



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

«Μεταγωγή μηχανικού σήματος σε καρκινικά κύτταρα του πνευμονικού επιθηλίου: Μεταβολές στο λιπιδικό προφίλ των κυττάρων και σε ενζυμικές δράσεις του κύκλου της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης»

ΝΤΟΡΙΑΝ ΜΥΡΤΑΪ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

«Μεταγωγή μηχανικού σήματος σε καρκινικά κύτταρα του πνευμονικού επιθηλίου: Μεταβολές στο λιπιδικό προφίλ των κυττάρων και σε ενζυμικές δράσεις του κύκλου της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης»

ΝΤΟΡΙΑΝ ΜΥΡΤΑΪ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, στο Τμήμα Χημείας, εργαστήριο Βιοχημείας, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κας Μαρίας Ελένης Λέκκα. Θερμές ευχαριστίες οφείλονται στον Αναπληρωτή Καθηγητή, του τομέα Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κο Λεονταρίτη Γεώργιο για την συνεισφορά του στη μελέτη των ενζυμικών δράσεων της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης.

Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτερες ευχαριστίες μου στην κα Μαρία Ελένη Λέκκα για την καθοδήγηση, την επιστημονική υποστήριξη και την επιμονή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Η συνεισφορά της ήταν ανεκτίμητη και καθοριστική για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Κώστα Τσαρχόπουλο για την πολύτιμη υποστήριξη και καθοδήγησή του. Μέσα από τη συνεργασία και τη μαθητεία δίπλα του, είχα την ευκαιρία να αποκτήσω ουσιαστική τεχνογνωσία στη λειτουργία και αξιοποίηση των συστημάτων LC-MS και LC-MS/MS, καθώς και εξειδικευμένες γνώσεις στη χρήση και διαχείριση σχετικών λογισμικών ανάλυσης δεδομένων. Η συμβολή του υπήρξε καθοριστική.

Ευχαριστώ επίσης τους πολύτιμους συνεργάτες και φίλους μου, την Ελένη Παπά και τον Στέλιο Παπαδόπουλο, για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και την αμέριστη βοήθειά τους σε όλα τα επίπεδα. Η υποστήριξή τους και η φιλία τους ήταν πηγή δύναμης καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της πορείας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζω στον φίλο, συνάδελφο και συνεργάτη Θανάση Καρκαμπούνα για τις αμέτρητες ώρες επικοινωνητικής κουβέντας στον χώρο που φιλοξενείται η "μάζα". Η συμβολή του ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω επίσης στην οικογένειά μου για την αμέριστη στήριξή τους, στις αδερφές μου, τις αδελφικές φίλες μου Τασιούλα Γεωργία και Βικτώρια Μπαλαμάτσια, τους νονούς μου Βασιλική Μάστακα και Παναγιώτη Τασιούλα για την πολύτιμη ενθάρρυνση και υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της διαδρομής.

Τέλος, ευχαριστώ όλους όσους συνέβαλαν, άμεσα ή έμμεσα, στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Η συνδρομή και η υποστήριξή τους υπήρξαν καθοριστικές.

Αφιερωμένο στην Μυρτώ

ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα εργασία εστιάσαμε κυρίως στη διερεύνηση της επίδρασης της μεταγωγής στατικού μηχανικού σήματος στον κύκλο της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης και στη συμπεριφορά των μείζονων μεμβρανικών φωσφολιπιδίων, δηλαδή της φωσφατιδυλοχολίνης, φωσφατιδυλαιθανολαμίνης και φωσφατιδυλοσερίνης σε καρκινικά κύτταρα του πνευμονικού επιθηλίου A₅₄₉.

Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκαν μεταβολές στις ενζυμικές δράσεις που εμπλέκονται στον κύκλο της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης συναρτήσει του χρόνου σε συνθήκες στατικής μηχανικής διάτασης. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν η κινάση PI3K και η φωσφατάση PTEN, καθώς και ο πιθανός μηχανισμός της δράσης του μηχανικού σήματος διάτασης (stretch), στην έκφραση του ενζύμου pAKT, σε επίπεδο πρωτεΐνης παρουσία αναστολέα p115 (SH-PTEN) και bcrV (phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor). Επιπλέον, με την τεχνική LC/MS και LC-MS/MS μελετήθηκε η συμπεριφορά κάποιων φωσφολιπιδίων της χολίνης, της αιθανολαμίνης και της σερίνης που εμπλέκονται σε μηχανισμούς απόκρισης στα μηχανικά ερεθίσματα. Χρησιμοποιήθηκαν οι αναλυτές μάζας orbitrap για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό τους και τριπλό τετράπολο (QQQ) για την ποσοτικοποίηση τους. Παράλληλα, στο πλαίσιο της μη στοχευμένης λιπιδιομικής προσέγγισης, πραγματοποιήθηκε *in silico* θραυσματοποίηση για την περαιτέρω υποστήριξη της ταυτοποίησης των λιπιδικών μορίων. Δημιουργήθηκε και αξιοποιήθηκε προσαρμοσμένη βάση δεδομένων, η οποία περιλάμβανε θεωρητικά φάσματα θραυσματοποίησης και δομικές πληροφορίες των γλυκεροφωσφολιπιδίων, ενισχύοντας την αξιοπιστία της αναγνώρισης. Η αντιστοίχιση των πειραματικών φασμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω σύγκρισης με φασματικές βιβλιοθήκες που αναπτύχθηκαν ειδικά για το παρόν διπλωματικό. Τέλος, με την βοήθεια της λιπιδιομικής ανάλυσης, βρέθηκαν λιπίδια που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς την απόκριση του κυττάρου υπό συνθήκες μηχανικής διάτασης.

Τα αποτελέσματα των χημικών και βιολογικών πειραμάτων της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι ο κύκλος της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης κινητοποιείται άμεσα κατά την εφαρμογή στατικής μηχανικής διάτασης. Η μεταγωγή του σήματος αυτού επηρεάζει την οδό PI3K/Akt και η απόκριση του κυττάρου ολοκληρώνεται με αλλαγές, όπως την αύξηση του ρυθμού βιοσύνθεσης των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων.

ΜΕΡΟΣ Α	14
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
A.1 Μεταγωγή μηχανικού σήματος.....	15
A.2 Ο κυτταροσκελετός και η δυναμική του.....	16
A.2.1 Ο ρόλος του κυτταροσκελετού στις ασθένειες	20
A.3 Μεταγωγή Μηχανικού Σήματος	21
A.3.1 Βασικές αρχές της μεταγωγής μηχανικού σήματος (mechanotransduction)	22
A.3.1.1 Μηχανοϋποδοχείς (mechanoreceptors)	22
A.3.1.2 Ιντεγκρίνες	23
A.3.1.3 Μηχανοεξαρτώμενοι Δίαυλοι Ιόντων.....	24
A.3.1.4 Υποδοχείς GPCR	25
A.4 Σηματοδότηση	26
A.5 Φωσφολιπίδια	29
A.5.1 Φωσφατιδυλοχολίνη (PC).....	30
A.5.1.1 Βιοσύνθεση της φωσφατιδυλοχολίνης	31
A.5.1.2 Βιολογικός ρόλος	32
A.5.2 Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE)	33
A.5.2.1 Βιοσύνθεση της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης	33
A.5.2.2 Βιολογικός ρόλος της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης	35
A.5.3 Φωσφοϊνοσιτιδία (PIs).....	37
A.5.3.1 3-φωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns3P) ⁴¹	39
A.5.3.2 4-φωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns4P) ⁴²	40
A.5.3.3 5-φωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns5P) ⁵⁹	40
A.5.3.4 3,4-Διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns(3,4)P ₂)	41
A.5.3.5 3,5-Διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη PtdIns(3,5)P ₂ ⁶⁴	42
A.5.3.6 4,5-Διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns(4,5)P ₂) ³⁹	42
A.5.3.7 3,4,5-Τριφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns(3,4,5)P ₃) ⁴⁰	43
A.5.4 Μηχανισμός κυτταρικής σηματοδότησης των φωσφοϊνοσιτιδίων	44
A.5.5 Ο ρόλος των φωσφοϊνοσιτιδίων στην μεταγωγή σήματος.	45
A.6 Η σηματοδοτική οδός της PI3K/Akt.....	46
A.6.1 Το ένζυμο 3-Κινάση των φωσφοϊνοσιτιδίων (PI3K).....	48
A.6.2 Ενεργοποίηση της μεταβολικής οδού PI3K/Akt	48
A.6.3 Ρύθμιση της σηματοδοτικής οδού PI3K/Akt.....	50
A.6.4 Η Βιοχημική οδός PIP2-PIP3	50

A.6.5	Δράσεις της σηματοδοτικής οδού PI3K/Akt	50
A.6.6	Αναστολείς της σηματοδοτικής οδού PI3K/Akt.....	51
A.6.7	Φάρμακευτικοί αναστολείς της PI3K	52
A.6.7.1	Αναστολείς της σηματοδοτικής οδού PI3K/mTOR	52
A.6.7.2	Αναστολείς της μεταβολικής οδού: Pan-PI3K.....	52
A.6.7.3	Αναστολείς που στοχεύουν στις ισομορφές της PI3K	53
A.6.8	Η ομόλογη πρωτεΐνη PTEN φωσφατάσης και τενσίνης.....	53
A.6.9	Δομή της PTEN	55
A.6.10	Βιολογική δράση της PTEN	55
A.6.11	Φάρμακα-Αναστολείς της PTEN.....	56
A.7	Ο πνεύμονας.....	56
A.8	Επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα	57
A.9	Επιφανειοδραστική ουσία: Σύνθεση και έκκριση	58
A.10	Τεχνικές Μηχανικής Διέγερσης Πνευμονοκυττάρων.....	59
A.11	Μεταγωγή μηχανικού σήματος στον πνεύμονα.....	62
A.12	Επίδραση κυκλικής μηχανικής διάτασης (Cyclic Stretch) στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα	62
A.12.1	Η κυκλική μηχανική διάταση (cyclic stretch) στα πνευμονικά κύτταρα	63
A.12.2	Επίδραση της κυκλικής μηχανικής διάτασης (κυκλικό stretch) στις βιοχημικές οδούς σηματοδότησης.....	64
A.13	Επίδραση του κυκλικού stretch στην παραγωγή της διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνης (DPPC).....	67
A.13.1	Η εφαρμογή της μηχανικής διάτασης στην επιφανειοδραστική ουσία	68
A.14	Μελέτη λιπιδίων με αναλυτικές τεχνικές.....	70
A.14.1	Φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry).....	70
A.14.1.1	Οργανολογία	71
A.14.1.2	Πηγή ιόντων-Τεχνικές ιοντισμού.....	72
A.14.1.3	Βασική αρχή της τεχνικής MALDI-MS.....	76
A.14.1.4	Μηχανισμός ιοντισμού στην τεχνική MALDI.....	77
A.14.1.5	Η τεχνική MALDI	80
A.14.2	Αναλυτές μάζας (Mass Analyzers)	80
A.14.2.1	Αναλυτές μαγνητικού πεδίου (magnetic sector mass filter).....	81
A.14.2.2	Αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (Time of flight analyzers, TOF).....	82
A.14.2.3	Αναλυτής μαζών τριπλού τετραπόλου (Triple Quadrupole, QqQ).....	82
A.14.2.4	Αναλυτής μαζών τεχνολογίας Orbitrap.....	85

Αρχή λειτουργίας του αναλυτή Orbitrap	85
A.14.3 Συζευγμένη τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) με τη φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry).....	86
A.14.3.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography)	87
A.14.3.2 Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography).....	89
A.15 Ανάλυση λιπιδίων με φασματομετρία μαζών	90
A.15.1 Ανάλυση λιπιδίων με διαχωρισμό – Μελέτη των λιπιδίων με βάση την υγρή χρωματογραφία.....	93
A.15.2 Υποστρώματα στην τεχνική MALDI για λιπίδια	95
ΜΕΡΟΣ Β	97
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	98
B.1 Καλλιέργεια Κυττάρων A ₅₄₉	99
B.1.1 Αντιδραστήρια	99
B.1.2 Υλικά-Συσκευές.....	100
B.1.3 Πειραματική Πορεία	100
B.1.3.1 Απόψυξη-Στρώσιμο Κυττάρων	100
B.1.3.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων (splitting)	101
B.1.3.3 Μέτρηση αριθμού και βιωσιμότητας κυττάρων	101
B.1.3.4 Στρώσιμο κυττάρων σε τρυβλία του χειροκίνητου στατικού Stretcher με κολλαγόνο 102	
B.1.3.5 Στατικό Stretch.....	103
B.1.3.6 Συλλογή κυττάρων με RIPA.....	104
B.1.3.7 Εκχύλιση.....	104
B.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε Πήγμα Πολυακρυλαμιδίου υπό Μετουσιωτικές Συνθήκες (SDS-PAGE)	105
B.2.1 Αρχή Μεθόδου.....	105
B.2.2 Αντιδραστήρια-Υλικά.....	106
B.2.3 Συσκευές	107
B.2.4 Διαλύματα Εργασίας.....	107
B.2.5 Πειραματική πορεία	108
B.2.5.1 Παρασκευή πήγματος διαδρομής (Resolving ή Separating Gel).....	108
B.2.5.2 Παρασκευή πήγματος επιστοίβαξης (Stacking Gel)	109
B.2.5.3 Προετοιμασία και τοποθέτηση των δειγμάτων	110
B.2.5.4 Χρώση πρωτεϊνών του πήγματος	110
B.2.5.5 Αποχρωματισμός του πήγματος.....	110

B.2.5.6	Στέγνωμα και μονιμοποίηση του πηγματος.....	111
B.3	Διαχωρισμός πρωτεϊνών εκχυλίσματος κυττάρων A ₅₄₉ και ανίχνευση της pAktSer437 με ανοσοαποτύπωση	111
B.3.1	Εισαγωγή	111
B.3.2	Ανίχνευση της pAktSer437 με ανοσοαποτύπωση	112
B.3.2.1	Αρχή Μεθόδου.....	112
B.3.3	Πειραματική πορεία.....	113
B.3.3.1	Υλικά – συσκευές.....	113
B.3.3.2	Διαλύματα.....	114
B.3.3.3	Αντισώματα.....	114
B.4	Ηλεκτρομεταφορά Πρωτεϊνών	114
B.4.1	Πειραματική πορεία	115
B.5	Ανοσοχημικές μέθοδοι.....	117
B.5.1	Πειραματική πορεία.....	118
B.6	Εμφάνιση Πρωτεϊνών	118
B.6.1	Πειραματική πορεία	118
B.6.2	Έλεγχος ισοφόρτωσης των δειγμάτων.....	118
B.7	Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης κατά Bradford	119
B.7.1	Αρχή Μεθόδου.....	119
B.7.2	Πειραματική Πορεία	120
B.7.2.1	Υλικά.....	120
B.7.2.2	Διαλύματα.....	121
B.7.2.3	Εκτέλεση μεθόδου	121
B.8	Προσδιορισμός Λιπιδικού Φωσφόρου με τη μέθοδο Bartlett	121
B.8.1	Αρχή Μεθόδου.....	122
B.8.2	Υλικά.....	122
B.8.3	Όργανα και σκεύη.....	123
B.8.4	Διαλύματα.....	123
B.8.5	Πειραματική Πορεία	124
B.9	Προσδιορισμός φωσφολιπιδίων με τις τεχνικές LC/MS και LC-MS/MS. 124	
B.9.1	Διάταξη Οργανολογία συστημάτων	124
B.9.1.1	LTQ Orbitrap XL.....	127
B.9.1.2	QTRAP 4500	128
B.9.2	Διαλύτες – Αντιδραστήρια.....	130
B.9.2.1	Αντιδραστήρια Όξινης Εκχύλισης/ Εκχύλισης Blich Dyer	130

B.9.3	Στήλες Χρωματογραφίας	131
B.9.4	Πρότυπες Ενώσεις	132
B.9.5	Υλικά-Συσκευές.....	134
B.9.5.1	Καλλιέργεια κυττάρων A ₅₄₉	134
B.9.5.2	Στατική Μηχανική Διάταση	135
B.9.5.3	Εκχύλιση.....	135
B.9.5.4	Ανάπτυξη Μεθοδολογίας και Βελτιστοποίηση Συνθηκών Ανάλυσης LC-MS και LC-MS/MS.....	135
B.9.6	Πειραματική πορεία	139
B.9.6.1	Καλλιέργεια κυττάρων A ₅₄₉	139
B.9.6.2	Στατική διάταση.....	139
B.9.6.3	Προετοιμασία κυττάρων A ₅₄₉ για εκχύλιση	139
B.9.6.4	Εκχύλιση λιπιδίων.....	139
B.9.6.5	Παραγωγοποίηση	139
ΜΕΡΟΣ Γ.....		140
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....		141
Γ.1	Επίδραση στατικής μηχανικής διάτασης σε κύτταρα A ₅₄₉ και ο ρόλος του κύκλου των φωσφοϊνοσιτιδίων στην φωσφορυλίωση της Akt	141
Γ.1.1	Συνθήκες εκτέλεσης πειραμάτων για την εφαρμογή στατικού stretch..	143
Γ.2	Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης κατά Bradford	146
Γ.3	Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου κατά Bartlett.....	147
Γ.4	Στατιστική Ανάλυση.....	147
Γ.5	Ανοσοαποτύπωση της pAkt ^{Ser473}	148
Γ.5.1	Ανάλυση αποτελεσμάτων της επίδρασης της στατικής μηχανικής διάτασης στην φωσφορυλίωση της Akt σε συνδυασμό με τη χρήση pictilisib, εκλεκτικό αναστολέα της PI3K	148
Γ.5.2	Ανάλυση αποτελεσμάτων της επίδρασης της στατικής μηχανικής διάτασης στην φωσφορυλίωση της Akt σε συνδυασμό με τη χρήση bpV(phen), αναστολέα της PTEN	152
Γ.6	Συγκεντρωτική διερεύνηση του ρόλου αναστολής σε τρεις χρόνους μηχανικής διάτασης.....	156
Γ.7	Συγκεντρωτική διερεύνηση του ρόλου της μηχανικής διάτασης σε συνθήκες αναστολής και μη	157
Γ.8	<i>In silico</i> θραυσματοποίηση / Βάση δεδομένων / Βιβλιοθήκες	159
Γ.8.1	Θεωρητικό υπόβαθρο και βιβλιογραφική ανασκόπηση	159
Γ.8.2	<i>In silico</i> Φασματικές Βιβλιοθήκες	161
Γ.8.2.1	Δομική αναπαράσταση και βάση δεδομένων.....	161

Γ.8.2.2	Μετατροπή της βάσης δεδομένων σε <i>in silico</i> MS/MS βιβλιοθήκη.....	162
Γ.8.3	Αναλυτική περιγραφή της παραγωγοποίησης και ενσωμάτωσή στην <i>in silico</i> βάση.....	164
Γ.8.4	Ανάπτυξη κανόνων θραυσματοποίησης για παραγωγοποιημένα γλυκεροφωσφολιπίδια	166
Γ.8.5	Διαγνωστικά ιόντα	169
Γ.8.6	Δημιουργία και διαχείριση της φασματικής βιβλιοθήκης	172
Γ.8.7	Μορφή και δομή αρχείων MSP για <i>in silico</i> MS/MS βιβλιοθήκες	175
Γ.8.7.1	Περιγραφή φάσματος MS/MS.....	176
Γ.8.7.2	Πλεονεκτήματα του MSP format για <i>in silico</i> βιβλιοθήκες	177
Γ.9	Ανάλυση δεδομένων με το Compound Discoverer 3.5	178
Γ.9.1	Λογισμικά και υπολογιστικά εργαλεία	178
Γ.9.2	Επεξεργασία δεδομένων με το Compound Discoverer 3.5	178
Γ.9.2.1	Μετατροπή φασματικών βιβλιοθηκών (NIST → MSP → mzVault → DB) 181	
Γ.9.2.2	Μετατροπή δομικών πληροφοριών σε SDF αρχείο	182
Γ.9.2.3	Εισαγωγή και διαχείριση βάσης δεδομένων στο Mass List	185
Γ.9.2.4	Δημιουργία και παραμετροποίηση workflow tree	186
Γ.9.3	Αλγόριθμος CD - Workflow tree	186
Γ.9.3.1	Σχολιασμός και ταυτοποίηση ενώσεων	188
Γ.9.3.2	Πειραματικός σχεδιασμός και Study Factors	189
Γ.9.3.3	Σχόλιο.....	189
Γ.10	Αποτελέσματα LC-HRMS (LTQ Orbitrap XL)	189
Γ.10.1	Αποτελέσματα απο LC-HRMS σε λειτουργία Full Scan – MS ¹	192
Γ.10.1.1	Πρότυπο φωσφατιδυλοσερίνης 12:0-12:0-PS-2Me	192
Γ.10.1.2	Πρότυπο φωσφατιδυλοχολίνης 17:0-14:1-PC-Me	193
Γ.10.1.3	Πρότυπο φωσφατιδυλαιθανολαμίνης 17:0-14:1-PE-Me	195
Γ.10.2	Ταυτοποίηση γλυκεροφωσφολιπιδίων πραγματικών δειγμάτων.....	197
Γ.10.2.1	PC-Me 16:0-16:0	197
Γ.10.2.2	PC-Me 18:0-18:1	199
Γ.10.3	Χρόνος κατακράτησης.....	200
Γ.11	Ταυτοποιημένα Γλυκεροφωσφολιπίδια με το Compound Discoverer	201
Γ.11.1	Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA).....	205
Γ.11.2	Αποτελέσματα από την περιγραφική στατιστική (Boxplots)	206
Γ.12	Αποτελέσματα απο LC-MSMS	208
Γ.12.1	Καμπύλες αναφοράς	208

Γ.12.2	Extracted Ion Chromatogram – MRM.....	209
Γ.12.3	Ποσοτικοποίηση 10 ειδών PC	213
Γ.12.4	Ποσοτικοποίηση 10 ειδών PE.....	214
Γ.13	Συμβολή της <i>in silico</i> προσέγγισης.....	216
ΜΕΡΟΣ Δ.....		217
Δ.	Συμπεράσματα	218
ΜΕΡΟΣ Ε.....		221
Ε.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	222

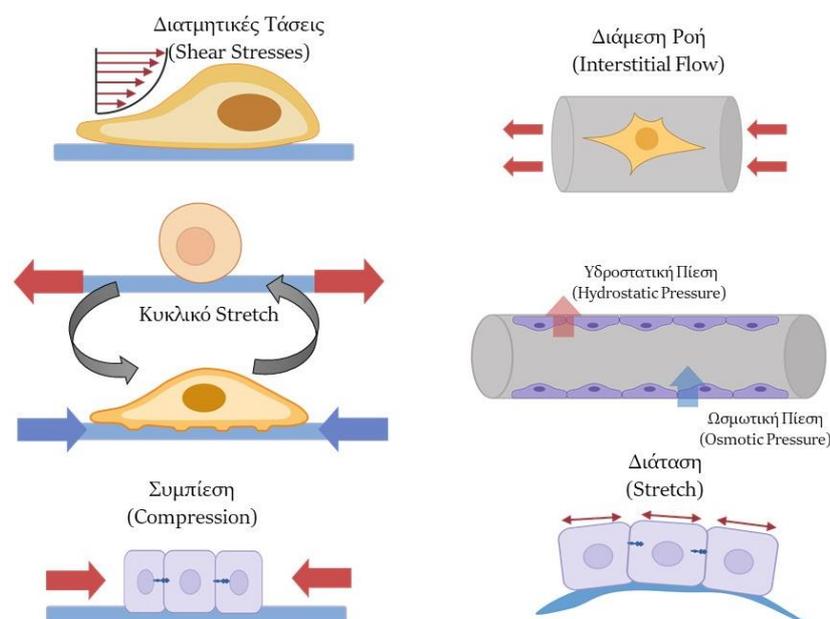
ΜΕΡΟΣ Α
ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΒΑΣΗ
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 Μεταγωγή μηχανικού σήματος

Το κύτταρο αποτελεί τη βασική δομική και λειτουργική μονάδα όλων των μορφών ζωής. Όλες οι κυτταρικές λειτουργίες είναι ελεγχόμενες από σήματα που προέρχονται από το ίδιο το κύτταρο, το εξωκυττάριο περιβάλλον αλλά και από γειτονικά ή μη κύτταρα. Αυτά τα σήματα μπορεί να είναι βιοχημικά, ηλεκτρικά ή μηχανικά, όπως είναι η περίπτωση που μελετάται στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία. Τροφοδοτώντας τα κύτταρα με σήματα, εκείνα αποκρίνονται και με αυτόν τον τρόπο μπορούν να μελετηθούν. Η μηχανική διέγερση μπορεί να χρησιμοποιηθεί, για παράδειγμα, στην προσομοίωση των συνθηκών μιας ασθένειας ή στη μελέτη της μεταγωγής μηχανικού σήματος.¹

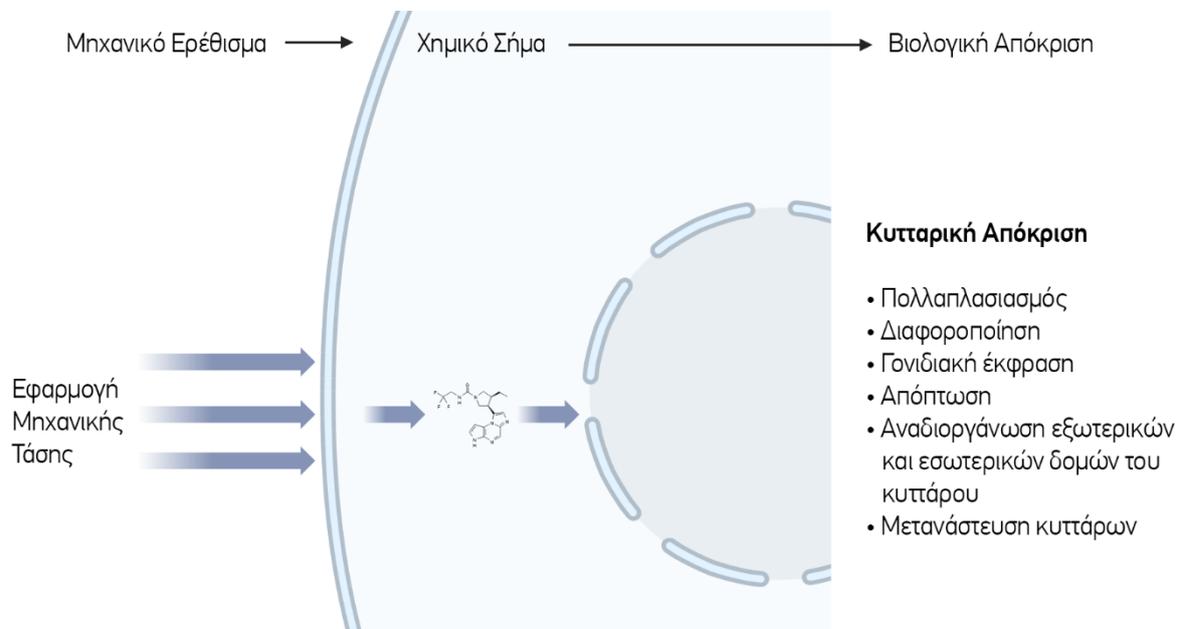
Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μηχανικών συσκευών, σχεδιασμένες να διεγείρουν τα κύτταρα με διαφορετικά είδη μηχανικών δυνάμεων όπως είναι η διατμητική τάση (shear stress), η οσμωτική πίεση (osmotic pressure), η υδροστατική πίεση (hydrostatic pressure), η διάμεση ροή (interstitial flow), η συμπίεση (compression) και η διάταση (stretch), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Το μέγεθος των συσκευών κυμαίνεται από το χειρισμό ενός κυττάρου έως τη διέγερση μεγάλων κυτταρικών πληθυσμών. Πολλές από αυτές τις συσκευές είναι ειδικά κατασκευασμένες από ερευνητικές ομάδες, αλλά υπάρχουν και άλλες οι οποίες διατίθενται εμπορικά (STREX Cell, CellScale και FlexCell).



Εικόνα 1: Τύποι μηχανικών δυνάμεων που υφίστανται τα κύτταρα.²

Τις τελευταίες δεκαετίες οι μηχανικές δυνάμεις έχουν μελετηθεί για τον καθοριστικό ρόλο που έχουν στην ανάπτυξη και τη διαμόρφωση των οργανισμών. Βασικό αντικείμενο των ερευνών ήταν η μεγάλη σημασία των γονιδίων και των χημικών παραγόντων για τον έλεγχο της κυτταρικής λειτουργίας, χωρίς να λαμβάνεται υπόψιν η σημασία της μηχανικής στην κυτταρική συμπεριφορά και την κυτταρική απόκριση. Ωστόσο, την τελευταία δεκαετία έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στον τομέα της μηχανοβιολογίας. Οι ανάγκες για βαθύτερη κατανόηση οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων τεχνικών για την ανάλυση των πρωτεϊνών και γονιδίων, εφαρμογών βιοπληροφορικής και νέων μεθόδων απεικόνισης. Η ανακάλυψη όλων αυτών των δυνατοτήτων αποκάλυψαν τις αρχές πάνω στις οποίες βασίζονται τα φαινόμενα μηχανικής ρύθμισης και ευαισθησίας των κυττάρων.

Σε κυτταρικό επίπεδο, οι μηχανικές δυνάμεις επηρεάζουν πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η γονιδιακή έκφραση, η απόπτωση, η μετανάστευση και η αναδιοργάνωση εξωτερικών-εσωτερικών δομών του κυττάρου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. Επιπλέον, τα ίδια τα κύτταρα ασκούν δυνάμεις στο περιβάλλον τους μέσω των μεγαλομορίων που βρίσκονται προσκολλημένα σε αυτά. Τα μόρια αυτά λειτουργούν ως ανιχνευτές και αισθάνονται τα μηχανικά ερεθίσματα και τις δυνάμεις που δέχονται από το περιβάλλον τους με αποτέλεσμα να μεταβάλλουν το σχήμα, την κίνηση, τη δομή, ακόμη και την ανάπτυξή τους.



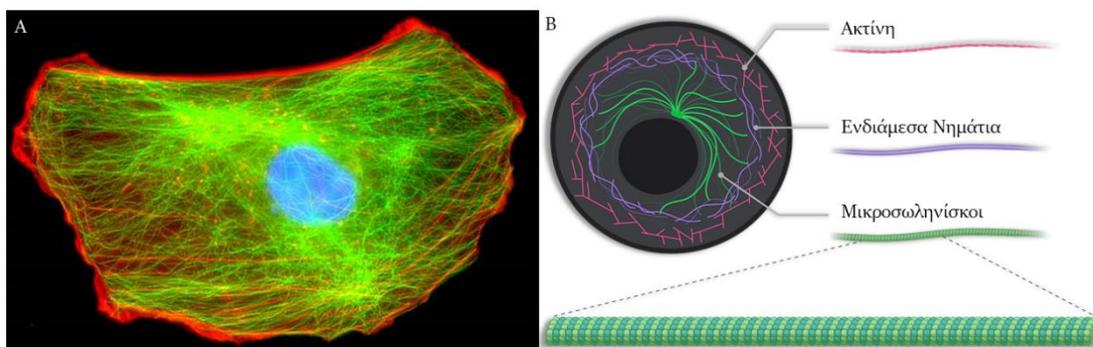
Εικόνα 2: Εφαρμογή μηχανικής δύναμης και κυτταρική απόκριση. Η μηχανική δύναμη μεταφράζεται διαμέσου των χημικών μορίων και αποκρίνεται μέσω κάποιου βιολογικού φαινομένου.

A.2 Ο κυτταροσκελετός και η δυναμική του

Η μεταγωγή μηχανικού σήματος είναι μια βιολογική διαδικασία πολλαπλών σταδίων με την οποία τα κύτταρα αισθάνονται και αποκρίνονται στα μηχανικά ερεθίσματα. Το κύτταρο για να αποκριθεί στο ερέθισμα μετατρέπει τη μηχανική διέγερση σε βιοχημικά σήματα. Η βιολογική απόκριση του κυττάρου στα εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια μηχανικά ερεθίσματα εξασφαλίζεται από τη ρύθμιση της έντασης του κυτταροσκελετού.

Ο κυτταροσκελετός αποτελεί βασικό δομικό στοιχείο όλων των κυττάρων. Αυτό το δίκτυο είναι πολυλειτουργικό και παρέχει δομική υποστήριξη στο κύτταρο, χώρο για τη διεκπεραίωση αρκετών μηχανισμών μεταφοράς και ένα σύστημα παραγωγής και μεταγωγής της μηχανικής δύναμης. Ο κυτταροσκελετός διατηρεί την κυτταρική οργάνωση, συνδέοντας μεταξύ τους πολλά κυτταρικά συστατικά, μεσολαβεί στην επικοινωνία σε ολόκληρο το κύτταρο και επομένως έχει τεράστιο αντίκτυπο στις κυτταρικές λειτουργίες. Βασικός ρόλος του κυτταροσκελετού είναι να αντέχει στο μεγάλο αριθμό των εξωτερικών και εσωτερικών δυνάμεων που δρουν στο κύτταρο.

Ο κυτταροσκελετός, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3, αποτελείται από τρία βασικά συστατικά: **(1)** τα μικρονημάτια, **(2)** τους μικροσωληνίσκους και **(3)** τα ενδιάμεσα νημάτια :



Εικόνα 3: *A: Απεικόνιση των ινοβλαστών ποντικού που δείχνουν τους μικροσωληνίσκους (πράσινο) και το κυτταροσκελετό ακτίνης (κόκκινο) με μικροσκοπία φθορισμού.² B: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του κυτταροσκελετού.*

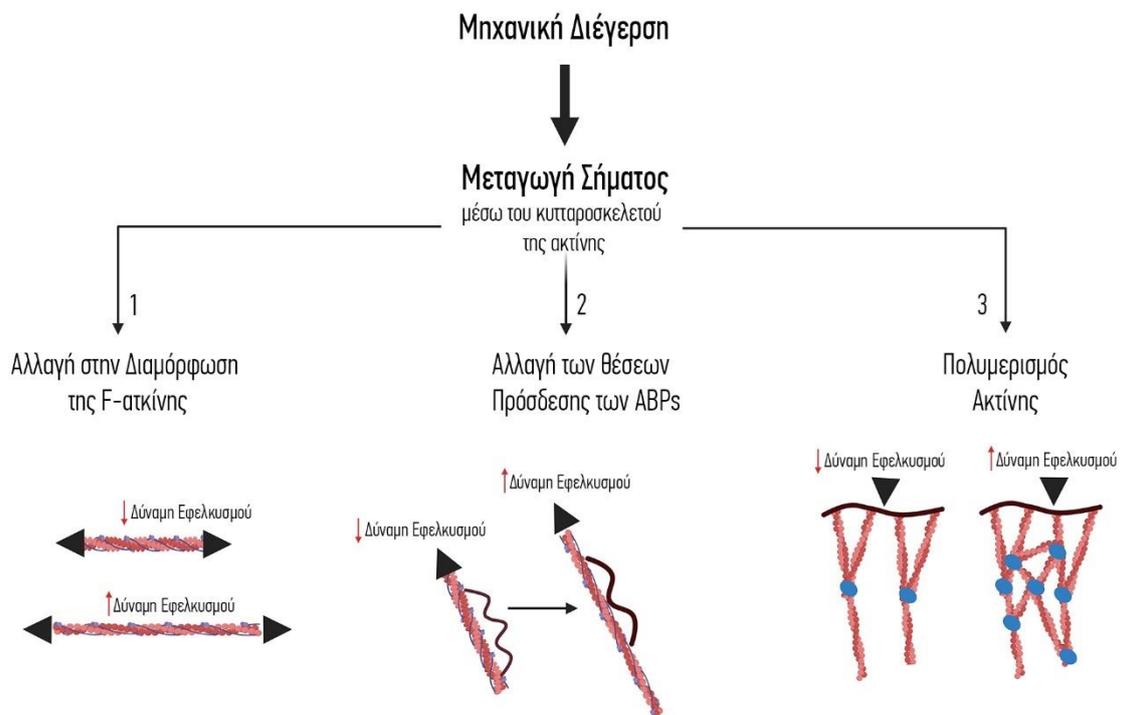
(1) Τα μικρονημάτια είναι πολυμερή ακτίνης πλάτους περίπου 7nm. Σχηματίζουν ένα εκτεταμένο δίκτυο σε ολόκληρο το κύτταρο και αποτελούνται κυρίως από την πρωτεΐνη ακτίνη, που υπάρχει σε αφθονία στα κύτταρα. Τα μικρονημάτια πιστεύεται ότι παρέχουν σημαντικές συστατικές δυνάμεις στο κύτταρο και βοηθούν στην κινητικότητα του. Έχουν πολύ υψηλή αντοχή στη μηχανική διάταση, ωστόσο οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν την ακτίνη μειώνουν αυτή τη μηχανική διάταση και επιτρέπουν την κάμψη. Τα μικρονημάτια λειτουργούν ως κύριος μεταφορέας του σήματος από το εξωτερικό περιβάλλον προς το εσωτερικό του κυττάρου.

(2) Οι μικροσωληνίσκοι (Microtubules, MTs) αποτελούν το μεγαλύτερο στοιχείο του κυτταροσκελετού, με πλάτος περίπου 20-25 nm και είναι μεγαλύτεροι από τα μικρονημάτια.³ Οι μικροσωληνίσκοι σχηματίζονται μέσω της πλευρικής σύνδεσης μεταξύ 12 και 17 πρωτεΐνονηματίων τουμπουλίνης, τα οποία σχηματίζουν μια πολύ άκαμπτη δομή του νηματίου. Οι μικροσωληνίσκοι είναι επίσης εξαιρετικά δυναμικοί και υποβάλλονται σε γρήγορους κύκλους πολυμερισμού και αποπολυμερισμού. Οι μικροσωληνίσκοι προέρχονται από ένα κέντρο οργάνωσης μικροσωληνίσκων (mTOC) όπου το ένα άκρο τους είναι ενσωματωμένο και το άλλο άκρο τους αναπτύσσεται προς την περιφέρεια του κυττάρου.³

(3) Τα ενδιάμεσα νημάτια (Intermediate Filaments, IFs) είναι το τρίτο βασικό συστατικό του κυτταροσκελετού και αντιπροσωπεύουν μια μεγαλύτερη ομάδα νηματίων που έχουν δομικές και λειτουργικές ομοιότητες. Έχουν περιγραφεί πέντε διαφορετικοί τύποι αυτών των νηματίων και παρόλο που κάθε τύπος αποτελείται από διαφορετικές μονομερείς πρωτεΐνες, ο μηχανισμός συναρμολόγησής τους είναι όμοιος και παράγει νημάτια πλάτους περίπου 10 nm. Σε αυτά τα νημάτια μπορούν να ενσωματωθούν έως και 50 διαφορετικές πρωτεΐνες. Αυτά τα νημάτια σχηματίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο όχι μόνο στο κυτταρόπλασμα αλλά και στον πυρήνα με τη μορφή ελασμάτων. Είναι εξαιρετικά εύκαμπτα, αλλά πολύ πιο σταθερά τόσο από τα μικρονημάτια όσο και από τους μικροσωληνίσκους. Τα ενδιάμεσα νημάτια δεν έχουν γνωστό ρόλο στην κινητικότητα των κυττάρων, ωστόσο παρέχουν μηχανική σταθερότητα στα κύτταρα στις περιοχές επαφής κυττάρου-κυττάρου.³

Ο κυτταροσκελετός δρα ως το φέρον δίκτυο στα κύτταρα και ως εκ τούτου έχει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή μηχανικών σημάτων. Μπορεί να λειτουργήσει ως γέφυρα μεταξύ του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος και του εσωτερικού του κυττάρου, αλλά μπορεί και να μεταφέρει σήματα με γρήγορο και αποτελεσματικό τρόπο, μέσα από το πλήθος των μορίων σηματοδότησης που συνδέονται με τον κυτταροσκελετό και ενεργοποιούνται από τα μηχανικά ερεθίσματα. Επιπλέον, λόγω της ικανότητας του κυτταροσκελετού να συνδέει τα διάφορα κυτταρικά συστατικά, μπορεί εύκολα να μεταδώσει σήματα μεταξύ διαφόρων διαμερισμάτων όπως το σύστημα Golgi ή τον πυρήνα και τη μεμβράνη. Η παραγωγή εσωτερικών μηχανικών σημάτων προκύπτει συνήθως από την έλξη των πρωτεϊνών της μυοσίνης στα νημάτια ακτίνης. Η επίδραση των εξωτερικών ερεθισμάτων είναι εμφανής στην αύξηση των ινών της ακτίνης που καταπονούνται και στην επανευθυγράμμισή τους όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε διατμητική τάση ή επιστρώνονται σε ορισμένα γεωμετρικά μοτίβα. Στην περίπτωση εντοπισμένων διατμητικών τάσεων, συνήθως υπάρχει μια αύξηση στο δίκτυο του κυτταροσκελετού σε αυτό το σημείο.³

Ο κυτταροσκελετός ακτίνης λειτουργεί ως μηχανικός αισθητήρας. Το ερώτημα είναι, πώς αντιδρά ο κυτταροσκελετός στην εφαρμογή της μηχανικής δύναμης (όπως φαίνεται στην Εικόνα 4). Αρχικά, αποκρίνεται μέσω αναδιαμόρφωσης της ακτίνης, η οποία αποτελείται από μονομερή (G-, globular) και πολυμερή (F-, Filamentous) ακτίνης και πρωτεΐνες προσδένουσας ακτίνης (actin binding proteins, ABPs). Τα ABPs οργανώνουν την F-ακτίνη ώστε να λαμβάνει πληθώρα διαφορετικών δομών, όπως οι πτυχωτές προεκτάσεις (lamellipodia), τα ινίδια του στρες (fiber stress), τα ινοπόδια (filopodia) και άλλες μορφές. Αυτές οι δομές εξυπηρετούν εξειδικευμένους ρόλους στην μηχανική απόκριση. Η F-ακτίνη, συνδεδεμένη με πρωτεΐνες εστιακής προσκόλλησης και συνδέσμους, μεταδίδει τα μηχανικά σήματα διαμέσου αυτών και εκείνα, αντίστοιχα, είναι συνδεδεμένα με την εξωκυττάρια μήτρα και άλλα κύτταρα.⁴



Εικόνα 4: Ο κυτταροσκελετός ακτίνης αποκρίνεται στη μεταγωγή μηχανικού σήματος. Τα μηχανικά φορτία επάγουν: 1. Αλλαγή στη διαμόρφωση της F-ακτίνης (αριστερό σχήμα). 2. Αλλαγή στη διαμόρφωση των σημείων πρόσδεσης των ABPs (μεσαίο σχήμα). 3. Μεταβολές στη δυναμική του πολυμερισμού της ακτίνης διαμέσου των ABPs (δεξιό σχήμα).

Η ικανότητα του κυτταροσκελετού να συστέλλεται οφείλεται στην ολίσθηση της F-ακτίνης στην κινητική πρωτεΐνη (motor protein) μυοσίνη II. Η F-ακτίνη και η μυοσίνη II συγκρατούνται μαζί από διασταυρούμενες συνδέσεις πρωτεϊνών (π.χ., α -ακτινίνη, φασίνη, φιλαμίνη) σχηματίζοντας τα ινίδια του στρες. Τα ABPs ρυθμίζουν τη δυναμική του κυτταροσκελετού. Οι παράγοντες πυρήνωσης (Arp2/3, προφιλίνη), οι καλλυπτήριες πρωτεΐνες (capping proteins), οι παράγοντες αποπολυμερισμού της ακτίνης (ADF/κοφιλίνη), οι

πρωτεΐνες σταθεροποίησης και οι παράγοντες σταυροσύνδεσης (crosslinkers) συμβάλλουν στον έλεγχο της αρχιτεκτονικής και των μηχανικών ιδιοτήτων του δικτύου.^{5,6}

Οι δυνάμεις εφελκυσμού που τεντώνουν ένα κύτταρο αυξάνουν αντίστοιχα το μήκος των νημάτων παράλληλα προς την κατεύθυνση της διάτμησης. Υπό αυτές τις συνθήκες, η συγγένεια δέσμευσης της κοφιλίνης μειώνεται και αυτή της μυοσίνης II αυξάνεται.⁷ Αυτή η μηχανικά επαγόμενη αλλαγή στο μήκος της F-ακτίνης και των προσδετών της οδηγεί σε σταθεροποίηση της μορφής της F-ακτίνης που μπορεί πιο εύκολα να σχηματίσει ινίδια του στρες.⁸

Η κύρια διαδικασία με την οποία ο κυτταροσκελετός της ακτίνης σταθεροποιείται με εφαρμογή εφελκυστικής τάσης συνίσταται στην αναστολή της δραστηριότητας της κοφιλίνης. Όταν είναι ενεργή σε αποφωσφορυλιωμένη μορφή, η κοφιλίνη αποσπά νημάτια F-ακτίνης και εκθέτει το «αγκαθωτό» άκρο, στο οποίο η πρωτεΐνη μπορεί να αποπολυμεριστεί (G-ακτίνη). Αυτό το γεγονός μειώνει την προκαλούμενη τάση στα κύτταρα. Αντίθετα, κατά τη μηχανική διέγερση, η κοφιλίνη φωσφορυλιώνεται συνεχώς από τη LIMK, μια κινάση που ενεργοποιείται από την οδό Rho/ROCK.⁷

Μεταβολές που προκαλούνται από τάση στη δομή της ακτίνης επηρεάζουν επίσης τη δέσμευση των πρωτεϊνών πυρήνωσης. Οι μηχανικά επαγόμενες αλλαγές στα νημάτια της ακτίνης μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση. Καθώς σχηματίζονται περισσότερα ινίδια του στρες κατά τη μηχανική διέγερση, ο μεταγραφικός παράγοντας YAP μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου και ενεργοποιείται. Το YAP είναι αναπόσπαστο στη σηματοδότηση Hippo και μεσολαβεί στην αυξημένη έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Έτσι, η απόκριση του κυτταροσκελετού ακτίνης στις εξωκυτταρικές μηχανικές δυνάμεις μπορεί να οδηγήσει σε διεργασίες που έχουν τόσο φυσιολογική όσο και παθοφυσιολογική σημασία.^{9,10}

A.2.1 Ο ρόλος του κυτταροσκελετού στις ασθένειες

Ο κυτταροσκελετός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές λειτουργίες, και αυτό σχετίζεται άμεσα με μια μεγάλη ποικιλία ασθενειών. Ορισμένες γενετικές μεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσουν σε έναν αδύναμο κυτταροσκελετό που δεν είναι σε θέση να παρέχει επαρκή υποστήριξη στο κύτταρο. Για παράδειγμα, μια μετάλλαξη στην πυρηνική πρωτεΐνη λαμίνη A προκαλεί το σχηματισμό της πρωτεΐνης προγερίνης, η οποία σχετίζεται με μια ασθένεια γνωστή ως προγηρία, στην οποία τα κύτταρα έχουν αδύναμο πυρήνα λόγω ελαττωμάτων στον πυρηνικό σκελετό. Τα ελαττώματα στη μιτωτική άτρακτο συνδέονται με

χρωμοσωμική αστάθεια και στη συνέχεια συνδέονται με όγκους. Η αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης συνδέεται επίσης στενά με τους καρκίνους καθώς τα κύτταρα αναπτύσσονται σε πολυσύχναστα περιβάλλοντα με περιορισμένη παροχή θρεπτικών συστατικών.¹¹ Από την άλλη, η διαταραχή της λειτουργίας των μικροσωληνίσκων έχει συνδεθεί με νευροεκφυλιστικές ασθένειες και μυοπάθειες, κυρίως λόγω της ελλειπούς μεταφοράς θρεπτικών ουσιών σε συναπτικές διασταυρώσεις. Αντίθετα, ένας δυσλειτουργικός κυτταροσκελετός ακτίνης, συνδέεται συχνά με μυϊκά ελάσματα. Σε αυτή την περίπτωση οι καρδιακοί μύες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι καθώς η δραστηριότητά τους βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη συστολή που καθοδηγείται από την ακτομυοσίνη.¹²

Μικροοργανισμοί όπως τα βακτήρια μπορούν επίσης να εκμεταλλευτούν τον κυτταροσκελετό του κυττάρου ξενιστή και να βελτιώσουν την πιθανότητα μόλυνσης. Τα εντεροπαθογόνα βακτήρια όπως η *Escherichia coli* επάγουν τον πολυμερισμό της ακτίνης και το σχηματισμό τμημάτων τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιούν για να προσκολληθούν στο κύτταρο.¹³ Άλλα βακτήρια όπως η *Listeria monocytogenes* χρησιμοποιούν τις ουρές της ακτίνης για να προωθηθούν μέσα στα κύτταρα ξενιστές.¹⁴ Σε άλλο παράδειγμα, το βακτήριο *Clostridium difficile* εκκρίνει τοξίνες που προκαλούν αναδιοργάνωση της ακτίνης, βοηθώντας έτσι τα βακτήρια στην κυτταρική εισβολή.¹⁵ Παρομοίως, ο σχηματισμός και η λειτουργία μικροσωληνίσκων μπορούν επίσης να ρυθμιστούν από μικροοργανισμούς όπως είναι οι *Campylobacter jejuni* και *Escherichia coli*, καθώς ο αποπολυμερισμός των μικροσωληνίσκων θα εμπόδιζε διαφορετικά την είσοδό τους. Ο ιός HIV είναι επίσης γνωστό ότι διαταράσσει το δίκτυο των μικροσωληνίσκων στα κύτταρα και η κινητική πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων, δυνεΐνη, είναι απαραίτητη για την είσοδο του αδενοϊού στα κύτταρα.¹⁶ Αυτά τα παραδείγματα εξηγούν ότι ο κυτταροσκελετός δε χρησιμοποιείται μόνο από τα κύτταρα για τη λειτουργία τους, αλλά χρησιμοποιείται εκτενώς και από παθογόνους οργανισμούς για να διευκολύνει τις δικές τους λειτουργίες, οδηγώντας στην εμφάνιση και την ανάπτυξη διαφόρων παθογενειών.

A.3 Μεταγωγή Μηχανικού Σήματος

Μέσα απο εκτενείς μελέτες, οι ερευνητές έχουν αποφανθεί ότι η εφαρμογή κάποιας μηχανικής δύναμης σε ένα ζωντανό οργανισμό και κατά συνέπεια κάποιου μηχανικού ερεθίσματος προκαλεί μηχανική και βιολογική απόκριση. Τα κύτταρα είναι εξοπλισμένα με μηχανικούς αισθητήρες, μετατροπείς και μηχανισμούς ενεργοποίησης και μπορούν έτσι να προσαρμοστούν στο μηχανικό τους περιβάλλον. Οι μηχανικές αυτές επιδράσεις είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της φυσιολογίας του κυττάρου ή και, σε κάποιες περιπτώσεις,

καθιστούν τα κύτταρα παθολογικά και μελετούνται σε βάθος μέσω της επιστήμης της Μηχανοβιολογίας.¹⁷

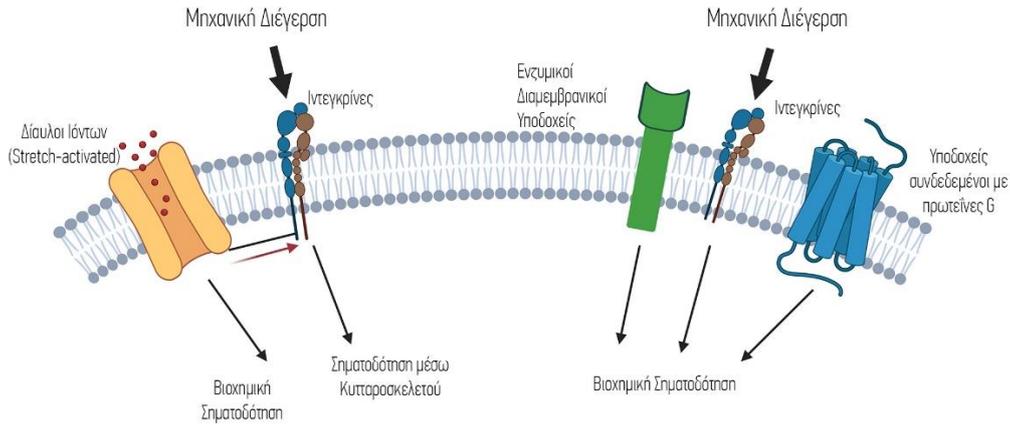
Τα κύτταρα αλληλεπιδρούν συνεχώς με το περιβάλλον τους, το οποίο αποτελείται από την εξωκυττάρια μήτρα (Extra-Cellular Matrix, ECM) και τα γειτονικά κύτταρα. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις, όπως προαναφέρθηκε, παίζουν καθοριστικό ρόλο για τη ζωή του κυττάρου. Ένα σημαντικό μέρος των αλληλεπιδράσεων οφείλεται στη μηχανική σηματοδότηση που μπορεί να δημιουργηθεί από γειτονικά κύτταρα, εξωτερικές δυνάμεις ή και από το ίδιο το κύτταρο. Προκειμένου τα κύτταρα να αποκριθούν στο μηχανικό ερέθισμα, μετατρέπουν αυτό το σήμα σε βιοχημική δραστηριότητα, φαινόμενο το οποίο είναι γνωστό ως μεταγωγή μηχανικού σήματος.

A.3.1 Βασικές αρχές της μεταγωγής μηχανικού σήματος (mechanotransduction)

Τα στοιχεία εκείνα που οδηγούν στη μεταγωγή του σήματος από κάποιο μηχανικό ερέθισμα είναι τα ακόλουθα: οι μηχανοϋποδοχείς (mechanoreceptors), η ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος (signal transduction) και η κυτταρική απόκριση.

A.3.1.1 Μηχανοϋποδοχείς (mechanoreceptors)

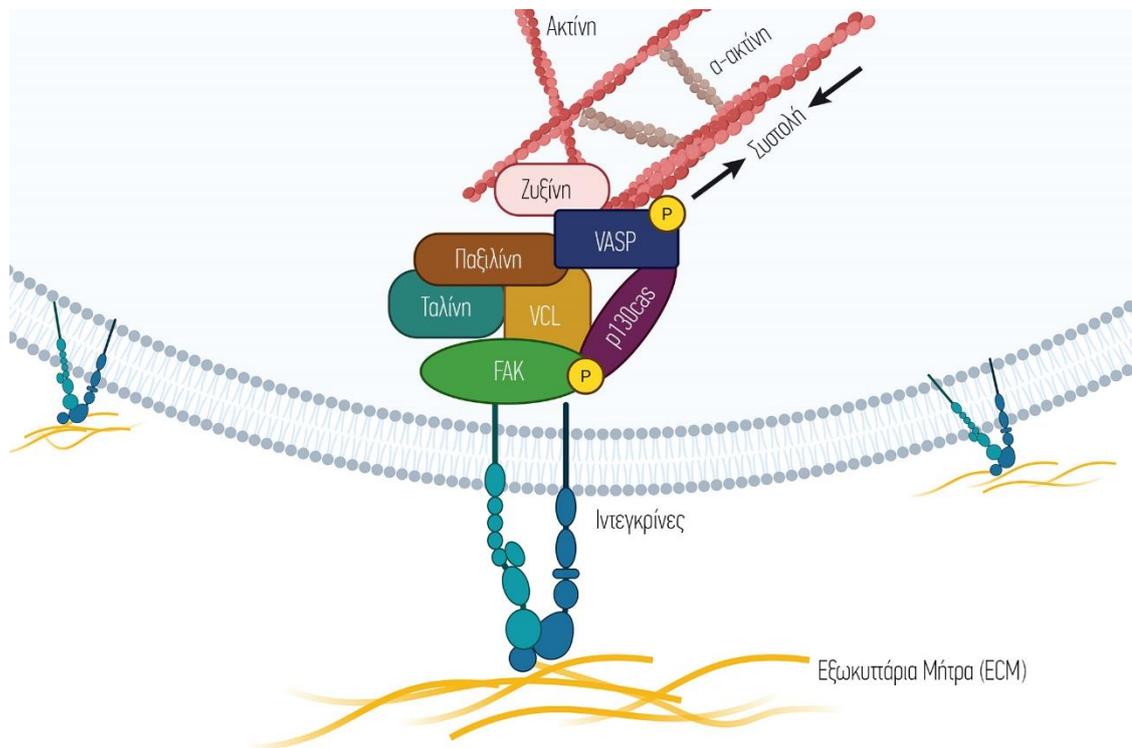
Οι **μηχανοϋποδοχείς (mechanoreceptors)** αλληλεπιδρούν με εξωκυττάρια σήματα και τα μετάγουν από το εξωτερικό προς το εσωτερικό του κυττάρου. Βρίσκονται μέσα στη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, στη συμβολή δηλαδή των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων χώρων. Το κύτταρο εντοπίζει το ερέθισμα και το μεταδίδει από το εξωτερικό προς το εσωτερικό του κυττάρου μέσω κάποια αλλαγής της διαμόρφωσης του μηχανο-υποδοχέα. Σε τέτοιου τύπου μηχανοϋποδοχείς ανήκουν οι ιντεγκρίνες, οι ενεργοποιημένοι διάυλοι ιόντων και άλλοι πρωτεϊνικοί υποδοχείς, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5: Μηχανοϋποδοχείς που συμμετέχουν στη μηχανική διέγερση για την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης.¹⁸

A.3.1.2 Ιντεγκρίνες

Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που συνδέονται με συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας. Παράλληλα, είναι συνδεδεμένες με τον κυτταροσκελετό μέσω πρωτεϊνών προσκόλλησης (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης της ακτίνης με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη ιντεγκρίνη. Οι ιντεγκρίνες είναι υπεύθυνες για τη δέσμευση με τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας (ECM). Προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα της μηχανικής σύνδεσης, οι ιντεγκρίνες είναι συνδεδεμένες με τον κυτταροσκελετό.¹⁸

Λόγω αυτής της φυσικής σύνδεσης της εξωκυττάριας μήτρας και του κυτταροσκελετού, η εφαρμογή κάποιας εξωτερικής δύναμης στις ιντεγκρίνες οδηγεί στη

ρύθμιση της ακτίνης μέσω της ενεργοποίησης βιοχημικών μονοπατιών, η οποία μεταβάλλει τη δομή του κυτταροσκελετού. Αυτή η παραμόρφωση μπορεί να επιφέρει διάφορες συνέπειες στο κύτταρο:

- Μεταβολή στις φυσικές ιδιότητες του κυττάρου
- Διάδοση του σήματος και ενεργοποίηση άλλων υποδοχέων
- Ρύθμιση βιοχημικών μονοπατιών.

A.3.1.3 Μηχανοεξαρτώμενοι Διάυλοι Ιόντων

Οι διάυλοι ιόντων είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν πόρους, οι λειτουργίες των οποίων περιλαμβάνουν τη διαμόρφωση του δυναμικού μεμβράνης και άλλων ηλεκτρικών σημάτων μέσω της ροής ιόντων στις κυτταρικές μεμβράνες.¹⁸ Συνδέουν επίσης την εξοκυττάρια μήτρα με το κυτοσόλιο. Είναι εξαιρετικά εκλεκτικοί ως προς την επιλογή των ιόντων που θα τα διαπεράσουν. Η εκλεκτικότητα εξαρτάται από το σχήμα, τη διάμετρο και την κατανομή των φορτισμένων αμινοξέων στο εσωτερικό του διαύλου. Ιόντα με κατάλληλο μέγεθος και φορτίο ευνοούνται θερμοδυναμικά. Η διάχυση των ανόργανων ιόντων από τη λιπιδική διπλοστοιβάδα περιλαμβάνει τα ιόντα K^+ , Na^+ , Ca^{+2} και Cl^- , τα οποία συμμετέχουν σε μεγάλο αριθμό βιοχημικών δραστηριοτήτων, όπως η ενδοκυτταρική σηματοδότηση, η γονιδιακή έκφραση, η μεταγραφή και η μετάφραση. Οι ιοντικοί διάυλοι χωρίς την παρουσία κάποιου ερεθίσματος είναι «κλειστοί», με αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται η διέλευσή τους. Η παρουσία ενός ερεθίσματος αλλάζει τη διαμόρφωση του υποδοχέα με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η διέλευση ιόντων από ή προς το κύτταρο, ανάλογα με την ηλεκτροχημική βαθμίδωση συγκέντρωσης.¹⁸

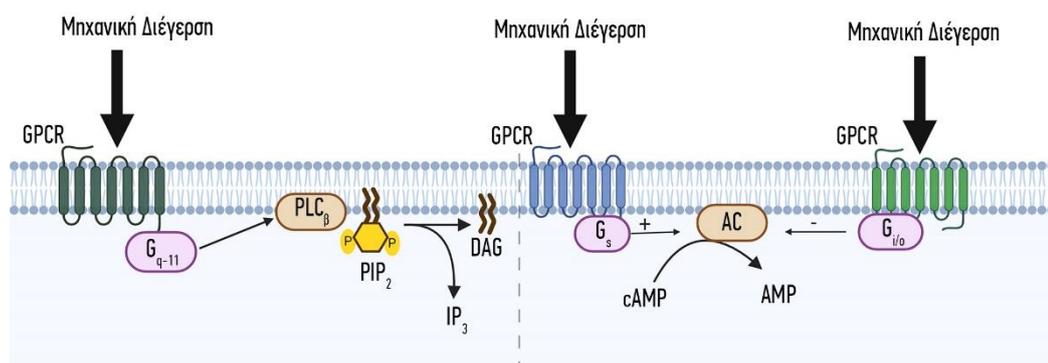
Ο μηχανισμός με τον οποίο ένας μηχανοευαίσθητος διάυλος ιόντων αποκρίνεται, παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Ωστόσο, μια εκδοχή είναι ότι η φυσική ή μη επιδρώσα μηχανική δύναμη επί της κυτταρικής μεμβράνης, προκαλεί μεταβολές στον ιοντικό διάυλο με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί τη δράση του. Μια άλλη προτεινόμενη εκδοχή είναι ότι μετά από παραμόρφωση του κυτταροσκελετού, τα συνδεδεμένα νημάτια ακτίνης με τους ιοντικούς διάυλους ρυθμίζουν την πύλη των διαύλων, και ως εκ τούτου τους ενεργοποιούν. Ενδιαφέρον παραμένει το γεγονός ότι, ορισμένοι διάυλοι ενεργοποιούνται με την επίδραση μηχανικής διέγερσης στο κύτταρο, ενώ άλλοι παραμένουν απενεργοποιημένοι.¹⁸

Η ενεργοποίηση των μηχανοευαίσθητων διαύλων ιόντων ύστερα από διατμητικές τάσεις, είναι μια από τις ταχύτερες αποκρίσεις στη μηχανική διέγερση, ως εκ τούτου οι διάυλοι ιόντων χαρακτηρίζονται ως μηχανικοί αισθητήρες (mechanosensors). Οι μηχανοευαίσθητοι διάυλοι ιόντων ασβεστίου παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος, καθώς μια μικρή

αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου στο κυττοσόλιο, διεγείρει την εξαρτώμενη από ασβέστιο σύνθεση αγγειοδιασταλτικών, όπως το μονοξειδίο το αζώτου και οι προστακυκλίνες.¹⁹ Εκτός αυτού, το ασβέστιο ρυθμίζει πολλές οδούς και υποδοχείς και επομένως επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων, την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, τη συστολή των μυών, το μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση. Ρυθμίζει τη δομή και τη δυναμική της ακτίνης, και τη συστολή της ακτομυοσίνης τόσο στα μυϊκά όσο και στα μη μυϊκά κύτταρα.²⁰ Εκτός από τα ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}), οι ροές των ιόντων καλίου (K^+), χλωρίου (Cl^-) και νατρίου (Na^+) αποκρίνονται ταχύτατα σε μηχανικά ερεθίσματα από διατμητικές τάσεις.²¹ Όλοι οι μηχανικά ενεργοποιούμενοι διάλυτοι ιόντων κατέχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της μηχανικής απόκρισης στα κύτταρα.²²

A.3.1.4 Υποδοχείς GPCR

Τυπικά οι πρωτεΐνες G είναι συνδεδεμένες με κάποιον υποδοχέα (GPCR, G Protein Coupled Receptor) και ενεργοποιούνται κατά την αλληλεπίδραση του προσδέματος ή του μηχανικού ερεθίσματος με τον εν λόγω υποδοχέα. Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης του υποδοχέα. Όλοι οι GPCRs αποτελούνται από επτά διαμεμβρανικές έλικες, δομικές περιοχές οι οποίες είναι ενσωματωμένες στο υδρόφοβο τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης. Μια ή περισσότερες από αυτές, ενεργοποιούν το καθοδικό μονοπάτι σηματοδότησης. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 7) απεικονίζεται η πορεία σηματοδότησης μέσω GPCR ύστερα από μηχανική διέγερση του κυττάρου.



Εικόνα 7: Μηχανική διέγερση των GPCRs και βιοχημικά μεσολαβούμενη μεταγωγή σήματος.²⁴

Σημαντικό ρόλο για την ενεργοποίηση της μεταγωγή μηχανικού σήματος κατέχει η κινάση των εστιακών προσκολλήσεων (Focal Adhesion Kinase, FAK). Ανάλογα με τα μηχανικά σήματα που λαμβάνει η FAK, μπορούν να ενεργοποιηθούν διαφορετικές θέσεις φωσφορυλίωσης, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν πολλές οδούς σηματοδότησης. Αυτές οι οδοί ελέγχουν, για παράδειγμα, την κυτταρική μετανάστευση μειώνοντας ή

αυξάνοντας τον πολυμερισμό της ακτίνης, την τάση (tension) που δημιουργείται από τον κυτταροσκελετό, καθώς και την αναδιαμόρφωση πρωτεϊνών εστιακής προσκόλλησης. Επιπλέον, η επαγόμενη από τη FAK σηματοδότηση, κατευθύνεται στον πυρήνα, όπου εκεί επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση, την απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση.

Στην ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος (signal transduction) πυροδοτείται η δημιουργία δεύτερων αγγελιοφόρων από τους τελεστές και ενεργοποιείται κάποιο βιοχημικό μονοπάτι ώστε να διαδώσει το σήμα καθοδικά μέχρι να φτάσει στο στόχο του. Καθοδικά το σήμα ενισχύεται μέσω ενζυμικών καταρρακτών και πολύπλοκων δικτύων ενδοκυττάρων σημάτων. Σε κάποιες περιπτώσεις μηχανικών διεγέρσεων συμμετέχει και ο ίδιος ο κυτταροσκελετός για τη μεταγωγή του σήματος.

Στην κυτταρική απόκριση, η ενίσχυση του σήματος οδηγεί, συνήθως, σε μεταβολές στη φωσφορυλίωση κάποιων πρωτεϊνών. Η φωσφορυλίωση είναι καθοριστικός παράγοντας για την ενεργοποίηση ή μη των ενζύμων και καταλύεται από ειδικές πρωτεϊνοκινάσες. Τα ένζυμα αυτά ρυθμίζουν ενδοκυττάρια πορείες σηματοδότησης και ρυθμίζονται από ενδοκυττάρια μηνύματα. Έτσι, μεταβάλλεται η κυτταρική συμπεριφορά μέσα από μια σύνθετη διεργασία μοριακών μηχανισμών οδηγώντας στην απόκριση του αρχικού σήματος.

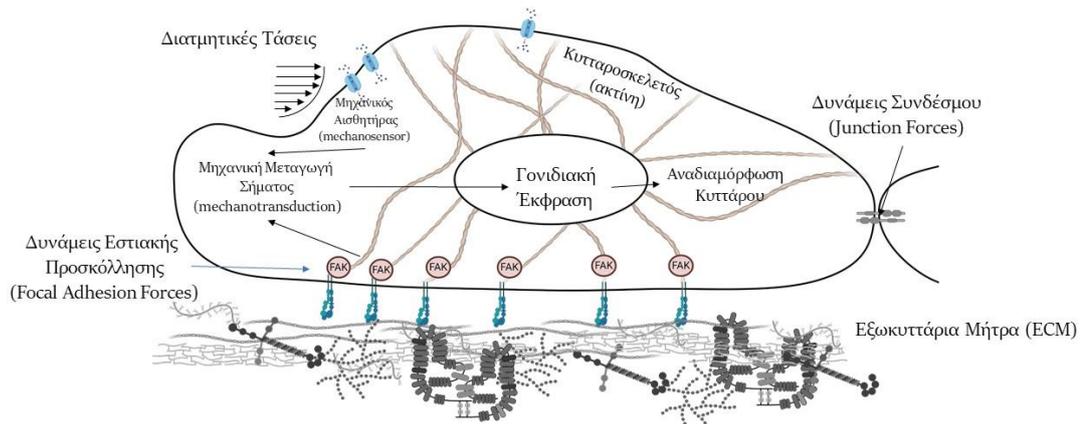
A.4 Σηματοδότηση

Τα μονοπάτια σηματοδότησης χρησιμεύουν στο κύτταρο ώστε να αποκριθεί στα εξωκυττάρια ερεθίσματα. Οι κυτταρικές μεμβράνες, οι θέσεις προσκόλλησης των κυττάρων και ο κυτταροσκελετός λειτουργούν ως κύριοι μηχανοαισθητήρες. Η βιοχημική ενεργοποίηση της μεταγωγής σήματος πυροδοτείται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα, ο οποίος εκκινεί μια πληθώρα ενδοκυττάρων διεργασιών. Τα κύτταρα προσκολλώνται σε γειτονικά κύτταρα και στην εξωκυτταρική μεμβράνη μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων που ανήκουν στην οικογένεια της καντερίνης (κύτταρο σε κύτταρο) και της ιντεγκρίνης (κύτταρο σε υπόστρωμα). Τα μόρια σηματοδότησης ενισχύονται καθοδικά της πορείας. Η διέγερση έχει ως στόχο την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες-στόχους, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις αλλαγές της κυτταρικής συμπεριφοράς. Τελικά αυτά τα μόρια αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες-στόχους, μεταβάλλοντάς τες, έτσι ώστε να προκαλούν αλλαγές στη συμπεριφορά του κυττάρου.

Τα μονοπάτια σηματοδότησης που χρησιμοποιούνται από το κύτταρο, χρησιμεύουν για να αποκριθεί το κύτταρο σε μια ποικιλία εξωκυτταρικών ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένων των διαλυτών σημάτων (για παράδειγμα, αυξητικών παραγόντων), της επικοινωνίας κυττάρου-κυττάρου και των μηχανικών σημάτων. Τα μόρια σηματοδότησης που εμπλέκονται

στην ενδοκυτταρική αναμετάδοση του σήματος είναι ένας συνδυασμός μικρών ενδοκυτταρικών μορίων-μεσολαβητών (επίσης γνωστοί ως δεύτεροι αγγελιοφόροι), και ενός δικτύου σηματοδότησης ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. Στην περιοχή του κυτταροπλάσματος, αυτοί οι υποδοχείς συνδέονται με πρωτεϊνικά σύμπλοκα που συνδέουν τους υποδοχείς με τον κυτταροσκελετό. Επίσης, μεσολαβούν στη μεταγωγή του σήματος μέσω της ενεργοποίησης μορίων σηματοδότησης όπως είναι οι κινάσες τυροσίνης (εστιακή προσκόλληση, p60Src), οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης (Erk-1,2, JNK, και κινάσες p38 MAP), οι λιπιδικές κινάσες ινοσιτόλης (φωσφολιπάση C) και ορισμένοι υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα (υποδοχείς VEGF και PDGF). Η ενεργοποίηση των μηχανικών υποδοχέων ενεργοποιεί πολλαπλούς καταρράκτες σημάτων με κανάλια ιόντων (κανάλι Na⁺, κανάλι K⁺, κανάλι Cl⁻) και ετεροτριμερείς πρωτεΐνες G (Gaq) που ενεργοποιούνται μέσα σε δευτερόλεπτα από τη μηχανική διέγερση και οι πρωτεϊνικές κινάσες (πρωτεϊνική κινάση C, κινάσες MAP, κινάσες τυροσίνης πρωτεϊνών μη υποδοχέα) ενεργοποιούνται στα πρώτα λεπτά διέγερσης. Η φωσφορυλίωση ειδικών πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού και πρωτεϊνών που βρίσκονται στη διεπιφάνεια των κυττάρων, άλλων ενζύμων και μεταγραφικών παραγόντων μέσω της δράσης της πρωτεϊνικής κινάσης επάγει την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού και διεγείρει την έκφραση των γονιδίων στα αγγειακά κύτταρα.

Οι δεύτεροι αγγελιοφόροι παράγονται σε μεγάλους αριθμούς σε απόκριση στην ενεργοποίηση του υποδοχέα. Λόγω του μικρού τους μεγέθους, είναι σε θέση να διαχέονται ταχέως σε όλο το κυτοσόλιο και, σε ορισμένες περιπτώσεις, κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης. Με σύνδεση προς και τροποποίηση της συμπεριφοράς των επιλεγμένων πρωτεϊνών σηματοδότησης ή των πρωτεϊνών-στόχων, οι δεύτεροι αγγελιοφόροι διαδίδουν το σήμα «κατάντη» του υποδοχέα. Ομοίως, σηματοδοτώντας ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, αναμεταδίδεται το σήμα «κατάντη» ενεργοποιώντας άλλες πρωτεΐνες και έτσι ακολουθείται μια σειρά γεγονότων για την μετάδοση του σήματος. Είναι ενδιαφέρον, ότι ο ρόλος των ιντεγκρινών δεν περιορίζεται μόνο στη μετάδοση του μηχανικού σήματος, αλλά και στο γεγονός ότι είναι επίσης ικανές να επάγουν βιοχημικές αποκρίσεις. Για παράδειγμα, η ομαδοποίηση των ιντεγκρινικών υποδοχέων στις εστιακές θέσεις προσκόλλησης, οδηγεί στην “επιστράτευση” και ενεργοποίηση των μορίων σηματοδότησης (π.χ., κινάσης εστιακής προσκόλλησης ή FAK), αρχίζοντας έτσι τη βιοχημική μεταγωγή σήματος. Τελικά, οι βιοχημικές οδοί σηματοδότησης αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες-στόχους, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη μεταβολή της συμπεριφοράς του κυττάρου (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Αποτέλεσμα μηχανικού ερεθίσματος.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η μεταγωγή μηχανικού σήματος ξεκινάει από την κυτταρική μεμβράνη.^{24,25} Πειράματα που έχουν γίνει σε υψηλής καθαρότητας ετεροτριμερείς πρωτεΐνες G, που έχουν ανασυσταθεί σε λιποσώματα έδειξαν ότι, ακόμη και η απουσία άλλων πιθανών μηχανοευαίσθητων υποδοχέων, οι πρωτεΐνες G ενεργοποιούνται κατά την εφαρμογή διατμητικών τάσεων στο κύτταρο.²⁵ Αυτό το εύρημα υποδηλώνει πώς η ίδια η λιπιδική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση του μηχανικού σήματος. Επιπλέον σε μια έρευνα που έγινε από τον Chachisvilis et al. έδειξαν ότι οι $\beta 2$ -αδρενεργικοί υποδοχείς απουσία προσδέματος και παρουσία του μηχανικού ερεθίσματος υπόκεινται σε αλλαγή της διαμόρφωσής τους με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται οι πρωτεΐνες G.²⁶ Από αυτά τα ευρήματα είναι φανερό πως οι GPCRs συμμετέχουν ενεργά στη μηχανική σηματοδότηση. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται συνοπτικά ο ρόλος των GPCRs στην μηχανική απόκριση.

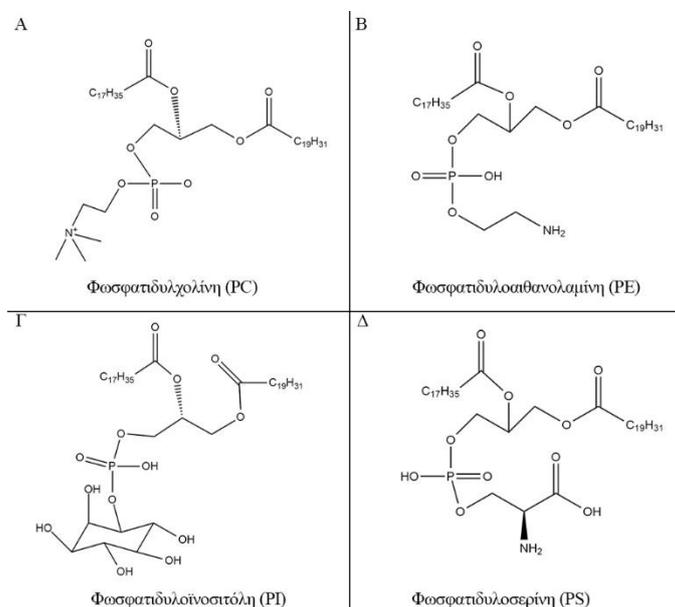
Πίνακας 1: Επισκόπηση των μηχανοευαίσθητων GPCR υποδοχέων.

Υποδοχέας	Πρωτεΐνη G	Έκφραση	Διέγερση	Πειραματική Προσέγγιση	Πιθανή Λειτουργία	Αναφορά
AT₁R	G _{q/11}	Υπερέκφραση στα HEK293 και A7r5 κύτταρα, ενδογενή στα αγγειακά κύτταρα των λείων μυών	Μηχανικό stretch, αυξημένη ενδοαγγειακή πίεση, Υποτονικότητα	Απεικόνιση Ca ²⁺ , Ανίχνευση IP ₃ , BRET, μέτρηση μυογενούς αγγειοσυστολής	Μηχανικός αισθητήρας στην μυογενή αγγειοσυστολή	27
		Υπερέκφραση στα HEK293 και COS-7 κύτταρα, ενδογενής στα καρδιομυοκύτταρα	Μηχανικό stretch απευθείας στην μεμβράνη, υπερφόρτιση πίεσης	ERK φωσφορυλίωση, Ανίχνευση IP ₃ , καρδιακή μορφομετρία, αιμοδυναμικές μετρήσεις	Παθοφυσιολογικός ρόλος ως μηχανικός αισθητήρας που επάγει την καρδιακή υπερτροφία	28
		Υπερέκφραση μεταλλαγμένων υποδοχέων στα HEK293 κύτταρα	Απευθείας μηχανική διάταση στην μεμβράνη	Παρεμπόδιση πρόσδεσης της αγγειοτενσίνης II	-	28
B₂R	G _{q/11}	Υπερέκφραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα βοός	Διατμητική τάση και υποτονικότητα	Τεχνικές Μικροσκοπίας Φθορισμού (FRET)	Αισθητήρας των διατμητικών τάσεων στα ενδοθηλιακά κύτταρα	26
D₅R	G _S	Αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα	Διατμητικές τάσεις	Μέτρηση επιπέδων Ca ²⁺	Αισθητήρας των διατμητικών τάσεων στα ενδοθηλιακά κύτταρα	29
FPR₁	G _{i/o}	Ενδογενή στα HL60 κύτταρα	Διατμητικές τάσεις	FRET στην πρωτεΐνη G _i	Συστολή στα ψευδοπόδια των ουδετερόφιλων	30
PTH₁R	G _S / G _{q/11}	Υπερέκφραση στα HEK293	Διατμητικές τάσεις	FRET	Ανάπτυξη οστών	31

A.5 Φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια είναι τα κύρια δομικά στοιχεία των βιολογικών μεμβρανών. Η λειτουργική ποικιλομορφία των φωσφολιπιδίων προέρχεται από δομικές παραλλαγές στα υδρόφοβα τμήματα της διακυλογλυκερόλης και στις υδρόφιλες φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται στην “κεφαλή” του μορίου. Η σύνθεση των φωσφολιπιδίων πραγματοποιείται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα μιτοχόνδρια, καθώς και στη διεπιφάνεια μεταξύ αυτών και άλλων οργανιδίων που διευκολύνουν το συνδυασμό της σύνθεσης και της μεταφοράς των λιπιδίων. Οι βιοσυνθετικές οδοί χρησιμοποιούν ως πρόδρομα μόρια τη διακυλογλυκερόλη ή τη CDP-διακυλογλυκερόλη στις οποίες προστίθενται χολίνη, αιθανολαμίνη, ινositόλη και γλυκερόλη, προς σχηματισμό ομάδων φωσφολιπιδίων. Ο συνδυασμός των βιοσυνθετικών οδών και των οδών αναδιαμόρφωσης οδηγεί στο σχηματισμό

διαφόρων ειδών φωσφολιπιδίων τα οποία εκτελούν συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες που πραγματοποιούνται μέσω συστημάτων μοντέλων. Οι δομές των βασικότερων φωσφολιπιδίων απεικονίζονται στην **Εικόνα 9**.



Εικόνα 9: Απεικόνιση των δομών των φωσφολιπιδίων: **A**: Φωσφατιδυλοχολίνη (PC), **B**: Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE), **Γ**: Φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PI), **Δ**: Φωσφατιδυλοσερίνη (PS).

A.5.1 Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)

Η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) (Εικόνα 9A) ανήκει στην οικογένεια των φωσφολιπιδίων που ενσωματώνουν τη χολίνη στην “κεφαλή” του μορίου. Αποτελεί το κύριο συστατικό των βιολογικών μεμβρανών και μπορεί να απομονωθεί χημικά από αρκετές φυσικές πηγές, όπως είναι ο κρόκος του αυγού ή η σόγια, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το εξάνιο. Η PC είναι επίσης μέλος της ομάδας της λεκιθίνης, μιας λιπαρής ουσίας κιτρινο-καφέ χρώματος, που βρίσκεται σε ζωικούς και φυτικούς ιστούς. Η PC συμμετέχει επίσης σημαντικά στην κυτταρική σηματοδότηση.³²

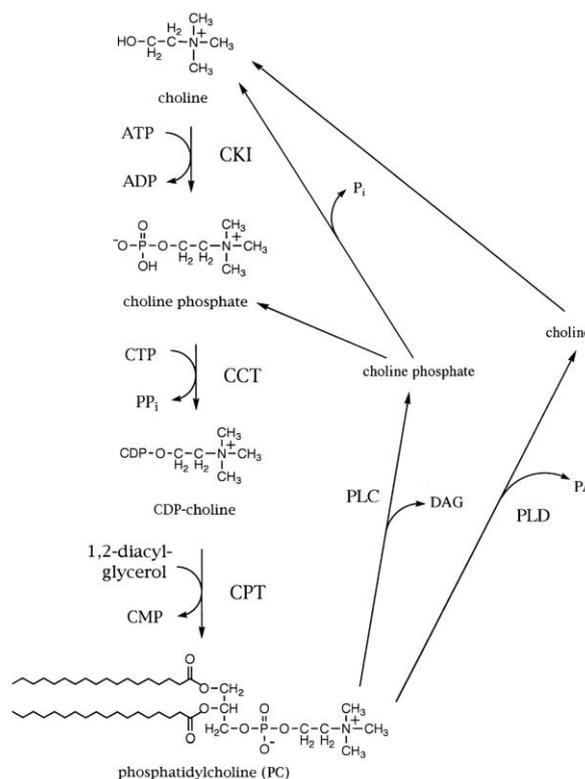
Η διπαλμιτοϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC), ως μοριακό είδος της λεκιθίνης, αποτελεί κύριο συστατικό των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών των θηλαστικών και βρίσκεται σε μεγάλη αφθονία. Επίσης, αποτελεί κύριο συστατικό και της πνευμονικής επιφανειοδραστικής ουσίας, και χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης για τον προσδιορισμό της ωριμότητας του εμβρυϊκού πνεύμονα. Βρίσκεται στον εξωκυτταρικό χώρο ή στο εξωτερικό φύλλο μιας κυτταρικής μεμβράνης, ενώ μεταφέρεται μεταξύ των μεμβρανών εντός του κυττάρου μέσω της πρωτεΐνης μεταφοράς φωσφατιδυλοχολίνης (PCTP).³³ Αυτό το φωσφολιπίδιο αποτελείται από μια ομάδα κεφαλής χολίνης και γλυκεροφωσφορικό οξύ, μαζί με έναν αριθμό λιπαρών οξέων. Συνήθως αποτελείται από ένα κορεσμένο λιπαρό οξύ (π.χ.

παλμιτικό οξύ) και από ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ (π.χ. ελαϊκό οξύ, ή 9Z-οκταδεκενοϊκό οξύ). Αντίθετα, η φωσφατιδυλοχολίνη των πνευμόνων των ζώων, για παράδειγμα, περιέχει υψηλή αναλογία διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνης.

Η υδρόλυση της PC καταλύεται από το ένζυμο φωσφολιπάση D, σχηματίζοντας φωσφατιδικό οξύ (PA) και απελευθερώνοντας τη διαλυτή ομάδα της χολίνης στο κυτταρόπλασμα.

A.5.1.1 Βιοσύνθεση της φωσφατιδυλοχολίνης

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί για τη βιοσύνθεση της PC στους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς αλλά και στους μικροοργανισμούς. Η ίδια η χολίνη δε συντίθεται ως έχει από ζωικά κύτταρα, ωστόσο αποτελεί απαραίτητο θρεπτικό συστατικό. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να λαμβάνεται από διατροφικές πηγές, ή με αποικοδόμηση των υπαρχόντων λιπιδίων που περιέχουν χολίνη. Μόλις εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, η χολίνη φωσφορυλιώνεται αμέσως από μια κινάση χολίνης και μετατρέπεται σε φωσφοχολίνη. Η φωσφοχολίνη στη συνέχεια αντιδρά με το ένζυμο τριφωσφορική κυτιδίνη (CTP) για να σχηματίσει τη διφωσφοχολίνη κυτιδίνης.



Εικόνα 10: Βιοσύνθεση της φωσφατιδυλοχολίνης μέσω της οδού CDP-χολίνης. Η οδός CDP-χολίνης είναι μια ανακυκλούμενη οδός που ενσωματώνει τη θρεπτική χολίνη ή τη χολίνη που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της σηματοδότησης, στα μεμβρανικά λιπίδια της φωσφατιδυλοχολίνης. Το ένζυμο κινάση της χολίνης (CKI) φωσφορυλιώνει την χολίνη στο υδροξύλιο άκρο και στην συνέχεια με την συμμετοχή των ενζύμων κυτιδυλοτρανσφεράση (CCT) και τριφωσφορική κυτιδίνη (CTP) σχηματίζεται η φωσφατιδυλοχολίνη στην οδό CDP-χολίνης. Η φωσφατιδυλοχολίνη υπόκειται σε συνεχή ανακύκλωση από

*φωσφολιπάσες που απελευθερώνουν χολίνη ή φωσφορική χολίνη, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ξανά ως ανακυκλώσιμα υποστρώματα από την οδό CDP-χολίνης. PLC: φωσφολιπάση C; PLD: φωσφολιπάση D; DAG: διακυλογλυκερόλη; PA: φωσφατιδικό οξύ.*³⁴

A.5.1.2 Βιολογικός ρόλος

Λόγω της δομής της, η PC οργανώνεται σε διπλοστοιβάδες, επομένως αποτελεί κύριο δομικό στοιχείο των βιολογικών μεμβρανών. Ειδικότερα, η DPPC αποτελεί το κύριο συστατικό της πνευμονικής επιφανειοδραστικής ουσίας (lung surfactant) και παρέχει σταθερότητα στις κυψελίδες του πνεύμονα, μειώνοντας την επιφανειακή τάση σε πολύ χαμηλό επίπεδο.

Επίσης, τα λιπίδια που βρίσκονται στον πυρήνα των ζωικών κυττάρων περιέχουν υψηλή αναλογία ακόρεστης PC, που αντιστοιχεί στο 10% του συνολικού όγκου. Αυτό το μόριο συντίθεται εξ ολοκλήρου μέσα στον πυρήνα, σε αντίθεση, π.χ. με τη φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη. Έχει προταθεί ότι μπορεί να έχει ρόλο στη σταθεροποίηση ή τη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης, καθώς και ότι αποτελεί πηγή διακυλογλυκερολών που συμμετέχουν σε σηματοδοτικές οδούς.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η PC αποτελεί το πιο άφθονο φωσφολιπιδικό συστατικό στο πλάσμα και μάλιστα σε όλες τις κατηγορίες λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Είναι το μόνο φωσφολιπίδιο που είναι απαραίτητο για τη συγκέντρωση και έκκριση των λιποπρωτεϊνών. Αν και είναι ιδιαίτερα άφθονη σε λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL), επηρεάζει έντονα τα επίπεδα όλων των ομάδων των λιποπρωτεϊνών και ιδιαίτερα των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), οι οποίες περιβάλλονται από μια μονοστοιβάδα φωσφολιπιδίου. Παρομοίως, απαιτείται η σύνθεση της PC για τη σταθεροποίηση της επιφάνειας των σταγονιδίων των λιπιδίων στους ιστούς όπου αποθηκεύονται οι τριακυλογλυκερόλες.

Εκτός από τη λειτουργία της ως συστατικό της μεμβράνης, η PC μπορεί να έχει ένα ρόλο στη σηματοδότηση μέσω της παραγωγής διακυλογλυκερολών από τη φωσφολιπάση C και συγκεκριμένα στον πυρήνα. Ομοίως, το φωσφατιδικό οξύ που παράγεται από τη PC από τη δράση της φωσφολιπάσης D στα φυτά έχει βασικές λειτουργίες σηματοδότησης. Η μορφή πλασμαλογόνου της PC μπορεί επίσης να συμμετέχει στις οδούς σηματοδότησης, όπως είναι η επεξεργασία της θρομβίνης των ενδοθηλιακών κυττάρων η οποία ενεργοποιεί μια εκλεκτική υδρόλυση (φωσφολιπάση A2) των μοριακών ειδών που περιέχουν αραχιδονικό οξύ στη θέση sn-2, απελευθερώνοντας αυτό το λιπαρό οξύ για την παραγωγή εικοσανοειδών. Η διάκυλο μορφή της PC μπορεί να έχει ενεργό ρόλο στη μεταγωγή σήματος σε άλλους ιστούς. Επιπλέον,

είναι γνωστό ότι το ένζυμο 3-υδροξυβουτυρική αφυδρογονάση είναι απαραίτητο να συνδεθεί με τη PC για να μπορέσει να έχει τη βέλτιστη δραστηριότητά της.

Η PC αποτελεί πρόδρομο μόριο της σφιγγομυελίνης και ως εκ τούτου έχει επίδραση στις πολλές μεταβολικές οδούς που αποτελούν τον κύκλο της σφιγγομυελίνης. Είναι επίσης και πρόδρομο μόριο του φωσφατιδικού οξέος, της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, και της φωσφατιδυλοσερίνης, το καθένα από τα οποία συμμετέχει σε σημαντικές οδούς σηματοδότησης.

Στα προκαρυωτικά κύτταρα, η PC είναι απαραίτητη για ορισμένες συμβιωτικές και παθογόνες αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροβίου-ξενιστή. Για παράδειγμα, σε ανθρώπινα παθογόνα όπως είναι το *Brucella abortus* και η *Legionella pneumophila*, αυτό το λιπίδιο είναι απαραίτητο για πλήρη λοιμογόνο δράση. Το ίδιο ισχύει και για τα παθογόνα των φυτών, όπως το *Agrobacterium tumefaciens*.

A.5.2 Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE)

Η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (1,2-διακυλ-sn-γλυκερο-3-φωσφοαιθανολαμίνη) (PE) (Εικόνα 9B) είναι ακόμη ένα φωσφολιπίδιο που αποτελεί βασικό συστατικό των μεμβρανών των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η PE αποτελεί συνήθως το δεύτερο πιο άθρονο φωσφολιπίδιο σε ζωικά και φυτικά λιπίδια μετά τη φωσφατιδυλοχολίνη, και αποτελεί συχνά το κύριο λιπιδικό συστατικό των μικροβιακών μεμβρανών. Μπορεί να υπάρχει σε ποσοστό 20% των συνολικών φωσφολιπιδίων του ήπατος και έως 45% των φωσφολιπιδίων του εγκεφάλου, ενώ βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό και στα μιτοχόνδρια. Ως εκ τούτου, αποτελεί βασικό δομικό στοιχείο της διπλοστοιβάδας της μεμβράνης και υπάρχει στο εσωτερικό τμήμα της πλασματικής μεμβράνης των ευκαρυωτικών κυττάρων. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η PE τείνει να υπάρχει σε μορφές διακυλο, αλκυλο, ακυλο, και αλκενυλο, ενώ περιέχει μεγαλύτερη αναλογία αραχιδονικού και εικοσιδυοεξανοϊκού οξέος από ό,τι η φωσφατιδυλοχολίνη.³⁵

A.5.2.1 Βιοσύνθεση της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης

Στα κύτταρα των θηλαστικών η βιοσύνθεση της PE πραγματοποιείται μέσω δύο κύριων οδών: (α) η πρώτη είναι η οδός της CDP-αιθανολαμίνης, η οποία αποτελεί κύρια μεταβολική οδό της *de novo* σύνθεσης φωσφολιπιδίων και πραγματοποιείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, και (β) η οδός της αποκαρβοξυλίωσης της PE, η οποία πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια. Στα φυτικά κύτταρα η αιθανολαμίνη παράγεται με αποκαρβοξυλίωση της σερίνης, ενώ στα κύτταρα των θηλαστικών λαμβάνεται από την τροφή. Το πρώτο στάδιο στη βιοσύνθεση της PE με την (α) βιοσυνθετική οδό, πραγματοποιείται στο κυτοσόλιο και περιλαμβάνει τη

φωσφορυλίωση της αιθανολαμίνης από δύο ειδικές κινάσες της αιθανολαμίνης, οδηγώντας στο σχηματισμό της φωσφορικής αιθανολαμίνης. Μπορεί να πραγματοποιηθεί και αντίστροφη αντίδραση με τη δράση του ενζύμου φωσφορική φωσφολυάση της αιθανολαμίνης, και αυτό μπορεί να έχει ρυθμιστική λειτουργία σε ορισμένους ιστούς. Το δεύτερο στάδιο αποτελεί η παραγωγή τριφωσφορικής κυτιδίνης (CTP) μέσα από μία αντίδραση που πραγματοποιείται με μικρό ρυθμό, προς σχηματισμό της διφωσφοαιθανολαμινο-κυτιδίνης, που καταλύεται από το ένζυμο CTP-φωσφοαιθανολαμινο-κυτιδυλοτρανσφεράση. Στο τελικό στάδιο της βιοσύνθεσης πραγματοποιείται αντίδραση της διφωσφοαιθανολαμινο-κυτιδίνης με τη διακυλογλυκερόλη προς σχηματισμό της PE, με τη δράση του ενζύμου CDP-αιθανολαμινο-διακυλογλυκερόλη αιθανολαμινο-φωσφοτρανσφεράση, το οποίο βρίσκεται στη μεμβράνη. Υπάρχουν δύο ένζυμα, η 1-φωσφοτρανσφεράση της αιθανολαμίνης (EPT1) στη συσκευή Golgi και η χολίνη/EPT1 (CEPT1) στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αλλά η EPT1 είναι το πιο σημαντικό ένζυμο για τη βιοσύνθεση της μορφής του πλασμαλογόνου, 1-αλκενυλ-2-ακυλ-γλυκεροφωσφο-αιθανολαμίνη, και ιδιαίτερα μοριακών ειδών που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ενώ η CEPT1 παράγει είδη με λιπαρά οξέα μικρότερης αλυσίδας.

Όπως αναφέρθηκε, η δεύτερη κύρια οδός είναι η αποκαρβοξυλίωση της φωσφατιδυλοσερίνης προς σχηματισμό PE και πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια δε συνδέονται με το υπόλοιπο δίκτυο της κυτταρικής μεμβράνης για αυτό και λαμβάνουν ή εξάγουν μικρά μόρια προς και από το κύτταρο μέσω μεταφοράς σε οργανίδια που βρίσκονται σε τμήματα της μεμβράνης, όπως μια συγκεκριμένη περιοχή του ενδοπλασματικού δικτύου που ονομάζεται μεμβράνη σχετιζόμενη με μιτοχόνδρια (Mitochondria Associated Membrane-MAM). Η μεταφορά λιπιδίων της φωσφατιδυλοσερίνης στη συνέχεια ενεργοποιείται από υποκαταστάτες που γεφυρώνουν τις δύο μεμβράνες, τις πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων. Σε αυτή τη διαδικασία, το λιπίδιο πρέπει να διασχίσει δύο υδατικά διαμερίσματα, το κυτοσόλιο και τον ενδομεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων, προκειμένου να φτάσει στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

Η αποκαρβοξυλίωση της φωσφατιδυλοσερίνης βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, και το μεγαλύτερο ποσοστό της PE στα μιτοχόνδρια προέρχεται από αυτή τη μεταβολική οδό. Ενώ υπάρχουν διάφορες ισομορφές της αποκαρβοξυλίωσης της φωσφατιδυλοσερίνης σε προκαρυωτικά κύτταρα, κύτταρα θηλαστικών και ζυμομυκήτων, οι κύριες μορφές που ονομάζονται “PSD1” βρίσκονται μόνο στα μιτοχόνδρια και σχετίζονται δομικά. Μια ισομορφή που ονομάζεται “PSD2” βρίσκεται στις ενδοσωμικές μεμβράνες των ζυμομυκήτων και η PE που σχηματίζεται εκεί αποτελεί πολύ

καλό υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση της φωσφατιδυλοχολίνης. Αυτό δείχνει ότι οι συγκεντρώσεις της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης και της φωσφατιδυλοσερίνης στο κύτταρο σχετίζονται άμεσα μεταξύ τους. Στα κύτταρα των θηλαστικών, η βιοσυνθετική οδός της PE εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου κάθε φορά.

Άλλες τρεις δευτερεύουσες βιοσυνθετικές οδοί είναι γνωστές: (1) Ο σχηματισμός της PE μέσω ενζυμικής αντίδρασης ανταλλαγής της αιθανολαμίνης με φωσφατιδυλοσερίνη, (2) Η επαναακυλίωση της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων, όπου βρίσκεται η συνθάση II της φωσφατιδυλοσερίνης, (3) Η βιοσύνθεση της PE στο βακτηριακό φυτικό παθογόνο *Xanthomonas campestris*, μέσω συμπύκνωσης της διφωσφορικής κυτιδίνης της διακυλογλυκερόλης με αιθανολαμίνη.

A.5.2.2 Βιολογικός ρόλος της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης

Στα βιολογικά συστήματα, η δράση της PE συχνά συσχετίζεται με αυτή της φωσφατιδυλοχολίνης. Ωστόσο, τα δύο φωσφολιπίδια διαφέρουν αρκετά ως προς τη χημική δομή τους αλλά και ως προς τις φυσικές τους ιδιότητες και τις βιοχημικές τους δράσεις. Και τα δύο φωσφολιπίδια αποτελούν βασικά συστατικά της διπλής στοιβάδας της κυτταρικής μεμβράνης, και η αναλογία τους είναι σημαντική για πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Ωστόσο, η PE έχει μια μικρότερη ομάδα στην “κεφαλή” του μορίου της, η οποία δίνει στο λιπίδιο ένα κωνικό σχήμα. Αυτό σημαίνει ότι δε μπορεί να σχηματίσει διπλές στοιβάδες από μόνη της, αλλά ανεστραμμένες εξαγωνικές βάσεις. Πιστεύεται ότι σε συνδυασμό με άλλα λιπίδια που βρίσκονται σε μια διπλή στοιβάδα, ασκείται μια πλευρική πίεση που ρυθμίζει την καμπυλότητα της μεμβράνης και σταθεροποιεί τις μεμβρανικές πρωτεΐνες στις βέλτιστες διαμορφώσεις τους. Μπορεί να συνθεθεί με γειτονικά λιπίδια και πρωτεΐνες μέσω της πολικής ομάδας που υπάρχει στην “κεφαλή” του μορίου, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου. Για παράδειγμα, η φωσφορική ομάδα μπορεί να σταθεροποιηθεί στη θέση δέσμευσης μέσω αλληλεπιδράσεων με πλευρικές αλυσίδες της λυσίνης και της αργινίνης ή με τα υδροξύλια της πλευρικής ομάδας της τυροσίνης. Οι ακυλικές αλυσίδες του φωσφολιπιδίου μπορούν επίσης να σχηματίσουν ισχυρές αλληλεπιδράσεις.

Σε αντίθεση με τη φωσφατιδυλοχολίνη, η PE απαντάται, όπως και η φωσφατιδυλοσερίνη στο εσωτερικό φύλλο της πλασματικής μεμβράνης. Από την άλλη πλευρά, υπάρχει τόσο στις εσωτερικές όσο και στις εξωτερικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων, αλλά στις εσωτερικές μεμβράνες βρίσκεται σε αρκετά υψηλά επίπεδα από ό,τι σε άλλα οργανίδια, ενώ διευκολύνει την κίνηση των πρωτεϊνών στις μεμβράνες, αλλά και άλλες

απαραίτητες λειτουργίες των μιτοχονδρίων, όπως είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση, η οποία πραγματοποιείται μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αποτελεί ένα σημαντικό λειτουργικό συστατικό της διεπιφάνειας της μεμβράνης μεταξύ του ενδοπλασματικού δικτύου και των μιτοχονδρίων. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, κυρίως σε αυτά των εντόμων, μελέτες έχουν δείξει ότι έχει παρόμοια λειτουργία με τη χοληστερόλη, καθώς αυξάνει την ακαμψία της διπλοστοιβάδας για να διατηρήσει τη ρευστότητα της μεμβράνης. Στις μεμβράνες των βακτηρίων, ο πρωταρχικός ρόλος της PE είναι να αραιώνει την υψηλή συγκέντρωση των ανιοντικών φωσφολιπιδίων.

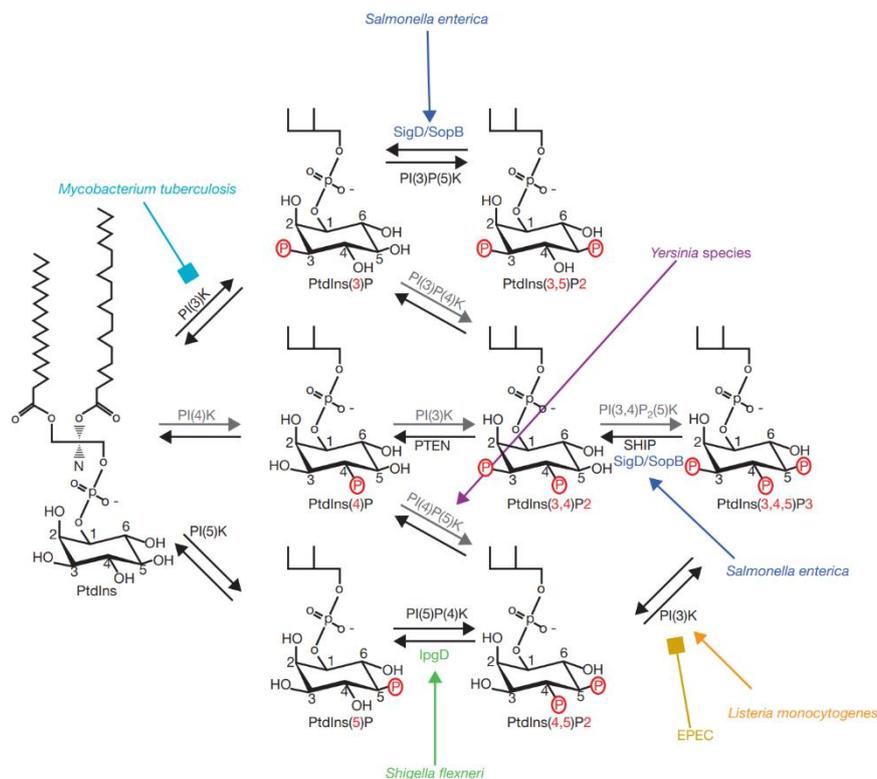
Η PE θεωρείται ότι έχει πολύ σημαντικό ρόλο στη δέσμευση της θέσης των αρνητικών αμινοξέων των πρωτεϊνών που βρίσκονται στην μεμβράνη του κυτταροπλάσματος, φέρνοντας μια ισορροπία στο φορτίο μεταξύ της επιφάνειας της μεμβράνης και των πρωτεϊνών. Ωστόσο, μπορεί επίσης να επιτρέψει την παρουσία αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, σε περιπτώσεις που χρειάζεται η υποστήριξη της πρωτεϊνικής λειτουργίας. Η PE είναι ζωτικής σημασίας για τις λειτουργίες που γίνονται στα μιτοχόνδρια, όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση αλλά και για τη ρύθμιση της δυναμικής του μιτοχονδρίου, αλλά και για τη βιογένεση των πρωτεϊνών στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Η σύνθεση της PE στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων είναι κρίσιμη για τη λειτουργία του συμπλόκου του κυτοχρώματος bc1 (III), όπου υπάρχει μια συγκεκριμένη θέση δέσμευσης του λιπιδίου σε μια συγκεκριμένη υπομονάδα. Η PE συνδέεται μη-ομοιοπολικά με μια υπεροικογένεια κυτοσολικών πρωτεϊνών με πολλαπλές λειτουργίες, οι οποίες ονομάζονται “πρωτεΐνες που δεσμεύουν τη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη”. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν πολλές διαφορετικές λειτουργίες όπως η δέσμευση λιπιδίων, η ανάπτυξη των νευρώνων, η αναστολή της πρωτεάσης της σερίνης και η ρύθμιση πολλών σηματοδοτικών οδών. Επίσης, η PE εμπλέκεται στην παραγωγή και την έκκριση της VLDL. Ακόμη, σχετίζεται με τη διαδικασία της αυτοφαγίας, καθώς δεσμεύεται με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται Atg8 και σχηματίζει ένα σύμπλοκο (με τη δράση της πρωτεάσης κυστεΐνης ATG4 που ανήκει στην οικογένεια των κασπασών) και σχηματίζει μεμβρανικά κυστίδια που περιέχουν τα προς αποικοδόμηση συστατικά. Επίσης, η οξειδωτικά τροποποιημένη PE είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην απόπτωση.

Η PE αποτελεί πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση της *N*-ακυλοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης και της *N*-αραχιδονοϋλαιθανολαμίνης, ενώ είναι ο δότης της φωσφορικής αιθανολαμίνης κατά τη σύνθεση μορίων γλυκοσυλοφωσφατιδυλο-ινοσιτόλης που στοχεύουν πρωτεΐνες σηματοδότησης στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης.

Αποτελεί επίσης υπόστρωμα του ηπατικού ενζύμου *N*-μεθυλοτρανσφεράση της PE, το οποίο παρέχει περίπου το ένα τρίτο της φωσφατιδυλοχολίνης στο ήπαρ. Η PE αποτελεί πρόδρομο μόριο ενός τμήματος αιθανολαμινο φωσφογλυκερόλης που συνδέεται με δύο κατάλοιπα γλουταμικού στον ευαρωτικό παράγοντα επιμήκυνσης 1A, ο οποίος αποτελεί βασικό συστατικό στη σύνθεση πρωτεϊνών.

A.5.3 Φωσφοϊνοσιτίδια (PIs)

Τα φωσφοϊνοσιτίδια (PIs), γνωστά και ως λιπίδια ινοσιτόλης (Εικόνα 9Γ), είναι γλυκεροφωσfolιπίδια, τα οποία αποτελούν το 1-1,5% της μεμβράνης των φωσfolιπιδίων. Το μόριο των φωσφοϊνοσιτιδίων αποτελείται από δύο λιπαρά οξέα, κυρίως στεατικό οξύ (C18:0), στη θέση 1 και αραχιδονικό οξύ (C20:4) στη θέση 2, αν και στα περισσότερα κύτταρα συνυπάρχουν και άλλα δευτερεύοντα μοριακά είδη. Αυτά τα λιπαρά οξέα συνδέονται σε ένα μόριο γλυκερίνης, η οποία με τη σειρά της συνδέεται μέσω ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού με ένα δακτύλιο ινοσιτόλης, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 11.³⁶ Τα PIs είναι τα πιο αρνητικά φορτισμένα λιπίδια που βρίσκονται στη μεμβράνη και συγκεκριμένα στο κυτταροπλασματικό τμήμα της επιφάνειας της μεμβράνης αλλά και των μεμβρανών των διαφόρων οργανιδίων.



Εικόνα 11: Διάγραμμα ροής του μεταβολισμού των φωσφοϊνοσιτιδίων. Απεικόνιση των δομών των φωσφοϊνοσιτιδίων: PtdIns3P, PtdIns4P, PtdIns5P, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4,5)P₃, PtdIns(3,4,5)P₃. Απεικονίζονται τα κύρια στάδια

της σύνθεσης και της αποδόμησης των φωσφοϊνοσιτιδίων, καθώς και ορισμένα από τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις και τα στάδια που τροποποιούνται από παθογόνα βακτήρια.³⁷

Αν και στο δακτύλιο της ινοσιτόλης υπάρχουν πέντε ελεύθερες υδροξυλομάδες, ειδικές κινάσες φωσφορυλιώνουν μόνο τις θέσεις 3,4 και 5, ενώ οι θέσεις 1 και 6 παρουσιάζουν στερική παρεμπόδιση. Αυτή η βιοσυνθετική οδός συμπεριλαμβάνει οκτώ μεταβολίτες μέσω ενός πυκνού δικτύου 21 χημικών αντιδράσεων, οι οποίες καταλύονται από 19 κινάσες και 28 φωσφατάσες.³⁸ Η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdIns) αντιπροσωπεύει το 80% των συνολικών φωσφολιπιδίων, αλλά έχουν ανιχνευθεί και άλλα 7 φωσφοϊνοσιτιδία, τα οποία είναι αποτέλεσμα του διαφορετικού συνδυασμού φωσφορυλίωσης στο δακτύλιο της ινοσιτόλης (Εικόνα 11). Αυτά τα 7 φωσφοϊνοσιτιδία χωρίζονται σε: **μονοφωσφορυλιωμένα φωσφοϊνοσιτιδία:** 4-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdIns4P), 3-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdIns3P) και 5-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdIns5P), **διφωσφορυλιωμένα φωσφοϊνοσιτιδία:** 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdIns(4,5)P₂, ή PIP₂), 3,4-διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns (3,4)P₂) και 3,5-διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns (3,5)P₂) και **τριφωσφορυλιωμένα φωσφοϊνοσιτιδία:** 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns (3,4,5) P₃, ή PIP₃). Στους οργανισμούς των θηλαστικών, στα συστατικά των κυττάρων, σε μεγαλύτερο ποσοστό βρίσκεται η PtdIns4P (90-96%) και ακολουθούν οι PtdIns3P και PtdIns5P (4-10%). Σε μεγάλο ποσοστό βρίσκεται επίσης και η PtdIns(4,5)P₂ (~9%), ενώ τα άλλα 2 πολυφωσφοϊνοσιτιδία, PtdIns(3,4)P₂ και PtdIns(3,5)P₂ βρίσκονται συνολικά σε ποσοστό 1-2%.

Τα Pls χαρακτηρίζονται από έναν εξαιρετικά ενεργό μεταβολισμό που περιλαμβάνει ένα σύνολο από αυστηρά ρυθμιζόμενες ειδικές κινάσες και φωσφατάσες, και δρουν κυρίως ως δεύτεροι αγγελιοφόροι. Αυτά τα λιπίδια μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα με συγκεκριμένες πρωτεϊνικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένων των PH (Pleckstrin Homology), FYVE (Fab-1, YGL023, Vps27 και EEA1), PX (phox) ή ENTH (Epsin N- Terminal Homology). Μετά από διάφορα ερεθίσματα, όπως για παράδειγμα μέσω ορμονών, αυξητικών παραγόντων, μορίων προσκόλλησης κ.α., οι κινάσες και οι φωσφατάσες των φωσφοϊνοσιτιδίων επανατοποθετούνται, ενεργοποιούνται ή αναστέλλονται, προκειμένου να επιτευχθεί ο σχηματισμός τμημάτων πάνω στη μεμβράνη, με συγκεκριμένο περιεχόμενο ως προς τα Pls. Τα Pls μπορούν στη συνέχεια να συντονίσουν τη δράση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σηματοδότησης για τον έλεγχο των κυτταρικών διεργασιών. Η παρουσία συγκεκριμένων υποδοχέων που αλληλεπιδρούν με τα Pls για τον εντοπισμό αυτών των λιπιδίων έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Διαφορετικές κυτταρικές μεμβράνες αποτελούνται από διαφορετικά είδη φωσφοϊνοσιτιδίων. Τα PtdIns συντίθενται στο

ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ μπορούν επίσης να βρεθούν στα μιτοχόνδρια αλλά και σε πολλά άλλα ενδοκυτταρικά οργανίδια. Χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές, έχει αποδειχθεί ότι η PtdIns (4,5)P₂, η PtdIns(3,4)P₂ και η PtdIns(3,4,5)P₃ εντοπίζονται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη,^{39,40} ενώ η PtdIns3P βρίσκεται κυρίως στα πρώιμα ενδοσώματα⁴¹, ενώ η PtdIns4P βρίσκεται κυρίως τόσο στην πλασματική μεμβράνη, όσο και στη συσκευή Golgi αλλά και στα εκκριτικά κυστίδια.⁴² Σε ορισμένα κύτταρα, η κατανομή των PIs είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της πολικότητας των κυττάρων.⁴³ Η σύνθεση των φωσφοϊνοσιτιδίων μπορεί επίσης να διαφέρει και μέσα σε ένα μεμβρανικό διαμέρισμα. Για παράδειγμα, οι πρωτογενείς βλεφαρίδες αποτελούνται από PtdIns(4,5)P₂ στη μεμβράνη του εγγύς τμήματος, αλλά όχι στην άκρη τους.⁴⁴ Κάθε φωσφοϊνοσιτίδιο εκτελεί συγκεκριμένο ρόλο στις κυτταρικές λειτουργίες:

A.5.3.1 3-φωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns3P)⁴¹

Η PtdIns3P υπάρχει σε μικρές ποσότητες στα ευκαρυωτικά κύτταρα και παράγεται κυρίως από τα φωσφοϊνοσιτίδια (PtdIns) μέσω των ενζύμων PI3K τύπου II και PI3K τύπου III. Επίσης, μπορεί να παραχθεί με αποφωσφορυλίωση της PtdIns(3,4)P₂ από το ένζυμο 4-φωσφατάση τύπου Ia, και με αποφωσφορυλίωση της PtdIns(3,5)P₂ από το ένζυμο 5-φωσφατάση (Fig4 ή Sac3). Οι PI3Ks τύπου II και η 4-φωσφατάση τύπου Ia, μπορούν να παράγουν υψηλή συγκέντρωση της PtdIns3P στην πλασματική μεμβράνη, ενώ οι PI3Ks τύπου III (Vps34) και η Fig4 είναι δυνατό να ελέγχουν τα ενδοσωμικά τμήματα.⁴⁵⁻⁴⁷ Η PI3K τύπου III παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αυτοφαγία με την παραγωγή PtdIns3P στα αυτοφαγοσώματα.⁴⁸ Ωστόσο, η διατήρηση μιας σταθερής συγκέντρωσης PtdIns3P είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, και κυρίως για τον έλεγχο της ενδοκυτταρικής μεταφοράς και τη διατήρηση της δυναμικής της μεμβράνης αλλά και της κυτταρικής δομής.⁴⁵

Η PtdIns3P αλληλεπιδρά με πρωτεϊνικούς παράγοντες μέσω των περιοχών FYVE ή PX (οι περιοχές FYVE χρησιμοποιούνται ευρέως για τον εντοπισμό αυτού του λιπιδίου μέσω απεικόνισης) και, ανάλογα με τη θέση του ρυθμίζει (α) την ενδοκυτταρική μεταφορά (ενδοσωματική σύντηξη, ανακύκλωση κυστιδίων στην πλασματική μεμβράνη και στο trans-Golgi σύστημα, ταξινόμηση στα λυσοσωμικά διαμερίσματα⁴¹, (β) ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος με δέσμευση πρωτεϊνών από την οικογένεια Atg-18 (WIPI1 και 2)⁴⁹, (3) εξωκυττάρωση των κοκκίων ινσουλίνης από άγνωστο μηχανισμό⁵⁰, (4) ενεργοποίηση του p40phox, ενός συστατικού της οξειδάσης της NADH⁵¹, (5) κυτταροκίνηση, καθώς δεσμεύεται η πρωτεΐνη FYVE-HUNDRED σε κυτταροκινητικές γέφυρες.⁵¹ Η PtdIns3P αποτελεί επίσης ένα σημαντικό ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση της PtdIns(3,5)P₂ κατά τη φωσφορυλίωσή της από

την 5-κινάση PIKfyve. Έτσι, η PtdIns3P έχει πολλούς ρόλους, αλλά η συμμετοχή της στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής μεταφοράς (ενδοσωματική οδός και αυτοφαγία) αποτελεί το βασικότερο χαρακτηριστικό της.

A.5.3.2 4-φωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns4P)⁴²

Η PtdIns4P είναι ένα από τα PIs που βρίσκονται σε αφθονία. Βρίσκεται κυρίως στη συσκευή Golgi και στην πλασματική μεμβράνη, αλλά μπορεί επίσης να βρεθεί και στα ενδοσωματικά διαμερίσματα αλλά και στο σύστημα trans-Golgi. Η παραγωγή της πραγματοποιείται στα θηλαστικά από τα ένζυμα PI4K τύπου II (PI4KII a και b), και PI4K τύπου III (PI4KIII a και b). Η PI4K τύπου IIa βρίσκεται κυρίως στα ενδοσώματα, στο σύστημα trans-Golgi και στην πλασματική μεμβράνη⁵² ενώ η PI4K τύπου IIb βρίσκεται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη.⁵³ Η PIK τύπου IIIa υπάρχει στην πλασματική μεμβράνη, στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και στη συσκευή Golgi. Η PI4K τύπου IIIb περιγράφεται ως το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της PtdIns4P στη συσκευή Golgi μετά την αλληλεπίδρασή της με τη μικρή πρωτεΐνη G Arf1 και την πρωτεΐνη NCS-1 (νευρωνικός αισθητήρας ασβεστίου-1).⁵⁴ Ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση και διατηρείται ενεργή μέσω αλληλεπιδράσεων με συγκεκριμένες πρωτεΐνες που εμποδίζουν την αποφωσφορυλίωσή του.⁵⁵ Ένα άλλο ένζυμο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό της PtdIns4P είναι η 4-φωσφατάση Sac1 που εντοπίζεται στο ER και στην πλασματική μεμβράνη. Όταν υπάρχει έλλειψη θρεπτικών συστατικών, η Sac1 μετακινείται στη συσκευή Golgi προκειμένου να μειωθεί η συγκέντρωση της PtdIns4P.⁵⁶ Η PtdIns4P ρυθμίζει τη μεταφορά από τη συσκευή Golgi στην πλασματική μεμβράνη και στα ενδοσωματικά διαμερίσματα. Έτσι, αυτό το λιπίδιο εξασφαλίζει διάφορες λειτουργίες, όπως: (α) εντοπίζει τα ένζυμα που βρίσκονται στη συσκευή Golgi, (β) παραμορφώνει τμήματα της μεμβράνης, σχηματίζοντας κυστίδια,⁵⁶ (γ) ταξινομεί τις πρωτεΐνες στα ενδοσώματα, αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη προσαρμογέα κλαθρίνης (GGA2), η οποία με τη σειρά της αλληλεπιδρά με την Arf1,⁵⁷ και (δ) μεταφέρει τις πρωτεΐνες από το σύστημα trans-Golgi στην πλασματική μεμβράνη.⁵⁸ Επιπλέον, η PtdIns4P αποτελεί ένα ενδιάμεσο κλειδί στη βιοσύνθεση της PtdIns(4,5)P2 στην πλασματική μεμβράνη.

A.5.3.3 5-φωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns5P)⁵⁹

Η PtdIns5P βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση στα κύτταρα και μπορεί να συντεθεί με φωσφορυλίωση της PtdIns από την 5-κινάση PIKfyve αλλά και με αποφωσφορυλίωση της PtdIns(3,5)P2 από 3-φωσφατάσες της οικογένειας των μυτομπουλαρινών. Επίσης, είναι δυνατό να συντεθεί και από τη δράση της 4-φωσφατάσης θηλαστικών τύπου II, στη PtdIns(4,5)P2. Αντίθετα, έχει αποδειχθεί ότι η PtdIns5P φωσφορυλιώνεται μόνο από τις PIP4K

A, B και C (ονομάζονται επίσης PIPKa, b και g τύπου II) και για την παραγωγή PtdIns(4,5)P₂. Το επίπεδο της PtdIns5P αυξάνεται μετά από συγκεκριμένα ερεθίσματα (μέσω θρομβίνης, ινσουλίνης, παράγοντα FGF-1, κάποιων ογκογονιδίων, ωσμωτικού στρες, επίδρασης H₂O₂, επίδρασης ακτινοβολίας UV, μόλυνσης από βακτήρια).⁵⁹ Βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη και σε διάφορα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένων του ER και της συσκευής Golgi.⁶⁰ Οι λειτουργίες που σχετίζονται με την αύξηση της συγκέντρωσης της PtdIns5P είναι διαφορετικές, ανάλογα με τη θέση στην οποία βρίσκεται. Η PtdIns5P που βρίσκεται στον πυρήνα, είναι το φωσφολιπίδιο το οποίο έχει χαρακτηριστεί περισσότερο και έχει περιγραφεί ως στοιχείο απόκρισης του στρες. Στον πυρήνα, η PtdIns5P ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων, αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Η PtdIns5P αλληλεπιδρά ιδιαίτερα με την περιοχή PHD της ING2, η οποία χρησιμοποιείται συνήθως ως ανιχνευτής για την απεικόνιση αυτού του φωσφολιπιδίου.⁶⁰ Μελέτες έχουν δείξει ότι ο παράγοντας λοιμογόνου δράσης του *Shigella flexneri*, *IpgD* (πλασμιδικό γονίδιο εισβολής D), είναι μια ισχυρή 4-φωσφατάση της PtdIns(4,5)P₂ που παράγει σημαντικές ποσότητες PtdIns5P στο κύτταρο ξενιστή κατά τη μόλυνση. Στη συνέχεια, η PtdIns5P που δημιουργείται στις θέσεις εισόδου των βακτηρίων, ρυθμίζει τη δυναμική της μεμβράνης και τα ενδοκυτταρικά σήματα του κυττάρου ξενιστή, ενεργοποιώντας έτσι τη σηματοδότηση του κυττάρου ξενιστή προς όφελος των βακτηρίων.⁶¹ Επιπλέον, η αύξηση της συγκέντρωσης της PtdIns5P στην πλασματική μεμβράνη οδηγεί στο κλείσιμο των ημικαναλιών κοννεξίνης, τα οποία κανονικά απελευθερώνουν ATP στο εξωκυττάριο περιβάλλον, προκειμένου να ενεργοποιήσουν φλεγμονώδη απόκριση ενάντια στο παθογόνο.⁶¹ Έτσι, το βακτηριακό παθογόνο χρησιμοποιεί την PtdIns5P για να παραβιάσει το μοριακό μηχανισμό και τις αποκρίσεις του κυττάρου ξενιστή προς όφελός του. Εκτός από αυτή την παθολογική κατάσταση, ο ρόλος της PtdIns5P στη φυσιολογία παραμένει άγνωστος. Η διέγερση των λιποκυττάρων με ινσουλίνη επάγει επίσης μια μέγιστη παραγωγή της PtdIns5P με αποτέλεσμα την απώλεια των ινών ακτίνης και την επιτάχυνση του μεταφορέα της γλυκόζης GLUT4 στην πλασματική μεμβράνη. Η PtdIns5P ρυθμίζει επίσης την αυτοφαγία, ανεξάρτητα από την κανονική μεταβολική οδό που περιλαμβάνει τα Vps34 και PtdIns3P, υποδηλώνοντας έντονα ότι η μη πυρηνική PtdIns5P μπορεί να ρυθμίζει τη μεταφορά ουσιών στο κυτταρικό περιβάλλον.

A.5.3.4 3,4-Διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns(3,4)P₂)

Η PtdIns(3,4)P₂ παράγεται στην πλασματική μεμβράνη κατά την κυτταρική διέγερση που προκαλείται από τη φωσφορυλίωση της PtdIns(3,4,5)P₃ από την 5-φωσφατάση SHIP1,

SHIP2 και SKIP, η έκφραση των οποίων ποικίλλει ανάλογα με το είδος των ιστών. Οι PI3K τύπου II έχει αναφερθεί ότι παράγουν μια ομάδα PtdIns(3,4)P₂ που ελέγχουν μια ενδοκυττάρωση εξαρτώμενη από την κλαθρίνη.⁶² Συγκεκριμένες λειτουργίες της PtdIns(3,4)P₂ εξακολουθούν να είναι ελάχιστα γνωστές. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι αυτό το λιπίδιο έχει σημαντικές λειτουργίες σε διάφορες άλλες κυτταρικές διεργασίες, εκτός της ενδοκυττάρωσης. Αυτές περιλαμβάνουν: (α) μείωση της σηματοδότησης της ινσουλίνης μέσω αλληλεπίδρασης της περιοχής PH των TAPP1 και 2,⁶⁴ (β) ενδοκυττάρωση υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνη G εξαρτώμενη από υποκαταστάτη, μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει τις SHIP1, SHIP2, τη δέσμευση της Λαμελλιποδίνης (Lamellipodin) μέσω της περιοχής της PH και την επακόλουθη δέσμευση της ενδοφιλίνης η οποία επάγει ενδοκύτωση,⁶⁵ (γ) σχηματισμός λαμελλιποδίων, πιθανόν μέσω της αλληλεπίδρασής της με τη λαμελλιποδίνη (4) και σχηματισμός ποδοσωμάτων.⁶³

A.5.3.5 3,5-Διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη PtdIns(3,5)P₂⁶⁴

Η PtdIns(3,5)P₂ αν και δε βρίσκεται σε αφθονία, συντίθεται κυρίως μέσω φωσφορυλίωσης της PtdIns3P από την 5-κινάση PIKfyve. Η PIKfyve λειτουργεί μέσα σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που ονομάζεται PAS (για PIKfyve/ArPIKfyve/Sac3). Το σύμπλεγμα PAS έχει την ικανότητα να παράγει αναστρέψιμα PtdIns(3,5)P₂ λόγω της παρουσίας της 5-φωσφατάσης Sac3, η οποία υδρολύει την PtdIns(3,5)P₂ σε PtdIns3P.⁶⁴ Αυτό το σύμπλεγμα κινάσης/φωσφατάσης εντοπίζεται στα ενδοσώματα λόγω της αλληλεπίδρασης της περιοχής FYVE της PIKfyve με τη PtdIns3P.⁶⁵ Μια άλλη σημαντική οδός μεταβολισμού της PtdIns(3,5)P₂ εμπλέκει τις 3-φωσφατάσες της οικογένειας των μυοτουμπουλαρινών, που παράγουν PtdIns5P με αποφωσφορυλίωση της PtdIns(3,5)P₂.⁶⁶ Αυτά τα ένζυμα και η PtdIns(3,5)P₂ συμμετέχουν στην ομοίωση της ενδοσωμικής μεταφοράς. Η PtdIns(3,5)P₂ είναι δυνατό να ρυθμίζει την ενδοσωμική σχάση και σύντηξη, την ανάδρομη μεταφορά των ενδοσωμάτων στο σύστημα trans-Golgi και τη διαλογή κυστιδίων στο όψιμο ενδόσωμα.⁶⁷ Αυτές οι επιδράσεις προκαλούνται μέσω υποδοχέων που έχουν στη δομή τους μια περιοχή που μοιάζει με β-προπέλα που δεσμεύει αυτό το λιπίδιο.⁶⁷ Μελέτες έχουν δείξει ότι οι PtdIns3P, PtdIns5P και PtdIns(3,5)P₂ συνδέονται σε μεγάλο βαθμό μεταξύ τους και ότι η αλληλομετατροπή μεταξύ αυτών των λιπιδίων μπορεί να συμβάλλει στη ρύθμιση και το συντονισμό της δυναμικής του κυτταροσκελετού.

A.5.3.6 4,5-Διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns(4,5)P₂)³⁹

Η PtdIns(4,5)P₂ υπάρχει επίσης σε αφθονία κυρίως στο εσωτερικό τμήμα της πλασματικής μεμβράνης. Η PtdIns(4,5)P₂ έχει επίσης βρεθεί στη συσκευή Golgi, στα

ενδοσώματα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στον πυρήνα. Η βιοσύνθεση της PtdIns(4,5)P₂ ελέγχεται από έξι διαφορετικές κινάσες: Οι PIP5Ks a, b και g (ονομάζονται επίσης και PIPK τύπου I (a, b και g)), χρησιμοποιούν τη PtdIns4P ως υπόστρωμα και παράγουν το μεγαλύτερο ποσοστό της PtdIns(4,5)P₂. Τα ένζυμα PIP4K2 A,B και C (ονομάζονται επίσης και PIP4K τύπου II a, b και g), φωσφορυλιώνουν τη PtdIns5P στη θέση 4 για την παραγωγή μορίων PtdIns(4,5)P₂. Αυτό το λιπίδιο αποτελεί κυρίως το υπόστρωμα της φωσφολιπάσης C (PLC), το οποίο, κατά την κυτταρική ενεργοποίηση, παράγει τους δεύτερους αγγελιαφόρους τριφωσφορική ινοσιτόλη (Ins(1,4,5)P₃) και διακυλογλυκερόλη (DAG). Άλλες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι η PtdIns(4,5)P₂ χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα των PI3Ks τύπου I, προς παραγωγή του δεύτερου αγγελιαφόρου PtdIns(3,4,5)P₃. Δηλαδή, η PtdIns(4,5)P₂ αποτελεί πρόδρομο μόριο τριών βασικών δεύτερων αγγελιαφόρων. Επιπλέον, η PtdIns(4,5)P₂ αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες μέσω των περιοχών PH, ENTH, FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin). Μέσα από αυτές τις αλληλεπιδράσεις, ρυθμίζονται αρκετοί ρυθμιστές του κυτταροσκελετού της ακτίνης, αλλά και ορισμένοι διάλυτοι ιόντων. Η PtdIns(4,5)P₂ αποτελεί πολύ σημαντικό λιπίδιο καθώς εμπλέκεται έμμεσα ή άμεσα σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες.

A.5.3.7 3,4,5-Τριφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PtdIns(3,4,5)P₃)⁴⁰

Η PtdIns(3,4,5)P₃ αποτελεί βασικό δεύτερο αγγελιαφόρο λιπιδίων. Βρίσκεται σε ίχνη στα κύτταρα, όταν αυτά βρίσκονται σε ηρεμία, και παράγεται ταχέως και για μικρό χρονικό διάστημα από την ενεργοποίηση της PI3K τύπου I, μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων της μεμβράνης. Η PtdIns(3,4,5)P₃ παράγεται κυρίως στο εσωτερικό τμήμα της πλασματικής μεμβράνης, όπου δεσμεύει και ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες που έχουν στη δομή τους την περιοχή PH, συμπεριλαμβανομένης και της πρωτεΐνης κινάσης της ακτίνης (Akt).⁶⁸ Αυτό το PI συμμετέχει σε μεγάλο βαθμό στο σχηματισμό και την οργάνωση συμπλεγμάτων ενδοκυτταρικής συμματοδότησης, και έτσι ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την επιβίωσή τους, όπως επίσης και την ομοιοστάση της γλυκόζης αλλά και άλλων διεργασιών, όπως η πόλωση των κυττάρων⁶⁸ και η κινητικότητά τους.⁶⁸

Οι κυτταρικές μεμβράνες αλλάζουν συνέχεια τη δομή τους, λόγω της συνεχούς τους κίνησης. Αυτό συνεπάγεται ότι και τα PIs επίσης κινούνται μεταξύ των κυτταρικών μεμβράνων. Βασικό χαρακτηριστικό των PIs που βρίσκονται σε διαφορετικά τμήματα της μεμβράνης είναι ότι ορίζονται και διατηρούνται από τη δράση ενζύμων όπως λιπιδικών κινασών και φωσφατασών. Τα περισσότερα από αυτά τα ένζυμα έχουν αρκετές ισομορφές εντοπισμένες σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα. Αυτός ο χωρικός διαχωρισμός των

ενζύμων υποδηλώνει ότι τα PIs μπορούν να βρεθούν σε πολλά και διαφορετικά μεμβρανικά διαμερίσματα κατά τη διάρκεια της σύνθεσης. Εκτός από τη μεταφορά των κυστιδίων, τα PIs μεταφέρονται μεταξύ των διαμερισμάτων της μεμβράνης μέσω πρωτεϊνών μεταφοράς των φωσφολιπιδίων. Οι διάφορες θέσεις επαφής της μεμβράνης αποτελούν βασικές θέσεις για τέτοιου είδους ανταλλαγή λιπιδίων.⁶⁹

Εκτός από αυτές τις διαφορές στη σύσταση μεταξύ των διαμερισμάτων της μεμβράνης, προκύπτουν και άλλες αλλαγές στη σύνθεση ενός PI, οι οποίες εξαρτώνται από τη μεταβολική οδό στην οποία συμμετέχουν κάθε φορά η φωσφοϊνοσιτιδική κινάση και οι φωσφατάσες. Για παράδειγμα, η PtdIns(4,5)P₂ της πλασματικής μεμβράνης, η οποία αποτελεί και βασικό συστατικό της, μπορεί να μειωθεί δυναμικά με φυσιολογική διέγερση των υποδοχέων της μεμβράνης που ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C (PLC). Αντίθετα, η PtdIns(3,4,5)P₃ υπάρχει μόνο όταν οι υποδοχείς ενεργοποιούν τις PtdIns 3-κινάσες. Οι εναλλασσόμενες δραστηριότητες των ενζύμων των PIs έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν ταλαντευόμενες αλλαγές στα φωσφολιπίδια της πλασματικής μεμβράνης.⁷⁰

Τα φωσφοϊνοσιτιδία έχουν διάφορες λειτουργίες: εμπλέκονται στην εκβλάστηση και τη σύντηξη της μεμβράνης, τη δυναμική του κυτταροσκελετού, τον έλεγχο της λειτουργίας του πυρήνα, την πολωμένη κυτταρική μετανάστευση και τη σύνθεση των σηματοδοτικών πρωτεϊνών στις μεμβράνες. Αλληλεπιδρούν επίσης με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των διαύλων ιόντων, των μεταφορέων και των υποδοχέων. Επίσης, συμμετέχουν και σε άλλες βασικές λειτουργίες, όπως είναι η διόρθωση βλαβών του DNA, η ρύθμιση της μεταγραφής και ο έλεγχος της δυναμικής του RNA.⁷¹ Θεωρούνται ως βασικοί ρυθμιστές αυτής της διαδικασίας, καθώς έχουν τη δυνατότητα να φωσφορυλιώνουν το δακτύλιο της ινοσιτόλης. Διαφορετικές μορφές φωσφοϊνοσιτιδίων φαίνεται να εκτελούν συγκεκριμένες λειτουργίες σε κάθε επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης, επομένως, οι διαδικασίες που γίνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, πρέπει να συμβάλλουν στη ρύθμιση της παραγωγής αυτών των βιοχημικών μορίων. Επιπλέον, συγκεκριμένα είδη φωσφοϊνοσιτιδίων αναγνωρίζονται από εξειδικευμένες πρωτεϊνικές περιοχές των πρωτεϊνών του κυτοσολίου, και εντοπίζουν πρωτεΐνες σε συγκεκριμένα μεμβρανικά διαμερίσματα, ενώ συχνά δημιουργούν μικρούς σηματοδοτικούς τομείς.⁷²

A.5.4 Μηχανισμός κυτταρικής σηματοδότησης των φωσφοϊνοσιτιδίων

Όπως προαναφέρθηκε, τα PIs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αρκετές κυτταρικές μεταβολικές οδούς. Τα PIs διατηρούνται σε σταθερά επίπεδα στο εσωτερικό φύλλο της

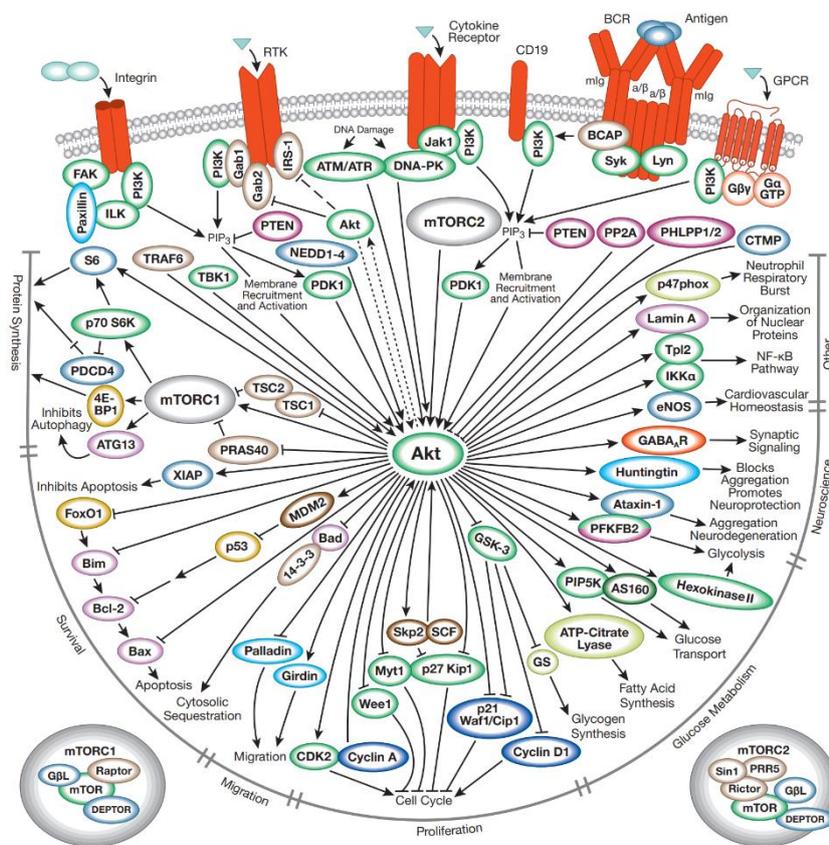
πλασματικής μεμβράνης, μέσω συνεχών και διαδοχικών αντιδράσεων φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης από ειδικές κινάσες και φωσφατάσες, αντίστοιχα, οι οποίες ρυθμίζονται ή/και μετατοπίζονται μέσω υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας που στοχεύουν σε αλληλεπίδραση με διάφορους εξωκυτταρικούς υποκαταστάτες.⁷³ Αυτή η διαδικασία έχει ονομαστεί «μάταιος κύκλος» και μπορεί να καταναλώσει ένα σημαντικό ποσοστό παραγωγής κυτταρικού ATP. Η ελεγχόμενη σύνθεση αυτών των διαφορετικών PIs μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διαφορετικά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, εκτελώντας διακριτές και ανεξάρτητα ρυθμιζόμενες λειτουργίες οι οποίες πραγματοποιούνται με διαφορετικά ένζυμα-στόχους.⁷⁴

Επομένως, η μελέτη του προφίλ των φωσφοϊνοσιτιδίων θα μας βοηθήσει να κατανοήσουμε τους σημαντικούς ρόλους που διαδραματίζουν τα φωσφοϊνοσιτιδία σε διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και του διαβήτη, καθιστώντας τα σημαντικούς στόχους για κλινική εφαρμογή με σκοπό τη θεραπεία. Παρόλο που μπορούν να έχουν πάρα πολλές φαρμακολογικές εφαρμογές, η μελέτη του προφίλ των φωσφοϊνοσιτιδίων έχει χρησιμοποιηθεί για την κατανόηση αρκετών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του οργανισμού και των παθογόνων.

A.5.5 Ο ρόλος των φωσφοϊνοσιτιδίων στην μεταγωγή σήματος.

Μεταξύ των μεταβολικών οδών όπου συμμετέχουν τα PIs, η μεταβολική οδός που έχει χαρακτηριστεί περισσότερο είναι αυτή της 3-κινάσης των φωσφοϊνοσιτιδίων (Phosphoinositide 3-kinase, PI3K).⁷⁵ Η λιπιδική κινάση PI3K συμμετέχει στη ρύθμιση ενός αριθμού κυτταρικών διεργασιών, όπως είναι η μεταγραφή, η μετανάστευση, η αγγειογένεση, η κυτταρική ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και ο μεταβολισμός της γλυκόζης. Η PI3K φωσφορυλιώνει τις φωσφατιδυλοϊνοσιτόλες της κυτταρικής μεμβράνης, δημιουργώντας μόρια όπως η 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PIP3) από το πρόδρομο μόριό της, 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PIP2). Η PIP3 αλληλεπιδρά με τις πρωτεϊνικές κινάσες της κυτταρικής μεμβράνης, όπως είναι η πρωτεϊνική κινάση B ή Akt (PKB/Akt) και η εξαρτώμενη από φωσφοϊνοσιτιδίο κινάση-1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1, PDK1), οι οποίες δεσμεύονται με την ομόλογη περιοχή PH (Pleckstrin Homology) της PI3K. Αυτή η διαδικασία σηματοδοτεί τη δράση της PI3K, οδηγώντας στη φωσφορυλίωση ενός μεγάλου αριθμού κυτταρικών μορίων, τα οποία σχετίζονται με τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, του κυτταρικού κύκλου, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ή της απόπτωσης των κυττάρων (Εικόνα 12).⁷⁶ Τα μεμβρανικά

φωσφολιπίδια που παράγονται με τη δράση της PI3K αποτελούν αναπόσπαστο στοιχείο που απαιτείται για την ενεργοποίηση της μεταβολικής οδού PKB/Akt.



Εικόνα 12: Σηματοδοτική οδός της PI3K/Akt. Πηγή: Cell Signaling Technology

A.6 Η σηματοδοτική οδός της PI3K/Akt

Η μεταβολική οδός της PI3K-Akt είναι μια ενδοκυτταρική οδός μεταγωγής σήματος που προάγει το μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση του κυττάρου, την ανάπτυξη και την αγγειογένεση, ως απόκριση σε εξωκυτταρικά σήματα. Πραγματοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσης της σερίνης ή/και της θρεονίνης που βρίσκονται σε ένα μεγάλο αριθμό διαφόρων υποστρωμάτων. Τα βασικά μόρια που εμπλέκονται σε αυτή τη σηματοδοτική οδό είναι:

- (1) **Υποδοχείς με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης (Receptor Tyrosine kinase, RTK):** Πρόκειται για υποδοχεία της κυτταρικής επιφάνειας που έχει υψηλή συγγένεια για πολλούς πολυπεπτιδικούς αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες και ορμόνες. Αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές: μια περιοχή δέσμευσης ενός εξωκυτταρικού προσδέματος, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυτταρική περιοχή της κινάσης της τυροσίνης. Όταν προσδέματα, όπως είναι ο αυξητικός

παράγοντας, συνδέονται με την RTK, δύο μονομερή RTK πλησιάζουν και σχηματίζουν ένα διμερές, το οποίο οδηγεί σε ενεργοποίηση της ενδοκυτταρικής περιοχής της κινάσης της τυροσίνης και αυτοφωσφορυλίωση από κάθε μονομερές.

(2) Η 3-κινάση της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης(Phosphatidylinositol 3-Kinase, PI3K):

Η PI3K είναι μια κινάση, η οποία έχει την ικανότητα να φωσφορυλιώνει την υδροξυλική ομάδα που βρίσκεται στη θέση 3 του δακτυλίου της ινοσιτόλης στο μόριο της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης. Η PI3K αποτελείται από μια καταλυτική περιοχή (P110) και δύο ρυθμιστικές περιοχές (P55 και P85).

(3) Η 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP2) και η 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (Phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphate, PIP3):

Όπως προαναφέρθηκε, η PIP2 και η PIP3 είναι μεμβρανικά φωσφολιπίδια που βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση και εκτελούν μια σειρά από σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η μετακίνηση των μεμβρανών (trafficking), η σύνδεση της πλασματικής μεμβράνης με τον κυτταροσκελετό, η λειτουργία ως δευτεροί αγγελιαφόροι, η συμβολή στην κυτταρική προσκόλληση και η ρύθμιση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων (Πίνακας 2). Η PIP3 είναι ο παράγοντας που διεγείρει τη μεταβολική οδό της PI3K. Η ενεργοποίηση της PI3K με διέγερσή της από αυξητικό παράγοντα των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση της PIP3 που συντίθεται από τη φωσφορυλίωση της PIP2. Η PIP2 αποτελεί πρόδρομο μόριο των δευτέρων αγγελιαφόρων στην κυτταρική σηματοδοτική οδό των Ca^{2+} , κινητοποιώντας τον αγγελιαφόρο 1,3,5 τριφωσφορική-ινοσιτόλη (IP3), καθώς και την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), ενώ ενεργοποιεί τη διακυλογλυκερόλη (DAG).

(4) Η πρωτεϊνική κινάση B (Akt/protein kinase B):

Η Akt η οποία ονομάζεται επίσης και πρωτεϊνική κινάση B, είναι μια σερίνο/θρεονινο εκλεκτική πρωτεϊνική κινάση, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Μόλις ενεργοποιηθεί, η Akt ρυθμίζει τη λειτουργία μέσω ενεργοποίησης της φωσφορυλίωσης, ή καταστολής ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την κίνηση, την προσκόλληση, τη νεοαγγείωση (neovascularization) και τον κυτταρικό θάνατο.

Πίνακας 2: Λειτουργίες της πλασματικής μεμβράνης που απαιτούν PIP2 και PIP3

<i>Λειτουργία</i>	<i>Φωσφοϊνοσιτίδια(PI)</i>
Κινητικότητα Μεμβρανών	Ενδοκύττωση Ρυθμιζόμενη εξωκύττωση
Διεπαφή Μεμβράνης/Κυτταροσκελετού	Σχηματισμός μικρολάχνης Προσκόλληση μεμβράνης στον κυτταροσκελετό
Κυτταρική Σηματοδότηση	Φαγοκυττάρωση Εντοπισμός και ενεργοποίηση πρωτεϊνικής κινάσης Ρύθμιση των ARF και GTP ασών Ρύθμιση της σηματοδότησης του υποδοχέα του EGF (EGFR)

A.6.1 Το ένζυμο 3-Κινάση των φωσφοϊνοσιτιδίων (PI3K)

Η PI3K είναι μια ομάδα λιπιδικών κινασών που δεσμεύονται στην πλασματική μεμβράνη, και αποτελείται από τρεις υπομονάδες: τη ρυθμιστική υπομονάδα P85, τη ρυθμιστική υπομονάδα P55 και την καταλυτική υπομονάδα P110.⁷⁷ Η PI3K χωρίζεται σε 3 τύπους, ανάλογα με τις διαφορετικές δομές και τα υποστρώματα στα οποία δεσμεύεται: τύπος I, II, και III. Οι PI3Ks τύπου I, αποτελούνται από τις PI3Ks τύπου IA και IB. Η PI3K τύπου IA είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από τη ρυθμιστική υπομονάδα P58 και την καταλυτική υπομονάδα P110 και εμπλέκονται κυρίως στον ανθρώπινο καρκίνο. Η PI3K τύπου IA περιέχει τις καταλυτικές υπομονάδες P110α, P110β και P110δ, οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (PIK3CA, PIK3CB και PIK3CD αντίστοιχα), ενώ το P110γ κωδικοποιείται από το γονίδιο PIK3CK και αποτελεί τη μοναδική καταλυτική υπομονάδα της PI3K τύπου 1B. Η ρυθμιστική υπομονάδα αποτελείται από τα P85a, P85b και P55g τα οποία κωδικοποιούνται από τα γονίδια PIK3R1, PIK3R2 και PIK3R3 αντίστοιχα. Η ρυθμιστική υπομονάδα P85 δεσμεύεται και προάγει σήματα από διάφορες ενδοκυτταρικές και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων της κινάσης της τυροσίνης, της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), την πρωτεΐνη 1-φωσφατάση της τυροσίνης η οποία περιέχει την ομόλογη περιοχή Src2 (SHP1), τους ορμονικούς υποδοχείς Rac, Rho, Src, καθώς και το μεταλλαγμένο υποδοχέα Ras.⁷⁷

A.6.2 Ενεργοποίηση της μεταβολικής οδού PI3K/Akt

Η μεταβολική οδός της PI3K/Akt ξεκινά με την ενεργοποίηση της PI3K από την RTK. Ένας αριθμός κυτοκινών ή αυξητικών παραγόντων, όπως είναι ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (Fibroblasts growth factor-FGF) και ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από

τα αιμοπετάλια (Platelet-derived growth factor-PDGF), δεσμεύονται στον υποδοχέα της πλασματικής μεμβράνης της RTK ως απόκριση στη διέγερση από εξωκυτταρικούς συνδέτες, επάγοντας το διμερισμό του υποδοχέα και τη διασταυρούμενη φωσφορυλίωση των αμινοξέων τυροσίνης σε διάφορες ενδοκυτταρικές περιοχές. Η ρυθμιστική υπομονάδα P85 συνδέεται με τη φωσφορυλιωμένη τυροσίνη στον ενεργοποιημένο υποδοχέα μέσω της περιοχής SH2. Η καταλυτική υπομονάδα P110 ρυθμίζεται στη συνέχεια προκειμένου να ενεργοποιήσει πλήρως το ένζυμο PI3K. Επίσης, η υπομονάδα P110 θα μπορούσε να ρυθμιστεί ανεξάρτητα από την υπομονάδα P85, όπως από τον παράγοντα Ras-GTP, αλλά και από άλλα μόρια, όπως είναι το υπόστρωμα του υποδοχέα της ινσουλίνης (Insulin Receptor Substrate, IRS). Στη συνέχεια, ο δεύτερος αγγελιαφόρος PIP3, ο οποίος φωσφορυλιώνεται από την PIP2, ενώνεται με τη σηματοδοτική πρωτεΐνη Akt και την 1-κινάση που είναι ανεξάρτητη της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (PDK1) στην υπομονάδα P110, μεταφέροντας την ανενεργή Akt και την PDK1 από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας στην PDK1 να αποκτήσει καταλυτική δράση. Ταυτόχρονα, η αλλαγή στη διαμόρφωση της δομής της Akt αλλάζει τις θέσεις φωσφορυλίωσης των αμινοξέων Thr308 και Ser473, οδηγώντας στη φωσφορυλίωση του αμινοξέος Thr308 από την PDK1. Επίσης, η δεύτερη φωσφορυλίωση στην τελική καρβοξυλομάδα του αμινοξέος Ser473 είναι αρκετά σημαντική και πραγματοποιείται κυρίως από το μηχανιστικό στόχο του συμπλέγματος ραπαμκίνης 2 (m TORC2).

Υπάρχουν και άλλες κινάσες που φωσφορυλιώνουν την Akt στο αμινοξύ Ser473, συμπεριλαμβανομένης της PDK1, της κινάσης που συνδέεται με ιντεγκρίνη (ILK) ή κινάσες που σχετίζονται με την ILK και την ίδια την Akt. Επίσης, πρωτεΐνες δέσμευσης όπως είναι η ακτίνη και η εξωκυτταρικά σηματοδορρυθμιζόμενη κινάση (Extracellular signalregulated kinase, ERK), είναι δυνατό να ρυθμίζουν τη δράση της Akt. Επιπλέον, τα μέλη της οικογένειας των κινασών σχετιζόμενων με την PI3K, συμπεριλαμβανομένων των εξαρτώμενων από το DNA πρωτεϊνικών κινασών (DNA-PK), μπορούν επίσης να φωσφορυλιώσουν την Akt στο αμινοξύ Ser473. Ως μέλος της Akt, η mTOR με τη σειρά της λειτουργεί ως ενεργοποιητής και ενεργοποιεί την Akt. Η mTOR συνδέεται με μια ρυθμιστική σχετιζόμενη πρωτεΐνη της mTOR (Raptor) σχηματίζοντας ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα, το οποίο ονομάζεται mTORC1, το οποίο φωσφορυλιώνει απευθείας την υδρόφοβη υπομονάδα του αμινοξέος Ser473 της Akt, και επομένως ενισχύει τη δράση της κινάσης Akt και προάγει τη φωσφορυλίωση του αμινοξέος Thr308 από το ένζυμο PDK1.⁷⁸ Το υπόστρωμα mTORC1 περιέχει τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E που δεσμεύει την πρωτεΐνη 1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 4EBP1) και την κινάση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6

(ribosomal protein S6 kinase), αλλά και το πολυπεπτίδιο 1 (S6K1), το οποίο, με τη σειρά του, φωσφορυλιώνει τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 (S6/RPS6), προάγοντας την πρωτεϊνική σύνθεση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

A.6.3 Ρύθμιση της σηματοδοτικής οδού PI3K/Akt

Η ενεργοποίηση της μεταβολικής οδού της PI3K-PKB/Akt ρυθμίζεται αυστηρά μέσω μιας διαδικασίας πολλαπλών βημάτων. Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς διεγείρουν άμεσα τις PI3Ks τύπου 1A που συνδέονται μέσω της ρυθμιστικής τους υπομονάδας ή των μορίων προσαρμογής, όπως είναι οι πρωτεΐνες του υποστρώματος του υποδοχέα ινσουλίνης (IRS). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PI3K και τη μετατροπή της PIP2 σε PIP3 στην καταλυτική της πλευρά. Η φωσφορυλίωση της Akt στην τελική καρβοξυλομάδα του αμινοξέος S473 είτε από το mTOR⁸² είτε από την DNA-PK,⁸³ διεγείρει την πλήρη δράση της Akt. Η πλήρης ενεργοποίηση της Akt οδηγεί σε πρόσθετες φωσφορυλιώσεις ειδικά για το υπόστρωμα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα, συμπεριλαμβανομένης της ανασταλτικής φωσφορυλίωσης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών FOXO.⁸⁴ Η πλήρως ενεργοποιημένη μεταβολική οδός PKB/Akt πραγματοποιεί πολυάριθμες κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η αγγειογένεση, ο μεταβολισμός, η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η πρωτεϊνοσύνθεση, η μεταγραφή και η απόπτωση.

Η σηματοδοτική οδός PI3K-Akt είναι σημαντικό να ρυθμιστεί με μεγάλη προσοχή. Η αρνητική ρύθμιση της οδού PI3K/Akt μπορεί να επιτευχθεί στοχεύοντας την PIP3 και την καταστολή της πρωτεΐνης Akt. Η ομόλογη πρωτεΐνη της φωσφατάσης και της τενσίνης (Phosphatase and Tensin homolog, PTEN protein) είναι μια ειδική φωσφατάση, η οποία έχει διπλή δράση: (α) αποτελεί ογκοκατασταλτικό παράγοντα και (β) μετατρέπει την PIP3 σε PIP2. Η αναστολή της AKT προκαλείται από την PTEN μέσω της αποφωσφορυλίωσης της PIP3 σε PIP2. Αυτή η μετατροπή μπορεί να γίνει και από την ομόλογη περιοχή Src που περιέχει την 1-ινοσιτόλη-5'-φωσφατάση (SHIP1). Άλλες δύο πρωτεΐνες αρνητικής ρύθμισης είναι η πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (Protein Phosphatase 2A-PP2A), η οποία αποφωσφορυλιώνει την Akt στο αμινοξύ Thr308 και η φωσφατάση PHLPP (phosphatase PHLPP), η οποία αποφωσφορυλιώνει την Akt στο αμινοξύ Ser473.

A.6.4 Δράσεις της σηματοδοτικής οδού PI3K/Akt

Μετά τη φωσφορυλίωση, η σηματοδοτική οδός PI3K/Akt συμμετέχει σε αρκετές βιολογικές δράσεις είτε φωσφορυλιώνοντας είτε σχηματίζοντας σύμπλοκα μόρια που συμμετέχουν σε αυτές τις βιολογικές δράσεις (π.χ. mTOR, πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την

ακτίνη κ.α.). Η Akt συμβάλλει στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, φωσφορυλιώνοντας και αναστέλλοντας τους αναστολείς κίνησης p21 και p27 που εξαρτώνται από την κυκλίνη, ενώ ρυθμίζει την απόπτωση, μέσω της αναστολής της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, της 9-κασπάσης και άλλων αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών. Μόλις ενεργοποιηθεί η Akt, μεταφέρεται από την πλασματική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, όπου εκεί βρίσκονται πολλά υποστρώματά της. Η φωσφορυλίωση από την Akt μπορεί να έχει είτε κατασταλτική είτε ενεργοποιητική δράση, καθώς καταστέλλει ή διεγείρει αντίστοιχα τη δράση των πρωτεϊνών που στοχεύει. Ανάλογα με την πρωτεΐνη που στοχεύει, η Akt μπορεί να ρυθμίσει διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες. Από αυτές, οι λειτουργίες που εμπλέκονται στη μεταβολική οδό της PI3K-Akt είναι οι ακόλουθες: (1) Κυτταρική απόπτωση ή επιβίωση. Η Akt ενισχύει την επιβίωση των κυττάρων εμποδίζοντας τη λειτουργία των προαποπτωτικών πρωτεϊνών (π.χ. Bcl-2) και διεργασιών, (2) Πρωτεϊνοσύνθεση και κυτταρική ανάπτυξη και (3) Πολλαπλασιασμός των κυττάρων και κυτταρικός κύκλος.

A.6.5 Αναστολείς της σηματοδοτικής οδού PI3K/Akt

Η PI3K αποτελεί έναν πολύ σημαντικό στόχο για τη θεραπεία διαφόρων ειδών καρκίνου καθώς η μεταβολική οδός της PI3K συσχετίζεται σημαντικά με την ανάπτυξη καρκίνου, την αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα, την ενισχυμένη χημειοταξία και τη δυνατότητα εισβολής των καρκινικών κυττάρων.

Οι αναστολείς της PI3K αποτελούν μια ομάδα φαρμάκων, τα οποία χρησιμοποιούνται κυρίως για τη θεραπεία διαφόρων ειδών καρκίνου. Η δράση τους βασίζεται στην αναστολή ενός ή περισσότερων από τα ένζυμα PI3K, τα οποία συμμετέχουν στη μεταβολική οδό PI3K/Akt/mTOR. Αυτή η μεταβολική οδός ρυθμίζεται αυστηρά σε υγιή κύτταρα, αλλά είναι πάντα ενεργή σε πολλά καρκινικά κύτταρα, επιτρέποντάς τα να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν. Οι αναστολείς της PI3K μπλοκάρουν τη μεταβολική οδό PI3K/Akt/mTOR και έτσι επιβραδύνουν την ανάπτυξη του καρκίνου και αποτελούν παράδειγμα στοχευμένης θεραπείας. Οι αναστολείς της PI3K χωρίζονται σε αναστολείς PI3K/mTOR, σε αναστολείς pan-PI3K και αναστολείς ειδικούς για ισομορφές.⁷⁷

Παρόλο που οι αναστολείς της PI3K είναι μια αποτελεσματική θεραπεία, ενδέχεται να έχουν πολύ σοβαρές παρενέργειες και επομένως χρησιμοποιούνται μόνο εάν άλλες θεραπείες δεν είναι αποτελεσματικές.

A.6.6 Φάρμακευτικοί αναστολείς της PI3K

A.6.6.1 Αναστολείς της σηματοδοτικής οδού PI3K/mTOR

NVP-BEZ235 (Dactolisib): είναι ένα ιμιδαζο-[4, 5-c]-κινολινικό παράγωγο, το οποίο αλληλεπιδρά με την περιοχή δέσμευσης του ATP της PI3K και της mTOR κινάσης, αναστέλλοντας την καταλυτική τους δράση. Το BEZ235 παρουσίασε ικανοποιητική αντικαρκινική δράση σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως καρκίνος του μαστού, καρκίνος του πνεύμονα, μελάνωμα, καρκίνος του παχέος εντέρου, καρκίνος του νεφρού, καρκίνος του προστάτη, λέμφωμα, και αδenoκαρκίνωμα του βλεννογόνου των ωοθηκών.

GDC-0980 (Apatolisib, RG7422): είναι ένα φάρμακο βιοδιαθέσιμο από το στόμα και αποτελεί ισχυρό αναστολέα της PI3K τύπου I και της mTOR κινάσης (TORC1/2). Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι αυτό το φάρμακο παρουσίασε αναστολή στο καρκίνωμα του ενδομητρίου, λέμφωμα non-Hodgkin και καρκίνο του παχέος εντέρου.

PF-04691502 και PF-05212384 (Gedatolisib, PKI-587): αποτελούν ανταγωνιστικούς αναστολείς των κινασών PI3K/mTOR, δεσμεύοντας το ATP. Μελέτες έδειξαν ότι αναστέλλουν τον όγκο του εγκεφάλου και του τραχήλου της μήτρας. Σε καρκινικές κυτταρικές σειρές όπου η PI3K έχει υποστεί μετάλλαξη και η PTEN διαγραφή, το PF-04691502 μπορεί να μειώσει τη φωσφορυλίωση της Akt και της S6RP, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Το PF-05212384 παρεμβαίνει ισχυρά στον κυτταρικό κύκλο και διακόπτει τις φάσεις G0/G1, ενώ προκαλεί και απόπτωση σε νευροενδοκρινικά καρκινικά κύτταρα. Επίσης έχει μελετηθεί και για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα, του εγκεφάλου, των ωοθηκών, του ενδομητρίου και του παγκρέατος.

A.6.6.2 Αναστολείς της μεταβολικής οδού: Pan-PI3K

BKM120 (NVP-BKM120, Buparlisib): το φάρμακο αυτό είναι βιοδιαθέσιμο από το στόμα και αποτελεί αντιστρεπτό αναστολέα της pan-PI3K τύπου 1. Το buparlisib έχει δείξει ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές του καρκίνου του μαστού, των ωοθηκών και του ενδομητρίου.

BAY 80-6946 (Copanlisib): είναι ένα ενδοφλέβιο φάρμακο, το οποίο αναστέλλει αντιστρεπτά την PI3K τύπου 1, και κυρίως τις ισομορφές p110α και p110δ, αν και βρίσκεται ακόμη στο στάδιο κλινικής ανάπτυξης. Έχει δοκιμαστεί για τη θεραπεία προχωρημένων όγκων, αλλά και για το λέμφωμα μη-Hodgkin, με αρκετά θετικά αποτελέσματα.

IPI-145 (Duvelisib): είναι ένα φάρμακο, βιοδιαθέσιμο από το στόμα, το οποίο αποτελεί αναστολέα της PI3K-δ και PI3K-γ, αλλά βρίσκεται ακόμη σε κλινική ανάπτυξη.

Προκλινικές μελέτες αποκάλυψαν ότι το IPI-145 καταστρέφει άμεσα τα κύτταρα χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας, ενώ δεν επιφέρει άμεση κυτταροτοξικότητα σε φυσιολογικά ανθρώπινα Β κύτταρα.

GDC-0941 (Pictilisib): το φάρμακο αυτό χορηγείται από το στόμα και αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα της pan-PI3K τύπου 1, το οποίο βρίσκεται στο στάδιο κλινικής ανάπτυξης. Μελέτες έχουν δείξει ότι έχει ισχυρή αντικαρκινική δράση σε ασθενείς με μη πλακώδη μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

GDC-0032 (Taselisib): αυτό το φάρμακο αποτελεί έναν ισχυρό και εκλεκτικό αναστολέα των ισομοφών p110α, p110δ και p110γ της PI3K τύπου I, ενώ παρουσιάζει 31 φορές χαμηλότερη αναστολή για την ισομορφή p110β. Το Taselisib έχει δοκιμαστεί κλινικά για τη θεραπεία τύπων καρκίνου όπως του μαστού.

A.6.6.3 Αναστολείς που στοχεύουν στις ισομορφές της PI3K

BYL719 (Alpelisib): αυτό το φάρμακο είναι βιοδιαθέσιμο από το στόμα και αποτελεί εκλεκτικό αναστολέα της ισομορφής PI3Kα. Μελέτες έχουν δείξει ότι παρουσιάζει αντικαρκινική δράση σε δοσοεξαρτώμενη συγκέντρωση.

CAL-101 (GS-1101, Idealisib): αυτό το φάρμακο χορηγείται από το στόμα και αποτελεί εκλεκτικό αναστολέα της ισομορφής PI3Kδ. Σύμφωνα με μελέτες, το Idelalisib έχει δείξει θεραπευτικά αποτελέσματα, χωρίς να αναστέλλει τη σηματοδοτική οδό της PI3K, η οποία είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία των υγιών κυττάρων. Το Idealisib αποτελεί το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο από τον FDA, το οποίο αναστέλλει τη δράση της PI3K, ενώ χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το Rituximab για τη θεραπεία της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας ή ως θεραπεία για το μικρό λεμφοκυτταρικό λέμφωμα και το θυλακιώδες λέμφωμα.

A.6.7 Η ομόλογη πρωτεΐνη PTEN φωσφατάσης και τενσίνης

Η ομόλογη πρωτεΐνη φωσφατάσης και τενσίνης (PTEN) είναι ταυτόχρονα μια λιπιδική φωσφατάση και ένας ογκοκατασταλτικός παράγοντας που έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό και κωδικοποιείται από το γονίδιο PTEN. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι μια φωσφατιδυλοϊνοσιτολ-3,4,5-τριφωσφορική 3-φωσφατάση. Περιέχει μια περιοχή που μοιάζει με την τενσίνη, καθώς και μια καταλυτική περιοχή παρόμοια με αυτή των φωσφατασών τυροσίνης. Σε αντίθεση με τις περισσότερες πρωτεϊνικές φωσφατάσες τυροσίνης, αυτή η πρωτεΐνη αποφωσφορυλιώνει κυρίως φωσφοϊνοσιτίδια. Ρυθμίζει επίσης

αρνητικά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της PIP3 στα κύτταρα και λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας, ρυθμίζοντας αρνητικά τη σηματοδοτική οδό Akt/PKB.⁷⁹

Οι μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου συμβάλλουν σημαντικά στην ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου, και συγκεκριμένα του γλοιοβλαστώματος, του καρκίνου του πνεύμονα, του καρκίνου του μαστού και του καρκίνου του προστάτη. Γονίδια που αντιστοιχούν στην PTEN έχουν ταυτοποιηθεί στα περισσότερα θηλαστικά.⁸⁰ Μεταβολίζει τη PIP3, το κύριο προϊόν της PI3K τύπου I, γεγονός που οδηγεί στην αναστολή της μεταβολικής οδού PI3K-Akt.⁸⁶ Η PTEN είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο, μοριακού βάρους 50 kD, που αλληλεπιδρά με την πλασματική μεμβράνη για να μεταβολίσει το λιπιδικό του υπόστρωμα.⁸¹ Η απώλεια της δραστηριότητάς της μέσω αρκετών διακριτών μηχανισμών παρατηρείται σε υψηλή συχνότητα σε πολλούς τύπους όγκων.⁸² Η δραστηριότητα της PTEN έχει ισχυρά αποτελέσματα σε πολλές κυτταρικές σειρές στον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, την επιβίωση και τις σχετικές αλλαγές στο μεταβολισμό ενώ μπορεί να ελέγξει την πόλωση και την κίνηση των κυττάρων με καθορισμένο τρόπο.⁸³ Πολλές από αυτές τις επιδράσεις προκαλούνται μέσω του μεταβολισμού της PIP3 που πραγματοποιείται από τη δράση της PTEN.⁸⁴ Η δραστηριότητα της PTEN ρυθμίζεται σε πολλά φυσιολογικά επίπεδα, μέσω ελεγχόμενης έκφρασής της και του μετα-μεταφραστικού ελέγχου της δραστηριότητάς της.⁸³ Όσον αφορά την αναστολή της, η PTEN, όπως και πολλές φωσφατάσες, επηρεάζεται σημαντικά από τις δραστικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η αναστολή μπορεί να συμβεί ως απόκριση στις ελεύθερες ρίζες ROS/RNS που είναι δυνατό να δημιουργηθούν εντός των κυττάρων.⁸⁵ Η PTEN είναι μέλος της υπερ-οικογένειας της πρωτεϊνικής φωσφατάσης της τυροσίνης (protein tyrosine phosphatase-PTP) και ακολουθεί έναν καταλυτικό μηχανισμό που βασίζεται στην αναγωγή μιας πυρηνόφιλης κυστεΐνης.⁸⁶

Ο έλεγχος της δράσης της PTEN έχει θεραπευτικό όφελος σε διάφορες καταστάσεις αν και υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι η μακροχρόνια συστηματική αναστολή της δράσης της PTEN ενδεχομένως να οδηγήσει σε αυξημένο κίνδυνο καρκίνου και ιδιαίτερα του μαστού.⁸⁷ Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η δράση της PTEN αναστέλλει την επιβίωση των κυττάρων κατά τη διάρκεια εγκεφαλικού επεισοδίου και καρδιακής ισχαιμίας⁸⁸ αλλά και την αναγέννηση των νευρώνων μετά από νευρωνική βλάβη.⁸⁹ Ως εκ τούτου, έχει αναπτυχθεί ενδιαφέρον για την πιθανή καταστολή της δράσης της PTEN για τη θεραπεία της νευρικής βλάβης και πιθανώς της καρδιακής ισχαιμίας με την προσδοκία ότι οι περίοδοι θεραπείας που μετρώνται σε ημέρες και εβδομάδες θα έχουν όφελος χωρίς να αυξάνουν σημαντικά τους κινδύνους καρκίνου. Η PTEN δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο

μέσω της δραστικότητας της φωσφατάσης του PIP3. Αυτή η φωσφατάση εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, εμποδίζοντας τα κύτταρα να αναπτυχθούν και να διαιρεθούν, και αποτελεί στόχο πολλών αντικαρκινικών φαρμάκων.

A.6.8 Δομή της PTEN

Η δομή της PTEN (όπως μελετήθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων X),⁹⁰ αποτελείται κυρίως από μια περιοχή φωσφατάσης και μια καρβοξυτελική περιοχή C2: η περιοχή φωσφατάσης περιέχει την ενεργή θέση, η οποία καταλύει την ενζυμική δράση της πρωτεΐνης, ενώ η περιοχή C2 δεσμεύεται στη μεμβράνη των φωσφολιπιδίων. Έτσι, η PTEN δεσμεύεται στη μεμβράνη τόσο μέσω των μορίων φωσφατάσης όσο και μέσω της περιοχής C2, φέρνοντας στην καταλυτική θέση τη PIP3 η οποία είναι δεσμευμένη στη μεμβράνη, για να την αποφωσφορυλιώσει.

Η καταλυτική περιοχή της PTEN αποτελείται από τρεις τομείς, τον τομέα TI, τον τομέα P και τον τομέα WPD, τα ονόματα των οποίων έχουν δοθεί σύμφωνα με την ονοματολογία PTPB1.⁹⁰ Μαζί σχηματίζουν μια ασυνήθιστα βαθιά και μεγάλη περιοχή η οποία επιτρέπει στην PTEN να δεσμεύσει το ογκώδες υπόστρωμα της 3,4,5-τριφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης. Ο μηχανισμός της αντίδρασης αποφωσφορυλίωσης της PTEN πιστεύεται ότι εξελίσσεται μέσω ενός ενδιάμεσου φωσφοενζύμου, με το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού στην κυστεΐνη C124 που βρίσκεται στην ενεργή περιοχή.

Η κρυσταλλική δομή της PTEN δεν περιέχει μια περιοχή που είναι γωστή ως PIP2 Binding Domain (PBD) ή PIP2 Binding Motif (PBM).^{91,92} Αυτή η περιοχή αυξάνει τη συγγένεια της PTEN για την πλασματική μεμβράνη δεσμεύοντας την PIP2 ή πιθανώς οποιοδήποτε ανιονικό λιπίδιο. Επίσης, η κρυσταλλική δομή δεν περιέχει το C τελικό άκρο (CTR), όπου περιλαμβάνει τα υπολείμματα 353-403. Το CTR φωσφορυλιώνεται σε διάφορες θέσεις της PTEN που επηρεάζουν διάφορες λειτουργίες της PTEN, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητάς της να συνδέεται με λιπιδικές μεμβράνες, και επίσης δρα είτε ως πρωτεΐνη είτε ως λιπιδική φωσφατάση.^{91,92}

A.6.9 Βιολογική δράση της PTEN

Η πρωτεΐνη PTEN δρα ως φωσφατάση και καταλύει την αποφωσφορυλίωση της 3'-φωσφορικής ομάδας του δακτυλίου της ινοσιτόλης στο μόριο της PIP3, σχηματίζοντας το διφωσφορικό προϊόν PIP2 (PtdIns(4,5)P2). Αυτή η αποφωσφορυλίωση είναι σημαντική γιατί έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σηματοδοτικής οδού της Akt. Η PTEN έχει επίσης χαμηλή δράση φωσφατάσης, ωστόσο αυτή η δράση παίζει σημαντικό ρόλο ως

ογκοκατασταλτικός παράγοντας. Η δράση της φωσφατάσης μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, εμποδίζοντας τα κύτταρα να αναπτυχθούν και να διαιρεθούν.⁹⁰ Έχουν αναφερθεί πολλά υποστρώματα για την PTEN, συμπεριλαμβανομένων των IRS1 και Dishevelled.⁹⁰ Η PTEN αποτελεί επίσης σημαντικό ογκοκατασταλτικό παράγοντα για την αντιμετώπιση διαφόρων τύπων καρκίνου, επομένως είναι σημαντικός στόχος για υποψήφια φάρμακα όπως είναι το oncomiR και το MIRN21.

A.6.10 Φάρμακα-Αναστολείς της PTEN

Ως προς την αναστολή της PTEN, έχουν συντεθεί κυρίως φάρμακα παράγωγα του βαναδίου. Καλοί εκπρόσωποι αυτής της ομάδας είναι το υδροξυ(οξο)βανάδιο-3-υδροξυπυριδινό-2-καρβοξυλικό οξύ (VO-OHpic) το οποίο έδειξε τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για την PTEN.⁹³ Από την άλλη, οι ενώσεις brV(rhen) και brV(pic) έχουν χρησιμοποιηθεί ως μελέτες από πολλές ομάδες για τη μελέτη της δράσης της PTEN σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 50 nM έως 5 μM.⁹³

A.7 Ο πνεύμονας

Ο πνεύμονας είναι ένα μοναδικό όργανο ως προς την ανατομική του δομή και το φυσιολογικό του ρόλο.⁹⁴ Ο πνεύμονας υπόκειται σε πολλές πολύπλοκες φυσικές δυνάμεις, όπως είναι η αναπνοή, η οποία αποτελεί και το κυριότερο χαρακτηριστικό του, η πνευμονική ροή του αίματος και η επιφανειακή τάση. Οι “αναπνευστικές κινήσεις” μπορούν να παρατηρηθούν με υπερηχογράφημα στο ανθρώπινο έμβρυο ήδη από τις 10 εβδομάδες κύησης. Μετά τη γέννηση, το πνευμονικό αγγειακό σύστημα έχει πολύ χαμηλή αντίσταση. Ο πνεύμονας δέχεται την ίδια ροή αίματος με ολόκληρο το κυκλοφορικό σύστημα. Η ροή του αίματος προέρχεται τόσο από τις πνευμονικές όσο και από τις βρογχικές αρτηρίες. Αυτά τα αιμοφόρα αγγεία υπόκεινται τόσο σε διατμητική τάση όσο και σε τέντωμα που δημιουργείται από την πίεση λόγω της ροής του αίματος. Η πίεση στις πνευμονικές αρτηρίες είναι συνήθως πολύ χαμηλότερη από αυτή στις αρτηρίες άλλων οργάνων. Ακόμη, οι συνολικές τάσεις που αντιμετωπίζει το πνευμονικό αγγειακό σύστημα επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τις αλλαγές στον όγκο των πνευμόνων κατά την αναπνοή. Ένα άλλο μοναδικό χαρακτηριστικό των φυσικών δυνάμεων που ασκούνται στον πνεύμονα είναι η διατμητική τάση και η πίεση της ροής του αέρα που ασκείται στον αεραγωγό. Η επιφανειακή τάση που σχηματίζεται στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού επηρεάζει επίσης τη διαμόρφωση του πνεύμονα και την αντίσταση των μικρών αεραγωγών. Ο πνεύμονας μοιράζεται το θωρακικό χώρο μαζί με την καρδιά και οι φυσικές δυνάμεις που προέρχονται από την καρδιά που χτυπά μπορεί να επηρεάσουν τη

λειτουργία και το μεταβολισμό του πνεύμονα, ειδικά κατά την ανάπτυξη του εμβρύου. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η δομή, η λειτουργία και ο μεταβολισμός των κυττάρων του πνεύμονα επηρεάζονται από τις φυσικές δυνάμεις. Παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη και η ωρίμανση των πνευμόνων του εμβρύου οι οποίες ρυθμίζονται από φυσικούς παράγοντες. Οι φυσικές δυνάμεις επηρεάζουν επίσης την ανάπτυξη των πνευμόνων μετά τη γέννηση, ενώ ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των κυττάρων επηρεάζονται κατά την ενηλικίωση. Ο τρόπος της αναπνοής και του μηχανικού αερισμού επηρεάζει επίσης τη σύνθεση και την έκκριση της πνευμονικής επιφανειοδραστικής ουσίας. Οι μηχανικές δυνάμεις που ασκούνται στον πνεύμονα έχουν βαθιές επιπτώσεις στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους και αφορούν κυρίως την ανάπτυξη των πνευμόνων, τις φυσιολογικές λειτουργίες και τις παθολογικές διεργασίες που πραγματοποιούνται στον πνεύμονα, όπως για παράδειγμα ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, ο μεταβολισμός της επιφανειοδραστικής ουσίας, ο κύκλος διεργασιών που πραγματοποιείται στην εξωκυτταρική μήτρα, η παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων, αλλά και η κυτταρική διαπερατότητα.

Οι φυσικές δυνάμεις μπορεί επίσης να συμβάλλουν στην αγγειογένεση και στην αγγειογένεση των πνευμονικών αιμοφόρων αγγείων καθώς και στη διακλάδωση των αεραγωγών κατά την ανάπτυξη των πνευμόνων. Από την άλλη, οι μη ελεγχόμενες φυσικές δυνάμεις συνδέονται με πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Ο υπερβολικός μηχανικός αερισμός μπορεί να προκαλέσει τραυματισμό των πνευμόνων σε κυτταρικό επίπεδο, όπως για παράδειγμα η χρόνια απόφραξη των αεραγωγών, η οποία συμβάλλει στην υπερπλασία και υπερτροφία των λείων μυών των αεραγωγών.

A.8 Επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα

Το κυψελιδικό επιθήλιο αποτελείται από δύο τύπους επιθηλιακών κυττάρων, τα οποία ονομάζονται κυψελιδικά κύτταρα τύπου I και τύπου II. Τα κύτταρα τύπου I είναι μεγάλα, επίπεδα κύτταρα που αποτελούν περίπου το 95% της κυψελιδικής επιφάνειας. Τα κύτταρα τύπου II είναι μικρά κυβοειδή κύτταρα που περιέχουν υψηλή πυκνότητα μιτοχονδρίων και έχουν χαρακτηριστικές φυλλιδωτές εγκοπές και μικρολάχνες. Κάθε κύτταρο τύπου II αποτελείται από περίπου 150 φυλλώδη σώματα, με μέση διάμετρο 1 μm και πολλαπλές διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων, και έχουν την τυπική κυτταρική μορφολογία.⁹⁵ Αντιπροσωπεύουν περίπου το 15% των συνολικών κυττάρων, αλλά καλύπτουν περίπου το 5% της κυψελιδικής επιφάνειας, ενώ αποτελούν προγονικά κύτταρα του κυψελιδικού επιθηλίου του ενήλικου πνεύμονα. Στον ενήλικο ανθρώπινο πνεύμονα κάθε κύτταρο τύπου II έχει επιφάνεια 250 m^2 , γεγονός που δηλώνει ότι το επιθήλιο είναι πιθανότατα η αρχική άμυνα στα

εισπνεόμενα σωματίδια. Τα κύτταρα τύπου II παράγουν και εκκρίνουν μια πνευμονική επιφανειοδραστική ουσία (surfactant). Έχουν επίσης τη δυνατότητα να μεταφέρουν νάτριο στην επιφάνεια του πνεύμονα προκειμένου να προστατέψουν την κυψελίδα από τα υγρά και να συμμετάσχουν στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα. Το κυψελιδικό υγρό έχει επίσης ορισμένα σημαντικά χαρακτηριστικά: πολύ χαμηλό όγκο (περίπου 35 mL ανά ενήλικο ανθρώπινο πνεύμονα) και όξινο pH περίπου 6.9.

Τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου I, τα οποία καλύπτουν το 95% της κυψελίδας αλλά αποτελούν μόνο το 8% των συνολικών κυττάρων στον υγιή ενήλικο ανθρώπινο πνεύμονα είναι επιμήκη, επίπεδα κύτταρα που μεσολαβούν στην ανταλλαγή αερίων. Αν και ο εμβρυϊκός πρόγονός τους δεν έχει ακόμη καθοριστεί, είναι παρόντα κατά τη γέννηση. Τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου I στις κυψελίδες πιστεύεται από καιρό ότι λειτουργούν ως προγονικά κύτταρα, καθώς όταν υπάρχει τραυματισμός των κυττάρων τύπου I, τα γειτονικά κύτταρα τύπου II διεγείρονται προκειμένου να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα τύπου I.⁹⁶

Τα κύτταρα τύπου I είναι πολύ πιο ευαίσθητα σε τραυματισμό από τα κύτταρα τύπου II. Στον τραυματισμένο πνεύμονα, τα κύτταρα τύπου II εξαπλώνονται προκειμένου να αναμορφώσουν το κυψελιδικό επιθήλιο μετά από απώλεια των κυττάρων τύπου I, ενώ στη συνέχεια διεγείρονται και πολλαπλασιάζονται για να αποκαταστήσουν το τραυματισμένο επιθήλιο. Είναι πιθανό τα κύτταρα τύπου II να εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες και προφλεγμονώδη μόρια, συμβάλλοντας στην επούλωση φλεγμονωδών αντιδράσεων. Από την άλλη, τα κύτταρα τύπου II μπορούν να προκαλέσουν καρκίνωμα των κυψελιδικών κυττάρων.

Τα κύτταρα τύπου II έχουν τέσσερις βασικές λειτουργίες: **(1)** Παραγωγή και έκκριση της επιφανειοδραστικής ουσίας, **(2)** Διεπιθηλιακή κίνηση του νερού και των ιόντων που ρυθμίζουν τον όγκο του κυψελιδικού επιφανειακού υγρού, **(3)** Έκφραση των ανοσοτροποποιητικών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την άμυνα εναντίον του ξενιστή και τη ρύθμιση της έμφυτης ανοσίας και **(4)** Αναγέννηση του κυψελιδικού επιθηλίου μετά από τραυματισμό.

A.9 Επιφανειοδραστική ουσία: Σύνθεση και έκκριση

Η επιφανειοδραστική ουσία αποτελεί απαραίτητο συστατικό για τη ζωή, καθώς καλύπτει τις κυψελίδες, μειώνει την επιφανειακή τους τάση και αποτρέπει την ατελεκτασία στο τέλος της εκπνοής. Συντίθεται αποκλειστικά από τα κύτταρα τύπου II και η σύστασή της

αποτελείται κυρίως από 90% λιπίδια και 10% πρωτεΐνες. Αποθηκεύεται σε συγκεκριμένα οργανίδια όπως τα ελασματικά σώματα, και εκκρίνεται με εξωκυττάρωση στον αυλό της κυψελίδας. Αρκετές οδοί σηματοδότησης που ρυθμίζουν την έκκριση της επιφανειοδραστικής ουσίας έχουν χαρακτηριστεί λεπτομερώς. Αυτές περιλαμβάνουν τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς σηματοδότησης: **(1)** την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης που σχηματίζει τη cAMP και ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση που είναι εξαρτώμενη από τη cAMP, **(2)** την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C και **(3)** ένα μηχανισμό που ρυθμίζεται από Ca^{2+} που πιθανώς οδηγεί στην ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από Ca^{2+} -καλμοδουλίνη πρωτεϊνικής κινάσης.⁹⁵ Αυτοί οι μηχανισμοί σηματοδότησης ενεργοποιούνται από μια ποικιλία αγωνιστών, όπως είναι το ATP, το οποίο ενεργοποιεί και τους τρεις μηχανισμούς σηματοδότησης. Επιπλέον, ο ρόλος και η ρύθμιση που παίζει ο κυτταροσκελετός στη σύντηξη του ελασματοειδούς σώματος με την πλασματική μεμβράνη και στην ανακύκλωση της επιφανειοδραστικής ουσίας και τον προσδιορισμό των μοριακών μηχανισμών που συνδέουν το ρυθμό ανακύκλωσης με αυτόν της έκκρισης, έχει ελκύσει αρκετά το ενδιαφέρον. Τα λιπίδια της επιφανειοδραστικής ουσίας έχουν τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες ιδιότητες. Οι λειτουργικές ομάδες που βρίσκονται στην κεφαλή του μορίου έχουν φορτίο με το οποίο σχηματίζουν σταθερές μεμβράνες με την επιφανειοδραστική ουσία στην κυψελιδική διεπιφάνεια αέρα-υγρού.⁹⁵

Η χαμηλή επιφανειακή τάση προκαλείται από τα φωσφολιπίδια, κυρίως τη διπαλμιτοΐλ φωσφατιδυλοχολίνη, η οποία αποτελεί το κύριο λιπίδιο της επιφανειοδραστικής ουσίας, και υποβοηθείται από τις υδρόφοβες επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες SP-B και SP-C.⁹⁵ Καθώς μόνο τα κύτταρα τύπου II παράγουν την επιφανειοδραστική πρωτεΐνη C, θεωρούνται ειδικός δείκτης. Επιπλέον, η πνευμονική επιφανειοδραστική ουσία προστατεύει τον περιφερικό πνεύμονα από επιβλαβή σωματίδια και μικροοργανισμούς.

A.10 Τεχνικές Μηχανικής Διέγερσης Πνευμονοκυττάρων

Μέχρι σήμερα έχει αναπτυχθεί μια τεράστια ποικιλία συσκευών για την εφαρμογή μηχανικής διέγερσης σε πειραματικά μοντέλα (π.χ. κύτταρα A549) και ιστούς. Η εφαρμογή του μηχανικού ερεθίσματος εξαρτάται από τη φύση του πειραματικού μοντέλου. Για παράδειγμα, τα κύτταρα A549 υποβάλλονται σε στατικό ή/και κυκλικό stretch καλλιεργημένα σε τρυβλία με ελαστικό πάτο. Τα λεία μυϊκά κύτταρα τεντώνονται, επομένως η μελέτη της συμπεριφοράς τους γίνεται από συσκευές που ασκούν εφελκυστικές δυνάμεις *in vivo*, ενώ τα

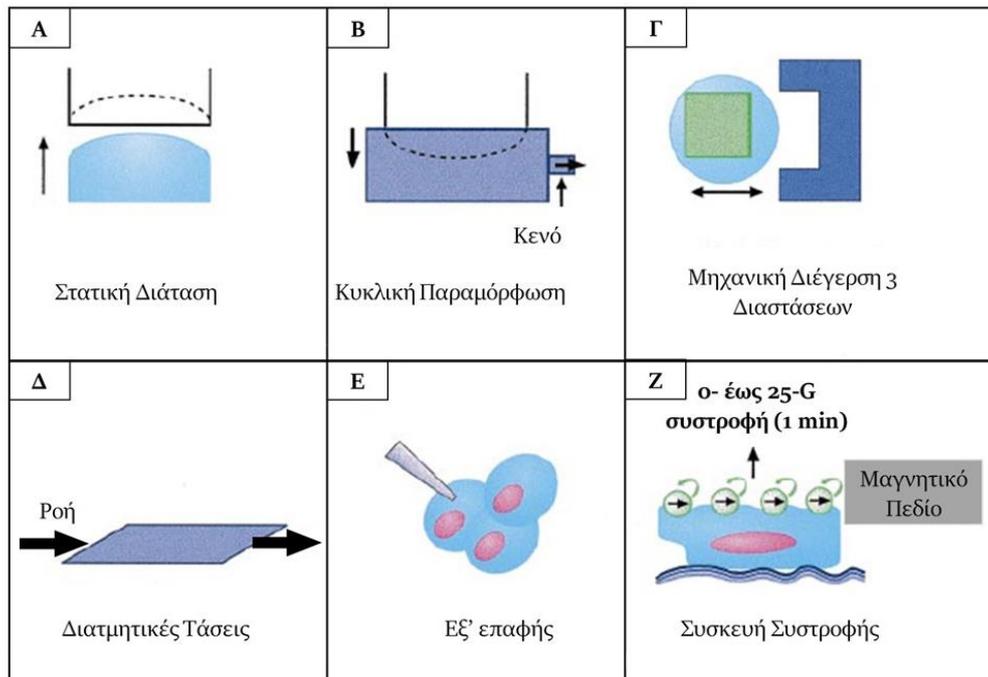
ενδοθηλιακά κύτταρα που επενδύουν την εσωτερική φόδρα των αιμοφόρων αγγείων υποβάλλονται σε δυνάμεις διάμεσης ροής (interstitial flow) βιολογικών ρευστών.

Η τεχνική του εφελκυσμού έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πειραματικά μοντέλα τόσο για μονοαξονική όσο και για διαξονική παραμόρφωση. Τα κύτταρα καλλιεργούνται και προσκολλώνται σε τρυβλία με εύκαμπτη μεμβράνη. Έτσι, μπορούν να εφαρμοστούν στατικές και κυκλικές δυνάμεις εφελκυσμού. Σε αυτή την τεχνική δύναται η δυνατότητα επιλογής υποστρώματος για τον έλεγχο περισσότερων παραμέτρων. Για παράδειγμα, μια βιοσυμβατή επιφάνεια τροποποιείται με επίστρωση της ελαστικής μεμβράνης με ειδικά μόρια της εξωκυττάριας μήτρας (κολλαγόνο, λαμινίνη κ.α.), παρέχοντας τη δυνατότητα της περαιτέρω διερεύνησης της αλληλεπίδρασης μεταξύ ECM-κυττάρου.

Αν και είναι προφανές ότι οι μηχανικές δυνάμεις είναι σημαντικοί ρυθμιστές του σχηματισμού, της λειτουργίας και του μεταβολισμού των πνευμόνων, μελέτες σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο περιορίστηκαν αρκετά λόγω της έλλειψης κατάλληλων συσκευών προσομοίωσης διαφόρων τύπων μηχανικών δυνάμεων σε κύτταρα *in vitro*. Κατά την τελευταία εικοσαετία, διάφορες συσκευές έχουν αναπτυχθεί για την εφαρμογή μηχανικής διέγερσης σε πνευμονοκύτταρα, μερικά από τα οποία έχουν καταστεί εμπορικά διαθέσιμα. Κατ' αρχήν, οι φυσικές δυνάμεις που εφαρμόζονται στα κύτταρα θα πρέπει να ποσοτικοποιούνται με συγκεκριμένους φυσικούς όρους όπως η τάση (stress), η καταπόνηση (strain) και η (διατμητική) τάση. Ωστόσο, λόγω του σχετικά μικρού μεγέθους ενός μεμονωμένου κυττάρου και της πολυπλοκότητας της κυτταρικής μορφολογίας, στις περισσότερες περιπτώσεις, οι δυνάμεις που ασκούνται δε μπορούν να ταξινομηθούν με ακρίβεια. Για παράδειγμα, η εφαρμογή μονοαξονικής δύναμης/τάσης μπορεί να οριστεί ως η αλλαγή του μήκους (L) διαιρούμενη με το αρχικό μήκος (L_0). Ωστόσο, όταν τα κύτταρα τεντώνονται προς μία κατεύθυνση, υπόκεινται επίσης σε συμπίεση (compression) προς την κατεύθυνση κάθετα προς τη δύναμη της έλξης. Επομένως, έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλοι όροι όπως «τέντωμα» και παραμόρφωση. Αυτοί οι όροι ενδέχεται να αντικατοπτρίζουν καλύτερα τη φύση των δυνάμεων που εφαρμόζονται στα κύτταρα.

Η συστολή και διαστολή του πνεύμονα κατά τη διάρκεια της αναπνοής προκαλεί παραμόρφωση στα πνευμονικά κύτταρα. Εκτός αυτού, ο όγκος του αέρα και η ροή του αίματος ασκούν πιέσεις που τεντώνουν τα τοιχώματα των αεραγωγών και των αιμοφόρων αγγείων. Η μελέτη των μηχανικών διεγέρσεων στα πνευμονοκύτταρα γίνεται από συσκευές

προσομοίωσης ειδικά σχεδιασμένες για εφαρμογή μηχανικής δύναμης στα κύτταρα. Στην **Εικόνα 13** αναφέρονται συνοπτικά κάποια είδη διεγέρσεων⁹⁷.



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση των συσκευών που υποβάλλουν τα κύτταρα σε μηχανική διέγερση⁹⁷. A: τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ελαστική μεμβράνη που ωθείται προς τα πάνω (βέλος) στατικά ή με παλμό. B: τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ελαστική μεμβράνη και έλκονται προς τα κάτω (κάτω βέλος) με αρνητική πίεση. Γ: τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ένα σφουγγάρι Gelfoam, το ένα άκρο του οποίου είναι κολλημένο στο κάτω μέρος ενός τρυβλίου Petri ενώ το άλλο άκρο είναι προσαρτημένο σε μεταλλική ράβδο. Μια μαγνητική δύναμη (βέλος) δρα στη μεταλλική ράβδο για να εφαρμόσει πίεση σε κυτταρικές καλλιέργειες στο σφουγγάρι. Δ: ένας διάυλος ροής παράλληλης πλάκας εφαρμόζει διατμητική τάση σε κύτταρα που καλλιεργούνται ως μονοστιβάδες. E: μια μικροπιπέτα ασκεί δύναμη στη μεμβράνη ενός κυττάρου και την παραμορφώνει. Z: Σφαιρικά σιδηρομαγνητικά υλικά προσκολλώνται πάνω σε μεμβρανικούς υποδοχείς και μαγνητίζονται προς μια κατεύθυνση. Ένα δεύτερο, ασθενέστερο, μαγνητικό πεδίο εφαρμόζεται σε προσανατολισμό 90 μοιρών και έτσι τα σφαιρίδια στρέφονται εφαρμόζοντας ελεγχόμενη διατμητική τάση.

Για το λόγο αυτό, έχουν σχεδιαστεί αρκετές συσκευές, προκειμένου να προσομοιώσουν το είδος της μηχανικής διέγερσης που εφαρμόζεται στα πνευμονικά κύτταρα. Αυτές οι συσκευές μπορούν να χωριστούν σε διαφορετικές κατηγορίες, ανάλογα με τα κύρια φυσικά χαρακτηριστικά τους, όπως είναι για παράδειγμα το είδος της μηχανικής διάτασης (στατική ή κυκλική), ο άξονας κίνησης της μηχανικής διάτασης (μονοαξονική ή διαξονική διάταση) και το είδος της έκτασης (δυσδιάστατη ή τρισδιάστατη).⁹⁴

Μηχανική στατική διάταση (Static Stretch): Η εφαρμογή αυτού του είδους διάτασης, μέσω συσκευής, σε μοντέλα πνευμονικών κυττάρων που καλλιεργούνται σε μια εύκαμπτη μεμβράνη, γίνεται μέσω διαξονικής τάσης, ωθώντας το υπόστρωμα προς τα πάνω υπό θετική πίεση. Από την άλλη, υπάρχει και άλλη συσκευή που εφαρμόζει στατική μονοαξονική τάνυση στις οποίες το ελαστικό υπόστρωμα έλκεται οριζόντια.

Μηχανική κυκλική διάταση (Cyclic Stretch): Για την εφαρμογή κυκλικής διάτασης σε μοντέλα κυττάρων του πνεύμονα, χρησιμοποιείται η συσκευή Flexercell, η οποία είναι και εμπορικά διαθέσιμη. Αυτός ο εξοπλισμός χρησιμοποιεί μια αντλία κενού, προκειμένου να μπορεί να μετακινεί μια εύκαμπτη μεμβράνη που καλύπτει τις κυψελίδες, προς τα κάτω. Η μεμβράνη μπορεί να προεπικαλυφθεί με διάφορες χημικές ουσίες ή συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM). Επίσης, για την εφαρμογή καταπόνησης σε κύτταρα πνεύμονα χρησιμοποιείται συνήθως συσκευή που εκτελεί διαζονική κυκλική διάταση.

A.11 Μεταγωγή μηχανικού σήματος στον πνεύμονα

Οι πνεύμονες παρουσιάζουν αξιολογική ευαισθησία στη μηχανική διάταση. Η επέκταση και η χαλάρωση των πνευμόνων κατά τις αναπνευστικές κινήσεις προκαλούν παραμόρφωση στα κύτταρα του πνεύμονα. Εκτός από τη διατμητική τάση, ο όγκος του αέρα και η ροή του αίματος δημιουργούν επίσης πιέσεις που προκαλούν διάταση στα τοιχώματα των αεραγωγών και των αιμοφόρων αγγείων. Από την άλλη πλευρά, καταστάσεις που διαστέλλουν ή συστέλλουν τον αναπτυσσόμενο πνεύμονα, μειώνουν τη μηχανική διάταση και καταλήγουν σε υποπλασία του πνεύμονα.⁹⁸ Μετά τη γέννηση, η ανάπτυξη των πνευμόνων διεγείρεται από διάταση που συνοδεύει τη διεύρυνση της θωρακικής κοιλότητας, κατευθύνοντας την ανάπτυξη των πνευμόνων ανάλογα με τις αλλαγές στο μέγεθος και το σχήμα του περιβάλλοντος χώρου. Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο η μηχανική διάταση συντονίζει και προάγει την ανάπτυξη των πνευμόνων, δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Οι ινοβλάστες του πνεύμονα (LFs) είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνθεση της μήτρας, την αναδιαμόρφωση του ιστού και την ανάπτυξη των πνευμόνων.⁹⁹

Αν και το μεγαλύτερο ποσοστό των μηχανοαισθητήρων και των οδών σηματοδότησης διεγείρονται τόσο από τη διατμητική τάση όσο και από την τάση, η φύση και το μέγεθος των μηχανικών δυνάμεων μπορεί να επηρεάσουν ορισμένες οδούς σηματοδότησης. Είναι ενδιαφέρον ότι η κυκλική αλλά όχι η σταθερή μηχανική καταπόνηση ενεργοποιεί τον αγγειακό παράγοντα FAK, και τον Src και οι ιντεγκρίνες εμπλέκονται στη σταθερή επαγόμενη από πίεση ενεργοποίηση του παράγοντα FAK στα αγγεία. Ωστόσο, η έντονη μηχανική διάταση έχει αποδειχτεί ότι ενεργοποιεί επίσης την οδό NFκB σε αρουραίους και στα κυτταρικά μοντέλα VILI μέσω της οδού PI3K ενώ επιδεινώνει την επαγόμενη από σήψη ενεργοποίηση του NFκB σε πνευμονικά κύτταρα που έχουν απομονωθεί.

A.12 Επίδραση κυκλικής μηχανικής διάτασης (Cyclic Stretch) στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα

Τα επιθηλιακά κύτταρα στους αεραγωγούς παίζουν αρκετά σημαντικό ρόλο τόσο στον καθορισμό του φυσικού φραγμού μεταξύ του ξενιστή και του εξωτερικού περιβάλλοντος όσο και στη ρύθμιση της απόκρισης σε φλεγμονές που προκαλούνται από ασθένειες των αεραγωγών, όπως είναι το άσθμα. Τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών μεταναστεύουν ως απόκριση σε τραυματισμό κατά μήκος της βασικής μεμβράνης που περιέχει αρκετές πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής μεμβράνης και χρησιμοποιούν υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας που ανήκουν στην οικογένεια των ιντεγκρινών.¹⁰⁰ Η μετανάστευση των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων μετά από τραυματισμό πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια μιας κυκλικής μηχανικής διάτασης (cyclic stretch) του υποκείμενου υποστρώματος στους αεραγωγούς κατά τη διαδικασία της αναπνοής. Παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι το άσθμα, είναι πιθανό να αλλάξουν αυτές τις μηχανικές καταπονήσεις, λόγω αλλαγών που γίνονται στους βρόγχους, παγίδευση του όγκου ή αναδιαμόρφωση της δομής των. Η κυκλική μηχανική διάταση (Cyclic Stetch) των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων προκαλεί αναστολή της επούλωσης των πληγών, κυρίως μέσω μηχανισμών που μειώνουν τη μετανάστευση των κυττάρων.¹⁰⁰

Κατά τη διάρκεια μηχανικού αερισμού με μεγάλους παλιρροϊκούς όγκους, τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα υφίστανται μηχανική διάταση. Είναι γνωστό ότι τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα ανταποκρίνονται στη μηχανική διάταση με διαφορετικούς τρόπους. Μία απλή μηχανική διάταση στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα προκάλεσε αύξηση του Ca^{2+} του κυτοσολίου, ακολουθούμενη από διέγερση της έκκρισης της επιφανειοδραστικής ουσίας σε ένα μόνο κύτταρο και σε επίπεδο ολόκληρου του οργάνου. Το μηχανικό stretch στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα αύξησε τη δραστηριότητα του ενζύμου $Na^+-K^+-ATPάσης$ και, σε εμβρυϊκά πνευμονικά κύτταρα, αύξησε την ενσωμάτωση θυμιδίνης, τα επίπεδα της cAMP και τη σύνθεση φωσφολιπιδίων που σχετίζονται με την επιφανειοδραστική ουσία και τη διαμόρφωση της εξωκυτταρικής μεμβράνης. Το κυκλικό stretch επίσης ενεργοποιεί τη MAPK στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα. Η εφαρμογή του κυκλικού stretch μπορεί να επάγει επίσης παραγωγή των ελεύθερων ριζών (ROS). Αυξημένα επίπεδα των ROS επάγουν την περαιτέρω αύξηση της αγγειακής διαρροής των πνευμόνων, διεγείροντας τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου, με αποτέλεσμα να δημιουργείται πνευμονικό οίδημα και φλεγμονή.

A.12.1 Η κυκλική μηχανική διάταση (cyclic stretch) στα πνευμονικά κύτταρα

Η κυκλική μηχανική διάταση και η στατική μηχανική διάταση έχει αποδειχθεί ότι έχουν σημαντικούς ρόλους στη ρύθμιση της λειτουργίας της εξωκυτταρικής μεμβράνης, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Στην πνευμονική κυκλοφορία, η παθολογική υπερδιάταση του

πνεύμονα μπορεί να προκαλέσει φλεγμονώδεις αποκρίσεις που προκαλούνται από τη μηχανική ενεργοποίηση των μακροφάγων, των επιθηλιακών και των ενδοθηλιακών κυττάρων, επάγοντας τη δυσλειτουργία του κυψελιδικού και του ενδοθηλιακού φραγμού, και αγγειακή διαρροή, καταλήγοντας σε πνευμονικό οίδημα που προκαλείται από τον αναπνευστήρα (VILI).¹⁰¹ Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και με πειράματα σε μοντέλα μηχανικού αερισμού με υψηλούς παλιρροϊκούς όγκους όπου πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση των διάφορων φλεγμονωδών αποκρίσεων, και αυξημένη αγγειακή διαρροή.¹⁰² Παρόμοια μηχανική διάταξη εμφανίζεται και από τα τριχοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα που σχηματίζουν στενές επαφές με το κυψελιδικό επιθήλιο. Μελέτες των κυτταρικών μηχανισμών που περιγράφουν την πνευμονική βλάβη που προκαλείται από αερισμό έχουν αποδείξει διάφορες πιθανές οδούς που οδηγούν στην αγγειακή δυσλειτουργία, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης της παραγωγής ιντερλευκίνης-8,¹⁰³ της διήθησης λευκοκυττάρων ή της διαταραχής της κυτταρικής μεμβράνης.¹⁰⁴ Από την άλλη, υπάρχουν και άλλα *in vitro* μοντέλα που έχουν παρομοιάσει τις επιδράσεις της παθολογικής κυκλικής διάτασης και των φλεγμονωδών παραγόντων στα πνευμονικά κύτταρα που αναπαρήγαγαν κυτταρικές αποκρίσεις, όπως η παραγωγή κυτοκίνης και η έξαρση της δυσλειτουργίας του ενδοθηλιακού φραγμού που προκαλείται από αγωνιστές από την κυκλική διάταση υψηλού πλάτους που παρατηρείται συνήθως στον τραυματισμένο πνεύμονα.¹⁰⁵ Το κυκλικό stretch έχει αποδειχθεί επίσης ότι διεγείρει την παραγωγή της προστακυκλίνης, της ενδοθηλίνης, του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου ιστού, και μονοξειδίου του αζώτου στην εξωκυτταρική μεμβράνη. Επιπλέον, το κυκλικό stretch αποτελεί ένα από τα πολλά ερεθίσματα που ρυθμίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση, την κυτταρική μορφολογία, τη μετανάστευση, την απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους στην εξωκυτταρική μεμβράνη.

A.12.2 Επίδραση της κυκλικής μηχανικής διάτασης (κυκλικό stretch) στις βιοχημικές οδούς σηματοδότησης

Η κυκλική μηχανική διάταση (κυκλικό stretch) συσχετίζεται άμεσα με τη σηματοδοτική οδό της PI3K σε ήδη τραυματισμένα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα, καθώς έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να αναστείλλει την ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού της PI3K, οδηγώντας σε μειωμένη ενεργοποίηση του παράγοντα Rac1. Ακόμη, η επίδραση του κυκλικού stretch είναι δυνατό να μειώσει το ρυθμό μετανάστευσης των κυττάρων. Η ενεργοποίηση της PI3K διεγείρει την ενεργοποίηση του παράγοντα Rac1, μέσω του παράγοντα Tiam1, οδηγώντας σε φωσφορυλίωση του παράγοντα JKN1.

Όπως έχει αναφερθεί, η ενεργοποίηση της PI3K έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση των λευκοκυττάρων, καθώς εμπλέκεται στην κινητικότητά τους. Η PI3K εμπλέκεται επίσης σε παρόμοιες διεργασίες και σε προσκολλημένα κύτταρα, αλλά ο ειδικός ρόλος της PI3K και οι αλληλεπιδράσεις της με άλλες σηματοδοτικές οδούς φαίνεται να ποικίλλουν σημαντικά ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου ή του ιστού.¹⁰⁶ Μελέτες έχουν δείξει ότι η επίδραση του κυκλικού stretch για χρονικό διάστημα μέχρι 6 ωρών μείωσε τη δράση της PI3K.¹⁰⁰ Μελέτες σχετικά με την επίδραση των μηχανικών ερεθισμάτων στη σηματοδοτική οδό PKB/Akt έχουν διεξαχθεί κυρίως σε κύτταρα που προέρχονται από το ενδοθήλιο.¹⁰⁷

Πολλές πρωτεΐνες που δεσμεύουν την ακτίνη ρυθμίζονται από συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις με φωσφοϊνοσιτίδια που ρυθμίζουν τη δράση τους και τον εντοπισμό τους.¹⁰⁸ Πειράματα *in vitro* έχουν δείξει ότι η PIP2 ρυθμίζει τον παράγοντα CapZ.¹⁰⁹ Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μηχανική σηματοδότηση προκάλεσε μια αλλαγή στη δυναμική τόσο του CapZ1 όσο και της ακτίνης μέσω της PIP2, η οποία αύξησε τη δράση της ακτίνης. Το καρβοξυτελικό άκρο του CapZ1 δεν αλληλεπιδράσε άμεσα με την περιοχή δέσμευσης της PIP2, ωστόσο η απομάκρυνσή του επέτρεψε στο υπόλοιπο μόριο να αλληλεπιδράσει περισσότερο με την PIP2. Επιπλέον, η παραγωγή της PIP2 ρυθμίστηκε από την οδό της RhoA/ROCK, ως απόκριση στη μηχανική διέγερση.

Τα μηχανικά σήματα μεταδίδονται από την εξωκυτταρική μεμβράνη στον κυτταροσκελετό μέσω των ιντεγκρινών. Η PIP2 έχει εμπλακεί στη ρύθμιση των εστιακών συμφύσεων κατά τη διάρκεια των αλλαγών που γίνονται κατά την προσκόλληση των κυττάρων στην εξωκυτταρική μεμβράνη. Η PIP2 ενεργοποιεί πολλά βασικά συστατικά της εστιακής πρόσφυσης, όπως η βινκουλίνη και η ταλίνη. Αυτές οι οδοί σηματοδότησης ενεργοποιούνται από δυνάμεις που μεταδίδονται από το εξωκυττάριο περιβάλλον ή από αυτές που δημιουργούνται εσωτερικά και προς τις δύο κατευθύνσεις οι οποίες οδηγούν στη συναρμολόγηση των νηματίων ακτίνης στις εστιακές συμφύσεις.¹¹⁰

Όπως έχει αναφερθεί, η PIP2 βρίσκεται κυρίως στο μεμβρανικό τμήμα των κυττάρων, αφού η δομή της αποτελείται από φωσφοϊνοσιτόλη και από δύο αλυσίδες λιπαρών οξέων, καθιστώντας τη εξαιρετικά υδρόφοβη και λιπόφιλη. Ακόμη, η ρύθμιση των νηματίων ακτίνης σε άλλα σημεία του κυττάρου, μπορεί να εμπλέκεται στη σηματοδοτική οδό της PIP2, παρόλο που η PIP2 βρίσκεται κυρίως στην επιφάνεια ή στην εσωτερική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης. Η PIP2 έχει άμεσο ρόλο στη ρύθμιση της συναρμολόγησης της ακτίνης μέσω

αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες σε πολλά κύτταρα. Επίσης, έχει αποδειχθεί *in vitro*, ότι η PIP2 επηρεάζει άμεσα τη δυναμική της ακτίνης καθώς αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη βιλλίνη που δεσμεύει την ακτίνη, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται η ασταθής F-ακτίνη. Η PIP2 συνδέεται επίσης με την ακτινίνη και αναστέλλει τη δραστηριότητα της δέσμευσης της ακτινίνης. Ωστόσο, μετά από μηχανική καταπόνηση, μεγαλύτερο ποσοστό της PIP2 εντοπίζεται με την ακτινίνη κυρίως στο δίσκο Z. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η PIP2 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του νηματίου ακτίνης καθώς αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που δεσμεύονται με την ακτίνη σε πολλές περιπτώσεις.¹⁰⁸

Η διάταση μιας υποτιθέμενης φυσιολογικής έκτασης στα κυψελιδικά κύτταρα, έχει συσχετιστεί με τη σηματοδοτική οδό του ασβεστίου, την έκκριση φωσφολιπιδίων¹¹¹ και με την έκφραση της πρωτεΐνης της επιφανειοδραστικής ουσίας.¹¹² Ωστόσο, η μηχανική διάταση υψηλού πλάτους προκαλεί στρες στην κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο και την απόπτωση.^{113,114} Λόγω της ανομοιογενούς φύσης των περισσότερων τραυματισμών του πνεύμονα, ο αερισμός με χαμηλό εισπνεόμενο όγκο στους τραυματισμένους πνεύμονες μπορεί να οδηγήσει σε υπερδιάταση των κυψελιδικών κυττάρων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο υπερδιάτασης και άλλων πνευμονικών κυττάρων. Πειράματα σε μοντέλα κυτταροκαλλιέργειας έδειξαν ότι ακόμη και η μέτρια μηχανική διάταση που οδηγεί σε αύξηση της επιφάνειας του κυττάρου κατά 30% με συχνότητα τάνυσης 40 κύκλων ανά λεπτό, ήταν επαρκής για να προκληθεί απόπτωση και νέκρωση των κυψελιδικών κυττάρων τύπου II.¹¹⁴ Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να διερευνηθούν οι μηχανισμοί προστασίας έναντι της κυτταρικής βλάβης που προκαλείται από τη μηχανική διάταση.

Οι αυξητικοί παράγοντες όπως είναι ο KGF και ο HGF είναι γνωστό ότι διεγείρουν τη σηματοδοτική οδό της PI3K-Akt στα κύτταρα τύπου II με αποτέλεσμα να αναστέλλουν την απόπτωση και να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων¹¹⁵ ενώ μειώνουν την ευαισθησία στον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από τη μηχανική διάταση. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο παράγοντας KGF μειώνει την ευαισθησία των κυττάρων τύπου II στη μηχανική διάταση.¹¹⁶

Η μηχανική διάταση μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της σηματοδοτικής οδού της PI3K-Akt μετά από μείωση της συγκέντρωσης μιας ουσίας, της βραδυκίνης, η οποία μπορεί να αποτρέψει την απόπτωση που επάγεται μετά από διάταση, με αποκατάσταση της σηματοδοτικής οδού PI3K/Akt/Bad. Μελέτες πάνω σε αυτή την υπόθεση έχουν δείξει ότι η

μηχανική διάταση μείωσε τη δράση της PI3K σε ποσοστό περίπου 10% με επαγόμενη μείωση του κυτταρικού περιεχομένου των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-XL, οι οποίες σταθεροποιούν τα μιτοχόνδρια, αποτρέποντας έτσι την απόπτωση. Τα μιτοχόνδρια συνδέονται με τον κυτταροσκελετό και ως εκ τούτου η μηχανική διάταση μπορεί να μεταδοθεί στα μιτοχόνδρια και να αλλάξει τη διαπερατότητά τους ενώ απελευθερώνονται οξειδωτικά μόρια από τα μιτοχόνδρια.¹¹⁷

Η κυκλική μηχανική διάταση με αύξηση του πλάτους κατά 30% στην κυτταρική επιφάνεια προκαλεί απόπτωση των κυττάρων τύπου II σε ποσοστό περίπου 30%. Επίσης προκαλεί ενεργοποίηση των ολιγονουκλεοσωμάτων, και της κασπάσης.¹¹⁴ Η μηχανική διάταση με αύξηση του πλάτους κατά 30% στην επιφάνεια αντιστοιχεί στην έκταση της παραμόρφωσης της κυψελιδικής βασικής μεμβράνης, η οποία επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια της διόγκωσης των πνευμόνων στο 100% της συνολικής χωρητικότητάς τους, το οποίο αντιστοιχεί σε φυσιολογικά επίπεδα.

Η διέγερση που προκαλείται από το κυκλικό stretch είχε επίσης ως αποτέλεσμα την αξιοσημείωτη ενίσχυση της PIP3 με τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο. Τα επίπεδα της δράσης της PIP3 και της Akt που εκτέθηκαν στο κυκλικό stretch είναι δυνατό να επηρεαστούν από τη φωσφατάση PTEN. Η φωσφατάση PTEN φωσφορυλιώνεται και αδρανοποιείται στην εξωκυτταρική μεμβράνη, μετά από επίδραση του κυκλικού stretch σε αυτή. Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρόιμη φάση (έως 10 λεπτά), η φωσφο-CK2 και η φωσφο-PTEN αυξήθηκαν γρήγορα ενώ το επίπεδο της αποφωσφορυλιωμένης PTEN μειώθηκε. Στην όψιμη φάση (περίπου 60 λεπτά), ενεργοποιείται η σηματοδοτική οδός της PI3K/Akt και η φωσφο-Akt φτάνει στο μέγιστο, ενώ η φωσφο-PTEN αρχίζει να μειώνεται στα βασικά επίπεδα. Αυτό ρυθμίζει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της PIP3 τα οποία οδηγούν σε σταδιακή μείωση της δράσης της Akt. Η αδρανοποίηση της PTEN είναι δυνατό να αυξήσει το μέγεθος των κυττάρων ενισχύοντας τη σηματοδοτική οδό της PI3K, ενώ η υπερέκφραση της PTEN είναι δυνατό να αναστείλλει τη σηματοδοτική οδό της PI3K, με αποτέλεσμα να μειωθεί το μέγεθος των κυττάρων.

A.13 Επίδραση του κυκλικού stretch στην παραγωγή της διπαλμιτοϋλο-φωσφατιδυλοχολίνης (DPPC)

Η διπαλμιτοϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC) είναι το βασικό φωσφολιπιδικό συστατικό της επιφανειοδραστικής ουσίας του πνεύμονα και υπάρχει με τη μορφή της 1,2-διπαλμιτοϋλ-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (DP-DPPC). Η DPPC συντίθεται *de novo* μέσω

μιας βιοχημικής οδού όπου το τελευταίο βήμα περιλαμβάνει την προσθήκη μιας ομάδας φωσφοχολίνης στο μόριο της διακυλογλυκερόλης, με τη δράση του ενζύμου CDP-χολίνη:1,2-διακυλογλυκερόλη χολινοφωσφοτρανσφεράση, (CPT), (EC 2.7.8.2). Η υποκατάσταση στη θέση sn-2 της DPPC με παλμιτικό οξύ πραγματοποιείται μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων αναδιαμόρφωσης: (i) Αποκοπή της sn-2-ακυλο υπομονάδας από την DPPC καταλύομενη από μια όξινη φωσφολιπαση A2 (aiPLA2), λυσοσωμικού τύπου και ανεξάρτητη από Ca^{2+} , και σχηματισμός ενός μορίου λυσο-DPPC. Αυτή η ισομορφή έχει ανιχνευθεί τόσο στο λυσοσωμικό κλάσμα όσο και στα φυλλώδη τμήματα των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων τύπου II και παρουσιάζει και μία δεύτερη δράση υπεροξειδάσης 6 (Prdx-6), ανεξάρτητη από τη Se^{118} και (ii) Το τελευταίο βήμα της οδού αναδιαμόρφωσης περιλαμβάνει την επαναακυλίωση της 1-παλμιτοϋλ-2-λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (lyso-DPPC) από τη δράση του ενζύμου παλμιτοϋλ-CoA: λυσοφωσφατιδυλοχολίνη ακυλοτρανσφεράση (LPCAT), (EC2.3.1.23), το οποίο έχει ανιχνευθεί και χαρακτηριστεί στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων τύπου II.¹¹⁹

A.13.1 Η εφαρμογή της μηχανικής διάτασης στην επιφανειοδραστική ουσία

Στην παραγωγή της επιφανειοδραστικής ουσίας *in vitro* συμμετέχουν πολλές χημικές ουσίες και μόρια όπως τα γλυκοκορτικοειδή, τα λιπαρά οξέα, οι εστέρες ασβεστίου και φορβόλης, αλλά και άλλες χημικές ουσίες. Εκτός από αυτά τα ερεθίσματα, οι κυτταρικοί στρεσογόνοι παράγοντες (π.χ. η παλιρροϊκή αναπνοή, το οσμωτικό σοκ και η κυκλική μηχανική διάταση) κατά τη διάρκεια του μηχανικού αερισμού, προκαλούν την απελευθέρωση αυτής της ουσίας.¹²⁰ Πρώτες μελέτες που έχουν γίνει, απέδειξαν ότι μια παροδική αύξηση στο ενδοκυτταρικό ασβέστιο που προκλήθηκε από μηχανική διάταση, προκάλεσε την έκκριση της πνευμονικής επιφανειοδραστικής ουσίας.

Η μηχανική διάταση ήπιας έντασης, μπορεί να προκαλέσει τη βιοσύνθεση της DP-DPPC σε ένα μοντέλο κυψελιδικών κυττάρων τύπου II. Μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα της DPPC αυξήθηκαν μετά από μη τραυματικές στατικές μηχανικές διατάσεις, με επακόλουθη αύξηση των επιπέδων της DP-DPPC. Η μηχανική διάταση ενίσχυσε τη δράση των ενζύμων CPT, aiPLA2 και LPCAT ενώ αύξησε και τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των παραπάνω ενζύμων (CHPT1, PRDX6 και LPCAT1, αντίστοιχα), τα οποία καταλύουν τα τελευταία βήματα της *de novo* βιοσυνθετικής πορείας σχηματισμού της DP-DPPC. Αντίθετα, η ένταση της μηχανικής διάτασης σε μοντέλα κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων τύπου II προκάλεσε μια μικρή παραμόρφωση του κυττάρου, σε ποσοστό 4 %, η οποία προσομοίωσε αυτή του πνευμονικού επιθηλίου κατά φυσιολογική εισπνοή ή κατά τη διάρκεια μηχανικού αερισμού με

χαμηλό παλιρροϊκό όγκο (5–6 mL/kg ιδανικού βάρους). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, δεν αυξήθηκε ούτε η διαπερατότητα της μεμβράνης, ούτε ο κυτταρικός θάνατος, καθώς ούτε η LDH ούτε τα φωσφολιπίδια απελευθερώθηκαν στο κύτταρο μετά από τη μηχανική διάταση. Παράδειγμα αποτελεί η ενεργοποίηση της κυτοσολικής φωσφολιπάσης PLA2 (cPLA2), ενός ενζύμου που συμβάλλει στην έκκριση της πνευμονικής επιφανειοδραστικής ουσίας από κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II, μέσω φωσφορυλίωσης που πραγματοποιείται στις σηματοδοτικές οδούς της MEK/ERK και της PI3K.¹²¹ Από την άλλη, μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η κυκλική διάταση σε κυψελιδικά κύτταρα αρουραίου τύπου II και καλλιέργειες ινοβλαστών οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής της DPPC.¹²²

Η εφαρμογή μηχανικής καταπόνησης είναι δυνατό να προκαλέσει αλλαγές στη δομή της λιπαρής ακυλικής αλυσίδας. Η αύξηση των επιπέδων της DPPC μετά από στατική μηχανική διάταση χαμηλής έντασης για 1 ώρα μπορεί να δικαιολογηθεί από την επαγωγή της δράσης της CPT, η οποία καταλύει το τελευταίο βήμα στη *de novo* βιοσύνθεσή της. Επιπλέον, η θετική ρύθμιση της CHPT1 mRNA, μια ισόμορφη της CPT, που αναγνωρίζεται στον πνεύμονα, παρέχει ισχυρές ενδείξεις ότι η CPT κινητοποιείται κάτω από την εφαρμογή ήπιας μηχανικής διάτασης.

Το τελικό βήμα της αντίδρασης αναδιαμόρφωσης της DPPC στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II που καταλύεται από το ένζυμο LPCAT, συμβάλλει στο σχηματισμό της DP-DPPC κατά 55-75%, μεταφέροντας κορεσμένες λιπαρές ακυλαλυσίδες, ιδιαίτερα παλμιτόυλ-υπομονάδες, στη θέση sn-2 της λυσο-DPPC. Η LPCAT σε κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II έχει κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί και βρέθηκε ότι δείχνει εκλεκτικότητα για το παλμιτοϋλ-CoA έναντι του ελαιοϋλ-CoA και λειτουργεί κυρίως ως μια λυσο-DPPC ακυλοτρανσφεράση.¹¹⁹ Είναι γνωστό ότι η έκφραση της LPCAT αυξάνεται κατά τη διαφοροποίηση των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων τύπου II και μειώνεται δραματικά όταν οι κυτταρικές καλλιέργειες τύπου II αποδιαφοροποιούνται σε φαινοτύπους κυττάρων τύπου I, αλλά αυτό δεν φαίνεται να συμβαίνει στα καρκινικά κύτταρα A549.¹¹⁹

Η εφαρμογή μηχανικής τάσης ήπιας έντασης μπορεί να προκαλέσει ταχεία αύξηση των συνολικών επιπέδων της DPPC εντός των κυττάρων A549, παράλληλα με τον εμπλουτισμό του κλάσματος DPPC με μόρια DP-DPPC. Αυτό το γεγονός δείχνει ότι είναι πολύ πιθανό η μηχανική διάταση να προκαλεί επίσης τη *de novo* παραγωγή της πνευμονικής επιφανειοδραστικής ουσίας και όχι μόνο την έκκριση ενός προσχηματισμένου μορίου. Η αρνητική επίδραση του αερισμού στην πνευμονική επιφανειοδραστική ουσία έχει ως

αποτέλεσμα την αύξηση της επιφανειακής τάσης οδηγώντας σε παθοφυσιολογικές δυσλειτουργίες.¹²³

A.14 Μελέτη λιπιδίων με αναλυτικές τεχνικές

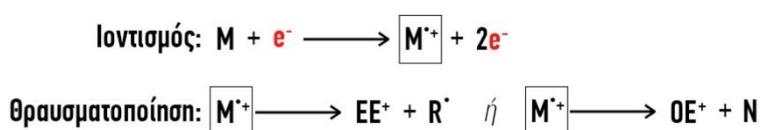
Τα λιπίδια αποτελούνται από οκτώ κατηγορίες όπου συνολικά περιλαμβάνουν 1.68 εκατομμύρια είδη. Ο μεγάλος αριθμός των λιπιδίων και οι αρκετά πολύπλοκες δομές τους αποτελούν μεγάλη πρόκληση για την πλήρη ανάλυση όλων των λιπιδίων. Η ανάλυση των λιπιδίων περιλαμβάνει δύο τεχνικές: τη στοχευμένη ανάλυση και τη μη στοχευμένη ανάλυση λιπιδίων. Η στοχευμένη ανάλυση λιπιδίων εστιάζει σε γνωστά λιπίδια και αναπτύσσει μια ειδική μέθοδο με υψηλή ευαισθησία για την ποσοτική ανάλυση αυτών των ειδικών λιπιδίων. Η μη στοχευμένη ανάλυση εστιάζει στην ταυτόχρονη ανίχνευση κάθε είδους λιπιδίου. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί επιτυχώς η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των λιπιδίων, έχουν αναπτυχθεί πολλές αναλυτικές μέθοδοι για τη μελέτη τους όπως είναι: η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC),¹²⁴ η αέρια χρωματογραφία (GC),¹²⁵ η υγρή χρωματογραφία (LC),¹²⁶ η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA,¹²⁷ η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR),¹²⁸ και η φασματομετρία μαζών (MS).¹²⁹ Μεταξύ αυτών, η φασματομετρία μαζών είναι η καλύτερη αναλυτική τεχνική, όσον αφορά την υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση, την υψηλή απόδοση και την υψηλή ακρίβεια.

A.14.1 Φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry)

Η φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) είναι μια τεχνική αναλυτικής ανίχνευσης υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιείται για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με τα μοριακά βάρη και τις χημικές δομές των μεγάλων βιολογικών μορίων όπως είναι τα πεπτίδια, οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια, τα ολιγονουκλεοτίδια, τα φυσικά προϊόντα και διάφοροι μεταβολίτες φαρμάκων.¹³⁰ Η φασματομετρία μαζών έχει αρκετά πλεονεκτήματα: **(i)** έχει μεγάλη εκλεκτικότητα που επιτυγχάνεται με την ακριβή μέτρηση των σχετικών μοριακών μαζών, γεγονός που επιτρέπει την απόλυτη ταυτοποίηση ενώσεων ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (10^{-12} g), **(ii)** απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος, **(iii)** η ανάλυση γίνεται σε μικρό χρονικό διάστημα, **(iv)** έχει πολύ υψηλή ευαισθησία, που φτάνει έως τα 10^{-18} M, **(v)** μπορεί να δράσει σαν καθολικός ανιχνευτής (universal detector) και επομένως να εφαρμοστεί για την ανάλυση οποιασδήποτε ένωσης, **(vi)** υπάρχει η δυνατότητα εύρεσης της δομής άγνωστων ενώσεων, για αυτό και έχει βρει μεγάλη εφαρμογή στις τεχνολογίες –omics, καθώς επιτυγχάνει αποδοτική εύρεση δομής πεπτιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων, αλλά και προσδιορισμό της μοριακής μάζας συνθετικών πολυμερών.¹³¹

Ωστόσο, παρουσιάζει και κάποια μειονεκτήματα, το κυριότερο από τα οποία είναι το μεγάλο κόστος αγοράς της οργανολογίας, της συντήρησης και της λειτουργίας των οργάνων. Η φασματομετρία μαζών χρησιμοποιείται ευρέως για διάφορους αναλυτικούς σκοπούς στη μοριακή βιολογία, στη βιοτεχνολογία, στη φαρμακοβιομηχανία, στην τοξικολογία και σε πολλά ακόμη ερευνητικά πεδία, μόνη της είτε σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές, λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει.¹³² Παραδείγματα αυτής της αναλυτικής τεχνικής περιλαμβάνουν ο χαρακτηρισμός του μοριακού βάρους, οι μεταλλάξεις και η ανάλυση της δομής των πρωτεϊνών, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA και η ανάλυση φαρμάκων *in vitro*.^{133–135}

Αρχή μεθόδου: Η λειτουργία της φασματομετρίας μαζών βασίζεται στο διαχωρισμό των μορίων με βάση το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z) μέσω ιοντισμού των μορίων με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας για τη διάσπαση ενός μορίου σε θραύσματα. Η θραυσματοποίηση των μορίων και οι τιμές του λόγου m/z παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τα μοριακά βάρη και τις χημικές δομές των προς μελέτη δειγμάτων.¹³⁶ Η φασματομετρία μαζών ακολουθεί την παρακάτω πορεία:



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση των διεργασιών ιοντισμού και θραυσματοποίησης μορίου (M) με κρούση ηλεκτρονίων. Αρχικά σχηματίζεται το μοριακό ιόν M^+ , το οποίο στη συνέχεια μπορεί να υποστεί θραυσματοποίηση μέσω διαφορετικών οδών, οδηγώντας στον σχηματισμό ιόντων με άρτιο (EE^+) ή περιττό (OE^+) αριθμό ηλεκτρονίων, καθώς και ουδέτερων ειδών. Όπου: M^+ = μοριακό ιόν, EE^+ = ιόν με άρτιο αριθμό ηλεκτρονίων, OE^+ = ιόν με περιττό αριθμό ηλεκτρονίων, N = ουδέτερο μόριο και R^\bullet = ρίζα.

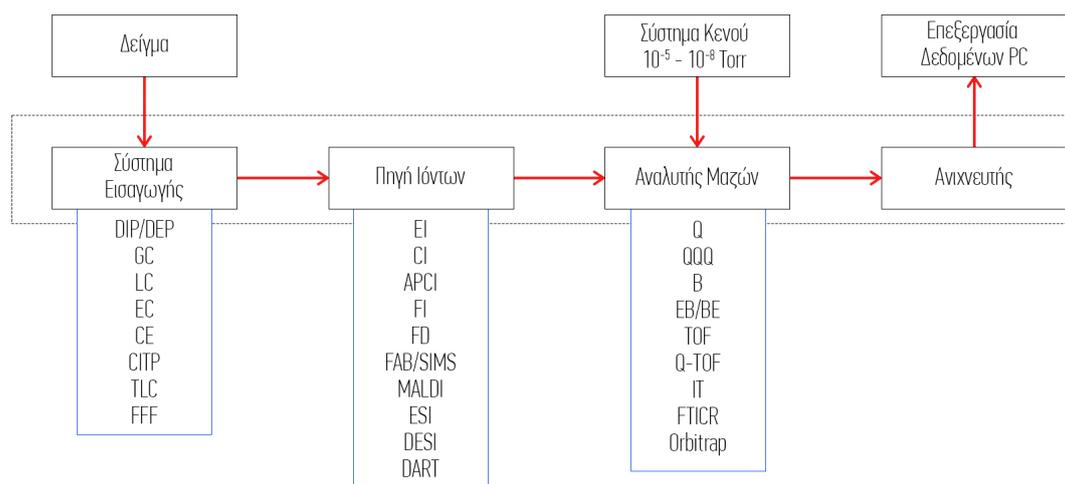
A.14.1.1 Οργανολογία

Ένα τυπικό φασματόμετρο μάζας αποτελείται από τα παρακάτω επιμέρους τμήματα¹³⁷

(Εικόνα 14):

1. **Το σύστημα της εισαγωγής του δείγματος:** Τις περισσότερες φορές το δείγμα εισάγεται στην αέρια ή την υγρή μορφή.
2. **Την πηγή ιόντων:** όπου τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα. Συχνά το σύστημα εισαγωγής συνενώνεται με την πηγή ιόντων.
3. **Τον αναλυτή μαζών:** όπου εδώ πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ιόντων, ανάλογα με το λόγο m/z τους.

4. **Τον ανιχνευτή:** ο οποίος συλλαμβάνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.
5. **Το σύστημα κενού:** Ο φασματογράφος βρίσκεται υπό κενό το οποίο δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού.
6. **Τον ηλεκτρονικό υπολογιστή:** ο οποίος χρησιμοποιεί το κατάλληλο λογισμικό για την επεξεργασία και ανάλυση των φασμάτων που προκύπτουν.



Εικόνα 15: Σχηματικό διάγραμμα των τμημάτων ενός φασματογράφου μαζών, με τις συντομογραφίες των κυριότερων τεχνικών κάθε σταδίου.¹⁴¹

A.14.1.2 Πηγή ιόντων-Τεχνικές ιοντισμού

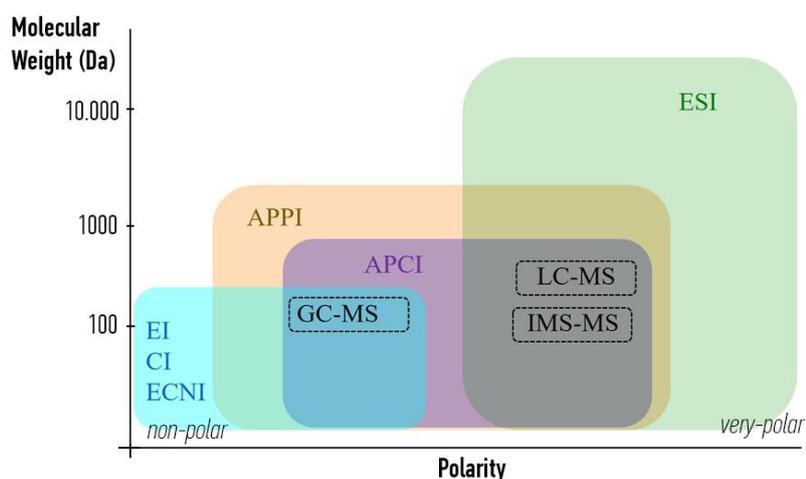
Η ανάλυση ενός μορίου με φασματομετρία μαζών απαιτεί πλήρη ιοντισμό του μορίου, είτε ως θετικό είτε ως αρνητικό μοριακό ιόν. Η επιλογή της τεχνικής ιοντισμού που θα εφαρμοστεί είναι μεγάλης σημασίας για την ανάλυση που θα ακολουθήσει. Ως εκ τούτου, η πηγή ιόντων αποτελεί βασικό κομμάτι όλων των φασματόμετρων μαζών. Οι πηγές ιοντισμού διακρίνονται σε σκληρές (hard ionization) και μαλακές (soft ionization), ανάλογα με την ενέργεια που μεταδίδουν στα μόρια του αναλυτή και στο σπάσιμο των δεσμών του μορίου σε μικρότερα θραύσματα. Στις σκληρές τεχνικές ιοντισμού χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια που προκαλεί τη διάσπαση της σε θυγατρικά ιόντα. Από την άλλη, μαλακές τεχνικές ιοντισμού καλούνται οι τεχνικές που επιτυγχάνουν τον ιοντισμό σε ηπιότερες συνθήκες με μικρή ή μηδενική θραύση.

1) Ιοντισμός σε Αέρια φάση

Ο ιοντισμός σε αέρια φάση είναι η πιο συνηθισμένη τεχνική ιοντισμού και εφαρμόζεται κατά προτίμηση σε ενώσεις που είναι σταθερές σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και έχουν σημείο ζέσεως κάτω από $\sim 500^\circ \text{C}$. Υπάρχουν δύο κατηγορίες αυτών των τεχνικών: αυτές που εφαρμόζονται σε συνθήκες κενού και συνδυάζονται με την αέρια χρωματογραφία και αυτές

που εφαρμόζονται σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και συνδυάζονται με τεχνικές διαχωρισμού στην υγρή φάση (π.χ. LC-MS, CE-MS κ.α).

Οι ενώσεις οι οποίες αναλύονται χωρίζονται σε πτητικές και μη πτητικές: Για τις πτητικές ενώσεις οι κύριες τεχνικές ιοντισμού που εφαρμόζονται είναι **(α)** ο Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact, EI) και **(β)** ο χημικός ιοντισμός (Chemical Ionization, CI). Για τις μη πτητικές ενώσεις, ο ιοντισμός πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και οι κύριες τεχνικές ιοντισμού που εφαρμόζονται είναι **(α)** ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray ionization, ESI) και **(β)** ο χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI). Σε κάθε περίπτωση, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 16, η επιλογή της τεχνικής ή των διαφόρων μορφών που θα χρησιμοποιηθεί, εξαρτάται από την απόδοση του ιοντισμού.¹³⁸



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση των περιοχών εφαρμογής διαφορετικών τεχνικών ιοντισμού στην φασματομετρία μαζών, σε συνάρτηση με το μοριακό βάρος και την πολικότητά τους. Οι τεχνικές EI, CI και ECNI καλύπτουν κυρίως ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους και χαμηλής πολικότητας, ενώ οι APPI και APCI επεκτείνονται σε μεσαία μοριακά βάρη και πολικότητες. Η τεχνική ηλεκτροψεκασμού (ESI) παρουσιάζει το ευρύτερο πεδίο εφαρμογής, εκτεινόμενη από χαμηλά έως πολύ υψηλά μοριακά βάρη και από μέτρια έως πολύ υψηλή πολικότητα. Για τον λόγο αυτό, η ESI αποτελεί την κυρίαρχη τεχνική σε αναλύσεις LC-MS και IMS-MS.¹³⁹

Από αυτές τις τεχνικές, η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (ESI) αποτελεί την κυριότερη μέθοδο σύζευξης υγρής χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών. Είναι μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για αναλύσεις πολυπεπτιδίων, πρωτεϊνών και ολιγονουκλεοτιδίων με μοριακά βάρη μεγαλύτερα από 100.000 Da. Από την άλλη, η τεχνική APCI εφαρμόζεται κυρίως για τη μελέτη μικρότερων και πιο άπολων μορίων, όπως είναι τα λιπίδια, τα στεροειδή, οι ορμόνες, οι στερόλες και συγγενή μόρια όπως οι στατίνες. Η τεχνική ESI καλύπτει το μεγαλύτερο πεδίο εφαρμογής για την ανάλυση βιομορίων καθώς επιτυγχάνει τον ιοντισμό πολλών κατηγοριών βιομορίων, όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, αμινοξέα, οργανικά οξέα, νουκλεοτίδια, σάκχαρα, βιταμίνες, και σχεδόν όλες τις κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών

(αλκαλοειδή, φαινόλες, τερπενοειδή, γλυκοζίτες κλπ.). Επίσης στη βιο-φαρμακευτική ανάλυση, η χρήση της τεχνικής ESI επικρατεί, καθώς τα περισσότερα φάρμακα εμπίπτουν στις κατηγορίες μορίων τα οποία ιονίζονται αποδοτικότερα με την τεχνική ESI (βιομόρια, πεπτίδια ή και αντισώματα).

Βασική αρχή της τεχνικής ESI: Η φασματομετρία μαζών αναλύει τα μόρια στην αέρια κατάστασή τους. Κατά την εφαρμογή της τεχνικής ESI, το δείγμα μετατρέπεται σε ένα λεπτό εκνέφωμα φορτισμένων σταγονιδίων, υπό την επίδραση ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου. Συγκεκριμένα, το έκλουσμα της στήλης εισέρχεται μέσω ενός τριχοειδούς μέσα σε πεδίο 3-5 kV, ενώ παράλληλα διαβιβάζεται αέριο για τη δημιουργία αυτού του εκνεφώματος. Το υγρό διασπείρεται σε νέφος με τη μορφή μικρών φορτισμένων σταγόνων, ενώ ο διαλύτης εξατμίζεται γρήγορα, ιοντίζοντας τις ενώσεις που αναλύονται. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται εξάτμιση με ιοντισμό (ion evaporation) και ανήκει στις μαλακές τεχνικές ιοντισμού. Ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας και το δυναμικό που επικρατούν κάθε φορά, μπορεί να πραγματοποιείται ή να μην πραγματοποιείται θραύση των μορίων. Το φαινόμενο του ηλεκτροψεκασμού αποτελείται από τρία βασικά βήματα,¹⁴⁰ ξεκινώντας από τη στιγμή που το δείγμα ψεκάζεται από το ESI, μέχρι τη μεταφορά του στο φασματομέτρο μαζών, στη θέση του δείγματος:

Βήμα 1: Παραγωγή φορτισμένων σταγονιδίων (νεφελοποίηση)

Σε αυτό το βήμα τα ιόντα, είτε θετικής είτε αρνητικής πολικότητας, συσσωρεύονται στην άκρη του τριχοειδούς. Προκειμένου να δημιουργηθούν φορτισμένα σταγονίδια από ένα διάλυμα που εκλούεται είτε από μία αντλία με σύριγγα είτε από την HPLC, αρχικά εφαρμόζεται ένα ηλεκτρικό πεδίο στο διάλυμα που ρέει το τριχοειδές. Αυτό το ηλεκτρικό πεδίο δημιουργείται από την ανάπτυξη διαφοράς δυναμικού μεταξύ του τριχοειδούς και της εισόδου του δείγματος στον φασματογράφο μαζών, που βρίσκεται απέναντι από αυτό.¹⁴¹ Στο σημείο αυτό πραγματοποιείται η νεφελοποίηση, κατά την οποία εφαρμόζεται έξω από το τριχοειδές ένα ρεύμα αερίου, ομοαξονικά στην εξερχόμενη ροή των δειγμάτων, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός των σταγονιδίων. Στη λειτουργία θετικού ιόντος, το τριχοειδές αποτελεί την άνοδο ενώ η θέση του δείγματος αποτελεί την κάθοδο. Καθώς το δείγμα ρέει μέσω του τριχοειδούς, τα ηλεκτρόνια αντλούνται από το διάλυμα. Στη συνέχεια, τα θετικά ιόντα απωθούνται από το τοίχωμα του τριχοειδούς, συγκεντρώνονται και συσσωρεύονται στην άκρη του. Από την άλλη, στη λειτουργία αρνητικών ιόντων, συμβαίνει το αντίστροφο. Αυτά τα ηλεκτροφορητικά φαινόμενα χαρακτηρίζουν την πηγή ESI ως

ηλεκτροχημικό στοιχείο. Στη λειτουργία θετικού ιόντος, η οξειδωση λαμβάνει χώρα στο άκρο του τριχοειδούς, ενώ η αναγωγή λαμβάνει χώρα στην είσοδο του φασματογράφου, ενώ το αντίστροφο ισχύει στη λειτουργία αρνητικού ιόντος. Το πρώτο βήμα αποτελεί ουσιαστικά το σχηματισμό μιας σφαιρικής σταγόνας στην άκρη του τριχοειδούς.

Βήμα 2: Συρρίκνωση φορτισμένων σταγονιδίων

Καθώς συσσωρεύονται περισσότερα ιόντα, η πυκνότητα του φορτίου αυξάνεται λόγω του φαινομένου της ηλεκτροστατικής απώθησης (δυνάμεις Coulomb) και αυτές οι πιέσεις επιμηκύνουν τη σταγόνα στο ακροφύσιο του τριχοειδούς. Τέλος, όταν συσσωρεύεται αρκετό φορτίο και η αυξημένη ηλεκτροστατική απώθηση γίνεται ίση με την επιφανειακή τάση του διαλύτη του δείγματος, η σταγόνα φτάνει στο γνωστό όριο σταθερότητας του Rayleigh και σπάει, σχηματίζοντας ένα σχήμα κώνου στην άκρη του τριχοειδούς. Αυτό είναι γνωστό ως κώνος του Taylor και είναι το σημείο στο οποίο γίνεται ο ψεκασμός. Αφού σχηματιστεί ο κώνος του Taylor, τα σταγονίδια συναντούν ένα ρεύμα θερμαινόμενου, αδρανούς αερίου (συνήθως άζωτο) που προκαλεί το φαινόμενο της αποδιάλυσης, προκειμένου να απομακρυνθεί ο διαλύτης από το δείγμα.¹⁴¹

Βήμα 3: Παραγωγή ιόντων αέριας φάσης

Προκειμένου να εξηγηθεί η μετάβαση από την ηλεκτροστατική απώθηση φορτίων στην απελευθέρωση ιόντων αέριας φάσης, υπάρχουν δύο αποδεκτές θεωρίες: η θεωρία των φορτισμένων υπολειμμάτων¹⁴² και η θεωρία «εξατμισμού» ιόντων από μικρά σταγονίδια.¹⁴³ Στην πρώτη θεωρία, έχει θεωρηθεί ότι μετά το σχηματισμό του κώνου του Taylor, εμφανίζεται μία σταγονοειδής σχάση. Αυτό επιτρέπει να σχηματιστούν σταγονίδια μικρότερου μεγέθους από τα μητρικά σταγονίδια που δημιουργούνται στην αρχή του ηλεκτροψεκασμού. Αυτά τα καινούρια σταγονίδια γίνονται όλο και μικρότερα, έως ότου το καθένα φέρει μόνο ένα ιόν. Τέλος, το ιόν απελευθερώνεται στην αέρια φάση όταν γίνει η αποδιάλυση. Στη δεύτερη θεωρία, η οποία βασίζεται σε ένα πείραμα κίνησης των ιόντων, έχει προταθεί ότι τα ιόντα που βρίσκονται μέσα στα σταγονίδια και των οποίων οι ακτίνες είναι μικρότερες από 10 nm μπορούν να «εξατμισθούν» και να διαφύγουν στην αέρια φάση. Αυτή η θεωρία βασίστηκε στο γεγονός ότι όταν το σταγονίδιο είναι ακόμα σημαντικά μεγαλύτερο από ένα ιόν, έχει ένα σημαντικά μεγάλο αριθμό ιόντων αέριας φάσης και έφερε πολλαπλά φορτία. Αν και οι δύο ιδέες δεν υποστηρίζουν η μία την άλλη, μαζί θα μπορούσαν να εξηγήσουν πώς η τεχνική ESI είναι σε θέση να σχηματίσει τόσο μονοφορτισμένα όσο και πολλαπλά φορτισμένα ιόντα.

2) Δημιουργία ιόντων με εκρόφηση

Αυτές οι τεχνικές εφαρμόζονται στην ανάλυση υγρών ή στερεών δειγμάτων. Τα δείγματα δέχονται ενέργεια από πηγές όπως είναι η δέσμη σωματιδίων, το laser κ.α, και με την απορρόφηση της ενέργειας, τα μόρια της ένωσης που αναλύεται εκροφούνται και ιονίζονται. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τεχνικές όπως είναι: **(α)** ο Βομβαρδισμός με Άτομα (Fast Atom Bombardment, FAB), **(β)** ο Βομβαρδισμός με Ιόντα (Secondary Ion MS), **(γ)** ο Ιοντισμός με λέιζερ υποβοηθούμενος από υπόστρωμα (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) και **(δ)** η τεχνική εκρόφησης με πλάσμα (Plasma Desorption).

Από αυτές τις τεχνικές, η τεχνική MALDI είναι η πιο διαδεδομένη και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση μορίων με μεγάλο μοριακό βάρος, μεγαλύτερο από 10^6 Da. Αποτελεί μια μέθοδο ιοντισμού μορίων για ανάλυση με φασματομετρία μαζών με, όπως υποδηλώνει το όνομά της, εκρόφηση με τη βοήθεια ενός υποστρώματος (matrix). Χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση πρωτεϊνών και φυσικών ή συνθετικών πολυμερών για την εύρεση του μοριακού βάρους, ενώ έχει βρει εφαρμογή και στην ανάλυση μορίων μικρού μοριακού βάρους μέσω της τεχνικής της φασματομετρικής απεικόνισης ιστών (MS imaging). Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η δυνατότητα μέτρησης πολύ μεγάλων μοριακών βαρών και για αυτόν το λόγο βρίσκει εφαρμογή στην πρωτεωμική ανάλυση, στο πρώτο στάδιο της ανάλυσης που αποτελεί τη μέτρηση του μοριακού βάρους μεγάλων πρωτεϊνών αλλά και στον προσδιορισμό της μοριακής μάζας συνθετικών πολυμερών.

A.14.1.3 Βασική αρχή της τεχνικής MALDI-MS

Η αρχή του ιοντισμού με τη μέθοδο MALDI βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητα που έχουν οι αναλυτές να εκροφούν.¹⁴⁴ Αυτό το χαρακτηριστικό της τεχνικής MALDI περιλαμβάνει δύο κύριους παράγοντες: μια πηγή φωτός λέιζερ και μια ένωση που απορροφά το φως μεταξύ λέιζερ –υποστρώματος. Οι κοινές πηγές λέιζερ MALDI περιλαμβάνουν τόσο μία λάμπα υπερύθρου (IR) όσο και μία λάμπα υπεριώδους (UV), η οποία χρησιμοποιείται συχνότερα. Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο πηγών λέιζερ βρίσκεται στη διάρκεια του παλμού ακτινοβολίας: μια πηγή IR παράγει μεγαλύτερο παλμό που διαρκεί από 6 έως 200 ns, ενώ ένας παλμός με βάση την υπεριώδη ακτινοβολία είναι πολύ πιο σύντομος, και διαρκεί περίπου 3-10 ns.¹⁴⁵ Για τον ιοντισμό προτιμάται μικρότερη διάρκεια παλμού, καθώς μπορεί να προκαλέσει αποτελεσματικά γρήγορη αφαίρεση του δείγματος με μικρή ή μηδενική θερμική αποικοδόμηση. Εκτός από τη διάρκεια του παλμού, μια άλλη παράμετρος γνωστή ως "fluence laser" είναι επίσης σημαντική στην αφαίρεση του δείγματος και τη δημιουργία ιόντων. Η ροή του λέιζερ είναι η ποσότητα της ενέργειας, στη συγκεκριμένη περίπτωση οπτικής ενέργειας,

που παρέχεται ανά μονάδα επιφάνειας σε έναν παλμό λέιζερ.¹⁴⁵ Η συνήθως παρατηρούμενη μονάδα ροής του λέιζερ στο MALDI-MS είναι η W/cm^2 και ποικίλλει ανάλογα με την πηγή του φωτός λέιζερ και το συνδυασμό μεταξύ αναλύτη και υποστρώματος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα διαφορετικά υποστρώματα απορροφούν το φως του λέιζερ με διαφορετικό τρόπο και ότι καθένα μπορεί να βοηθήσει στον ιοντισμό του αναλύτη με διαφορετική απόδοση. Γενικά, ο σχηματισμός των ιόντων συμβαίνει στην ή πάνω από την είσοδο ροής του λέιζερ, η οποία είναι περίπου 10^6 (W/cm^2).¹⁴⁵ Οι πηγές λέιζερ του παλμού μικρής διάρκειας σε συνδυασμό με έναν κατάλληλο συνδυασμό υποστρώματος και αναλύτη μπορούν να μειώσουν αυτό το όριο, οδηγώντας σε αποτελεσματική κατάλυση του αναλύτη και του σχηματισμού ιόντων.

Κατά τη διαδικασία της τεχνικής MALDI, το δείγμα αναμειγνύεται με ένα κατάλληλο οργανικό υπόστρωμα, το οποίο απορροφά ακτινοβολία σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος στο UV. Γενικά, η ποσότητα του υποστρώματος που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη, έτσι ώστε να εμποδίζει τα μόρια του αναλύτη να σχηματίζουν συμπλέγματα μεταξύ τους και να απορροφά το μήκος κύματος του λέιζερ αρκετά ισχυρά και επαρκώς, ώστε, κατά την εξάτμιση, να δημιουργούνται μοριακά ιόντα των αναλυτών.¹⁴⁶ Γενικά, τα περισσότερα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στη λειτουργία θετικών ιόντων είναι ασθενή οξέα, τα οποία συχνά έχουν αρωματικές ενώσεις συνδεδεμένες με λειτουργικές ομάδες καρβοξυλικού οξέος. Αυτά τα οξέα έχουν την ικανότητα να προσφέρουν ένα H^+ για τον επακόλουθο ιοντισμό των αναλυτών, ενώ οι βασικές ενώσεις χρησιμοποιούνται στη μέθοδο αρνητικού ιόντος για αποτελεσματική αφαίρεση πρωτονίων από τους αναλύτες.¹⁴⁷ Αφού το δείγμα αναμιχτεί με το υπόστρωμα και εξατμιστεί ο διαλύτης, το δείγμα ακτινοβολείται με μια δέσμη laser. Στη συνέχεια το υπόστρωμα (π.χ. νικοτινικό οξύ), απορροφά την ενέργεια αυτής της ακτινοβολίας, ιοντίζεται και προκαλεί ιοντισμό των μεγαλομορίων. Οι επακόλουθες συγκρούσεις στην αέρια κατάσταση επιτρέπουν τη διαμοριακή μεταφορά φορτίου (πρωτονίωση και αποπρωτονίωση), ιοντίζοντας με αυτόν τον τρόπο και την αναλυόμενη ουσία.

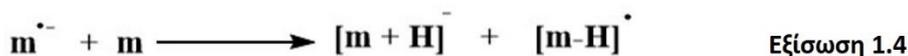
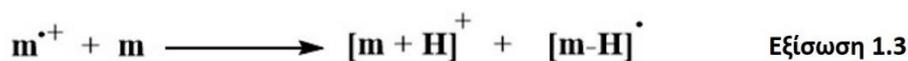
A.14.1.4 Μηχανισμός ιοντισμού στην τεχνική MALDI

Ολόκληρη η διαδικασία της τεχνικής MALDI αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα: **(1)** ιοντισμός του υποστρώματος,¹⁴⁸ **(2α)** εκρόφηση του υποστρώματος που οδηγεί στην **(2β)** εκρόφηση του αναλύτη¹⁴⁹ και **(3)** ιοντισμός του αναλύτη.¹⁴⁸

Ο πιο σημαντικός ρόλος του υποστρώματος στην τεχνική MALDI είναι να απορροφά την ενέργεια στο συγκεκριμένο μήκος κύματος που εκπέμπεται από το λέιζερ. Αυτός είναι ο

λόγος που τα περισσότερα υποστρώματα στην τεχνική MALDI είναι αρωματικές ενώσεις.¹⁴⁶ Μετά την απορρόφηση, η ενέργεια του λέιζερ μετατρέπεται γρήγορα σε θερμική ενέργεια από τους στερεούς κρυστάλλους του υποστρώματος, προκαλώντας μερική εξάχνωση αυτών των κρυστάλλων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το υπόστρωμα και οι αναλύτες αναμειγνύονται έτσι ώστε να σχηματιστούν ομοιογενείς κρύσταλλοι. Ως εκ τούτου, καθώς οι κρύσταλλοι εκροφούν, τραβούν επίσης μέρος του άθικτου αναλύτη στη φάση ατμού του διαστελλόμενου νέφους. Το επόμενο βήμα, που είναι ο ιοντισμός του αναλύτη, απαιτεί πρώτα να φορτιστεί το υπόστρωμα, το οποίο μπορεί να είναι είτε είναι ένα ασθενές οξύ (λειτουργία θετικού ιόντος) είτε μια βάση (λειτουργία αρνητικού ιόντος), χρησιμοποιώντας φωτοϊοντισμό. Μετά τον φωτοϊοντισμό, τα μόρια του υποστρώματος διεγείρονται και λαμβάνουν αρκετή ενέργεια για να πραγματοποιηθεί το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενός ηλεκτρονίου (πιθανότατα τα απεντοπισμένα ηλεκτρόνια του αρωματικού δακτυλίου) για την παραγωγή θετικών ιόντων του υποστρώματος (**Εξίσωση 1.1**). Αυτό το φωτοηλεκτρόνιο συγκρούεται με ένα άλλο μόριο ενός ουδέτερου υποστρώματος, προκαλώντας ένα αρνητικό ιόν του υποστρώματος (**Εξίσωση 1.2**). Ως εκ τούτου, παράγονται τόσο θετικά όσο και αρνητικά ιόντα από το υπόστρωμα, καθώς και τα παράγωγά τους, ωστόσο όμως, η πολικότητα της λειτουργίας του φασματογράφου καθορίζει ποιο ιόν ανιχνεύεται. Περαιτέρω προϊόντα προέρχονται από τη σύγκρουση των θετικά φορτισμένων ή αρνητικά φορτισμένων ιόντων και άλλων μορίων του ουδέτερου υποστρώματος, που οδηγεί σε μεταφορές πρωτονίων μεταξύ των μορίων προκαλώντας πρωτονιωμένα ή αποπρωτονιωμένα ιόντα του υποστρώματος (**Εξίσωση 1.3 και 1.4**). Η επιτυχία του φωτοϊοντισμού του υποστρώματος είναι σημαντική για τον επακόλουθο ιοντισμό του αναλύτη. Μελέτες έχουν δείξει ότι μια καλή απόδοση ιόντων του υποστρώματος (περίπου 10^{-4} ή 10^{-5} ιόντα σε ουδέτερα μόρια)¹⁵⁰ οδηγεί σε υψηλή ένταση ιόντων αναλύτη (έως και 10% υψηλότερη από αυτή των σημάτων του υποστρώματος).¹⁵¹ Τα σήματα αυτών των δύο μορίων εξαρτώνται το ένα από το άλλο. Ως εκ τούτου, θεωρείται ότι η μεταφορά φορτίου συμβαίνει μετά τον φωτοϊοντισμό του υποστρώματος.¹⁴⁸ Υπάρχουν επί του παρόντος δύο ανταγωνιστικές θεωρίες που εξηγούν πώς τα μόρια του αναλύτη λαμβάνουν τα φορτία τους: η θεωρία ιοντισμού αέριας φάσης και το μοντέλο Lucky Survivor.¹⁵² Στη θεωρία ιοντισμού αέριας φάσης, υποστηρίζεται ότι καθώς οι αναλύτες και τα ιόντα του υποστρώματος εξατμίζονται στο διαστελλόμενο χώρο μετά τον φωτοϊοντισμό, τα πρωτόνια που προέρχονται από τα πρωτονιωμένα ιόντα του υποστρώματος (που δημιουργούνται όπως φαίνεται στην **Εξίσωση 1.1-1.4**) μεταφέρονται από το υπόστρωμα στους ουδέτερους αναλύτες στη λειτουργία θετικών ιόντων.¹⁴⁸ Αντίθετα, η αφαίρεση πρωτονίων συμβαίνει στη λειτουργία των αρνητικών ιόντων. Αυτό το μοντέλο βασίζεται στη

σύγκρουση μεταξύ του υποστρώματος όσο και των αναλυτών. Στο μοντέλο Lucky Survivor, τα ιόντα θεωρούνται ότι είναι προ-φορτισμένα στον κρύσταλλο του υποστρώματος πριν από την εκρόφηση.¹⁵³ Αυτό το μοντέλο εφαρμόζεται σε πειράματα MALDI στα οποία το διάλυμα του αναλύτη παρασκευάζεται με την τυπική προσθήκη TFA προκειμένου να πρωτονιωθούν τα μόρια.¹⁴⁶



Εικόνα 17: Βασικοί μηχανισμοί ιοντισμού και δημιουργίας ιοντικών ειδών: (1.1) φωτοϊοντισμός μορίου, (1.2) σύλληψη ηλεκτρονίου, (1.3) σχηματισμός ιόντων μέσω μεταφοράς πρωτονίου σε θετική λειτουργία και (1.4) σχηματισμός ιόντων μέσω μεταφοράς πρωτονίου σε αρνητική λειτουργία.

Προκειμένου ένα μόριο να μπορέσει να ανιχνευθεί και να αναλυθεί από τον φασματογράφο μαζών, πρέπει να φέρει ένα ή περισσότερα φορτία. Αρχικά, η φασματομετρία μαζών (MS) δε χρησιμοποιούταν για την ανάλυση των βιομορίων, καθώς είχε σχεδιαστεί για τη μελέτη πιο πτητικών μορίων (π.χ. μικρές οργανικές ενώσεις) που μπορούν εύκολα να πάρουν τη μορφή αερίου. Σε αντίθεση με προηγούμενες μεθόδους ιοντισμού όπως η πρόσκρουση ηλεκτρονίων, στην οποία τα δείγματα καταστρέφονται εντελώς κατά τη σύγκρουση με ηλεκτρόνια από την πηγή, οι μέθοδοι μαλακού ιοντισμού επιτρέπουν στα άθικτα μόρια να ιοντιστούν και να μεταφερθούν στο φασματόμετρο μαζών για περαιτέρω επεξεργασία και ανίχνευση. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για το διαχωρισμό και την ανάλυση βιομορίων από πολύπλοκα υποστρώματα. Ο μαλακός ιοντισμός είναι δυνατό να ελαχιστοποιήσει τη θραυσματοποίηση στην πηγή, ένα γεγονός όπου οι αναλύμενες ουσίες ενεργοποιούνται για να θραυσματοποιηθούν μετά τη λήψη περίσσειας ενέργειας κατά τη διάρκεια του ιοντισμού.¹⁵⁴ Αυτό πραγματοποιείται στην πηγή, και είναι δυνατό να οδηγήσει σε προβλήματα κατά την ερμηνεία των σημάτων των ιόντων στα φάσματα μαζών. Αυτό το φαινόμενο δεν είναι ιδιαίτερα συχνό στην τεχνική ESI, αν και τα δύο μπορούν να εφαρμοστούν συνδυαστικά σε συγκεκριμένα πειράματα. Το φαινόμενο της θραυσματοποίησης στην πηγή συχνά συνδυάζεται με την τεχνική MALDI. Στην τεχνική MALDI, η ενέργεια που προέρχεται από το λέιζερ μπορεί να ελεγχθεί προκειμένου να μειωθούν τα φαινόμενα θραυσματοποίησης της πηγής. Εναλλακτικά, μπορεί να εφαρμοστεί η τεχνική MALDI με ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric

Pressure- MALDI, AP-MALDI) MALDI, η οποία έχει αναφερθεί ότι αποτελεί μια πιο ήπια μέθοδο ιοντισμού από το MALDI¹⁵⁵ κενού.

A.14.1.5 Η τεχνική MALDI

Η τεχνική MALDI με ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure-MALDI, AP-MALDI) λειτουργεί σε ατμοσφαιρική πίεση, εκτός του περιβάλλοντος κενού του φασματογράφου. Η φύση του κενού στην τεχνική MALDI απαιτεί να βρίσκεται μέσα στο φασματόμετρο μαζών, όπως στην περίπτωση ενσωμάτωσης μιας πηγής MALDI σε ένα όργανο TOF. Η τεχνική AP-MALDI, ωστόσο, επιτρέπει την εύκολη εγκατάσταση και αφαίρεση της πηγής από κάθε φασματόμετρο μαζών που έχει διεπαφή ατμοσφαιρικής πίεσης.¹⁵⁶ Για το λόγο αυτό, είναι δυνατή η σύζευξη της τεχνικής AP-MALDI με πηγές ιοντισμού AP όπως η ESI. Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της τεχνικής AP-MALDI συγκριτικά με την κλασική τεχνική MALDI κενού, είναι η ικανότητά της να μειώνει την αποσύνθεση στην πηγή, η οποία επηρεάζει τα ασταθή μόρια όπως τα λιπίδια και τα πεπτίδια. Αυτό είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται συνήθως με την τεχνική MALDI κενού. Γενικά μετά την εκρόφιση στο κενό στην τεχνική MALDI, τα ιόντα αναδύονται από την ενσωμάτωση του υποστρώματος και η εσωτερική τους θερμοκρασία αυξάνεται λόγω **1)** της ενέργειας που απορροφά το υπόστρωμα από το λέιζερ, **2)** της σύγκρουσης των ιόντων με τα μόρια του υποστρώματος και την επακόλουθη μεταφορά της πολύ αποτελεσματικά απορροφούμενης ενέργειας λέιζερ και **3)** της επίδρασης του ηλεκτρικού πεδίου στη διεπιφάνεια μεταξύ της πλάκας MALDI και της εισόδου του τριχοειδούς που προορίζεται για τη μεταφορά ιόντων.¹⁴⁸ Όλοι αυτοί οι παράγοντες συμβάλλουν στην αύξηση της θερμοκρασίας των ιόντων, γεγονός που τα καθιστά επιρρεπή σε θραυσματοποίηση πριν εισέλθουν στο φασματόγραφο. Στην τεχνική AP-MALDI, η θερμοποίηση του υποστρώματος και των αναλυτών γίνεται πιο εύκολα και αποτελεσματικά μετά την ακτινοβολία με λέιζερ, οδηγώντας σε πολύ λίγες θραυσματοποιήσεις στην πηγή, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει ότι η τεχνική AP-MALDI είναι πιο ήπια μέθοδος ιοντισμού από την κλασική μέθοδο MALDI.¹⁵⁶

A.14.2 Αναλυτές μάζας (Mass Analyzers)

Εκτός από την πηγή ιόντων, αρκετά σημαντικό παράγοντα σε ένα φασματόμετρο μάζας αποτελούν οι αναλυτές μάζας. Συσκευές που διαχωρίζουν τα παραγόμενα ιόντα από την πηγή ιοντισμού με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z). Μετά τον ιοντισμό, τα ιόντα μεταφέρονται στον αναλυτή μάζας ώστε να μπορούν να διαχωριστούν με βάση τα m/z τους. Μια αναλυόμενη ουσία μπορεί να φέρει ένα μόνο ή πολλαπλά φορτία ανάλογα με τη φύση των μορίων, την προετοιμασία του δείγματος και τον τρόπο ιοντισμού. Υπάρχουν διαθέσιμοι πολλοί τύποι

αναλυτών και καθένας από αυτούς έχει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και επιλέγεται βάσει αυτών και η ανάλογη εφαρμογή. Ο ιδανικός αναλυτής θα πρέπει να μπορεί να διαχωρίζει όσο το δυνατόν μικρότερες διαφορές του λόγου m/z , να επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού ιόντων, ώστε να έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία και να είναι συμβατός με όλες τις τεχνικές εισαγωγής δείγματος, και ιοντισμού.

Το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό της ποιότητας ενός φασματομέτρου μαζών είναι η διαχωριστική ή διακριτική ικανότητα (Resolution R) ενός αναλυτή και δίνεται από τη σχέση:

$$R = m/\Delta m$$

Όπου: Δm : η διαφορά μαζών δύο διαδοχικών κορυφών και m : η μάζα της πρώτης κορυφής.

Οι αναλυτές μάζας διακρίνονται σε (α) απλούς αναλυτές με μικρή διαχωριστική ή διακριτική ικανότητα και (β) αναλυτές με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα. Οι αναλυτές με μεγάλη διακριτική ικανότητα R (10^4 - 10^5), είναι απαραίτητοι για την εύρεση του ακριβούς μοριακού τύπου μιας ένωσης, ενώ για τη διασάφηση απλώς της δομής των ουσιών δε χρειάζονται όργανα μεγάλης διακριτικής ικανότητας ($R=100$ - 1000). Υπάρχουν πολλά είδη αναλυτών μάζας, συμπεριλαμβανομένων του μαγνητικού αναλυτή, του ανιχνευτή τετραπόλου (Q), του αναλυτή παγίδας ιόντων (IT), του αναλυτή χρόνου πτήσης (TOF), το (FTICR) και του αναλυτή orbitrap.

Τα ιόντα διαχωρίζονται στον αναλυτή μαζών (mass analyzer) με βάση το λόγο m/z και μετά συλλέγονται από έναν ανιχνευτή (detector). Ο ανιχνευτής ιόντων συλλαμβάνει τα προσπίπτοντα ιόντα και τα μετατρέπει σε ανάλογο ηλεκτρικό ρεύμα. Υπάρχουν επίσης μεταγωγείς (transducers) που μετατρέπουν τη δέσμη των ιόντων σε ένα ηλεκτρικό σήμα. Το σύστημα δεδομένων επεξεργάζεται το μέγεθος των ηλεκτρικών σημάτων, το ψηφιοποιεί, το αποθηκεύει στη μνήμη ενός υπολογιστή και παρουσιάζει το φάσμα των μαζών. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε ένα γράφημα σχετικής έντασης ως προς το λόγο m/z κατά τη διάρκεια μιας ελεγχόμενης ανίχνευσης των μαγνητικών ή ηλεκτρικών πεδίων. Το μέγεθος των κορυφών σχετίζεται με την ύπαρξη ιόντων και κατακερματισμένων ιόντων που παράγονται. Οι κορυφές κανονικοποιούνται, ενώ η πιο έντονη κορυφή στο φάσμα ονομάζεται μητρική κορυφή (base peak) και αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος του μορίου. Με βάση αυτή την κορυφή που χρησιμοποιείται ως αναφορά, υπολογίζεται το ύψος κάθε κορυφής.

A.14.2.1 Αναλυτές μαγνητικού πεδίου (magnetic sector mass filter)

Οι αναλυτές αυτοί δημιουργούν ένα μαγνητικό πεδίο μέσα στο οποίο κινούνται τα ιόντα διαγράφοντας μια τροχιά και διαχωρίζονται ανάλογα με την ορμή των ιόντων, η οποία

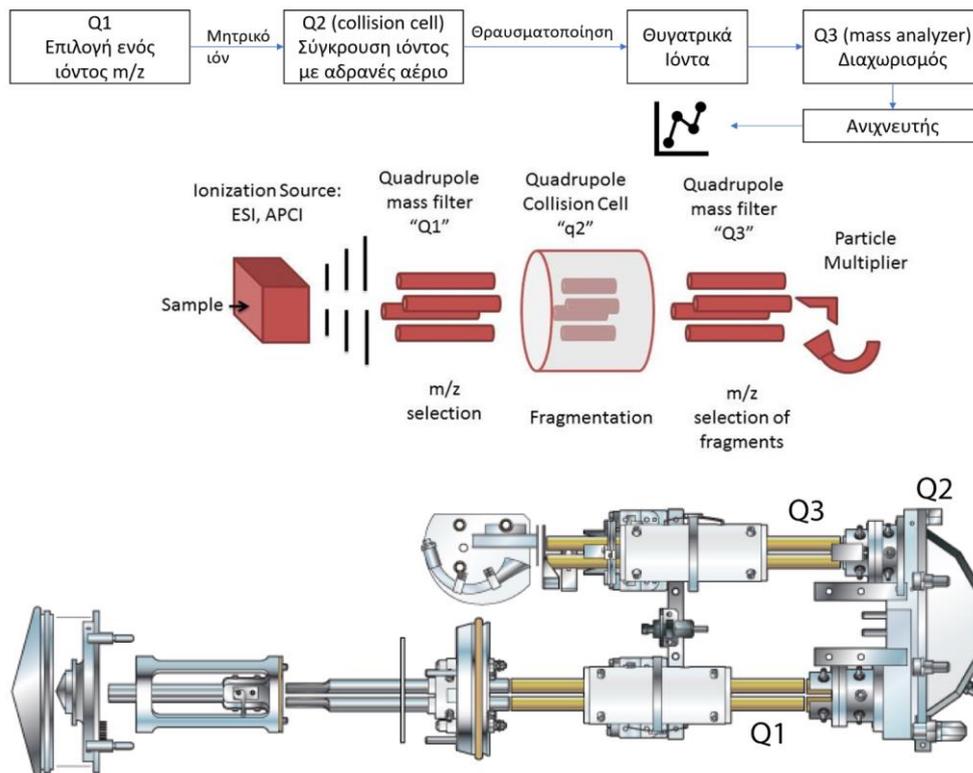
εξαρτάται και από το λόγο m/z του κάθε ιόντος. Έτσι, συγκεκριμένα ιόντα που έχουν τον ίδιο λόγο m/z ακολουθούν την προβλεπόμενη τροχιά και εστιάζονται στη σχισμή που οδηγεί στον ανιχνευτή. Το φάσμα μαζών μπορεί κάθε φορά να είναι διαφορετικό, αλλάζοντας το μαγνητικό πεδίο ή το δυναμικό επιτάχυνσης των ιόντων, ώστε να μεταφέρονται στον ανιχνευτή κάθε φορά συγκεκριμένα ιόντα βάση του λόγου m/z .

A.14.2.2 Αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (Time of flight analyzers, TOF)

Τα ιόντα διαχωρίζονται με βάση το διαφορετικό χρόνο πτήσης τους για μια γνωστή απόσταση. Ο τρόπος στον οποίο βασίζονται είναι η ταχύτητα ενός ιόντος που κινείται σε χώρο απαλλαγμένο από ηλεκτρομαγνητικά πεδία και εξαρτάται από το λόγο m/z . Τα φασματομέτρα μάζας με αναλυτή μαζών χρόνου πτήσης είναι απλά, φθηνά και μετρούν μάζες μεγάλου εύρους μέχρι και 300 kDa. Ωστόσο, έχουν μικρότερη διαχωριστική ικανότητα και επαναληψιμότητα από άλλα π.χ. αναλυτές μαγνητικού πεδίου. Σε αυτόν τον αναλυτή, τα ιόντα εισάγονται απευθείας από την πηγή ιόντων του οργάνου ή από προηγούμενο αναλυτή (σε περίπτωση σύζευξης) με τη μορφή παλμού. Έπειτα επιταχύνονται μέσα στο θάλαμο πτήσεων από ένα ηλεκτρικό πεδίο που ασκείται και έχει τιμή που κυμαίνεται μεταξύ ενός εύρους 2-25 KV και αποκτούν την ίδια κινητική ενέργεια. Μετά την αρχική επιτάχυνση, το ιόν εισέρχεται σε χώρο που δεν υπάρχει ηλεκτρικό πεδίο, δηλαδή κινείται ευθύγραμμο και ομαλά μέχρι τον ανιχνευτή, σε ένα σωλήνα πτήσης, για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Όσο μικρότερη μάζα έχει το ιόν, τόσο μεγαλύτερη ταχύτητα και μικρότερο χρόνο πτήσης θα έχει. Ο χρόνος πτήσης από την πηγή ιόντων μέσω του σωλήνα πτήσης στον ανιχνευτή που μετρείται σε microseconds, μπορεί να μετασχηματιστεί στην τιμή m/z .

A.14.2.3 Αναλυτής μαζών τριπλού τετραπόλου (Triple Quadrupole, QqQ)

Ο αναλυτής μαζών τριπλού τετραπόλου, QqQ, όπως υποδηλώνει και το όνομά του, αποτελείται από τρία τετράπολα. Ένα τετράπολο αποτελεί το ίδιο αναλυτή μαζών, και είναι ικανό να φιλτράρει τα ιόντα με βάση τις τιμές του λόγου m/z των προς ανάλυση μορίων. Το τετράπολο περιέχει δύο ζεύγη ράβδων, όπου κάθε ζευγάρι φέρει μια πολικότητα (θετική ή αρνητική).



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση της οργανολογίας ενός αναλυτή μάζας τριπλού τετραπόλου και απο κάτω απεικονίζεται η πραγματική κάτοψη της οργανολογίας απο το εσωτερικό του συστήματος Sciex QTRAP 4500.

Οι δύο ράβδοι σε κάθε ζεύγος είναι τοποθετημένες παράλληλα μεταξύ τους έτσι ώστε οι δύο πολικότητες να είναι αντιπαράλληλες, σχηματίζοντας μια δομή. Το ένα ζεύγος φέρει θετική δυναμική ενέργεια (**Εξίσωση 1.5**), ενώ το άλλο μεταφέρει αρνητική δυναμική ενέργεια (**Εξίσωση 1.6**):¹⁵⁷

$$\varphi = +(U - V\cos(\omega t)) \quad \text{Εξίσωση 1.5}$$

$$\varphi = -(U - V\cos(\omega t)) \quad \text{Εξίσωση 1.6}$$

Όπου: **U** = το δυναμικό συνεχούς ρεύματος (DC) που εφαρμόζεται στη ράβδο, **Vcos ωt** = το δυναμικό εναλλασσόμενου ρεύματος (AC), **V** = το πλάτος της τάσης ραδιοσυχνότητας (RF) και **ω** = η γωνιακή συχνότητα του πεδίου RF.¹⁵⁷

Το συνολικό ηλεκτρικό πεδίο που προκύπτει από την εφαρμοζόμενη τάση παρεμβαίνει στις τροχιές των ιόντων που ταξιδεύουν μέσα από αυτό. Με την αλλαγή του εφαρμοζόμενου DC και του AC, μόνο τα ιόντα των οποίων οι λόγοι m/z ταιριάζουν με την προκύπτουσα τάση μετατόπισης επιβιώνουν κατά τη διαδρομή μέσω του τετραπόλου και στη συνέχεια παρατηρούνται από τον ανιχνευτή.

Ο αναλυτής μαζών τριπλού τετραπόλου χρησιμοποιείται ευρέως στη στοχευμένη ανάλυση λιπιδίων. Στο φασματογράφο μαζών τριπλού τετραπόλου υπάρχουν πολλές τεχνικές ανίχνευσης, συμπεριλαμβανομένων των:

1. **Τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan):** Σε αυτή την τεχνική λαμβάνεται το ολικό φάσμα μεταξύ δύο τιμών m/z για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Μέσω της τεχνικής πλήρους σάρωσης προσδιορίζεται η δομή/ταυτότητα μιας άγνωστης ένωσης με τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους ή μέσω σύγκρισης με πρότυπα φάσματα.
2. **Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring, SIM):** Σε αυτή την τεχνική γίνεται ανάλυση των ενώσεων, μέσω σύγκρισής τους με γνωστά φάσματα.
3. **Τεχνική της φασματομετρίας μαζών σε σειρά (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS):** Αυτή η τεχνική αποτελείται από δύο ή περισσότερα επίπεδα φασματομετρικής ανάλυσης και επίσης διακρίνεται σε άλλες υποκατηγορίες λειτουργιών σάρωσης, όπως π.χ. η λειτουργία της παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring-SRM), η λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (Multiple Reaction Monitoring-MRM), η λειτουργία της σάρωσης πρόδρομων ιόντων (Precursor Ion Scan, PIS), η λειτουργία της σάρωσης ουδέτερης απώλειας (Neutral Loss Scan, NLS) και η λειτουργία της σάρωσης θυγατρικών ιόντων (Daughter Ion Scan, DIS).

Η φασματομετρία μαζών σε σειρά είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική σάρωσης και μπορεί να πραγματοποιηθεί στο χώρο ή στο χρόνο. Για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής σάρωσης στο χώρο (Tandem Mass Spectrometry in Space), είναι απαραίτητη η συμμετοχή δύο αναλυτών μαζών. Η πιο κοινή διαμόρφωση είναι το τριπλό τετράπολο (QqQ). Σε ένα QqQ, το πρώτο και το τρίτο τετράπολο (Q1 και Q3) λειτουργούν ως αναλυτές, σαρώνοντας μόνο τα ιόντα που έχουν την επιθυμητή μάζα. Το δεύτερο τετράπολο (q2) χρησιμοποιείται ως χώρος θραύσης των ιοντισμένων μορίων και πληρώνεται με ένα αδρανές αέριο σύγκρουσης (collision gas) που είναι, συνήθως, το αργό, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο κατακερματισμός των μορίων ιόντων. Αυτός ο κατακερματισμός πραγματοποιείται μεταφέροντας εσωτερική ενέργεια από τη σύγκρουση των μορίων ιόντων με το αέριο ή με αντιδράσεις μεταξύ μορίων ιόντων και αερίου, αντίστοιχα.¹⁵⁷

Κατά τη διαδικασία αυτής της τεχνικής, το μητρικό ή πρόδρομο ιόν (parent or precursor ion) παράγεται στην πηγή ιοντισμού και επιλέγεται από το 1^ο τετράπολο. Στη συνέχεια

οδηγείται στο 2^ο τετράπολο (κυψελίδα συγκρούσεων) όπου συγκρούεται με περίσσεια ενός αδρανούς αερίου (Ar ή He), παράγοντας θυγατρικά ιόντα (daughter or product ions). Τέλος, ο διαχωρισμός και η μέτρηση των θυγατρικών ιόντων γίνεται στο 3^ο τετράπολο.

Το τριπλό τετράπολο υστερεί σχετικά στη λειτουργικότητα, αλλά είναι λιγότερο απαιτητικό όργανο τόσο σε κόστος αγοράς όσο και στη λειτουργία του, καθώς έχει υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα για την ποσοτική ανάλυση γνωστών ενώσεων στόχων.

Χρησιμοποιώντας τη λειτουργία απλής ανίχνευσης, το φασματόμετρο μαζών τριπλού τετραπόλου μπορεί να ανιχνεύσει επιλεκτικά ένα ή ένα συγκεκριμένο είδος λιπιδίων με υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια.¹⁵⁸ Για παράδειγμα, με τη λειτουργία ανίχνευσης MRM σε πλάσμα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, είναι δυνατό να ανιχνευθεί λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC) γεγονός που δείχνει ότι αυτό το λιπίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου.¹⁵⁹ Ομοίως, μέσω αυτής της λειτουργίας ανιχνεύθηκαν συγκεκριμένα λευκοτριένια ως δείκτες για τον καρκίνο του πνεύμονα.¹⁶⁰ Πιστεύεται ότι με την ανάπτυξη της φασματομετρίας μαζών, και κυρίως με την ανάπτυξη των αναλυτών και της περαιτέρω εφαρμογής τους στη μελέτη και ανάλυση των λιπιδίων, θα είναι δυνατή η ανίχνευση περισσότερων λειτουργικών λιπιδίων, τα οποία θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες και θεραπευτικοί παράγοντες.

A.14.2.4 Αναλυτής μαζών τεχνολογίας Orbitrap

Ο αναλυτής μαζών Orbitrap, αποτελεί τεχνολογία τροχιακής παγίδευσης ιόντων και πρόκειται για έναν καινοτόμο αναλυτή μαζών που κατασκεύασε το 2005 η εταιρεία Thermo Fisher Scientific. Ο συγκεκριμένος αναλυτής μαζών προσφέρει υψηλή ευαισθησία και ισχύ διαχωρισμού, δυναμικό εύρος και υψηλή σταθερότητα και ακριβή μέτρηση των μαζών. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του Orbitrap είναι ότι λειτουργεί χωρίς μαγνητικό πεδίο. Ο αναλυτής μαζών Orbitrap συνήθως είναι συζευγμένος με σύστημα υγρής χρωματογραφίας (LC) και έχει σχεδιαστεί για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων με υψηλή απόδοση.

Αρχή λειτουργίας του αναλυτή Orbitrap

Ο αναλυτής τροχιάς παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 2000 από τον Makarov.¹⁶¹ Ο σχεδιασμός του αναλυτή τροχιάς προσαρμόστηκε από το αρχικό σχέδιο του Kingdon το 1923,¹⁶² το οποίο βρήκε έναν τρόπο να παγιδεύει τα ιόντα μέσω της αρχής της ηλεκτροστατικότητας. Έκτοτε, η παγίδα Kingdon έχει συνδυαστεί με διάφορες ρυθμίσεις φασματόμετρου μαζών. Για παράδειγμα, ο Knight το 1981 συνέδεσε αυτήν την παγίδα με μια πηγή λέιζερ Nd:YAG που ιοντίζει στερεά δείγματα¹⁶³ και ο Oksman συνδύασε την παγίδα Kingdon με ένα φασματόμετρο μαζών χρόνου πτήσης.¹⁶⁴ Η παγίδα Kingdon, γνωστή και ως ο

πυρήνας του σχεδιασμού της τροχιάς, αποτελείται από δύο ηλεκτρόδια: μια κυλινδρική άνοδο και μια συρμάτινη κάθοδο στο κέντρο της ανόδου. Όταν εφαρμόζεται μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων ένα δυναμικό DC, δημιουργείται ένα ακτινικό δυναμικό που θα παρεμποδίσει την κίνηση οποιουδήποτε φορτισμένου σωματιδίου που ταξιδεύει σε αυτό το χώρο.¹⁶⁵ Στη μελέτη του 1981 που έγινε από το Knight, η παγίδα Kingdon τροποποιήθηκε για να μετρήσει επίσης τη συχνότητα των ταλαντώσεων των ιόντων στον περιορισμένο χώρο (αξονική κίνηση κατά μήκος του κεντρικού ηλεκτροδίου) της παγίδας, μαζί με τη συχνότητα περιστροφής των ιόντων (ακτινική/τροχιακή κίνηση γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο). Αυτό ήταν πολύ κοντά στο μοντέλο τροχιάς που υπάρχει σήμερα. Τα συνολικά ηλεκτροστατικά δυναμικά που παράγονται σε αυτόν τον αναλυτή μάζας περιγράφονται με την **Εξίσωση 1.7**:^{161,162,166,167}

$$U(r, z) = \frac{k}{2}(z^2 - \frac{r^2}{2} + \frac{k}{2}(Rm)^2 \ln \left[\frac{r}{Rm} \right] + C \quad \text{Εξίσωση 1.7}$$

Όπου: ο πρώτος όρος περιγράφει το ηλεκτρικό δυναμικό στο συμμετρικά κυλινδρικό εσωτερικό χώρο της τροχιάς και ο δεύτερος όρος είναι η λογαριθμική συνάρτηση του ακτινικού δυναμικού μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων, τα r και z είναι οι ακτινικές συντεταγμένες, το k είναι η αξονική δύναμη επαναφοράς και εξαρτάται αυστηρά από το σχήμα και των δύο ηλεκτροδίων και την τάση που εφαρμόζεται σε αυτά, το Rm είναι η σφαιρική ακτίνα της τροχιάς και το C είναι μία σταθερά. Με άλλα λόγια, στην εγκατάσταση μιας παγίδας Kingdon ή μιας τροχιάς, ένα σταθερό ιόν είναι αυτό που περιφέρεται γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο και επίσης κινείται ταυτόχρονα αξονικά κατά μήκος του άξονα z . Καθώς τα ιόντα ταλαντώνονται μέσω της τροχιάς, ακτινικά ή αξονικά, τα ρεύματα που προκύπτουν καταγράφονται, ενισχύονται και υφίστανται μετασχηματισμό Fourier για να παραχθούν τα φάσματα μάζας.

A.14.3 Συζευγμένη τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) με τη φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry)

Τα τελευταία χρόνια, στη μελέτη των -omics, εφαρμόζεται συνδυασμός των τεχνικών της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) και της φασματομετρίας μαζών (Mass Spectrometry), προκειμένου να προκύπτουν βελτιστοποιημένα αποτελέσματα και με μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία. Ο συνδυασμός αυτών των δύο τεχνικών χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό των μη πτητικών ενώσεων, καθώς και για τον προσδιορισμό θερμοευαίσθητων ενώσεων που δε μπορούν να προσδιοριστούν με τη χρωματογραφία GC-MS. Επίσης, ο συνδυασμός αυτών των δύο τεχνικών χρησιμοποιείται και για τον προσδιορισμό της καθαρότητας της χρωματογραφικής κορυφής αλλά και για την ταυτοποίηση της δομής

άγνωστων ενώσεων, όπως είναι οι μεταβολίτες φαρμάκων, τα πεπτίδια, οι πρωτεΐνες και άλλα είδη ενώσεων.

A.14.3.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography)

Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας αποτελεί την πιο διαδεδομένη και ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική τεχνική για το διαχωρισμό και την ανάλυση των ενώσεων που βρίσκονται σε ένα πολύπλοκο μείγμα. Η λειτουργία της βασίζεται στην παρουσία μιας υγρής κινητής φάσης και μιας υγρής ή στερεής στατικής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη πάνω σε ένα αδρανές υπόστρωμα. Στην υγρή χρωματογραφία, ο διαχωρισμός των ουσιών ενός μείγματος βασίζεται στη διαφορετική αλληλεπίδραση του κάθε συστατικού με την κινητή και τη στατική φάση, με αποτέλεσμα να απαιτείται διαφορετικός χρόνος έκλουσης για κάθε ουσία ξεχωριστά που περνάει από τη στήλη. Αυτός ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης οφείλεται κυρίως στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης που έχει κάθε ένωση στην κινητή φάση. Το είδος της αλληλεπίδρασης σχετίζεται με το μέγεθος, το σχήμα και την πυκνότητα του φορτίου των σωματιδίων που περιέχονται στο δείγμα, και για αυτό το λόγο υπάρχουν διάφορα είδη χρωματογραφίας όπως για παράδειγμα, χρωματογραφία προσρόφησης, χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, χρωματογραφία ιονανταλλαγής κ.α.

Ο διαχωρισμός με βάση την HPLC λειτουργεί ακολουθώντας την αρχή της έλξης μεταξύ μορίων με παρόμοιες χημικές ιδιότητες, όπως είναι η πολικότητά τους.¹⁶⁸ Οι ενώσεις που βρίσκονται σε ένα μείγμα διαχωρίζονται καθώς εκκλύονται από μια στήλη που έχει διάμετρο μόλις λίγων μικρομέτρων. Το υλικό της στήλης είναι συνήθως πυρίτιο, αλλά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλα πολυμερή, όπως το πολυστυρένιο. Η επιφάνεια του πυριτίου περιέχει μια όξινη, υδρόφιλη λειτουργική ομάδα σιλανόλης (Si-OH), η οποία μπορεί να αντιδράσει με άλλες λειτουργικές ομάδες και να αυξήσει την υδροφοβικότητα της στήλης. Όλο αυτό αποτελεί τη στατική φάση της στήλης. Οι διαφορές στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βιομορίων και της στατικής φάσης έχουν ως αποτέλεσμα την έκλυση μορίων σε διαφορετικούς χρόνους, γεγονός που με τη σειρά του οδηγεί σε διαφορές στους χρόνους κατακράτησης (RT) μεταξύ αυτών των βιομορίων. Αυτή η ανάλυση μεταξύ των βιομορίων μπορεί να βελτιωθεί με την επιλογή του συστήματος διαλυτών, το οποίο είναι γνωστό ως κινητή φάση.

Ανάλογα με τη σχέση της πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης: **(1)** η χρωματογραφία κανονικής φάσης (Normal Phase, NP-HPLC) και **(2)** η χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (Reversed Phase,

RP-HPLC), όπου η στατική φάση είναι λιγότερο πολική συγκριτικά με την κινητή. Στην NP-HPLC, η στατική φάση είναι πολική, ως εκ τούτου, το υπόστρωμα πυριτίου μπορεί να διατηρεί την ομάδα σιλανόλης, ή μπορεί να τροποποιηθεί ελαφρώς με την προσθήκη λιγότερο υδρόφοβων ομάδων, όπως για παράδειγμα μια κυανο-ομάδα ή μια μικρή υδρογονανθρακική αλυσίδα. Από την άλλη, η κινητή φάση είναι μη πολική και εξαιρετικά υδρόφοβη και συνήθως αποτελείται από εξάνιο και τετραϋδροφουράνιο. Από την άλλη, η RP-HPLC απαιτεί τροποποιήσεις στο υπόστρωμα πυριτίου με προσθήκη υδρόφοβων ομάδων, όπως για παράδειγμα υδρογονάνθρακες μακρίας αλυσίδας (π.χ. C18), ώστε να δημιουργήσει μια μη πολική στατική φάση. Η κινητή φάση είναι πολική και συνήθως αποτελείται από νερό, αλκοόλη και ακετονιτρίλιο.¹⁶⁸ Όσον αφορά την επιλογή του τύπου της υδρόφοβης αλκυλικής αλυσίδας για τη στατική φάση, το μήκος της αλυσίδας είναι σημαντικό και εξαρτάται από το μέγεθος της ουσίας που αναλύεται. Για παράδειγμα, ένα μεγαλύτερο μόριο που έχει στη δομή του πολλά υδρόφοβα τμήματα, θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με την πολική στατική φάση. Ως εκ τούτου, μια αλυσίδα C4 θα ήταν πιο κατάλληλη επιλογή από μια αλυσίδα C18. Από την άλλη πλευρά, η RP-HPLC λειτουργεί υπό αντίστροφες συνθήκες, συγκριτικά με την NP-HPLC. Η RP-HPLC αποτελείται από μια μη πολική στατική φάση και μια πολική κινητή φάση. Η βάση της στήλης είναι το πυρίτιο και συνήθως τροποποιείται προκειμένου να μειώσει την πολικότητα της στήλης μέσω ομοιοπολικού δεσμού με μια μη πολική λειτουργική ομάδα. Προκειμένου να επιτευχθεί η μείωση της πολικότητας, συνήθως χρησιμοποιούνται μακριές αλυσίδες υδρογονανθράκων. Η κινητή φάση στην RP-HPLC περιέχει δύο διαλύτες, τον Α και τον Β, οι οποίοι κατά σύμβαση είναι υδατικός (νερό) και οργανικός, αντίστοιχα. Τις περισσότερες φορές, η κινητή φάση περιέχει μια μικρή ποσότητα οξέος, όπως είναι το TFA ή το FA. Αυτά τα οξέα λειτουργούν ως πηγή πρωτονίων καθώς και για τη βελτίωση του σήματος. Στην RP-HPLC η κινητή φάση αποτελείται συνήθως από μείγματα νερού ή υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα με διάφορους οργανικούς διαλύτες, όπως η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο ή το τετραϋδροφουράνιο που αναμειγνύονται με το νερό. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, η σύσταση της κινητής φάσης μπορεί να διατηρείται σταθερή (ισοκρατική έκλυση) ή να μεταβάλλεται με το χρόνο (βαθμωτή έκλυση).

Η διάταξη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελείται από τα εξής τμήματα: **(α)** φιάλη(ες) αποθήκευσης διαλυτών, **(β)** μονάδα εισαγωγής δείγματος, **(γ)** αντλία υψηλής πίεσης, **(δ)** χρωματογραφική στήλη, **(ε)** ανιχνευτής και **(στ)** σύστημα συλλογής, καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων.

Για την περιγραφή της αποδοτικότητας ενός χρωματογραφικού συστήματος, τα σημαντικότερα μεγέθη που χρησιμοποιούνται είναι τα ακόλουθα:

- 1) Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών (N) και το ύψος της θεωρητικής πλάκας (H), οι οποίες περιγράφονται από τις σχέσεις:

$$N = 16 x (tR/w)^2 \quad \text{και} \quad N = \frac{L}{H}$$

Όπου: **t_R**: χρόνος κατακράτησης της κάθε ένωσης, **w**: το εύρος της κορυφής της ένωσης και **L**: το μήκος του πληρωμένου τμήματος της στήλης.

Τα μεγέθη N και H σχετίζονται με την αναλυτική στήλη μέσω της εξίσωσης Van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \times u = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M) \times u$$

Όπου: **A**: συντελεστής φαινομένου πολλαπλότητας διαδρομών ροής, **B**: συντελεστής διαμήκους διάχυσης, **C**: συντελεστής μεταφοράς μάζας μεταξύ των φάσεων

- 2) Η διαχωριστική ικανότητα της στήλης R_s , η οποία αποτελεί ποσοτικό μέτρο της ικανότητας της στήλης για το διαχωρισμό δύο προσδιοριζόμενων ουσιών και δίνεται από τη σχέση:

$$R_s = \frac{2[(tR)_A - (tR)_B]}{W_A + W_B}$$

Όπου: **(t_R)_A** και **(t_R)_B**: χρόνοι κατακράτησης των δύο ενώσεων και **W_A**, **W_B**: τα εύρη των κορυφών των δύο ενώσεων

- 3) Η ασυμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών, η οποία δίνεται από στη σχέση:

$$S_{10} = \frac{a}{b}$$

Όπου: **a** και **b**: τα εύρη της κορυφής που βρίσκεται εκατέρωθεν του κεντρικού άξονα στο 1/10 του ύψους της κορυφής και $0.8 \leq S_{10} \leq 1.2$.

A.14.3.2 Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography)

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας UHPLC αποτελεί μια αναβαθμισμένη και βελτιστοποιημένη τεχνική, συγκριτικά με την απλή HPLC. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η UHPLC είναι το γεγονός ότι η χρήση μικρότερων σωματιδίων που προέρχονται από κάποιο αδρανές υλικό, για την πλήρωση της στατικής φάσης, είναι δυνατό να βελτιώσει τα όρια της ανάλυσης, οδηγώντας σε αναλύσεις με μεγαλύτερη ευαισθησία. Η UHPLC λειτουργεί με χρωματογραφικά σωματίδια μεγέθους κάτω από 2 μm και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πιέσεις που κυμαίνονται σε ένα εύρος μεταξύ 6000–15.000 psi, παρέχοντας

αυξημένη χρωματογραφική ανάλυση σε σύγκριση με τη συμβατική χρωματογραφία HPLC όπου εκεί μελετώνται μεγαλύτερα σωματίδια. Η UHPLC παρέχει ένα μεγαλύτερο εύρος γραμμικών ταχυτήτων ενώ διαθέτει καλύτερη χρωματογραφική ανάλυση και επομένως μπορεί να εφαρμοστεί σε μικρότερο χρόνο ανάλυσης. Η υψηλή χρωματογραφική ανάλυση, η οποία οδηγεί σε αυξημένο λόγο σήματος/θόρυβο (signal-to-noise ratio) και σε μικρό εύρος της κορυφής, σε σύγκριση με τη συμβατική HPLC, αποτελεί πλεονέκτημα για τη μελέτη του μεταβολικού προφίλ καθώς επιτρέπει τον προσδιορισμό ενός πάρα πολύ μεγάλου αριθμού μεταβολιτών σε φυσιολογικά επίπεδα.

Ο συνδυασμός των τεχνικών UHPLC-MS έχει γίνει βασικός άξονας για την πρωτεομική και τη μεταβολομική ανάλυση, για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών και την ταυτοποίηση μεταβολιτών, αντίστοιχα.¹⁶⁹ Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας (LC) σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών (MS) χρησιμοποιείται συνήθως για την ταυτοποίηση μορίων μικρού μοριακού βάρους, με μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση. Σε αυτή τη διάταξη, οι χημικές ουσίες εκλούνται μέσω της υγρής χρωματογραφικής στήλης σε διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης (RTs), πριν εισέλθουν στο φασματογράφο μάζας και δυνητικά υφίστανται θραυσματοποίηση. Η θραυσματοποίηση παράγει συγκεκριμένα θραύσματα, τα οποία αποτυπώνονται σε διακριτές κορυφές, ανάλογα με την τιμή του λόγου m/z που αντιστοιχεί στο καθένα.¹⁷⁰

Μεταξύ των αναλυτικών τεχνικών, η συνδυασμένη τεχνική LC-MS αναγνωρίζεται ως μία από τις καλύτερες αναλυτικές τεχνικές σε επίπεδο εκλεκτικότητας, ευαισθησίας και επαναληψιμότητας.¹⁷¹ Επιπλέον, μεταξύ των διαφόρων συνδυασμένων τεχνικών LC-MS, η UHPLC-MS/MS θεωρείται ως το πιο ισχυρό εργαλείο για λιπιδική ανάλυση υψηλής απόδοσης, ειδικά για μη στοχευμένη ανάλυση λιπιδίων μεγάλης κλίμακας λόγω της ενισχυμένης επαναληψιμότητας του χρόνου κατακράτησης.

A.15 Ανάλυση λιπιδίων με φασματομετρία μαζών

Η μελέτη των λιπιδίων είναι γνωστή με τον όρο lipidomics και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φασματομετρία μαζών. Τα μόρια των λιπιδίων είναι μη πτητικά και θερμικά ασταθή. Δεδομένου ότι τα λιπίδια αποτελούνται ως επί το πλείστον από άνθρακα, υδρογόνο, οξυγόνο, άζωτο και φωσφορικά άλατα, οι δομές τους αναλύονται καλύτερα χωρίς να έχουν υποστεί επεξεργασία προηγουμένως, προτού πραγματοποιηθεί η θραυσματοποίηση με το φασματόμετρο μαζών. Με αυτόν τον τρόπο, οι μοριακές και δομικές πληροφορίες που είναι απαραίτητες για την αναγνώριση της μοριακής ταυτότητας διατηρούνται αναλλοίωτες, ενώ

επίσης είναι δυνατή και η ποσοτικοποίησή τους. Ως εκ τούτου, η ικανότητα ιοντισμού δειγμάτων λιπιδίων που δεν έχουν υποστεί προηγούμενη επεξεργασία, χρησιμοποιώντας τεχνικές μαλακού ιοντισμού χωρίς θραυσματοποίηση, είναι πολύ σημαντική για την ανάλυση των λιπιδίων. Όπως προαναφέρθηκε, μια τέτοια τεχνική αποτελεί ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI).

Η ανάπτυξη του ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI) στα τέλη της δεκαετίας του 1980,¹³⁶ επιτρέπει σε πολλά μόρια, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λιπιδίων να ιοντίζονται σε ένα υγρό μέσο, χωρίς να προηγείται προηγούμενος διαχωρισμός. Η τεχνική ESI χρησιμοποιείται για να σχηματίσει είτε θετικά είτε αρνητικά ιόντα, και μερικές κατηγορίες λιπιδίων μπορούν να σχηματιστούν με αυτόν τον τρόπο. Με την τεχνική ESI το μόριο παραμένει ολόκληρο και χωρίς να έχει υποστεί θραυσματοποίηση στη διαδικασία ιοντισμού. Οι πηγές ESI σχηματίζουν συνήθως θετικά μοριακά ιόντα μέσω της προσθήκης ενός πρωτονίου σε ένα μόριο $[M+H]^+$ ή αρνητικά μοριακά ιόντα μέσω της απομάκρυνσης ενός πρωτονίου από ένα μόριο $[M-H]^-$. Για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα του ιοντισμού για ορισμένα μόρια, σε ορισμένες περιπτώσεις, μια μικρή ποσότητα πρόσθετου ιόντος, όπως οξικό αμμώνιο, προστίθεται στο διάλυμα ESI για να επιτραπεί ο σχηματισμός μοριακών κατιόντων αμμωνίου $[M+NH_4]^+$ ή όξινο ανθρακικό ιόν, στην περίπτωση σχηματισμού μοριακών ανιόντων $[M+CH_3CO_2]^-$. Λόγω της ευρείας τεχνικής της, η τεχνική ESI χρησιμοποιείται για όλες τις κατηγορίες λιπιδίων και παράγει αυτά τα ιόντα αέριας φάσης από μόρια λιπιδίων, με μεγάλη αποτελεσματικότητα.

Στην περίπτωση των φωσφολιπιδίων, η ESI είναι η πιο εξελιγμένη και ευκολότερη τεχνική για τη μελέτη της περιεκτικότητας ενός βιολογικού δείγματος σε φωσφολιπίδια, λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της εκλεκτικότητας που παρουσιάζει. Μέσω της τεχνικής αυτής πραγματοποιείται άμεση ανάλυση των φωσφολιπιδίων, αυτούσιων ως μόρια, και διατηρεί τις πληροφορίες που βασίζονται στη σχετική θέση των ακυλο-αλυσίδων που βρίσκονται στην κεντρική μονάδα της γλυκερίνης. Χρησιμοποιώντας τον κλασικό εξοπλισμό, η τεχνική ESI-MS έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον χαρακτηρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φωσφολιπιδίων.¹⁷² Έχουν υιοθετηθεί διαφορετικές προσεγγίσεις για την ανάλυση των μοριακών ειδών των φωσφολιπιδίων χρησιμοποιώντας την τεχνική ESI-MS. Σε ορισμένες από αυτές, ακατέργαστα εκχυλίσματα λιπιδίων εγχύονται στο φασματογράφο MS και χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των διαφορετικών ειδών των λιπιδίων αυτών μέσω σαρώσεων ή ειδικών σαρώσεων των πρόδρομων ιόντων. Άλλες μέθοδοι που έχουν εφαρμοστεί για την ανάλυση των λιπιδίων περιλαμβάνουν το συνδυασμό της υγρής χρωματογραφίας

υψηλής απόδοσης με τη φασματομετρία μαζών (HPLC-ESI-MS). Ο συνδυασμός αυτών των δύο τεχνικών μειώνει την επίδραση της καταστολής του ιοντισμού των διαφόρων ειδών PLs χαμηλής αφθονίας, συγκριτικά με την απλή εφαρμογή της τεχνικής ESI-MS. Επιπλέον, ο συνδυασμός των τεχνικών HPLC-ESI-MS προσφέρει το πλεονέκτημα ενός χαμηλού σήματος θορύβου στο φάσμα μάζας. Ωστόσο, η ποσοτική ανάλυση των PLs δεν είναι τόσο εύκολη αφού τα σήματα των μαζών των PLs επηρεάζονται από τις διαφορετικές επιδράσεις που σχετίζονται με το μήκος της αλυσίδας του ακυλίου, το βαθμό ακορεστότητας της ακυλικής αλυσίδας και τη συγκέντρωση του εκάστοτε λιπιδίου.¹⁷²

Στην περίπτωση των φωσφοϊνοσιτιδίων ο προσδιορισμός τους με τη φασματομετρία μαζών είναι δύσκολος, λόγω του όξινου χαρακτήρα τους που αποδίδονται στις φωσφορυλιωμένες ομάδες τους, και οι ίδιες αποδίδουν χαμηλά επίπεδα των ιόντων. Αυτό συμβαίνει ιδιαίτερα στην περίπτωση του PtdIns(3,4,5)P3. Ωστόσο, αυτή η δυσκολία μπορεί να αντιμετωπιστεί μέσω αντίδρασης μεθυλίωσης των φωσφορικών ομάδων των φωσφοϊνοσιτιδίων με TMS-διαζωμεθάνιο, προκειμένου να βελτιωθεί ο ιοντισμός τους και να παραχθούν σταθερά ιόντα, έτσι ώστε να είναι ανιχνεύσιμα από το φασματογράφο.¹⁷³

Η εφαρμογή της τεχνικής ESI στη μελέτη των lipidomics είναι πολύ διαφορετική λόγω της αποτελεσματικής της ικανότητας ιοντισμού και της εύκολης σύζευξής της με άλλες τεχνικές. Αυτός ο συνδυασμός των τεχνικών επιτρέπει την άμεση εισαγωγή εκχυλισμάτων λιπιδίων στο φασματόμετρο μαζών, χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό,¹⁷⁴ με σκοπό την ανάλυση λιπιδίων που βρίσκονται σε βιολογικά δείγματα σε μεγάλη κλίμακα, και που ανήκουν σε όλες τις κατηγορίες.¹⁷⁵ Αυτή η εφαρμογή επιτρέπει την ανακάλυψη νέων ειδών λιπιδίων, καθώς δεν υπάρχουν δυσκολίες κατά το χρωματογραφικό διαχωρισμό. Επιπλέον, τα μοριακά ιόντα όλων των ειδών λιπιδίων εμφανίζονται σε ένα φάσμα μαζών, επιτρέποντας εύκολες και άμεσες συγκρίσεις φασμάτων από διαφορετικά δείγματα. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι επίσης αρκετά σημαντικό για τον ποσοτικό προσδιορισμό με την άμεση έγχυση των λιπιδίων στην πηγή ESI. Σε αυτό το είδος ανάλυσης, τα εκχυλίσματα των λιπιδίων εισάγονται στην πηγή ESI με ένα συγκεκριμένο ρυθμό ροής μέσω μιας αντλίας σύριγγας (ταχύτητα ροής $\mu\text{L}/\text{min}$),¹⁷⁶ και στη συνέχεια ψεκάζονται στο φασματόμετρο μαζών. Τα εκχυλίσματα των λιπιδίων μπορούν επίσης να εισαχθούν απευθείας στο φασματόμετρο μαζών, μέσω μιας στατικής πηγής νανο-ESI χωρίς αντλία σύριγγας, με πολύ χαμηλότερο ρυθμό ροής nL/min .¹⁷⁷ Επειδή δεν προηγείται διαχωρισμός, όλα τα είδη των λιπιδίων αναλύονται ταυτόχρονα σε σταθερή συγκέντρωση, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα, η ολοκλήρωση της έντασης των κορυφών μεταξύ όλων των ιόντων να είναι ομοιόμορφη. Με αυτόν τον τρόπο είναι εφικτός ο ποσοτικός προσδιορισμός των

ενδογενών ειδών λιπιδίων αποτελεσματικά με απευθείας έγχυση, χωρίς να απαιτείται προσθήκη ενός εσωτερικού προτύπου για κάθε κατηγορία λιπιδίων που υπάρχει στο εκχύλισμα.

A.15.1 Ανάλυση λιπιδίων με διαχωρισμό – Μελέτη των λιπιδίων με βάση την υγρή χρωματογραφία

Στην ανάλυση των λιπιδίων, η τεχνική ESI μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως η διεπαφή μεταξύ χημικού διαχωρισμού και διαχωρισμού βάσει του λόγου m/z . Ο χημικός διαχωρισμός πραγματοποιείται με την τεχνική HPLC όπου τα διαφορετικά είδη λιπιδίων διαχωρίζονται λόγω διαφορετικής υδροφοβικότητας. Τα προς ανάλυση λιπίδια που εκλούνται, εισάγονται στη συνέχεια στο φασματόμετρο μαζών και διαχωρίζονται περαιτέρω με βάση το λόγο m/z .

Ανάλογα με τη φύση των λιπιδίων, χρησιμοποιείται είτε η HPLC κανονικής φάσης (Normal Phase-NP) είτε η HPLC ανάστροφης φάσης (Reverse Phase-RP). Κάθε μέθοδος χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό των λιπιδίων για διαφορετικό λόγο. Η NP-HPLC χρησιμοποιείται συνήθως για το διαχωρισμό διαφορετικών κατηγοριών λιπιδίων, ενώ η RP-HPLC αναλύει μεμονωμένα είδη που ανήκουν σε μια κατηγορία λιπιδίων.

Η επιλογή της μεθόδου της HPLC που θα εφαρμοστεί για το διαχωρισμό των λιπιδίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος της μελέτης που γίνεται κάθε φορά. Τα GPs είναι η κύρια κατηγορία των λιπιδίων της μεμβράνης.¹⁷⁸ Πρόκειται για αμφιπαθή μόρια λόγω της πολικής τους ομάδας που έχουν στην κεφαλή του μορίου και των μη πολικών αλυσίδων λιπαρών οξέων που έχουν δεσμούς στις θέσεις sn-1 και sn-2. Επειδή η ομάδα που έχουν αυτά τα μόρια στην κεφαλή τους είναι πολική, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τη στατική φάση κατά το διαχωρισμό μέσω της NP-HPLC. Ως εκ τούτου, η NP-HPLC χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των λιπιδίων ανά κατηγορία με βάση τις διαφορές στις ομάδες κεφαλής τους. Η πολικότητα και η οξύτητα μιας λειτουργικής ομάδας συνδέονται στενά. Επομένως, η σχετική πολικότητα κάθε κατηγορίας φωσφολιπιδίων μπορεί να προβλεφθεί με βάση την τιμή της pK_a του. Οι συνθήκες έκλουσης της στήλης της HPLC συνήθως περιέχουν μια μικρή ποσότητα τριφθοροξικού οξέος (TFA) ή μυρμηκικού οξέος (FA), διατηρώντας το pH της κινητής φάσης γύρω στο 1,5-2,27. Σε αυτή την τιμή pH, μόνο η λειτουργική ομάδα του φωσφορικού οξέος αποπρωτονιώνεται. Η παρουσία επιπρόσθετων λειτουργικών ομάδων στο φωσφορικό άλας επηρεάζει την τιμή της pK_a , και μεταβάλλει την πολικότητα της ομάδας της κεφαλής. Το φωσφατιδικό οξύ (PA) περιέχει μόνο μια φωσφορική ομάδα στην κεφαλή του μορίου, με δύο ιονίσια πρωτόνια. Η τιμή της pK_a του πρώτου πρωτονίου που ιοντίζεται είναι 3,0, ενώ η τιμή

της pKa του δεύτερου πρωτονίου είναι 8,0. Το πρώτο πρωτόνιο στην ομάδα φωσφορικών συγκρίνεται με άλλα πρωτόνια που ιοντίζονται σε άλλες ομάδες κεφαλής. Οι τιμές των pKa των GPC, GPE, GPS, GPI και της φωσφατιδυλογλυκερόλης (PG) σε αύξουσα σειρά είναι οι ακόλουθες: 1,0, 1,7, 2,5, 2,5 και 2,9 αντίστοιχα.¹⁷⁹ Η αύξηση της τιμής της pKa οδηγεί σε μείωση της οξύτητας και της πολικότητας. Ως εκ τούτου, η υδροφοβικότητα όλων των ομάδων κεφαλής μπορεί να ταξινομηθεί ως εξής: χολίνη (PC) < αιθανολαμίνη (PE) < σερίνη (PS) = ινοσιτόλη (PI) < γλυκερίνη (PG) < υδρογόνο (PA). Επομένως, στην NP-HPLC, οι GPC χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να αλληλεπιδράσουν με την πολική στήλη, ενώ το GPA εκλύεται πρώτο από το σύστημα. Επομένως, η NP-HPLC είναι μια χρήσιμη μέθοδος για το διαχωρισμό διαφορετικών κατηγοριών λιπιδίων που περιέχονται σε βιολογικά δείγματα.

Στην RP-HPLC, τα μόρια των λιπιδίων διαχωρίζονται με βάση την υδρόφοβη αλληλεπίδραση μεταξύ των ακυλιωμένων αλυσίδων των λιπαρών οξέων, τόσο με τη μη πολική στατική φάση όσο και με την πολική κινητή φάση. Η υδροφοβικότητα των ακυλιωμένων αλυσίδων εξαρτάται από το μήκος, τον αριθμό και τη διαμόρφωση της ακόρεστης αλυσίδας. Μία αλυσίδα μεγάλου μήκους αντιστοιχεί σε υψηλότερη υδροφοβικότητα, ενώ η παρουσία πολλαπλών ακόρεστων δεσμών μειώνει την υδροφοβικότητα.¹⁷⁵ Επειδή τα λιπίδια από διαφορετικές κατηγορίες μπορεί να έχουν παρόμοια μοριακά βάρη και βαθμούς υδροφοβικότητας, η χρήση της RP-HPLC για την ανάλυση των μορίων λιπιδίων σε ένα μείγμα που αποτελείται από διαφορετικές κατηγορίες λιπιδίων, μπορεί να είναι αρκετά περίπλοκη. Έτσι, η RP-HPLC είναι πιο χρήσιμη όταν διαχωρίζονται μεμονωμένα είδη λιπιδίων που ανήκουν σε μια κατηγορία λιπιδίων.

Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα κατά το διαχωρισμό των λιπιδικών εκχυλισμάτων με HPLC πριν από την ανάλυση με τη φασματομετρία μαζών. Αρχικά, ο διαχωρισμός απλοποιεί το στάδιο ανάλυσης, το οποίο συνήθως περιλαμβάνει δείγματα που περιέχουν πολλές κατηγορίες λιπιδίων και μεγάλο αριθμό ειδών λιπιδίων σε κάθε κατηγορία. Η τροποποίηση και η βελτιστοποίηση της τεχνικής διαχωρισμού οδηγεί σε καλύτερη ανάλυση και ανίχνευση των μεμονωμένων ειδών λιπιδίων. Ένα σημαντικό θέμα της φασματομετρίας μαζών είναι ότι τα πιο άφθονα είδη λιπιδίων μπορούν να καταστείλουν σήματα από είδη που βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση, καθώς η άμεση έγχυση πραγματοποιείται σε σύνθετα λιπιδικά εκχυλίσματα. Ο διαχωρισμός με HPLC μειώνει αυτήν την καταστολή των ιόντων και επιτρέπει την ανίχνευση των ειδών που βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση.¹⁸⁰

Επιπλέον, η HPLC είναι επίσης πολύ σημαντική για την αναγνώριση των λιπιδικών μορίων, χρησιμοποιώντας για κάθε είδος που ανιχνεύεται, εκτός από το λόγο m/z και την παράμετρο RT.¹⁸¹ Η παράμετρος RT κάθε λιπιδικού μορίου συνδέεται με τον υδρόφοβο χαρακτήρα του. Τα λιπίδια που έχουν παρόμοιες μάζες μπορούν ακόμα να διαχωριστούν χρησιμοποιώντας τις διαφορετικές τιμές των RTs τους. Η σωστή ανάλυση των ειδών των λιπιδίων είναι πολύ σημαντική, ειδικά όταν πρέπει να γίνει και ποσοτικοποίηση των λιπιδικών μορίων, κάτι που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης σε περιπτώσεις μελέτης ασθενειών.

Χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό των μεθόδων NP-HPLC και RP-HPLC για τη δημιουργία μιας δισδιάστατης διάταξης διαχωρισμού είναι δυνατός ο διαχωρισμός της κατηγορίας και του είδους κάθε λιπιδίου, ενώ εμπλουτίζεται και η ανάλυση των λιπιδίων που βρίσκονται σε βιολογικά εκχυλίσματα. Γενικά, ο συνδυασμός των μεθόδων LC και ESI-MS, παίζει ουσιαστικό ρόλο στην ανακάλυψη νέων ειδών λιπιδίων και αποτελεί αρκετά σημαντική εφαρμογή στη μελέτη των lipidomics.

A.15.2 Υποστρώματα στην τεχνική MALDI για λιπίδια

Η βασική αρχή της τεχνικής MALDI έγκειται στην ικανότητα των χημικών υποστρωμάτων να σχηματίζουν μικροκρυστάλλους οι οποίοι κατανέμονται ομοιογενώς μεταξύ των αναλυτών, έτσι ώστε να απορροφούν αποτελεσματικά την ενέργεια που προέρχεται από το λέιζερ και να μεταφέρουν αυτή την ενέργεια στα γύρω μόρια του περιβάλλοντος αναλύτη, οδηγώντας στην εκρόφηση.¹⁴⁷

Κατά το στάδιο προετοιμασίας του δείγματος στην τεχνική MALDI, μεγάλη προσοχή δίνεται στη βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητας του υποστρώματος στην εκρόφηση και στον ιοντισμό. Η αναλογία της συγκέντρωσης του υποστρώματος προς τον αναλύτη προσδιορίζεται πειραματικά και συνήθως διαφέρει μεταξύ των μορίων υψηλού μοριακού βάρους και των μικρών μορίων (για παράδειγμα, πρωτεΐνες έναντι λιπιδίων). Στην πρωτεομική ανάλυση, τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες που αποτελούν τους αναλύτες είναι σε μεγάλο βαθμό κορεσμένοι από το υπόστρωμα. Συχνά χρησιμοποιούνται οι αναλογίες υποστρώματος προς πρωτεΐνη 500:1 ή ακόμα και 1000:1.¹⁸² Στη λιπιδωμική ανάλυση από την άλλη, ανάλογα με την αφθονία των συγκεκριμένων ειδών λιπιδίων που μελετούνται, η μοριακή αναλογία υποστρώματος προς λιπίδιο είναι συχνά πολύ μικρότερη από 500:1.

Η επιλογή της αναλογίας του υποστρώματος προς τον αναλύτη βασίζεται στην αναλογία σήματος/θόρυβο (signal to noise ratio). Οι συγκεντρώσεις των λιπιδίων που είναι

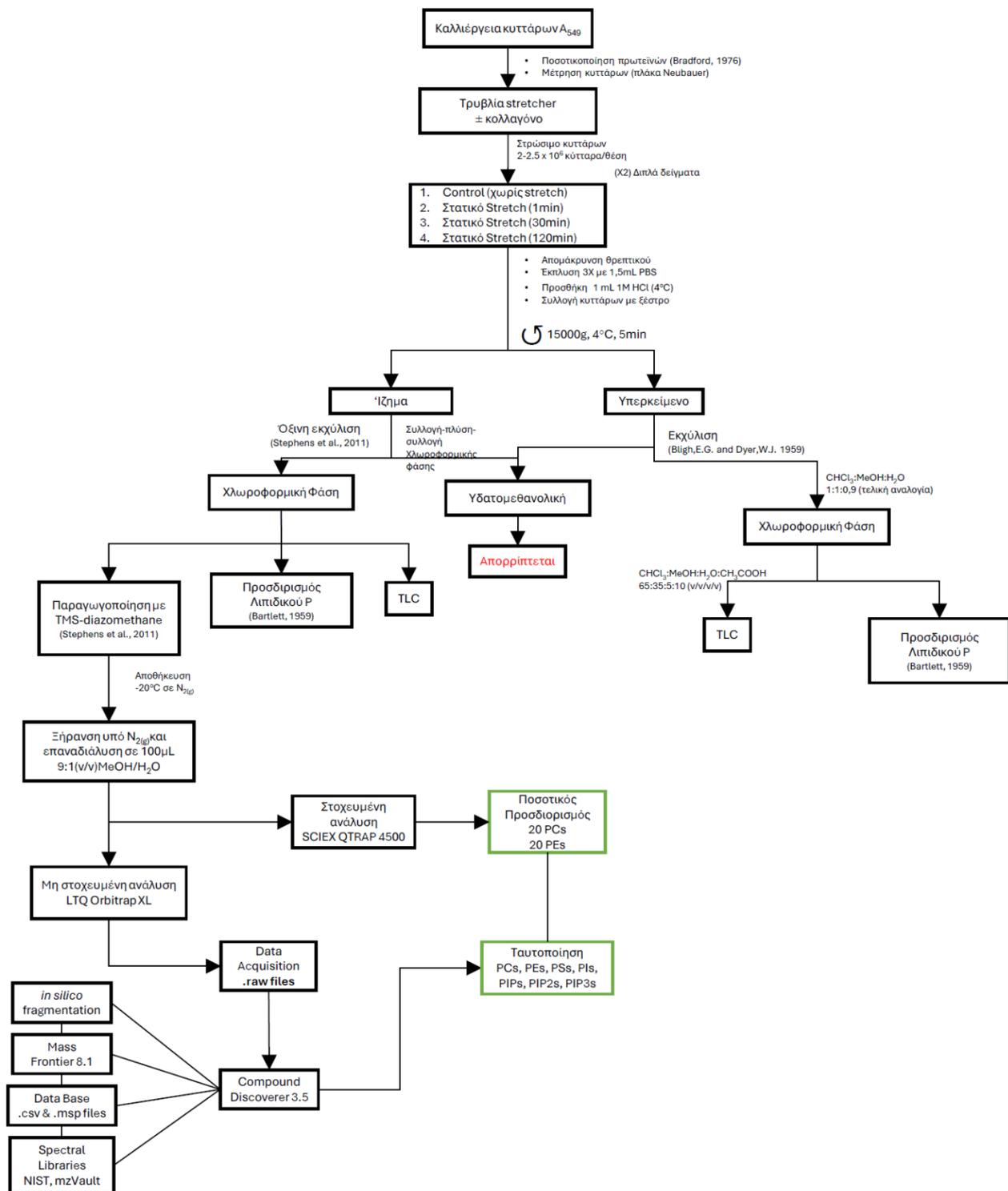
πολύ χαμηλές παράγουν πολύ χαμηλό σήμα ιόντων, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις λιπιδίων οδηγούν σε πλήρη καταστολή του σήματος.¹⁸² Το ίδιο ισχύει και για τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Επομένως, η σωστή μοριακή αναλογία υποστρώματος προς λιπίδιο συχνά επιλύεται εμπειρικά. Για την ανάλυση των λιπιδίων χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά αρκετά υποστρώματα όπως: το 2,5 διυδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB)¹⁸³ και το 1,5-διαμινοαφθαλένιο (DAN)¹⁸⁴ τόσο για τη θετική όσο και για τη λειτουργία αρνητικών ιόντων και η 9-αμινοακρινιδίνη (9-AA),¹⁸⁵ η ρ-νιτροανιλίνη (PNA)¹⁸⁶ και η (DMAN)¹⁸⁷ για τη λειτουργία αρνητικών ιόντων. Αυτά τα υποστρώματα προτιμώνται λόγω της ικανότητάς τους να ενσωματώνονται καλά στους λιπιδικούς αναλύτες για να δημιουργήσουν έναν ομοιογενή κρυστάλλο,¹⁴⁶ να παράγουν απλά φάσματα υποστρώματος-ένωσης στα οποία παρατηρούνται μόνο λίγα σήματα από το θόρυβο του υποστρώματος και να ενισχύουν το σήμα των ιόντων των αναλυτών λιπιδίων.

Η ανάπτυξη της τεχνικής ESI επέτρεψε την απευθείας ανάλυση των λιπιδίων, χωρίς να απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος, σε διάλυμα χωρίς την παρουσία οξυγόνου.

Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγονται παράπλευρες αντιδράσεις οξειδωσης λόγω της παρουσίας οξυγόνου.¹⁸⁸ Επιπλέον, η τεχνική ESI επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών ειδών λιπιδίων που βρίσκονται σε ένα πολύπλοκο δείγμα. Η τεχνική ESI, είτε από μόνο της είτε σε συνδυασμό με μια τεχνική διαχωρισμού όπως η HPLC, αποτελεί μια ισχυρή τεχνική για λιπιδομική μελέτη.

ΜΕΡΟΣ Β
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
ΥΛΙΚΑ-ΥΛΙΚΑ ΜΕΘΟΔΟΙ

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



Εικόνα 19: Διάγραμμα ροής πειραματικού μέρους

B.1 Καλλιέργεια Κυττάρων A₅₄₉

B.1.1 Αντιδραστήρια

Θρεπτικό υλικό: Ham's F12K (Nutrient Mixture Kaighn's Modification 1x/ 500mL, Cat. No 21127022 Gibco-BRL- Life Technologies Inc Scotland)

Πλήρες Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων A₅₄₉: Σε 500 mL θρεπτικού υλικού F12K προστίθενται 50 mL αδρανοποιημένου FBS, 5 mL γλουταμίνης, 10 mL δικαρβονικού νατρίου και 5 mL αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Φυλάσσεται στους 4°C.

Μη Πλήρες Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων A₅₄₉: Σε 500 mL θρεπτικού υλικού F12K προστίθενται 5 mL γλουταμίνης, 10 mL δικαρβονικού νατρίου και 5 mL αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Φυλάσσεται στους 4°C.

Ορός εμβρύου βοός (Fetal bovine serum, FBS) (Cat. No. A15-101 PAA, The Cell Culture Company). **Αδρανοποίηση FBS:** Το παρασκεύασμα απενεργοποιείται σε υδατόλουτρο στους 60°C για 30 min. Στη συνέχεια, διαμοιράζεται σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία των 50 mL σε στείρες συνθήκες, αφού πρώτα διηθηθεί με αποστειρωμένο φίλτρο. Φυλάσσεται στους -20°C.

L-Γλουταμίνη, 200mM (Glutamine, Cat. No. K0282, Seromed): Χωρίζεται σε αποστειρωμένα δοχεία στο hood, φυλάσσεται στους -20°C (Τελικός όγκος: 5mL).

Ανθρακικό νάτριο, 7.5% (w/v)

Αντιβιοτικό (Antibiotic- antimycotic 10,000 U/mL πενικιλίνη, 10,000 µg/mL θειική στρεπτομυκίνη, 25 µg/mL αμοτερικίνη B). Φυλάσσεται στους 4°C.

Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-saline, pH 7.4. Φυλάσσεται στους 4°C

Διάλυμα 0.4% Trypan blue

Διάλυμα θρυψίνης-EDTA (1x) (Trypsin- EDTA 1x, 0.5g/L trypsin, 0.2g/L EDTA σε PBS 1x)

0,02N Οξικό οξύ: Για 20mL, 28µL glacial acetic acid προστίθενται σε 20mL αποστειρωμένο ddH₂O.

Διάλυμα παρακαταθήκης Κολλαγόνου συγκέντρωσης 3,77mg/mL

Διάλυμα εργασίας κολλαγόνου συγκέντρωσης 0,1 mg/mL σε 0,02 N glacial οξικού οξέος.

Αναστολέας του ενζύμου PI3K Class I, pictilisib σε τελική συγκέντρωση 0.5 μM.

Αναστολέας του ενζύμου PTEN, bpV(phen) σε τελική συγκέντρωση 1.0 μM.

Διάλυμα RIPA

B.1.2 Υλικά-Συσκευές

- Αιματοκυτόμετρο Neubauer, Καλυπτρίδες & Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο
- Επωαστικός θάλαμος CO₂: Θάλαμος σταθερής θερμοκρασίας (37°C), 5% CO₂
- Θάλαμος νηματοειδούς ροής, επιπέδου Βιοασφάλειας ΙΙ
- Απόβλητα (χλωρίνη)
- Αυτόματες πιπέτες (100 μL & 10 μL) & Αποστειρωμένα tips
- Eppendorf πολυπροπυλενίου 1 mL και 2 mL
- Πλαστικά αποστειρωμένα σιφώνια 5, 10 & 20 mL
- Σωληνάκια φυγοκέντρησης Corning των 15 mL, 45 mL (πολυπροπυλενίου)
- Τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων (50 και 100 mm)
- Τρυβλία Strecher (50 mm)
- Σιφώνια υάλινα του 1 mL, 5 mL και 10 mL
- Μικρές πιπέτες Pasteur
- Πουάρ, Φουσκάλες Πουάρ & Ηλεκτρονικό Πουάρ
- Ψυχόμενη Φυγόκεντρος

B.1.3 Πειραματική Πορεία

B.1.3.1 Απόψυξη-Στρώσιμο Κυττάρων

Το στρώσιμο των κυττάρων πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής. Αρχικά, σηκώνεται το τζάμι του θαλάμου, μέχρι το ύψος που υποδηλώνεται από τον κατασκευαστή και ψεκάζεται με 70% αιθανόλη. Όλα τα σκεύη που θα χρησιμοποιηθούν (το θρεπτικό υλικό

F12-K, τα απόβλητα, τα δύο αποστειρωμένα σιφώνια των 10 mL, και το αποστειρωμένο σιφώνι των 5mL, τα τρυβλία και το ηλεκτρονικό πουάρ) ψεκάζονται επίσης με 70% αιθανόλη και τοποθετούνται στο θάλαμο. Στη συνέχεια προστίθενται στο τρυβλίο 200 mL θρεπτικού υλικού και γίνεται μεταφορά του κρυοφιαλιδίου (1.000.000 κύτταρα/mL) από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37°C για περίπου 2 min. Έπειτα γίνεται σχολαστική αναδιασπορά των κυττάρων (περίπου 30 αναρροφήσεις-εκροφήσεις) για τη δημιουργία εναιωρήματος κυττάρων και 1 mL από αυτό το εναιώρημα μεταφέρεται στο τρυβλίο και το δείγμα ανακινείται ήπια. Στη συνέχεια γίνεται έλεγχος στο οπτικό μικροσκόπιο ώστε να επιβεβαιωθεί εάν έχει γίνει μεταφορά κυττάρων. Γίνεται μεταφορά στον επωαστικό θάλαμο (5% CO₂ στους 37°C) για 24 h μέχρι να κολλήσουν τα κύτταρα. Μετά από 24 h γίνεται απόρριψη του θρεπτικού υλικού και προστίθενται 10 mL καινούριου θρεπτικού υλικού και το τρυβλίο μεταφέρεται στο θάλαμο μέχρι να είναι έτοιμο για ανακαλλιέργεια (splitting).

B.1.3.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων (splitting)

Σε οπτικό μικροσκόπιο παρατηρείται αν τα κύτταρα έχουν κολλήσει και καλύψει το ~ 80% του τρυβλίου. Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και το τρυβλίο των κυττάρων εκπλένεται 3 φορές με 3 mL PBS και προστίθενται 2 mL διαλύματος θρυψίνης-EDTA στο τρυβλίο. Έπειτα το τρυβλίο μεταφέρεται στον επωαστικό θάλαμο CO₂ για 10 min (αποκόλληση κυττάρων) και προστίθενται 8 mL θρεπτικού υλικού F12-K προκειμένου να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του εναιωρήματος των κυττάρων για 5 min στις 800g και το υπερκείμενο το οποίο αποτελείται από θρεπτικό υλικό και θρυψίνη απορρίπτεται. Στο ίζημα (pellet) προστίθεται κατάλληλη ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού ώστε έτσι ώστε σε 1 mL να υπάρχουν περίπου 1.000.000 κύτταρα. Πραγματοποιείται η καταμέτρηση των κυττάρων με τη χρήση αιματοκυτόμετρου Neubauer και τα τρυβλία μεταφέρονται στον επωαστικό θάλαμο για προσκόλληση, μέχρι το ταπήτιο να καλυφθεί κατά 80% (μετά από 5-7 ημέρες). Ανά τρεις ημέρες γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υλικού.

B.1.3.3 Μέτρηση αριθμού και βιωσιμότητας κυττάρων

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων γίνεται με τη χρήση αιματοκυτόμετρου Neubauer. Τα κύτταρα βάφονται με βαφή Trypan Blue. Σε σωλήνα erpendorf προστίθενται 90 μL βαφής Trypan Blue 1x και 10 μL εναιωρήματος κυττάρων. Το εναιώρημα των κυττάρων αναδιασπείρεται με την πιπέτα και τοποθετούνται 10 μL στο αιματοκυτόμετρο μεταξύ πλάκας και καλυπτρίδας. Στη συνέχεια γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στο ανάστροφο μικροσκόπιο και καταγράφεται ο αριθμός των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων. Τα ζωντανά κύτταρα εμφανίζονται ως φωτεινά ενώ τα νεκρά χρωματίζονται με μπλε χρώμα.

Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων του δείγματος υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων} = (\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων}) \times \text{αραίωση} \left(\frac{1}{10}\right) \times 10^4$$

B.1.3.4 Στρώσιμο κυττάρων σε τρυβλία του χειροκίνητου στατικού Stretcher με κολλαγόνο

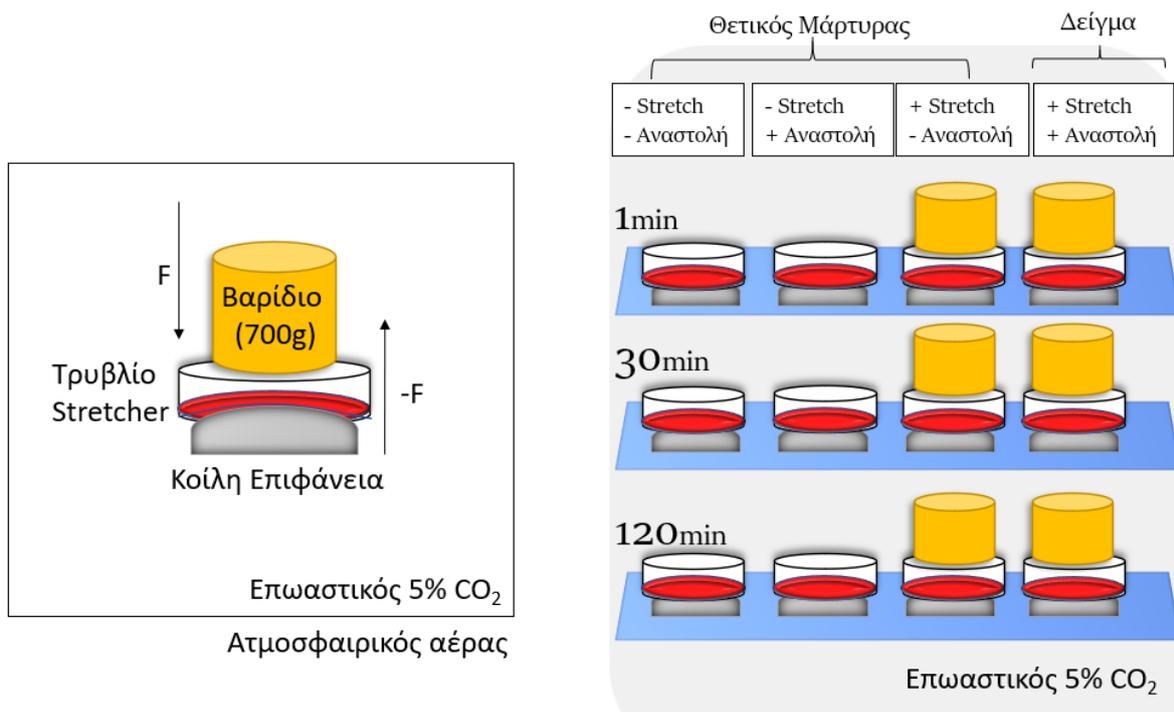
Σε τρυβλίο stretcher 50 mm, προστίθεται 1.6 mL 0.1 mg/mL κολλαγόνο (σε 0.02 N οξικό οξύ) και γίνεται ήπια ανακίνηση ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια της μεμβράνης του τρυβλίου και το διάλυμα αφήνεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου (στο θάλαμο νηματικής ροής ώστε να μην μολυνθεί). Το κολλαγόνο αναρροφάται και το τρυβλίο πλένεται 3 φορές με 1.5 mL PBS. Τέλος, προστίθενται 3 mL θρεπτικού υλικού F12-K ώστε να μη στεγνώσει η μεμβράνη του τρυβλίου και αφήνεται μέχρι την προσθήκη των κυττάρων. Σε κάθε τρυβλίο προστίθενται 2 mL εναιωρήματος κυττάρων 1 mL/10⁶ κύτταρα A₅₄₉. Ο τελικός όγκος του θρεπτικού υλικού στο τρυβλίο είναι 5 mL. Τέλος, τα τρυβλία αφήνονται για 18 h στον επωαστικό θάλαμο CO₂ μέχρι την πρόσφυση τους στην μεμβράνη. Μετά το πέρας των 18 h, το πλήρες θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με μη πλήρες και αφήνεται για 2 h μέχρι το σύστημα να έλθει σε ισορροπία. Στη συνέχεια προστίθενται οι αναστολείς p115 και bpV(phn) σε τελική συγκέντρωση 0.5 μM και 1 μM αντίστοιχα και γίνεται επώαση για 30 min. Μετά την επώαση λαμβάνει χώρα το χειροκίνητο στατικό Stretching. Για κάθε συνθήκη μελετήθηκαν διπλά δείγματα. Οι συνθήκες αποτελούνταν από δύο αναστολείς των ενζύμων (PI3K/PTEN) και τρεις διαφορετικούς χρόνους στατικού stretching (1 min, 30 min και 120 min) (**Πίνακας 3**). Συνολικά υπάρχουν 3 διαφορετικά είδη θετικού μάρτυρα για κάθε συνθήκη (+/- αναστολή και +/- stretch) και 1 είδος δείγματος (+αναστολή, + stretch) για τους τρεις διαφορετικούς χρόνους.

Πίνακας 3: Συνθήκες πειράματος στατικού stretching.

Συνθήκες
Control 1min χωρίς Stretch χωρίς Αναστολέα PI3K/PTEN
Control 1min χωρίς Stretch με Αναστολέα PI3K/PTEN
Control 1min Stretch χωρίς αναστολέα PI3K/PTEN
1min Static Stretch με Αναστολέα PI3K/PTEN
Control 30 min χωρίς Stretch χωρίς Αναστολέα PI3K/PTEN
Control 30 min χωρίς Stretch με Αναστολέα PI3K/PTEN
Control 30 min με Stretch χωρίς Αναστολέα PI3K/PTEN
30min Static Stretch με Αναστολέα PI3K/PTEN
Control 120 min χωρίς Stretch χωρίς Αναστολέα PI3K/PTEN
Control 120 min χωρίς Stretch με Αναστολέα PI3K/PTEN
Control 120 min με Stretch χωρίς Αναστολέα PI3K/PTEN
120min Static Stretch με Αναστολέα PI3K/PTEN

B.1.3.5 Στατικό Stretch

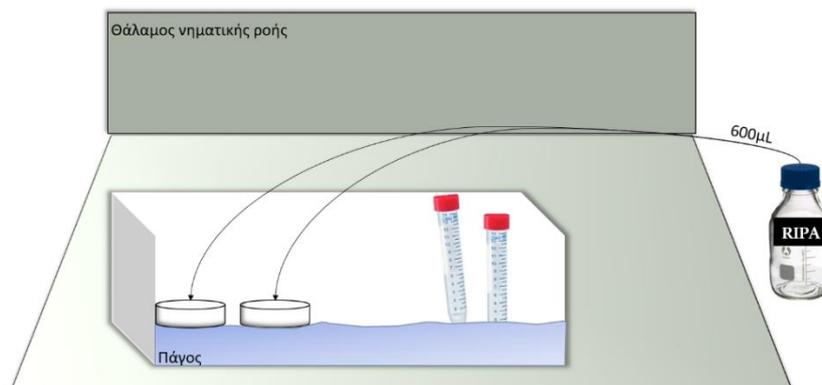
Οι διαφανείς βάσεις κοίλης επιφάνειας, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 20**, τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο CO₂. Στη συνέχεια τοποθετούνται όλα τα τρυβλία του stretcher επί της κοίλης επιφάνειας και έπειτα τοποθετούνται τα βαρίδια (~700 g) επί του τρυβλίου. Αφήνονται για χρόνους 1 min, 30 min και 120 min. Στη συνέχεια απομακρύνονται τα τρυβλία από τον επωαστικό θάλαμο και τοποθετούνται σε πάγο στο θάλαμο νηματικής ροής. Το θρεπτικό υλικό (ή υπερκείμενο) συλλέγεται και φυλάσσεται στους -80°C. Έπειτα τα τρυβλία πλένονται 2 φορές με 1.5 mL PBS. Τα κύτταρα συλλέγονται με ρυθμιστικό διάλυμα RIPA. Αυτή η διαδικασία γίνεται όσο το δυνατό γρηγορότερα ώστε να μη μεταβληθούν οι συνθήκες του πειράματος.



Εικόνα 20: Απεικόνιση στατικού stretch στον επωαστικό θάλαμο CO₂.

B.1.3.6 Συλλογή κυττάρων με RIPA

Προστίθενται 600 μ L διαλύματος RIPA σε κάθε τρυβλίο. Γίνεται ήπια ανακίνηση μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα. Τα κύτταρα συλλέγονται σε σωλήνες eppendorfs των 1.5 mL (Εικόνα 21). Στη συνέχεια οι σωλήνες eppendorfs τοποθετούνται σε ανακινούμενη βάση στους 4°C για 30 min. Έπειτα φυγοκεντρώνονται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 15.000 RPM. Το υπερκείμενο διάλυμα διαμοιράζεται σε όγκους των 100 μ L και φυλάσσεται στους -20°C.



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση της συλλογής των κυττάρων με διάλυμα RIPA.

B.1.3.7 Εκχύλιση

Προετοιμασία κυττάρων A549 για εκχύλιση: Τα κύτταρα A549 καλλιεργούνται και έπειτα στρώνονται στη μεμβράνη των τρυβλίων του στατικού stretch. Αφήνονται για 18 h στον

επωαστικό θάλαμο CO₂ ώστε να κολλήσουν στη μεμβράνη. Στη συνέχεια το πλήρες θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με το μη πλήρες και αφήνονται για 2 h ώστε το σύστημα να έλθει σε ισορροπία. Στη συνέχεια προστίθενται οι αναστολείς p1ctilisib και bpV(phen) των ενζύμων PTEN και PI3K Class I, αντίστοιχα. Τέλος πραγματοποιείται το στατικό stretching, όπως αναγράφεται στην **Παράγραφο Β. 1.3.5**.

Συλλογή κυττάρων για εκχύλιση: Μετά το πέρας του στατικού stretching τα τρυβλία μεταφέρονται στον πάγο. Το θρεπτικό υλικό αναρροφάται και αποθηκεύεται σε πλαστικό corning στους -80°C. Γίνεται έκπλυση 2 φορές με 1.5 mL PBS και στο τρυβλίο προστίθενται 1.5 mL διαλύματος 1M HCl (2 φορές από 750 μL). Τα κύτταρα αποκολλώνται με ειδικό ξέστρο, συλλέγονται με πιπέτα και τοποθετούνται σε σωλήνες πολυπροπυλενίου erpendorfs όγκου 2 mL, τα οποία είναι τοποθετημένα στον πάγο. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για 5 min, στους 4° C, στις 15.000 g και το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται. Το ίζημα (pellet) αναδιαλύεται σε 170 μL H₂O και 750 μL μονοφασικού συστήματος διαλύματος A (quench mixture).

B.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε Πήγμα Πολυακρυλαμιδίου υπό Μετουσιωτικές Συνθήκες (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών υπό μετουσιωτικές συνθήκες με βάση το μοριακό τους βάρος σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου επιτυγχάνεται με την τεχνική της *ηλεκτροφόρησης*.

B.2.1 Αρχή Μεθόδου

Η αποδιάταξη της δομής των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ενός αποδιατακτικού μέσου, το δωδέκυλο-σουλφονικό νάτριο (SDS). Το SDS είναι οργανοθεϊκό άλας και έχει ιδιότητες απορρυπαντικού και την ικανότητα να δεσμεύει τις πρωτεΐνες. Ως (ανιονικό) απορρυπαντικό καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μίας πρωτεΐνης και παράλληλα δεσμεύεται πάνω σε αυτές σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1,4 g SDS/g πρωτεΐνης). Το καθαρό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία συμπλόκων με σαφή και καθορισμένη μορφή τα οποία φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο. Έτσι κατά την ηλεκτροφόρηση, η ικανότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων να διαχωρίζονται είναι μια εξίσωση με μοναδική μεταβλητή το μοριακό βάρος της εκάστοτε προς διαχωρισμό πρωτεΐνης.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου, ένα προϊόν συμπολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και του δις-ακρυλαμιδίου. Έτσι σχηματίζεται ένα πολυμερές πλέγμα με πόρους, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού

και τη συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα. Η αντίδραση πολυμερισμού γίνεται μέσω του μηχανισμού ελεύθερων ριζών και πυροδοτείται με την προσθήκη υπερθεϊκού αμμωνίου ((NH₄)₂S₂O₈) και του φωτοχημικού καταλύτη τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) για τη διάδοσή του. Στην τεχνική αυτή παρασκευάζονται δύο διαφορετικά, ως προς το pH και τη σύστασή τους, πήγματα. Στο πήγμα επιστοιβάξης (stacking gel) συμπυκνώνονται οι πρωτεΐνες προς διαχωρισμό σε μια λεπτή ζώνη, ενώ στο πήγμα διαχωρισμού (resolving gel) πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε λεπτές ζώνες κατά την κίνηση τους μέσα σε αυτό.

B.2.2 Αντιδραστήρια-Υλικά

- **Tris-HCl** (C₄H₁₁NO₃, 121,14 g/mol, T1503, Sigma)
- **Σουλφονυλοδωδέκυλο νάτριο, SDS** (C₁₂H₂₅NaO₄S, 288,38 g/mol, A2263, AppliChem)
- **Ακρυλαμίδιο** (C₃H₅NO, 71,08 g/mol, A3553, Sigma).
- **N,N'-Μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδιο** (C₇H₁₀N₂O₂, 154,17 g/mol, 1610201, BioRad)
- **Υπερθεϊκό αμμώνιο, APS** ((NH₄)₂S₂O₈, 228,20 g/mol, A3678, Sigma)
- **Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη, TEMED** (C₆H₁₆N₂, 116,20 g/mol, T9281, Sigma)
- **Ισοβουτανόλη** (C₄H₁₀O, 74,12 g/mol, 414264, Carlo Erba)
- **Απόλυτη Αιθανόλη** (CH₃CH₂OH, 46,07 g/mol, 1.00983.2511, Merck)
- **Γλυκερόλη** (C₃H₈O₃, 92,02 g/mol, 101186M, AnalaR)
- **Κυανό της βρωμοφαινόλης**, Bromophenol Blue Sodium Salt (C₁₉H₉Br₄O₅SNa 691,94 g/mol, 318744, Sigma)
- **2-Μερκαπτοαιθανόλη** (C₂H₆OS, 78,13 g/mol, M3148, Sigma)
- **Γλυκίνη** (C₂H₅O₂N, 75,05 g/mol, A1067, AppliChem)
- **Coomassie Brilliant Blue R-250** (C₄₅H₄₄N₃NaO₇S₂, 825,97 g/mol, B0149, Sigma)
- **Μεθανόλη** (CH₄O, 32,04 g/mol, 32213, Riedel-de Haën)
- **Οξικό Οξύ** (C₂H₄O₂, 60,05 g/mol, 33209, Fluka)
- **Πρότυπα Μοριακά Βάρη** (Prestained protein ladder 10-170 kDa, 26618, Thermo)

- **Σελοφάν για gels** (Gel drying frames, Z377597, Sigma)

B.2.3 Συσκευές

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini-PROTEAN II Cell, BioRad) που περιέχει μικρές γυάλινες πλάκες 7.3 cm x 10.2 cm, μεγάλες γυάλινες πλάκες 8.3 cm x 10.2 cm, διαχωριστές (spacers) πάχους 1.0 mm, κάρτα ευθυγράμμισης (alignment card), βάση στήριξης πλακών, ελάσματα καουτσούκ, κτένι 10 φρεατίων πάχους 1.0 mm, σύστημα σταθεροποίησης πλακών με σφιγκτήρες, δεξαμενή ηλεκτροφόρησης, σύστημα ηλεκτροδίων, καπάκι σύνδεσης με τα ηλεκτρόδια, τροφοδοτικό ρεύματος PowerPac HC
- Ανακινούμενη βάση

B.2.4 Διαλύματα Εργασίας

Ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8: Ζυγίζονται 6.0 g Tris-HCl και διαλύονται σε 100 mL νερού. Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 6.8 με διάλυμα 4N HCl και φυλάσσεται στους 4°C.

Ρυθμιστικό διάλυμα 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8: Ζυγίζονται 18,15 g Tris-HCl και διαλύονται σε 100 mL νερού. Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 8.8 με διάλυμα 4N NaOH και φυλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα 10 % w/v SDS: Ζυγίζονται 10 g SDS και διαλύονται σε 100 mL νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα 30 %/0.8 % w/v ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου: Ζυγίζονται 29.2 g ακρυλαμιδίου και 0.8 g bis-ακρυλαμιδίου και διαλύονται σε 100 mL νερού. Το διάλυμα διηθείται και φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο στους 4°C.

Διάλυμα 10 % w/v υπερθειϊκού αμμωνίου (APS): Ζυγίζεται 0.1 g υπερθειϊκού αμμωνίου και διαλύεται σε 1 mL νερού. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του και στην συνέχεια απορρίπτεται.

Διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων (Sample Buffer) 6x: Περιέχει 197.4 mM Tris-HCl, 26.3 % v/v γλυκερόλη, 2.1 % w/v SDS, 0.01 % w/v κυανό της βρωμοφαινόλης και 2 % v/v 2-μερκαπτοαιθανόλη. Αναμιγνύονται 1.1958 mg Tris-HCl, 39.45 mL γλυκερόλης, 3.15 g SDS, 15.0 mg κυανού της βρωμοφαινόλης και 3 mL 2-μερκαπτοαιθανόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 mL με νερό και το pH ρυθμίζεται στην τιμή 6.8. Το διάλυμα χωρίζεται ανά 1.0 mL σε πλαστικά σωληνάκια, τα οποία φυλάσσονται στους -20°C.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrode Running Buffer) 10x: Περιέχει 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris-HCl και 0.1 % w/v SDS. Ζυγίζονται 144.1 g γλυκίνης, 30.3 g Tris-HCl και 10 g SDS και διαλύονται σε 1L απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 8.8. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrode ή Running Buffer) 1x: 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10x αραιώνονται σε τελικό όγκο 1 L με νερό. Το διάλυμα παρασκευάζεται πριν την χρήση του και έπειτα απορρίπτεται.

Διάλυμα χρωματισμού πήγματος (Staining Buffer): Περιέχει 0.1 % w/v Coomassie R-250, 40% v/v μεθανόλη και 10 % v/v οξικό οξύ. Ζυγίζεται 0.5 g Coomassie R-250 και διαλύεται σε 400 mL μεθανόλης και 100 mL οξικού οξέος. Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με νερό. Το διάλυμα αναδεύεται και διηθείται σε πυκνωτό ηθμό και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα αποχρωματισμού πήγματος (Destaining Buffer): Περιέχει 40% v/v μεθανόλη και 10 % v/v οξικό οξύ. Αναμιγνύονται 400 mL μεθανόλης και 100 mL οξικού οξέος και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα στεγνώματος πήγματος (Gel Drying Buffer): Περιέχει 20%v/v μεθανόλη και 10 % v/v γλυκερόλη. Αναμιγνύονται 100 mL μεθανόλης και 50 mL γλυκερόλης σε τελικό όγκο 500 mL νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

B.2.5 Πειραματική πορεία

Προετοιμάζεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης. Πλένονται οι γυάλινες πλάκες της συσκευής και τα spacers του kit με απεσταγμένο H₂O και απόλυτη αιθανόλη. Συναρμολογούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του kit. Για να ελεγχθεί εάν υπάρχει διαρροή, προστίθεται ποσότητα απεσταγμένου νερού μεταξύ το γυάλινων πλακών και αφήνεται για 15-20 min. Έπειτα η ποσότητα αυτή απομακρύνεται και η περίσσεια του νερού αφαιρείται με διηθητικό χαρτί.

B.2.5.1 Παρασκευή πήγματος διαδρομής (Resolving ή Separating Gel)

Σε πλαστικό σωληνάριο corning των 50 mL αναμιγνύονται τα αντιδραστήρια με την σειρά που εμφανίζονται στον **Πίνακα 4**.

Πίνακας 4: Σύσταση πήγματος διαδρομής 10%, 12% και 15% και πήγματος επιστοίβαξης 5% για την ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).

Αντιδραστήρια	Πήγμα Διαδρομής (Resolving Gel)			Πήγμα Επιστοίβαξης (Stacking Gel) 5%
	10%	12%	15%	
dH₂O	4 mL	3,4 mL	2,5 mL	3,5 mL
Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl 1,5 M, pH 8.8	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	-
Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl 0,5 M, pH 6.8	-	-	-	3 mL
10% SDS	100 μL	100 μL	100 μL	80 μL
30%/0,8% Acrylamide / Bis-acrylamide	3,3 mL	4 mL	5 mL	1,3 mL
10% Υπερθειϊκό Αμμώνιο (APS)	100 μL	100 μL	100 μL	80 μL
TEMED	10 μL	10 μL	10 μL	8 μL

Η έναρξη του πολυμερισμού λαμβάνει χώρα κατά την προσθήκη των διαλυμάτων APS και TEMED γι' αυτό προστίθενται στο τέλος. Μετά την προσθήκη όλων των διαλυμάτων πολυμερισμού, γίνεται ήπια ανάδευση και μεταφέρεται το μίγμα ανάμεσα στις δύο γυάλινες πλάκες τις συσκευής ηλεκτροφόρησης. Το μίγμα, ανάμεσα στις πλάκες, πρέπει να φτάσει 0.5 cm κάτω από το κτένι και 2 cm κάτω από το άνω όριο του μικρού τζαμιού. Εν συνεχεία, πάνω από το πήγμα διαδρομής προστίθεται ισοβουτανόλη ώστε η επιφάνεια του πολυακρυλαμιδίου να μην είναι εκτεθειμένη στον αέρα και ξεραθεί. Το μίγμα αφήνεται να πολυμεριστεί στους 37°C για 45 min.

Για να επιβεβαιωθεί ότι το πήγμα διαδρομής έχει πήξει, φυλάσσεται μια μικρή ποσότητα στο corning από το μίγμα και τοποθετείται στον επωαστήρα μαζί με τη συσκευή. Αν το περιεχόμενο στο corning έχει πήξει τότε το πήγμα διαδρομής έχει πήξει.

B.2.5.2 Παρασκευή πήγματος επιστοίβαξης (Stacking Gel)

Αμέσως μετά τον πολυμερισμό του πήγματος διαδρομής, αποχύνεται απότομα η ισοβουτανόλη και η επιφάνεια του πήγματος ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό. Χρησιμοποιώντας διηθητικό χαρτί απομακρύνεται η περίσσεια του νερού. Για την παρασκευή του πήγματος επιστοίβαξης, σε πλαστικό σωλήνα corning των 50 mL αναμιγνύονται τα

αντιδραστήρια της τελευταίας στήλης του Πίνακα 4, προσθέτοντας τελευταία τα APS και TEMED. Γίνεται ήπια ανάδευση για την ομογενοποίηση του διαλύματος. Το μίγμα επιστοιβάζεται στο πήγμα διαδρομής και τοποθετείται το ειδικό κτένι για την δημιουργία θέσεων. Ο πολυμερισμός λαμβάνει χώρα στους 37°C για 30 min. Για να επιβεβαιωθεί ότι το πήγμα επιστοιβάξης έχει πήξει παρακολουθείται το περιεχόμενο από το corning το οποίο πολυμερίστηκε στις ίδιες συνθήκες. Μετά τον πολυμερισμό, οι γυάλινες πλάκες αφαιρούνται από τη συσκευή στήριξης και τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το κτένι απομακρύνεται προσεκτικά από τις γυάλινες πλάκες και ο χώρος ανάμεσα από τις γυάλινες πλάκες, τις θέσεις των δειγμάτων αλλά και στον εξωτερικό χώρο του πήγματος τοποθετείται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1X.

B.2.5.3 Προετοιμασία και τοποθέτηση των δειγμάτων

Σε κατάλληλη ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα A₅₄₉ προστίθεται ποσότητα διαλύματος φόρτωσης (sample buffer) 6x σε πλαστικούς σωλήνες erpendorf (100 μL δείγματος αναμιγνύονται με 20 μL sample buffer 6x). Ο μέγιστος όγκος που μπορεί να προστεθεί σε κάθε θέση είναι 45 μL. Τα δείγματα θερμαίνονται για 5 min στους 100°C. Μετά το βρασμό τους τα δείγματα τοποθετούνται με ειδικό ρύγχος μεγάλης απόληξης στις αντίστοιχες θέσεις του πήγματος. Στην πρώτη θέση τοποθετούνται τα πρότυπα μοριακά βάρη (markers). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 150V για περίπου μια ώρα. Όταν το μέτωπο της βαφής φτάσει στο τέλος του πήγματος διαδρομής τότε ολοκληρώνεται η ηλεκτροφόρηση.

B.2.5.4 Χρώση πρωτεϊνών του πήγματος

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι γυάλινες πλάκες αποσυνδέονται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η μικρή από τη μεγάλη γυάλινη πλάκα αποκολλάται και κόβεται το πήγμα επιστοιβάξης με ειδικό πλαστικό κοπίδι (gel knife). Το πήγμα τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει το διάλυμα χρωματισμού (Staining Buffer) και αφήνεται στην ανακινούμενη βάση, σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου μισή ώρα έως ότου εμφανιστούν οι κυανόχρωμες πρωτεϊνικές ζώνες.

B.2.5.5 Αποχρωματισμός του πήγματος

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

B.2.5.6 Στέγνωμα και μονιμοποίηση του πηγματος

Το ειδικό σελοφάν εμβαπτίζεται στο διάλυμα στεγνώματος του πηγματος (Gel Drying Buffer) για 30 λεπτά και απλώνεται πάνω σε ένα πλαίσιο. Το πήγμα, αφού εμβαπτιστεί κι αυτό στο διάλυμα στεγνώματος του πηγματος για τον ίδιο χρόνο με το σελοφάν, τοποθετείται πάνω στο σελοφάν, στο κέντρο του πλαισίου, προσεκτικά έτσι ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα μεταξύ τους. Ένα ακόμη πλαίσιο στερεώνεται πάνω στο προηγούμενο με τη βοήθεια συνδετήρων. Τα πλαίσια με το πήγμα τοποθετούνται κάθετα και αφήνονται για 2-3 ημέρες, σε θερμοκρασία δωματίου ή για 12-16 h σε ρεύμα αέρα.

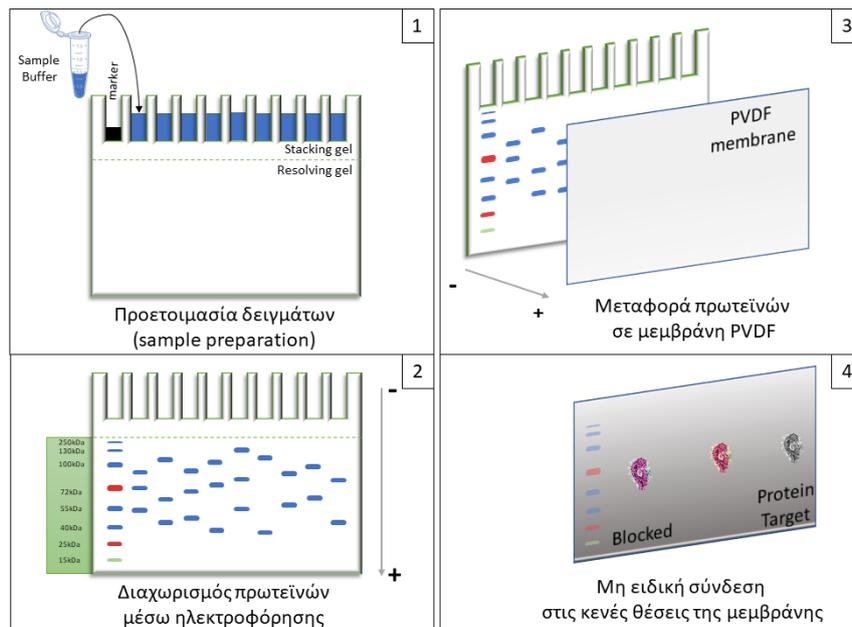
B.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών εκχυλίσματος κυττάρων A₅₄₉ και ανίχνευση της pAktSer437 με ανοσοαποτύπωση

B.3.1 Εισαγωγή

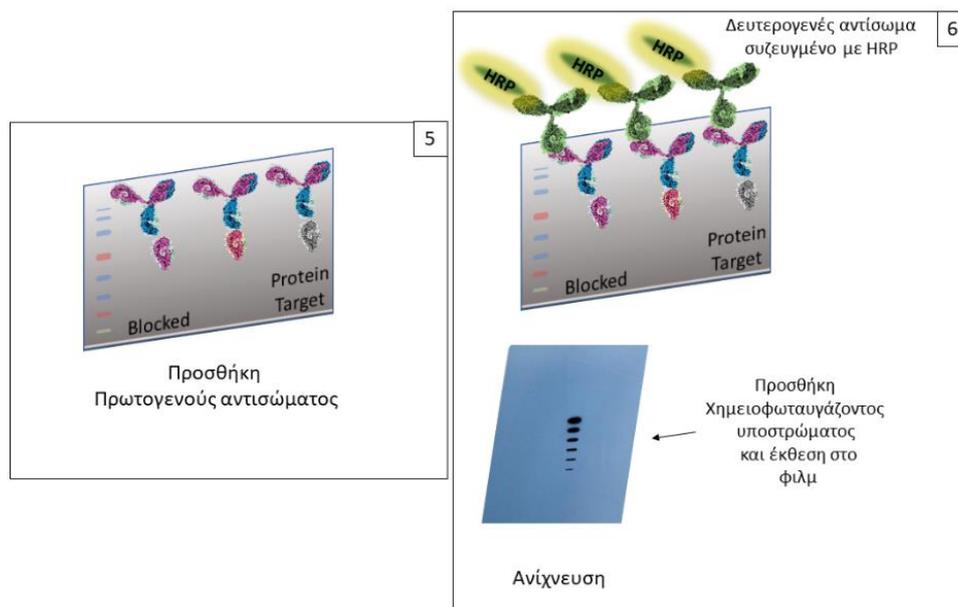
Οι ανοσοχημικές μέθοδοι με χρήση πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων, λαμβάνουν χώρα για την ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, γνωστή και ως Western Blot, είναι μια εργαστηριακή μέθοδος ανίχνευσης και ημι-ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης-στόχου σε ένα πολύπλοκο δείγμα, βιολογικής προέλευσης ¹⁸⁹. Συνδυάζει την υψηλή διαχωριστική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης, την εκλεκτικότητα των αντισωμάτων, την ευαισθησία των ενζυμικών αντιδράσεων και κατ' επέκταση την υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης της πρωτεΐνης-στόχου.

Η μέθοδος συνοπτικά, αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Προετοιμασία δειγμάτων (Sample Preparation)
2. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών με SDS-PAGE
3. Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από το πήγμα πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη PVDF
4. Επώαση της μεμβράνης με πρωτεϊνούχο διάλυμα για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων σύνδεσης (blocking buffer)
5. Επώαση με ειδικό πρωτογενές αντίσωμα
6. Επώαση με ειδικό δευτερογενές αντίσωμα
7. Επώαση με χημειοφωταγάζον υπόστρωμα ECL
8. Εμφάνιση σε ειδικό φιλμ



Εικόνα 22: Συνοπτικό διάγραμμα ροής της τεχνικής ανοσοαποτύπωσης (μέρος 1/2)



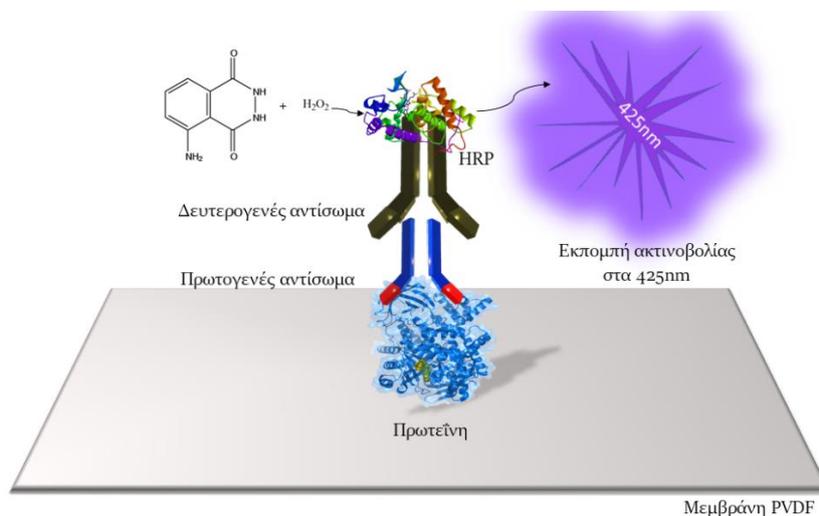
Εικόνα 23: Συνοπτικό διάγραμμα ροής της τεχνικής ανοσοαποτύπωσης (μέρος 2/2)

B.3.2 Ανίχνευση της pAktSer437 με ανοσοαποτύπωση

B.3.2.1 Αρχή Μεθόδου

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης στηρίζεται στην ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από το πήγμα πολυακρυλαμιδίου στην μεμβράνη πολυβινυλοδιφθορίου (PVDF). Η απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης-πρωτογενές αντίσωμα - δευτερογενές αντίσωμα - HRP γίνεται με χρήση ειδικού χημειοφωταγάζοντος υποστρώματος ειδικό για τον ενζυμικό δείκτη HRP που είναι συζευγμένος στο δευτερογενές αντίσωμα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 24**. Η

εκπεμπόμενη ακτινοβολία από την αντίδραση χημειοφωταύγειας αποτυπώνεται με μορφή κηλίδας (blot) λόγω οξειδοαναγωγικής αντίδρασης πάνω στο φωτοευαίσθητη επιφάνεια του φωτογραφικού φιλμ. Η πυκνομετρική ανάλυση γίνεται με χρήση σαρωτή και του ειδικού υπολογιστικού προγράμματος ImageJ.



Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση της ανοσοχημικής μεθόδου που ακολουθείται στην τεχνική της ανοσοαποτύπωσης. Οι ελαφριές αλυσίδες του πρωτογενούς αντισώματος συνδέονται ειδικά στον αντιγονικό επίτοπο της στοχεύουσας πρωτεΐνης πάνω στην μεμβράνη PVDF. Ένα δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με τον ενζυμικό δείκτη HRP, συνδέεται στο πρωτογενές αντίσωμα. Το υπόστρωμα του ενζυμικού δείκτη, λουμινόλη, παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου οξειδώνεται από την HRP και παράγεται προϊόν το οποίο εκπέμπει ακτινοβολία μήκους κύματος 425nm.

B.3.3 Πειραματική πορεία

B.3.3.1 Υλικά – συσκευές

1. Συσκευή ανοσοαποτύπωσης (Amersham Biosciences Corp)
2. Μεμβράνη μεταφοράς πρωτεϊνών PVDF (Bio-Rad)
3. Διηθητικό χαρτί 3mm
4. Blotter paper (Amersham Biosciences)
5. Tween-20 (Cat. No. P1379, Sigma-Aldrich)
6. Trizma Base (C₄H₁₁NO₃, FW:121.14)
7. Διαλύματα χημειοφωταύγειας (ECL AmershamBiosciences)
8. Κασετίνα εμφάνισης των φιλμ (LifeRay Ferrania Incorp)
9. Φιλμ (Kodak)
10. Υγρό εμφάνισης του φιλμ (Kodak X-Ray Developer pH=9-12)

11. Υγρό μονιμοποίησης του φιλμ (Kodak X-Ray Fixer)

12. Σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου

B.3.3.2 Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer): 7.2 g γλυκίνης, 1.5 g Tris-base και 5 mL 10 % SDS προστίθενται σε 400 mL νερού και αναδεύονται. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 mL με την προσθήκη 100 mL μεθανόλης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα έκπλυσης TBS (10x): 24.2 g Tris-base και 80 g NaCl προστίθενται σε νερό συνολικού όγκου 1 L και ρυθμίζεται το pH=7.6. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα έκπλυσης εργασίας TBS-Tween 20: 100 mL του διαλύματος έκπλυσης 10x αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 1 L. Στη συνέχεια προστίθεται 1 mL Tween-20. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C. Το διάλυμα χρησιμοποιείται ως αναστολέας πρωτεασών.

Διάλυμα εμφάνισης φιλμ (Development): 50 mL υγρού εμφάνισης αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 200 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη.

Διάλυμα μονιμοποίησης φιλμ (Fixer): 50 mL υγρού εμφάνισης αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 200 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη.

B.3.3.3 Αντισώματα

Πρωτεύοντα αντισώματα:

- Phospho-AktSer473, πολυκλωνικό, 1:5000 σε 5%γάλα-TBS Tween-20 (cell signaling, #9271)
- β-ακτίνη (1:500 σε 3% γάλα TBST, ή 1:000 σε 5% γάλα TBST, monoclonal)
- GAPDH (1:5000, σε 5% γάλα TBST)

Δευτερεύοντα αντισώματα:

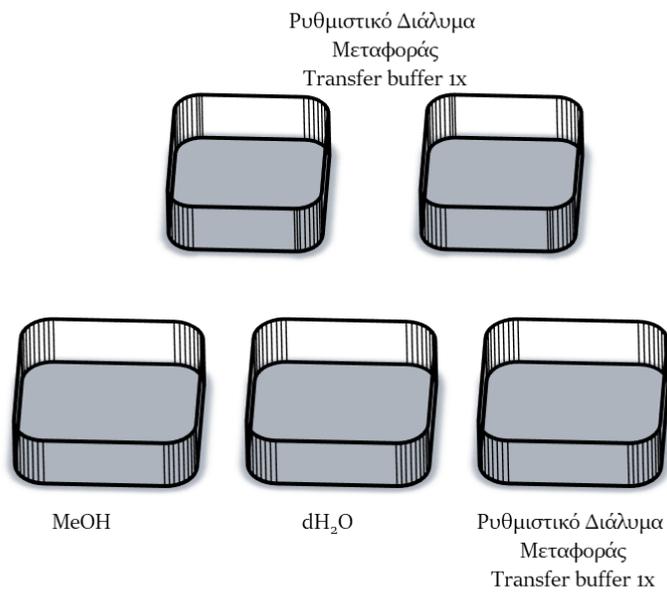
- Anti-Rabbit, 1:9000 TBS Tween-20
- m-IgG-BP HRP, 1:6000 TBS Tween-20

B.4 Ηλεκτρομεταφορά Πρωτεϊνών

Το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) έχει pH ~ 8.3. Λόγω της αλκαλικότητας του διαλύματος διασφαλίζεται η μεταφορά του αρνητικά φορτισμένου συμπλόκου SDS-πρωτεΐνη από το πήγμα στη μεμβράνη. Επιπλέον, το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς περιέχει σε ποσοστό 20% v/v μεθανόλη με σκοπό την αύξηση της υδροφοβικότητας της μεμβράνης και την αποφυγή διόγκωσης του πηγματος κατά τη μεταφορά. Ως μεμβράνη μεταφοράς των πρωτεϊνών επιλέχθηκε η PVDF έναντι της νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη PVDF σε σχέση με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιείται διότι έχει αρκετά υψηλή χημική συγγένεια και ικανότητα πρόσδεσης (πάνω από 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) με τα σύμπλοκα SDS-πρωτεΐνης, δίνει υψηλό σήμα και χαμηλό θόρυβο στην εμφάνιση, έχει αυξημένη κατακράτηση ώστε να παραμείνουν συνδεδεμένες οι πρωτεΐνες στην μεμβράνη ακόμα και σε harsh stripping wash steps. Επιπλέον οι μεμβράνες PVDF ενδείκνυνται για πρωτεΐνες με μοριακό βάρος άνω των 14 kDa.

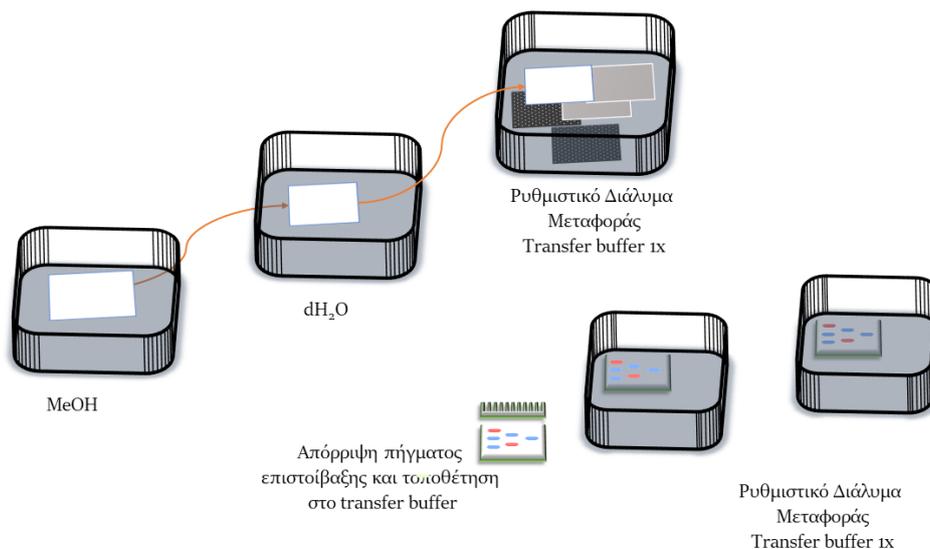
B.4.1 Πειραματική πορεία

Ελάχιστα πριν την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης ετοιμάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) 1x. Ετοιμάζονται τρία μεσαίου μεγέθους μπολ, , όπως φαίνεται στην **Εικόνα 25**, όπου περιέχουν κατά σειρά μεθανόλη, απεσταγμένο νερό και το διάλυμα μεταφοράς. Επιπλέον, προστίθεται διάλυμα μεταφοράς σε μικρά μπολ ανάλογα με τα πηγματα που ηλεκτροφορούνται.



Εικόνα 25: Σχηματική διάταξη των δοχείων στο στάδιο της ηλεκτρομεταφοράς.

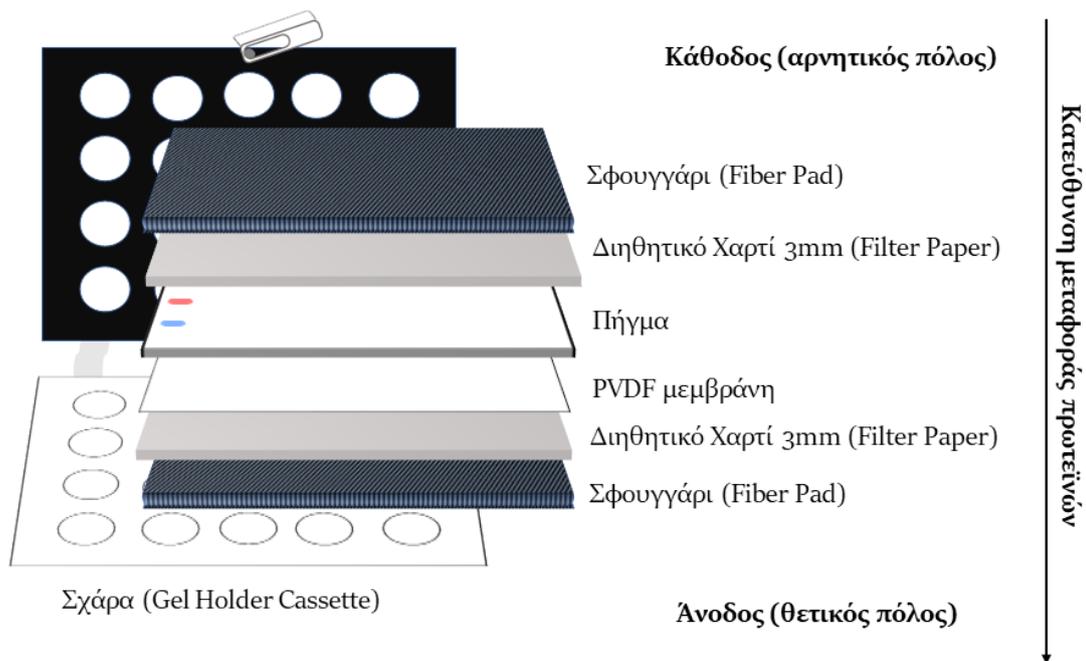
Στο διάλυμα μεταφοράς βυθίζονται 4 διηθητικά χαρτιά (filter papers) 3 χιλιοστών και τα ενισχυτικά σφουγγάρια (fiber pads). Επιπλέον, κόβεται μεμβράνη PVDF στις ίδιες διαστάσεις με αυτές του πηγματος (6x9cm). Η μεμβράνη ενεργοποιείται για λίγα δευτερόλεπτα σε μεθανόλη, μετά βυθίζεται στο μπολ με το νερό και τέλος εμβαπτίζεται στο διάλυμα μεταφοράς, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 26**. Το σύστημα αφήνεται να εξισορροπηθεί για περίπου 10λεπτά.



Εικόνα 26: Εικονική αναπαράσταση της διάταξης των δοχείων με την τοποθέτηση των διαλυμάτων. Στο δοχείο με την μεθανόλη ενεργοποιείται η μεμβράνη PVDF για λίγα δευτερόλεπτα, ύστερα, τοποθετείται στο νερό και τέλος εμβαπτίζεται στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Στο διάλυμα μεταφοράς είναι ήδη βυθισμένα τα διηθητικά χαρτιά και τα σφουγγάρια. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, κόβεται το πηγμα επιστοιβαξης και τα πηγμα διαδρομής βυθίζεται στο διάλυμα μεταφοράς.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, εμβαπτίζεται σε διάλυμα μεταφοράς. Εκεί το σύστημα των γυάλινων τζαμιών διαβρέχεται με διάλυμα μεταφοράς, αποκολλάται το μικρό τζάμι και προσεκτικά κόβεται το πήγμα επιστοιβαξης. Το μεγάλο τζάμι αναποδογυρίζεται στο διάλυμα έτσι ώστε να αποκολληθεί πλήρως το πήγμα.

Στη συσκευή μεταφοράς (σχάρα) τοποθετούνται αυστηρά με αυτή τη σειρά: (μαύρη πλευρά, αρνητικός πόλος) 1 σφουγγάρι, 1 διηθητικό χαρτιά 3mm, το πήγμα, η μεμβράνη PVDF (αφαιρούνται τυχόν φυσαλίδες με ένα roller), 1 διηθητικό χαρτί 3mm και 1 σφουγγάρι (άσπρη πλευρά, θετικός πόλος). Η PVDF μεμβράνη βρίσκεται πάντα από τη θετική πλευρά του πόλου, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 27**. Οι/Η σχάρες/σχάρα τοποθετούνται στη συσκευή μαζί με παγοκύστες. Η μεταφορά ρυθμίζεται στα 150V για 1 h. Μετά το πέρας της μεταφοράς το πήγμα βάφεται με Coomassie blue. Η μη εμφάνιση ζωνών υποδηλώνει την αποτελεσματική μεταφορά των πρωτεϊνών.



Εικόνα 27: Αναπαράσταση της τοποθέτησης των σφουγγαριών, των διηθητικών χαρτιών, του πήγματος και της μεμβράνης στην συσκευή μεταφοράς για την μεταφορά των πρωτεϊνών στο πήγμα.

B.5 Ανοσοχημικές μέθοδοι

Μετά το στάδιο της ηλεκτρομεταφοράς ακολουθεί η ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης με τη χρήση (ειδικών) αντισωμάτων. Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, ο ιχνηθέτης είναι η υπεροξειδάση του άγριου ραπανιού (Horseradish Peroxidase ή HRP). Το ένζυμο αυτό έχει ως υπόστρωμα τη λουμινόλη η οποία οξειδώνεται παρουσία υπεροξειδίου

του υδρογόνου H₂O₂ εκπέμποντας ακτινοβολία με μέγιστο μήκος κύματος στα 425 nm (βιολετί).

B.5.1 Πειραματική πορεία

Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη επωάζεται για 2 h σε ψυχρό θάλαμο στους 4°C με διάλυμα 5% w/v γάλακτος-TBS Tween 20 (blocking buffer). Η καζεΐνη του γάλακτος μπλοκάρει στη μεμβράνη όλες τις μη ειδικές θέσεις δέσμευσης των αντισωμάτων αφήνοντας εκτεθειμένες μόνο αυτές στις οποίες βρίσκονται οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια η μεμβράνη εκπλένεται 3x10min με TBST και επωάζεται όλη τη νύχτα (overnight) σε ανακινούμενη βάση με το πρωτογενές αντίσωμα διαλυμένο σε 5 % w/v γάλα-TBST. Την επόμενη μέρα ακολουθούν 3 δεκάλεπτες εκπλύσεις με TBST και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες με το δευτερογενές αντίσωμα διαλυμένο σε 5% w/v γάλα-TBST. Τέλος, η μεμβράνη εκπλένεται 3 φορές από 10 min με TBST. Η μεμβράνη είναι έτοιμη για την επώαση με το υπόστρωμα λουμινόλης (ECL, Western Blotting Reagent).

B.6 Εμφάνιση Πρωτεϊνών

B.6.1 Πειραματική πορεία

Η μεμβράνη τοποθετείται σε επίπεδο πλεξιγκλάς, χωρίς να έχει φουσκάλες και προστίθεται επι αυτής 1 mL διαλύματος ECL ώστε να καλύψει όλη την επιφάνεια της μεμβράνης. Τοποθετείται στην ειδική κασέτα εμφάνισης. Μετάβαση στο σκοτεινό θάλαμο. Προσεκτικά κόβεται κομμάτι φιλμ, όμοιων διαστάσεων με τη μεμβράνη, τοποθετείται προσεκτικά πάνω στην κασετίνα ώστε να καλύψει τη μεμβράνη. Η κασετίνα κλείνεται και αφήνεται για 10 min. Έπειτα, το φιλμ τοποθετείται στο διάλυμα εμφάνισης (Development) για περίπου ένα λεπτό έως ότου εμφανιστούν οι ζώνες. Στην συνέχεια τοποθετείται στο διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer). Τέλος, το φιλμ εκπλένεται με νερό βρύσης και αφήνεται να στεγνώσει. Η πυκνομετρική ανάλυση γίνεται με τη χρήση σαρωτή και τα αποτυπώματα αναλύονται με τη βοήθεια του λογισμικού επεξεργασίας εικόνας ImageJ.

B.6.2 Έλεγχος ισοφόρτωσης των δειγμάτων

Για να διασφαλιστεί η ακρίβεια, η πιστότητα και η ποιότητα της ανοσοαποτύπωσης πρέπει να εκτιμηθούν πιθανά σφάλματα κατά την εκτέλεση^{190,191}. Ένα σημαντικό ζήτημα είναι η ποσότητα της πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή (lane), η οποία μπορεί να ποικίλει λόγω, τυχαίων ή και μη, σφαλμάτων στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, στον όγκο φόρτωσης ή/και στην αποτελεσματικότητα μεταφοράς της από το πήκτωμα στην μεμβράνη.¹⁹² Για να ληφθούν υπόψη αυτές οι πιθανές διακυμάνσεις από δείγμα σε δείγμα, η ποσότητα της

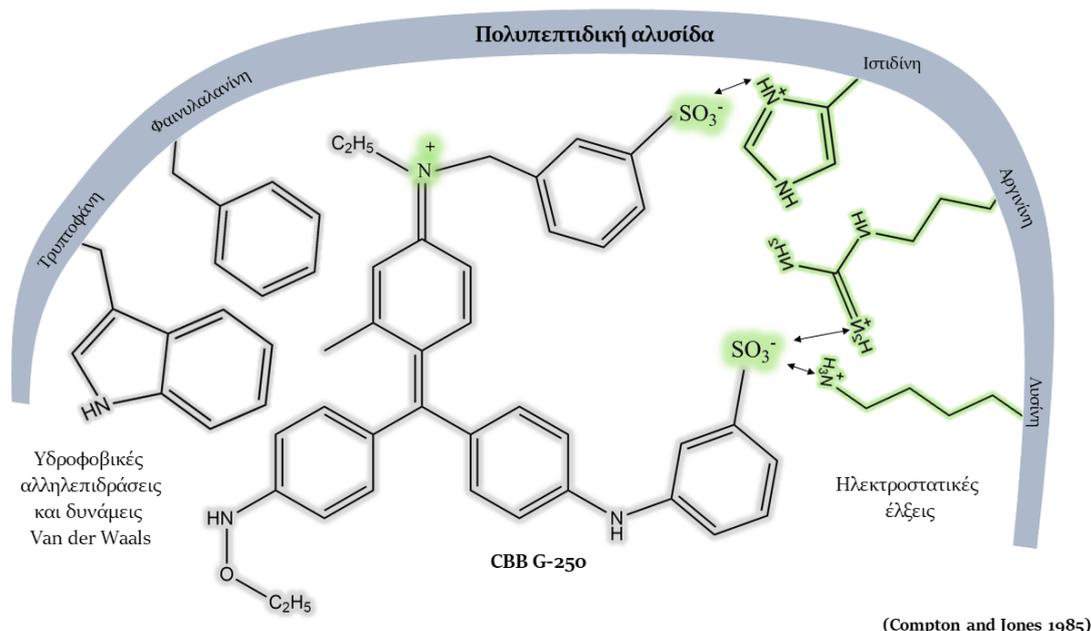
πρωτεΐνης-στόχου θα πρέπει να κανονικοποιηθεί με την ποσότητα μιας άλλης πρωτεΐνης που υπάρχει στα κύτταρα.

Για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιούνται πρωτεΐνες ιδιοσύστατων (συνεχώς ενεργά) γονιδίων γνωστά και ως διαχειριστικά γονίδια (housekeeping genes), οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας, επομένως η έκφρασή τους αναμένεται να παραμείνει σταθερή υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι η β-ακτίνη, η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) και η β-τουμπουλίνη. Η ποσοτικοποίηση αυτών γίνεται στην ίδια μεμβράνη που προσδιορίστηκε η πρωτεΐνη-στόχος. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται με πρωτογενές αντίσωμα β-ακτίνης και GAPDH για να ελεγχθεί η ισοφόρτωση των δειγμάτων.

B.7 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης κατά Bradford

B.7.1 Αρχή Μεθόδου

Η μέθοδος Bradford προσδιορίζει την ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης και βασίζεται στην ικανότητα συμπλοκοποίησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) με την πρωτεΐνη.¹⁹³ Η βαφή CBB συνδέεται με την πρωτεΐνη μέσω ηλεκτροστατικών έλξεων. Οι σουλφονικές ομάδες της χρωστικής έλκονται κυρίως από το βασικό αμινοξύ αργινίνη και σε λιγότερο βαθμό από την ιστιδίνη και τη λυσίνη. Δευτερευόντως, δημιουργούνται υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και δυνάμεις Van Der Waals μεταξύ των αρωματικών αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και του υδρόφοβου τμήματος του μορίου της βαφής, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 28**. Το μέγιστο απορρόφησης του συμπλόκου πρωτεΐνη-CBB μετατοπίζεται από τα 470 nm στα 595 nm λόγω σταθεροποίησης της ανιοντικής μορφής της χρωστικής.¹⁹⁴ Επομένως, η μέτρηση της απορρόφησης του συμπλόκου πρωτεΐνη-CBB στα 595 nm επιτρέπει την ακριβή ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου σε ένα δείγμα.



Εικόνα 28: Η ανιοντική μορφή της χρωστικής CBB προσδένεται πάνω στην πρωτεΐνη με ηλεκτροστατικές έλξεις που δημιουργούνται μεταξύ των βασικών αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και των σουλφονικών ομάδων της χρωστικής, που βρίσκονται σε πλήρη διάσταση. Από τα βασικά αμινοξέα η αργινίνη συμμετέχει στις ηλεκτροστατικές έλξεις σε μεγαλύτερο βαθμό έναντι της ιστοδίνης και της λυσίνης. Επιπλέον, η χρωστική συμμετέχει σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δυνάμεις Van Der Waals, μεταξύ των αρωματικών αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και του υδρόφοβου τμήματος της.

Η μέθοδος Bradford είναι μια ευαίσθητη μέθοδος προσδιορισμού και χρησιμοποιείται και ως μικρομέθοδος για αραιά διαλύματα πρωτεϊνών για γραμμικό εύρος 1-20 μg . Ως πρότυπο αναφοράς χρησιμοποιείται η αλβουμίνη βοός (BSA ή Bovine Serum Albumin) η οποία δίνει επαναλήψιμα και αναπαραγωγίμα αποτελέσματα.

B.7.2 Πειραματική Πορεία

B.7.2.1 Υλικά

1. Αλβουμίνη ορού βοός (BSA, Bovine Serum Albumin, Cat. No. A-9647, Sigma)
2. Βαφή Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford Reagent, B6916, Sigma)
3. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS-saline (D8537, SIGMA)
4. Πιπέτα
5. Ογκομετρική φιάλη 50mL
6. Κυψελίδα ($V=1\text{mL}$ & $b=1\text{cm}$)
7. Eppendorfs σωληνάκια 1mL
8. Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu UV 16-01)
9. Αναλυτικό Ζυγός (ABT-220-4NM, KERN)

B.7.2.2 Διαλύματα

Παρασκευή πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης BSA συγκέντρωσης 1 mg/mL (stock solution): Σε αναλυτικό ζυγό ακρίβειας 4 δεκαδικών, ζυγίζονται 50 mg BSA και διαλύονται σε 30 mL απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα αφήνεται σε ήπια μαγνητική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την πλήρη διάλυση του BSA. Έπειτα τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Στο ποτήρι ζέσεως που έγινε η διαλυτοποίηση προστίθενται 3 φορές από 5 mL νερό και τοποθετούνται στην ογκομετρική και συμπληρώνεται με νερό μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε μικρούς όγκους και αποθηκεύεται στους -20°C.

Παρασκευή διαλύματος εργασίας BSA συγκέντρωσης 25 µg/mL (working solution): Λαμβάνονται 1.25 mL διαλύματος παρακαταθήκης (1 mg/mL BSA) και αραιώνονται σε τελικό όγκο 50 mL. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε μικρούς όγκους και αποθηκεύεται στον -20°C.

B.7.2.3 Εκτέλεση μεθόδου

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης: Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη εύρους 0-10 µg από το διάλυμα εργασίας σε 11 σωλήνες erpendorf. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 800 µL με διάλυμα PBS. Προσθήκη 200 µL βαφής CBB.

Πίνακας 5: Κατασκευή πρότυπης καμπύλης BSA εύρους 0-10 µg

Αντιδραστήρια (µL)	Blank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
25 µg/mL BSA	-	40	80	120	160	200	240	280	320	360	400
PBS	800	760	720	680	640	600	560	520	480	440	400
CBB	200										
Ήπια Ανάδευση και παραμονή για 10min σε θερμοκρασία δωματίου											
Μέτρηση και καταγραφή της απορρόφησης στα 595nm											

Προετοιμασία των δειγμάτων: Χρησιμοποιούνται διπλά δείγματα. Λαμβάνονται 2 µL πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κυττάρων A₅₄₉ από κάθε δείγμα και αραιώνονται σε 798 µL με PBS. Προστίθενται 200 µL βαφής CBB και ακολουθεί ήπια ανάδευση και παραμονή για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετράται και καταγράφεται η απορρόφηση στα 595 nm.

B.8 Προσδιορισμός Λιπιδικού Φωσφόρου με τη μέθοδο Bartlett

B.8.1 Αρχή Μεθόδου

Η μέθοδος Bartlett είναι μια φασματοφωτομετρική μέθοδος και στηρίζεται στην αναγωγή του (οργανικού) λιπιδικού φωσφόρου σε ανόργανα ορθοφωσφορικά ιόντα μετά από καύση των (φώσφο-)λιπιδίων σε υπερχλωρικό οξύ.¹⁹⁵ Τα παραγόμενα από την καύση ορθοφωσφορικά, αντιδρούν με το μολυβδαινικό αμμώνιο σε μια αντίδραση δύο σταδίων, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 29**. Αρχικά παράγεται το φωσφομολυβδαινικό οξύ, το οποίο με την παρουσία του αναγωγικού αντιδραστήριου ANSA (1,2,4-αμίνο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ) υπό θέρμανση, ανάγεται προς το χρωμοφόρο σύμπλοκο κυανού του φωσφολυβδαινίου.¹⁹⁶ Η μέτρηση της απορρόφησης στα 820 nm σε συνδυασμό με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς, με πρότυπη ένωση τα ορθοφωσφορικά, προσδιορίζει την περιεκτικότητα των φωσφολιποειδών σε ένα δείγμα.¹⁹⁷

Στάδιο 1:



Στάδιο 2:



Εικόνα 29: Απλουστευμένη αναπαράσταση της αντίδρασης συμπλοκοποίησης των ανόργανων ορθοφωσφορικών ιόντων με το μολυβδαινικό αμμώνιο σε ισχυρά όξινες συνθήκες. Στο στάδιο 1 φαίνεται η αντίδραση του ορθοφωσφορικού με τα μολυβδαινικό αμμώνιο το οποίο παράγει ένα ενδιάμεσο οξύ. Στο στάδιο 2 το οξύ ανάγεται από το αντιδραστήριο ANSA σε κυανού του φωσφομολυβδαινίου. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των ορθοφωσφορικών.

B.8.2 Υλικά

- **Υπερχλωρικό οξύ (HClO₄ 70%)**, CAS: 7601-90-3, Thermo Fischer Scientific
- **Χλωροφόρμιο (CHCl₃)**, CAS: 67-66-3, Thermo Fischer Scientific
- **Μεθανόλη (MeOH)**, CAS: 67-56-1, Thermo Fischer Scientific
- **Αέριο άζωτο**
- **Μεταδιθειώδες Νάτριο (Na₂S₂O₅)**, CAS: 7681-57-4, Sigma-Aldrich
- **Μολυβδαινικό αμμώνιο [(NH₄)₆Mo₇O₂₄•4H₂O]**, CAS: 12054-85-2, FW:1,235.86, Sigma-Aldrich
- **ANSA (1-άμινο-2-νάφθολο-4-σουλφονικό οξύ)**, C₁₀H₉NO₄S, M_r=239.25g/mol, Fluka-Chemika, 08751

- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄), CAS: A888473, Merck

B.8.3 Όργανα και σκεύη

- Βιδωτοί Δοκιμαστικοί σωλήνες (Pyrex) με πόμα από Teflon
- Σιφόνια
- Πιπέτες
- Κυψελίδες (b=1cm)
- Φασματοφωτόμετρο SHIMDZU Υπεριώδους-Ορατού (UV-VIS)
- Αμμόλουτρο
- Κύκλοαναδευτήρας Vortex
- Υδατόλουτρο (Water Bath)

B.8.4 Διαλύματα

ANSA

- Διάλυμα Παρακαταθήκης: 38.5 g Na₂S₂O₅ και 6 g Na₂SO₃ διαλύονται σε 250 mL απιοντισμένο νερό. Προστίθεται 0.5 g ANSA. Φυλάσσεται στους 4°C σε σκουρόχρωμη φιάλη.
- Διάλυμα Εργασίας: Πριν την εκτέλεση του πειράματος το διάλυμα παρακαταθήκης ANSA αναμειγνύεται με απιοντισμένο νερό σε αναλογία 4:6 (v/v).
- 0.4% (w/v) Μολυβδαινικό Αμμώνιο: Ποσότητα 2.13 g τετρα-ένυδρου μολυβδαινικού αμμωνίου [(NH₄)₆ 2Mo₇O₂₄•4H₂O] διαλύεται σε τελικό όγκο 500 mL.

Φωσφορικά

- Πρότυπο διάλυμα Φωσφορικών – Διάλυμα Παρακαταθήκης 1 mg/mL: 1 g KH₂PO₄ πρότυπου διαλύματος ορθοφωσφορικών ξηραίνεται για 1 h στους 105°C στο πυριαντήριο. Ζυγίζονται 439.35 mg KH₂PO₄ και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 mL σε ογκομετρική φιάλη. Η τελική περιεκτικότητα είναι 4.3935 mg/mL KH₂PO₄ ή 1 mg/mL φωσφόρου (P). Φυλάσσεται στους 4°C.
- Πρότυπο Διάλυμα Εργασίας Φωσφορικών 4 μg/mL: 0.4 mL διαλύματος παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1 mg/mL αραιώνονται σε τελικό όγκο 100 mL.

B.8.5 Πειραματική Πορεία

Προετοιμασία και καύση δειγμάτων (Sample Preparation): Χλωροφορμικό εκχύλισμα λιπιδίων από περίπου 1×10^6 εκατομμύρια κύτταρα A₅₄₉ φέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμίζεται υπό ρεύμα αζώτου (N_{2(g)}) μέχρι ξηρού. Προσθήκη σε όλα τα φέροντα δείγματα 0.5 mL υπερχλωρικού οξέος 70%. Παράλληλα, προστίθεται 0.5 mL υπερχλωρικό οξύ σε 6 άδειους δοκιμαστικούς σωλήνες, που προορίζονται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης φωσφορικών. Οι σωλήνες σκεπάζονται με αλουμινόχαρτο και ακολουθεί καύση σε αμμόλουτρο για 1 h στους 170-180°C.

Εκτέλεση Προσδιορισμού: Μετά το πέρας της καύσης οι σωλήνες ψύχονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολουθεί προσθήκη 1 mL H₂O σε όλους τους σωλήνες.

Στους σωλήνες των πρότυπων διαλυμάτων προστίθενται από το πρότυπο διάλυμα εργασίας φωσφορικών (4 μg/mL) οι όγκοι 0.2 mL, 0.4 mL, 0.6 mL, 0.8 mL και 1.0 mL και ο τελικός όγκος αυτών συμπληρώνεται στο 1 mL (ή συνολικά 2.5 mL). Στο τυφλό δεν προστίθεται πρότυπο διάλυμα φωσφορικών, αντί αυτού 1.0 mL απιοντισμένο νερό. Κατόπιν, σε όλους τους σωλήνες προστίθενται 3.0 mL 0.4% μολυβδαινικού αμμωνίου και 0.5 mL διαλύματος εργασίας ANSA. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και θέρμανση σε ζέον υδρόλουτρο (~95°C) για 15 min. Οι σωλήνες αφήνονται για ψύξη υπό λουτρό νερού βρύσης. Μηδενίζοντας με το τυφλό καταγράφεται η ένδειξη της απορρόφησης για τα πρότυπα και τα δείγματα στα 820 nm. Καταγράφονται τα αποτελέσματα, κατασκευάζεται η γραφική παράσταση $F(\mu\text{g P}) = \text{Abs}_{820\text{nm}}$. Λαμβάνονται υπόψιν και οι αραιώσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση.

B.9 Προσδιορισμός φωσφολιπιδίων με τις τεχνικές LC/MS και LC-MS/MS

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός και ποσοτική μέτρηση διάφορων φωσφολιπιδίων της αιθανολαμίνης, χολίνης και της σερίνης παραγωγισιμένα με TMS-διαζομεθάνιο τόσο στα πρότυπα δείγματα όσο και στα πραγματικά δείγματα.

B.9.1 Διάταξη Οργανολογία συστημάτων

Για την ολοκλήρωση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ο υβριδικός αναλυτής Orbitrap του κατασκευαστικού οίκου Thermo Scientific, , όπως φαίνεται στην **Εικόνα 30**, καθώς και το τριπλό τετράπολο QTRAP μοντέλο 4500 του κατασκευαστικού οίκου Sciex. Και οι δύο αναλυτές μάζας ήταν συζευγμένοι με υγρούς χρωματογράφους υψηλής απόδοσης.

Πιο συγκεκριμένα ο υβριδικός αναλυτής orbitrap ήταν συνδεδεμένος με ένα HPLC Accela αποτελούμενος από τα παρακάτω υπο-συστήματα:

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας LC που περιλαμβάνει αντλία (AccelaPump Ser. No 750157) και θερμοστατούμενο σύστημα αυτόματου δειγματολήπτη και στήλης χρωματογραφικού διαχωρισμού (AccelaAS)
- Μονάδα Liebert NX UPS
- Μονάδα παραγωγής N₂ (Claino LCMS)
- Σύστημα ψύξης (Chiller, ThermoFlex900, Thermo Scientific)
- Φιάλη He υψηλής καθαρότητας
- Μονάδα υπολογιστή-εκτυπωτή
- Λογισμικό χρήσης και επεξεργασίας Xcalibur 2.1



Εικόνα 30: Σύστημα υγρής χρωματογραφίας UPLC Accela συζευγμένο με τον υβριδικό αναλυτή Orbitrap.

Το σύστημα LC-MS τριπλού τετραπόλου αποτελείται από τα παρακάτω υποσυστήματα:

- Σύστημα Αντλιών

Μοντέλο: SPH1240 Gradient system - Διαθέτει δύο αντλίες για ανάμιξη και βαθμωτή έκλυση σε υπέρ υψηλή πίεση (τουλάχιστον έως 18,000psi). Οι αντλίες διαθέτουν

ενσωματωμένο σύστημα απαέρωσης με κενό, τουλάχιστον τεσσάρων θέσεων και βαλβίδα επιλογής διαλυτών, τεσσάρων θέσεων.

- Αυτόματο δειγματολήπτη με θερμοστάτηση δειγμάτων

Μοντέλο: Alias UHPLC autosampler, cool. Λειτουργεί σε πιέσεις τουλάχιστον έως 18,000 psi, με δυνατότητα πλήρους ή μερικής έγχυσης. Ο δειγματολήπτης διαθέτει βαλβίδα επιλογής διαλυτών τουλάχιστον έξι διαλυτών έκπλυσης ή προσθήκης αντιδραστηρίων και λειτουργία εσωτερικής και εξωτερικής έκπλυσης της βελόνας καθώς και στέγνωμά της. Επιπλέον διαθέτει δυνατότητα ψύξης των δειγμάτων έως +4°C.

- Κλίβανο Θερμοστάτησης Στηλών

Μοντέλο: Mistral Column Oven. Ο κλίβανος στηλών έχει εύρος θερμοστάτησης από +5 έως +90°C και έχει ικανότητα υποδοχής έως 6 στήλες. Μπορεί να προγραμματιστεί έτσι ώστε να εκτελεί βαθμωτή θερμοστάτηση με δυνατότητα προγραμματισμού τουλάχιστον 10 θερμοκρασιακών βημάτων με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας από 0.1 έως 5°C/min τουλάχιστον και ρυθμό ψύξης από 0.1 έως 1.5°C/min.

- Σύστημα ελέγχου λειτουργίας, συλλογής δεδομένων και επεξεργασίας αποτελεσμάτων με το λογισμικό Analyst OS v.1.7.1.

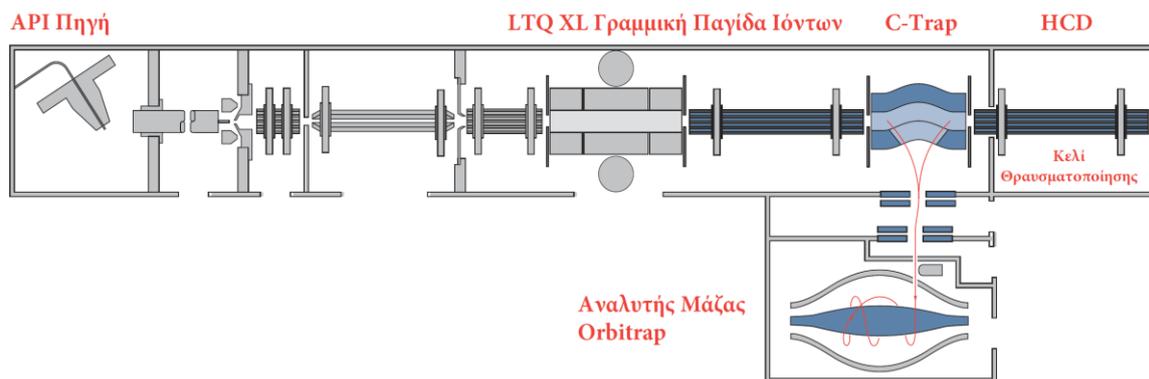
Το λογισμικό είναι κατάλληλο να προγραμματίζει κάθε λειτουργία των μονάδων LC και MS και επεξεργάζεται τα δεδομένα της ανάλυσης. Το λογισμικό διαθέτει την δυνατότητα επεξεργασίας δεδομένων για την ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό λιπιδίων.



Εικόνα 31: Σύστημα γρήγης χρωματογραφίας Exion LC συζευγμένο με τον αναλυτή μάζας τριπλού τετραπόλου μοντέλου QTRAP 4500.

B.9.1.1 LTQ Orbitrap XL

Το υβριδικό φασματοόμετρο μάζας, αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων, γνωστό και ως orbitrap, συνδυάζει μια γραμμική και ηλεκτροστατική παγίδα ιόντων. Ο υβριδικός αναλυτής orbitrap προσφέρει υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια μάζας και διαχωριστική ικανότητα, και είναι εξαιρετικά σταθερός σε δυναμικό εύρος μαζών.

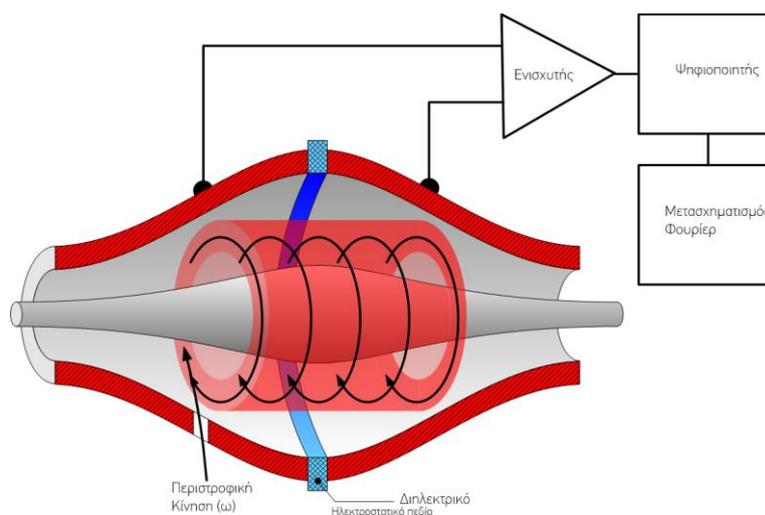


Εικόνα 32: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης του αναλυτή μάζας orbitrap.

Τα ιόντα που δημιουργούνται από την ατμοσφαιρική πηγή ιόντων (ESI ή APCI) συλλέγονται στην γραμμική παγίδα ιόντων LTQ XL και από εκεί επιταχύνονται προς την παγίδα C (C-trap), όπου τα ιόντα παγιδεύονται. Τα ιόντα εισέρχονται στην παγίδα orbitrap και

με απότομη αύξηση του ηλεκτρικού πεδίου πραγματοποιούν περιστροφική κίνηση γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο η οποία θεωρείται αρμονική ταλάντωση.

Αυτή η κίνηση των ιόντων προκαλεί την παραγωγή ενός ρεύματος το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί από έναν διαφοροποιημένο ενισχυτή. Περιστρεφόμενα ιόντα με συγκεκριμένη μάζα παράγουν ένα σύνθετο κυματικό σήμα συχνοτήτων, τα οποία προσδιορίζονται με μετασχηματισμούς Fourier.



Εικόνα 33: Σχηματική αναπαράσταση της περιστροφικής κίνησης στο κεντρικό ηλεκτρόδιο της τροχιακής παγίδας ιόντων.

Η συχνότητα ταλάντωσης (ω) ενός ιόντος επηρεάζεται από δύο παράγοντες. Από την σταθερά ταλάντωσης (k) του συστήματος και τον λόγο μάζα προς φορτίο (m/z).

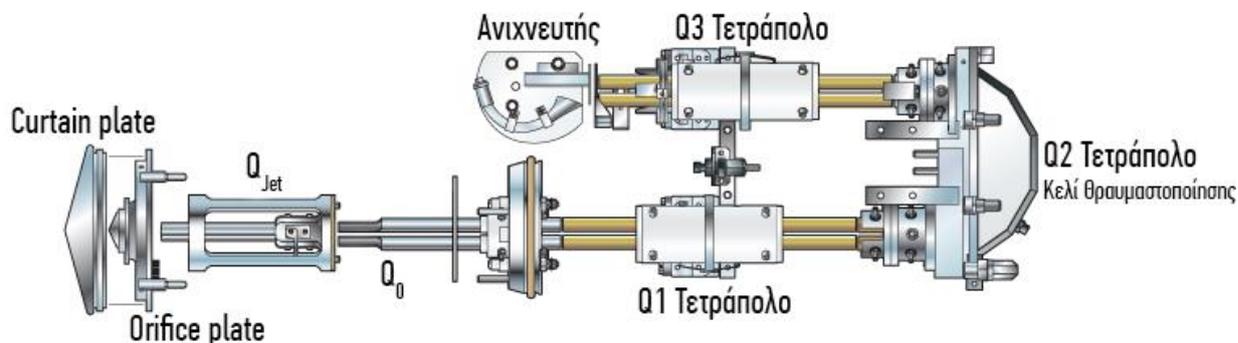
$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

Ιόντα που διαφέρουν στο λόγο m/z πραγματοποιούν πιο αργές ή γρήγορες περιστροφικές κινήσεις με αποτέλεσμα να παράγουν διαφορετικές συχνότητες και κατ' επέκταση διαφορετικό σήμα. Έτσι με την διαφοροποίηση και μετασχηματισμό του σήματος μπορούμε και υπολογίζουμε την συχνότητα της ταλάντωσης με αποτέλεσμα να μπορούμε να υπολογίσουμε τον λόγο μάζα προς φορτίο.

B.9.1.2 QTRAP 4500

Το φασματόμετρο μάζας τύπου τριπλού τετραπόλου αποτελείται από μια σειρά τετραπόλων τα οποία κατευθύνουν την ιόντα σύμφωνα με το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z). Τα ιόντα αφού περάσουν την διαφραγματική πλάκα (orifice plate) εισέρχονται στο τετράπολο Q_{jet} το οποίο δεν φιλτράρει τα ιόντα αλλά έχει σκοπό να τα ευθυγραμμίσει προτού εισέλθουν

στην περιοχή Q0. Τα ιόντα στην περιοχή Q0 ευθυγραμμίζονται και πακετάρονται εκ νέου ώστε να κατευθυνθούν στο πρώτο τετράπολο Q1.



Εικόνα 34: Το μονοπάτι των ιόντων. Σχηματική αναπαράσταση της οργανολογίας του τριπλού τετραπόλου QTRAP4500.

Το τετράπολο Q1 παίζει το ρόλο του φίλτρου, έτσι τα ιόντα που περνάνε από εκεί μέσα φιλτράρονται και μετά εισέρχονται στο κελί θραυσματοποίησης Q2. Σ' αυτό το τετράπολο πραγματοποιούνται κρούσεις μεταξύ αδρανών αερίων (κυρίως Ήλιο) και των εισερχόμενων ιόντων. Η εσωτερική ενέργεια των ιόντων αυξάνεται λόγω των κρούσεων και έτσι επάγεται η θραυσματοποίησή τους, δηλαδή η διάσπαση κάποιων δεσμών που απαιτούν σχετικά λίγη ενέργεια. Τα προϊόντα αυτής της διάσπασης ονομάζονται θυγατρικά ιόντα (product ions). Με αυτή την τεχνική σχεδιάζονται πειράματα όπου με την μέτρηση των θυγατρικών ιόντων προσδιορίζεται η πρόδρομος ένωση.

Μετά τη διέλευση από το κελί θραυσματοποίησης, τα διασπασμένα ή μη ιόντα εισέρχονται στο Q3 τετράπολο για πρόσθετη διαλογή. Στην συνέχεια εισέρχονται στον ανιχνευτή. Τα ιόντα, στον ανιχνευτή, δημιουργούν ένα ρεύμα το οποίο μετατρέπεται σε παλμό τάσης. Οι εξερχόμενοι παλμοί από τον ανιχνευτή μετατρέπονται σε σήμα το οποίο είναι αντιπροσωπευτικό προς την ένταση των ιόντων για μια συγκεκριμένη τιμή m/z και το σύστημα εμφανίζει αυτές τις πληροφορίες ως φάσμα μάζας.

Επιπλέον, το τριπλό τετράπολο της Sciex μπορεί να λειτουργήσει ως γραμμική παγίδα ιόντων. Η λειτουργία της γραμμικής παγίδας ιόντων ορίζεται από το λογισμικό. Αυτό που συμβαίνει στην πραγματικότητα είναι ότι τα εξερχόμενα ιόντα από το κελί θραυσματοποίησης εισέρχονται στο Q3 που πλέον λειτουργεί όχι ως φίλτρο αλλά ως παγίδα ιόντων. Έτσι τα ιόντα που θραύονται στέλνονται με διάφορες τεχνικές στον ανιχνευτή και από εκεί μέσω ενός πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων ενισχύεται το σήμα και τελικά παράγεται το φάσμα μάζας.

B.9.2 Διαλύτες – Αντιδραστήρια

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ως κινητές φάσεις στην υγρή χρωματογραφία αλλά και ως διαλύτες στην ροή εργασίας κατά την προετοιμασία των δειγμάτων ήταν υψηλής καθαρότητας (LCMS grade).

- **Μεθανόλη**
MeOH, CAS No: 67-56-1, LC/MS grade (p/n: A456-500)
- **Ακετονιτρίλιο**
ACN, CAS No: 75-05-8, LC/MS grade (p/n: A955-500)
- **Νερό**
H₂O, CAS No: 7732-18-5, LC/MS grade (p/n: W6500)
- **Ισοπροπανόλη**
IPA, CAS No: 67-63-0, LC/MS grade (p/n: A461-500)

Τα παρακάτω αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν ως πρόσθετα στους διαλύτες της κινητής φάσης σε ποσοστά μέχρι 0.2% για την υποβοήθηση του ιοντισμού των αναλυτών στην πηγή ESI στο φασματόμετρο μάζας. Τα αντιδραστήρια είναι LCMS grade.

- **Φορμικό** οξύ,
HCOOH, CAS No: 64-18-6, LC/MS grade, Honeywell (p/n: 56302)
- **Φορμικό** Αμμώνιο,
HCOONH₄, CAS No: 540-69-2, LC/MS grade, Honeywell (p/n: 55674)
- **Οξικό** Οξύ
CH₃COOH, CAS No: 64-19-7, LC/MS grade, Honeywell (p/n: 49199)

B.9.2.1 Αντιδραστήρια Όξινης Εκχύλισης/ Εκχύλισης Bligh Dyer

TMS-διαζομεθάνιο σε εξάνιο σε συγκέντρωση 2M: (διάλυμα παραγωγοποίησης, Sigma Aldrich), 22,85 g TMS-διαζομεθανίου διαλύονται σε 100 mL εξάνιο. Φυλάσσεται στους 4°C.

Φορμικό οξύ και υδροχλωρικό οξύ (analytical grade).

Χλωροφόρμιο, μεθανόλη, νερό (ultra gradient), ακετονιτρίλιο (ultra gradient) και οξικό οξύ (glacial).

Εσωτερικό πρότυπο C_{17:0}/C_{16:0} PtdIns(3,4,5)-P₃. (1 mg πρότυπης ουσίας διαλύεται σε 10 mL νερό για παραγωγή διαλύματος εργασίας 100 ppm). Φυλάσσεται στους 4 °C.

Διάλυμα προετοιμασίας κυττάρων για εκχύλιση (διάλυμα Α): 484 mL MeOH, 242 mL CHCl₃ & 23.55 mL HCl 1 M (μονοφασικό). Φυλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα πλύσης πριν την παραγωγopoίηση (διάλυμα Β): 120 mL MeOH, 240 mL CHCl₃ & 90 mL HCl 0.01 M (διφασικό) και συλλογή της πάνω φάσης. Φυλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα πλύσης μετά την παραγωγopoίηση (διάλυμα Γ): 120 mL MeOH, 240 mL CHCl₃ & 90 mL H₂O (διφασικό) και συλλογή της πάνω φάσης. Φυλάσσεται στους 4°C.

Τα διαλύματα πλύσης αναταράσσονται ισχυρά και αφήνονται σε ηρεμία έως ότου επέλθει ισορροπία, ώσπου να διαχωριστούν πλήρως οι δύο στοιβάδες. **Η πάνω φάση σε κάθε διάλυμα χρησιμοποιείται.** Οι οργανικοί διαλύτες πρέπει να φυλάσσονται σε **κωνικές φιάλες με εσφυρισμένο πόμα** ώστε να αποφεύγεται η διαλυτοποίηση των πλαστικοποιητών.

Διάλυμα πλύσης (διάλυμα Δ): MeOH:H₂O σε αναλογία 9:1 v/v. 90 mL MeOH αναμιγνύονται με 10 mL H₂O. Φυλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα HCl 1M: Αναμιγνύονται 5mL 12M HCl με 50 mL H₂O. Φυλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα HCl 2M: Αναμιγνύονται 10 mL 12M HCl με 50 mL H₂O. Φυλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα HCl 0,01M: Αναμιγνύονται 830 µL HCl 12M με 1 L H₂O. Φυλάσσεται στους 4°C.

B.9.3 Στήλες Χρωματογραφίας

Εξετάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν οι δύο παρακάτω στήλες UPLC του οίκου Fortis-Technologies. Εξετάστηκαν ως προς την αποτελεσματικότητα και την επαναληψιμότητα τους.

1. Fortis C18 (p/n: FT18-020526)

- Μέγεθος Σωματιδίων: 1.7 µm
- Μήκος: 100 mm
- Εσωτερική Διάμετρος: 2.1 mm
- Επιφάνεια: 380 m²/g
- Μέγεθος Πόρων: 80 Å

- Περιεκτικότητα Άνθρακα: 17%

2. Fortis C8 (ρ/n: FT8-020526)

- Μέγεθος Σωματιδίων: 1.7 μm
- Μήκος: 100 mm
- Εσωτερική Διάμετρος: 2.1 mm
- Επιφάνεια: 380 m²/g
- Μέγεθος Πόρων: 80 Å
- Περιεκτικότητα Άνθρακα: 13%

B.9.4 Πρότυπες Ενώσεις

Τα λιπίδια, όπως φαίνεται στην **Πίνακα 6**, αγοράστηκαν από τους οίκους Merck και Avanti Polar Lipids με σκοπό την στοχευμένη και μη ανάλυση της οικογένειας των φωσφατιδυλοχολινών, φωσφατιδυλοαιθανολαμινών και φωσφατιδυλοσερινών σε πραγματικά δείγματα εκχυλισμένων A₅₄₉ κυττάρων. Επίσης, τα πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν για την βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάλυσης και της σωστής επιλογής όλων των υλικών (στήλη, διαλύτες, αντιδραστήρια, εκχύλιση κ.α.).

Πίνακας 6: Πρότυπες ενώσεις λιπιδίων.

Part Number	Όνομασία	CAS Number	Συγκέντρωση	Διαλύτης	Μάζα	Εταιρία
P6638	L- α -Phosphatidylcholine (Bovine Brain)	8002-43-5	10 mg/mL	Χλωροφόρμιο	-	Merck
840038P	12:0-12:0 PS	208757-51-1	-	-	10mg	Avanti Polar Lipids
LM1004	17:0-14:1 PC	1246304-46-0	10 μ g/mL	Μεθανόλη	-	Avanti Polar Lipids
LM1104	17:0-14:1 PE	958763-89-8	10 μ g/mL	Μεθανόλη	-	Avanti Polar Lipids
P6636	L- α -Phosphatidylinositol from Glycine max (soybean)	97281-52-2	~50% (TLC)	-	250mg	Merck
840022P	L- α -phosphatidylethanolamine (Brain, Porcine)	383907-18-4	>99% (TLC)	-	25mg	Avanti Polar Lipids
840046X	Brain PI(4,5)P2	383907-42-4	1 mg/mL	Χλωροφόρμιο	-	Avanti Polar Lipids

Τα πρότυπα που είναι αποτέλεσμα προϊόντων εκχύλισης και δεν αποτελούν μεμονωμένες ενώσεις έχουν διαφορετικές αναλογίες λιπαρών οξέων στην σύστασή τους, σύμφωνα με τα πιστοποιητικά ανάλυσής τους όπως φαίνονται και στον **Πίνακα 7**. Ανάλογα την προέλευσή τους φαίνεται ότι κάποια λιπαρά οξέα παίζουν σημαντικό ρόλο στην σύσταση του προτύπου. Για παράδειγμα, βλέπουμε ότι στο πρότυπο εκχύλισμα εγκεφάλου βοοειδών και απομόνωσης της οικογένειας φωσφατιδυλχολινών, κυρίαρχο ρόλο έχει ο συνδυασμός των λιπαρών οξέων παλμιτικό (16:0) και ελαϊκό (18:1).

Πίνακας 7: Κατανομή Λιπαρών Οξέων

Κατανομή Λιπαρών Οξέων	Brain PE 840022	Soy PI P6636	Brain PC P6638	Brain PIP ₂ 840046X
14:0	-	-	0.3	-
14:1	-	-	-	-
16:0 Παλμιτικό Οξύ	3.7	31.0	30.6	4.6
16:1	0.6	-	0.9	-
18:0 Στεατικό Οξύ	15.9	7.0	16.5	37.0
18:1 Ελαϊκό Οξύ	24.1	5.0	33.3	6.1
18:2 Λινελαϊκό Οξύ	0.4	50.0	1.1	-
18:3 Λινολενικό Οξύ	-	7.0	-	-
20:0	-	-	-	-
20:1	2.3	-	0.8	-
20:2	0.6	-	-	3.2
20:3	0.6	-	0.2	2.0
20:4 Αραχιδονικό Οξύ	18.6	-	3.1	36.8
22:0	-	-	-	-
22:1	0.5	-	-	-
22:6	11.5	-	0.6	-
22:4	-	-	-	2.6
24:1	-	-	-	-
Άγνωστο	21.1	-	12.8	1.7

B.9.5 Υλικά-Συσκευές

Χρησιμοποιούνται τα ίδια υλικά και συσκευές που περιγράφονται στην Ενότητα 1.

B.9.5.1 Καλλιέργεια κυττάρων A549

1. Απόψυξη-Στρώσιμο Κυττάρων

2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων (splitting)
3. Μέτρηση αριθμού και βιωσιμότητας κυττάρων

B.9.5.2 Στατική Μηχανική Διάταξη

1. Στατική διάταξη με την συσκευή τάνυσης για 1, 30 και 120λεπτά

B.9.5.3 Εκχύλιση

1. Προετοιμασία κυττάρων A₅₄₉ για εκχύλιση
2. Εκχύλιση λιπιδίων
3. Παραγωγοποίηση
4. Φύλαξη των δειγμάτων μέχρι την ανάλυση.

B.9.5.4 Ανάπτυξη Μεθοδολογίας και Βελτιστοποίηση Συνθηκών Ανάλυσης LC-MS και LC-MS/MS

Ο σχεδιασμός και η εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε, πραγματοποιήθηκαν με στόχο την ανίχνευση, τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση γλυκεροφωσφολιπιδίων της αιθανολαμίνης (PE), της σερίνης (PS) και της χολίνης (PC). Η ανάλυση διεξήχθη με χρήση συζευγμένων συστημάτων υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (LC-MS), αξιοποιώντας αναλυτές μάζας τύπου τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap) και τριπλού τετραπόλου (Triple Quadrupole) για την εξασφάλιση υψηλής ευαισθησίας και διακριτικής ικανότητας.

B.9.5.4.1 Βελτιστοποίηση Παραμέτρων Φασματομετρίας Μάζας (MS Tuning)- Orbitrap

Ο καθορισμός των βέλτιστων συνθηκών ιοντισμού και ανίχνευσης των υπο εξέταση λιπιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου της απευθείας έγχυσης (direct infusion). Για τον σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των ενώσεων 17:0-14:1 PC, 17:0-14:1 PE και 12:0-12:0 PS, σε μείγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:1, v/v), σε συγκέντρωση 1 μg/mL. Τα διαλύματα αυτά, τα οποία περιελάμβαναν τόσο τις μη παραγωγοποιημένες όσο και τις παραγωγοποιημένες -με TMS-διαζομεθάνιο- μορφές, εγχύθηκαν στο σύστημα με σταθερή ροή 200 μL/min με αντλία απευθείας έγχυσης.

Η διαδικασία συντονισμού (tuning) εστιάστηκε στη ρύθμιση των παραμέτρων της πηγής ηλεκτροψεκασμού (ESI) και των οπτικών τμημάτων (ion optics). Η τάση ψεκασμού (Spray Voltage) καθορίστηκε στα 3–4 kV για τη θετική λειτουργία ιοντισμού, στοχεύοντας τα

κατιόντα , και στα 2.5–3 kV για την αρνητική λειτουργία, στοχεύοντας τα ανιόντα . Η θερμοκρασία πηγής ρυθμίστηκε στο εύρος 275–300°C, ενώ βελτιστοποιήθηκαν οι ροές των αερίων περιβλήματος (Sheath Gas) και βοηθητικού αερίου (Auxiliary Gas) για τη μέγιστη απόδοση αποδιαλύτωσης και σταθερότητας του σήματος. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε μικρορρυθμίστη των τάσεων του Tube Lens και του τριχοειδούς μέσω έγχυσης σε χαμηλούς ρυθμούς ροής (1–10 $\mu\text{L}/\text{min}$) για τη μεγιστοποίηση της έντασης.

Ειδικότερα για τον αναλυτή Orbitrap, η διακριτική ικανότητα (Resolution) ορίστηκε σε 60,000. Οι παράμετροι Automatic Gain Control (AGC) και ο μέγιστος χρόνος έγχυσης (Maximum Injection Time) προσαρμόστηκαν ώστε να επιτευχθεί επαρκής συσσώρευση ιόντων χωρίς φαινόμενα κορεσμού. Η απόκτηση δεδομένων πραγματοποιήθηκε με σάρωση πλήρους φάσματος (Full Scan) στο εύρος μάζας 100–1300, ενώ η ακρίβεια μάζας διασφαλίστηκε εντός 1–2 ppm μέσω βαθμονόμησης με πρότυπο μείγμα. Η επαλήθευση της μεθόδου έγινε μέσω έγχυσης μίγματος όλων των εσωτερικών προτύπων, επιβεβαιώνοντας τη λήψη ισχυρών και σταθερών σημάτων για όλες τις λιπιδικές τάξεις.

B.9.5.4.1.1 Ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας LCHRMS

Η επιλογή των συνθηκών χρωματογραφικού διαχωρισμού βασίστηκε σε συγκριτική αξιολόγηση διαφορετικών στατικών φάσεων, και συγκεκριμένα των στηλών HILIC, C8 και C18. Κατά τη δοκιμή προτύπων μειγμάτων εκχυλισμάτων γλυκεροφωσφολιπιδίων, η στήλη C8 εμφάνισε την βέλτιστη διαχωριστική ικανότητα για τις παραγωγοποιημένες μορφές λιπιδίων σε σύγκριση με την C18, επιτυγχάνοντας πλήρη διαχωρισμό των οικογενειών της φωσφατιδυλοχολίνης, φωσφατιδυλαιθανολαμίνης και φωσφατιδυλοσερίνης.

Ως προς την κινητή φάση, διερευνήθηκαν διάφορα συστήματα διαλυτών (νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, ισοπροπανόλη) και τροποποιητών (φορμικό οξύ, φορμικό αμμώνιο). Τα βέλτιστα αποτελέσματα ως προς την ιοντική απόκριση και τη χρωματογραφική κορυφή επιτεύχθηκαν με χρήση συστήματος νερού (Διαλύτης A) και 90% ακετονιτριλίου (Διαλύτης B), αμφότερα με προσθήκη 0.1% φορμικού οξέος για τη σταθεροποίηση του pH και την ενίσχυση του ιοντισμού στην πηγή. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης (gradient elution) σταθερής ροής 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. Η αναλογία του Διαλύτη B αυξήθηκε από 75% σε 100% εντός 10 λεπτών, διατηρήθηκε σταθερή έως το 20ό λεπτό και επανήλθε στις αρχικές συνθήκες για εξισορρόπηση, ολοκληρώνοντας τον κύκλο ανάλυσης στα 28 λεπτά.

B.9.5.4.2 Στοχευμένη Ανάλυση και Ποσοτικοποίηση σε Τριπλό Τετράπολο (LC-QqQ-MS/MS)

Η στοχευμένη ανάλυση και ποσοτικοποίηση των φωσφολιπιδίων πραγματοποιήθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένο με φασματογράφο μάζας τριπλού τετραπόλου (Triple Quadrupole MS), σε συνθήκες παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (Multiple Reaction Monitoring – MRM) με στόχο τη μέγιστη ευαισθησία και εκλεκτικότητα για την ανίχνευση των συγκεκριμένων λιπιδίων σε σύνθετα δείγματα.

B.9.5.4.2.1 Παράμετροι Πηγής και Αναλυτή

Ο ιοντισμός των δειγμάτων επιτεύχθηκε με χρήση πηγής Turbo Spray σε θετική πολικότητα (Positive Ion Mode). Οι αναλυτές μάζας ρυθμίστηκαν ώστε να παρέχουν διακριτική ικανότητα "Unit" για το πρώτο τετράπολο (Q1 Resolution: Unit) και "Low" για το τρίτο τετράπολο (Q3 Resolution: Low), βελτιστοποιώντας την ιοντική διαπερατότητα. Ο χρόνος παραμονής (Dwell time) για κάθε μετάβαση ορίστηκε στα 50.00 msec.

Για τη μεγιστοποίηση της ευαισθησίας και τη σταθερότητα του σήματος, οι παράμετροι της πηγής ιοντισμού Turbo Spray καθώς και τα δυναμικά των οπτικών τμημάτων του φασματόμετρου ρυθμίστηκαν σε συγκεκριμένες τιμές. Η τάση ιοντισμού (Ion Spray Voltage) καθορίστηκε στα 4500 V με τη θερμοκρασία της πηγής να διατηρείται στους 300°C. Η ροή των αερίων της πηγής βελτιστοποιήθηκε με το αέριο φραγμού (Curtain Gas) στα 20 psi, το αέριο νεφελοποίησης (Gas 1) στα 18 psi και το αέριο εξάτμισης (Gas 2) στα 20 psi, ενώ ενεργοποιήθηκε και ο θερμαντήρας διεπαφής (Interface Heater). Παράλληλα, τα δυναμικά των ιόντων ρυθμίστηκαν με το δυναμικό αποσυσσωμάτωσης (Declustering Potential) στα 100 V, το δυναμικό εισόδου (Entrance Potential) στα 10 V, την ενέργεια σύγκρουσης (Collision Energy) στα 35 V και το δυναμικό εξόδου από το κελί σύγκρουσης (Cell Exit Potential) στα 10 V.

B.9.5.4.2.2 Μεταβάσεις MRM (Transitions)

Για την ανίχνευση των αναλυτών επιλέχθηκαν συγκεκριμένα ζεύγη προδρομικών ιόντων (Q1 Mass) και ιόντων θραυσμάτων (Q3 Mass), τα οποία αντιστοιχούν στην χαρακτηριστική απώλεια της κεφαλής και το σχηματισμό διακυλογλυκερόλης (DAG). Οι μεταβάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για το εσωτερικό πρότυπο και τις ενδογενείς ενώσεις παρατίθενται αναλυτικά:

- 16:0/16:0-PC (749.6 / 198.1)
- 16:0/18:0-PC (777.6 / 198.1)

- 16:0/18:1-PC (775.6 / 198.1)
- 16:0/20:4-PC (797.6 / 198.1)
- 16:0/22:6-PC (821.6 / 198.1)
- 18:0/18:1-PC (803.6 / 198.1)
- 18:0/20:4-PC (825.6 / 198.1)
- 18:0/22:6-PC (849.6 / 198.1)
- 18:1/20:4-PC (823.6 / 198.1)
- 18:1/22:6-PC (847.6 / 198.1)
- 16:0/16:0-PE (706.5 / 551.5)
- 16:0/18:0-PE (734.6 / 579.5)
- 16:0/18:1-PE (732.6 / 577.5)
- 16:0/20:4-PE (754.5 / 599.5)
- 16:0/22:6-PE (778.5 / 623.5)
- 18:0/18:1-PE (760.6 / 605.6)
- 18:0/20:4-PE (782.6 / 627.5)
- 18:0/22:6-PE (806.6 / 651.5)
- 18:1/20:4-PE (780.6 / 625.5)
- 18:1/22:6-PE (804.6 / 649.5)

Η επιλογή των παραπάνω μεταβάσεων στηρίχθηκε στην παρατήρηση ότι η θραυσματοποίηση των μεθυλιωμένων παραγώγων σε θετική πολικότητα οδηγεί στον σχηματισμό σταθερών ιόντων DAG, τα οποία προσφέρουν υψηλή διαγνωστική αξία και αναπαραγωγιμότητα.

B.9.5.4.2.3 Ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας LC-QqQ-MS

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με σταθερό ρυθμό ροής 0.1 mL/min, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση ένα σύστημα νερού (Διαλύτης A) και ακετονιτριλίου (Διαλύτης B), αμφότερα με προσθήκη 0.1% φορμικού οξέος. Το πρόγραμμα έκλουσης ξεκίνησε με ισοκρατική παραμονή στο 45% του Διαλύτη B για τα πρώτα 5 λεπτά, ακολουθούμενη από γραμμική αύξηση έως το 100% του Διαλύτη B μέσα στα επόμενα 5 λεπτά. Οι συνθήκες αυτές (100% B) διατηρήθηκαν σταθερές έως το 15ο λεπτό, οπότε και το σύστημα επανήλθε απότομα στις αρχικές αναλογίες (45% B) στο 16ο λεπτό, επιτρέποντας την εξισορρόπηση της στήλης έως την ολοκλήρωση της ανάλυσης στο 20ό λεπτό.

B.9.6 Πειραματική πορεία

B.9.6.1 Καλλιέργεια κυττάρων A549

Πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

B.9.6.2 Στατική διάταξη

Πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

B.9.6.3 Προετοιμασία κυττάρων A549 για εκχύλιση

Η διαδικασία πραγματοποιείται όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

B.9.6.4 Εκχύλιση λιπιδίων

Αρχικά προστίθενται 725 μL CHCl_3 και 170 μL 2M HCl, αναδεύεται σχολαστικά και φυγοκεντρείται για 5 min, σε θερμοκρασία δωματίου στις 1500 g. Ακολουθεί διαχωρισμός του διφασικού συστήματος με την πάνω στοιβάδα να είναι η υδατική, η μεσοστοιβάδα να αποτελείται από πρωτεΐνες και η κάτω να είναι η οργανική. Στη συνέχεια συλλέγεται η οργανική φάση σε ένα νέο σωλήνα και προστίθενται 708 μL (πάνω φάση) διάλυμα πλύσης B (pre-derivatization mixture), αναδεύεται σχολαστικά και φυγοκεντρείται για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου στις 1500 g. Συλλέγεται η κάτω φάση για το διάλυμα παραγωγοποίησης (derivatization).

B.9.6.5 Παραγωγοποίηση

Σε 1 mL λιπιδικού εκχυλίσματος (χλωροφορμική φάση) προστίθενται 50 μL 2M TMS-διαζομεθάνιο. Σχηματίζεται κιτρινόχρωμο διάλυμα και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια προστίθενται 6 μL οξικού οξέος και εξουδετερώνεται το περισσευούμενο TMS-διαζομεθάνιο (η αντίδραση εκλύει αέριο N_2). Έπειτα προστίθενται 700 μL διαλύματος πλύσης Γ (post-derivatization) και το μείγμα φυγοκεντρείται για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου στις 1500 g. Το ίδιο στάδιο επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά. Στη συνέχεια, προστίθενται 100 μL διαλύματος $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ σε αναλογία 9:1 v/v. Συλλέγεται η κάτω φάση και εξατμίζεται υπο ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και αμέσως επαναδιαλύεται σε 80 mL MeOH . Ακολουθεί σχολαστική υπερήχηση και προστίθενται 20 μL H_2O . Τα δείγματα αποθηκεύονται και πραγματοποιείται HPLC/MS και HPLC-MS/MS ανάλυση.

ΜΕΡΟΣ Γ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία εστίασαμε κυρίως στην διερεύνηση της επίδρασης της μεταγωγής στατικού μηχανικού σήματος στον κύκλο της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης και στην συμπεριφορά των φωσφολιπιδίων της φωσφατιδυλοχολίνης, φωσφατιδυλαιθανολαμίνης και φωσφατιδυλοσερίνης σε καρκινικά κύτταρα του πνευμονικού επιθηλίου A₅₄₉

Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκαν, η εμπλοκή του κύκλου των φωσφοϊνοσιτιδίων κατά τη μεταγωγή στατικού μηχανικού σήματος για διαφορετικές χρονικές στιγμές, μέσω της κινάσης PI3K και φωσφατάσης PTEN, καθώς και ο πιθανός μηχανισμός της δράσης του stretch, διερευνώντας την έκφραση του ενζύμου pAKT, σε επίπεδο πρωτεΐνης παρουσία αναστολέα p115 (SH-PTEN) και bpV(phn). Επιπλέον, με την τεχνική LC/MS και LC-MS/MS μελετήθηκε η συμπεριφορά κάποιων φωσφολιπιδίων της χολίνης, της αιθανολαμίνης και της σερίνης που εμπλέκονται με διάφορους μηχανισμούς στα απόκριση μηχανικών ερεθισμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν οι αναλυτές μάζας orbitrap για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό τους και τριπλό τετράπολο (QQQ) για την ποσοτικοποίηση τους.

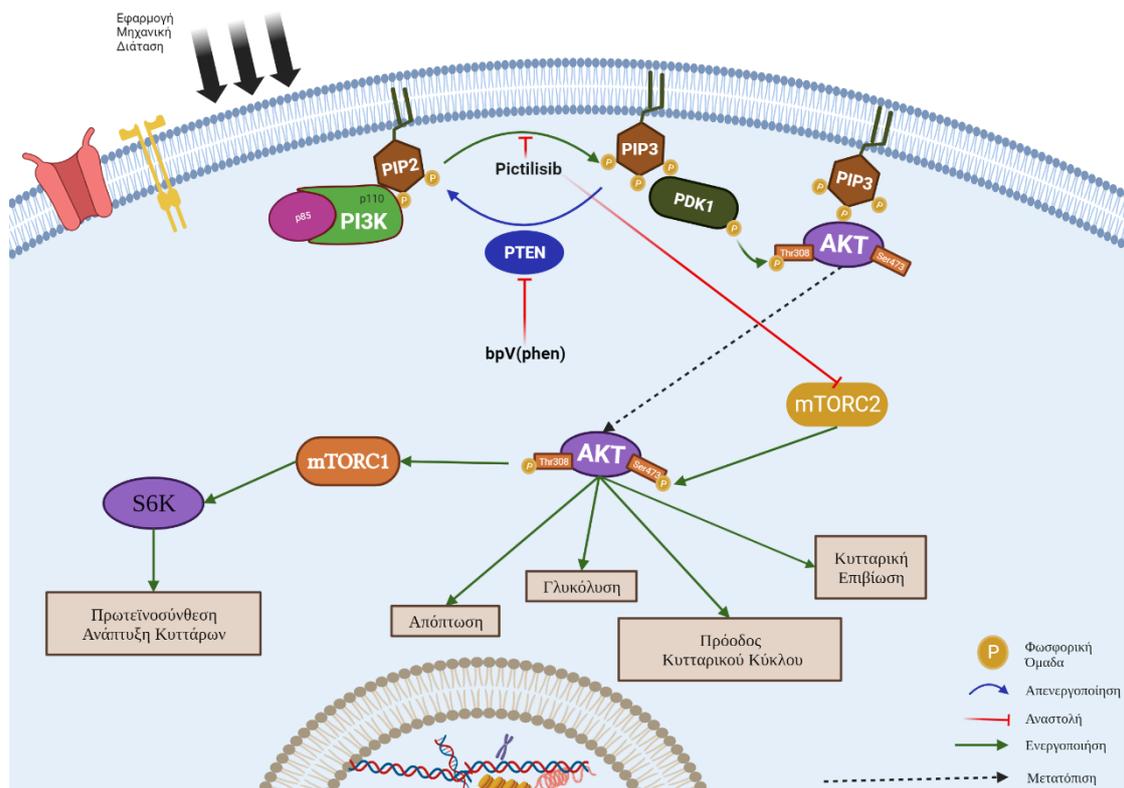
Τα αποτελέσματα των χημικών και βιολογικών πειραμάτων, δείχνουν ότι ο κύκλος των φωσφοϊνοσιτιδίων κινητοποιείται άμεσα κατά την εφαρμογή του μηχανικού σήματος. Το μηχανικό ερέθισμα μεταφέρεται διαμέσου της οδού PI3K/Akt και η απόκριση του κυττάρου ολοκληρώνεται με αλλαγές, όπως την αύξηση του ρυθμού βιοσύνθεσης φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης.

Τέλος, με την βοήθεια της λιπιδιομικής ανάλυσης, βρέθηκαν λιπίδια που να δείχνουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς τις αλλαγές του κυττάρου κάτω από συνθήκες μηχανικής διάτασης.

Γ.1 Επίδραση στατικής μηχανικής διάτασης σε κύτταρα A₅₄₉ και ο ρόλος του κύκλου των φωσφοϊνοσιτιδίων στην φωσφορυλίωση της Akt

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει δυο διαφορετικές συνθήκες αναστολής και τρεις διαφορετικούς χρόνους εφαρμογής. Συγκεκριμένα, οι κατηγορίες των πειραματικών συνθηκών περιλαμβάνουν τους θετικούς μάρτυρες (κύτταρα χωρίς διάταση ή με διάταση και χωρίς αναστολείς ή με αναστολείς) και τα δείγματα (κύτταρα με διάταση και αναστολείς). Οι χρόνοι εφαρμογής είναι 1 λεπτό, 30 λεπτά και 120 λεπτά, και όλες οι κυτταρικές καλλιέργειες επωάζονται σε θάλαμο με 5% CO₂, διασφαλίζοντας τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης και διατήρησης των κυττάρων κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Ο καταρράκτης σηματοδότησης των φωσφοϊνοσιτιδίων μέσω του μονοπατιού PI3K/Akt απεικονίζεται στην **Εικόνα 35**, με την εφαρμογή της μηχανικής διάτασης να ενεργοποιεί τα μονοπάτια σηματοδότησης. Η ενεργοποίηση της PI3K οδηγεί στη φωσφορυλίωση του PIP2 σε PIP3, με την PDK1 να φωσφορυλιώνει την Akt στη θέση Thr308 και το mTORC2 στη θέση Ser473. Η ενεργοποιημένη Akt προάγει τη γλυκόλυση, την απόπτωση, την κυτταρική επιβίωση και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, ενώ η πρωτεϊνσύνθεση και η ανάπτυξη των κυττάρων προάγονται μέσω του mTORC1. Η φωσφατάση PTEN αποτρέπει την ενεργοποίηση της Akt, αναστέλλοντας τη μετατροπή του PIP2 σε PIP3, και οι αναστολείς Pictilisib και bpV(phen) παρεμβαίνουν σε αυτά τα μονοπάτια για να εξεταστεί η επίδραση της αναστολής στη σηματοδότηση. Συνολικά, η πειραματική διάταξη και η ανάλυση των μονοπατιών σηματοδότησης παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για τους μηχανισμούς που διέπουν την κυτταρική απόκριση σε μηχανικά ερεθίσματα και την επίδραση των αναστολέων σε αυτά τα μονοπάτια.

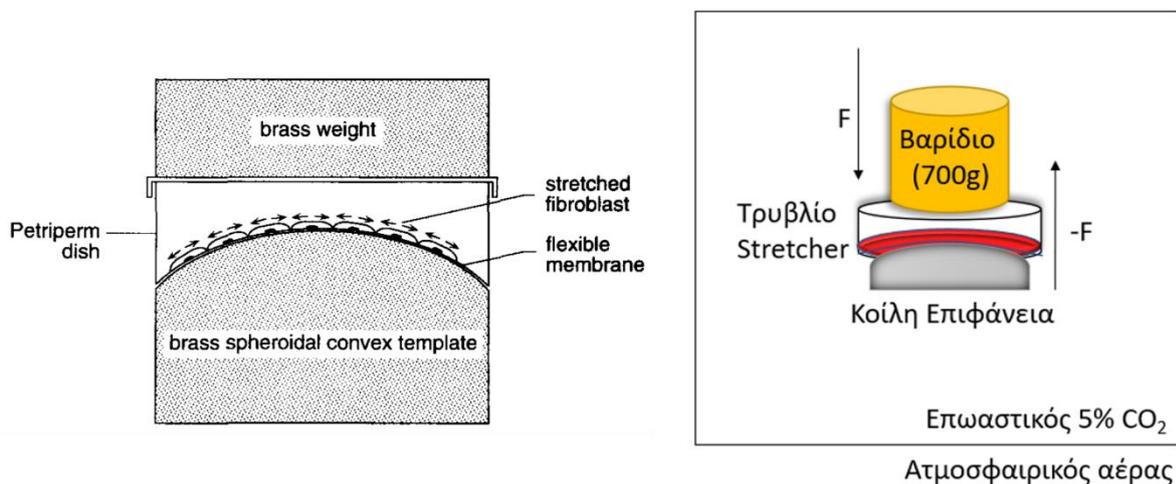


Εικόνα 35: Εικονική αναπαράσταση του καταρράκτη σηματοδότησης των φωσφοϊνοσιτιδίων μέσω του μονοπατιού PI3K/Akt. Το κύτταρο αποκρίνεται σε κάποιο ερέθισμα ενεργοποιώντας την κινητοποίηση της οικογένειας των ενζύμων PI3K (υπομονάδες p85, p110), οι οποίες φωσφορυλιώνουν την PIP2, η οποία είναι αγκυροβολημένη στην λιπιδική διπλοστοιβάδα. Το PIP3 ενεργοποιεί την PDK1, η οποία φωσφορυλιώνει την Akt στην Thr308 και η mTORC2 στην Ser473. Η ενεργοποιημένη phospho-Akt μετατοπίζεται μέσα στο κύτταρο και ανάλογα τις εκάστοτε ανάγκες του κυττάρου ενεργοποιεί πρωτεΐνες-στόχους για την τελική απόκριση του κυττάρου. Όταν η απόκριση φτάσει στο τελικό της στόχο και το κύτταρο έχει ολοκληρώσει την σηματοδότηση, τότε έχουμε την συμμετοχή των φωσφατασών για την διακοπή του σήματος. Η φωσφατάση PTEN συμμετέχει στην από-φωσφορυλίωση της PIP3 σε PIP2. Στο σχήμα φαίνονται οι αναστολείς pictilisib και bpV(phen). Ο αναστολέας Pictilisib, δρα ενάντια της PI3K στις υπομονάδες p110- α , - β , - γ , - δ και αναστέλλει ελαφρώς την δράση της mTORC2, η οποία φωσφορυλιώνει την Akt στην σερίνη 473. Ο αναστολέας bpV(phen) προκαλεί την οξείδωση των σουλφυδριλίων (-SH) δύο κυστεϊνών Cys 124, Cys 71 σχηματίζοντας δισουλφιδικό δεσμό αναστέλλοντας την δράση της PTEN.

Γ.1.1 Συνθήκες εκτέλεσης πειραμάτων για την εφαρμογή στατικού stretch

Στην παρούσα μελέτη, κυτταροκαλλιέργειες A₅₄₉ χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθεί η επίδραση της μηχανικής διάτασης στην κυτταρική λειτουργία και την ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης PI3K/AKT μέσω φωσφορυλίωσης της Akt. Τα κύτταρα A₅₄₉ καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό F-12K που περιείχε ορό εμβρύου βοός, γλουταμίνη και αντιβιοτικά. Στη συνέχεια, στρώθηκαν περίπου 5×10^5 κύτταρα ανά τρυβλίο Lumox 50mm και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο 5% CO₂ στους 37°C για 18 ώρες. Μετά από επώαση σε μέσο χωρίς ορό για 2 ώρες (growth arrest), τα κύτταρα ήταν έτοιμα για τα πειράματα.

Οι κυτταρικές καλλιέργειες υποβλήθηκαν σε στατική μηχανική διάταση για 1, 30 και 120 λεπτά χρησιμοποιώντας μια χειροκίνητη συσκευή τάνυσης, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 36**. Συγκεκριμένα, ο ελαστικός πυθμένας του τρυβλίου Lumox με τα προσκολλημένα κύτταρα τοποθετήθηκε πάνω σε κυρτή και λεία επιφάνεια από plexiglass. Ένα βαρίδιο 700 γραμμαρίων, τοποθετείται πάνω από το τρυβλίο Lumox για να εφαρμόσει την απαραίτητη δύναμη (F). Αυτό το βάρος εξασφαλίζει τη σωστή διάταση της μεμβράνης. Η κοίλη επιφάνεια δημιουργεί την κατάλληλη γεωμετρία για να προκαλέσει τη διάταση της εύκαμπτης μεμβράνης, προσομοιώνοντας έτσι το μηχανικό ερέθισμα. Εφαρμόστηκε δύναμη 35 g/cm², προκαλώντας παραμόρφωση των κυττάρων κατά 4%. Οι μη διατεταμένες καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες.



Εικόνα 36: Εικονική αναπαράσταση της συσκευής τάνυσης σε διατεταμένους ινοβλάστες. Οι δύο διατάξεις απεικονίζουν την ίδια βασική ιδέα: την εφαρμογή μιας δύναμης για να προκαλέσει μηχανική διάταση σε κύτταρα που είναι προσκολλημένα σε μια εύκαμπτη μεμβράνη. Αυτή η διάταξη χρησιμοποιείται για να μελετηθεί η απόκριση των κυττάρων σε μηχανικά ερεθίσματα.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει δυο διαφορετικές συνθήκες αναστολής και τρεις διαφορετικούς χρόνους εφαρμογής, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 37**.

Θετικοί Μάρτυρες:

- I. Χωρίς Διάταση, Χωρίς Αναστολή: Κύτταρα που δεν έχουν υποβληθεί σε διάταση και δεν έχουν εκτεθεί σε αναστολείς.
- II. Χωρίς Διάταση, Με Αναστολή: Κύτταρα που δεν έχουν υποβληθεί σε διάταση αλλά έχουν εκτεθεί σε αναστολείς.
- III. Με Διάταση, Χωρίς Αναστολή: Κύτταρα που έχουν υποβληθεί σε διάταση χωρίς την παρουσία αναστολέων.

Δείγματα:

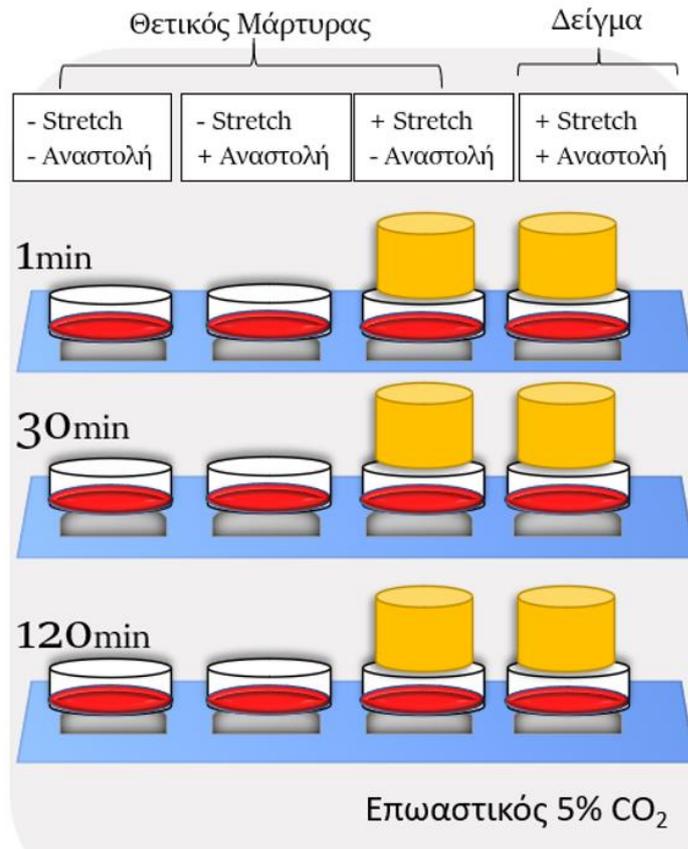
- I. Με Διάταση, Με Αναστολή: Κύτταρα που έχουν υποβληθεί σε διάταση και έχουν εκτεθεί σε αναστολείς.

Χρόνοι Εφαρμογής:

- I. 1 λεπτό: Κυτταρική απεικόνιση μετά από 1 λεπτό εφαρμογής στατικής τάνυσης.
- II. 30 λεπτά: Κυτταρική απεικόνιση μετά από 30 λεπτά εφαρμογής στατικής τάνυσης.
- III. 120 λεπτά: Κυτταρική απεικόνιση μετά από 120 λεπτά εφαρμογής στατικής τάνυσης.

Συνθήκες Επώασης:

Όλες οι καλλιέργειες επωάζονται σε θάλαμο με 5% CO₂, διασφαλίζοντας τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης και διατήρησης των κυττάρων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.



Εικόνα 37: Εικονική αναπαράσταση των δειγμάτων και controls. Η παραπάνω εικόνα αναπαριστά έναν επωαστικό θάλαμο CO₂ που περιέχει όλους τους τύπους δειγμάτων που δημιουργήθηκαν για την εκτέλεση των πειραμάτων. Τα κύτταρα έχουν ομαδοποιηθεί με βάση το χρόνο της μηχανικής διάτασης και την αναστολή PI3K ή PTEN. Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 3 τύποι θετικών μαρτύρων (control samples) και ενός δείγματος όπως υποδεικνύεται στην εικόνα. Οι θετικοί μάρτυρες απαρτίζονται από κύτταρα χωρίς διάταση και χωρίς αναστολή, κύτταρα χωρίς διάταση με αναστολή PI3K ή PTEN, και κύτταρα με διάταση και χωρίς αναστολή. Κύτταρα που υπέστησαν μηχανική διάταση και ταυτόχρονα αναστολή θεωρούνται ως δείγμα.

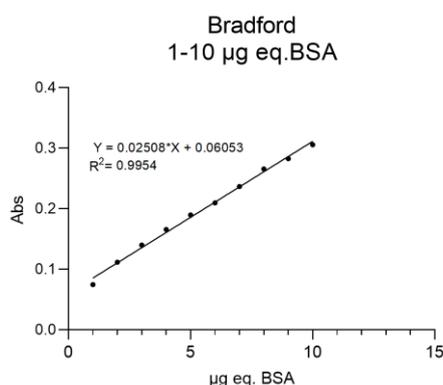
Για τη διερεύνηση της οδού σηματοδότησης των φωσφοϊνοσιτιδίων που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της Akt, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε προκατεργασία για 30 λεπτά με τους ειδικούς αναστολείς Pictilisib (0.5μM), αναστολέα του μονοπατιού PI3K/AKT, ή bpV(Phen) (1μM), αναστολέα της φωσφατάσης PTEN. Η βιωσιμότητα των κυττάρων εκτιμήθηκε μορφολογικά με την χρωστική Trypan blue.

Μετά το πέρας των πειραμάτων, το μέσο καλλιέργειας συλλέχθηκε, διαμοιράστηκε και αποθηκεύτηκε στους -80°C. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν με παγωμένο PBS και συλλέχθηκαν με RIPA επί πάγου, ομογενοποιήθηκαν με υπερήχους και διαμοιράστηκαν. Τα ομογενοποιημένα κύτταρα επεξεργάστηκαν με διάλυμα φόρτωσης που περιείχε δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS), β-μερκαπτοαιθανόλη και μπλε βρωμοφαινόλης. Μετά από βράσιμο για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στους 4°C (14.000×g για 10 λεπτά), το υπερκείμενο μοιράστηκε και αποθηκεύτηκε στους -80°C για μελλοντική ανάλυση.

Η ολική πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με τη μικροδοκιμασία Bradford χρησιμοποιώντας BSA ως ένωση αναφοράς.

Γ.2 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης κατά Bradford

Σε ομογενοποιημένα κυττάρων *A549* πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου τους μετά από εφαρμογή των συνθηκών της στατικής διάταξης για τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές 1, 30, και 120 λεπτά και την χρήση δύο διαφορετικών αναστολέων p1ctilisib και bpV(pphen). Διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης κυμάνθηκαν σε ένα εύρος 512 έως 580μg/mL στις διαφορετικές συνθήκες αναστολής και τους διαφορετικούς χρόνους μηχανικής στατικής διάταξης, χωρίς στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ τους, ούτε και με τα κύτταρα αναφοράς, τα οποία δεν είχαν κατεργαστεί με αναστολείς και δεν είχαν υποστεί μηχανική διάταξη (**Πίνακας 8**).



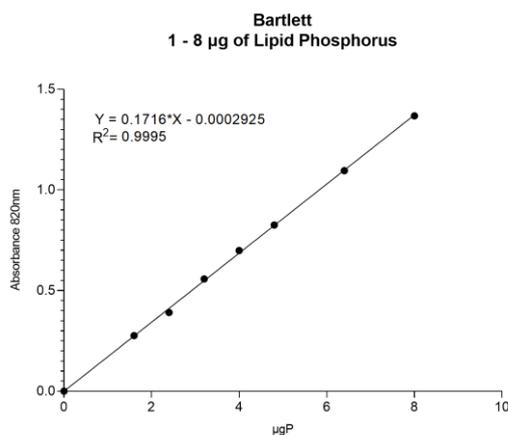
Εικόνα 38: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς κατά την μικροδοκιμασία Bradford.

Πίνακας 8: Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης σε ομογενοποιημένα κυττάρων *A549* σε διάφορους χρόνους μηχανικής διάταξης και αναστολής. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 3 διαφορετικών πειραμάτων ($MO \pm SEM$). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές.

Δείγματα	Πρωτεΐνη (μg/mL/10 ⁶ κύτταρα)
Χωρίς Αναστολή, Χωρίς Stretch	550 ± 18
Χωρίς Αναστολή, 1min Stretch	580 ± 28
Χωρίς Αναστολή, 30min Stretch	578 ± 27
Χωρίς Αναστολή, 120min Stretch	569 ± 16
PI3K Αναστολή, 1min Stretch	525 ± 12
PI3K Αναστολή, 30min Stretch	519 ± 17
PI3K Αναστολή, 120min Stretch	536 ± 17
PTEN Αναστολή, 1min Stretch	537 ± 12
PTEN Αναστολή, 30min Stretch	518 ± 13
PTEN Αναστολή, 120min Stretch	512 ± 19

Γ.3 Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου κατά Bartlett

Στη συνέχεια, στα ίδια ομογενοποιημένα κυττάρων A549 πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του λιπιδικού φωσφόρου με την μέθοδο Bartlett. Παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχει κάποια σημαντική μεταβολή του περιεχόμενου λιπιδικού φωσφόρου. Η αναγωγή των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τον αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν μετά τη συλλογή τους.



Εικόνα 39: Γραφική παράσταση της πρότυπης καμπύλης προσδιορισμού του λιπιδικού φωσφόρου, εκφρασμένου σε µg P, που περιέχεται στα κύτταρα, με τη μέθοδο Bartlett.

Πίνακας 9: Προσδιορισμός του λιπιδικού φωσφόρου με την μέθοδο Bartlett σε κύτταρα A549 συναρτήσει του χρόνου της μηχανικής διάτασης και των συνθηκών αναστολής. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 3 διαφορετικών πειραμάτων ($MO \pm SEM$).

Δείγματα	Λιπιδικός P (µg/mL/10 ⁶ κύτταρα)
Χωρίς Αναστολή, Χωρίς Stretch	82 ± 4
Χωρίς Αναστολή, 1min Stretch	93 ± 3
Χωρίς Αναστολή, 30min Stretch	94 ± 6
Χωρίς Αναστολή, 120min Stretch	90 ± 4
PI3K Αναστολή, 1min Stretch	89 ± 5
PI3K Αναστολή, 30min Stretch	95 ± 5
PI3K Αναστολή, 120min Stretch	90 ± 3
PTEN Αναστολή, 1min Stretch	94 ± 4
PTEN Αναστολή, 30min Stretch	93 ± 6
PTEN Αναστολή, 120min Stretch	93 ± 4

Γ.4 Στατιστική Ανάλυση

Η αξιολόγηση της επίδρασης της μηχανικής διάτασης και της αναστολής των ενζύμων PI3K και PTEN, που εμπλέκονται στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος των φωσφοϊνοσιτιδίων, έγινε με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση. Κάθε πειραματική συνθήκη εκτελέστηκε

τουλάχιστον τρεις φορές (ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις) με διπλά δείγματα (τεχνικών επαναλήψεων). Η ποσοτικοποίηση κάθε δέσμης έγινε με το πρόγραμμα Image J.

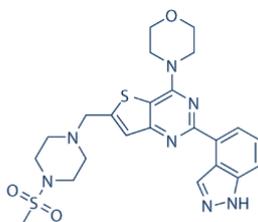
Η τιμή απορρόφησης κάθε δέσμης p-Akt κανονικοποιήθηκε ως προς την αντίστοιχη της β-ακτίνης. Αρχικά, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των διπλών τεχνικών επαναλήψεων για κάθε πείραμα. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι για τον προσδιορισμό της μέσης τιμής των τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων, της τυπικής απόκλισης και της στατιστικής σημαντικότητας.

Τα δεδομένα αναλύθηκαν στο λογισμικό GraphPad 8.1.1. Το στατιστικό εργαλείο ήταν η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης (two-way ANOVA). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε $p < 0.05$.

Γ.5 Ανοσοαποτύπωση της pAkt^{Ser473}

Για να αξιολογηθεί η έκφραση της πρωτεΐνης p-Akt στα διετισταμένα κύτταρα A₅₄₉, εάν ενεργοποιήθηκε περαιτέρω με την μηχανική διάταση, ως πιθανό αίτιο της ενεργοποίησης του καταρράκτη σηματοδότησης των φωσφοϊνοσιτιδίων, πραγματοποιήθηκε η τεχνική western blot σε ολικό ομογενοποίημα κυττάρων χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα, ειδικό για την ανίχνευση της p-Akt στο αμινοξύ σερίνη-473.

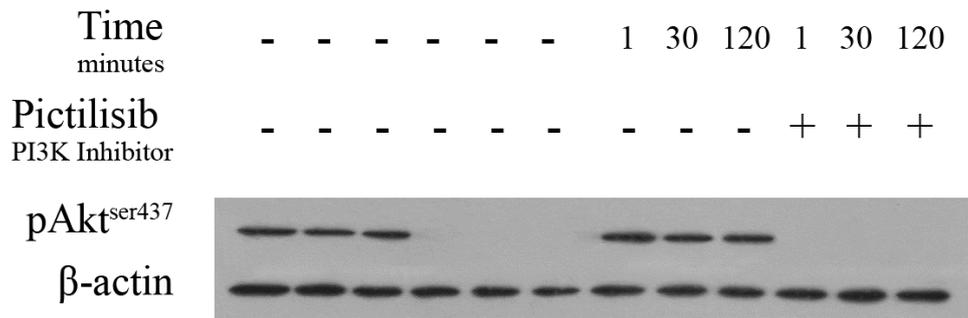
Γ.5.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων της επίδρασης της στατικής μηχανικής διάτασης στην φωσφορυλίωση της Akt σε συνδυασμό με τη χρήση pictilisib, εκλεκτικό αναστολέα της PI3K



Εικόνα 40: Το Pictilisib (GDC-0941, RG7321) είναι ένας ισχυρός αναστολέας των ισόμορφων PI3K-α και PI3K-δ. Παρουσιάζει μέτρια εκλεκτικότητα έναντι των καταλυτικών υπομονάδων p110β και p110γ των ισομορφών PI3K-β και -γ.

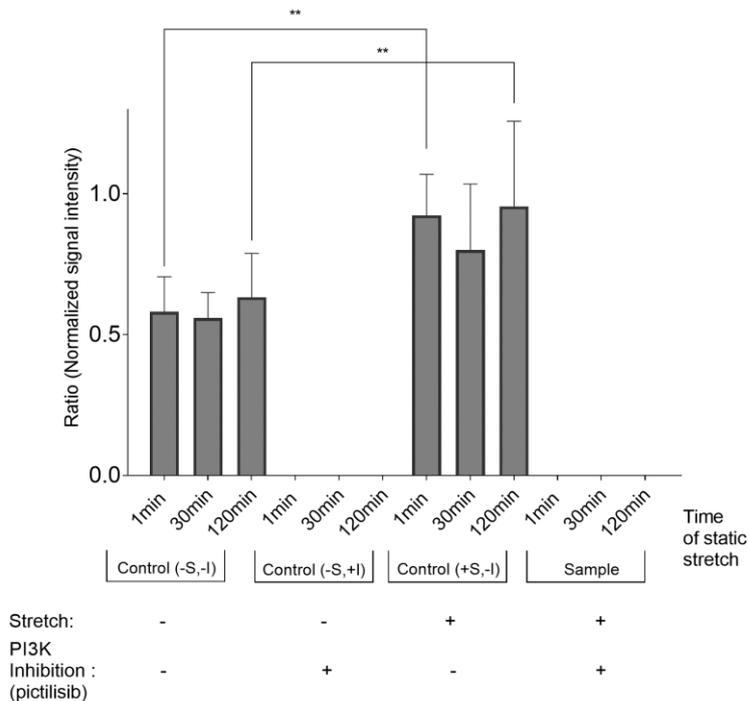
Στην **Γράφημα 1** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης. Συνολικά, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η μηχανική διάταση προάγει τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της Akt στα κύτταρα A₅₄₉, και αυτή η επίδραση αναστέλλεται από τον Pictilisib, επιβεβαιώνοντας τον ρόλο της PI3K στην απόκριση της Akt στη μηχανική διάταση.

Η αναστολή του ενζύμου PI3K με pictilisib είχε σαν αποτέλεσμα την έλλειψη εμφάνισης σήματος Akt, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 41**.



Εικόνα 41: Το στατικό stretch επάγει την φωσφορυλίωση της Akt. Κότταρα A549 υποβλήθηκαν σε μηχανική στατική διάταση για χρόνους 1, 30 και 120 λεπτά. Τα επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης phospho-Akt αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση επωάζοντας με πολυκλωνικό αντίσωμα phospho-Akt (Ser473). Η χρήση του αναστολέα, των PI3K Class I, pictilisib φαίνεται ότι έχει δράση και δεν έχει ενεργοποιηθεί η έκφραση της p-Akt. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων ελέγχθηκε με την χρήση της β-ακτίνης. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική για τρία ανεξάρτητα πειράματα με διπλά δείγματα.

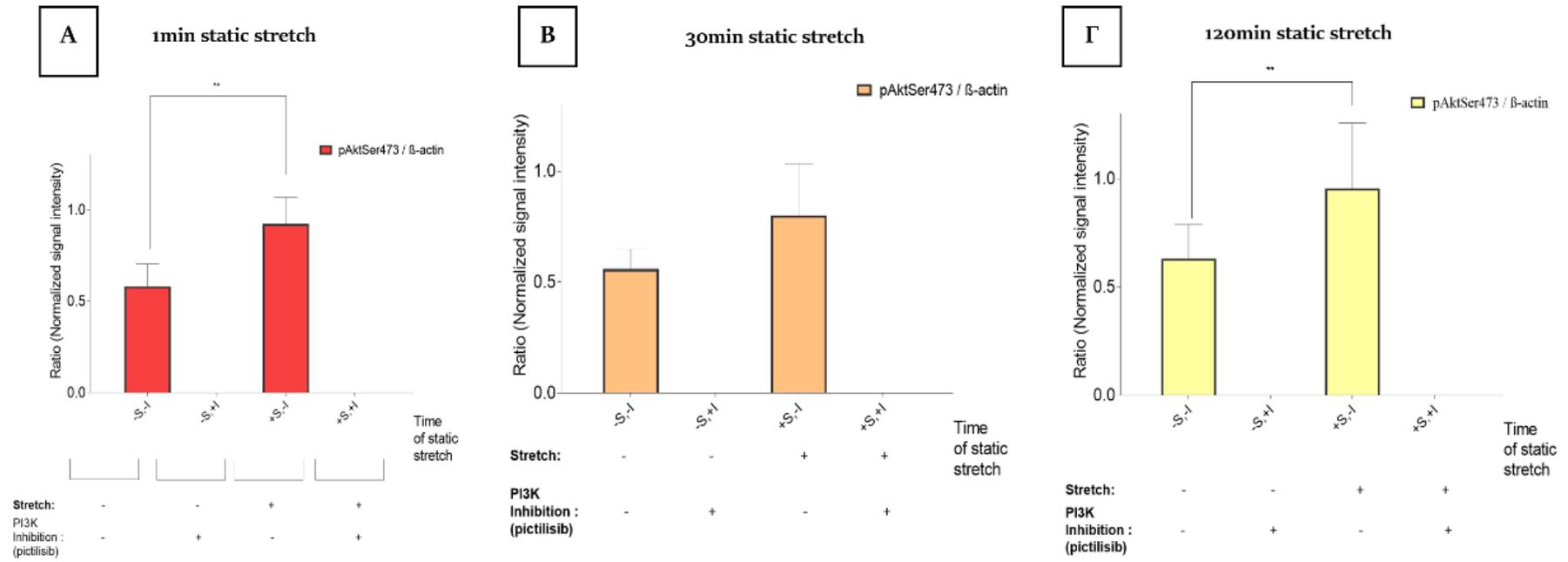
Από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης φαίνεται ότι με την εφαρμογή μηχανικής διάτασης έχουμε στατιστικά σημαντική αύξηση στην φωσφορυλίωση της Akt στην χρονική διάρκεια του 1 λεπτού. Παρατηρώντας την χρονική διάρκεια της διάτασης με τους αντίστοιχους μάρτυρες παρατηρούμε ότι η μηχανική διάταση επάγει την φωσφορυλίωση της Akt σε σημαντικά επίπεδα καθ' όλη την διάρκεια της διάτασης. Η αναστολή του ενζύμου PI3K με pictilisib είχε σαν αποτέλεσμα την ολική εξάλειψη του σήματος phosphoAkt.



Γράφημα 1: Το γράφημα μπάρας αναπαριστά την ποσοτικοποίηση της έντασης της p-Akt^{ser437} για κάθε συνθήκη του πειράματος κανονικοποιημένη με την β-ακτίνη (housekeeping genes). Το πρόγραμμα ImageJ χρησιμοποιήθηκε για την πικνομετρική

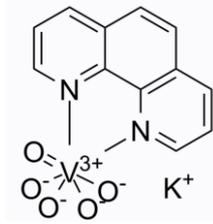
ανάλυση των δεδομένων. Η κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το ποσοστό της έντασης της pAktser⁴³⁷ προς την αντίστοιχη της β-ακτίνης. Η αναστολή των PI3Ks με pīctilisib προκάλεσε την ολική εξάλειψη του σήματος phospho-Akt τόσο στα control όσο και στα διατεταμένα δείγματα. Τα αποτελέσματα εκφράζουν τον MO +/- την τυπική απόκλιση διπλών πειραμάτων από τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα. Ως στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ δυο μέσων τιμών θεωρήθηκε $p^ < 0.05$.*

Η ανάλυση διακύμανσης μας δείχνει ότι οι παράγοντες χρόνος διάτασης και αναστολή δεν έχουν κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ τους ενώ η αλληλεπίδραση που έχουν με την εξαρτημένη μεταβλητή, την phospho-Akt, είναι στατιστικά σημαντική. Στα γραφήματα παρουσιάζονται τρία στιγμιότυπα του κυττάρου που αναδεικνύουν την αλληλεπίδραση της διάτασης με τον χρόνο που εκτέθηκαν σε μηχανικό ερέθισμα. Τα κύτταρα, φαίνεται να, αποκρίνονται σ' αυτή την αλλαγή με την υπερ-έκφραση της phospho-Akt. Συμπληρώνοντας, η ανασταλτική δράση του pīctilisib προκάλεσε την ολική εξάλειψη του σήματος phospho-Akt τόσο στα control όσο και στα διατεταμένα δείγματα.



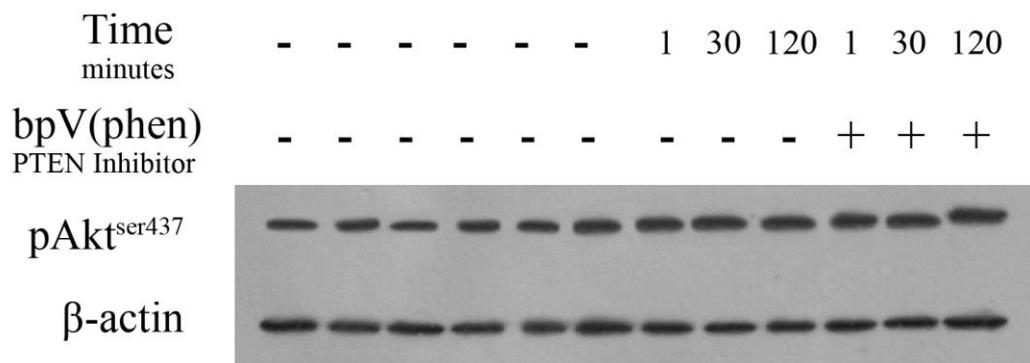
Εικόνα 42: Τα γραφήματα μπάρας αναπαριστούν την έκφραση της phospho-Akt σε κύτταρα A549 που υποβλήθηκαν σε μηχανική στατική διάταση για χρόνο 1, 30 και 120 λεπτά. Από το την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι στην χρονική διάρκεια της διάτασης η επαγόμενη έκφραση της Akt είναι στατιστικά σημαντική ως προς τον θετικό μάρτυρα, δηλαδή το δείγμα που δεν έχει υποστεί διάταση και αναστολή. Τα γραφήματα αντιπροσωπεύουν τα αποτελέσματα από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Γ.5.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων της επίδρασης της στατικής μηχανικής διάταξης στην φωσφορυλίωση της Akt σε συνδυασμό με τη χρήση bpV(phen), αναστολέα της PTEN



Εικόνα 43: Δομή του bpV(phen).

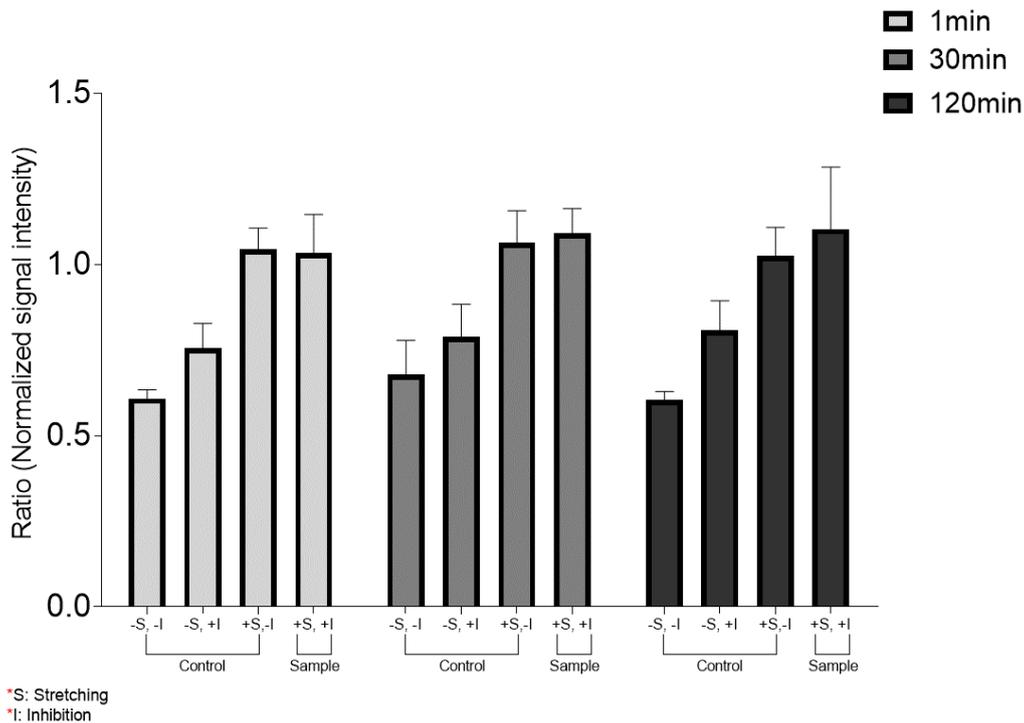
Στο **Γράφημα 2** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης με την συνθήκη αναστολής την φωσφατάσης PTEN. Η χρήση του αναστολέα, των PTEN, φαίνεται ότι έχει δράσει και έχει ωθήσει την φωσφορυλίωση της Akt. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων ελέγχθηκε με την χρήση της β-ακτίνης.



Εικόνα 44: Η μηχανική διάταση και επάγει την φωσφορυλίωση της Akt. Κύτταρα A549 υποβλήθηκαν σε μηχανική στατική διάταση για χρόνους 1, 30 και 120 λεπτά και επεξεργάστηκαν με bpV(phen), αναστολέα της φωσφατάσης PTEN. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Akt αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση επωάζοντας με πολυκλωνικό αντίσωμα phospho-Akt, με ειδικό επίτοπο στην σερίνη 473. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων ελέγχθηκε με την χρήση της β-ακτίνης. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική για τρία ανεξάρτητα πειράματα με διπλά δείγματα.

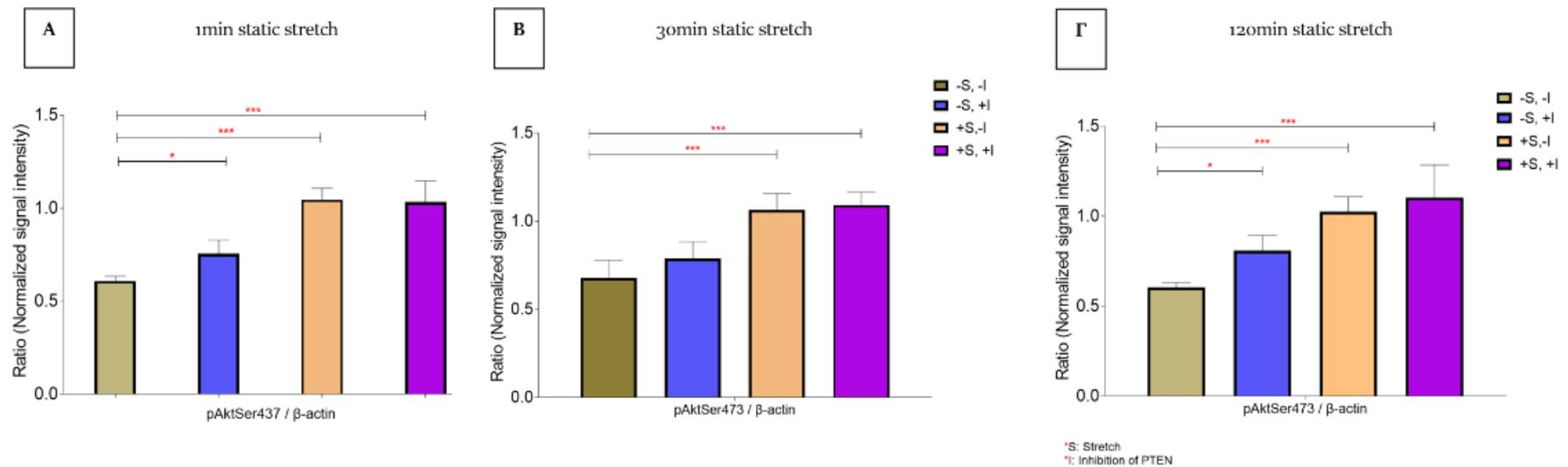
Από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης φαίνεται ότι ο θετικός μάρτυρας (-S,-I*) έχει χαμηλά επίπεδα εκφρασμένης phospho-Akt, ενώ όταν τα κύτταρα επωάζονται με τον αναστολέα του PTEN υπάρχει μια ελαφριά τάση των επιπέδων της phospho-Akt να αυξάνονται. Με την εφαρμογή μηχανικής διάταξης έχουμε στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση της Akt στην χρονική διάρκεια του 1 λεπτού. Συγκρίνοντας την χρονική διάρκεια του stretch με τους αντίστοιχους μάρτυρες παρατηρούμε ότι η μηχανική διάταση επάγει την φωσφορυλίωση της Akt σε σημαντικά επίπεδα καθ' όλη την διάρκεια της διάτασης.

time dependent static stretch



Γράφημα 3: Χρονοεξαρτώμενη επίδραση της στατικής μηχανικής διάτασης στην έκφραση της p-AktSer437. Η ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων ανάλογα με τη διάρκεια της διάτασης (1, 30 και 120 λεπτά) αναδεικνύει με μεγαλύτερη σαφήνεια τη δυναμική αλληλεπίδραση της μηχανικής διάτασης με τους θετικούς μάρτυρες, καθώς και την επίδραση της αναστολής της φωσφατάσης PTEN. Το διάγραμμα παρουσιάζει την ποσοτικοποιημένη ένταση της p-AktSer437 για κάθε πειραματική συνθήκη, κανονικοποιημένη ως προς τη β-ακτίνη (housekeeping gene), ώστε να διασφαλίζεται η συγκρισιμότητα μεταξύ των δειγμάτων. Η πικνομετρική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ImageJ και κάθε τιμή εκφράζει τον λόγο της έντασης της p-AktSer437 προς την αντίστοιχη ένταση της β-ακτίνης. Ως στατιστικά σημαντική θεωρείται η διαφορά μεταξύ δύο μέσων τιμών όταν $p < 0.05$.

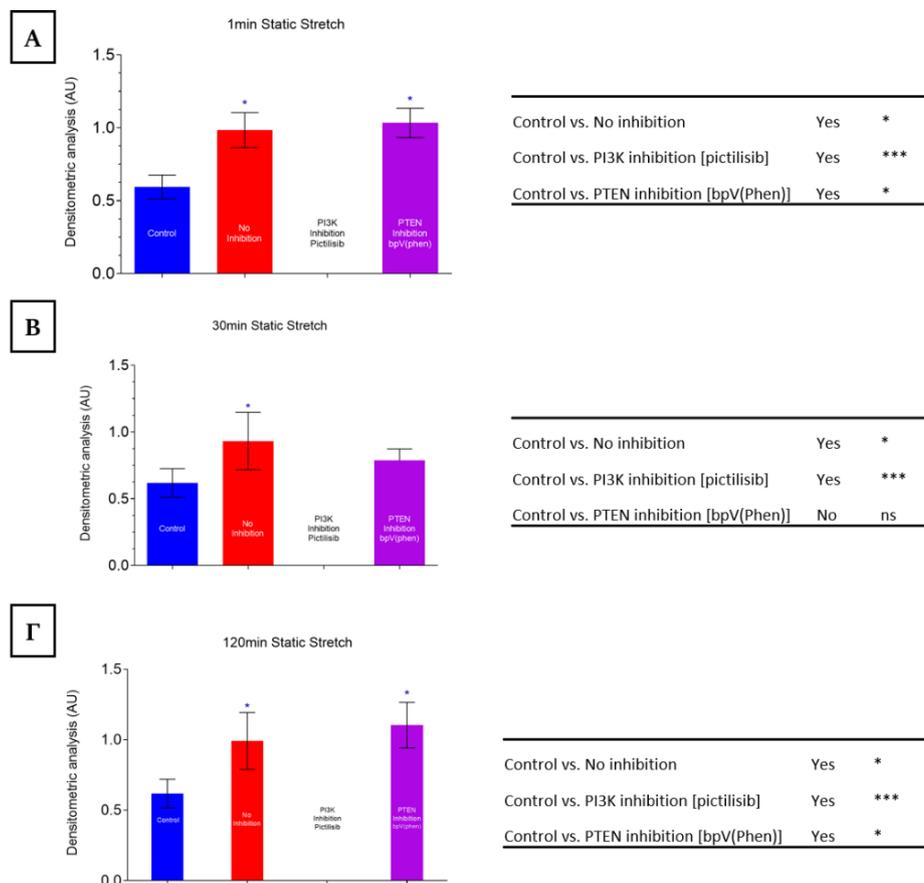
Η ανάλυση διακύμανσης μας δείχνει ότι οι παράγοντες μηχανική διάταση και αναστολή PTEN δεν έχουν κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Συγκρίνοντας την κατάσταση όπου τα κύτταρα έχουν υποστεί μηχανική διάταση με αναστολή και χωρίς αναστολή PTEN φαίνεται από τους μέσους όρους ότι δεν έχει επηρεάσει τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της Akt. Αντιθέτως, η διάταση έχει σημαντική αλληλεπίδραση με την εξαρτημένη μεταβλητή, την phospho-Akt. Στα γραφήματα παρουσιάζονται τα τρία στιγμιότυπα του κυττάρου που αναδεικνύουν την αλληλεπίδραση της μηχανικής έκτασης με τον χρόνο. Τα κύτταρα, φαίνεται να, αποκρίνονται σ' αυτή την αλλαγή με την υπερ-φωσφορυλίωση της phospho-Akt, φτάνοντας σχεδόν διπλάσιες τιμές. Η ανασταλτική δράση του hrV(phen) δεν προκάλεσε σημαντικές αλλαγές του σήματος phospho-Akt ούτε στα control ούτε στα διατεταμένα δείγματα.



Εικόνα 45: Τα γραφήματα μπάρας A, B και Γ αναπαριστούν την φωσφορυλίωση της Akt σε κύτταρα A549 που υποβλήθηκαν σε μηχανική στατική διάταση για χρόνους 1, 30 και 120 λεπτά, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα από την ανοσοαποτύπωση έχουν ομαδοποιηθεί από το δείγμα που δεν έχει καμία κατεργασία (-S,-I) μέχρι το δείγμα που έχει υποστεί μηχανική διάταση και ταυτόχρονη αναστολή της φωσφατάσης PTEN (+S,+I). Η επαγόμενη φωσφορυλίωση της Akt είναι στατιστικά σημαντική ως προς τον untreated control, δηλαδή το δείγμα που δεν έχει υποστεί διάταση και αναστολή. Τα γραφήματα αντιπροσωπεύουν τα αποτελέσματα από διπλά δείγματα και από τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα.

Γ.6 Συγκεντρωτική διερεύνηση του ρόλου αναστολής σε τρεις χρόνους μηχανικής διάτασης

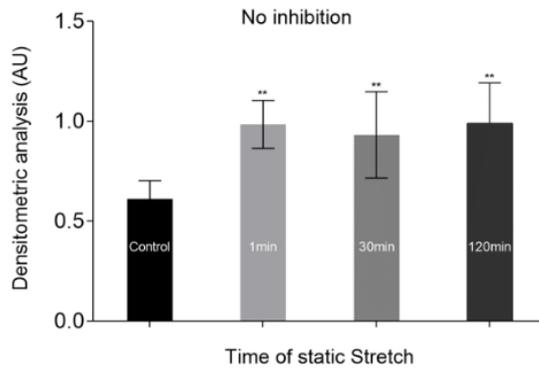
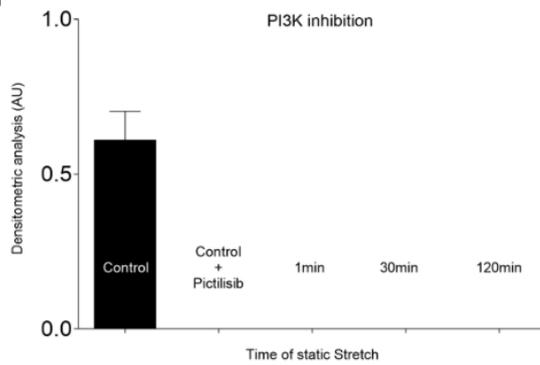
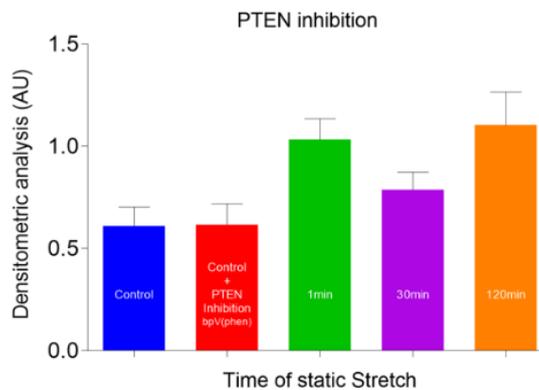
Η μηχανική διάταση που υπέστησαν τα κύτταρα στους χρόνους 1, 30 και 120 λεπτά είναι στατιστικά σημαντική ως προς το control. Συγκρίνοντας τα κύτταρα που έχουν υποστεί διάταση με αναστολή και χωρίς αναστολή PTEN φαίνεται ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά. Αυτό το μοτίβο παρατηρείται και στους 3 χρόνους διάτασης. Η αναστολή του ενζύμου PI3K έχει προκαλέσει ολική εξάλειψη του σήματος phospho-Akt. Η συγκεντρωτική διερεύνηση φαίνεται στο **Γράφημα 4**.



Γράφημα 4: Συγκεντρωτική διερεύνηση του ρόλου αναστολής σε τρεις χρόνους μηχανικής διάτασης. Τα γραφήματα μπάρας A, B και Γ αναπαριστούν την φωσφορυλίωση της Akt σε κύτταρα A549 που υποβλήθηκαν σε μηχανική στατική διάταση για χρόνους 1, 30 και 120 λεπτά σε συνθήκες αναστολής των ενζύμων PI3K και PTEN. Ως control χαρακτηρίζεται το δείγμα εκείνο το οποίο δεν έχει υποστεί διάταση και αναστολή. Για κάθε χρονική διάρκεια έχει πραγματοποιηθεί ανάλυση διασποράς και σύγκριση των control με τις αντίστοιχες συνθήκες της ανάλυσης. Για την διερεύνηση του ρόλου της αναστολής, τα αποτελέσματα από την ανοσοαποτύπωση έχουν ομαδοποιηθεί στα τρία στιγμιότυπα του χρόνου μηχανικής διάτασης ως προς τις συνθήκες της αναστολής. Τα γραφήματα αντιπροσωπεύουν τα αποτελέσματα διπλών δειγμάτων από τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα.

Γ.7 Συγκεντρωτική διερεύνηση του ρόλου της μηχανικής διάτασης σε συνθήκες αναστολής και μη

Η ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων διατηρώντας της συνθήκες αναστολής σταθερές και παρατηρώντας την μεταβολή της phospho-Akt ως προς το χρόνο μας επιτρέπει να διερευνήσουμε την επίδραση της διάτασης στο μονοπάτι PI3K/Akt. Από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι τα κύτταρα σε συνθήκες αναστολής PTEN και χωρίς αναστολή δεν έχει κάποια σημαντική αλλαγή στην phospho-Akt. Αξιοσημείωτο είναι ότι η σύγκριση της διάτασης με αναστολή PTEN με το αντίστοιχο control του μας δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, ενώ η αντίστοιχη σύγκριση των τριών χρόνων μεταξύ τους δείχνει ότι τα επίπεδα της phospho-Akt είναι στατιστικά σημαντικές στο 1 και 120 λεπτά σε σύγκριση με τα 30 λεπτά. Επιπλέον, η διάταση έχει σημαντική επίδραση στην μεταβολή της φωσφορυλίωσης της Akt. Από την ανάλυση φαίνεται ότι ο χρόνος της διάτασης δεν φαίνεται να παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στην μεταβολή της phospho-Akt.

A**B****Γ**

Control vs. Control +bpV(Phen)	No	ns
Control vs. 1min	Yes	**
Control vs. 30min	Yes	*
Control vs. 120min	Yes	**
Control +bpV(Phen) vs. 1min	Yes	*
Control +bpV(Phen) vs. 30min	No	ns
Control +bpV(Phen) vs. 120min	Yes	**
1min vs. 30min	Yes	*
1min vs. 120min	No	ns
30min vs. 120min	Yes	*

Γράφημα 5: Συγκεντρωτική διερεύνηση του ρόλου της μηχανικής διάτασης σε συνθήκες αναστολής και μη. **[A]** Στο σχήμα A διερευνάται η διάταση χωρίς συνθήκες αναστολής σε κύτταρα A549. Το control δείγμα σε σύγκριση με όλους τους χρόνους μηχανικής διάτασης έχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα διατεταμένα δείγματα δεν έχουν κάποια διαφορά μεταξύ τους. **[B]** Στο σχήμα B φαίνεται η αναστολή του PI3K ως προς τους χρόνους της μηχανικής διάτασης σε κύτταρα A549. Η επίδραση με pictilisib έχει προκαλέσει την ολική εξάλειψη του σήματος της φωσφορυλιωμένης Akt. **[Γ]** Στο σχήμα Γ φαίνεται η αναστολή του PTEN ως προς τους χρόνους της μηχανικής διάτασης σε κύτταρα A549. Η επίδραση με bpV(phen) δεν φαίνεται να προκαλεί κάποια αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της p-Akt στα μη διατεταμένα κύτταρα. Από την άλλη συγκρίνοντας τα επίπεδα εκφρασμένης p-Akt του control δείγματος με αναστολή PTEN σε σχέση με τα διατεταμένα κύτταρα σε όλους τους χρόνους διάτασης έχουμε σημαντικά αυξημένα επίπεδα p-Akt.

Γ.8 *In silico* θραυσματοποίηση / Βάση δεδομένων / Βιβλιοθήκες

Η ταυτοποίηση λιπιδικών ενώσεων σε σύνθετα βιολογικά δείγματα μέσω υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) αποτελεί μια διαδικασία με εγγενείς περιορισμούς, οι οποίοι απορρέουν κυρίως από τη μη διαθεσιμότητα επαρκών δεδομένων αναφοράς. Παρά την υψηλή ευαισθησία των σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών, η επιβεβαίωση της ταυτότητας ενός λιπιδίου βασίζεται παραδοσιακά στη σύγκριση των πειραματικών φασμάτων με βιβλιοθήκες ή με χημικά πρότυπα. Ωστόσο, όπως επισημαίνεται εκτενώς στη βιβλιογραφία, οι υπάρχουσες πειραματικές βάσεις δεδομένων καλύπτουν μόνο ένα ελάχιστο ποσοστό της τεράστιας δομικής ποικιλομορφίας των φυσικών λιπιδίων (Cajka Tomasand Fiehn, 2017). Επιπροσθέτως, η εμπορική διάθεση προτύπων αναφοράς για κάθε πιθανό λιπιδικό είδος και τα παράγωγά του είναι πρακτικά αδύνατη, δημιουργώντας σημαντικά κενά στην ταυτοποίηση της ένωσης¹⁹⁹.

Δεδομένης της απουσίας φασματικών βιβλιοθηκών για τα λίπδια, κρίθηκε δόκιμη η υιοθέτηση μιας υπολογιστικής (*in silico*) προσέγγισης. Αξιοποιώντας τη γνώση ότι τα λίπδια θραυσματοποιούνται ακολουθώντας αυστηρούς και προβλέψιμους κανόνες²⁰⁰, η δημιουργία μιας προσαρμοσμένης *in silico* φασματικής βιβλιοθήκης επιτρέπει εν μέρει τον χαρακτηρισμό της ένωσης βάσει των θεωρητικά αναμενόμενων διαγνωστικών ιόντων της.

Γ.8.1 Θεωρητικό υπόβαθρο και βιβλιογραφική ανασκόπηση

Η δομική ταυτοποίηση των λιπιδίων σε σύνθετα βιολογικά δείγματα μέσω υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (LC-HRMS/MS) αποτελεί μια σύνθετη αναλυτική διαδικασία, η οποία συχνά προσκρούει στην έλλειψη ολοκληρωμένων δεδομένων αναφοράς. Σε αντίθεση με άλλους κλάδους των βιοεπιστημών, η λιπιδιομική χαρακτηρίζεται από ένα σημαντικό κενό μεταξύ του πλήθους των θεωρητικά αναμενόμενων μοριακών ειδών και των διαθέσιμων πειραματικών φασμάτων στις δημόσιες ή εμπορικές βιβλιοθήκες. Όπως επισημαίνουν οι Cajka και Fiehn¹⁹⁸, οι τρέχουσες βάσεις δεδομένων καλύπτουν περιορισμένο τμήμα του λιπιδικού χώρου, γεγονός που καθιστά την ταυτοποίηση άγνωστων ενώσεων εξαιρετικά δυσχερή, ιδιαίτερα όταν απουσιάζουν τα χημικά πρότυπα αναφοράς. Το πρόβλημα επιτείνεται από το γεγονός ότι η επιτυχής ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός των λιπιδίων εξαρτώνται απόλυτα από τις πειραματικές συνθήκες ιοντισμού, και κυρίως από την επιλογή της κατάλληλης πολικότητας, η οποία καθορίζει τη φύση των παραγόμενων διαγνωστικών θραυσμάτων.

Η βιβλιογραφία καταδεικνύει σαφώς ότι διαφορετικές κατηγορίες φωσφολιπιδίων συμπεριφέρονται με διακριτό τρόπο ανάλογα με το αν αναλύονται σε θετική (ESI+) ή αρνητική (ESI-) λειτουργία ιοντισμού. Σύμφωνα με τη συγκριτική μελέτη των Pi et al.²⁰¹, η επιλογή της πολικότητας δεν επηρεάζει μόνο την ένταση του σήματος, αλλά υπαγορεύει και τον μηχανισμό θραυσματοποίησης που αποκαλύπτει τη δομή του μορίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι φωσφατιδυλοχολίνες (PC), οι οποίες λόγω της τεταρτοταγούς αμμωνιακής ομάδας στη φωσφοχολίνη φέρουν μόνιμο θετικό φορτίο. Οι μελέτες των Hsu και Turk²⁰² έχουν αποδείξει ότι κατά την ανάλυση σε θετική πολικότητα, τα ιόντα των PC υφίστανται θραυσματοποίηση που οδηγεί κυρίως στην παραγωγή του χαρακτηριστικού ιόντος φωσφοχολίνης στο 184, μέσω της απώλειας της πολικής κεφαλής. Αυτό το θραύσμα αποτελεί τον πλέον αξιόπιστο δείκτη για την αναγνώριση της συγκεκριμένης τάξης λιπιδίων. Αντιθέτως, η ανάλυση των PC σε αρνητική πολικότητα είναι συχνά αναποτελεσματική ή απαιτεί ειδικές συνθήκες σχηματισμού συμπλόκων (adducts) για να αποδώσει διαγνωστική πληροφορία, όπως επιβεβαιώνεται από τα ευρήματα των Pi et al.²⁰¹ που καταγράφουν τη δραματική διαφοροποίηση στα φάσματα MS/MS μεταξύ των δύο πολικότητων.

Στον αντίποδα, κατηγορίες όπως οι φωσφατιδυλοσερίνες (PS) και οι φωσφατιδυλοϊνσιτόλες (PI) αναλύονται βέλτιστα σε αρνητική πολικότητα. Οι Hsu και Turk²⁰³ περιγράφουν αναλυτικά ότι το πρόδρομο ιόν (precursor ion) των φωσφατιδυλοσερινών διασπάται κυρίως μέσω της ουδέτερης απώλειας του τμήματος της σερίνης (87 Da), σχηματίζοντας ένα ιόν που αντιστοιχεί στο φωσφατιδικό οξύ (PA). Παρόμοια, για τις φωσφατιδυλοϊνσιτόλες, η αρνητική λειτουργία επιτρέπει τον σχηματισμό καρβοξυλικών ανιόντων που αποκαλύπτουν άμεσα τη ταυτότητα των λιπαρών οξέων στις θέσεις sn-1 και sn-2, πληροφορία που είναι πολύ πιο δύσκολο να ανακτηθεί σε θετική πολικότητα χωρίς την παρουσία συγκεκριμένων μεταλλικών ιόντων λιθίου ή νατρίου²⁰³. Συνεπώς, η εφαρμογή λανθασμένης πολικότητας κατά την πειραματική διαδικασία μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη απώλεια της διαγνωστικής πληροφορίας, καθιστώντας αναγκαία την υιοθέτηση εναλλακτικών μεθοδολογιών ταυτοποίησης όταν τα πειραματικά δεδομένα είναι ελλιπή.

Για την αντιμετώπιση αυτών των πειραματικών περιορισμών, η επιστημονική έρευνα έχει στραφεί δυναμικά στην ανάπτυξη *in silico* εργαλείων για τη δημιουργία θεωρητικών φασματικών βιβλιοθηκών. Η θεμελιώδης παραδοχή πίσω από αυτή την προσέγγιση είναι ότι, σε αντίθεση με την απρόβλεπτη συμπεριφορά άλλων μεταβολιτών, τα λιπίδια ακολουθούν αυστηρούς και επαναλαμβανόμενους κανόνες θραυσματοποίησης (fragmentation rules) που εξαρτώνται από τη χημική τους δομή. Όπως αναλύουν οι Tobias & Fiehn²⁰⁰, η *in silico*

θραυσματοποίηση και η δημιουργία φασμάτων επιτρέπει την επέκταση της αναζήτησης πέρα από τα όρια των εμπορικών βιβλιοθηκών, καλύπτοντας θεωρητικά ολόκληρο τον πιθανό χώρο των λιπιδίων. Μεταξύ των διαφόρων υπολογιστικών προσεγγίσεων, οι μέθοδοι που βασίζονται σε κανόνες (rule-based) θεωρούνται οι πλέον ενδεδειγμένες για τη λιπιδιομική. Εργαλεία όπως το LipidBlast και το Mass Frontier αξιοποιούν τη συσσωρευμένη γνώση της οργανικής χημείας για να προβλέψουν τις αντιδράσεις διάσπασης, μετατρέποντας τη δομική πληροφορία κωδικοποιημένη σε μορφή SMILES ή InChIKeys σε εικονικά φάσματα μάζας ²⁰⁴(Cajka Tomasand Fiehn, 2017).

Η υπεροχή των rule-based μεθόδων έγκειται στη δυνατότητά τους να ενσωματώνουν συγκεκριμένους μηχανισμούς αντίδρασης, όπως οι χαρακτηριστικές ουδέτερες απώλειες και τα διαγνωστικά ιόντα κεφαλής που προαναφέρθηκαν. Σε αντίθεση με τις μεθόδους μηχανικής μάθησης (π.χ. ISIS), οι οποίες εξαρτώνται από την ποιότητα των δεδομένων εκπαίδευσης ²⁰⁵, ή τις καθαρά συνδυαστικές μεθόδους τύπου CFM-ID που προσομοιώνουν διασπάσεις ²⁰⁶, η βασισμένη σε κανόνες προσέγγιση προσφέρει άμεσο έλεγχο επί των προβλεπόμενων θραυσμάτων. Αυτό επιτρέπει στον ερευνητή να προσαρμόσει τους κανόνες θραυσματοποίησης ώστε να αντικατοπτρίζουν συγκεκριμένες χημικές τροποποιήσεις, όπως η παραγωγοποίηση, και να υπολογίσει με ακρίβεια τις μάζες των πρόδρομων ιόντων και των θραυσμάτων για διάφορα adducts ¹⁹⁹. Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη μιας προσαρμοσμένης *in silico* βάσης δεδομένων που αξιοποιεί αυτούς τους βιβλιογραφικά τεκμηριωμένους κανόνες αποτελεί μια ισχυρή και επιστημονικά έγκυρη στρατηγική για την ταυτοποίηση λιπιδίων, γεφυρώνοντας το χάσμα που δημιουργούν οι πειραματικοί περιορισμοί και η έλλειψη προτύπων αναφοράς.

Γ.8.2 *In silico* Φασματικές Βιβλιοθήκες

Η *in silico* δημιουργία φασματικής βιβλιοθήκης και μιας διευρυμένης βάσης δεδομένων πραγματοποιήθηκε με στόχο την υποστήριξη της ταυτοποίησης παραγωγοποιημένων γλυκεροφωσφολιπιδίων σε δεδομένα LC-HRMS/MS. Η διαδικασία επικεντρώθηκε στις μεθυλιωμένες μορφές των φωσφολιπιδίων μετά από παραγωγοποίηση με TMS-diazomethane, καθώς αυτές αντιστοιχούν στις πραγματικά ανιχνευόμενες χημικές οντότητες στο αναλυτικό στάδιο.

Γ.8.2.1 Δομική αναπαράσταση και βάση δεδομένων

Ως αρχικό στάδιο της *in silico* διαδικασίας, αναπτύχθηκε μία ολοκληρωμένη βάση δεδομένων γλυκεροφωσφολιπιδίων, η οποία περιλάμβανε τόσο τις intact όσο και τις παραγωγοποιημένες μορφές κάθε ένωσης. Για κάθε λιπίδιο καταχωρήθηκαν μοναδικά

αναγνωριστικά (πχ. DOR_PCID), ακριβείς μάζες και μοριακοί τύποι (Exact Mass, Intact Formula), καθώς και ονοματολογία σε συνοπτική μορφή (Intact Name, Intact Short Name).

Η δομική περιγραφή των ενώσεων βασίστηκε σε γραμμικές αναπαραστάσεις SMILES και InChIKeys, τόσο για τις intact όσο και για τις παραγωγοποιημένες μορφές (SMILES, InChIKey, SMILES_Der, InChIKey_Der). Παράλληλα, για τις παραγωγοποιημένες ενώσεις καταχωρήθηκαν οι αντίστοιχοι μοριακοί τύποι και οι ακριβείς μονοϊσοτοπικές μάζες (FormulaDer, ExactMassDer), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν άμεσα στους υπολογισμούς των precursor ions και των διαγνωστικών θραυσμάτων.

Η δομή των λιπιδίων αποτυπώθηκε επιπλέον μέσω παραμέτρων που αφορούν τη σύσταση των λιπαρών αλυσίδων, όπως το μήκος ανθρακικής αλυσίδας και ο αριθμός διπλών δεσμών στις θέσεις sn-1 και sn-2 (Sn1/Sn2 chain length και double bonds). Οι πληροφορίες αυτές αποτέλεσαν βασικό στοιχείο για τον ορισμό των διαγνωστικών απωλειών ακυλομάδων και την ερμηνεία του μηχανισμού της θραυσματοποίησης.

Στη βάση δεδομένων περιλαμβάνονταν εκτεταμένες υπολογισμένες μάζες για πιθανά fragments και neutral losses υπό διαφορετικά adducts ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$), ωστόσο στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας έμφαση δόθηκε μόνο στα διαγνωστικά ιόντα, καθώς είναι τα καθοριστικά για την ταυτοποίηση των γλυκεροφωσφολιπιδίων. Τα ιόντα αυτά περιλαμβάνουν χαρακτηριστικά fragments του headgroup, επιλεγμένες απώλειες ακυλομάδων από τις θέσεις sn-1 και sn-2, καθώς και precursor-related ιόντα με ή χωρίς απώλειες μικρών ουδέτερων μορίων.

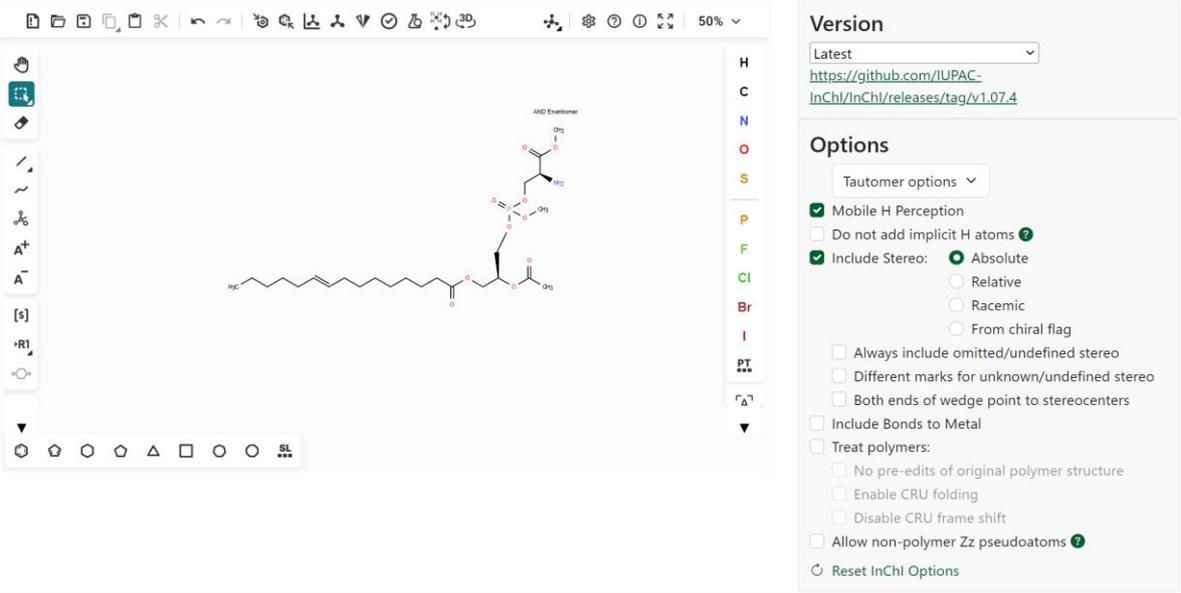
Έτσι κατέστη δυνατή η άμεση και συστηματική μετατροπή των δεδομένων σε μορφή κατάλληλη για την *in silico* φασματική βιβλιοθήκη, διασφαλίζοντας συνέπεια μεταξύ δομικής πληροφορίας, υπολογισμένων μαζών και διαγνωστικών MS/MS χαρακτηριστικών.

Γ.8.2.2 Μετατροπή της βάσης δεδομένων σε *in silico* MS/MS βιβλιοθήκη

Η μετατροπή της βάσης δεδομένων σε μορφή κατάλληλη για την *in silico* MS/MS φασματική βιβλιοθήκη πραγματοποιήθηκε μέσω μιας διαδικασίας τυποποίησης και φιλτραρίσματος των διαθέσιμων δεδομένων, με στόχο τη διατήρηση μόνο της πληροφορίας που είναι άμεσα αξιοποιήσιμη για φασματική αντιστοίχιση.

InChI RInChI About

Draw structure and convert to InChI Convert Molfile to InChI Convert Auxinfo to structure Convert SDF to InChIs



Version: Latest
<https://github.com/IUPAC-InChI/InChI/releases/tag/v1.07.4>

Options: Tautomer options

- Mobile H Perception
- Do not add implicit H atoms ?
- Include Stereo:
 - Absolute
 - Relative
 - Racemic
 - From chiral flag
- Always include omitted/undefined stereo
- Different marks for unknown/undefined stereo
- Both ends of wedge point to stereocenters
- Include Bonds to Metal
- Treat polymers:
 - No pre-edits of original polymer structure
 - Enable CRU folding
 - Disable CRU frame shift
- Allow non-polymer Zz pseudoatoms ?
- Reset InChI Options

InChI
InChI=1S/C25H46NO10P/c1-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-24(28)33-18-22(36-21(2)27)19-34-37(30,32-4)35-20-23(26)25(29)31-3/h9-10,22-23H,5-8,11-20,26H2,1-4H3/b10-9+/t22-,23-,37?/m0/s1

InChIKey
 KVIXJHZZKNKVIDF-LEQVOAQQSA-N

Εικόνα 46: Διαδικτυακό εργαλείο επίδειξης της IUPAC για τη δημιουργία και επαλήθευση InChI και InChIKey από χημικές δομές ή γραμμικές αναπαραστάσεις (π.χ. SMILES), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της μοναδικότητας των χημικών δομών σε 2 διαστάσεις χωρίς τον υπολογισμό της στερεοχημείας. <https://iupac-inchi.github.io/InChI-Web-Demo/>

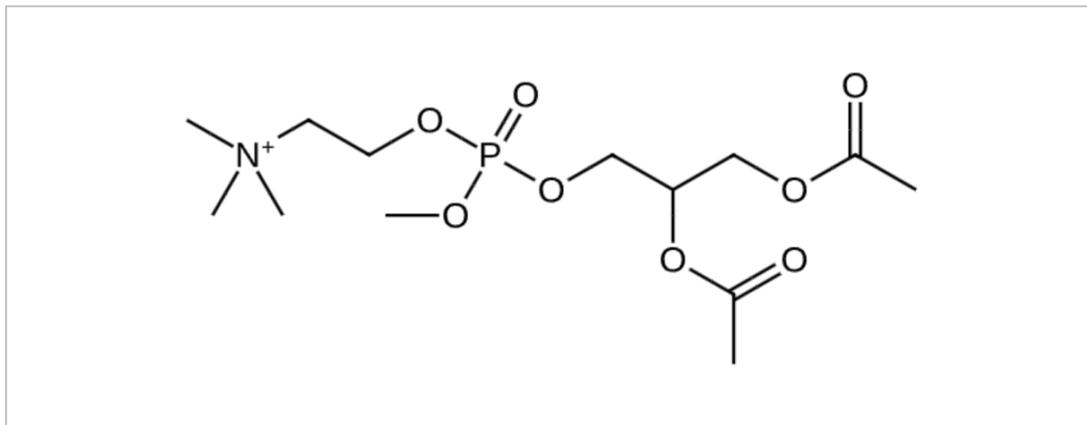
Σε πρώτο στάδιο, για κάθε λιπίδιο επιλέχθηκε μία μοναδική αναπαράσταση της παραγωγοποιημένης μορφής, βασισμένη στον μοριακό τύπο (FormulaDer), την ακριβή μονοϊσοτοπική μάζα (ExactMassDer) και τη δομική πληροφορία (SMILES_Der και InChIKey_Der). Η πληροφορία αυτή αποτέλεσε το θεμέλιο για τον υπολογισμό των precursors και για τη διασύνδεση των φασματικών δεδομένων με συγκεκριμένες χημικές δομές.

SMILES

```
CC(=O)OCC(COP(OC)(=O)OCC[N+](C)(C)C)OC(C)=O
```

Examples: [aspirin](#), [penguinone](#), [18-crown-6](#), [citric acid](#).

Structure



Εικόνα 47: Διαδικτυακό εργαλείο χημικής πληροφορικής για την απεικόνιση, επεξεργασία και μετατροπή χημικών δομών (π.χ. μεταξύ γραμμικών αναπαραστάσεων και δομικών μορφών), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο και την επιμέλεια των δομών που εντάχθηκαν στη βάση δεδομένων. <https://www.leskoff.com/s01810-0>

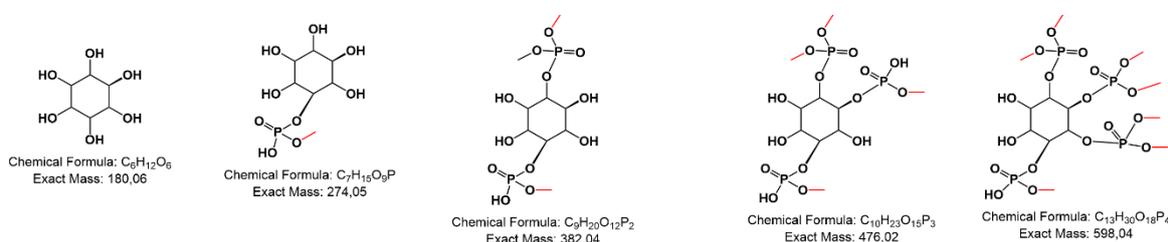
Στη συνέχεια, από το σύνολο των υπολογισμένων πιθανών θραυσμάτων και των «neutral losses» που περιλαμβάνονταν στη βάση δεδομένων, επιλέχθηκαν περίπου 5-11 θραύσματα μαζί με όλα τα διαγνωστικά ιόντα που είναι καθοριστικά για την ταυτοποίηση των γλυκεροφωσfolιπιδίων. Η επιλογή αυτή βασίστηκε στη γνωστή MS/MS συμπεριφορά των φωσfolιπιδίων και στη σύγκλιση με τα πειραματικά δεδομένα των εσωτερικών προτύπων. Με τον τρόπο αυτό αποφεύχθηκε η υπερφόρτωση της βιβλιοθήκης με μη ειδικά ή χαμηλής διαγνωστικής αξίας θραύσματα.

Για κάθε επιλεγμένο adduct ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ και $[M+NH_4]^+$), υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες πρόδρομες μάζες και τα συνδεδεμένα διαγνωστικά θραύσματα. Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με τρόπο που διασφαλίζει ότι κάθε φασματική εγγραφή αντιστοιχεί σε ένα ορισμένο πρόδρομο-θραύσμα, όπως απαιτείται για αξιόπιστη MS/MS αντιστοίχιση.

Γ.8.3 Αναλυτική περιγραφή της παραγωγοποίησης και ενσωμάτωσή στην *in silico* βάση

Η παραγωγοποίηση των γλυκεροφωσfolιπιδίων πραγματοποιήθηκε με χρήση TMS-diazomethane και οδηγεί σε μεθυλίωση των όξινων -OH ομάδων που απαντώνται στα φωσφορικά και πολυφωσφορικές κεφαλές των φωσfolιπιδίων. Η χημική αυτή τροποποίηση μεταβάλλει τη στοιχειομετρική σύσταση των λιπιδίων, επηρεάζοντας άμεσα την μάζα, τη συμπεριφορά ιοντισμού και τη θραυσματοποίηση τους σε συνθήκες MS/MS.

Στην *in silico* θρασματοποίηση, ο μηχανισμός που ακολουθήθηκε για την παραγωγή ενσωματώθηκε με απλοποιημένη στοιχειομετρική προσέγγιση, κατά την οποία κάθε μεθυλίωση αποτυπώθηκε ως αντικατάσταση ενός όξινου υδρογόνου (–H) από μία μεθυλομάδα (–CH₃).



Εικόνα 48: Σχηματική απεικόνιση της μεθυλίωσης των όξινων υδρογόνων (–H) στις φωσφορικές κεφαλές των PI, PIP, PIP₂ και PIP₃ μετά από παραγωγή με TMS-diazomethane. Στην *in silico* θρασματοποίηση, η παραγωγή ενσωματώθηκε με απλοποιημένη στοιχειομετρική προσέγγιση, όπου κάθε όξινο υδρογόνο αντικαταστάθηκε από μία μεθυλομάδα (–CH₃), οδηγώντας στις αντίστοιχες παραγγοποιημένες μορφές και χαρακτηριστικές ουδέτερες απώλειες.

Ο αριθμός των προστιθέμενων μεθυλομάδων εξαρτάται άμεσα από τον αριθμό των διαθέσιμων όξινων –OH ομάδων στην κάθε κατηγορία φωσφολιπιδίων, όπως φαίνεται για παράδειγμα στην **Εικόνα 48** η παραγωγή των πολικών κεφαλών των φωσφοϊνοσιτιδίων. Συγκεκριμένα, στο *in silico* μοντέλο εφαρμόστηκαν οι μετατροπές, όπως φαίνονται στο **Πίνακα 10**.

Πίνακας 10: Σύνοψη της παραγωγής των γλυκεροφωσφολιπιδίων με TMS-diazomethane, όπου παρουσιάζεται ο αριθμός των όξινων φωσφορικών –OH ομάδων ανά κατηγορία λιπιδίων, ο αντίστοιχος αριθμός μεθυλίωσης (–CH₃) και η προκύπτουσα στοιχειομετρική μεταβολή που εφαρμόστηκε στο *in silico* μοντέλο.

Κατηγορία λιπιδίων	Όξινες –OH ομάδες	Μεθυλίώσεις	Στοιχειομετρική μεταβολή
PC	1 H	1 × CH ₃	+C ₁ H ₂
PE	1 H	1 × CH ₃	+C ₁ H ₂
PS	2 H	2 × CH ₃	+C ₂ H ₄
PI	1 H	1 × CH ₃	+C ₁ H ₂
PIP	3 H	3 × CH ₃	+C ₃ H ₆
PIP ₂	5 H	5 × CH ₃	+C ₅ H ₁₀
PIP ₃	7 H	7 × CH ₃	+C ₇ H ₁₄
LysoPC	1 H	1 × CH ₃	+C ₁ H ₂
LysoPE	1 H	1 × CH ₃	+C ₁ H ₂
LysoPS	2 H	2 × CH ₃	+C ₂ H ₄
LysoPI	1 H	1 × CH ₃	+C ₁ H ₂

Η προσέγγιση αυτή εφαρμόστηκε τόσο στους μοριακούς τύπους (FormulaDer) όσο και στις ακριβείς μονοϊσοτοπικές μάζες (ExactMassDer), καθώς και στις δομικές αναπαραστάσεις (SMILES_Der, InChIKey_Der). Με τον τρόπο αυτό διασφαλίστηκε ότι όλα τα *in silico*

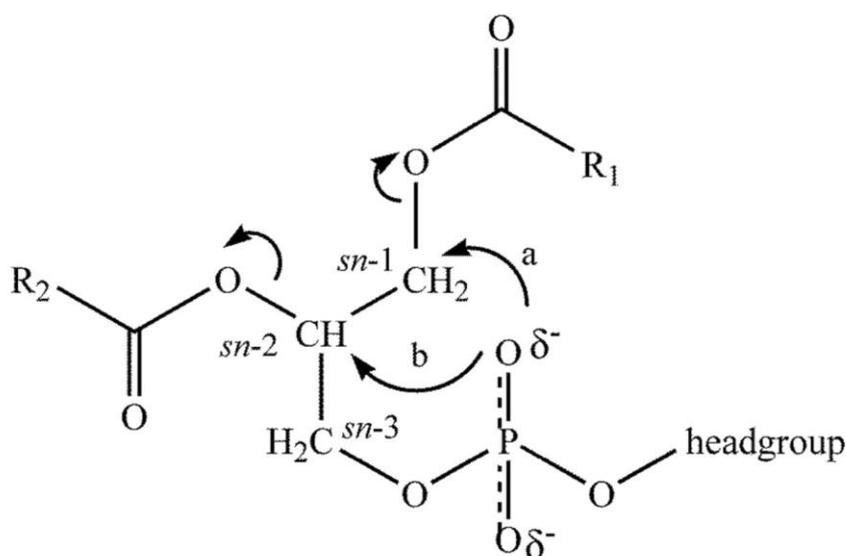
παραγόμενα precursor ions και διαγνωστικά fragments βασίζονται σε χημικές δομές, πλήρως συμβατές, με τις πειραματικά παρατηρούμενες παραγωγοποιημένες μορφές.

Γ.8.4 Ανάπτυξη κανόνων θραυσματοποίησης για παραγωγοποιημένα γλυκεροφωσfolιπίδια

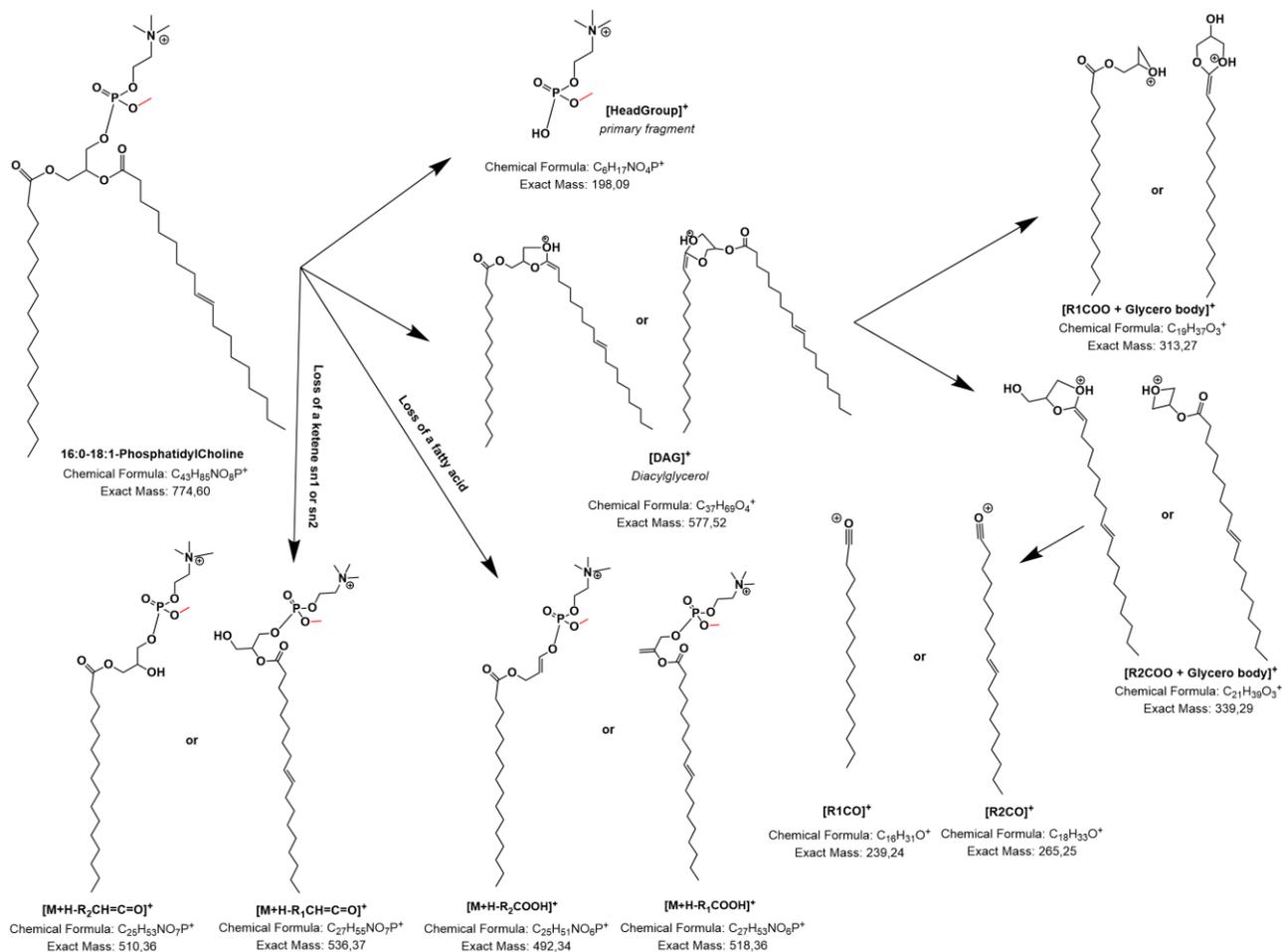
Η *in silico* θραυσματοποίηση των παραγωγοποιημένων γλυκεροφωσfolιπιδίων αναπτύχθηκε με τη λογική διάσπασης του γλυκεροφωσfolιπιδικού σκελετού και των ακυλομάδων σε θετικό ιοντισμό.

Μηχανισμός θραυσματοποίησης (Pi et al.)

Οι Pi et al. περιγράφουν συστηματικά πρότυπα θραυσματοποίησης για PC/PE/PS/PI σε ESI(±) και σε ευρύ εύρος ενεργειών σύγκρουσης, αναδεικνύοντας ότι η διάσπαση στα γλυκεροφωσfolιπίδια καθοδηγείται από την πολική κεφαλή και από διασπάσεις των εστερικών δεσμών των ακυλομάδων (sn-1/sn-2 related ions), και από το γεγονός ότι τα λιπαρά οξέα εμφανίζονται με επαναλαμβανόμενους τύπους ιόντων/απωλειών (π.χ. ακυλικές μορφές σε θετικό ιοντισμό), κάτι που επιτρέπει την προβλέψιμη παραγωγή άκυλο προϊόντων, ανεξάρτητα από την κατηγορία, με διαφοροποίηση κυρίως ως προς τη πολική κεφαλή, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 49**.



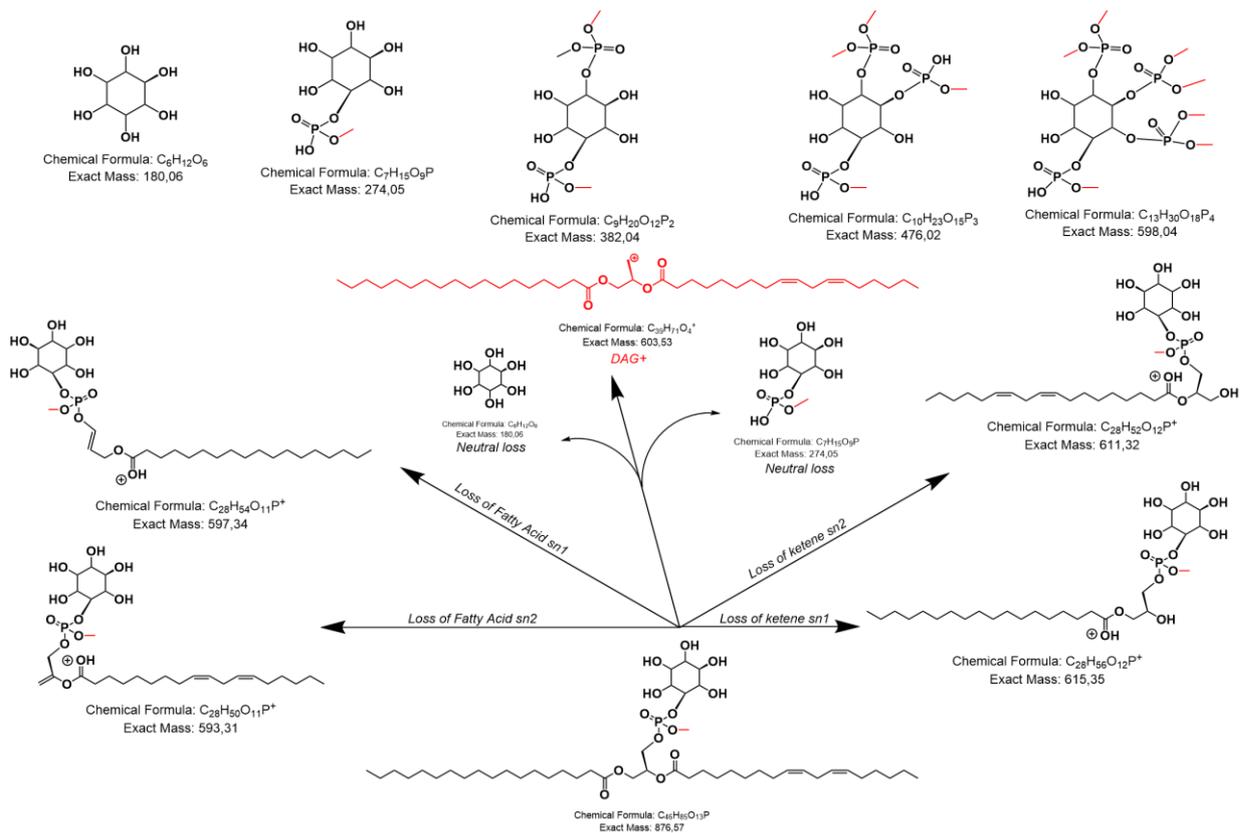
Εικόνα 49: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού θραυσματοποίησης των γλυκεροφωσfolιπιδίων²⁰¹.



Εικόνα 50: Προτεινόμενος μηχανισμός MS/MS θραυσματοποίησης παραγωγοποιημένης φωσφατιδυλχολίνης (PC) σε θετικό ιοντισμό μετά από μεθυλίωση με TMS-diazomethane. Απεικονίζεται ο σχηματισμός του διαγνωστικού μεθυλιωμένου headgroup⁺ (m/z 198), η παραγωγή του ιόντος διακυλογλυκερόλης (DAG⁺), καθώς και χαρακτηριστικές απώλειες ακυλομάδων και κετονών από τις θέσεις sn-1 και sn-2. Ο μηχανισμός αυτός αποτέλεσε τη βάση για τον ορισμό των κανόνων *in silico* θραυσματοποίησης της κατηγορίας PC.

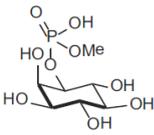
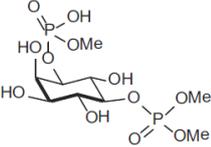
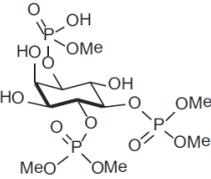
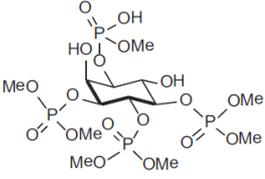
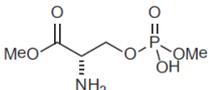
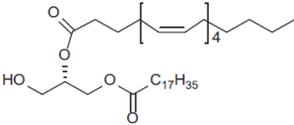
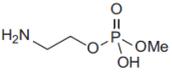
Η συμβολή των Pi et al. εδώ ήταν να ορίσει το ποια διάσπαση είναι χημικά αναμενόμενη (rule-based rationale) και ποια fragments έχουν υψηλή πιθανότητα να είναι αναπαραγώγιμα υπό CID/HCD/IT τύπου θραυσματοποίησης.

Οι Stephens & Hawkins (Kielkowska et al.) περιγράφουν ότι η μεθυλίωση με TMS διαζομεθάνιο στοχεύει τις όξινες φωσφορικές -OH, με ελάχιστη/αμελητέα μεθυλίωση των ελεύθερων υδροξυλίων της ινοσιτόλης όταν τηρούνται οι συνθήκες, και χωρίς τροποποίηση των λιπαρών αλυσίδων. Για τα φωσφοϊνοσιτίδια ειδικά, τεκμηριώνουν ότι η θραυσματοποίηση λαμβάνει χώρα σε θετικό ιοντισμό και διασπάται στον δι-εστερικό δεσμό της φωσφορικής ομάδας, η οποία οδηγεί σε απώλεια μιας ουδέτερης πολικής κεφαλής (παραγωγοποιημένης) με χαρακτηριστική μάζα ανά κατηγορία, και ταυτόχρονη ανίχνευση της διακυλογλυκερόλης DAG⁺ ως προϊόν (class-independent carrier of acyl composition).



Εικόνα 51: Προτεινόμενος μηχανισμός MS/MS θραυσματοποίησης παραγωγοποιημένης φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI) σε θετικό ιοντισμό μετά από μεθυλίωση με TMS-diazomethane. Η κύρια διάσπαση λαμβάνει χώρα στον δι-εστερικό δεσμό της φωσφορικής ομάδας, οδηγώντας σε απώλεια ουδέτερου, παραγωγοποιημένου headgroup (neutral loss 274 Da) και ταυτόχρονο σχηματισμό του ιόντος DAG⁺. Δευτερογενείς απώλειες λιπαρών αλυσίδων από τις θέσεις sn-1 και sn-2 παρατηρούνται σε υψηλότερες ενέργειες σύγκρουσης και ενσωματώθηκαν στο *in silico* μοντέλο ως υποστηρικτικά θραύσματα.

Στην **Εικόνα 52** αποτυπώνονται οι ουδέτερες απώλειες των πολικών κεφαλών για τα παραγωγοποιημένα φωσφοϊνοσιτίδια PtdIns / PtdInsP / PtdInsP2 / PtdInsP3 με 274, 382, 490 και 598Da αντίστοιχα, που χρησιμοποιούνται άμεσα ως κανόνες για τα θραύσματα για την δημιουργία *in silico* MS/MS βιβλιοθηκών.

	Structure	Mass [Da]
PtdIns		274
PtdInsP		382
PtdInsP ₂		490
PtdInsP ₃		598
Phosphatidic acid		126
Phosphatidylserine		213
Phosphatidylcholine		626
Phosphatidylethanolamine		155

Εικόνα 52: Χαρακτηριστικά ουδέτερα θραύσματα των παραγωγοποιημένων πολικών κεφαλών γλυκεροφωσfolιπιδίων μετά από μεθυλίωση με TMS-diazomethane. Παρουσιάζονται οι δομές και οι αντίστοιχες μάζες των ουδέτερων απολειών για PtdIns, PtdInsP, PtdInsP₂ και PtdInsP₃, καθώς και διαγνωστικά θραύσματα όπως χρησιμοποιήθηκαν στον ορισμό των κανόνων *in silico* MS/MS θραυσματοποίησης.²⁰⁷

Γ.8.5 Διαγνωστικά ιόντα

Τα θραύσματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι παραγωγοποιημένα και σε θετικό ιοντισμό

Στην *in silico* θραυσματοποίηση σε συνθήκες θετικού ιοντισμού και στην παραγωγοποιημένη τους μορφή τα γλυκεροφωσφολιπίδια μπορούν να ταξινομηθούν και με τον παρακάτω τρόπο:

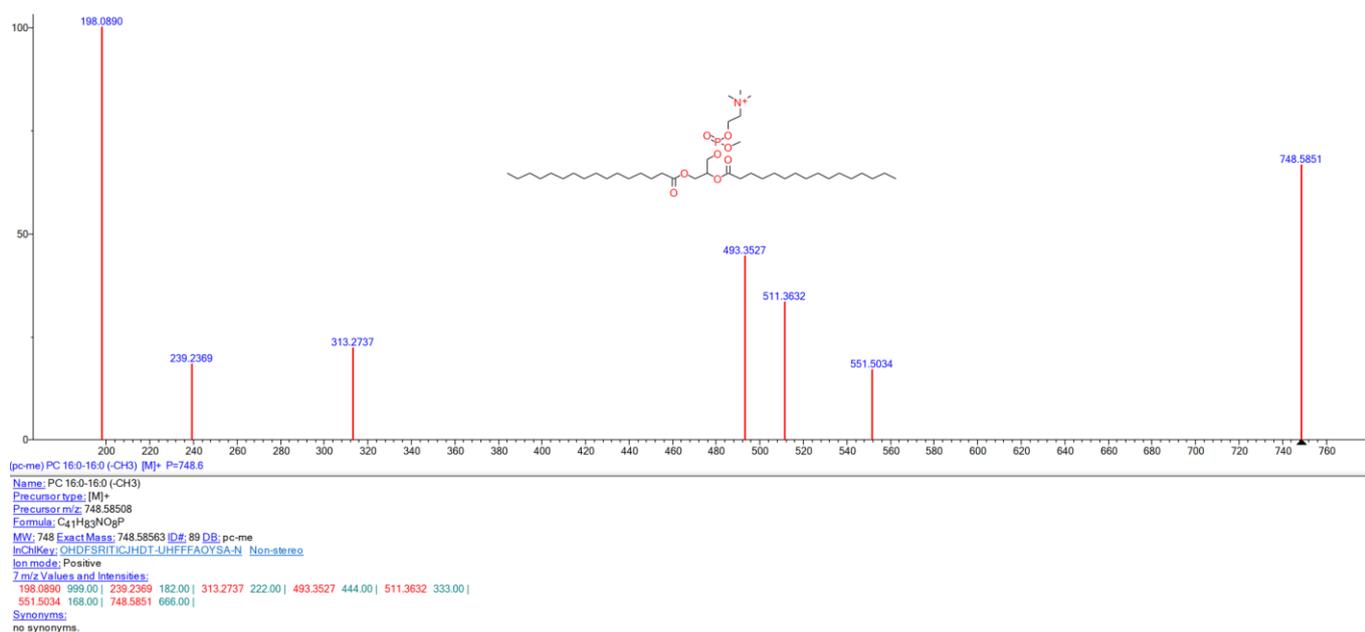
Τάξη φωσφολιπιδίου	Τύπος διαγνωστικού ιόντος	m/z ή ουδέτερη απώλεια	Περιγραφή
PC Φωσφατιδυλοχολίνη	Διαγνωστικό θραύσμα	m/z 198	Μεθυλιωμένο διαγνωστικό ιόν φωσφοχολίνης
PE (Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη)	Διαγνωστικό θραύσμα	m/z 156	Μεθυλιωμένο διαγνωστικό ιόν φωσφοαιθανολαμίνης
PS (Φωσφατιδυλοσερίνη)	Διαγνωστικό θραύσμα	m/z 214	Μεθυλιωμένο διαγνωστικό ιόν φωσφοσερίνης
PI (Φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη)	Ουδέτερη απώλεια	274Da	Χαρακτηριστική ουδέτερη απώλεια της πολικής κεφαλής PI
PIP (Φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη-μονοφωσφορική)	Ουδέτερη απώλεια	382Da	Χαρακτηριστική ουδέτερη απώλεια της πολικής κεφαλής PIP
PIP2 (Φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη-διφωσφορική)	Ουδέτερη απώλεια	490Da	Χαρακτηριστική ουδέτερη απώλεια της πολικής κεφαλής PIP2
PIP3 (Φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη-τριφωσφορική)	Ουδέτερη απώλεια	598Da	Χαρακτηριστική ουδέτερη απώλεια της πολικής κεφαλής PIP3

Ωστόσο για κάθε παραγωγοποιημένο φωσφολιπίδιο δημιουργήθηκαν και αποθηκεύτηκαν τα ακόλουθα ιόντα με τα adducts ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$):

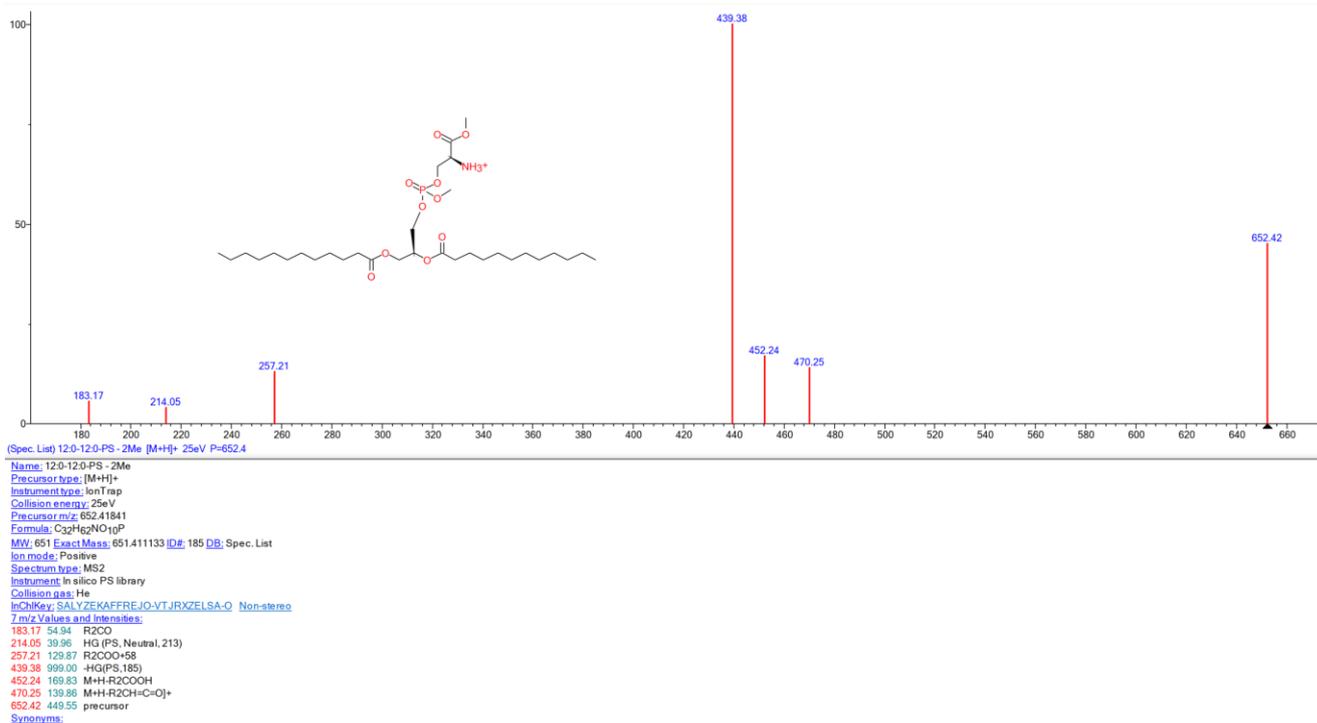
- precursor ion
- DAG⁺
- R1COO–C₃H₅O₂
- R2COO–C₃H₅O₂
- FA1-body–HG–Me
- FA2-body–HG–Me
- μεθυλιωμένο headgroup (π.χ. HG+Me, m/z 198 για phosphatidylcholines)
- $[M+H-R1COOH]^+$
- $[M+H-R2COOH]^+$

- FA1
- FA2

Όλες οι τιμές m/z υπολογίστηκαν από **μονοϊσοτοπικές ακριβείς μάζες**, βάσει της στοιχειομετρικής σύστασης κάθε θραύσματος. Για τις φωσφατιδυλοχολίνες, τα μόρια αντιμετωπίστηκαν ως **εγγενώς φορτισμένα $[M]^+$** , λόγω της μόνιμα φορτισμένης χολίνης, αλλά και ως **$[M+H]^+$** , ενταγμένα στο ίδιο πλαίσιο διαχείρισης των adducts. Η προσέγγιση αυτή επιλέχθηκε ώστε να καλυφθεί το πλήρες φάσμα των παρατηρούμενων precursor ions στα πειραματικά δεδομένα.



Εικόνα 53: Παράδειγμα *in silico* παραγόμενου φάσματος MS/MS από τη φασματική βιβλιοθήκη για παραγωγοποιημένη 16:0-16:0-Φωσφατιδυλοχολίνη (PC) σε θετικό ιοντισμό. Απεικονίζονται τα διαγνωστικά προϊόντα ιόντων, συμπεριλαμβανομένου του μεθυλιωμένου headgroup⁺ (m/z 198), του ιόντος DAG⁺ και επιλεγμένων θραυσμάτων που προκύπτουν από απώλειες ακυλομάδων, όπως ορίστηκαν από τους κανόνες *in silico* θραυσματοποίησης και χρησιμοποιήθηκαν για φασματική αντιστοίχιση.



Εικόνα 54: Παράδειγμα *in silico* παραγόμενου φάσματος MS/MS από τη φασματική βιβλιοθήκη για παραγωγοποιημένη 12:0-12:0-Φωσφατιδυλσερίνη (PS) σε θετικό ιοντισμό. Το φάσμα χαρακτηρίζεται από την κυρίαρχη απώλεια του παραγωγοποιημένου πολικού headgroup με ταυτόχρονο σχηματισμό του ιόντος DAG⁺, καθώς και δευτερογενή προϊόντα ιόντων από απώλειες ακυλομάδων, σύμφωνα με τους κανόνες *in silico* θραυσματοποίησης που εφαρμόστηκαν.

Γ.8.6 Δημιουργία και διαχείριση της φασματικής βιβλιοθήκης

Η τελική φασματική βιβλιοθήκη δημιουργήθηκε μέσω μιας πολυβηματικής διαδικασίας. Αρχικά, όλα τα *in silico* παραγόμενα δεδομένα οργανώθηκαν σε μια βάση δεδομένων σε μορφή πίνακα.

Στη συνέχεια, τα δεδομένα μετατράπηκαν σε αρχεία μορφής MSP.

Γ.8.7 Μορφή και δομή αρχείων MSP για *in silico* MS/MS βιβλιοθήκες

Τα αρχεία μορφής MSP αποτελούν ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο, απλό αλλά πλήρως τυποποιημένο format για την αποθήκευση φασματικών δεδομένων MS/MS. Χρησιμοποιούνται εκτεταμένα σε φασματικές βιβλιοθήκες (π.χ. NIST, mzVault, Compound Discoverer). Το format είναι text-based (.txt), γεγονός που επιτρέπει τόσο την αυτόματη δημιουργία όσο και τον άμεσο έλεγχο και την αναπαραγωγικότητα των δεδομένων.

Κάθε εγγραφή MSP αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό φάσμα MS/MS και περιλαμβάνει δύο βασικά τμήματα:

1. τα δεδομένα της ένωσης και των πειραματικών συνθηκών και
2. το σύνολο των θραυσμάτων (product ions) που απαρτίζουν το φάσμα.

Στο πρώτο τμήμα της εγγραφής περιλαμβάνονται πληροφορίες που ορίζουν με σαφήνεια την ταυτότητα της ένωσης και τις συνθήκες υπό τις οποίες “υποτίθεται” ότι αποκτήθηκε το φάσμα. Στην παρούσα εργασία, τα βασικά πεδία που χρησιμοποιήθηκαν περιλάμβαναν:

- **Name:** μοναδική και συνοπτική ονομασία της παραγωγοποιημένης ένωσης (π.χ. class + λιπαρές αλυσίδες).
- **Formula:** μοριακός τύπος της παραγωγοποιημένης μορφής.
- **Exact Mass:** μονοϊσοτοπική μάζα της παραγωγοποιημένης ένωσης.
- **Precursor m/z:** m/z του precursor ion για το συγκεκριμένο adduct.
- **Precursor type:** τύπος ιοντισμού (π.χ. $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$).
- **Ion mode:** θετικός ιοντισμός (positive).
- **Collision energy:** καθορισμένη ενέργεια σύγκρουσης (π.χ. 25-35 eV).
- **Instrument type:** τύπος οργάνου (IonTrap).
- **Collision gas:** αέριο σύγκρουσης (helium).
- **InChIKey:** μοναδικός δομικός αναγνωριστικός κωδικός της παραγωγοποιημένης μορφής.
- **Comment:** περιγραφικές πληροφορίες (π.χ. ότι το φάσμα είναι *in silico* παραγόμενο).

Η παρουσία αυτών των πεδίων εξασφαλίζει ότι κάθε φάσμα μπορεί να συσχετιστεί μονοσήμαντα με συγκεκριμένη χημική δομή και συγκεκριμένες υποθετικές πειραματικές συνθήκες.

Γ.8.7.1 Περιγραφή φάσματος MS/MS

Το δεύτερο τμήμα της εγγραφής MSP περιέχει το ίδιο το φάσμα MS/MS και ξεκινά με το πεδίο:

- **Num Peaks:** αριθμός των καταγεγραμμένων product ions.

Ακολουθεί λίστα γραμμών της μορφής:

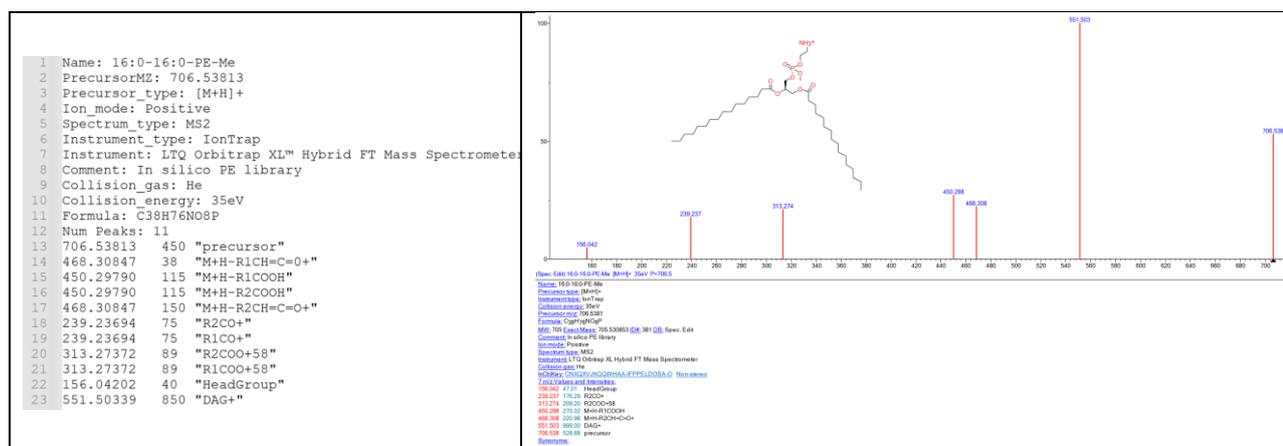
m/z_1 intensity_1

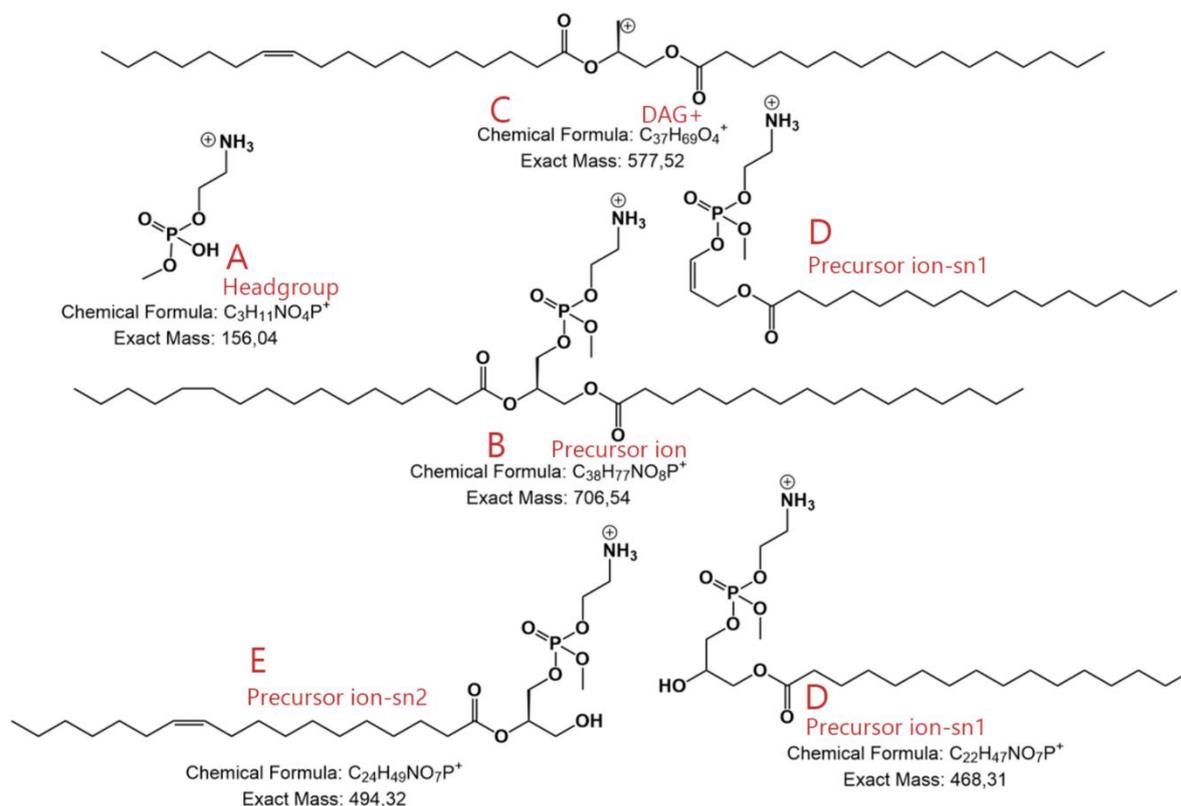
m/z_2 intensity_2

όπου κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα προϊόν ιόν. Στην *in silico* βιβλιοθήκη της παρούσας μελέτης, τα προϊόντα ιόντων που περιλαμβάνονται περιορίστηκαν σκόπιμα στα διαγνωστικά fragments, ώστε το φάσμα να λειτουργεί ως “δακτυλικό αποτύπωμα” της κατηγορίας φωσφολιπιδίων και όχι ως πλήρης αναπαράσταση όλων των πιθανών θραυσμάτων.

Οι εντάσεις αποδόθηκαν με σχετική κλίμακα, με σκοπό τη συμβατότητα με λογισμικά φασματικής αντιστοίχισης, χωρίς να επιχειρείται ποσοτική προσομοίωση πραγματικών MS/MS εντάσεων.

Πίνακας 11: Παράδειγμα εγγραφής MSP και του αντίστοιχου *in silico* παραγόμενου φάσματος MS/MS για την παραγωγοποιημένη phosphatidylethanolamine (16:0-16:0-PE-Me) σε θετικό ιοντισμό. Αριστερά παρουσιάζεται η δομή της εγγραφής MSP με τα δεδομένα (precursor m/z, adduct, συνθήκες θραυσματοποίησης και επιλεγμένα διαγνωστικά ιόντα), ενώ δεξιά απεικονίζεται το αντίστοιχο φάσμα MS/MS με χαρακτηριστικά θραύσματα, όπως η μεθυλιωμένη πολική κεφαλή και το ιόν DAG⁺ και προϊόντα από απώλειες ακυλομάδων, όπως ορίστηκαν από τους κανόνες *in silico* θραυσματοποίησης.





Εικόνα 57: Χαρακτηριστικά θραύσματα από MS/MS θραυσματοποίηση παραγωγοποιημένης 16:0–16:0–PE–Me σε θετικό ιοντισμό μετά από μεθυλίωση με TMS-diazomethane. Παρουσιάζονται το διαγνωστικό μεθυλιωμένο headgroup⁺ (A), το precursor ion (B), το ιόν diacylglycerol (DAG⁺)(C), καθώς και προϊόντα ιόντων που προκύπτουν από απώλειες ακυλομάδων και κετενίων από τις θέσεις sn-1 (D) και sn-2 (E), τα οποία ενσωματώθηκαν ως βασικά στοιχεία στους κανόνες *in silico* θραυσματοποίησης της κατηγορίας PE.

Γ.8.7.2 Πλεονεκτήματα του MSP format για *in silico* βιβλιοθήκες

Η επιλογή του MSP format προσφέρει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα στο πλαίσιο της *in silico* φασματικής βιβλιοθήκης:

- επιτρέπει αυτόματη παραγωγή φασμάτων από υπολογισμένα δεδομένα,
- είναι συμβατό με εργαλεία διαχείρισης βιβλιοθηκών (πχ NIST) και workflows αναγνώρισης,
- διατηρεί σαφή διάκριση μεταξύ διαφορετικών adducts και precursor ions,
- και εξασφαλίζει αναπαραγωγιμότητα, καθώς κάθε φάσμα μπορεί να ελεγχθεί σε επίπεδο απλού κειμένου.

Με τον τρόπο αυτό, η μετατροπή της βάσης δεδομένων σε αρχεία MSP αποτέλεσε το κρίσιμο ενδιάμεσο βήμα και μετέτρεψε την χημική πληροφορία σε λειτουργική *in silico* MS/MS βιβλιοθήκη, άμεσα αξιοποιήσιμη για φασματική αντιστοίχιση σε μη στοχευμένες αναλύσεις.

Γ.9 Ανάλυση δεδομένων με το Compound Discoverer 3.5

Γ.9.1 Λογισμικά και υπολογιστικά εργαλεία

Για την υλοποίηση της μη στοχευμένης γλυκεροφωσφολιπιδομικής ανάλυσης με την προσέγγιση που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία, απαιτήθηκε η συνδυασμένη χρήση εξειδικευμένων λογισμικών για την επεξεργασία των φασματομετρικών δεδομένων, διαχείριση φασματικών βιβλιοθηκών, δομική αναπαράσταση ενώσεων, χημειοπληροφορική επεξεργασία και οπτικοποίηση δεδομένων. Συγκεκριμένα, για την προετοιμασία και διαχείριση φασματικών βιβλιοθηκών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό NIST MS Search Demo 2017 (free version), ενώ η μετατροπή και η οργάνωση των βιβλιοθηκών πραγματοποιήθηκε μέσω του mzVault. Η κεντρική πλατφόρμα επεξεργασίας και ανάλυσης των δεδομένων ήταν το Compound Discoverer, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την αυτοματοποιημένη επεξεργασία μεγάλου batch δειγμάτων και την ενσωμάτωση βιβλιοθηκών, βάσεων δεδομένων και παραγόντων του πειραματικού σχεδιασμού.

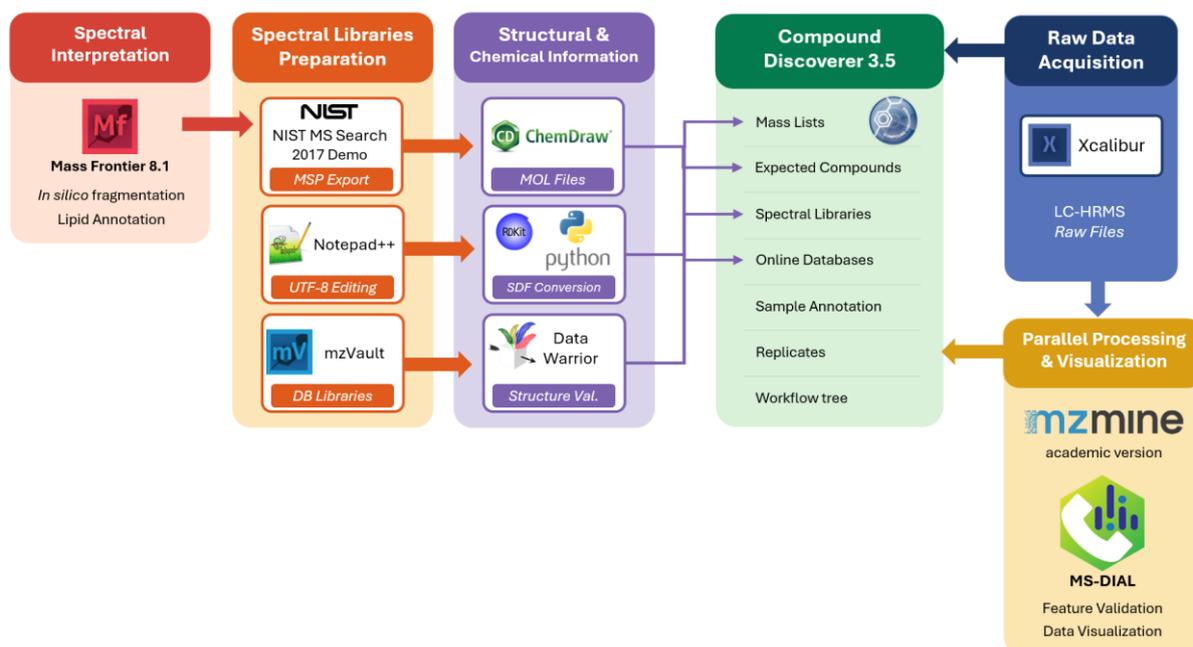
Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά MZmine (academic version), MS-DIAL και το Xcalibur 2.1, με έμφαση στην εξερεύνηση και οπτικοποίηση των raw αρχείων LC–HRMS. Για την ανάγνωση και επιβεβαίωση των δομικών αρχείων τύπου SDF χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό DataWarrior. Για τον έλεγχο και την επεξεργασία αρχείων κειμένου (π.χ. MSP, CSV, UTF-8 encoded αρχεία) αξιοποιήθηκε το Notepad++.

Επιπλέον, για την *in silico* θραυσματοποίηση χρησιμοποιήθηκε το Mass Frontier v8.1 (demo version), ενώ η δημιουργία και επεξεργασία μοριακών δομών σε μορφή MOL πραγματοποιήθηκε με το ChemDraw. Τέλος, για τη μαζική μετατροπή και επεξεργασία χημικών δεδομένων εφαρμόστηκαν υπολογιστικά εργαλεία βασισμένα στη γλώσσα προγραμματισμού Python, με χρήση της βιβλιοθήκης RDKit για εφαρμογές χημειοπληροφορικής, όπως η μετατροπή βιβλιοθηκών ενώσεων σε μορφή SDF και η διαχείριση δομικών ιδιοτήτων.

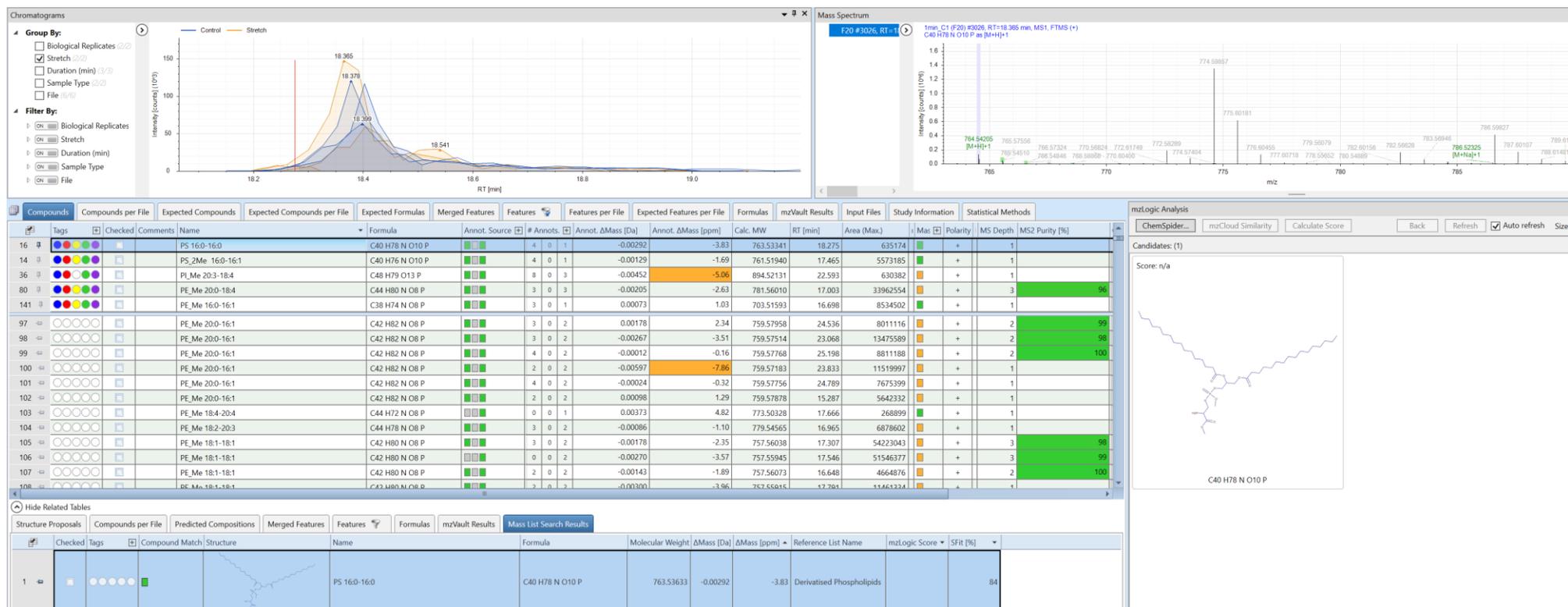
Γ.9.2 Επεξεργασία δεδομένων με το Compound Discoverer 3.5

Η επεξεργασία των δεδομένων, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 58**, της μη στοχευμένης γλυκεροφωσφολιπιδομικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Compound Discoverer v3.5 (Thermo Scientific), με κύριο στόχο την αυτοματοποιημένη επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκε η demo version όπου δίνεται δωρεάν από την ίδια την κατασκευάστρια εταιρία. Το Compound Discoverer επιτρέπει την ενιαία διαχείριση ενός ολοκληρωμένου pipeline, από την εισαγωγή raw δεδομένων έως την

εξαγωγή αποτελεσμάτων, αξιοποιώντας τοπικές βιβλιοθήκες και βάσεις δεδομένων, καθώς και online βιβλιοθήκες/βάσεις (π.χ. LIPID MAPS) και online φασματικές βιβλιοθήκες, με τρόπο που αυξάνει την αξιοπιστία της ταυτοποίησης, μειώνει την πιθανότητα χειροκίνητων σφαλμάτων και διασφαλίζει συγκρίσιμα αποτελέσματα σε όλα τα δείγματα του ίδιου πειραματικού σχεδιασμού.



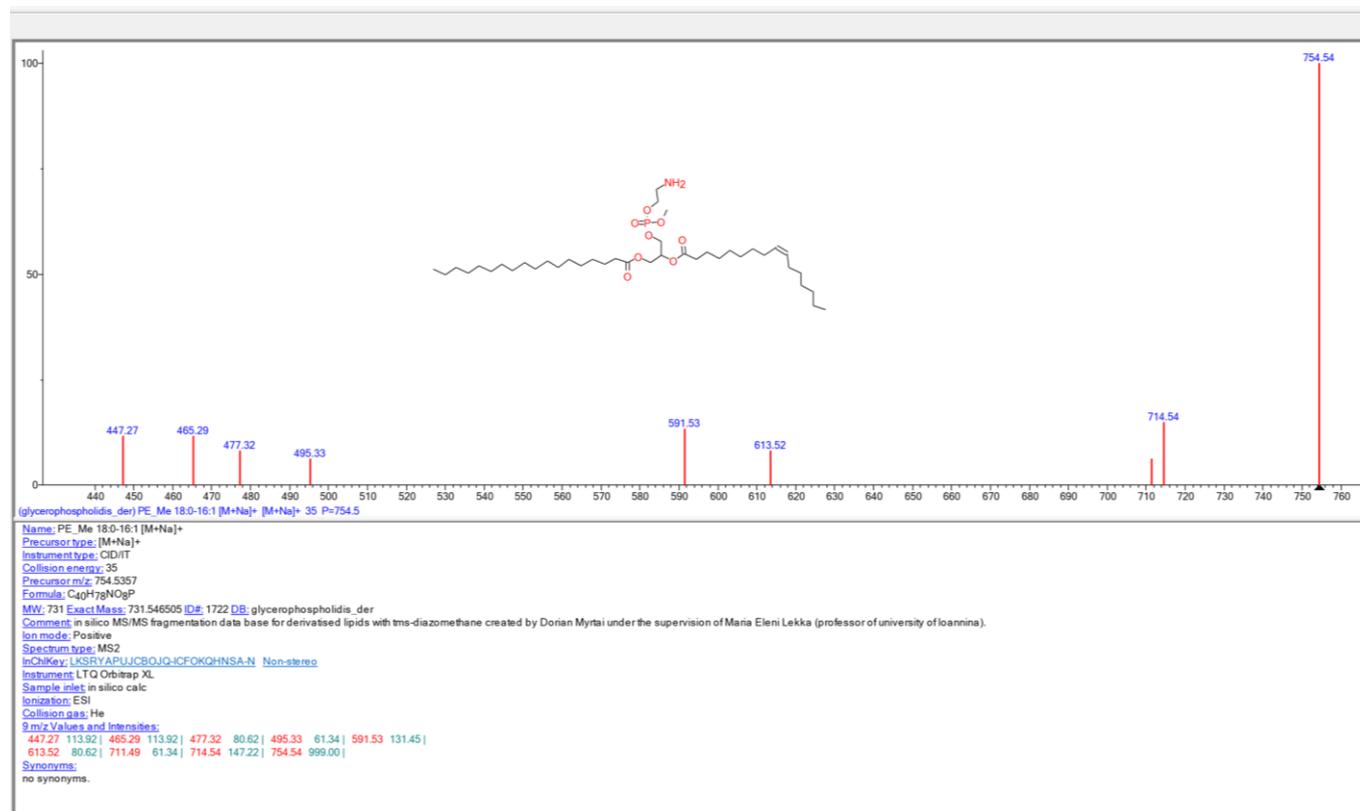
Εικόνα 58: Συνολικό διάγραμμα ροής (workflow) για την επεξεργασία και ερμηνεία δεδομένων LC-HRMS. Το workflow περιλαμβάνει τη συλλογή πρωτογενών δεδομένων μέσω του λογισμικού Xcalibur, την προετοιμασία των φασματικών βιβλιοθηκών από NIST και mzVault, τη δομική και χημική επεξεργασία πληροφοριών με τα λογισμικά ChemDraw, Python, DataWarrior και την ολοκληρωμένη ανάλυση, ταυτοποίηση και επεξήγηση (annotation) των ενώσεων μέσω του Compound Discoverer 3.5. Παράλληλα, εφαρμόζεται ανεξάρτητη επεξεργασία και οπτικοποίηση δεδομένων με τα λογισμικά MZmine και MS-DIAL, με σκοπό την επιβεβαίωση των χαρακτηριστικών (feature validation) και την ενίσχυση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 59: Παράδειγμα επεξεργασίας πραγματικών πειραματικών δεδομένων LC–HRMS μέσω του λογισμικού Compound Discoverer. Παρουσιάζονται φάσματα που προέρχονται από πολλαπλά δείγματα, συμπεριλαμβανομένου του χρωματογραφήματος εκχύλισης ιόντος (Extracted Ion Chromatogram – EIC), του αντίστοιχου φάσματος μάζας υψηλής ανάλυσης (MS), καθώς και του πίνακα ανιχνευμένων ενώσεων με τα εμβιά κορυφών, τις προβλεπόμενες στοιχειακές συνθέσεις και τις βαθμολογήσεις ταυτοποίησης. Τα δεδομένα προέρχονται από πραγματική πειραματική ανάλυση και έχουν υποστεί πλήρη επεξεργασία σύμφωνα με το custom workflow που φτιάξαμε.

Γ.9.2.1 Μετατροπή φασματικών βιβλιοθηκών (NIST → MSP → mzVault → DB)

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν οι τοπικές φασματικές βιβλιοθήκες προερχόμενες από τη βάση δεδομένων NIST, οι οποίες εξήχθησαν σε μορφή MSP. Η μορφή *.msp* αποτελεί τυποποιημένο format βιβλιοθηκών MS/MS, στο οποίο κάθε εγγραφή περιλαμβάνει μεταδεδομένα, όπως το όνομα της ένωσης, το precursor m/z, τα adducts, τις ενέργειες θραυσματοποίησης, τον σύστημα θραυσματοποίησης (CID, HCD, IT κ.α.) καθώς και τη λίστα των θραυσμάτων MS/MS (m/z–intensity).



Εικόνα 60: Παράδειγμα εγγραφής φασματικής βιβλιοθήκης που δημιουργήθηκε μέσω *in silico* fragmentation. Απεικονίζεται το θεωρητικό φάσμα MS/MS σε συνδυασμό με τη χημική δομή του φωσφολιπιδίου, όπως προέκυψε από υπολογιστική πρόβλεψη θραυσμάτων και χρησιμοποιήθηκε για την υποστήριξη της ταυτοποίησης σε *untargeted lipidomics* ανάλυση.

Για να καταστεί δυνατή η αξιοποίηση των βιβλιοθηκών αυτών από το Compound Discoverer, τα αρχεία *.msp* εισήχθησαν στο mzVault (Thermo Scientific) και οργανώθηκαν ως φασματικές βιβλιοθήκες εντός του mzVault. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετατροπή της βιβλιοθήκης στη μορφή *.db*, δηλαδή σε μορφή βάσης δεδομένων που είναι ευανάγνωστη και συμβατή με το περιβάλλον του Compound Discoverer. Με αυτόν τον τρόπο, οι NIST βιβλιοθήκες μετασηματίστηκαν από κείμενο MSP σε “λογισμικά βελτιστοποιημένη” βάση δεδομένων DB, με σκοπό την ταχύτερη αναζήτηση και σύγκριση φασμάτων.

Compound Discoverer 3.5.0.476

File Reporting Lists & Libraries Ardia Server View Window Help

Start Page X 1min_A1 X Compounds No Graphs A4 X Compounds No Graphs A4 X License Manager X Lists & Libraries X

New... Edit... Delete Import... Export All... Generate Inclusion List...

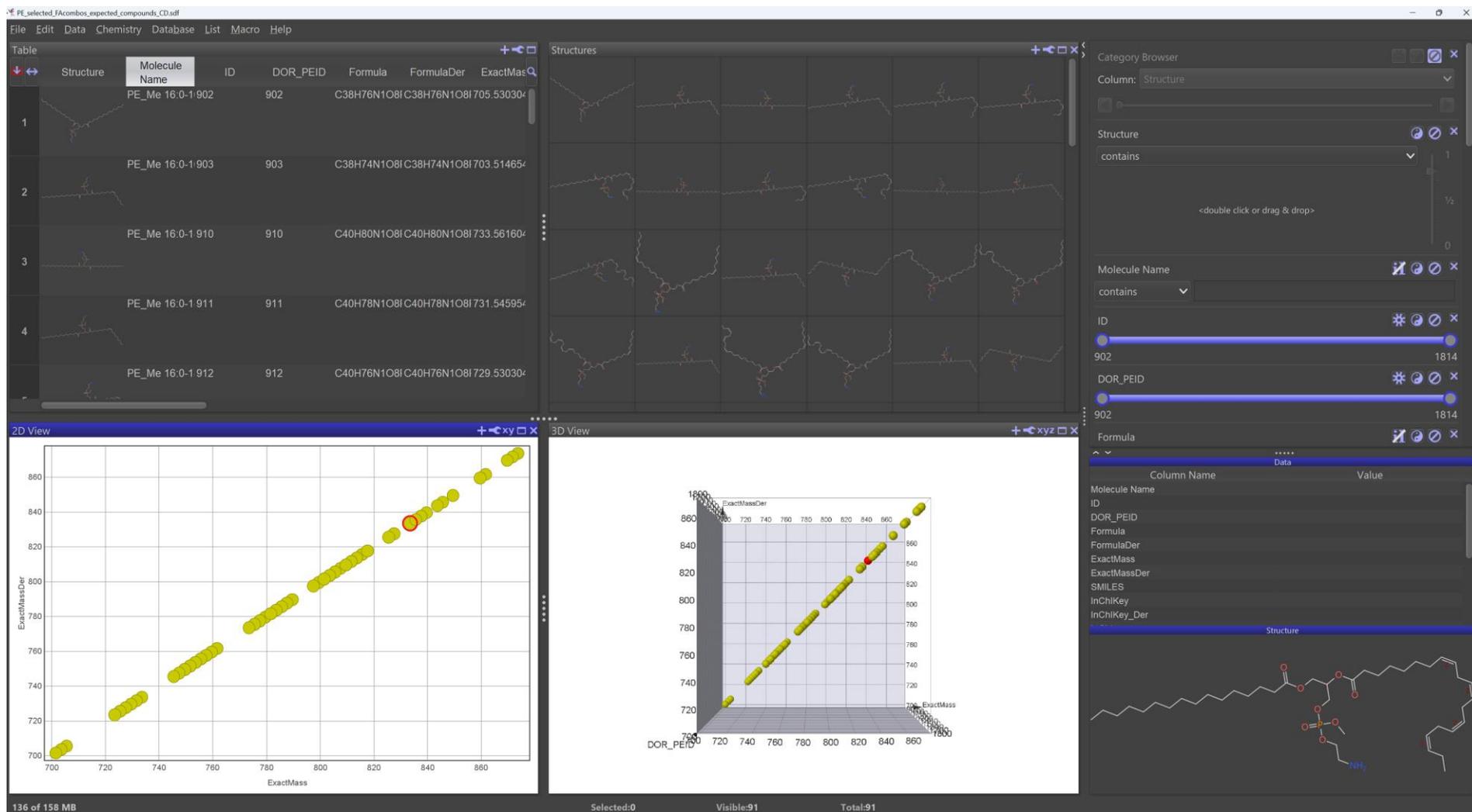
	Name	Description	Elemental Composition	Molecular Weight [Da]	Structure
112	PE_Me 18:0-22:6		C46 H80 N O8 P	805.56215	
113	PE_Me 18:1-18:1		C42 H80 N O8 P	757.56215	
114	PE_Me 18:1-18:2		C42 H78 N O8 P	755.54650	
115	PE_Me 18:1-18:3		C42 H76 N O8 P	753.53085	
116	PE_Me 18:1-18:4		C42 H74 N O8 P	751.51520	
117	PE_Me 18:1-20:3		C44 H80 N O8 P	781.56215	
118	PE_Me 18:1-20:4		C44 H78 N O8 P	779.54650	
119	PE_Me 18:1-22:1		C46 H88 N O8 P	813.62475	
120	PE_Me 18:1-22:6		C46 H78 N O8 P	803.54650	
121	PE_Me 18:2-18:2		C42 H76 N O8 P	753.53085	
122	PE_Me 18:2-18:3		C42 H74 N O8 P	751.51520	
123	PE_Me 18:2-18:4		C42 H72 N O8 P	749.49955	

Εικόνα 61: Παράδειγμα λίστας *Expected Compounds* στο *Compound Discoverer*, με ενσωματωμένες χημικές δομές φωσφολιπιδίων (SDF) που χρησιμοποιήθηκαν για την υποστήριξη της ταυτοποίησης στη μη στοχευμένη λιπιδωματική ανάλυση.

Γ.9.2.2 Μετατροπή δομικών πληροφοριών σε SDF αρχείο

Παράλληλα με την προετοιμασία των φασματικών βιβλιοθηκών, πραγματοποιήθηκε η μετατροπή των ενώσεων της βιβλιοθήκης σε δομική μορφή SDF (Structure Data File), ώστε να μπορεί το workflow να αξιοποιήσει χημικές δομές (όπου απαιτείται) στο node *Expected*

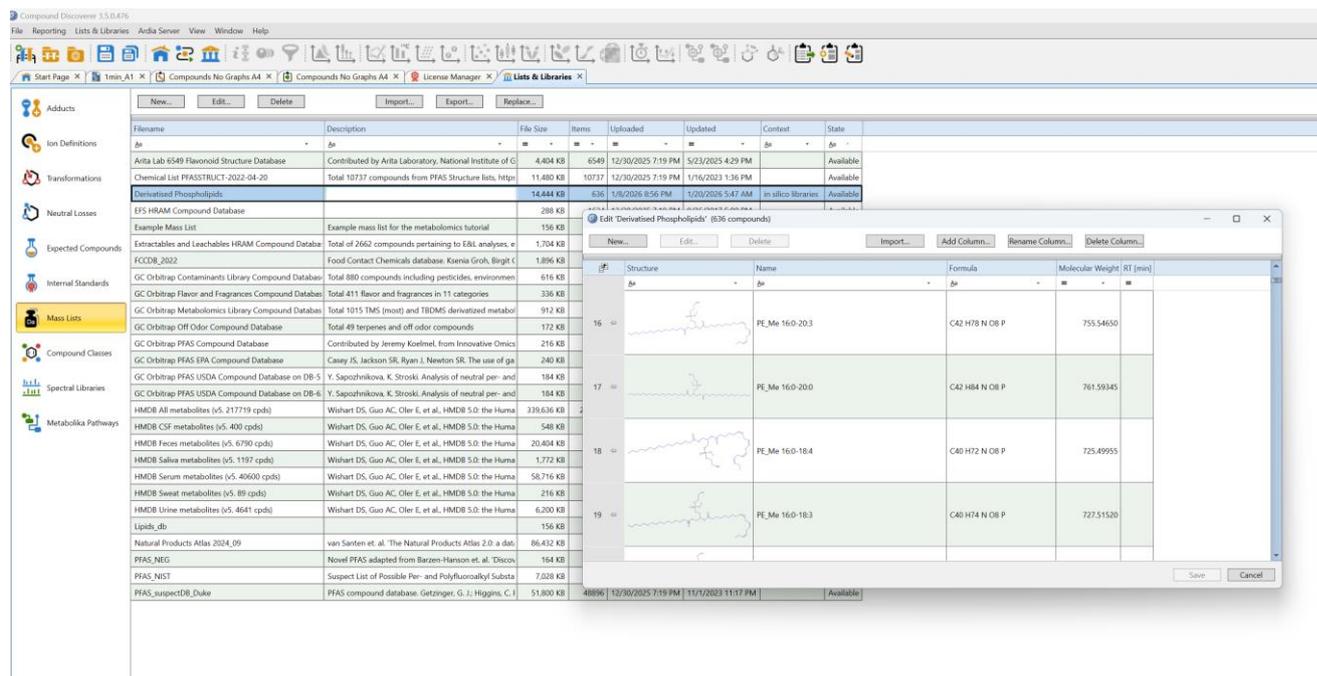
Compounds. Η μετατροπή έγινε με χρήση κώδικα στην γλώσσα Python και της χημειοπληροφορικής βιβλιοθήκης RDKit, η οποία επιτρέπει τη δημιουργία και διαχείριση μοριακών αναπαραστάσεων και την εξαγωγή τους σε αρχεία SDF. Η χρήση SDF επέτρεψε την ενσωμάτωση της δομής κάθε γλυκεροφωσfolιπιδίου στο αρχείο αναμενόμενων ενώσεων, ώστε το CD να μπορεί να το χρησιμοποιεί ως αναφορά κατά τα στάδια annotation/identification που βασίζονται σε expected lists.



Εικόνα 62: Έλεγχος και οπτικοποίηση SDF δομών φωσφολιπιδίων στο DataWarrior.

Γ.9.2.3 Εισαγωγή και διαχείριση βάσης δεδομένων στο Mass List

Στο περιβάλλον του Compound Discoverer, το σύνολο της βάσης δεδομένων των παραγωγισμένων γλυκεροφωσfolιπιδίων εισήχθη στο node Mass List, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως λίστα αναφοράς κατά την επεξεργασία και την απόδοση πιθανών ταυτοτήτων (suspects). Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει στον αλγόριθμο να συγκρίνει τα ανιχνευμένα features (κορυφές κτλ.) με προκαθορισμένες θεωρητικές αναμενόμενες τιμές, για τη καλύτερη αξιοποίηση μιας τοπικής βάσης στο πλαίσιο της μη στοχευμένης αναζήτησης.

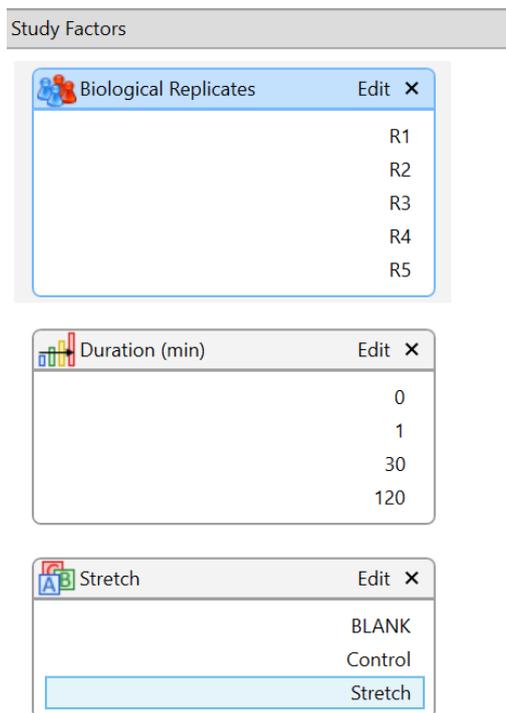


Εικόνα 63: Εισαγωγή και διαχείριση βάσεων δεδομένων φωσfolιπιδίων (Mass Lists / Expected Compounds) στο Compound Discoverer για υποστήριξη της μη στοχευμένης λιπιδιομικής ανάλυσης.

Στη συνέχεια, εισήχθησαν όλα τα raw αρχεία (LC–HRMS δεδομένα) στο project του Compound Discoverer και πραγματοποιήθηκε η οργάνωση των δειγμάτων σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 64**:

- καταχωρήθηκαν οι βιολογικές επαναλήψεις (independent experiments) και οι τεχνικές επαναλήψεις (replicate injections/measurements ανά βιολογική επανάληψη),
- ορίστηκε ο τύπος κάθε δείγματος ως control, blank ή standard, ώστε το λογισμικό να εφαρμόζει τη σωστή λογική χειρισμού ,
- καταχωρήθηκαν οι παράγοντες κατηγοριοποίησης (categorical factors) που περιγράφουν ομάδες/συνθήκες (π.χ. condition, sample type, batch όπου απαιτείται),

- καταχωρήθηκαν οι αριθμητικοί παράγοντες (numerical factors), όπως ο χρόνος εφαρμογής του stretch (π.χ. 0, 30, 120 min).



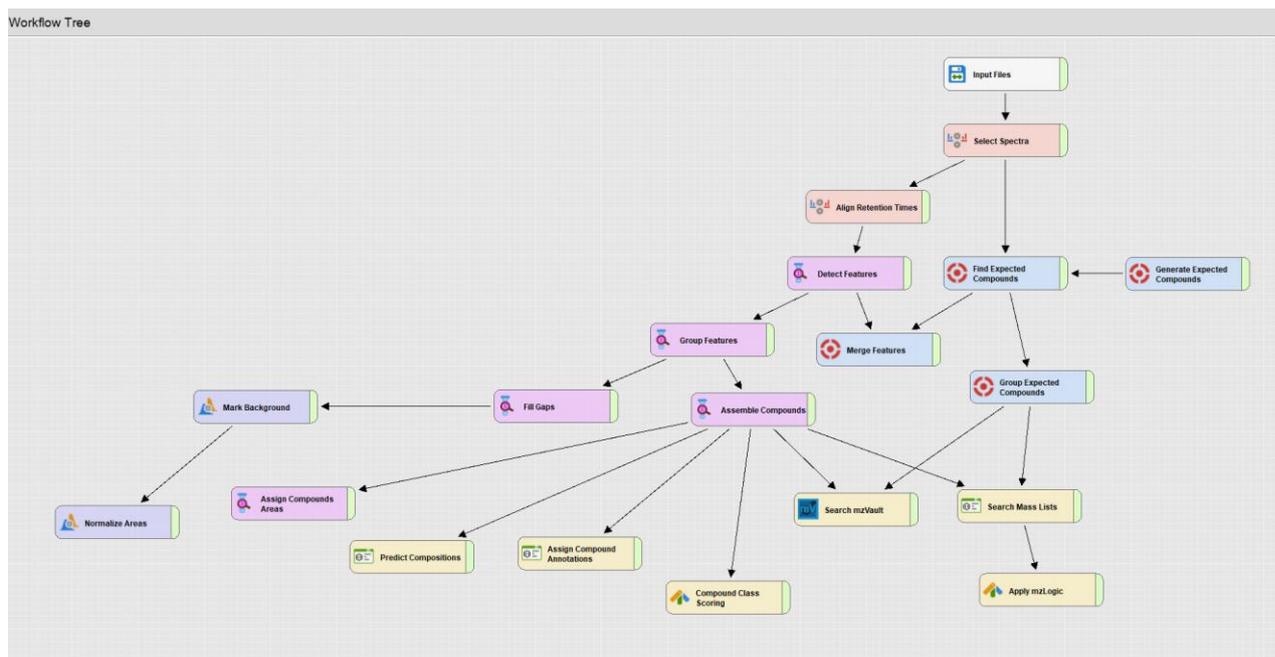
Εικόνα 64: Ορισμός πειραματικών παραγόντων στο Compound Discoverer, συμπεριλαμβανομένων βιολογικών επαναλήψεων, αριθμητικού παράγοντα χρόνου (duration) και κατηγοριοποίησης δειγμάτων (control, stretch, blank).

Γ.9.2.4 Δημιουργία και παραμετροποίηση workflow tree

Τέλος, δημιουργήθηκε και παραμετροποιήθηκε το workflow tree του Compound Discoverer ώστε να εκτελείται η επεξεργασία όπως απαιτείται για μη στοχευμένη γλυκεροφωσfolιπιδομική ανάλυση.

Γ.9.3 Αλγόριθμος CD - Workflow tree

Τα μη επεξεργασμένα (raw data) αρχεία LC–HRMS εισήχθησαν στο λογισμικό και εφαρμόστηκε επιλογή των φασμάτων (Select Spectra) όλων των δεδομένων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση των χρόνων κατακράτησης (Align Retention Times) μεταξύ όλων των δειγμάτων, προκειμένου να διορθωθούν μικρές μεταβολές στη χρωματογραφική συμπεριφορά και να καταστεί δυνατή η σύγκριση των χαρακτηριστικών μεταξύ των δειγμάτων.



Εικόνα 65: Διάγραμμα ροής μη στοχευμένης λιπιδωμικής ανάλυσης στο Compound Discoverer, που απεικονίζει τη διαδοχική ροή επεξεργασίας από την εισαγωγή των raw δεδομένων, την ανίχνευση και ομαδοποίηση χαρακτηριστικών (features), έως τη «συναρμολόγηση ενώσεων», την αναζήτηση σε φασματικές βιβλιοθήκες και βάσεις δεδομένων (mzVault, Mass Lists, Expected Compounds) και την τελική απόδοση ταυτοτήτων και (ημι)ποσοτικών πληροφοριών.

Το επόμενο στάδιο αφορούσε την ανίχνευση χαρακτηριστικών (Detect Features), κατά την οποία αναγνωρίστηκαν ιοντικά σήματα βάσει του m/z και του χρόνου κατακράτησης. Τα ανιχνευμένα features ομαδοποιήθηκαν (Group Features) και συγχωνεύθηκαν (Merge Features), ώστε να αντιπροσωπεύουν κοινές ενώσεις που εμφανίζονται σε διαφορετικά δείγματα. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε «συναρμολόγηση» ενώσεων (Assemble Compounds), με σκοπό τη σύνδεση των επιμέρους ιοντικών μορφών (π.χ. διαφορετικά adducts) στην ίδια χημική οντότητα.

Για τη βελτίωση της πληρότητας του dataset εφαρμόστηκε συμπλήρωση κενών τιμών (Fill Gaps), ενώ τα σήματα φόντου επισημάνθηκαν μέσω της χρήσης blank δειγμάτων (Mark Background), επιτρέποντας τον διαχωρισμό πραγματικών βιολογικών σημάτων από πιθανές επιμολύνσεις ή θόρυβο. Η ημιποσοτικοποίηση των ενώσεων βασίστηκε στα εμβαδά των κορυφών (Assign Compound Areas), ενώ στη συνέχεια εφαρμόστηκε κανονικοποίηση των δεδομένων (Normalize Areas) για τη μείωση τεχνικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας 12: Αναλυτική περιγραφή των nodes απο το διάγραμμα ροής του CD

Node (Κόμβος)	Λειτουργία / Περιγραφή
Input Files	Εισαγωγή των ακατέργαστων αρχείων δεδομένων (.raw) από το LC-HRMS
Select Spectra	Επιλογή και φιλτράρισμα των φασμάτων MS1 και MS2 βάσει προκαθορισμένων κριτηρίων.
Align Retention Times	Χρωματογραφική ευθυγράμμιση των χρόνων κατακράτησης μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων.
Detect Features	Ανίχνευση σημάτων (peaks) που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες τιμές m/z και έντασης.
Group Features	Ομαδοποίηση σημάτων που προέρχονται από την ίδια ουσία (π.χ. ισότοπα, adducts όπως [M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺).
Fill Gaps	Αυτόματη συμπλήρωση κενών τιμών στα δείγματα όπου μια ένωση δεν ανιχνεύθηκε αρχικά, για αξιόπιστη στατιστική.
Generate Expected Compounds	Θεωρητική πρόβλεψη πιθανών ενώσεων ή μεταβολιτών βάσει χημικών κανόνων.
Find Expected Compounds	Στοχευμένη αναζήτηση των προβλεπόμενων ενώσεων στα πειραματικά δεδομένα.
Merge / Group Expected Compounds	Συγχώνευση των αποτελεσμάτων της στοχευμένης αναζήτησης με τα γενικά ανιχνευμένα features.
Assemble Compounds	Τελική σύνθεση όλων των πληροφοριών (m/z, RT, θραύσματα) σε μία ενιαία χημική οντότητα.
Search mzVault	Ταυτοποίηση μέσω σύγκρισης των πειραματικών φασμάτων MS2 με τη φασματική βιβλιοθήκη mzVault.
Search Mass Lists	Σύγκριση των μαζών που ανιχνεύθηκαν με προσαρμοσμένες λίστες γνωστών ενώσεων (custom mass lists).
Predict Compositions	Υπολογισμός και πρόβλεψη του πιθανού μοριακού τύπου (formula) βάσει ακριβούς μάζας.
Assign Compound Annotations	Απόδοση ονόματος και χημικής δομής στις ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς.
Compound Class Scoring	Κατάταξη των ενώσεων σε χημικές τάξεις (π.χ. λιπίδια) βάσει δομικών μοτίβων.
Apply mzLogic	Χρήση αλγορίθμων για την ιεράρχηση των πιθανών δομών βάσει του MS2 fragmentation.
Mark Background	Σήμανση των ενώσεων που εντοπίζονται στα δείγματα ελέγχου (blanks) ως θόρυβος υποβάθρου.
Normalize Areas	Κανονικοποίηση των εμβαδών των κορυφών για τη διόρθωση πειραματικών διακυμάνσεων.
Assign Compounds Areas	Τελικός υπολογισμός της ημι-ποσοτικής αφθονίας (peak area) της κάθε ένωσης για στατιστική ανάλυση.

Γ.9.3.1 Σχολιασμός και ταυτοποίηση ενώσεων

Η ταυτοποίηση των ανιχνευμένων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό διαφορετικών προσεγγίσεων. Αρχικά, προβλέφθηκαν στοιχειακές συνθέσεις (Predict Compositions) βάσει ακριβούς μάζας και ισοτοπικού μοτίβου. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων και λίστες μαζών (Search mzVault, Search Mass Lists),

καθώς και αντιστοίχιση με αναμενόμενες ενώσεις (Find / Generate Expected Compounds), όπου ήταν διαθέσιμες.

Οι ενώσεις επεξηγήθηκαν (annotated) περαιτέρω μέσω ανάθεσης χημικών κατηγοριών (Compound Class Scoring) και εφαρμόστηκαν φίλτρα «λογικής» (Apply rule logic), ώστε να διατηρηθούν οι πιο αξιόπιστες ταυτοποιήσεις. Οι ταυτοποιήσεις που προέκυψαν στο πλαίσιο της μη στοχευμένης ανάλυσης θεωρούνται putative annotations, καθώς βασίζονται σε συνδυασμό ακριβούς μάζας, MS/MS φασμάτων και βιβλιοθηκών, χωρίς επιβεβαίωση από πρότυπες χημικές ενώσεις.

Γ.9.3.2 Πειραματικός σχεδιασμός και Study Factors

Ο πειραματικός σχεδιασμός ενσωματώθηκε στο διάγραμμα ροής μέσω της χρήσης των παραγόντων ανάλυσης (study factors), τα οποία επέτρεψαν τη συστηματική οργάνωση και στατιστική αξιολόγηση των δεδομένων. Ως βιολογικές επαναλήψεις ορίστηκαν πέντε ανεξάρτητα replicates (R1–R5), αντιπροσωπεύοντας ανεξάρτητες πειραματικές επαναλήψεις.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ο αριθμητικός παράγοντας που υποδηλώνει την διάρκεια του stretch (Duration, σε λεπτά) με επίπεδα 0, 1, 30 και 120 min, καθώς και ο παράγοντας που αφορούσε τη συνθήκη Stretch (Control, Stretch, Blank). Η ενσωμάτωση των παραγόντων αυτών επέτρεψε τη σύγκριση των προφίλ τόσο μεταξύ διαφορετικών χρονικών σημείων όσο και μεταξύ συνθηκών ελέγχου και μηχανικής καταπόνησης.

Γ.9.3.3 Σχόλιο

Το συγκεκριμένο διάγραμμα ροής εξασφάλισε την αναπαραγωγή και συστηματική επεξεργασία μεγάλου όγκου δεδομένων μη στοχευμένης γλυκεροφωσφολιπιδιομικής ανάλυσης. Παρότι η προσέγγιση αυτή δεν παρέχει την απόλυτη επιβεβαίωση ταυτότητας για όλες τις ενώσεις, επιτρέπει την αξιόπιστη ανάδειξη τάσεων, διαφορών μεταξύ συνθηκών και χρονικά εξαρτώμενων μεταβολών στο φωσφολιπιδικό προφίλ, οι οποίες αποτελούν το κύριο αντικείμενο της παρούσας μελέτης.

Γ.10 Αποτελέσματα LC-HRMS (LTQ Orbitrap XL)

Η ανάλυση LC-HRMS με το LTQ Orbitrap XL παρείχε μεγάλο όγκο δεδομένων για τη μη στοχευμένη φωσφολιπιδιομική διερεύνηση των δειγμάτων, επιτρέποντας την ανίχνευση, ταυτοποίηση και συγκριτική αξιολόγηση λιπιδικών χαρακτηριστικών μεταξύ των διαφορετικών χρονικών συνθηκών μηχανικής καταπόνησης. Η υψηλή φασματική ακρίβεια 5

δεκαδικών και η αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων κατέστησαν δυνατή τη διερεύνηση μεταβολών στο λιπιδικό προφίλ ως συνάρτηση του χρόνου έκθεσης, με τα δείγματα ελέγχου (0 min) να λειτουργούν ως σημείο αναφοράς.

Η μη στοχευμένη λιπιδομική ανάλυση πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 58 δείγματα. Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε samples, που αφορούν τα ομογενοποιημένα κυττάρων A549 τα οποία υποβλήθηκαν σε μηχανική διάταση για χρονικές διάρκειες του 1 λεπτού, 30λεπτών και 120 λεπτών, τα control δείγματα τα οποία αφορούν τα πραγματικά δείγματα χωρίς να έχουν υποστεί μηχανική διάταση, και τέλος, τα δείγματα blank τα οποία είναι ουσιαστικά «κενά» δείγματα που έχουν περάσει τα ίδια στάδια με τα πραγματικά δείγματα χωρίς την ύπαρξη των κυττάρων.

Sample	File	Sample Identifier	Sample Type	Biological Rep	Stretch	Duration (min)
S1	F1	1min_A1	Sample	R1	Stretch	1
S2	F2	1min_A2	Sample	R1	Stretch	1
S3	F3	1min_A3	Sample	R1	Stretch	1
S4	F4	30min_A1	Sample	R1	Stretch	30
S5	F5	30min_A2	Sample	R1	Stretch	30
S6	F6	120min_A1	Sample	R1	Stretch	120
S7	F7	1min_B1	Sample	R2	Stretch	1
S8	F8	1min_B2.raw	Sample	R2	Stretch	1
S9	F9	30min_B1.raw	Sample	R2	Stretch	30
S10	F10	120min_B1.raw	Sample	R2	Stretch	120
S11	F11	120min_B2.raw	Sample	R2	Stretch	120
S12	F12	Blank_B1	Blank	R1	BLANK	0
S13	F13	Blank_B2	Blank	R1	BLANK	0
S20	F20	1min_C1	Sample	R3	Stretch	1
S21	F21	1min_C2.raw	Sample	R3	Stretch	1
S22	F22	30min_C1.raw	Sample	R3	Stretch	30
S23	F23	30min_C2.raw.raw	Sample	R3	Stretch	30
S24	F24	120min_C1.raw.raw	Sample	R3	Stretch	120
S25	F25	120min_C2.raw.raw	Sample	R3	Stretch	120
S26	F26	Blank_C1	Blank	R3	BLANK	0
S27	F27	Blank_C2.raw	Blank	R3	BLANK	0
S28	F28	Blank_C3.raw	Blank	R3	BLANK	0
S29	F29	Blank_C4.raw	Blank	R3	n/a	n/a
S30	F30	Blank_C5.raw	Blank	R3	n/a	n/a
S31	F31	Blank_C6.raw	Blank	R3	n/a	n/a
S32	F32	Blank_C7.raw	Blank	R3	n/a	n/a
S33	F33	Control_C1	Control	R3	Control	0
S34	F34	Control_C2.raw	Control	R3	Control	0
S35	F35	Control_C3	Control	R3	Control	0
S37	F37	N1	Sample	R2	Stretch	30
S40	F40	120min_D4	Sample	R4	Stretch	120
S41	F41	1min_D1	Sample	R4	Stretch	1
S42	F42	1min_D2	Sample	R4	Stretch	1
S43	F43	1min_D3	Sample	R4	Stretch	1
S44	F44	30min_D1	Sample	R4	Stretch	30
S45	F45	30min_D2	Sample	R4	Stretch	30
S46	F46	30min_D3	Sample	R4	Stretch	30
S47	F47	120min_D1	Sample	R4	Stretch	120
S48	F48	120min_D2	Sample	R4	Stretch	120
S49	F49	120min_D3	Sample	R4	Stretch	120
S50	F50	Control_D1	Control	R4	Control	0
S51	F51	Control_D2	Control	R4	Control	0
S52	F52	1min_E1	Sample	R5	Stretch	1
S53	F53	1min_E2	Sample	R5	Stretch	1
S54	F54	30min_E1	Sample	R5	Stretch	30
S55	F55	30min_E2	Sample	R5		30
S56	F56	120min_E1	Sample	R5	Stretch	120
S57	F57	120min_E2	Sample	R5	Stretch	120
S58	F58	Control_E1	Control	R5	Control	0

Εικόνα 66: Κατάλογος δειγμάτων που αναλύθηκαν στη μη στοχευμένη λιπιδωματική ανάλυση με το λογισμικό Compound Discoverer. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν με βάση τον τύπο του δείγματος (Sample, Control, Blank), τη βιολογική επανάληψη (R1–R5), τη συνθήκη μηχανικής καταπόνησης (Stretch) και τη διάρκεια έκθεσης (0, 1, 30 και 120 min). Το Sample Identifier αποτελεί μοναδικό αναγνωριστικό κάθε δείγματος και κωδικοποιεί τη χρονική διάρκεια της καταπόνησης, τη βιολογική και τεχνική επανάληψη. Τα γράμματα A–E αντιστοιχούν σε πέντε διαφορετικές ημέρες πραγματοποίησης των πειραμάτων, ενώ οι αριθμοί που ακολουθούν (π.χ. A1, A2, A3) αντιπροσωπεύουν τις τεχνικές επαναλήψεις της ίδιας πειραματικής συνθήκης. Τα δείγματα ελέγχου και τα κενά αντιστοιχούν σε συνθήκες χωρίς μηχανική καταπόνηση (0 min), επιτρέποντας τη συγκριτική αξιολόγηση της επίδρασης του χρόνου διάτασης στο φωσφολιπιδικό προφίλ των κυττάρων A549.

Πραγματοποιήθηκαν πέντε βιολογικά ανεξάρτητες επαναλήψεις, με κάθε δείγμα να αναλύεται σε διπλές ή τριπλές τεχνικές επαναλήψεις. Για κάθε βιολογική επανάληψη συλλέχθηκαν πολλαπλά δείγματα ανά χρονική συνθήκη, γεγονός που επέτρεψε τη σύγκριση του φωσφολιπιδικών προφίλ μεταξύ συνθηκών και την εκτίμηση της βιολογικής μεταβλητότητας. Τα δείγματα ελέγχου (Control, 0 min) χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο

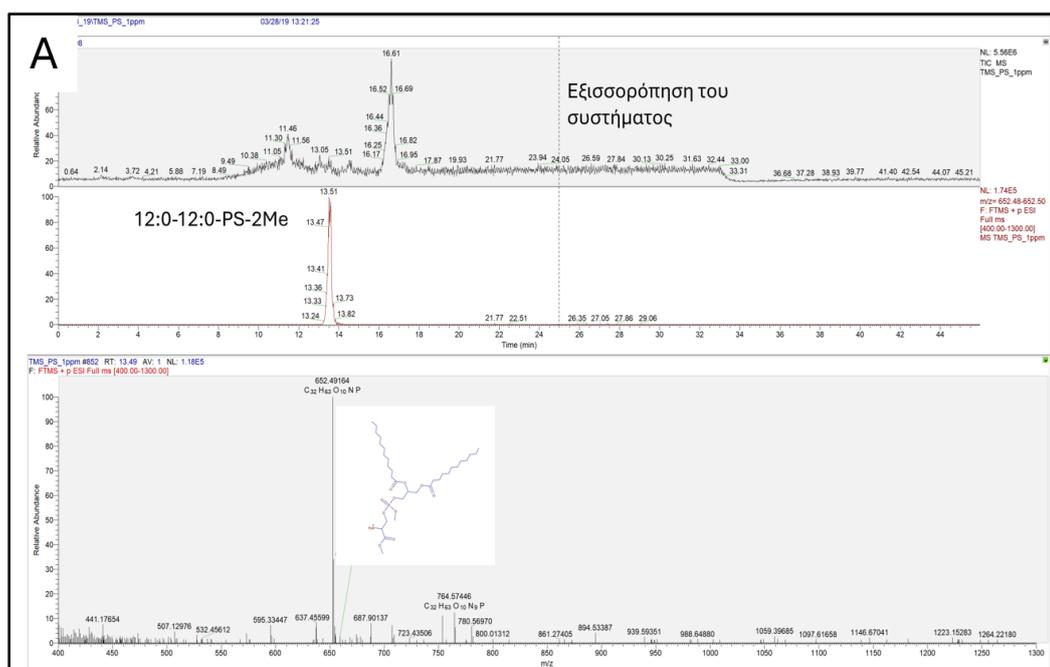
αναφοράς, ενώ τα κενά δείγματα (Blank) χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο υποβάθρου και πιθανών επιμολύνσεων.

Γ.10.1 Αποτελέσματα από LC-HRMS σε λειτουργία Full Scan – MS¹

Η λιπιδομική ανάλυση μέσω LC-HRMS παρέχει ολοκληρωμένα δεδομένα για τη διερεύνηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς και των φασματικών χαρακτηριστικών των φωσφολιπιδικών ενώσεων. Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται και συζητούνται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη λειτουργία Full Scan (MS¹), με έμφαση στην ανίχνευση των πρόδρομων ιόντων (precursor ions) των πρότυπων φωσφολιπιδικών ενώσεων με χρήση αναλυτή Orbitrap.

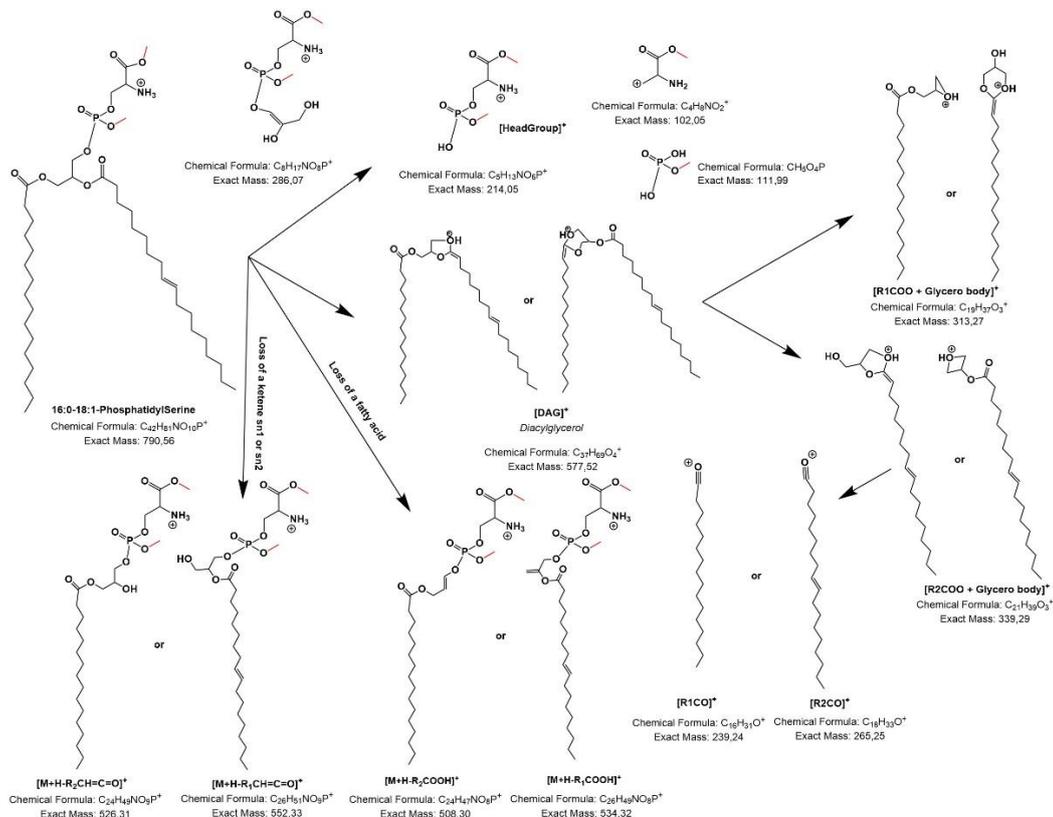
Γ.10.1.1 Πρότυπο φωσφατιδυλοσερίνης 12:0-12:0-PS-2Me

Το πρότυπο διμεθυλιωμένης φωσφατιδυλοσερίνης PS-2Me (12:0–12:0) αναλύθηκε με LC-HRMS, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 67**, σε λειτουργία Full Scan (MS¹), με στόχο την αξιολόγηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς και της φασματικής απόκρισης του πρόδρομου ιόντος. Το χρωματογράφημα Full Scan παρουσιάζει σαφή κορυφή κατά τον αναμενόμενο χρόνο κατακράτησης, ενώ μετά τα 25 min εφαρμόστηκε φάση εξισορρόπησης του συστήματος, προκειμένου να εκλουστούν τυχόν ενώσεις που παρέμεναν προσροφημένες στη χρωματογραφική στήλη.



Εικόνα 67: Ανάλυση LCMS του προτύπου διμεθυλιωμένης φωσφατιδυλοσερίνης PS-2Me (12:0–12:0) σε λειτουργία Full Scan (MS¹). Στο πάνω μέρος της εικόνας βλέπουμε το ολικό χρωματογράφημα, από κάτω το XIC (extracted ion chromatograph),

όπου παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή της πρότυπης ένωσης. Στο κάτω μέρος της εικόνας βλέπουμε το φάσμα μάζας MS¹, στο οποίο ανιχνεύεται το πρόδρομο ιόν (precursor ion) του PS-2Me με σαφή φασματική απόκριση και με m/z 652.49154, επιβεβαιώνοντας τη μοριακή ταυτότητα της ένωσης. Μετά τα 25 min εφαρμόστηκε φάση εξισορρόπησης του συστήματος, με στόχο την έκλυση ενώσεων που ενδεχομένως παρέμεναν προσροφημένες στη χρωματογραφική στήλη



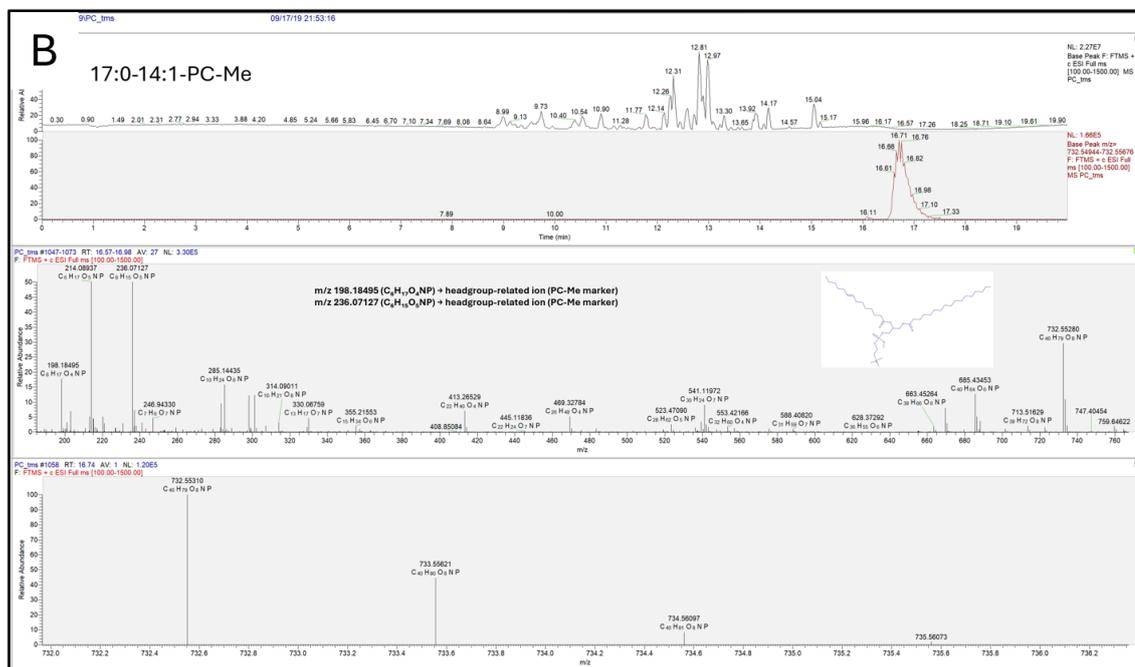
Εικόνα 68: Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης της διμεθυλιωμένης φωσφατιδυλοσερίνης PS-2Me, με απεικόνιση των κύριων διαγνωστικών θραυσμάτων που προκύπτουν από απώλειες της μεθυλιωμένης πολικής κεφαλής, της γλυκερολικής ραχοκοκαλιάς και των λιπαρών αλυσίδων.

Το πρότυπο PS 12:0–12:0-2Me εκλούστηκε σε σχετικά πρώιμο χρόνο κατακράτησης (~13.5 min), γεγονός που αντικατοπτρίζει τη χαμηλότερη υδροφοβικότητα της ένωσης λόγω του μικρού μήκους των λιπαρών αλυσίδων. Παρατηρείται σαφής και καλά ορισμένη χρωματογραφική κορυφή, υποδεικνύοντας σταθερή και αναπαραγωγίμη χρωματογραφική συμπεριφορά. Το MS φάσμα εμφανίζει έντονο precursor ion επιβεβαιώνοντας την φασματική απόκριση του προτύπου.

Γ.10.1.2 Πρότυπο φωσφατιδυλοχολίνης 17:0-14:1-PC-Me

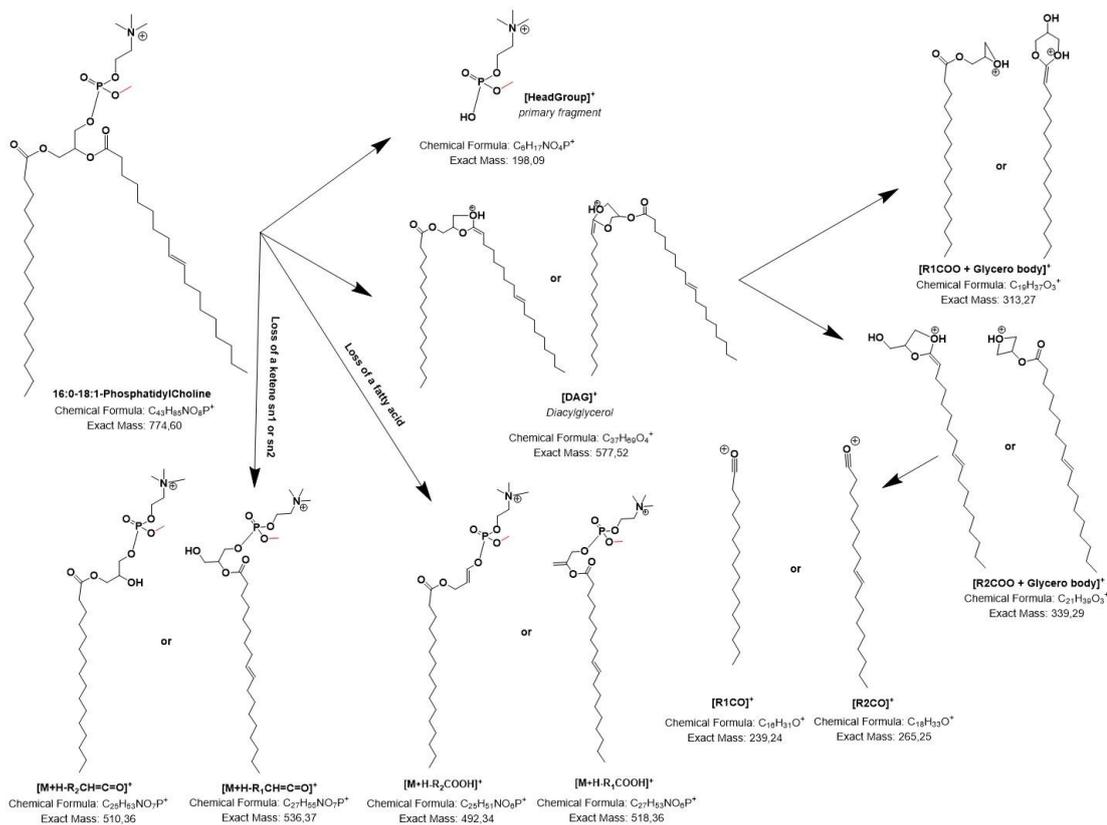
Το πρότυπο μεθυλιωμένης φωσφατιδυλοχολίνης PC-Me (17:0–14:1) αναλύθηκε με LC-HRMS, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 69**, προκειμένου να διερευνηθεί η χρωματογραφική συμπεριφορά και η φασματική απόκριση του πρόδρομου ιόντος. Το χρωματογράφημα Full Scan (MS¹) παρουσιάζει σαφή κορυφή στον αναμενόμενο χρόνο κατακράτησης, χωρίς σημαντικές παρεμβολές από συγχρονιζόμενα σήματα, γεγονός που υποδηλώνει αποτελεσματικό χρωματογραφικό διαχωρισμό της ένωσης υπό τις εφαρμοζόμενες συνθήκες

ανάλυσης. Η σταθερότητα του σήματος στο χρονικό εύρος έκλουσης επιβεβαιώνει την αναπαραγωγιμότητα της απόκρισης του προτύπου.



Εικόνα 69: LC-HRMS ανάλυση του πρότυπου μεθυλιωμένης φωσφατιδυλοχολίνης PC-Me (17:0–14:1). Στην εικόνα παρουσιάζεται το χρωματογράφημα Full Scan (MS¹), όπου παρατηρείται σαφής κορυφή στον αναμενόμενο χρόνο κατακράτησης. Στο φάσμα MS¹ διακρίνεται ισοτοπικό πρότυπο συμβατό με τη θεωρητική ισοτοπική κατανομή της ένωσης. Στο φάσμα εμφανίζεται χαρακτηριστικά το διαγνωστικό θραύσμα της φωσφατιδυλοχολίνης, η μεθυλιωμένη πολική κεφαλή στα m/z 198 (native PC headgroup m/z 184 + 14 Da λόγω μεθυλίωσης), επιβεβαιώνοντας τη δομική ταυτότητα του PC-Me (17:0–14:1).

Η ταυτοποίηση του PC-Me (17:0–14:1) υποστηρίζεται συνδυαστικά από τα δεδομένα του Full Scan και το ισοτοπικό μοτίβο. Στο MS¹ παρατηρείται ισοτοπικό μοτίβο (isotopic pattern) συμβατό με τη θεωρητική ισοτοπική κατανομή της ένωσης, ενισχύοντας την αντιστοίχιση της μοριακής σύστασης. Επιπλέον, στο φάσμα κατακερματισμού (MS/MS) ανιχνεύεται το χαρακτηριστικό ιόν της μεθυλιωμένης πολικής κεφαλής της PC στα m/z 198, το οποίο αντιστοιχεί στο κλασικό διαγνωστικό ιόν της φωσφατιδυλοχολίνης (m/z 184) με μετατόπιση +14 Da λόγω μεθυλίωσης. Η ταυτόχρονη παρουσία του ισοτοπικού προτύπου, του πρόδρομου ιόντος και του διαγνωστικού headgroup fragment στα m/z 198 επιβεβαιώνει τη δομική ταυτότητα της μεθυλιωμένης PC και καθιστά το πρότυπο ισχυρό σημείο αναφοράς για τη σύγκριση με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά στα βιολογικά δείγματα.



Εικόνα 70: Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης της μεθυλιωμένης φωσφατιδυλοχολίνης PC-Me. Απεικονίζονται τα κύρια μονοπάτια θραυσματοποίησης του πρόδρομου ιόντος, συμπεριλαμβανομένου του διαγνωστικού θραύσματος της μεθυλιωμένης πολικής κεφαλής στο m/z 198, καθώς και θραυσμάτων που προκύπτουν από απώλειες λιπαρών αλυσίδων, σχηματισμό DAG και ιόντων σχετιζόμενων με το κορμό γλυκερόλης.

Το πρότυπο PC-Me εκλούστηκε στα ~16.7 min, εντός της περιοχής όπου συγκεντρώνεται η πλειονότητα των PC ενώσεων στην μη στοχευμένη ανάλυση. Το φάσμα μάζας χαρακτηρίζεται από την παρουσία διαγνωστικών headgroup-related ιόντων (π.χ. m/z ~198), τα οποία αποτελούν τυπικούς δείκτες της μεθυλιωμένης φωσφοχολίνης.

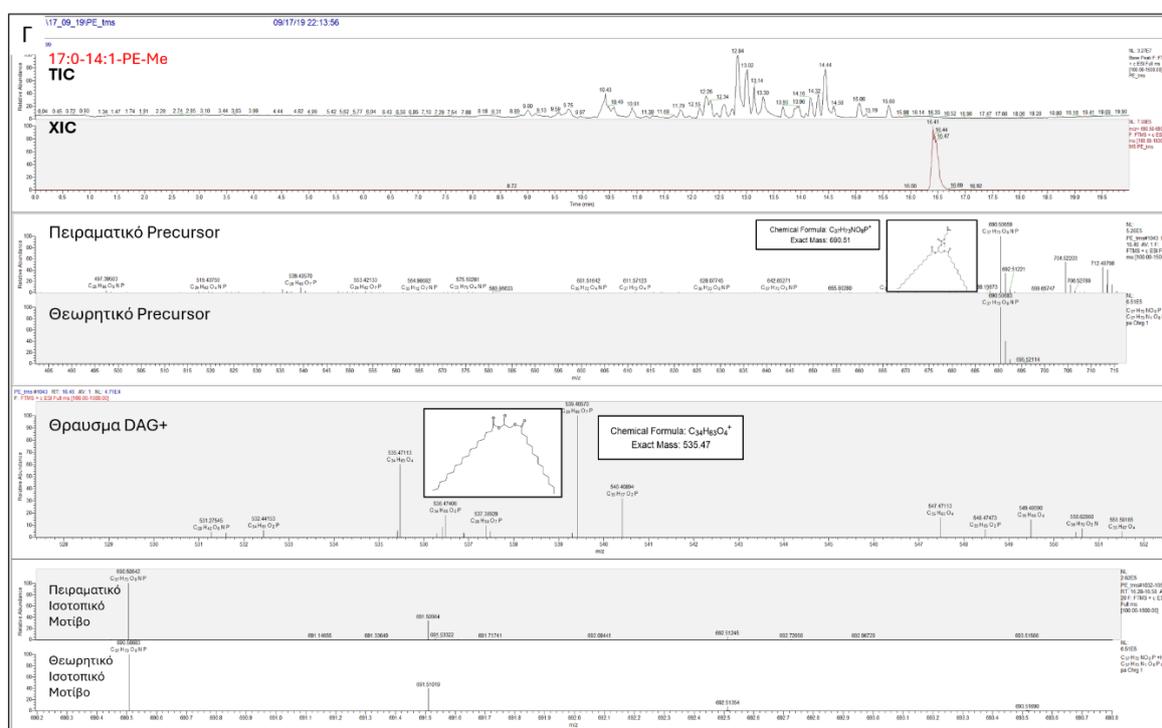
Γ.10.1.3 Πρότυπο φωσφατιδυλαιθανολαμίνης 17:0-14:1-PE-Me

Το πρότυπο της μεθυλιωμένης φωσφατιδυλαιθανολαμίνης PE-Me (17:0–14:1) αναλύθηκε με LC-HRMS, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 71** σε θετικό ιοντισμό, με σκοπό να διερευνηθεί η χρωματογραφική του συμπεριφορά και η φασματική απόκριση του πρόδρομου ιόντος. Στο εξαγόμενο ιοντικό χρωματογράφημα (XIC) του πρόδρομου ιόντος εμφανίζεται σαφής και διαχωρισμένη κορυφή στον χρόνο κατακράτησης ~16.4 min, επιβεβαιώνοντας την έκλυση της ένωσης από τη χρωματογραφική στήλη.

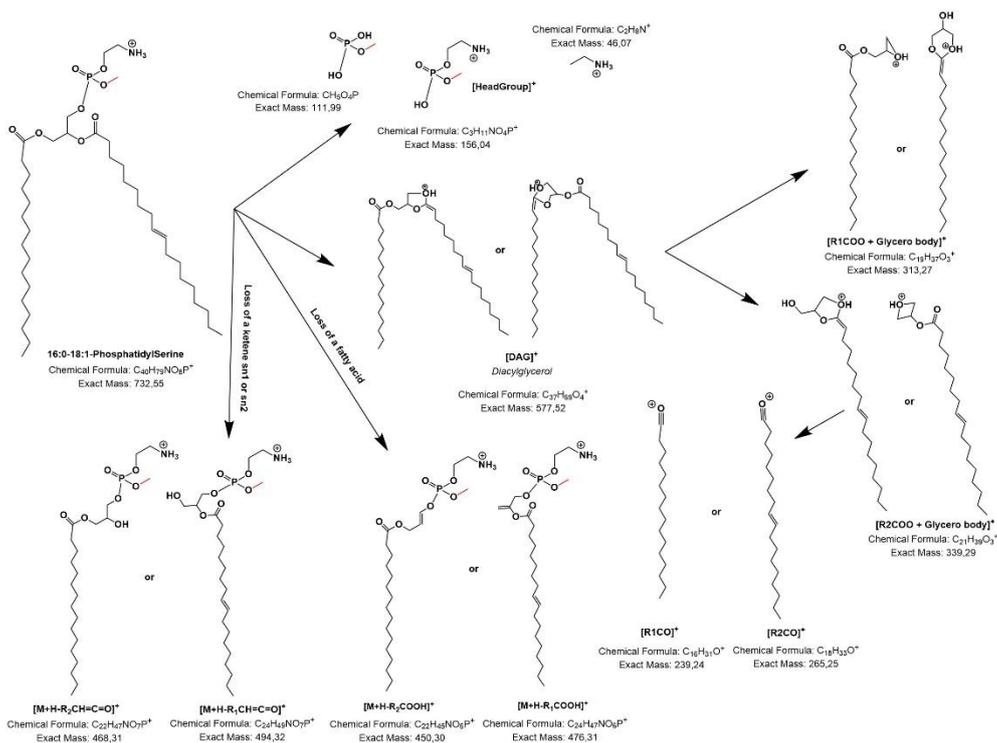
Η ταυτοποίηση του PE-Me (17:0–14:1) επιβεβαιώνεται περαιτέρω από τη σύγκριση του πειραματικού φάσματος MS^1 του πρόδρομου ιόντος με το αντίστοιχο θεωρητικό, όπου παρατηρείται εξαιρετική συμφωνία ως προς τη μοριακή μάζα (m/z 690.51) και τη σχετική ένταση των ισοτοπικών κορυφών. Η σύμπτωση του πειραματικού και θεωρητικού ισοτοπικού

μοτίβου υποστηρίζει την ορθή αντιστοίχιση της μοριακής σύστασης της ένωσης και ενισχύει την αξιοπιστία της ταυτοποίησης στο επίπεδο MS¹.

Στο φάσμα παρατηρείται, επίσης, και ο σχηματισμός του χαρακτηριστικού θραύσματος DAG⁺ στα m/z 535.47, το οποίο προκύπτει από απώλεια της πολικής κεφαλής της PE και αποτελεί διαγνωστικό στοιχείο για τη συγκεκριμένη λιπιδική τάξη. Η παρουσία του DAG⁺, σε συνδυασμό με το πρόδρομο ιόν και το ισοτοπικό μοτίβο, επιβεβαιώνει τη δομική ταυτότητα του PE-Me (17:0–14:1) και καθιστά το πρότυπο κατάλληλο σημείο αναφοράς για την ερμηνεία και σύγκριση των αντίστοιχων λιπιδικών χαρακτηριστικών στα βιολογικά δείγματα.



Εικόνα 71: LC-HRMS ανάλυση της πρότυπης μεθυλιωμένης φωσφατιδυλαιθανολαμίνης PE-Me (17:0–14:1), με παρουσίαση του TIC και XIC, του πειραματικού και θεωρητικού πρόδρομου ιόντος (m/z 690.51), του διαγνωστικού θραύσματος DAG⁺ (m/z 535.47) και της σύγκρισης πειραματικού–θεωρητικού ισοτοπικού μοτίβου, επιβεβαιώνοντας τη δομική ταυτοποίηση της ένωσης.

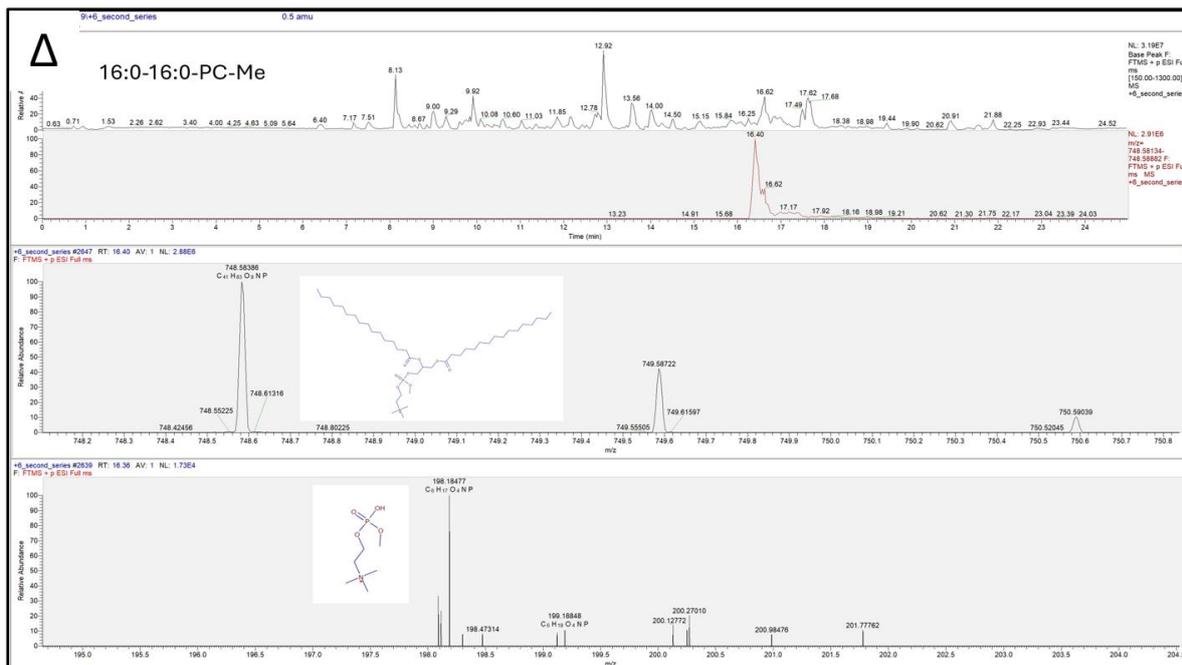


Εικόνα 72: Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης της μεθυλιωμένης φωσφατιδυλαιθανολαμίνης PE-Me (16:0–18:1) κατά LC-MS/MS, με απεικόνιση των κύριων διαγνωστικών θραυσμάτων που προκύπτουν από απώλειες της πολικής κεφαλής, σχηματισμό ιόντων DAG⁺, καθώς και θραυσμάτων που σχετίζονται με το γλυκερολικό σώμα και τις λιπαρές αλυσίδες.

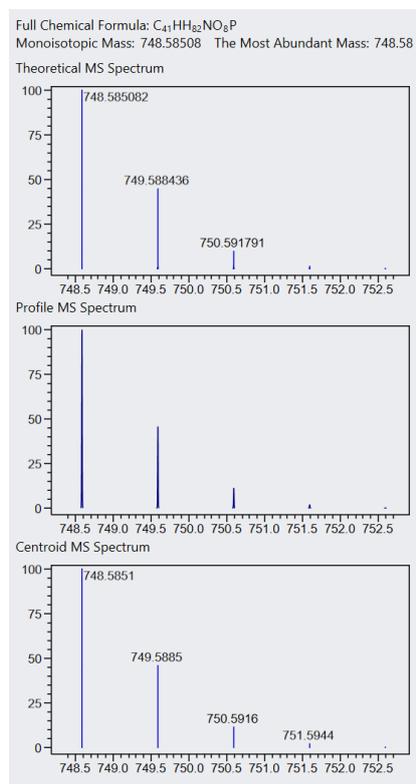
Γ.10.2 Ταυτοποίηση γλυκεροφωσfolιπιδίων πραγματικών δειγμάτων

Γ.10.2.1 PC-Me 16:0-16:0

Το 16:0–16:0-PC-Me εκλούστηκε σε ελαφρώς χαμηλότερο χρόνο κατακράτησης, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 73**, σε σύγκριση με το 17:0–14:1-PC-Me. Η διαφορά στην υδροφοβικότητα είναι πολύ μικρή και αναμένεται σε τέτοιες αναλύσεις δειγμάτων να έχουμε μικρές διακυμάνσεις με σφάλματα της τάξης του 5%. Στην προκειμένη περίπτωση αναμένεται η διπαλμιτούλοφωσφατιδυλοχολίνη να εκλουστεί κοντα στα 17.5λεπτά. Όπως και να έχει το MS φάσμα εμφανίζει σαφή precursor ion και χαρακτηριστικά διαγνωστικά headgroup-related θραύσματα για την κατηγορία PC-Me. Επιπλέον φαίνεται και το ιστοπικό μοτίβο της ένωσης η οποία έρχεται σε απόλυτη ταύτιση με το θεωρητικό μοτίβο.



Εικόνα 73: LC-HRMS ανάλυση της μεθυλιωμένης φωσφατιδυλοχολίνης PC-Me (16:0–16:0) σε κανονικό δείγμα ομογενοποιημένων κυττάρων. Παρουσιάζονται το πρόδρομο ιόν στο φάσμα MS¹, καθώς και το διαγνωστικό θραύσμα της μεθυλιωμένης πολικής κεφαλής της PC στο m/z 198, επιβεβαιώνοντας την παρουσία και ταυτοποίηση του PC-Me στο βιολογικό δείγμα.

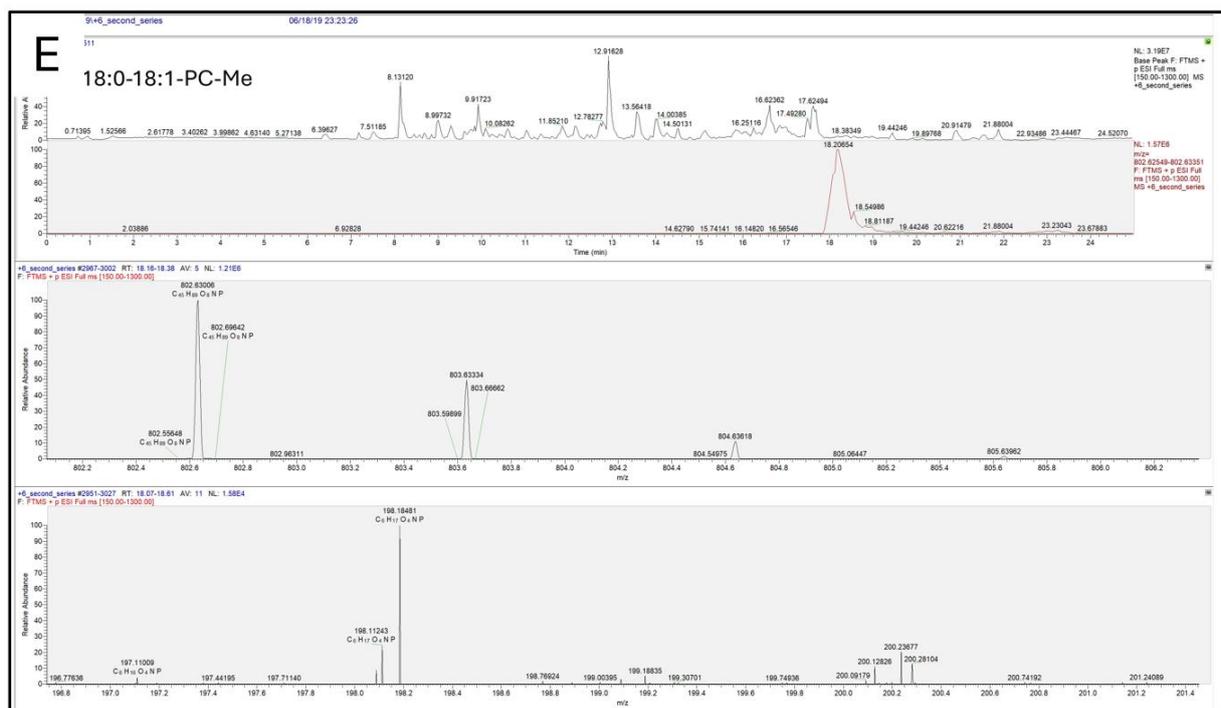


Εικόνα 74: Θεωρητικό ισοτοπικό μοτίβο (theoretical isotopic pattern) για τη μεθυλιωμένη φωσφατιδυλοχολίνη PC-Me (16:0–16:0), όπως προκύπτει από τη μονοϊσοτοπική μάζα και τη στοιχειακή σύσταση της ένωσης, παρουσιάζοντας την αναμενόμενη κατανομή των ισοτοπικών κορυφών στο φάσμα MS¹. Η εικόνα έχει εξαχθεί από το Mass Frontier 8.1 demo version.

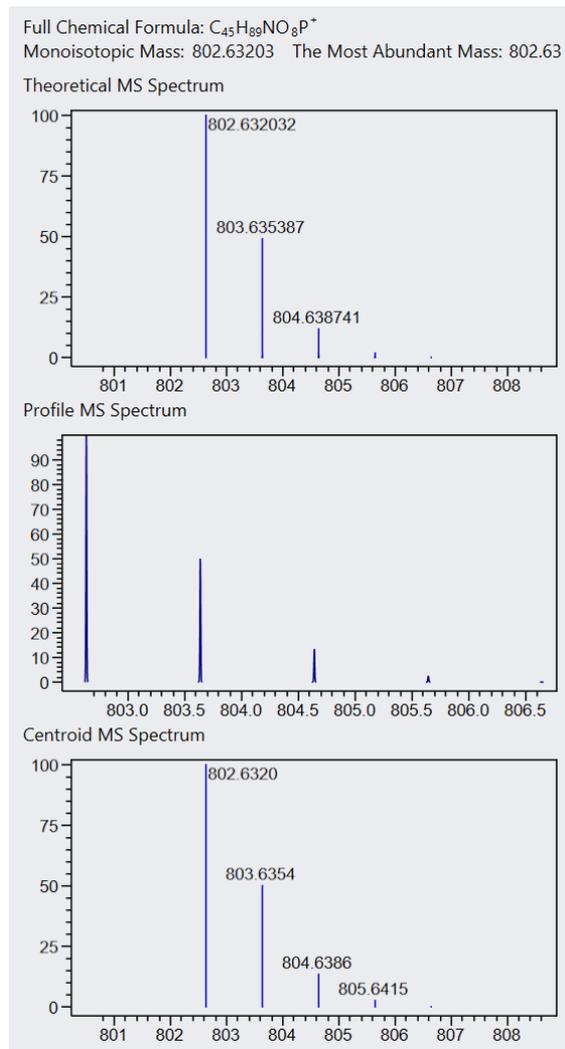
Γ.10.2.2 PC-Me 18:0-18:1

Στην παρακάτω **Εικόνα 75** παρουσιάζεται η ανίχνευση της ένωσης 18:0-18:1-PC-Me σε πραγματικό δείγμα. Η ένωση εκλούστηκε στα ~18.2 min, εμφανίζοντας μια καλά διαχωρισμένη χρωματογραφική κορυφή εντός της περιοχής όπου ανιχνεύονται οι περισσότερες PC-Me ενώσεις στην μη στοχευμένη ανάλυση. Ο χρόνος κατακράτησης είναι ελαφρώς αυξημένος σε σύγκριση με το αντίστοιχο PC-Me πρότυπο. Η PC-Me 18:0-18:1 παρουσιάζει αυξημένη υδροφοβικότητα.

Το φάσμα MS¹ εμφανίζει καθαρό precursor ion με ισοτοπικό μοτίβο συμβατό με τη θεωρητική σύσταση της ένωσης. Στο φάσμα παρατηρείται έντονα η μεθυλιωμένη πολική κεφαλή στο m/z ~198, το οποίο αποτελεί διαγνωστικό ιόν για την τάξη των PCs. Η παρουσία του συγκεκριμένου θραύσματος, σε συνδυασμό με το χρωματογραφικό προφίλ, επιβεβαιώνει τη σωστή απόδοση της ένωσης ως PC-Me στο δείγμα. Σημαντικό να αναφερθεί ότι δεν μπορούμε να αποφανθούμε για την θέση που αντιστοιχεί για κάθε λιπαρή αλυσίδα.



Εικόνα 75: LC-HRMS ανάλυση της μεθυλιωμένης φωσφατιδυλοχολίνης PC-Me (18:0-18:1) σε κανονικό δείγμα ομογενοποιημένων κυττάρων. Παρουσιάζονται το ολικό ιοντικό χρωματογράφημα (TIC) και το εξαγόμενο ιοντικό χρωματογράφημα (XIC) με κορυφή στον χρόνο κατακράτησης 18.2 min, το φάσμα MS¹ του πρόδρομου ιόντος, καθώς και το φάσμα με το χαρακτηριστικό διαγνωστικό θραύσμα της μεθυλιωμένης πολικής κεφαλής της PC στο m/z 198, επιβεβαιώνοντας την παρουσία της ένωσης στο βιολογικό δείγμα. Στο φάσμα φαίνεται και το ισοτοπικό μοτίβο.

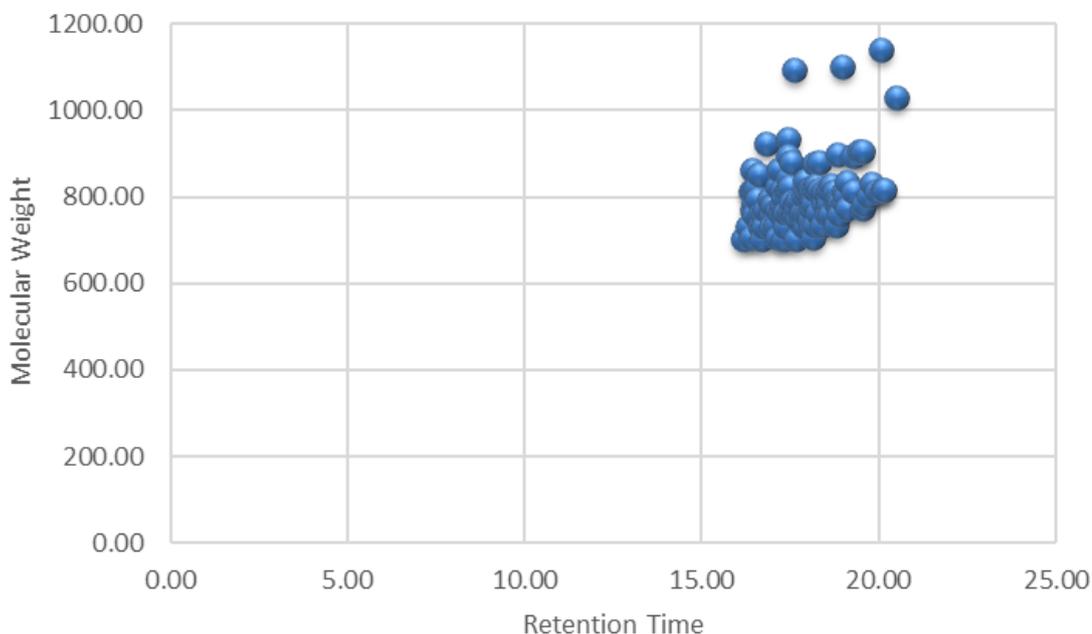


Εικόνα 76: Θεωρητικό ισοτοπικό μοτίβο (*theoretical isotopic pattern*) για τη μεθυλιωμένη φωσφατιδυλοχολίνη PC-Me (18:0–18:1), βασισμένο στη στοιχειακή σύσταση και τη μονοϊσοτοπική μάζα της ένωσης (m/z 802.63), απεικονίζοντας την αναμενόμενη κατανομή των ισοτοπικών κορυφών.

Γ.10.3 Χρόνος κατακράτησης

Η κατανομή των χρόνων κατακράτησης (RT), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 77**, όλων των λιπιδικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν μέσω της μη στοχευμένης λιπιδομικής LC–HRMS ανάλυσης μέσω του λογισμικού Compound Discoverer 3.5 (Demo Version) παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα. Παρατηρείται ότι η πλειονότητα των ενώσεων εκλύεται στο χρονικό διάστημα μεταξύ 16–19 min, γεγονός που αντανάκλα τη χρωματογραφική συμπεριφορά των φωσφολιπιδικών τάξεων υπό τις εφαρμοζόμενες συνθήκες ανάστροφης φάσης. Επιπλέον, μικρότερος αριθμός ενώσεων εμφανίζεται σε υψηλότερους χρόνους κατακράτησης (περίπου 21–25 min), γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε λιπίδια με αυξημένη υδροφοβικότητα, όπως εκείνα με μεγαλύτερο μήκος λιπαρών αλυσίδων ή χαμηλότερο βαθμό ακορεστότητας. Η συνολική κατανομή των RT υποδηλώνει ικανοποιητικό

χρωματογραφικό διαχωρισμό και αναμενόμενη συμπεριφορά των ανιχνευθέντων λιπιδικών ειδών στο πλαίσιο της μη στοχευμένης λιπιδομικής προσέγγισης.



Εικόνα 77: Διάγραμμα διασποράς της μοριακής μάζας (*Molecular Weight*) σε συνάρτηση με τον χρόνο κατακράτησης (*Retention Time*) για τα ανιχνευθέντα χαρακτηριστικά της λιπιδομικής ανάλυσης. Η κατανομή των σημάτων σε περιορισμένο εύρος χρόνων κατακράτησης ($\approx 16-20$ min) και μοριακών μαζών υποδηλώνει συνεκτικό χρωματογραφικό διαχωρισμό και ομοιογενές λιπιδικό προφίλ των αναλυθέντων δειγμάτων.

Γ.11 Ταυτοποιημένα Γλυκεροφωσfolιπίδια με το Compound Discoverer

Ο παρακάτω πίνακας προέκυψε από την επεξεργασία των δεδομένων LC-HRMS στο λογισμικό Compound Discoverer, έπειτα από το αντίστοιχο αναλυτικό run όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά μέθοδοι. Κατά τη διαδικασία ταυτοποίησης ανιχνεύθηκαν πολυάριθμες λιπιδικές ενώσεις, εκ των οποίων στον πίνακα παρουσιάζονται όλες οι χαρακτηριστικές ενώσεις, με αναφορά στην ονομασία τους, τον μοριακό τύπο, τον χρόνο κατακράτησης (RT) και τη μοριακή μάζα (MW).

Πίνακας 13: Πίνακας ταυτοποιημένων φωσφολιπιδίων από την λιπιδιομική ανάλυση, με αναφορά στην ονομασία της ένωσης (Name), τον μοριακό τύπο (Formula), τον χρόνο κατακράτησης (RT, min) και τη μοριακή μάζα (MW). Τα ανιχνευθέντα λιπιδικά είδη καλύπτουν διαφορετικές κατηγορίες φωσφολιπιδίων (PE, PC, PS, PI, PIP, PIP₂) και εκλύονται κυρίως στο εύρος 16–20 min, υποδηλώνοντας παρόμοια χρωματογραφική συμπεριφορά των φωσφολιπιδικών κλάσεων υπό τις εφαρμοζόμενες συνθήκες ανάλυσης.

Name	Formula	RT [min]	MW
PE_Me 16:0-16:1	C38H74NO8P	16.16	703.52
PE_Me 16:1-18:1	C40H76NO8P	16.31	729.53
PE_Me 16:0-16:0	C38H76NO8P	16.38	705.53
PE_Me 22:0-18:2	C46H88NO8P	16.39	813.62
PS_2Me 20:3-20:4	C48H80NO10P	16.41	861.55
PS_2Me 16:1-20:3	C44H78NO10P	16.42	811.54
PC 16:1-18:3 (-CH3)	C43H79NO8P	16.43	768.55
PE_Me 16:1-22:1	C44H84NO8P	16.47	785.59
PE_Me 20:0-20:3	C46H86NO8P	16.47	811.61
PE_Me 20:0-16:1	C42H82NO8P	16.48	759.58
PC 18:4-20:3 (-CH3)	C47H81NO8P	16.53	818.57
PC 16:1-20:4 (-CH3)	C45H81NO8P	16.56	794.57
PI_Me 18:0-16:1	C44H83O13P	16.60	850.56
PE_Me 18:1-18:1	C42H80NO8P	16.65	757.56
PE_Me 16:1-18:1	C40H76NO8P	16.66	729.53
PE_Me 16:0-16:1	C38H74NO8P	16.70	703.52
PE_Me 20:0-16:1	C42H82NO8P	16.73	759.58
PE_Me 16:0-18:0	C40H80NO8P	16.73	733.56
PE_Me 18:0-16:1	C40H78NO8P	16.73	731.55
PC 16:1-18:2 (-CH3)	C43H81NO8P	16.78	770.57
PI_Me 18:1-22:6	C50H83O13P	16.81	922.56
PC 16:1-20:4 (-CH3)	C45H81NO8P	16.90	794.57
PE_Me 20:0-16:1	C42H82NO8P	16.96	759.58
PE_Me 18:2-20:3	C44H78NO8P	16.96	779.55
PE_Me 16:1-18:1	C40H76NO8P	16.97	729.53
PE_Me 20:0-18:4	C44H80NO8P	17.00	781.56
PE_Me 16:0-18:0	C40H80NO8P	17.10	733.56
PC 16:1-18:2 (-CH3)	C43H81NO8P	17.12	770.57
PE_Me 16:0-16:0	C38H76NO8P	17.13	705.53
PC 18:2-20:3 (-CH3)	C47H85NO8P	17.14	822.60
PE_Me 22:0-22:6	C50H88NO8P	17.18	861.62
PE_Me 20:0-16:1	C42H82NO8P	17.20	759.58
PS_2Me 20:0-16:1	C44H84NO10P	17.24	817.58

<i>PE_Me 20:0-18:4</i>	C44H80NO8P	17.27	781.56
<i>PE_Me 16:0-16:1</i>	C38H74NO8P	17.28	703.52
<i>PE_Me 18:1-18:1</i>	C42H80NO8P	17.31	757.56
<i>PC 16:0-20:3 (-CH3)</i>	C45H85NO8P	17.32	798.60
<i>PE_Me 18:0-16:1</i>	C40H78NO8P	17.33	731.55
<i>PS_2Me 16:0-16:1</i>	C40H76NO10P	17.36	761.52
<i>PE_Me 20:0-20:3</i>	C46H86NO8P	17.41	811.61
<i>PIP_3Me 16:0-16:0</i>	C44H86O16P2	17.42	932.54
<i>PI_Me 20:3-18:4</i>	C48H79O13P	17.44	894.53
<i>PE_Me 22:0-18:2</i>	C46H88NO8P	17.44	813.62
<i>PS_2Me 16:0-22:1</i>	C46H88NO10P	17.45	845.61
<i>PS_2Me 16:0-16:1</i>	C40H76NO10P	17.46	761.52
<i>PC 18:2-20:3 (-CH3)</i>	C47H85NO8P	17.48	822.60
<i>PE_Me 16:0-22:1</i>	C44H86NO8P	17.52	787.61
<i>PI_Me 16:0-20:0</i>	C46H89O13P	17.53	880.60
<i>PE_Me 18:1-18:1</i>	C42H80NO8P	17.55	757.56
<i>PC 16:1-18:2 (-CH3)</i>	C43H81NO8P	17.59	770.57
<i>PE_Me 20:0-16:1</i>	C42H82NO8P	17.60	759.58
<i>PIP2_5Me 20:0-16:1</i>	C50H97O19P3	17.62	1094.58
<i>PE_Me 16:0-16:1</i>	C38H74NO8P	17.65	703.52
<i>PE_Me 20:0-18:2</i>	C44H84NO8P	17.67	785.59
<i>PE_Me 18:4-20:4</i>	C44H72NO8P	17.67	773.50
<i>PC 16:0-16:0 (-CH3)</i>	C41H83NO8P	17.71	748.59
<i>PC 18:3-18:3 (-CH3)</i>	C45H79NO8P	17.71	792.55
<i>PE_Me 18:1-18:1</i>	C42H80NO8P	17.79	757.56
<i>PE_Me 16:0-20:0</i>	C42H84NO8P	17.81	761.59
<i>PE_Me 16:1-18:1</i>	C40H76NO8P	17.86	729.53
<i>PE_Me 20:3-20:4</i>	C46H78NO8P	17.87	803.55
<i>PE_Me 18:0-16:1</i>	C40H78NO8P	17.89	731.55
<i>PE_Me 22:0-20:4</i>	C48H88NO8P	17.92	837.62
<i>PE_Me 20:0-16:1</i>	C42H82NO8P	17.94	759.58
<i>PE_Me 20:0-20:4</i>	C46H84NO8P	17.97	809.59
<i>PE_Me 18:1-18:1</i>	C42H80NO8P	18.01	757.56
<i>PE_Me 16:1-20:3</i>	C42H76NO8P	18.05	753.53
<i>PC 18:4-20:3 (-CH3)</i>	C47H81NO8P	18.05	818.57
<i>PC 16:0-16:1 (-CH3)</i>	C41H81NO8P	18.06	746.57
<i>PS_2Me 20:0-16:1</i>	C44H84NO10P	18.06	817.58
<i>PE_Me 22:0-18:2</i>	C46H88NO8P	18.07	813.62

<i>PE_Me 20:0-18:3</i>	C44H82NO8P	18.10	783.58
<i>PE_Me 18:0-16:1</i>	C40H78NO8P	18.10	731.55
<i>PC 16:0-18:1 (-CH3)</i>	C43H85NO8P	18.11	774.60
<i>PE_Me 20:0-18:2</i>	C44H84NO8P	18.13	785.59
<i>PE_Me 16:0-16:0</i>	C38H76NO8P	18.14	705.53
<i>PS_2Me 20:0-16:1</i>	C44H84NO10P	18.15	817.58
<i>PE_Me 16:0-18:0</i>	C40H80NO8P	18.16	733.56
<i>PL_Me 18:1-18:1</i>	C46H85O13P	18.19	876.57
<i>PC 18:3-20:0 (-CH3)</i>	C47H89NO8P	18.24	826.63
<i>PS 16:0-16:0</i>	C40H78NO10P	18.28	763.54
<i>PE_Me 22:0-18:1</i>	C46H90NO8P	18.31	815.64
<i>PL_Me 20:0-16:1</i>	C46H87O13P	18.33	878.59
<i>PE_Me 16:0-18:0</i>	C40H80NO8P	18.39	733.56
<i>PE_Me 20:0-18:2</i>	C44H84NO8P	18.43	785.59
<i>PE_Me 22:0-18:2</i>	C46H88NO8P	18.44	813.62
<i>PE_Me 18:1-18:1</i>	C42H80NO8P	18.51	757.56
<i>PC 18:3-18:4 (-CH3)</i>	C45H77NO8P	18.55	790.54
<i>PE_Me 16:0-22:1</i>	C44H86NO8P	18.56	787.61
<i>PC 18:1-18:1 (-CH3)</i>	C45H87NO8P	18.57	800.62
<i>PE_Me 20:0-18:2</i>	C44H84NO8P	18.57	785.59
<i>PE_Me 22:0-18:1</i>	C46H90NO8P	18.58	815.64
<i>PE_Me 20:0-16:1</i>	C42H82NO8P	18.59	759.58
<i>PC 18:3-20:0 (-CH3)</i>	C47H89NO8P	18.65	826.63
<i>PE_Me 22:0-18:2</i>	C46H88NO8P	18.76	813.62
<i>PE_Me 16:1-22:1</i>	C44H84NO8P	18.81	785.59
<i>PE_Me 16:0-18:0</i>	C40H80NO8P	18.81	733.56
<i>PE_Me 16:0-22:0</i>	C44H88NO8P	18.82	789.62
<i>PL_Me 18:2-20:3</i>	C48H83O13P	18.84	898.56
<i>PE_Me 16:0-22:1</i>	C44H86NO8P	18.86	787.61
<i>PE_Me 18:1-18:1</i>	C42H80NO8P	18.89	757.56
<i>PIP_3Me 22:0-22:0</i>	C56H110O16P2	18.97	1100.73
<i>PE_Me 16:0-22:1</i>	C44H86NO8P	19.02	787.61
<i>PE_Me 22:0-18:2</i>	C46H88NO8P	19.02	813.62
<i>PC 18:1-18:1 (-CH3)</i>	C45H87NO8P	19.06	800.62
<i>PC 16:0-18:1 (-CH3)</i>	C43H85NO8P	19.08	774.60
<i>PE_Me 20:0-22:6</i>	C48H84NO8P	19.11	833.59
<i>PL_Me 20:3-18:4</i>	C48H79O13P	19.28	894.53
<i>PE_Me 22:0-18:2</i>	C46H88NO8P	19.28	813.62

<i>PI_Me 20:0-18:2</i>	C48H89O13P	19.44	904.60
<i>PC 16:0-18:1 (-CH3)</i>	C43H85NO8P	19.53	774.60
<i>PI_Me 20:0-18:2</i>	C48H89O13P	19.55	904.60
<i>PE_Me 20:0-18:2</i>	C44H84NO8P	19.56	785.59
<i>PC 16:1-20:0 (-CH3)</i>	C45H89NO8P	19.70	802.63
<i>PC 16:1-22:1 (-CH3)</i>	C47H91NO8P	19.78	828.65
<i>PE_Me 22:0-18:2</i>	C46H88NO8P	19.92	813.62
<i>PIP2_5Me 20:3-20:4</i>	C54H93O19P3	20.07	1138.55
<i>PE_Me 20:0-20:0</i>	C46H92NO8P	20.10	817.66
<i>PE_Me 22:0-18:1</i>	C46H90NO8P	20.15	815.64
<i>PIP_3Me 18:1-22:6</i>	C52H88O16P2	20.51	1030.55

Γ.11.1 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

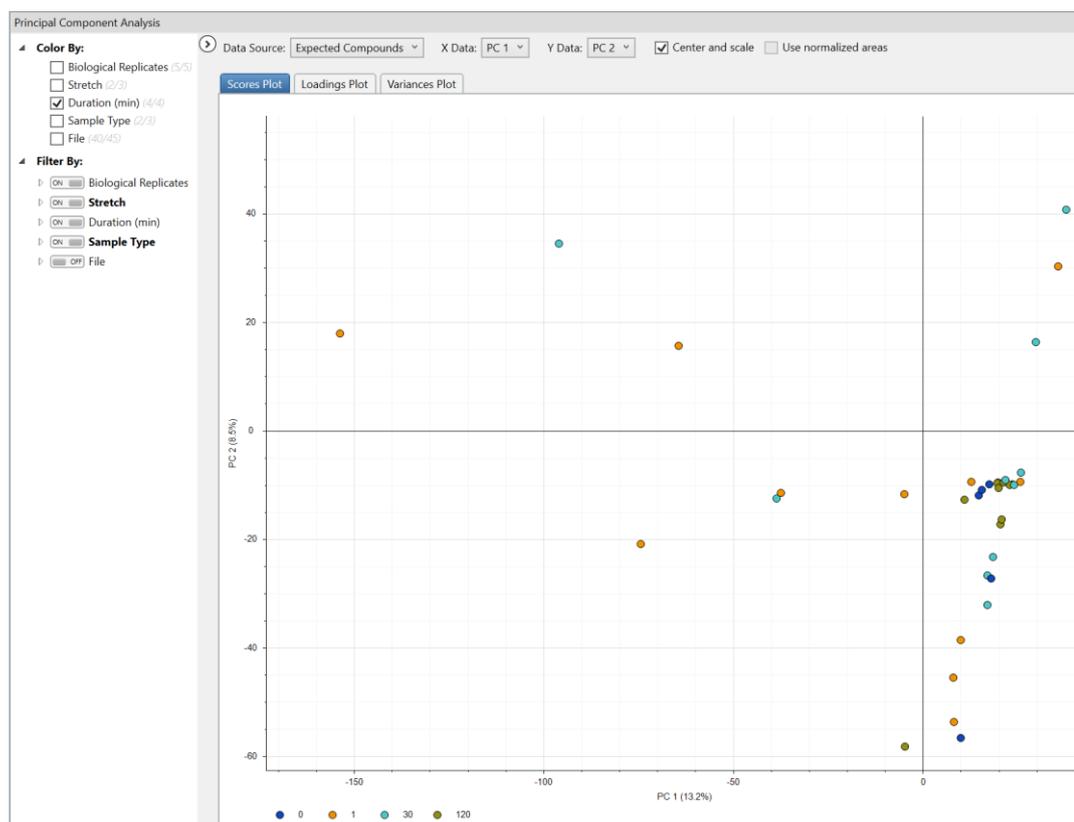
Το διάγραμμα scores της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 78**, βασισμένο στις αναμενόμενες ενώσεις (expected compounds), παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα. Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες εξηγούν συνολικά το ποσοστό της διακύμανσης των δεδομένων, με την PC1 να συνεισφέρει το 13.2% και την PC2 το 8.5%, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μεταβλητότητα του λιπιδικού προφίλ κατανέμεται περισσότερο στα δείγματα που έχουν υποστεί διάταση παρά στα control.

Η πλειονότητα των δειγμάτων συγκεντρώνεται σε σχετικά μικρή περιοχή του χώρου των συνιστωσών, υποδηλώνοντας συνολικά παρόμοια λιπιδική σύσταση. Παράλληλα, παρατηρείται διασπορά μεμονωμένων δειγμάτων κατά μήκος της PC1 και της PC2, η οποία πιθανόν αντανακλά διαφοροποιήσεις στην ένταση ή στη σχετική αφθονία συγκεκριμένων λιπιδικών ειδών.

Η χρωματική κωδικοποίηση βάσει της διάρκειας (Duration, min) δεν οδηγεί σε ξεκάθαρο ομαδοποιημένο διαχωρισμό των δειγμάτων, ωστόσο παρατηρούνται ήπιες τάσεις μετατόπισης κατά μήκος της PC1, υποδεικνύοντας ότι η διάρκεια ενδέχεται να επηρεάζει επιμέρους χαρακτηριστικά του λιπιδικού προφίλ. Η απουσία έντονου διαχωρισμού μεταξύ των δειγμάτων υποδηλώνει ότι οι παρατηρούμενες διαφορές είναι ποσοτικές και όχι ποιοτικές, στοιχείο που είναι σύμφωνο με τη φύση της μη στοχευμένης λιπιδομικής ανάλυσης.

Συνοψίζοντας, η ανάλυση κύριων συνιστωσών PCA καταδεικνύει καλή συνοχή μεταξύ των δειγμάτων, με μικρή αλλά υπαρκτή μεταβλητότητα, δείχνοντας ότι οι κύριες

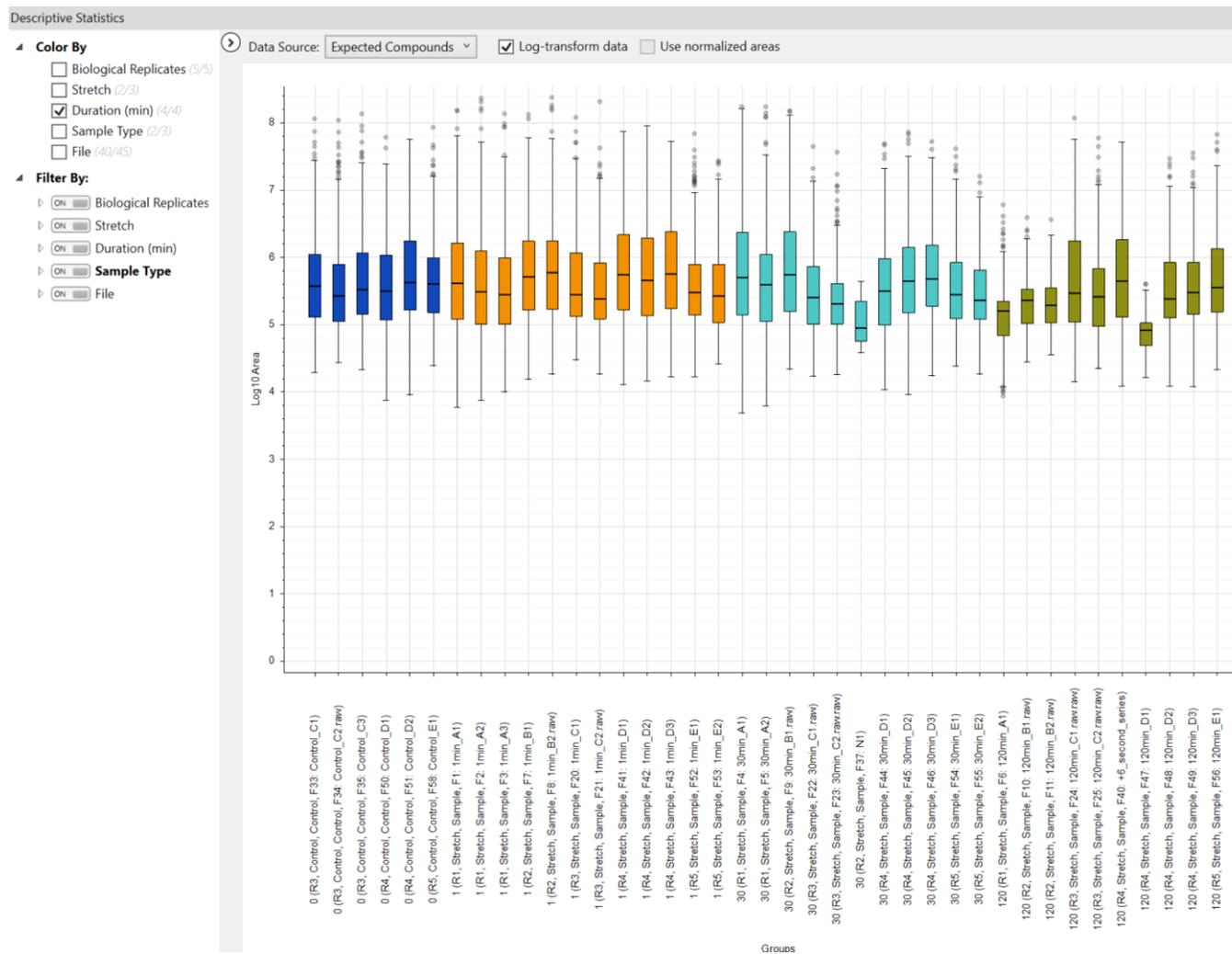
διαφοροποιήσεις στο λιπιδικό προφίλ μάλλον προκύπτουν από μεταβολές στην αφθονία συγκεκριμένων ενώσεων και όχι από ριζικά διαφορετικά λιπιδικά μοτίβα.



Εικόνα 78: Διάγραμμα κύριων συνιστωσών (PCA) των φωσφογλυκερολιπιδικών χαρακτηριστικών, βασισμένο στις κανονικοποιημένες εντάσεις, όπου απεικονίζεται η κατανομή των δειγμάτων στον χώρο των PC1 και PC2, αναδεικνύοντας διαφοροποιήσεις μεταξύ των πειραματικών συνθηκών.

Γ.11.2 Αποτελέσματα από την περιγραφική στατιστική (Boxplots)

Στην Εικόνα 79 παρουσιάζεται η περιγραφική στατιστική των λογαριθμικά μετασχηματισμένων περιοχών (\log_{10} area) των αναμενόμενων λιπιδικών ενώσεων για όλα τα δείγματα, ομαδοποιημένα βάσει της διάρκειας της μηχανικής διάτασης (0, 1, 30 και 120 min). Η εφαρμογή λογαριθμικού μετασχηματισμού επιτρέπει την οπτικοποίηση της κατανομής των εντάσεων σε ευρύ δυναμικό εύρος και διευκολύνει τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων.



Εικόνα 79: Διάγραμμα περιγραφικής στατιστικής (boxplots) των κανονικοποιημένων και λογαριθμικά μετασχηματισμένων λιπιδικών ενόσεων ανά ομάδα, που απεικονίζει τη διασπορά, τη διάμεσο και τις ενδοτεταρτημοριακές αποκλίσεις, επιτρέποντας την αξιολόγηση της κατανομής και της αναπαραγωγιμότητας των δεδομένων μεταξύ των πειραματικών συνθηκών.

Παρατηρείται ότι οι διάμεσες τιμές των κατανομών βρίσκονται σε παρόμοια επίπεδα μεταξύ των διαφορετικών χρονικών συνθηκών, υποδηλώνοντας συγκρίσιμη συνολική λιπιδική απόκριση μεταξύ των δειγμάτων. Τα εύρη των κατανομών (interquartile ranges) εμφανίζονται γενικά παρόμοια, γεγονός που υποδηλώνει μικρή μεταβλητότητα και απουσία έντονων αποκλίσεων μεταξύ των ομάδων. Επιπλέον, η παρουσία μεμονωμένων ακραίων τιμών (outliers) είναι αναμενόμενη σε μη στοχευμένη λιπιδομική ανάλυση και πιθανόν αντανακλά στη διαφοροποιημένη αφθονία συγκεκριμένων λιπιδικών ειδών. Ωστόσο, δεν παρατηρείται συστηματική μετατόπιση ολόκληρων κατανομών προς υψηλότερες ή χαμηλότερες τιμές με την αύξηση της διάρκειας της καταπόνησης, υποδεικνύοντας ότι οι παρατηρούμενες διαφορές είναι κυρίως ποσοτικές και εντοπίζονται σε επιμέρους ενώσεις.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της περιγραφικής στατιστικής υποστηρίζουν την καλή συγκρισιμότητα των δεδομένων μεταξύ των δειγμάτων και επιβεβαιώνουν ότι οι μεταβολές στο λιπιδικό προφίλ δεν οφείλονται σε γενικευμένες μεταβολές της συνολικής έντασης, αλλά πιθανόν σε στοχευμένες αλλαγές συγκεκριμένων λιπιδικών χαρακτηριστικών.

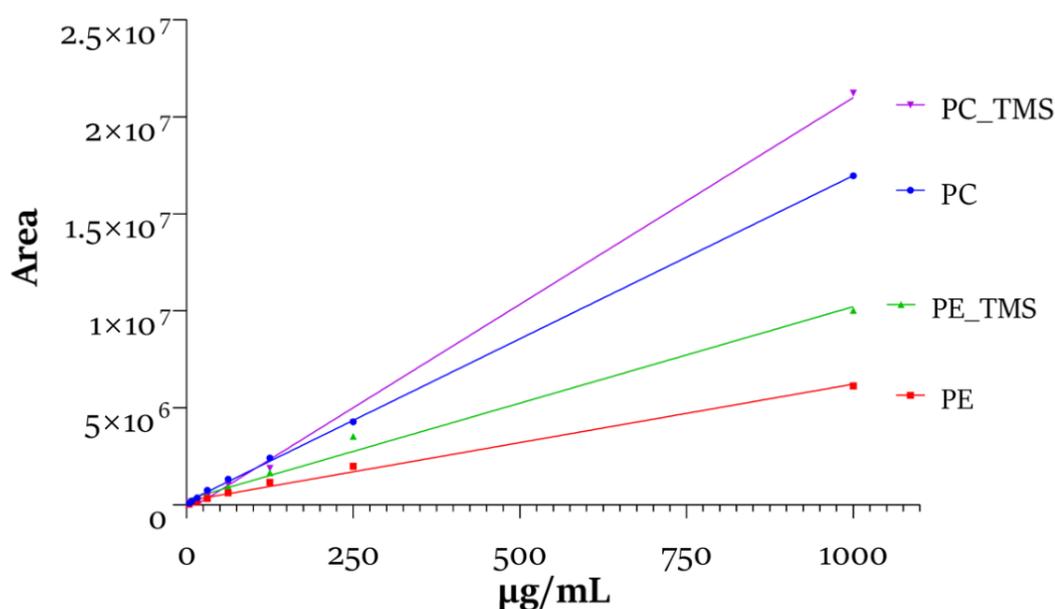
Γ.12 Αποτελέσματα απο LC-MSMS

Στα πλαίσια της σχετικής ποσοτικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής μάζας τριπλού τετραπόλου (QQQ), όπου τα δείγματα αναλύθηκαν με την τεχνική Multiple Reaction Monitoring (MRM), και παρακολουθείται επιλεκτικά ένα πρόδρομο ιόν (Q1) και το αντίστοιχο χαρακτηριστικό θραύσμα του (Q3). Ως εξωτερικά πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις PC (17:1–14:1) και PE (17:1–14:1), βάσει των οποίων κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς για τη σχετική ποσοτικοποίηση των λιπιδικών χαρακτηριστικών στα δείγματα. Για τις ενώσεις PC, το MRM μετάβασης (transition) βασίστηκε στο πρόδρομο ιόν στο Q1 και στο διαγνωστικό θραύσμα της μεθυλιωμένης πολικής κεφαλής στο m/z 198 στο Q3, ενώ για τις ενώσεις PE η αντίστοιχη μετάβαση (transition) περιλάμβανε το πρόδρομο ιόν και το χαρακτηριστικό θραύσμα DAG⁺. Για λόγους συγκριτικής αξιολόγησης της απόκρισης του οργάνου και της επίδρασης της παραγωγοποίησης, πραγματοποιήθηκε επιπλέον ανάλυση των αντίστοιχων ενώσεων στη φυσική τους (native) μορφή, χωρίς παραγωγοποίηση, ώστε να διερευνηθούν διαφορές στη γραμμικότητα και την ευαισθησία της απόκρισης.

Γ.12.1 Καμπύλες αναφοράς

Οι καμπύλες αναφοράς, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 80**, που προέκυψαν από την ανάλυση MRM στο QQQ παρουσιάζουν υψηλή γραμμικότητα σε όλο το εξεταζόμενο εύρος

συγκεντρώσεων ($R^2 \approx 0.99$), υποδεικνύοντας αξιόπιστη και αναπαραγώγιμη απόκριση του οργάνου. Παρατηρείται σαφώς αυξημένη απόκριση για τις παραγωγοποιημένες μορφές (PC-TMS και PE-TMS) σε σύγκριση με τις αντίστοιχες native ενώσεις, όπως προκύπτει από τις μεγαλύτερες κλίσεις των καμπυλών. Το εύρημα αυτό καταδεικνύει ότι η παραγωγοποίηση ενισχύει την ευαισθησία της μεθόδου, ιδιαίτερα για τα φωσφολιπίδια τύπου PC, καθιστώντας τις καμπύλες κατάλληλες για σχετική ποσοτική σύγκριση των λιπιδικών χαρακτηριστικών στα δείγματα.



External Standards	Equation	Rsquare
14:0 / 17:1 - PC TMS-DiazoMethane	$Y = 9947 * X + 270528$	0.9901
14:0 / 17:1 - PC	$Y = 16825 * X + 149832$	0.9996
14:0 / 17:1 - PE TMS-DiazoMethane	$Y = 21323 * X - 322747$	0.9970
14:0 / 17:1 - PE	$Y = 6026 * X + 198266$	0.9936

Εικόνα 80: Πρότυπες καμπύλες αναφοράς που προέκυψαν από ανάλυση MRM στο QQQ για τα εξωτερικά πρότυπα PC (17:1–14:1) και PE (17:1–14:1), τόσο στη native όσο και στην παραγωγοποιημένη (TMS) μορφή. Απεικονίζεται η γραμμική σχέση μεταξύ συγκέντρωσης (µg/mL) και απόκρισης (Area), καθώς και οι αντίστοιχες εξισώσεις και συντελεστές γραμμικότητας (R^2).

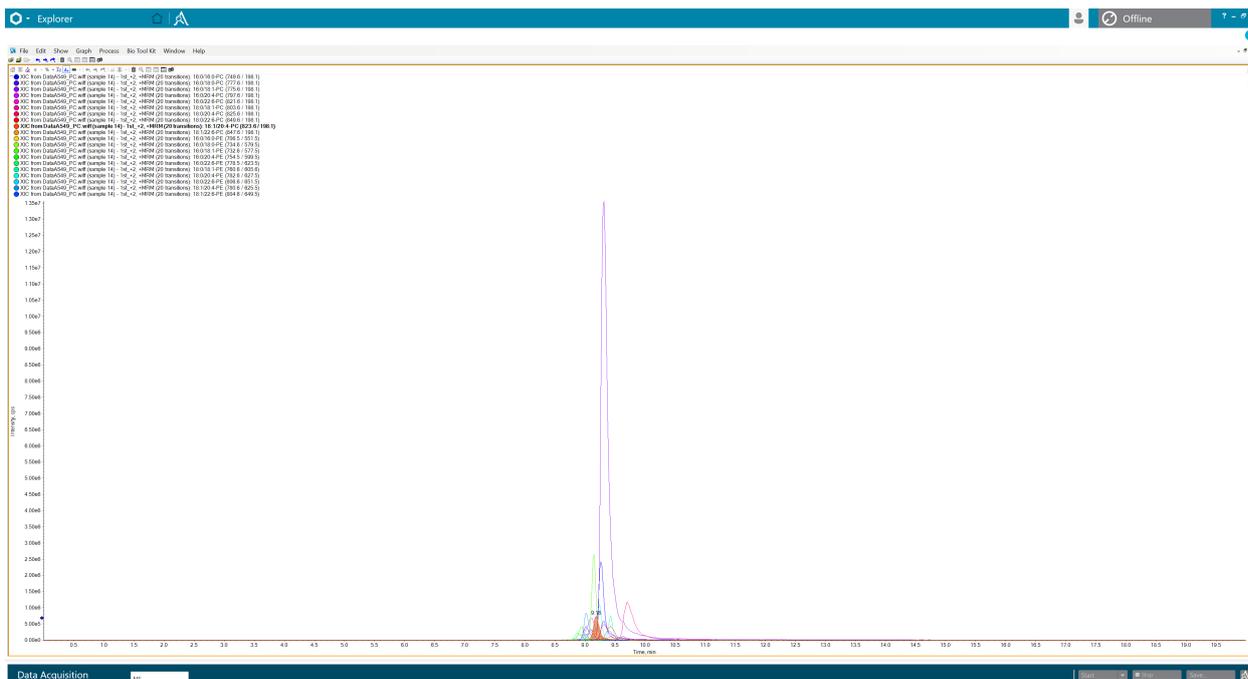
Γ.12.2 Extracted Ion Chromatogram – MRM

Στην ανάλυση MRM (QQQ) παρακολούθηθηκαν συνολικά 20 μεταβάσεις (transitions), επιτρέποντας την ταυτόχρονη και εκλεκτική ανίχνευση φωσφολιπιδίων PC-Me και PE-Me στο κανονικό δείγμα. Για τις ενώσεις PC-Me, η τεχνική MRM βασίστηκε στη μετάβαση από το πρόδρομο ιόν (Q1) προς το διαγνωστικό θραύσμα της μεθυλιωμένης πολικής κεφαλής στο m/z 198.1 (Q3), ενώ για τις ενώσεις PE-Me χρησιμοποιήθηκε η μετάβαση από το πρόδρομο ιόν προς το χαρακτηριστικό θραύσμα DAG⁺. Συγκεκριμένα, παρακολούθηθηκαν οι μεταβάσεις:

Φωσφολιπίδια	Transition (m/z Q1 → Q3)
PC-Me 16:0/16:0	749.6 → 198.1
PC-Me 16:0/18:0	777.6 → 198.1
PC-Me 16:0/18:1	775.6 → 198.1
PC-Me 16:0/20:4	797.6 → 198.1
PC-Me 16:0/22:6	821.6 → 198.1
PC-Me 18:0/18:1	803.6 → 198.1
PC-Me 18:0/20:4	825.6 → 198.1
PC-Me 18:0/22:6	849.6 → 198.1
PC-Me 18:1/20:4	823.6 → 198.1
PC-Me 18:1/22:6	847.6 → 198.1
PE-Me 16:0/16:0	706.5 → 551.5
PE-Me 16:0/18:0	734.6 → 579.5
PE-Me 16:0/18:1	732.6 → 577.5
PE-Me 16:0/20:4	754.5 → 599.5
PE-Me 16:0/22:6	778.5 → 623.5
PE-Me 18:0/18:1	760.6 → 605.6
PE-Me 18:0/20:4	782.6 → 627.5
PE-Me 18:0/22:6	806.6 → 651.5
PE-Me 18:1/20:4	780.6 → 625.5
PE-Me 18:1/22:6	804.6 → 649.5

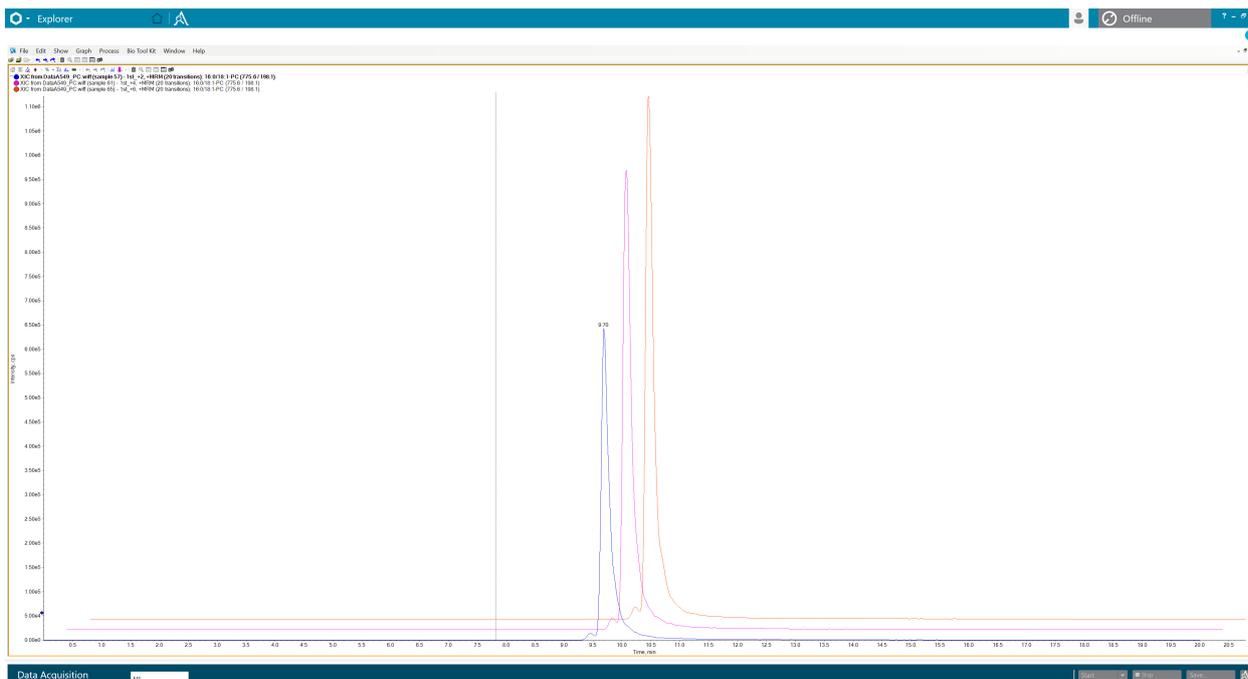
Η ταυτόχρονη παρακολούθηση των συγκεκριμένων μεταβάσεων στο XIC επέτρεψε την αξιόπιστη, εκλεκτική και συγκρίσιμη καταγραφή της απόκρισης των επιμέρους λιπιδικών ειδών στο δείγμα.

Το εξαγόμενο ιοντικό χρωματογράφημα (XIC) από την ανάλυση MRM, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 81**, παρουσιάζει σαφείς και καλά ορισμένες κορυφές για τις παρακολουθούμενες μεταβάσεις, με κοινό και στενό χρονικό παράθυρο (50ms dwell time) έκλουσης, γεγονός που υποδηλώνει αποτελεσματικό χρωματογραφικό διαχωρισμό και υψηλή εκλεκτικότητα της μεθόδου. Η ταυτόχρονη εμφάνιση των σημάτων των διαφορετικών μεταβάσεων στον ίδιο χρόνο κατακράτησης ενισχύει τη δομική συσχέτιση των αντίστοιχων λιπιδικών ειδών, ενώ η υψηλή ένταση και ο χαμηλός θόρυβος βάσης καταδεικνύουν την καλή ευαισθησία και αναπαραγωγικότητα της MRM προσέγγισης.



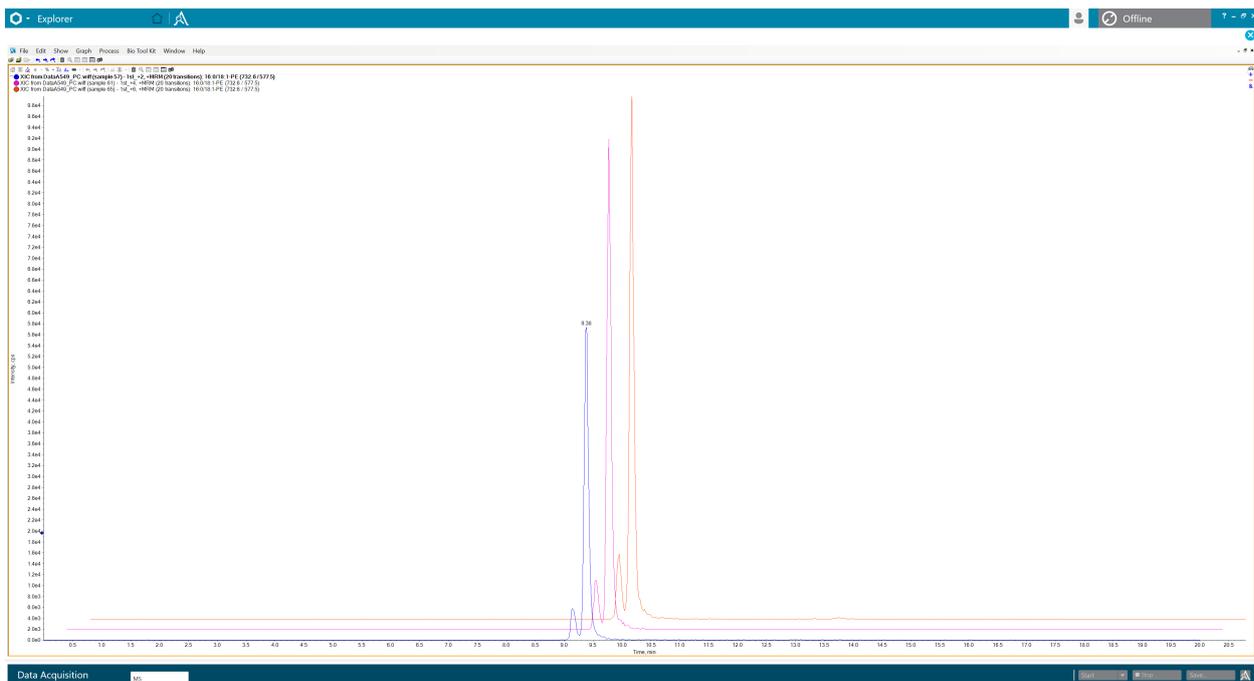
Εικόνα 81: Εξαγόμενο ιοντικό χρωματογράφημα (XIC) από ανάλυση MRM στο QQQ, όπου απεικονίζονται οι ταυτόχρονες μεταβάσεις των επιλεγμένων φωσφολιπιδικών ενώσεων (PC-Me και PE-Me). Οι καλά διαχωρισμένες κορυφές υποδηλώνουν υψηλή εκλεκτικότητα, σταθερό χρόνο κατακράτησης και αξιόπιστη ανίχνευση των λιπιδικών ειδών στο δείγμα.

Για το παράδειγμα στην **Εικόνα 82** φαίνεται το εξαγόμενο ιοντικό χρωματογράφημα (XIC) της συγκεκριμένης μετάβασης MRM (Q1 → 198.1) για το λιπίδιο 16:0–18:1–PC όπου παρουσιάζει σαφή, καλά διαχωρισμένη κορυφή με χρόνο κατακράτησης ~9.7–10.0 min, γεγονός που υποδηλώνει την εκλεκτική και αξιόπιστη ανίχνευση του συγκεκριμένου λιπιδικού είδους. Ο επαναλήψιμος χρόνος έκλουσης μεταξύ 3 διαφορεικών δειγμάτων, καθώς και ο χαμηλός θόρυβος βάσης, επιβεβαιώνουν την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου και τη σωστή στόχευση του πρόδρομου ιόντος σε συνδυασμό με το διαγνωστικό θραύσμα της μεθυλιωμένης πολικής κεφαλής της PC. Το συγκεκριμένο XIC αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα της εκλεκτικότητας που προσφέρει η προσέγγιση MRM για τη σχετική ποσοτική ανάλυση των φωσφολιπιδίων.



Εικόνα 82: Εξαγόμενο ιοντικό χρωματογράφημα (XIC) για το λιπίδιο PC 16:0–18:1 από ανάλυση MRM (Q1 → 198.1), το οποίο εμφανίζει σαφή και καλά διαχωρισμένες κορυφές με σταθερούς χρόνους κατακράτησης (~9.7 min) και στα 3 δείγματα.

Ενα άλλο παράδειγμα είναι και το PE 16:0–18:1. Το εξαγόμενο ιοντικό χρωματογράφημα (XIC), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 83**, της αντίστοιχης μετάβασης MRM (Q1 → DAG⁺) παρουσιάζει καθαρή και συμμετρική κορυφή με σταθερό χρόνο κατακράτησης (~9.3–9.6 min), υποδηλώνοντας εκλεκτική ανίχνευση του συγκεκριμένου λιπιδικού είδους. Η σύγκλιση των κορυφών μεταξύ των διαφορετικών επαναλήψεων και ο χαμηλός θόρυβος βάσης καταδεικνύουν την καλή αναπαραγωγικότητα και ευαισθησία της μεθόδου. Η χρήση του χαρακτηριστικού θραύσματος DAG⁺ ως ιόντος προϊόντος ενισχύει τη δομική ειδικότητα για τις ενώσεις τύπου PE, καθιστώντας το συγκεκριμένο XIC αντιπροσωπευτικό παράδειγμα της αποτελεσματικότητας της MRM προσέγγισης για τη στοχευμένη ανίχνευση και σχετική ποσοτικοποίηση φωσfolιπιδίων.



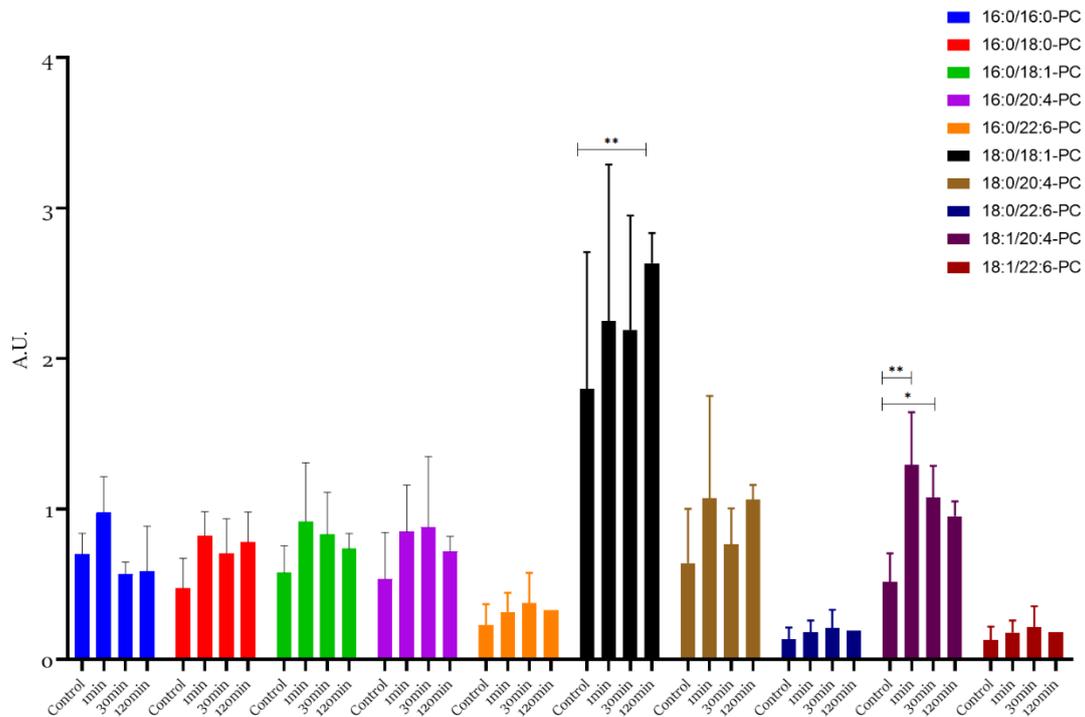
Εικόνα 83: Εξαγόμενο ιοντικό χρωματογράφημα (XIC) για το PE 16:0–18:1 από ανάλυση MRM ($Q1 \rightarrow DAG^+$), το οποίο παρουσιάζει καθαρή και συμμετρική κορυφή με σταθερό χρόνο κατακράτησης και στα 3 δείγματα.

Γ.12.3 Ποσοτικοποίηση 10 ειδών PC

Η ποσοτικοποίηση δέκα ειδών φωσφατιδυλοχολίνης (PC) με βάση τις καμπύλες αναφοράς, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 84**, μας δείχνει ότι υπάρχει μια τάση αύξησης στα επίπεδα των λιπιδίων ως συνάρτηση του χρόνου μηχανικής διάτασης (stretch), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (control). Η τάση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική στις περισσότερες περιπτώσεις. Για τα περισσότερα PC παρατηρείται αυτό το μοτίβο «προσαρμογής» ως μορφή απόκρισης μετά την εφαρμογή του stretch. Η συμπεριφορά αυτή μας δείχνει ότι η μηχανική διάταση επηρεάζει το φωσφολιπιδικό προφίλ των κυττάρων, πιθανόν μέσω αναδιαμόρφωσης της κυτταρικής μεμβράνης ή ενεργοποίησης λιπιδικών μεταβολικών οδών. Παρόλα αυτά η αύξηση αυτή δεν είναι ομοιόμορφη για όλα τα είδη PC, αλλά εξαρτάται από τη σύσταση των λιπαρών αλυσίδων, με ορισμένα είδη να εμφανίζουν πιο έντονη μεταβολή σε σχέση με άλλα.

Παρότι στις περισσότερες περιπτώσεις οι παρατηρούμενες μεταβολές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, ορισμένα είδη φωσφατιδυλοχολίνης παρουσίασαν σημαντική διαφορά σε σχέση με το control. Συγκεκριμένα, το PC 18:0/18:1 εμφάνισε στατιστικά σημαντική αύξηση μετά από 120 λεπτά μηχανικής διάτασης ($p=0.0019$), γεγονός που υποδηλώνει ότι η παρατεταμένη εφαρμογή stretch μπορεί να επηρεάζει πιο έντονα συγκεκριμένα φωσφολιπιδικά είδη. Επιπλέον, το PC 18:1/20:4 παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά για 1 και 30 εφαρμογές μηχανικής διάτασης ($p=0.0042$) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, υποδεικνύοντας

μα πιο άμεση απόκριση αυτού του λιπιδικού είδους στο μηχανικό ερέθισμα. Για τα υπόλοιπα PC είδη που εξετάστηκαν δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου.



Εικόνα 84: Σχετική ποσοτικοποίηση δέκα ειδών φωσφατιδυλογολίνης (PC) σε δείγματα ελέγχου (Control) και μετά από μηχανική καταπόνηση (stretch) διάρκειας 1, 30 και 120 min. Οι τιμές εκφράζονται σε αυθαίρετες μονάδες (A.U.) και παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση βιολογικών επαναλήψεων, μετά από κανονικοποίηση ως προς ίση ποσότητα δείγματος (μg πρωτεΐνης και μg φωσφόρου)

Να σημειωθεί ότι για τη σχετική ποσοτικοποίηση φορτώθηκαν ίδιες ποσότητες δείγματος, κανονικοποιημένες τόσο ως προς τα μg ολικής πρωτεΐνης όσο και ως προς τα μg φωσφόρου (P), εξασφαλίζοντας έλεγχο της αρχικής ποσότητας βιολογικού υλικού και περιορίζοντας πειραματικές αποκλίσεις. Συνεπώς, οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις στα επίπεδα των PC ειδών αποδίδονται σε πραγματικές βιολογικές μεταβολές που σχετίζονται με τη μηχανική διάταση και όχι σε διαφορές στη φόρτωση ή την προετοιμασία των δειγμάτων.

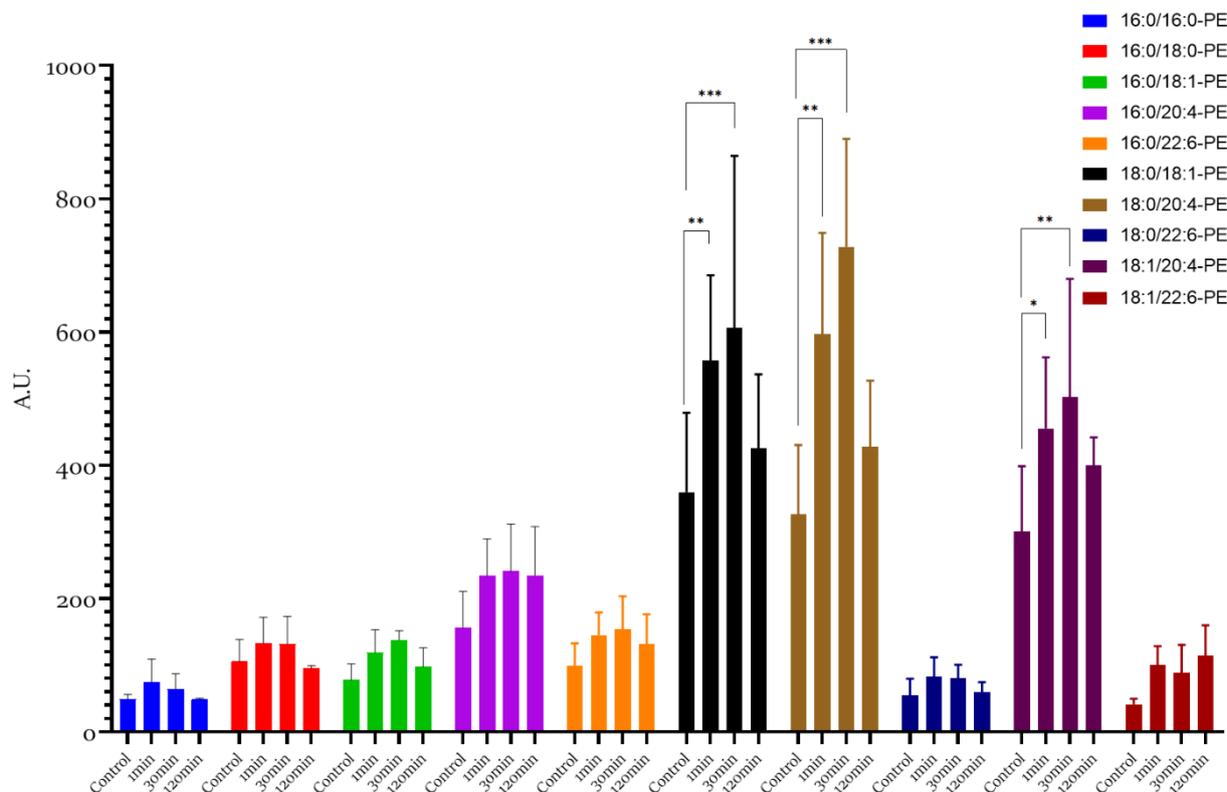
Γ.12.4 Ποσοτικοποίηση 10 ειδών PE

Η ποσοτικοποίηση δέκα ειδών φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PE) με την τεχνική MRM, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 85**, ανέδειξε επίσης μεταβολές στα επίπεδά των PEs ως απόκριση των κυττάρων στη μηχανική διάταση, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου. Για την πλειονότητα των PE ειδών παρατηρείται τάση αύξησης μετά την εφαρμογή του stretch, με πιο εμφανείς μεταβολές στις χρονικές συνθήκες των 30 και 120 min. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει

ότι, αντίστοιχα με τα PC, και τα PE συμμετέχουν ενεργά στην προσαρμογή της κυτταρικής μεμβράνης στο μηχανικό ερέθισμα.

Οι μεταβολές που καταγράφονται διαφοροποιούνται ανάλογα με τη σύσταση των λιπαρών αλυσίδων, με ορισμένα PE είδη να εμφανίζουν εντονότερη αύξηση σε σχέση με άλλα, γεγονός που υποδεικνύει επιλεκτική ρύθμιση συγκεκριμένων μοριακών ειδών.

Η στατιστική ανάλυση διακύμανσης ανέδειξε ότι ορισμένα είδη φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PE) παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές σε σχέση με το control. Συγκεκριμένα, το PE 18:0/18:1 εμφάνισε στατιστικά σημαντική αύξηση τόσο στο 1 λεπτό ($p=0.0054$) όσο και στα 30 λεπτά ($p=0.0003$) μετά την εφαρμογή μηχανικής διάτασης. Ακόμη πιο έντονη μεταβολή παρατηρήθηκε για το PE 18:0/20:4, το οποίο παρουσίασε σημαντική αύξηση στο 1 λεπτό και στα 30 λεπτά ($p<0.0001$ και στις δύο περιπτώσεις). Παρόμοια τάση παρατηρήθηκε και για το PE 18:1/20:4, όπου καταγράφηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στο 1 λεπτό ($p=0.0447$) και στα 30 λεπτά ($p=0.0041$). Αντίθετα, για τα υπόλοιπα είδη PE που εξετάστηκαν δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου.



Εικόνα 85: Ποσοτικοποίηση δέκα ειδών φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PE) με την τεχνική MRM σε δείγματα ελέγχου (Control) και δείγματα που έχουν υποστεί μηχανική καταπόνηση (stretch) διάρκειας 1, 30 και 120 min. Οι τιμές εκφράζονται σε αθθαίρετες

μονάδες (A.U.) και παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση βιολογικών επαναλήψεων, μετά από κανονικοποίηση ως προς ίση ποσότητα δείγματος (μg πρωτεΐνης και μg φωσφόρου).

Όπως και στην περίπτωση των PC, η ποσοτικοποίηση των PE πραγματοποιήθηκε μετά από φόρτωση ίσων ποσοτήτων δείγματος, κανονικοποιημένων ως προς τα μg ολικής πρωτεΐνης και τα μg φωσφόρου (P), διασφαλίζοντας τον έλεγχο της αρχικής ποσότητας βιολογικού υλικού. Συνεπώς, οι παρατηρούμενες αυξήσεις στα επίπεδα των PE ειδών αποδίδονται σε πραγματικές βιολογικές αποκρίσεις των κυττάρων στη μηχανική καταπόνηση και όχι σε τεχνικές διαφοροποιήσεις της ανάλυσης.

Γ.13 Συμβολή της *in silico* προσέγγισης

Η ανάπτυξη της *in silico* βάσης δεδομένων αποτέλεσε ουσιαστικό εργαλείο για την ενίσχυση της αξιοπιστίας και της ακρίβειας της ταυτοποίησης των λιπιδικών μορίων. Μέσω της δημιουργίας θεωρητικών προτύπων θραυσματοποίησης (*in silico* fragmentation) και της οργάνωσής τους σε επιμελημένη φασματική βιβλιοθήκη, κατέστη δυνατή η συστηματική αντιστοίχιση των πειραματικών MS/MS φασμάτων με αναμενόμενα πρότυπα. Η προσέγγιση αυτή μείωσε τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα και βελτίωσε το επίπεδο εμπιστοσύνης στην ταυτοποίηση, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ισοβαρών ή δομικά συγγενών λιπιδικών ειδών.

Η συμβολή της παρούσας διατριβής στη λιπιδομική ανάλυση έγκειται όχι μόνο στη βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων, αλλά και στη μεθοδολογική ενίσχυση της αναλυτικής διαδικασίας μέσω της ενσωμάτωσης υπολογιστικών εργαλείων και curated φασματικών βιβλιοθηκών. Η συνδυαστική χρήση πειραματικών δεδομένων υψηλής διακριτικής ικανότητας και η *in silico* προσέγγιση συνέβαλε στη βαθύτερη και πιο τεκμηριωμένη χαρτογράφηση του λιπιδικού προφίλ υπό συνθήκες μηχανικής διάτασης.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της μελέτης ανέδειξαν χρονικά εξαρτώμενες μεταβολές σε συγκεκριμένες κατηγορίες λιπιδίων που σχετίζονται με τον καταρράκτη σηματοδότησης PI3K/PTEN/AKT, υποδεικνύοντας πιθανό ρυθμιστικό ρόλο της λιπιδικής αναδιαμόρφωσης στη μεταγωγή του μηχανικού σήματος. Η ανάδειξη αυτών των μεταβολών, σε συνδυασμό με τη στοχευμένη υπολογιστική υποστήριξη της ταυτοποίησης, ενισχύει τη σημασία των αποτελεσμάτων και προσδίδει αξία στη λιπιδομική προσέγγιση που ακολουθήσαμε, ανοίγοντας παράλληλα έναν δρόμο για τη συνδυαστική αξιοποίηση της υπολογιστικής χημείας με τα πειραματικά δεδομένα.

ΜΕΡΟΣ Δ
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Δ. Συμπεράσματα

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής προτείνεται ένα μοντέλο μηχανισμού σύμφωνα με το οποίο η μηχανική διάταξη στα κύτταρα A549 ενεργοποιεί την οδό σηματοδότησης PI3K/Akt μέσω μηχανισμών μεταγωγής μηχανικού σήματος, οι οποίοι ξεκινούν από την κυτταρική μεμβράνη και καταλήγουν σε ενδοκυττάρια μεταβολές δρώντας μέσω της φωσφορυλίωσης καθοδικά στο μονοπάτι PI3K/Akt.

Συγκεκριμένα, η εφαρμογή μηχανικής διάταξης για διάρκειες 1, 30 και 120 λεπτά οδήγησε σε αύξηση της φωσφορυλίωσης της Akt στη θέση Ser473, γεγονός που υποδηλώνει την ενεργοποίηση της οδού PI3K/Akt. Η απουσία σήματος της φωσφορυλιωμένης Akt παρουσία του αναστολέα PI3K class I, pictilisib, επιβεβαιώνει ότι η ενεργοποίηση της Akt είναι εξαρτώμενη από τη δραστηριότητα της PI3K. Τα δεδομένα αυτά τεκμηριώνουν ότι το μηχανικό ερέθισμα μετατρέπεται σε βιοχημικό σήμα μέσω της ενεργοποίησης της PI3K και την συνεπακόλουθη παραγωγή PIP3 από PIP2.

Στο προτεινόμενο μοντέλο, η μηχανική διάταξη ανιχνεύεται, πιθανώς, από μηχανοευαίσθητες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως οι ιντεγκρίνες και άλλες πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, οι οποίες μεταδίδουν το μηχανικό ερέθισμα καθοδικά, σε ενδοκυττάρια σηματοδοτικές πρωτεΐνες. Η ενεργοποίηση της PI3K οδηγεί σε τοπική αύξηση των επιπέδων PIP3, η οποία επιτρέπει την πρόσδεση και την στρατολόγηση της Akt. Στη συνέχεια, η Akt φωσφορυλιώνεται στη Ser473 και ενεργοποιείται, πυροδοτώντας καθοδικές αποκρίσεις που σχετίζονται με επιβίωση, μεταβολισμό και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού.

Ρυθμιστικό ρόλο στη συγκεκριμένη σηματοδοτική πορεία διαδραματίζει η φωσφατάση PTEN, η οποία αποφωσφορυλιώνει την PIP3 προς PIP2, περιορίζοντας την ένταση και τη διάρκεια του σήματος. Η χρήση του αναστολέα bpV(phen) αναδεικνύει τη σημασία της PTEN ως αρνητικού ρυθμιστή της οδού, επιβεβαιώνοντας ότι η ισορροπία μεταξύ PI3K και PTEN καθορίζει το τελικό επίπεδο ενεργοποίησης της Akt.

Πέρα από την μελέτη και ερμηνεία του καθοδικού μονοπατιού της σηματοδότησης από την εφαρμογή μηχανικής διάστασης, τα δεδομένα της λιπιδομικής ανάλυσης υποδηλώνουν ότι η εφαρμογή μηχανικής διάταξης σε κύτταρα A549 συνοδεύεται από αναδιαμόρφωση του λιπιδικού προφίλ των κυττάρων. Μεταβολές σε είδη φωσφοϊνσιτιδίων (PI, PIP, PIP2, PIP3), καθώς και σε γλυκεροφωσfolιπίδια όπως PC, PE και PS, ενδέχεται να επηρεάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες της μεμβράνης και να διευκολύνουν τη οργάνωση των σηματοδοτικών σημάτων. Κατά συνέπεια, προτείνεται ότι η μηχανική διάταξη δεν ενεργοποιεί

μόνο την PI3K/Akt, αλλά συμβάλλει σε δυναμική αναδιοργάνωση του συνολικού λιπιδιώματος των κυττάρων, η οποία ενισχύει ή σταθεροποιεί τη σηματοδοτική απόκριση.

Η σύγκριση των ευρημάτων με τη βιβλιογραφία αναδεικνύει σημαντικές ομοιότητες αλλά και στοιχεία πρωτοτυπίας. Η ενεργοποίηση της οδού PI3K/Akt ως απόκριση σε μηχανικά ερεθίσματα έχει περιγραφεί εκτενώς στη βιβλιογραφία, κυρίως σε ενδοθηλιακά και μυϊκά κύτταρα. Μηχανικές δυνάμεις όπως οι διατμητικές τάσεις και η κυκλική διάταση έχουν δείχθει ότι ενεργοποιούν την PI3K μέσω ιντεγκρινών, G-protein-coupled receptors (GPCRs) και μηχανοεξαρτώμενων διαύλων ιόντων, οδηγώντας σε παραγωγή PIP3 και επακόλουθη φωσφορυλίωση της Akt. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι η εφαρμογή διατμητικών τάσεων (shear stress) σε ενδοθηλιακά κύτταρα προκαλεί ταχεία ενεργοποίηση της Akt μέσω της οδού PI3K/Akt, γεγονός που συνδέεται με την επιβίωση των κυττάρων και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού^{208,211}. Επιπλέον, οι integrin-mediated μηχανισμοί μεταγωγής μηχανικού σήματος έχουν αναγνωριστεί ως βασικοί ρυθμιστές της PI3K/Akt σηματοδότησης ως απόκριση στην μηχανική παραμόρφωση²¹⁰.

Η βιβλιογραφία έχει επίσης αναδείξει τη σημασία της PTEN ως αρνητικού ρυθμιστή της PI3K/Akt οδού, ιδιαίτερα σε καρκινικά κύτταρα όπου η δυσλειτουργία της οδηγεί σε υπερενεργοποίηση της Akt²⁰⁹. Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν τη ρυθμιστική ισορροπία PI3K/PTEN και την καθοριστική της συμβολή στην ένταση του σήματος μετά από μηχανική διέγερση. Με βάση τα παραπάνω, είναι πιθανό η PTEN να συμμετέχει ενεργά στη ρύθμιση της αύξησης της φωσφορυλίωσης της Akt που παρατηρείται μετά από μηχανική διάταση, μέσω μηχανισμών που σχετίζονται με την αναστολή της PI3K σηματοδότησης. Η υπόθεση αυτή θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω σε μελλοντικά πειράματα.

Η παρούσα διατριβή συμφωνεί με τα παραπάνω δεδομένα, επιβεβαιώνοντας ότι η μηχανική διάταση οδηγεί σε ενεργοποίηση της Akt μέσω της οδού PI3K/Akt. Ωστόσο, σε αντίθεση με τις περισσότερες προηγούμενες μελέτες που επικεντρώνονται αποκλειστικά σε πρωτεϊνικό επίπεδο, η παρούσα εργασία ενσωματώνει λιπιδωμική ανάλυση επιτρέποντας τη συσχέτιση μεταβολών στο λιπιδίωμα με τη δυναμική της σηματοδότησης. Η καινοτομία της παρούσας μελέτης έγκειται στον συνδυασμό της μηχανικής βιολογίας με την στοχευμένη και μη στοχευμένη λιπιδωμική ανάλυση με αναλυτή μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας, καθώς και στη χρήση υπολογιστικής χημείας από δεδομένα *in silico* θραυσματοποίησης για την ενίσχυση της ταυτοποίησης περισσότερων λιπιδικών ειδών. Η ολοκληρωμένη αυτή

προσέγγιση επιτρέπει τη συσχέτιση μεταβολών στις πορείες σηματοδότησης με μεταβολές στη λιπιδική σύσταση των κυττάρων, παρέχοντας ένα πολυεπίπεδο μοντέλο κατανόησης της μηχανο-βιολογικής απόκρισης.

Συνολικά, προτείνεται ότι η μηχανική διάταση στα κύτταρα A549 ενεργοποιεί την οδό PI3K/Akt μέσω μηχανισμών μεταγωγής μηχανικού σήματος που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της PI3K, αύξηση των επιπέδων PIP3 και φωσφορυλίωση της Akt, ενώ παράλληλα προκαλεί αναδιοργάνωση του λιπιδικού προφίλ των κυττάρων. Η ισορροπία μεταξύ PI3K και PTEN ρυθμίζει τη διάρκεια και την ένταση του σήματος, διαμορφώνοντας την τελική κυτταρική απόκριση στη μηχανική διάταση.

ΜΕΡΟΣ Ε
ΑΝΑΦΟΡΕΣ
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Birla, R. Introduction to tissue engineering: applications and challenges. *John Wiley & Sons* (2014).
2. Bernard Piette. Modelling the Cytoskeleton - The cytoskeleton in the cell: actin filament in red and microtubules in green. (2015).
3. Guolla L Haase K, and Pelling AE, B. M. Force transduction and strain dynamics in actin stress fibres in response to nanonewton forces. *J. Cell. Sci.* **125**, 603–613 (2012).
4. Harris Jreij, P., and Fletcher, D.A., A. R. Mechanotransduction by the actin cytoskeleton: converting mechanical stimuli into biochemical signals. *Annual review of biophysics* **47**, 617–631 (2018).
5. Pollard and Cooper, J.A., T. D. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**, 1208–1212 (2009).
6. Shaw DeLuca, J.G., and Bamberg, J.R., A. E. ADF/cofilin regulates actomyosin assembly through competitive inhibition of myosin II binding to F-actin. *Developmental cell* **22**, 530–543 (2012).
7. Hayakawa Tatsumi, H., and Sokabe, M., K. Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament. *Journal of Cell Biology* **195**, 721–727 (2011).
8. Hayakawa Sakakibara, S., Sokabe, M., and Tatsumi, H., K. Single-molecule imaging and kinetic analysis of cooperative cofilin–actin filament interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 9810–9815 (2014).
9. Halder Dupont, S., and Piccolo, S., G. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nature reviews Molecular cell biology* **13**, 591–600 (2012).
10. Ohashi Fujiwara, S., and Mizuno, K., K. Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction. *The Journal of Biochemistry* **161**, 245–254 (2017).
11. Rao J, and L. N. Microfilament actin remodeling as a potential target for cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets* **4**, 345–354 (2004).
12. Olson TM Thibodeau SN, Tai YS, and Keating MT, M. V. V. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* **280**, 750–752 (1998).
13. Croxen MA, and F. B. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 26–38 (2010).
14. MB, G. Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 595–626 (2001).
15. Barbieri JT, Riese MJ, and A. K. Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 315–44 (2002).

16. Haglund CM, and W. M. Pathogens and polymers: microbe-host interactions illuminate the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **195**, 7–17 (2011).
17. Michell, R. The multiplying roles of inositol lipids and phosphates in cell control processes. *Essays Biochem.* **32**, 31–47 (1997).
18. Doyle, D. A. Molecular insights into ion channel function. *Mol Membr. Biol.* **21**, 221–225 (2004).
19. Kuchan Jo, H., and Frangos, J.A., M. J. Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **267**, C753–C758 (1994).
20. Jones TJ, N. SM. Mechanosensory calcium signaling. *Adv Exp Med Biol.* **740**, 1001–15 (2012).
21. Nilius B, D. G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev.* **81**, 1415–1459.
22. Gautam M Barakat AI., G. A. Flow-activated ion channels in vascular endothelium. *Cell Biochem Biophys.* **46**, 277–284 (2006).
23. Pettitt, T. R., Dove, S. K., Lubben, A., Calaminus, S. D. J. & Wakelam, M. J. O. Analysis of intact phosphoinositides in biological samples. *J. Lipid Res.* **47**, 1588–1596 (2006).
24. Knudsen and Frangos, J.A., H. L. Role of cytoskeleton in shear stress-induced endothelial nitric oxide production. *American Journal of Physiology-Heart Circulatory Physiology* **273**, H347–H355 (1997).
25. Gudi Nolan, J.P., and Frangos, J.A., S. Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 2515–2519 (1998).
26. Chachisvilis Zhang, Y.-L., and Frangos, J.A., M. G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 15463–15468 (2006).
27. Mederos y Schnitzler M Meibers S, Nurwakagari P, Breit A, Essin K, Gollasch M, Gudermann T., S. U. Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J.* **27**, 3092–3103.
28. Yasuda N Qin Y, Zou Y, Komuro I., A. H. A novel mechanism of mechanical stress-induced angiotensin II type 1-receptor activation without the involvement of angiotensin II. *Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **377**, 393–399.
29. Abdul-Majeed S, N. SM. Dopamine receptor type 5 in the primary cilia has dual chemo- and mechano-sensory roles. *Hypertension* **58**, 325–31.
30. Makino A Bünemann M, Wang JM, Yao W, Schmid-Schönbein GW., P. E. R. G protein-coupled receptors serve as mechanosensors for fluid shear stress in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol.* **290**, C1633-9.

31. Zhang YL Chachisvilis M., F. J. A. Mechanical stimulus alters conformation of type 1 parathyroid hormone receptor in bone cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* **296**, C1391-9.
32. Foster L., D. A. and X. Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol. Cancer Res.*, **1**, 789–800 (2003).
33. KW, W. ‘Phospholipid transfer proteins’. *Annual Review of Biochemistry* **60**, 73–99 (1991).
34. Sohlenkamp, C., López-Lara, I. M. & Geiger, O. Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Progress in lipid research* **42**, 115–162 (2003).
35. Annibal Riemer, T., Jovanovic, O., Westphal, D., Griesser, E., Pohl, E.E., Schiller, J., Hoffmann, R. and Fedorova, M., A. Structural, biological and biophysical properties of glycated and glycooxidized phosphatidylethanolamines. *Free Rad. Biol. Med.*, **95**, 293–307 (2016).
36. Viaud, J. *et al.* Phosphoinositides: Important lipids in the coordination of cell dynamics. *Biochimie* **125**, 250–258 (2016).
37. Pizarro-Cerdá, J. & Cossart, P. Subversion of phosphoinositide metabolism by intracellular bacterial pathogens. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1026–1033 (2004).
38. Sasaki, T. *et al.* Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Prog. Lipid Res.* **48**, 307–343 (2009).
39. Y. Sun A.C. Hedman, R.A. Anderson, N. T. Phosphatidylinositol 4,5- biphosphate: targeted production and signaling. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **35**, 513e522-513e522 (2013).
40. R.S. Salamon, J. M. B. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate: tool of choice for class I PI 3-kinases. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **35**, 602e611-602e611 (2013).
41. K.O. Schink H. Stenmark, C. R. Phosphatidylinositol 3-phosphate, a lipid that regulates membrane dynamics, protein sorting and cell signalling. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **35**, 900e912-900e912 (2013).
42. M.A. De Matteis G. D’Angelo, C. W. Phosphatidylinositol-4-phosphate: the Golgi and beyond. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **35**, 612e622.-612e622. (2013).
43. A. Gassama-Diagne, B. P. Phosphoinositide signaling pathways: promising role as builders of epithelial cell polarity. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **273**, 313e343-313e343 (2009).
44. Garcia-Gonzalo FR Roberson EC, Garcia G 3rd, Abedin M, Schurmans S, Inoue T, Reiter JF., P. S. C. Phosphoinositides Regulate Ciliary Protein Trafficking to Modulate Hedgehog Signaling. *Dev Cell* **34**, 400–409 (2015).
45. M. Falasca, *et al.* The role of phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling. *J. Biol. Chem.* **82**, 28226e28236-28226e28236 (2007).

46. I. Ivetac, et al. The type Ialpha inositol polyphosphate 4-phosphatase generates and terminates phosphoinositide 3-kinase signals on endosomes and the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2218e2233-2218e2233 (2005).
47. J.E. Slessareva B. Temple, V.A. Bankaitis, H.G. Dohlman, S. M. R. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome. *Cell* **126**, 191e203-191e203 (2006).
48. A. Kihara N. Ishihara, Y. Ohsumi, T. N. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **152**, 519e530-519e530 (2001).
49. T. Proikas-Cezanne P. Donnes, O. Kohlbacher, Z. T. WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J. Cell Sci.* **128**, 207e217-207e217 (2015).
50. V. Dominguez, et al. Class II phosphoinositide 3-kinase regulates exocytosis of insulin granules in pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 4216e4225-4216e4225 (2011).
51. A.P. Sagona, et al. PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat. Cell Biol.* **12**, 362e371-362e371 (2010).
52. D. Lu, et al. Phosphatidylinositol 4-kinase Ialpha is palmitoylated by Golgilocalized palmitoyltransferases in cholesterol-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **287**, 21856e21865-21856e21865 (2012).
53. Y.J. Wei, et al. Type II phosphatidylinositol 4-kinase beta is a cytosolic and peripheral membrane protein that is recruited to the plasma membrane and activated by Rac-GTP. *J. Biol. Chem.* **277**, 46586e46593-46586e46593 (2002).
54. A. Godi, et al. ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P2 on the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* **1**, 280e287-280e287 (1999).
55. A. Hausser, et al. Phospho-specific binding of 14-3-3 proteins to phosphatidylinositol 4-kinase III beta protects from dephosphorylation and stabilizes lipid kinase activity. *J. Cell Sci.* **119**, 3613e3621-3613e3621 (2006).
56. A. Blagoveshchenskaya, et al. Integration of Golgi trafficking and growth factor signaling by the lipid phosphatase SAC1. *J. Cell Biol.* **180**, 803e812-803e812 (2008).
57. L. Demmel, et al. The clathrin adaptor Gga2p is a phosphatidylinositol 4- phosphate effector at the Golgi exit. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1991e2002-1991e2002 (2008).
58. E. Mizuno-Yamasaki J. Coleman, P. Novick, M. M. Phosphatidylinositol 4-phosphate controls both membrane recruitment and a regulatory switch of the Rab GEF Sec2p. *Dev. Cell* **18**, 828e840-828e840 (2010).
59. J. Viaud H. Tronchere, F. Gaits-Iacovoni, B., F. B. Payrastre, Phosphatidylinositol 5-phosphate: a nuclear stress lipid and a tuner of membranes and cytoskeleton dynamics. *BioEssays news Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **36**, 260e272-260e272 (2014).

60. D. Sarkes, L. E. R. A novel HPLC-based approach makes possible the spatial characterization of cellular PtdIns5P and other phosphoinositides. *Biochem. J.* **428**, 375e384-375e384 (2010).
61. K. Niebuhr, et al. Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the S.flexneri effector IpgD reorganizes host cell morphology. *EMBO J.* **21**, 5069e5078-5069e5078 (2002).
62. Y. Posor, et al. Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol- 3,4-bisphosphate. *Nature* **499**, 233e237-233e237 (2013).
63. T. Oikawa T. Takenawa, T. I. Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *J. Cell Biol.* **182**, 157e169-157e169 (2008).
64. A.J. McCartney L.S. Weisman, Y. Z. Phosphatidylinositol 3,5- bisphosphate: low abundance, high significance. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **36**, 52e64-52e64 (2014).
65. D. Sbrissa A. Shisheva, O. C. I. Phosphatidylinositol 3-phosphateinteracting domains in PIKfyve. Binding specificity and role in PIKfyve. Endomenbrane localization. *J. Biol. Chem.* **277**, 6073e6079-6073e6079 (2002).
66. K. Hnia A. Bolino, J. Laporte, I. V. Myotubularin phosphoinositide phosphatases: cellular functions and disease pathophysiology. *Trends Mol. Med.* **18**, 317e327-317e327 (2012).
67. A.C. Rutherford, et al. The mammalian phosphatidylinositol 3-phosphate 5- kinase (PIKfyve) regulates endosome-to-TGN retrograde transport. *J. Cell Sci.* **119**, 3944e3957-3944e3957 (2006).
68. K.M. Vasudevan, L. A. G. AKT signaling in physiology and disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **347**, 105e133-105e133 (2010).
69. Mesmin, B. *et al.* XA four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi Tether OSBP. *Cell* **155**, 830 (2013).
70. Xiong H Mou B, Qin J, Motes D, Lu W, et al., S. A. Genetic Diversity and Population Structure of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *PLoS ONE* **11**, e0160941–e0160941 (2016).
71. Hammond G Schiavo G., T. C. L. Nuclear phosphoinositides and their functions. *Curr Top Microbiol Immunol* **282**, 177–206 (2004).
72. Jill B. Jensen Björn H. Falkenburger, E. J. D. Phospholipids | Lipid Signaling and Ion Channels. in *Encyclopedia of Biological Chemistry III (Third Edition)*, Elsevier 537–544 (2021). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819460-7.00110-9>.
73. Di Paolo G, D. C. P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657 (2006).
74. MG., R. Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol Rev* **84**, 699–730 (2004).

75. Vivanco I, S. CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 489–501 (2002).
76. Pitt SC, C. H. The phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling pathway in medullary thyroid cancer. *Surgery* **144**, 721–724 (2008).
77. Yang, J. *et al.* Targeting PI3K in cancer: Mechanisms and advances in clinical trials 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. *Molecular Cancer* **18**, 1–28 (2019).
78. Laplante and Sabatini, D. M., M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274–293 (2012).
79. Chu EC, T. A. ‘PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology’. *Medical Science Monitor* **10**, RA235–41.
80. Chu EC, T. A. ‘PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology’. *Medical Science Monitor* **10**, RA235–41.
81. Leslie NR Maccario H, Davidson L, Downes CP, B. I. H. Understanding PTEN regulation: PIP2, polarity and protein stability. *Oncogene* **27**, 5464e76-5464e76 (2008).
82. Fragoso R, B. JT. PTEN and leukemia stem cells. *Adv Biol Regul* **56**, 22e9 (2014).
83. Song MS Pandolfi PP., S. L. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 283e96-283e96 (2012).
84. Bassi C Srikumar T, Dowling RJ, Gorrini C, Miller SJ, et al, H. J. Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. *Science (New York, NY)* **341**, 395e9-395e9 (2013).
85. Kwak YD Diao S, Zhang X, Chen Y, Hsu J, et al, M. T. NO signaling and S-nitrosylation regulate PTEN inhibition in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **5**, 49 (2010).
86. Lee JO Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, et al, Y. H. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* **99**, 323e34-323e34 (1999).
87. Alimonti A Clohessy JG, Trotman LC, Nardella C, Egia A, et al, C. A. Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat Genet* **42**, 454e8-454e8.
88. Ruan H Ren S, Gao J, Li G, Kim R, et al, L. J. Inducible and cardiac specific PTEN inactivation protects ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 193e200-193e200 (2009).
89. Park KK Hu Y, Smith PD, Wang C, Cai B, et al, L. K. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/ mTOR pathway. *Science (New York, NY)* **322**, 963e6-963e6 (2008).
90. Lee JO Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, Dixon JE, Pandolfi P, Pavletich NP, Y. H. ‘Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for

- its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association'. *Cell* **99**, 323–334.
91. Campbell RB Ross AH, L. F. 'Allosteric activation of PTEN phosphatase by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate'. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 33617–33620.
 92. Iijima M Luo HR, Vazquez F, Devreotes PN, H. Y. E. 'Novel mechanism of PTEN regulation by its phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding motif is critical for chemotaxis'. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 16606–16613.
 93. Spinelli, L., Lindsay, Y. E. & Leslie, N. R. PTEN inhibitors: An evaluation of current compounds. *Advances in Biological Regulation* **57**, 102–111 (2015).
 94. Liu, M., Tanswell, A. K. & Post, M. Mechanical force-induced signal transduction in lung cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **277**, (1999).
 95. Hadrioui M.; Derouichea, A.; Ridouanea, A., N. ; L. Physical properties of phospholipids and integral proteins and their biofunctional roles in pulmonary surfactant from molecular dynamics simulation. *RSC Adv.* **10**, 8568–8579 (2020).
 96. Ruaro, B. *et al.* The history and mystery of alveolar epithelial type ii cells: Focus on their physiologic and pathologic role in lung. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 1–16 (2021).
 97. Liu, M., Tanswell, A. K. & Post, M. Mechanical force-induced signal transduction in lung cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **277**, (1999).
 98. Khan PA Piedboeuf B., C. M. Tracheal occlusion: a review of obstructing fetal lungs to make them grow and mature. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **145C**, 125–138 (2007).
 99. Seaborn T Cloutier M, Tremblay MG, Maltais F, Dinel S, S.-A. J. & Moulin V Piedboeuf B., K. P. A. Identification of cellular processes that are rapidly modulated in response to tracheal occlusion within mice lungs. *Pediatr Res* **63**, 124–130 (2008).
 100. Desai, L. P., White, S. R. & Waters, C. M. Cyclic mechanical stretch decreases cell migration by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase- and focal adhesion kinase-mediated JNK1 activation. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 4511–4519 (2010).
 101. S., U. Ventilation-induced lung injury and mechanotransduction: sStretching it too far? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**, L892-896 (2002).
 102. JC., P. Inhibitors of myosin light chain kinase and phosphodiesterase reduce ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol* **89**, 2241–2248 (2000).
 103. Vlahakis NE Limper AH, and Hubmayr, S. M. A. & RD. Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* **277**, L167-173 (1999).
 104. CM., W. Reactive oxygen species in mechanotransduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**, L484-485 (2004).

105. Birukov KG Flores AA, Ye SQ, Birukova AA, J. J. R. & Verin AD, and G. J. G. Magnitude-dependent regulation of pulmonary endothelial cell barrier function by cyclic stretch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L785-797 (2003).
106. Birukov KG Lehoux S, Merval R, Shirinsky VP, B. N. & A., and T. Intraluminal pressure is essential for the maintenance of smooth muscle caldesmon and filamin content in aortic organ culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 922–927 (1998).
107. Kippenberger, S. *et al.* Mechanical stretch stimulates protein kinase B/Akt phosphorylation in epidermal cells via angiotensin II type 1 receptor and epidermal growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 3060–3067 (2005).
108. Li, J. & Russell, B. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates CapZ β 1 and actin dynamics in response to mechanical strain. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **305**, 1614–1623 (2013).
109. Huang S Blanchoin L, Staiger CJ, G. L. Heterodimeric capping protein from Arabidopsis is regulated by phosphatidic acid. *Mol Biol Cell* **17**, 1946–1958 (2006).
110. RO., H. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).
111. Wirtz HR, D. LG. Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells. *Science* **250**, 1266–1269 (1990).
112. Sanchez-Esteban J Wang Y, Tsai SW, Williams LK, C. L. A. & Torday JS, R. L. P. Mechanical stretch promotes alveolar epithelial type II cell differentiation. *J Appl Physiol* **91**, 589–595 (2001).
113. Tschumperlin DJ Margulies AS., O. J. Deformation-induced injury of alveolar epithelial cells. Effect of frequency, duration, and amplitude. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, 357–362 (2000).
114. Hammerschmidt S Grasenack T, Gessner C, Wirtz H., K. H. Apoptosis and necrosis induced by cyclic mechanical stretching in alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**, 396–402 (2004).
115. Bao S Sweeney P, Chaudhuri A, Doseff AI, Marsh CB, Knoell, W. Y. & DL. Keratinocyte growth factor induces Akt kinase activity and inhibits Fas-mediated apoptosis in A549 lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**, L36-42 (2005).
116. Oswari J Margulies SS., M. M. A. Keratinocyte growth factor reduces alveolar epithelial susceptibility to in vitro mechanical deformation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L1068–L1077 (2001).
117. Hammerschmidt, S., Kuhn, H., Gessner, C., Seyfarth, H. J. & Wirtz, H. Stretch-induced alveolar type II cell apoptosis: Role of endogenous bradykinin and PI3K-Akt signaling. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **37**, 699–705 (2007).

118. Fisher AB, D. C. Role of acidic Ca²⁺ -independent phospholipase A2 in synthesis of lung dipalmitoylphosphatidylcholine. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **272**, L238–L243 (1997).
119. Chen X Mucenski ML, Mason RJ, Shannon JM, H. B. A. Identification and characterization of a lysophosphatidylcholine acyltransferase in alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 11724–11729 (2006).
120. Lamb RG McKinney JS, Rzigalinski BA, Ellis EF, H. C. C. Alterations in phosphatidylcholine metabolism of stretchinjured cultured rat astrocytes. *J Neurochem* **68**, 1904–1910 (1997).
121. Letsiou E Nakos G, Lekka ME, K. E. I. Mild stretch activates cPLA(2) in alveolar type II epithelial cells independently through the MEK/ERK and PI3K pathways. *Biochim Biophys Acta* **1811**, 370–376 (2011).
122. Torday JS, R. V. Stretch-stimulated surfactant synthesis is coordinated by the paracrine actions of PTHP and leptin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**, L130–L135 (2002).
123. Kitsiouli EI Lekka ME, N. G. Phospholipase A2 subclasses in acute respiratory distress syndrome. *Biochim Biophys Acta* **1792**, 941–953 (2009).
124. Fuchs R.; Teubera, K.; Eibisch, M.; Schiller, J., B. ; S. Lipid analysis by thin-layer chromatography—A review of the current state. *J. Chromatogr. A* **1218**, 2754–2774 (2011).
125. Tang K.H., B. ; R. Development of gas chromatography analysis of fatty acids in marine organisms. *J. Chromatogr. Sci.* **51**, 599–607 (2013).
126. Saeed N.K., S. ; H. High-performance liquid chromatography and spectroscopic studies on fish oil oxidation products extracted from frozen atlantic mackerel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76**, 391–397 (1999).
127. Goodridge R.M.; Pestka, J.J.; Smith, D.M., C. F. ; B. ELISA for monitoring lipid oxidation in chicken myofibrils through quantification of hexanal-protein adducts. *J. Agric. Food Chem.* **17**, 7533–7539 (2003).
128. Knothe J.A., G. ; K. Determination of the fatty acid profile by 1H NMR spectroscopy. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **106**, 88–96 (2004).
129. Harkewicz E.A., R. ; D. Applications of mass spectrometry to lipids and membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 301–325 (2011).
130. Biemann, K. Laying the groundwork for proteomics: mass spectrometry from 1958 to 1988. *J. Proteomics* **107**, 62–70 (2014).
131. Zhu Fang, Q., Y. Analytical detection techniques for droplet microfluidics. *Anal. Chim. Acta* **787**, 24–35 (2013).
132. Pi Sael, L., J. Mass spectrometry coupled experiments and protein structure modeling methods. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 20635–20657 (2013).

133. Steendam Ceuleneer, M.D., Dhaenens, M., Hoofstat, D.V., Deforce, D., K. V. Mass spectrometry-based proteomics as a tool to identify biological matrices in forensic science. *Int. J. Legal. Med.* **127**, 287–298 (2013).
134. Benesch Ruotolo, B.T., J. L. P. Mass spectrometry: come of age for structural and dynamical biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 641–649 (2011).
135. Glish Vachet, R.W., G. L. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2**, 140–150 (2003).
136. Fenn Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M., J. B. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71 (1989).
137. Theodoridis, G. *et al.* Κεφάλαιο 12 : Φασματομετρία Μάζας. *Βιοαναλυτική Χημεία* 1–13 (2016).
138. Theodoridis, G. *et al.* Κεφάλαιο 12 : Φασματομετρία Μάζας. *Βιοαναλυτική Χημεία* 1–13 (2016).
139. Wei, J., Xiang, L. & Cai, Z. Emerging environmental pollutants hydroxylated polybrominated diphenyl ethers: From analytical methods to toxicology research. *Mass Spectrom. Rev.* **40**, 255–279 (2021).
140. Kebarle L., P. ; T. From ions in solution to ions in the gas phase. *Analytical chemistry* **65**, 972A-986A (1993).
141. de Hoffmann V., E. ; S. Electrospray. In *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Third ed. *John Wiley & Sons, Ltd: West Sussex, England* 43–46 (2013).
142. Dole, M. Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics* **49**, 2240 (1968).
143. Iribarne, J. V. On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics* **64**, 2287 (1976).
144. Marvin M. A.; Fay, L. B., L. F. ; R. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* **337**, 11–21 (2003).
145. Gross, J. H. *Mass spectrometry*. 2nd ed.; *Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Heidelberg* 773 (2011).
146. Fuchs R.; Schiller, J., B. ; S. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog Lipid Res* **49**, 450–475 (2010).
147. Fuchs J., B. ; S. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics. *European Journal of Lipid Science and Technology* **111**, 83–98 (2009).
148. Hillenkamp T. W.; Karas, M., F. ; J. The MALDI Process and Method. *Maldi Ms* 2–40 (2014).
149. Dreisewerd, K. The desorption process in MALDI. *Chemical Reviews* **103**, 395–425 (2003).

150. Quist T.; Sundqvist, B. U. R., A. P. ; H.-F. Total yield measurements in matrix-assisted laser desorption using a quartz crystal microbalance. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **8**, 149–154 (1994).
151. Knochenmuss F.; Dale, M. J.; Zenobi, R., R. ; D. The matrix suppression effect and ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **10**, 871–877 (1996).
152. Knochenmuss, R. Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analytst* **131**, 966–986 (2006).
153. Karas M.; Schäfer, J., M. ; G. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: Singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 1–12 (2000).
154. de Hoffmann V., E. ; S. Formation and Fragmentation of Ions: Basic Rules In Mass Spectrometry: Principles and Applications, Third ed.; *John Wiley & Sons, Ltd: West Sussex, England*, 76–80 (2013).
155. Tan V. V.; Doroshenko, V. M., P. V. ; L. Atmospheric Pressure MALDI with Pulsed Dynamic Focusing for High-Efficiency Transmission of Ions into a Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* **76**, 2462–2469 (2004).
156. de Hoffmann V., E. ; S. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization. In Mass Spectrometry: Principles and Applications, Third ed. *John Wiley & Sons, Ltd: West Sussex, England* 33–41 (2013).
157. de Hoffmann V., E. ; S. Quadrupole Analysers. In Mass Spectrometry: Principles and Applications, Third ed. *John Wiley & Sons, Ltd: West Sussex, England* 88–99 (2013).
158. Seppanen-Laakso M., T. ; O. How to study lipidomes. *J. Mol. Endocrinol.* **42**, 185–190 (2009).
159. Zhao Y.J.; Elson, P.; Tan, H.Y.; Plummer, S.J.; Berk, M.; Aung, P.P.; Lavery, I.C., Z. W. ; X. & Achkar L., J. P. ; L. Plasma lysophosphatidylcholine levels: Potential biomarkers for colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 2696–2701 (2007).
160. Poczobutt M.; Amin, J.; Hanson, D.; Li, H.; Walker, D.; Weiser-Evans, M.; Lu, X., J. M. ; G. & Murphy R.A., R. C. ; N. Eicosanoid profiling in an orthotopic model of lung cancer progression by mass spectrometry demonstrates selective production of leukotrienes by inflammatory cells of the microenvironment. *PLoS One* **8**, e79633–e79633 (2013).
161. Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry* **72**, (2000).
162. Kingdon, K. H. A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures. *Physical Review* **21**, 408–418 (1923).
163. Knight, R. D. Storage of ions from laser-produced plasmas. *Applied Physics Letters* **38**, 221 (1981).

164. Oksman A, P. Fourier transform time-of-flight mass spectrometer. A SIMION calculation approach. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **141**, 67–76 (1995).
165. Perry R. G.; Noll, R., J., R. H. ; C. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews* **27**, 661–699 (2008).
166. Gillig B. K.; Russell, D. H., K. J. ; B. Ion motion in a Fourier transform ion cyclotron resonance wire ion guide cell. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **157–158**, 129–147 (1996).
167. Makarov E.; Lange, O., A. ; D. Performance evaluation of a high-field Orbitrap mass analyzer. *J Am Soc Mass Spectrom* **20**, 1391–1396 (2009).
168. Harris, D. C. High-performance liquid chromatography. In Quantitative Chemical Analysis, Seventh Ed ed. *W.H.Freeman and Company: New York, USA*, 556–570 (2007).
169. Y.Y. Zhao, R. C. L. UPLC–MSE application in disease biomarker discovery: the discoveries in proteomics to metabolomics. *Chem. Biol. Interact.* **215**, 7–16 (2014).
170. Dührkop M.; Ludwig, M.; Aksenov, A.A.; Melnik, A.V.; Meusel, M.; Dorrestein, P.C.; K. ; F. & Rousu S., J. ; B. SIRIUS 4: A rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nat. Methods* **16**, 299 (2019).
171. M. Li H. Nie, Y. Bai, H. Liu, Z. Z. Recent advances of chromatography and mass spectrometry in lipidomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 243–249 (2011).
172. Berdeaux, O. *et al.* Identification and quantification of phosphatidylcholines containing very-long-chain polyunsaturated fatty acid in bovine and human retina using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1217**, 7738–7748 (2010).
173. Kielkowska, A. *et al.* A new approach to measuring phosphoinositides in cells by mass spectrometry. *Advances in Biological Regulation* **54**, 131–141 (2014).
174. Ejlsing K.; Jackson, S.; Duchslav, E.; Hao, Z.; Pelt, C. K. v.; Simins, K.; C. S. ; E. & Shevchenko, A. Shotgun lipidomics: High throughput profiling of the molecular composition of phospholipids. *ASMS Abstract Archives* **25**, (2004).
175. Han, X. Mass spectrometry-based lipidomics approaches. In Lipidomics: Comprehensive Mass Spectrometry of Lipids, 1st ed. *John Wiley & Sons, Inc.* 53–87 (2016).
176. Han R. W., X. ; G. Electrospray ionization mass spectroscopic analysis of human erythrocyte plasma membrane phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 10635–10639 (1994).
177. Brugger G.; Sandhoff, R.; Wieland, F. T.; Lehmann, W. D., B. ; E. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2339–2344 (1997).

178. Bennett N.; Xu, H.; Franko, B.; Fai, S.; Figeys, D., S. A. L. ; V. Using neurolipidomics to identify phospholipid mediators of synaptic (dys)function in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Physiology* **4**, 1–16 (2013).
179. Tsui D. M.; Hubbell, W. L., F. C. ; O. The intrinsic pKa values for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in phosphatidylcholine host bilayers. *Biophysical Journal* **49**, 459–468 (1986).
180. Xu N.; Fai, S.; Figeys, D.; Bennett, S. A. L., H. ; V. Targeted lipidomics - Advances in profiling lysophosphocholine and platelet-activating factor second messengers. *FEBS Journal* **280**, 5652–5667 (2013).
181. Li J.; Wang, Z.; Liu, J. a.; Wei, J.; Xiong, S.; Zhao, Z., L. ; H. Mass spectrometry methodology in lipid analysis. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 10492–10507 (2014).
182. Schiller J.; Benard, S.; Müller, M.; Reichl, S.; Arnold, K., J. ; A. Lipid analysis by matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry: A methodological approach. *Analytical Biochemistry* **267**, 46–56 (1999).
183. Harvey, D. J. Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry of Phospholipids. *Journal of Mass Spectrometry* **30**, 1333–1346 (1995).
184. Thomas J. L.; Fournaise, E.; Chaurand, P., A. ; C. Sublimation of new matrix candidates for high spatial resolution imaging mass spectrometry of lipids: Enhanced information in both positive and negative polarities after 1,5-diaminonaphthalene deposition. *Analytical Chemistry* **84**, 2048–2054 (2012).
185. Cerruti F.; Laprevote, O.; Touboul, D.; Brunelle, A., C. D. ; B. MALDI imaging and structural analysis of rat brain lipid negative ions with 9-aminoacridine matrix. *Anal Chem* **84**, 2164–2171 (2012).
186. Steven J., R. T. ; B. Repeat MALDI MS imaging of a single tissue section using multiple matrices and tissue washes. *Anal Bioanal Chem* **405**, 4719–4728 (2013).
187. Guo Y.; Zhou, D.; Li, Z., S. ; W. Significantly increased monounsaturated lipids relative to polyunsaturated lipids in six types of cancer microenvironment are observed by mass spectrometry imaging. *Scientific Reports* **4**, 5959 (2014).
188. Pulfer R. C., M. ; M. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews* **22**, 332–364 (2003).
189. Kurien, B. T. & Scofield, R. H. Western blotting. *Methods* **38**, 283–293 (2006).
190. Murphy, R. M. & Lamb, G. D. Important considerations for protein analyses using antibody based techniques: down-sizing Western blotting up-sizes outcomes. *J. Physiol.* **591**, 5823–5831 (2013).
191. Towbin, H., T. Staehelin, and J. G. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350–4 (1979).

192. Posch, A., et al. V3 stain-free workflow for a practical, convenient, and reliable total protein loading control in western blotting. *J Vis Exp.* **82**, 50948 (2013).
193. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254 (1976).
194. Compton, S. J., & Jones, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **151**, 369–374 (1985).
195. Bartlett, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* **234**, 466–468 (1959).
196. Worsfold, P., McKelvie, I., & Monbet, P. Determination of phosphorus in natural waters: A historical review. *Analytica Chimica Acta*, **918**, 8–20 (2016).
197. Bartlett, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* **234**, 466–468 (1959).
198. Cajka Tomas and Fiehn, O. LC–MS-Based Lipidomics and Automated Identification of Lipids Using the LipidBlast In-Silico MS/MS Library. in *Lipidomics: Methods and Protocols* (ed. Bhattacharya, S. K.) 149–170 (Springer New York, New York, NY, 2017). doi:10.1007/978-1-4939-6996-8_14.
199. De Vijlder, T. *et al.* A tutorial in small molecule identification via electrospray ionization-mass spectrometry: The practical art of structural elucidation. *Mass Spectrom. Rev.* **37**, 607–629 (2018).
200. Tobias Kind, K.-H. L. D. Y. L. O. F. Generation of in-silico MS/MS mass spectra using combinatorial algorithms and reaction prediction expert systems. (2010).
201. Pi, J., Wu, X. & Feng, Y. Fragmentation patterns of five types of phospholipids by ultra-high-performance liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Analytical Methods* **8**, 1319–1332 (2016).
202. Hsu, F.-F. u & Turk, J. Electrospray ionization/tandem quadrupole mass spectrometric studies on phosphatidylcholines: the fragmentation processes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 352–363 (2003).
203. Hsu, F.-F. & Turk, J. Studies on Phosphatidylserine by Tandem Quadrupole and Multiple Stage Quadrupole Ion-Trap Mass Spectrometry with Electrospray Ionization: Structural Characterization and the Fragmentation Processes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 1510–1522 (2005).
204. Zhou, J. *et al.* HAMMER: automated operation of mass frontier to construct in silico mass spectral fragmentation libraries. *Bioinformatics* **30**, 581–583 (2014).
205. Kangas, L. J. *et al.* In silico identification software (ISIS): a machine learning approach to tandem mass spectral identification of lipids. *Bioinformatics* **28**, 1705–1713 (2012).
206. Djoumbou-Feunang, Y. *et al.* CFM-ID 3.0: Significantly Improved ESI-MS/MS Prediction and Compound Identification. *Metabolites* **9**, (2019).

207. Kielkowska, A. *et al.* A new approach to measuring phosphoinositides in cells by mass spectrometry. *Adv. Biol. Regul.* **54**, 131–141 (2014).
208. Kuchan, M. J., Jo, H., & Frangos, J. A. (1994). Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells. *The American journal of physiology*, *267*(3 Pt 1), C753–C758.
209. Vasudevan, K. M., & Garraway, L. A. (2010). AKT signaling in physiology and disease. *Current topics in microbiology and immunology*, *347*, 105–133.
210. Harris, A.R., Jreij, P., & Fletcher, D.A. (2018). Mechanotransduction by the Actin Cytoskeleton: Converting Mechanical Stimuli into Biochemical Signals. *Annual Review of Biophysics*, *47*, 617-631.
211. Chachisvilis, M., Zhang, Y. L., & Frangos, J. A. (2006). G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(42), 15463–15468.

Αφέθηκε σκόπιμα κενή σελίδα.