



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΤΟΥ STRESS ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ HSP70-ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ.  
*ΜΟΝΤΕΛΟ ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗΣ/ΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ***

**ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ Π. ΖΕΡΙΚΙΩΤΗΣ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017**









**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΤΟΥ STRESS ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ HSP70-ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ.  
*ΜΟΝΤΕΛΟ ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗΣ/ΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ***

**ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ Π. ΖΕΡΙΚΙΩΤΗΣ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017**



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»





Ημερομηνία αίτησης του κ. Στυλιανού Ζερικιώτη: 21-11-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 623<sup>α</sup>/18-12-2007

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα

Βεζυράκη Πατρώνα, Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μιχάλης Λάμπρος, Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αγγελίδης Χαράλαμπος Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 29-1-2008**

*«Μελέτη των μηχανισμών του stress σε πρωτογενείς καλλιέργειες και Hsp70-διαγονιδιακών ποντικών. Μοντέλο Δοξορουβικίνης/καρδιακής ανεπάρκειας»*

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** 753<sup>α</sup>/18-6-2013

<b>Ευαγγέλου Άγγελος</b>	Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μιχάλης Λάμπρος</b>	Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Αγγελίδης Χαράλαμπος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Βεζυράκη Πατρώνα</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Καλφακάκου Βασιλική</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Νάκα Αικατερίνη</b>	Επίκουρη Καθηγήτρια Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Πέσχος Δημήτριος</b>	Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην κυτταρική Φυσιολογία, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 16-12-2016

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Μηνάς Πασχόπουλος**

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



**Η Γραμματέας του Τμήματος**

**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**



***Στην οικογένειά μου...***



# **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**



Η παρούσα εργασία στα πλαίσια της διδακτορικής μου διατριβής εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας, στο τμήμα της Ιατρικής, της σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Φυσιολογίας, κ. Βεζυράκη-Αγγελίδη Πάτρας.

Εν πρώτοις, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κ. Βεζυράκη Πάτρα, η οποία, αρχικά, από τα φοιτητικά μου χρόνια μου έδωσε τη δυνατότητα να ξεκινήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Φυσιολογίας, και στη συνέχεια, με εμπιστεύτηκε, αναθέτοντας μου αυτή τη διδακτορική διατριβή. Την ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ υπό την καθοδήγησή της, την πολύτιμη βοήθεια της σε όλους τους τομείς, την ενεργό συμμετοχή της, την υποστήριξη και τις χρήσιμες συμβουλές, που απεδείχθησαν καταλυτικές για την ολοκλήρωση της διατριβής μου. Από την πρώτη στιγμή, με μύησε στο θεωρητικό υπόβαθρο της εργασίας και μου υπέδειξε τον σωστό τρόπο εργασίας, επιστημονικής σκέψης και συγγραφής, όσον αφορά την ακόλουθη εργασία. Για μένα ήταν σημαντική η απλόχερη και από καρδιάς στήριξη της τόσο σε εργαστηριακό όσο και προσωπικό επίπεδο.

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να απευθύνω στον Καθηγητή Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής και μέλος της τριμελούς επιτροπής, κ. Αγγελίδη Χαράλαμπο, που μου επέτρεψε να εργαστώ στο εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την εκπόνηση ορισμένων πειραμάτων και τη δυνατότητα, που μου προσέφερε να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής ομάδας του. Η ενεργός συμμετοχή του και η βοήθεια του σε συμβουλευτικό, αλλά και σε επίπεδο τεχνογνωσίας και υλικών ήταν υπερπολύτιμες και δίχως αυτές δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της διατριβής μου. Το συνεχές και ειλικρινές ενδιαφέρον, που μου έδειξε, αλλά και η αγάπη του για την έρευνα και την επιστήμη αποτέλεσαν έμπνευση και παράδειγμα προς μίμηση για εμένα.

Γενικώς, θα ήθελα να σταθώ, αναγνωρίζοντας ότι οφείλω τα πάντα στην κ. Βεζυράκη και στον κ. Αγγελίδη και θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου για τη συνεργασία μας και για την αδιάκοπη συμπαράσταση τους σε επιστημονικό αλλά και σε προσωπικό επίπεδο.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, κ. Μιχάλη Λάμπρο, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις πολύτιμες συμβουλές που μας προσέφερε και τη σημαντική οικονομική στήριξη, αφού μέρος του πειραματικού έργου χρηματοδοτήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος: "Ο ρόλος της Hsp70 στην καρδιακή ανεπάρκεια. Πειραματικό μοντέλο μυοκαρδιοπάθειας (από δοξορουβικίνη) σε διαγονιδιακά Hsp70 ποντίκια" από τη ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΗ ΓΡΑΜΜΗ Α.Ε.

Ιδιαίτερη μνεία θα ήθελα να κάνω και να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, κ. Νάκα Αικατερίνη για την άριστη και εποικοδομητική συνεργασία, που είχαμε κατά την εκπόνηση της διατριβής μου και ειδικότερα για την υλοποίηση της πειραματικής διαδικασίας στο κομμάτι των πειραματοζώων. Η συμβολή της σε υλικό και τεχνικό επίπεδο, αλλά και μέσω των συμβουλών και των σημαντικών γνώσεων που μου προσέφερε, ήταν καθοριστική για την αποπεράτωση και συγγραφή της εργασίας μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μιχάλη και την κ. Νάκα για την παραχώρηση των ορών ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια για την υλοποίηση των μετρήσεων σε κλινικό επίπεδο.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, κ. Ευαγγέλου Άγγελο, μέλος της επταμελούς επιτροπής, για την υποδοχή του στο εργαστήριο και την άριστη συνεργασία μας όλο αυτόν τον καιρό, καθώς και για την πρόθυμη βοήθεια και στήριξη του σε όλα τα επίπεδα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, κ. Καλφακάκου Βασιλική, μέλος της επταμελούς επιτροπής, για την αρμονική συνύπαρξη και συνεργασία μας στο εργαστήριο, για τη βοήθεια και τις συμβουλές της σε επιστημονικό και μη επίπεδο, καθώς και τη θερμή και το ενδιαφέρον, που μου έδειξε όλο αυτό το διάστημα.

Ευχαριστώ, επίσης, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής, κ. Πέσχο Δημήτριο, για την αποδοχή του να συμμετάσχει στην επταμελή επιτροπή και να αξιολογήσει το εν λόγω ερευνητικό εγχείρημα, καθώς και για την καθημερινή συνεργασία στο χώρο του εργαστηρίου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Καρκαμπούνα Σπυρίδων, για τη συνεργασία, τις ιδέες του και την υλικοτεχνική βοήθεια του κατά τη διάρκεια της μελέτης μου.

Ακολούθως, θα πρέπει να ευχαριστήσω τους συναδέλφους και φίλους, με τους οποίους συνεργαστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια και με βοήθησαν με τον ένα ή με τον άλλο τρόπο, είτε σε τεχνικά ζητήματα, είτε σε υλική βοήθεια, είτε ακόμη και σε ηθική υποστήριξη και οι οποίοι συνεισέφεραν τα μέγιστα όσον αφορά στην εκμάθηση της χρήσης του απαραίτητου εργαστηριακού εξοπλισμού καθώς και στην επίλυση αποριών μου που ανέκυψαν κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών.

Πιο συγκεκριμένα, θα ήθελα να αναφερθώ και να ευχαριστήσω, από το Εργαστήριο Βιολογίας, τον Καλαϊτζάκη Αλέξανδρο για τη συνεργασία μας σε ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της έρευνας μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Κασιούμη Παναγιώτα και Βραζέλη Παρασκευή για τη φιλοξενία τους στο εργαστήριο, την αρμονική συνεργασία, τις συμβουλές και την υλικοτεχνική βοήθεια τους, όποτε τους το ζήτησα, καθώς και τη γενικότερη πολύτιμη συμβολή τους στην εκπόνηση των πειραματικών διαδικασιών, που έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Βιολογίας.

Από το εργαστήριο Φυσιολογίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω, αρχικά, τον συνάδελφο και φίλο Λέκκα Παναγιώτη για την ανεκτίμητη βοήθεια και συμπαράσταση του σε όλα τα επίπεδα τόσο εντός όσο και εκτός του χώρου του εργαστηρίου, καθώς και για την αρμονική συνεργασία, που είχαμε κατά τη συντήρηση και αναπαραγωγή των πειραματοζώων μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δήμα Ίριδα για την πολύτιμη υλική και συμβουλευτική βοήθεια που μου προσέφερε, την άψογη συνεργασία και συνύπαρξη μας στο εργαστήριο, καθώς και την καθημερινή της υποστήριξη όλο αυτό τον καιρό. Επιπλέον, εκφράζω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στους: Ζαχαρίου Χριστιάννα, Κονταργύρη Ευάγγελο, Γκιούλη Μαρία, Δεληγιάννη Ιωάννη και Τζίμα Χριστίνα για τη συνεργασία, τις επιστημονικές συμβουλές, τις ιδέες, τη φιλία, τις συζητήσεις και την καθημερινή στήριξη τους.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη των εργαστηρίων Βιολογίας και Φυσιολογίας, μέλη ΔΕΠ, προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές, τις γραμματείς και τα μέλη Ε.Τ.Ε.Π. και Ε.Ε.Δ.Ι.Π. για την άψογη και εποικοδομητική συνεργασία μας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου την οικογένεια μου και τους κοντινούς μου ανθρώπους και φίλους για την ψυχολογική υποστήριξη και ουσιαστική τους βοήθεια όλα αυτά τα χρόνια.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ



<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	9
<b>1.1. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ STRESS</b>	11
1.1.1. Ονοματολογία και βασικός διαχωρισμός των stress πρωτεϊνών	11
1.1.2. Πρωτεϊνική αναδίπλωση	12
1.1.2.1. In vitro πρωτεϊνική αναδίπλωση	13
1.1.2.2. In vivo πρωτεϊνική αναδίπλωση	14
<b>1.2. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΥΝΟΔΟΙ (CHAPERONES – CO-CHAPERONES)</b>	15
1.2.1. Γενικά στοιχεία	16
1.2.2. Μέλη της οικογένειας των μοριακών συνοδών	21
1.2.2. 1. Μικρού Μ.Β. πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Small Heat Shock Proteins-sHSPS) και α- κρυσταλλίνες	22
1.2.2. 2. Οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού στρες των 40kda	23
1.2.2. 3. Οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού στρες των 60kda	25
<b>1.3. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ 70KDA</b>	26
1.3.1 Hsc70	27
1.3.2. BiP	28
1.3.3. Grp75	29
1.3.4. Ssa1-4p	29
1.3.5. Kar2	30
1.3.6. DnaK	31
<b>1.4. Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ ΤΩΝ 70 KDA - HSP70</b>	31
<i>Hsp70-1a και Hsp70-1b</i>	33
<i>Hsp70-1t</i>	34
<i>Hsp70-2</i>	34
<i>Hsp70-5, Bip, Grp78</i>	34
<i>Hsp70-6</i>	34
<i>Hsp70-8, Hsc70</i>	35
<i>Hsp70-9</i>	35
1.4.1. Δομή της Hsp70	36
1.4.2. Λειτουργίες της HSP70	38
1.4.3. Hsp70 και ασθένειες	40
1.4.4. Ομοσυνοδές πρωτεΐνες της οικογένειας των HSP70s	40
<i>Bag-1</i>	41
<i>Chip</i>	41
<i>DnaJ1</i>	41
<i>Αυξιλίνη (auxilin)</i>	41
<i>p16</i>	41
<i>Hop</i>	41
<b>1.5. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ 90KDA</b>	42
<b>1.6. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ 100KDA</b>	43
<b>1.7. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΣΥΝΟΔΩΝ</b>	44
1.7.1. Μοριακοί συνοδοί και ασθένειες	47
<b>1.8. ΑΠΟΠΤΩΣΗ</b>	48

1.8.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης	50
1.8.2. Χαρακτηριστικά διαχωρισμού απόπτωσης και νέκρωσης	51
1.8.3. Άλλες μορφές προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου	53
1.8.4. Μηχανισμοί της απόπτωσης	53
1.8.4.1. Κασπάσες	54
1.8.4.2. Το εξωτερικό (εξωγενές) μονοπάτι	56
1.8.4.3. Το εσωτερικό (ενδογενές) μονοπάτι	58
1.8.4.4. Το μονοπάτι εκτέλεσης	60
1.8.4.5. Perforin/Granzyme μονοπάτι	61
1.8.4.6. Μονοπάτι ανεξάρτητο από κασπάσες	61
1.8.5. Πρωτεΐνες θερμικού σοκ και απόπτωση	62
1.8.5.1. HSP70 και απόπτωση	63
1.8.5.2. Άλλες HSPs και απόπτωση	67
1.8.5.3. Η Bcl-2 οικογένεια	69
1.8.6. Ασθένειες και απόπτωση	70
<b>1.9. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ</b>	71
1.9.1. Καρδιακή Ανεπάρκεια	72
<b>1.10. ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗ</b>	73
1.10.1. Μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης της δοξορουβικίνης	76
1.10.2. Επαγόμενες από DOX καρδιακές δομικές αλλαγές	76
1.10.3. Μηχανισμός δράσης	78
1.10.3.1. Οξειδωτικό στρες	79
1.10.3.2. Ο σίδηρος στην επαγόμενη από ανθρακυκλίνες καρδιοτοξικότητα	82
1.10.3.3. Απορύθμιση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου	83
1.10.3.4. DOX απόπτωση	84
1.10.3.5. Καταστολή της έκφρασης γονιδίων	87
1.10.3.6. Φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές	87
1.10.3.7. Αλλαγές στο απόθεμα φωσφορικού υψηλής ενέργειας	88
1.10.3.8. Η αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας	88
1.10.3.9. Νέκρωση	88
1.10.3.10. Αυτοφαγία	89
1.10.3.11. Γήρανση	89
<b>1.11. Η HSP70 ΣΤΙΣ ΚΑΡΔΙΑΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ</b>	90
<b>1.12. HSP70 ΚΑΙ ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗ</b>	93
<b>1.13. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟ DOX ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΠΑΘΕΙΑΣ</b>	94
<b>1.14. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	96
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	97
<b>2.1 Καλλιέργειες κυττάρων</b>	99
2.1.1. Κυτταρικές σειρές	99
2.1.2. Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων	99
2.1.3. Υλικά κυτταροκαλλιέργειας	100

<i>Θρεπτικό υλικό</i>	100
<i>Ρυθμιστικό διάλυμα (PBS)</i>	100
<i>Ορός (FBS)</i>	100
<i>Διάλυμα Θρυψίνης /EDTA (Trypsin/EDTA)</i>	101
<i>Υλικά – Αναλώσιμα</i>	101
<b>2.2 Κυτταρικές σειρές</b>	101
2.2.1 Απομόνωση ινοβλαστών και δημιουργία πρωτογενών καλλιιεργειών	102
<b>2.3. Ανάπτυξη, διατήρηση και αποθήκευση κυττάρων</b>	103
2.3.1. Αποθήκευση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών	104
<b>2.4. Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα θηλαστικών</b>	104
<b>2.5. Πειραματόζωα</b>	105
2.5.1. Συντήρηση πειραματοζώων	106
2.5.2. Αναπαραγωγή πειραματοζώων	106
2.5.3. Απομόνωση και καθαρισμός ολικού DNA από ιστούς ποντικών	106
2.5.4. Επιβεβαίωση ομοζυγωτίας για το διαγονίδιο της Hsp70 με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	107
2.5.5. Πρόκληση καρδιακής ανεπάρκειας	107
2.5.6. Υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη των ποντικών	108
2.5.7. Λήψη και συντήρηση ιστών	109
2.5.8. Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από ιστούς	109
<b>2.6. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)</b>	110
2.6.1. Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Bio-Rad protein assay)	110
2.6.2. Άλλες μέθοδοι υπολογισμού της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε εκχυλίσματα	111
2.6.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	111
2.6.4. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)	112
2.6.4.1. Μεταφορά πρωτεϊνών σε φύλλο νιτροκυτταρίνης	112
2.6.4.2. Χρώση των πρωτεϊνών στην πηκτή με χρωστική Coomassie Blue	113
2.6.4.3. Κάλυψη μη ειδικών θέσεων μεμβράνης (Blocking)	113
2.6.4.4. Επώαση με ειδικά αντισώματα	114
2.6.4.5. Εμφάνιση των αντιγόνων με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL)	115
2.6.4.6. Χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με Ponceau S	116
<b>2.7. Πειραματικές συνθήκες</b>	116
<b>2.8. Παρασκευή των διαλυμάτων Δοξορουβικίνης</b>	117
<b>2.9. Μέθοδος αποκλεισμού της χρωστικής Trypan Blue (Trypan Blue exclusion assay)</b>	118
<b>2.10. Μέθοδος προσδιορισμού ικανότητας σχηματισμού αποικιών (Colony forming efficiency)</b>	118
<b>2.11. Κυτταρομετρία ροής</b>	119
2.11.1. Κυτταρομετρία ροής (FACS)	119

2.11.2. Χρώση των κυττάρων με Ιωδιούχο Προπίδιο (pI) και Αννεξίνη V (Annexin-V)	120
2.11.3. Ανάλυση της έκφρασης της Hsp70 με κυτταρομετρία ροής (FACS)	122
<b>2.12. Έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT (MTT assay)</b>	123
<b>2.13. Φασματοφωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός της επαγόμενης Hsp70</b>	125
<b>2.14. Δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων</b>	127
2.14.1. Μέτρηση της δραστηριότητας της SOD	127
2.14.2. Μέτρηση της δραστηριότητας της GPx	128
<b>2.15. Στατιστική ανάλυση</b>	130
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	131
<b>3.1. Hsp70 και καρδιακή ανεπάρκεια</b>	133
3.1.1. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ως μέσο ανίχνευσης της ομοζυγωτίας διαγονιδιακών ζώων	133
3.1.2. Η παρουσία της Hsp70 βελτιώνει αισθητά την καρδιακή λειτουργία μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης	135
3.1.3. Η Hsp70 προστατεύει τα κύτταρα του μυοκαρδίου από την απόπτωση, ελέγχοντας την ενεργοποίηση των κασπασών	142
<b>3.2. Η υπερέκφραση της Hsp70 σε πρωτογενή εμβρυονικά κύτταρα των Hsp70-διαγονιδιακών ποντικών</b>	145
<b>3.3. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη μέθοδο αποκλεισμού της χρωστικής Trypan Blue</b>	150
<b>3.4. Προσδιορισμός του κυτταρικού θανάτου μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης με χρήση κυτταρομετρίας ροής</b>	157
<b>3.5. Προσδιορισμός της ικανότητας σχηματισμού αποικιών (Colony forming efficiency) των κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης</b>	168
<b>3.6. Υπολογισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT μετά από επώαση με δοξορουβικίνη</b>	181
<b>3.7. Το αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τη δοξορουβικίνη σε πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα ποντικών και ο ρόλος της Hsp70</b>	201
<i>H Hsp70 δεν επάγεται στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης</i>	202
<i>H Hsp70 προστατεύει τα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα από την απόπτωση, που προκαλείται από δοξορουβικίνη</i>	204
<i>H Hsp70 προστατεύει τα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα από την επαγόμενη από τη δοξορουβικίνη απόπτωση μέσω αναστολής της φωσφορυλίωσης της p53</i>	205
<i>H Hsp70 ελέγχει το εσωτερικό μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι με μείωση της συσσώρευσης της Bax στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης</i>	207
<i>H Hsp70 ελέγχει το κασπασο-εξαρτώμενο αποπτωτικό μονοπάτι με αναστολή της ενεργοποίησης της κασπάσης-9 στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης</i>	208

<i>Η Hsp70 ελέγχει το κασπασο-εξαρτώμενο αποπτωτικό μονοπάτι με αναστολή της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης</i>	210
<i>Προτεινόμενο μοντέλο</i>	212
<b>3.8. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων</b>	214
3.8.1: Μέτρηση της δραστηριότητας της SOD	214
3.8.2: Μέτρηση της δραστηριότητας της GPx	222
<b>3.9. Φασματοφωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός της επαγόμενης Hsp70 σε ορούς ασθενών</b>	232
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	239
<b>5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	263
<b>6. ABSTRACT</b>	267
<b>7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	271
<b>8. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b>	321





# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## 1.1. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ STRESS

Η Hsp70 (Heat Shock Protein 70) συνιστά μια πρωτεΐνη, που εντάσσεται στην υποοικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 70 kDa. Ανήκει, επίσης, στην οικογένεια των μοριακών συνοδών πρωτεϊνών (Chaperones). Συνεργάζεται με ομο-συνοδές πρωτεΐνες (Co-chaperones) για τη δημιουργία λειτουργικών νανομηχανών. Η έκφρασή της επάγεται από περιβαλλοντικά, φυσικά ή χημικά ερεθίσματα και εμπλέκεται:

- α) σε μοριακούς κυτταρικούς μηχανισμούς όπως η δίπλωση/αναδίπλωση (folding/refolding) των πρωτεϊνών,
- β) σε κυτταρικά μονοπάτια όπως απόπτωση, κυτταρική επιβίωση, θερμοανοχή, DNA επιδιόρθωση και
- γ) στην προστασία των οργανισμών από ασθένειες ή παθολογικές καταστάσεις, όπως έμφραγμα, εγκεφαλικό, επιληψία, μυϊκή δυστροφία και την καρδιακή ανεπάρκεια, που αποτελεί και τον στόχο της παρούσας εργασίας.

Τα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα αντιδρούν σε έκθεση σε δυσμενείς συνθήκες του εξωτερικού περιβάλλοντος με αυξημένη σύνθεση των stress πρωτεϊνών. Οι δομές και οι λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών είναι εξελικτικά υψηλά διατηρημένες και είναι παρούσες σε όλες τις διάφορες παραλλαγές των κυττάρων σε όλους τους ζώντες οργανισμούς.

### 1.1.1. Ονοματολογία και βασικός διαχωρισμός των stress πρωτεϊνών

Ο όρος “heat shock πρωτεΐνες”, που αποδόθηκε από τον Tissieres et.al. (1974), χρησιμοποιείται πιο πολύ σαν ιστορικό όνομα, αλλά παράλα αυτά, ακόμα, υπερισχύει από τον προφανώς πιο λογικά σωστό όρο “stress πρωτεΐνες”. Το όνομα αυτό προσδιορίζει όλη την ομάδα των πρωτεϊνών, των οποίων η έκφραση αυξάνεται εξαιτίας της επίπτωσης των στρες παραγόντων. Μια άλλη συντόμευση, που χρησιμοποιείται είναι το “hsc”(heat shock cognates), το οποίο χρησιμοποιείται για τη δομική μορφή των hsp, οι οποίες είναι παρούσες και σε μη στρεσαρισμένα κύτταρα και σε αντίθεση με την πλειοψηφία των άλλων πρωτεϊνών, η συγκέντρωσή τους αυξάνεται κατά τη διάρκεια του θερμικού σοκ.

Ο όρος “chaperone” χρησιμοποιείται πολύ συχνά και υποδεικνύει επακριβώς τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Αφορά τόσο stress, όσο και μη stress πρωτεΐνες, οι οποίες συνοδεύουν ξεδιπλωμένα πολυπεπίδια κατά τη διάρκεια της κυτταρικής μεταφοράς τους και δημιουργούν δίοδο των πρωτεϊνών διαμέσου των μεμβρανών ή την ενσωμάτωσή τους στα κυτταρικά οργανίδια. Ένας παρόμοιος, γνωστός όρος “chaperonin” είναι το εναλλακτικό όνομα για την πρωτεΐνη GroEL, που ονομάζεται εν συντομία “cp60” ή “hsp60”. Τα “chaperonins” βρίσκονται στα βακτήρια, όπως και στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες.

Η αυξημένη γνώση για τις stress πρωτεΐνες οδήγησε στο διαχωρισμό της υπεροικογένειας των hsp σε συγκεκριμένες οικογένειες [1]. Το σημαντικό καθοριστικό κριτήριο είναι τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών [2]. Η σημαντική αλληλουχία και οι λειτουργικές ομοιότητες παρατηρήθηκαν ανάμεσα στα μέλη των χαρακτηριστικών hsp οικογενειών [3, 4]. Οι αρχικά διαχωρισμένες οικογένειες: hsp90, hsp70, hsp60 και τα μικρά hsps [5] έχουν επεκταθεί βήμα βήμα σε hsp110, hsp100, hsp90, hsp70, hsp60, hsp40, hsp10 και οι μικρές hsp οικογένειες [5, 6]. Ο

αριθμητικός δείκτης αντιπροσωπεύει το πρωτεϊνικό μοριακό βάρος σε kDa. Οι stress πρωτεΐνες καταγράφηκαν σε οικογένειες ανάλογα με τα παραπλήσια μοριακά βάρη, τις λειτουργίες τους στα κύτταρα και τις ομολογίες τους στις πρωτοταγείς δομές.

### 1.1.2. Πρωτεϊνική αναδίπλωση

Ο όρος πρωτεϊνική αναδίπλωση (protein folding) αναφέρεται στη διαδικασία, κατά την οποία ένα πολυπεπτίδιο μετατρέπεται από μία γραμμική αλληλουχία αμινοξέων σε μία τρισδιάστατη δομή, η οποία και αποτελεί τη λειτουργική πρωτεΐνη. Ο όρος αυτός συμπεριλαμβάνει και την έννοια της επαναδίπλωσης (refolding), η οποία αναφέρεται σε πρωτεΐνες, που έχουν χάσει τη φυσική διαμόρφωσή τους λόγω μετουσίωσης (π.χ. μετά από έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες ή σε χημικούς παράγοντες) ή λόγω τροποποιήσεων που μπορεί να υφίστανται κατά τη διάρκεια μεταφοράς στο στόχο τους (translocation) και οι οποίες θα πρέπει να επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση. Η κατανόηση της πορείας που ακολουθεί μία πρωτεΐνη προς την πλήρη αναδίπλωσή της καθώς και η περιγραφή των μηχανισμών και των παραγόντων, που συμμετέχουν σε αυτήν, αποτελούν ένα από τα βασικότερα πεδία της σύγχρονης Βιολογίας με έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον.

Η στερεοχημική πληροφορία, που είναι απαραίτητη για τις νεοσυντιθέμενες πρωτεϊνικές αλυσίδες ώστε να αναδιπλωθούν σωστά μέσα στα κύτταρα, βρίσκεται αποκλειστικά στην πρωτοταγή δομή του αρχικού μεταφραστικού προϊόντος, αρχή που θεμελιώθηκε από τον Anfinsen το 1973 και επιβεβαιώθηκε τα επόμενα χρόνια [7, 8]. Δηλαδή, μία νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη ή μία πρωτεΐνη, που έχει αποδιαταχθεί λόγω ύπαρξης κάποιου μετουσιωτικού παράγοντα, κατέχει όλη την απαιτούμενη πληροφορία ώστε να αναδιπλωθεί αυθόρμητα *in vitro* και να υιοθετήσει μία φυσική τρισδιάστατη δομή, μετά την απομάκρυνση του αποδιατακτικού παράγοντα [9]. Κατά την αναδίπλωση της πρωτεΐνης τα υδροφοβικά της κατάλοιπα εγκλείονται στο εσωτερικό του μορίου δημιουργώντας έναν υδροφοβικό πυρήνα, ενώ στο εξωτερικό μένουν εκτεθειμένα τα υδροφιλικά κατάλοιπα, σε επαφή με το υδατικό περιβάλλον [10].

Όμως, *in vivo*, στο εσωτερικό του κυττάρου, μία νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη έρχεται αντιμέτωπη με αρκετούς κινδύνους. Καθώς η πολυπεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνεται, μπορεί να αναδιπλωθεί λανθασμένα πριν ολοκληρωθεί η σύνθεσή της, να αποδομηθεί, καθώς δεν είναι πλήρως αναδιπλωμένη και είναι επιδεκτική σε πρωτεάσες, ή να συμπλεγματοποιηθεί με παρόμοιες γειτονικές αλυσίδες [8].

Η συμπλεγματοποίηση (*aggregation*) προκύπτει επειδή κάποιες πρωτεΐνες αναδιπλώνονται και ξεδιπλώνονται μέσω ενδιάμεσων, που εκθέτουν παροδικά στις επιφάνειές τους υδροφοβικά κατάλοιπα, τα οποία φυσιολογικά είναι προστατευμένα στο εσωτερικό του μορίου. Κατά τη σταδιακή σύνθεση της αλυσίδας από ένα ριβόσωμα ή κατά τη διάρκεια του ξεδιπλώματος ώριμων πρωτεϊνών λόγω στρες, οι παροδικά εκτεθειμένες υδροφοβικές περιοχές μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αντίστοιχες των γειτονικών αλυσίδων, σχηματίζοντας μη λειτουργικά συμπλέγματα [11].

Η μεγάλη συγκέντρωση μακρομορίων, δηλαδή ο μακρομοριακός συνωστισμός (*macromolecular crowding*), στο εσωτερικό των κυττάρων κάνει το φαινόμενο της συμπλεγματοποίησης πολύ έντονο. Οι υψηλές συγκεντρώσεις των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνικών επιφανειών μέσα στα κύτταρα γεννούν την ανάγκη για την ύπαρξη μηχανισμών, που θα αποτρέπουν τις λάθος αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε υδροφοβικές επιφάνειες. Ένας τέτοιος μηχανισμός είναι η ύπαρξη πρωτεϊνών, που

αναγνωρίζουν και δεσμεύονται μεταβατικά σε αυτές τις επιφάνειες και έτσι παρεμποδίζουν την πρόιμη ή ακατάλληλη αλληλεπίδραση. Αυτές οι πρωτεΐνες καλούνται μοριακοί συνοδοί (*molecular chaperones*) [12]. Λαμβάνοντας υπόψη το μέγεθος της ενέργειας, που το κύτταρο έχει ήδη επενδύσει στη σύνθεση ενός νέου πολυπεπτιδίου, δεν είναι έκπληξη ότι έχουν εξελιχθεί στρατηγικές για την προώθηση της αποτελεσματικής αναδίπλωσης μιας πρωτεΐνης σε μια ενεργή διαμόρφωση. Κατά τη μοριακή εξέλιξη, η πολυπεπτιδική αλληλουχία, πιθανώς, να μην επιλεγόταν βασισμένη στις βιολογικές ιδιότητες, αλλά επίσης και από το αν μπορούν να αναδιπλωθούν παραγωγικά. Για να αυξηθεί η προσιτή διαμόρφωση, τα κύτταρα ανέπτυξαν μοριακούς συνοδούς, πρωτεΐνες, που συνδέονται με μη αναδιπλωμένα πολυπεπτίδια, παρεμποδίζοντας τη συσσωμάτωση και προάγοντας την παραγωγική αναδίπλωση με ένα τρόπο εξαρτώμενο από ATP.

### 1.1.2.1. In vitro πρωτεϊνική αναδίπλωση

Μικρές πρωτεΐνες μπορούν, υπό κατάλληλες συνθήκες, να αναδιπλωθούν στη φυσική τους κατάσταση μέσα σε μερικές δεκάδες χιλιοστά του δευτερολέπτου με μη ανιχνεύσιμα ενδιάμεσα [13, 14]. Τα πρώτα στάδια της αναδίπλωσης περιλαμβάνουν κατάρρευση από μία υδρόφοβη κατάσταση σε μια σχετικά συμπαγή κατάσταση και σχηματισμό ασταθών δευτερογενών δομών. Αυτή η αρχική κατάσταση κατάρρευσης αποτελείται από έναν πολύ μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων. Περαιτέρω συμπύκνωση θα οδηγήσει σε ένα ή περισσότερα ιδιαίτερα σταθερά ενδιάμεσα. Οι πρωτεΐνες στο κύτταρο, είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς σε συσσωμάτωση, πιθανώς μέσω ειδικών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ υδρόφοβων επιφανειών της δομικής υπομονάδας [15, 16]. Η τάση των μερικώς αναδιπλωμένων ενδιάμεσων να συσχετιστούν ή να δημιουργήσουν συσσωματώματα επιδεινώνεται, καθώς αυξάνει η συγκέντρωση της πρωτεΐνης.

Η πληροφορία, που μεταφέρεται από το DNA στο mRNA και από το mRNA στο πολυπεπτίδιο απαιτεί μοριακή συμπληρωματικότητα και τον γενετικό κώδικα. Αυτό μεταφράζει τη γραμμική αλληλουχία μιας τριπλέτας βάσεων σε μια γραμμική αλληλουχία από αμινοξέα. Το τελικό στάδιο στη διαδικασία από το γονίδιο στη λειτουργική πρωτεΐνη, η πρωτεϊνική αναδίπλωση, μετατρέπει αυτήν τη γραμμική πληροφορία σε μια τρισδιάστατη δομή. Αποδεικνύεται ότι αυτή η αντίδραση είναι πολύ περίπλοκη. Η έρευνα του προβλήματος της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης ξεκινάει από το 1960 με το πρωτοποριακό πείραμα του Christian Anfinsen και τους συνεργάτες του στην αναστρέψιμη αναδίπλωση ενός άφθονου ενζύμου διάσπασης του RNA, τη ριβονουκλεάση A (Rnase A) [7, 17].

Η φυσική κατάσταση μιας πρωτεΐνης αντιστοιχεί σε ένα αρκετά στενό ενεργειακό ελάχιστο στο ενεργειακό τοπίο διαμόρφωσης [18, 19]. Η μετουσιωμένη κατάσταση, από την άλλη πλευρά, εκπροσωπείται από ένα μεγάλο σύνολο διαμορφώσεων με υψηλή εσωτερική ενέργεια και ευελιξία. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αναδίπλωσης, σχηματίζονται πολυάριθμες μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, που απαιτούν την ακριβή τοποθέτηση ποικίλων μορίων της πρωτεΐνης. Ανάμεσα σε αυτά, οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις φαίνονται να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο [20]. Υδροφοβικά μόρια τείνουν να σχετίζονται μεταξύ τους σε πολικό περιβάλλον για λόγους εντροπίας και ενθαλπίας. Αντίστοιχα, υδροφοβικά αμινοξέα βρίσκονται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα μιας διπλωμένης πρωτεΐνης. Οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις δεν είναι μόνο σημαντικές στη σταθεροποίηση των διπλωμένων σχηματισμών, αλλά μπορούν να έχουν και επιβλαβή επίδραση [21].

Κατά την διάρκεια πρώιμων σταδίων δίπλωσης, πολλές πρωτεΐνες σχηματίζουν ενδιάμεσα, τα οποία εκθέτουν ένα αξιοσημείωτο ποσό υδροφοβικών επιφανειών. Τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να συνδεθούν μη ειδικά μέσω αυτών των υδροφοβικών επιφανειών και τελικά συσσωματώνονται. Αφού η συσσωμάτωση είναι δευτέρου ή υψηλότερου βαθμού αντίδρασης, η συγκέντρωση πρωτεΐνης διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην απόφαση εάν θα επικρατήσει η αναδίπλωση στη φυσική μορφή ή η μη ειδική συσσωμάτωση [22]. Για μία δεδομένη πρωτεΐνη, η αναδίπλωση *in vitro* μπορεί συχνά να βελτιωθεί μέσω βελτιστοποίησης των πειραματικών συνθηκών, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η πρωτεϊνική συγκέντρωση, η θερμοκρασία και το pH ανάμεσα σε άλλες.

### 1.1.2.2. In vivo πρωτεϊνική αναδίπλωση

Σε αντίθεση με την *in vitro* κατάσταση, όλες οι πρωτεΐνες πρέπει να διπλωθούν κάτω από τις ίδιες συνθήκες σε ένα ζωντανό κύτταρο. Αυτές οι συνθήκες φαίνονται να είναι αντιπαραγωγικές για επιτυχή δίπλωση, κυρίως εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας και του μεγάλου αριθμού μη φυσικών πρωτεϊνών, που είναι παρούσες. Κάτω από αυτές τις περιστάσεις φαίνεται εκπληκτικό το ότι τα κύτταρα συνήθως στερούνται συσσωματωμένες πρωτεΐνες. Υπάρχουν δύο πιθανές εξηγήσεις για αυτήν την παρατήρηση. Πρώτον, η συσσωμάτωση συμβαίνει *in vivo*, αλλά τα προϊόντα της αφαιρούνται ταχύτατα από τις κυτταρικές πρωτεάσες. Από αυτό συνεπάγεται ότι τα κύτταρα ξοδεύουν πολλή ενέργεια για να παράγουν πρωτεΐνες, που δεν γίνονται ποτέ λειτουργικές. Δεύτερον, τα κύτταρα έχουν βρει μία στρατηγική ελαχιστοποίησης της συσσωμάτωσης των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών σε πρώτη φάση. Αυτό έχει επιτευχθεί με μηχανές πρωτεϊνικών συμπλόκων, τους μοριακούς συνοδούς, που επηρεάζουν την αυθόρμητη αντίδραση δίπλωσης των πρωτεϊνών και αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη συσσωμάτωση. Είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι αυτοί οι μοριακοί συνοδοί δεν παρέχουν εξειδικευμένη στερεοχημική πληροφορία για τη δίπλωση των πρωτεϊνών-στόχων, αλλά αναστέλλουν μη παραγωγικές αλληλεπιδράσεις και επομένως, επιτρέπουν στην πρωτεΐνη να διπλωθεί περισσότερο επιτυχώς στη φυσική της δομή.

Οι μοριακοί συνοδοί εδράζονται σε όλα τα διαμερίσματα του κυττάρου, όπου συμβαίνουν δίπλωση ή πιο γενικά διαμορφωτικές αναδιατάξεις των πρωτεϊνών. Παρόλο που η πρωτεϊνική σύνδεση είναι η κύρια πηγή των μη διπλωμένων πολυπεπτιδικών αλυσίδων, άλλες διαδικασίες μπορούν, επίσης, να παράγουν μη διπλωμένες πρωτεΐνες. Σε μη φυσιολογικές υψηλές θερμοκρασίες ή σε παρουσία συγκεκριμένων χημικών ουσιών, οι πρωτεΐνες μπορούν να γίνουν δομικά ασταθείς και ακόμα να ξεδιπλωθούν. Τελικά αυτό μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια της λειτουργίας των επηρεαζόμενων πρωτεϊνών και στη συσσώρευση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Το κύτταρο αποκρίνεται σε αυτήν την απειλή παράγοντας εξειδικευμένες προστατευτικές πρωτεΐνες, φαινόμενο που αναφέρεται ως απόκριση στο θερμικό σοκ ή απόκριση στο στρες (heat-shock response ή stress response) [23]. Έχει βρεθεί ότι πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες είναι μοριακοί συνοδοί.

## 1.2. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΥΝΟΔΟΙ (CHAPERONES – CO-CHAPERONES)

Ο έλεγχος της ποιότητας των πρωτεϊνών, επίσης γνωστός ως πρωτεόσταση, αποτελεί τη ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης, αναδίπλωσης, ξεδιπλώματος και αλλαγής. Διαμεσολαβείται από τα συστήματα των συνοδών και των πρωτεασών, μαζί με τους μηχανισμούς κυτταρικής εκκαθάρισης, όπως η αυτοφαγία και η λυσοσωματική αποικοδόμηση. Αυτά τα συστήματα ποιοτικού ελέγχου έχουν ένα ουσιώδη ρόλο στη ζωή των κυττάρων, εξασφαλίζοντας ότι οι πρωτεΐνες είναι σωστά αναδιπλωμένες και λειτουργικές στο σωστό χώρο και χρόνο [24, 25]. Είναι σημαντικοί για την μετρίαση των επιβλαβών επιδράσεων της λανθασμένης αναδίπλωσης και της συσσωμάτωσης των πρωτεϊνών.

Μία τάξη οικογενειών πρωτεϊνών, που ορίζονται ως *μοριακοί συνοδοί*, βοηθά ποικίλες διαδικασίες, οι οποίες περιλαμβάνουν την αναδίπλωση, το ξεδίπλωμα και την ομοιόσταση των κυτταρικών πρωτεϊνών. Μετά από τη μετουσίωση των πρωτεϊνών, που προκαλείται από stress (για παράδειγμα μετά από έκθεση σε θερμότητα ή τοξίνες) ή καταστάσεις ασθενειών, οι πρωτεΐνες μπορούν να ξεδιπλωθούν, να συσσωματωθούν και μετά να αναδιπλωθούν ή μπορούν να αποτελέσουν στόχο για απόρριψη από τα πρωτεολυτικά συστήματα. Οι συνοδοί εδράζονται σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα και δρουν σε ένα ευρύ φάσμα μη φυσικών υποστρωμάτων. Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), συγκεκριμένα, είναι κύρια θέση για την παραγωγή πρωτεϊνών και του ποιοτικού ελέγχου στη μεμβράνη και τα εκκριτικά συστήματα.

**Ιστορικά στοιχεία:** Η πρώτη ιδέα για την έννοια των μοριακών συνοδών προήλθε από την παρουσία μιας τοξίνης στο δηλητήριο του αυστραλιανού φιδιού *Oxyuranus s. scutellatus*. Οι δύο υπομονάδες ( $\beta$  και  $\gamma$ ) της πρωτεΐνης, που περιβάλλουν την ενεργό νευροτοξική υπομονάδα  $\alpha$ , περιγράφησαν ως συνοδοί, οι οποίοι αυξάνουν την ειδικότητα της τοξίνης και την προστατεύουν από τον καταβολισμό [26]. Από την παρατήρηση αυτή, δεν έγινε περαιτέρω προσπάθεια για επέκταση της έννοιας του συνοδού σε άλλα συστήματα [27, 28].

Ο όρος μοριακός συνοδός χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Laskey, για να περιγράψει το ρόλο μιας πρωτεΐνης η οποία παρεμποδίζει τις λανθασμένες ιονικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις ιστόνες και το DNA σε εκχυλίσματα από αυγά που λήφθηκαν από το βάτραχο *Xenopus laevis* [29]. Η πρωτεΐνη αυτή, η οποία αρχικά χαρακτηρίστηκε ως «πρωτεΐνη συγκρότησης νουκλεοσωμάτων», δεν ήταν άλλη από τη νουκλεοπλασμίνη. Ο καταλυτικός αυτός παράγοντας, έχοντας οξειδωτικές ιδιότητες, βοηθά στην οργάνωση των ιστονών σε «πρόδρομα νουκλεοσωμικά σύμπλοκα» [29], ελαττώνοντας το ισχυρό θετικό φορτίο των μονομερών ιστονών. Η νουκλεοπλασμίνη χαρακτηρίστηκε ως μοριακός συνοδός, γιατί αφενός δεν είναι συστατικό των νουκλεοσωμάτων, αφετέρου δε το νουκλεόσωμα δύναται να συγκροτηθεί αφ' εαυτού, εάν μειωθεί η υψηλή αλατότητα του διαλύματος με διαπίδυση [27].

Μια δεκαετία σχεδόν αργότερα, ο όρος αυτός γενικεύτηκε για να περιγράψει μια κατηγορία κυτταρικών πρωτεϊνών, των οποίων η βασική λειτουργία είναι η διασφάλιση της ορθής αναδίπλωσης άλλων πολυπεπτιδικών αλυσίδων και της συγκρότησής τους σε ολιγομερείς δομές [23], ακολουθώντας την πρόταση του Hugh Pelham για την ύπαρξη τέτοιων πρωτεϊνών και συγκεκριμένα της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ των 70 και 90 kDa (Hsp70s και Hsp90s). Ο Pelham είχε ισχυριστεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών σε φυσιολογικές συνθήκες, καθώς εδράζονται στο κυτταρόπλασμα και το

ενδοπλασματικό δίκτυο, κατεξοχήν χώροι της πρωτεϊνοσύνθεσης, ενώ υπό συνθήκες στρες βοηθούν στην επανασυγκρότηση των αποδιαταγμένων κυτταρικών δομών [30].

Η ιστορία της άλλης υπο-ομάδας των μοριακών συνοδών (chaperonins) περιλαμβάνει δύο άσχετες φαινομενικά παρατηρήσεις, που χρονολογούνται στη δεκαετία του 1970. Αυτές είναι η γενετική της μορφογένεσης του βακτηριοφάγου λ, κατά την οποία απαιτείται η παρουσία των δύο ισομορφών της πρωτεΐνης GroE (GroEL και GroES ή chaperonin 60 – cpn60 και chaperonin 10 – cpn10 αντίστοιχα [31]) [32-35], όσο και του βακτηριοφάγου T4, κατά το πρώτο στάδιο συγκρότησης του καψιδίου [34, 36], ενώ απουσία ή κατόπιν μετάλλαξης στο γονίδιο *groE*, παρατηρείται εσφαλμένη συγκρότηση της κεφαλής στους φάγους αυτούς [34, 37-39], όσο και της ουράς του φάγου T5 [40].

Η δεύτερη παρατήρηση αφορά στη σύνθεση του ενζύμου ribulose 1,5 biphosphate carboxylase (Rubisco) κατά τη βιογένεση των χλωροπλαστών (*Pisum sativum*), κατά την οποία απαιτείται η πρόσδεση της μεγάλης υπομονάδας του ριβοσώματος με το «πολυπεπτιδίο 60» [27, 41]. Ανάλογα φαινόμενα παρατηρήθηκαν και σε εκχυλίσματα από φύλλα σπανακιού, σίτου, κριθαριού και καπνού [42].

Οι δύο αυτές παρατηρήσεις συνδύαστηκαν στα τέλη του 1980 από τις ομάδες των Georgopoulos και Ellis, οι οποίοι έδειξαν ότι η GroEL και η Rubisco-συνδέουσα πρωτεΐνη είναι εξελικτικά ομόλογες μεταξύ τους. Η ομολογία αυτή βασίστηκε στην προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία τους, στη στερεοδομή τους, καθώς και οι δύο αποτελούνται από 14 υπομονάδες, αλλά και στη λειτουργία τους, καθώς εμφανίζουν ασθενή δράση ATPάσης [42-44]. Τελικά, στην κατηγορία αυτή των μοριακών συνοδών, στην οποία ανήκουν πρωτεΐνες βακτηρίων, μιτοχονδρίων και χλωροπλαστών, αποδόθηκε η ονομασία «chaperonins» [27, 44]. Επιπλέον δεδομένα για τη σχέση μεταξύ των δύο αυτών πρωτεϊνών έδωσε και η ομάδα του Lorimer, αποδεικνύοντας ότι η αυξημένη έκφραση των GroE πρωτεϊνών οδηγεί σε αύξηση της ενεργής Rubisco κατά τη μετα-μεταφραστική συγκρότηση των νεοσυντιθέμενων πεπτιδίων της Rubisco για το σχηματισμό του ενεργού ολοενζύμου, αλλά και στη μετατροπή των νεοσυντιθέμενων πεπτιδίων σε ένα οκταμερή πυρήνα. Από την άλλη, μεταλλάξεις του *groE* γονιδίου, οδήγησαν σε έλλειψη ενεργής Rubisco και συγκρότησης του ολοενζύμου [45]. Τελικώς, αποδείχθη ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας GroE αποτελούν σημαντικό κομμάτι της απόκρισης σε θερμικό στρες και επικουρούν τη διαδικασία αναδίπλωσης άλλων πρωτεϊνών [46].

### **1.2.1. Γενικά στοιχεία**

Προκειμένου μία πρωτεΐνη να χαρακτηριστεί ως *μοριακός συνοδός*, θα πρέπει να πληροί τα εξής κριτήρια:

#### **α) Δέσμευση σε πρωτεΐνες που εκθέτουν στην επιφάνειά τους υδρόφοβα αμινοξέα.**

Η βασική ιδιότητα κάθε μοριακού συνοδού είναι η ικανότητά του να αναγνωρίζει και να δεσμεύει μετουσιωμένα ή μερικώς αναδιπλωμένα πολυπεπτιδία (Εικόνα 1Α). Κατά τα πρώιμα στάδια της *de novo* αναδίπλωσης ή όταν συμβεί λανθασμένη αναδίπλωση, υδρόφοβα αμινοξέα που κανονικά βρίσκονται στο εσωτερικό των πρωτεϊνών, εκτίθενται στην επιφάνεια αυτών, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να έχουν τάση να συσσωματωθούν (Εικόνα 1Ε) [47, 48]. Η πιθανότητα της συσσωμάτωσης μειώνεται σημαντικά καθώς οι μοριακοί συνοδοί συνδέονται με τις υδρόφοβες αυτές περιοχές, αποτρέποντας τέτοιου είδους ενδοπεπτιδικών και διαπεπτιδικών αλληλεπιδράσεων [49].

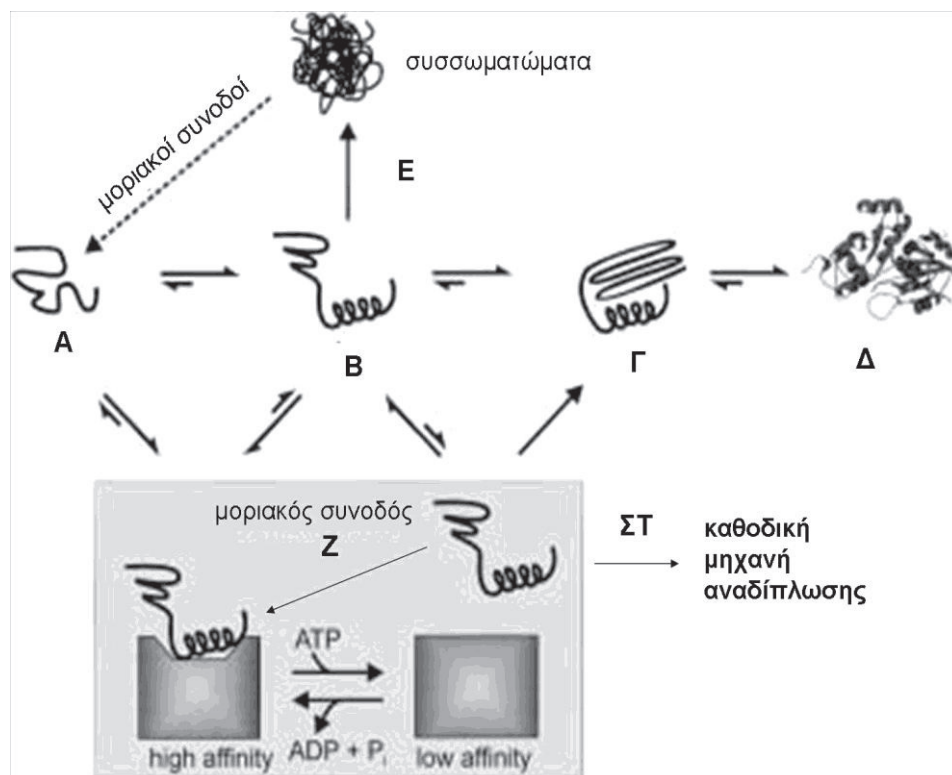


### **β) Ελεγχόμενη απελευθέρωση των προσδεδεμένων πολυπεπτιδίων.**

Η ικανότητα αυτή των μοριακών συνοδών, οφείλεται στη δυνατότητα που έχουν να κινούνται μεταξύ δύο εναλλακτικών καταστάσεων, μίας που έχει υψηλή συγγένεια για το υποστρώμα και μίας που έχει χαμηλή συγγένεια για αυτό. Η μετάβαση από την πρώτη στη δεύτερη κατάσταση, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του υποστρώματος και επιτυγχάνεται με κατανάλωση ενέργειας, που προέρχεται από την υδρόλυση ATP [50]. Η δράση ενός μοριακού συνοδού προϋποθέτει την κυκλική εναλλαγή των δύο αυτών καταστάσεών του, με επαγόμενο αποτέλεσμα τη διαδοχική και αυστηρά ρυθμιζόμενη δέσμευση και αποδέσμευση του μετουσιωμένου υποστρώματος (Εικόνα 1Ζ), μέχρι αυτό να αναδιπλωθεί (Εικόνα 1Δ) ή να μεταφερθεί σε ένα άλλο συνοδό (Εικόνα 1ΣΤ) [51, 52].

### **γ) Επαγωγή αλλαγών στη δομή των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων.**

Οι μοριακοί συνοδοί, κατά τη διάρκεια αυτών των διαδοχικών κύκλων δέσμευσης-αποδέσμευσης του υποστρώματος, επάγουν αλλαγές στη διαμόρφωσή του. Παράδειγμα αυτής της δράσης τους, αποτελεί το ελεγχόμενο ξεδίπλωμα (unfolding) πολυπεπτιδίων, τα οποία έχουν εγκλωβιστεί είτε σε ενδιάμεσες μη παραγωγικές μορφές (Εικόνα 1Β,1Γ) κατά τη διαδικασία της αναδίπλωσης, είτε σε συσσωματώματα μετά την πλήρη μετουσίωσή τους και τα οποία θα πρέπει πρώτα να ξεδιπλωθούν πριν επιχειρηθεί πάλι η αναδίπλωσή τους [53-55]. Εδώ θα πρέπει να τονιστεί, ότι οι μοριακοί συνοδοί δε φέρουν καμία ειδική ή συμπληρωματική πληροφορία για την αναδίπλωση του υποστρώματος, παρά μόνο διευκολύνουν την υλοποίηση της πληροφορίας, που περιλαμβάνεται στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης-στόχου.



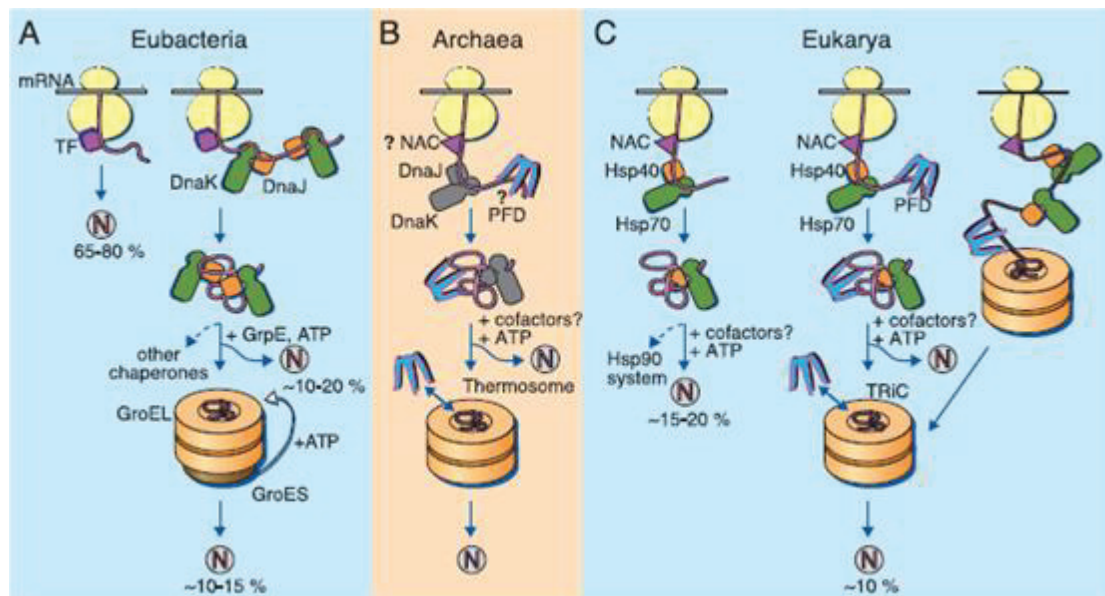
**Εικόνα 1.1:** Πρωτεϊνική αναδίπλωση υποβοηθούμενη από μοριακούς συνοδούς. Τόσο η βιοσύνθεση πρωτεϊνών όσο και το κυτταρικό στρες μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία

πολυπεπτιδίων, τα οποία έχουν χάσει ή δεν έχουν χάσει την τριτοταγή τους διαμόρφωση (A). Τα μόρια αυτά θα πρέπει να αναδίπλωθούν μέσω διαφόρων ενδιάμεσων μορφών (B, Γ), μέχρις ότου φθάσουν τη φυσική και ταυτόχρονα λειτουργική τους διαμόρφωση (Δ). Οι ενδιάμεσες αυτές μορφές, είναι δυνατό να εκθέτουν στην επιφάνειά τους υδρόφοβα αμινοξέα, τα οποία και τις καθιστούν ευαίσθητες στη συσσωμάτωση (E). Οι μοριακοί συνοδοί αναγνωρίζουν και συνδέονται με τις επιφάνειες αυτές και παρεμποδίζουν τη συσσωμάτωσή τους. Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα, αναδεικνύουν τη δυνατότητα κάποιων μοριακών συνοδών να επαναδιαλυτοποιούν πρωτεΐνες, που είναι εγκλωβισμένες στα συσσωματώματα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, μία ATP-εξαρτώμενη αλλαγή στη διαμόρφωση του μοριακού συνοδού, σηματοδοτεί την αποδέσμευση του πολυπεπτιδίου, το οποίο βρίσκεται υπό αναδίπλωση. Κάποια από τα μόρια, που αποδεσμεύονται, είναι σε θέση να καταλάβουν την ορθή τους διαμόρφωση χωρίς επιπλέον βοήθεια από τους μοριακούς συνοδούς, κάποια άλλα μεταφέρονται σε άλλη μηχανή αναδίπλωσης (ΣΤ), ενώ τέλος, τα υπολοίπων επαναδεσμεύονται στον ίδιο μοριακό συνοδό και συμμετέχουν σε ένα νέο κύκλο αναδίπλωσης (Ζ). (Με τροποποιήσεις, από Walter S. και Buchner J., 2002, *Angrew. Chem. Int. Ed.* 41,1101[56]).






Οι μοριακοί συνοδοί απαρτίζουν μια ομάδα από φαινομενικά μη σχετιζόμενες πρωτεΐνες. Δραστηριοποιούνται σε μια πληθώρα διεργασιών, όπως:

- α) τη μετα-μεταφραστική αναδίπλωση ολιγομερών πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό φέρουν δομικές πληροφορίες για τη συγκρότησή τους [23, 31],
- β) την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Εάν υπάρχουν σημαντικά σφάλματα διαμόρφωσης ή συμπλεγματοποίηση που οφείλονται σε περιβαλλοντικό στρες ή ασθένεια, λειτουργούν ως αισθητήρες που ωθούν το κύτταρο προς απόπτωση [57].

Συναντώνται σε ιικά, ζωικά και φυτικά κύτταρα [23], αλλά και σε οργανισμούς και των τριών βασιλείων, καθώς και σε ενδοσυμβιωτικά κυτταρικά οργανίδια [27, 58] (Εικόνα 1.2).



**Εικόνα 1.2:** Η ευρεία κατανομή των μοριακών συνοδών στους οργανισμούς των διαφόρων βασιλείων [59]. Συγκεντρωτικά, τα κυριότερα μέλη της οικογένειας των μοριακών συνοδών, η δομή, η λειτουργία, καθώς και οι τυχόν ομοσυνοδές πρωτεΐνες, που εμπλέκονται στις διάφορες λειτουργίες τους, παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 1.1).

Οικογένεια	Δομή	ATP	Μέλη		Ομοσυνοδές	Λειτουργίες
			Προκαρυωτικά	Ευκαρυωτικά		
Hsp100	6-7μερής 	+	ClpB			-Αποσυμπλεγματοποίηση με την Hsp70
			ClpA			-Πρωτεόλυση με τη ClpP πρωτεάση
				Hsp104		-Θερμοανσγή -Αποσυμπλεγματοποίηση με την Hsp70
Hsp90	διμερής 	+	HtpG			-Ανογή σε ακραίο θερμοκόστρος
				Hsp90	Hop, p23 CDC37	-Ανογή σε στρες -Έλεγχος ανάπτυξης και ενεργότητας των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, κινασών κ.λπ.
Hsp70	μονομερής 	+	DnaK		DnaJ, GrpE	-De novo ανάπτυξη πρωτεϊνών -Εμπόδιση συνάθροισης θερμικά μετασυσσωμένων πρωτεϊνών -Καταβολισμός πρωτεϊνικών συμπλόκων -Ρύθμιση στρες απόκρισης
					Hsp70, Hsc70	Hsp40, Bag1 Hip, Chip Hop, HspBP1
Hsp60	14μερής 16μερής 		GroEL		GroES	-De novo ανάπτυξη πρωτεϊνών -Εμπόδιση συνάθροισης θερμικά μετασυσσωμένων πρωτεϊνών
					CCT/TriC	Προφολντίνη
sHsps	8-24μερής 		IbpA, IbpB			-Εμπόδιση συνάθροισης θερμικά μετασυσσωμένων πρωτεϊνών που συνδέονται στον κυτταροσκελετό
					Hsp25, Κρυσταλλίνη	

**Πίνακας 1.1:** Οι οικογένειες των μοριακών συνοδών με την αντίστοιχη δομή και λειτουργία τους [60-63].

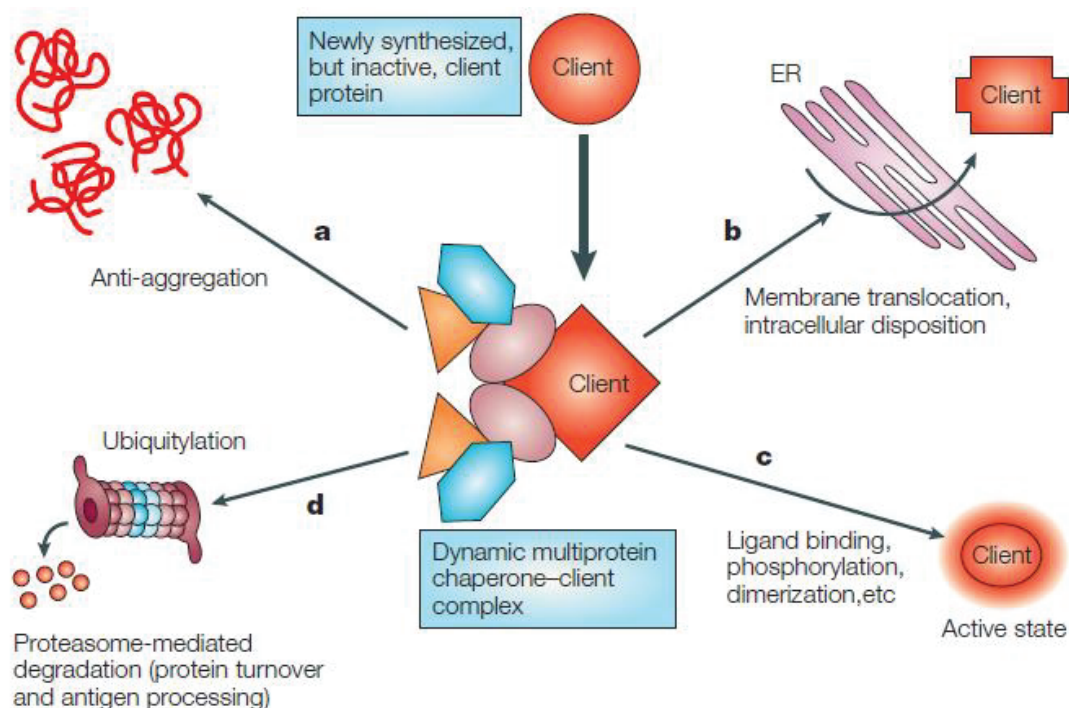
Αναλύοντας τον πίνακα παρατηρούμε ότι οι συνοδές πρωτεΐνες (Hsp70, DnaK, GroEL) συνεργάζονται με ομοσυνοδές πρωτεΐνες (DnaJ, Grp, GroES) δημιουργώντας μοριακές ναομηχανές (Hsp70/DnaJ, DnaK/GrpE, GroES/GroEL) με συγκεκριμένη λειτουργία.

Οι μοριακοί συνοδοί εμπλέκονται:

- στη σταθεροποίηση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών προς αποτροπή συμπλεγματοποίησής τους [58],
- στην αποδιάταξη πρωτεϊνών [64] προς μεταφορά αυτών διαμέσου μεμβρανών,

γ) στον καταβολισμό πρωτεϊνών καθιστώντας τις στόχους σε πρωτεάσες [57] και δ) στον έλεγχο της ορθής διαμόρφωσης και τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών [57] (Εικόνα 1.2).

Η αποτυχία της ορθής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών είναι θανατηφόρος, όχι μόνο λόγω απώλειας της λειτουργικότητάς τους, αλλά ακόμη περισσότερο λόγω της τοξικότητας των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, που σχηματίζουν [57].



**Εικόνα 1.3:** Διεργασίες της διατήρησης της ακεραιότητας των πρωτεϊνών στις οποίες συμμετέχουν οι μοριακοί συνοδοί [65].

Οι μοριακοί συνοδοί, συνήθως της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού στρες, εδράζονται σε αφθονία στο κυτταρόπλασμα, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες [57]. Μετά από σύντομο ή εκτεταμένο θερμικό στρες, εισέρχονται στους πυρήνες και στους πυρηνίσκους, αφενός μεν για την επιδιόρθωση του DNA [66], αφετέρου δε για την ταχύτερη επιδιόρθωση των πυρηνίσκων και τη συγκρότηση των ριβοσωμάτων με άμεση πρόσδεση και επιδιόρθωση των κατεστραμμένων RNPs [67].

Οι μοριακοί συνοδοί έχουν κάποιες κοινές ιδιότητες, οι οποίες συνοψίζονται στην αλληλεπίδραση με μη αναδιπλωμένες ή μερικά αναδιπλωμένες υπομονάδες, (π.χ. νεοσυντιθέμενες αλυσίδες κατά την έξοδό τους από το ριβόσωμα ή εκτεταμένες αλυσίδες, που μεταφέρονται διαμέσου υποκυτταρικών μεμβρανών). Επιπλέον, σταθεροποιούν τη μη φυσική διαμόρφωση και διευκολύνουν την ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνικών υπομονάδων [23, 68]. Δεν αλληλεπιδρούν με τις ορθά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, ούτε αποτελούν τμήμα της τελικής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών [23]. Ορισμένοι μοριακοί συνοδοί εμφανίζουν μη-ειδικότητα ως προς το υπόστρωμα [57], ενώ άλλοι περιορίζονται σε συγκεκριμένους στόχους. Υπάρχουν, επίσης, ειδικές πρωτεΐνες συνοδοί, που συμπεριλαμβάνονται στην αναδίπλωση/σύνδεση μόνο μίας, ή ενός περιορισμένου αριθμού συγκεκριμένου πρωτεϊνικού υποστρώματος. Οι πρωτεΐνες συνοδοί είναι "καταλύτες", με την έννοια

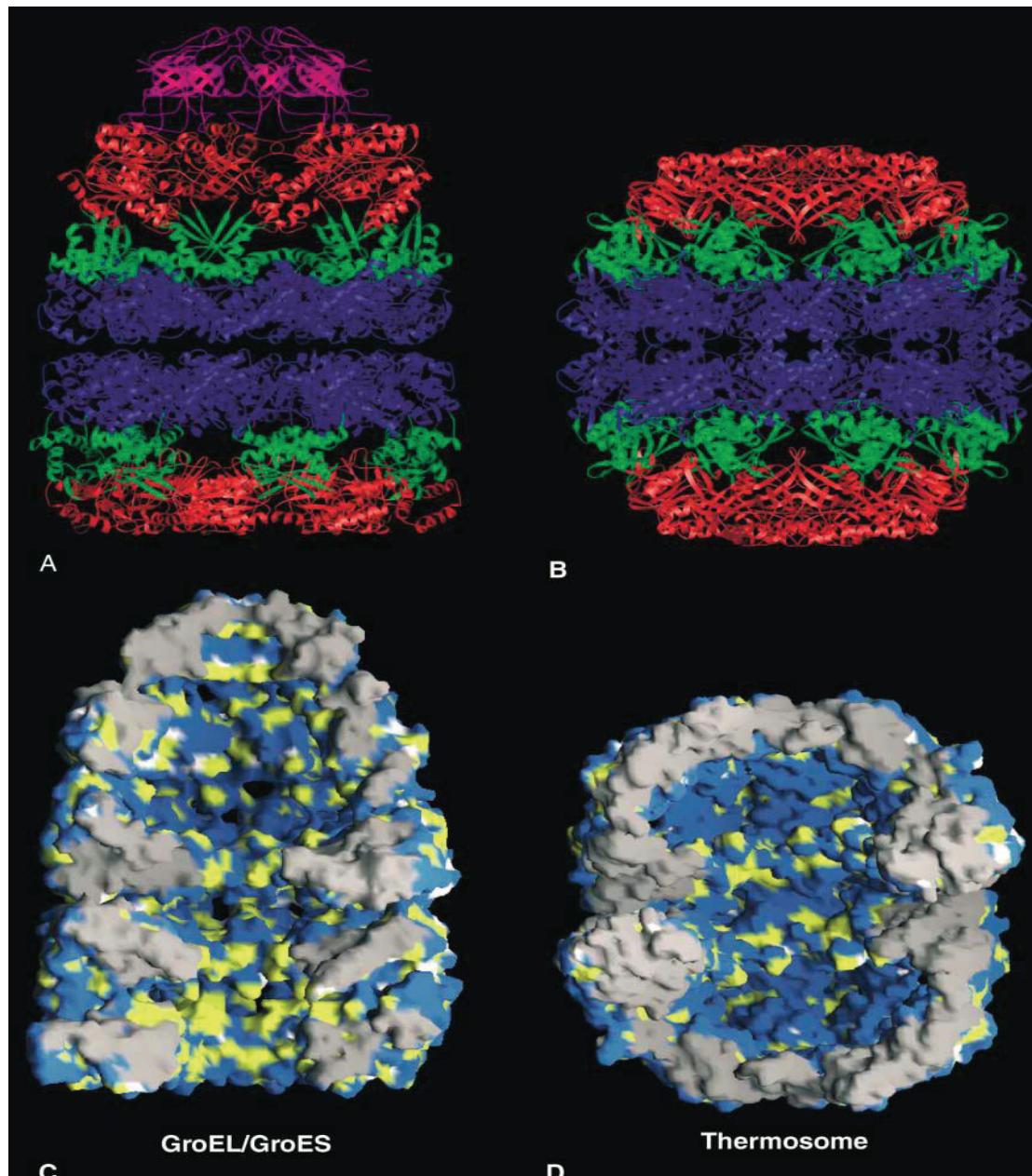
ότι παροδικά αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες του υποστρώματος, αλλά δεν είναι παρόντες στο τελικό αναδιπλωμένο προϊόν, καθώς επίσης και κατά το ότι αυξάνουν την απόδοση της αναδιπλωμένης πρωτεΐνης. Ωστόσο, δεν υπάρχει καμία πειστική απόδειξη ότι πράγματι ενισχύουν το αυθόρμητο ποσοστό της ίδιας της αναδίπλωσης, αν και μπορεί να φαίνεται να το κάνουν αυτό με την ελαχιστοποίηση αντιδράσεων εκτός του μονοπατιού. Συνήθως, απαιτούν πρόσδεση/υδρόλυση ATP προκειμένου να ολοκληρώσουν τη διαδικασία αναδίπλωσης [28, 57, 69, 70]. Τέλος, θεωρούνται απαραίτητοι για τη βιωσιμότητα του κυττάρου [44, 71-73], ενώ η έκφρασή τους πλειορρυθμίζεται στην περίπτωση που τα κύτταρα υποβληθούν σε κάποιο τύπο στρες [68, 69, 74], όπως θερμικό [1, 75-78], χημικό [1, 75, 79, 80], υποξία ή ανοξία, ακόμα και ιική μόλυνση [75].

### 1.2.2. Μέλη της οικογένειας των μοριακών συνοδών

Η οικογένεια των μοριακών συνοδών (Chaperones) και ομο-συνοδών (Co-Chaperones) αποτελείται από αρκετά μέλη (Πίνακας 1.1). Μερικά από αυτά επάγονται κατά τη διάρκεια έκθεσης των κυττάρων σε στρες (περιβαλλοντικό, φυσικό ή χημικό). Για το λόγο αυτό ονομάζονται και στρες πρωτεΐνες (stress proteins) ή πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins).

**Chaperonins:** Όσον αφορά στην υποομάδα των «chaperonins», βασισμένοι στην ομολογία των αλληλουχιών τους, μπορούμε να τις κατατάξουμε σε δύο ομάδες (Εικόνα 1.4). Η ομάδα I αποτελείται από μέλη, που ανήκουν στα ευβακτήρια (GroEL), τα μιτοχόνδρια (Hsp60) και τους χλωροπλάστες (Rubisco προσδένουσα πρωτεΐνη), ενώ η ομάδα II αποτελείται από μέλη που ανήκουν στα αρχαιοβακτήρια (θερμόσωμα/TF55) [81] και μέλη που συναντώνται στο κυτοσόλιο των ευκαρυωτικών οργανισμών, από ζυμομύκητες έως και θηλαστικά (TCP1/CCT) [82, 83].

Οι δύο ομάδες έχουν παρόμοια αρχιτεκτονική και ενζυμικές ιδιότητες, αλλά έχουν και σημαντικές διαφορές, που υποδεικνύουν τους διαφορετικούς τους ρόλους [84]. Και οι δύο ομάδες είναι θερμικά επαγόμενες και διευκολύνουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών στη φυσική τους διαμόρφωση *in vivo* μέσω κύκλων πρόσδεσης ATP [85].



Εικόνα 1.4: Η δομή δύο βασικών μελών από τις 2 ομάδες των “chaperonins” [85].

Οι κύριες κατηγορίες των γενικών μοριακών συνοδών είναι οι HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, 100-kDa πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP100), και οι μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ.

### 1.2.2.1. Μικρού Μ.Β. πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Small Heat Shock Proteins- sHSPS) και α- κρυσταλλίνες

Οι μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες θερμικού στρες αποτελούν μια πολυπληθή και ετερογενή ομάδα ATP-ανεξάρτητων μοριακών συνοδών [1, 70], που σχηματίζουν μεγάλα σύμπλοκα (συνήθως ένα κέλυφος 12 – 24 υπομονάδων, πιο σπάνια 42 έως και 50 υπομονάδων [86]) που φέρουν μια κοινή διατηρημένη C-τελική περιοχή, περιοχή α-κρυσταλλίνης, με μια β-πτυχή [57]. Συναντώνται σε όλους τους

οργανισμούς [1] και το μοριακό τους βάρος ποικίλει από 12 έως 43 kDa [87], ενώ άλλες αναφορές υποδεικνύουν πρωτεΐνες μοριακού βάρους 15 έως 40 kDa [70] ή ακόμα και 16 έως 40 kDa [88]. Σε πολλούς οργανισμούς, διάφορα διαφορετικά μέλη της οικογένειας είναι παρόντα σε ένα διαμέρισμα, προτείνοντας, έτσι, λειτουργική ποικιλία. Σε σύγκριση με τις άλλες οικογένειες συνοδών, επιδεικνύουν μία χαρακτηριστική ανομοιογένεια σε αλληλουχία και μέγεθος.

Συνήθως συγκροτούνται από διμερή, που σχηματίζουν μεταβλητούς δεσμούς στις αμινικές (N-) και καρβοξυλικές (C-) περιοχές τους [88, 89]. Μελέτη της τρισδιάστατης δομής μιας sHsp από τα αρχαία, αποκάλυψε μία κοίλη σφαίρα με ανοίγματα στο εσωτερικό [90]. Ο βασικός κορμός αυτής της ολιγομερούς δομής είναι ένα διμερές, που συνδέεται στη συνέχεια για να σχηματίσει τη σφαίρα. Σταθεροποιούν παθητικά τις αποδιαταγμένες λόγω στρες πρωτεΐνες, οι οποίες παραδίδονται ακολούθως στους ATP-εξαρτώμενους μοριακούς συνοδούς προς επαναδίπλωση ή αποσυμπλοκοποίηση. Οι sHsps λειτουργούν για τη σύνδεση μη φυσικών πρωτεϊνών, αφού μεγάλες ποσότητες μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών έχουν σχηματιστεί, για παράδειγμα, ως συνέπεια συνθηκών στρες ή υπερέκφρασης των πρωτεϊνών. Η σύνδεση αποτρέπει το σχηματισμό μεγάλων συσσωματωμάτων και κάνει πιθανή την επακόλουθη αναδίπλωση από την Hsp70 ή άλλα ενδεχόμενα ATP-εξαρτώμενα συστήματα συνοδών. Εμπλέκονται σε πολλές ασθένειες και φαίνεται να αλληλεπιδρούν με το ανοσοποιητικό σύστημα και τη φλεγμονώδη απόκριση, καθώς και με αρκετά άλλα κυτταρικά μονοπάτια [57]. Παρ' όλα αυτά, ο ρόλος τους φαίνεται να είναι δευτερεύουσας σημασίας, καθώς ο ρυθμός απελευθέρωσης των προσδεδωμένων αποδιαταγμένων πρωτεϊνών είναι μικρός ή ανύπαρκτος [87].

Αντιπρόσωπος της οικογένειας αυτής είναι η πρωτεΐνη θερμικού στρες των 25 kDa (Hsp25) που ανήκει στις  $\alpha$ -κρυσταλλίνες και αποτελεί συστατικό του φακού του οφθαλμού. Η δράση της έγκειται στην προστασία έναντι του κυτταρικού στρες, προσδένοντας ισχυρά τις μετουσιωμένες από το στρες πρωτεΐνες, παρεμποδίζοντας έτσι τη συσώρευσή τους. Με τον τρόπο αυτό, δεν επιτρέπει το σχηματισμό καταρράκτη στον οφθαλμό [87].

### 1.2.2.2. Οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού στρες των 40kda

Η οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού στρες των 40 kDa ή DnaJ οικογένεια αριθμεί πάνω από 100 μέλη, που χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας διατηρημένης J-περιοχής αποτελούμενης από περίπου 78 κατάλοιπα [87]. Το μοναδικό κριτήριο, που απαιτείται για την κατάταξη μίας πρωτεΐνης στην ομάδα αυτή, είναι η παρουσία στην αλληλουχία της μίας λειτουργικής περιοχής μήκους ~70αμινοξέων, γνωστή ως J (J domain), η οποία βρίσκεται συνήθως στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και η οποία έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει τη δραστηριότητα ATPάσης των πρωτεϊνών Hsp70 [91, 92]. Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας αποτελούνται συνήθως από αρκετές περιοχές [87]. Εκτός από την J-περιοχή, αποτελείται από την G/F περιοχή, τη CR περιοχή και την περιοχή καρβοξυτελικού άκρου. Με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) [93, 94], αποδείχθηκε ότι έχει το σχήμα ενός προεκτεταμένου δακτύλου, ο οποίος διαμορφώνεται από τέσσερις  $\alpha$ -έλικες. Οι δύο από αυτές (II και III), είναι μακριές και αντιπαράλληλες, περικλείουν ένα υδρόφοβο πυρήνα, ενώ στο άκρο τους φέρουν το λειτουργικά απαραίτητο πρότυπο των τριών αμινοξέων, ιστιδίνη(H) -προλίνη(P) -ασπαρτικό οξύ (D). Το πρότυπο αυτό (HPD motif), βρίσκεται σε όλες τις πρότυπες πρωτεΐνες DnaJ, που έχουν βρεθεί ως σήμερα, και φαίνεται ότι παίζει καθοριστικό

ρόλο στη δράση της J περιοχής, αφού μετάλλαξη σε οποιοδήποτε από τα τρία αυτά αμινοξέα, έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία της πρωτεΐνης να διεγείρει τη δραστηριότητα ATPάσης της Hsp70 [95]. Η G/F περιοχή είναι πλούσια σε γλυκίνη και φαινυλαλανίνη (40% και 15% αντίστοιχα), ενώ ο λειτουργικός της ρόλος δεν είναι αποσαφηνισμένος. Αρχικά θεωρήθηκε ότι αποτελεί απλά ένα ευλύγιστο σύνδεσμο μεταξύ της J περιοχής και του υπόλοιπου μορίου [91, 92]. Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι σε ορισμένες τουλάχιστον περιπτώσεις, συμμετέχει αποφασιστικά στη ρύθμιση της αλληλεπίδρασης ολόκληρου του μορίου της DnaJ με την DnaK, είτε άμεσα, ως συνδεόμενη η ίδια με την DnaK [96, 97], ρυθμίζοντας ταυτόχρονα την ειδικότητα αυτής της σχέσης [98], είτε έμμεσα, επηρεάζοντας τη διαμόρφωση της J περιοχής προκειμένου αυτή να γίνει κατάλληλη για σύνδεση με την DnaK [99]. Η CR περιοχή είναι μία αλληλουχία πλούσια σε κυστεΐνες (Cysteine Rich domain) και το πρότυπο αυτό, είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό δύο δακτύλων  $Zn^{2+}$ . Η δομή αυτής της αλληλουχίας της DnaJ, αποτελεί τμήμα και όχι το σύνολο της περιοχής δέσμευσης του υποστρώματος. Έτσι είναι εν μέρει υπεύθυνη, τουλάχιστον η περιοχή του πρώτου δακτύλου  $Zn^{2+}$  [100] για τις ιδιότητες μοριακού συνοδού, που έχουν αποδοθεί στην πρωτεΐνη [101, 102]. Σύμφωνα δε με σχετικά πρόσφατα στοιχεία, η περιοχή του δευτέρου δακτύλου  $Zn^{2+}$  μπορεί να αποτελεί μία νέα θέση αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με την πρωτεΐνη DnaK [100]. Η περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου αποτελεί τη λιγότερο συντηρημένη μεταξύ των μελών της οικογένειας Hsp40. Ο ρόλος της εξακολουθεί να παραμένει αμφιλεγόμενος. Παρόλα αυτά, έχειδειχθεί ότι τμήματα αυτής της περιοχής, είναι υπεύθυνα για τη δράση της DnaJ, όσον αφορά την αναγνώριση και δέσμευση των πεπτιδικών υποστρωμάτων και την περαιτέρω αναδίπλωσή τους μέσω της DnaK [103, 104]. Υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των μη J-περιοχών των μελών της οικογένειας. Τα καλύτερα μελετημένα παραδείγματα είναι η DnaJ από την *E. coli* και αρκετά ομόλογα αυτής που συναντώνται στους ζυμομύκητες, όπως η Mdj1p και η Ydj1p [87]. Η Mdj1p αποτελεί τη μιτοχονδριακή ομόλογο της DnaJ και έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών [105, 106], την προστασία των πρωτεϊνών από θερμική αποδιάταξη, το σχηματισμό συμπλεγμάτων [106] και τη συγκρότηση των μιτοχονδρίων κατά την αερόβια ανάπτυξη [105, 106]. Με την απουσία της Mdj1p παρατηρείται συνάθροιση συμπλεγμάτων από τις λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, που εισέρχονται στα μιτοχόνδρια σε υψηλές θερμοκρασίες [105, 106]. Η Ydj1p, που εδράζεται στο κυτταρόπλασμα, αποτελεί ομόλογη της DnaJ στους ζυμομύκητες και έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει τη δράση ATPάσης των Ssa και Ssb πρωτεϊνών, που είναι ομόλογες της Hsp70 στους ζυμομύκητες, επηρεάζοντας την πρόσδεση των υποστρωμάτων σε αυτές [107]. Επιπλέον, η Ydj1p διευκολύνει την είσοδο των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια, ενώ με τη φαρνεσυλίωση της μετά από θερμικό στρες προσκολλάται στην κυτταρική μεμβράνη, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα [105].

Τόσο οι προκαρυωτικές όσο και οι ευκαρυωτικές μορφές της Hsp40 αλληλεπιδρούν με την HSP70, παρουσία ATP, για την καταστολή της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης [108]. Έχει προταθεί ότι η Hsp40 απαιτείται για την αποτελεσματική σύνδεση του πρωτεϊνικού υποστρώματος στην HSP70 μέσω της διέγερσης της δραστηριότητας της ATPάσης [109]. Σε ζυμομύκητες, η DnaJ και τα ομόλογά της απαιτούνται όχι μόνο για τη δίπλωση πρωτεϊνών, αλλά επίσης και για την επιλεκτική, εξαρτώμενη από ουβικιτίνη, αποικοδόμηση των ανώμαλα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών [110]. Ο ρόλος της Hsp40 που έχει προσδιοριστεί καλύτερα μέχρι σήμερα είναι αυτός του ομοσυνοδού της Hsp70. Παρόλα αυτά, δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός ο μηχανισμός δράσης της Hsp40, ενώ υπάρχουν στοιχεία, που υποδεικνύουν ότι η DnaJ και άλλα μέλη της οικογένειας θερμικού στρες των 40 kDa είναι αφ'εαυτού μοριακοί



συνοδοί, εφόσον προσδένονται σε κάποιες μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες [87, 111]. Άλλες γνωστές πρωτεΐνες της οικογένειας θερμικού στρες των 40 kDa με δράση μοριακού συνοδού, που φέρουν J-περιοχή είναι η Sis1 και η Sec63.

### 1.2.2.3. Οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού στρες των 60kda

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής ανήκουν στην οικογένεια των “chaperonins” [44]. Έχουν ασθενή δράση ATPάσης [112-114], εκφράζονται κατά συνεχή τρόπο [49] και εμπλέκονται στη ρύθμιση της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών [31, 45, 114-118]. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει την GroEL των ευβακτηρίων, τη μιτοχονδριακή Hsp60, τη Rubisco συνδέουσα πρωτεΐνη των χλωροπλαστών, την CCT (γνωστή και ως Tric ή c-cpn) του ευκαρυωτικού κυτοσόλιου και πυρήνα και ορισμένες πρωτεΐνες των αρχαιοβακτηρίων όπως οι TF55/56 και το θερμόσωμα [119]. Πιο αναλυτικά, η οικογένεια αυτή χωρίζεται σε δύο υποοικογένειες με βάση την ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων και δομικές ομοιότητες: την GroE (ομάδα I) και την TCP-1 (ομάδα II) υποοικογένεια [87, 119].

Η GroE υποοικογένεια περιλαμβάνει την πρωτεΐνη GroEL, της οποίας το κωδικοποιό γονίδιο φέρει τις πληροφορίες για μια πιο μικρή πρωτεΐνη, την GroES, γνωστή και ως chaperonin 10 [49]. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν τις κύριες θερμικά επαγόμενες πρωτεΐνες στην *E. coli*, ενώ η έκφρασή τους φαίνεται να επάγεται και από αιθανόλη, βαρέα μέταλλα και ανάλογα αμινοξέων. Εμπλέκονται στη *de novo* πρωτεϊνική αναδίπλωση και στην παρεμπόδιση συνάθροισης θερμικά μετουσιωμένων πρωτεϊνών, ωθώντας αυτές προς την ορθή αναδίπλωση. Με τον τρόπο αυτό παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη στρες απόκριση [119]. Υπάρχουν αναφορές ότι οι πρωτεΐνες αυτές απαιτούνται για τη συγκρότηση του καψιδίου ορισμένων φάγων [32, 33, 38]. Στην ίδια υποοικογένεια, στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες αντίστοιχα, συναντώνται οι Hsp60 και η Rubisco προσδένουσα πρωτεΐνη. Η Hsp60 βοηθά στην αναδίπλωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, που εισέρχονται από το κυτοσόλιο στη μιτοχονδριακή μεμβράνη ή στον καταβολισμό των πρωτεϊνών αυτών μετά από στρες.

Η TCP-1 υποοικογένεια, περιλαμβάνει το θερμόσωμα και την πρωτεΐνη TF55. Οι άνωθι αναφερόμενες πρωτεΐνες αποτελούν τις κύρια επαγόμενες θερμικά πρωτεΐνες των Αρχαιοβακτηρίων, στον οποίων το κυτταρόπλασμα και εντοπίζονται. Προσδένονται στις θερμικά αποδιαταγμένες πρωτεΐνες και αποτρέπουν τη μεταξύ τους συμπλεγματοποίηση, χωρίς όμως να έχουν πάντα δραστικότητα επαναδίπλωσης.

Η δομή της GroEL της *E. coli* αποτελείται από 14 πανομοιότυπες υπομονάδες σε δύο στοιβαγμένους επταμερείς δακτυλίους, το καθένα από τα οποία περιέχει μία κεντρική κοιλότητα. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από τρεις περιοχές: την ισημερινή, την ενδιάμεση και την κορυφαία. Αυτοί οι δακτύλιοι περιβάλλουν ανοιχτές κοιλότητες διαμέτρου ~ 5nm, τα τοιχώματα των οποίων επικαλύπτονται από μια ζώνη συνεχόμενων υδροφοβικών επιφανειών. Οι δύο δακτύλιοι εναλλακτικά διέρχονται μέσω κύκλων σύνδεσης και υδρόλυσης του ATP. Κατά τη σύνδεση του ATP, ένας GroEL δακτύλιος ταχύτατα στρατολογεί την ομοσυνοδό GroES, ένα δακτύλιο εφτά 10 kDa υπομονάδων, που καλύπτει την κοιλότητα, συνεπάγοντας μια δραματική δομική αναδιοργάνωση που μετατρέπει τον ανοιχτό δακτύλιο σε έναν κλειστό θάλαμο με μια υδροφιλική κάλυψη [120]. Ο ανοιχτός, υδροφοβικός επενδυμένος δακτύλιος είναι η κατάσταση δέκτη, που αιχμαλωτίζει μη φυσικά πολυπεπτίδια με εκτιθέμενες υδροφοβικές επιφάνειες και που ευθύνεται για την έλλειψη εξειδίκευσης

σύνδεσης των chaperonins της ομάδας I. Οι δράσεις των GroEL, ATP και GroES ασκούν μηχανικές δυνάμεις στο υπόστρωμα, πράγμα το οποίο δυνητικά οδηγεί στο ξεδίπλωμα παγιδευμένων, λανθασμένα αναδίπλωμένων πρωτεϊνών [121]. Αυτό κορυφώνεται με ένα δυνατό χτύπημα, που εξάγει το υπόστρωμα από τις υδροφοβικές θέσεις και ταυτόχρονα το παγιδεύει μέσα στον καλυμμένο από GroES υδροφιλικό θάλαμο για αναδίπλωση [122]. Όταν εγκολλώνεται, η έλλειψη εκτεθειμένων υδροφοβικών θέσεων ή άλλων συμμετεχόντων για συσσωμάτωση, μαζί με τον περιορισμένο εγκλεισμό (διάστασης ~ 7nm το περισσότερο), παρεμποδίζει περαιτέρω τα μονοπάτια της λανθασμένης αναδίπλωσης ή συσσωμάτωσης, έτσι ώστε το υπόστρωμα να μπορεί είτε να ακολουθήσει το μονοπάτι της αναδίπλωσης που καθορίζεται από την αμινοξική αλληλουχία του είτε να παραμείνει ξεδίπλωμένο. Μετά από ένα αργό βήμα υδρόλυσης ATP, ο θάλαμος ξαναοίγει, απελευθερώνοντας την πρωτεΐνη είτε διαμορφωμένη στην τελική της αναδίπλωση και σύνδεση είτε απελευθερώνοντας την σε μία μη φυσική κατάσταση, που θα μπορεί να ανακτηθεί ξανά από ένα δακτύλιο chaperonin. Υδροφοβικές θέσεις στην κορυφαία περιοχή σχηματίζουν τις θέσεις δέσμησης της GroES και του υποστρώματος. Μια κινητή θηλιά της GroES συνδέεται στο μακρινό τμήμα αυτής της θέσης, περιοχή, που επίσης, εμπλέκεται στη σύνδεση υποστρώματος και οδηγεί στην ιδέα ότι η σύνδεση της GroES και του υποστρώματος αλληλοαποκλείονται. Η ομοσυνοδός GroES είναι μία θολωτού σχήματος δομή δακτυλίου με διάμετρο 75 Å και αποτελείται από επτά υπομονάδες [123]. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της GroES είναι ο επονομαζόμενος κινητός βρόγχος, μια έκταση 16 αμινοξέων, που διαμεσολαβεί για τη σύνδεση στη GroEL [124, 125]. Η σύνδεση της GroES συμβαίνει στα δύο άκρα του GroEL βαρελιού και εξαρτάται από την παρουσία νουκλεοτιδίων. Σύνδεση του ATP στον trans δακτύλιο προκαλεί την απελευθέρωση της GroES στον cis δακτύλιο και έτσι επιτρέπει στην εγκολλημένη πρωτεΐνη να εξέλθει από την κοιλότητα [126]. Τέλος, έχει υποτεθεί ότι η GroEL είναι ικανή να ξεδιπλώνει μερικώς τις πρωτεΐνες και ως εκ τούτου τις οδηγεί πίσω στο σωστό δρόμο στη φυσική τους κατάσταση.

## **1.2. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ 70KDA**

Τα μέλη της οικογένειας αυτής αποτελούν τα περισσότερο διατηρημένα μέλη των μοριακών συνοδών. Συναντώνται στο κυτταρόπλασμα των αρχαιοβακτηρίων και ευβακτηρίων, καθώς και στον πυρήνα, στα μιτοχόνδρια, στους χλωροπλάστες και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευκαρυωτικών οργανισμών [70]. Εμπλέκονται στη *de novo* αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και στην παρεμπόδιση συμπλεγματοποίησης σε μια ποικιλία μετα-μεταφραστικών διεργασιών [59], όπως η στόχευση πρωτεϊνών, η διαμεμβρανική μεταφορά, η πρωτεϊνική αποδιάταξη και η απόπτωση [127-129]. Η έκφραση συγκεκριμένων μελών της οικογένειας αυτής επάγεται ισχυρά υπό συνθήκες στρες, όπως π.χ. θερμικό. Έχουν δράση ATPάσης, που σε συνδυασμό με τους ομοσυνοδούς τους, τους επιτρέπει να προσαρμόζονται στις διάφορες λειτουργίες τους [70]. Γενικά σταθεροποιούν εκτεταμένες πρωτεϊνικές αλυσίδες προς αποφυγή συμπλεγματοποίησής τους [59, 128]. Ρυθμίζουν την απόκριση σε θερμικό στρες, το οποίο προκαλεί και αύξηση της ενδοκυττάριας ποσότητάς τους [130-133]. Αυτό το επιτυγχάνουν καταστέλλοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα ενεργοποίησης των πρωτεϊνών θερμικού στρες HSF-1, με την απευθείας πρόσδεσή τους στην περιοχή ενεργοποίησής του (μοντέλο αυτορρύθμισης) [132, 133]. Το μοντέλο αυτορρύθμισης δεν ισχύει στην περίπτωση μετάλλαξης στα τελευταία 4 αμινοξέα της Hsp70 από EEVD σε AAAA. Στην

περίπτωση αυτή, δεν είναι δυνατή η πρόσδεσή της στον HSF-1 και συνεπώς δεν μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφική του δραστηριότητα [133].

Οι μοριακοί συνοδοί της οικογένειας των 70kDa έχουν δύο κύριες λειτουργικές περιοχές: μια N-τελική περιοχή μοριακού βάρους 44 kDa με δράση ATPάσης [134, 135], που διευκολύνεται παρουσία  $Mg^{2+}$  και  $K^+$  [87] και, επίσης, μια C-τελική περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων [134-136] μεταβλητού μοριακού βάρους 18 - 27 kDa, το μέγεθος της οποίας εξαρτάται από την πρωτεΐνη στόχο [134, 135].

Ορισμένα από τα πιο γνωστά μέλη της οικογένειας στα θηλαστικά είναι η συνεχώς εκφραζόμενη Hsc70 (ή Hsp73) που εδράζεται στο κυτταρόπλασμα, η στρες επαγόμενη Hsp70 (ή Hsp72) που εδράζεται επίσης στο κυτταρόπλασμα, η BiP (ή Grp78) του ενδοπλασματικού δικτύου και η mHsp70 (ή mito-Hsp70, ή Grp75) των μιτοχονδρίων. Στους ζυμομύκητες οι ομόλογες πρωτεΐνες των Hsc70 και BiP είναι γνωστές ως Ssa1-4 και Kar2 αντίστοιχα. Στα βακτήρια τέλος, η κύρια μορφή της Hsp70 είναι η DnaK [87]. Η δράση των μελών αυτών παρουσιάζεται συνοπτικά παρακάτω.

### 1.3.1 Hsc70

Η Hsc-70 (Heat-shock-cognate-70) αποτελεί το συνεχώς εκφραζόμενο μέλος της οικογένειας των στρες-70 πρωτεϊνών. Το N-τελικό της άκρο αποτελείται από μια περιοχή με δράση ATPάσης, η οποία αποτελείται από δύο λοβούς. Η πρόσδεση των νουκλεοτιδίων πραγματοποιείται στη βάση μιας βαθιάς αύλακας ανάμεσα στους δύο αυτούς λοβούς. Το C-τελικό άκρο της Hsc-70 έχει προταθεί ως η περιοχή «εξειδίκευσης», η οποία προκαλεί τη σύζευξη των πρωτεϊνών στόχων με την περιοχή ATPάσης της διατηρημένης N-τελικής περιοχής [69]. Η Hsc70 παίζει σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές συνθήκες κατά τη σταθεροποίηση της αναδίπλωσης των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο [137] και την εισαγωγή τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο [138] και πιθανά στα μιτοχόνδρια [139]. Παρουσία ATP, αλληλεπιδρά με τις νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες στο κυτταρόπλασμα, προκειμένου να τις σταθεροποιήσει μέχρι να λάβουν την τελική διαμόρφωσή τους [140]. Το ATP βοηθά στη σταθεροποίηση της μονομερούς μορφής της Hsc70, σε αντίθεση με το ADP, το οποίο σταθεροποιεί τη διμερή μορφή της πρωτεΐνης [69].

Πρόσφατα στοιχεία εμπλέκουν την Hsc70 στην απόκριση σε οξειδωτικό στρες, με τις αντι-οξειδωτικές ουσίες να εμποδίζουν την έκφραση του γονιδίου. Η υποξία επάγει την έκφραση της Hsc70 μέσω αυξημένης παραγωγής  $H_2O_2$  [137]. Επιπλέον, η απόπτωση κατά την εμβρυϊκή εννεύρωση επηρεάζει κυρίως κύτταρα με χαμηλά επίπεδα Hsc70, υποδεικνύοντας ότι η Hsc70 ρυθμίζει την απόπτωση κατά την εμβρυογένεση [141].

Μελέτες σχετικά με την κατανομή της Hsc70 απέδειξαν ότι είναι κατά κύριο λόγο κυτταροπλασματική, ενώ μετά από οξειδωτικό στρες εισέρχεται στον πυρήνα προκειμένου να καταλύσει την επαναδίπλωση των κατεστραμμένων λόγω ROS πυρηνικών πρωτεϊνών μέχρι να λάβουν την κατάλληλη διαμόρφωσή τους [137]. Ανάλογο φαινόμενο παρατηρείται και μετά από θερμικό στρες, οπότε η Hsc70 συνδέεται στον πυρήνα με πολυπεπτιδία, που σχηματίζουν αδιάλυτα σύμπλοκα λόγω θερμικής αποδιάταξης [69]. Επιπλέον, η υπερέκφραση της Hsc70 φαίνεται να καθιστά τα κύτταρα πιο ανθεκτικά στο οξειδωτικό στρες [137]. Τέλος, παρουσία ATP, προσδένεται στους κλωβούς κλαθρίνης, την ενδιάμεση δομή των επιστρωμένων κυστιδίων κατά το μονοπάτι της εξαρτώμενης από υποδοχείς ενδοκύττωσης, επάγοντας την υδρόλυση ενός μορίου ATP. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα

την αποδιάταξη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων κλαθρίνης, οδηγώντας τελικά στην αποδιάταξη των κλωβών στα συστατικά τους που είναι τα τριμερή κλαθρίνης [30, 142].

### 1.3.2. BiP

Η BiP αποτελεί το μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού στρες των 70 kDa, με μοριακό βάρος 78kDa, που εδράζεται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου και αποτελεί το 5% των συστατικών του. Παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά πρόδρομων πρωτεϊνών διαμέσου της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου [69] και την επακόλουθη αναδίπλωση και συγκρότησή τους στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου [30, 69, 143, 144]. Αρχικά ανακαλύφθηκε στα κύτταρα των θηλαστικών, προσδεδεμένη σε πρόδρομα μόρια ανοσοσφαιρινών [145] και συγκεκριμένα σε κύτταρα μυελώματος, που δεν παράγουν ελαφριές αλυσίδες [146]. Η BiP προσδέεται σφιχτά σε ατελώς ή κακώς αναδιπλωμένες, μεταλλαγμένες μορφές εκκρινόμενων και μεμβρανικών πρωτεϊνών, μπλοκάροντας την έξοδό τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο και στοχεύοντας τις πιθανά προς αποικοδόμηση [30, 69, 147]. Αναγνωρίστηκε ως η κύρια πρωτεΐνη, που επάγεται μετά από αποστέρηση γλυκόζης σε κύτταρα στην κυτταροκαλλιέργεια. Για το λόγο αυτό είναι γνωστή και με την ονομασία Grp78 [148]. Άλλες ομάδες την εντόπισαν αργότερα μετά από επεξεργασία με παράγοντες που παρεμποδίζουν τη γλυκοσυλίωση, ή προκαλούν συγκέντρωση μεταλλαγμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο [149, 150]. Η συγκέντρωση μη ορθώς αναδιπλωμένων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, οδηγεί σε επαγωγή της BiP [151].

Υπάρχουν διάφορα μοντέλα για τη δράση της BiP που την εμπλέκουν στη σύνδεσή της με πολυμερή ατελώς συγκροτημένων εκκρινόμενων πρωτεϊνών, μέχρι την ολοκλήρωση της διαμόρφωσής τους [143], στην αποδιάταξη συμπλόκων μεταξύ νεοσυντιθέμενων εκκρινόμενων πρωτεϊνών [152] και στην περισυλλογή λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο [153]. Το κοινό χαρακτηριστικό των παραπάνω μοντέλων είναι ότι η BiP προσδέεται παροδικά στις νεο-εκκριθείσες από το ενδοπλασματικό δίκτυο πρωτεΐνες, σταθεροποιώντας την ενδιάμεση πολυπεπτιδική δομή τους, ενώ με την υδρόλυση ATP προωθεί την αναδίπλωση και τη συγκρότησή τους [69]. Η απελευθέρωση των πρωτεϊνών αυτών στόχων πραγματοποιείται μετά από την απόκτηση της ορθής αναδίπλωσης, διαμόρφωσης ή της τελικής κατάστασης γλυκοσυλίωσής τους. Συνεχής πρόσδεση με την πρωτεΐνη υποδηλώνει αποτυχία των παραπάνω [154].

Η BiP ανήκει στις συνεχώς εκφραζόμενες πρωτεΐνες της οικογένειας των 70 kDa και περιέχει υδρόφοβες αμινοτελικές επαναλήψεις, χαρακτηριστικές μιας ακολουθίας σήματος εκκρινόμενων πρωτεϊνών. Επιπλέον, από το αμινοτελικό άκρο του μορίου της πρωτεΐνης απουσιάζουν εν δυνάμει θέσεις γλυκοσυλίωσης [153]. Τέλος, η BiP φέρει στο C-τελικό της άκρο τη χαρακτηριστική ακολουθία KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu), που έχει χαρακτηριστεί ως σήμα συγκράτησης στο ενδοπλασματικό δίκτυο [154].

Η ρύθμισή της πραγματοποιείται στο επίπεδο της μεταγραφής, με επαγωγή του μετάγραφου του γονιδίου της BiP/Grp78 από διάφορα περιβαλλοντικά στρες, όπως αποστέρηση γλυκόζης, επώαση με παράγοντες που αναστέλλουν τη γλυκοσυλίωση των πρωτεϊνών, διατάραξη του ενδοκυτταρικού ισοζυγίου ιόντων  $Ca^{2+}$  και προσθήκη αναγωγικών παραγόντων (β-μερκαπτοαιθανόλη), που οδηγούν στη συγκέντρωση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο [151], ενώ σε αντίθεση με τις άλλες στρες-70 πρωτεΐνες, δεν επάγεται μετά από

θερμικό στρες, λόγω έλλειψης του στοιχείου ελέγχου θερμικού πλήγματος HSE από τον υποκινητή του γονιδίου [153].

### 1.3.3. Grp75

Η Grp75 αποτελεί το μέλος της οικογένειας θερμικού στρες των 70 kDa που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια [155]. Έχει μοριακό βάρος 75 kDa και ανήκει στις συνεχώς εκφραζόμενες πρωτεΐνες της οικογένειας [156]. Συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρεται μετα-μεταφραστικά στο μιτοχόνδριο [155]. Η σύνθεσή της αυξάνεται στα κύτταρα μετά από αποστέρηση γλυκόζης ή μετά από έκθεση σε μεταφορείς ιόντων ασβεστίου (A23187) ή 2- δεοξυγλυκόζη, καθώς και κατά την επαναφορά μετά από έκθεση σε ανάλογα αμινοξέων. Για το λόγο αυτό κατατάσσεται στις λεγόμενες γλυκοζο-ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες [156]. Έχει βρεθεί ότι συνδέεται παροδικά με νεοσυντιθέμενες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κατά τρόπο ευαίσθητο στο ATP. Συνδέεται επίσης και με μια άλλη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη της οικογένειας GroE, την Hsp58, σχηματίζοντας ένα σταθερό σύμπλοκο. Η προσθήκη ATP φαίνεται, όπως και πριν, να καταστρέφει αυτό το σύμπλοκο και να οδηγεί στην αυτο-φωσφορυλίωση της Grp75, η οποία εξαρτάται από την παρουσία ασβεστίου, ενώ πραγματοποιείται σε χαμηλό pH (~6.0), δηλαδή τις συνθήκες που επικρατούν εντός του μιτοχονδρίου. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, σε συνδυασμό και με τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, αποτελούν έναν πιθανό μηχανισμό, που εξηγεί πως οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες μεταφέρονται και συγκροτούνται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα, η Grp75 σταθεροποιεί τα μεταφερόμενα και μη αναδιπλωμένα πολυπεπτίδια, παρεμποδίζοντας την πρόωρη αναδίπλωση μέχρι να ολοκληρωθεί η μεταφορά εντός του μιτοχονδρίου. Εκεί ξεκινά η αναδίπλωση με την ATP-εξαρτώμενη, όπως αναφέρθηκε, αποκόλληση της Grp75 από το πολυπεπτίδιο και τη συμβολή της Hsp58, η οποία επικουρεί το σχηματισμό ολιγομερών μορφών, ή την υψηλότερου βαθμού συγκρότηση [155].

### 1.3.4. Ssa1-4p

Οι πρωτεΐνες Ssa1p (προϊόν του πρώην γονιδίου YG100 [157]), Ssa2p (προϊόν του πρώην γονιδίου YG102 [157]), Ssa3p και Ssa4p, που εδράζονται στο κυτταρόπλασμα, αποτελούν την SSA υποοικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού στρες στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae* με ομολογία προς την Hsp70 των ευκαρυωτικών και δράση μοριακού συνοδού. Παρά τη γενική κατανομή τους στο κυτταρόπλασμα, οι Ssa1p και Ssa2p συναντώνται και στο κυτταρικό τοίχωμα [158]. Η Ssa1p φέρει ομολογία ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων κατά 99%, 84% και 85,6% με τις Ssa2p, Ssa3p και Ssa4p αντίστοιχα [159]. Οι Ssa3p και Ssa4p αποτελούν τις θερμικά επαγόμενες πρωτεΐνες της οικογένειας και δεν είναι απαραίτητες για την επιβίωση, τη θερμοανοχή και την εκβλάστηση των ζυμομυκήτων [160]. Η Ssa1p εκφράζεται συνεχώς, αλλά επάγεται και μετά από θερμικό σοκ [160-162], ενώ η Ssa2p δε φαίνεται να επάγεται θερμικά [160, 162].

Η αυξημένη έκφραση μετά από θερμικό στρες ελέγχεται από το μεταγραφικό ενεργοποιητή Hsf1p που αναγνωρίζει και προσδένει δυο στοιχεία θερμικού σοκ (HSEs), ένα στην καρβοξυ-τελική περιοχή του (CTA) και ένα στην αμινο-τελική περιοχή του (NTA), στον υποκινητή SSA1. Η ικανότητα αυτή πρόσδεσης DNA και στις δύο περιοχές του Hsf1, οδηγεί σε δύο διαφορετικές αποκρίσεις στο θερμικό στρες. Μια μεταβατική, κατά την οποία η σύνθεση του mRNA των Ssas αυξάνεται,

κορυφώνεται και ακολούθως μειώνεται και μια παρατεταμένη, κατά την οποία ορισμένα μόρια mRNA παραμένουν σταθερά σε αυξημένες ποσότητες [163, 164].

Οι Ssa πρωτεΐνες:

α) εμπλέκονται στην αποδιάταξη ή την παρεμπόδιση σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ των μη ορθώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών [165],

β) επικουρούν τη μετέπειτα ορθή αναδίπλωσή τους σε συνεργασία με τις Ydj1 και Hsp104 [166],

γ) μετέχουν στη μεταφορά πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο [167, 168],

δ) εμπλέκονται στον καταβολισμό των κατεστραμμένων πρωτεϊνών [169, 170] και

ε) εμπλέκονται στην αυτορρύθμιση της έκφρασής τους [171], αλλά και στη ρύθμιση της έκφρασης άλλων πρωτεϊνών θερμικού πλήγματος, όπως του *KAR2*, το οποίο κωδικοποιεί για την BiP στους ζυμομύκητες [172].

στ) Επιπλέον, οι Ssa1p και Ssa2p εμπλέκονται στο μηχανισμό επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA, καθώς αναγνωρίστηκαν ως μέλη των συμπλόκων ελέγχου του DNA *Rad9* [173, 174].

### 1.3.5. Kar2

Η πρωτεΐνη Kar2 (Kar2p), προϊόν του γονιδίου καρυογαμίας *KAR2*, είναι υπεύθυνη για την πυρηνική σύντηξη κατά το σχηματισμό διπλοειδών πυρήνων κατά τη σύζευξη του ζυμομύκητα του γένους *S. cerevisiae* [175] και αποτελεί το ομόλογο μέλος της πρωτεΐνης BiP των θηλαστικών. Εδράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τον πυρηνικό φάκελο και μαζί με τη BiP, αποτελεί το μοναδικό μέλος από τις συνεχώς εκφραζόμενες πρωτεΐνες της οικογένειας, που φέρει μια λειτουργική ακολουθία εκκριτικής σηματοδότησης, η οποία οφείλεται στην παρουσία υδρόφοβων αμινοτελικών επαναλήψεων. Το καρβοξυτελικό άκρο της φέρει στο τέλος του την ακολουθία HDEL [153], που έχει βρεθεί ότι αποτελεί σήμα συγκράτησης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και είναι τμήμα ενός συστήματος, που αποτρέπει την έκκριση των πρωτεϊνών [176]. Από το αμινοτελικό άκρο του μορίου απουσιάζουν πλήρως οι πιθανές θέσεις γλυκοσυλίουσης [153], μια συχνά απαντώμενη τροποποίηση των πρωτεϊνών, που επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία τους.

Η ποσότητα της πρωτεΐνης στα κύτταρα αυξάνεται μετά από επώαση των κυττάρων με φάρμακα, τα οποία παρεμποδίζουν τη γλυκοσυλίουση. Επιπλέον, επάγεται σε μεταγραφικό επίπεδο από τη συνάθροιση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μέσω ενός στοιχείου απόκρισης σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (UPRE). Επίσης επάγεται σε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό μετά από θερμικό στρες μέσω των στοιχείων απόκρισης σε θερμικό σοκ (HSE) [172].

Η παρουσία της πρωτεΐνης είναι απαραίτητη για την επιβίωση και την ανάπτυξη των απλοειδών, όσο και των διπλοειδών κυττάρων των ζυμομυκήτων. Υπάρχουν δύο μοντέλα σχετικά με τη δράση της Kar2p κατά την καρυογαμία. Κατά το πρώτο μοντέλο, η πρωτεΐνη δρα έμμεσα, με την παρουσία της να είναι απαραίτητη για την εντόπιση και τη συνάθροιση μιας ή περισσότερων πρωτεϊνών, που είναι συστατικά στοιχεία της μηχανής πυρηνικής σύντηξης, στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου. Στο δεύτερο μοντέλο, η πρωτεΐνη εμπλέκεται άμεσα στη διαδικασία σύντηξης, καταλύοντας πιθανά το σχηματισμό ή την αποδιάταξη πρωτεϊνικών συμπλόκων κατά τη σύντηξη των πυρηνικών μεμβρανών [153].

### 1.3.6. DnaK

Η DnaK (συνώνυμη και με το παράγωγο του γονιδίου *groPC756* [177]) αρχικά αναγνωρίστηκε ως μια πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του βακτηριοφάγου λ [177-179]. Στην ATP-προσδένουσα κατάστασή της, η DnaK προσδένει και απελευθερώνει υποστρώματα με μεγάλη ταχύτητα [180]. Η υδρόλυση του ATP σε ADP έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του συμπλόκου μοριακού συνοδού – υποστρώματος [165, 181]. Ο κύκλος μεταξύ ATP και ADP-προσδένουσας κατάστασης της DnaK ρυθμίζεται από τους ομοσυνοδούς της, DnaJ και GrpE [51, 101, 182]. Η DnaJ ενεργοποιεί τη δράση ATPάσης της DnaK, επιτρέποντας έτσι την πρόσδεση και συγκράτηση του πεπτιδίου [101]. Ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων GrpE επάγει την αποκόλληση του ADP από τη DnaK, οδηγώντας στην απελευθέρωση του υποστρώματος και την ολοκλήρωση του κύκλου αντίδρασης της DnaK. Συνεργαζόμενη με τους συμπαράγοντές της DnaJ και GrpE, η DnaK σταθεροποιεί τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια και διατηρεί την ικανότητα αναδίπλωσης [51]. Επίσης, επανενεργοποιεί τις θερμικά αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες [183] και ελέγχει την απόκριση σε συνθήκες θερμικού σοκ με την πρόσδεσή της στο μεταγραφικό παράγοντα σ32 [184, 185]. Εμπλέκεται σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η επιβίωση των βακτηρίων υπό διάφορες συνθήκες στρες, η εκκίνηση της εξαρτώμενης από το *oriC* του *E. coli* αντιγραφής του DNA του βακτηριοφάγου λ, η ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης, η ρύθμιση της πρωτεόλυσης, η φωσφορυλίωση και η διαμεμβρανική μεταφορά των πρωτεϊνών [182].

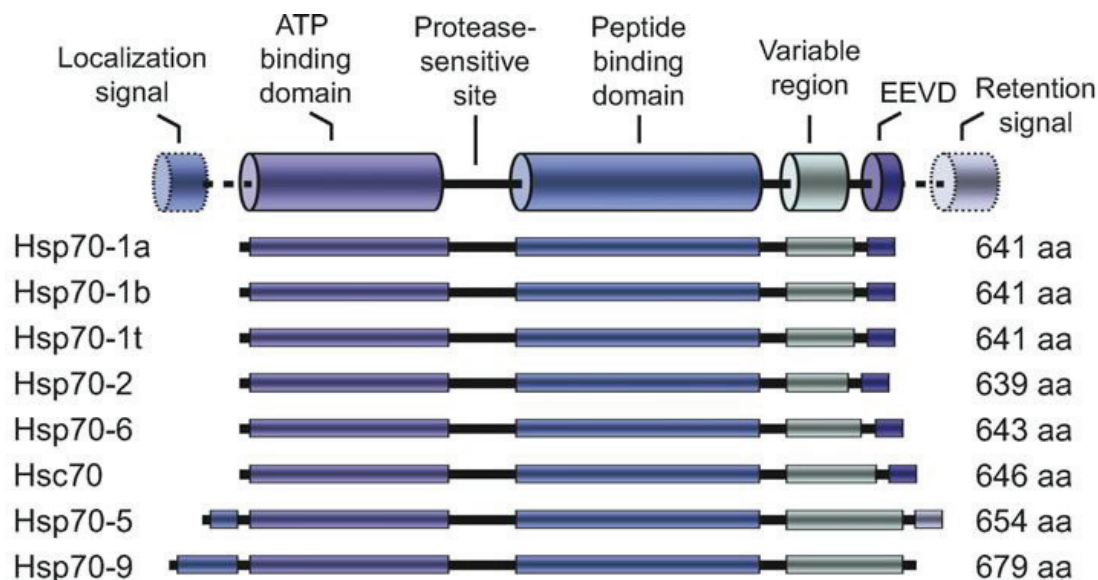
## 1.4 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ ΤΩΝ 70 KDA - HSP70

Οι πρώτες αναφορές σχετικά με την επαγωγή της έκφρασης κάποιων γονιδίων μετά από θερμικό στρες χρονολογούνται από το 1962, στο Ινστιτούτο Γενετικής της Παβία στην Ιταλία, όταν ένας συνεργάτης του Ferruccio Ritossa ανέβασε κατά λάθος τη θερμοκρασία ενός επωαστικού θαλάμου, όπου ανέπτυσσε ιστούς που είχε απομονώσει από σιελογόνους αδένες της *Drosophila busckii* από τους 25 στους 30°C, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο ένα ανεπιθύμητο ίσως, αλλά με ευχάριστες εξελίξεις θερμικό στρες στους ιστούς [186, 187]. Με τον τρόπο αυτό έγινε η πρώτη παρατήρηση για την απόκριση σε θερμικό σοκ. Αυτό που παρατήρησε ο Ritossa μετά από τη μεταβολή της θερμοκρασίας στον επωαστικό θάλαμο, ήταν πως το θερμικό σοκ προκαλούσε μεταβολές στο πρότυπο των διογκώσεων στους σιελογόνους αδένες της *Drosophila*.

Μετά από 10 χρόνια περίπου από την ανακάλυψη του Ritossa, το 1973, η ομάδα των Tissières και Mitchell εγκαινίασε τη μοριακή ανάλυση της απόκρισης σε θερμικό σοκ, αναφέροντας ότι η επαγωγή αυτών των διογκώσεων συνέπιπτε με τη σύνθεση ενός μικρού αριθμού νέων πρωτεϊνών [188], οι οποίες ονομάστηκαν πρωτεΐνες θερμικού στρες (Hsps), επειδή επάγονταν μετά από έκθεση των κυττάρων σε αυξημένη θερμοκρασία [189]. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες αυτές είναι διατηρημένες σε όλους τους οργανισμούς, από τα ευβακτήρια ως τα αρχαιοβακτήρια, τα θηλαστικά και τα φυτά, ενώ η απόκριση σε θερμικό πλήγμα συναντάται σε κάθε κυτταρικό τύπο και ιστό πολυκύτταρων οργανισμών [1].

Μια από τις πρωτεΐνες θερμικού στρες που επάγονται αποτελεί και η Hsp70. Η Hsp70 αποτελεί το κυριότερο και πιο καλά χαρακτηρισμένο μέλος των στρες επαγόμενων πρωτεϊνών [189].

Στον άνθρωπο, υπάρχουν διάφορες ισομορφές της οικογένειας των Hsp70s, που κωδικοποιούνται από αρκετά διακριτά γονίδια [190], για τον αριθμό των οποίων υπάρχουν διχογνωμίες ανάμεσα στις διάφορες ερευνητικές ομάδες. Έτσι, η πρώτη έρευνα ταυτοποίησε 11 γονίδια [189], ενώ πιο πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν την ύπαρξη 12 [191], 13 [190, 192, 193], ακόμα και 17 διακριτών γονιδίων [194], που εδράζονται στα χρωμοσώματα 1 [189], 5 [195], 6 [196-198], 9 [199], 11 [200], 14 [197, 201] και 21 [197].



**Εικόνα 1.5:** Γραμμική αναπαράσταση της δομής των μελών της οικογένειας Hsp70 στον άνθρωπο [202].

Ο εντοπισμός της Hsp70-5 (Bip ή Grp78) και της Hsp70-9 (mtHsp70 ή Grp75) περιορίζονται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου και στη μήτρα του μιτοχονδρίου αντίστοιχα, ενώ οι υπόλοιπες έξι Hsp70 πρωτεΐνες κατανέμονται βασικά στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα γεγονός που υποδηλώνει ότι είτε έχουν ειδικότητα για την κάθε πρωτεΐνη που αποτελεί υπόστρωμά τους ή εμπλέκονται σε συγκεκριμένες λειτουργίες ανεξάρτητες από αυτές μίας συνοδού πρωτεΐνης.

Τα μελετημένα οκτώ γονιδιακά προϊόντα που διαφέρουν μεταξύ τους στην αλληλουχία αμινοξέων, στο επίπεδο έκφρασης και στον υποκυτταρικό εντοπισμό τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.2) [189].



Πρωτεΐνη	Εναλλακτικά ονόματα	Ομολογία με την Hsp70-1a (%)	Locus	Χρωμοσωμική τοποθεσία	Κυτταρική τοποθεσία	Επαγόμενα από στρες
Hsp70-1a	Hsp70, Hsp72, Hsp70-1	100	HSPA1A	6p21.3	Κυτταρόπλασμα Πυρήνας Λυσοσώματα	Ναι
Hsp70-1b	Hsp70, Hsp72, Hsp70-1	99	HSPA1B	6p21.3	Κυτταρόπλασμα Πυρήνας Λυσοσώματα	Ναι
Hsp70-1t	Hsp70-hom, Hsp70-11	91	HSPA1L	6p21.3	Κυτταρόπλασμα Πυρήνας	Όχι
Hsp70-2	Hsp70-3, Hsp70-1b, HspA2	84	HSPA2	14q24.1	Κυτταρόπλασμα Πυρήνας	Όχι
Hsp70-5	Bip, Grp78	64	HSPA5	9q33-q34.1	Ενδοπλασματικό δίκτυο	Όχι
Hsp70-6	Hsp70B'	85	HSPA6	1cen-qter	Κυτταρόπλασμα Πυρήνας	Ναι
Hsc70	Hsp70-8, Hsp73	86	HSPA8	11q23.3-q25	Κυτταρόπλασμα Πυρήνας	Όχι
Hsp70-9	Grp75, mtHsp75, Mortalin	52	HSPA9	5q31.1	Μιτοχόνδρια	Όχι

**Πίνακας 1.2:** Χαρακτηριστικά στοιχεία των μελών της οικογένειας *Hsp70* στον άνθρωπο, όπως και ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους [202].

### ***Hsp70-1a* και *Hsp70-1b*:**

Ένας τεράστιος όγκος πρόσφατα δημοσιευμένων δεδομένων, σχετικά με την οικογένεια των *Hsp70* στον άνθρωπο, έχει να κάνει με τα βασικά μέλη της οικογένειας αυτής, δηλαδή την *Hsp70-1a* και την *Hsp70-1b* (κοινώς ονομαζόμενες *Hsp70-1*), οι οποίες και επάγονται από διάφορα είδη στρες μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και οι υψηλές περιβαλλοντικές θερμοκρασίες. Τα γονίδια *HSPA1A* και *HSPA1B*, που κωδικοποιούν τις *Hsp70-1a* και *Hsp70-1b* αντίστοιχα, είναι στενά συνδεδεμένα, επάγονται από το στρες και δεν έχουν ιντρόνια [75, 203-205]. Επίσης, ανήκουν στη ομάδα MHC III (μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας), που εντοπίζεται ανάμεσα στα γονίδια του συμπληρώματος και του TNF (Tumor Necrosis Factor) στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6 [203, 206].

Σύμφωνα με δημοσιευμένες ακολουθίες πρωτεϊνών, οι *Hsp70-1a* (NM\_005345) και *Hsp70-1b* (NM\_005346) έχουν πάνω από 99% ομολογία, αφού ουσιαστικά διαφέρουν μόνο σε δύο αμινοξέα (E110D, N499S) από τα 641 συνολικά. Κατά τη διάρκεια διαφόρων συνθηκών στρες, και τα δύο γονίδια των *Hsp70-1* ενεργοποιούνται από την πρόσδεση ενός επαγόμενου από το στρες μεταγραφικού παράγοντα, του HSF1 (Heat Shock Factor-1) πάνω σε ρυθμιστικά στοιχεία του θερμικού σοκ (Heat Shock Elements: HSE) που βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα ανοδικά των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων [206, 207].

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η έκφραση των πρωτεϊνών *Hsp70-1* εξαρτάται και από τον τύπο κυττάρων, αλλά και από τη συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου, αφού έχει παρατηρηθεί συσσώρευσή τους κατά την G1 και S φάση [208, 209].

### ***Hsp70-1t:***

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την Hsp70-1t (HSPA1L) δεν έχει ιντρόνια και εδράζεται στην ίδια περιοχή (MHC class III region), όπως και τα γονίδια HSPA1A και HSPA1B [196, 206]. Η πρωτεΐνη είναι ομόλογη κατά 91% με την Hsp70-1a (Πίνακας 1.2), αφού η βασική διαφορά τους εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο τους (Εικόνα 1.5). Το γονίδιο HSPA1L δεν περιέχει καθόλου ρυθμιστικά στοιχεία του θερμικού σοκ (Heat Shock Elements: HSE) στην περιοχή του υποκινητή του και εκφράζεται διαρκώς σε υψηλά επίπεδα στους όρχεις, ενώ σε χαμηλά επίπεδα σε άλλους ιστούς. Η λειτουργία και μεταγραφική της ρύθμιση είναι προς το παρόν άγνωστη.

### ***Hsp70-2:***

Η πρωτεΐνη Hsp70-2, εκφράζεται διαρκώς σε χαμηλά επίπεδα στους περισσότερους ιστούς και σε υψηλά επίπεδα μόνο στους όρχεις και στον εγκέφαλο [201, 210]. Το γονίδιο HSPA2 που την κωδικοποιεί εντοπίζεται στο 14 χρωμόσωμα, ενώ η πρωτεΐνη δείχνει ομολογία 84% με την Hsp70-1a (Πίνακας 1.2). Η έκφρασή της είναι συχνά μειωμένη στους άνδρες με ανώμαλη σπερματογένεση [210] και αρσενικά διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου HSPA2 είναι στείρα λόγω της μαζικής απόπτωσης των σπερματοζωαρίων τους [211]. Επιπλέον, η Hsp70-2 απαιτείται για την ανάπτυξη και την επιβίωση διαφόρων ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων [212, 213].

### ***Hsp70-5, Bip, Grp78:***

Το γονίδιο HSPA5 εδράζεται στο χρωμόσωμα 9 και κωδικοποιεί μία συνεχώς εκφραζόμενη ειδικά διαμερισματοποιημένη (compartment-specific) πρωτεΐνη, την Hsp70-5 (Πίνακας 1.2). Η Hsp70-5 (γνωστή και ως Bip ή Grp78) βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου και διευκολύνει τη μεταφορά των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου και την περαιτέρω αναδίπλωσή τους [152, 199, 214]. Η Hsp70-5 περιέχει ένα υποτιθέμενο N-τελικό σήμα ER εντοπισμού, το οποίο οδηγεί στον εντοπισμό της στο ER. Στο μακρινό C-τελικό της άκρο, έχει ένα υψηλά διατηρημένο "KDEL" σήμα συγκράτησης στο ER [154]. Η Hsp70-5 βρίσκεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, αλλά έχει υψηλά επίπεδα έκφρασης σε εκκριτικά κύτταρα όπως του θυρεοειδούς και των παγκρεατικών νησιδίων (islets). Σε διαγονιδιακά ποντίκια, όπου υπάρχει έλλειψη του γονιδίου Hspa5, τα έμβρυα πεθαίνουν σε 3,5 μέρες, γεγονός που εντάσσει την Hsp70-5 στην κατηγορία των πιο θεμελιωδών γονιδίων [215].

### ***Hsp70-6:***

Η Hsp70-6 είναι ένα αυστηρά επαγόμενο από στρες μέλος της οικογένειας των Hsp70s και κωδικοποιείται από το γονίδιο HSPA6, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 1. Η Hsp70-6 έχει ομολογία 85% με την Hsp70-1a [216] (Πίνακας 1.2) και επάγεται μόνο μετά από σκληρές συνθήκες στρες [217]. Αν και διαφέρει κατά 15% από τις δύο άλλες επαγόμενες από στρες Hsp70 πρωτεΐνες (Hsp70-1a και Hsp70-1b), είναι πολύ πιθανό η Hsp70-6 να λειτουργεί κατά ένα παρόμοιο τρόπο ως ένα εξάρτημα της γενικής απόκρισης στο στρες. Η Hsp70-6 εκφράζεται σε μέτρια επίπεδα στο αίμα, ειδικά στα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells), τα μονοκύτταρα

και τα κύτταρα φυσικούς φονιάδες, αλλά σχεδόν απουσιάζει σε άλλα είδη κυττάρων του αίματος, όπως επίσης και σε άλλους ιστούς.

### ***Hsp70-8, Hsc70:***

Το γονίδιο HSPA8 εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 και εκφράζεται συνεχώς στους περισσότερους ιστούς [218]. Το γονίδιο HSPA8 κωδικοποιεί το «συγγενές» (cognate) μέλος της Hsp70 οικογένειας, την Hsc70 (Hsp70-8), η οποία παρουσιάζει 86% ομολογία με την Hsp70-1a (Πίνακας 1.2). Έχει αναφερθεί ότι η Hsc70 εμπλέκεται σε ένα μεγάλο πλήθος θεμελιωδών λειτουργιών των συνοδών πρωτεϊνών, όπως η αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων, η πρωτεϊνική μεταφορά διαμέσου μεμβρανών, η αυτοφαγοκυττάρωση σχετιζόμενη με συνοδές πρωτεΐνες, η αποφυγή συσσωμάτωσης πρωτεϊνών υπό συνθήκες στρες και η αποσυναρμολόγηση κυστιδίων περιβαλλομένων από κλαθρίνη [75, 219]. Οπότε, η Hsc70 θεωρείται ως ένα θεμελιώδες για την επιβίωση γονίδιο.

### ***Hsp70-9:***

Το γονίδιο HSPA-9 εδράζεται στο χρωμόσωμα 5 και δεν επάγεται από στρες. Η πρωτεΐνη Hsp70-9 (mtHsp70) έχει ομολογία 52% με την Hsp70-1a (Πίνακας 1.2) και 65% με την SSC1 (αντίστοιχη μιτοχονδριακή Hsp70 στη ζύμη) [202, 220-222], κάτι που υποδεικνύει ότι, στις μιτοχονδριακές Hsp70 μεταξύ διαφόρων ειδών, υπάρχει υψηλότερο επίπεδο συντήρησης αλληλουχιών, παρά μεταξύ των πρωτεϊνών της οικογένειας των Hsp70 του ίδιου είδους. Ένα ειδικό σήμα 42 αμινοξέων στη δομή της, μεταφέρει την Hsp70-9 στη μιτοχονδριακή μήτρα, όπου αλληλεπιδρά με τις εισερχόμενες πρωτεΐνες και τις βοηθάει στη σωστή αναδίπλωση μετά τη διαμεμβρανική μεταφορά τους [156, 222].

Η ***Hsp70*** αποτελεί το κυριότερο μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού στρες των 70 kDa [189]. Στη συγκεκριμένη ενότητα θα γίνει αναφορά στην ανθρώπινη Hsp70 (HSPA1A – παλαιότερες ονομασίες Hsp72, Hsp70i, Hsp70-1, HSPA – κωδικός αρίθμησης Swiss Prot 3303), η οποία είναι μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 641 αμινοξέα (PUBMED - US National Library of Medicine/National Institutes of Health) (Εικόνα 1.6) και της οποίας η έκφραση επάγεται σημαντικά σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας [75].

Η επαγόμενη από στρες Hsp70 εκφράζεται σε μεγάλες ποσότητες στο κυτταρόπλασμα και την πλασματική μεμβράνη πρωτογενών όγκων διάφορων προελεύσεων. Έχει αποδειχθεί η ενσωμάτωση της Hsp70 στην πλασματική μεμβράνη κακοήθων νεοπλασιών, ενώ σε μη κακοήθη μετασχηματισμένα κύτταρα, συνδέεται με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας. Η έκφρασή της στα καρκινικά κύτταρα ενισχύεται περισσότερο ως απόκριση σε αρκετά παθολογικά και περιβαλλοντικά στρες, όπως αποστέρηση θρεπτικών υλικών, υποξία, βαρέα μέταλλα, ακτινοβολία και χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Αντίθετα, η έκφρασή της σε κύτταρα υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι χαμηλή και περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ σε συνθήκες θερμικού σοκ εισέρχεται στον πυρήνα και συγκεκριμένα στους πυρηνίσκους και/ή σε άλλες ετεροχρωματινικές περιοχές [66, 223-229].

Εκτός από την ενδοκυττάρια εντόπιση της Hsp70, υπάρχουν αναφορές για ανεξάρτητη απελευθέρωσή της από το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύμπλεγμα Golgi [229, 230], με αρκετά υψηλές ποσότητες να μετρώνται στο πλάσμα και τον ορό του αίματος [231]. Επιπλέον, η Hsp70 έχει βρεθεί στην επιφάνεια ανθρώπινων

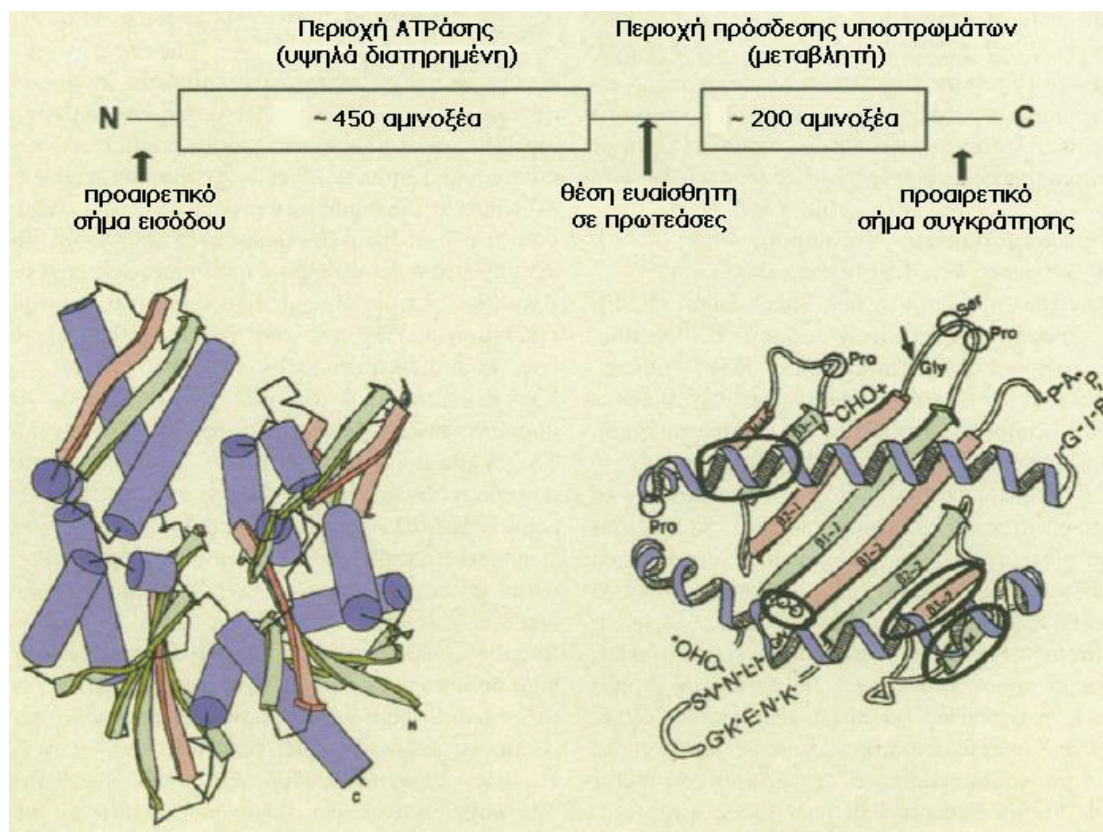
καρκινικών κυττάρων [225], παρόλο που δεν φέρει διαμεμβρανική περιοχή [229], όχι όμως και στην επιφάνεια φυσιολογικών κυττάρων [225]. Οι μηχανισμοί εξόδου της Hsp70 από τα κύτταρα είναι ακόμα αμφιλεγόμενοι, καθώς δεν έχει βρεθεί κάποιο σήμα έκκρισης από αυτά [229]. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι το περιβάλλον σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα είναι όξινο, υποξικό και χωρίς θρεπτικά στοιχεία [232], επάγοντας έτσι ένα χαμηλότερο ενδοκυτταρικό pH σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι το χαμηλό pH προκαλεί τέτοιες αλλαγές στη διαμόρφωση της Hsp70, που τελικά έχουν ως αποτέλεσμα την εντόπισή της στην επιφάνεια του κυττάρου. Δεν πρέπει, όμως, να αποκλειστεί και η πιθανότητα της απευθείας αλληλεπίδρασης της Hsp70 με τη μεμβράνη, δεδομένου ότι δεν έχει βρεθεί κάποιος υποδοχέας για την Hsp70 στην επιφάνεια των κυττάρων [233]. Όσον αφορά στην εξωκυττάρια Hsp70 (eHSP70) στον άνθρωπο, δεν ανιχνεύεται στους σκελετικούς μύες, οι οποίοι δεν φαίνεται να την εκφράζουν [231]. Φαίνεται ότι οι μυικές ίνες, που δεν έχουν υποστεί βλάβες λόγω άσκησης, είναι αδιαπέραστες από την Hsp70 [234]. Αντίθετα, οι ηπατοσπλαγγχικοί ιστοί δύνανται να απελευθερώσουν Hsp70 στη συστηματική κυκλοφορία μετά από άσκηση [235]. Παρόμοια έκκριση της Hsp70 μετά από άσκηση, φαίνεται να πραγματοποιείται και από τον εγκέφαλο [236].

### 1.4.1. Δομή της Hsp70

Τα μέλη της οικογένειας θερμικού στρες των 70 kDa έχουν υψηλή ομολογία μεταξύ τους ως προς την ακολουθία των αμινοξέων τους. Παρ' όλα αυτά, το ποσοστό των συντηρημένων αμινοξέων των διάφορων μελών ανάμεσα στις ίδιες πρωτεΐνες στα διάφορα είδη, εξαρτάται από το πόσο σημαντική λειτουργία επιτελεί κάθε μέλος, ώστε η αλληλουχία να έχει διατηρηθεί κατά την εξέλιξη [237].

Η δομή των πρωτεϊνών της οικογένειας των Hsp70 εξήχθη κυρίως από δεδομένα, που λήφθηκαν από βιοχημική, κρυσταλλογραφική και μοριακή ανάλυση μοντέλων [238].

Η ανθρώπινη Hsp70 είναι μια πρωτεΐνη 640 αμινοξέων [239]. Η ανάλυση της δομής της έδειξε ότι αποτελείται από δύο περιοχές (Εικόνα 1.6), μια υψηλά συντηρημένη N-τελική περιοχή με δράση ATPάσης [237, 240, 241] των 44 kDa [238, 240, 241], που προσδένει νουκλεοτίδια [190] και φέρει ομολογία με την ακτίνη [190, 237, 242] και την εξοκινάση [243]. Η περιοχή αυτή βρέθηκε να είναι ανθεκτική σε πρωτεόλυση [238], ενώ αποτελείται από δύο λοβούς με μια βαθιά αύλακα ανάμεσά τους, στη βάση της οποίας προσδένεται το ATP [243]. Στην περιοχή ATPάσης συναντώνται δύο ιόντα ασβεστίου, εκ των οποίων το ένα εμπλέκεται στην υδρόλυση του ATP και την *in vitro* φωσφορυλίωση, ενώ το δεύτερο πιθανώς είναι υπεύθυνο για τη σταθεροποίηση της πρωτεϊνικής δομής τη Hsp70 [239]. Το μόριο της Hsp70 φέρει και μια λιγότερο διατηρημένη C-τελική περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων [237] με μοριακή μάζα 25 kDa [66]. Η περιοχή αυτή διαχωρίζεται στην περιοχή πρόσδεσης υποστρωμάτων (SBD), γνωστή και ως περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων (PBD) με μέγεθος 15 kDa περίπου [190]. Το υπόλοιπο τμήμα των 10 kDa [134] εμπλέκεται στην πρόσδεση των ομο-συνοδών μορίων [190]. Η περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων βρίσκεται πλησίον της περιοχής με δράση ATPάσης [134] και ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις της Hsp70 με κακώς αναδιπλωμένα, μη αναδιπλωμένα, ή μερικώς αποδιαταγμένα πολυπεπτιδικά υποστρώματα [66]. Το υπόλοιπο τμήμα της C-τελικής περιοχής μεγέθους 10 kDa, που αναφέρθηκε, περιέχει την όξινη ρυθμιστική περιοχή EEVD (Glu-Glu-Val-Asp), η οποία ρυθμίζει την υδρόλυση του ATP, την αλληλεπίδραση της Hsp70 με τα υποστρώματά της, αλλά και τη γενικότερη δομή και λειτουργία της Hsp70 [244].



**Εικόνα 1.6: Δομή της ανθρώπινης Hsp70.** Η Hsp70 αποτελείται από δύο βασικές περιοχές, μια συντηρημένη N-τελική περιοχή με δράση ATPάσης και μια λιγότερο συντηρημένη C-τελική περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων (κορυφή). Η δομή της περιοχής με δράση ATPάσης (αριστερά) εξήχθη με κρυσταλλογραφική ανάλυση ακτίνων X από την περιοχή ATPάσης της Hsc70 των βοοειδών. Το μοντέλο για την περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων (δεξιά) εξήχθη από τη δομή των μορίων του MHC κλάσης I. Τα κεφαλαία γράμματα αντιπροσωπεύουν σημαντικές προσθήκες. Τα κενά (ελλείμματα) είναι κυκλωμένα (το N-άκρο της έλικας της περιοχής 1, οι πτυχές 3 και 4 της α-2 περιοχής, οι κυστεΐνες που σχηματίζουν το δισουλφιδικό δεσμό στην α-2 περιοχή). Φαίνονται, επίσης, οι πιθανές θέσεις γλυκοζύλιωσης (CHO), οι θέσεις των προλινών και η περιοχή που αναγνωρίζεται από τη χυμοθρυψίνη (βέλος) ([237] με τροποποιήσεις).

Συνοπτικά, οι ανθρώπινες Hsp70s περιλαμβάνουν διακριτές λειτουργικές περιοχές:

α) την περιοχή πρόσδεσης στο πεπτίδιο, μεγέθους 30 kDa [Peptide Binding Domain (PBD)], που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στο υπόστρωμα,

β) την περιοχή πρόσδεσης στο νουκλεοτίδιο, μεγέθους 45 kDa [Nucleotide Binding Domain (NBD)], η οποία περιλαμβάνει μια μικρή περιοχή, σαν "σχισμή" για την πρόσδεση του ATP, και τέλος δύο άλλες περιοχές, οι οποίες βρίσκονται στα περισσότερα μέλη της οικογένειας,

γ) ένα μοτίβο στο καρβόξυ-τελικό άκρο ή αλλιώς, μοτίβο μοριακού συνοδού EEVD και

δ) μια μεταβλητή περιοχή στο C-τελικό άκρο.

Η περιοχή ATPάσης έχει βρεθεί να έχει την αναδίπλωση, όπως η ακτίνη και η εξοκινάση, με δύο ευέλικτες περιοχές που περιβάλλουν μια βαθιά σχισμή σύνδεσης νουκλεοτιδίων, που περικλείει ATP [243, 245]. Η περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος είναι λεπτή και σε σχηματισμό τούβλου με μία σχισμή, που καλύπτεται από ένα κινητό α-ελικοειδές καπάκι. Τόσο το καπάκι όσο και η σχισμή

ανοίγουν για να επιτρέψουν τη σύνδεση του υποστρώματος, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να παγιδευτεί όταν το καπάκι κλείσει [135]. Η νουκλεοτιδική κατάσταση της περιοχής ATPάσης επηρεάζει το άνοιγμα (που διεγείρεται από σύνδεση του ATP) και κλείσιμο (μετά από υδρόλυση του ATP) της θέσης δέσμευσης του υποστρώματος.

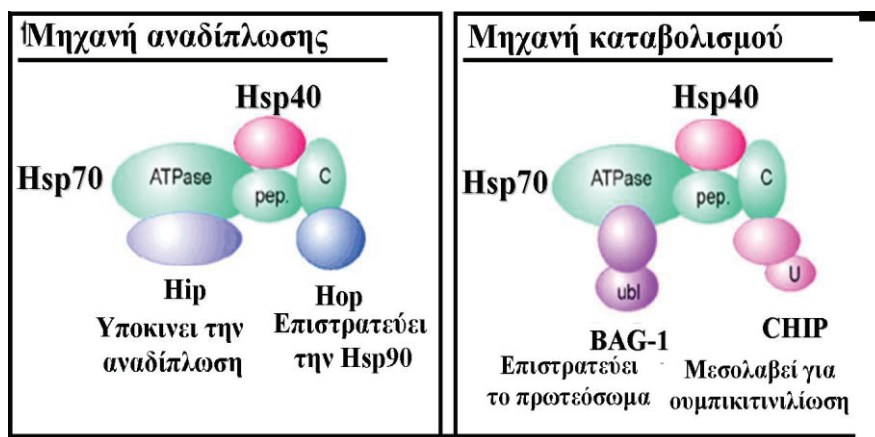
#### 1.4.2. Λειτουργίες της HSP70

Η δράση της Hsp70 ρυθμίζεται από την υδρόλυση του ATP. Η δραστηριότητα σαν μοριακός συνοδός εξαρτάται από την κατάσταση πρόσδεσης ATP. Με την πρόσδεσή της με ATP, η Hsp70 συνδέεται με χαμηλή συγγένεια στα υποστρώματά της, ενώ στην ADP-προσδένουσα κατάσταση, η συγγένεια πρόσδεσης με τα υποστρώματα είναι πιο ισχυρή και η δράση ATPάσης της είναι αδύναμη [190].

Σε μοριακό επίπεδο, η θερμικά επαγόμενη Hsp70 καθοδηγεί τη διαμόρφωση άλλων πρωτεϊνών καθ'όλη τη διάρκεια της ύπαρξής τους, αποτρέποντας τη συμπλεγματοποίησή τους, με την προστασία των ενεργών – υδρόφοβων περιοχών τους από το σχηματισμό μη παραγωγικών αλληλεπιδράσεων [219, 246]. Με αυτή της τη δράση, η Hsp70 λειτουργεί ως μοριακός συνοδός που:

- α) εμπλέκεται στα μονοπάτια της αναδίπλωσης [140], βοηθώντας στην αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, όπως αυτές εξέρχονται από τα ριβοσώματα [219, 246],
- β) καθοδηγεί τη διαμεμβρανική μεταφορά πρωτεϊνών στα μικροσωμάτια [139, 219, 246],
- γ) ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, ελέγχοντας τις αλλαγές στη διαμόρφωσή τους [219, 246] και
- δ) σε περιπτώσεις στρες, όπως θερμικό στρες, κατά το οποίο προκαλείται αποδιάταξη των πρωτεϊνών [247], ή την αποστέρηση ορού, η Hsp70 διευκολύνει τη λυσοσωμική αποδιάταξη [248], είτε παρεμποδίζοντας απλά τη συμπλεγματοποίηση, κρατώντας τα υποστρώματα σε μια κατάσταση ευπαθή στην πρωτεόλυση, είτε διευκολύνοντας ενεργά τη μεταφορά τους σε πρωτεολυτικά συστήματα [219, 246].

Οι λειτουργίες αυτές της Hsp70 περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενους κύκλους πρόσδεσης και απελευθέρωσης υποστρωμάτων, μέχρι την τελική ενεργό διαμόρφωση ή την είσοδο των υποστρωμάτων σε πρωτεολυτικά συστήματα [219, 246]. Συνήθως, δρα σε συνεργασία με μια ομάδα ομο-συνοδών πρωτεϊνών, όπως η Hsp40, προς σχηματισμό ενεργών μοριακών συμπλόκων (μοριακές νανομηχανές), οι οποίες επικουρούν τη δράση της ως μοριακού συνοδού [109]. Στοιχεία σχετικά με την κατάσταση ολιγομερισμού των Hsp70s, οδήγησαν στην υπόθεση ότι η ολιγομερής Hsp70 είναι αδρανής ή έχει ελάχιστη δραστηριότητα και για να έχει δράση μοριακού συνοδού, θα πρέπει να βρίσκεται στη μονομερή μορφή [249, 250].



Εικόνα 1.7: Η νανομηχανή αναδίπλωσης - καταβολισμού της Hsp70 [251].

Η Hsp70 δεν δρα μόνη της, αλλά στις λεγόμενες «Hsp70 μοριακές νανομηχανές», συνεργάζεται και ρυθμίζεται από αρκετούς ομοσυνοδούς και συμπαράγοντες [246]. Ένα εκτεταμένα μελετημένο μοντέλο τέτοιας «μηχανής», αποτελεί η μηχανή αναδίπλωσης – καταβολισμού (Εικόνα 1.7), στην οποία η Hsp70, συνεργαζόμενη με τις Hsp40 και Hsp90, ανάλογα με την ανταγωνιστική πρόσδεση των ομοσυνοδών Hip και BAG-1 στο N-άκρο της δομής ATPάσης της, οδηγεί τα υποστρώματα στην αναδίπλωση ή τον καταβολισμό μέσω συγκρότησης του πρωτεοσώματος, αντίστοιχα. Στο C-άκρο της Hsp70, προσδένονται ανταγωνιστικά οι Hop και CHIP μέσω του TPR υποδοχέα. Η Hop, ωθεί προς την κατεύθυνση της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης, ενώ η CHIP αδρανοποιεί τη δράση ATPάσης της Hsp70, εμποδίζοντας τη σύνδεσή της με άλλους παράγοντες, που θα ήταν απαραίτητοι για την πρωτεϊνική αναδίπλωση. Έτσι το σύστημα οδηγείται προς καταβολισμό (Εικόνα 1.7) [251].

Είναι άξιο λόγου να αναφερθεί ότι η N- και C-τελική περιοχή σχετίζονται με την έκθεση σε αντιγόνο, μια σημαντική διεργασία, με την οποία η Hsp70 συμμετέχει στην ανοσολογική απόκριση, εμφανίζοντας παράλληλη δράση μοριακού συνοδού και κυτοκίνης [252].

Ως απόκριση σε θερμικό στρες, η Hsp70 επάγεται και μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα προς τον πυρήνα και τους πυρηνίσκους [223]. Η μετατόπιση αυτή πραγματοποιείται προκειμένου η Hsp70 να ρυθμίσει μονοπάτια που εμπλέκονται στην ποιότητα και την ακεραιότητα του DNA αλλά και των πυρηνίσκων υπό συνθήκες στρες [66], γεγονός που καθιστά την Hsp70 ένα καίριο μόριο στο κύτταρο, καθώς οι πυρηνίσκοι αποτελούν βασικό συστατικό στοιχείο των ριβοσωμάτων, στα οποία πραγματοποιείται η πρωτεϊνοσύνθεση [253]. Επιπλέον, υπάρχουν εκτεταμένες μελέτες, που υποδηλώνουν μια πιθανή σχέση ανάμεσα στην υπερέκφραση της Hsp70 και την προστασία από βλάβες στο DNA, όπως σχάσεις μονής και διπλής έλικας, που προκαλούνται από διάφορα ερεθίσματα, όπως ακραίο θερμικό στρες, απουσία οξυγόνου, βαρέα μέταλλα, UV ακτινοβολία, γ-ακτινοβολία και χημικές ενώσεις [254, 255]. Επίσης, ορισμένες ομάδες έχουν προσδώσει στην Hsp70 επιδιορθωτικό ρόλο στα συστήματα επιδιόρθωσης DNA. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η Hsp70 ενισχύει την επιδιόρθωση μέσω αποκοπής βάσεων (BER) σε ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα μετά από επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας [256], ενώ εμπλέκεται και στο μηχανισμό επαγωγής βλαβών στο DNA από υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), με την Hsp70 να ρυθμίζει την ομοιόσταση ιόντων σιδήρου στο κύτταρο και να

προστατεύει τις μεμβράνες των λυσοσωμάτων από την επαγόμενη από οξειδωτικό στρες αποσταθεροποίηση, μέσω ρύθμισης των σχάσεων μονής αλυσίδας του DNA [257].

### 1.4.3. Hsp70 και ασθένειες

Σε επίπεδο κυττάρων, η Hsp70 εμπλέκεται στην ογκογένεση [228, 258, 259] και την κυτταρική επιβίωση μετά από ακραίο θερμικό στρες [72], ενώ η παρουσία της φαίνεται να προσδίδει ανθεκτικότητα στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο από απόπτωση ή νέκρωση [260] μετά από διάφορα κασπάσο - εξαρτώμενα [228, 261, 262] ή κασπάσο - ανεξάρτητα ερεθίσματα, όπως TNF, θερμικό στρες, αποστέρηση ορού ή οξειδωτικό στρες [228, 263, 264], εμφανίζοντας αντιφλεγμονώδη δράση [265]. Επιπλέον, η παρουσία της Hsp70 προσδίδει θερμοανθεκτικότητα [72, 250, 266, 267] και προστασία των κυττάρων του μυοκαρδίου από ισχαιμικό σοκ [78, 250].

Η δράση της Hsp70 σχετίζεται, συχνά, με την προστασία από διάφορες ασθένειες και παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις [78, 268], πνευμονοπάθειες [269], μυοπάθειες [270] και νευροεκφυλιστικές νόσους [271, 272]). Η μείωση της έκφρασής της ενδέχεται να προστατεύει από διάφορα είδη καρκίνου [273], ενώ η ίδια η παρουσία της στα καρκινικά κύτταρα τα προστατεύει από βλάβες, που μπορούν να προκληθούν από περιβαλλοντικά ερεθίσματα, σταθεροποιώντας τα λυσοσώματα και παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την κυτταρική αυτοφαγία [274, 275].

Αυξημένα επίπεδα της Hsp70 βρέθηκαν σε όγκους διαφορετικής γένεσης σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Σχεδόν όλες οι κυτταρικές σειρές, που προέρχονται από δείγματα κλινικών όγκων και χρησιμοποιούνται σε πειράματα κυτταρικής βιολογίας, περιέχουν αυξημένα ποσά της πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η περιεκτικότητα της Hsp70 είναι ένας πρώιμος δείκτης της εξέλιξης του καρκίνου [276]. Η αυξημένη μεταγραφή των Hsps στα καρκινικά κύτταρα οφείλεται στην απώλεια της δράσης της p53 στην αυξημένη έκφραση των πρωτοογκογονιδίων HER2 και c-Myc, και είναι μεγάλης σημασίας στην καρκινογένεση. Τα μέλη της οικογένειας των Hsps, και κυρίως η Hsp70, παίζουν επικαλυπτόμενους και σημαντικούς ρόλους στην ανάπτυξη όγκων, προάγοντας τον αυτόνομο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, παράλληλα με την αναστολή των μονοπατιών του κυτταρικού θανάτου. Η Hsp70 υπερεκφράζεται σε διάφορους όγκους και φαίνεται να εμπλέκεται σε αρκετά από τα στάδια της εξέλιξης των όγκων, καθώς και στην ανθεκτικότητα των κυττάρων ενάντια στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα.

Για τους λόγους αυτούς, οι Hsps μπορούν να αποτελέσουν φαρμακολογικούς στόχους για το σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων και μια νέα προσέγγιση για να καταστήσουν τα καρκινικά κύτταρα ευαίσθητα στις συμβατικές χημειοθεραπείες.

### 1.4.4. Ομοσυνοδές πρωτεΐνες της οικογένειας των HSP70s

Εκτός από τις γνωστές DnaJ και GrpE, που δρουν ως ομοσυνοδοί της DnaK (ομολόγου της Hsp70 των ευκαρυωτικών) στα βακτήρια, υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες, που στα θηλαστικά κύτταρα δρουν ως ομοσυνοδοί της Hsp70, όπως η Hip, η BAG-1, η DnaJ1 και η αυξιλίνη (auxilin). Η παρουσία αυτών των συμπαραγόντων φανερώνει την πολυπλοκότητα των μηχανισμών, με τους οποίους δρουν οι Hsp70 μοριακοί συνοδοί στα κύτταρα [87]. Παρακάτω, θα αναφερθούμε συνοπτικά στις ομοσυνοδές αυτές πρωτεΐνες.



### ***Bag-1***

Η *Bag-1* είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη, η οποία εμπλέκεται στην αναστολή του κυτταρικού θανάτου μέσω συνεργασίας με τη Bcl-2. Θεωρείται ρυθμιστικό μέλος αποπτωτικών, μεταγραφικών και αυξητικών διεργασιών. Επιπλέον, εμπλέκεται στην κυτταρική σηματοδότηση και διαφοροποίηση. Φέρει τρεις ισομορφές, με εντόπιση τόσο πυρηνική, όσο και κυτταροπλασματική [277].

### ***Chip***

Η *Chip* είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη με διατηρημένη αλληλουχία. Εκφράζεται κύρια στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες και στον εγκέφαλο. Φέρει τρεις λειτουργικές περιοχές:

- α) την TPR περιοχή στο αμινο-τελικό άκρο,
- β) την U-box περιοχή στο καρβόξυ-τελικό άκρο και
- γ) μια ενδιάμεση φορτισμένη περιοχή.

Η *Chip* αλληλεπιδρά με τις Hsp70, Hsc70 και Hsp90 μέσω της TPR περιοχής. Η αλληλεπίδραση με τους μοριακούς αυτούς συνοδούς έχει ως αποτέλεσμα την ουβικιτινυλίωση και αποικοδόμηση της πρωτεΐνης στόχου από το πρωτεόσωμα [278].

### ***DnaJ1***

Η *DnaJ1* αποτελεί τη βακτηριακή ομόλογο πρωτεΐνη της Hsp40 στα βακτηριακά κύτταρα. Εδράζεται στο κυτταρόπλασμα και εμπλέκεται στη μετάφραση, αναδίπλωση, αποδίπλωση, μεταφορά και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Η εμπλοκή της στις διεργασίες αυτές έγκειται στην ενεργοποίηση της περιοχής ATPάσης των Hsp70s. Η πρόσδεσή της στις τελευταίες επιτυγχάνεται μέσω της J-περιοχής, που φέρει στο μόριό της [279].

### ***Αυξιλίνη (auxilin)***

Η *αυξιλίνη* αποτελεί ένα συμπαράγοντα μοριακού βάρους 100 kDa, που εμπλέκεται στη ρυθμιζόμενη από την Hsc70 απομάκρυνση της κλαθρίνης από επιστρωμένα κυστίδια. Η παρουσία μιας J-περιοχής στο -COOH άκρο της υποδηλώνει ότι αποτελεί μέλος της οικογένειας των DnaJ πρωτεϊνών [280].

### ***p16***

Η *p16* είναι ένα άλλο μέλος της οικογένειας των ομοσυνοδών των Hsp70s, μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, που συγκατακρημνίζεται με την Hsc70 σε ήπαρ ψαριού. Η *p16* έχει αναγνωριστεί ως μέλος της οικογένειας των Nm23 νουκλεοτιδικών διφωσφορικών κινασών και ενδέχεται να ρυθμίζει τη δραστηριότητα της Hsc70, διατηρώντας τη σε μονομερή μορφή [281].

### ***Hop***

Η *Hop* είναι μία 60-kDa πρωτεΐνη, έχει ανακαλυφθεί πρόσφατα, και μπορεί να σχηματίσει μια φυσική σύνδεση μεταξύ της HSP70 και της HSP90, διαμορφώνοντας έτσι τις δραστηριότητές τους [282]. Διεγείρει την αναδίπλωση από την HSP70 και

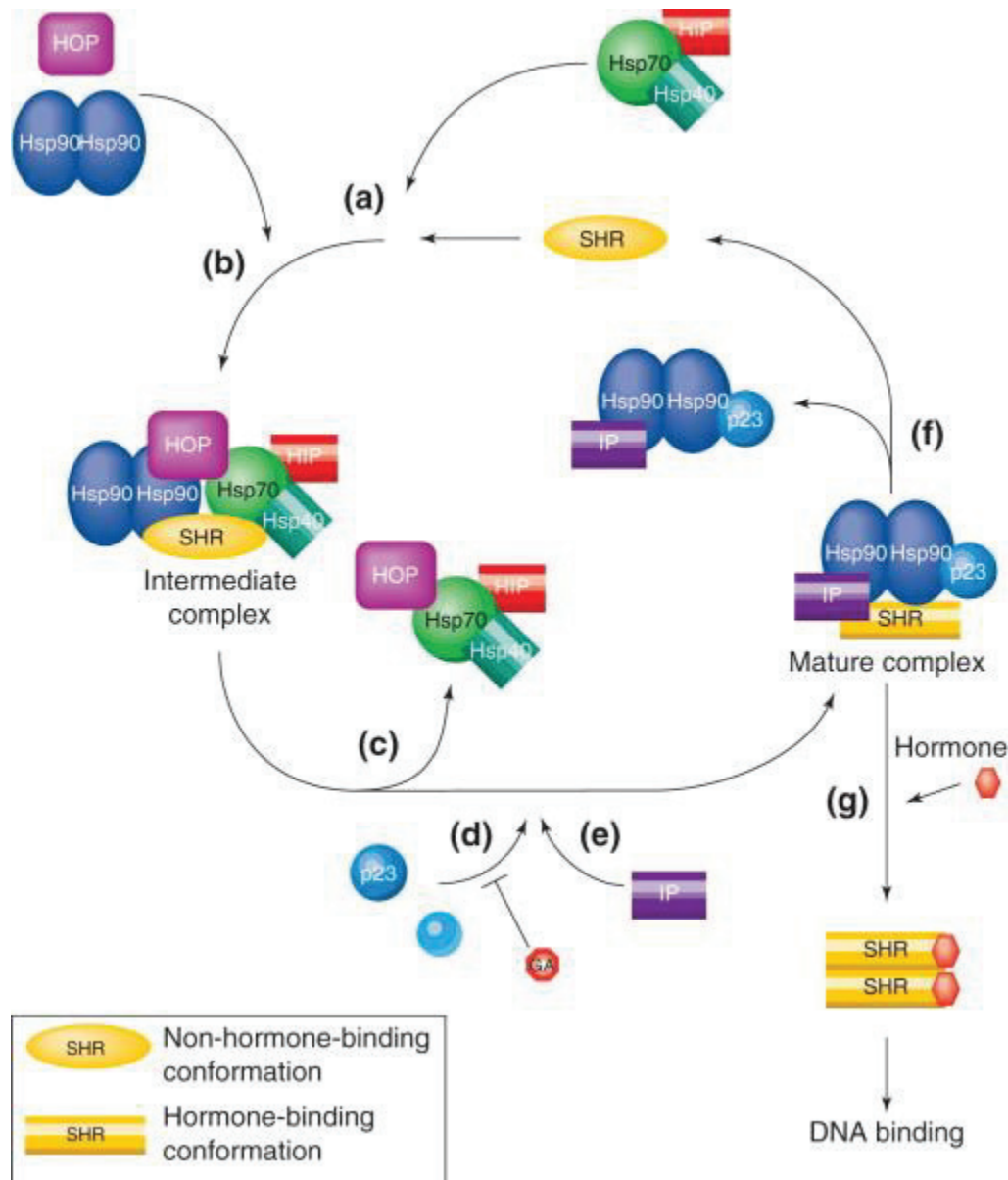
την Hdj-1 σε ένα καθαρό σύστημα αναδίπλωσης. Η Hsp, κατά προτίμηση, σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την ADP-δεσμευμένη HSP70 και εμφανίζεται, επίσης, να συνδέεται με την ADP-δεσμευμένη μορφή της HSP90.

### **1.5. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ 90KDA**

Τα μέλη της οικογένειας αυτής βρίσκονται στα ευβακτήρια, στο κυτοσόλιο των ευκαρυωτικών οργανισμών, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα μιτοχόνδρια [57]. Μέλη της οικογένειας HSP90 είναι αρκετά συντηρημένα. Είναι βασικές πρωτεΐνες, που βρίσκονται σε όλους τους οργανισμούς από τα βακτήρια μέχρι τους ανθρώπους. Παραδείγματα αποτελούν η κυτταροπλασματική μορφή στους ευκαρυώτες, η μορφή του ενδοπλασματικού δικτύου της HSP90, Grp94, και το ομόλογο της *E. Coli*, HtpG. Δρουν καθοδικά του συστήματος Hsp70/Hsp40 και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών κατά τα τελικά στάδια της αναδίπλωσης και τη σηματοδότηση των κυττάρων [57, 70]. Παρόλο που υπάρχουν αρκετές ομοιότητες μεταξύ των δράσεων των Hsp90 και Hsp70, για την πρώτη έχουν αναγνωριστεί αρκετές εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις, π.χ. με κυττοσκελετικά στοιχεία, με σηματοδοτικές πρωτεΐνες μεταγωγής (συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων στεροειδών ορμονών) και πρωτεϊνικές κινάσες. Πρόσφατες μελέτες γενετικής ανάλυσης αποκάλυψαν την εμπλοκή της Hsp90 σε εκκριτικά μονοπάτια, την κυτταρική μεταφορά, τον κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική διαίρεση [283].

Η Hsp90 σχηματίζει ένα ομοδιμερές. Κάθε υπομονάδα του αποτελείται από τρεις τομείς: μια N-τελική περιοχή με δράση ATPάσης, μια φορτισμένη περιοχή πρόσδεσης και μια C-τελική περιοχή διμερισμού [284]. Η πρόσδεση των υποστρωμάτων στην Hsp90 εξαρτάται από την Hsp70 [285] και ρυθμίζεται από τη Hsp, της οποίας η TPR2 περιοχή αλληλεπιδρά απευθείας με την Hsp90 με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις [286]. Η Hsp90 πραγματοποιεί ρυθμιζόμενους κύκλους πρόσδεσης και απελευθέρωσης ATP, μέχρι την τελική απελευθέρωση της πρωτεΐνης στη φυσική διαμόρφωση [287]. Υπό συνθήκες στρες, όπως θερμικό, η Hsp90 μειώνει την εκλεκτικότητά της ως προς τα υποστρώματα και υιοθετεί το ρόλο ενός αποθηκευτικού χώρου για τις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, τις οποίες διατηρεί σε μια κατάσταση, στην οποία δύνανται να αναδιπλωθούν. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να αναδιπλωθούν ακολούθως από άλλους μοριακούς συνοδούς, όπως η Hdj-1 ή η Hsp70 [288].

Η Hsp90 αποτελεί τμήμα μιας εξαιρετικά εξελιγμένης μηχανής αποτελούμενης από πολλούς μοριακούς συνοδούς. Η δράση της βασίζεται σε αρκετούς συμπαραγόντες, που εξαρτώνται από το προσδεμένο υπόστρωμα (Εικόνα 1.8) [70].



Εικόνα 1.8: Ο κύκλος δράσης της Hsp90 ως μοριακού συνοδού με τους συμπαραγόντες της [289].

### 1.6. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ 100KDA

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας της HSP100 (ή Clp) ανήκουν στις θερμικά επαγόμενες πρωτεΐνες και έχουν ως λειτουργία την προστασία των οργανισμών από έντονα στρες [290]. Αποτελούν μέλη της μεγάλης AAA+ υπεροικογένειας, που περιέχει πρωτεΐνες με δράση ΑΤΡάσης και σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές διεργασίες [57], μεταξύ των οποίων και η πρωτεόλυση. Αποτελούν μια οικογένεια ιδιαίτερα διατηρημένων πρωτεϊνών, που συναντώνται σε όλους τους οργανισμούς (βακτήρια, ζυμομύκητες, φυτά και θηλαστικά), ενώ η δομή τους περιλαμβάνει περιοχές πρόσδεσης ΑΤΡ και πεπτιδίων. Η δομή τους απαρτίζεται από εξαμερή δακτυλιοειδή σύμπλοκα [87], τα οποία συνδέονται με αμινοξέα που σηματοδοτούν τη μεταφορά του ξεδιπλωμένου πολυπεπτιδίου σε ένα πρωτεολυτικό θάλαμο ή την

αναδίπλωσή του από άλλους μοριακούς συνοδούς [57]. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν σε συνδυασμό με ομόλογες πρωτεΐνες της Hsp70 και της DnaJ προκειμένου να αυξήσουν την ποσότητα των επαναδιαταγμένων πρωτεϊνών [290].

Τα μέλη της οικογένειας αυτής θεωρούνται ως οι ισχυρότεροι μοριακοί συνοδοί, έχοντας την ικανότητα να ξεδιπλώνουν ακόμα και σταθερά αναδίπλωμένες πρωτεΐνες και να αποδιατάσσουν μεγάλα συσσωματώματα [57]. Η Hsp104 έχει βρεθεί ότι διαλυτοποιεί *in vivo* τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών, που έχουν προκύψει μετά από θερμικό πλήγμα [291], αυξάνοντας έτσι τη θερμοανθεκτικότητα [57].

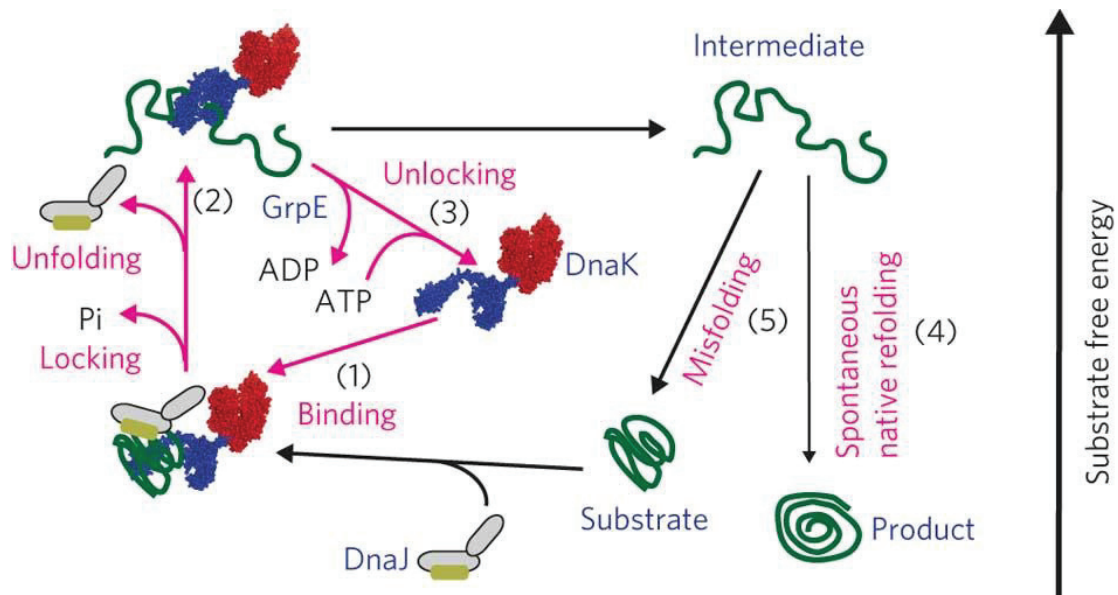
Η ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας πραγματοποιείται με επαγωγή μετά από θερμικό στρες, εξαιτίας της παρουσίας ενός στοιχείου θερμικού σοκ (HSE) στον υποκινητή του γονιδίου τους [290]. Η έκφρασή τους φαίνεται, επίσης, να ρυθμίζεται από την παρουσία τριών στοιχείων απόκρισης σε στρες (STREs), τα οποία είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων ως απόκριση σε αρκετούς τύπους στρες όπως θερμικό, οσμωτικό, οξειδωτικό, αιθανόλη και έκθεση σε παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA [292, 293]. Η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών επάγεται, ακόμη, και μετά από την επώαση με βαρέα μέταλλα όπως αρσενικό, κάδμιο και χαλκό, τα οποία οδηγούν στο σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) [290].

Το υπόστρωμα στοχεύεται για την είσοδο για το Hsp70 κανάλι. Αφού ένα όριο ή βρόχος ενός πολυπεπτιδίου είναι κατειλημμένο στο κανάλι, περιστροφές των AAA+ υποπεριοχών, που τροφοδοτούνται από τον κύκλο ATPάσης, πιστεύεται ότι παράγουν μία κυκλική κίνηση που τυλίγει την ξεδιπλωμένη αλυσίδα μέσω του καναλιού.

## 1.7. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΣΥΝΟΔΩΝ

Η γενικότητα των λειτουργιών των μελών της οικογένειας των μοριακών συνοδών έγινε γνωστή από τη μελέτη τη απόκρισης σε θερμικό στρες, η οποία ξεκίνησε το 1962 με την παρατήρηση του Ferruccio Ritossa ότι ενεργοποιείται η έκφραση μιας μικρής ομάδας γονιδίων της *Drosophila* μετά από σύντομη αύξηση της θερμοκρασίας και παραγωγή RNA, που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένους, αλλά τους ίδιους κάθε φορά γονδιακούς τόπους [186, 187]. Η σύνθεση κάποιων από τα μέλη της οικογένειας αυτής, που είναι παρόντα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μπορούσε επίσης να αυξηθεί μετά από αποστέρηση γλυκόζης. Οι πρωτεΐνες αυτές βρέθηκε ότι όχι μόνο δεν απουσίαζαν από τα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά εκφράζονταν σε αφθονία [68]. Μελλοντικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες αυτές υπερεκφράζονταν στον καρκίνο, συσχετιζόνταν με ογκογονικές πρωτεϊνικές κινάσες και υποδοχείς στεροειδών ορμονών και παρουσίαζαν αυξημένη έκφραση σε συγκεκριμένα στάδια διαφοροποίησης και ανάπτυξης [28].

Η περιγραφή της λειτουργίας των μοριακών συνοδών σε διάφορα στάδια και η δομική ανάλυση των διαφόρων οικογενειών αυτών σε μοριακό επίπεδο, έδειξε πως εμπλέκονται στην πρωτεϊνική αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών [23, 68, 69, 84] και τον καταβολισμό μέσω των ATP-οδηγούμενων νανομηχανών [28, 70].



**Εικόνα 1.9:** Σχηματική αναπαράσταση του ATP τροφοδοτούμενου κύκλου αντίδρασης της DnaK με τους συμπαραγόντες της DnaJ και GrpE [294].

Ο ATP-εξαρτώμενος κύκλος της αναδίπλωσης και απελευθέρωσης πεπτιδίων, είναι καλύτερα κατανοητός στη βακτηριακή DnaK και στους συμπαραγόντες της DnaJ και GrpE (Εικόνα 1.9). Όταν ATP βρίσκεται προσκολλημένο στη DnaK πραγματοποιείται ραγδαία προσκόλληση και απελευθέρωση πεπτιδίων. Αντίθετα, κατά την προσκόλληση ADP, η προσκόλληση και απελευθέρωση πεπτιδίων είναι αργή [180, 181]. Η σύνδεση των πεπτιδίων σε συνδυασμό με τις DnaJ και GrpE επιταχύνουν τη διαδικασία εναλλαγής των δύο μορφών της DnaK (ATP/ADP προσδένουσα) [51, 182].

Ο κύκλος υδρόλυσης ATP ακολουθεί τα εξής στάδια: (1) Η DnaJ αλληλεπιδρά με ένα μη αναδιπλωμένο πεπτίδιο και το στοχεύει στη DnaK. (2) Η DnaK προσδένει το πολυπεπίδιο στην ATP-προσδένουσα κατάσταση. Η αλληλεπίδραση με τη DnaJ προκαλεί την υδρόλυση του ATP από τη DnaK και σταθεροποιεί την ADP-προσδένουσα κατάσταση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός σταθερού τριμερούς συμπλόκου πεπτιδίου-DnaJ-DnaK. (3) Ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων GrpE, προωθεί την απελευθέρωση του ADP από τη DnaK, γεγονός που αποσταθεροποιεί το τριμερές σύμπλοκο και προκαλεί την απελευθέρωση της DnaJ. (4) Το υπόστρωμα αποκολλάται από τη DnaK μετά από εκ νέου πρόσδεση ATP [180]. Μετέπειτα μπορεί να αναδιπλωθεί, να επαναπροσκολληθεί στη DnaJ ή να μεταφερθεί σε άλλο σύστημα μοριακών συνοδών, όπως αυτό της GroEL που περιγράφεται παρακάτω, για τελική αναδίπλωση [51, 101].

Η διαδικασία της αναδίπλωσης στους μοριακούς συνοδούς GroEL/GroES των βακτηρίων πραγματοποιείται μέσω παρεμπόδισης της λανθασμένης αναδίπλωσης και της συμπλεγματοποίησης. Συνολικά αυξάνουν την απόδοση του κυττάρου σε ορθά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες [68] παρά το ρυθμό αναδίπλωσης, ο οποίος παραμένει σταθερός ή και μειώνεται [295], παρακάμπτοντας παράπλευρες αντιδράσεις, που αναστέλλουν την αναδίπλωση [296]. Υπάρχουν δύο διαδοχικές διαδικασίες, οι οποίες προωθούν την αναδίπλωση. Η πρώτη αφορά την πρόσδεση των κατεστραμμένων, ή των μη αναδιπλωμένων ενδιάμεσων πεπτιδίων στο κέντρο του δακτυλίου μέσω υδροφοβικών [58, 77, 296-298] ή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [299-301]. Η

πρόσδεση αυτή σταθεροποιεί τη μη φυσική διαμόρφωση και έτσι η ενέργεια πρόσδεσης μπορεί να ξεδιπλώσει κινητικά παγιδευμένα μη-ορθώς αναδιπλωμένα ενδιάμεσα μόρια [302-305]. Η δεύτερη διαδικασία επιτρέπει την αναδίπλωση, απελευθερώνοντας το προσδεδεμένο πολυπεπτίδιο σε μια εκτεταμένη κλειστή κοιλότητα, όπου μπορεί να αναδιπλωθεί απομονωμένο, αποτρέποντας με αυτό τον τρόπο τη συμπλεγματοποίηση ή την πρωτεόλυση [306-308]. Το τελευταίο αυτό στάδιο απαιτεί την πρόσδεση και υδρόλυση ATP [58, 84], καθώς και την πρόσδεση της ομοσυννοδού GroES, ως καπάκι του κεντρικού αγωγού [33, 58, 112, 307]. Εάν η αναδίπλωση προς τη φυσική διαμόρφωση της πρωτεΐνης δεν πραγματοποιηθεί με την πρώτη φορά, η GroEL συμμετέχει ενεργά σε περεταιίρω προσπάθειες αναδίπλωσης, ξεδιπλώνοντας ενεργά και κατ' εξακολούθηση το πρωτεϊνικό υπόστρωμα [295].

Τη δράση των μοριακών συνοδών στους μηχανισμούς ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών, φαίνεται να αξιολογούν και οι ιοί, εξελίσσοντας μηχανισμούς, που χρησιμοποιούν τους μοριακούς συνοδούς των ξενιστών τους προκειμένου να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους [309]. Αρκετές έρευνες υποδεικνύουν ότι η έκφραση των μοριακών συνοδών επάγεται κατά τη διάρκεια ικών μολύνσεων, είτε προς διευκόλυνση της ικής παθογένειας ή ως απόκριση προς τη μόλυνση, προκειμένου να αποσοβηθεί το στρες από τη μόλυνση αυτή [310-312]. Επιπλέον, οι ιοί μπορούν να ρυθμίζουν τους μοριακούς συνοδούς των ξενιστών τους σε διάφορα επίπεδα, όπως μεταγραφή, μετάφραση, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και κυτταρικό εντοπισμό.

Η αυξημένη παρουσία των πρωτεϊνών θερμικού στρες έχει προταθεί ως μάρτυρας ορισμένων ικών μολύνσεων [309], ενώ η παρουσία της Gpr94 έχει συσχετιστεί με την μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV), λειτουργώντας πιθανά ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας [313]. Η συγκέντρωση στοιχείων επέδειξε ότι οι μοριακοί συνοδοί έχουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών κατά τις ικές μολύνσεις. Συγκεκριμένα, όλες οι οικογένειες των μοριακών συνοδών φαίνεται να εμπλέκονται στις ικές μολύνσεις, η καθεμιά παίζοντας διαφορετικό ρόλο σε λειτουργίες, όπως η εισαγωγή του ιού στον ξενιστή, η εισαγωγή του ιικού DNA στον πυρήνα του ξενιστή, ο ιικός πολλαπλασιασμός, η αναδίπλωση των ικών πρωτεϊνών, η συγκρότηση του ιικού καψιδίου, η ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή και τέλος η χρήση των αποπτωτικών μονοπατιών του ξενιστή [309].

Πέραν όμως της εμπλοκής των μοριακών συνοδών στην πρωτεϊνική αναδίπλωση και καταβολισμό, περαιτέρω στοιχεία κατέδειξαν μια επιπλέον λειτουργία, που έθεσε σε δεύτερη μοίρα αυτή της αναδίπλωσης-καταβολισμού. Η λειτουργία αυτή αφορούσε την εμπλοκή τους στο μηχανισμό ελέγχου ποιότητας των πρωτεϊνών και συγκεκριμένα σε δύο επίπεδα: κατά την έναρξη της αναδίπλωσης και κατά τη συγκρότηση ολιγομερών [314]. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, οι μοριακοί συνοδοί δεν αποτελούν πρωτεΐνες αναδίπλωσης, αλλά έχουν ένα μοναδικό ρόλο να αποτρέπουν άλλες πρωτεΐνες από το να εισέρχονται σε «αδιέξοδα αναδίπλωσης» και παράλληλα συνεργάζονται με πρωτεολυτικά συστήματα για την καταστροφή σταθερών λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών [28].

Μια ενδιαφέρουσα λειτουργία της GroEL, η οποία θα μπορούσε να υποδηλώνει μια σύνδεση των μοριακών συνοδών με τον αρχαίο κόσμο του RNA, αφορά στη ρύθμιση του mRNA.

Η προστασία ενάντια στο οξειδωτικό στρες στους προκαρυωτικούς και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς σχετίζεται έντονα με τη λειτουργία των μοριακών συνοδών και συγκεκριμένα με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ [315, 316]. Συγκεκριμένα, η οικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού στρες μικρού μοριακού βάρους και η οικογένεια των Hsp70s δρουν ως κυτταροπλασματικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες,

προστατεύοντας τις πρωτεΐνες στόχους τους, καλύπτοντας τις ευαίσθητες περιοχές τους. Σε περίπτωση αδυναμίας του μηχανισμού προστασίας, οι Hsps όπως έχει ήδη αναφερθεί, συγκρατούν τις αποδιαταγμένες πρωτεΐνες μέχρι την επαναδίπλωση ή την αποδιάταξή τους [316].

Ελλείπει βάσιμων στοιχείων, πολλοί υποθέτουν ότι η λειτουργία των μοριακών συνοδών μπορεί να ρίξει φως σε τομείς όπου δεν υπάρχουν ακόμη επαρκή ερευνητικά στοιχεία, όπως για παράδειγμα στην ανοσολογία, κατά την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων [86], αλλά και στον έλεγχο του κυτταρικού θανάτου, της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης και στους μηχανισμούς γήρανσης [28], οι οποίοι σχετίζονται με τη συμπλεγματοποίηση των πρωτεϊνών [317].

### 1.7.1. Μοριακοί συνοδοί και ασθένειες

Σε επίπεδο οργανισμού, έχει δειχθεί ότι η αργή εκκίνηση των συμπτωμάτων νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος του Huntington, η νόσος Creutzfeldt-Jacob, η νωτιαυπαρεγκεφαλιδική αταξία και το πάρκινσον συνδέονται γενετικά και παθολογικά με την συμπλεγματοποίηση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών πλούσιων σε β-πτυχές [70, 318]. Η βάση των ασθενειών αυτών πρέπει να οφείλεται σε εξασθένηση, λόγω ηλικίας, των μηχανισμών ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών από τους μοριακούς συνοδούς [70]. Ο λόγος, για τον οποίο η τοξικότητα λόγω συμπλεγματοποίησης εμφανίζεται αργά στη ζωή [318] και εάν συνδέεται μηχανιστικά με τη γήρανση, είναι άγνωστα μέχρι στιγμής [317]. Πρόσφατες έρευνες, ωστόσο, καταδεικνύουν το ρόλο του παράγοντα θερμικού σοκ 1 (Hsf1) στην επέκταση του προσδόκιμου ζωής στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans* [317]. Συγκεκριμένα, αύξηση στην έκφραση του Hsf-1 οδηγεί σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής του σκώληκα [319], ανεξάρτητα εάν η αύξηση αυτή πραγματοποιηθεί σε εντερικό, νευρικό ή μυϊκό ιστό με χρήση ειδικών κάθε φορά για τον ιστό υποκινητών [320], ενώ η μείωση της έκφρασής του οδηγεί σε ένα φαινότυπο ραγδαίας γήρανσης και μείωση του προσδόκιμου ζωής [320, 321]. Ζώα, που φέρουν επιπλέον αντίγραφα του γονιδίου *hsf-1*, αποδείχθηκε ότι ανθίστανται στο οξειδωτικό και το θερμικό στρες και ζουν κατά 40% περισσότερο από τα αντίστοιχα αγρίου τύπου ζώα [319]. Το γεγονός ότι η μεταγραφή του Hsf-1 οδηγεί στην έκφραση διάφορων μοριακών συνοδών [319-321], υποδηλώνει ότι η ακεραιότητα της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης, στην οποία σημαντικό ρόλο παίζουν οι μοριακοί συνοδοί, μπορεί να διαδραματίσει ένα καίριο ρόλο στη διαμόρφωση του προσδόκιμου ζωής και στην υποβάθμιση της τοξικότητας, που προέρχεται από τη συμπλεγματοποίηση των πρωτεϊνών [317].

Οι μοριακοί συνοδοί της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού στρες, παίζουν σημαντικό ρόλο σε κλινικές καταστάσεις, που έχουν να κάνουν με παθήσεις της καρδιάς, όπως καρδιακή υπερτροφία, καρδιακή ανεπάρκεια, ισχαιμικό επεισόδιο, τραύμα των αγγειακών τοιχωμάτων, βοηθώντας στη φυσιολογική προσαρμογή, αλλά και σε χειρουργικές επεμβάσεις της καρδιάς και κατά την ισχαιμική προετοιμασία (preconditioning). Σε ορισμένες από αυτές τις καταστάσεις, όπως στην περίπτωση της ισχαιμίας, οι πρωτεΐνες του μυοκαρδίου υφίστανται βλάβες, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις κακώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών [322, 323]. Στις περιπτώσεις αυτές, για να επανέλθει η κυτταρική ομοιόσταση, το κύτταρο αποκρίνεται μέσω των Hsps [323], οι οποίες, όπως έχει αναφερθεί, καθοδηγούν τις πρωτεΐνες στην ορθή τους διαμόρφωση [68, 71], επιδιορθώνουν τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες ή προωθούν την αποικοδόμησή τους [30, 205]. Η επιβεβαίωση της εμπλοκής της Hsp70 σε καρδιακές

παθήσεις, έρχεται από φαρμακολογικές ή γενετικές μεθόδους, οι οποίες αυξάνοντας την έκφραση της πρωτεΐνης στο μυοκάρδιο των ασθενών με κίνδυνο οξέος ισχαιμικού επεισοδίου, μπορούν να μειώσουν το ισχαιμικό τραύμα [322].

Η ανάλυση των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης, που γειτνιάζουν σε μεταλλάξεις υπεύθυνες για μια σωρεία κληρονομήσιμων ασθενειών, αποκάλυψε ότι αλλαγές σε γονίδια, που κωδικεύουν για μοριακούς συνοδούς με γνωστές λειτουργίες, μπορεί να είναι υπεύθυνες για τις ασθένειες αυτές λόγω απώλειας της λειτουργίας μιας ή περισσότερων πρωτεϊνών υποστρωμάτων, που λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί [70]. Παραδείγματα αποτελούν η κληρονομική σπαστική παραπληγία [324], ο σχηματισμός μιας μορφής κληρονομικού καταρράκτη [325] και μια μορφή μυοπάθειας, σχετιζόμενη με τη δεσμίνη [326].

Μια δράση των μοριακών συνοδών, που πρόσφατα ήρθε στο φως, αφορά το ρόλο τους στην τοπική απόκριση του δέρματος σε πληγές, γήρανση λόγω περιβαλλοντικών ρύπων [327] και ένα εύρος δερματικών παθήσεων, όπως ερύθημα, οίδημα, ρυτίδωση, φλεγμονή, αυτοάνοσες αντιδράσεις, υπερευαισθησία, ανωμαλίες κερατινοποίησης, προνεοπλαστικές κακώσεις και καρκίνος, που πιθανά οφείλονται στην αλληλεπίδραση του δέρματος με ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) που βρίθουν στο περιβάλλον [327, 328]. Στο ανθρώπινο δέρμα, συναντώνται υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά υπό συνθήκες στρες, όλες οι γνωστές οικογένειες των Hsps [327] θεωρούνται σημαντικές για το δέρμα σε θεμελιώδεις διεργασίες, όπως η προστασία από βλάβες προκαλούμενες από UV ακτινοβολία [329-331] και η επούλωση του δέρματος από πληγές [332]. Η προστατευτική τους δράση φαίνεται να έχει να κάνει κυρίως με τη διατήρηση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης, η οποία αν διαταραχθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, λόγω των ανωτέρω αναφερόμενων στρεσογόνων για το δέρμα παραγόντων, μπορεί να οδηγήσει σε αναποτελεσματική ανάπτυξη και παθογένειες του δέρματος, που σχετίζονται με μια σειρά ασθενειών που οφείλονται σε τραύμα του δερματικού ιστού [327].

## 1.8. ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Ήδη από τα μέσα του δεκάτου ενάτου αιώνα, πολλές παρατηρήσεις έχουν δείξει ότι ο κυτταρικός θάνατος παίζει ένα αξιοσημείωτο ρόλο κατά τη διάρκεια φυσιολογικών διαδικασιών των πολυκύτταρων οργανισμών, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και της μεταμόρφωσης [333, 334]. Ο όρος "προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος" εισήχθη το 1964, προτείνοντας ότι ο κυτταρικός θάνατος κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, δεν είναι τυχαίας φύσης, αλλά ακολουθεί μια αλληλουχία ελεγχόμενων βημάτων, οδηγώντας σε τοπικά και χρονικά ορισμένη αυτοκαταστροφή [335].

Η απόπτωση (apoptosis) είναι ένας περιγραφικός όρος, που προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Kerr και τους συνεργάτες του [336], αν και τα φαινόμενα της απόπτωσης πρωτοπεριγράφηκαν από τον γερμανό επιστήμονα Carl Vogt το έτος 1842. Η λέξη "apoptosis" προέρχεται από την ελληνική λέξη απόπτωση, η οποία περιγράφει την πτώση των φύλλων από τα δένδρα ή την πτώση των πετάλων από τα λουλούδια. Σήμερα, ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για να περιγράψει έναν θάνατο επιθυμητό ή προγραμματισμένο, ο οποίος παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Η απόπτωση έχει, πλέον, αναγνωριστεί και αποδειχθεί ως ένας διακριτός και σημαντικός τρόπος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η κατανόηση μας για τους μηχανισμούς, που εμπλέκονται στη διαδικασία της απόπτωσης στα θηλαστικά κύτταρα αποπνέει από την έρευνα του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, που

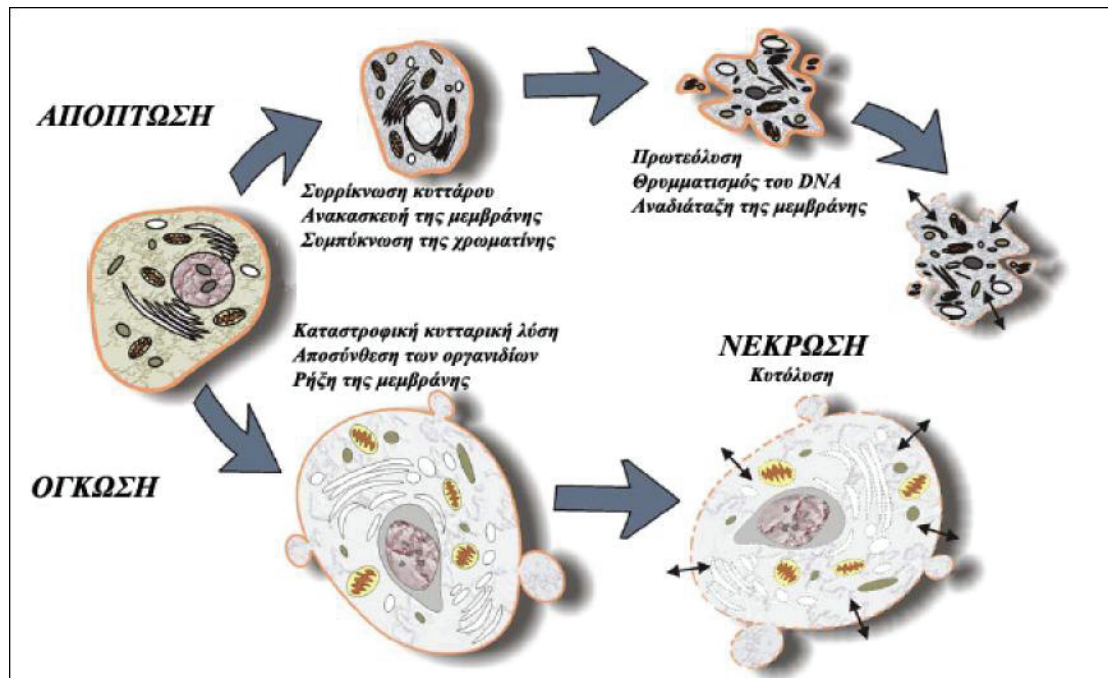


συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νηματώδους *Caenorhabditis elegans* [337].

Εξαιτίας της σημασίας του σε τέτοιες διάφορες βιολογικές διαδικασίες, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι ένα διαδεδομένο φαινόμενο, που συμβαίνει σε όλα τα είδη οργανισμών. Η απόπτωση συμβαίνει φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της γήρανσης και ως ένας ομοιοστατικός μηχανισμός, που διατηρεί τον κυτταρικό πληθυσμό στους ιστούς. Η απόπτωση, επίσης, συμβαίνει ως ένας αμυντικός μηχανισμός, όπως στις ανοσοαποκρίσεις ή όταν τα κύτταρα καταστρέφονται από ασθένεια ή επιβλαβείς παράγοντες [338]. Ο αποπτωτικός τρόπος κυτταρικού θανάτου είναι μια ενεργή και καθορισμένη διαδικασία, που παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών και τη ρύθμιση και διατήρηση των κυτταρικών πληθυσμών στους ιστούς κάτω από φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες. Πρέπει να τονιστεί ότι η απόπτωση είναι μια καλά καθορισμένη και πιθανόν η πιο συχνή μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, αλλά και οι άλλοι μη αποπτωτικοί τύποι κυτταρικού θανάτου, μπορούν, επίσης, να είναι βιολογικής σημασίας [339]. Παρόλο που υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία ερεθισμάτων και συνθηκών, τόσο φυσιολογικών όσο και παθολογικών, που μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση, δεν πεθαίνουν απαραίτητα όλα τα κύτταρα σε απόκριση στο ίδιο ερέθισμα. Υπάρχει, επίσης, το θέμα του διαχωρισμού της απόπτωσης από τη νέκρωση, δύο διαδικασίες, που μπορούν να συμβαίνουν ανεξάρτητα, διαδοχικά, καθώς και ταυτόχρονα [340, 341]. Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι ο τύπος του ερεθίσματος και/ή ο βαθμός του ερεθίσματος, που καθορίζει εάν το κύτταρο πεθαίνει από απόπτωση ή νέκρωση. Σε χαμηλές δόσεις, μια ποικιλία επιβλαβών ερεθισμάτων, όπως θερμότητα, ακτινοβολία, υποξία και κυτταροτοξικά αντικαρκινικά φάρμακα, μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση, αλλά τα ίδια ερεθίσματα μπορούν να οδηγήσουν σε νέκρωση σε υψηλότερες δόσεις. Τελικά, η απόπτωση είναι μια συντονισμένη και συχνά ενεργο-εξαρτώμενη διαδικασία, που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση μιας ομάδας πρωτεασών κυστεΐνης, που καλούνται κασπάσες, και ενός περίπλοκου καταρράκτη γεγονότων, που συνδέουν το αρχικό ερέθισμα με τον τελικό θάνατο του κυττάρου.

Στο σύνολο τους, οι αποπτωτικές διαδικασίες είναι εκτενούς βιολογικής σημασίας, που περιλαμβάνονται στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό/ομοίωση, τη ρύθμιση και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και την απομάκρυνση ελαττωματικών και, επομένως, επιβλαβών κυττάρων. Επομένως, δυσλειτουργία ή απορρύθμιση του αποπτωτικού προγράμματος εμπλέκεται σε μια ποικιλία παθολογικών συνθηκών. Ελαττώματα στην απόπτωση μπορούν να οδηγήσουν σε καρκίνο, αυτοάνοσα νοσήματα και εξάπλωση ιογενών μολύνσεων, ενώ νευροεκφυλιστικές διαταραχές, AIDS και ισχαιμικές ασθένειες προκαλούνται ή ενισχύονται από υπερβολική απόπτωση [342].

Ο κυτταρικός θάνατος πραγματοποιείται σε κάποιο σημείο της μέγιστης διάρκειας ζωής του οργανισμού και αναπαριστά την τελευταία απόφαση διαφοροποίησης του κυττάρου. Η απόφαση αυτή είναι πολύ σημαντική, γιατί σε ένα πολυκύτταρο οργανισμό η ομοίωση των ιστών του στηρίζεται σε μια δυναμική ισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης [336, 343].



Εικόνα 1.10: Μορφές κυτταρικού θανάτου.

### 1.8.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης

Η απόπτωση μπορεί να διαιρεθεί σε τρία ξεχωριστά στάδια:

α) Τη δέσμευση: Κατά την διάρκεια του σταδίου αυτού ένα κύτταρο λαμβάνει ένα αποπτωτικό ερέθισμα και γίνεται αμετάκλητα δεσμευμένο με τον θάνατο.

β) Την εκτέλεση: Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει γρήγορες αλλαγές μέσα στο κύτταρο, συμπεριλαμβανομένων της συμπύκνωσης της χρωματίνης, της συρρίκνωσης του κυτταροπλάσματος, της κυστοποίησης της μεμβράνης, του τεμαχισμού του πυρήνα και της δημιουργίας αποπτωτικών σωματιδίων. Αυτές οι αλλαγές είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης ποικίλων ενζύμων (πρωτεάσες, λιπάσες και νουκλεάσες) δια μέσου ενός συνεργαζόμενου δικτύου σηματοδοτούντων οδών και

γ) Την κάθαρση ή την απομάκρυνση: Περιλαμβάνει τη φαγοκύτωση και την αποικοδόμηση των αποπτωτικών σωματιδίων από τα μακροφάγα ή τα γειτονικά κύτταρα.

Τα αποπτωτικά κύτταρα μπορούν να αναγνωριστούν από στερεοτυπικές μορφολογικές αλλαγές: το κύτταρο συρρικνώνεται, εμφανίζει παραμόρφωση και χάνει την επαφή με τα γειτονικά κύτταρα. Η χρωματίνη τους συμπυκνώνεται και περιθωριοποιείται στην πυρηνική μεμβράνη, η κυτταροπλασματική μεμβράνη διογκώνεται ή αναπτύσσεται, και, τελικά, το κύτταρο θρυμματίζεται σε συμπαγείς έγκλειστες σε μεμβράνες δομές, που ονομάζονται "αποπτωτικά σωματίδια", που περιέχουν κυτοσόλιο, τη συμπυκνωμένη χρωματίνη και οργανίδια. Τα αποπτωτικά σωματίδια εγκολπώνονται από τα μακροφάγα, παρεγχυματικά κύτταρα ή νεοπλασματικά κύτταρα και, έτσι, απομακρύνονται από τον ιστό χωρίς να προκαλέσουν φλεγμονώδη αντίδραση. Δεν υπάρχει απαραίτητα φλεγμονώδη

αντίδραση που να συσχετίζεται με τη διαδικασία της απόπτωσης ούτε με την απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων επειδή:

(1) τα αποπτωτικά κύτταρα δεν απελευθερώνουν τα κυτταρικά τους συστατικά στον περιβάλλοντα ενδιάμεσο ιστό,

(2) φαγοκυτταρώνονται ταχύτατα από τα περιβάλλοντα κύτταρα εμποδίζοντας, επομένως, πιθανά δευτερογενώς, τη νέκρωση, και

(3) τα εγκολλημένα κύτταρα δεν παράγουν αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες [344, 345]. Αυτές οι μορφολογικές αλλαγές είναι συνέπεια των χαρακτηριστικών μοριακών και βιοχημικών γεγονότων, που συμβαίνουν σε ένα αποπτωτικό κύτταρο, κυρίως η ενεργοποίηση των πρωτεολυτικών ενζύμων, που, τελικά, προκαλούν τη διάσπαση του DNA σε ολιγονουκλεοσωμικά θραύσματα, καθώς και η διάσπαση ενός πλήθους ειδικών πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, που συνήθως αποφασίζουν για την ακεραιότητα και το σχήμα του κυτταροπλάσματος ή των οργανιδίων [346].

## 1.8.2. Χαρακτηριστικά διαχωρισμού απόπτωσης και νέκρωσης

Ενώ η απόπτωση είναι μία ενεργή πορεία, σε αντίθεση η νέκρωση αποτελεί έναν παθητικό τύπο κυτταρικού θανάτου, που σχετίζεται με ερεθισμό που προέρχεται από κυτταρική ή οργανιδιακή διόγκωση, ρήξη της πλασματικής μεμβράνης και άδειασμα του κυτταρικού χυμού σε εξοκυτταρικό περιβάλλον. Η διαδικασία οδηγεί στη νέκρωση με λύση του πυρήνα (karyolysis) και διόγκωση του κυττάρου, ενώ η απόπτωση οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο με συρρίκνωση του κυττάρου, πύκνωση και θραύση του πυρήνα (karyorrhexis).

Δεν είναι πάντα εύκολος ο διαχωρισμός της απόπτωσης από τη νέκρωση, και αυτές μπορούν να συμβαίνουν ταυτόχρονα, εξαρτώμενες από παράγοντες, όπως η ένταση και η διάρκεια του ερεθίσματος, η έκταση της μείωσης του ATP και η διαθεσιμότητα των κασπασών [341]. Η νέκρωση είναι μία μη ελεγχόμενη και παθητική διαδικασία, που συχνά επηρεάζει μεγάλα πεδία κυττάρων, ενώ η απόπτωση είναι ελεγχόμενη και ενεργο-εξαρτώμενη και μπορεί να επηρεάζει μεμονωμένα κύτταρα ή συμπλέγματα κυττάρων.

Ορισμένες από τις κύριες μορφολογικές αλλαγές, που συμβαίνουν με τη νέκρωση περιλαμβάνουν διόγκωση του κυττάρου, σχηματισμό κυτταροπλασματικών κενотоπιών, διογκωμένο ενδοπλασματικό δίκτυο, σχηματισμό κυτταροπλασματικών κυστιδίων, συμπυκνωμένα, διογκωμένα ή διαρρηγμένα μιτοχόνδρια, διαχωρισμό και αποκόλληση των ριβοσωμάτων, διαταραγμένες μεμβράνες των οργανιδίων, διογκωμένα και διαρρηγμένα λυσοσώματα και τελικά διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης [336, 347, 348]. Η απώλεια αυτή της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί στην απελευθέρωση του περιεχομένου του κυτταροπλάσματος στον περιβάλλοντα ιστό, στέλνοντας χημειοτακτικά σήματα με τελική στρατολόγηση των φλεγμονοδών κυττάρων. Επειδή τα αποπτωτικά κύτταρα δεν απελευθερώνουν τα αποπτωτικά τους συστατικά στον περιβάλλοντα ενδιάμεσο ιστό και φαγοκυτταρώνονται ταχύτατα από μακροφάγα ή γειτνιάζοντα φυσιολογικά κύτταρα, δεν υπάρχει απαραίτητα φλεγμονώδη αντίδραση [344, 345].

<i>ΝΕΚΡΩΣΗ</i>	<i>ΑΠΟΠΤΩΣΗ</i>
<b>ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ</b>	
▪ Ρήξη της πλασματικής μεμβράνης	▪ Διόγκωση της μεμβράνης, αλλά διατήρηση της ακεραιότητας
▪ Διόγκωση του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων	▪ Συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα
▪ Ολική κυτταρική λύση	▪ Συσσώρευση της χρωματίνης στην πυρηνική μεμβράνη
▪ Καμία δημιουργία κυστιδίου	▪ Θρυμματισμός του κυττάρου σε μικρότερα σώματα
▪ Αποσύνθεση όλων των οργανιδίων και διασπορά των περιεχομένων τους	▪ Διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών
-	▪ Αποσυναρμολόγηση πυρηνικού περιβλήματος
<b>ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ</b>	
▪ Απώλεια της ρύθμισης της ομοιόστασης	▪ Αυστηρά προγραμματισμένη διαδικασία με ενζυματικά βήματα
▪ Δεν απαιτείται κατανάλωση ενέργειας (παθητική διαδικασία)	▪ Ενεργειακά ATP-εξαρτώμενη διαδικασία (ενεργητική διαδικασία)
▪ Τυχαία πέψη του DNA	▪ Προγραμματισμένος θρυμματισμός του DNA
▪ Λύση του θρυμματισμένου DNA	▪ Απελευθέρωση ποικίλων παραγόντων στο κυτταρόπλασμα των μιτοχονδρίων (κυτόχρωμα C)
-	▪ Ενεργοποίηση διαδοχικών κασπασών
-	▪ Μεταβολές στη μεμβρανική ασυμμετρία
<b>ΣΠΟΥΔΑΙΟΤΗΤΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ</b>	
▪ Επηρεασμός των γειτονικών κυττάρων	▪ Αφορά μόνο ατομικά κύτταρα
▪ Πρόκληση από μη φυσιολογικές ενοχλήσεις	▪ Πρόκληση από φυσιολογικά ερεθίσματα
▪ Φαγοκύτωση από γειτονικά κύτταρα	▪ Φαγοκύτωση από παρακείμενα κύτταρα ή μακροφάγα
▪ Δυνητικά επιβλαβή φλεγμονώδη απάντηση	▪ Καμία φλεγμονώδη απάντηση

**Πίνακας 1.3:** *Αποπτωτικά και νεκρωτικά χαρακτηριστικά των κυττάρων.*

Είναι, επίσης, σημαντικό να σημειώσουμε ότι πύκνωση και θραύση του πυρήνα (karyorrhexis) δεν είναι αποκλειστικά της απόπτωσης και μπορεί να είναι μέρος του φάσματος των κυτταρομορφολογικών αλλαγών, που συμβαίνουν με τη νέκρωση [349]. Εάν ένα κύτταρο πεθαίνει από νέκρωση ή απόπτωση εξαρτάται εν μέρει από τη φύση του σήματος κυτταρικού θανάτου, τον τύπο του ιστού, το αναπτυξιακό στάδιο του ιστού και το φυσιολογικό περιβάλλον [341, 350].

### 1.8.3. Άλλες μορφές προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου

Υπάρχουν στοιχεία και για άλλες μορφές μη αποπτωτικού προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η "αυτοφαγία" αντιπροσωπεύει άλλον ένα μηχανισμό για τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και, παρομοίως με την απόπτωση, έχει σημαντικούς ρόλους στις αναπτυξιακές διαδικασίες, τις ανθρώπινες ασθένειες και τις κυτταρικές αποκρίσεις σε στέρηση θρεπτικών ουσιών [351-353]. Ο αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος χαρακτηρίζεται από διαχωρισμό του κυτταροπλάσματος και των οργανιδίων σε διπλά ή πολυμεμβρανικά κυστίδια και παράδοση στα κύτταρα των δικών τους λυσοσωμάτων για επακόλουθη αποικοδόμηση [354]. Κατά μία έννοια, το κύτταρο "καννιβαλίζει" τον εαυτό του. Είναι μια υψηλά ρυθμισμένη δυναμική διαδικασία, που περιλαμβάνει αποικοδόμηση των κυτοσολικών πρωτεϊνών και των οργανιδίων μέσω εγκόλπωσης σε κυστίδια διπλής μεμβράνης, που ονομάζονται αυτοφαγοςώματα, που, στη συνέχεια, συγχωνεύονται με λυσοσώματα και ακολούθως, αποικοδομούν το περιεχόμενο. Οι μηχανισμοί και η μορφολογία της αυτοφαγίας είναι εξελικτικά διατηρημένα με σημαντικές ομοιότητες ανάμεσα στους οργανισμούς τόσο διαφορετικούς όσο οι άνθρωποι, τα φυτά και οι ζύμες. Η διαδικασία της αυτοφαγίας εξαρτάται από τόσο τη συνεχή πρωτεϊνική σύνθεση όσο και τη συνεχή παρουσία του ATP. Συγκεκριμένα, η αυτοφαγία συμβαίνει σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και περιλαμβάνει τη δυναμική αναδιάταξη των υποκυτταρικών μεμβρανών για να απομονώσουν το κυτταρόπλασμα και τα οργανίδια για παράδοση στα λυσοσώματα ή τα κενοτόπια, όπου συμβαίνει η αποικοδόμηση. Έχει αναφερθεί ότι υπάρχουν περιπτώσεις, όπου η αυτοφαγία και η απόπτωση φαίνονται να είναι διασυνδεδεμένες, καθώς και ορισμένες περιπτώσεις, όπου η αυτοφαγία μπορεί να λειτουργεί σαν προστατευτικός μηχανισμός, που περιορίζει την ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση και την απόπτωση. Υπάρχουν αναφορές ότι η απόπτωση και ο αυτοφαγικός προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος δεν αλληλοαποκλείονται [352] και σε συγκεκριμένα κύτταρα και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της αυτοφαγίας μπορούν να συμβαίνουν πριν από τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, αντιπροσωπεύοντας μια πρόιμη φάση της απόπτωσης.

### 1.8.4. Μηχανισμοί της απόπτωσης

Οι μηχανισμοί της απόπτωσης είναι αρκετά πολύπλοκοι και εξελιγμένοι, περιλαμβάνοντας έναν ενεργο-εξαρτώμενο καταρράκτη μοριακών γεγονότων. Μέχρι σήμερα, η έρευνα δείχνει ότι υπάρχουν δύο κύρια αποπτωτικά μονοπάτια: το εξωτερικό ή υποδοχέων θανάτου μονοπάτι και το εσωτερικό ή μιτοχονδριακό μονοπάτι. Παρόλα αυτά, έχει πλέον αποδειχτεί ότι τα δύο μονοπάτια συνδέονται και ότι μόρια του ενός μονοπατιού μπορούν να επηρεάσουν το άλλο [355]. Υπάρχει ένα επιπρόσθετο μονοπάτι, που περιλαμβάνει διαμεσολαβούμενη από T-κύτταρα κυτταροτοξικότητα και από την περφορίνη εξαρτώμενη θανάτωση του κυττάρου. Το perforin/granzyme μονοπάτι μπορεί να επάγει απόπτωση είτε μέσω του granzyme B είτε του granzyme A. Το εξωτερικό, το εσωτερικό και το granzyme B μονοπάτι συγκλίνουν στο ίδιο τέρμα, ή στο εκτελεστικό μονοπάτι. Αυτό το μονοπάτι ξεκινάει με τη σχάση (διάσπαση) της κασπάσης-3 και οδηγεί στη θραύση του DNA, την αποικοδόμηση των κυτταροσκελετικών και πυρηνικών πρωτεϊνών, τη διασύνδεση των πρωτεϊνών, το σχηματισμό των αποπτωτικών σωματιδίων, την έκφραση των

υποκαταστατών για φαγοκυτταρικούς υποδοχείς του κυττάρου και τελικά πρόσληψη από φαγοκυτταρικά κύτταρα.

Τα αποπτωτικά κύτταρα επιδεικνύουν διάφορες βιοχημικές τροποποιήσεις, όπως η πρωτεϊνική διάσπαση, η πρωτεϊνική διασύνδεση, ο κατακερματισμός του DNA και η φαγοκυτταρική αναγνώριση, που μαζί οδηγούν στη διακριτή δομική παθολογία, που περιγράφηκε νωρίτερα [356].

Η απόπτωση μπορεί να προκαλείται από διάφορα ερεθίσματα από εξωτερικά ή εσωτερικά του κυττάρου, π.χ. από σύνδεση των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας, από βλάβη του DNA ως αιτία ελαττωμάτων στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, από μεταχείριση με κυτταροτοξικά φάρμακα ή ακτινοβολία, από έλλειψη σημάτων επιβίωσης, από αντιφατική σηματοδότηση κυτταρικού κύκλου ή από σήματα αναπτυξιακού θανάτου. Η λίστα των αποπτωτικών ερεθισμάτων περιλαμβάνει μια περίσσεια ή μείωση των θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων, απώλεια επαφής με τη βασική μεμβράνη ή άλλη επιφάνεια (ορισμένο ως *apoptosis*), μη επιδιορθώσιμη DNA βλάβη, άκαιρη έκφραση των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, ιϊκή μόλυνση και φάρμακα, που χρησιμοποιούνται σε κλινική πρακτική [357-359]. Πολλοί υποκαταστάτες μπορούν να προκαλούν ή να ενισχύουν την απόπτωση και ταξινομούνται ανάλογα με την προέλευση τους σε εξωτερικούς σηματοδοτικούς υποκαταστάτες, όπως οι κυτοκίνες, οι ορμόνες, ορισμένα παθογόνα και φυσικές ενώσεις, και σε εσωτερικούς υποκαταστάτες, όπως το οξειδωτικό στρες (ROS, GSH, NO), το κυτόχρωμα c και τα ιόντα ασβεστίου. Σήματα θανάτου τέτοιας διαφορετικής προέλευσης, φαίνονται, τελικά, να ενεργοποιούν ένα συνήθη μηχανισμό κυτταρικού θανάτου, που οδηγεί στα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου.

#### 1.8.4.1. Κασπάσες

Οι κασπάσες, πρωτεάσες κυστεΐνης, ομόλογες της *ced-3* του *C. elegans*, είναι κεντρικής σημασίας στο αποπτωτικό σηματοδοτικό δίκτυο και οι οποίες ενεργοποιούνται στις περισσότερες περιπτώσεις του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου [360]. Ο όρος κασπάσες προέρχεται από τον ορισμό τους ως *cysteine-dependent aspartate-specific proteases*. Η καταλυτική τους δραστηριότητα εξαρτάται από ένα κρίσιμο κατάλοιπο κυστεΐνης με ένα υψηλά διατηρημένο ενεργό κέντρο πενταπεπτιδίου QACRG, και οι κασπάσες διασπούν ειδικά τα υποστρώματα τους μετά τα κατάλοιπα Asp. Μέχρι σήμερα, 7 διαφορετικές κασπάσες έχουν ταυτοποιηθεί στη *Drosophila* και 14 διαφορετικά μέλη της οικογένειας των κασπασών έχουν περιγραφεί στα θηλαστικά, με την κασπάση-11 και την κασπάση-12 να έχουν προσδιοριστεί μόνο στα ποντίκια [361, 362]. Σύμφωνα με μία ενιαία ονοματολογία, οι κασπάσες αναφέρονται με τη σειρά δημοσίευσής τους.

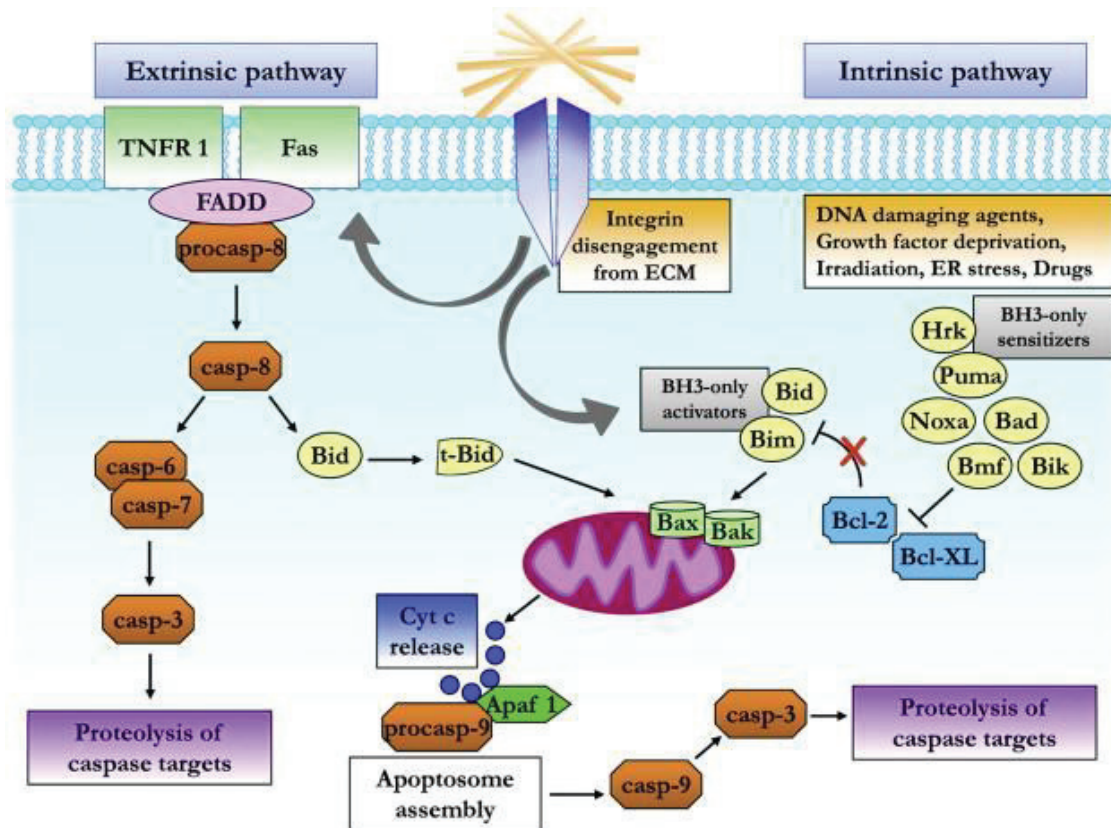
Στο κύτταρο, οι κασπάσες συντίθενται σαν ανενεργά προένζυμα (ζυμογόνα), τις ονομαζόμενες προκασπάσες, οι οποίες στο N-τελικό άκρο τους φέρουν μια προπεριοχή, που ακολουθείται από μια μεγάλη και μία μικρή υπομονάδα, οι οποίες κάποιες φορές διαχωρίζονται από ένα συνδετικό πεπτιδίο. Κατά την ωρίμανση, οι προκασπάσες επεξεργάζονται πρωτεολυτικά ανάμεσα στη μεγάλη και τη μικρή υπομονάδα, οδηγώντας σε μία μικρή και μία μεγάλη υπομονάδα. Η προπεριοχή, συχνά, αλλά όχι απαραίτητα, απομακρύνεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ενεργοποίησης. Ένα ετεροτετραμερές, που αποτελείται από δύο μικρές και δύο μεγάλες υπομονάδες, στη συνέχεια σχηματίζει μια ενεργή κασπάση. Αφού ενεργοποιηθούν, μπορούν, συχνά να ενεργοποιήσουν άλλες προκασπάσες,

επιτρέποντας την εκκίνηση ενός καταρράκτη πρωτεασών. Κάποιες προκασπάσες μπορούν να συσσωματωθούν και να αυτοενεργοποιηθούν. Αυτός ο πρωτεολυτικός καταρράκτης, κατά τον οποίο μια κασπάση μπορεί να ενεργοποιήσει άλλες κασπάσες, ενισχύει το αποπτωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι και έτσι, οδηγεί σε γρήγορο κυτταρικό θάνατο.

Οι κασπάσες έχουν πρωτεολυτική δραστηριότητα και είναι ικανές να διασπούν πρωτεΐνες στα κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος, παρόλο που διαφορετικές κασπάσες έχουν διαφορετικές εξειδικεύσεις, που περιλαμβάνουν αναγνώριση των γειτονικών αμινοξέων. Αφού οι κασπάσες αρχικά ενεργοποιηθούν, αυτό φαίνεται να είναι μια μη αναστρέψιμη δέσμευση προς τον κυτταρικό θάνατο. Μέχρι σήμερα, πάνω από δέκα κύριες κασπάσες έχουν ταυτοποιηθεί και κατηγοριοποιούνται γενικά στις κασπάσες εκκινήτες (εναρκτήριες κασπάσες) (κασπάση -2, -8, -9, -10), τελεστές ή εκτελεστές (κασπάση -3, -6, -7) και στις φλεγμονώδεις κασπάσες (κασπάση -1, -4, -5) [363, 364]. Άλλες κασπάσες, που έχουν ταυτοποιηθεί περιλαμβάνουν την κασπάση-11, η οποία έχει αναφερθεί να ρυθμίζει την απόπτωση και την ωρίμανση κυτοκινών κατά τη διάρκεια του σηπτικού σοκ, η κασπάση-12, που διαμεσολαβεί την ειδική για το ενδοπλασματικό δίκτυο απόπτωση και κυτταροτοξικότητα από το αμυλοειδές-β (amyloid-β), η κασπάση-13, η οποία έχει προταθεί να είναι ένα βοοειδές γονίδιο, και η κασπάση-14, η οποία εκφράζεται υψηλά σε εμβρυονικούς ιστούς, αλλά όχι σε ενήλικες ιστούς [365-368]. Η κασπάση-1, όπως και οι κασπάσες -4, -5, -11 και -12 φαίνονται να εμπλέκονται, κύρια, στην πρωτεολυτική ωρίμανση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως οι pro-IL-1β και pro-IL-18 και η συνεισφορά τους στην εκτέλεση της απόπτωσης παραμένει αμφισβητήσιμη [361].

Ενώ οι κασπάσες τελεστές κατέχουν μόνο μικρές προπεριοχές, οι εναρκτήριες κασπάσες κατέχουν μακριές προπεριοχές, περιέχοντας τις DEDs (Death Effector Domains) στην περίπτωση της προκασπάσης-8 και της -10 ή τις CARDs (Caspase Recruitment Domains), όπως στην περίπτωση της προκασπάσης-9 και της -2. Αμφότερες οι ομάδες των κασπασών ρυθμίζονται αρνητικά από τις IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins).

Μέσω των προπεριοχών τους, οι εναρκτήριες κασπάσες ανακτώνται και ενεργοποιούνται σε επαγόμενα από θάνατο σηματοδοτικά σύμπλοκα είτε σε απόκριση στη σύνδεση των κυτταρικών επιφανειακών υποδοχέων θανάτου (εξωτερικό αποπτωτικό μονοπάτι) είτε σε απόκριση σε σήματα, που προέρχονται από το εσωτερικό του κυττάρου (εσωτερικό αποπτωτικό μονοπάτι). Αφού οι εναρκτήριες κασπάσες ενεργοποιηθούν, μπορούν να ενεργοποιήσουν πρωτεολυτικά τις εκτελεστικές προκασπάσες -3, -6 και -7, οι οποίες, επακόλουθα, διασπούν μια ειδική σειρά πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, που περιλαμβάνουν τις ίδιες τις προκασπάσες, οδηγώντας στη διαμεσολάβηση και ενίσχυση του σήματος θανάτου και τελικά την εκτέλεση του κυτταρικού θανάτου με όλα τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, που συνήθως παρατηρούνται [369].



Εικόνα 1.11: Τα δύο μοριακά μονοπάτια της απόπτωσης. Αριστερά: Εξωγενές ή μονοπάτι υποδοχών θανάτου. Δεξιά: Ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι [370].

#### 1.8.4.2. Το εξωτερικό (εξωγενές) μονοπάτι

Τα εξωτερικά σηματοδοτικά μονοπάτια, που εκκινούν την απόπτωση περιλαμβάνουν διαμεσολαβούμενες από διαμεμβρανικούς υποδοχείς αλληλεπιδράσεις. Αυτοί περιλαμβάνουν υποδοχείς θανάτου, που είναι μέλη της υπερικογένειας γονιδίων των TNF (Tumor Necrosis Factor)-υποδοχών [371]. Μέλη της οικογένειας των TNF-υποδοχών μοιράζονται παρόμοιες εξωκυτταρικές περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη και έχουν μια κυτταροπλασματική περιοχή 80 περίπου αμινοξέων, που καλείται "περιοχή θανάτου (death domain)" [357]. Αυτή η περιοχή θανάτου παίζει κρίσιμο ρόλο στη μετάδοση του σήματος θανάτου από την κυτταρική επιφάνεια στα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Μέχρι σήμερα, οι καλύτερα χαρακτηρισμένοι υποκαταστάτες και αντίστοιχοι υποδοχείς θανάτου περιλαμβάνουν τους FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 και Apo2L/DR5 [357, 372-375].

Η αλληλουχία των γεγονότων, που καθορίζουν την εξωτερική φάση της απόπτωσης έχουν καλύτερα χαρακτηριστεί με τα FasL/FasR και TNF- $\alpha$ /TNFR1 μοντέλα. Στα μοντέλα αυτά, υπάρχει ομαδοποίηση των υποδοχών και σύνδεση με τους ομόλογους τριμερείς υποκαταστάτες. Κατά τη σύνδεση του υποκαταστάτη, ανακτώνται κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες προσαρμογείς, οι οποίες εκθέτουν αντίστοιχες περιοχές θανάτου (DDs), που συνδέονται με τους υποδοχείς. Η σύνδεση του Fas υποκαταστάτη στον Fas υποδοχέα οδηγεί στη σύνδεση της πρωτεΐνης-προσαρμογέα FADD και η σύνδεση του TNF υποκαταστάτη στον TNF υποδοχέα



οδηγεί στην πρωτεΐνη-προσαρμογέα TRADD με στρατολόγηση των FADD και RIP [376-378]. Η FADD, στη συνέχεια, σχετίζεται με την προκασπάση-8 μέσω διμερισμού της περιοχής του εκτελεστή θανάτου. Μια ομότυπη αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα ανάμεσα στις περιοχές θανάτου (DDs) του TNFR-1 (Tumor Necrosis Factor Receptor-1) και των Fas-υποδοχέων και στα αντίστοιχα μόρια-υποδοχείς τους, TRADD και FADD [371, 379, 380]. Η επακόλουθη σηματοδότηση διαμεσολαβείται από το κυτταροπλασματικό μέρος των υποδοχέων θανάτου, που περιέχει μια διατηρημένη αλληλουχία, που ορίζεται ως περιοχή θανάτου (DD, Death Domain). Προσαρμοστικά μόρια, όπως η FADD ή η TRADD κατέχουν οι ίδιες τις δικές τους DDs, μέσω των οποίων ανακτώνται στις DDs των ενεργοποιημένων υποδοχέων θανάτου, σχηματίζοντας, επομένως, το καλούμενο DISC (Death-Inducing Signaling Complex), οδηγώντας στην αυτοκαταλυτική ενεργοποίηση της προκασπάσης-8 [381]. Η προκασπάση-8 ανακτάται από τις DEDs της στο DISC, ένα σύμπλοκο μεμβρανικού υποδοχέα. Όταν δεσμεύονται στο DISC, διάφορα μόρια προκασπάσης-8 βρίσκονται κοντά το ένα με το άλλο, και, επομένως, υποτίθεται ότι ενεργοποιούν το ένα το άλλο με αυτοπρωτεόλυση [361]. Τελικά, το σύμπλοκο DISC ενεργοποιεί την προκασπάση-8, η οποία με τη σειρά της προκαλεί διαμεσολαβούμενα από την κασπάση-3 γεγονότα κυτταρικού θανάτου. Αφού ενεργοποιηθεί η κασπάση-8, προκαλείται η φάση εκτέλεσης της απόπτωσης.

Το Fas-επαγόμενο αποπτωτικό μονοπάτι μπορεί, επίσης, να ανακτήσει την πρωτεΐνη-προσαρμογέα DAXX αντί για τη FADD, για να ενεργοποιήσει την Ask-1 (Apoptosis Signal regulated Kinase-1) [382], η οποία ενεργοποιεί τη SAPK/JNK και επομένως, προκαλεί απόπτωση [383].

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, η τοπική συγκέντρωση διαφόρων μορίων της προκασπάσης-8 στο DISC οδηγεί στην αυτοκαταλυτική ενεργοποίηση και απελευθέρωση της ενεργής κασπάσης-8. Η ενεργή κασπάση-8, στη συνέχεια, επεξεργάζεται καθοδικά τις εκτελεστικές κασπάσες, που ακολούθως, διασπών συγκεκριμένα υποστρώματα, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Κύτταρα, που κατέχουν την ικανότητα να επάγουν τέτοια άμεσα και, κυρίως, κασπασο-εξαρτώμενα αποπτωτικά μονοπάτια, ταξινομούνται να ανήκουν στα επονομαζόμενα τύπου I κύτταρα [384].

Στα κύτταρα τύπου II, το σήμα, που προέρχεται από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα, δεν παράγει έναν αποπτωτικό καταρράκτη κασπασών αρκετά ισχυρό να εκτελέσει κυτταρικό θάνατο από μόνος του. Στην περίπτωση αυτή, το σήμα χρειάζεται να ενισχυθεί μέσω των εξαρτώμενων από τα μιτοχόνδρια αποπτωτικών μονοπατιών. Η σύνδεση μεταξύ του αποπτωτικού καταρράκτη κασπασών και των μιτοχονδρίων παρέχεται από το μέλος της Bcl-2 οικογένειας, τη Bid. Η Bid διασπάται από την κασπάση-8 και η περικομμένη μορφή της (tBid) μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια, όπου δρα σε συμφωνία με τα προαποπτωτικά μέλη της Bcl-2 οικογένειας, Bax και Bak, για να επάγουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων μιτοχονδριακών προαποπτωτικών παραγόντων στο κυτταρόσολιο [385]. Το κυτταρόσολιο c συνδέεται στο μονομερή Araf-1, που στη συνέχεια, με μία dATP-εξαρτώμενη διαμορφωτική αλλαγή, ολιγομερίζεται για να συναρμολογήσει το αποπτώσωμα, ένα σύμπλοκο με δομή, που μοιάζει με τροχό με εφταπλάσια συμμετρία, που προκαλεί την ενεργοποίηση της εναρκτήριας προκασπάσης-9 [386]. Η ενεργοποιημένη κασπάση-9, ακολούθως, ξεκινάει ένα καταρράκτη κασπασών, που περιλαμβάνει καθοδικά τις εκτελεστικές κασπάσες, όπως η κασπάση-3, η κασπάση-7 και η κασπάση-6, οδηγώντας, τελικά, σε κυτταρικό θάνατο [387].

### 1.8.4.3. Το εσωτερικό (ενδογενές) μονοπάτι

Τα εσωτερικά σηματοδοτικά μονοπάτια, που εκκινούν την απόπτωση, περιλαμβάνουν μια διαφορετική σειρά μη διαμεσολαβούμενων από υποδοχείς ερεθισμάτων, που παράγουν ενδοκυτταρικά σήματα, που δρουν απευθείας στους στόχους εντός του κυττάρου και είναι γεγονότα που ξεκινούν από τα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια παίζουν κεντρικό ρόλο στην ολοκλήρωση και διάδοση των σημάτων θανάτου, που προέρχονται από το εσωτερικό του κυττάρου, όπως η βλάβη του DNA, το οξειδωτικό στρες, η ασιτία, όπως και αυτών που επάγονται από χημειοθεραπευτικά φάρμακα [388, 389].

Τα ερεθίσματα, που εκκινούν το εσωτερικό μονοπάτι, προκαλούν αλλαγές στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, που οδηγεί στη διάνοιξη του πόρου μετάπτωσης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας (mitochondrial permeability transition (MPT) pore), διαταραχή του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού ( $\Delta\psi$ ) και απελευθέρωση των δύο κύριων ομάδων των φυσιολογικά διαχωρισμένων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών από τον ενδομεμβρανικό χώρο εντός του κυτοσόλιου [390]. Ταυτόχρονα, οσμωτική μιτοχονδριακή διόγκωση έχει παρατηρηθεί με εισροή νερού στη μήτρα με τελική ρήξη της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, οδηγώντας στην απελευθέρωση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών από τον μιτοχονδριακό ενδομεμβρανικό χώρο στο κυτταρόπλασμα [391, 392]. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από το κυτόχρωμα c, τη Smac/DIABLO και τις πρωτεάσες σερίνης Htra2/Omi [393-396]. Οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούν το κασπασο-εξαρτώμενο μιτοχονδριακό μονοπάτι. Το κυτόχρωμα c συνδέεται και ενεργοποιεί τον Araf-1, όπως και την προκασπάση-9, σχηματίζοντας το αποπτώσωμα [397, 398]. Το κυτόχρωμα c συνδέεται στον Araf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor -1), βοηθώντας στον ολιγομερισμό του και την ανάκτηση της προκασπάσης-9 για να σχηματίσουν ένα λειτουργικό αποπτώσωμα.

Η συμπλεγματοποίηση της προκασπάσης-9 με τον τρόπο αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Η Smac/DIABLO και η Htra2/Omi έχουν αναφερθεί να προωθούν την απόπτωση αναστέλλοντας τη δραστηριότητα των IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins) [399, 400]. Ο σχηματισμός αυτού του συμπλόκου βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του Araf-1 και της προκασπάσης-9 μέσω των αντίστοιχων περιοχών τους ανάκτησης κασπασών (CARDs, Caspase Recruitment Domains), για να παράγουν ενεργά διμερή κασπάσης-9, τα οποία, στη συνέχεια, διασπών και ενεργοποιούν τις κασπάσες τελεστές [401]. Το σύμπλοκο του αποπτωσώματος επεξεργάζεται πρωτεολυτικά την προκασπάση-9 σε μια ενεργή μορφή, που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, ενεργοποιώντας την εκτελεστική κασπάση-3 [380, 402-404].

Είναι ενδιαφέρον ότι η PT (Permeability Transition) ακολουθείται πάντοτε από  $\Delta\psi$ , αλλά η  $\Delta\psi$  δεν προκαλείται πάντα από PT, και απελευθέρωση του κυτοχρώματος c παρατηρείται ακόμα και σε απουσία της  $\Delta\psi$  [391, 405]. Επιπρόσθετα της απελευθέρωσης των μιτοχονδριακών παραγόντων, η διάχυση των  $\Delta\psi$  και PT προκαλεί, επίσης, απώλεια της βιοχημικής ομοιόστασης του κυττάρου : η σύνθεση του ATP σταματάει, οξειδοαναγωγικά μόρια, όπως το NADH, το NADPH και η γλουταθειόνη οξειδώνονται και οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) παράγονται σε αυξημένο βαθμό [405, 406]. Αυξημένα επίπεδα ROS προκαλούν άμεσα την οξείδωση των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων, ενισχύοντας, επομένως, τη διαταραχή της  $\Delta\psi$  ως μέρος μια θετικής ανάδρασης [407]. Διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί για την PT έχουν προταθεί, αλλά φαίνεται να υπάρχει συναίνεση στο ότι σχηματίζεται ένας ονομαζόμενος πόρος μεταβολής της

διαπερατότητας (PTP, Permeability Transition Pore), αποτελούμενο από τις ANT (Adenine Nucleotide Translocator) και VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) ως βασικά συστατικά του. Η ANT είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και ως ένα διαμεμβρανικό κανάλι είναι υπεύθυνο για την εξαγωγή του ATP σε ανταλλαγή με ADP (αντιμεταφορά). Η VDAC, που ονομάζεται, ακόμη, πορίνη (porin), είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και σχηματίζει ένα μη-εκλεκτικό πόρο διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης. Τα VDAC-ANT σύμπλοκα, πιθανώς, συνδέουν την εσωτερική και την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη στις επονομαζόμενες "θέσεις επαφής", αντιστοιχώντας στη στενή σύνδεση των δύο μεμβρανών και, επομένως, συγκροτώντας, πιθανά, τον PT πόρο [408]. Αυτά τα μιτοχονδριακά γεγονότα πρέπει να διατηρούνται κάτω από τον αυστηρό έλεγχο των ρυθμιστικών μηχανισμών, οι οποίοι είναι πολλές φορές εξαρτώμενοι από μέλη της Bcl-2 οικογένειας.

Η δεύτερη ομάδα των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, ο AIF, η ενδονουκλεάση G και η CAD, απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, αλλά αυτό είναι ένα όψιμο γεγονός, που συμβαίνει μετά που ένα κύτταρο έχει καταδικαστεί να πεθάνει. Ο AIF μετατοπίζεται στον πυρήνα και προκαλεί κατακερματισμό του DNA σε κομμάτια ~ 50-300 kb και συμπύκνωση της περιφερειακής πυρηνικής χρωματίνης [409]. Αυτή η πρόιμη μορφή της πυρηνικής συμπύκνωσης αναφέρεται ως "στάδιο I (stage I)" συμπύκνωση [410]. Η ενδονουκλεάση G, επίσης, μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου διασπά την πυρηνική χρωματίνη για να παράγει ολιγονουκλεοσωμικά DNA θραύσματα [411]. Τόσο ο AIF όσο και η ενδονουκλεάση G λειτουργούν με έναν ανεξάρτητο από κασπάσες τρόπο. Η CAD απελευθερώνεται επακόλουθα από τα μιτοχόνδρια και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου μετά από διάσπαση από τη καπάση-3, οδηγεί σε ολιγονουκλεοσωμικό κατακερματισμό του DNA και σε μια πιο σαφή και προηγμένη συμπύκνωση χρωματίνης [412]. Αυτή η τελευταία και πιο σαφής συμπύκνωση χρωματίνης αναφέρεται ως "στάδιο II (stage II)" συμπύκνωση [410].

Ο έλεγχος και η ρύθμιση αυτών των αποπτωτικών μιτοχονδριακών γεγονότων συμβαίνουν μέσω μελών της Bcl-2 οικογένειας πρωτεϊνών [413]. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 έχει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της Bcl-2 οικογένειας πρωτεϊνών, παρόλο που οι ακριβείς μηχανισμοί δεν έχουν ακόμα πλήρως διευκρινιστεί [414]. Η Bcl-2 οικογένεια πρωτεϊνών ελέγχει τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και μπορεί να είναι είτε προ-αποπτωτική είτε αντι-αποπτωτική. Μέχρι σήμερα, συνολικά 25 γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί στη Bcl-2 οικογένεια. Ορισμένες από τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τις Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG και ορισμένες από τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τις Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik και Blk. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν ιδιαίτερη σημασία, αφού αυτές αποφασίζουν εάν το κύτταρο διαπράττει την απόπτωση ή ματαιώνει τη διαδικασία. Είναι η ισορροπία ανάμεσα στις πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας με αντιτιθέμενες λειτουργίες, που, στην πραγματικότητα αποφασίζουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και της Smac/Diablo από τα μιτοχόνδρια [359, 415]. Πιστεύεται ότι ο κύριος μηχανισμός δράσης της Bcl-2 οικογένειας πρωτεϊνών είναι η ρύθμιση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια μέσω μεταβολής της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Μερικοί πιθανοί μηχανισμοί έχουν μελετηθεί, αλλά κανένας δε έχει πλήρως αποδειχθεί. Μιτοχονδριακή βλάβη στο Fas μονοπάτι της απόπτωσης διαμεσολαβείται από τη διάσπαση της Bid από την κασπάση-8 [416, 417]. Αυτό είναι ένα παράδειγμα της "παρεμβολής" ανάμεσα στο μονοπάτι υποδοχέων θανάτου (εξωτερικό) και το

μιτοχονδριακό (εσωτερικό) μονοπάτι [355]. Φωσφορυλίωση σερίνης της Bad συσχετίζεται με την 14-3-3, ένα μέλος της οικογένειας των πολυλειτουργικών μορίων που συνδέονται με φωσφοσερίνες. Όταν η Bad φωσφορυλιώνεται, παγιδεύεται από την 14-3-3 και απομονώνεται στο κυτοσόλιο, αλλά αφού η Bad αποφωσφορυλιωθεί, μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια για να απελευθερωθεί το κυτόχρωμα c [418].

Η Bad μπορεί, επίσης, να ετεροδιμερίζεται μαζί με την Bcl-Xl ή την Bcl-2, ουδετεροποιώντας την προστατευτική επίδραση και προωθώντας τον κυτταρικό θάνατο [419]. Όταν δεν απομονώνονται από τη Bad, αμφότερες οι Bcl-Xl και Bcl-2 αναστέλλουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, παρόλο που ο μηχανισμός δεν έχει πλήρως κατανοηθεί. Αναφορές δείχνουν ότι η Bcl-2 και η Bcl-Xl αναστέλλουν τον αποπτωτικό θάνατο, πρωτίστως ελέγχοντας την ενεργοποίηση των κασπασών πρωτεασών [420]. Αποδεικνύεται ότι υπερέκφραση είτε της Bcl-2 είτε της Bcl-Xl υπορυθμίζει την άλλη, δείχνοντας μια αμοιβαία ρύθμιση ανάμεσα σε αυτές τις δύο πρωτεΐνες.

#### 1.8.4.4. Το μονοπάτι εκτέλεσης

Αμφότερα το εξωτερικό και το εσωτερικό μονοπάτι τελειώνουν στο σημείο της φάσης της εκτέλεσης, που θεωρείται το τελικό μονοπάτι της απόπτωσης. Είναι η ενεργοποίηση των κασπασών τελεστών, που αρχίζει αυτή τη φάση της απόπτωσης. Οι εκτελεστικές κασπάσες ενεργοποιούν την κυτταροπλασματική ενδονουκλεάση, που αποικοδομεί τα πυρηνικά υλικά, και πρωτεάσες, που αποικοδομούν πυρηνικές και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες [421]. Η κασπάση-3, η κασπάση-6 και η κασπάση-7 λειτουργούν ως κασπάσες "τελεστές ή εκτελεστές", που διασπών διάφορα υποστρώματα, που περιλαμβάνουν τις κυτοκερατίνες (cytokeratins), την PARP, την κυτταροσκελετική πρωτεΐνη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, alpha fodrin, την πυρηνική πρωτεΐνη NuMA και άλλες, και που προκαλούν, τελικά, τις μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές, που διακρίνονται στα αποπτωτικά κύτταρα [422].

Η κασπάση-3 θεωρείται η πιο σημαντική από τις κασπάσες-εκτελεστές και ενεργοποιείται από καθεμία από τις κασπάσες-εκκινητές (κασπάση-8, κασπάση-9 ή κασπάση-10). Η κασπάση-3 ενεργοποιεί ειδικά την ενδονουκλεάση G. Σε πολλαπλασιάζομενα κύτταρα, η CAD συμπλέκεται με τον αναστολέα της, ICAD. Σε αποπτωτικά κύτταρα, η ενεργοποιημένη κασπάση-3 διασπά τον ICAD για να απελευθερώσει την CAD [423]. Η CAD, στη συνέχεια, αποικοδομεί το χρωμοσωμικό DNA εντός του πυρήνα και προκαλεί συμπύκνωση της χρωματίνης. Η κασπάση-3, επίσης, επάγει κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση και διάσπαση του κυττάρου σε αποπτωτικά σωματίδια. Η γελσολίνη (gelsolin), μια πρωτεΐνη δέσμευσης της ακτίνης, έχει προσδιοριστεί ως ένα από τα βασικά υποστρώματα της ενεργοποιημένης κασπάσης-3.

Η κασπάση-3 διασπά τη γελσολίνη και τα διασπασμένα τεμάχια της γελσολίνης, με τη σειρά τους, διασπών τα νημάτια ακτίνης με ένα ασβέστιο-ανεξάρτητο τρόπο. Αυτό οδηγεί σε διαταραχή του κυτταροσκελετού, ενδοκυτταρική μεταφορά, κυτταρική διαίρεση και μεταγωγή σήματος [424].

Η φαγοκυτταρική πρόσληψη των αποπτωτικών κυττάρων είναι το τελευταίο συστατικό της απόπτωσης. Φωσφολιπιδική ασυμμετρία και εξωτερίκευση των φωσφατιδυλοσερινών στην επιφάνεια των αποπτωτικών κυττάρων, καθώς και τα θραύσματα τους είναι το χαρακτηριστικό αυτής της φάσης. Η εμφάνιση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική επιφάνεια των αποπτωτικών κυττάρων, στη συνέχεια, διευκολύνει μη φλεγμονώδη φαγοκυτταρική αναγνώριση, επιτρέποντας την

πρώιμη λήψη και απόρριψη τους [425]. Αυτή η διαδικασία πρώιμης και επιτυχούς πρόσληψης με μη απελευθέρωση των κυτταρικών συστατικών, οδηγεί απαραίτητα σε μη φλεγμονώδη απόκριση.

Η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης είναι ένας ευρέως γνωστός υποκαταστάτης αναγνώρισης για τα φαγοκύτταρα στην επιφάνεια του αποπτωτικού κυττάρου. Η Αννεξίνη V (Annexin V) είναι μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σύνδεσης της φωσφατιδυλοσερίνης, που αλληλεπιδρά ισχυρά και εξειδικευμένα με κατάλοιπα φωσφατιδυλοσερίνης και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της απόπτωσης [426, 427].

#### **1.8.4.5. Perforin/Granzyme μονοπάτι**

Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει την έκκριση του διαμεμβρανικού μορίου σχηματισμού πόρων, περφορίνη (perforin), με επακόλουθη απελευθέρωση των κυτταροπλασματικών κοκκίων διαμέσου του πόρου και εντός του κυττάρου-στόχου [428]. Οι πρωτεάσες σερίνης granzyme A και granzyme B είναι τα πιο σημαντικά συστατικά εντός των κοκκίων.

Το Granzyme B διασπά τις πρωτεΐνες στα κατάλοιπα του ασπαρτικού και ενεργοποιεί, επομένως, την προκασπάση-10 και μπορεί να διασπάσει παράγοντες, όπως ο ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase) [423]. Αναφορές έχουν, επίσης, δείξει ότι το granzyme B μπορεί να χρησιμοποιήσει το μιτοχονδριακό μονοπάτι για ενίσχυση του σήματος θανάτου από ειδική διάσπαση της Bid και επαγωγής της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c [429, 430]. Παρόλα αυτά, το granzyme B μπορεί να ενεργοποιήσει άμεσα την κασπάση-3. Με αυτόν τον τρόπο, τα ανοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια παρακάμπτονται και υπάρχει άμεση επαγωγή της εκτελεστικής φάσης της απόπτωσης.

Το Granzyme A, επίσης, είναι σημαντικό στην κυτταροτοξική επαγόμενη από τα T κύτταρα απόπτωση και ενεργοποιεί μονοπάτια ανεξάρτητα από κασπάσες. Η Granzyme A πρωτεάση διασπά το σύμπλοκο SET. Οι πρωτεΐνες, που απαρτίζουν αυτό το σύμπλοκο (SET, Ape1, pp32 και HMG2) φαίνονται να συνεργάζονται για να προστατεύσουν τη χρωματίνη και τη δομή του DNA [431]. Επομένως, απενεργοποίηση αυτού του συμπλόκου από το granzyme A πιθανότατα, επίσης, συνεισφέρει στην απόπτωση, εμποδίζοντας τη διατήρηση του DNA και την ακεραιότητα της δομής της χρωματίνης.

Η συσσώρευση της Hsp70 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων, τα καθιστά πιο ευπαθή σε ανοσολογική επίθεση. Ο υποκείμενος μηχανισμός μπορεί να περιλαμβάνει μια ενισχυμένη πρόσληψη του granzyme B μέσω της σύνδεσης του στην Hsp70 [432] και μπορεί να εξηγήσει προηγούμενες παρατηρήσεις ότι η Hsp70 ενισχύει τη CTL-διαμεσολαβούμενη θανάτωση [433], προτείνοντας μια διαφορετική δράση για την Hsp70 σε σχέση με το γνωστό αντιαποπτωτικό της ρόλο.

#### **1.8.4.6. Μονοπάτι ανεξάρτητο από κασπάσες**

Οι ROS μπορεί να είναι ο κύριος παράγοντας, που επάγει απόπτωση ανεξάρτητη από κασπάσες. Για παράδειγμα, το granzyme A μπορεί να επάγει άμεσα την αύξηση των ROS και την ανεξάρτητη από κασπάσες ζημιά των μιτοχονδρίων [434]. Ο AIF έχει βρεθεί να είναι ο κύριος ανεξάρτητος από κασπάσες

προαποπτωτικός παράγοντας, που μπορεί να απελευθερωθεί από τα μιτοχόνδρια και να μετατοπιστεί στον πυρήνα για να διασπάσει το DNA και, τελικά, αν η βλάβη του DNA δεν έχει επιδιορθωθεί από τα κύτταρα, η απόπτωση συμβαίνει.

Οι ROS μπορούν να διαμεσολαβήσουν στην ενεργοποίηση της PARP-1 και η ενεργοποίηση της PARP-1 είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση του AIF από τα μιτοχόνδρια. Η PARP-1 (Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1) είναι ένα άφθονο πυρηνικό ένζυμο των ευκαρυωτικών κυττάρων και ανήκει στην οικογένεια των PARPs. Η PARP-1 είναι μια διατηρημένη πυρηνική μεταλλοπρωτεΐνη ψευδαργύρου 113 kDa, που λειτουργεί ως αισθητήρας θηλιών στο DNA και ως σηματοδοτικό μόριο. Η PARP-1 διασπά το  $\text{NAD}^+$  σε ADP-ριβόζη και νικοτιναμίδιο [435]. Όταν ενεργοποιείται από σχάσεις στη μονή έλικα του DNA, η PARP ξεκινάει έναν κυτταρικό κύκλο, με κατανάλωση ενέργειας, μεταφέροντας μονάδες ADP-ριβόζης από το  $\text{NAD}^+$  στις πυρηνικές πρωτεΐνες. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε ταχεία εξάντληση του ενδοκυτταρικού  $\text{NAD}^+$  και των αποθεμάτων τριφωσφορικής αδενοσίνης, επιβραδύνοντας το ρυθμό της γλυκόλυσης και της μιτοχονδριακής αναπνοής και οδηγώντας, τελικά, σε κυτταρική δυσλειτουργία και θάνατο [436]. Εκτός από το ρόλο της στην ανίχνευση DNA βλαβών και την επιδιόρθωση μονής αλυσίδας βλαβών, μέσω του μηχανισμού αποκοπής βάσεων [437], η PARP-1 μπορεί να δράσει και κατά τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσα από διάφορους επιγενετικούς μηχανισμούς, όπως ο έλεγχος της συμπύκνωσης της χρωματίνης, η μεθυλίωση του DNA και η ρύθμιση μεταγραφικών καταστολέων-ενισχυτών [438, 439]. Σε διάφορες πιο πρόσφατες μελέτες, οι επαγόμενες από Dox θραύσεις του DNA και η ενεργοποίηση της PARP έχει προσδιοριστεί ως ένας σημαντικός παράγοντας στις επαγόμενες από δοξορουβικίνη καρδιακές βλάβες [440-442].

Πολλοί άλλοι υποκαταστάτες και σηματοδοτικά μόρια *in vitro* ή *in vivo* σε κύτταρα, ως αποπτωγονικοί παράγοντες, εμπλέκονται στο ανεξάρτητο από τις κασπάσες αποπτωτικό μονοπάτι, όπως η διαπερατότητα της λυσοσωμικής μεμβράνης, ορισμένες ιϊκές πρωτεΐνες, φάρμακα, p53 ογκοκατασταλτικοί παράγοντες, οι GSH και NO ή και κάποιες άλλες άγνωστες ενώσεις. Στα κύτταρα, ορισμένα συστατικά και γεγονότα, όπως οι AIF, ROS,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NAD}^+$  και ATP, όπως και η λανθασμένη αναδίπλωση και τροποποίηση πρωτεϊνών μπορούν να προκαλέσουν την ανεξάρτητη από κασπάσες απόπτωση.

Στην περίπτωση των κασπασο-ανεξάρτητων μονοπατιών, η καθεψίνη B μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο. Το ένζυμο αυτό γίνεται απαραίτητο όταν απελευθερώνεται από τα λυσοσώματα εξαιτίας της βλάβης, που προκαλείται από αποπτωγονικό ερέθισμα, όπως ο TNF ή το αντικαρκινικό φάρμακο ετοποσίδιο [443]. Η καθεψίνη B με την εξαιρετικά υψηλή (παρόλο που δεν είναι τόσο εξειδικευμένη όσο αυτή των κασπασών) πρωτεολυτική δραστηριότητα είναι ικανή να αποσταθεροποιεί κυτταρικές λειτουργίες μέσω της καταστροφής ζωτικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών δομών.

### 1.8.5. Πρωτεΐνες θερμικού σοκ και απόπτωση

Τα ζωντανά συστήματα έχουν αναπτύξει μια ποικιλία στρατηγικών για να επανορθώσουν τη ζημιά από μια ποικιλία βλαβών από εσωτερικούς και εξωτερικούς φυσικοχημικούς και βιοτικούς παράγοντες και/ή να εξαλείψουν τα ζημιωμένα/κατεστραμμένα στοιχεία. Η απόκριση θερμικού σοκ ή στρες είναι μια κυτταρική προσαρμοστική απόκριση, η οποία βοηθάει στη διατήρηση της κυτταρικής

ομοιόστασης μετά από στρες. Ανάμεσα στις πολλές αλλαγές στην κυτταρική δραστηριότητα και φυσιολογία, το πιο αξιοσημείωτο γεγονός στα στρεσαρισμένα κύτταρα είναι η παραγωγή μιας υψηλά διατηρημένης ομάδας πρωτεϊνών, των πρωτεϊνών θερμικού σοκ ή στρες πρωτεϊνών (Hsps) [444] και συγκεκριμένων μη κωδικοποιημένων RNAs [445]. Πολλές πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ παίζουν κρίσιμους ρόλους στη ρύθμιση των αποπτωτικών καταρρακτών [446-451], για να παρέχουν προστασία και να διευκολύνουν την κυτταρική ανάκαμψη μετά από έκθεση σε επιβλαβή ερεθίσματα [452-454]. Η ικανότητα τους ως μοριακοί συνοδοί στον διαχωρισμό, την αναδίπλωση και αναδιάταξη των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών αντισταθμίζει τις, κατά τα άλλα, μοιραίες συνέπειες των βλαβερών ερεθισμάτων [455, 456]. Η λειτουργία των Hsps έχει δείχτει να είναι ευρύτερη και περικλείει έναν αντι-αποπτωτικό ρόλο, που μπορεί, αλλά όχι πάντοτε, να εξαρτάται από την ικανότητα τους ως συνοδών [453, 457].

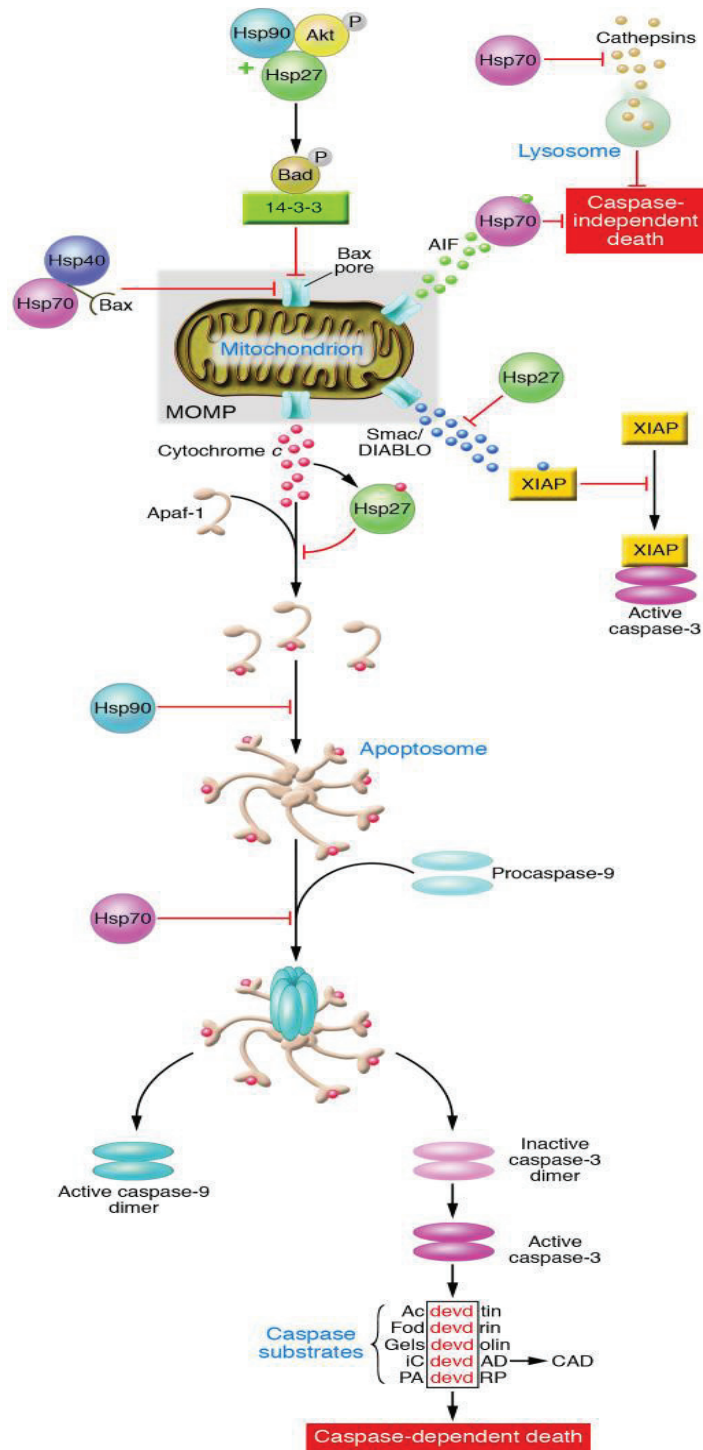
Οι Hsp27, Hsp70 και Hsp90 υποοικογένειες εμπλέκονται στην προστασία ενάντια στην απόπτωση, που επάγεται από μια ποικιλία ερεθισμάτων, που συμπεριλαμβάνουν τη χημειοθεραπευτικά επαγόμενη βλάβη του DNA, την UV ακτινοβολία [458], την επέκταση επαναλαμβανόμενης πολυγλουταμίνης [459], τις συνδέσεις των υποδοχέων θανάτου [460, 461], το θερμικό σοκ [462, 463], την έλλειψη θρεπτικών ουσιών [464], το κεραμίδιο [465], τις ενεργές μορφές οξυγόνου, στρες του ER, την αναστολή του πρωτεασώματος και τη διαταραχή του κυτταροσκελετού [449].

Υπερέκφραση των Hsp27, Hsp70 ή Hsp90 αποτρέπουν την απόπτωση, που προκαλείται από διάφορα ερεθίσματα, που συμπεριλαμβάνουν την υπερθερμία, το οξειδωτικό στρες, τη σταυροσπορίνη, τη σύνδεση του Fas/Apo-1/CD95 υποδοχέα θανάτου ή αντικαρκινικά φάρμακα [457, 466-468]. Υπορύθμιση ή αναστολή των Hsp27, Hsp70 ή Hsp90 έχει δείχτει να είναι αρκετή για να ευαισθητοποιήσει ένα κύτταρο στην απόπτωση, αποδεικνύοντας ότι τα ενδογενή επίπεδα αυτών των συνοδών φαίνονται να είναι επαρκώς υψηλά για να ελέγχουν την απόπτωση [469-471]. Είναι πλέον γνωστό ότι αυτοί οι συνοδοί μπορούν να αλληλεπιδρούν με βασικές πρωτεΐνες των αποπτωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών.

Το ενοποιητικό χαρακτηριστικό αυτών των παρατηρήσεων θεωρείται μια αναστολή της πρωτεολυτικής ωρίμανσης και/ή δραστηριότητα των κασπασών [462, 472, 473] και διάσπαση των υποστρωμάτων στόχων τους, που περιλαμβάνουν την κίνηση εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase, FAK) [474] και την PARP [462, 473].

### **1.8.5.1. HSP70 και απόπτωση**

Η Hsp70 έχει δείχτει να αναστέλλει τα αποπτωτικά μονοπάτια σε διαφορετικά επίπεδα. Σε προ-μιτοχονδριακό επίπεδο, η Hsp70 συνδέεται και εμποδίζει τη δραστηριότητα της c-Jun N-τελικής Κινάσης (JNK1) [264, 475]. Επιβεβαιώνοντας αυτό το αποτέλεσμα, έλλειψη της Hsp70 επάγει ενεργοποίηση της JNK και ενεργοποίηση της κασπάσης-3 [476] σε απόπτωση, που επάγεται από υπερωσμωτικότητα. Η Hsp70, επίσης, έχει δείχτει να συνδέεται στη μη-φωσφορυλιωμένη πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και την Akt, σταθεροποιώντας και τις δύο πρωτεΐνες [477].



**Εικόνα 1.12:** Ο αντιαποπτοτικός ρόλος της Hsp70 στο ενδογενές μονοπάτι [449].

Σε μιτοχονδριακό επίπεδο, η Hsp70 αναστέλλει τη μετατόπιση της Bax και την εισαγωγή της στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Ως συνέπεια, η Hsp70 αποτρέπει τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και του AIF [478].

Οι Hsp27 και Hsp70 μπορούν να ρυθμίσουν την Bid-εξαρτώμενη απόπτωση [479, 480]. Η εξαρτώμενη από κασπάση-8 διάσπαση της Bid και η επακόλουθη Bax/Bak-εξαρτώμενη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c ενσωματώνει το εξωτερικό



και το εσωτερικό μονοπάτι. Η Hsp70 αναστέλλει την TNF-επαγόμενη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, καταστέλλοντας τη διαμεσολαβούμενη από κασπάση-8 διάσπαση και ενεργοποίηση της Bid, ανεξάρτητα από την ικανότητα της ως συνοδού [480].

Επιπρόσθετα, η Hsp70 και η ομοσυνοδός της Hsp40, αποτρέπουν τη μετατόπιση της Bax στα μιτοχόνδρια κατά τη διάρκεια της NO-διαμεσολαβούμενης απόπτωσης, ένα γεγονός το οποίο απαιτεί τις δραστηριότητες σύνδεσης τόσο της ΑΤΡάσης όσο και του πεπτιδίου από την Hsp70 [481]. Πιο πρόσφατα δεδομένα, επίσης, εμπλέκουν ένα συνεργατικό ρόλο για την Hsp70 και της ομοσυνοδού της Hsp40 (Hdj-1) ή HSDJ (Hdj-2) στην αναστολή της μετατόπισης της Bax στα μιτοχόνδρια για να αποτραπεί η επαγόμενη από νιτρικό οξείδιο απόπτωση [481]. Αυτή η δραστηριότητα εξαρτάται από αμφότερες δράσεις συνοδού και ΑΤΡάσης της Hsp70 και απαιτεί το C-τελικό φαινυλίωση Caax μοτίβο των Hdj-1 και Hdj-2 ομοσυνοδών μορίων [481]. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι, ενώ οι Hsp πρωτεΐνες μπορούν να λειτουργούν μόνες για να αναστείλουν την απόπτωση και η συνεργατική αλληλεπίδραση με τα καθορισμένα μόρια ομοσυνοδούς τους είναι πιθανό να ενισχύουν τις αντι-αποπτωτικές τους δραστηριότητες.

Σε μετά-μιτοχονδριακό επίπεδο, η Hsp70 έχει δείχθει να συνδέεται απευθείας στον Araf-1, και αποτρέποντας, με αυτόν τον τρόπο, την ανάκτηση της προκασπάσης-9 στο αποπτώσωμα [472]. Ο Li C.Y. et al. 2000 βρήκε ότι η δραστηριότητα συνοδού της Hsp70 είναι απαραίτητη για την καταστολή της ενεργοποίησης κασπασών σε κάποιο σημείο καθοδικά της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, αλλά ανοδικά της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 [482]. Αυτό είναι σύμφωνο με διάφορες άλλες μελέτες, που έχουν σημειώσει ότι ο σχηματισμός του Araf-1 αποπτωσώματος είναι ένα πρωταρχικό ρυθμιστικό σημείο για τις αντι-αποπτωτικές επιδράσεις των διαφόρων Hsps. Η Hsp70 μπορεί να αναστέλλει το σχηματισμό ενός λειτουργικά ικανού αποπτωσώματος με απευθείας σύνδεση με τον Araf-1 για να αποτρέψει την ανάκτηση και ενεργοποίηση της εναρκτήριας κασπάσης, προκασπάσης-9 [472, 483]. Η Hsp70 μπορεί να αναστέλλει τον ολιγομερισμό του Araf-1 [483] ή διατηρεί το ολιγομερές σε μια διαμόρφωση, που είναι ασύμβατη με την ανάκτηση της προκασπάσης-9, εμποδίζοντας την έκθεση της Araf-1 CARD περιοχής [472].

Έχει προταθεί ότι η Hsp70 μπορεί να επηρεάζει την ενεργοποίηση των κασπασών -3 και -7, αφού οι διασπασμένες τους μορφές μπορούν να προσελκύουν τη συνοδό. Φαίνεται πιθανό ότι η σύνδεση της συνοδού στις κασπάσες συμβαίνει κατά την περίοδο όταν αλλάζει η διαμόρφωση τους στο πρώτο βήμα της πρωτεολυτικής τροποποίησης στην αποπτωτική διαδικασία [484].

Η Hsp70, επίσης, αποτρέπει τον κυτταρικό θάνατο σε συνθήκες, στις οποίες δεν συμβαίνει ενεργοποίηση κασπάσης [263]. Πράγματι, η Hsp70 συνδέεται στον AIF, αναστέλλει την πυρηνική μετατόπιση του και τη συμπύκνωση της χρωματίνης [485-487]. Η αλληλεπίδραση περιλαμβάνει μια περιοχή του AIF ανάμεσα στα αμινοξέα 150 και 228 [488]. Η Hsp70 έχει, ακόμη, δείχθει να συσχετίζεται με την EndoG και να αποτρέπει τον κατακερματισμό του DNA [489], αλλά, αφού, η EndoG σχηματίζει σύμπλοκα με τον AIF, η σύνδεση της με την Hsp70 μπορεί να περιλαμβάνει τον AIF σαν μοριακή γέφυρα. Ακόμη, η Hsp70, παρακωλύει, επίσης, ένα λυσοσωματικά διαμεσολαβούμενο κασπάσο-ανεξάρτητο μονοπάτι κυτταρικού θανάτου, αφού διατηρεί την ακεραιότητα της λυσοσωματικής μεμβράνης και επομένως, εμποδίζει απελευθέρωση της καθεψίνης στο κυτοσόλιο [228].

Στο επίπεδο των υποδοχέων θανάτου, η Hsp70 συνδέεται στις DR4 και DR5, αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο, την TRAIL-επαγόμενη συγκρότηση και

δραστηριότητα του DISC (Death Inducing Signaling Complex) [490]. Τελικά, η Hsp70 έχει δείξει να αναστέλλει τη διαπερατότητα της λυσοσωματικής μεμβράνης και αποτρέποντας, έτσι, την απελευθέρωση των καθεψινών και πρωτεασών, που, επίσης, εμπλέκονται στην απόπτωση [491, 492].

Είναι ενδιαφέρον ότι η περιοχή σύνδεσης του ATP της Hsp70 δεν είναι πάντοτε απαραίτητη. Για παράδειγμα, ενώ η λειτουργία ATPάσης χρειάζεται για την σύνδεση του Araf-1 [486] και του AIF [487], είναι περιττή για την JNK [462] ή GATA-1 [493] σύνδεση/προστασία.

Διάφορες μελέτες έχουν προτείνει ότι η ικανότητα της Hsp70 να καταστέλλει την απόπτωση είναι άμεση συνέπεια της ικανότητας της να ρυθμίζουν αρνητικά τα JNK σηματοδοτικά γεγονότα. Η αρνητική ρύθμιση της ενεργοποίησης της JNK από την Hsp70, και, επομένως, οι καθοδικές συνέπειες της δράσης της, συμβαίνουν ανεξάρτητα από τη δραστηριότητα της ATPάσης της [463, 494], μέσω ενός ή δύο πιθανών μηχανισμών: είτε καταστολής της άμεσης φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης της από την ανοδική κίνηση SEK [475], ή αναστολής της στρες-επαγόμενης καταστολής της JNK αποφωσφορυλίωσης [495], διατηρώντας τα επίπεδα της ανενεργής αποφωσφορυλιωμένης JNK. Και το ένα και το άλλο σενάριο οδηγεί σε φραγμό στην JNK σηματοδότηση και, ως εκ τούτου, κάτω από περιστάσεις, όπου η JNK απαιτείται για την απόπτωση, η Hsp70 βοηθάει στη διατήρηση της επιβίωσης.

Η δραστηριότητα της JNK ρυθμίζει διάφορες πρωτεΐνες, που περιλαμβάνονται στην αποπτωτική διαδικασία, παρέχοντας, επομένως, έναν αποτελεσματικό κορυφαίο στόχο για την Hsp70 στο γενικότερο πλαίσιο της αποπτωτικής ρύθμισης. Η JNK φωσφορυλιώνει τη c-Myc και την p53 [496-498], αμφότερες οι οποίες εμπλέκονται στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c [499-502]. Παρομοίως, η JNK-διαμεσολαβούμενη φωσφορυλίωση των Bcl-2 και Bcl-x<sub>L</sub>, που μπορούν να ανταγωνιστούν τις αντι-αποπτωτικές δραστηριότητες αυτών των πρωτεϊνών [503-505], μπορούν να αλλάξουν σημαντικά την ευαισθησία των κυττάρων στα επιβλαβή ερεθίσματα. Πιο πρόσφατα δεδομένα, επίσης, εμπλέκουν την JNK στην απελευθέρωση της Smac/DIABLO από τα μιτοχόνδρια [506]. Η ικανότητα της Hsp70 να διαταράσσει την JNK σηματοδότηση μπορεί να έχει αντίκτυπο σε πολλαπλά μονοπάτια στην αποπτωτική διαδικασία και μπορεί να αντιπροσωπεύει τον υποκείμενο μηχανισμό της Hsp70-διαμεσολαβούμενης καταστολής της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c [453, 462].

Η στρες-επαγόμενη Hsp70 φαίνεται πως αποτρέπει τη διάσπαση και την ενεργοποίηση της Bid σε απόκριση του TNF, και αυτή η επίδραση είναι ανεξάρτητη από την ικανότητα της ως συνοδού [480]. Αυτή η δραστηριότητα της Hsp70 μπορεί να αντανάκλα στην ικανότητα της να καταστέλλει την ενεργοποίηση της MAP κίνησης JNK, που είναι μέρος του προ-αποπτωτικού σηματοδοτικού καταρράκτη, που ρυθμίζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c [507] και της Smac [506] από τα μιτοχόνδρια. Παρόλο που η Fas-επαγόμενη απόπτωση, τυπικά, περιλαμβάνει τη FADD και την ενεργοποίηση της κασπάσης-8, ένα εναλλακτικό μονοπάτι υπάρχει. Στην περίπτωση αυτή, η ανάκτηση ενός εναλλακτικού μορίου προσαρμογέα, της Daxx, οδηγεί στην ενεργοποίηση της MAPKK κίνησης Ask-1 (Apoptosis signal-regulated kinase -1) [382] για να επάγει την ενεργοποίηση της SAPK/JNK, οδηγώντας σε απόπτωση [383]. Οι Hsp27 και Hsp70 εμφανίζονται να καταστέλλουν την απόπτωση με σύνδεση σε και αναστολή των Daxx και Ask-1, αντίστοιχα [508, 509].

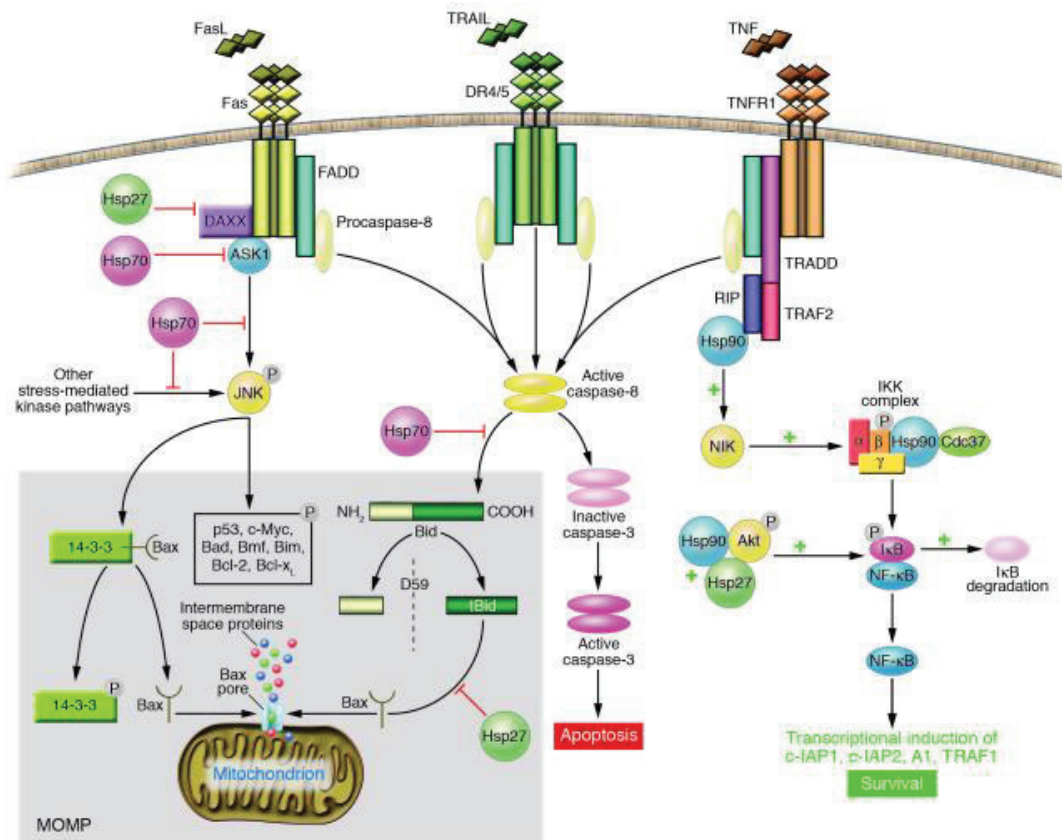
Η Hsp70 μπορεί, ακόμη, να σώσει τα κύτταρα σε μεταγενέστερη φάση της απόπτωσης σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη γνωστή πρωτεΐνη επιβίωσης, καθοδικά της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 [261]. Κατά τη διάρκεια των τελικών φάσεων της

απόπτωσης, το χρωμοσωμικό DNA πέπτεται από την DNAάση CAD (Caspase Activated DNase) μετά από την ενεργοποίηση από την κασπάση-3. Η ενζυματική δραστηριότητα και η σωστή αναδίπλωση της CAD έχει αναφερθεί να ρυθμίζεται από την Hsp70 [510]. Οι κασπάσες -3 και -7 έχουν δειχτεί να διασπούν ένζυμα υπεύθυνα για τον σχηματισμό της τυπικής αποπτωτικής μορφολογίας, που περιλαμβάνουν και τη φωσφολιπάση A2. Η Hsp70 έχει αναφερθεί να αναστέλλει την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A2 και σώζει τα κύτταρα από TNF-διαμεσολαβούμενη απόπτωση.

Ορισμένες ομάδες έχουν, επίσης, δείξει ότι οι Hsp27 και Hsp70 μπορούν, επίσης, να καταστέλλουν την TRAIL- [511] και την TNF- επαγόμενη απόπτωση σε μια ποικιλία διαφορετικών κυτταρικών τύπων [461, 512-516], παρόλο που η δραστηριότητα συνοδού της Hsp70 μπορεί να είναι περιττή για αυτή τη λειτουργία [480].

Έχει, τέλος, δειχτεί ότι οι πρωτεΐνες του NF-κΒ συμπλόκου των μεταγραφικών ρυθμιστών είναι στόχοι της Hsp70 [517].

**Συμπερασματικά, η Hsp70 είναι ένας κλασικός ρυθμιστής της απόπτωσης, που μπορεί να παρέμβει σε όλα τα κύρια αποπτωτικά μονοπάτια.**



**Εικόνα 1.13: Ο αντιαποπτωτικός ρόλος της Hsp70 στο εξωγενές μονοπάτι [449].**

### 1.8.5.2. Άλλες HSPs και απόπτωση

**Hsp90:** Οι πρωτεΐνες-‘πελάτες’ της Hsp90 περιλαμβάνουν έναν αριθμό σηματοδοτικών πρωτεϊνών, όπως οι εξαρτώμενοι από υποκαταστάτη μεταγραφικοί παράγοντες και οι κινάσες μεταγωγής σήματος, που παίζουν ένα ρόλο στην αποπτωτική διαδικασία. Κατά τη σύνδεση και την υδρόλυση του ATP, η διαμόρφωση

της Hsp90 αλλάζει και την πρωτεΐνη-‘πελάτη’, η οποία δε συνοδεύεται ακόμα, ουβικιτινοποιείται και αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα [518].

Αμφότερες οι Hsp70 και Hsp90 μπορούν να σταματήσουν την εξέλιξη της αποπτωτικής σηματοδότησης με άμεση αλληλεπίδραση με τον Araf-1, για να αποτρέψουν τον ολιγομερισμό του και/ή την συνένωση του με την προκασπάση-9 [472, 519]. Η Hsp90 και η Hsp27 έχουν, επίσης, αναφερθεί να αποτρέπουν τον ολιγομερισμό του Araf-1 με απευθείας σύνδεση τους με τον Araf-1 [519] και του κυτοχρώματος c, αντίστοιχα [520].

Η Hsp90 λειτουργεί στο μονοπάτι σερίνης/θρεονίνης -πρωτεϊνικής κινάσης Akt. Η Akt φωσφορυλιώνει διάφορες πρωτεΐνες, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης. Για παράδειγμα, φωσφορυλίωση της προ-αποπτωτικής Bcl-2 πρωτεΐνης Bad επάγει τη διάσπαση της από την Bcl-x<sub>L</sub> και επακόλουθο διαχωρισμό από τις κυτοσολικές 14-3-3 πρωτεΐνες. Αυτό αποτρέπει τη μετατόπιση της στα μιτοχόνδρια και τη συμμετοχή της στην απελευθέρωση των προ-αποπτωτικών παραγόντων [418]. Η Akt, επίσης, ρυθμίζει τους μεταγραφικούς παράγοντες, που διευθύνουν την έκφραση διάφορων κυτταρικών γονιδίων θανάτου. Η Akt-διαμεσολαβούμενη φωσφορυλίωση του FKHRL1 (forkhead) αποτρέπει τη μετατόπιση της στον πυρήνα και, επομένως, αποτρέπει την επαγόμενη έκφραση των γονιδίων στόχων της, που περιλαμβάνουν τον Fas υποκαταστάτη (FasL), την πρωτεΐνη δέσμευσης του IGF-1 [521] και ενδεχόμενα τη Bim [522]. Η AKT, επίσης, φωσφορυλιώνει τον IκB [523], προωθώντας τη NF-κB-διαμεσολαβούμενη μεταγραφή των γονιδίων, που κωδικοποιούν προ-επιβιωτικές πρωτεΐνες, που περιλαμβάνουν τους αναστολείς κασπασών C-IAP1 [524] και C-IAP2 [525] και την Bcl-2 πρωτεΐνη A1 [526].

Η Hsp90 κυρίως προάγει την κυτταρική επιβίωση μέσω της εμπλοκής της σε διάφορα βήματα του σχηματισμού του ενεργού NF-κB. Η Hsp90 είναι απαραίτητη για τη σταθερότητα της RIP, η οποία ανακτάται από τον ενεργοποιημένο TNFR-1, μετά από σύνδεση στον υποκατάστατη του, τον TNF, για παρατεταμένη δραστηριότητα του NF-κB [527, 528]. Η Hsp90 απευθείας αλληλεπιδρά και διατηρεί τη δραστηριότητα της Akt, αναστέλλοντας την αποφωσφορυλίωση της [529, 530]. Επιπρόσθετα, η Hsp90 και η ομοσυνοδός της Cdc37, βοηθούν στο σχηματισμό των ενεργών IKK ή Akt συμπλόκων, καθένα από τα οποία μπορούν να φωσφορυλιώσουν τον IκB και να προκαλέσουν, επομένως, την αποσύνδεση του NF-κB από τον αναστολέα του [528].

Διάφορες μελέτες εμπλέκουν αμφότερες τις Hsp90 και Hsp27 στη διατήρηση της δραστηριότητας της Akt, που μπορεί να συνεισφέρει στην προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης [529, 531, 532]. Η σταθερότητα και η δραστηριότητα της Akt διατηρείται όταν είναι σε σύμπλοκο με την Hsp90 και τη Cdc37 [529, 530], πιθανά μέσω της αναστολής της αποφωσφορυλίωσης της από τη φωσφατάση PP2A [529].

Εκτός από τον άμεσο ρόλο του στην προώθηση των μονοπατιών κυτταρικής επιβίωσης, το σύμπλοκο Hsp90-Akt μπορεί, επίσης, έμμεσα να προάγει την κυτταρική επιβίωση με αναστολή του JNK-διαμεσολαβούμενου κυτταρικού θανάτου μέσω της φωσφορυλίωσης και της επακόλουθης απενεργοποίησης της ASK-1, η οποία είναι ένας από τους ενεργοποιητές της JNK [533].

Hsp27: Η Hsp27 συνδέεται με το κυτόχρωμα c στο κυτοσόλιο, αναστέλλοντας, με αυτόν τον τρόπο, το σχηματισμό του συμπλόκου ενεργοποίησης της κασπάσης-3 [473, 534]. Η Hsp27 μπορεί να διαταράξει το σχηματισμό του αποπτωσώματος μέσω της αλληλεπίδρασης του και της απομόνωσης του κυτοχρώματος c, μετά από την απελευθέρωση του από τα μιτοχόνδρια [520].

Η Hsp27 μπορεί, επίσης, να αποτρέψει τη μετατόπιση της Bid στα μιτοχόνδρια, το οποίο μπορεί να συσχετίζεται με την ικανότητα της Hsp27 να σταθεροποιεί τον κυτταροσκελετό, σταθεροποιώντας τα μικρονημάτια ακτίνης [479]. Για τη σχέση μεταξύ της Hsp27-διαμεσολαβούμενης σταθεροποίησης των κυτταροσκελετικών συστατικών και της διατήρησης της κυτταρικής επιβίωσης πιστεύεται ότι απαιτείται η φωσφορυλίωση και ο ολιγομερισμός της Hsp27 [535, 536]. Αντίθετα, ο Chauhan et al. έχει συνδέσει την Hsp27 με την καταστολή της επαγόμενης από δεξαμεθαζόνη απόπτωσης σε κύτταρα μυελώματος μέσω αναστολής της Smac, αλλά όχι απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c [537].

Επίσης, διαμεσολαβεί την αναστολή της ενεργοποίησης της προκασπάσης-3, πιο πιθανά μέσω της ικανότητας της να εμποδίζει τις εναρκτήριες κασπάσες, όπως η κασπάση-9, από το να αποκτήσουν πρόσβαση στα κατάλοιπα, των οποίων η διάσπαση είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της προκασπάσης-3 [538].

Η Hsp27 μπορεί, επίσης, να παρέμβει, στην ενεργοποίηση της κασπάσης ανοδικά από τα μιτοχόνδρια [479].

Επιπρόσθετα, η Akt-διαμεσολαβούμενη φωσφορυλίωση της Hsp27 διευκολύνει μια αλληλεπίδραση ανάμεσα στις δύο αυτές πρωτεΐνες, που σταθεροποιεί την Akt, με διαχωρισμό της Hsp27, και, έτσι, προωθεί την κυτταρική επιβίωση [532].

Ο γνωστός προ-αποπτωτικός ρόλος της Hsp27, μέχρι σήμερα, είναι ότι ενισχύει την TNF-επαγόμενη απόπτωση, αναστέλλοντας την αποικοδόμηση του IκB και επομένως, εμποδίζοντας την NF-κB διαμεσολαβούμενη κυτταρική επιβίωση [539].

**Hsp60:** Η κυτοσολική Hsp60 είναι, κυρίως, αντιαποπτωτική, καθώς συνδέεται με τις προ-αποπτωτικές Bax και Bak πρωτεΐνες σε καρδιακά μυοκύτταρα αρουραίων και, έτσι, εμποδίζουν την πρόκληση του αποπτωτικού μηχανισμού [540]. Ο Shan et al 2003 βρήκε ότι η Bcl-XL, επίσης, συνδέεται με την Hsp60 σε φυσιολογικούς καρδιακούς ιστούς [541].

Σύνδεση της μιτοχονδριακής Hsp60 στην προκασπάση-3 ενισχύει την ευαισθησία της σε πρωτεάσες και, επομένως, την κάνει πιο ευπαθή στη δράση του κυτοχρώματος c και του dATP [542, 543].

### 1.8.5.3 Η Bcl-2 οικογένεια

Η Bcl-2 οικογένεια πρωτεϊνών μπορεί να προσδιοριστεί από την παρουσία διατηρημένων αλληλουχικών μοτίβων, γνωστών ως Bcl-2 ομόλογων περιοχών (BH1 έως BH4). Διακρίνονται σε τρεις ομάδες: (i) τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, στις οποίες ανήκουν οι Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, A1 και Mcl-1 και κατέχουν τέσσερις BH περιοχές (BH 1-4), (ii) τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, που ανήκουν οι Bax, Bak και Bok, οι οποίες περιέχουν τρεις BH περιοχές (BH 1-3) και (iii) τις προ-αποπτωτικές BH3-only πρωτεΐνες, που συμπεριλαμβάνουν τις Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP3 και Spike, και έχουν μόνο το βραχύ BH3 μοτίβο, μια περιοχή αλληλεπίδρασης, που είναι απαραίτητη και αποτελεσματική για τη δράση θανάτωσης [413, 544].

Η κεντρική λειτουργία των μελών της Bcl-2 οικογένειας των θηλαστικών είναι να διαφυλάσσουν τη μιτοχονδριακή ακεραιότητα και να ελέγχουν την απελευθέρωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα [413], καθώς και μέλη της Bcl-2 μπορεί άμεσα να ελέγχουν την ενεργοποίηση των κασπασών [545]. Αντίθετα, τα αντιαποπτωτικά μέλη της Bcl-2 απομονώνουν τα προαποπτωτικά μέλη

της Bcl-2, με σύνδεση στις BH3 περιοχές τους και, έτσι, τελικά, αποτρέπουν την ενεργοποίηση/ολιγομερισμό των Bax και Bak και ακολούθως, αναστέλλουν τα μιτοχονδριακά προαποπτωτικά γεγονότα. Εκτός από την πρόκληση των αντιαποπτωτικών της επιδράσεων σε μιτοχονδριακό επίπεδο με έμμεσο έλεγχο της ενεργοποίησης του αποπτωσώματος, η Bcl-2, επίσης, φαίνεται να αναστέλλει τα αποπτωτικά μονοπάτια, που είναι ανεξάρτητα από τις Araf-1/κασπάση-9, και που μπορεί να έχουν την κασπάση-7 ως κεντρικό εκτελεστή [546]. Οι ξεχωριστές BH3-μόνο πρωτεΐνες πιστεύεται ότι μεταγάγουν συγκεκριμένα σήματα θανάτου, αφού μπορούν να ενεργοποιηθούν από τη σηματοδότηση της απόπτωσης ανιχνεύοντας το κυτταρικό στρες, όπως η βλάβη του DNA (οι Noxa και Puma είναι p53-επαγόμενα γονίδια), η στέρηση αυξητικών παραγόντων (η mRNA των Hrk και Bim αυξάνεται) ή το apoikis (η Bmf ενεργοποιείται από υποκυτταρική επανεντόπιση) [547]. Γενικά, οι BH3-only πρωτεΐνες πιστεύεται ότι παρεμβαίνουν με την τελειοποιημένη ισορροπία του όμο- ή έτερο-ολιγομερισμού ανάμεσα στα προαποπτωτικά μέλη πολλαπλών περιοχών Bax/Bak και στα αντι-αποπτωτικά μέλη Bcl-2/ Bcl-X<sub>L</sub>.

Περίληπτικά, ένα ισχύον μοντέλο για το πώς τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας ρυθμίζουν την απόπτωση περιγράφεται ως εξής: ειδικά σήματα αποπτωτικού στρες προκαλούν την ενεργοποίηση συγκεκριμένων BH3-only πρωτεϊνών, οι οποίες στη συνέχεια, αλληλεπιδρούν με τα αντιαποπτωτικά μέλη της εξωτερικής μιτοχονδριακής (αλλά επίσης πυρηνικής/ER) μεμβράνης, οδηγώντας στην απελευθέρωση των παρόμοιων με τη Bax προαποπτωτικών παραγόντων. Οι παρόμοιοι με τη Bax παράγοντες υφίστανται μια διαμορφωτική αλλαγή (πιθανά υποβοηθούμενοι από κάποιες BH3-only πρωτεΐνες), εισάγονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπου προκαλούν την PT και την απελευθέρωση των αποπτωτικών παραγόντων [547].

Η ικανότητα των πολυπεριοχών (multidomain) των προαποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών Bax και Bak να επάγουν MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization) ρυθμίζεται από έναν αριθμό μηχανισμών, που περιλαμβάνουν αλλαγές στον εντοπισμό (Η Bax κανονικά εδρεύει στο κυτοσόλιο, αλλά μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια ως επακόλουθο του αποπτωτικού ερεθίσματος) και διαφοροποιήσεις στην διαμόρφωση και στην κατάσταση ολιγομερισμού τους (oligomeric status). Αυτές οι αλλαγές στην Bax και στην Bak, συνακόλουθες με την απόκτηση της ικανότητας τους για διαπερατότητα, είναι πιθανό να μεσολαβούνται μέσω των BH3-only πρωτεϊνών, π.χ. Bid, Bim, Bmf και Bad, καθένα από τα οποία είναι αντικείμενο διαφορετικής ρύθμισης, ανάλογα με τον τύπο του επιβαλλόμενου στο κύτταρο αποπτωτικού ερεθίσματος [548, 549]. Για παράδειγμα, η Bid διασπάται και ενεργοποιείται από την κασπάση-8, ακολουθώντας τη σύνδεση του υποδοχέα θανάτου [385, 550]. Η Bim [551, 552] και η Bmf [553] διαχωρίζονται δομικά στα κυττοσκελετικά τους στοιχεία και απελευθερώνονται για να ασκήσουν τις προαποπτωτικές τους δραστηριότητες μετά από μεταχείριση με φάρμακα, όπως η ταξόλη ή κυτταρική αποκόλληση (apoikis), αντιστοίχως. Και η ικανότητα της Bad να επάγει απόπτωση αποκαλύφθηκε με αλλαγές στην κατάσταση φωσφορυλίωσης της ακολουθούμενη από την απομάκρυνση κυτοκίνης [418, 554].

### 1.8.6. Ασθένειες και απόπτωση

Απορρύθμιση της αποπτωτικής σηματοδότησης μπορεί να παίζει πρωταρχικό ή δευτερεύον ρόλο σε διάφορες ασθένειες με ανεπαρκή απόπτωση οδηγώντας σε π.χ. καρκίνο (συσσώρευση κυττάρων, ανθεκτικότητα σε θεραπεία, ελαττωματική

επιτήρηση του όγκου από το ανοσοποιητικό σύστημα), αυτοανοσία (αποτυχία εξάλειψης των αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων), επίμονες λοιμώξεις (αποτυχία εξαφάνισης μολυσμένων κυττάρων), ενώ υπερβολική απόπτωση συνεισφέρει σε π.χ. νευροεκφυλισμό (ασθένεια του Alzheimer, ασθένεια του Parkinson, ασθένεια του Huntington, αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση), αυτοανοσία (ανεξέλεγκτη επαγωγή της απόπτωσης σε συγκεκριμένα όργανα), AIDS (μείωση των T λεμφοκυττάρων) και ισχαιμία (καρδιακή προσβολή, έμφραγμα του μυοκαρδίου) [555]. Δυσλειτουργία του μηχανισμού θανάτου, που είναι αποτέλεσμα από τη μετάλλαξη γονιδίων που κωδικοποιούν για παράγοντες άμεσα ή έμμεσα, που εμπλέκονται στην εκκίνηση, τη διαμεσολάβηση και την εκτέλεση της απόπτωσης, και διάφορες μεταλλάξεις στα γονίδια της απόπτωσης έχουν προσδιοριστεί ως παράγοντες πρόκλησης ή συνεισφοράς σε ανθρώπινες ασθένειες [556].

Ειδικού ενδιαφέροντος είναι η εμπλοκή των μονοπατιών ελαττωματικής απόπτωσης στο σχηματισμό του όγκου, την εξέλιξη και τη μετάσταση, όπως και στην εμφάνιση ανθεκτικότητας σε πολλαπλά φάρμακα κατά τη διάρκεια της καρκινικής θεραπείας [557]. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων αποδεικνύεται όλο και περισσότερο ότι η καρκινογένεση δεν είναι απλώς το αποτέλεσμα υπερβολικού πολλαπλασιασμού εξαιτίας της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων, αλλά στο ίδιο πλαίσιο εξαρτάται από τη –συχνά ταυτόχρονη– βλάβη των σημείων ελέγχου της απόπτωσης [558, 559]. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν ανθεκτικότητα στην απόπτωση με την έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η Bcl-2 ή με υπορύθμιση ή μετάλλαξη των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η Bax. Η έκφραση αμφοτέρων των Bcl-2 και Bax ρυθμίζεται από το p53 ογκοκατασταλτικό γονίδιο [560]. Ο κρίσιμος ρόλος της p53 είναι έκδηλος από το γεγονός ότι είναι μεταλλαγμένη σε πάνω από το 50% όλων των ανθρώπινων καρκίνων. Η p53 μπορεί να ενεργοποιήσει τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNA, όταν το DNA έχει υποστεί βλάβη, μπορεί να κρατάει τον κυτταρικό κύκλο στο G1/S σημείο ρύθμισης στην αναγνώριση της βλάβης του DNA, και μπορεί να εκκινήσει την απόπτωση εάν η βλάβη του DNA αποδειχθεί να είναι ανεπανόρθωτη [561]. Καρκινογένεση μπορεί να συμβεί εάν αυτό το σύστημα πάει στραβά. Εάν το p53 γονίδιο έχει υποστεί βλάβη, η καταστολή του όγκου μειώνεται σημαντικά. Το p53 γονίδιο μπορεί να υφίσταται βλάβη από ακτινοβολία, διάφορα χημικά και ιούς, όπως ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papillomavirus, HPV).

## 1.9. ANATOMIA ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ

Η καρδιά είναι ένα κοίλο μυώδες όργανο σχήματος ανεστραμμένης τρίγωνης πυραμίδας. Αποτελεί την κεντρική κινητήρια δύναμη της κυκλοφορίας του αίματος. Περιβάλλεται από το περικάρδιο, το οποίο τη στηρίζει σε συνδυασμό με τα μεγάλα αγγεία, που εκφύονται από αυτή και καταλαμβάνει το λεγόμενο μέσο μεσοπνευμόνιο χώρο [562].

Από ανατομικής σκοπιάς είναι ένα μονοφυές όργανο, που αποτελείται από τέσσερις κοιλότητες: δύο κόλπους (αριστερό και δεξιό) και τις αντίστοιχες κοιλίες, που χωρίζονται εξωτερικά με τις υπάρχουσες αύλακες (στεφανιαία, πρόσθια και οπίσθια επιμήκη και μεσοκολπική) και εσωτερικά από το μεσοκοιλιακό και το μεσοκοιλιακό διάφραγμα [562].

Ο κύριος ιστός της καρδιάς είναι το μυοκάρδιο, το οποίο συνδέεται με ένα ειδικό σύστημα μυικών ινών, το σύστημα αγωγής των διεγέρσεων, το οποίο αποτελεί τη μοναδική σύνδεση μεταξύ κόλπων και κοιλιών. Το μυοκάρδιο επενδύεται

εσωτερικά από το ενδοκάρδιο και εξωτερικά από το επικάρδιο. Επίσης, η καρδιά φέρει ινώδη σκελετό, ο οποίος είναι διάτρητος από τα κολποκοιλιακά και αρτηριακά στόμια [562].

Το μυοκάρδιο αποτελείται από συγκυτιώδες δίκτυο γραμμωτών μυών, διαφορετικών μορφολογικά από τους σκελετικούς μύες και διαχωρίζεται στο μυοκάρδιο των κόλπων και των κοιλιών. Μεταξύ των μυικών ινών παρεμβάλλεται συνδετικός ιστός, αιμοφόρα αγγεία και νευρικά στοιχεία του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Επιπλέον, υπάρχει το αγωγό μυοκάρδιο, που αποτελείται από ειδικά διαφοροποιημένες μυικές ίνες και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή και αγωγή των διεγέρσεων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα μυοκύτταρα της καρδιάς παρουσιάζουν ρυθμική εκπόλωση και αναπόλωση των κυτταρικών μεμβρανών τους που φέρεται από κύτταρο σε κύτταρο. Ο ρυθμός εκπόλωσης και αναπόλωσης είναι ταχύτερος στο φλεβόκομβο, ο οποίος αποτελεί και το βηματοδότη της καρδιάς [562].

Το μυοκάρδιο εμφανίζει κάποιες χαρακτηριστικές ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες: αυτοματία (αυτόχθονη παραγωγή ερεθισμάτων), αγωγιμότητα (μεταφορά ερεθισμάτων στα γειτονικά κύτταρα), διεγερσιμότητα (ικανότητα αντίδρασης σε ένα ερέθισμα) και ανερεθιστότητα (περίοδος κατά την οποία το κύτταρο δεν είναι ικανό να αντιδράσει απόλυτα ή σχετικά σε ένα ερέθισμα) [563].

Η βιολογική αποστολή του μυοκαρδίου είναι να προωθεί το αίμα προς τα περιφερικά όργανα και να το επαναφέρει στην καρδιά. Η λειτουργία αυτή μπορεί να εξεταστεί από δύο όψεις: α) την αιμοδυναμική της κυκλοφορίας που εξετάζει τη λειτουργία της καρδιάς ως αντλίας, δηλαδή τις μεταβολές των καρδιαγγειακών πιέσεων, όγκων και ροής του αίματος κατά τη διάρκεια του καρδιακού κύκλου και β) τη μηχανική λειτουργία της καρδιάς ως μύος, που περιλαμβάνει τις πολλαπλές μηχανικές μεταβολές που διέπουν τη σύσπαση και τη χάλαση του μυοκαρδίου [564].

### **1.9.1. Καρδιακή Ανεπάρκεια**

Η καρδιακή ανεπάρκεια μπορεί να οριστεί ως το κλινικό σύνδρομο που προέρχεται από την αδυναμία της καρδιάς να προμηθεύει επαρκή αιμάτωση στους περιφερικούς ιστούς κατά την ηρεμία, ή και κατά την άσκηση και συνοδεύεται από την αύξηση της διαστολικής πίεσης της αριστερής ή της δεξιάς κοιλίας. Είναι φανερό ότι στην πάθηση αυτή εμπλέκεται ένα φάσμα κυτταρικών ανωμαλιών, που προηγούνται των κλινικών συμπτωμάτων. Το πιο σταθερό εύρημα στον απομονωμένο καρδιακό μυ στην καρδιακή ανεπάρκεια είναι η έκπτωση της συσταλτικότητας, η οποία σε κυτταρικό επίπεδο προκαλείται από δομικές και βιοχημικές τροποποιήσεις, που οδηγούν με τη σειρά τους στη συστολική και διαστολική δυσλειτουργία. Συνοπτικά, οι κυτταρικές ανωμαλίες, που συνοδεύουν την καρδιακή ανεπάρκεια, περιλαμβάνουν αλλαγές στη δομική οργάνωση των μυικών κυττάρων, αλλά και στους μηχανισμούς ρύθμισης των αντλιών ιόντων ασβεστίου και τις αλληλεπιδράσεις αυτών με τις πρωτεΐνες των μυικών ινιδίων [565, 566].

Αίτια της καρδιακής ανεπάρκειας μπορεί να είναι βαλβιδοπάθειες ή συγγενείς καρδιοπάθειες. Σπανιότερα μηχανικά αίτια είναι οι καταστάσεις, που εμποδίζουν την πλήρωση των κοιλιών, όπως υπερτροφική ή περιοριστική μυοκαρδιοπάθεια. Άλλα μηχανικά αίτια μπορούν να θεωρηθούν η απότομη και μεγάλη αύξηση της αρτηριακής πίεσης, η υπερφόρτωση με υγρά που συμβαίνει κατά τη νεφρική ανεπάρκεια ή κατά την έντονη αρτηριοφλεβική επικοινωνία [566].



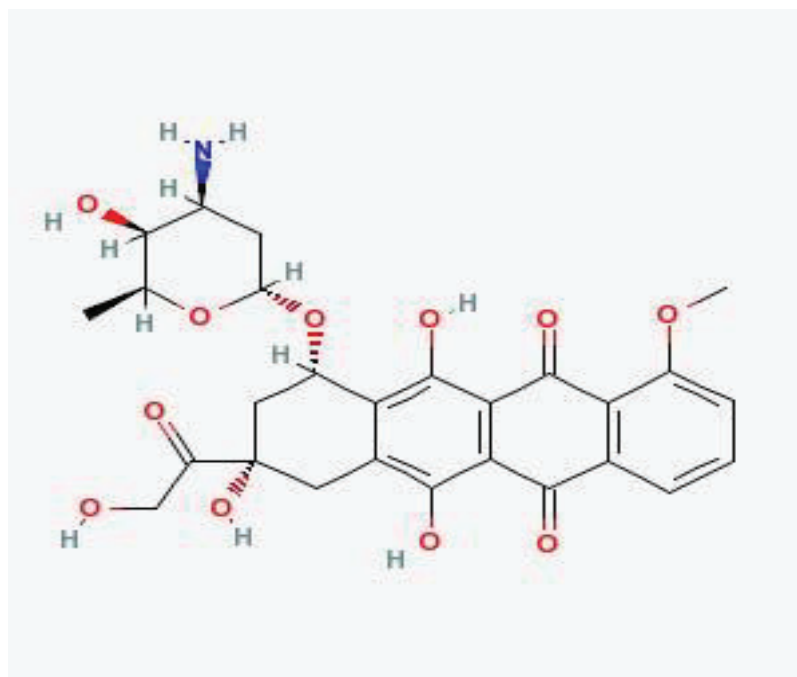
## 1.10. ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗ

Η εισαγωγή των ανθρακυκλινών (ANTs) αντινεοπλασματικών αντιβιοτικών, στη χημειοθεραπεία κακοηθών νεοπλασιών, είναι μία από τις μεγαλύτερες επιτυχίες στην ιατρική του καρκίνου. Όπως όλα τα άλλα αντικαρκινικά μέσα, παρόλα αυτά, οι ανθρακυκλίνες αποτελούν δίκοπο μαχαίρι, επειδή η χρήση τους μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στα καρκινικά κύτταρα και μπορεί να είναι τοξική για τους υγιείς ιστούς. Η δοξορουβικίνη μαζί με τη δαουνορουβικίνη, την επιρουβικίνη και την ιδαρουβικίνη ανήκει στην οικογένεια των ανθρακυκλινών. Αυτές είναι καλά καθορισμένοι και υψηλά αποτελεσματικοί αντι-νεοπλασματικοί παράγοντες, που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διάφορων ενηλίκων και παιδιατρικών καρκίνων, όπως συμπαγείς όγκους, λευχαιμία, λεμφώματα και καρκίνο του μαστού.

Η δοξορουβικίνη (Doxorubicin, DOX) ή αδριαμυκίνη (Adriamycin, ADR) είναι μια φαρμακευτική ουσία, που χρησιμοποιείται στη χημειοθεραπεία κατά του καρκίνου. Είναι ένα αντιβιοτικό ανθρακυκλίνης, που δρα παρεμβάλλοντας στο DNA [567]. Η πιο σοβαρή παρενέργεια της δοξορουβικίνης είναι η πρόκληση καρδιακής ανεπάρκειας που δύναται να απειλήσει τη ζωή του ασθενούς [568]. Η χρήση της δοξορουβικίνης είναι ευρεία, καθώς χρησιμοποιείται συχνά στη θεραπεία αιματολογικών κακοηθειών, πολλών τύπων καρκίνου και σαρκωμάτων στους μαλακούς ιστούς [567]. Η DOX παραμένει ένα σημαντικό στοιχείο πολλών σύγχρονων χημειοθεραπευτικών πρωτοκόλλων για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, σαρκωμάτων, συμπαγών όγκων παιδικής ηλικίας (π.χ. όγκος Wilm's), λευχαιμιών, ασθένειας Hodgkin's και μη-Hodgkin's λεμφωμάτων και πολλών άλλων καρκίνων [569]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η δοξορουβικίνη είναι μια ουσία φωτοευαίσθητη [570].

Η ιστορία της δοξορουβικίνης χρονολογείται στη δεκαετία του 1950, όταν μια ιταλική ερευνητική εταιρεία ξεκίνησε μια προσπάθεια ανεύρεσης ενώσεων με αντινεοπλαστικές ιδιότητες από μικροοργανισμούς του εδάφους. Απομονώθηκε έτσι ένας νέος τύπος του *Streptomyces peucetius*, ο οποίος έδινε μια ερυθρά χρώση και παρήγαγε ένα αντιβιοτικό, που είχε καλή δραστηριότητα έναντι όγκων ποντικών. Το αντιβιοτικό αυτό ονομάστηκε αρχικά δαουνομυκίνη (daunomycin, DNR). Στα 1967 βρέθηκε ότι προκαλούσε μεταξύ άλλων και θανάσιμη καρδιακή τοξικότητα [571]. Έρευνες, σύντομα, αποκάλυψαν ότι μικρές αλλαγές στη δομή της χημικής ένωσης οδηγούσαν σε μεταβολές στη βιολογική δραστηριότητα. Μια μετάλλαξη σε ένα στέλεχος του *Streptomyces* με τη χρήση N-νιτροζο-N-μέθυλο-ουρεθάνης οδήγησε στην παραγωγή ενός νέου στελέχους (*Streptomyces peucetius* var. *cesius*), που παρήγαγε μια 14-υδρόξυλο παραλλαγή του ερυθρόχρωου αντιβιοτικού, το οποίο ονομάστηκε αρχικά αδριαμυκίνη [572] και αργότερα δοξορουβικίνη. Η δοξορουβικίνη επέδειξε καλύτερη δραστηριότητα κατά των όγκων σε ποντίκια και ιδιαίτερα σε συμπαγείς όγκους, ενώ εμφανίζει υψηλότερο θεραπευτικό δείκτη σε σχέση με άλλες ανθρακυκλίνες. Όσον αφορά τη δομή της, η DOX είναι μια αγλυκόνη, που αποτελείται από έναν τετρακυκλικό δακτύλιο με γειτονικές ομάδες κίνησης-υδροκινόνης στους C-B δακτυλίους, ένα μεθοξυ-υποκαταστάτη στο C-4 του δακτυλίου D και μια μικρή πλευρική αλυσίδα στο C-9 με ένα καρβονύλιο στο C-13. Ένα 3-αμινο-2,3,6-τριδεοξυ-L-φουκοσυλο (daunosamine) τμήμα προσδένεται με γλυκοσιδικό δεσμό στο C-7 του δακτυλίου A. Οι δομές της DOX και της DNR είναι αρκετά όμοιες. Η μόνη τους διαφορά είναι ότι η πλευρική αλυσίδα της DOX ολοκληρώνεται με μια πρωτοταγή αλκοόλη, ενώ αυτή της DNR ολοκληρώνεται με μια μεθυλομάδα. Όμως, αυτή η ελάχιστη διαφορά έχει μεγάλη επίδραση στο φάσμα

των δραστηριοτήτων των DNR και DOX, καθώς η πρώτη έχει δράση ειδικά σε οξείες λεμφοβλαστικές και μυελοβλαστικές λευχαιμίες. Οι μεταβολίτες της DOX περιλαμβάνουν μια αλκοόλη, που παράγεται μέσω αναγωγής καρβονυλίου και διαφόρων παραγώγων αγλυκόνης.



**Εικόνα 1.14:** Δομή της δοξορουβικίνης.

Οι οξείες παρενέργειες της χρήσης δοξορουβικίνης περιλαμβάνουν ναυτία, εμέτους και καρδιακές αρρυθμίες. Μπορεί, επίσης, να προκαλέσει ουδετεροπενία, όπως και πλήρη αλωπεκία. Έχει προταθεί ότι η προκαλούμενη από χημειοθεραπεία αλωπεκία είναι αποτέλεσμα της επαγόμενης από ανθρακυκλίνες απόπτωσης των κυττάρων του θυλακίου των τριχών [573]. Μια πιο ήπια παρενέργεια αφορά τη χρώση των ούρων, τα οποία λαμβάνουν μια ήπια ερυθρά χρώση έως και 48 ώρες μετά τη χορήγηση, μέχρι την πλήρη αποικοδόμηση του φαρμάκου από τον οργανισμό. Παρ' όλα αυτά, ενώ σε αρχικά στάδια δεν εμφανίζει παρενέργειες στη λειτουργία της καρδιάς, η καρδιοτοξικότητα εμφανίζεται αργότερα, έως και δέκα χρόνια, ως παράπλευρη παρενέργεια [574]. Εάν η συνολική δόση δοξορουβικίνης ανέλθει στα 550 mg/m<sup>2</sup>, αυξάνεται δραματικά ο κίνδυνος ανάπτυξης παρενεργειών στην καρδιά, όπως χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, διατακτική μυοκαρδιοπάθεια, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια [575] και τελικά θάνατο [576]. Η καρδιοτοξικότητα της δοξορουβικίνης χαρακτηρίζεται από μια δοσο-εξαρτώμενη ελάττωση της μιτοχονδριακής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Οι ROS, που γεννώνται από την αλληλεπίδραση της δοξορουβικίνης με το σίδηρο, μπορούν να βλάψουν τα μυοκαρδιοκύτταρα, προκαλώντας απώλεια των μυικών ινών και τη δημιουργία κυτταροπλασματικών κενотоπίων [577].

Η πιο σημαντική παρενέργεια της δοξορουβικίνης είναι η καρδιοτοξικότητα. Η έναρξή της μπορεί να καθυστερήσει μέχρι και 15 χρόνια μετά την παύση της χημειοθεραπείας. Οι διαφορές στο χρόνο έναρξης της μυοκαρδιοπάθειας μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης υποδεικνύουν την ύπαρξη διαφόρων μηχανισμών. Η μυοκαρδιοπάθεια αυτή συνδέεται ισχυρά με το καρδιακό οξειδωτικό στρες, όπως φανερώνει η ύπαρξη επαγόμενων από ROS βλαβών. Αξίζει να αναφερθεί ότι η

δοξορουβικίνη δεν επηρεάζει μόνο το μυοκάρδιο, αλλά και το ενδοκάρδιο (ενδοθηλιακός ιστός).

Η οξεία καρδιοτοξικότητα ξεκινάει εντός 24 ωρών από την έγχυση και περιλαμβάνει ηχοκαρδιογραφικές ανωμαλίες, όπως μη ειδικές ST-T αλλαγές, μειωμένο QRS δυναμικό, ισοπέδωση του T-κύματος, φλεβοκομβική ταχυκαρδία, πρόωρα υπερκοιλιακά και κοιλιακά συμπλέγματα, υπερκοιλιακές αρρυθμίες, παράταση του QT διαστήματος και σπανίως, οξεία ισχαιμία του μυοκαρδίου. Παρόλα αυτά, η πρόγνωση είναι αρκετά καλή σε αυτό το στάδιο. Αυτές οι ηλεκτροκαρδιογραφικές αλλαγές σχετίζονται, συνήθως, με λίγα συμπτώματα, αλλά μπορεί και να είναι τελείως ασυμπτωματικές, και συνήθως υποχωρούν αυτόματα μέσα σε μερικές ώρες ή εβδομάδες μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας στους περισσότερους ασθενείς. Ενδομυοκαρδιακός ιστός από τη δεξιά κοιλία δείχνει τυπικές ιστοπαθολογικές αλλαγές, που περιλαμβάνουν σχηματισμό κενοτοπίων στο κυτταρόπλασμα, ενώ με ηλεκτρονική μικροσκοπία, τα συνήθη ευρήματα είναι απώλεια μυϊκών ινιδίων και έκταση του σαρκοπλασματικού δικτύου και των T-σωληναρίων. Οξεία επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητα συμβαίνει σε ποσοστό έως 40% του πληθυσμού των ασθενών.

Η υποξεία καρδιοτοξικότητα είναι μάλλον σπάνια, εμφανίζεται μερικές εβδομάδες ή μήνες (έως 30 μήνες) μετά την τελευταία δόση της ανθρακυκλίνης και η πιο συχνή εκδήλωση της είναι η μυοκαρδίτιδα ή η περικαρδίτιδα [578, 579]. Μικροσκοπικά, φαίνεται σοβαρό διάμεσο οίδημα του μυοκαρδίου με κυτταρικό διήθημα.

Η χρόνια μορφή δεν γίνεται εμφανής μέχρι 4 έως 20 έτη μετά την τελευταία χορήγηση της δοξορουβικίνης, και σχετίζεται με προοδευτική δυσλειτουργία του μυοκαρδίου. Έχει δείχτει ότι ο βαθμός θνησιμότητας είναι 50 % μετά τα πενήντα χρόνια [580]. Σποραδική, αυθόρμητη αναστροφή της σοβαρής δυσλειτουργίας της αριστεράς κοιλίας (LV) έχει αναφερθεί, συνήθως μετά από μια οξεία εμφάνιση των συμπτωμάτων [581, 582]. Η πρόωρης έναρξης, χρόνια, προοδευτική καρδιοτοξικότητα συμβαίνει, συνήθως, μέσα σε ένα χρόνο από τη θεραπεία, που εμμένει ή εξελίσσεται ακόμη και μετά τη διακοπή της θεραπείας με ανθρακυκλίνη, οδηγώντας σε χρόνια διατακτική μυοκαρδιοπάθεια σε ενήλικους ασθενείς και σε περιοριστική μυοκαρδιοπάθεια σε παιδιατρικούς ασθενείς [583, 584]. Εάν η θεραπεία με DOX συνεχιστεί μετά την εκκίνηση της υποκλινικής δυσλειτουργίας της αριστερής κοιλίας, συμβαίνει μία ταχεία μείωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας και καρδιακή ανεπάρκεια [585]. Από την άλλη μεριά, η όψιμης έναρξης προοδευτική καρδιοτοξικότητα, οδηγεί σε κοιλιακή δυσλειτουργία, καρδιακή ανεπάρκεια και αρρυθμίες, χρόνια ή ακόμη και δεκαετίες μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας [584, 586].

Προτεινόμενοι μηχανισμοί για να εξηγήσουν την καθυστερημένη DOX καρδιοτοξικότητα κυμαίνονται από την προοδευτική εξασθένηση των μηχανισμών χειρισμού ασβεστίου του σαρκοπλασματικού δικτύου, που παρατηρείται 13 με 18 εβδομάδες μετά τον τερματισμό της θεραπείας [587], ως τις βλάβες του DNA, που προέρχονται από τις ελεύθερες ρίζες [588], όπως και οι επαγόμενες από DOX οξειδωτικές βλάβες στο mtDNA. Άλλη μία πιθανή εξήγηση μπορεί να περιλαμβάνει την επιλεκτική απομάκρυνση των προγονικών κυττάρων σε νεαρούς ασθενείς [589], η οποία θα περιορίσει αργότερα την ήδη περιορισμένη αναγεννητική ικανότητα της καρδιάς.

### 1.10.1. Μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης της δοξορουβικίνης

Ο μηχανισμός δράσης της δοξορουβικίνης αφορά την παρεμβολή της στο DNA και την παρεμπόδιση της μακρομοριακής του βιοσύνθεσης, που οδηγεί στην αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Η δοξορουβικίνη έχει αναφερθεί ότι αλληλεπιδρά απευθείας με την κυτταρική μεμβράνη και παρεμποδίζει τη δράση της DNA ελικάσης στο ξεδίπλωμα του DNA κατά την αντιγραφή. Ένας από τους κύριους στόχους της δοξορουβικίνης είναι το ένζυμο τοποϊσομεράση II. Η σταθεροποίηση του συμπλόκου της τοποϊσομεράσης II με το DNA παρεμποδίζει την επανασυγκόλληση της διπλής έλικας, σταματώντας την αντιγραφή και οδηγεί σε σχάσεις στο DNA, που σχετίζονται με πρωτεΐνες [590].

Οι κύριοι μηχανισμοί, που έχουν προταθεί για τις αντικαρκινικές επιδράσεις της DOX περιλαμβάνουν:

(1) Παρεμβολή της DOX στο DNA, οδηγώντας σε αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης και της αντιγραφής του DNA,

(2) Παραγωγή των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), οδηγώντας σε καταστροφή του DNA και/ή λιπιδική υπεροξειδωση,

(3) Διασταυρούμενη σύνδεση DNA, δέσμευση και αλκυλίωση,

(4) Παρέμβαση με ξετύλιγμα του DNA ή διαχωρισμό των αλυσίδων του DNA και δραστηριότητα ελικάσης,

(5) Άμεση επίδραση στη μεμβράνη με διαταραχή της δομής διπλοστοιβάδας

(6) Εκκίνηση της καταστροφής του DNA μέσω αναστολής της τοποϊσομεράσης II [591, 592] και

(7) Επαγωγή της απόπτωσης σε απόκριση της αναστολής της τοποϊσομεράσης II [593, 594].

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η αντικαρκινική δραστηριότητα των ANTs οφειλόταν στην ικανότητα τους να παρεμβαίνουν στην αντιγραφή του DNA, αλλά φαίνεται απίθανο ότι αυτός ο μηχανισμός συμμετέχει στην καρδιοτοξικότητα, δεδομένου ότι τα τελικά διαφοροποιημένα καρδιακά κύτταρα δεν διαιρούνται και άλλα φάρμακα, που βλάπτουν το DNA, δεν είναι καρδιοτοξικά. Επομένως, η υπόθεση ότι η επαγόμενη από ROS ANT καρδιοτοξικότητα μπορεί να αποτραπεί χωρίς να διακυβεύεται η αντικαρκινική δράση, παρουσιάστηκε το 1977 στο περιοδικό Science [595]. Αυτό εγείρει ελπίδες ότι πρωτόκολλα χορήγησης μπορούν να σχεδιαστούν ώστε, να προστατεύουν την καρδιά χωρίς την ελάττωση της αντικαρκινικής δραστηριότητας του φαρμάκου.

### 1.10.2. Επαγόμενες από DOX καρδιακές δομικές αλλαγές

Η καρδιοτοξικότητα εκδηλώνεται με δόσο-εξαρτώμενη μυοκαρδιοπάθεια και ανίατη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. Όπως και με άλλες μορφές διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας, οι καρδιές, που επηρεάζονται από την καρδιοτοξικότητα της DOX, διογκώνονται με διαστολή όλων των κοιλοτήτων, και τοιχωματικοί θρόμβοι διακρίνονται συχνά σε αμφοτέρες τις κοιλίες. Σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, η καρδιοτοξικότητα της DOX συσχετίζεται με υπερδομικές παθολογικές αλλαγές, που περιλαμβάνουν το σχηματισμό κενотоπιών στο κυτταρόπλασμα, διάταξη των T-σωληνίσκων και του σαρκοπλασματικού/ενδοπλασματικού δικτύου, αποδιοργάνωση και απώλεια των μυοϊνιδίων, μιτοχονδριακές αλλαγές, που περιλαμβάνουν διόγκωση [596-599] και διαταραχή ακρολοφιών [600], αυξημένο αριθμό λυσοσωμάτων [594], και, συσσώρευση της χρωματίνης και συρρίκνωση του πυρήνα μαζί με διαχωρισμό

των κοκκιωδών και ινιδικών συστατικών [601], την απώλεια (σαρκοπενία) των καρδιομυοκυττάρων, καθώς και την απόπτωση [594, 602]. Η DOX διαταράσσει τον κυτταρικό κυτταροσκελετό και τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων, όπως παρατηρείται από τη μειωμένη έκφραση της α-ακτίνης, των ελαφριών και βαριών αλυσίδων μυοσίνης, της τροπομυοσίνης, της τροπονίνης I, της τροπονίνης C και της δεσμίνης [580, 593, 601, 603]. Η θεραπεία με DOX, επίσης, επηρεάζει τις πρωτεΐνες προσκόλλησης, όπως η έκφραση των γονιδίων των μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας MMP-2/MMP-9 [604], οδηγώντας στην αποκόλληση των κυττάρων [605].

Ένα εύλογο ερώτημα είναι γιατί η καρδιά είναι τόσο πολύ πιο ευπαθής σε σχέση με τους άλλους ιστούς στο οξειδωτικό στρες, που παράγεται από τις ANTs. Διάφορες απαντήσεις έχουν προταθεί. Οι ANTs έχουν δείξει να συγκρατούνται εντός των καρδιομυοκυττάρων περισσότερο σε σχέση με τους άλλους τύπους κυττάρων [606]. Έχει προταθεί ότι ο καρδιακός ιστός έχει ασθενή αντιοξειδωτική δραστηριότητα, αφού στερείται καταλάσης [607]. Επιπλέον, μία ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η DOX υπορυθμίζει επιλεκτικά την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης [568], ενώ η DOX μειώνει την κυτοσολική Cu-Zn υπεροξειδική δισμουτάση [608], προτείνοντας ότι τα καρδιομυοκύτταρα εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου. Επιπρόσθετα, τα καρδιομυοκύτταρα είναι πλούσια σε μιτοχόνδρια (μεγάλη πυκνότητα/όγκος μιτοχονδρίων), που αντιπροσωπεύουν περίπου το 50% της μάζας των καρδιομυοκυττάρων και υπηρετούν τόσο ως πηγή όσο και ως στόχος των ROS [577, 598, 609]. Η καρδιά, επίσης, είναι ιδιαίτερα ευπαθής στην επαγόμενη από DOX οξειδωτική βλάβη, εξαιτίας του αυξημένου ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου. Επιπλέον, ένας σημαντικός ρόλος έχει αποδοθεί στην εξωγενή NADH αφυδρογονάση. Σε αντίθεση με τα μιτοχόνδρια της καρδιάς, τα μιτοχόνδρια του ήπατος στερούνται του σχετικού με τη NADH μονοπατιού αναγωγικών ισοδυνάμων από το κυτοσόλιο στην αναπνευστική αλυσίδα. Ως αποτέλεσμα, τα μιτοχόνδρια του ήπατος δεν παράγουν σημαντικά ποσά των ANT ημικινονών [610]. Τελικά, οι ANTs πιστεύεται ότι εισέρχονται στα μιτοχόνδρια και αναστέλλουν την αναπνευστική αλυσίδα, με σύνδεση στην καρδιολιπίνη, που είναι ένα ειδικό για την καρδιά φωσφολιπίδιο, το οποίο είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η καρδιολιπίνη έχει υψηλή συγγένεια για τις ANTs [611]. Τέλος, ο καρδιακός ιστός έχει μια σχετικά χαμηλή έκφραση των ενζύμων του κυτοχρώματος 450, προτείνοντας μια πολύ μικρότερη συνεισφορά του κύκλου οξειδοαναγωγής της ενδοκυτταρικής DOX και της παραγωγής ROS από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Παρόλα αυτά, η DOX κατανέμεται ευρέως σε όλο το σώμα μετά τη χορήγηση της σε ποντίκια, καθώς η παρουσία του φαρμάκου σημειώνεται στα περισσότερα όργανα [612].

Ένας αριθμός παραγόντων κινδύνου συνεισφέρει στην επαγόμενη από DOX καρδιοτοξικότητα, που περιλαμβάνουν τη συνολική σωρευτική δόση, τη συνολική δόση, που χορηγήθηκε κατά τη διάρκεια μιας ημέρας ή μιας διαδικασίας (πορείας) της θεραπείας, ο ρυθμός και το χρονοδιάγραμμα χορήγησης, η μεσοθωρακική ακτινοθεραπεία, η ηλικία, το φύλο, η ταυτόχρονη χορήγηση καρδιοτοξικών φαρμάκων, συνδυασμένη θεραπεία, η προγενέστερη χημειοθεραπεία με ανθρακυκλίνες, το ιστορικό προϋπαρχόντων καρδιαγγειακών διαταραχών, η υπέρταση, ηπατική ασθένεια και οι ηλεκτρολυτικές διαταραχές, όπως η υποκαλιαιμία και η υπομαγνησιαμία [586, 613-615]. Επιπλέον, χρόνιες καταστάσεις, όπως η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, ηπατική ασθένεια, και προηγούμενη καρδιακή ασθένεια μπορούν, επίσης, να συνεισφέρουν σε αυξημένο κίνδυνο καρδιοτοξικότητας [616]. Ενώ η πιθανότητα ανάπτυξης μυοκαρδιοπάθειας είναι σε μεγάλο βαθμό δοσο-

εξαρτώμενη [617], η καρδιοτοξικότητα μπορεί να συμβαίνει σε χαμηλές δόσεις εξαιτίας αυξημένης ατομικής ευαισθησίας [585].

Η διαφορά στο φύλο έχει αναφερθεί ως ένας από τους παράγοντες κινδύνου στις τοξικές επιδράσεις της δοξορουβικίνης. Ο Lipshultz S.E. et al. 1995 ανέφερε ότι τα θηλυκά εμφανίζουν πιο σοβαρή καρδιοτοξικότητα με περισσότερο μειωμένη συσταλτικότητα [614]. Ένας άλλος παράγοντας κινδύνου είναι η ηλικία, για παράδειγμα, ηλικιωμένοι ηλικίας άνω των 65 ετών και παιδιά ηλικίας κάτω από 4 ετών βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο [616, 618, 619] για επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητα. Συγκεκριμένα στα παιδιά, ο λόγος μπορεί να σχετίζεται με ειδικές επιδράσεις σε πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα στις καρδιές μεταγεννητικά, διαταράσσοντας την ικανότητα τους να διαφοροποιούνται σε λειτουργικά καρδιομυοκύτταρα. Ομοίως με άλλα αδιαφοροποίητα κύτταρα, τα καρδιακά βλαστοκύτταρα μπορούν να είναι πιο ευαίσθητα στη DOX και η απώλεια τους μπορεί να περιορίσει την αναγεννητική ικανότητα της καρδιάς [589]. Η ηλικία, επίσης, συσχετίζεται σε υψηλό βαθμό με την κάθαρση του φαρμάκου, η οποία είναι μειωμένη στον ιστό της καρδιάς των ηλικιωμένων ασθενών και μπορεί να συνεισφέρει στην επαγόμενη από DOX καρδιοτοξικότητα [620]. Η σχετιζόμενη με την ηλικία DOX καρδιοτοξικότητα αποδίδεται, ακόμη, στη μείωση της περιφερειακής ροής του αίματος, με την ηλικία, που μπορεί να είναι υπεύθυνη για τις αλλαγμένες συγκεντρώσεις της DOX στην πορεία του χρόνου στο πλάσμα και τον καρδιακό ιστό [620].

### 1.10.3. Μηχανισμός δράσης

Η επαγόμενη από ανθρακυκλίνες καρδιοτοξικότητα φαίνεται να είναι μια πολλαπλών σταδίων κατάσταση, με διάφορα μονοπάτια να εμπλέκονται. Τα μονοπάτια αυτά δεν είναι απαραίτητα ανεξάρτητα το ένα από το άλλο ή αποκλειστικά, καθώς καθένα από αυτά παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση καρδιοτοξικότητας μέσω διαφορετικών μηχανισμών, είτε από μόνα τους ή σε συνεργασία με άλλα μονοπάτια.

Η επαγόμενη από DOX καρδιοτοξικότητα έχει αποδοθεί σε μια σειρά από αιτίες, που περιλαμβάνουν αυξημένο οξειδωτικό στρες, άμεση αναστολή βασικών μεταφορέων, που εμπλέκονται στην ομοιόσταση των ιόντων (όπως η  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ΑΤΡάση και η  $\text{Ca}^{2+}$  ΑΤΡάση), που οδηγεί σε μεταβολές στην ομοιόσταση του κυτταρικού ασβεστίου, αυξημένη συσσώρευση του κυτοσολικού σιδήρου, μιτοχονδριακή βλάβη, αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών, απελευθέρωση αγγειοδραστικών αμινών, αλλαγές στην αδρενεργική λειτουργία, λυσοσωμικές μεταβολές και απόπτωση [596, 621, 622].

Ο μακρύς κατάλογος των μηχανισμών, που έχουν προταθεί να εξηγήσουν την ανάπτυξη της επαγόμενης από DOX μυοκαρδιοπάθειας, δείχνει ότι η αιτία είναι πιθανώς, πολυπαραγοντική και πολυσύνθετη, αλλά οι περισσότερες από τις μεταβολές αυτές μπορούν να αποδοθούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου, στη μιτοχονδριακή και βιοενεργειακή βλάβη, οι οποίες μπορούν, τελικά, να αναπτυχθούν σε απόπτωση [596]. Εναλλακτικά, η DOX μπορεί να αλληλεπιδρά απευθείας με τα ζεύγη βάσεων του DNA για να παρεμβαίνει στην αντιγραφή του DNA [623, 624] και αναστολή της DNA τοποϊσομεράσης II από τη DOX αναστέλλει την αντιγραφή του DNA [625], ενώ ο σχηματισμός ενός συμπλόκου DOX-τοποϊσομεράση II-DNA αποτρέπει την επιδιόρθωση των σπασμένων αλυσίδων του

DNA [626]. Αποδεικνύεται ότι η δοξορουβικίνη, επίσης, επεμβαίνει τόσο με πυρηνική όσο και με μιτοχονδριακή μεταγραφική ρύθμιση [627].

### 1.10.3.1. Οξειδωτικό στρες

Το επαγόμενο από δοξορουβικίνη οξειδωτικό στρες μπορεί να εξηγηθεί από τη χημική της δομή, που είναι ικανή να παράγει ROS. Τα οργανίδια στόχοι της καρδιοτοξικότητας της DOX είναι τα μιτοχόνδρια, εντός των οποίων συσσωρεύεται η DOX [628, 629]. Η ενδοκυτταρική, και επομένως, η ενδομιτοχονδριακή συγκέντρωση της DOX είναι, σχεδόν, δύο τάξεις μεγέθους υψηλότερη της εξωκυτταρικής συγκέντρωσης σε καλλιέργεια. Μιτοχονδριακά ένζυμα (π.χ. η NADH αφυδρογονάση) δρουν στη DOX έτσι ώστε ο δακτύλιος κινόνης να υφίσταται κύκλους οξειδοαναγωγής ανάμεσα σε καταστάσεις κινόνης και ημικινόνης. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα ηλεκτρόνια, που παράγονται, συλλαμβάνονται από οξειδωτικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του οξυγόνου, που στη συνέχεια ξεκινάει μια αλυσιδωτή αντίδραση, οδηγώντας στην παραγωγή ROS [630]. Αυτή η ρίζα ημικινόνης μπορεί ταχέως να αυτοοξειδώνεται, χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο ως έναν αποδέκτη ηλεκτρονίων, επιστρέφοντας προς τη μητρική ένωση χωρίς καθαρό μεταβολισμό του φαρμάκου. Το σενάριο αυτό επιτρέπει την έναρξη ενός ανώφελου κύκλου οξειδοαναγωγής, οδηγώντας σε μια ουσιώδη αύξηση σε σχηματισμό υπεροξειδίου κάτω από αερόβιες συνθήκες [631]. Η εκκίνηση των ROS αναμένεται να επηρεάζει, κατά προτίμηση, πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα κ.α. σε κοντινή απόσταση από τη θέση παραγωγής, καθιστώντας τον πυρήνα, το ER και τα μιτοχόνδρια προτιμητέους στόχους του επαγόμενου από DOX οξειδωτικού στρες. Η αναγωγή του κυτοχρώματος P-450 και η οξειδάση της ξανθίνης έχουν, επίσης, βρεθεί να καταλύουν την αναγωγή της ανθρακινόνης σε ελεύθερες ρίζες ημικινόνης [632, 633]. Επιπλέον, τα καρδιομυοκύτταρα εκφράζουν μόνο χαμηλά επίπεδα καταλάσης, και η εξαρτώμενη από σελήνιο GSH-υπεροξειδάση-1 απενεργοποιείται εύκολα κατά την έκθεση σε DOX [568, 634], πράγμα το οποίο μειώνει τα επίπεδα και τη δραστηριότητα της κυτοσολικής CuZn δισμουτάσης του υπεροξειδίου, προτείνοντας ότι μειώσεις στα επίπεδα διαφορετικών αντιοξειδωτικών ενζύμων αντιπροσωπεύουν μια κοινή απόκριση στη μεταχείριση με DOX [608]. Παρομοίως, η DOX έχει, επίσης, δείχτει, να καταστέλλει τα επίπεδα μιας ποικιλίας αντιοξειδωτικών, που συνεισφέρει, περαιτέρω, στο οξειδωτικό στρες [634, 635].

Καθώς ο καρδιακός ιστός έχει υψηλό αριθμό μιτοχονδρίων ανά κύτταρο, συγκρινόμενος με άλλους ιστούς, θεωρείται ότι το κύριο ένζυμο, που εμπλέκεται στην οξειδοαναγωγή της DOX είναι το σύμπλοκο I (NADH: οξειδοαναγωγή ουβικινόνης) [636]. Συγκεκριμένα, η DOX ανάγεται από το σύμπλοκο I, σχηματίζοντας μια ιδιαίτερα δραστική ημικινόνη, εκκινώντας έναν κύκλο οξειδοαναγωγής μετά από αντίδραση με οξυγόνο και απελευθερώνοντας ROS στη διαδικασία [637]. Οι ROS οδηγούν σε παθολογικές αλλαγές των λιπιδίων, των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων και των βιομορίων, και μπορούν, επίσης, να υπηρετούν ως σηματοδοτικά μόρια. Η αναγωγή ενός ηλεκτρονίου του δακτυλίου C της ANT τετρακυκλίνης οδηγεί στο σχηματισμό μιας ελεύθερης ρίζας ημικινόνης. Η ρίζα αυτή είναι σχετικά σταθερή σε ανοξικό περιβάλλον, αλλά κάτω από νορμοξικές συνθήκες, το μονήρες ηλεκτρόνιο του δίνεται στο οξυγόνο, σχηματίζοντας ρίζες υπεροξειδίου. Κατάλληλες φλαβοπρωτεΐνες, όπως το σύμπλοκο I, καταλύουν το σχηματισμό ανηγμένων ριζών ημικινόνης, αποδεχόμενες τα ηλεκτρόνια από το NADH ή το NADPH και δίνοντας τα στην ANT. Αυτή η αλληλουχία των αντιδράσεων, γνωστή και ως "κύκλος οξειδοαναγωγής", μπορεί να είναι ιδιαίτερα

επιζήμια, επειδή σχετικά ένα μικρό ποσό της ANT είναι επαρκές για το σχηματισμό πολυάριθμων ριζών υπεροξειδίου [638]. Ο κύκλος οξειδοαναγωγής των ANTs έχει περιγραφεί στο κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια και το σαρκοπλασματικό δίκτυο [639]. Οι πρώτοι στόχοι της διαμεσολαβούμενης από ANTs βλάβης των ελευθέρων ριζών για να αναγνωριστούν, καθώς και οι στόχοι, που έχουν συζητηθεί πιο πολύ, είναι διάφορες κυτταρικές μεμβράνες, οι οποίες είναι πλούσιες σε λιπίδια, επιρρεπή σε υπεροξείδωση. Αυτή η βλάβη των ριζών οδηγεί στην παραγωγή πολλών σχετικά σταθερών και ιδιαίτερα τοξικών αλδευδών, όπως η μηλονοδιαλδεϋδη (MDA).

Μια κύρια υπόθεση για την τοξικότητα της DOX βασίζεται στην παραγωγή οξειδωτικού στρες μέσω αλληλεπίδρασης με σίδηρο και οξυγόνο. Με (μονοσθενές) οξειδοαναγωγικό δυναμικό των περίπου -320 mV, η DOX είναι ένα ευνοϊκό υπόστρωμα για αναγωγή από έναν αριθμό οξειδοαναγωγασών εντός του κυττάρου, που περιλαμβάνουν την εξαρτώμενη από NADPH αναγωγή του κυτοχρώματος P450 [640], τη NADH-αφυδρογονάση του μιτοχονδριακού συμπλόκου I [637, 641] και τις ανάμεικτες διαλυτές οξειδοαναγωγάσεις, που είναι παρούσες στο κυτταρόπλασμα, συμπεριλαμβανομένης της οξειδάσης της ζανθίνης [639].

Έκτος από τις ROS, οι αντιδραστικές μορφές αζώτου (RNS) εμπλέκονται, επίσης, στην ANT καρδιοτοξικότητα [642]. Η DOX μπορεί να αναχθεί από την περιοχή αναγωγής των eNOS, ενισχύοντας το σχηματισμό υπεροξειδίου [643]. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η  $K_m$  για την αναγωγή της DOX σε ελεύθερες ρίζες ημικινόνης από τις eNOS είναι 10- έως 100-φορές χαμηλότερη από αυτή που έχει αναφερθεί για την αναγωγή του κυτοχρώματος P450 και τη NADH αφυδρογονάση [643]. Μία αναφορά από τον Garner A.P. et al. 1999 έθεσε την πιθανότητα ότι οι NOS είναι τα κύρια ένζυμα, που εμπλέκονται στην καρδιοτοξικότητα της DOX [644]. Πιο πρόσφατα αναφέρθηκε ότι έκθεση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε  $H_2O_2$  προωθεί την έκφραση των eNOS [645] και η επαγόμενη από DOX απόπτωση έχει δείχτει να συνδέεται με τον ενδοκυτταρικό σχηματισμό  $H_2O_2$  [645, 646].

Ο ρόλος των επαγόμενων iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) στην παθογένεση της επαγόμενης από δοξορουβική καρδιακής δυσλειτουργίας είναι ακόμη πιο αμφιλεγόμενος. Έλλειψη των iNOS έχει αναφερθεί τόσο να ενισχύει όσο και να προστατεύει ενάντια [604] στην επαγόμενη από δοξορουβική καρδιοτοξικότητα [647]. Φαίνεται ότι οι καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις των iNOS είναι εξαιτίας της παραγωγής NO, ενώ οι καρδιοτοξικές επιδράσεις είναι εξαιτίας της επαγωγής υπεροξυνιτρικών, που παράγονται όταν το NO αντιδρά με  $O_2^-$ . Επιπλέον, τα υπεροξυνιτρικά είναι γνωστό να προκαλούν βλάβες στο DNA, ενεργοποιώντας την Parp (Poly ADP-ribose Polymerase), οδηγώντας σε μία ενεργητική ανισορροπία και, τελικά, σε κυτταρικό θάνατο [604].

Η DOX, επίσης, συντονίζεται με ελεύθερα μεταβατικά μέταλλα, όπως ο σίδηρος, για να σχηματίσει σύμπλοκα συντονισμού μετάλλων και να διεγείρει την παραγωγή μερικώς ανηγμένων μορφών οξυγόνου [648]. Οι επαγόμενες από DOX ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μπορούν να βλάψουν τα φωσφολιπίδια στις βιολογικές μεμβράνες, αυξάνοντας τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και απενεργοποιώντας μεμβρανικούς υποδοχείς και άλλα ένζυμα [649, 650]. Η DOX, ακόμα, παρουσιάζει ισχυρή συγγένεια για την καρδιολιπίνη [611, 651], ένα από τα πιο άφθονα φωσφολιπίδια στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (IMM) και το οποίο απαιτείται για τη δραστηριότητα των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας, όπως η οξειδάση του κυτοχρώματος c και η οξειδοαναγωγή NADH κυτοχρώματος c [652]. Ο σχηματισμός των συμπλόκων φαρμάκου-λιπιδίου οδηγεί σε αναστολή της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης, επειδή η καρδιολιπίνη δεν μπορεί πλέον να δρα ως συμπαραγόντας για τα μιτοχονδριακά ένζυμα [653]. Η σύνδεση της DOX στην



καρδιολιπίνη προτείνει μια ισχυρή συγγένεια για τις μιτοχονδριακές μεμβράνες. Είναι ακόμα αδιευκρίνιστο το ποσοστό της συνολικής DOX, που διαπερνά την IMM και ανάγεται (μειώνεται) από το σύμπλοκο I στην πλευρά της μήτρας.

Σε ποικίλα *in vitro* και *in vivo* μοντέλα, μια συγκεκριμένη άποψη για την τοξικότητα της DOX είναι μια απώλεια της ικανότητας φόρτωσης του μιτοχονδριακού ασβεστίου [597, 609, 654-656]. Έχει δειχθεί ότι απώλεια της ικανότητας φόρτωσης ασβεστίου ήταν εξαιτίας της αυξημένης επαγωγής του πόρου μετάπτωσης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPT) [609, 654], το οποίο είναι ένα επιβλαβές φαινόμενο για τα μιτοχόνδρια και τα κύτταρα, και το οποίο μπορεί να εκκινήσει την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου [657]. Το οξειδωτικό στρες, η υπερφόρτωση ασβεστίου ή η μη αναστρέψιμη μιτοχονδριακή εκπόλωση οδηγούν στην επαγωγή της MPT. Το άνοιγμα του πόρου μετάπτωσης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας οδηγεί σε μιτοχονδριακή οσμωτική διόγκωση και σε δομική βλάβη των μιτοχονδρίων. Το άνοιγμα του MPT πόρου μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση προαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως το κυτόχρωμα c ή η SMAC/DIABLO εξαιτίας της ρήξης της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης ή εξαιτίας της ανάκτησης των προαποπτωτικών πρωτεϊνών [658].

Επιβλαβείς μεταβολές στην καρδιακή μιτοχονδριακή λειτουργία, που περιλαμβάνουν τη μειωμένη ικανότητα φόρτωσης ασβεστίου και το προφίλ γονιδιακής έκφρασης, έχουν δείξει σε μοντέλα τρωκτικών να είναι μη αναστρέψιμα [609, 659, 660], το οποίο υποστηρίζει πάλι την ιδέα ότι η τοξικότητα της DOX στο μυοκάρδιο είναι σωρευτική και μη αναστρέψιμη στη φύση.

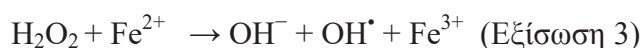
Τα μιτοχόνδρια είναι τα πιο εκτεταμένα και προοδευτικά κατεστραμμένα υποκυτταρικά οργανίδια από την επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητα. Ένας λόγος για αυτό μπορεί να είναι το γεγονός ότι το κατιονικό φάρμακο δοξορουβικίνη κατακρατείται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, σχηματίζοντας ένα σχεδόν μη αναστρέψιμο σύμπλοκο με την καρδιολιπίνη, όπως προαναφέρθηκε [661]. Οι πρωτεΐνες της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων απαιτούν τη σύνδεση της καρδιολιπίνης για να λειτουργήσουν σωστά, και έχει υποστηριχθεί ότι αφού η δοξορουβικίνη διαταράσσει τη διεπαφή καρδιολιπίνης-πρωτεΐνης, συμβαίνει περισσότερος σχηματισμός υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) [662]. Σε ένα μοντέλο αρουραίων χρόνιας επαγόμενης από δοξορουβικίνη μυοκαρδιοπάθειας, βρέθηκε ότι η οξείδωση λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας σε μιτοχόνδρια της καρδιάς είναι σημαντικά μειωμένη, ενώ ο μεταβολισμός της γλυκόζης αυξάνεται, υποδεικνύοντας μια συνολική αλλαγή από μια αερόβια σε μια αναερόβια μεταβολική κατάσταση [663]. Αυτή η αλλαγή στο μεταβολισμό είναι ένα συνηθισμένο χαρακτηριστικό της καρδιακής ανεπάρκειας.

Η DOX καταστρέφει, επίσης, το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) [664], σχηματίζοντας πρόσθετα (adducts) με το κυκλικό γονιδίωμα και διαταράσσοντας, επομένως, τη διαδικασία σύνθεσης της μιτοχονδριακής μηχανής [665-667]. Η οξείδωση του mtDNA [668, 669] μπορεί να οδηγήσει σε ελαττωματική αναπνευστική αλυσίδα, η οποία μπορεί να είναι, τότε, ανίκανη να ανταποκριθεί στις υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις και παράγει υψηλότερη διαρροή ηλεκτρονίων σε μοριακό οξυγόνο, αυξάνοντας την παραγωγή ROS, πράγμα το οποίο διαιωνίζει, έπειτα, τη μιτοχονδριακή βιοενεργειακή ανεπάρκεια. Οι αλλαγές στο mtDNA μπορούν να συσσωρευτούν με το χρόνο, ακόμη και σε απουσία θεραπείας, οδηγώντας σε μία ελαττωματική αναπνευστική αλυσίδα, η οποία με τη σειρά της παράγει περισσότερες ROS και συνεισφέρει στην αύξηση της mtDNA βλάβης. Αυτό φαίνεται μια πολύ καλή εξήγηση για την επίμονη και σωρευτική φύση της καρδιοτοξικότητας της DOX.

### 1.10.3.2. Ο σίδηρος στην επαγόμενη από ανθρακυκλίνες καρδιοτοξικότητα

Ο σίδηρος (Fe) είναι ένα κρίσιμο βιογενές στοιχείο, αναγκαίο για όλα τα ζωντανά κύτταρα, όπου είναι απαραίτητο για την κατάλυση της οξειδωσης-αναγωγής και τη βιοενεργητική. Παρόλα αυτά, εκτός εάν διαχωριστεί κατάλληλα, το μέταλλο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό ROS [670]. Υπάρχουν δύο κύρια μονοπάτια, με τους οποίους ο Fe προωθεί το σχηματισμό ROS σε εκτιθέμενα σε ANT κύτταρα: ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει τις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss, ενώ ο δεύτερος περιλαμβάνει το σχηματισμό ANT-Fe συμπλόκων.

Η ικανότητα της ANT αγκυκλίνης να υφίσταται κύκλο οξειδοαναγωγής οδηγεί στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ). Η δισμουτίωση του  $O_2^{\bullet-}$  σε υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) καταλύεται από τη δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD) ή μπορεί να γίνει αυθόρμητα. Το  $H_2O_2$  είναι ένα σχετικά σταθερό μόριο χαμηλής τοξικότητας, και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι υπερβολικές ποσότητες εξαλείφονται από την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Παρόλα αυτά, το  $H_2O_2$  και το  $O_2^{\bullet-}$  μπορούν να παράγουν ιδιαίτερα τοξικές ρίζες υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ). Αυτό λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης Haber-Weiss (εξίσωση 1), η οποία είναι πολύ αργή εκτός εάν καταλυθεί από μέταλλα μετάπτωσης, και ιδιαίτερα το Fe [670]. Η καταλύομενη από Fe αντίδραση Haber-Weiss μπορεί να διαχωριστεί σε δύο μέρη: στο πρώτο βήμα, το ιόν τρισθενούς σιδήρου ( $Fe^{3+}$ ) ανάγεται σε ιόν δισθενούς σιδήρου ( $Fe^{2+}$ ) από το  $O_2^{\bullet-}$  (εξίσωση 2). Στο δεύτερο βήμα, η αντίδραση Fenton (εξίσωση 3) συμβαίνει μεταξύ του  $Fe^{2+}$  και του  $H_2O_2$ .



Δεδομένου του βασικού καταλυτικού ρόλου του ελεύθερου κυτταρικού Fe στην παραγωγή του επικίνδυνου  $OH^{\bullet}$ , οι οργανισμοί είναι εφοδιασμένοι με ειδικές πρωτεΐνες, σχεδιασμένες για την απόκτηση, τη μεταφορά και την αποθήκευση Fe, καθώς και με εξελιγμένους μηχανισμούς, που ρυθμίζουν την ενδοκυτταρική ομοιόσταση Fe. Η ασταθής δεξαμενή του κυτοσολικού Fe, η οποία προφανώς αντιστοιχεί σε Fe κατά τη μετάβαση ανάμεσα στο μεταφορέα τρανσφερίνη και την πρωτεΐνη αποθήκευσης φερριτίνη, ανιχνεύεται από τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες σιδήρου (IRPs). Οι πρωτεΐνες αυτές ελέγχουν την έκφραση του υποδοχέα τρανσφερίνης και της φερριτίνης σε μεταφραστικό επίπεδο ώστε να διατηρήσει την ενδοκυτταρική δεξαμενή ελεύθερου Fe σε χαμηλά επίπεδα [671]. Παρόλα αυτά, έχει δείχτει ότι οι ANTs μπορούν να αυξάνουν την ποσότητα του ελεύθερου, ενεργοποιούμενου από οξειδοαναγωγή Fe με την παραγωγή  $O_2^{\bullet-}$ , που διαμεσολαβεί την αργή αναγωγική απελευθέρωση του Fe από τη φερριτίνη [672].

Η ρίζα υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ), που σχηματίζεται με αυτόν τον τρόπο, έχει πολύ βραχεία ημίσεια ζωής και εξαιρετικά υψηλή δραστηριότητα. Αυτό κάνει την ένωση επικίνδυνη για τα κύτταρα. Σε αντίθεση με το  $O_2^{\bullet-}$  ή το  $H_2O_2$ , αμφότερα τα οποία μπορούν εύκολα να αποτοξινωθούν από ενζυματικά συστήματα, το  $OH^{\bullet}$  δεν μπορεί να εξαλειφθεί από ένζυμα. Αντί αυτού, το  $OH^{\bullet}$  αντιδρά με οποιαδήποτε οξειδωσιμη

ένωση στη γειτνιάζουσα περιοχή της και, έτσι, μπορεί να επάγει βλάβη σε όλους τους τύπους μακρομορίων, που περιλαμβάνουν λιπίδια (υπεροξειδωση), νουκλεϊκά οξέα (μεταλλάξεις) και πρωτεΐνες [670].

Ο δεύτερος μηχανισμός, με τον οποίο ο Fe προωθεί οξειδωτικό στρες περιλαμβάνει το σχηματισμό ANT-Fe συμπλόκων. Δύο διακριτοί μηχανισμοί έχουν περιγραφεί, ένας εξαρτώμενος από την παρουσία ενός αναγωγικού συστήματος και ένας άλλος, με τον οποίο ρίζες σχηματίζονται από το ίδιο ANT-Fe σύμπλοκο, σε απουσία ενός αναγωγικού συστήματος [638]. Υπό την παρουσία ενός αναγωγικού συστήματος, που μπορεί να είναι η NADH αναγωγή του κυτοχρώματος 450 ή οι θειόλες της κυστεΐνης ή της γλουταθειόνης, το ANT-Fe<sup>3+</sup> ανάγεται σε ANT-Fe<sup>2+</sup>. Μπορεί να αντιδρά με το O<sub>2</sub> για να σχηματίσει O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, το οποίο με τη σειρά του οξειδοανάγει (dismutates) το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και/ή εισέρχεται στην αντίδραση Haber-Weiss, οδηγώντας σε OH<sup>•</sup>. Εναλλακτικά, το ANT-Fe<sup>2+</sup> μπορεί να αντιδρά με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για να αποφέρει OH<sup>•</sup> άμεσα. Σε απουσία ενός αναγωγικού συστήματος, το ANT-Fe<sup>3+</sup> μπορεί να ανάγει τον χηλικό του σίδηρο μέσω μιας ενδομοριακής οξειδοαναγωγικής αντίδρασης, είτε με οξείδωση της πλευρικής αλυσίδας στον C9 ή του τμήματος υδροκινόνης στο δακτύλιο C, σχηματίζοντας μια χηλική ένωση ANT ελευθέρων ριζών με το Fe<sup>2+</sup> (ANT<sup>•</sup>-Fe<sup>2+</sup>). Υπό την παρουσία O<sub>2</sub>, το σύμπλοκο αυτό μπορεί να οξειδωθεί για να αποφέρει O<sub>2</sub><sup>•-</sup> και μπορεί, επίσης, να αντιδρά με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για να παράγει OH<sup>•</sup>.

Οι ANTs έχουν δείξει να παρεμβαίνουν με τον κυτταρικό Fe με ένα πολύ περίπλοκο τρόπο και αυτό ασφαλώς δεν περιορίζεται από την απλή παραγωγή των τοξικών ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η αναγωγή της δοξορουβικίνης με την παρουσία ελεύθερου σιδήρου, επίσης, θέτει έναν κύκλο παραγωγής ελευθέρων ριζών (οξειδοαναγωγική ανακύκλωση) και ο μεταβολίτης δοξορουβικινόλη (doxorubicinol), η οποία είναι έως 50 φορές πιο ισχυρή από την αρχική ένωση, είναι γνωστό να αλληλεπιδρά με ομάδες θειόλης επί των πρωτεϊνών επιδεινώνοντας τις ζημιές στο κύτταρο [673]. Οι ANTs και/ή οι μεταβολίτες τους διαταράσσουν τον κυτταρικό μεταβολισμό του Fe, αλληλεπιδρώντας με πολλαπλούς μοριακούς στόχους, που περιλαμβάνουν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες σιδήρου 1 και 2 (IRP1 και IRP2). Η δραστηριότητα σύνδεσης RNA των μορίων αυτών ρυθμίζει την έκφραση του υποδοχέα τρανσφερίνης 1 και της φερριτίνης, που είναι βασικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες, που εμπλέκονται στην πρόσληψη και αποθήκευση Fe, αντίστοιχα. Είναι πιθανό αυτό να συμβαίνει ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες, καθώς και με ένα ROS-ανεξάρτητο τρόπο [674, 675]. Επιπλέον, έχει δείξει ότι η DOX μπορεί να προκαλεί τη συσσώρευση Fe στη φερριτίνη και να αποτρέπει την κινητοποίηση της [676], το οποίο μπορεί να δημιουργεί μια σχετική έλλειψη Fe για μεταβολική χρήση.

### 1.10.3.3. Απορύθμιση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου

Η επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητα συνοδεύεται, επίσης, από μία αύξηση στα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Η αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου δεν είναι η μόνη αιτία της απορύθμισης του μιτοχονδριακού ασβεστίου, αλλά η δοξορουβικίνη επηρεάζει, ακόμη, τη μεταφορά του μιτοχονδριακού ασβεστίου, το οποίο συνεισφέρει στην αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου.

Η απορύθμιση των συγκεντρώσεων του ενδοκυτταρικού ασβεστίου είναι τόσο αποτέλεσμα όσο και αιτία της παραγωγής ROS. Η επαγόμενη από δοξορουβικίνη παραγωγή ROS και η απόπτωση μπορούν να ανασταλούν χρησιμοποιώντας ένα χηλωτή Ca<sup>2+</sup> [677]. Οι ROS και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που παράγονται, αλλάζουν τη φυσιολογική

ομοιόσταση ασβεστίου σε μια ποικιλία τύπων μυϊκών κυττάρων μέσω διαταραχής της φυσιολογικής λειτουργίας του σαρκοπλασματικού δικτύου.

Όπως οι άλλες κασπάσες, η κασπάση-12, επίσης, ενεργοποιεί αποπτωτικά μονοπάτια. Οι καλπαΐνες είναι εξαρτώμενες από ασβέστιο πρωτεάσες, που ενεργοποιούνται από ασβέστιο. Επειδή αρκετό από το ενδοκυτταρικό ασβέστιο περιέχεται στο σαρκοπλασματικό δίκτυο, το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε διαφυγή ασβεστίου, ενεργοποίηση της καλπαΐνης και διάσπαση της κασπάσης-12. Πειραματικά μοντέλα σε ένα μοντέλο με αρουραίους έδειξε ότι αυτός είναι ένας από τους μηχανισμούς, που ενεργοποιούνται από τη δοξορουβικίνη [678]. Επιπρόσθετα, η καρδιομυοπάθεια από δοξορουβικίνη σχετίζεται με μυοϊνιδική αλλοίωση [679], πράγμα το οποίο, επίσης, μπορεί να αποτελεί συνέπεια της ενεργοποίησης καλπαΐνης [680].

#### 1.10.3.4. DOX απόπτωση

Παρόλο που η επαγόμενη από DOX απόπτωση στους όγκους είναι ευεργετική, η προαποπτωτική της επίδραση στα καρδιομυοκύτταρα και τα αγγειακά κύτταρα μπορεί να είναι υπεύθυνη για την καρδιοτοξικότητα της. Είναι γενικά αποδεκτό ότι το οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη, ενεργοποιεί τη σηματοδότηση της απόπτωσης, οδηγώντας σε απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων [681] και αμφότερα το εξωτερικό και το εσωτερικό αποπτωτικά μονοπάτια εμπλέκονται [682, 683]. Η ταχέως αναπτυσσόμενη μάζα των αποδείξεων υποστηρίζει την ιδέα ότι η απόπτωση και η νέκρωση τόσο των ενδοθηλιακών κυττάρων όσο και των καρδιομυοκυττάρων εμπλέκονται στην επαγόμενη από DOX τοξικότητα [684, 685]. Οι μοριακοί μηχανισμοί, που υπόκεινται του επαγόμενου από DOX θανάτου των καρδιομυοκυττάρων περιλαμβάνουν την περίσσεια παραγωγή των ROS [646, 686] και άλλους ανεξάρτητους από ROS μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν την παραγωγή και συσσώρευση κεραμιδίου [687] ή την εκκίνηση της Fas-διαμεσολαβούμενης απόπτωσης [688].

Όπως προαναφέρθηκε, η χορήγηση DOX αυξάνει το οξειδωτικό στρες και διαταράσσει την ομοιόσταση του κυτταρικού ασβεστίου. Οι ROS αυξάνουν τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, προωθώντας την απελευθέρωση του ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (SR) μέσω ανοίγματος του υποδοχέα ρυανοδίνης ή αλλοιώνοντας τα συστήματα κάθαρσης ασβεστίου στα καρδιομυοκύτταρα [689-693]. Στα καρδιομυοκύτταρα, τα μιτοχόνδρια εντοπίζονται κοντά στις θέσεις απελευθέρωσης του ασβεστίου στο SR και μπορεί να καταλαμβάνουν μια μεγάλη ποσότητα του απελευθερούμενου ασβεστίου. Εξαιτίας του σημαντικά αυξανόμενου οξειδωτικού στρες, τα μιτοχονδριακά επίπεδα ασβεστίου αυξάνουν πέραν ενός ορίου. Η μιτοχονδριακή υπερφόρτωση με ασβέστιο προκαλεί μιτοχονδριακή μετάβαση διαπερατότητας (MPT), οδηγώντας σε απώλεια του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού, μιτοχονδριακή διόγκωση, ρήξη της εξωτερικής μεμβράνης και συνεπώς, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης από τα μιτοχόνδρια [689, 694, 695].

Πολυάριθμες μελέτες έδειξαν ότι η επαγόμενη από DOX απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων συσχετίζεται με αυξημένη έκφραση και ενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 [696-698]. Βλάβες του DNA, που επάγονται από τις ROS ή άμεσα από τη DOX, ενεργοποιούν την ERK1/2, που ακολουθείται από αυξημένη φωσφορυλίωση της p53 και η τελευταία υπερρυθμίζει περαιτέρω καθοδικά της p53 γονίδια, όπως η Bax. Κατά την ενεργοποίηση, η p53 επάγει την έκφραση των γονιδίων, που συσχετίζονται με αναστολή του κυτταρικού κύκλου (cell arrest),

επιδιόρθωση του DNA και απόπτωση [698]. Η ενεργοποίηση της p53 μπορεί άμεσα να επάγει την ενεργοποίηση του Bax γονιδίου, που περιέχει θέση σύνδεσης της p53, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μετατόπιση της Bax/Bad από το κυτοσόλιο στα μιτοχόνδρια. Ως αποτέλεσμα, το εσωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιείται. Η DOX δεν επάγει μόνο βλάβη του DNA και οξειδωτική μιτοχονδριακή ζημιά, αλλά, επίσης, επάγει πυρηνική μετατόπιση της p53 [698]. Η p53 μπορεί, επίσης, να διαμεσολαβεί στην επαγόμενη από DOX καρδιοτοξικότητα μέσω άλλων μονοπατιών ανεξάρτητων από την απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων. Για παράδειγμα, η διαμεσολαβούμενη από την p53 αναστολή του στόχου της σηματοδότησης της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά μπορεί να συνεισφέρει στη μείωση της μάζας και τη δυσλειτουργία της καρδιάς, που παρατηρείται σε οξεία DOX καρδιοτοξικότητα [699].

Επιπλέον, οι βλάβες του DNA, που επάγονται από τις ROS ή απευθείας από την αλληλεπίδραση με DOX, ενεργοποιούν τα JNK και p38 MAPK μονοπάτια για να επάγουν την απόπτωση [700]. Το οξειδωτικό στρες είναι γνωστό να ενεργοποιεί την ASK1, μία ενεργοποιούμενη από μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση, η οποία είναι καθοδικά του Fas υποδοχέα (εναλλακτικό μονοπάτι) [700]. Η ενεργοποιημένη ASK1, ακολούθως, ενεργοποιεί τα JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase) και p38 MAPK μονοπάτια για να επάγει την απόπτωση [701], μάλλον μέσω ενός μηχανισμού, που περιλαμβάνει τη μετατόπιση της Bax στα μιτοχόνδρια μέσω της φωσφορυλίωσης της 14-3-3 πρωτεΐνης από την ενεργοποιημένη JNK [702].

Η ενεργοποίηση των κασπασών μπορεί, επίσης, να επηρεαστεί από τη δοξορουβικίνη. Η DOX ενεργοποιεί το εσωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης, που εκδηλώνεται με διάσπαση (σχάση) της κασπάσης-9. Αυτό ακολουθείται από διάσπαση της PARP και την εμφάνιση της αποπτωτικής μορφολογίας και κυτταρικό θάνατο, όπως αποδεικνύεται από την παύση του κυτταρικού μεταβολισμού. Έχει δείξει ότι η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και, επομένως, η απόπτωση, σχετίζεται με τη χορήγηση δοξορουβικίνης *in vivo* [703]. Ο επαγόμενος από DOX καρδιακός κυτταρικός θάνατος μπορεί, επίσης, να συμβαίνει μέσω ανεξάρτητων από κασπάσες μονοπατιών [704], που δεν αφήνουν χώρο για την αποτελεσματική χρήση των αναστολέων κασπασών. Είναι δύσκολο να καθοριστεί εάν ή πως η δοξορουβικίνη άμεσα επηρεάζει τη δραστηριότητα κασπάσης, καθώς πολλά μονοπάτια μπορούν να συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση της κασπασο-εξαρτώμενης απόπτωσης.

Επιπλέον, μελέτες αποδεικνύουν ότι η απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων στην επαγόμενη από DOX μυοκαρδιοπάθεια μπορεί να εκτελεστεί μέσω του Fas-διαμεσολαβούμενου μονοπατιού [705]. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB ενεργοποιείται από τις ROS σε καρδιομυοκύτταρα νεογνών αρουραίων, που έχουν μεταχειριστεί με DOX, και στο μυοκάρδιο και ασκεί μια προαποπτωτική επίδραση μέσω άμεσης ενεργοποίησης των αποπτωτικών γονιδίων, που περιλαμβάνουν το FasL, το Fas, τη c-Myc και την p53 [706-708].

Ένα πρώιμο γεγονός, που παρατηρείται, επίσης, στην καρδιοτοξικότητα της DOX είναι η εξάντληση της GATA-4, η οποία, επίσης, οδηγεί σε απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων [709]. Η GATA-4 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, σημαντικός στην ανάπτυξη της καρδιάς, που ρυθμίζει το αποπτωτικό μονοπάτι, ενεργοποιώντας το αντιαποπτωτικό γονίδιο Bcl-X<sub>L</sub>, διατηρώντας, έτσι, τη μιτοχονδριακή λειτουργία και ακεραιότητα [685]. Η DOX, επίσης, αναστέλλει την AKT φωσφορυλίωση, αυξάνοντας την GSK3β, έναν αρνητικό ρυθμιστή της GATA-4 στον πυρήνα [710]. Επίσης, η φωσφορυλίωση της AKT και της Bad μπορούν να ενεργοποιήσουν την κασπάση-3, επάγοντας την ενδονουκλεωσωματική βλάβη του DNA [711].

Ο καταστολέας της απόπτωσης με μια περιοχή στρατολόγησης κασπάσης (ARC) είναι ένας ενδογενής αναστολέας της απόπτωσης και περιορίζεται κατά κύριο λόγο σε τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα, όπως τα μυοκύτταρα των σκελετικών μυών, οι νευρώνες και τα καρδιομυοκύτταρα. Απενεργοποιεί τα αποπτωτικά μονοπάτια μέσω αποτροπής της μετατόπισης της Bax στο μιτοχόνδριο ή με σύνδεση σε συστατικά του εξωτερικού μονοπατιού, όπως ο Fas, η FADD και η κασπάση-8. Υπορύθμιση του ARC mRNA και των επιπέδων της πρωτεϊνικής έκφρασης παρατηρήθηκε σε καρδιομυοκύτταρα νεογνών αρουραίων και σε καρδιές ποντικών μετά από έκθεση σε DOX. Η p53-εξαρτώμενη μεταγραφική υπορύθμιση ή η επαγόμενη από p53 E3 λιγάση ουβικιτίνης Mdm2 μπορεί να συνδέεται με μείωση της ARC.

Επιπρόσθετα, μία πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η επαγόμενη από DOX υπερρύθμιση της Ser/Thr φωσφατάσης PP1 μπορεί να εμπλέκεται στην αποφωσφορλίωση των Akt και Bad, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 [711]. Η επαγόμενη από DOX παραγωγή κεραμιδίου μπορεί, επίσης, να συνεισφέρει στην απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων μέσω κατακερματισμού των μιτοχονδρίων, διαπερατότητας της μιτοχονδριακής εξωτερικής μεμβράνης και απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c [712, 713]. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι μεταχείριση καρδιομυοκυττάρων αρουραίων με DOX, αυξάνουν τη μιτοχονδριακή παραγωγή ROS, ενεργοποιούν το ασβεστίου/ καλσινευρίνης σηματοδοτικό μονοπάτι και περαιτέρω τη NFAT4 (Nuclear Factor-Activated T cell 4), οδηγώντας σε υπερρύθμιση του Fas/FasL [677].

Μελέτες αποκαλύπτουν ότι η Dox επάγει τη δυσλειτουργία του συστήματος ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος (UPS), το οποίο προκαλεί την ειδική αποικοδόμηση των περισσότερων κυτταρικών πρωτεϊνών, εκτός από την τήρηση των σημαντικών μη πρωτεολυτικών υποχρεώσεων του κυττάρου [714]. Αφού εισαχθεί στο σώμα, η Dox παθητικά διαχέεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο κυτταροπλάσμα, όπου αλληλεπιδρά με το πρωτεάσωμα. Το σύμπλοκο Dox-πρωτεάσωμα, στη συνέχεια, μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου η Dox απελευθερώνεται από το πρωτεάσωμα και συνδέεται στο DNA, εξαιτίας της υψηλότερης συγγένειας δέσμευσης της για το DNA [715]. Η Dox έχει δείχτεί, σταθερά, να ενισχύει σημαντικά τη διαμεσολαβούμενη από το πρωτεάσωμα αποικοδόμηση βασικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών στα καρδιομυοκύτταρα. Τα ευρήματα δείχνουν ότι η Dox μπορεί να αυξάνει την πρωτεολυτική δραστηριότητα του UPS [716], με αύξηση στην έκφραση της CHIP, που είναι μία U box περιεχόμενη E3 λιγάση ουβικιτίνης, καθώς και ομοσυνόδός της Hsp70. Ένας αριθμός μελετών αποκαλύπτει ότι η μεταχείριση με Dox ενισχύει τη διαμεσολαβούμενη από το UPS αποικοδόμηση των βασικών μεταγραφικών παραγόντων, των μυϊκών ινών και των παραγόντων κυτταρικής επιβίωσης στα καρδιομυοκύτταρα. Μεταγραφικοί παράγοντες, που εμπλέκονται με την UPS ενεργοποίηση από τη Dox αποτελούν η β-κατενίνη, οι NFATs (Nuclear Factor-Activated T cells) και η p300. Η αυξημένη αποικοδόμηση αυτών των προστατευτικών μεταγραφικών παραγόντων φαίνεται να είναι ένας υποκείμενος μηχανισμός για την επαγόμενη από Dox μυοκαρδιοπάθεια. Έχει, επίσης, δείχτεί ότι η Dox αυξάνει τη διαμεσολαβούμενη από το UPS αποικοδόμηση διαφόρων άλλων κυτταρικών πρωτεϊνών, όπως η ARC (καταστολέας απόπτωσης με περιοχή στρατολόγησης κασπάσης) και η Bcl-2, γέρνοντας, ως εκ τούτου, την πλάστιγγα ανάμεσα στον κυτταρικό θάνατο και την επιβίωση προς τον κυτταρικό θάνατο. Ο μεταγραφικός παράγοντας NFκB (Nuclear transcription Factor κB) μπορεί να είναι αντιαποπτωτικός, όπως σε καρκινικά κύτταρα, αλλά ο Wang S. et al. 2002 έδειξε ότι η ενεργοποίηση του NFκB είναι προαποπτωτική σε ενδοθηλιακά κύτταρα και

καρδιομυοκύτταρα μετά από μεταχείριση με Dox [708]. Η ενεργοποίηση του NFκB εξαρτάται από τη διαμεσολαβούμενη από το UPS αποικοδόμηση του IκB, αναστολέα του NFκB. Η Dox επάγει την ενεργοποίηση του NFκB με ένα χρόνο-εξαρτώμενο και δόσο-εξαρτώμενο τρόπο τόσο σε ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και σε καρδιομυοκύτταρα [708]. Η ενεργοποίηση αυτή προκαλείται από την ενεργοποιούμενη από ROS φωσφορυλίωση και αποικοδόμηση της IκB [717].

### 1.10.3.5. Καταστολή της έκφρασης γονιδίων

Η δοξορουβικίνη υπορυθμίζει την έκφραση μιας ποικιλίας ειδικών για τους καρδιακούς μύες πρωτεϊνών, που συμπεριλαμβάνουν συσταλτικές πρωτεΐνες (α-ακτίνη, ελαφριές και βαριές αλυσίδες μυοσίνης, τροπονίνη I, δεσμίνη), πρωτεΐνες σαρκοπλασματικού δικτύου ( $Ca^{2+}$  ATPάση, υποδοχέας ρυανοδίνης 2), μιτοχονδριακές πρωτεΐνες (πρωτεΐνη σιδήρου-θείου, ADP/ATP μετατοπάση, φωσφοφρουκτοκινάση, Mt-CK), και άλλες (κινάση της κρεατίνης, φωσφολαμβάνη, καλσεκεστρίνη, φωσφολιπάση A2, νατριουρητικό πεπτίδιο εγκεφάλου [BNP]). Μειώσεις στις πρωτεΐνες των καρδιακών μυών συσχετίζονται άμεσα με μειωμένη συσταλτικότητα των καρδιομυοκυττάρων και μπορεί να εξηγήσει τα παθολογικά χαρακτηριστικά της απώλειας των μυοϊνιδίων στην επαγόμενη από DOX μυοκαρδιοπάθεια. Μελέτες έχουν, επίσης, δείξει ότι χορήγηση DOX μειώνει την GATA-4 [718, 719], η οποία είναι ένας βασικός ρυθμιστής της ανάπτυξης της καρδιάς, που είναι γνωστό να ρυθμίζει τη μυοκαρδιακή έκφραση των πρωτεϊνών του σαρκομεριδίου, όπως η βαριά αλυσίδα της μυοσίνης και η τροπονίνη I [709, 720]. Η απενεργοποίηση της εξωκυτταρικής ρυθμιζόμενης από σήμα κινάσης (ERK) στις καρδιές, που επηρεάζονται από την καρδιοτοξικότητα της DOX [721], μπορεί να είναι το ανοδικό σήμα για την αρνητική ρύθμιση της έκφρασης της GATA-4 και των πρωτεϊνών του σαρκομεριδίου. Επιπλέον, η διαμεσολαβούμενη από DOX καταστολή των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών επιδεινώνει τη μυοκαρδιακή παραγωγή ενέργειας και η αναστολή της  $Ca^{2+}$  ATPάσης του σαρκοπλασματικού δικτύου παρεμβαίνει με την κατάσχεση του κυττοσολικού ελεύθερου  $Ca^{2+}$  μετά τη συστολή, προκαλώντας, ως εκ τούτου, διαστολική δυσλειτουργία. Παραμένει άγνωστο εάν η τροποποιημένη έκφραση των εξειδικευμένων πρωτεϊνών ή των μεταγραφικών παραγόντων, διαμεσολαβείται απευθείας από τις ROS.

### 1.10.3.6. Φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές

Οι ανθρακυκλίνες είναι ικανές για την προώθηση της απελευθέρωσης προφλεγμονωδών κυτοκινών [722]. Η δοξορουβικίνη διεγείρει τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα με επακόλουθη απελευθέρωση ισταμίνης και του TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha). Οι ουσίες αυτές έχουν συσχετιστεί με αρχιτεκτονικές αλλαγές και τη διατακτική μυοκαρδιοπάθεια, μέσω δέσμευσης υποδοχέων του μυοκαρδίου [594].

Ο Wong J. et al. 2013 εξέτασε τις επιδράσεις της δοξορουβικίνης στο MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) μονοπάτι, που είναι απαραίτητο για τη μεταφορά σημάτων από την κυτταρική επιφάνεια (μέσω υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης) στον πυρήνα και, ανάμεσα σε άλλες λειτουργίες, ρυθμίζει προφλεγμονώδεις κυτοκίνες [723]. Η έκφραση των κυτοκινών αυτών έχει δείχτει να έχει ένα σχετικό ρόλο στην καρδιοτοξικότητα, που επάγεται από ανθρακυκλίνες, κυρίως, ρυθμίζοντας την απόπτωση μέσω TNF υποδοχέων, των οποίων η λειτουργία επηρεάζεται από δοξορουβικίνη [724].

### **1.10.3.7. Αλλαγές στο απόθεμα φωσφορικού υψηλής ενέργειας**

Βλάβη των μιτοχονδρίων εξασθενεί την ικανότητα παραγωγής ATP (Adenosine Triphosphate). Μειώσεις στα επίπεδα ATP μπορεί να προκύψει από την ενεργοποίηση των αποπτωτικών μονοπατιών και των επαγόμενων από ασβέστιο πρωτεασών, που καταναλώνουν ATP [680]. Οι ενεργειακές δαπάνες για να αντικατασταθούν οι κατεστραμμένες πρωτεΐνες μπορούν, επίσης, να είναι τεράστιες. Επομένως, αλλαγές στο απόθεμα φωσφορικού υψηλής ενέργειας φαίνεται να συμβαίνουν, κυρίως, ως αποτέλεσμα των διαδικασιών, που περιγράφηκαν νωρίτερα, παρά απευθείας από την ίδια τη δοξορουβικίνη.

### **1.10.3.8. Η αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας**

Έχειδειχτεί ότι η δοξορουβικίνη έχει επίδραση στην καρδιά, ενισχύοντας την παραγωγή των MMP-2 και MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-2 και -9) [725, 726]. Αυτό πιστεύεται ότι συνεισφέρει στη μυοκαρδιοπάθεια, αδυνατίζοντας τη κολλαγονώδη θεμέλια ουσία, ενάντια στην οποία δουλεύουν τα καρδιομυοκύτταρα και συνεισφέροντας στην παθολογική αναδιαμόρφωση. Αμφότερες οι δραστηριότητες των MMP-2 και MMP-9 ενισχύονται από την επαγόμενη από δοξορουβικίνη παραγωγή ROS, καθώς και από τα επίπεδα της NADPH οξειδάσης [726].

Άλλοι μηχανισμοί, που έχουνδειχτεί να εμπλέκονται στην καρδιοτοξικότητα της DOX έχουν αναφερθεί να είναι οι αναστολείς της COX-2, η σηματοδότηση νεουρεγκιουλίνης, η συσσώρευση κεραμίδιου (μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-3) και η σηματοδότηση κανναβινοειδών [578].

### **1.10.3.9. Νέκρωση**

Μελέτες έδειξαν ότι η νέκρωση αυξάνεται σε καρδιές ποντικών, που έχουν μεταχειριστεί με DOX [727-729]. Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στο θάνατο των νεκρωτικών καρδιομυοκυττάρων. Η λογική είναι ότι οι αυξημένες ROS οδηγούν σε υπερφόρτωση του μιτοχονδριακού ασβεστίου, που προωθεί το άνοιγμα του MPT πόρου, προκαλεί μιτοχονδριακή διόγκωση και εξάντληση του ATP, και ως εκ τούτου, προκαλεί νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο [730, 731]. Για το λόγο αυτό, η διαταραχή της ομοιόστασης του μιτοχονδριακού ασβεστίου μπορεί να ασκήσει ένα κρίσιμο παράγοντα στη σωρευτική και μη αναστρέψιμη μυοκαρδιοπάθεια, που συσχετίζεται με μακροπρόθεσμη χορήγηση DOX. Η DOX, επίσης, επάγει μιτοχονδριακή βλάβη του DNA, ακρωτηριασμό της μιτοχονδριακής αναπνοής, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και εξάντληση του ATP. Όλα αυτά τα γεγονότα συνεισφέρουν στη νέκρωση [609, 636, 732-734]. Επιπρόσθετα, η επαγόμενη από ROS λιπιδική υπεροξειδωση μπορεί, επίσης, να συνεισφέρει στη νέκρωση των καρδιομυοκυττάρων [735]. Επιπλέον, η αποικοδόμηση της τιτίνης, της μεγαλύτερης πρωτεΐνης των μυονηματίων, ενισχύεται στα αρχικά στάδια της μεταχείρισης με DOX από ενεργοποίηση των εξαρτώμενων από ασβέστιο πρωτεασών καλπαΐνης, που μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό εγγύς βήμα, που οδηγεί σε επιταχυνόμενη αποικοδόμηση μυονηματίων και νέκρωση [680].



### 1.10.3.10. Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία, φυσιολογικά, συμβαίνει στο μυοκάρδιο, αντιπροσωπεύει τον πιο διαδεδομένο μηχανισμό ανανέωσης των κυτταρικών συστατικών, και ενισχύεται ουσιαστικά σε παθολογικές συνθήκες, που περιλαμβάνουν την καρδιακή υπερτροφία, τη μυοκαρδιοπάθεια και την καρδιακή ανεπάρκεια. Μελέτες δείχνουν ότι η αυτοφαγία υπηρετεί την καρδιά μετά από στρες. Από τη μία μεριά, λειτουργεί απομακρύνοντας τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα και τα κατεστραμμένα οργανίδια σαν ένα προ-επιβιωτικό μονοπάτι, διατηρώντας την ενεργειακή ομοιόσταση, ενώ από την άλλη μεριά, έντονη ενίσχυση της αυτοφαγίας μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο [736-741].

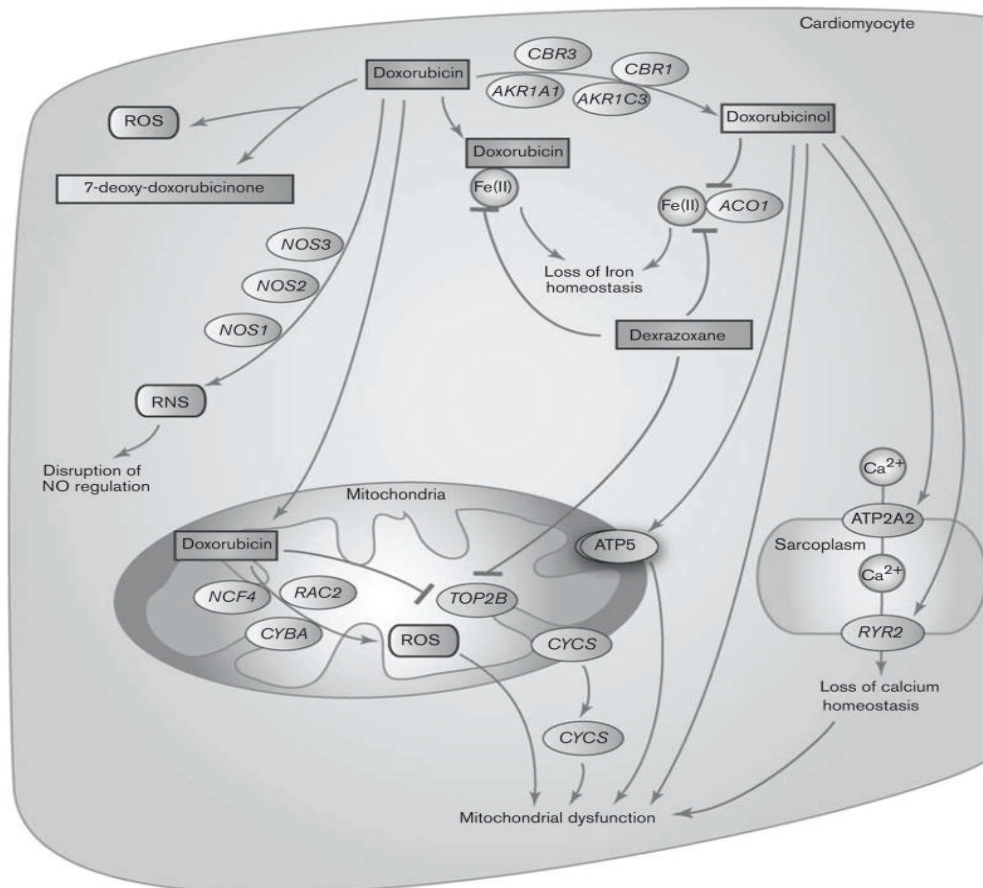
Η Bcl-2 οικογένεια εμπλέκεται στην παρεμβολή ανάμεσα στην απόπτωση και την αυτοφαγία [742-747]. Η επαγόμενη από ROS αύξηση στο ενδοκυτταρικό ασβέστιο όχι μόνο προκαλεί απόπτωση και νέκρωση, αλλά, επίσης, επάγει και αυτοφαγία με ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από καλμοδουλίνη κινάσης και της ενεργοποιούμενης από AMP πρωτεϊνικής κινάσης [742]. Άλλες σχετικές με την απόπτωση πρωτεΐνες, όπως η p53, έχουν, επίσης, δείχτει να παίζουν ένα ρόλο στην αυτοφαγία [744]. Μία άλλη πιο πρόσφατη μελέτη προτείνει ότι η ενεργοποίηση της PARP-1 (Poly (ADP-ribose) Polymerase-1), ενός από τους κύριους στόχους των κασπασών, περιλαμβάνεται στην αυτοφαγία, που μπορεί να είναι κυτταροπροστατευτική κατά τη διάρκεια της απόκρισης σε βλάβη του DNA [748].

Υπερβολική αυτοφαγία, που επάγεται από σοβαρά ερεθίσματα, μπορεί, επίσης, να βλάπτει το κυτοσόλιο και τα οργανίδια, ειδικά τα μιτοχόνδρια και το ER, και απελευθερώνει λυσοσωματικά ένζυμα ή άλλους επαγόμενους από κυτταρικό θάνατο παράγοντες, οδηγώντας, ως εκ τούτου, σε αποπτωτικό και νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο [745, 749].

Οι τρεις τύποι του κυτταρικού θανάτου μπορεί να συγκλίνουν σε κύτταρα, που πεθαίνουν, σε πολλά επίπεδα διαφορετικών μονοπατιών, όπως στο οξειδωτικό στρες, την απορύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου, τη μιτοχονδριακή βλάβη και την επαγωγή των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Όλα αυτά συμβαίνουν στην επαγόμενη από DOX καρδιοτοξικότητα. Παρόλο που δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα αποδείξεις αυτοφαγίας στην επαγόμενη από DOX καρδιοτοξικότητα, είναι πιθανό ότι η DOX είναι ικανή να επάγει αυτοφαγία των καρδιομυοκυττάρων, που μπορεί να είναι προστατευτική ή επιβλαβής, ανάλογα με τα επίπεδα του στρες, και ιδίως τη δόση της DOX.

### 1.10.3.11. Γήρανση

Η γήρανση, που χαρακτηρίζεται από προοδευτική συσσώρευση μακρομοριακής βλάβης, αναστολής της ανάπτυξης των φυσιολογικών σωματικών κυττάρων και μείωση της λειτουργίας, κυρίως επηρεάζει τα μακράς διάρκειας ζωής μεταμιτωτικά κύτταρα, όπως οι νευρώνες και τα καρδιομυοκύτταρα.



**Εικόνα 1.15: Μηχανισμοί δράσης της δοξορουβικίνης στα καρδιομυοκύτταρα [750].**

Αποτελεί έναν παράγοντα κινδύνου για την καρδιακή δυσλειτουργία και τις ασθένειες της καρδιάς [751]. Οι γνωστοί παράγοντες, που εμπλέκονται στη γήρανση των καρδιομυοκυττάρων περιλαμβάνουν οξειδωτικό στρες, τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση/μεταλλάξεις, φλεγμονή, μειωμένη κυτταρική προστασία και επιδιόρθωση, αλλαγμένος κυτταρικός μεταβολισμός, μεταβολές στο μηχανισμό της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης και το μηχανισμό αυτοφαγίας, και άλλα [752]. Η γήρανση των καρδιομυοκυττάρων μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην επαγόμενη από DOX υποβόσκουσα τοξικότητα του μυοκαρδίου πολλά χρόνια μετά την τελευταία χορήγηση. Μία μελέτη έδειξε ότι καλλιεργημένα καρδιομυοκύτταρα νεογνών αρουραίων, που έχουν μεταχειριστεί με DOX, εκδήλωσαν χαρακτηριστικές αλλαγές, παρόμοιες με καρδιομυοκύτταρα γηρασμένων αρουραίων. Το οξειδωτικό στρες και η ακετυλίωση της p53 μπορεί να εμπλέκονται σε αυτήν τη διαδικασία [753].

## 1.11. Η HSP70 ΣΤΙΣ ΚΑΡΔΙΑΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

Η οικογένεια των επαγόμενων από στρες Hsp70 πρωτεϊνών αποτελεί την πιο εκτεταμένα μελετημένη στις καρδιαγγειακές παθήσεις. Τόσο πειραματικά, όσο και κλινικά στοιχεία υποδεικνύουν ότι η επαγόμενη Hsp70 αποτελεί καίριο στοιχείο ενδογενών μονοπατιών, τα οποία περιορίζουν την έκταση της βλάβης στο μυοκάρδιο στην περίπτωση τραυματισμών λόγω πειραματικής ισχαιμίας-επαναιμάτωσης [78] ή μετά από χειρουργική επέμβαση στην καρδιά [754]. Είναι αναπόφευκτος ως ένα βαθμό ο ισχαιμικός τραυματισμός των καρδιομυοκυττάρων σε περιπτώσεις

εγχειρήσεων ανοικτής καρδιάς. Οι αορτικές διασυνδέσεις και η καρδιοπνευμονική παράκαμψη προάγουν την ολική ισχαιμία του μυοκαρδίου, επηρεάζοντας την ακεραιότητα των κυτταροσκελετικών και των συσταλών πρωτεϊνών [754].

Στην κλινική πράξη, εφαρμόζονται αρκετές προσεγγίσεις για την καθυστέρηση της εξέλιξης των συμπτωμάτων της ισχαιμίας, μεταξύ των οποίων είναι και η χρήση της Hsp70, που εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα. Η Hsp70 προωθεί την επιβίωση των καρδιομυοκυττάρων, διατηρώντας υψηλά τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ουσιών και αναστέλλοντας τα προαποπτωτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των αποπτωτικών καταρρακτών που ελέγχονται από τις κασπάσες και τον Fas. Η ιδέα της προ-επώασης στο θερμικό πλήγμα ως ενίσχυση της καρδιακής λειτουργίας προ-ισχαιμικά απεδείχθη πρώτη φορά in vivo σε επίμυες, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε αυξημένη θερμοκρασία 24 ώρες πριν το ισχαιμικό επεισόδιο. Η προεπώαση είχε ως αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης δεικτών των βλαβών του μυοκαρδίου σε συνδυασμό με ταχύτερη ανάρρωση και βελτιωμένη συσταλτικότητα του καρδιακού ιστού. Αργότερα απεδείχθη και η αρνητική σχέση μεταξύ της ποσότητας της Hsp70, που εκφράζεται στα καρδιομυοκύτταρα και στο μέγεθος του εμφράγματος, ενώ αρκετές απόπειρες με διαγονιδιακά ζώα επιβεβαίωσαν ότι η Hsp70 παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του μυοκαρδίου σε πειραματικά μοντέλα, προστατεύοντας τα ποντίκια κατά τη διάρκεια σύντομου ισχαιμικού επεισοδίου, αλλά και ελαττώνοντας τη θνησιμότητα σε περίπτωση εμφράγματος μετά από εκτεταμένη ισχαιμία. Πράγματι, καρδιές, που απομονώθηκαν από διαγονιδιακά ποντίκια, που σχεδιάστηκαν για να εκφράζουν ανθρώπινες Hsps στο μυοκάρδιο, έδειξαν σημαντικά βελτιωμένη λειτουργική αποκατάσταση, με μειωμένο μέγεθος εμφράγματος μετά από πειραματική επαγωγή ισχαιμίας και επαναιμάτωσης [755-757]. Η Hsp70 μπορεί να συνδέεται σε μετουσιωμένες πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και να προωθεί την αναδίπλωση ή την αναδιάταξη σε κανονικές διαμορφώσεις κατά την επανέγχυση. Σε ένα σύστημα κουνελιών με βλάβες στο μυοκάρδιο λόγω ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, απεδείχθη ότι η ενδομυοκαρδιακή ένεση με αδενοϊό, που φέρει κατασκευή με την ανθρώπινη Hsp70, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά δύο φορές του μεγέθους του εμφράκτου σε σχέση με τα πειραματόζωα ελέγχου [78]. Έτσι, η αύξηση της έκφρασης της Hsp70 στον καρδιακό ιστό σε πειραματικά συστήματα, βελτίωσε σημαντικά τη διάσωσή του από τον κίνδυνο ισχαιμικού εμφράγματος σε συνδυασμό με τη βελτίωση της καρδιακής συσταλτικότητας μεθ-ισχαιμικά [754]. Η παρουσία της ανθρώπινης Hsp70 σε διαγονιδιακές καρδιές φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη βελτιωμένη μετά-ισχαιμική συσταλτική ανάκαμψη.

Μια μελέτη έδειξε ότι η προστασία του μυοκαρδίου, που παρέχεται από την υπερρύθμιση της Hsp70 είναι στενά εξαρτώμενη από την καταστολή των φλεγμονωδών κυτοκινών σε ένα μοντέλο ισχαιμίας και βλάβης επαναιμάτωσης [758]. Υπάρχουν, επίσης, άλλες ενδεχόμενες προστατευτικές λειτουργίες, που έχουν ανατεθεί στην Hsp70. Συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι η Hsp70 μπορεί να βελτιώσει τη διαδικασία της αποκατάστασης των ινών μετά από βλάβη του μυοκαρδίου, ενισχύοντας τη σύνθεση του κολλαγόνου και την επιδιόρθωση των καναλιών ιόντων [759]. Έχει δείχτει ότι το άνοιγμα των ευαίσθητων σε ATP καναλιών καλίου, ειδικά των μιτοχονδριακών καναλιών, είναι ένα κρίσιμο βήμα για τη σύνθεση του ATP στα κύτταρα του μυοκαρδίου [760]. Με την επιδιόρθωση αυτών των καναλιών ιόντων κάτω από συνθήκες στρες, η υπερρύθμιση της Hsp70 μπορεί να προστατέψει το μιτοχονδριακό ενεργειακό μεταβολισμό, καθώς και την κυτταρική λειτουργία στην τραυματισμένη καρδιά [761].

Στον άνθρωπο, καινοτόμες μελέτες σε επεμβατικές περιπτώσεις καρδιάς έδειξαν ότι ακόμη και σε περιορισμένο χρονικό διάστημα το μυοκάρδιο αποκρίνεται στην ισχαιμία αυξάνοντας την έκφραση της Hsp70. Δείγματα από μυοκάρδιο έδειξαν αύξηση στη μεταγραφική έκφραση της Hsp70 αλλά και αύξηση στην ποσότητά της μετά το πέρας της τοποθέτησης μοσχεύματος σε επέμβαση παράκαμψης στένωσης της στεφανιαίας αρτηρίας. Μελέτες σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε εγχείρηση ανοικτής καρδιάς έδειξαν ότι αυξήθηκαν τα επίπεδα της Hsp70 στις αορτικές διασυνδέσεις στο 40% των περιπτώσεων. Ασθενείς με υψηλά επίπεδα λειτουργικής Hsp70 στο μυοκάρδιο εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα βιοχημικών δεικτών μυοκαρδιακής βλάβης μετεγχειρητικά, ενώ ασθενείς, στους οποίους δεν αυξήθηκε η μυοκαρδιακή έκφραση της Hsp70 περι-χειρουργικά, εμφάνισαν σχεδόν διπλάσια έκφραση των δεικτών αυτών μετεγχειρητικά. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν την ιδέα ότι η ενδοκυττάρια Hsp70 προστατεύει το ανθρώπινο μυοκάρδιο από ισχαιμικές προσβολές. Κλείνοντας, φαίνεται πως οι καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες της Hsp70 σχετίζονται και με την ηλικία [754].

Ο χρονικός ορίζοντας επαγωγής της Hsp70 επηρεάζει το βαθμό της λειτουργικής δράσης της ως μοριακού συνοδού σε περιπτώσεις ισχαιμίας και επαναιμάτωσης. Μερικές μελέτες ασχολήθηκαν ειδικά με την κινητική της αύξησης στην έκφραση της Hsp70 *in vitro*, αλλά και *in vivo*. Σε συστήματα επίμυος, αύξηση της θερμοκρασίας σε ολόκληρο το σώμα, οδήγησε στην επαγωγή της αύξησης της Hsp70 μεταξύ 3 και 72 ωρών, ενώ η ευεργετική επίδραση της προ-επώασης στο μέγεθος του εμφράγματος μεθ-ισχαιμικά μεγιστοποιήθηκε στο χρόνο μεταξύ 48 και 72 ωρών. Επιπλέον, βρέθηκε αυξανόμενη συγκέντρωση των επιπέδων της Hsp70 κατά τη διάρκεια εγχείρησης ανοικτής καρδιάς, με αύξηση πάνω από δυο φορές μετά από 2 ώρες, παρόμοια με αυτή στα πειραματικά συστήματα. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι η προετοιμασία για ισχαιμία προχειρουργικά μπορεί να επάγει τα καρδιοπροστατευτικά αποτελέσματα της Hsp70. Πράγματι, δύο κύκλοι ισχαιμίας-επαναιμάτωσης ως προετοιμασία πριν από την αντικατάσταση βαλβίδων, βρέθηκε ότι μειώνει τις καρδιομυϊκές δομικές αλλοιώσεις και βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία μετεγχειρητικά. Τα στοιχεία αυτά συγκεντρωτικά δείχνουν ότι η Hsp70 στο ανθρώπινο μυοκάρδιο επάγεται μέσα σε μια σύντομη χρονική περίοδο μετά την έναρξη του ισχαιμικού επεισοδίου [754].

Η υπερέκφραση της HSP70 στο μυ της αριστερής κοιλίας (LV), ακολούθως προστατεύει την καρδιά από βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Μια προηγούμενη μελέτη έδειξε καλύτερη ανάκαμψη της λειτουργίας και μικρότερη διαρροή της φωσφοκινάσης της κρεατίνης μετά από ισχαιμία σε καρδιές, που έχουν επιμολυνθεί με το γονίδιο της HSP70, σε σχέση με τις καρδιές ελέγχου ή καρδιές, που δεν έχουν μεταχειριστεί [762]. Η απόκτηση της καρδιακής ανθεκτικότητας σε ισχαιμία, μετά από ισχαιμική προεπεξεργασία ή θερμικό σοκ, είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο, που περιλαμβάνει διάφορους άλλους πιθανούς μηχανισμούς. Αυτοί περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C [763, 764], τον υποδοχέα κινάση τυροσίνης [765], την ενεργοποιούμενη από στρες MAPKAP κινάση 2 [766], τον NF-κΒ [767], τις συνθάσες νιτρικού οξειδίου [768, 769], τα αμυντικά συστήματα αντιοξειδωτικών, όπως οι αυξημένες δραστηριότητες της SOD [770] και της καταλάσης [771], το άνοιγμα των ATP-ευαίσθητων καναλιών καλίου [772, 773] ή πιθανώς και άλλων άγνωστων μηχανισμών. Κάποιοι από τους παραπάνω διαμεσολαβητές μπορεί να έχουν ρόλο στα σηματοδοτικά μονοπάτια, οδηγώντας στη σύνθεση  $\geq 1$  των προστατευτικών πρωτεϊνών, που περιλαμβάνουν την HSP70 [774].

Τέλος, έχει δειχτεί ότι καρδιές θηλυκών Sprague-Dawley αρουραίων έχουν δύο φορές περισσότερη HSP70 από τις αρσενικές καρδιές, εξαιτίας της υπερρύθμισης

τους από το οιστρογόνο [775]. Το περιεχόμενο της HSP70 μπορεί να συνεισφέρει στις βιοχημικές διαφοροποιήσεις, που μπορούν να καθορίζουν την ευπάθεια του ιστού. Ο προσδιορισμός του μεγαλύτερου ποσού της HSP70 στο ήπαρ από ότι στην καρδιά θηλυκών αρουραίων, που έχουν μεταχειριστεί με DOX, και η αντιστοιχία τους στη μεγαλύτερη ιστική διατήρηση στο ήπαρ σε σχέση με την καρδιά, μπορεί να είναι σημαντικά για την κατανόηση της λειτουργίας αυτής της πρωτεΐνης στη διαφορετική ζημιά των οργάνων.

## 1.12. HSP70 ΚΑΙ ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗ

Τα στοιχεία, που υπάρχουν για την προστατευτική επίδραση της Hsp70 ενάντια στην τοξικότητα, καθώς και για την εμπλοκή της στους μηχανισμούς δράσης της δοξορουβικίνης, είναι αρκετά περιορισμένα, καθώς δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα μέχρι σήμερα. Ο προστατευτικός ρόλος της Hsp70 ενάντια στην επαγόμενη από DOX απόπτωση μπορεί να περιλαμβάνει κάποια πτυχή του ρόλου της στην αναδίπλωση και την επιδιόρθωση της λειτουργίας των πρωτεϊνών, που είναι σημαντικές για την αναστολή της απόπτωσης στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα, καθώς και την εμπλοκή της στα αποπτωτικά μονοπάτια, που προαναφέρθηκαν, και που προκαλούνται από τη δοξορουβικίνη. Οι Hsps μπορούν να επέμβουν ευνοϊκά με τα ROS-επαγόμενα φαινόμενα, εξαιτίας του βιολογικού τους ρόλου ως "μοριακοί συνοδοί".

Έχει αναφερθεί η συσσώρευση της Hsp70, συμπεριλαμβανομένης της Hsp72, από τη Dox [776]. Επίσης, έχει αναφερθεί η μεταβολική ζημιά από τη Dox, που περιλαμβάνει αυξημένη παραγωγή των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, που είναι γνωστό να επάγουν αυξημένη έκφραση των Hsps [777-779]. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η Dox μπορεί, εν δυνάμει, να ενισχύει την παραγωγή των επαγόμενων από θερμότητα Hsps. Έχει αναφερθεί ότι η επαγωγή της βλάβης του DNA από τη Dox υποστηρίζει μια πιθανή σχέση ανάμεσα στη διαμεσολαβούμενη από ρίζες υδροξυλίου διάσπαση του DNA και την πυρηνική μετατόπιση της Hsp70 πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η μεταχείριση με Dox μπορεί να επάγει τη μετατόπιση της Hsp70 στον πυρήνα για την προστασία της DNA χρωματίνης από περαιτέρω ζημιά. Παρατηρήθηκε ότι η Hsp70 μετατοπίζεται στον πυρήνα, και συγκεκριμένα στον πυρηνίσκο, σε HeLa κύτταρα, μετά από προσθήκη της DOX στο μέσο, και αυτό συσχετίζεται με δραστικές αλλαγές στη μορφολογία και λειτουργία του πυρηνίσκου.

Σε μια μελέτη η έκφραση των επιπέδων της HSP70 στα κύτταρα συσχετίζεται με την επιβίωση τους, μετά από επεξεργασία με DOX [228, 261, 462]. Σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού, η δοξορουβικίνη επάγει τις Hsp27 και Hsp70 [780]. Έχει δείχτει ότι τα αντικαρκινικά φάρμακα μπορούν να επάγουν τη δραστηριότητα δέσμευσης στο DNA του HSF1 και η μερική φωσφορυλίωση του HSF1 και η επαγόμενη από το φάρμακο ενεργοποίηση του HSF1 οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των μιτοχονδριακών HSP75 και HSP60. Σε ένα μοντέλο δοξορουβικίνης, το οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί τον HSF-1, ο οποίος δρα για να παράγει περισσότερη Hsp25, που σταθεροποιεί την p53 και αυξάνει την παραγωγή των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών [781]. Η Hsp70 είναι ικανή να αναστέλλει την απόπτωση. Σε HL60 κύτταρα, δείχτηκε ότι η DOX προκαλεί εξαρτώμενη από κασπάσες απόπτωση, που μπορεί να ανασταλεί από την Hsp70 [782].

Επιπρόσθετα, η βλάβη του DNA, που εισάγεται από τη δοξορουβικίνη, προκαλεί τα κύτταρα στόχους να συσσωρεύονται στην G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου [783, 784]. Μετά την προσθήκη δοξορουβικίνης, τα κύτταρα συσσωρεύονται

στην όψιμη S και κυρίως, στην G2/M φάση. Στα σχετικά πρώιμα χρονικά σημεία, οι συγκεντρώσεις της δοξορουβικίνης επάγουν μια μείωση των κυττάρων στο G1 κλάσμα, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκφρασης της hsp70. Τα στοιχεία δείχνουν ότι το G2/M σημείο ελέγχου για την είσοδο στη μίτωση είναι λειτουργικό στα κύτταρα και δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την υπερέκφραση της hsp70. Στα όψιμα χρονικά σημεία, παρόλα αυτά, κύτταρα, που υπερεκφράζουν την hsp70, επιδεικνύουν μια αξιοσημείωτη αύξηση στα κύτταρα στο G1 κλάσμα, ενώ τα κύτταρα ελέγχου παραμένουν σε κατάσταση αναστολής του κυτταρικού τους κύκλου. Η παρατήρηση ότι η υπερέκφραση της hsp70 ενισχύει την ικανότητα για επανεκκίνηση του πολλαπλασιασμού μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου και προτείνει εμπλοκή της hsp70 στον έλεγχο της διάρκειας της G2 αναστολής του κυτταρικού κύκλου κατά τη διάρκεια της χορήγησης δοξορουβικίνης [785].

Έχει, επίσης, αναφερθεί ότι οι παραγόμενες από DOX ROS επάγουν την απόπτωση, ενεργοποιώντας τις p38 MAPKs υπομονάδες α και β. Είναι ενδιαφέρον ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs), που επάγονται σε απόκριση στο στρες, έχουν βρεθεί να φωσφορυλιώνονται από τη MAPKAP-2 (MAPK-Assisted Protein Kinase 2, καθοδικά της p38 MAPK) και οι φωσφορυλιωμένες HSPs μπορούν να δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές της απόπτωσης [786, 787], προτείνοντας ότι η επαγωγή των HSPs θα ρυθμίζει την p38 MAPK και, πιθανώς, αναστέλλει την επαγόμενη από DOX απόπτωση, παρόλο που η νέα αυτή υπόθεση παραμένει να διευκρινιστεί πλήρως [788].

Η εμπλοκή του SAPK/JNK μονοπατιού έχει, επίσης, αναφερθεί στην επαγόμενη από DOX απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα [789], και μπορεί, επομένως, να πιθανολογηθεί ότι η Hsp70, πιθανώς, αναστέλλει την απόπτωση σε κάποιο σημείο καθοδικά της ενεργοποίησης της SAPK/JNK. Παρόλο που τα ενδοκυτταρικά σήματα του JNK/SAPK μονοπατιού, που συνδέονται με κυτταρική βλάβη από αντικαρκινικά φάρμακα, είναι ακόμη ασαφή, υπάρχουν αποδείξεις ότι η HSP70 διαμεσολαβεί την καταστολή της JNK/SAPK, ένα πρώιμο συστατικό του επαγόμενου από στρες αποπτωτικού σηματοδοτικού μονοπατιού [463, 790].

Ο ρόλος της Hsp70 στα επαγόμενα από δοξορουβικίνη αποπτωτικά μονοπάτια παραμένει, ακόμη σήμερα, ένα πεδίο έρευνας, και μένει να αποσαφηνιστεί περαιτέρω.

### **1.13. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟ DOX ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΠΑΘΕΙΑΣ**

Η πρόκληση για το μέλλον είναι να σχεδιαστούν πρωτόκολλα, που να είναι καρδιοπροστατευτικά τόσο για τις βραχυπρόθεσμες όσο και για τις μακροπρόθεσμες επιδράσεις της δοξορουβικίνης, κατά προτίμηση χωρίς μακροπρόθεσμη χορήγηση και χωρίς να εμποδίζεται η αντικαρκινική δράση του φαρμάκου. Το πιο αποτελεσματικό εργαλείο για να αποτραπεί η επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητα είναι η ρύθμιση της δόσης. Ο περιορισμός της σωρευτικής δόσης της DOX είναι η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στην καρδιοτοξικότητα [791]. Πρόσθετες στρατηγικές, που έχουν χρησιμοποιηθεί στην προσπάθεια για την πρόληψη της επαγόμενης από DOX μυοκαρδιοπάθειας, περιλαμβάνουν τη χρήση DOX αναλόγων, εναλλακτικές μεθόδους χορήγησης φαρμάκων, αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη E, το νιτροξειδίο πιπεριδίνης, λιποφιλικές παγίδες στροφορμής (spin), η μελατονίνη, η βιταμίνη A και η βιταμίνη C [792], αναγωγικές ουσίες που περιέχουν θειόλη (γλουταθειόνη, N-ακετυλοκυστεΐνη, S-αλλυλ-κυστεΐνη, αμφοστίνη), η ανηγμένη γλουταθειόνη [793],

το PZ51 (seleorganic compound) [794], το ελαιανολικό και το ουρσολικό οξύ [795] και η αμβροξόλη [796], καθώς και η προβουκόλη. Άλλοι καρδιοπροστατευτικοί παράγοντες επιγραμματικά είναι ο χηλικός παράγοντας σιδήρου δεξαζοξάνη, το monoHER (συστατικό του φλαβονοειδούς Venoruton), οι βήτα-αδρενεργικοί ανταγωνιστές και οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE) - όπως οι καρβεδιλόλη, μετοπρολόλη και οι αναστολείς εναλαπρίλη ή ραμιπρίλη-, η ερυθροποιητίνη, η σιλδεναφίλη, η ρεσβερατρόλη, ενώ ευεργετική επίδραση έχουν η θεραπεία καρδιακού επανασυγχρονισμού (CRT) και η μεταμόσχευση [578].

Εναλλακτικές μέθοδοι χορήγησης του φαρμάκου, όπως η ηπιότερη (πιο αργή) έγχυση μειώνει σημαντικά την καρδιοτοξικότητα της DOX. Η χρήση λιποσωμάτων για τη στόχευση της χορήγησης της DOX μπορεί να μειώσει την καρδιοτοξικότητα της. Καθώς η παραγωγή ROS θεωρείται ένας πρωταρχικός μηχανισμός της επαγόμενης από DOX καρδιοτοξικότητας, κλινικές προσεγγίσεις, που σχεδιάστηκαν για την εξασθένηση της επαγόμενης από DOX καρδιοτοξικότητας, απαρτίζονται από αντιοξειδωτικά, χηλωτές σιδήρου και καθαριστές ελευθέρων ριζών. Άλλες ενδεχόμενες προσεγγίσεις στην αυξημένη απόκριση στον όγκο και μειωμένη καρδιοτοξικότητα, περιλαμβάνουν την εφαρμογή λιποσωμικών ανθρακυκλινών, προφαρμάκων και παραγώγων της DOX [797-801]. Σύμφωνα με μια πιο πρόσφατη μελέτη, μία άλλη υποσχόμενη μέθοδος είναι η εύρεση υποψηφίων με την ικανότητα να σχηματίζουν διαχυτούς μεταβολίτες, που απομακρύνουν την περίσσεια ανθρακυκλινών και αποτρέπουν τη συσσώρευση στην καρδιά [802]. Τα ευεργετικά αποτελέσματα της άσκησης στον καρδιακό μυ έχουν ευρέως αναφερθεί και περιλαμβάνουν την υπεργύθμιση των αντιοξειδωτικών συστημάτων της καρδιάς [803], τη βελτίωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, τη μείωση του σχηματισμού παραπροϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης [804] και την επαγωγή της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Hsps) [805].

Τέλος, αποτελέσματα μελετών της προστασίας του μυοκαρδίου με τις Hsps έχει παρακινήσει αρκετούς ερευνητές να εξετάσουν τις θεραπευτικές δυνατότητες των μορίων αυτών σε κλινικό επίπεδο. Μία ήπια θερμική κατεργασία πριν από υποθερμική αποθήκευση έχει δείχτει να βελτιώνει τη λειτουργική ανάκαμψη της μεταμοσχευμένης καρδιάς [759, 806]. Νέες θεραπευτικές στρατηγικές περιλαμβάνουν τόσο φαρμακολογικές παρεμβάσεις όσο και τεχνικές μεταφοράς γονιδίων. Τεχνικές μεταφοράς των hsp γονιδίων αντιπροσωπεύουν μια υποσχόμενη στρατηγική θεραπευτικής παρέμβασης σε αυτό το πεδίο. Η χρήση συμπλόκων λιποσώματος, που διανέμουν hsp γονίδια μέσω ενδοστεφανιαίας έγχυσης [807, 808] μπορεί να αποτελεί μια ελπιδοφόρα υποψήφια στρατηγική για προστασία του μυοκαρδίου. Η ανάπτυξη ιϊκών φορέων, ικανών να μεταφέρει με ασφάλεια και αποτελεσματικότητα τα hsp γονίδια στα κύτταρα της καρδιάς [809, 810], δίνει ελπίδα ότι οι hsp θα μπορούσαν να μεταφερθούν στην καρδιά με ασφαλείς και αποτελεσματικούς ιϊκούς φορείς.

## 1.14. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η Hsp70 συμμετέχει σε ευρείας κλίμακας διαδικασίες και μηχανισμούς τόσο σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο οργανισμού, καθώς συσχετίζεται με διάφορες ασθένειες και παθοφυσιολογικές καταστάσεις.

Δεδομένου ότι η δοξορουβικίνη αποτελεί ένα δυνητικό παράγοντα πρόκλησης καρδιακής ανεπάρκειας, ο σκοπός αυτής της εργασίας, σε πρώτο στάδιο, είναι να διερευνηθεί η ενδεχόμενη προστατευτική επίδραση της πρωτεΐνης Hsp70 στην καρδιακή δυσλειτουργία, που επάγεται από τη δοξορουβικίνη, καθώς και οι μηχανισμοί δράσης της, σε ένα μοντέλο διαγονιδιακών ποντικών, στους οποίους υπερεκφράζεται σταθερά η Hsp70. Σε δεύτερο στάδιο, αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη των μηχανισμών με τους οποίους ασκείται η τοξική δράση της δοξορουβικίνης, σε πρωτογενείς εμβρυϊκές κυτταρικές καλλιέργειες, που απομονώθηκαν από τα Hsp70-διαγονιδιακά ποντίκια και από ποντίκια άγριου τύπου. Επίσης, στόχος της έρευνας μας είναι και η διαλεύκανση του ρόλου της Hsp70 ενάντια στην τοξικότητα του φαρμάκου στα κύτταρα, καθώς και η εξέταση της πιθανής συμμετοχής και του σημείου δράσεως της πρωτεΐνης στο αποπτωτικό μονοπάτι, που επάγεται από τη δοξορουβικίνη.



## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**



## 2.1 Καλλιέργειες κυττάρων

### 2.1.1. Κυτταρικές σειρές

Η ανάπτυξη των κυττάρων και των δύο κυτταρικών σειρών (F1/F1 και Tg/Tg), που χρησιμοποιήθηκαν, έγινε σύμφωνα με τις συνθήκες που έχουν προταθεί από την Αμερικανική Κυτταρική Συλλογή (American Type Culture Collection, ATCC) σε αποστειρωμένα τρυβλία μιας χρήσης διαμέτρου 10 cm (Πιο αναλυτικά στην ενότητα 2.2).

### 2.1.2. Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων

- Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών υλοποιήθηκε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο κυτταροκαλλιέργειας (cell culture room), ο οποίος διατηρείται στείρος με τη χρήση υπερϊώδους ακτινοβολίας. Ο χώρος βρίσκεται υπό σταθερή θερμοκρασία 21-23 °C με τη βοήθεια χρήσης κλιματιστικού.
- Προς αποφυγή των μολύνσεων, οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιούνται σε εστία νηματικής ροής (Gelairé BHNG laminar air flow class 100 και AURA 2000 MAC), στον οποίο όλα τα αντικείμενα επεξεργασίας των κυττάρων εισάγονται κατόπιν ψεκασμού με 70% αιθανόλη για λόγους αποστείρωσης.
- Η ανάπτυξη των κυττάρων γίνεται σε επωαστικό κλίβανο (Napco, CO<sub>2</sub> Water-Jacket Incubator Precision Scientific και Forma, Direct Heat CO<sub>2</sub> Incubator, Forma Scientific) υπό σταθερή θερμοκρασία 37°C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub> για τη διατήρηση του pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.
- Η παρατήρηση (μικροσκοπικός έλεγχος) των κυττάρων πραγματοποιείται σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Olympus CK2– Olympus Optical Co. Ltd.).
- Η ανάπτυξη των κύτταρων πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία ή πολυτρυβλία πολυστυρενίου (CELLSTAR® - Greiner Bio-one) μιας χρήσης.
- Η μακρόχρονη αποθήκευση των κυττάρων για μακρόχρονη συντήρηση γίνεται σε δοχείο υγρού αζώτου (-192 °C).
- Τα υλικά, που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια και την επεξεργασία των κυττάρων, εξάγονται από την ψύξη και θερμαίνονται σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 37°C (Julabo - Bioline Scientific General Purpose Waterbath 5015WB).
- Όλα τα υλικά και σκεύη, που χρησιμοποιήσαμε κατά την περάτωση της εργασίας (τρυβλία, πιπέττες, φιαλίδια, φυγοκεντρικοί σωλήνες), ήταν μιας χρήσης και αποστειρωμένα.
- Οι φιάλες και τα διαλύματα, που παρασκευάστηκαν, αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο (Sanyo, Electric Co) για 25 λεπτά στους 120°C.
- Για την παρατήρηση και φωτογράφιση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε και οπτικό μικροσκόπιο (Nikon, Eclipse E400), όπου η ανάλυση, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν η plan fluor 40X, καθώς και φωτογραφική μηχανή Superhigh-Performance 3X Zoom Digital Camera (Nikon, Coolpix 990).

### 2.1.3. Υλικά κυτταροκαλλιέργειας

#### Θρεπτικό υλικό

Τα κύτταρα, τα οποία ήταν σε εναιώρημα, καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Biochrom). Το υγρό θρεπτικό υλικό, επίσης, παρασκευάζεται από το αντίστοιχο στερεό μετά από διάλυση του με δις- απεσταγμένο νερό υπό συνεχή ανάδευση. Το θρεπτικό υλικό παρασκευάζεται με διάλυση σε 10 λίτρα ddH<sub>2</sub>O σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών, με ταυτόχρονη προσθήκη 3,7 g/l όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO<sub>3</sub>) και ρυθμίστηκε με τη βοήθεια pH-μέτρου (Consort C863 multi parameter analyzer) σε pH 7,4. Το θρεπτικό υλικό εν συνεχεία αποστειρώθηκε με διήθηση σε διηθητική διάταξη (MILLIPORE), στην οποία τοποθετήθηκαν προφίλτρα γυάλινων ινών (MILLIPORE #AP1512450) και φίλτρα PVDF 0,22 μm (Durapore membrane filters – Millipore #GVWP14250), με τη βοήθεια αντλίας κενού (MILLIPORE #XX5522050) από φίλτρο της MILLIPORE. Το θρεπτικό υλικό διατηρείται στους 4 °C έως ότου χρησιμοποιηθεί. Πριν τη χρήση του θρεπτικού μέσου, προστίθενται 5ml/500ml από τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (PAA) (10<sup>5</sup>U/10<sup>5</sup>μg ανά λίτρο αντίστοιχα) για την αποφυγή μικροβιακών μολύνσεων, καθώς και 13,5% ορός FBS.

#### Ρυθμιστικό διάλυμα (PBS)

Οι εκπλύσεις των κυττάρων από το θρεπτικό υλικό ή από τις ουσίες με τις οποίες τυχόν επώαστηκαν, προκειμένου να ακολουθήσουμε διάφορα πρωτόκολλα επεξεργασίας τους, πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του ισότονου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων, PBS (Phosphate Buffered Saline), ελλειμματικού σε ιόντα Ca<sup>2+</sup> και Mg<sup>2+</sup>. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται διαλύοντας 0,4% w/v NaCl, 0,01% w/v KCl, 0,072% w/v Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, και 0,012% w/v KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (137 mM NaCl, 10.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> και 2.68 mM KCl (Merck, Darmstadt, Germany)). Το διάλυμα ρυθμίζεται σε pH 7,3 με τη βοήθεια ορθοφωσφορικού οξέος 85%. Εμείς, για την παρασκευή του PBS χρησιμοποιήσαμε πέντε παστίλιες (Phosphate Buffered Saline της εταιρείας Sigma, #P 4417-SOTAB) σε ένα λίτρο δις-απεσταγμένου νερού. Μετά την παρασκευή του, αποστειρώνεται για 30 λεπτά στους 121°C, σε αυτόκαυστο (Rayra steam sterilizer – R. Espinar S.L.) (Sanyo, Electric Co) και τέλος τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένες φιάλες στους 4°C έως τη χρησιμοποίησή του.

#### Ορός (FBS)

Σε όλες τις κυτταρικές καλλιέργειες το θρεπτικό υλικό εμπλουτίζεται πριν από τη χρήση του με ορό που έχει ληφθεί από αίμα εμβρύων βοοειδών (FBS – PAA #A15-043, Fetal Bovine Serum, Biochrom, Gibco BRL), ελεγμένο για ενδοτοξίνες και μυκόπλασμα, σε τελική συγκέντρωση 13,5 %. Η προσθήκη του ορού είναι απαραίτητη για τον εμπλουτισμό του θρεπτικού υλικού σε αυξητικούς (αναπτυξιακούς) παράγοντες, αναγκαίους για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

### Διάλυμα Θρυψίνης /EDTA (Trypsin/EDTA)

Η αποκόλληση των κυττάρων από το ταπήτιο των τρυβλίων, δηλαδή η αποκόλλησή τους από το υπόστρωμα, επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης/EDTA (#L11-004, PAA) 0.05%/0.02% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα D-PBS ελλειμματικού σε ιόντα  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$ , σε συγκέντρωση 1x για χρήση. Η επίδραση με θρυψίνη (σε κατάλληλο χρόνο ανάλογα με την κυτταρική σειρά), βοηθά στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (ECM), προκειμένου να επιτυγχάνεται η δημιουργία μονοκύτταρου κυτταρικού εναιωρήματος.

### Υλικά - Αναλώσιμα

- Τρυβλία των 5 και 10 cm (Greiner Bio-one), όπου έγινε η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών.
- Τα διαλύματα φυλάσσονται σε γυάλινα μπουκάλια των 500 ml (Isolab Germany, Pyrex και Schott Duran) και των 100 ml (Gibco BRL και Biochrom KG).
- Αυτόματες πιπέτες (Gilson) των 20, 100, 200 και 1000  $\mu$ l (2-20, 20-100, 20-200, 200-1000  $\mu$ l) με τη χρήση αποστειρωμένων μπλε και κίτρινων tips (Sarstedt) για τη μεταφορά μικρών όγκων διαλυμάτων, καθώς και πολυπιπέτες (20-200, 200-1000  $\mu$ l).
- Πιπέτες των 5, 10 και 25 ml (Corning Incorporated) σε συσκευή Pipet-akku (Hirschman Laborgeräte) για τη μεταφορά όγκων διαλυμάτων.
- Αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur (Brand GmbH & Co. KG) για την αναρρόφηση των υγρών από τα τρυβλία μέσω παγίδας κενού συνδεδεμένης με βρύση του χώρου της κυτταροκαλλιέργειας.
- Κρυοφιαλίδια ψύξης (cryovials) (NYNC) του 1 ml για την αποθήκευση των κυττάρων σε υγρό άζωτο.
- Πολυτρυβλία των 96 φρεατίων.
- Πλάκες Neubauer, για μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο.
- Πλαστικά μπουκαλάκια Falcon (15 ml και 50ml) για αποθήκευση και μεταφορά διαλυμάτων.
- Σύριγγες 1ml, 25G, της εταιρίας BD.

## 2.2 Κυτταρικές σειρές

Η μελέτη μας πραγματοποιήθηκε σε πρωτογενείς καλλιέργειες ιστών ή κυτταροκαλλιέργειες εμβρύων, προερχόμενα από ομοζυγωτικά αγρίου τύπου και Hsp70-διαγονιδιακά ποντίκια. Σε πρώτη φάση έγινε διασταύρωση σε επιλεγθέντα ομοζυγωτικά αρσενικά και θηλυκά Hsp70-διαγονιδιακά ποντίκια, σύμφωνα με τον τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.1.1. Έμβρυα 10-13 ημερών αφαιρέθηκαν από τις μήτρες των εγκύων μητέρων και από τα έμβρυα δημιουργήσαμε πρωτογενείς εμβρυϊκές καλλιέργειες.

Οι πρωτογενείς εμβρυϊκές κυτταρικές σειρές, που προέκυψαν και χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας, ήταν από τα αγρίου τύπου ποντίκια, τα F1/F1 κύτταρα, και από τα διαγονιδιακά ποντίκια, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, τα Tg/Tg κύτταρα.

Επίσης, στα πλαίσια της έρευνας μας, χρησιμοποιήθηκαν και οι κυτταρικές σειρές NIH-3T3 και C2C12, ως επιπλέον κύτταρα ελέγχου (control) για τον έλεγχο της απόπτωσης ή της έκφρασης της Hsp70 και άλλων πρωτεϊνών.

NIH-3T3 κύτταρα: Εμβρυϊκή κυτταρική σειρά ινοβλαστών ποντικών.

C2C12 κύτταρα: Κυτταρική σειρά μυϊκών κυττάρων ποντικών. Πρόκειται για μυοβλάστες ποντικού, οι οποίοι διαφοροποιούνται ταχύτατα, δίνοντας συσταλτές μυϊκές ίνες και εκφράζουν χαρακτηριστικές πρωτεΐνες των μυών.

## **2.2.1 Απομόνωση ινοβλαστών και δημιουργία πρωτογενών καλλιιεργειών**

1. Μετά τη θανάτωση του πειραματόζωου, που είναι σε κύηση (10-13 μέρα) εμβαπτίζεται σε διάλυμα 70% αλκοόλης και τοποθετείται στην εστία νηματικής ροής. Αν είναι δυνατόν αφήνεται κάτω από το UV για 5 λεπτά.
2. Με μια αποστειρωμένη λαβίδα ανοίγεται το ζώο μέχρι την περιοχή της μήτρας. Με καινούργιες λαβίδες απομονώνεται η μήτρα και τοποθετείται σε ένα τρυβλίο. Απομακρύνεται ο εξωεμβρυϊκός ιστός και με τη βοήθεια PBS απομακρύνεται το αίμα. Συνεχίζονται οι εκπλύσεις με PBS μέχρι το διάλυμα να είναι καθαρό.
3. Μεταφέρονται 6-8 έμβρυα σε ένα αποστειρωμένο ποτήρι ζέσεως και τεμαχίζονται με αποστειρωμένα ψαλίδια με PBS. Κάτω από άσηπτες συνθήκες τα τεμαχισμένα έμβρυα μεταφέρονται σε μια αποστειρωμένη φλάσκα των 500 ml.
4. Προστίθενται 400ml ακατέργαστης DNAάσης (DNAase), με σκοπό την προφύλαξη του διαλύματος από το να γίνει κολλώδες, λόγω της απελευθέρωσης του DNA. Στη συνέχεια προστίθεται 0.25% θρυψίνη σε HBSS (GIBCO/BRL).
5. Αναδεύεται το εκχύλισμα στους 37° C για 15 λεπτά.
6. Οι ιστοί θα παραμείνουν στον πυθμένα με τη βαρύτητα και το υπερκείμενο διάλυμα με τα εναιωρούμενα κύτταρα συλλέγεται σε ένα φυγοκεντρικό σωλήνα μεγάλου μεγέθους, που περιέχει 1ml ορού (FCS)/10ml εναιωρήματος για να αδρανοποιηθεί η θρυψίνη. Ακολουθεί η προσθήκη φρέσκου διαλύματος θρυψίνης στα εναπομείναντα άπεπτα τεμάχια σε μια φλάσκα και επαναλαμβάνονται τα βήματα 7 και 8.
7. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα εναιωρήματα των κυττάρων σε 1200 στροφές για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
8. Ακολουθεί επαναιώρηση των κυττάρων σε PBS και φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 5 λεπτά.
9. Στη συνέχεια, γίνεται έκπλυση των κυττάρων μερικές φορές με PBS μέχρι το υπερκείμενο να είναι καθαρό.
10. Γίνεται επαναιώρηση της τελικής δεξαμενής των κυττάρων με 10ml DMEM, που περιέχει 10% ορό (FCS) και αντιβιοτικά (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη) μέχρι τελικού όγκου 100 ml.
11. Τα μη διαλυμένα τμήματα του ιστού κατακρημνίζονται με τη βαρύτητα ή ακολουθεί πέραςμα του εναιωρήματος των κυττάρων από μια αποστειρωμένη γάζα.
12. Προκειμένου να υπολογισθεί η συγκέντρωση των παρόντων κυττάρων προστίθενται 0.2 ml του εναιωρήματος και 1.8ml 1% οξικού οξέος, προκειμένου να λυθούν τα τυχόν ερυθρά αιμοσφαίρια, που υπάρχουν, και ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο. Μια τυπική τιμή για έμβρυα 15 ημερών ανά ml είναι  $5 \cdot 10^7$  -  $1 \cdot 10^8$  κύτταρα.
13. Ακολουθεί σπορά 10.000.000-40.000.000 κυττάρων ανά τρυβλίο, που περιέχει 10ml θρεπτικό υλικό και επωάζονται μέχρι το ταπήτιο να είναι πλήρες.

14. Όταν οι καλλιέργειες γίνουν πλήρεις, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και ακολούθως γίνεται δύο φορές πλύση με 10ml θερμό διάλυμα versene (0.53mM EDTA σε PBS).

15. Ακολουθεί ίσος θερμικός όγκος 0.05% θρυψίνης-EDTA.

16. Πραγματοποιείται επώαση στους 37<sup>0</sup> για 5 λεπτά.

17. Με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης πιπέτας γίνεται σπορά των κυττάρων σε ένα αποστειρωμένο φυγοκεντρικό σωλήνα που περιέχει 1-2 ml ορού (FCS). Η τελική συγκέντρωση του ορού θα πρέπει να είναι 10%.

18. Μετά τη φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1200 στροφές για 5 λεπτά, απομακρύνεται το υπερκείμενο.

19. Ακολουθεί επαναιώρηση των κυττάρων σε 5ml θρεπτικού υλικού και μετά την προσθήκη επί πλέον 15 ml του μέσου, το εναιώρημα μοιράζεται σε δύο τρυβλία των 100 mm διαμέτρου.

20. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C στον επωαστικό κλίβανο και όταν το ταπήτιο γίνει πλήρες, τότε συνεχίζουμε από το βήμα 15-20.

#### **HBSS**

8g/l NaCl

400mg/l KCl

60mg/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> μονοβασικό

47.86mg/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> άνυδρο

1000mg/l γλυκόζη άνυδρη

350mg/l NaHCO<sub>3</sub>

#### **Ακατέργαστη DNAάση (Crude Dnase)**

10mg/ml DNAάση σε 0.3M NaCl, που περιέχει 50% γλυκερόλη.

Αποθηκεύεται στους -20°C.

### **2.3. Ανάπτυξη, διατήρηση και αποθήκευση κυττάρων**

- Αρχικά, τα κύτταρα, τα οποία βρίσκονται αποθηκευμένα σε υγρό άζωτο σε θερμοκρασία -192°C μέσα σε φιαλίδια ψύξης (Corning), αποψύχονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37° C.
- Στη συνέχεια, επαναιωρούνται σε 10 ml θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με ορό FBS 13,5% και αντιβιοτικά σε συγκέντρωση 0,1 mg/ml (10000U/10000μg/ml πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης, Biochrom).
- Τα τρυβλία τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες, ώστε τα κύτταρα να προσκολληθούν και να σχηματίσουν μονοστοιβάδα (ταπήτιο).
- Μετά το πέρας των 24 ωρών, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ξεπλένονται τρεις φορές με 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline της εταιρείας Sigma) κάθε φορά, και στη συνέχεια, προστίθεται εκ νέου θρεπτικό υλικό, ώστε τα κύτταρα να αναπτυχθούν και να καταλάβουν όλη τη διαθέσιμη επιφάνεια των τρυβλίων.
- Ακολούθως, πραγματοποιείται η διαδικασία της ανακαλλιέργειας. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται τρεις φορές με 10 ml PBS και με τη δράση 1,5 ml διαλύματος θρυψίνης-EDTA (Trypsin-EDTA) (PAA) 0,4% για 2-3 λεπτά ώστε να ανασηκωθούν από το υπόστρωμα, αυτά αποκολλώνται (θρυψινοποιούνται). Προστίθεται ποσότητα θρεπτικού υλικού (4,5 ml), με σκοπό να σταματήσει η δράση της θρυψίνης και τα κύτταρα συλλέγονται σε μονοκύτταρο εναιώρημα με τη βοήθεια συνεχών αναρροφήσεων-εκροφήσεων

με αυτόματη πιπέττα. Τα κύτταρα, στη συνέχεια, μεταφέρονται σε νέα τρυβλία με καινούριο θρεπτικό υλικό.

- Στην περίπτωση που τα κύτταρα είναι απαραίτητο να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα, τοποθετούνται σε ειδικό μέσο αποθήκευσης, προκειμένου να διατηρηθούν ζωντανά, στο υγρό άζωτο σε θερμοκρασία  $-192^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3.1. Αποθήκευση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών**

Για τη μακροχρόνια αποθήκευση και συντήρηση των κυτταρικών σειρών ακολουθείται η διαδικασία αποθήκευσης σε υγρό άζωτο. Για να πραγματοποιήσουμε τη διαδικασία αυτή, αρχικά, σε κύτταρα, που βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα ξεπλένονται τρεις φορές με διάλυμα 10 ml PBS 1X κάθε φορά. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα θρυψίνης/EDTA 1X και τα κύτταρα επωάζονται έως 5 λεπτά, μέχρι να ανασηκωθούν από το υπόστρωμα. Για τη διευκόλυνση της αποκόλλησης, μπορούν να εφαρμοστούν ελαφρά χτυπήματα στη βάση του σκεύους καλλιέργειας. Μετά την αποκόλλησή τους, συλλέγεται το 80% των κυττάρων από πλήρες ταπήτιο, σε θρεπτικό υλικό (4,5 ml), για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης και τα κύτταρα συλλέγονται σε φυγοκεντρικούς σωλήνες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3.000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρείται το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 1 ml διαλύματος ψύξης, το οποίο αποτελείται από 90% v/v FBS και 10% v/v DMSO (Dimethylsulfoxid Methyl Sulfoxide της εταιρείας Sigma-Aldrich). Το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται σε κρυοφιαλίδιο ψύξης (cryovial) (Greiner Bio-one) του 1,5 ml, και για 15 λεπτά περίπου παραμένει σε λουτρό πάγου, ενώ στη συνέχεια μεταφέρεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 16 ώρες και τέλος σε δοχείο υγρού αζώτου (Taylor-Wharton) στους  $-192^{\circ}\text{C}$ . Έτσι, με τον τρόπο αυτό, η μείωση της θερμοκρασίας, πραγματοποιείται σταδιακά και όχι απότομα, γεγονός που θα προκαλούσε θάνατο μεγάλου αριθμού κυττάρων.

### **2.4. Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα θηλαστικών**

Προκειμένου να απομονωθεί το συνολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών από μονή στοιβάδα κυττάρων θηλαστικών σε τρυβλίο χωρητικότητας 10 ml (5 ml), αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και ακολουθεί διπλή έκπλυση των κυττάρων με 10 ml (5 ml), ανά έκπλυση, διαλύματος PBS. Συμπληρώνουμε το τρυβλίο με 7 ml (3 ml) διαλύματος PBS. Με ένα φύλλο σιλκόνης τα κύτταρα αποκολλούνται από το ταπήτιο του τρυβλίου, συλλέγονται σε αποστειρωμένα φυγοκεντρικά σωληνάκια των 10 ml και φυγοκεντρώνονται στις 3.000 rpm για 3 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$  (Sigma - #D-37520, Germany). Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης απομακρύνεται το υπερκείμενο, τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρούνται σε 1 ml PBS και μεταφέρονται σε μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια eppendorf, στον πάγο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται σύντομη φυγοκέντρηση για 8 δευτερόλεπτα στις 11.000 rpm σε φυγόκεντρο για eppendorfs (Eppendorf Centrifuge 5417 C, Germany), σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρείται το υπερκείμενο πλήρως με αναρρόφηση υπό κενό (στο στάδιο αυτό τα κύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν για σύντομο χρονικό διάστημα στους  $-80^{\circ}\text{C}$ ) και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 300  $\mu\text{l}$  (200  $\mu\text{l}$ )



διαλύματος RIPA (5% v/v Tris-HCl pH 7.5 1M, 3% v/v NaCl 5M, 1% v/v Triton-X-100 100%, 10% v/v sodium deoxycholate 10%, 1% v/v SDS 10%), στο οποίο προστίθενται αμέσως πριν τη χρήση 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin και 0.5 µg/ml pepstatin. Το εναιώρημα επωάζεται για 20 min στον πάγο. Στα πρώτα 10 λεπτά διευκολύνεται η κυτταρική λύση περνώντας το εκχύλισμα από σύριγγα 1 ml (Kessler #SH.K01) μέσα από βελόνα 21x1½ G (UNOLOK single use needles – HMD Healthcare Limited, UK) και ανάδευση σε Vortex (K-550-GE – Scientific Industries Inc, USA). Για την τελική διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών, το εναιώρημα οδηγείται σε συσκευή υπερήχων (Vibra Cell VCX 130PB – Sonics & Materials Inc, USA), όπου και εφαρμόζονται παλμοί των 30 sec στο 30% της ισχύος της κεφαλής, μέσα στον πάγο, προκειμένου να αποφευχθεί η υπερθέρμανσή του. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε πλήρη ταχύτητα (14.800 rpm) για 20 λεπτά στους 4°C σε μικροφυγόκεντρο erppendorf. Το υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί και το ολικό κυτταρικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα, συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα erppendorf, όπου επαναιωρείται σε διάλυμα φόρτωσης 5x (3,785% w/v Trizma base, 15% w/v SDS, 50% v/v γλυκερόλη 87%, 25% v/v 2-μερκαπτοαιθανόλη), ρυθμισμένο σε pH 6.8 και εμπλουτισμένο με 0.5% w/v κυανό της βρωμοφαινόλης και θερμαίνεται προς αποδιάταξη στους 100°C για 5 min σε θερμική συσκευή (heatblock) (Test Tube Heater SHT 10 – Stuart Scientific Co. Ltd, Great Britain).

## 2.5. Πειραματόζωα

Για τις ανάγκες των πειραμάτων μελέτης της επίδρασης της δοξορουβικίνης στην καρδιά, χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια των στελεχών CBAx C57BL/6J, τόσο αγρίου τύπου (F1/F1) (EKEBE Φλέμινγκ), όσο και διαγονιδιακά ποντίκια (Tg/Tg), τα οποία υπερεκφράζουν την ανθρώπινη Hsp70 και δημιουργήθηκαν στο Ινστιτούτο Παστέρ Αθηνών με τη βοήθεια του καθηγητή Γ. Κόλλια, όπως έχει ήδη περιγραφεί [78, 811]. Για όλα τα πρωτόκολλα που έχουν σχέση με τα πειραματόζωα, έχει ληφθεί σχετική άδεια μετά από κατάθεσή τους στην κτηνιατρική υπηρεσία της Νομαρχίας Ιωαννίνων.



### **2.5.1. Συντήρηση πειραματοζώων**

Προκειμένου να διατηρηθεί υγιής ο πληθυσμός των πειραματοζώων, χρειάζονται κάποιες ενέργειες για τη συντήρησή τους. Συγκεκριμένα, τα κλουβιά πρέπει να καθαρίζονται και να αλλάζονται δύο φορές την εβδομάδα. Επιπλέον, πρέπει να προστίθεται τροφή και νερό όποτε είναι απαραίτητο, ενώ κάθε δύο μέρες θα πρέπει να τοποθετείται στο κλουβί φρέσκο πόσιμο νερό.

Σημαντικό είναι να αποφεύγεται ο υπερπληθυσμός μέσα σε κάθε κλουβί, διότι οδηγεί σε φαινόμενα επιθετικότητας και κανιβαλισμού, που ενέχουν σοβαρούς κινδύνους πρόκλησης ασθενειών λόγω μολύνσεων από τις πληγές. Λόγω μεγαλύτερης επιθετικότητας στα αρσενικά άτομα, καλό είναι να μην υπερβαίνουν τα 3 άτομα ανά κλουβί, ενώ στα θηλυκά, ο αριθμός αυτός μπορεί να ανέλθει στα 4 άτομα ανά κλουβί.

### **2.5.2. Αναπαραγωγή πειραματοζώων**

Για τη διατήρηση σταθερού πληθυσμού, ικανού να καλύψει τις τυχόν πειραματικές ανάγκες και δεδομένου ότι κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούμε αρσενικά ποντίκια, πρέπει ανά τακτά χρονικά διαστήματα να υποβάλλεται ο πληθυσμός σε αναπαραγωγή.

Δύο ημέρες πριν από την αναπαραγωγή, ένα αρσενικό ζώο τοποθετείται σε ένα άδειο κλουβί, προκειμένου να εγκλιματιστεί στο χώρο. Κατόπιν, τοποθετούνται στο κλουβί δύο θηλυκά ζώα και αφήνονται σε ηρεμία. Δέκα ημέρες μετά την τοποθέτηση των θηλυκών, αφαιρείται το αρσενικό. Η κύηση διαρκεί περίπου τρεις εβδομάδες, δίνοντας 6-7 νεογνά ανά γέννα περίπου. Οι μητέρες παραμένουν στο κλουβί με τα νεογνά για 3 εβδομάδες περίπου, μέχρι να ολοκληρωθεί ο θηλασμός. Κατόπιν, απομακρύνονται οι μητέρες από το κλουβί και τα νεογνά αφήνονται να μεγαλώσουν για 2 ακόμη εβδομάδες, οπότε και γίνεται ο διαχωρισμός των αρσενικών από τα θηλυκά άτομα. Σημαντικό είναι να μην καθυστερήσει πολύ ο διαχωρισμός αυτός, καθώς τα ποντίκια ωριμάζουν γεννητικά σε 3 μήνες και υπάρχει κίνδυνος επιπλέον κυήσεων. Επίσης, τα αρσενικά ζώα (πατέρες) θα πρέπει να μην παραμένουν στα κλουβιά μετά τη γέννα, καθώς μπορεί να πνίξουν τα νεογνά, ενώ υπάρχει η πιθανότητα να καταστήσουν εκ νέου έγκυα τα θηλυκά.

Στην περίπτωση αποτυχημένης κυήσεως (μικρός ή ανύπαρκτος αριθμός απογόνων), μπορούμε να ξαναβάλουμε τα ποντίκια να αναπαραχθούν άμεσα, ειδικά στην περίπτωση που στην αναπαραγωγή θα χρησιμοποιηθούν νεαρά άτομα. Αποτυχημένη κύηση, μπορεί επίσης να συμβεί εάν τα πειραματοζώα, που χρησιμοποιούνται στην αναπαραγωγή είναι μεγαλύτερα των 18 μηνών.

### **2.5.3. Απομόνωση και καθαρισμός ολικού DNA από ιστούς ποντικών**

Για την απομόνωση DNA από ποντικούς, κόψαμε ουρές από τα ζώα, που μας ενδιέφεραν και χρησιμοποιήθηκε το DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen - #69505) με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Συνοπτικά, χρησιμοποιήθηκαν μέχρι 25 mg ιστού, ο οποίος λύεται ολονύκτια παρουσία πρωτεΐνάσης K στους 55°C υπό ανάδευση. Προστίθεται αιθανόλη για τον καθαρισμό του DNA και, κατόπιν, περνάμε το εκχύλισμα από στήλη καθαρισμού.

Εκεί, κατακρατείται μόνο το DNA, ενώ απορρίπτονται όλα τα υπόλοιπα μακρομόρια του ιστού. Η στήλη εκπλένεται στη συνέχεια με διάφορα διαλύματα και εκλύεται το DNA, το οποίο φωτομετρείται για να εξακριβωθεί η πυκνότητά του. Ακολούθως, αποθηκεύεται στους 4°C και είναι έτοιμο για χρήση.

#### 2.5.4. Επιβεβαίωση ομοζυγωτίας για το διαγονίδιο της Hsp70 με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Για την ταυτοποίηση των ποντικών ως προς την ύπαρξη ή μη του διαγονιδίου της ανθρώπινης Hsp70, αλλά και τη διαπίστωση της ομοζυγωτίας ως προς το διαγονίδιο, εφαρμόστηκε ποσοτική PCR στα DNA, που απομονώθηκαν από τις ουρές των ποντικών.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

- 5' *IVS-TRG* (40-μερής):  
5'-TTTTATGGTAATAACGCGCCGGCCCGGCTTCCTTTATCCC-3'
- 3' *HSP70-TRG* (39-μερής):  
5'-TACGCCTCGGCGATCTCCTTCATCTTGGTCAGCACCATG-3'

Για την αντίδραση, χρησιμοποιήθηκε 1 µg απομονωμένου γενωμικού DNA, 500 ng από τον κάθε εκκινητή, 200 mM DNTPs, 1x διάλυμα αντίδρασης Taq πολυμεράσης, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Taq πολυμεράση και συμπληρώνουμε μέχρι τα 100 µl με δις-αποστειρωμένο, φιλτραρισμένο ddH<sub>2</sub>O.

Σαν θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκαν 100 ng από το φορέα pHβ-apr-Hsp70, που φέρει το γονίδιο της ανθρώπινης Hsp70 υπό τον υποκινητή της α-ακτίνης. Λόγω του μεγάλου μεγέθους του προϊόντος, ξεκινάμε την αντίδραση με μια αρχική αποδιάταξη στους 94°C/4min, μετά το πέρας των οποίων τοποθετείται στην αντίδραση η Taq πολυμεράση. Το θερμικό προφίλ της αντίδρασης έχει ως εξής:

- Αποδιάταξη: 1.5 min/94 °C
- Υβριδοποίηση: 1 min/71 °C
- Επιμήκυνση: 2 min/72 °C,

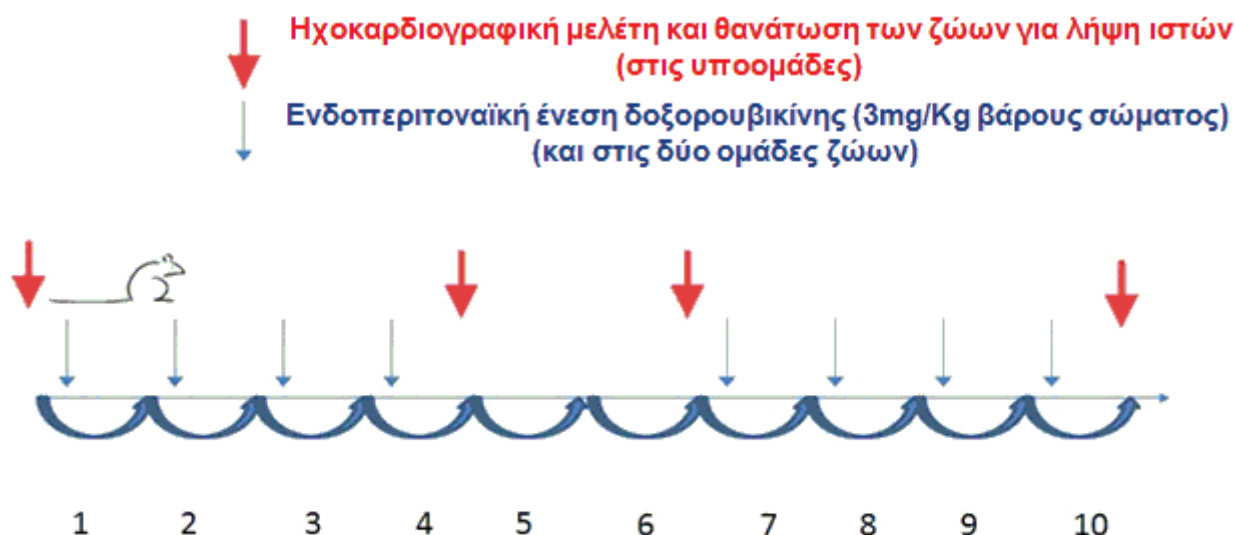
το οποίο επαναλαμβάνεται για 50 κύκλους. Στο τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 7 λεπτά, προκειμένου να κλείσουν όλα τα κενά και να μην υπάρχουν μονόκλινα DNAs. Η αντίδραση αναμένεται να δώσει προϊόν της τάξης των 600 ζευγών βάσεων περίπου. Τα ομόζυγα F1/F1 ζώα δε θα πρέπει να φέρουν προϊόν, τα ομόζυγα Tg/Tg ζώα θα φέρουν έντονα τη διαγνωστική ζώνη στα 600 ζεύγη βάσεων, ενώ τα ετερόζυγα F1/Tg φέρουν μια λιγότερο έντονη ζώνη στα 600 ζεύγη βάσεων, όταν τρέξουμε τα προϊόντα της PCR σε πηκτή 1.5% w/v αγαρόζης σε TBE.

#### 2.5.5. Πρόκληση καρδιακής ανεπάρκειας

Για την πρόκληση καρδιακής ανεπάρκειας στα ποντίκια χρησιμοποιήθηκε η αντνεοπλαστική ουσία δοξορουβικίνη (Pharmachemie BV, Netherlands), η οποία κατά τη χορήγησή της είναι γνωστό ότι προκαλεί τέτοιου είδους επιπλοκές, που μπορεί να οδηγήσουν και στο θάνατο [571].

Η χορήγηση της δοξορουβικίνης πραγματοποιήθηκε κατά διαλείποντα τρόπο ενδοπεριτοναϊκά σε ένα χρονικό ορίζοντα 10 εβδομάδων. Συγκεκριμένα, χορηγήθηκαν 4 δόσεις των 3 mg/kg ανά εβδομάδα, ακολουθούμενες από 2 εβδομάδες

ανάπαυλας με χορήγηση στη συνέχεια άλλων 4 δόσεων ίδιας συγκέντρωσης. Το σκεύασμα αραιώθηκε με φυσιολογικό ορό (0.9% w/v NaCl). Για τον αποκλεισμό πιθανών ενδεχόμενων παρενεργειών στην καρδιακή λειτουργία από το φυσιολογικό ορό, δημιουργήθηκε μια ομάδα ελέγχου, στην οποία χορηγήθηκε ισόποση δόση σε NaCl (φυσιολογικός ορός), όπως στην ομάδα της καρδιακής ανεπάρκειας.



### Εβδομάδες από την εκκίνηση χορήγησης δοξορουβικίνης

**Εικόνα 2.1:** Χρονοδιάγραμμα της μελέτης της πρόκλησης καρδιακής ανεπάρκειας με δοξορουβικίνη στα αγρίου τύπου και στα Hsp70-διαγονιδιακά ποντίκια.

#### 2.5.6. Υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη των ποντικών

Για τη μελέτη της καρδιακής λειτουργίας των ποντικών πραγματοποιήθηκε διαθωρακική ηχοκαρδιογραφία με τη βοήθεια υπερηχογράφου (VIVIDi – GE Healthcare, USA) που φέρει κεφαλή συχνότητας 11.5 MHz, ειδική για νεογνά.

Προκειμένου να αποφευχθεί η αναστάτωση των ζώων, αναισθητοποιήθηκαν με τη βοήθεια 100 mg/kg υδροχλωρικής κεταμίνης (εμπορική ονομασία: Ketalar – Pfizer) και διατηρήθηκαν σε θερμαινόμενη επιφάνεια για τη λήψη M-mode εικόνων 2 διαστάσεων στο άκρο των θηλοειδών μυών. Χρησιμοποιώντας τις εικόνες αυτές, μετρήθηκε τελοδιαστολικά το πάχος του πρόσθιου (AWTd) και οπίσθιου καρδιακού τοιχώματος (PWTd), αλλά και η διάμετρος της αριστερής κοιλίας τελοδιαστολικά (LVDd) και τελοσυστολικά (LVDs), μετρώντας συμβατικά τις αντίστοιχες αποστάσεις. Όλες οι παράμετροι μετρήθηκαν σε τρεις τουλάχιστον καρδιακούς κύκλους.

Επιπλέον, υπολογίστηκε η βράχυνση των κυτταρικών τοιχωμάτων με τον τύπο  $[(LVDd-LVDs)/LVDd] \times 100$ , η μάζα της αριστερής κοιλίας ως  $[1.05 \times \{(PWTd+AWTd+LVDd)^3 - (LVDd)^3\}]$ , η οποία αντιστοιχίστηκε με το αντίστοιχο σωματικό βάρος κάθε ζώου, ενώ ο ρυθμός πάχυνσης των τοιχωμάτων

προς την ακτίνα της καρδιάς (R/H ratio), υπολογίστηκε με τον τύπο  $2x(LVDd/PWTd)$  και χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης δυσμενούς αναδιαμόρφωσης.

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε μονοσήμαντη δοκιμή ANOVA με μετέπειτα ανάλυση Bonferroni, για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα ζώα αναφοράς, ενώ χρησιμοποιήθηκε και ασύζευκτο t-test για τις μετέπειτα συγκρίσεις με την ομάδα ελέγχου. Για τον υπολογισμό της θνητότητας, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος  $\chi^2$  (chi-square test).

### **2.5.7. Λήψη και συντήρηση ιστών**

Μετά την ολοκλήρωση των 10 εβδομάδων χορήγησης δοξορουβικίνης, αλλά και σε διαστήματα 4 και 6 εβδομάδων, ορισμένα ποντίκια (αγρίου τύπου και διαγονιδιακά) τόσο της ομάδας ελέγχου, όσο και της ομάδας καρδιακής ανεπάρκειας, αναισθητοποιήθηκαν, μελετήθηκαν υπερηχογραφικά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (ενότητα 2.5.6.) και ακολούθως θανατώθηκαν για τη λήψη της καρδιάς τους, καθώς και άλλων ιστών.

Τα ζώα ξυρίστηκαν στο ύψος του στέρνου, μέχρι και το ύψος της κοιλιακής χώρας. Ακολούθως, από το ύψος της κοιλιάς και ανερχόμενοι προς το στέρνο, πραγματοποιήθηκε τομή για τη διάνοιξη του δέρματος. Στη συνέχεια, αναισθητώθηκε με λαβίδα το στέρνο, ανοίχθηκε τομή δεξιά και αριστερά του θώρακα, προκειμένου να αποκαλυφθεί το εσωτερικό της θωρακικής κοιλότητας. Προκειμένου να εκπλυθεί η καρδιά από το αίμα, πραγματοποιήθηκε μικρή τομή στο ύψος του αριστερού κόλπου προκειμένου να υπάρχει δίοδος διαφυγής του αίματος και εγχύθηκε μέσω της δεξιάς κοιλιάς παγωμένο PBS μέχρι να εκπλυθεί η καρδιά όσο το δυνατόν καλύτερα (perfusion in situ). Ακολούθως, αποκόπηκε η καρδιά, εμβαπτίστηκε μέσα σε παγωμένο PBS για εκ νέου έκπλυση και αποθηκεύτηκε άμεσα σε υλικό ψύξης Tissue-TEK O.C.T. Compound (Miles Inc, USA), στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για μελλοντική χρήση σε κρυτομές, ή υποβλήθηκε άμεσα σε λύση για πρωτεϊνικό εκχύλισμα, με τον τρόπο που περιγράφεται στην επόμενη ενότητα (Ενότητα 2.5.8), μετά από ζύγιση. Ένα ποσοστό από τους ιστούς, τοποθετήθηκε άμεσα σε αποστειρωμένα σωληνάκια erppendorf και αποθηκεύτηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$  χωρίς να υποστεί κάποια κατεργασία, για μελλοντική χρήση.

### **2.5.8. Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από ιστούς**

Για να εξάγουμε τις πρωτεΐνες από φρέσκο ιστό, κόβουμε την επιθυμητή ποσότητα ιστού και τη ζυγίζουμε σε ζυγό ακριβείας (PLS 360-3 – KERN & Sohn GmbH, Germany). Στη συνέχεια, ομογενοποιούμε τον ιστό σε ομογενοποιητή με ιγδίο (Wheaton - #358005), μέσα σε διάλυμα ουρίας (Urea extraction buffer) (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4 M Urea, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 μg/ml λευπεπτίνη και 0.5 μg/ml πεπστατίνη), σε αναλογία 10 μl διαλύματος εκχύλισης για κάθε mg ιστού. Η λύση των ιστών, που τυχόν δεν έχουν λυθεί, ολοκληρώνεται με τη βοήθεια υπερηχοβολισμού για 30 sec, στο 30% της έντασης της κεφαλής. Τα στερεά υπολείματα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 5 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Το προκύπτον υπερκείμενο (καθαρό πρωτεϊνικό εκχύλισμα), μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι erppendorf και του προστίθεται διάλυμα φόρτωσης 5x.

## **2.6. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)**

Για την ηλεκτροφόρηση και την ανάλυση των πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιήθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, που προήλθαν, όπως σημειώθηκε νωρίτερα, από κύτταρα θηλαστικών (Ενότητα 2.4) ή από ιστούς (Ενότητα 2.5.8).

### **2.6.1. Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Bio-Rad protein assay)**

Η μέτρηση της ποσότητας των πρωτεϊνών έγινε με αξιοποίηση των αρχών της μεθόδου Bradford, κατά την οποία η ερυθρόχρωμη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, όταν προσδεθεί σε κάποια πρωτεΐνη, αλλάζει μέγιστο απορρόφησης από τα 460 nm στα 595 nm, δίνοντας ένα κυανό χρώμα, η ένταση του οποίου μπορεί να μετρηθεί σε φασματοφωτόμετρο. Η μέθοδος βασίζεται στον έμμεσο υπολογισμό της ποσότητας μιας άγνωστης πρωτεΐνης, συγκρίνοντας τις τιμές απορρόφησης στα 595 nm των αγνώστων δειγμάτων, με τις τιμές απορρόφησης πρότυπων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης (συνήθως βόειου αλβουμίνης – BSA), βάσει των οδηγιών της κατασκευάστριας εταιρίας.

Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης για μικρές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών, γίνεται παρασκευάζοντας διαδοχικές αραιώσεις BSA, από 1 μg/ml έως 25 μg/ml, σε ddH<sub>2</sub>O. Τοποθετούμε 0.8 ml από το καθένα από τα πρότυπα δείγματα σε καθαρά σωληνάκια, καθώς και ένα ακόμα δείγμα με 0.8 ml ddH<sub>2</sub>O, που θα αποτελέσει τον αρνητικό μάρτυρα (τυφλό) της φωτομέτρησης. Στη συνέχεια, τοποθετούμε σε όλα τα δείγματα 0.2 ml διαλύματος χρωστικής (Bio-Rad - #500-0006), αναδεύουμε ήπια, και επωάζουμε για τουλάχιστον 5 λεπτά. Ακολουθεί φωτομέτρηση (General Purpose UV/Vis Spectrophotometer DU 520 - Beckman) στα 595 nm και με βάση τον αρνητικό μάρτυρα, κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

Η παρασκευή των προς υπολογισμό αγνώστων δειγμάτων γίνεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Διαλύουμε 10 μl από το δείγμα σε ddH<sub>2</sub>O μέχρι όγκου 0.8 ml, προσθέτουμε τη χρωμογόνο χρωστική μέχρι τελικού όγκου 1 ml και επωάζουμε για τουλάχιστον 5 λεπτά. Όπως και στην περίπτωση της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιούμε αρνητικό μάρτυρα πριν από κάθε μέτρηση. Χρησιμοποιώντας στη συνέχεια την εξίσωση της καμπύλης πρότυπων δειγμάτων, που έχουμε ήδη κατασκευάσει, υπολογίζουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα άγνωστά μας δείγματα με βάση τις τιμές απορρόφησης, που πήραμε από το φασματοφωτόμετρο.

Καθώς η παραπάνω τεχνική αποτελεί μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο, θα πρέπει να προσέχουμε κατά την εκτέλεσή της να μην υπάρχουν τυχόν συσσωματώματα στα δείγματά μας (πρότυπα και άγνωστα), τα οποία ενέχουν τον κίνδυνο ψευδούς αύξησης της οπτικής πυκνότητας του δείγματος, όταν αυτό μετράται από τον ανιχνευτή του φωτομέτρου. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να φιλτράρεται το διάλυμα χρωστικής πριν τη χρήση, καθώς εμφανίζει την τάση σχηματισμού συσσωματωμάτων με την πάροδο του χρόνου. Επίσης, τα πρωτεϊνικά δείγματά μας θα πρέπει να είναι απαλλαγμένα από αδιάλυτα σωματίδια (μεμβράνες κ.λπ). Τέλος, η φωτομέτρηση θα πρέπει να πραγματοποιηθεί το πολύ μέσα σε 30 λεπτά μετά την προσθήκη του διαλύματος χρωστικής στα δείγματα, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός μεγάλων συσσωματωμάτων χρωστικής-πρωτεϊνών που θα μπορούσαν να δώσουν για μια ακόμη φορά ψευδώς μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα.

## 2.6.2. Άλλες μέθοδοι υπολογισμού της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε εκχυλίσματα

Πέραν της μεθόδου Bradford, υπάρχουν και άλλες μέθοδοι προσδιορισμού της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα, με υπολογιστικές μεθόδους, οι οποίες όμως είναι προσεγγιστικές κατά κύριο λόγο και βασίζονται εν πολλοίς στην ύπαρξη προτύπου γνωστής συγκέντρωσης πρωτεΐνης, για έμμεσο υπολογισμό της συγκέντρωσης στα άγνωστα δείγματα. Ο υπολογισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί μετρώντας την ένταση του χρώματος μετά από χρώση της πηκτής ή του φύλλου νιτροκυτταρίνης (μετά από μεταφορά σε αυτό των πρωτεϊνών) με τον τρόπο που θα αναφερθεί παρακάτω (Ενότητα 2.6.4.1), ή τον αριθμό των “pixels” που καταλαμβάνει μια ζώνη μετά από ανοσοαποτύπωση και φωτογράφιση σε υπολογιστή.

Οι μέθοδοι αυτές, λόγω της προσεγγιστικότητάς τους, δεν χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, αλλά κυρίως για έλεγχο της ισοφόρτωσης των δειγμάτων στην πηκτή, δηλαδή τη διαβεβαίωση ότι έχουμε την ίδια ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης σε όλα τα δείγματα, προκειμένου να μπορούμε να τα συγκρίνουμε.

## 2.6.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών, υπό μετουσιωτικές συνθήκες, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση μίας διαστάσεως σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli [812]. Κατά την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιείται σύστημα δύο κάθετων γυάλινων πλακών, μεταξύ των οποίων σχηματίζεται κενό με τη βοήθεια ειδικών διαχωριστικών (spacers) μεταβλητού πάχους (συνήθως 1 mm) (Bio-Rad - #1652932), ανάλογα με την ποσότητα του δείγματος, που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε. Στο διάμεσο του κενού αυτού στοιβάζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου, η οποία αποτελείται από δύο μέρη:

- i. την πηκτή επιστοίβαξης, με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 5% (ddH<sub>2</sub>O, 17% v/v Acrylamide mix (30% w/v acrylamide – Sigma – #A8887 και 0.8% w/v methylene-bis-acrylamide – Fluka - #66667), 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% w/v SDS, 1% w/v APS, 0.1% v/v TEMED).
- ii. την πηκτή διαχωρισμού, με μεταβλητή τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου από 6% έως 15%. Για τις περισσότερες πρωτεΐνες χρησιμοποιούμε πηκτή με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 10% (ddH<sub>2</sub>O, 33% v/v Acrylamide mix, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 1% w/v SDS, 1% w/v APS, 0.1% v/v 0.04% v/v TEMED), ενώ για μικρότερου μεγέθους πρωτεΐνες χρησιμοποιούμε πηκτή με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 15% (ddH<sub>2</sub>O, 50% v/v Acrylamide mix, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 1% w/v SDS, 1% w/v APS, 0.04% v/v TEMED).

Για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli, χρησιμοποιήθηκε αυτό το σύστημα των δύο κάθετων γυάλινων πλακών, μεταξύ των οποίων στοιβάζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Όσον αφορά τα δύο μέρη, στα οποία

χωρίζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου, η μεν πηκτή επιστοιβαξης [H<sub>2</sub>O, 30% Acrylamide mix, 1M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED] είναι με μεγάλο μέγεθος πόρων, ενώ η πηκτή διαχωρισμού [H<sub>2</sub>O, 30% Acrylamide mix, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED] με μικρότερο μέγεθος πόρων.

Τα δύο τελευταία συστατικά της πηκτής (ammonium persulfate – Sigma #A3678, TEMED – Sigma #T8133) επιταχύνουν τον πολυμερισμό της. Ο πολυμερισμός της πηκτής έγινε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά. Ο πολυμερισμός επιταχύνεται επιπλέον με τοποθέτηση της διάταξης σε θερμοκρασία 37°C. Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα των πρωτεϊνών ξηραίνονται σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού, επαναιωρούνται σε 20-30 μl διάλυμα φόρτωσης [62.5 mM Tris-HCl, 3% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0.01% (w/v) bromophenol blue] και θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 100 °C. Η φόρτωση της επιθυμητής ποσότητας των δειγμάτων στην πηκτή γίνεται με σύριγγα Hamilton 50 μl (#705N) μετά από τη θέρμανσή τους. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 60 mA (120 mA στην περίπτωση που θα τρέξουμε ταυτόχρονα δύο πηκτές) και η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται σε περίπου 250V σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (25 mM Tris- HCl, 192 mM Glycine, 0.1% SDS).

## **2.6.4. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)**

### **2.6.4.1. Μεταφορά πρωτεϊνών σε φύλλο νιτροκυτταρίνης**

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης αποσυναρμολογούμε τη διάταξη στην οποία αυτή πραγματοποιήθηκε και εφόσον λάβει χώρα η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Whatman - #10 401 196).

Η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα μεταφοράς (0.58% w/v Tris, 0.292% w/v γλυκίνη και 20% v/v μεθανόλη) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να σταθεροποιηθούν οι πρωτεΐνες και να αποφευχθεί η διάχυσή τους εντός της πηκτής. Στο ίδιο διάλυμα εμβαπτίζονται και 4 κομμάτια ανά πηκτή διηθητικού χαρτιού Whatman 3 mm (#3030 917) διαστάσεων 8.4 cm x 5.5 cm (οι διαστάσεις της πηκτής – mini gel – που χρησιμοποιούμε), καθώς και ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης Hybond C (AMERSHAM) ιδίων διαστάσεων ανά πηκτή, το οποίο πρέπει να παραμείνει εντός του διαλύματος για 10 min προκειμένου να ενυδατωθεί επαρκώς. Ακολούθως, τοποθετούμε τα παραπάνω στην κάθοδο συσκευής ημίξηρης μεταφοράς (Trans-blot SD Semi-dry Transfer Cell – Bio-Rad, U.S.A.) με την εξής σειρά: 2 φύλλα Whatman, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, πηκτή πολυακρυλαμιδίου, 2 φύλλα Whatman. Πριν τοποθετηθεί η άνοδος της συσκευής πάνω από τη διάταξη, διώχνουμε τυχόν φυσαλίδες, που ενδέχεται να παρεμποδίσουν την απρόσκοπτη μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή προς τη μεμβράνη. Διαβρέχουμε και τα δύο ηλεκτρόδια με το διάλυμα μεταφοράς και ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό (PowerPac HC – Bio-Rad, Singapore) στα 15 V για 30 λεπτά.

Στην περίπτωση που έχουμε πολύ μικρή ποσότητα πρωτεΐνης, που θέλουμε να ελέγξουμε, επειδή η ημίξηρη μέθοδος μεταφοράς έχει απώλειες, χρησιμοποιούμε την υγρή μέθοδο μεταφοράς. Το διάλυμα μεταφοράς είναι κι εδώ το ίδιο, όπως και οι



διαστάσεις των φύλλων Whatman, της πηκτής και της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, εφόσον πρόκειται για την περίπτωση mini-gel, αλλά και η διάταξη των επιμέρους τμημάτων. Διαφορά αποτελεί το γεγονός ότι σε κάθε στάδιο της μεταφοράς όλα τα επιμέρους στοιχεία παραμένουν εμβαπτισμένα στο διάλυμα μεταφοράς, αυξάνεται η ένταση του ρεύματος στα 200 mA για χρόνο 45 min, ενώ το διάλυμα μεταφοράς εντός της συσκευής (Criterion Blotter – Bio-Rad) αναδεύεται διαρκώς σε μαγνητικό αναδευτήρα (MR 0 – Heidolph, Germany) προκειμένου να κατανέμεται ομοιόμορφα η θερμότητα που δημιουργείται λόγω της αυξημένης έντασης ρεύματος και ψύχεται προκειμένου να μην αυξηθεί ανεξέλεγκτα η θερμοκρασία του.

#### **2.6.4.2. Χρώση των πρωτεϊνών στην πηκτή με χρωστική Coomassie Blue**

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, πριν (εάν δεν επιθυμούμε περαιτέρω ανάλυση των πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση) ή και μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε φύλλο νιτροκυτταρίνης, οι πρωτεΐνες που έχουν διατρέξει την πηκτή γίνονται ορατές μετά από χρώση σε διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue (0.25% w/v Coomassie Brilliant Blue G250 (Fluka - #27815), 9.2% v/v οξικό οξύ, 45.5% διάλυμα μεθανόλης) για τουλάχιστον 2 ώρες.

Επειδή η παραμονή στο διάλυμα χρώσης βάφει ολόκληρη την πηκτή, είναι απαραίτητος ο αποχρωματισμός της, προκειμένου να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών, οι οποίες παραμένουν χρωματισμένες. Ο αποχρωματισμός αυτός πραγματοποιείται σε διάλυμα αποχρωματισμού 25% v/v μεθανόλης – 7% v/v οξικού οξέος υπό ολονύκτια ανάδευση (περιστροφικός αναδευτήρας RO 2 – Gerhardt, Germany). Μετά την πάροδο 2 ωρών στο διάλυμα αποχρωματισμού, προκειμένου να επιταχυνθεί η διαδικασία, μπορεί να πραγματοποιηθεί αλλαγή του διαλύματος αποχρωματισμού, με την προσθήκη απορροφητικού χαρτιού, το οποίο τραβάει την περίσσεια της χρωστικής.

#### **2.6.4.3. Κάλυψη μη ειδικών θέσεων μεμβράνης (Blocking)**

Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στο φύλλο νιτροκυτταρίνης, η μεμβράνη μεταφέρεται σε 3% w/v φρέσκου διαλύματος μη λιπαρού γάλακτος σε σκόνη (Carnation, Non fat dry milk, Nestle, Switzerland), διαλυμένου σε PBS 1x (διάλυμα μπλοκαρίσματος – Blocking Buffer), όπου και παραμένει υπό ολονύκτια ανάδευση στους 4 °C προκειμένου να καλυφθούν οι θέσεις της μεμβράνης στις οποίες δεν υπάρχουν πρωτεΐνες και θα μπορούσαν να δώσουν μη ειδικές συνδέσεις κατά τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης. Πιο σύντομα, η διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε 10% διάλυμα γάλακτος σε PBS 1x, όπου παραμένει η μεμβράνη υπό ανάδευση για 1 ώρα. Ακολούθως, η μεμβράνη εκπλένεται 2 φορές με PBS 1x. Η διάρκεια της κάθε έκπλυσης είναι 5 λεπτά, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος μπλοκαρίσματος.

#### 2.6.4.4. Επώαση με ειδικά αντισώματα

Στη συνέχεια, ακολουθεί η επώαση με το επιθυμητό πρωτεΐνιο αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη, που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε, στην κατάλληλη αραιώση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη 3% w/v διαλύματος BSA σε PBS 1x. Αναλόγως του τίτλου του αντισώματος, αλλά και της ποσότητας της ολικής πρωτεΐνης εντός του δείγματος, μπορούμε να επώασουμε για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, ή στους 4 °C υπό ολονύκτια ανάδευση.

Προκειμένου να απομακρυνθεί από τη μεμβράνη η περίσσεια του πρωτεΐνιου αντισώματος, το οποίο δεν προσδέθηκε με την πρωτεΐνη, εκπλένεται η μεμβράνη υπό ανάδευση 2 φορές με διάλυμα 0.05% v/v Tween 20 σε PBS 1x, για 5 λεπτά κάθε φορά και ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με δευτερογενές αντίσωμα ειδικό για τις ανοσοσφαιρίνες του είδους προέλευσης του πρωτογενούς αντισώματος. Η επώαση πραγματοποιείται μέσα σε διάλυμα 2.5% w/v μη λιπαρού γάλακτος σε σκόνη, διαλυμένου σε PBS 1x σε θερμοκρασία δωματίου και διαρκεί 60 λεπτά. Το δευτερογενές αντίσωμα φέρει συζευγμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανιού (HRP), το οποίο είναι υπεύθυνο για την αντίδραση χημειοφωταύγειας.

Στην παράγραφο αυτή παρατίθεται μια λίστα με τα αντισώματα (πρωτεύοντα και δευτερεύοντα – συζευγμένα με HRP), που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης.

- Μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την επαγόμενη Hsp70: (Enzo Life Sciences - # SPA-810, κλώνος C92F3A-5), αραιώση 1:1000
- Μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τη συνεχώς εκφραζόμενη Hsc70: (Stressgen - #SPA-815, κλώνος 1B5), αραιώση 1:5000
- Μονοκλωνικό αντίσωμα από ασκίτες ποντικού που αναγνωρίζει την α-τουμπουλίνη: (Sigma - #T5168, κλώνος B-5-1-2), αραιώση 1:5000
- Μονοκλωνικό αντίσωμα από ασκίτες ποντικού που αναγνωρίζει τη β-ακτίνη: (Sigma - #A5441, κλώνος AC-15), αραιώση 1:5000
- Πολυκλωνικό αντίσωμα anti- Cleaved Caspase-9 (Asp353): (Cell Signalling Technology - #9509), αραιώση 1:1000
- Πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την ενεργό μορφή της κασπάσης-3: (BD Pharmingen - #559565, κλώνος C92-605), αραιώση 1:500
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού ειδικό για τα αμινοξέα 764-1014 που βρίσκονται στο C-τελικό άκρο της PARP-1 (anti-PARP-1): (Santa Cruz Biotechnology, Inc. , H-250, sc-7150), αραιώση 1:1000
- Πολυκλωνικό αντίσωμα anti- Phospho-p53 (Ser15): (Cell Signaling Technology - #9284), αραιώση 1:1000
- Μονοκλωνικό αντίσωμα anti- p53: (Santa Cruz Biotechnology, Inc.- #1801), αραιώση 1:40
- Μονοκλωνικό αντίσωμα anti- Bax ειδικό για τα αμινοξέα 1-171 της Baxa περιοχής των ποντικών: (Santa Cruz Biotechnology, Inc. , Bax(B-9): sc -7480), αραιώση 1:200
- Δευτερογενές αντίσωμα από κατσίκα ειδικό για ανοσοσφαιρίνες ποντικού, συζευγμένο με την υπεροξειδάση του ραπανιού (Goat anti-mouse IgG H+L HRP conjugated): (Pierce - #31430), αραιώση 1:10000
- Δευτερογενές αντίσωμα από κατσίκα ειδικό για ανοσοσφαιρίνες κουνελιού, συζευγμένο με την υπεροξειδάση του ραπανιού (Goat anti-rabbit IgG H+L HRP conjugated): (Pierce Biotechnology - #31460), αραιώση 1:3000 έως 1:8000

- Δευτερογενές αντίσωμα από γάιδαρο ειδικό για ανοσοσφαιρίνες κατσίκας, συζευγμένο με την υπεροξειδάση του ραπανιού (Donkey anti-goat IgG H+L HRP conjugated): (Jackson ImmunoResearch - #705-035-003), αραιώση 1:12000
- Δευτερογενές αντίσωμα από κατσίκια, ειδικό για ανοσοσφαιρίνες επίμους, συζευγμένο με την υπεροξειδάση του ραπανιού (Goat anti-rat IgG H+L HRP conjugated): (Pierce Biotechnology - #31470), αραιώση 1:10000.

#### 2.6.4.5. Εμφάνιση των αντιγόνων με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL)

Μετά και την επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, η μεμβράνη εκπλένεται 2 φορές, όπως και προηγουμένως, με διάλυμα 0.05% v/v Tween 20/PBS 1x και ακολουθεί η εφαρμογή της μεθόδου της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, προκειμένου να εμφανισθούν οι ζώνες των επιθυμητών πρωτεϊνών. Η διαδικασία, που ακολουθείται, είναι αυτή που συνιστάται από την κατασκευάστρια εταιρεία στο φύλλο οδηγιών του αντιδραστηρίου ECL (Thermo Scientific - #34080).

Η μέθοδος ECL είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης της υπεροξειδάσης του ραπανιού (HRP) σε συνθήκες ανοσοαποτύπωσης. Η ικανότητα ανίχνευσης ενός αντιγόνου με τη μέθοδο αυτή αγγίζει την τάξη του pg. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ανάμιξη ίσων ποσοτήτων δύο αντιδραστηρίων, ενός υπεροξειδίου και ενός ενισχυτή σήματος. Το μίγμα των δύο αυτών αντιδραστηρίων απλώνεται ομοιόμορφα πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επωάζεται για 5 min, οπότε και πραγματοποιείται η αντίδραση χημειοφωταύγειας μεταξύ του υπεροξειδίου και της HRP. Ακολούθως, απορρίπτεται η περίσσεια του μίγματος ECL και τοποθετείται η μεμβράνη στην ειδική τράπεζα, που φέρει η συσκευή εμφάνισης (Molecular Imager ChemiDOC XRS Imaging System – Bio-Rad, USA).

Ο ανιχνευτής του μηχανήματος εμφάνισης ρυθμίζεται σε πρώτο βήμα στη μέγιστη ευαισθησία, οπότε και μπορεί να ανιχνεύσει το φθορισμό, που δίνει η χημειοφωταύγεια. Σαν δεύτερο βήμα, καθορίζουμε τον τρόπο εμφάνισης, ο οποίος μπορεί να είναι αυτόματος, οπότε η εμφάνιση σταματά μόλις ο ανιχνευτής αντιληφθεί κορεσμό του σήματος. Υπάρχει και η δυνατότητα ρυθμιζόμενης εμφάνισης, είτε καθορίζοντας εξαρχής τον επιθυμητό χρόνο λήψης της φωτογραφίας από το σύστημα, είτε ρυθμίζοντας επιθυμητό χρόνο έναρξης και λήξης της έκθεσης και καθορίζοντας τον αριθμό των φωτογραφιών που επιθυμούμε να λάβει το σύστημα, επιτρέποντας έτσι τη λήψη διαδοχικών χρονικών εικόνων, με τις οποίες μπορούμε να ελέγξουμε τον τρόπο που εξελίσσεται η χημειοφωταύγεια με την πάροδο του χρόνου, που έχουμε θέσει.

Μετά το πέρας της εμφάνισης, ακολουθεί επανέκπλυση της μεμβράνης από το ECL με Tween 20, όπως και πριν, και είτε φυλάσσεται για μελλοντική χρήση σε PBS 1x στους 4 °C, είτε επωάζεται με νέο αντίσωμα (reprobing).

#### 2.6.4.6. Χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με Ponceau S

Προκειμένου να ελέγξουμε εάν έχει πραγματοποιηθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου στο φύλλο νιτροκυτταρίνης, μπορούμε να βάψουμε τη μεμβράνη με διάλυμα Ponceau S (Sigma – P3504) (2% w/v Ponceau S, 50% v/v TCA και 30% w/v θειο-σαλικυλικό οξύ - Sigma #S3147). Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής έναντι άλλων τεχνικών χρώσης της μεμβράνης έγκειται στην ικανότητα επαναχρησιμοποίησης της μεμβράνης, καθώς η χρωστική απομακρύνεται πλήρως από τη μεμβράνη μετά από πλύσεις με PBS 1x.

Η μεμβράνη τοποθετείται σε δοχείο και εμβαπτίζεται μέσα σε διάλυμα Ponceau S, όπου και παραμένει υπό ανάδευση για 5 λεπτά. Αφού ολοκληρωθεί η χρώση της μεμβράνης, η χρωστική επιστρέφεται στο δοχείο της και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη γίνεται με σταδιακό αποχρωματισμό αυτής με τη χρήση δις-απεσταγμένου νερού μέχρι του επιθυμητού βαθμού αποχρωματισμού. Ο πλήρης αποχρωματισμός επιτυγχάνεται, όπως προαναφέρθηκε, με διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης υπό ανάδευση με PBS 1x.

### 2.7. Πειραματικές συνθήκες

- Αρχικά, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία ιστοκαλλιέργειας των 10 cm, καλλιέργειες εναιωρήματος περίπου  $8 \cdot 10^5$  κυττάρων/τρυβλίο από κάθε κυτταρική σειρά (F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα). Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας αυτής, επιλέξαμε τα τρυβλία, τα οποία στο μικροσκόπιο είχαν σχεδόν πλήρες ταπήτιο (confluent).
- Στην αρχή αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και κατόπιν ακολουθούν τρεις πλύσεις με 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline).
- Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τη δράση 1,5 ml διαλύματος θρυψίνης-EDTA 0,4% για 2-3 λεπτά, μέχρι να ανασηκωθούν από το υπόστρωμα. Η δράση της θρυψίνης σταματά με την προσθήκη ποσότητας θρεπτικού υλικού.
- Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρονται σε φυγοκεντρικούς σωλήνες και λαμβάνεται δείγμα 11μl, το οποίο τοποθετείται σε αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer), με σκοπό τη μέτρηση των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο (Nikon). Από τη μέτρηση αυτή στο μικροσκόπιο, υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε ml. Με τον τρόπο αυτό υπολογίζεται εναιώρημα  $8 \cdot 10^5$  κυττάρων και ο αριθμός αυτός των κυττάρων μεταφέρεται σε κάθε νέο τρυβλίο.
- Μετά το πέρας 24 ωρών από τη σπορά, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων τρεις φορές με 10 ml PBS.
- Στη συνέχεια προστίθεται η ουσία (δοξορουβικίνη) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε 10 ml θρεπτικού μέσου DMEM, που περιείχε τις αντίστοιχες δόσεις του φαρμάκου (0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 μM DOX) σε διάλυμα.
- Κατόπιν, κάθε κυτταρική σειρά αφήνεται για επώαση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της ουσίας και για χρονική διάρκεια 24 και 48 ωρών.
- Τα κύτταρα ελέγχου (control) επώαστηκαν μόνο με θρεπτικό υλικό DMEM και καλλιεργήθηκαν με τον ίδιο τρόπο, όπως και τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε δοξορουβικίνη.

Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές και περιελάμβανε τριπλά δείγματα.

## 2.8. Παρασκευή των διαλυμάτων Δοξορουβικίνης

Η δοξορουβικίνη αγοράστηκε από την εταιρεία EBEWE (Doxorubicin “Ebewe” 10mg/5ml). Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα δοξορουβικίνης 1mM από τη συγκέντρωση του παρασκευαστή. Για τη λήψη του διαλύματος από το μπουκαλάκι χρησιμοποιήθηκε σύριγγα του 1ml (BD).

Στη συνέχεια, η δοξορουβικίνη διαλύθηκε με θρεπτικό μέσο και εισήχθη στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων με σκοπό την επίτευξη των τελικών επιθυμητών συγκεντρώσεων του φαρμάκου (0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M DOX). Έτσι, για την επίτευξη των συγκεκριμένων συγκεντρώσεων (σε τρυβλία των 10 cm), χρησιμοποιήσαμε:

- Για τα κύτταρα ελέγχου (control), δηλαδή συγκέντρωσης 0  $\mu$ M, τοποθετούμε σε τρυβλίο μόνο 10 ml θρεπτικού μέσου DMEM.
- Για 0,5 $\mu$ M DOX τοποθετούμε 5  $\mu$ l (5 $\mu$ l διαλύματος DOX και 9995 $\mu$ l θρεπτικό υλικό).
- Για συγκέντρωση 1 $\mu$ M DOX, χρησιμοποιούμε 10  $\mu$ l DOX διαλύματος στα 10 ml θρεπτικού υλικού (10 $\mu$ l διαλύματος DOX και 9990 $\mu$ l θρεπτικό υλικό).
- Για 5 $\mu$ M DOX προσθέτουμε 50  $\mu$ l (50 $\mu$ l διαλύματος DOX και 9950 $\mu$ l θρεπτικό υλικό).
- Για 10 $\mu$ M DOX τοποθετούμε 100  $\mu$ l (100 $\mu$ l διαλύματος DOX και 9900 $\mu$ l θρεπτικό υλικό).
- Για 25 $\mu$ M DOX προστίθεται 250  $\mu$ l (250 $\mu$ l διαλύματος DOX και 9750 $\mu$ l θρεπτικό υλικό).
- Για 50 $\mu$ M DOX χρησιμοποιούνται 500  $\mu$ l (500 $\mu$ l διαλύματος DOX και 9500 $\mu$ l θρεπτικό υλικό).
- Για 100 $\mu$ M DOX τοποθετούμε 1000  $\mu$ l (1000 $\mu$ l διαλύματος DOX και 9000 $\mu$ l θρεπτικό υλικό).
- Με ανάλογο τρόπο δημιουργήθηκαν και τα διαλύματα της ουσίας και για διαφορετικές συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν, ή για διαφορετικά τρυβλία (πολυτρυβλία), στα οποία επώαστηκαν τα κύτταρα.
- Το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε μετά το τέλος του χρόνου επώασης (24 και 48 ώρες), τα κύτταρα ξεπλύθηκαν τρεις φορές με 10 ml PBS κάθε φορά και θρυψινοποιήθηκαν με διάλυμα 1.5 ml θρυψίνης-EDTA 0,4%, ώστε να ανασηκωθούν από το υπόστρωμα.
- Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα θρεπτικού υλικού για να σταματήσει τη δράση της η θρυψίνη. Τα κύτταρα συλλέγονται σε μονοκύτταρο εναιώρημα με τη βοήθεια συνεχών αναρροφήσεων-εκροφήσεων με αυτόματη πιπέτα.
- Ακολούθως τα κύτταρα μετρούνται με αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) σε οπτικό μικροσκόπιο (Nikon) και χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα με τους χειρισμούς, που ακολουθούν για την κάθε πειραματική διαδικασία.

## 2.9. Μέθοδος αποκλεισμού της χρωστικής Trypan Blue (Trypan Blue exclusion assay)

- Η μέθοδος προσδιορισμού της βιωσιμότητας με τη χρησιμοποίηση της χρωστικής Trypan Blue στηρίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής να βάφει επιλεκτικά τα νεκρά κύτταρα (αφού μπορεί να διαπερνά τη μεμβράνη των νεκρών κυττάρων), προσδίδοντας τους ένα έντονο μπλε χρώμα. Σε αντίθεση, τα ζωντανά κύτταρα, επειδή δεν βάφονται με τη συγκεκριμένη χρωστική, στο μικροσκόπιο εμφανίζουν την εικόνα άθικτων κυττάρων, δηλαδή έχουν λευκό (διαφανές) χρώμα.
- Στη μέθοδο αποκλεισμού της χρωστικής Trypan Blue, μετά το πέρας επώασης των κυττάρων με τα διαλύματα του φαρμάκου, τα κύτταρα αφού ξεπλυθούν τρεις φορές με 10 ml PBS, στη συνέχεια, αποκολλούνται με θρυψίνη-EDTA και συλλέγονται σε θρεπτικό υλικό DMEM.
- Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται, στη συνέχεια, σε φυγοκεντρικούς σωλήνες και φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο Sigma 2-4 στις 3000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά.
- Το κυτταρικό ίζημα, το οποίο προκύπτει μετά τη φυγοκέντρωση, αφού πρώτα αφαιρεθεί το υπερκείμενο, αναμειγνύεται με 0,5 ml χρωστικής Trypan Blue 0,4% (Sigma) σε 0,5 ml PBS, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της Trypan Blue να είναι 0,2% και αφήνεται για 10 λεπτά.
- Τελικά, μετράται ο αριθμός των ζωντανών, αλλά και των νεκρών κυττάρων κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο (Nikon) με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer). Η μέτρηση πραγματοποιείται στα τετράγωνα της πλάκας με πλευρά 1mm στα οποία αντιστοιχεί όγκος 0,1 mm<sup>3</sup>. Η κυτταρική βιωσιμότητα υπολογίζεται ως εξής:

Βιωσιμότητα % = (κύτταρα που δεν βάφτηκαν) / (βαμμένα + κύτταρα που δεν βάφτηκαν) και εκφράστηκε τελικά ως ποσοστό (%) επί της βιωσιμότητας των κυττάρων ελέγχου (control).

## 2.10. Μέθοδος προσδιορισμού ικανότητας σχηματισμού αποικιών (Colony forming efficiency)

- Στη μέθοδο αυτή του προσδιορισμού της ικανότητας των κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες, εκτιμάται έμμεσα ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού βάσει του αριθμού και του μεγέθους των αποικιών, που σχηματίζουν τα κύτταρα. Όσο μεγαλύτερος είναι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων, τόσο περισσότερα κύτταρα υπάρχουν στις αποικίες και κατά συνέπεια τόσο μεγαλύτερο είναι και το μέγεθος αυτών.
- Σύμφωνα με τη διαδικασία της μεθόδου αυτής, μετά την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης των κυττάρων στις διάφορες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, σε αυτά, αφού πρώτα αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS, στη συνέχεια προστέθηκε θρυψίνη-EDTA και τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν.
- Κατόπιν μεταφέρεται δείγμα 11μl από το κυτταρικό εναιώρημα σε αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και τα κύτταρα καταμετρούνται σε

οπτικό μικροσκόπιο (Nikon). Μετά την ολοκλήρωση της καταμέτρησης, κύτταρα τοποθετήθηκαν σε νέα τρυβλία διαμέτρου 10 cm σε πυκνότητα 20000 κυττάρων/τρυβλίο.

- Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με ορό 13,5% FBS για 14 ημέρες, έως ότου δημιουργήθηκαν ορατές αποικίες γύρω από κάθε κύτταρο.
- Εφόσον με το πέρας του χρόνου αυτού, σχηματίστηκαν αποικίες, αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS.
- Τα κύτταρα (αποικίες), στη συνέχεια, μονιμοποιήθηκαν με πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα μονιμοποίησης (μεθανόλη 75% v/v και οξικό οξύ 25% v/v) και επωάστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Μετά την αφαίρεση του διαλύματος μονιμοποίησης, τα τρυβλία παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ξηραθούν και κατόπιν ακολούθησε χρώση των αποικιών με διάλυμα χρωστικής Giemsa (χρωστική Giemsa, Riedel-de Haën 10% v/v σε θερμό νερό βρύσης).
- Το διάλυμα της χρωστικής παρέμεινε στα τρυβλία για 30 λεπτά και όταν απομακρύνθηκε από αυτά, οι αποικίες ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης και καταμετρήθηκαν χωριστά σε κάθε τρυβλίο.
- Η ικανότητα των κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:  
Ικανότητα σχηματισμού αποικιών = (#αποικιών κυττάρων) / (#μεμονωμένων κυττάρων) x 100  
και να εκφραστεί τελικά ως ποσοστό (%) επί της ικανότητας σχηματισμού αποικιών των κυττάρων ελέγχου (control).

## 2.11. Κυτταρομετρία ροής

Το κυτταρόμετρο ροής είναι ένα όργανο που ρίχνει φως στα κύτταρα (ή σε άλλα σωματίδια), τα οποία ρέουν μεμονωμένα μέσω πίεσης μέσα από μια κυνελίδα και μπροστά από μια πηγή φωτός, που προέρχεται από κάποιο λέιζερ. Στη συνέχεια, το φως αυτό λαμβάνεται από μια διάταξη, η οποία ανιχνεύει και συσχετίζει τα σήματα, ταξινομώντας τα με βάση κάποιες ιδιότητες, για τις οποίες έχει ρυθμιστεί ο ανιχνευτής (μέγεθος, κοκκίωση, ένταση φθορισμού) και ακολούθως, μας δείχνει μέσω ειδικού λογισμικού το αποτέλεσμα, σε ηλεκτρονικό υπολογιστή [813].

### 2.11.1. Κυτταρομετρία ροής (FACS)

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία τεχνική, η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση παραμέτρων φθορισμού μονήρων κυττάρων, που βρίσκονται σε ένα κυτταρικό εναιώρημα. Εξαιτίας του γεγονότος ότι χρησιμοποιείται ο φθορισμός για την ανάλυση των κυττάρων, η κυτταρομετρία ροής αναφέρεται και ως φθορισμοενεργοποιούμενη κυτταρική σάρωση (Fluorescence Activated Cell Scanning- FACS).

Η μέτρηση των κυτταρικών εναιωρημάτων απαιτεί την υδροδυναμική εστίαση σε μια κεντρική ροή και εισαγωγή των κυττάρων ένα-ένα σε μια κυνελίδα ροής και από μια πηγή προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η ανάλυση των δειγμάτων αξιοποιεί τη

σκέδαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και την παραγόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία, οι οποίες μετρώνται από ειδικούς ανιχνευτές.

Η ακτινοβολία, που συνήθως προέρχεται από ένα ή περισσότερα λέιζερ, είναι απαραίτητη για τη διέγερση των φθορίζουσων χρωστικών, και μετράται από το κυτταρόμετρο ροής ως εκπομπή φθορισμού (Fluorescence Emission). Ταυτόχρονα, όμως, καθώς προσπίπτει στα κύτταρα σκεδάζεται στο χώρο. Η σκέδαση εξαρτάται από τα φυσικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, δίνοντας τη δυνατότητα στο κυτταρόμετρο ροής να διαχωρίζει τον πληθυσμό ενός δείγματος σύμφωνα με την πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter, FSC), η οποία μετράται σε μικρή γωνία 1-19° και καθορίζει το μέγεθος των κυττάρων και την πλευρική σκέδαση (Side Scatter, SSC), που μετράται στις 90° και καθορίζει την κοκκίωση των κυττάρων. Η ταυτόχρονη ανάλυση της πρόσθιας και πλευρικής σκέδασης σε ένα ιστόγραμμα δύο διαστάσεων επιτρέπει τον διαχωρισμό του πληθυσμού ενδιαφέροντος μας από ένα ετερογενές μείγμα ή από θραύσματα νεκρών κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η απομόνωση ηλεκτρονικά του κυτταρικού πληθυσμού που μας ενδιαφέρει με την εφαρμογή μιας περίφραξης (gate) γύρω από αυτόν. Η ανάλυση των υπολοίπων παραμέτρων μπορεί να γίνει με ιστογράμματα έντασης φθορισμού.

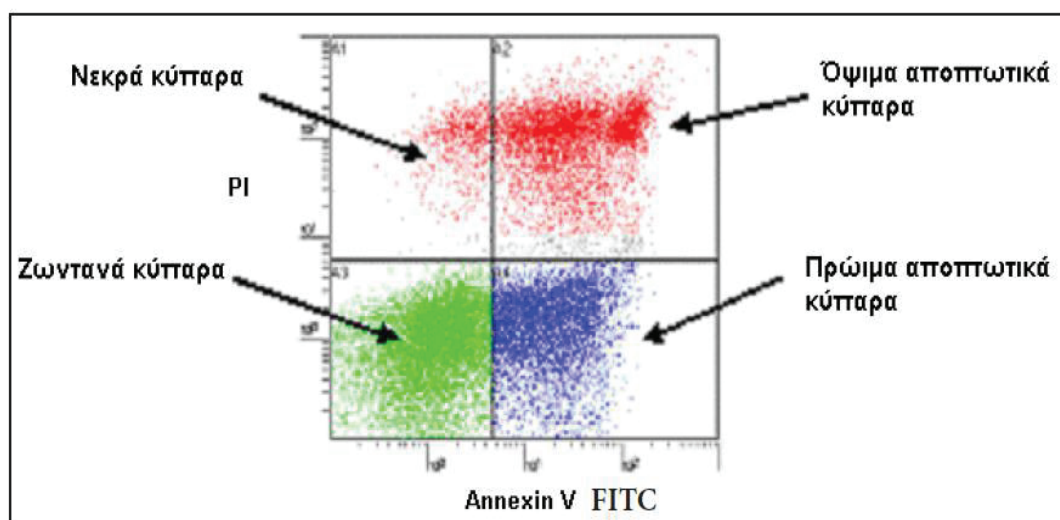
Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες για την μέτρηση φθορισμού από την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (EGFP), του ιωδιούχου προπιδίου αλλά και για τον έμμεσο ανοσοφθορισμό με δευτερεύοντα αντισώματα συζευγμένα με χρωμογόνα ουσία (FITC).

### **2.11.2. Χρώση των κυττάρων με Ιωδιούχο Προπίδιο (pI) και Αννεξίνη V (Annexin-V)**

Για τον προσδιορισμό των αρχικών σταδίων της απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιείται η μέθοδος της Αννεξίνης V, κατά την οποία πραγματοποιείται χρώση των κυττάρων με ιωδιούχο προπίδιο (pI) και αννεξίνη V (Annexin-V). Οι αννεξίνες αποτελούν μια οικογένεια ασβέστιο-εξαρτώμενων πρωτεϊνών, που προσδένονται σε φωσφατιδυλοσερίνες, οι οποίες στα υγιή κύτταρα εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Κατά την έναρξη της απόπτωσης χάνεται η ασυμμετρία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και οι φωσφατιδυλοσερίνες μετατοπίζονται στην εξωκυτταρική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, όπου ανιχνεύονται από τη σημασμένη με FITC Αννεξίνη.

Τα τελευταία στάδια της απόπτωσης χαρακτηρίζονται από τον κατακερματισμό του DNA και τη διαπερατότητα των μεμβρανών. Σε αυτά τα στάδια το ιωδιούχο προπίδιο (PI) είναι δυνατό να εισέρχεται στο κύτταρο και να προσδένεται στο DNA. Στα πρώτα στάδια της απόπτωσης, όμως, τα κύτταρα αποκλείουν την είσοδο σε χρωστικές, όπως είναι το ιωδιούχο προπίδιο. Τα ζωντανά κύτταρα είναι αρνητικά στην Annexin V-FITC και στο PI. Τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα είναι θετικά στην Annexin V-FITC και αρνητικά στο PI. Τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα είναι θετικά στην Annexin V-FITC, αλλά και στο PI, στο οποίο είναι θετικά και τα νεκρά κύτταρα.





**Εικόνα 2.2:** Προσδιορισμός της απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής. Ανάλυση των ποσοστών των πρώιμων αποπτωτικών, όψιμων αποπτωτικών και νεκρών κυττάρων (αλλά και του ποσοστού επιβίωσης του κυτταρικού πληθυσμού), με το συνδυασμό χρώσης Αννεξίνης V και PI, σε κυτταρόμετρο ροής.

Αρχικά, πραγματοποιείται σπορά 1.000.000 κυττάρων σε τρυβλία των 10 ml. Τα κύτταρα διατηρούνται σε επωαστικό θάλαμο σε συνθήκες 37 °C και 5% CO<sub>2</sub>. Με την πάροδο 24 ωρών, πραγματοποιείται η προσθήκη των διάφορων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 μM) και για διάφορους χρόνους επώασης (24 και 48 ώρες). Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, το θρεπτικό υλικό συλλέγεται από κάθε τρυβλίο σε φυγοκεντρικούς σωλήνες (falcon) των 15ml, για να διατηρήσουμε και τα κύτταρα που ενδεχομένως έχουν αποκολληθεί από το ταπήτιο. Ακολουθεί πλύση με 10ml διαλύματος PBS σε κάθε τρυβλίο. Κατόπιν, προστίθενται 1,5 ml θρυψίνης και τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα. Προκειμένου να σταματήσει η δράση της θρυψίνης, προστίθενται 4,5 ml PBS και τα κύτταρα αναδεύονται ήπια με τη χρήση πιπέτας. Αφού αποκολληθούν πλήρως τα κύτταρα, συλλέγονται στα αντίστοιχα φυγοκεντρικά σωληνάρια falcon. Πραγματοποιείται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με χρήση πλάκας Neubauer στο μικροσκόπιο. Τα κύτταρα στους φυγοκεντρικούς σωλήνες φυγοκεντρούνται στις 3.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Η επαναιώρηση των κυτταρικών ιζημάτων γίνεται σε διάλυμα Calcium Buffer 1x. Μετά από τους κατάλληλους υπολογισμούς λαμβάνονται και τοποθετούνται σε erpendorf 100.000 κύτταρα σε 100μl Calcium Buffer 1x.

Τα κύτταρα, στη συνέχεια, μεταφέρονται σε σκοτεινό θάλαμο, όπου σε κάθε erpendorf προστίθενται 5μl Αννεξίνης και 5μl Ιωδιούχο Προπίδιο (PI). Όλα τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Μετά το πέρας των 15 λεπτών προστίθεται επιπλέον 1ml Calcium Buffer 1x (τελικός όγκος 1.1ml). Τα δείγματα μεταφέρονται σε κυτταρόμετρο ροής (CyFlow®ML, Partec, Munster, Germany), όπου πραγματοποιείται ανάλυση και προσδιορισμός του εκατοστιαίου ποσοστού (%) των κυττάρων που βρίσκονται σε αποπτωτική ή νεκρωτική φάση.

Λόγω του αυτοφθορισμού της δοξορουβικίνης, για κάθε συγκέντρωση και χρόνο επώασης χρησιμοποιείται και ένα άβαφο δείγμα (χωρίς προσθήκη PI και Annexin) 100.000 κυττάρων. Μετά τη μέτρηση και των δύο δειγμάτων πραγματοποιήσαμε αφαίρεση του αριθμού των κυττάρων του άβαφου δείγματος από

τον αριθμό των κυττάρων του βαμμένου για κάθε ποσοστό, για να προσδιορίσουμε τα ποσοστά επιβίωσης, νέκρωσης και απόπτωσης για την κάθε περίπτωση.

### 2.11.3. Ανάλυση της έκφρασης της Hsp70 με κυτταρομετρία ροής (FACS)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε θερμικό σοκ (Heat Shock) στους 42,5°C για 90 λεπτά και στις δύο κυτταρικές σειρές (F1/F1 και Tg/Tg) και, στη συνέχεια, τα κύτταρα αφήνονται στους 37 °C με επαναφορά σε επωαστικό κλίβανο για 180 λεπτά (recovery).

Η ανάλυση της έκφρασης της Hsp70 παρουσιάστηκε και με κυτταρομετρία ροής μετά από βαφή των κυττάρων. Στην αρχή, υλοποιείται μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Neubauer και διατηρούνται 1000000 κύτταρα για κάθε δείγμα. Χρησιμοποιείται ένα άβαφο δείγμα (control), ένα το οποίο επωάζεται μόνο με το δεύτερο αντίσωμα (IgG), και ένα που επωάζεται και με τα δύο αντισώματα (FITC), για την κάθε περίπτωση.

Αρχικά πραγματοποιείται η διαδικασία σε όλα τα δείγματα.

- Συγκεντρώνεται το θρεπτικό υλικό από τα τρυβλία και αφού τα φυγοκεντρήσουμε για 3 λεπτά στις 3000 στροφές (rpm), κρατάμε το ίζημα με τα κύτταρα, που πιθανόν είχαν αποκολληθεί.
- Αρχικά πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων δύο φορές με 10 ml PBS.
- Προστίθεται 1,5ml διαλύματος θρυψίνης (Trypsin-EDTA) και τα κύτταρα συλλέγονται σε φυγοκεντρικούς σωλήνες falcon σε 5ml PBS.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 2000 στροφές (rpm).
- Τα κύτταρα, στη συνέχεια, επαναιωρούνται σε 1 ml διαλύματος 1 % w/v παραφορμαλδεΐδης σε PBS.
- Κατόπιν, τα δείγματα αφήνονται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για δέκα λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 2000 στροφές (rpm).
- Τα δείγματα ξεπλένονται πολύ καλά με PBS.
- Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται εκ νέου για 3 λεπτά στις 2000 στροφές (rpm).
- Τα δείγματα ξεπλένονται με 5 ml διαλύματος 0,25% Saponin σε PBS και αναδεύονται αρκετά ήπια.

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαδικασία μόνο στα δείγματα, όπου τα κύτταρα θα επωαστούν και με τα δύο αντισώματα (FITC).

- Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 3 λεπτά στις 2000 στροφές (rpm).
- Επαναιωρούνται τα κύτταρα σε 200μl διαλύματος 0,25% Saponin σε PBS με ποσότητα 1,5 μl του πρώτου μονοκλωνικού αντισώματος, ειδικού για την επαγόμενη Hsp70 (anti-Hsp70).
- Αφήνονται για επώαση στους 37°C για 1 ώρα.
- Μετά το πέρας της 1 ώρας, τα δείγματα συμπληρώνονται με 5ml 0,25% Saponin σε PBS.

Κατόπιν, πραγματοποιείται η διαδικασία στα δείγματα, που θα επωαστούν και με τα δύο αντισώματα (FITC) και στα δείγματα, που θα επωαστούν μόνο με το δεύτερο αντίσωμα (IgG).

- Αρχικά, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 2000 στροφές (rpm).
- Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 200μl διαλύματος 0,25% Saponin σε PBS με 4 μl του δεύτερου αντισώματος anti-mouse FITC.
- Αφήνονται για επώαση στο σκοτάδι στους 37 °C για 1 ώρα.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 3 λεπτά στις 2000 στροφές (rpm).
- Ακολουθεί έκπλυση με 5 ml διαλύματος 0,25% Saponin σε PBS.

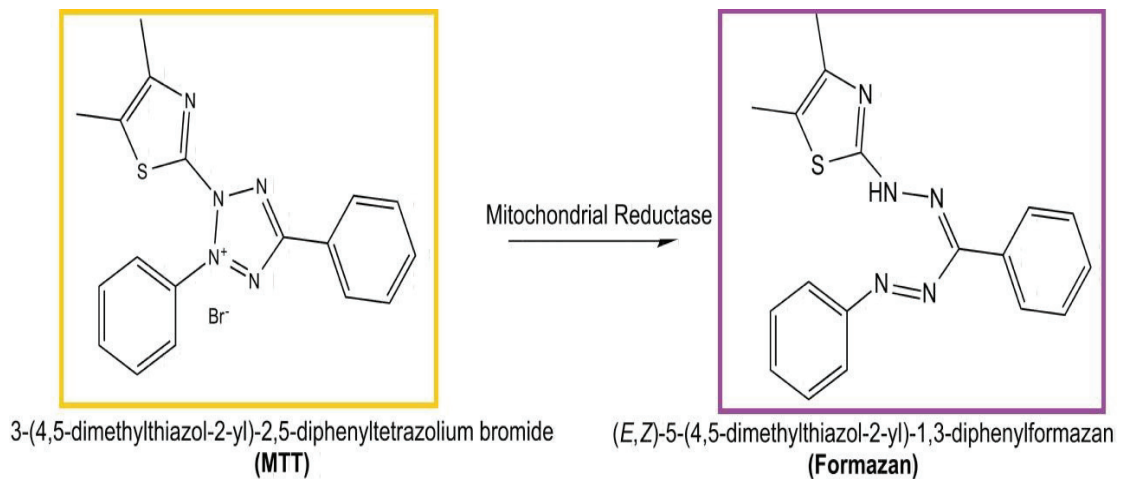
Η υπόλοιπη διαδικασία συνεχίζεται ξανά σε όλα τα δείγματα.

- Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 2000 στροφές (rpm).
- Ακολουθεί έκπλυση των δειγμάτων με 5 ml PBS.
- Εκ νέου φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 2000 στροφές (rpm).
- Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1 ml διαλύματος PBS.
- Τέλος, πραγματοποιείται μέτρηση στο κυτταρόμετρο ροής (FACS).

## **2.12. Έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT (MTT assay)**

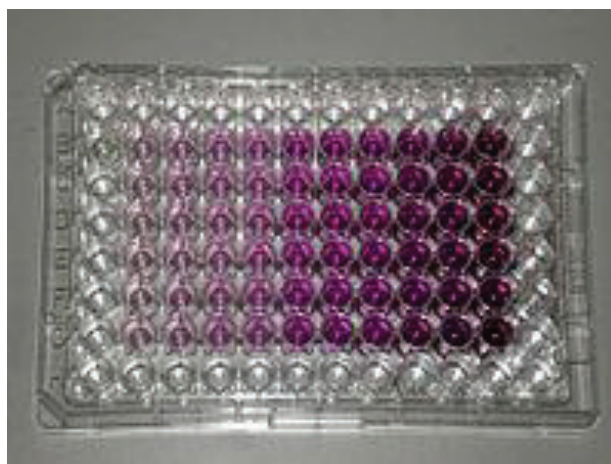
Για τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος με χρήση του αντιδραστηρίου MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, approx. 97.5% TLC, #M5655, SIGMA).

Η μέθοδος MTT (MTT colorimetric assay) είναι μια χρωματομετρική μέθοδος, που βασίζεται στη μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης. Το κίτρινο χρώματος άλας τετραζολίου (απορρόφηση στα 690 nm), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ανάγεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων (ηλεκτρική αφυδρογονάση) των ζωντανών κυττάρων με αποτέλεσμα το σχηματισμό ιζήματος ιώδους (μωβ) χρώματος (απορρόφηση στα 540 nm) κρυστάλλων φορμαζάνης (Εικόνα 2.3), οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου.



**Εικόνα 2.3:** Η μέθοδος MTT. Η μετατροπή του MTT σε κρυστάλλους φορμαζάνης από μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες, που καταλύουν το σχηματισμό ιζήματος ιώδους χρώματος στα ζωντανά κύτταρα.

Η αντίδραση πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά (σε ζωντανά κύτταρα) και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων. Οι κρύσταλλοι αυτοί είναι δυνατό να διαλυτοποιηθούν με προσθήκη κατάλληλου οργανικού διαλύτη (DMSO, dimethylsulfoxide) και να προσδιοριστεί στη συνέχεια φασματοφωτομετρικά (οπτική απορρόφηση) η έκταση της αντίδρασης. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων τόσο πιο έντονος είναι ο σχηματισμός των κρυστάλλων και τόσο μεγαλύτερη οπτική απορρόφηση καταγράφεται σε μήκος κύματος από 540-570 nm. Με τον τρόπο αυτό, σε αυξανόμενα ποσοστά βιωσιμότητας το μωβ χρώμα είναι και πιο έντονο στα φρεάτια (Εικόνα 2.4).



**Εικόνα 2.4:** Κύτταρα σε πολυτρυβλίο 96 θέσεων μετά από 3 ώρες επώαση με το MTT.

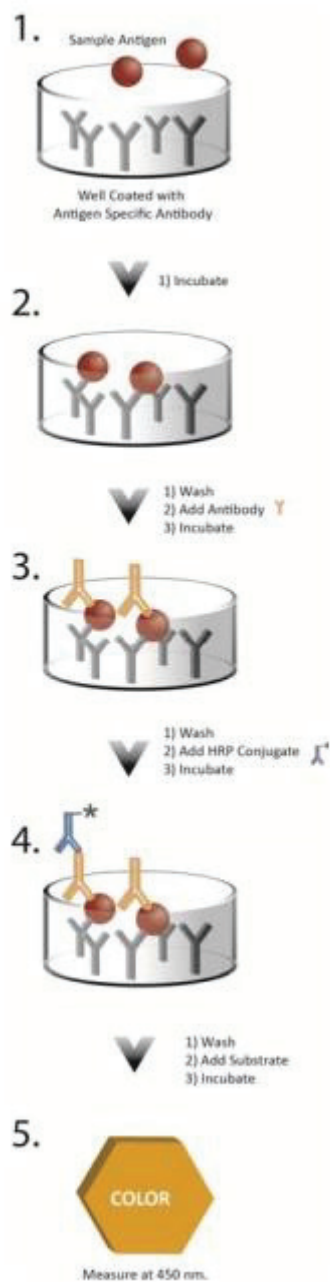
Αρχικά πραγματοποιείται σπορά 10000 κυττάρων σε ένα πολυτριβλίο 96 φρεατίων και για τις δύο κυτταρικές σειρές (F1/F1 και Tg/Tg). Μετά από επώαση 24 ωρών σε επωαστικό θάλαμο με συνθήκες 37 °C και 5% CO<sub>2</sub>, πραγματοποιείται επώαση σε ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης (0, 0.5, 1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 μM) και για διάφορους χρόνους επώασης (12, 24, 36, 48 h). Για κάθε συγκέντρωση και χρόνο επώασης με δοξορουβικίνη χρησιμοποιήθηκαν τρία πηγαδάκια, ενώ τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, ακολουθεί η προσθήκη 50μl MTT (3mg/ml) (Το MTT παρασκευάζεται με διάλυση 0,2 g Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide σε 100 ml PBS) και νέα επώαση για 3 ώρες στον επωαστικό κλίβανο. Στη συνέχεια, αφαιρείται με προσοχή το υπερκείμενο διάλυμα και πραγματοποιείται η διάλυση των κρυστάλλων, που σχηματίστηκαν στο ταπήτιο του πολυτριβλίου, με προσθήκη 200μl DMSO και ήπια ανάδευση με τη χρήση πολυπιπέτας. Η απορρόφηση σε κάθε φρεάτιο του πολυτριβλίου και για κάθε συγκέντρωση ουσίας πραγματοποιείται στα 540nm (η απορρόφηση υποβάθρου-background absorbance μετρήθηκε στα 690 nm ως φίλτρο αναφοράς) με τη χρήση ενός φασματοφωτομέτρου (Multiscan Spectrum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

### **2.13. Φασματοφωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός της επαγόμενης Hsp70**

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της επαγόμενης πρωτεΐνης θερμικού σοκ των 70 kDa (Hsp70) από ορούς ασθενών, χρησιμοποιήθηκε το Hsp70 high sensitivity ELISA Kit (Enzo Life Sciences - #ADI-EKS-715). Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε η ποσότητα της επαγόμενης Hsp70, ενώ δεν ανιχνεύονται τα άλλα μέλη της Hsp70 οικογένειας.

Τα δείγματα των ορών του αίματος ελήφθησαν από ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια και μας δόθηκαν από το Μιχαηλίδειο Καρδιολογικό Κέντρο από την κ. Νάκα Κατερίνα. Τα δείγματα του αίματος, αφού συλλεχθούν, αφήνονται για 30 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στα 1000g για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρωση συλλέγεται το υπερκείμενο σε καινούρια σωληνάκια και μπορεί να αποθηκευτεί στους -20 °C.



**Εικόνα 2.5:** *Hsp70 high sensitivity ELISA Kit*. Τα βήματα και η αρχή, που διέπουν τη διαδικασία για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων της επαγόμενης Hsp70 σε δείγματα ορών αίματος (*Enzo Life Sciences*).

Συνοπτικά, τόσο τα πρότυπα δείγματα (δείγματα αναφοράς), όσο και τα δείγματα μας, προστέθηκαν στα πηγαδάκια, που είχαν επικαλυφθεί με μονοκλωνικό αντίσωμα, ειδικό για την Hsp70. Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετήθηκαν 100μl από το κάθε δείγμα μας (αραίωση 1:4) και το πιάτο αφήνεται για επώαση υπό ανάδευση (120-700 rpm) σε θερμοκρασία δωματίου για δύο ώρες. Τα πηγαδάκια, στη συνέχεια, ξεπλένονται, και με τον τρόπο αυτό παραμένει μόνο η δεσμευμένη Hsp70. Μετά, προστίθεται ένα κίτρινο διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού ειδικού για την Hsp70, με το οποίο κατακρατείται δεσμευμένη η Hsp70 στο πιάτο, και το πιάτο επωάζεται υπό ανάδευση (120-700 rpm) σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης τα δείγματα ξεπλένονται, ώστε να απομακρυνθεί

η περίσσεια του αντισώματος. Κατόπιν, προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι ένα μπλέ διάλυμα με αντίσωμα IgG κατσίκας (goat) έναντι αντισωμάτων κουνελιού (anti-rabbit), που είναι συνδεδεμένο με το ενζύμο HRP (HRP-conjugated goat-anti-rabbit IgG), για τη σύνδεση στο αντίσωμα. Το πιάτο επωάζεται, εκ νέου, υπό ανάδευση (120-700 rpm) σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα και ακολούθησαν πλύσεις για την απομάκρυνση της περίσσειας του HRP συζεύγματος (HRP conjugate). Ύστερα, προστίθεται ένα διάλυμα υποστρώματος (3,3',5,5' tetramethylbenzidine, TMB) στα πηγαδάκια και το πιάτο αφήνεται για επώαση υπό ανάδευση (120-700 rpm) σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Η αντίδραση, που λαμβάνει χώρα και καταλύεται από την HRP (Horseradish Peroxidase) παράγει ένα μπλε χρώμα στο διάλυμα. Μετά το τέλος του χρόνου επώασης προστίθεται ένα διάλυμα (Stop Solution), που περιέχει υδροχλωρικό οξύ, για να σταματήσει η αντίδραση και τα διαλύματα, που προκύπτουν, αποκτούν κίτρινο χρώμα. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η μέτρηση των δειγμάτων φασματοφωτομετρικά στα 450 nm με τη χρήση ενός φασματοφωτόμετρου (Multiscan Spectrum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Η μέτρηση της απορρόφησης είναι απευθείας ανάλογη των επιπέδων της Hsp70 στο δείγμα.

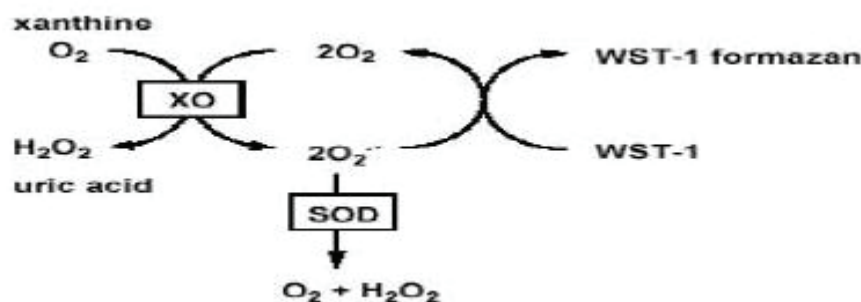
Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις υπό τις ίδιες συνθήκες κατά την πειραματική διαδικασία. Μετά την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης και την στατιστική ανάλυση των μετρήσεων, προσδιορίστηκε η ποσότητα της επαγόμενης Hsp70 σε κάθε δείγμα.

## **2.14. Δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων**

### **2.14.1. Μέτρηση της δραστηριότητας της SOD**

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα. Καταλύει την αναγωγή του ανιόντος του υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και σε μοριακό οξυγόνο.

Για τη μέτρηση της δραστηριότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης χρησιμοποιήθηκε το Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit (Biovision - #K335-100). Είναι μια ευαίσθητη μέθοδος, που χρησιμοποιεί την WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt), που παράγει μια υδατοδιαλυτή χρώση φορμαζάνης, καθώς ανάγεται από ένα ανιόν υπεροξειδίου. Ο ρυθμός αναγωγής με ένα ανιόν υπεροξειδίου είναι γραμμικά σχετικός με τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (XO), η οποία αναστέλλεται από την υπεροξειδική δισμουτάση. Συνεπώς, η αναστολή της δραστηριότητας της SOD μπορεί να μετρηθεί μέσω μιας χρωματομετρικής μεθόδου.



**Εικόνα 2.6:** Η αρχή της δράσης της SOD στο SOD Assay Kit (Biovision).

Αφού, αρχικά, πραγματοποιήθηκε σπορά περίπου  $8 \cdot 10^5$  κυττάρων σε κάθε τρυβλίο για κάθε κυτταρική σειρά (F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα), στη συνέχεια, με την πάροδο 24 ωρών, προστέθηκαν τα διαλύματα με τις διάφορες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (0, 0.5, 1, 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$ ) και τα κύτταρα αφέθηκαν για επώαση για 24 και 48 ώρες. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης τα κύτταρα, αφού ξεπλύθηκαν, συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά στις 3000 στροφές. Κατόπιν, για την προετοιμασία των δειγμάτων, τα κύτταρα ομογενοποιούνται σε παγωμένο διάλυμα 0.1 M Tris/HCl pH 7.4, που περιέχει 0.5% Triton X-100, 5mM  $\beta$ -ME και 0.1 mg/ml PMSF και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, απορρίπτονται τα κυτταρικά θραύσματα, ενώ διατηρείται το υπερκείμενο, από το οποίο προσδιορίζεται η δραστηριότητα της συνολικής SOD, τόσο από το κυτοσόλιο όσο και από τα μιτοχόνδρια.

Στη συνέχεια, τοποθετούμε 20 $\mu\text{l}$  από τα δείγματα μας στα πηγαδάκια και δημιουργούμε και τα δείγματα αναφοράς (blanks). Μετά, προστέθηκαν 200 $\mu\text{l}$  από το διάλυμα εργασίας (WST, Working Solution) σε κάθε πηγαδάκι και 20  $\mu\text{l}$  από το διάλυμα του ενζύμου (Enzyme Working Solution) και αναμίχθηκαν πλήρως. Στη συνέχεια, αφήνουμε το πιάτο για επώαση για 20 λεπτά στους 37° C και πραγματοποιούμε μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (Multiscan Spectrum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Αφού υπολογίσαμε τη δραστηριότητα της SOD (ρυθμός αναστολής %), κατασκευάσαμε τα γραφήματα με τα ποσοστά της δραστηριότητας της SOD για τις δύο κυτταρικές σειρές (F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα) στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και για τους δύο χρόνους επώασης των 24 και 48 ωρών με το φάρμακο. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις υπό τις ίδιες συνθήκες κατά την πειραματική διαδικασία.

## 2.14.2. Μέτρηση της δραστηριότητας της GPx

Για τη μέτρηση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης χρησιμοποιήθηκε το Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit (Biovision - #K762-100). Η οικογένεια των ενζύμων της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των οργανισμών από την οξειδωτική βλάβη. Οι GPx μετατρέπουν την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), ανάγοντας παράλληλα τα



υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων προς τις αντίστοιχες αλκοόλες ή το ελεύθερο υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό. Αρκετά ισοένζυμα έχουν βρεθεί με διαφορετικό κυτταρικό εντοπισμό και με διαφορετική εξειδίκευση στο υπόστρωμα. Χαμηλά επίπεδα των GPx συσχετίζονται με διαταραχές ελευθέρων ριζών.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο, οι GPx ανάγουν το υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου, ενώ οξειδώνεται η GSH σε GSSG. Η παραγόμενη GSSG ανάγεται σε GSH με κατανάλωση του NADPH από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR, Glutathione Reductase). Η μείωση του NADPH (μπορεί να μετρηθεί στα 340 nm) είναι ανάλογη της δραστηριότητας των GPx. Η ευαισθησία ανίχνευσης της μεθόδου αυτής είναι των 0,5 mU/ml GPx στο δείγμα και μετρώνται όλες οι εξαρτώμενες από γλουταθειόνη υπεροξειδάσες (η συνολική δραστηριότητα αναφέρεται ως δραστηριότητα της GPx).

Και στη μέθοδο αυτή, πραγματοποιήθηκε, αρχικά, σπορά περίπου  $8 \cdot 10^5$  κυττάρων σε κάθε τρυβλίο για κάθε κυτταρική σειρά (F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα). Στη συνέχεια, αφού περάσουν 24 ώρες, προστέθηκαν τα διαλύματα με τις διάφορες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (0, 0.5, 1, 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$ ) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, τα κύτταρα, αφού ξεπλυθούν, συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται για 3 λεπτά στις 3000 στροφές. Για την προετοιμασία των δειγμάτων, ομογενοποιούνται  $10^6$  κύτταρα σε 0,2 ml κρύου ρυθμιστικού διαλύματος (Glutathione Peroxidase Assay Buffer) και πιπετάρουμε τα κύτταρα αρκετές φορές πάνω κάτω στον πάγο, ενώ, κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στα 10000 g για 15 λεπτά στους 4 ° C. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε νέα σωληνάκια και τα διατηρούμε στον πάγο.

Αρχικά, ετοιμάζουμε τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης του NADPH. Κατόπιν, τοποθετούμε τα δείγματα μας στα πηγαδάκια μαζί με τα θετικά control (GPx Positive Control) και τα δείγματα αναφοράς. Στην αρχή, τοποθετούμε 50μl από τα δείγματα μας σε κάθε πηγαδάκι (μετά από δοκιμή, ώστε οι μετρήσεις να είναι εντός του εύρους της πρότυπης καμπύλης). Στη συνέχεια, προσθέτουμε σε κάθε πηγαδάκι 40 μl από το μείγμα αντίδρασης, που έχουμε προετοιμάσει, και το οποίο περιέχει (για κάθε πηγαδάκι του πιάτου) 33μl ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας (GPx Assay Buffer), 3 μl διαλύματος 40mM NADPH, 2 μl διαλύματος αναγωγής της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR Solution) και 2 μl διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH Solution). Αφού αναδεύσουμε καλά, αφήνουμε τα δείγματα για επώαση για 15 λεπτά, ώστε να εξαντληθούν όλα τα αποθέματα οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στο δείγμα. Στο σημείο αυτό, πραγματοποιούμε μέτρηση της απορρόφησης στα 340 nm, για να σιγουρευτούμε ότι υπάρχει αρκετή ποσότητα NADPH για την αντίδραση, και αν χρειάζεται προσθέτουμε επιπλέον ποσότητα NADPH σε κάθε δείγμα. Μετά, προσθέτουμε 10 μl διαλύματος υδροϋπεροξειδίου του κουμενίου (Cumene Hydroperoxide Solution), ώστε να εκκινήσει η αντίδραση της GPx. Αφού αναμείζουμε καλά, πραγματοποιούμε τις μετρήσεις μας στα 340 nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (Multiscan Spectrum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Τέλος, από τις μετρήσεις και για συγκεκριμένο χρόνο αντίδρασης, υπολογίζουμε τη δραστηριότητα της GPx στα δείγματα μας. Κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη και τα γραφήματα με τη δραστηριότητα της GPx για τις δύο κυτταρικές σειρές (F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα) στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και για τους δύο χρόνους επώασης των 24 και 48 ωρών. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις υπό τις ίδιες συνθήκες κατά την πειραματική διαδικασία.

## 2.15. Στατιστική ανάλυση

Για το προσδιορισμό της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test. Με τη χρήση του ασύζευκτου t-test συγκρίθηκαν οι τιμές ανάμεσα στις διάφορες ομάδες ή ανάμεσα στους χρόνους για την ίδια ομάδα. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων στα in vivo πειράματα πραγματοποιήθηκε και με μονοσήμαντη δοκιμή ANOVA (one-way analysis of variance) και μετέπειτα συγκριτική ανάλυση με Tukey's test ή Dunn's test. Για την εύρεση της στατιστικής σημαντικότητας για κάθε χρονικό σημείο της πειραματικής διαδικασίας ανάμεσα στις ομάδες των πειραματοζώων χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος  $\chi^2$  (chi-square test). Αυτές οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 16.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Τιμές  $p < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές (5% πιθανότητα λάθους). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  σταθερή απόκλιση. Κάθε πείραμα διεξήχθη τουλάχιστον τρεις φορές και μόνο τα αποτελέσματα με υψηλή επαναληψιμότητα θεωρήθηκαν έγκυρα.

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

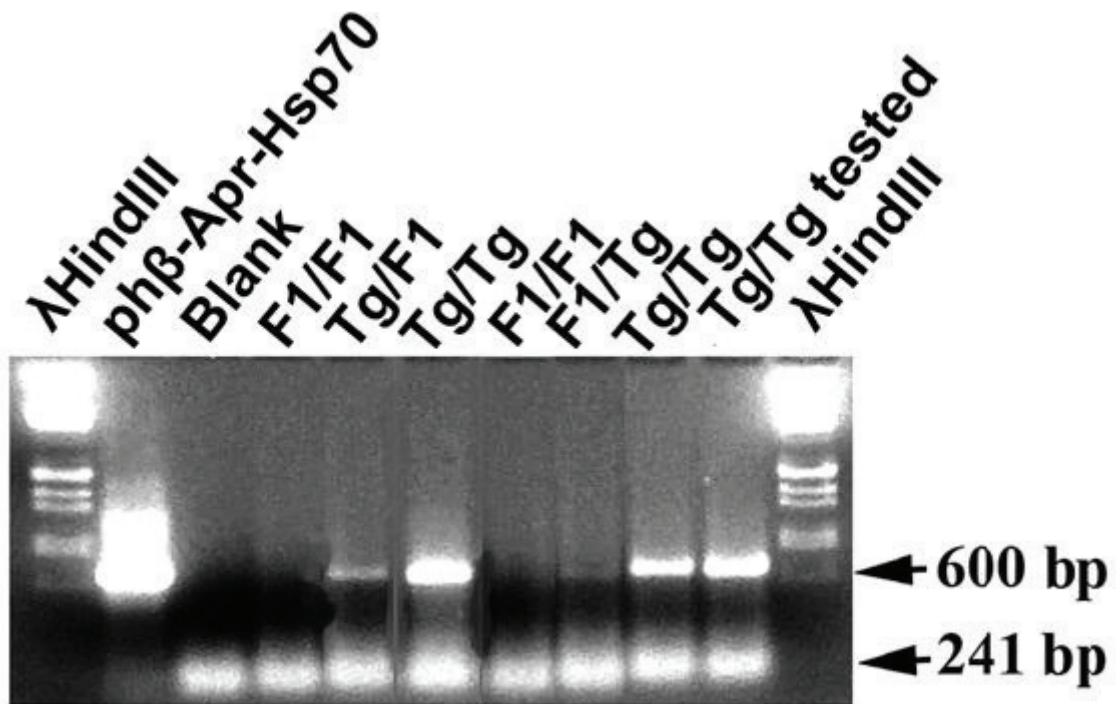


### 3.1. Hsp70 και καρδιακή ανεπάρκεια

Αρχικά, μελετήσαμε τον προστατευτικό ρόλο της Hsp70 στην καρδιακή ανεπάρκεια με τη χρήση ενός μοντέλου διαγονιδιακών ποντικών, που υπερεκφράζουν σε όλους τους ιστούς που ελέγχθηκαν (όπως και στον ιστό της καρδιάς), την ανθρώπινη πρωτεΐνη Hsp70 (Heat shock protein 70). Η καρδιακή ανεπάρκεια προκλήθηκε στα πειραματόζωα, τεχνητά, με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του κυτταροστατικού φαρμάκου, δοξορουβικίνη. Βιβλιογραφικά, όπως προαναφέρθηκε, είναι γνωστό ότι η χορήγηση δοξορουβικίνης επάγει την απόπτωση των κυττάρων μέσω του μιτοχονδριακού (εσωτερικού) μονοπατιού [814]. Είναι επίσης γνωστό ότι η χορήγηση δοξορουβικίνης σε κύτταρα, ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κασπασών [646, 698, 815] και ότι η Hsp70 προστατεύει τα κύτταρα του μυοκαρδίου από διάφορες παθήσεις [754]. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό σε ποιο σημείο του επαγόμενου από τη δοξορουβικίνη αποπτωτικού μονοπατιού στο μυοκάρδιο, επεμβαίνει η Hsp70 και ασκεί τον προστατευτικό της ρόλο.

#### 3.1.1. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ως μέσο ανίχνευσης της ομοζυγωτίας διαγονιδιακών ζώων

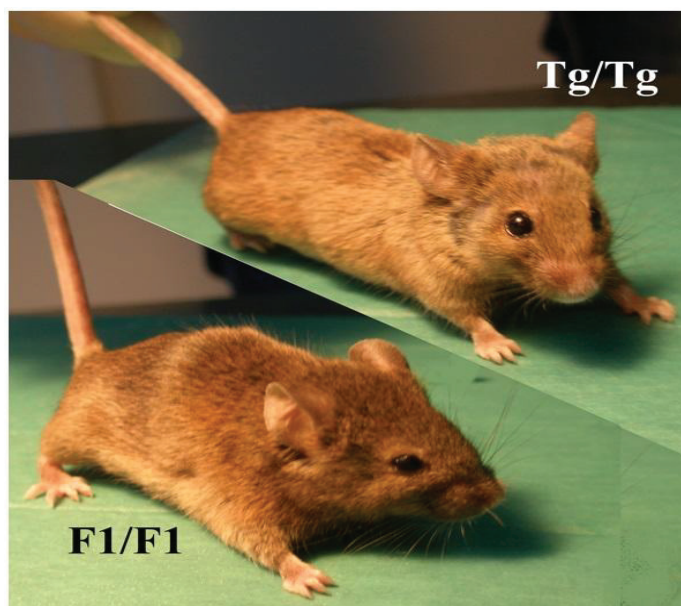
Η ταυτοποίηση των ποντικών, ως προς το γενετικό τους χάρτη (όσον αφορά τουλάχιστον την έκφραση της Hsp70), ήταν το πρωταρχικό στάδιο στην παρούσα *in vivo* μελέτη. Πραγματοποιώντας διασταυρώσεις ομόζυγων αγρίου τύπου ποντικών (F1/F1) με ομόζυγα διαγονιδιακά ως προς την Hsp70 ποντίκια, που υπερεκφράζουν την Hsp70 (Tg/Tg), προέκυψαν σε πρώτη φάση ετερόζυγα ως προς την έκφραση της Hsp70 ποντίκια (F1/Tg), βάσει της μεντελικής κληρονομικότητας. Διασταυρώνοντας μεταξύ τους, στη συνέχεια, τα ετερόζυγα ζώα, βάσει, επίσης, μεντελικής κληρονομικότητας με σχέση επικρατούς – υπολειπόμενου, αναμένουμε ανά γέννα 25% ομόζυγα αγρίου τύπου ποντίκια (F1/F1), 25% ομόζυγα διαγονιδιακά ποντίκια (Tg/Tg) και 50% ετερόζυγα ποντίκια (F1/Tg).



**Εικόνα 3.1:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για τον έλεγχο ύπαρξης του διαγονιδίου της *Hsp70* σε ποντίκια. Ενδεικτική εικόνα των προϊόντων που ελήφθησαν μετά από PCR στο DNA, που λήφθηκε από ουρές ομόζυγων (αγρίου τύπου – F1/F1 και διαγονιδιακών ποντικών – Tg/Tg), καθώς και ετερόζυγων (F1/Tg) ποντικών, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.5%. Χρησιμοποιώντας την ίδια ποσότητα DNA από όλα τα δείγματα, βλέπουμε ότι τα αγρίου τύπου ζώα δεν εμφανίζουν τη διαγνωστική ζώνη του διαγονιδίου στα 600 bp περίπου, ενώ τα διαγονιδιακά ζώα εμφανίζουν πολύ έντονη τη ζώνη αυτή. Η ενδιάμεσης έντασης σε φωτεινότητα ζώνη αντιστοιχεί στα ετερόζυγα ζώα. Ως θετικός μάρτυρας για το ύψος της ζώνης του διαγονιδίου χρησιμοποιήθηκε ο φορέας υπερέκφρασης της *Hsp70* pHβ-Apr-Hsp70, ενώ για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήσαμε DNA που λήφθηκε από διαγονιδιακό ποντίκι. Σαν αρνητικός μάρτυρας ελέγχου της PCR, χρησιμοποιήθηκε ddH<sub>2</sub>O στη θέση του DNA. Η διεύρυνση του 18S rRNA ποντικού, χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός δείκτης ίσης φόρτωσης (241 bp).

Με σκοπό την εξακρίβωση του γονιδιακού φορτίου κάθε ζώου, ελέγξαμε με την τεχνική της PCR 100 ζώα (50 θηλυκά και 50 αρσενικά) με τον τρόπο, που αναφέρθηκε στις ενότητες 2.5.3 και 2.5.4. Ακολούθως, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1.5% (Εικόνα 3.1). Τα ομόζυγα αγρίου τύπου ζώα δεν εμφανίζουν καθόλου προϊόν, σε αντίθεση προς τα ομόζυγα διαγονιδιακά, τα οποία φέρουν τη διαγνωστική ζώνη με μεγάλης έντασης φωτεινότητα του διαγονιδίου της *Hsp70* στα 600 bp περίπου. Τα ετερόζυγα ζώα φέρουν και αυτά τη διαγνωστική ζώνη, με πολύ μικρότερη ένταση.

Τα ομόζυγα διαγονιδιακά ζώα (29 τον αριθμό), τα οποία υπερεκφράζουν την *Hsp70*, διατηρήθηκαν για περαιτέρω αναπαραγωγή και συνέχιση της αποικίας, καθώς και για τη χρησιμοποίησή τους σε επόμενα πειράματα.



**Εικόνα 3.2:** Φωτογραφία, όπου φαίνονται τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αγρίου τύπου ποντικών ελέγχου (F1/F1) (αριστερά) και των διαγονιδιακών ποντικών, που υπερεκφράζουν την Hsp70 (Tg/Tg) (δεξιά).

### 3.1.2. Η παρουσία της Hsp70 βελτιώνει αισθητά την καρδιακή λειτουργία μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης

Μετά από την επιβεβαίωση για την ύπαρξη του διαγονιδίου, που είναι υπεύθυνο για την υπερέκφραση της Hsp70, στα υπό μελέτη ζώα, πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση δοξορουβικίνης τόσο σε διαγονιδιακά, όσο και σε αγρίου τύπου ζώα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στην ενότητα 2.5.5. Μετά το πέρας της διαδικασίας (του κύκλου ενέσεων), τα ζώα, τα οποία μεταχειρίστηκαν με δοξορουβικίνη, καθώς και τα ζώα, που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες της καρδιακής λειτουργίας υπό φυσιολογικές συνθήκες και για τις δύο ομάδες, αναισθητοποιήθηκαν. Η αναισθησία πραγματοποιήθηκε με χρήση κεταμίνης και τα ποντίκια εξετάστηκαν υπερηχοκαρδιογραφικά (ενότητα 2.5.6) ως προς διάφορες παραμέτρους, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για την καρδιακή λειτουργία και την παθογένεια της καρδιάς (Πίνακας 3.2).

Αρχικά, προσδιορίστηκε η θνητότητα των δύο ομάδων πειραματοζώων μετά από χρόνια χορήγηση δοξορουβικίνης σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο (Πίνακας 3.1). Όπως παρατηρείται και στον πίνακα, στην ομάδα των διαγονιδιακών Tg/Tg ποντικών, που έλαβαν δοξορουβικίνη για 4, 6 και 10 εβδομάδες, το ποσοστό θνητότητας ήταν σημαντικά χαμηλότερο, συγκρινόμενο με την ομάδα των αγρίου τύπου F1/F1 ποντικών. Στα F1/F1 ποντίκια, η θνητότητα παρουσίασε αύξηση καθ'όλη τη διάρκεια του πρωτοκόλλου, αφού καταγράφηκαν θάνατοι των ζώων από τις πρώτες εβδομάδες μεταχείρισης με το φάρμακο. Αντίθετα, στα Tg/Tg ποντίκια η θνητότητα παρουσιάζει μηδενικά ποσοστά στα δύο πρώτα χρονικά σημεία και αυξάνεται μόνο στις 10 εβδομάδες από την εκκίνηση χορήγησης δοξορουβικίνης. Όπως φαίνεται και από τα στοιχεία του πίνακα, το ποσοστό θνητότητας για τα αγρίου τύπου ποντίκια (F1/F1) ξεκίνησε σε ποσοστό 18% στις 4 δόσεις δοξορουβικίνης, εμφανίστηκε 30% στις 6 εβδομάδες και κατέληξε σε ποσοστό 45% μετά το πέρας του πρωτοκόλλου (10 εβδομάδες), ενώ στα Hsp70-διαγονιδιακά (Tg/Tg) ποντίκια τα

ποσοστά θνητότητας ήταν μηδενικά στις 4 και 6 εβδομάδες, και σε ποσοστό 15% 10 εβδομάδες μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης. Τα αποτελέσματα αυτά, μετά από στατιστική ανάλυση (chi-square test), είναι στατιστικά σημαντικά, με  $p < 0,05$  σε όλα τα χρονικά σημεία της πειραματικής διαδικασίας. Επομένως, είναι εμφανές ότι τα Tg/Tg διαγονιδιακά ποντίκια, που υπερεκφράζουν την Hsp70, επιδεικνύουν καλύτερη επιβίωση στη δοξορουβικίνη σε σχέση με τα αγρίου τύπου F1/F1 ποντίκια.

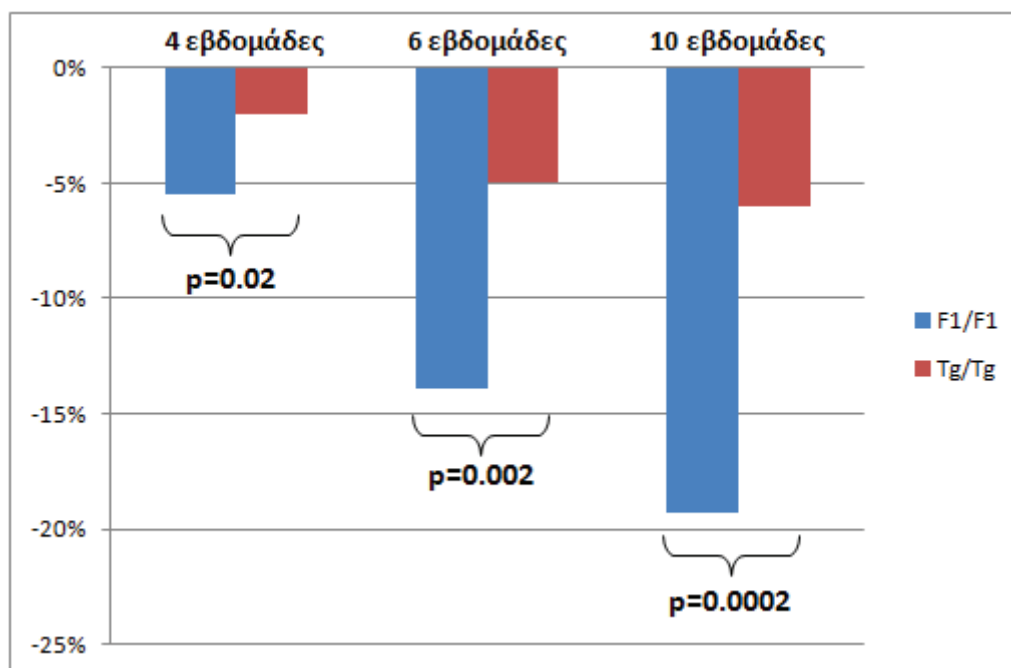
<b>Θνητότητα</b>	<b>4 Εβδομάδες</b>	<b>6 Εβδομάδες</b>	<b>10 Εβδομάδες</b>
<b>Ποντίκια</b>	Μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης		
<b>F1/F1</b>	18 % (2/11)	30 % (3/10)	45 % (5/11)
<b>Tg/Tg</b>	0 % (0/8)	0 % (0/8)	15 % (2/13)
<b>P (Value)</b>	<0.001	<0.005	<0.05

**Πίνακας 3.1:** Ποσοστό θνητότητας των αγρίου τύπου (F1/F1) και των διαγονιδιακών (Tg/Tg) ποντικών μετά από χρόνια χορήγηση δοξορουβικίνης (για 4, 6 και 10 εβδομάδες). Οι αριθμοί στην παρένθεση υποδεικνύουν τον αριθμό των πειραματοζώων, που κατέληξαν (αριθμητής) και τον συνολικό αριθμό των ζώων, που χρησιμοποιήθηκαν (παρονομαστής), για κάθε βήμα της πειραματικής διαδικασίας.

Στη συνέχεια, μετρήθηκε, σαν μια πρώτη απόδειξη της τοξικής δράσης της δοξορουβικίνης στα πειραματόζωα, το βάρος του σώματος των αγρίου τύπου και των Hsp70-διαγονιδιακών ποντικών μετά από τις 4, 6 και 10 εβδομάδες από τη χορήγηση του φαρμάκου και συγκρίθηκαν με τις βασικές μετρήσεις από τα ζώα ελέγχου. Στο παρακάτω γράφημα (Εικόνα 3.3) φαίνονται τα ποσοστά μείωσης του βάρους σώματος των δύο ομάδων πειραματοζώων στα χρονικά σημεία του πρωτοκόλλου. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.3, παρατηρήθηκε μια ολοένα και αυξανόμενη μείωση του σωματικού βάρους των ζώων με την πάροδο του χρόνου, τόσο των F1/F1 όσο και των διαγονιδιακών Tg/Tg ποντικών. Όμως, το ποσοστό μείωσης του βάρους στα Hsp70-διαγονιδιακά ποντίκια στις 4, 6 και 10 εβδομάδες μετά τη χορήγηση της δοξορουβικίνης (συγκρινόμενο με το βάρος των ζώων πριν από την εκκίνηση χορήγησης του φαρμάκου), ήταν σημαντικά χαμηλότερο από το ποσοστό μείωσης του βάρους στην ομάδα των F1/F1 ποντικών, που έλαβαν DOX. Τα ποσοστά μείωσης του βάρους των αγρίου τύπου ποντικών, σε σχέση με τις βασικές μετρήσεις, ήταν 5.5%, 13.9% και 19.3% στις 4, 6 και 10 εβδομάδες αντίστοιχα, μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου. Αντίθετα, στα διαγονιδιακά ζώα, η μείωση του σωματικού βάρους υπήρξε μη στατιστικά σημαντική, σε σχέση με τις βασικές μετρήσεις, και μικρότερη σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα, αφού εμφανίζεται σε ποσοστό 2% στις 4 εβδομάδες, 5% στις 6 εβδομάδες και αγγίζει μόλις το 6% περίπου στις 10 εβδομάδες. Οι διαφορές αυτές στα ποσοστά μείωσης του βάρους σώματος ανάμεσα στα αγρίου τύπου και τα Hsp70-διαγονιδιακά ζώα, μετά από στατιστική ανάλυση,



είναι στατιστικά σημαντικά με  $p < 0,02$  για όλα τα χρονικά σημεία του πρωτοκόλλου. Επομένως, παρατηρείται ότι τα Tg/Tg ποντίκια, που υπερεκφράζουν την Hsp70, έχουν την ικανότητα να διατηρούν το βάρος σε μεγάλο βαθμό μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης, σε αντίθεση με τα αγρίου τύπου F1/F1 ποντίκια.



**Εικόνα 3.3:** Γραφική απεικόνιση των ποσοστών μείωσης του βάρους των αγρίου τύπου (F1/F1) και των διαγονιδιακών (Tg/Tg) ποντικών μετά από διαλείπουσα ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση δοξορουβικίνης (για 4, 6 και 10 εβδομάδες), ως προς τις βασικές μετρήσεις βάρους σώματος των ζώων για κάθε ομάδα.

Ομόζυγα αγρίου τύπου (F1/F1) ποντίκια				
Δείκτες	Βασικές μετρήσεις (n=11)	Εβδομάδες μετά Δοξορουβικίνης		
		4 (n=4)	6 (n=4)	10 (n=6)
Ηλικία (Μήνες)	10.3 (2.6)	13.0 (1.1)	13.0 (1.1)	12.6 (1.4)
Σωματικό βάρος (g)	32.8 (3.7)	31.0 (3.4)	28.2 (5.2)	26.5 (2.3) *
Καρδιακός ρυθμός (παλμοί/λεπτό)	577 (103)	498 (44)	520 (97)	550 (91)
AWTd (mm)	1.02(0.10)	1.09 (0.17)	1.00 (0.14)	0.91 (0.06) *
PWTd (mm)	1.28 (0.12)	1.38 (0.17)	1.15 (0.15)	1.11 (0.11) *
LVDd (mm)	2.56 (0.30)	2.68 (0.20)	3.25 (0.36) *	2.56 (0.48)
LVDs (mm)	0.76 (0.18)	0.96 (0.18)*	1.49 (0.13) *	1.20 (0.22) *
Κλασματική βράχυνση (%)	70.8 (4.6)	63.7 (3.7) *	54.2 (3.6) *	52.7 (6.8) *

<b>Μάζα αριστερής κοιλίας (g)</b>	105.5 (22.1)	124.3 (32.1)	132.2 (36.5)	85.5 (21.1)
<b>Μάζα αριστερής κοιλίας/σωματικό βάρος</b>	3.2 (0.6)	3.8 (1.2)	4.0 (0.8) *	2.9 (0.7)
<b>Αναλογία R/H</b>	4.09 (0.54)	4.04 (0.47)	5.79 (0.94) *	4.74 (0.97) *
<b>Ομόζυγα διαγονιδιακά ως προς την Hsp70 (Tg/Tg) ποντίκια</b>				
<b>Δείκτες</b>	<b>Βασικές μετρήσεις (n=9)</b>	<b>Εβδομάδες μετά Δοξορουβικίνης</b>		
		<b>4 (n=4)</b>	<b>6 (n=4)</b>	<b>10 (n=8)</b>
<b>Ηλικία (Μήνες)</b>	6.5 (1.4)	9.6 (1.7)	10.5 (1.8)	9.7 (2.0)
<b>Σωματικό βάρος (g)</b>	27.8 (2.3)	27.2 (2.4)	26.4 (2.7)	26.1 (2.7)
<b>Καρδιακός ρυθμός (παλμοί/λεπτό)</b>	599 (115)	527 (82)	559 (103)	529 (131)
<b>AWTd (mm)</b>	1.05 (0.08)	1.09 (0.09)	1.07 (0.07)	1.04 (0.10) †
<b>PWTd (mm)</b>	1.21 (0.16)	1.34 (0.20)	1.24 (0.10)	1.23 (0.14)
<b>LVDd (mm)</b>	2.27 (0.32)†	2.49 (0.39)	2.70 (0.30)*†	2.68 (0.32) *
<b>LVDs (mm)</b>	0.70 (0.16)	0.91 (0.29)*	1.01 (0.18)*†	0.96 (0.17)*†
<b>Κλασματική βράχυνση (%)</b>	69.5 (4.7)	64.3 (7.4) *	62.7 (4.8) *†	64.2 (4.1) *†
<b>Μάζα αριστερής κοιλίας (g)</b>	87.7 (23.3)	111.1 (27.9)*	111.9 (10.5)*	107.6 (19.7) *
<b>Μάζα αριστερής κοιλίας/σωματικό βάρος</b>	3.1 (0.7)	3.7 (0.7)	3.7 (0.5)	4.1 (0.8) *†
<b>Αναλογία R/H</b>	3.87 (0.59)	3.93 (1.08)	4.48 (0.72) *†	4.55 (0.78) *

**Πίνακας 3.2:** Υπερηχοκαρδιογραφικοί δείκτες σε αγρίου τύπου και διαγονιδιακά ποντίκια. Αγρίου τύπου (F1/F1) και διαγονιδιακά ως προς την υπερέκφραση της Hsp70 (Tg/Tg) ποντίκια μελετήθηκαν υπερηχοκαρδιογραφικά ως προς δείκτες της καρδιακής λειτουργίας και φυσιολογίας υπό φυσιολογικές συνθήκες ή μετά από 4, 6 ή 10 εβδομάδες ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης 3 mg/kg δοξορουβικίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι, με την τυπική τους απόκλιση σε παρένθεση και φανερώνουν την σαφώς βελτιωμένη κλινική εικόνα των διαγονιδιακών ποντικιών σε όλα τα χρονικά σημεία χορήγησης δοξορουβικίνης.

*AWTd:* τελοδιαστολική πάχυνση πρόσθιου καρδιακού τοιχώματος

*PWTd:* τελοδιαστολική πάχυνση οπίσθιου καρδιακού τοιχώματος

*LVDd:* τελοδιαστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας

*LVDs:* τελοσυστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας

Αναλογία R/H: δείκτης δυσμενούς καρδιακής λειτουργίας (Ενότητα 2.5.6)

\*  $P < 0.05$  vs βασικές μετρήσεις μέσα σε κάθε ομάδα

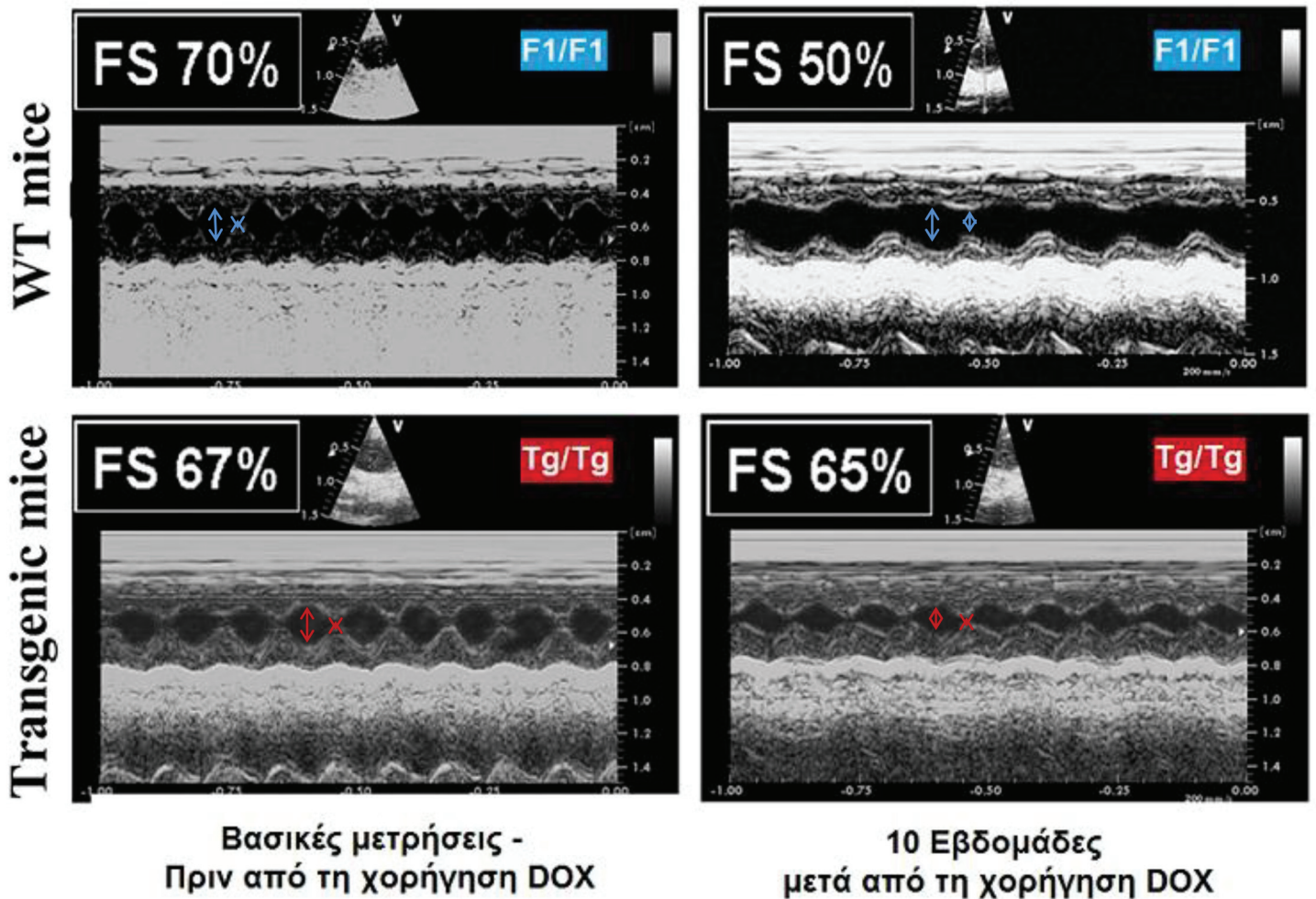
†  $P < 0.05$  vs μάρτυρες (controls)

Από τις υπερηχοκαρδιογραφικές αναλύσεις (Πίνακας 3.2), παρατηρήσαμε ότι στα ποντίκια αγρίου τύπου (F1/F1) η χρόνια χορήγηση δοξορουβικίνης φαίνεται να προκαλέσει ορισμένες μεταβολές στην καρδιακή λειτουργία, που συνάδουν στην υπερηχογραφική εκδήλωση συστολικής καρδιακής ανεπάρκειας.

Συγκεκριμένα, μετά από χορήγηση 4 εβδομαδιαίων δόσεων δοξορουβικίνης, παρατηρήσαμε αύξηση της τελοσυστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας από 0.76 mm σε 0.96 mm και της μάζας της αριστερής κοιλίας, καθώς και έκπτωση της συστολικής λειτουργικότητας αυτής με ενδεικτική μείωση του δείκτη κλασματικής βράχυνσης (FS) από 70.8% σε 63.7%, με μικρού βαθμού μη στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους των τοιχωμάτων της (υπερτροφία).

Μετά από μια ανάρρωση 2 εβδομάδων (6η εβδομάδα του πρωτοκόλλου), παρατηρήθηκε αύξηση της τελοδιαστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας από 2.56 mm σε 3.25 mm. Επίσης, η τελοσυστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας αυξήθηκε περαιτέρω σε σχέση με τη μέτρηση των 4 εβδομάδων από 0.76 mm σε 1.49 mm, με επακόλουθη αύξηση της μάζας αυτής (έκκεντρη υπερτροφία) και περαιτέρω έκπτωση της συστολικής λειτουργικότητας αυτής, με το δείκτη κλασματικής βράχυνσης να φτάνει το 54.2%.

Μετά το πέρας του πρωτοκόλλου χορήγησης (10 εβδομάδες), η τελοσυστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας παρέμεινε αυξημένη σε σχέση με τις βασικές μετρήσεις στα 1.2 mm, η συστολική της λειτουργικότητα παρέμεινε ελαττωμένη με το δείκτη κλασματικής βράχυνσης στο 52.7%, ενώ παρατηρήθηκε λέπτυνση του πάχους των τοιχωμάτων της αριστερής κοιλίας (τόσο του πρόσθιου όσο και του οπίσθιου καρδιακού τοιχώματος) με επακόλουθη επαναφορά της μάζας της στα προ χορήγησης δοξορουβικίνης επίπεδα.



**Εικόνα 3.4:** Η επαγόμενη από DOX καρδιακή δυσλειτουργία εξασθενεί στα διαγονιδιακά ποντίκια (Tg/Tg), που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70. Αντιπροσωπευτικές ηχοκαρδιογραφικές M-mode εικόνες από καρδιές ποντικών των αγρίου τύπου (F1/F1) (Πάνω) και των Hsp70-διαγονιδιακών ποντικών (Tg/Tg) (Κάτω), πριν από τη χορήγηση δοξορουβικίνης (controls) (Αριστερά) και μετά από χρόνια χορήγηση δοξορουβικίνης για 10 εβδομάδες (Δεξιά) (πρωτόκολλο διαλείπουσας ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης 3 mg/kg DOX για 10 εβδομάδες).

**FS:** Κλασματική Βράχυνση %, που χρησιμοποιείται ως δείκτης της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας.

Στην περίπτωση των διαγονιδιακών ποντικών (Tg/Tg), που υπερεκφράζουν την Hsp70, η χρόνια χορήγηση δοξορουβικίνης φαίνεται να προκάλεσε ορισμένες μεταβολές (Πίνακας 3.2), όπως αυτές αναλύθηκαν μετά από την υπερηχοκαρδιογραφική παρατήρηση, οι οποίες φαίνονται να είναι μικρότερες σε σύγκριση με τα F1/F1 ποντίκια.

Στις 4 εβδομάδες, παρατηρήθηκε αύξηση της τελοσυστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας από 0.70 mm σε 0.91 mm και της μάζας της αριστερής κοιλίας, ενώ παρουσιάστηκε και μικρή έκπτωση της συστολικής λειτουργικότητας αυτής, με το δείκτη κλασματικής βράχυνσης από 69.5% να φτάνει το 64.3%. Επίσης,

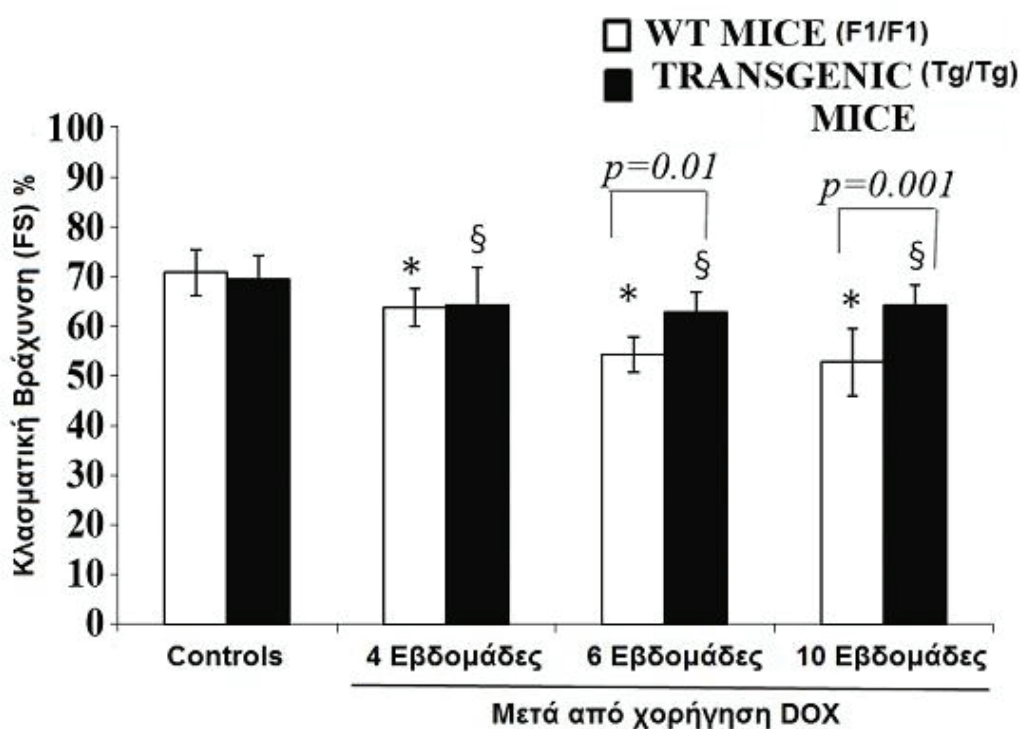
παρατηρήθηκε πολύ μικρή, μη στατιστικά σημαντική, αύξηση του πάχους των τοιχωμάτων (υπερτροφία) της αριστερής κοιλίας.

Μετά το στάδιο της ανάρρωσης των δύο εβδομάδων (6 εβδομάδες), παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της τελοδοιαστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας από 2.27 mm σε 2.70 mm, αλλά και της τελοσυστολικής της διαμέτρου από 0.70 mm σε 1.01 mm, με επακόλουθη αύξηση της μάζας της (έκκεντρη υπερτροφία). Αυτά τα φαινόμενα δε φαίνεται να επηρέασαν σημαντικά τη συστολική λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας, καθώς ο δείκτης κλασματικής βράχυνσης παρέμεινε στο 62.7%, σε σχέση και με τη μέτρηση των 4 εβδομάδων. Οι μεταβολές αυτές στα διαγονιδιακά ζώα φαίνεται να είναι ηπιότερες σε απόλυτο και σχετικό βαθμό από αυτές, που είχαν παρατηρηθεί νωρίτερα για τα αγρίου τύπου F1/F1 ζώα των βασικών μετρήσεων.

Μετά την ολοκλήρωση του κύκλου ενέσεων με δοξορουβικίνη στα διαγονιδιακά ζώα (10 εβδομάδες), η τελοσυστολική διάμετρος παρέμεινε αυξημένη (0.96 mm) σε σχέση με την αρχική προ παρέμβασης μέτρηση, η δε συστολική λειτουργικότητα φάνηκε να επανέρχεται λίγο, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά, με το δείκτη κλασματικής βράχυνσης να φτάνει το 64.2%. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε μείωση του πάχους των τοιχωμάτων της αριστερής κοιλίας σε αντίθεση προς τα αγρίου τύπου ζώα.

Παρατηρώντας το δείκτη δυσμενούς καρδιακής λειτουργίας R/H, φαίνεται να αυξάνεται μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης και στις δύο ομάδες πειραματοζώων σε σχέση με τις προ της χορήγησης βασικές μετρήσεις. Η αναλογία αυτή αποτελεί ουσιαστικά ένδειξη της δυσμενούς αναδιαμόρφωσης της καρδιάς και όπως φαίνεται, στα Hsp70-διαγονιδιακά ποντίκια (Tg/Tg) διατηρείται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου (F1/F1) ποντίκια.

Τέλος, παρατίθεται το γράφημα (Εικόνα 3.5) με τη συγκριτική απεικόνιση του δείκτη κλασματικής βράχυνσης (%) ανάμεσα στα αγρίου τύπου, F1/F1, και στα διαγονιδιακά Tg/Tg ποντίκια, που υπερεκφράζουν την Hsp70, πριν από τη χορήγηση δοξορουβικίνης (controls) και στις 4, 6 και 10 εβδομάδες μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του φαρμάκου. Η κλασματικής βράχυνση (Fractional Shortening), όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί δείκτη της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας. Όπως φαίνεται από το γράφημα (Εικόνα 3.5), αλλά και από τις ηχοκαρδιογραφικές M-mode εικόνες (Εικόνα 3.4), αρχικά, ο δείκτης κλασματικής βράχυνσης (FS) δεν διαφέρει ανάμεσα στις δύο ομάδες ελέγχου (πριν από τη χορήγηση DOX), τόσο των F1/F1 όσο και των Tg/Tg ποντικίων. Αντίθετα, ο δείκτης FS δείχνει να μειώνεται στατιστικώς σημαντικά και στις δύο ομάδες πειραματοζώων, που έλαβαν δοξορουβικίνη, σε σχέση με τις βασικές μετρήσεις των αντίστοιχων ομάδων ελέγχου ( $p < 0,05$  σε όλα τα χρονικά σημεία της διαδικασίας και για τις δύο ομάδες ποντικίων). Η έκπτωση αυτή στη συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας επιδεινώνεται με την πάροδο του χρόνου με τη χορήγηση δοξορουβικίνης, και φαίνεται να είναι σημαντικά μεγαλύτερη στα F1/F1 σε σύγκριση με τα Tg/Tg ποντίκια. Ο δείκτης κλασματικής βράχυνσης μειώνεται στα αγρίου τύπου ζώα από 70.8±4.6% σε 63.7±3.7% στις 4 εβδομάδες, σε 54.2±3.6% στις 6 εβδομάδες και σε 52.7±6.8% στις 10 εβδομάδες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου, ενώ στα διαγονιδιακά ζώα ο δείκτης FS μειώνεται από 69.5±4.7% σε 64.3±7.4% και 62.7±4.8% στις 4 και 6 εβδομάδες αντίστοιχα, και επανέρχεται λίγο σε 64.2±4.1% στις 10 εβδομάδες. Οι διαφορές στα ποσοστά μείωσης του δείκτη κλασματικής βράχυνσης (ως προς τις βασικές μετρήσεις για την κάθε ομάδα), ανάμεσα στα αγρίου τύπου και τα Hsp70-διαγονιδιακά ποντίκια, είναι στατιστικά σημαντικές (μετά από στατιστική ανάλυση t-test) για τις 6 και τις 10 εβδομάδες μετά από την εκκίνηση χορήγησης της δοξορουβικίνης, με  $p = 0,01$  στις 6 εβδομάδες και  $p = 0,001$  στις 10 εβδομάδες του πρωτοκόλλου.



**Εικόνα 3.5:** Γραφική απεικόνιση της Κλασματικής Βράχυνσης (%) (Fractional Shortening, FS), που αποτελεί δείκτη της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας, στα αγρίου τύπου F1/F (WT) και στα Hsp70-διαγονιδιακά ποντίκια (Tg/Tg), που υπερεκφράζουν την Hsp70, πριν από τη χορήγηση δοξορουβικίνης (controls) και στις 4, 6 και 10 εβδομάδες μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του φαρμάκου.

\*  $p < 0.05$  συγκρινόμενη με την ομάδα ελέγχου (control) των αγρίου τύπου (WT) ποντικών (χωρίς χορήγηση DOX)

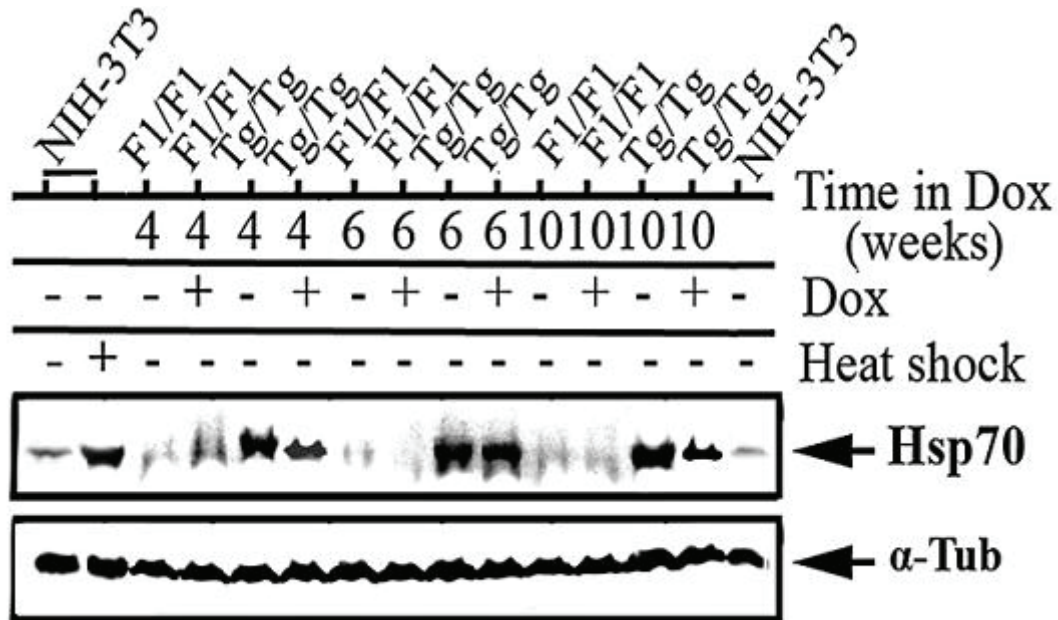
§  $p < 0.05$  συγκρινόμενη με την ομάδα ελέγχου (control) των διαγονιδιακών ποντικών (Tg/Tg) (χωρίς χορήγηση DOX)

Συνολικά, σε όλα τα χρονικά σημεία που μελετήσαμε, τα διαγονιδιακά ζώα παρουσιάζουν καλύτερη εικόνα, τόσο κλινικά (θνητότητα, σωματικό βάρος), όσο και υπερηχοκαρδιογραφικά, σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα. Φαίνεται ότι τα διαγονιδιακά ποντίκια μπαίνουν σε μια ηπιότερη καρδιακή ανεπάρκεια στις 4 και 6 εβδομάδες, η οποία φαίνεται να βελτιώνεται στις 10 εβδομάδες, κάτι που μπορούμε να υποθέσουμε ότι σχετίζεται, προφανώς, με την υπερέκφραση της Hsp70 στα ζώα αυτά.

### 3.1.3. Η Hsp70 προστατεύει τα κύτταρα του μυοκαρδίου από την απόπτωση, ελέγχοντας την ενεργοποίηση των κασπασών

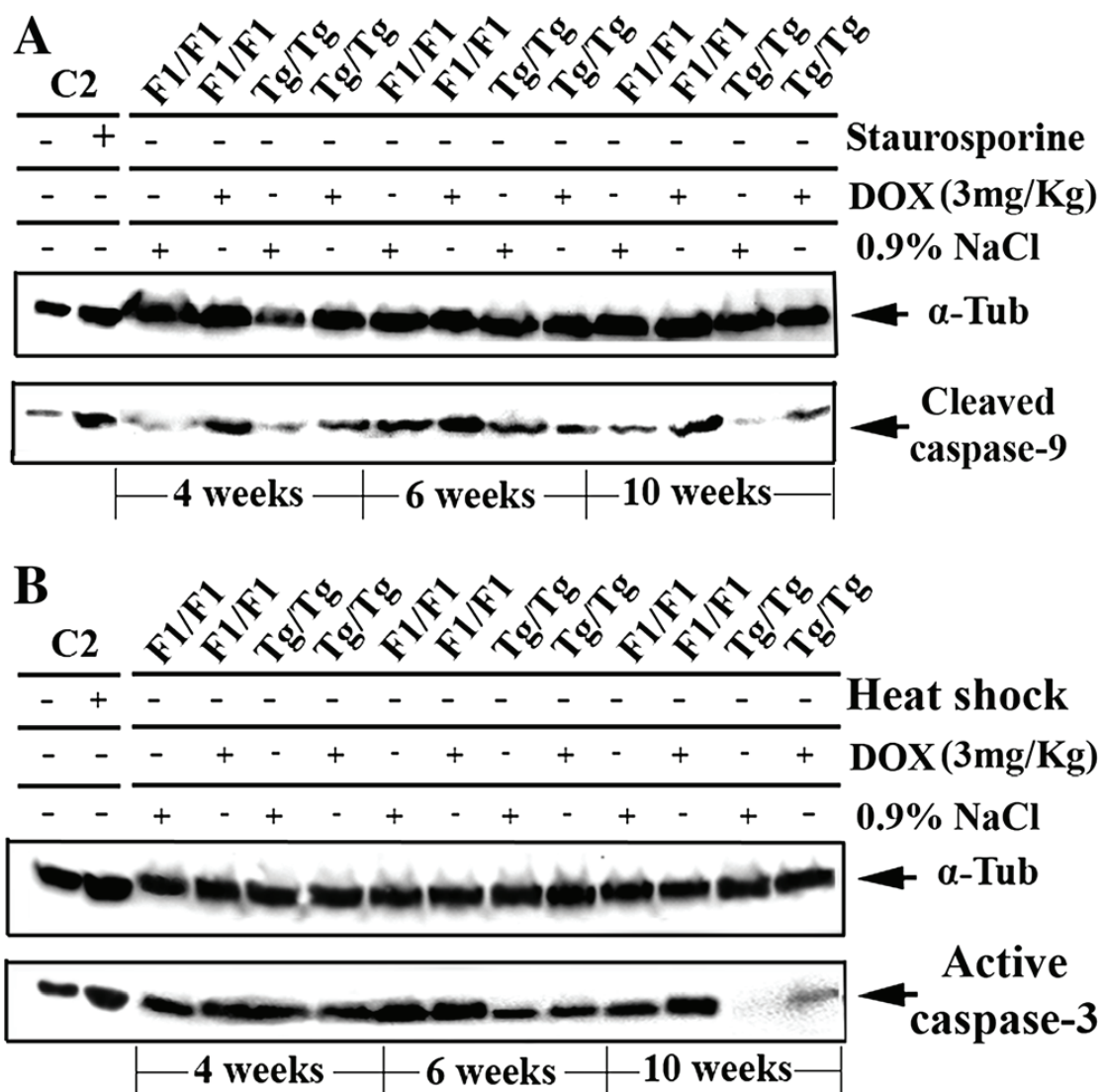
Αφού επιβεβαιώθηκε η εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας μετά τη χορήγηση της δοξορουβικίνης, αλλά και ο προστατευτικός ρόλος της Hsp70, τόσο κλινικά όσο και υπερηχοκαρδιογραφικά, στόχος μας ήταν η επιβεβαίωση της προστασίας της Hsp70 στα κύτταρα του μυοκαρδίου από την απόπτωση, καθώς και η βιοχημική μελέτη του μονοπατιού, μέσω του οποίου η Hsp70 προστατεύει τον καρδιακό ιστό από την επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιακή ανεπάρκεια.

Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, απομονώθηκε ο καρδιακός ιστός (ενότητα 2.5.7) από τα αγρίου τύπου και τα διαγονιδιακά ποντίκια πριν από τη χορήγηση δοξορουβικίνης, αλλά και σε χρονικά διαστήματα 4, 6 και 10 εβδομάδων μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης. Από τις καρδιές αυτές, στη συνέχεια, λήφθηκε το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα (ενότητα 2.4).



**Εικόνα 3.6:** Η έκφραση της πρωτεΐνης Hsp70 σε καρδιακούς ιστούς των Hsp70-διαγονιδιακών ποντικών. F1/F1 και Tg/Tg ποντίκια εκτέθηκαν σε DOX (3mg/Kg) για 4, 6 ή 10 εβδομάδες. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα καρδιακού ιστού (20 μg/δείγμα), που λήφθηκαν από F1/F1 και Tg/Tg ποντίκια, αναλύθηκαν σε SDS-PAGE και υποβλήθηκαν σε ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα ενάντια στην επαγόμενη Hsp70 (anti-Hsp70). Η α-τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων. Η NIH-3T3 κυτταρική σειρά χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης της έκφρασης της Hsp70 μετά από θερμικό σοκ (60 λεπτά σε 42.5°C και 90 λεπτά επαναφορά στους 37°C).

Αρχικά, θελήσαμε να ερευνήσουμε την έκφραση της πρωτεΐνης Hsp70 στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρδιακό ιστό και πραγματοποιήθηκε έλεγχος, μέσω ανοσοαποτύπωσης, μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου για 4, 6 και 10 εβδομάδες (Εικόνα 3.6). Παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη Hsp70 εκφράζεται σε υψηλό βαθμό μόνο στα Tg/Tg διαγονιδιακά ποντίκια. Αντίθετα, στα F1/F1 ποντίκια εμφανίζεται μια μικρή αύξηση στο ποσό της Hsp70, και κυρίως στις 4 εβδομάδες μετά τη χορήγηση της δοξορουβικίνης, χωρίς, πάντως η αύξηση αυτή να φαίνεται να είναι σημαντική. Παραδόξως, παρατηρείται και μια μικρή υπορρύθμιση της Hsp70 στους καρδιακούς ιστούς των Tg/Tg ποντικών μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου στις 4, 6 και 10 εβδομάδες.



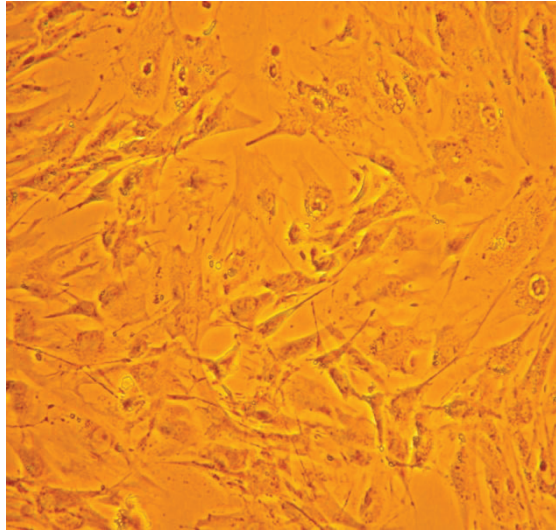
**Εικόνα 3.7:** Αναστολή της κασπάσης-9 και της κασπάσης-3 σε καρδιακούς ιστούς των *Hsp70*-διαγονιδιακών ποντικών. Σε *F1/F1* και *Tg/Tg* ποντίκια χορηγήθηκε *DOX* (3mg/Kg) για 4, 6 ή 10 εβδομάδες. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα καρδιακού ιστού (20 μg/δείγμα), που λήφθηκαν από *F1/F1* και *Tg/Tg* ποντίκια, αναλύθηκαν σε *SDS-PAGE* και υποβλήθηκαν σε ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα ενάντια στην ενεργή κασπάση-9 (anti-Cleaved Caspase-9) (A) και στην ενεργή κασπάση-3 (anti-Active Caspase-3) (B). Η  $\alpha$ -τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων. C2 κύτταρα (C2C12, κυτταρική σειρά μυϊκών κυττάρων ποντικού (μυοβλάστες) εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ (60 λεπτά σε 42.5°C και 90 λεπτά επαναφορά στους 37°C) ή σταυροσπορίνη (3 ώρες σε 1μM) για να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της έκφρασης της *Hsp70* ή ως δείκτες της ενεργοποίησης της απόπτωσης (σε συνεργασία με τον Καλαϊτζάκη Αλέξανδρο).



Στη συνέχεια, θελήσαμε να μελετήσουμε εάν η παρουσία της Hsp70 ελέγχει την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών, με κάποιο τρόπο. Από τη βιβλιογραφία, είναι γνωστό ότι η χορήγηση δοξορουβικίνης ενεργοποιεί τον καταρράκτη [646, 698, 815]. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από καρδιακό ιστό και πραγματοποιήθηκε έλεγχος, μέσω ανοσοαποτύπωσης, της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και της κασπάσης-9, μετά από χρόνια διαλείπουσα ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση δοξορουβικίνης. Παρατηρήθηκε ότι στα διαγονιδιακά ζώα, τα οποία υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 είναι κατά πολύ μικρότερη, κυρίως, στις 6 και 10 εβδομάδες, σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια (Εικόνα 3.7A). Επίσης, παρατηρήθηκε πολύ μικρότερη ενεργοποίηση της κασπάσης-9 στην καρδιά των Tg/Tg ποντικίων σε σύγκριση με τα F1/F1 ποντίκια σε όλα τα χρονικά σημεία της πειραματικής διαδικασίας μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης (Εικόνα 3.7B). Από την παρατήρηση μας αυτή συμπεραίνεται ότι ενεργοποιείται το ίδιο αποπτωτικό μονοπάτι, που περιλαμβάνει την κασπάση-9 και την κασπάση-3, μετά από την έκθεση σε δοξορουβικίνη και στις δύο ομάδες πειραματοζώων. Επομένως, το σημείο, που δρα η Hsp70 φαίνεται να είναι ανοδικά της ενεργοποίησης της κασπάσης-9 (και συνεπώς, ανοδικά και της εκτελεστικής κασπάσης-3 στα τελικά στάδια της απόπτωσης), ελέγχοντας την απόπτωση των κυττάρων του μυοκαρδίου με αποτροπή της ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών. Ακολούθως, θελήσαμε να μελετήσουμε εάν η Hsp70 ελέγχει και κάποιο άλλο στάδιο του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μηχανισμού, ή ακόμη και την απόπτωση μέσω άλλου μηχανισμού. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε σε ανοσοαποτύπωση ένας μεγάλος αριθμός αντισωμάτων και σε πρωτογενή εμβρυονικά κύτταρα φυσιολογικών (F1/F1) και Hsp70-διαγονιδιακών ποντικίων (Tg/Tg). Η Hsp70 εμφανίζεται να δρα και ανοδικά της ενεργοποίησης της p53, όπως δείχτηκε με πειράματα ανοσοαποτύπωσης σε πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα, και αναφέρονται πολύ αναλυτικότερα παρακάτω (Ενότητα 3.7.), καθώς και μέσω ανοσοφθορισμού και παρατήρησης σε συνεστιακό μικροσκόπιο, όπως και με πειράματα ανοσοαποτύπωσης (Western Blotting), που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιολογίας του κ. Αγγελίδη (Καλαϊτζάκης) [816].

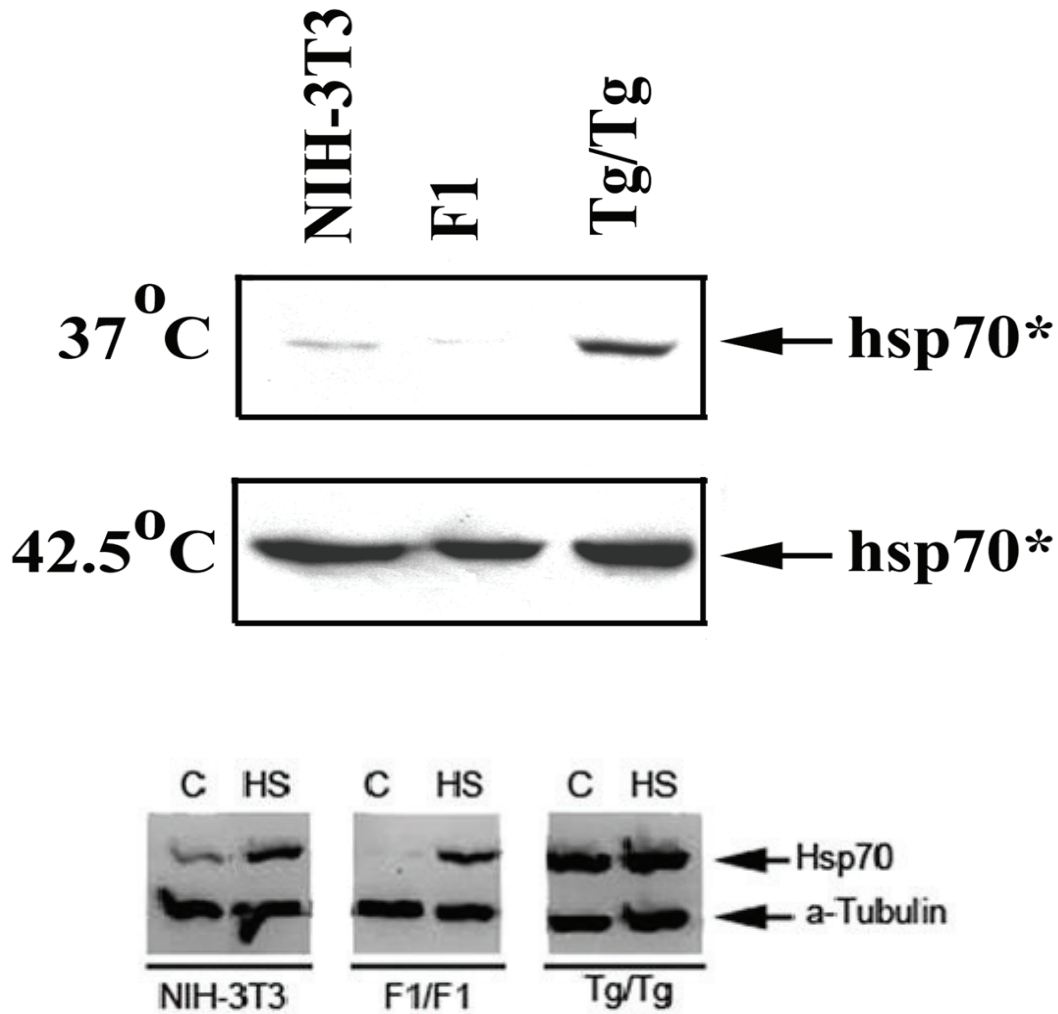
### **3.2. Η υπερέκφραση της Hsp70 σε πρωτογενή εμβρυονικά κύτταρα των Hsp70-διαγονιδιακών ποντικίων.**

Στην αρχή, πραγματοποιήθηκε φωτογράφιση των κυττάρων για να παρατηρηθεί η μορφολογία τους κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο. Η μορφολογία των πρωτογενών εμβρυικών κυττάρων φαίνεται στην εικόνα 3.8. Τα κύτταρα περίπου μετά την 18<sup>η</sup>-20<sup>η</sup> γενιά φαίνονται σαν ινοβλάστες και δείχνουν να αποκτούν ομοιογένεια.



**Εικόνα 3.8:** Φωτογραφία των κυττάρων, όπως φαίνονται σε οπτικό μικροσκόπιο.

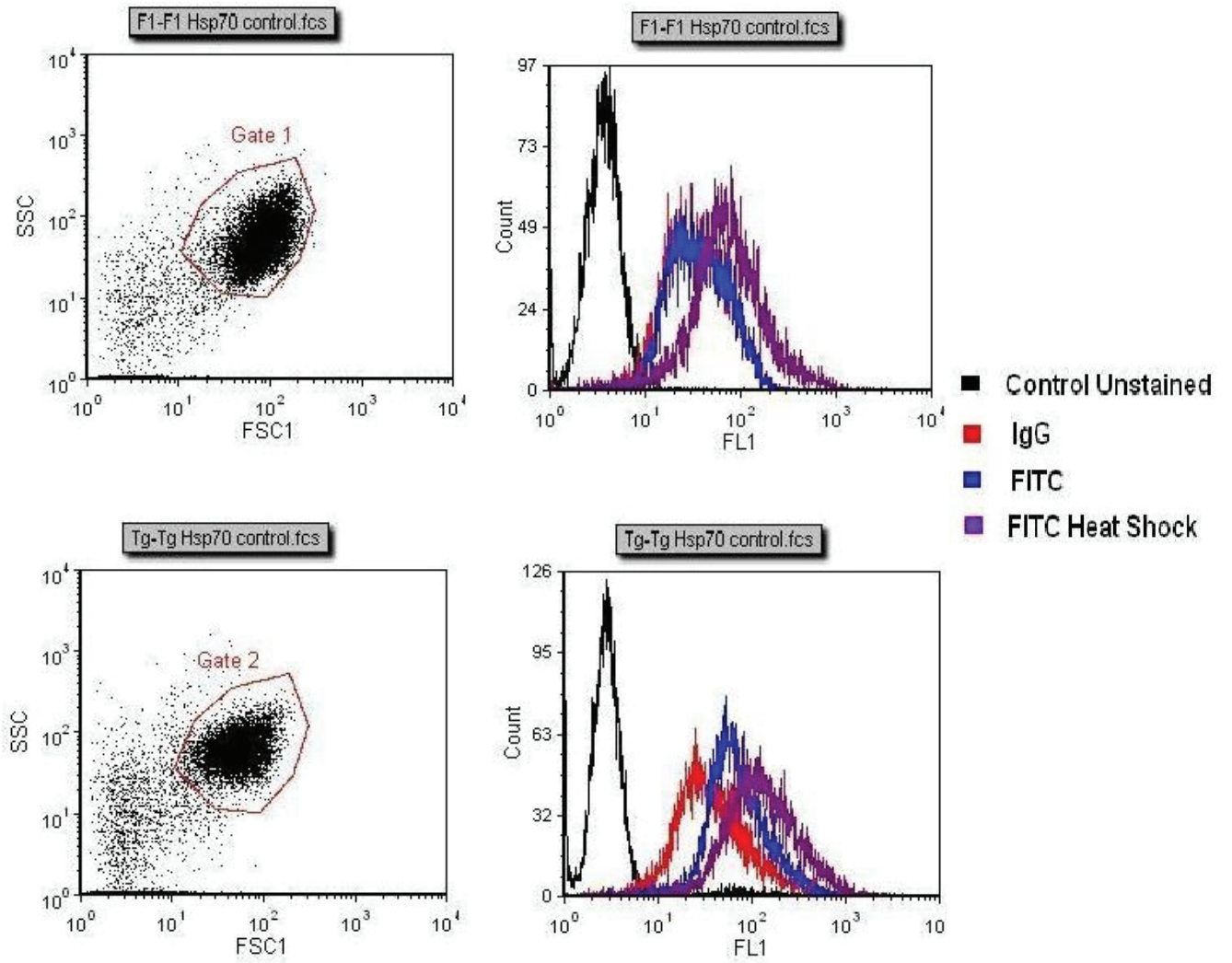
Αρχικά, οι πρωτογενείς εμβρυικές κυτταρικές σειρές, που απομονώθηκαν από έμβρυα ποντικών των Hsp70-διαγονιδιακών και αγρίου τύπου ζώων (μετά από περίπου 80 γενιές), εξετάστηκαν ως προς την έκφραση της Hsp70, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Western Blotting) πριν και μετά από θερμικό σοκ στους 43 °C για 90 min και ανάκαμψη στους 37°C για 3 ώρες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.9, δεν παρατηρήθηκαν ανιχνεύσιμα επίπεδα της Hsp70 στα F1/F1 κύτταρα ελέγχου (control), σε αντίθεση με τα Tg/Tg κύτταρα. Διαπιστώθηκε ότι πράγματι τα εμβρυικά πρωτογενή κύτταρα (Tg/Tg) υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, σε αντίθεση με τα F1/F1, όπου η πρωτεΐνη Hsp70 δεν ανιχνεύεται σε φυσιολογικές συνθήκες (37°C). Μετά την έκθεση των κυττάρων σε θερμικό σοκ, είναι εμφανής η αυξημένη έκφραση της Hsp70 σε όλες τις κυτταρικές σειρές, που επάγεται από το στρες. Η έκφραση της Hsp70 στα Tg/Tg κύτταρα (χωρίς στρες) ήταν παρόμοια με τα F1/F1 κύτταρα, όταν αυτά εκτίθενται στο θερμικό σοκ (Εικόνα 3.9). Η κυτταρική σειρά NIH-3T3, που πρόκειται για ινοβλάστες ποντικού, χρησιμοποιήθηκε σαν επιπλέον έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης Hsp70 κάτω από τις ίδιες συνθήκες.



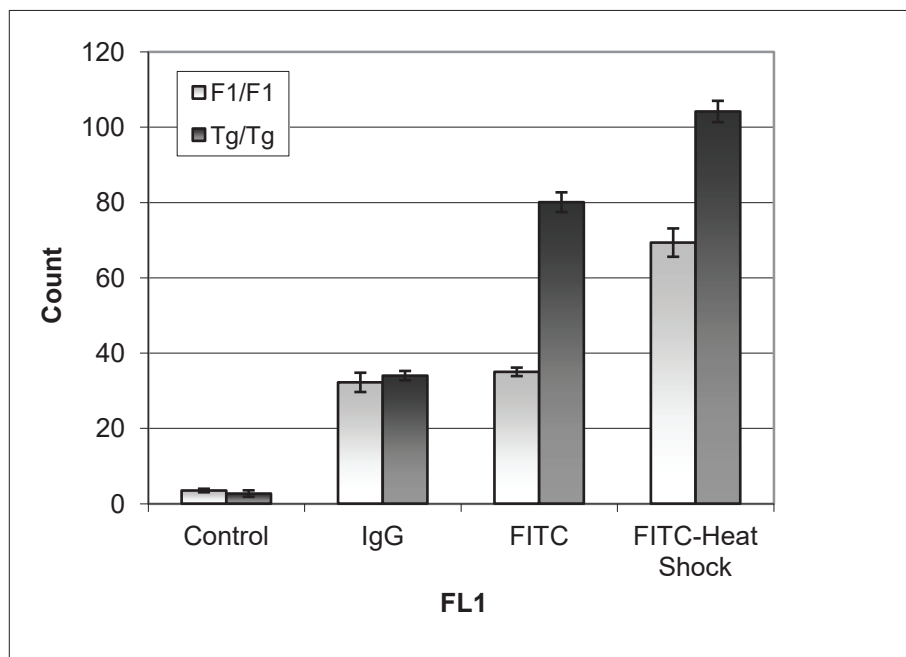
**Εικόνα 3.9:** Έκφραση της HSP70 σε φυσιολογικά πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα, F1/F1, και σε Tg/Tg κύτταρα από διαγονιδιακά ποντίκια, που υπερεκφράζουν την Hsp70. NIH-3T3, F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα εξετάστηκαν ως προς την έκφραση της Hsp70 κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (37 °C), ή μετά από έκθεση τους σε θερμικό σοκ (90 λεπτά σε 43°C και 90 λεπτά επαναφορά στους 37°C). Πρωτεϊνικά δείγματα (10 μg ανά δείγμα) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και υποβλήθηκαν σε ανοσοαποτύπωση (Western Blot), χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα, ειδικό για την επαγόμενη Hsp70. Η NIH-3T3 κυτταρική σειρά είναι κύτταρα ινοβλαστών ποντικού.

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώθηκαν και με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Έτσι, παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες, χρησιμοποιώντας anti-Hsp70 αντίσωμα (StressGen SPA 810) και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 3.10).

**A**



**B**



**Εικόνα 3.10:** Η υπερέκφραση της *Hsp70* στα *Tg/Tg* κύτταρα, σε σχέση με τα φυσιολογικά *F1/F1*, μετά από ανάλυση της έκφρασης της με κυτταρομετρία ροής. (A) Τα ίδια πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση της ενδοκυτταρικής *Hsp70*, με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας το ίδιο *anti-Hsp70* αντίσωμα. **Control:** άβαφο δείγμα, **IgG:** Επώαση μόνο με το δευτερογενές αντίσωμα *anti-mouse-FITC*, **FITC:** Επώαση με *anti-Hsp70* και *anti-mouse-FITC*, **FITC-Heat shock:** Επώαση με *anti-Hsp70* και *anti-mouse-FITC*, μετά από 90 λεπτά θερμικό σοκ στους 42.5 °C και 3 ώρες επαναφορά στους 37 °C. (B) Ιστόγραμμα ποσοστών έκφρασης της ενδοκυτταρικής *Hsp70*, με ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής, χρησιμοποιώντας το ίδιο *anti-Hsp70* αντίσωμα, όπως στο A. **Control:** άβαφο δείγμα, **IgG:** Επώαση μόνο με το δευτερογενές αντίσωμα *anti-mouse-FITC*, **FITC:** Επώαση με *anti-Hsp70* και *anti-mouse-FITC*, **FITC-Heat shock:** Επώαση με *anti-Hsp70* και *anti-mouse-FITC*, μετά από 90 λεπτά θερμικό σοκ στους 42.5 °C και 3 ώρες επαναφορά στους 37 °C ( $P < 0,0004$ ).

Κύτταρα *F1/F1* και *Tg/Tg*, που υπερεκφράζουν την *Hsp70*, τα οποία υπέστησαν ή όχι θερμικό σοκ, ελέγχθησαν για την επαγωγή της έκφρασης της *Hsp70*, με κυτταρομετρία ροής. Μετρήθηκε ο φθορισμός της *Hsp70* σε κάθε περίπτωση και, ακολούθως, μελετήθηκε η επαγωγή της, συγκρίνοντας τις καμπύλες φθορισμού και αφαιρώντας σε κάθε περίπτωση τον αυτοφθορισμό, που προέρχεται από το δευτερογενές αντίσωμα. Για την παρουσία έκφρασης της *Hsp70* χρησιμοποιήθηκε ειδικό μονόκλωνο αντίσωμα, που αναγνωρίζει την επαγόμενη *Hsp70*. Είναι εμφανής η αυξημένη έκφραση της *Hsp70* στα *Tg/Tg* κύτταρα σε σχέση με τα *F1/F1* κύτταρα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ενώ έκθεση των δύο κυτταρικών σειρών σε θερμικό σοκ έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή σε μεγαλύτερο βαθμό της πρωτεΐνης (Εικόνα 3.10A). Επομένως, τα *Tg/Tg* κύτταρα, που ανακτήθηκαν από τα διαγονιδιακά ποντίκια, εκφράζουν συνεχώς την *Hsp70*, χωρίς έκθεση τους σε θερμικό σοκ, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά *F1/F1* κύτταρα.

Για την καλύτερη ανάλυση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήσαμε ποσοτικοποίηση της έκφρασης της *Hsp70*, όπως αυτά προέκυψαν μετά από την κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 3.10B). Και από το γράφημα είναι εμφανής η αυξημένη έκφραση της *Hsp70* στα *Tg/Tg* κύτταρα σε σύγκριση με τα *F1/F1* κύτταρα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Μετά το θερμικό σοκ και τα φυσιολογικά κύτταρα *F1/F1* επάγουν την έκφραση της *Hsp70*, ενώ τα *Tg/Tg* κύτταρα την εκφράζουν σε μεγαλύτερο βαθμό. Τα αποτελέσματα μας για τη σύγκριση των δύο κυτταρικών σειρών ως προς την έκφραση της *Hsp70*, τόσο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες όσο και μετά από την έκθεση τους σε θερμικό στρες, είναι στατιστικά σημαντικά με  $P < 0,0004$  σε όλες τις περιπτώσεις.

Από όλα τα παραπάνω, αποδεικνύεται η συνεχής υπερέκφραση της *Hsp70* στα *Tg/Tg* πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα, που προέρχονται από τα διαγονιδιακά ποντίκια, σε αντίθεση με τα *F1/F1* φυσιολογικά πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα.

### 3.3. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη μέθοδο αποκλεισμού της χρωστικής Trypan Blue.

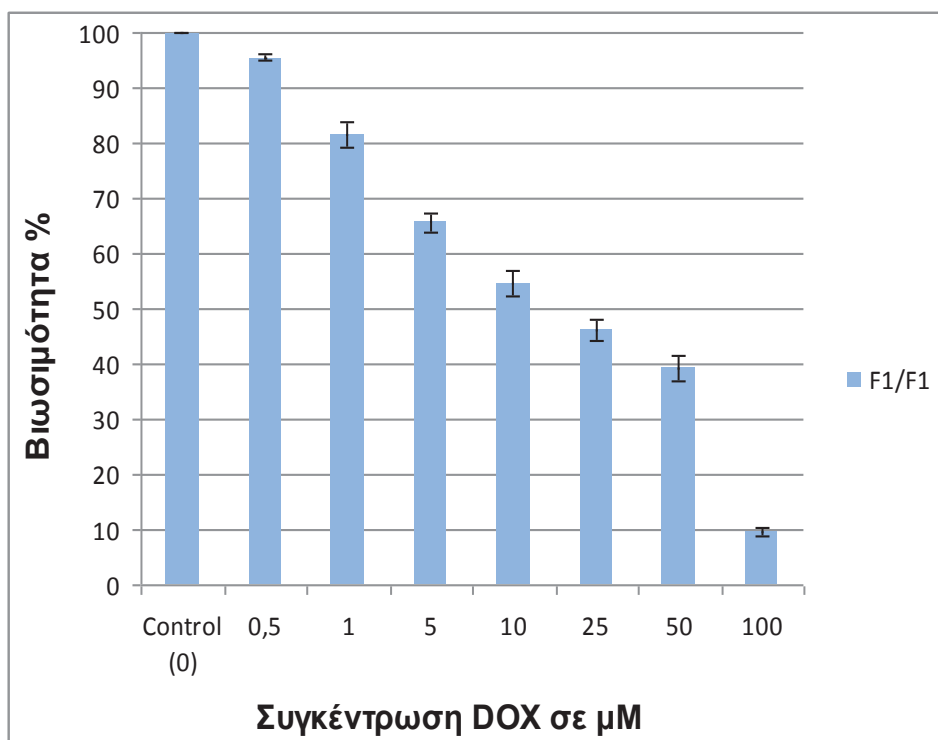
Αφού προσδιορίστηκε η έκφραση της Hsp70 στις κυτταρικές σειρές μας (F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα), στη συνέχεια της μελέτης μας μετρήσαμε την κυτταρική βιωσιμότητα και πώς μπορεί αυτή να επηρεάζεται από τη έκθεση των κυττάρων σε διάφορες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης με τη μέθοδο αποκλεισμού της χρωστικής Trypan Blue.

Η μέθοδος προσδιορισμού της βιωσιμότητας με τη χρησιμοποίηση της χρωστικής Trypan Blue στηρίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής να βάφει επιλεκτικά τα νεκρά κύτταρα, προσδίδοντας τους ένα έντονο μπλε χρώμα. Σε αντίθεση, τα ζωντανά κύτταρα, επειδή δεν βάφονται με τη συγκεκριμένη χρωστική, στο μικροσκόπιο εμφανίζουν την εικόνα άθικτων κυττάρων, δηλαδή έχουν λευκό (διαφανές) χρώμα.

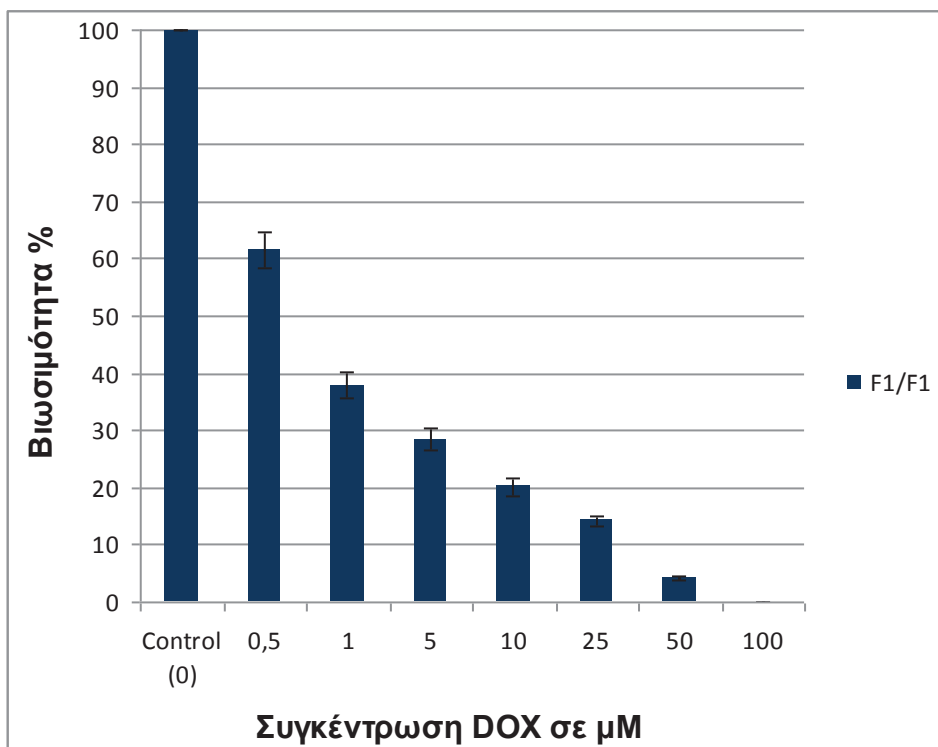
Στη μέθοδο αποκλεισμού της χρωστικής Trypan Blue, μετά το πέρας επώασης των κυττάρων με τα διαλύματα του φαρμάκου, τα κύτταρα αφού ξεπλυθούν τρεις φορές με 10 ml PBS, αποκολλούνται με θρυψίνη-EDTA και συλλέγονται σε θρεπτικό υλικό DMEM. Το κυτταρικό εναίωρημα φυγοκεντρείται και το κυτταρικό ίζημα, αναμειγνύεται με 0,5 ml χρωστικής Trypan Blue 0,4% (Sigma) σε 0,5 ml PBS, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της Trypan Blue να είναι 0,2% και αφήνεται για 10 λεπτά. Τελικά, μετράται ο αριθμός των ζωντανών, αλλά και των νεκρών κυττάρων κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο (Nikon) με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer). Η κυτταρική βιωσιμότητα υπολογίζεται ως εξής:

Βιωσιμότητα % = (άθικτα κύτταρα) / (νεκρά + κύτταρα που δεν βάφτηκαν)  
και εκφράστηκε τελικά ως ποσοστό (%) επί της βιωσιμότητας των κυττάρων ελέγχου (control).

Μετά από μέτρηση της βιωσιμότητας των F1/F1 κυττάρων ελέγχου μετά από χορήγηση διαφόρων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης και για χρόνο έκθεσης 24 ωρών, παρατηρήθηκε μια σταδιακή μείωση της κυτταρικής επιβίωσης ανάλογη με την αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου (Εικόνα 3.11). Μείωση της κυτταρικής επιβίωσης, που αντιστοιχεί περίπου στο 50% του κυτταρικού πληθυσμού, λαμβάνει χώρα μετά τη συγκέντρωση DOX των 10μM και πριν τη συγκέντρωση των 25μM. Μικρή επιβίωση παρατηρείται στα F1/F1 κύτταρα σε συγκέντρωση δοξορουβικίνης 100μM, μετά από 24 ώρες επώασης με το φάρμακο.

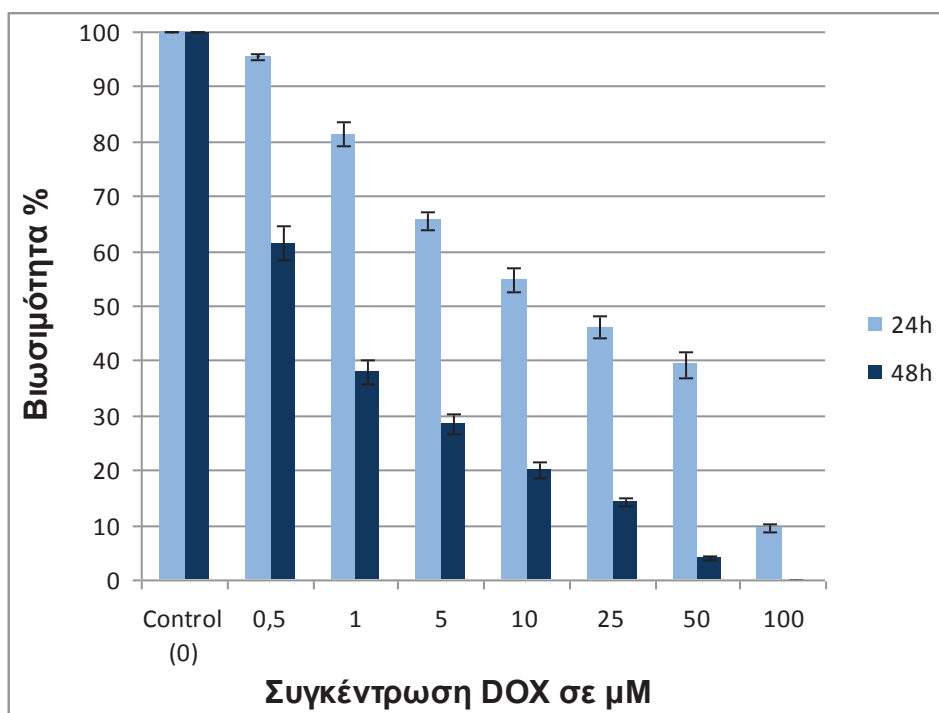


**Εικόνα 3.11:** Γραφική απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των F1/F1 κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 και 100 $\mu\text{M}$ ) για 24 ώρες.



**Εικόνα 3.12:** Γραφική απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των F1/F1 κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 και 100 $\mu\text{M}$ ) για 48 ώρες.

Σταδιακή μείωση του εκατοστιαίου ποσοστού της κυτταρικής βιωσιμότητας παρατηρήθηκε και μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε κύτταρα F1/F1 για χρονικό διάστημα 48 ωρών, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.12. Η παρατηρούμενη μείωση της κυτταρικής επιβίωσης στο 50% για 48 ώρες έκθεσης, εμφανίζεται μετά τη συγκέντρωση 0,5  $\mu\text{M}$ , ενώ ήδη από τη συγκέντρωση του 1  $\mu\text{M}$  DOX, η βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού είναι αρκετά μικρότερη από το 50%. Η επιβίωση των κυττάρων μειώνεται σημαντικά στις μεγάλες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (10 $\mu\text{M}$ , 25 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ ), ενώ εμφανίζεται μηδενική σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{M}$  DOX 48 ώρες μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου.



**Εικόνα 3.13:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών επιβίωσης των F1/F1 κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p < 4,7 \cdot 10^{-5}$ ).

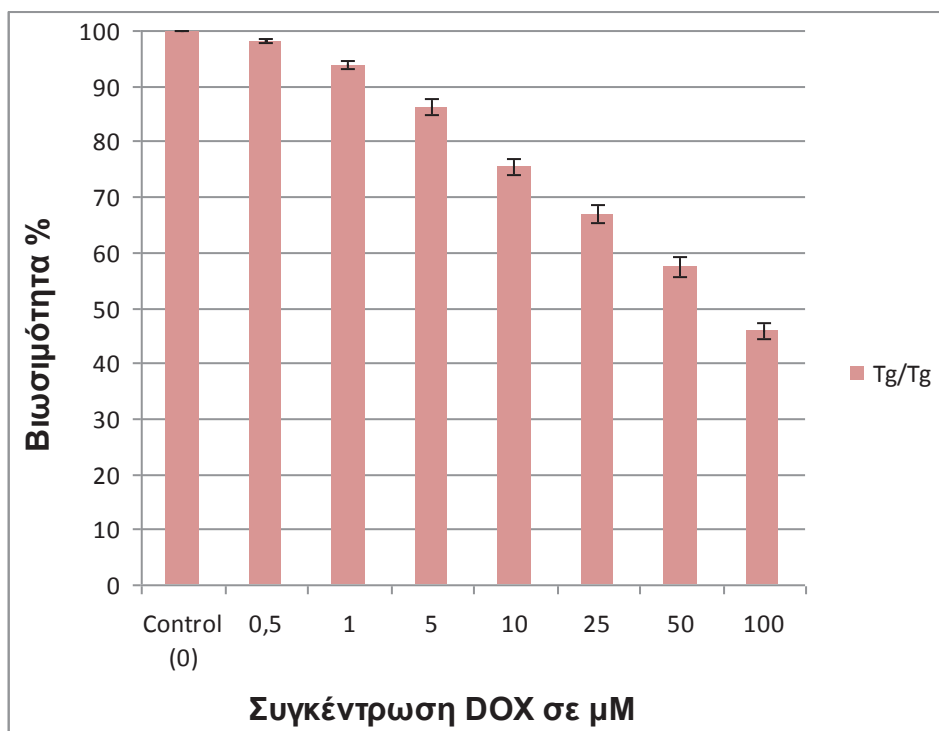
Στη συνέχεια, κατόπιν συγκρίσεως της βιωσιμότητας των F1/F1 κυττάρων σε χρόνο 24 και 48 ωρών μετά από τη χορήγηση των αντίστοιχων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης (Εικόνα 3.13), παρατηρείται η σταδιακή μείωση των ποσοστών επιβίωσης των F1/F1 κυττάρων, με αύξηση της συγκέντρωσης της δοξορουβικίνης και του χρόνου επώασης των κυττάρων με το φάρμακο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η σύγκριση των ποσοστών επιβίωσης των F1/F1 κυττάρων ανάμεσα στους δύο χρόνους από τη χορήγηση του φαρμάκου, δείχνει ότι η κυτταρική βιωσιμότητα είναι πολύ μεγαλύτερη στις 24 ώρες σε σχέση με τις 48 ώρες. Η διαφορά αυτή στα ποσοστά επιβίωσης είναι ιδιαίτερα εμφανής σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα μας, μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), ως προς τη σύγκριση των ποσοστών επιβίωσης ανάμεσα στους δύο χρόνους επώασης για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης στα F1/F1 κύτταρα, είναι στατιστικά σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις επώασης στο φάρμακο ( $p < 4,7 \cdot 10^{-5}$  για όλες τις συγκεντρώσεις DOX).

Κατά την επώαση των κυττάρων Tg/Tg, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για 24 ώρες, παρατηρείται



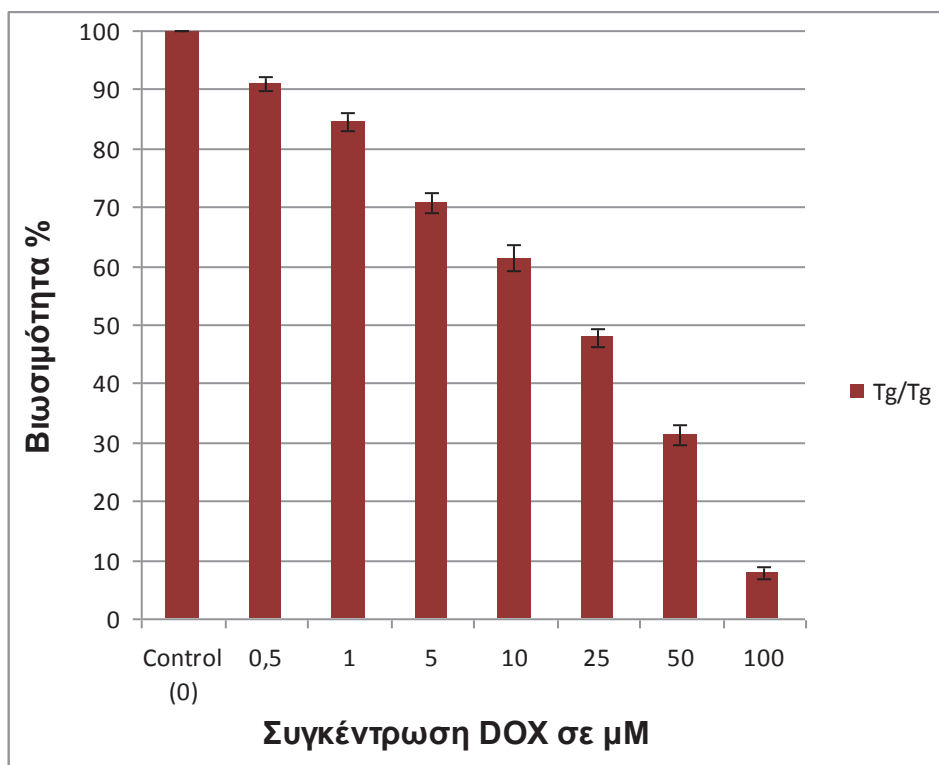
αυξημένη ανθεκτικότητα των κυττάρων στο φάρμακο. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.14, και στα Tg/Tg κύτταρα, φαίνεται μια σταδιακή μείωση της επιβίωσης του κυτταρικού πληθυσμού με αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης της DOX. Η μείωση των ποσοστών επιβίωσης των Tg/Tg κυττάρων, φαίνεται να καθυστερεί και να μην είναι τόσο έντονη, ακόμα και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, αφού, ακόμα, και στη συγκέντρωση των 100  $\mu\text{M}$ , η επιβίωση εμφανίζεται λίγο κάτω από το 50% του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού.

Από το γράφημα είναι εμφανής η αυξημένη ανθεκτικότητα των Tg/Tg κυττάρων στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις επώασης με δοξορουβικίνη, όπου τα κύτταρα επιδεικνύουν καλύτερη επιβίωση.



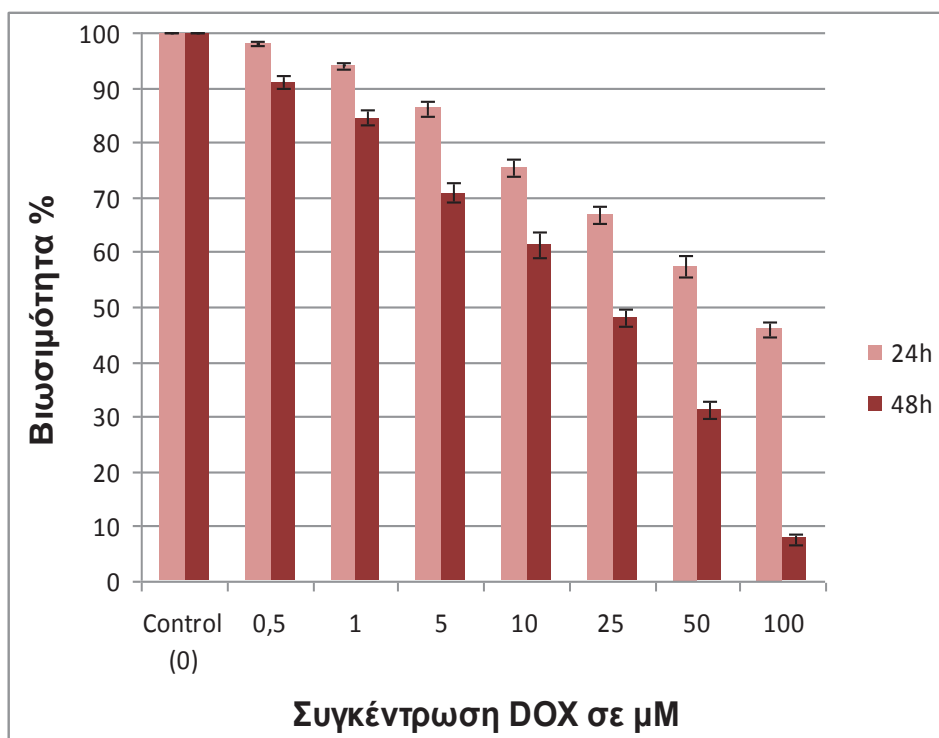
**Εικόνα 3.14:** Γραφική απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 και 100  $\mu\text{M}$ ) για 24 ώρες.

Στην παράθεση του γραφήματος, απεικονίζονται τα ποσοστά της βιωσιμότητας των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση των αντίστοιχων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης για 48 ώρες. Όταν τα Tg/Tg κύτταρα επώασθησαν στον χρόνο των 48 ωρών, παρατηρήθηκε ανάλογη σταδιακή μείωση στην επιβίωση του κυτταρικού πληθυσμού με αύξηση της συγκέντρωσης της δοξορουβικίνης (Εικόνα 3.15). Το ποσοστό επιβίωσης για τα Tg/Tg κύτταρα, που είναι περίπου στο 50% του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού, εμφανίζεται στη συγκέντρωση των 25  $\mu\text{M}$  δοξορουβικίνης, ενώ εμφανίζεται μια απότομη μείωση της βιωσιμότητας, μετά τη συγκέντρωση των 50  $\mu\text{M}$  DOX. Είναι, πάντως, εμφανές από το γράφημα μας, ότι παρατηρείται κυτταρική επιβίωση για τα Tg/Tg κύτταρα, ακόμα και για τις μεγάλες συγκεντρώσεις DOX μετά από 48 ώρες επώασης, πράγμα το οποίο καθιστά τα Tg/Tg κύτταρα πιο ανθεκτικά στη δοξορουβικίνη.



**Εικόνα 3.15:** Γραφική απεικόνιση του ποσοστού βιωσιμότητας των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 και 100 μM) για 48 ώρες.

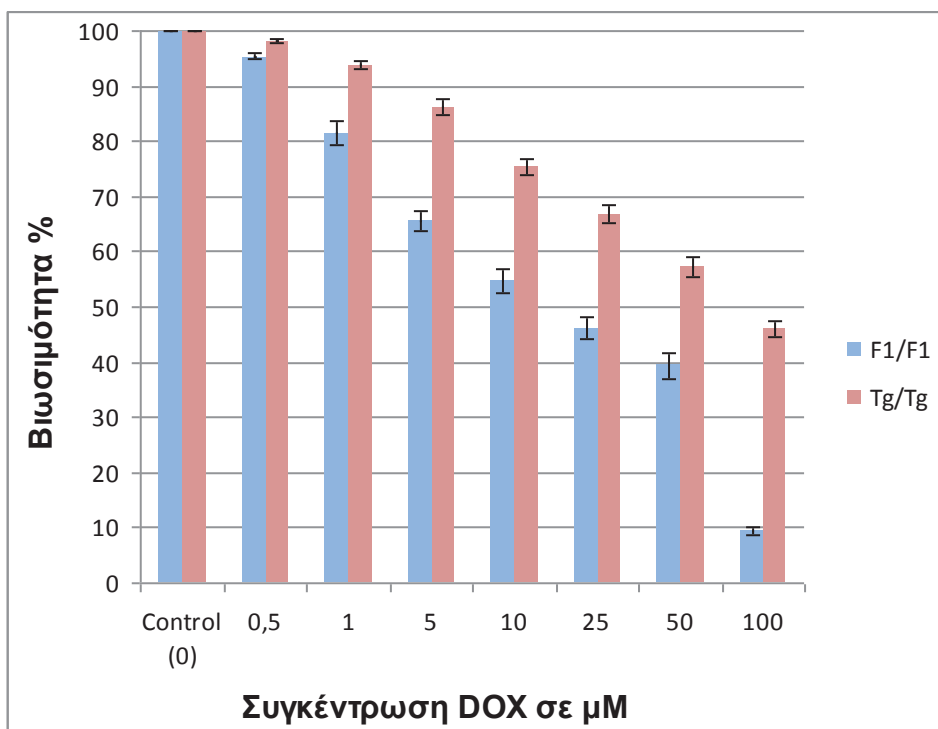
Στη σύγχρονη απεικόνιση της βιωσιμότητας των Tg/Tg κυττάρων, που υπερεκφράζουν την Hsp70, για τους δύο χρόνους έκθεσης, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.16, προκύπτει το συμπέρασμα ότι, όπως και στα F1/F1 κύτταρα, η επιβίωση είναι μειωμένη στις 48 ώρες επώασης σε σύγκριση με αυτή στις 24 για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήθηκαν. Επίσης, συμπεραίνεται η σταδιακή μείωση των ποσοστών επιβίωσης στα Tg/Tg κύτταρα, όσο μεγαλώνει η συγκέντρωση, καθώς και ο χρόνος επώασης των κυττάρων με δοξορουβικίνη. Η διαφορά στη βιωσιμότητα ανάμεσα στους δύο χρόνους επώασης δεν είναι το ίδιο έντονη στα Tg/Tg κύτταρα, όπως ήταν στα F1/F1 κύτταρα, και κυρίως στις μικρότερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, πράγμα το οποίο δείχνει ότι τα Tg/Tg κύτταρα επιδεικνύουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα. Οι διαφορές στη βιωσιμότητα των Tg/Tg κυττάρων στις δύο χρονικές διάρκειες έκθεσης των 24 και 48 ωρών είναι στατιστικά σημαντικές, μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), με  $p < 0,0008$  για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης.



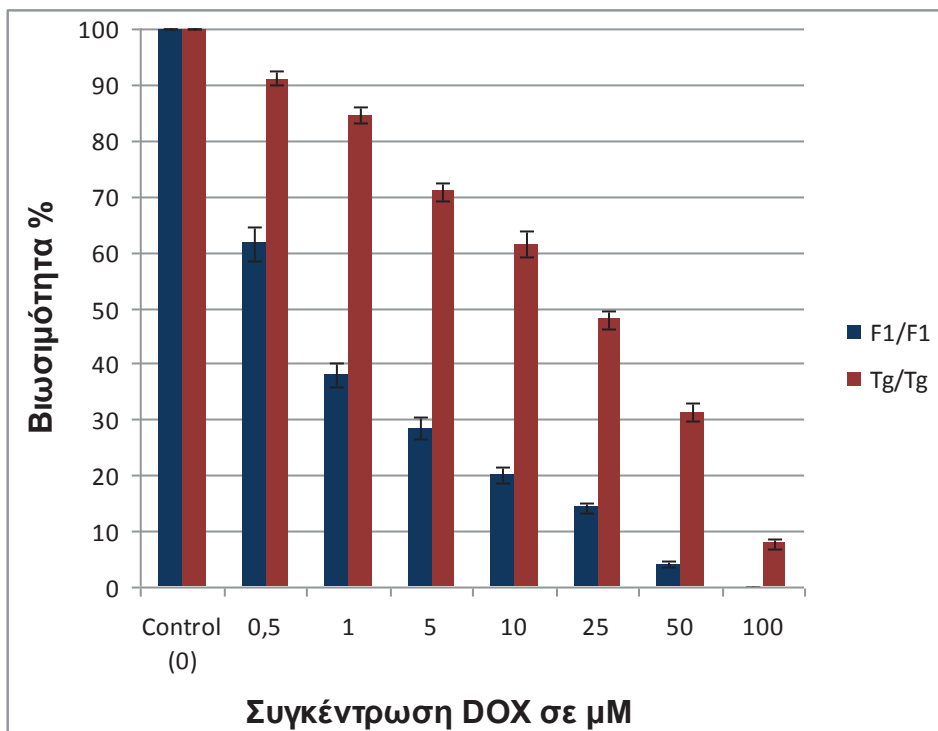
**Εικόνα 3.16:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών επιβίωσης των Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p < 0,0008$ ).

Από τα παραπάνω γραφήματα, συμπεραίνεται ότι η τοξική δράση της δοξορουβικίνης στον κυτταρικό πληθυσμό έχει τόσο δόσο-εξαρτώμενη όσο και χρόνο-εξαρτώμενη βάση.

Ακολούθησε η σύγκριση του ποσοστού της κυτταρικής βιωσιμότητας στις δύο κυτταρικές σειρές στην ίδια χρονική διάρκεια έκθεσης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της δοξορουβικίνης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.17, στις 24 ώρες, παρατηρήθηκε αυξημένη τιμή των ποσοστών επιβίωσης στα Tg/Tg κύτταρα σε σύγκριση με αυτή στα F1/F1 για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης. Η διαφορά στη βιωσιμότητα ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές είναι εμφανής σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήσαμε, ενώ είναι ακόμη πιο έντονη στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου για 24 ώρες μετά τη χορήγηση. Από το γράφημα είναι έκδηλο ότι τα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, εμφανίζουν καλύτερη επιβίωση στη δράση της δοξορουβικίνης σε σχέση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου μετά από 24 ώρες επώασης με το φάρμακο. Τα αποτελέσματά μας, μετά τη στατιστική ανάλυση (t-test), ως προς τη σύγκριση των ποσοστών βιωσιμότητας ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για 24 ώρες επώασης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, είναι στατιστικά σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις ( $p=0,002$  -  $p=0,0000$ ).



**Εικόνα 3.17:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών επιβίωσης μεταξύ των F1/F1 και Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p=0,002$  -  $p=0,0000$ ).



**Εικόνα 3.18:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών επιβίωσης μεταξύ των F1/F1 και Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 48 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p < 0,0001$ ).

Κατά την έκθεση των δύο κυτταρικών σειρών σε δοξορουβικίνη για 48 ώρες παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά στη συνολική επιβίωση στα κύτταρα Tg/Tg σε σχέση με τα F1/F1 (Εικόνα 3.18), για όλες τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου, που χρησιμοποιήθηκαν. Η διαφορά στα ποσοστά επιβίωσης, που παρατηρείται ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές στις 48 ώρες επώασης είναι ιδιαίτερα εμφανής σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και είναι πιο έντονη από τη διαφορά, που προέκυψε νωρίτερα στις 24 ώρες επώασης με το φάρμακο, όπως παρατηρήθηκε και στο προηγούμενο γράφημα. Σε αντίθεση με τα F1/F1 κύτταρα, όπου στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις DOX, η επιβίωση είναι μικρή και μηδενίζεται στη συγκέντρωση των 100  $\mu\text{M}$ , στα Tg/Tg κύτταρα παρατηρείται επιβίωση, ακόμα και στις μεγάλες συγκεντρώσεις φαρμάκου. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι και στην περίπτωση των 48 ωρών μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης, τα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, φαίνονται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο φάρμακο, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα. Οι διαφορές στην επιβίωση, που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για 48 ώρες επώασης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, είναι στατιστικά σημαντικές ( $p < 0,0001$ ), μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), για όλες τις συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν.

Συμπερασματικά, μπορούμε να αποφανθούμε ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση του ποσοστού επιβίωσης στα κύτταρα, ενώ επίσης εξαρτάται και από το είδος των πρωτογενών κυτταρικών σειρών, αφού φαίνεται η αυξημένη επιβίωση των Tg/Tg κυττάρων σε σύγκριση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου. Τα ιστογράμματα των ποσοστών βιωσιμότητας έδειξαν ότι τα F1/F1 κύτταρα με μη ανιχνεύσιμα ποσά της Hsp70, παρουσιάζουν λιγότερη επιβίωση σε σύγκριση με τα Tg/Tg κύτταρα για 24 και 48 ώρες, προτείνοντας, επομένως, ότι η παρουσία της Hsp70 στα Tg/Tg κύτταρα προσδίδει σε αυτά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη δοξορουβικίνη.

### **3.4. Προσδιορισμός του κυτταρικού θανάτου μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης με χρήση κυτταρομετρίας ροής**

Μετά τον προσδιορισμό της επιβίωσης των κυττάρων ακολούθησε ο προσδιορισμός του κυτταρικού θανάτου, που προκαλείται από τη χορήγηση δοξορουβικίνης. Για τον υπολογισμό της απόπτωσης των κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης, χρησιμοποιήθηκε χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (pI) και Αννεξίνη V, συζευγμένη με φθορίζον αντίσωμα (FITC) και μέτρηση σε κυτταρόμετρο.

Η μέτρηση του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής, βασίζεται στη διαδικασία μεταφοράς της αρνητικά φορτισμένης φωσφατιδυλοσερίνης (PS) από την εσωτερική προς την εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης [817], η οποία γίνεται στην έναρξη της απόπτωσης. Τα κύτταρα, κατά τη διάρκεια της αποπτωτικής διαδικασίας, χάνουν την ασυμμετρία της διπλής φωσφολιπιδικής μεμβράνης και εκθέτουν στο εξωτερικό της τη φωσφατιδυλοσερίνη, που φυσιολογικά βρίσκεται στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης. Αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα κατά τα πρώιμα στάδια του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όπου η διαπερατότητα της μεμβράνης

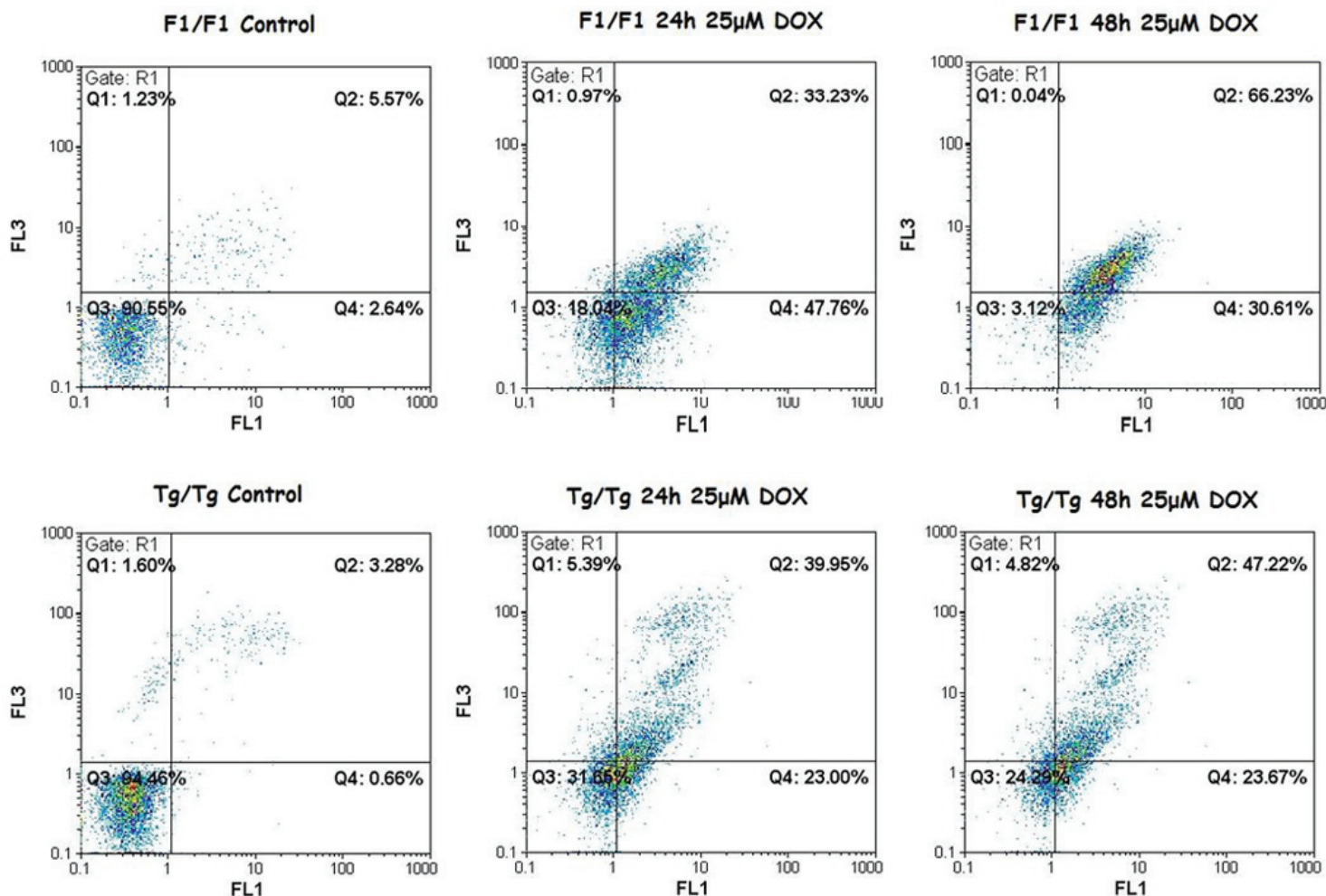
παραμένει ακέραια. Η αννεξίνη V ανήκει σε μία οικογένεια πρωτεϊνών με αντισυγκολλητικές ιδιότητες, που συνδέεται κατά προτίμηση με αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, όπως είναι η φωσφατιδυλοσερίνη της εξωτερικής μεμβράνης, παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$ . Έτσι, με τη σύνδεση της Αννεξίνης V με τη φθορίζουσα χρωστική (FITC) είναι δυνατή η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των αποπτωτικών κυττάρων ένα προς ένα με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής. Η χρώση με Αννεξίνη-V ανιχνεύει τα εξωτερικευμένα προϊόντα αποδόμησης της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην κυτταρική μεμβράνη, που αποκαλύπτονται νωρίς κατά την εξέλιξη της απόπτωσης, προσδιορίζοντας με αυτό τον τρόπο έναν συγκεκριμένο πληθυσμό κυττάρων, που ονομάζονται Ann+ και συνιστούν τον πληθυσμό των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων. Καθώς η διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου εξελίσσεται και το κύτταρο βρίσκεται σε όψιμο ή τελικό στάδιο απόπτωσης, η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης μεταβάλλεται με αποτέλεσμα μόρια, όπως το Ιωδιούχο Προπίδιο (PI), να την διαπερνούν ελεύθερα και να συνδέονται με το DNA του κυττάρου. Στο αποπτωτικό αυτό στάδιο η διπλή χρώση με Αννεξίνη και PI, προσδιορίζει έναν δεύτερο πληθυσμό κυττάρων Ann+ PI+, που συνιστούν τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα. Κύτταρα, τα οποία δεν εκφράζουν κανένα από τα δύο προαναφερθείσα μόρια αποτελούν τον ακέραιο ζώντα πληθυσμό, ενώ τέλος αυτά, που εκφράζουν μόνο το PI συνιστούν πληθυσμό κυττάρων σε φάση νέκρωσης και πλήρους καταστροφής της μεμβράνης.

Η ανάλυση και η μέτρηση του κυτταρικού θανάτου στις κυτταρικές σειρές (F1/F1 και Tg/Tg) με τη μέθοδο αυτή με κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε μετά από προσθήκη δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25  $\mu$ M) και για διάφορους χρόνους επώασης (24, 48 ώρες).

Λόγω του αυτοφθορισμού της δοξορουβικίνης, για κάθε συγκέντρωση και χρόνο επώασης χρησιμοποιείται και ένα άβαφο δείγμα (χωρίς προσθήκη PI και Αννεξίνης) 100.000 κυττάρων. Μετά τη μέτρηση και των δύο δειγμάτων, πραγματοποιήσαμε αφαίρεση του αριθμού των κυττάρων του άβαφου δείγματος από τον αριθμό των κυττάρων του βαμμένου για κάθε ποσοστό, για να προσδιορίσουμε τα ποσοστά επιβίωσης, νέκρωσης και απόπτωσης για την κάθε περίπτωση.

Μετά τον υπολογισμό των ποσοστών της επιβίωσης, της απόπτωσης και της νέκρωσης του πληθυσμού των κυττάρων για κάθε συγκέντρωση και χρονική περίοδο επώασης με τη δοξορουβικίνη, προέκυψαν τα γραφήματα, που παρατίθενται στη συνέχεια. Τα ποσοστά, που αντιστοιχούν στις διάφορες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, υπολογίστηκαν ως προς το επί τοις % της συνολικής απόπτωσης και νέκρωσης των κυττάρων ελέγχου (χωρίς προσθήκη του φαρμάκου στο δείγμα μας) για το ίδιο χρονικό διάστημα επώασης με δοξορουβικίνη. Ως απόπτωση αναφέρουμε το ποσοστό της συνολικής απόπτωσης, που αποτελεί το άθροισμα τόσο του ποσοστού των πρώιμων όσο και αυτού των όψιμων αποπτωτικών κυττάρων.

Παρακάτω παρατίθεται η απεικόνιση ενδεικτικών μετρήσεων από το κυτταρόμετρο για τις δύο κυτταρικές σειρές και στους δύο χρόνους επώασης των 24 και 48 ωρών με δοξορουβικίνη. Οι μετρήσεις αυτές είναι, όπως προέκυψαν με την κυτταρομετρία ροής, χωρίς τον υπολογισμό του αυτοφθορισμού του φαρμάκου.



**Εικόνα 3.19:** Ενδεικτική απεικόνιση γραφημάτων των δύο κυτταρικών σειρών πρωτογενών εμβρυικών κυττάρων (F1/F1 και Tg/Tg), όπως μετρήθηκαν στο κυτταρόμετρο, σε συγκεντρώσεις 0µM (Control) και 25µM DOX για 24 και 48 ώρες επώασης. Η μέτρηση της απόπτωσης των κυττάρων έγινε με τη χρήση Αννεξίνης V (Annexin V) και ιωδιούχου προπιδίου (PI), με κυτταρομετρία ροής.

Q3= % Ποσοστό των ζωντανών κυττάρων

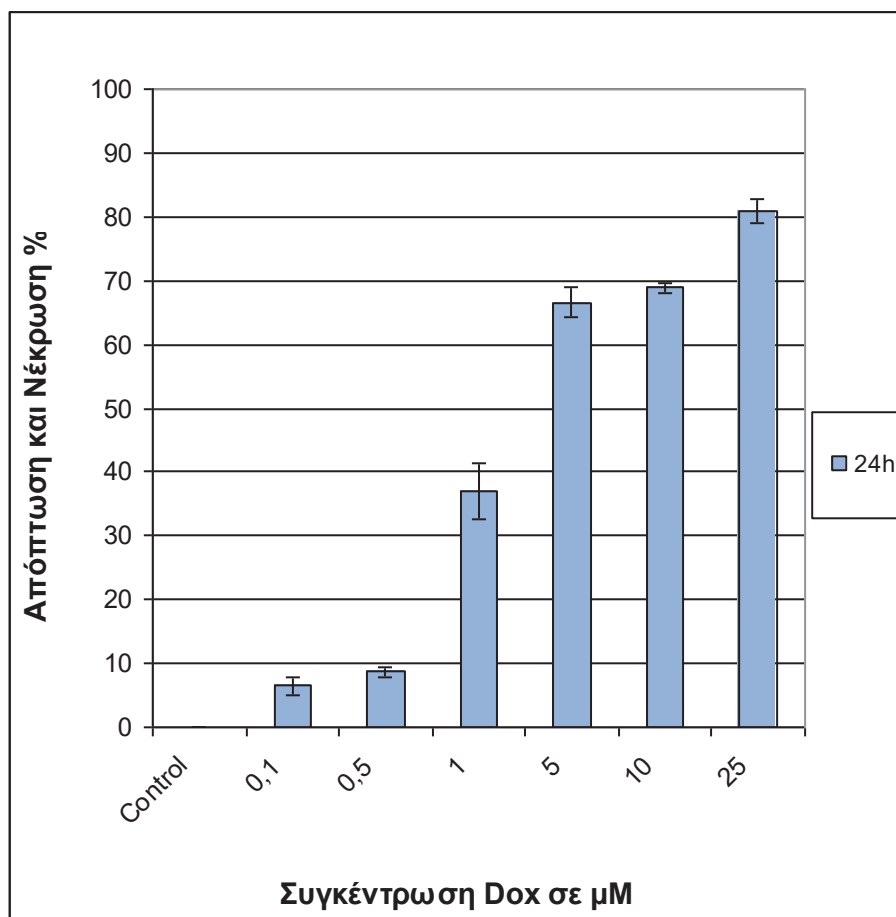
Q1= % Ποσοστό νεκρωτικών κυττάρων

Q2= % Ποσοστό όψιμων αποπτωτικών κυττάρων (late apoptotic cells)

Q4= % Ποσοστό πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων (early apoptotic cells).

Από τις εικόνες αυτές είναι εμφανής η καλύτερη επιβίωση, που επιδεικνύουν τα Tg/Tg κύτταρα σε σύγκριση με τα F1/F1 κύτταρα.

Μετά τη μέτρηση και την αφαίρεση του αριθμού των κυττάρων του άβαφου δείγματος από τον αριθμό των κυττάρων του βαμμένου με PI και Αννεξίνη V δείγματος για κάθε ποσοστό, λόγω του αυτοφθορισμού της δοξορουβικίνης, και τον προσδιορισμό των ποσοστών επιβίωσης, νέκρωσης και απόπτωσης για κάθε συγκέντρωση και χρονική περίοδο επώασης με τη δοξορουβικίνη, προέκυψαν τα ακόλουθα γραφήματα.

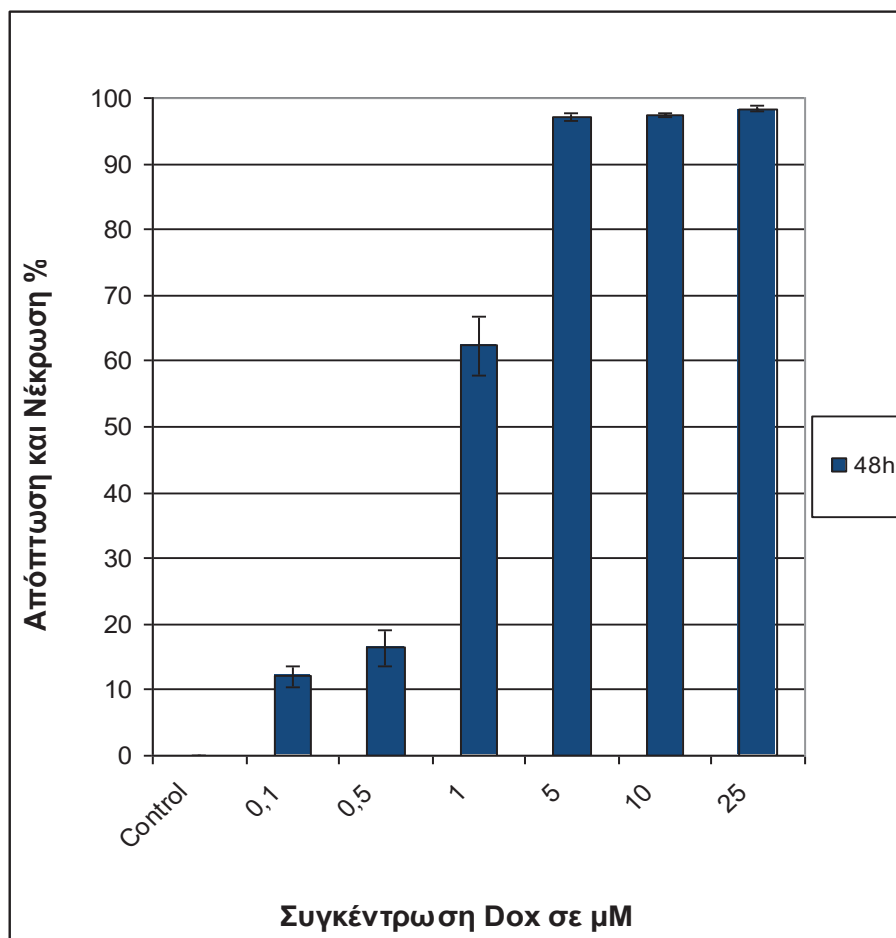


**Εικόνα 3.20:** Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των αποπτωτικών και νεκρωτικών F1/F1 κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$ ) για 24 ώρες.

Αρχικά, προσδιορίστηκε η βιοσιμότητα στα F1/F1 κύτταρα στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και σε χρόνο έκθεσης 24 ώρες, όπου παρατηρήθηκε μια σταδιακή αύξηση της συνολικής απόπτωσης και νέκρωσης, ανάλογη με την αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.20. Παρατηρήθηκε μια έντονη αύξηση του κυτταρικού θανάτου στον πληθυσμό των F1/F1 κυττάρων, που ξεπερνά και το 50%, από τη συγκέντρωση των 5 $\mu\text{M}$  περίπου. Μικρή επιβίωση παρατηρείται στα κύτταρα σε συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που αντιστοιχούν σε 25 $\mu\text{M}$  και πάνω.

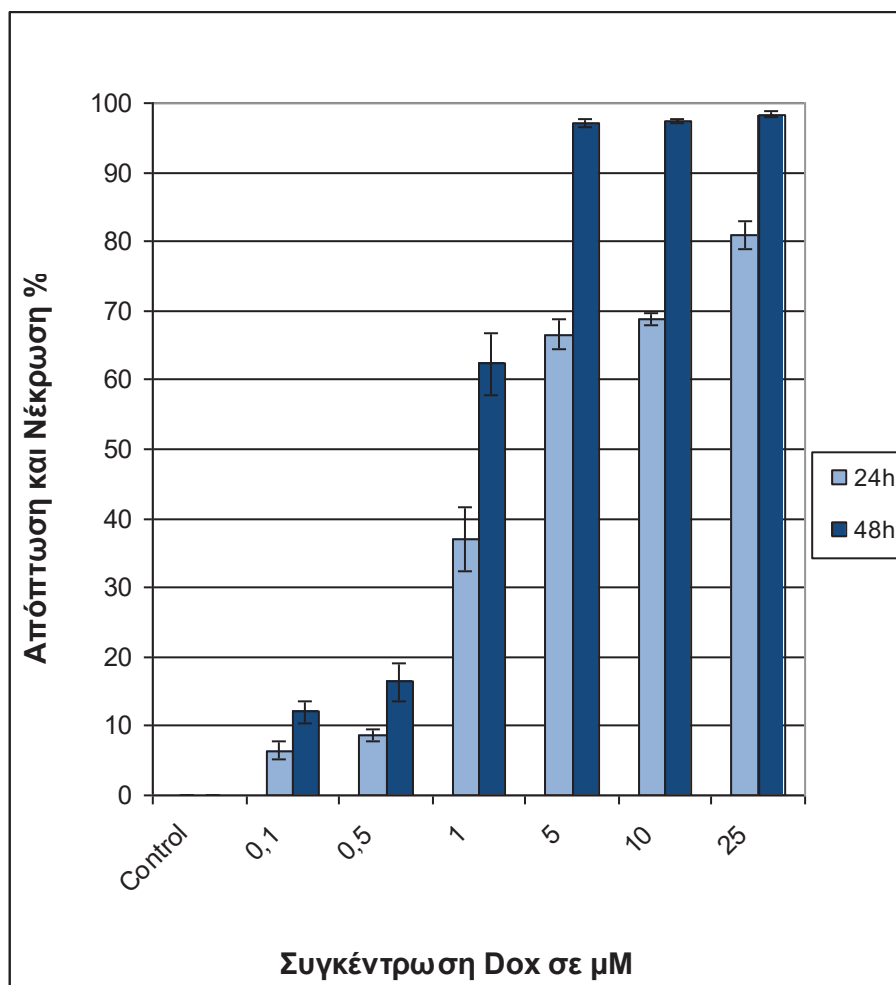
Σταδιακή αύξηση του ποσοστού της κυτταρικής απόπτωσης και νέκρωσης παρατηρήθηκε και ύστερα από έκθεση των F1/F1 κυττάρων σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για χρονική διάρκεια 48 ωρών (Εικόνα 3.21). Συνολική απόπτωση και νέκρωση άνω του 50 % του κυτταρικού πληθυσμού παρατηρείται μόλις από τη συγκέντρωση φαρμάκου 1 $\mu\text{M}$  για χρονικό διάστημα 48 ωρών μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης. Η βιοσιμότητα των κυττάρων εμφανίζεται να είναι ελάχιστη από συγκέντρωση DOX 5 $\mu\text{M}$  και πάνω (5 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 25 $\mu\text{M}$ ). Στις συγκεντρώσεις αυτές δεν φαίνονται ιδιαίτερες διαφορές ως προς το σύνολο της απόπτωσης και της νέκρωσης, καθώς ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων είναι ιδιαίτερα μικρός.





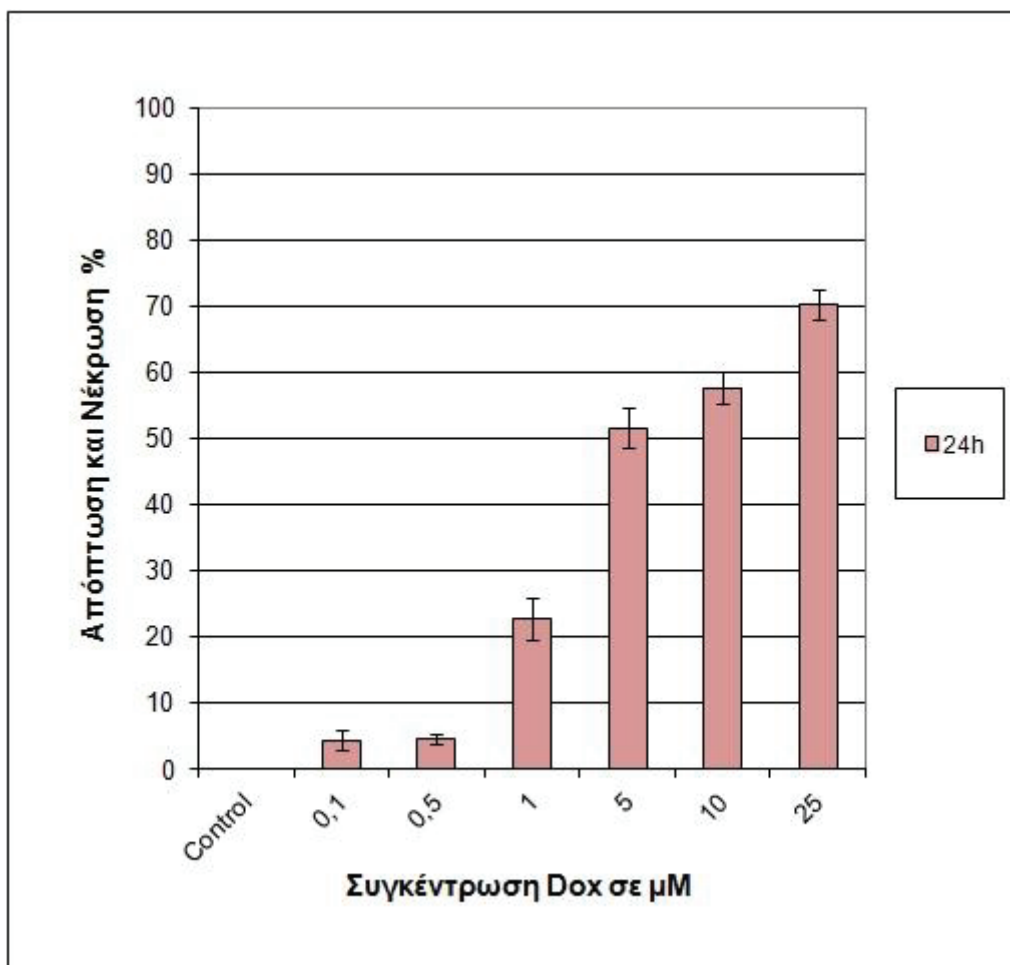
**Εικόνα 3.21:** Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των αποπτωτικών και νεκρωτικών F1/F1 κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$ ) για 48 ώρες.

Στο επόμενο γράφημα απεικονίζεται η σύγκριση των ποσοστών απόπτωσης και νέκρωσης των F1/F1 κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών μετά από τη χορήγηση των αντίστοιχων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης (Εικόνα 3.22) όπου φαίνεται η σταδιακή αύξηση των ποσοστών απόπτωσης και νέκρωσης στα F1/F1 κύτταρα, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της δοξορουβικίνης και ο χρόνος επώασης των κυττάρων με το φάρμακο. Από τη σύγκριση των ποσοστών ανάμεσα στους δύο χρόνους από τη χορήγηση της δοξορουβικίνης, αποδεικνύεται, ότι ο κυτταρικός θάνατος είναι πολύ πιο έντονος στις 48 ώρες σε σχέση με τις 24 για τα F1/F1 κύτταρα, και η διαφορά αυτή είναι ιδιαίτερα έκδηλη στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου (1 $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$  και 25 $\mu\text{M}$ ), όπου η επιβίωση των κυττάρων μειώνεται δραματικά. Τα αποτελέσματα, μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), ως προς τη σύγκριση των ποσοστών απόπτωσης και νέκρωσης ανάμεσα στους δύο χρόνους επώασης για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης στα F1/F1 κύτταρα, είναι στατιστικά σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις επώασης στο φάρμακο ( $p=0,009$  -  $p=0,000$ ).



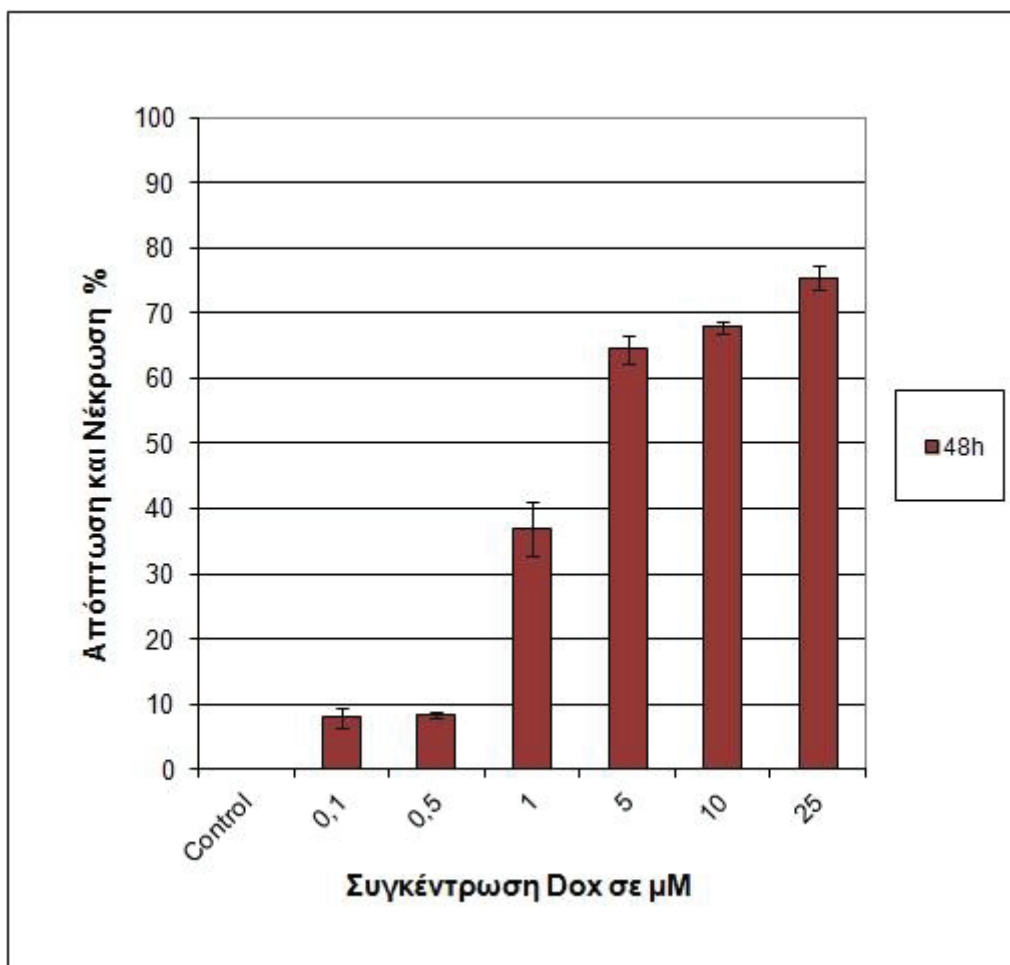
**Εικόνα 3.22:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών απόπτωσης και νέκρωσης των F1/F1 κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p < 0,009$ ).

Στο γράφημα, που απεικονίζονται τα ποσοστά της συνολικής απόπτωσης και νέκρωσης των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση των αντίστοιχων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης για 24 ώρες, παρατηρήθηκε μια σταδιακή αύξηση της συνολικής απόπτωσης και νέκρωσης με αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.23. Επίσης, στα Tg/Tg κύτταρα διακρίνεται μια αύξηση του κυτταρικού θανάτου από τη συγκέντρωση DOX των 5μM περίπου, όπου το ποσοστό της συνολικής απόπτωσης και νέκρωσης είναι περίπου στο 50%. Από το γράφημα είναι, επίσης, εμφανής η αυξημένη ανθεκτικότητα των Tg/Tg κυττάρων στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις επώασης με δοξορουβικίνη, όπου τα κύτταρα επιδεικνύουν καλύτερη επιβίωση.



**Εικόνα 3.23:** Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των αποπτωτικών και νεκρωτικών Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$ ) για 24 ώρες.

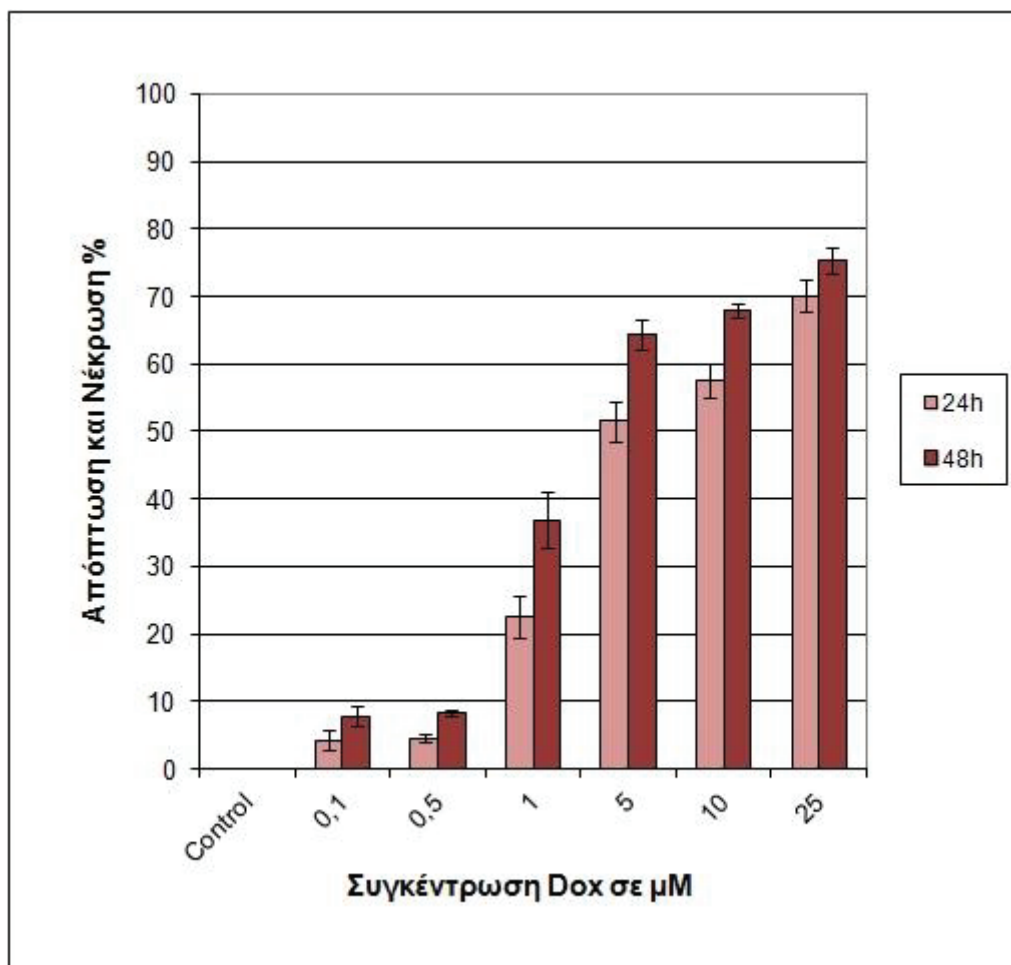
Ανάλογη σταδιακή αύξηση του ποσοστού της συνολικής κυτταρικής απόπτωσης και νέκρωσης παρατηρήθηκε μετά από έκθεση των Tg/Tg κυττάρων στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για χρονικό διάστημα 48 ωρών (Εικόνα 3.24). Στα Tg/Tg κύτταρα, παρατηρείται αύξηση του κυτταρικού θανάτου και η συνολική απόπτωση και νέκρωση ανέρχεται του 50 % του κυτταρικού πληθυσμού, από τη συγκέντρωση των 5 $\mu\text{M}$  για χρονικό διάστημα 48 ωρών μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις επώασης με δοξορουβικίνη για 48 ώρες το ποσοστό απόπτωσης και νέκρωσης φαίνεται να διατηρείται στα επίπεδα μεταξύ 65-75% μέχρι και τη συγκέντρωση των 25 $\mu\text{M}$ . Στις μεγάλες συγκεντρώσεις παρατηρείται κυτταρική επιβίωση και για τις δύο χρονικές διάρκειες έκθεσης (πιο εμφανές στις 48 ώρες) για τα Tg/Tg κύτταρα, γεγονός το οποίο μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι αυτά επιδεικνύουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο φάρμακο.



**Εικόνα 3.24:** Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των αποπτωτικών και νεκρωτικών Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$ ) για 48 ώρες.

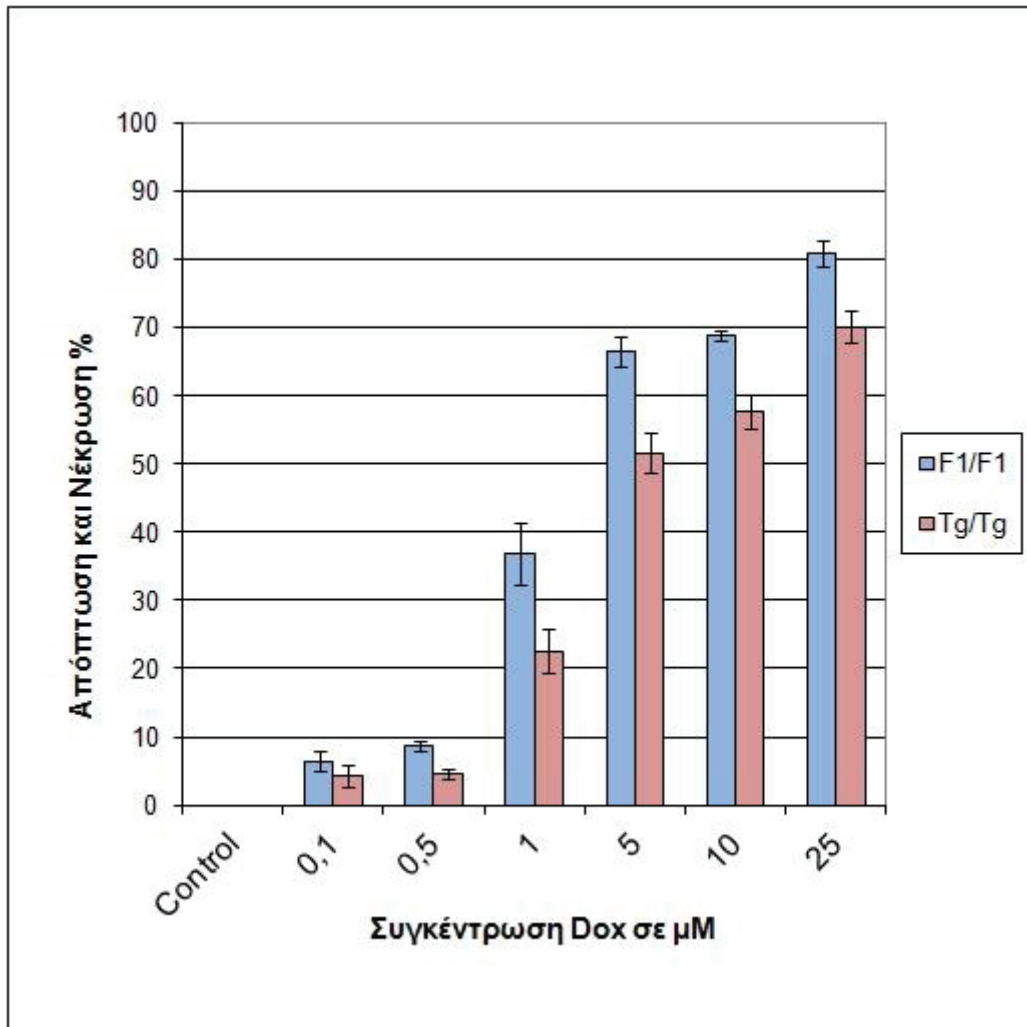
Κατά τη σύγκριση των ποσοστών απόπτωσης και νέκρωσης των Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών μετά από τη χορήγηση των αντίστοιχων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης (Εικόνα 3.25), προκύπτει η σταδιακή αύξηση των ποσοστών απόπτωσης και νέκρωσης στα Tg/Tg κύτταρα, όσο μεγαλώνει η συγκέντρωση, καθώς και ο χρόνος επώασης των κυττάρων με δοξορουβικίνη. Η σύγκριση των ποσοστών αυτών ανάμεσα στους δύο χρόνους από τη χορήγηση της δοξορουβικίνης για τα Tg/Tg κύτταρα, δείχνει ότι το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου είναι αυξημένο στις 48 ώρες σε σχέση με τις 24, αποτέλεσμα που είναι ανάλογο και με τη μέτρηση και για τα F1/F1 κύτταρα. Η διαφορά αυτή ανάμεσα στους δύο χρόνους επώασης δεν είναι το ίδιο έντονη στα Tg/Tg κύτταρα, όπως ήταν στα F1/F1 κύτταρα, σε όλες τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου, που χρησιμοποιήθηκαν και αποδεικνύει την καλύτερη επιβίωση των Tg/Tg κυττάρων. Οι διαφορές στο συνολικό ποσοστό απόπτωσης και νέκρωσης των Tg/Tg κυττάρων στις δύο χρονικές διάρκειες έκθεσης των 24 και 48 ωρών είναι στατιστικά σημαντικές και κυμαίνονται από  $p=0,04$  έως  $p=0,001$ , μετά από στατιστική ανάλυση (t-test).

Από τα παραπάνω γραφήματα, συμπεραίνουμε ότι η θανατηφόρος δράση της δοξορουβικίνης στον κυτταρικό πληθυσμό έχει τόσο δόσο-εξαρτώμενη όσο και χρόνο-εξαρτώμενη βάση.



**Εικόνα 3.25:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών απόπτωσης και νέκρωσης των Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p < 0,04$ ).

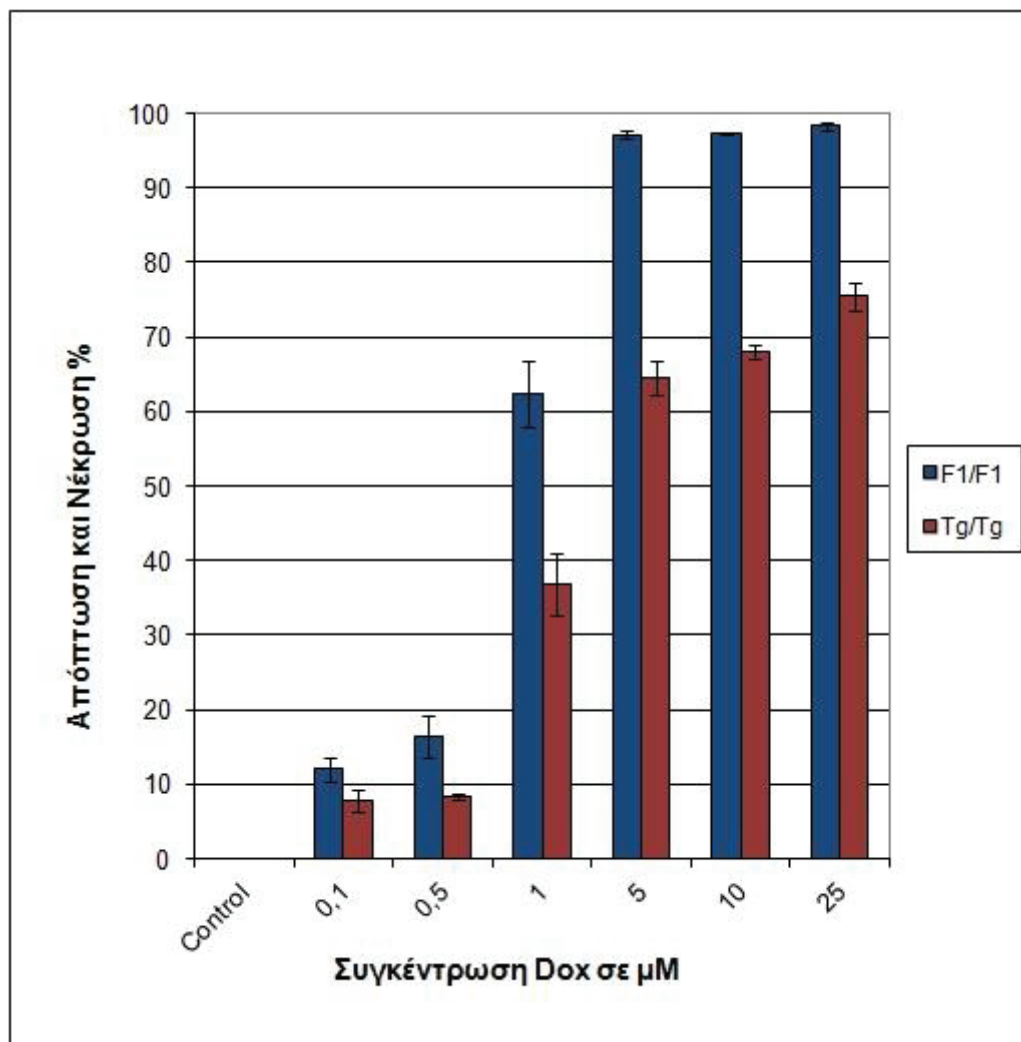
Στη συνέχεια, συγκρίναμε τα ποσοστά της συνολικής απόπτωσης και νέκρωσης στις δύο κυτταρικές σειρές για την ίδια χρονική διάρκεια έκθεσης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της δοξορουβικίνης. Στις 24 ώρες, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.26, παρατηρήθηκε μειωμένη τιμή του ποσοστού απόπτωσης και νέκρωσης στα Tg/Tg κύτταρα σε σχέση με αυτή στα F1/F1 για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης. Η διαφορά στο ποσοστό απόπτωσης και νέκρωσης ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές είναι πιο εμφανής στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου (1μM-25μM) για 24 ώρες μετά τη χορήγηση. Τα αποτελέσματά μας, μετά τη στατιστική ανάλυση (t-test), ως προς τη σύγκριση των ποσοστών απόπτωσης και νέκρωσης ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για 24 ώρες επώασης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, είναι στατιστικά σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις επώασης στο φάρμακο ( $p=0,01$  -  $p=0,001$ ), εκτός από την πολύ μικρή συγκέντρωση των 0,1μM, όπου η διαφορά στο ποσοστό είναι μικρή. Είναι φανερό ότι τα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, παρουσιάζουν σε όλες τις συγκεντρώσεις μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην τοξική επίδραση της δοξορουβικίνης, σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, F1/F1.



**Εικόνα 3.26:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών απόπτωσης και νέκρωσης μεταξύ των F1/F1 και Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p < 0,01$  εκτός από τη συγκέντρωση των  $0,1 \mu\text{M}$ , όπου  $p = 0,136$ ).

Κατά την έκθεση των δύο κυτταρικών σειρών σε δοξορουβικίνη για 48 ώρες παρατηρήθηκαν μειωμένα ποσοστά στο σύνολο της απόπτωσης και της νέκρωσης στα κύτταρα Tg/Tg σε σχέση με τα F1/F1 (Εικόνα 3.27), για όλες τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου, που χρησιμοποιήθηκαν. Η διαφορά, που παρατηρείται ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για τις 48 ώρες είναι έντονη σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και είναι πιο ευδιάκριτη από τη διαφορά, που προέκυψε νωρίτερα για τις 24 ώρες επώασης με το φάρμακο, όπως φάνηκε στο προηγούμενο γράφημα. Η μειωμένη αυτή απόπτωση και νέκρωση στα Tg/Tg κύτταρα σε σύγκριση με τα F1/F1 στις 48 ώρες είναι πιο πολύ εμφανής στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $1 \mu\text{M}$ - $25 \mu\text{M}$ ). Στις συγκεντρώσεις των  $5 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$  και  $25 \mu\text{M}$ , ενώ στα F1/F1 κύτταρα η επιβίωση των κυττάρων φαίνεται να είναι ελάχιστη έως σχεδόν μηδενική, αντίθετα στα Tg/Tg κύτταρα παρατηρείται σημαντική επιβίωση του κυτταρικού πληθυσμού. Επομένως, και στην περίπτωση των 48 ωρών μετά την χορήγηση δοξορουβικίνης, τα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, εμφανίζονται να είναι πιο ανθεκτικά και να παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιβίωση στο φάρμακο, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα. Οι διαφορές στο συνολικό ποσοστό απόπτωσης και νέκρωσης, που παρατηρήθηκαν στις δύο

κυτταρικές σειρές για 48 ώρες επώασης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, είναι στατιστικά σημαντικές και κυμαίνονται από  $p=0,02$  έως  $p=0,00$ , μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), για όλες τις συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν.



**Εικόνα 3.27:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών απόπτωσης και νέκρωσης μεταξύ των F1/F1 και Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 48 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p<0,02$ ).

Με την κυτταρομετρία ροής μπορούμε να αντλήσουμε και πληροφορίες για τον τρόπο κυτταρικού θανάτου, που προκαλεί η τοξική δράση της δοξορουβικίνης στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα, που χρησιμοποιήσαμε. Από τα ιστογράμματα, παρατηρήθηκε ότι ο κυτταρικός θάνατος, που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη, διενεργείται, κατά κύριο λόγο, μέσω του αποπτωτικού μηχανισμού.

Συμπερασματικά μπορούμε να αποφανθούμε ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη αύξηση των ποσοστών συνολικής απόπτωσης και νέκρωσης στα κύτταρα, ενώ επίσης εξαρτάται και από το είδος των πρωτογενών κυτταρικών σειρών, αφού φαίνεται η αυξημένη επιβίωση των Tg/Tg κυττάρων σε σύγκριση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου. Βρέθηκε ότι τα Tg/Tg κύτταρα έχουν αυξημένη αντι-αποπτωτική δραστηριότητα, συγκρινόμενη με αυτή των F1/F1

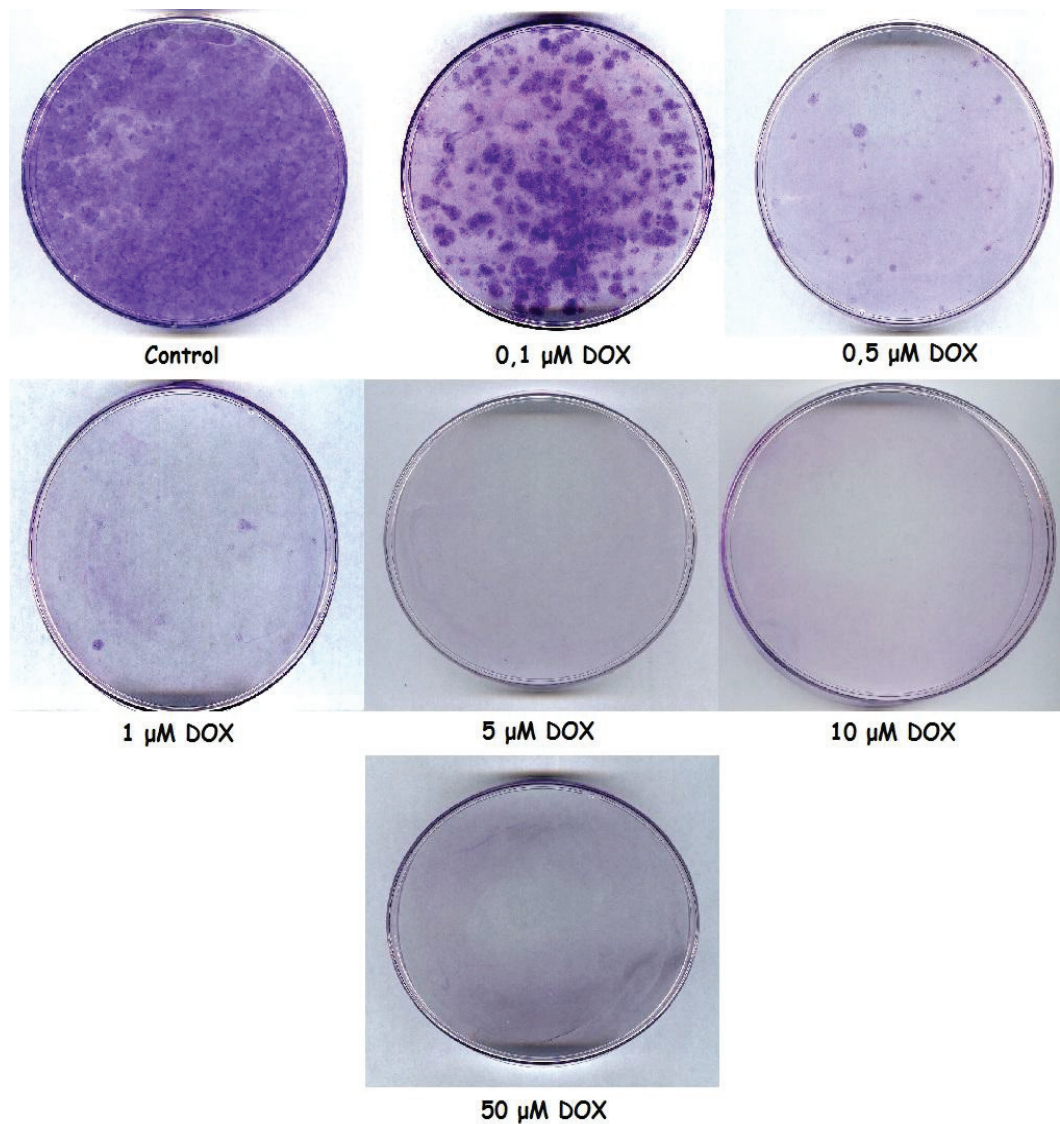
κυττάρων. Τα ιστογράμματα των ποσοστών των αποπτωτικών κυττάρων έδειξαν ότι τα F1/F1 κύτταρα με μη ανιχνεύσιμα ποσά της Hsp70, παρουσιάζουν αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα σε σύγκριση με τα Tg/Tg κύτταρα για 24 και 48 ώρες, προτείνοντας επομένως, ότι η παρουσία της Hsp70 στα Tg/Tg κύτταρα μειώνει την απόπτωση. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αυτά, όπως θα δούμε παρακάτω (Ενότητα 3.7), χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του αποπτωτικού μηχανισμού, που φαίνεται να ενεργοποιείται από τη μεταχείριση με δοξορουβικίνη.

### **3.5. Προσδιορισμός της ικανότητας σχηματισμού αποικιών (Colony forming efficiency) των κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης.**

Ο προσδιορισμός της ικανότητας των κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες μετά από επώαση τους σε δοξορουβικίνη, με την μέθοδο Colony formation assay είχε σαν στόχο τη μελέτη της ικανότητας των κυττάρων να αναπτύσσουν μεγάλες αυτοσυντηρούμενες αποικίες έπειτα από επώασή τους στις εκάστοτε ακραίες συνθήκες, σε σύγκριση με την ικανότητα αυτή των κυττάρων, στα οποία δεν έχει συμβεί κάποια αλλαγή (control). Τα κύτταρα μετά από ένα ακραίο στρες είτε μπορούν είτε δεν μπορούν να ανακάμψουν πλήρως, να ξεπεράσουν τον θάνατο και να εξελιχτούν φυσιολογικά, πολλαπλασιαζόμενα και δημιουργώντας αποικίες. Στη μέθοδο αυτή του προσδιορισμού της ικανότητας των κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες, εκτιμάται έμμεσα ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού βάσει του αριθμού και του μεγέθους των αποικιών, που σχηματίζουν τα κύτταρα. Κάθε πείραμα σχηματισμού αποικιών επαναλήφθηκε τουλάχιστον 3 φορές.

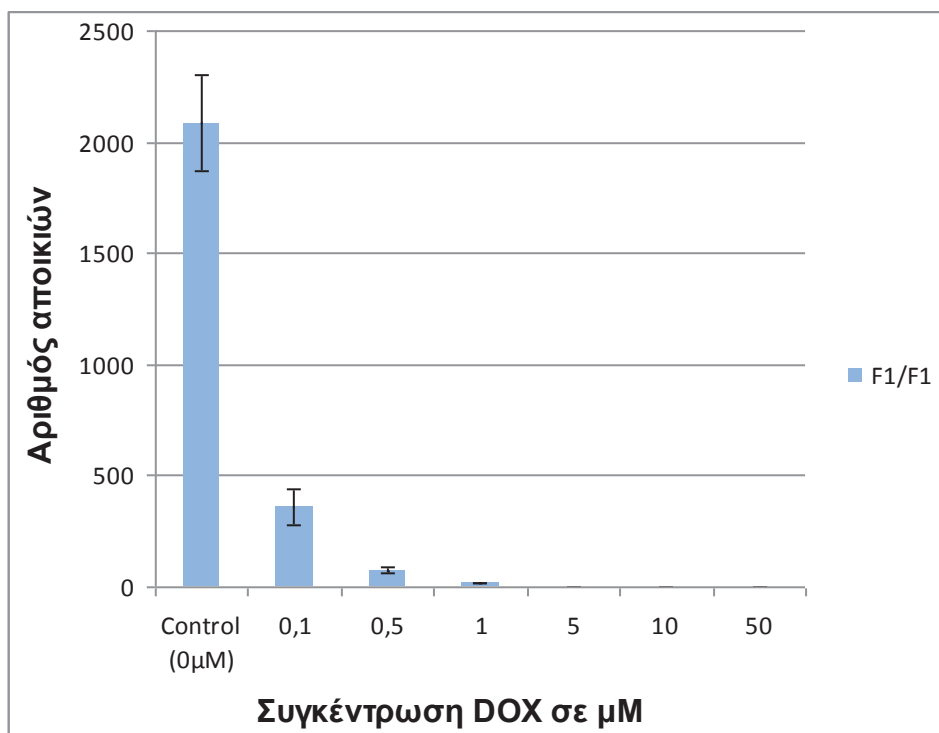
Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.28) απεικονίζονται τα τρυβλία με τις αποικίες, που σχηματίστηκαν σε χρόνο 12 ημερών, από τα κύτταρα F1/F1 μετά την έκθεση τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για 24 ώρες.





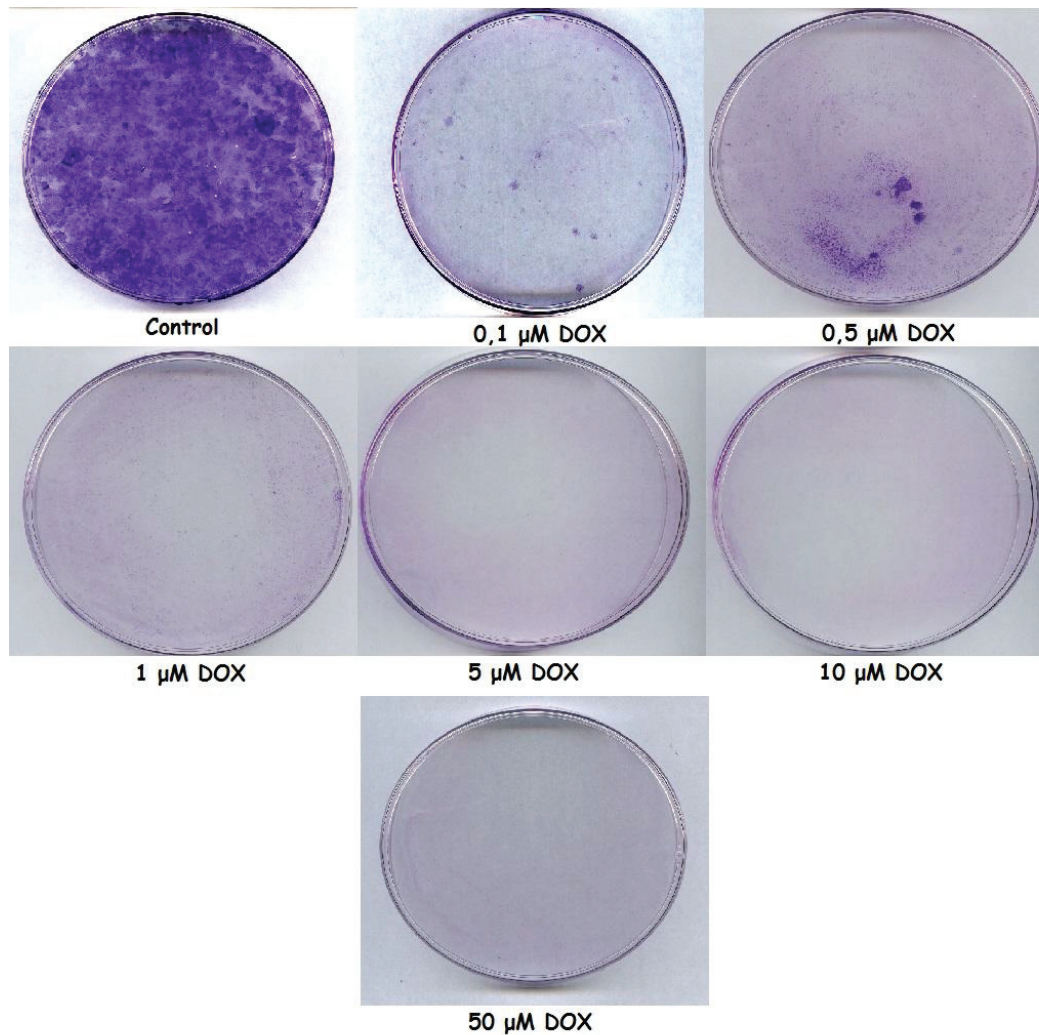
**Εικόνα 3.28:** Απεικόνιση των τρυβλίων, όπου διακρίνονται οι αποικίες των κυττάρων και προσδιορίζεται η ικανότητα σχηματισμού αποικιών σε κύτταρα F1/F1 για 24 ώρες επώασης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης.

Όπως φαίνεται από την απεικόνιση των τρυβλίων (Εικόνα 3.28) και το αντίστοιχο γράφημα (Εικόνα 3.29) ο αριθμός εμφάνισης των αποικιών για τα F1/F1 κύτταρα μετά από 24 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη είναι σημαντικός μόνο για τη συγκέντρωση 0,1μM DOX, ενώ στη συνέχεια ο αριθμός των αποικιών, που εμφανίζεται για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις είναι ελάχιστος έως μηδαμινός. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (5μM, 10μM, 50μM) δεν παρατηρούνται καθόλου αποικίες, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι τα κύτταρα έχουν απολέσει πλήρως την ικανότητα σχηματισμού αποικιών.



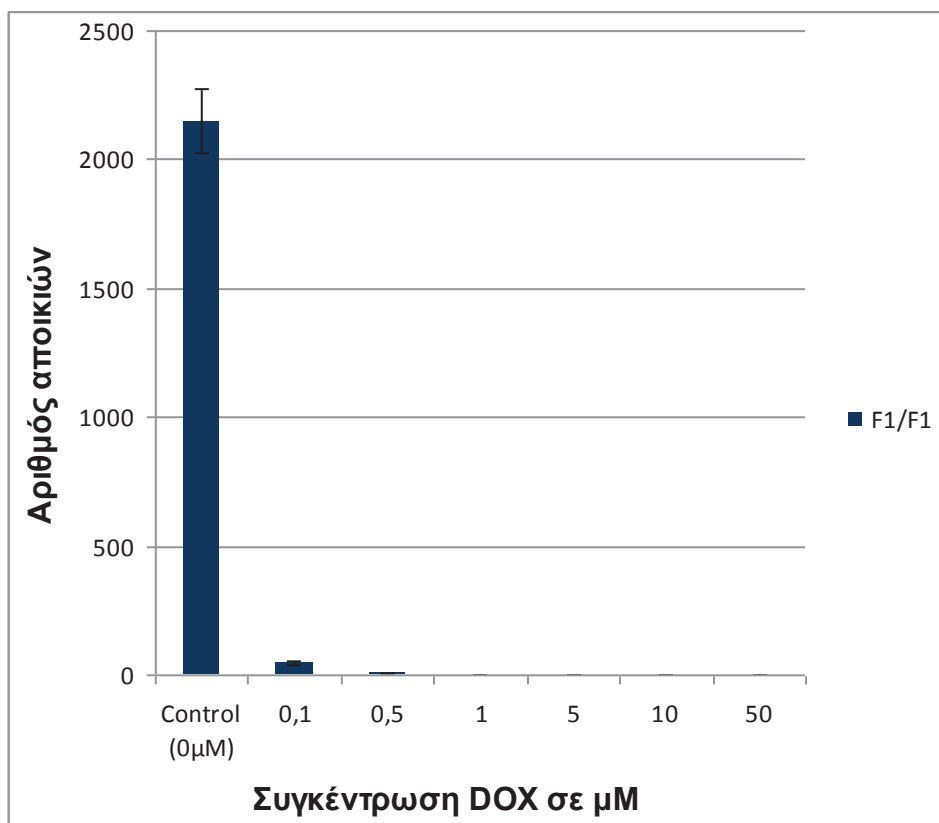
**Εικόνα 3.29:** Αριθμός αποικιών που σχηματίστηκαν όταν κύτταρα F1/F1 επωάσθηκαν για 24 ώρες σε διάφορες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 και 50  $\mu\text{M}$ ).

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται τα τρυβλία με τις αποικίες, που σχηματίστηκαν σε χρόνο 12 ημερών, από τα κύτταρα F1/F1 μετά την έκθεσή τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για 48 ώρες (Εικόνα 3.30).

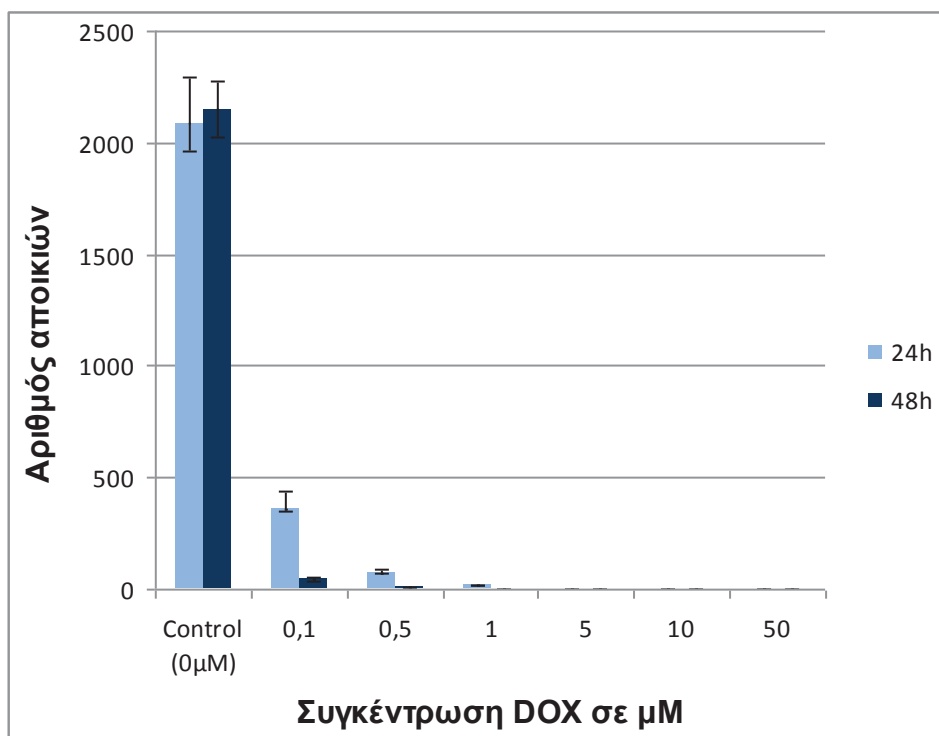


**Εικόνα 3.30:** Απεικόνιση των τρυβλίων, όπου διακρίνονται οι αποικίες των κυττάρων και προσδιορίζεται η ικανότητα σχηματισμού αποικιών σε κύτταρα F1/F1 για 48 ώρες επώασης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης.

Στην περίπτωση των 48 ωρών μετά από τη χορήγηση των αντίστοιχων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης για τα F1/F1 κύτταρα, ο αριθμός των αποικιών, που παρατηρούνται είναι ελάχιστος από την πολύ μικρή συγκέντρωση των 0,1μM, ενώ μηδενίζεται ουσιαστικά από την συγκέντρωση των 0,5μM και μετά (Εικόνα 3.31). Από τη συγκέντρωση 1μM DOX μέχρι και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, που χρησιμοποιήσαμε, των 50μM, δεν εμφανίστηκαν καθόλου αποικίες. Από τα αποτελέσματά μας είναι εμφανής η έντονη τοξική επίδραση της δοξορουβικίνης στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών στα F1/F1 κύτταρα, αφού παρόλο που παρατηρείται κυτταρική επιβίωση στις συγκεντρώσεις αυτές, τα κύτταρα στερούνται της δυνατότητας να αναπτύξουν ικανοποιητικό αριθμό αποικιών.



**Εικόνα 3.31:** Αριθμός αποικιών που σχηματίστηκαν όταν κύτταρα F1/F1 επωάσθηκαν για 48 ώρες στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 και 50 μΜ).

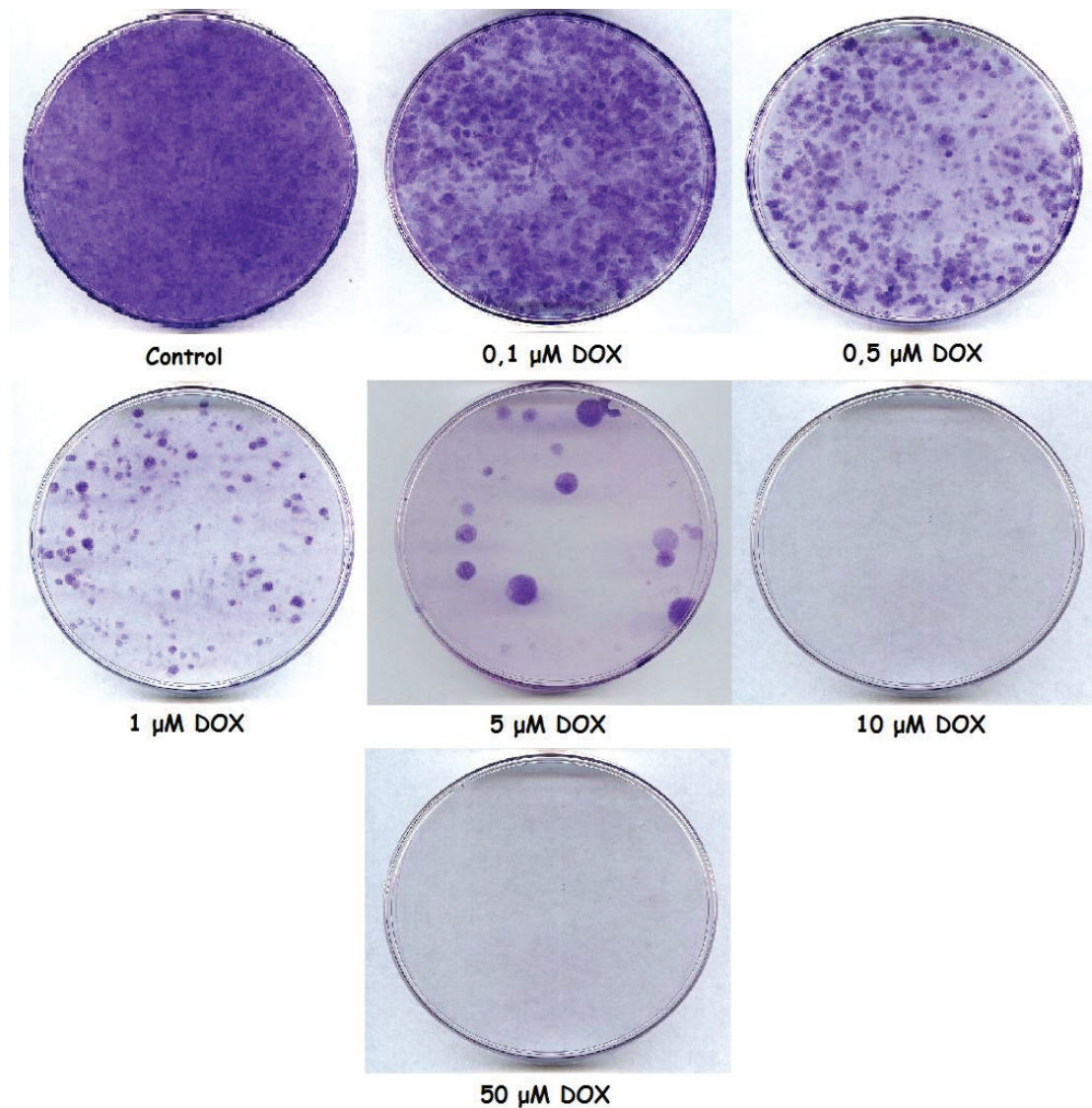


**Εικόνα 3.32:** Συγκριτική απεικόνιση του αριθμού ανάπτυξης αποικιών των F1/F1 κυττάρων στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και σε χρόνο έκθεσης 24 και 48 ωρών ( $p < 0,002$ ).

Στη σύγχρονη απεικόνιση των αποικιών των F1/F1 κυττάρων στις 24 και 48 ώρες (Εικόνα 3.32) φαίνεται η διαφορά της ανάπτυξης των αποικιών στις μικρές συγκεντρώσεις επώασης με δοξορουβικίνη. Κατόπιν συγκρίσεως της ικανότητας σχηματισμού αποικιών των F1/F1 κυττάρων μετά από τη χορήγηση των αντίστοιχων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης για χρόνο 24 και 48 ωρών (Εικόνα 3.32), παρατηρείται πως ο ρυθμός ανάπτυξης των αποικιών είναι μεγαλύτερος στην έκθεση των 24 ωρών σε σχέση με την έκθεση των 48 ωρών. Παρατηρείται η έντονη μείωση του αριθμού των αποικιών των F1/F1 κυττάρων και στους δύο χρόνους επώασης με δοξορουβικίνη, αφού ακόμη και από τη μικρή συγκέντρωση των 0,1  $\mu\text{M}$ , οι αποικίες, που παρατηρούνται είναι λίγες. Από τη συγκέντρωση 1  $\mu\text{M}$  για τις 24 ώρες και 0,5  $\mu\text{M}$  για τις 48 ώρες δεν εμφανίζονται αποικίες στα τρυβλία μας, αφού τα κύτταρα έχουν χάσει τελείως την ικανότητα τους να σχηματίζουν αποικίες, αποδεικνύοντας την ισχυρή τοξική δράση του φαρμάκου για τα F1/F1 κύτταρα. Τα αποτελέσματα μας, μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), ως προς τη σύγκριση του αριθμού των αποικιών ανάμεσα στους δύο χρόνους επώασης για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης στα F1/F1 κύτταρα, είναι στατιστικά σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις επώασης στο φάρμακο, όπου υπάρχει ανεπτυγμένος αριθμός αποικιών (0,1 $\mu\text{M}$  - 1 $\mu\text{M}$ ), με  $p < 0,002$  για αυτές τις συγκεντρώσεις DOX. Για την περίπτωση της συγκέντρωσης ελέγχου (control), χωρίς προσθήκη δοξορουβικίνης στο μέσο επώασης (0 $\mu\text{M}$  DOX), οι διαφορές στον αριθμό αποικιών ανάμεσα στους δύο χρόνους επώασης με το φάρμακο δεν είναι στατιστικά σημαντικές για τα F1/F1 κύτταρα.

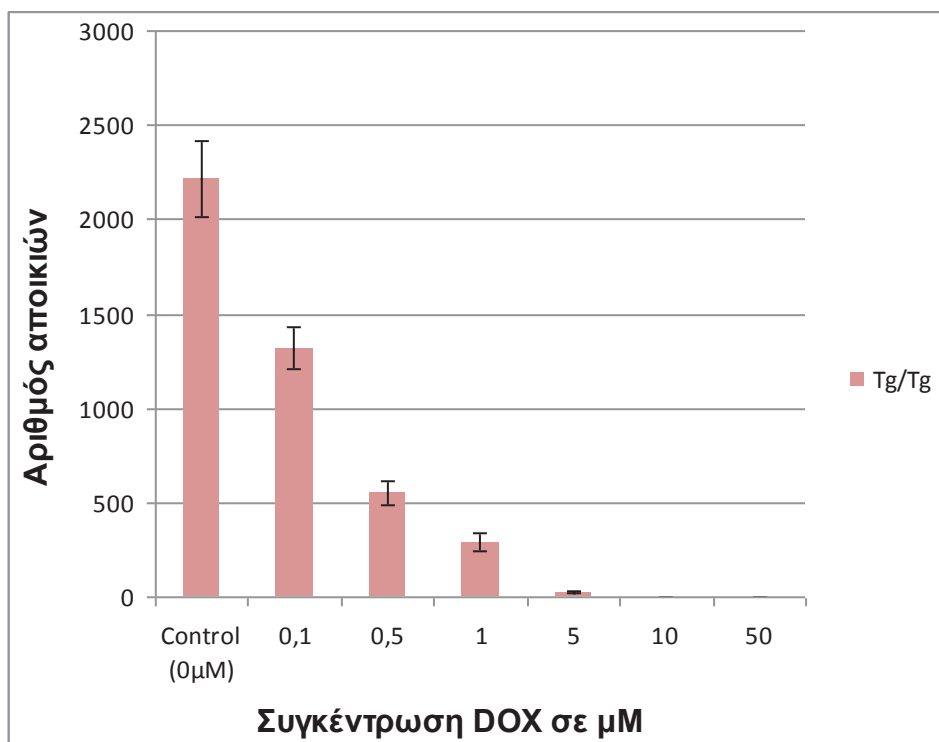
Κατά την επώαση των κυττάρων Tg/Tg, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για 24 ώρες, παρατηρείται αυξημένη ανθεκτικότητα των κυττάρων στο φάρμακο σε σχέση με τα κύτταρα F1/F1 της φυσιολογικής σειράς, όπως είδαμε προηγουμένως. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.33 και στο αντίστοιχο γράφημα (Εικόνα 3.34) στα Tg/Tg κύτταρα, φαίνεται μια σταδιακή μείωση του αριθμού ανάπτυξης αποικιών με αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης της DOX. Στην περίπτωση των Tg/Tg κυττάρων για 24 ώρες μετά τη χορήγηση της δοξορουβικίνης, ο αριθμός των αποικιών, που σχηματίζονται παραμένει σημαντικός μέχρι και τη συγκέντρωση 1  $\mu\text{M}$  DOX. Στη συγκέντρωση των 5  $\mu\text{M}$  DOX οι αποικίες, που παρατηρούνται, είναι λιγιστές, ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (10 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ ) δεν εμφανίζονται αποικίες, καθώς η τοξική δράση του φαρμάκου καθιστά τα κύτταρα ανίκανα να αναπτύξουν αποικίες.

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται τα τρυβλία με τις αποικίες, που σχηματίστηκαν σε χρόνο 12 ημερών, από τα κύτταρα Tg/Tg μετά την έκθεσή τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για 24 ώρες.



**Εικόνα 3.33:** Απεικόνιση των τρυβλίων, όπου διακρίνονται οι αποικίες των κυττάρων και προσδιορίζεται η ικανότητα σχηματισμού αποικιών σε κύτταρα Tg/Tg για 24 ώρες επώασης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης.

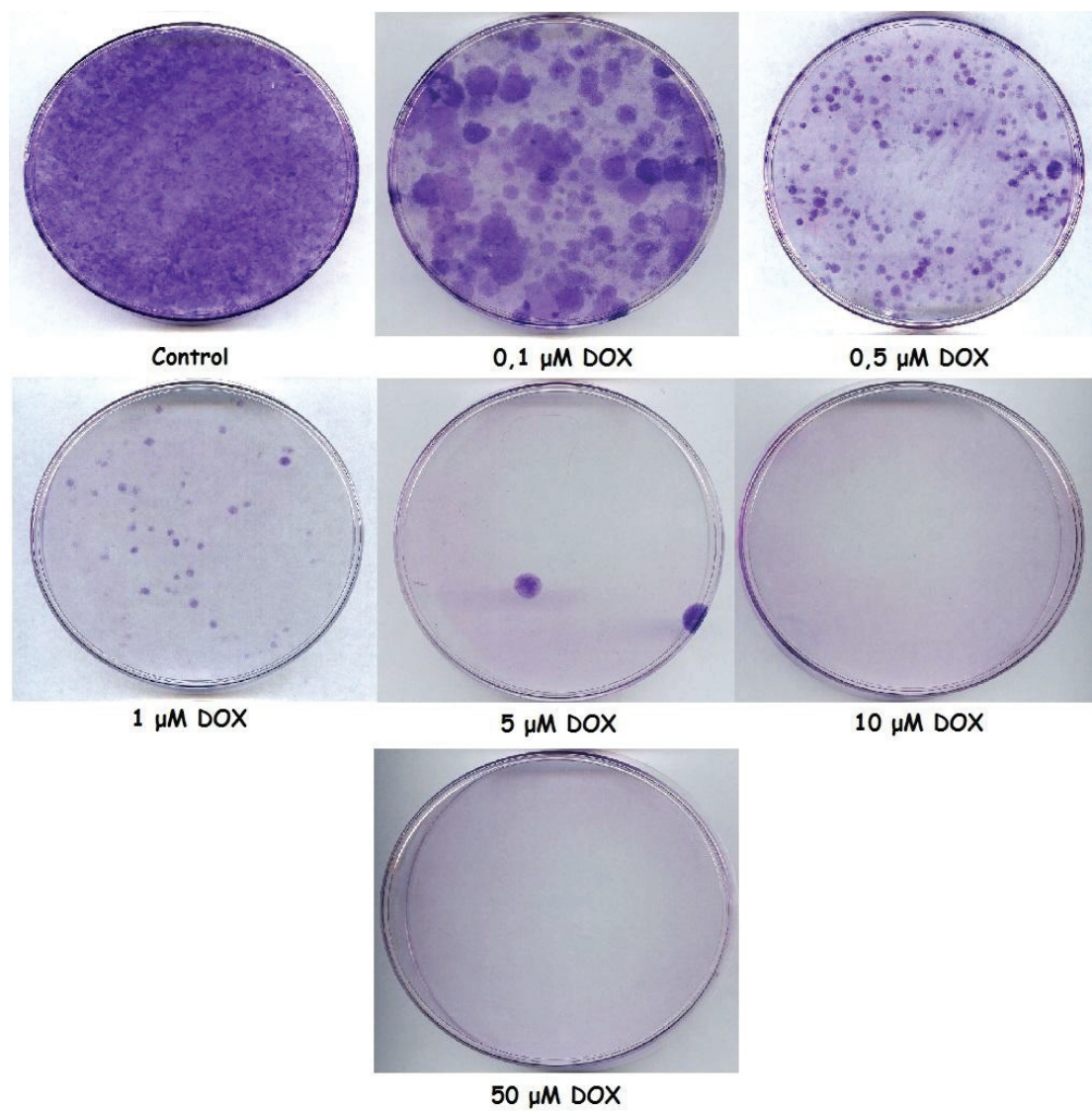
Στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 3.33), όπως και στο παρακάτω γράφημα (Εικόνα 3.34), φαίνεται πως ο ρυθμός ανάπτυξης αποικιών στα Tg/Tg κύτταρα που επώασθηκαν στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για 24 ώρες, είναι εμφανώς μεγαλύτερος σε σχέση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου. Η υπερέκφραση της Hsp70 στα συγκεκριμένα κύτταρα φαίνεται να καθιστά τα κύτταρα ανθεκτικά και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ώστε να επιβιώσουν, αλλά και να είναι ικανά να αναπτύξουν αποικίες.



**Εικόνα 3.34:** Αριθμός αποικιών που σχηματίστηκαν όταν κύτταρα Tg/Tg επωάστηκαν για 24 ώρες στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 και 50 μΜ).

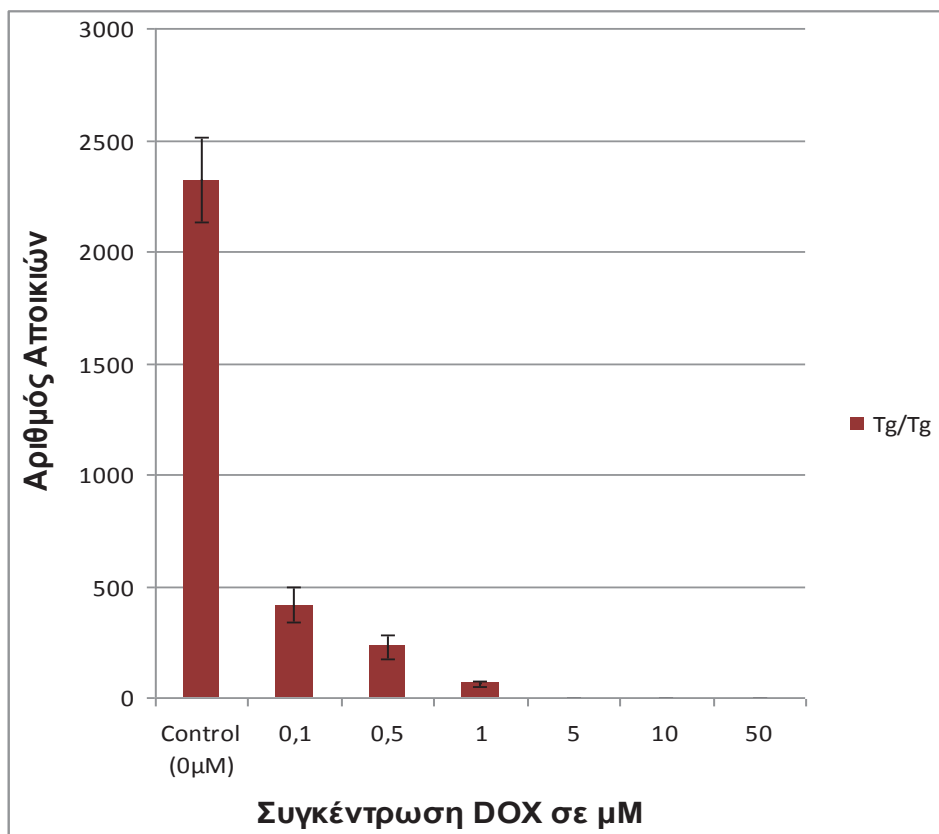
Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.35) απεικονίζονται τα τρυβλία με τις αποικίες, που σχηματίστηκαν σε χρόνο 12 ημερών, από τα κύτταρα Tg/Tg μετά την έκθεση τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για 48 ώρες.

Από την απεικόνιση των αποικιών και το αντίστοιχο γράφημα του αριθμού των αποικιών (Εικόνα 3.36) των κυττάρων Tg/Tg στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και σε χρόνο έκθεσης 48 ωρών, παρατηρήθηκε και εδώ μια έντονη μείωση του αριθμού των αποικιών, που είναι ικανά να σχηματίσουν τα κύτταρα από τις μικρότερες συγκεντρώσεις. Ο αριθμός αυτός των αποικιών, που σχηματίζονται, είναι σημαντικός μέχρι και τη συγκέντρωση 1 μΜ DOX, ενώ από τη συγκέντρωση των 5 μΜ και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οι αποικίες σχεδόν εξαφανίζονται, λόγω της τοξικότητας του φαρμάκου. Είναι, πάντως, εμφανές ότι στις μικρότερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης τα Tg/Tg κύτταρα είναι πιο ανθεκτικά και με μεγαλύτερη ικανότητα να σχηματίζουν αποικίες σε σχέση με τα F1/F1 κύτταρα.



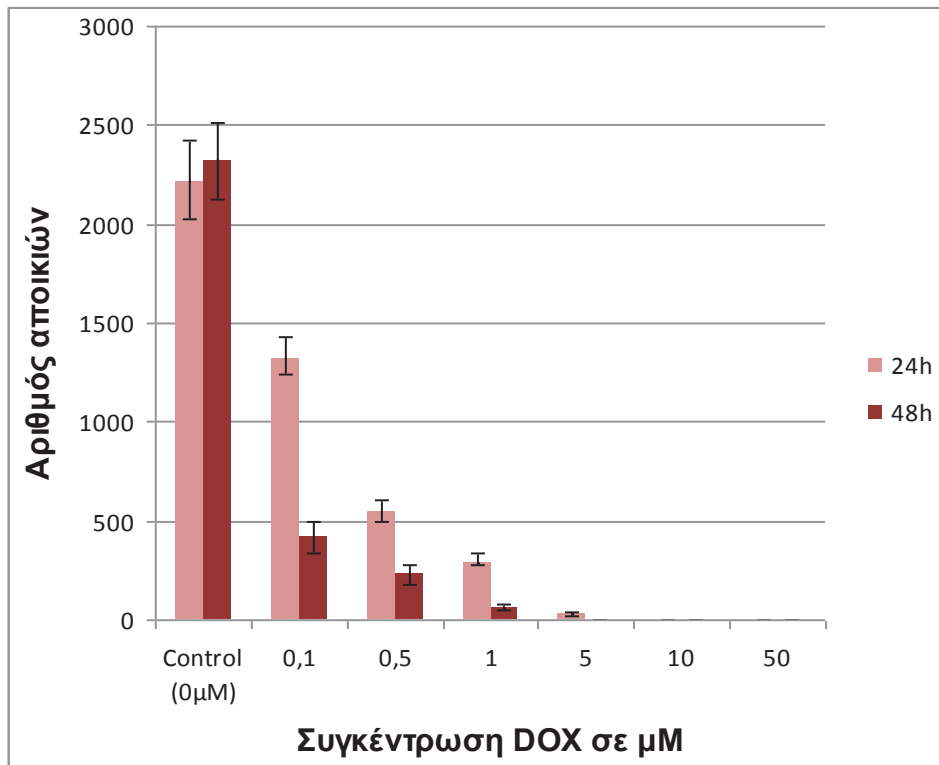
**Εικόνα 3.35:** Απεικόνιση των τρυβλίων, όπου διακρίνονται οι αποικίες των κυττάρων και προσδιορίζεται η ικανότητα σχηματισμού αποικιών σε κύτταρα Tg/Tg για 48 ώρες επώασης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης.



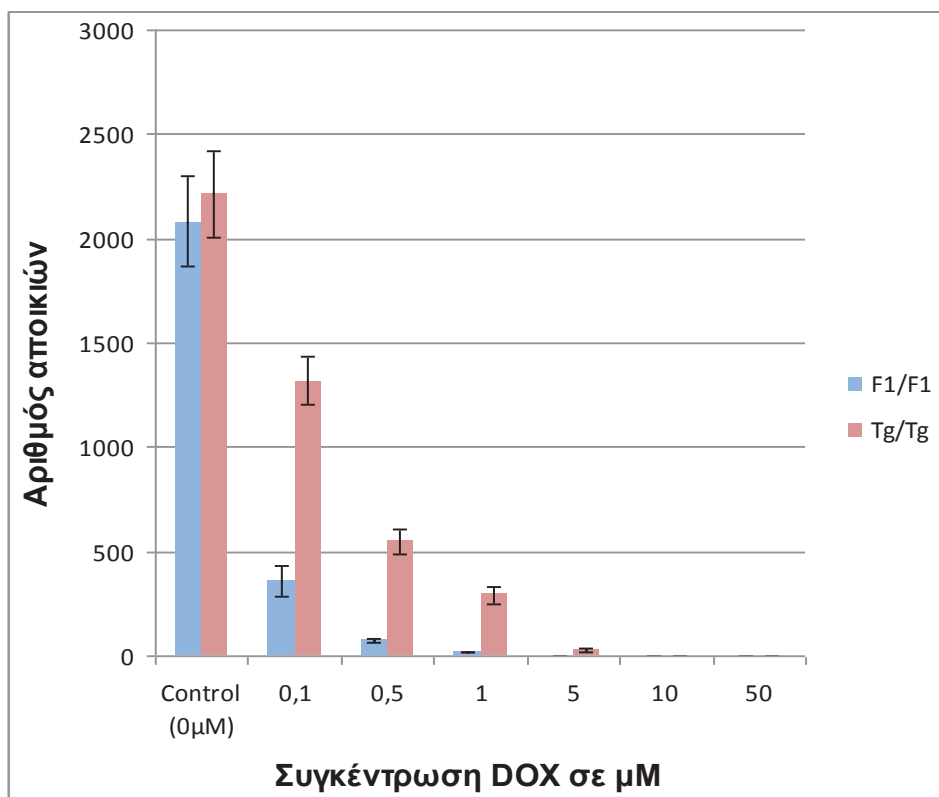


**Εικόνα 3.36:** Αριθμός αποικιών που σχηματίστηκαν όταν κύτταρα Tg/Tg επώασθησαν για 48 ώρες στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 και 50 μΜ).

Από τη σύγχρονη απεικόνιση των γραφημάτων των αποικιών των Tg/Tg κυττάρων, που υπερεκφράζουν την Hsp70, για τους δύο χρόνους έκθεσης, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.37, προκύπτει το συμπέρασμα ότι, όπως και στα F1/F1 κύτταρα, ο αριθμός των αποικιών, που σχηματίζονται, είναι μειωμένος στις 48 ώρες επώασης σε σύγκριση με αυτόν στις 24 για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, κατά τις οποίες η τοξική δράση του φάρμακου επέτρεψε την ανάπτυξη αποικιών (0,1 μΜ-5 μΜ). Η ανθεκτικότητα και ικανότητα των Tg/Tg κυττάρων να αναπτύσσονται αποικίες στο χρόνο έκθεσης των 48 ωρών φαίνεται να εξαντλείται στη συγκέντρωση 1 μΜ, ενώ για τις 24 ώρες αυτό συμβαίνει στην συγκέντρωση των 5 μΜ. Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι και στα κύτταρα Tg/Tg, η ικανότητα σχηματισμού αποικιών, είναι δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη κατά την έκθεση των κυττάρων μας στη δοξορουβικίνη. Οι διαφορές, που παρατηρούνται στον αριθμό των αναπτυσσόμενων αποικιών, στους δύο χρόνους έκθεσης των 24 και 48 ωρών είναι στατιστικά σημαντικές, μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), με  $p < 0,002$  για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, κατά τις οποίες είχαμε εμφάνιση αποικιών (0,1 μΜ – 1 μΜ), ενώ στη συγκέντρωση των 5 μΜ, όπου αποικίες σχηματίστηκαν μόνο μετά από 24 ώρες έκθεσης στο φάρμακο, η  $p$  ισούται με 0,01. Για τη συγκέντρωση ελέγχου (control), χωρίς προσθήκη δοξορουβικίνης στο μέσο επώασης (0 μΜ DOX), οι διαφορές στον αριθμό αποικιών ανάμεσα στους δύο χρόνους επώασης με το φάρμακο δεν είναι στατιστικά σημαντικές και για τα Tg/Tg κύτταρα.



**Εικόνα 3.37:** Συγκριτική απεικόνιση του αριθμού ανάπτυξης αποικιών των Tg/Tg κυττάρων στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και σε χρόνο έκθεσης 24 και 48 ωρών ( $p < 0,002$ , εκτός από τη συγκέντρωση των 5μΜ, όπου  $p = 0,01$ ).



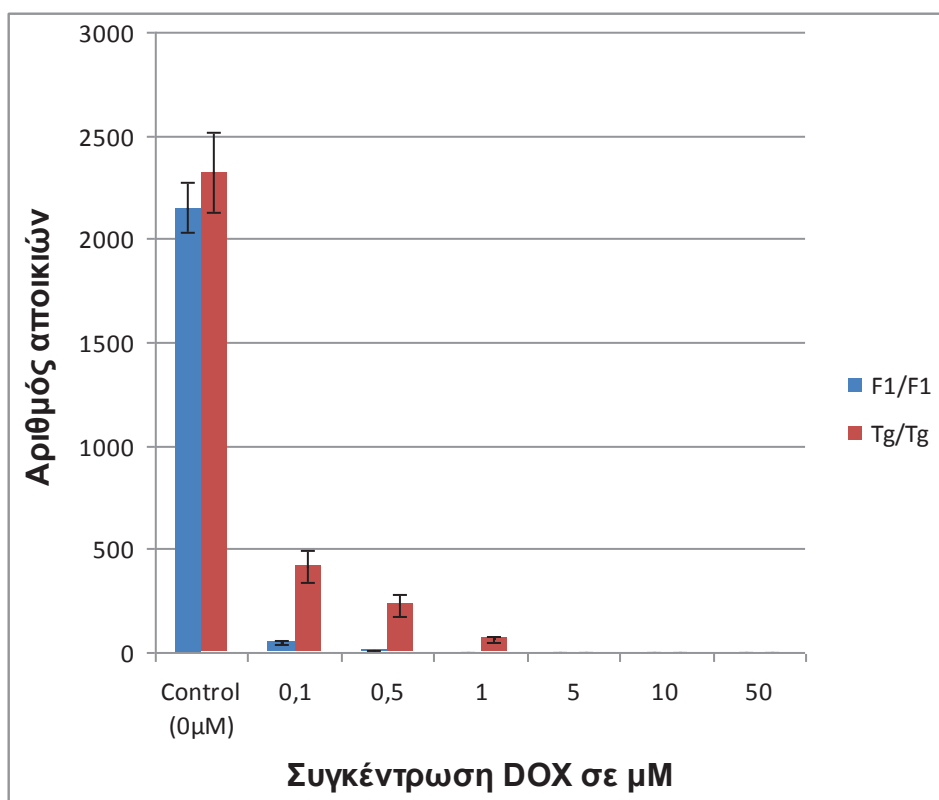
**Εικόνα 3.38:** Συγκριτική απεικόνιση του αριθμού ανάπτυξης αποικιών των Tg/Tg κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα F1/F1 στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και σε χρόνο έκθεσης 24 ωρών ( $p < 0,007$ ).

Στη σύγκριση του αριθμού των αποικιών, που σχηματίστηκαν από τις δύο κυτταρικές σειρές στην ίδια χρονική διάρκεια έκθεσης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της δοξορουβικίνης και η σύγχρονη απεικόνιση του αριθμού των αποικιών των δύο κυτταρικών σειρών δείχνει τη διαφορά των Tg/Tg κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα F1/F1 (Εικόνα 3.38).

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα 3.38, για τις 24 ώρες, παρατηρήθηκε αυξημένη τιμή του αριθμού των αποικιών, που σχηματίζουν τα Tg/Tg κύτταρα σε σύγκριση με αυτή στα F1/F1 για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης. Είναι εμφανής η διαφορά στον αριθμό των αποικιών, που αναπτύσσονται, ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήσαμε και απέδωσαν αποικίες. Από το γράφημα είναι έκδηλο ότι τα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη δράση της δοξορουβικίνης σε σχέση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου μετά από 24 ώρες επώασης με το φάρμακο, καθιστώντας τα και πιο ικανά να αναπτυχθούν και να δημιουργήσουν αποικίες. Επίσης, είναι εμφανές ότι στα Tg/Tg κύτταρα, η μείωση του αριθμού των αναπτυσσόμενων αποικιών, δεν είναι το ίδιο έντονη με αυτή, που παρατηρείται στα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα, ακόμα και στις μικρότερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, πράγμα το οποίο, αποδεικνύει, επίσης, την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα, που επιδεικνύουν τα κύτταρα Tg/Tg. Από την απεικόνιση φαίνεται η ικανότητα των κυττάρων Tg/Tg να αναπτύσσουν σημαντικό αριθμό αποικιών στις συγκεντρώσεις 0,5μM-5μM, εκεί όπου η ικανότητα των F1/F1 κυττάρων είναι πολύ μειωμένη, αφού ο αριθμός των αποικιών για τα F1/F1 κύτταρα στις συγκεντρώσεις αυτές είναι από ελάχιστος έως μηδενικός.

Τα αποτελέσματα μας, μετά τη στατιστική ανάλυση (t-test), ως προς τη σύγκριση του αριθμού αποικιών ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για 24 ώρες επώασης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, είναι στατιστικά σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις ( $p < 0,007$ ), όπου αναπτύχθηκαν αποικίες. Για τη συγκέντρωση ελέγχου (control), χωρίς προσθήκη δοξορουβικίνης στο μέσο επώασης (0μM DOX), οι διαφορές στον αριθμό αποικιών ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές μετά από 24 ώρες επώασης με το φάρμακο δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

Συμπερασματικά τα Tg/Tg κύτταρα, λόγω της υπερέκφρασης της Hsp70, καθίστανται ανθεκτικότερα, όχι μόνο να επιβιώσουν, αλλά και να αναπτύξουν αποικίες, σε συγκεντρώσεις του φαρμάκου, όπου για τα φυσιολογικά κύτταρα οι συγκεντρώσεις αυτές είναι τοξικές.



**Εικόνα 3.39:** Συγκριτική απεικόνιση του αριθμού ανάπτυξης αποικιών των Tg/Tg κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα F1/F1 στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και σε χρόνο έκθεσης 48 ωρών ( $p < 0,001$ , εκτός από τη συγκέντρωση των 5μM ( $p=0,158$ )).

Κατά τη συγκριτική απεικόνιση του αριθμού των αποικιών των δύο κυτταρικών σειρών για τον χρόνο έκθεσης των 48 ωρών (Εικόνα 3.39), παρατηρήθηκε ότι τα Tg/Tg κύτταρα διατηρούν την ικανότητα ανάπτυξης σημαντικού αριθμού αποικιών στις μικρές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (0,1μM – 1μM), ενώ τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα εμφανίζουν ελάχιστο έως μηδαμινό αριθμό αποικιών από την πολύ μικρή συγκέντρωση των 0,1 μM. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (5μM – 50μM) και οι δύο κυτταρικές σειρές έχουν απολέσει την ικανότητα τους να σχηματίζουν αποικίες, 48 ώρες μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου. Φαίνεται ότι η υπερέκφραση της Hsp70 για τα Tg/Tg κύτταρα, τα καθιστά πολύ ικανότερα των φυσιολογικών στην επιβίωση και στην ανάπτυξη αποικιών στο διαρκές στρες των 48 ωρών, που προκαλείται από το φάρμακο. Οι διαφορές, που παρατηρήθηκαν, μετά τη στατιστική ανάλυση (t-test), ως προς τη σύγκριση του αριθμού αποικιών ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για 48 ώρες επώασης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, είναι στατιστικά σημαντικές για όλες τις συγκεντρώσεις, όπου αναπτύχθηκαν αποικίες, με  $p < 0,001$ , εκτός από τη συγκέντρωση των 5μM ( $p=0,158$ ), όπου τα Tg/Tg κύτταρα εμφανίζουν ελάχιστο αριθμό αποικιών, ενώ τα F1/F1 κύτταρα μηδενικό. Για τη συγκέντρωση ελέγχου (control), χωρίς προσθήκη δοξορουβικίνης στο μέσο επώασης (0μM DOX), οι διαφορές στον αριθμό αποικιών ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές μετά από 48 ώρες επώασης με το φάρμακο δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

Συμπερασματικά, μπορούμε να αποφανθούμε ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση του αριθμού των αποικιών, που σχηματίζουν τα κύτταρα. Η ικανότητα ανάπτυξης αποικιών εξαρτάται και από το είδος των πρωτογενών κυτταρικών σειρών, αφού φαίνεται η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα και ικανότητα των Tg/Tg κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες, σε σύγκριση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου. Από τα παραπάνω γραφήματα είναι εμφανής η έντονη τοξικότητα του κυτταροστατικού φαρμάκου δοξορουβικίνη, και στις δύο κυτταρικές σειρές, η δράση της οποίας δεν επιτρέπει στα κύτταρα να αναπτύσσουν αποικίες, καθώς ο αριθμός των αποικιών, που σχηματίζονται είναι ιδιαίτερα μειωμένος από τις μικρές συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Ενώ στις προηγούμενες μεθόδους, που χρησιμοποιήσαμε, παρατηρήθηκε επιβίωση των κυττάρων στις συγκεντρώσεις αυτές, παρόλα αυτά φαίνεται ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί στα κύτταρα απώλεια της ικανότητας τους να αναπτύσσουν αποικίες. Η έντονη αυτή μείωση του αριθμού των αποικιών είναι πιο έκδηλη στα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα σε σχέση με τα Tg/Tg κύτταρα. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Hsp70 φαίνεται να καθιστά τα κύτταρα Tg/Tg ανθεκτικότερα, με μεγαλύτερες αντιστάσεις και ικανότερα όχι μόνο να επιβιώσουν, αλλά και να έχουν τη δυνατότητα ανάπτυξης αποικιών στις διάφορες τοξικές συγκεντρώσεις της δοξορουβικίνης.

### **3.6. Υπολογισμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο MTT μετά από επώαση με δοξορουβικίνη**

Αφού εκτιμήθηκε έμμεσα ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων μέσω της ικανότητας τους να σχηματίζουν αποικίες, στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης και η μελέτη του κυτταροπροστατευτικού ρόλου της Hsp70 ενάντια στο στρες, που προκαλείται στα κύτταρα από το φάρμακο. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο MTT. Για τα F1/F1 και τα Tg/Tg κύτταρα έγιναν μετρήσεις με την μέθοδο MTT (MTT colorimetric assay) για ένα εύρος συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης και χρόνων επώασης. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε το ποσοστό κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε καμπύλη επιβίωσης ανάλογα με τη συγκέντρωση δοξορουβικίνης και υπολογίστηκε το IC<sub>50</sub> για κάθε χρόνο επώασης σε κάθε κυτταρική σειρά.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σπορά 10000 κυττάρων σε ένα πολυτρυβλίο 96 φρεατίων και για τις δύο κυτταρικές σειρές (F1/F1 και Tg/Tg). Μετά από επώαση 24 ωρών σε επωαστικό θάλαμο με συνθήκες 37° C και 5% CO<sub>2</sub>, ακολούθησε επώαση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (0, 0.5, 1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 μM) και για διάφορους χρόνους επώασης (12, 24, 36, 48 h). Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, ακολουθεί η προσθήκη 50μl MTT (3mg/ml) και νέα επώαση για 3 ώρες στον επωαστικό κλίβανο. Η απορρόφηση σε κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου και για κάθε συγκέντρωση ουσίας πραγματοποιήθηκε με φωτομέτρηση με ELISA στα 540nm (η απορρόφηση υποβάθρου-background absorbance μετρήθηκε στα 690 nm ως φίλτρο αναφοράς) με τη χρήση ενός φασματοφωτόμετρου (Multiscan Spectrum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

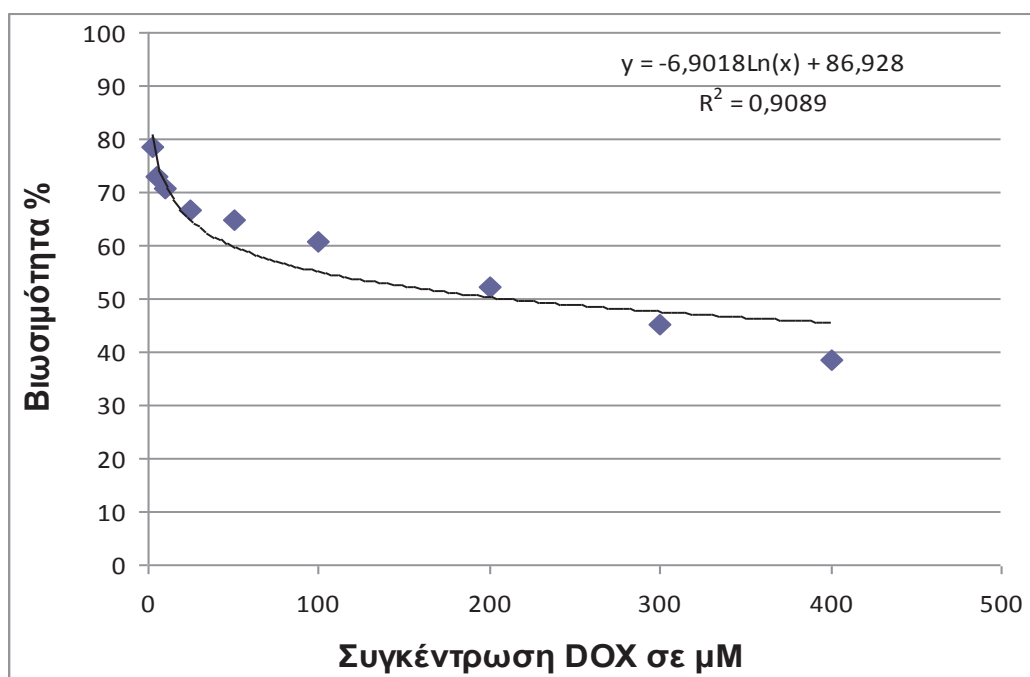
Η μέθοδος στηρίζεται στο κίτρινο χρώματος άλας τετραζολίου, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT, Sigma), που οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και παράγονται πορφυρού χρώματος κρύσταλλοι φορμαζάνης, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων.

Παράλληλα με τα παραπάνω δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν και πολυτρυβλία μάρτυρες για κάθε συγκέντρωση του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου. Δεν πραγματοποιήθηκε επίδραση με το αντιδραστήριο MTT, αλλά προσθήκη απευθείας 200 μl DMSO και ήπια ανάδευση με τη χρήση πολυπιπέτας. Αυτά τα δείγματα μάρτυρες, στα οποία δεν χρησιμοποιήσαμε MTT, αλλά μόνο το χημειοθεραπευτικό, δεν έδειξαν σημαντικές τιμές στην απορρόφηση (της τάξεως των 0,005 έως 0,009). Οπότε, στα αποτελέσματα δεν έχει συνυπολογιστεί η αυτο-απορρόφηση της δοξορουβικίνης, μιας και είναι ελάχιστη και χωρίς ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων.

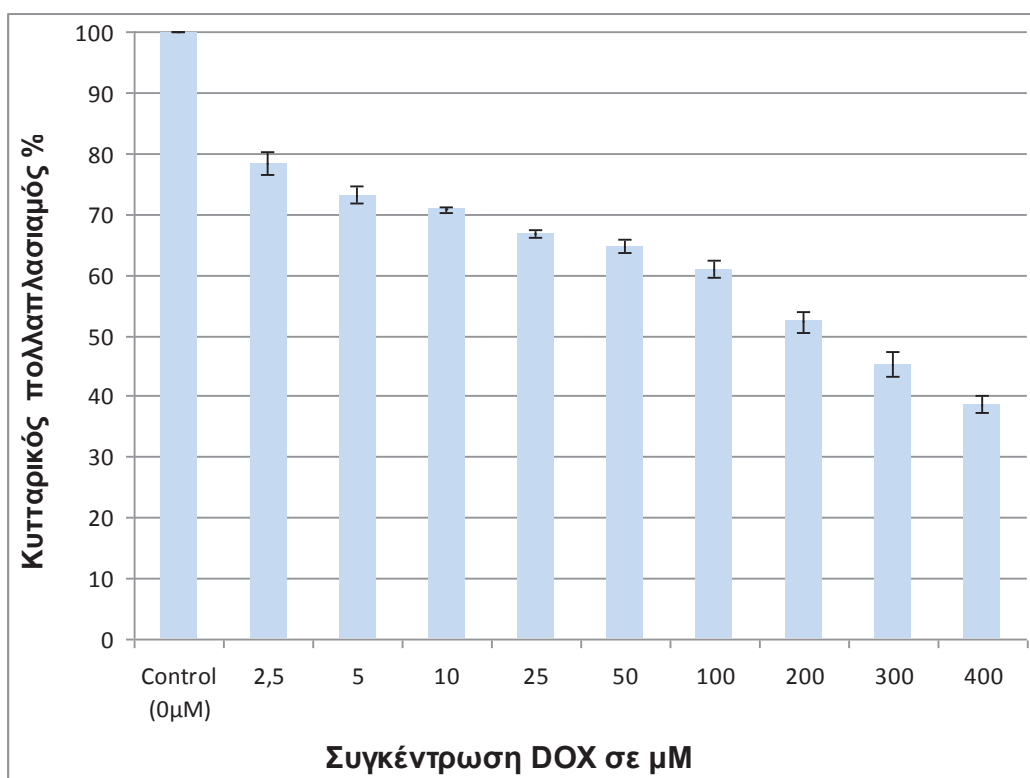
Η κυτταροτοξική δράση της δοξορουβικίνης προσδιορίζεται από την σχετική επιβίωση των κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Θα ερευνηθεί εάν αποδεικνύεται ότι η αυξημένη παρουσία της Hsp70 καθιστά τα κύτταρα πιο ανθεκτικά στη δοξορουβικίνη, όπως παρατηρήθηκε και με τις προηγούμενες μεθόδους, και εάν τα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, είναι πιο ανθεκτικά στη δράση του φαρμάκου, πράγμα το οποίο θα φανεί και από το εάν χρειάζονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για να πεθάνει το 50% του πληθυσμού τους.

Αρχικά, από τα αποτελέσματα μας υπολογίσαμε τα ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων στις διάφορες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήσαμε, ως προς τη συγκέντρωση ελέγχου (control), χωρίς προσθήκη δοξορουβικίνης στο μέσο επώασης (0μM). Κατόπιν, κατασκευάσαμε τις καμπύλες επιβίωσης και τα γραφήματα με τα ποσοστά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού για κάθε κυτταρική σειρά και χρόνο επώασης με το φάρμακο.

**A.**



**B.**



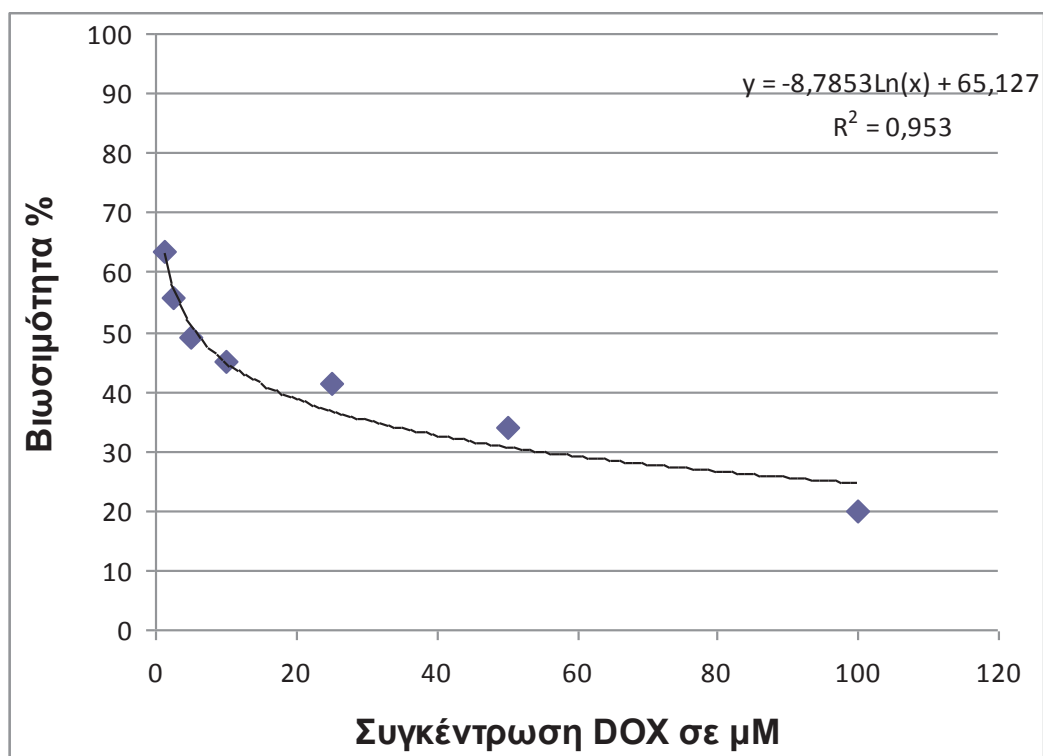
**Εικόνα 3.40:** **A)** Καμπύλη επιβίωσης των F1/F1 κυττάρων για 12 ώρες μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης. **B)** Γραφική απεικόνιση των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού των F1/F1 κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 και 400 μM) για 12 ώρες.

Αρχικά, παρατηρώντας την καμπύλη επιβίωσης και τη γραφική απεικόνιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των F1/F1 κυττάρων ελέγχου μετά από χορήγηση των διαφόρων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης και για χρόνο έκθεσης 12 ωρών, φαίνεται μια σταδιακή μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ανάλογη με την αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου (Εικόνα 3.40). Η σταδιακή μείωση, που παρατηρείται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό 12 ώρες μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου, φαίνεται να είναι ήπια, αφού παρατηρείται επιβίωση σε υψηλά επίπεδα των F1/F1 κυττάρων ακόμα και στις πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης. Η τιμή του IC<sub>50</sub> για τα F1/F1 κύτταρα στις 12 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του MTT στα **214,2649 μM** με τυπική απόκλιση ±45,3104.

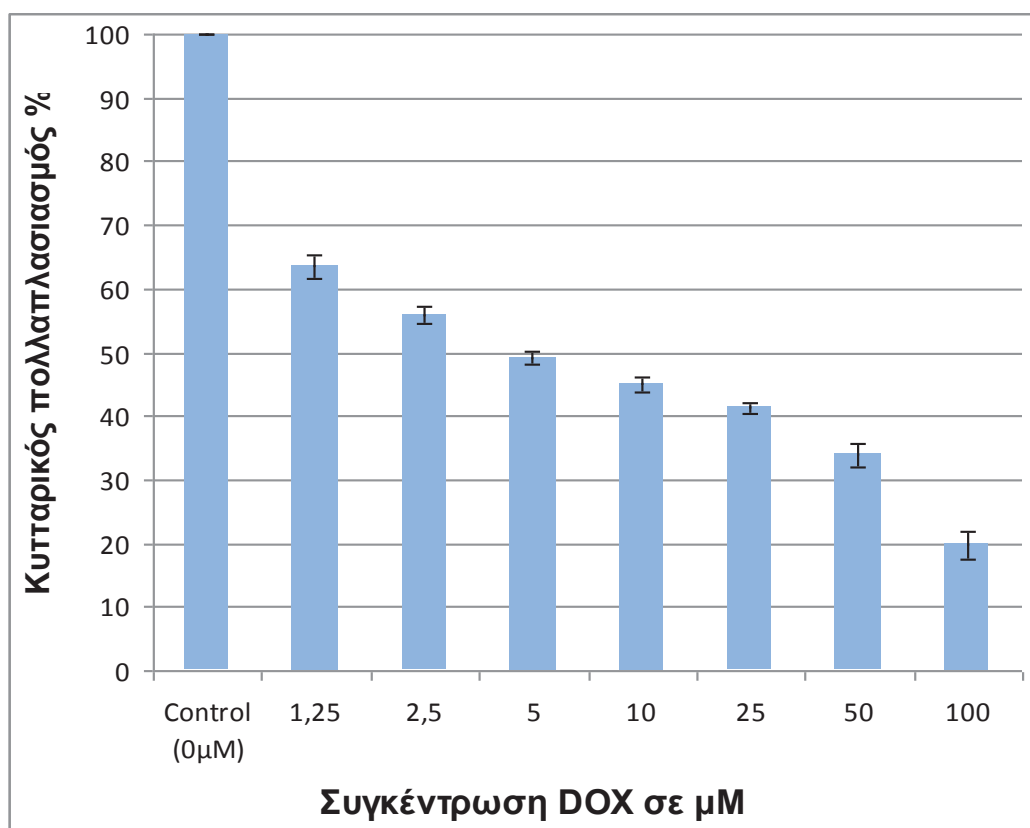
Σταδιακή μείωση του εκατοστιαίου ποσοστού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε και μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε κύτταρα F1/F1 για χρονικό διάστημα 24 ωρών, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.41. Το ποσοστό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων φαίνεται να υφίσταται μια απότομη μείωση, στην περίπτωση των 24 ωρών, από τις αρχικές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης των 1,25 μM, αλλά στη συνέχεια διατηρείται σε σημαντικά επίπεδα, ακόμη και στις υψηλές συγκεντρώσεις (μέχρι και 100μM) του φαρμάκου. Το IC<sub>50</sub> για τα F1/F1 κύτταρα στις 24 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του MTT στα **5,650638 μM** με τυπική απόκλιση ±0,915185.



**A.**

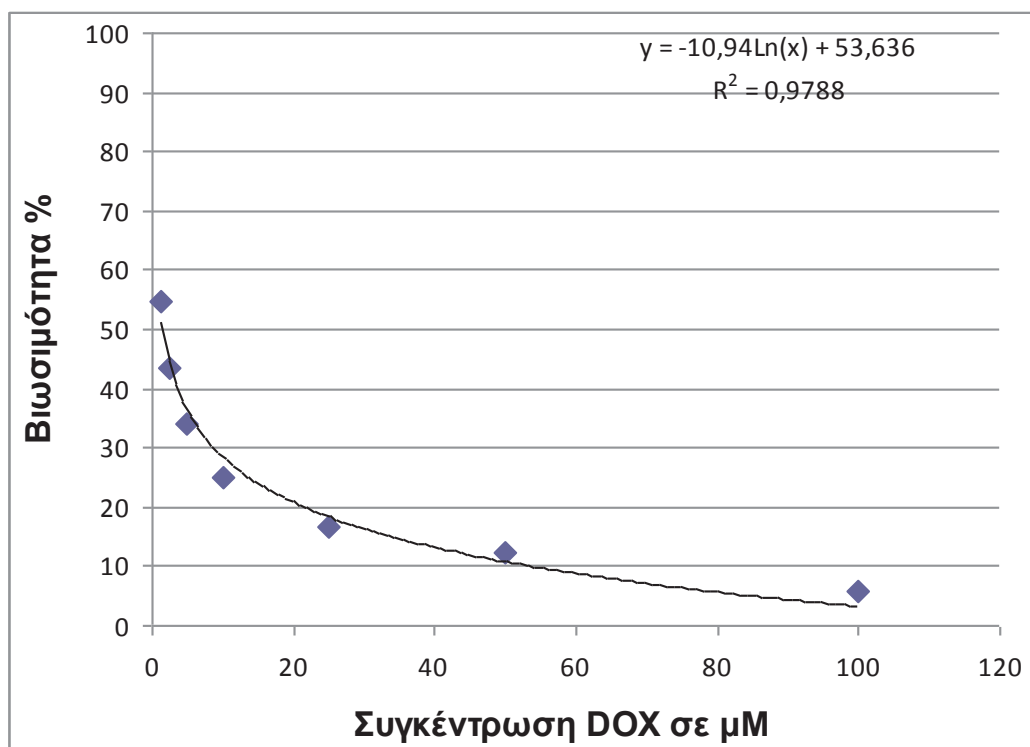


**B.**

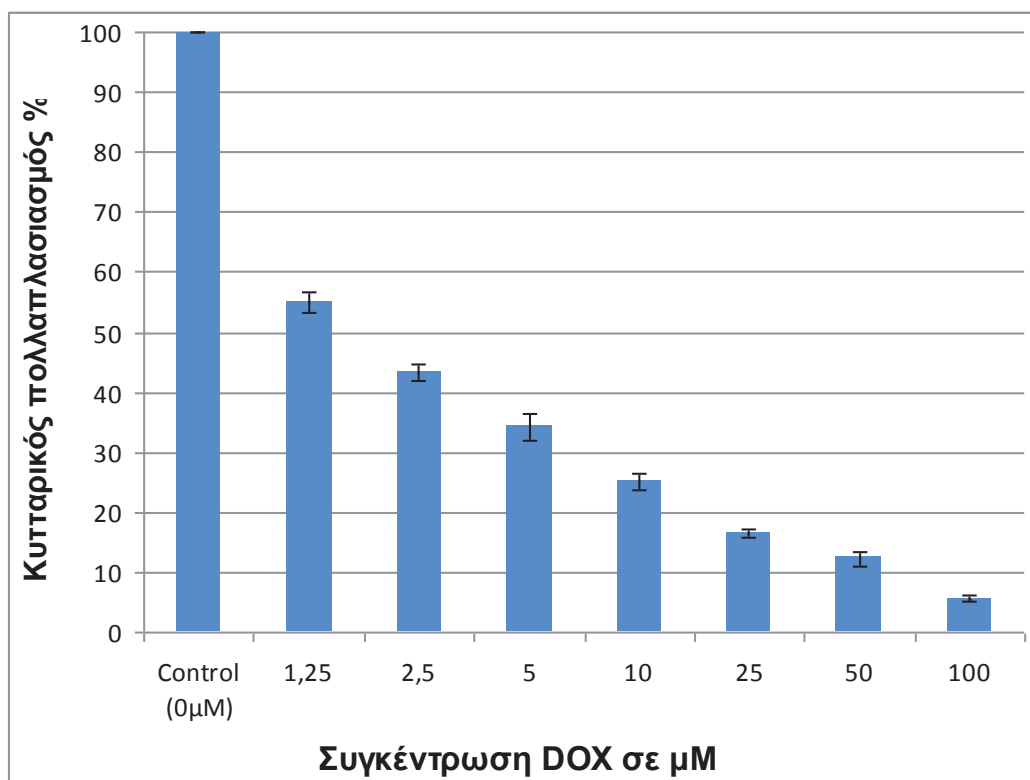


**Εικόνα 3.41:** *A)* Καμπύλη επιβίωσης των F1/F1 κυττάρων για 24 ώρες μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης. *B)* Γραφική απεικόνιση των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού των F1/F1 κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 1,25, 2,5, 5, 10, 25, 50 και 100 μM) για 24 ώρες.

**A.**



**B.**

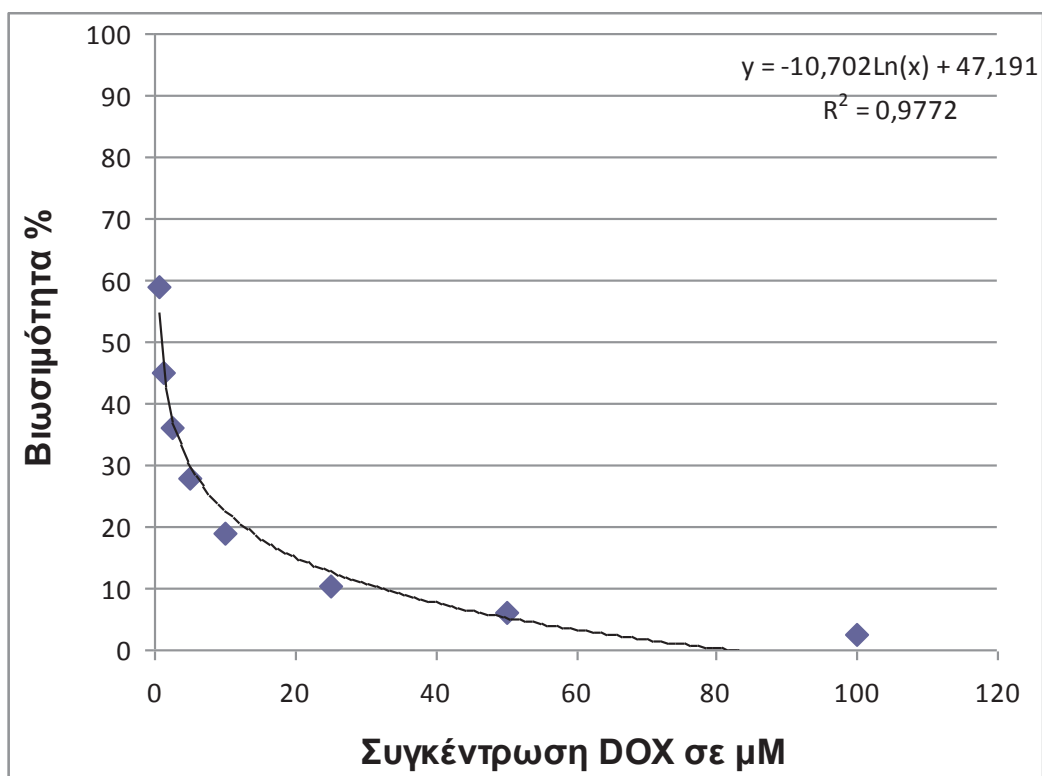


**Εικόνα 3.42:** *A)* Καμπύλη επιβίωσης των F1/F1 κυττάρων για 36 ώρες μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης. *B)* Γραφική απεικόνιση των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού των F1/F1 κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 1,25, 2,5, 5, 10, 25, 50 και 100 μM) για 36 ώρες.

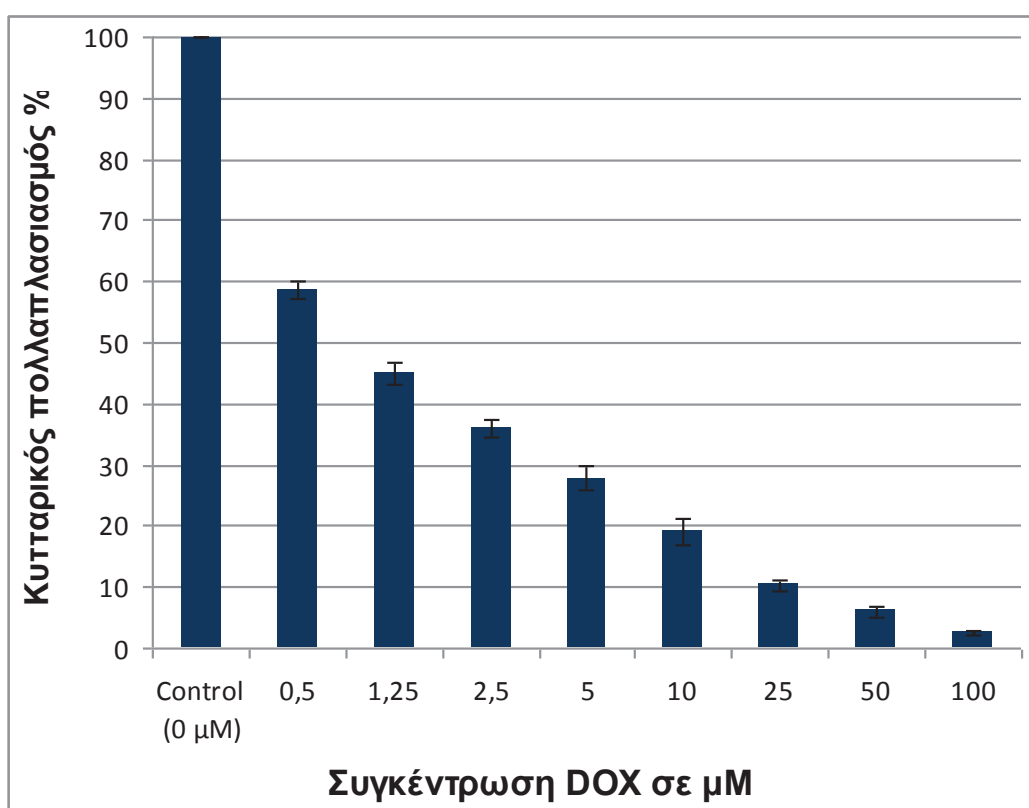
Ακολούθησε, το χρονοδιάγραμμα του πειράματος μας, πραγματοποιώντας επώαση των F1/F1 κυττάρων ελέγχου με δοξορουβικίνη για 36 ώρες. Μετά την κατασκευή της καμπύλης επιβίωσης και του γραφήματος με τα ποσοστά του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μας στις αντίστοιχες αυξανόμενες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των 36 ωρών μία δόσο-εξαρτώμενη μείωση του εκατοστιαίου ποσοστού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.42. Το ποσοστό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, στις 36 ώρες, φαίνεται να υφίσταται μια απότομη μείωση από τις αρχικές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης των 1,25  $\mu\text{M}$ , αλλά στη συνέχεια διατηρείται σε ικανοποιητικά επίπεδα μέχρι τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις DOX, όπου ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός φαίνεται να είναι σε μικρά ποσοστά. Το  $\text{IC}_{50}$  για τα F1/F1 κύτταρα στις 36 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη προσδιορίστηκε στα **1,403215  $\mu\text{M}$**  με τυπική απόκλιση  $\pm 0,225587$ .

Τέλος χορηγήθηκαν αυξανόμενες δόσεις δοξορουβικίνης στα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα για 48 ώρες. Από τα αποτελέσματα μας (Εικόνα 3.43), παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του εκατοστιαίου ποσοστού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και για χρονικό διάστημα 48 ωρών μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου. Έντονη μείωση παρατηρείται στα ποσοστά του πολλαπλασιασμού των F1/F1 κυττάρων και στις 48 ώρες, από τις αρχικές πολύ μικρές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (από τη συγκέντρωση 0,5  $\mu\text{M}$ ). Τα ποσοστά αυτά φαίνεται να μειώνονται σταδιακά με αύξηση της δόσης του χορηγούμενου φαρμάκου, ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις DOX (25-100  $\mu\text{M}$ ) τα ποσοστά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού δείχνουν να είναι από μικρά έως ελάχιστα. Η βιωσιμότητα των F1/F1 κυττάρων φαίνεται να μειώνεται στο 50% από τις πολύ μικρές συγκεντρώσεις DOX, καθώς το  $\text{IC}_{50}$  στις 48 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του MTT στα **0,775002  $\mu\text{M}$**  με τυπική απόκλιση  $\pm 0,132806$ .

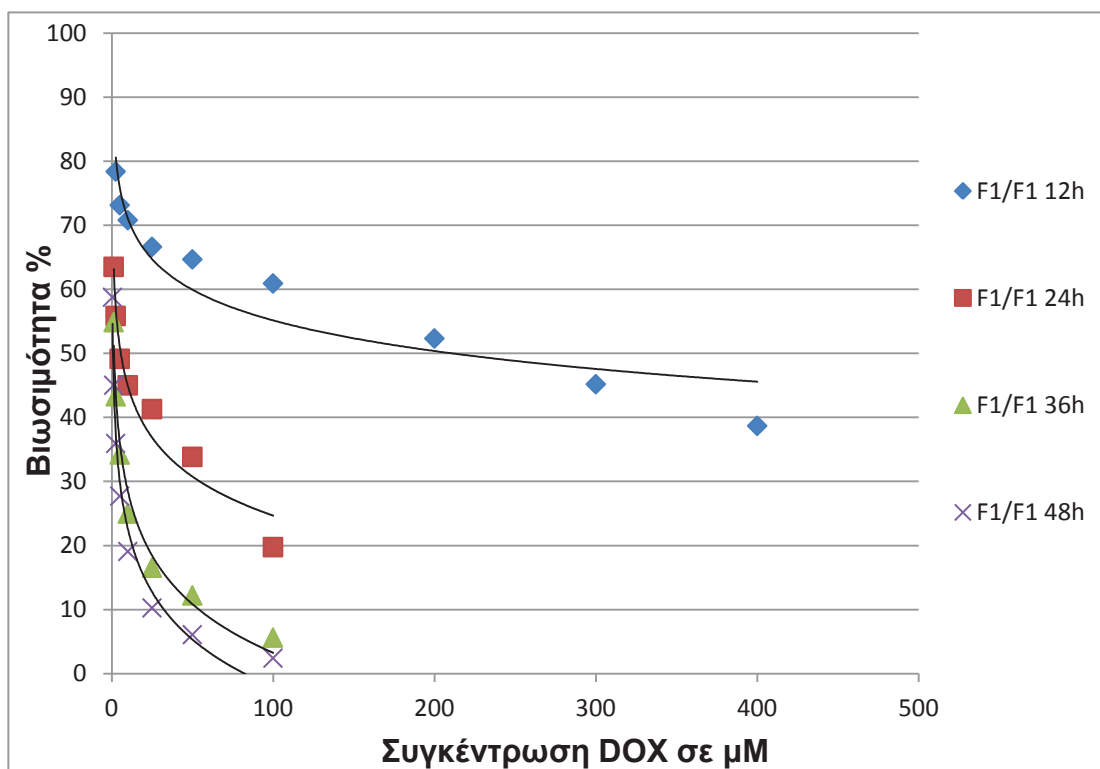
**A.**



**B.**



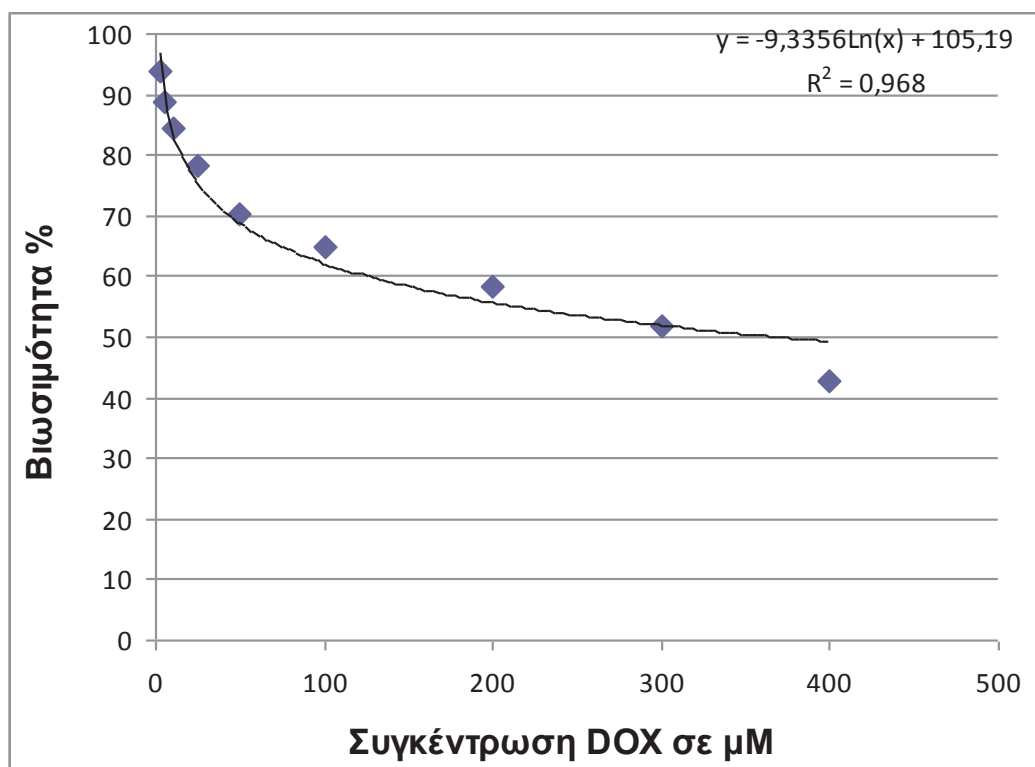
**Εικόνα 3.43:** *A)* Καμπύλη επιβίωσης των F1/F1 κυττάρων για 48 ώρες μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης. *B)* Γραφική απεικόνιση των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού των F1/F1 κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0,5, 1,25, 2,5, 5, 10, 25, 50 και 100  $\mu\text{M}$ ) για 48 ώρες.



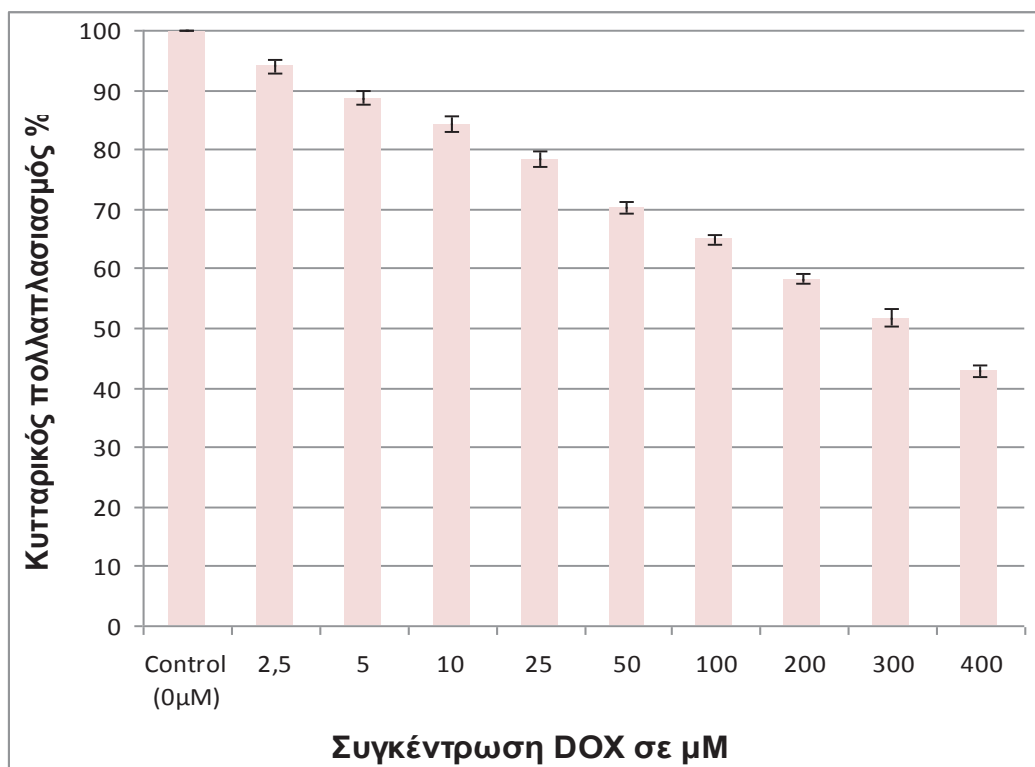
**Εικόνα 3.44:** Σύγχρονη απεικόνιση της επιβίωσης των F1/F1 κυττάρων στους διάφορους χρόνους επώασης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p < 0,01$ ).

Από τη σύγκριση της βιωσιμότητας των F1/F1 κυττάρων στους διάφορους χρόνους επώασης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, όπως προκύπτει και από την εικόνα 3.44, παρατηρείται η σταδιακή μείωση των ποσοστών επιβίωσης των F1/F1 κυττάρων, με αύξηση του χρόνου επώασης των κυττάρων με το φάρμακο. Από τις καμπύλες επιβίωσης της εικόνας 3.44, προκύπτει ότι η χορήγηση δοξορουβικίνης προκαλεί, εκτός από δόσο-εξαρτώμενη (όπως είδαμε παραπάνω), και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση στα ποσοστά επιβίωσης των F1/F1 κυττάρων. Η διαφορά αυτή στα ποσοστά επιβίωσης ανάμεσα στους χρόνους επώασης είναι ιδιαίτερα εμφανής σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματά μας, μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), είναι στατιστικά σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις επώασης στο φάρμακο ( $p < 0,01$ ).

**A.**



**B.**



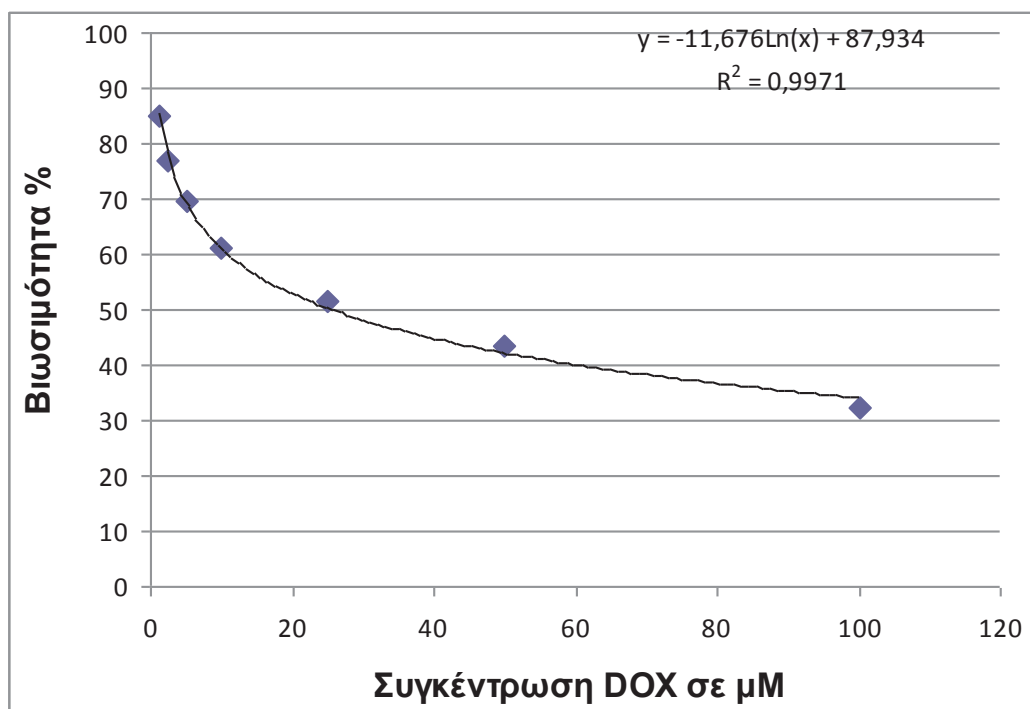
**Εικόνα 3.45:** **A)** Καμπύλη επιβίωσης των Tg/Tg κυττάρων για 12 ώρες μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης. **B)** Γραφική απεικόνιση των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 και 400 μM) για 12 ώρες

Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε το ίδιο χρονοδιάγραμμα επώασης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για τα Tg/Tg κύτταρα, τα οποία υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70. Κατά την επώαση των κυττάρων Tg/Tg στις διάφορες δόσεις δοξορουβικίνης, παρατηρείται αυξημένη ανθεκτικότητα των κυττάρων στο φάρμακο.

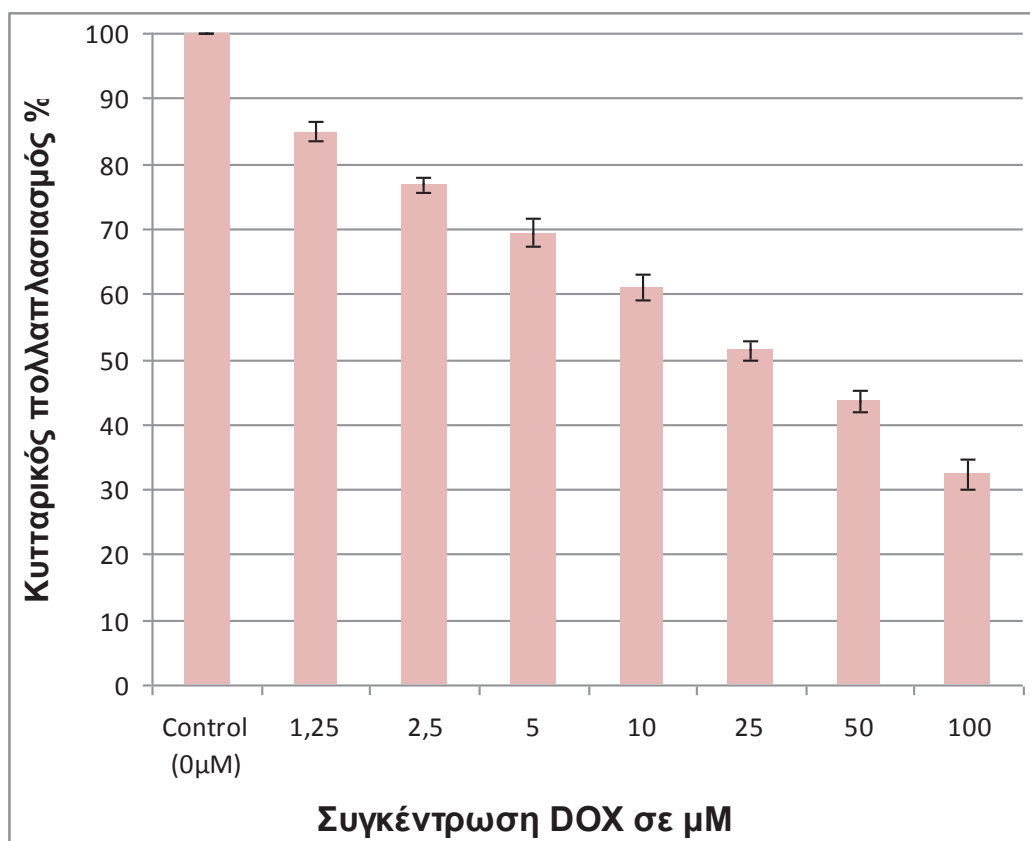
Στην καμπύλη επιβίωσης και το γράφημα, που απεικονίζει τα ποσοστά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση των αντίστοιχων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης για 12 ώρες, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.45, και στα Tg/Tg κύτταρα, παρουσιάστηκε μια σταδιακή μείωση του πολλαπλασιασμού του κυτταρικού πληθυσμού με αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης της δοξορουβικίνης. Η μείωση των ποσοστών επιβίωσης των Tg/Tg κυττάρων για τις 12 ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου, φαίνεται να καθυστερεί και να μην είναι τόσο έντονη, ακόμα και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, αφού, στη συγκέντρωση των 400  $\mu\text{M}$ , η επιβίωση εμφανίζεται λίγο κάτω από το 50% του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού. Από το γράφημα είναι, επίσης, εμφανής η αυξημένη ανθεκτικότητα των Tg/Tg κυττάρων, ακόμη και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις επώασης με δοξορουβικίνη, όπου είναι πιο ήπια η μείωση των ποσοστών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η τιμή του  $\text{IC}_{50}$  για τα Tg/Tg κύτταρα στις 12 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του MTT στα **370,7874  $\mu\text{M}$**  με τυπική απόκλιση  $\pm 40,52205$ .

Η παράθεση της καμπύλης επιβίωσης και η γραφική απεικόνιση των ποσοστών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση των αντίστοιχων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης για 24 ώρες (Εικόνα 3.46), έδειξε ανάλογη σταδιακή μείωση στα ποσοστά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με αύξηση της συγκέντρωσης της δοξορουβικίνης. Το ποσοστό του πολλαπλασιασμού των Tg/Tg κυττάρων στις 24 ώρες, δεν δείχνει να υφίσταται απότομη μείωση, όπως στην περίπτωση των F1/F1 κυττάρων, και διατηρείται σε υψηλά επίπεδα, ακόμη και στις μεγάλες συγκεντρώσεις (μέχρι και 100 $\mu\text{M}$ ) δοξορουβικίνης. Το  $\text{IC}_{50}$  για τα Tg/Tg κύτταρα, για 24 ώρες μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης, προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του MTT στα **25,98418  $\mu\text{M}$**  με τυπική απόκλιση  $\pm 4,149383$ .

**A.**



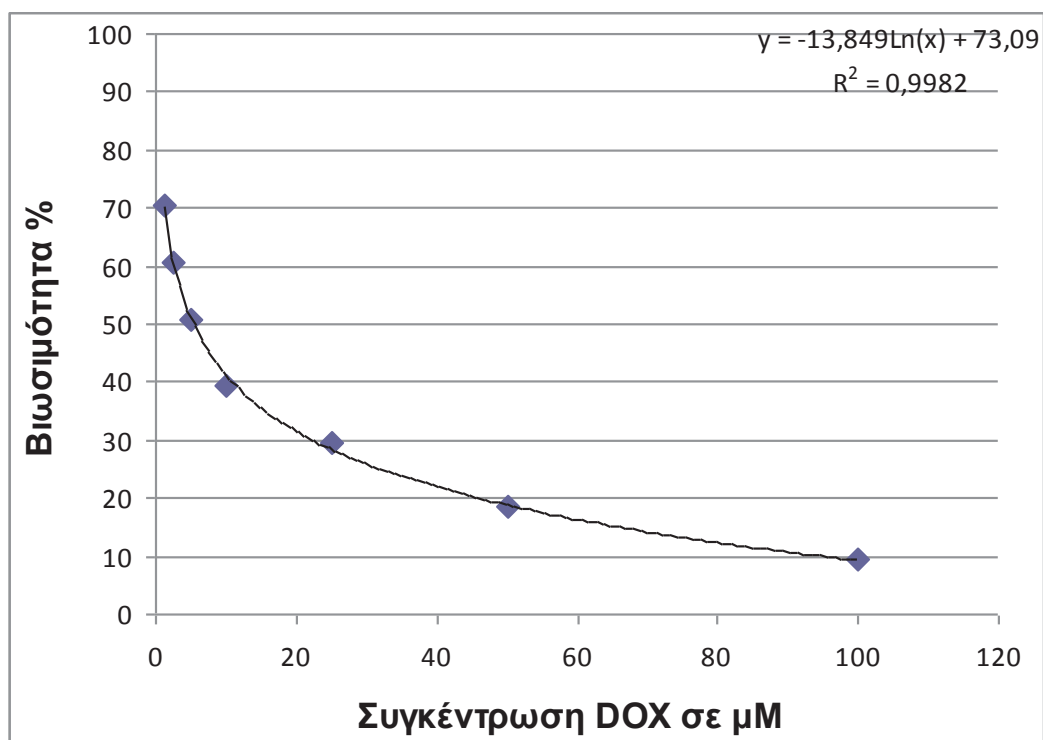
**B.**



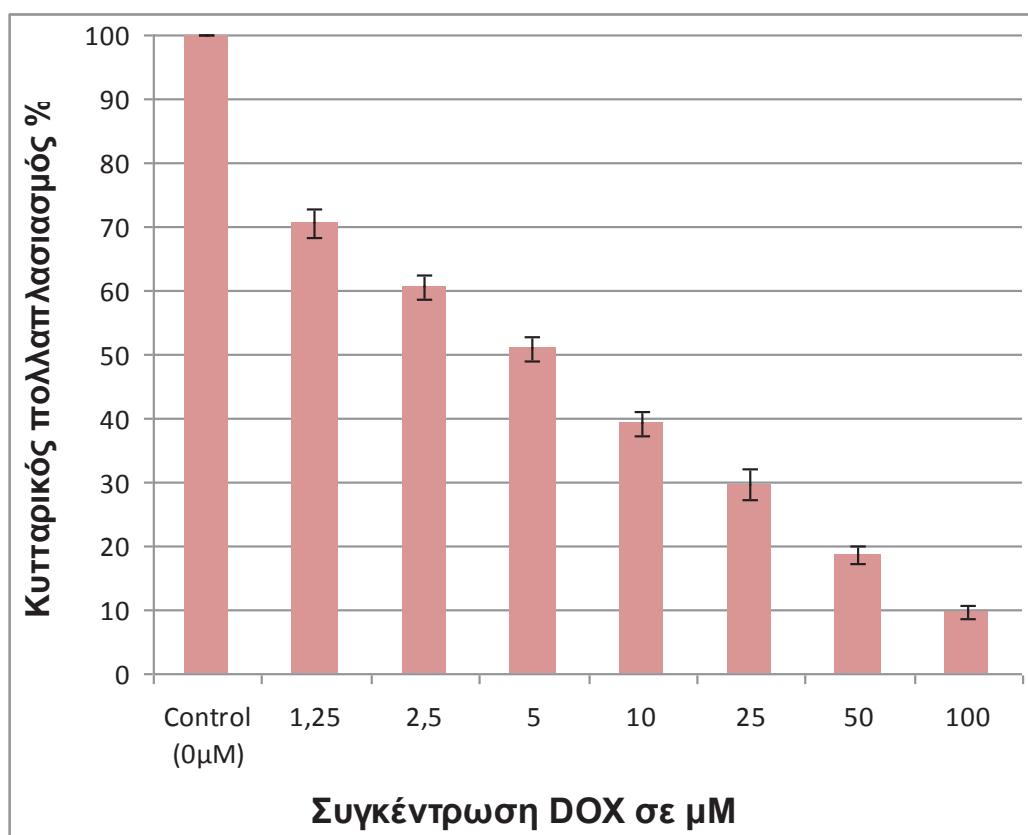
**Εικόνα 3.46:** *A)* Καμπύλη επιβίωσης των Tg/Tg κυττάρων για 24 ώρες μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης. *B)* Γραφική απεικόνιση των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 1,25, 2,5, 5, 10, 25, 50 και 100  $\mu\text{M}$ ) για 24 ώρες.



**A.**



**B.**

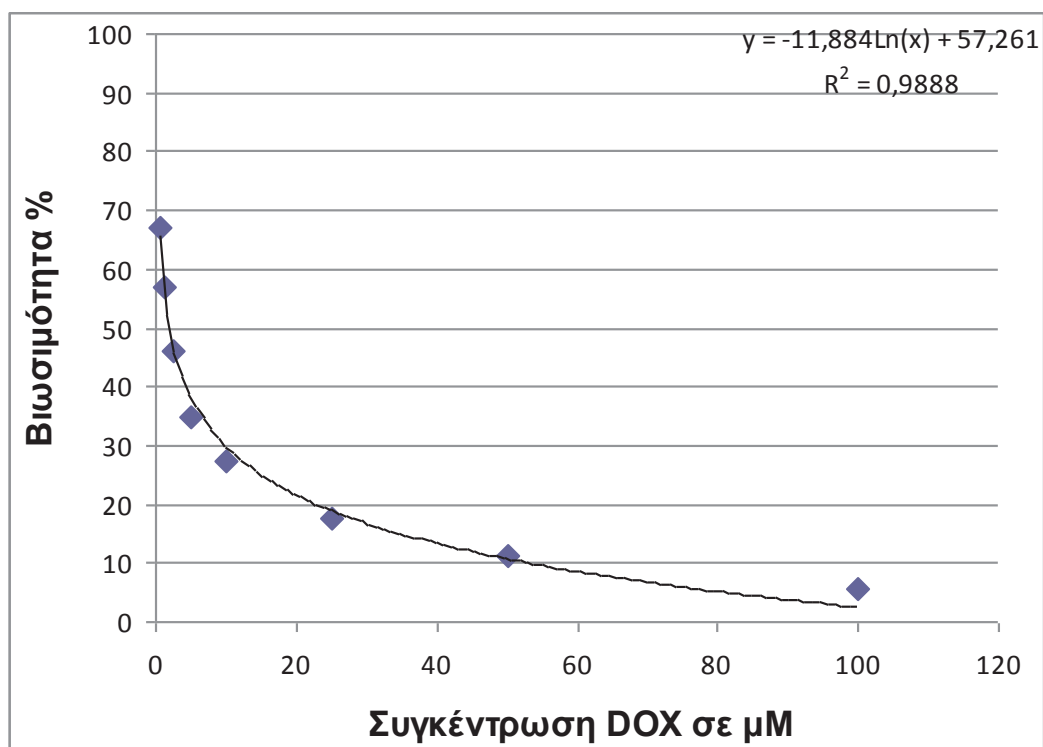


**Εικόνα 3.47:** *A)* Καμπύλη επιβίωσης των Tg/Tg κυττάρων για 36 ώρες μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης. *B)* Γραφική απεικόνιση των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 1,25, 2,5, 5, 10, 25, 50 και 100  $\mu\text{M}$ ) για 36 ώρες.

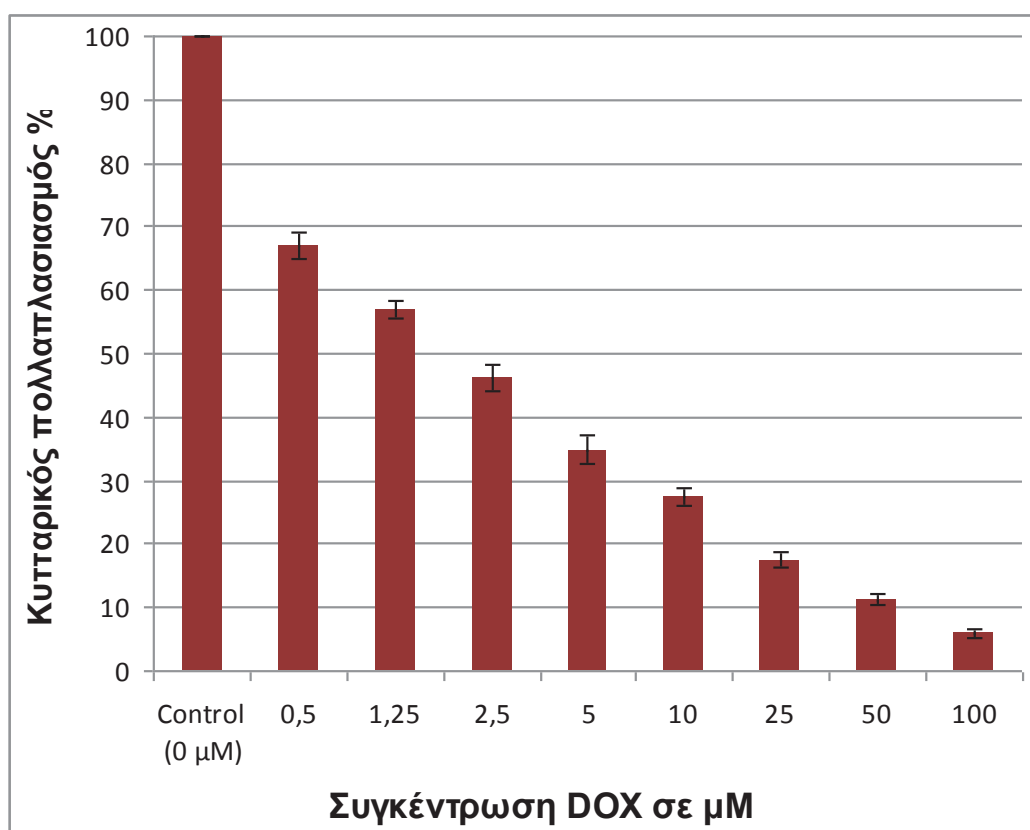
Από τα αποτελέσματα μας (Εικόνα 3.47), μετά τη χορήγηση των αυξανόμενων δόσεων δοξορουβικίνης στα Tg/Tg κύτταρα, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του εκατοστιαίου ποσοστού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και για χρονικό διάστημα 36 ωρών μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου. Το ποσοστό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, στις 36 ώρες, δεν δείχνει να υφίσταται απότομη μείωση από τις αρχικές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, ενώ, στη συνέχεια, διατηρείται σε ικανοποιητικά επίπεδα μέχρι τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις DOX, όπου τα ποσοστά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού φαίνεται να εμφανίζονται μειωμένα. Το IC<sub>50</sub> για τα Tg/Tg κύτταρα στις 36 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη προσδιορίστηκε στα **5,327362 μM** με τυπική απόκλιση ±0,733143.

Τέλος, μετά την κατασκευή της καμπύλης επιβίωσης και του γραφήματος με τα ποσοστά του πολλαπλασιασμού των Tg/Tg κυττάρων (Εικόνα 3.48) στις αντίστοιχες αυξανόμενες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των 48 ωρών μία δόσο-εξαρτώμενη μείωση του εκατοστιαίου ποσοστού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η μείωση, που παρατηρείται στα ποσοστά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των Tg/Tg κυττάρων 48 ώρες μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου, δείχνει να είναι σημαντική από τις μικρές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης. Τα ποσοστά αυτά μειώνονται σταδιακά με αύξηση της δόσης της DOX, ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις DOX (50-100 μM) τα ποσοστά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού δείχνουν να είναι σημαντικά μειωμένα. Είναι, πάντως, έκδηλο ότι η μείωση αυτή στα ποσοστά του πολλαπλασιασμού των Tg/Tg κυττάρων, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, δεν είναι το ίδιο έντονη, όπως στα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα (όπως είδαμε παραπάνω), γεγονός το οποίο αποδεικνύει ότι τα πρώτα είναι πιο ανθεκτικά και επιδεικνύουν καλύτερη επιβίωση. Το IC<sub>50</sub> για τα Tg/Tg κύτταρα στις 48 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του MTT στα **1,845448 μM** με τυπική απόκλιση ± 0,211605.

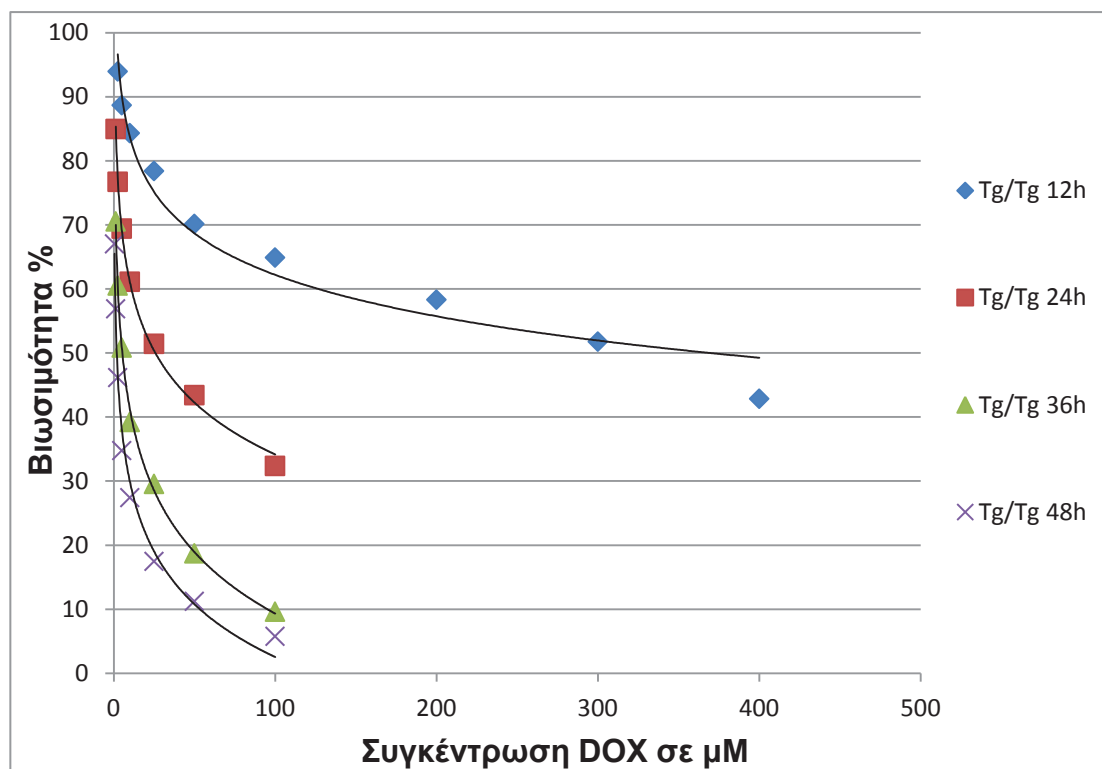
**A.**



**B.**



**Εικόνα 3.48:** **A)** Καμπύλη επιβίωσης των Tg/Tg κυττάρων για 48 ώρες μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης. **B)** Γραφική απεικόνιση των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0,5, 1,25, 2,5, 5, 10, 25, 50 και 100  $\mu\text{M}$ ) για 48 ώρες.

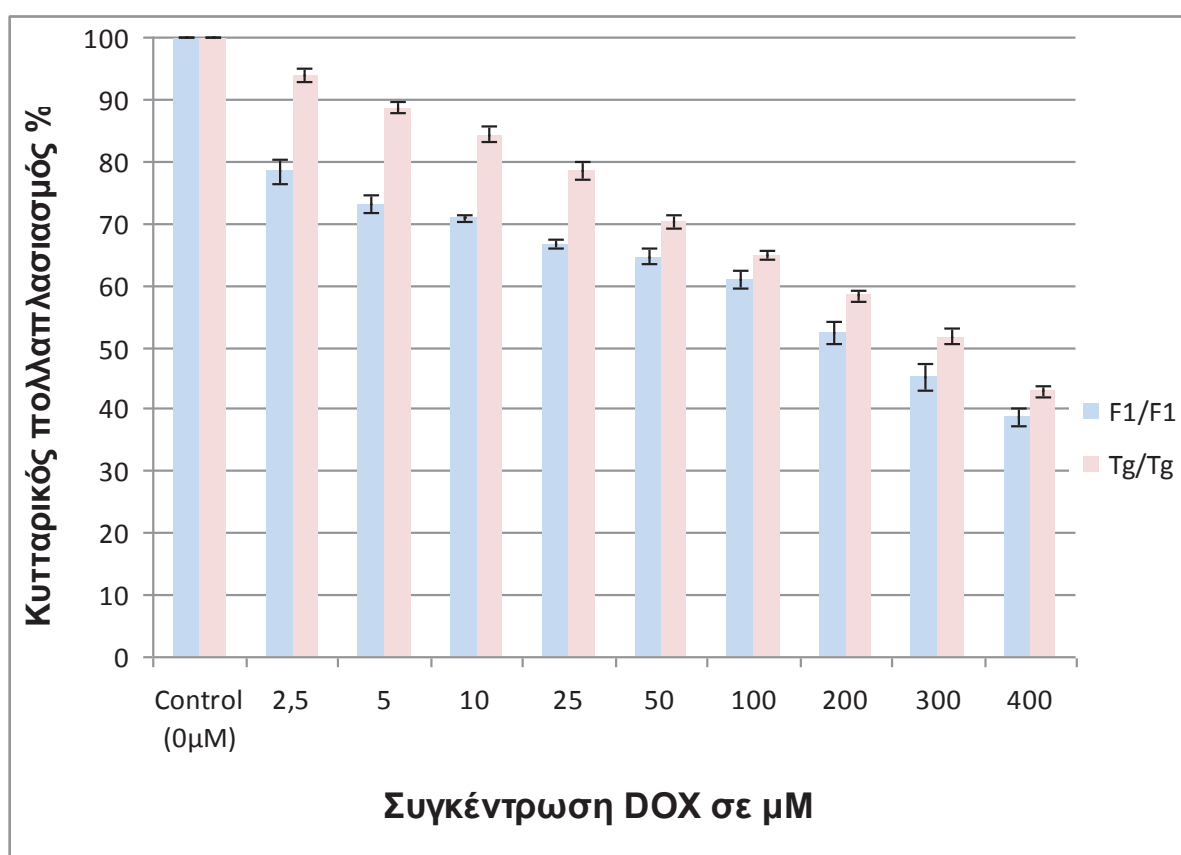


**Εικόνα 3.49:** Σύγχρονη απεικόνιση της επιβίωσης των Tg/Tg κυττάρων στους διάφορους χρόνους επώασης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p < 0,007$ ).

Από την σύγκριση της βιωσιμότητας των Tg/Tg κυττάρων στους διάφορους χρόνους επώασης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.49, παρατηρείται η σταδιακή μείωση των ποσοστών επιβίωσης των Tg/Tg κυττάρων, με αύξηση του χρόνου επώασης των κυττάρων με το φάρμακο. Η χορήγηση δοξορουβικίνης, όπως δείχνουν οι καμπύλες επιβίωσης, προκαλεί, εκτός από δοσο-εξαρτώμενη (όπως είδαμε και στα προηγούμενα γραφήματα), και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση στα ποσοστά επιβίωσης και στα Tg/Tg κύτταρα, όπως είχαμε δει αντίστοιχα και στα F1/F1 κύτταρα. Η μείωση αυτή, παρόλα αυτά, δεν είναι το ίδιο έντονη στα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα. Η διαφορά στα ποσοστά της βιωσιμότητας ανάμεσα στους χρόνους έκθεσης σε δοξορουβικίνη είναι εμφανής σε όλες τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου, που χρησιμοποιήσαμε. Μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), τα αποτελέσματά μας είναι στατιστικά σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις επώασης με τη δοξορουβικίνη ( $p < 0,007$ ).

Ακολούθησε η σύγκριση του ποσοστού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για την ίδια χρονική διάρκεια έκθεσης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της δοξορουβικίνης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.50, για τις 12 ώρες, παρατηρήθηκε αυξημένη τιμή των ποσοστών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα Tg/Tg κύτταρα σε σύγκριση με αυτή στα F1/F1 για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήσαμε. Η διαφορά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές είναι εμφανής σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης. Οι διαφορές αυτές στα ποσοστά του κυτταρικού

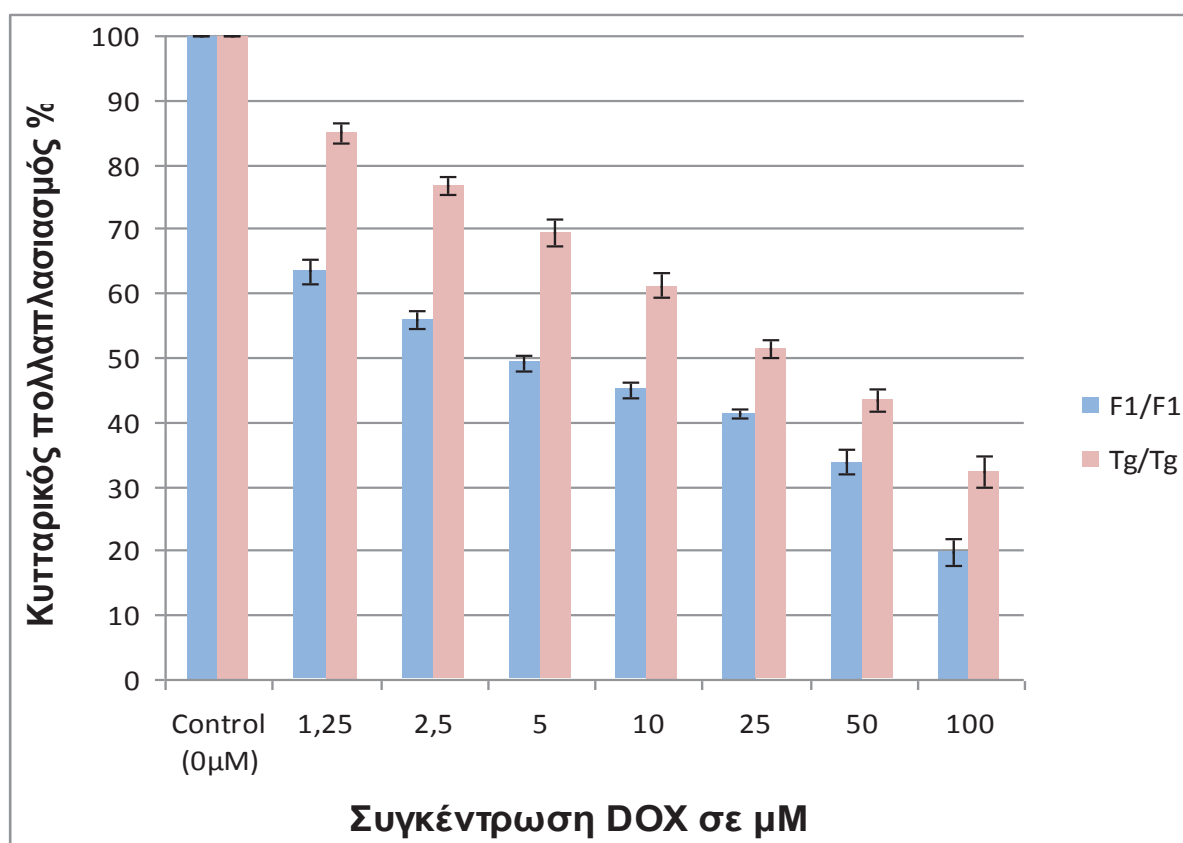
πολλαπλασιασμού, δεν φαίνονται να είναι τόσο μεγάλες ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές στις 12 ώρες επώασης με τη δοξορουβικίνη, σε σχέση και με τους άλλους χρόνους επώασης (όπως θα δούμε και παρακάτω), αφού είναι πιθανό ότι οι επιπτώσεις από την τοξική δράση της δοξορουβικίνης στα κύτταρα δεν είναι τόσο έντονες για χρονική διάρκεια 12 ωρών από τη χορήγηση του φαρμάκου. Από το γράφημα είναι φανερό ότι τα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, είναι πιο ανθεκτικά και εμφανίζουν καλύτερη επιβίωση στη δράση της δοξορουβικίνης σε σχέση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου μετά από 12 ώρες επώασης με το φάρμακο. Τα αποτελέσματά μας, μετά τη στατιστική ανάλυση (t-test), ως προς τη σύγκριση των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για 12 ώρες επώασης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, είναι στατιστικά σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις ( $p=0,01$  -  $p=0,0000$ ).



**Εικόνα 3.50:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού μεταξύ των F1/F1 και Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 12 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p=0,01$  -  $p=0,0000$ ).

Κατά την έκθεση των δύο κυτταρικών σειρών στις αντίστοιχες δόσεις δοξορουβικίνης για 24 ώρες, παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα κύτταρα Tg/Tg σε σχέση με τα F1/F1 (Εικόνα 3.51), για όλες τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου, που χρησιμοποιήθηκαν. Οι διαφορές στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, που παρατηρούνται ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για τις 24 ώρες είναι ιδιαίτερα εμφανείς σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και είναι πιο έντονες από τις διαφορές, που προέκυψαν νωρίτερα για τις 12 ώρες επώασης με το φάρμακο, όπως παρατηρήθηκε και στο προηγούμενο γράφημα. Οι διαφορές αυτές στα ποσοστά κυτταρικού πολλαπλασιασμού για τις 24 ώρες είναι

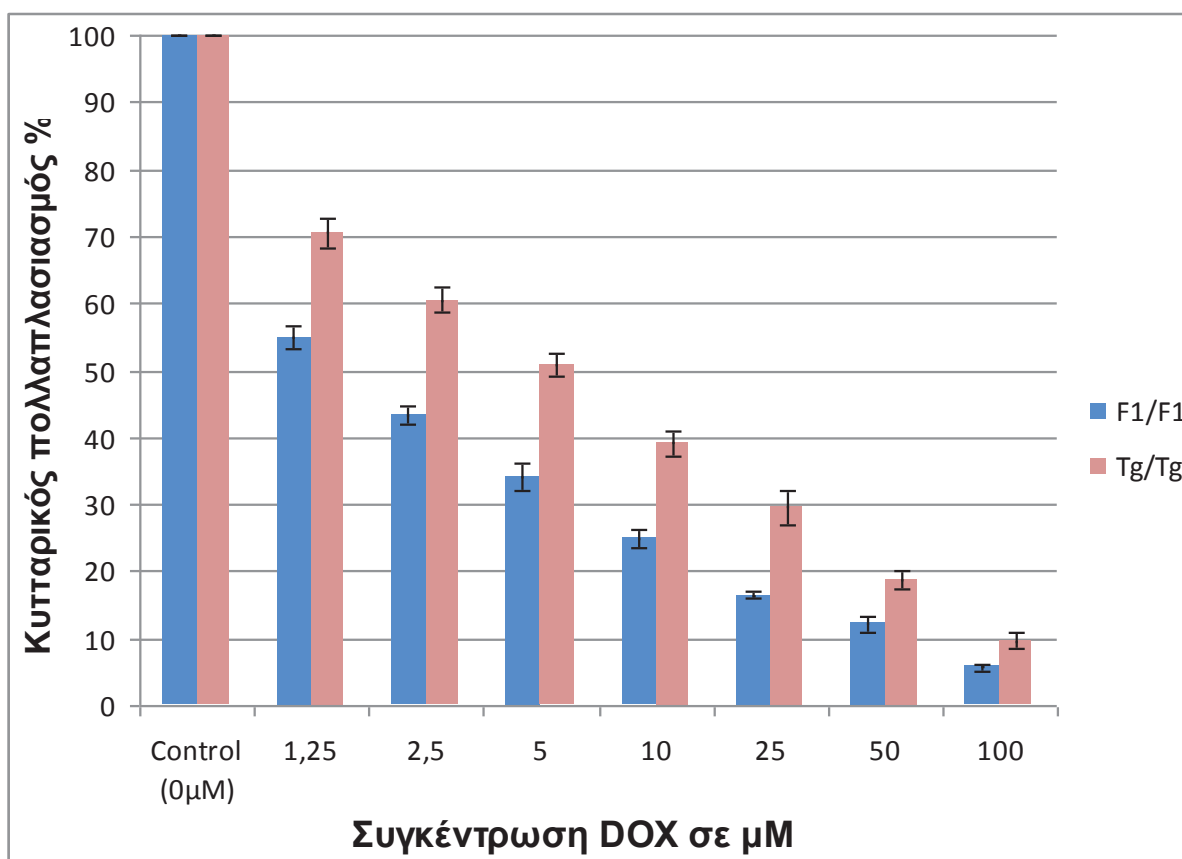
μεγάλες από τις αρχικές μικρές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και δείχνουν να παραμένουν σημαντικές, ακόμα και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι και στην περίπτωση των 24 ωρών μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης, τα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, φαίνονται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο φάρμακο, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα. Οι διαφορές στα ποσοστά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για 24 ώρες επώασης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, είναι στατιστικά σημαντικές ( $p=0,002$  -  $p=0,0000$ ), μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), για όλες τις συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν.



**Εικόνα 3.51:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού μεταξύ των F1/F1 και Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p=0,002$  -  $p=0,0000$ ).

Η σύγκριση των ποσοστών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για 36 ώρες μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου έδειξε ανάλογα αποτελέσματα και με τα υπόλοιπα χρονικά διαστήματα επώασης με δοξορουβικίνη, όπως είδαμε προηγουμένως. Στο παρακάτω γράφημα (Εικόνα 3.52) για τις 36 ώρες, οι τιμές των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού των Tg/Tg κυττάρων είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές των F1/F1 κυττάρων, για όλες τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου, που χρησιμοποιήσαμε. Η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των Tg/Tg κυττάρων, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, σε σχέση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα, είναι ιδιαίτερα εμφανής σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, αφού οι

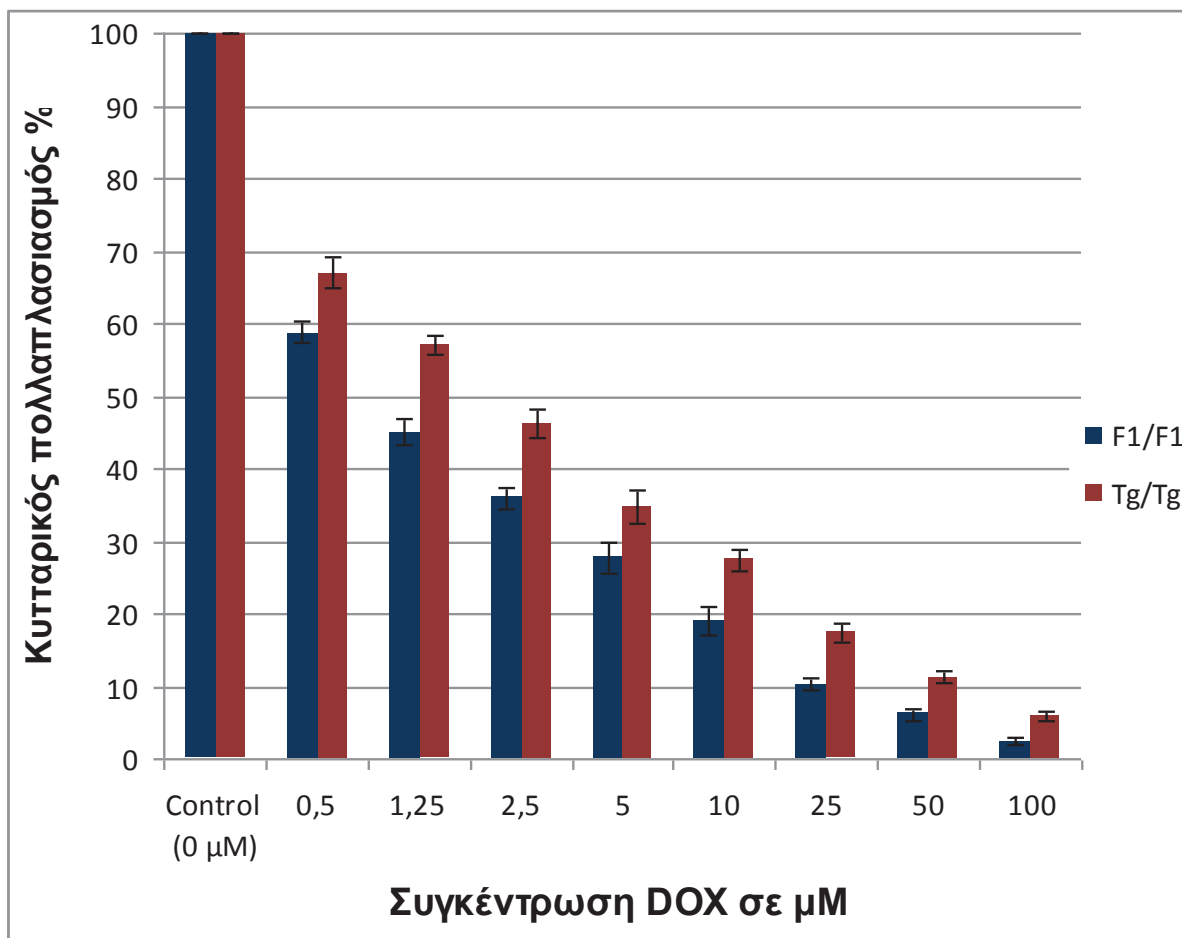
διαφορές, που παρατηρούνται ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές είναι σημαντικές τόσο στις μικρές όσο και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Μετά τη στατιστική ανάλυση (t-test), ως προς τη σύγκριση των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για 36 ώρες επώασης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, τα αποτελέσματα μας είναι στατιστικά σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις ( $p=0,006$  -  $p=0,0001$ ).



**Εικόνα 3.52:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού μεταξύ των F1/F1 και Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 36 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p=0,006$  -  $p=0,0001$ ).

Τέλος, μετά από έκθεση των δύο κυτταρικών σειρών στις αντίστοιχες δόσεις δοξορουβικίνης για 48 ώρες παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά στα συνολικά ποσοστά κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα κύτταρα Tg/Tg σε σχέση με τα F1/F1 (Εικόνα 3.53), για όλες τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Οι διαφορές αυτές, που παρατηρούνται ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για τα ποσοστά κυτταρικού πολλαπλασιασμού για τις 48 ώρες είναι εμφανείς από τις αρχικές μικρές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και παραμένουν σημαντικές, ακόμα και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Σε αντίθεση με τα F1/F1 κύτταρα, όπου στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις DOX, παρατηρούνται μικρές έως ελάχιστες τιμές στα ποσοστά κυτταρικού πολλαπλασιασμού για 48 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη, στα Tg/Tg κύτταρα παρατηρούνται σημαντικές τιμές στα ποσοστά κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ακόμα και στις μεγάλες συγκεντρώσεις φαρμάκου. Τα αποτελέσματα μας αυτά καθιστούν σαφές ότι τα Tg/Tg κύτταρα, τα οποία

υπερεκφράζουν την Hsp70, επιδεικνύουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα και επιβίωση στις βλαβερές επιπτώσεις της δράσης της δοξορουβικίνης, σε σχέση με τα F1/F1 κύτταρα, για 48 ώρες μετά τη χορήγηση της, κάτι το οποίο παρατηρήθηκε, άλλωστε και για όλους τους χρόνους, που χρησιμοποιήσαμε. Οι παρατηρούμενες διαφορές στα ποσοστά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για 48 ώρες έκθεσης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, είναι στατιστικά σημαντικές, μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), για όλες τις συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν, με  $p=0,01 - p=0,0007$ .



**Εικόνα 3.53:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού μεταξύ των F1/F1 και Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 48 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p=0,01 - p=0,0007$ )

Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας με τις τιμές  $IC_{50}$  και τις τυπικές αποκλίσεις (ST.DEV.) για τις δύο κυτταρικές σειρές για όλους τους χρόνους επώασης με δοξορουβικίνη, όπως αυτές προέκυψαν με τη μέθοδο MTT. Από τις τιμές των  $IC_{50}$  είναι φανερή η δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη τοξική δράση της δοξορουβικίνης στα κύτταρα, καθώς και η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των Tg/Tg κυττάρων, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα, αφού απαιτείται σημαντικά μεγαλύτερη δόση του φαρμάκου για τη θανάτωση του 50% του κυτταρικού πληθυσμού, για όλους τους χρόνους επώασης με δοξορουβικίνη.



### IC<sub>50</sub> ± ST.DEV.

	F1/F1	Tg/Tg
12 h	214,2649 ± 45,3104	370,7874 ± 40,52205
24 h	5,650638 ± 0,915185	25,98418 ± 4,149383
36 h	1,403215 ± 0,225587	5,327362 ± 0,733143
48 h	0,775002 ± 0,132806	1,845448 ± 0,211605

**Πίνακας 3.3:** Πίνακας τιμών IC<sub>50</sub> με την τυπική απόκλιση (σε μM) των δύο κυτταρικών σειρών F1/F1 και Tg/Tg στους διάφορους χρόνους επώασης με δοξορουβικίνη.

Συμπερασματικά, λοιπόν, μπορούμε να αποφανθούμε ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση των ποσοστών του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ενώ επίσης εξαρτάται και από το είδος των πρωτογενών κυτταρικών σειρών, αφού είναι εμφανής η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των Tg/Tg κυττάρων, τα οποία υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, σε σύγκριση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου. Από τα γραφήματα και τους υπολογισμούς των τιμών του IC<sub>50</sub> φαίνεται η αυξημένη επιβίωση των Tg/Tg κυττάρων σε σύγκριση με τα F1/F1 κύτταρα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης με δοξορουβικίνη. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ο σημαντικός ρόλος της Hsp70, που προσδίδει προστασία στα κύτταρα, ελαττώνοντας τις βλαπτικές συνέπειες της τοξικής δράσης της δοξορουβικίνης.

### 3.7. Το αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τη δοξορουβικίνη σε πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα ποντικών και ο ρόλος της Hsp70.

Αφού αποδείχθηκε η τοξικότητα της δοξορουβικίνης στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα, ακολούθησε η ανίχνευση του μηχανισμού δράσης του φαρμάκου και ο προσδιορισμός του αποπτωτικού μονοπατιού, το οποίο ενεργοποιείται από τη δοξορουβικίνη. Επίσης, εξετάσαμε τη συμμετοχή της Hsp70 στο αποπτωτικό αυτό

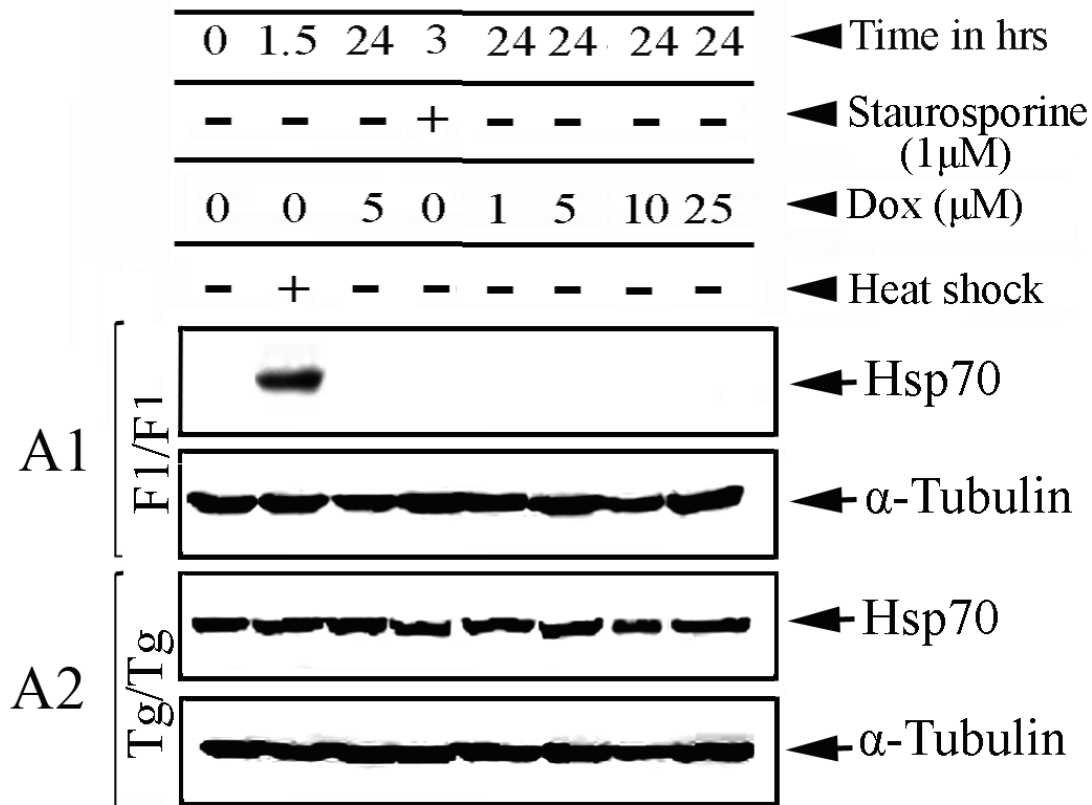
μονοπάτι και τον πιθανό τρόπο, που ασκεί την προστατευτική δράση της στα κύτταρα μας μετά από τη χορήγηση της δοξορουβικίνης.

Δεδομένου ότι η δοξορουβικίνη εισέρχεται στον πυρήνα και ασκεί την επίδραση της, προκαλώντας βλάβες στο DNA, εξετάστηκε η διέγερση του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού, που ενεργοποιείται μετά από βλάβη στο DNA. Πιο συγκεκριμένα ερευνήθηκαν, η ενεργοποίηση των p53, Bax, κασπάση-9, κασπάση-3 και PARP-1, που εμπλέκονται σε αυτό το μονοπάτι και συγχρόνως ο ρυθμιστικός ρόλος της Hsp70.

Για το σκοπό αυτό, πιο συγκεκριμένα, σε τρυβλία πραγματοποιήθηκε σπορά  $1 \times 10^6$  κυττάρων F1/F1 και Tg/Tg, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, αμφότερα κύτταρα που προέρχονται μετά από 80 περίπου επανακαλλιέργειες. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες 37°C και 5% CO<sub>2</sub> για 24 ώρες. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού, τα μισά τρυβλία με F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα εκτέθηκαν σε δοξορουβικίνη στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις (0, 1, 5, 10 και 25 μM) για 24 ώρες, ενώ τα άλλα μισά χρησιμοποιήθηκαν για κύτταρα μάρτυρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS ηλεκτροφόρηση και με ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση κατάλληλων και ειδικών αντισωμάτων για τις πρωτεΐνες Hsp70, PARP-1, phospho-p53 [ser15], Bax, cleaved-Caspase-9 και active caspase 3. Ταυτόχρονα, ίδια κύτταρα εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ (60 λεπτά στους 42.5°C και επαναφορά (recovery) για 90 λεπτά στους 37°C), ή σταυροσπορίνη (σε συγκέντρωση 1μM για 3 ώρες) για να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της έκφρασης της Hsp70 ή ως δείκτες της ενεργοποίησης της αποπτωτικής διαδικασίας, αντίστοιχα. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης α-τουμπουλίνης, η οποία και χρησιμοποιήθηκε σαν δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Η Hsp70 δεν επάγεται στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης

Όπως έχουμε αναφέρει, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsps), και πιο συγκεκριμένα η Hsp70, επάγονται στα κύτταρα μετά από έκθεση τους σε διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα. Αρχικά, επιδιώξαμε να ανιχνεύσουμε εάν η Hsp70 επάγεται στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα, που αναγνωρίζει την επαγόμενη Hsp70 (Enzo Life Sciences - # SPA-810, κλώνος C92F3A-5).



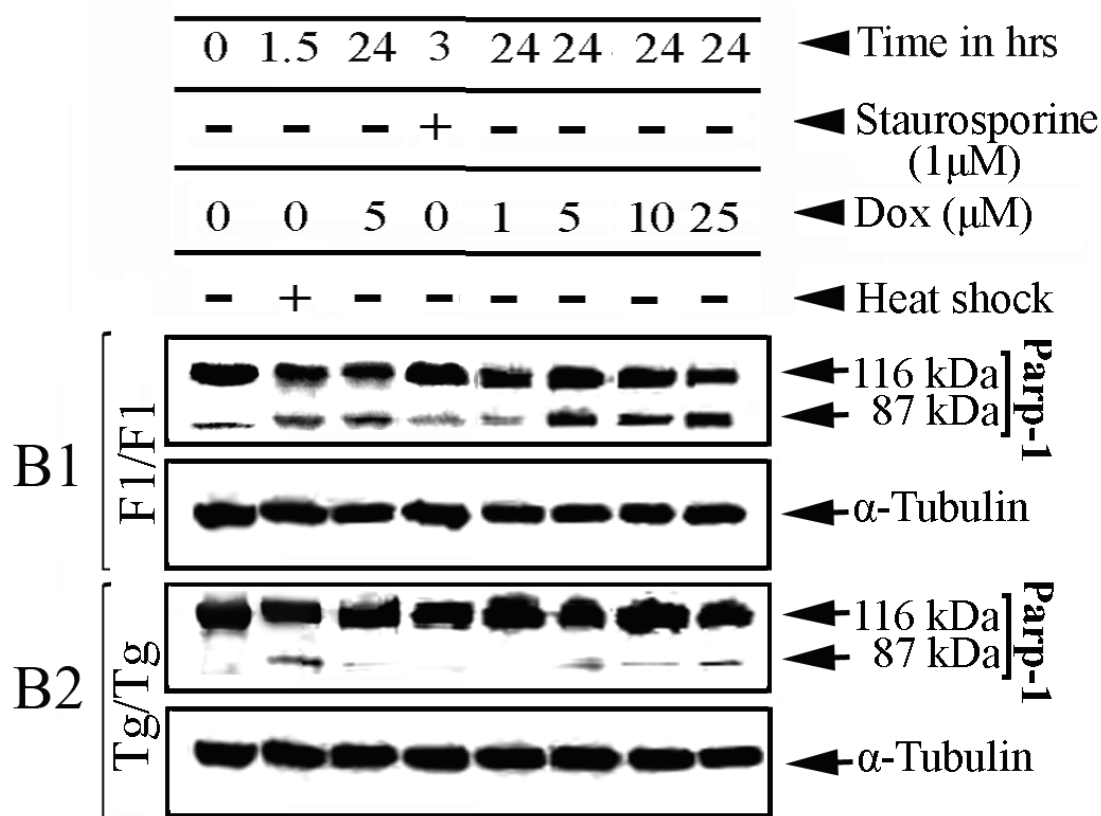
**Εικόνα 3.54:** Η Hsp70 δεν επάγεται μετά από επώαση των πρωτογενών εμβρυϊκών κυττάρων σε δοξορουβικίνη. Τα F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα εκτέθηκαν σε 1, 5, 10 και 25 μM DOX για 24 ώρες. Συγχρόνως, τα ίδια κύτταρα εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ (60 λεπτά στους 42.5°C και επαναφορά 90 λεπτά στους 37°C) ή σταυροσπορίνη (3 ώρες σε 1μM) για να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της έκφρασης της Hsp70 ή ως δείκτες της ενεργοποίησης της απόπτωσης. Δέκα μικρογραμμάρια από κάθε κυτταρικό κλάσμα αναλύθηκαν με Western blot με αντίσωμα ενάντια στην επαγόμενη Hsp70 (anti-Hsp70) (A1, A2). Η α-τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.54 (A1-A2), η επώαση των κυττάρων της έρευνας με δοξορουβικίνη δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την έκφραση της Hsp70 σε οιονδήποτε κυτταρικό τύπο. Μετά από έκθεση των κυττάρων στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (1-25 μM) για 24 ώρες, η Hsp70 δεν ανιχνεύτηκε στα αγρίου τύπου κύτταρα (F1/F1) (σε αντίθεση με την περίπτωση, που τα κύτταρα υπέστησαν θερμικό σοκ, όπου αυξάνεται σημαντικά η έκφραση της Hsp70), ενώ η έκφραση της παρέμεινε σχεδόν σταθερή στα Tg/Tg κύτταρα. Από τα αποτελέσματα μας αυτά, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη δράση της δοξορουβικίνης των Tg/Tg κυττάρων, που υπερεκφράζουν την Hsp70, σε σύγκριση με τα F1/F1 κύτταρα, οφείλεται αποκλειστικά στην Hsp70, που εκφράζεται ήδη στα κύτταρα αυτά, αφού δεν επάγεται σε μεγαλύτερο βαθμό μετά από τη βλάβη, που προκαλεί το φάρμακο στα κύτταρα.

Η Hsp70 προστατεύει τα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα από την απόπτωση, που προκαλείται από δοξορουβικίνη

Στη συνέχεια μελετήθηκε ο ρόλος της Hsp70 στην απόπτωση των κυττάρων, που προκαλείται από την έκθεση τους στις αντίστοιχες δόσεις δοξορουβικίνης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού ειδικό για τα αμινοξέα 764-1014 που βρίσκονται στο C-τελικό άκρο της PARP-1 (anti-PARP-1) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. , H-250, sc-7150).

Η PARP-1 είναι μια διατηρημένη πυρηνική μεταλλοπρωτεΐνη ψευδαργύρου, που συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA, την αντιγραφή του DNA, τη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης και την απόπτωση. Χρησιμοποιείται ως αποπτωτικός δείκτης, καθώς διασπάται, κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης της αποπτωτικής διαδικασίας ενός κυττάρου, από τα 116 kDa (ακέραια μορφή) σε 87 και 29 kDa πεπτίδια. Η διάσπαση αυτή της PARP-1 προκαλείται μετά από ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών (με συμμετοχή της εκτελεστικής ενεργοποιημένης κασπάσης 3). Το τμήμα των 87 kDa φαίνεται μετά από ανοσοαποτύπωση διότι περιέχει τον επίτοπο του αντισώματος για την PARP-1, ενώ το 29 kDa δεν την περιέχει αυτήν την περιοχή με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται.



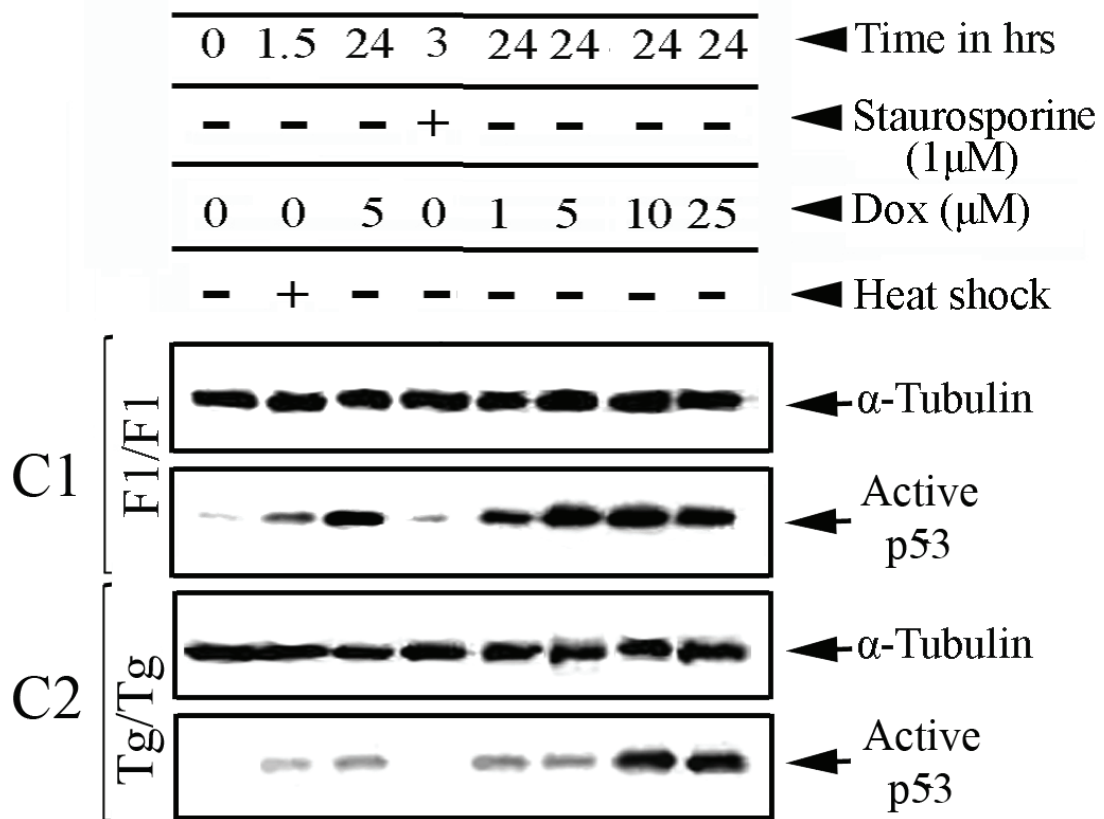
**Εικόνα 3.55:** Η Hsp70 έχει προστατευτική δράση ενάντια στην απόπτωση, που προκαλείται από δοξορουβικίνη, στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα. F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα εκτέθηκαν σε 1, 5, 10 και 25 μM DOX για 24 ώρες. Συγχρόνως, τα ίδια κύτταρα εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ (60 λεπτά στους 42.5°C και επαναφορά 90 λεπτά στους 37°C) ή σταυροσπορίνη (3 ώρες σε 1 μM) για να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της έκφρασης της Hsp70 ή ως δείκτες της ενεργοποίησης της απόπτωσης. Δέκα μικρογραμμάρια από κάθε κυτταρικό κλάσμα αναλύθηκαν με Western blot με αντίσωμα ενάντια στην Parp-1 (anti-Parp-1) (B1, B2). Η α-τουμουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Από τα αποτελέσματα μας, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.55, συγκρίνοντας τα επίπεδα διάσπασης της Parp-1 στις δύο κυτταρικές σειρές (F1/F1 και Tg/Tg), παρατηρούμε ότι η διάσπαση της Parp-1 (εμφάνιση της ζώνης των 87 kDa) πραγματοποιείται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό στα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα, σε σχέση με Tg/Tg κύτταρα, τα οποία υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70. Τα επίπεδα διάσπασης της Parp-1 δείχνουν να αυξάνονται με αύξηση της συγκεντρώσεως της δοξορουβικίνης και στις δύο κυτταρικές σειρές, με την αύξηση, όμως, αυτή να είναι πιο σημαντική στα F1/F1 κύτταρα. Από την εικόνα, φαίνεται ότι στα F1/F1 κύτταρα ξεκινάει η διάσπαση της Parp-1 από τις μικρές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για 24 ώρες μετά τη χορήγηση της. Αντίθετα, στα Tg/Tg κύτταρα η διάσπαση της PARP-1 εμποδίζεται, όταν τα κύτταρα εκφράζουν Hsp70, και παρατηρούμε ότι αυτή καθυστερεί, καθώς η ζώνη των 87 kDa εμφανίζεται σε μικρό βαθμό και μόνο στις μεγάλες συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Με τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύεται ο αντι-αποπτωτικός ρόλος της Hsp70 στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα μετά από επώαση τους με δοξορουβικίνη, αφού η Hsp70 εμφανίζεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση της βλάβης του DNA, που προκαλείται από τη DOX και ανιχνεύεται με την PARP-1.

#### Η Hsp70 προστατεύει τα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα από την επαγόμενη από τη δοξορουβικίνη απόπτωση μέσω αναστολής της φωσφορυλίωσης της p53

Εφόσον αποδείχθηκε ο προστατευτικός ρόλος της Hsp70 στα κύτταρα ενάντια στην απόπτωση, που προκαλείται από τη δράση της δοξορουβικίνης, κατόπιν προσδιορίσαμε βιοχημικά το αποπτωτικό μονοπάτι, με το οποίο η δοξορουβικίνη οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση και την εμπλοκή της πρωτεΐνης Hsp70 σε αυτό. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η χορήγηση δοξορουβικίνης επάγει την απόπτωση των κυττάρων μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού [814]. Επίσης, όπως έχει προαναφερθεί, η δοξορουβικίνη εισέρχεται στον πυρήνα, όπου και προκαλεί βλάβες στο DNA μέσω οξειδωτικού στρες. Η p53 είναι μια σημαντική πρωτεΐνη κατά την απόκριση σε βλάβες του DNA. Βιβλιογραφικά, πολυάριθμες μελέτες έδειξαν ότι η επαγόμενη από DOX απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων συσχετίζεται με αυξημένη έκφραση και ενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 [696-698]. Επίσης, έχει ήδη αποδειχθεί ότι η p53 φωσφορυλιώνεται σε πολλαπλές θέσεις *in vivo* και από διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες *in vitro* [818, 819]. Οι βλάβες του DNA επάγουν τη φωσφορυλίωση της p53 στη Ser15 και Ser20, οδηγώντας σε μειωμένη αλληλεπίδραση ανάμεσα στην p53 και τον αρνητικό ρυθμιστή της, την ογκοπρωτεΐνη MDM2 [820].

Έτσι, γνωρίζοντας ότι η φωσφορυλίωση της p53 αποτελεί αποπτωτικό σήμα [821], ανιχνεύθηκε και συγκρίθηκε η ποσότητα της φωσφορυλιωμένης p53 στις δύο κυτταρικές σειρές (F1/F1 και Tg/Tg) μετά από έκθεση τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για 24 ώρες. Χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-Phospho-p53 (Ser15) (Cell Signaling Technology -#9284), ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει την φωσφορυλιωμένη μορφή της p53 στην Ser15.



**Εικόνα 3.56:** Η Hsp70 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της p53 μέσω φωσφορυλίωσης αυτής κατά την αποπτωτική διαδικασία, που προκαλείται από χορήγηση δοξορουβικίνης στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα. F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα εκτέθηκαν σε 1, 5, 10 και 25 μM DOX για 24 ώρες. Συγχρόνως, τα ίδια κύτταρα εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ (60 λεπτά στους 42.5°C και επαναφορά 90 λεπτά στους 37°C) ή σταυροσπορίνη (3 ώρες σε 1μM) για να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της έκφρασης της Hsp70 ή ως δείκτες της ενεργοποίησης της απόπτωσης. Δέκα μικρογραμμάρια από κάθε κυτταρικό κλάσμα αναλύθηκαν με Western blot με αντίσωμα ενάντια στην Phospho-p53 (anti- Phospho-p53) (C1, C2). Η α-τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Στην εικόνα 3.56 φαίνεται η συσσώρευση της p53, που αποτελεί το πρώτο ενεργοποιούμενο μόριο κατά τη διάρκεια του επαγόμενου από δοξορουβικίνη αποπτωτικού μονοπατιού, όπου η p53 εμπλέκεται με τη φωσφορυλιωμένη της μορφή. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μια καθυστέρηση στην ενεργοποίηση της p53 μέσω της φωσφορυλίωσης της στα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα. Η ενεργοποίηση της p53 στα F1/F1 κύτταρα φαίνεται να πραγματοποιείται σε σημαντικό βαθμό από τις μικρές συγκεντρώσεις του φαρμάκου, ενώ στα Tg/Tg κύτταρα η συσσώρευση της φωσφορυλιωμένης p53 φαίνεται να αυξάνεται μόνο στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (10, 25 μM). Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης p53 (Ser15) είναι εμφανώς υψηλότερα στα F1/F1 κύτταρα σε σχέση με τα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήθηκαν, για 24 ώρες επώασης με το φάρμακο.

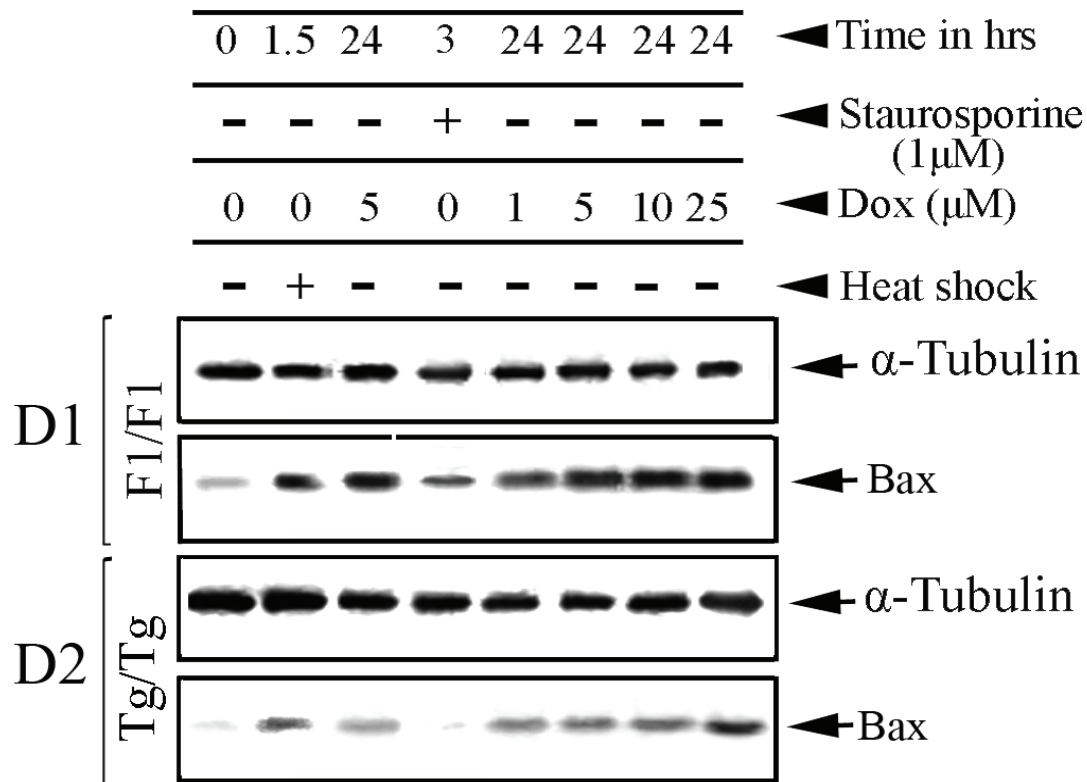
Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ενεργοποίηση της p53 αποτελεί την έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας, είναι εύλογο να υποθέσουμε, τελικά, ότι η Hsp70 προστατεύει τα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα από την επαγόμενη από τη

δοξορουβικίνη απόπτωση. Η φωσφορυλιωμένη μορφή της p53 οδηγεί σε κασπασοεξαρτώμενη απόπτωση. Η αυξημένη συσσώρευση της φωσφορυλιωμένης p53 έμμεσα δείχνει την προαγωγή του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού. Η αποτροπή της φωσφορυλίωσης της p53 από την Hsp70, αποτρέπει τελικά τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων.

Η Hsp70 ελέγχει το εσωτερικό μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι με μείωση της συσσώρευσης της Bax στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης.

Αφού παρατηρήθηκε η ενεργοποίηση της p53 από τη δοξορουβικίνη στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα, στη συνέχεια, ακολούθησε ο χαρακτηρισμός του αποπτωτικού μονοπατιού με μεγαλύτερη λεπτομέρεια. Η αυξημένη φωσφορυλίωση της p53 υπερρυθμίζει περαιτέρω καθοδικά της p53 γονίδια, μέλη της προ-αποπτωτικής Bcl-2 ομάδας γονιδίων, όπως η Bax.

Για να μελετήσουμε την πιθανή ενεργοποίηση της Bax από την p53 και εάν η πρωτεΐνη Hsp70 επηρεάζει την ενεργοποίηση της Bax, χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Bax(B-9): sc - 7480), το οποίο ανιχνεύει και τις δύο isoμορφές της Bax, Baxα και Baxβ. Η ζώνη της Bax ανιχνεύεται μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western στα 23 kDa περίπου.



**Εικόνα 3.57:** Η Hsp70 μειώνει τη συσσώρευση της Bax στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης. F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα εκτέθηκαν σε 1, 5, 10 και 25 μM DOX για 24 ώρες. Συγχρόνως, τα ίδια κύτταρα εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ (60 λεπτά στους 42.5°C και επαναφορά 90 λεπτά στους 37°C) ή σταυροσπορίνη (3 ώρες σε 1μM) για να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της έκφρασης της Hsp70 ή ως δείκτες της ενεργοποίησης της απόπτωσης. Δέκα μικρογραμμάρια από κάθε κυτταρικό κλάσμα αναλύθηκαν με Western blot με αντίσωμα ενάντια στην Bax (anti-Bax) (D1, D2). Η α-τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.57, παρατηρήθηκε ότι η ενεργοποίηση της Bax καθυστερεί στα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα. Η συσσώρευση της Bax στα F1/F1 κύτταρα φαίνεται να πραγματοποιείται σε σημαντικό βαθμό από τις μικρές συγκεντρώσεις της δοξορουβικίνης, ενώ στα Tg/Tg κύτταρα η συσσώρευση της Bax φαίνεται να αυξάνεται μόνο στη μεγάλη συγκέντρωση των 25μM DOX. Η αυξημένη έκφραση της Bax είναι εμφανώς μεγαλύτερη στα F1/F1 κύτταρα, σε σχέση με τα Tg/Tg κύτταρα, σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήθηκαν, για 24 ώρες επώασης με το φάρμακο.

Αποδεικνύεται, λοιπόν, ότι η δοξορουβικίνη φαίνεται να προκαλεί συσσώρευση της πρωτεΐνης Bax στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα. Από την ενεργοποίηση αυτή της Bax συμπεραίνεται ότι η δοξορουβικίνη οδηγεί τα κύτταρα στην αποπτωτική διαδικασία μέσω του εσωτερικού μιτοχονδριακού μονοπατιού. Η Hsp70 δείχνει να εμποδίζει τη συσσώρευση της Bax στα κύτταρα μετά τη χορήγηση του φαρμάκου.

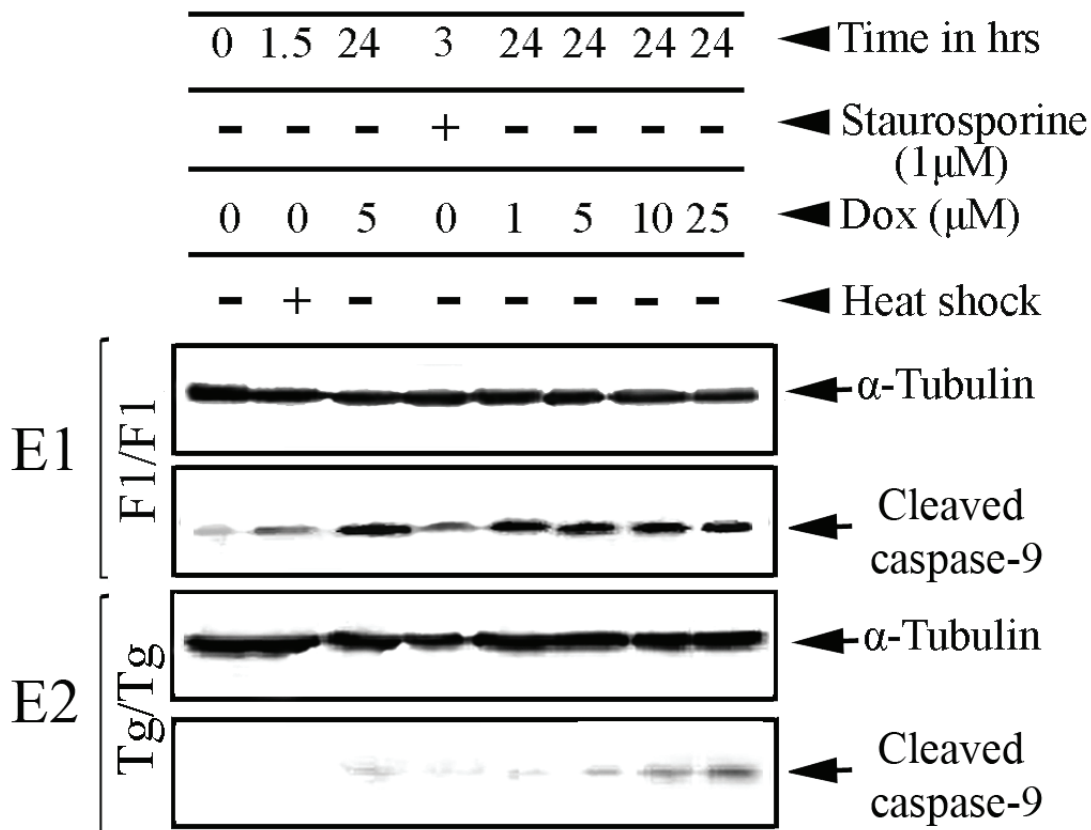
Η Hsp70 ελέγχει το κασπασο-εξαρτώμενο αποπτωτικό μονοπάτι με αναστολή της ενεργοποίησης της κασπάσης-9 στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης.

Μετά και την απόδειξη ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί την ενεργοποίηση του ενδογενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού στα κύτταρα, μέσω ενεργοποίησης των p53 και Bax, ακολουθήσαμε την εξέλιξη του αποπτωτικού μονοπατιού. Στο ενδογενές μονοπάτι, η ενεργοποίηση των κασπασών πραγματοποιείται ως συνέχεια της διάτρησης της μιτοχονδριακής μεμβράνης και της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, που ρυθμίζεται από την Bax. Έτσι, μελετήσαμε την ενεργοποίηση των κασπασών, γεγονός το οποίο, αφού συμβαίνει, σημαίνει την μη αναστρέψιμη πορεία των κυττάρων προς τον αποπτωτικό θάνατο. Αρχικά, ερευνήθηκε η ενεργοποίηση της κασπάσης-9 και η εμπλοκή της Hsp70 στην ενεργοποίησή της.

Η κασπάση-9 είναι ένα σημαντικό μέλος της οικογένειας των κυστεϊνικών πρωτεασών (κασπασών) και εμπλέκεται στην απόπτωση. Μετά από ένα αποπτωτικό ερέθισμα, το κυτόχρωμα c, που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, συνδέεται με την 47 kDa προκασπάση-9 και τον Araf-1, σχηματίζοντας το αποπτόσωμα. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο αυτό, μετατρέπει την προκασπάση-9 σε ένα μεγάλο ενεργό τμήμα (35kDa) και ένα μικρό τμήμα (10kDa) με αυτό-διάσπαση (σχάση) στο Asp315 [403, 822, 823]. Η διασπασμένη κασπάση-9 (cleaved caspase-9), στη συνέχεια, ενεργοποιεί άλλα μέλη των κασπασών, που περιλαμβάνουν τις κασπάσες-3 και -7, εκκινώντας τον καταρράκτη κασπασών, που οδηγεί στην απόπτωση [387, 824-826].

Για τη μελέτη της ενεργοποίησης της κασπάσης-9 στα κύτταρα μας μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-Cleaved Caspase-9 (Asp353) (Cell Signalling Technology - #9509). Το αντίσωμα αυτό ανιχνεύει τα ενδογενή επίπεδα του ενεργού τμήματος της κασπάσης-9, που εμφανίζεται σε ζώνη των 37 kDa περίπου μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western, μόνο μετά από διάσπαση (σχάση) στο Asp353.





**Εικόνα 3.58:** Η Hsp70 ελέγχει την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης. F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα εκτέθηκαν σε 1, 5, 10 και 25 μM DOX για 24 ώρες. Συγχρόνως, τα ίδια κύτταρα εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ (60 λεπτά στους 42.5°C και επαναφορά 90 λεπτά στους 37°C) ή σταυροσπορίνη (3 ώρες σε 1μM) για να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της έκφρασης της Hsp70 ή ως δείκτες της ενεργοποίησης της απόπτωσης. Δέκα μικρογραμμάρια από κάθε κυτταρικό κλάσμα αναλύθηκαν με Western blot με αντίσωμα ενάντια στην ενεργή κασπάση-9 (anti- Cleaved Caspase-9) (E1, E2). Η α-τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Γνωρίζουμε βιβλιογραφικά ότι η χορήγηση δοξορουβικίνης ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κασπασών [646, 698, 815]. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε αρχικά εάν η παρουσία της Hsp70 ελέγχει με κάποιο τρόπο την ενεργοποίηση του καταρράκτη. Χρησιμοποιώντας τα εκχυλίσματα από τις δύο κυτταρικές σειρές μετά από επώαση τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για 24 ώρες, ελέγξαμε μέσω ανοσοαποτύπωσης την ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Από την εικόνα 3.58 φαίνεται ότι στα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, δεν ενεργοποιείται σε σημαντικό βαθμό η κασπάση-9, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα, όπου η διασπασμένη κασπάση-9 εμφανίζεται από τις μικρές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-9 στα F1/F1 κύτταρα φαίνεται να πραγματοποιείται σε σημαντικό βαθμό από τις μικρές συγκεντρώσεις του φαρμάκου, ενώ στα Tg/Tg κύτταρα η κασπάση-9 ενεργοποιείται μόνο στις μεγάλες συγκεντρώσεις και σε μικρό βαθμό. Η αυξημένη ενεργοποίηση της κασπάσης-9 στα F1/F1 κύτταρα, σε σχέση με τα Tg/Tg κύτταρα, είναι έκδηλη σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήθηκαν, για 24 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη.

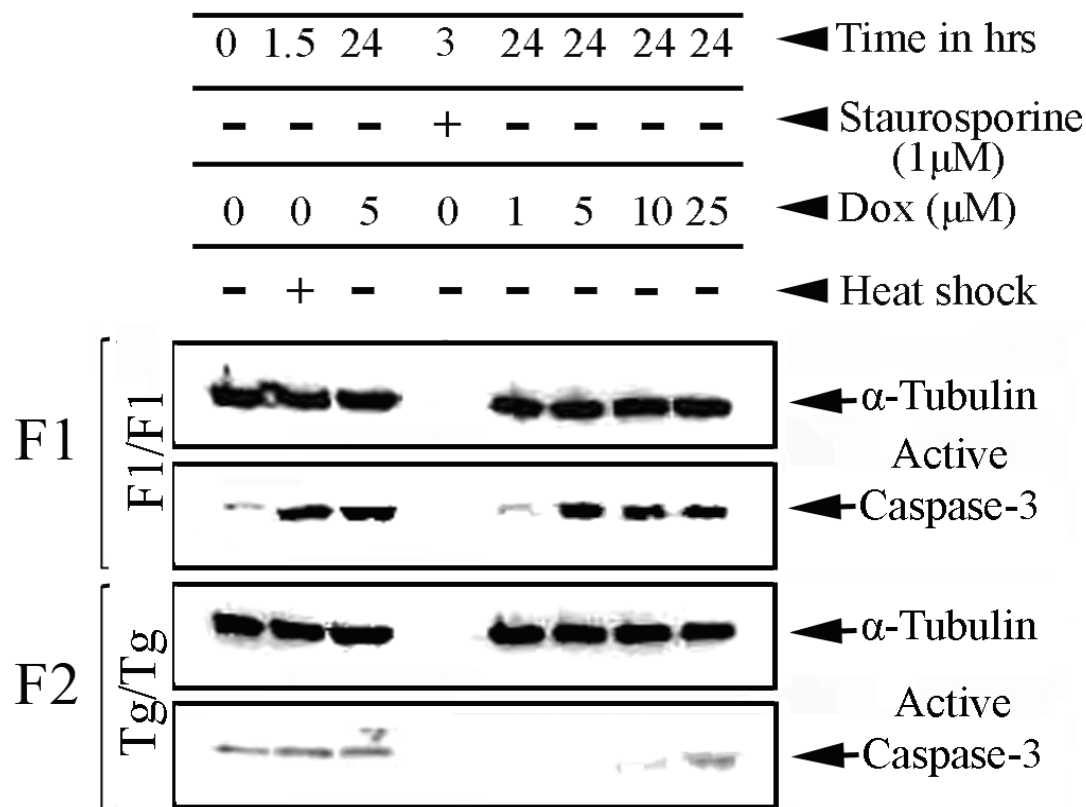
Επομένως, αποδεικνύεται ότι η δοξορουβικίνη φαίνεται να προκαλεί ενεργοποίηση της κασπάσης-9 στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα. Από αυτό προκύπτει ότι η δοξορουβικίνη επάγει στα κύτταρα το κασπασο-εξαρτώμενο αποπτωτικό μονοπάτι, με ενεργοποίηση των εναρκτήριων κασπασών, όπως η κασπάση-9. Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη κασπάση-9, θα πρέπει να ενεργοποιεί άλλα μέλη των κασπασών, που περιλαμβάνουν τις εκτελεστικές κασπάσες-3 και -7, εκκινώντας τον καταρράκτη κασπασών, που οδηγεί στην ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας. Η παρατήρηση ότι στα Tg/Tg κύτταρα, τα επίπεδα της διασπασμένης κασπάσης-9, είναι μειωμένα έως ελάχιστα (στις μικρές συγκεντρώσεις DOX), μας υποδεικνύει ότι η Hsp70 ελέγχει την απόπτωση των κυττάρων στο στάδιο των κασπασών, αποτρέποντας την ενεργοποίηση των εναρκτήριων κασπασών, όπως η κασπάση-9.

Η Hsp70 ελέγχει το κασπασο-εξαρτώμενο αποπτωτικό μονοπάτι με αναστολή της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης.

Αφού παρατηρήσαμε ότι η δοξορουβικίνη ενεργοποιεί την εναρκτήρια κασπάση-9, στη συνέχεια ερευνήσαμε αν ενεργοποιείται ο καταρράκτης κασπασών, με ενεργοποίηση των κασπασών τελεστών (κασπάση-3 και -7), καθώς και την πιθανή συμμετοχή της Hsp70 στα τελικά στάδια της απόπτωσης. Η φάση της εκτέλεσης θεωρείται το τελικό μονοπάτι της απόπτωσης. Έτσι, ερευνήθηκε η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και η εμπλοκή της Hsp70 στην ενεργοποίηση της.

Η κασπάση-3 ανήκει στην οικογένεια των πρωτεασών κυστεΐνης και διαδραματίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο στην απόπτωση. Συντίθεται ως ένα ανενεργό προ-ένζυμο, το οποίο υφίσταται αυτο-πρωτεόλυση και/ή διάσπαση από άλλες κασπάσες (κασπάση 8, 9 και 10) ανοδικά του αποπτωτικού μονοπατιού στα κύτταρα που αποίπτουν. Η διασπασμένη μορφή της κασπάσης-3 αποτελείται από μια μεγάλη (17-22 kDa) και μια μικρή (12 kDa) υπομονάδα. Οι δύο αυτές υπομονάδες συνδέονται για να σχηματίσουν το ενεργό ένζυμο. Η ενεργή κασπάση-3 αποτελεί δείκτη για τα κύτταρα, που υφίστανται απόπτωση, και αποτελείται από ένα ετεροδιμερές με υπομονάδες των 17 kDa και 12 kDa, που προέρχεται από το 32 kDa προένζυμο. Η ενεργός κασπάση-3 με τη σειρά της διασπά πρωτεολυτικά άλλες κασπάσες, καθώς και άλλα μόρια στα κύτταρα, όπως η PARP-1.

Για τη μελέτη της ενεργοποίησης της κασπάσης-3, μετά από επώαση των κυττάρων μας με δοξορουβικίνη, χρησιμοποιήσαμε το πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την ενεργό μορφή της κασπάσης-3 (BD Pharmingen - #559565, κλώνος C92-605). Το αντίσωμα αυτό έχει αναφερθεί να αναγνωρίζει ειδικά την ενεργή μορφή της κασπάσης-3, αλλά δεν αναγνωρίζει τη μορφή του προενζύμου της κασπάσης-3. Η ενεργή μορφή της κασπάσης-3 εμφανίζεται με τη χαρακτηριστική ζώνη στα 19 kDa περίπου σε ανοσοαποτύπωση κατά Western.



**Εικόνα 3.59:** Η Hsp70 ελέγχει την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης. F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα εκτέθηκαν σε 1, 5, 10 και 25 μM DOX για 24 ώρες. Συγχρόνως, τα ίδια κύτταρα εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ (60 λεπτά στους 42.5°C και επαναφορά 90 λεπτά στους 37°C) ή σταυροσπορίνη (3 ώρες σε 1μM) για να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της έκφρασης της Hsp70 ή ως δείκτες της ενεργοποίησης της απόπτωσης. Δέκα μικρογραμμάρια από κάθε κυτταρικό κλάσμα αναλύθηκαν με Western blot με αντίσωμα ενάντια στην ενεργή κασπάση-3 (anti- Active Caspase-3) (F1, F2). Η α-τουμποουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Από την εικόνα 3.59 φαίνεται ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Μετά την έκθεση των δύο κυτταρικών σειρών (F1/F1 και Tg/Tg) στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για 24 ώρες, παρατηρήσαμε την ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Από την εικόνα 3 φαίνεται ότι στα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, δεν ενεργοποιείται η κασπάση-3, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα, όπου η ενεργή κασπάση-3 εμφανίζεται από τις μικρές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 στα F1/F1 κύτταρα φαίνεται να πραγματοποιείται σε σημαντικό βαθμό από τις μικρές συγκεντρώσεις του φαρμάκου, και κυρίως από τη συγκέντρωση των 5μM DOX, ενώ στα Tg/Tg κύτταρα η κασπάση-3 δεν δείχνει να ενεργοποιείται, παρά μόνο στη μεγάλη συγκέντρωση των 25μM DOX και σε ελάχιστο βαθμό. Η αυξημένη ενεργοποίηση της κασπάσης-3 στα F1/F1 κύτταρα, σε σχέση με τα Tg/Tg κύτταρα, είναι ιδιαίτερα εμφανής σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήσαμε, για 24 ώρες μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου.

Από τα αποτελέσματα μας αυτά, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η δοξορουβικίνη επάγει στα κύτταρα το κασπασο-εξαρτώμενο αποπτωτικό μονοπάτι, όπου ενεργοποιείται και η εκτελεστική κασπάση-3. Η παρατήρηση ότι στα Tg/Tg κύτταρα, τα επίπεδα της ενεργής κασπάσης-3, είναι μηδαμινά έως ελάχιστα (στη

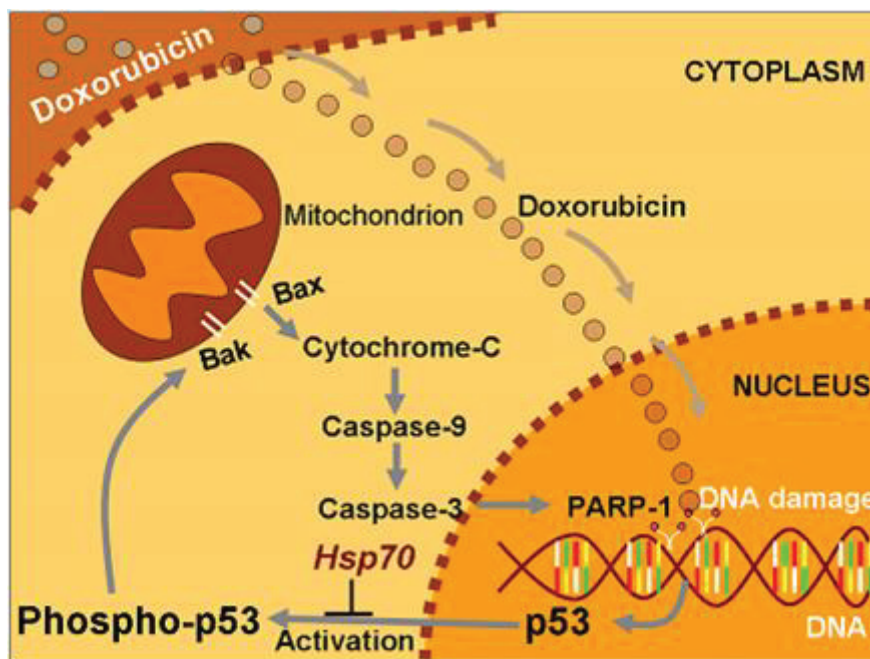
μεγάλη συγκέντρωση DOX), ενώ στα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα η κασπάση-3 ενεργοποιείται από τις πιο μικρές συγκεντρώσεις DOX, μας υποδεικνύει ότι η Hsp70 ελέγχει την αποπτωτικότητα των κυττάρων στα τελικά στάδια της απόπτωσης, αποτρέποντας την ενεργοποίηση των τελεστικών κασπασών, όπως η κασπάση-3.

Αφού ενεργοποιηθούν και οι εκτελεστικές κασπάσες, όπως η κασπάση-3, τα κύτταρα βαίνουν προς την ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας. Η ενεργή κασπάση-3, στη συνέχεια, προκαλεί επιπλέον γεγονότα ενεργοποίησης κασπασών, τα οποία κορυφώνονται με την πρωτεόλυση των υποστρωμάτων τους και τον κυτταρικό θάνατο με όλα τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, που παρατηρούνται [369].

Συμπερασματικά, λοιπόν, η παρουσία της Hsp70 αναστέλλει μερικώς την ενεργοποίηση και περαιτέρω προαγωγή του p53-αποπτωτικού μονοπατιού. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η δοξορουβικίνη, προκαλώντας βλάβη στο DNA των κυττάρων, ενεργοποιεί το μιτοχondριακό αποπτωτικό μονοπάτι, που περνάει μέσω των p-53, Bax, κασπάση-9 και κασπάση-3. Η Hsp70 εμφανίζεται να αναστέλλει την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μονοπατιού και η δράση της εντοπίζεται ανοδικά της ενεργοποίησης της p53.

#### Προτεινόμενο μοντέλο:

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, μπορούμε να καταλήξουμε στο ακόλουθο προκαταρκτικό μοντέλο σχετικά με τη δράση της Hsp70 στην επαγόμενη από δοξορουβικίνη απόπτωση των πρωτογενών εμβρυϊκών κυττάρων (Εικόνα 3.60).



**Εικόνα 3.60:** Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης του προστατευτικού ρόλου της Hsp70 σε πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης. Η δοξορουβικίνη εισέρχεται στον πυρήνα, όπου και προκαλεί βλάβες στο DNA μέσω οξειδωτικού στρες. Λόγω του στρες αυτού, η p53 φωσφορυλιώνεται και εξέρχεται του πυρήνα, σηματοδοτώντας την έναρξη του μιτοχondριακού αποπτωτικού μονοπατιού, μέσω ενεργοποίησης της Bax. Ακολούθως, ενεργοποιείται ο καταρράκτης των κασπασών και τα κύτταρα αποπύπτουν. Η παρουσία της Hsp70 δρα στο μονοπάτι αυτό, επηρεάζοντας τη φωσφορυλίωση της p53, προστατεύοντας τελικά τα κύτταρα από την απόπτωση.

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό η δοξορουβικίνη εισέρχεται στον πυρήνα και προσκολλάται στο DNA, στο οποίο και προκαλεί βλάβες με άμεση σύνδεση ή μέσω ROS από το οξειδωτικό στρες. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική απόκριση σε βλάβες στο DNA. Η ενεργοποίηση της p53 μπορεί να οδηγήσει είτε σε πάγωμα/παύση του κυτταρικού κύκλου και επιδιόρθωση του DNA ή σε απόπτωση, όταν οι βλάβες είναι μη αναστρέψιμες. Σε αρχικό στάδιο, το στρεσογόνο ερέθισμα, αναστέλλει το μεταγραφικό ρόλο της p53, η οποία προσδένεται πιθανά στην MDM2 και εξέρχεται από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα. Εξαιτίας του στρες, η p53 φωσφορυλιώνεται και σταθεροποιείται, πηγαίνει πιθανά στο μιτοχόνδριο, ενεργοποιεί το μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι και οδηγεί το κύτταρο στην απόπτωση. Η πρωτεΐνη MDM2 αναστέλλει τη συσσώρευση της p53, στοχεύοντας την για ουβικιτινίωση και πρωτεοσωμική αποικοδόμηση. Η φωσφορυλίωση, όμως, εξασθενεί την ικανότητα της MDM2 να συνδέεται στην p53, προάγοντας τόσο τη συσσώρευση όσο και την ενεργοποίηση της p53 σε απόκριση στη βλάβη του DNA.

Η φωσφορυλίωση της p53 αποτελεί αποπτωτικό σήμα για την προαγωγή του ενδογενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης. Η αυξημένη φωσφορυλίωση της p53, στη συνέχεια, υπερρυθμίζει περαιτέρω καθοδικά της p53 γονίδια, όπως μέλη της προ-αποπτωτικής Bcl-2 ομάδας γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης και της Bax. Η ενεργοποίηση της p53 μπορεί άμεσα να επάγει την ενεργοποίηση της Bax με αλλαγές στη διαμόρφωση της, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μετατόπιση της Bax από το κυτοσόλιο στα μιτοχόνδρια, ως επακόλουθο του αποπτωτικού ερεθίσματος. Η μετακίνηση αυτή οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bak ολιγομερίζονται, σχηματίζοντας πόρους εντός της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Οι πόροι διακόπτουν τη συνοχή της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και οδηγούν στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Το κυτόχρωμα c, αφού απελευθερωθεί από τα μιτοχόνδρια, συνδέεται με την προκασπάση-9 και τον Araf-1, σχηματίζοντας το αποπτώσωμα. Με τον τρόπο αυτό ενεργοποιείται η εναρκτήρια κασπάση-9, η οποία, με τη σειρά της, λειτουργεί ως υπόστρωμα για την ενεργοποίηση άλλων μελών των κασπασών, που περιλαμβάνουν τις εκτελεστικές κασπάσες-3 και -7, εκκινώντας τον καταρράκτη κασπασών, που οδηγεί στην απόπτωση. Αφού ενεργοποιηθούν και οι εκτελεστικές κασπάσες, όπως η κασπάση-3, τα κύτταρα βγαίνουν προς την ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας. Η ενεργή κασπάση-3, στη συνέχεια, προκαλεί επιπλέον γεγονότα ενεργοποίησης κασπασών, τα οποία κορυφώνονται με την πρωτεόλυση των υποστρωμάτων τους και τον κυτταρικό θάνατο με όλα τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, που παρατηρούνται συνήθως.

Η παρουσία της Hsp70, βάσει των παρατηρήσεών μας, επιδρά σε αρχικό στάδιο του αποπτωτικού μηχανισμού, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης της p53 και αποτρέποντας την έξοδό της από τον πυρήνα, οπότε αυτή δρα φυσιολογικά ως σήμα έναρξης της μεταγραφής. Με τον τρόπο αυτό, το κύτταρο δεν ωθείται προς την απόπτωση, αφού δεν ενεργοποιείται το εσωτερικό μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι. Το σημείο ακριβώς της δράσης της Hsp70 στο στάδιο αυτό, μένει ακόμη να ταυτοποιηθεί. Η παρεμπόδιση στη φωσφορυλίωση της p53 από την Hsp70, οδηγεί σε αναστολή της ενεργοποίησης της Bax, και κατά επέκταση, της ενεργοποίησης των κασπασών -9 και -3, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να μην ωθούνται σε απόπτωση.

Με βάση τα παραπάνω, γίνεται φανερό ότι η Hsp70 προστατεύει τα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα από την απόπτωση, μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης, μέσω του ελέγχου φωσφορυλίωσης της p53.

### **3.8. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων**

#### **3.8.1. Μέτρηση της δραστηριότητας της SOD**

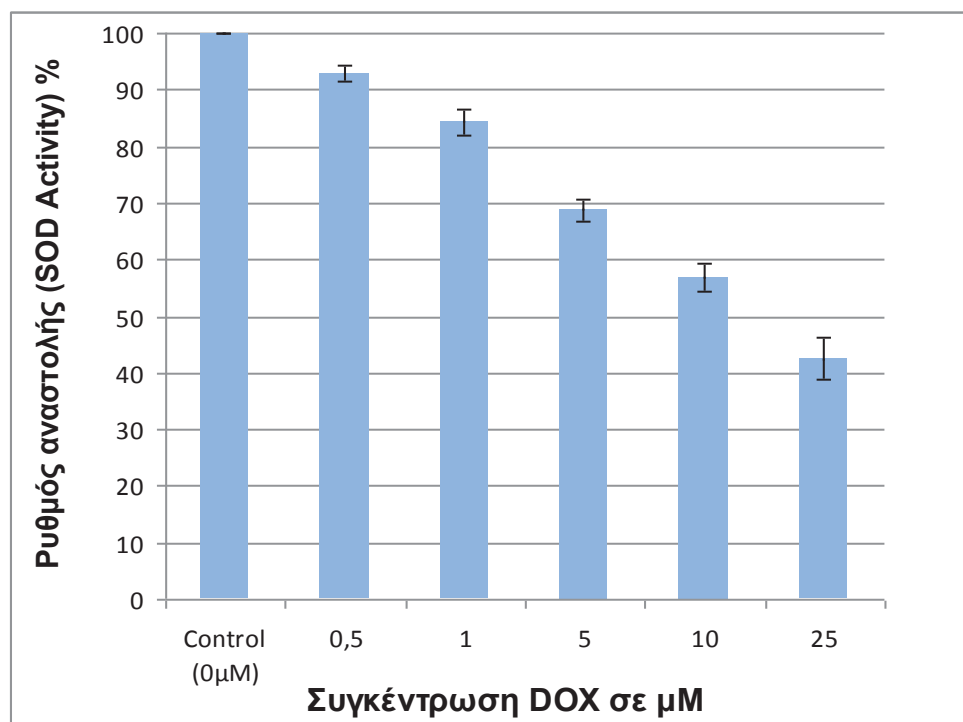
Εφόσον είναι γνωστό ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί οξειδωτικό στρες στα κύτταρα, προσδιορίσαμε το ποσοστό δραστηριότητας ενός αντιοξειδωτικού ενζύμου, της SOD, στις δύο κυτταρικές σειρές, μετά από επώαση τους με την δοξορουβικίνη. Για τη μέτρηση της δραστηριότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης χρησιμοποιήθηκε το Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit (Biovision - #K335-100). Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα και καταλύει την αναγωγή του ανιόντος του υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και σε μοριακό οξυγόνο. Κατά τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται η WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt), που παράγει μια υδατοδιαλυτή χρώση φορμαζάνης, καθώς ανάγεται από ένα ανιόν υπεροξειδίου. Ο ρυθμός αναγωγής με ένα ανιόν υπεροξειδίου είναι γραμμικά σχετικός με τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης (XO), η οποία αναστέλλεται από την υπεροξειδική δισμουτάση. Συνεπώς, η αναστολή της δραστηριότητας της SOD μπορεί να μετρηθεί μέσω μιας χρωματομετρικής μεθόδου.

Αρχικά, στις δύο κυτταρικές σειρές (F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα) προστέθηκαν τα διαλύματα με τις διάφορες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (0, 0.5, 1, 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$ ) και τα κύτταρα αφέθηκαν για επώαση για 24 και 48 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση των βημάτων της πειραματικής διαδικασίας (όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.14.1) τόσο για τα δείγματα μας όσο και για τα δείγματα αναφοράς (blanks), πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm σε φασματοφωτόμετρο. Από τις μετρήσεις μας αυτές, πραγματοποιήσαμε τους υπολογισμούς της εκατοστιαίας αναστολής του υποστρώματος λόγω της δραστηριότητας της SOD.

Αφού υπολογίσαμε τη δραστηριότητα της SOD (ρυθμός αναστολής του υποστρώματος %), κατασκευάσαμε τα γραφήματα με τα ποσοστά της δραστηριότητας της SOD για τις δύο κυτταρικές σειρές (F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα) στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και για τους δύο χρόνους επώασης των 24 και 48 ωρών με το φάρμακο. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις υπό τις ίδιες συνθήκες κατά την πειραματική διαδικασία. Τα ποσοστά, που αντιστοιχούν στις διάφορες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, υπολογίστηκαν ως προς το επί τοις % της δραστηριότητας της SOD των κυττάρων ελέγχου (χωρίς προσθήκη του φαρμάκου στο δείγμα μας) για το ίδιο χρονικό διάστημα επώασης με δοξορουβικίνη.

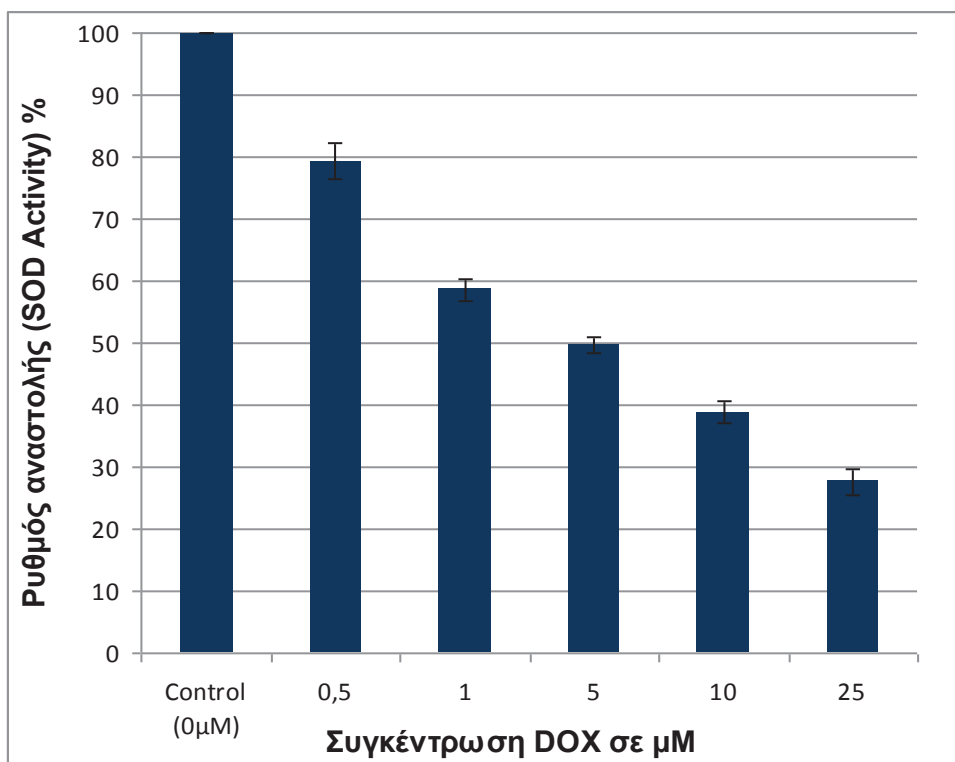
Αρχικά, υπολογίστηκε το ποσοστό αναστολής του υποστρώματος λόγω της δραστηριότητας της SOD στα F1/F1 κύτταρα ελέγχου μετά από χορήγηση διαφόρων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης και για χρόνο έκθεσης 24 ωρών. Από τις μετρήσεις αυτές (Εικόνα 3.61), παρατηρήθηκε μια μείωση της δραστηριότητας της SOD σε

σχέση με τα κύτταρα, στα οποία δεν χορηγήθηκε δοξορουβικίνη στο μέσο επώασης (control), και η μείωση αυτή εμφανίζεται σταδιακά μεγαλύτερη με την αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου. Η δραστηριότητα της SOD φαίνεται να διατηρείται σε ικανοποιητικά επίπεδα στις μικρές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, ενώ φαίνεται να μειώνεται στο 50% περίπου μετά τη συγκέντρωση DOX των 10  $\mu\text{M}$  ύστερα από 24 ώρες επώασης των F1/F1 κυττάρων με το φάρμακο.

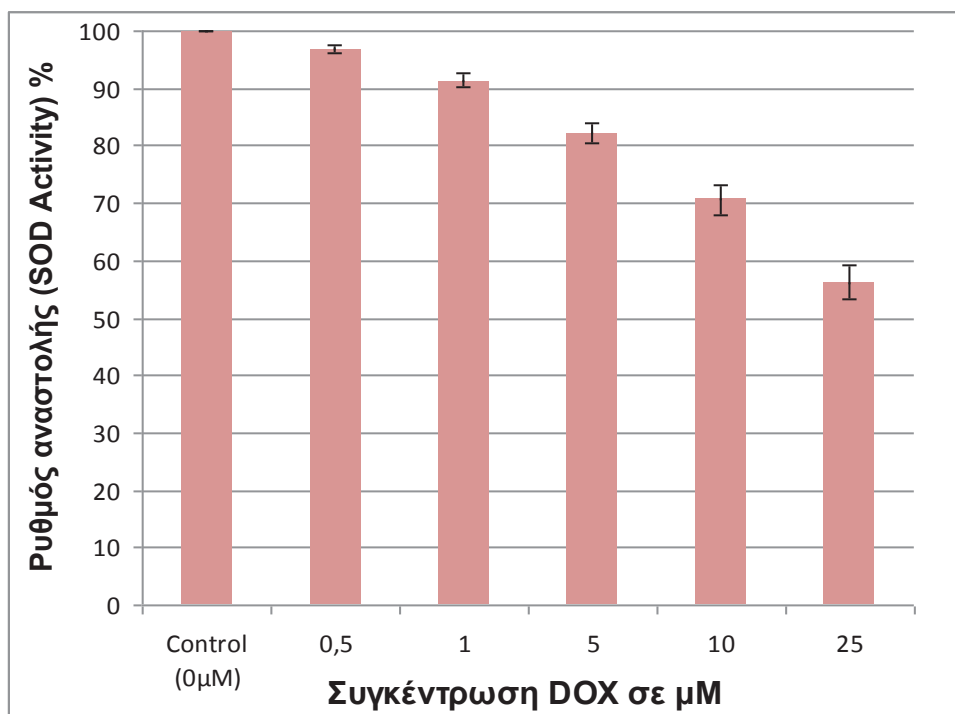


**Εικόνα 3.61:** Γραφική απεικόνιση του ποσοστού της δραστηριότητας της SOD (ποσοστό αναστολής της WST-1) των F1/F1 κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1, 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$ ) για 24 ώρες.

Σταδιακή μείωση του εκατοστιαίου ποσοστού της δραστηριότητας της SOD παρατηρήθηκε και μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε κύτταρα F1/F1 για χρονικό διάστημα 48 ωρών, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.62. Η παρατηρούμενη μείωση της αναστολής του υποστρώματος, λόγω της δράσης της SOD, στο 50% για 48 ώρες έκθεσης, λαμβάνει χώρα στη συγκέντρωση περίπου των 5  $\mu\text{M}$  DOX. Η δραστηριότητα της SOD στα F1/F1 κύτταρα για 48 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη, δείχνει να μειώνεται απότομα από τις μικρές συγκεντρώσεις DOX (1 $\mu\text{M}$ ), ενώ η δράση της SOD στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις DOX εμφανίζεται σε χαμηλά επίπεδα, με το ποσοστό να εμφανίζεται λίγο πάνω από το 20% στη συγκέντρωση των 25 $\mu\text{M}$  DOX.



**Εικόνα 3.62:** Γραφική απεικόνιση του ποσοστού της δραστηριότητας της SOD (ποσοστό αναστολής της WST-1) των F1/F1 κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1, 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$ ) για 48 ώρες.

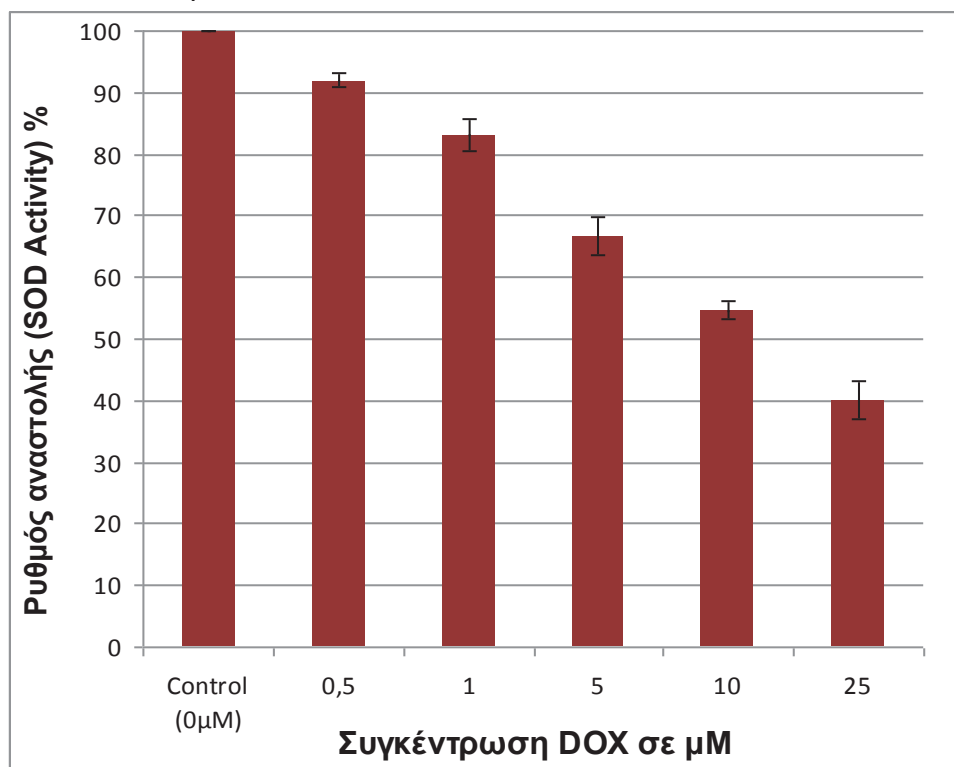


**Εικόνα 3.63:** Γραφική απεικόνιση του ποσοστού της δραστηριότητας της SOD (ποσοστό αναστολής της WST-1) των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1, 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$ ) για 24 ώρες.



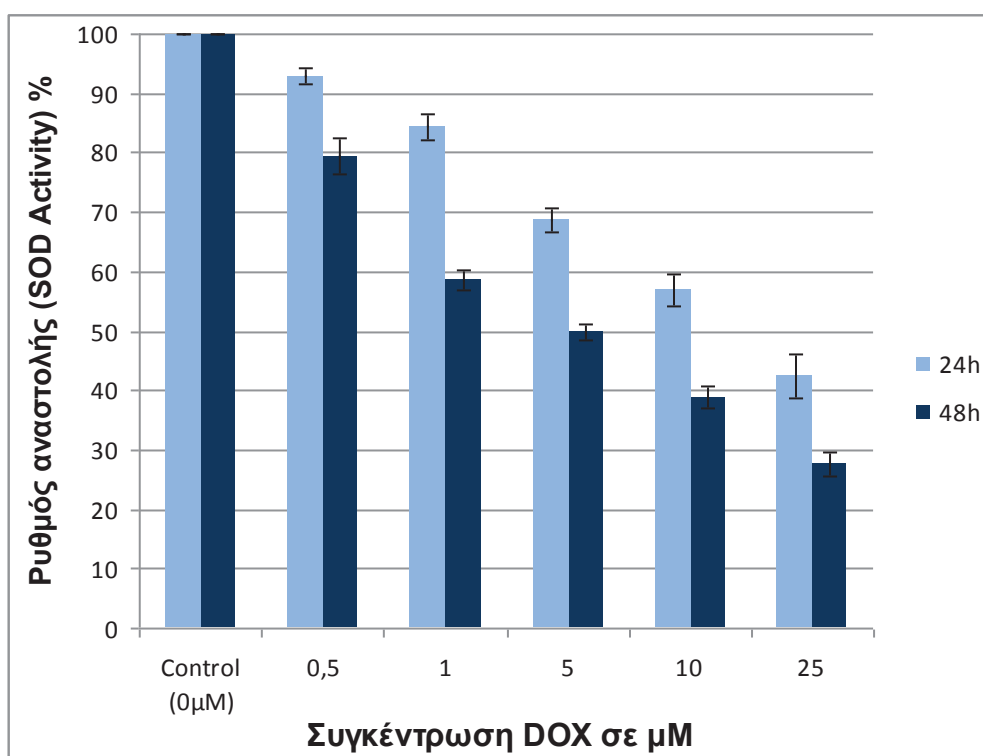
Στη συνέχεια, κατά την επώαση των κυττάρων Tg/Tg, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για 24 ώρες, παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα της SOD. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.63, και στα Tg/Tg κύτταρα, φαίνεται μια σταδιακή μείωση της αναστολής του υποστρώματος, λόγω της δράσης της SOD, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του φαρμάκου. Τα Tg/Tg κύτταρα φαίνεται να παρουσιάζουν μια καθυστέρηση στη μείωση των ποσοστών της SOD δραστηριότητας, τα οποία παραμένουν σε αρκετά υψηλά επίπεδα (πάνω από 80%) ακόμα και μετά τη συγκέντρωση των 5μM DOX. Η μείωση αυτή του ποσοστού της δραστηριότητας της SOD δεν εμφανίζεται να είναι έντονη, ακόμα και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, αφού, ακόμα, και στη συγκέντρωση των 25 μM, το ποσοστό της δραστηριότητας της SOD παραμένει σε επίπεδα πάνω από 50%.

Κατόπιν, παρατίθεται το γράφημα, που απεικονίζει τα ποσοστά της δραστηριότητας της SOD των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση των αντίστοιχων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης για 48 ώρες. Όταν τα Tg/Tg κύτταρα επώασθηκαν στο χρόνο των 48 ωρών, παρατηρήθηκε ανάλογη σταδιακή μείωση στα ποσοστά της δραστηριότητας της SOD με αύξηση της συγκέντρωσης της δοξορουβικίνης (Εικόνα 3.64). Απότομη μείωση των ποσοστών της δραστηριότητας της SOD, στην περίπτωση των Tg/Tg κυττάρων για 48 ώρες επώασης με το φάρμακο, εμφανίζεται μετά τη συγκέντρωση των 5μM DOX, ενώ στις μικρότερες συγκεντρώσεις διατηρείται σε ικανοποιητικά επίπεδα. Μείωση του ποσοστού της δράσης της SOD στο 50% παρατηρείται μετά τη συγκέντρωση των 10μM δοξορουβικίνης. Είναι, πάντως, εμφανές από το γράφημα μας, ότι παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα της SOD στα Tg/Tg κύτταρα, ακόμα και για τις μεγάλες συγκεντρώσεις DOX, πράγμα το οποίο τα καθιστά πιο ανθεκτικά στο οξειδωτικό στρες, που προκαλεί το φάρμακο στα κύτταρα.



**Εικόνα 3.64:** Γραφική απεικόνιση του ποσοστού της δραστηριότητας της SOD (ποσοστό αναστολής της WST-1) των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1, 5, 10 και 25 μM) για 48 ώρες.

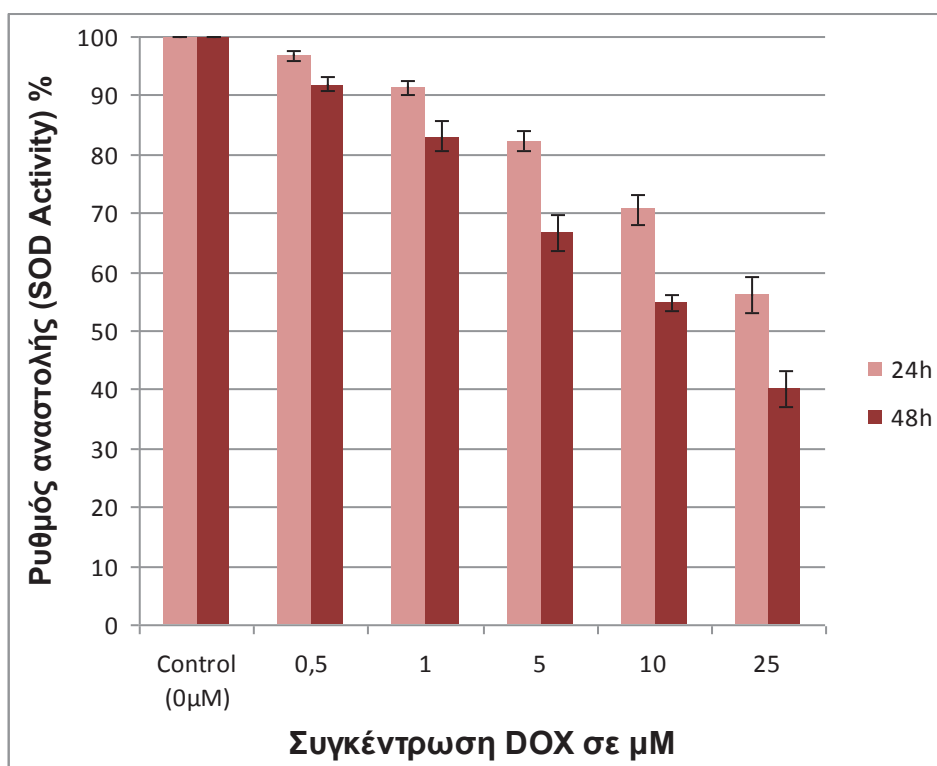
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των ποσοστών δραστηριότητας της SOD των F1/F1 κυττάρων στις δύο χρονικές διάρκειες, των 24 και 48 ωρών, επώασης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (Εικόνα 3.65). Στο γράφημα αυτό παρατηρείται η σταδιακή μείωση των ποσοστών δραστηριότητας της SOD των F1/F1 κυττάρων, με αύξηση της συγκέντρωσης της δοξορουβικίνης και του χρόνου επώασης των κυττάρων με το φάρμακο. Με βάση τα αποτελέσματα μας, η σύγκριση των ποσοστών αυτών ανάμεσα στους δύο χρόνους από τη χορήγηση του φαρμάκου, δείχνει ότι η αναστολή του υποστρώματος λόγω της δράσης της SOD είναι αρκετά μειωμένη στις 48 ώρες σε σχέση με τις 24 ώρες. Η διαφορά αυτή στη μείωση των ποσοστών της δραστηριότητας της SOD είναι ιδιαίτερα εμφανής σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήθηκαν. Το ποσοστό της δραστηριότητας του ενζύμου φαίνεται να μειώνεται στο 50% μετά τη συγκέντρωση των 10μM DOX στις 24 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη, ενώ στις 48 ώρες το ποσοστό αυτό εμφανίζεται να πέφτει στο 50%, νωρίτερα, από τη συγκέντρωση των 5μM DOX. Τα αποτελέσματα μας, μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), ως προς τη σύγκριση των ποσοστών της δραστηριότητας της SOD ανάμεσα στους δύο χρόνους επώασης για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης στα F1/F1 κύτταρα, είναι στατιστικά σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις επώασης στο φάρμακο ( $p < 0,004$  για όλες τις συγκεντρώσεις DOX).



**Εικόνα 3.65:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών δραστηριότητας της SOD (ποσοστό αναστολής της WST-1) των F1/F1 κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p < 0,004$ ).

Κατά τη σύγχρονη απεικόνιση των ποσοστών δραστηριότητας της SOD των Tg/Tg κυττάρων, που υπερεκφράζουν την Hsp70, για τους δύο χρόνους έκθεσης (Εικόνα 3.66), προκύπτει το συμπέρασμα ότι, όπως και στα F1/F1 κύτταρα, η αναστολή του υποστρώματος λόγω της δράσης της SOD είναι μειωμένη στις 48 ώρες επώασης σε σύγκριση με αυτή στις 24 για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης,

που χρησιμοποιήθηκαν. Επίσης, συμπεραίνεται η σταδιακή μείωση των ποσοστών δραστηριότητας της SOD στα Tg/Tg κύτταρα, όσο μεγαλώνει τόσο η συγκέντρωση όσο και ο χρόνος επώασης των κυττάρων με δοξορουβικίνη. Η μείωση αυτή στα ποσοστά δραστηριότητας της SOD ανάμεσα στους δύο χρόνους επώασης δεν εμφανίζεται να είναι το ίδιο έντονη στα Tg/Tg κύτταρα, όπως ήταν στα F1/F1 κύτταρα, και κυρίως στις μικρότερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, πράγμα το οποίο δείχνει ότι τα Tg/Tg κύτταρα επιδεικνύουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από το φάρμακο. Η δραστηριότητα της SOD φαίνεται να μειώνεται κατά 50% μετά τη συγκέντρωση των 10 $\mu$ M DOX στις 48 ώρες έκθεσης στο φάρμακο, ενώ στις 24 ώρες η δραστηριότητα του ενζύμου παραμένει πάνω από το 50% ακόμα και στη μεγάλη συγκέντρωση των 25  $\mu$ M DOX. Οι διαφορές στα ποσοστά της δραστηριότητας της SOD των Tg/Tg κυττάρων στις δύο χρονικές διάρκειες έκθεσης των 24 και 48 ωρών είναι στατιστικά σημαντικές, μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), με  $p < 0,006$  για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης.

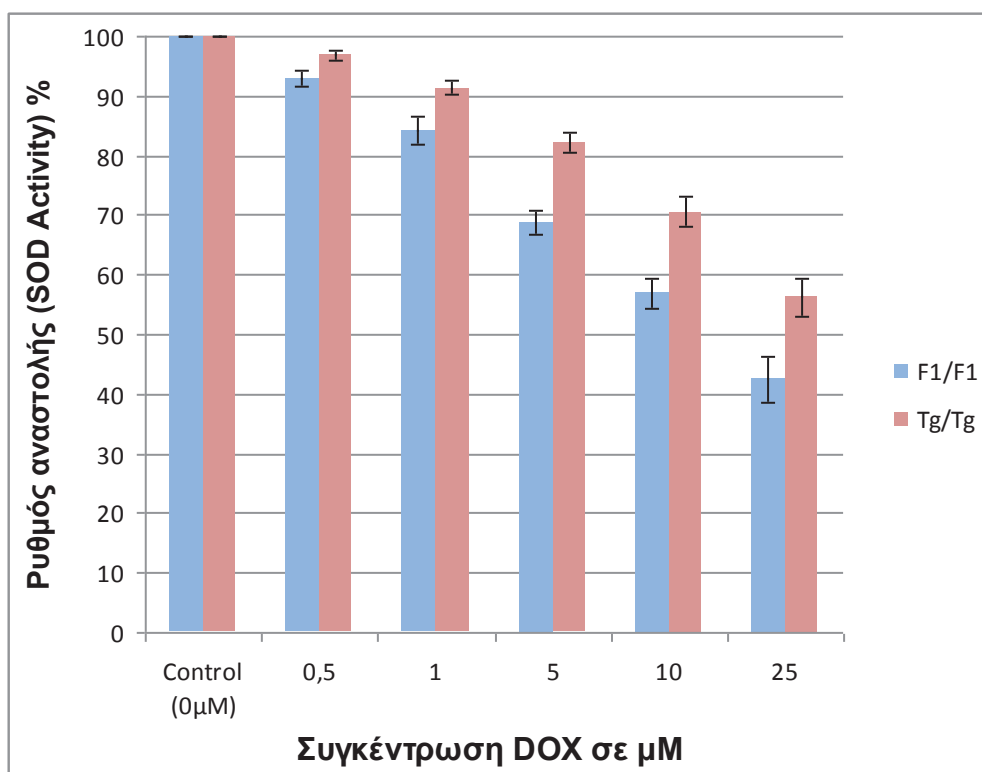


**Εικόνα 3.66:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών δραστηριότητας της SOD (ποσοστό αναστολής της WST-1) των Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p < 0,006$ ).

Από τα παραπάνω γραφήματα, συμπεραίνεται ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί στα κύτταρα τόσο δόσο-εξαρτώμενη όσο και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση του ποσοστού δραστηριότητας του αντιοξειδωτικού ενζύμου, SOD.

Ακολούθησε η σύγκριση των ποσοστών μείωσης της δραστηριότητας της SOD στις δύο κυτταρικές σειρές στην ίδια χρονική διάρκεια έκθεσης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της δοξορουβικίνης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.67, για τις 24

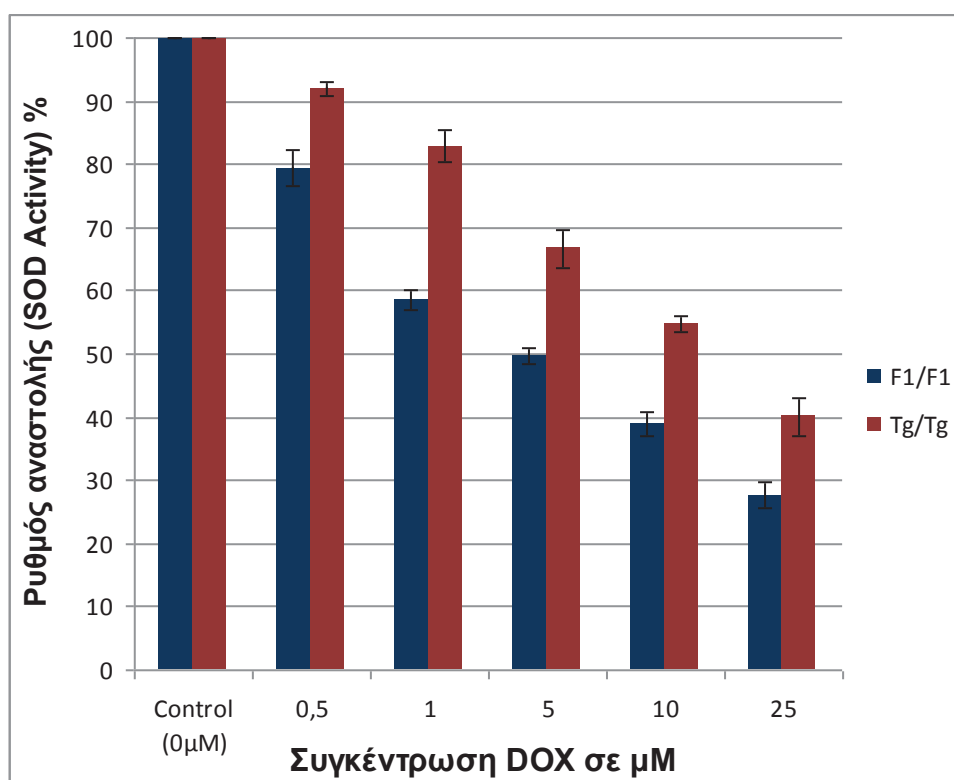
ώρες, παρατηρήθηκε αυξημένη τιμή των ποσοστών δραστηριότητας του ενζύμου στα Tg/Tg κύτταρα σε σύγκριση με αυτή στα F1/F1 για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης. Η διαφορά στη δραστηριότητα της SOD ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές είναι εμφανής σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήσαμε, ενώ είναι ακόμη πιο έντονη στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου για 24 ώρες μετά τη χορήγηση. Από το γράφημα είναι έκδηλο ότι στα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, εμφανίζεται μεγαλύτερη δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου μετά από τη χορήγηση της δοξορουβικίνης σε σχέση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου μετά από 24 ώρες επώασης με το φάρμακο. Ενώ στα F1/F1 κύτταρα, η δραστηριότητα της SOD φαίνεται να μειώνεται στο 50% μετά τη συγκέντρωση των 10μM DOX, στα Tg/Tg κύτταρα η δραστηριότητα του ενζύμου παραμένει πάνω από το 50% ακόμα και στη μεγάλη συγκέντρωση των 25 μM DOX, για τις 24 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη. Τα αποτελέσματά μας, μετά τη στατιστική ανάλυση (t-test), ως προς τη σύγκριση των ποσοστών δραστηριότητας του ενζύμου ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές, για 24 ώρες επώασης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, είναι στατιστικά σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις ( $p=0,01$  -  $p=0,0009$ ).



**Εικόνα 3.67:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών δραστηριότητας της SOD (ποσοστό αναστολής της WST-1) μεταξύ των F1/F1 και Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p=0,01$  -  $p=0,0009$ ).

Τέλος, κατά την έκθεση των δύο κυτταρικών σειρών σε δοξορουβικίνη για 48 ώρες παρατηρήθηκαν, επίσης, αυξημένα ποσοστά στη δραστηριότητα της SOD στα κύτταρα Tg/Tg σε σχέση με τα F1/F1 (Εικόνα 3.68), για όλες τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου, που χρησιμοποιήθηκαν. Η διαφορά στην αναστολή του υποστρώματος λόγω της δράσης του ενζύμου, που παρατηρείται ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για τις 48 ώρες είναι ιδιαίτερα εμφανής σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης

και είναι πιο έντονη από τη διαφορά, η οποία παρατηρήθηκε νωρίτερα για τις 24 ώρες επώασης με το φάρμακο. Σε αντίθεση με τα F1/F1 κύτταρα, όπου στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, το ποσοστό της δραστηριότητας της SOD είναι μικρό (ευρίσκεται λίγο πάνω από το 20 % στη συγκέντρωση των 25 $\mu$ M DOX), στα Tg/Tg κύτταρα παρατηρείται ότι η δραστηριότητα του ενζύμου διατηρείται σε ικανοποιητικά επίπεδα, ακόμα και στις μεγάλες συγκεντρώσεις φαρμάκου (περίπου 40% σε συγκέντρωση 25 $\mu$ M DOX). Επίσης, τα Tg/Tg κύτταρα παρουσιάζουν μια καθυστέρηση στη μείωση της δραστηριότητας της SOD στο 50%, όπου εμφανίζεται μετά τη συγκέντρωση των 10 $\mu$ M DOX, σε σχέση με τα F1/F1 κύτταρα, όπου η δραστηριότητα του ενζύμου φαίνεται να μειώνεται στο 50% ήδη από τη συγκέντρωση των 5 $\mu$ M DOX για τις 48 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι και στην περίπτωση των 48 ωρών μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης, τα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, εμφανίζονται πιο ανθεκτικά στο φάρμακο, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα, λόγω της αυξημένης δραστηριότητας του αντιοξειδωτικού ενζύμου SOD. Οι διαφορές στη δραστηριότητα της SOD, που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για 48 ώρες επώασης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, είναι στατιστικά σημαντικές ( $p=0,004$  -  $p=0,0001$ ), μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), για όλες τις συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν.



**Εικόνα 3.68:** Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών δραστηριότητας της SOD (ποσοστό αναστολής της WST-1) μεταξύ των F1/F1 και Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 48 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p=0,004$  -  $p=0,0001$ ).

Συμπερασματικά, μπορούμε να αποφανθούμε ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση του ποσοστού της δραστηριότητας της SOD στα κύτταρα, ενώ επίσης εξαρτάται και από το είδος των πρωτογενών κυτταρικών σειρών, αφού φαίνεται η αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου στα Tg/Tg κύτταρα σε σύγκριση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου. Από τα αποτελέσματα μας είναι εμφανές ότι τα F1/F1 κύτταρα, με μη ανιχνεύσιμα ποσά της Hsp70, παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα της SOD σε σύγκριση με τα Tg/Tg κύτταρα για 24 και 48 ώρες, προτείνοντας, επομένως, ότι η παρουσία της Hsp70 στα Tg/Tg κύτταρα προσδίδει σε αυτά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη.

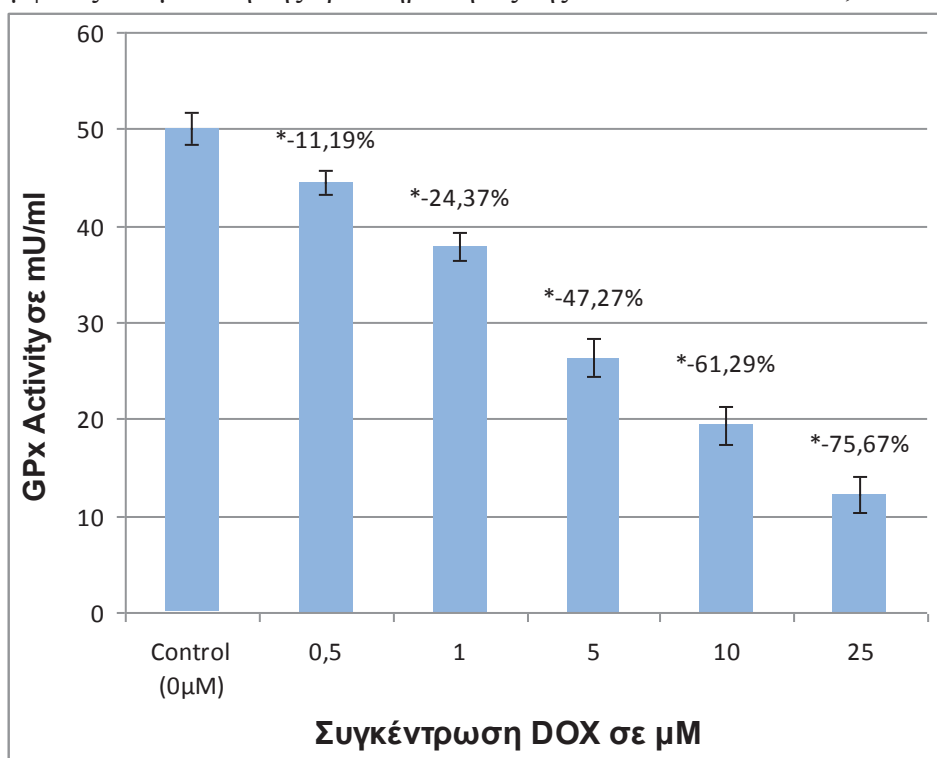
### 3.8.2. Μέτρηση της δραστηριότητας της GPx

Αφού μελετήσαμε τη δραστηριότητα της SOD στα κύτταρα μας, στη συνέχεια υπολογίστηκε η δραστηριότητα ενός άλλου αντιοξειδωτικού ενζύμου, της GPx, μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης. Για τη μέτρηση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης χρησιμοποιήθηκε το Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit (Biovision - #K762-100). Η οικογένεια των ενζύμων της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των οργανισμών από την οξειδωτική βλάβη και μετατρέπουν την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), ανάγοντας παράλληλα τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων προς τις αντίστοιχες αλκοόλες ή το ελεύθερο υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό. Κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο, οι GPx ανάγουν το υδροϋπεροξειδίο του κουμενίου, ενώ παράλληλα οξειδώνεται η GSH σε GSSG. Η παραγόμενη GSSG ανάγεται σε GSH με κατανάλωση του NADPH από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR, Glutathione Reductase). Η μείωση του NADPH είναι ανάλογη της δραστηριότητας των GPx και μπορεί να μετρηθεί στα 340 nm. Η ευαισθησία ανίχνευσης της μεθόδου αυτής είναι των 0,5 mU/ml GPx στο δείγμα και μετρώνται όλες οι εξαρτώμενες από γλουταθειόνη υπεροξειδάσες.

Μετά την ολοκλήρωση των βημάτων του πρωτοκόλλου (όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.14.2) τόσο για τα δείγματα μας όσο και για τα δείγματα, που αποτέλεσαν τα θετικά control (GPx Positive Control) και τα δείγματα αναφοράς, πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις μας σε φασματοφωτόμετρο στα 340 nm.

Από τις μετρήσεις και για συγκεκριμένο χρόνο αντίδρασης, υπολογίζουμε τη δραστηριότητα της GPx (Glutathione Peroxidase) στα δείγματα μας. Κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη του NADPH και τα γραφήματα με τη δραστηριότητα της GPx για τις δύο κυτταρικές σειρές (F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα) στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και για τους δύο χρόνους επώασης των 24 και 48 ωρών. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις υπό τις ίδιες συνθήκες κατά την πειραματική διαδικασία. Εκτός από τη δραστηριότητα της GPx για την κάθε κυτταρική σειρά και χρόνο επώασης με το φάρμακο, υπολογίστηκε και το ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας της GPx των κυττάρων για τις διάφορες συγκεντρώσεις του φαρμάκου ως προς τη δραστηριότητα της GPx των κυττάρων ελέγχου (χωρίς προσθήκη του φαρμάκου στο δείγμα μας) για το ίδιο χρονικό διάστημα επώασης με δοξορουβικίνη.

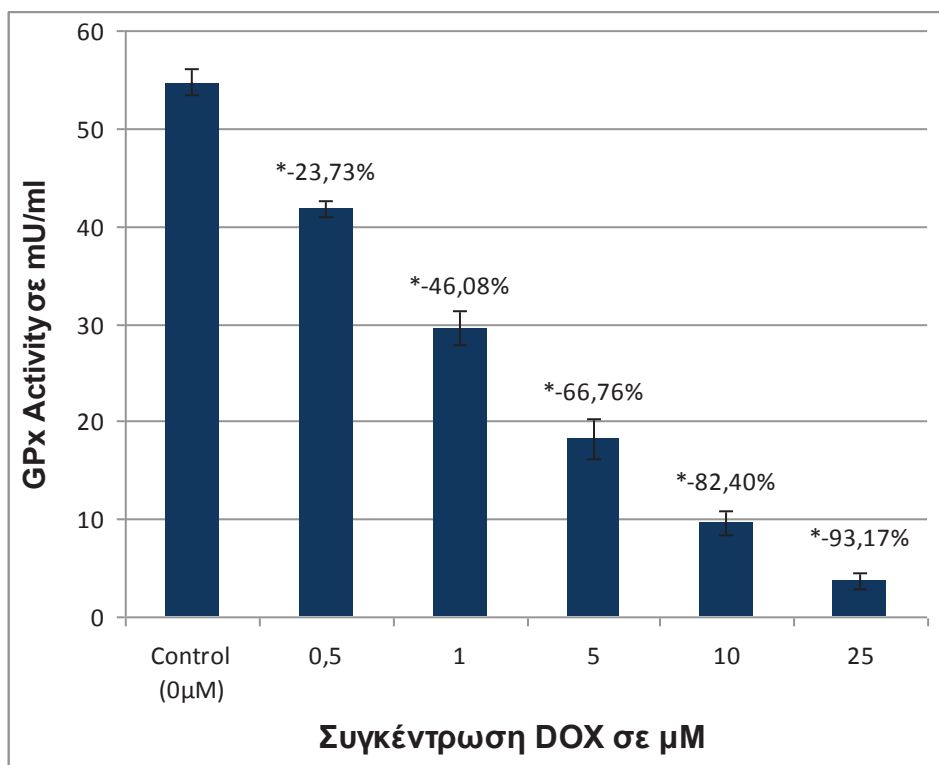
Αρχικά, υπολογίστηκαν οι τιμές της δραστηριότητας της GPx στα F1/F1 κύτταρα ελέγχου μετά από χορήγηση των διαφόρων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης και για χρόνο έκθεσης 24 ωρών. Από τις μετρήσεις μας αυτές (Εικόνα 3.69), παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας της GPx σε σχέση με τα κύτταρα, στα οποία δεν χορηγήθηκε δοξορουβικίνη στο μέσο επώασης (control). Η δραστηριότητα του ενζύμου φαίνεται να μειώνεται σταδιακά με αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου. Η δραστηριότητα της GPx, όπως φαίνεται στο γράφημα, διατηρείται σε ικανοποιητικά επίπεδα στις μικρές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, ενώ μείωση της δράσης του ενζύμου στο 50%, παρατηρείται περίπου μετά τη συγκέντρωση των 5  $\mu\text{M}$  DOX ύστερα από 24 ώρες επώασης των F1/F1 κυττάρων με το φάρμακο. Στη μεγάλη συγκέντρωση των 25 $\mu\text{M}$  DOX στις 24 ώρες εμφανίζεται μείωση της δραστηριότητας της DOX σε ποσοστό 75,67%.



**Εικόνα 3.69:** Γραφική απεικόνιση της δραστηριότητας της GPx των F1/F1 κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1, 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$ ) για 24 ώρες.

\* Ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας της GPx ως προς τη δραστηριότητα του ενζύμου στα κύτταρα ελέγχου (control).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.70, σταδιακή μείωση της δραστηριότητας της GPx παρατηρήθηκε και μετά από αύξηση της συγκέντρωσης της δοξορουβικίνης, που χορηγήθηκε σε κύτταρα F1/F1 για χρονικό διάστημα 48 ωρών. Από το γράφημα, είναι προφανής η απότομη μείωση στη δραστηριότητα του ενζύμου, που παρατηρείται από τις μικρές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης στα F1/F1 κύτταρα για τις 48 ώρες έκθεσης στο φάρμακο, αφού και η μείωση της δράσης της GPx στο 50% εμφανίζεται μόλις μετά τη μικρή συγκέντρωση 1 $\mu\text{M}$  DOX. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, η δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου πέφτει σε πολύ χαμηλά επίπεδα, με τη μείωση της δράσης της GPx να ανέρχεται σε ποσοστό 93,17% σε σχέση με τη δράση του ενζύμου σε φυσιολογικές συνθήκες (control).



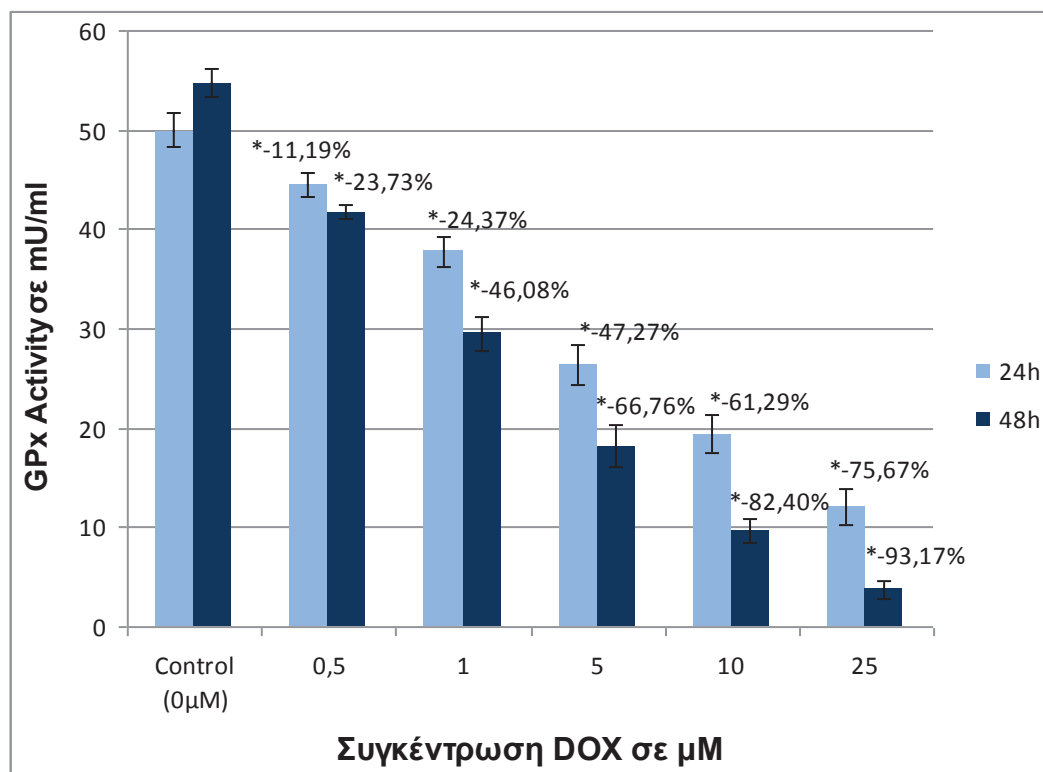
**Εικόνα 3.70:** Γραφική απεικόνιση της δραστηριότητας της GPx των F1/F1 κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1, 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$ ) για 48 ώρες.

\* Ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας της GPx ως προς τη δραστηριότητα του ενζύμου στα κύτταρα ελέγχου (control).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των τιμών της δραστηριότητας της GPx, καθώς και των ποσοστών μείωσης της δράσης του ενζύμου σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (control), των F1/F1 κυττάρων στις δύο χρονικές διάρκειες, των 24 και 48 ωρών, επώασης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (Εικόνα 3.71). Από το γράφημα αυτό μπορεί να παρατηρηθεί η σταδιακή μείωση της δραστηριότητας της GPx των F1/F1 κυττάρων, με αύξηση της συγκέντρωσης της δοξορουβικίνης και του χρόνου επώασης των κυττάρων με το φάρμακο. Από τα αποτελέσματά μας, συγκρίνοντας τη δραστηριότητα της GPx ανάμεσα στους δύο χρόνους έκθεσης στο φάρμακο, διαφαίνεται ότι η δράση του ενζύμου είναι αρκετά μειωμένη στις 48 ώρες σε σχέση με τις 24 ώρες. Η διαφορά αυτή στη μείωση της δραστηριότητας της GPx είναι ιδιαίτερα εμφανής σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήθηκαν, και παρουσιάζονται εντονότερες στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Η δραστηριότητα της GPx δείχνει να υφίσταται μείωση της τάξεως του 50% ως προς τα κύτταρα ελέγχου (control) μετά τη συγκέντρωση των 5  $\mu\text{M}$  DOX στις 24 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη, ενώ στις 48 ώρες το ποσοστό μείωσης εμφανίζεται να πέφτει στο 50%, νωρίτερα, μετά από τη συγκέντρωση 1  $\mu\text{M}$  DOX. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για τις 48 ώρες μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου, η δραστηριότητα του ενζύμου δείχνει να κυμαίνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (με ποσοστό μείωσης 93,17% της δραστηριότητας της GPx στη συγκέντρωση των 25  $\mu\text{M}$  DOX), ενώ στις 24 ώρες εμφανίζεται αρκετά μειωμένη μεν, αλλά να διατηρείται σε πιο ικανοποιητικά επίπεδα (με το ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας της GPx στη συγκέντρωση των 25  $\mu\text{M}$  DOX να υπολογίζεται σε 75,67%). Τα αποτελέσματά μας, μετά από στατιστική



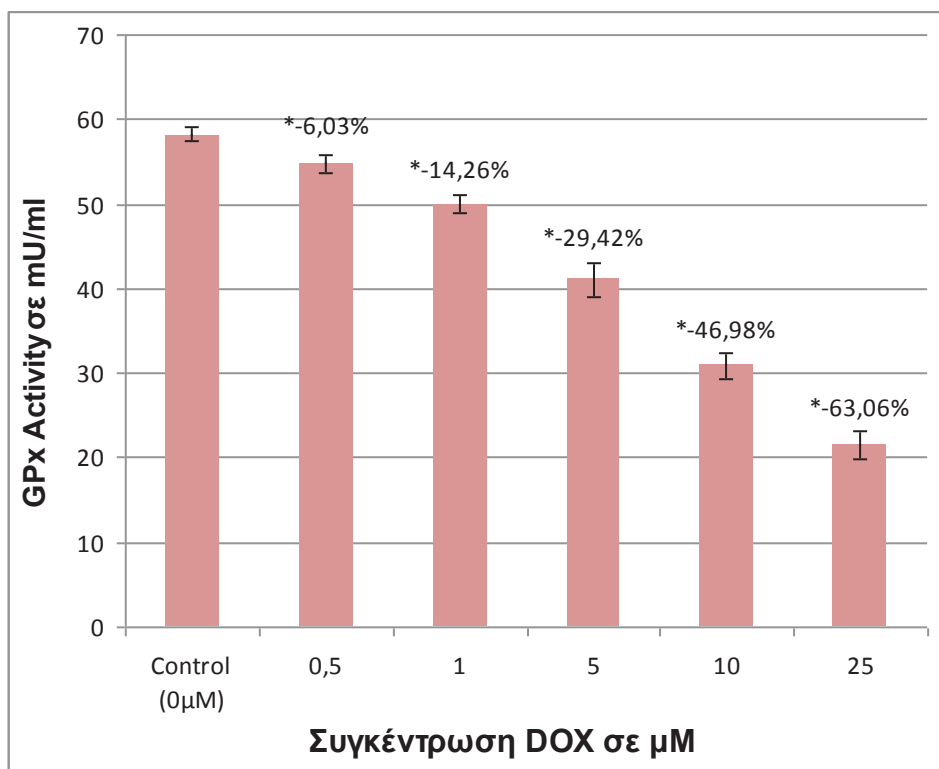
ανάλυση (t-test), ως προς τη σύγκριση των τιμών της δραστηριότητας της GPx και των ποσοστών μείωσης ως προς τα κύτταρα ελέγχου (control) ανάμεσα στους δύο χρόνους επώασης για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης στα F1/F1 κύτταρα, είναι στατιστικά σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις επώασης στο φάρμακο ( $p < 0,03$  για όλες τις συγκεντρώσεις DOX).



**Εικόνα 3.71:** Συγκριτική απεικόνιση της δραστηριότητας της GPx των F1/F1 κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p < 0,03$ ).

\* Ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας της GPx ως προς τη δραστηριότητα του ενζύμου στα κύτταρα ελέγχου (control) για τον ίδιο χρόνο επώασης με DOX.

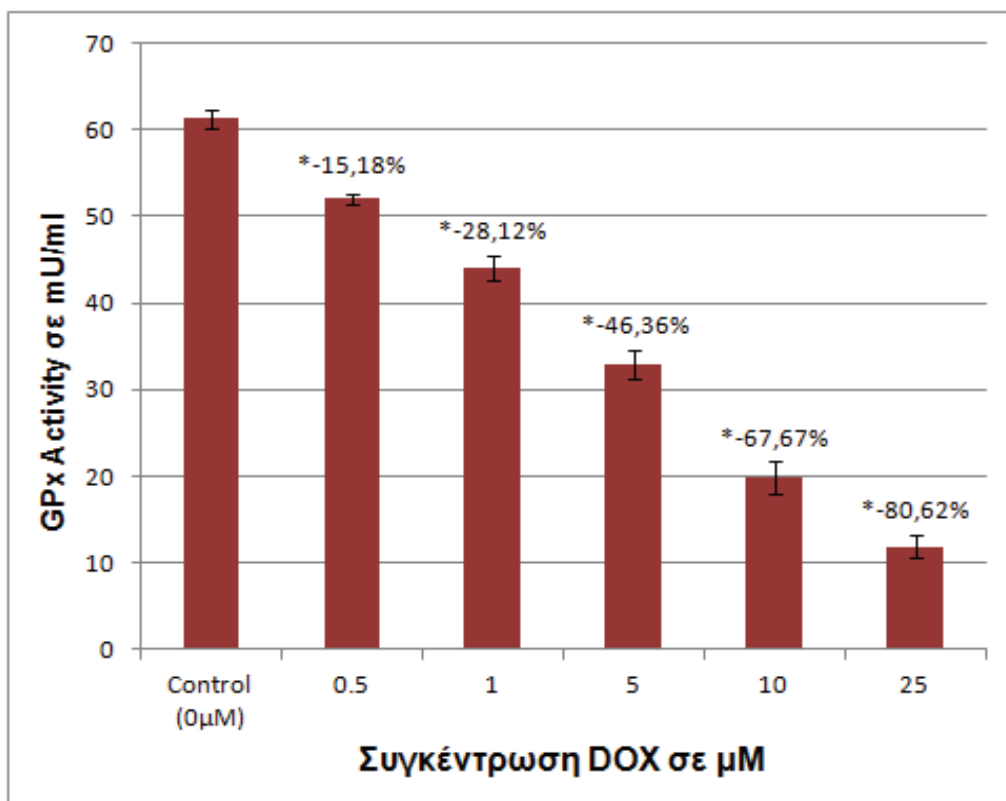
Στη συνέχεια, μετά τη χορήγηση των αντίστοιχων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης στα κύτταρα Tg/Tg, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, για 24 ώρες, παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα της GPx. Τόσο στα Tg/Tg κύτταρα, όσο και στα F1/F1 κύτταρα, φαίνεται μια σταδιακή μείωση της δραστηριότητας της GPx, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του φαρμάκου (Εικόνα 3.72). Στα Tg/Tg κύτταρα, μετά από 24 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη, δεν παρατηρείται τόσο έντονη μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου, αφού η δραστηριότητα της GPx διατηρείται σε υψηλά επίπεδα, ακόμα και μέχρι τη συγκέντρωση των 5 $\mu\text{M}$  DOX (με ποσοστό μείωσης 29,42% ως προς τα κύτταρα ελέγχου). Το ποσοστό μείωσης της δράσης της GPx υπολογίστηκε στο 50% μετά τη συγκέντρωση των 10 $\mu\text{M}$  DOX περίπου. Η μείωση αυτή στη δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου δεν εμφανίζεται να είναι έντονη, ακόμα και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, αφού, ακόμα, και στη συγκέντρωση των 25 $\mu\text{M}$ , η μείωση της δραστηριότητας της GPx είναι σε ποσοστό 63,06% ως προς τα κύτταρα ελέγχου (control).



**Εικόνα 3.72:** Γραφική απεικόνιση της δραστηριότητας της GPx των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1, 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$ ) για 24 ώρες.

\* Ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας της GPx ως προς τη δραστηριότητα του ενζύμου στα κύτταρα ελέγχου (control).

Στο επόμενο γράφημα απεικονίζονται οι τιμές της δραστηριότητας της GPx των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση των αντίστοιχων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης για 48 ώρες. Όταν τα Tg/Tg κύτταρα επώασθησαν στο χρόνο των 48 ωρών, παρατηρήθηκε ανάλογη σταδιακή μείωση στην ενζυμική δραστηριότητα με αύξηση της συγκέντρωσης της δοξορουβικίνης (Εικόνα 3.73). Τα Tg/Tg κύτταρα για τις 48 ώρες επώασης με το φάρμακο, εμφανίζουν μια απότομη μείωση στη δραστηριότητα της GPx, μετά τη συγκέντρωση των 5  $\mu\text{M}$  DOX, ενώ στις μικρότερες συγκεντρώσεις διατηρείται σε πιο υψηλά επίπεδα. Μετά τη συγκέντρωση αυτή των 5  $\mu\text{M}$  DOX φαίνεται να υπάρχει 50% μείωση σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (control) στη δραστηριότητα του ενζύμου. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, η ενζυμική δράση της GPx, φαίνεται να βρίσκεται σε πιο χαμηλά, αλλά ικανοποιητικά επίπεδα, με τη μείωση της δραστηριότητας της GPx να υπολογίζεται σε ποσοστό 80,62% για τις 48 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη. Έτσι, στο γράφημα 3.73 παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα της GPx στα Tg/Tg κύτταρα, ακόμα και για τις μεγάλες συγκεντρώσεις DOX, πράγμα το οποίο υποδηλώνει την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα τους στο οξειδωτικό στρες, που προκαλεί το φάρμακο στα κύτταρα.

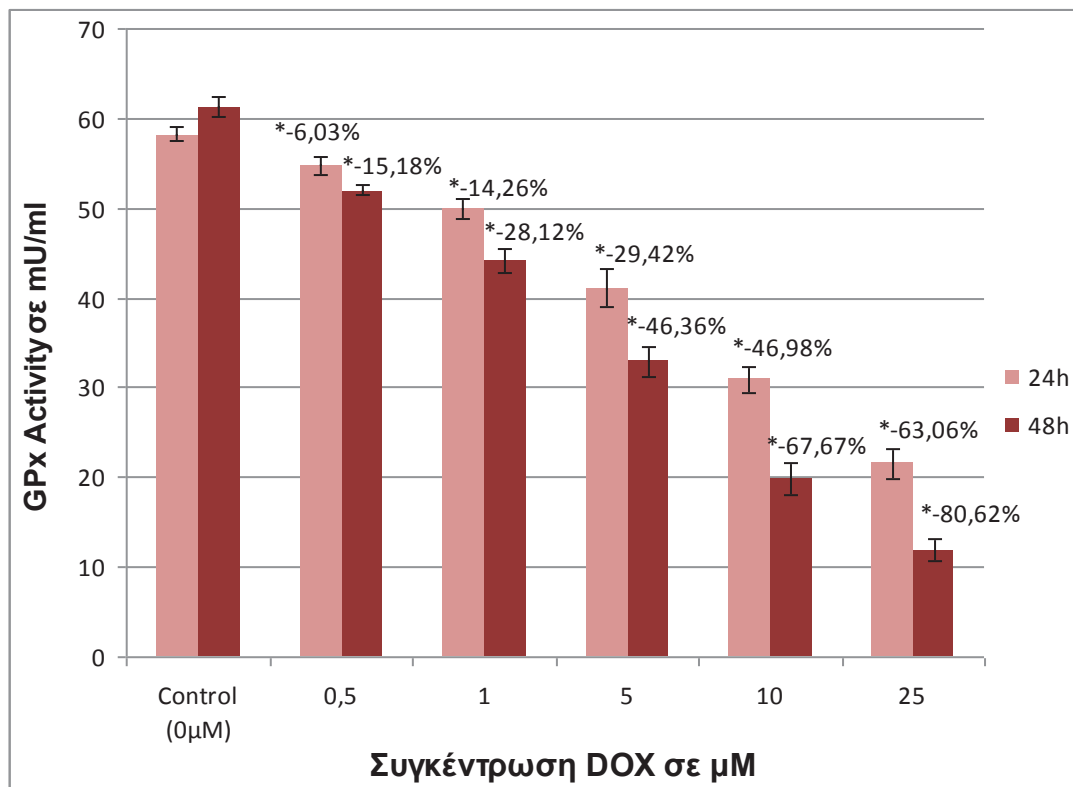


**Εικόνα 3.73:** Γραφική απεικόνιση της δραστηριότητας της GPx των Tg/Tg κυττάρων μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.5, 1, 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$ ) για 48 ώρες.

\* Ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας της GPx ως προς τη δραστηριότητα του ενζύμου στα κύτταρα ελέγχου (control).

Κατά τη σύγχρονη απεικόνιση των τιμών της δραστηριότητας της GPx και των ποσοστών μείωσης της δράσης του ενζύμου σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (control) των Tg/Tg κυττάρων, που υπερεκφράζουν την Hsp70, για τους δύο χρόνους έκθεσης (Εικόνα 3.74), παρατηρείται ότι, όπως και στα F1/F1 κύτταρα, η δραστηριότητα της GPx μειώνεται στις 48 ώρες επώασης σε σύγκριση με αυτή στις 24 για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήθηκαν. Επίσης, είναι εμφανής η σταδιακή μείωση της δραστηριότητας της GPx στα Tg/Tg κύτταρα, όσο αυξάνεται τόσο η συγκέντρωση όσο και ο χρόνος επώασης των κυττάρων με δοξορουβικίνη. Η μείωση αυτή στη δραστηριότητα του ενζύμου ανάμεσα στους δύο χρόνους επώασης δεν εμφανίζεται να είναι το ίδιο έντονη στα Tg/Tg κύτταρα, όπως ήταν στα F1/F1 κύτταρα, και κυρίως στις μικρότερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, πράγμα το οποίο δείχνει ότι τα Tg/Tg κύτταρα διατηρούν σε καλύτερο βαθμό την αντιοξειδωτική τους ικανότητα μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου. Μείωση της δραστηριότητας της GPx σε ποσοστό 50% ως προς τα κύτταρα ελέγχου (control) παρατηρείται μετά τη συγκέντρωση των 10 $\mu\text{M}$  DOX στις 24 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη, ενώ στις 48 ώρες το ποσοστό μείωσης εμφανίζεται στο 50%, νωρίτερα, μετά από τη συγκέντρωση των 5 $\mu\text{M}$  DOX. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, για τις 24 ώρες μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου, η δραστηριότητα του ενζύμου δεν δείχνει να μειώνεται τόσο έντονα και διατηρείται σε πιο υψηλά επίπεδα (με το ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας της GPx στη συγκέντρωση των 25 $\mu\text{M}$  DOX να υπολογίζεται σε 63,06%), ενώ στις 48 ώρες η δραστηριότητα της GPx, αν και παρουσιάζεται μειωμένη, δείχνει να διατηρείται σε πιο ικανοποιητικά επίπεδα (με ποσοστό μείωσης 80,62% της

δραστηριότητας της GPx στη συγκέντρωση των 25 $\mu$ M DOX). Οι διαφορές στις τιμές δραστηριότητας της GPx, καθώς και στα ποσοστά μείωσης της ως προς τα κύτταρα ελέγχου (control), των Tg/Tg κυττάρων στις δύο χρονικές διάρκειες έκθεσης των 24 και 48 ωρών είναι στατιστικά σημαντικές, μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), με  $p < 0,01$  για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης.



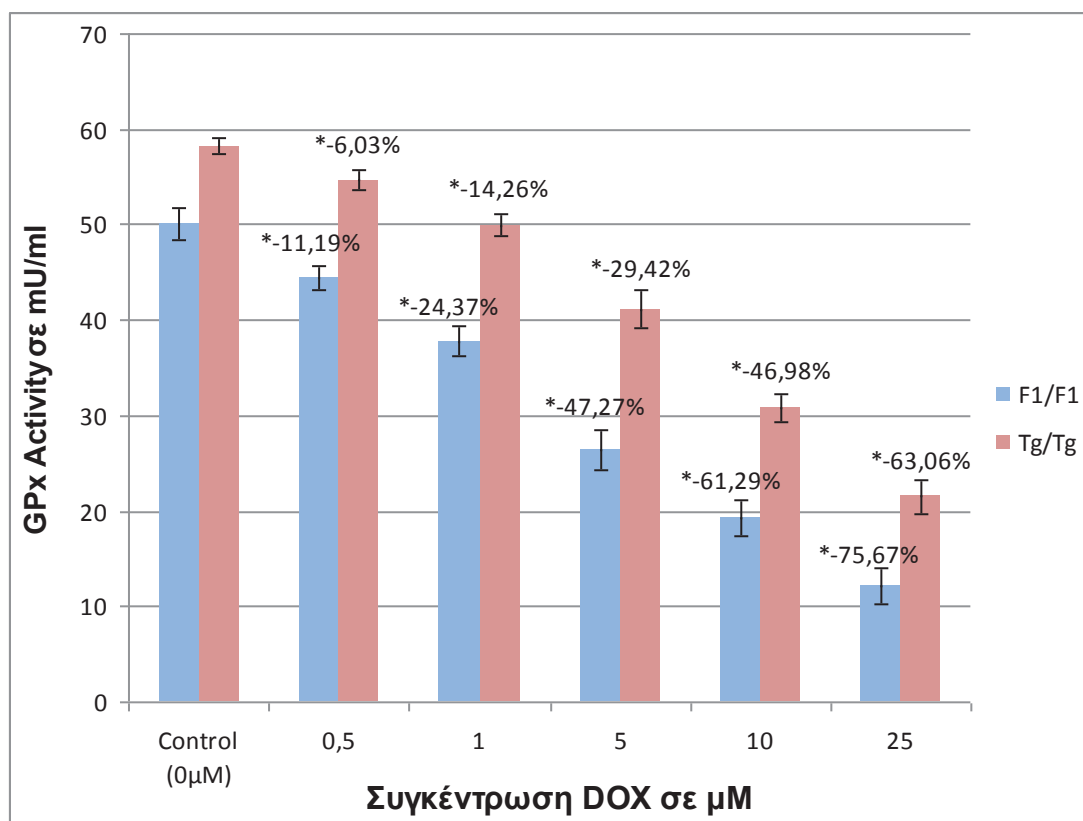
**Εικόνα 3.74:** Συγκριτική απεικόνιση της δραστηριότητας της GPx των Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p < 0,01$ ).

\* Ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας της GPx ως προς τη δραστηριότητα του ενζύμου στα κύτταρα ελέγχου (control) για τον ίδιο χρόνο επώασης με DOX.

Από τα παραπάνω γραφήματα, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί στα κύτταρα τόσο δόσο-εξαρτώμενη όσο και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε τη σύγκριση της δραστηριότητας της GPx στις δύο κυτταρικές σειρές στο ίδιο χρονικό διάστημα επώασης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.75, για τις 24 ώρες, παρατηρήθηκε αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου στα Tg/Tg κύτταρα σε σύγκριση με αυτή στα F1/F1 για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης. Οι διαφορές στη δραστηριότητα της GPx ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές είναι εμφανείς σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήσαμε, ενώ εμφανίζονται ακόμη εντονότερες στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου για 24 ώρες μετά τη χορήγηση. Από το γράφημα είναι προφανές ότι στα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, εμφανίζεται μεγαλύτερη δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου μετά από τη χορήγηση της δοξορουβικίνης σε σχέση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου μετά από 24 ώρες επώασης με το φάρμακο. 24 ώρες μετά τη

χορήγηση του φαρμάκου, η ενζυμική δραστηριότητα στα Tg/Tg κύτταρα, παραμένει σε αρκετά υψηλές τιμές στις μικρές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, κάτι που δεν φαίνεται να ισχύει και στα F1/F1 κύτταρα, όπου η δραστηριότητα του ενζύμου μειώνεται σημαντικά. Ενώ στα F1/F1 κύτταρα, παρατηρείται 50% μείωση της δραστηριότητας της GPx ως προς τα κύτταρα ελέγχου (control, 0μM DOX) σχεδόν μετά τη συγκέντρωση των 5μM DOX, στα Tg/Tg κύτταρα η δραστηριότητα του ενζύμου μειώνεται σε ποσοστό 50% λίγο μετά τη συγκέντρωση των 10μM DOX, για τις 24 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, για τις 24 ώρες μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου, η δραστηριότητα του ενζύμου στα F1/F1 κύτταρα δείχνει να μειώνεται αρκετά (με ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας της GPx στο 75,67% στη συγκέντρωση των 25μM DOX ως προς τα κύτταρα ελέγχου), ενώ στα Tg/Tg κύτταρα η δραστηριότητα της GPx φαίνεται να διατηρείται σε πιο ικανοποιητικά επίπεδα (με ποσοστό μείωσης στο 63,06% της δραστηριότητας της GPx στη συγκέντρωση των 25μM DOX). Τα αποτελέσματα μας, μετά τη στατιστική ανάλυση (t-test), ως προς τη σύγκριση της δραστηριότητας του ενζύμου και των ποσοστών μείωσης της δράσης της GPx ως προς τα κύτταρα ελέγχου (χωρίς προσθήκη DOX στο μέσο επώασης) ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές, για 24 ώρες επώασης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, είναι στατιστικά σημαντικά για όλες τις συγκεντρώσεις ( $p=0,002$  -  $p=0,0009$ ).

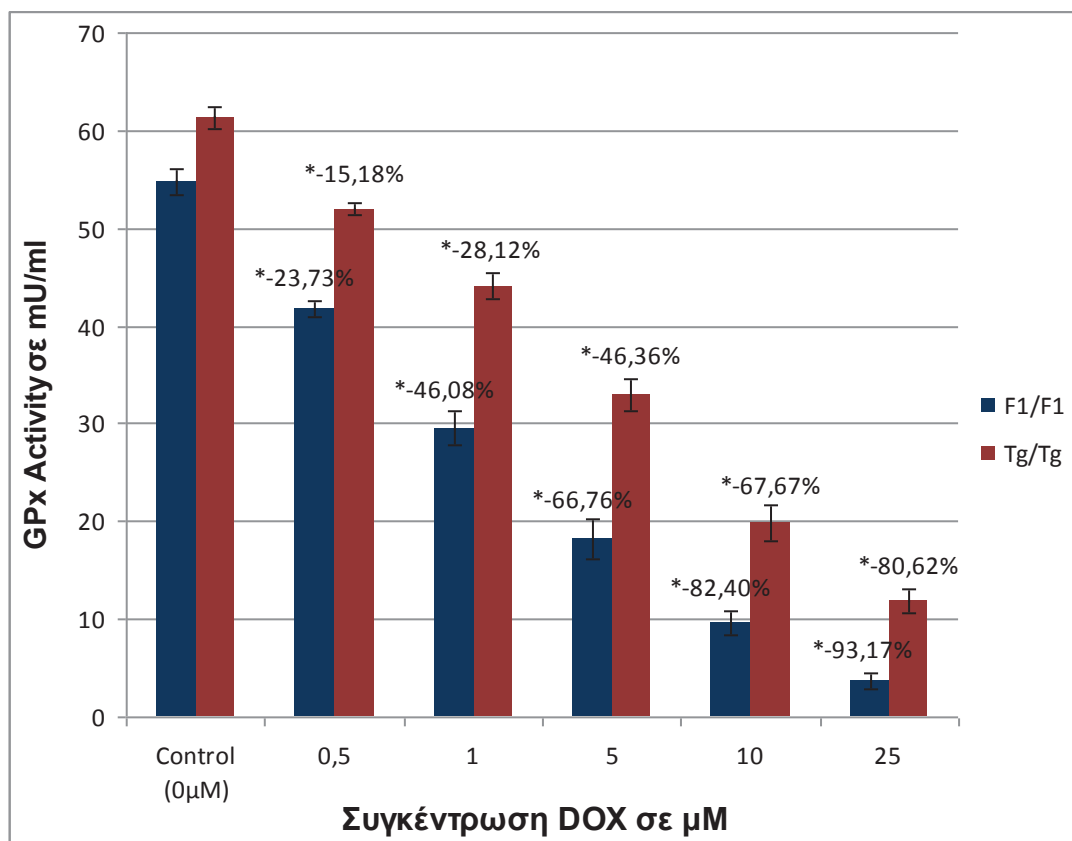


**Εικόνα 3.75:** Συγκριτική απεικόνιση της δραστηριότητας της GPx μεταξύ των F1/F1 και Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p=0,002$  -  $p=0,0009$ ).

\* Ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας της GPx ως προς τη δραστηριότητα του ενζύμου στα κύτταρα ελέγχου (control) για την ίδια κυτταρική σειρά.

Τέλος, κατά την έκθεση των δύο κυτταρικών σειρών σε δοξορουβικίνη για 48 ώρες παρατηρήθηκε, επίσης, αυξημένη δραστηριότητα της GPx στα κύτταρα Tg/Tg σε σχέση με τα F1/F1 (Εικόνα 3.76), για όλες τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου, που χρησιμοποιήθηκαν. Η διαφορά στη δραστηριότητα του ενζύμου, που παρατηρείται ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για τις 48 ώρες είναι ιδιαίτερα εμφανής σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης και φαίνεται να είναι πιο έντονη από τη διαφορά, η οποία παρατηρήθηκε νωρίτερα για τις 24 ώρες επώασης με το φάρμακο, και ιδιαίτερα στις μικρότερες συγκεντρώσεις DOX. Τα Tg/Tg κύτταρα παρουσιάζουν μια καθυστέρηση στη μείωση της δραστηριότητας της GPx, αφού ποσοστό μείωσης 50% ως προς τα κύτταρα ελέγχου (που δεν εκτέθηκαν σε δοξορουβικίνη), παρατηρείται μετά τη συγκέντρωση των 5μM DOX, σε σχέση με τα F1/F1 κύτταρα, όπου το ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας του ενζύμου στο 50% εμφανίζεται ήδη από τη συγκέντρωση 1μM DOX για τις 48 ώρες επώασης με δοξορουβικίνη. Επίσης, σε αντίθεση με τα F1/F1 κύτταρα, όπου στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, οι τιμές δραστηριότητας της GPx είναι μικρές (με το ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας της GPx στη συγκέντρωση των 25μM DOX να υπολογίζεται σε 93,17%), στα Tg/Tg κύτταρα παρατηρείται ότι η δραστηριότητα του ενζύμου διατηρείται σε πιο ικανοποιητικά επίπεδα (με ποσοστό μείωσης 80,62% της δραστηριότητας της GPx ως προς τα κύτταρα ελέγχου στη συγκέντρωση των 25μM DOX).

Επομένως, από τα αποτελέσματα μας αυτά, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι και στην περίπτωση των 48 ωρών μετά την χορήγηση δοξορουβικίνης, τα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο φάρμακο, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα, λόγω της αυξημένης δραστηριότητας του αντιοξειδωτικού ενζύμου GPx. Οι διαφορές στη δραστηριότητα της GPx και στα ποσοστά μείωσης της ενζυμικής δράσης ως προς τα κύτταρα ελέγχου (control), που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές για 48 ώρες επώασης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, είναι στατιστικά σημαντικές ( $p=0,002$  -  $p=0,0000$ ), μετά από στατιστική ανάλυση (t-test), για όλες τις συγκεντρώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν.



**Εικόνα 3.76:** Συγκριτική απεικόνιση της δραστηριότητας της GPx μεταξύ των F1/F1 και Tg/Tg κυττάρων για χρονικό διάστημα 48 ωρών μετά από έκθεση στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης ( $p=0,002 - p=0,0000$ ).

\* Ποσοστό μείωσης της δραστηριότητας της GPx ως προς τη δραστηριότητα του ενζύμου στα κύτταρα ελέγχου (control) για την ίδια κυτταρική σειρά.

Συμπερασματικά, λοιπόν, προκύπτει ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση της δραστηριότητας της GPx στα κύτταρα, ενώ επίσης εξαρτάται και από το είδος των πρωτογενών κυτταρικών σειρών, αφού φαίνεται η αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου στα Tg/Tg κύτταρα σε σύγκριση με τα F1/F1 κύτταρα. Από τα αποτελέσματά μας είναι έκδηλο ότι τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα της GPx σε σύγκριση με τα Tg/Tg κύτταρα, τόσο για 24 όσο και για 48 ώρες επώασης με το φάρμακο, πράγμα το οποίο μας οδηγεί στην υπόθεση ότι η παρουσία της Hsp70 στα Tg/Tg κύτταρα προσδίδει σε αυτά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη. Όπως, φάνηκε από τη δραστηριότητα και των δύο αντιοξειδωτικών ενζύμων, τόσο της SOD όσο και της GPx, τα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, διατηρούν σε μεγαλύτερο βαθμό την αντιοξειδωτική τους ικανότητα ενάντια στην τοξική δράση της δοξορουβικίνης.

### 3.9. Φασματοφωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός της επαγόμενης Hsp70 σε ορούς ασθενών

Στη συνέχεια, εξετάστηκε εάν η καρδιακή ανεπάρκεια προκαλεί αλλαγή της έκφρασης της επαγόμενης Hsp70 στον ορό ασθενών. Αυτή η ερευνητική προσπάθεια (αδημοσίευτα αποτελέσματα) έρχεται σε συνέχεια με το δημοσιευμένο μέρος της δουλειάς μας [816], η οποία σε επίπεδο ποντικών απέδειξε την προστατευτική λειτουργία της Hsp70 ενάντια στην καρδιακή ανεπάρκεια, που επάγεται από την δοξορουβικίνη.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της επαγόμενης πρωτεΐνης θερμικού σοκ των 70 kDa (Hsp70) από ορούς ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια χρησιμοποιήθηκε το Hsp70 high sensitivity ELISA Kit (Enzo Life Sciences - #ADI-EKS-715). Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε ειδικά η ποσότητα της επαγόμενης Hsp70. Το χρησιμοποιούμενο αντίσωμα του kit δεν ανιχνεύει άλλα μέλη της Hsp70 οικογένειας.

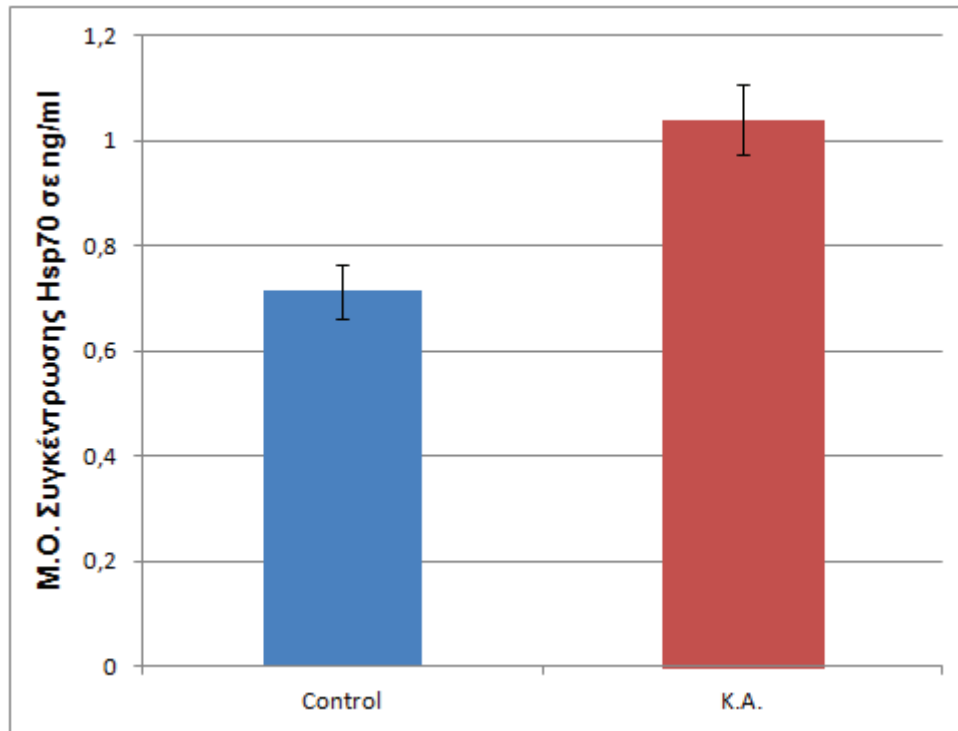
Εκτός από τους ορούς αίματος από ασθενείς, που είχαν πιστοποιηθεί κλινικά με καρδιακή ανεπάρκεια (n=24), χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ορού αίματος από υγιή άτομα ως δείγματα ελέγχου (control) (n=15). Τα δείγματα του αίματος αφού συλλεχθούν, αφήνονται για 30 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στα 1000g για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρωση συλλέγεται το υπερκείμενο σε καινούρια σωληνάκια και μπορεί να αποθηκευτεί στους -20 °C.

Τα δείγματα επεξεργάζονται σύμφωνα με τη μεθοδολογία που προτείνεται από την εταιρεία (Hsp70 high sensitivity ELISA Kit: Enzo Life Sciences - #ADI-EKS-715) και περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι (Ενότητα 2.13). Τα δείγματα, μετά το πέρας της διαδικασίας, μετρήθηκαν στα 450 nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (Multiscan Spectrum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Τα επίπεδα της Hsp70 στο δείγμα είναι ανάλογα της μετρήσιμης απορρόφησης. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Μετά από την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης και τη στατιστική ανάλυση των μετρήσεων, προσδιορίστηκε η ποσότητα της επαγόμενης Hsp70 για κάθε δείγμα.

Αφού υπολογίστηκε η Hsp70 στον ορό για κάθε άτομο ξεχωριστά, στη συνέχεια, τα άτομα αυτά ομαδοποιήθηκαν και υπολογίστηκε η μέση τιμή της συγκέντρωσης της επαγόμενης Hsp70 για την κάθε κατηγορία των υγιών ατόμων και των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια. Επίσης, τα άτομα κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τις διάφορες παραμέτρους από το ιστορικό τους ή τις κλινικές τους εξετάσεις, και υπολογίστηκε η μέση τιμή της Hsp70 για την κάθε κατηγορία ξεχωριστά. Μετά από τις μετρήσεις και τους υπολογισμούς μας, οι μέσοι όροι των τιμών της Hsp70 για την κάθε κατηγορία, συγκρίθηκαν και απεικονίστηκαν στα παρακάτω γραφήματα.



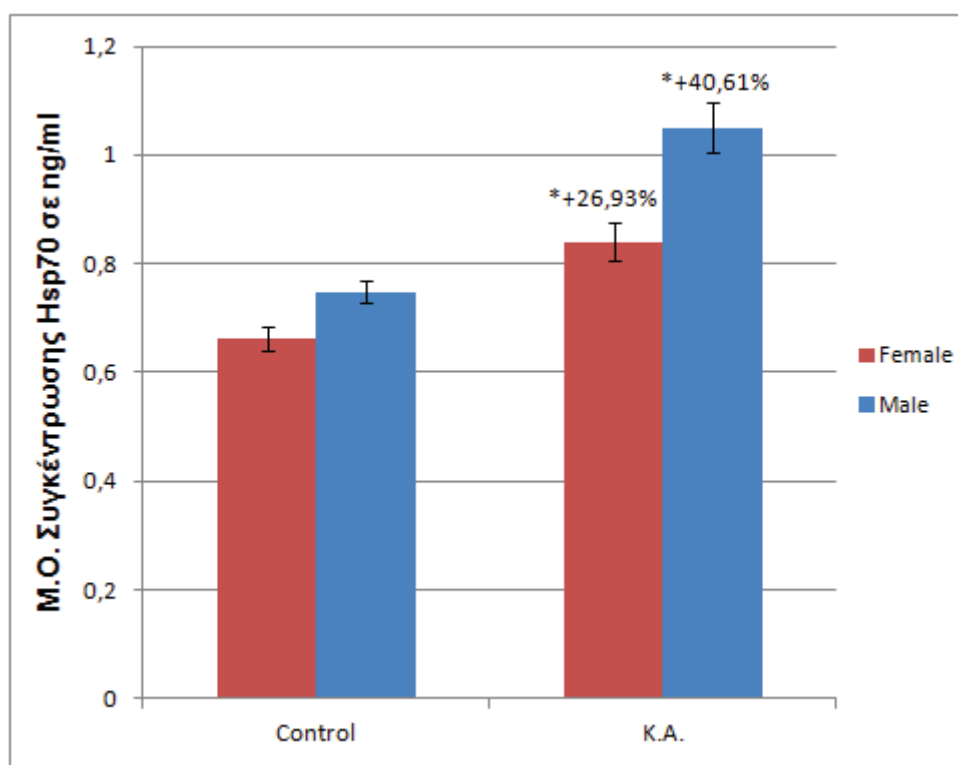


**Εικόνα 3.77:** Γραφική απεικόνιση της μέσης ποσότητας της επαγόμενης Hsp70 σε ορούς αίματος από υγιή άτομα (control) (n=15) και από ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια (K.A.) (n=24) (p=0,0027).

Αρχικά, υπολογίστηκε η μέση τιμή της συγκέντρωσης της επαγόμενης Hsp70 από ορούς αίματος ασθενών με επιβεβαιωμένη καρδιακή ανεπάρκεια και συγκρίθηκε ως προς τη μέση τιμή της ποσότητας της Hsp70 σε ορούς υγιών ατόμων, που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου (control). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.77, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη μέση τιμή της ποσότητας της επαγόμενης Hsp70 στους ορούς των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια σε σχέση με αυτή των υγιών ατόμων. Η διαφορά αυτή στο μέσο όρο του ποσού της Hsp70 στον ορό ασθενών, σε σχέση με των υγιών ατόμων, είναι στατιστικά σημαντική, μετά από στατιστική ανάλυση, με  $p=0,0027$ . Από τα αποτελέσματα μας αυτά, φαίνεται πιθανό ότι η καρδιακή ανεπάρκεια επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης Hsp70 στο αίμα των ασθενών.

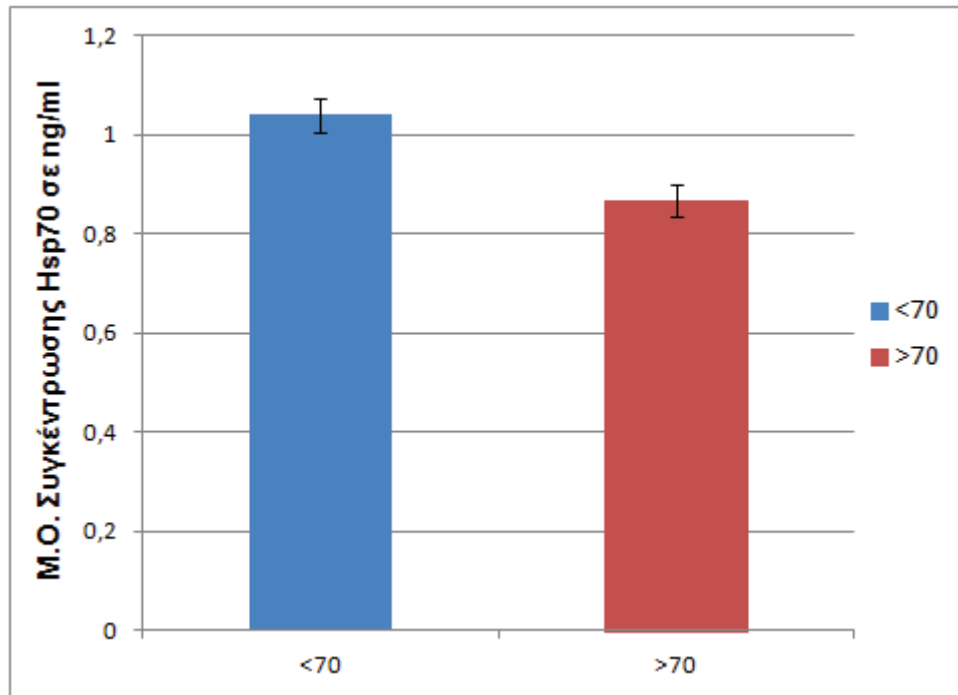
Στη συνέχεια, εξετάστηκε εάν η έκφραση αυτή της Hsp70 στους ορούς των ασθενών επηρεάζεται από το φύλο. Έτσι, τόσο η ομάδα ελέγχου όσο και η ομάδα με τους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια ταξινομήθηκαν με βάση το φύλο τους και υπολογίστηκε η μέση τιμή της επαγόμενης Hsp70 στους ορούς κάθε κατηγορίας. Όπως φαίνεται και στο παρακάτω γράφημα (Εικόνα 3.78), παρατηρήθηκε αύξηση της μέσης τιμής της συγκέντρωσης της Hsp70 και στα δύο φύλα, στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control) για το κάθε φύλο. Η αύξηση αυτή παρουσιάζεται σημαντική, μετά από στατιστική ανάλυση, τόσο στις γυναίκες ( $p=0,002$ ) όσο και στους άντρες ( $p=0,0004$ ). Επίσης, στην εικόνα 3.78, παρατηρείται ότι η αύξηση στο ποσό της Hsp70 είναι μεγαλύτερη στα αρσενικά άτομα με καρδιακή ανεπάρκεια (n=16) σε σύγκριση με τα θηλυκά άτομα (n=8). Η αύξηση αυτή στους άνδρες υπολογίστηκε σε ποσοστό 40,61% ως προς την αρσενική ομάδα ελέγχου (control) (n=8), ενώ στις γυναίκες με καρδιακή ανεπάρκεια η συγκέντρωση της Hsp70 αυξήθηκε σε ποσοστό 26,93% ως προς τη θηλυκή ομάδα ελέγχου (control) (n=7), και η διαφορά αυτή στα ποσοστά αύξησης ανάμεσα στα δύο

φύλα είναι στατιστικά σημαντική με  $p=0,0036$ . Η διαφορά στην ποσότητα της επαγόμενης Hsp70, ανάμεσα στους άνδρες και στις γυναίκες, εμφανίζεται να είναι στατιστικά σημαντική, τόσο στα υγιή άτομα ( $p=0,0073$ ) όσο και στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια ( $p=0,0031$ ). Επομένως, συμπεραίνεται ότι υπάρχει διαφορά στην ποσότητα της Hsp70 ανάμεσα στα δύο φύλα, αφού οι άνδρες φαίνεται να έχουν αυξημένα ποσά της πρωτεΐνης στον ορό τους, και η συγκέντρωση της Hsp70 στο αίμα αυξάνεται σημαντικά μετά από καρδιακή ανεπάρκεια, με την αύξηση αυτή να εμφανίζεται αισθητά μεγαλύτερη στους άνδρες σε σύγκριση με τις γυναίκες.



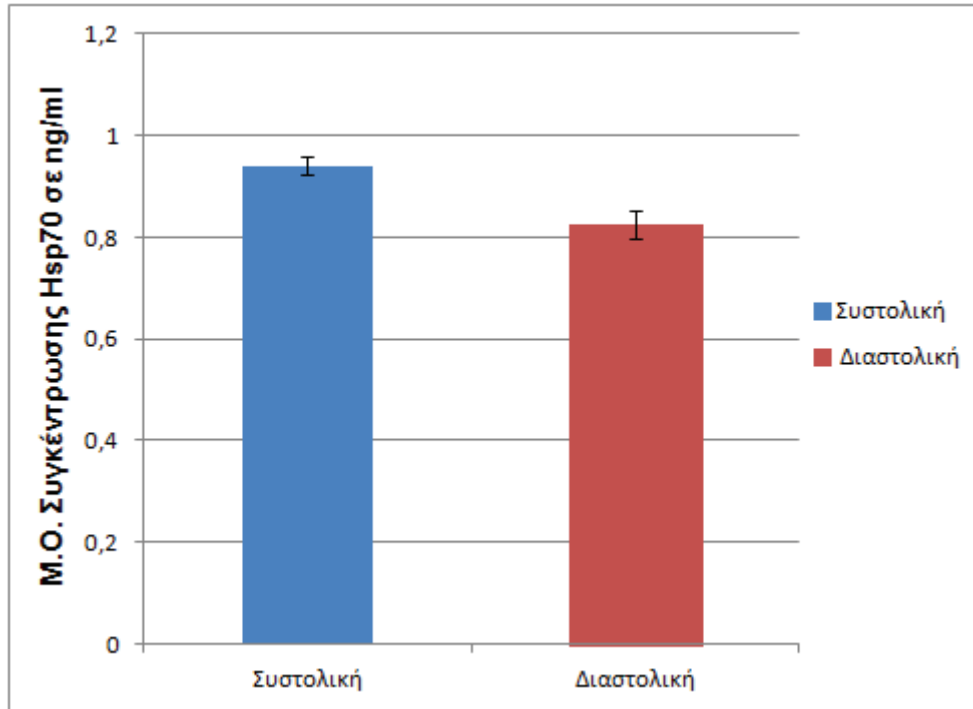
**Εικόνα 3.78:** Συγκριτική γραφική απεικόνιση της μέσης ποσότητας της επαγόμενης Hsp70 σε ορούς αίματος από υγιή άτομα (control) και από ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια (K.A.) ως προς το φύλο ( $p=0,007 - p=0,0004$ ).

Κατόπιν, θελήσαμε να ερευνήσουμε εάν η μέση τιμή της συγκέντρωσης της Hsp70 στους ορούς αίματος των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια επηρεάζεται από χαρακτηριστικά των ασθενών ή τα κλινικά χαρακτηριστικά της καρδιακής ανεπάρκειας, που είχαν εκδηλώσει. Στην αρχή, μελετήθηκε εάν η ποσότητα της Hsp70 στον ορό επηρεάζεται από την ηλικία των ασθενών. Για το σκοπό αυτό, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, τους ασθενείς με ηλικία κάτω των 70 ετών ( $n=12$ ) και τους ασθενείς με ηλικία άνω των 70 ετών ( $n=12$ ). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.79, η μέση τιμή της συγκέντρωσης της επαγόμενης Hsp70 είναι μεγαλύτερη στους ορούς ασθενών κάτω των 70 ετών σε σύγκριση με αυτή των ασθενών, που είναι πάνω από 70 ετών. Η διαφορά ανάμεσα στις δύο κατηγορίες ασθενών είναι στατιστικά σημαντική, μετά από στατιστική ανάλυση, με  $p=0,0034$ . Επομένως, παρατηρείται ότι, πιθανώς, οι νεότεροι ασθενείς έχουν τη δυνατότητα να επάγουν σε μεγαλύτερα ποσά την πρωτεΐνη Hsp70 στο ορό του αίματος τους, λόγω της ανάπτυξης της καρδιακής ανεπάρκειας, σε σύγκριση με τους πιο ηλικιωμένους ασθενείς.

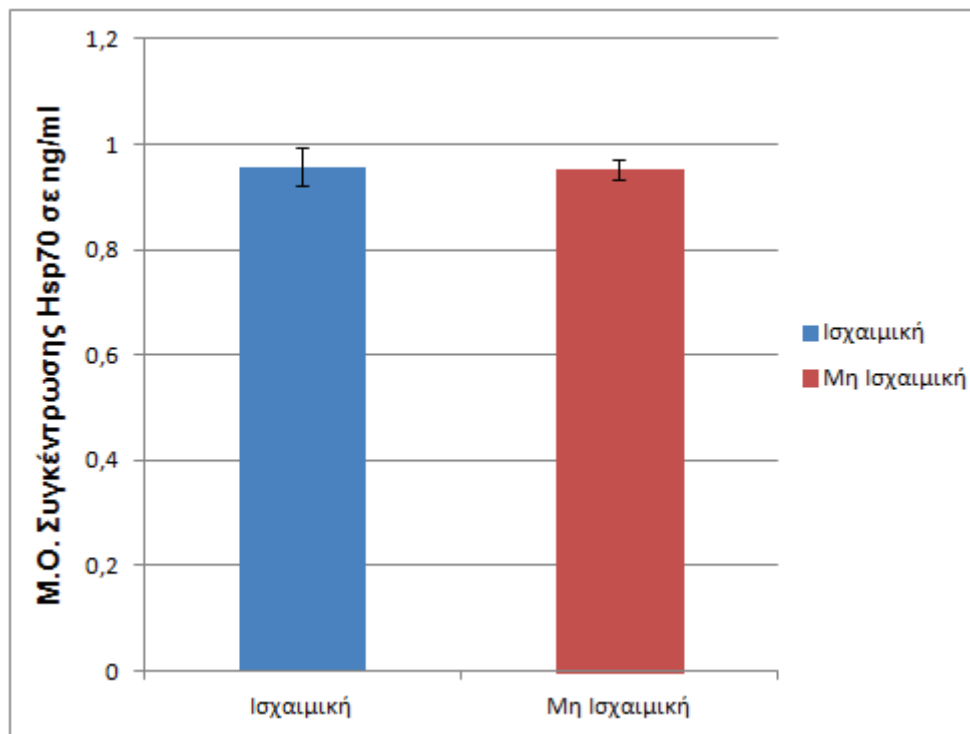


**Εικόνα 3.79:** Συγκριτική γραφική απεικόνιση της μέσης ποσότητας της επαγόμενης Hsp70 σε ορούς αίματος ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια (Κ.Α.) ως προς την ηλικία ( $p=0,0034$ ).

Στη συνέχεια, με σκοπό να μελετήσουμε εάν η ποσότητα της επαγόμενης Hsp70 επηρεάζεται από ορισμένα χαρακτηριστικά της ασθένειας, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με τα κλινικά χαρακτηριστικά της καρδιακής ανεπάρκειας και υπολογίστηκε η μέση τιμή της πρωτεΐνης στους ορούς των ομάδων αυτών των ασθενών. Όλοι οι οροί, που είχαμε στη διάθεση μας, ήταν από ασθενείς με μορφή αριστερής καρδιακής ανεπάρκειας. Έπειτα, οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε δύο κατηγορίες με βάση τον τύπο της καρδιακής ανεπάρκειας, που ανέπτυξαν, στην ομάδα, που εμφάνισε συστολική καρδιακή ανεπάρκεια ( $n=18$ ) και στην ομάδα, που εμφάνισε διαστολική καρδιακή ανεπάρκεια ( $n=6$ ). Υπολογίστηκε η μέση τιμή της ποσότητας της επαγόμενης Hsp70 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω γράφημα (Εικόνα 3.80). Παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της Hsp70 από τους ορούς των ασθενών με συστολική καρδιακή ανεπάρκεια ήταν πιο αυξημένη σε σχέση με την τιμή της ποσότητας της πρωτεΐνης από τους, ορούς, που συλλέχθηκαν από τους ασθενείς με διαστολική καρδιακή ανεπάρκεια. Η διαφορά αυτή ανάμεσα στις δύο κατηγορίες ασθενών με διαφορετικό τύπο καρδιακής ανεπάρκειας, εμφανίζεται να είναι σημαντική, μετά από στατιστική ανάλυση, με  $p=0,0041$ . Επομένως, συμπεραίνεται ότι ο τύπος της καρδιακής ανεπάρκειας μπορεί να επηρεάζει την ποσότητα της επαγόμενης Hsp70 στον ορό του αίματος των ασθενών.



**Εικόνα 3.80:** Συγκριτική γραφική απεικόνιση της μέσης ποσότητας της επαγόμενης Hsp70 σε ορούς αίματος ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια (Κ.Α.) ως προς τον τύπο της καρδιακής ανεπάρκειας ( $p=0,0041$ ).



**Εικόνα 3.81:** Συγκριτική γραφική απεικόνιση της μέσης ποσότητας της επαγόμενης Hsp70 σε ορούς αίματος ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια (Κ.Α.) ως προς το αίτιο της καρδιακής ανεπάρκειας ( $p=0,82$ ).

Τέλος, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν και ανάλογα με το αίτιο της καρδιακής ανεπάρκειας και υπολογίστηκε η μέση τιμή της επαγόμενης Hsp70 σε ορούς αίματος των ασθενών αυτών. Οι δύο ομάδες, που σχηματίστηκαν, ήταν οι ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια ισχαιμικής αιτιολογίας (n=13) και οι ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια μη ισχαιμικής αιτιολογίας (n=11). Όπως παρατηρείται στην εικόνα 3.81, το ποσό της πρωτεΐνης στους ορούς των δύο ομάδων των ασθενών αυτών δεν δείχνει να παρουσιάζει ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ τους. Αυτό αποδεικνύεται και μετά από στατιστική ανάλυση, αφού η διαφορά, που παρατηρείται ανάμεσα στις δύο κατηγορίες ασθενών, είναι ασήμαντη ( $p=0,82$ ), κάτι, που είναι λογικό, καθώς η μέση τιμή της συγκέντρωσης της Hsp70 είναι παραπλήσια στους ορούς των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια ισχαιμικής αιτιολογίας και σε αυτούς των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια μη ισχαιμικής αιτιολογίας. Επομένως, η ποσότητα της επαγόμενης Hsp70 στους ορούς των ασθενών δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την αιτία πρόκλησης της καρδιακής ανεπάρκειας.

Τα αποτελέσματα μας αυτά ως προς την έκφραση της Hsp70 στους ορούς αίματος ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια, ανάλογα και με τα χαρακτηριστικά και την κλινική τους εικόνα, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και θα πρέπει να επαληθευτούν και σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών.



## **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**





Από την ανακάλυψη των πρωτεϊνών του θερμικού σοκ [186] μέχρι και σήμερα, οι διάφορες πρωτεΐνες της οικογένειας των μοριακών συνοδών, βρίσκονται συχνά στο επίκεντρο της έρευνας. Η πρωτεΐνη του θερμικού σοκ των 70 kDa (Hsp70) συνιστά ένα από τα δημοφιλέστερα μέλη της οικογένειας των μοριακών συνοδών, ενώ ταυτόχρονα είναι η πιο σημαντική πρωτεΐνη θερμικού σοκ, η οποία επάγεται στα κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε πολλά διαφορετικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα, φυσικά ή χημικά.

Η HSP70 συμμετέχει σε ευρείας κλίμακας διαδικασίες. Στο μοριακό επίπεδο, η HSP70 εμπλέκεται στην πρωτεϊνική αναδίπλωση, την πρωτεϊνική μετακίνηση, τον πρωτεϊνικό καταβολισμό και την επιδιόρθωση του DNA, πάντοτε σε συνεργασία με μία ομάδα ομο-συνοδών πρωτεϊνών [105, 109, 111]. Στο κυτταρικό επίπεδο, επίσης, έχει αποδειχθεί η εμπλοκή της HSP70 σε προστατευτικούς μηχανισμούς, όπως τη βιωσιμότητα των κυττάρων ενάντια σε υψηλές θερμοκρασίες [72, 250], σε άλλα είδη στρες [827] καθώς και στον κυτταρικό θάνατο ή απόπτωση [260, 828, 829]. Τέλος, στο επίπεδο ολόκληρου του οργανισμού, η HSP70 φαίνεται να συσχετίζεται με ασθένειες ή παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως το ισχαιμικό σοκ (παρέχοντας προστασία στα κύτταρα του μυοκαρδίου) [78], την καρδιακή ανεπάρκεια [816, 830], τις καρδιαγγειακές παθήσεις [268], τις πνευμονοπάθειες [269], τις μυοπάθειες [270], τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες [831] και τον καρκίνο [832]. Η επιβεβαίωση της εμπλοκής της Hsp70 σε καρδιακές παθήσεις, έρχεται από φαρμακολογικές ή γενετικές μεθόδους, οι οποίες αυξάνοντας την έκφραση της πρωτεΐνης στο μυοκάρδιο των ασθενών με κίνδυνο οξέος ισχαιμικού επεισοδίου, μπορούν και μειώνουν το ισχαιμικό τραύμα [322].

Επειδή η πρωτεϊνική αστάθεια είναι το κύριο πρόβλημα των κυττάρων μετά από την έκθεσή τους σε στρες, πολλές εκ των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, μεταξύ αυτών και η Hsp70, δρουν σαν μοριακοί συνοδοί, που συνεισφέρουν στην αναδίπλωση και τη σταθερότητα των πρωτεϊνών [68, 75, 833, 834]. Γνωρίζουμε ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, όπως και η Hsp70, επάγονται, όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως για παράδειγμα το θερμικό στρες και μετακομίζουν στον πυρήνα και τους πυρηνίσκους [223], όμως συνεχίζει να παραμένει άγνωστη η εκεί λειτουργία τους. Επί σειρά ετών δεν ήταν γνωστός στην επιστημονική κοινότητα ο λόγος για τον οποίο η Hsp70 επάγεται στα κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε στρες, μετατοπίζεται και συσσωρεύεται στον πυρήνα και ιδιαίτερα στους πυρηνίσκους. Πιο πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι ο λόγος της μετακίνησης της πρωτεΐνης Hsp70 στον πυρήνα και τους πυρηνίσκους αφορά την προστασία και διατήρηση της ποιότητας των πρωτεϊνών και του DNA. Σύμφωνα με το μοντέλο που προτάθηκε, η μετατόπιση της Hsp70 προς τον πυρήνα και τους πυρηνίσκους μετά από στρες, γίνεται προκειμένου αυτή να συμμετάσχει σε μονοπάτι, που σχετίζεται με την προστασία του νουκλεοπλασματικού και του ριβοσωμικού DNA των πυρηνίσκων από σημειακές θραύσεις, και η δράση της επιτελείται με πρόσδεση της με την PARP-1 και την XRCC1 [66].

Στην *in vivo* μελέτη μας προσδιορίστηκε ο ρόλος της Hsp70 στην καρδιακή ανεπάρκεια, χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο διαγονιδιακών ποντικών, τα οποία υπερεκφράζουν σε όλους τους ιστούς, που ελέγχθηκαν (όπως και στον ιστό της καρδιάς), την ανθρώπινη πρωτεΐνη Hsp70 (Heat shock protein 70). Για το σκέλος αυτό, ακολουθήθηκε η επαγόμενη από δοξορουβική καρδιακή ανεπάρκεια, μια πολύ γνωστή παρενέργεια, που προκαλεί η δοξορουβική σε καρκινοπαθείς, οι οποίοι δέχονται θεραπεία με το εν λόγω κυτταροστατικό φάρμακο [578].

Αρχικά, ερευνήθηκε ο μηχανισμός της προστασίας της καρδιάς σε επίπεδο πειραματοζώων. Για τις πειραματικές ανάγκες, πραγματοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο

διαλείπουσας ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης δοξορουβικίνης σε ποντίκια αγρίου τύπου και ποντίκια, που έχουν τροποποιηθεί γενετικά ώστε να υπερεκφράζουν την ανθρώπινη Hsp70. 84 ποντίκια (ομόζυγα αγρίου τύπου F1/F1 και ομόζυγα Hsp70-διαγονιδιακά Tg/Tg ποντίκια), επιλέχθηκαν μέσω ανάλυσης με PCR (Εικόνα 3.1) και χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της μελέτης μας. Χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες ποντίκια και των δύο ομάδων, στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε κάποια επεξεργασία, προχωρήσαμε, ακολούθως, σε υπερηχοκαρδιογραφικό έλεγχο της καρδιακής λειτουργίας των ζώων σε χρονικά πλαίσια των 4, 6 και 10 εβδομάδων, μετά από την πραγματοποίηση των εβδομαδιαίων ενέσεων δοξορουβικίνης. Όπως αναμενόταν, η χορήγηση δοξορουβικίνης προκάλεσε στα ζώα καρδιακή ανεπάρκεια, η οποία βάσει των υπερηχοκαρδιογραφικών μετρήσεων, φαίνεται να εγκαθίσταται στις 6 εβδομάδες και στις δύο ομάδες ζώων. Στην περίπτωση, όμως, των αγρίου τύπου ποντικιών, η καρδιακή ανεπάρκεια είναι πιο βαριάς μορφής, όπως αποκαλύπτεται από τους καρδιακούς δείκτες, αλλά και τη θνητότητα των ζώων σε κάθε χρονικό σημείο. Αντιθέτως, τα διαγονιδιακά ως προς την έκφραση της Hsp70 ζώα, εμφανίζουν μια ηπιότερης μορφής καρδιακή ανεπάρκεια, η οποία στις 10 εβδομάδες τείνει να ανακάμψει, όπως φανερώνουν οι δείκτες καρδιακής λειτουργίας. Παράλληλα, τα ζώα αυτά εμφανίζουν μικρότερα ποσοστά θνητότητας. Έτσι, οδηγούμαστε σε ένα πρώιμο συμπέρασμα ότι η Hsp70 βοηθά στην ανάκαμψη της καρδιακής λειτουργίας και την επιβίωση των ζώων μετά από την από δοξορουβικίνη επαγόμενη καρδιακή ανεπάρκεια.

Από τα αποτελέσματα μας αυτά επιβεβαιώθηκε η προστατευτική επίδραση της Hsp70 στα Tg/Tg ποντίκια, που υπερεκφράζουν την ανθρώπινη Hsp70 σε όλα τα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των κυττάρων της καρδιάς [811], σε σύγκριση με τα F1/F1 αγρίου τύπου ποντίκια. Πιο συγκεκριμένα, τα τρέχοντα αποτελέσματα μας στα ποντίκια, μετά από χρόνια χορήγηση δοξορουβικίνης, που επάγει την καρδιακή δυσλειτουργία, έδειξαν ότι η Hsp70 μπορεί να παρέχει προστασία ενάντια στην επαγόμενη από το φάρμακο βλάβη του μυοκαρδίου, όπως εκτιμήθηκε από τη χαμηλότερη θνησιμότητα, τη διατήρηση του σωματικού βάρους και την καλύτερη συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας στα διαγονιδιακά Tg/Tg σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου F1/F1 ποντίκια. Όπως προσδιορίστηκε με διαθωρακική ηχοκαρδιογραφία, η μείωση της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας (Εικόνα 3.5), μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου, εξασθένησε στα Tg/Tg ποντίκια σε σύγκριση με τα F1/F1, υποδηλώνοντας ότι η υπερέκφραση της Hsp70 συνεισέφερε στην προστασία της καρδιάς των ζώων ενάντια στη δοξορουβικίνη.

Οι επιπτώσεις της δοξορουβικίνης στην καρδιακή λειτουργία έχουν παρατηρηθεί σε μοντέλα πειραματοζώων με χρήση ηχοκαρδιογραφίας, σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [835-838]. Μια προστατευτική επίδραση της Hsp70 στο μυοκάρδιο στη ρύθμιση της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης [808, 839] και στην κολπική μαρμαρυγή [840] έχει αποδειχθεί, ενώ ο ρόλος της Hsp70 στην καρδιακή ανεπάρκεια δεν έχει αποκλειστεί [323, 841]. Η αναστολή της απόπτωσης και των προφλεγμονωδών κυτοκινών, η επιδιόρθωση των καναλιών ιόντων, η αποκατάσταση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και η αλληλεπίδραση στην επαγόμενη από νιτρικό οξείδιο προστασία, έχουν αναφερθεί ως μηχανισμοί, μέσω των οποίων η Hsp70 μπορεί να προστατεύει τα κύτταρα της καρδιάς [842]. Μια προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι η Hsp70 παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του μυοκαρδίου από την απόπτωση μετά από ισχαιμία-επαναιμάτωση [78]. Επίσης, προηγούμενες μελέτες έδειξαν μια δυνητική παρέμβαση της Hsp70 στην καρδιοτοξικότητα, που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη [785, 843-845].

Άλλες πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsps), εμπλέκονται, επίσης, στην προστασία της καρδιάς από την επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητα, ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγονται οι Hsp60 [846], Hsp20 [711] και Hsp27 [788]. Σημαντική προσθήκη σε αυτό το πεδίο αποτέλεσε μια μελέτη για το ρόλο του HSF1, ενός μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί ταυτόχρονα πολλά γονίδια του θερμικού σοκ (heat shock genes) με το στοιχείο θερμικού σοκ, HSE (heat shock element), στην επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιακή ανεπάρκεια [781]. Επομένως, δεν γνωρίζουμε ακόμα, ποια από τα επαγόμενα γονίδια εμπλέκονται στην εγκαθίδρυση της καρδιακής ανεπάρκειας. Επιπλέον, ο μηχανισμός δράσης της προστατευτικής επίδρασης της Hsp70 στην επαγόμενη από δοξορουβικίνη μυοκαρδιοπάθεια, δεν έχει προηγουμένως μελετηθεί σε ζωικό μοντέλο.

Η ταχέως αναπτυσσόμενη συσσώρευση των αποδείξεων υποστηρίζει την ιδέα ότι η απόπτωση και η νέκρωση τόσο των ενδοθηλιακών κυττάρων όσο και των καρδιομυοκυττάρων εμπλέκονται στην επαγόμενη από δοξορουβικίνη τοξικότητα [684, 685]. Ο προστατευτικός ρόλος της Hsp70 ενάντια στην επαγόμενη από δοξορουβικίνη απόπτωση μπορεί να περιλαμβάνει κάποια πτυχή του ρόλου της στην αναδίπλωση και την επιδιόρθωση της λειτουργίας των πρωτεϊνών, που είναι σημαντικές για την αναστολή της απόπτωσης στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα, καθώς και την εμπλοκή της στα αποπτωτικά μονοπάτια, που προαναφέρθηκαν, και που επάγονται από τη δοξορουβικίνη.

Επειδή όμως μόνο οι κλινικές παρατηρήσεις δεν ήταν αρκετές για να υποστηρίξουν την υπόθεση για την προστασία του μυοκαρδίου από την Hsp70, επιχειρήθηκε η βιοχημική ανάλυση των κυττάρων του μυοκαρδίου και των αποπτωτικών μηχανισμών, που ενεργοποιούνται μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης. Επίσης, μελετήθηκε και το επίπεδο, που μπορεί η Hsp70 να αναστείλει τον επαγόμενο από δοξορουβικίνη κυτταρικό θάνατο στα καρδιομυοκύτταρα.

Αφού επιβεβαιώθηκε η εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας μετά τη χορήγηση της δοξορουβικίνης, αλλά και ο προστατευτικός ρόλος της Hsp70 σε επίπεδο ζώου, στόχος μας ήταν η επιβεβαίωση της προστασίας της Hsp70 στα κύτταρα του μυοκαρδίου από την απόπτωση, καθώς και η βιοχημική μελέτη του μονοπατιού, μέσω του οποίου η Hsp70 προστατεύει τον καρδιακό ιστό από την επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιακή ανεπάρκεια.

Μετά την απομόνωση του καρδιακού ιστού από τα αγρίου τύπου και τα διαγονιδιακά ποντίκια πριν από τη χορήγηση δοξορουβικίνης, αλλά και σε χρονικά διαστήματα 4, 6 και 10 εβδομάδων μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης και τη λήψη του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, αρχικά, προσδιορίστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης Hsp70 μέσω ανοσοαποτύπωσης (Εικόνα 3.6). Παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη Hsp70 εκφράζεται σε υψηλό βαθμό μόνο στα Tg/Tg διαγονιδιακά ποντίκια. Αντίθετα, στα F1/F1 ποντίκια εμφανίζεται μια μικρή αύξηση στο ποσό της Hsp70, και κυρίως στις 4 εβδομάδες μετά τη χορήγηση της δοξορουβικίνης, χωρίς, πάντως η αύξηση αυτή να φαίνεται να είναι σημαντική. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε προηγούμενες μελέτες, όπου δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στα επίπεδα της Hsp70 στις καρδιές ποντικών μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης [847]. Επίσης, έχει δείχτει ότι η μεταχείριση με δοξορουβικίνη δεν είχε καμιά επίδραση στα επίπεδα της Hsp72 της καρδιάς σε ενήλικους αρσενικούς Sprague-Dawley αρουραίους [848].

Μία μη αναμενόμενη χαμηλότερη έκφραση της Hsp70 παρατηρήθηκε στα Tg/Tg ποντίκια στις 4, 6 και 10 εβδομάδες μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης

(Εικόνα 3.6). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στα Tg/Tg κύτταρα, όταν εκτέθηκαν για 48 ώρες σε συγκεντρώσεις του φαρμάκου των 5, 10 και 25  $\mu\text{M}$  (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, που έδειξαν ότι η μειωμένη συσσώρευση της Hsp70 μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε “Wistar” αρουραίους, μπορεί να αποδοθεί στην αποικοδόμηση της Hsp70 από τη δοξορουβικίνη [849]. Μία σχετικά πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι μια θεραπευτική δόση της δοξορουβικίνης ενεργοποιεί τη διαμεσολαβούμενη από το σύστημα ουβικιτίνης/πρωτεασώματος πρωτεόλυση, δρώντας σε αμφότερα τη συσκευή ουβικιτινίωσης και το πρωτεάσωμα [850]. Επιπλέον, έχειδειχτεί ότι η CHIP δρα ως λιγάση ουβικιτίνης, διαμεσολαμβάνοντας κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ανάκαμψης στο στρες με διαδοχική ουβικιτινίωση υποστρωμάτων και της Hsp70 [851], παρόλο που απαιτείται περαιτέρω έρευνα, προκειμένου να διευκρινιστεί αυτή η πτυχή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και εάν συνεισφέρει στην καρδιοτοξικότητα, που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη.

Ακολούθως, μελετήθηκε η απόπτωση στους ιστούς αμφότερων των F1/F1 και Tg/Tg ποντικών. Η ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων του μυοκαρδίου, έδειξαν ότι η διασπασμένη κασπάση-9 και η ενεργή κασπάση-3 υπορυθμίστηκαν στα κύτταρα των ιστών, που υπερεκφράζουν την Hsp70. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι στα διαγονιδιακά ζώα, τα οποία υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 είναι κατά πολύ μικρότερη, κυρίως, στις 6 και 10 εβδομάδες, σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια (Εικόνα 3.7A). Επίσης, παρατηρήθηκε πολύ μικρότερη ενεργοποίηση της κασπάσης-9 στην καρδιά των Tg/Tg ποντικών σε σύγκριση με τα F1/F1 ποντίκια σε όλα τα χρονικά σημεία της πειραματικής διαδικασίας μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης (Εικόνα 3.7B). Από την παρατήρηση μας αυτή συμπεραίνεται ότι η δοξορουβικίνη ενεργοποιεί το αποπτωτικό μονοπάτι, που περιλαμβάνει την κασπάση-9 και την κασπάση-3, και στις δύο ομάδες πειραματοζώων.

Σε πιο πρόσφατες μελέτες, έχειδειχτεί ότι οι επαγόμενες από δοξορουβικίνη θραύσεις του DNA και η ενεργοποίηση της PARP έχουν προσδιοριστεί ως ένας σημαντικός παράγοντας στις επαγόμενες από δοξορουβικίνη καρδιακές βλάβες [440-442]. Τα αποτελέσματα μας είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, αφού έχει παρατηρηθεί ότι η χορήγηση δοξορουβικίνης ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κασπασών [646, 698, 815]. Σε διαγονιδιακά ποντίκια, που υπερεκφράζουν την Hsp70, έχειδειχτεί η μειωμένη διάσπαση της κασπάσης-9 μετά από βλάβη υποξίας/ισχαιμίας [852]. Η επαγωγή της έκφρασης της Hsp70, επίσης, έχειδειχτεί σε προηγούμενες μελέτες, να καταστέλλει την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 σε μοντέλα ποντικών μετά από άσκηση [853] ή βλάβη ισχαιμίας [854]. Επομένως, το σημείο, που δρα η Hsp70 φαίνεται να είναι ανοδικά της ενεργοποίησης της κασπάσης-9 (και, συνεπώς, ανοδικά και της εκτελεστικής κασπάσης-3 στα τελικά στάδια της απόπτωσης), ελέγχοντας την απόπτωση των κυττάρων του μυοκαρδίου με αποτροπή της ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών.

Τα δύο μονοπάτια, τα οποία διεγείρουν την απόπτωση είναι το εσωτερικό και το εξωτερικό μονοπάτι. Μία πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι τα καρδιομυοκύτταρα είναι με συνέπεια ανθεκτικά στο εξωτερικό μονοπάτι [685]. Τα αποτελέσματα μιας άλλης μελέτης αποδεικνύουν ότι το εσωτερικό σηματοδοτικό μονοπάτι, και όχι το εξωτερικό, είναι ο κύριος μηχανισμός, που συμμετέχει στην επαγόμενη από δοξορουβικίνη απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων [855].

Μελέτες ανοσοφθορισμού σε τομές ιστών και συνεστιακή μικροσκοπία, χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα ενάντια στην ενεργοποιημένη μορφή της p53 (φωσφορυλιωμένη p53 (Ser15)) ενίσχυσαν την παρατήρηση ότι η Hsp70 παρέχει

προστασία ενάντια στην p53-απόπτωση (Καλαϊτζακης, [816]). Η ενεργοποίηση της p53 ως απόκριση στη χορήγηση δοξορουβικίνης έχει αναφερθεί σε καρδιακούς ιστούς [856]. Όπως έχει αποδειχθεί η φωσφορυλιωμένη p53 εμπλέκεται στο μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι με την ενεργοποίηση της Bax-1 [857]. Στη συνέχεια της έρευνας, μελετήθηκε η ενεργοποίηση της p53, καθώς μετατοπίζεται από τον πυρήνα στο μονοπάτι στα μιτοχόνδρια. Στα F1/F1 δείγματα η φωσφορυλιωμένη μορφή της p53 ανιχνεύεται, κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και συσσωρεύεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα Tg/Tg κύτταρα. Η συσσώρευση της p53 στο κυτταρόπλασμα από τις τομές των F1/F1 ποντικών είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, που έδειξαν τη μετατόπιση της φωσφορυλιωμένης μορφής της p53 στο κυτταρόπλασμα ή τα μιτοχόνδρια [858].

Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι τα διαγονιδιακά ποντίκια, που υπερεκφράζουν την Hsp70, επιδεικνύουν αυξημένη αντίσταση στο p53-αποπτωτικό μονοπάτι, το οποίο με τη σειρά του, μπορεί να προκαλεί καθυστέρηση στην επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιακή ανεπάρκεια. Ο ακριβής μηχανισμός, με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό, παραμένει αδιευκρίνιστος. Πειράματα δέσμευσης της Hsp70 με πληθυσμούς της p53 προτείνουν την εμπλοκή της Hsp70 στην ενεργοποίηση της p53 (Αγγελίδης, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Πολυάριθμες μελέτες έδειξαν ότι η επαγόμενη από DOX απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων συσχετίζεται με αυξημένη έκφραση και ενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 [696-698]. Η σημασία της p53 στην πρόκληση καρδιοτοξικότητας από τη δοξορουβικίνη έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια με αποσιώπηση της p53, όπου εξασθένησε η μείωση της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας και η απόπτωση των μυοκυττάρων, που προκαλούνται από το φάρμακο [859]. Βλάβες του DNA, που επάγονται από τις ROS ή άμεσα από τη DOX, ενεργοποιούν την ERK1/2, που ακολουθείται από αυξημένη φωσφορυλίωση της p53 και η τελευταία υπερρυθμίζει περαιτέρω καθοδικά της p53 γονίδια, όπως η Bax. Κατά την ενεργοποίηση, η p53 επάγει την έκφραση των γονιδίων, που συσχετίζονται με παύση του κυτταρικού κύκλου (cell arrest), επιδιόρθωση του DNA και απόπτωση [698].

Αφού εξετάστηκε ο προστατευτικός ρόλος της πρωτεΐνης Hsp70 ενάντια στην καρδιακή ανεπάρκεια, που προκαλείται από τη χορήγηση δοξορουβικίνης σε επίπεδο πειραματοζώων, στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι επιπτώσεις του φαρμάκου και η επίδραση της Hsp70 σε κυτταρικό επίπεδο. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς εμβρυικές κυτταρικές σειρές, που απομονώθηκαν από έμβρυα ποντικών των Hsp70-διαγονιδιακών (Tg/Tg) και αγρίου τύπου (F1/F1) ζώων (μετά από περίπου 80 γενιές). Αρχικά, επιβεβαιώθηκε η υπερέκφραση της Hsp70 στα Tg/Tg κύτταρα, που προέρχονται από τα διαγονιδιακά ποντίκια, σε αντίθεση με τα F1/F1, όπου η πρωτεΐνη Hsp70 δεν ανιχνεύεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Western Blotting) και με ανάλυση σε κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα ενάντια στην επαγόμενη Hsp70. Όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ, ήταν εμφανής η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Hsp70, και ιδιαίτερα στα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα.

Αρχικά, λοιπόν, στο πειραματικό μας πρωτόκολλο προσδιορίστηκε η τοξικότητα του φαρμάκου με μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από έκθεση τους σε διάφορες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για χρονική διάρκεια επώασης 24 και 48 ωρών, με τη μέθοδο αποκλεισμού της χρωστικής Trypan Blue. Από τις μετρήσεις μας αποκαλύφθηκε μια δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας και για τις δύο κυτταρικές σειρές. Έτσι, αυξανόμενης της συγκέντρωσης της δοξορουβικίνης, παρατηρήθηκε μείωση της κυτταρικής επιβίωσης

και συγκρίνοντας τις δύο χρονικές διάρκειες επώασης, παρουσιάστηκαν μειωμένα ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων ύστερα από 48 ώρες επώασης στο φάρμακο σε σχέση με τις 24 ώρες. Επίσης, από τα ιστογράμματα των ποσοστών βιωσιμότητας, ήταν εμφανής η αυξημένη επιβίωση των Tg/Tg κυττάρων, που υπερεκφράζουν την Hsp70, σε σύγκριση με τα F1/F1 κύτταρα με μη ανιχνεύσιμα ποσά της Hsp70, για τις δύο χρονικές διάρκειες των 24 και 48 ωρών και για όλες τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου, προτείνοντας, επομένως, ότι η παρουσία της Hsp70 στα Tg/Tg κύτταρα προσδίδει σε αυτά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη δοξορουβικίνη.

Στη συνέχεια, η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των Tg/Tg κυττάρων, στα οποία υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη Hsp70, σε σχέση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα, επιβεβαιώθηκε και με την εκτίμηση της ικανότητας των κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες με τη μέθοδο “Colony formation assay”. Από τα αποτελέσματα μας, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση της ικανότητας σχηματισμού αποικιών με αύξηση είτε της συγκέντρωσης της δοξορουβικίνης είτε με αύξηση του χρόνου επώασης των κυττάρων με το φάρμακο. Η δοξορουβικίνη, επομένως, εμφανίζεται να προκαλεί δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση του αριθμού των αποικιών, που σχηματίζουν τα κύτταρα. Είναι εμφανής η έντονη τοξικότητα του κυτταροστατικού φαρμάκου δοξορουβικίνη, και στις δύο κυτταρικές σειρές, η δράση της οποίας δεν επιτρέπει στα κύτταρα να αναπτύσσουν αποικίες, καθώς ο αριθμός των αποικιών, που σχηματίζονται είναι ιδιαίτερα μειωμένος από τις μικρές συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Επομένως, παρόλο που παρατηρήθηκε επιβίωση των κυττάρων στις συγκεντρώσεις αυτές με τις υπόλοιπες μεθόδους, φαίνεται ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί στα κύτταρα απώλεια της ικανότητας τους να αναπτύσσουν αποικίες. Η έντονη αυτή μείωση του αριθμού των αποικιών είναι πιο έκδηλη στα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα σε σχέση με τα Tg/Tg κύτταρα. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Hsp70 φαίνεται να καθιστά τα κύτταρα Tg/Tg ανθεκτικότερα, με μεγαλύτερες αντιστάσεις και ικανότερα όχι μόνο να επιβιώσουν, αλλά και να έχουν τη δυνατότητα ανάπτυξης αποικιών στις διάφορες τοξικές συγκεντρώσεις της δοξορουβικίνης. Έτσι, θεωρούμε ότι η μεγαλύτερη δυνατότητα σχηματισμού αποικιών από τα Tg/Tg κύτταρα, οφείλεται πιθανά στην αυξημένη παραγωγή της Hsp70, σε σχέση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου.

Με σκοπό την ανίχνευση του τρόπου κυτταρικού θανάτου, που προκαλεί η δοξορουβικίνη στα κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (pI) και Αννεξίνη V και πραγματοποιήθηκε μέτρηση σε κυτταρόμετρο. Με χρήση της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα συνολικά ποσοστά απόπτωσης και νέκρωσης των κυττάρων (καθώς και το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων) μετά από προσθήκη δοξορουβικίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις στο μέσο επώασης και για χρόνο 24 και 48 ωρών. Όπως αποδείχτηκε από τις μετρήσεις μας, η κυτταροστατική ουσία δοξορουβικίνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα, ο οποίος, σύμφωνα με τις παρατηρήσεις μας, διενεργείται, κατά κύριο λόγο, μέσω της αποπτωτικής διαδικασίας.

Βιβλιογραφικά, έχει αποδειχθεί ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο, τουλάχιστον εν μέρει, επάγοντας την απόπτωση [860]. Τα αποτελέσματα μας είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, που έδειξαν ότι η δοξορουβικίνη επάγει την απόπτωση σε φυσιολογικές (ενδοθηλιακά κύτταρα και καρδιομυοκύτταρα) και καρκινικές κυτταρικές σειρές μέσω διαφόρων μηχανισμών [861, 862]. Επίσης, σε έρευνα με πρωτογενείς εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικών (MEFs) παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση μετά από μεταχείριση με δοξορουβικίνη [863]. Ακόμη, το φάρμακο έχει δείξει να επάγει την απόπτωση και την αναστολή της ανάπτυξης των H9c2 κυττάρων (μυοβλάστες αρουραίου) [864].

Συνολικά, από τα αποτελέσματα μας με την κυτταρομετρία ροής προέκυψε ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενη αύξηση των ποσοστών συνολικής απόπτωσης και νέκρωσης στα κύτταρα, ενώ επίσης εξαρτάται και από το είδος των πρωτογενών κυτταρικών σειρών, αφού φαίνεται η αυξημένη επιβίωση των Tg/Tg κυττάρων σε σύγκριση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου. Οι μετρήσεις των ποσοστών των αποπτωτικών κυττάρων έδειξαν ότι τα F1/F1 κύτταρα με μη ανιχνεύσιμα ποσά της Hsp70, παρουσιάζουν αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα σε σύγκριση με τα Tg/Tg κύτταρα για 24 και 48 ώρες, προτείνοντας επομένως, ότι η παρουσία της Hsp70 στα Tg/Tg κύτταρα ελαττώνει τα ποσοστά της απόπτωσης, που προκαλείται από το φάρμακο. Επομένως, και με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής διαφαίνεται η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των Tg/Tg κυττάρων, τα οποία προέρχονται από τα διαγονιδιακά ποντίκια, που υπερεκφράζουν την Hsp70, ενάντια στην τοξικότητα της δοξορουβικίνης, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα.

Κατόπιν η τοξική δράση του κυτταροστατικού φαρμάκου, επιβεβαιώθηκε και με τη μέθοδο του MTT, με την οποία μετρήθηκαν τα ποσοστά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά από χορήγηση διαφόρων δόσεων δοξορουβικίνης και για διάφορες χρονικές διάρκειες (12, 24, 36 και 48 ώρες) επώασης με το φάρμακο, ενώ παράλληλα υπολογίστηκαν οι τιμές IC<sub>50</sub> για κάθε χρόνο επώασης σε κάθε κυτταρική σειρά. Συμπερασματικά, αποφανθήκαμε ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση των ποσοστών του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ενώ επίσης, εξαρτάται και από το είδος των πρωτογενών κυτταρικών σειρών. Όπως είναι εμφανές από τις καμπύλες επιβίωσης και τα γραφήματα με τα ποσοστά του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τα Tg/Tg κύτταρα, τα οποία υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σύγκριση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν, ήταν αντίστοιχα με αυτά, που παρατηρήθηκαν και με τις προηγούμενες μεθόδους. Από τους υπολογισμούς των τιμών του IC<sub>50</sub> (όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3) φαίνεται, επίσης, η αυξημένη επιβίωση των Tg/Tg κυττάρων σε σχέση με τα F1/F1 κύτταρα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης με δοξορουβικίνη. Επομένως, η ποσότητα του φαρμάκου, που απαιτείται, για να επιτευχθεί η ίδια τοξική δράση στον κυτταρικό πληθυσμό, είναι σαφώς μεγαλύτερη στα Tg/Tg κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα. Παράλληλα, αυτό σημαίνει ότι η ίδια ποσότητα του φαρμάκου έχει λιγότερες επιπτώσεις στον κυτταρικό πληθυσμό των Tg/Tg κυττάρων από ότι στα F1/F1 κύτταρα. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ο σημαντικός ρόλος της Hsp70, που προσδίδει προστασία στα κύτταρα, ελαττώνοντας τις βλαπτικές συνέπειες της τοξικής δράσης της δοξορουβικίνης.

Συνολικά, με τη χρήση όλων των παραπάνω μεθόδων, αποδείχθηκε η προστασία, που προσδίδει η πρωτεΐνη Hsp70 στα κύτταρα, τα οποία επιδεικνύουν αυξημένη επιβίωση και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα ενάντια στις επιπτώσεις, που προκαλεί η χορήγηση της δοξορουβικίνης. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν πρώτη φορά σε πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα και σε κύτταρα, που προέρχονται από διαγονιδιακά ποντίκια, που υπερεκφράζουν την Hsp70.

Τα αποτελέσματα μας αυτά συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Πολυάριθμες μελέτες, οι οποίες έχουν χρησιμοποιήσει τις ίδιες πειραματικές μεθόδους με τη δική μας έρευνα, έχουν πραγματοποιηθεί και έχουν δείξει την τοξικότητα του φαρμάκου σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Η δοξορουβικίνη έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την κυτταρική βιωσιμότητα και επάγει την απόπτωση των κυττάρων με δοσο-εξαρτώμενο και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο τόσο σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές, όπως σε H9c2 κύτταρα μυοβλαστών [864, 865], σε ενδοθηλιακά BAEC κύτταρα [861], σε Raji κύτταρα λεμφοβλαστών [866] και σε

κύτταρα ζύμης *Candida utilis* [867], όσο και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως σε HeLa κύτταρα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [865], FTC 133 κύτταρα καρκίνου του θυροειδούς [862], PA-1 κύτταρα καρκίνου ωοθηκών [861] και A549 κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα [868].

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη Hsp70 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, την ανάπτυξη και την απόπτωση. Η υπερέκφραση της Hsp70 έχει δείξει ότι καθιστά τα WEHI-S κύτταρα (κυτταρική σειρά ινοσαρκώματος ποντικού) ανθεκτικά στην τοξική δράση της δοξορουβικίνης [261]. Μία άλλη μελέτη, που χρησιμοποίησε την ίδια κυτταρική σειρά, έδειξε ότι τα κύτταρα που υπερεκφράζουν την Hsp70, επέδειξαν αυξημένη επιβίωση σε διάφορες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου [785]. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην καρκινική κυτταρική σειρά τραχήλου της μήτρας (ME-180 cells) [486]. Επίσης, σε μια άλλη έρευνα έχει δείξει ότι φαρμακολογική επαγωγή της Hsp70 αυξάνει τη βιωσιμότητα και προσδίδει ανθεκτικότητα σε HL-60 κύτταρα ενάντια στην απόπτωση, που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη [782]. Τέλος, σε μία άλλη έρευνα σε Raji κύτταρα, αποδείχτηκε ότι η αυξημένη έκφραση της Hsp70, μετά από υπερθερμία, αύξησε την επιβίωση και προστατεύσε τα κύτταρα από την τοξικότητα του φαρμάκου [866]. Από τη βιβλιογραφία καθίσταται σαφές, λοιπόν, η προστατευτική επίδραση της Hsp70 στα κύτταρα ενάντια σε ένα μεγάλο εύρος στρεσογόνων παραγόντων, έναν από τους οποίους αποτελεί και η δοξορουβικίνη.

Αφού επιβεβαιώθηκε με τις παραπάνω μεθόδους ο κυτταρικός θάνατος, που προκαλείται από την τοξικότητα της δοξορουβικίνης στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα, μέσω της αποπτωτικής διαδικασίας, στη συνέχεια, ακολούθησε η μελέτη του μηχανισμού δράσης του φαρμάκου και του πιθανού τρόπου, με τον οποίο ασκεί η Hsp70 την προστατευτική δράση της στα κύτταρα μετά από τη χορήγηση της δοξορουβικίνης. Προκειμένου να εξεταστεί το αποπτωτικό μονοπάτι, που ενεργοποιείται μετά από έκθεση σε δοξορουβικίνη, χρησιμοποιήθηκαν φυσικά αθανατοποιημένα πρωτογενή εμβρυονικά κύτταρα (πάνω από 80 γενεών), που απομονώθηκαν από έγκυες μητέρες αγρίου τύπου ποντικών (F1/F1 κύτταρα) ή ομόζυγων διαγονιδιακών ποντικών, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70 (Tg/Tg κύτταρα). Υποθέσαμε ότι αυτές οι κυτταρικές σειρές θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα χρήσιμο εργαλείο ώστε να καθοριστεί, αφ' ενός, ο αποπτωτικός μηχανισμός, ο οποίος επάγεται από τη δοξορουβικίνη και αφ' ετέρου, το σημείο δράσης της Hsp70 στο μονοπάτι.

Υπάρχουν εκτεταμένες μελέτες, που υποδηλώνουν μια πιθανή σχέση ανάμεσα στην υπερέκφραση της Hsp70 και την προστασία από βλάβες στο DNA, όπως σχάσεις μονής και διπλής έλικας, που προκαλούνται από διάφορα ερεθίσματα, όπως ακραίο θερμικό στρες, απουσία οξυγόνου, βαρέα μέταλλα, UV ακτινοβολία, γ-ακτινοβολία και χημικές ενώσεις [254, 255].

Προηγούμενες μελέτες σε κυτταρικό επίπεδο έχουν δείξει ότι η Hsp70 μπορεί να παρεμποδίζει πολλαπλά βήματα του αποπτωτικού καταρράκτη. Η Hsp70 έχει δείξει να μπλοκάρει την απόπτωση ανοδικά των μιτοχονδρίων, αποτρέποντας τη μετατόπιση της Bax [478], την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και του AIF (Apoptosis-Inducing Factor), την ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 και προκασπάσης-3, και ακόμη πιο καθοδικά της ενεργής κασπάσης-3 [261, 463, 472, 486, 490]. Αρκετές προγενέστερες μελέτες υποστήριξαν την προστατευτική επίδραση της Hsp70 στα κύτταρα, που έχουν μεταχειριστεί με δοξορουβικίνη. Σε μία μεγάλη μελέτη, που εκτιμήθηκαν οι μηχανισμοί, που διαμεσολαβούν στην κυτταροπροστασία ενάντια στη δοξορουβικίνη, μελετήθηκαν 71 γονίδια και στελέχη διαγραφής του



*Saccharomyces cerevisiae*, που εμφανίζουν ποικίλους βαθμούς υπερευαισθησίας στο φάρμακο [869]. Γονίδια, που εμπλέκονται σε πολλαπλά μονοπάτια, που περιλαμβάνουν την επιδιόρθωση του DNA, το μεταβολισμό του RNA, την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, το μεταβολισμό των αμινοξέων και την απόκριση στο θερμικό σοκ, βρέθηκαν να διαμεσολαβούν στην κυτταροπροστασία ενάντια στη δοξορουβικίνη. Ανάμεσα σε αυτά, το γονίδιο της Hsp70 εμφανίζεται να παίζει σημαντικό ρόλο. Η θερμική προεπεξεργασία προστατεύει αποτελεσματικά τα καρδιομυοκύτταρα ενάντια στην επαγόμενη από δοξορουβικίνη απόπτωση και η προστασία αυτή εξασθενεί από αποσιώπηση (knockdown) της Hsp70 στα καρδιομυοκύτταρα από αντιπληροφοριακό (anti-sense) αγγελιαφόρο RNA [870]. Η υπερέκφραση της Hsp70, έχει δείχτει παλαιότερα, να παρέχει προστασία ενάντια στην κυτταροτοξικότητα από το φάρμακο, και η συσσώρευση της Hsp70 έχει συσχετισθεί με βράχυνση (συντόμηση) της διαμεσολαβούμενης από DOX αναστολής του κυτταρικού κύκλου στην G2 φάση και επανέναρξη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κατόπιν χορηγήσεως δοξορουβικίνης [785, 843].

Όπως έχει αναφερθεί, τα μιτοχόνδρια παίζουν κεντρικό ρόλο στην ολοκλήρωση και διάδοση των σημάτων θανάτου, που προέρχονται από το εσωτερικό του κυττάρου, όπως η βλάβη του DNA, το οξειδωτικό στρες, η ασιτία, όπως και αυτών, που επάγονται από χημειοθεραπευτικά φάρμακα [388, 389]. Δεδομένου ότι η δοξορουβικίνη εισέρχεται στον πυρήνα και ασκεί την επίδραση της, προκαλώντας βλάβες στο DNA, εξετάστηκε η διέγερση του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού, που ενεργοποιείται μετά από βλάβη στο DNA [871, 872], με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Πιο συγκεκριμένα ερευνήθηκαν, η ενεργοποίηση των p53, Bax, κασπάση-9, κασπάση-3 και PARP-1, που εμπλέκονται σε αυτό το μονοπάτι και συγχρόνως η έκφραση και ο ρυθμιστικός ρόλος της Hsp70.

Όπως παρατηρήθηκε, η επώαση των κυττάρων της έρευνας με δοξορουβικίνη δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την έκφραση της Hsp70 και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 3.54). Η έκφραση της Hsp70 στα Tg/Tg κύτταρα παρέμεινε σχεδόν σταθερή και ήταν παρόμοια με αυτή των F1/F1 κυττάρων μετά από έκθεση τους σε θερμικό σοκ. Αντίθετα, η Hsp70 δεν ανιχνεύεται στα αγρίου τύπου κύτταρα (F1/F1) μετά από τη μεταχείριση με το φάρμακο. Από τα αποτελέσματα μας αυτά, συμπεραίνεται ότι η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη δράση της δοξορουβικίνης των Tg/Tg κυττάρων, που υπερεκφράζουν την Hsp70, σε σύγκριση με τα F1/F1 κύτταρα, οφείλεται αποκλειστικά στην Hsp70, που εκφράζεται ήδη στα κύτταρα αυτά, αφού δεν επάγεται σε μεγαλύτερο βαθμό μετά από την τοξική δράση, που προκαλεί το φάρμακο στα κύτταρα.

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την επαγωγή της πρωτεΐνης Hsp70 μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης είναι αρκετά περιορισμένα, αλλά εμφανίζονται και αντιφατικά. Τα επίπεδα της Hsp70 δεν φαίνονται να αλλάζουν σημαντικά μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης σε 3T3 κύτταρα [850]. Επίσης, η χορήγηση δοξορουβικίνης δεν δείχτηκε να επηρεάζει αισθητά τα επίπεδα της Hsp70 σε ενδοθηλιακά κύτταρα BAECs (Bovine aortic endothelial cells) [645] και σε καρκινικές σειρές [873, 874] ή να εμφανίζουν μια πολύ μικρή μη στατιστικά σημαντική αύξηση σε PMBC (Peripheral blood mononuclear cells) κύτταρα [875]. Η δοξορουβικίνη από μόνη της δεν μπορούσε να επάγει την hsp72 σε V-79 κύτταρα κινέζικων χαμστερ μετά από 24 ώρες επώασης με το φάρμακο [876]. Τα αποτελέσματα μας, όμως, είναι σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες, που έδειξαν συσσώρευση της Hsp70, συμπεριλαμβανομένης της Hsp72, από τη δοξορουβικίνη [776, 780]. Επίσης, έχει αναφερθεί η μεταβολική βλάβη από το φάρμακο, που

περιλαμβάνει αυξημένη παραγωγή των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, που είναι γνωστό να επάγουν αυξημένη έκφραση των Hsps [777-779].

Η επιβεβαίωση ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί την απόπτωση των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε με τη μελέτη της έκφρασης της PARP-1, η οποία χρησιμοποιείται ως αποπτωτικός δείκτης, καθώς διασπάται, κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης της αποπτωτικής διαδικασίας. Η PARP-1 είναι μια διατηρημένη πυρηνική μεταλλοπρωτεΐνη ψευδαργύρου, που συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA, την αντιγραφή του DNA, τη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης και την απόπτωση. Καταλύει τη μεταφορά μονάδων ADP-ριβόζης από το  $\text{NAD}^+$  σε έναν αριθμό μορίων-δεκτών και αναγνωρίζει θραύσεις των αλυσίδων του DNA, όπου συνδέεται με το RNA και ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφή. Η απελευθέρωση της μιτοχονδριακής προαποπτωτικής πρωτεΐνης AIF και η μετατόπιση του από τα μιτοχόνδρια στον πυρήνα εξαρτάται από την PARP-1 και είναι απαραίτητη για τον εξαρτώμενο από την PARP-1 κυτταρικό θάνατο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας (Εικόνα 3.55), συγκρίνοντας τα επίπεδα διάσπασης της PARP-1 στις δύο κυτταρικές σειρές, παρατηρούμε ότι η διάσπαση της PARP-1 (εμφάνιση της ζώνης των 87 kDa) πραγματοποιείται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό στα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα, σε σχέση με Tg/Tg κύτταρα, τα οποία υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70. Τα επίπεδα διάσπασης της PARP-1 δείχνουν να αυξάνονται με αύξηση της συγκέντρωσης της δοξορουβικίνης και στις δύο κυτταρικές σειρές, με την αύξηση, όμως, αυτή να είναι πιο σημαντική στα F1/F1 κύτταρα. Η PARP-1 αποκάλυψε τη βλάβη του DNA, που προκαλείται στα κύτταρα από τη δοξορουβικίνη. Η διάσπαση αυτή της PARP-1 προκαλείται μετά από ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών (με συμμετοχή της εκτελεστικής ενεργοποιημένης κασπάσης-3). Με τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύτηκε ο αντι-αποπτωτικός ρόλος της Hsp70 στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα μετά από επώαση τους με δοξορουβικίνη, αφού η Hsp70 εμφανίζεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση της βλάβης του DNA, που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη και ανιχνεύεται με την PARP-1.

Βιβλιογραφικά, *in vivo* και *in vitro* μελέτες συμφωνούν με τα δικά μας ευρήματα, αφού έχουν αποδείξει τη διάσπαση της PARP, που επάγεται από τη δοξορουβικίνη [698, 855, 877] και η Hsp70 έχει δείχτει να μειώνει αυτή τη διάσπαση της PARP [463].

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε η βιοχημική μελέτη του αποπτωτικού μονοπατιού, με το οποίο η δοξορουβικίνη οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση. Είναι γνωστό, βιβλιογραφικά, ότι η χορήγηση δοξορουβικίνης επάγει την απόπτωση των κυττάρων μέσω του εσωτερικού μιτοχονδριακού μονοπατιού [814]. Επίσης, όπως έχει προαναφερθεί, η δοξορουβικίνη εισέρχεται στον πυρήνα, όπου και προκαλεί βλάβες στο DNA μέσω οξειδωτικού στρες. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική απόκριση σε βλάβες στο DNA και σε άλλες ανωμαλίες του γονιδιώματος. Καθώς έχει δείχτει ότι η p53 αποκρίνεται στη βλάβη του DNA και στο οξειδωτικό στρες για να προκαλέσει καθοδικά τη σηματοδότηση της απόπτωσης, ο μηχανισμός για την απόπτωση, που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη φαίνεται να προέρχεται από τις συνέπειες του φαρμάκου στη βλάβη του DNA και από το οξειδωτικό στρες [878]. Η ενεργοποίηση της p53 μπορεί να οδηγήσει είτε σε παύση του κυτταρικού κύκλου και επιδιόρθωση του DNA ή σε απόπτωση, όταν οι βλάβες είναι μη αναστρέψιμες [879]. Πολυάριθμες μελέτες έδειξαν ότι η επαγόμενη από DOX απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων συσχετίζεται με αυξημένη έκφραση και ενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 [696-698]. Επίσης, έχει ήδη αποδειχθεί ότι η p53 φωσφορυλιώνεται σε πολλαπλές θέσεις *in vivo* και από διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες *in vitro* [818, 819]. Οι

βλάβες του DNA επάγουν τη φωσφορυλίωση της p53 στη Ser15 και Ser20, οδηγώντας σε μειωμένη αλληλεπίδραση ανάμεσα στην p53 και τον αρνητικό ρυθμιστή της, την ογκοπρωτεΐνη MDM2 [820]. Η MDM2 αναστέλλει τη συσσώρευση της p53, στοχεύοντας την για ουβικιτινίωση και πρωτεοσωμική αποικοδόμηση [880, 881]. Η φωσφορυλίωση εξασθενεί την ικανότητα της MDM2 να συνδέεται στην p53, προάγοντας τόσο τη συσσώρευση όσο και την ενεργοποίηση της p53 σε απόκριση στη βλάβη του DNA [820, 882].

Γνωρίζοντας ότι η φωσφορυλίωση της p53 αποτελεί αποπτωτικό σήμα [821], ανιχνεύθηκε και συγκρίθηκε η ποσότητα της φωσφορυλιωμένης p53 στις δύο κυτταρικές σειρές (F1/F1 και Tg/Tg) μετά από έκθεση τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης για 24 ώρες (Εικόνα 3.56). Παρατηρήθηκε μια καθυστέρηση στην ενεργοποίηση της p53 μέσω της φωσφορυλίωσης της στα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης p53 (Ser15) ήταν εμφανώς υψηλότερα στα F1/F1 κύτταρα σε σχέση με τα Tg/Tg κύτταρα για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήθηκαν. Από τα αποτελέσματα αυτά υποθέτουμε, λοιπόν, ότι η Hsp70 προστατεύει τα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα από την επαγόμενη από τη δοξορουβικίνη απόπτωση με αποτροπή της φωσφορυλίωσης της p53.

Βιβλιογραφικά, σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα, έχειδειχτεί ότι η χορήγηση δοξορουβικίνης προκαλεί την ενεργοποίηση της p53 και την εξαρτώμενη από τα μιτοχόνδρια απόπτωση σε H9c2 καρδιομυοκύτταρα [698, 864]. Έχει αναφερθεί η επαγόμενη από δοξορουβικίνη ενεργοποίηση της p53, που οδηγεί στην απόπτωση, σε ενδοθηλιακά κύτταρα της ομφαλικής φλέβας και καρδιομυοκύτταρα νεογνών [883, 884]. Η ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού έχει προταθεί να εξαρτάται από την επαγωγή της πρωτεΐνης p53 και έχει συσχετιστεί με την επαγόμενη από δοξορουβικίνη απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων [885]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η δοξορουβικίνη αυξάνει σημαντικά την έκφραση της φωσφορυλιωμένης p53 σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα μυελού των οστών (BMSCs) [886] και η φωσφορυλιωμένη μορφή της p53 στη σερίνη 15 (Ser15) υπερρυθμίζεται σε H9c2 καρδιομυοκύτταρα [698]. Η δοξορουβικίνη, επίσης, έχειδειχτεί να επάγει την έκφραση της p53 σε H9c2 καρδιομυοκύτταρα και στον καρδιακό ιστό [697, 877]. Η Hsp70 έχειδειχτεί να αναστέλλει την p53 σε προμιτοχονδριακό επίπεδο [887, 888]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενη μελέτη ότι η επαγωγή της έκφρασης της Hsp70 σε κύτταρα OHSC (καλλιέργειας υπόκαμπου), μείωσε σημαντικά τη συσσώρευση της p53 [889]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί σε ορισμένες άλλες έρευνες ότι η αναστολή της έκφρασης της Hsp70 οδήγησε σε ενεργοποίηση των p53 σηματοδοτικών μονοπατιών [887, 890].

Μετά από την παρατήρηση της ενεργοποίησης της p53 από τη δοξορουβικίνη στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα, χαρακτηρίστηκε περαιτέρω το αποπτωτικό μονοπάτι με μεγαλύτερη λεπτομέρεια. Η αυξημένη φωσφορυλίωση της p53 υπερρυθμίζει περαιτέρω καθοδικά της p53 γονίδια, μέλη της προ-αποπτωτικής Bcl-2 ομάδας γονιδίων, όπως η Bax [697, 891]. Η έκφραση αμφοτέρων των Bcl-2 και Bax ρυθμίζεται από το p53 ογκοκατασταλτικό γονίδιο [413, 560]. Η ενεργοποίηση της p53 μπορεί άμεσα να επάγει την ενεργοποίηση του Bax γονιδίου, που περιέχει θέση σύνδεσης της p53, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μετατόπιση της Bax από το κυτοσόλιο στα μιτοχόνδρια. Ως αποτέλεσμα, το εσωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιείται. Η Bax αποτελεί το πρώτο αναγνωρισμένο προ-αποπτωτικό μέλος της οικογένειας Bcl-2. Προάγει την απόπτωση μέσω ανταγωνιστικής δράσης με την Bcl-2. Η Bax σε φυσιολογικές συνθήκες, εδράζεται στο κυτταρόπλασμα. Σε περίπτωση

όμως αποπτωτικών σημάτων, αλλάζει η διαμόρφωσή της και εισέρχεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

Μετά από τα αποτελέσματα μας με την ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 3.57) αποδείχθηκε ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί τη συσσώρευση της πρωτεΐνης Bax στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα. Από την ενεργοποίηση αυτή της Bax συμπεραίνεται ότι η δοξορουβικίνη οδηγεί τα κύτταρα στην αποπτωτική διαδικασία μέσω του εσωτερικού μιτοχονδριακού μονοπατιού. Η αυξημένη έκφραση της Bax μετά από μεταχείριση με δοξορουβικίνη έχειδειχτεί και βιβλιογραφικά, σε H9c2 καρδιομυοκύτταρα και σε καρδιακό ιστό [697, 698, 855, 877], όπως και σε BMSC κύτταρα [886]. Παρατηρήθηκε ότι η ενεργοποίηση της Bax καθυστερεί στα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, σε σύγκριση με τα F1/F1 κύτταρα ελέγχου. Η αυξημένη έκφραση της Bax είναι εμφανώς μεγαλύτερη στα F1/F1 κύτταρα, σε σχέση με τα Tg/Tg κύτταρα, σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήθηκαν, για 24 ώρες επώασης με το φάρμακο. Επομένως, η Hsp70 εμφανίζεται να παρεμποδίζει τη συσσώρευση της Bax στα κύτταρα μετά τη χορήγηση του φαρμάκου.

Από την ενεργοποίηση αυτή της Bax συμπεραίνεται ότι η δοξορουβικίνη οδηγεί τα κύτταρα στην αποπτωτική διαδικασία μέσω του εσωτερικού μιτοχονδριακού μονοπατιού, αφού η Bax κανονικά εδρεύει στο κυτοσόλιο, αλλά μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια ως επακόλουθο του αποπτωτικού ερεθίσματος. Η μετακίνηση αυτή οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, μέσω των πόρων, που σχηματίζονται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη από τις Bax και Bak, που ολιγομερίζονται. Επίσης, έχειδειχτεί ότι η επαγόμενη από δοξορουβικίνη παραγωγή κεραμιδίου μπορεί να συνεισφέρει στην απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων μέσω του κατακερματισμού των μιτοχονδρίων, της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής εξωτερικής μεμβράνης και της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c [712, 713].

Η πρωτεΐνη Hsp70 έχειδειχτεί στο παρελθόν να αναστέλλει την απόπτωση ανοδικά των μιτοχονδρίων [892]. Η Hsp70 φαίνεται να εμποδίζει τη συσσώρευση της Bax στα κύτταρα μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Βιβλιογραφικά, έχειδειχτεί ότι σε μιτοχονδριακό επίπεδο, η HSP70 εμποδίζει τη διατάραξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ενώ ανταγωνίζεται την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c μέσω της αναστολής της Bax [63, 449]. Σύμφωνα και με τα προηγούμενα αποτελέσματα μας, είναι πιθανό η Hsp70 να εμποδίζει τη συσσώρευση της Bax, μέσω της αναστολής της φωσφορυλίωσης της p53, η οποία όταν ενεργοποιείται, επάγει την έκφραση της Bax [413]. Τα αποτελέσματα μας αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, που έχουν δείξει ότι σε μιτοχονδριακό επίπεδο, η Hsp70 αναστέλλει τη μετατόπιση της Bax και την εισαγωγή της στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Ως συνέπεια, η Hsp70 αποτρέπει τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και του AIF [478, 492].

Στο ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης, η ενεργοποίηση των κασπασών (όπως των κασπασών -9 και -3) λαμβάνει χώρα ως συνέχεια της διάτρησης της μιτοχονδριακής μεμβράνης και της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, που ρυθμίζεται από την Bax [893, 894]. Αφού, λοιπόν, αποδείχθηκε ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί την ενεργοποίηση του ενδογενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού στα κύτταρα, μέσω ενεργοποίησης των p53 και Bax, μελετήθηκε, στην πορεία, η ενεργοποίηση των κασπασών, γεγονός το οποίο, αφού συμβαίνει, σημαίνει την μη αναστρέψιμη πορεία των κυττάρων προς τον αποπτωτικό θάνατο. Οι κασπάσες διακρίνονται στις κασπάσες εκκινητές (εναρκτήριες) και στις καπάσες τελεστές, οι οποίες γίνονται καταλυτικά ενεργές μόνο μετά από πέψη από τις εναρκτήριες. Η

κασπάση-9, της οποίας η ενεργοποίηση ερευνήθηκε αρχικά, είναι ένα σημαντικό μέλος της οικογένειας των κυστεϊνικών πρωτεασών (κασπασών) και εμπλέκεται στην απόπτωση. Μετά από ένα αποπτωτικό ερέθισμα, το κυτόχρωμα c, που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, συνδέεται με την 47 kDa προκασπάση-9 και τον Araf-1, σχηματίζοντας το αποπτώσωμα. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο αυτό, μετατρέπει την προκασπάση-9 σε ένα μεγάλο ενεργό τμήμα (35kDa) και ένα μικρό τμήμα (10kDa) με αυτό-διάσπαση (σχάση) στο Asp315 [403, 822, 823]. Η διασπασμένη κασπάση-9 (cleaved caspase-9), στη συνέχεια, ενεργοποιεί άλλα μέλη των κασπασών, που περιλαμβάνουν τις κασπάσες-3 και -7, εκκινώντας τον καταρράκτη κασπασών, που οδηγεί στην απόπτωση [387, 824-826].

Από τα αποτελέσματα μας εξάγεται το συμπέρασμα ότι η δοξορουβικίνη επάγει την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα. Από αυτό προκύπτει ότι η δοξορουβικίνη επάγει στα κύτταρα το κασπασο-εξαρτώμενο αποπτωτικό μονοπάτι, με ενεργοποίηση των εναρκτήριων κασπασών, όπως η κασπάση-9. Τα συμπεράσματα μας αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, που έχουν δείξει ότι η χορήγηση του κυτταροστατικού φαρμάκου ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κασπασών [646, 698, 815]. Η δοξορουβικίνη έχει δείχτει, βιβλιογραφικά, να επάγει τη διάσπαση της κασπάσης-9 στον καρδιακό ιστό Sprague-Dawley αρουραίων [877], σε H9c2 καρδιομυοκύτταρα [698], αλλά και σε καρκινικά κύτταρα A549 [868]. Από τα πειράματα μας φάνηκε ότι στα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την Hsp70, δεν ενεργοποιείται σε σημαντικό βαθμό η κασπάση-9, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα, όπου η διασπασμένη κασπάση-9 εμφανίζεται από τις μικρότερες συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης σε σημαντικό βαθμό. Η αυξημένη ενεργοποίηση της κασπάσης-9 στα F1/F1 κύτταρα, σε σχέση με τα Tg/Tg κύτταρα, ήταν εμφανής για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 3.58). Αποδεικνύεται, επομένως, ότι η Hsp70 ελέγχει την απόπτωση των κυττάρων στο στάδιο των κασπασών, αποτρέποντας την ενεργοποίηση των εναρκτήριων κασπασών, όπως η κασπάση-9.

Αυτό είναι σε συμφωνία με βιβλιογραφικές μελέτες, που έχουν δείξει ότι σε HL60 κύτταρα η DOX προκαλεί εξαρτώμενη από κασπάσες απόπτωση, που μπορεί να ανασταλεί από την Hsp70 [782]. Παλαιότερα, είχε αναφερθεί ότι η δράση της Hsp70 εντοπίζεται ανοδικά του σχηματισμού του αποπτωσώματος [892]. Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ των 70 kDa έχει δείχτει να εμποδίζει την ανάκτηση της προκασπάσης-9 από το σύμπλοκο του αποπτωσώματος [895]. Έχει αναφερθεί ότι η έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ προκαλεί αναστολή των κασπασών και η Hsp70 εμποδίζει την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 [896]. Τέλος, η υπερέκφραση της Hsp70 έχει αποδειχθεί να εξασθενεί σημαντικά την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 σε SH-SY5Y επιθηλιακά κύτταρα μυελού των οστών [897], σε C2C12 κύτταρα μυοβλαστών ποντικού [895] και σε SW480 καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου [898].

Σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες, η Hsp70 μπορεί να αναστέλλει το σχηματισμό ενός λειτουργικά ικανού αποπτωσώματος και με απευθείας σύνδεση με τον Araf-1 για να αποτρέψει την ανάκτηση και ενεργοποίηση της εναρκτήριας κασπάσης, προκασπάσης-9 [472, 483]. Η Hsp70 μπορεί να αναστέλλει τον ολιγομερισμό του Araf-1 [483] ή να διατηρεί το ολιγομερές σε μια διαμόρφωση που είναι ασύμβατη με την ανάκτηση της προκασπάσης-9, εμποδίζοντας την έκθεση της Araf-1 CARD περιοχής [472].

Στην πορεία της εξέλιξης του αποπτωτικού μηχανισμού, η ενεργοποιημένη κασπάση-9, θα πρέπει να ενεργοποιεί άλλα μέλη των κασπασών, που περιλαμβάνουν τις εκτελεστικές κασπάσες-3 και -7, εκκινώντας τον καταρράκτη κασπασών, που οδηγεί στην ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας. Η φάση της εκτέλεσης

θεωρείται το τελικό μονοπάτι της απόπτωσης. Η ενεργοποίηση των κασπασών τελεστών αρχίζει αυτή τη φάση της απόπτωσης και πραγματοποιείται μετά από πέψη από τις εναρκτήριες κασπάσες. Η κασπάση-3 ανήκει στην οικογένεια των πρωτεασών κυστεΐνης και θεωρείται η πιο σημαντική από τις κασπάσες-εκτελεστές διαδραματίζοντας, επίσης, σημαντικό ρόλο στην απόπτωση. Συντίθεται ως ένα ανενεργό προ-ένζυμο, το οποίο υφίσταται αυτο-πρωτεόλυση και/ή διάσπαση από άλλες κασπάσες (κασπάση 8, 9 και 10) ανοδικά του αποπτωτικού μονοπατιού στα κύτταρα που αποπίπτουν. Η ενεργή κασπάση-3 αποτελεί δείκτη για τα κύτταρα, που υφίστανται απόπτωση, και αποτελείται από ένα ετεροδιμερές με υπομονάδες των 17 kDa και 12 kDa, που προέρχεται από το 32 kDa προένζυμο. Η ενεργός κασπάση-3 με τη σειρά της διασπά πρωτεολυτικά άλλες κασπάσες, καθώς και άλλα μόρια στα κύτταρα, όπως η PARP-1.

Με την ανοσοαποτύπωση κατά Western επιβεβαιώθηκε η ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών από τη δοξορουβικίνη. Όπως παρατηρήθηκε, η κασπάση-3 δεν ενεργοποιείται στα Tg/Tg κύτταρα, παρά μόνο στις μεγάλες συγκεντρώσεις του φαρμάκου, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα, όπου η ενεργή κασπάση-3 εμφανίζεται από τις μικρές συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (Εικόνα 3.59). Έτσι, είναι έκδηλη η αυξημένη ενεργοποίηση της κασπάσης-3 στα F1/F1 κύτταρα, σε σχέση με τα Tg/Tg κύτταρα, για όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης. Από τα αποτελέσματα μας αυτά συμπεραίνεται ότι η δοξορουβικίνη επάγει στα κύτταρα το κασπασο-εξαρτώμενο αποπτωτικό μονοπάτι, όπου ενεργοποιείται και η εκτελεστική κασπάση-3, και ότι η Hsp70 ελέγχει την αποπτωτικότητα των κυττάρων στα τελικά στάδια της απόπτωσης, αποτρέποντας την ενεργοποίηση των τελεστών κασπασών, όπως η κασπάση-3.

Τα αποτελέσματα μας αυτά είναι σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Η κασπάση-3 αποτελεί βασικό εκτελεστή της απόπτωσης και έχει αναφερθεί να ενεργοποιείται από τη δοξορουβικίνη [899]. Έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 από το φάρμακο σε H9c2 καρδιομυοκύτταρα και στον καρδιακό ιστό αρουραίων [698, 855, 877]. Η δοξορουβικίνη έχει βρεθεί να ρυθμίζει θετικά την έκφραση της κασπάσης-3 σε BMSC μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα [886] και σε A549 καρκινικά κύτταρα [868]. Η Hsp70 με τη σειρά της έχει δείχτει να αναστέλλει τα διαμεσολαβούμενα από την κασπάση-3 αποπτωτικά γεγονότα [261]. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Hsp70 έχει, επίσης, δείχτει να αποτρέπει τον κυτταρικό θάνατο, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 [463]. Πολυάριθμες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η υπερέκφραση της Hsp70 εμφανίζει ανασταλτική επίδραση στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 σε C2C12 κύτταρα μυοβλαστών ποντικού [895], σε U937 κύτταρα [482] και σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού (MEFs) [476]. Τέλος, σε BLR κύτταρα ινοβλαστών ήπατος αρουραίων, που υπερεκφράζουν την Hsp70, εμφανίστηκε σημαντική μείωση στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3, οδηγώντας σε μειωμένη απόπτωση τους [900].

Αφού ενεργοποιηθούν και οι εκτελεστικές κασπάσες, όπως η κασπάση-3, τα κύτταρα βαίνουν προς την ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας. Η ενεργή κασπάση-3, στη συνέχεια, προκαλεί επιπλέον γεγονότα ενεργοποίησης κασπασών, τα οποία κορυφώνονται με την πρωτεόλυση των υποστρωμάτων τους και τον κυτταρικό θάνατο με όλα τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, που παρατηρούνται [369].

Η κασπάση-3 έχει δείχτει να ενεργοποιεί ειδικά την ενδονουκλεάση G. Επιπλέον, σε πολλαπλασιάζομενα κύτταρα, η CAD συμπλέκεται με τον αναστολέα της, ICAD, αλλά σε αποπτωτικά κύτταρα, η ενεργοποιημένη κασπάση-3 διασπά τον ICAD για να απελευθερώσει την CAD [423]. Η CAD, στη συνέχεια, αποικοδομεί το

χρωμοσωμικό DNA εντός του πυρήνα και προκαλεί συμπύκνωση της χρωματίνης. Η κασπάση-3, επίσης, επάγει κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση και διάσπαση του κυττάρου σε αποπτωτικά σωματίδια. Η γελσολίνη (gelsolin), μια πρωτεΐνη δέσμευσης της ακτίνης, έχει προσδιοριστεί ως ένα από τα βασικά υποστρώματα της ενεργοποιημένης κασπάσης-3. Η κασπάση-3 διασπά τη γελσολίνη και τα διασπασμένα τεμάχια της γελσολίνης, με τη σειρά τους, διασπούν τα νημάτια ακτίνης με ένα ασβέστιο-ανεξάρτητο τρόπο. Αυτό οδηγεί σε διαταραχή του κυτταροσκελετού, ενδοκυτταρική μεταφορά, κυτταρική διαίρεση και μεταγωγή σήματος [424]. Η φαγοκυτταρική πρόσληψη των αποπτωτικών κυττάρων είναι το τελευταίο συστατικό της απόπτωσης.

Έτσι, η ανασοαποτύπωση κατά Western αποκάλυψε ότι η μεταχείριση των κυττάρων με δοξορουβικίνη, ενεργοποιεί την p53, η οποία, κατόπιν, προωθεί σήματα του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού και τον καταρράκτη των κασπασών. Πιο συγκεκριμένα, η p53 ενεργοποιεί την Bax, την κασπάση-9 και την κασπάση-3, ενώ η ενεργοποίηση της PARP-1 αποκαλύπτει την επαγόμενη από δοξορουβικίνη βλάβη του DNA. Το αποπτωτικό αυτό μονοπάτι φαίνεται να αναστέλλεται, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, από την αυξημένη έκφραση της ανθρώπινης Hsp70 στα πρωτογενή εμβρυικά Tg/Tg κύτταρα και η ανασταλτική αυτή επίδραση ξεκινά από την ενεργοποίηση της p53. Συμπερασματικά, η Hsp70 μπορεί να αποτρέπει την προώθηση της απόπτωσης, που επάγεται από τη δοξορουβικίνη, δρώντας σε ένα σημείο ανοδικά της ενεργοποίησης της p53.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα μας, καταλήξαμε σε ένα προκαταρκτικό μοντέλο σχετικά τον αποπτωτικό μηχανισμό, που επάγεται από τη δοξορουβικίνη στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα και την εμπλοκή της Hsp70 στο μονοπάτι αυτό (Εικόνα 3.60). Τα ευρήματά μας αυτά είναι σε συμφωνία με τη μελέτη, που προηγήθηκε σε επίπεδο πειραματοζώων, και αφορούσε τη δράση της Hsp70 στην προστασία των καρδιομυοκυττάρων μετά από επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιακή ανεπάρκεια. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η δοξορουβικίνη εισέρχεται στον πυρήνα, όπου και προκαλεί βλάβες στο DNA με άμεση σύνδεση ή μέσω ROS από το οξειδωτικό στρες. Κατά την κυτταρική απόκριση σε βλάβες στο DNA, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Σε αρχικό στάδιο, το στρεσογόνο ερέθισμα, αναστέλλει το μεταγραφικό ρόλο της p53, η οποία προσδέεται πιθανά στην MDM2 και εξέρχεται από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα. Η p53 φωσφορυλιώνεται και πηγαίνει πιθανά στο μιτοχόνδριο, όπου και ενεργοποιεί το μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι, οδηγώντας το κύτταρο στην απόπτωση. Η φωσφορυλίωση εξασθενεί την ικανότητα της MDM2 να συνδέεται στην p53, προάγοντας τη συσσώρευση και την ενεργοποίηση της p53 σε απόκριση στη βλάβη του DNA. Η φωσφορυλιωμένη μορφή της p53, που μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, προωθεί το p53-αποπτωτικό μιτοχονδριακό μονοπάτι. Η αυξημένη φωσφορυλίωση της p53, στη συνέχεια, επάγει περαιτέρω καθοδικά της p53 γονίδια, όπως μέλη της προ-αποπτωτικής Bcl-2 ομάδας γονιδίων, στα οποία συμπεριλαμβάνεται και η Bax. Ως επακόλουθο του αποπτωτικού ερεθίσματος, η ενεργοποίηση της p53 μπορεί άμεσα να επάγει την ενεργοποίηση της Bax με αλλαγές στη διαμόρφωση της, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μετατόπιση της Bax από το κυτοσόλιο στα μιτοχόνδρια. Η μετακίνηση αυτή οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bak ολιγομερίζονται, σχηματίζοντας πόρους εντός της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Οι πόροι διακόπτουν τη συνοχή της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και οδηγούν στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Το κυτόχρωμα c, αφού απελευθερωθεί από τα μιτοχόνδρια, συνδέεται με την προκασπάση-9 και τον

Araf-1, σχηματίζοντας το αποπτώσωμα. Με τον τρόπο αυτό ενεργοποιείται η εναρκτήρια κασπάση-9, η οποία, με τη σειρά της, λειτουργεί ως υπόστρωμα για την ενεργοποίηση άλλων μελών των κασπασών, που περιλαμβάνουν τις εκτελεστικές κασπάσες-3 και -7, εκκινώντας τον καταρράκτη κασπασών, που οδηγεί στην απόπτωση. Αφού ενεργοποιηθούν και οι εκτελεστικές κασπάσες, όπως η κασπάση-3, τα κύτταρα βαίνουν προς την ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας. Η ενεργή κασπάση-3, στη συνέχεια, προκαλεί επιπλέον γεγονότα ενεργοποίησης κασπασών, τα οποία κορυφώνονται με την πρωτεόλυση των υποστρωμάτων τους (όπως είναι και η PARP-1) και τον κυτταρικό θάνατο με όλα τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, που παρατηρούνται συνήθως.

Η Hsp70, σύμφωνα με τις παρατηρήσεις μας, εμπλέκεται στα αρχικά στάδια του αποπτωτικού αυτού μονοπατιού. Συγκεκριμένα, ασκεί την ανασταλτική της επίδραση ανοδικά της ενεργοποίησης μέσω φωσφορυλίωσης της p53, οπότε αυτή επιτελεί το ρόλο της εντός του πυρήνα, δρώντας φυσιολογικά ως σήμα έναρξης της μεταγραφής, χωρίς να ενεργοποιεί το μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι. Με βάση τα παραπάνω, γίνεται φανερό ότι η Hsp70 προστατεύει τα κύτταρα (όπως και τα κύτταρα του μυοκαρδίου) από την απόπτωση μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης μέσω του ελέγχου της φωσφορυλίωσης της p53.

Το προτεινόμενο μοντέλο μπορεί να συμπληρωθεί μετά από μελέτη της φωσφορυλίωσης της p53 και ανοδικά αυτής. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνεται στη σερίνη-15 σε απόκριση στους διάφορους παράγοντες βλάβης του DNA. Σε υψηλά επίπεδα βλάβης του DNA, η προ-αποπτωτική λειτουργία της p53 ενεργοποιείται, οδηγώντας σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο [858]. Υποθέτουμε ότι στο μοντέλο, που μελετήσαμε, η υπερέκφραση της Hsp70 μπορεί να προκαλεί μετρίαση του p53-αποπτωτικού μηχανισμού, επηρεάζοντας τη φωσφορυλίωση της p53, πιθανά μέσω των ATM και/ή DNA-PK κινασών [901-903], καθώς και μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης PKC (PKCδ) [904, 905]. Οι κινάσες αυτές έχουν δείξει σε πρόσφατες μελέτες να συμμετέχουν στη φωσφορυλίωση της p53 στη σερίνη 15 [904, 906]. Επίσης, αφού προηγούμενες μελέτες έδειξαν σύνδεση της Hsp70 στην p53, μια τέτοια προσέγγιση δεν θα πρέπει να αγνοηθεί (Αγγελίδης αδημοσίευτα αποτελέσματα, [907]).

Τέλος, ένας άλλος πιθανός μηχανισμός, που έχει αναφερθεί, πρόσφατα, βιβλιογραφικά, για τη φωσφορυλίωση της p53 αφορά τη συμμετοχή των MAPK κινασών, που περιλαμβάνουν τις ERK (ERK1/2), JNK και p38 κινάσες [908, 909], παρέχοντας, επομένως, έναν πιθανό κορυφαίο στόχο για την Hsp70 στο γενικότερο πλαίσιο της αποπτωτικής ρύθμισης. Πολυάριθμες μελέτες έχουν προτείνει την εμπλοκή των MAPK κινασών στον κυτταρικό θάνατο [886], όπως στην απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων και τη βλάβη του μυοκαρδίου, που επάγονται από τη δοξορουβικίνη, εξαιτίας της παραγωγής ROS και της βλάβης του DNA [698, 855, 868, 910]. Η ενεργοποίηση των MAPK σηματοδοτικών μονοπατιών από το φάρμακο ακολουθείται από την ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης της p53 και την επακόλουθη επαγωγή του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μονοπατιού με τα γεγονότα, που περιγράφησαν παραπάνω [855, 864, 911, 912]. Η πρωτεΐνη Hsp70 έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες να καταστέλλει την απόπτωση, ρυθμίζοντας τα MAPK σηματοδοτικά μονοπάτια με διάφορους μηχανισμούς [476, 913]. Έχει δείξει η αναστολή της ενεργοποίησης τόσο των JNK και p38 κινασών [462, 475, 790], όσο και της ERK από την Hsp70 [476], αποτρέποντας τα περαιτέρω γεγονότα, που οδηγούν στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια [453]. Πάντως,



το σημείο της φωσφορυλίωσης της p53 δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί και πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Στο επόμενο βήμα της έρευνας μας, εξετάστηκε η τοξική δράση της δοξορουβικίνης στα κύτταρα, μέσω του οξειδωτικού στρες, που προκαλεί. Το οξειδωτικό στρες στα βιολογικά συστήματα προέρχεται από τη διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στις κυτταρικές ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) και στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά δεν διαδραματίζουν μόνο βασικό ρόλο ως καθαριστές των ROS, αλλά, επίσης, ρυθμίζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων [914]. Κατά το οξειδωτικό στρες, τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η SOD και η GPx, δαπανώνται και η ικανότητα της αντιοξειδωτικής τους δραστηριότητας μειώνεται [915].

Η βασική κυτταρική προστασία ενάντια στο οξύ στρες, μπορεί να παρέχεται από διάφορα ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά, όπως η γλουταθειόνη, η  $\alpha$ -τοκοφερόλη, το ασκορβικό οξύ, το  $\beta$ -καροτένιο κ.α., καθώς και αντιοξειδωτικά ένζυμα, που συμπεριλαμβάνουν τη δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Αυτές οι κυτταρικές ενώσεις ελαττώνουν/εξαλείφουν το οξειδωτικό στρες, καθαρίζοντας τις δραστικές μορφές οξυγόνου, πριν καταστρέψουν ζωτικά κυτταρικά συστατικά και επομένως, μπορούν να θεωρηθούν ως τμήμα της πρώτης γραμμής άμυνας ενάντια στο εξωτερικό στρες. Συχνά, εξαιτίας της ανεπάρκειας των ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών ή λόγω της παρουσίας αυξημένου οξειδωτικού στρες, οι ενεργές μορφές οξυγόνου μπορεί να φθάσουν τους στόχους τους, που περιλαμβάνουν τα νουκλεϊκά οξέα, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Αυτό οδηγεί στην καταστροφή των κυτταρικών συστατικών, προκαλώντας θραύσεις στις αλυσίδες του DNA, την πρωτεϊνική αποικοδόμηση και τη λιπιδική υπεροξειδωση [770].

Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, η δοξορουβικίνη προκαλεί οξειδωτικό στρες στα κύτταρα [578, 916] και η πιθανότερη αιτία του φαινομένου αυτού είναι η αυξημένη παραγωγή των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) [577] και αζώτου (RNS) [642]. Για το λόγο αυτό, στην πορεία της μελέτης μας, προσδιορίστηκε η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και GPx μετά από χορήγηση διαφόρων δόσεων του φαρμάκου στις δύο κυτταρικές σειρές (F1/F1 και Tg/Tg κύτταρα) για χρονικό διάστημα των 24 και 48 ωρών.

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα και καταλύει την αναγωγή του ανιόντος του υπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και σε μοριακό οξυγόνο. Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα μας, προέκυψε ότι η δοξορουβικίνη προκαλεί στα κύτταρα τόσο δόσο-εξαρτώμενη όσο και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση των ποσοστών δραστηριότητας του αντιοξειδωτικού ενζύμου, SOD. Η διαφορά στη δραστηριότητα της SOD ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές είναι εμφανής σε όλες τις συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης, που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ είναι ακόμη πιο έντονη στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Όπως παρατηρήθηκε, τα F1/F1 κύτταρα, με μη ανιχνεύσιμα ποσά της Hsp70, παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα της SOD σε σύγκριση με τα Tg/Tg κύτταρα για 24 και 48 ώρες (Εικόνες 3.67 και 3.68), προτείνοντας, επομένως, ότι η παρουσία της Hsp70 στα Tg/Tg κύτταρα προσδίδει σε αυτά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη.

Στη συνέχεια, υπολογίσθηκε και η δραστηριότητα ενός άλλου αντιοξειδωτικού ενζύμου, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx), μετά από τη χορήγηση δοξορουβικίνης. Η οικογένεια των ενζύμων της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των οργανισμών από την οξειδωτική βλάβη και μετατρέπουν την ανηγμένη γλουταθειόνη

(GSH) σε οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), ανάγοντας παράλληλα τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων προς τις αντίστοιχες αλκοόλες ή το ελεύθερο υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό. Όπως παρατηρήθηκε, η δραστηριότητα του ενζύμου φαίνεται να μειώνεται σταδιακά με αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου και του χρόνου επώασης με αυτό, όπως παρατηρήθηκε και για τη SOD. Στα κύτταρα εμφανίστηκε, λοιπόν, δόσο-εξαρτώμενη και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx), λόγω της δράσης της δοξορουβικίνης. Συγκεντρωτικά, φάνηκε η αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου στα Tg/Tg κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα, τα οποία παρουσίασαν μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης της δραστηριότητας της GPx τόσο για 24 όσο και για 48 ώρες επώασης με το φάρμακο (Εικόνες 3.75 και 3.76). Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα και με τη μέθοδο αυτή, ότι η παρουσία της Hsp70 στα Tg/Tg κύτταρα προσδίδει σε αυτά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη.

Επομένως, φάνηκε ότι η δοξορουβικίνη μειώνει στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα τα επίπεδα της δραστηριότητας τουλάχιστον δύο εκ των σημαντικών ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD και GPx), που είναι υπεύθυνα για τον καθαρισμό των ριζών υπεροξειδίου. Το φάρμακο μπορεί να προκαλεί υπερβολική κατανάλωση, μειωμένη παραγωγή ή χημική απενεργοποίηση των ενζύμων αυτών [639, 878]. Εάν τα αποθέματα αντιοξειδωτικών διαταραχθούν, τα κύτταρα δεν μπορούν να απομακρύνουν τις ROS [868] και δεν επιτυγχάνεται η προστασία τους ενάντια στο οξειδωτικό στρες [917]. Τα αποτελέσματα μας αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες από τη βιβλιογραφία, όπου δείχθηκε ότι η επώαση με δοξορουβικίνη μειώνει τη δραστηριότητα της SOD και της GPx (όπως και της καταλάσης CAT) σε H9c2 κύτταρα [865] και σε A549 κύτταρα [868]. Σημαντική μείωση στη δραστηριότητα αυτών των αντιοξειδωτικών ενζύμων παρατηρήθηκε μετά από χορήγηση διαφόρων συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης και σε ζύμη *Candida utilis*. [867]. Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και από μελέτες σε επίπεδο πειραματοζώων. Σύμφωνα με αυτά, τα επίπεδα και οι δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και GPx μειώθηκαν σημαντικά σε καρδιακούς ιστούς ποντικών μετά από χορήγηση δοξορουβικίνης, σε σύγκριση με ποντίκια, που δεν είχαν μεταχειριστεί με το φάρμακο [835, 918]. Παρόμοιες επιπτώσεις του φαρμάκου στα αντιοξειδωτικά ένζυμα παρατηρήθηκαν και σε άλλους ιστούς, όπως για παράδειγμα στο ήπαρ Wistar αρουραίων [919].

Όπως αποδείχτηκε στη δική μας μελέτη, από τη δραστηριότητα και των δύο αντιοξειδωτικών ενζύμων, τόσο της SOD όσο και της GPx, τα Tg/Tg κύτταρα, που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Hsp70, είναι πιο ανθεκτικά και έχουν τη δυνατότητα να διατηρούν σε μεγαλύτερο βαθμό την αντιοξειδωτική τους ικανότητα ενάντια στην τοξική δράση της δοξορουβικίνης.

Είναι γνωστή από τη βιβλιογραφία, η ικανότητα της Hsp70 να προσδίδει στα κύτταρα ανθεκτικότητα ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Προηγούμενες μελέτες έχουν προτείνει την κυτταροπροστατευτική επίδραση της Hsp70 μετά από οξειδωτικό στρες [920], ενώ, επιπλέον, έχει δείχτεί ότι η Hsp70 μειώνει την κυτταρική βλάβη, που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες σε κύτταρα νεφρού [921]. Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης Hsp70 έχει δείχτεί, βιβλιογραφικά, να αυξάνει σημαντικά τις δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD [922] και GPx [923, 924] στα κύτταρα. Επίσης, έχει προταθεί ότι η υπερέκφραση της Hsp72 σε σκελετικούς μύες διαγονιδιακών ποντικών, προστατεύει τα κύτταρα από τη βλάβη, που επάγεται από τις ROS [925, 926].

Οι μηχανισμοί, με τους οποίους η Hsp70 ενισχύει τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων μετά από στρες, δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, αλλά θεωρείται ότι σχετίζεται με τη δράση της ως συνοδός. Η ρύθμιση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων μπορεί να αποτελεί ένα δυνητικό κρίσιμο μηχανισμό, με τον οποίο διαμεσολαβείται η ενισχυμένη προστασία, που παρέχεται στα κύτταρα από την αυξημένη έκφραση της Hsp70. Αφού η κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση ρυθμίζει περαιτέρω τα μονοπάτια της απόπτωσης (που συμπεριλαμβάνουν και τα βήματα, που περιγράφηκαν παραπάνω), η ικανότητα της Hsp70 να ρυθμίζει το οξειδοαναγωγικό περιβάλλον του κυττάρου θα μπορούσε να αποδειχθεί ότι είναι ένα κεντρικό και ενοποιητικό γεγονός κατά την κυτταροπροστασία [923].

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη σε κλινικό επίπεδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης Hsp70. Έτσι, εξετάστηκε εάν η καρδιακή ανεπάρκεια προκαλεί αλλαγή της έκφρασης της επαγόμενης Hsp70 σε ορούς ασθενών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, παρατηρήθηκε ότι η μέση τιμή της συγκέντρωσης της επαγόμενης Hsp70 από τους ορούς αίματος των ασθενών με πιστοποιημένη καρδιακή ανεπάρκεια, παρουσίασε σημαντική αύξηση σε σχέση με αυτή των υγιών ατόμων (Εικόνα 3.77). Επομένως, υποθέσαμε ότι η καρδιακή ανεπάρκεια επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης Hsp70 στο αίμα των ασθενών.

Τα αποτελέσματα μας αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, που έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη Hsp70 είναι σημαντικά αυξημένη σε ορούς ασθενών με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια σε σύγκριση με αυτούς υγιών ατόμων. Τα επίπεδα της Hsp70 συσχετίστηκαν με τη σοβαρότητα της ασθένειας, καθώς ήταν πιο υψηλά στους ασθενείς με προχωρημένη καρδιακή ανεπάρκεια [830, 927]. Ακόμη, έχει δείχτει ότι τα επίπεδα της Hsp70 σχετίζονται θετικά με την εξέλιξη της καρδιακής ανεπάρκειας [928]. Τα ίδια ευρήματα έχουν παρατηρηθεί και σε ένα μοντέλο ποντικών (σε BALB/c ποντίκια), όπου η συγκέντρωση της πρωτεΐνης Hsp70 ήταν αυξημένη στο πλάσμα ποντικών με καρδιακή ανεπάρκεια σε σχέση με τα ζώα ελέγχου [928]. Επίσης, έχει αναγνωριστεί και βιβλιογραφικά, ότι η Hsp70 είναι παρούσα στην περιφερική κυκλοφορία των υγιών ατόμων [929, 930], πράγμα το οποίο είναι σε συμφωνία και με τις δικές μας μετρήσεις. Τέλος, μια ερευνητική ομάδα απέδειξε ότι η Hsp70 συμμετέχει στην παθοφυσιολογική εξέλιξη της καρδιακής ανεπάρκειας και ανέφερε ότι η πρωτεΐνη θερμικού σοκ των 70 kDa μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως ένας κλινικός δείκτης για την πρόγνωση [928], ενώ μία άλλη έρευνα επέκτεινε αυτήν τη μελέτη, προτείνοντας ότι τα αυξημένα επίπεδα της Hsp70 μπορεί να αποτελέσουν έναν ανεξάρτητο δείκτη πρόγνωσης της θνησιμότητας στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια [931].

Η αυξημένη έκφραση της Hsp70 μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν έμφυτο προστατευτικό μηχανισμό στους ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια [928], που αναπτύχθηκε για την αποκατάσταση των φυσιολογικών συνθηκών [932]. Η Hsp70 θεωρείται, παραδοσιακά, ως ένας ενδοκυτταρικός κυτταροπροστατευτικός συνοδός και τα επίπεδα της μπορούν να αυξηθούν αρκετές φορές σε απόκριση στο στρες [933], το οποίο μπορεί να είναι μόλυνση, υποξία, ισχαιμία και μειωμένη βράχυνση μυοκυττάρων, χαρακτηριστικά τα οποία παρατηρούνται στην καρδιά που παρουσιάζει ανεπάρκεια [932]. Αυξημένα επίπεδα της Hsp70 έχουν αναφερθεί, επίσης, σε ορούς ασθενών με περιφερική αγγειακή και νεφρική νόσο [934], στεφανιαία νόσο [935, 936], αιμολυτική αναιμία [937] και μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου [938, 939].

Ο λόγος, για τον οποίο ευρίσκεται η Hsp70 στον ορό, δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Παρόλα αυτά, διάφορες θεωρίες έχουν προτείνει ως πηγή την

απελευθέρωση από ζωντανά κύτταρα, μέσω ενός μηχανισμού, που επάγεται από συγκεκριμένες κυτοκίνες [940], από ενδοθηλιακά κύτταρα [941], από το ίδιο το μυοκάρδιο [942] ή από νεκρωτικά κύτταρα του ιστού [943].

Στη συνέχεια, αφού τα άτομα της μελέτης κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με το φύλο, παρατηρήθηκε αύξηση της μέσης τιμής της συγκέντρωσης της Hsp70 και στα δύο φύλα, στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control) για το κάθε φύλο. Επίσης, από τα αποτελέσματα μας (Εικόνα 3.78), συμπεραίνεται ότι υπάρχει διαφορά στην ποσότητα της Hsp70 ανάμεσα στα δύο φύλα, αφού τα αρσενικά άτομα φαίνεται να έχουν αυξημένα ποσά της πρωτεΐνης στον ορό τους, και η συγκέντρωση της Hsp70 στο αίμα αυξάνεται σημαντικά μετά από καρδιακή ανεπάρκεια, με την αύξηση αυτή να εμφανίζεται αισθητά μεγαλύτερη στους άνδρες σε σύγκριση με τις γυναίκες.

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά τη σύγκριση ανάμεσα στα δύο φύλα ως προς τα επίπεδα της Hsp70 στον ορό αίματος είναι περιορισμένα και αρκετά αντιφατικά. Έτσι, σε προηγούμενες μελέτες έχει αναφερθεί ότι τα ποσά της Hsp70 είναι λίγο πιο αυξημένα στα αρσενικά άτομα σε σχέση με τα θηλυκά (χωρίς τα αποτελέσματα να είναι στατιστικά σημαντικά) [944], ενώ σε άλλες μελέτες δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα της πρωτεΐνης ανάμεσα στα δύο φύλα [936, 945]. Άλλες έρευνες έχουν αναφέρει ότι τα επίπεδα της Hsp70 στις καρδιές αρουραίων είναι πιο αυξημένα στα αρσενικά άτομα σε σύγκριση με τα θηλυκά μετά από στρες, όπως η έντονη άσκηση [946] ή η υπερθερμία [947]. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση, που θα μπορούσε ως ένα βαθμό να συσχετιστεί και με την Hsp70, ήταν ότι η απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων ήταν πολύ υψηλότερη στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες σε φυσιολογικές ανθρώπινες καρδιές [948].

Κατόπιν ταξινόμησης των ατόμων της μελέτης με βάση την ηλικία τους, παρατηρήθηκε ότι η μέση τιμή της ποσότητας της επαγόμενης Hsp70 είναι μεγαλύτερη στους ορούς των ασθενών κάτω των 70 ετών σε σύγκριση με αυτή των ασθενών, που είναι πάνω από 70 ετών (Εικόνα 3.79). Επομένως, προκύπτει ότι, πιθανώς, οι νεότεροι ασθενείς έχουν τη δυνατότητα να επάγουν σε μεγαλύτερα ποσά την πρωτεΐνη Hsp70 στον ορό του αίματος τους, λόγω της ανάπτυξης της καρδιακής ανεπάρκειας, σε σύγκριση με τους πιο ηλικιωμένους ασθενείς.

Σε προηγούμενες μελέτες έχει διαφανεί ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης Hsp70 σχετίζονται με την ηλικία και τη γήρανση. Η ποσότητα της Hsp70 εμφάνισε σαφή μείωση στον ορό αίματος των μεγαλύτερων σε ηλικία ατόμων [949]. Επίσης, έχει δείχτει ότι η συγκέντρωση της Hsp70 στον ορό μειώνεται με την ηλικία, προσθέτοντας περαιτέρω αποδεικτικά στοιχεία στη θεωρία ότι η ικανότητα παραγωγής Hsp70 μειώνεται με τη γήρανση [945]. Μία σχετική με την ηλικία μείωση όλων των κύριων Hsps (όπως και της Hsp70) έχει παρατηρηθεί στον ορό και τα κύτταρα του περιφερικού αίματος στον άνθρωπο [945, 950-953], ενώ το περιεχόμενο σε Hsp72 μειώνεται με την ηλικία και στους σκελετικούς μύες [954, 955].

Στη συνέχεια της μελέτης μας, μετά την ταξινόμηση των ασθενών με βάση κλινικά χαρακτηριστικά της καρδιακής ανεπάρκειας (με μορφή αριστερής καρδιακής ανεπάρκειας), που είχαν αναπτύξει, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της Hsp70 από τους ορούς των ασθενών με συστολική καρδιακή ανεπάρκεια ήταν πιο αυξημένη σε σχέση με την τιμή της ποσότητας της πρωτεΐνης από τους, ορούς, που συλλέχθηκαν από τους ασθενείς με διαστολική καρδιακή ανεπάρκεια (Εικόνα 3.80). Έτσι, φαίνεται ότι ο τύπος της καρδιακής ανεπάρκειας μπορεί να επηρεάζει την ποσότητα της επαγόμενης Hsp70 στον ορό του αίματος των ασθενών.

Τέλος, από τη σύγκριση των ασθενών με βάση το αίτιο της καρδιακής ανεπάρκειας, παρατηρήθηκε ότι η ποσότητα της επαγόμενης Hsp70 στους ορούς των

ασθενών δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την αιτία πρόκλησης της καρδιακής ανεπάρκειας. Οι δύο ομάδες, που σχηματίστηκαν, ήτοι οι ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια ισχαιμικής αιτιολογίας και οι ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια μη ισχαιμικής αιτιολογίας, δεν εμφάνισαν ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ τους ως προς τη συγκέντρωση της επαγόμενης Hsp70 στον ορό τους (Εικόνα 3.81).

Δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία πολλά ερευνητικά δεδομένα, που να συγκρίνουν την ποσότητα της Hsp70 στον ορό των ασθενών με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά της καρδιακής ανεπάρκειας. Αυξημένα επίπεδα της Hsp70 του ορού έχουν συσχετιστεί με επικράτηση διατατικής και ισχαιμικής μυοκαρδιοπάθειας [830]. Σε μία μελέτη αποδείχθηκε ότι η συγκέντρωση της Hsp70 σε ορό ασθενών με διαφορετικές μορφές καρδιακής ανεπάρκειας ήταν σημαντικά αυξημένη σε όλες τις κατηγορίες σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Οι ασθενείς αυτοί είχαν διαχωριστεί με βάση τη μορφή καρδιακής ανεπάρκειας, που έφεραν, σε ασθενείς με αρρυθμογόνο μυοκαρδιοπάθεια της δεξιάς κοιλίας, με διατατική μυοκαρδιοπάθεια και με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια. Τα επίπεδα της Hsp70 στον ορό των ασθενών αυτών δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους σε όλες τις κατηγορίες καρδιακής ανεπάρκειας, πράγμα το οποίο είναι παραπλήσιο με τα δικά μας αποτελέσματα. Οι ίδιοι ερευνητές πρότειναν ότι το κατεστραμμένο μυοκάρδιο ήταν η κύρια πηγή των αυξημένων επιπέδων της Hsp70 στην κυκλοφορία του αίματος, καθώς οι ασθενείς όλων των κατηγοριών εμφάνισαν βλάβη στο μυοκάρδιο [956].

Τα αποτελέσματα μας αυτά ως προς την έκφραση της Hsp70 στους ορούς αίματος ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και θα πρέπει να επαληθευτούν και σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών. Επίσης, θα ήταν σημαντικό να συσχετιστούν τα αυξημένα επίπεδα της Hsp70 με τη σοβαρότητα της καρδιακής ανεπάρκειας και την επιβίωση.

Συμπερασματικά, σε αυτό το μοντέλο της επαγόμενης από δοξορουβικίνη καρδιακής ανεπάρκειας σε Hsp70-διαγονιδιακά ποντίκια, η Hsp70 φαίνεται να παρέχει προστασία ενάντια στη μυοκαρδιακή βλάβη, που προκαλείται από το φάρμακο, μέσω μιας μείωσης στην εξαρτώμενη από την ενεργοποίηση της p53 απόπτωσης. Ανάλογη προστατευτική επίδραση προσέδωσε η πρωτεΐνη Hsp70 και στα πρωτογενή εμβρυικά κύτταρα, που προέρχονται από τα διαγονιδιακά ποντίκια, τα οποία υπερεκφράζουν την Hsp70, ενάντια στην τοξικότητα της δοξορουβικίνης, μέσω ρύθμισης του ίδιου σημείου του αποπτωτικού μονοπατιού. Επίσης, αποδείχθηκε και η αυξημένη ανθεκτικότητα, που παρέχεται από την Hsp70, στα κύτταρα ενάντια στο οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από το φάρμακο. Μελλοντικά, θα πρέπει, να επιβεβαιωθεί το σημείο δράσης της Hsp70 στον έλεγχο της απόπτωσης, εάν γίνεται εντός ή εκτός του πυρηνικού χώρου, μελετώντας εάν η p53 εξέρχεται από τον πυρήνα ή παραμένει εκεί, και ο μηχανισμός της αναστολής της ενεργοποίησης της p53.

Επιπλέον, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για το εάν η Hsp70 θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος ενάντια στην επαγόμενη από τη δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητα, και ειδικότερα ως μια θεραπευτική στρατηγική για τη μείωση των παρενεργειών της χημειοθεραπείας, που επισκιάζουν την επιτυχημένη επί χρόνων χορήγηση του φαρμάκου στη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου, χωρίς να επηρεάζεται η θεραπευτική της αποτελεσματικότητα. Απαιτείται, ακόμη, περαιτέρω διερεύνηση και άλλων μηχανισμών, που μπορεί να εμπλέκονται σε αυτή την προστατευτική επίδραση της Hsp70 στην επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιακή δυσλειτουργία. Μια άμεση επίδραση της Hsp70 στη φλεγμονώδη απόκριση και/ή το οξειδωτικό στρες, καθώς και σε άλλα μονοπάτια, μέσω των οποίων η Hsp70 μπορεί να αναστέλλει την απόπτωση, δεν θα πρέπει να αποκλειστεί. Λαμβάνοντας

υπόψη τις αντι-αποπτωτικές ιδιότητες της Hsp70, ο ρόλος της σε άλλους τύπους καρδιακής ανεπάρκειας, θα πρέπει, επίσης, να εξεταστεί. Η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών, που θα περιλαμβάνουν τόσο φαρμακολογικές παρεμβάσεις όσο και τεχνικές μεταφοράς γονιδίων, με σκοπό την επαγωγή ή τη μεταφορά του hsp70 γονιδίου με ασφάλεια και αποτελεσματικότητα στα κύτταρα της καρδιάς, θα αποτελούσε μια σημαντική πρόκληση για τον μέλλον.

## **5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**





Η HSP70 αποτελεί έναν από τους δημοφιλέστερους μοριακούς συνοδούς, ενώ ταυτόχρονα είναι η πιο σημαντική πρωτεΐνη θερμικού σοκ, η οποία επάγεται στα κύτταρα μετά από έκθεσή τους σε διάφορα φυσικά ή χημικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του κυττάρου, δεδομένου ότι εμπλέκεται άμεσα ή έμμεσα σε πολλά βασικά κυτταρικά μονοπάτια.

Στην παρούσα εργασία, διερευνήθηκε η προστατευτική επίδραση της πρωτεΐνης Hsp70 στην καρδιακή δυσλειτουργία, που επάγεται από τη δοξορουβικίνη (DOX), ένα σημαντικό αντικαρκινικό φάρμακο που αποτελεί ένα δυνητικό παράγοντα πρόκλησης καρδιακής ανεπάρκειας, καθώς και οι μηχανισμοί δράσης της, σε αγρίου τύπου ποντίκια (F1/F1) και διαγονιδιακά ποντίκια (Tg/Tg), που υπερεκφράζουν την ανθρώπινη Hsp70. Και οι δύο τύποι πειραματοζώων υπεβλήθησαν σε χρόνια χορήγηση δοξορουβικίνης και η εκτίμηση της καρδιακής λειτουργίας *in vivo* με διαθωρακική ηχοκαρδιογραφία έδειξε πως η μείωση της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας, που παρατηρήθηκε μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου, ήταν χαμηλότερη στα Tg/Tg ποντίκια ( $p < 0.05$ ). Έτσι, η ανάλυση των καρδιακών δεικτών έδειξε ότι η υπερέκφραση της Hsp70 συνεισέφερε στην προστασία του μυοκαρδίου των πειραματοζώων, ενάντια στη δοξορουβικίνη.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο μηχανισμός, με τον οποίο προκαλείται η καρδιακή ανεπάρκεια και οι πιθανοί δρόμοι ανασχεσής της από την Hsp70. Σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από το μυοκάρδιο των ίδιων ποντικών με επαγόμενη από δοξορουβικίνη καρδιακή ανεπάρκεια, παρατηρήθηκε η επαγωγή της αποπτωτικής διαδικασίας, μέσω της ενεργοποίησης του καταρράκτη των κασπασών. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η υπερέκφραση της Hsp70 στα διαγονιδιακά Tg/Tg ποντίκια, η οποία δεν επάγεται στον καρδιακό ιστό σε μεγαλύτερο βαθμό από το φάρμακο, παρέχει προστασία ενάντια στη βλάβη του μυοκαρδίου μέσω παρεμπόδισης της ενεργοποίησης της p53 από την Hsp70, αναστέλλοντας, επομένως, τον επακόλουθο αποπτωτικό μηχανισμό.

Σε κυτταρικό επίπεδο, μελετήθηκαν, επίσης, η τοξική επίδραση της δοξορουβικίνης και ο προστατευτικός ρόλος της Hsp70 ενάντια στο φάρμακο σε πρωτογενείς κυτταρικές καλλιέργειες, που απομονώθηκαν από τα ίδια πειραματοζώα. Στις δύο κυτταρικές σειρές (F1/F1 και Tg/Tg), που εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης με δοξορουβικίνη, αποδείχτηκε η δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενη τοξική επίδραση του φαρμάκου στα κύτταρα σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες, που διενεργήθηκαν.

Η βιοχημική μελέτη του αποπτωτικού μονοπατιού, που επάγεται από τη δοξορουβικίνη στις πρωτογενείς εμβρυϊκές κυτταρικές σειρές, αποκάλυψε ότι η μεταχείριση των κυττάρων με το φάρμακο δεν επάγει περαιτέρω την Hsp70, ενώ ενεργοποιεί την p53, η οποία, στη συνέχεια, προωθεί το μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι και τον καταρράκτη των κασπασών. Πιο συγκεκριμένα, η p53 φαίνεται να ενεργοποιεί τις Bax, κασπάση-9 και κασπάση-3, ενώ η ενεργοποίηση της PARP-1 αποκαλύπτει την επαγόμενη από DOX βλάβη του DNA. Το αποπτωτικό αυτό μονοπάτι φαίνεται να αναστέλλεται από την αυξημένη έκφραση της Hsp70 στα Tg/Tg κύτταρα. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι η Hsp70 μπορεί να αποτρέπει την προώθηση της απόπτωσης, που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη, δρώντας σε ένα σημείο ανοδικά της ενεργοποίησης της p53.

Η προστατευτική επίδραση της πρωτεΐνης Hsp70 αποδείχθηκε και με την εκτίμηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων, SOD και GPx. Η δοξορουβικίνη φαίνεται να προκαλεί δοσο- και χρόνο-εξαρτώμενη μείωση στα επίπεδα της δραστηριότητας τουλάχιστον δύο εκ των σημαντικών ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD και GPx) στα πρωτογενή εμβρυϊκά κύτταρα. Ήταν

εμφανής η αυξημένη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών στα Tg/Tg σε σύγκριση με τα φυσιολογικά F1/F1 κύτταρα, προτείνοντας ότι η παρουσία της Hsp70 στα Tg/Tg κύτταρα προσδίδει σε αυτά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη.

Τέλος, σε κλινικό επίπεδο, προσδιορίστηκαν ποσοτικά τα επίπεδα έκφρασης της επαγόμενης Hsp70 σε ορούς ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια. Από τα αποτελέσματα μας προέκυψε ότι στην καρδιακή ανεπάρκεια φαίνεται να αυξάνεται η συγκέντρωση της Hsp70 στους ορούς αίματος των ασθενών σε σχέση με αυτή των υγιών ατόμων. Η αυξημένη έκφραση της Hsp70 στους ορούς ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια φαίνεται να συσχετίζεται με διάφορες παραμέτρους, όπως το φύλο, την ηλικία και τον τύπο της καρδιακής ανεπάρκειας. Η συγκέντρωση της Hsp70 στον ορό είναι αυξημένη στους άνδρες σε σύγκριση με τις γυναίκες, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης στους νεότερους ασθενείς, ενώ η συγκέντρωση της Hsp70 είναι μεγαλύτερη στους ασθενείς με συστολική καρδιακή ανεπάρκεια σε σχέση με αυτούς με διαστολική καρδιακή ανεπάρκεια. Αντίθετα, η αιτιολογία της καρδιακής ανεπάρκειας, είτε ισχαιμική είτε μη ισχαιμική, δεν φάνηκε να επηρεάζει τα επίπεδα της Hsp70 στον ορό του αίματος των ασθενών.

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανή σύνδεση της πρωτεΐνης Hsp70 με την καρδιακή ανεπάρκεια, ενώ ταυτόχρονα ήλθαν στο φως νέα στοιχεία σχετικά με τον πιθανό μηχανισμό δράσης της.

## **6. ABSTRACT**



HSP70 is one of the most popular, well studied molecular chaperones and the most important heat shock protein, whose expression is induced in the cells after exposure to various physical or chemical environmental stimuli. It plays an important role in cell survival, as it participates directly or indirectly in several key cellular pathways.

In the present study, it was investigated the potential protective effect of the Hsp70 protein in the cardiac dysfunction induced by doxorubicin (DOX), an important anti-cancer drug that is a potential heart failure inducer, as well as the mechanisms of its action, in wild-type mice (F1/F1) and Hsp70-transgenic mice (Tg/Tg) overexpressing human HSP70. Both types of our experimental animals were subjected to chronic DOX administration and the *in vivo* cardiac function assessment by transthoracic echocardiography showed that the reduction in left ventricular systolic function observed after DOX administration was lower in Tg/Tg mice ( $p < 0.05$ ). Thus, the analysis of the cardiac markers indicated that overexpression of Hsp70 contributed to the protection of the myocardium of the experimental animals against doxorubicin.

Then, the heart failure induced mechanism and the possible paths of the inhibitory action of Hsp70 were studied. In myocardial protein extracts from identical mice with DOX-induced heart failure, the induction of the apoptotic process and the activation of the caspase cascade were observed. Our results indicated that in Tg/Tg transgenic mice the overexpression of Hsp70, which is not induced in the heart tissue to a greater extent by the drug, provides protection from myocardial damage via an Hsp70-block in p53 activation, thus reducing the subsequent apoptotic mechanism.

Next, at a cellular level, the toxic effects of doxorubicin and the protective role of Hsp70 against doxorubicin were studied in primary cell cultures isolated from embryos of these mice. Both cell lines (F1/F1 and Tg/Tg cells) were exposed to various concentrations and incubation times with doxorubicin and the dose- and time-dependent toxicity of the drug to the cells was demonstrated with all experimental procedures that were performed.

The biochemical characterization of the doxorubicin-induced apoptotic pathway in primary embryonic cell lines revealed that treatment of cells with the drug did not further induce Hsp70, but activated p53, which then promotes the mitochondrial apoptotic signals and the caspase cascade. Specifically, p53 activates Bax, caspase-9 and caspase-3, while the activation of PARP-1 reveals the DOX-induced DNA damage. This apoptotic pathway appeared to be inhibited by the high expression of human Hsp70 in the primary embryonic Tg/Tg cells. Consequently, it can be concluded that Hsp70 may prevent the promotion of apoptosis induced by doxorubicin, acting at a site upstream of p53 activation.

The protective effect of Hsp70 was demonstrated, also, with determination of the activity of the antioxidant enzymes, SOD and GPx. Doxorubicin administration appeared to result in a dose- and time-dependent decrease in activity of at least two of the major endogenous antioxidant enzymes (SOD and GPx) in primary embryonic cells. The increased activity of these enzymes in Tg/Tg cells compared to that of the control F1/F1 cells was obvious, suggesting that the presence of Hsp70 in Tg/Tg cells renders them more resistant to doxorubicin-induced oxidative stress.

Finally, at clinical level, the expression levels of the inducible Hsp70 were quantified in serum from patients with heart failure. Our results showed that in heart failure the concentration of Hsp70 appeared to be increased in blood sera of patients compared to that of healthy individuals. The enhanced expression of Hsp70 in serum of patients with heart failure seems to be associated with various features, such as

gender, age and the type of heart failure. The amount of Hsp70 in serum was increased in men compared to women, elevated levels of the protein were observed in younger patients, and the concentration of Hsp70 was higher in patients with systolic heart failure compared to them with diastolic heart failure. In contrast, the etiology of heart failure, either ischemic or non-ischemic, did not appear to affect the levels of Hsp70 in blood serum of patients.

Overall, in the present study was examined the potential association between the Hsp70 protein and the heart failure and new evidence came to light concerning the possible mechanism of its action.

## **7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**





1. Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem.* 1986;55:1151-91.
2. Kaufmann SH. Heat shock proteins and autoimmunity: a critical appraisal. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994;103(4):317-22.
3. Shinnick TM, Vodkin MH, Williams JC. The Mycobacterium tuberculosis 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the Escherichia coli GroEL protein. *Infect Immun.* 1988 Feb;56(2):446-51.
4. Jaattela M, Wissing D. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann Med.* 1992 Aug;24(4):249-58.
5. Kopecek P, Altmannova K, Weigl E. Stress proteins: nomenclature, division and functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2001 Dec;145(2):39-47.
6. Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol.* 1999;61:243-82.
7. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science.* 1973 Jul 20;181(4096):223-30.
8. Ellis RJ, Hartl FU. Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol.* 1999 Feb;9(1):102-10.
9. Rose GD, Fleming PJ, Banavar JR, Maritan A. A backbone-based theory of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 7;103(45):16623-33.
10. Ellis RJ. Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem Sci.* 2006 Jul;31(7):395-401.
11. Ellis RJ. Molecular chaperones ten years. Introduction. *Semin Cell Dev Biol.* 2000 Feb;11(1):1-5.
12. Ellis RJ, Hartl FU. Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. *FASEB J.* 1996 Jan;10(1):20-6.
13. Privalov PL. Intermediate states in protein folding. *J Mol Biol.* 1996 May 24;258(5):707-25.
14. Sosnick TR, Mayne L, Hiller R, Englander SW. The barriers in protein folding. *Nat Struct Biol.* 1994 Mar;1(3):149-56.
15. Fink AL. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des.* 1998;3(1):R9-23.
16. Wetzel R. For protein misassembly, it's the "I" decade. *Cell.* 1996 Sep 6;86(5):699-702.
17. Anfinsen CB, Haber E, Sela M, White FH, Jr. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1961 Sep 15;47:1309-14.
18. Creighton TE. Protein folding. *Biochem J.* 1990 Aug 15;270(1):1-16.
19. Dill KA. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry.* 1990 Aug 7;29(31):7133-55.
20. Kauzmann W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv Protein Chem.* 1959;14:1-63.
21. Jaenicke R, Seckler R. Protein misassembly in vitro. *Adv Protein Chem.* 1997;50:1-59.
22. Kiefhaber T, Rudolph R, Kohler HH, Buchner J. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N Y).* 1991 Sep;9(9):825-9.
23. Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature.* 1987 Jul 30-Aug 5;328(6129):378-9.
24. Gidalevitz T, Prahlad V, Morimoto RI. The stress of protein misfolding: from single cells to multicellular organisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Jun;3(6).
25. Taylor RC, Dillin A. Aging as an event of proteostasis collapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 May;3(5).
26. Fohlman J, Eaker D, Karlsoon E, Thesleff S. Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian snake taipan (*Oxyuranus s.*

- scutellatus). Isolation, characterization, quaternary structure and pharmacological properties. *Eur J Biochem.* 1976 Sep 15;68(2):457-69.
27. Ellis RJ. Discovery of molecular chaperones. *Cell Stress Chaperones.* 1996 Sep;1(3):155-60.
  28. Morange M. What history tells us II. The discovery of chaperone function. *J Biosci.* 2005 Sep;30(4):461-4.
  29. Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature.* 1978 Oct 5;275(5679):416-20.
  30. Pelham HR. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell.* 1986 Sep 26;46(7):959-61.
  31. Goloubinoff P, Christeller JT, Gatenby AA, Lorimer GH. Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature.* 1989 Dec 21-28;342(6252):884-9.
  32. Georgopoulos CP, Hendrix RW, Casjens SR, Kaiser AD. Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J Mol Biol.* 1973 May 5;76(1):45-60.
  33. Tilly K, Murialdo H, Georgopoulos C. Identification of a second *Escherichia coli* groE gene whose product is necessary for bacteriophage morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Mar;78(3):1629-33.
  34. Georgopoulos C, Tilly K, Casjens SR. Lambdoid phage head assembly. In *Lambda II*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1983;13:279-304.
  35. Kochan J, Murialdo H. Early intermediates in bacteriophage lambda prohead assembly. II. Identification of biologically active intermediates. *Virology.* 1983 Nov;131(1):100-15.
  36. Murialdo H. Early intermediates in bacteriophage lambda prohead assembly. *Virology.* 1979 Jul 30;96(2):341-67.
  37. Coppo A, Manzi A, Pulitzer JF, Takahashi H. Abortive bacteriophage T4 head assembly in mutants of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 1973 May 5;76(1):61-87.
  38. Sternberg N. Properties of a mutant of *Escherichia coli* defective in bacteriophage lambda head formation (groE). II. The propagation of phage lambda. *J Mol Biol.* 1973 May 5;76(1):25-44.
  39. Murialdo H, Becker A. A genetic analysis of bacteriophage lambda prohead assembly in vitro. *J Mol Biol.* 1978 Oct 15;125(1):57-74.
  40. Zweig M, Cummings DJ. Cleavage of head and tail proteins during bacteriophage T5 assembly: selective host involvement in the cleavage of a tail protein. *J Mol Biol.* 1973 Nov 5;80(3):505-18.
  41. Barraclough R, Ellis RJ. Protein synthesis in chloroplasts. IX. Assembly of newly-synthesized large subunits into ribulose biphosphate carboxylase in isolated intact pea chloroplasts. *Biochim Biophys Acta.* 1980 Jun 27;608(1):19-31.
  42. Ellis RJ, Van Der Vies SM. The Rubisco subunit binding protein. *Photosynth Res.* 1988 Apr;16(1-2):101-15.
  43. Hendrix RW. Purification and properties of groE, a host protein involved in bacteriophage assembly. *J Mol Biol.* 1979 Apr 15;129(3):375-92.
  44. Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT, Georgopoulos CP, et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature.* 1988 May 26;333(6171):330-4.
  45. Goloubinoff P, Gatenby AA, Lorimer GH. GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature.* 1989 Jan 5;337(6202):44-7.
  46. Lorimer GH. A personal account of chaperonin history. *Plant Physiol.* 2001 Jan;125(1):38-41.
  47. Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature.* 1991 Oct 24;353(6346):726-30.

48. Landry SJ, Jordan R, McMacken R, Gierasch LM. Different conformations for the same polypeptide bound to chaperones DnaK and GroEL. *Nature*. 1992 Jan 30;355(6359):455-7.
49. Hartl FU, Martin J, Neupert W. Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1992;21:293-322.
50. Palleros DR, Reid KL, Shi L, Welch WJ, Fink AL. ATP-induced protein-Hsp70 complex dissociation requires K<sup>+</sup> but not ATP hydrolysis. *Nature*. 1993 Oct 14;365(6447):664-6.
51. Szabo A, Langer T, Schroder H, Flanagan J, Bukau B, Hartl FU. The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the Escherichia coli Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct 25;91(22):10345-9.
52. Buchberger A, Schroder H, Hestekamp T, Schonfeld HJ, Bukau B. Substrate shuttling between the DnaK and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. *J Mol Biol*. 1996 Aug 23;261(3):328-33.
53. Hubbard TJ, Sander C. The role of heat-shock and chaperone proteins in protein folding: possible molecular mechanisms. *Protein Eng*. 1991 Oct;4(7):711-7.
54. Zahn R, Spitzfaden C, Ottiger M, Wuthrich K, Pluckthun A. Destabilization of the complete protein secondary structure on binding to the chaperone GroEL. *Nature*. 1994 Mar 17;368(6468):261-5.
55. Goloubinoff P, Mogk A, Zvi AP, Tomoyasu T, Bukau B. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 23;96(24):13732-7.
56. Walter S, Buchner J. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2002 Apr 2;41(7):1098-113.
57. Saibil HR. Chaperone machines in action. *Curr Opin Struct Biol*. 2008 Feb;18(1):35-42.
58. Fenton WA, Horwich AL. GroEL-mediated protein folding. *Protein Sci*. 1997 Apr;6(4):743-60.
59. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*. 2002 Mar 8;295(5561):1852-8.
60. Macario AJ, Conway de Macario E. Sick chaperones, cellular stress, and disease. *N Engl J Med*. 2005 Oct 6;353(14):1489-501.
61. Terasawa K, Minami M, Minami Y. Constantly updated knowledge of Hsp90. *J Biochem*. 2005 Apr;137(4):443-7.
62. Tyedmers J, Mogk A, Bukau B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Nov;11(11):777-88.
63. Zorzi E, Bonvini P. Inducible hsp70 in the regulation of cancer cell survival: analysis of chaperone induction, expression and activity. *Cancers (Basel)*. 2011;3(4):3921-56.
64. Lewis MJ, Pelham HR. Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70 kd heat shock protein. *EMBO J*. 1985 Dec 1;4(12):3137-43.
65. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005 Oct;5(10):761-72.
66. Kotoglou P, Kalaitzakis A, Vezyraki P, Tzavaras T, Michalis LK, Dantzer F, et al. Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks. *Cell Stress Chaperones*. 2009 Jul;14(4):391-406.
67. Pelham HR. Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J*. 1984 Dec 20;3(13):3095-100.
68. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 1996 Jun 13;381(6583):571-9.
69. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature*. 1992 Jan 2;355(6355):33-45.
70. Barral JM, Broadley SA, Schaffar G, Hartl FU. Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2004 Feb;15(1):17-29.
71. Ellis RJ, Hemmingsen SM. Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem Sci*. 1989 Aug;14(8):339-42.

72. Angelidis CE, Lazaridis I, Pagoulatos GN. Constitutive expression of heat-shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance. *Eur J Biochem.* 1991 Jul 1;199(1):35-9.
73. Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem.* 1993 Jan 25;268(3):1517-20.
74. Craig EA, Weissman JS, Horwich AL. Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell.* 1994 Aug 12;78(3):365-72.
75. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988;22:631-77.
76. Craig EA, Gross CA. Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem Sci.* 1991 Apr;16(4):135-40.
77. Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, Boisvert DC, Joachimiak A, Horwich AL, et al. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature.* 1994 Oct 13;371(6498):578-86.
78. Plumier JC, Ross BM, Currie RW, Angelidis CE, Kazlaris H, Kollias G, et al. Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest.* 1995 Apr;95(4):1854-60.
79. Yokota SI, Yanagi H, Yura T, Kubota H. Upregulation of cytosolic chaperonin CCT subunits during recovery from chemical stress that causes accumulation of unfolded proteins. *Eur J Biochem.* 2000 Mar;267(6):1658-64.
80. Lee AS. Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells. *Trends in Biochemical Sciences.* 12:20-3.
81. Phipps BM, Hoffmann A, Stetter KO, Baumeister W. A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria. *EMBO J.* 1991 Jul;10(7):1711-22.
82. Lewis VA, Hynes GM, Zheng D, Saibil H, Willison K. T-complex polypeptide-1 is a subunit of a heteromeric particle in the eukaryotic cytosol. *Nature.* 1992 Jul 16;358(6383):249-52.
83. Yaffe MB, Farr GW, Miklos D, Horwich AL, Sternlicht ML, Sternlicht H. TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature.* 1992 Jul 16;358(6383):245-8.
84. Xu Z, Sigler PB. GroEL/GroES: structure and function of a two-stroke folding machine. *J Struct Biol.* 1998 Dec 15;124(2-3):129-41.
85. Horwich AL, Fenton WA, Farr GW. Chaperonins. *Encyclopedia of Biological Chemistry.* Oxford, UK: Elsevier; 2004. 393-8 p.
86. Clark JI, Muchowski PJ. Small heat-shock proteins and their potential role in human disease. *Curr Opin Struct Biol.* 2000 Feb;10(1):52-9.
87. Fink AL. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev.* 1999 Apr;79(2):425-49.
88. White HE, Orlova EV, Chen S, Wang L, Ignatiou A, Gowen B, et al. Multiple distinct assemblies reveal conformational flexibility in the small heat shock protein Hsp26. *Structure.* 2006 Jul;14(7):1197-204.
89. Shi J, Koteiche HA, McHaourab HS, Stewart PL. Cryoelectron microscopy and EPR analysis of engineered symmetric and polydisperse Hsp16.5 assemblies reveals determinants of polydispersity and substrate binding. *J Biol Chem.* 2006 Dec 29;281(52):40420-8.
90. Kim KK, Kim R, Kim SH. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature.* 1998 Aug 6;394(6693):595-9.
91. Caplan AJ, Cyr DM, Douglas MG. Eukaryotic homologues of *Escherichia coli* dnaJ: a diverse protein family that functions with hsp70 stress proteins. *Mol Biol Cell.* 1993 Jun;4(6):555-63.
92. Silver PA, Way JC. Eukaryotic DnaJ homologs and the specificity of Hsp70 activity. *Cell.* 1993 Jul 16;74(1):5-6.
93. Pellicchia M, Szyperski T, Wall D, Georgopoulos C, Wuthrich K. NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich region of the *Escherichia coli* DnaJ chaperone. *J Mol Biol.* 1996 Jul 12;260(2):236-50.

94. Qian YQ, Patel D, Hartl FU, McColl DJ. Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J-domain. *J Mol Biol.* 1996 Jul 12;260(2):224-35.
95. Tsai J, Douglas MG. A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. *J Biol Chem.* 1996 Apr 19;271(16):9347-54.
96. Wall D, Zylicz M, Georgopoulos C. The conserved G/F motif of the DnaJ chaperone is necessary for the activation of the substrate binding properties of the DnaK chaperone. *J Biol Chem.* 1995 Feb 3;270(5):2139-44.
97. Karzai AW, McMacken R. A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the Escherichia coli DnaK protein. *J Biol Chem.* 1996 May 10;271(19):11236-46.
98. Yan W, Craig EA. The glycine-phenylalanine-rich region determines the specificity of the yeast Hsp40 Sis1. *Mol Cell Biol.* 1999 Nov;19(11):7751-8.
99. Huang K, Flanagan JM, Prestegard JH. The influence of C-terminal extension on the structure of the "J-domain" in E. coli DnaJ. *Protein Sci.* 1999 Jan;8(1):203-14.
100. Linke K, Wolfram T, Bussemer J, Jakob U. The roles of the two zinc binding sites in DnaJ. *J Biol Chem.* 2003 Nov 7;278(45):44457-66.
101. Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK, Hartl FU. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature.* 1992 Apr 23;356(6371):683-9.
102. Schroder H, Langer T, Hartl FU, Bukau B. DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.* 1993 Nov;12(11):4137-44.
103. Goffin L, Georgopoulos C. Genetic and biochemical characterization of mutations affecting the carboxy-terminal domain of the Escherichia coli molecular chaperone DnaJ. *Mol Microbiol.* 1998 Oct;30(2):329-40.
104. Johnson JL, Craig EA. An essential role for the substrate-binding region of Hsp40s in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 2001 Feb 19;152(4):851-6.
105. Cyr DM, Langer T, Douglas MG. DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem Sci.* 1994 Apr;19(4):176-81.
106. Rowley N, Prip-Buus C, Westermann B, Brown C, Schwarz E, Barrell B, et al. Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell.* 1994 Apr 22;77(2):249-59.
107. Cyr DM, Douglas MG. Differential regulation of Hsp70 subfamilies by the eukaryotic DnaJ homologue YDJ1. *J Biol Chem.* 1994 Apr 1;269(13):9798-804.
108. Cyr DM. Cooperation of the molecular chaperone Ydj1 with specific Hsp70 homologs to suppress protein aggregation. *FEBS Lett.* 1995 Feb 13;359(2-3):129-32.
109. Minami Y, Hohfeld J, Ohtsuka K, Hartl FU. Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J Biol Chem.* 1996 Aug 9;271(32):19617-24.
110. Lee DH, Sherman MY, Goldberg AL. Involvement of the molecular chaperone Ydj1 in the ubiquitin-dependent degradation of short-lived and abnormal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1996 Sep;16(9):4773-81.
111. Bozidis P, Lazaridis I, Pagoulatos GN, Angelidis CE. Mydj2 as a potent partner of hsc70 in mammalian cells. *Eur J Biochem.* 2002 Mar;269(5):1553-60.
112. Chandrasekhar GN, Tilly K, Woolford C, Hendrix R, Georgopoulos C. Purification and properties of the groES morphogenetic protein of Escherichia coli. *J Biol Chem.* 1986 Sep 15;261(26):12414-9.
113. Viitanen PV, Lubben TH, Reed J, Goloubinoff P, O'Keefe DP, Lorimer GH. Chaperonin-facilitated refolding of ribulosebisphosphate carboxylase and ATP hydrolysis by chaperonin 60 (groEL) are K<sup>+</sup> dependent. *Biochemistry.* 1990 Jun 19;29(24):5665-71.
114. Martin J, Langer T, Boteva R, Schramel A, Horwich AL, Hartl FU. Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate. *Nature.* 1991 Jul 4;352(6330):36-42.

115. Cheng MY, Hartl FU, Martin J, Pollock RA, Kalousek F, Neupert W, et al. Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature*. 1989 Feb 16;337(6208):620-5.
116. Ostermann J, Horwich AL, Neupert W, Hartl FU. Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature*. 1989 Sep 14;341(6238):125-30.
117. Buchner J, Schmidt M, Fuchs M, Jaenicke R, Rudolph R, Schmid FX, et al. GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation. *Biochemistry*. 1991 Feb 12;30(6):1586-91.
118. Mendoza JA, Rogers E, Lorimer GH, Horowitz PM. Chaperonins facilitate the in vitro folding of monomeric mitochondrial rhodanese. *J Biol Chem*. 1991 Jul 15;266(20):13044-9.
119. Kubota H. Heat shock proteins: HSP60 family genes. In *Encyclopedia of Stress*. United States of America: Academic Press; 2000. 348-9 p.
120. Xu Z, Horwich AL, Sigler PB. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex. *Nature*. 1997 Aug 21;388(6644):741-50.
121. Lin Z, Madan D, Rye HS. GroEL stimulates protein folding through forced unfolding. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Mar;15(3):303-11.
122. Motojima F, Chaudhry C, Fenton WA, Farr GW, Horwich AL. Substrate polypeptide presents a load on the apical domains of the chaperonin GroEL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 19;101(42):15005-12.
123. Hunt JF, Weaver AJ, Landry SJ, Gierasch L, Deisenhofer J. The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1996 Jan 4;379(6560):37-45.
124. Landry SJ, Zeilstra-Ryalls J, Fayet O, Georgopoulos C, Gierasch LM. Characterization of a functionally important mobile domain of GroES. *Nature*. 1993 Jul 15;364(6434):255-8.
125. Richardson A, Schwager F, Landry SJ, Georgopoulos C. The importance of a mobile loop in regulating chaperonin/ co-chaperonin interaction: humans versus *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2001 Feb 16;276(7):4981-7.
126. Rye HS, Burston SG, Fenton WA, Beechem JM, Xu Z, Sigler PB, et al. Distinct actions of cis and trans ATP within the double ring of the chaperonin GroEL. *Nature*. 1997 Aug 21;388(6644):792-8.
127. Kang PJ, Ostermann J, Shilling J, Neupert W, Craig EA, Pfanner N. Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*. 1990 Nov 8;348(6297):137-43.
128. Hartl FU, Hlodan R, Langer T. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem Sci*. 1994 Jan;19(1):20-5.
129. Pilon M, Schekman R. Protein translocation: how Hsp70 pulls it off. *Cell*. 1999 Jun 11;97(6):679-82.
130. DiDomenico BJ, Bugaisky GE, Lindquist S. The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell*. 1982 Dec;31(3 Pt 2):593-603.
131. Tilly K, McKittrick N, Zylicz M, Georgopoulos C. The dnaK protein modulates the heat-shock response of *Escherichia coli*. *Cell*. 1983 Sep;34(2):641-6.
132. Baler R, Welch WJ, Voellmy R. Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. *J Cell Biol*. 1992 Jun;117(6):1151-9.
133. Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev*. 1998 Mar 1;12(5):654-66.
134. Wang TF, Chang JH, Wang C. Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding. *J Biol Chem*. 1993 Dec 15;268(35):26049-51.
135. Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, et al. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*. 1996 Jun 14;272(5268):1606-14.

136. Gragerov A, Zeng L, Zhao X, Burkholder W, Gottesman ME. Specificity of DnaK-peptide binding. *J Mol Biol.* 1994 Jan 21;235(3):848-54.
137. Dastoor Z, Dreyer J. Nuclear translocation and aggregate formation of heat shock cognate protein 70 (Hsc70) in oxidative stress and apoptosis. *J Cell Sci.* 2000 Aug;113 ( Pt 16):2845-54.
138. Zimmermann R, Sagstetter M, Lewis MJ, Pelham HR. Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes. *EMBO J.* 1988 Sep;7(9):2875-80.
139. Chirico WJ, Waters MG, Blobel G. 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature.* 1988 Apr 28;332(6167):805-10.
140. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science.* 1990 May 18;248(4957):850-4.
141. de la Rosa EJ, Vega-Nunez E, Morales AV, Serna J, Rubio E, de Pablo F. Modulation of the chaperone heat shock cognate 70 by embryonic (pro)insulin correlates with prevention of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Aug 18;95(17):9950-5.
142. Ungewickell E. The 70-kd mammalian heat shock proteins are structurally and functionally related to the uncoating protein that releases clathrin triskelia from coated vesicles. *EMBO J.* 1985 Dec 16;4(13A):3385-91.
143. Bole DG, Hendershot LM, Kearney JF. Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *J Cell Biol.* 1986 May;102(5):1558-66.
144. Gething MJ, McCammon K, Sambrook J. Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport. *Cell.* 1986 Sep 12;46(6):939-50.
145. Haas IG, Wabl M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature.* 1983 Nov 24-30;306(5941):387-9.
146. Morrison SL, Scharff MD. Heavy chain-producing variants of a mouse myeloma cell line. *J Immunol.* 1975 Feb;114(2 Pt 1):655-9.
147. Dorner AJ, Bole DG, Kaufman RJ. The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J Cell Biol.* 1987 Dec;105(6 Pt 1):2665-74.
148. Shiu RP, Pouyssegur J, Pastan I. Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Sep;74(9):3840-4.
149. Wu FS, Park YC, Roufa D, Martonosi A. Selective stimulation of the synthesis of an 80,000-dalton protein by calcium ionophores. *J Biol Chem.* 1981 Jun 10;256(11):5309-12.
150. Resendez E, Jr., Attenello JW, Grafsky A, Chang CS, Lee AS. Calcium ionophore A23187 induces expression of glucose-regulated genes and their heterologous fusion genes. *Mol Cell Biol.* 1985 Jun;5(6):1212-9.
151. Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature.* 1988 Mar 31;332(6163):462-4.
152. Munro S, Pelham HR. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell.* 1986 Jul 18;46(2):291-300.
153. Rose MD, Misra LM, Vogel JP. KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell.* 1989 Jun 30;57(7):1211-21.
154. Munro S, Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell.* 1987 Mar 13;48(5):899-907.
155. Mizzen LA, Kabling AN, Welch WJ. The two mammalian mitochondrial stress proteins, grp 75 and hsp 58, transiently interact with newly synthesized mitochondrial proteins. *Cell Regul.* 1991 Feb;2(2):165-79.
156. Mizzen LA, Chang C, Garrels JI, Welch WJ. Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, grp 75, a member of

the hsp 70 family and hsp 58, a homolog of the bacterial groEL protein. *J Biol Chem*. 1989 Dec 5;264(34):20664-75.

157. Slater MR, Craig EA. The SSA1 and SSA2 genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 1989 Jan 25;17(2):805-6.

158. Lopez-Ribot JL, Chaffin WL. Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1996 Aug;178(15):4724-6.

159. Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol*. 1994 Jan;38(1):1-17.

160. Werner-Washburne M, Stone DE, Craig EA. Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1987 Jul;7(7):2568-77.

161. Ellwood MS, Craig EA. Differential regulation of the 70K heat shock gene and related genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1984 Aug;4(8):1454-9.

162. Craig EA, Jacobsen K. Mutations of the heat inducible 70 kilodalton genes of yeast confer temperature sensitive growth. *Cell*. 1984 Oct;38(3):841-9.

163. Halladay JT, Craig EA. A heat shock transcription factor with reduced activity suppresses a yeast HSP70 mutant. *Mol Cell Biol*. 1995 Sep;15(9):4890-7.

164. Trott A, Morano KA. The yeast response to heat shock. In: Hohmann S, Mager WH, editors. *Yeast Stress Responses*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2003. p. 71-119.

165. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 1998 Feb 6;92(3):351-66.

166. Glover JR, Lindquist S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*. 1998 Jul 10;94(1):73-82.

167. Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, Schekman R. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature*. 1988 Apr 28;332(6167):800-5.

168. Becker J, Craig EA. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem*. 1994 Jan 15;219(1-2):11-23.

169. McClellan AJ, Scott MD, Frydman J. Folding and quality control of the VHL tumor suppressor proceed through distinct chaperone pathways. *Cell*. 2005 Jun 3;121(5):739-48.

170. Park SH, Bolender N, Eisele F, Kostova Z, Takeuchi J, Coffino P, et al. The cytoplasmic Hsp70 chaperone machinery subjects misfolded and endoplasmic reticulum import-incompetent proteins to degradation via the ubiquitin-proteasome system. *Mol Biol Cell*. 2007 Jan;18(1):153-65.

171. Stone DE, Craig EA. Self-regulation of 70-kilodalton heat shock proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1990 Apr;10(4):1622-32.

172. Oka M, Kimata Y, Mori K, Kohno K. *Saccharomyces cerevisiae* KAR2 (BiP) gene expression is induced by loss of cytosolic HSP70/Ssa1p through a heat shock element-mediated pathway. *J Biochem*. 1997 Mar;121(3):578-84.

173. Gilbert CS, van den Bosch M, Green CM, Vialard JE, Grenon M, Erdjument-Bromage H, et al. The budding yeast Rad9 checkpoint complex: chaperone proteins are required for its function. *EMBO Rep*. 2003 Oct;4(10):953-8.

174. van den Bosch M, Lowndes NF. Remodelling the Rad9 checkpoint complex: preparing Rad53 for action. *Cell Cycle*. 2004 Feb;3(2):119-22.

175. Polaina J, Conde J. Genes involved in the control of nuclear fusion during the sexual cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 1982;186(2):253-8.

176. Pelham HR, Hardwick KG, Lewis MJ. Sorting of soluble ER proteins in yeast. *EMBO J*. 1988 Jun;7(6):1757-62.

177. Georgopoulos CP, Lam B, Lundquist-Heil A, Rudolph CF, Yochem J, Feiss M. Identification of the *C. coli* dnaK (groPC756) gene product. *Mol Gen Genet*. 1979 May 4;172(2):143-9.

178. Georgopoulos CP. A new bacterial gene (groPC) which affects lambda DNA replication. *Mol Gen Genet*. 1977 Feb 28;151(1):35-9.



179. Sunshine M, Feiss M, Stuart J, Yochem J. A new host gene (groPC) necessary for lambda DNA replication. *Mol Gen Genet.* 1977 Feb 28;151(1):27-34.
180. Schmid D, Baici A, Gehring H, Christen P. Kinetics of molecular chaperone action. *Science.* 1994 Feb 18;263(5149):971-3.
181. Palleros DR, Welch WJ, Fink AL. Interaction of hsp70 with unfolded proteins: effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jul 1;88(13):5719-23.
182. Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, Zylicz M. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Apr 1;88(7):2874-8.
183. Manukhov IV, Eroshnikov GE, Vyssokikh MY, Zavilgelsky GB. Folding and refolding of thermolabile and thermostable bacterial luciferases: the role of DnaKJ heat-shock proteins. *FEBS Lett.* 1999 Apr 9;448(2-3):265-8.
184. Gamer J, Bujard H, Bukau B. Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor sigma 32. *Cell.* 1992 May 29;69(5):833-42.
185. Liberek K, Galitski TP, Zylicz M, Georgopoulos C. The DnaK chaperone modulates the heat shock response of Escherichia coli by binding to the sigma 32 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 15;89(8):3516-20.
186. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia.* 1962;18(12):571-3.
187. Ritossa F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones.* 1996 Jun;1(2):97-8.
188. Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* 1974 Apr 15;84(3):389-98.
189. Tavaría M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones.* 1996 Apr;1(1):23-8.
190. Heck TG, Scholer CM, de Bittencourt PI. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell Biochem Funct.* 2011 Apr;29(3):215-26.
191. Henderson B. Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. *Cell Biochem Funct.* 2010 Jan;28(1):1-14.
192. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones.* 2009 Jan;14(1):105-11.
193. Hageman J, Kampinga HH. Computational analysis of the human HSPH/HSPA/DNAJ family and cloning of a human HSPH/HSPA/DNAJ expression library. *Cell Stress Chaperones.* 2009 Jan;14(1):1-21.
194. Brocchieri L, Conway de Macario E, Macario AJ. hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol Biol.* 2008 Jan 23;8:19.
195. Fathallah DM, Cherif D, Dellagi K, Arnaout MA. Molecular cloning of a novel human hsp70 from a B cell line and its assignment to chromosome 5. *J Immunol.* 1993 Jul 15;151(2):810-3.
196. Goate AM, Cooper DN, Hall C, Leung TK, Solomon E, Lim L. Localization of a human heat-shock HSP 70 gene sequence to chromosome 6 and detection of two other loci by somatic-cell hybrid and restriction fragment length polymorphism analysis. *Hum Genet.* 1987 Feb;75(2):123-8.
197. Harrison GS, Drabkin HA, Kao FT, Hartz J, Hart IM, Chu EH, et al. Chromosomal location of human genes encoding major heat-shock protein HSP70. *Somat Cell Mol Genet.* 1987 Mar;13(2):119-30.

198. Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Mar;86(6):1968-72.
199. Hendershot LM, Valentine VA, Lee AS, Morris SW, Shapiro DN. Localization of the gene encoding human BiP/GRP78, the endoplasmic reticulum cognate of the HSP70 family, to chromosome 9q34. *Genomics*. 1994 Mar 15;20(2):281-4.
200. Tavaría M, Gabriele T, Anderson RL, Mirault ME, Baker E, Sutherland G, et al. Localization of the gene encoding the human heat shock cognate protein, HSP73, to chromosome 11. *Genomics*. 1995 Sep 1;29(1):266-8.
201. Bonnycastle LL, Yu CE, Hunt CR, Trask BJ, Clancy KP, Weber JL, et al. Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (HSPA2). *Genomics*. 1994 Sep 1;23(1):85-93.
202. Daugaard M, Rohde M, Jaattela M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett*. 2007 Jul 31;581(19):3702-10.
203. Wu B, Hunt C, Morimoto R. Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. *Mol Cell Biol*. 1985 Feb;5(2):330-41.
204. Hightower LE. *Stress Proteins In Biology and Medicine*. Richard I. Morimoto, Alfred Tissieres, and Costa Georgopoulos, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1990. x, 450 pp., illus. \$97. Cold Spring Harbor Monograph Series 19. Science. 1990 Aug 3;249(4968):572-3.
205. Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell*. 1991 Jul 26;66(2):191-7.
206. Milner CM, Campbell RD. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics*. 1990;32(4):242-51.
207. Anckar J, Sistonen L. Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv Exp Med Biol*. 2007;594:78-88.
208. Milarski KL, Morimoto RI. Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Dec;83(24):9517-21.
209. Taira T, Narita T, Iguchi-Arigo SM, Arigo H. A novel G1-specific enhancer identified in the human heat shock protein 70 gene. *Nucleic Acids Res*. 1997 May 15;25(10):1975-83.
210. Son WY, Han CT, Hwang SH, Lee JH, Kim S, Kim YC. Repression of hspA2 messenger RNA in human testes with abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril*. 2000 Jun;73(6):1138-44.
211. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, et al. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 16;93(8):3264-8.
212. Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev*. 2005 Mar 1;19(5):570-82.
213. Daugaard M, Kirkegaard-Sorensen T, Ostensfeld MS, Aaboe M, Hoyer-Hansen M, Orntoft TF, et al. Lens epithelium-derived growth factor is an Hsp70-2 regulated guardian of lysosomal stability in human cancer. *Cancer Res*. 2007 Mar 15;67(6):2559-67.
214. Gething MJ. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol*. 1999 Oct;10(5):465-72.
215. Luo S, Mao C, Lee B, Lee AS. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol*. 2006 Aug;26(15):5688-97.
216. Leung TK, Rajendran MY, Monfries C, Hall C, Lim L. The human heat-shock protein family. Expression of a novel heat-inducible HSP70 (HSP70B') and isolation of its cDNA and genomic DNA. *Biochem J*. 1990 Apr 1;267(1):125-32.
217. Parsian AJ, Sheren JE, Tao TY, Goswami PC, Malyapa R, Van Rheeden R, et al. The human Hsp70B gene at the HSPA7 locus of chromosome 1 is transcribed but non-functional. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Nov 15;1494(1-2):201-5.

218. Dworniczak B, Mirault ME. Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock 'cognate' protein. *Nucleic Acids Res.* 1987 Jul 10;15(13):5181-97.
219. Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell.* 2006 May 5;125(3):443-51.
220. Domanico SZ, DeNagel DC, Dahlseid JN, Green JM, Pierce SK. Cloning of the gene encoding peptide-binding protein 74 shows that it is a new member of the heat shock protein 70 family. *Mol Cell Biol.* 1993 Jun;13(6):3598-610.
221. Bhattacharyya T, Karnezis AN, Murphy SP, Hoang T, Freeman BC, Phillips B, et al. Cloning and subcellular localization of human mitochondrial hsp70. *J Biol Chem.* 1995 Jan 27;270(4):1705-10.
222. Deocaris CC, Kaul SC, Wadhwa R. On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones.* 2006 Summer;11(2):116-28.
223. Welch WJ, Feramisco JR. Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J Biol Chem.* 1984 Apr 10;259(7):4501-13.
224. Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer.* 1992 Jun 19;51(4):613-9.
225. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Muller E, Meier T, Wilmanns W, et al. A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer.* 1995 Apr 10;61(2):272-9.
226. Multhoff G, Botzler C, Jennen L, Schmidt J, Ellwart J, Issels R. Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J Immunol.* 1997 May 1;158(9):4341-50.
227. Hantschel M, Pfister K, Jordan A, Scholz R, Andreesen R, Schmitz G, et al. Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients. *Cell Stress Chaperones.* 2000 Nov;5(5):438-42.
228. Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Hoyer-Hansen M, et al. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med.* 2004 Aug 16;200(4):425-35.
229. Multhoff G, Hightower LE. Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies. *Cell Stress Chaperones.* 2011 May;16(3):251-5.
230. Hightower LE, Guidon PT, Jr. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *J Cell Physiol.* 1989 Feb;138(2):257-66.
231. Periard JD, Ruell P, Caillaud C, Thompson MW. Plasma Hsp72 (HSPA1A) and Hsp27 (HSPB1) expression under heat stress: influence of exercise intensity. *Cell Stress Chaperones.* 2012 May;17(3):375-83.
232. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 1989 Dec 1;49(23):6449-65.
233. Multhoff G, Hightower LE. Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chaperones.* 1996 Sep;1(3):167-76.
234. Febbraio MA, Steensberg A, Walsh R, Koukoulas I, van Hall G, Saltin B, et al. Reduced glycogen availability is associated with an elevation in HSP72 in contracting human skeletal muscle. *J Physiol.* 2002 Feb 1;538(Pt 3):911-7.
235. Febbraio MA, Ott P, Nielsen HB, Steensberg A, Keller C, Krstrup P, et al. Exercise induces hepatosplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. *J Physiol.* 2002 Nov 1;544(Pt 3):957-62.
236. Lancaster GI, Moller K, Nielsen B, Secher NH, Febbraio MA, Nybo L. Exercise induces the release of heat shock protein 72 from the human brain in vivo. *Cell Stress Chaperones.* 2004 Autumn;9(3):276-80.
237. Feige U, Polla BS. Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia.* 1994 Nov 30;50(11-12):979-86.

238. Gunther E, Walter L. Genetic aspects of the hsp70 multigene family in vertebrates. *Experientia*. 1994 Nov 30;50(11-12):987-1001.
239. Sriram M, Osipiuk J, Freeman B, Morimoto R, Joachimiak A. Human Hsp70 molecular chaperone binds two calcium ions within the ATPase domain. *Structure*. 1997 Mar 15;5(3):403-14.
240. Chappell TG, Konforti BB, Schmid SL, Rothman JE. The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *J Biol Chem*. 1987 Jan 15;262(2):746-51.
241. DeLuca-Flaherty C, Flaherty KM, McIntosh LJ, Bahrami B, McKay DB. Crystals of an ATPase fragment of bovine clathrin uncoating ATPase. *J Mol Biol*. 1988 Apr 20;200(4):749-50.
242. Flaherty KM, McKay DB, Kabsch W, Holmes KC. Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jun 1;88(11):5041-5.
243. Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*. 1990 Aug 16;346(6285):623-8.
244. Freeman BC, Myers MP, Schumacher R, Morimoto RI. Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J*. 1995 May 15;14(10):2281-92.
245. Bork P, Sander C, Valencia A. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 15;89(16):7290-4.
246. Kampinga HH, Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Aug;11(8):579-92.
247. Hofmann G, Somero G. Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *J Exp Biol*. 1995;198(Pt 7):1509-18.
248. Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science*. 1989 Oct 20;246(4928):382-5.
249. Benaroudj N, Triniolles F, Ladjimi MM. Effect of nucleotides, peptides, and unfolded proteins on the self-association of the molecular chaperone HSC70. *J Biol Chem*. 1996 Aug 2;271(31):18471-6.
250. Angelidis CE, Lazaridis I, Pagoulatos GN. Aggregation of hsp70 and hsc70 in vivo is distinct and temperature-dependent and their chaperone function is directly related to non-aggregated forms. *Eur J Biochem*. 1999 Jan;259(1-2):505-12.
251. Αγγελίδης Χ. Μοριακοί συνοδοί (chaperones). In *Αναδίπλωση και συστήματα ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών*. Ιωάννινα: Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο Ιωαννίνων; 2003α. 3-4 p.
252. Asea A. Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72. *Exerc Immunol Rev*. 2005;11:34-45.
253. Cooper GM, Hausman RE. The nucleus. In *The Cell: A Molecular Approach*. 4th edition ed. Sunderland, Massachusetts, U.S.A: Sinauer Associates Inc.; 2007. 355-83 p.
254. Calini V, Urani C, Camatini M. Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicol In Vitro*. 2003 Oct-Dec;17(5-6):561-6.
255. Niu P, Liu L, Gong Z, Tan H, Wang F, Yuan J, et al. Overexpressed heat shock protein 70 protects cells against DNA damage caused by ultraviolet C in a dose-dependent manner. *Cell Stress Chaperones*. 2006 Summer;11(2):162-9.
256. Bases R. Heat shock protein 70 enhanced deoxyribonucleic acid base excision repair in human leukemic cells after ionizing radiation. *Cell Stress Chaperones*. 2006 Autumn;11(3):240-9.
257. Doulias PT, Kotoglou P, Tenopoulou M, Keramisanou D, Tzavaras T, Brunk U, et al. Involvement of heat shock protein-70 in the mechanism of hydrogen peroxide-induced DNA damage: the role of lysosomes and iron. *Free Radic Biol Med*. 2007 Feb 15;42(4):567-77.

258. Jaattela M. Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int J Cancer*. 1995 Mar 3;60(5):689-93.
259. Jaattela M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene*. 2004 Apr 12;23(16):2746-56.
260. Samali A, Cotter TG. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res*. 1996 Feb 25;223(1):163-70.
261. Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J*. 1998 Nov 2;17(21):6124-34.
262. Xanthoudakis S, Nicholson DW. Heat-shock proteins as death determinants. *Nat Cell Biol*. 2000 Sep;2(9):E163-5.
263. Creagh EM, Carmody RJ, Cotter TG. Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp Cell Res*. 2000 May 25;257(1):58-66.
264. Gabai VL, Yaglom JA, Volloch V, Meriin AB, Force T, Koutroumanis M, et al. Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death. *Mol Cell Biol*. 2000 Sep;20(18):6826-36.
265. Gutierrez LL, Maslinkiewicz A, Curi R, de Bittencourt PI, Jr. Atherosclerosis: a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins. *Biochem Pharmacol*. 2008 Jun 15;75(12):2245-62.
266. Li GC, Werb Z. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 May;79(10):3218-22.
267. Li GC, Li LG, Liu YK, Mak JY, Chen LL, Lee WM. Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Mar 1;88(5):1681-5.
268. Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, de Faire U, Frostegard J. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension*. 2003 Sep;42(3):235-8.
269. Ogawa F, Shimizu K, Hara T, Muroi E, Hasegawa M, Takehara K, et al. Serum levels of heat shock protein 70, a biomarker of cellular stress, are elevated in patients with systemic sclerosis: association with fibrosis and vascular damage. *Clin Exp Rheumatol*. 2008 Jul-Aug;26(4):659-62.
270. Gehrig SM, van der Poel C, Sayer TA, Schertzer JD, Henstridge DC, Church JE, et al. Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature*. 2012 Apr 04;484(7394):394-8.
271. Cummings CJ, Sun Y, Opal P, Antalffy B, Mestrlil R, Orr HT, et al. Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum Mol Genet*. 2001 Jul 1;10(14):1511-8.
272. Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatos G, Angelidis C, et al. Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein. *J Neurosci*. 2003 Mar 15;23(6):2203-11.
273. Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene*. 2004 Apr 12;23(16):2907-18.
274. Horvath I, Multhoff G, Sonnleitner A, Vigh L. Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jul-Aug;1778(7-8):1653-64.
275. Horvath I, Vigh L. Cell biology: Stability in times of stress. *Nature*. 2010 Jan 28;463(7280):436-8.
276. Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, Ohta T, Ohki M, Asaka M, et al. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2003 Jan;37(1):198-207.
277. Aveic S, Pigazzi M, Basso G. BAG1: the guardian of anti-apoptotic proteins in acute myeloid leukemia. *PLoS One*. 2011;6(10):e26097.

278. McDonough H, Patterson C. CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones*. 2003 Winter;8(4):303-8.
279. Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Nov;63(22):2560-70.
280. Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SE, Lindner R, Prasad K, Barouch W, et al. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature*. 1995 Dec 7;378(6557):632-5.
281. Leung SM, Hightower LE. A 16-kDa protein functions as a new regulatory protein for Hsc70 molecular chaperone and is identified as a member of the Nm23/nucleoside diphosphate kinase family. *J Biol Chem*. 1997 Jan 31;272(5):2607-14.
282. Johnson BD, Schumacher RJ, Ross ED, Toft DO. Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J Biol Chem*. 1998 Feb 6;273(6):3679-86.
283. McClellan AJ, Xia Y, Deutschbauer AM, Davis RW, Gerstein M, Frydman J. Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell*. 2007 Oct 5;131(1):121-35.
284. Young JC, Moarefi I, Hartl FU. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol*. 2001 Jul 23;154(2):267-73.
285. Hutchison KA, Dittmar KD, Pratt WB. All of the factors required for assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with heat shock protein 90 are preassociated in a self-sufficient protein folding structure, a "foldosome". *J Biol Chem*. 1994 Nov 11;269(45):27894-9.
286. Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, et al. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell*. 2000 Apr 14;101(2):199-210.
287. Obermann WM, Sondermann H, Russo AA, Pavletich NP, Hartl FU. In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol*. 1998 Nov 16;143(4):901-10.
288. Freeman BC, Morimoto RI. The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J*. 1996 Jun 17;15(12):2969-79.
289. Buchner J. Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci*. 1999 Apr;24(4):136-41.
290. Glover JR, Schirmer EC, Singer MA, Lindquist SL. Hsp104. In *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins. Structure, Function, and Mode of Action*. Fink AL, Goto Y, editors. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1998. 193-224 p.
291. Parsell DA, Kowal AS, Singer MA, Lindquist S. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature*. 1994 Dec 1;372(6505):475-8.
292. Ruis H, Schuller C. Stress signaling in yeast. *Bioessays*. 1995 Nov;17(11):959-65.
293. Mager WH, De Kruijff AJ. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rev*. 1995 Sep;59(3):506-31.
294. Sharma SK, De los Rios P, Christen P, Lustig A, Goloubinoff P. The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase. *Nat Chem Biol*. 2010 Dec;6(12):914-20.
295. Thirumalai D, Lorimer GH. Chaperonin-mediated protein folding. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2001;30:245-69.
296. Itzhaki LS, Otzen DE, Fersht AR. Nature and consequences of GroEL-protein interactions. *Biochemistry*. 1995 Nov 7;34(44):14581-7.
297. Fenton WA, Kashi Y, Furtak K, Horwich AL. Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature*. 1994 Oct 13;371(6498):614-9.
298. Lin Z, Schwartz FP, Eisenstein E. The hydrophobic nature of GroEL-substrate binding. *J Biol Chem*. 1995 Jan 20;270(3):1011-4.
299. Katsumata K, Okazaki A, Tsurupa GP, Kuwajima K. Dominant forces in the recognition of a transient folding intermediate of alpha-lactalbumin by GroEL. *J Mol Biol*. 1996 Dec 13;264(4):643-9.
300. Perrett S, Zahn R, Stenberg G, Fersht AR. Importance of electrostatic interactions in the rapid binding of polypeptides to GroEL. *J Mol Biol*. 1997 Jun 27;269(5):892-901.

301. Pack CG, Aoki K, Taguchi H, Yoshida M, Kinjo M, Tamura M. Effect of electrostatic interactions on the binding of charged substrate to GroEL studied by highly sensitive fluorescence correlation spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jan 7;267(1):300-4.
302. Weissman JS, Kashi Y, Fenton WA, Horwich AL. GroEL-mediated protein folding proceeds by multiple rounds of binding and release of nonnative forms. *Cell*. 1994 Aug 26;78(4):693-702.
303. Ranson NA, Dunster NJ, Burston SG, Clarke AR. Chaperonins can catalyse the reversal of early aggregation steps when a protein misfolds. *J Mol Biol*. 1995 Jul 28;250(5):581-6.
304. Walter S, Lorimer GH, Schmid FX. A thermodynamic coupling mechanism for GroEL-mediated unfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9425-30.
305. Zahn R, Perrett S, Stenberg G, Fersht AR. Catalysis of amide proton exchange by the molecular chaperones GroEL and SecB. *Science*. 1996 Feb 2;271(5249):642-5.
306. Weissman JS, Hohl CM, Kovalenko O, Kashi Y, Chen S, Braig K, et al. Mechanism of GroEL action: productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. *Cell*. 1995 Nov 17;83(4):577-87.
307. Mayhew M, da Silva AC, Martin J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hartl FU. Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature*. 1996 Feb 1;379(6564):420-6.
308. Weissman JS, Rye HS, Fenton WA, Beechem JM, Horwich AL. Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. *Cell*. 1996 Feb 9;84(3):481-90.
309. Xiao A, Wong J, Luo H. Viral interaction with molecular chaperones: role in regulating viral infection. *Arch Virol*. 2010 Jul;155(7):1021-31.
310. Lewthwaite J, Skinner A, Henderson B. Are molecular chaperones microbial virulence factors? *Trends Microbiol*. 1998 Nov;6(11):426-8.
311. Sullivan CS, Pipas JM. The virus-chaperone connection. *Virology*. 2001 Aug 15;287(1):1-8.
312. Neckers L, Tatu U. Molecular chaperones in pathogen virulence: emerging new targets for therapy. *Cell Host Microbe*. 2008 Dec 11;4(6):519-27.
313. Zhu XD, Li CL, Lang ZW, Gao GF, Tien P. Significant correlation between expression level of HSP gp96 and progression of hepatitis B virus induced diseases. *World J Gastroenterol*. 2004 Apr 15;10(8):1141-5.
314. Hurtley SM, Helenius A. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol*. 1989;5:277-307.
315. Graf PC, Jakob U. Redox-regulated molecular chaperones. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Oct;59(10):1624-31.
316. Papp E, Nardai G, Soti C, Csermely P. Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis. *Biofactors*. 2003;17(1-4):249-57.
317. Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW, Dillin A. Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science*. 2006 Sep 15;313(5793):1604-10.
318. Selkoe DJ. Folding proteins in fatal ways. *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):900-4.
319. Hsu AL, Murphy CT, Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*. 2003 May 16;300(5622):1142-5.
320. Morley JF, Morimoto RI. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell*. 2004 Feb;15(2):657-64.
321. Garigan D, Hsu AL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Kenyon C. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics*. 2002 Jul;161(3):1101-12.
322. Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 1998 Jul 27;83(2):117-32.
323. Willis MS, Patterson C. Hold me tight: Role of the heat shock protein family of chaperones in cardiac disease. *Circulation*. 2010 Oct 26;122(17):1740-51.

324. Hansen JJ, Durr A, Cournu-Rebeix I, Georgopoulos C, Ang D, Nielsen MN, et al. Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am J Hum Genet.* 2002 May;70(5):1328-32.
325. Litt M, Kramer P, LaMorticella DM, Murphey W, Lovrien EW, Weleber RG. Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA. *Hum Mol Genet.* 1998 Mar;7(3):471-4.
326. Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, et al. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet.* 1998 Sep;20(1):92-5.
327. Babizhayev MA, Nikolayev GM, Nikolayeva JG, Yegorov YE. A survey and analysis of the role of molecular chaperone proteins and imidazole-containing dipeptide-based compounds as molecular escorts into the skin during stress, injury, water structuring and other types of cutaneous pathophysiology. *Int J Cosmet Sci.* 2011 Feb;33(1):1-16.
328. Trouba KJ, Hamadeh HK, Amin RP, Germolec DR. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid Redox Signal.* 2002 Aug;4(4):665-73.
329. Trautinger F, Kindas-Mugge I, Barlan B, Neuner P, Knobler RM. 72-kD heat shock protein is a mediator of resistance to ultraviolet B light. *J Invest Dermatol.* 1995 Aug;105(2):160-2.
330. Zhou X, Tron VA, Li G, Trotter MJ. Heat shock transcription factor-1 regulates heat shock protein-72 expression in human keratinocytes exposed to ultraviolet B light. *J Invest Dermatol.* 1998 Aug;111(2):194-8.
331. Trautinger F. Stress proteins in the photobiology of mammalian skin. In *Handbook of Photochemistry and Photobiology*. Nalwa HS, editor. Stevenson Ranch, California: American Scientific Publishers; 2003. 149-58 p.
332. Laplante AF, Moulin V, Auger FA, Landry J, Li H, Morrow G, et al. Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem.* 1998 Nov;46(11):1291-301.
333. Glucksmann A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1951 Feb;26(1):59-86.
334. Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Jul;2(7):545-50.
335. Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *Journal of Insect Physiology.* 1964 1964/08/01;10(4):643-9.
336. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
337. Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 1999 Apr 1;59(7 Suppl):1701s-6s.
338. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:367-401.
339. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Aug;2(8):589-98.
340. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, et al. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene.* 1997 Sep 25;15(13):1573-81.
341. Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol.* 2003 Sep;40(5):481-95.
342. Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Dec 29;266(3):699-717.
343. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):355-65.
344. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):784-8.
345. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol.* 2003 Nov 1;171(9):4672-9.



346. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000 Feb;45(3):528-37.
347. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995 Jan;146(1):3-15.
348. Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol.* 1997 Jan-Feb;25(1):82-8.
349. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Cellular pathology I: cell injury and cell death. In: Robbins Pathologic Basis of Disease. 6 ed. Cortan RS, Kumar V, Collins T, editors. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co; 1999. 1–29 p.
350. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenaabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene.* 1999 Dec 16;18(54):7719-30.
351. Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, Osborne BA. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Feb 1;90(3):980-4.
352. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* 2004 Apr 12;23(16):2891-906.
353. Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy.* 2005 Jul;1(2):66-74.
354. Noda T, Suzuki K, Ohsumi Y. Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol.* 2002 May;12(5):231-5.
355. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002 Apr;2(4):277-88.
356. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):770-6.
357. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.
358. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1317-22.
359. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1309-12.
360. Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 2000 Apr 10;256(1):27-33.
361. Denault JB, Salvesen GS. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev.* 2002 Dec;102(12):4489-500.
362. Richardson H, Kumar S. Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. *J Immunol Methods.* 2002 Jul 1;265(1-2):21-38.
363. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997 Aug 15;326 ( Pt 1):1-16.
364. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2005 Sep;4(3):138-44.
365. Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G, Dixit VM. Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem.* 1998 Nov 6;273(45):29648-53.
366. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 2000 Jan 6;403(6765):98-103.
367. Koenig U, Eckhart L, Tschachler E. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Aug 3;285(5):1150-4.
368. Kang SJ, Wang S, Kuida K, Yuan J. Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ.* 2002 Oct;9(10):1115-25.
369. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:383-424.
370. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1833(12):3481-98.

371. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001 Feb 23;104(4):487-501.
372. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, et al. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*. 1997 Dec 19;272(51):32401-10.
373. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol*. 1998 Oct;10(5):545-51.
374. Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*. 2001 Apr 19;20(17):2122-33.
375. Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, et al. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*. 2005 Nov 1;106(9):3214-22.
376. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 1995 May 19;81(4):495-504.
377. Grimm S, Stanger BZ, Leder P. RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 1;93(20):10923-7.
378. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1635-6.
379. Screaton G, Xu XN. T cell life and death signalling via TNF-receptor family members. *Curr Opin Immunol*. 2000 Jun;12(3):316-22.
380. Yan N, Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:35-56.
381. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal*. 1995;14(22):5579-88.
382. Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, Baltimore D. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science*. 1998 Sep 18;281(5384):1860-3.
383. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*. 1997 Jun 27;89(7):1067-76.
384. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*. 1998 Mar 16;17(6):1675-87.
385. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998 Aug 21;94(4):481-90.
386. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. 2002 Feb;9(2):423-32.
387. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*. 1999 Jan 25;144(2):281-92.
388. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*. 2000 Apr 10;256(1):42-9.
389. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 2001 Nov 15;15(22):2922-33.
390. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004 Apr 12;23(16):2861-74.
391. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem*. 1999 Sep;264(3):687-701.

392. Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*. 2000 Apr 10;256(1):19-26.
393. Cai J, Yang J, Jones DP. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug 10;1366(1-2):139-49.
394. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):33-42.
395. van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ*. 2002 Oct;9(10):1031-42.
396. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 2006 Sep;13(9):1423-33.
397. Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*. 1999 Apr;1(1):5-15.
398. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J*. 2004 May 19;23(10):2134-45.
399. van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*. 2002 Jan;9(1):20-6.
400. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*. 2004 Oct 15;64(20):7183-90.
401. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*. 1998 Jun;1(7):949-57.
402. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15:269-90.
403. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*. 1999 Apr 23;274(17):11549-56.
404. van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 May 9;304(3):487-97.
405. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. 2000 May;6(5):513-9.
406. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*. 1997 Jan;18(1):44-51.
407. Marchetti P, Decaudin D, Macho A, Zamzami N, Hirsch T, Susin SA, et al. Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. *Eur J Immunol*. 1997 Jan;27(1):289-96.
408. Beutner G, Ruck A, Riede B, Brdiczka D. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Jan 5;1368(1):7-18.
409. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001 Mar 29;410(6828):549-54.
410. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*. 2000 Aug 21;192(4):571-80.
411. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001 Jul 5;412(6842):95-9.
412. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):43-50.

413. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2(9):647-56.
414. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2001 Nov;29(Pt 6):684-8.
415. Willis S, Day CL, Hinds MG, Huang DC. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J Cell Sci*. 2003 Oct 15;116(Pt 20):4053-6.
416. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998 Aug 21;94(4):491-501.
417. Esposti MD. The roles of Bid. *Apoptosis*. 2002 Oct;7(5):433-40.
418. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*. 1996 Nov 15;87(4):619-28.
419. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):285-91.
420. Newmeyer DD, Bossy-Wetzler E, Kluck RM, Wolf BB, Beere HM, Green DR. Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ*. 2000 Apr;7(4):402-7.
421. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
422. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 2001 Mar 9;276(10):7320-6.
423. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):96-9.
424. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 1997 Oct 10;278(5336):294-8.
425. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):1071-7.
426. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 1998 Jan 1;31(1):1-9.
427. Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, et al. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell*. 2003 Apr;4(4):587-98.
428. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*. 2002 Oct;2(10):735-47.
429. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*. 2002 Jun;2(6):401-9.
430. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:323-70.
431. Lieberman J, Fan Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol*. 2003 Oct;15(5):553-9.
432. Gross C, Koelch W, DeMaio A, Arispe N, Multhoff G. Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. *J Biol Chem*. 2003 Oct 17;278(42):41173-81.
433. Dressel R, Elsner L, Quentin T, Walter L, Gunther E. Heat shock protein 70 is able to prevent heat shock-induced resistance of target cells to CTL. *J Immunol*. 2000 Mar 1;164(5):2362-71.
434. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005 Mar;22(3):355-70.
435. Banasik M, Stedeford T, Strosznajder RP. Natural inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Mol Neurobiol*. 2012 Aug;46(1):55-63.

436. Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Mabley JG, Szabo E, Szabo C. The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes*. 2002 Feb;51(2):514-21.
437. Schreiber V, Ame JC, Dolle P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem*. 2002 Jun 21;277(25):23028-36.
438. Kraus WL. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2008 Jun;20(3):294-302.
439. Caiafa P, Guastafierro T, Zampieri M. Epigenetics: poly(ADP-ribosylation) of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *FASEB J*. 2009 Mar;23(3):672-8.
440. Pacher P, Liaudet L, Bai P, Virag L, Mabley JG, Hasko G, et al. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Mar;300(3):862-7.
441. Szenczi O, Kemecsei P, Holthuijsen MF, van Riel NA, van der Vusse GJ, Pacher P, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase regulates myocardial calcium handling in doxorubicin-induced heart failure. *Biochem Pharmacol*. 2005 Mar 1;69(5):725-32.
442. Pacher P, Liaudet L, Mabley JG, Cziraki A, Hasko G, Szabo C. Beneficial effects of a novel ultrapotent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in murine models of heart failure. *Int J Mol Med*. 2006 Feb;17(2):369-75.
443. Jaattela M. Programmed cell death: many ways for cells to die decently. *Ann Med*. 2002;34(6):480-8.
444. Mason P. Heat Shock: From Bacteria to Man. Edited by Schesinger Milton J.. Cold Spring Harbor Laboratory, P.O. Box 100, Cold Spring Harbor, N.Y. 11724. (1982). 440 pages. *Genetical Research*. 1983 1983/008/001;42(1):111.
445. Lakhotia SC, Ray P, Rajendra TK, Prasanth KV. The non-coding transcripts of hsr-omega gene in *Drosophila*: Do they regulate trafficking and availability of nuclear RNA-processing factors? *Current Science*. 1999 Aug 25;77(4):553-63.
446. Samali A, Orrenius S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones*. 1998 Dec;3(4):228-36.
447. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Aug 24;286(3):433-42.
448. Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 2004 Mar;101(3):227-57.
449. Beere HM. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest*. 2005 Oct;115(10):2633-9.
450. Kim HP, Morse D, Choi AM. Heat-shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin Ther Targets*. 2006 Oct;10(5):759-69.
451. Didelot C, Schmitt E, Brunet M, Maingret L, Parcellier A, Garrido C. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol*. 2006 (172):171-98.
452. Beere HM. Stressed to death: regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins. *Sci STKE*. 2001 Jul 31;2001(93):re1.
453. Beere HM, Green DR. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2001 Jan;11(1):6-10.
454. Beere HM. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci*. 2004 Jun 1;117(Pt 13):2641-51.
455. Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet*. 1993;27:437-96.
456. Nollen EA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci*. 2002 Jul 15;115(Pt 14):2809-16.
457. Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 May 9;304(3):505-12.

458. Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jaattela M, et al. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest*. 1995 Mar;95(3):926-33.
459. Warrick JM, Chan HY, Gray-Board GL, Chai Y, Paulson HL, Bonini NM. Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nat Genet*. 1999 Dec;23(4):425-8.
460. Clemons NJ, Buzzard K, Steel R, Anderson RL. Hsp72 inhibits Fas-mediated apoptosis upstream of the mitochondria in type II cells. *J Biol Chem*. 2005 Mar 11;280(10):9005-12.
461. Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem*. 1996 Jul 12;271(28):16510-4.
462. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, et al. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2000 Oct;20(19):7146-59.
463. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1997 Sep;17(9):5317-27.
464. Mailhos C, Howard MK, Latchman DS. Heat shock protects neuronal cells from programmed cell death by apoptosis. *Neuroscience*. 1993 Aug;55(3):621-7.
465. Ahn JH, Ko YG, Park WY, Kang YS, Chung HY, Seo JS. Suppression of ceramide-mediated apoptosis by HSP70. *Mol Cells*. 1999 Apr 30;9(2):200-6.
466. Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Chauffert B, et al. HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res*. 1997 Jul 1;57(13):2661-7.
467. Garrido C, Mehlen P, Fromentin A, Hammann A, Assem M, Arrigo AP, et al. Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27. *Eur J Biochem*. 1996 May 1;237(3):653-9.
468. Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo AP. Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death. *EMBO J*. 1996 Jun 3;15(11):2695-706.
469. Nylandsted J, Wick W, Hirt UA, Brand K, Rohde M, Leist M, et al. Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by Hsp70 depletion. *Cancer Res*. 2002 Dec 15;62(24):7139-42.
470. Chatterjee M, Jain S, Stuhmer T, Andrulis M, Ungethüm U, Kuban RJ, et al. STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90alpha and beta in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival. *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):720-8.
471. Gurbuxani S, Bruy JM, Fromentin A, Larmonier N, Parcellier A, Jaattela M, et al. Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. *Oncogene*. 2001 Nov 8;20(51):7478-85.
472. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*. 2000 Aug;2(8):469-75.
473. Garrido C, Bruy JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J*. 1999 Nov;13(14):2061-70.
474. Mao H, Li F, Ruchalski K, Mosser DD, Schwartz JH, Wang Y, et al. hsp72 inhibits focal adhesion kinase degradation in ATP-depleted renal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2003 May 16;278(20):18214-20.
475. Park HS, Lee JS, Huh SH, Seo JS, Choi EJ. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO J*. 2001 Feb 1;20(3):446-56.

476. Lee JS, Lee JJ, Seo JS. HSP70 deficiency results in activation of c-Jun N-terminal Kinase, extracellular signal-regulated kinase, and caspase-3 in hyperosmolarity-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2005 Feb 25;280(8):6634-41.
477. Gao T, Newton AC. The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C. *J Biol Chem*. 2002 Aug 30;277(35):31585-92.
478. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem*. 2005 Nov 18;280(46):38729-39.
479. Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Virost S, Arrigo AP. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol*. 2002 Feb;22(3):816-34.
480. Gabai VL, Mabuchi K, Mosser DD, Sherman MY. Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2002 May;22(10):3415-24.
481. Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ*. 2004 Apr;11(4):390-402.
482. Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem*. 2000 Aug 18;275(33):25665-71.
483. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol*. 2000 Aug;2(8):476-83.
484. Komarova EY, Afanasyeva EA, Bulatova MM, Cheetham ME, Margulis BA, Guzhova IV. Downstream caspases are novel targets for the antiapoptotic activity of the molecular chaperone hsp70. *Cell Stress Chaperones*. 2004 Autumn;9(3):265-75.
485. Schmitt E, Parcellier A, Gurbuxani S, Cande C, Hammann A, Morales MC, et al. Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Res*. 2003 Dec 1;63(23):8233-40.
486. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*. 2001 Sep;3(9):839-43.
487. Ruchalski K, Mao H, Li Z, Wang Z, Gillers S, Wang Y, et al. Distinct hsp70 domains mediate apoptosis-inducing factor release and nuclear accumulation. *J Biol Chem*. 2006 Mar 24;281(12):7873-80.
488. Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, et al. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene*. 2003 Oct 2;22(43):6669-78.
489. Kalinowska M, Garncarz W, Pietrowska M, Garrard WT, Widlak P. Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis*. 2005 Aug;10(4):821-30.
490. Guo F, Sigua C, Bali P, George P, Fiskus W, Scuto A, et al. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1246-55.
491. Gyrð-Hansen M, Nylandsted J, Jaattela M. Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle*. 2004 Dec;3(12):1484-5.
492. Bivik C, Rosdahl I, Ollinger K. Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes. *Carcinogenesis*. 2007 Mar;28(3):537-44.
493. Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M, et al. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):102-5.
494. Volloch V, Gabai VL, Rits S, Sherman MY. ATPase activity of the heat shock protein hsp72 is dispensable for its effects on dephosphorylation of stress kinase JNK and on heat-induced apoptosis. *FEBS Lett*. 1999 Nov 12;461(1-2):73-6.
495. Meriin AB, Yaglom JA, Gabai VL, Zon L, Ganiatsas S, Mosser DD, et al. Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by HSP72. *Mol Cell Biol*. 1999 Apr;19(4):2547-55.

496. Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, Yin Z, Wu X, Jones SN, et al. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev.* 1998 Sep 1;12(17):2658-63.
497. Fuchs SY, Adler V, Pincus MR, Ronai Z. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Sep 1;95(18):10541-6.
498. Noguchi K, Kitanaka C, Yamana H, Kokubu A, Mochizuki T, Kuchino Y. Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* 1999 Nov 12;274(46):32580-7.
499. Chipuk JE, Maurer U, Green DR, Schuler M. Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell.* 2003 Nov;4(5):371-81.
500. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* 2004 Feb 13;303(5660):1010-4.
501. Juin P, Hueber AO, Littlewood T, Evan G. c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev.* 1999 Jun 1;13(11):1367-81.
502. Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein JC, Fitzgerald P, Green DR. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem.* 2000 Mar 10;275(10):7337-42.
503. Fan M, Goodwin M, Vu T, Brantley-Finley C, Gaarde WA, Chambers TC. Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade. *J Biol Chem.* 2000 Sep 29;275(39):29980-5.
504. Maundrell K, Antonsson B, Magnenat E, Camps M, Muda M, Chabert C, et al. Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J Biol Chem.* 1997 Oct 3;272(40):25238-42.
505. Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol.* 1999 Dec;19(12):8469-78.
506. Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, et al. JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem.* 2003 May 16;278(20):17593-6.
507. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science.* 2000 May 5;288(5467):870-4.
508. Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H, Landry J. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol.* 2000 Oct;20(20):7602-12.
509. Park HS, Cho SG, Kim CK, Hwang HS, Noh KT, Kim MS, et al. Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol.* 2002 Nov;22(22):7721-30.
510. Sakahira H, Nagata S. Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J Biol Chem.* 2002 Feb 1;277(5):3364-70.
511. Ozoren N, El-Deiry W. Heat shock protects HCT116 and H460 cells from TRAIL-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 2002 Dec 10;281(2):175-81.
512. Jaattela M. Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. *J Immunol.* 1993 Oct 15;151(8):4286-94.
513. Jaattela M, Wissing D, Bauer PA, Li GC. Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J.* 1992 Oct;11(10):3507-12.
514. Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem.* 1997 Jan 10;272(2):1402-11.
515. Mehlen P, Mehlen A, Guillet D, Preville X, Arrigo AP. Tumor necrosis factor-alpha induces changes in the phosphorylation, cellular localization, and oligomerization of human hsp27, a stress protein that confers cellular resistance to this cytokine. *J Cell Biochem.* 1995 Jun;58(2):248-59.



516. Mehlen P, Preville X, Chareyron P, Briolay J, Klemenz R, Arrigo AP. Constitutive expression of human hsp27, Drosophila hsp27, or human alpha B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *J Immunol.* 1995 Jan 1;154(1):363-74.
517. Guzhova IV, Margulis BA. [Induction and accumulation of HSP70 leads to formation of its complexes with other cell proteins]. *Tsitologiya.* 2000;42(7):647-52.
518. Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* 2004 Mar 26;562(1-3):11-5.
519. Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, et al. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* 2000 Aug 15;19(16):4310-22.
520. Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol.* 2000 Sep;2(9):645-52.
521. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 1999 Mar 19;96(6):857-68.
522. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol.* 2000 Oct 5;10(19):1201-4.
523. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol.* 1999 Jun 3;9(11):601-4.
524. You M, Ku PT, Hrdlickova R, Bose HR, Jr. ch-IAP1, a member of the inhibitor-of-apoptosis protein family, is a mediator of the antiapoptotic activity of the v-Rel oncoprotein. *Mol Cell Biol.* 1997 Dec;17(12):7328-41.
525. Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 16;94(19):10057-62.
526. Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gelinas C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev.* 1999 Feb 15;13(4):382-7.
527. Lewis J, Devin A, Miller A, Lin Y, Rodriguez Y, Neckers L, et al. Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem.* 2000 Apr 7;275(14):10519-26.
528. Chen G, Cao P, Goeddel DV. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell.* 2002 Feb;9(2):401-10.
529. Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 26;97(20):10832-7.
530. Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tschlis P, Rosen N. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem.* 2002 Oct 18;277(42):39858-66.
531. Nakagomi S, Suzuki Y, Namikawa K, Kiryu-Seo S, Kiyama H. Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation. *J Neurosci.* 2003 Jun 15;23(12):5187-96.
532. Rane MJ, Pan Y, Singh S, Powell DW, Wu R, Cummins T, et al. Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J Biol Chem.* 2003 Jul 25;278(30):27828-35.
533. Zhang R, Luo D, Miao R, Bai L, Ge Q, Sessa WC, et al. Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene.* 2005 Jun 2;24(24):3954-63.
534. Rocchi P, Jugpal P, So A, Sinneman S, Ettinger S, Fazli L, et al. Small interference RNA targeting heat-shock protein 27 inhibits the growth of prostatic cell lines and induces apoptosis via caspase-3 activation in vitro. *BJU Int.* 2006 Nov;98(5):1082-9.

535. Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci.* 1997 Feb;110 ( Pt 3):357-68.
536. Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* 1996 Jan 15;56(2):273-9.
537. Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, et al. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood.* 2003 Nov 1;102(9):3379-86.
538. Pandey P, Farber R, Nakazawa A, Kumar S, Bharti A, Nalin C, et al. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene.* 2000 Apr 13;19(16):1975-81.
539. Kammanadiminti SJ, Chadee K. Suppression of NF-kappaB activation by *Entamoeba histolytica* in intestinal epithelial cells is mediated by heat shock protein 27. *J Biol Chem.* 2006 Sep 8;281(36):26112-20.
540. Kirchhoff SR, Gupta S, Knowlton AA. Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury. *Circulation.* 2002 Jun 18;105(24):2899-904.
541. Shan YX, Liu TJ, Su HF, Samsamshariat A, Mestrlil R, Wang PH. Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Sep;35(9):1135-43.
542. Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J.* 1999 Apr 15;18(8):2040-8.
543. Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassady R, et al. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J.* 1999 Apr 15;18(8):2049-56.
544. Mund T, Gewies A, Schoenfeld N, Bauer MK, Grimm S. Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *FASEB J.* 2003 Apr;17(6):696-8.
545. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:217-45.
546. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, et al. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature.* 2002 Oct 10;419(6907):634-7.
547. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol.* 2003 Jan;39(11):615-47.
548. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:395-419.
549. Marsden VS, Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:71-105.
550. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem.* 1999 Jan 8;274(2):1156-63.
551. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, et al. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* 1998 Jan 15;17(2):384-95.
552. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell.* 1999 Mar;3(3):287-96.
553. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, et al. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science.* 2001 Sep 7;293(5536):1829-32.
554. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science.* 1997 Oct 24;278(5338):687-9.

555. Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Feb;1(2):111-21.
556. Mullauer L, Gruber P, Seibinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res*. 2001 Jul;488(3):211-31.
557. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 2002 Jan 25;108(2):153-64.
558. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
559. Wang XW. Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis. *Anticancer Res*. 1999 Nov-Dec;19(6A):4759-71.
560. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1994 Jun;9(6):1799-805.
561. Pieterpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*. 2002 Dec 27;181-182:475-81.
562. Παπαδόπουλος ΝΙ. Ανατομική της καρδιάς. Στο Καρδιακές παθήσεις. Τόμος 1. Τούτουζας Π, Μπουντούλας Χ, editors. Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις "Γρηγόριος Παρισιάνος"; 1992. 17-65 p.
563. Γκίμπα-Τζιαμπίρη Ο. Η φυσιολογία του κυκλοφορικού συστήματος. Στο Καρδιακές παθήσεις. Τόμος 1. Τούτουζας Π, Μπουντούλας Χ, editors. Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις "Γρηγόριος Παρισιάνος"; 1992. 68-106 p.
564. Κωλέττης Μ. Μηχανική λειτουργία της καρδιάς. Στο Καρδιακές παθήσεις. Τόμος 1. Τούτουζας Π, Μπουντούλας Χ, editors. Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις "Γρηγόριος Παρισιάνος"; 1992. 107-30 p.
565. Λίμας Κ, Λίμα Α. Καρδιακή ανεπάκεια-ανωμαλίες του μυοκαρδιακού κυττάρου. Στο Καρδιακές παθήσεις. Τόμος 1. Τούτουζας Π, Μπουντούλας Χ, editors. Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις "Γρηγόριος Παρισιάνος"; 1992β. 745-55 p.
566. Μπουντούλας Χ, Γκελερής Π. Καρδιακή ανεπάκεια-κλινική εικόνα. Στο Καρδιακές παθήσεις. Τόμος 1. Τούτουζας Π, Μπουντούλας Χ, editors. Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις "Γρηγόριος Παρισιάνος"; 1992. 758-83 p.
567. Reddy NN, Varaprasad K, Ravindra S, Reddy GVS, Reddy KMS, Mohan Reddy KM, et al. Evaluation of blood compatibility and drug release studies of gelatin based magnetic hydrogel nanocomposites. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011 7/20;/385(1-3):20-7.
568. Doroshow JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest*. 1980 Jan;65(1):128-35.
569. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al. . American Cancer Society: Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition ed. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
570. Wood MJ, Irwin WJ, Scott DK. Photodegradation of doxorubicin, daunorubicin and epirubicin measured by high-performance liquid chromatography. *J Clin Pharm Ther*. 1990 Aug;15(4):291-300.
571. Tan C, Tasaka H, Yu KP, Murphy ML, Karnofsky DA. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer*. 1967 Mar;20(3):333-53.
572. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, et al. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng*. 1969 Nov;11(6):1101-10.
573. Cece R, Cazzaniga S, Morelli D, Sfondrini L, Bignotto M, Menard S, et al. Apoptosis of hair follicle cells during doxorubicin-induced alopecia in rats. *Lab Invest*. 1996 Oct;75(4):601-9.
574. Amadori D. Moving forward with new data and approaches: a fresh look at anthracyclines in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Rep*. 2011 Oct 28;3(3s):e1.
575. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1998 Sep 24;339(13):900-5.
576. Ortho Biotech. Doxil (doxorubicin HCl liposome injection): product information (revised). . Ortho Biotech Products LP (New Jersey, USA). 2007:1-19.

577. Berthiaume JM, Wallace KB. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biol Toxicol.* 2007 Jan;23(1):15-25.
578. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Jun;52(6):1213-25.
579. Hengel CL, Russell PA, Gould PA, Kaye DM. Subacute anthracycline cardiotoxicity. *Heart Lung Circ.* 2006 Feb;15(1):59-61.
580. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007 Mar-Apr;49(5):330-52.
581. Saini J, Rich MW, Lyss AP. Reversibility of severe left ventricular dysfunction due to doxorubicin cardiotoxicity. Report of three cases. *Ann Intern Med.* 1987 Jun;106(6):814-6.
582. Cohen M, Kronzon I, Lebowitz A. Reversible doxorubicin-induced congestive heart failure. *Arch Intern Med.* 1982 Aug;142(8):1570-1.
583. Buzdar AU, Marcus C, Smith TL, Blumenschein GR. Early and delayed clinical cardiotoxicity of doxorubicin. *Cancer.* 1985 Jun 15;55(12):2761-5.
584. Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CT, Heller G, Murphy ML. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA.* 1991 Sep 25;266(12):1672-7.
585. Jain D. Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives. *J Nucl Cardiol.* 2000 Jan-Feb;7(1):53-62.
586. Pai VB, Nahata MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf.* 2000 Apr;22(4):263-302.
587. Chugun A, Temma K, Oyamada T, Suzuki N, Kamiya Y, Hara Y, et al. Doxorubicin-induced late cardiotoxicity: delayed impairment of Ca<sup>2+</sup>-handling mechanisms in the sarcoplasmic reticulum in the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 2000 Apr;78(4):329-38.
588. Monti E, Prosperi E, Supino R, Bottiroli G. Free radical-dependent DNA lesions are involved in the delayed cardiotoxicity induced by adriamycin in the rat. *Anticancer Res.* 1995 Jan-Feb;15(1):193-7.
589. De Angelis A, Piegari E, Cappetta D, Marino L, Filippelli A, Berrino L, et al. Anthracycline cardiomyopathy is mediated by depletion of the cardiac stem cell pool and is rescued by restoration of progenitor cell function. *Circulation.* 2010 Jan 19;121(2):276-92.
590. Fornari FA, Randolph JK, Yalowich JC, Ritke MK, Gewirtz DA. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol.* 1994 Apr;45(4):649-56.
591. Hortobagyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs.* 1997;54 Suppl 4:1-7.
592. Aubel-Sadron G, Londos-Gagliardi D. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie.* 1984 May;66(5):333-52.
593. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1999 Apr 1;57(7):727-41.
594. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004 Jun;56(2):185-229.
595. Myers CE, McGuire WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K, Young RC. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science.* 1977 Jul 8;197(4299):165-7.
596. Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem.* 2000 Apr;207(1-2):77-86.
597. Oliveira PJ, Bjork JA, Santos MS, Leino RL, Froberg MK, Moreno AJ, et al. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 Oct 15;200(2):159-68.
598. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics. *J Mol Cell Cardiol.* 2006 Sep;41(3):389-405.

599. Unverferth DV, Magorien RD, Unverferth BP, Talley RL, Balcerzak SP, Baba N. Human myocardial morphologic and functional changes in the first 24 hours after doxorubicin administration. *Cancer Treat Rep.* 1981 Nov-Dec;65(11-12):1093-7.
600. Ascensao A, Magalhaes J, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, et al. Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Aug;289(2):H722-31.
601. Sardao VA, Oliveira PJ, Holy J, Oliveira CR, Wallace KB. Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial, and cytoskeletal targets. *Cell Biol Toxicol.* 2009 Jun;25(3):227-43.
602. Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep.* 2009 Jan-Feb;61(1):154-71.
603. Ferreira AL, Matsubara LS, Matsubara BB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2008 Oct;6(4):278-81.
604. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Batkai S, Kashiwaya Y, Hasko G, Liaudet L, et al. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 May;296(5):H1466-83.
605. DeAtley SM, Aksenov MY, Aksenova MV, Jordan B, Carney JM, Butterfield DA. Adriamycin-induced changes of creatine kinase activity in vivo and in cardiomyocyte culture. *Toxicology.* 1999 May 3;134(1):51-62.
606. Johnson BA, Cheang MS, Goldenberg GJ. Comparison of adriamycin uptake in chick embryo heart and liver cells and murine L5178Y lymphoblasts in vitro: role of drug uptake in cardiotoxicity. *Cancer Res.* 1986 Jan;46(1):218-23.
607. Deng S, Kulle B, Hosseini M, Schluter G, Hasenfuss G, Wojnowski L, et al. Dystrophin-deficiency increases the susceptibility to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Eur J Heart Fail.* 2007 Oct;9(10):986-94.
608. Li T, Danelisen I, Singal PK. Early changes in myocardial antioxidant enzymes in rats treated with adriamycin. *Mol Cell Biochem.* 2002 Mar;232(1-2):19-26.
609. Zhou S, Starkov A, Froberg MK, Leino RL, Wallace KB. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res.* 2001 Jan 15;61(2):771-7.
610. Nohl H, Gille L, Staniek K. The exogenous NADH dehydrogenase of heart mitochondria is the key enzyme responsible for selective cardiotoxicity of anthracyclines. *Z Naturforsch C.* 1998 Mar-Apr;53(3-4):279-85.
611. Goormaghtigh E, Huart P, Praet M, Bresseur R, Ruyschaert JM. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophys Chem.* 1990 Apr;35(2-3):247-57.
612. van Asperen J, van Tellingen O, Tijssen F, Schinkel AH, Beijnen JH. Increased accumulation of doxorubicin and doxorubicinol in cardiac tissue of mice lacking mdr1a P-glycoprotein. *Br J Cancer.* 1999 Jan;79(1):108-13.
613. Yeh ET, Tong AT, Lenihan DJ, Yusuf SW, Swafford J, Champion C, et al. Cardiovascular complications of cancer therapy: diagnosis, pathogenesis, and management. *Circulation.* 2004 Jun 29;109(25):3122-31.
614. Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM, Goorin AM, Sallan SE, Sanders SP, et al. Female sex and drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. *N Engl J Med.* 1995 Jun 29;332(26):1738-43.
615. Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(6):431-44.
616. Hershman DL, McBride RB, Eisenberger A, Tsai WY, Grann VR, Jacobson JS. Doxorubicin, cardiac risk factors, and cardiac toxicity in elderly patients with diffuse B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2008 Jul 1;26(19):3159-65.
617. Allen A. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Semin Oncol.* 1992 Oct;19(5):529-42.

618. Biancaniello T, Meyer RA, Wong KY, Sager C, Kaplan S. Doxorubicin cardiotoxicity in children. *J Pediatr*. 1980 Jul;97(1):45-50.
619. Godoy LY, Fukushige J, Igarashi H, Matsuzaki A, Ueda K. Anthracycline-induced cardiotoxicity in children with malignancies. *Acta Paediatr Jpn*. 1997 Apr;39(2):188-93.
620. Li J, Gwilt PR. The effect of age on the early disposition of doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003 May;51(5):395-402.
621. Cardoso S, Santos RX, Carvalho C, Correia S, Pereira GC, Pereira SS, et al. Doxorubicin increases the susceptibility of brain mitochondria to Ca(2+)-induced permeability transition and oxidative damage. *Free Radic Biol Med*. 2008 Nov 15;45(10):1395-402.
622. Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J. Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? *Int J Cardiol*. 2007 Apr 12;117(1):6-15.
623. Sinha BK, Chignell CF. Binding mode of chemically activated semiquinone free radicals from quinone anticancer agents to DNA. *Chem Biol Interact*. 1979 Dec;28(2-3):301-8.
624. Graves DE, Krugh TR. Adriamycin and daunorubicin bind in a cooperative manner to deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*. 1983 Aug 2;22(16):3941-7.
625. Holm C, Stearns T, Botstein D. DNA topoisomerase II must act at mitosis to prevent nondisjunction and chromosome breakage. *Mol Cell Biol*. 1989 Jan;9(1):159-68.
626. Capranico G, Tinelli S, Zunino F. Formation, resealing and persistence of DNA breaks produced by 4-demethoxydaunorubicin in P388 leukemia cells. *Chem Biol Interact*. 1989;72(1-2):113-23.
627. Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A, Suliman HB. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ Res*. 2008 Nov 21;103(11):1232-40.
628. Sarvazyan N. Visualization of doxorubicin-induced oxidative stress in isolated cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1996 Nov;271(5 Pt 2):H2079-85.
629. Konorev EA, Kennedy MC, Kalyanaraman B. Cell-permeable superoxide dismutase and glutathione peroxidase mimetics afford superior protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity: the role of reactive oxygen and nitrogen intermediates. *Arch Biochem Biophys*. 1999 Aug 15;368(2):421-8.
630. Davies KJ, Doroshov JH. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1986 Mar 5;261(7):3060-7.
631. Bachur NR, Gordon SL, Gee MV. Anthracycline antibiotic augmentation of microsomal electron transport and free radical formation. *Mol Pharmacol*. 1977 Sep;13(5):901-10.
632. Berlin V, Haseltine WA. Reduction of adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome P-450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen. *J Biol Chem*. 1981 May 25;256(10):4747-56.
633. Bachur NR, Gordon SL, Gee MV, Kon H. NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Feb;76(2):954-7.
634. Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK. Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation*. 1995 Jan 1;91(1):10-5.
635. Doroshov JH, Locker GY, Baldinger J, Myers CE. The effect of doxorubicin on hepatic and cardiac glutathione. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1979 Nov;26(2):285-95.
636. Wallace KB. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol*. 2003 Sep;93(3):105-15.
637. Doroshov JH. Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res*. 1983 Oct;43(10):4543-51.

638. Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther.* 1990;47(2):219-31.
639. Doroshow JH. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res.* 1983 Feb;43(2):460-72.
640. Thornalley PJ, Dodd NJ. Free radical production from normal and adriamycin-treated rat cardiac sarcosomes. *Biochem Pharmacol.* 1985 Mar 1;34(5):669-74.
641. Doroshow JH, Davies KJ. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J Biol Chem.* 1986 Mar 5;261(7):3068-74.
642. Fogli S, Nieri P, Breschi MC. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *FASEB J.* 2004 Apr;18(6):664-75.
643. Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KA, Jr., Kalyanaraman B. Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry.* 1997 Sep 23;36(38):11293-7.
644. Garner AP, Paine MJ, Rodriguez-Crespo I, Chinje EC, Ortiz De Montellano P, Stratford IJ, et al. Nitric oxide synthases catalyze the activation of redox cycling and bioreductive anticancer agents. *Cancer Res.* 1999 Apr 15;59(8):1929-34.
645. Kalivendi SV, Kotamraju S, Zhao H, Joseph J, Kalyanaraman B. Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase. Effect of antiapoptotic antioxidants and calcium. *J Biol Chem.* 2001 Dec 14;276(50):47266-76.
646. Kotamraju S, Konorev EA, Joseph J, Kalyanaraman B. Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. *J Biol Chem.* 2000 Oct 27;275(43):33585-92.
647. Cole MP, Chaiswing L, Oberley TD, Edelmann SE, Piascik MT, Lin SM, et al. The protective roles of nitric oxide and superoxide dismutase in adriamycin-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Res.* 2006 Jan;69(1):186-97.
648. Demant EJ, Jensen PK. Destruction of phospholipids and respiratory-chain activity in pig-heart submitochondrial particles induced by an adriamycin-iron complex. *Eur J Biochem.* 1983 May 16;132(3):551-6.
649. Marcillat O, Zhang Y, Davies KJ. Oxidative and non-oxidative mechanisms in the inactivation of cardiac mitochondrial electron transport chain components by doxorubicin. *Biochem J.* 1989 Apr 1;259(1):181-9.
650. Yoon SB, Kajiyama K, Hino Y, Sugiyama M, Ogura R. Effect of adriamycin on lipid peroxide, glutathione peroxidase and respiratory responses of mitochondria from the heart, liver and kidney. *Kurume Med J.* 1983;30(1):1-4.
651. Parker MA, King V, Howard KP. Nuclear magnetic resonance study of doxorubicin binding to cardiolipin containing magnetically oriented phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Oct 1;1514(2):206-16.
652. Claypool SM, Koehler CM. The complexity of cardiolipin in health and disease. *Trends Biochem Sci.* 2012 Jan;37(1):32-41.
653. Goormaghtigh E, Huart P, Bresseur R, Ruyschaert JM. Mechanism of inhibition of mitochondrial enzymatic complex I-III by adriamycin derivatives. *Biochim Biophys Acta.* 1986 Sep 25;861(1):83-94.
654. Ascensao A, Lumini-Oliveira J, Machado NG, Ferreira RM, Goncalves IO, Moreira AC, et al. Acute exercise protects against calcium-induced cardiac mitochondrial permeability transition pore opening in doxorubicin-treated rats. *Clin Sci (Lond).* 2011 Jan;120(1):37-49.
655. Santos DL, Moreno AJ, Leino RL, Froberg MK, Wallace KB. Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002 Dec 15;185(3):218-27.

656. Oliveira PJ, Wallace KB. Depletion of adenine nucleotide translocator protein in heart mitochondria from doxorubicin-treated rats--relevance for mitochondrial dysfunction. *Toxicology*. 2006 Mar 15;220(2-3):160-8.
657. Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*. 2012 Jun 22;149(7):1536-48.
658. Baines CP. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol*. 2009 Jun;46(6):850-7.
659. Berthiaume JM, Wallace KB. Persistent alterations to the gene expression profile of the heart subsequent to chronic Doxorubicin treatment. *Cardiovasc Toxicol*. 2007;7(3):178-91.
660. Richard C, Ghibu S, Delemasure-Chalumeau S, Guillaud JC, Des Rosiers C, Zeller M, et al. Oxidative stress and myocardial gene alterations associated with Doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats persist for 2 months after treatment cessation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 Dec;339(3):807-14.
661. Goormaghtigh E, Chatelain P, Caspers J, Ruyschaert JM. Evidence of a complex between adriamycin derivatives and cardiolipin: possible role in cardiotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 1980 Nov 1;29(21):3003-10.
662. Schlame M, Rua D, Greenberg ML. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res*. 2000 May;39(3):257-88.
663. Carvalho RA, Sousa RP, Cadete VJ, Lopaschuk GD, Palmeira CM, Bjork JA, et al. Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin cardiomyopathy. *Toxicology*. 2010 Apr 11;270(2-3):92-8.
664. Ashley N, Poulton J. Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Jan 16;378(3):450-5.
665. Adachi K, Fujiura Y, Mayumi F, Nozuhara A, Sugi Y, Sakanashi T, et al. A deletion of mitochondrial DNA in murine doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Sep 15;195(2):945-51.
666. Ellis CN, Ellis MB, Blakemore WS. Effect of adriamycin on heart mitochondrial DNA. *Biochem J*. 1987 Jul 1;245(1):309-12.
667. Hixon SC, Ellis CN, Daugherty JP. Heart mitochondrial DNA synthesis: preferential inhibition by adriamycin. *J Mol Cell Cardiol*. 1981 Sep;13(9):855-60.
668. Serrano J, Palmeira CM, Kuehl DW, Wallace KB. Cardioselective and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following subchronic doxorubicin administration. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Apr 21;1411(1):201-5.
669. Palmeira CM, Serrano J, Kuehl DW, Wallace KB. Preferential oxidation of cardiac mitochondrial DNA following acute intoxication with doxorubicin. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Aug 22;1321(2):101-6.
670. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, New York: Oxford University Press; 2007.
671. Mladenka P, Simunek T, Hubl M, Hrdina R. The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism. *Free Radic Res*. 2006 Mar;40(3):263-72.
672. Thomas CE, Aust SD. Release of iron from ferritin by cardiotoxic anthracycline antibiotics. *Arch Biochem Biophys*. 1986 Aug 1;248(2):684-9.
673. Xu X, Persson HL, Richardson DR. Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Mol Pharmacol*. 2005 Aug;68(2):261-71.
674. Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, Joseph J, Kalyanaraman B. Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells: role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis. *J Biol Chem*. 2002 May 10;277(19):17179-87.
675. Minotti G, Ronchi R, Salvatorelli E, Menna P, Cairo G. Doxorubicin irreversibly inactivates iron regulatory proteins 1 and 2 in cardiomyocytes: evidence for distinct metabolic pathways and implications for iron-mediated cardiotoxicity of antitumor therapy. *Cancer Res*. 2001 Dec 1;61(23):8422-8.



676. Kwok JC, Richardson DR. Anthracyclines induce accumulation of iron in ferritin in myocardial and neoplastic cells: inhibition of the ferritin iron mobilization pathway. *Mol Pharmacol.* 2003 Apr;63(4):849-61.
677. Kalivendi SV, Konorev EA, Cunningham S, Vanamala SK, Kaji EH, Joseph J, et al. Doxorubicin activates nuclear factor of activated T-lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium. *Biochem J.* 2005 Jul 15;389(Pt 2):527-39.
678. Jang YM, Kendaiah S, Drew B, Phillips T, Selman C, Julian D, et al. Doxorubicin treatment in vivo activates caspase-12 mediated cardiac apoptosis in both male and female rats. *FEBS Lett.* 2004 Nov 19;577(3):483-90.
679. Sawyer DB, Zuppinger C, Miller TA, Eppenberger HM, Suter TM. Modulation of anthracycline-induced myofibrillar disarray in rat ventricular myocytes by neuregulin-1beta and anti-erbB2: potential mechanism for trastuzumab-induced cardiotoxicity. *Circulation.* 2002 Apr 2;105(13):1551-4.
680. Lim CC, Zuppinger C, Guo X, Kuster GM, Helmes M, Eppenberger HM, et al. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2004 Feb 27;279(9):8290-9.
681. Nitobe J, Yamaguchi S, Okuyama M, Nozaki N, Sata M, Miyamoto T, et al. Reactive oxygen species regulate FLICE inhibitory protein (FLIP) and susceptibility to Fas-mediated apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 2003 Jan;57(1):119-28.
682. Papadopoulou LC, Theophilidis G, Thomopoulos GN, Tsiftoglou AS. Structural and functional impairment of mitochondria in adriamycin-induced cardiomyopathy in mice: suppression of cytochrome c oxidase II gene expression. *Biochem Pharmacol.* 1999 Mar 1;57(5):481-9.
683. Liu B, Bai QX, Chen XQ, Gao GX, Gu HT. [Effect of curcumin on expression of survivin, Bcl-2 and Bax in human multiple myeloma cell line]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2007 Aug;15(4):762-6.
684. Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res.* 2000 Apr 1;60(7):1789-92.
685. Zhang YW, Shi J, Li YJ, Wei L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2009 Nov-Dec;57(6):435-45.
686. Spallarossa P, Garibaldi S, Altieri P, Fabbi P, Manca V, Nasti S, et al. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Oct;37(4):837-46.
687. Andrieu-Abadie N, Jaffrezou JP, Hatem S, Laurent G, Levade T, Mercadier JJ. L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation. *FASEB J.* 1999 Sep;13(12):1501-10.
688. Yamaoka M, Yamaguchi S, Suzuki T, Okuyama M, Nitobe J, Nakamura N, et al. Apoptosis in rat cardiac myocytes induced by Fas ligand: priming for Fas-mediated apoptosis with doxorubicin. *J Mol Cell Cardiol.* 2000 Jun;32(6):881-9.
689. Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Nov;291(5):C1082-8.
690. Gen W, Tani M, Takeshita J, Ebihara Y, Tamaki K. Mechanisms of Ca<sup>2+</sup> overload induced by extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in quiescent isolated rat cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol.* 2001 Nov;96(6):623-9.
691. Kim SY, Kim SJ, Kim BJ, Rah SY, Chung SM, Im MJ, et al. Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca<sup>2+</sup> increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. *Exp Mol Med.* 2006 Oct 31;38(5):535-45.
692. Zeng Q, Zhou Q, Yao F, O'Rourke ST, Sun C. Endothelin-1 regulates cardiac L-type calcium channels via NAD(P)H oxidase-derived superoxide. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Sep;326(3):732-8.
693. Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res.* 2006 Jul 15;71(2):310-21.

694. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res.* 2002 Aug 15;62(16):4592-8.
695. Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, et al. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene.* 2008 Jan 10;27(3):285-99.
696. L'Ecuyer T, Sanjeev S, Thomas R, Novak R, Das L, Campbell W, et al. DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Sep;291(3):H1273-80.
697. Liu X, Chua CC, Gao J, Chen Z, Landy CL, Hamdy R, et al. Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Mar;286(3):H933-9.
698. Liu J, Mao W, Ding B, Liang CS. ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Nov;295(5):H1956-65.
699. Zhu W, Soonpaa MH, Chen H, Shen W, Payne RM, Liechty EA, et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway. *Circulation.* 2009 Jan 6;119(1):99-106.
700. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.* 1997 Jan 3;275(5296):90-4.
701. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 1995 Nov 24;270(5240):1326-31.
702. Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, et al. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 2004 Apr 21;23(8):1889-99.
703. Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, Murakoshi N, Iemitsu M, Miyauchi T, et al. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J Pharmacol Sci.* 2006 Jun;101(2):151-8.
704. Youn HJ, Kim HS, Jeon MH, Lee JH, Seo YJ, Lee YJ, et al. Induction of caspase-independent apoptosis in H9c2 cardiomyocytes by adriamycin treatment. *Mol Cell Biochem.* 2005 Feb;270(1-2):13-9.
705. Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, Katsuda S, Takahashi H, Koh E. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: In vivo study. *Circulation.* 2000 Aug 1;102(5):572-8.
706. Kim DS, Woo ER, Chae SW, Ha KC, Lee GH, Hong ST, et al. Plantainoside D protects adriamycin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells via the inhibition of ROS generation and NF-kappaB activation. *Life Sci.* 2007 Jan 2;80(4):314-23.
707. Li H, Gu H, Sun B. Protective effects of pyrrolidine dithiocarbamate on myocardium apoptosis induced by adriamycin in rats. *Int J Cardiol.* 2007 Jan 8;114(2):159-65.
708. Wang S, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B. Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 2002 Nov 1;367(Pt 3):729-40.
709. Kim Y, Ma AG, Kitta K, Fitch SN, Ikeda T, Ihara Y, et al. Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Pharmacol.* 2003 Feb;63(2):368-77.
710. Suliman HB, Carraway MS, Ali AS, Reynolds CM, Welty-Wolf KE, Piantadosi CA. The CO/HO system reverses inhibition of mitochondrial biogenesis and prevents murine doxorubicin cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2007 Dec;117(12):3730-41.
711. Fan GC, Zhou X, Wang X, Song G, Qian J, Nicolaou P, et al. Heat shock protein 20 interacting with phosphorylated Akt reduces doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiotoxicity. *Circ Res.* 2008 Nov 21;103(11):1270-9.

712. Armstrong SC. Anti-oxidants and apoptosis: attenuation of doxorubicin induced cardiomyopathy by carvedilol. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Oct;37(4):817-21.
713. Parra V, Eisner V, Chiong M, Criollo A, Moraga F, Garcia A, et al. Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2008 Jan 15;77(2):387-97.
714. Wang X, Su H, Ranek MJ. Protein quality control and degradation in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 Jul;45(1):11-27.
715. Kiyomiya K, Matsuo S, Kurebe M. Proteasome is a carrier to translocate doxorubicin from cytoplasm into nucleus. *Life Sci.* 1998;62(20):1853-60.
716. Kumarapeli AR, Horak KM, Glasford JW, Li J, Chen Q, Liu J, et al. A novel transgenic mouse model reveals deregulation of the ubiquitin-proteasome system in the heart by doxorubicin. *FASEB J.* 2005 Dec;19(14):2051-3.
717. Li Q, Sanlioglu S, Li S, Ritchie T, Oberley L, Engelhardt JF. GPx-1 gene delivery modulates NFkappaB activation following diverse environmental injuries through a specific subunit of the IKK complex. *Antioxid Redox Signal.* 2001 Jun;3(3):415-32.
718. Molkenstin JD, Kalvakolanu DV, Markham BE. Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol.* 1994 Jul;14(7):4947-57.
719. Murphy AM, Thompson WR, Peng LF, Jones L, 2nd. Regulation of the rat cardiac troponin I gene by the transcription factor GATA-4. *Biochem J.* 1997 Mar 1;322 ( Pt 2):393-401.
720. Aries A, Paradis P, Lefebvre C, Schwartz RJ, Nemer M. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 4;101(18):6975-80.
721. Lou H, Danelisen I, Singal PK. Involvement of mitogen-activated protein kinases in adriamycin-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Apr;288(4):H1925-30.
722. Schubert C, Hong S, Natarajan L, Mills PJ, Dimsdale JE. The association between fatigue and inflammatory marker levels in cancer patients: a quantitative review. *Brain Behav Immun.* 2007 May;21(4):413-27.
723. Wong J, Smith LB, Magun EA, Engstrom T, Kelley-Howard K, Jandhyala DM, et al. Small molecule kinase inhibitors block the ZAK-dependent inflammatory effects of doxorubicin. *Cancer Biol Ther.* 2013 Jan;14(1):56-63.
724. Chiosi E, Spina A, Sorrentino A, Romano M, Sorvillo L, Senatore G, et al. Change in TNF-alpha receptor expression is a relevant event in doxorubicin-induced H9c2 cardiomyocyte cell death. *J Interferon Cytokine Res.* 2007 Jul;27(7):589-97.
725. Goetzenich A, Hatam N, Zerneck A, Weber C, Czarnotta T, Autschbach R, et al. Alteration of matrix metalloproteinases in selective left ventricular adriamycin-induced cardiomyopathy in the pig. *J Heart Lung Transplant.* 2009 Oct;28(10):1087-93.
726. Spallarossa P, Altieri P, Garibaldi S, Ghigliotti G, Barisione C, Manca V, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase. *Cardiovasc Res.* 2006 Feb 15;69(3):736-45.
727. Ikegami E, Fukazawa R, Kanbe M, Watanabe M, Abe M, Watanabe M, et al. Edaravone, a potent free radical scavenger, prevents anthracycline-induced myocardial cell death. *Circ J.* 2007 Nov;71(11):1815-20.
728. Li K, Sung RY, Huang WZ, Yang M, Pong NH, Lee SM, et al. Thrombopoietin protects against in vitro and in vivo cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Circulation.* 2006 May 9;113(18):2211-20.
729. Riad A, Bien S, Westermann D, Becher PM, Loya K, Landmesser U, et al. Pretreatment with statin attenuates the cardiotoxicity of Doxorubicin in mice. *Cancer Res.* 2009 Jan 15;69(2):695-9.
730. Dorn GW, 2nd. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2009 Feb 15;81(3):465-73.
731. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc Res.* 2008 Jan 15;77(2):334-43.

732. Lebrecht D, Walker UA. Role of mtDNA lesions in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 2007;7(2):108-13.
733. Solem LE, Heller LJ, Wallace KB. Dose-dependent increase in sensitivity to calcium-induced mitochondrial dysfunction and cardiomyocyte cell injury by doxorubicin. *J Mol Cell Cardiol.* 1996 May;28(5):1023-32.
734. Wallace KB. Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis. *Cardiovasc Toxicol.* 2007;7(2):101-7.
735. Casey TM, Arthur PG, Bogoyevitch MA. Necrotic death without mitochondrial dysfunction-delayed death of cardiac myocytes following oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Mar;1773(3):342-51.
736. De Meyer GR, Martinet W. Autophagy in the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Sep;1793(9):1485-95.
737. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Autophagy in ischemic heart disease. *Circ Res.* 2009 Jan 30;104(2):150-8.
738. Matsui Y, Kyoji S, Takagi H, Hsu CP, Hariharan N, Ago T, et al. Molecular mechanisms and physiological significance of autophagy during myocardial ischemia and reperfusion. *Autophagy.* 2008 May;4(4):409-15.
739. Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in load-induced heart disease. *Circ Res.* 2008 Dec 5;103(12):1363-9.
740. Shimomura H, Terasaki F, Hayashi T, Kitaura Y, Isomura T, Suma H. Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J.* 2001 Nov;65(11):965-8.
741. Terman A, Brunk UT. Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology. *Cardiovasc Res.* 2005 Dec 1;68(3):355-65.
742. Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell.* 2007 Jan 26;25(2):193-205.
743. Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy.* 2008 Jul;4(5):600-6.
744. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Sep;8(9):741-52.
745. Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K. Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circ Res.* 2008 Aug 15;103(4):343-51.
746. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol.* 2004 Dec;6(12):1221-8.
747. Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2005 Nov;12 Suppl 2:1528-34.
748. Munoz-Gamez JA, Rodriguez-Vargas JM, Quiles-Perez R, Aguilar-Quesada R, Martin-Oliva D, de Murcia G, et al. PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy.* 2009 Jan;5(1):61-74.
749. Nishida K, Kyoji S, Yamaguchi O, Sadoshima J, Otsu K. The role of autophagy in the heart. *Cell Death Differ.* 2009 Jan;16(1):31-8.
750. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Jul;21(7):440-6.
751. Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. The lysosomal-mitochondrial axis theory of postmitotic aging and cell death. *Chem Biol Interact.* 2006 Oct 27;163(1-2):29-37.
752. Bernhard D, Laufer G. The aging cardiomyocyte: a mini-review. *Gerontology.* 2008;54(1):24-31.
753. Maejima Y, Adachi S, Ito H, Hirao K, Isobe M. Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage. *Aging Cell.* 2008 Mar;7(2):125-36.

754. de Jong PR, Schadenberg AW, Jansen NJ, Prakken BJ. Hsp70 and cardiac surgery: molecular chaperone and inflammatory regulator with compartmentalized effects. *Cell Stress Chaperones*. 2009 Mar;14(2):117-31.
755. Radford NB, Fina M, Benjamin IJ, Moreadith RW, Graves KH, Zhao P, et al. Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 19;93(6):2339-42.
756. Hutter JJ, Mestril R, Tam EK, Sievers RE, Dillmann WH, Wolfe CL. Overexpression of heat shock protein 72 in transgenic mice decreases infarct size in vivo. *Circulation*. 1996 Sep 15;94(6):1408-11.
757. Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest*. 1995 Apr;95(4):1446-56.
758. Grunenfelder J, Zund G, Stucki V, Hoerstrup SP, Kadner A, Schoeberlein A, et al. Heat shock protein upregulation lowers cytokine levels after ischemia and reperfusion. *Eur Surg Res*. 2001 Sep-Dec;33(5-6):383-7.
759. Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res*. 2001 Sep;51(4):637-46.
760. Eells JT, Henry MM, Gross GJ, Baker JE. Increased mitochondrial K(ATP) channel activity during chronic myocardial hypoxia: is cardioprotection mediated by improved bioenergetics? *Circ Res*. 2000 Nov 10;87(10):915-21.
761. Sammut IA, Jayakumar J, Latif N, Rothery S, Severs NJ, Smolenski RT, et al. Heat stress contributes to the enhancement of cardiac mitochondrial complex activity. *Am J Pathol*. 2001 May;158(5):1821-31.
762. Suzuki K, Sawa Y, Kaneda Y, Ichikawa H, Shirakura R, Matsuda H. In vivo gene transfection with heat shock protein 70 enhances myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in rat. *J Clin Invest*. 1997 Apr 1;99(7):1645-50.
763. Kukreja RC, Qian YZ, Okubo S, Flaherty EE. Role of protein kinase C and 72 kDa heat shock protein in ischemic tolerance following heat stress in the rat heart. *Mol Cell Biochem*. 1999 May;195(1-2):123-31.
764. Baxter GF, Goma FM, Yellon DM. Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischaemia in rabbit myocardium. *Br J Pharmacol*. 1995 May;115(2):222-4.
765. Imagawa J, Baxter GF, Yellon DM. Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, blocks the "second window of protection" 48 h after ischemic preconditioning in the rabbit. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Jul;29(7):1885-93.
766. Engel K, Ahlers A, Brach MA, Herrmann F, Gaestel M. MAPKAP kinase 2 is activated by heat shock and TNF-alpha: in vivo phosphorylation of small heat shock protein results from stimulation of the MAP kinase cascade. *J Cell Biochem*. 1995 Feb;57(2):321-30.
767. Maulik N, Sato M, Price BD, Das DK. An essential role of NFkappaB in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial adaptation to ischemia. *FEBS Lett*. 1998 Jun 16;429(3):365-9.
768. Imagawa J, Yellon DM, Baxter GF. Pharmacological evidence that inducible nitric oxide synthase is a mediator of delayed preconditioning. *Br J Pharmacol*. 1999 Feb;126(3):701-8.
769. Zhao T, Xi L, Chelliah J, Levasseur JE, Kukreja RC. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed myocardial protection induced by activation of adenosine A(1) receptors: evidence from gene-knockout mice. *Circulation*. 2000 Aug 22;102(8):902-7.
770. Das DK, Maulik N, Moraru, II. Gene expression in acute myocardial stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. *J Mol Cell Cardiol*. 1995 Jan;27(1):181-93.
771. Auyeung Y, Sievers RE, Weng D, Barbosa V, Wolfe CL. Catalase inhibition with 3-amino-1,2,4-triazole does not abolish infarct size reduction in heat-shocked rats. *Circulation*. 1995 Dec 1;92(11):3318-22.

772. Hoag JB, Qian YZ, Nayeem MA, D'Angelo M, Kukreja RC. ATP-sensitive potassium channel mediates delayed ischemic protection by heat stress in rabbit heart. *Am J Physiol*. 1997 Nov;273(5 Pt 2):H2458-64.
773. Bernardo NL, D'Angelo M, Okubo S, Joy A, Kukreja RC. Delayed ischemic preconditioning is mediated by opening of ATP-sensitive potassium channels in the rabbit heart. *Am J Physiol*. 1999 Apr;276(4 Pt 2):H1323-30.
774. Okubo S, Bernardo NL, Elliott GT, Hess ML, Kukreja RC. Tyrosine kinase signaling in action potential shortening and expression of HSP72 in late preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Nov;279(5):H2269-76.
775. Voss MR, Stallone JN, Li M, Cornelussen RN, Knuefermann P, Knowlton AA. Gender differences in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Aug;285(2):H687-92.
776. Huber SA. Heat-shock protein induction in adriamycin and picornavirus-infected cardiocytes. *Lab Invest*. 1992 Aug;67(2):218-24.
777. Clerget M, Polla BS. Erythrophagocytosis induces heat shock protein synthesis by human monocytes-macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Feb;87(3):1081-5.
778. Omar R, Pappolla M. Oxygen free radicals as inducers of heat shock protein synthesis in cultured human neuroblastoma cells: relevance to neurodegenerative disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1993;242(5):262-7.
779. Sierra-Rivera E, Meredith MJ, Voorhees GJ, Oberley LW, Eisert DR, Freeman ML. Synthesis of heat shock proteins following oxidative challenge: role of glutathione. *Int J Hyperthermia*. 1994 Jul-Aug;10(4):573-86.
780. Ciocca DR, Fuqua SA, Lock-Lim S, Toft DO, Welch WJ, McGuire WL. Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer Res*. 1992 Jul 1;52(13):3648-54.
781. Vedam K, Nishijima Y, Druhan LJ, Khan M, Moldovan NI, Zweier JL, et al. Role of heat shock factor-1 activation in the doxorubicin-induced heart failure in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Jun;298(6):H1832-41.
782. Demidenko ZN, Vivo C, Halicka HD, Li CJ, Bhalla K, Broude EV, et al. Pharmacological induction of Hsp70 protects apoptosis-prone cells from doxorubicin: comparison with caspase-inhibitor- and cycle-arrest-mediated cytoprotection. *Cell Death Differ*. 2006 Sep;13(9):1434-41.
783. Gamba-Vitalo C, Blair OC, Tritton TR, Lane PA, Carbone R, Sartorelli AC. Cytotoxicity and differentiating actions of adriamycin in WEHI-3B D+ leukemia cells. *Leukemia*. 1987 Mar;1(3):188-97.
784. Barlogie B, Drewinko B, Johnston DA, Freireich EJ. The effect of adriamycin on the cell cycle traverse of a human lymphoid cell line. *Cancer Res*. 1976 Jun;36(6):1975-9.
785. Karlseder J, Wissing D, Holzer G, Orel L, Sliutz G, Auer H, et al. HSP70 overexpression mediates the escape of a doxorubicin-induced G2 cell cycle arrest. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Mar 7;220(1):153-9.
786. Arrigo AP, Paul C, Ducasse C, Manero F, Kretz-Remy C, Viot S, et al. Small stress proteins: novel negative modulators of apoptosis induced independently of reactive oxygen species. *Prog Mol Subcell Biol*. 2002;28:185-204.
787. Arrigo AP, Paul C, Ducasse C, Sauvageot O, Kretz-Remy C. Small stress proteins: modulation of intracellular redox state and protection against oxidative stress. *Prog Mol Subcell Biol*. 2002;28:171-84.
788. Venkatakrisnan CD, Tewari AK, Moldovan L, Cardounel AJ, Zweier JL, Kuppusamy P, et al. Heat shock protects cardiac cells from doxorubicin-induced toxicity by activating p38 MAPK and phosphorylation of small heat shock protein 27. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Dec;291(6):H2680-91.
789. Yu K, Ravera CP, Chen YN, McMahon G. Regulation of Myc-dependent apoptosis by p53, c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases, and Mdm-2. *Cell Growth Differ*. 1997 Jul;8(7):731-42.

790. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, et al. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem.* 1997 Jul 18;272(29):18033-7.
791. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer.* 2003 Jun 1;97(11):2869-79.
792. Shimpo K, Nagatsu T, Yamada K, Sato T, Niimi H, Shamoto M, et al. Ascorbic acid and adriamycin toxicity. *Am J Clin Nutr.* 1991 Dec;54(6 Suppl):1298S-301S.
793. Yoda Y, Nakazawa M, Abe T, Kawakami Z. Prevention of doxorubicin myocardial toxicity in mice by reduced glutathione. *Cancer Res.* 1986 May;46(5):2551-6.
794. Pritsos CA, Sokoloff M, Gustafson DL. PZ-51 (Ebselen) in vivo protection against adriamycin-induced mouse cardiac and hepatic lipid peroxidation and toxicity. *Biochem Pharmacol.* 1992 Aug 18;44(4):839-41.
795. Balanehru S, Nagarajan B. Intervention of adriamycin induced free radical damage. *Biochem Int.* 1992 Dec;28(4):735-44.
796. Nowak D, Pierscinski G, Drzewoski J. Ambroxol inhibits doxorubicin-induced lipid peroxidation in heart of mice. *Free Radic Biol Med.* 1995 Nov;19(5):659-63.
797. Burkhart DJ, Barthel BL, Post GC, Kalet BT, Nafie JW, Shoemaker RK, et al. Design, synthesis, and preliminary evaluation of doxazolidine carbamates as prodrugs activated by carboxylesterases. *J Med Chem.* 2006 Nov 30;49(24):7002-12.
798. Kratz F, Ehling G, Kauffmann HM, Unger C. Acute and repeat-dose toxicity studies of the (6-maleimidocaproyl)hydrazone derivative of doxorubicin (DOXO-EMCH), an albumin-binding prodrug of the anticancer agent doxorubicin. *Hum Exp Toxicol.* 2007 Jan;26(1):19-35.
799. Lebrecht D, Geist A, Ketelsen UP, Haberstroh J, Setzer B, Kratz F, et al. The 6-maleimidocaproyl hydrazone derivative of doxorubicin (DOXO-EMCH) is superior to free doxorubicin with respect to cardiotoxicity and mitochondrial damage. *Int J Cancer.* 2007 Feb 15;120(4):927-34.
800. Rigacci L, Mappa S, Nassi L, Alterini R, Carrai V, Bernardi F, et al. Liposome-encapsulated doxorubicin in combination with cyclophosphamide, vincristine, prednisone and rituximab in patients with lymphoma and concurrent cardiac diseases or pre-treated with anthracyclines. *Hematol Oncol.* 2007 Dec;25(4):198-203.
801. Yildirim Y, Gultekin E, Avci ME, Inal MM, Yunus S, Tinar S. Cardiac safety profile of pegylated liposomal doxorubicin reaching or exceeding lifetime cumulative doses of 550 mg/m<sup>2</sup> in patients with recurrent ovarian and peritoneal cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2008 Mar-Apr;18(2):223-7.
802. Salvatorelli E, Menna P, Lusini M, Covino E, Minotti G. Doxorubicinolone formation and efflux: a salvage pathway against epirubicin accumulation in human heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009 Apr;329(1):175-84.
803. Ramires PR, Ji LL. Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Aug;281(2):H679-88.
804. Venditti P, Di Meo S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch Biochem Biophys.* 1996 Jul 1;331(1):63-8.
805. Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, et al. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol.* 1998 Nov;275(5 Pt 2):R1468-77.
806. Kevelaitis E, Patel AP, Oubenaissa A, Peynet J, Mouas C, Yellon DM, et al. Backtable heat-enhanced preconditioning: a simple and effective means of improving function of heart transplants. *Ann Thorac Surg.* 2001 Jul;72(1):107-12; discussion 12-3.
807. Jayakumar J, Suzuki K, Sammut IA, Smolenski RT, Khan M, Latif N, et al. Heat shock protein 70 gene transfection protects mitochondrial and ventricular function against ischemia-reperfusion injury. *Circulation.* 2001 Sep 18;104(12 Suppl 1):I303-7.
808. Okubo S, Wildner O, Shah MR, Chelliah JC, Hess ML, Kukreja RC. Gene transfer of heat-shock protein 70 reduces infarct size in vivo after ischemia/reperfusion in the rabbit heart. *Circulation.* 2001 Feb 13;103(6):877-81.

809. Brar BK, Stephanou A, Wagstaff MJ, Coffin RS, Marber MS, Engelmann G, et al. Heat shock proteins delivered with a virus vector can protect cardiac cells against apoptosis as well as against thermal or hypoxic stress. *J Mol Cell Cardiol.* 1999 Jan;31(1):135-46.
810. Martin JL, Mestral R, Hilal-Dandan R, Brunton LL, Dillmann WH. Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation.* 1997 Dec 16;96(12):4343-8.
811. Angelidis CE, Nova C, Lazaridis I, Kontoyannis D, Kollias G, Pagoulatos GN. Overexpression of hsp70 in transgenic mice results in increased cell thermotolerance. *Transgenics.* 1996;2:111-7.
812. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
813. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol.* 2004;263:1-32.
814. Kim DW, Kim KO, Shin MJ, Ha JH, Seo SW, Yang J, et al. siRNA-based targeting of antiapoptotic genes can reverse chemoresistance in P-glycoprotein expressing chondrosarcoma cells. *Mol Cancer.* 2009 May 15;8:28.
815. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med.* 2005 Dec 19;202(12):1691-701.
816. Naka KK, Vezyraki P, Kalaitzakis A, Zerikiotis S, Michalis L, Angelidis C. Hsp70 regulates the doxorubicin-mediated heart failure in Hsp70-transgenic mice. *Cell Stress Chaperones.* 2014 Nov;19(6):853-64.
817. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today.* 1993 Mar;14(3):131-6.
818. Meek DW. Post-translational modification of p53. *Semin Cancer Biol.* 1994 Jun;5(3):203-10.
819. Milczarek GJ, Martinez J, Bowden GT. p53 Phosphorylation: biochemical and functional consequences. *Life Sci.* 1997;60(1):1-11.
820. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997 Oct 31;91(3):325-34.
821. Bates S, Vousden KH. p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* 1996 Feb;6(1):12-8.
822. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 1996 Jul 12;86(1):147-57.
823. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997 Nov 14;91(4):479-89.
824. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 1998 Apr 15;17(8):2215-23.
825. Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1999 Feb 19;274(8):5053-60.
826. MacFarlane M, Cain K, Sun XM, Alnemri ES, Cohen GM. Processing/activation of at least four interleukin-1beta converting enzyme-like proteases occurs during the execution phase of apoptosis in human monocytic tumor cells. *J Cell Biol.* 1997 Apr 21;137(2):469-79.
827. Jaattela M, Wissing D. Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J Exp Med.* 1993 Jan 1;177(1):231-6.
828. Samali A, Gorman AM, Cotter TG. Apoptosis -- the story so far. *Experientia.* 1996 Oct 31;52(10-11):933-41.
829. Wissing D, Jaattela M. HSP27 and HSP70 increase the survival of WEHI-S cells exposed to hyperthermia. *Int J Hyperthermia.* 1996 Jan-Feb;12(1):125-38.
830. Genth-Zotz S, Bolger AP, Kalra PR, von Haehling S, Doehner W, Coats AJ, et al. Heat shock protein 70 in patients with chronic heart failure: relation to disease severity and survival. *Int J Cardiol.* 2004 Sep;96(3):397-401.



831. Turturici G, Sconzo G, Geraci F. Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochem Res Int.* 2011;2011:618127.
832. Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Oct 4;92(19):1564-72.
833. Morimoto RI, Jurovich DA, Kroeger PE, Mathur SK, Murphy SP, Nakai A, et al. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones.* Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos G, editors. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994. 417-56 p.
834. Feldman DE, Frydman J. Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones. *Curr Opin Struct Biol.* 2000 Feb;10(1):26-33.
835. Wang L, Zhang TP, Zhang Y, Bi HL, Guan XM, Wang HX, et al. Protection against doxorubicin-induced myocardial dysfunction in mice by cardiac-specific expression of carboxyl terminus of hsp70-interacting protein. *Sci Rep.* 2016 Jun 21;6:28399.
836. Oliveira MS, Melo MB, Carvalho JL, Melo IM, Lavor MS, Gomes DA, et al. Doxorubicin Cardiotoxicity and Cardiac Function Improvement After Stem Cell Therapy Diagnosed by Strain Echocardiography. *J Cancer Sci Ther.* 2013;5(2):52-7.
837. Anjos Ferreira AL, Russell RM, Rocha N, Placido Ladeira MS, Favero Salvadori DM, Oliveira Nascimento MC, et al. Effect of lycopene on doxorubicin-induced cardiotoxicity: an echocardiographic, histological and morphometrical assessment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007 Jul;101(1):16-24.
838. Gabrielson KL, Mok GS, Nimmagadda S, Bedja D, Pin S, Tsao A, et al. Detection of dose response in chronic doxorubicin-mediated cell death with cardiac technetium 99m annexin V single-photon emission computed tomography. *Mol Imaging.* 2008 May-Jun;7(3):132-8.
839. Liu JC, Wan L, He M, Cheng XS. Protection of myocardiocytes against anoxia-reoxygenation injury by heat shock protein 70 gene transfection: experiment with rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2007 Dec 25;87(48):3436-9.
840. Brundel BJ, Shiroshita-Takeshita A, Qi X, Yeh YH, Chartier D, van Gelder IC, et al. Induction of heat shock response protects the heart against atrial fibrillation. *Circ Res.* 2006 Dec 8;99(12):1394-402.
841. Knowlton AA, Kapadia S, Torre-Amione G, Durand JB, Bies R, Young J, et al. Differential expression of heat shock proteins in normal and failing human hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1998 Apr;30(4):811-8.
842. Delogu G, Signore M, Mechelli A, Famularo G. Heat shock proteins and their role in heart injury. *Curr Opin Crit Care.* 2002 Oct;8(5):411-6.
843. Abe T, Fukamachi Y, Kanazawa Y, Furukawa H, Shimizu K, Hirano T, et al. Inhibition of nucleolar function and morphological change by adriamycin associated with heat shock protein 70 accumulation. *Jpn J Cancer Res.* 1996 Sep;87(9):945-51.
844. Ciocca DR, Rozados VR, Cuello Carrion FD, Gervasoni SI, Matar P, Scharovsky OG. Hsp25 and Hsp70 in rodent tumors treated with doxorubicin and lovastatin. *Cell Stress Chaperones.* 2003 Spring;8(1):26-36.
845. Kalay N, Basar E, Ozdogru I, Er O, Cetinkaya Y, Dogan A, et al. Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Dec 5;48(11):2258-62.
846. Tanonaka K, Yoshida H, Toga W, Furuhashi K, Takeo S. Myocardial heat shock proteins during the development of heart failure. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 May 4;283(2):520-5.
847. Liu L, Zhang X, Qian B, Min X, Gao X, Li C, et al. Over-expression of heat shock protein 27 attenuates doxorubicin-induced cardiac dysfunction in mice. *Eur J Heart Fail.* 2007 Aug;9(8):762-9.
848. Kavazis AN, Smuder AJ, Min K, Tumer N, Powers SK. Short-term exercise training protects against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial damage independent of HSP72. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 Nov;299(5):H1515-24.

849. Simoncikova P, Ravingerova T, Barancik M. The effect of chronic doxorubicin treatment on mitogen-activated protein kinases and heat stress proteins in rat hearts. *Physiol Res.* 2008;57 Suppl 2:S97-S102.
850. Liu J, Zheng H, Tang M, Ryu YC, Wang X. A therapeutic dose of doxorubicin activates ubiquitin-proteasome system-mediated proteolysis by acting on both the ubiquitination apparatus and proteasome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Dec;295(6):H2541-50.
851. Qian SB, McDonough H, Boellmann F, Cyr DM, Patterson C. CHIP-mediated stress recovery by sequential ubiquitination of substrates and Hsp70. *Nature.* 2006 Mar 23;440(7083):551-5.
852. Matsumori Y, Northington FJ, Hong SM, Kayama T, Sheldon RA, Vexler ZS, et al. Reduction of caspase-8 and -9 cleavage is associated with increased c-FLIP and increased binding of Apaf-1 and Hsp70 after neonatal hypoxic/ischemic injury in mice overexpressing Hsp70. *Stroke.* 2006 Feb;37(2):507-12.
853. Mikami T, Sumida S, Ishibashi Y, Ohta S. Endurance exercise training inhibits activity of plasma GOT and liver caspase-3 of mice [correction of rats] exposed to stress by induction of heat shock protein 70. *J Appl Physiol (1985).* 2004 May;96(5):1776-81.
854. Wang Z, Gall JM, Bonegio RG, Havasi A, Hunt CR, Sherman MY, et al. Induction of heat shock protein 70 inhibits ischemic renal injury. *Kidney Int.* 2011 Apr;79(8):861-70.
855. Xiao J, Sun GB, Sun B, Wu Y, He L, Wang X, et al. Kaempferol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and in vitro. *Toxicology.* 2012 Feb 6;292(1):53-62.
856. Long X, Boluyt MO, Hipolito ML, Lundberg MS, Zheng JS, O'Neill L, et al. p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 1997 Jun 1;99(11):2635-43.
857. Seong HA, Ha H. Murine protein serine-threonine kinase 38 activates p53 function through Ser15 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2012 Jun 15;287(25):20797-810.
858. Helton ES, Chen X. p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem.* 2007 Mar 1;100(4):883-96.
859. Shizukuda Y, Matoba S, Mian OY, Nguyen T, Hwang PM. Targeted disruption of p53 attenuates doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice. *Mol Cell Biochem.* 2005 May;273(1-2):25-32.
860. Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell.* 1994 Aug 26;78(4):539-42.
861. Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2004 Jun 11;279(24):25535-43.
862. Massart C, Barbet R, Genetet N, Gibassier J. Doxorubicin induces Fas-mediated apoptosis in human thyroid carcinoma cells. *Thyroid.* 2004 Apr;14(4):263-70.
863. Attardi LD, de Vries A, Jacks T. Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer. *Oncogene.* 2004 Jan 29;23(4):973-80.
864. Zhang DX, Ma DY, Yao ZQ, Fu CY, Shi YX, Wang QL, et al. ERK1/2/p53 and NF-kappaB dependent-PUMA activation involves in doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016 Jun;20(11):2435-42.
865. Xing W, Mao Y. Effect of catalpol on doxorubicin-induced cytotoxicity in H9c2 cells. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2012;6(5):849-54.
866. Fang X, Jiang Y, Feng L, Chen H, Zhen C, Ding M, et al. Blockade of PI3K/AKT pathway enhances sensitivity of Raji cells to chemotherapy through down-regulation of HSP70. *Cancer Cell Int.* 2013 May 24;13(1):48.
867. Khavari-Nejad S. Doxorubicin-Induced Alterations in Anti-ROS Enzymes Activity and Cytochromes Content in *Candida utilis*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2015;3(9):417-24.

868. Poornima P, Kumar VB, Weng CF, Padma VV. Doxorubicin induced apoptosis was potentiated by neferine in human lung adenocarcinoma, A549 cells. *Food Chem Toxicol.* 2014 Jun;68:87-98.
869. Xia L, Jaafar L, Cashikar A, Flores-Rozas H. Identification of genes required for protection from doxorubicin by a genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res.* 2007 Dec 1;67(23):11411-8.
870. Ito H, Shimojo T, Fujisaki H, Tamamori M, Ishiyama S, Adachi S, et al. Thermal preconditioning protects rat cardiac muscle cells from doxorubicin-induced apoptosis. *Life Sci.* 1999;64(9):755-61.
871. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci.* 2003 Oct 15;116(Pt 20):4077-85.
872. Ngok-Engam P, Watcharasit P, Thiantanawat A, Satayavivad J. Pharmacological inhibition of GSK3 attenuates DNA damage-induced apoptosis via reduction of p53 mitochondrial translocation and Bax oligomerization in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2013 Mar;18(1):58-74.
873. At-Assa S, Porcher JM, Kretz-Remy C, Velarde G, Arrigo AP, Lambre C. Induction of the hsp70 Gene Promoter by Various Anticancer Drugs. *Toxicol In Vitro.* 1999 Aug-Oct;13(4-5):651-5.
874. Bielka H, Hoinkis G, Oesterreich S, Stahl J, Benndorf R. Induction of the small stress protein, hsp25, in Ehrlich ascites carcinoma cells by anticancer drugs. *FEBS Lett.* 1994 Apr 25;343(2):165-7.
875. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Cuello-Carrion FD, Ciocca DR. Deoxyribonucleic acid damage induced by doxorubicin in peripheral blood mononuclear cells: possible roles for the stress response and the deoxyribonucleic acid repair process. *Cell Stress Chaperones.* 2003 Winter;8(4):361-72.
876. Ohtsubo T, Kanob E, Uedac K, Matsumoto H, Saito T, Hayashib S, et al. Enhancement of heat-induced heat shock protein (hsp)72 accumulation by doxorubicin (Dox) in vitro. *Cancer Lett.* 2000 Oct 16;159(1):49-55.
877. Sun J, Sun G, Meng X, Wang H, Luo Y, Qin M, et al. Isorhamnetin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and in vitro. *PLoS One.* 2013;8(5):e64526.
878. Yeh YC, Liu TJ, Wang LC, Lee HW, Ting CT, Lee WL, et al. A standardized extract of *Ginkgo biloba* suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes. *Br J Pharmacol.* 2009 Jan;156(1):48-61.
879. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):323-31.
880. Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 23;96(24):13777-82.
881. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 1997 Dec 22;420(1):25-7.
882. Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* 1999 Jan 15;13(2):152-7.
883. Lorenzo E, Ruiz-Ruiz C, Quesada AJ, Hernandez G, Rodriguez A, Lopez-Rivas A, et al. Doxorubicin induces apoptosis and CD95 gene expression in human primary endothelial cells through a p53-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2002 Mar 29;277(13):10883-92.
884. Nobori K, Ito H, Tamamori-Adachi M, Adachi S, Ono Y, Kawachi J, et al. ATF3 inhibits doxorubicin-induced apoptosis in cardiac myocytes: a novel cardioprotective role of ATF3. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Oct;34(10):1387-97.
885. Yoshida M, Shiojima I, Ikeda H, Komuro I. Chronic doxorubicin cardiotoxicity is mediated by oxidative DNA damage-ATM-p53-apoptosis pathway and attenuated by pitavastatin through the inhibition of Rac1 activity. *J Mol Cell Cardiol.* 2009 Nov;47(5):698-705.

886. Yang F, Chen H, Liu Y, Yin K, Wang Y, Li X, et al. Doxorubicin caused apoptosis of mesenchymal stem cells via p38, JNK and p53 pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2013;32(4):1072-82.
887. Gabai VL, Yaglom JA, Waldman T, Sherman MY. Heat shock protein Hsp72 controls oncogene-induced senescence pathways in cancer cells. *Mol Cell Biol*. 2009 Jan;29(2):559-69.
888. Dudeja V, Mujumdar N, Phillips P, Chugh R, Borja-Cacho D, Dawra RK, et al. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis in cancer cells through simultaneous and independent mechanisms. *Gastroenterology*. 2009 May;136(5):1772-82.
889. Bonner HP, Concannon CG, Bonner C, Woods I, Ward MW, Prehn JH. Differential expression patterns of Puma and Hsp70 following proteasomal stress in the hippocampus are key determinants of neuronal vulnerability. *J Neurochem*. 2010 Jul;114(2):606-16.
890. Sherman MY, Gabai V, O'Callaghan C, Yaglom J. Molecular chaperones regulate p53 and suppress senescence programs. *FEBS Lett*. 2007 Jul 31;581(19):3711-5.
891. Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F, et al. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*. 2002 Apr 4;416(6880):560-4.
892. Steel R, Doherty JP, Buzzard K, Clemons N, Hawkins CJ, Anderson RL. Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1. *J Biol Chem*. 2004 Dec 3;279(49):51490-9.
893. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010 Mar 15;48(6):749-62.
894. Florentin A, Arama E. Caspase levels and execution efficiencies determine the apoptotic potential of the cell. *J Cell Biol*. 2012 Feb 20;196(4):513-27.
895. Jiang B, Wang K, Liang P, Xiao W, Wang H, Xiao X. ATP-binding domain of heat shock protein 70 is essential for its effects on the inhibition of the release of the second mitochondria-derived activator of caspase and apoptosis in C2C12 cells. *FEBS J*. 2009 May;276(9):2615-24.
896. Bartling B, Hilgert C, Friedrich I, Silber RE, Simm A. Cardio-protective determinants are conserved in aged human myocardium after ischemic preconditioning. *FEBS Lett*. 2003 Dec 18;555(3):539-44.
897. Sabirzhanov B, Stoica BA, Hanscom M, Piao CS, Faden AI. Over-expression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase-independent pathways and inhibits neuronal apoptosis. *J Neurochem*. 2012 Nov;123(4):542-54.
898. Rashmi R, Kumar S, Karunakaran D. Ectopic expression of Hsp70 confers resistance and silencing its expression sensitizes human colon cancer cells to curcumin-induced apoptosis. *Carcinogenesis*. 2004 Feb;25(2):179-87.
899. Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, Wang S, Konorev E, Kotamraju S. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. *Mol Cell Biochem*. 2002 May-Jun;234-235(1-2):119-24.
900. Kong F, Wang H, Guo J, Peng M, Ji H, Yang H, et al. Hsp70 suppresses apoptosis of BRL cells by regulating the expression of Bcl-2, cytochrome C, and caspase 8/3. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2016 May;52(5):568-75.
901. Tomita M. Involvement of DNA-PK and ATM in radiation- and heat-induced DNA damage recognition and apoptotic cell death. *J Radiat Res*. 2010;51(5):493-501.
902. Achanta G, Pelicano H, Feng L, Plunkett W, Huang P. Interaction of p53 and DNA-PK in response to nucleoside analogues: potential role as a sensor complex for DNA damage. *Cancer Res*. 2001 Dec 15;61(24):8723-9.
903. Schweikl H, Petzel C, Bolay C, Hiller KA, Buchalla W, Krifka S. 2-Hydroxyethyl methacrylate-induced apoptosis through the ATM- and p53-dependent intrinsic mitochondrial pathway. *Biomaterials*. 2014 Mar;35(9):2890-904.
904. Dashzeveg N, Yoshida K. Crosstalk between tumor suppressors p53 and PKCdelta: Execution of the intrinsic apoptotic pathways. *Cancer Lett*. 2016 Jul 28;377(2):158-63.
905. Takayama S, Reed JC, Homma S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*. 2003 Dec 8;22(56):9041-7.

906. Lee SJ, Kim DC, Choi BH, Ha H, Kim KT. Regulation of p53 by activated protein kinase C-delta during nitric oxide-induced dopaminergic cell death. *J Biol Chem*. 2006 Jan 27;281(4):2215-24.
907. Walerych D, Olszewski MB, Gutkowska M, Helwak A, Zylicz M, Zylicz A. Hsp70 molecular chaperones are required to support p53 tumor suppressor activity under stress conditions. *Oncogene*. 2009 Dec 3;28(48):4284-94.
908. Chen L, Liu L, Huang S. Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5. *Free Radic Biol Med*. 2008 Oct 1;45(7):1035-44.
909. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J*. 1997 Feb;11(2):118-24.
910. Kang YJ, Zhou ZX, Wang GW, Buridi A, Klein JB. Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*. 2000 May 5;275(18):13690-8.
911. Wang Z, Zheng M, Li Z, Li R, Jia L, Xiong X, et al. Cardiac glycosides inhibit p53 synthesis by a mechanism relieved by Src or MAPK inhibition. *Cancer Res*. 2009 Aug 15;69(16):6556-64.
912. Bragado P, Armesilla A, Silva A, Porras A. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis*. 2007 Sep;12(9):1733-42.
913. Bienemann AS, Lee YB, Howarth J, Uney JB. Hsp70 suppresses apoptosis in sympathetic neurones by preventing the activation of c-Jun. *J Neurochem*. 2008 Jan;104(1):271-8.
914. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. 1999 Nov;32(8):595-603.
915. Ozgocmen S, Kaya H, Fadillioglu E, Yilmaz Z. Effects of calcitonin, risedronate, and raloxifene on erythrocyte antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Arch Med Res*. 2007 Feb;38(2):196-205.
916. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev*. 2014 Jan;34(1):106-35.
917. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*. 2007 Feb;115(2):81-103.
918. Mohan IK, Kumar KV, Naidu MU, Khan M, Sundaram C. Protective effect of CardiPro against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Phytomedicine*. 2006 Mar;13(4):222-9.
919. Hozayen WG, Seif HSA, Amin S. Protective Effects of Ruitn and / or Hesperidin Against Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity. *International Journal of Clinical Nutrition*. 2014 2014/01/16;2(1):11-7.
920. Xu L, Giffard RG. HSP70 protects murine astrocytes from glucose deprivation injury. *Neurosci Lett*. 1997 Mar 7;224(1):9-12.
921. Suzuki S, Maruyama S, Sato W, Morita Y, Sato F, Miki Y, et al. Geranylgeranylacetone ameliorates ischemic acute renal failure via induction of Hsp70. *Kidney Int*. 2005 Jun;67(6):2210-20.
922. Zhang HY, Lu NH, Xie Y, Guo GH, Zhan JH, Chen J. Influence of heat shock preconditioning on structure and function of mitochondria in gastric mucosa of severely burned animals: experiment with rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2008 Feb 26;88(8):564-7.
923. Guo S, Wharton W, Moseley P, Shi H. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. *Cell Stress Chaperones*. 2007 Autumn;12(3):245-54.
924. Hu X, Liu R, Li Y, Wang W, Tai F, Xue R, et al. Heat shock protein 70 regulates the abscisic acid-induced antioxidant response of maize to combined drought and heat stress. *Plant Growth Regulation*. 2009;60(3):225-35.
925. McArdle A, van der Meulen J, Close GL, Pattwell D, Van Remmen H, Huang TT, et al. Role of mitochondrial superoxide dismutase in contraction-induced generation of reactive

oxygen species in skeletal muscle extracellular space. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 May;286(5):C1152-8.

926. Broome CS, Kayani AC, Palomero J, Dillmann WH, Mestril R, Jackson MJ, et al. Effect of lifelong overexpression of HSP70 in skeletal muscle on age-related oxidative stress and adaptation after nondamaging contractile activity. *FASEB J.* 2006 Jul;20(9):1549-51.

927. Gombos T, Forhecz Z, Pozsonyi Z, Janoskuti L, Prohaszka Z. Interaction of serum 70-kDa heat shock protein levels and HspA1B (+1267) gene polymorphism with disease severity in patients with chronic heart failure. *Cell Stress Chaperones.* 2008 Summer;13(2):199-206.

928. Li Z, Song Y, Xing R, Yu H, Zhang Y, Li Z, et al. Heat shock protein 70 acts as a potential biomarker for early diagnosis of heart failure. *PLoS One.* 2013;8(7):e67964.

929. Pockley AG, Shepherd J, Corton JM. Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest.* 1998 Dec;27(6):367-77.

930. Dhingra R, Larson MG, Benjamin EJ, Lipinska I, Gona P, Corey D, et al. Cross-sectional correlates of serum heat shock protein 70 in the community. *Am J Hypertens.* 2006 Feb;19(2):227-31; discussion 32-3.

931. Jenei ZM, Gombos T, Forhecz Z, Pozsonyi Z, Karadi I, Janoskuti L, et al. Elevated extracellular HSP70 (HSPA1A) level as an independent prognostic marker of mortality in patients with heart failure. *Cell Stress Chaperones.* 2013 Nov;18(6):809-13.

932. Knowlton AA, Eberli FR, Brecher P, Romo GM, Owen A, Apstein CS. A single myocardial stretch or decreased systolic fiber shortening stimulates the expression of heat shock protein 70 in the isolated, erythrocyte-perfused rabbit heart. *J Clin Invest.* 1991 Dec;88(6):2018-25.

933. Prohaszka Z, Fust G. Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life. *Mol Immunol.* 2004 May;41(1):29-44.

934. Wright BH, Corton JM, El-Nahas AM, Wood RF, Pockley AG. Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in peripheral and renal vascular disease. *Heart Vessels.* 2000;15(1):18-22.

935. Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, et al. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation.* 2002 Feb 12;105(6):685-90.

936. Zhu J, Quyyumi AA, Wu H, Csako G, Rott D, Zalles-Ganley A, et al. Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Jun 1;23(6):1055-9.

937. Molvarec A, Prohaszka Z, Nagy B, Kalabay L, Szalay J, Fust G, et al. Association of increased serum heat shock protein 70 and C-reactive protein concentrations and decreased serum alpha(2)-HS glycoprotein concentration with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *J Reprod Immunol.* 2007 Apr;73(2):172-9.

938. Dybdahl B, Slordahl SA, Waage A, Kierulf P, Espevik T, Sundan A. Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction. *Heart.* 2005 Mar;91(3):299-304.

939. Satoh M, Shimoda Y, Akatsu T, Ishikawa Y, Minami Y, Nakamura M. Elevated circulating levels of heat shock protein 70 are related to systemic inflammatory reaction through monocyte Toll signal in patients with heart failure after acute myocardial infarction. *Eur J Heart Fail.* 2006 Dec;8(8):810-5.

940. Bausero MA, Gastpar R, Multhoff G, Asea A. Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *J Immunol.* 2005 Sep 1;175(5):2900-12.

941. Zhan R, Leng X, Liu X, Wang X, Gong J, Yan L, et al. Heat shock protein 70 is secreted from endothelial cells by a non-classical pathway involving exosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Sep 18;387(2):229-33.

942. St Rammos K, Koullias GJ, Hassan MO, Argyrakakis NP, Voucharas CG, Scarupa SJ, et al. Low preoperative HSP70 atrial myocardial levels correlate significantly with high

- incidence of postoperative atrial fibrillation after cardiac surgery. *Cardiovasc Surg.* 2002 Jun;10(3):228-32.
943. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol.* 2000 Nov;12(11):1539-46.
944. Contreras-Sesvold C, Revenis BD, O'Connor FG, Deuster PA. Association of Plasma Heat Shock Protein 70, Interleukin 6, and Creatine Kinase Concentrations in a Healthy, Young Adult Population. *J Biomark.* 2015;2015:967120.
945. Njemini R, Bautmans I, Onyema OO, Van Puyvelde K, Demanet C, Mets T. Circulating heat shock protein 70 in health, aging and disease. *BMC Immunol.* 2011 Mar 28;12:24.
946. Paroo Z, Tiidus PM, Noble EG. Estrogen attenuates HSP 72 expression in acutely exercised male rodents. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1999 Aug;80(3):180-4.
947. Shinohara T, Takahashi N, Ooie T, Ichinose M, Hara M, Yonemochi H, et al. Estrogen inhibits hyperthermia-induced expression of heat-shock protein 72 and cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in female rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Nov;37(5):1053-61.
948. Mallat Z, Fornes P, Costagliola R, Esposito B, Belmin J, Lecomte D, et al. Age and gender effects on cardiomyocyte apoptosis in the normal human heart. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001 Nov;56(11):M719-23.
949. Jin X, Wang R, Xiao C, Cheng L, Wang F, Yang L, et al. Serum and lymphocyte levels of heat shock protein 70 in aging: a study in the normal Chinese population. *Cell Stress Chaperones.* 2004 Mar;9(1):69-75.
950. Rao DV, Watson K, Jones GL. Age-related attenuation in the expression of the major heat shock proteins in human peripheral lymphocytes. *Mech Ageing Dev.* 1999 Feb 1;107(1):105-18.
951. Fagnoli J, Kunisada T, Fornace AJ, Jr., Schneider EL, Holbrook NJ. Decreased expression of heat shock protein 70 mRNA and protein after heat treatment in cells of aged rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jan;87(2):846-50.
952. Rea IM, McNerlan S, Pockley AG. Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging. *Exp Gerontol.* 2001 Feb;36(2):341-52.
953. Njemini R, Abeele MV, Demanet C, Lambert M, Vandebosch S, Mets T. Age-related decrease in the inducibility of heat-shock protein 70 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Immunol.* 2002 Jul;22(4):195-205.
954. Vasilaki A, Jackson MJ, McArdle A. Attenuated HSP70 response in skeletal muscle of aged rats following contractile activity. *Muscle Nerve.* 2002 Jun;25(6):902-5.
955. Selsby JT, Judge AR, Yimlamai T, Leeuwenburgh C, Dodd SL. Life long calorie restriction increases heat shock proteins and proteasome activity in soleus muscles of Fisher 344 rats. *Exp Gerontol.* 2005 Jan-Feb;40(1-2):37-42.
956. Wei YJ, Huang YX, Shen Y, Cui CJ, Zhang XL, Zhang H, et al. Proteomic analysis reveals significant elevation of heat shock protein 70 in patients with chronic heart failure due to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem.* 2009 Dec;332(1-2):103-11.





## **8. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**



<b>11q23.3-q25</b>	<i>Genetic area 23.3 to 25 of the large arm of chromosome 11</i>
<b>14-3-3</b>	<i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein</i>
<b>14q24.1</b>	<i>Genetic area 24.1 of the large arm of chromosome 14</i>
<b>18S rRNA</b>	<i>18S ribosomal RNA</i>
<b>1cen-qter</b>	<i>Genetic area of the large arm of chromosome 1</i>
<b>5q31.1</b>	<i>Genetic area 31.1 of the large arm of chromosome 5</i>
<b>6p21.3</b>	<i>Genetic area 21.3 of the short arm of chromosome 6</i>
<b>9q33-q34.1</b>	<i>Genetic area 33 to 34.1 of the large arm of chromosome 9</i>
<b>A</b>	<i>Alanine</i>
<b>A1</b>	<i>Bcl-2-related protein A1</i>
<b>A2</b>	<i>Phospholipase A2 (PLA2s)</i>
<b>A23187</b>	<i>Calcium ionophore</i>
<b>A549</b>	<i>Adenocarcinomic human alveolar epithelial cells</i>
<b>AAA+</b>	<i>ATPases Associated with diverse cellular Activities</i>
<b>ACE</b>	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>
<b>ADP</b>	<i>Adenosine diphosphate</i>
<b>ADR</b>	<i>Adriamycin</i>
<b>AIDS</b>	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
<b>AIF</b>	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
<b>Akt</b>	<i>Serine/threonine-specific protein kinase, Protein kinase B (PKB)</i>
<b>AMP</b>	<i>Adenosine monophosphate</i>
<b>Ann</b>	<i>Annexin V</i>
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of variance</i>
<b>ANT</b>	<i>Adenine Nucleotide Translocator</i>
<b>ANTs</b>	<i>Anthracyclines (anthracycline antibiotics)</i>
<b>Apaf-1</b>	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
<b>Ape1</b>	<i>Apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease 1</i>

<b>Apo2L</b>	<i>Apoptosis-inducing ligand 2</i>
<b>Apo3L</b>	<i>Apoptosis-inducing ligand 3</i>
<b>APS</b>	<i>Ammonium persulfate</i>
<b>ARC</b>	<i>Apoptosis repressor with caspase recruitment (CARD) domain</i>
<b>Ask-1 (ASK1)</b>	<i>Apoptosis signal-regulating kinase -1</i>
<b>Asp</b>	<i>Aspartic acid</i>
<b>Asp315</b>	<i>Aspartic acid 315</i>
<b>Asp353</b>	<i>Aspartic acid 353</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATM</b>	<i>Ataxia telangiectasia mutated (protein)</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosine triphosphate</i>
<b>ATPase</b>	<i>Adenylpyrophosphatase</i>
<b>AWTd</b>	<i>Anterior wall thickness at end-diastole</i>
<b>Bad</b>	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
<b>BAECs</b>	<i>Bovine aortic endothelial cells</i>
<b>BAG</b>	<i>Bcl-2-associated athanogene</i>
<b>BAG-1</b>	<i>Bcl2 athanogene protein 1</i>
<b>Bak</b>	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
<b>BALB/c</b>	<i>Inbred strain of mice</i>
<b>Bax</b>	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
<b>Bax<math>\alpha</math> (Bax-1)</b>	<i>Bax isoform <math>\alpha</math></i>
<b>Bax<math>\beta</math></b>	<i>Bax isoform <math>\beta</math></i>
<b>Bcl-10</b>	<i>B-cell lymphoma/ leukemia 10</i>
<b>Bcl-2 (Bcl2)</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>Bcl-w</b>	<i>Bcl-2 like protein 2</i>
<b>Bcl-x</b>	<i>Bcl-2 like protein 1</i>
<b>Bcl-XL</b>	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>

<b>Bcl-XS</b>	<i>Bcl-2 related protein, short isoform</i>
<b>BER</b>	<i>Base excision repair</i>
<b>BH1</b>	<i>Bcl-2 Homology 1 domain</i>
<b>BH2</b>	<i>Bcl-2 Homology 2 domain</i>
<b>BH3</b>	<i>Bcl-2 Homology 3 domain</i>
<b>BH3-only</b>	<i>Containing only a single BH3-domain</i>
<b>BH4</b>	<i>Bcl-2 Homology 4 domain</i>
<b>Bid</b>	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
<b>Bik</b>	<i>Bcl-2-interacting killer</i>
<b>Bim</b>	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
<b>BiP</b>	<i>Immunoglobulin binding protein</i>
<b>Blk</b>	<i>Bik-like killer protein</i>
<b>Bmf</b>	<i>Bcl-2-modifying factor</i>
<b>BMSCs</b>	<i>Bone marrow-derived mesenchymal stem cells</i>
<b>BNIP3</b>	<i>Bcl-2/adenovirus E1B 19 kda-interacting protein 3</i>
<b>BNP</b>	<i>Brain natriuretic peptide</i>
<b>Bok</b>	<i>Bcl-2 related ovarian killer</i>
<b>bp</b>	<i>Base pairs</i>
<b>BRL</b>	<i>Buffalo rat liver cells</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i>
<b>C</b>	<i>Control</i>
<b>C</b>	<i>Cysteine</i>
<b><i>C. elegans</i></b>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>C2C12</b>	<i>Murine skeletal muscle cells (myoblasts)</i>
<b>Ca</b>	<i>Calcium</i>
<b>Caax</b>	<i>Motif with cysteine followed by two aliphatic amino acids and a terminal "X" residue</i>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<i>Calcium chloride</i>

<b>CAD</b>	<i>Caspase Activated deoxyribonuclease (DNase)</i>
<b>CARD</b>	<i>Caspase activation and recruitment domain</i>
<b>Caspases</b>	<i>Cysteine-dependent <u>aspartate-specific proteases</u></i>
<b>CAT</b>	<i>Catalase</i>
<b>c-cpn</b>	<i>Cytosol chaperonin</i>
<b>CCT</b>	<i>Chaperonin containing T-complex polypeptide 1</i>
<b>Cdc37</b>	<i>Cell division cycle protein 37</i>
<b>ced-3</b>	<i>Caenorhabditis elegans death protein-3</i>
<b>CHIP</b>	<i>Carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein</i>
<b>CHO</b>	<i>Aldehyde group</i>
<b>C-IAP1</b>	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein 1</i>
<b>C-IAP2</b>	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein 2</i>
<b>Clp</b>	<i>Coactosin like protein A</i>
<b>ClpA</b>	<i>Coactosin like protein A</i>
<b>ClpB</b>	<i>Coactosin like protein B</i>
<b>ClpP</b>	<i>Clp protease</i>
<b>cm</b>	<i>centimetres</i>
<b>c-Myc</b>	<i>Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	<i>Carbon dioxide</i>
<b>-COOH</b>	<i>Carboxyl / C-terminus</i>
<b>COX-2</b>	<i>Cyclooxygenase-2</i>
<b>cpn10</b>	<i>10 kDa chaperonin</i>
<b>cpn60</b>	<i>60 kDa chaperonin</i>
<b>CR domain</b>	<i>Cysteine Rich domain</i>
<b>CRT</b>	<i>Cardiac Resynchronization Therapy</i>
<b>CTA</b>	<i>Carboxyl terminus of the Saccharomyces heat shock protein family</i>
<b>CTL</b>	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i>

<b>Cu</b>	<i>Copper</i>
<b>D</b>	<i>Aspartic acid</i>
<b>Da</b>	<i>Daltons</i>
<b>dATP</b>	<i>Deoxyadenosine triphosphate</i>
<b>DAXX (Daxx)</b>	<i>Fas death domain-associated protein</i>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<i>Double distilled water</i>
<b>DDs</b>	<i>Death domains</i>
<b>DEDs</b>	<i>Death Effector Domains</i>
<b>DISC</b>	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium</i>
<b>DMSO</b>	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>DnaJ</b>	<i>Bacterial homologue of Hsp40</i>
<b>DnaK</b>	<i>Bacterial Hsp70</i>
<b>DNA-PK</b>	<i>DNA-activated protein kinase</i>
<b>DNR</b>	<i>Daunorubicin (Daunomycin)</i>
<b>DNTP (dNTP)</b>	<i>Deoxyrinonucleotide triphosphate</i>
<b>DOX (Dox)</b>	<i>Doxorubicin</i>
<b>DR3</b>	<i>Death receptor 3</i>
<b>DR4</b>	<i>Death receptor 4</i>
<b>DR5</b>	<i>Death receptor 5</i>
<b>E</b>	<i>Glutamic acid</i>
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>E3</b>	<i>E3 ubiquitin ligases</i>
<b>ECG</b>	<i>Electrocardiography</i>
<b>ECL</b>	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<b>ECM</b>	<i>Extracellular matrix</i>

<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>EGFP</b>	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
<b>eHsp70</b>	<i>Extracellular Hsp70</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>EndoG</b>	<i>Endonuclease G</i>
<b>eNOS</b>	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
<b>ER</b>	<i>Endoplasmic reticulum</i>
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>ERK1/2</b>	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
<b>F</b>	<i>Phenylalanine</i>
<b>F1/F1</b>	<i>Wild type mice (cells)</i>
<b>F1/Tg</b>	<i>Heterozygous mice</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-activated cell sorting (scanning)</i>
<b>FADD</b>	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
<b>FAK</b>	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
<b>Fas (Apo-1/CD95)</b>	<i>Stress receptor of the TNF family (also known as CD95)</i>
<b>FasL</b>	<i>Fas ligand</i>
<b>FasR</b>	<i>Fas receptor</i>
<b>FBS</b>	<i>Foetal bovine serum</i>
<b>FCS</b>	<i>Foetal Calf Serum</i>
<b>Fe</b>	<i>Iron (ferrum)</i>
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	<i>Ferrous ion</i>
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	<i>Ferric ion</i>
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
<b>FKHRL1</b>	<i>Forkhead in rhabdomyosarcoma transcription factor like 1, FOXO3a</i>
<b>FS</b>	<i>Fractional Shortening</i>
<b>FSC</b>	<i>Forward Scatter</i>



<b>FTC 133</b>	<i>Human follicular thyroid carcinoma cells</i>
<b>G</b>	<i>Glycine</i>
<b>g (gr)</b>	<i>grams</i>
<b>g force</b>	<i>Gravitational force</i>
<b>G1</b>	<i>Gap 1 (Phase of cell cycle)</i>
<b>G2</b>	<i>Gap 2 (Phase of cell cycle)</i>
<b>GATA-1</b>	<i>Globin transcription factor 1 (GATA binding protein 1)</i>
<b>GATA-4</b>	<i>Globin transcription factor 4 (GATA binding protein 4)</i>
<b>Gln</b>	<i>Glutamine</i>
<b>Glu</b>	<i>Glutamic acid</i>
<b>GPx</b>	<i>Glutathione peroxidase</i>
<b>GR</b>	<i>Glutathione Reductase</i>
<b>GroE</b>	<i>Chaperonin protein of E.coli</i>
<b>GroEL</b>	<i>Chaperonin 60 heat-shock protein from E. coli affecting head morphogenesis of <math>\lambda</math> phage</i>
<b>GroES</b>	<i>Co-chaperone of GroEL with the same function</i>
<b>groPC756</b>	<i>E. coli DnaK</i>
<b>Grp</b>	<i>Glucose regulated protein</i>
<b>Grp75</b>	<i>75 kDa glucose regulated protein</i>
<b>Grp78</b>	<i>78 kDa glucose regulated protein</i>
<b>Grp94</b>	<i>94 kDa glucose regulated protein</i>
<b>GrpE</b>	<i>E. coli glucose regulated protein</i>
<b>GSH</b>	<i>Reduced glutathione</i>
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
<b>GSSG</b>	<i>Oxidized glutathione</i>
<b>H</b>	<i>Histidine</i>
<b>h(hrs)</b>	<i>hours</i>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<i>Water</i>

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<i>Hydrogen peroxide</i>
<b>H9c2</b>	<i>Rat embryonic cells from heart/myocardium (myoblasts)</i>
<b>HBSS</b>	<i>Hanks' Balanced Salt (Saline) Solution</i>
<b>HBV</b>	<i>Hepatitis B virus</i>
<b>HCl</b>	<i>Hydrogen chloride</i>
<b>Hdj-1</b>	<i>Human DnaJ protein homologue 1 (Mammalian DnaJ)</i>
<b>Hdj-2</b>	<i>Human DnaJ homologue 2 protein</i>
<b>HeLa</b>	<i>Mammary cancer cells derived from Henrietta Lacks</i>
<b>HER2</b>	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
<b>Hip</b>	<i>Hsc70 interacting protein</i>
<b>HL-60</b>	<i>Human acute promyelocytic leukemia cells (promyeloblasts)</i>
<b>HMG2</b>	<i>High mobility group protein 2</i>
<b>Hop</b>	<i>HSP70-Hsp90 Organising Protein</i>
<b>HPV</b>	<i>Human Papillomavirus</i>
<b>Hrk</b>	<i>Activator of apoptosis harakiri</i>
<b>HRP</b>	<i>Horseradish Peroxidase</i>
<b>HS</b>	<i>Heat Shock</i>
<b>hsc</b>	<i>heat shock cognates</i>
<b>Hsc70</b>	<i>70 kDa heat shock cognate</i>
<b>HSDJ</b>	<i>Hdj-2</i>
<b>HSE</b>	<i>Heat shock element</i>
<b>Hsf-1 (Hsf1)</b>	<i>Heat shock factor 1</i>
<b>Hsf1p</b>	<i>Yeast heat shock factor 1</i>
<b>hsp</b>	<i>Heat shock protein</i>
<b>Hsp10 (hsp10)</b>	<i>10 kDa heat shock protein</i>
<b>HSP100 (hsp100)</b>	<i>100 kDa heat shock protein</i>
<b>Hsp104</b>	<i>104 kDa heat shock protein</i>

<b>Hsp110 (hsp110)</b>	<i>110 kDa heat shock protein</i>
<b>Hsp25</b>	<i>25 kDa heat shock protein</i>
<b>Hsp27</b>	<i>27 kDa heat shock protein</i>
<b>Hsp40 (hsp40)</b>	<i>40 kDa heat shock protein</i>
<b>Hsp58</b>	<i>58 kDa heat shock protein</i>
<b>Hsp60 (hsp60)</b>	<i>60 kDa heat shock protein</i>
<b>Hsp70 (hsp70)</b>	<i>70 kDa heat shock protein</i>
<b>Hsp70-1</b>	<i>Hsp70</i>
<b>Hsp70-1a (hsp70-1a)</b>	<i>Hsp70</i>
<b>Hsp70-1b (hsp70-1b)</b>	<i>Intronless human Hsp70</i>
<b>hsp70-1l</b>	<i>70 kDa heat shock like protein</i>
<b>Hsp70-1t</b>	<i>Hsp70-1l</i>
<b>Hsp70-2 (hsp70-2)</b>	<i>Hsp70-1b</i>
<b>Hsp70-3 (hsp70-3)</b>	<i>Ratus norvegicus Hsp70-like protein</i>
<b>Hsp70-5 (hsp70-5)</b>	<i>Grp78</i>
<b>Hsp70-6 (hsp70-6)</b>	<i>Hsp70 isotype</i>
<b>Hsp70-8 (hsp70-8)</b>	<i>Hsp70 isotype</i>
<b>Hsp70-9 (hsp70-9)</b>	<i>Hsp70 isotype</i>
<b>Hsp70B</b>	<i>Hsp70 isotype</i>
<b>Hsp70B'</b>	<i>Hsp70 isotype</i>
<b>Hsp70-hom</b>	<i>Hsp70 isotype</i>
<b>Hsp70i</b>	<i>Hsp70</i>
<b>Hsp70s</b>	<i>70 kDa heat shock protein family</i>
<b>Hsp72</b>	<i>Hsp70</i>
<b>Hsp73</b>	<i>Hsc70</i>
<b>HSP75 (mtHsp75)</b>	<i>Mitochondrial Hsp70 isotype</i>
<b>Hsp90 (hsp90)</b>	<i>90 kDa heat shock protein</i>

<b>HSPA</b>	<i>Hsp70 old name</i>
<b>HSPA1A</b>	<i>Hsp70</i>
<b>HSPA1B</b>	<i>Hsp70-1b</i>
<b>HSPA1L</b>	<i>hsp70-1l</i>
<b>HSPA2</b>	<i>hsp70-2b</i>
<b>HSPA5</b>	<i>hsp70-5</i>
<b>HSPA6</b>	<i>hsp70-6</i>
<b>HSPA8</b>	<i>Hsc70</i>
<b>HSPA9</b>	<i>hsp70-9</i>
<b>Hsps</b>	<i>Heat shock protein family</i>
<b>HtpG</b>	<i>High temperature protein G(bacterial homolog of Hsp90)</i>
<b>Htra2/Omi</b>	<i>High temperature requirement serine protease A2</i>
<b>IAPs</b>	<i>Inhibitors of apoptosis proteins</i>
<b>IC<sub>50</sub></b>	<i>Inhibitory concentration of 50%</i>
<b>ICAD</b>	<i>Inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease (DNase)</i>
<b>IGF-1</b>	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
<b>IgG</b>	<i>Immunoglobulin G</i>
<b>IKB (IκB)</b>	<i>Inhibitor of NF-κB</i>
<b>IKK</b>	<i>IκB kinase</i>
<b>IMM</b>	<i>Inner mitochondrial membrane</i>
<b>iNOS</b>	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
<b>IRP1</b>	<i>Iron Regulatory Protein 1</i>
<b>IRP2</b>	<i>Iron Regulatory Protein 2</i>
<b>IRPs</b>	<i>Iron Regulatory Proteins</i>
<b>JNK</b>	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
<b>JNK1</b>	<i>c-Jun N-terminal kinase 1</i>
<b>K</b>	<i>Lysine</i>

<b>K<sup>+</sup></b>	<i>Potassium</i>
<b>Kar2 (KAR2)</b>	<i>Karyogamy gene 2</i>
<b>Kar2p</b>	<i>Protein of the karyogamy gene 2</i>
<b>kb</b>	<i>kilobases</i>
<b>KCl</b>	<i>Potassium chloride</i>
<b>kDa</b>	<i>Kilodaltons</i>
<b>Kg</b>	<i>Kilograms</i>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<i>Monopotassium phosphate</i>
<b>K<sub>m</sub></b>	<i>Michaelis-Menten constant</i>
<b>L</b>	<i>Leucine</i>
<b>l (lt)</b>	<i>litre</i>
<b>LV</b>	<i>Left Ventricle</i>
<b>LVDd</b>	<i>Left ventricular diameter at end-diastole</i>
<b>LVDs</b>	<i>Left ventricular diameter at end-systole</i>
<b>M</b>	<i>Molar</i>
<b>M</b>	<i>Mitosis (Phase of cell cycle)</i>
<b>mA</b>	<i>Milliamperes</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
<b>MAPKAP-2 (MAPKAP2)</b>	<i>MAP kinase activated protein kinase 2</i>
<b>MAPKK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
<b>Mcl-1</b>	<i>Myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
<b>MDA</b>	<i>Malondialdehyde</i>
<b>MDCK</b>	<i>Madin-Darby canine kidney epithelial cells</i>
<b>Mdj1p</b>	<i>Yeast Dj-1 protein homologue</i>
<b>Mdm2 (MDM2)</b>	<i>Murine double minute 2 protein</i>
<b>ME-180 cells</b>	<i>Human cervical epidermoid carcinoma cells</i>
<b>MEFs</b>	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>

<b>mg</b>	<i>Milligrams</i>
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	<i>Magnesium</i>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<i>Magnesium chloride</i>
<b>MHC class I</b>	<i>Major histocompatibility complex class I</i>
<b>MHC class III</b>	<i>Major histocompatibility complex class II</i>
<b>mHsp70 (mtHsp70)</b>	<i>Mitochondrial Hsp70</i>
<b>MHz</b>	<i>Megahertz</i>
<b>min</b>	<i>minute</i>
<b>mito-Hsp70</b>	<i>mHsp70</i>
<b>ml</b>	<i>millilitre</i>
<b>mM</b>	<i>millimolar</i>
<b>mm</b>	<i>millimetres</i>
<b>mm<sup>3</sup></b>	<i>cubic millimetres</i>
<b>M-mode</b>	<i>Motion mode</i>
<b>MMP-2</b>	<i>Matrix metalloproteinase-2</i>
<b>MMP-9</b>	<i>Matrix metalloproteinase-9</i>
<b>Mn-SOD</b>	<i>Manganese-superoxide dismutase</i>
<b>MOMP</b>	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
<b>monoHER</b>	<i>7-monohydroxyethylrutoside</i>
<b>Mortalin</b>	<i>Hsp70-9</i>
<b>MPT (MPTP)</b>	<i>Mitochondrial Permeability Transition pore</i>
<b>mRNA</b>	<i>Messenger RNA</i>
<b>Mt-CK (MtCK)</b>	<i>Mitochondrial creatine kinase</i>
<b>mtDNA</b>	<i>Mitochondrial DNA</i>
<b>MTT</b>	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide</i>
<b>mU</b>	<i>milliunits</i>
<b>mV</b>	<i>millivolts</i>

<b>Na<sup>+</sup></b>	<i>Sodium</i>
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<i>Sodium phosphate dibasic</i>
<b>NaCl</b>	<i>Sodium chloride</i>
<b>NAD</b>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
<b>NAD<sup>+</sup></b>	<i>Oxidized nicotinamide adenine dinucleotide</i>
<b>NADH</b>	<i>Reduced nicotinamide adenine dinucleotide</i>
<b>NADPH</b>	<i>Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	<i>Sodium bicarbonate</i>
<b>NBD</b>	<i>Nucleotide binding domain</i>
<b>NFAT</b>	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
<b>NFAT4</b>	<i>Nuclear factor of activated T-cells 4</i>
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>ng</b>	<i>nanograms</i>
<b>-NH<sub>2</sub></b>	<i>Amine / N-terminus</i>
<b>NIH-3T3</b>	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
<b>nm</b>	<i>nanometres</i>
<b>Nm23</b>	<i>Nucleoside diphosphate kinase</i>
<b>NMR</b>	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
<b>NO</b>	<i>Nitric oxide</i>
<b>NOS</b>	<i>Nitric oxide synthase</i>
<b>Noxa</b>	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 / a pro-apoptotic BH3-containing protein</i>
<b>NTA</b>	<i>N-terminal area</i>
<b>NTD</b>	<i>N-terminal domain</i>
<b>NuMA</b>	<i>Nuclear mitotic apparatus protein</i>
<b>O<sub>2</sub></b>	<i>Molecular Oxygen</i>
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	<i>Superoxide anion</i>

<b>OH<sup>-</sup></b>	<i>Hydroxyl ion</i>
<b>OH<sup>•</sup></b>	<i>Hydroxyl radical</i>
<b>OHSC</b>	<i>Organotypic hippocampal slice culture</i>
<b>oriC</b>	<i>Origin of replication</i>
<b>P</b>	<i>Proline</i>
<b>p16</b>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
<b>p300</b>	<i>A histone acetyl transferase</i>
<b>p38</b>	<i>p38 mitogen-activated protein kinases</i>
<b>P-450</b>	<i>Cytochrome P450 (CYPs)</i>
<b>p53</b>	<i>Tumor suppressor protein p53</i>
<b>PA-1</b>	<i>Human ovarian teratocarcinoma cell line</i>
<b>PAGE</b>	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>PARP-1 (Parp-1)</b>	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>
<b>PARPs</b>	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase family</i>
<b>PBD</b>	<i>Peptide binding domain</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>pg</b>	<i>picograms</i>
<b>pH</b>	<i>Measure of the activity of the (solvated) hydrogen ion</i>
<b>Phospho-p53</b>	<i>Phosphorylated p53</i>
<b>pI (PI)</b>	<i>Propidium Iodide</i>
<b>PKC (PKC<math>\delta</math>)</b>	<i>Protein kinase C (<math>\delta</math>)</i>
<b>PMBC</b>	<i>Human Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
<b>PMSF</b>	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
<b>PP1</b>	<i>Protein phosphatase 1</i>
<b>PP2A</b>	<i>Protein phosphatase 2A</i>
<b>pp32</b>	<i>Phosphoprotein 32</i>



<b>pro-IL-18</b>	<i>Pro-interleukin-18 (precursor IL-18)</i>
<b>pro-IL-1<math>\beta</math></b>	<i>Pro-interleukin-1 beta (precursor IL-1<math>\beta</math>)</i>
<b>PS</b>	<i>Phosphatidylserine</i>
<b>PT</b>	<i>Permeability Transition</i>
<b>PTP</b>	<i>Permeability Transition Pore</i>
<b>Puma</b>	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
<b>PVDF</b>	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
<b>PWTd</b>	<i>Posterior wall thickness at end-diastole</i>
<b>PZ51</b>	<i>Ebselen, Seleno-organic compound 2-phenyl-1,2-benzoisoselenazol-3(2H)on</i>
<b>Q</b>	<i>Glutamine</i>
<b>QRS</b>	<i>QRS complex (represents the rapid depolarization of the right and left ventricles in ECG)</i>
<b>QT</b>	<i>QT interval (the time from the beginning of the QRS complex to the end of the T wave in ECG)</i>
<b>R</b>	<i>Arginine</i>
<b>R/H ratio</b>	<i>Cardiac index of adverse remodeling</i>
<b>Rad9</b>	<i>DNA yeast checkpoint complex</i>
<b>Raji</b>	<i>Human lymphoblastoid cells derived from a Burkitt lymphoma</i>
<b>RIP</b>	<i>Receptor-interacting protein</i>
<b>RIPA</b>	<i>Radioimmunoprecipitation buffer</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>Rnase A</b>	<i>Ribonuclease A</i>
<b>RNP</b>	<i>Ribonucleoprotein</i>
<b>RNS</b>	<i>Reactive nitrogen species</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>rpm</b>	<i>Revolutions per minute</i>
<b>Rubisco</b>	<i>Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase</i>
<b>S</b>	<i>Svedberg unit</i>

<b>S</b>	<i>Synthesis (Phase of cell cycle)</i>
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>SAPK</b>	<i>Stress-activated protein kinase</i>
<b>SBD</b>	<i>Substrate binding domain</i>
<b>SD</b>	<i>Semi-dry</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<b>sec</b>	<i>seconds</i>
<b>Sec63</b>	<i>Secretion protein 63</i>
<b>SEK</b>	<i>SAPK/ERK kinase</i>
<b>Ser</b>	<i>Serine</i>
<b>Ser15</b>	<i>Serine 15</i>
<b>Ser20</b>	<i>Serine 20</i>
<b>SET</b>	<i>Nucleosome assembly protein / An endoplasmic reticulum-associated complex</i>
<b>sHSPs (shsps)</b>	<i>Small Heat Shock proteins</i>
<b>SH-SY5Y</b>	<i>Human neuroblastoma cell line from bone marrow</i>
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering RNA</i>
<b>Sis1</b>	<i>Yeast initiation of translation protein 1</i>
<b>Smac/DIABLO</b>	<i>Second mitochondrial activator of caspases/Direct IAP binding protein with low PI</i>
<b>SOD</b>	<i>Superoxide Dismutase</i>
<b>Spike</b>	<i>A novel BH3-only BCL-2 family member protein</i>
<b>SR</b>	<i>Sarcoplasmic reticulum</i>
<b>Ssa</b>	<i>Yeast Hsp70 homologue</i>
<b>SSA1</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae Hsp70 homologue</i>
<b>Ssa1-4</b>	<i>Yeast heat shock protein gene 1-4</i>
<b>Ssa1p</b>	<i>Stress-seventy subfamily A protein 1</i>
<b>Ssa2p</b>	<i>Stress-seventy subfamily A protein 2</i>

<b>Ssa3p</b>	<i>Stress-seventy subfamily A protein 3</i>
<b>Ssa4p</b>	<i>Stress-seventy subfamily A protein 4</i>
<b>Ssas</b>	<i>Stress-seventy subfamily A protein family</i>
<b>Ssb</b>	<i>Single-strand binding protein</i>
<b>SSC</b>	<i>Side Scatter</i>
<b>SSC1</b>	<i>Mitochondrial Hsp70 of Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>ST</b>	<i>ST segment (connects the QRS complex and the T wave and represents the period when the ventricles are depolarized in ECG)</i>
<b>ST.DEV. (S.D.)</b>	<i>Standard deviation</i>
<b>STREs</b>	<i>Stress response elements</i>
<b>ST-T</b>	<i>The portion of ST segment and T wave in ECG</i>
<b>SW480</b>	<i>Human colon adenocarcinoma cells</i>
<b>T</b>	<i>T wave (represents the repolarization of the ventricles in ECG)</i>
<b>TBE</b>	<i>Tris/Borate/EDTA</i>
<b>tBid</b>	<i>truncated Bid</i>
<b>TCA</b>	<i>Trichloroacetic acid</i>
<b>TCP1 (TCP-1)</b>	<i>T-complex protein 1</i>
<b>TEMED</b>	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
<b>TF55</b>	<i>Thermophylic factor 55</i>
<b>TF55/56</b>	<i>Thermophylic factor 55/56</i>
<b>Tg/Tg</b>	<i>Homozygous transgenic mice (cells)</i>
<b>Thr</b>	<i>Threonine</i>
<b>TMB</b>	<i>3,3',5,5' tetramethylbenzidine</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>TNFR-1 (TNFR1)</b>	<i>Tumor necrosis factor receptor-1</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math> (TNF<math>\alpha</math>)</b>	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
<b>TPR</b>	<i>Tetratricopeptide repeat</i>

<b>TPR2</b>	<i>Tetratricopeptide repeat domain 2</i>
<b>TRADD</b>	<i>TNF receptor-1-associated death domain protein</i>
<b>TRAIL</b>	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
<b>TriC</b>	<i>CCT</i>
<b>t-test</b>	<i>Student's t-distribution test</i>
<b>T-tubules</b>	<i>Transverse tubules</i>
<b>U</b>	<i>Units</i>
<b>U937</b>	<i>Human leukemic monocyte histiocytic lymphoma cell</i>
<b>U-box</b>	<i>Ufd2-box (domain) / A modified RING domain without the Zn<sup>2+</sup>-binding residues in certain ubiquitin ligases</i>
<b>UPRE</b>	<i>Unfolded protein response element</i>
<b>UPS</b>	<i>Ubiquitin-proteasome system</i>
<b>UV</b>	<i>Ultra Violet</i>
<b>V</b>	<i>Volts</i>
<b>V</b>	<i>Valine</i>
<b>v/v</b>	<i>volume/volume</i>
<b>V-79</b>	<i>Chinese hamster lung cell line</i>
<b>VDAC</b>	<i>Voltage-dependent anion channel</i>
<b>w/v</b>	<i>weight/volume</i>
<b>WEHI-S</b>	<i>Murine fibrosarcoma cells (Walter and Eliza Hall Institute)</i>
<b>WST</b>	<i>Working Solution</i>
<b>WST-1</b>	<i>2-(4-Iodophenyl)- 3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt</i>
<b>WT</b>	<i>Wild type mice</i>
<b>x<sup>2</sup></b>	<i>chi-square test</i>
<b>XO</b>	<i>Xanthine oxidase</i>
<b>Ydj1 (Ydj-1)</b>	<i>Yeast DnaJ gene</i>
<b>Ydj1p</b>	<i>Yeast DnaJ protein</i>

<b>Zn</b>	<i>Zinc</i>
<b><math>\alpha</math>-Tub</b>	<i><math>\alpha</math>-Tubulin</i>
<b><math>\beta</math>-ME</b>	<i><math>\beta</math>-mercaptoethanol</i>
<b><math>\Delta\psi</math></b>	<i>Mitochondrial transmembrane potential</i>
<b>Κ.Α.</b>	<i>Καρδιακή ανεπάρκεια</i>
<b>Μ.Ο.</b>	<i>Μέσος όρος</i>
<b><math>\mu</math>g</b>	<i>microgram</i>
<b><math>\mu</math>l</b>	<i>microlitre</i>
<b><math>\mu</math>M</b>	<i>micromolar</i>
<b><math>\mu</math>m</b>	<i>micrometres</i>
<b><math>^{\circ}</math> C</b>	<i>Celsius degree</i>
<b><math>\sigma</math>32</b>	<i>E. coli transcription factor sigma 32</i>

