



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Συγκριτική πρωτεομική μελέτη της επίδρασης της
μηχανικής διάτασης πνευμονικών κυττάρων στον
μεταβολισμό της φωσφατιδυλοχολίνης**

ΒΕΛΙΒΑΣΗ ΓΛΥΚΕΡΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Συγκριτική πρωτεομική μελέτη της επίδρασης της
μηχανικής διάτασης πνευμονικών κυττάρων στον
μεταβολισμό της φωσφατιδυλοχολίνης**

ΒΕΛΙΒΑΣΗ ΓΛΥΚΕΡΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	4
ΣΚΟΠΟΣ	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1. Δομή και λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος	
1.1 Ανατομία του αναπνευστικού συστήματος	7
1.2 Πνευμονικό επιθήλιο	13
1.3 Κυψελιδικό επιθήλιο	13
2. Επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων	
2.1 Γενικά	18
2.2 Σύσταση του πνευμονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα	18
2.3 Οργάνωση και διακίνηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα	20
2.4 Έκκριση	22
2.5 Ο ρόλος των λιπιδίων στη λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα	23
2.6 Ο ρόλος των πρωτεϊνών στη λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα	24
2.7 Ερεθίσματα της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα	25
3. Μηχανικά σήματα στον πνεύμονα	
3.1 Γενικά	27
3.2 Μοντέλα μηχανικής διάτασης πνευμονοκυττάρων	27
3.3 Ενδοκυττάρια μεταγωγή μηχανικού σήματος	30
3.4 Βιολογικές επιδράσεις των μηχανικών σημάτων στα κύτταρα του πνεύμονα	34
4. Μεταβολισμός της φωσφατιδυλοχολίνης (PC)	
4.1 Γενικά	38
4.2 Βιοσύνθεση της PC (πορεία Kennedy)	40
4.3 CTP: φωσφοχολινο κυτιδυλοτρανσφεράση (CCT)-Δομή και λειτουργία	43

4.4 Ακυλο-συνένζυμο A (acyl-CoA): Λυσοφωσφολιπιδικές ακυλοτρανσφεράσες (LPLATs)	50
4.5 Καταβολισμός της PC	55
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
1. Διάγραμμα ροής	58
2. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς A549	58
3. Εφαρμογή κυκλικής μηχανικής διάταξης	62
4. Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (Μικρομέθοδος 0 έως 20 µg πρωτεΐνης)	63
5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)	66
6. Διαφορική ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης χωρίς σήμανση	72
7. Απομόνωση ολικού RNA κυττάρων A549	77
8. Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος καθαρότητας RNA	80
9. Αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase-PCR ή RT-PCR)	81
10. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR ανάλυσης σε πήκτωμα αгарόζης	85
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
1. Επίδραση κυκλικής μηχανικής διατασης στη μελέτη του ρυθμιστικού ενζύμου CCTa σε καρκινικά κύτταρα A549	87
1.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης κατά Bradford	87
1.2 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του ρυθμιστικού ενζύμου CCTa	88
1.3 Μελέτη της επίδρασης της πρωτεϊνικής έκφρασης της CCTa με πρωτεομική ανάλυση	94
2. Πρωτεομική ανάλυση του ολικού ομογενοποιηµατος των κυττάρων A549 σε διαφορετικές συνθήκες μηχανικής διάταξης και ταξινόμηση αυτών	100
2.1 Ταξινόμηση των πρωτεϊνών των κυττάρων A549 σύμφωνα με τη μοριακή λειτουργία και την κατανομή σε υποκυττάρια οργανίδια	101
2.2 Ταξινόμηση των πρωτεϊνών σε μεταβολικές πορείες	103
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	122

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	131
ABSTRACT	133
ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	134
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	135

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Μαρίας-Ελένης Λέκκα. Ένα μεγάλο μέρος της διατριβής, που αφορά τις πρωτεομικές αναλύσεις, σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών “Αλέξανδρος Φλέμινγκ”, στο εργαστήριο του Δρ. Γιώργου Παναγιώτου, ερευνητή Α’ του Κέντρου υπό την επίβλεψη της Δρ. Μαρτίνας Σαμιωτάκη, ερευνήτριας του Κέντρου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την επιβλέπουσα της εργασίας μου κ. Μαρία-Ελένη Λέκκα για την καθοδήγηση, την πολύτιμη επιστημονική βοήθεια, την επιμονή και το ενδιαφέρον που έδειξε καθ’ όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Ευχαριστώ, επίσης, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Χημείας, κ. Ευγενία Πάνου, καθώς και τον Λέκτορα του τμήματος Ιατρικής, κ. Γιώργο Λεονταρίτη για την αποδοχή τους να αποτελέσουν μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον κ. Γιώργο Παναγιώτου και την κ. Μαρτίνα Σαμιωτάκη για τη φιλοξενία στο εργαστήριό τους και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν στην πραγματοποίηση των πειραμάτων πρωτεομικής ανάλυσης. Ευχαριστώ ιδιαίτερος την κ. Σαμιωτάκη για τις επιστημονικές γνώσεις, την πολύτιμη βοήθειά της στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, την υπομονή, τις παρατηρήσεις και τις συμβουλές της κάθε φορά που τη χρειαζόμουν.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ειρήνη Κητσιούλη για την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τις εύστοχες παρατηρήσεις της στο πειραματικό κομμάτι της εργασίας μου που αφορούσε τον προσδιορισμό γονιδιακής έκφρασης.

Ευχαριστώ θερμά τους πολύτιμους συνεργάτες και φίλους μου Ελευθερία Καζεπίδου, Αλεξία Τσαπίνου, Σοφία Τσάφου, Μαρία Κολιού, Κατερίνα Νέλλη, Θανάση Καρκαμπούνα για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και τη βοήθεια που μου προσέφεραν σε όλα τα επίπεδα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους εξαιρετικούς μου φίλους και συνεργάτες Στελίνα Παπαδάκη, Αγγελική Καλογεροπούλου, Σοφία Σιδηροπούλου, Αλεξία Γκουρογιάννη, Μαρία Τσουμάνη, Κατερίνα Τσούκα, Ηρακλή Μοσχονά και Βασίλη Χατζηχρήστο για όλες τις όμορφες και δύσκολες στιγμές που μοιραστήκαμε μαζί.

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω το σύντροφό μου Μιχάλη Καραγιαννόπουλο, καθώς και τους αγαπημένους μου γονείς Αιμίλιο και Ελένη και τα αδέρφια μου Μιχάλη και Χρυσή για την αγάπη, την υπομονή, τη συμπαράσταση και την αμέριστη στήριξή τους, ηθική και υλική, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Βελιβάση Γλυκερία

Ιωάννινα, 3-4-2017

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός αυτής της εργασίας εστιάζεται στη διερεύνηση της επίδρασης της μηχανικής διάτασης στη γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση του ρυθμιστικού ενζύμου του μεταβολισμού της φωσφατιδυλοχολίνης (PC), CTP: φωσφοχολινοκυτιδυλοτρανσφεράση, CCT, και συγκεκριμένη της α ισομορφής της (CCTα). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά A549, ως μοντέλο μελέτης των πνευμονοκυττάρων τύπου II.

Η γονιδιακή έκφραση του ρυθμιστικού ενζύμου μελετήθηκε με τη βοήθεια της ποσοτικής RT-PCR μετά από εφαρμογή δύο συνθηκών κυκλικής μηχανικής διάτασης 15% και 25%, χρονικής διάρκειας 1 h, 6 h και 24 h. Όσον αφορά τη πρωτεϊνική έκφραση του ενζύμου, η μελέτη της πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της πρωτεομικής ανάλυσης μετά από εφαρμογή δύο συνθηκών κυκλικής μηχανικής διάτασης 15% και 25%, χρονικής διάρκειας 24 h. Κύτταρα τα οποία δεν υποβλήθηκαν σε μηχανική διάταση χρησιμοποιήθηκαν ως control.

Τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της συνολικής πορείας βιοσύνθεσης της PC, στην οποία συμμετέχει και το ένζυμο CCT, καθώς και της πορείας αναδιαμόρφωσης και καταβολισμού της PC. Η μελέτη των πορειών αυτών θα μας βοηθήσει να κατανοήσουμε καλύτερα το ρόλο και τη λειτουργία του ρυθμιστικού ενζύμου.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος και των λιπαρών οξέων, τα οποία προκύπτουν ως προϊόντα καταβολισμού της PC. Ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων συνδέεται, επίσης με την πορεία της γλυκόλυσης/γλυκονεογένεσης και τον κύκλο του κιτρικού οξέος και οι πορείες αυτές συσχετίζονται με τη βιοσύνθεση της PC.

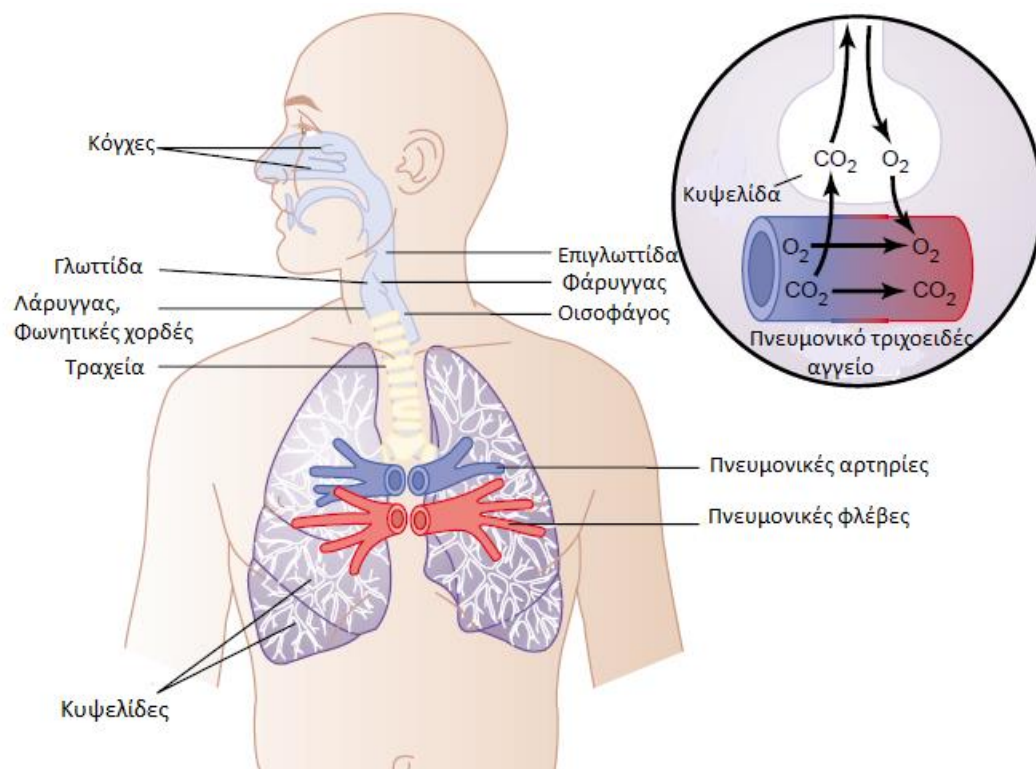
Τέλος, με τη βοήθεια της πρωτεομικής ανάλυσης, μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες που σχετίζονται άμεσα με την απόκριση των κυττάρων A549 στο μηχανικό ερέθισμα και τη μεταγωγή σήματος.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Δομή και λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος

1.1 Ανατομία του αναπνευστικού συστήματος

Το αναπνευστικό σύστημα συγκροτείται από τη ρινική κοιλότητα, τον φάρυγγα, τον λάρυγγα, την τραχεία, τους βρόγχους και τους πνεύμονες. Η ρινική κοιλότητα και ο φάρυγγας αποτελούν το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα, ενώ ο λάρυγγας, η τραχεία και οι βρόγχοι αποτελούν το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα (Εικόνα 1). Στους πνεύμονες λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή των αερίων, δηλαδή η πρόσληψη O_2 από την ατμόσφαιρα και η αποβολή του CO_2 από τον οργανισμό.

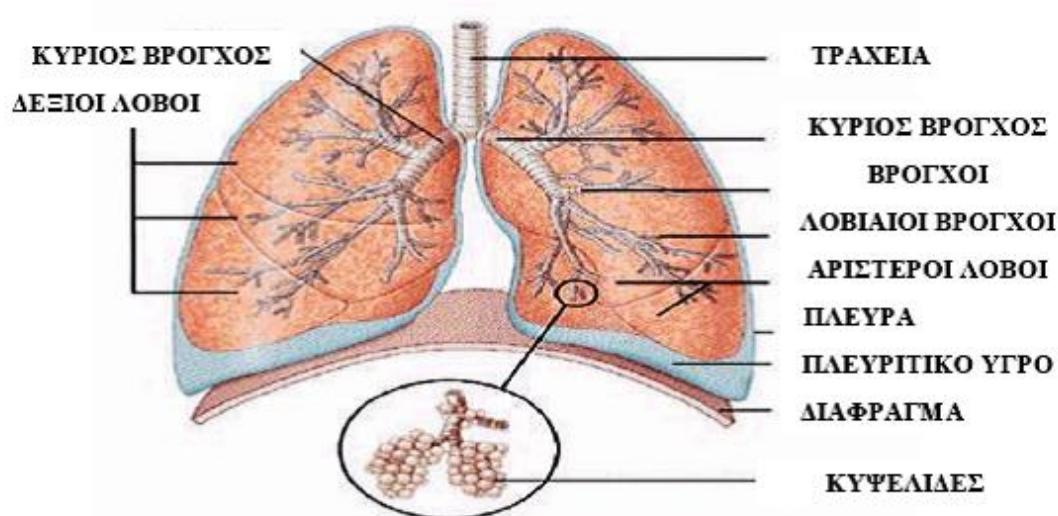


Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του αναπνευστικού συστήματος (Textbook of Medical Physiology, Chapter 37, eleventh edition).

Πνεύμονες

Η κορυφή των πνευμόνων βρίσκεται στην είσοδο του θώρακα, πάνω από τον πρώτο πλευρικό χόνδρο. Στην πίσω όψη, η κορυφή του πνεύμονα βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με το πρώτο πλευρό. Η βάση του πνεύμονα είναι μία κοίλη δομή που βρίσκεται πάνω από το διάφραγμα. Η κύρια επιφάνεια του πνεύμονα είναι η πλευρική, η οποία είναι λεία και έχει το σχήμα του θωρακικού τοιχώματος. Το σχήμα της διάμεσης επιφάνειας του πνεύμονα στην πίσω πλευρά διαμορφώνεται σύμφωνα με την σπονδυλική στήλη και την καρδιά. Οι πνεύμονες έχουν επίσης εσοχές από τις πολυάριθμες αγγειακές δομές, όπως την αορτή, με την οποία βρίσκονται σε επαφή.

Ο δεξιός πνεύμονας αποτελείται από τον άνω, μέσο και κάτω λοβό, ενώ ο αριστερός από τον άνω και κάτω λοβό. Στο δεξιό πνεύμονα υπάρχουν δύο σχισμές. Η λοξή σχισμή χωρίζει τον κάτω λοβό από τον άνω και τον μέσο. Η μικρότερη οριζόντια σχισμή χωρίζει τον άνω από τον μέσο λοβό. Στον αριστερό πνεύμονα υπάρχει μόνο μία λοξή σχισμή, η οποία χωρίζει τον άνω από τον κάτω λοβό (**Εικόνα 2**)¹.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του ανθρώπινου πνεύμονα.

Υπεζωκότας

Οι πνεύμονες καλύπτονται από μία λεπτή μεμβράνη, τον υπεζωκότα. Στην εξωτερική πλευρά βρίσκεται το τοιχωματικό πέταλο υπεζωκότος, ενώ στην εσωτερική πλευρά το σπλαχνικό πέταλο είναι προσκολλημένο στους πνεύμονες. Μεταξύ των δύο υπάρχει ένας πολύ μικρός κενός χώρος, η υπεζωκοτική κοιλότητα. Ο υπεζωκότας τροφοδοτείται από τα περιφερειακά αιμοφόρα αγγεία του¹.

Τραχεία και βρόγχοι

Η τραχεία είναι ένας σωλήνας μήκους 100 mm και αποτελείται από χόνδρους σε σχήμα μικρού δακτυλίου. Στο επίπεδο του τέταρτου σπονδύλου, η τραχεία χωρίζεται στον δεξιό και αριστερό βρόγχο (**Εικόνα 2**). Ο δεξιός κύριος βρόγχος έχει μήκος περίπου 25 mm και χωρίζεται στον δεξιό άνω λοβό στο επίπεδο του πέμπτου θωρακικού σπονδύλου. Έπειτα, συνεχίζει ως διάμεσος βρόγχος με μήκος περίπου 20 mm. Ο δεξιός κύριος βρόγχος είναι ευρύτερος, κοντύτερος και πιο κάθετος από τον αριστερό κύριο βρόγχο και ως εκ τούτου τα ξένα σωματίδια τείνουν να καταλαμβάνουν πιο συχνά τον δεξιό κύριο βρόγχο. Ο διάμεσος βρόγχος έπειτα διακλαδίζεται στον κάτω λοβό. Ο δεξιός κάτω λοβός σχηματίζει μία διακλάδωση στο ανώτερο τμήμα και συνεχίζει να κατεβαίνει στο πίσω μέρος, σχηματίζοντας διακλαδώσεις στα διάμεσα, πρόσθια, πλάγια και οπίσθια τμήματα του κάτω λοβού.

Ο αριστερός κύριος βρόγχος είναι μακρύτερος, περίπου 40 mm σε μήκος, και εισέρχεται στην πνευμονική πύλη του αριστερού πνεύμονα κατά προσέγγιση στο επίπεδο του έκτου θωρακικού σπονδύλου. Χωρίζεται στον άνω αριστερό λοβό και στον κάτω αριστερό λοβό. Ο άνω αριστερός λοβός διαιρείται με τη σειρά του σε διακλαδώσεις που φτάνουν ως το ανώτερο και κατώτερο τμήμα του. Ο κάτω αριστερός λοβός κατέρχεται στο πίσω μέρος και στη συνέχεια σχηματίζει διακλαδώσεις πρόσθια, πλευρικά και στο πίσω μέρος του βρόγχου.

Η τραχεία τροφοδοτείται στο άνω μέρος από τις αρτηρίες του θυρεοειδούς και στο κάτω μέρος από τις βρογχικές αρτηρίες. Η φλεβική παροχέτευση τείνει προς το κατώτερο φλεβικό πλέγμα του θυρεοειδούς και η λεμφική παροχέτευση προς τους προ-τραχειακούς και παρα-τραχειακούς λεμφαδένες. Οι βρόγχοι και οι αεραγωγοί τροφοδοτούνται από τις βρογχικές αρτηρίες, οι οποίες προέρχονται από τη συστηματική κυκλοφορία και προκύπτουν είτε απευθείας από τη θωρακική αορτή είτε έμμεσα μέσω των μεσοπλεύριων αρτηριών. Η φλεβική παροχέτευση των αεραγωγών είναι πιο

περίπλοκη και αποτελείται από βρογχικές φλέβες που επικοινωνούν με τις πνευμονικές φλέβες που διοχετεύονται στον αριστερό κόλπο. Υπάρχουν, επίσης, επιφανειακές βρογχικές φλέβες που διοχετεύονται στην αζύγο φλέβα ή τις μεσοπλευρίες φλέβες. Η νεύρωση του ενδοβρογχικού δέντρου γίνεται μέσω του πρόσθιου και του οπίσθιου πνευμονικού πλέγματος, το οποίο περιλαμβάνει τμήματα από τα πνευμονογαστρικά, τα λαρυγγικά και τα συμπαθητικά νεύρα¹.

Βρογχοπνευμονικά τμήματα

Οι κύριοι βρόγχοι χωρίζονται στους λοβιαίους βρόγχους, οι οποίοι με τη σειρά τους χωρίζονται σε τμηματικούς βρόγχους (**Εικόνα 2**). Ο καθένας από αυτούς χωρίζεται σε μία δομικά και λειτουργικά ανεξάρτητη μονάδα ιστού. Ο δεξιός πνεύμονας αποτελείται από 10 βρογχοπνευμονικά τμήματα: τρία στον άνω λοβό, δύο στο μέσο λοβό και πέντε στον κάτω λοβό. Ο αριστερός πνεύμονας αποτελείται από 9 τμήματα: πέντε στον άνω λοβό, συμπεριλαμβανομένων δύο εντός της γλωσσίδας, και τέσσερα στον κάτω λοβό. Κάθε βρόγχος συνεχίζει να υποδιαιρείται σε μικρότερους, πιο στενούς αεραγωγούς έως ότου σχηματίσουν τα τελικά βρογχιόλια κι έπειτα τα αναπνευστικά βρογχιόλια, τα οποία στερούνται του χόνδρου. Ο τελικός αυτός σχηματισμός ονομάζεται βρογχικό δέντρο. Αυτά με τη σειρά τους οδηγούν σε κυψελιδικούς αγωγούς, οι οποίοι καταλήγουν σε κυψελίδες. Η δομή αυτή ορίζεται ως κυψελιδικός σάκος. Ο δευτερογενής πνευμονικός βρόγχος είναι το μικρότερο τμήμα του πνεύμονα που περιβάλλεται από συνδετικό ιστό και συνήθως αποτελείται από τρεις έως έξι πνευμονικούς κυψελιδικούς σάκους σχηματίζοντας ένα εξαγωνικό σχήμα με την κεντρική αρτηρία, τις λεμφικές και τις περιφερικές φλέβες¹.

Πνευμονικές πύλες

Οι πνευμονικές πύλες ενώνουν το μεσαίο τμήμα του πνεύμονα με την καρδιά και την τραχεία. Σε κάθε πνευμονική πύλη, υπάρχει μια σειρά από δομές οι οποίες εισέρχονται ή εξέρχονται της πύλης. Περιλαμβάνουν τους κύριους βρόγχους, την πνευμονική αρτηρία, την ανώτερη πνευμονική φλέβα, την κατώτερη πνευμονική φλέβα, τη βρογχική αρτηρία, τη βρογχική φλέβα, το πνευμονικό αυτόνομο νευρικό πλέγμα, τα λεμφαγγεία και τον χαλαρό συνδετικό ιστό¹.

Πνευμονική αγγειακή και λεμφική παροχέτευση

Η πνευμονική αρτηρία μεταφέρει το αποξυγονωμένο αίμα στις κυψελίδες κι έπειτα το οξυγονωμένο αίμα επιστρέφει μέσω των πνευμονικών φλεβών στον αριστερό κόλπο. Οι πνευμονικές αρτηρίες βρίσκονται πρόσθια της τρόπιδας της τραχείας και των αντίστοιχων κύριων βρόγχων. Η αρτηρία, έπειτα, εισέρχεται στον πνεύμονα μέσω της πνευμονικής πύλης. Στη δεξιά πλευρά, η ανώτερη διακλάδωση των πνευμονικών αρτηριών είναι πρόσθια και πλευρικά του άνω δεξιού λοβού, ενώ η κατώτερη διακλάδωση της πνευμονικής αρτηρίας διέρχεται πλευρικά και πίσω από τον κάτω λοβό. Στην αριστερή πλευρά, οι πνευμονικές αρτηρίες τόσο του άνω όσο και του κάτω λοβού βρίσκονται πλευρικά και πίσω από τους αντίστοιχους αεραγωγούς. Η φθίνουσα διακλάδωση της αριστερής πνευμονικής αρτηρίας διέρχεται πίσω από τον άνω αριστερό λοβό και οδεύει πλευρικά και κάτω από τον κάτω αριστερό λοβό.

Υπάρχουν δύο πνευμονικές φλέβες σε κάθε πλευρά (ανώτερες και κατώτερες πνευμονικές φλέβες) που διέρχονται πρόσθια και κάτω από την πνευμονική αρτηρία και τους βρόγχους. Τα λεμφαγγεία διοχετεύονται στην πνευμονική πύλη και εν συνεχεία στους τραχειοβρογχικούς λεμφαδένες¹.

Μεσοθωράκιος χώρος

Ο μεσοθωράκιος χώρος είναι ο χώρος μεταξύ των δύο πνευμόνων. Το ανώτερο τμήμα του είναι η θωρακική είσοδος και το κατώτερο τμήμα του το διάφραγμα. Το πρόσθιο άκρο του είναι το στέρνο και το οπίσθιο άκρο του η σπονδυλική στήλη. Χωρίζεται στο ανώτερο, πρόσθιο, μέσο και οπίσθιο μεσοθωράκιο χώρο. Ο μεσοθωράκιος χώρος περιέχει πολυάριθμες δομές, όπως ο θύμος αδένας, οι θωρακικοί λεμφαδένες, οι θωρακικοί πόροι, το πνευμονογαστρικό νεύρο και το αυτόνομο νευρικό πλέγμα.

Ο θύμος αδένας βρίσκεται στον ανώτερο και πρόσθιο μεσοθωράκιο χώρο. Το κατώτερο άκρο του βρίσκεται στον τέταρτο πλευρικό χόνδρο. Η παροχή αίματός του χωρίζεται από μία διακλάδωση της έσω θωρακικής αρτηρίας και της κατώτερης θυρεοειδούς αρτηρίας. Οι θυμικές φλέβες διοχετεύονται στην αριστερή βραχιόνια κεφαλική φλέβα και στις έσω θωρακικές φλέβες. Η λεμφική παροχέτευση βρίσκεται στους τραχειοβρογχικούς λεμφαδένες.

Οι λεμφαδένες του μεσοθωράκιου χώρου βρίσκονται σε διάφορες θέσεις, όπως η προ-τραχειακή, η παρα-τραχειακή, η τροπιδική και η παρα-οισοφαγική θέση και

ταξινομούνται σε σταθμούς λεμφαδένων (π.χ. ο σταθμός 4 είναι ο δεξιός παρατραχειακός λεμφαδένας). Ο θωρακικός αγωγός ξεκινά από το επίπεδο του 12^{ου} θωρακικού σπονδύλου και εισέρχεται στο μεσοθωράκιο χώρο διαμέσου του αορτικού ανοίγματος του διαφράγματος. Εκτείνεται στην οπίσθια όψη του μεσοθωράκιου χώρου ακριβώς δεξιά της μέσης γραμμής μεταξύ της αορτής και της αζύγου φλέβας. Στο ανώτερο τμήμα του μεσοθωράκιου χώρου, ανέρχεται πάνω από την αριστερή πλευρά δίπλα στον οισοφάγο. Τελικά, καταλήγει σε μία από τις υποκλείδιες φλέβες ή την έσω σφαγίτιδα φλέβα.

Το πνευμονογαστρικό νεύρο στη δεξιά πλευρά βρίσκεται πλάγια προς την τραχεία και οπίσθια στο μέσο της δεξιάς βραχιονοκεφαλικής φλέβας και της άνω κοίλης φλέβας. Έπειτα, διέρχεται πίσω από τον κύριο δεξιό βρόγχο και συνεχίζει στην οπίσθια πλευρά του δεξιού κόλπου. Εκεί, χωρίζεται σε διακλαδώσεις, οι οποίες σχηματίζουν το αυτόνομο νευρικό πλέγμα. Το αριστερό πνευμονογαστρικό νεύρο βρίσκεται ανάμεσα στην αριστερή κοινή καρωτίδα και την υποκλείδια αρτηρία και πίσω από την αριστερή βραχιονοκεφαλική φλέβα. Διασχίζει το αορτικό τόξο και διέρχεται πίσω από την αριστερή πνευμονική πύλη. Εκεί, διαιρείται και σχηματίζει το πνευμονικό πλέγμα. Το αυτόνομο νευρικό πλέγμα στο μεσοθωράκιο σχηματίζεται από το πνευμονογαστρικό νεύρο, τη θωρακική συμπαθητική αλυσίδα και το αυτόνομο πλέγμα (καρδιακό, οισοφαγικό και πνευμονικό πλέγμα).

Το δεξιό φρενικό νεύρο κατέρχεται πλευρικά στην άνω κοίλη φλέβα μπροστά από την πνευμονική πύλη και στη συνέχεια κατά μήκος του περικαρδίου (πάνω από το δεξιό κόλπο) πριν φτάσει στο διάφραγμα. Το αριστερό φρενικό νεύρο διατρέχει το πνευμονογαστρικό νεύρο πάνω από το αορτικό τόξο κι έπειτα μπροστά από την αριστερή πνευμονική πύλη. Στη συνέχεια, εκτείνεται κατά μήκος του περικαρδίου (καλύπτοντας την αριστερή κοιλία) προτού τροφοδοτήσει το διάφραγμα¹.

Διάφραγμα

Το διάφραγμα είναι μία μεμβράνη που χωρίζει το θώρακα και τη κοιλιά (**Εικόνα 2**). Παίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό της αναπνοής και του βήχα. Έχει μία κυρτή άνω επιφάνεια και συνδέεται περιφερειακά στην κάτω πλευρά του θώρακα με μυϊκές ίνες που συγκλίνουν σε έναν κεντρικό τένοντα. Το διάφραγμα έχει τρία ανοίγματα μέσω των οποίων διέρχονται η κάτω κοίλη φλέβα (στο επίπεδο του 8^{ου} θωρακικού σπονδύλου), ο οισοφάγος και η αορτή. Η παροχή αίματός του πραγματοποιείται από τις πέντε μεσοπλεύριες αρτηρίες, την υποπλεύρια αρτηρία και

τις φρενικές αρτηρίες. Η φλεβική παροχέτευση πραγματοποιείται από τις φρενικές φλέβες, οι οποίες διοχετεύονται στην κάτω κοίλη φλέβα¹.

Ανάπτυξη

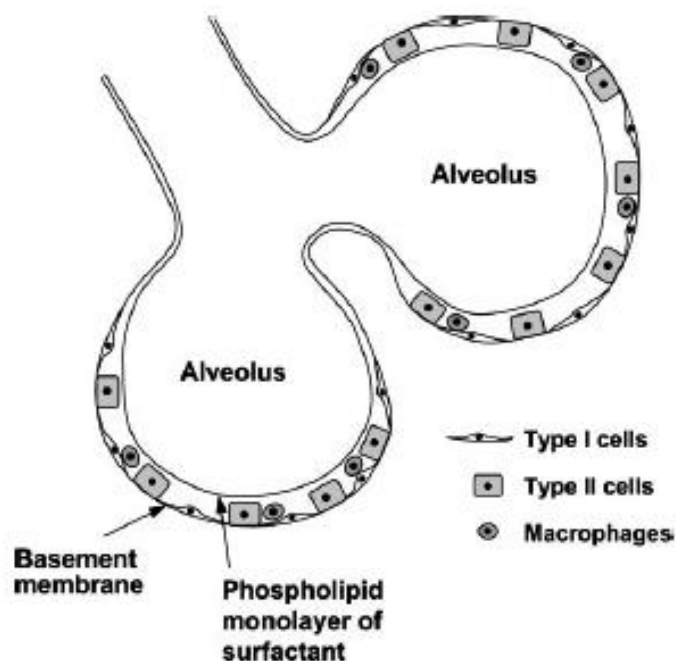
Η ανάπτυξη του αναπνευστικού συστήματος λαμβάνει χώρα στις 26 μέρες της κύησης με τον πολλαπλασιασμό ενός εκκολώματος που προέρχεται από το εμπρόσθιο έντερο. Πρώτα σχηματίζονται ο λαρυγγοτραχειακός σωλήνας και οι κύριοι βρόγχοι. Κατά τις επόμενες 10 εβδομάδες, αναπτύσσονται οι κατώτεροι αεραγωγοί και τελικά οι κυψελοειδείς δομές. Κατόπιν, σχηματίζονται οι πνευμονικές κυψελίδες και ο διάμεσος ιστός. Η κυψελιδική ανάπτυξη λαμβάνει χώρα στις 28 εβδομάδες κύησης και συνεχίζει κατά τη διάρκεια της πρώιμης παιδικής ηλικίας¹.

1.2 Πνευμονικό επιθήλιο

Το επιθήλιο των αεραγωγών διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας των αεραγωγών, από την τραχεία έως τις κυψελίδες, δεδομένου ότι ο πνεύμονας εκτίθεται συνεχώς σε εισπνεόμενους παθογόνους μικροοργανισμούς (όπως βακτήρια και ιούς) και αιωρούμενα σωματίδια (συμπεριλαμβανομένων καυσαερίων και καπνού) από το περιβάλλον. Το επιθήλιο των αεραγωγών αποτελείται από μία ποικιλία κυτταρικών τύπων όπως βλεφαριδωτά, βλεννώδη, βασικά και κύτταρα Clara στο βρογχικό επιθήλιο και τύπου I και τύπου II κύτταρα στο κυψελιδικό επιθήλιο². Το πνευμονικό επιθήλιο δρα ως φυσικός φραγμός, ρυθμίζει την ισορροπία των υγρών του πνεύμονα, ρυθμίζει το μεταβολισμό και την εκκαθάριση των εισπνεόμενων παραγόντων και εκκρίνει πολλούς μεσολαβητές, αρκετοί από τους οποίους προσλαμβάνουν και ενεργοποιούν φλεγμονώδη κύτταρα προς απόκριση σε τραυματισμό ή μόλυνση³.

1.3 Κυψελιδικό επιθήλιο

Οι πνεύμονες αποτελούνται από περίπου 300 εκατομμύρια κυψελίδες, καθεμία από τις οποίες έχει διάμετρο 0.3 mm. Στις κυψελίδες λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή των αερίων. Η διεπαφή με το περιβάλλον αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα επιφανειοδραστικού παράγοντα, μια μικρή ποσότητα κυψελιδικού υγρού, κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα, TI και TII και κυψελιδικά μακροφάγα⁴.



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση κυψελίδας και των κυττάρων μέσα σε αυτή (Andreeva AV et al, 2007)

Κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου I

Μορφολογία

Τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου I είναι μεγάλα επίπεδα κύτταρα που καλύπτουν περίπου το 95% της κυψελιδικής επιφάνειας, αποτελούν περίπου το 8% των κυττάρων του πνεύμονα και έχουν εμβαδόν περίπου $5000 \mu\text{m}^2$ ανά κύτταρο (**Εικόνα 3**)⁴. Τα τύπου I κύτταρα περιέχουν αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, συσκευή Golgi, μιτοχόνδρια και λυσοσώματα στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα. Οι κυτταροπλασματικές πλάκες στερούνται κυτταροπλασματικών οργανιδίων, γι' αυτό και είναι επιρρεπή στην καταστροφή από πολλούς εισπνεόμενους παράγοντες. Ωστόσο, αυτές οι κυτταροπλασματικές πλάκες περιέχουν πολυάριθμες μικροπινοκυτωτικά κυστίδια με διάμετρο περίπου 35 nm ⁵.

Ρόλος

A. Ανταλλαγή αερίων: Η δομή του μεσοκυψελιδικού φράγματος είναι τέτοια ώστε τα αέρια και το αίμα να βρίσκονται σε στενή επαφή πάνω από μια μεγάλη περιοχή. Ο χώρος των αερίων και ο αγγειακό χώρος επενδύονται από ένα συνεχές στρώμα

κυττάρων με πολύ λεπτές κυτταροπλασματικές προεκτάσεις. Όταν οι ίνες του συνδετικού ιστού κατά μήκος του κυψελιδικού φράγματος είναι εκτεταμένες, τα τριχοειδή αγγεία μετατοπίζονται εναλλάξ προς τη μία ή την άλλη πλευρά του φράγματος⁶. Πάνω από την εξωτερική επιφάνεια του τριχοειδούς αγγείου, τα βασικά ελάσματα του αγγειακού επιθηλίου και το κυψελιδικό επιθήλιο τύπου I συγχωνεύονται σχηματίζοντας ένα πολύ λεπτό φράγμα ανταλλαγής αερίων πάχους 0.2-0.5 μm ⁵.

B. Λειτουργίες φράγματος: Η διαπερατότητα κατά μήκος του κυψελιδικού επιθηλίου είναι πολύ περιορισμένη⁷. Οι επιθηλιακοί δεσμοί αποτελούνται από αλληλένδετες προεξοχές και αυλακώσεις, χωρίς διάκενα^{7,8}. Παρόλα αυτά, το επιθηλιακό φράγμα δεν είναι απόλυτο, καθώς υπάρχουν πρωτεΐνες που μεταφέρονται από το διάμεσο πνευμονικό χώρο στους κυψελιδικούς θαλάμους και αντίστροφα. Είναι πιθανό ότι η κίνηση των μακρομορίων και προς τις δύο κατευθύνσεις κατά μήκος του επιθηλίου εμπλέκει τα πινοκυτωτικά κυστίδια. Τα λιπιδικά αδιάλυτα μόρια μεταφέρονται μέσω μεγάλων πόρων ή πινοκυτωτικών κυστιδίων⁵.

Κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II

Μορφολογία

Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι μικρά κοκκώδη κύτταρα, που καλύπτουν περίπου το 5% της κυψελιδικής επιφάνειας, αποτελούν το 15% των πνευμονοκυττάρων κι έχουν εμβαδό περίπου 250 μm^2 ανά κύτταρο (**Εικόνα 3**)⁹. Διαθέτουν μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, πολυριβοσώματα και συσκευή Golgi. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι τα πεταλοειδή σωμάτια στο κυτταρόπλασμα και οι μικρολάχνες γύρω από την κορυφή. Αυτά τα πεταλοειδή σωμάτια είναι ο χώρος αποθήκευσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα, ενός μίγματος πρωτεϊνών και λιπιδίων που καλύπτει την επιφάνεια της κυψελίδας^{4,5}.

Ρόλος

A. Σύνθεση και έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα: Η κύρια λειτουργία των τύπου II κυττάρων είναι να παράγουν επιφανειοδραστικό παράγοντα, ο οποίος μειώνει την επιφανειακή τάση στις περιοχές ανταλλαγής αερίων των πνευμόνων. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας μειώνει το έργο της αναπνοής, επιτρέπει την αποτελεσματική ανταλλαγή των αερίων, αποτρέπει το πνευμονικό οίδημα και διαθέτει αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Αποτελείται κυρίως από

φωσφολιπίδια, τα κυριότερα εκ των οποίων είναι η φωσφατιδυλοχολίνη και η φωσφατιδυλογλυκερόλη.

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας διαθέτει, επίσης, τέσσερις πρωτεΐνες: SP-A, SP-B, SP-C και SP-D. Οι SP-A και SP-D είναι υδρόφιλες, ασβεστιο-εξαρτώμενες κολλεκτίνες κι έχουν πρωταρχικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία. Οι SP-B και SP-C είναι υδρόφοβες πρωτεΐνες, οι οποίες διευκολύνουν τη διάδοση, την προσρόφηση και τη διατήρηση της φυσικής δομής του επιφανειοδραστικού παράγοντα⁴.

Β. Πολλαπλασιασμός: Στον φυσιολογικό πνεύμονα, τα τύπου II κύτταρα πολλαπλασιάζονται για να παρέχουν θυγατρικά κύτταρα, μερικά από τα οποία παραμένουν ως τύπου II κύτταρα και άλλα διαφοροποιούνται για να γίνουν πνευμονοκύτταρα τύπου I.

Στην οξεία πνευμονική βλάβη, τα τύπου I κύτταρα είναι πιο επιρρεπή σε βλάβη, ενώ τα κύτταρα τύπου II είναι υπεύθυνα για την αποκατάσταση του επιθηλίου. Μετά από τραυματισμό του πνεύμονα, τα κύτταρα τύπου II εξαπλώνονται και πολλαπλασιάζονται. Κάποια από αυτά υφίστανται απόπτωση και άλλα διαφοροποιούνται σε κύτταρα τύπου I.

Υπάρχει μια ποικιλία αυξητικών παραγόντων που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων τύπου II, όπως τα μέλη της οικογένειας FGF, HGF και EGF⁴.

Γ. Διεπιθηλιακή μεταφορά νατρίου: Οι βήτα αδρενεργικοί αγωνιστές διεγείρουν τη διεπιθηλιακή μεταφορά νατρίου και διευκολύνουν την εκκαθάριση του κυψελιδικού υγρού.

Τα τύπου II κύτταρα διαθέτουν αυτόν τον μηχανισμό μεταφοράς (διάλυτοι ιόντων νατρίου και Na/K ATPάση) κι έχουν άφθονα μιτοχόνδρια ως πηγή ενέργειας για την κίνηση των αντλιών⁴.

Δ. Έμφυτη ανοσία: Ο πνεύμονας 'βομβαρδίζεται' συνεχώς από εισπνεόμενους μικροοργανισμούς, τοξικά αέρια και σωματίδια και αντιμετωπίζει τις εισβολές αυτές με μία μόνο φλεγμονώδη απόκριση. Τα κύτταρα τύπου II είναι υπεύθυνα για αυτή την έμφυτη ανοσία, αλλά είναι πολύ πιθανό να εμπλέκονται και τα κύτταρα τύπου I. Ο ρόλος των κυττάρων τύπου II στην έμφυτη ανοσία είναι περίπλοκος. Σε κατάσταση ηρεμίας, τα κύτταρα τύπου II δημιουργούν μία γραμμή άμυνας εκκρίνοντας μία ποικιλία αντιφλεγμονωδών και αντιμικροβιακών ουσιών στο υγρό των κυψελίδων.

Αυτές οι ουσίες περιλαμβάνουν τις κολλεκτίνες SP-A και SP-D, αντιμικροβιακές πρωτεΐνες όπως λυσοζύμη, καθελικιδίνη και λιποκαλίνη 2 και αντιοξειδωτικά όπως γλουταθειόνη. Επίσης, τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα μεταφέρουν ανοσοσφαιρίνη στο υγρό των κυψελίδων κι έχουν υψηλό επίπεδο έκφρασης του μεταφορέα πολυμερικής ανοσοσφαιρίνης⁴.

Σε περίπτωση μόλυνσης ή όταν τα κύτταρα καταστρέφονται, τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα ενισχύουν την άμυνά τους αυξάνοντας την παραγωγή αντιμικροβιακών πρωτεϊνών και εκκρίνοντας μία ποικιλία χημειοκινών και κυτοκινών. Τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν τις κυτοκίνες IL-1β, IL-1α, TNF και IL-6. Εκκρίνουν, επίσης, μία ποικιλία χημειοκινών όπως GRO (CXCL1), ENA-78 (CXCL5), IL-8 (CXCL8), MIP-2 (CXCL2), NAP-2 (CXCL7), RANTES (CCL5) και MCP-1 (CCL2)^{10,11}. Τα κυψελιδικά κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς (toll-like receptors (TLR)), ιδίως τους TLR2 και TLR4. Ως εκ τούτου, μπορούν να αναγνωρίζουν gram-θετικά και gram-αρνητικά βακτήρια. Εκφράζουν, επίσης, τον υποδοχέα TLR3, ο οποίος αναγνωρίζει κάποιους ιούς⁴.

Κυψελιδικά μακροφάγα (AM)

Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις τύποι μακροφάγων στους πνεύμονες: τα βρογχικά μακροφάγα, τα μακροφάγα του διάμεσου χώρου και τα κυψελιδικά μακροφάγα. Τα κυψελιδικά μακροφάγα είναι μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα που βρίσκονται στον εναέριο χώρο των κυψελίδων, όπου αποτελούν το 90-95% του κυτταρικού περιεχομένου σε σταθερή κατάσταση (**Εικόνα 3**)¹². Δρουν στην πρώτη γραμμή άμυνας της έμφυτης ανοσίας στους κατώτερους αεραγωγούς, όπου προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα και φαγοκυτταρώνουν τα μικρόβια που μεταφέρονται προς αυτούς από τη ροή του κυψελιδικού υγρού¹³. Τα κυψελιδικά μακροφάγα είναι απαραίτητα για την αντιμετώπιση της πνευμονικής λοίμωξης από βακτήρια και μύκητες συμπεριλαμβανομένων των *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacteria tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Pneumocystis carini*^{14,15,16,17}. Οι πρωτεΐνες SP-A και SP-D του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων έχουν προ- και αντιφλεγμονώδη δράση στα κυψελιδικά μακροφάγα, η οποία διαμεσολαβείται από την αλληλεπίδραση της ουράς ή της κεφαλής των πρωτεϊνών αυτών με διαφορετικούς υποδοχείς των κυψελιδικών κυττάρων¹².

2. Επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων

2.1 Γενικά

Οι πνεύμονες διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των σπονδυλωτών. Ωστόσο, περιέχουν όλοι πνευμονικό επιφανειοδραστικό παράγοντα, ένα υλικό το οποίο παράγεται και εκκρίνεται από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II και επενδύει το επιθήλιό τους, μειώνοντας το μηχανικό έργο της αναπνοής. Η σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα αντικατοπτρίζει την εξέλιξη των πνευμόνων των σπονδυλωτών και έχει προσαρμοστεί στις ειδικές απαιτήσεις της αναπνοής κάθε οργανισμού. Στα θηλαστικά, η πρωταρχική λειτουργία του είναι η ρύθμιση της κυψελιδικής επιφανειακής τάσης με σκοπό την αποτελεσματική ανταλλαγή των αερίων και τη σταθερότητα των κυψελίδων¹⁸.

Άλλη μία ιδιότητα του κυψελιδικού επιφανειοδραστικού παράγοντα με σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον είναι η άμυνα του ξενιστή, η οποία στηρίζεται κατά κύριο λόγο σε ειδικές επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες, τις SP-A και SP-D που δρουν ως κολλεκτίνες. Και οι δύο πρωτεΐνες προσδένονται στην επιφάνεια διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών, όπου δρουν ως οψωνίνες (ανοσοσφαιρίνες) διευκολύνοντας την απομάκρυνσή τους με τη βοήθεια των κυψελιδικών μακροφάγων¹⁹.

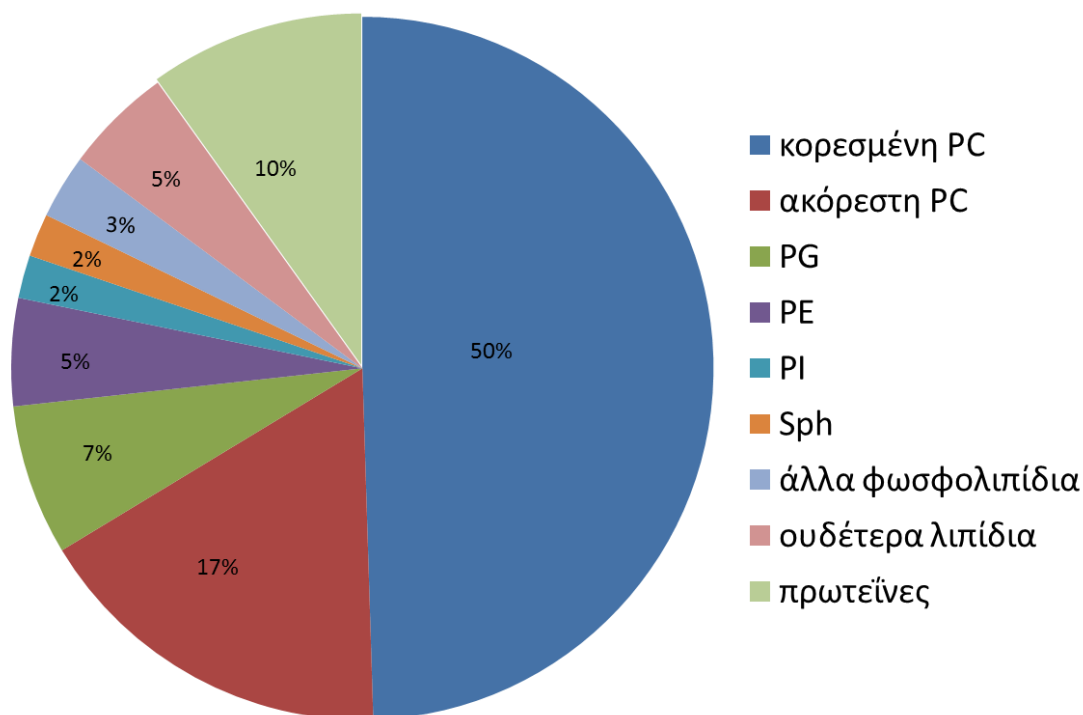
Όλα τα συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυψελιδικών κυττάρων τύπου II (ATII), οργανώνονται και αποθηκεύονται σε ποικίλες δομές, όπως τα πεταλοειδή σωμάτια. Υπό αυτή τη μορφή, ο κυψελιδικός παράγοντας εκκρίνεται στον κυψελιδικό χώρο²⁰.

Η ομοιότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι κρίσιμης σημασίας για τη λειτουργία των πνευμόνων και διατηρείται μέσω της βιοσύνθεσης, έκκρισης, ανακύκλωσης και αποσύνθεσης των συστατικών του. Ποιοτικές και ποσοτικές τροποποιήσεις της σύστασης του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση της απόδοσης της αναπνοής και της ανταλλαγής των αερίων ή σε ακραίες περιπτώσεις σε σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας¹⁹.

2.2 Σύσταση του πνευμονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων είναι ένα λιποπρωτεϊνικό μίγμα που αποτελείται κυρίως από λιπίδια (~90%), συμπεριλαμβανομένων των

φωσφολιπιδίων, τριγλυκεριδίων, χοληστερόλης και λιπαρών οξέων και τις επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες A, B, C και D (SP-A, SP-B, SP-C και SP-D). Οι πρωτεΐνες SP-A και SP-D είναι υδρόφιλες, ενώ οι SP-B και SP-C είναι υδρόφοβες (εικόνα 4)^{18,21}.



Εικόνα 4: Γράφημα πίτας που αναπαριστά τα συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα του πνεύμονα. PC=φωσφατιδυλοχολίνη, PG=φωσφατιδυλογλυκερόλη, PE=φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PI=φωσφατιδυλοϊνσιτόλη, Sph=σφιγγομυελίνη (Akella A and Deshpande SB, 2013).

Η φωσφολιπιδική σύνθεση είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένη μεταξύ των θηλαστικών. Η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) είναι το κυριότερο φωσφολιπίδιο, αποτελώντας το 80% των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Περίπου το 60% της φωσφατιδυλοχολίνης βρίσκεται στη δικορεσμένη της μορφή, ως διπαλμιτοϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC)^{22,23}. Πιθανόν, αυτά τα μοριακά είδη επιτυγχάνουν το κατάλληλο «πακετάρισμα» του επιφανειοδραστικού παράγοντα και τη διατήρηση των τασιενεργών ιδιοτήτων του²⁴.

Το δεύτερο μεγαλύτερο σε ποσοστό φωσφολιπίδιο είναι η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), αντιπροσωπεύοντας το 7-15% των ολικών φωσφολιπιδίων. Καθένα από τα υπόλοιπα φωσφολιπίδια γενικά αναλογεί σε λιγότερο από 5% των ολικών φωσφολιπιδίων. Ο ακριβής βιολογικός ρόλος της φωσφατιδυλογλυκερόλης δεν είναι γνωστός, αλλά ίσως παίζει ρόλο στη σταθερότητα των κυψελίδων και τη ρύθμιση της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης^{25,26}.

Η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE), η σφιγγομυελίνη (Sph), η φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI) και η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) αποτελούν τα υπόλοιπα, μικρότερα σε ποσοστό φωσφολιπίδια.

Όσον αφορά τα ουδέτερα λιπιδικά συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα, λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες. Στα θηλαστικά, η χοληστερόλη είναι το κυριότερο συστατικό (80-90%). Υπάρχουν παρόντα μικρά ποσοστά μονοακυλογλυκερόλης, διακυλογλυκερόλης και τριακυλογλυκερόλης. Οι εστέρες χοληστερόλης εμφανίζονται σε χαμηλά ποσοστά. Επίσης, περιέχονται ελεύθερα λιπαρά οξέα, κυρίως παλμιτικό^{27,28,29}.

Εκτός από λιπίδια, το 5-10% του επιφανειοδραστικού παράγοντα αποτελείται από πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν εκτενώς με τα φωσφολιπίδια. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις ρυθμίζουν τη δομή και τις ιδιότητες του στρώματος των λιπιδίων²⁰. Οι πρωτεΐνες SP-B και SP-C είναι καθοριστικής σημασίας για τη ρύθμιση του σχηματισμού και της σταθερότητας του στρώματος του επιφανειοδραστικού παράγοντα³⁰, ενώ οι SP-A και SP-D εμπλέκονται στην έμφυτη ανοσία και τη φλεγμονώδη απόκριση³¹. Η SP-D μπορεί, επίσης, να παίζει ρόλο στο μεταβολισμό του επιφανειοδραστικού παράγοντα και την πνευμονική ομοιοστάση³².

2.3 Οργάνωση και διακίνηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα

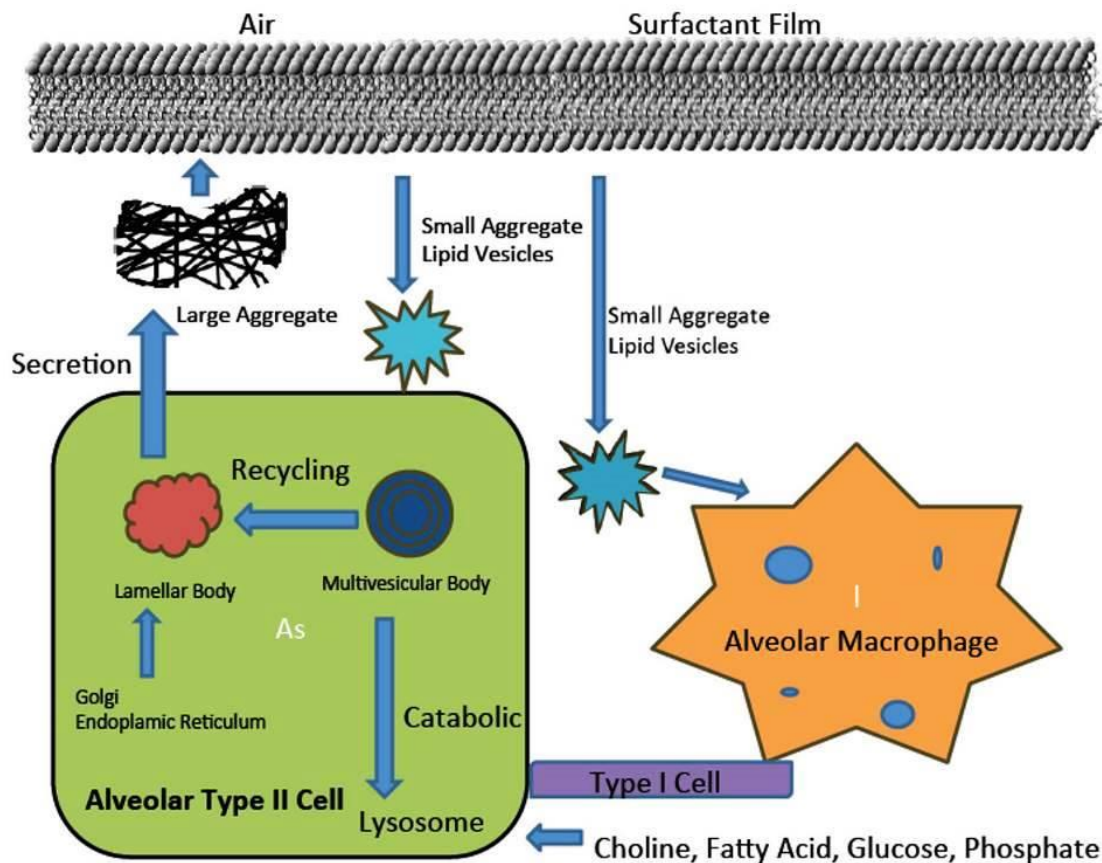
Τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα βιοσυντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ΑΤΠ κυττάρων. Έπειτα, μετακινούνται στη συσκευή Golgi από όπου μεταφέρονται, συγκεντρώνονται και συσκευάζονται σε ενδοκυτταρικά οργανίδια αποθήκευσης, τα πεταλοειδή σωμάτια (lamellar bodies, LB). Ένα μέρος των συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα που είναι ενσωματωμένα στα πεταλοειδή σωμάτια προέρχεται από τα πολυκυστιδικά σωμάτια (multivesicular bodies, MVB). Αυτά τα οργανίδια ανήκουν στο ενδοσωμικό-λυσosomal σύστημα των ΑΤΠ κυττάρων και αξιοποιούνται για τον μετα-μεταφραστικό σχηματισμό των πεταλοειδών σωματίων (Εικόνα 5)¹⁸.

Τα πεταλοειδή σωμάτια είναι οργανίδια τα οποία χρησιμεύουν ως χώροι αποθήκευσης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Αυτά τα συστατικά εγκλείονται σε μία μεμβράνη, η οποία συγκροτείται τόσο από λυσοσωμικές/ενδοσωμικές όσο και από ειδικές ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ενδοκυτταρική μεταφορά τους. Οι μεμβράνες των πεταλοειδών σωματίων περιλαμβάνουν αντλίες για τη διατήρηση του χαμηλού pH και των υψηλών επιπέδων Ca^{2+} ^{33,34}.

Η μεταφορά των φωσφολιπιδίων από τη συσκευή Golgi στα πεταλοειδή σωμάτια λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια πρωτεϊνών ανταλλαγής φωσφολιπιδίων. Τέτοιες πρωτεΐνες έχουν βρεθεί σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων. Έχουν χαρακτηριστεί κυρίως τρία είδη: 1) PC-πρωτεΐνη μεταφοράς (PC-TP), η οποία μεταφέρει φωσφατιδυλοχολίνη, 2) PI-πρωτεΐνη μεταφοράς (PI-TP), η οποία μεταφέρει φωσφατιδυλινωσιτόλη και φωσφατιδυλοχολίνη, με προτίμηση στη φωσφατιδυλινωσιτόλη και 3) μη ειδική πρωτεΐνη μεταφοράς λιπιδίων, η οποία διεγείρει τη μεταφορά φωσφολιπιδίων, γλυκολιπιδίων και χοληστερόλης^{35,36,37,38,39,40}.

Η μετατόπιση των λιπιδίων διαμέσου της μεμβράνης των πεταλοειδών σωματίων πραγματοποιείται μέσω ABC μεταφορέων (ATP-binding cassette, ABC), οι οποίοι αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες υπεροικογένειες πρωτεϊνών μεταφορέων. Η υποομάδα ABCA3 εκφράζεται κυρίως στον πνεύμονα, εντοπίζεται στις μεμβράνες των πεταλοειδών και πολυκυστιδιακών σωματίων και πιθανόν εμπλέκεται στην συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων και της χοληστερόλης στα πεταλοειδή σωμάτια¹⁸.

Τα πεταλοειδή σωμάτια κινούνται στο κορυφαίο τμήμα των ΑΤΗ κυττάρων, όπου συγχωνεύονται με την πλασματική μεμβράνη και το περιεχόμενό τους εκκρίνεται στην υπόφαση για να σχηματίσει ένα άριστα οργανωμένο δίκτυο από επιφανειοδραστικά λιπίδια και πρωτεΐνες, που ονομάζεται σωληνοειδής μυελίνη (tubular myelin, TM). Παράλληλα, η λιπιδική διπλοστιβάδα ξετυλίγεται και μια μονοστιβάδα απλώνεται στη διεπιφάνεια αερίου-υγρού. Μετά από ορισμένους κύκλους εισπνοών-εκπνοών, τμήματα του επιφανειοδραστικού παράγοντα χάνουν τις τασιενεργές ιδιότητές τους, μετατρέπονται σε μικρά κυστίδια, τα οποία έπειτα ανακυκλώνονται από τα ΑΤΗ κύτταρα ή φαγοκυτταρώνονται και αποδομούνται από τα κυψελιδικά μακροφάγα¹⁸. Το ποσοστό του επιφανειοδραστικού παράγοντα που ανακυκλώνεται είναι περίπου 25-95%, το οποίο εσωτερικεύεται ξανά στα πεταλοειδή σωμάτια και επανεκκρίνεται (**Εικόνα 5**)⁴¹.



Εικόνα 5: Μεταβολισμός του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγής του επιφανειοδραστικού παράγοντα, οργάνωσής του στα πεταλοειδή σωματίδια και έκκρισής του από τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II. Μικρά και μεγάλα συσσωματώματα σχηματίζονται και στη συνέχεια καταβολίζονται από τα κυψελιδικά κύτταρα και τα μακροφάγα (Agassandian M and Mallampalli RK, 2013).

2.4 Έκκριση

Η έκκριση είναι απαραίτητο βήμα για την ομοιόσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Περιλαμβάνει συγχώνευση των πεταλοειδών σωματίων με την πλασματική μεμβράνη των ΑΤΙΙ κυττάρων και εξωκυττάρωση του περιεχομένου τους. Η έκκριση είναι μία διαδικασία, η οποία είτε λαμβάνει χώρα διαρκώς είτε επάγεται. Ποικίλα σήματα διεγείρουν τη συγχώνευση των πεταλοειδών σωματίων με την πλασματική μεμβράνη και την εξωκυττάρωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Αυτά περιλαμβάνουν φυσιολογικά μηχανικά ερεθίσματα που εφαρμόζονται στο πνευμονικό επιθήλιο εξαιτίας της διαστολής και συστολής του πνεύμονα κατά τη διάρκεια της αναπνοής, του οσμωτικού σοκ και λοιπά. Επίσης, σε παθολογικές

καταστάσεις, η μηχανική υποστήριξη της αναπνοής ή η υπεροξυγόνωση πυροδοτούν μια σειρά βιοχημικών γεγονότων με αποτέλεσμα μία αύξηση στην έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα^{18,42}.

Οι τελεστές που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι οι εξής:

1. Η αδενυλική κυκλάση (adenylate cyclase, AC). Ενεργοποιείται μέσω β-αδρενεργικών υποδοχέων και A_{2B} υποδοχέων αδενοσίνης, οι οποίοι είναι συζευγμένοι με GTP πρωτεΐνη (GTP-binding protein, Gs). Οι εξαρτώμενες από cAMP πρωτεϊνικές κινάσες, πιθανόν με τη βοήθεια του ATP, αυξάνουν τα επίπεδα του κυκλικού AMP⁴³.
2. Η φωσφοϊνσιτιδάση, μία φωσφολιπάση C (PLC) η οποία μετατρέπει την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP₂) σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃) και διακυλογλυκερόλη (DAG). Η (PLC)-β3 ισομορφή συζευγνύεται με τους υποδοχείς P2Y₂ μέσω Gq πρωτεϊνών. Η IP₃ συνδέεται απευθείας στους υποδοχείς των ενδοκυτταρικών κυστιδίων αποθήκευσης Ca^{2+} και ελευθερώνει Ca^{2+} , ενώ η DAG ενεργοποιεί την εξαρτώμενη από ασβέστιο πρωτεϊνική κινάση (PKC) και φωσφολιπάση D (PLD). Η PLD υδρολύει τη φωσφατιδυλοχολίνη σχηματίζοντας χολίνη και φωσφατιδικό οξύ (PA). Ένα άλλο ένζυμο, η φωσφατιδική φωσφατάση μετατρέπει το φωσφατιδικό οξύ σε ενεργοποιώντας ένα δεύτερο κύμα ενεργοποίησης PKC¹⁸.
3. Η αύξηση των επιπέδων Ca^{2+} στα ΑΤΗ κύτταρα είτε από ενδοκυτταρικές είτε από εξωκυτταρικές αποθήκες, μετά από ενεργοποίηση των IP₃ και Ca^{2+} - ιονοφόρων αντίστοιχα. Το Ca^{2+} δρα συνεργιστικά με την DAG και το PA, οδηγώντας στη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών από άλλες κινάσες όπως οι PKA, PKC ή CaM-PK (Ca^{2+} calmodulin-dependent protein kinase) και ακολούθως στην έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων¹⁸.

2.5 Ο ρόλος των λιπιδίων στη λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα

2.5.1 Φωσφατιδυλοχολίνη

Το λεπτό στρώμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα που καλύπτει τις κυψελίδες είναι εμπλουτισμένο σε διπαλμιτοϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC). Η DPPC δεν είναι μόνο το κυριότερο συστατικό του επιφανειοδραστικού παράγοντα, αλλά είναι και το μοναδικό συστατικό που δημιουργεί χαμηλή επιφανειακή τάση κατά

τη διάρκεια της συμπίεσης. Παίζει, επίσης, σπουδαίο ρόλο στην έκκριση από τα πεταλοειδή σωματίδια, στο σχηματισμό της σωληνοειδούς μυελίνης ή και των πρόδρομων ουσιών του επιφανειοδραστικού παράγοντα και στην επαναπρόσληψη των συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα ΑΤΠ κύτταρα^{27,44}.

2.5.2 Όξινα φωσφολιπίδια

Τα όξινα φωσφολιπίδια (φωσφατιδυλογλυκερόλη, PG και φωσφατιδυλινοσιτόλη, PI) αποτελούν σημαντικά συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η ανάμιξη των όξινων φωσφολιπιδίων με DPPC οδηγεί σε ενισχυμένη προσρόφησή της στη στιβάδα του επιφανειοδραστικού παράγοντα, παίζοντας πιθανό ρόλο στη μείωση της επιφανειακής τάσης⁴⁵. Σε ασθενείς με σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) παρατηρείται μείωση του ποσοστού της PG²⁷.

2.5.3 Υπόλοιπα φωσφολιπιδικά συστατικά

Στον επιφανειοδραστικό παράγοντα, υπάρχει ένας αριθμός φωσφολιπιδίων σε σχετικά χαμηλά ποσοστά, τα οποία επιδρούν ελάχιστα στη δραστηριότητά του και σχετίζονται με θέματα μεταβολισμού. Τα υψηλότερα ποσοστά αυτών των λιπιδίων παρατηρούνται σε πνευμονική βλάβη, τα οποία συμβάλλουν στη μειωμένη δραστηριότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα²⁷.

2.5.4 Ουδέτερα λιπίδια

Η μονοακυλογλυκερόλη, η διακυλογλυκερόλη, τριακυλογλυκερόλη, το ελεύθερο παλμιτικό οξύ και η χοληστερόλη ενισχύουν το ποσοστό προσρόφησης της DPPC, αυξάνοντας τη ρευστότητα^{46,47}. Η χοληστερόλη περιορίζει τις ελάχιστες επιφανειακές τάσεις κατά τη διάρκεια της συμπίεσης.

2.6 Ο ρόλος των πρωτεϊνών στη λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Οι μικρές υδρόφοβες πρωτεΐνες SP-B και SP-C, οι οποίες βρίσκονται εντός των πεταλοειδών σωματίων, εκκρίνονται στην υδατική υπόφαση μαζί με το περιεχόμενο των πεταλοειδών σωματίων. Και οι δύο πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξαγωγή των μη-DPPC συστατικών κατά τη διάρκεια του σχηματισμού και της συμπίεσης του λιπιδικού στρώματος. Αντιθέτως, οι μεγάλες υδρόφιλες πρωτεΐνες

SP-A και SP-D εκκρίνονται ανεξέρτητα από το περιεχόμενο των πεταλοειδών σωματιών⁴⁸. Η παρουσία της SP-A είναι απαραίτητη για τη γρήγορη προσρόφηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη διεπιφάνεια αερίου-υγρού¹⁸.

Οι SP-A και SP-D έχουν την ικανότητα να προσκολλούνται σε μια ποικιλία μυκήτων, βακτηρίων και ιών για να διευκολύνουν την απομόνωσή τους. Δρουν ως κολλεκτίνες που διεγείρουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις παρουσία Ca^{2+} . Η SP-A δρα είτε ως προφλεγμονώδης είτε ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας, αυξάνοντας ή μειώνοντας την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών από φλεγμονώδη κύτταρα για να ενισχύσουν την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών ή να καταστείλουν τη φλεγμονή⁴⁹.

Η SP-D συνεισφέρει στη ρύθμιση της ομοιόστασης του επιφανειοδραστικού παράγοντα, εν μέρει αναδιοργανώνοντας τα λιπίδιά του. Η SP-D παίζει σημαντικό ρόλο στη παθογένεση μιας μεγάλης ποικιλίας μολυσματικών και φλεγμονωδών πνευμονικών διαταραχών. Οι πιθανές λειτουργίες της SP-D είναι αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και ανοσορρυθμιστικές⁵⁰.

Η SP-B ανήκει στην υπεροικογένεια των σαποσινών. Η παρουσία της SP-B είναι ζωτικής σημασίας για τη μείωση της επιφανειακής τάσης και τη διατήρηση του όγκου του πνεύμονα στο τέλος της εκπνοής⁵¹.

Η παρουσία της SP-C στον επιφανειοδραστικό παράγοντα των πνευμόνων ενισχύει την αντίσταση στη ροή του επιφανειοδραστικού παράγοντα αυξάνοντας το ιξώδες του, σε αντίθεση με την SP-B η οποία έχει ελάχιστη επίδραση. Και οι δύο πρωτεΐνες διεγείρουν το σχηματισμό της στιβάδας του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα πολυκυστιδιακά σωματίδια¹⁸.

2.7 Ερεθίσματα της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Η ρυθμιζόμενη έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να ξεκινήσει από χημικά ή φυσικά ερεθίσματα. Το πρωταρχικό φυσιολογικό ερέθισμα είναι η απευθείας μηχανική διάταση των ΑΤΠ κυττάρων ως αποτέλεσμα της αναπνοής^{51,52}. Αυτό μπορεί να αναπαραχθεί με καλλιεργημένα κύτταρα τύπου ΙΙ^{52,53}. Η μηχανική διάταση των κυττάρων τύπου ΙΙ πυροδοτεί μία αύξηση στα επίπεδα του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , η οποία απαιτείται για την κυτταρική απόκριση^{53,54}. Η μηχανική συστολή είναι, επίσης, απαραίτητη για τη διατήρηση της έκφρασης των πρωτεϊνικών συστατικών του επιφανειοδραστικού παράγοντα⁵⁵. Επιπλέον, τα

μηχανικά ερεθίσματα προάγουν την απελευθέρωση του ATP και τον σχηματισμό της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3) στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών¹⁸.

Πολλοί αγωνιστές και δεύτεροι αγγελιοφόροι διεγείρουν την έκκριση στα κύτταρα τύπου II⁵⁶. Αυτά τα ερεθίσματα ενεργοποιούν μία ή περισσότερες από τις πρωτεϊνικές κινάσες: πρωτεϊνική κινάση A (PKA), πρωτεϊνική κινάση C (PKC) ή πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από Ca^{2+} /καλμοδοουλίνη (CaMK). Η αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} όχι μόνο ενεργοποιεί τη CaMK, αλλά και διεγείρει την έκκριση δρώντας μέσω αννεξινών⁵⁷.

3. Μηχανικά σήματα στον πνεύμονα

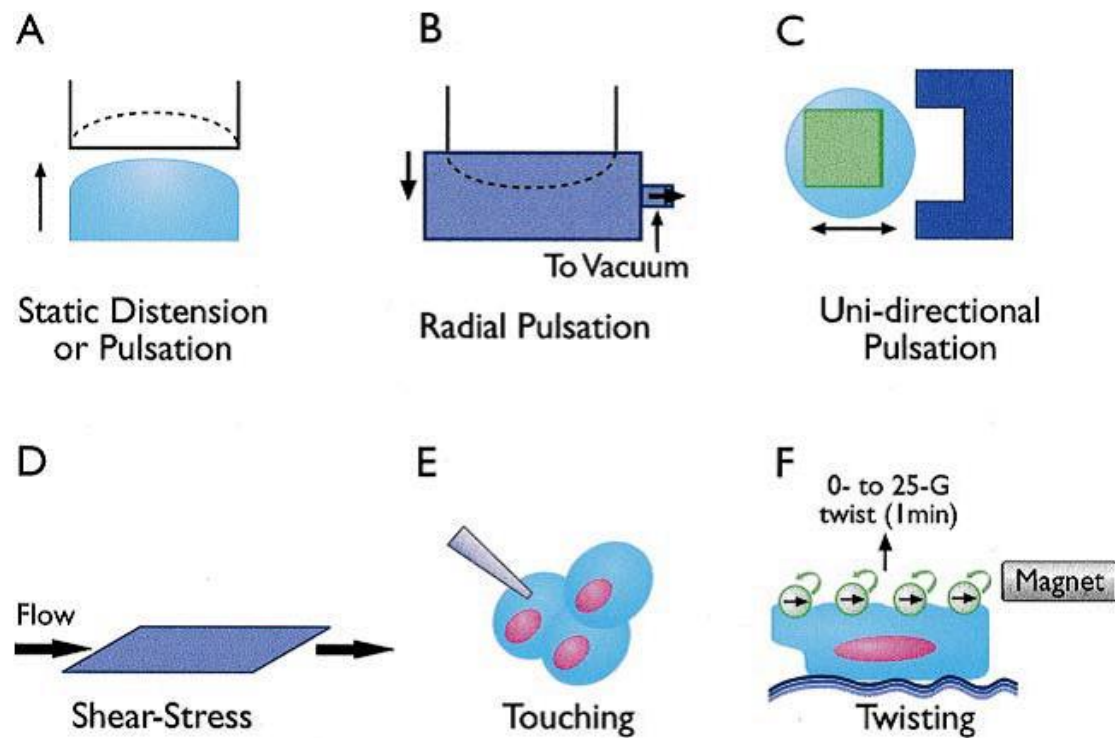
3.1 Γενικά

Ο πνεύμονας είναι ένα όργανο του σώματος που υπόκειται σε μια σειρά μηχανικών τάσεων. Η παραμόρφωση των κυψελίδων λόγω της αναπνοής, η ροή του αίματος και οι αλλαγές στην επιφανειακή τάση στη διεπιφάνεια αερίου-υγρού εντός των κυψελίδων λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της αναπνοής, επηρεάζοντας την ανάπτυξη του πνεύμονα, καθώς επίσης τη δομή και τη λειτουργική του ικανότητα⁵⁸. Η αναπνοή είναι μία μοναδική χαρακτηριστική ιδιότητα του πνεύμονα, κατά τη διάρκεια της οποίας οι κυψελίδες υφίστανται διακυμάνσεις του όγκου τους, προκαλώντας διάταση της βασικής μεμβράνης^{59,60,61}. Η ροή του αίματος προέρχεται από τις πνευμονικές και βρογχικές αρτηρίες. Αυτά τα αιμοφόρα αγγεία υποβάλλονται τόσο σε διατμητική τάση όσο και σε δυνάμεις που οφείλονται στη ροή του αίματος και επηρεάζονται και από τις μεταβολές του όγκου του πνεύμονα κατά τη διάρκεια της αναπνοής. Η επιφανειακή τάση που σχηματίζεται στη διεπιφάνεια αερίου-υγρού, επίσης, επηρεάζει τη μεταβολή του όγκου του πνεύμονα⁶² και την αντίσταση των μικρών αεραγωγών του⁶³.

Μη φυσιολογικές μηχανικές τάσεις συνδέονται με πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Ο εκτεταμένος μηχανικός αερισμός μπορεί να προκαλέσει πνευμονική βλάβη σε κυτταρικό επίπεδο^{64,65}. Η διόγκωση του πνεύμονα κατά τη διασωλήνωση, ο ρυθμός επαναιμάτωσης και το μοντέλο αερισμού επηρεάζουν τη λειτουργία του πνεύμονα^{66,67}. Η χρόνια απόφραξη της αναπνευστικής οδού συμβάλλει στην υπερπλασία των λείων μυών των αεραγωγών και την υπερτροφία. Επίσης, οι αυξημένες μηχανικές δυνάμεις εμπλέκονται στην ανάπτυξη πνευμονικής υπέρτασης^{68,69}.

3.2 Μοντέλα μηχανικής παραμόρφωσης πνευμονοκυττάρων

Έχουν κατασκευαστεί και χρησιμοποιηθεί αρκετές συσκευές για την εφαρμογή διαφόρων ειδών δυνάμεων σε κύτταρα του πνεύμονα, μερικές από τις οποίες έχουν καταστεί εμπορικά διαθέσιμες. Εν συνεχεία, περιγράφονται ορισμένες εξελιγμένες και κοινώς χρησιμοποιούμενες συσκευές (**Εικόνα 6**)⁷⁰:



Εικόνα 6: Συσκευές μηχανικής παραμόρφωσης. Α. στατική παραμόρφωση, Β. κυκλική παραμόρφωση, C. παραμόρφωση σε καλλιέργεια τριών διαστάσεων, D. διατμητική τάση, E. συσκευή επαφής, F. συσκευή συστρώσης (Liu M et al, 1999).

3.2.1 Μηχανική παραμόρφωση

Η διαστολή και συστολή του πνεύμονα κατά τη διάρκεια της αναπνοής προκαλεί παραμόρφωση των πνευμονοκυττάρων. Διάφορες συσκευές έχουν σχεδιαστεί με σκοπό την προσομοίωση αυτού του είδους μηχανικού ερεθίσματος σε κύτταρα του πνεύμονα.

➤ Στατική διάταση (static stretch)

Οι συσκευές στατικής παραμόρφωσης έχουν σχετικά απλό σχεδιασμό και το πλεονέκτημα ότι αλλαγές στην κυτταρική μορφολογία, το ενδοκυτταρικό Ca^{2+} και σε άλλα σήματα εξετάζονται άμεσα στο μικροσκόπιο. Εφαρμόζουν διαξονική καταπόνηση (ωθώντας το υπόστρωμα προς τα πάνω υπό θετική πίεση) είτε μονοαξονική (έλκοντας το υπόστρωμα οριζόντια), σε κύτταρα που καλλιεργούνται σε ελαστική μεμβράνη (Εικόνα 6)⁷¹.

➤ Κυκλική εφαρμογή διάτασης (cyclic stretch)

Μια εμπορικά διαθέσιμη συσκευή, η Flexcell, έχει χρησιμοποιηθεί για να προκαλέσει κυκλική παραμόρφωση σε κύτταρα, που προσομοιάζει με τη διάταση που υφίστανται τα κύτταρα του πνεύμονα κατά την αναπνοή. Η συσκευή αυτή διαθέτει μία αντλία κενού, η οποία ωθεί την ελαστική μεμβράνη προς τα κάτω (**Εικόνα 6**). Η μεμβράνη αυτή είναι επικαλυμμένη με διάφορα χημικά ή συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας. Έχουν σχεδιαστεί αρκετές συσκευές διαξονικής κυκλικής παραμόρφωσης που προκαλούν διάταση σε κύτταρα του πνεύμονα^{72,73,74}. Έχει βρεθεί ότι η παραμόρφωση των κυττάρων αντιστοιχεί περίπου στο 60% της παραμόρφωσης του υποστρώματος¹⁷. Ωστόσο, στην περίπτωση κυκλικής εφαρμογής ισοδιαξονικής διάτασης βρέθηκε ότι η παραμόρφωση τόσο των κυττάρων όσο και του υποστρώματος είχαν υψηλό βαθμό συσχέτισης⁷⁵.

➤ Καλλιέργεια τριών διαστάσεων

Έχει δειχθεί ότι η καλλιέργεια εμβρυϊκών κυττάρων σε τριδιάστατο περιβάλλον σε σφουγγάρια βελτιώνει τη διατήρηση της κυτταρικής μορφολογίας και φαινότυπου⁷⁶. Σε αυτές τις καλλιέργειες, ως υπόστρωμα για την προσκόλληση των κυττάρων, χρησιμοποιούνται δομές κολλαγόνου. Τα εμβρυϊκά πνευμονοκύτταρα συσσωματώνονται σχηματίζοντας «κυψελιδικές δομές» στα σφουγγάρια, τα οποία περιβάλλονται από μεσεγχυματικά κύτταρα (**Εικόνα 6**)^{77,78}.

3.2.2 Διατμητικές τάσεις (shear stress)

Διατμητική τάση ορίζεται ως η δύναμη τριβής ανά μονάδα εμβαδού επιφάνειας στην κατεύθυνση της ροής που ασκείται στη διεπιφάνεια υγρού-στερεού. Ένας δίαυλος ροής παράλληλης πλάκας είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη διάταξη για την εφαρμογή διατμητικών τάσεων σε κύτταρα που καλλιεργούνται ως μονοστιβάδα (**Εικόνα 6**)⁷⁹.

3.2.3 Συσκευές επαφής (“touching” devices)

Μία γυάλινη πιπέτα με διάμετρο ρύγχους περίπου 1 μm τοποθετείται κοντά στη μεμβράνη ενός μεμονωμένου κυττάρου με τη βοήθεια μικροεπεξεργαστή. Η πιπέτα πιέζεται προς τα κάτω από μία πιεζοηλεκτρική συσκευή ελεγχόμενη από υπολογιστή και παραμορφώνει παροδικά την κυτταρική μεμβράνη (**Εικόνα 6**).

3.2.4 Συσκευές συστροφής (“twisting” devices)

Οι διατάξεις αυτές επιτρέπουν στα κύτταρα να δεσμεύουν σφαιρικά σιδηρομαγνητικά μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με ειδικούς προσδέτες υποδοχέων. Μαγνητίζοντας αυτά τα σφαιρίδια σε μία κατεύθυνση κι έπειτα εφαρμόζοντας ένα δεύτερο, ασθενέστερο μαγνητικό πεδίο προσανατολισμένο στις 90°, μπορεί κανείς να στρέψει τα σφαιρίδια κι ως εκ τούτου να εφαρμόσει μία ελεγχόμενη διατμητική τάση στους δεσμευμένους κυτταρικούς επιφανειακούς υποδοχείς (Εικόνα 6)⁸⁰.

3.3 Ενδοκυττάρια μεταγωγή μηχανικού σήματος

Η διάταξη καθώς και άλλα είδη μηχανικών ερεθισμάτων ρυθμίζουν τις αποκρίσεις των κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης και αλληλεπίδρασης διαφόρων ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών γεγονότων, τα οποία περιλαμβάνουν⁵⁸:

1. Παραγωγή δευτέρων αγγελιοφόρων
2. Ενεργοποίηση ειδικών πρωτεϊνικών κινασών
3. Φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση σηματοδοτικών μορίων
4. Ενίσχυση μέσω ενζυμικών καταρρακτών, και
5. Τροποποίηση γονιδιακής έκφρασης

Ανάμεσα σε πολλούς προτεινόμενους μηχανισμούς, η *ενεργοποίηση διαύλων ιόντων* και η συμμετοχή μιας πορείας *εξωκυττάριας μήτρας-ιντεγκρίνης-κυτταροσκελετού* είναι αυτοί που κυριαρχούν^{81,82}.

3.3.1 Μηχανοϋποδοχείς

➤ Δίαυλοι ιόντων

Σε κύτταρα του πνεύμονα έχουν βρεθεί ενεργοποιημένοι διάυλοι ιόντων μετά από εφαρμογή μηχανικής παραμόρφωσης. Το Ca^{2+} είναι από τα πιο κοινά μόρια που διαμεσολαβούν στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση μετά τη μηχανική καταπόνηση (Εικόνα 7). Μία στατική παραμόρφωση της τάξης του 20% σε πνευμονικά αρτηριακά λεία μυϊκά κύτταρα αρουραίου αύξησε τόσο την εισροή όσο και την εκροή Ca^{2+} ⁷¹. Παρομοίως, η κυκλική παραμόρφωση ενεργοποιεί τον διάυλο ιόντων Na^+/K^+ σε κυτταρική σειρά κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων τύπου II ποντικού⁸³.

➤ **Πορεία εξωκυττάριας μήτρας-ιντεγκρίνης-κυτταροσκελετού**

Τα κύτταρα προσκολλώνται στην εξωκυττάρια μήτρα μέσω ιντεγκρινών που είναι συνδεδεμένες στον κυτταροσκελετό (**Εικόνα 7**). Αυτό το σύμπλοκο μεταδίδει το σήμα από την εξωκυττάρια μήτρα στα κύτταρα⁸⁴. Η μηχανική παραμόρφωση προκαλεί αλλαγές στην κυτταροσκελετική δυσκαμψία και μπορεί να μεταβάλλει τη λειτουργία των δομικών μορίων που απαρτίζουν τον κυτταροσκελετό και τον πυρήνα, συμπεριλαμβανομένων μερικών κρίσιμων ρυθμιστικών πρωτεϊνών⁸². Αυτή η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα των μεταδιδόμενων σημάτων από την εξωκυττάρια μήτρα στο εσωτερικό του κυττάρου⁸⁵.

3.3.2 Πρωτεϊνικές κινάσες

Η μηχανική διέγερση προκαλεί την ενεργοποίηση πολλών δευτέρων αγγελιοφόρων για την μετάδοση των σημάτων μέσα στο κύτταρο⁸⁶. Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα, τα οποία ρυθμίζονται μέσω των δευτέρων αγγελιοφόρων, φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες και παίζουν ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση⁸⁷.

➤ **Πρωτεϊνοκινάση A (PKA)**

Η PKA ονομάζεται και πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από cAMP, επειδή χρησιμοποιεί τη cAMP ως δεύτερο αγγελιοφόρο. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη συγκέντρωση cAMP και αυξημένη δραστηριότητα PKA μετά από μερική πνευμονεκτομή ή μηχανικό αερισμό σε ιστούς του πνεύμονα⁸⁸. Η δραστηριότητα της cAMP εξαρτάται από το είδος και το πλάτος της μηχανικής παραμόρφωσης. Μηχανική καταπόνηση 24 h με τη συσκευή Flexcell σε εμβρυϊκά επιθηλιακά κύτταρα κουνελιού επέφερε αύξηση στα επίπεδα της cAMP⁸⁹. Παρόμοιο αποτέλεσμα είχε και η εφαρμογή διακοπτόμενης μηχανικής πίεσης μεγέθους 18% σε εμβρυϊκά πνευμονικά κύτταρα αρουραίου⁹⁰. Ωστόσο, με εφαρμογή πίεσης μεγέθους 5%, δεν επηρεάστηκαν ούτε τα επίπεδα της cAMP ούτε η δραστηριότητα της PKA⁹¹.

➤ Ασβεστιο-εξαρτώμενη πρωτεϊνοκινάση (PKC)

Η PKC είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών με μεγάλο αριθμό ισοενζύμων. Η δραστηριότητα πολλών ισοενζύμων της PKC ρυθμίζεται από τις ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις του ελεύθερου Ca^{2+} και της διακυλογλυκερόλης (DAG) (Εικόνα 7)⁹². Η ενδοκυττάρια αποθήκη του Ca^{2+} μπορεί να ενεργοποιηθεί από την 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη [$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$] ή από την είσοδο του Ca^{2+} μέσω διαύλων ιόντων⁹³. Η $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ και η DAG προέρχονται από την υδρόλυση της 4,5-διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης από φωσφολιπάσες (PLs)^{92,93}.

Μετά από σύντομη εφαρμογή μηχανικής πίεσης σε εμβρυϊκά πνευμονικά κύτταρα, αυξήθηκαν δραματικά οι ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις της $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ και της DAG, πιθανώς εξαιτίας της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C- γ 1 (PLC- γ 1) από αυξημένη φωσφορυλίωση της τυροσίνης. Η PKC ενεργοποιήθηκε ταχέως, μετατοπίστηκε από το κυτοσόλιο στη μεμβράνη και παρέμεινε ενεργοποιημένη καθ'όλη τη διάρκεια των 48 h διακοπτόμενης μηχανικής παραμόρφωσης. Η μηχανική παραμόρφωση ενεργοποίησε, επίσης, τη φωσφολιπάση D (PLD), η οποία μπορεί να συνεισφέρει στην παρατεταμένη ενεργοποίηση της PKC⁹¹.

➤ Πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης (PTK)

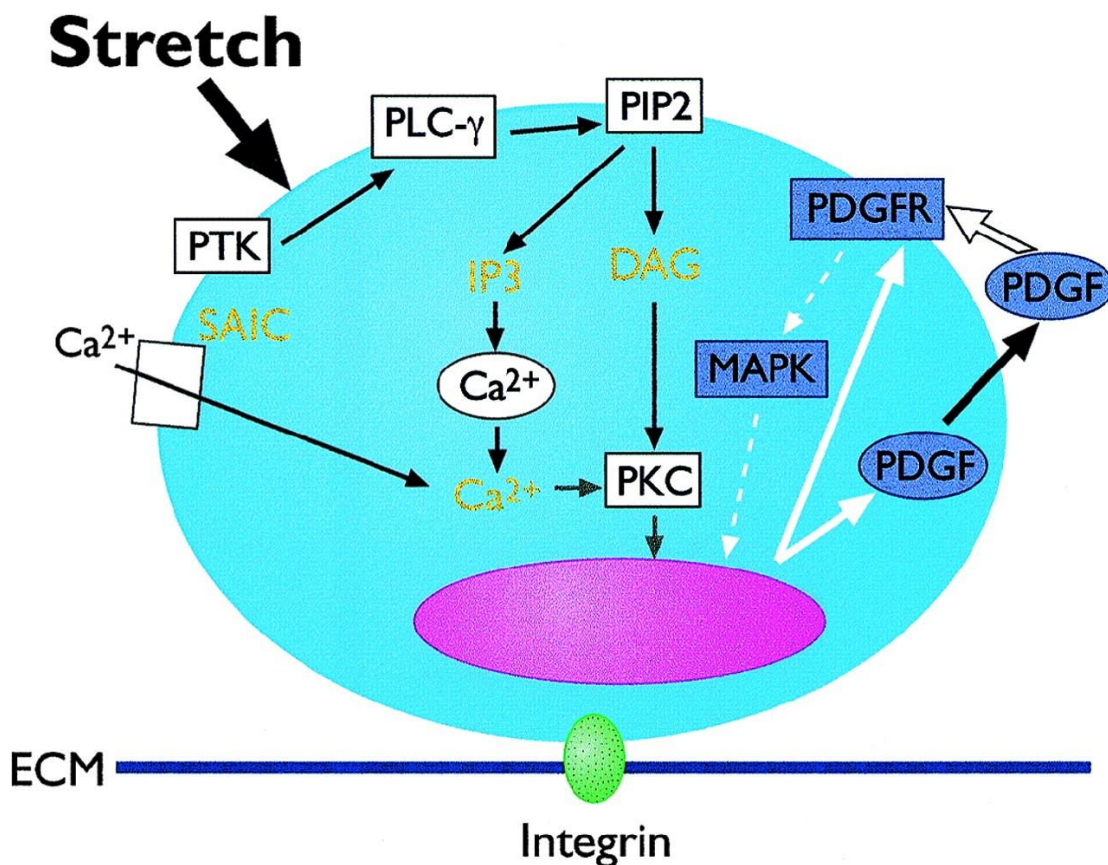
Τα κυτταρικά επίπεδα φωσφορυλίωσης της τυροσίνης ρυθμίζονται από τις δραστηριότητες των PTKs και των πρωτεϊνικών φωσφατασών τυροσίνης (Εικόνα 7). Πολλά μέλη των κυτταροπλασματικών PTKs ανήκουν στην επονομαζόμενη Src οικογένεια. Κάποια pp60^{src} (Src) υποστρώματα είναι είτε κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό. Αυτές οι πρωτεΐνες περιλαμβάνουν την $\text{pp125}^{\text{FAK}}$, μία PTK εστιακής προσκόλλησης⁹⁴, την p120, μία τυροσινο-φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη⁹⁵, μία πρωτεΐνη 110 kDa που σχετίζεται με ινίδιο ακτίνης (AFAP-110)⁹⁶, η κορτακτίνη, μία πρωτεΐνη 80/85 kDa συνδεδεμένη σε ινίδιο ακτίνης που βρίσκεται εμπλουτισμένη στο περίβλημα του κυττάρου⁹⁷ και η παξιλλίνη, μία πρωτεΐνη εστιακής προσκόλλησης που σχετίζεται με τη βινκουλίνη⁹⁸.

Βρέθηκε ότι η ολική δραστηριότητα της PTK σε κυτταρολύματα αυξήθηκε μέσα σε 15 min μηχανικής πίεσης⁹⁹. Το σύστημα PTK-PLC- γ -PKC είναι η κύρια πορεία που οδηγεί σε κυτταρική ανάπτυξη των εμβρυϊκών πνευμονοκυττάρων μετά από εφαρμογή μηχανικού σήματος.

➤ Πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα (MAPK)

Πολλές μιτογονικές δραστηριότητες που διεγείρονται από αυξητικούς παράγοντες και άλλα μιτογόνα διαμεσολαβούνται μέσω MAP κινασών (**Εικόνα 7**) ή μέσω των αποκαλούμενων εξωκυττάρων ρυθμιζόμενων κινασών (ERKs).

Η μηχανική παραμόρφωση ενεργοποίησε ταχέως τις ERKs σε μία ανθρώπινη πνευμονική επιθηλιακή κυτταρική σειρά (H441)¹⁰⁰. Είναι πιθανό ότι η ενεργοποίηση της MAP κινάσης μετά από μηχανική παραμόρφωση διαμεσολαβείται εμμέσως μέσω της αύξησης της παραγωγής του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF-BB). Παράλληλα με την πορεία ERK, έχουν οριστεί άλλες δύο πορείες που σχετίζονται με το κυτταρικό στρες: οι πορείες p38 MAP κινάσης και JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase).



Εικόνα 7: Μεταγωγή μηχανικού σήματος μετά από μηχανική παραμόρφωση. Το σήμα αυτό προκαλεί την εισροή Ca^{2+} και την ενεργοποίηση της PTK. Ενεργοποίηση της PLC-γ μέσω φωσφορύλιωσης υδrolύει την PIP2 για παραγωγή IP3 και DAG, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την PKC. Παράλληλα, επάγεται η γονιδιακή έκφραση και

πρωτεϊνική σύνθεση των PDGF και PDGFR, οι οποίοι διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω MAPK (Liu M et al, 1999).

3.3.3 Μεταγραφικές και μετα-μεταφραστικές ρυθμίσεις

Στο κύτταρο, πολλές μεταβολικές πορείες μετάγουν σήματα από την πλασματική μεμβράνη στον πυρήνα μεταβάλλοντας την έκφραση των γονιδίων-στόχων. Φυσικές τάσεις επιδρούν στα κύτταρα επηρεάζοντας την έκφραση των αποκαλούμενων γονιδίων άμεσης απόκρισης (όπως c-fos, c-jun, c-myc, JE και Egr-1), τα οποία κωδικεύουν πρωτεΐνες που σχετίζονται με μεταγραφικούς παράγοντες και μεταγωγή σήματος¹⁰¹. Στον πνεύμονα έχειδειχτεί ότι ο NF-κΒ ενεργοποιείται ως απόκριση στη μηχανική παραμόρφωση. Ο NF-κΒ είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας-κλειδί για τη μέγιστη έκφραση πολλών κυτοκινών που εμπλέκονται στην παθογένεια φλεγμονωδών νοσών¹⁰². Επίσης, οι φυσικές δυνάμεις επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων που κωδικεύουν εκκρινόμενες πρωτεΐνες όπως αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες και μόρια της εξωκυττάριας μήτρας, καθώς επίσης και γονίδια που κωδικεύουν δομικές πρωτεΐνες του κυττάρου. Τέλος, η κυτταρική σηματοδότηση μετά από εφαρμογή μηχανικής παραμόρφωσης μπορεί να επηρεάσει τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση και την ενδοκυττάρια διακίνηση των πρωτεϊνών.

3.4 Βιολογικές επιδράσεις των μηχανικών σημάτων στα κύτταρα του πνεύμονα

➤ Πολλαπλασιασμός των κυττάρων

Ο πολλαπλασιασμός των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του πνευμονικού επιθηλίου, κυρίως κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επιδιόρθωσης μετά από βλάβη. Όταν καλλιεργηθούν πνευμονοκύτταρα τύπου II σε ελαστική μεμβράνη η οποία διατείνεται, τότε παρατηρείται αποκόλληση των κυττάρων, όσο μικρή κι αν είναι η διάταση¹⁰³. Έχει χρησιμοποιηθεί η κυτταρική σειρά H441, η οποία προέρχεται από ανθρώπινο πνευμονικό επιθήλιο, προκειμένου να μελετηθεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μετά από μηχανική παραμόρφωση¹⁰⁰. Επιθηλιακά πνευμονοκύτταρα τύπου II, τα οποία εκτέθηκαν σε μέσο στο οποίο είχαν αναπτυχθεί ινοβλάστες και υπέστησαν κυκλική μηχανική διάταση με τη συσκευή Flexcell, έδειξαν αυξημένη σύνθεση DNA¹⁰⁴. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, ως αποτέλεσμα της μηχανικής διέγερσης

παρατηρείται τόσο σε εμβρυϊκά κύτταρα του πνεύμονα^{77,105} όσο και σε κύτταρα των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών¹⁰⁶.

➤ **Διαφοροποίηση των πνευμονοκυττάρων τύπου II σε τύπου I**

Τα μηχανικά σήματα ρυθμίζουν τόσο τη μετάβαση όσο και την διατήρηση των φαινοτύπων των κυττάρων τύπου II και τύπου I στο κυψελιδικό επιθήλιο. Έχει βρεθεί ότι η παρατεταμένη διαστολή πνεύμονα ζώου που είχε διασωληνωθεί είχε ως αποτέλεσμα μία μείωση του αριθμού των κυττάρων τύπου II που οφείλεται σε φαινόμενα διαφοροποίησης των κυττάρων τύπου II σε τύπου I⁵⁸. Επίσης, σε *in vitro* συνθήκες έχει αποδειχθεί ότι σε πρωτογενείς καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων τύπου II αρουραίου, η εφαρμογή μηχανικής παραμόρφωσης για 18 h επέφερε μία σημαντική αύξηση στον αριθμό των κυττάρων τύπου I και μία αντίστοιχη μείωση του αριθμού των κυττάρων τύπου II¹⁰⁷.

➤ **Μεταβολισμός του επιφανειοδραστικού παράγοντα**

Η σύνθεση και η έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων είναι βασικές λειτουργίες των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων τύπου II. Η διαστολή και η συστολή του πνεύμονα κατά τη διάρκεια της αναπνοής διατείνουν το κυψελιδικό επιθήλιο. Η στατική διάταση διάρκειας 30 min βρέθηκε ότι προκάλεσε μία ταχεία αύξηση στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση του Ca^{2+} και ακολούθως μία αύξηση στην έκκριση φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα⁵². Η εφαρμογή κυκλικής μηχανικής διάτασης σε πρωτογενείς καλλιέργειες εμβρυϊκών κυττάρων κουνελιού αύξησε τη σύνθεση και την έκκριση των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα⁸⁹. Διακοπτόμενη μηχανική διάταση σε καλλιέργεια εμβρυϊκών πνευμονοκυττάρων αρουραίου προκάλεσε μία επιλεκτική αύξηση στα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης SP-C του επιφανειοδραστικού παράγοντα, αλλά όχι της SP-A¹⁰⁸.

➤ **Μεταβολισμός συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας**

Η μηχανική παραμόρφωση ρυθμίζει ποικιλοτρόπως τη γονιδιακή έκφραση των βασικών συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας σε εμβρυϊκά κύτταρα του πνεύμονα. Μία διακοπτόμενη μηχανική διάταση προκαλεί αύξηση στα επίπεδα mRNA του κολλαγόνου τύπου IV και της τροποελαστίνης, αλλά αναστέλλει τα επίπεδα mRNA του $\alpha_1(\text{I})$ -προκολλαγόνου, της διγλυκάνης και της φιμπρονεκτίνης^{107,109}. Η γονιδιακή

έκφραση και η δραστικότητα των μεταλλοπρωτεϊνών και του αναστολέα τους δεν επηρεάστηκαν από τη μηχανική διέγερση¹⁰⁸. Η έκκριση γλυκοζαμινογλυκανών και πρωτεογλυκανών αυξήθηκε από την εφαρμογή μηχανικής καταπόνησης και όσον αφορά τις ιδιοστατικές, όσο και τις επαγόμενες πορείες έκκρισης¹¹⁰. Η αύξηση στην παραγωγή των γλυκοζαμινογλυκανών συσχετίστηκε με μία αυξημένη δραστικότητα αντιθρομβίνης εξαιτίας μίας αύξησης στη συγκέντρωση της ενεργούς θεικής χονδροϊτίνης.

➤ **Διαπερατότητα κυττάρων του πνεύμονα**

Η διαπερατότητα των πνευμονικών ενδοθηλιακών κυττάρων είναι διαδικασία αυστηρά ελεγχόμενη. Για να μελετηθεί η επίδραση διατμητικών τάσεων σε αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα πνεύμονα βοός, έγινε καλλιέργεια σε περατά μικροσφαιρίδια, τα οποία τοποθετήθηκαν σε στήλες. Το μέγεθος της διατμητικής τάσης ρυθμιζόταν από τη ροή του υγρού έκλουσης. Παρατηρήθηκε ότι η διαπερατότητα των κυττάρων αυξανόταν αυξανόμενης της ροής, αντιστρέφτα¹¹¹. Αντίστοιχη πειραματική διάταξη εφαρμόζεται και για τη μελέτη της επίδρασης διατμητικών τάσεων σε μεσοθηλιακά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν φραγμό μεταξύ του πνεύμονα και των γύρω υγρών και ιστών. Υπόκεινται λοιπόν σε σημαντική μηχανική καταπόνηση κατά την αναπνοή, οπότε διατείνονται και συρρικνώνονται κυκλικά. Κατά την κίνηση αυτή, ορισμένες περιοχές των σπλαχνικών πλευρών διολισθαίνουν έναντι των πλευρικών, που βρίσκονται στο στέρνο. Οι τάσεις λοιπόν που ασκούνται είναι διατμητικές, τα δε μεσοθηλιακά κύτταρα αποκρίνονται σε αυτές.

➤ **Παραγωγή φλεγμονωδών διαβιβαστών και κυτταρική βλάβη**

Ο μηχανικός αερισμός μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF)-α, ιντερλευκινών (ILs) όπως οι IL-1β, IL-6 και IL-10, της φλεγμονώδους πρωτεΐνης των μακροφάγων (MIP-2), και της ιντερφερόνης-γ¹¹². Η μηχανική καταπόνηση με τη συσκευή Flexcell αύξησε την έκκριση της IL-8 στα κύτταρα A549, μία ανθρώπινη κυψελιδική επιθηλιακή κυτταρική σειρά¹¹³.

Εκτός από φλεγμονώδη πεπτίδια, η μηχανική καταπόνηση οδηγεί και στην παραγωγή εικοσανοειδών σε επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών, τα οποία πυροδοτούν φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Κυκλική μηχανική καταπόνηση των κυττάρων

αυτών σε συσκευή Flexcell προκάλεσε μείωση στη σύνθεση προσταγλανδινών (PGs) συμπερολαμβανομένων των PGE₂ και PGI₂¹¹⁴. Η μείωση αυτή φαίνεται να οφείλεται σε απενεργοποίηση της κυκλοοξυγονάσης. Αντίθετα, σε κύτταρα του πνευμονικού ενδοθηλίου, διατμητικές τάσεις οδήγησαν σε αύξηση της προστακυκλίνης¹¹⁵, ενώ σε εμβρυϊκά πνευμονοκύτταρα αρουραίου, αύξηση διατμητικής τάσης οδήγησε σε έκκριση προστακυκλίνης⁹⁰.

➤ Απόπτωση

Η απόπτωση είναι μια φυσιολογική διαδικασία του κυττάρου που οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Αυτή η μορφή κυτταρικού θανάτου είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των ιστών και διακρίνεται από τη νέκρωση, η οποία δεν είναι γενετικά ελεγχόμενη και συνήθως προκύπτει από σωματική βλάβη.

Η κυκλική εφαρμογή μηχανικής τάσης έχει βρεθεί ότι επάγει αλλαγές που συμφωνούν με την έναρξη της απόπτωσης σε απομονωμένα επιθηλιακά κύτταρα τύπου II. Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν τη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, η οποία μετράται ως αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης^{73,116}, καθώς επίσης και αύξηση της συμπύκνωσης του πυρήνα και κατακερματισμό του DNA^{117,118}. Υπάρχουν, επίσης, ενδείξεις ότι η μηχανική τάση οδηγεί στην ενεργοποίηση κασπασών και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c σε επιθηλιακά κύτταρα τύπου II, τα οποία θεωρούνται κύρια χαρακτηριστικά της απόπτωσης. Επιπλέον, η εφαρμογή μηχανικής διέγερσης σε επιθηλιακά κύτταρα τύπου II έχει δείξει ότι: (1) οδηγεί στην έκκριση φλεγμονωδών κυτοκινών, παραγόντων που πυροδοτούν την απόπτωση σε κύτταρα και (2) ενεργοποιεί σηματοδοτικές πορείες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης σε άλλα κυτταρικά συστήματα. Οι φλεγμονώδεις παράγοντες περιλαμβάνουν τη φλεγμονώδη πρωτεΐνη των μακροφάγων (MIP-2)¹¹⁹, την ιντερλευκίνη-8¹²⁰ και την προστακυκλίνη¹²¹. Εκτός από αυτά, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου¹²², ο μονοκυτταρικός χημειοελκτικός παράγοντας¹²³, η ιντερλευκίνη-1¹²², η ιντερλευκίνη-6¹²², η χημειοκίνη RANTES¹²⁴ και οι παράγοντες διέγερσης αποικιών (colony-stimulating factors)¹²⁵ εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα τύπου II.

4. Μεταβολισμός της φωσφατιδυλοχολίνης (PC)

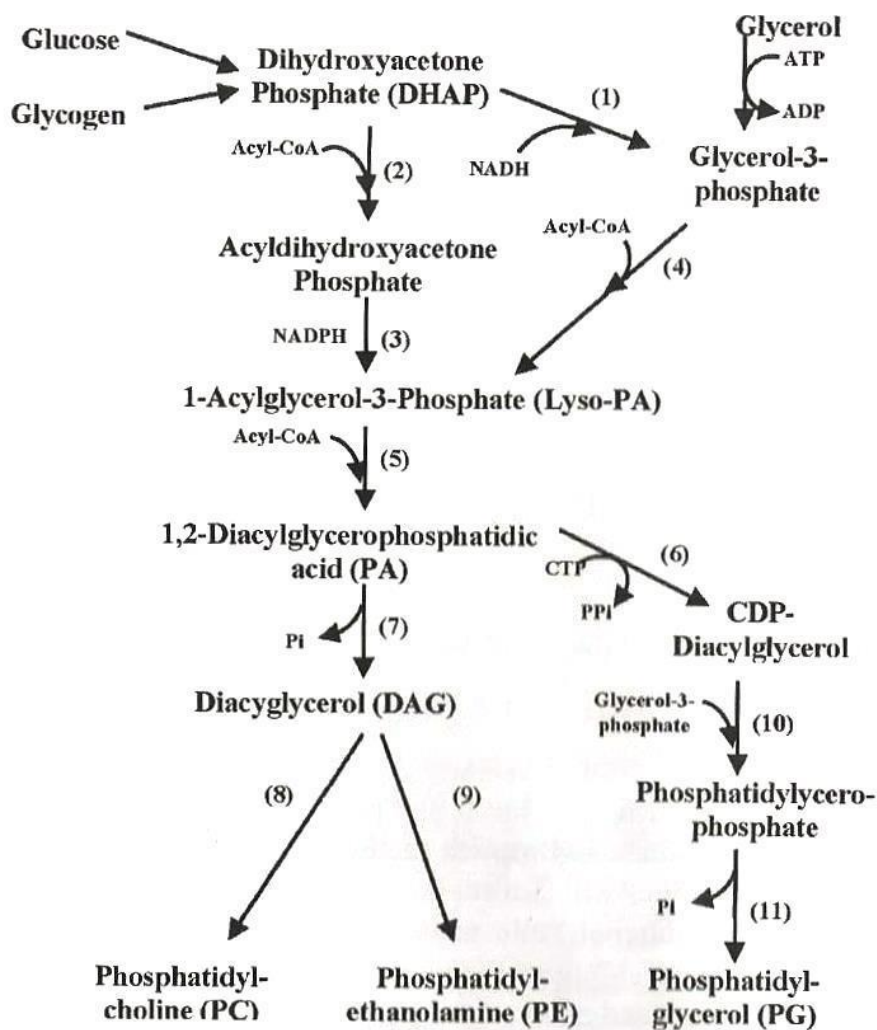
4.1 Γενικά

Οι φωσφολιπιδικές διπλοστιβάδες διατηρούν τη δομή και τη λειτουργικότητα όλων των μονοκύτταρων και πολυκύτταρων μεμβρανικών συστημάτων. Η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) είναι το μεγαλύτερο σε ποσοστό φωσφολιπίδιο των ευκαρυωτικών μεμβρανών κι επίσης, βρίσκεται σε επιλεγμένους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Αποτελεί βασικό συστατικό των φωσφολιπιδικών μονοστιβάδων των λιποπρωτεϊνών του ορού, του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων και των λιπιδικών σταγονιδίων. Επίσης, είναι το κύριο φωσφολιπιδικό συστατικό των μικκυλίων της χολής. Η PC είναι πηγή δεύτερων αγγελιοφόρων όπως η διακυλογλυκερόλη (DAG), το φωσφατιδικό οξύ (PA) και το αραχιδονικό οξύ (AA)¹²⁶ και πρόδρομο μόριο άλλων μεμβρανικών φωσφολιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων της σφιγγομυελίνης, της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE) και της φωσφατιδυλοσερίνης (PS)¹²⁷. Η PC μπορεί να χρησιμεύσει ως δότης λιπαρού οξέος για τη μετατροπή της διακυλογλυκερόλης σε τριακυλογλυκερόλη^{128,129}. Τέλος, χρησιμεύει ως πηγή γλυκεροφωσφοχολίνης, η οποία έχει ζωτικής σημασίας λειτουργία στα νεφρά και τα νευρικά κύτταρα. Το 1949, οι Friedkin και Lehninger έδειξαν ότι η σύνθεση των λιπιδίων είναι μία διαδικασία ενεργειακά εξαρτώμενη και διαμεσολαβούμενη από ένζυμα, παρά μια τυχαία χημικο-συνθετική διαδικασία¹³⁰. Η Eugene P. Kennedy δημοσίευσε την πρώτη ανασκόπηση για το μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων το 1957, στην οποία αναλύεται η ενζυμική σύνθεση της PC διαμεσολαβούμενη από ένα ενδιάμεσο νουκλεοζίτη¹³¹. Αυτό το ενδιάμεσο είναι μία κυτιδίνη διφωσφοχολίνης (CDP-Cho) και τη βιοχημική πορεία που οδηγεί στη σύνθεση της PC είναι γνωστό ως πορεία της CDP-Cho ή πορεία Kennedy. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσυνθετική πορεία Kennedy βρίσκονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Η PC του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων βιοσυντίθεται αποκλειστικά μέσω της πορείας Kennedy και όχι μέσω μεθυλίωσης της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE) όπως συμβαίνει σε άλλους ιστούς και κυρίως στο ήπαρ. Η αρχική αντίδραση του *de novo* σχηματισμού της PC είναι η αποφωσφορυλίωση του φωσφατιδικού οξέος (PA), μία αντίδραση η οποία καταλύεται από φωσφατιδική φωσφατάση, σχηματίζοντας διακυλογλυκερόλη. Ο πνευμονικός ιστός περιέχει κυτοσολικές ή μεμβρανικές μορφές αυτού του ενζύμου. Έπειτα, μία

CDP-χολίνη: χολινοφωσφοτρανσφεράση (CPT) μεταφέρει τη φωσφοχολίνη στη διακυλογλυκερόλη (**Εικόνα 8**)¹⁸.

Ο σκελετός της γλυκερόλης των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε κύτταρα τύπου II ενηλίκων προέρχεται κυρίως από τη γλυκόζη από την κυκλοφορία, ενώ η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα μόνο κατά την πρώιμη περιγεννητική περίοδο. Αργότερα, η γλυκόζη προέρχεται από την υδρόλυση του γλυκογόνου, η οποία μειώνεται παράλληλα με τον σχηματισμό των πεταλοειδών σωματίων, πιθανώς μέσω της ενεργοποίησης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (**Εικόνα 8**)¹⁸.



Εικόνα 8: *De novo* σύνθεση της PC, PE, και PG. PPI: πυροφωσφορικό, Pi: ανόργανο φωσφορικό, (1): αφυδρογονάση της 3-φωσφορική γλυκερόλης, (2): ακυλοτρανσφεράση της φωσφορικής διυδροξυακετόνης, (3): αναγωγή της φωσφορικής ακυλο-διυδροξυακετόνης, (4),(5): ακυλοτρανσφεράση του 1-ακυλογλυκεροφωσφορικού, (6): φωσφατιδική κυτιδυλοτρανσφεράση, (7): φωσφατιδική φωσφατάση (8): CDP-χολίνη:

χολινοφωσφοτρανσφεράση (CPT), (9): αιθανολαμινοτρανσφεράση (EPT), (10): γλυκεροφωσφορική φωσφατιδυλοτρανσφεράση, (11): φωσφατιδυλογλυκερο φωσφατάση (Pantazi and Lekka, 2009).

4.2 Βιοσύνθεση της PC (πορεία Kennedy)

4.2.1 Μεταφορά της χολίνης

Η χολίνη αποτελεί απαραίτητο θρεπτικό συστατικό και παρέχεται κυρίως από τη διατροφή. Η μεταφορά της χολίνης μέσα και έξω από το κύτταρο είναι μία σημαντική διαδικασία η οποία ρυθμίζεται άμεσα και συνδέεται τόσο με την πορεία της CDP-Cho όσο και με τον μεταβολισμό της χολίνης. Τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II συσσωρεύουν χολίνη έναντι μιας βαθμίδωσης συγκέντρωσης με μια διαδικασία μεταφοράς εξαρτώμενη από ενέργεια¹⁸. Αν και ο βασικότερος ρόλος των μεταφορέων της χολίνης είναι η πρόσληψη της χολίνης από τον εξωκυττάριο χώρο, είναι, επίσης, σημαντικοί για την κατεύθυνση της χολίνης στα μιτοχόνδρια για αποδόμηση και παραγωγή βεταΐνης και για την έξοδο της χολίνης από τα κύτταρα στα θηλαστικά. Τρεις τύποι μεταφορέων διαμεσολαβούν στη μετακίνηση της χολίνης κατά μήκος των μεμβρανών στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς: οι μεταφορείς οργανικών κατιόντων, οι μεταφορείς χολίνης υψηλής συγγένειας και πρωτεΐνες τύπου μεταφορέων χολίνης (choline transporter-like proteins). Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη μετατροπή της χολίνης σε βεταΐνη εκφράζονται επιλεκτικά στο νεφρό και το ήπαρ¹³².

4.2.2 Κινάση της χολίνης (CK)

Οι CKs είναι κατανεμημένες σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται στο κυτοσόλιο και στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II βρέθηκε πενταπλάσια από ότι στο κυτοσόλιο ολόκληρων πνευμονοκυττάρων. Η κινάση της χολίνης καταλύει το πρώτο βήμα της πορείας Kennedy, κατά το οποίο η χολίνη φωσφορυλιώνεται σε φωσφοχολίνη και ADP με την κατανάλωση ενός μορίου ATP (**Εικόνα 9**). Η CK περιγράφηκε για πρώτη φορά σε ζυμομύκητα ως ένα κυτοσολικό ένζυμο ικανό να φωσφορυλιώνει τόσο τη χολίνη όσο και την αιθανολαμίνη¹³³ και αυτό ακολούθησε ο χαρακτηρισμός των ενζύμων από ιστούς αρουραίων με παρόμοια δραστηριότητα¹³⁴. Η CK βρίσκεται στα κύτταρα θηλαστικών ως τουλάχιστον τρεις ισομορφές που κωδικοούνται από δύο ξεχωριστά γονίδια (CKα και CKβ), οι οποίες

είναι ενεργές μόνο ως ομοδιμερή ή ως ετεροδιμερή¹³⁵. Οι CKs διαθέτουν δύο άκρως συντηρημένες περιοχές: πρώτον, το καρβοξυ-τελικό τμήμα τους περιέχει μία συντηρημένη περιοχή, γνωστή ως μοτίβο του Brenner, κοινό σε πολλά ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς φωσφορικής ομάδας, όπως πρωτεϊνικές κινάσες. Η δεύτερη συντηρημένη ομάδα αμινοξέων είναι το μοτίβο CK, που εμπλέκεται στην πρόσδεση του ATP και στη σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης της αντίδρασης¹³⁶.

Οι αλλαγές στη δραστηριότητα της CK μπορούν να επηρεάσουν το ρυθμό σύνθεσης της PC. Η υπερέκφραση της CK σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με την φωσφοχολίνη να δρα ως δεύτερος αγγελιοφόρος απαραίτητος για τη σύνθεση του DNA που επάγεται από αυξητικούς παράγοντες. Τα αυξημένα επίπεδα της CK και της φωσφοχολίνης παρατηρούνται σε αρκετούς όγκους θηλαστικών και πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό μετασχηματισμό¹³⁷.

Η φυσιολογική σημασία των CKs μελετήθηκε σε ποντίκια που είχαν υποστεί απαλοιφή γονιδίου. Η απαλοιφή του CKα προκάλεσε εμβρυϊκή θνησιμότητα, επισημαίνοντας το ρόλο του στην ανάπτυξη, ενώ η απώλεια της λειτουργίας της δραστηριότητας του CKβ, με μετάλλαξη του CKβ, οδήγησε σε μυϊκή δυστροφία και παραμόρφωση των οστών των νεογνών¹³⁸.

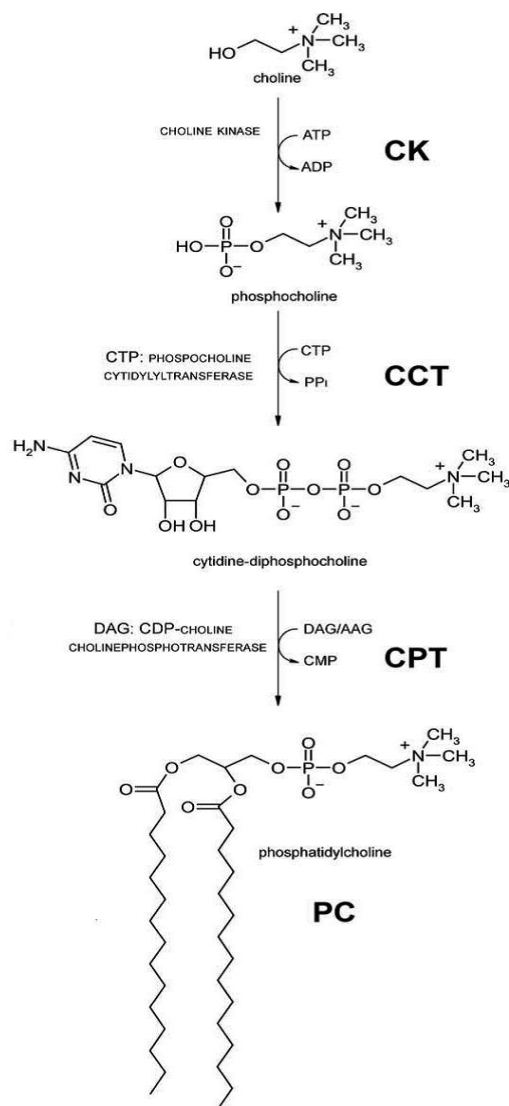
4.2.3 CTP: φωσφοχολινο κυτιδυλοτρανσφεράση (CCT)

Το δεύτερο βιοσυνθετικό βήμα της πορείας Kennedy καταλύεται από τη CCT, η οποία χρησιμοποιεί τη φωσφοχολίνη και CTP για να σχηματίσει CDP-χολίνη με παράλληλη απελευθέρωση πυροφωσφορικού (**Εικόνα 9**)¹³⁹. Η CCT είναι το βασικό ρυθμιστικό ένζυμο της πορείας της CDP-χολίνης, επειδή είναι το πιο αργό βήμα και ως εκ τούτου καθορίζει τη βιοσυνθετική ροή από τη χολίνη προς τη PC. Πολλές μελέτες αποκαλύπτουν ότι η CDP-χολίνη, προϊόν της δράσης του ενζύμου CCT, είναι παρούσα σε εξαιρετικά μικρές ποσότητες στα κύτταρα, παρά τα υψηλά επίπεδα φωσφοχολίνης, υποδεικνύοντας ότι η νεοσυντιθέμενη CDP-χολίνη είναι ενσωματωμένη στην PC¹²⁸. Η δομή και η λειτουργία της CCT περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα 4.3.

4.2.4 Χολινο φωσφοτρανσφεράση (CPT)

Η CPT καταλύει το τελικό βήμα της σύνθεσης της PC μέσω της πορείας Kennedy με τη μεταφορά της φωσφοχολίνης από τη CDP-χολίνη στη διακυλογλυκερόλη (DAG) (**Εικόνα 9**). Το 1958 οι Weiss, Smith και Kennedy δημοσίευσαν μια λεπτομερή μελέτη της βιοχημείας της CPT, όπου επιβεβαίωσαν ότι η CDP-χολίνη ήταν το ενεργειακά ενεργό υπόστρωμα για τη CPT και ότι η αντίδραση ήταν αντιστρεπτή¹⁴⁰.

Το ένζυμο CPT είναι ενσωματωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη. Η δραστηριότητα αυτής της πρωτεΐνης επηρεάζεται από τη σύνθεση της μεμβράνης ή του μικκυλίου στο οποίο είναι ενσωματωμένη¹⁴¹. Το υπόστρωμα DAG είναι λιπόφιλο, ενώ το υπόστρωμα της CDP-χολίνης είναι υδατοδιαλυτό και η αντίδραση λαμβάνει χώρα στην υδρόφοβη-υδρόφιλη διεπαφή των μεμβρανών, το οποίο έχει επιπτώσεις στην κινητική συμπεριφορά. Η κλασμάτωση των υποκυτταρικών οργανιδίων αποκάλυψε ότι το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι η περιοχή με την υψηλότερη δραστηριότητα CPT ανά χιλιοστόγραμμα πρωτεΐνης (ορίζεται ως 100%), ακολουθούμενη από τη συσκευή Golgi (37%), τα μιτοχόνδρια (14%), την πλασματική μεμβράνη (1%) και τον πυρήνα (<1%)^{142,143,144}. Η αναστολή της δραστηριότητας της CPT μειώνει τη σύνθεση φωσφολιπιδίων και οδηγεί στη συσσώρευση των υποστρωμάτων της CCT. Η μείωση της σύνθεσης της PC είναι ένα γεγονός που ακολουθεί τη μόλυνση θηλαστικών κυττάρων από ένα βακτηριακό παθογόνο, με αποτέλεσμα την απόπτωση¹⁴⁵.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της πορείας Kennedy (Gibellini F and Smith TK, 2010)

4.3 CTP: φωσφοχολινο κυτιδυλοτρανσφεράση (CCT) - Δομή και λειτουργία

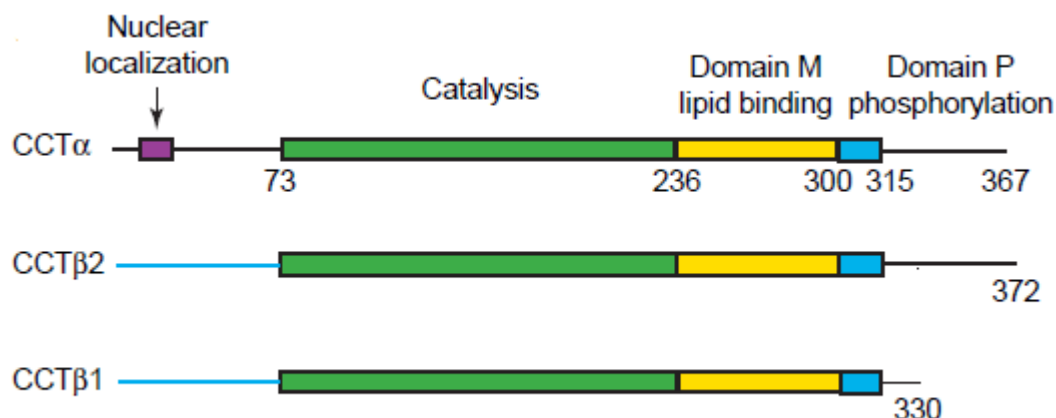
Η CCT καταλύει το ρυθμο-καθοριστικό βήμα της πορείας Kennedy για τη βιοσύνθεση της PC και μαζί με φωσφολιπάσες θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για την ομοιοστάση της PC. Η φύση έχει αναπτύξει περίτεχνους μηχανισμούς για τον έλεγχο της φωσφολιπιδικής σύστασης των μεμβρανών, η οποία επηρεάζει την εγγενή καμπυλότητά τους, την ελαστικότητα, το ιξώδες, το ηλεκτρικό δυναμικό της επιφάνειας και τη βιολογική λειτουργία. Η CCT παρέχει έναν από αυτούς τους μηχανισμούς ελέγχου λόγω της ικανότητάς της να «αισθάνεται» ή να «εξετάζει» την

περιεκτικότητα των μεμβρανών σε PC και να μετατρέπει αυτό το φυσικοχημικό σήμα σε μια αλλαγή στην ενζυμική δραστικότητα και στη σύνθεση της CDP-χολίνης που ρυθμίζουν την περιεκτικότητα σε PC¹⁴⁶.

Ο εμβρυϊκός πνεύμονας έχει ανάγκη από υψηλά επίπεδα CCT για να παρέχει μεγάλη ποσότητα PC του επιφανειοδραστικού παράγοντα απαραίτητη για την προστασία έναντι της αναπνευστικής δυσχέρειας. Στο τέλος της κύησης, η δραστικότητα της CCT αυξάνεται στα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II. Υπάρχει μία αντίστοιχη μείωση των ενδοκυτταρικών αποθηκών γλυκογόνου, καθώς ο πνεύμονας παράγει την απαραίτητη ποσότητα επιφανειοδραστικού παράγοντα για τη δημιουργία της αναπνοής. Τα υψηλά επίπεδα παραγωγής PC είναι μία συνεχής αναγκαιότητα μετά τον τοκετό και κατά τη διάρκεια της ζωής για να διατηρήσουν τα λειτουργικά επίπεδα του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων¹⁴⁷.

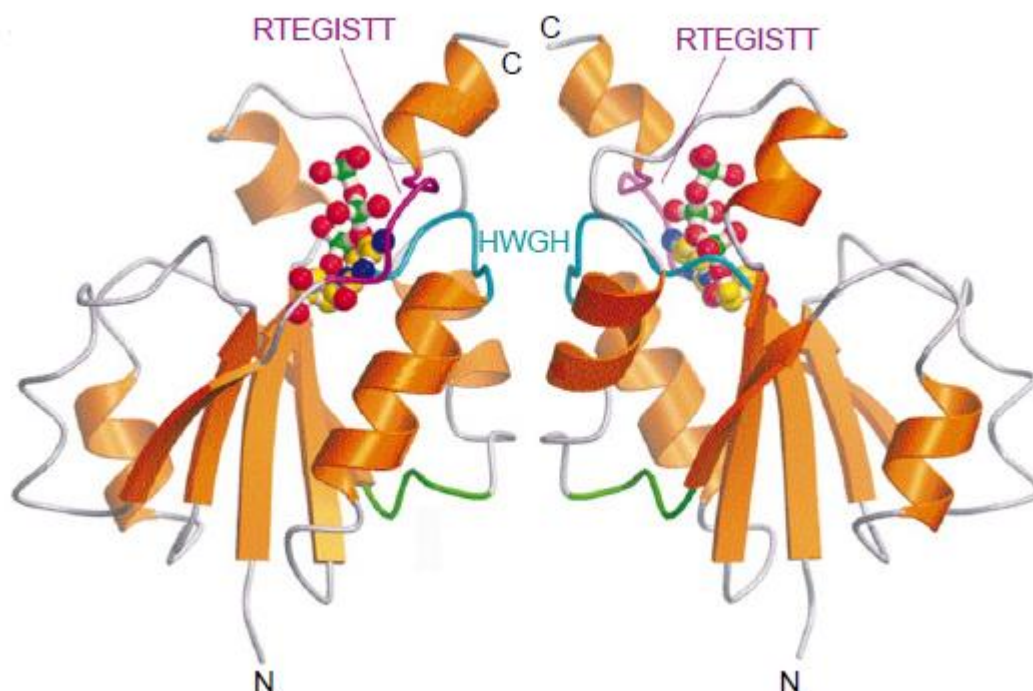
4.3.1 Δομή της CCT

Η δομή των περισσότερων ευκαρυωτικών CCTs αποτελείται από τέσσερις λειτουργικές περιοχές: μία N-τελική περιοχή πυρηνικού εντοπισμού, έναν καταλυτικό πυρήνα, μια περιοχή μακριάς αμφιπαθούς α-έλικας πρόσδεσης λιπιδίων και μία C-τελική περιοχή φωσφορυλίωσης¹³⁹. Τρεις ισομορφές του ανθρώπινου γονιδίου της CCT έχουν χαρακτηριστεί: οι CCTα, CCTβ1 και CCTβ2 (**Εικόνα 10**). Οι βήτα ισομορφές είναι αλληλόμορφα του ίδιου γονιδίου και διαφέρουν μόνο στο C-τελικό άκρο τους. Ένα ξεχωριστό γονίδιο κωδικεύει τη CCTα. Έχει βρεθεί ότι η CCTα είναι τόσο πηρινηκή όσο και κυτταροπλασματική πρωτεΐνη. Ωστόσο, σε κύτταρα του πνεύμονα η CCTα εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα. Μέσα στο κυτταρόπλασμα η CCTα βρέθηκε ελεύθερη ή δεσμευμένη στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τον πυρηνικό φάκελο, με έναν μικρό πληθυσμό μορίων συνδεδεμένο στην πλασματική μεμβράνη. Οι CCTβ ισομορφές εντοπίζονται μόνο στο κυτταρόπλασμα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο¹⁴⁸. Οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα στην καταλυτική περιοχή και την περιοχή πρόσδεσης στη μεμβράνη και όλες ρυθμίζονται από λιπίδια¹⁴⁹. Οι CCTα και CCTβ εκφράζονται εξίσου στον εγκέφαλο, ενώ σε άλλους ιστούς η CCTβ εκφράζεται φυσιολογικά 10 φορές λιγότερο¹³⁹. Στον πνεύμονα, η CCTα είναι η βασική ισομορφή, ζωτικής σημασίας για τον κατάλληλο σχηματισμό των πεταλοειδών σωματίων¹⁸.



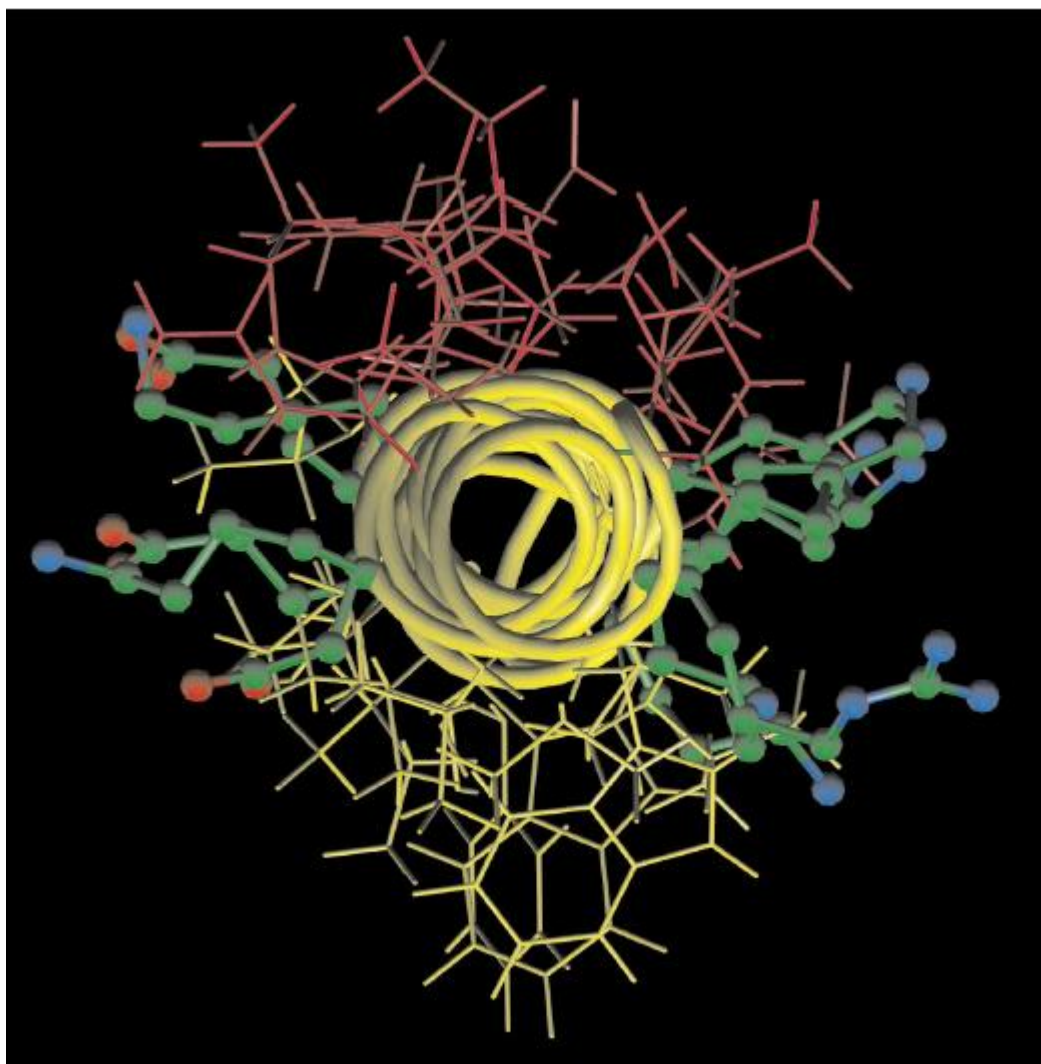
Εικόνα 10: Δομή των CCTα, CCTβ1 και CCTβ2. Και στις τρεις ισομορφές υπάρχει ομολογία μεταξύ των αμινοξέων 73 και 323. Οι β ισομορφές διαφέρουν στο C-τελικό άκρο μετά το αμινοξύ 323 (Cornell RB and Northwood IC, 2000).

Η καταλυτική περιοχή είναι συντηρημένη στην οικογένεια των κυτιδυλοτρανσφερασών (CT), η οποία εκτός από τη CCT, περιλαμβάνει, επίσης, τις φωσφοαιθανολάμινο CT και φωσφογλυκερολ CT (ECT και GCT, αντίστοιχα)¹⁵⁰. Η δέσμευση του CTP και η σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης στην CCT διαμεσολαβούνται κυρίως από κατάλοιπα σε δύο άκρως συντηρημένες περιοχές που αναφέρονται ως μοτίβα HXGH και RTEGISTS αντίστοιχα. Έχει αποδειχθεί ότι η CCT υφίσταται ως ένα επίμηκες διμερές με μοριακό βάρος υπομονάδας περίπου 45kDa (Εικόνα 11)¹⁵¹.



Εικόνα 11: Δομή της διμερούς GCT με επισημασμένα τα συντηρημένα μοτίβα HWGH και RTEGISTT (Cornell RB and Northwood IC, 2000).

Αναλύσεις πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) δύο διαστάσεων έδειξαν την ύπαρξη μίας αμφιπαθούς α-έλικας περίπου 52 καταλοίπων με μία N-τελική κλίση στην περιοχή πρόσδεσης στη μεμβράνη (περιοχή M) (Εικόνα 12)¹⁵². Η πολική πλευρά αποτελείται κυρίως από όξινα κατάλοιπα και οι ζώνες τις διεπιφάνειας είναι κυρίως βασικές, ιδιαίτερα κοντά στο N-τελικό άκρο. Η μη πολική πλευρά περιέχει 18 υδρόφοβα κατάλοιπα, τα οποία παρέχουν επαρκή κινητήρια δύναμη για την πρόσδεση στη μεμβράνη. Στη διαλυτή της διαμόρφωση, αυτά τα κατάλοιπα ίσως είναι κρυμμένα, ελαχιστοποιώντας έτσι την υδρόφοβη κινητήρια δύναμη και ως εκ τούτου και τη συγγένεια της μεμβράνης.



Εικόνα 12: Δομή της αμφιπαθούς α-έλικας (αμινοξέα 243-287). Οι πλευρικές αλυσίδες της πολικής επιφάνειας απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα και εκείνες της μη πολικής επιφάνειας με κίτρινο. Τα άτομα άνθρακα των αλυσίδων της διεπιφάνειας απεικονίζονται με πράσινο, του αζώτου με μπλε και του οξυγόνου με κόκκινο χρώμα (Cornell RB and Northwood IC, 2000).

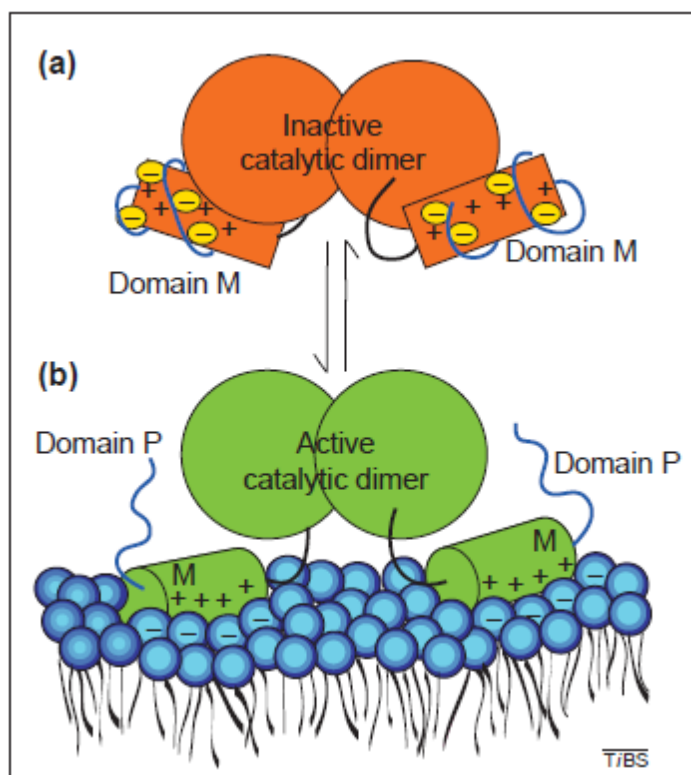
Η περιοχή φωσφορυλίωσης της CCTa έχει χαρτογραφηθεί στη C-τελική περιοχή μεγέθους περίπου 50 καταλοίπων (περιοχή P). Στη CCTa βακιλοϊού, και οι 16 σερίνες μεταξύ των καταλοίπων 315 και 367 είναι >50% φωσφορυλιωμένες¹⁵³. Αυτή η πλούσια σε προλίνη περιοχή είναι η πιο ευαίσθητη σε πρωτεάσες περιοχή της πρωτεΐνης, υποδηλώνοντας μία ευέλικτη δομή και τον εντοπισμό της στην επιφάνεια^{154,155}. Η CCTa έχει επτά θέσεις για μια προλινο-κατευθυνόμενη κινάση, πέντε πιθανές θέσεις για κινάση συνθάσης γλυκογόνου 3 και μία θέση για την κινάση καζεΐνης II. Ωστόσο, έχει αποδειχτεί ότι το ένζυμο είναι ένα φτωχό υπόστρωμα για

φωσφορυλίωση in vitro από αυτές τις κινάσες^{156,157}. Η CCTα μπορεί να αποφωσφορυλιωθεί in vitro από την πρωτεϊνική φωσφατάση 1.

4.3.2 Μηχανισμοί ρύθμισης της CCT

Πρόσδεση σε μεμβράνες

Αυξήσεις του ρυθμού σύνθεσης της CCT συχνά συνδέονται με μία μετατόπιση του ενζύμου από το διαλυτό στο σωματιδιακό κλάσμα. Αυτά τα ένζυμα, όπως η CCT, ονομάζονται αμφίτροπα επειδή αλληλομετατρέπονται μεταξύ μιας αδρανούς διαλυτής μορφής και μιας ενεργού μορφής δεσμευμένης σε λιπίδια μεμβρανών¹⁵⁸. Η πρόσδεση της CCT σε μεμβράνες του κυττάρου είναι μια διαδικασία που διαμεσολαβείται από λιπίδια (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση του διμερούς της CCT στην (a) διαλυτή και την (b) μεμβρανική του μορφή. Ενεργοποίηση της καταλυτικής περιοχής μετά από πρόσδεση στη λιπιδική διπλοστιβάδα. Η πρόσδεση γίνεται με τη βοήθεια της α -έλικας. Η αποφωσφορυλίωση συμβάλλει στη σταθεροποίηση της μεμβρανικής μορφής (Cornell RB and Northwood IC, 2000).

Η κατεργασία των κυττάρων με φωσφολιπάση C ήταν ο πρώτος παράγοντας που βρέθηκε να προκαλεί μετατόπιση της CCT¹⁵⁹ και πιθανώς αυτό οφείλεται στην παραγωγή διακυλογλυκερόλης στο κύτταρο από τη φωσφολιπάση. Η εξωγενής διακυλογλυκερόλη μπορεί, επίσης, να προκαλέσει μετατόπιση της CCT¹⁶⁰. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι οι εστέρες φορβόλης και τα λιπαρά οξέα αυξάνουν τα επίπεδα της διακυλογλυκερόλης και της μεμβρανικής CCT, ενώ η κατεργασία με cAMP έχει αντίθετο αποτέλεσμα^{161,162,163}.

Η αλλοίωση της σύστασης των φωσφολιπιδίων, όπως η έλλειψη χολίνης, μπορεί, επίσης, να προκαλέσει ενεργοποίηση και μετατόπιση της CCT in vivo. Φαίνεται ότι μία αλλαγή στην ομάδα της κεφαλής των φωσφολιπιδίων, καθώς και προσθήκη λιπαρών οξέων ή διακυλογλυκερόλης μπορούν να προκαλέσουν μετατόπιση της CCT¹⁶⁴.

Το ένζυμο ενεργοποιείται σε μεγάλο βαθμό από κυστίδια φωσφατιδυλοχολίνης που περιέχουν ανιονικά λιπίδια όπως ελαϊκό, φωσφατιδυλογλυκερόλη ή φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη. Μικτά μικκύλια Triton X-100 και ανιονικών λιπιδίων, επίσης, ενεργοποιούν, με το ποσοστό της ενεργοποίησης να εξαρτάται από την πυκνότητα του αρνητικού φορτίου στο μικκύλιο¹⁶⁵.

Η περιοχή της αμφιπαθούς α-έλικας είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των λιπιδίων in vitro και για την πρόσδεση στη μεμβράνη in vivo¹⁶⁶. Η περιοχή λιπιδικής σύνδεσης είναι ανασταλτική περιοχή και αυτή η αναστολή παύει να υφίσταται είτε με μεταλλαξογένεση είτε με πρόσδεση σε λιπίδια ή μεμβράνες¹⁶⁷.

Φωσφορυλίωση

Η πρώτη αναφορά ότι η CCT ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση βασίστηκε στην αναστολή της βιοσύνθεσης της PC από ανάλογα της cAMP¹⁶⁸. Αυτή η πιθανότητα ενισχύθηκε από το γεγονός ότι η πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από cAMP μπορούσε να φωσφορυλιώσει και να απενεργοποιήσει τη CCT in vitro¹⁶⁹. Παρόμοια επίδραση στη ρύθμιση της CCT είχε και η πρωτεϊνική κινάση C.

Δραματική μείωση των επιπέδων της φωσφορυλίωσης της CCT συμβαίνει κατά την κατεργασία των κυττάρων με διάφορους παράγοντες που προκαλούν μετατόπιση και ενεργοποίηση της CCT: φωσφολιπάση C¹⁷⁰, λιπαρά οξέα¹⁷¹ και έλλειψη χολίνης¹⁷². Επιπλέον, καθώς η αποφωσφορυλίωση συνοδεύει την ενεργοποίηση, η αναστολή της CCT από οκαδαϊκό οξύ, η οποία αυξάνει την ποσότητα της διαλυτής CCT σε ηπατοκύτταρα, οδηγεί σε μια αύξηση της κατάστασης φωσφορυλίωσης της CCT¹⁶². Επομένως, η διαλυτή, σχετικά αδρανής μορφή της CCT

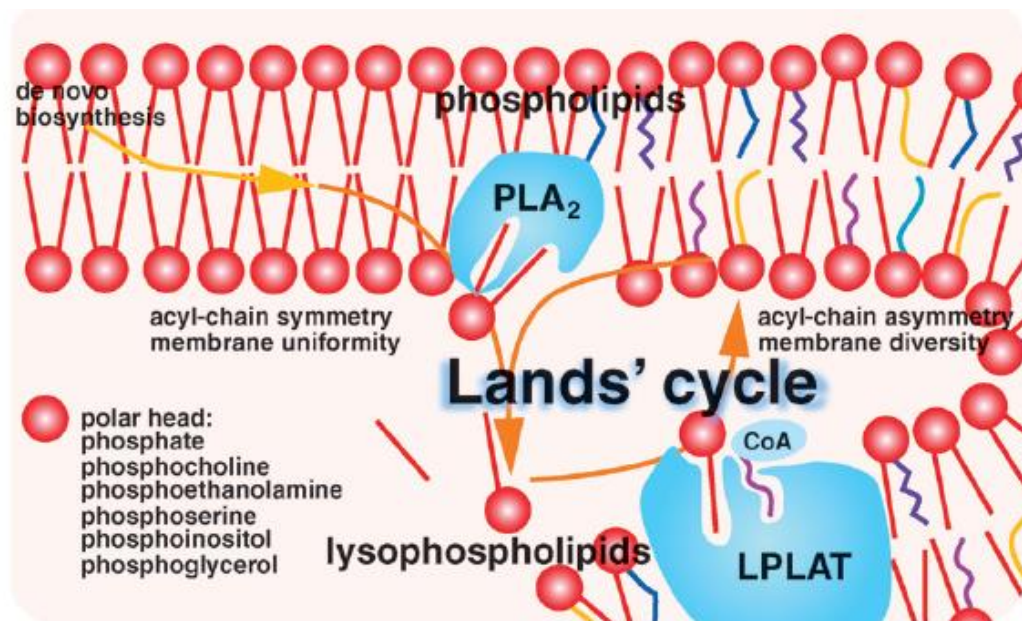
είναι φωσφορυλιωμένη σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από ότι η μεμβρανική, ενεργή μορφή. Έχει αποδειχτεί ότι η αποφωσφορυλίωση δεν πυροδοτεί τη σύνδεση του ενζύμου στη μεμβράνη, αλλά σταθεροποιεί τη μεμβρανική του μορφή¹⁶⁴.

Το επίπεδο φωσφορυλίωσης της CCT έχει, επίσης, συσχετιστεί με το στάδιο του κυτταρικού κύκλου. Βρέθηκε ότι το ένζυμο είναι περισσότερο φωσφορυλιωμένο όταν η δραστηριότητά του είναι χαμηλότερη, δηλαδή κατά τη διάρκεια της G₀ και M φάσης, και λιγότερο φωσφορυλιωμένο όταν είναι πιο ενεργό, δηλαδή κατά τη διάρκεια της G1 φάσης¹⁷³.

Οι θέσεις που φωσφορυλιώνονται στη CCT έχουν χαρτογραφηθεί σε μια περιοχή κοντά στο C-τελικό άκρο, κοντά στην περιοχή πρόσδεσης στη μεμβράνη.

4.4 Ακυλο-συνένζυμο Α (acyl-CoA): Λυσοφωσφολιπιδικές ακυλοτρανσφεράσες (LPLATs)

Τα γλυκεροφωσφολιπίδια είναι σημαντικά δομικά και λειτουργικά συστατικά των βιολογικών μεμβρανών, των λιποπρωτεϊνών του ορού και του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων. Επιπλέον, παίζουν σημαντικό ρόλο ως πρόδρομα μόρια των λιπιδικών διαμεσολαβητών όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) και τα εικοσανοειδή. Οι άκυλο ομάδες των γλυκεροφωσφολιπιδίων είναι εξαιρετικά ποικιλόμορφες, ανάλογα με την πολική ομάδα της κεφαλής και κατανέμονται με ασύμμετρο τρόπο^{174,175,176,177}. Χρησιμοποιώντας acyl-CoAs, τα γλυκεροφωσφολιπίδια αρχικά συντίθενται από γλυκερολ-3-φωσφορικό στην πορεία Kennedy και υφίστανται ωρίμανση στην πορεία αναδιαμόρφωσης, όπως αναφέρθηκε από τον Lands το 1958 (κύκλος του Lands)¹⁷⁸. Η γρήγορη μετατροπή του sn-2-άκυλο τμήματος των γλυκεροφωσφολιπιδίων αποδίδεται στις συντονισμένες δράσεις των φωσφολιπασών A₂ (PLA₂s) και των λυσοφωσφολιπιδικών ακυλοτρανσφερασών (LPLATs) (**Εικόνα 14**)¹⁷⁹. Επειδή υπάρχουν πολλά είδη γλυκεροφωσφολιπιδίων που διαφέρουν στη φωσφορυλο-ομάδα της κεφαλής και τα λιπαρά οξέα στο μήκος της αλυσίδας και το βαθμό κορεσμού, υπάρχουν πολλές LPLATs¹⁸⁰



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της βιοσυνθετικής πορείας (Kennedy) και της πορείας αναδιαμόρφωσης (Lands) για τη δημιουργία μεμβρανικής ποικιλομορφίας (Shindou H et al, 2009)

4.4.1 Ακυλοτρανσφεράσες στη *de novo* πορεία (πορεία Kennedy)

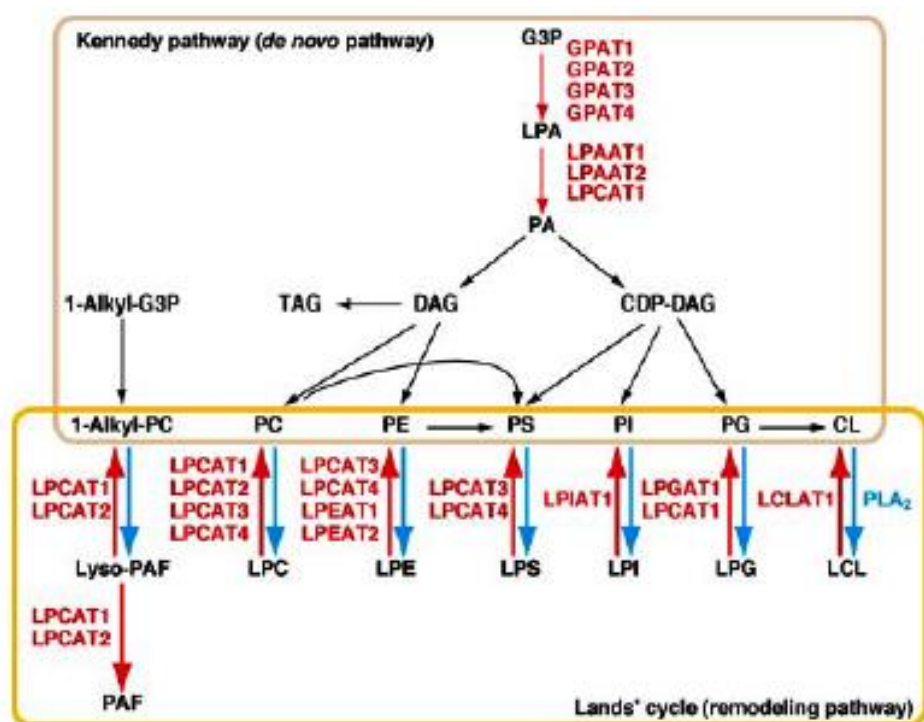
Στη *de novo* πορεία βιοσύνθεσης των γλυκεροφωσfolιπιδίων, το λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA) σχηματίζεται αρχικά από γλυκερολ-3-φωσφορικό (GP) με γλυκερολ-3-φωσφορικές ακυλοτρανσφεράσες (GPATs). Έπειτα το LPA μετατρέπεται σε φωσφατιδικό οξύ (PA) από λυσο-PA ακυλοτρανσφεράσες (LPAATs) και παράγονται δύο τύποι παραγώγων γλυκερόλης¹⁸¹. Μία είναι η διακυλογλυκερόλη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε τριακυλογλυκερόλη, φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) και κάποια από αυτά μετατρέπονται σε φωσφατιδυλοσερίνη (PS). Το άλλο παράγωγο γλυκερόλης είναι η κυτιδίνο διφωσφορική διακυλογλυκερόλη, η οποία τροποποιείται για να σχηματίσει φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (PI), φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) και καρδιολιπίνη (CL) ή PS. Αρκετές GPATs και LPAATs έχουν ταυτοποιηθεί από την οικογένεια 1-ακυλογλυκερολ-3-φωσφορικό O-ακυλοτρανσφερασών (AGPAT), η οποία διαθέτει AGPAT μοτίβα (LPLAT μοτίβα) (Εικόνα 15)¹⁸².

Σύνθεση LPA

Από την οικογένεια AGPAT έχουν κλωνοποιηθεί τέσσερα GPATs θηλαστικών, τα οποία συνθέτουν LPA από GP (Εικόνα 15). Οι GPAT1 και GPAT2 βρίσκονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ενώ οι GPAT3 και GPAT4 βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα ένζυμα αυτά προτιμούν κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά ακυλ-CoAs. Οι μικροσωμικές GPATs πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνθεση της τριακυλογλυκερόλης. Οι μιτοχονδριακές GPATs ορμονικά και με τη διατροφή¹⁸⁰.

Σύνθεση PA

Το PA συντίθεται από LPA με LPAAT. Δύο LPAATs (LPAAT1 και 2) έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί, οι οποίες βρίσκονται στους περισσότερους ιστούς (Εικόνα 15). Η ανθρώπινη LPAAT1 δείχνει μεγαλύτερη δραστικότητα προς τα 14:0-, 16:0- και 18:2-CoAs, ενώ η ανθρώπινη LPAAT2 προτιμά το 20:4-CoA περισσότερο από τα 16:0- ή 18:0-CoA. Τα μοτίβα AGPAT περιέχουν τις ακολουθίες nHxxxxD (μοτίβο 1), GxxFxxR (μοτίβο 2), EGtr (μοτίβο 3) και xxPxx (μοτίβο 4) και είναι σημαντικά για τη δραστικότητά τους¹⁸¹.



Εικόνα 15: Πορείες βιοσύνθεσης των γλυκεροφωσfolιπιδίων (πορείες Kennedy και Lands) (Shindou H and Shimizu T, 2009)

4.4.2 Ακυλοτρανσφεράσες στην πορεία αναδιαμόρφωσης (κύκλος του Lands)

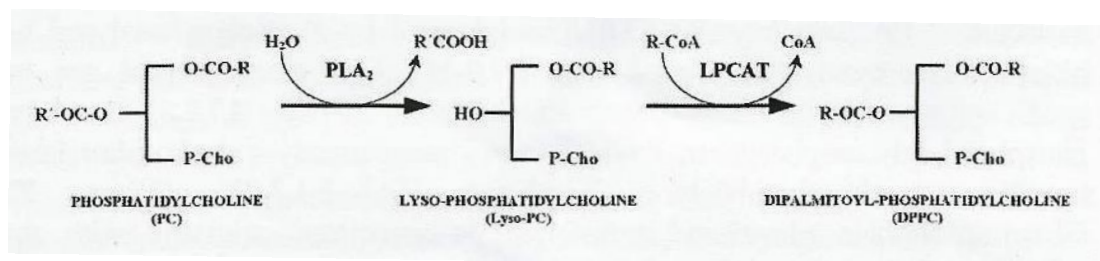
Ο Lands ανέφερε ότι η σύσταση των λιπαρών ακυλοομάδων στην sn-2 θέση μεταβάλλεται στην πορεία αναδιαμόρφωσης (κύκλος του Lands) μέσω των συντονισμένων δράσεων των PLA₂s και των LPLATs (Εικόνα 15).

Σύνθεση PC και PAF στην πορεία αναδιαμόρφωσης

Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε ένζυμα με δραστικότητα LPCAT. Οι LPCAT1, LPCAT2 και LPEAT2 είναι μέλη της οικογένειας AGPAT, ενώ οι LPCAT3 και LPCAT4 είναι μέλη της οικογένειας O-ακυλοτρανσφερασών συνδεδεμένων σε μεμβράνη (MBOAT).

➤ LPCAT1

Η LPCAT1 καταλύει τη σύνθεση της δικορεσμένης-PC και της δικορεσμένης-PG (Εικόνα 15). Εκφράζεται κυρίως στον πνεύμονα, και ιδιαίτερα στα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II, και το επίπεδο του mRNA της αυξάνεται κατά την περιγεννητική περίοδο. Τα δικορεμένα φωσφολιπίδια, κυρίως η διπαλμιτοϋλο-PC (DPPC) (Εικόνα 16), αποτελούν σημαντικά συστατικά των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα, τα οποία μειώνουν την επιφανειακή τάση και ως εκ τούτου είναι απαραίτητα για την αναπνοή. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας περιέχει μικρές ποσότητες διπαλμιτοϋλο-PG και PC με λινελαϊκό οξύ (18:2) ή λινολενικό (18:3) στην sn-2 θέση. Η LPCAT1 χρησιμοποιεί 18:2-CoA ή 18:3-CoA ως υποστρώματα *in vitro*¹⁸³. Έτσι, η LPCAT1 συνθέτει τα περισσότερα φωσφολιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων και παίζει κρίσιμο ρόλο στη φυσιολογία του αναπνευστικού συστήματος.



Εικόνα 16: Αναδιαμόρφωση της DPPC σε δύο στάδια. Απακυλίωση από την PLA₂ προς σχηματισμό λυσο-PC και επανακυλίωση της λυσο-PC προς σχηματισμό DPPC (Pantazi and Lekka, 2009).

➤ LPCAT2

Η LPCAT2 καταλύει τόσο τη σύνθεση της PC όσο και του PAF, κυρίως σε φλεγμονώδη κύτταρα, από το ίδιο πρόδρομο μόριο (lyso-PAF) (**Εικόνα 15**)¹⁸⁴. Κατά την επαγωγή οξείας φλεγμονής με λιποπολυσακχαρίτη, η δραστηριότητα LPCAT2 της λυσο-PAF ακυλοτρανσφεράσης ενεργοποιήθηκε από την πορεία εξαρτώμενη από p38 MAP κινάση¹⁸⁵. Έτσι, ένα μόνο ένζυμο καταλύει τη μεμβρανική βιογένεση των φλεγμονωδών κυττάρων, παράγοντας PAF σε απόκριση εξωτερικών ερεθισμάτων. Ενώ η δραστηριότητα της LPCAT2 εξαρτάται από Ca^{2+} , η δραστηριότητα της LPCAT1 είναι ανεξάρτητη από αυτό. Το συμπέρασμα αυτό υποδεικνύει δύο διακριτές πορείες αναδιαμόρφωσης για τη σύνθεση PAF: μία φλεγμονώδη πορεία επαγόμενη από την LPCAT2 και μία αντιφλεγμονώδη, ιδιοσυστατική από την LPCAT1¹⁸⁶.

➤ LPEAT2

Η LPEAT2 αναφέρθηκε ότι εμφανίζει δραστηριότητα LPCAT στα ερυθρά αιμοσφαίρια, αν και η δραστηριότητά της είναι σχετικά μικρή¹⁸⁷.

➤ LPCAT3 και LPCAT4

Η LPCAT3 ανήκει στην οικογένεια MBOAT, η οποία περιέχει διακυλογλυκερολ ακυλοτρανσφεράση 1, χοληστερολ ακυλοτρανσφεράσες 1 και 2 και πρωτεϊνικές ακυλοτρανσφεράσες όπως ακυλοτρανσφεράση γκρελίνης¹⁸⁸. Η LPCAT3 έχει δραστηριότητα LPCAT, LPEAT και λυσο-PS ακυλοτρανσφεράσης (LPSAT) (**Εικόνα 15**). Το mRNA της LPCAT3 ποντικού ανιχνεύτηκε παντού κι έδειξε μεγαλύτερη δραστηριότητα ακυλοτρανσφεράσης προς τα πολυακόρεστα λιπαρά ακυλο-CoAs, 20:4-CoA και 18:2-CoA, από ότι τα κορεσμένα λιπαρά ακυλο-CoAs.

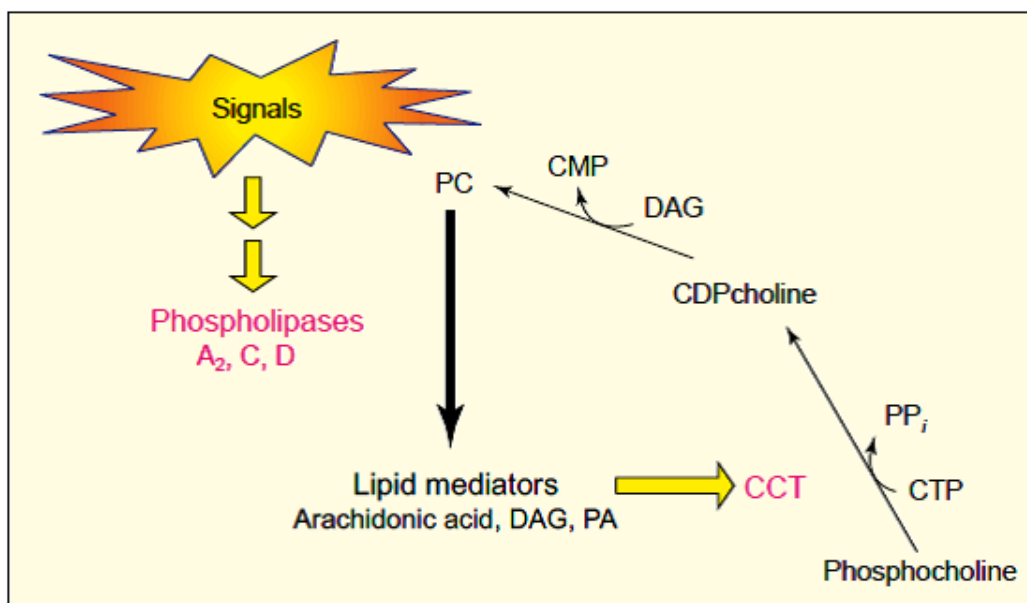
Η LPCAT4 έχει δραστηριότητα LPCAT και LPEAT με προτίμηση στο 18:1-CoA (**Εικόνα 15**). Το mRNA της LPCAT4 ποντικού εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στην επιδιδυμίδα, τον εγκέφαλο, τους όρχεις και τις ωοθήκες¹⁸⁹.

4.5 Καταβολισμός της PC

Η χολίνη είναι μία τεταρτοταγής αμίνη και βασικό θρεπτικό συστατικό για τα θηλαστικά. Η κύρια πορεία της χολίνης είναι η σύνθεση της PC μέσω της πορείας Kennedy, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό 95% της συνολικής αποθήκης χολίνης στους περισσότερους ιστούς. Το υπόλοιπο 5% περιλαμβάνει ελεύθερη χολίνη, φωσφοχολίνη, γλυκεροφωσφοχολίνη, CDP-χολίνη, ακετυλοχολίνη, καθώς και άλλα φωσφολιπίδια που περιέχουν χολίνη όπως σφιγγομυελίνη, πλασμαλογόνα και λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, τα οποία αν και μικρότερα σε ποσοστό, εμπλέκονται στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας και των λειτουργιών σηματοδότησης των κυτταρικών μεμβρανών. Η PC χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τη σύνθεση σφιγγομυελίνης μέσω συνθασών σφιγγομυελίνης, η οποία μεταφέρει την ομάδα της χολίνης σε μια λιπιδική άγκυρα κεραμιδίου^{190,191}.

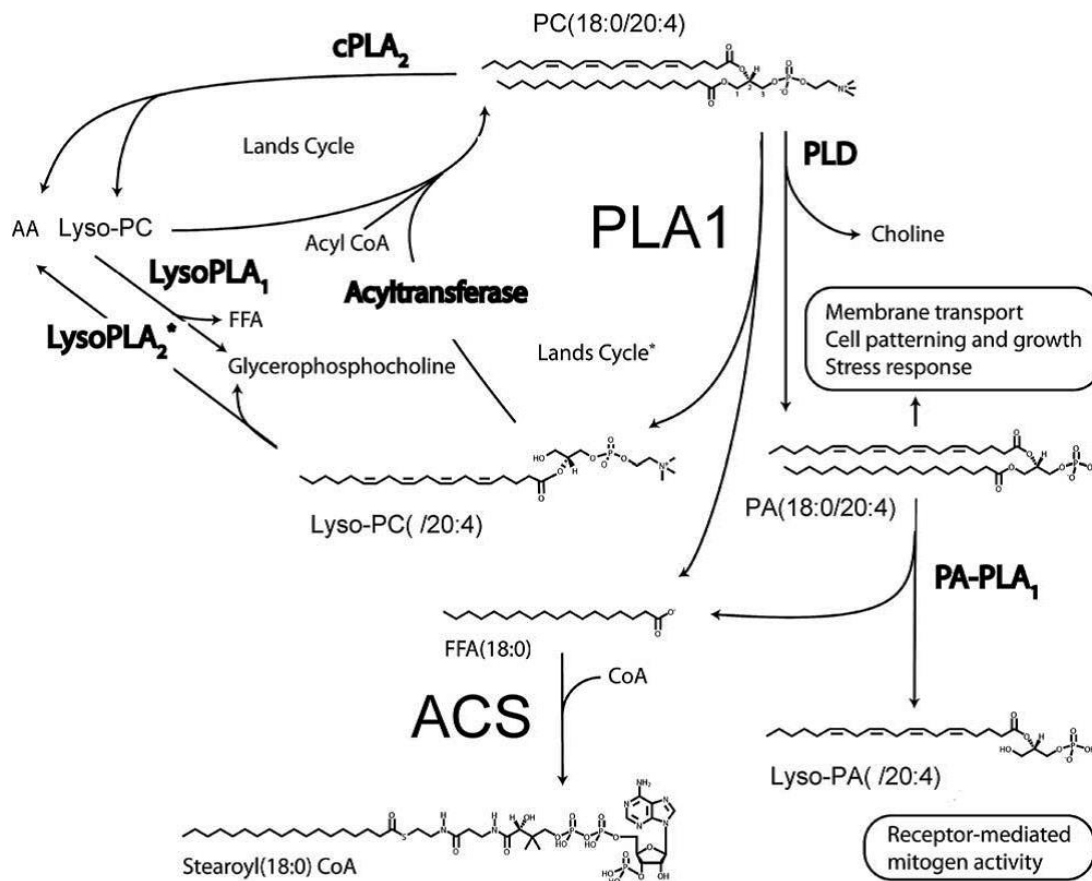
Η βιοσύνθεση της PC απαιτείται για την έκκριση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας από τα κύτταρα του ήπατος. Η χολίνη ανακυκλώνεται στο ήπαρ και ανακατανέμεται από τους νεφρούς, τον πνεύμονα και το έντερο προς το ήπαρ και τον εγκέφαλο όταν η ποσότητα της χολίνης μειωθεί^{190,191}.

Η CCT συμβάλλει στην παραγωγή των λιπιδικών δεύτερων αγγελιοφόρων όπως η DAG, το PA, το λυσοφωσφατιδικό οξύ και το αραχιδονικό οξύ με τον έλεγχο της στον μεταβολικό κύκλο της PC, δημιουργώντας αυτούς τους λιπιδικούς διαμεσολαβητές μέσω του καταβολισμού της PC. Οι πορείες βιοσύνθεσης και καταβολισμού της PC συντονίζονται για τη διατήρηση της ομοιοστασίας της PC (**Εικόνα 17**)^{132,192}. Τα ένζυμα αποδόμησης της PC είναι ευαίσθητα στα επίπεδα δραστηριότητας της CCTα και/ή της παραγωγής PC. Η PC αποδομείται από διάφορες φωσφολιπάσες, οι οποίες ελευθερώνουν DAG, PA, λιπαρά οξέα και λυσο-PC. Η δραστηριότητα των ανεξάρτητων από ασβέστιο PLA₂s (iPLA₂s) είναι σημαντική σε πολλές καλλιέργειες κυττάρων για τη διατήρηση της ομοιόστασης της PC^{193,194}. Σε πολλές κυτταρικές σειρές υπάρχουν ενδείξεις για αυξημένη δραστηριότητα iPLA₂ σε απόκριση στην αυξημένη σύνθεση CCTα¹⁹⁵.



Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση του αναβολισμού και καταβολισμού της PC (Cornell RB and Northwood IC, 2000).

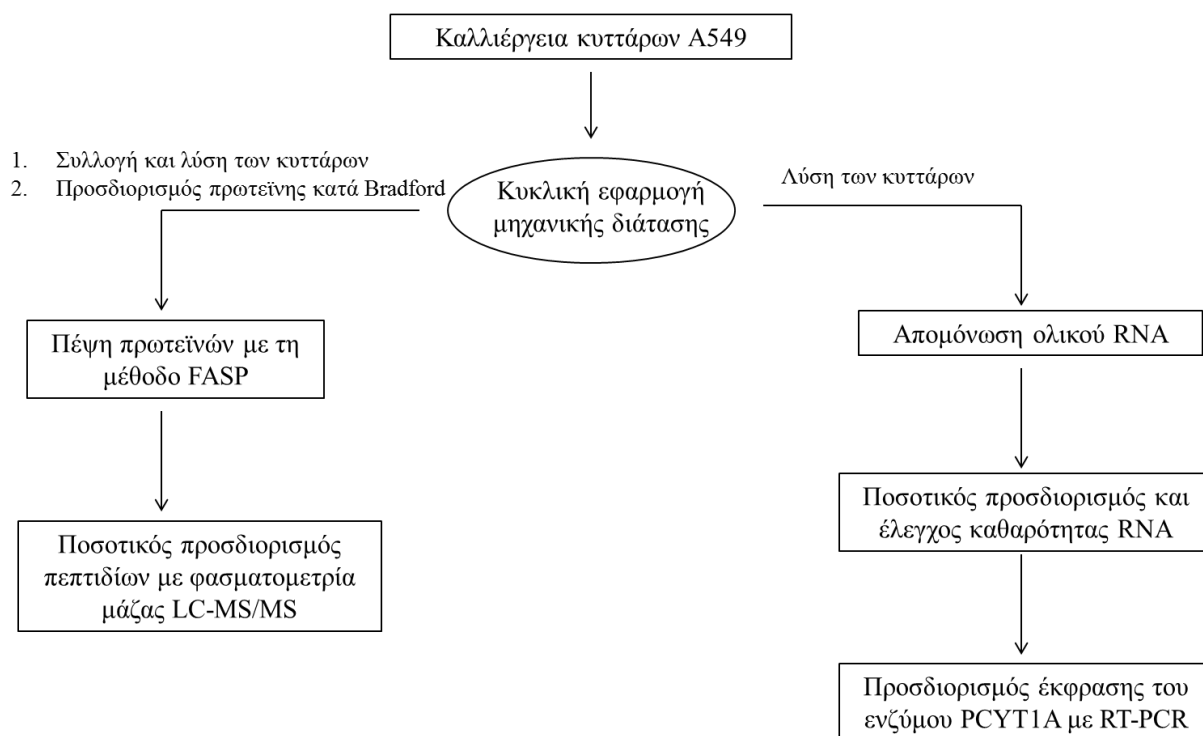
Η χολίνη και οι μεταβολίτες της χολίνης αναγεννούνται με ελεγχόμενη διάσπαση των φωσfolιπιδίων της χολίνης, μέσω διαφόρων πορειών. Οι κύριες πορείες υδρόλυσης της PC λαμβάνουν χώρα μέσω των φωσfolιπασών D που παράγουν χολίνη και φωσφατιδικό οξύ και μέσω των φωσfolιπασών A₁ και A₂ που παράγουν ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερο-φωσφοχολίνη¹⁹¹. Η επακόλουθη υδρόλυση της γλυκεροφωσφοχολίνης σε 3-φωσφορική γλυκερόλη και χολίνη καταλύεται από μία φωσφοδιεστεράση. Η σφιγγομυελίνη, επίσης, καταβολίζεται από τη δράση των σφιγγομυελινασών για την παραγωγή φωσφοχολίνης, η οποία εισάγεται ξανά στην πορεία Kennedy, και κεραμιδίου (**Εικόνα 18**)¹⁹¹.



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση του καταβολισμού της φωσφατιδυλοχολίνης και δημιουργία μεταβολιτών ως μόρια σηματοδότησης. PC= φωσφατιδυλοχολίνη, PA= φωσφατιδικό οξύ, LPLA1/2= λυσοφωσfolιπάση, PLA₂= φωσfolιπάση A₂, PLA₁= φωσfolιπάση A₁, PLD= φωσfolιπάση D, AA= αραχιδονικό οξύ, FFA= ελεύθερα λιπαρά οξέα, ACS= συνθετάση ακυλο-CoA (Gibellini F and Smith TK, 2010).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Διάγραμμα ροής



2. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς A549

Η κυτταρική σειρά A549 δημιουργήθηκε το 1972 από τον D.J. Giard et al. από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων που απομονώθηκαν από πνεύμονα 58χρόνου Κανκάσιας φυλής. Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι περίπου 24 ώρες.

Χαρακτηριστικά:

- Επίπεδο βιοασφάλειας: 1
- Συνθήκες ανάπτυξης: Επιθηλιακά

2.1 Υλικά

- 1) Ham's F12-K, 1X, 500 mL (Cat. No. 21127022, Gibco-BRL).
- 2) Ορός εμβρύου βοός (Foetal Bovine Serum-FBS Cat. No. A15-101).
- 3) Γλουταμίνη (200 mM L-Glutamine, Cat. No.K0282, Seromed)
- 4) Αντιβιοτικό (Αντιβιοτικό-Αντιμυκητιακό, περιέχει: 10000 U/mL Penicillin G sodium, 10000 µg/mL Streptomycin Sulfate, 25 µg/mL amphotericin B as fungizone, Cat. No. 15240-062, Gibco-BRL)
- 5) Αιθανόλη (Riedel-de Haen).
- 6) Διμεθυλοσουλφοξείδιο αποστειρωμένο (DMSO, C₂H₆OS, 1X, 50 mL, Cat. No. 11101-011, Gibco).
- 7) Αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσης των 5 και 10 mL, σωληνάκια Corning των 15, 45 mL, τρυβλία petri των 10 mL (100/20 mm sterile 15 pieces, Cellstar).
- 8) Δοχείο φύλαξης κυττάρων στο υγρό άζωτο και των 5 θέσεων (Cryocane, aluminum, pcs. 12, Cat. No. 5015-0001, Nunc).
- 9) Βαφή Trypan Blue (Blue solution 0.4 % in NaCl, Cat. No. T- 8154, Sigma).
- 10) Αιματοκυτόμετρο, καλυπτρίδες.
- 11) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS 1X, 500 mL, Cat. No. 10010-015 Gibco).
- 12) Θρυψίνη (Trypsin-EDTA 1x, Cat. No. L11-004, PAA)

2.2 Συσκευές

- 1) Θάλαμος Επώασης. Η ανάπτυξη γίνεται σε επωαστήρα συστάσεως 5 % CO₂ - 95% αέρα, θερμοκρασίας 37 °C (Incubator, RS, Biotech, Galaxy, R).
- 2) Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (autoclave).
- 3) Θάλαμος νηματοειδούς ροής (Laminar Flow, Hood Class II type A/B3, Nuair, Model No. 425-100, Ser. No. 27190AR).
- 4) Ανάστροφο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο (Ser.No.1131010065, Cat. No. D-22976, Kruss, Hamburg, Germany).

2.3 Διαλύματα εργασίας

1) Αδρανοποίηση FBS

Το παρασκεύασμα του εμπορίου FBS απενεργοποιείται σε υδρόλουτρο στους 60 °C για 30 min. Στη συνέχεια μοιράζεται σε αποστειρωμένα πλαστικά corning/ 50mL σε στείρες συνθήκες αφού πρώτα διηθηθεί από αποστειρωμένο φίλτρο. Φυλάσσεται στους -20 °C.

2) Πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων A549

Στα 500 mL θρεπτικού υλικού F12K προστίθενται 50 mL αδρανοποιημένου FBS, 5 mL γλουταμίνης, 10 mL δικαρβονικού νατρίου και 5 mL αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4 °C.

3) Μη Πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων A549

Στα 500 mL θρεπτικού υλικού F12K προστίθενται 5 mL γλουταμίνης, 10 mL δικαρβονικού νατρίου και 5 mL αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το μη πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4 °C.

2.4 Πειραματική Εκτέλεση

A) *Συντήρηση και φύλαξη των κυττάρων*

▪ *Δημιουργία Αποθεμάτων κυττάρων*

Για τη δημιουργία αποθεμάτων κυττάρων (stock), σε 950 μ L εναιωρήματος κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό προστίθενται 50 μ L αποστειρωμένου DMSO. Φυλάσσονται σε σωληνάρια υψηλής κατάψυξης (cryovials) στους -80 °C για 2-5 μέρες (ρυθμός παγώματος 1°C/min περίπου) και στη συνέχεια τοποθετούνται στο δοχείο φύλαξης, σε υγρό άζωτο.

Για την εκκίνηση νέας καλλιέργειας το σωληνάριο με το απόθεμα τοποθετείται σε υδρόλουτρο 37 °C για 1-2 min. Με αυτόματη πιπέτα τα κύτταρα αναδιασπείρονται προσεκτικά στο θάλαμο νηματώδους ροής όπου και διαμοιράζονται σε 2 τρυβλία των 10 mL με το αντίστοιχο θρεπτικό υλικό. Ενδεικτικά, παρατηρήθηκε ότι απόθεμα κυττάρων που ήταν παγωμένο για 6 μήνες στο υγρό άζωτο και χρησιμοποιήθηκε για καλλιέργεια εργασίας είχε διατηρήσει τη βιωσιμότητά του σε ικανοποιητικό ποσοστό (80 %).

B) 1^η Ανακαλλιέργεια

Γίνεται παρατήρηση των κυττάρων και αν έχουν κολλήσει καλά και έχουν αναπτυχθεί (~80% ταπήτιο), γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα τρυβλία και απόρριψη αυτού. Ακολουθεί ξέπλυμα με ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων, PBS, 3 mL σε κάθε τρυβλίο και στη συνέχεια απόρριψη αυτού. Προσθήκη 3 mL θρυψίνης (η θρυψίνη διασπά πεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυλικό άκρο των αμινοξέων λυσίνη και αργινίνη, εκτός από τις περιπτώσεις που αυτά ακολουθούνται από προλίνη) και τοποθέτηση των τρυβλίων στον επωαστικό θάλαμο για να αποκολληθούν τα κύτταρα (περίπου για 10 min). Ακολουθεί προσθήκη 3 mL PBS σε κάθε τρυβλίο για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης και παραλαβή ανά 2 τρυβλία σε 1 corning των 10 mL. Γίνεται φυγοκέντρηση για 5 min στις 2000 στροφές στους 4°C. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκείμενου (PBS με θρυψίνη) στα απόβλητα. Με πιπέτα απομακρύνεται το υπόλειμμα του υπερκείμενου. Γίνεται προσθήκη 1 mL θρεπτικού υλικού στο ίζημα σε κάθε corning και σχολαστική επανεναιώρηση αυτών. Ακολούθως, προστίθενται σε τρυβλία, 10 mL πλήρους θρεπτικού υλικού και κατάλληλη ποσότητα από το εναιώρημα των κυττάρων. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο (37 °C και 5% CO₂) για προσκόλληση των κυττάρων.

Γ) 2^η Ανακαλλιέργεια

Πραγματοποιείται περίπου 4 μέρες μετά τη πρώτη ανακαλλιέργεια και όταν το ταπήτιο των προσκολλημένων κυττάρων φτάνει περίπου το 70-90% της επιφάνειας του τρυβλίου.

Ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με τη πρώτη ανακαλλιέργεια.

Δ) Απομόνωση, μέτρηση και στρώσιμο κυττάρων

Γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από κάθε τρυβλίο και ξέπλυμα με 3 mL PBS και ακολούθως προσθήκη 3 mL θρυψίνης για την αποκόλληση των κυττάρων (10 min στον επωαστικό θάλαμο). Ακολουθεί προσθήκη 3 mL PBS. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση για 5 min στις 2000 στροφές. Γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου και εναιώρηση του ιζήματος με 1 mL πλήρους θρεπτικού υλικού. Σε σωλήνα eppendorf προστίθενται 90 μL βαφής Trypan Blue 1x (από το stock 10 μL βαφής και 90 μL ddH₂O) και 10 μL εναιωρήματος κυττάρων (10 φορές αραιωμένα κύτταρα). Ακολουθεί ανάδευση και στη συνέχεια 10 μL τοποθετούνται σε

αιματοκυτόμετρο (πλάκα Neubauer) και γίνεται μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Αριθμός κυττάρων} = (\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων}) \times (\text{αραίωση}) \times 10^4$$

3. Εφαρμογή κυκλικής μηχανικής διάτασης

3.1 Αρχή της μεθόδου

Η κυκλική μηχανική διάταση (cyclic mechanical stretch) αποτέλεσε το μηχανικό ερέθισμα για τη μελέτη των μεταβολών του πρωτεϊνικού προφίλ των κυττάρων A549 και συγκεκριμένα των μεταβολών του μεταβολισμού της φωσφατιδυλογολίνης (PC).

3.2 Υλικά-Συσκευές

1. Πολυτρυβλία έξι θέσεων με ελαστική μεμβράνη
2. Πλαστικά σωληνάκια (eppendorf)
3. Ηλεκτρονικός υπολογιστής με επίπεδη οθόνη (DELL)
4. Επίπεδη βάση με τέσσερα λάστιχα
5. Φίλτρο ξήρανσης, παγίδα νερού, αντλίες κενού και λιπαντικό
6. Συσκευή μηχανικής διάτασης (FLEXCELL FX5000T System)

3.3 Πειραματική εκτέλεση

Καλλιέργειες κυττάρων A549 ετοιμάστηκαν σε πολυτρυβλία έξι θέσεων με ελαστική μεμβράνη (2×10^6 κύτταρα ανά θέση). Όταν τα κύτταρα σχημάτισαν ταπήτιο (confluent 90 %, 24 ώρες) σε πλήρες θρεπτικό υλικό, το πλήρες θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό. Τα πολυτρυβλία τοποθετήθηκαν στην επίπεδη βάση. Η εφαρμογή της πίεσης έγινε σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 37°C, συστάσεως 95 % σε οξυγόνο και 5 % σε CO₂. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε δύο διαφορετικά μεγέθη μηχανικής διάτασης: 15% και 25% για 1 h, 6 h και 24 h ($1/2$ ημιτονοειδές κύμα, συχνότητας 0.5 Hz). Κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε μηχανική διάταση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (control).

Μετά την ολοκλήρωση της μηχανικής διάτασης, συλλέχθηκαν χωριστά τα κύτταρα από τα υπερκείμενά τους σε πλαστικά σωληνάκια (eppendorfs).



Εικόνα 19: Συσκευή μηχανικής παραμόρφωσης (FLEXCELL FX5000T System)

4. Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (Μικρομέθοδος 0 έως 20 μg πρωτεΐνης)

4.1 Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος προσδιορισμού της πρωτεΐνης κατά Bradford¹⁹⁶ περιλαμβάνει την προσθήκη μιας όξινης χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 σε διάλυμα πρωτεΐνης. Αυτή η χρωστική συνδέεται με τα βασικά και αρωματικά αμινοξέα καταλήγοντας σε μια μεταβολή της απορρόφησης από τα 465 nm σε 595 nm.

Πιο λεπτομερείς μελέτες δείχνουν ότι η ελεύθερη βαφή μπορεί να υπάρχει σε τρεις διαφορετικές μορφές ιοντισμού για τις οποίες οι τιμές της pK_a είναι 1.15, 1.82 και 12.4. Το μεγαλύτερο ποσοστό από τις κατιοντικές κόκκινες και πράσινες τιμές της βαφής, οι οποίες επικρατούν στο διάλυμα αντίδρασης της όξινης χημικής δοκιμής, έχουν μέγιστη απορρόφηση στα 470 και 650 nm, αντίστοιχα. Σε αντίθεση, το

μεγαλύτερο ποσοστό της ανιοντικής μπλε μορφής της βαφής, η οποία δεσμεύεται στην πρωτεΐνη, έχει μια μέγιστη απορρόφηση στα 590 nm. Έτσι, η ποσότητα της πρωτεΐνης μπορεί να υπολογιστεί με τον προσδιορισμό της ποσότητας της βαφής σε μπλε ιοντική μορφή. Αυτό επιτυγχάνεται μετρώντας την απορρόφηση του διαλύματος στα 595 nm.

Η μικρομέθοδος είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος προσδιορισμού πρωτεΐνης και χρησιμοποιείται όταν η ποσότητα της άγνωστης πρωτεΐνης είναι μικρή. Η μικρομέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για αραιά διαλύματα πρωτεΐνης 1-20 μg .

4.2 Υλικά και συσκευές

- 1) Dye Reagent (Bio-Rad Protein Assay)
- 2) Αλβουμίνη ορού βοός (BSA, Bovine Serum Albumin, Fraction V, 5gr, assay 96%, A2153, Sigma).
- 3) Πλαστική κυψελίδα του 1mL.
- 4) Πλαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου.
- 5) Φωτόμετρο SHIMADZU UV-1601.

4.3 Διαλύματα εργασίας

- 1) BSA (Stock) [C=1 mg/mL]
50 mg BSA διαλύονται σε 50 mL H_2O . Ακολουθεί ήπια ανάδευση στους 37 °C. Φύλαξη στους -20 °C.
- 2) BSA (Working) [25 mg/mL]
1.250 mL stock BSA (1 mg/mL) διαλύονται σε 50 mL H_2O (Τελικός όγκος). Φύλαξη στους -20 °C.
- 3) Bradford Reagent (B-6916, Sigma)

4.4 Πειραματική εκτέλεση

Πρότυπη Καμπύλη

Πίνακας 1: Προετοιμασία πρότυπης καμπύλης.

Αντιδραστήριο	Τυφλό	1	2	3	4	5	6
BSA (μL)	-	40	80	120	160	200	240
PBS (μL)	800	760	720	680	640	600	560
Χρωστική (μL)	200	200	200	200	200	200	200

Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης, τοποθετούνται σε eppendorf οι παραπάνω ποσότητες πρότυπης πρωτεΐνης BSA, PBS και χρωστικής. Ακολουθεί ανάδευση των eppendorf στο vortex. Μετά το πέρας 5 min, μετρώνται οι απορροφήσεις στα 595 nm.

Άγνωστα δείγματα

Πίνακας 2: Προετοιμασία αγνώστων δειγμάτων.

Αντιδραστήριο	1 ^ο δείγμα	2 ^ο δείγμα
PBS (μL)	790	790
Ποσότητα δείγματος (μL)	10	10
Χρωστική (μL)	200	200

Για τη μέτρηση αγνώστων δειγμάτων, τοποθετούνται σε eppendorf οι παραπάνω ποσότητες δείγματος, PBS και χρωστικής. Ακολουθεί ανάδευση των eppendorf στο vortex. Μετά το πέρας 5 min, μετρώνται οι απορροφήσεις στα 595 nm.

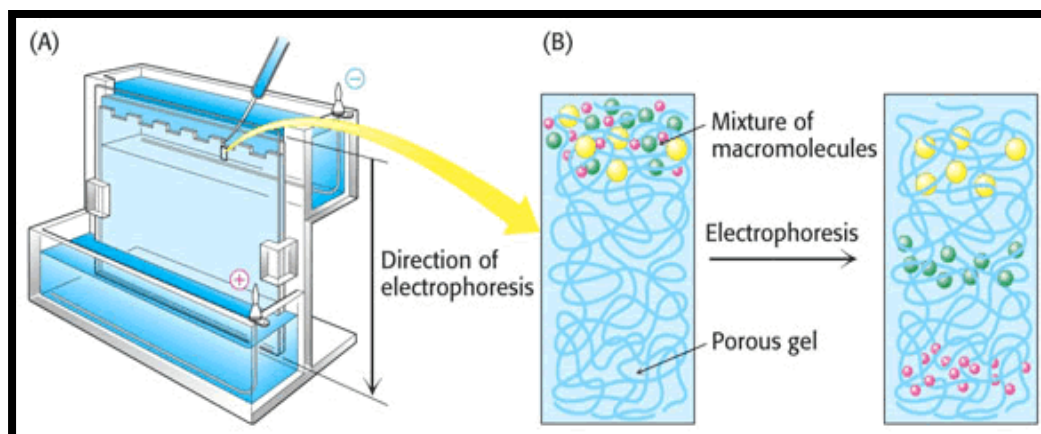
Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Από τις απορροφήσεις των προτύπων και με βάση τη γνωστή τους συγκέντρωση σε αλβουμίνη, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Excel, κατασκευάζεται σε γράφημα η βέλτιστη ευθεία της μορφής $y=ax$ (απορρόφηση συναρτήσει μg πρωτεΐνης) σύμφωνα με τη γραμμική σχέση του νόμου του Beer. Με βάση την καμπύλη υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση των δειγμάτων σε πρωτεΐνη. Γίνεται αναγωγή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ανά mL δείγματος. Η καμπύλη έχει γραμμική περιοχή περίπου 1-6 μg πρωτεΐνης.

5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

5.1 Αρχή της μεθόδου

Ηλεκτροφόρηση λέγεται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο με καθαρό ηλεκτρικό φορτίο μετακινείται σε ηλεκτρικό πεδίο μέσω ενός φορέα. Η ταχύτητα μετακίνησης μιας πρωτεΐνης σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, από το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης και τον συντελεστή τριβής. Η τριβή εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου. Ως μέσα μετακίνησης χρησιμοποιούνται τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, διότι αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και το μέγεθος των πόρων τους μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου. Τα μόρια μικρού μεγέθους, μετακινούνται εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το προς ανάλυση δείγμα θερμαίνεται παρουσία ισχυρού ανιοντικού απορρυπαντικού, όπως το SDS. Τα μετουσιωμένα πολυπεπτίδια προσδένονται στο SDS και φορτίζονται αρνητικά. Λόγω του ότι το ποσοστό του SDS που προσδένεται στα πολυπεπτίδια είναι ανάλογο του μοριακού τους βάρους και ανεξάρτητο της αλληλουχίας τους, η μετακίνηση των συμπλόκων SDS-πολυπεπτιδίων εξαρτάται μόνο από το μέγεθός τους και επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος μεταξύ των ηλεκτροδίων.



Εικόνα 20: Διαχωρισμός μορίων στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

5.2 Υλικά-Συσκευές

1. Bromophenol Blue Sodium Salt ($C_{19}H_9Br_4O_5SNa$, MW:691.9, Cat. No. B-8026, Sigma).
2. Coomassie Brilliant Blue R-250 (Cat. No.161-0400, $\lambda_{max}=550$ nm, S:22, 24/25, Bio-Rad).
3. Υπερθεϊκό αμμώνιο (Ammonium Persulfate, APS) (Cat. No.161-0700, MW: 228.20, R:8,22,37,42/43, S:17,24,26,43, Bio-Rad).
4. Sodium dodecyl sulphate (SDS) (MW:288.38, Cat. No.161-0301, R: 22,36/38, S: 22, Bio-Rad).
5. Bis N, N'-Methylene-bis acrylamide (MW:154.17, Cat. No. 161-0200, 5 g, R: 22,37/38, S: 22,24/25, Bio-Rad).
6. Ακρυλαμίδιο (Acrylamide, C_3H_5NO , MW:71.08, R:45-46-24/25-48/23/24/25, S:53-45, Merck).
7. Γλυκερόλη (Glycerol, $CH_2OHCHOHCH_2OH$, MW:92.09, Assay 99.5%, 2.5 L, Analar).
8. TEMED ($C_6H_{16}N_2$, MW:116.2, 99%, Cat. No.T-8133, R:11-20/22-34, S:16-26-36/37/39-45, Sigma).
9. Γλυκίνη (Glycine, MW:75.07, Cat. 161-0718, Bio-Rad).

10. Μερκαπτοαιθανόλη (2-mercaptoethanol, C_2H_6OS , FW:78.13, R:23/24/25, S:45-26-36/37/39-23, Cat. No. M-3148, Sigma).
11. Πρότυπα Μοριακά Βάρη (Marker, Prestained protein Ladder 10-170 kDa, proteins are covalently coupled with a blue chromophore except for a reference one- 72 kDa, coupled with an orange dye, Cat. No. #SM0671, Fermentas).
12. Trizma Base ($C_4H_{11}NO_3$, MW:121.1, Cat. No. T-1503, Sigma).
13. Μεθανόλη (Methanol, 1l=0.79 Kg, MW:32.04, Riedel-de Haen).
14. Οξικό Οξύ (Acetic acid glacial, MW:60.05, R:10-35, S:23-26-45, Carlo Erba).
15. Απόλυτη Αιθανόλη (Ethanol absolute, 1L=0.788 Kg, assay=99.8%, MW:46.07, R:11, S:7-16, Riedel-de Haen).
16. Σελοφάν για το στέγνωμα των gels (PolyLabo).
17. Συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad, Mini protean).

5.3 Διαλύματα

1. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrode Buffer ή Running Buffer)

0.025 M Tris-base, 0.192 M Γλυκίνης, 0.1% SDS, pH=8.3 {διάλυμα 10x}

36 gr Tris-base ,172.8 gr Γλυκίνης και 12 gr SDS προστίθενται σε νερό και ρυθμίζεται το pH σε 8.3. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 1200 mL.

2. Ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M Trizma base pH 6.8

Ζυγίζονται 6.0 gr Trizma base και διαλύονται σε 100 mL νερού. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6.8 με διάλυμα 4 N HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στο στους 4°C.

3. Διάλυμα 10 % SDS

10 gr SDS διαλύονται σε 100 mL νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

4. Διάλυμα 10 % υπερθειικού αμμωνίου (APS)

0.1 gr υπερθειικού αμμωνίου διαλύονται σε 1 mL νερού. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

5. Διάλυμα 30 % ακρυλαμιδίου / δις ακρυλαμιδίου (BIS)

29.2 gr ακρυλαμιδίου και 0.8 gr bis-ακρυλαμιδίου διαλύονται σε 100 mL νερού. Το διάλυμα διηθείται και φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο στους 4°C.

6. Διάλυμα κυανού της βρωμοφαινόλης 0.05 % (w/v)

2.5 mgr κυανού της βρωμοφαινόλης διαλύονται σε 5 mL νερού.

7. Διάλυμα 12% αιθανόλης

Αναμιγνύονται 60 mL αιθανόλης με 440 mL νερού και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

8. Διάλυμα χρωματισμού 1 % κυανού του Coomassie R-250 (Staining Buffer)

2 gr κυανού του Coomassie R-250 διαλύονται σε 200 mL νερού. Το διάλυμα αναδεύεται και διηθείται. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

9. Διάλυμα χρώσης πηκτώματος

Αναμιγνύονται 250 mL μεθανόλης, 50 mL οξικού οξέος και 62.5 mL διαλύματος 1 % κυανού του Coomassie R-250. Ο όγκος ρυθμίζεται στα 500 mL.

10. Διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining Buffer)

Αναμιγνύονται 300 mL μεθανόλης, 50 mL οξικού οξέος και 650 mL νερού.

11. Διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων

Αναμιγνύονται 0.3028 gr Trizma base, 0.5 gr SDS, 5 mL γλυκερόλης, 1 mL μερκαπτοαιθανόλης και 5 mgr κυανού της βρωμοφαινόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 mL με νερό και το pH ρυθμίζεται στην τιμή 6.8. Το διάλυμα χωρίζεται ανά 0.5 mL σε πλαστικά σωληνάκια και φυλάσσονται στους -20 °C.

12. Διάλυμα Μεταφοράς (Transfer Buffer) {Διάλυμα 10x}

6 gr Tris-base, 28.8 gr Glycine και 20 mL διαλύματος SDS 10%. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 1200 mL.

Για διάλυμα 1x: 100 mL από 10x και 200 mL MeOH μέχρι τα 1000 mL.

5.4 Πειραματική εκτέλεση

Προετοιμάζεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης. Πλένονται οι γυάλινες πλάκες της συσκευής και τα spacers του kit με dH₂O και EtOH. Συναρμολογούνται σύμφωνα με τις οδηγίες στο kit.

Παρασκευή πηκτώματος διαδρομής (resolving gel)

Σε πλαστικό σωληνάριο coming των 50 mL αναμιγνύονται τα αντιδραστήρια με την σειρά που εμφανίζονται στον **πίνακα 3**.

Πίνακας 3: Σύσταση πηκτώματος διαδρομής 15% και πηκτώματος επιστοίβασης 5% για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΗΚΤΩΜΑ ΔΙΑΔΡΟΜΗΣ 10% (Resolving gel)	ΠΗΚΤΩΜΑ ΔΙΑΔΡΟΜΗΣ 12% (Resolving gel)	ΠΗΚΤΩΜΑ ΔΙΑΔΡΟΜΗΣ 15% (Resolving gel)	ΠΗΚΤΩΜΑ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΣΗΣ 5% (Stacking gel)
H ₂ O	4 mL	3,4 mL	2,5 mL	3,5 mL
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-base 1.5 M pH=8.8	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	-
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-base 0.5 M pH=6.8	-	-	-	3 mL
10% SDS	100μL	100μL	100 μL	80 μL
Acrylamide / Bis- acrylamide 30%	3,3 mL	4 mL	5 mL	1,3 mL
Υπερθειϊκόαμμώνιο (APS)	100μL	100μL	100 μL	80 μL
TEMED	10μL	10 μL	10 μL	8μL

Τα διαλύματα υπερθεϊκού αμμωνίου και TEMED είναι υπεύθυνα για την έναρξη του πολυμερισμού γι' αυτό και προστίθενται στο τέλος. Αμέσως μετά την προσθήκη των διαλυμάτων, μεταφέρουμε το μίγμα του πηκτώματος ανάμεσα στις δυο γυάλινες πλάκες της συσκευής ηλεκτροφόρησης έως ότου φτάσει σε επίπεδο 0.5 εκατοστού κάτω από το κτένι και 2 cm κάτω από το άνω όριο του μικρού τζαμιού. Στην συνέχεια προσθέτουμε νερό στην επιφάνεια του πολυακρυλαμιδίου για την προστασία του από την επαφή με τον αέρα. Το μίγμα αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά.

Παρασκευή πηκτώματος επιστοίβασης (stacking gel)

Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος διαδρομής, απομακρύνεται το νερό χρησιμοποιώντας διηθητικό χαρτί. Σε πλαστικό σωληνάριο corning αναμιγνύονται τα αντιδραστήρια για την παρασκευή του πηκτώματος επιστοίβασης, αφήνοντας πάλι τελευταία τα διαλύματα υπερθεϊκού αμμωνίου και TEMED, σύμφωνα με τον **πίνακα 3**. Αμέσως μετά την ανάμιξη το μίγμα επιστοιβάζεται προσεκτικά στο πήκτωμα διαδρομής και στη συνέχεια προστίθεται το κτένι για την δημιουργία των θέσεων. Το μίγμα αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μια περίπου 30 min. Μετά τον πολυμερισμό, αφαιρούνται οι γυάλινες πλάκες από την συσκευή στήριξης και τοποθετούνται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το κτένι αφαιρείται και στο χώρο ανάμεσα από τις γυάλινες πλάκες, στις θέσεις των δειγμάτων, αλλά και στον εξωτερικό χώρο του πηκτώματος, σε ύψος περίπου πέντε εκατοστών, τοποθετείται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer).

Προετοιμασία και τοποθέτηση δειγμάτων

Σε κατάλληλη ποσότητα δείγματος προστίθεται ποσότητα διαλύματος φόρτωσης σε πλαστικούς σωλήνες eppendorf. Ο μέγιστος όγκος που μπορεί να προστεθεί σε κάθε θέση είναι 20 μ L που αντιστοιχεί περίπου σε 80 μ g πρωτεΐνης. Τα δείγματα θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 100°C. Μετά το βρασμό τους, τα δείγματα τοποθετούνται με ειδικό ρύγχος μεγάλης απόληξης στις αντίστοιχες θέσεις. Στην πρώτη θέση συνήθως τοποθετούνται τα πρότυπα μοριακά βάρη. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 150 V για περίπου μια ώρα. Το πέρας της ηλεκτροφόρησης

διαπιστώνεται όταν το μέτωπο της βαφής φτάσει στο τέλος του πηκτώματος της διαδρομής.

Χρώση πρωτεϊνών του πηκτώματος

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι πλάκες αποσυνδέονται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το πήκτωμα μεταφέρεται σε γυάλινο δοχείο που περιέχει το διάλυμα βαφής χρωματισμού Coomassie R-250 και αφήνεται υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για μισή ώρα ή έως ότου οι πρωτεϊνικές ζώνες χρωματιστούν κυανές.

Αποχρωματισμός του πηκτώματος

Στη συνέχεια το πήκτωμα μεταφέρεται σε γυάλινο δοχείο που περιέχει το διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining Buffer) και αφήνεται υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έως ότου μείνουν χρωματισμένες στον επιθυμητό βαθμό μόνο οι πρωτεϊνικές ζώνες.

Στέγνωμα και μονιμοποίηση του πηκτώματος

Το ειδικό σελοφάν εμβαπτίζεται στο διάλυμα 12 % αιθανόλης για 2-3 λεπτά και απλώνεται πάνω σε ένα πλαίσιο. Το πήκτωμα τοποθετείται πάνω στο σελοφάν, στο κέντρο του πλαισίου, προσεκτικά έτσι ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα μεταξύ τους. Ένα ακόμη πλαίσιο στερεώνεται πάνω στο προηγούμενο με τη βοήθεια συνδετήρων. Τα πλαίσια με το πήκτωμα τοποθετούνται κάθετα και αφήνονται για 2-3 ημέρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή για 12-16 ώρες σε ρεύμα αέρα.

6. Διαφορική ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης χωρίς σήμανση

6.1 Αρχή της μεθόδου

Η πρωτεομική ανάλυση χωρίς σήμανση¹⁹⁷ είναι μία γρήγορη και χαμηλού κόστους μέθοδος φασματομετρίας μάζας (LC/MS), η οποία προσδιορίζει τη σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών σε δύο ή περισσότερα βιολογικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή δεν χρησιμοποιεί ισότοπα, τα οποία περιέχονται σε ενώσεις και σημαίνουν τις πρωτεΐνες, αλλά, βασίζεται στην καταμέτρηση των φασματικών κορυφών. Περιλαμβάνει την ανίχνευση των πεπτιδίων, την αντιστοίχισή τους με πεπτίδια από τα

πολλαπλά δεδομένα LC/MS και την επιλογή των πεπτιδίων που ξεχωρίζουν. Αρχικά, καταμετρώνται οι φασματικές κορυφές που εντοπίζονται για ένα συγκεκριμένο πεπτίδιο σε διαφορετικά βιολογικά δείγματα και στη συνέχεια ενσωματώνονται τα αποτελέσματα για όλα τα πεπτίδια των πρωτεϊνών που ποσοτικοποιούνται.

6.2 Υλικά-Συσκευές

1. Sodium dodecyl sulfate (SDS)
2. Tris/HCl
3. Διθειοθρεϊτόλη, DTT
4. LC/MS Grade H₂O
5. Ουρία
6. Ιωδοακεταμίδιο
7. Όξινο ανθρακικό αμμώνιο
8. Ακετονιτρίλιο
9. Μυρμηκικό οξύ
10. Φίλτρα φυγοκέντρησης (Mw cut-off 10 kDa, Sartorius)
11. Ψυχόμενη φυγόκεντρος για eppendorf
12. Θερμαινόμενος αναδευτήρας
13. Κυψελίδες χαλαζία
14. Συσκευή nanodrop

6.3 Διαλύματα

1. Διάλυμα λύσης των κυττάρων (lysis buffer)

Σε πλαστικό σωλήνα corning των 50 mL προστίθενται: 2 mL SDS 10%, 0.5 mL 1 M Tris/HCl και 0.077 g DTT σε 2.5 mL H₂O LC/MS Grade. Το διάλυμα φέρεται σε τελικό όγκο 5 mL με προσθήκη H₂O.

2. Διάλυμα ουρίας (UA)

Σε πλαστικό σωλήνα corning των 50 mL διαλύονται 14.4 g ουρίας 8 M σε 3 mL 1 M Tris/HCl pH 6.8. Το διάλυμα φέρεται σε τελικό όγκο 30 mL με προσθήκη H₂O.

3. Διάλυμα ιωδοακεταμιδίου (IAA)

Σε πλαστικό σωληνάκι τύπου erpendorf διαλύονται 15 mg ιωδοακεταμιδίου σε 1.5 mL διαλύματος ουρίας (UA).

4. Διάλυμα όξινου ανθρακικού αμμωνίου (Ammonium bicarbonate, Ambic)

Σε πλαστικό σωλήνα corning των 15 mL διαλύονται 30 mg Ambic σε 10 mL H₂O. Φυλάσσεται στους 4°C.

5. Διάλυμα θρυψίνης

Σε πλαστικό σωληνάκι τύπου erpendorf διαλύονται 2 μg θρυψίνης σε 160 μL διαλύματος Ambic. Φυλάσσεται στους -80°C.

6.4 Πειραματική εκτέλεση

Συλλογή και λύση των κυττάρων

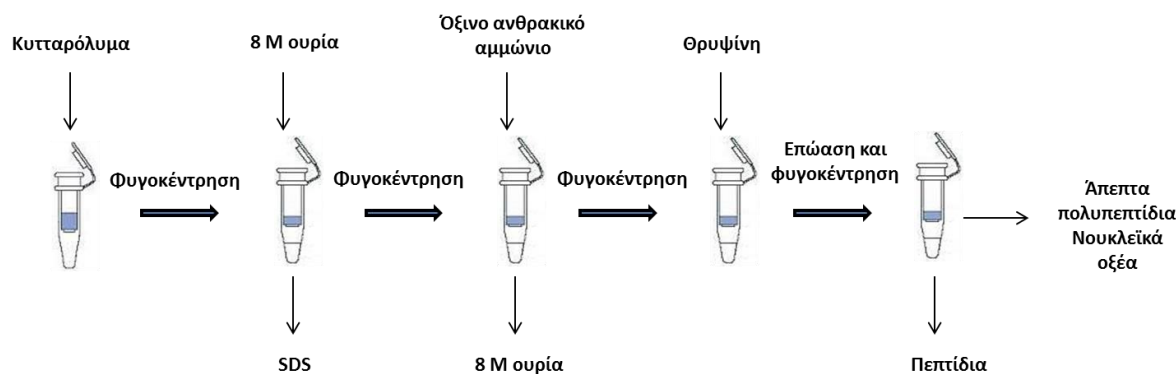
1. Συλλογή των κυττάρων και φυγοκέντρηση (1200 rpm, 5 λεπτά, 4°C).
2. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και πλύση του ιζήματος με παγωμένο διάλυμα PBS για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του θρεπτικού υλικού.
3. Φυγοκέντρηση (1200 rpm, 5 λεπτά, 4°C) και πλύση του ιζήματος με παγωμένο διάλυμα PBS.
4. Φυγοκέντρηση (1200 rpm, 5 λεπτά, 4°C) και απομάκρυνση του PBS.
5. Λύση των κυττάρων με διάλυμα (lysis buffer) που περιέχει 4% SDS, 100 mM DTT, 100 mM Tris HCl pH 7.6, προσθήκη 150 μL διαλύματος λύσης σε κάθε δείγμα και επώαση για πέντε λεπτά στους 95°C.
6. Ακολουθεί επώαση σε λουτρό υπερήχων για 30 λεπτά για θραυσματοποίηση του DNA και γενικότερα για τη διαλυτοποίηση του ιζήματος.
7. Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά σε 17000xg. Συλλογή των υπερκειμένων.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης σε πρωτεΐνη με την μέθοδο Bradford

Η μέθοδος έχει περιγραφεί στη σελίδα 57.

Πέψη πρωτεϊνών με τη μέθοδο FASP (Filter Aided Sample Preparation)

1. Προσθήκη 300 μL διαλύματος ουρίας (UA) στο πρωτεϊνικό δείγμα (20-100 μg). Το δείγμα τοποθετείται σε ειδικά φίλτρα που προσαρμόζονται με τη σειρά τους σε πλαστικά σωληνάκια τύπου eppendorf.
2. Φυγοκέντρηση στα 14.000xg για 30-45 λεπτά. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για τρεις συνεχόμενες φορές.
3. Προσθήκη 100 μL διαλύματος ιωδακεταμιδίου 0.05 M (IAA) και ανάδευση σε 600 rpm για 1 λεπτό. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται αλκυλιοποίηση για να μη σχηματίσουν ξανά δεσμούς οι κυστεΐνες. Τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία να επωαστούν για 30 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Φυγοκέντρηση στα 14,000xg για 20 λεπτά.
5. Έκπλυση του φίλτρου κάθε δείγματος με 150 μL UA και φυγοκέντρηση στα 14.000 xg για 30 λεπτά. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές.
6. Προσθήκη 150 μL διαλύματος Ambic για έκπλυση των φίλτρων των δειγμάτων και φυγοκέντρηση στα 14.000 xg για 30 λεπτά. Στην περίπτωση που το διάλυμα έκπλυσης δεν έχει απομακρυνθεί εντελώς από το φίλτρο, η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται. Το βήμα επαναλαμβάνεται δύο φορές.
7. Τα φίλτρα μεταφέρονται σε νέους σωλήνες τύπου eppendorf.
8. Προσθήκη 75 μL θρυψίνης συγκέντρωσης 12.5 ng/ μL σε 50 mM όξινου ανθρακικού αμμωνίου και ανάδευση στα 600 rpm για ένα λεπτό. Τα δείγματα επωάζονται στους 37°C overnight με ήπια ανάδευση.
9. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 12,000xg για 20 λεπτά.
10. Προσθήκη 100 μL H_2O σε κάθε δείγμα και ήπια ανάδευση στους 37°C για περίπου 40-60 λεπτά.
11. Φυγοκέντρηση στα 12,000xg για 20 λεπτά.
12. Εξάτμιση των δειγμάτων μέχρι ξηρού σε Speedvac για περίπου 3-4 ώρες.
13. Προσθήκη 50 μl διαλύματος 2% ακετονιτριλίου σε 0.1% μυρμηκικό οξύ και επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο υπερήχων για 3 λεπτά.
14. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πεπτιδίων από την απορρόφηση στα 280 nm σε συσκευή nanodrop (τοποθετώντας στην ειδική υποδοχή του οργάνου 1-2 μL δείγματος).



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση της πορείας FASP

Φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS)

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (Ultimate RSLC) σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Τα πεπτίδια διαχωρίστηκαν με την τεχνική της nano υγρής χρωματογραφίας πολύ υψηλής πίεσης (ultra high pressure nano LC) τροφοδοτούμενη από μια προστήλη συμύκνωσης C18, μια στήλη C18 (50 cm μήκους, 75 μ m ID, 2 μ m μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης, 100 Å, Acclaim PepMap RSLC, Thermo Scientific) και μια αντλία δύο καναλιών (RSLCnano, Thermo Scientific). Η κινητή φάση αποτελούνταν από τα διαλύματα A (2% ακετονιτρίλιο σε 0.1% μυρμηκικό οξύ) και B (80% ακετονιτρίλιο σε 0.1% μυρμηκικό οξύ). Αρχικά συμπυκνώνονταν στην προστήλη έως 2.5 μ g πεπτιδίων με ταχύτητα ροής 5 μ l/min για 10 min και στη συνέχεια κλασματώνονταν στη nano στήλη με ταχύτητα ροής 300 nl/min για 8 h με γραμμική βαθμίδωση εκλουστικού διαλύματος B από 4% έως 40%. Κατά την κλασμάτωση των πεπτιδίων η στήλη ήταν τοποθετημένη σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 35°C. Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με μονάδα ανάλυσης φασμάτων μάζας. Σε κάθε σάρωση στο φασματογράφο μάζας LTQ Orbitrap XL τα έξι πιο άφθονα και πολλαπλά φορτισμένα ιόντα (data dependent acquisition) επιλέχθηκαν και υπέστησαν θραυσματοποίηση με CID (collision induced dissociation). Το εύρος σάρωσης ήταν από 350 έως 2000 m/z. Ο αυτόματος έλεγχος εισόδου στο φασματογράφο ορίστηκε στα 10^6 ιόντα. Τα φάσματα ανακτήθηκαν με διακριτική ικανότητα 60K (για m/z 400). Τα θραύσματα-ιόντα ανιχνεύονται στη συνέχεια στο φασματογράφο μάζας τύπου ιοντικής παγίδας. Τα πρόδρομα ιόντα αποκλείονται στη συνέχεια δυναμικά για 90 sec από επαναλαμβανομένη θραυσματοποίηση.

Ανάλυση των φασμάτων

Η αναζήτηση των φασμάτων μέσω της FASTA βάσης δεδομένων του πρωτεώματος του *Homo Sapiens* πραγματοποιήθηκε με αυστηρά κριτήρια, όπως την ειδική πέψη της πρωτεάσης θρυψίνη επιτρέποντας μέχρι δύο αστοχίες εντός ενός πεπτιδίου. Το όριο εμπιστοσύνης της μάζας του πρόδρομου πεπτιδίου ορίστηκε όχι μεγαλύτερο των 10 ppm και δυναμικές τροποποιήσεις ήταν η πιθανή οξείδωση του καταλοίπου της μεθειονίνης, της ακετυλίωσης του αμινοτελικού άκρου του πεπτιδίου, της απαμίδωσης του ασπαρτικού οξέος και του γλουταμικού οξέος. Όταν υπάρχει επαρκής αριθμός επαναλήψεων (βιολογικών και τεχνικών) για τα δείγματα, προχωρούμε σε ανάλυση με το λογισμικό MaxQuant και Perseus το οποίο παρέχεται και υποστηρίζεται δωρεάν από το Max Planck στη Γερμανία. Το MaxQuant προσδιορίζει όχι μόνο το spectral count αλλά μας δίνει την ποσότητα των πρωτεϊνών βάση των αθροισμάτων των εμβαδών όλων των πεπτιδίων. Επίσης, με ειδικούς αλγόριθμους πραγματοποιεί «κανονικοποίηση» των δειγμάτων υπό σύγκριση ώστε να είναι άμεσα συγκρίσιμα μεταξύ τους. Η ποσοτική τιμή για κάθε πρωτεΐνη δίνεται με την μορφή LFQ (Label Free Quantification). Η ανάλυση παίρνει περισσότερο χρόνο αλλά δίνει πιο πλήρη αποτελέσματα. Επίσης, με το πέρας της ανάλυσης κάνουμε και ένα ποιοτικό έλεγχο των αποτελεσμάτων μας με ένα ειδικό λογισμικό, το οποίο ονομάζεται CreateQC.

7. Απομόνωση ολικού RNA κυττάρων A549

7.1 Αρχή της μεθόδου

Η απομόνωση RNA είναι μια ευαίσθητη μέθοδος, κρίσιμη για την εκτέλεση διάφορων πειραμάτων μοριακής βιολογίας. Κατά τη διαδικασία απομόνωσης, είναι σημαντικό να αποφευχθεί η αποδόμηση του RNA. Τα κύτταρα λύνονται με επώαση σε ένα διάλυμα που περιέχει μεγάλες ποσότητες χαοτροπικών ιόντων. Αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης απενεργοποιεί αμέσως RNάσες και δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες δέσμευσης, οι οποίες ευνοούν την προσρόφηση του RNA στη μεμβράνη πυριτίου. Το DNA, το οποίο είναι, επίσης, δεσμευμένο στη μεμβράνη πυριτίου, απομακρύνεται από ένα διάλυμα rDNάσης, το οποίο εφαρμόζεται απευθείας στη μεμβράνη πυριτίου. Πλύσεις με δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα αφαιρούν τα

άλατα, τους μεταβολίτες και τα μακρομοριακά κυτταρικά συστατικά. Το καθαρό RNA εκλύεται τελικά υπό συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος με H₂O απαλλαγμένο από RNάσες.

7.2 Υλικά - Συσκευές

1. Total RNA Isolation Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel)
2. 96-100% αιθανόλη
3. Μερκαπτοαιθανόλη (2-mercaptoethanol, C₂H₆OS, FW:78.13, R:23/24/25, S:45-26-36/37/39-23, Cat. No. M-3148, Sigma)
4. Αποστειρωμένα RNase-free eppendorfs των 1.5 mL
5. Αποστειρωμένα RNase-free tips
6. Πιπέττες
7. Φυγόκεντρος για eppendorfs (MIKRO 20 Hettich zentrifugen)

7.3 Πειραματική εκτέλεση

Η απομόνωση του RNA από τα δείγματα κυττάρων A549 περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Απομόνωση κυττάρων: 6×10^6 κύτταρα απομονώνονται με φυγοκέντρηση (500g, 10 min) σε αποστειρωμένα, RNAase-free πλαστικά σωληνάκια. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης απορρίπτεται.
2. Λύση των κυττάρων: προσθέτουμε 350μl RA1 (από kit) και 3.5μl β-μερκαπτοαιθανόλη στο ίζημα των κυττάρων. Αναδεύουμε σε vortex.
3. Διήθηση των λυμένων κυττάρων: Μεταφέρουμε το ίζημα στο *NucleoSpin Filter Unit* (από kit). Τοποθετούμε το *NucleoSpin Filter Unit* σε ένα σωληνάκι συλλογής και φυγοκεντρούμε για 1min στα 11,000 x g (13000 rpm).
4. Καθορισμός συνθηκών πρόσδεσης RNA: αφαιρούμε το *NucleoSpin Filter Unit* και προσθέτουμε 350μl αιθανόλη (70%) στο σωληνάκι συλλογής. Ακολουθεί καλή ανάδευση.

5. Πρόσδεση RNA: Τοποθετούμε το *NucleoSpin RNAII Column* (από kit) σε ένα σωληνάκι φυγοκέντρησης των 2ml (από kit). Αδειάζουμε το ίζημα στο *NucleoSpin RNAII column* και φυγοκεντρούμε για 30sec στα 11,000 x g (13000 rpm). Τοποθετούμε το *NucleoSpin RNAII column* πάνω σε καινούργιο αποστειρωμένο σωληνάκι των 2ml.
6. Αφαλάτωση μεμβράνης silica: προσθέτουμε 350μl MDB (Membrane Desalting Buffer, από kit) και φυγοκεντρούμε για 60 sec στα 11,000 x g (13000 rpm).
7. Πέψη DNA: ετοιμάζουμε DNase reaction mixture σε αποστειρωμένο σωληνάκι φυγοκέντρησης και προσθέτουμε 10μl reconstituted rDNase (από kit) και 90μl Reaction buffer for rDNase (από kit). Προσθέτουμε το μίγμα στο *NucleoSpin RNAII column* και το επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
8. 1^η πλύση – ξήρανση μεμβράνης: προσθέτουμε 200μl buffer RA2 (από kit) στο *NucleoSpin RNAII column*. Φυγοκεντρούμε για 30 sec στα 11,000 x g (13000 rpm), τοποθετούμε το *NucleoSpin RNAII column* σε καινούργιο αποστειρωμένο σωληνάκι των 2ml.
9. 2^η πλύση: Προσθέτουμε 600μl buffer RA3 (από kit) στο *NucleoSpin RNAII column*. Φυγοκεντρούμε για 30 sec στα 11,000 x g (13000 rpm).
10. 3^η πλύση: Προσθέστε 250μl buffer RA3 (από kit) στο *NucleoSpin RNAII column*. Φυγοκεντρούμε για 2 min στα 11,000 x g (13000 rpm) μέχρι να στεγνώσει τελείως το *NucleoSpin RNAII column*.
11. Τοποθετούμε το *NucleoSpin RNAII column* πάνω σε νέο σωληνάκι μικροφυγοκέντρησης nuclease free (από kit).
12. Έκλυση καθαρού RNA: Διαχωρίζουμε το RNA με έκλυση με 60μl H₂O(RNase free, από kit) και φυγοκεντρούμε για 1min στα 11,000 x g (13000 rpm). Το RNA που εκλύεται μετά από αυτή τη διαδικασία είναι περίπου 60 μg.

8. Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος καθαρότητας RNA

8.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση, καθώς και τον προσδιορισμό της καθαρότητας δειγμάτων RNA είναι η φασματοφωτομετρική ανάλυση, η οποία βασίζεται στην αρχή του ότι το RNA απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (260 nm). Ένα μέρος της ακτινοβολίας διαπερνά το δείγμα, ενώ ένα άλλο απορροφάται από αυτό. Όσο περισσότερη ακτινοβολία απορροφάται από το δείγμα, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του RNA στο δείγμα και τόσο μεγαλύτερη η οπτική πυκνότητα (OD).

8.2 Συσκευές

1. Eppendorfs των 1.5 mL
2. Γυάλινες κυψελίδες
3. Φωτόμετρο SHIMADJU UV-1601

8.3 Πειραματική εκτέλεση

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του απομονωμένου RNA ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. Ποσότητα ίση με 10 μ l από το απομονωμένο RNA αναμιγνύεται με 990 μ l νερό (RNase free) σε σωληνάκι eppendorf (αραίωση 100 φορές).
2. Χρησιμοποιούμε 2 γυάλινες κυψελίδες του 1 ml, ειδικές για φωτομέτρηση στο υπεριώδες. Στη μία κυψελίδα τοποθετούμε το αραιωμένο διάλυμα RNA και στην άλλη νερό.
3. Μετράμε την απορρόφηση στα 260nm (όπου απορροφούν μέγιστα τα νουκλεοτίδια), αφού προηγουμένως έχουμε μηδενίσει σε αυτό το μήκος κύματος με την κυψελίδα που περιέχει το νερό.
4. Επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία στα 280 nm (όπου απορροφούν μέγιστα οι πρωτεΐνες), χωρίς να αδειάσουμε τις δυο κυψελίδες, αρχικά μηδενίζοντας με το νερό και στη συνέχεια μετρώντας την απορρόφηση.
5. Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση του διαλύματος RNA θεωρώντας ότι τα 40 μ g RNA/ ml δίνουν απορρόφηση ίση με τη μονάδα στα 260nm, με βάση τον ακόλουθο τύπο:

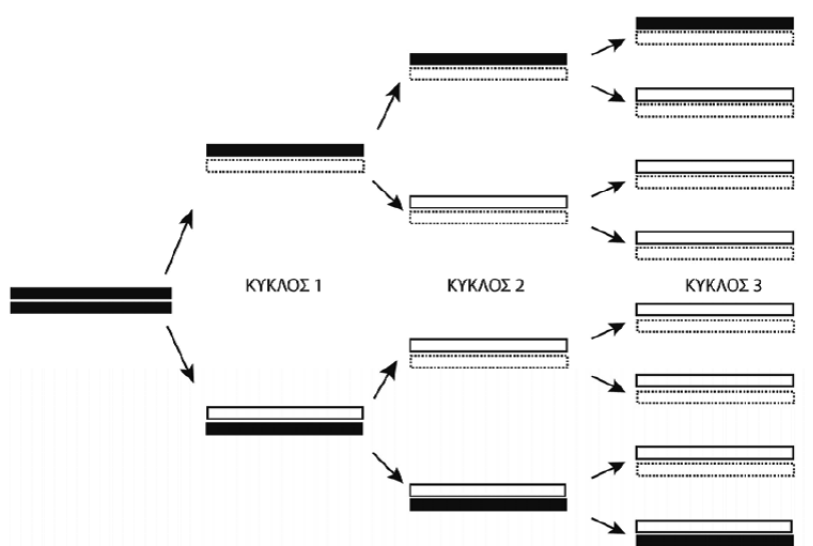
$$\text{Περιεκτικότητα απομονωμένου RNA (}\mu\text{g/mL)} = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Αραίωση}$$

Ο λόγος $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ δίνει πληροφορίες για την καθαρότητα του δείγματος και θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος ή ίσος του 1.7 (με ιδανικό 1.9).

9. Αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase-PCR ή RT-PCR)

9.1 Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (**P**olymerase **C**hain **R**eaction ή **PCR**) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον εκθετικό πολλαπλασιασμό μικρών αλληλουχιών DNA από ένα μεγαλύτερο μόριο δίκλωνου DNA, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η PCR απαιτεί τη χρήση ενός ζεύγους εκκινητών, το καθένα περίπου 20 νουκλεοτίδια σε μήκος, που είναι συμπληρωματικά προς μία αλληλουχία που ορίζεται σε κάθε μία από τις δύο έλικες του DNA. Οι εκκινητές επιμηκύνονται με τη δράση μιας DNA πολυμεράσης παρουσία των τεσσάρων τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων, έτσι ώστε ένα αντίγραφο να κατασκευάζεται από την καθορισμένη αλληλουχία. Οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τη σύνθεση του DNA. Αυτό οδηγεί σε λογαριθμική αύξηση.



Εικόνα 22: Πολλαπλασιασμός τμημάτων DNA σε PCR αντίδραση. Μετά το τέλος του 1ου κύκλου το δίκλωνο DNA έχει διπλασιαστεί, μετά το τέλος του 2ου κύκλου έχει

τετραπλασιαστεί, μετά το τέλος του 3ου κύκλου έχει οκταπλασιαστεί, ακολουθώντας εκθετική αύξηση της μορφής $2n$, όπου n ο αριθμός των κύκλων.

Σε κάθε κύκλο της διαδικασίας πολλαπλασιασμού, είναι αναγκαίο να αυξηθεί η θερμοκρασία στους 95°C περίπου για να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA. Ωστόσο, σε μια τόσο υψηλή θερμοκρασία τα συνήθη ένζυμα συνήθως μετουσιώνονται και απενεργοποιούνται. Ένα σημαντικό βήμα προόδου ήταν η ανακάλυψη μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης (*Taq* πολυμεράση) που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* που ζει σε περιβάλλον με υψηλή θερμοκρασία. Ως εκ τούτου δεν είναι αναγκαίο να προστεθεί νέα πολυμεράση σε κάθε γύρο αντιγραφής. Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis στις αρχές της δεκαετίας του 1980^{198,199,200} και θεωρήθηκε πολύ σημαντική για την προαγωγή της επιστήμης, ώστε το 1993 του απονεμήθηκε το βραβείο Nobel Χημείας.

Προκειμένου να μετρηθεί αγγελιοφόρο RNA (mRNA), η μέθοδος της PCR μπορεί να επεκταθεί χρησιμοποιώντας το ένζυμο **αντίστροφη μεταγραφάση** για να μετατρέψει RNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) το οποίο στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται με PCR και αναλύεται με ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αгарόζης. Αναλυτικά τα στάδια περιλαμβάνουν:

- Το mRNA αντιγράφεται σε cDNA με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή. Το μίγμα της PCR περιλαμβάνει μια θερμοσταθερή πολυμεράση (όπως *Taq* πολυμεράση), ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο ενδιαφέροντος, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια και ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με ιόντα μαγνησίου τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης.
- Το cDNA αποδιατάσσεται σε 94°C περίπου, έτσι ώστε οι δύο κλώνοι να διαχωριστούν.
- Με τη μείωση της θερμοκρασίας στους 50 έως 60°C , οι δεσμοί υδρογόνου αποκαθίστανται μεταξύ των συμπληρωματικών αλληλουχιών των εκκινητών με τον αποδιαταγμένο κλώνο. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται υβριδισμός ή αναδιάταξη των εκκινητών.
- Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και η θερμοανθεκτική *Taq* DNA πολυμεράση ξεκινάει την ενίσχυση της συμπληρωματικής αλληλουχίας. Οι αρχικές δύο αλληλουχίες γίνονται τέσσερις.

- Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα, το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητών.
- Μετά από 30 με 40 κύκλους ενίσχυσης του cDNA, τα προϊόντα της αντίδρασης συνήθως αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης το οποίο περιέχει τη φθορίζουσα ένωση «βρωμιούχο αιθίδιο» ενώ οι ζώνες γίνονται ορατές σε υπεριώδες φως.

9.2 Υλικά-Συσκευές

1. Αποστειρωμένα σωληνάκια για PCR (Certified PCR Performance Tested SARSTEDT 72.737.002)
2. iTaq Universal SYBR Green one-step kit (Biorad 172-5150)
3. Primer PCYT1A (Hs-PCYT1A-1-SG Qiagen QT 00051835)
4. Primer GAPDH (Hs-GAPDH-2-SG Qiagen QT 01192646)
5. Εκμαγείο RNA (RNA template)
6. Mini Opticon Real time PCR System (Biorad)



Εικόνα 23: Συσκευή Real time PCR

9.3 Πειραματική εκτέλεση

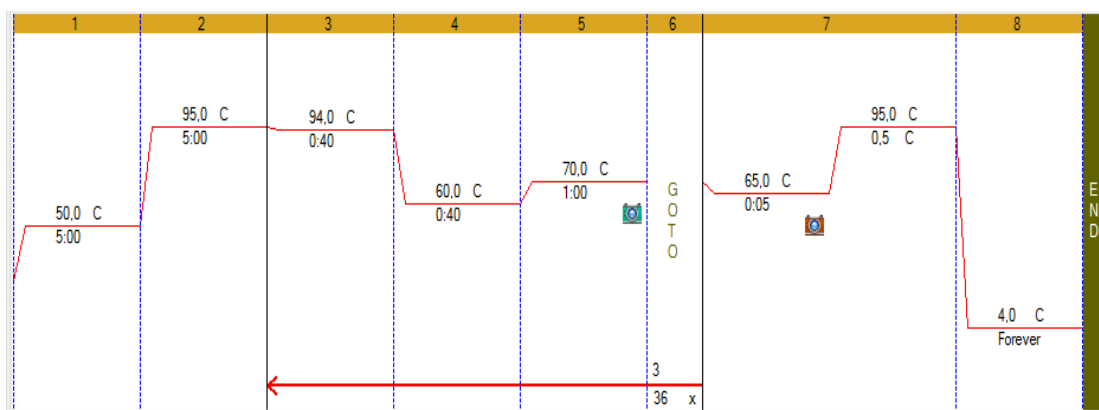
Για την παρασκευή cDNA χρησιμοποιήθηκαν από κάθε δείγμα 100 ng RNA. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 20 μ l. Σε κάθε σωληνάκι προστέθηκαν 2 μ L ζεύγος εκκινητών, 10 μ L μίγματος πολυμεράσης και 0.25 μ L μεταγραφάσης. Η ανάμιξη των παραπάνω ποσοτήτων γίνεται στους 4°C για την αποφυγή εκκίνησης των ενζυμικών αντιδράσεων μεταγραφής και πολλαπλασιασμού. Συνιστάται η παρασκευή 2 αρχικών μιγμάτων (master mix) ένα για κάθε εκκινητή πριν το διαμοιρασμό σε κάθε σωλήνα. Στο τέλος προστέθηκαν τα RNA αραιωμένα με το νερό.

Παράλληλα ετοιμάστηκαν δείγματα ελέγχου:

- 1) Αρνητικό δείγμα ελέγχου (χωρίς RNA): ελέγχουμε τα αντιδραστήριά μας για επιμόλυνση.
- 2) Αρνητικό δείγμα ελέγχου χωρίς αντίστροφη μεταγραφάση: ελέγχουμε την επιμόλυνση του δείγματος RNA με DNA.

Οι σωλήνες κλείνονται, το περιεχόμενό τους αναμιγνύεται σε κυκλοαναδευτήρα (vortex) και αμέσως τοποθετούνται στις ανάλογες θέσεις στη συσκευή PCR.

Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρωτόκολλο κατά το οποίο ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμίζεται για 5 min στους 50°C για την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής με ενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης και στη συνέχεια 5 min στους 95°C για την ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης και απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης, 40 sec στους 94°C για τη μετουσίωση των κλώνων του σχηματιζόμενου cDNA, 40 sec στους 60°C και 1 min στους 70°C για την επέκταση των κλώνων. Πραγματοποιήθηκαν 36 κύκλοι ενίσχυσης του cDNA. Οι αλληλουχίες των cDNA αναλύθηκαν ημιποσοτικά έχοντας ως γονίδιο αναφοράς την δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH), η οποία είναι ένα μόριο που εκφράζεται σταθερά από τα κύτταρα και τους ιστούς (housekeeping gene).



Εικόνα 24: Σχηματικό πρωτόκολο θερμοκυκλοποιητή.

10. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR ανάλυσης σε πήκτωμα αγαρόζης

10.1 Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική που διαχωρίζει τα μόρια του DNA κατά μέγεθος με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου κατά μήκος ενός πηκτώματος αγαρόζης. Η βασική αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο ότι τα μόρια DNA είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω των φωσφορικών ομάδων του σκελετού και κατά την ηλεκτροφόρηση μετατοπίζονται προς το θετικό πόλο του πηκτώματος. Η απόσταση που διανύει ένα τμήμα DNA σε πήκτωμα αγαρόζης είναι αντιστρόφως ανάλογη του μήκους του. Στα πηκτώματα αγαρόζης προστίθεται μια φθορίζουσα χρώση το βρωμιούχο αιθίδιο. Αυτή η χρωστική παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων, επιτρέποντας τα μόρια DNA να είναι ορατά στο υπεριώδες φως. Η ένταση της ζώνης είναι ενδεικτική της συγκέντρωσης των μορίων ίδιου μεγέθους.

10.2 Υλικά-Συσκευές

1. Αγαρόζη (Merck K37124401)
2. Trizma Base ($C_4H_{11}NO_3$, MW:121.1, Cat. No. T-1503, Sigma)
3. Οξικό Οξύ (Acetic acid glacial, MW:60.05, R:10-35, S:23-26-45, Carlo Erba)
4. EDTA

5. Gel loading Dye Blue 6x (Biolabs B70215)
6. DNA ladder (Biolabs N32315)
7. Συσκευή ηλεκτροφόρησης (omniPAGE multiSUB Cleaver Scientific Ltd)
8. 3UV Transilluminator

10.3 Διαλύματα

1. Ρυθμιστικό διάλυμα 50X TAE

- 242 g Tris Base
- 57.1 mL οξικό οξύ
- 100 mL 500 mM EDTA, pH 8.0
- H₂O μέχρι τελικό όγκο 1 lt

2. Διάλυμα 10 mg/mL βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

3. 1.2% πήκτωμα αγαρόζης

- 0.6 gr αγαρόζης
- 50 mL 1X TAE
- 5 μ L 10 mg/mL EtBr

10.4 Πειραματική πορεία

Ο έλεγχος των προϊόντων της RT-PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2 % (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris – οξικό οξύ - EDTA, pH 8.0 (TAE), που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (2,5 μ L βαφής / 50 mL TAE).

Τα δείγματα αναμείχθηκαν με ποσότητα βαφής φόρτωσης των δειγμάτων, όπου η συνιστώμενη ποσότητα ενδείκνυται σε ένα μέρος βαφής για κάθε πέντε μέρη διαλύματος DNA.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο 50 V για 30 min, ενώ τόσο η άνοδος όσο και η κάθοδος ήταν βυθισμένες σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M TAE. Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR αντίδρασης έγινε με τοποθέτηση των πηκτωμάτων πάνω σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΚΛΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΣΗΣ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ CCTα ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ A549

Στην παρούσα εργασία εστιάσαμε κυρίως στη διερεύνηση της επίδρασης μηχανικών τάσεων στο ρυθμιστικό ένζυμο του μεταβολισμού της φωσφατιδυλοχολίνης, τη CCTα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μια συγκριτική μελέτη μεταξύ της γονιδιακής και της πρωτεϊνικής έκφρασης του ενζύμου αυτού. Η ποσοτικοποίηση του ομογενοποιημάτος των κυττάρων έγινε με βάση την περιεκτικότητά τους σε ολική πρωτεΐνη.

1.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης κατά Bradford

Σε ομογενοποιημάτα κυττάρων A549 πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου τους μετά από εφαρμογή δύο συνθηκών κυκλικού stretch, 15% και 25% για 1 h, 6 h και 24 h. Διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης κυμάνθηκαν από 691 ως 725 $\mu\text{g/mL}$ στις διαφορετικές συνθήκες μηχανικής διάτασης, χωρίς στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ τους, ούτε και με τα κύτταρα αναφοράς, τα οποία δεν είχαν υποστεί μηχανική διάταση (**Πίνακας 4**).

Πίνακας 4: Ολική πρωτεΐνη ομογενοποιημάτων κυττάρων A549 σε διάφορες συνθήκες διάτασης συναρτήσει του χρόνου. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο (MO) $\pm$ SEM 3 διαφορετικών πειραμάτων. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

Δείγματα	Πρωτεΐνη ($\mu\text{g/mL}$)
control	700 $\pm$ 10
stretch 15%, 1 h	725 $\pm$ 11
stretch 15%, 6 h	721 $\pm$ 21
stretch 15%, 24 h	708 $\pm$ 14
stretch 25%, 1 h	691 $\pm$ 24

stretch 25%, 6 h	722 ± 25
stretch 25%, 24 h	713 ± 19

1.2 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του ρυθμιστικού ενζύμου CCTα

Η CTP:-φωσφοχολινο-κυτιδυλοτρανσφεράση α (CCTα), το ρυθμιστικό ένζυμο βιοσύνθεσης της PC, κωδικεύεται από το γονίδιο *PCYT1A*. Η μελέτη της έκφρασης αυτού του γονιδίου πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ποσοτικής RT-PCR, χρησιμοποιώντας ως αναφορά το γονίδιο *GAPDH*. Με σκοπό τη λεπτομερέστερη μελέτη του ενζύμου, εξετάσαμε τρεις χρονικές στιγμές, δύο μεγεθών κυκλικής μηχανικής διάτασης. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν ήταν οι εξής: control, κυκλικό stretch 15% και κυκλικό stretch 25%. Οι χρονικές διάρκειες της μηχανικής παραμόρφωσης ήταν: 1h, 6h και 24h.

1.2.1 Αποτελέσματα καθαρότητας και περιεκτικότητας RNA

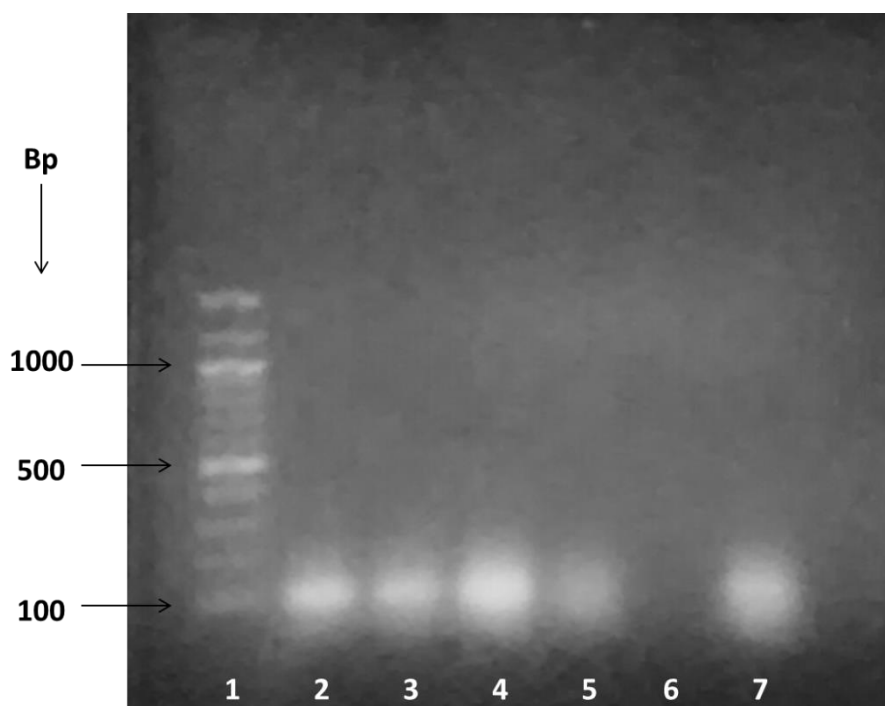
Αρχικά έγινε απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων A549 από κάθε συνθήκη μετά την εφαρμογή μηχανικής διάτασης και ακολούθησε η μέτρηση των απορροφήσεων τους στα 260 nm, όπου απορροφούν μέγιστα τα νουκλεοτίδια, και στα 280 nm, όπου απορροφούν μέγιστα οι πρωτεΐνες, για τον προσδιορισμό της καθαρότητας και περιεκτικότητάς τους. Η καθαρότητα υπολογίστηκε από το λόγο των απορροφήσεων (260 nm/280 nm) και κυμάνθηκε μεταξύ 1.629 και 1.734. Τα δείγματά μας ήταν αρκετά καθαρά, διότι οι μετρήσεις μας πλησίασαν το αποδεκτό όριο (≥ 1.7). Η περιεκτικότητα πυκνού RNA (ng/mL) για κάθε συνθήκη υπολογίστηκε από το γινόμενο $A_{260} \times 40 \times$ αραιώση, όπου τα 40 $\mu\text{g RNA/mL}$ δίνουν απορρόφηση ίση με τη μονάδα στα 260 nm. Όλα τα δείγματά μας αραιώθηκαν 100 φορές. Οι περιεκτικότητες κυμάνθηκαν μεταξύ 790 και 2152 ng/mL, χωρίς στατιστικά σημαντικές μεταβολές και απεικονίζονται στον **Πίνακα 5**.

Πίνακας 5: Προσδιορισμός καθαρότητας και περιεκτικότητας πυκνού και αραιωμένου RNA. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο (MO) $\pm$ SEM 3 διαφορετικών πειραμάτων. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

Δείγματα	Καθαρότητα (260 nm/280 nm)	Περιεκτικότητα πυκνού RNA (ng/mL)	Περιεκτικότητα αραιωμ. RNA (μg/mL)
control	1.647 $\pm$ 0.046	1358 $\pm$ 122	13.58 $\pm$ 1.22
stretch 15%, 1 h	1.629 $\pm$ 0.033	858 $\pm$ 167	8.58 $\pm$ 1.67
stretch 15%, 6 h	1.648 $\pm$ 0.015	808 $\pm$ 68	8.08 $\pm$ 0.68
stretch 15%, 24 h	1.637 $\pm$ 0.030	790 $\pm$ 93	7.90 $\pm$ 0.93
stretch 25%, 1 h	1.734 $\pm$ 0.017	1928 $\pm$ 28	19.28 $\pm$ 0.28
stretch 25%, 6 h	1.644 $\pm$ 0.049	1472 $\pm$ 40	14.72 $\pm$ 0.40
stretch 25%, 24 h	1.686 $\pm$ 0.084	2152 $\pm$ 188	21.52 $\pm$ 1.88

1.2.2 Έλεγχος προϊόντων της RT-PCR

Αφού διαπιστώσαμε ότι τα παρασκευάσματά μας είχαν την απαιτούμενη καθαρότητα και ποσότητα RNA για την ολοκλήρωση των πειραμάτων μας ελέγξαμε τη λειτουργία των εκκινητών *PCYT1A* με ένα προκαταρκτικό πείραμα RT-PCR επιλέγοντας τυχαία δείγματα DNA που προέκυψαν. Για να δούμε και να επιβεβαιώσουμε το προϊόν της RT-PCR, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (**Γράφημα 1**). Σε μία θέση του πηκτώματος φορτώθηκε δείγμα με ζεύγος εκκινητών *GAPDH*, το οποίο επιλέξαμε ως γονίδιο αναφοράς. Οι ζώνες έγιναν ορατές σε λάμπα UV.

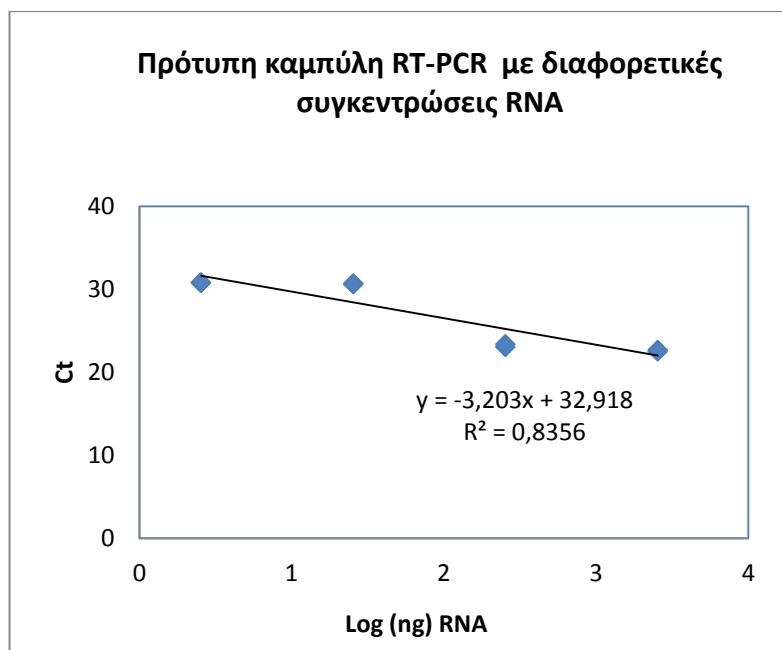


Γράφημα 1: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντων RT-PCR: **1:** ladder, **2:** δείγμα control (*PCYT1A*), **3:** δείγμα stretch 15%, 24 h (*PCYT1A*), **4:** δείγμα stretch 25%, 24 h (*PCYT1A*), **5:** δείγμα stretch 15%, 24 h (χωρίς εκκινητές), **6:** χωρίς RNA (*PCYT1A*), **7:** δείγμα control (*GAPDH*).

Το προϊόν της RT-PCR ανιχνεύτηκε στα 99 bp (ζεύγη βάσεων), όπως αναμενόταν.

1.2.3 Απόδοση της αντίδρασης (μέθοδος Pfaffl)

Επόμενο βήμα ήταν η εύρεση της απόδοσης της αντίδρασης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *PCYT1A*. Για ένα τυχαίο δείγμα, στην προκειμένη περίπτωση το control, ετοιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις που να διαφέρουν μεταξύ τους σε πολλαπλάσια του 10 (1, 10, 100, 1000 ng RNA). Ο συντελεστής απόδοσης, *E*, υπολογίζεται αν γνωρίζουμε την κλίση της καμπύλης *C_q* (αριθμός κύκλων) συναρτήσει του λογαρίθμου των διαφορετικών συγκεντρώσεων RNA (**Γράφημα 2**). Η απόδοση υπολογίζεται από την εξής εξίσωση: **$E = 10^{(-1/\text{κλίση})}$** .



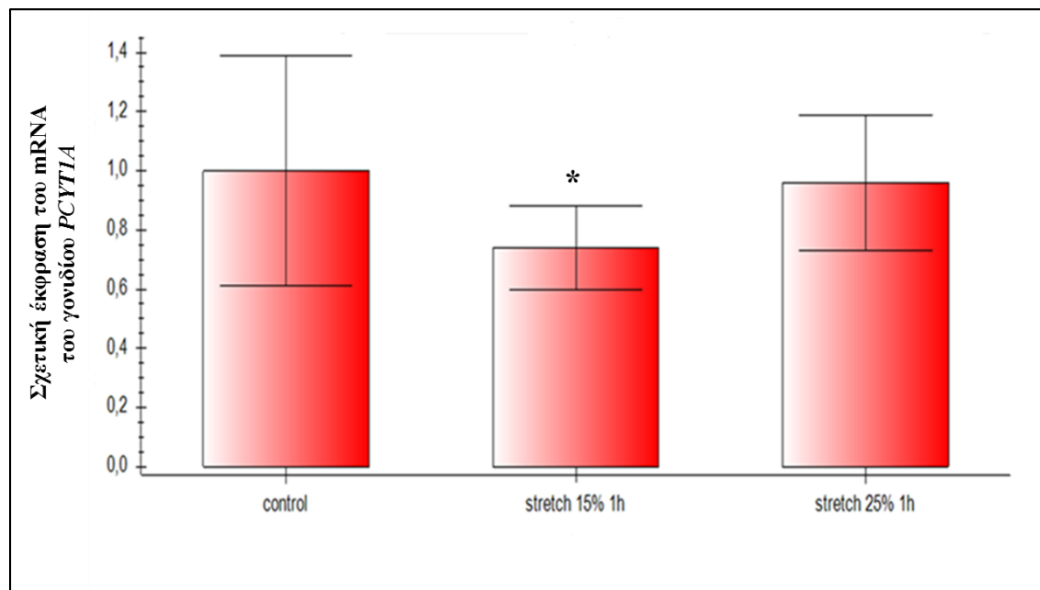
Γράφημα 2: Πρότυπη καμπύλη RT-PCR με διαφορετικές συγκεντρώσεις RNA από δείγμα control κυττάρων A549 συναρτήσει μέσου Ct διπλών δειγμάτων.

Από την κλίση της καμπύλης υπολογίστηκε η απόδοση, $E = 2.0521$, που σημαίνει ότι η ποσότητα του DNA σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Το DNA αυξάνεται περίπου από 1 σε 2 σε κάθε κύκλο, έτσι ο συντελεστής αύξησης κάθε κύκλου είναι 2.

1.2.4 Προσδιορισμός της έκφρασης του γονιδίου *PCYT1A* στα κύτταρα A549

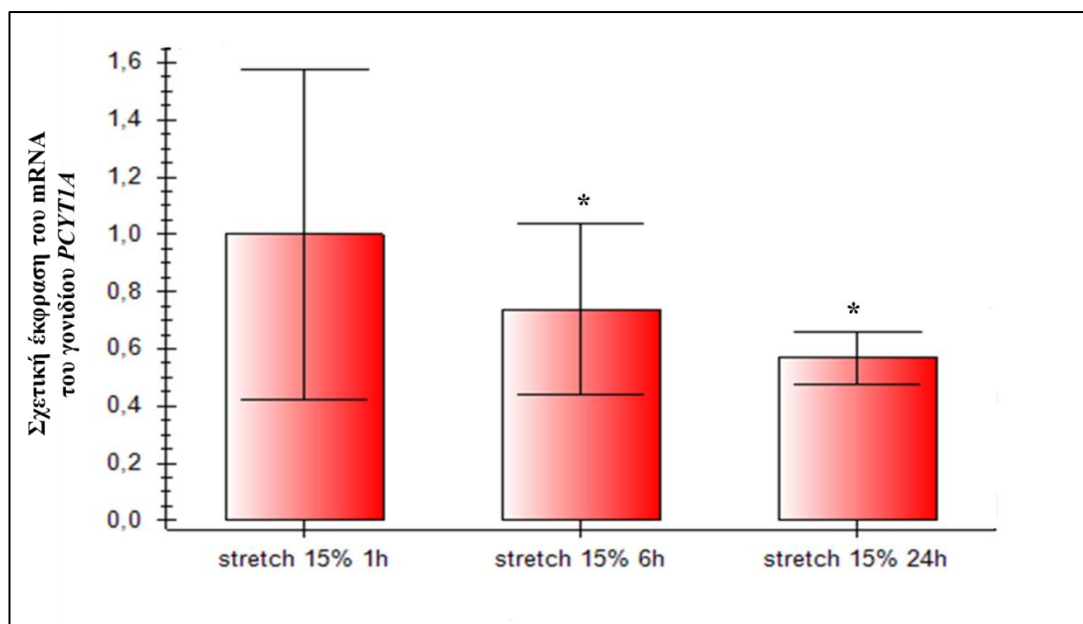
Για τον προσδιορισμό της έκφρασης του γονιδίου *PCYT1A* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ποσοτικής RT-PCR. Η μέθοδος περιλαμβάνει αρχικά τη μετατροπή του RNA των δειγμάτων σε cDNA με τη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Στη συνέχεια ακολουθεί μετουσίωση του DNA-στόχου, πρόσδεση των εκκινητών στους κλώνους του DNA-στόχου και σύνθεση νέων κλώνων DNA από το ένζυμο DNA πολυμεράση. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η *GAPDH*.

Αρχικά, έγινε σύγκριση του δείγματος control με τα δύο μεγέθη μηχανικής διάτασης, 15% και 25%, διάρκειας 1 h. Παρατηρήσαμε μία μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γονιδίου μετά από μηχανική διάταση 15%, 1 h σε σχέση με το control (stretch 15%, 1 h vs control: 0.740 ± 0.141 vs 1 ± 0.386), ενώ δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στο επίπεδο έκφρασης του γονιδίου μετά από μηχανική διάταση 25%, 1h σε σύγκριση με την κατάσταση ηρεμίας. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο **Γράφημα 3**.



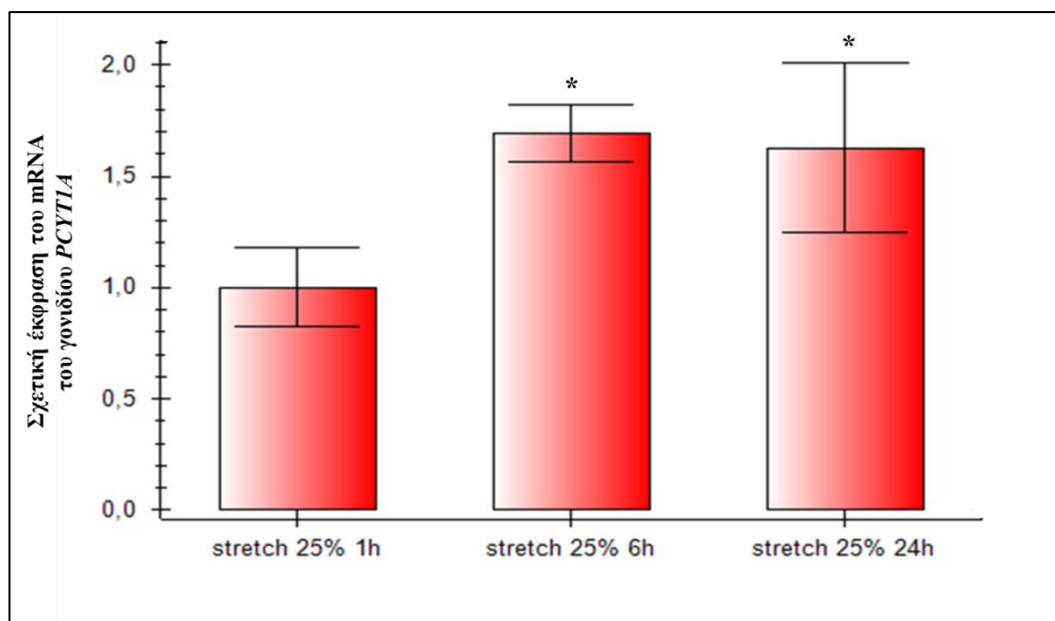
Γράφημα 3: Έκφραση του mRNA του γονιδίου *PCYT1A* σε κύτταρα A549 που υποβλήθηκαν σε μηχανική διάταση 15% και 25% διάρκειας 1 h. Τα επίπεδα έκφρασης κάθε mRNA κανονικοποιήθηκαν ως προς εκείνα του γονιδίου αναφοράς *GAPDH*. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μεταβολή σε σύγκριση με το control $\pm$ SEM και είναι οι μέσες τιμές διπλών δειγμάτων. Control: 1 ± 0.386 , stretch 15%, 1 h: 0.740 ± 0.141 , stretch 25%, 1 h: 0.959 ± 0.229 . Με αστερίσκο (*) επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το control ($p < 0.05$).

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε σε σύγκριση κάθε μεγέθους μηχανικής διάτασης ξεχωριστά ως προς τη χρονική διάρκεια του φαινομένου. Συγκεκριμένα, συγκρίναμε το stretch μεγέθους 15%, διάρκειας 6 h και 24 h χρησιμοποιώντας ως αναφορά το stretch 15% διάρκειας 1 h. Παρατηρήσαμε μία μείωση της έκφρασης του ρυθμιστικού ενζύμου σε επίπεδο γονιδίου μετά από 6 h (stretch 15%, 6 h vs stretch 15%, 1 h: 0.739 ± 0.301 vs 1 ± 0.575), η οποία συνεχίστηκε και μετά από 24 h διάρκειας του φαινομένου (stretch 15%, 24 h vs stretch 15%, 1 h: 0.569 ± 0.091 vs 1 ± 0.575). Οι μεταβολές αυτές στα επίπεδα έκφρασης ήταν στατιστικά σημαντικές. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο **Γράφημα 4**.



Γράφημα 4: Έκφραση του mRNA του γονιδίου *PCYT1A* σε κύτταρα A549 που υποβλήθηκαν σε μηχανική παραμόρφωση 15% διάρκειας 1 h, 6 h και 24 h. Τα επίπεδα έκφρασης κάθε mRNA κανονικοποιήθηκαν ως προς εκείνα του γονιδίου αναφοράς *GAPDH*. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μεταβολή σε σύγκριση με το stretch 15%, 1 h $\pm$ SEM και είναι οι μέσες τιμές διπλών δειγμάτων. Stretch 15%, 1 h: 1 ± 0.575 , stretch 15%, 6h: 0.739 ± 0.301 , stretch 15%, 24 h: 0.569 ± 0.091 . Με αστερίσκο (*) επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το stretch 15% 1 h ($p < 0.05$).

Επίσης, συγκρίναμε το stretch μεγέθους 25%, διάρκειας 6 h και 24 h χρησιμοποιώντας ως αναφορά το stretch 25% διάρκειας 1 h. Στην περίπτωση αυτή, παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης των επιπέδων του mRNA του γονιδίου *PCYT1A* μετά από 6 h (stretch 25%, 6 h vs stretch 25%, 1 h: 1.690 ± 0.128 vs 1 ± 0.177), η οποία διατηρείται μετά από 24 h διάρκειας του φαινομένου χωρίς να αυξάνει περαιτέρω (stretch 25%, 24 h vs stretch 25%, 1 h: 1.627 ± 0.381 vs 1 ± 0.177). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο **Γράφημα 5**.



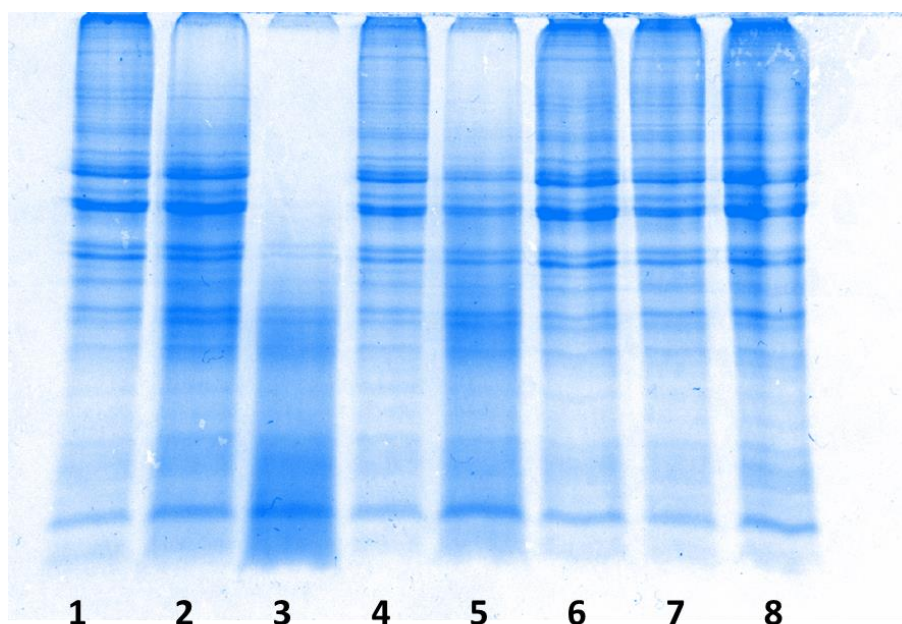
Γράφημα 5: Έκφραση του mRNA του γονιδίου *PCYT1A* σε κύτταρα A549 που υποβλήθηκαν σε μηχανική παραμόρφωση 25% διάρκειας 1 h, 6 h και 24 h. Τα επίπεδα έκφρασης κάθε mRNA κανονικοποιήθηκαν ως προς εκείνα του γονιδίου αναφοράς *GAPDH*. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μεταβολή σε σύγκριση με το stretch 25%, 1 h $\pm$ SEM και είναι οι μέσες τιμές διπλών δειγμάτων. Stretch 25%, 1 h: 1 ± 0.177 , stretch 25%, 6h: 1.690 ± 0.128 , stretch 25%, 24 h: 1.627 ± 0.381 . Με αστερίσκο (*) επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το stretch 25% 1 h ($p < 0.05$).

1.3 Μελέτη της επίδρασης της μηχανικής διάτασης στην πρωτεϊνική έκφραση της CCTa με πρωτεομική ανάλυση

Σε επίπεδο πρωτεΐνης, η μελέτη της CCTa πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της διαφορικής ανάλυσης της πρωτεϊνικής έκφρασης χωρίς σήμανση, η οποία συμβάλλει τόσο στην ανίχνευση όσο και στην ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών των δειγμάτων μας. Για την πρωτεομική ανάλυση μελετήσαμε την επίδραση δύο διαφορετικών μεγεθών κυκλικής μηχανικής διάτασης 15% και 25%, χρονικής διάρκειας 24 h, στα κύτταρα A549. Οι συνθήκες προς ανάλυση είχαν ως εξής: control, stretch 15%, 24 h και stretch 25%, 24 h. Η διαδικασία ολοκληρώνεται σε 5 στάδια, τα ακόλουθα: 1) συλλογή και λύση των κυττάρων, 2) προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Bradford, 3) πέψη πρωτεϊνών με τη μέθοδο FASP, 4) φωτομετρία μάζας (LC-MS/MS) και 5) ανάλυση των φασμάτων.

1.3.1 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Σε προκαταρκτικό στάδιο, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε ομογενοποιήματα κυττάρων A549 με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Σκοπός της ανάλυσης ήταν να διαπιστωθεί η ύπαρξη πρωτεϊνικού περιεχομένου, πριν τη διεξαγωγή της πρωτεομικής ανάλυσης. Για μια καλή ανάλυση συνήθως απαιτούνται τουλάχιστον 4 μg πρωτεΐνης. Παρασκευάστηκε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12%, ενώ σε κάθε θέση του πηκτώματος φορτώθηκαν περίπου 8 μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν ήταν οι εξής: control (1), (2) (2 δείγματα control), κυκλικό stretch 15% και κυκλικό stretch 25%. Οι χρονικές διάρκειες του stretch που μελετήθηκαν ήταν: 1h, 6h και 24h. Ακολούθησε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών και τέλος, η χρώση του πηκτώματος με διάλυμα βαφής Coomassie R-250, όπου έγιναν εμφανείς οι πρωτεϊνικές ζώνες κάθε δείγματος. Όπως φαίνεται και στο **Γράφημα 6**, οι πρωτεϊνικές ζώνες είναι παρόμοιες σε όλα τα δείγματα, με εξαίρεση το δείγμα 3 πιθανώς λόγω κάποιου ελαττώματος στην εμφάνιση.



Γράφημα 6: Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μετά από χρώση με διάλυμα βαφής Coomassie R-250, στο οποίο απεικονίζονται οι διαχωρισμένες με βάση το μοριακό τους βάρος πρωτεΐνες κάθε δείγματος. Τα πρωτεϊνικά δείγματα που φορτώθηκαν και διαχωρίστηκαν είναι τα εξής: **1:** Control (1), **2:** Control (2), **3:** Stretch 15%, 1 h, **4:** Stretch 25%, 1 h, **5:** Stretch 15%, 6 h, **6:** Stretch 25%, 6 h, **7:** Stretch 15%, 24 h, **8:**

Stretch 25%, 24 h. Παρατηρούμε ότι οι πρωτεϊνικές ζώνες κάθε δείγματος είναι παρόμοιες μεταξύ τους. Στο δείγμα stretch 15%, 1 h δεν είναι εμφανείς οι ζώνες στο πάνω μέρος πιθανώς λόγω κάποιου ελαττώματος στην εμφάνιση.

1.3.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πεπτιδίων σε νανοφωτόμετρο

Μετά την πέψη των πρωτεϊνών με τη μέθοδο FASP, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των πεπτιδίων που προέκυψαν σε συσκευή nanodrop (νανοφωτόμετρο) (Πίνακας 6). Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 280 nm, προσθέτοντας 1-2 μL από κάθε δείγμα στην ειδική υποδοχή του οργάνου. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν ήταν οι εξής: control, κυκλικό stretch 15%, 24 h και κυκλικό stretch 25%, 24 h. Διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα των πεπτιδίων κυμάνθηκαν από 0.922 ως 1.051 mg/mL στις διαφορετικές συνθήκες μηχανικής διάτασης, χωρίς στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ τους, ούτε και με τα κύτταρα αναφοράς, τα οποία δεν είχαν υποστεί μηχανική διάταση (Πίνακας 6).

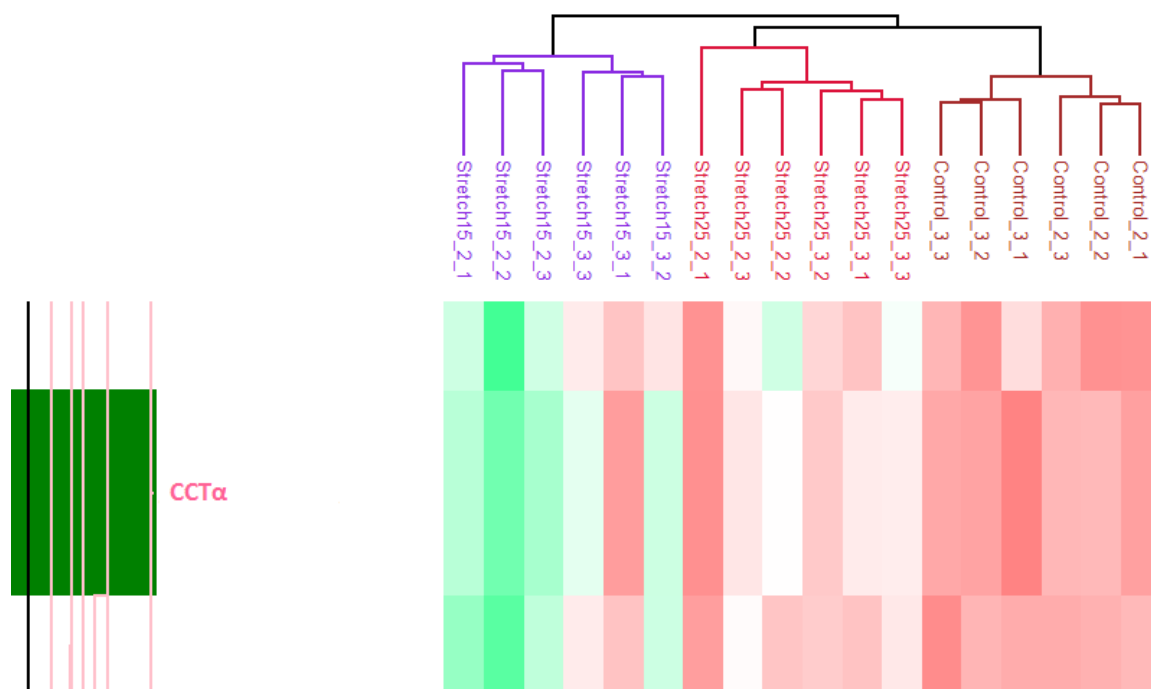
Πίνακας 6: Πεπτιδικό περιεχόμενο σε ομογενοποιήματα κυττάρων A549. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο (MO) $\pm$ SEM 3 διαφορετικών πειραμάτων. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

Δείγματα	O.D. (mg/mL)
control	0.963 $\pm$ 0.059
stretch 15%, 24 h	0.922 $\pm$ 0.011
stretch 25%, 24 h	1.051 $\pm$ 0.062

1.3.3 Ταυτοποίηση της CCTa

Ετοιμάστηκαν καλλιέργειες κυττάρων A549, τα οποία υποβλήθηκαν σε δύο συνθήκες κυκλικής μηχανικής διάτασης 15% και 25%, διάρκειας 24 h. Κύτταρα τα οποία δεν υπέστησαν διάταση χρησιμοποιήθηκαν ως control. Η μελέτη της έκφρασης του ενζύμου CCTa σε πρωτεϊνικό επίπεδο πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της πρωτεομικής ανάλυσης. Για την ανάλυση κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκαν περίπου 2.5 μg πεπτιδίων. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν και επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Perseus 1.0.

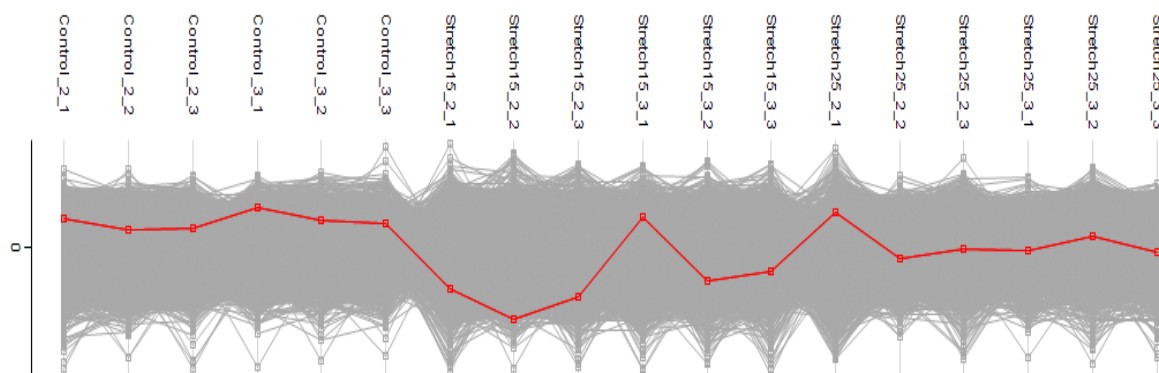
Το **Γράφημα 7** απεικονίζει ένα τμήμα του θερμικού χάρτη, όπως προκύπτει από το λογισμικό Perseus, στο οποίο έχουμε εστιάσει στο ρυθμιστικό ένζυμο, CCTα, και στις μεταβολές του σε επίπεδο πρωτεΐνης για κάθε συνθήκη χωριστά. Το λογισμικό Perseus αξιοποιεί τα βιολογικά δεδομένα μας εφαρμόζοντας στατιστικές αναλύσεις και ερμηνεύοντας τα αποτελέσματά μας. Το κόκκινο χρώμα υποδηλώνει την αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση, ενώ το πράσινο χρώμα τη μειωμένη. Κάθε στήλη αναπαριστά ένα δείγμα. Παρατηρούμε ότι τα δείγματα control παρουσίασαν αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση, η οποία μειώθηκε μετά από μηχανικό stretch 25% για 24 h. Μετά από κυκλικό stretch 15%, 24 h, τα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου ήταν αισθητά μειωμένα (πράσινο χρώμα).



Γράφημα 7: Τμήμα θερμικού χάρτη (heatmap) που απεικονίζει τις μεταβολές της πρωτεϊνικής έκφρασης του ρυθμιστικού ενζύμου, CCTα. Κάθε στήλη αναπαριστά ένα δείγμα. Το κόκκινο χρώμα υποδηλώνει την αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση, το πράσινο χρώμα τη μειωμένη, ενώ το λευκό χρώμα υποδηλώνει καμία ουσιαστική μεταβολή. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

Το **Γράφημα 8** απεικονίζει το πρωτεϊνικό προφίλ του ρυθμιστικού ενζύμου CCTα στις τρεις εξεταζόμενες συνθήκες (control, stretch 15%, 24 h και stretch 25%, 24 h) για κάθε δείγμα χωριστά. Ομοίως, στο γράφημα αυτό παρατηρήθηκαν υψηλά

επίπεδα έκφρασης του ρυθμιστικού ενζύμου στα δείγματα control, τα οποία μετά από την εφαρμογή κυκλικής μηχανικής διάτασης μειώθηκαν. Η αναστολή της έκφρασης ήταν περισσότερο αισθητή μετά από το κυκλικό stretch 15%, 24 h.

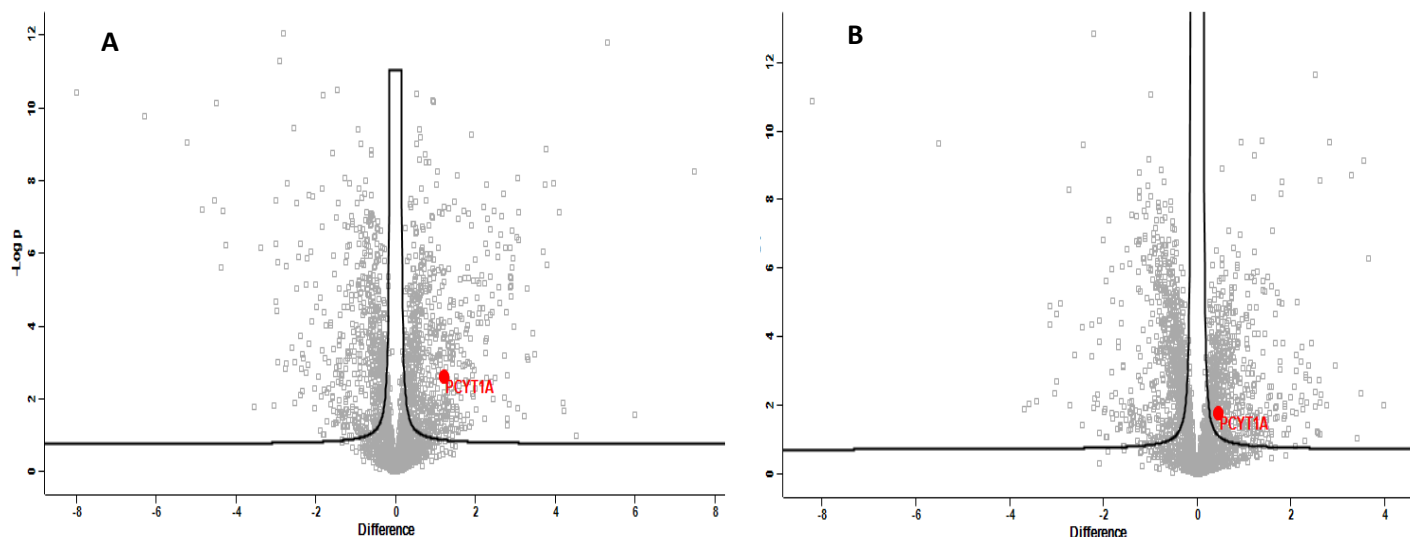


Γράφημα 8: Γραφική παράσταση του πρωτεϊνικού προφίλ του ρυθμιστικού ενζύμου CCTα για κάθε εξεταζόμενο δείγμα. Παρατηρούμε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης ήταν περισσότερο αυξημένα στο control σε σχέση με εκείνα μετά από την εφαρμογή κυκλικού stretch. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

1.3.4 Ποσοτικοποίηση της μεταβολής της πρωτεϊνικής έκφρασης της CCTα

Για να ποσοτικοποιήσουμε τη μεταβολή της έκφρασης της CCTα σε επίπεδο πρωτεΐνης μετά από την επίδραση μηχανικής διάτασης, πραγματοποιήσαμε με τη βοήθεια του λογισμικού Perseus δύο ξεχωριστές στατιστικές αναλύσεις (t-test), οι οποίες οπτικοποιήθηκαν ως volcano plots: στο 1^ο t-test συγκρίναμε το control με το κυκλικό stretch 15%, ενώ στο 2^ο t-test το control με το κυκλικό stretch 25%. Ο άξονας χ δείχνει τη μεταβολή (difference), ενώ ο άξονας ψ τον αρνητικό λογάριθμο της στατιστικής σημαντικότητας, p. Η καμπύλη διαχωρισμού (cutoff curve) υποδεικνύει ποιες πρωτεΐνες έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Αριστερά της καμπύλης οι τιμές των πρωτεϊνών αυξάνουν μετά από μηχανική διάταση, ενώ δεξιά ελαττώνονται. Οι τιμές των πρωτεϊνών κάτω από τη καμπύλη δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Ως εκ τούτου, από το **Γράφημα 9** συμπεραίνουμε ότι η εφαρμογή μηχανικής διάτασης ανέστειλε την πρωτεϊνική έκφραση της CCTα και οι μεταβολές αυτές ήταν στατιστικά σημαντικές. Αναλυτικά, οι τιμές των μεταβολών απεικονίζονται στον **Πίνακα 7**. Παρατηρούμε ότι η πρωτεϊνική έκφραση της CCTα υποδιπλασιάστηκε μετά από την εφαρμογή κυκλικού stretch 15% σε σύγκριση με το control και η μεταβολή αυτή είχε

στατιστική σημαντικότητα $p=0.002$, ενώ λιγότερο μειωμένη ήταν η έκφρασή της μετά από κυκλικό stretch 25% σε σύγκριση με το control. Η μεταβολή αυτή είχε στατιστική σημαντικότητα $p=0.02$.



Γράφημα 9: Volcano plots που δείχνουν το μέγεθος της μεταβολής (άξονας χ) και τη σημαντικότητα (άξονας ψ) των πρωτεϊνικών συγκρίσεων του ρυθμιστικού ενζύμου, CCTa μεταξύ: του control και του stretch 15% (A) και του control και του stretch 25% (B). Αριστερά των καμπυλών διαχωρισμού οι τιμές των πρωτεϊνών αυξάνονται μετά από μηχανική διάταση, ενώ δεξιά ελαττώνονται. Οι τιμές των πρωτεϊνών κάτω από τις καμπύλες δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Perseus. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

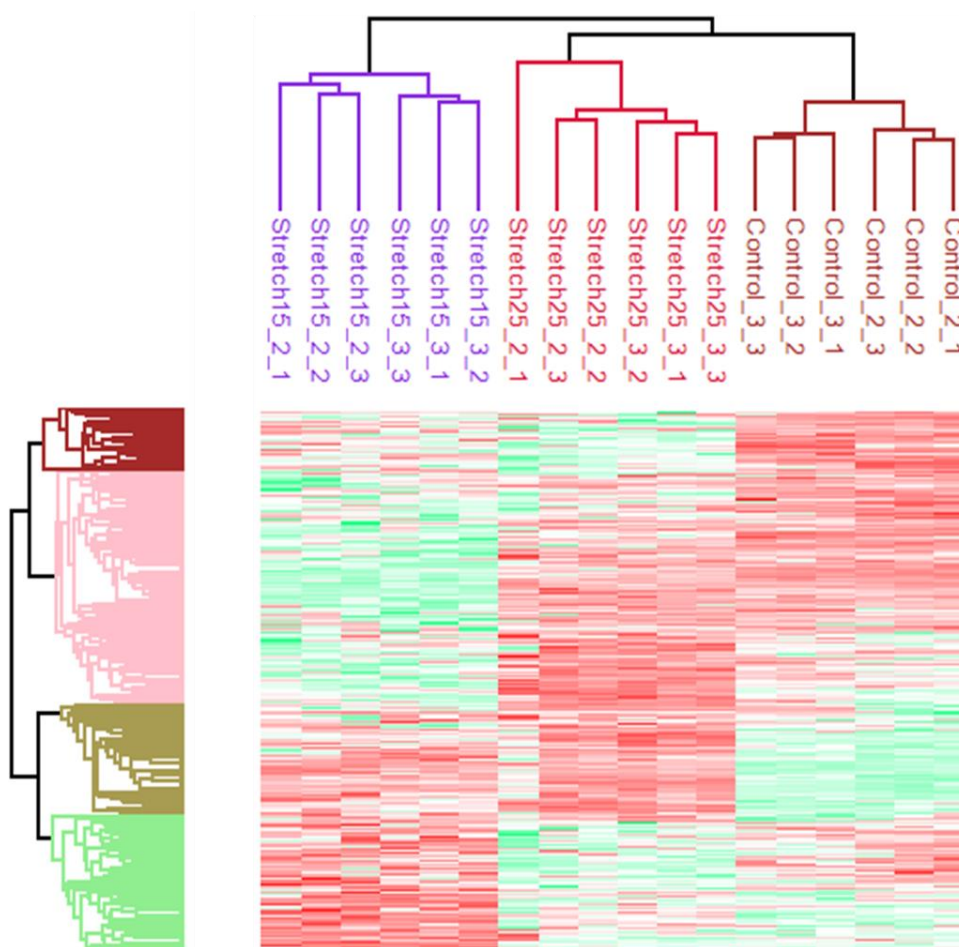
Πίνακας 7: Διαφορικά ρυθμιζόμενη πρωτεϊνική έκφραση του ρυθμιστικού ενζύμου, CCTa, μετά από μηχανικό stretch 15% και 25%, διάρκειας 24 h σε σύγκριση με το control, καθώς και σύγκριση του stretch 15% με το 25%. Οι τιμές των μεταβολών είναι στατιστικά σημαντικές ($P<0.05$). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

Όνομα γονιδίου	Όνομα πρωτεΐνης	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 15%	Ρύθμιση	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 25%	Ρύθμιση	Μεταβολή (fold change) stretch 15% vs stretch 25%	Ρύθμιση
<i>PCYT1A</i>	Χολινο-φωσφορική κυτιδυλοτρανσφεράση A	2.31	↓	1.37	↓	1.68	↑

2. ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ A549 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΥΤΩΝ

Με τη βοήθεια της πρωτεομικής ανάλυσης ταυτοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες του ολικού ομογενοποιημένου των κυττάρων A549 σε τρεις συνθήκες: control, stretch 15%, 24 h και stretch 25%, 24 h. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού Perseus και οπτικοποιήθηκαν με θερμικό χάρτη (heat map). Οι πρωτεΐνες που εμφάνισαν αυξορρύθμιση μετά την εφαρμογή μηχανικής διάτασης επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα, ενώ εκείνες που εμφάνισαν μειορρύθμιση επισημαίνονται με πράσινο χρώμα. Κάθε στήλη του χάρτη αναπαριστά ένα δείγμα. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 2110 πρωτεΐνες και από τις τρεις συνθήκες (**Γράφημα 10**). Από αυτές περίπου 242 πρωτεΐνες είχαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης στις συνθήκες μηχανικής διάτασης σε σχέση με τα δείγματα control, ενώ σχεδόν 433 πρωτεΐνες παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε συνθήκες stretch σε σχέση με την κατάσταση ηρεμίας. Επίσης, σε περίπου 920 πρωτεΐνες παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης σε μηχανική διάταση 15% σε σχέση με το control και τη μηχανική διάταση 25%. Τέλος, σε λιγότερες από 515 πρωτεΐνες βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης σε stretch 15% σε σχέση με το control και το stretch 25%.

Εκτός από την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών των δειγμάτων μας, η πρωτεομική ανάλυση μας έδωσε τη δυνατότητα να συλλέξουμε πληροφορίες, να επεξεργαστούμε και να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματά μας. Αξιοποιήσαμε τα δεδομένα μας όπως προκύπτουν από το λογισμικό Perseus, και συγκεκριμένα τη λίστα των γονιδίων των πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας τα ειδικά λογισμικά FunRich και DAVID. Με τη βοήθεια του λογισμικού FunRich, ομαδοποιήσαμε και ταξινομήσαμε τις πρωτεΐνες μας με κριτήριο τα κυτταρικά οργανίδια στα οποία ανήκουν και τις λειτουργίες τους. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται παρακάτω στα **Γραφήματα 11** και **12**. Το λογισμικό DAVID είναι ένα, επίσης, χρήσιμο εργαλείο για την ερμηνεία, την ταξινόμηση και την απεικόνιση αναλύσεων βιοπληροφορικής, με τη βοήθεια του οποίου μελετήσαμε ορισμένες μεταβολικές πορείες στις οποίες θα αναφερθούμε στη συνέχεια.



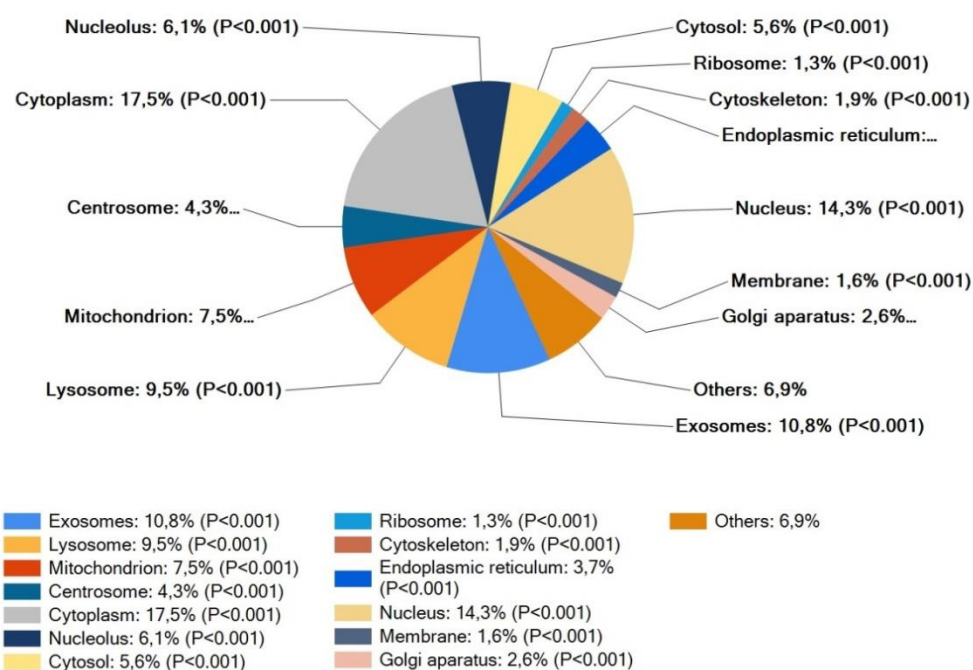
Γράφημα 10: Θερμικός χάρτης (heatmap) που απεικονίζει τις πρωτεΐνες που εμφανίζουν τατιστικά σημαντικές διαφορές. Ο συνολικός αριθμός των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν είναι 2110 και είναι ομαδοποιημένες σε τέσσερις κατηγορίες. Οι πρωτεΐνες που εμφάνισαν αυξορρύθμιση επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα, εκείνες που εμφάνισαν μειορρύθμιση επισημαίνονται με πράσινο χρώμα, ενώ με λευκό χρώμα εκείνες χωρίς καμία ουσιαστική μεταβολή. Κάθε στήλη αναπαριστά ένα δείγμα, με 6 δείγματα ανά συνθήκη. Κάθε γραμμή αναπαριστά μία πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

2.1 Ταξινόμηση των πρωτεϊνών των κυττάρων A549 σύμφωνα με τη μοριακή λειτουργία και την κατανομή τους σε υποκυτταρικά οργανίδια

Όπως αναφέραμε προηγουμένως, χρησιμοποιώντας τα δεδομένα του λογισμικού Perseus από την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών των δειγμάτων μας και με τη βοήθεια του λογισμικού FunRich, καταγράψαμε τη μοριακή λειτουργία των πρωτεϊνών που απαντώνται στα ομογενοποιημένα των κυττάρων A549 και στις τρεις

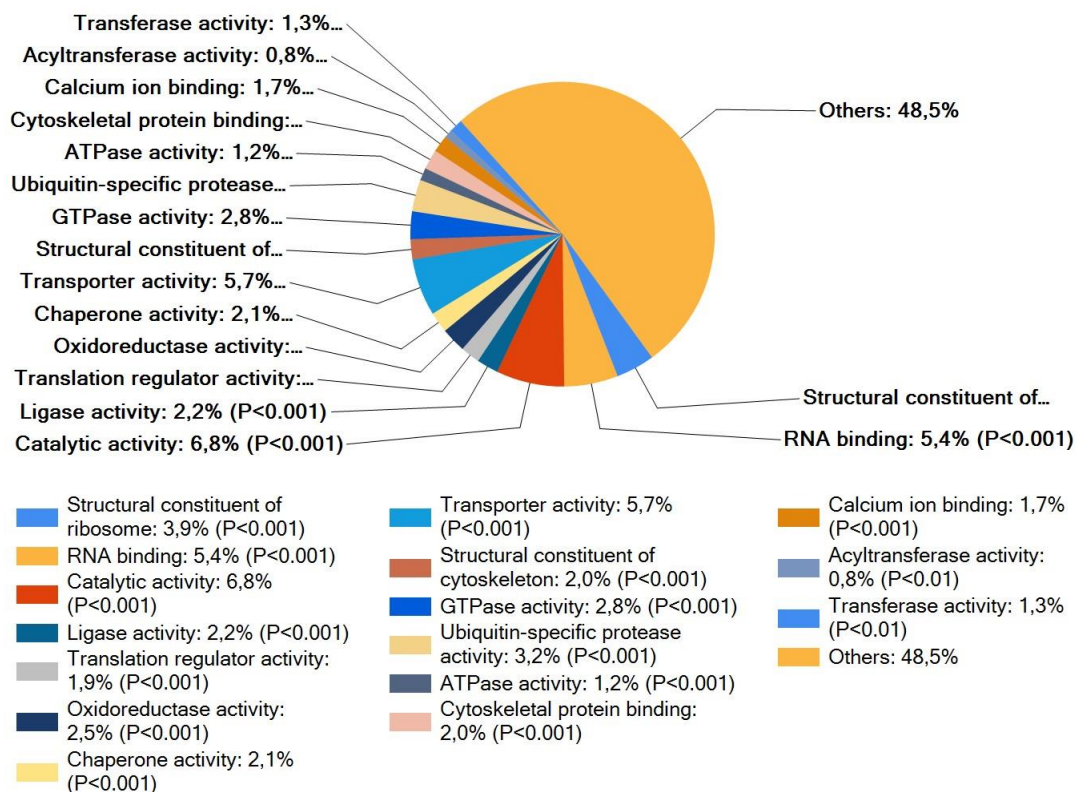
συνθήκες (control, stretch 15%, 24 h και stretch 25%, 24 h) και τα κυριότερα κυτταρικά οργάνδια όπου επιτελούνται οι αντίστοιχες βιοχημικές πορείες. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μας απεικονίστηκαν με γραφήματα πίτας.

Από τις πρωτεΐνες που απαντώνται στα διάφορα οργάνδια του κυττάρου, το μεγαλύτερο μέρος αποτελούν οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, οι πυρηνικές και οι εξωσωμικές πρωτεΐνες και ακολουθούν οι λυσοσωμικές, οι μιτοχονδριακές και άλλες (Γράφημα 11).



Γράφημα 11: Γράφημα πίτας που αναπαριστά τα μεγαλύτερα σε ποσοστό οργάνδια των κυττάρων A549 στις τρεις πειραματικές συνθήκες. Το γράφημα προέκυψε με τη βοήθεια του λογισμικού FunRich.

Όσον αφορά τη λειτουργία τους, οι περισσότερες πρωτεΐνες εμφάνισαν καταλυτική δραστηριότητα, είναι δηλαδή ένζυμα. Ακολουθούν οι πρωτεΐνες-μεταφορείς (transporters), οι οποίες μεταφέρουν ουσίες, όπως μικρά μόρια ή ιόντα μέσα και έξω από το κύτταρο, καθώς και μεταξύ των κυττάρων, οι RNA-δεσμευτικές πρωτεΐνες οι οποίες δεσμεύονται σε μόρια RNA σχηματίζοντας ριβονουκλεοπρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μάτισμα του mRNA, τη σταθεροποίηση, τον εντοπισμό και τη μετάφραση και άλλες (Γράφημα 12).



Γράφημα 12: Γράφημα πίτας που αναπαριστά τις κυριότερες λειτουργίες των πρωτεϊνών των κυττάρων A549 στις τρεις πειραματικές συνθήκες. Το γράφημα προέκυψε με τη βοήθεια του λογισμικού FunRich.

2.2 Ταξινόμηση των πρωτεϊνών σε μεταβολικές πορείες

Στη συνέχεια, διευκρινίσθηκαν οι βιοχημικές πορείες στις οποίες εμπλέκονται οι σημαντικότερες πρωτεΐνες που προέκυψαν από την πρωτεομική ανάλυση, οι οποίες παρουσιάζουν μεταβολές κατά την κυκλική εφαρμογή μηχανικής διάταξης.

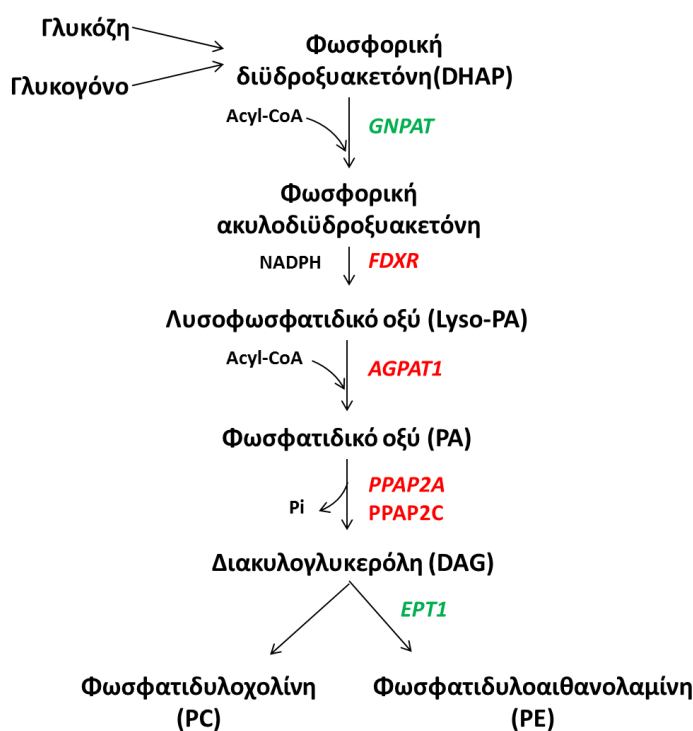
2.2.1 Βιοσύνθεσης, αναδιαμόρφωσης και καταβολισμός της PC

Αρχικά μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της φωσφατιδυλοχολίνης. Έχουμε επισημάνει ότι κύριος στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του ρυθμιστικού ενζύμου του μεταβολισμού της PC, CCTα. Για να κατανοήσουμε τη λειτουργία αυτού του ενζύμου εστιάσαμε στη συνολική πορεία βιοσύνθεσης, αναδιαμόρφωσης και καταβολισμού της PC. Με τη βοήθεια των δεδομένων που συλλέξαμε από το λογισμικό Perseus, καταγράψαμε τις μεταβολές που

παρουσιάζουν τα ένζυμα που συμμετέχουν στις πορείες αυτές μετά από δύο συνθήκες μηχανικής παραμόρφωσης, 15% και 25%, 24 h συγκρίνοντάς τες με την κατάσταση ηρεμίας (control).

A. *De novo* πορεία βιοσύνθεσης των PC και PE

Το **Γράφημα 13** απεικονίζει τη *de novo* βιοσυνθετική πορεία δύο φωσφολιπιδίων, των PC και PE, έχοντας ως πρόδρομες ενώσεις τη γλυκόζη και το γλυκογόνο. Από τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης παρατηρούμε ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτή τη πορεία παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης κυρίως μετά από κυκλικό stretch 15%, με εξαίρεση το ένζυμο *GNPAT*, που ευθύνεται για το σχηματισμό της φωσφορικής ακυλοδιυδροξυακετόνης και το ένζυμο *EPT1* που καταλύει το τελικό στάδιο βιοσύνθεσης της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (**Πίνακας 8, Γράφημα 14**).

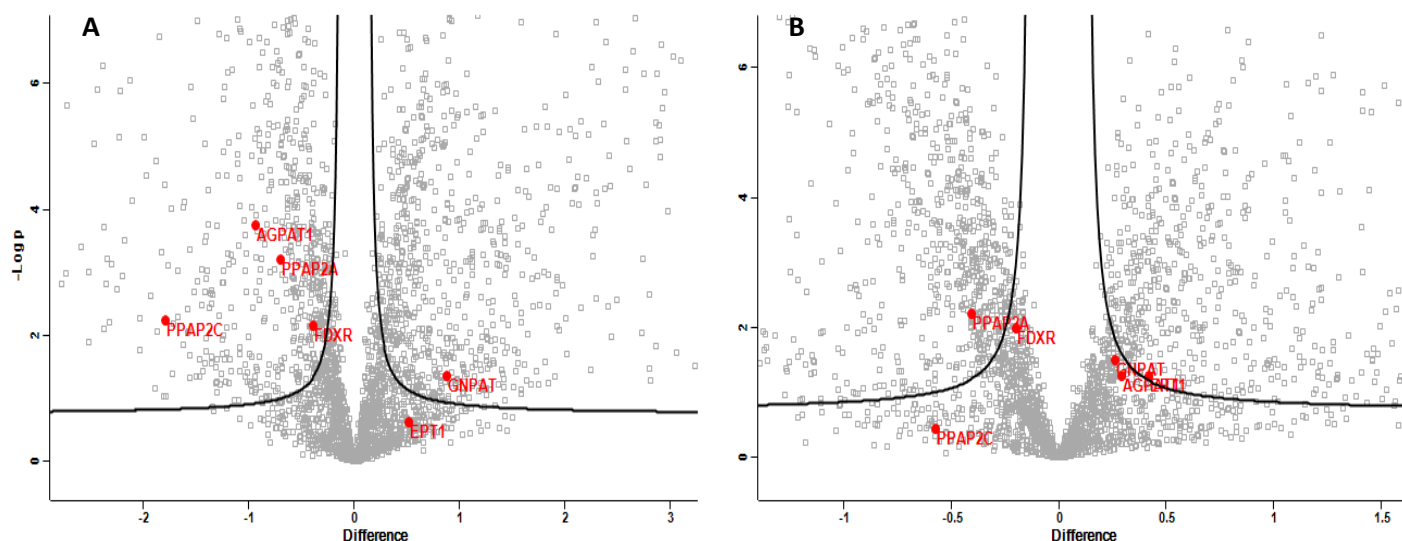


Γράφημα 13: *De novo* πορεία βιοσύνθεσης των PC και PE. Με κόκκινο χρώμα είναι επισημασμένα τα γονίδια, των οποίων οι εκφραζόμενες πρωτεΐνες εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης, ενώ με πράσινο χρώμα εκείνες που εμφάνισαν μειορρύθμιση.

Πίνακας 8: Διαφορικά ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες της *de novo* πορείας βιοσύνθεσης των PC και PE μετά από μηχανικό stretch 15% και 25%, 24 h σε σύγκριση με το control, καθώς και σύγκριση του stretch 15% με το 25%. Οι τιμές των μεταβολών είναι στατιστικά σημαντικές ($P < 0.05$). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

Όνομα γονιδίου	Όνομα πρωτεΐνης	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 15%	Ρύθμιση	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 25%	Ρύθμιση	Μεταβολή (fold change) stretch 15% vs stretch 25%	Ρύθμιση
<i>GNPAT</i>	Ακυλοτρανσφεράση της φωσφορικής διυδροξυακετόνης	1.83	↓	-	-	-	-
<i>FDXR</i>	NADPH:οξειδοαναγωγάση της αδρενοδοξίνης	1.32	↑	-	-	-	-
<i>AGPAT1</i>	1-acyl-sn-γλυκερολ-3-φωσφορική ακυλοτρανσφεράση	1.92	↑	-	-	2.35	↓
<i>PPAP2A</i>	Λιπιδική φωσφορική φωσφοϋδρολάση 1	1.62	↑	1.33	↑	-	-
<i>PPAP2C</i>	Λιπιδική φωσφορική φωσφοϋδρολάση 2	3.47	↑	-	-	2.33	↓
<i>EPT1</i>	Αιθανολαμινοφωσφοτρανσφεράση 1	-	-	1.33	↓	-	-

“-” : Δεν αναγράφονται οι τιμές για μεταβολές που δεν είναι στατιστικά σημαντικές.



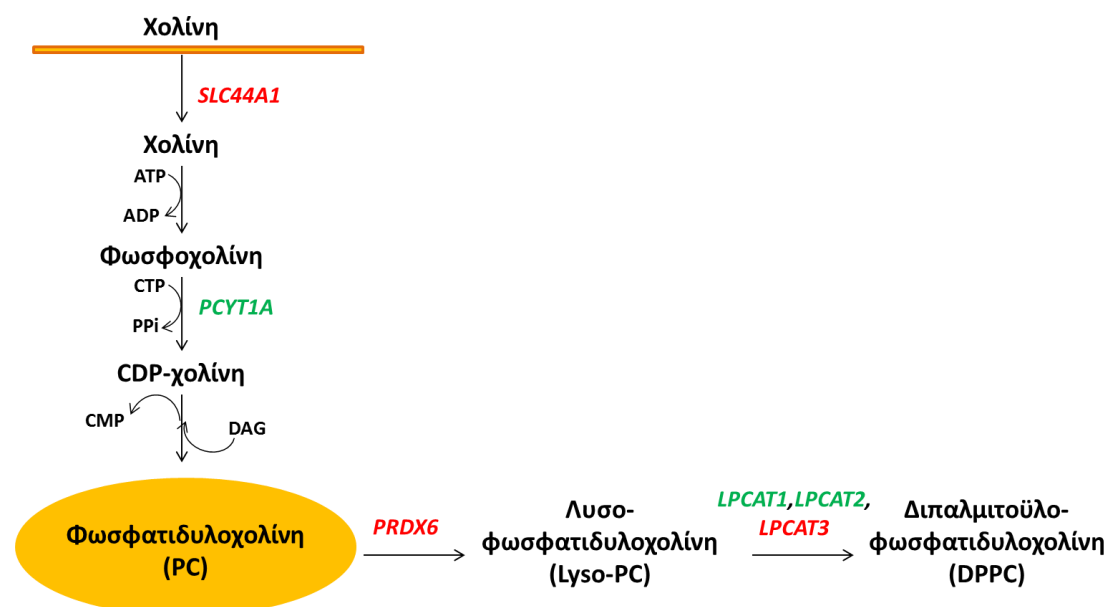
Γράφημα 14: Volcano plots που δείχνουν το μέγεθος της μεταβολής (άξονας χ) και τη σημαντικότητα (άξονας ψ) των πρωτεϊνικών συγκρίσεων της de novo βιοσύνθεσης των PC και PE μεταξύ: του control και του stretch 15% (A) και του control και του stretch 25% (B). Αριστερά των καμπυλών διαχωρισμού οι τιμές των πρωτεϊνών αυξάνονται μετά από μηχανική διάταση, ενώ δεξιά ελαττώνονται. Οι τιμές των πρωτεϊνών κάτω από τις καμπύλες δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Perseus. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

B. Βιοσυνθετική πορεία της CDP-χολίνης (πορεία Kennedy) και αναδιαμόρφωση της PC

Στην πορεία της CDP-χολίνης (Γράφημα 15) παρατηρήθηκε διπλάσια αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης μεταφοράς της χολίνης από τον εξωκυττάριο χώρο στο εσωτερικό του κυττάρου μετά από stretch 25%, που κωδικεύεται από το γονίδιο *SLC44A1*. Ωστόσο, το ρυθμιστικό ένζυμο CCTα, που κωδικεύεται από το γονίδιο *PCYT1A*, εμφάνισε μειωμένα επίπεδα έκφρασης μετά από stretch 15% (υποδιπλασιάστηκε) και 25% (Πίνακας 9).

Όσον αφορά την αναδιαμόρφωση της PC προς σχηματισμό της DPPC (Γράφημα 15), η ανεξάρτητη από το Ca^{2+} φωσφολιπάση A_2 , aiPLA_2 , που κωδικεύεται από το γονίδιο *PRDX6* και είναι υπεύθυνη για την απακυλίωση της PC και το σχηματισμό της lyso-PC, εμφάνισε αυξημένα επίπεδα έκφρασης. Στο στάδιο της επανακυλίωσης, όπου η lyso-PC μετατρέπεται σε DPPC, ανιχνεύθηκαν τρεις ακυλοτρανσφεράσες της φωσφατιδυλοχολίνης (LPCAT). Οι LPCAT1 και LPCAT2

εμφάνισαν μειωμένη έκφραση σε αντίθεση με την αυξημένη έκφραση της LPCAT3. Οι μεταβολές των πρωτεϊνών ήταν μεγαλύτερες κυρίως μετά από κυκλική εφαρμογή διάτασης κατά 15% (Πίνακας 9).



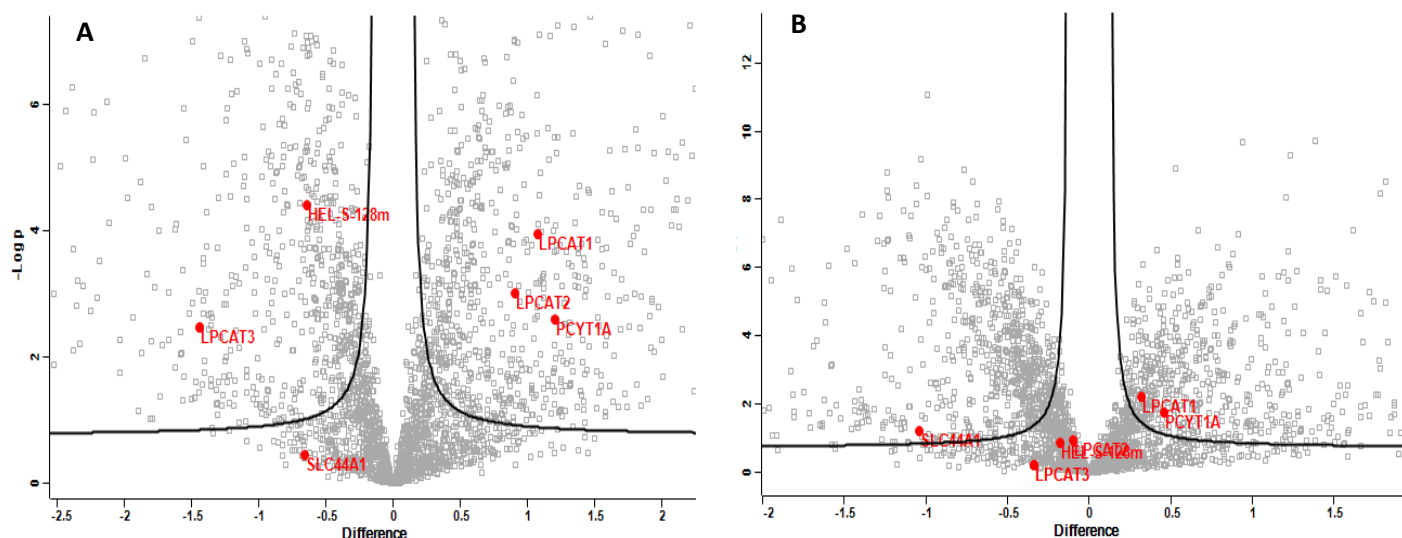
Γράφημα 15: Πορεία βιοσύνθεσης της PC (πορεία Kennedy) και αναδιαμόρφωσης και σχηματισμού της DPPC. Τα γονίδια που επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα έδειξαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών τους, ενώ τα επισημασμένα με κόκκινο χρώμα είχαν μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση.

Πίνακας 9: Διαφορικά ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες της πορείας βιοσύνθεσης και αναδιαμόρφωσης της PC μετά από μηχανικό stretch 15% και 25%, 24 h σε σύγκριση με το control, καθώς και σύγκριση του stretch 15% με το 25%. Οι τιμές των μεταβολών είναι στατιστικά σημαντικές ($P < 0.05$). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

Όνομα γονιδίου	Όνομα πρωτεΐνης	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 15%	Ρύθμιση	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 25%	Ρύθμιση	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 25%	Ρύθμιση
<i>SLC44A1</i>	Πρωτεΐνη-μεταφορέας της χολίνης 1	-	-	2.06	↑	-	-
<i>PCYT1A</i>	Χολινο-φωσφορική κυτιδυλοτρανσφεράση A	2.31	↓	1.37	↓	1.68	↑
<i>PRDX6</i> (HEL-S-128m)	Υπεροξειρεδοξίνη-6	1.56	↑	-	-	1.38	↓
<i>LPCAT1</i>	Ακυλοτρανσφεράση της	2.10	↓	1.24	↓	1.69	↑

	λυσοφωσφατιδυλοχολίνης 1						
<i>LPCAT2</i>	Ακυλοτρανσφεράση της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης 2	1.87	↓	-	-	2.00	↑
<i>LPCAT3</i>	Λυσοφωσφολιπιδική ακυλοτρανσφεράση 5	2.72	↑	-	-	2.15	↓

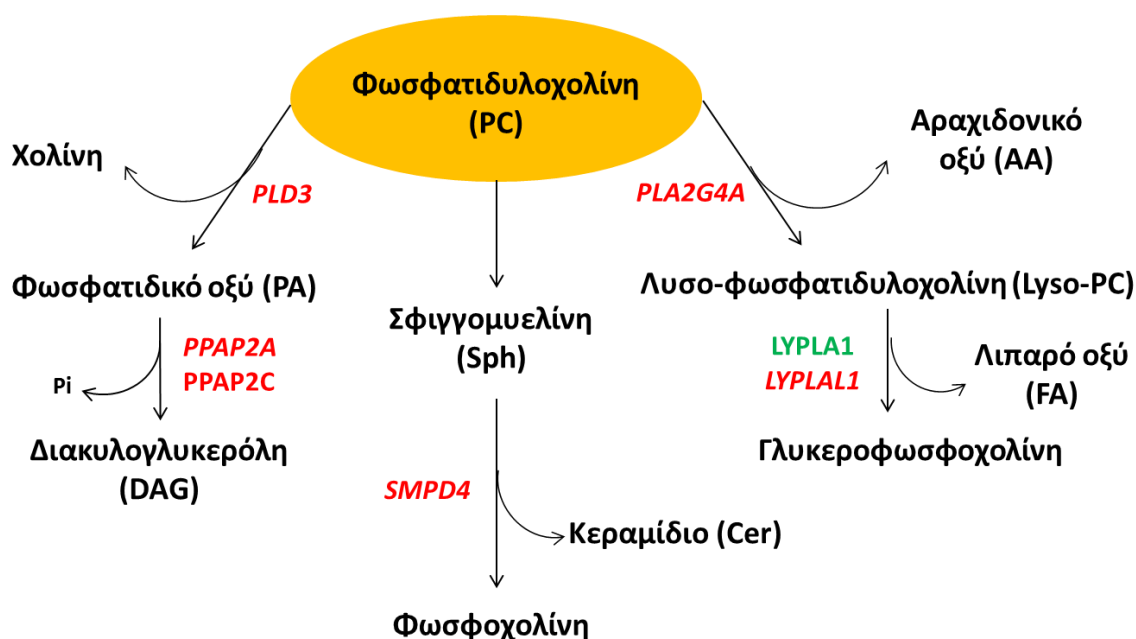
“-” : Δεν αναγράφονται οι τιμές για μεταβολές που δεν είναι στατιστικά σημαντικές.



Γράφημα 16: Volcano plots που δείχνουν το μέγεθος της μεταβολής (άξονας χ) και τη σημαντικότητα (άξονας ψ) των πρωτεϊνικών συγκρίσεων της πορείας της CDP-χολίνης και της αναδιαμόρφωσης της PC μεταξύ: του control και του stretch 15% (A) και του control και του stretch 25% (B). Αριστερά των καμπυλών διαχωρισμού οι τιμές των πρωτεϊνών αυξάνονται μετά από μηχανική διάταση, ενώ δεξιά ελαττώνονται. Οι τιμές των πρωτεϊνών κάτω από τις καμπύλες δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Perseus. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

Γ. Πορείες καταβολισμού της PC

Μετά τη βιοσύνθεσή της, η PC μπορεί να καταβολιστεί οδηγώντας στο σχηματισμό διαφόρων ενώσεων. Το **Γράφημα 17** απεικονίζει τις πορείες καταβολισμού της PC. Παρατηρούμε ότι σχεδόν όλες οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στις πορείες αυτές παρουσίασαν σημαντική αύξηση στα επίπεδα έκφρασής τους μετά την εφαρμογή κυκλικής μηχανικής διάτασης. Στις περισσότερες πρωτεΐνες οι μεταβολές ξεπέρασαν το διπλάσιο σε σύγκριση με την κατάσταση ηρεμίας κυρίως μετά από 15% κυκλικό stretch (**Πίνακας 10, Γράφημα 18**). Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η ακυλοπρωτεΐνη θειοεστεράση 1, που κωδικεύεται από το γονίδιο *LYPLA1*, η οποία είχε μειωμένα επίπεδα έκφρασης. Κατά τον καταβολισμό της PC σχηματίστηκαν φωσφατιδικό οξύ, διακυλογλυκερόλη, φωσφοχολίνη, κεραμίδια, αραχιδονικό οξύ, λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη, γλυκεροφωσφοχολίνη και λιπαρά οξέα και αναγεννήθηκε η χολίνη.

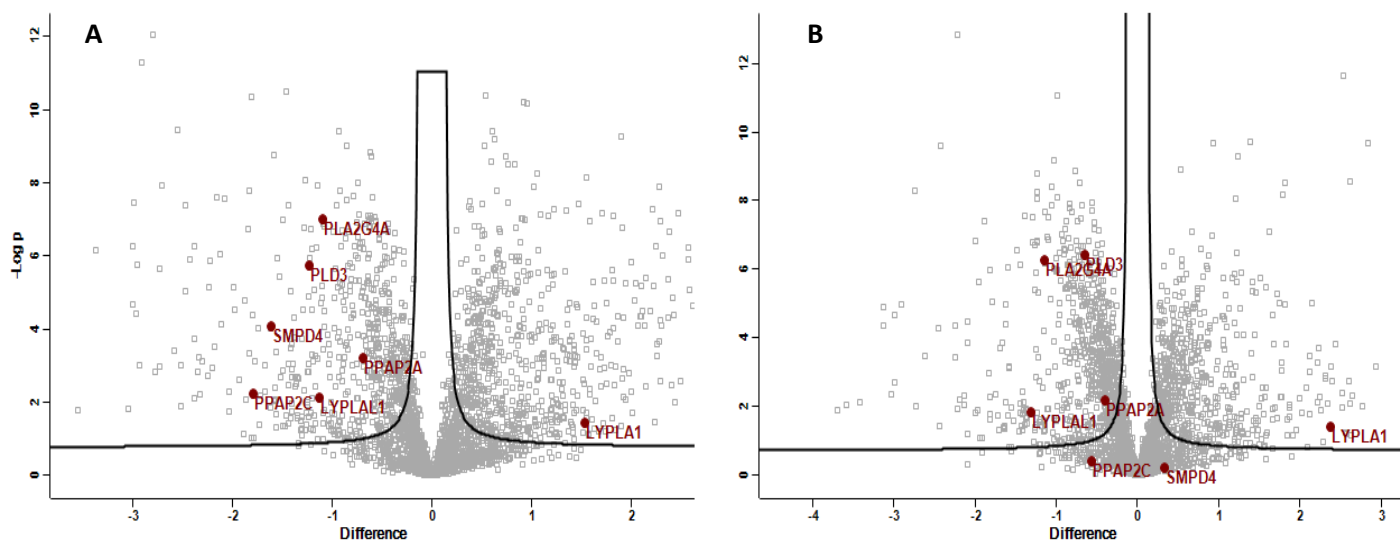


Γράφημα 17: Πορείες καταβολισμού της PC. Τα επισημασμένα με κόκκινο χρώμα γονίδια υποδηλώνουν την υπερέκφραση των πρωτεϊνών τους, ενώ εκείνο με το πράσινο χρώμα δείχνει τη μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση.

Πίνακας 10: Διαφορικά ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες των πορειών καταβολισμού της PC μετά από μηχανικό stretch 15% και 25%, 24 h σε σύγκριση με το control, καθώς και σύγκριση του stretch 15% με το 25%. Οι τιμές των μεταβολών είναι στατιστικά σημαντικές ($P < 0.05$). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

Όνομα γονιδίου	Όνομα πρωτεΐνης	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 15%	Ρύθμιση	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 25%	Ρύθμιση	Μεταβολή (fold change) stretch 15% vs stretch 25%	Ρύθμιση
<i>PLD3</i>	Φωσφολιπάση D3	2.36	↑	1.58	↑	1.50	↓
<i>PPAP2A</i>	Λιπιδική φωσφορική φωσφοϋδρολάση 1	1.62	↑	1.33	↑	-	-
<i>PPAP2C</i>	Λιπιδική φωσφορική φωσφοϋδρολάση 2	3.47	↑	-	-	2.33	↓
<i>SMPD4</i>	Φωσφοδιεστεράση της σφιγγομυελίνης 4	3.06	↑	-	-	3.85	↓
<i>PLA2G4A</i>	Κυτοσολική φωσφολιπάση A ₂	2.15	↑	2.23	↑	-	-
<i>LYPLA1</i>	Ακυλο-πρωτεΐνη θειοεστεράσης 1	2.89	↓	5.16	↓	-	-
<i>LYPLAL1</i>	Πρωτεΐνη λυσοφωσφολιπάσης 1	2.20	↑	2.50	↑	-	-

“-” : Δεν αναγράφονται οι τιμές για μεταβολές που δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

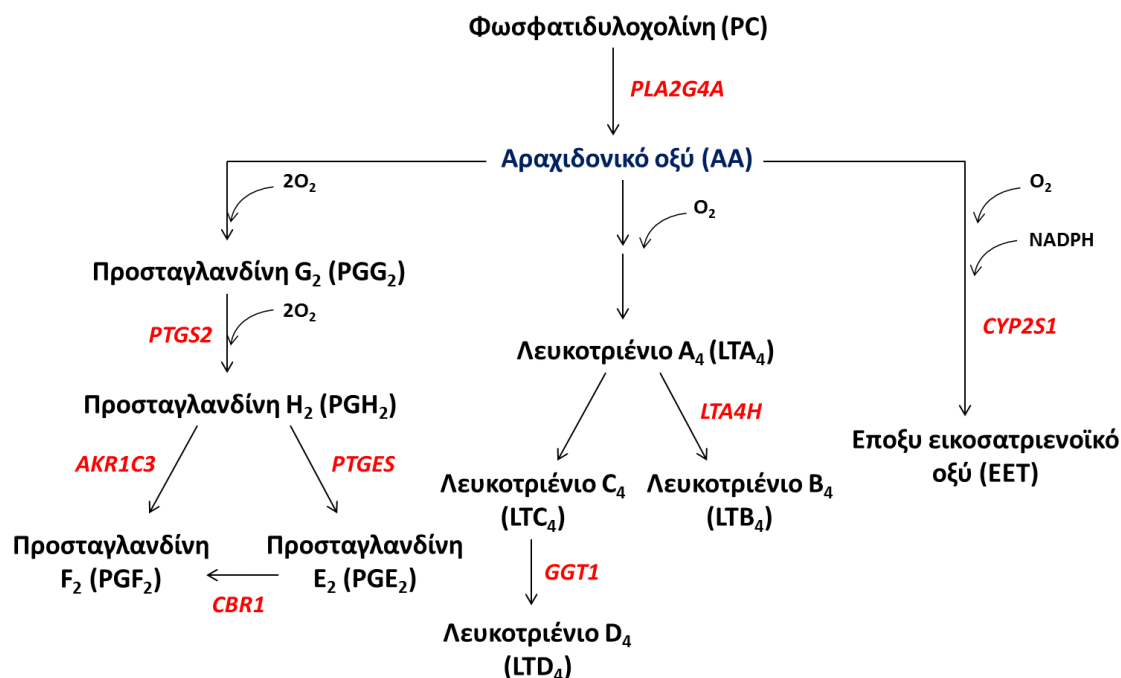


Γράφημα 18: Volcano plots που δείχνουν το μέγεθος της μεταβολής (άξονας χ) και τη σημαντικότητα (άξονας ψ) των πρωτεϊνικών συγκρίσεων των καταβολικών πορειών της PC μεταξύ: του control και του stretch 15% (A) και του control και του stretch 25% (B). Αριστερά των καμπυλών διαχωρισμού οι τιμές των πρωτεϊνών αυξάνονται μετά από μηχανική διάταση, ενώ δεξιά ελαττώνονται. Οι τιμές των πρωτεϊνών κάτω από τις καμπύλες δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Perseus. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

2.2.2 Μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος

Μετά το σχηματισμό του λόγω της δράσης της κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2 κατά την πορεία καταβολισμού της PC, το αραχιδονικό οξύ (AA) μεταβολίζεται περαιτέρω σχηματίζοντας προσταγλανδίνες (PGs), λευκοτριένια (LT) και εποξυεικοσατριενοϊκό οξύ (EET) (**Γράφημα 19**). Η συνθάση 2 της προσταγλανδίνης G/H σχηματίζει τη προσταγλανδίνη H_2 , η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται στις προσταγλανδίνες F_2 και E_2 . Το AA σχηματίζει, επίσης, το λευκοτριένιο A_4 , το οποίο μεταβολίζεται σε λευκοτριένιο B_4 και C_4 , το οποίο με τη σειρά του σχηματίζει το λευκοτριένιο D_4 . Άλλο ένα παράγωγο του μεταβολισμού του AA είναι το εποξυεικοσατριενοϊκό οξύ. Παρατηρήθηκε ότι όλα τα ένζυμα που συμμετέχουν στις πορείες αυτές εμφάνισαν αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση (**Γράφημα 20**) και οι τιμές τους απεικονίζονται στον **Πίνακα 11**. Επίσης, παρατηρήσαμε ότι κάποιες πρωτεΐνες μεταβλήθηκαν περισσότερο μετά από κυκλικό stretch 15% (συνθάση της προσταγλανδίνης E και γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση), άλλες μετά από κυκλικό stretch

25% (συνθάση της προσταγλανδίνης G/H, αλδο-κετο ρεδουκτάση και καρβονυλορεδουκτάση) και άλλες είχαν παρόμοια μεταβολή και στις δύο συνθήκες stretch (κυτοσολική PLA₂, υδρολάση του λευκοτριενίου A-4 και κυτόχρωμα P450).



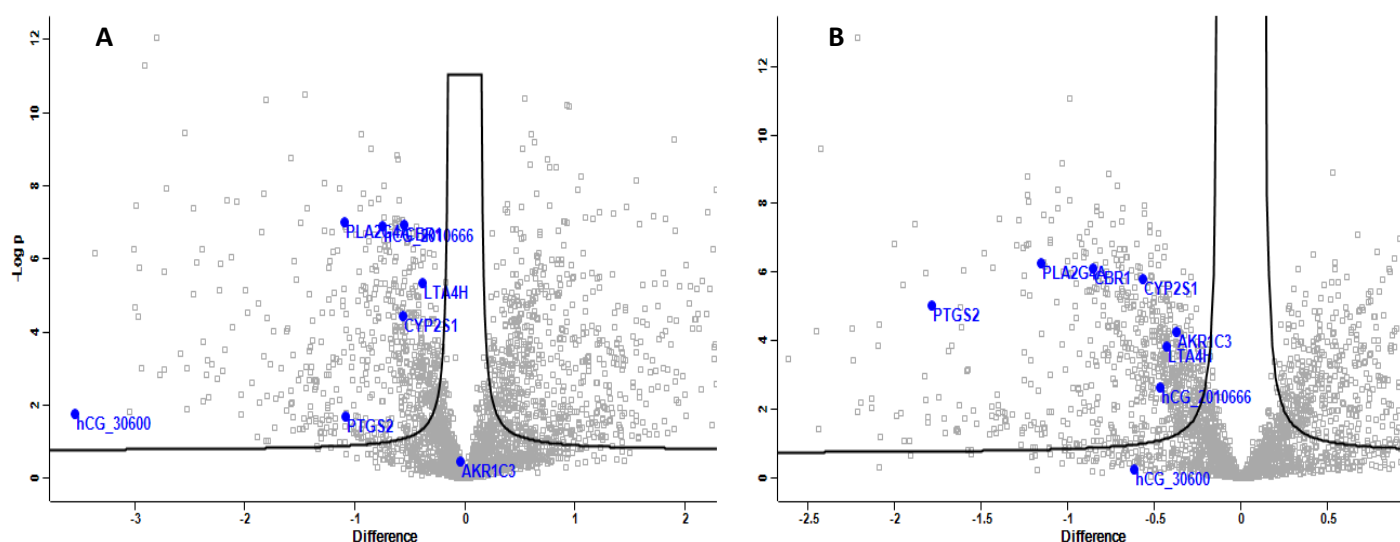
Γράφημα 19: Μεταβολικές πορείες του αραχιδονικού οξέος. Τα επισημασμένα με κόκκινο χρώμα γονίδια υποδηλώνουν αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση.

Πίνακας 11: Διαφορικά ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες των πορειών καταβολισμού της PC μετά από μηχανική διάταση 15% και 25%, 24 h σε σύγκριση με το control, καθώς και σύγκριση του stretch 15% με το 25%. Οι τιμές των μεταβολών είναι στατιστικά σημαντικές ($P < 0.05$). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

Όνομα γονιδίου	Όνομα πρωτεΐνης	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 15%	Ρύθμιση	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 25%	Ρύθμιση	Μεταβολή (fold change) stretch 15% vs stretch 25%	Ρύθμιση
<i>PLA2G4A</i>	Κυτοσολική φωσφολιπάση A2	2.15	↑	2.23	↑	-	-
<i>PTGS2</i>	Συνθάση της προσταγλανδίνης G/H 2	2.13	↑	3.46	↑	-	-
<i>AKR1C3</i>	Αλδο-κετο ρεδουκτάση 1-C3	-	-	1.30	↑	1.26	↑
<i>PTGES</i>	Συνθάση της	11.71	↑	-	-	7.63	↓

(hCG_30600)	προσταγλανδίνης E						
<i>CBR1</i>	Καρβονυλορεδουκτάση [NADPH] 1	1.47	↑	1.81	↑	1.23	↑
<i>LTA4H</i>	Υδρολάση του λευκοτριενίου A-4	1.31	↑	1.35	↑	-	-
<i>GGT1</i> (hCG_201066 6)	Γαμμα-γλουταμιλοπεπτιδάση 1	1.69	↑	1.38	↑	-	-
<i>CYP2S1</i>	Κυτόχρωμα P450 2S1	1.48	↑	1.49	↑	-	-

“-” : Δεν αναγράφονται οι τιμές για μεταβολές που δεν είναι στατιστικά σημαντικές.



Γράφημα 20: Volcano plots που δείχνουν το μέγεθος της μεταβολής (άξονας χ) και τη σημαντικότητα (άξονας ψ) των πρωτεϊνικών συγκρίσεων του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος μεταξύ: του control και του stretch 15% (A) και του control και του stretch 25% (B). Αριστερά των καμπυλών διαχωρισμού οι τιμές των πρωτεϊνών αυξάνονται μετά από μηχανική διάταση, ενώ δεξιά ελαττώνονται. Οι τιμές των πρωτεϊνών κάτω από τις καμπύλες δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Perseus. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

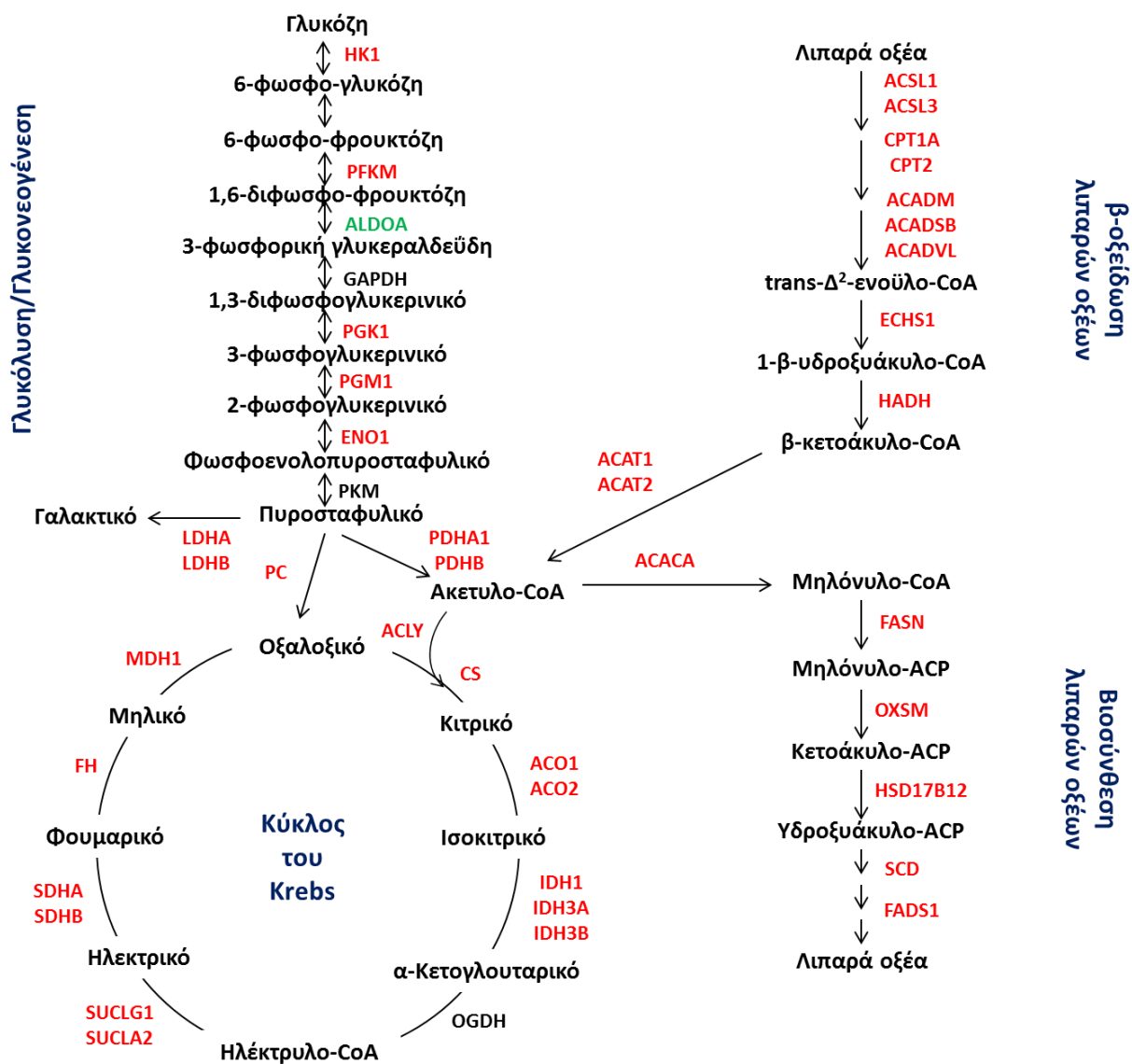
2.2.3 Κύκλος του κιτρικού οξέος (Krebs), γλυκόλυση/γλυκονεογένεση και μεταβολισμός λιπαρών οξέων

Τα λιπαρά οξέα ελευθερώνονται κατά την υδρόλυση της PC, όταν προσλαμβάνονται και ανακυκλώνονται από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II. Η ενεργοποίησή τους περιλαμβάνει τη μετατροπή τους σε ακετυλο-συνένζυμο A από την ακετυλο-CoA συνθετάση (β-οξειδωση λιπαρών οξέων), διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο κυτοσόλιο. Τα ΑΤΠ κύτταρα χρησιμοποιούν τα λιπαρά οξέα, τα οποία βιοσυντίθενται από το ακετυλο-CoA, για τη σύνθεση της PC και των άλλων φωσφολιπιδίων.

Έχουμε αναφέρει, στην ενότητα 4 της εισαγωγής ότι ο κορμός γλυκερόλης των φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα προέρχεται κυρίως από τη γλυκόζη. Κατά τη γλυκολυτική πορεία σχηματίζεται ακετυλο-CoA, από το οποίο προκύπτει ο σχηματισμός των λιπαρών οξέων και κατ' επέκταση των φωσφολιπιδίων, ανάμεσα στα οποία συγκαταλέγεται και η PC.

Τόσο κατά την πορεία της γλυκόλυσης/γλυκονεογένεσης όσο και κατά τη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων παράγεται ακετυλο-CoA, το οποίο συνδέεται με τον κύκλο του κιτρικού οξέος, ο οποίος λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και αποτελεί πηγή ενέργειας για τα κύτταρα.

Το **Γράφημα 21** περιγράφει και συνδέει τις τρεις αυτές βιοχημικές διεργασίες. Σχεδόν όλα τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις των διεργασιών αυτών εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης μετά από εφαρμογή μηχανικής διάτασης, 15% και 25%. Οι περισσότερες πρωτεΐνες μεταβλήθηκαν περισσότερο μετά από κυκλική παραμόρφωση 25%, ορισμένες μετά από 15% και κάποιες άλλες εμφάνισαν παρόμοια μεταβολή και στις δύο συνθήκες stretch. Η 2-οξογλουταρική αφυδρογονάση, που κωδικεύεται από το γονίδιο *OGDH*, ένζυμο του κύκλου του Krebs, καθώς και η δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης και η πυροσταφυλική κινάση, που κωδικεύονται από τα γονίδια *GAPDH* και *PKM*, αντίστοιχα και συμμετέχουν στη γλυκολυτική πορεία δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Επίσης, η αλδολάση A, ένζυμο της πορείας της γλυκόλυσης, που κωδικεύεται από το γονίδιο *ALDOA*, εμφάνισε μειωμένα επίπεδα έκφρασης. Η συλλογή και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων μας (**Πίνακας 12, Γράφημα 22**) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της διαδικτυακής βάσης δεδομένων DAVID, για την οποία έγινε αναφορά στην ενότητα 2 των αποτελεσμάτων.



Γράφημα 21: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου του κιτρικού οξέος, της γλυκόλυσης/γλυκονεογένεσης και της βιοσύνθεσης και β-οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Με κόκκινο χρώμα είναι επισημασμένα τα γονίδια, των οποίων τα ένζυμα παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης, με πράσινο χρώμα το γονίδιο με το μειωμένο επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης, ενώ με μαύρο χρώμα είναι επισημασμένα τα γονίδια, των οποίων τα ένζυμα δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μετά την εφαρμογή μηχανικής διάτασης.

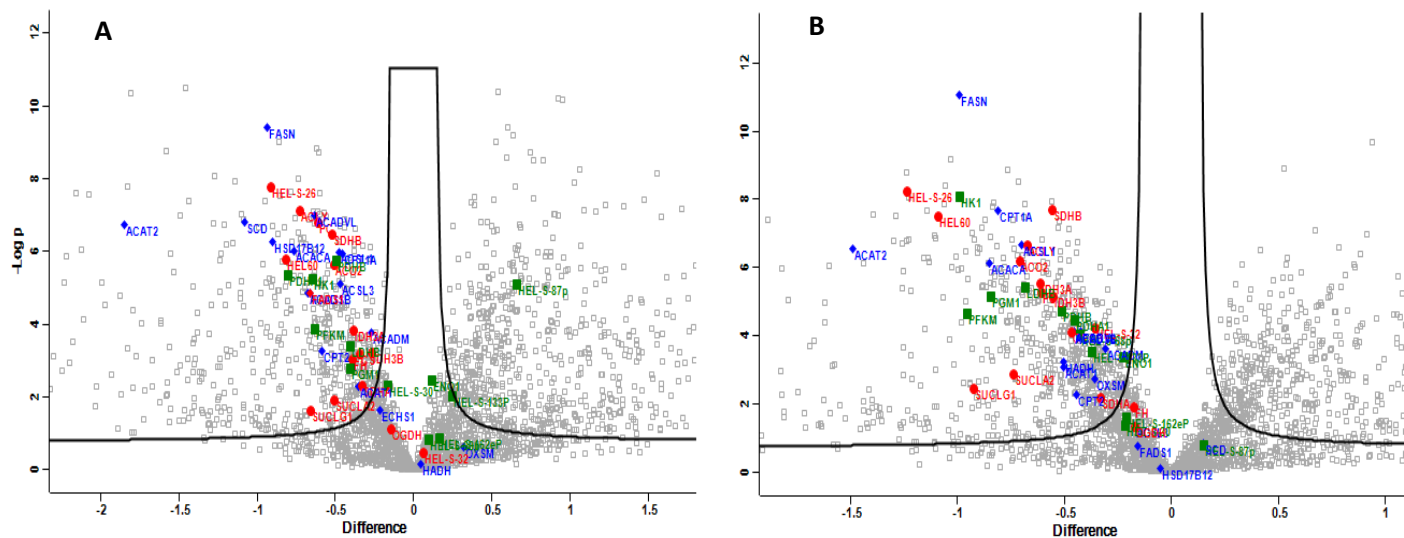
Πίνακας 12: Διαφορικά ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες του κύκλου του Krebs, της γλυκόλυσης/γλυκονεογένεσης και του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων μετά από μηχανικό stretch 15% και 25%, 24 h σε σύγκριση με το control, καθώς και σύγκριση του stretch 15% με το 25%. Οι τιμές των μεταβολών είναι στατιστικά σημαντικές ($P < 0.05$). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

Όνομα γονιδίου	Όνομα πρωτεΐνης	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 15%	Ρύθμιση	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 25%	Ρύθμιση	Μεταβολή (fold change) stretch 15% vs stretch 25%	Ρύθμιση
Κύκλος του Krebs							
<i>CS</i>	Κιτρική συνθάση, μιτοχονδριακή	1.27	↑	1.26	↑	-	-
<i>ACO1</i> (HEL60)	Κυτταροπλασματική ακονιτική υδρατάση	1.76	↑	2.13	↑	-	-
<i>ACO2</i>	Ακονιτική υδρατάση, μιτοχονδριακή	1.43	↑	1.64	↑	-	-
<i>IDH1</i> (HEL-S-26)	Ισοκιτρική δεϋδρογονάση [NADP] κυτταροπλασματική	1.89	↑	2.35	↑	1.25	↑
<i>IDH3A</i>	Ισοκιτρική δεϋδρογονάση [NAD] υπομονάδα Α, μιτοχονδριακή	1.31	↑	1.53	↑	-	-
<i>IDH3B</i>	Ισοκιτρική δεϋδρογονάση [NAD] υπομονάδα Β, μιτοχονδριακή	1.21	↑	1.47	↑	1.22	↑
<i>OGDH</i>	2-οξογλουταρική δεϋδρογονάση, μιτοχονδριακή	-	-	-	-	-	-
<i>SUCLG1</i>	Ηλεκτρυλο-CoA λιγάση [ADP/GDP-forming] υπομονάδα Α, μιτοχονδριακή	1.58	↑	1.90	↑	-	-
<i>SUCLA2</i>	Ηλεκτρυλο-CoA λιγάση [ADP-forming] υπομονάδα Β, μιτοχονδριακή	1.42	↑	1.67	↑	1.18	↑
<i>SDHA</i>	Ηλεκτρική αφυδρογονάση [ubiquinone] φλαβοπρωτεϊνική υπομονάδα, μιτοχονδριακή	1.26	↑	1.26	↑	-	-
<i>SDHB</i>	Ηλεκτρική αφυδρογονάση [ubiquinone] υπομονάδα σιδήρου-θείου, μιτοχονδριακή	1.44	↑	1.48	↑	-	-
<i>FH</i>	Φουμαρική υδρατάση, μιτοχονδριακή	1.31	↑	-	-	-	-
<i>MDH1</i> (HEL-S-32)	Μηλική αφυδρογονάση, κυτταροπλασματική	-	-	1.28	↑	1.34	↑

<i>PC</i>	Πυροσταφυλική καρβοξυλάση, μιτοχονδριακή	1.53	↑	1.53	↑	-	-
<i>ACLY</i>	ATP-κιτρική συνθάση	1.66	↑	1.60	↑	-	-
Γλυκόλυση/Γλυκονεογένεση							
<i>HK1</i>	Εξοκινάση-1	1.57	↑	1.99	↑	1.27	↑
<i>PFKM</i>	ATP-εξαρτώμενη 6-φωσφοφρουκτοκινάση	1.55	↑	1.94	↑	1.25	↑
<i>ALDOA</i> (<i>HEL-S87</i>)	Φρουκτοζο-διφωσφορική αλδολάση Α	1.58	↓	-	-	1.42	↑
<i>GAPDH</i> (<i>HEL-S-162eP</i>)	Δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης	-	-	-	-	-	-
<i>PGK1</i> (<i>HEL-S-68p</i>)	Φωσφογλυκερική κινάση 1	-	-	1.35	↑	1.44	↑
<i>PGM1</i>	Φωσφογλυκομουτάση-1	1.32	↑	1.79	↑	1.36	↑
<i>ENO1</i>	Αλφα-ενολάση	-	-	1.17	↑	1.26	↑
<i>PKM</i> (<i>HEL-S-30</i>)	Πυροσταφυλική κινάση	-	-	-	-	-	-
<i>LDHA</i> (<i>HEL-S-133P</i>)	L-γαλακτική αφυδρογονάση Α	-	-	1.29	↑	1.53	↑
<i>LDHB</i>	L-γαλακτική αφυδρογονάση Β	1.32	↑	1.61	↑	1.21	↑
<i>PDHA1</i>	Πυροσταφυλική αφυδρογονάση Ε1 υπομονάδα Α, μιτοχονδριακή	1.75	↑	1.37	↑	1.28	↓
<i>PDHB</i>	Πυροσταφυλική αφυδρογονάση Ε1 υπομονάδα Β, μιτοχονδριακή	1.41	↑	1.43	↑	-	-
Μεταβολισμός των λιπαρών οξέων							
<i>ACSL1</i>	Λιγάση μακριάς αλυσίδας λιπαρών οξέων-CoA 1	1.39	↑	1.62	↑	-	-
<i>ACSL3</i>	Λιγάση μακριάς αλυσίδας λιπαρών οξέων-CoA 3	1.38	↑	-	-	1.23	↓
<i>CPT1A</i>	Καρνιτίνη Ο-παλμιτοϋλοτρανσφεράση 1, ηπατική ισομορφή	1.37	↑	1.75	↑	1.28	↑
<i>CPT2</i>	Καρνιτίνη Ο-παλμιτοϋλοτρανσφεράση 2, μιτοχονδριακή	1.50	↑	1.36	↑	-	-
<i>ACADM</i>	Αφυδρογονάση μέσης αλυσίδας ακυλο-CoA, μιτοχονδριακή	1.21	↑	1.24	↑	-	-
<i>ACADSB</i>	Αφυδρογονάση μικρής αλυσίδας ακυλο-CoA, μιτοχονδριακή	1.60	↑	1.38	↑	-	-
<i>ACADVL</i>	Αφυδρογονάση πολύ μεγάλης αλυσίδας ακυλο-CoA, μιτοχονδριακή	1.55	↑	1.37	↑	-	-
<i>ECHS1</i>	Ενοϋλο-CoA υδρατάση, μιτοχονδριακή	-	-	1.34	↑	-	-
<i>HADH</i>	Υδροξυακυλο-CoA αφυδρογονάση,	-	-	1.42	↑	1.46	↑

	μιτοχονδριακή						
<i>ACAT1</i>	Ακετυλο-CoA ακυλοτρανσφεράση, μιτοχονδριακή	1.28	↑	1.42	↑	-	-
<i>ACAT2</i>	Ακετυλο-CoA ακυλοτρανσφεράση, κυτοσολική	3.60	↑	2.80	↑	-	-
<i>ACACA</i>	Ακετυλο-CoA καρβοξυλάση 1	1.70	↑	1.81	↑	-	-
<i>FASN</i>	Συνθάση λιπαρού οξέος, [Acyl-carrier-protein] S- μηλονυλοτρανσφεράση	1.91	↑	1.99	↑	-	-
<i>OXSM</i>	3-οξοακυλ-[acyl-carrier- protein] συνθάση, μιτοχονδριακή	-	-	1.28	↑	1.60	↑
<i>HSD17B1</i> <i>2</i>	Πολύ μεγάλης αλυσίδας 3- οξοακυλο-CoA ρεδοκτάση	1.87	↑	-	-	1.81	↓
<i>SCD</i>	Ακυλο-CoA δεσατουράση	2.11	↑	-	-	2.34	↓
<i>FADS1</i>	Δεσατουράση λιπαρού οξέος 1	1.58	↑	-	-	1.42	↓

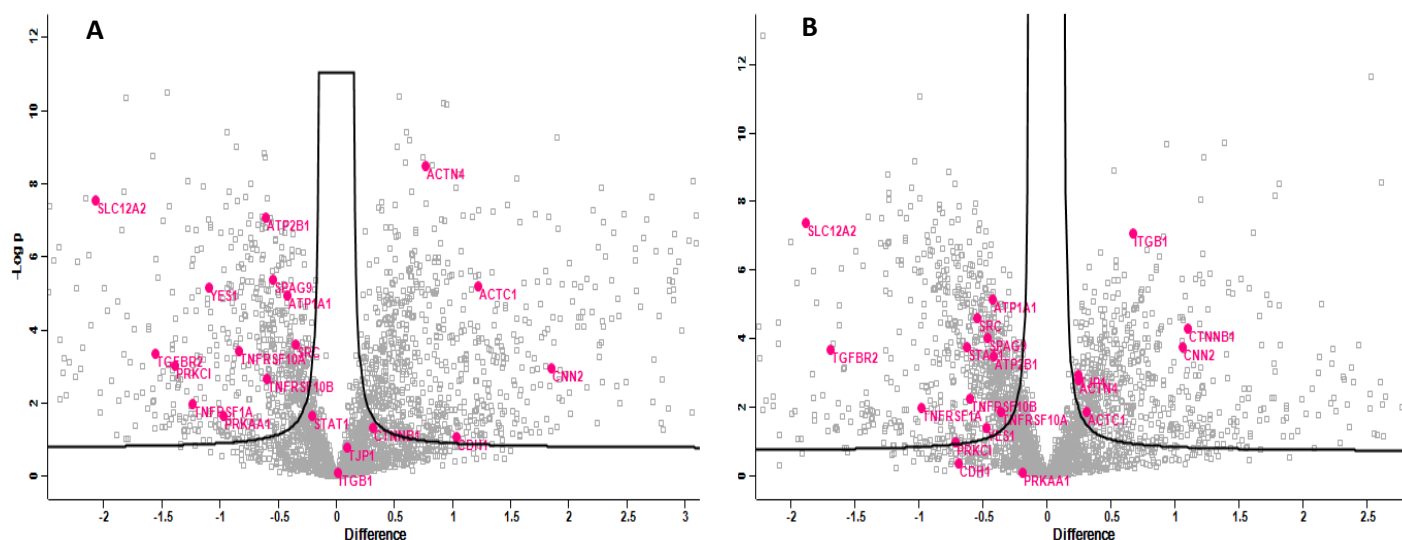
“-” : Δεν αναγράφονται οι τιμές για μεταβολές που δεν είναι στατιστικά σημαντικές.



Γράφημα 22: Volcano plots που δείχνουν το μέγεθος της μεταβολής (άξονας χ) και τη σημαντικότητα (άξονας ψ) των πρωτεϊνικών συγκρίσεων του κύκλου του Krebs (κόκκινο χρώμα), της γλυκόλυσης/γλυκονεογένεσης (πράσινο χρώμα) και του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων (μπλε χρώμα) μεταξύ: του control και του stretch 15% (A) και του control και του stretch 25% (B). Αριστερά των καμπυλών διαχωρισμού οι τιμές των πρωτεϊνών αυξάνονται μετά από μηχανική διάταση, ενώ δεξιά ελαττώνονται. Οι τιμές των πρωτεϊνών κάτω από τις καμπύλες δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Perseus. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

2.2.4 Μεταβολές άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόκριση των κυττάρων A549 στη μηχανική διάταση

Στο **Γράφημα 23** και τον **Πίνακα 13** απεικονίζονται πρωτεΐνες που μεταβλήθηκαν κατά την απόκριση των κυττάρων A549 στο μηχανικό ερέθισμα. Η κατενίνη βήτα-1, η καντερίνη-1 και η πρωτεΐνη στεγανού συνδέσμου 1 (tight junction protein 1), που κωδικοούνται από τα γονίδια *CTNNB1*, *CDH1* και *TJP1*, αντίστοιχα, συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων στην κυτταρική μεμβράνη και σε άλλα κύτταρα με το σχηματισμό δεσμών και παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης. Το ίδιο συμβαίνει και με την ιντεγκρίνη β1, που κωδικοείται από το γονίδιο *ITGB1*, η οποία είναι κυτταρικός υποδοχέας που αλληλεπιδρά με την εξωκυττάρια μήτρα. Η άλφα-ακτινίνη-4, η καλπονίνη-2 και η άλφα-ακτίνη, που κωδικοούνται από τα γονίδια *ACTN4*, *CNN2* και *ACTA1*, αντίστοιχα, αποτελούν συστατικά του κυτταροσκελετού της ακτίνης κι εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης. Αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση παρουσίασαν τρεις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως διάλυτοι ιόντων Ca^{2+} ή Na^+/K^+ , οι οποίοι κωδικοούνται από τα γονίδια *ATP2B1*, *ATP1A1* και *SLC12A2*. Πρωτεϊνικές κινάσες και κινάσες της τυροσίνης, που κωδικοούνται από τα γονίδια *PRKAA1*, *PRKC1*, *SPAG9*, *YES1* και *SRC* εμφάνισαν αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση και είναι υπεύθυνες για τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της σηματοδότησης μετά από την εφαρμογή μηχανικού ερεθίσματος. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης εμφάνισε και ο υποδοχέας μετασχηματισμού του αυξητικού παράγοντα βήτα (TGF-beta receptor), που κωδικοείται από το γονίδιο *TGFBR2* και συμμετέχει στη μεταγωγή του μηχανικού σήματος, καθώς και ο μεταγραφικός παράγοντας STAT1, που κωδικοείται από το γονίδιο *STAT1*. Τέλος, τρεις πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκου και κωδικοούνται από τα γονίδια *TNFRSF10B*, *TNFRSF10A* και *TNFRSF1A* παρουσίασαν αυξημένη πρωτεϊνική σύνθεση και η δράση τους σχετίζεται με τη διαδικασία της απόπτωσης. Οι περισσότερες πρωτεΐνες μεταβλήθηκαν περισσότερο μετά από 15% κυκλικό stretch, ενώ λίγες ήταν εκείνες που παρουσίασαν μεγαλύτερη μεταβολή μετά από 25% κυκλικό stretch.



Γράφημα 23: Volcano plots που δείχνουν το μέγεθος της μεταβολής (άξονας χ) και τη σημαντικότητα (άξονας ψ) των πρωτεϊνικών συγκρίσεων της απόκρισης στο μηχανικό ερέθισμα μεταξύ: του control και του stretch 15% (A) και του control και του stretch 25% (B). Αριστερά των καμπυλών διαχωρισμού οι τιμές των πρωτεϊνών αυξάνονται μετά από μηχανική παραμόρφωση, ενώ δεξιά ελαττώνονται. Οι τιμές των πρωτεϊνών κάτω από τις καμπύλες δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Perseus. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

Πίνακας 13: Διαφορικά ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες της απόκρισης στο μηχανικό ερέθισμα μετά από μηχανικό stretch 15% και 25%, 24 h σε σύγκριση με το control, καθώς και σύγκριση του stretch 15% με το 25%. Οι τιμές των μεταβολών είναι στατιστικά σημαντικές ($P < 0.05$). Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τρία ανεξάρτητα πειράματα, ενώ κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές.

Όνομα γονιδίου	Όνομα πρωτεΐνης	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 15%	Ρύθμιση	Μεταβολή (fold change) control vs stretch 25%	Ρύθμιση	Μεταβολή (fold change) stretch 15% vs stretch 25%	Ρύθμιση
<i>CTNNB1</i>	Κατενίνη βήτα-1	-	-	2.14	↓	1.73	↓
<i>CDH1</i>	Καντερίνη-1	2.04	↓	-	-	3.30	↑
<i>TJP1</i>	Πρωτεΐνη στεγανού συνδέσμου ZO-1	-	-	1.19	↓	-	-
<i>ATP2B1</i>	ATPase μεταφοράς ασβεστίου 1 πλασματικής μεμβράνης	1.53	↑	1.33	↑	-	-

<i>ATP1A1</i>	ATPase μεταφοράς Na ⁺ /K ⁺ υπομονάδας άλφα-1	1.34	↑	1.35	↑	-	-
<i>SLC12A2</i>	Διαλυτή πρωτεΐνη- μεταφορέας-12A2	4.21	↑	3.70	↑	-	-
<i>ITGB1</i>	Ιντεγκρίνη βήτα-1	-	-	1.59	↓	1.58	↓
<i>ACTN4</i>	Άλφα-ακτινίνη-4	1.70	↓	1.18	↓	1.44	↑
<i>CNN2</i>	Καλπονίνη-2	3.59	↓	2.08	↓	1.73	↑
<i>ACTA1</i> (<i>ACTC1</i>)	Ακτίνη, άλφα	2.33	↓	1.24	↓	1.88	↑
<i>PRKAA1</i>	5-AMP-ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση καταλυτικής υπομονάδας άλφα-1	1.96	↑	-	-	-	-
<i>PRKCI</i>	Πρωτεϊνική κινάση C τύπου γιώτα	2.63	↑	1.64	↑	1.60	↓
<i>SPAG9</i>	C-Jun-αμινο-τελική κινάση- 4	1.47	↑	1.38	↑	-	-
<i>YES1</i>	Πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης Yes	2.14	↑	1.39	↑	1.54	↓
<i>SRC</i>	Πρωτο-ογκογονο πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης Src	1.28	↑	1.46	↑	-	-
<i>TGFB2</i>	TGF-βήτα υποδοχέα τύπου-2	2.95	↑	3.22	↑	-	-
<i>STAT1</i>	Ενεργοποιητής της μεταγραφής και μεταγωγέας σήματος 1	-	-	1.55	↑	1.34	↑
<i>TNFRSF10</i> <i>B</i>	Υποδοχέας παράγοντα νέκρωσης όγκου-10B	1.52	↑	1.52	↑	-	-
<i>TNFRSF10</i> <i>A</i>	Υποδοχέας παράγοντα νέκρωσης όγκου-10A	1.79	↑	1.28	↑	1.40	↓
<i>TNFRSF1A</i>	Υποδοχέας παράγοντα νέκρωσης όγκου-1A	2.37	↑	1.98	↑	-	-

“-” : Δεν αναγράφονται οι τιμές για μεταβολές που δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα κύρια ευρήματα στην παρούσα εργασία ήταν:

1. Η κυκλική εφαρμογή stretch 15%, διάρκειας 1h , 6 h και 24 h στα κύτταρα A549 οδήγησε στη μειωμένη γονιδιακή έκφραση του ρυθμιστικού ενζύμου, CCTα, ενώ στην περίπτωση του κυκλικού stretch 25% παρατηρήθηκε επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης του ενζύμου μετά από 6 h, η οποία διατηρήθηκε έως και τις 24 h.
2. Μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση του ρυθμιστικού ενζύμου παρατηρήθηκε μετά από την εφαρμογή και των δύο συνθηκών κυκλικής μηχανικής διάτασης, 15% και 25%, διάρκειας 24 h στα κύτταρα A549.
3. Η κυκλική εφαρμογή stretch επηρέασε κυρίως τα ένζυμα που συμμετέχουν στον καταβολισμό της PC σε σχέση με εκείνα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεσή της.
4. Το κυκλικό stretch προκάλεσε την επαγωγή των πρωτεϊνών που συμμετέχουν τόσο στη βιοσύνθεση όσο και στη διάσπαση (β-οξείδωση) των λιπαρών οξέων, τα οποία σχηματίζονται κατά τον καταβολισμό της PC.
5. Αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση παρατηρήθηκε και στα ένζυμα της γλυκολυτικής πορείας και του κύκλου του κιτρικού οξέος, μεταβολικές πορείες οι οποίες συνδέονται τόσο με το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, όσο και με τη βιοσύνθεση της PC και άλλων φωσφολιπιδίων.
6. Παρατηρήθηκαν μεταβολές σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος μετά την εφαρμογή του μηχανικού ερεθίσματος.

Επίδραση της μηχανικής διάτασης στην πρωτεϊνική και γονιδιακή έκφραση του ρυθμιστικού ενζύμου του μεταβολισμού της PC, CCTα, καθώς και στη βιοσύνθεση και αναδιαμόρφωση της PC σε κύτταρα A549.

Η μελέτη του ρυθμιστικού ενζύμου του μεταβολισμού της PC, η CTP: φωσφοχολινο κυτιδυλοτρανσφεράση, CCTα, αποτέλεσε τον πρωταρχικό σκοπό της παρούσας εργασίας. Τόσο με τη βοήθεια της ποσοτικής RT-PCR όσο και της πρωτεομικής ανάλυσης, προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε τη γονιδιακή και

πρωτεϊνική έκφραση αυτού του ενζύμου μετά την κυκλική εφαρμογή μηχανικής διάτασης. Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του ρυθμιστικού ενζύμου, τα κύτταρα A549 υποβλήθηκαν σε κυκλική μηχανική διάταση 15% και 25%, διάρκειας 1 h, 6 h και 24 h. Όσον αφορά την εφαρμογή μηχανικής διάτασης 15%, παρατηρήσαμε μία συνεχή μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PCYT1A* έως και τις 24 h. Ωστόσο, μετά την εφαρμογή μηχανικής διάτασης 25% στα κύτταρα A549, σημειώθηκε μία αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου μετά από 6 h, η οποία διατηρήθηκε έως τις 24 h. Από τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης προέκυψε ότι και τα δύο μεγέθη μηχανικής διάτασης, 15% και 25%, διάρκειας 24 h, ανέστειλαν την πρωτεϊνική έκφραση του ενζύμου, με αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού παραγωγής της PC. Και οι δύο μεταβολές ήταν στατιστικά σημαντικές με μεγαλύτερη εκείνη της μηχανικής διάτασης 15%, κατά την οποία τα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου υποδιπλασιάστηκαν. Η διαφορά μεταξύ της γονιδιακής και της πρωτεϊνικής έκφρασης που εντοπίζεται στην περίπτωση του κυκλικού stretch 25% πιθανόν οφείλεται στη διαφορετική ευαισθησία των δύο μεθόδων.

Μελετήθηκαν, επίσης, σε πρωτεϊνικό επίπεδο τα ένζυμα που συμμετέχουν στην πορεία βιοσύνθεσης και αναδιαμόρφωσης της PC μετά την επίδραση κυκλικού stretch 15% και 25%, διάρκειας 24 h. Στη *de novo* πορεία βιοσύνθεσης της PC, όλες οι πρωτεΐνες, εκτός από την ακυλοτρανσφεράση της φωσφορικής διϋδροξυακετόνης, εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης. Οι πρωτεΐνες με τη μεγαλύτερη αύξηση ήταν η ακυλοτρανσφεράση του 1-ακυλογλυκεροφωσφορικού (σχεδόν διπλασιάστηκε μετά από stretch 15%) και η λιπιδική φωσφορική φωσφοϋδρολάση 2 (τριπλασιάστηκε μετά από stretch 15%). Όσον αφορά την πορεία της CDP-χολίνης και της αναδιαμόρφωσης της PC σε DPPC, εκτός από τη μείωση των επιπέδων πρωτεΐνης του ρυθμιστικού ενζύμου, CCTα, αναστολή της πρωτεϊνικής τους έκφρασης παρουσίασαν και οι ακυλοτρανσφεράσες της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης 1 και 2. Αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης παρουσίασαν η πρωτεΐνη-μεταφορέας της χολίνης, η οποία διπλασιάστηκε μετά από stretch 25%, η ανεξάρτητη από Ca^{2+} φωσφολιπάση A_2 (υπεροξειρεδοξίνη (peroxiredoxin-6) ή *ai*-PLA₂) με μία μικρότερη αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση και η λυσοφωσφολιπιδική ακυλοτρανσφεράση 5, η οποία σχεδόν τριπλασιάστηκε μετά από stretch 15%.

Στο εργαστήριό μας έχει ερευνηθεί και αποδειχθεί η επαγωγή της βιοσύνθεσης και αναδιαμόρφωσης της PC σε DPPC σε κύτταρα A549 μετά από στατικό stretch 5%, διάρκειας 1 h, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του ενζύμου που

καταλύει το τελικό βήμα βιοσύνθεσης της PC, της CDP-χολίνη: χολινοφωσφοτρανσφεράσης (CPT), της ανεξάρτητης από Ca^{2+} φωσφολιπάσης A_2 (ai-PLA₂) που καταλύει την απακυλίωση της PC και της ακυλοτρανσφεράσης της φωσφατιδυλοχολίνης (LPCAT) που καταλύει την επανακυλίωση της lyso-PC²⁰¹. Στην παρούσα εργασία δεν μελετήθηκε το ένζυμο CPT. Παρατηρήσαμε αναστολή της έκφρασης του ρυθμιστικού ενζύμου, CCTa μετά από 24 h κυκλικού stretch 15% και 25%, η οποία υποδηλώνει μείωση του ρυθμού παραγωγής της PC. Μπορούμε να συμπεράνουμε, λοιπόν, ότι μία μικρού μεγέθους και διάρκειας διάταση επάγει τη βιοσύνθεση της PC, ενώ αυξανόμενης της διάρκειας και του μεγέθους της διάτασης ο ρυθμός παραγωγής της μειώνεται. Παρατηρήσαμε, επίσης, μία μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση της ai-PLA₂ και μία τριπλάσια αύξηση της LPCAT3, που συμφωνούν με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας.

Η εφαρμογή μηχανικής διάτασης σε καλλιέργειες πνευμονοκυττάρων προσομοιάζει το μηχανικό αερισμό σε ασθενείς που βρίσκονται διασωληνωμένοι στη μονάδα εντατικής θεραπείας, γι' αυτό και οι επιπτώσεις και των δύο στον επιφανειοδραστικό παράγοντα των πνευμόνων και συγκεκριμένα στα φωσφολιπίδια μπορούν να συσχετιστούν μεταξύ τους. Σε παλαιότερες δημοσιευμένες εργασίες του εργαστηρίου μας, ερευνήθηκαν οι επιπτώσεις του μηχανικού αερισμού σε ασθενείς με σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) ή πνευμονία και σε control ασθενείς (ασθενείς με υγιείς πνεύμονες). Δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) από διασωληνωμένους ασθενείς με υγιείς πνεύμονες έδειξαν, σε διάρκεια δύο εβδομάδων νοσηλείας, μείωση των επιπέδων της PC, φωσφολιπίδιο το οποίο ρυθμίζει την μείωση της επιφανειακής τάσης στη διεπιφάνεια αερίου/υγρού²⁰². Επιπλέον, σε δείγματα BAL διασωληνωμένων ασθενών με ατελεκτασία, πνευμονία ή ARDS παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα της PC και παράλληλα μία μικρή αύξηση των επιπέδων της lyso-PC και άλλων λυσοφωσφολιπιδίων, λόγω της δράσης των φωσφολιπασών, τα οποία αδρανοποιούν τον επιφανειοδραστικό παράγοντα και προκαλούν βλάβη στο κυψελιδικό επιθήλιο^{203,204}.

Άλλη βιβλιογραφική έρευνα υποδεικνύει την αναστολή τόσο της πρωτεϊνικής όσο και της γονιδιακής έκφρασης του ρυθμιστικού ενζύμου σε κύτταρα A549 μετά από 4 h έως και 24 h εφαρμογής μηχανικής διάτασης 25% και 37%, ενώ μετά από εφαρμογή μηχανικής διάτασης 12% τα επίπεδα έκφρασης επανέρχονται σε εκείνα του control μετά από 24 h²⁰⁵. Πρόκειται, ωστόσο, για στατική και όχι κυκλική εφαρμογή μηχανικής διάτασης, όπως στη δική μας περίπτωση.

Ήδη από την εισαγωγή, έχουμε αναφέρει ότι η CCTa, η οποία αποτελεί την κυριότερη ισομορφή στους πνεύμονες, είναι ένα αμφιτροπικό ένζυμο που είτε βρίσκεται στο κυτοσόλιο σε διαλυτή ανενεργή μορφή είτε ενεργοποιείται συνδεδεμένο σε μεμβράνες. Ως εκ τούτου, είναι ένα ρυθμιστικό ένζυμο το οποίο ελέγχει τη βιοσυνθετική ροή και την ομοιόσταση της PC^{158,206}. Ο ρόλος αυτός της CCTa μπορεί να εξηγήσει τη δράση της στην παρούσα εργασία, διότι η CCTa αναστέλλει την έκφρασή της μετά από την εφαρμογή μηχανικής διάτασης, με αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού παραγωγής της PC, αλλά τη διατηρήσή της σε σταθερό επίπεδο.

Δημοσιευμένες έρευνες υποστηρίζουν ότι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των c-Jun N-τελικών κινασών, καθώς και η πρωτεϊνική κινάση C, αναστέλλουν τη δραστηριότητα της CCTa, μειώνοντας παράλληλα και το ποσοστό σύνθεσης της PC^{207,208}. Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν το ρυθμιστικό ένζυμο στη C-τελική περιοχή φωσφορυλίωσης, με αποτέλεσμα να το καθιστούν ανενεργό στη διαλυτή μορφή του. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες αυτές ήταν η κυτταρική σειρά H441, πνευμονοκυττάρων ανθρώπου και τα MLE, πνευμονικά κύτταρα ποντικού. Στην εργασία μας διαπιστώσαμε μία μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης μίας πρωτεΐνης μέλους της οικογένειας των c-Jun N-τελικών κινασών και μία σχεδόν διπλάσια αύξηση μίας πρωτεΐνης μέλους των πρωτεϊνικών κινασών C μετά από εφαρμογή μηχανικής διάτασης. Η αύξηση των επιπέδων έκφρασης των δύο αυτών κινασών πιθανόν ευθύνεται για τη φωσφορυλίωση της CCTa και συνεπώς τη μείωση του ποσοστού του ενεργού ενζύμου, το οποίο συνδέεται στις λιπιδικές μεμβράνες.

Επίδραση της μηχανικής διάτασης στις πορείες καταβολισμού της PC και τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος.

Παρατηρήσαμε ότι η εφαρμογή κυκλικής μηχανικής διάτασης στα κύτταρα A549 επηρέασε περισσότερο τις πορείες καταβολισμού της PC από ότι την πορεία βιοσύνθεσης και αναδιαμόρφωσής της. Το μηχανικό αυτό ερέθισμα προκάλεσε την επαγωγή σχεδόν όλων των πρωτεϊνών που καταλύουν αντιδράσεις στις πορείες αυτές με τις τιμές τους να ξεπερνούν τη διπλάσια αύξηση σε σχέση με την κατάσταση ηρεμίας.

Αναλυτικά, η μηχανική διάταση είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της κυτοσολικής φωσφολιπάσης A₂ (διπλασιάστηκε μετά από κυκλικό stretch 15% και 25%), η οποία συνοδεύεται από την παραγωγή αραχιδονικού οξέος και lyso-PC.

Ανάλογο εύρημα έχει δημοσιευτεί σε εργασία του εργαστηρίου μας σύμφωνα με την οποία μία ήπια στατική μηχανική διάταση της τάξης του 4% ενεργοποίησε τη cPLA₂ μέσα σε σύντομο διάστημα 15 min σε κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II μέσω των ανεξάρτητων πορειών MEK/ERK και PI3K²⁰⁹. Η lyso-PC, προϊόν υδρόλυσης της cPLA₂, έχει βρεθεί ότι σε ανθρώπινα κύτταρα του πνεύμονα αλληλεπιδρά με τα μεμβρανικά λιπίδια με τα οποία συνδέεται η CCTa προκαλώντας την μετατόπισή της στον πυρήνα, όπου βρίσκεται σε ανεργή κατάσταση^{204,210}.

Το δεύτερο προϊόν υδρόλυσης της PC από τη cPLA₂ είναι το αραχιδονικό οξύ, το οποίο με τη σειρά του μεταβολίζεται στους φλεγμονώδεις μεσολαβητές: τις προσταγλανδίνες, τα λευκοτριένια και το εποξυεικοσατριenoϊκό οξύ. Όλες οι πρωτεΐνες που καταλύουν τις αντιδράσεις του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης μετά από την εφαρμογή κυκλικής μηχανικής διάτασης 15% και 25%. Τα παραγόμενα λευκοτριένια διεγείρουν την εισροή Ca²⁺ κι ενεργοποιούν περαιτέρω τη cPLA₂^{204,206}.

Τα κεραμίδια, προϊόντα του καταβολισμού της PC, σχηματίστηκαν μετά από την αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση της φωσφοδιεστεράσης της σφίγγομυελίνης, τα επίπεδα της οποίας τριπλασιάστηκαν με την εφαρμογή κυκλικού stretch 15%. Δημοσιευμένες μελέτες σε ανθρώπινα πνευμονοκύτταρα και ηπατοκύτταρα υπέδειξαν ότι ανάλογα κεραμιδίου ελάττωσαν τη σύνθεση της PC στοχεύοντας στην αναστολή του ρυθμιστικού ενζύμου, CCTa, προκαλώντας απόπτωση^{211,212}.

Τέλος, μία από τις πορείες καταβολισμού της PC οδηγεί στην αναγέννηση της χολίνης και την παραγωγή φωσφατιδικού οξέος, αντίδραση η οποία καταλύεται από τη φωσφολιπάση D3. Το ένζυμο αυτό εμφάνισε αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης μετά την εφαρμογή κυκλικής μηχανικής διάτασης (διπλασιάζεται μετά από κυκλικό stretch 15%).

Η χολίνη, καθώς και οι λιπιδικοί δεύτεροι αγγελιοφόροι, όπως η DAG, το PA και το αραχιδονικό οξύ συμμετέχουν στον μεταβολικό κύκλο της PC, στον οποίο η αποδόμηση της PC παράγει λιπιδικούς μεσολαβητές για τις σηματοδοτικές λειτουργίες και συγχρόνως τα λιπίδια αυτά ενεργοποιούν τη CCT για την επανασύνθεση της PC, διατηρώντας έτσι την ομοιοστασία της^{213,214}.

Επίδραση της μηχανικής διάταξης στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, τον κύκλο του κιτρικού οξέος και την πορεία της γλυκόλυσης.

Η εφαρμογή της μηχανικής διάταξης στα κύτταρα A549 επέφερε την επαγωγή των πρωτεϊνών που καταλύουν τόσο τις αντιδράσεις βιοσύνθεσης όσο και εκείνες της β-οξειδωσης (διάσπασης) των λιπαρών οξέων, όπως υπέδειξαν τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης. Τα λιπαρά οξέα ελευθερώνονται κατά τον καταβολισμό της PC και άλλων φωσφολιπιδίων και στη συνέχεια προσλαμβάνονται και ανακυκλώνονται από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II για τη σύνθεση των φωσφολιπιδίων¹⁸. Όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή, τα λιπαρά οξέα συμπεριλαμβάνονται στους ενεργοποιητές του ρυθμιστικού ενζύμου, CCTα¹⁷¹. Ωστόσο, λόγω του μεταβολισμού τους σε ακετυλο-CoA ενδέχεται να μην μπορούν να συσσωρευτούν ώστε να οδηγήσουν στη σύνθεση της PC²¹¹.

Επίσης, η κυκλική διάταξη είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην πορεία της γλυκόλυσης και στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Οι μεταβολικές αυτές πορείες μαζί με τη βιοσύνθεση και τη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων συνδέονται μεταξύ τους με ένα μόριο, το ακετυλο-συνένζυμο Α. Στους πνεύμονες, η γλυκόζη προσλαμβάνεται κυρίως μέσω της κυκλοφορίας. Τα κυριότερα προϊόντα της γλυκολυτικής πορείας είναι το γαλακτικό και το πυροσταφυλικό οξύ. Το τελευταίο σχηματίζει το ακετυλο-CoA, το οποίο εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος και αποτελεί το πρόδρομο μόριο βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων, από τα οποία βιοσυντίθενται τα φωσφολιπίδια. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος αποτελεί πηγή ενέργειας μέσω της οξειδωσης του πυροσταφυλικού και των λιπαρών οξέων. Η συνεχής λειτουργία του απαιτεί την αναπλήρωση των ενδιάμεσων προϊόντων που διοχετεύονται για τις αναβολικές αντιδράσεις. Η διαδικασία αναπλήρωσης επιτυγχάνεται μέσω της καρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού προς οξαλοξικό μέσω της εξαρτώμενης από ATP πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης^{215,216}.

Μεταβολές πρωτεϊνικής έκφρασης κατά τη μεταγωγή μηχανικού σήματος

Η εφαρμογή μηχανικής διάταξης στα κύτταρα A549 προκάλεσε ποικίλες μεταβολές στην έκφραση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη μεταγωγή του μηχανικού σήματος. Οι πρωτεΐνες κυτταρικής προσκόλλησης κατενίνη βήτα-1 και καντερίνη-1, καθώς και η πρωτεΐνη ZO-1 των στεγανών συνδέσμων μείωσαν τα

επίπεδα έκφρασής τους λόγω του κυκλικού μηχανικού ερεθίσματος. Το ίδιο συνέβη και με τις πρωτεΐνες ιντεγκρίνη βήτα-1, άλφα ακτινίνη-4, καλπονίνη-2 και ακτίνη-1, που αποτελούν συστατικά του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Πράγματι, η κυκλική εφαρμογή μηχανικής διάτασης επάγει δομικές και κυτοσολικές αλλαγές στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα και τελικά προκαλεί δυσλειτουργία του επιθηλιακού φραγμού και πνευμονική διαπερατότητα, όπως αποδεικνύεται από τη βιβλιογραφία. Η διάσπαση των ενδοκυττάρων συνδέσμων, η οποία προκαλείται από τις μειώσεις της έκφρασης των πρωτεϊνών των στεγανών συνδέσμων είναι ένας σημαντικός παράγοντας της αύξησης της επιθηλιακής διαπερατότητας²¹⁷.

Το μηχανικό ερέθισμα προκάλεσε την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών-διαύλων ιόντων Ca^{2+} και Na^+/K^+ . Τα ιόντα Ca^{2+} , με την παράλληλη απελευθέρωση ATP, παίζουν σημαντικό ρόλο ως δεύτεροι αγγελιοφόροι οι οποίοι μεταδίδουν το σήμα από το σύμπλοκο εξωκυττάριας μήτρας-ιντεγκρίνης-κυτταροσκελετού στο εσωτερικό του κυττάρου²¹⁸. Επίσης, έχουμε αναφέρει ότι τα ιόντα Ca^{2+} εργοποιούν τη cPLA₂. Η κυκλική μηχανική διάταση σε κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα οδήγησε σε αύξηση της δραστηριότητας της αντλίας Na^+ με σκοπό την απορρόφηση του πνευμονικού οιδήματος που προκαλείται από την αυξημένη διαπερατότητα του κυψελιδικού επιθηλίου²¹⁹.

Αύξηση παρατηρήθηκε και στην έκφραση των πρωτεϊνικών κινάσων μετά την εφαρμογή κυκλικής μηχανικής διάτασης και συγκεκριμένα στην 5-AMP πρωτεϊνική κινάση, την πρωτεϊνική κινάση C, τις κινάσες τυροσίνης Yes και Src και τη c-Jun αμινο-τελική κινάση, ο ρόλος των οποίων είναι η φωσφορυλίωση άλλων πρωτεϊνών κατά τη μεταγωγή του μηχανικού σήματος. Ανάλογη αύξηση βρέθηκε και στην πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα μετασχηματισμού του αυξητικού παράγοντα βήτα (TGF-beta receptor). Η ενεργοποίηση της 5-AMP πρωτεϊνικής κινάσης λόγω της κυκλικής μηχανικής διάτασης απαιτεί την παρουσία δυστρογλυκάνης, μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που συνδέει την εξωκυττάρια μήτρα με τον κυτταροσκελετό και μεσολαβεί στη μεταγωγή του σήματος στον πνεύμονα²²⁰. Έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι η μηχανική παραμόρφωση ενεργοποιεί την PKC, η οποία φωσφορυλιώνει τη c-Src κινάση κι εκείνη με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και επιφέρει τη μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της p120-κατενίνης, που παίζει ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας των επιθηλιακών κυττάρων²²¹. Η πρωτεϊνική κινάση C και η c-Jun N-τελική κινάση φωσφορυλιώνουν και αναστέλλουν τη δραστηριότητα του ρυθμιστικού ενζύμου, CCTα, μετά από μηχανική διάταση, όπως αναφέραμε στην

αρχή της ενότητας των συμπερασμάτων. Έχει βρεθεί ότι μέσω της φωσφορυλίωσης της PKC επάγεται η έκφραση του TGF-β1 τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο γονιδίου ως αποτέλεσμα της κυκλικής εφαρμογής μηχανικής διάτασης σε κύτταρα A549²²².

Η εφαρμογή του μηχανικού ερεθίσματος επέφερε αύξηση και στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα STAT1, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση μίας ποικιλίας κυτταρικών τύπων. Σε παλαιότερη δημοσιευμένη εργασία αποδείχτηκε ότι η εφαρμογή μηχανικής διάτασης σε καρδιομυοκύτταρα αρουραίου προκάλεσε τη φωσφορυλίωση της JAK2 κινάσης, η οποία ενεργοποίησε τους μεταγραφικούς παράγοντες STAT1 και STAT3. Η επονομαζόμενη πορεία JAK/STAT απαιτεί την παρουσία ενδοκυττάριου ασβεστίου για τη φωσφορυλίωση των STAT, καθώς και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C²²³.

Τέλος, παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης των μελών της υπερικογένειας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκου λόγω της εφαρμογής του μηχανικού ερεθίσματος, οι οποίοι μεσολαβούν στη διαδικασία της απόπτωσης. Έχει βρεθεί ότι μία μηχανική διάταση της τάξης του 25% σε λεία μυϊκά κύτταρα προκάλεσε την παρατεταμένη δέσμευση του υποδοχέα νέκρωσης όγκου-1 (TNFR-1) με τον παράγοντα TRAF-2 (TNF-α receptor-associated factor-2), οδηγώντας στην ενεργοποίηση των JNK και p38 κινασών, προκαλώντας τελικά απόπτωση²²⁴.

Τα κυριότερα ευρήματα στην παρούσα εργασία ήταν:

1. Η μηχανική διάταση μπορεί να ρυθμίσει τα επίπεδα της PC με τη συμμετοχή του ρυθμιστικού ενζύμου CCTα.
2. Η αναστολή της έκφρασης της CCTα υποδηλώνει τη μείωση του ρυθμού σύνθεσης της PC.
3. Η επαγωγή της cPLA₂ κατά την πορεία καταβολισμού της PC οδηγεί σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις με την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως τα λευκοτριένια και οι προσταγλανδίνες, τα οποία σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) αποτελεί το κυριότερο φωσφολιπιδικό συστατικό του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων. Βιοσυντίθεται μέσω μίας *de novo* πορείας (πορεία Kennedy), το καθοριστικό και ρυθμιστικό στάδιο της οποίας καταλύεται από το ένζυμο CTP: φωσφοχολινο κυτιδυλοτρανσφεράση (CCT). Η PC μετατρέπεται σε διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη (DPPC) ακολουθώντας δύο στάδια αναδιαμόρφωσης και καταβολίζεται παράγοντας χολίνη και άλλους μεταβολίτες. Ο σκοπός αυτής της εργασίας εστιάζεται στη διερεύνηση της επίδρασης της μηχανικής διάτασης στη γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση του ρυθμιστικού ενζύμου του μεταβολισμού της PC, CCT, και συγκεκριμένη της α ισομορφής της (CCT α), η οποία κωδικεύεται από το γονίδιο *PCYT1A*. Μελετήθηκε, επίσης, η πρωτεϊνική έκφραση των ενζύμων που συμμετέχουν σε πορείες που σχετίζονται με το μεταβολισμό της PC. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά A549, ως μοντέλο μελέτης των πνευμονοκυττάρων τύπου II. Συγκεκριμένα: 1) Μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση του ρυθμιστικού ενζύμου με τη βοήθεια της ποσοτικής RT-PCR μετά από εφαρμογή δύο συνθηκών κυκλικής μηχανικής διάτασης 15% και 25%, χρονικής διάρκειας 1 h, 6 h και 24 h. Όσον αφορά τη πρωτεϊνική έκφραση του ενζύμου, η μελέτη της πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της πρωτεομικής ανάλυσης μετά από εφαρμογή δύο συνθηκών κυκλικής μηχανικής διάτασης 15% και 25%, χρονικής διάρκειας 24 h. 2) Μελετήθηκε η επίδραση της μηχανικής διάτασης 15% και 25%, διάρκειας 24 h στις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση, την αναδιαμόρφωση και τον καταβολισμό της PC, στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος και των λιπαρών οξέων, την πορεία γλυκόλυσης/γλυκονεογένεσης και τον κύκλο του Krebs και στις πρωτεΐνες που σχετίζονται άμεσα με την απόκριση των κυττάρων A549 στο μηχανικό ερέθισμα. Τα ευρήματα της μελέτης συνοψίζονται στα εξής: Η εφαρμογή κυκλικού stretch 15%, διάρκειας 1h , 6 h και 24 h στα κύτταρα A549 οδήγησε στη μειωμένη γονιδιακή έκφραση του ρυθμιστικού ενζύμου, CCT α , ενώ στην περίπτωση του κυκλικού stretch 25% παρατηρήθηκε επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης του ενζύμου μετά από 6 h έως και τις 24 h. Σε επίπεδο πρωτεΐνης παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του ρυθμιστικού ενζύμου μετά από την εφαρμογή και των δύο συνθηκών κυκλικής μηχανικής διάτασης, 15% και 25%, διάρκειας 24 h. Το κυκλικό stretch επηρέασε κυρίως τα ένζυμα που συμμετέχουν στον καταβολισμό της PC, αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασή τους. Επίσης, παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης των ενζύμων που

καταλύουν τις αντιδράσεις παραγωγής λευκοτριενίων και προσταγλανδινών κατά το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, καθώς και σχεδόν όλων των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, τη γλυκολυτική πορεία και τον κύκλο του Krebs. Τέλος, παρατηρήθηκαν μεταβολές σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος μετά την εφαρμογή του μηχανικού ερεθίσματος. Συμπεραίνουμε ότι η αναστολή της έκφρασης της CCTa έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού σύνθεσης της PC και ότι η εφαρμογή μηχανικής διάτασης μπορεί να ρυθμίσει τα επίπεδα της PC με τη συμμετοχή του ρυθμιστικού ενζύμου CCTa.

ABSTRACT

Phosphatidylcholine (PC) is the major phospholipid component of lung surfactant. It is biosynthesized via a *de novo* (Kennedy) pathway, which is regulated by choline-phosphate cytidylyltransferase (CCT). PC is converted into dipalmitoyl-PC (DPPC) through two remodeling steps. PC is also catabolized to generate choline and other metabolites. Our work mainly focuses on the effect of cyclic stretch on gene and protein expression of CCT, and specifically its major isoform, CCT α . It was also investigated the expression of all proteins involved in pathways related to PC metabolism. For this purpose, we used the human alveolar epithelial cell line A549, as a model of type II pneumocytes. Specifically: 1) A549 cells were subjected to two different magnitudes of cyclic stretch, 15% and 25% from 1 h to 24 h. Total RNA preparations and cell homogenates were used for qRT-PCR and proteomic analysis respectively. *PCYT1A* gene expression was assessed by qRT-PCR after 1 h, 6 h and 24 h of cyclic stretch, while proteomic analysis was performed after 24 h of cyclic stretch. 2) we studied the impact of two different magnitudes of cyclic stretch, 15% and 25%, after 24 h on all proteins involved in PC biosynthesis, remodeling and catabolism, on arachidonic and fatty acid metabolism, on glycolysis/gluconeogenesis pathway, Krebs cycle as well as proteins related to response to mechanical stimulus. We found that the cyclic stretch 15% we subjected on A549 cells resulted in a gradual reduction in *PCYT1A* gene expression from 1 h to 24 h, while in the case of the cyclic stretch 25%, we observed an increase after 6 h up to 24 h. We also found a reduction in CCT α protein levels following both 15% and 25% cyclic stretch, 24 h. It was demonstrated that catabolic pathways of PC were more affected by cyclic stretch. An induction of the enzymes that catalyze the production of leukotrienes and prostaglandins in arachidonic acid metabolism was noticed. There was a similar effect on most of the proteins involved in fatty acid metabolism, glycolysis pathway and Krebs cycle. Finally, both magnitudes of cyclic stretch alter the levels of the proteins related to response to mechanical stimulus. Our findings suggest that the inhibition of CCT α expression reduced the biosynthetic rate of PC and that cyclic stretch can regulate PC levels through the involvement of CCT.

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- **Εικόνα 1:** Guyton AC, Hall JE. **Textbook of Medical Physiology**. Elsevier Inc, Eleventh edition, 2006, 37: p479
- **Εικόνα 3:** Andreeva AV, Kutuzon MA, Voyno-Yasenetskaya TA. **Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells**. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293: L259-L271
- **Εικόνα 5:** Agassandian M, Mallampalli RK. **Surfactant phospholipid metabolism**. Biochim Biophys Acta, 2013, 1831: 612-625
- **Εικόνες 6-7:** Liu M, Tanswell AK, Post M. **Mechanical force-induced signal transduction in lung cells**. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1999, 277: L667-L683
- **Εικόνες 8-16:** Pantazi D, Lekka ME. **Production and secretion of pulmonary surfactant by type II pneumonocytes**. In: Nakos G, Papathanasiou A (eds). Surfactant in Pathogenesis and Treatment of Lung Disease. Research Signpost, 37/661 (2), Fort PO, Trivandrum, 2009; 1-24
- **Εικόνες 9-18:** Gibellini F, Smith TK. **The Kennedy Pathway-De Novo Synthesis of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine**. Life 2010, 62: 414-428
- **Εικόνες 10-11-12-13-17:** Cornell RB, Northwood IC. **Regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase by amphitropism and relocalization**. Trends Biochem Sci, 2000, 25: 441-447
- **Εικόνα 14:** Shindou H, Hishikawa D, Harayama T, Yuki K, Shimizu T. **Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research**. J Lipid Res, 2009, 50: 46-51
- **Εικόνα 15:** Shindou H, Shimizu T. **Acyl-CoA: lysophospholipid acyltransferases**. J Biol Chem, 2009, 284: 1-5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

-
- ¹ Palange P, Simonds AK. **Respiratory Medicine**, 2nd Edition. The Europeans Respiratory Society, UK, 2013, 13-17
 - ² Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D, Man SFP, Sin DD. **The airway epithelium: more than just a structural barrier**. *The Adv Respir Dis*, 2011, 5(4): 255-273
 - ³ Knight DA, Holigate ST. **The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease**. *Rspirolgy*, 2003, 8: 432-446
 - ⁴ Mason RJ. **Biology of alveolar type II cells**. *Rspirolgy*, 2006, 11: 512-515
 - ⁵ Ward HE, Nicholas TE. **Alveolar Type I and Type II Cells**. *Aust NZ J Med*, 1984, 14: 731-734
 - ⁶ Weiber ER, Gehr P, Haies D, Gill J, Bachofen M. **The cell population of the normal lung**. In: *Lung Cells in Disease*, edited by Barchys A, Amsterdam: North Holland Publishing Company, 1976: 3-16
 - ⁷ Scheeberger EE. **Barrier function of intercellular junctions in adult and fetal lungs**. In: *Pulmonary edema*, edited by Fishman AP, Renkin EM, Bethesda: Waverley Press, 1979: 21-38
 - ⁸ Gill J, Silage DA, McNiff JM. **Distribution of vesicles in cells of air-blood barrier in the rabbit**. *J Appl Physiol Respirat Environ Exercise Physiol*, 1981, 50: 334-340
 - ⁹ Stone KC, Mercer RR, Gehr P, Stockstill B, Crapo JD. **Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung**. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1992, 6: 235-243
 - ¹⁰ Vanderbilt JN, Mager EM, Allen L et al. **CXC chemokines and their receptors are expressed in typt II cells and upregulated following lung injury**. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 29: 661-668
 - ¹¹ Jeyaseelan S, Manzer R, Young SK et al. **Induction of CXCL5 during inflammation in the rodent lung involves activation of alveolar epithelium**. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 32: 531-539
 - ¹² Kopf M, Schneider C, Nobs SP. **The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells**. *Immunology of the lung*, Nature America, Inc, 2015
 - ¹³ Westphalen K et al. **Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity**. *Nature*, 2014, 506: 503-506
 - ¹⁴ Ballinger MN et al. **Role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor during gram-negative lung infection with Pseudomonas aeruginosa**. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34: 766-774
 - ¹⁵ Gonzalez-Juarrero M et al. **Disruption of granulocyte macrophage-colony stimulating factor production in the lungs severely affects the ability of mice to control Mycobacterium tuberculosis infection**. *J Leukoc Biol*, 2005, 77: 914-922
 - ¹⁶ Paine R III et al. **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the innate immune response to Pneumocystis carinni pneumonia in mice**. *J Immunol*, 2000, 164: 2602-2609
 - ¹⁷ LeVine AM, Reed JA, Kurak KE, Cianciolo E, Whitsett JA. **GM-CSF-deficient mice are susceptible to pulmonary group B streptococcal infection**. *J Clin Invest*, 1999, 103: 563-569
 - ¹⁸ Pantazi D, Lekka ME. **Production and secretion of pulmonary surfactant by type II pneumonocytes**. In: *Surfactant in Pathogenesis and Treatment of Lung Disease*, edited by Nakos G, Papathanasiou A, Research Signpost, 37/661 (2), Fort PO, Trivandrum. 2009: 1–24

-
- ¹⁹ van de Wetering JK, van Golde LM, Batenburg JJ. **Collectins: players of the innate immune system.** Eur J Biochem, 2004, 271: 1229-1249
- ²⁰ Yu SH, Possmayer F. **Comparative studies on the biophysical activities of the low-molecular-weight hydrophobic proteins purified from bovine pulmonary surfactant.** Biochim Biophys Acta, 2013, 961: 337-350
- ²¹ Agassandian M, Mallampalli RK. **Surfactant phospholipid metabolism.** Biochim Biophys Acta, 2013, 1831(3): 612-625
- ²² Batenburg JJ. **Surfactant phospholipids: synthesis and storage.** Am J Physiol, 1992, 262: L367-L385
- ²³ Holm BA et al. **Content of dipalmitoylphosphatidylcholine in lung surfactant: ramifications for surface activity.** Pediatr Res, 1996, 39(5): 805-811
- ²⁴ Van Golde LMG, Batenburg JJ, Robertson B. **The pulmonary surfactant system.** News Physiol Sci, 1994, 9: 13-20
- ²⁵ Hallman M, Enhorning G, Possmayer F. **Composition and surface activity of normal and phosphatidylglycerol-deficient lung surfactant.** Pediatr Res, 1985, 19 (3): 286-292
- ²⁶ Numata M et al. **Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection.** Proc Natl Acad Sci, USA, 2010, 107 (1): 320-325
- ²⁷ Veldhuizen R, Nag K, Orgeig S, Possmayer F. **The role of lipids in pulmonary surfactant.** Biochim Biophys Acta, 1998, 90-108
- ²⁸ Possmayer F. **Biochemistry of pulmonary surfactant during fetal development and in the perinatal period.** In: *Pulmonary surfactant*, edited by Robertson B, van Golde LMG, Batenburg JJ, Elsevier, Amsterdam, 1984, 295-355
- ²⁹ King RJ. **Isolation and chemical composition of pulmonary surfactant.** In: *Pulmonary surfactant*, edited by Robertson B, van Golde LMG, Batenburg JJ, Elsevier, Amsterdam, 1984, 1-15
- ³⁰ Wearer TE, Conkright JJ. **Function of surfactant proteins B and C.** Annu Rev Physiol, 2001, 63: 555-578
- ³¹ Crouch E, Wright JR. **Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense.** Annu Rev Physiol, 2001, 63: 521-554
- ³² Herbein JF, Savon J, Wright JR. **Binding and uptake of surfactant protein D by freshly isolated rat alveolar type II cells.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 278 (4): L830-L839
- ³³ Wadsworth SJ, Spitzer AR, Chander A. **Ionic regulation of proton chemical (pH) and electrical gradients in lung lamellar bodies.** Am J Physiol, 1997, 273: L427-L436
- ³⁴ Wadsworth SJ, Chander A. **H⁺-and K⁺-dependence of Ca²⁺ uptake in lung lamellar bodies.** J Membr Biol, 2000, 174: 41-51
- ³⁵ Batenburg JJ, Ossendorp BC, Snoek GT, Wirtz KW, Houweling M, Elfring RH. **Phospholipid-transfer proteins and their mRNAs in developing rat lung and in alveolar type-II cells.** Biochem J, 1994, 298: 223-229
- ³⁶ Tsao FM, Tian Q, Strickland MS. **Purification, characterization and substrate specificity of rabbit lung phospholipid transfer proteins.** Biochim Biophys Acta, 1992, 1125: 321-329

-
- ³⁷ Kaushal S, Ghosh S, Sharma N, Sanyal SN, Majumdar S. **Role of phospholipid transfer protein in rabbit lung development.** *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58: 2098-2107
- ³⁸ Geijtenbeek TB, Smith AJ, Borst P, Wirtz KW. **cDNA cloning and tissue-specific expression of the phosphatidylcholine transfer protein gene.** *Biochem J*, 1996, 316: 49-55
- ³⁹ Kanno K, Wu MK, Scapa EF, Roderick SL, Cohen DE. **Structure and function of phosphatidylcholine transfer protein (PC-TP)/StarD2.** *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1771: 654-662
- ⁴⁰ Lumb RH. **Phospholipid transfer proteins in mammalian lung.** *Am J Physiol*, 1989, 257: L190-L194
- ⁴¹ Schmitz G, Muller G. **Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids.** *J Lipid Res*, 1991, 32: 1539-1570
- ⁴² Tsangaris I, Lekka ME, Kitsioulis E, Constantopoulos S, Nakos G. **Bronchoalveolar lavage alterations during prolonged ventilation of patients without acute lung injury.** *Eur Respir J*, 2003, 21: 495-501
- ⁴³ Gobran LI, Rooney SA. **Adenylate cyclase-coupled ATP receptor and surfactant secretion in type II pneumocytes from newborn rats.** *Am J Physiol*, 1997, 272: L187-L196
- ⁴⁴ Mehan C. **Effect of lipids and other substances on the adsorption of dipalmitoyl phosphatidylcholine.** *Pediatr Res*, 1981, 15: 1029-1031
- ⁴⁵ Notter RH, Holcomb H, Mavis RD. **Dynamic surface properties of phosphatidylglycerol-dipalmitoyl-phosphatidylcholine mixed films.** *Chem Phys Lipids*, 1980, 27: 305-319
- ⁴⁶ Fleming BD, Keough KMW. **Surface respreading after collapse of monolayers containing major lipids of pulmonary surfactant.** *Chem Phys Lipids*, 1988, 49: 81-86
- ⁴⁷ Rooney SA. **Lung surfactant: cellular and molecular processing.** Austin, Texas, R.G. Landes Company, Austin Texas, 1998
- ⁴⁸ Matalon S, Wright JR. **Surfactant proteins and inflammation: the yin and the yang.** *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31: 585-586
- ⁴⁹ DeSilva NS, Ofek I, Crouch EC. **Interactions of surfactant protein D with fatty acids.** *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 29: 757-770
- ⁵⁰ Walther F, Waring AJ, Sherman MA, Zasadzinski JA, Gordon LM. **Hydrophobic surfactant proteins and their analogues.** *Neonatology*, 2007, 91: 303-310
- ⁵¹ Rooney SA, Young SL, Mendelson CR. **Molecular and cellular processing of lung surfactant.** *FASEB J*, 1994, 8: 957-967
- ⁵² Wirtz HR, Dobbs LG. **Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells.** *Science*, 1990, 250: 1266-1269
- ⁵³ Frick M, Bertocchi C, Jennings P, Haller T, Mair N, Singer W, Pfaller W, Ritsch-Marte M, Dieltz P. **Ca²⁺ entry is essential for cell strain-induced lamellar body fusion in isolated rat type II pneumocytes.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286: L210-L220
- ⁵⁴ Ashino Y, Ying X, Dobbs LG, Bhattacharya J. **[Ca²⁺]: oscillations regulate type II cell exocytosis in the pulmonary alveolus.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279: L5-L13
- ⁵⁵ Gutierrez JA, Suzara VV, Dobbs LG. **Continuous mechanical contraction modulates expression of alveolar epithelial cell phenotype.** *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 29: 81-87

-
- ⁵⁶ Rooney SA. **Regulation of surfactant secretion.** Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2001, 129: 233-243
- ⁵⁷ Andreeva AV, Kutuzov MA, Voyno-Yasenetskaya TA. **Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293: L259-L271
- ⁵⁸ Edwards YS. **Stretch stimulation: its effects on alveolar type II cell function in the lung.** Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 2001, 129: 245-260
- ⁵⁹ Forrest J. **The effect of changes in lung volume on the size and shape of alveoli.** J Physiol, 1970, 210: 533-547
- ⁶⁰ Fredberg J, Kamm R. **Stress transmission in the lung: pathways from organ to molecule.** Annu Rev Physiol, 2006, 68: 507-541
- ⁶¹ Oldmixon E, Hoppin FJ. **Alveolar septing folding and lung inflation history.** J Appl Physiol, 1991, 71: 2369-2379
- ⁶² Notter RH, Shapiro DL. **Lung surfactants for replacement therapy: biochemical, biophysical and clinical aspects.** Clin Peritaneol, 1987, 14: 433-479
- ⁶³ Liu ML, Wang EL, Enchoring G. **Pulmonary surfactant will secure free airflow through a narrow tube.** J Appl Physiol, 1991, 71: 742-748
- ⁶⁴ Dreyfuss D, Saumon G. **Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies.** Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157: 294-323
- ⁶⁵ Marcy TW. **Barotrauma: detection, recognition, and management.** Chest, 1993, 104: 578-584
- ⁶⁶ DeCampos KN, Keshavjee S, Liu M, Slutsky AS. **Optimal inflation volume for hypothermic preservation of rat lungs.** J Heart Lung Transplant, 1998, 17: 599-607
- ⁶⁷ Pierre AF, DeCampos KI, Liu M, Edwards V, Cutz E, Slutsky AS, Keshavjee SH. **Rapid reperfusion causes stress failure in ischemic rat lungs.** J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 116: 932-942
- ⁶⁸ Moraes D, Loscalzo J. **Pulmonary hypertension: newer concepts in diagnosis and management.** Clin Cardiol, 1997, 20: 676-682
- ⁶⁹ Voelkel NF, Tuder RM. **Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension.** Eur Respir J, 1995, 8: 2129-2138
- ⁷⁰ Liu M, Tanswell AK, Post M. **Mechanical force-induced signal transduction in lung cells.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1999, 277: L667-L683
- ⁷¹ Bialecki RA, Kulik TJ, Colucci WS. **Stretching increases calcium influx and efflux in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells.** Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol 7), 1992, 263: L602-L606
- ⁷² Banes AJ, Gilbert J, Taylor D, Monbureau O. **A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cycle tension or compression to cells in vitro.** J Cell Sci, 1985, 75: 35-42
- ⁷³ Tschumperlin DJ, Margulies SS. **Equibiaxial deformation-induced injury of alveolar epithelial cells in vitro.** Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol 19), 1998, 275: L1173-L1183
- ⁷⁴ Winston FK, Macarak EJ, Gorfien SF, Thibault LE. **A system to reproduce and quantify the biochemical environment of the cell.** J Appl Physiol, 1989, 67: 397-405

-
- ⁷⁵ Lee AA, Delhaas T, Waldman LK, MacKenna DA, Villarreal FJ, McCulloch AD. **An equibiaxial strain system for cultured cells.** *Am J Physiol (Cell Physiol 40)*, 1996, 271: C1400-C1408
- ⁷⁶ Simpson LL, Tanswell AK, Joneja MG. **Epithelial cell differentiation in organotypic cultures of fetal rat lung.** *Am J Anat*, 1985, 172: 31-40
- ⁷⁷ Liu MS, Skinner JM, Xu J, Han Rnn, Tanswell AK, Post M. **Stimulation of fetal rat lung cell proliferation in vitro by mechanical strain.** *Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol 7)*, 1992, 263: L376-L383
- ⁷⁸ Liu M, Xu J, Souza P, Tanswell B, Tanswell AK, Post M. **The effect of mechanical strain on fetal rat lung cell proliferation: comparison of two- and three-dimensional culture systems.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1995, 31: 858-866
- ⁷⁹ Tran-Son-Tay R. **Techniques for studying the effects of physical forces on mammalian cells and measuring cell mechanical properties.** In: *Physical Forces and the Mammalian Cell*, edited by Frangos JA, San Diego, CA: Academic, 1993, p. 1-60
- ⁸⁰ Wang N, Butler JP, Ingber DE. **Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton.** *Science*, 1993, 260: 1124-1127
- ⁸¹ Banes AJ, Tsuzaki M, Yamamoto J, Fischer T, Brigman B, Brown T, Miller L. **Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals.** *Biochem Cell Biol*, 1995, 73: 349-365
- ⁸² Ingber DE. **Integrins as mechanochemical transducers.** *Curr Opin Cell Biol*, 1991, 3: 841-848
- ⁸³ Wang T, Tseng Y, Chang H. **Regulation of connexin 43 gene expression by cyclical mechanical stretch in neonatal rat cardiomyocytes.** *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 267: 551-557
- ⁸⁴ Juliano RL, Haskill S. **Signal transduction from the extracellular matrix.** *J Cell Biol*, 1993, 120: 577-585
- ⁸⁵ Smith PG, Garcia R, Kogerman L. **Strain reorganizes focal adhesions and cytoskeleton in cultured airway smooth muscle cells.** *Exp Cell Res*, 1997, 232: 127-136
- ⁸⁶ Sadoshima J, Izumo S. **The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress.** *Annu Rev Physiol*, 1997, 59: 551-571
- ⁸⁷ Lord JM, Bunce CM, Brown G. **The role of protein phosphorylation in the control of cell growth and differentiation.** *Br J Cancer*, 1988, 58: 549-555
- ⁸⁸ Russo LA, Rannels SR, Laslow KS, Rannels DE. **Stretch-related changes in lung cAMP after partial pneumonectomy.** *Am J Physiol (Endocrinol Metab 20)*, 1989, 257: E261-E268
- ⁸⁹ Scott JE, Yang SY, Stanik E, Anderson JE. **Influence of strain on [3H]thymidine incorporation, surfactant-related phospholipid synthesis, and cAMP levels in fetal type II alveolar cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993, 8: 258-265
- ⁹⁰ Skinner SJ, Somervell CE, Olson DM. **The effects of mechanical stretching on fetal rat lung cell prostacyclin production.** *Prostaglandins*, 1992, 43: 413-433
- ⁹¹ Liu M, Xu J, Liu J, Kraw ME, Tanswell AK, Post M. **Mechanical strain-enhanced fetal lung cell proliferation is mediated by phospholipases C and D and protein kinase C.** *Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol 12)*, 1995, 268: L729-L738

- ⁹² Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, Strickler JE, McLaughlin MM, Siemens IR, Fisher SM, Livi GP, White JR, Adams JL, Young PR. **A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis.** Nature, 1994, 372: 739-745
- ⁹³ Berridge MJ. **Inositol triphosphate and calcium signaling.** Nature, 1993, 361: 315-325
- ⁹⁴ Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. **pp125^{FAK}, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions.** Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 5192-5196
- ⁹⁵ Reynolds AB, Herbert L, Cleveland JL, Berg ST, Gaut JR. **p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60src, is related to cadherin-binding factors, beta-catenin, plakoglobin and armadillo.** Oncogene, 1992, 7: 2439-2445
- ⁹⁶ Flynn DC, Leu TH, Reynolds AB, Parsons JT. **Identification and sequence analysis of cDNAs encoding a 110-kilodalton actin filament-associated pp60src substrate.** Mol Cell Biol, 1993, 13: 7892-7900
- ⁹⁷ Wu H, Parsons JT. **Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex.** J Cell Biol, 1993, 120: 1417-1426
- ⁹⁸ Turner CE, Glenney JR, Burridge K. **Paxillin, a new visculin-binding protein present in focal adhesions.** J Cell Biol, 1990, 111: 1059-1068
- ⁹⁹ Liu M, Qin Y, Liu J, Tanswell AK, Post M. **Mechanical strain induces pp60src activation and translocation to cytoskeleton in fetal rat lung cells.** J Biol Chem, 1996, 271: 6625-6630
- ¹⁰⁰ Chess PR, Toia L, Finkelstein JN. **The effect of mechanical strain on pulmonary epithelial cell proliferation and signaling (Abstract).** Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155: A610
- ¹⁰¹ Komuro I, Katoh Y, Kaida T, Shibazaki Y, Kurabayashi M, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y. **Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes.** J Biol Chem, 1991, 266: 1265-1268
- ¹⁰² Μπατιστάτου Α, Καναβάρος Π. **Πνευμονικές βλάβες που σχετίζονται/προκαλούνται από αναπνευστήρα (VALI/VILI).** Ιστολογική εικόνα-παθογενετικοί μηχανισμοί. Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας, 2004, Τόμος 7: 55-62
- ¹⁰³ Λέκκα ΜΕ, Μασσαλάς ΧΒ. **Μεταγωγή μηχανικού σήματος.** Σύγχρονη Ιατρική της Εντατικής Θεραπείας, 2004, Τόμος 6: 29-47
- ¹⁰⁴ Pasternack MJ, Liu X, Goodman RA, Rannels DE. **Regulated stimulation of epithelial cell DNA synthesis by fibroblast-derived mediators.** AM J Physiol (Lung Cell Mol Physiol 16), 1997, 272: L616-L630
- ¹⁰⁵ Xu J, Liu M, Tanswell AK, Post M. **Mesenchymal determination of mechanical strain-induced fetal lung cell proliferation.** Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol 19), 1998, 275: L545-L550
- ¹⁰⁶ Smith PG, Janiga KE, Bruce MC. **Strain increases airway smooth muscle cell proliferation.** Am J Respir Cell Mol Biol, 1994, 10: 85-90
- ¹⁰⁷ Gutierrez JA, Gonzales RF, Dobbs LG. **Mechanical distension modulates pulmonary alveolar epithelial phenotypic expression in vitro.** Am J Physiol, 1998, 274: L196-L202

-
- ¹⁰⁸ Nakamura T, Liu M, Slutsky AS, Post M. **Glucocorticoids differentially affect mechanical strain induced SP-C and tropoelastin mRNA expression in fetal rat lung cells (Abstract).** Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155: A273
- ¹⁰⁹ Xu J, Liu M, Post M. **Differential regulation of extracellular molecules by mechanical strain of fetal lung cells.** Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol 20), 1999, 276: L728-L735
- ¹¹⁰ Xu J, Liu M, Liu J, Caniggia I, Post M. **Mechanical strain induces constitutive and regulated secretion of glycosaminoglycans and proteoglycans in fetal lung cells.** J Cell Sci, 1996, 109: 1605-1613
- ¹¹¹ Waters CM. **Flow-induced modulation of the permeability of endothelial cells cultured on microcarrier beads.** J Cell Physiol, 1996, 168: 403-411
- ¹¹² Tremblay L, Valenza F, Ribeiro S, Li J, Slutsky AS. **Injurious ventilator strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model.** J Clin Invest, 1997, 99: 944-952
- ¹¹³ Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AH, Hubmayr RD. **Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro.** Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol 21), 1999, 277: L167-L173
- ¹¹⁴ Savla U, Sporn PH, Waters CM. **Cyclic stretch of airway epithelium inhibits prostanoid synthesis.** Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol 17), 1997, 273: L1013-L1019
- ¹¹⁵ Reeves JT, van Grondelle A, Voelkel NF, Walker B, Lindenfeld J, Worthen S, Mathias B. **Prostacyclin production and lung endothelial cell shear stress.** Prog Clin Biol Res, 1983, 136: 125-131
- ¹¹⁶ Tschumperlin DJ, Oswari J, Margulies SS. **Deformation-induced injury of alveolar epithelial cells. Effect of frequency, duration and amplitude.** Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162: 357-362
- ¹¹⁷ Edwards YS, Sutherland LM, Murray AW. **NO protects alveolar type II cells from stretch-induced apoptosis. A novel role for macrophages in the lung.** Am J Physiol, 2000, 279: L1236-L1242
- ¹¹⁸ Edwards YS, Sutherland LM, Power JHT, Nicholas TE, Murray AW. **Cyclic stretch induces both apoptosis and secretion in rat alveolar type II cells.** FEBS Lett 1999, 448: 127-130
- ¹¹⁹ Mourgeon E, Isowa N, Keshavjee S, Zhang X, Slutsky AS, Liu M. **Mechanical stretch stimulates macrophage inflammatory protein-2 secretion from fetal rat lung cells.** Am J Physiol, 2000, 279: L699-L706
- ¹²⁰ Quinn D, Tager A, Joseph PM, Bonventre JV, Force T, Hales CA. **Stretch-induced mitogen-activated protein kinase activation and interleukin-8 production in type II alveolar cells.** Chest, 1999, 116: 89S-90S
- ¹²¹ Skinner SJM, Somervell CE, Alson DM. **The effects of mechanical stretching on fetal rat lung prostacyclin production.** Prostaglandins, 1992, 43: 413-433
- ¹²² Haddad JJE, Land SC, Saade NE, Safieh-Garabedian B. **Immunomodulatory potential of thymulin-Zn²⁺ in the alveolar epithelium: amelioration of endotoxin-induced cytokine release and partial amplification of a cytoprotective IL-10-sensitive pathway.** Biochem Biophys Res Commun, 2000, 274: 500-505
- ¹²³ Barrett EG, Johnson C, Oberdorster G, Finkelstein JN. **Silica-induced chemokine expression in alveolar type II cells is mediated by TNF-alpha.** Am J Physiol, 1998, 275: L1110-L1119

-
- ¹²⁴ Olszewska-Pazdrak B, Casola A, Saito T et al. **Cell-specific expression of RANTES, MCP-1 and MIP-1 α by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus.** J Virol, 1998,72: 4756-4764
- ¹²⁵ Blau H, Riklis S, Kravtsov V, Kalina M. **Secretion of cytokines by rat alveolar epithelial cells: possible regulatory role for SP-A.** Am J Physiol, 1994, 266: L148-L155
- ¹²⁶ Exton JH. **Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction.** Biochim Biophys Acta, 1994, 1212: 26-42
- ¹²⁷ Vance DE. **Phospholipid Synthesis in Eukaryotes. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**, fourth edition, 2002, 205-232
- ¹²⁸ Oelkers P, Tinkelenberg A, Erdeniz N, Cromley D, Billheimer JT, Sturley SL. **A lecithin cholesterol acyltransferase-like gene mediates diacylglycerol esterification in yeast.** J Biol Chem, 2000, 275: 15609-15612
- ¹²⁹ van der Veen JN, Lingrell S, Vance DE. **The membrane lipid phosphatidylcholine is an unexpected source of triacylglycerol in the liver.** J Biol Chem, 2012, 287: 23418-23426
- ¹³⁰ Friedkin M, Lehninger AL. **Oxidation-coupled incorporation of inorganic radiophosphate into phospholipide and nucleic acid in a cell-free system.** J Biol Chem, 1949, 177: 775-788
- ¹³¹ Kennedy EP. **Metabolism of lipides.** Annu Rev Biochem, 1957, 26: 119-148
- ¹³² Fagone P, Jackowski S. **Phosphatidylcholine and the CDP-Choline Cycle.** Biochim Biophys Acta, 2013, 1831(3): 523-532
- ¹³³ Wittenberg J, Kornberg A. **Choline phosphokinase.** J Biol Chem, 1953, 202: 431-444
- ¹³⁴ Ishidate K, Furusawa K, Nakazawa Y. **Complete co-purification of choline kinase and ethanolamine kinase from rat kidney and immunological evidence for both kinase activities residing on the same enzyme protein(s) in rat tissues.** Biochim Biophys Acta, 1985, 836: 119-124
- ¹³⁵ Aoyama C, Liao H, Ishidate K. **Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells.** Prog Lipid Res, 2004, 43: 266-281
- ¹³⁶ Scheeff ED, Bourne PE. **Structural evolution of the protein kinase-like superfamily.** PLoS Comput Biol, 2005, 1, e49
- ¹³⁷ de Molina AR, Gallego-Ortega D, Sarmentero-Estrada J, Lagares D, del Pulgar TG, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Lacal JC. **Choline kinase as a link connecting phospholipid metabolism and cell cycle regulation: implications in cancer therapy.** Int J Biochem Cell, 2008, 40: 1753-1763
- ¹³⁸ Vance DE, Vance JE. **Physiological consequences of disruption of mammalian phospholipid genes.** J Lipid Res, 2009, 50: S132-S137
- ¹³⁹ Gibellini F, Smith T. **The Kennedy Pathway-De Novo Synthesis of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine.** Life, 2010, 62(6): 414-428
- ¹⁴⁰ Weiss SB, Smith SW, Kennedy EP. **The enzymatic formation of lecithin from cytidine diphosphate choline and D-1,2-diglyceride.** J Biol Chem, 1958, 231: 53-64
- ¹⁴¹ Wright MM, McMaster CR. **PC and PE synthesis: mixed micellar analysis of the cholinephosphotransferase and ethanolaminephosphotransferase activities of human choline/ethanolamine phosphotransferase 1 (CEPT1).** Lipids, 2002, 37: 663-672

-
- ¹⁴² Moreau P, Morre DJ. **Cell-free transfer of membrane lipids. Evidence for lipid processing.** J Biol Chem, 1991, 266: 4329-4333
- ¹⁴³ Sparace SA, Moore TS. **Phospholipid Metabolism in Plant Mitochondria: II. Submitochondrial site of synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine.** Plant Physiol, 1981, 67: 261-265
- ¹⁴⁴ Stith IE, Das SK. **Development of cholinephosphotransferase in guinea pig lung mitochondria and microsomes.** Biochim Biophys Acta, 1982, 714: 250-256
- ¹⁴⁵ Zweigner J, Jackowski S, Smith SH, Van Der MM, Weber JR, Tuomanen EI. **Bacterial inhibition of phosphatidylcholine synthesis triggers apoptosis in the brain.** J Exp Med, 2004, 200: 99-106
- ¹⁴⁶ Cornell RB, Ridgway ND. **CTP: phosphocholine cytidyltransferase: Function, regulation, and structure of an amphitropic enzyme required for membrane biogenesis.** Progress in Lipid Research, 2015, 59: 147-171
- ¹⁴⁷ Zimmermann LJ, Hogan M, Carlson KS, Smith BT, Post M. **Regulation of phosphatidylcholine synthesis in fetal type II cells by CTP: phosphocholine cytidyltransferase.** Am J Physiol, 1993, 264: L575-L580
- ¹⁴⁸ Ridsdale R, Tseu I, Wang J, Post M. **CTP: Phosphocholine Cytidyltransferase α Is a Cytosolic Protein in Pulmonary Epithelial Cells and Tissues.** J Biol Chem, 2001, 276: 49148-49155
- ¹⁴⁹ Lykidis A et al. **Distribution of CTP: phosphocholine cytidyltransferase (CCT) isoforms. Identification of a new CCT β splice variant.** J Biol Chem, 1999, 274: 26992-27001
- ¹⁵⁰ Park YS et al. **Identification of functional conserved residues of CTP: glycerol-3-phosphate cytidyltransferase. Role of histidines in the conserved HXGH in catalysis.** J Biol Chem, 1997, 272: 15161-15166
- ¹⁵¹ Weber CH et al. **A prototypical cytidyltransferase: CTP: glycerol-3-phosphate cytidyltransferase from Bacillus subtilis.** Structure, 1999, 7: 1113-1124
- ¹⁵² Dunne SJ et al. **Structure of the membrane binding domain of CTP: phosphocholine cytidyltransferase.** Biochemistry, 1996, 35: 11975-11984
- ¹⁵³ MacDonald JJ, Kent C. **Identification of phosphorylation sites in rat liver CTP: phosphocholine cytidyltransferase.** J Biol Chem, 1994, 269: 10529-10537
- ¹⁵⁴ Craig L et al. **Identification of the membrane-binding domain of the rat liver CTP: phosphocholine cytidyltransferase using chymotrypsin proteolysis.** J Biol Chem, 1994, 269: 3311-3317
- ¹⁵⁵ Johnson JE et al. **An amphipathic alpha-helix is the principle membrane-embedded region of CTP: phosphocholine cytidyltransferase. Identification of the 3-(trifluoromethyl)-3-(m[¹²⁵I]iodophenyl) diazirine photolabeled domain.** Biochim Biophys Acta, 1997, 1324: 273-284
- ¹⁵⁶ Cornell RB et al. **Functions of the C-terminal domain of CTP: phosphocholine cytidyltransferase. Effects of C-terminal deletions on enzyme activity. Intracellular localization and phosphorylation potential,** Biochem J, 1995, 310: 699-708
- ¹⁵⁷ Arnold RS et al. **Binding of CTP: phosphocholine cytidyltransferase to lipid vesicles: diacylglycerol and enzyme dephosphorylation increase the affinity for negatively charged membranes.** Biochemistry, 1997, 36: 6149-6156

-
- ¹⁵⁸ Cornell RB, Northwood IC. **Regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase by amphitropism and relocation.** Trends Biochem Sci, 2000, 25(9): 441-447
- ¹⁵⁹ Sleight R, Kent C. **Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in mammalian cells. II. Effects of phospholipase C treatment on the activity and subcellular distribution of CTP: phosphocholine cytidyltransferase in Chinese hamster ovary and LM cell lines.** J Biol Chem, 1983, 258: 831-835
- ¹⁶⁰ Kolesnick RN, Hemer MR. **Physiologic 1,2-diacylglycerol levels induce protein kinase C-independent translocation of a regulatory enzyme.** J Biol Chem, 1990, 265: 10900-10904
- ¹⁶¹ Utal AK, Jamil H, Vance DE. **Diacylglycerol signals the translocation of CTP: choline-phosphate cytidyltransferase in HeLa cells treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate.** J Biol Chem, 1991, 266: 24084-24091
- ¹⁶² Hatch GM, Jamil H, Utal AK, Vance DE. **On the mechanism of the okadaic acid-induced inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis in isolated rat hepatocytes.** J Biol Chem, 1992, 267: 15751-15758
- ¹⁶³ Jamil H, Utal AK, Vance DE. **Evidence that cyclic AMP-induced inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis is caused by a decrease in cellular diacylglycerol levels in cultured rat hepatocytes.** J Biol Chem, 1992, 267: 1752-1760
- ¹⁶⁴ Kent C. **CTP: phosphocholine cytidyltransferase.** Biochim Biophys Acta, 1997, 1348: 79-90
- ¹⁶⁵ Cornell RB. **Regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase by lipids. Negative surface charge dependence for activation.** Biochemistry, 1991, 30: 5873-5880
- ¹⁶⁶ Kalmar GB, Kay RJ, Lachance A, Aebersold R, Cornell RB. **Cloning and expression of rat liver CTP: phosphocholine cytidyltransferase: an amphipathic protein that controls phosphatidylcholine synthesis.** Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 6029-6033
- ¹⁶⁷ Wang Y, Kent C. **Identification of an inhibitory domain of CTP: phosphocholine cytidyltransferase.** J Biol Chem, 1995, 270: 18948-18952
- ¹⁶⁸ Pelech SL, Pritchard PH, Vance DE. **cAMP analogues inhibit phosphatidylcholine biosynthesis in cultured rat hepatocytes.** J Biol Chem, 1981, 256: 8283-8286
- ¹⁶⁹ Sanghera JS, Vance DE. **CTP: phosphocholine cytidyltransferase is a substrate for cAMP-dependent protein kinase in vitro.** J Biol Chem, 1989, 264: 1215-1223
- ¹⁷⁰ Watkins JD, Kent C. **Regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase activity and subcellular location by phosphorylation in Chinese hamster ovary cells. The effect of phospholipase C treatment.** J Biol Chem, 1991, 266: 21113-21117
- ¹⁷¹ Wang Y, MacDonald JJ, Kent C. **Regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase in HeLa cells. Effect of oleate on phosphorylation and intracellular localization.** J Biol Chem, 1993, 268: 5512-5518
- ¹⁷² Weinhold PA, Charles L, Feldman DA. **Regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase in HepG2 cells: effect of choline depletion on phosphorylation, translocation and phosphatidylcholine levels.** Biochim Biophys Acta, 1994, 1210: 335-347

-
- ¹⁷³ Jackowski S. **Coordination of membrane phospholipid synthesis with the cell cycle.** J Biol Chem, 1994, 269: 3858-3867
- ¹⁷⁴ Shimizu T. **Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation.** Annu Rev Pharmacol, 2009, 49: 123-150
- ¹⁷⁵ Ishii S, Shimizu T. **Platelet-activating factor (Paf) receptor and genetically engineered Paf receptor mutant mice.** Prog Lipid Res, 2000, 39: 41-82
- ¹⁷⁶ Yamashita A, Sugiura T, Waku K. **Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells.** J Biochem, 1997, 122: 1-16
- ¹⁷⁷ Lands WE. **Stories about acyl chains.** Biochim Biophys Acta, 2000, 1483: 1-14
- ¹⁷⁸ Lands WE. **Metabolism of glycerolipids; a comparison of lecithin and triglyceride synthesis.** J Biol Chem, 1958, 231: 883-888
- ¹⁷⁹ Waku K, Nakazawa Y. **Acyltransferase activity to 1-acyl-, 1-o-alkenyl-, and 1-o-alkyl-glycero-3-phosphorylcholine in ehrlich ascites tumor cells.** J Biochem, 1972, 72: 495-497
- ¹⁸⁰ Shindou H, Hishikawa D, Harayama T, Yuki K, Shimizu T. **Recent progress on acyl-CoA: lysophospholipid acyltransferase research.** J Lipid Res, 2009, 50: S46-51
- ¹⁸¹ Coleman RA, Lee DP. **Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation.** Prog Lipid Res, 2004, 43: 134-176
- ¹⁸² Yamashita A, Nakanishi H, Suzuki H, Kamata R, Tanaka K, Waku K, Sugiura T. **Topology of acyltransferase motifs and substrate specificity and accessibility in 1-acyl-sn-glycero-3-phosphate acyltransferase 1.** Biochim Biophys Acta, 2007, 1771: 1202-1215
- ¹⁸³ Nakanishi H, Shindou H, Hishikawa D, Harayama T, Ogasawara R, Suwabe A, Taguchi R, Shimizu T. **Cloning and characterization of mouse lung-type acyl-CoA: lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1): expression in alveolar type II cells and possible involvement in surfactant production.** J Biol Chem, 2006, 281: 20140-20147
- ¹⁸⁴ Shindou H, Hishikawa D, Nakanishi H, Harayama T, Ishii S, Taguchi R, Shimizu T. **A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA: lyso-PAF acetyltransferase.** J Biol Chem, 2007, 282: 6532-6539
- ¹⁸⁵ Shindou H, Ishii S, Yamamoto M, Takada K, Akira S, Shimizu T. **Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A: lyso-platelet-activating factor acetyltransferase is myd88 and trif independent.** J Immunol, 2005, 175: 1177-1183
- ¹⁸⁶ Harayama T, Shindou H, Ogasawara R, Suwabe A, Shimizu T. **Identification of a novel noninflammatory biosynthetic pathway of platelet-activating factor.** J Biol Chem, 2008, 283: 11097-11106
- ¹⁸⁷ Soupene E, Fyfe H, Kuypers FA. **Mammalian acyl-CoA: lysophosphatidylcholine acyltransferase enzymes.** Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 88-93
- ¹⁸⁸ Hofmann K. **A superfamily of membrane-bound o-acyltransferases with implications for wnt signaling.** Trends Biochem Sci, 2000, 25: 111-112

-
- ¹⁸⁹ Hishikawa D, Shindou H, Kobayashi S, Nakanishi H, Taguchi R, Shimizu T. **Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity.** Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 2830-2835
- ¹⁹⁰ Dowd SR, Bier ME, Patton-Vogt JL. **Turnover of phosphatidylcholine in *Saccharomyces cerevisiae*.** J Biol Chem, 2001, 276: 3756-3763
- ¹⁹¹ Li Z, Vance DE. **Phosphatidylcholine and choline homeostasis.** J Lipid Res, 2008, 49: 1187-1194
- ¹⁹² Pelech SL, Vance DE. **Signal transduction via phosphatidylcholine cycles.** Trends Biochem Sci, 1989, 14: 28-30
- ¹⁹³ Baburina I, Jackowski S. **Cellular responses to excess phospholipid.** J Biol Chem, 1999, 274: 9400-9408
- ¹⁹⁴ Morash SC, Cook HW, Spence MW. **Phosphatidylcholine metabolism in cultured cells: catabolism via glycerophosphocholine.** Biochim Biophys Acta, 1988, 961: 194-202
- ¹⁹⁵ Barbour SE, Kapur A, Deal CL. **Regulation of phosphatidylcholine homeostasis by calcium-independent phospholipase A₂.** Biochim Biophys Acta, 1999, 1439: 77-88
- ¹⁹⁶ Bradford M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1976, 72: 248-254
- ¹⁹⁷ Megger DA, Bracht T, Meyer HE, Sitek B. **Label-free quantification in clinical proteomics.** Biochim Biophys Acta, 2013, 1834: 1581-1590
- ¹⁹⁸ Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986, 51: 263-273
- ¹⁹⁹ Mullis KB, Faloona FA. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.** Methods Enzymol. 1987, 155: 335-350
- ²⁰⁰ Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** Science, 1988, 239(4839):487-491
- ²⁰¹ Pantazi D, Kitsiouli E, Karkabounas A, Trangas T, Nakos G, Lekka ME. **Dipalmitoyl-phosphatidylcholine biosynthesis is induced by non-injurious mechanical stretch in a model of alveolar type II cells.** Lipids, 2013, 48(8): 827-838
- ²⁰² Tsangaris I, Lekka ME, Kitsiouli E, Constantinopoulos S, Nakos G. **Bronchoalveolar lavage alterations during prolonged ventilation of patients without acute lung injury.** Eur Respir J, 2003, 21: 495-501
- ²⁰³ Nakos G, Kitsiouli EI, Tsangaris I, Lekka ME. **Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early intermediate and late phases of ARDS.** Intensive Care Med, 1998, 24: 296-303
- ²⁰⁴ Nakos G, Tsangaris H, Liokatis S, Kitsiouli E, Lekka ME. **Ventilator-associated pneumonia and atelectasis: evaluation through bronchoalveolar lavage fluid analysis.** Intensive Care Med, 2003, 29: 555-563
- ²⁰⁵ Ren Y, Zhan Q, Hu Q, Sun B, Yang C, Wang C. **Static stretch induces active morphological remodeling and functional impairment of alveolar epithelial cells.** Respiration, 2009, 78: 301-311

- ²⁰⁶ Lee J, Taneva SG, Holland BW, Tieleman DP, Cornell RB. **Structural basis for autoinhibition of CTP: phosphocholine cytidyltransferase (CCT), the regulatory enzyme in phosphatidylcholine synthesis, by its membrane-binding amphipathic helix.** J Biol Chem, 2014, 289(3): 1742-1755
- ²⁰⁷ Ryan AJ, Andrews M, Zhou J, Mallampalli RK. **c-Jun N-terminal kinase regulates CTP: phosphocholine cytidyltransferase.** Arch Biochem Biophys, 2006, 447: 23-33
- ²⁰⁸ Awasthi S, Vivekananda J, Awasthi V, Smith D, King RJ. **CTP: phosphocholine cytidyltransferase inhibition by ceramide via PKC- α , p38 MAPK, cPLA₂, and 5-lipoxygenase.** Am J Physiol, 2001, 281: L108-L118
- ²⁰⁹ Letsiou E, Kitsioulis E, Nakos G, Lekka ME. **Mild stretch activates cPLA2 in alveolar type II epithelial cells independently through the MEK/ERK and PI3K pathways.** Biochim Biophys Acta, 2011, 1811: 370-376
- ²¹⁰ Boggs KP, Rock CO, Jackowski S. **Lysophosphatidylcholine and 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine inhibit the CDP-choline pathway of phosphatidylcholine synthesis at the CTP: phosphocholine cytidyltransferase step.** J Biol Chem, 1995, 270: 7757-7764
- ²¹¹ Ramos B, El Mouedden M, Claro E, Jackowski S. **Inhibition of CTP: phosphocholine cytidyltransferase by C(2)-ceramide and its relationship to apoptosis.** Mol Pharmacol, 2002, 62: 1068-1075
- ²¹² Vivekananda J, Smith D, King RJ. **Sphingomyelin metabolites inhibit sphingomyelin synthase and CTP: phosphocholine cytidyltransferase.** Am J Physiol, 2001, 281: L98-L107
- ²¹³ Pelech SL, Vance DE. **Signal transduction via phosphatidylcholine cycles.** TIBS, 1989, 14: 28-30
- ²¹⁴ Ng MN, Kito TE, Cornell RB. **Contribution of lipid second messengers to the regulation of phosphatidylcholine synthesis during cell cycle re-entry.** Biochim Biophys Acta, 2004, 1686: 85-99
- ²¹⁵ Sellers K, Fox MP, Bousamra M 2nd, Slone SP, Higashi RM, Miller DM, Wang Y, Yan J, Yuneva MO, Deshpande R, Lane AN, Fan TW. **Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation.** J Clin Invest, 2015, 125: 687-698
- ²¹⁶ Fisher AB. **Intermediary metabolism of the lung.** Environ Health Perspect, 1984, 55: 149-158
- ²¹⁷ Gu C, Liu M, Zhao T, Wang D, Wang Y. **Protective role of p120-catenin in maintaining the integrity of adherens and tight junctions in ventilator-induced lung injury.** Respir Res, 2015, 16:58
- ²¹⁸ Murata N, Ito S, Furuya K, Takahara N, Naruse K, Aso H, Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y. **Ca²⁺ influx and ATP release mediated by mechanical stretch in human lung fibroblasts.** Biochem Biophys Res Commun, 2014, 453: 101-105
- ²¹⁹ Fisher JL, Margulies SS. **Na⁺-K⁺-ATPase activity in alveolar epithelial cells increases with cyclic stretch.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283: L737-L746
- ²²⁰ Budinger GR, Urich D, DeBiase PJ, Chiarella SE, Burgess ZO, Baker CM, Soberanes S, Mutlu GM, Jones JC. **Stretch-induced activation of AMP kinase in the lung requires dystroglycan.** Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 39:666-672
- ²²¹ Zhao T, Zhao H, Li G, Zheng S, Liu M, Gu C, Wang Y. **Role of the PKC α -c-Src tyrosine kinase pathway in the mediation of p120-catenin degradation in ventilator-induced lung injury.** Respirology, 2016, 21: 1404-1410

-
- ²²²Yamamoto H, Teramoto H, Uetani K, Igawa K, Shimizu E. **Cyclic stretch upregulates interleukine-8 and transforming growth factor-beta 1 production through a protein kinase C-dependent pathway in alveolar epithelial cells.** *Respirology*, 2002, 7: 103-109
- ²²³ Pan J, Fukuda K, Saito M, Matsuzaki J, Kodama H, Sano M, Takahashi T, Kato T, Ogawa S. **Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes.** *Circ Res*, 1999, 84: 1127-1136
- ²²⁴ Sotoudeh M, Li YS Yajima N, Chang CC, Tsou TC, Wang Y, Usami S, Ratcliffe A, Chien S, Shyy JY. **Induction of apoptosis in vascular smooth muscle cells by mechanical stretch.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282: H1709-H1716