αντίδραση γίνεται παρουσία χημικών ενισχυτών όπως οι φαινόλες. Η μέγιστη ακτινοβολία η οποία παρατηρείται 5-20 λεπτά μετά την αντίδραση έχει μήκος κύματος 428 nm και ανιχνεύεται μετά από έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

Για την ανίχνευση του σήματος με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, η μεμβράνη μετά την επεξεργασία με τα αντισώματα επωάστηκε με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (0,125 ml υποστρώματος/$cm^2$ μεμβράνης) για 1 λεπτό. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετείθηκε ανάμεσα από διαφανή ζελατίνα και εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ για διάφορους χρόνους από μερικά δευτερόλεπτα μέχρι και λίγα λεπτά, ώστε να ληφθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. Μετά την έκθεση το φιλμ εμφανίστηκε με τοποθέτηση επί 3 λεπτά στο διάλυμα εμφάνισης και μονιμοποίηση του σήματος με τοποθέτησή του στο διάλυμα μονιμοποίησης για 7 λεπτά.

## 2.14 Μέτρηση της ενεργότητας των κασπασών -3 και -7

Η ενεργότητα της κασπάσης 3 μετρήθηκε φθορισμομετρικά όπως περιγράφηκε από τον Nicholson και τους συνεργάτες του (Nicholson et al., 1995). Χρησιμοποιήθηκε το φθορογόνο υπόστρωμα Ac-DEVD-AMC (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-Methyl-Coumarin). Το τετραπεπτίδιο DEVD σχάζεται από την ενεργοποιημένη κασπάση-3 της οποίας αποτελεί υπόστρωμα, και απελευθερώνεται η φθορίζουσα ουσία AMC. Επειδή το τετραπεπτίδιο DEVD σχάζεται σε μικρότερο ποσοστό και από άλλες ενεργοποιημένες κασπάσες (-7, -6, -8, -10) η ενεργότητα που μετρείται με την μέθοδο αυτή καλείται και caspase-3-like ή ενεργότητα DEVDase.

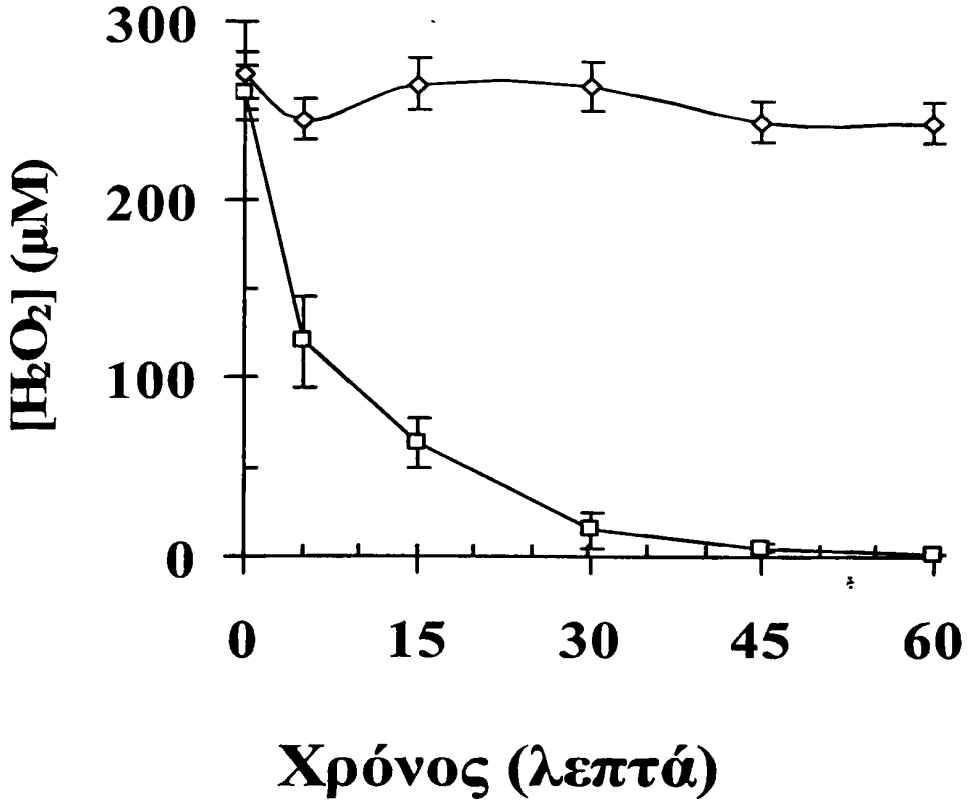
Για την μέτρηση της ενεργότητας των κασπασών, 150 μg κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος επωάστηκε για 1 ώρα στους 37° C με το διάλυμα αντίδρασης (100 mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1 % CHAPS και 10 mM DTT) που περιείχε 100 μM του φθορογόνου υποστρώματος Ac-DEVD-AMC. Η πυκνότητα του φθορισμού από το AMC που απελευθερώνεται μετρήθηκε σε φθορισμόμετρο με διέγερση στα 380 nm και εκπομπή στα 460 nm. Όπου οι τιμές φθορισμού είναι ιδιαίτερα υψηλές, τα δείγματα αραιώθηκαν και έγινε μετά την μέτρηση η διόρθωση στην απορρόφηση.

# 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 3.1. Έκθεση κυττάρων σε $H_2O_2$

Παρ' ότι οι επιπτώσεις της έκθεσης των κυττάρων σε $H_2O_2$ έχουν μελετηθεί εκτενώς, οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους αυτό δρα και προκαλεί βλάβες στα κυτταρικά συστατικά παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι. Στις περισσότερες δημοσιεύσεις, το $H_2O_2$ προστίθεται άμεσα με αποτέλεσμα την απότομη αύξηση της συγκέντρωσής του στο καλλιεργητικό υλικό αλλά και στο εσωτερικό των κυττάρων, καθώς αυτό διαχέεται ελεύθερα διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών (Antunes and Cadenas, 2000). Από την στιγμή όμως που το $H_2O_2$ εισέλθει στο κύτταρο, αρχίζει η αποικοδόμησή του από αμυντικούς ενζυμικούς μηχανισμούς, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή. Σύμφωνα με τα πειράματα που έγιναν στην μελέτη αυτή για την εκτίμηση της συγκέντρωσης του $H_2O_2$ στην καλλιέργεια (σχήμα 11), αλλά και από μελέτες άλλων εργαστηρίων (Antunes and Cadenas, 2000) φαίνεται ότι η αποικοδόμηση του $H_2O_2$ από τα κύτταρα ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης. Για τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (Jurkat, κλώνος E6-1) και για τις συνθήκες αυτής της μελέτης ($1,5 \times 10^6$ κύτταρα/ml), ο χρόνος ημιζωής του εκτιμήθηκε περίπου ίσος με 8 λεπτά. Κατά συνέπεια, όταν το $H_2O_2$ προστίθεται άμεσα στο καλλιεργητικό υλικό, τα κύτταρα εκτίθενται αρχικά σε υψηλές συγκεντρώσεις οι οποίες στη συνέχεια μειώνονται και μέσα σε 45 περίπου λεπτά έχει εξαφανιστεί πλήρως από την καλλιέργεια (σχήμα 11). Αντίθετα, σε πειράματα που έγιναν απουσία κυττάρων αλλά σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640, η προστιθέμενη συγκέντρωση του $H_2O_2$ παρέμεινε σταθερή για αρκετές ώρες, γεγονός που αποδεικνύει ότι η μείωσή του στην καλλιέργεια οφείλεται στην αποικοδόμησή του από τα κύτταρα και όχι στην αντίδρασή του με συστατικά του θρεπτικού μέσου (σχήμα 11).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε επίσης ένας άλλος τρόπος έκθεσης των κυττάρων σε $H_2O_2$, ο οποίος εξασφαλίζει την συνεχή έκθεση σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις $H_2O_2$. Αυτό επιτεύχθηκε με την προσθήκη του ενζύμου της οξειδάσης της γλυκόζης (GO) στο καλλιεργητικό υλικό. Οι συγκεντρώσεις του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτής της μελέτης κυμαίνονταν από 1 έως 1000 ng/ml. Υπολογίστηκε ότι οι ποσότητες αυτές δημιουργούν από 0.02 έως 20 μM $H_2O_2$ / λεπτό. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να ρυθμίσουμε επιλεκτικά την ταχύτητα δημιουργίας $H_2O_2$ και




**Σχήμα 11: Μέτρηση της συγκέντρωσης του $H_2O_2$ στο καλλιεργητικό υλικό παρουσία ή απουσία κυττάρων.**

$H_2O_2$ (250 μM) προστέθηκε σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (◊) ή σε καλλιέργεια κυττάρων Jurkat (1.5 x $10^6$ κύτταρα /ml) (□). Στη συνέχεια στους χρόνους που αναγράφονται, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και η συγκέντρωση του $H_2O_2$ μετρήθηκε στο υπερκείμενο με την μέθοδο Fox όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριπλών μετρήσεων (± SD < 10%).

χρησιμοποιώντας τις ανάλογες ποσότητες GO, να επιτύχουμε μικρές αλλαγές της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ισορροπίας.

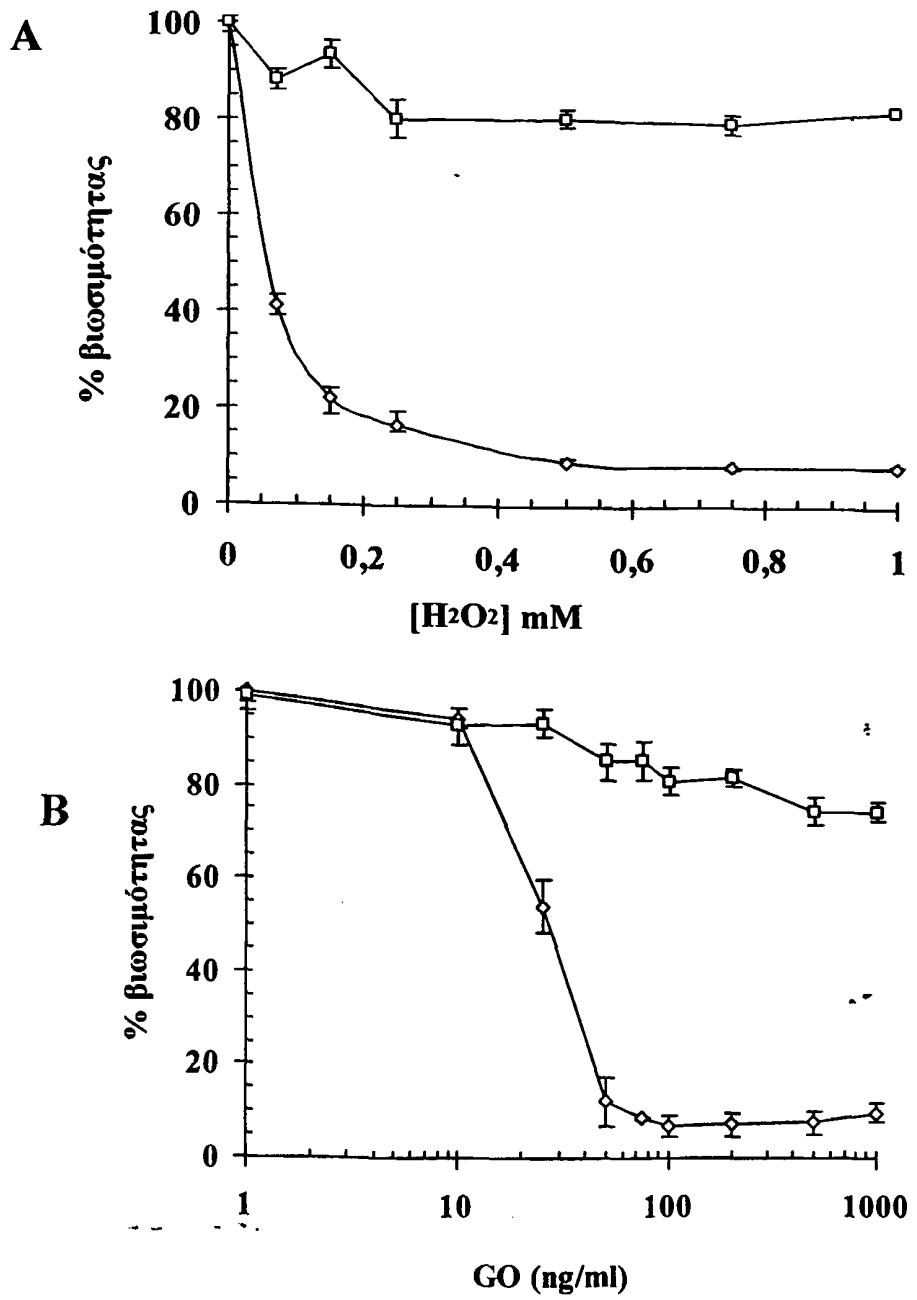
### 3.2 Βιωσιμότητα

Εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με την μέθοδο του Trypan blue, έδειξε ότι μετά από επώαση για 6 ώρες με συγκεντρώσεις $H_2O_2$ έως 1 mM ή GO έως 1000 ng/ml, περισσότερα από το 80% των κυττάρων δεν επιτρέπουν την είσοδο της χρωστικής (σχήμα 12A και 12B). Αντίθετα, όταν η βιωσιμότητα ελέγχθηκε με την μέθοδο MTT, τα κύτταρα έδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία (σχήμα 12A και 12B). Συγκεκριμένα, αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ έως και 0.5 mM οδήγησαν σε μια σταδιακή μείωση των μεταβολικά ενεργών κυττάρων, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις φαίνεται πως τα κύτταρα χάνουν εντελώς την ικανότητά τους να ανάγουν το MTT (σχήμα 12A). Όταν τα κύτταρα επωάστηκαν με συνεχώς παραγόμενο $H_2O_2$ παρατηρήθηκε μείωση των μεταβολικά ενεργών κυττάρων για συγκεντρώσεις υψηλότερες των 10 ng /ml GO (ταχύτητες παραγωγής υψηλότερες από 0.2 μM $H_2O_2$ / λεπτό). Σε συγκεντρώσεις υψηλότερες των 75 ng/ml GO (ταχύτητες παραγωγής υψηλότερες των 15 μM $H_2O_2$ / λεπτό) τα κύτταρα χάνουν πλήρως την ικανότητά τους να ανάγουν το MTT. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται πως η μέθοδος του MTT είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος για την ανάλυση της βιωσιμότητας σε σχέση με την μέθοδο του Trypan blue.

### 3.3 Επιπτώσεις στο DNA

*Έκθεση σε $H_2O_2$ για σύντομα χρονικά διαστήματα*

Ήταν ήδη γνωστό ότι το πιο ευαίσθητο από τα κυτταρικά συστατικά μετά από έκθεση κυττάρων σε $H_2O_2$ είναι το DNA (Halliwell et al., 1991, Henle et al., 1999, Stohs et al., 1995). Στα επόμενα πειράματα, κύτταρα Jurkat εκτέθηκαν σε αυξανόμενα επίπεδα συνεχώς παραγόμενου $H_2O_2$ για διαφορετικούς χρόνους και εξετάστηκε η δημιουργία σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με την τεχνική comet assay. Σε μια πρώτη φάση τα πειράματα επικεντρώθηκαν στις επιπτώσεις μέσα στην πρώτη ώρα μετά την προσθήκη του $H_2O_2$. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του ενζύμου GO από 1 έως 1000 ng ενζύμου ανά ml (απελευθερώνουν από 0,02 έως 20 μM $H_2O_2$/λεπτό).




**Σχήμα 12: Μέτρηση των βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από έκθεση σε $H_2O_2$.** Κύτταρα Jurkat (1,5 x $10^6$ / ml), επωάστηκαν για 6 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ **(A)**, ή με αυξανόμενες συγκεντρώσεις GO **(B)**. Η βιωσιμότητα των κυττάρων ως ποσοστό (%) σε σχέση με τους μάρτυρες εκτιμήθηκε με την μέθοδο Trypan Blue (□) και με την μέθοδο MTT (◊), όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριπλών μετρήσεων που δεν διέφεραν περισσότερο από 10 %.

Μετά από επώαση 10 λεπτών, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και εκτιμήθηκε το επίπεδο των σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με την μέθοδο comet assay. Στο σχήμα 13Α φαίνεται ότι σε συγκεντρώσεις του ενζύμου από 0 έως 5 ng/ml GO (0 έως 0,1 μM $H_2O_2$/λεπτό), τα επίπεδα των σχάσεων δεν διέφεραν σημαντικά από αυτό των κυττάρων μαρτύρων. Είναι φανερό ότι κάτω από αυτές τις συνθήκες οι αμυντικοί μηχανισμοί του κυττάρου υπερτερούν και απομακρύνουν το $H_2O_2$ πριν προλάβει να προκαλέσει βλάβες στο DNA. Σε ταχύτητες δημιουργίας του $H_2O_2$ 0,2 έως 2 μM $H_2O_2$/λεπτό (10 έως 100 ng/ml ενζύμου) παρατηρήθηκε μια σταδιακή, δοσοεξαρτώμενη αύξηση βλαβών στο DNA, ενώ σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 200 ng/ml GO (ρυθμός παραγωγής υψηλότερος από 4 μM $H_2O_2$/λεπτό) η βλάβη που προκλήθηκε ήταν η μέγιστη που μπορούσε να παρατηρηθεί με τη συγκεκριμένη μέθοδο.

Στη συνέχεια με βάση τα αποτελέσματα του σχήματος 13Α, επιλέχθηκαν συγκεκριμένες συγκεντρώσεις GO (1, 10, 50 και 200 ng/ml), και ελέγχθηκαν οι βλάβες που προκαλούν στο DNA σε συνάρτηση με το χρόνο επώασης. Σε συγκέντρωση 1 ng/ml ενζύμου (0,02 μM $H_2O_2$ /λεπτό) δεν ανιχνεύθηκε καμία αύξηση. Συγκέντρωση 10 ng/ml GO (εκλύει 0,2 μM $H_2O_2$/λεπτό), προκλήθηκε μεν μια προσωρινή αύξηση της βλάβης, η οποία στη συνέχεια μειώθηκε ξανά φτάνοντας στα βασικά επίπεδα των μαρτύρων παρά το γεγονός ότι το $H_2O_2$ συνέχιζε να εκλύεται στην καλλιέργεια. Αυτό το προφίλ της παροδικής αύξησης της βλάβης, παρατηρήθηκε γενικότερα και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του ενζύμου της τάξης των 25-75 ng/ml (εκλύουν 0,5-1,5 μM $H_2O_2$/λεπτό). Στις περιπτώσεις αυτές η αρχική απότομη αύξηση της βλάβης του DNA ακολουθείται από μια αισθητή μείωση η οποία όμως μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα ακολουθείται από μια επόμενη φάση αύξησης (σχήμα 13Β).

Η παροδική αύξηση της βλάβης που παρατηρήθηκε στα 10 ng/ml GO, οφείλεται πιθανά στην δράση αμυντικών μηχανισμών που καταφέρνουν να επιδιορθώσουν τις σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA, μειώνοντας έτσι την βλάβη που εντοπίζεται με την συγκεκριμένη τεχνική. Σε υψηλότερες όμως συγκεντρώσεις GO (25 έως 75 ng/ml), φαίνεται πως τα επίπεδα του $H_2O_2$ προκαλούν βλάβες που υπερνικούν τους αμυντικούς μηχανισμούς, με αποτέλεσμα η βλάβη να φτάνει τελικά σε υψηλά επίπεδα. Τέλος η βλάβη που προκλήθηκε στο DNA από συγκέντρωση 200 ng/ml GO, (ταχύτητα παραγωγής $H_2O_2$ 4 μM / min), ήταν η μέγιστη που μπορεί να ανιχνευτεί με την μέθοδο αυτή.

Στο πείραμα που περιγράφεται στο σχήμα 13Γ τα κύτταρα εκτέθηκαν για χρόνους 5, 10 ή 30 λεπτά σε 1000 ng/ml GO και στη συνέχεια το $H_2O_2$ απομακρύνθηκε με προσθήκη περίσσειας του ενζύμου της καταλάσης (10 μg, 19U). Η απομάκρυνση του $H_2O_2$ από την

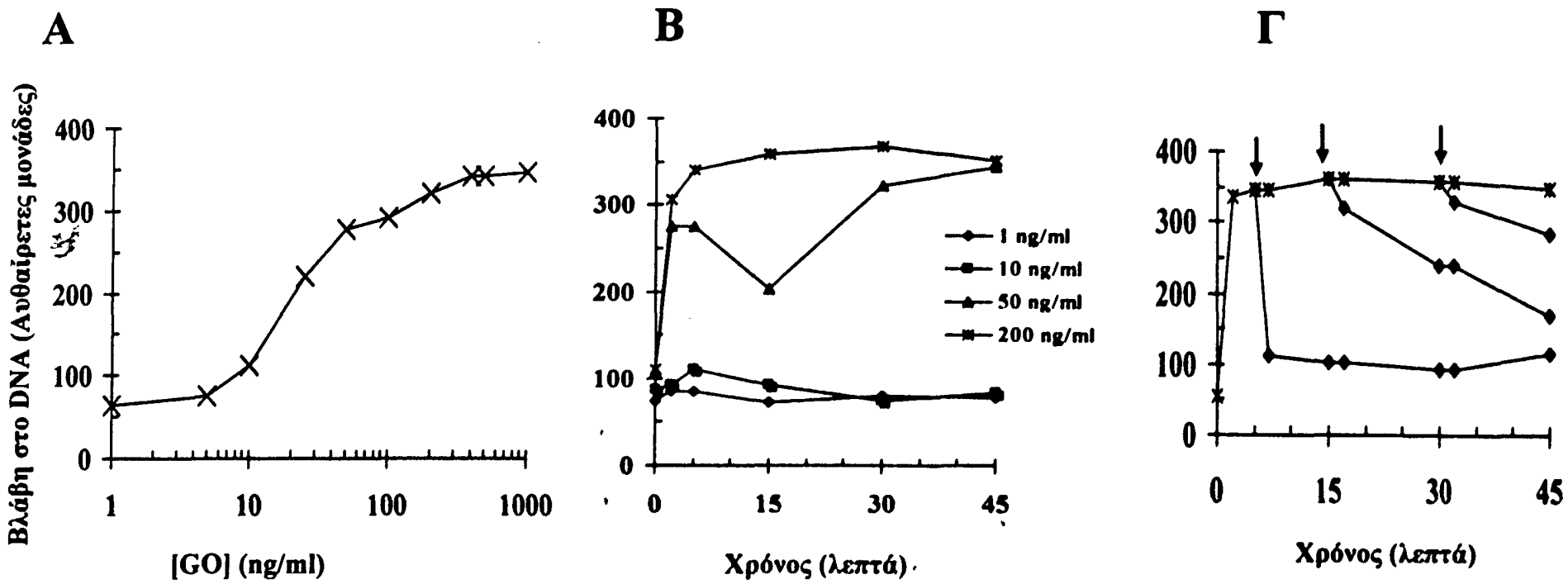
καλλιέργεια οδήγησε σε σχετικά γρήγορη μείωση των παρατηρούμενων σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA. Συγκεκριμένα όταν η καταλάση προστέθηκε στην καλλιέργεια 5 λεπτά μετά την προσθήκη της GO, οι βλάβες μειώθηκαν αμέσως και έφτασαν περίπου στα επίπεδα των κυττάρων μαρτύρων. Όταν όμως τα κύτταρα εκτέθηκαν για 15 ή 30 λεπτά σε $H_2O_2$ η μείωση των βλαβών ήταν σχετικά πιο αργή.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η βλάβη που προκαλείται στο DNA μπορεί να επιδιορθωθεί σχετικά γρήγορα, μόνο όταν το $H_2O_2$ επιδράσει για σύντομα χρονικά διαστήματα στα κύτταρα, διαφορετικά φαίνεται πως προκαλούνται μη επιδιορθώσιμες βλάβες. Ακόμη είναι πιθανό σε μεγαλύτερους χρόνους επώασης του $H_2O_2$ να επηρεάζονται οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης της βλάβης.

*Έκθεση σε $H_2O_2$ για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα*

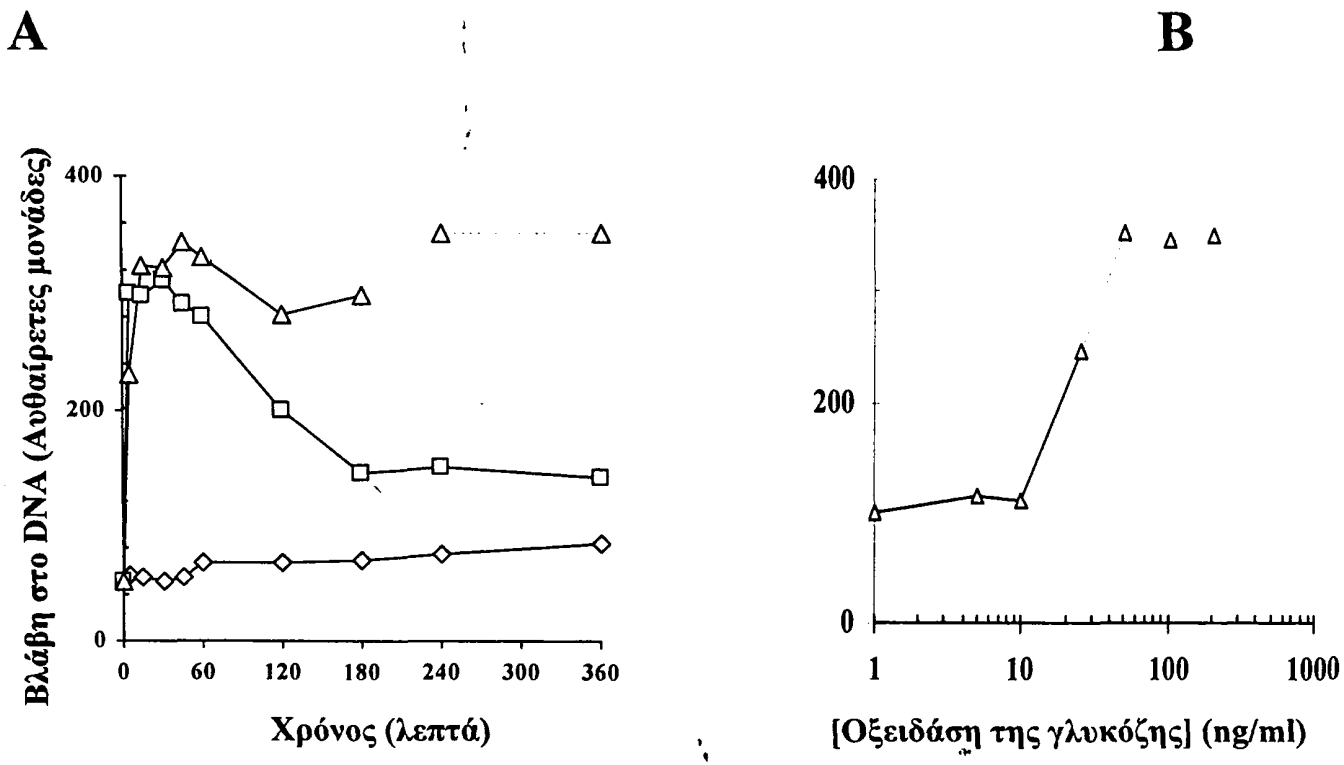
Στα επόμενα πειράματα, εξετάστηκαν οι επιπτώσεις στο DNA όταν η έκθεση στο $H_2O_2$ διήρκησε για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Όπως φαίνεται στο σχήμα 14A, προσθήκη 0,25 mM $H_2O_2$ στο καλλιεργητικό υλικό προκάλεσε μια απότομη αύξηση στις σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA η οποία όμως μειώθηκε σταδιακά μετά από 15 λεπτά, καθώς το $H_2O_2$ απομακρύνεται από τους αμυντικούς μηχανισμσύς του κυττάρου. Τρεις ώρες μετά την προσθήκη του, και ενώ το $H_2O_2$ είχε απομακρυνθεί πλήρως, η βλάβη στο DNA διατηρήθηκε σε σταθερά επίπεδα, τα οποία ήταν λίγο υψηλότερα από τα αρχικά. Το γεγονός ότι η βλάβη στο DNA παρέμεινε σε υψηλότερα επίπεδα αρκετές ώρες μετά την εξαφάνιση του $H_2O_2$, φαίνεται να υποδηλώνει ότι ένα ποσοστό των σχάσεων δεν επιδιορθώνεται. Σε αντίθεση με την απ' ευθείας προσθήκη, η έκθεση των κυττάρων σε συνεχώς παραγόμενο $H_2O_2$ (100 ng/ml GO), οδήγησε σε γρήγορη αύξηση της βλάβης που παρέμεινε στα ίδια επίπεδα για ώρες. Θα πρέπει να αναφερθεί εδώ ότι στην τελευταία περίπτωση παρατηρήθηκε επίσης ένα μεγάλο ποσοστό κυττάρων που είχε εντελώς κατεστραμμένο DNA.

Η πρόκληση τόσο σημαντικών βλαβών στο πυρηνικό DNA από την συνεχή παραγωγή του $H_2O_2$, προκάλεσε ενδιαφέρον και για το λόγο αυτό εξετάστηκε στη συνέχεια με μεγαλύτερη λεπτομέρεια. Όπως φαίνεται στο σχήμα 14B, τα κύτταρα εκτέθηκαν για 6 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις GO και εκτιμήθηκαν οι βλάβες στο DNA. Για ταχύτητες παραγωγής $H_2O_2$ έως και 10 ng/ml GO, δεν ανιχνεύθηκε αύξηση των σχάσεων σε σχέση με




**Σχήμα 13: Επιπτώσεις στο πυρηνικό DNA μετά από σύντομη έκθεση Jurkat κυττάρων σε $H_2O_2$.**

Τα κύτταρα, ($1.5 \times 10^5$ ανά 100μl) εκτέθηκαν σε **(Α)** αυξανόμενες συγκεντρώσεις GO (0 έως 1000 ng/ml) για 10 λεπτά **(Β)** 1, 10, 50 και 200 ng/ml GO, για χρόνους από 0 έως 45 λεπτά και **(Γ)** 1000 ng/ml GO για ορισμένα χρονικά διαστήματα και μετά το $H_2O_2$ απομακρύνθηκε με προσθήκη περίσσεια καταλάσης όπως υποδεικνύεται με τα βέλη. Η βλάβη στο DNA εκτιμήθηκε με την τεχνική 'comet assay' όπως αναφέρθηκε στα Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο διπλών μετρήσεων που δεν διέφεραν περισσότερο από 10%.




**Σχήμα 14: Επιπτώσεις στο πυρηνικό DNA μετά από έκθεση κυττάρων σε $H_2O_2$.**

Jurkat κύτταρα (1.5 x $10^5$ ανά 100μl), εκτέθηκαν **(A)** για διαφορετικούς χρόνους σε 0.25 mM $H_2O_2$ (□) ή σε συνεχώς παραγόμενο $H_2O_2$ από την δράση 100 ng/ml οξειδάσης της γλυκόζης (Δ), ενώ οι μάρτυρες επωάστηκαν με ίδιο όγκο διαλύματος PBS (◊). **(B)** για 6 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις οξειδάσης της γλυκόζης (0 έως 1000 ng/ml). Ακολούθως εκτιμήθηκε η βλάβη στο DNA με την τεχνική 'comet assay' όπως αναφέρθηκε στα Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιστοιχεί σε διπλές μετρήσεις που δεν διέφεραν μεταξύ τους περισσότερο από 10 %. Τα πειράματα αυτά επαναλήφθηκαν άλλες δύο φορές τα ίδια περίπου αποτελέσματα.

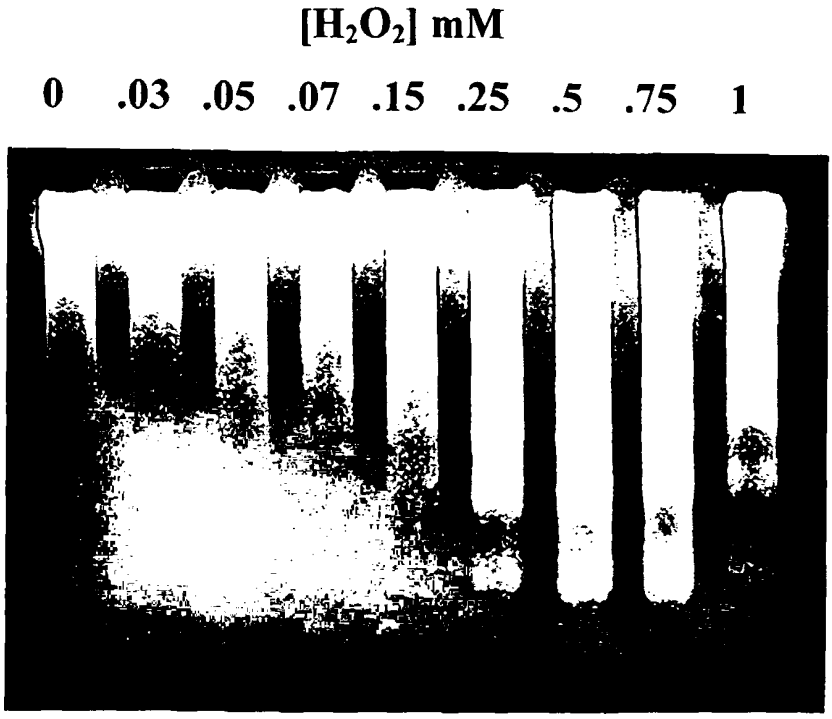
τους μάρτυρες. Συγκεντρώσεις υψηλότερες των 10 ng/ml ενζύμου προκάλεσαν σταδιακή αύξηση της βλάβης στο DNA που έφτασε στο μέγιστο που μπορεί να ανιχνευθεί με την μέθοδο αυτή. Επιπλέον για συγκεντρώσεις υψηλότερες από 50 ng/ml πολλά κύτταρα εμφάνισαν κατεστραμμένο DNA όπως περιγράφηκαν προηγουμένως. Για συγκεντρώσεις υψηλότερες των 200 ng/ml το 100 % των κυττάρων είχαν κατεστραμμένο DNA.

### 3.4 Απόπτωση

#### 3.4.1. Ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις

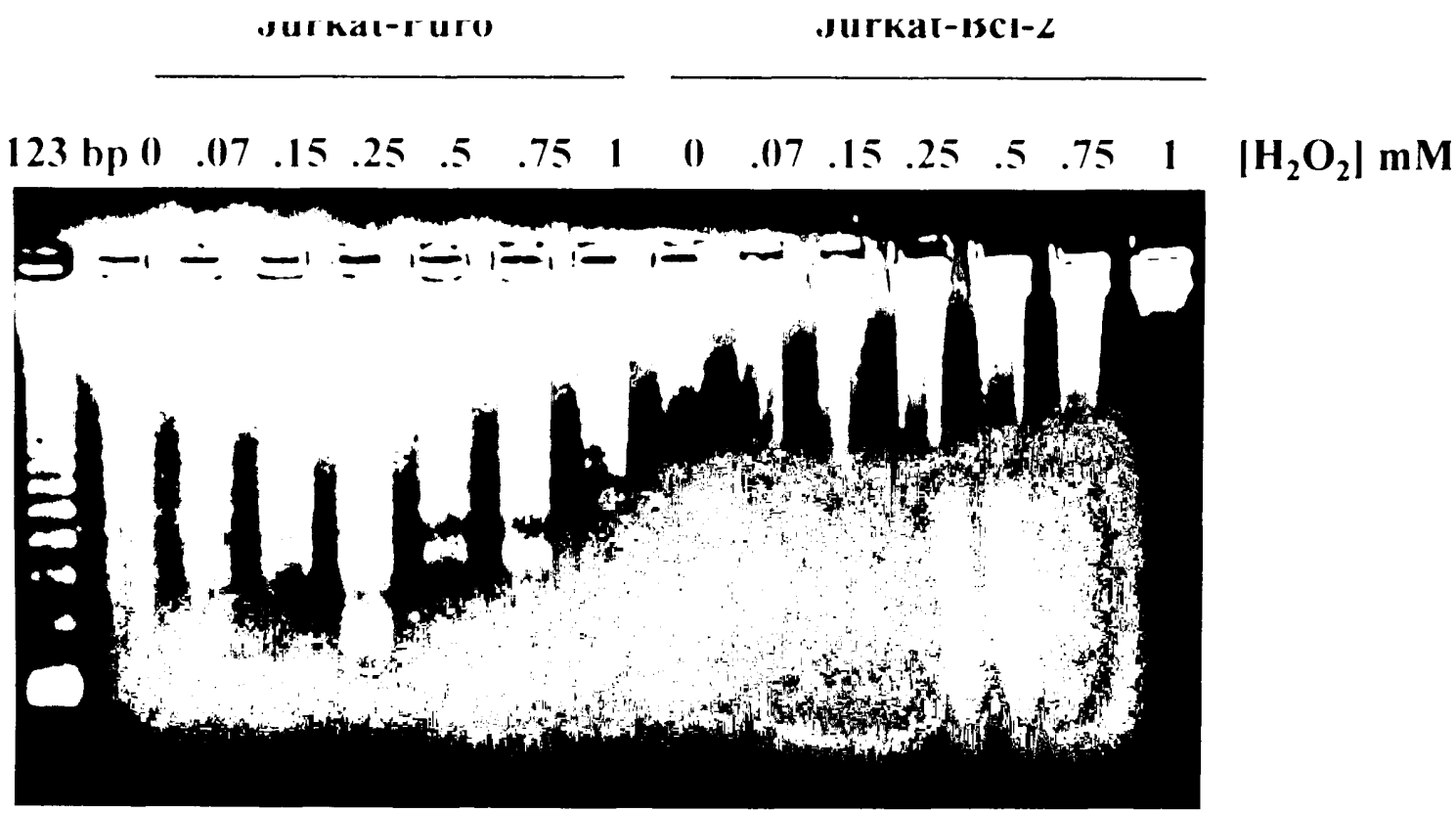
*Άμεση προσθήκη $H_2O_2$*

Είναι γνωστό ότι παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA, οδηγούν συνήθως σε κυτταρικό θάνατο είτε με απόπτωση είτε με νέκρωση. Κατά συνέπεια, μετά την εξέταση της δημιουργίας βλαβών στο DNA, εξετάστηκαν οι επιπτώσεις του $H_2O_2$ και στον κυτταρικό θάνατο. Η ενδονουκλεοσωμική σχάση της χρωματίνης, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, θεωρείται ως η πιο χαρακτηριστική αλλαγή που συμβαίνει κατά την απόπτωση, καθώς λαμβάνει χώρα στο τελευταίο στάδιο της αποπτωτικής πορείας και είναι κοινή για τα περισσότερα ερεθίσματα (Enari et al., 1998). Στο πείραμα που περιγράφεται στο σχήμα 15, εξετάστηκαν οι επιπτώσεις της άμεσης προσθήκης του $H_2O_2$ στην πρόκληση απόπτωσης. Ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις ανιχνεύθηκαν για συγκεντρώσεις $H_2O_2$ υψηλότερες των 0,15 mM και αυξήθηκαν ανάλογα με την δόση έως τα 0,.5 mM. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε μείωση των ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων χωρίς όμως να ανιχνευθεί τυχαία θραυσματοποίηση του DNA (smear), που είναι χαρακτηριστικό του νεκρωτικού θανάτου. Επιπλέον κύτταρα στα οποία είχε γίνει επιμόλυνση ούτως ώστε να υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Bcl-2, έδειξαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα (σχήμα 16). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Jurkat που επιμολύνθηκαν μόνο με ρετροϊούς (Jurkat-puro) καθώς και κύτταρα που υπερεκφράζουν την Bcl-2 (Jurkat-Bcl-2). Η επώαση για 6 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ προκάλεσε ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις στα κύτταρα Jurkat-puro, ενώ αντίθετα η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 ανέστειλε σημαντικά τις ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις που προκαλούνται από το $H_2O_2$. Παρ' όλα αυτά η προστασία που παρείχε η Bcl-2 δεν ήταν πλήρης καθώς ένα μικρό ποσοστό ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων παραμένει στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη.




**Σχήμα 15: Πρόκληση ενδονουκλεοσωμικής σχάσης μετά από έκθεση κυττάρων σε $H_2O_2$.**

Κύτταρα Jurkat (6 x $10^6$ ανά δείγμα) επωάστηκαν για 6 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ (0 έως 1mM). Ακολούθως από κάθε δείγμα απομονώθηκε το DNA και ηλεκτροφορήθηκε σε 1.8 % πηκτή αγαρόζης όπως περιγράφηκε στα Υλικά και Μέθοδοι.




**Σχήμα 16: Ο ρόλος της πρωτεΐνης Bcl-2 στην ενδονουκλεοσωμική σχάση που προκαλείται από το $H_2O_2$.** Κύτταρα Jurkat τα οποία υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Bcl-2 (Jurkat-Bcl-2) καθώς και κύτταρα που επιμολύνθηκαν μόνο με το πλασμίδιο (Jurkat-puro), επωάστηκαν για 6 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ (0 έως 1 mM). Στη συνέχεια εξετάστηκε η δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων στο πυρηνικό DNA όπως περιγράφηκε στο σχήμα 15.

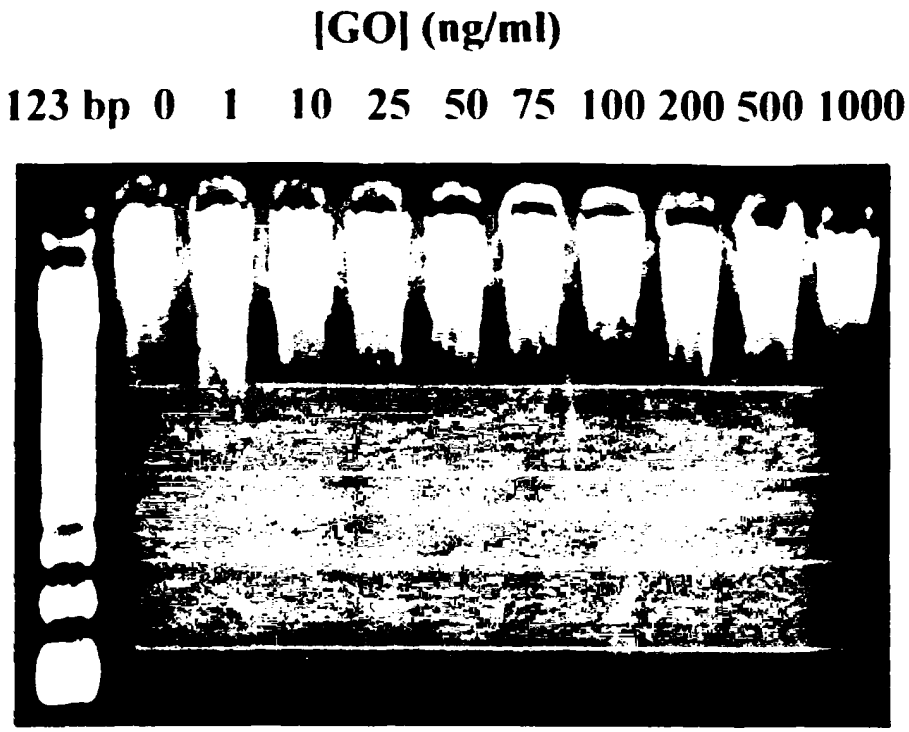
*Συνεχής έκθεση σε $H_2O_2$*

Αντίθετα με τα παραπάνω, η έκθεση σε συνεχή παραγωγή του $H_2O_2$ παρά τις σημαντικές βλάβες που προκαλεί στο DNA (βλέπε σχήμα 14) δεν οδήγησε στην πρόκληση ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων (σχήμα 17). Χρησιμοποιήθηκε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων GO, από 1 έως 1000 ng/ml, που εκλύουν από 0.02 έως 20 μM $H_2O_2$/λεπτό, αλλά σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε η χαρακτηριστική εμφάνιση τμημάτων DNA πολλαπλασίων των 180-200 βάσεων (ladder pattern) που υποδηλώνει τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων. Επιπλέον, δεν ανιχνεύθηκε τυχαία θραυσματοποίηση του DNA που να υποδηλώνει νεκρωτικό θάνατο.

Από τα αποτελέσματα αυτά, γίνεται φανερό ότι οι επιπτώσεις του $H_2O_2$ μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα τον τρόπο που τα κύτταρα εκτίθενται σε αυτό. Η άμεση προσθήκη $H_2O_2$, προκαλεί την αύξηση των ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων και συνεπώς αποπτωτικό θάνατο, ενώ αντίθετα η συνεχής παραγωγή δεν προκαλεί την εμφάνιση του χαρακτηριστικού ladder pattern στο DNA που να υποδηλώνει αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων.

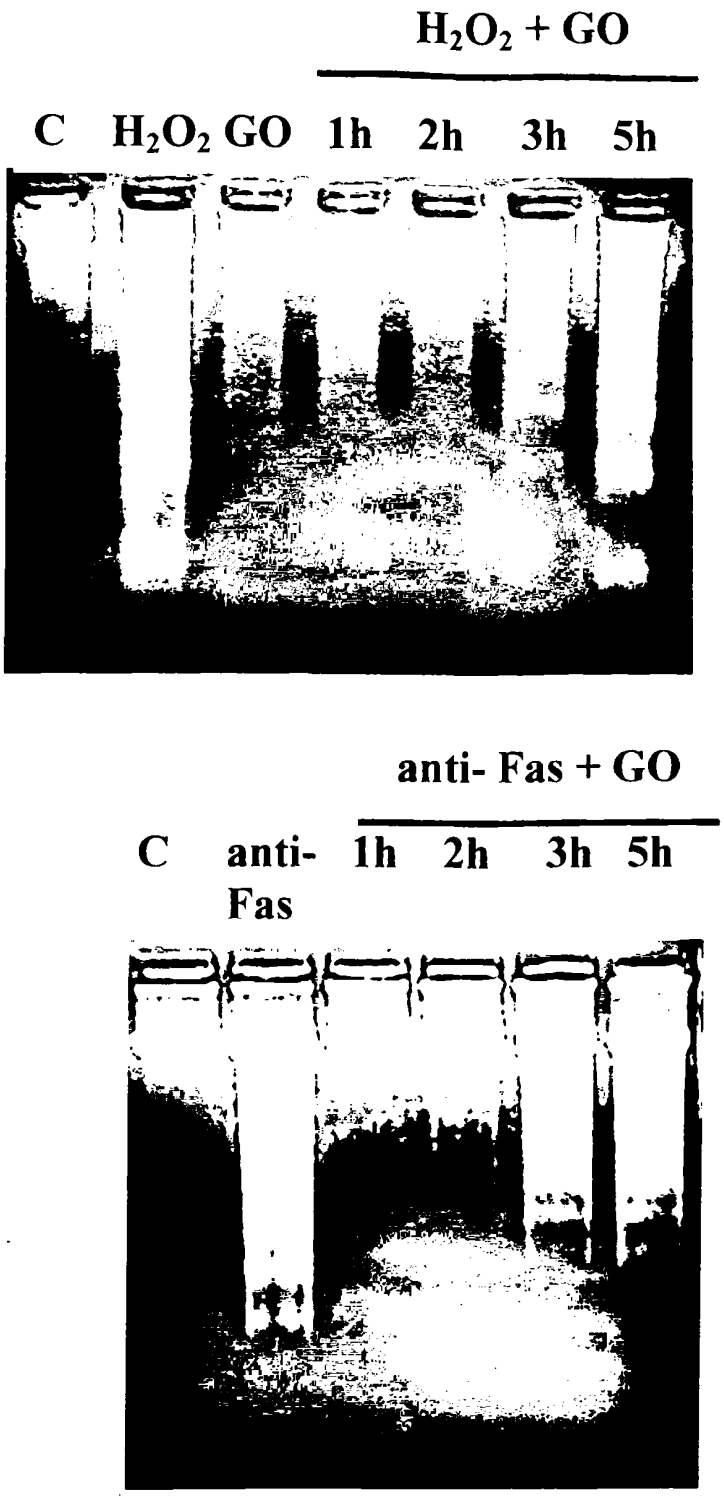
*Αναστολή της δημιουργίας ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων από το $H_2O_2$*

Στα πειράματα που παρουσιάζονται στο σχήμα 18 προκλήθηκε απόπτωση είτε διαμέσου έκθεσης κυττάρων σε $H_2O_2$ είτε διαμέσου προσθήκης μονοκλωνικού αντισώματος εναντίον του υποδοχέα Fas. Επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 0.25 mM $H_2O_2$ που όπως παρατηρήθηκε σε προηγούμενα πειράματα προκαλεί ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις σε ικανοποιητικό βαθμό, ενώ προστέθηκαν 0.5 μg/ml αντισώματος Fas που όπως ήταν γνωστό από την βιβλιογραφία ήταν ικανά να προκαλέσουν απόπτωση στο συγκεκριμένο μοντέλο (Van den Dobbelsteen et al., 1996). Μετά την προσθήκη του αποπτωτικού ερεθίσματος και στους χρόνους που αναγράφονται στο σχήμα 18 προστέθηκαν στην καλλιέργεια και 100 ng/ml GO. Συγκεκριμένα το ένζυμο προστέθηκε 1, 2, 3 ή 5 ώρες μετά το $H_2O_2$ ή το μονοκλωνικό αντίσωμα Fas. Έξι ώρες μετά την προσθήκη του αποπτωτικού ερεθίσματος, τα κύτταρα συλλέχθηκαν, απομονώθηκε το DNA και εξετάστηκαν οι ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις στο κάθε δείγμα όπως σε προηγούμενα πειράματα. Παρατηρήθηκε ότι προσθήκη του ενζύμου GO 1 ή 2 ώρες μετά το αποπτωτικό ερέθισμα ανέστειλε ολοκληρωτικά τις ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις που προκαλούνται τόσο από το $H_2O_2$ όσο και από το αντίσωμα Fas. Όταν όμως η GO προστέθηκε 3 ή 5 ώρες μετά το αρχικό ερέθισμα, η δημιουργία




**Σχήμα 17: Επιπτώσεις από τη συνεχή παραγωγή του $H_2O_2$ στην πρόκληση ενδονουκλεοσωμικής σχάσης.**

Κύτταρα Jurkat (6 x $10^6$ ανά δείγμα) επωάστηκαν για 6 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις GO (0 έως 1000 ng/ml). Στη συνέχεια εξετάστηκε η δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων στο πυρηνικό DNA όπως περιγράφηκε στο σχήμα 15.




**18: Αναστολή της ενδονουκλεοσωμικής σχάσης από την παρουσία**

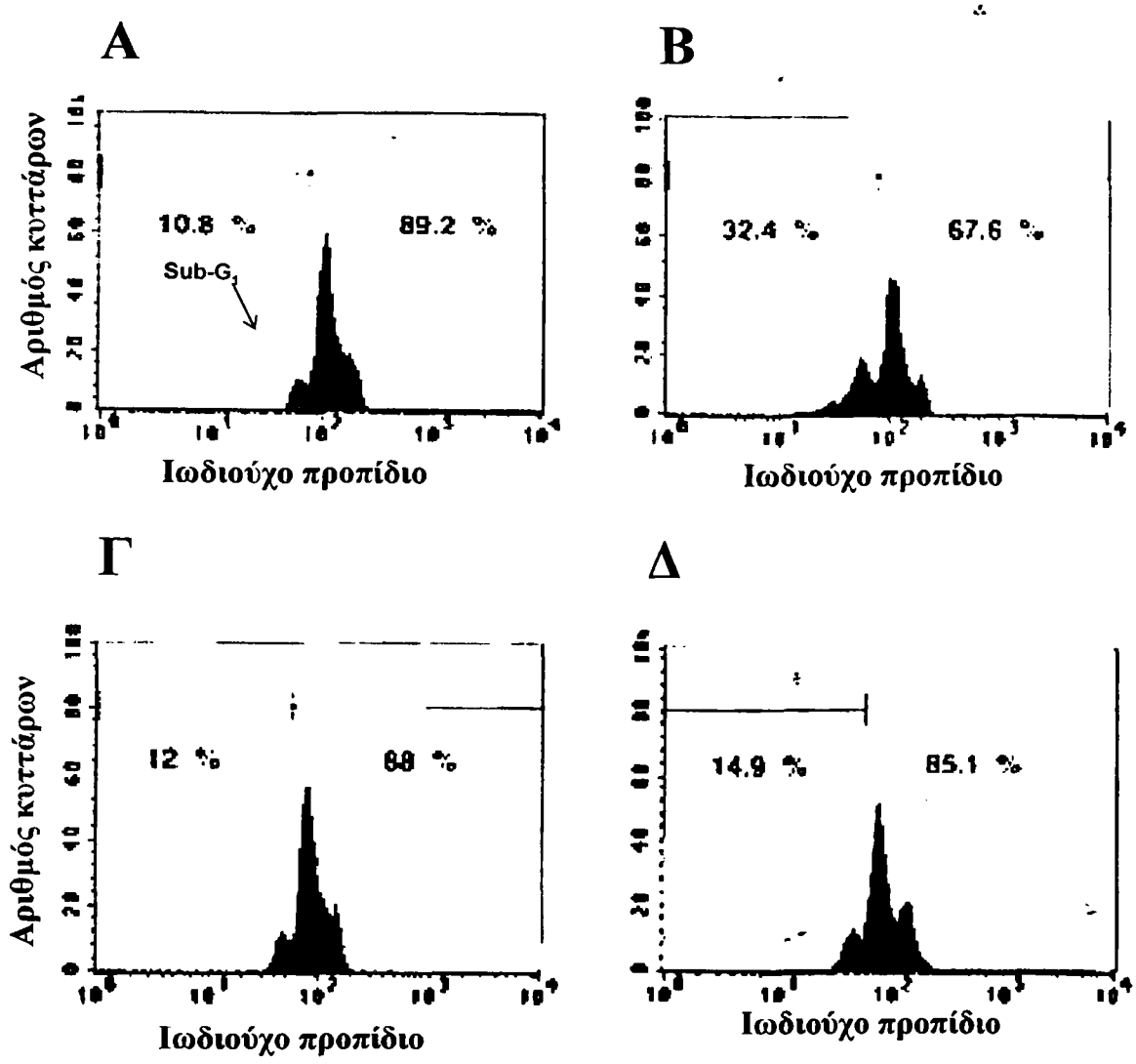
ι Jurkat επωάστηκαν με 0.25 mM $H_2O_2$ **(A)** ή με 0.5 μg/ml αντισώματος 1, 2, 3 ή 5 ώρες μετά την προσθήκη του αποπτωτικού ερεθίσματος ηκαν στην καλλιέργεια 100 ng/ml GO και 6 ώρες μετά το αρχικό ι απομονώθηκε το DNA από κάθε δείγμα και εξετάστηκε η κλεοσωμική σχάση όπως στο σχήμα 15.

ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων ανεστάλη μερικώς ή καθόλου (σχήμα 18Α και 18Β).

Τα παραπάνω πειράματα υποδηλώνουν ότι η παρουσία έστω και μικρών ποσοτήτων $H_2O_2$ στην καλλιέργεια, κατά την διάρκεια της απόπτωσης αναστέλλουν την δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων. Συγκεκριμένα, ταχύτητες δημιουργίας $H_2O_2$ της τάξεως των 2 μM/λεπτό, ανέστειλαν τις ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις που προκλήθηκαν από διαφορετικά αποπτωτικά ερεθίσματα τα οποία ενεργοποιούν είτε την ενδογενή οδό των μιτοχονδρίων είτε την εξωγενή οδό του υποδοχέα θανάτου. Η παρουσία του $H_2O_2$ στην καλλιέργεια, μέσα στις 3 πρώτες ώρες μετά την προσθήκη του αποπτωτικού ερεθίσματος, ανέστειλε πλήρως τις ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις, ενώ όταν το $H_2O_2$ προστέθηκε 3 ώρες μετά η ανασταλτική δράση του $H_2O_2$ ήταν περιορισμένη.

### 3.4.2 Μέτρηση της περιεκτικότητας των κυττάρων σε DNA με κυτταρομετρία ροής

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια και με κυτταρομετρία ροής. Έξι ώρες μετά την προσθήκη του $H_2O_2$ στα κύτταρα έγινε χρώση του πυρηνικού DNA με ιωδιούχο προπίδιο και εξετάστηκε η απόπτωση με κυτταρομετρία ροής. Με τον τρόπο αυτό ο κυτταρικός κύκλος μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις φάσεις: $G_0/G_1$, S και $G_2/M$, ανάλογα με την ποσότητα του κυτταρικού DNA. Ο πληθυσμός των κυττάρων που ανιχνεύεται πριν από την φάση $G_1$ (φάση sub-$G_1$) και ο οποίος περιέχει μικρότερο ποσοστό DNA από τα φυσιολογικά κύτταρα, θεωρείται αποπτωτικός. Όπως φαίνεται στο σχήμα 19Α ένας αποπτωτικός πληθυσμός με μικρότερη περιεκτικότητα DNA από την $G_1$ φάση (της τάξεως του 10%), ανιχνεύθηκε ακόμη και στα κύτταρα μάρτυρες. Επώαση με 0,25 mM $H_2O_2$ προκάλεσε την αύξηση αυτού του αποπτωτικού πληθυσμού σε 32% (σχήμα 19Β) σε αντίθεση με τη συνεχή παραγωγή $H_2O_2$ που δεν οδήγησε σε σημαντική αύξηση αυτού του πληθυσμού (12% σε σχέση με 10,8% στους μάρτυρες) (σχήμα 19Γ). Επιπλέον, όταν το $H_2O_2$ και η GO προστέθηκαν ταυτόχρονα, τότε το ποσοστό των κυττάρων που οδηγήθηκαν σε απόπτωση από το $H_2O_2$ μειώθηκε σημαντικά (14,9% σε σχέση με 32,4% στα κύτταρα που επωάστηκαν μόνο με $H_2O_2$) (σχήμα 19Δ). Το τελευταίο πείραμα δείχνει ότι σε αντίθεση με την άμεση προσθήκη του $H_2O_2$, η συνεχής παρουσία του στην καλλιέργεια, όχι μόνο δεν προκαλεί αύξηση του αποπτωτικού πληθυσμού αλλά επιπλέον αναστέλλει την απόπτωση που προκαλείται από το αρχικό ερέθισμα.




**Σχήμα 19: Ανάλυση της περιεκτικότητας των κυττάρων σε DNA με κυτταρομετρία ροής.**

Κύτταρα Jurkat (1.5 x $10^6$ / ml) επωάστηκαν για 6 ώρες με PBS (**A**), 0.25 mM $H_2O_2$ (**B**), 100 ng/ml GO (**Γ**), ή 0.25 mM $H_2O_2$ και 100 ng/ml GO που προστέθηκαν ταυτόχρονα (**Δ**). Στη συνέχεια εκτιμήθηκε η απόπτωση με κυτταρομετρία ροής όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στα υλικά και μέθοδοι. Ο κάθετος άξονας αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυττάρων και ο οριζόντιος τον φθορισμό του ιωδιούχου προπιδίου που είναι ανάλογος με την περιεκτικότητα των κυττάρων σε DNA. Ο πληθυσμός των κυττάρων με μικρότερο φθορισμό από την $G_1$ φάση (φάση sub-$G_1$) θεωρείται αποπτωτικός.

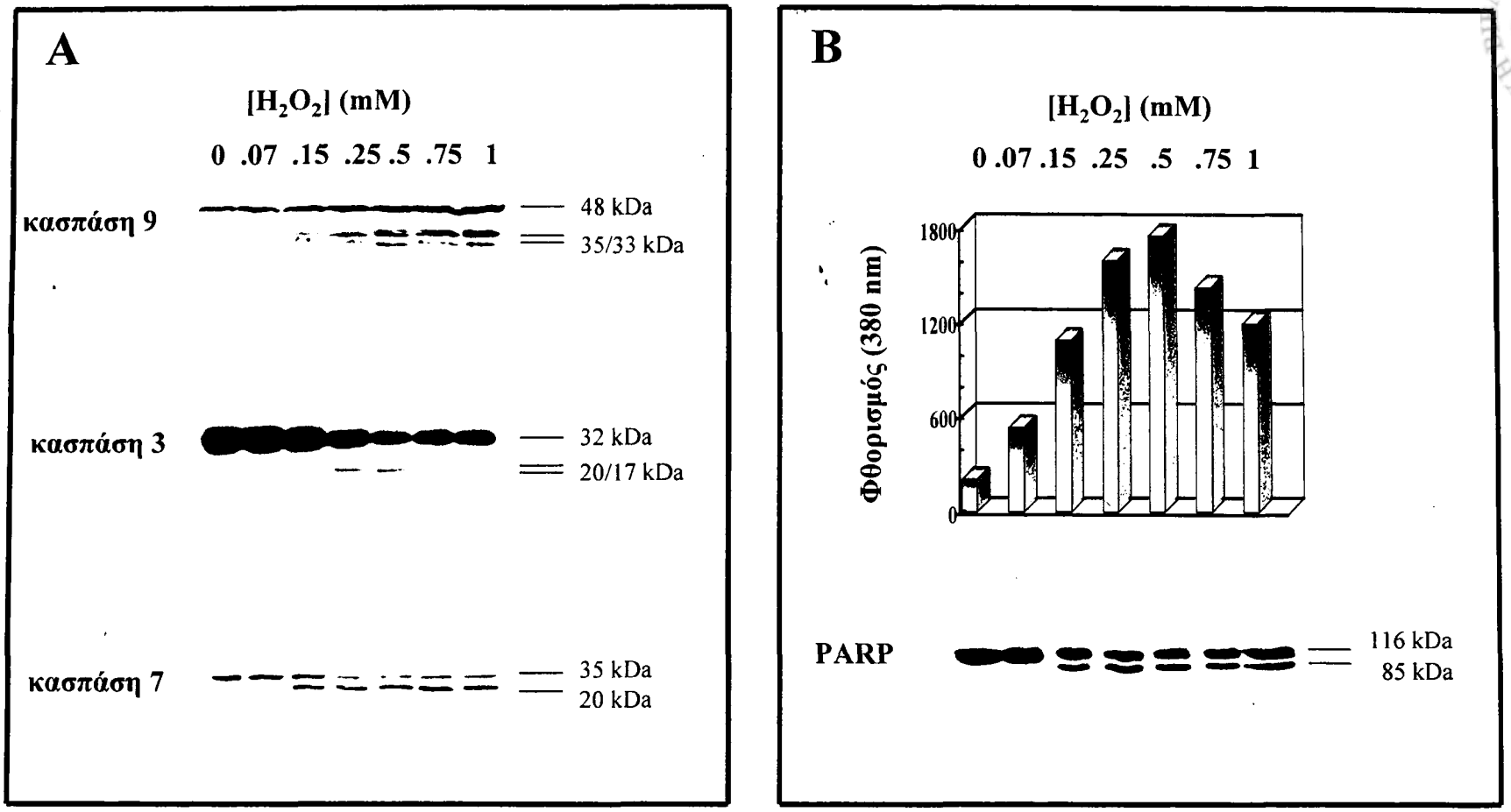
### 3.4.3 Σχάση και ενεργοποίηση των κασπασών

Στη συνέχεια διερευνήθηκαν τα βήματα της αποπτωτικής πορείας ένα προς ένα ούτως ώστε να γίνει δυνατός ο εντοπισμός του ακριβούς σημείου στο οποίο δρα ανασταλτικά το $H_2O_2$. Εξετάστηκε λεπτομερώς η ενεργοποίηση της οδού του καταρράκτη των κασπασών η οποία θεωρείται το τελικό κοινό στάδιο της απόπτωσης (που οδηγεί στην πρόκληση ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων). Η ενεργοποίηση των κασπασών εξετάστηκε με τη χρήση ενός φθορίζοντος υποστρώματος και με εξέταση της σχάσης της πρωτεΐνης PARP που αποτελεί ενδοκυττάριο υπόστρωμά τους, ενώ η σχάση των ίδιων των κασπασών που προκαλεί και την ενεργοποίησή τους εξετάστηκε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης.

*Άμεση προσθήκη $H_2O_2$*

Στα πειράματα που παρουσιάζονται στο σχήμα 20, εξετάστηκε η σχάση και η ενεργοποίηση των κασπασών-9, -3 και -7 μετά από επώαση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$. Έξι ώρες μετά την προσθήκη του $H_2O_2$ ανιχνεύθηκαν οι σχασμένες υπομονάδες της κασπάσης-9, της κασπάσης-3 καθώς και της κασπάσης-7 (σχήμα 20A). Η ανίχνευση των σχασμένων υπομονάδων που είναι αποτέλεσμα της σχάσης των κασπασών έγινε για συγκεντρώσεις υψηλότερες των 0.15 mM και ήταν μέγιστη για συγκεντρώσεις της τάξεως των 0,25 με 0,5 mM $H_2O_2$.

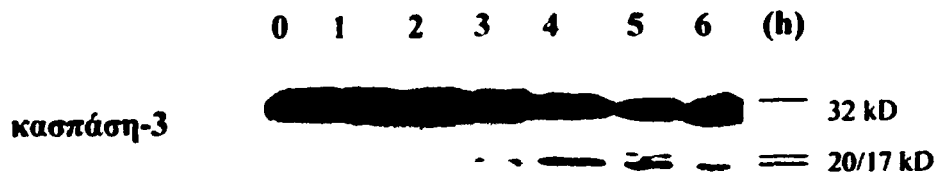
Στη συνέχεια μετρήθηκε η ενεργότητα των κασπασών με το συνθετικό φθορίζον υπόστρωμα ακέτυλο-DEVD-AMC. Το τετραπεπτίδιο DEVD διασπάται κυρίως από την ενεργή κασπάση-3 και την κασπάση-7. Είναι όμως πιθανόν να αποκόπτεται σε μικρότερο βαθμό και από άλλες ενεργοποιημένες κασπάσες. Όπως φαίνεται στο σχήμα 20B, επώαση των κυττάρων με $H_2O_2$ που προστέθηκε άμεσα στην καλλιέργεια, προκάλεσε την αύξηση του φθορισμού που υποδηλώνει σχάση του υποστρώματος και συνεπώς ενεργοποίηση των κασπασών. Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε από την συγκέντρωση των 0,07 mM $H_2O_2$ (περίπου 100%) και έφτασε στο μέγιστο στην συγκέντρωση των 0,5 mM (περίπου 800%), ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ο φθορισμός μειώθηκε ξανά. Η ενεργότητα των κασπασών ελέγχθηκε και με την πρωτεΐνη PARP η οποία έχει αναφερθεί ότι διασπάται από την κασπάση-3 στην C-τελική περιοχή μεταξύ του ασπαρτικού 214 και της γλυκίνης 215 μετά από την αλληλουχία DEVD. Έτσι, από την πρόδρομη πρωτεΐνη που έχει μοριακό βάρος 116 kDa, σχηματίζονται δύο θραύσματα των 29 και 85 kDa. Όπως φαίνεται στο σχήμα 20B η



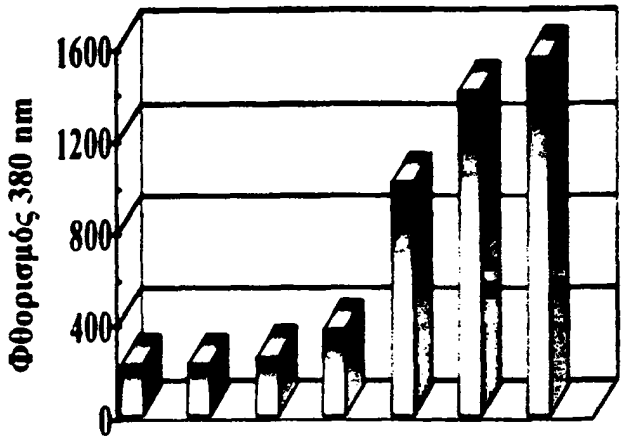

**Σχήμα 20: Επιπτώσεις της άμεσης προσθήκης $H_2O_2$ στην σχάση και την ενεργοποίηση των κασπασών.**

Κύτταρα Jurkat επωάστηκαν για 6 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ από 0 έως 1 mM. **(A)** Στα κυτταροπλασματικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η σχάση των κασπασών -9, -3 και -7 με την τεχνική της ανοσοαπωτύπωσης. **(B)** Στα ίδια εκχυλίσματα εξετάστηκε η ενεργότητα των κασπασών με το φθορίζον υπόστρωμα Ac-DEVD-AMC, ενώ σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η σχάση του ενδοκυττάριου υποστρώματος της PARP με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στα υλικά και μέθοδοι.

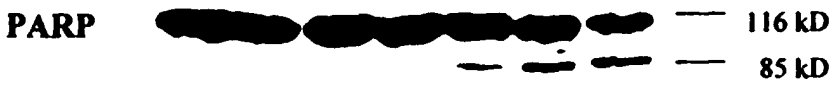
A




B




Γ




**Σχήμα 21: Ενεργοποίηση των κασπασών συναρτήσει του χρόνου μετά από άμεση προσθήκη $H_2O_2$.**

Κύτταρα Jurkat επωάστηκαν με 0.25 mM $H_2O_2$ για χρονικά διαστήματα από 0 έως 6 ώρες. Στη συνέχεια σε κυτταροπλασματικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εξετάστηκε **(Α)** η σχάση της κασπάσης-3 με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης και **(Β)** η ενεργότητα των κασπασών με το φθορίζον υπόστρωμα Ac-DEVD-AMC, ενώ σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η σχάση του ενδοκυττάριου υποστρώματος της PARP με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης **(Γ)**. Τα πειράματα αυτά έγιναν όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο σχήμα.

επώαση με $H_2O_2$ προκάλεσε την διάσπαση της PARP, η οποία παρατηρήθηκε για συγκεντρώσεις υψηλότερες των 0.15 mM.

Στο σχήμα 21 εξετάστηκαν οι επιπτώσεις της άμεσης προσθήκης $H_2O_2$ στην σχάση και ενεργοποίηση των κασπασών συναρτήσει του χρόνου. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 0 έως 6 ώρες με 0.25 mM $H_2O_2$ και εξετάστηκε η σχάση της κασπάσης-3, η ενεργότητα των κασπασών και η σχάση της πρωτεΐνης PARP. Όπως φαίνεται στο σχήμα 25Α, ανάμεσα στην $3^η$ και $4^η$ ώρα παρατηρήθηκε απότομη αύξηση της σχάσης της κασπάσης-3. Επίσης η ενεργότητα των κασπασών αυξήθηκε σε ποσοστό 345% σε σχέση με τους μάρτυρες (σχήμα 21Β) και ανιχνεύθηκε το σχασμένο τμήμα της πρωτεΐνης PARP (σχήμα 21Γ).

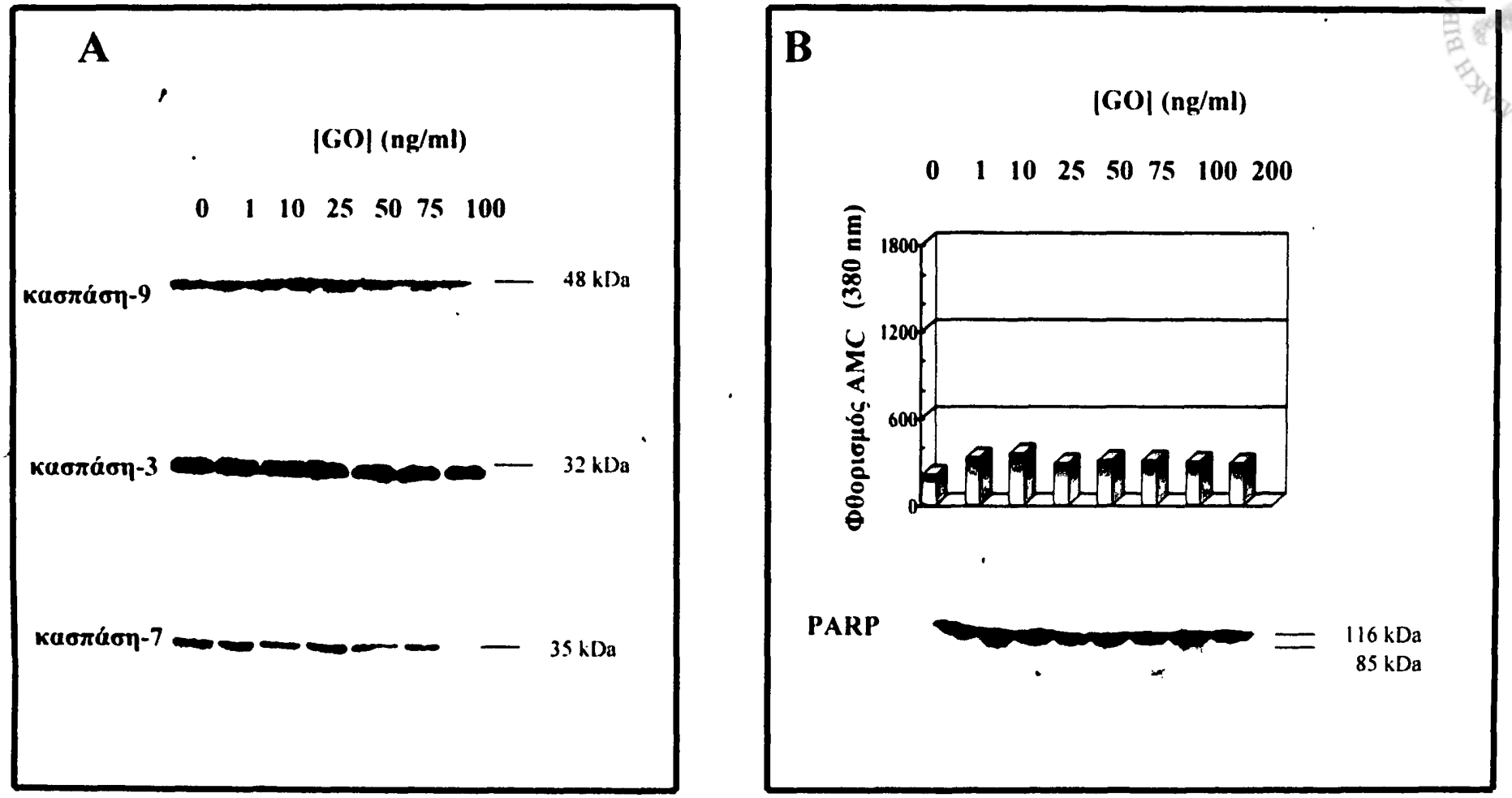
*Επώαση με συνεχώς παραγόμενο $H_2O_2$*

Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι επιπτώσεις από την έκθεση των κυττάρων σε συνεχώς παραγόμενο $H_2O_2$ στη σχάση και την ενεργοποίηση των κασπασών. Στο σχήμα 22 τα κύτταρα επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις GO, από 1 έως 200 ng/ml. Οι συγκεντρώσεις αυτές δεν είχαν καμία επίπτωση στην σχάση των κασπασών -9, -3 και -7 όπως φαίνεται στο σχήμα 22Α, καθώς για τις συγκεκριμένες ταχύτητες δημιουργίας $H_2O_2$ ανιχνεύθηκε μόνο η πρόδρομη μορφή της κασπάσης-9 (48 kDa), της κασπάσης-3 (32 kDa) και της κασπάσης-7 (35kDa).

Επίσης κάτω από αυτές τις συνθήκες δεν παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας των κασπασών όπως αυτή μετρήθηκε με το φθορίζον υπόστρωμα (σχήμα 22Β). Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι σε σχετικά χαμηλούς ρυθμούς παραγωγής $H_2O_2$ (σε συγκεντρώσεις από 10 έως 50 ng/ml ενζύμου) παρατηρήθηκε αύξηση του φθορισμού της τάξεως του 50 έως 70%. Η αύξηση όμως αυτή ήταν πολύ μικρή σε σχέση με αυτή που προκαλείται από την άμεση προσθήκη του $H_2O_2$. Σε αυτές τις συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκε ούτε σχάση της πρωτεΐνης PARP. Τα πειράματα αυτά υποδεικνύουν ότι η έκθεση των κυττάρων σε συνεχή παραγωγή του $H_2O_2$ δεν προκαλεί σχάση και ενεργοποίηση καμιάς από τις κασπάσες που εξετάστηκαν.

*Αναστολή της σχάσης και της ενεργοποίησης των κασπασών από το $H_2O_2$*

Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάστηκαν όπως περιγράφηκε αναλυτικά στο σχήμα 18 και εξετάστηκε εάν η συνεχής παρουσία του $H_2O_2$ μπορεί να αναστείλει τον καταρράκτη




**Σχήμα 22: Επιπτώσεις της συνεχούς παραγωγής $H_2O_2$ στην σχάση και την ενεργοποίηση των κασπασών.**

Κύτταρα Jurkat επωάστηκαν για 6 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις GO από 0 έως 200 ng/ml. **(A)** Στα κυτταροπλασματικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η σχάση των κασπασών -9, -3 και -7 με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. **(B)** Στα ίδια εκχυλίσματα εξετάστηκε η ενεργότητα των κασπασών με το φθορίζον υπόστρωμα Ac-DEVD-AMC, ενώ σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η σχάση του ενδοκυττάριου υποστρώματος της PARP με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, όπως αναφέρθηκε στο σχήμα 20.

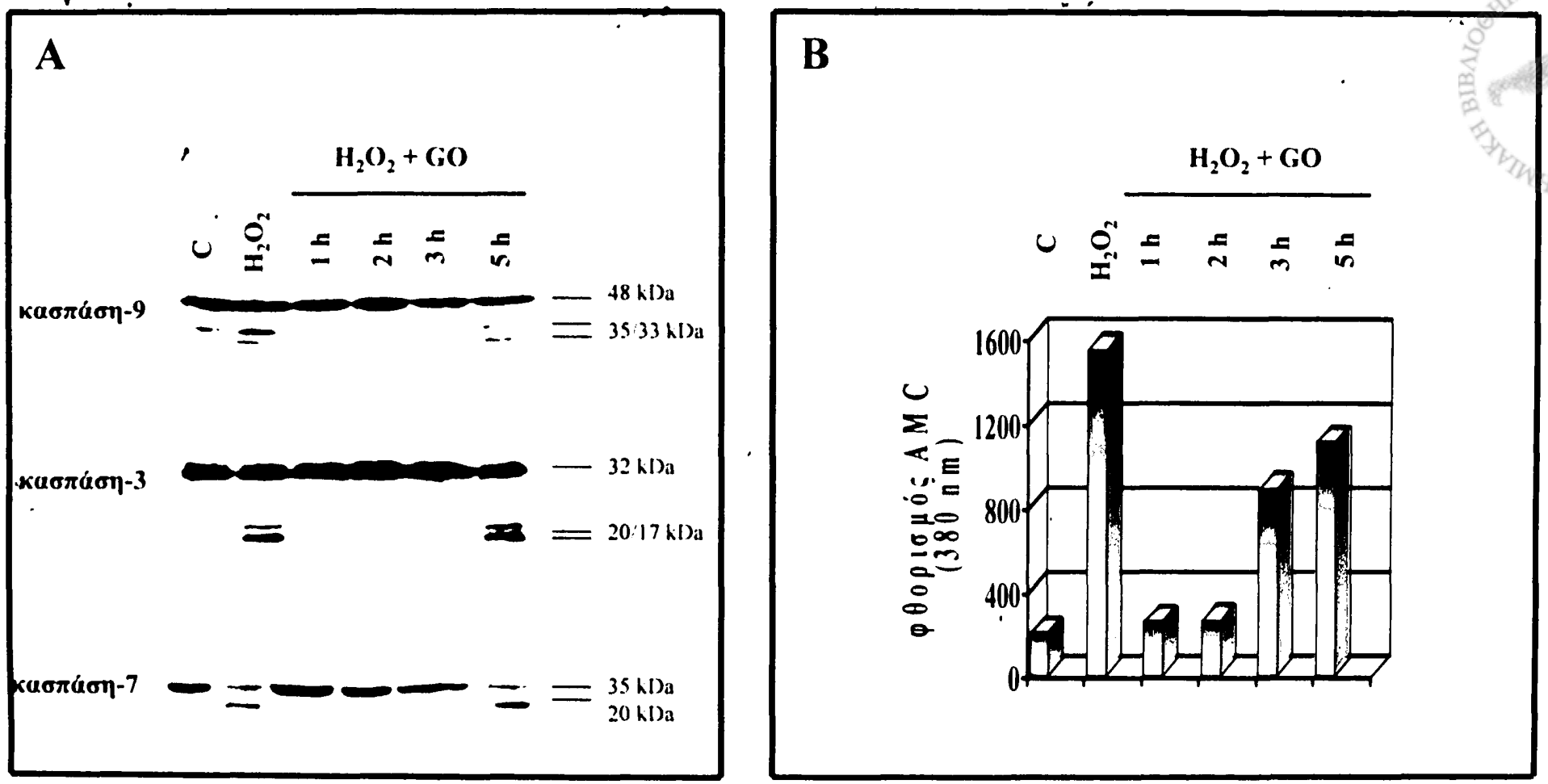
ενεργοποίησης των κασπασών. Όπως φαίνεται στο σχήμα 23Α, επώαση με 0.25 mM $H_2O_2$ οδήγησε στην πρωτεολυτική σχάση της κασπάσης-9, -3 και -7. Η προσθήκη όμως 100 ng/ml GO στην καλλιέργεια 1, 2 ή 3 ώρες μετά το $H_2O_2$ ανέστειλε πλήρως την σχάση των κασπασών καθώς ανιχνεύθηκαν μόνο οι πρόδρομες μορφές τους. Αντίθετα όταν το ένζυμο προστέθηκε 5 ώρες μετά, ανέστειλε μερικώς ή καθόλου την σχάση αυτών των κασπασών.

Το ίδιο παρατηρήθηκε και όταν μετρήθηκε η ενεργότητα των κασπασών-3 και -7 με το φθορίζον υπόστρωμα. Όπως φαίνεται στο σχήμα 23Β, η αναστολή της σχάσης των κασπασών ανέστειλε και την ενεργοποίησή τους. Πιο συγκεκριμένα, ενώ η επώαση για 6 ώρες με 0,25 μM $H_2O_2$, οκταπλασίασε σχεδόν την ενεργότητα των κασπασών, η προσθήκη 100 ng/ml GO, 1 ή 2 ώρες μετά το $H_2O_2$ ανέστειλε πλήρως την αύξηση της ενεργότητας των κασπασών. Όταν η προσθήκη της GO, έγινε 3 ή 5 ώρες μετά το $H_2O_2$, παρατηρήθηκε μια μικρή μόνο αναστολή στην ενεργοποίηση των κασπασών. Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εμφανές ότι η παρουσία του $H_2O_2$ στην καλλιέργεια μέσα στις 3 πρώτες ώρες μετά την επίδραση του αποπτωτικού ερεθίσματος που είναι το ίδιο το $H_2O_2$ σε μεγάλες δόσεις, μπορεί να αναστείλει πλήρως τον καταρράκτη της ενεργοποίησης των κασπασών.

Στα πειράματα του σχήματος 24, εξετάστηκε ο ρόλος της παρουσίας του $H_2O_2$ στην διαδικασία της απόπτωσης που προκαλείται από τον υποδοχέα Fas. Στην καλλιέργεια προστέθηκε αρχικά αντίσωμα Fas σε συγκέντρωση 0.5 μg/ml, και στη συνέχεια σε διάφορους χρόνους προστέθηκαν και 100 ng/ml GO, όπως ακριβώς και σε προηγούμενα πειράματα. Όπως φαίνεται στο σχήμα επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα Fas οδήγησε στη σχάση της κασπάσης -9 (σχήμα 24Α) και της κασπάσης-3 (σχήμα 24Β). Επίσης προκάλεσε την αύξηση της ενεργότητας των κασπασών κατά 300% σε σχέση με τους μάρτυρες (σχήμα 24Γ). Η προσθήκη της GO όμως 1 ή 2 ώρες μετά το αντίσωμα Fas, ανέστελλε πλήρως τα παραπάνω γεγονότα. Αντίθετα, όταν το ένζυμο προστέθηκε μετά τις 3 πρώτες ώρες, δεν φαίνεται να ανέστειλε ούτε την σχάση ούτε την ενεργοποίηση των κασπασών.

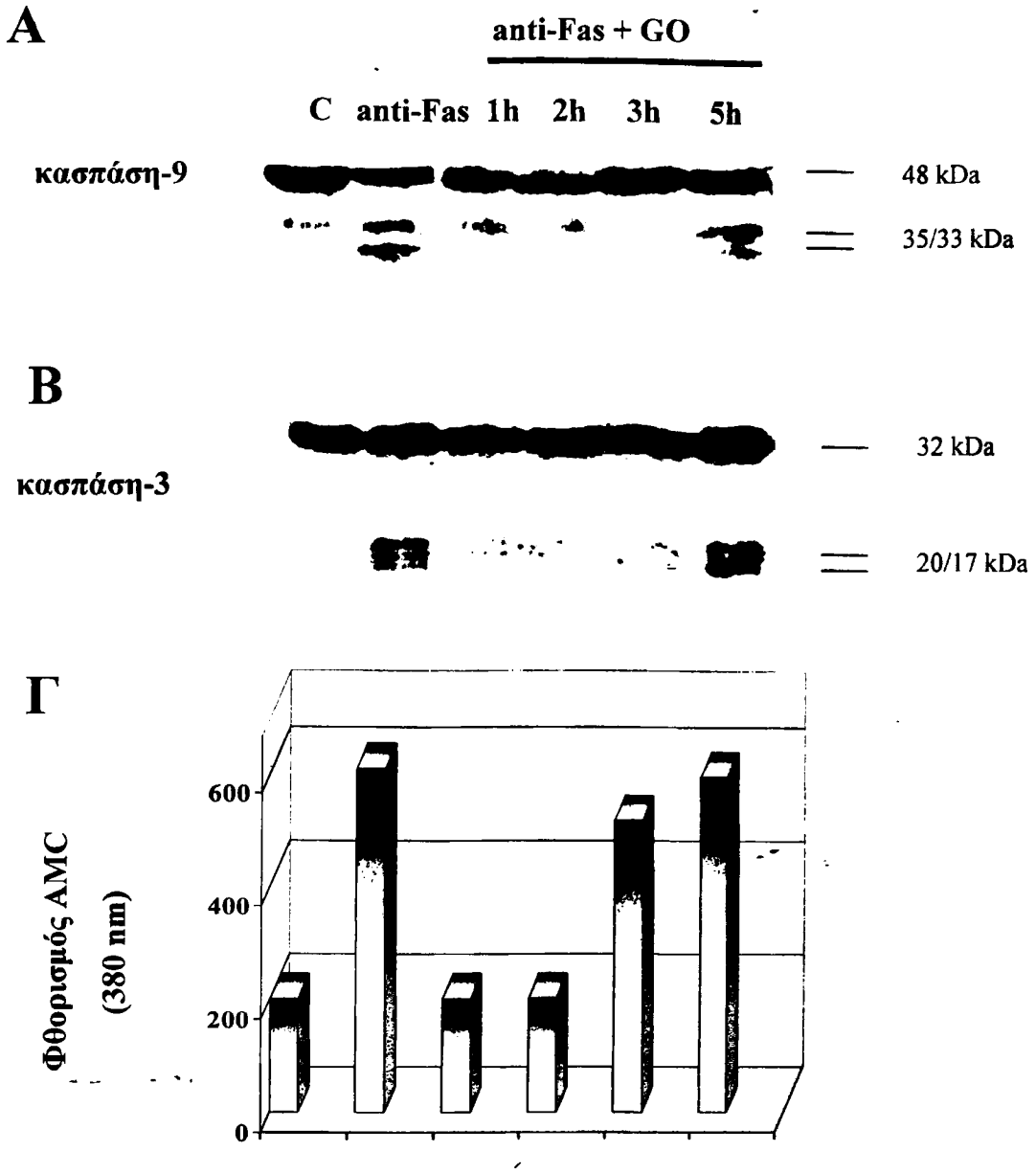
Στο σχήμα 25 εξετάστηκε η κασπάση-8 και η πρωτεΐνη Bid που αποτελούν τους αρχικούς στόχους που σχάζονται από την δέσμευση στον υποδοχέα του Fas. Όπως φαίνεται στο σχήμα 25Α, επώαση των κυττάρων με το αντίσωμα Fas, προκάλεσε την σχάση της προκασπάσης-8 (σχήμα 25Α) καθώς και τη μείωση της πρωτεΐνης Bid σε σχέση με τους μάρτυρες (σχήμα 25Β). Παρουσία του $H_2O_2$ στην καλλιέργεια μέσω της δράσης της GO, δεν φαίνεται να ανέστειλε ούτε την σχάση της κασπάσης-8 ούτε την σχάση της πρωτεΐνης Bid.

Συμπερασματικά, από τα πειράματα του σχήματος 24 και 25 φαίνεται πως η παρουσία του $H_2O_2$ κατά την διαδικασία της απόπτωσης που προκαλείται από τον υποδοχέα



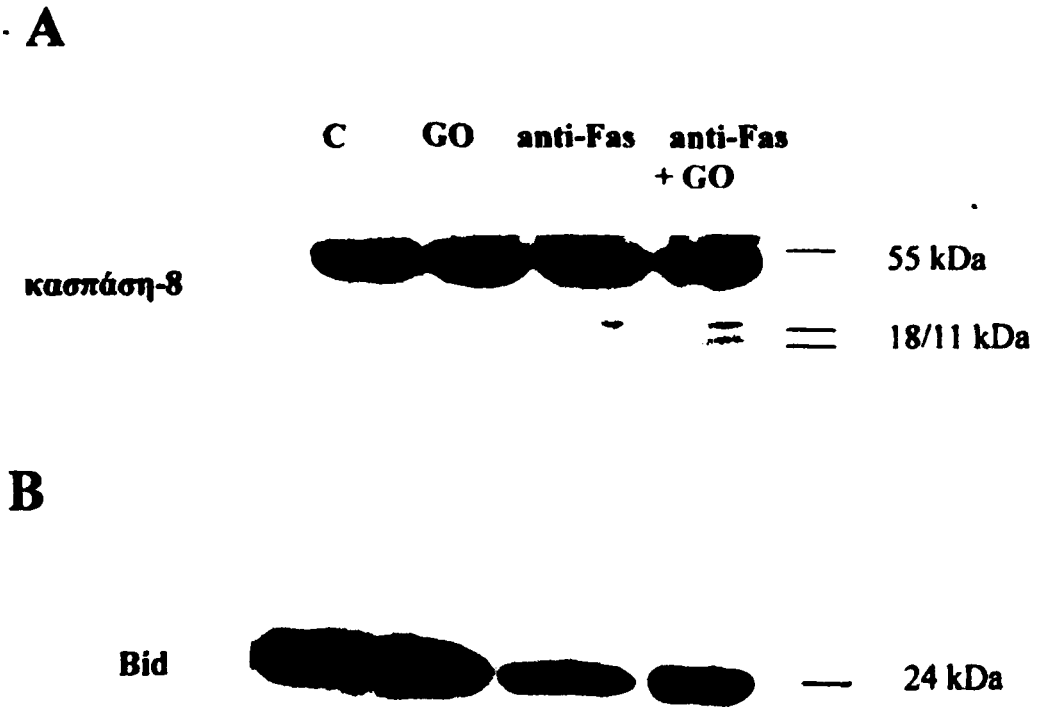

**Σχήμα 23: Οι επιπτώσεις της συνεχούς παραγωγής $H_2O_2$, στην σχάση και την ενεργοποίηση των κασπασών.**

Σε κύτταρα Jurkat προστέθηκαν 0.25 mM $H_2O_2$ και στη συνέχεια στους χρόνους που αναγράφονται προστέθηκαν και 100 ng/ml GO. Έξι ώρες μετά την αρχική προσθήκη του $H_2O_2$ εξετάστηκε η σχάση των κασπασών -9, -3 και 7, **(A)** καθώς και η ενεργότητα των κασπασών με το φθορίζον υπόστρωμα Ac-DEVD-AMC **(B)**, όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο σχήμα 20.




**Σχήμα 24: Οι επιπτώσεις της συνεχούς παραγωγής $H_2O_2$ στην σχάση και την ενεργοποίηση των κασπασών που προκαλείται από αντίσωμα Fas.**

Σε κύτταρα Jurkat προστέθηκαν 0.5 μg/ml αντισώματος Fas και στη συνέχεια σε διάφορους χρόνους προστέθηκαν και 100 ng/ml GO. Έξι ώρες μετά την προσθήκη του αποπτωτικού ερεθίσματος εξετάστηκε η σχάση της κασπάσης - 9 **(Α)**, η σχάση της κασπάσης-3 **(Β)** και η ενεργότητα των κασπασών με το φθορίζον υπόστρωμα Ac-DEVD-AMC **(Γ)**, όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο σχήμα 20.




**Σχήμα 25: Οι επιπτώσεις της συνεχούς παραγωγής $H_2O_2$ στην κασπάση-8 και στην πρωτεΐνη Bid.**

Κύτταρα Jurkat επωάστηκαν με GO (100 ng/ml), αντίσωμα Fas (0.5 μg/ml) ή GO και αντίσωμα Fas μαζί. Έξι ώρες μετά, απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος και εξετάστηκε η σχάση της κασπάσης -8 (A) και η σχάση της Bid (B) με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

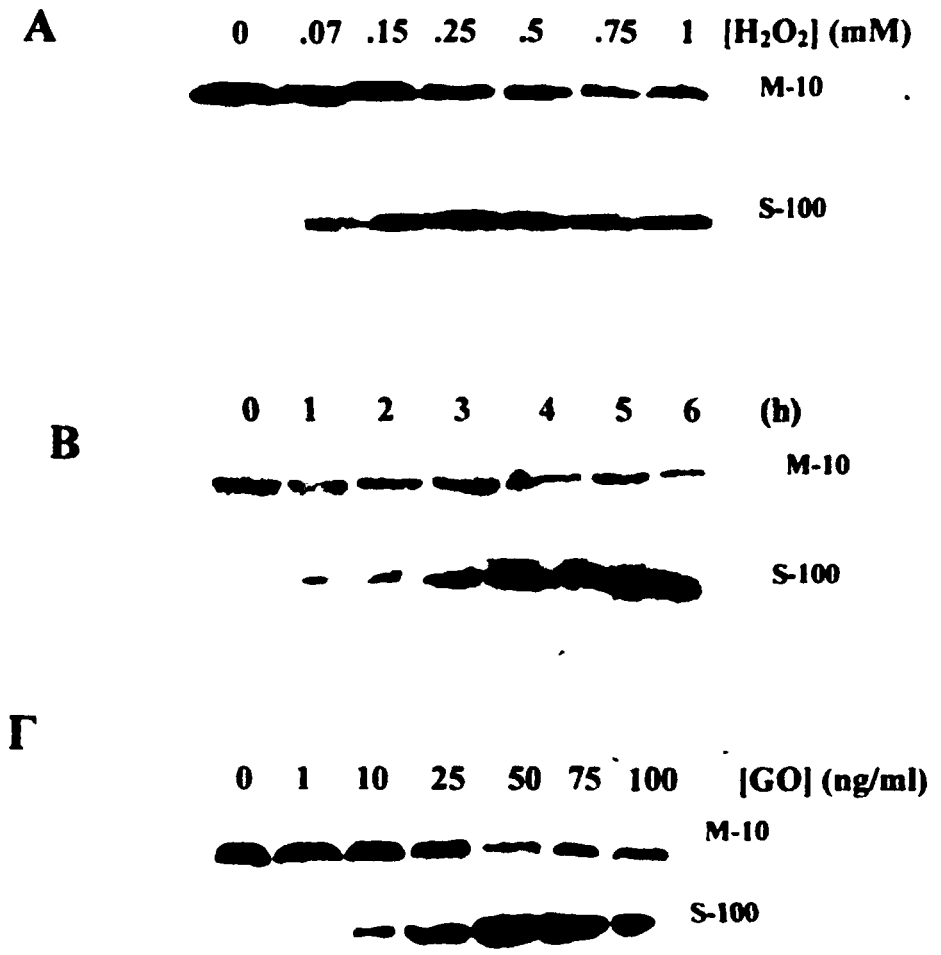
Fas, αναστέλλει την σχάση της κασπάσης -9 καθώς και τα επακόλουθα γεγονότα της αποπτωτικής πορείας. Αντίθετα, δεν φαίνεται να έχει επιπτώσεις στην σχάση και την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 ούτε στη σχάση της Bid που αποτελεί υπόστρωμα της συγκεκριμένης κασπάσης.

### 3.4.4 Απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c*

Είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση της κασπάσης-9 και τα επακόλουθα γεγονότα που εξετάστηκαν προηγουμένως, είναι αποτέλεσμα της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια που βρίσκεται φυσιολογικά και τη μεταφορά του στο κυτταροδιάλυμα, όπου μαζί με τον παράγοντα Apaf-1 σχηματίζουν το λεγόμενο αποπτώσωμα επάνω στο οποίο ενεργοποιείται η κασπάση-9 (Acehan et al., 2002, Adrain and Martin, 2001). Έτσι στην προσπάθεια να εντοπιστεί το σημείο στο οποίο δρα ανασταλτικά το $H_2O_2$, διαχωρίστηκαν τα κλάσματα του κυτταροδιαλύματος από αυτά των μιτοχονδρίων (S-100 και M-10 αντίστοιχα) και η περιεκτικότητα του κυτοχρώματος c σε αυτά ανιχνεύθηκε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Άμεση προσθήκη $H_2O_2$ είχε σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και την εμφάνισή του στο κυτταροδιάλυμα (σχήμα 26Α). Από την συγκέντρωση των 0,07 mM, μια μικρή ποσότητα κυτοχρώματος c ανιχνεύθηκε στο κυτταροδιάλυμα ενώ η απελευθέρωσή του ήταν πιο σημαντική για συγκεντρώσεις υψηλότερες των 0,15 mM $H_2O_2$, στις οποίες παρατηρήθηκε σημαντική μείωσή του στα μιτοχονδριακά κλάσματα και ταυτόχρονα αύξησή του στο κλάσμα του κυτταροδιαλύματος. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε συγκεντρώσεις υψηλότερες των 0,15 mM $H_2O_2$ παρατηρήθηκε και ενεργοποίηση των κασπασών (βλέπε σχήμα 20) καθώς επίσης και δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων (βλέπε σχήμα 15).

Στη συνέχεια εξετάστηκε η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c σε συνάρτηση με το χρόνο. Όπως φαίνεται στο σχήμα 26Β, σημαντική μετατόπιση του παράγοντα αυτού παρατηρήθηκε μετά από 3 ώρες επώαση με 0,25 mM $H_2O_2$, αν και μια μικρή ποσότητα κυτοχρώματος c ανιχνεύθηκε στο κυτταροδιάλυμα από την $1^η$ κιόλας ώρα επώασης. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενα στα οποία παρατηρήθηκε ότι η σχάση και ενεργοποίηση των κασπασών λαμβάνουν χώρα επίσης μετά την $3^η$ ώρα.

Στο σχήμα 26Γ παρατηρείται επίσης ότι και η συνεχής παραγωγή $H_2O_2$ προκαλεί την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c παρότι δεν ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κασπασών

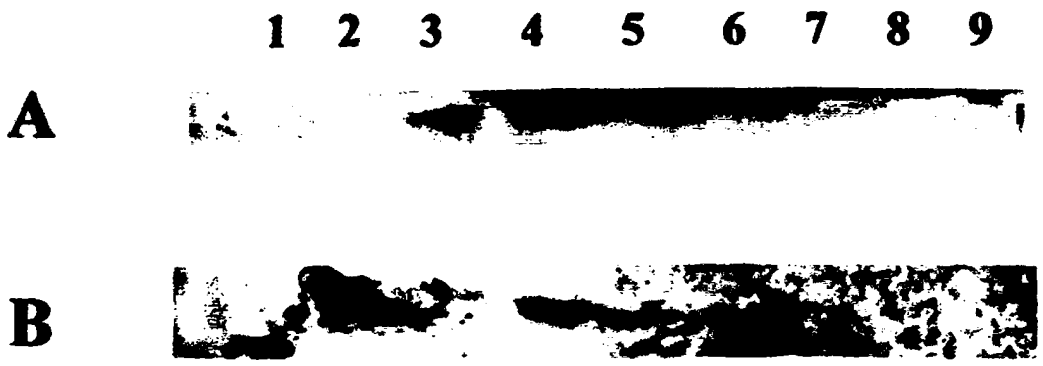



**Σχήμα 26: Ο ρόλος του $H_2O_2$ στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια.** Τα κύτταρα επωάστηκαν με **(Α)** αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ από 0 έως 1 mM για 6 ώρες **(Β)** 0.25 mM $H_2O_2$ για αυξανόμενους χρόνους έως και 6 ώρες και **(Γ)** με αυξανόμενες συγκεντρώσεις οξειδάσης της γλυκόζης από 0 έως 100 ng/ml για 6 ώρες. Στη συνέχεια διαχωρίστηκαν τα μιτοχονδριακά (M-10) και κλάσματα του κυτταροδιαλύματος (S-100) και εξετάστηκε σε αυτά η ποσότητα του κυτοχρώματος c με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης.

ούτε οδηγεί σε δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων (βλέπε και σχήματα 22 και 17). Το κυτόχρωμα c ανιχνεύθηκε στο κλάσμα του κυτταροδιαλύματος από την συγκέντρωση των 10 ng/ml και έως τα 50 ng/ml GO παρατηρήθηκε σταδιακή μετατόπισή του από τα μιτοχόνδρια στο κυτταροδιάλυμα. Για συγκεντρώσεις όμως της τάξεως των 50 ng/ml GO ή και υψηλότερες, το κυτόχρωμα c ανιχνεύθηκε κυρίως στο κυτταροδιάλυμα.

### 3.4.5 Ολιγομερισμός του παράγοντα Apaf-1

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, και η συνεχής και η άμεση προσθήκη $H_2O_2$ (bolus) προκαλούν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και την μεταφορά του στο κυτταροδιάλυμα. Όμως μόνο στην δεύτερη περίπτωση έχουμε ενεργοποίηση κασπασών ενώ η συνεχής παρουσία του αναστέλλει αυτήν την ενεργοποίηση. Το γεγονός που λαμβάνει χώρα ανάμεσα στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 είναι ο σχηματισμός του αποπτωσώματος το οποίο προκύπτει από τη δέσμευση του κυτοχρώματος c στον παράγοντα Apaf-1 και τον πολυμερισμό τους. Για περαιτέρω διερεύνηση της αναστολής της απόπτωσης από το $H_2O_2$ εξετάστηκε ο ολιγομερισμός του Apaf-1. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 6 ώρες απουσία GO (σχήμα 27A) ή παρουσία 100 ng/ml GO (σχήμα 27B). Ακολούθως διαχωρίστηκε το κλάσμα του κυτταροδιαλύματος (S-100) το οποίο στη συνέχεια τοποθετήθηκε πάνω σε γραμμική βαθμίδωση σουκρόζης 10% έως 50% και υπερφυγοκεντρήθηκε, όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Μετά την υπερφυγοκέντρηση, το διάλυμα σουκρόζης διαχωρίστηκε σε 9 κλάσματα και στο καθ΄ ένα από αυτά εξετάστηκε η παρουσία του Apaf-1 με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Στα κύτταρα επωάστηκαν απουσία GO, ο Apaf-1 ανιχνεύθηκε στο $3^o$ και $4^o$ κλάσμα από την επιφάνεια (σχήμα 27A). Μετά από επώαση με συνεχώς παραγόμενο $H_2O_2$ όμως, ο Apaf-1 εκτός από το $3^o$ και το $4^o$ ανιχνεύθηκε και στο $5^o$ και $6^o$ κλάσμα (σχήμα 27B), γεγονός που υποδηλώνει την συμμετοχή του Apaf-1 σε σύμπλοκα πρωτεϊνών με μεγαλύτερο MB. Από αυτά τα πειράματα βγαίνει το συμπέρασμα ότι μετά από έκθεση των κυττάρων σε συνεχώς παραγόμενο $H_2O_2$, ο Apaf-1 βρίσκεται στο κυτταροδιάλυμα ενωμένος με άλλες πρωτεΐνες που πιθανά σχετίζονται με το αποπτώσωμα. Οι ακριβείς όμως μηχανισμοί με τους οποίους η συνεχής παραγωγή του $H_2O_2$ δρα μη επιτρέποντας την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 παραμένουν προς το παρόν άγνωστοι και απαιτείται περαιτέρω μελέτη πάνω στο θέμα αυτό.




**Σχήμα 27: Ολιγομερισμός του παράγοντα Apaf-1 μετά από επώαση με GO.** Κύτταρα Jurkat επωάστηκαν για 6 ώρες με PBS (A) ή με 100 ng/ml G.O. (B). Οι πρωτεΐνες του κυτταροδιαλύματος (S-100), μετά την εκχύλισή τους υπερφυγοκεντρήθηκαν σε γραμμική βαθμίδωση σουκρόζης 10-50%. Μετά την υπερφυγοκέντρηση, διαχωρίστηκαν 9 κλάσματα και σε αυτά εξετάστηκε η περιεκτικότητα σε Apaf-1 με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης.

### 3.4.6 Μορφολογία του πυρήνα

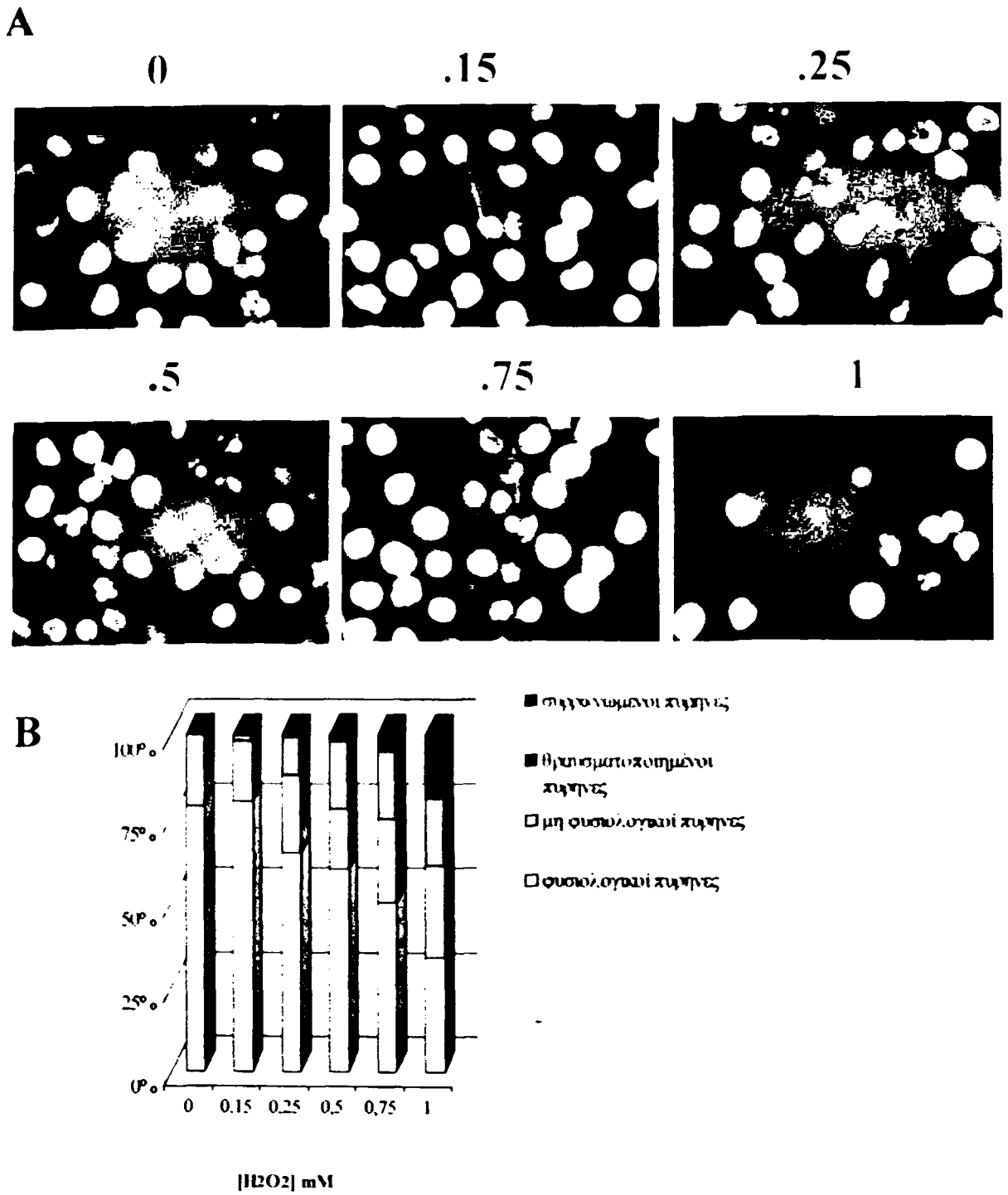
Από τα παραπάνω πειράματα είναι φανερό ότι η συνεχής παρουσία του $H_2O_2$ μπορεί να αναστείλει τον καταρράκτη των κασπασών και τα επακόλουθα γεγονότα, όπως είναι η πρόκληση ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων. Από την άλλη όμως επηρεάζει τα μιτοχόνδρια προκαλώντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και επιπλέον προκαλεί σημαντικές βλάβες στο DNA του πυρήνα. Έτσι το ερώτημα που τίθεται σε αυτό το σημείο είναι η τύχη αυτών των κυττάρων, εάν δηλαδή η αναστολή των κασπασών επιτρέπει στα κύτταρα να ζουν και να πολλαπλασιάζονται φυσιολογικά παρά τις σημαντικές βλάβες ή εάν οδηγεί στο θάνατο με κάποιο άλλο μηχανισμό που είναι ανεξάρτητος των κασπασών.

Για την διερεύνηση των παραπάνω ερωτημάτων εξετάστηκε η μορφολογία των πυρήνων σε μικροσκόπιο φθορισμού. Όπως φαίνεται στο σχήμα 28Α η άμεση προσθήκη $H_2O_2$ οδήγησε στην εμφάνιση χαρακτηριστικής αποπτωτικής μορφολογίας, ανιχνεύθηκαν δηλαδή πυρήνες με εξογκώματα και ανομοιομορφία, θραυσματοποιημένοι ή συμπυκνωμένοι πυρήνες. Οι αλλαγές αυτές ήταν περισσότερο εμφανείς στις υψηλότερες συγκεντρώσεις $H_2O_2$. Για να εκφραστεί ποσοτικά η απόπτωση, μετρήθηκαν σε κάθε δείγμα τουλάχιστον 200 πυρήνες και χαρακτηρίστηκαν ως φυσιολογικοί, μη φυσιολογικοί (με εξογκώματα και ανομοιομορφία), θραυσματοποιημένοι ή συμπυκνωμένοι. Στο σχήμα 28Β, παρουσιάζεται το επί τις εκατό ποσοστό των φυσιολογικών και αποπτωτικών κυττάρων για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις $H_2O_2$.

Αντίθετα, η συνεχής παρουσία $H_2O_2$ οδήγησε σε διαφορετική εικόνα. Για συγκεντρώσεις ενζύμου έως και 25 ng/ml δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (σχήμα 29Α). Σε υψηλότερες όμως συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν συρρικνωμένοι πυρήνες, γεγονός που ήταν πιο εμφανές στα 100 και 200 ng/ml ενζύμου. Να τονιστεί ότι σε αυτές τις συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκε ανομοιομορφία ή θραυσματοποίηση των πυρήνων όπως φαίνεται και στην γραφική παράσταση (σχήμα 29Β).

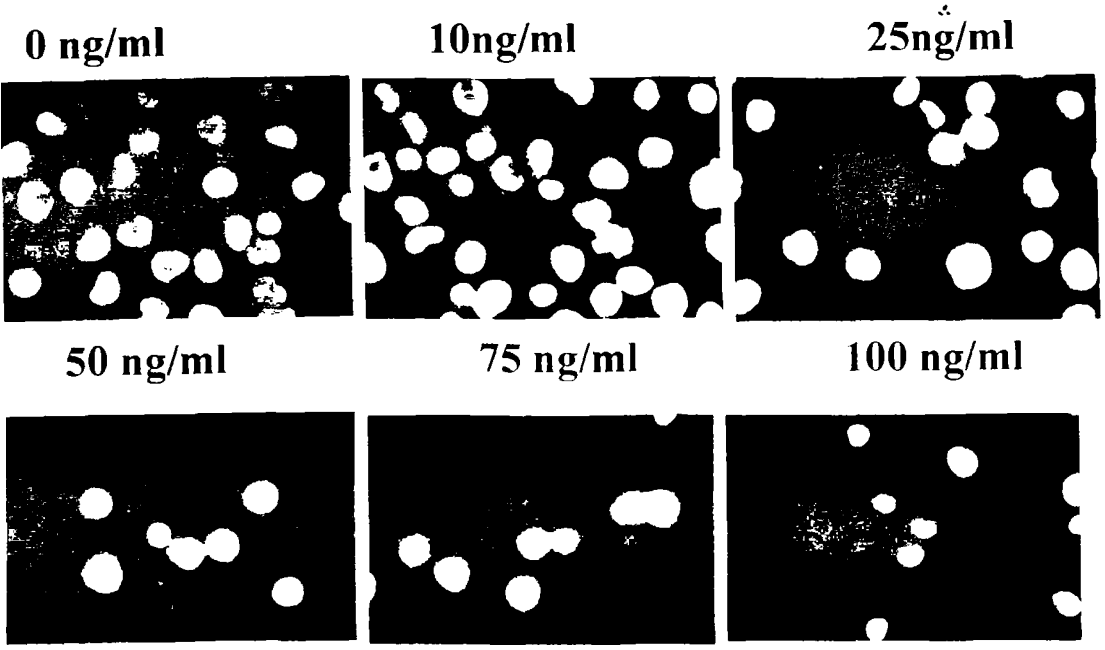
*Ο ρόλος της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2*

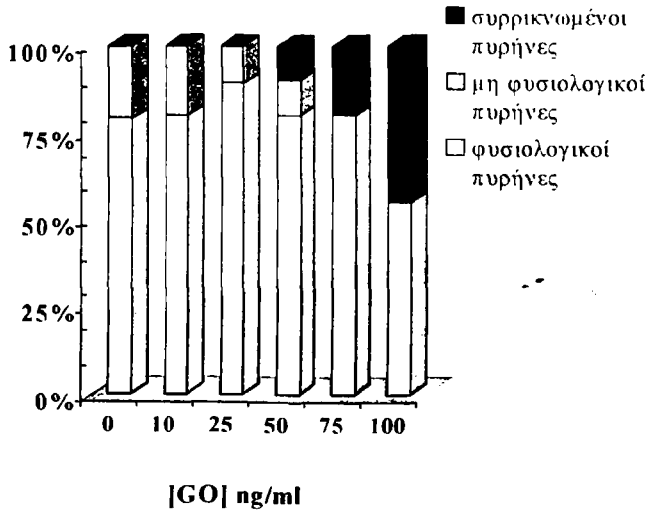
Στα επόμενα πειράματα εξετάστηκε η μορφολογία των πυρήνων σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2. Όπως και σε προηγούμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν επιμολυσμένα κύτταρα Jurkat που υπερεκφράζουν την Bcl-2 (Jurkat-Bcl-2) ενώ σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί μόνο με τον πλασμίδιο (Jurkat-puro). Η άμεση προσθήκη $H_2O_2$ (0 έως 1 mM) στην καλλιέργεια, οδήγησε




**Σχήμα 28: Εξέταση της μορφολογίας των πυρήνων μετά από επώαση με $H_2O_2$.**

**(A)** Κύτταρα Jurkat ($7.5 \times 10^5$ ανά 0.5 ml), επωάστηκαν για 6 ώρες με 0, .15, .25, .5, .75 και 1 mM $H_2O_2$ και εξετάστηκε η μορφολογία του πυρήνα σε μικροσκόπιο φθορισμού όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στα υλικά και μέθοδοι. **(B)** Στην γραφική παράσταση φαίνεται το % ποσοστό των φυσιολογικών (□), των μη φυσιολογικών (▤) των θραυσματοποιημένων (▩) και των συρρικνωμένων πυρήνων (■) αντίστοιχα, όπως εκτιμήθηκε μετά από οπτική παρατήρηση.




**29: Εξέταση της μορφολογίας των πυρήνων μετά από επώαση με GO.**

τταρα Jurkat (7.5 x 106 ανά 0.5 ml), επωάστηκαν για 6 ώρες με 0, 10, 25, 50, 75 ) ng/ml GO και εξετάστηκε η μορφολογία του πυρήνα όπως αναφέρθηκε στο ιο Υλικά και Μέθοδοι. **(B)** Στην γραφική παράσταση, φαίνεται το % ποσοστό των ογικών (□), των μη φυσιολογικών (▒) και των συρρικνωμένων πυρήνων (▓) ιχα, όπως εκτιμήθηκε μετά από οπτική παρατήρηση.

στην εμφάνιση θραυσματοποιημένων και συρρικνωμένων πυρήνων στα κύτταρα Jurkat-puro (σχήμα 30A). Επιπλέον, αυξανόμενες συγκεντρώσεις GO προκάλεσαν συρρίκνωση των πυρήνων στα ίδια κύτταρα (σχήμα 31A). Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 όμως ανέστειλε σε σημαντικό βαθμό την εμφάνιση αυτών των αποπτωτικών αλλαγών και στις δύο περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, η προσθήκη $H_2O_2$ σε κύτταρα Jurkat-Bcl-2 δεν προκάλεσε θραυσματοποίηση, ή συρρίκνωση των πυρήνων (σχήμα 30B), ενώ στα ίδια κύτταρα αυξανόμενες συγκεντρώσεις GO δεν οδήγησαν σε συρρίκνωση των πυρήνων (σχήμα 31B). Στο σημείο αυτό, να σημειωθεί ότι αυτή η προστατευτική δράση της Bcl-2 δεν παρατηρήθηκε για τις πιο υψηλές συγκεντρώσεις $H_2O_2$ ή GO.

Από τα πειράματα αυτά φαίνεται πως η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 μπορεί να αναστείλει την θραυσματοποίηση ή και την συρρίκνωση των πυρήνων σε κύτταρα που εκτίθενται σε $H_2O_2$. Επειδή η Bcl-2 εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια, φαίνεται πιθανό ότι η αναστολή και της θραυσματοποίησης αλλά και της συρρίκνωσης των πυρήνων οφείλεται στην σταθεροποίηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης που προσφέρει η πρωτεΐνη αυτή. Πιθανά, η Bcl-2 αναστέλλει την διαφυγή αποπτωτικών μιτοχονδριακών παραγόντων που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση αυτών των χαρακτηριστικών αλλαγών της απόπτωσης.

### 3.4.7 Μετατόπιση του AIF από τα μιτοχόνδρια στον πυρήνα

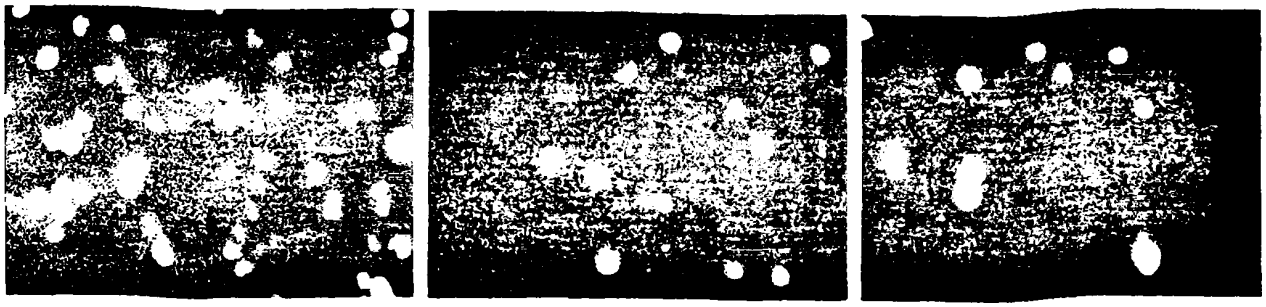
Από τα παραπάνω πειράματα είναι φανερό ότι η συνεχής παρουσία του $H_2O_2$ στην καλλιέργεια προκάλεσε συμπύκνωση των πυρήνων που αποτελεί χαρακτηριστική αλλαγή του αποπτωτικού θανάτου. Η παρατήρηση αυτή θεωρήθηκε σημαντική καθώς κάτω από αυτές τις συνθήκες το $H_2O_2$ όχι μόνο δεν προκαλεί αλλά αντίθετα αναστέλλει κάποια γεγονότα της αποπτωτικής διαδικασίας. Από πρόσφατα δεδομένα (Susin et al., 1999) υποστηρίζεται ότι η συμπύκνωση του πυρήνα μπορεί να οφείλεται σε μια ακολουθία βιοχημικών γεγονότων, που οδηγεί στην μετατόπιση του μιτοχονδριακού παράγοντα AIF στον πυρήνα. Για τον σκοπό αυτό εξετάστηκε στη συνέχεια ο εντοπισμός του AIF με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού καθώς και με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης μετά από επώαση των κυττάρων με $H_2O_2$ ή με GO.

Τα κύτταρα επωάστηκαν με 0,25 mM $H_2O_2$ για χρόνους 0, 15 λεπτά, 3 ώρες και 6 ώρες και ελέγχθηκε ο εντοπισμός του παράγοντα AIF με την τεχνική του ανοσοφθορισμού (σχήμα 32A). Στα κύτταρα μάρτυρες δε έγινε δυνατή η ανίχνευση του AIF πιθανόν λόγω της μιτοχονδριακής εντόπισής του, ενώ μετά από 15 λεπτά επώασης εντοπίζεται στο κυτταροδιάλυμα. Αυτό πιθανά υποδηλώνει την απελευθέρωσή του από τα μιτοχόνδρια

**A**

**Jurkat- puro**

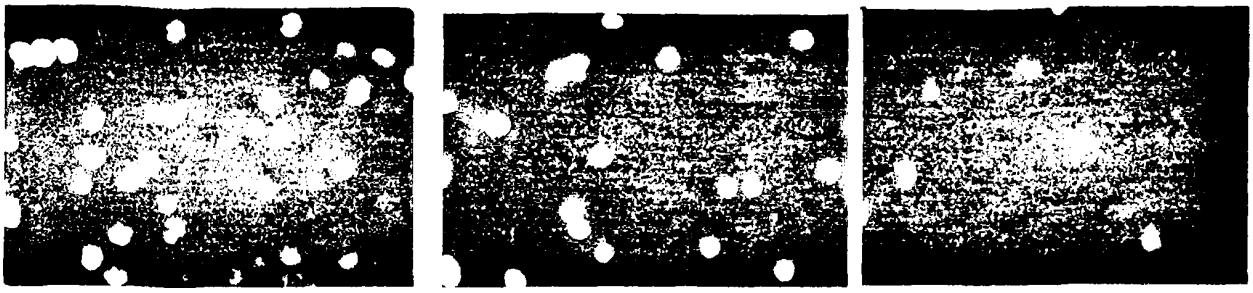
**0 mM** **0.25 mM** **1 mM**



**B**

**Jurkat- Bcl-2**

**0 mM** **0.25 mM** **1 mM**



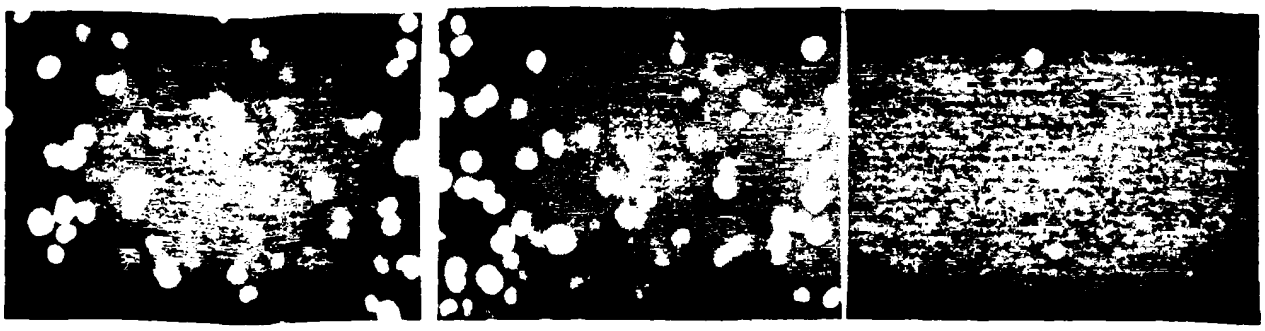
**Σχήμα 30: Ο ρόλος της πρωτεΐνης Bcl-2 στην απόπτωση που προκαλείται από το $H_2O_2$.**

Επιμολυσμένα κύτταρα Jurkat που περιέχουν είτε το πλασμίδιο (Jurkat-puro) **(A)**, είτε το πλασμίδιο και το γονίδιο Bcl-2 (Jurkat-Bcl-2) **(B)** επωάστηκαν για 6 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ (0 έως 1 mM). Η μορφολογία του πυρήνα εξετάστηκε όπως περιγράφηκε στο σχήμα 28.

**A**

**Jurkat- puro**

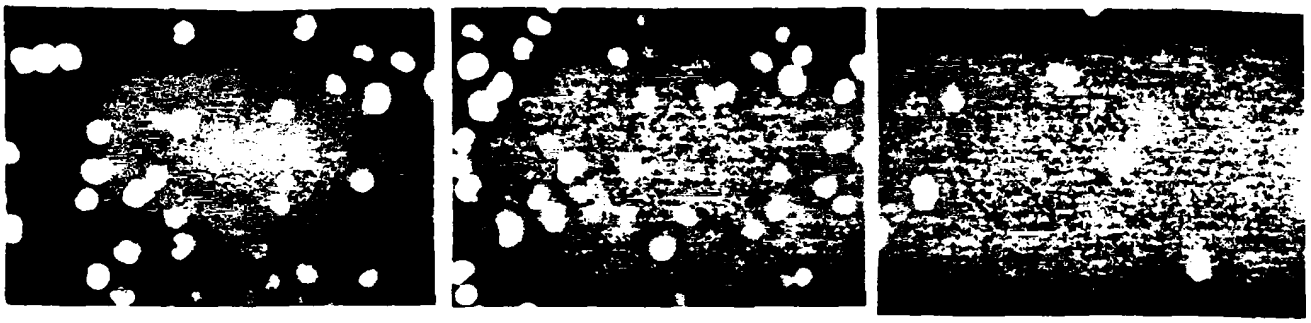
**0 ng/ml** **50 ng/ml** **100 ng/ml**



**B**

**Jurkat- Bcl-2**

**0 ng/ml** **50 ng/ml** **100 ng/ml**



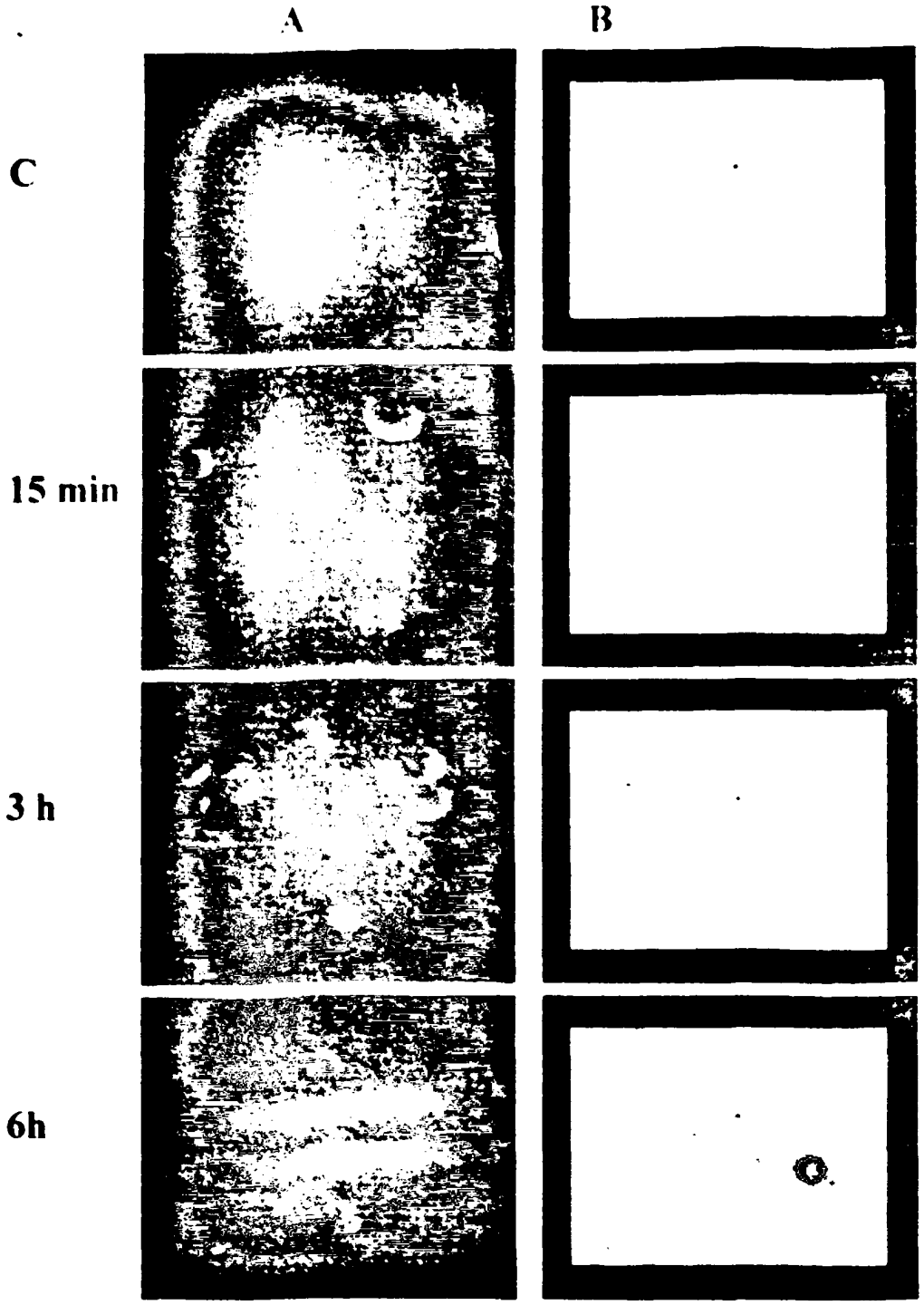
**Σχήμα 31: Ο ρόλος της πρωτεΐνης Bcl-2 στην απόπτωση που προκαλείται από την GO** Επιμολυσμένα κύτταρα Jurkat που περιέχουν είτε το πλασμίδιο (Jurkat-puro) **(A)**, είτε το πλασμίδιο και το γονίδιο Bcl-2 (Jurkat-Bcl-2) **(B)** επωάστηκαν για 6 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις GO (0 έως 100 ng/ml). Η μορφολογία του πυρήνα εξετάστηκε όπως περιγράφηκε στο σχήμα 28.

που όπως είναι γνωστό συναντάται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και την μετατόπισή του στο κυτταροδιάλυμα. Όταν τα κύτταρα επωάστηκαν για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα με $H_2O_2$ ο AIF εντοπίστηκε και πάλι κυρίως στο κυτταροδιάλυμα ενώ στον πυρήνα εντοπίστηκε μόνο σε ένα πολύ μικρό ποσοστό κυττάρων. Τα ίδια κύτταρα εξετάστηκαν επίσης σε μικροσκόπιο αντιθέτου φάσεως (σχήμα 32B), και όπως φαίνεται στις 6 ώρες επώασης με $H_2O_2$ παρατηρήθηκε μια μικρή συρρίκνωση αυτών των κυττάρων.

Απελευθέρωση του AIF από τα μιτοχόνδρια και μετατόπισή του στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα παρατηρήθηκε και μετά από επώαση με $H_2O_2$ που εκλύεται συνεχώς από την δράση 100 ng/ml GO (σχήμα 33A). Ο AIF μετά από 15 λεπτά επώασης με GO ανιχνεύθηκε στο κυτταροδιάλυμα. Η συνεχής παρουσία όμως του $H_2O_2$ για 3 ή 6 ώρες φαίνεται πως είχε πιο σημαντικές επιπτώσεις καθώς ο AIF εντοπίστηκε στον πυρήνα σε πολύ υψηλό ποσοστό του κυτταρικού πληθυσμού. Τα ίδια κύτταρα, όταν εξετάστηκαν σε μικροσκόπιο αντιθέτου φάσεως φαίνονται αρκετά συρρικνωμένα (σχήμα 33B) Να σημειωθεί ότι σε προηγούμενα πειράματα, η επώαση για 6 ώρες με 100 ng/ml ενζύμου οδήγησε σε συμπύκνωση των πυρήνων σε ποσοστό περίπου 45% (βλέπε σχήμα 29).

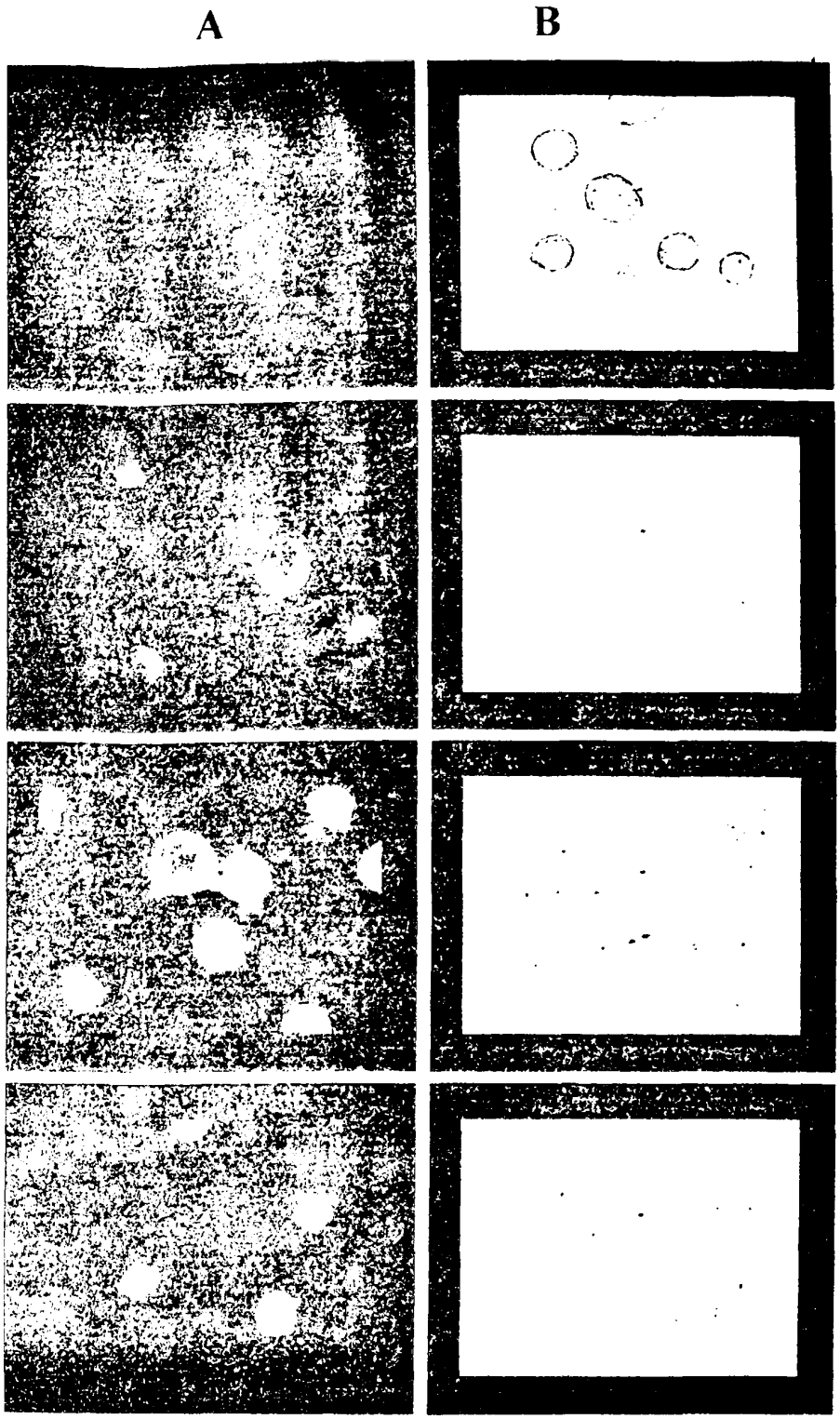
Στο σχήμα 34 τα κύτταρα επωάστηκαν για 6 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ ή GO, απομονώθηκαν τα πυρηνικά κλάσματα τα οποία στη συνέχεια ελέγχθηκαν για την παρουσία της πρωτεΐνης AIF, με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Ο AIF ανιχνεύθηκε στα πυρηνικά εκχυλίσματα για συγκεντρώσεις $H_2O_2$ υψηλότερες των 0.15 mM (σχήμα 34A), ενώ στην περίπτωση της συνεχούς παραγωγής $H_2O_2$ για συγκεντρώσεις υψηλότερες των 25 ng/ml GO (σχήμα 34B).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εμφανές ότι η επώαση με $H_2O_2$ που προστίθεται στην καλλιέργεια είτε άμεσα είτε εκλύεται συνεχώς από την δράση της GO οδηγεί σε απελευθέρωση του μιτοχονδριακού παράγοντα AIF κατ' αρχήν στο κυτταροδιάλυμα και μετά στον πυρήνα. Η μετατόπιση στον πυρήνα φαίνεται να είναι πιο μαζική στην περίπτωση της συνεχούς παραγωγής $H_2O_2$ από την δράση 100 ng/ml GO. Να σημειωθεί σε αυτές τις ταχύτητες παραγωγής $H_2O_2$ παρατηρήθηκε σε προηγούμενα πειράματα έντονη συμπύκνωση των πυρήνων.



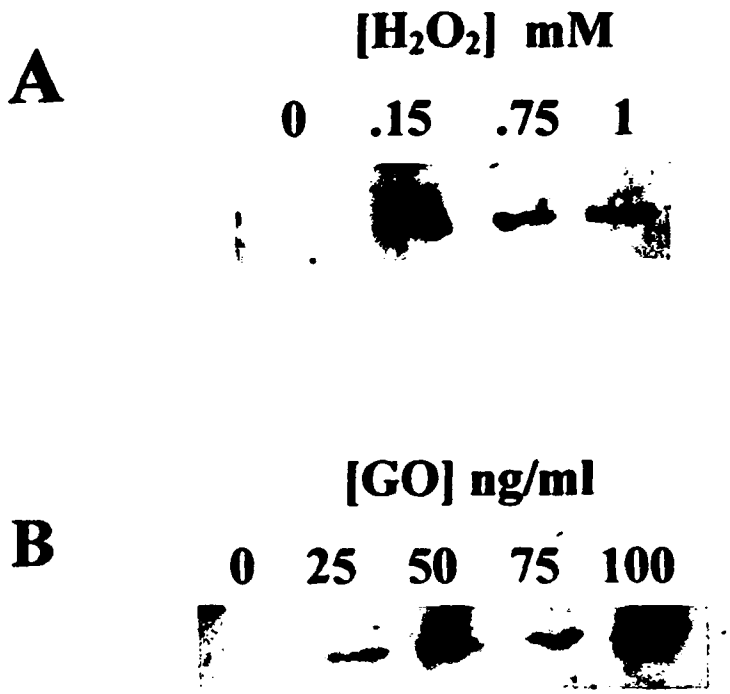

**Σχήμα 32: Εξέταση του εντοπισμού του AIF με ανοσοφθορισμό μετά από ε κυττάρων με $H_2O_2$.**

Κύτταρα Jurkat ($4.5 \times 10^5$ ανά δείγμα) επωάστηκαν για διαφορετικά χρονικά με 0.25 mM $H_2O_2$. **(A)** Εξετάστηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός τ ανοσοφθορισμό με την βοήθεια αντισωμάτων και μικροσκοπίας φθορισμο μορφολογία των ίδιων κυττάρων σε μικροσκόπιο αντιθέτου φάσεως όπως αναλυτικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.




**μα 33: Εξέταση του εντοπισμού του AIF με ανοσοφθορισμό μετά από ση των κυττάρων με GO.**

ταρα Jurkat (4,5 x $10^5$ ανά δείγμα) επωάστηκαν για διαφορετικά χρονικά τήματα με 100 ng/ml GO, και εξετάστηκε **(A)** ο εντοπισμός του AIF με οσκόπιο φθορισμού και **(B)** η μορφολογία των κυττάρων σε μικροσκόπιο ιέτου φάσεως όπως αναφέρθηκε στο σχήμα 32.




**Σχήμα 34: Παρουσία του AIF στον πυρήνα μετά από επώαση κυττάρων με $H_2O_2$ ή με GO.**

Κύτταρα Jurkat ($10 \times 10^6$) επωάστηκαν για 6 ώρες με αυξανόμενες ποσότητες $H_2O_2$ **(A)** ή με αυξανόμενες ποσότητες GO **(B)**. Στη συνέχεια από κάθε δείγμα απομονώθηκαν οι πυρήνες των κυττάρων από τους οποίους εκχειλίστηκαν οι πρωτεΐνες τους και εξετάστηκε η περιεκτικότητά τους σε AIF με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης με την χρήση ειδικού αντισώματος όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

### 3.4.8 Διαμεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων

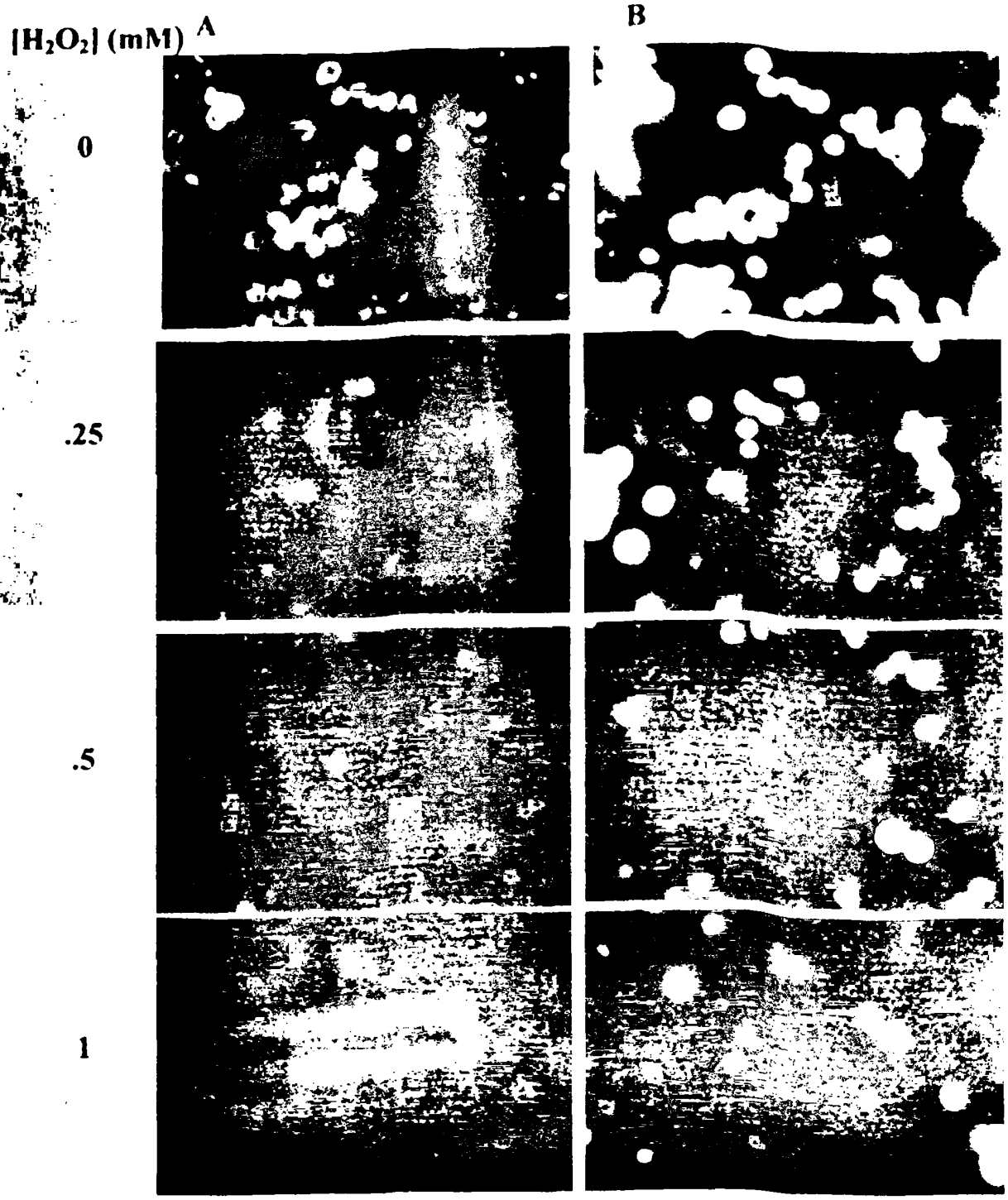
Αν και δεν είναι γνωστή η ακριβής ακολουθία γεγονότων που οδηγούν στην απελευθέρωση του AIF από τα μιτοχόνδρια, σε αρκετές μελέτες υποστηρίζεται ότι λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα ή λίγο μετά την πτώση του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων (Δψm) (Yu et al., 2002, Susin et al., 1999, Cande et al., 2002). Έτσι, στα τελευταία πειράματα εξετάστηκαν οι αλλαγές στο Δψm μετά από επώαση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ ή GO.

#### 3.4.8.1 Εκτίμηση του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων σε μικροσκόπιο φθορισμού

Στο σχήμα 35 εξετάστηκαν οι επιπτώσεις στο διαμεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων (Δψm) με μικροσκόπιο φθορισμού μετά από 6 ώρες επώαση με $H_2O_2$. Τα κύτταρα μάρτυρες παρουσίασαν έντονο φθορισμό του JC-1 που δείχνει τον σχηματισμό συσσωματωμάτων του JC-1 που με την σειρά του υποδηλώνει υψηλό Δψm (σχήμα 35A). Επίσης, οι πυρήνες που ελέγχθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες εμφάνισαν φυσιολογική μορφολογία (σχήμα 35B). Η επώαση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ προκάλεσε μια σχετικά μικρή μείωση του φθορισμού δηλαδή μικρή πτώση του Δψm ενώ ταυτόχρονα παρατηρήθηκαν πυρήνες με αποπτωτική μορφολογία. Αντιθέτως, η συνεχής παραγωγή $H_2O_2$ προκάλεσε σημαντική πτώση στο Δψm (σχήμα 36). Ενώ μέχρι τα 10 ng/ml GO η μείωση δεν ήταν μεγάλη για συγκεντρώσεις της τάξεως των 50 ng/ml ενζύμου προκλήθηκε απότομη πτώση του Δψm (σχήμα 36A), ενώ ταυτόχρονα στη συγκέντρωση αυτή παρατηρήθηκε και συμπύκνωση των πυρήνων (σχήμα 36B). Τέλος, συγκεντρώσεις 100 ng/ml ενζύμου οδήγησαν σε πλήρη καταστροφή του Δψm. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε αυτές τις συγκεντρώσεις $H_2O_2$, παρατηρήθηκε επίσης και συμπύκνωση των πυρήνων σε ένα σημαντικό αριθμό κυττάρων καθώς και μαζική μετατόπιση του AIF στον πυρήνα (σχήματα 33 και 29).

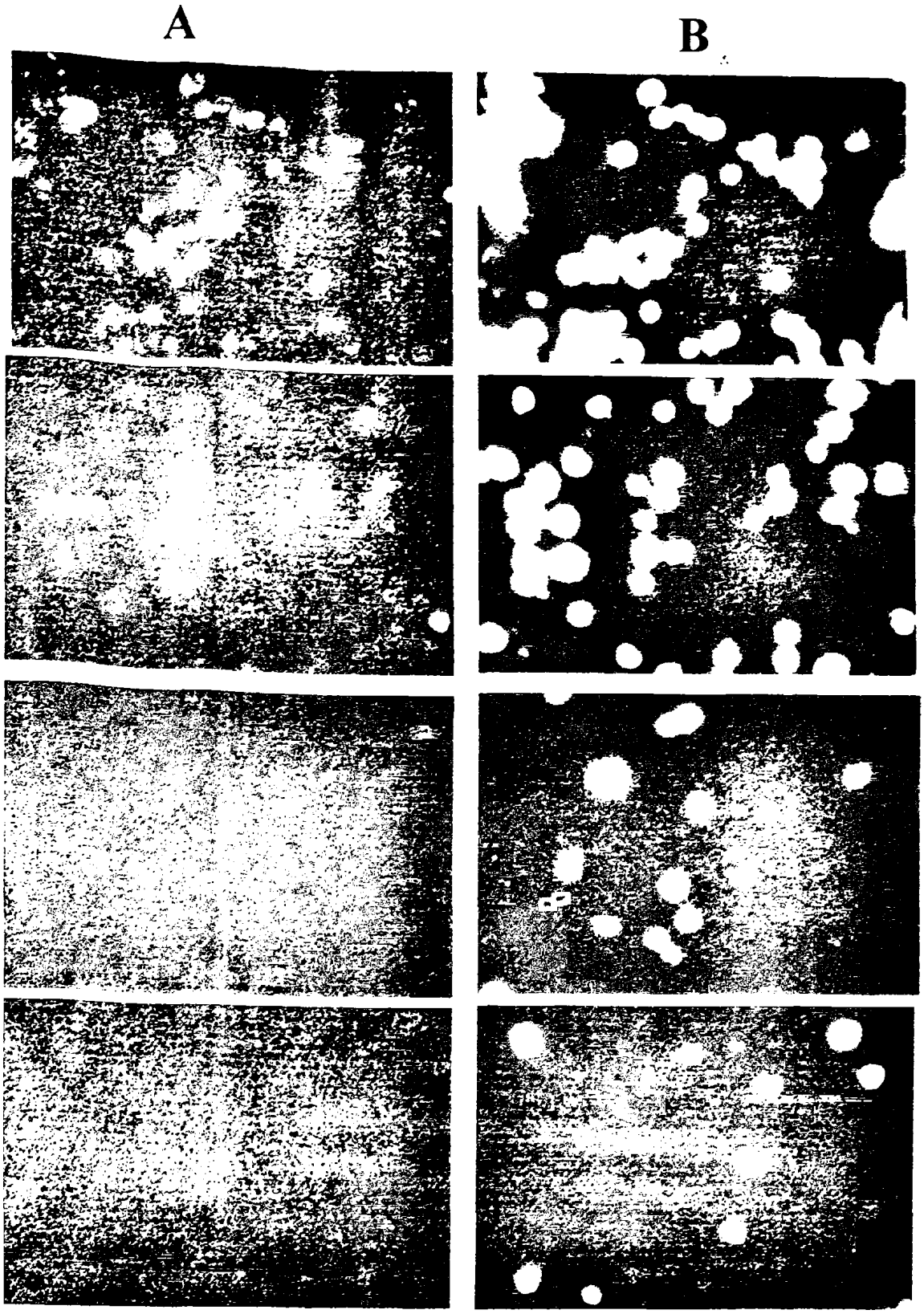
#### 3.4.8.2 Εκτίμηση του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων με κυτταρομετρία ροής

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια και με κυτταρομετρία ροής. Στις παραστάσεις του σχήματος 37 ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει το φθορισμό των μονομερών και ο κάθετος τον φθορισμό των συσσωματωμάτων του JC-1




**Σχήμα 35: Εκτίμηση του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων μετά από επώαση με $H_2O_2$ σε μικροσκόπιο φθορισμού.**

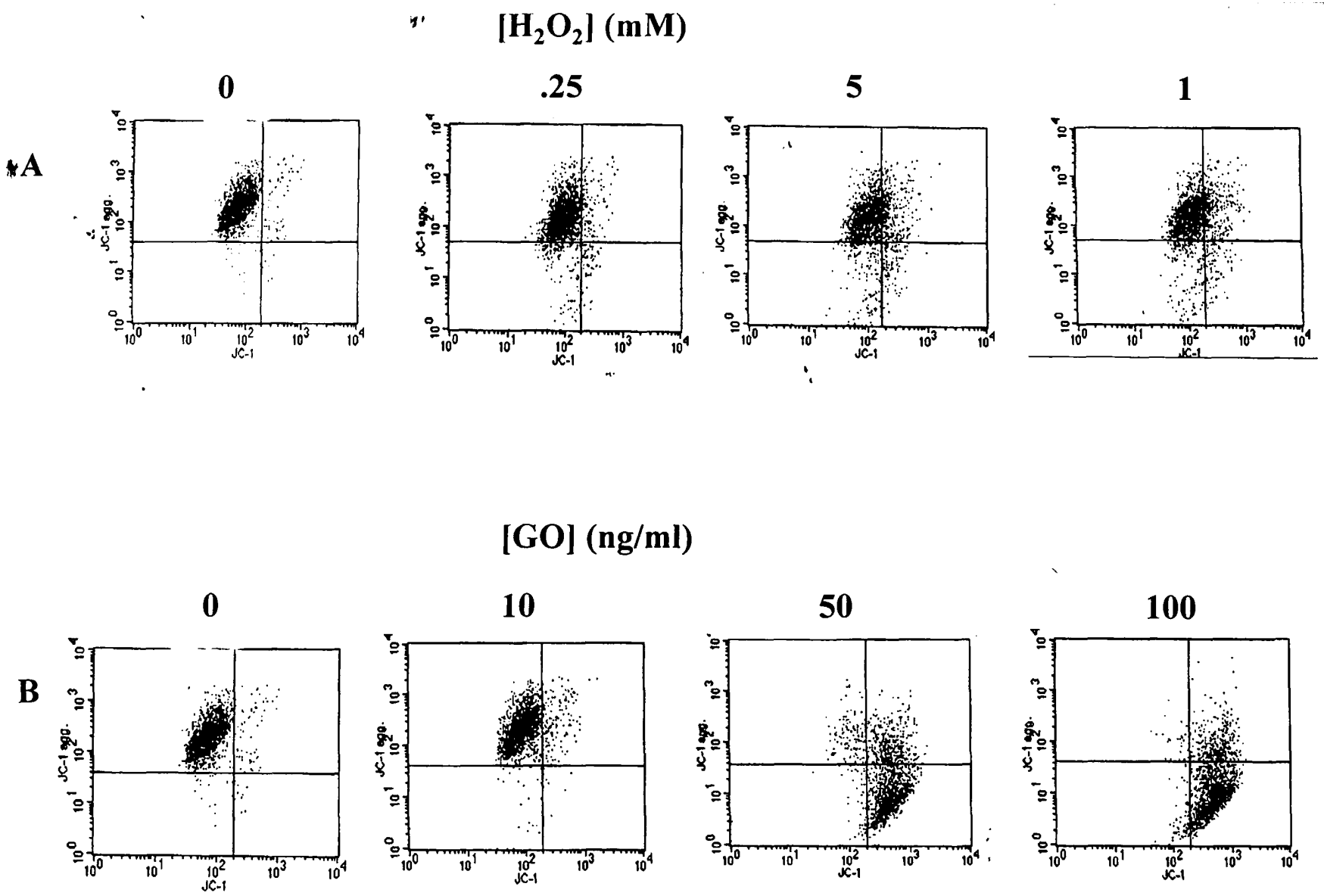
Κύτταρα Jurkat (1.5 x $10^6$ ανά δείγμα) επωάστηκαν για 6 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$. Ακολούθως, σε μικροσκόπιο φθορισμού εξετάστηκαν: **(A)** το διαμεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων με τη χρήση της φθορίζουσας ουσίας JC-1 και **(B)** η μορφολογία των πυρήνων με τη χρήση της φθορίζουσας ουσίας Hoechst-33342 όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.




**:ίμηση του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων μετά από σε μικροσκόπιο φθορισμού.**

(1.5 x $10^6$ ανά δείγμα) επωάστηκαν για 6 ώρες με αυξανόμενες GO. Ακολούθως, σε μικροσκόπιο φθορισμού εξετάστηκε: **(A)** το υναμικό των μιτοχονδρίων με τη χρήση της φθορίζουσας ουσίας JC-1 και α των πυρήνων με τη χρήση της φθορίζουσας ουσίας Hoechst-33342 όπως λυτικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

(j-aggregates). Στους μάρτυρες σχεδόν όλος ο πληθυσμός των κυττάρων παρουσιάζει χαμηλό φθορισμό για τα μονομερή του JC-1 και υψηλό φθορισμό για τα συσσωματώματα του JC-1, πράγμα που υποδηλώνει υψηλό Δψm. Μετά από επώαση με $H_2O_2$ σε ένα αρκετά μικρό υποπληθυσμό κυττάρων μειώθηκαν τα συσσωματώματα και ταυτόχρονα αυξήθηκαν τα μονομερή του JC-1 (μετατόπιση του υποπληθυσμού στο τεταρτημόριο κάτω και δεξιά), μειώθηκε δηλαδή στα κύτταρα αυτά το Δψm (σχήμα 37A). Αντιθέτως, η συνεχής παραγωγή $H_2O_2$ προκάλεσε δραματική πτώση του Δψm (σχήμα 37B). Συγκεκριμένα σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 50 ng/ml ενζύμου προκλήθηκε απότομη πτώση του Δψm η οποία ήταν πιο σημαντική για συγκεντρώσεις 100 ng/ml ενζύμου. Από τα πειράματα αυτής της ενότητας είναι φανερό ότι επώαση για 6 ώρες με συγκεκριμένες ποσότητες $H_2O_2$ που προστίθεται άμεσα στο καλλιεργητικό υλικό δεν επηρεάζουν σημαντικά το Δψm παρά το γεγονός ότι κάτω από αυτές τις συνθήκες το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια. Αντίθετα, συνεχής έκθεση των κυττάρων στον ίδιο παράγοντα οδηγεί 6 ώρες μετά σε πλήρη καταστροφή του Δψm.






**Σχήμα 37: Οι επιπτώσεις στο διαμεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων με κυτταρομετρία ροής μετά από επώαση με $H_2O_2$ ή GO.** Κύτταρα Jurkat (1,5 x $10^6$ / ml) επωάστηκαν για 6 ώρες **(A)** με αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ ή **(B)** με αυξανόμενες συγκεντρώσεις GO. Στη συνέχεια εξετάστηκε το διαμεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων με τη χρήση της φθορίζουσας ουσίας JC-1 με κυτταρομετρία ροής.

# 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## 4.1 Επιπτώσεις του $H_2O_2$ στο κυτταρικό DNA

Ήταν ήδη γνωστό ότι η έκθεση κυττάρων σε διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες προκαλεί τροποποιήσεις σε όλα τα βασικά συστατικά του όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, το DNA κα. Ειδικά το DNA, αν και θεωρείται το πιο σημαντικό μόριο καθώς είναι υπεύθυνο για την αποθήκευση και την μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας, είναι περισσότερο ευαίσθητο σε σχέση με τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά και υφίσταται σημαντικές βλάβες όταν εκτίθεται σε οξειδωτικούς παράγοντες. Από προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριό μας ήταν γνωστό ότι έκθεση σε συνεχώς παραγόμενο $H_2O_2$ προκαλεί μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA ανθρώπινων Τ- λεμφοκυττάρων, όπως αυτές εκτιμήθηκαν με την τεχνική comet assay (Panagiotidis et al., 1999). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Jurkat (Τ- λεμφοκυτταρικής προέλευσης) και εξετάστηκαν αναλυτικά οι επιπτώσεις της συνεχούς παραγωγής του $H_2O_2$ στην πρόκληση βλαβών στο DNA με την ίδια τεχνική. Παρόμοια με τα ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα, το $H_2O_2$ πρόκάλεσε την αύξηση των σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA κυττάρων Jurkat (σχήμα 13). Οι σχάσεις στο DNA ανιχνεύθηκαν από τα πρώτα κιόλας λεπτά επώασης και αυξήθηκαν ανάλογα με την δόση του $H_2O_2$ (σχήμα 13Α). Επιπλέον, οι επιπτώσεις ήταν ορατές μέσα σε λίγα λεπτά της ώρας (σχήμα 13Β). Μια παρατήρηση που θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα ήταν ότι για ορισμένες ταχύτητες παραγωγής $H_2O_2$ η βλάβη αυξήθηκε στα πρώτα λεπτά αλλά στη συνέχεια τα επίπεδα των σχάσεων μειώθηκαν παρά το γεγονός ότι το $H_2O_2$ παραγόταν συνεχώς. Η παρατηρούμενη μείωση των σχάσεων στις μονές αλυσίδες οφείλεται ενδεχομένως στην ενεργοποίηση με το χρόνο αμυντικών μηχανισμών του κυττάρου που πιθανά συνδέονται είτε με την απομάκρυνση του $H_2O_2$ από τα κύτταρα ή με την επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις $H_2O_2$, μετά την αρχική αύξηση της βλάβης δεν παρατηρείται μείωση. Πιθανά σε αυτές τις συνθήκες η δημιουργία βλαβών που προκαλείται από το $H_2O_2$ υπερβαίνει την ικανότητα των κυττάρων για επιδιόρθωση και έτσι οι βλάβες παραμένουν σε υψηλά επίπεδα καθ΄ όλη την διάρκεια της έκθεσης σε $H_2O_2$. Επιπλέον, όταν το $H_2O_2$ απομακρυνθεί από την καλλιέργεια, με την προσθήκη καταλάσης, τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να επιδιορθώνουν ένα μέρος από τις βλάβες που προκάλεσε το $H_2O_2$ (σχήμα 13Γ). Αυτή η ικανότητα φαίνεται να μειώνεται όσο αυξάνει ο χρόνος έκθεσης των κυττάρων στο $H_2O_2$.

Όταν εξετάστηκαν οι επιπτώσεις στο DNA σε μεγαλύτερους χρόνους επώασης με $H_2O_2$, παρατηρήθηκε ότι η συνεχής έκθεση προκαλεί τόσο σημαντικές βλάβες οι οποίες πλέον αγγίζουν τα ανώτατα όρια ανίχνευσης με την τεχνική comet assay (σχήμα 14). Αντίθετα, όταν το $H_2O_2$ προστέθηκε άμεσα στην καλλιέργεια προκάλεσε αρχικά σημαντικές βλάβες στο DNA, στην συνέχεια όμως και καθώς το $H_2O_2$ απομακρυνόταν από τα κύτταρα (βλέπε και σχήμα 11) η βλάβη μειώθηκε σταδιακά και μετά από 3 περίπου ώρες έφτασε σε ένα καινούριο σταθερό με το χρόνο επίπεδο (σχήμα 14Α).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εμφανές ότι το $H_2O_2$ μπορεί μέσα σε μερικά λεπτά να προκαλέσει υψηλό ποσοστό σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA. Η παρατήρηση αυτή έγινε πιθανά αντιληπτή διότι χρησιμοποιήθηκε μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μεθοδολογία με την οποία ανιχνεύονται μικρά επίπεδα βλάβης στις μονές αλυσίδες του DNA. Παρόλα αυτά, οι μηχανισμοί δημιουργίας σχάσεων στις μονές αλυσίδες από το $H_2O_2$ δεν είναι πλήρως γνωστοί. Το $H_2O_2$ δεν είναι ιδιαίτερα δραστικό μόριο και έτσι δεν θεωρείται πιθανό να δρα απ' ευθείας πάνω στο DNA. Πιστεύεται όμως ότι αντιδρά με ελεύθερα ιόντα μετάλλων που βρίσκονται στο κύτταρο και μέσω της αντίδρασης Fenton παράγει την ρίζα ΌΗ που είναι ιδιαίτερα δραστικό μόριο και όταν παραχθεί κοντά στο DNA προκαλεί σχάση στο δεσμό δεοξυριβόζης και φωσφορικού οξέως. Τέτοιου είδους βλάβες μπορούν να ανιχνευθούν με την comet assay. Επιπλέον, η βλάβη που ανιχνεύεται με την τεχνική αυτή μπορεί να είναι επακόλουθο της δράσης επιδιορθωτικών μηχανισμών. Η τροποποίηση στις βάσεις από την δράση του $H_2O_2$, προκαλεί επίσης την ενεργοποίηση της επιδιόρθωσης με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων που απομακρύνοντας τις βάσεις αυτές αφήνουν μια κενή θέση στο συγκεκριμένο σημείο του DNA (απουρινικά ή απυριμιδινικά σημεία). Τα σημεία αυτά μετατρέπονται σε σχάσεις από το υψηλό αλκαλικό pH των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στην τεχνική αυτή (alkali labile sites). Εν ολίγοις η υψηλή βλάβη που μετρείται με την comet assay μπορεί επίσης να αντιπροσωπεύει και υψηλό ρυθμό επιδιόρθωσης του DNA.

## 4.2 Επιπτώσεις του $H_2O_2$ στη απόπτωση

### 4.2.1 Πρόκληση της απόπτωσης από την άμεση προσθήκη $H_2O_2$

Παρατηρήσεις από τις αρχές της δεκαετία του 90 είχαν δείξει ότι η έκθεση κυττάρων σε $H_2O_2$ μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο με απόπτωση. Η επικρατούσα άποψη ήταν ότι όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του $H_2O_2$ ξεπεράσει ορισμένα επίπεδα, με άγνωστους εν πολλοίς μηχανισμούς προκαλεί την απελευθέρωση πρωτεϊνών από τα μιτοχόνδρια που στη

συνέχεια ενεργοποιούν τη διαδικασία της απόπτωσης. Αντίθετα, όταν τα επίπεδα του $H_2O_2$ αυξηθούν περισσότερο τα κύτταρα οδηγούνται στο θάνατο με νέκρωση.

Σε ένα πρώτο στάδιο στην παρούσα μελέτη, κύτταρα Jurkat εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις $H_2O_2$ που προστέθηκαν άμεσα στην καλλιέργεια και 6 ώρες μετά εξετάστηκαν οι επιπτώσεις όσον αφορά στον κυτταρικό θάνατο. Αρχικά εξετάστηκαν στάδια της απόπτωσης που σχετίζονται με την βιοχημική πορεία ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών, που θεωρείται από τα πιο χαρακτηριστικά γεγονότα του αποπτωτικού θανάτου. Όπως ήταν αναμενόμενο κάτω από αυτές τις συνθήκες παρατηρήθηκε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και μετατόπισή του στο κυτταρόπλασμα (σχήμα 26A), σχάση των κασπασών -9, -3 και -7 (σχήμα 20A), σχάση υποστρωμάτων των κασπασών (σχήμα 20B), καθώς και ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις στο DNA του πυρήνα (σχήμα 15). Τα γεγονότα αυτά έγιναν εμφανή από την συγκέντρωση των 0.07 mM $H_2O_2$ αλλά ήταν πιο έντονα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα στα 0.25 και 0.5 mM $H_2O_2$, παρατηρήθηκε σημαντική μετατόπιση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, η σχάση των κασπασών ήταν η μέγιστη όπως και η ενεργοποίηση τους που σχεδόν οκταπλασιάστηκε σε σχέση με τους μάρτυρες, ενώ παρατηρήθηκε και το μέγιστο των ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων. Είναι αξιοπρόσεκτο ότι τα χαρακτηριστικά αυτά της απόπτωσης παρατηρήθηκαν σε αρκετά περιορισμένο εύρος συγκεντρώσεων, καθώς σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 0.5 ή 0.75 mM $H_2O_2$ μειώθηκε η σχάση και η ενεργότητα των κασπασών, καθώς και η δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων. Αυτή η μείωση της απόπτωσης σε υψηλές συγκεντρώσεις $H_2O_2$ είχε παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές και υπήρχε η γενική πεποίθηση πως πρόκειται για μια μεταβολή του αποπτωτικού τύπου θανάτου σε νεκρωτικό (Lemaire et al., 1998, Lee and Shacter, 1999, Lee and Shacter, 2000, Walisser et al., 1999, Hampton and Orrenius, 1997).

Επιπλέον, εξετάστηκαν οι επιπτώσεις του $H_2O_2$ στην πρόκληση της απόπτωσης σε σχέση με το χρόνο. Από τα αποτελέσματα αυτά έγινε εμφανές ότι η επώαση με 0.25 mM $H_2O_2$ προκαλεί από την πρώτη κιόλας ώρα απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και μετατόπισή του στο κυτταροδιάλυμα (σχήμα 26B). Η μετατόπιση όμως αυξάνεται σημαντικά κατά την διάρκεια της τρίτης και τέταρτης ώρας επώασης με επακόλουθο την σημαντική σχάση της κασπάσης-3, την αύξηση της ενεργότητας των κασπασών και την σχάση της πρωτεΐνης PARP (σχήμα 21). Είναι ενδιαφέρον ότι η απότομη μετατόπιση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταροδιάλυμα παρατηρείται αρκετές ώρες μετά την άμεση προσθήκη του $H_2O_2$ και ενώ αυτό έχει εξαφανιστεί πλήρως από

την πρώτη κιόλας ώρα επώασης με τα κύτταρα. Τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στο ενδιάμεσο χρονικό διάστημα στο οποίο τα κύτταρα δεν εκτίθενται σε $H_2O_2$ δεν είναι γνωστά. Ωστόσο όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για να εξηγήσουν τους μηχανισμούς με τους οποίους αυξάνει η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης η οποία προκαλεί την απελευθέρωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Υποστηρίζεται για παράδειγμα ότι διάφορα ερεθίσματα μπορεί να προκαλέσουν διόγκωση της μιτοχονδριακής μήτρας και ρήξη της εξωτερικής μεμβράνης, ενώ άλλες μελέτες υποδεικνύουν ως βασικό γεγονός την αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης ώστε να επιτρέπει την απελευθέρωση μικρών πρωτεϊνών, όπως είναι για παράδειγμα και το κυτόχρωμα c (Belzacq et al 2002; Kroemer and Reed, 2000; Desagher and Martinou, 2000; Brenner and Kroemer, 2000a).

### 4.2.2 Αναστολή της απόπτωσης από το $H_2O_2$

Σε αντίθεση με άλλες μελέτες, η έκθεση των κυττάρων σε $H_2O_2$ στην παρούσα εργασία έγινε και με έναν επιπλέον τρόπο, με προσθήκη του ενζύμου οξειδάσης της γλυκόζης στο καλλιεργητικό υλικό. Με τον τρόπο αυτό εκλύονται συνεχώς ελεγχόμενες ποσότητες $H_2O_2$ και συνεπώς το σύστημα αυτό πλεονεκτεί καθώς προκαλεί μικρές αλλαγές στην οξειδοαναγωγική ισορροπία και είναι πιο κοντά σε in vivo καταστάσεις. Παρατηρήθηκε ότι σε αντίθεση με την άμεση προσθήκη του, η συνεχής παρουσία του $H_2O_2$ δεν προκαλεί την σχάση των κασπασών -9, -3 και -7 (σχήμα 22A), με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η αύξηση της ενεργότητας των κασπασών και η σχάση της PARP (σχήμα 22B). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι κάτω από αυτές τις συνθήκες δεν προκαλούνται ενδονουκλεοσωμικές σχάσεις στο DNA του πυρήνα (σχήμα 17). Επίσης, η συνεχής παρουσία του $H_2O_2$ μπορεί επίσης και να αναστείλει τα παραπάνω γεγονότα που προκαλούνται είτε από το ίδιο το $H_2O_2$ είτε από αντίσωμα Fas που προκαλεί την απόπτωση διαμέσου της οδού του υποδοχέα θανάτου. Και στις δύο περιπτώσεις, η παρουσία χαμηλών ποσοτήτων $H_2O_2$ στην καλλιέργεια μέσα στις 3 πρώτες ώρες μετά το αποπτωτικό ερέθισμα ανέστειλε πλήρως την σχάση και την ενεργοποίηση των κασπασών -9, -3 και -7 (σχήματα 24 και 25) και ανέστειλε την δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων (σχήμα 18). Αντίθετα η παρουσία του $H_2O_2$ 3 ώρες μετά το αποπτωτικό ερέθισμα δεν κατάφερε να αναστείλει αυτά τα χαρακτηριστικά γεγονότα της απόπτωσης. Είναι προφανές ότι η ανασταλτική δράση του $H_2O_2$ έχει να κάνει με κάποιο βήμα της αποπτωτικής πορείας που λαμβάνει χώρα μέσα στις 3 πρώτες ώρες μετά το αποπτωτικό

ερέθισμα. Σε αντίθεση όμως με τα παραπάνω, η συνεχής παρουσία του $H_2O_2$ δεν επηρέασε ούτε τη σχάση της κασπάσης -8 ούτε την σχάση της Bid όταν η απόπτωση προκλήθηκε με αντίσωμα Fas (σχήμα 25).

Έτσι, θεωρήθηκε αρχικά πιθανό, η ανασταλτική δράση του $H_2O_2$ να οφείλεται στα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή περικλείουν πρωτεΐνες οι οποίες όσο βρίσκονται στο εσωτερικό των οργανιδίων αυτών δεν αποτελούν απειλή για το κύτταρο όταν όμως διαφύγουν οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο με απόπτωση (Green and Reed, 1998, Verhagen et al., 2000, Joza et al., 2001, Parrish et al., 2001). Το κυτόχρωμα c, είναι μια από αυτές τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που αποτελεί παράγοντα της αναπνευστικής αλυσίδας. Όταν διαφύγει στο κυτταρόπλασμα σηματοδοτεί μια καθοριστική μη αντιστρεπτή πορεία για την τύχη του κυττάρου οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο μέσω της ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών (Adrain and Martin, 2001). Γι' αυτό τα μιτοχόνδρια έχουν χαρακτηριστεί ως «το κουτί της Πανδώρας» για να τονιστεί η σοβαρότητα των επιπτώσεων από την πρόκληση βλαβών σε αυτά. Η εξέλιξη ή όχι της απόπτωσης ελέγχεται στο επίπεδο του μιτοχονδρίου από τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 ογκοπρωτεϊνών που ρυθμίζουν την διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών και με τον τρόπο αυτό επάγουν ή παρεμποδίζουν την διαφυγή αποπτωγενών πρωτεϊνών (Adams and Cory, 1998, Chao and Korsmeyer, 1998). Όταν όμως ελέγχθηκε η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c σε συνθήκες συνεχούς παρουσίας του $H_2O_2$, παρατηρήθηκε η μετατόπισή του από τα μιτοχόνδρια στο κυτταροδιάλυμα (σχήμα 26Γ). Επιπλέον, κάτω από αυτές τις συνθήκες παρατηρήθηκε σημαντική πτώση του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων (σχήματα 36 και 37Β).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερό ότι η συνεχής παρουσία του $H_2O_2$ επηρεάζει τα μιτοχόνδρια προκαλώντας απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταροδιάλυμα και πλήρη καταστροφή του διαμεμβρανικού δυναμικού. Παρόλα αυτά, αναστέλλει τον καταρράκτη των κασπασών καθώς και τα επακόλουθα γεγονότα. Η αναστολή των κασπασών οφείλεται στην μη ενεργοποίηση της εναρκτήριας κασπάσης-9 που αποτελεί την αρχική κασπάση που σχάζεται και ενεργοποιείται μετά από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή το γεγονός που λαμβάνει χώρα μεταξύ της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c και της ενεργοποίησης της κασπάσης-9 είναι ο σχηματισμός του αποπτωσώματος, ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου θανάτου που περιλαμβάνει τον Apaf-1, το κυτόχρωμα c και την κασπάση-9 (Jiang and Wang, 2000, Acehan et al., 2002, Adrain et al., 1999, Qin et al., 1999). Όταν ελέγχθηκε ο Apaf-1,

παρατηρήθηκε ότι η συνεχής έκθεση σε $H_2O_2$ προκάλεσε τον ολιγομερισμό του Apaf-1 (σχήμα 27) γεγονός που υποδεικνύει την σύνδεσή του παράγοντα αυτού στις συγκεκριμένες συνθήκες, με άλλες πρωτεΐνες.

Μετά από λεπτομερειακή εξέταση των βημάτων της αποπτωτικής διαδικασίας, είναι εμφανές ότι η ανασταλτική δράση του $H_2O_2$ εντοπίζεται στο επίπεδο του σχηματισμού του αποπτωσώματος και στην πρωτεολυτική αυτοενεργοποίηση της κασπάσης-9 (σχήμα 38). Ο ακριβής όμως μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η αναστολή της απόπτωσης δεν έχει διευκρινιστεί. Είναι γνωστό ότι η απόπτωση ρυθμίζεται ενδοκυττάρια σε διάφορα επίπεδα. Η ενεργοποίηση των κασπασών για παράδειγμα υποστηρίζεται ότι ελέγχεται ισχυρά από τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες του κυττάρου. Τα μέλη της οικογένειας των κασπασών περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο μια πυρηνόφιλη κυστεΐνη (Almerni et al., 1996) που είναι επιρρεπής στην οξείδωση ή και στην αλκυλίωση (Nobel et al., 1997, Nicholson et al., 1995). Για το λόγο αυτό οι κασπάσες παρουσιάζουν βέλτιστη ενεργότητα σε αναγωγικές συνθήκες και οποιαδήποτε απόκλιση από αυτές φαίνεται ότι καθιστά τις κασπάσες ανενεργές. Έχει αναφερθεί ότι το $H_2O_2$ σε υψηλές συγκεντρώσεις καταστέλλει τόσο τη σχάση καθώς και την αύξηση της ενεργότητας της κασπάσης-3 (Hampton and Orrenius., 1997) και υποστηρίχθηκε ότι αυτό οφείλεται σε οξειδωτική τροποποίηση του ενεργού της κέντρου. Οι παραπάνω παρατηρήσεις προέρχονται κυρίως από in vitro πειράματα στα οποία η αναστολή της κασπάσης -3 οφείλεται σε έκθεση σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις $H_2O_2$. Επιπλέον, στις μελέτες αυτές η απενεργοποίηση των κασπασών σε κύτταρα που είχαν τραυματιστεί θανατηφόρα, μετέτρεψε τον κυτταρικό θάνατο από απόπτωση σε νέκρωση (Lemaire et al., 1998, Melino et al., 1997). Αντίθετα, στην παρούσα μελέτη μετά από λεπτομερειακή εξέταση των κασπασών, παρατηρήθηκε ότι η συνεχής παρουσία του $H_2O_2$ δεν επιτρέπει την σχάση και την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 που είναι η αρχική κασπάση που ενεργοποιείται στην οδό του μιτοχονδρίου (σχήματα 22, 23, 24). Η αναστολή αυτή θα μπορούσε να οφείλεται σε τροποποίηση του ενεργού κέντρου του ενζύμου από την συνεχή παρουσία μικρών ποσοτήτων $H_2O_2$ στα κύτταρα. Στην περίπτωση αυτή η τροποποίηση του ενεργού κέντρου αποτρέπει την σχάση αυτού του ενζύμου το οποίο όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή αυτοενεργοποιείται πρωτεολυτικά. Να αναφερθεί ότι στην παρούσα μελέτη, η αναστολή της απόπτωσης κάτω από αυτές τις συνθήκες δεν προκάλεσε νεκρωτικό θάνατο στα κύτταρα.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η ενεργοποίηση των κασπασών και συγκεκριμένα οι κασπάσες -9, -7 και -3 ρυθμίζονται ενδοκυττάρια από τις πρωτεΐνες IAPs που αποτελούν ενδοκυττάριους αναστολείς των κασπασών. Οι πρωτεΐνες αυτές ρυθμίζονται

με την σειρά τους από την Smac/Diablo που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια πολύ πιθανά μαζί με το κυτόχρωμα c (Du et al., 2000). Έτσι, στη συγκεκριμένη μελέτη δεν φαίνεται πιθανό η αναστολή των κασπασών να οφείλεται στις IAPs καθώς η συνεχής παραγωγής του $H_2O_2$ που προκαλεί αναστολή των κασπασών επηρεάζει σημαντικά τα μιτοχόνδρια.

Η μείωση των ενεργειακών αποθεμάτων του κυττάρου είναι ένα άλλο σημείο στο σημείο οποίο θα μπορούσε το $H_2O_2$ να ρυθμίζει την απόπτωση. Όπως προκύπτει από μελέτες της ομάδας της Emily Shacter (Lee and Shacter, 1999, Lee and Shacter, 2000) μετά από προσθήκη σημαντικών δόσεων, το $H_2O_2$ αναστέλλει την απόπτωση και επίσης προκαλεί και μείωση στις ενδοκυττάριες αποθήκες του ATP. Επιπλέον, η αναστολή της απόπτωσης προκάλεσε την εναλλαγή του τύπου θανάτου σε νεκρωτικό. Στις μελέτες αυτές αν και δεν έγινε διερεύνηση του σχηματισμού του αποπτωσώματος υποστηρίχθηκε ότι η μείωση των επιπέδων του ATP δεν επιτρέπει τον σχηματισμό του συμπλόκου διότι αυτή η διαδικασία απαιτεί κατανάλωση ενέργειας (Kass et al., 1996, Richter et al., 1996, Lelli et al., 1998, Leist et al., 1997, Eguchi et al., 1997). Βέβαια σε αντιπαράθεση με τα προηγούμενα, άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι η αναστολή της απόπτωσης δεν οφείλεται στην μείωση των επιπέδων του ATP, καθώς ακόμη και όταν τα επίπεδα του ενδοκυττάριου ATP παραμένουν υψηλά με θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με γλυκόζη οι κασπάσες δεν ενεργοποιούνται και τα κύτταρα πάνε σε απόπτωση (Lemaire et al., 1998). Στην παρούσα μελέτη πάντως η αναστολή της απόπτωση δεν οδήγησε τα κύτταρα σε νεκρωτικό θάνατο.

Όσον αφορά το αποπτώσωμα, είναι γνωστό ότι ορισμένοι παράγοντες δρώντας με διαφορετικούς μηχανισμούς αναστέλλουν την απόπτωση μη επιτρέποντας τον σχηματισμό του. Ένας τέτοιος παράγοντας φαίνεται να είναι η προθυμοσίνη-α που όπως υποστηρίχθηκε πρόσφατα (Jiang et al., 2003) μια από τις δράσεις της είναι να προλαμβάνει τον σχηματισμό του αποπτωσώματος και με τον τρόπο αυτό να αναστέλλει την πορεία της απόπτωσης που εξαρτάται από τις κασπάσες. Μια τέτοια δράση συμφωνεί και με την ογκογενετική λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής, καθώς και άλλοι αρνητικοί ρυθμιστές της απόπτωσης όπως είναι ορισμένα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 (Adams and Cory, 1998, Chao and Korsmeyer, 1998) και οι IAPs (Deveraux and Reed, 1999) έχουν επίσης ογκογενετικές ιδιότητες. Εκτός από την προθυμοσίνη-α, σχετικά νέα δεδομένα υποδεικνύουν και άλλους αναστολείς του σχηματισμού του αποπτωσώματος όπως είναι οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ. Η Hsp-70 για παράδειγμα, αναστέλλει την απόπτωση παρεμποδίζοντας την συνάθροιση της προκασπάσης-9 στον Apaf-1 (Breere et al., 2000, Chun-Ying Li et al., 2000). Θεωρείται

πιθανό ότι η Hsp-70 δεσμεύεται στην CARD περιοχή του Apaf-1 και με τον τρόπο αυτό παρεμποδίζει τον ολιγομερισμό του ή την συνάθροιση της κασπάσης-9 (Saleh et al., 2000). Επίσης και οι Hsp-90 και Hsp-27, έχουν εμπλακεί ως ρυθμιστές του αποπτωσώματος μολονότι φαίνεται πως δρουν σε διαφορετικά επίπεδα. Η Hsp-90 για παράδειγμα πιστεύεται ότι περιορίζει τον ολιγομερισμό του αποπτωσώματος (Pandey et al., 2000) ενώ η Hsp-27 δεσμεύεται στο κυτόχρωμα c και δεν επιτρέπει την ένωσή του με τον Apaf- 1 και τον επακόλουθο ολιγομερισμό του (Bruey et al., 2000). Το $H_2O_2$ που όπως είναι γνωστό ρυθμίζει ένα πλήθος μεταγραφικών παραγόντων, θα μπορούσε κάτω από τις συνθήκες αυτής της μελέτης να προκαλεί την έκφραση τέτοιων πρωτεϊνών που δρουν αναστέλλοντας τον σχηματισμό του αποπτωσώματος. Όπως παρατηρήθηκε στο σχήμα 27, ο Apaf-1 φαίνεται πως ολιγομερίζεται μετά από συνεχή έκθεση σε $H_2O_2$, αλλά δεν εξετάστηκαν οι παράγοντες με τους οποίους είναι συνδεδεμένος.

Ένας άλλος παράγοντας που θα μπορούσε να αναστείλει το σχηματισμό του αποπτωσώματος είναι η οξειδωτική κατάσταση του κυτοχρώματος c. Το κυτόχρωμα c εντοπίζεται ανάμεσα στο σύμπλοκο III (UQH2 – αναγωγάση του κυτοχρώματος c) και στο σύμπλοκο IV (οξειδάση του κυτοχρώματος c) στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα ευκαριωτικά μιτοχόνδρια και η οξειδωτική του κατάσταση οφείλεται στο ιόν σιδήρου που περιέχει η προσθετική ομάδα της αίμης της πρωτεΐνης. Έχει αναφερθεί ότι το αποκυτόχρωμα c που δεν περιέχει ως προσθετική ομάδα την αίμη δεν μπορεί να προκαλέσει απόπτωση in vitro. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι για να προκαλέσει το κυτόχρωμα c την απόπτωση θα πρέπει ο σίδηρος της αίμης να βρίσκεται στην οξειδωμένη μορφή (Ferri, $Fe^{3+}$) ενώ όταν υπάρχει στην οξειδωτική κατάσταση $2^+$ (Ferro, $Fe^{2+}$) κάτω δηλαδή από αναγωγικές συνθήκες δεν μπορεί να προκαλέσει απόπτωση (Hancock et al., 2001). Αυτό όμως που δεν είναι ευρέως γνωστό είναι ότι ο σίδηρος της αίμης μπορεί να υπάρξει και στην οξειδωτική κατάσταση $Fe^{4+}$, όταν οξειδωθεί περαιτέρω. Τα παραπάνω δημιουργούν ερωτήματα για τον ρόλο που παίζει στην απόπτωση το κυτόχρωμα c καθώς αλλαγές στην οξειδωτική κατάσταση της προσθετικής ομάδας του, θα μπορούσε να προκαλέσει προσαρμοστική αλλαγή του μορίου και να επηρεάζει την ικανότητα σύνδεσής του στον Apaf-1.

### 4.2.3 Ο AIF στην διαμεσολάβηση της απόπτωσης

Η αναστολή της απόπτωσης από την συνεχή παραγωγή $H_2O_2$ έφερε στην επιφάνεια το ερώτημα για την τύχη αυτών των κυττάρων. Η επικρατούσα πεποίθηση ήταν ότι η αναστολή της απόπτωσης οδηγεί σε νεκρωτικό θάνατο και πιστεύεται ότι το καθοριστικό γεγονός για την διαφοροποίηση ανάμεσα στους δύο τύπους κυτταρικού θανάτου είναι η ενεργοποίηση του πυρηνικού ενζύμου PARP. Το ένζυμο αυτό ενεργοποιείται ως απόκριση των βλαβών στο DNA και παίρνει μέρος στην επιδιόρθωση του γονιδιώματος. Σε περιπτώσεις ενεργοποίησης του ενζύμου τα ενδοκυττάρια αποθέματα του $NAD^+$ το οποίο όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή αποτελεί υπόστρωμα της PARP, μειώνονται. Το γεγονός αυτό πιστεύεται ότι μπορεί να εξαντλήσει τα επίπεδα του ATP του κυττάρου και να κατευθύνει τα κύτταρα σε νεκρωτικό θάνατο, πιθανά λόγω αναστολής του σχηματισμού του αποπτωσώματος. Αντίθετα, στις περιπτώσεις που ενεργοποιούνται οι κασπάσες, αποκόπτεται η PARP με αποτέλεσμα να χάνει την ενεργότητά της, τα κυτταρικά επίπεδα του $NAD^+$ και του ATP να παραμένουν υψηλά και το κύτταρο να πεθαίνει με απόπτωση. Στην μελέτη αυτή, η συνεχής παραγωγή $H_2O_2$ προκάλεσε μεγαλύτερο ποσοστό βλαβών στις μονές αλυσίδες του DNA σε σχέση με την άμεση προσθήκη του $H_2O_2$ (σχήμα 14) και επιπλέον δεν διασπάστηκε η PARP (σχήμα 22B). Αν και θα περίμενε κανείς τα κύτταρα κάτω από αυτές τις συνθήκες να οδηγούνται σε νεκρωτικό θάνατο, εν' τούτοις δεν ήταν θετικά στη δοκιμασία με Trypan blue (σχήμα 12) και δεν παρατηρήθηκε η χαρακτηριστική ουρά (smear) μετά από ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης (σχήμα 15). Επιπλέον, όταν εξετάστηκε η μορφολογία αυτών των κυττάρων σε μικροσκόπιο φθορισμού παρατηρήθηκε συμπύκνωση της χρωματίνης, μια αλλαγή χαρακτηριστική του αποπτωτικού θανάτου.

Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται να υποδεικνύουν μια εναλλακτική πορεία αποπτωτικού θανάτου ανεξάρτητης των κασπασών. Η απελευθέρωση του AIF από τα μιτοχόνδρια και η μετατόπισή του στον πυρήνα, είχε θεωρηθεί σε άλλα πειραματικά μοντέλα ως υπεύθυνη για την συμπύκνωση της χρωματίνης και την δημιουργία μεγάλης κλίμακας θραυσμάτων του DNA (50 Kb) χωρίς όμως την ενεργοποίηση των κασπασών. Έλεγχος της τοπολογίας του AIF σε Jurkat κύτταρα που εκτίθενται συνεχώς σε $H_2O_2$ προκάλεσε την απελευθέρωση του AIF από τα μιτοχόνδρια και την μετατόπισή του στον πυρήνα (σχήμα 33A). Στα κύτταρα που εκτέθηκαν για 3 ή 6 ώρες με 100 ng/ml GO, ο AIF ανιχνεύθηκε στον πυρήνα σε ένα μεγάλο ποσοστό του κυτταρικού πληθυσμού. Τα ίδια κύτταρα στα οποία ανιχνεύθηκε ο AIF στον πυρήνα ήταν εμφανώς συρρικνωμένα σε σχέση με τους μάρτυρες

(σχήμα 33B). Στην ίδια συγκέντρωση GO ανιχνεύθηκε σημαντικό ποσό του AIF στα πυρηνικά εκχυλίσματα μετά από εξέταση με την τεχνική της ανοσοαποπτύπωσης (σχήμα 34B). Να σημειωθεί ότι στην συγκέντρωση αυτή παρατηρήθηκε και σημαντικό ποσοστό συμπύκνωσης των πυρήνων (σχήμα 29). Αντίθετα, με την άμεση προσθήκη $H_2O_2$ αν και ανιχνεύθηκε ο AIF στα πυρηνικά κλάσματα, η μετατόπισή του από τα μιτοχόνδρια στον πυρήνα δεν ήταν τόσο σημαντική (σχήματα 32 και 34A). Μετά από 6 ώρες επώαση με 0.25 mM $H_2O_2$ μόνο σε ένα μικρό ποσοστό κυττάρων ο AIF ανιχνεύθηκε στον πυρήνα. Να σημειωθεί ότι με την άμεση προσθήκη $H_2O_2$ παρατηρήθηκε ένα ποσοστό συμπυκνωμένων πυρήνων μόνο στην συγκέντρωση του 1 mM $H_2O_2$, ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις το ποσοστό αυτό δεν διέφερε σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες.

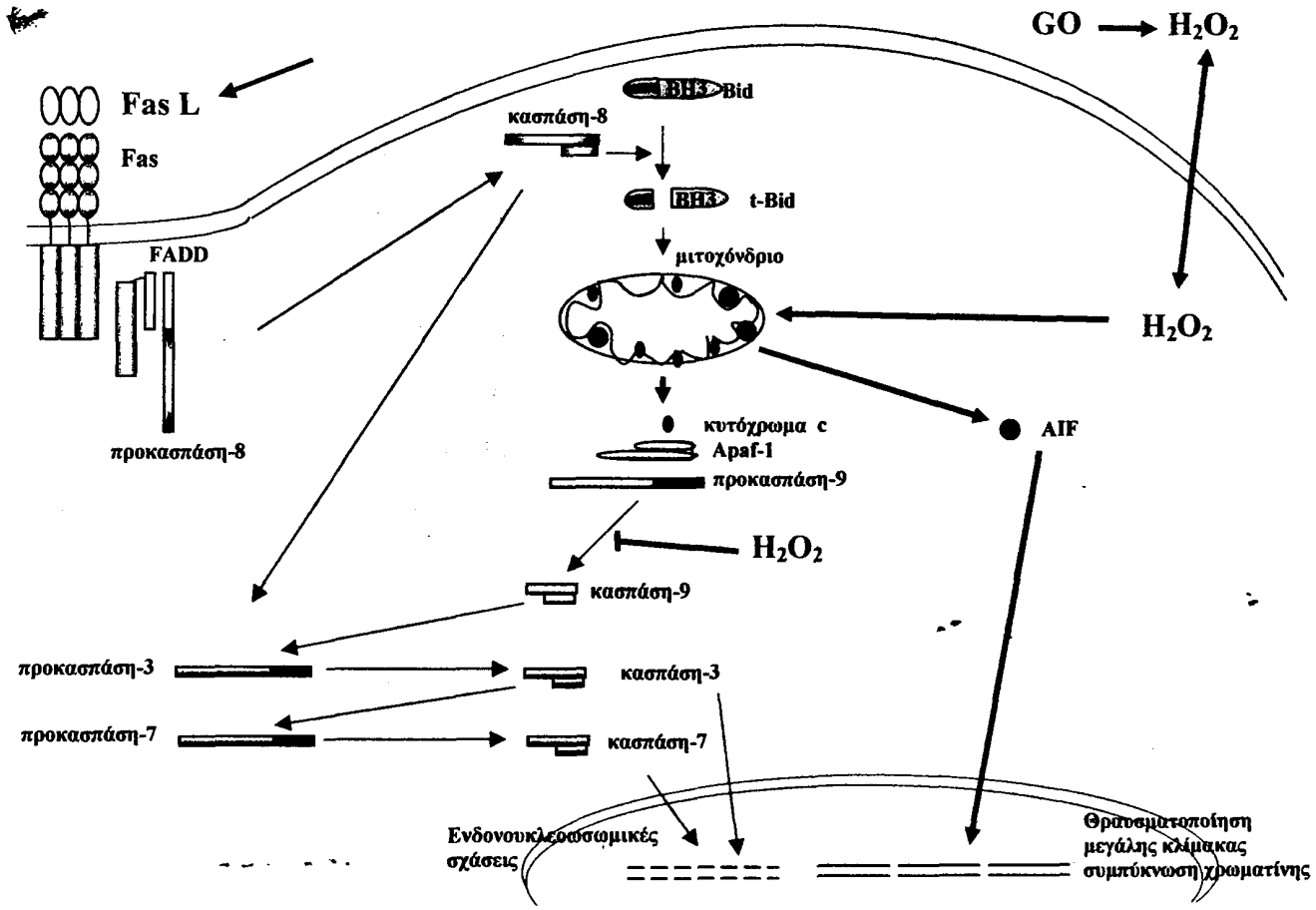
Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που προκαλούν την απελευθέρωση του AIF, καθώς και του κυτοχρώματος c και των άλλων μιτοχονδριακών παραγόντων δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Υποστηρίζεται σχεδόν σε όλες τις δημοσιευμένες μελέτες ότι η απελευθέρωση του AIF ακολουθεί την μείωση του διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων. Όπως παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη η συνεχής παρουσία του $H_2O_2$ προκάλεσε σημαντική πτώση του Δψm. Συγκεκριμένα, μείωση του Δψm παρατηρήθηκε για συγκεντρώσεις υψηλότερες των 10 ng/ml ενζύμου, ενώ στη συγκέντρωση των 100 ng/ml παρατηρήθηκε πλήρης καταστροφή του (σχήματα 36 και 37B). Επίσης ένα μικρό ποσοστό του AIF ανιχνεύθηκε στα πυρηνικά εκχυλίσματα για συγκεντρώσεις ενζύμου υψηλότερες των 25 ng/ml ενώ το ποσό αυτό ήταν πιο σημαντικό στην συγκέντρωση των 100 ng/ml (σχήμα 34B). Στις ίδιες συνθήκες παρατηρήθηκε επίσης και συμπύκνωση της χρωματίνης (σχήμα 28).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η άμεση προσθήκη $H_2O_2$ δεν φαίνεται να προκάλεσε σημαντικές αλλαγές στο Δψm. Μετά από 6 ώρες επώαση με $H_2O_2$ παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση του Δψm (σχήματα 35 και 37A) η οποία είναι αμελητέα σε σχέση με αυτή που παρατηρείται από την GO. Επιπλέον, κάτω από αυτές τις συνθήκες δεν παρατηρήθηκε σημαντική μετατόπιση του AIF στον πυρήνα, όπως δεν παρατηρήθηκε και συμπύκνωση των πυρήνων αυτών των κυττάρων. Η άμεση προσθήκη του $H_2O_2$ όμως προκάλεσε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια παρά το γεγονός ότι το Δψm παρέμεινε υψηλό. Αν και η παρατήρηση αυτή έχει γίνει και από άλλες ομάδες, δεν έχει ξεκαθαριστεί πως τα κύτταρα καταφέρνουν και διατηρούν το Δψm κάτω από αυτές τις συνθήκες.

Επιπλέον, υπάρχουν στην βιβλιογραφία διαφορετικές απόψεις ως προς τον παράγοντα που διαφεύγει πρώτος από τα μιτοχόνδρια. Σε ορισμένες εργασίες υποστηρίζεται ότι πρώτα διαφεύγει ο AIF ο οποίος μάλιστα μπορεί να προκαλέσει την περαιτέρω απελευθέρωση του AIF και του κυτοχρώματος c, ενώ μερικοί ερευνητές υποστηρίζουν το αντίθετο. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι 6 ώρες μετά την προσθήκη του $H_2O_2$ και οι δύο παράγοντες έχουν απελευθερωθεί και επίσης όταν παρατηρείται απότομη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c τότε φαίνεται πως μετατοπίζεται και ο AIF. Δεν μπορούμε όμως να υποστηρίξουμε με σιγουριά ποιος από τους δύο παράγοντες απελευθερώνεται πρώτος και ποιος δεύτερος.

Το εύλογο ερώτημα που δημιουργείται είναι γιατί ο AIF απελευθερώνεται σε σημαντικό βαθμό μόνο στην περίπτωση της συνεχούς παραγωγής του $H_2O_2$. Φαίνεται πως κάτω από τις συνθήκες αυτές η PARP ενεργοποιείται σε σημαντικό βαθμό ως αποτέλεσμα της βλάβης στο DNA. Μια πρόσφατη μελέτη υποστήριξε ότι τον κεντρικό ρόλο για την απελευθέρωση του AIF από τα μιτοχόνδρια παίζουν οι βλάβες στο γονιδίωμα. Η ενεργοποίηση της PARP προκαλεί την πτώση του $NAD^+$ και στη συνέχεια με ένα άγνωστο μηχανισμό φαίνεται πως οδηγεί στην πτώση του $\Delta\psi m$. Το γεγονός αυτό προκαλεί στη συνέχεια την απελευθέρωση του AIF. Αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζουν περισσότερο τα πειραματικά δεδομένα καθώς η συνεχής παραγωγή $H_2O_2$ προκαλεί σημαντικότερες βλάβες στο DNA όπως αυτές μετρήθηκαν με την τεχνική SCGE που μετρά τις βλάβες στις μονές αλυσίδες.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται πως η συνεχής έκθεση κυττάρων Jurkat-T σε $H_2O_2$ αναστέλλει τον καταρράκτη των κασπασών στο επίπεδο του σχηματισμού του αποπτωσώματος και της ενεργοποίησης της κασπάσης-9. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ο κυτταρικός θάνατος λαμβάνει χώρα με μια πορεία ανεξάρτητη των κασπασών η οποία όμως εξαρτάται από την μετατόπιση του AIF από τα μιτοχόνδρια στον πυρήνα (σχήμα 38).




**Σχήμα 38:** Ο ρόλος του $H_2O_2$ στους μοριακούς μηχανισμούς πρόκλησης της απόπτωσης

## 5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΣΤΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Η συνεχής δημιουργία και απομάκρυνση του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου ($H_2O_2$) καθώς και άλλων Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ΔΜΟ), φαίνεται να είναι κοινό φαινόμενο μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων. Παρόλα αυτά, η αύξηση της δημιουργίας του $H_2O_2$ μπορεί να διαταράξει την οξειδοαναγωγική ισορροπία στα κύτταρα και να οδηγήσει σε μια κατάσταση που είναι γνωστή ως «οξειδωτικό στρες». Σε σχετικά χαμηλά επίπεδα, το οξειδωτικό στρες ελέγχει πορείες μεταγωγής σήματος, με αποτέλεσμα να έχει επιπτώσεις σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση. Σε υψηλότερα επίπεδα όμως, το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα βασικά κυτταρικά συστατικά καθώς και τον θάνατο είτε με απόπτωση είτε με νέκρωση. Από τα μόρια που είναι υπεύθυνα για την αύξηση του οξειδωτικού στρες, κεντρικό ρόλο παίζει το $H_2O_2$. Το μόριο αυτό παράγεται από όλες σχεδόν τις ενδοκυττάριες πηγές του οξειδωτικού στρες και εξαιτίας της δομής και της χαμηλής δραστικότητάς του, μπορεί να διαχέεται ελεύθερα μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών διαμερισμάτων ή κυττάρων ενός ιστού και να δρα σαν δεύτερος διαβιβαστής.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν οι μοριακοί μηχανισμοί πρόκλησης κυτταρικού θανάτου από το $H_2O_2$ στην ανθρώπινη λεμφοκυτταρική σειρά Jurkat. Για τον σκοπό των πειραμάτων τα κύτταρα εκτέθηκαν είτε σε $H_2O_2$ που προστέθηκε άμεσα στην καλλιέργεια, είτε σε χαμηλές δόσεις του ίδιου παράγοντα που δημιουργούνται από την ενζυμική δράση της οξειδάσης της γλυκόζης. Η απόπτωση εκτιμήθηκε με ανάλυση του σχηματισμού του χαρακτηριστικού ladder μετά από ηλεκτροφόρηση του DNA, που είναι αποτέλεσμα της ενδονουκλεοσωμικής σχάσης. Επώαση με $H_2O_2$ που προστέθηκε άμεσα στην καλλιέργεια ή με αντίσωμα Fas οδήγησε σε αποπτωτικό τύπο θανάτου. Παρόλα αυτά, η συνεχής έκθεση των κυττάρων σε χαμηλές δόσεις $H_2O_2$ ανέστειλε την πρόκληση ενδονουκλεοσωμικής σχάσης ανεξάρτητα από το ερέθισμα και την αποπτωτική πορεία που ενεργοποιείται αρχικά. Εκτός από την ενδονουκλεοσωμική σχάση, η συνεχής παραγωγή χαμηλών δόσεων $H_2O_2$ ανέστειλε επίσης την σχάση και ενεργοποίηση της κασπάσης-9, της κασπάσης-3 και της κασπάσης-7, καθώς και την σχάση του πυρηνικού υποστρώματός τους PARP, ανεξάρτητα αν

η απόπτωση προκλήθηκε από την άμεση προσθήκη $H_2O_2$ ή από αντίσωμα Fas. Παρόλα αυτά το $H_2O_2$ ανεξάρτητα από τον τρόπο προσθήκης του στην καλλιέργεια οδήγησε σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, η συνεχής παραγωγή $H_2O_2$ προκάλεσε τον ολιγομερισμό του Apaf-1 στο κυτταρόπλασμα. Από τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανές πως η παρουσία του $H_2O_2$ κατά την διάρκεια της εκτέλεσης της απόπτωσης αναστέλλει την διαδικασία στο επίπεδο του σχηματισμού του αποπτωσώματος ή της ενεργοποίησης της κασπάσης-9. Η ενεργοποίηση των κασπασών υποστηρίζεται ότι ελέγχεται ισχυρά από τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες του κυττάρου, καθώς τα ένζυμα αυτά περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο μια πυρηνόφιλη κυστεΐνη που είναι επιρρεπής στην οξείδωση ή και στην αλκυλίωση. Είναι πιθανό η αναστολή της πορείας των κασπασών από την συνεχή παρουσία του $H_2O_2$ στην μελέτη αυτή να οφείλεται σε τροποποίηση του ενεργού κέντρου της κασπάσης-9. Επίσης είναι πιθανό κάτω από τις συνθήκες αυτής της μελέτης η ανασταλτική δράση του $H_2O_2$ να οφείλεται σε υπερέκφραση πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο αποπτώσωμα και δεν επιτρέπουν την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών.

Το ερώτημα που προέκυψε στη συνέχεια ήταν για την τύχη των κυττάρων στα οποία εμποδίζεται η ενεργοποίηση των κασπασών από την συνεχή παρουσία του $H_2O_2$. Όταν εξετάστηκε η μορφολογία αυτών των κυττάρων, παρατηρήθηκε ότι η συνεχής παραγωγή του $H_2O_2$ προκάλεσε συμπύκνωση της χρωματίνης. Επιπλέον, προκλήθηκε πλήρης καταστροφή του διαμεμβρανικού δυναμικού. Τα παραπάνω αποτελούν χαρακτηριστικά του αποπτωτικού θανάτου, και παρατηρήθηκαν κάτω από συνθήκες στις οποίες δεν ενεργοποιούνται οι κασπάσες. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης υποδηλώνουν ότι το $H_2O_2$ κάτω από ορισμένες συνθήκες είναι δυνατόν να προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο μέσω ενός μηχανισμού που είναι ανεξάρτητος των κασπασών αλλά εξαρτάται από τον AIF.

## 6. SUMMARY

## STUDIES ON THE ROLE OF HYDROGEN PEROXIDE ON THE MOLECULAR MECHANISMS OF APOPTOTIC CELL DEATH

Continuous generation and removal of hydrogen peroxide ($H_2O_2$) and other "reactive oxygen species" (ROS) appears to be a common phenomenon among different cell types. However, conditions of increased production or decreased removal may lead to a higher steady-state level of these species, a situation generally called "oxidative stress". This situation has been shown to modulate signal transduction pathways with consequent effects on basic cellular functions, like cell proliferation and differentiation. Even higher levels of oxidative stress may induce cell damage and death either by necrosis or apoptosis. Among a great variety of ROS, $H_2O_2$ plays a pivotal role since it is generated from nearly all sources of oxidative stress and can diffuse freely in and out of cells and tissues. Moreover, it has been shown that $H_2O_2$ has the ability to modulate signal transduction pathways.

In the present study, the molecular mechanisms of $H_2O_2$-induced DNA damage and cell death, were investigated. Jurkat cells (ATCC, clone E6-1) were treated with either a bolus addition of $H_2O_2$ or exposed to the enzyme glucose oxidase which was able to generate continuously $H_2O_2$.

The extent of apoptosis in cells exposed to either a bolus addition (0.25 mM) or to continuously generated $H_2O_2$ (0.1 μg/ml glucose oxidase able to generate about 2 μM $H_2O_2$/min) was evaluated by analyzing the formation of the characteristic ladder pattern after electrophoresis of the extracted cellular DNA. As expected, clear apoptotic cell death was observed when cells were exposed for 6 hours to a bolus addition of $H_2O_2$ or to an anti-Fas monoclonal antibody. However, the DNA of cells exposed to continuously generated $H_2O_2$ did not show any signs of internucleosomal fragmentation. Moreover, the presence of relatively low levels of $H_2O_2$ during the course of execution of the apoptotic process inhibited the fragmentation of DNA regardless whether the initiator was a bolus addition of $H_2O_2$ or an anti-Fas anti-body. Apart from nucleosomal cleavage, the continuous presence of $H_2O_2$ inhibited also the cleavage and the activation of caspase-9, caspase-3, caspase-7 and PARP. Interestingly, both $H_2O_2$ treatments were able to induce the release of cytochrome c from mitochondria to cytosol. Moreover, continuous generation of $H_2O_2$ induced Apaf-1

oligomerization. From the above results, it was concluded that the presence of relatively low concentrations of $H_2O_2$ during the execution of the apoptotic process leads to inhibition rather than activation of caspase cascade. It was also shown that this inhibition is exerted at the stage of caspase-9 auto-activation.

The question arising from the above results regards the ultimate fate of cells in which the activation of caspases was blocked by the presence of $H_2O_2$. When nuclear morphology was examined, it was observed that continuously generated $H_2O_2$ caused chromatin condensation, a characteristic apoptotic marker, although under the same conditions the caspases remained inactive. Moreover, it was observed that AIF, a mitochondrial protein associated with apoptosis, was released from the mitochondria and transported to the nucleus. These results indicate that exposure of cells to continuously generated $H_2O_2$ leads to a caspase-independent cell death, like that described to be induced by AIF. Indeed, it appears that cells under these conditions are doomed to die by AIF-dependent cell death.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abid, MR., Tsai, JC., Spokes, KC., Deshpande, SS., Irani, K., Aird, W.C. (2001) Vascular endothelial growth factor induces manganese-superoxide dismutase expression in endothelial cells by a Rac1-regulated NADPH oxidase-dependent mechanism. FASEB J. **13,** 2548-2550

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., Akey, C.W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. Mol. Cell **2,** 423-432

Adrain, C., Slee, E.A., Harte, M.T., Martin, S.L. (1999) Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40repeat region. J. Biol. Chem. **274,** 20855-20860

Adrain, C., Martin, S.J. (2001) The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. Trends Biochem. Sci. **6,** 390-397

Adams, J.M., Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science **281,** 1322 -1326

Allen, R.G., Balin, A.K. (1989) Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. Free Radic. Biol. Med. **6,** 631-661

Alnemri, E..S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 Protease Nature. Cell **87,** 171-176

Antunes, F., Cadenas, E. (2000) Estimation of $H_2O_2$ gradients across biomarkers. FEBS Let. **475,** 121-126

Arnold, R.S., Shi, J., Murad, E., Whalen, A.M., Sun, C.Q., Polavarapu, R., Parthasarathy, S., Petros, J.A., Lambeth, J.D. (2001) Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic Oxidase Nox-1. Proc Natl Acad Sci USA **98,** 5550-5555

Arnoult, D., Parone, P., Martinou, J.C., Antonsson, B., Estaquier, J. and Ameisen, J.C.(2002) Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. J. Cell Biol. **159,** 923-929

Ashkenazi, A., Dixit, V.M. (1998) Death Receptors: Signaling and Modulation. Science **281,** 1305-1308

Ashkenazi, A., Dixit, V.M. (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors Curr. Opin. Cell Biol. **11;** 255-260

Baeuerle, P.A. (1998) IκB-NF-κB structures: at the interface of inflammation control. Cell **95,** 729-731

Baeuerle, P.A., Henkel, T. (1994) Function and activation of NF-κB in the immune system. Annu. Rev. Immunol. **12,** 141-179

Banki, K., Hutter, E., Gonchoroff, N.J., Perl, A. (1999) Elevation of Mitochondrial Transmembrane Potential and Reactive Oxygen Intermediate Levels Are Early Events and Occur Independently from Activation of Caspases in Fas Signaling. J. Immun. **15,** 1466-1479

Basanez, G., Nechushtan, A., Drozhinin, O., Chanturiya, A., Choe, E., Tutt, S., Wood, K.A., Hsu, Y., Zimmerberg, J., Youle, R.J. (1999) Bax, but not Bcl-$X_L$ decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **11,** 5492-5497

Bayraktutan, U., Blayney, L., Shah, A.M. (2000) Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91$^{-phox}$ and p22$^{-phox}$ in endothelial cells. Arterioscler. Thomb. Vasc. Biol. **20,** 1903-1911

Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M., Green, D.R. (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. Nat. Cell Biol. **8,** 469-475

Belzacq, A.S., Vieira, H.L., Kroemer, G., Brenner, C. (2002) The adenine nucleotide translocator in apoptosis. Biochimie. **84**, 167-176.

Beraud, C., Henzel, W.J., Baeuerle, P.A. (1999) Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-κB activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 429-434

Berder, K., Gottlicher, M., Whitwrside, S., Rahmsdorf, H.J., Herrlich, P. (1998) Sequential DANN damage independent and dependent activation of NF-κB by UV. EMBO J. **17**, 5171-5181

Bhunia, A.K., Akai, T., Bulkley, G., Chatterjee, S. (1998) Lactosylceramide mediates tumor necrosis factor-α-induced intercellular sdhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and the adhesion of neutrophil in human umbilical vein endothelial cells. J. Biol. Chem. **273**, 34349-34357

Bidere, N., Senik, A. (2001) Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: A minireview. Apoptosis. **6**, 371-375

Boldin, M.P., Concharov, T.M., Goltsev, Y.V., Wallach, D. (1996) Involvment of MACH, a novel MORT1/FADD- interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. Cell **85**, 803-815

Bonizzi, G., Dejardin, E., Piret, B., Piette, J., Merville, MP., Bours, V. (1996) Interleukin-1 β induces factor κB in epithelial cells independently of the production of reactive oxygen intermediates. Eur. J. Biochem. **242**, 544-549

Bonizzi, G., Piette, J., Merville, MP., Bours, V. (1997) Distinct signal transduction pathways mediate nuclear factor-kappa B induction by IL-1β in epithelial and lymphoid cells. J. Immunol. **159**, 5264-5272

Bonizzi, G., Piette, J., Schoonbroodt, S., Greimers, R., Havard, L., Merville, MP., Bours, V. (1999) Reactive oxygen intermediate-dependent NF-κB activation by interleukin-1b requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity. Mol. Cell Biol. **19,** 1950-1960

Brancolini, C., Benedetti, M., Schneider, C. (1995) Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. EMBO J. **14,** 5179-5190

Bratton, S.B., Walker, G., Roberts, D.L., Cain, K., Cohen, G.M. (2001a) Caspase-3 cleaves Apaf-1 into an approximately 30 kDa fragment that associates with an inappropriately oligomerized and biologically inactive approximately 1.4 MDa apoptosome complex. Cell Death Differ. **4,** 425-433

Bratton, S.B., Cohen, GM. (2001b) Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? Trends Pharmacol. Sci. **6,** 306-315

Brenner, C., Kroemer, G. (2000a) Mitochondria-the death signal integrators. Science **289,** 1150-1151

Brenner, C. (2000b) Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. Oncogene **19,** 329-336

Burkle, A. (2001) Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. Bioessays **9,** 795-806

Cain, K., Brown, D.G., Langlais, C., Cohen, G.M.(1999) Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (~ 700 kDa) caspase-activating complex. J. Biol. Chem. **32,** 22686-22692

Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M., Cohen, G.M. (2000) Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. J Bio Chem **9,** 6067-6070

Cain, K., Bratton, S.B., Cohen, G.M. (2002) The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. Biochimie 2-3, 203-214

Cande, C., Cecconi, F., Dessen P., and Kroemer G. (2002a) Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? Journal of Cell Science **115**, 4727-4734

Cande, C., Cohen, C., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N. Zamzami, N. and Kroemer, G. (2002b) Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. Biochimie **84**, 215–222

Castedo, M., Ferri, K., Roumier, T., Metivier, D., Zamzami, N. and Kroemer G. (2002) Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. J. Immun. Meth. **256**, 39–47

Cecconi F. (1999) Apaf-1 and the apoptotic machinery. Cell Death Differ. **11**, 1087-1098

Cerretti, D.P., Kozolosky C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T. A., March, C.J. Kronheim, S.R., Druck, T., Cannizarro L.A., Huebner, K. and Black, R.A. (1992) Molecular cloning of the of the interleukin-1β converting enzyme. Science **256**, 97-100

Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., Shi. Y. (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. Nature. **406**, 855-862.

Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev. **59**, 527-605

Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. **29**, 323-333

Chao, D.T., Korsmeyer, S.J. (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. Annu. Rev. Immunol. **16**, 395-419

Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J.P., Brauer, M.J., Kiefer, M.C., Barr, P.J., Mountz, J.D. (1994) Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. Science **263,** 1759-1762

Chen, J.W., Dodia, C., Feinstein, S.I., Jain, M.K., Fisher, A.B. (2000) 1-Cys peroxide-doxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. J. Biol. Chem. **275,** 28421-28427

Chen, K.H., Reece, L.M., Leary, J.F. (1999) Mitochondrial glutathione modulates TNF-alpha-induced endothelial cell dysfunction. Free Radic. Biol. Med. **27,** 100-109

Chen, M., Wang, J. (2002) Initiator caspases in apoptosis signalling pathways. Apoptosis **7,** 313-319

Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K., Hardwick, J.M. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. Science **278,** 1966-1968

Chiarugi, A., Moskowitz, M.A. (2002) PARP-1-a Perpetrator of Apoptotic Cell Death? Science **297,** 200-201

Clerk, A., Fuller, SJ., Michael, A., Sugden, P.H. (1998) Stimulation of "stress regulated" mitogen-activated protein kinase (stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinase and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative stresses. J. Biol. Chem. **273,** 7228-7234

Coffer, P.J., Jin, J., Woodgett, JR. (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol-3-kinase activation. Biochem J **335,** 1-13

Cohen, G.M (1997) Caspases: the ex ecutioners of apoptosis. Biochem. J. **326,** 1-16

Cooke, MS. (1997) Immunogenicity of DNA damaged by ROS-implications for anti-DNA antibodies in lupus. Free Rad. Biol. Med. **22,**151-156

Cooncanon, C.G., Orrenius, S, Samali, A. (2001) Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. Gene Exper. **4-5**, 195-201

Coyle, J.T., Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. Science **262**, 689-692

Cregan, E.M. and Martin, S.J. (2001) Caspases: cellular demolition experts. Biochemical Society Transdactions **29**, 696-702

Cregan, P.C., Fortin, A., MacLaurin, J.G., Callaghan, S.M., Cecconi, F., Yu, S.W., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Park, D.S., Kroemer, G. and Slack, R.S. (2002) Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. J. Cell Biol. **158**, 507–517

Crys, V., Yuan, J. (1998) Proteases to die for. Genes & Development **12**, 1551-1570

Daugas, E., Santos, A., Susin, A., Zamzami, N., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., Kroemer, G. (2000a) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis FASEB J **14**, 729-739

Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S.A., Zamzami, M. and Kroemer, G. (2000b) Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. FEBS Letters. **476**, 118-123

Darzynkiewich, Z., Li, X. (1996) DNA content analysis after extraction of the degraded DNA from apoptotic cells. Techniques in apoptosis, a user's guide. Cotter T.G., Martin S.J. Portlant Press Ltd. London, UK pp 89-94

Davis, L.G., Kuehl, W.M., Battey, J.F. (1994) Basic Methods in Molecular Biology, 2nd ed. Appleton & Lange, Norwalk, CT

Davies, M.J, Dean, R.T. (1997) Radical–mediated protein oxidation, from chemistry to medicine. Oxford University Press, Oxford UK

Davies MJ. (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. Biochem Biophys Res Commun. **305;** 761-770

De Keulenaer, G.W., Alexader, R.W., Ushio-Fukai M., Ishizaka, N., Griendling, KK. (1998) Tumor necrosis factor-α activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle cells. Biochem J. **329,** 653-657

Denizof, F., Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J. Immunol. Methods **2,** 271-277

Desagher, S., Martinou, J.C. (2000) Mitochondria as a control point of apoptosis. Trends Cell Biol. **10,** 369-377

Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, JC. (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. Nature **388,** 300-304.

Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., Reed. J.C. (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. EMBO J. **17,** 2215-2223

Deveraux, Q.L., Reed, J.C. (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. Genes Dev. **13,** 239-252.

Di Donato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E., Karin, M.A. (1997) A cytokine-responsive IκB kinase that activates the transcription factor NF-κB. Nature **388,** 548-554

Dimmeler, S., Assums, B., Hermann, C., Haendeler, J., Zeiher, AM. (1998) Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. Circ Res **83,** 334-341

Downward J. (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. Curr. Option. Cell Biol **10**, 262-267

Dragana. X., Filipovic. M., Brian Reeves X. (1999) Inhibition of PARP prevents oxidant-induced necrosis but not apoptosis in LLC-PK1 cells. Am. J. Physiol. Renal Physiol. **277**, 428-436

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000) Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c–Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. Cell **102**, 33-42

Duval, C., Cantero, A., Auge, N., Mabile, L., Thiers, J.C.,Salvayre, A., Salvayre, R. Proliferation and wound healing of vascular cells. trigger the generation of extracellular reactive oxygen species and LDL oxidation. Free Radical Biol. Med. **35**, 1589-1598 Carine Duval,

Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annu. Rev. Biochem. **68**, 383-424

Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (1997) Intracellular ATP levels determine cell fate by apoptosis or necrosis. Cancer Res. **57**, 1835-1840

Ekert, P.G., Silke, J., Hawkins, C.J., Verhagen, A.M., Vaux, D.L. (2001) DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. J Cell Biol. **152**, 483-490.

Elisaf, M., Tselepis, A.D. (2003) Effect of hypolipidemic drugs on lipoprotein-associated platelet activating factor acetylhydrolase. Implication for atherosclerosis. Biochem. Pharmacol. **11**, 2069-2073

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature **391**, 43-50.

Feng, L., Xia Y., Garcia GE., Hwang D., Wilson CB. (1995) Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1 tumor necrosis factor alpha, and lipopolysaccharide.J. Clin. Invest. **95,** 1669-1675

Ferri, K.F., Jacotot, E., Blanco, J., Este, J.A., Zamzami A., Susin, S.A., Brothers, G., Reed, J.C., Penninger, J.M., Kroemer, G. (2000a) Apoptosis control in syncytia induced by the HIV-1-envelope glycoprotein complex. Role of mitochondria caspases. J. Exp. Med. **192,** 1081-1092

Ferri, K.F., Jacotot, E., LeDuc, P., Geuskens, M., Ingber, D.E., Kroemer, G. (2000b) Apoptosis of syncytia induced by HIV-1-Envelope glycoprotein complex. Influence of cell shape and size. Exp. Cell Sci. **261,** 119-126

Flohe, L., Brigelius-Flohe, R., Saliou, C., Traber, MG. , Packer, I. (1997) Redox regulation of NF-κB activation. Free Radic Biol Med **22,** 1115-1126

Forman, E.J., Cadenas, E. (1997) Oxidative stress and signal transduction. University of Southern California, International Thomson Publishing, Los Angeles, California

Fujio, Y., Walsh, K. (1999) Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. J. Biol. Chem. **274,** 16349-1654.

Fukui, T., Ishizaka, N., Rajagopalan, S., Laursen, JB., Capers, Q., Taylor, WR., Harrison, DG., DeLeon, H., Wilcox, JN., Griendling, KK. (1997) p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. Circ. Res. **80,** 45-51

Gaetani, G.F. (1995) Importance of catalase in the disposal of $H_2O_2$ within human erythrocytes. Blood **216;** 841-845

Garmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.B., Michell, J.B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomatic assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. **47:** 936-942 (1987)

Gerber, H.P., Mc Murtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V., Ferrara, N. (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. J. Biol. Chem. **273**, 30336-43.

Genini, D., Sheeter, D., Rought, S., Zaunders, J.J. Susin, S.A., Kroemer, G., Richman D.D., Carson, D.A., Corbeil, J., Leoni, L.M. (2001) HIV induces lymphocyte apoptosis by a p53-initiated,mitochondrial-mediated mechanism. Faseb J. **15**, 5-7

Ginn-Pease, M.E., Whisler, R.L. (1998) Redox signals and NF-κB activation in T cells. Free Radic. Biol. Med. **25**, 346-361

Goldman, R., Moshonov, S., Zor, U. (1998) Generation of reactive oxygen species in a human keratinocyte cell line: role of calcium. Arch. Biochem. Biophys. **350**, 10-18

Goldman, R., Zor, U., Meller, R., Moshonov, S., Furstenberger, G., Seger, R. (1997) Activation of MAP kinases, $cPLA_2$ and reactive oxygen species formation by EGF and calcium mobilixing agonists in human keratinocyte cell line. Adv. Exp. Med. Biol. **407**, 289-293

Goosens, V., Grooten, J., Fiers, W. (1996) The oxidative metabolism of glutamine. A modulation of reactive oxygen intermediate-mediated cytotoxicity of tumor necrosis factor in L929 fibrosarcoma cells. J Biol. Chem. **271**, 192-296

Gopalakrishna, R., Jaken, S. (2000) Protein kinase C signaling and oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. **28**, 1349-1361

Gorlach, A., Brandes, R.P., Nguyen, K., Amidi, M., Dehghani, F., Busse, R. (2000) A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. Circ Res. **87**, 26-32.

Gorman, A., McCathy, J., Finucane, D., Reville, W., Cotter, T. (1996) Trypan blue exclusion. Techniques in Apoptosis, A User's Guide. Cotter T.G. and Martin S.J. Portlant Press Ltd.London, UK. pp 6-7

Gower, J.D. (1998) A role for dietary lipids and antioxidants in the activation of carcinogens. Free Rad. Biol. Med. **5,** 95-100

Green, D.R., Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. Science **281,** 1309-1312

Griendling, K.K., Minieri, C.A., Ollerenshaw, J.D., Alexander, R.W. (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase in cultured vascular smooth muscle cells. Circ. Res. **74,** 1141-1148

Grossmann, J. (1998) Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. Am. J. Physiol. **274,** G1117-G1124

Ha, H.S., Snyder, S.H. (2000) Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 in the nervous system Neurobiol. Dis. **7,** 225-239

Halliwell, B., Aruoma, O.I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBS Lett. **281,** 321-336

Halliwell, B., Cutteridge J.C. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. 3nd ed. Clarendon Press, Oxford 500pp

Hampton, M.B., Orrenius, S. (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. FEBS Lett. **414,** 552-556.

Hampton, M.B., Fadeel, B., Orrenius, S. (1998) Redox regulation of the caspases during apoptosis. Ann. N. Y. Acad Sci. **854,**328-335

Han, J., Luby-Phelps. K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A., Broek, D. (1998) Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. Science **279**, 558-560.

Han, Z., Hendrickson, E.A, Bremner, T.A., Wyche, J.H. (1997) A sequential two step mechanism for the production of the mature p17/p12 form of caspase-3 in vitro. J. Biol. Chem. **272**, 13432-13436

Hancock, J.T., Desikan, R., Neill, S.J. (2000) Does the redox state of cytochrome c act as a fail-safe mechanism in the regulation of programmed cell death? Free Radic. Biol. Med. **31**, 697-703

Hass, U. (2003) Current status of developmental neurotoxicity: regulatory view. Toxicol Lett. **11**, 155-159

Haass C. (1999) Dead end for neurodegeneration? Nature **399**, 204-207

Hedges, J.C., Dechert, MA., Yamboliev, IA., Hickey, E., Webwr, L.A., Gerthoffer, W.T. (1999) A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. J Biol. Chem. **274**, 24211-24219

Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis Nature **407**, 770-776

Henle, E.S., Han, Z., Tang, N., Rai, P., Luo, Y., Linn, S. (1999) Sequence-specific DNA cleavage by $Fe^{2+}$- mediated Fenton reaction has possible biological implication. J. Biol. Chem. **274**, 962-971

Hirata, H. (1998) Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream process in Fas-induced apoptosis. J. Exp. Med **187**, 587-600

Hofmann, K., Bucher, P., Tschopp, J. (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. Trends in Biochemical Sciences **22**, 155-156

Hohlbaum, A.M, Moe, S., Marshak-Rothstein, A. (2000) Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival J Exp Med. **7,** 1209-1220

Horvitz, H.R. (2001) Genetic control of programmed cell death in C. Elegans. ScientificWorld Journal. **1,** 137-139

Humke, E. W., Ni, J., Dixit, V.M. (1998) ERICE, a novel FLICE-activatable caspase. J. Biol. Chem. **273,** 15702-15707

Hu, Y.M., Benedict, M.L., Ding, L.Y., Nunez, G. (1999) Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. EMBO J. **18,** 3586-3595

Imbert, V., Rupec, RA., Livolsi, H., Pahl, HL. Traenckner, EB., Mueller-Dieckmann C., Farahifar, D., Rossi, B., Auberger, P., Baeuerle, PA., Peyron, JF. (1996) Tyrosine phosphorylation of IκBα activates NF-κB without proteolytic degradation of IκBα. Cell **86,** 787-798

Irani, K., Xia, Y., Zweier, JL., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finker, T., Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in Rat-transformed fibroblasts. Science **275,** 1649-1652

Isael, N., Gougerot-Pocidalo, M.-A., Aillet, F., Virelizier, J.-L. (1992) Redox status of cells influences constituative or induced NF-κB translocation and HIV long terminal repeat activity in human T and monocyte cell lnes. J. Immunol. **149,** 3386-3393

Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizusima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell **66,** 233-243

Jacobson, M.D. (1997) Programmed cell death in animal development. Cell **88,** 347-354

Janssen-Heininger, Y.M.W., Poynter, M.E., Baeuerle, P.A. (2000) Recent advantages towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor κB. Free Radic. Biol. Med. **28**,1317-1327

Jiang, X, Wang, X. (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. J. Biol. Chem. **40**, 31199-31203

Jiang, X, Kim, H.E, Shu, H., Zhao, Y., Zhang, H., Kofron, J., Donnelly, J., Burns, D., Rosenberg, S., Wang, X. (2003) Distinctive roles of PHAP proteins and Prothymosin-α in a death regulatory pathway. Science **299**, 223-226

Jin, N., Hatton, N.D., Harrington, m.A., Xia, X., Lansen, S.H., Rhoades R.A. (2000) $H_2O_2$-induced erg-1, fra-1 and c-jun gene expression is mediated by tyrosine kinase in aortic smooth muscle cells. Free Radic. Biol. Med. **29**, 736-746

Joneson, T., Bar-Sagi, D. (1998) A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production. J. Biol. Chem. **273**, 17991-17994

Joza, N., Kroemer, G., Penninger, J.M. (2002) Genetic analysis of the mammalian cell death machinery Trends in Genetics **18**, 142-149

Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanfordk, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y.J., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.-Y. M., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G. and Penninger, J.M. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. Nature **410**, 549-554

Kang, S.W., Chae, H.Z., Seo, M.S., Kim, K.H., Baines, I.C., Rhee, S.G. (1998) Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-α. J. Biol. Chem. **273**, 6297-6302

Kass, G.E.N., Erikson J.E., Weis, M., Orrenius, S., Chow, S.C. (1996) Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. Biochem. J. **318**, 749-752

Kaufmann, S. Hengartner, M.O. (2001) Programmed cell death: alive and well in the new millennium. Trends Cell Biol. **11,** 526-534

Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., Poirier, G.G. (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Res. **53,** 3976-3985

Kensler, T.W., Teffe, B.G. (1986) Free radicals in tumour promotion. Free Rad. Biol. Med. **2,** 347-351

Kerr, J.F., Wyllie, X., Currie, A. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British J. Cancer **26,** 239-257

Kolettas, E, Rosenberger, R.F. (1998) Suppression of decorin expression and partial induction of anchorage-independent growth by the v-src oncogene in human fibroblasts Eur. J. Biochem. **254,** 266-247

Krammer, P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. Nature **407;** 789-795

Krammer, P.H. (1999) CD95 (APO-1/Fas) - mediated apoptosis: live and let die. Adv. Immunol **71,** 163-210

Kroemer, G., Zamzami, N., Susin, S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. Immunol. Today. **18,** 44-48

Kroemer, G., Reed, J.C. (2000) Mitochondrial control of cell death. Nat. Med. **6,** 513-519

Kyriakidis, J.M., Avruch, J. (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. J. Biol. Chem. **271,** 24313-24316

Lajarin, F., Rubio, G., Lorenzo, N, Gamiz, P, Hernanbez-Caselles, T, Garcia-Penarrubia, P. (1999) Implication of reactive oxygen species in the antibacterial activity against Salmonella typhimurium of hepatocyte cell lines. Free Radic. Biol. Med. **27**, 1008-1018

Lee, SL., Wang, WW., Fanburg, BL. (1998) Superoxide as an intermediate signal for serotonin-induced mitogenesis. Free Radic. Biol. Med. **24**, 855-858

Lee, SL., Wang, W.W., Finlay, GA., Fanburg, BL. (1999) Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. **277**, L282-L291

Lee, YJ, Shacter, E. (1999) Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. J. Biol. Chem. **274**, 19792-19798

Lee, Y.J., Shacter, E. (2000) Hydrogen peroxide inhibits activation, not activity, of cellular caspase-3 in vivo. Free Radic. Biol. Med. **29**, 684-692

Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kuhnle, S., and Nicotera, P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision of between apoptosis and necrosis. J. Exp. Med. **185**, 1481-1486

Lelli, J.L., Becks, L.L., Dabroska M.I., Hinshaw, D.B. (1998) ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. Free Radic. Biol. Med. **25**, 694-702

Lemaire, C., Andreau, K., Souvannavong, V., Adam, A. (1998) Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis. FEBS Let. **425**, 266-270

Leusen, J.H., de Boer, M., Bolscher, B.G., Hilarius, P.M., Weening, R.S., Ochs, H.D., Roos, D., Verhoeven, A.J. (1994) A point mutation in gp91-phox of cytochrome b558 of the human NADPH oxidase leading to defective translocation of the cytosolic proteins p47-phox and p67-phox. J Clin Invest. **5**, 2120-2126

Leusen, J.H., Fluiter, K., Hilarius, P.M., Roos, D., Verhoeven, A.J., Bolscher, B.G. (1995) Interactions between the cytosolic components p47phox and p67phox of the human neutrophil NADPH oxidase that are not required for activation in the cell-free system. J. Biol. Chem. **270,** 11216-21

Leusen, J.H., Verhoeven, A.J., Roos, D. (1996a) Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family. J. Lab. Clin. Med. **128,** 461-476

Leusen, J.H.W., Verhoeven, A.J., Roos, D. (1996b) Interactions between the components of the human NADPH oxidase: A review about the intrigues in the phox family. Front. Biosci. **1,** 72-90

Leusen, J.H., Meischl, C., Eppink, M.H., Hilarius, P.M., de Boer, M., Weening, R.S., Ahlin, A., Sanders, L., Goldblatt, D., Skopczynska, H., Bernatowska, E., Palmblad, J., Verhoeven, A.J., van Berkel, W.J., Roos, D. (2000) Four novel mutations in the gene encoding gp91-phox of human NADPH oxidase: consequences for oxidase assembly. Blood. **95,** 666-673

Li, H., Zhu, H., Xu, C., Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. Cell **94,** 491-501

Li, N., Karin, M. (1998) Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-κB through two distinct mechanisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95,** 13012-13017

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. Cell **91,** 479-489

Li, Y.P., Schwartz, R.Z., Waddell, I.D., Holloway, B.R., Reid, M.B. (1998) Sceletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-κB activation in response to tumor necrosis factor alpha. FASEB J. **12,** 871-880

Liang, H., Fesik, S.W. (1997) Three dimensional structures of proteins involved in programmed cell death. J. Mol. Biol. **274,** 291-302

Lipton, S.A., Bossy-Wetze, E. (2002) Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity neurons. Cell **111**, 147–150

Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., Kyriakis, J.M. (2000) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. Mol. Cell Biol. **20**, 2198-2208

Liu, Q.A., Hengartner, M.O. (1999) The molecular mechanism of programmed cell death in C. elegans. Annu. New York Acad. Sci. **887**, 92-104

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. Cell **89**, 175-184

Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo M.J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell **104**, 487-501

Loeffler, M., Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Metivier, D., Nieminen, A.L., Brothers, G., Penninger, J.M., and Kroemer, G. (2001) Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. Faseb J. **15**, 758-767

Lorenzo, H.K., Susin, S.A., Penninger, J., Kroemer, G. (1999) Apoptosis-inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. Cell Death Differ. **6**, 516-524

Louie, S., Halliwell, B., Cross, C.E. (1997) Adult respiratory distress syndrome: a radical perspective. Adv. Pharmacol. **38**, 457-490

Lyras, L., Cairns, N.J., Jenner, A., Jenner, P., Halliwell, B. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. (1997) J. Neurochem **68**, 2061

Miramar, M.D., Costantini, P., Ravagnan, L., Saraiva, L.M., Haouzi, D., Brothers, G., Penninger, G.M., Peleato, M.L., Kroemer, G. and Susin, S.A. (2001) NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. J. Biol. Chem. **276,**16391–16398

Manniatis, T. (1997) Catalysis by a multiprotein IκB kinase complex. Science **278,** 818-819

Martin, S. J., Reutelingsperger C. P. M., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie C. A. A., LaFace, D. M., and Green, D. R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J. Exp. Med. **182,** 1545-1549

Martinez, G.R., Loureiro, A.P., Marques, S.A., Miyamoto, S., Yamaguchi, L.F., Onuki, J., Almeida, E.A., Garcia, C.C., Barbosa, L.F., Medeiros, M.H., Di Mascio, P. (2003) Oxidative and alkylating damage in DNA. Mutat Res. 544,115-27.

Marumo, T., Schini-Kerth, V.B., Fisslthaler, B., Buse, R. (1997) Platelet- derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-κB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. Circulation **96,** 2361-2367

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Rémy, R., Xie, Z., Reed, J.C., Kroemer, G. (1998a) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2 related proteins. J. Exp. Med. **187,** 1261-1271

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jürgensmeier, J., Susin, S.A., Vieira, H., Prévost, M., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., Kroemer, G. (1998b) Bax, and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. Science **281,** 2027-2031

Marzo, I., Perez-Galan, P., Giraldo, P., Rubio-Felix, D., Anel, A., Naval, J. (2001) Cladribine induces apoptosis in human leukaemia cells by caspase dependent and -independent pathways acting on mitochondria. Biochem. J. **359,** 537-546

Mashima, T., Naito, M., Fujita, N., Noguchi, K., Tsuruo, T. (1995) Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not

ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Communication. 217, 1185-1192

Mate, M.J., Ortiz-Lombaridia, M., Boitel, B., Haouz, A., Tello, D., Susin, S.A., Penninger, J., Kroemer, G., Alzari, P.M. (2002) The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. Nat. Struc. Biol. 9, 442-446.

Matsubara, T., Ziff, M. (1996) Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. J. Immunol. 137, 3295-3298

May, M.J., Ghosh, S. (1998) Signal transduction through NF-κB. Immunol. Today 19, 80-88

McCord, J.M., Fridovich, I.(1969a) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem. 244, 6049-55

McCord, J.M., Fridovich, I.(1969b) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. J. Biol. Chem. 244, 6056-6063.

McCord, J.M., Turrens, J.F. (1994) Mitochondrial injury by ischemia and reperfusion. Curr. Top. Bioenerg 17, 173-179

Meier, P., Finch A., Evan G. (2000) Apoptosis in development. Nature 407, 796-801

Meiler, B.,Radeke, H.H., Selle, S., Younes, M., Sies, H., Resch, K., Habermehl, G.G.(1989) Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor-alpha. Biochem. J. 263, 539-545

Meiler, B., Cross, A.R., Hancock, J.T., Kaup, F.J., Jones, O.T. (1991) Identification of a superoxide-generating NADPH Oxidase system in human fibroblasts. Biochem. J. 275, 241-245

Meiler, B. (1997) Regulation of the superoxide releasing system in human fibroblasts. Adv. Exp. Med. Biol. **387,** 113-116

Meister, A. (1995) Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. Biochim. Biophys. Acta. **1271,** 35-41

Mercurino ,F., Zhu, H., Murray, B., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J.W., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M. (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IκB kinases essential for NF-κB activation. Science **278,** 860-866

Mills, E.M., Takeda, K., Yu, Z.X., Ferrans, V., Katagiri, Y., Jiang, H., Lavigne, M.C., Guroff, G. (1998). Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells. J. Biol. Chem. **273,** 22165-22168

Mittl, P.R.E., Di Marco, S., Krebs, J.F., Bai, X., Karanewsky, D.S., Priestle, J.P., Tomaselli, K.J., and Grutter, M.G. (1997) Structure of Recombinant Human CPP32 in Complex with the Tetrapeptide Acetyl-Asp-Val-Ala-Asp Fluoromethyl Ketone Journal of Biological Chemistry **272,** 6539–6547

Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55-63

Nagata S, Golstein P. (1995) The Fas death factor. Science 267, 1449-1456

Nakamura, H., Nakamura, K., Yodoi, J. (1997) Redox regulation of cellular activation. Ann. Rev. Immunol. **15,** 351-369

Nemoto, S., DiDonato, JA., Lin, A. (1998) Coordinate regulation of IκB kinases by mitogen-activated protein kinase kinase I and NF-κB-inducing kinase. Mol Cell Biol **18,** 7336-7343

Nicholson, D.W., Thornberry, N.A. (1997) Caspases: killer proteases, Trends in Biochemical Sciences, **22,** 299-306

Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature **376**, 37-43.

Nicotera, P., Leist, M., Fava, E., Berliocchi, L., Volbracht, C. (2000) Energy requirement for caspase activation and neuronal cell death. Brain Pathol. **10**, 276-282

Nourooz-Zadeh, J., Rahimi, A., Tajaddini-Sarmadi, J., Tritschler, H., Rosen, P., Halliwell, B., Betteridge, DJ. (1997) Relationships between plasma measurements of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. Diabetologia. **40**, 647-653

Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., Wollf, SP. (1994) Measurements of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphospine. Anal. Biochem. **220**, 403-409

Oehm, A., Behramann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, C. (1992) Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen JBC **267**, 10709-10715

Ona, V.O., Li, M., Vonsattel, J.P., Andrews, L.J., Khan, S.Q., Chung, W.M., Frey, A.S., Menon, A.S., Li, X.J, Stieg, P.E, Yuan, J., Penney, J.B., Young, A.B., Cha, J.H., Friedlander, R.M. (1999) Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. Nature **399**, 263-7.

Ormerod, M.G., Sun, X.M., Snowden, R.T., Davies, R., Fearnhead, H., Cohen, G.M. (1993) Increased membrane permeability of apoptotic thymocytes: a flow cytometry study. Cytometry **14**, 595-599

Ormerod, M.G. (2002) Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. J. Immunol. Meth. **265**, 73-80

Orth, K., Chinnaiyan, A.M., Garg, M., Froelich, C.J. and Dixit, V.M. (1996) The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. J. Biol. Chem. **271,** 16443-16446

Ostling, O., Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. **123,** 291-298

Panagiotidis, M., Tsolas, O., Galaris, D. (1999) Glucose oxidase-produced $H_2O_2$ induces $Ca^{2+}$-dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. Free Radical Biol. Med. **26,** 548-556

Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., Kharbanda, S. (2000) Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. EMBO J. **16,** 4310-4322

Pagano, PJ., Chanick, S.J., Siwik, D.A., Colucci, W.S., Clark, J.K. (1998) Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. **32,** 331-337

Parrish, J., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X., Xue, D. (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in C. Elegans. Nature **412,** 90-94

Parthasarathy, S., Steinberg, D., Witztum, J.L. (1992) The role of oxidased LDL in the pathogenesis of atherosclerosis. Annu. Rev. Med. **43,** 219-225

Patterson, C., Ruef, J., Madamanchi, NR., Barry-Lane, P., Hu, Z., Horaist, C., Ballinger, CA., Brasier, AR., Bode, C., Runge, MS. (1999) Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that $p47^{phox}$ may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. J Biol Chem **274,** 19814-19822

Phillips, K., Dauter, Z., Murchie, A.I., Lilley, D.M. and Luisi, B. (1997) Qin HX, Srinivasula SM, Wu G, Fernandes Alnemni T, Alnemni ES. Shi YG. Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic-protease activating factor 1. Nature (1999) 399; 549-557

Rao, L., Perez, D., White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. J. Cell Biol. **135**, 1-9

Rathmell, J., Thomson, C.R. (2002) Pathway of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. Cell **109**, S97-S107

Ravagnar, L., Gurbuxni, S., Susin. S.A., Maisse, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J.M., Garrido, C., Kroemer, G. (2001) Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor Nature Cell Biology **3**, 839-843

Regnier, C.H., Song, H.Y., Gao, X., Goedder, D.V., Cao, Z., Rothe, M. (1997) Identification and characterization of an IkB kinase. Cell **90**, 373-383

Rhee, S.G., Kang, S.W., Netto, L.E., Seo, M.S., Stadtman, E.R. (1999a) A family of novel peroxidases, peroxiredoxins. Biofactors **10**, 207-209

Rhee, S.G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. (1999b) Exp Mol Med **31**, 53-59

Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. (2001) Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. IUBMB Life **52**, 35-41

Richter, C., Schweizer, N., Cossarizza, A., Franceshi C (1996) Control of apoptosis by the cellular ATP levels. Febs Lett. **378**, 107-110

Rodriguez J, Lazebnik Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. Genes Dev. **13**, 3179-3184

Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G., Karin, M. (1998) IKKγ is an essential regulatory subunit of the IκB kinase complex. Nature **395,** 297-301

Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature. **391,** 96-99

Samali, A., Zhivotovsky, B., Jones, D., Nagata, S., Orrenius, S. (1999) Apoptosis: cell death defined by caspase activation. Cell Death Differ. **6,** 495-496

Samali, A., Nordgren, H., Zhivitovsky, B., Peterson, E., Orrenius, S. (1999) A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. Biochem. Biophys. Res. Com. **255,** 6-11

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular Cloning Second Edition. Gold Spring Harbor Laboratory Press 1989

Satio, M., Korsmeyer, S.J., Schlesinger, P.H. (2000) Bax-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. Nat. Cell Biol. **2,** 553-555

Satriano, JA., Shuldiner, M., Hora, K., Xing, Y., Shan, Z., Schondorff , D. (1993)Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. J Clin Invest **92,** 1564-1571

Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D., Alnemri, E.S. (2000) Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. Nat. Cell Biol. **8,** 476-483

Salvesen, G.S., Dixit, V.M. (1999) Caspase activation: the induced proximity model. Proc. Natl. Acad. Sci. **96,** 10964-10967

Sartorius, U., Schmitz, I., Krammer, P.H. (2001) Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. Chembiochem **2,** 20-29

Sakahira, H., Enari, M., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Nagata, S. (1999) Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation. Curr Biol. **9**, 543-546

Scaffini, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Dedatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J. **17**, 1675-1687

Schenk, H., Klein, M., Endbugger, W., Droge, W., Schulze-Otshoff, K. (1994) Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-κB and AP-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 1672-1676

Schitz, I., Walczak, H., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1999) Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand. Cell Death Differ. **6**, 821-822

Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J.L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A., Tschopp, J. (1998) Conversion of membrane bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. JEM **187**, 1205-1213

Schoonbroodt, S., Ferreira, V., Best-Belpomme, M., Boelaert, JR., Legrand-Ppcls, S., Korner, M., Piette, J. (2000) Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxy-terminal PEST domain of IκBα in NF-κB activation by an oxidative stress. J Immunol **164**, 4292-4300

Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R. (1998) Evaluation of a soluble tetraxolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. **48**, 4827-4833

Sculze-Osthoff, K, Beyaert, R, Vandevoorde, V, Haegeman, G, Fiers, W. (1993) Depletion of the mitochondria electron transport abrogates the cytoxic and gene-inductive effects of TNF. EMBO J. **12**, 3095-3104

Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. Nature **399,** 483-487

Sies, H. (1985) Oxidative stress: introductory remarks. Oxidative stress, Academic Press. Orlando ,Florida, pp 1-7

Simeonova, P.P., Leonard, S., Flood, L., Shi, X., Luster, M.I. (1999) Redox-dependent regulation of interleukin-8 by tumor necrosis factor-alpha in lung epithelial cells. Lab Invest **79,** 1027-1037

Singh, N.P., McCory, M.Y., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of damage in individual cells. Exp. Cell Res. **175,** 184-191

Slupphaug, G., Kavli, B., Krokan, H.E. (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutat Res. 531, 231-251.

Smiley, S.T., Reers, M., Mottola Marthshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T.W., Steele, G.D., Bo Cohen, Jr. (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming cation JC-1. Proc.Natl.Acad.Sci.USA **88,** 3671-3677

Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes, T., Alnemni, E.S. (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated ologomerixation Mol Cell **1,** 949-957

Steinberg, D. (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. J. Biol. Chem. **272,** 20963-20966

Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. Properties of caspases. (1998) Biochim Biophys Acta **1378,** 17-31

Stohs, S.J., Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radic. Biol. Med. **18,** 321-336

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. (1995) Requirement for generation of $H_2O_2$ for platelet-derived growth factor signal transduction. Science **270**, 296-299.

Sundaresan, M., Yu, ZX, Ferrans, VJ., Sulciner, DJ., Gutkind, JS., Irani, K, Goldschmidt-Clermont, PJ and Finkel, T. (1996) Regulation of reactive oxygen species generation in fibroblasts by Rac1. Biochem J **318**, 379-382

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell **75**, 1169-1178

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. and Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature **397**, 441-446

Susin, S.A., Daugas, D., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prévost, M.C., Brothers, G., Mak, T.W., Penninger, J., Earnshaw, W.C. and Kroemer, G. (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. J. Exp. Med. **192**, 571–579

Takahashi, A., Alnemri, E.S., Lazebnik, Y.A., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C. (1996) Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. **93**, 8395-400

Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D. and Wong W.W. (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. J. Biol. Chem. **272**, 9677-9682

Tamatani, M., Che, Y.H., Matsuzaki, H., Ogawa, S., Okado, H., Miyake, S., Mizuno, T., Tohyama, M. (1999) Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NF-κB activation in primary hippocampal neurons. J. Biol. Chem. **274**, 8531-8538

Tammariello, S.P., Quinn, M.T., Estus, S. (2000) NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. J Neurosci. **20** RC53

Terry, C.M., Clikeman, J.A., Hoidal, J.R., Callahan, R.K. (1999) TNF-α and IL-1α induces heme oxygenase-1 via protein kinase C, $Ca^{+2}$ and phospholipase $A_2$ in endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol **276,** H1493-H1501

Thannickal VJ., Fanburg BL. (1995) Activation of an $H_2O_2$ generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta1. J. Biol. Chem. **270,** 30334-30338

Thannickal VJ, Aldweib KD., Fandurg BL. (1998) Tyrosine phosphorylation regulates $H_2O_2$ production in lung fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1. J. Biol. Chem. 277, 23611-23615

Thannickal VJ, Day RM., Klinz SJ., Bastien MC., Larios JM., Fanburg BL. (2000) Ras-dependent and independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF-β1. FASEB J. **14,** 1741-1748

Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, Horowitz JC, Day RM, Thomas PE. (2003) Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. J. Biol. Chem. **278,** 14-19

Thompson C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease Science **276,** 1456-1462

Thornberry N.A., Bull, H.G., Calaycay, K.T., Chapman, A.D., Howard, M.J., Kostura, D.K., Miller, S.M., Molineaux, J.R., Weider, J., Aunins, K.O., Elliston J.M., Ayala, F.J., Casano, J., Chin, G.J-F., Ding, L.A. Egger, E. P. Caffney et al (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1β processing in monocytes. Nature **356,** 768-774

Thornberry, N., Lazebnik, Y. (1998) Caspases: Enemies within. Science **281**, 1312-1316

Timmer, T, De Vries, De Jong, S. (2002) Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? J. Pathol. **196**, 125-134

Tran, K., Merika, M., Thanos, D. (1997) Dinstinct functional properties of IkappaB alpha and IkappaB beta. Mol. Cell Biol. **17**, 5386-5399

Ushio–Fukai, M., Zafari, A.M., Fukui, T., Ishizaka, N., Griendling, K.K. (1996) p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. **271**, 23317-23321

Ushio-Fukai, M., Alexander, R.W., Akers, M., Yin, Q., Walsh, K., Griendling, K.K. (1999) Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensine II in vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. **274**, 22699-22704

Ushio-Fukai, M., Alexander, R.W., Akers, M., Yin, Q., Walsh, K., Griendling KK. (1998) p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. J. Biol. Chem. **273**, 15022-15029

Van den Dobbelsteen, D.J., Nobel, C.S., Schlegel, J., Cotgreave, I.A., Orrenius, S., Slater, A.F. (1996) Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. J. Biol. Chem. **271**, 15420-15427

Vanags, D.M., Porn-Ares, M.I., Coppola, S., Burgess, D.H., Orrenius, S. (1996) Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. J. Biol. Chem. **271**, 31075-31085

Vander-Heiden, M.G., Thompson, C.B. (1999) Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? Nat. Cell Biol. E209-E216

Vaux, D., Korsemeyer, S.J. (1999) Cell death in development. Cell **96,** 245-254)

Vaux, D. Silke, J. (2003) Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. Biochem Biophys Res Commun. **304,** 499-504

Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizes IAP proteins. Cell **102,** 43-53

Verhagen, A.M., Coulson, E.J., Vaux, D.L. (2001) Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. Genome Biol. **2,** 7-14

Verhagen AM, Vaux DL. (2002a) Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. Apoptosis. **7,** 163-166.

Verhagen, A.M, Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L. (2002b) HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. J Biol. Chem. **277,** 445-454

Verheij, M., Bose, R., Lin, XH., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, MJ., Szabo, E., Zon, LI., Kyriakidis, J.M., Haimovitz-Friendman, A., Fuks, Z., Kolesnick, RN. (1996) Requirement for ceramide-initiated SARK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. Nature **380,** 75-79

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. (1995) A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection pf phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled annexin V. J. Immunological Methods **184,** 39-45

Verna, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E., Van Antwerp, D., Miyamoto, S. (1995) Rel/NF-κB/IκB family: intimate tales of association and dissociation Genes Dev **9,** 2723-2735

Wajant, H. (2002) The Fas signaling pathway: more than one paradigm. Science **296**, 1635-1636

Walczak, H., Sprinck, M.R. (2001) Biochemistry and function of he disc. Trends Bioch. Scien. **26**, 44-45

Walker, N.P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferenz, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C., Hammill L.D. (1994) Crystal Structure of the Cysteine Protease interleukin-1- Converting Enzyme: a (p20/p10)2 Homodimer. Cell **78**, 343-347

Wallach, T.M., Segal, A.W. (1996) Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b558 of the NADPH oxidase of phagocytes. Biochem J. **320**, 33-8

Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., Baldwin, A.S. (1998) NF-κB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. Science **281**, 1680-1683

Wang, N., Verma, L., Hardy, S., Zhu, Y., Ma, K.S., Barrer, M.J., Stemerman, M.B. (1999) c-Jun triggers apoptosis in human vascular endothelial cells. Circ. Res. **85**, 385-393

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. Science. **292**, 727-730

Westendorp, M.O., Shatrov, V.A., Schulze-Osthoff, K., Frank, R., Kraft, M., Los, M., Krammer, P.H., Droge, W., Lehmann, V. (1995) HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. EMBO J. **3**, 546-554

Wilson, KP, Black, JA, Thomson, JA, Kim, EE, Griffith, JP, Navia, MA, Murcko, MA, Chambers, SP, Aldape, RA, Raybuck, S.A. (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. Nature **370**, 270-275

Wolf, B.B. Green, D.R. (1999) Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases. Journal of Biological Chemistry **274,** 20049-20052

Wolfe, J.T., Pringle, J.H., Cohen, G.M. (1996) Assays for the measurement of DNA fragmentation during apoptosis. Techniques in Apoptosis, A User's Guide. Cotter T.G. and Martin S.J. Portlant Press Ltd. London, pp53-58

Wolgemuth, D.J., Hsu, M-T. (1981) Visualization of nascent RNA transcription and replication in viral nucleoprotein complexes from adenovirus 2-infected HeLa cells. J. Mol. Biol. **147,** 247-268

Woronicz, J.D., Gao, X. Cao, Z., Rothe, M., Goeddel, D.V. (1997) IκB kinase-α and NIK. Science **278,** 866-869

Wu, L.W., Mayo, L.D., Dunbar, J.D., Kessler, K.M., Baerwald, M.R., Jaffe, E.A., Wang, D., Warren, R.S., Donner, D.B. (2000) Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. J. Biol. Chem. **275,** 5096-103

Xue, D., Horvitz, H.R. (1997) Caenorhabditis elegans CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. Nature **39,** 305-308

Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T-I., Jones D.P. and Wang X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science **275,** 1129-1133

Yang, Y.L., Li, X.M. (2000) The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. Cell Res. **10,** 169-177

Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A, Korsmeyer, S.J. (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. Nature. **400,** 886-891.

Yoshida, Y., Maruyama, M., Fujita, T., Arai, N., Hayashi, R., Araya, J., Matsui, S., Yamashita, N., Sugiyama, E., Kobayashi, M. (1999) Reactive oxygen intermediates stimulate interleukin-6 production in human bronchial epithelial cells. Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol. **276**, L900-L908

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. (1993). The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. Cell **75**, 641-652

Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., Dawson, V.L. (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. Science **297**, 259-263

Zafari, A.M., Ushio-Fukari, M., Akers, M., Yin, Q., Shah, A., Harrison, DG., Taylor, WR., Griendling, KK. (1998) Role of NADH/NADPH oxidase-derived $H_2O_2$ in angiotensin II-induced vascular hypertroply. Hypertension **32**, 488-495

Zafari, A.M., Ushio-Fukari, M., Minieri, C.A., Akers, M., Lassegue, B., Griendling, KK. (1999) Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells. Antioxidants &Redox Signaling **1**, 167-179

Ziegler, M., Oei, S.L. (2001) A cellular survival switch: poly(ADP-ribosyl)ation stimulates DNA repair and silences transcription. BioEssays **23**, 543-548

Zimmermann, K., Bonzon, C., Green, D. (2001) The machinery of programmed cell death Biochemical society Transactions **92**, 57-70

Zoratti, M., Szabo, I. (1995) The mitochorial permeability transition. Biochim. Biophys. Acta **1241**, 139-176

Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X. (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. J. Biol. Chem. **274**, 11549-11556.

Zou, H., Henzei, W.J., Liu, X., Lutschg, A, Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell **90,** 405-413