

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200199





245

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΦΩΤΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΣΙΔΗΡΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ
ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΒΛΑΒΩΝ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ DNA ΚΑΙ
ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΕΚΤΙΘΕΝΤΑΙ ΣΕ
ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ**

**ΠΑΣΧΑΛΗΣ ΘΩΜΑΣ Α. ΔΟΥΛΙΑΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004



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



Ημερομηνία αιτήσεως: 5-10-1999

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 390α/ 12-10-1999

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Γαλάρης (Επιβλέπων)

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας,

Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ορέστης Τσόλας (Μέλος)

Καθηγητής Βιολογικής Χημείας,

Αλέξανδρος Τσελέπης (Μέλος)

Επίκουρος Καθηγητής Χημικού Τμήματος

Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 18-10-1999

Ημερομηνία καταθέσεως της Διδακτορικής Διατριβής: 21-12-2004

Ο Πρόεδρος της Ιατρικής Σχολής: Επαμεινώνδας Τσιανός, Καθηγητής Παθολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ορέστης Τσόλας, Ομότιμος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, μέλος

Θεόδωρος Φώτης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, μέλος

Κωνσταντίνος Σεφεριάδης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, μέλος

Δημήτριος Γαλάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, επιβλέπων

Αλέξανδρος Τσελέπης, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημικού Τμήματος, μέλος

Ευάγγελος Κωλέττας, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας, μέλος

Σάββας Χριστοφορίδης, Λέκτορας Βιολογικής Χημείας, μέλος

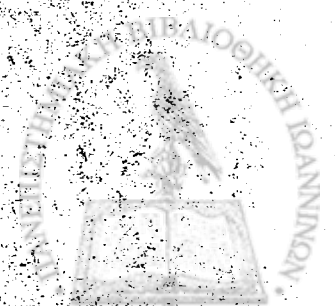
Η Διατριβή έγινε ομόφωνα αποδεκτή με Βαθμό: "ΑΡΙΣΤΑ"

Η γραμματέας της Σχολής

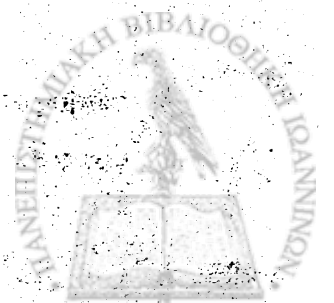
ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ



στην οικογένεια μου



στη Μαργαρίτα



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) είναι ένα ενδιάμεσο προϊόν της αναγωγής του O_2 σε νερό που σχηματίζεται και απομακρύνεται συνεχώς σε όλα τα είδη κυττάρων. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 ελέγχουν διάφορα μονοπάτια μεταγωγής του σήματος με αποτέλεσμα την τροποποίηση βασικών κυτταρικών διεργασιών όπως ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των κυττάρων. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις όμως το H_2O_2 δρα τοξικά προκαλώντας βλάβες σε όλα τα βασικά κυτταρικά συστατικά όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, τα σάκχαρα, και το DNA. Το πυρηνικό DNA, αν και είναι το βασικότερο από τα κυτταρικά συστατικά, αφού περιέχει τις πληροφορίες για την διατήρηση και εξέλιξη της ζωής είναι παράλληλα και ιδιαίτερα ευάλωτο στην τοξική δράση του H_2O_2 . Οι μοριακοί μηχανισμοί όμως με τους οποίους το H_2O_2 προκαλεί βλάβες στο DNA παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι.

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκαν οι μοριακοί μηχανισμοί πρόκλησης βλαβών στο κυτταρικό DNA μετά από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 . Αρχικά μελετήθηκε ο ρόλος αντιοξειδωτικών και μεταλλοδεσμευτικών παραγόντων και στη συνέχεια διερευνήθηκε ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των ιόντων σιδήρου που διαμεσολαβούν στην τοξική δράση του H_2O_2 . Επίσης, μελετήθηκε ο ρόλος των ιόντων σιδήρου στην απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 καθώς και η εμπλοκή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Άμεσος επιβλέπων ήταν ο Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Δημήτριος Γαλάρης, στον οποίο οφείλω θερμότες ευχαριστίες για τη διαρκή επιστημονική υποστήριξη και καθοδήγηση, το αμείωτο και ακούραστο ενδιαφέρον του καθώς και τις συμβουλές του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω και στον Ομότιμο Καθηγητή κ. Ορέστη Τσόλα, μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής, για το ενδιαφέρον που έδειξε κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας κ. Αλέξανδρο Τσελέπη, μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής, για την πολύτιμη συμβολή του.

Ευχαριστώ θερμά τον Λέκτορα Βιολογικής Χημείας κ. Σάββα Χριστοφορίδη για την συνεργασία που είχαμε, το ενδιαφέρον του και τις πολύτιμες συμβουλές του



οποιαδήποτε στιγμή τις χρειάστηκα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής κ.κ. Θεόδωρο Φώτση, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας, Κωνσταντίνο Σεφεριάδη, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας και Ευάγγελο Κωλέττα, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας, για τις συμβουλές και τα εποικοδομητικά τους σχόλια. Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στα μέλη της ομάδας Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Στρες για τη συνεργασία που είχαμε καθώς και στα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας για την βοήθεια τους στα διάφορα προβλήματα που παρουσιάστηκαν. Τέλος, ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Ιωάννη Μήτσιο για την πολύτιμη βοήθεια του κατά τα πρώτα βήματα της ενασχόλησης μου με την κυτταρομετρία ροής και τον διδάκτορα Βιοχημείας κ. Λουκά Τσιρώνη για την φιλία του και τη συμπαράσταση του στην αντιμετώπιση των προβλημάτων που παρουσιάστηκαν.

Με την ευκαιρία του προλόγου αυτού, θέλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κ. Μαργαρίτα Τενοπούλου για την υπομονή της καθώς και την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση της κατά τη διάρκεια της διατριβής μου.

Τέλος, περισσότερο από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την συνεχή ηθική και υλική υποστήριξη τους, συμβάλλοντας έτσι στην περάτωση των μέχρι τώρα σπουδών και της Διατριβής μου.

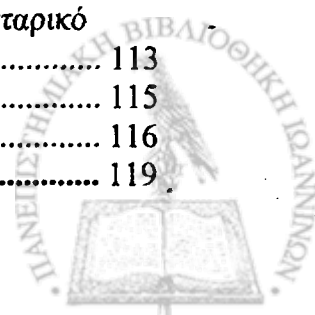


ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΧΗΜΑΤΑ	i
ΠΙΝΑΚΕΣ	iv
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	v
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1 Ελεύθερες Ρίζες-Αντιοξειδωτικοί παράγοντες.....	3
1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ).....	6
1.2.1 Οξειδοαναγωγική ισορροπία.....	8
1.2.2 Ανιόν του σουπεροξειδίου (O_2^-).....	9
1.2.3 Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).....	9
1.2.3.1 Ο ρόλος του υπεροξειδίου του υδρογόνου στην μεταγωγή του σήματος.....	10
1.2.3.2 Υπεροξείδιο του υδρογόνου και κυτταρικός πολλαπλασιασμός.....	12
1.2.3.3 Υπεροξείδιο του υδρογόνου και απόπτωση.....	13
1.3 Πρόκληση βλαβών στα κυτταρικά συστατικά από τις δραστικές μορφές οξυγόνου.....	14
1.3.1 Δημιουργία ριζών του υδροξυλίου ($\cdot OH$) στα κύτταρα από το H_2O_2	14
1.3.2 Υπεροξείδωση των λιπιδίων.....	14
1.3.3 Βλάβες στις πρωτεΐνες.....	16
1.3.4 Βλάβες στο κυτταρικό DNA.....	17
1.3.4.1 Βλάβες στις βάσεις του DNA.....	17
1.3.4.2 Βλάβες στη ριβόζη και στις πυρηνικές πρωτεΐνες.....	18
1.3.5 Επιπτώσεις από τις βλάβες στο DNA.....	18
1.3.6 Επιδιόρθωση των βλαβών του DNA.....	19
1.3.7 Ο ρόλος των ιόντων μετάλλων μετάπτωσης.....	21
1.4 Ομοιοστασία των ιόντων μετάλλων μετάπτωσης.....	23
1.4.1 Πρωτεΐνες ρύθμισης της ομοιοστασίας των ιόντων μετάλλων μετάπτωσης.....	24
1.4.1.1 Τρανσφερρίνη.....	24
1.4.1.2 Υποδοχέας της τρανσφερρίνης.....	25
1.4.1.3 Φερριτίνη.....	28
1.4.1.4 Πρωτεΐνες ρύθμισης του σιδήρου, 1 και 2 (IRP1 και IRP2).....	31
1.4.1.5 Αλβουμίνη και σερούλοπλασμίνη.....	33
1.4.2 Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος.....	34
1.4.3 Μηχανισμοί ελέγχου των ενδοκυττάρων επιπέδων ιόντων σιδήρου.....	35
1.5 Σκοπός της μελέτης.....	38
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	39
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
2.1 Υλικά.....	41
2.2. Καλλιέργειες κυττάρων.....	43
2.2.1 Διατήρηση κυτταρικών σειρών.....	43
2.2.2 Κυτταρικές σειρές και συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας.....	44
2.2.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων.....	45
2.3 Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	45
2.4 Διαμόλυνση των κυττάρων.....	45
2.5 Έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2	47
2.6 Μέτρηση του ρυθμού παραγωγής H_2O_2 από την οξειδάση της γλυκόζης.....	47



2.7 Ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης (comet assay).....	47
2.7.1 Πειραματική διαδικασία	48
2.7.2 Εκτίμηση της βλάβης.....	49
2.8 Ανοσοφθορισμός.....	49
2.9 Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα και προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών	51
2.10 Ηλεκτροφόρηση, μεταφορά και ανίχνευση πρωτεϊνών	52
2.10.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.....	52
2.10.2 Μεταφορά και ανοσοαποτύπωση (Western blot) πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη	53
2.10.3 Ανίχνευση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας	54
2.11 Κυτταρομετρία ροής.....	54
2.11.1 Ανάλυση της περιεκτικότητας των κυττάρων σε DNA.....	54
2.11.2 Προσδιορισμός της σταθερότητας της μεμβράνης των λυσοσωματίων.....	55
2.11.3 Μέτρηση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού	56
2.12 Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση κυτταρικού DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	56
2.12.1 Απομόνωση κυτταρικού DNA	57
2.12.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA.....	57
2.12.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	58
2.13 Μέτρηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου.....	58
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
3.1 Εκτίμηση της πρόκλησης σχάσεων στο πυρηνικό DNA.....	61
3.2 Πρόκληση σχάσεων στο πυρηνικό DNA από συνεχώς παραγόμενο H ₂ O ₂	62
3.3 Προστασία από αντιοξειδωτικές ενώσεις	65
3.4 Δεσμευτές ιόντων σιδήρου.....	67
3.4.1 Δεσμευτές που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη	67
3.4.2 Δεσμευτές που δεν διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη.....	72
3.5 Δεσμευτές ιόντων χαλκού.....	73
3.6 Περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου δράσης της δεσφεριοξαμίνης	82
3.6.1 Προστασία του DNA	82
3.6.2 Πρόσληψη της δεσφεριοξαμίνης από τα κύτταρα μέσω ενδοκύτωσης.....	83
3.6.3 Προστασία της μεμβράνης των λυσοσωματίων μετά από έκθεση κυττάρων σε H ₂ O ₂	89
3.6.4 Προστασία σε συνθήκες διαταραχής της ομοιοστασίας του σιδήρου.....	89
3.6.5 Επιπτώσεις στην απόπτωση	96
3.6.6 Ο ρόλος των ιόντων σιδήρου των λυσοσωματίων στην μείωση του μεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων.....	96
3.6.7 Ο ρόλος της δεσφεριοξαμίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό	98
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	107
4.1 Πρόκληση βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H ₂ O ₂	107
4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την πρόκληση βλαβών στο DNA.....	108
4.2.1 Αντιοξειδωτικές ενώσεις.....	108
4.2.2 Ιόντα μετάλλων μετάπτωσης.....	109
4.3 Δεσφεριοξαμίνη.....	111
4.3.1 Προστασία του κυτταρικού DNA.....	111
4.3.2 Λυσοσωμάτια και μοριακοί μηχανισμοί πρόκλησης βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H ₂ O ₂	113
4.3.3 Δεσφεριοξαμίνη και κυτταρικός πολλαπλασιασμός	115
4.3.4 Λυσοσωμάτια και απόπτωση	116
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	119



6. SUMMARY 121
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 123



ΣΧΗΜΑΤΑ

- Σχήμα 1.** Ομολυτική και ετερολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού.
- Σχήμα 2.** Αντιδράσεις ελευθέρων ριζών με βασικά κυτταρικά συστατικά.
- Σχήμα 3.** Τερματισμός αλυσιδωτών αντιδράσεων ελευθέρων ριζών.
- Σχήμα 4.** Διαγραμματική απεικόνιση των διαδοχικών βημάτων αναγωγής του οξυγόνου σε νερό με μονά ηλεκτρόνια.
- Σχήμα 5.** Δημιουργία $\cdot\text{OH}$ από την αλληλεπίδραση του H_2O_2 με τα ιόντα σιδήρου που βρίσκονται συνδεδεμένα στο DNA.
- Σχήμα 6.** Η αντίδραση η οποία καταλύεται από το ένζυμο πολυ(ADP-ριβόζη)πολυμεράση (PARP, P = φωσφορική ομάδα).
- Σχήμα 7.** Μηχανισμός πρόσληψης σιδήρου από τα κύτταρα
- Σχήμα 8.** Δομή της Η αλυσίδας της ανθρώπινης φερριτίνης (A) και ολόκληρου του μορίου (B).
- Σχήμα 9.** Ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της IRP1.
- Σχήμα 10.** Αλληλεπίδραση των IRPs με τα IRE των mRNAs των φερριτίνη και υποδοχέα της τρανσφερρίνης.
- Σχήμα 11.** Μορφολογική κατάταξη των σχηματισμών του DNA στις διάφορες τάξεις
- Σχήμα 12.** Κατανομή των σχηματισμών του DNA στις διάφορες τάξεις.
- Σχήμα 13.** Πρόκληση βλαβών στο πυρηνικό DNA μετά από έκθεση κυττάρων σε H_2O_2 .
- Σχήμα 14.** Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών παραγόντων στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 .
- Σχήμα 15.** Δεσμευτές σιδήρου που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη.
- Σχήμα 16.** Ο ρόλος των δεσμευτών σιδήρου στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 .
- Σχήμα 17.** Ο ρόλος των δεσμευτών σιδήρου στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 .
- Σχήμα 18.** Ο ρόλος του BPS στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 .
- Σχήμα 19.** Ο ρόλος της δεσφεριοξαμίνης στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 .



- Σχήμα 20.** Ο ρόλος του DTPA στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 .
- Σχήμα 21.** Χημικές δομές δεσμευτών χαλκού.
- Σχήμα 22.** Ο ρόλος των NC και BCS στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 .
- Σχήμα 23.** Ο ρόλος των DDC και PDTC στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 .
- Σχήμα 24.** Η επίδραση των BCS και 1,10-φαινανθρολίνης στην τοξική δράση των δεσμευτών χαλκού.
- Σχήμα 25.** Ο ρόλος της δεσφериοξαμίνης στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 .
- Σχήμα 26.** Η επίδραση της θερμοκρασίας στην προστατευτική δράση των σιδηροδεσμευτικών ενώσεων 1,10-φαινανθρολίνης και δεσφериοξαμίνης.
- Σχήμα 27.** Ο ρόλος των dynamin και Rab5 στην προστατευτική δράση της δεσφериοξαμίνης.
- Σχήμα 28.** Έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών Rab5 (S34N) και Rab5 (Q79L) και επιπτώσεις στη μορφολογία των πρώιμων ενδοσωματίων κυττάρων HeLa.
- Σχήμα 29.** Επιπτώσεις στην ακεραιότητα των λυσοσωματίων μετά από έκθεση κυττάρων σε H_2O_2 .
- Σχήμα 30.** Προστασία της ακεραιότητας των λυσοσωματίων από δεσφериοξαμίνη.
- Σχήμα 31.** Πρόκληση βλαβών στο DNA κυττάρων που υπερεκφράζουν την IRP1_{C437S}, μετά από έκθεση σε H_2O_2 .
- Σχήμα 32.** Εκτίμηση των επιπέδων του ενδοκυττάρου σιδήρου σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την IRP1_{C437S}.
- Σχήμα 33.** Ο ρόλος της δεσφериοξαμίνης στην προστασία του DNA κυττάρων που υπερεκφράζουν την IRP1_{C437S}, από το H_2O_2 .
- Σχήμα 34.** Δεσφериοξαμίνη και απόπτωση.
- Σχήμα 35.** Ο ρόλος της δεσφериοξαμίνης στην προστασία των μιτοχονδρίων σε κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2 .
- Σχήμα 36.** Η επίδραση της δεσφериοξαμίνης στην ανάπτυξη των κυττάρων.
- Σχήμα 37.** Εξέταση της πρόκλησης ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων στο DNA κυττάρων HeLa από δεσφериοξαμίνη
- Σχήμα 38.** Εξέταση της αντιστρεψιμότητας της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τη δεσφериοξαμίνη.

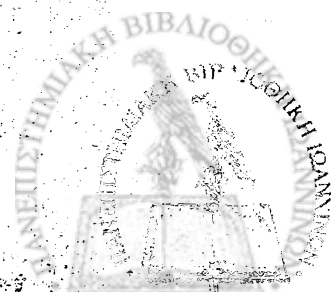


Σχήμα 39. Επίδραση της δεσφериοξαμίνης στην μορφολογία των κυττάρων.

Σχήμα 40. Επίδραση της δεσφериοξαμίνης στο κυτταρικό κύκλο.

Σχήμα 41. Τα διάφορα μονοπάτια της ενδοκύτωσης καθώς και πρωτεΐνες που επηρεάζουν τη λειτουργία τους

Σχήμα 42. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού πρόκλησης βλαβών στο κυτταρικό DNA και απόπτωσης σε κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2 .



ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

(The table content is extremely faint and illegible due to the quality of the scan. It appears to be a multi-column table with several rows of data.)



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

A: Alanine, αμινοξύ αλανίνη

AO: Acridine orange

A.I.F.: Apoptosis inducing factor

APS: ammonium persulfate, υπερ-θεικό αμμώνιο.

BCS: Bathocuproine disulfonate, 2,9 διμέθυλο-4,7-διφαινόλο-1,10-φαινανθρολίνη-σουλφονικό οξύ.

BSA: Bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός

ΔΜΟ: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

DDC: Diethyldithiocarbamate, διεθύλο-δίθειοκαρβαμίδιο.

DFO: Desferrioxamine mesilate, δεσφεριοξαμίνη

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DTPA: Diethylenetriaminopentaacetic acid, δι-αιθυλένο-τριάμινο-πενταοξικό οξύ.

EDTA: Ethylenetriaminetetraacetic acid, αιθυλένο-τριάμινο-τετραοξικό οξύ.

EEA1: Early endosomes antigen 1

FACS: Fluorescence Activated Cell Scanner

FCS: Fetal bovine calf serum, ορός εμβρύου μόσχου.

FITC: Fluroscein-5-isothiocyanate

GDP: Guanosine diphosphate, διφωσφορική γουανοσίνη

GFP: Green fluorescence protein, πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη

GO: Glucose oxidase, οξειδάση της γλυκόζης

GTP: Guanosine triphosphate, τριφωσφορική γουανοσίνη

HA: Haemaglutinine, αιμογλουτινίνη

HBED: N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid.

IRE: Iron Responsive Element, στοιχείο απόκρισης στο σίδηρο

IRP: Iron Regulatory Protein, πρωτεΐνη ρύθμισης του σιδήρου

JC-1: 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide

K: Lysine, αμινοξύ λυσίνη

L: Leucine, αμινοξύ λευκίνη

LA: α-Λιποϊκό οξύ

mRNA: messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA

N: Asparagine, αμινοξύ ασπαραγίνη



NAC: N-ακέτυλο-κυστεΐνη

NC: Neocuproine, νεοκουπρεΐνη

PBS: Phosphate buffer saline

PDTC: Pyrrolidine dithiocarbamate, πυρολιδίνο-δίθειοκαρβαμίδιο

PI: Propidium iodide, ιωδιούχο προπίδιο

Q: Glutamine, αμινοξύ γλουταμίνη

RR: Ribonucleotide Reductase, αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων

S: Serine, αμινοξύ σερίνη

SCGE: Single cell gel electrophoresis, ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αгарόζης

SDS: Sodium dodecacyl sulphate, δωδεκύλοθειϊκό νάτριο

SIH: Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone

TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη

TPEN: N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridyl-methyl)ethylenediamine

Tris: Τρις-υδρόξυμεθυλένο-διαμίνη

TRITC: Tetramethylrhodamine-isothiocyanate

Trolox: (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

Trypan blue: Κυανούν του τροπανίου.



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

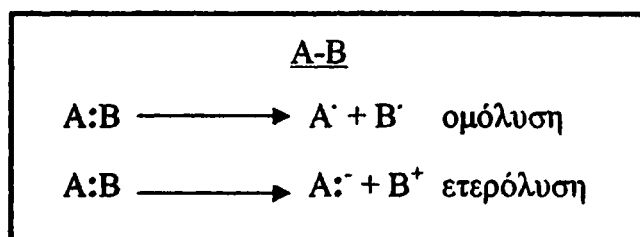


1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες-Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Ο όρος ρίζα στην χημεία συνήθως εκφράζει μία ομάδα ατόμων τα οποία συμπεριφέρονται σαν μία μονάδα, π.χ. η ρίζα του ανθρακικού (CO_3^{2-}) ή η ρίζα του νιτρικού (NO_3). Προκειμένου να περιγραφεί ο όρος ελεύθερη ρίζα εισάγεται ένας νέος ορισμός. Ελεύθερη ρίζα (free radical) ονομάζεται κάθε άτομο ή μόριο με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του στοιβάδα σε αντίθεση με τις μη-ελεύθερες ρίζες οι εξωτερικές στοιβάδες των οποίων καλύπτονται από ζεύγη ηλεκτρονίων με αντίθετη στροφορμή (spin).

Ελεύθερες ρίζες μπορούν να προέλθουν είτε από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής είτε από ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού, όπου τα ηλεκτρόνια τα οποία αποτελούσαν πριν το δεσμό μοιράζονται από ένα σε κάθε ομάδα με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο ελευθέρων ριζών. Στις περιπτώσεις αυτές όμως, απαιτείται η παροχή ενέργειας υπό τη μορφή είτε θερμότητας είτε υπεριώδους ή ιονίζουσας ακτινοβολίας (σχήμα 1).

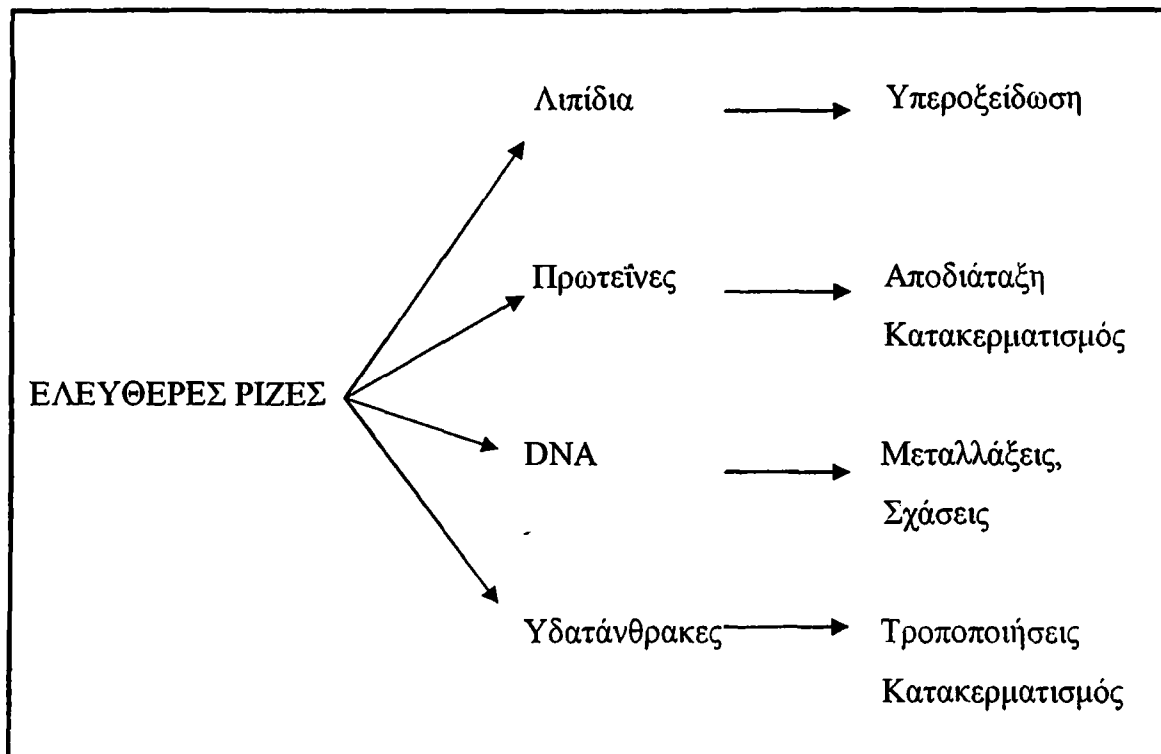


Σχήμα 1: Ομολυτική και ετερολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού.

Οι σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες είναι συνήθως εξαιρετικά δραστικές, λόγω της τάσης του ασύζευκτου ηλεκτρονίου τους να αποσπάσει ένα ακόμη ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια προκειμένου να συμπληρώσει την ηλεκτρονιακή του στοιβάδα, και για τον λόγο αυτό ο χρόνος ημιζωής τους είναι πολύ σύντομος. Για παράδειγμα, οι ρίζες του υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) ή του χλωρίου ($\text{Cl}\cdot$) είναι τόσο δραστικές ώστε αντιδρούν χωρίς εξειδίκευση με οτιδήποτε βρεθεί δίπλα τους την στιγμή του σχηματισμού τους. Υπάρχουν όμως και λιγότερο δραστικές ελεύθερες ρίζες οι οποίες προλαβαίνουν να

διαχθούν και να αντιδράσουν εξειδικευμένα με ορισμένα μόρια. Τέλος, υπάρχουν και μερικές εξαιρέσεις σχετικά σταθερών ελευθέρων ριζών, οι οποίες μπορούν να ανιχνευτούν σε υδατικά διαλύματα ακόμη και σε θερμοκρασία δωματίου.

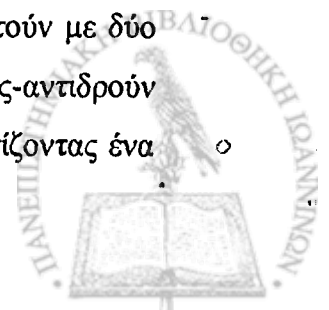
Ανεξέλεγκτη δημιουργία ελευθέρων ριζών στο κύτταρο έχει καταστροφικές συνέπειες λόγω της μεγάλης δραστηριότητας των μορίων αυτών. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με όλα τα βασικά κυτταρικά συστατικά του κυττάρου προκαλώντας σε αυτά σημαντικές βλάβες (σχήμα 2).



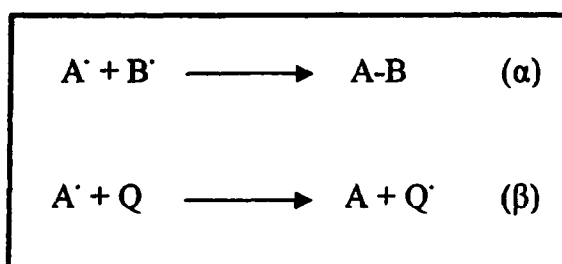
Σχήμα 2: Αντιδράσεις ελευθέρων ριζών με βασικά κυτταρικά συστατικά.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι μετά την αντίδραση μιας ελεύθερης ρίζας με ένα μόριο-μη ελεύθερη-ρίζα, τουλάχιστον ένα από τα προϊόντα της αντίδρασης είναι μια νέα ελεύθερη ρίζα (λόγω της αφαίρεσης ενός ηλεκτρονίου από ένα ζεύγος ηλεκτρονίων). Η νέα ελεύθερη ρίζα αντιδρά με τη σειρά της σχηματίζοντας νέες ελεύθερες ρίζες. Κατ' αυτόν τον τρόπο γίνονται αλυσιδωτές αντιδράσεις οι οποίες εάν δεν ανασταλούν επέρχεται πλήρης καταστροφή του βιολογικού υλικού.

Αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών μπορούν να τερματιστούν με δύο τρόπους (σχήμα 3). Στην πρώτη περίπτωση (α) δύο μόρια-ελεύθερες-ρίζες-αντιδρούν μεταξύ τους συνεισφέροντας από ένα ηλεκτρόνιο η κάθε μία και σχηματίζοντας ένα

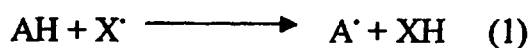


ομοιοπολικό δεσμό, ενώ στη δεύτερη (β) η ελεύθερη ρίζα (A[·]) αντιδρά με ένα άλλο μόριο Q σχηματίζοντας μία νέα ελεύθερη ρίζα (Q[·]). Σε αυτή την περίπτωση όμως η ελεύθερη ρίζα της ένωσης Q ανήκει σε εκείνες που δεν είναι δραστικές και έτσι διακόπτεται η ακολουθία των αντιδράσεων. Οι πιθανότητες να συμβεί το ενδεχόμενο (α) είναι εξαιρετικά μειωμένες λόγω του ότι τα A[·] και B[·] είναι πολύ δραστικά μόρια και κατά συνέπεια η συγκέντρωσή τους δεν είναι ποτέ τόσο υψηλή. Αντιδράσεις τύπου (β) είναι κατ' εξοχήν υπεύθυνες για την αντιμετώπιση ελευθέρων ριζών οι οποίες σχηματίζονται στο κύτταρο.



Σχήμα 3: Τερματισμός αλυσιδωτών αντιδράσεων ελευθέρων ριζών.

Τα μόρια που είναι ικανά να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες ονομάζονται “εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών” (free radical scavengers) ή απλώς αντιοξειδωτικά. Ο κύριος τύπος αντιοξειδωτικού (AH) εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες αποδίδοντας συνήθως ένα άτομο υδρογόνου (ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο μαζί) (αντίδραση 1).



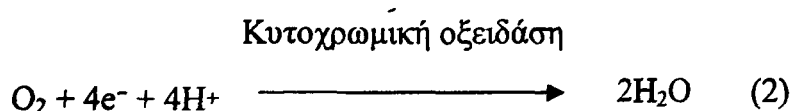
Κατά συνέπεια, μόρια ικανά να δράσουν σαν αντιοξειδωτικά είναι αυτά που εύκολα δίνουν ένα άτομο υδρογόνου και επιπλέον σχηματίζουν μια σχετικά σταθερή, δηλαδή ανενεργό, ελεύθερη ρίζα. Το ασκορβικό οξύ, η α-τοκοφερόλη και το β-καροτένιο αποτελούν χαρακτηριστικές περιπτώσεις αντιοξειδωτικών ικανών να δράσουν με τον παραπάνω τρόπο.



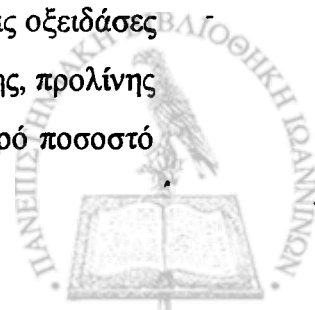
1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ).

Παρ' ότι, όπως είναι γνωστό, το οξυγόνο αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα ύπαρξης της ζωής, η αφθονία του στα βιολογικά συστήματα σε συνδυασμό με την ικανότητά του να ανάγεται με μονά ηλεκτρόνια το καθιστούν τον σημαντικότερο παράγοντα δημιουργίας ελεύθερων ριζών στις αερόβιες μορφές ζωής (Balentine 1982, Bruyninckx et al., 1978, Shigenaga et al., 1994) . Η κατανόηση του "παράδοξου του οξυγόνου", όπως αυτό συνήθως αποκαλείται, έγινε σχετικά πρόσφατα αλλά οι ακριβείς βιοχημικοί μηχανισμοί οι οποίοι είναι υπεύθυνοι παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι.

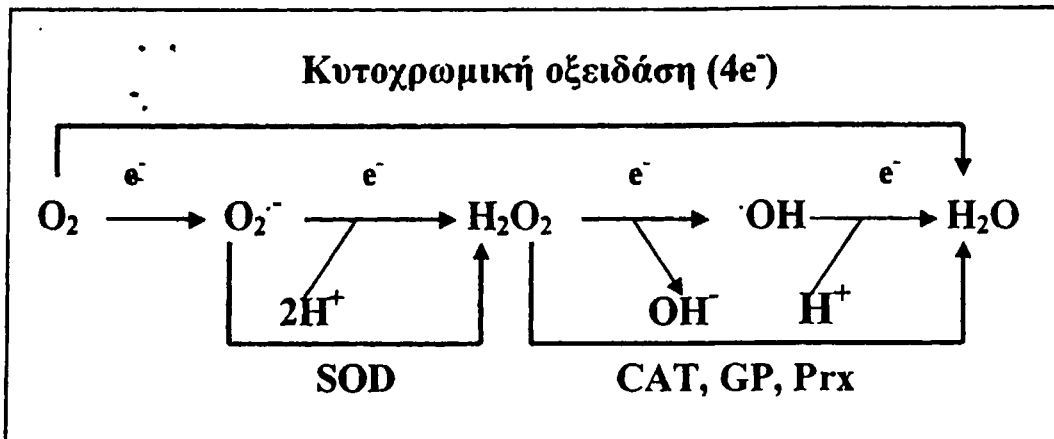
Είναι γνωστό ότι το οξυγόνο αποτελεί τον τελικό αποδέκτη των ηλεκτρονίων τα οποία παράγονται από τις οξειδωτικές διεργασίες του καταβολισμού (Halliwell, 1984, Scharifa, 1996). Πιο συγκεκριμένα, το μοριακό οξυγόνο (O_2) ανάγεται σε δύο μόρια ύδατος προσλαμβάνοντας 4 ηλεκτρόνια. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο «κυτοχρωμική οξειδάση» η οποία αποτελεί το τελευταίο σύμπλοκο στην ακολουθία των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας (αντίδραση 2).



Το ενζυμικό σύμπλοκο της κυτοχρωμικής οξειδάσης έχει ειδική δομή (2 μόρια αίμης και 2 άτομα Cu), η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη μεταφορά και των τεσσάρων ηλεκτρονίων στο O_2 πριν τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης (δύο μόρια H_2O) αφεθούν ελεύθερα. Κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων δια μέσου της αναπνευστικής αλυσίδας, πρωτόνια από το εσωτερικό της μιτοχονδριακής μήτρας μεταφέρονται στον διαμεμβρανικό χώρο σχηματίζοντας ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό. Το δυναμικό αυτό χρησιμοποιείται από μια ειδική πρωτεΐνη, την ΑΤΡαση των μιτοχονδρίων για τη φωσφορυλίωση του ADP και το σχηματισμό ATP. Με τον τρόπο αυτό καταναλώνεται περίπου το 85% με 90% του προσλαμβανόμενου από τον οργανισμό O_2 . Το μεγαλύτερο μέρος του οξυγόνου που δεν χρησιμοποιείται στα μιτοχόνδρια (10-15%) συμμετέχει σε αντιδράσεις που καταλύονται από τις οξειδάσες (D-άμινο-οξειδάση, οξειδάση της ξανθίνης κ.α.), τις υδροξυλάσες (λυσίνης, προλίνης και τυροσίνης) καθώς και από διάφορες μονοοξυγονάσες. Τέλος, ένα μικρό ποσοστό



(περίπου 2%) ανάγεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες με διαδοχικά μονά ηλεκτρόνια όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 4).



Σχήμα 4: Διαγραμματική απεικόνιση των διαδοχικών βημάτων αναγωγής του οξυγόνου σε νερό με μονά ηλεκτρόνια

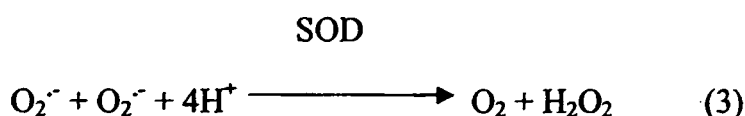
Το αναγωγικό περιβάλλον το οποίο επικρατεί στα κύτταρα προσφέρει αρκετές δυνατότητες στο O_2 για αναγωγή με ένα ηλεκτρόνιο σχηματίζοντας το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$). Κατ' αυτό τον τρόπο, ενώσεις όπως το $O_2^{\cdot-}$, η υδροϋπεροξειδική ρίζα (HO_2^{\cdot}), το H_2O_2 και η εξαιρετικά δραστική ρίζα του υδροξυλίου ($\cdot OH$) μπορούν να θεωρηθούν κανονικά προϊόντα της καθημερινής αερόβιας ζωής. Αυξημένη δημιουργία αυτών των ενδιάμεσων μορφών της αναγωγής του θεωρείται υπεύθυνη για μια πλειάδα παθολογικών καταστάσεων στους αερόβιους οργανισμούς (Ames et al., 1993, Fridovich, 1975, Griendling et al., 1999, McCord, 1974). Στον πίνακα 1 αναφέρονται μια σειρά από ενώσεις του O_2 οι οποίες είναι δυνατόν να συμμετέχουν σε τοξικές για τα κύτταρα αντιδράσεις και οι οποίες ονομάζονται "Δραστικές Μορφές Οξυγόνου". Όπως παρατηρείται μόνο μερικές από αυτές είναι ελεύθερες ρίζες.

Ένωση	Όνομα
Ελεύθερες ρίζες	
$O_2^{\cdot-}$	ανιόν σουπεροξειδίου
HO_2^{\cdot}	υδροϋπεροξειδική ρίζα

·OH	ρίζα υδροξυλίου
RO·	ρίζα αλκοξειδίου
ROO·	ρίζα υπεροξειδίου
<i>Μη-ελεύθερες ρίζες</i>	
H ₂ O ₂	υπεροξείδιο του υδρογόνου
ROOH	οργανικά υδροπεροξείδια
¹ O ₂	μονήρες οξυγόνο
O ₃	όζον
HOCl	υποχλωριώδες οξύ

Πίνακας 1: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι μία συνεχής συσσώρευση ΔΜΟ θα ήταν καταστρεπτική για τα κύτταρα. Για να μπορέσουν να επιβιώσουν οι οργανισμοί χρειάζονται ενζυμικά συστήματα ικανά να απομακρύνουν συνεχώς τις σχηματιζόμενες ΔΜΟ. Οι διάφορες “δισμουτάσες του σουπεροξειδίου” οι οποίες απαντώνται σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς αποτελούν ακριβώς ένα σύστημα απομάκρυνσης του O₂⁻ (αντίδραση 3) (McCord et al., 1969).



Η απομάκρυνση όμως του O₂⁻ συνεπάγεται τη δημιουργία H₂O₂ το οποίο επίσης πρέπει να απομακρυνθεί. Αυτό επιτυγχάνεται με τρία είδη ενζύμων: α) την καταλάση, β) την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, και γ) τις περόξυ-ρεδοξίνες. Όλα αυτά τα ένζυμα έχουν τη δυνατότητα να ανάγουν το H₂O₂ με δύο ηλεκτρόνια σε H₂O παρακάμπτοντας έτσι τη δημιουργία των εξαιρετικά δραστικών ριζών του υδροξυλίου (Chance et al., 1979, Wood et al., 2003).

1.2.1 Οξειδοαναγωγική ισορροπία

Όπως γίνεται φανερό από το σχήμα 4, οι ΔΜΟ δημιουργούνται συνέχεια στα κύτταρα ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και απομακρύνονται συνεχώς



από τους αμυντικούς μηχανισμούς των κυττάρων με αποτέλεσμα η συγκέντρωση τους να βρίσκεται συνεχώς σε μία ισορροπία (Chance et al., 1979). Υπάρχει λοιπόν μία λεπτή ισορροπία που καλείται "οξειδοαναγωγική ισορροπία". Διαφορετικοί τύποι κυττάρων έχουν διαφορετικές ταχύτητες τόσο δημιουργίας όσο και απομάκρυνσης των ΔΜΟ και κατά συνέπεια η οξειδοαναγωγική ισορροπία δεν είναι η ίδια σε όλα τα είδη κυττάρων. Αλλά ακόμα και στα ίδια κύτταρα, η ισορροπία αυτή είναι δυναμική και μπορεί εύκολα να μετατοπισθεί κάτω από ορισμένες συνθήκες. Στις περιπτώσεις που διαταράσσεται προς όφελος των οξειδωτικών παραγόντων, προκαλείται μια κατάσταση που είναι γνωστή ως "οξειδωτικό στρες" (Sies, 1985).

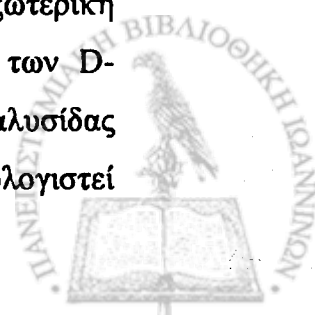
1.2.2 Ανιόν του σουπεροξειδίου (O_2^-)

Το πρώτο προϊόν της αναγωγής του O_2 με μονά ηλεκτρόνια είναι η ελεύθερη ρίζα "ανιόν του σουπεροξειδίου" το οποίο αρκετές φορές ονομάζεται απλά σουπεροξειδίο. Το O_2^- από μόνο του μπορεί να αντιδράσει με πρωτεΐνες των οποίων οι προσθετικές ομάδες έχουν άτομα Fe ή Cu όπως τα μόρια της αίμης και τα σύμπλοκα σιδήρου-θείου (Flint et al., 1993, Gutteridge et al., 1990, Halliwell et al., 1992,). Σε τέτοιου είδους αντιδράσεις προσβάλλονται κυρίως τα αμινοξέα τα οποία βρίσκονται κοντά στις προσθετικές ομάδες, με συνέπεια την απώλεια της δραστηριότητας των πρωτεϊνών αυτών. Για παράδειγμα θα μπορούσαμε να αναφέρουμε την απενεργοποίηση του ενζύμου ακονιτάση των μιτοχονδρίων (περιέχει σύμπλοκο 4Fe-4S) μετά από έκθεση σε O_2^- (Gardner et al., 1994).

Η σημαντικότερη αντίδραση του σουπεροξειδίου είναι αυτή της αυτοοξειδωαναγωγής του στις οποίες ένα μόριο O_2^- δρα σαν αναγωγικό και ένα άλλο σαν οξειδωτικό μέσο. Αυτό σημαίνει ότι όταν σε κάποιο βιολογικό σύστημα σχηματίζεται O_2^- τότε είναι αναπόφευκτη και η δημιουργία H_2O_2 .

1.2.3 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

Εκτός από το H_2O_2 που σχηματίζεται κατά την αναγωγή του O_2^- , αρκετά ένζυμα όπως η μονοάμινο οξειδάση (MAO), που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, η οξειδάση του ουρικού και η οξειδάση των D-αμινοξέων στα υπεροξυσώματα καθώς και παράγοντες της αναπνευστικής αλυσίδας παράγουν H_2O_2 με απ' ευθείας μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο O_2 . Έχει υπολογιστεί



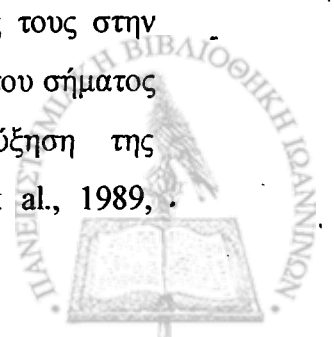
ότι η συγκέντρωση του στα ηπατοκύτταρα κυμαίνεται μεταξύ 10^{-8} - 10^{-7} M (Böveris et al., 1973).

Χωρίς αμφιβολία το H_2O_2 αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα των δραστικών μορφών οξυγόνου. Είναι ασθενές οξειδωτικό μέσο αλλά παρ' όλα αυτά μπορεί να οξειδώσει αρκετά βιολογικά μόρια, κυρίως αυτά τα οποία έχουν σουλφυδρικές ομάδες (-SH) (Brodie et al., 1987), σύμπλοκα σιδήρου θείου (Fe-S) (Pantopoulos et al., 1998), μόρια αίμης (Gutteridge, 1986, Paller et al., 1994). Λόγω του ότι είναι μικρό και αφόρτιστο μόριο μπορεί εύκολα να διαχέεται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, μια ιδιότητα ιδιαίτερα σημαντική για τη φυσιολογική του δράση. Όταν προστίθεται στο υλικό κυττάρων σε καλλιέργεια σε συγκεντρώσεις μεταξύ 10-100 μ M προξενεί βλάβες σε αυτά οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις οδηγούν στο θάνατο των κυττάρων. Μερικές από τις βλάβες αυτές μπορεί να είναι άμεσες αλλά οι περισσότερες, κυρίως στα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA είναι έμμεσες μιας και το H_2O_2 δεν αντιδρά απευθείας με τα μόρια αυτά. Στην περίπτωση αυτή πιστεύεται ότι το H_2O_2 διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και μετά αντιδρά ενδοκυττάρια με διάφορα μέταλλα μετάπτωσης (κυρίως Fe και πιθανά του Cu) δημιουργώντας δραστικές ρίζες $\cdot OH$ ή άλλους παράγοντες με παρόμοια υψηλή δραστικότητα (Mello Filho et al., 1984a, Mello Filho et al., 1984b, Halliwell et al., 1991, Meneghini, 1997, Spencer et al., 1995a).

Σχετικά πρόσφατα άρχισε να διαμορφώνεται η άποψη ότι η συνεχής δημιουργία και απομάκρυνση του H_2O_2 ακόμα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι μια τυχαία και βλαπτική ατέλεια η οποία είναι συνυφασμένη με την αναγωγή του O_2 αλλά αποτελεί μια δυναμική κατάσταση μέσω της οποίας ελέγχονται βασικές λειτουργίες όπως η ενεργοποίηση ενζύμων, η δράση μεταγραφικών παραγόντων και τελικά μέσω αυτών ο πολλαπλασιασμός ή η απόπτωση των κυττάρων.

1.2.3.1 Ο ρόλος του υπεροξειδίου του υδρογόνου στην μεταγωγή του σήματος

Την τελευταία κυρίως δεκαετία υπάρχουν πολλές αναφορές ότι η σύνδεση ορισμένων αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών στους υποδοχείς τους στην επιφάνεια του κυττάρου και η ενεργοποίηση διάφορων οδών μεταγωγής του σήματος στις περισσότερες των περιπτώσεων συνοδεύεται από την αύξηση της συγκεντρώσεως του ενδοκυττάρου H_2O_2 (Das et al., 1992, Meier et al., 1989,



Shibanuma et al., 1990, Sundaresan et al., 1996, Thannickal et al., 1998, Ushio-Fukai et al., 1998). Η άμεση εμπλοκή του H_2O_2 στην σηματοδοτική δράση των μορίων αυτών υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι η απομάκρυνση του δια μέσου της υπερέκφρασης της καταλάσης έχει σαν συνέπεια την ολική ή μερική αναστολή της δράσης τους (Bae et al., 1997, Sundaresan et al., 1995, Ushio-Fukai et al., 1999).

Παρόλο που η εμπλοκή του H_2O_2 στους σηματοδοτικούς μηχανισμούς έχει μελετηθεί αρκετά, οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης του παραμένουν άγνωστοι. Πρόσφατες πειραματικές μελέτες προτείνουν ότι η δράση του H_2O_2 σαν σηματοδοτικό μόριο σχετίζεται με την οξειδωση σουλφυδρικών ομάδων στα κυστεϊνικά κατάλοιπα ορισμένων πρωτεϊνών (Gotoh et al., 1998, Saitoh et al., 1998). Το αποτέλεσμα της οξειδωσης της κυστεϊνης είναι ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών (-S-S), σουλφενικού οξέως (-SOH), σουλφινικού οξέως (-SO₂H) και σουλφονικού οξέως (-SO₃H) ανάλογα με τις συνθήκες (Claiborne et al., 1993, Denu et al., 1998). Παρόλο που οι περισσότερες πρωτεΐνες περιέχουν αρκετά κατάλοιπα κυστεϊνών, το H_2O_2 δεν οξειδώνει οποιαδήποτε από αυτές αλλά δρα επιλεκτικά μόνο σε ορισμένες από τις κυστεϊνες αυτές. Σημαντικό ρόλο στο αν μια κυστεΐνη θα οξειδωθεί παίζει το περιβάλλον της και συγκεκριμένα η παρουσία φορτισμένων αμινοξέων σε γειτονικές θέσεις. Το pKa των περισσότερων κυστεϊνών μιας πρωτεΐνης είναι περίπου 8.5 και κατά συνέπεια σε φυσιολογικό pH (περίπου 7.4) η σουλφυδρική τους ομάδα είναι πρωτονιωμένη. Στην περίπτωση όμως που μία κυστεΐνη περιβάλλεται από φορτισμένα αμινοξέα το pKa της σουλφυδρικής της ομάδας μειώνεται με συνέπεια σε φυσιολογικό pH η ομάδα αυτή να αποπρωτονιώνεται και κατά συνέπεια το μόριο αυτό να είναι αρνητικά φορτισμένο (Lohse et al., 1997, Zhang et al., 1993). Στην περίπτωση αυτή πιστεύεται ότι η συγκεκριμένη κυστεΐνη είναι ευάλωτη στην οξειδωτική δράση του H_2O_2 . Μόρια που περιέχουν τέτοιες ευάλωτες κυστεϊνες είναι τα ένζυμα τυροσινικές φωσφατάσες. Πιο συγκεκριμένα, το ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτών χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μιας περιοχής που αποτελείται από μια κυστεΐνη και μία αργινίνη ανάμεσα στις οποίες παρεμβάλλονται πέντε αμινοξέα (I/V-C-X-X-G-X-R-S/T, όπου X ένα τυχαίο αμινοξύ). Όπως προαναφέρθηκε, το περιβάλλον αυτό ευνοεί την αποπρωτονίωση της σουλφυδρικής ομάδας της κυστεΐνης αυτής καθιστώντας την ταυτόχρονα ευάλωτη στην οξειδωση από το H_2O_2 η οποία οδηγεί στην απώλεια της ενεργότητας του ενζύμου (Caselli et al., 1998, Denu et al., 1998, Lee et al., 1998) με αποτέλεσμα την



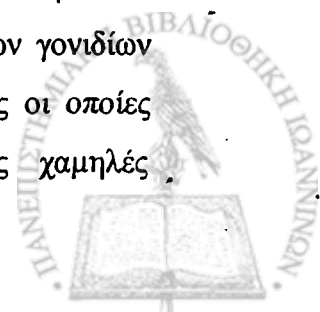
αύξηση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών η οποία θεωρείται ότι ενεργοποιεί η απενεργοποιεί διάφορες οδούς μεταγωγής του σήματος.

Πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του H_2O_2 τροποποιεί την δράση αρκετών μεταγραφικών παραγόντων (Carballo et al., 1999, Ghosh, 2002, Lando et al., 2002, Li et al., 1999, Semenza et al., 2001, Simon et al., 2000, Xanthoudakis et al., 1992) με επακόλουθη συνέπεια την επαγωγή ή την αναστολή της έκφρασης δεκάδων γονιδίων τα οποία ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές διεργασίες σχετιζόμενες με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση.

1.2.3.2 Υπεροξειδίου του υδρογόνου και κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων παίζουν μόρια όπως αναπτυξιακοί παράγοντες και κυτοκίνες τα οποία συνδέονται σε ειδικούς υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη και ενεργοποιούν μία σειρά πολύπλοκων αντιδράσεων με τις οποίες μεταφέρεται το μήνυμα της κυτταρικής ανάπτυξης και διαίρεσης. Τα μηνύματα αυτά οδηγούν στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων όπως τα πρωτοογκογονίδια και την έναρξη των διεργασιών οι οποίες σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αν και η όλη διαδικασία είναι εξαιρετικά πολύπλοκη φαίνεται ότι το H_2O_2 αποτελεί τον συνδετικό κρίκο μεταξύ της δράσης των παραγόντων αυτών και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Das, 1992, Gorlach et al., 2001, Patterson et al., 1999, Rao et al., 1999, Shibanuma, 1990, Touyz et al., 1999, Ushio-Fukai et al., 1998). Η άμεση εμπλοκή του H_2O_2 στη μιτογόνο δράση των παραπάνω παραγόντων αποδεικνύεται από το γεγονός ότι η καταλάση έχει την ικανότητα να αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων (Sundaresan et al., 1995).

Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει αποδειχθεί ότι η προσθήκη μικρών ποσοτήτων H_2O_2 σε καλλιέργειες κυττάρων επάγει την ανάπτυξη τους παρακάμπτοντας τη δράση των αναπτυξιακών παραγόντων (Burdon et al., 1989, Burdon et al., 1990a, Burdon et al., 1990b, Burdon et al., 1996). Αν και ο ακριβής μοριακός μηχανισμός δράσης του H_2O_2 παραμένει εν πολλοίς άγνωστος, η επικρατούσα άποψη θεωρεί ότι η δράση του H_2O_2 σχετίζεται με την επαγωγή γονιδίων που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων όπως τα πρώτο-ογκογονίδια *c-jun* και *c-fos*. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών φαίνεται να ενεργοποιούν στη συνέχεια πολύπλοκες διαδικασίες οι οποίες τελικά οδηγούν στην κυτταρική ανάπτυξη. Σε αντίθεση με τις χαμηλές

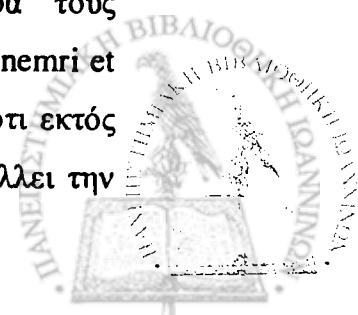


συγκεντρώσεις, η έκθεση των κυττάρων σε υψηλότερες συγκεντρώσεις H_2O_2 αναστέλλει την ανάπτυξη τους (Burdon et al., 1989, Burdon et al., 1990a) και μπορεί να ενεργοποιήσει την διαδικασία της απόπτωσης (Barbouti et al., 2002, Barbouti, 2004, Doulias et al., 2004).

1.2.3.3 Υπεροξειδίο του υδρογόνου και απόπτωση

Ο όρος απόπτωση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1972 προκειμένου να περιγραφεί ένας εναλλακτικός τύπος θανάτου από τη νέκρωση που ήταν μέχρι τότε γνωστή (Kerr et al., 1972). Σήμερα, η απόπτωση διακρίνεται από τον κλασικό νεκρωτικό θάνατο από μία σειρά ευδιάκριτων μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών. Η νέκρωση είναι μία παθητική διαδικασία η οποία μορφολογικά σχετίζεται με αύξηση του όγκου του κυττάρου, κατάρρευση της πλασματικής μεμβράνης αλλά και των άλλων μεμβρανών του κυττάρου και έκχυση των κυτταρικών συστατικών στο μεσοκυττάριο περιβάλλον. Αντίθετα, η απόπτωση είναι μία ενεργητική διαδικασία που πραγματοποιείται από ένα γενετικά καθορισμένο πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου και έχει διάφορα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά όπως τη συρρίκνωση του κυττάρου, τη συμπύκνωση της χρωματίνης, τη δημιουργία ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων και το σχηματισμό αποπτωτικών σωματιδίων (Kerr et al., 1972, McConkey et al., 1988, Wyllie et al., 1980). Φυσιολογικά η απόπτωση αποτελεί μηχανισμό απομάκρυνσης των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβες και αυτών που βρίσκονται σε περίσσεια καθώς και ανασύστασης των ιστών (Jacobson et al., 1997, Rathmell et al., 2002, Thompson et al., 1995, Vaux et al., 1999). Δυσλειτουργίες στη διαδικασία αυτή οδηγούν συχνά σε ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων καθώς έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή της κυτταρικής ομοιοστασίας (Meier et al., 2000, Thompson et al., 1995)

Έχει παρατηρηθεί ότι η έκθεση σε H_2O_2 επάγει τη διαδικασία της απόπτωσης σε διάφορα είδη κυττάρων (Barbouti et al., 2002, Borutaite et al., 2001, Chandra et al., 2000, Hampton et al., 1997, Stridh et al., 1998). Στην περίπτωση αυτή πιστεύεται ότι το H_2O_2 δρα κυρίως στα μιτοχόνδρια των κυττάρων προκαλώντας την απελευθέρωση προαποπτωτικών παραγόντων οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα επόμενα βήματα αυτού του τύπου κυτταρικού θανάτου (Alnemri et al., 1996, Stridh et al., 1998). Πρόσφατες πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι εκτός από την πρόκληση απόπτωσης το H_2O_2 έχει την ικανότητα και να αναστέλλει την

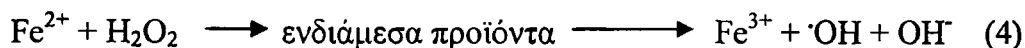


διαδικασία αυτή κατά το στάδιο της ενεργοποίησης της κασπάσης-9 και προκαλεί την εκτροπή από τον κλασικό τύπο απόπτωσης προς ένα είδος θανάτου το οποίο προκαλείται από την έκλυση του AIF από τα μιτοχόνδρια (Barbouti et al., 2002, Barbouti, 2004).

1.3 Πρόκληση βλαβών στα κυτταρικά συστατικά από τις δραστικές μορφές οξυγόνου.

1.3.1 Δημιουργία ριζών του υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) στα κύτταρα από το H_2O_2 .

Περισσότερο από 100 χρόνια πριν - το 1894 - ο H.J.H. Fenton περιέγραψε την αντίδραση ενός μείγματος H_2O_2 με άλατα δισθενούς σιδήρου τα προϊόντα της οποίας μπορούσαν να οξειδώσουν ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών οργανικών μορίων (Fenton, 1894). Σήμερα, μετά από τόσα χρόνια από την αρχική αυτή παρατήρηση, συνεχίζονται οι μελέτες για τη διαλεύκανση του ακριβούς μηχανισμού αυτής της αντίδρασης (Halliwell et al., 1992b, Sutton et al., 1989). Αν και είναι πιθανόν να εμπλέκονται αρκετοί ενδιάμεσοι οξειδωτικοί παράγοντες, ο καλύτερα μελετημένος από αυτούς είναι η ρίζα του υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) (αντίδραση 4).



Οι $\cdot\text{OH}$ λόγω της μεγάλης δραστικότητάς τους αντιδρούν μη εξειδικευμένα με οτιδήποτε τύχει να βρεθεί δίπλα τους κατά τη στιγμή του σχηματισμού τους. Ειδικά στα κύτταρα μπορεί να αντιδράσουν και να οξειδώσουν το DNA, τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια, τα σάκχαρα και γενικά όλα τα βασικά κυτταρικά συστατικά (Dean et al., 1997, Gutteridge et al., 1982, Halliwell et al., 1990, Halliwell et al., 1991, Henle et al., 1999, Meneghini et al., 1997, Stohs et al., 1995). Η κύρια πηγή σχηματισμού $\cdot\text{OH}$ στα κύτταρα θεωρείται η αλληλεπίδραση του H_2O_2 με τα ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης κυρίως του σιδήρου και του χαλκού (Halliwell et al., 1999).

1.3.2 Υπεροξείδωση των λιπιδίων

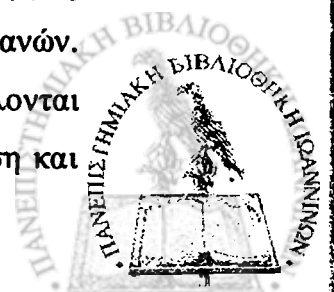
Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός αντίδρασης των $\cdot\text{OH}$ και γενικότερα των ελευθέρων ριζών με κυτταρικά συστατικά είναι αυτός με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Poly unsaturated fatty acids, PUFA), τα οποία συνδεδεμένα στα



φωσφολιπίδια αποτελούν τα βασικά συστατικά των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών. Το φαινόμενο αυτό καλείται "λιπιδιακή υπεροξειδωση" και παρατηρείται όταν η δημιουργία ελευθέρων ριζών υπερισχύει των κυτταρικών αμυντικών μηχανισμών.

Το έναυσμα της υπεροξειδωσης μπορεί να προκληθεί από οποιαδήποτε ρίζα αρκεί να είναι τόσο δραστική ώστε να μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου (H[•]) από μια μεθυλομάδα (-CH₂-). Είναι γνωστό ότι όταν η μεθυλομάδα είναι γειτονική με ένα διπλό δεσμό και περισσότερο όταν ευρίσκεται μεταξύ δύο διπλών δεσμών, η ισχύς του δεσμού του H με τον αντίστοιχο άνθρακα εξασθενεί σημαντικά. Κατά συνέπεια σχεδόν πάντοτε οι διάφοροι οξειδωτικοί παράγοντες αφαιρούν ένα H[•] από μεθυλομάδες μεταξύ δύο διπλών δεσμών (-CH=CH-CH₂-CH=CH-) δημιουργώντας μία νέα ελεύθερη ρίζα στο αντίστοιχο άτομο άνθρακα. Η ρίζα του λιπαρού οξέος η οποία δημιουργείται ανασυνδυάζεται γρήγορα με ηλεκτρόνια από τους διπλανούς διπλούς δεσμούς σχηματίζοντας αφ' ενός μεν συζυγή διένια (conjugated dienes, αλληλουχία διπλού-μονού-διπλού δεσμού) και αφ' ετέρου μία νέα ελεύθερη ρίζα στο αντίστοιχο άτομο άνθρακα. Η νέα ελεύθερη ρίζα είναι σχετικά σταθερότερη και προλαβαίνει να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο δημιουργώντας μία ρίζα υπεροξειδίου η οποία με τη σειρά της μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ δημιουργώντας μια νέα ελεύθερη ρίζα και ένα υπεροξειδίο του λιπαρού οξέος. Ο κύκλος αυτός, εάν δεν τερματισθεί με κάποιο τρόπο, μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές με καταστρεπτικά αποτελέσματα για τις διάφορες μεμβράνες, προκαλώντας τελικά τον θάνατο του κυττάρου. Τα υπεροξειδία των λιπαρών οξέων τα οποία σχηματίζονται στην συνέχεια διασπώνται με πολύπλοκους μηχανισμούς σχηματίζοντας μια πλειάδα προϊόντων και συντελώντας στην περαιτέρω επέκταση των αλυσιδωτών αντιδράσεων.

Σε γενικές γραμμές τα αποτελέσματα της οξείδωσης των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών συνίστανται κυρίως στη μείωση της ρευστότητας, μείωση του μεμβρανικού δυναμικού, αύξηση της διαπερατότητας σε ιόντα καθώς και σε αναστολή μεμβρανικών ενζύμων. Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι τα προϊόντα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης επηρεάζουν σημαντικά διάφορες κυτταρικές λειτουργίες πριν αυτό καθ' αυτό το φαινόμενο επιφέρει την τελική καταστροφή των μεμβρανών. Για παράδειγμα, επηρεάζονται οι πρωτεΐνες μεταφοράς ασβεστίου, αναστέλλονται ένζυμα όπως η φωσφατάση της δ-φωσφορικής γλυκόζης, η αδενυλική κυκλάση και



το κυτόχρωμα P-450. Επίσης, ενέχονται σε αντιδράσεις σουλφιδρυλικών ομάδων (-SH) καθώς και σε διασυνδέσεις πρωτεϊνών οι οποίες περιέχουν τέτοιες ομάδες.

Το κατεξοχήν αντιοξειδωτικό που προφυλάσσει τις μεμβράνες και τις λιποπρωτεΐνες διακόπτοντας τις αλυσιδωτές της λιπιδιακής υπεροξειδωσης είναι η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E). Η ρίζα της τελευταίας είναι σχετικά μη δραστική και ανάγεται σε α-τοκοφερόλη από το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) στην επιφάνεια των μεμβρανών.

1.3.3 Βλάβες στις πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες αποτελούν επίσης στόχους για την δράση των ελευθέρων ριζών τόσο ενδοκυττάρια αλλά και εξωκυττάρια. Το ενδιαφέρον όμως για την μελέτη της οξειδωτικής τροποποίησης των πρωτεϊνών αναπτύχθηκε σχετικά πρόσφατα. Η καθυστέρηση αυτή φαίνεται να οφείλεται στο γεγονός ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι δυνατόν να υποστούν σημαντικές οξειδωτικές βλάβες χωρίς σοβαρές επιπτώσεις στην λειτουργικότητά τους. Μόνο όταν θιγούν απαραίτητα αμινοξέα ή προσθετικές ομάδες στο ενεργό τους κέντρο επηρεάζεται η γενικότερη λειτουργία τους.

Έχει παρατηρηθεί για παράδειγμα η οξειδωτική τροποποίηση ενζύμων, υποδοχέων, πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος, πρωτεϊνών μεταφοράς ιόντων κλπ με αποτέλεσμα ανωμαλίες στη γενική λειτουργία του οργανισμού. Επίσης βλάβες στις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης και την μεταγραφή του DNA έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των μεταλλάξεων. Τέλος οξειδωτικά τροποποιημένες πρωτεΐνες μπορεί να προκαλέσουν την ανοσολογική απόκριση με αποτέλεσμα την δημιουργία αντισωμάτων τα οποία πιθανόν να σχετίζονται με ορισμένα αυτοάνοσα νοσήματα.

Οι επιπτώσεις της δημιουργίας ελευθέρων ριζών σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη εξαρτώνται: α) από την περιεκτικότητα της πρωτεΐνης σε αμινοξέα τα οποία είναι ευαίσθητα στη δράση ελευθέρων ριζών, β) το πόσο σημαντικά είναι αυτά τα αμινοξέα για την δράση της πρωτεΐνης, και γ) από την ικανότητα των κυττάρων να διορθώσουν τις βλάβες στην συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Κατά συνέπεια, πρωτεΐνες που περιέχουν σχετικά μεγάλες ποσότητες από τα αμινοξέα κυστεΐνη, μεθειονίνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη προσβάλλονται πιο εύκολα λόγω της υψηλής δραστικότητας των θειούχων και ακόρεστων μορίων με ελεύθερες ρίζες.



1.3.4 Βλάβες στο κυτταρικό DNA

Το DNA που απομονώνεται από αερόβια βακτήρια, φυτά και ζώα περιέχει σε χαμηλά επίπεδα διάφορα προϊόντα βάσεων που έχουν υποστεί βλάβες με τρόπο ο οποίος είναι σύμφωνος με την προσβολή του DNA από τις $\cdot\text{OH}$ οι οποίες σχηματίζονται *in vivo* (Spencer et al., 1995a). Ειδικότερα, οι Ames και συνεργάτες υπολογίσανε ότι το DNA σχεδόν όλων των κυττάρων των αερόβιων οργανισμών υφίσταται καθημερινά περισσότερες από 10^3 οξειδωτικές βλάβες (Helbock et al., 1998). Ο παραπάνω αριθμός, σε συνδυασμό με την αυθόρμητη απομάκρυνση των πουρινών από το DNA, την απαμίνωση της κυτοσίνης σε ουρακίλη καθώς και με τα λάθη που γίνονται κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, υπογραμμίζει το πόσο σημαντικοί είναι για το κύτταρο οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA.

1.3.4.1 Βλάβες στις βάσεις του DNA

Από τις δραστικές μορφές οξυγόνου τα $\text{O}_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 δεν φαίνεται να αντιδρούν σε σημαντικό βαθμό με τις βάσεις των DNA και RNA καθώς και με τη ριβόζη και δεοξυριβόζη. Αντίθετα, η έκθεση του κυτταρικού DNA σε $\cdot\text{OH}$ οδηγεί στη δημιουργία μεγάλου αριθμού προϊόντων μιας και οι $\cdot\text{OH}$ αντιδρούν ακαριαία με όλα τα μόρια που απαρτίζουν το DNA δηλαδή τα σάκχαρα, τις πουρίνες και τις πυριμιδίνες (Breen and Murphy, 1995, von Sonntag, 1987). Για παράδειγμα οι $\cdot\text{OH}$ προστίθενται στη γουανίνη σε μία από τις θέσεις 4, 5 και 8 του πουρινικού δακτυλίου. Προσθήκη μίας $\cdot\text{OH}$ στη θέση 8 του δακτυλίου οδηγεί στη δημιουργία μίας νέας ελεύθερης ρίζας, της ρίζας της 8-υδρόξυ-γουανίνης. Η ρίζα αυτή στη συνέχεια μπορεί είτε να οξειδωθεί (απώλεια ενός ηλεκτρονίου) σε 8-υδρόξυ-γουανίνη ή να αναχθεί σε 2,6-διάμινο-4-υδρόξυ-5-φορμαμιδοπυριμιδίνη (FAPyG) (Bonice et al., 1980, Chetsanga et al., 1983, Dizdaroglu, 1985a, Dizdaroglu, 1985b, Hems 1960, Kasai et al., 1984, Steenken, 1989). Παρόμοια προϊόντα δημιουργούνται όταν οι $\cdot\text{OH}$ προστεθούν σε έναν από τους C-4, C-5 ή C-8 της αδενίνης.

Σε ότι αφορά τις πυριμιδίνες οι $\cdot\text{OH}$ προστίθενται κυρίως σε ένα από δύο τα άτομα άνθρακα που σχηματίζουν το διπλό δεσμό του πυριμιδινικού δακτυλίου (δεσμός C5-C6). Αποτέλεσμα της προσθήκης αυτής είναι ο σχηματισμός μίας



ελεύθερης ρίζας στο άλλο άτομο άνθρακα του δεσμού (Fujita et al., 1981, Hazra et al., 1983). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι οι $\cdot\text{OH}$ έχουν την ικανότητα να αποσπών ένα άτομο υδρογόνου από την μεθυλομάδα της θυμίνης όμως η αντίδραση αυτή δεν συμβαίνει τόσο συχνά όσο οι αντίστοιχες αντιδράσεις προσθήκης (Fujita et al., 1981).

Περισσότερα από 20 προϊόντα προσθήκης $\cdot\text{OH}$ στις βάσεις του DNA έχουν ταυτοποιηθεί με την τεχνική της αερίου χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS) (Dizdaroglu, 1994, Halliwell et al., 1991).

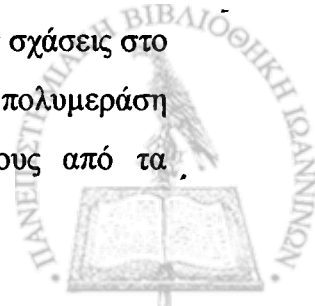
1.3.4.2 Βλάβες στη ριβόζη και στις πυρηνικές πρωτεΐνες

Εκτός από τις βάσεις του DNA, οι $\cdot\text{OH}$ έχουν την ικανότητα να αντιδρούν και με τη δεόξυριβόζη. Η αντίδραση αυτή περιλαμβάνει την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από κάποιο από τα άτομα άνθρακα του σακχάρου με αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας ελεύθερης ρίζας στο άτομο αυτό η οποία στη συνέχεια ανάλογα με τις συνθήκες υφίσταται διάφορες τροποποιήσεις (von Sonntag et al., 1987). Για παράδειγμα, παρουσία οξυγόνου αντιδρά με αυτό με αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας περόξυ ρίζας ($\text{RCOO}\cdot$) στο αντίστοιχο άτομο άνθρακα, η οποία στη συνέχεια υφίσταται μία σειρά τροποποιήσεων όπως αποπρωτονίωση, επανάδιευθέτηση του μορίου, απομάκρυνση ύδατος και σχάση ενός δεσμού C-C, με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό διαφόρων καρβονυλικών προϊόντων (Dizdaroglu et al., 1977, Dizdaroglu et al., 1975, Goldberg, 1987).

Εκτός των επιπτώσεων στις βάσεις και τη δεόξυριβόζη, βλάβες υφίστανται και οι πυρηνικές πρωτεΐνες οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις συνδέονται ομοιοπολικά με το DNA (διασυνδέσεις DNA-πρωτεϊνών). Τέτοιου είδους διασυνδέσεις εμποδίζουν στη συνέχεια το ξεδίπλωμα της χρωματίνης, την επιδιόρθωση του DNA καθώς και τις διαδικασίες σύνθεσης νέου DNA (Altman et al., 1995).

1.3.5 Επιπτώσεις από τις βλάβες στο DNA

Οι επιπτώσεις από τις βλάβες στο DNA μπορεί να είναι πολλαπλές ανάλογα με το είδος και την ένταση των βλαβών. Έτσι για παράδειγμα, πολλαπλές σχάσεις στο DNA προκαλούν την ενεργοποίηση του ενζύμου πολύ-(ADPριβόζη) πολυμεράση (PARP) (σχήμα 6) με συνέπεια την χρησιμοποίηση μεγάλου μέρους από τα



αποθέματα NAD^+ , την μείωση της ικανότητας σύνθεσης νέου ATP και τελικά στο θάνατο (Szabo et al., 1996). Αυτή η αντίδραση καλείται πολλές φορές αντίδραση αυτοκτονίας. Εφόσον η επιδιόρθωση του DNA δεν προλαβαίνει να είναι απόλυτα εφικτή τα μεμονωμένα κύτταρα προτιμούν να "αυτοκτονήσουν" για να αποφευχθεί η ενσωμάτωση λαθών στο DNA η οποία θα είχε σοβαρές συνέπειες για ολόκληρο τον οργανισμό.

Οι οξειδωτικές τροποποιήσεις των βάσεων στο DNA προκαλούν επίσης μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μεταλλάξεις αυτές δεν είναι τυχαία κατανομημένες αλλά εντοπίζονται σε ορισμένα σημεία του DNA. Αυτό μπορεί να προέρχεται είτε από το γεγονός ότι οι οξειδωτικοί παράγοντες έρχονται σε επαφή μόνο με ορισμένα σημεία στο DNA ενώ έχουν δυσκολία να αντιδράσουν με άλλα (πχ το νουκλεοσωμικό DNA) είτε ότι ορισμένες αλληλουχίες μπορούν και δεσμεύουν καλύτερα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης (κυρίως Fe και Cu) τα οποία συμμετέχουν στην δημιουργία OH στα συγκεκριμένα σημεία μετά από την αντίδραση με υπεροξειδία (Oikawa and Kawanishi, 1999).

1.3.6 Επιδιόρθωση των βλαβών του DNA

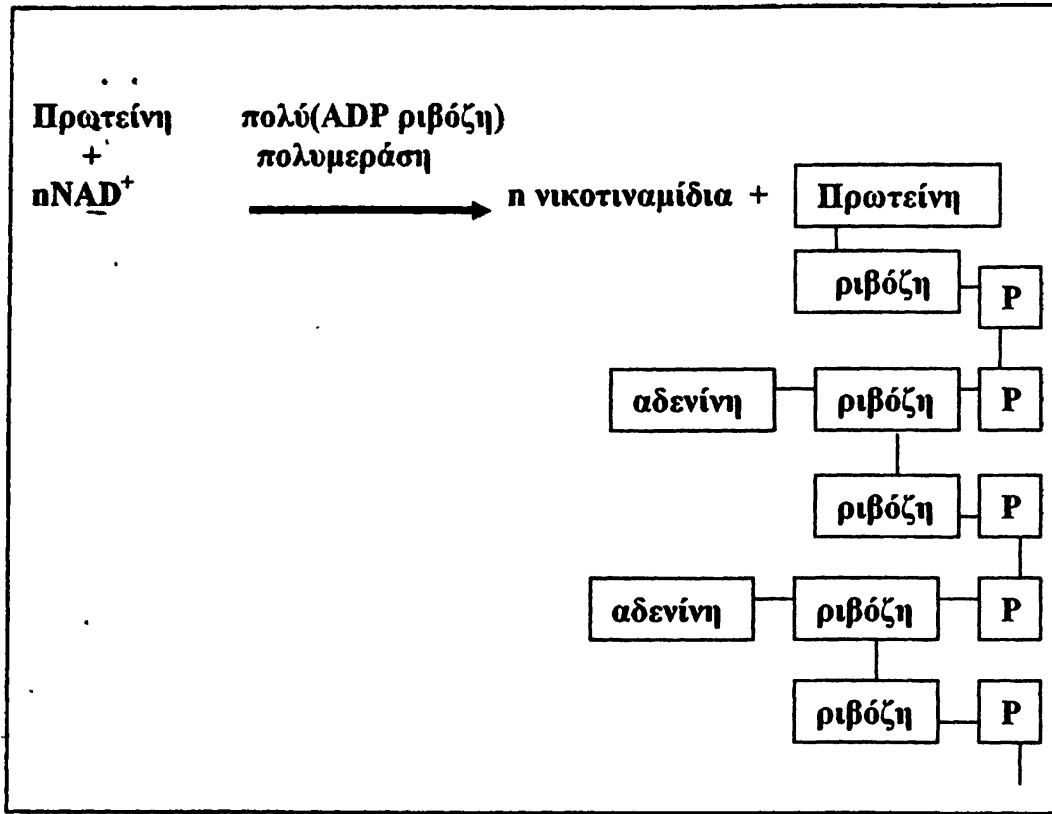
Καθώς όλα τα κύτταρα ενός αερόβιου οργανισμού δημιουργούν δραστικές μορφές οξυγόνου, οι οποίες στη συνέχεια προκαλούν βλάβες στο DNA, η ύπαρξη αποτελεσματικών επιδιορθωτικών μηχανισμών είναι αναγκαία για την ομαλή συνέχιση των κυτταρικών διεργασιών. Συνήθως, τα κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί βλάβες στο DNA τους σταματούν να πολλαπλασιάζονται ούτως ώστε να δώσουν χρόνο για δράση στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς (Wiseman and Halliwell, 1996). Παρόλο που τα ένζυμα DNA πολυμεράσες έχουν μεγάλη πιστότητα, σε ορισμένες περιπτώσεις γίνονται κάποια λάθη και αυτά πρέπει να επιδιορθωθούν. Επιπλέον, συμβαίνουν αυθόρμητες απουρινώσεις και απαμινώσεις οι οποίες πρέπει επίσης να επισκευάζονται. Τα πρόδρομα νουκλεοτίδια του DNA (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) είναι επίσης δυνατόν να υποστούν οξειδωτική βλάβη. Μεγαλύτερη προσοχή έχει δοθεί στην οξείδωση του dGTP, το οποίο μετατρέπεται σε 8-υδροξύ-GTP και στη συνέχεια μπορεί να ενσωματωθεί στο DNA από τις DNA πολυμεράσες (Hayakawa et al., 1995), ενώ το ίδιο συμβαίνει και με το dATP. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της διπλής αλυσίδας του DNA είναι ότι εάν μία αλυσίδα έχει υποστεί



βλάβη τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί η πληροφορία της άλλης αλυσίδας ούτως ώστε να επιδιορθωθεί η πρώτη με ακρίβεια.

Γενικά, οι λάθος ζευγαρωμένες, οι οξειδωτικά τροποποιημένες και οι απαμινωμένες βάσεις επιδιορθώνονται με έναν από τους δύο ακόλουθους μηχανισμούς. Κατά τον πρώτο τύπο επιδιόρθωσης, ο οποίος είναι ο μοναδικός για απομάκρυνση ογκωδών αλλοιώσεων όπως τα διμερή πυριμιδινών και τα προϊόντα προσθήκης καρκινογόνων ουσιών, το DNA κόβεται και στις δύο μεριές της περιοχής που έχει υποστεί αλλοίωση από ένα ένζυμο που ονομάζεται νουκλεάση εκτομής (excinuclease). Κατ' αυτόν τον τρόπο η βάση που δεν χρειάζεται απομακρύνεται ως τμήμα ενός ολιγονουκλεοτιδίου. Στη συνέχεια η DNA πολυμεράση γεμίζει το κενό που δημιουργείται χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την αλυσίδα που δεν έχει υποστεί βλάβη ενώ μία λιγάση συνδέει το DNA. Η παραπάνω διαδικασία ονομάζεται επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων (nucleotide excision repair). Κατά τον δεύτερο τύπο επιδιόρθωσης, απομακρύνεται μόνο η βάση που έχει υποστεί βλάβη (base excision repair). Οι DNA γλυκοσυλάσες, υδρολύουν το δεσμό που συνδέει την μη φυσιολογική βάση με τον σκελετό του DNA με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας απουρινικής ή απυριμιδινικής θέσης (AP sites) στο DNA. Στη συνέχεια, κατάλληλα ένζυμα αναγνωρίζουν τις θέσεις αυτές και κόβουν και τις δύο μεριές του DNA στην περιοχή που λείπει η βάση (μία AP λυάση σχάζει την 3' περιοχή και μία ενδονουκλεάση σχάζει την 5' περιοχή) ελευθερώνοντας έτσι το μόριο της δεόξυριβόζης που ήταν συνδεδεμένο με την βάση που απομακρύνθηκε. Η DNA πολυμεράση προσθέτει στη συνέχεια το σωστό νουκλεοτίδιο χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA και μία λιγάση συνδέει το DNA.

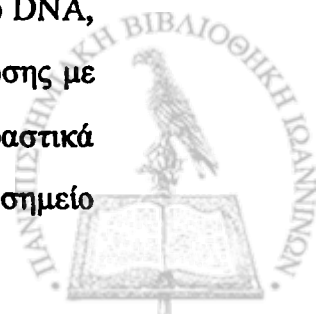




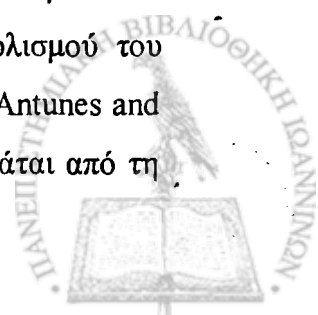
Σχήμα 6: Η αντίδραση η οποία καταλύεται από το ένζυμο πολυ(ADP-ριβόζη) πολυμεράση (PARP, P = φωσφορική ομάδα)

1.3.7 Ο ρόλος των ιόντων μετάλλων μετάπτωσης

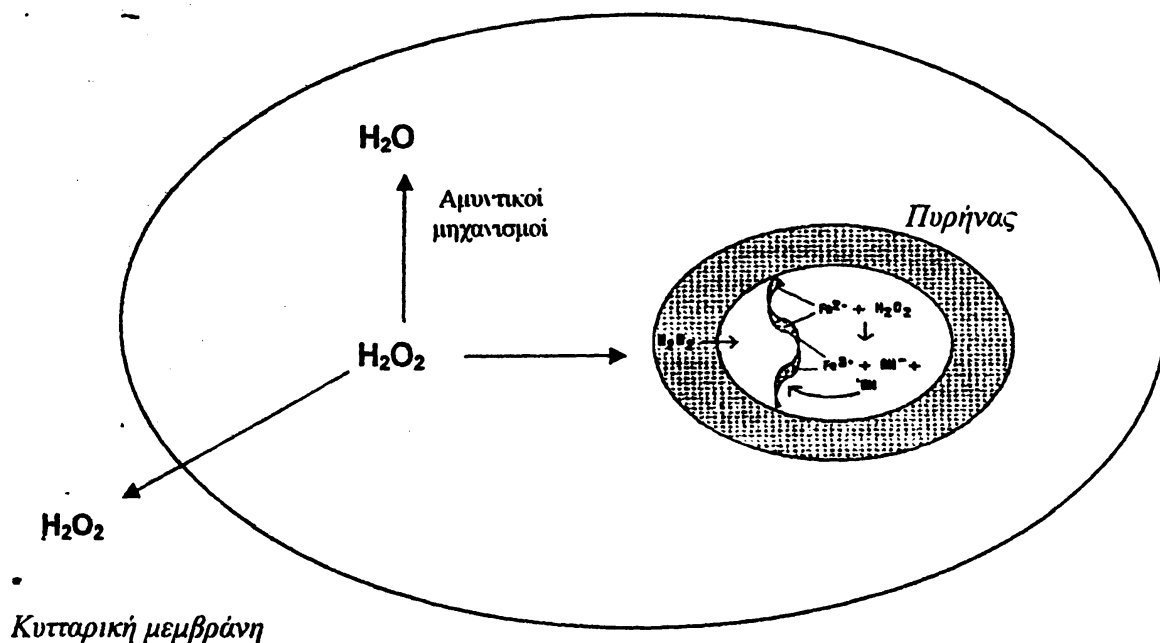
Προσθήκη H_2O_2 σε καλλιέργεια πολλών τύπων κυττάρων οδηγεί σε αύξηση των σχάσεων του DNA λίγα μόλις λεπτά μετά την προσθήκη του, ενώ όταν εξετάστηκε, παρατηρήθηκε και αύξηση του αριθμού των προϊόντων οξειδωσης των βάσεων του (Mello Filho et al., 1984, Mello Filho et al., 1984, Nassi-Calo et al., 1989). Ο τύπος της βλάβης αυτής (αύξηση των επιπέδων των διαφόρων προϊόντων οξειδωσης των τεσσάρων βάσεων) είναι σύμφωνος με την προσβολή του DNA από τις $\cdot\text{OH}$. Το H_2O_2 όμως δεν έχει την ικανότητα να προκαλεί άμεσες βλάβες στο DNA, αλλά έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τα ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης με αποτέλεσμα το σχηματισμό $\cdot\text{OH}$. Από την άλλη, οι $\cdot\text{OH}$ είναι ιδιαίτερα δραστικά μόρια τα οποία δεν προλαβαίνουν να διαχυθούν αλλά αντιδρούν ακαριαία στο σημείο



που δημιουργούνται (Halliwell et al., 1987). Κατά συνέπεια, προκειμένου να προσβάλλουν το DNA θα πρέπει να δημιουργούνται πολύ κοντά σε αυτό ή ακόμα και επάνω σε αυτό. Το DNA, το οποίο έχει αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες είναι στην πράξη ένα μεγάλο ανιόν ικανό να δεσμεύει διάφορα κατιόντα. Έτσι έχειδειχθεί ότι σίδηρος και χαλκός όταν είναι διαθέσιμα έχουν την ικανότητα να συνδέονται στο DNA, με τη σταθερά πρόσδεσης του Fe(II) να έχει τιμή σε pH 7.4 2.1×10^{14} ενώ η αντίστοιχη του Cu(II) να είναι 2×10^4 (Halliwell and Gutteridge, 1999), με το χαλκό να συνδέεται επιλεκτικά σε περιοχές πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη (Rodriguez et al., 1995). Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές έχει επικρατήσει η άποψη ότι η πρόκληση βλαβών στο πυρηνικό DNA από το H_2O_2 οφείλεται στην αλληλεπίδραση του μορίου αυτού με τα ιόντα σιδήρου και χαλκού που βρίσκονται συνδεδεμένα στο DNA με αποτέλεσμα το σχηματισμό $\cdot OH$ επάνω στο DNA, οι οποίες στη συνέχεια προλαβαίνουν να αντιδράσουν με αυτό και να του προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες (Chevion et al., 1988, Halliwell et al., 1990, Halliwell et al., 1991, Henle et al., 1999, Galey, 1997, Meneghini, 1997, Stohs et al., 1995) (σχήμα 5). Παρόλα αυτά, υπάρχουν ενδείξεις που δείχνουν ότι τουλάχιστον σε ορισμένες περιπτώσεις ο μηχανισμός πρόκλησης βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H_2O_2 είναι ανεξάρτητος της αλληλεπίδρασης του με τα ιόντα σιδήρου και χαλκού του DNA αλλά συνδέεται άμεσα με αλλαγές στα επίπεδα των ιόντων ασβεστίου (Cantoni et al., 1989, Panayiotidis et al., 1999). Στην περίπτωση αυτή υποστηρίζεται ότι η έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 αυξάνει αρχικά την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ειδικών ενδονουκλεασών, οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν σχάσεις στο DNA. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο μηχανισμός αυτός είναι ασβέστιο-εξαρτώμενος σε χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 αλλά ανεξάρτητος αυτού σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (Panayiotidis et al., 1999). Η παρατήρηση αυτή αποκτά ιδιαίτερη σημασία εάν ληφθεί υπόψη ότι όταν το H_2O_2 προστίθεται απευθείας στην κυτταρική καλλιέργεια, όπως συμβαίνει στις περισσότερες μελέτες (Chevion, 1988, Galey, 1997, Halliwell et al., 1990, Halliwell et al., 1991, Henle et al., 1999, Meneghini et al., 1997, Stohs et al., 1995), τα κύτταρα εκτίθενται αρχικά σε μία σχετικά υψηλή συγκέντρωση H_2O_2 , η οποία μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα μειώνεται δραματικά εξαιτίας του μεταβολισμού του κυρίως από τα ένζυμα υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και καταλάση (Antunes and Cadenas, 2000). Στην περίπτωση που ο τρόπος δράσης του H_2O_2 εξαρτάται από τη



συγκέντρωση του (Imlay and Linn, 1988), τότε σχεδόν σε όλες τις προαναφερθείσες μελέτες τα αποτελέσματα που αφορούν την εμπλοκή του ασβεστίου στους μηχανισμούς δράσης του H_2O_2 είναι αντιφατικά αφού δεν έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στην συγκέντρωση του H_2O_2 .

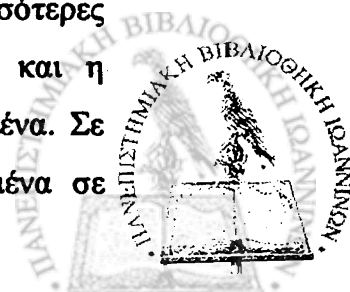


Σχήμα 5: Δημιουργία OH από την αλληλεπίδραση του H_2O_2 με τα ιόντα σιδήρου που βρίσκονται συνδεδεμένα στο DNA

Από τα παραπάνω λοιπόν προκύπτει ότι ο ακριβής μοριακός μηχανισμός με τον οποίο το H_2O_2 προκαλεί βλάβες στο κυτταρικό DNA δεν είναι απόλυτα γνωστός αλλά χρίζει περαιτέρω διερεύνησης.

1.4 Ομοιοστασία των ιόντων μετάλλων μετάπτωσης

Τα ιόντα σιδήρου και χαλκού έχουν την ικανότητα να αλλάζουν την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση αποδίδοντας ή προσλαμβάνοντας ηλεκτρόνια γεγονός που τους προσδίδει από την μία πλευρά μια προνομιακή θέση στη ζώσα ύλη αλλά από την άλλη τα καθιστά πιθανές πηγές κινδύνου. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα ιόντα αυτά αποτελούν προσθετικές ομάδες πρωτεϊνών και η δραστηρότητά τους ελέγχεται από την πρωτεΐνη στην οποία είναι συνδεδεμένα. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως ευρίσκονται στα κύτταρα χαλαρά συνδεδεμένα σε



διάφορα μόρια όπως οργανικά ανιόντα, πολυπεπίδια και συστατικά των μεμβρανών και τότε υπάρχει το ενδεχόμενο να δράσουν τοξικά. Η τοξικότητα τους οφείλεται κυρίως στην ικανότητα τους να συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου καταλύοντας έτσι αντιδράσεις τύπου Fenton (Fenton, 1894) με αποτέλεσμα τη δημιουργία HO[·] και R-CO[·]. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς με τους οποίους ελέγχουν με ακρίβεια την ομοιοστασία των ιόντων αυτών ούτως ώστε αφενός μεν να καλύπτουν τις ανάγκες τους και αφετέρου να αποτρέπεται η τοξική τους δράση. Ο σίδηρος προσλαμβάνεται από τα κύτταρα συνδεδεμένος στην πρωτεΐνη τρανσφερρίνη μετά από πρόσδεση της τελευταίας στον υποδοχέα της στην επιφάνεια του κυττάρου και ενδοκύτωση του συμπλόκου αυτού. Στο εσωτερικό του ενδοσωματίου ο σίδηρος αποδεσμεύεται από την τρανσφερρίνη και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα όπου και χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο. Η περίσσεια του σιδήρου αποθηκεύεται στη φερριτίνη η οποία αποτελεί την κυριότερη ενδοκυττάρια αποθήκη σιδήρου. Παρόλα αυτά, κατά τη μεταφορά του από το σημείο αποθήκευσης στο σημείο που γίνεται η σύνθεση των νέων πρωτεϊνών ο σίδηρος θα πρέπει να βρίσκεται "ελεύθερος" και κατά συνέπεια να είναι οξειδοαναγωγικά ενεργός. Στο κεφάλαιο αυτό αναλύονται οι κυριότεροι μηχανισμοί ρύθμισης της ομοιοστασίας των ιόντων σιδήρου.

1.4.1 Πρωτεΐνες ρύθμισης της ομοιοστασίας των ιόντων μετάλλων μετάπτωσης

1.4.1.1 Τρανσφερρίνη

Η τρανσφερρίνη είναι μονομερής γλυκοπρωτεΐνη, με μοριακό βάρος περίπου 80 kDa από το οποίο 6% είναι υδατάνθρακες (MacGillivray et al., 1983). Η πρωτεΐνη αποτελείται από δύο λοβούς και συνδέει με μεγάλη συγγένεια ($K_d = 10^{-23}$ M) και εξειδίκευση δύο άτομα σιδήρου (III). Η σύνδεση του σιδήρου συμβαίνει ταυτόχρονα με τη σύνδεση δύο καρβονικών ανιόντων και είναι αντιστρεπτή. Στη δέσμευση του σιδήρου συμβάλλουν έξι προσδέτες, τέσσερις βρίσκονται στην πρωτεΐνη (δύο τυροσίνες, μία ιστιδίνη και ένα ασπαρτικό) και τα δύο καρβονικά ανιόντα. Η σύνδεση του μετάλλου κατ' αυτόν τον τρόπο αποτρέπει την αντίδραση του με υπεροξείδια αφού γύρω του σχηματίζεται ένα σχεδόν τέλειο οκτάεδρο. Η σύνδεση της πρωτεΐνης με το σίδηρο είναι ιδιαίτερα ισχυρή σε pH 7.4 (επιφάνεια του κυττάρου) αλλά σε χαμηλότερο pH εξασθενεί, γεγονός σπουδαίας φυσιολογικής σημασίας καθώς οδηγεί

στην απόδοση του μετάλλου στα κύτταρα. Έχει υπολογιστεί ότι κάθε μόριο τρανσφερίνης έχει χρόνο ημιζωής περίπου 8 ημέρες ενώ σχεδόν κάθε 2 ώρες εκτελεί ένα κύκλο μεταφοράς σιδήρου. Επομένως, κάθε μόριο της πρωτεΐνης χρησιμοποιείται σχεδόν εκατό φορές προτού αποσυρθεί από την κυκλοφορία για να κατακερματιστεί (Katz, 1961).

1.4.1.2 Υποδοχέας της τρανσφερίνης

Η πρόσληψη σιδήρου από τα κύτταρα, όταν αυτά χρειάζονται σίδηρο, αρχίζει με έκφραση υποδοχέων της τρανσφερίνης στην επιφάνεια του κυττάρου και την πρόσδεση της τρανσφερίνης σε αυτόν. Ο υποδοχέας της τρανσφερίνης στον άνθρωπο, είναι προϊόν ενός γονιδίου το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3 (Enns et al., 1982, Goodfellow et al., 1982, Kuhn et al., 1984). Το mRNA της πρωτεΐνης έχει μέγεθος 5 kb, από τα οποία τα 2.28 kb μεταφράζονται ενώ τα υπόλοιπα αποτελούν μια ασυνήθιστα μεγάλη 3' αμετάφραστη περιοχή (3' untranslated region). Η τελευταία περιέχει αλληλουχίες νουκλεοτιδίων απαραίτητες για τη ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA όπως θα περιγραφεί παρακάτω (Casey et al., 1989, Mullner et al., 1989).

Ο υποδοχέας της τρανσφερίνης είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους περίπου 180 kDa. Αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες η κάθε μία από τις οποίες περιέχει δύο υπολείμματα κυστεΐνης στις θέσεις 89 και 98 οι οποίες συνδέουν τις δύο υπομονάδες με δισουλφιδικούς δεσμούς. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από τρία τμήματα, το εξωκυττάριο που είναι το μεγαλύτερο (671 αμινοξέα) και περιλαμβάνει το C-τελικό τελικό άκρο της πρωτεΐνης, το διαμεμβρανικό (28 αμινοξέα) και τέλος το ενδοκυττάριο στο οποίο βρίσκεται το N-τελικό της άκρο (62 αμινοξέα) (McClelland et al., 1984, Schneider et al., 1984, Trowbridge et al., 1981). Το εξωκυττάριο τμήμα της κάθε υπομονάδας περιέχει τρεις θέσεις N-γλυκοζυλίωσης στα υπολείμματα ασπαραγίνης 251, 317 και 727 και μια θέση γλυκοζυλίωσης στο οξυγόνο της θρεονίνης στη θέση 104 (Hayes et al., 1992). Η γλυκοζυλίωση φαίνεται να είναι απαραίτητη στην φυσιολογική λειτουργία του μορίου. Η τρανσφερίνη συνδέεται στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα μία ανά κάθε υπομονάδα (Enns and Sussman, 1981).

Παρόλο που η πρωτεΐνη δεν έχει αλληλουχία στόχευσης (leader sequence) οδηγείται στην κυτταρική μεμβράνη χάρη στο διαμεμβρανικό της τμήμα το οποίο συμβάλλει και στην αγκυροβόληση της. Επιπλέον, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις



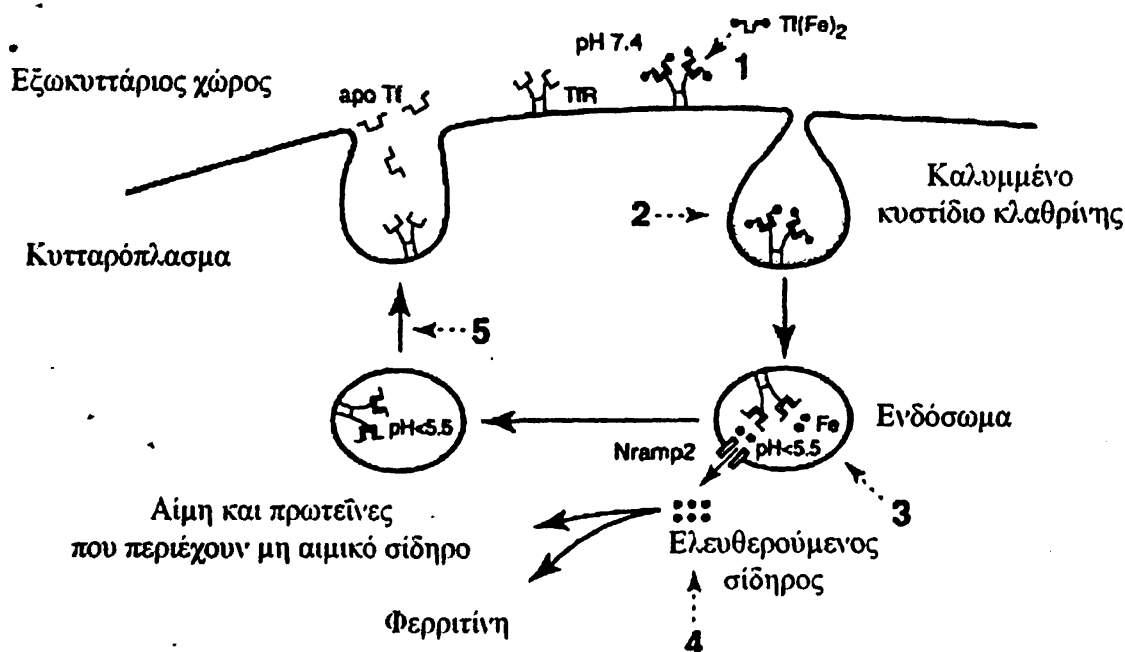
του τμήματος αυτού (προσθήκη παλμιτικού οξέος) φαίνεται ότι συμβάλλουν στην αποτελεσματικότερη αγκυροβόληση της πρωτεΐνης (Jing and Trowbridge, 1990).

Στο ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης περιέχεται ένα υπόλειμμα σερίνης (σερίνη 24) η φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση της οποίας είχε προταθεί ότι ρυθμίζει την ενδοκύτωση του υποδοχέα. Όταν όμως οι Rothenberger και συνεργάτες αντικατέστησαν τη σερίνη 24 παρατήρησαν ότι ο υποδοχέας ενδοκυτώνεται το ίδιο αποτελεσματικά παρόλο που δεν φωσφορυλιώνεται. Έτσι, προτεινάνε ότι η φωσφορυλίωση του υποδοχέα στη σερίνη 24 δεν είναι απαραίτητη για την ενδοκύτωση του (Rothenberger et al., 1987). Μεταγενέστερες μελέτες συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι το κυτταροπλασματικό τμήμα της πρωτεΐνης έχει τον ουσιαστικότερο ρόλο στην ενδοκύτωση της (Alvarez et al., 1990). Ειδικότερα, έχει προταθεί ότι το τετραπεπτίδιο 20Tyr-Thr-Arg-Phe23 αποτελεί σήμα για την αποτελεσματική ενδοκύτωση του υποδοχέα (Collawn et al., 1990, Collawn et al., 1993).

Η σταθερά αποσύνδεσης της τρανσφερρίνης από τον υποδοχέα της εξαρτάται κυρίως από το είδος του κυττάρων. Διαφορετικές μετρήσεις την προσδιόρισαν μεταξύ 10^{-7} - 10^{-9} M. Η απόκλιση αυτή ίσως να οφείλεται στη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να προσδιοριστεί η σταθερά. Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την συγγένεια του υποδοχέα για την τρανσφερρίνη είναι ο αριθμός των ιόντων σιδήρου που βρίσκονται συνδεδεμένα σε αυτή. Η συγγένεια είναι υψηλή για την τρανσφερρίνη με δύο άτομα σιδήρου, ενδιάμεση γι' αυτή με ένα άτομο και πολύ χαμηλή για την από-τρανσφερρίνη (Young et al., 1984). Φυσιολογικά η συγκέντρωση της τρανσφερρίνης στο πλάσμα είναι περίπου 5×10^{-5} M ενώ περίπου 10% αυτής έχει συνδεδεμένα δύο άτομα σιδήρου (5×10^{-6} M). Η σταθερά σύνδεσης της τελευταίας στον υποδοχέα είναι 30 και 500 φορές υψηλότερη από αυτές των μόνο- και από-τρανσφερρίνης αντίστοιχα. Επομένως, σε φυσιολογικές συνθήκες η πρόσληψη του σιδήρου γίνεται σχεδόν αποκλειστικά από την τρανσφερρίνη που μεταφέρει δύο άτομα σιδήρου.

Η διαδικασία πρόσληψης σιδήρου μέσω του υποδοχέα της τρανσφερρίνης έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει προταθεί ότι αποτελείται από τα παρακάτω στάδια (σχήμα 7). Στο πρώτο στάδιο, η τρανσφερρίνη συνδέεται στον υποδοχέα της στην επιφάνεια του κυττάρου. Η αλληλεπίδραση τους είναι μία φυσικοχημική διαδικασία που δεν εξαρτάται από τη θερμοκρασία ούτε την κατανάλωση ATP. Το σύμπλοκο τρανσφερρίνη-υποδοχέας εγκλείεται σε καλυμμένα κυστίδια κλαθρίνης (στάδιο 2) τα

οποία στη συνέχεια αποκόπτονται από την κυτταρική μεμβράνη. Στο εσωτερικό του κυστιδίου το pH ελαττώνεται και αυτό διευκολύνει την ελευθέρωση του σιδήρου από την τρανσφερρίνη χωρίς να επηρεάζει την σύνδεση της με τον υποδοχέα (στάδιο 3). Έχει προταθεί ότι υπεύθυνη για την ελάττωση του pH είναι μία ATP-αση η οποία εισάγει πρωτόνια στο εσωτερικό του ενδοσώματος, όμως μέχρι σήμερα δεν έχει ταυτοποιηθεί η ύπαρξη μιας τέτοιας πρωτεΐνης. Σημαντικό ρόλο στην ελευθέρωση του σιδήρου από την τρανσφερρίνη εκτός από το pH παίζει και ο υποδοχέας της ο οποίος αλλάζει τη διαμόρφωση του και διευκολύνει την αποδέσμευση του σιδήρου από αυτή (Bali and Harris, 1990, Sipe et al., 1991). Στο επόμενο βήμα (στάδιο 4) ο σίδηρος που ελευθερώνεται μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα με μηχανισμό ο οποίος ακόμα είναι ασαφής. Πιο κατάλληλος υποψήφιος για το ρόλο αυτό φαίνεται να είναι η μεμβρανική πρωτεΐνη DMT1 (Nramp2) η οποία εκτός από την μεμβράνη των ενδοσωματίων έχει βρεθεί και στη μεμβράνη των λυσοσωματίων (Tabuchi et al., 2000).



Σχήμα 7: Μηχανισμός πρόσληψης σιδήρου από τα κύτταρα (Cairo et al., 2002).

Επιπλέον, φαίνεται πιθανό ότι ο σίδηρος που ελευθερώνεται από την τρανσφερρίνη πρώτα ανάγεται σε σίδηρο (II), ο οποίος είναι πιο διαλυτός, και στη συνέχεια μεταφέρεται από την DMT1 (Gunshin et al., 1997). Ο μηχανισμός αναγωγής του σιδήρου παραμένει ακόμα ασαφής. Οι Núñez και συνεργάτες αναφέρουν ότι στην

μεμβράνη των ενδοσωματίων υπάρχει μία οξειδοαναγωγή η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγωγή του σιδήρου (Núñez et al., 1990), αν και η ύπαρξη της δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα. Ένα μέρος του σιδήρου που μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα χρησιμοποιείται προκειμένου να καλυφθούν οι μεταβολικές ανάγκες του κυττάρου ενώ το μεγαλύτερο μέρος της περίσσειάς του αποθηκεύεται στη φερριτίνη. Ένα μικρό μέρος του σιδήρου πιθανά συνδέεται χαλαρά σε διάφορα σημεία του κυττάρου και η ύπαρξη του έχει συνδεθεί με την κάλυψη των άμεσων αναγκών του κυττάρου σε σίδηρο (Kakhlon et al., 2002).

1.4.1.3 Φερριτίνη

Η φερριτίνη αποτελεί την κύρια ενδοκυττάρια αποθήκη σιδήρου. Οι φερριτίνες των θηλαστικών αποτελούνται από 24 υπομονάδες, τις βαριές (heavy, H) και τις ελαφριές (light, L), οι οποίες συνδυάζονται μεταξύ τους σε διαφορετικές αναλογίες σχηματίζοντας ένα σφαιρικό σκελετό στον οποίο μπορούν να αποθηκευτούν περίπου 4500 άτομα σιδήρου (III) στη μορφή ένυδρων οξειδίων (σχήμα 8). Στα κύτταρα των θηλαστικών οι δύο υπομονάδες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (Caskey et al., 1983, Worwood et al., 1985) τα οποία υπάρχουν σε μονά αντίγραφα, ενώ πρόσφατα αναφέρθηκε η ύπαρξη μιας μιτοχονδριακής φερριτίνης η οποία κωδικοποιείται από ένα άλλο γονίδιο (Levi et al., 2001, Corsi et al., 2002).

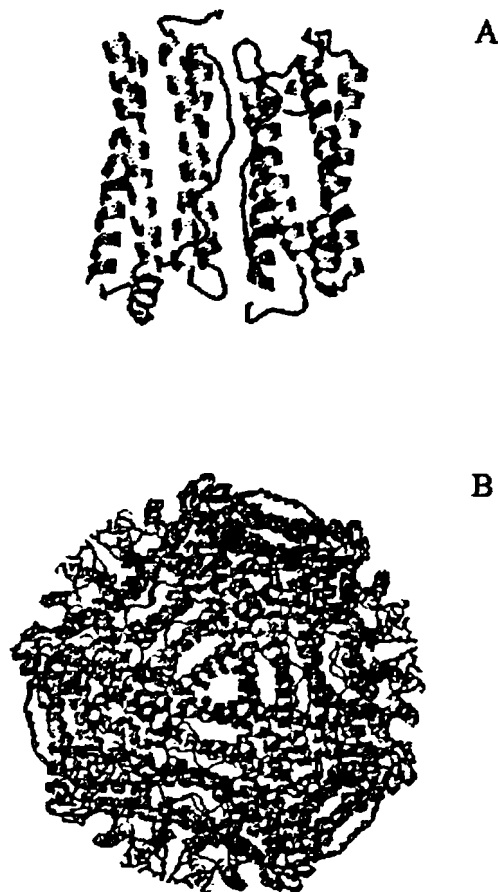
Η αλληλεπίδραση του σιδήρου με την πρωτεΐνη ξεκινάει με τη σύνδεση του σιδήρου (II) σε μια συγκεκριμένη περιοχή της H υπομονάδας, η οποία αποτελείται από 7 αμινοξέα και ονομάζεται κέντρο οξείδωσης του σιδήρου (ferroxidase center). Εκεί, ο σίδηρος αντιδρά με το οξυγόνο, οξειδώνεται σε σίδηρο (III) και στη συνέχεια μεταφέρεται στο εσωτερικό της πρωτεΐνης όπου και αποθηκεύεται. Αντίθετα με την H υπομονάδα, η L υπομονάδα δεν έχει την ικανότητα να οξειδώνει το σίδηρο αλλά ο ρόλος της σχετίζεται με την αποθήκευση του. Στην υπομονάδα αυτή τα αμινοξέα του κέντρου οξείδωσης του σιδήρου υποκαθίστανται από μια ενδοπρωτεϊνική γέφυρα αλάτων η οποία σταθεροποιεί περαιτέρω την υπομονάδα (Santambrogio et al., 1992). Επιπλέον, η L υπομονάδα περιέχει όξινα κατάλοιπα τα οποία διευκολύνουν στην πυρήνωση του σιδήρου και βοηθούν στην ανακύκλωση του κέντρου οξείδωσης της H υπομονάδας (Levi et al., 1994).



Η φερριτίνη των θηλαστικών είναι κυρίως κυτταροπλασματική πρωτεΐνη. Επιπλέον, ένα μικρό της μέρος βρίσκεται στον ορό και στα άλλα εκκριντικά υγρά. Παρ' όλο που η φερριτίνη του ορού δεν αποθηκεύει σίδηρο έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνεται σε συνθήκες υπερφόρτωσης σιδήρου καθώς και σε φλεγμονές (Kozioi et al., 2001, Lipschitz et al., 1974, Torti et al., 1994). Αν και χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη ως δείκτης της αποθηκευτικής ικανότητας του οργανισμού λίγα είναι γνωστά για την προέλευση και τη λειτουργικότητα της.

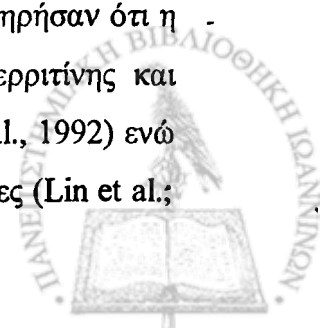
Ο ρόλος της φερριτίνης στην ομοιοστασία του ενδοκυττάριου σιδήρου φαίνεται ότι συνδέεται στενά με την πρωταρχική και καλύτερα χαρακτηρισμένη λειτουργία της, την αποθήκευση του σιδήρου. Όμως, η ενεργή της συμμετοχή στη διαδικασία αυτή δεν είναι ακόμα απόλυτα ξεκαθαρισμένη για δύο κυρίως λόγους. Ο πρώτος από αυτούς σχετίζεται με το γεγονός ότι η συγγένεια της για το μέταλλο δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια επειδή εξαρτάται τόσο από το είδος του σιδήρου που της είναι διαθέσιμος (Fe^{2+} , Fe^{3+}) καθώς και από την αναλογία των υπομονάδων στο μόριο της η οποία δεν είναι σταθερή ανάμεσα στα διαφορετικά είδη κυττάρων. Ο δεύτερος λόγος σχετίζεται με το γεγονός ότι συνήθως η φερριτίνη είναι μερικώς κορεσμένη (λιγότερα από 1500 άτομα σιδήρου ανά μόριο της) και κατά συνέπεια θα μπορούσε να αποθηκεύσει την περίσσεια του σιδήρου χωρίς να χρειαστεί να μεταβληθούν τα επίπεδα της. Ασαφές παραμένει επίσης το πώς μεταβάλλονται τα επίπεδα έκφρασης της κάθε υπομονάδας της σε συνάρτηση με τις μεταβολές των επιπέδων του σιδήρου. Στην περίπτωση αυτή φαίνεται ότι επηρεάζονται κυρίως τα επίπεδα έκφρασης της Η-υπομονάδας η οποία αποτελεί και τον κύριο ρυθμιστή της ενεργότητας της φερριτίνης. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από μία σειρά πειραματικών μελετών στις οποίες παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση της τροποποιεί σημαντικά το φαινότυπο των κυττάρων (Cozzi et al., 2000, Epsztejn et al., 1999, Picard et al., 1996, Picard et al., 1998). Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές προτάθηκε ότι η Η υπομονάδα καθορίζει το ποσό του σιδήρου που ενσωματώνεται στην πρωτεΐνη συμβάλλοντας στην διατήρηση της κυτταρικής ομοιοστασίας αφού με τον τρόπο αυτό απομακρύνεται ο πολύ δραστικός και τοξικός σίδηρος (II). Η βιολογική σπουδαιότητα της υπομονάδας αυτής τονίζεται περαιτέρω από την παρατήρηση ότι ποντίκια στα οποία έχει απαλειφθεί το γονίδιο της, πεθαίνουν στα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσής τους (Ferreira et al., 2000).





Σχήμα 8: Δομή της H αλυσίδας της ανθρώπινης φερριτίνης (A) και ολόκληρου του μορίου της ανθρώπινης φερριτίνης (B) (Arosio and Levi, 2002).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφραση της φερριτίνης επηρεάζεται από παράγοντες ανεξάρτητους από το σίδηρο όπως κυτοκίνες, ογκογονίδια και οξειδωτικό στρες (Ai et al., 1999, Balla et al., 1992, Cozzi et al., 2000, Lin et al., 1997, Lin et al., 1998, Orino et al., 2001, Picard et al., 1998, Torti et al., 1988, Tsuji et al., 1993, Tsuji et al., 1995, Wei et al., 1990, Wu et al., 1999,). Το οξειδωτικό στρες είναι μία συνεχής απειλή για την ακεραιότητα των κυττάρων. Επομένως, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί διαφορετικά μονοπάτια ελέγχου της φερριτίνης. Πειραματικά δεδομένα στηρίζουν την άποψη ότι η φερριτίνη έχει προστατευτικό ρόλο έναντι του οξειδωτικού στρες. Οι πρώτες παρατηρήσεις σχετικά με το θέμα αυτό έγιναν από τους Balla και συνεργάτες οι οποίοι παρατήρησαν ότι η έκθεση ενδοθηλιακών κυττάρων σε αίμη επάγει τη σύνθεση της φερριτίνης και ταυτόχρονα μειώνει την ευαισθησία των κυττάρων στο H_2O_2 (Balla et al., 1992) ενώ παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και από άλλες ερευνητικές ομάδες (Lin et al.;



1997, Lin et al., 1998, Picard et al., 1998). Παρατηρήθηκε επίσης ότι η υπερέκφραση της H υπομονάδας μειώνει τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (Cozzi et al., 2000, Orino et al., 2001) και επιφέρει ανθεκτικότητα σε διάφορα φάρμακα (Epsztejn, et al., 1999), ενώ η καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου της καθιστά τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες (Tsuji et al., 1995, Tsuji et al., 2000).

Γενικότερα, η φερριτίνη δεν πρέπει να θεωρείται μόνο ως μέλος μιας ομάδας πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη ρύθμιση του σιδήρου όπως η τρανσφερρίνη και ο υποδοχέας της αλλά μιας ευρύτερης οικογένειας πρωτεϊνών που κατευθύνουν και ρυθμίζουν την κυτταρική απόκριση και άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής (Torti et al., 1988).

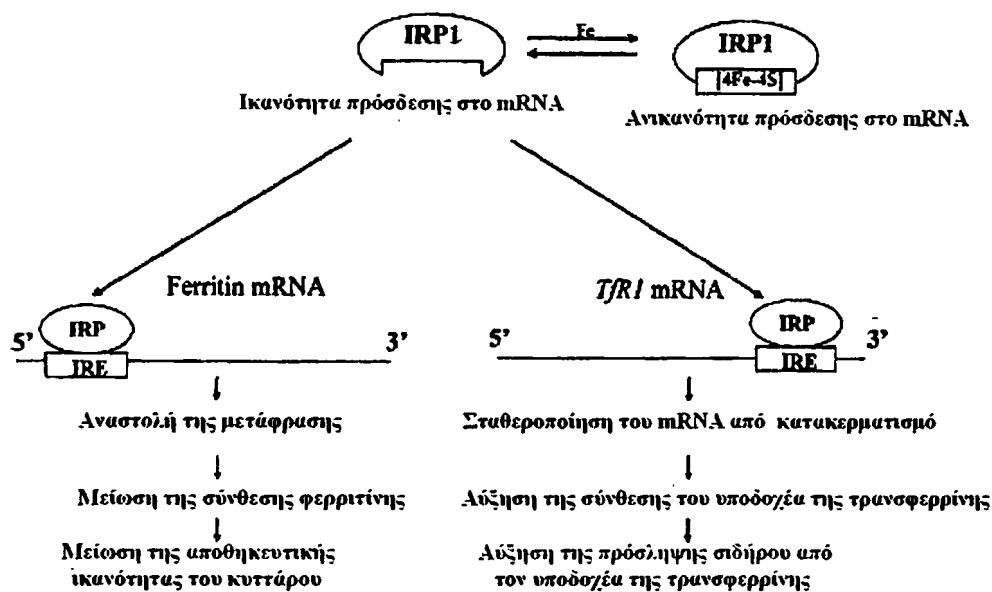
1.4.1.4 Πρωτεΐνες ρύθμισης του σιδήρου, 1 και 2 (IRP1 και IRP2).

Όπως προαναφέρθηκε, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει εξειδικευμένους μηχανισμούς για τον ακριβή έλεγχο των ενδοκυττάρων επιπέδων του σιδήρου. Ο έλεγχος αυτός επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της ταυτόχρονης τροποποίησης της έκφρασης της φερριτίνης και του υποδοχέα της τρανσφερρίνης. Κεντρικό ρόλο σε αυτούς τους μηχανισμούς ελέγχου παίζουν δύο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες ρύθμισης του σιδήρου (iron regulatory proteins, IRPs), οι οποίες όταν ενεργοποιούνται έχουν την ικανότητα να ελέγχουν τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα της τρανσφερρίνης και φερριτίνης μέσω τροποποίησης της μετάφρασης του mRNA τους. Πιο συγκεκριμένα δεσμεύονται σε ειδικές περιοχές επάνω στο mRNA των πρωτεϊνών αυτών που καλούνται στοιχεία απόκρισης στο σίδηρο (iron responsive elements, IRE) (Cairo et al., 2000, Hentze et al., 1996,).

Η IRP1 είναι ένα κυτταροπλασματικό ομόλογο της μιτοχondριακής ακονιτάσης, ενός ενζύμου του κύκλου του Krebs. Σημαντικό ρόλο στην ενεργότητα της IRP1 παίζει ένα σύμπλοκο σιδήρου θείου [4Fe-4S] που βρίσκεται σε μία σχισμή μεταξύ των δύο υπομονάδων της πρωτεΐνης. Όταν τα επίπεδα του σιδήρου είναι υψηλά τότε σχηματίζεται το σύμπλοκο και η IRP1 δεν έχει την ικανότητα να συνδέεται στα IRE αλλά έχει ενεργότητα κυτταροπλασματικής ακονιτάσης. Αντίθετα, σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου το σύμπλοκο αποδομείται και τότε η πρωτεΐνη αποκτά την κατάλληλη διαμόρφωση που της επιτρέπει να αλληλεπιδρά με τα IRE. Η ύπαρξη ενός τέτοιου συμπλόκου στο μόριο της IRP1 επιτρέπει τη ρύθμιση της ενεργότητας της χωρίς να απαιτείται να μεταβληθούν τα επίπεδα έκφρασης της (σχήμα 9).



Παρόλο που ο ρόλος της IRP1 στους μηχανισμούς ρύθμισης της ομοιοστασίας του ενδοκυττάριου σιδήρου είναι καλά μελετημένος, οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αποδόμηση και τον επανασχηματισμό του συμπλόκου παραμένουν ακόμα ασαφείς. Ένα από τα τέσσερα άτομα σιδήρου του συμπλόκου είναι σχετικά ασταθές και έχειδειχθεί ότι απομακρύνεται εύκολα παρουσία H_2O_2 (Brazzolotto et al., 1999). Στην περίπτωση αυτή παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη χάνει μεν την ενεργότητα της ακονιτάσης δεν αποκτά όμως την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τα IRE γεγονός που υποδηλώνει ότι η απομάκρυνση ενός ατόμου σιδήρου δεν είναι ικανή να την ενεργοποιήσει. Επιπλέον, εκτός από το σίδηρο, σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα του συμπλόκου παίζουν τόσο η φωσφορυλίωση ενός υπολείμματος σερίνης, η οποία είναι απαραίτητη για τη σύνδεση της πρωτεΐνης στο mRNA (Brown et al., 1998, Fillebeen et al., 2003), όσο και τρία κατάλοιπα κυστεϊνών στις θέσεις 437, 503 και 506 (Hirling et al., 1994, Philpott et al., 1993).



Σχήμα 9: Ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της IRP1 (Cairo et al. 2002).

Λίγες είναι επίσης οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό επανασχηματισμού του συμπλόκου στην περίπτωση που πρέπει να ανασταλεί η δράση της IRP1. Από μελέτη που έγινε σε βακτήρια προτάθηκε ότι ο

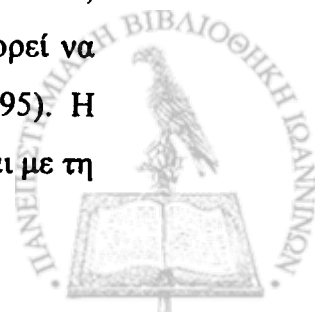


επανασχηματισμός του συμπλόκου είναι μία αυθόρμητη διαδικασία εφόσον υπάρχει διαθέσιμος σίδηρος και αναγωγικά μέσα (Frazzon and Dean, 2001). Στα κύτταρα των θηλαστικών όμως, η παραπάνω πρόταση δεν φαίνεται να ισχύει και έχει προταθεί η ύπαρξη εξειδικευμένων ενζύμων για τη συναρμολόγηση των συμπλόκων σιδήρου θείου (Land and Rouault, 1998).

Η IRP2 είναι σε μεγάλο βαθμό ομόλογη της IRP1 (έχουν 79% ομολογία σε επίπεδο αμινοξέων). Συνδέεται με την ίδια συγγένεια και εξειδίκευση στα IRE όπως και η IRP1 αλλά διαφέρει σημαντικά με αυτή σε ότι αφορά το μηχανισμό ενεργοποίησης και απενεργοποίησης της. Η ενεργότητα της IRP2 δεν ρυθμίζεται από κάποιο σύμπλοκο σιδήρου θείου αλλά αποκρίνεται στην έλλειψη ή την παρουσία του σιδήρου είτε με την εκ νέου σύνθεση της είτε με αύξηση της αποικοδόμησης της αντίστοιχα. Σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της φαίνεται ότι παίζει μια περιοχή 73 αμινοξέων στο N-τελικό της άκρο η οποία είναι ευαίσθητη σε σίδηρο-εξαρτώμενες οξειδωτικές τροποποιήσεις. Στην περίπτωση που τα επίπεδα του σιδήρου είναι υψηλά, ιόντα σιδήρου συνδέονται σε κατάλοιπα κυστεΐνης της περιοχής αυτής και καταλύουν την οξειδωτική τροποποίηση παρακείμενων αμινοξέων μέσω του σχηματισμού ελευθέρων ριζών. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη σηματοδοτείται με ουβικουΐτίνη και τελικά κατακερματίζεται από το πρωτεάσωμα (Iwai et al., 1998). Πρόσφατες μελέτες όμως δεν δείχνει να στηρίζουν αυτή την υπόθεση αλλά φαίνεται ότι η πρωτεΐνη κατακερματίζεται με κάποιο άλλο μηχανισμό (Wang et al., 2004), ενώ σε περίπτωση που τα επίπεδα του σιδήρου είναι χαμηλά η πρωτεΐνη συντίθεται εκ νέου (Cairo et al., 2000).

1.4.1.5 Αλβουμίνη και σερουλοπλασμίνη

Στον ορό του αίματος τα ιόντα Cu είναι συνήθως προσδεδεμένα στην αλβουμίνη η οποία έχει μια υψηλής ισχύος θέση δέσμευσης για τον σίδηρο και μερικές χαμηλότερης για τα ιόντα χαλκού (Halliwell and Gutteridge, 1999). Το σύμπλοκο αλβουμίνης-Cu προσλαμβάνεται κυρίως από τα ηπατοκύτταρα τα οποία αποδίδουν το χαλκό σε μια άλλη πρωτεΐνη την σερουλοπλασμίνη (132 kDa) η οποία στη συνέχεια εκλύεται στο πλάσμα (Gutteridge and Stocks, 1981, Gutteridge et al., 1985). Η σερουλοπλασμίνη έχει 6 θέσεις δέσμευσης ιόντων χαλκού και μπορεί να αποδώσει τα ιόντα αυτά σε κύτταρα τα οποία τα χρειάζονται (Harris, 1995). Η διαδικασία αυτή όπως και στην περίπτωση της πρόσληψης του σιδήρου, γίνεται με τη

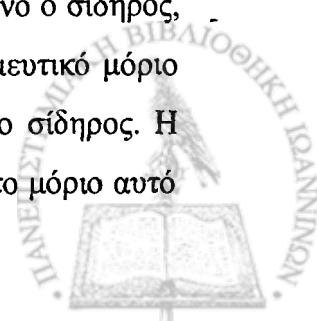


σύνδεση της πρωτεΐνης σε ειδικούς υποδοχείς και την ενδοκύτωση του συμπλόκου. Η τύχη του χαλκού που ελευθερώνεται από την πρωτεΐνη και η ενδοκυττάρια ομοιοστασία του παραμένουν εν πολλοίς άγνωστα. Έχει προταθεί ότι η γλουταθειόνη θα μπορούσε να παίζει το ρόλο του ενδοκυττάριου μεταφορέα χαλκού.

1.4.2 Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος

Το μεγαλύτερο μέρος του ενδοκυττάριου σιδήρου είτε βρίσκεται αποθηκευμένο στην φερριτίνη, είτε είναι ενσωματωμένο στις διάφορες σίδηρο-πρωτεΐνες. Πιστεύεται όμως ότι ένα μικρό του ποσοστό (περίπου 1%) είναι χαλαρά συνδεδεμένο σε διάφορα μόρια όπως οργανικά ανιόντα, πολυπεπτίδια και συστατικά των μεμβρανών και θεωρείται ότι ο ρόλος του είναι να καλύπτει τις άμεσες ανάγκες του κυττάρου σε σίδηρο. Επειδή όμως ο σίδηρος αυτός είναι χαλαρά συνδεδεμένος και έχει την ικανότητα να αντιδρά με τα διάφορα υπεροξειδία έχει ονομαστεί “οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος” (redox active iron).

Παρότι οι πρώτες αναφορές για την ύπαρξη του “οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου” έγιναν αρκετές δεκαετίες πριν (Greenberg and Wintrobe, 1946), η ταυτοποίηση του άργησε να γίνει κύριως γιατί δεν υπήρχαν οι κατάλληλες μέθοδοι για την ανίχνευση του. Σήμερα έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για την μέτρηση του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (Epsztejn et al., 1997, Petrat et al., 2002) με πιο διαδεδομένες τις φθορισμομετρικές μεθόδους οι οποίες σε σχέση με τις υπόλοιπες πλεονεκτούν στο ότι η μέτρηση γίνεται σε ανέπαφα κύτταρα. Στις φθορισμομετρικές μεθόδους χρησιμοποιούνται φθορίζοντα μόρια τα οποία αποτελούνται από μία φθορίζουσα ουσία συνδεδεμένη με ένα δεσμευτή σιδήρου. Συνήθως το φθορίζων μόριο φέρει και μία εστερική ομάδα, η οποία το διευκολύνει να διαχέεται ελεύθερα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Ενδοκυττάρια, ο εστερικός δεσμός υδρολύεται ταχύτατα από μη εξειδικευμένες εστεράσες με αποτέλεσμα το φθορίζων μόριο να αποκτά αρνητικό φορτίο και να μην μπορεί πλέον να διαπερνά τις διάφορες μεμβράνες του κυττάρου. Στη συνέχεια, το μόριο αυτό συνδέει ιόντα σιδήρου αλλά και άλλων μετάλλων με αποτέλεσμα τη μείωση του φθορισμού του ανάλογα με το ποσό των μετάλλων που συνδέονται. Προκειμένου να απομακρυνθεί μόνο ο σίδηρος, τα κύτταρα εκτίθενται σε κάποιο εξειδικευμένο και ισχυρό σιδηροδεσμευτικό μόριο το οποίο προστίθεται σε περίσσεια ώστε να απομακρυνθεί ποσοτικά ο σίδηρος. Η απομάκρυνση του σιδήρου από το φθορίζων μόριο έχει ως αποτέλεσμα το μόριο αυτό

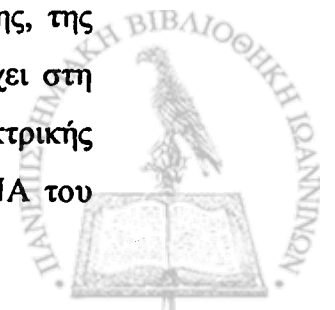


να επανακτά την ικανότητα του να φθορίζει ενώ η αύξηση του φθορισμού είναι ανάλογη του σιδήρου που απομακρύνεται. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας κατάλληλες μαθηματικές προσεγγίσεις υπολογίζεται η συγκέντρωση του σιδήρου που είχε συνδεθεί στο φθορίζον μόριο (Petrat et al., 2002, Kakhlon et al., 2002). Μετρήσεις των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου δείχνουν ότι κυμαίνεται σε στενά καθορισμένα πλαίσια (Epsztejn et al., 1997, Esposito et al., 2002) ώστε αφενός μεν να καλύπτονται οι ανάγκες των κυττάρων σε σίδηρο και αφετέρου να αποτρέπεται η τοξική του δράση. Κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου παίζουν οι πρωτεΐνες ρύθμισης του σιδήρου (IRPs) οι οποίες αισθάνονται τις μεταβολές που υφίσταται και τροποποιώντας την ενεργότητα τους τον επαναφέρουν στα φυσιολογικά του επίπεδα. Πρόσφατα όμως, έχει αναφερθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η ρύθμιση του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου γίνεται και με άλλους τρόπους ανεξάρτητους των πρωτεϊνών ρύθμισης του σιδήρου (Kakhlon et al., 2002).

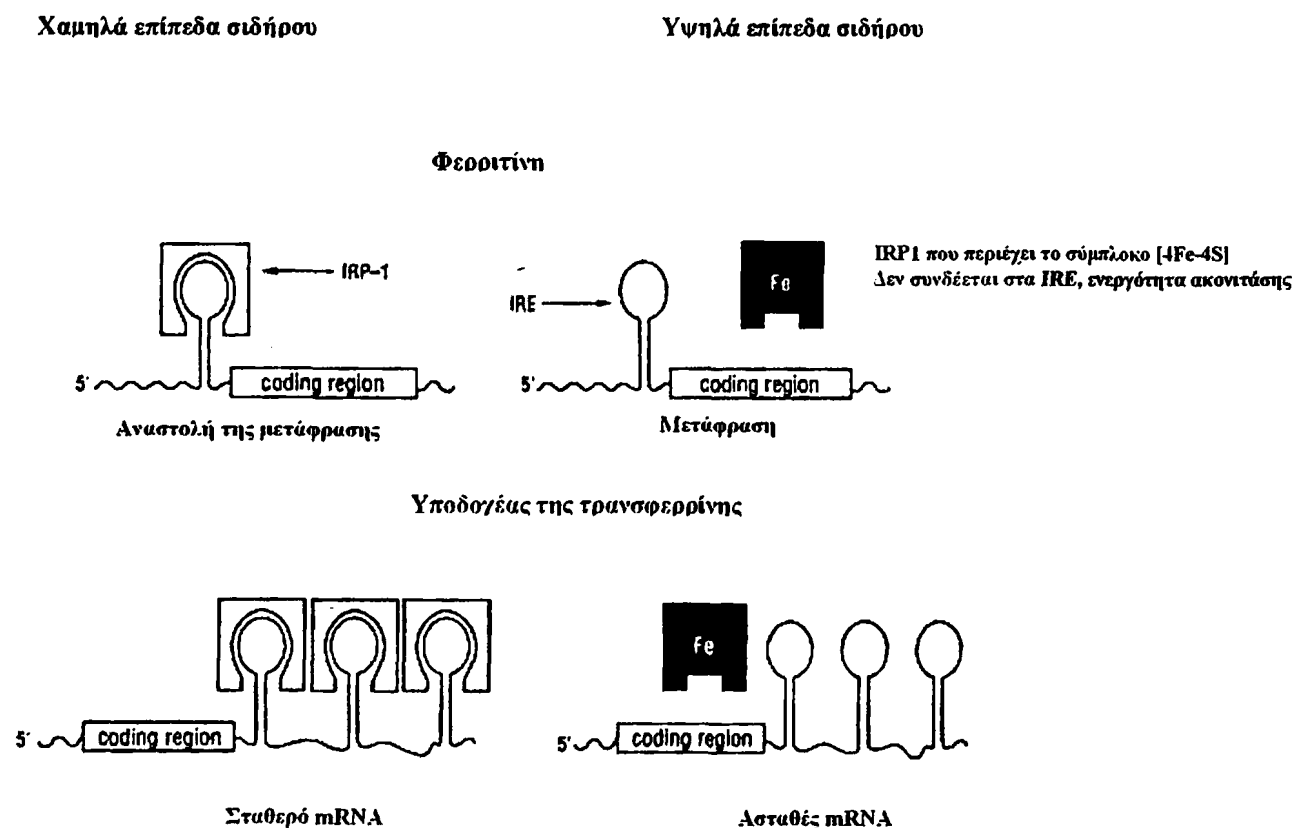
1.4.3 Μηχανισμοί ελέγχου των ενδοκυττάρων επιπέδων ιόντων σιδήρου

Σε προηγούμενη ενότητα αναφέρθηκε ότι τα επίπεδα του ενδοκυττάρου σιδήρου ρυθμίζονται μέσω μηχανισμών οι οποίοι ελέγχουν και τροποποιούν ταυτόχρονα τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ομοιοστασία του σιδήρου δηλαδή των φερριτίνης και του υποδοχέα της τρανσφερρίνης. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασης των IRPs και συγκεκριμένων περιοχών του mRNA των φερριτίνης και υποδοχέα της τρανσφερρίνης οι οποίες ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στο σίδηρο (iron responsive elements, IRE).

Τα IRE είναι τμήματα του mRNA με δομή φουρκέτας και βρίσκονται είτε στο 3' είτε στο 5' αμετάφραστο άκρο του (3' ή 5' untranslated region, UTR). Μια συντηρημένη αζευγάρωτη κυτοσίνη που βρίσκεται 5 ζεύγη βάσεων πριν από τη θηλεία είναι απαραίτητη για την πρόσδεση των IRPs. Συνήθως τα IRE του 5' αμετάφραστο άκρου του mRNA απαντώνται σε μονά αντίγραφα ενώ τα αντίστοιχα του 3' άκρου σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι περισσότερα του ενός. Στοιχεία απόκρισης στο σίδηρο υπάρχουν στο 5' αμετάφραστο τμήμα των mRNAs της φερριτίνης, της συνθετάσης του δ-αμινολεβουλινικού οξέος των ερυθροκυττάρων (συμμετέχει στη σύνθεσή της αίμης), της μιτοχondριακής ακονιτάσης και της ηλεκτρικής αφυδρογόνωσης. Πέντε IRE υπάρχουν στο 3' αμετάφραστο τμήμα του mRNA του



υποδοχέα της τρανσφερρίνης (transferrin receptor, TfR) και ένα στο mRNA του μεταφορέα δισθενών μετάλλων (divalent metal transporter 1). Η σύνδεση των IRPs στα IRE του 5' αμετάφραστου τμήματος του mRNA αναστέλλει την μετάφραση του, ενώ η σύνδεση τους στο IRE του 3' άκρου σταθεροποιεί το mRNA και το προστατεύει από τη δράση των νουκλεασών, ενώ το αντίθετο συμβαίνει όταν οι IRPs δεν βρίσκονται συνδεδεμένες στα IRE (σχήμα 10). Παρόλα αυτά, η παρουσία στοιχείου απόκρισης του σιδήρου στο mRNA μιας πρωτεΐνης δεν προϋποθέτει ότι η έκφραση της ρυθμίζεται μέσω της αλληλεπίδρασης του IRE με τις IRPs, δηλαδή σε συνάρτηση με τις μεταβολές των επιπέδων του ενδοκυττάριου σιδήρου (Wardrop et al., 1999, Wardrop et al., 2000).



Σχήμα 10: Αλληλεπίδραση των IRPs με τα IRE των mRNAs των φερριτίνη και υποδοχέα της τρανσφερρίνης (Cairo and Pietrangelo, 2000).

Όπως προαναφέρθηκε οι IRPs ενεργοποιούνται σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου ενώ απενεργοποιούνται όταν ο ενδοκυττάριος σίδηρος είναι σε υψηλά



επίπεδα. Σύμφωνα με τα παραπάνω, αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των IRPs είναι η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα της τρανσφερρίνης και η αναστολή της σύνθεσης της φερριτίνης, δηλαδή αυξάνεται η ικανότητα των κυττάρων να προσλαμβάνουν σίδηρο ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η ικανότητα τους να τον αποθηκεύουν. Η ρύθμιση αυτή οδηγεί στην αύξηση του διαθέσιμου σιδήρου για την κάλυψη των μεταβολικών αναγκών του κυττάρου. Αντίθετα, όταν τα επίπεδα του σιδήρου είναι υψηλά, τότε οι IRPs δεν είναι ενεργοποιημένες γεγονός που οδηγεί στη σύνθεση της φερριτίνης και την αναστολή της σύνθεσης του υποδοχέα της τρανσφερίνης. Δηλαδή, στην περίπτωση αυτή ενισχύεται η αποθηκευτική ικανότητα του κυττάρου και δεσμεύεται με ασφάλεια ο πλεονάζων σίδηρος με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η τοξική του δράση.



1.5 Σκοπός της μελέτης

Στόχος της παρούσης μελέτης είναι η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών πρόκλησης βλαβών στο κυτταρικό DNA, οι οποίες προκαλούνται μετά από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 . Παρότι η επικρατούσα άποψη θεωρεί ότι το H_2O_2 προκαλεί βλάβες στο DNA αντιδρώντας με ιόντα μετάλλων μετάπτωσης τα οποία είναι προσδεμένα πάνω στο DNA, υπάρχουν ενδείξεις ότι η παραπάνω άποψη δεν είναι απόλυτα θεμελιωμένη και ο ακριβής μηχανισμός χρίζει περαιτέρω διερεύνησης. Το κυριότερο πρόβλημα στις περισσότερες μελέτες ήταν ότι τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς αποικοδόμησης του H_2O_2 και κατά συνέπεια η προσθήκη του συνοδεύεται και από άμεση αποικοδόμηση του. Στην παρούσα εργασία η έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 έγινε χρησιμοποιώντας ένα ενζυμικό σύστημα, την οξειδάση της γλυκόζης, το οποίο εξασφάλιζε συνεχή και σταθερό ρυθμό παραγωγής H_2O_2 ούτως ώστε να διασφαλίζεται μία σταθερή συγκέντρωση του. Για την εκτίμηση των βλαβών στο κυτταρικό DNA χρησιμοποιήθηκε μία ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδος, η “ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων κυττάρων” (comet assay). Σε συνδυασμό με μία σειρά εξειδικευμένων μεταλλοδεσμευτικών ενώσεων διερευνήθηκε αρχικά η εμπλοκή των ενδοκυττάρων ιόντων σιδήρου και χαλκού στους μηχανισμούς δράσης του H_2O_2 ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η δράση σιδηροδεσμευτικών μορίων, τα οποία δεν είχαν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη. Προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός πρόσληψης από τα κύτταρα αυτών των μορίων, επιλέχθηκε ένα από αυτά, η δεσφεριοξαμίνη, και μελετήθηκε λεπτομερώς ο μηχανισμός πρόσληψης της από τα κύτταρα. Ειδικότερα, μελετήθηκε η δράση της σε κύτταρα στα οποία είχαν τροποποιηθεί επιλεκτικά τα διάφορα μονοπάτια της ενδοκύτωσης μετά από υπερέκφραση μεταλλαγμένων επικρατουσών μορφών των πρωτεϊνών dynamin και Rab5. Παράλληλα με τα παραπάνω μελετήθηκε η εμπλοκή της δεσφεριοξαμίνης και κατ’ επέκταση των ιόντων σιδήρου που δεσμεύονται από αυτή, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς και στην απόπτωση η οποία προκαλείται από το H_2O_2 .



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά -

Sigma Company, St Louis, MO, USA

RPMI-1640 εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη, δισκία ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS), οξειδάση της γλυκόζης (*Aspergillus niger*, 18000 Units/g), πεπστατίνη A (pepstatin A), λουπεπτίνη (leupeptin), Hoechst 33342, ασκορβικό οξύ, α-λιποϊκό οξύ, α-τοκοφερόλη, 2,2'-dipyridyl, N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN), diethylenetriaminopentaacetic acid (DTPA), κυανού της βρωμοφαινόλης, τετρακυκλίνη, πορτοκαλί της ακριδίνης (acridine orange, AO).

Gibco BRL Company, Grand Island, NY, USA

Ορός εμβρύου μόσχου (FCS), πλαστικά καλλιεργειών, αгарόζη χαμηλού σημείου τήξεως, πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, πουρομυκίνη, πρωτεΐνάση K, PMSF (phenylmethyl sulfonyl fluoride).

Aldrich Company, Steinheim, Germany

1,10-ορθο-φαινανθρολίνη, 1,7-φαινανθρολίνη, πυρολιδίνο-δίθειοκαρβαμίδιο, διέθυλο-δίθειοκαρβαμίδιο, νεοκουπρέϊνη, 2,9-διμέθυλο-4,7-διφαίνυλο-1,10-φαινανθρολίνη-σουλφονικό οξύ, 4,7-διφαίνυλ-1,10-φαινανθρολίνη σουλφονικό οξύ, 6-υδροξύ-2-,5,7,8-τετραμέθυλχρωμάν-2-καρβοξυλικό οξύ.

BioRad Laboratories Company, Richmond, CA, USA

Τα υλικά της ηλεκτροφόρησης: ακρυλαμίδιο, N-N' μεθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο, N,N,N',N'-τετραμέθυλο-αιθυλοδιαμίνη (TEMED), υπερθεϊκό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, αντιδραστήριο Bradford.



Merck Company, Darmstadt, Germany

Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂), βρωμιούχο αιθίδιο, κυανούν του τροπανίου (trypan blue).

Biochrom AG Company, Berlin, Germany

DMEM, L-γλουταμίνη, θρυψίνη.

Molecular Probes Company, Eugene, OR, USA

Ιωδιούχο προπίδιο (propidium iodide, PI), 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1), ακετομεθόξυ-εστέρας της καλσεΐνης (Calcein-AM).

QIAGEN Company, Hilden, Germany

Effectene[®] Transfection reagent

Illmenau Company, Germany

Neubauer Improved Hematocytometer

Boehringer Mannheim Company, Mannheim, Germany

RNase-A

Novartis Company, Basle, Switzerland

Desferrioxamine mesilate (DFO)

Menzel-Glaset Company, Menzel, Germany

Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου (Microscope superfrosted glass slides)

Roche Diagnostics Company, Mannheim, Germany

Aprotinin

Schleicher and Schuell Company, Dassel, Germany

Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Optitran BA-S 85)



Amersham Biosciences Company, Buckinghamshire, England

Αντίσωμα αίγιός έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού συνδεδεμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP), αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL reagent)

Dianova Company, Hamburg, Germany

Αντίσωμα όνου έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού συνδεδεμένο με FITC, αντίσωμα όνου έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συνδεδεμένο με TRITC, αντίσωμα όνου έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συνδεδεμένο με HRP. Όλα τα παραπάνω αντισώματα ήταν ευγενική προσφορά των κ.κ. Carol Murphy και Θεόδωρου Φώτση.

Τα αντισώματα ποντικού κατά των επιτόπων myc και hemagglutinin (HA), παρήχθησαν και προσφέρθηκαν από την κ. Carol Murphy και τον κ. Θεόδωρο Φώτση ενώ τα αντισώματα κουνελιού κατά των πρωτεϊνών Rab5 και EEA1 παρήχθησαν και προσφέρθηκαν από τον κ. Marino Zerial (Max Plank Institute, Dresden, Germany). Η διαδικασία παραγωγής όλων των παραπάνω αντισωμάτων περιγράφηκε προηγουμένως (Stenmark et al., 1995, Mc Bride et al., 1999). Το salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) ήταν μία ευγενική προσφορά του κ. Κωνσταντίνου Παντόπουλου (McGill University, Montreal, Canada).

Τα υπόλοιπα χημικά ήταν αναλυτικής ποιότητας του εμπορίου.

2.2. Καλλιέργειες κυττάρων

2.2.1 Διατήρηση κυτταρικών σειρών

Τα κύτταρα διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα κατεψυγμένα σε δοχεία που περιέχουν υγρό άζωτο (-196 °C). Η διαδικασία κατάψυξης τους είναι η ακόλουθη: Κύτταρα στην εκθετική φάση ανάπτυξης τους, συλλέγονται και φυγοκεντρώνται στα 700 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau, Germany) για 5 λεπτά. Επαναιωρούνται σε 5 ml PBS και φυγοκεντρώνται όπως και προηγούμενα. Το κυτταρικό ίζημα, επαναιωρείται στο μίγμα κατάψυξης που αποτελείται από 90% εμβρυϊκού ορού μόσχου (FCS) και 10% διμέθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Ένα ml του παραπάνω μίγματος (5-7.5 x 10⁶ κύτταρα) μεταφέρεται σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης τα οποία ψύχονται σταδιακά. Αρχικά τοποθετούνται σε δοχείο με πάγο για 10 περίπου λεπτά, στη συνέχεια σε καταψύκτη -80 °C και 48 ώρες αργότερα τοποθετούνται στο δοχείο υγρού αζώτου όπου και διατηρούνται.



Η απόψυξη τους γίνεται γρήγορα με τη μεταφορά του σωληναρίου κατάψυξης στους 37 °C. Το περιεχόμενο του μεταφέρεται σε φυγοκεντρικό σωλήνα με 9 ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και φυγοκεντρείται στα 700 x g για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και καλλιεργούνται στις συνθήκες συνθήκες καλλιέργειας τους για 24 ώρες.

2.2.2 Κυτταρικές σειρές και συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή ήταν οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές Jurkat, HeLa, H1299 και MCF-7.

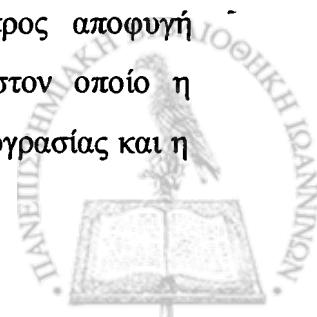
Η κυτταρική σειρά Jurkat προέρχεται από T-λεμφοκύτταρα ασθενούς με οξεία λευχαιμία. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σαν εναιώρημα σε RPMI-1640 το οποίο περιέχει 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (FCS) 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη.

Τα κύτταρα HeLa προέρχονται από ασθενή με καρκίνωμα μήτρας και έχουν μορφολογία επιθηλίου. Αναπτύσσονται προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα και καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% FCS, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη.

Τα κύτταρα H1299 και MCF7 προέρχονται από ασθενή με καρκίνο του πνεύμονα και του μαστού αντίστοιχα και έχουν μορφολογία επιθηλίου. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή είχαν διαμολυνθεί με το γονίδιο της IRP1_{C437S} η οποία εκφραζόταν κάτω από τον έλεγχο ενός υποκινητή ευαίσθητου στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη. Η ανάπτυξη και διαμόλυνση των κυττάρων έγινε από τον κ. Παντόπουλο.

Τα κύτταρα αναπτύσσονται προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα σε πλήρες DMEM παρουσία 2 μg/ml πουρομυκίνης και 2 μg/ml τετρακυκλίνης. Το καλλιεργητικό υλικό των κυττάρων αντικαθίσταται κάθε 24 ώρες με φρέσκο που περιέχει τα αντιβιοτικά. Για την επαγωγή της έκφρασης της IRP1_{C437S} τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες χωρίς τετρακυκλίνη.

Ο χειρισμός των κυττάρων γίνεται σε εστία κάθετης νηματικής ροής ώστε να εξασφαλίζεται περιβάλλον απομονωμένο από την ατμόσφαιρα προς αποφυγή μολύνσεων. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο στον οποίο η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 37 °C, επικρατούν συνθήκες υγρασίας και η



ατμόσφαιρα είναι εμπλουτισμένη με 5% CO₂ ώστε να ρυθμίζεται σε σταθερή τιμή το pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.

2.2.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων

Η μέτρηση της βιωσιμότητας έγινε με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρωστικής κυανού του τροπανίου (trypan blue dye exclusion) από τα ζωντανά κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0,25% χρωστικής σε 0,15 M NaCl. Σε ένα μέρος εναιωρήματος κυττάρων προστέθηκε ένα μέρος διαλύματος της χρωστικής, το μίγμα μεταφέρθηκε σε αιματοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer και παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο. Τα ζωντανά κύτταρα φαινόταν φωτεινά και διάφανα ενώ τα νεκρά εμφανιζόταν βαθύ μπλε. Η βιωσιμότητα είναι το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων στο σύνολο αυτών που μετρήθηκαν.

2.3 Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Τρία ml εναιωρήματος κυττάρων HeLa (1.33×10^5 κύτταρα ανά ml) τοποθετήθηκαν σε κάθε φρεάτιο πλαστικού πλακιδίου έξι θέσεων και καλλιεργήθηκαν για 24 περίπου ώρες στις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων (37 °C, 5% CO₂) προκειμένου να προσκολληθούν σταθερά στον πυθμένα του πλακιδίου. Ακολούθως, το καλλιεργητικό υλικό αντικαταστάθηκε από φρέσκο που περιείχε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δεσφεριοξαμίνης και η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε κάθε 24 ώρες. Στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα τα κύτταρα συλλέχθηκαν με χρήση θρυψίνης, ο όγκος τους προσαρμόστηκε στο 1 ml και ο αριθμός τους προσδιορίστηκε σε αιματοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer. Η γραφική αναπαράσταση του αριθμού των κυττάρων ανά ml σε συνάρτηση με το χρόνο δίνει την καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων ενώ από την κλίση της ευθείας προσδιορίζεται ο ρυθμός ανάπτυξης τους.

Σε ορισμένα πειράματα, η δεσφεριοξαμίνη (100μM) προστέθηκε για 24 ή 48 ώρες και στη συνέχεια απομακρύνθηκε από το καλλιεργητικό υλικό. Ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων προσδιορίστηκε όπως και προηγουμένως.

2.4 Διαμόλυνση των κυττάρων

Στην παρούσα εργασία κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με επικρατούσες μεταλλαγμένες μορφές των πρωτεϊνών dynamin και Rab5. Οι πλασμιδιακοί φορείς

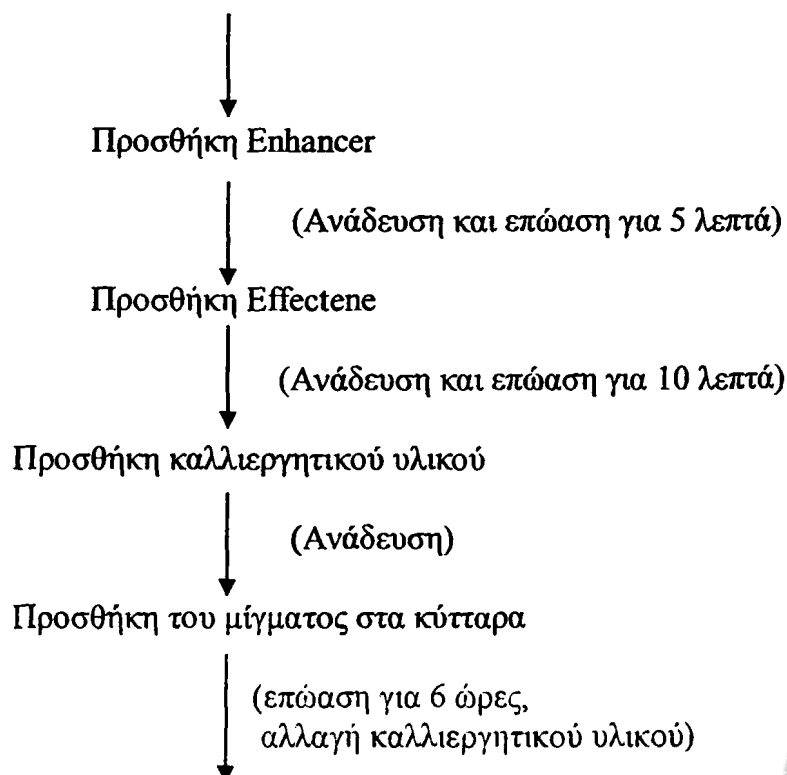


έκφρασης της Rab5 κατασκευάστηκαν και προσφέρθηκαν από τους κ.κ. M. Zerial, C. Murphy και Θ. Φώτη ενώ οι αντίστοιχοι της dynamin ήταν ευγενική προσφορά της κ. S. Smidt (Scripps Research Institute, CA, USA).

Σε αρχικά πειράματα επιλέχθηκαν οι συνθήκες που θα χρησιμοποιούνταν για την διαμόλυνση των κυττάρων. Η πυκνότητα των κυττάρων αποτελεί έναν ιδιαίτερα κρίσιμο παράγοντα στη διαδικασία της διαμόλυνσης. Ιδιαίτερα υψηλές πυκνότητες επηρεάζουν αρνητικά το ποσοστό της διαμόλυνσης (transfection efficiency) ενώ σε χαμηλές πυκνότητες επηρεάζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων.

Στα πειράματα της μελέτης αυτής 8×10^4 κύτταρα HeLa τοποθετήθηκαν σε κάθε φρεάτιο πλαστικού πλακιδίου 24 θέσεων και καλλιεργήθηκαν στις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων για περίπου 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα γονίδια που κωδικοποιούσαν τις πρωτεΐνες dynamin και Rab5 ακολουθώντας τη διαδικασία που προτείνεται από τους κατασκευαστές του kit που χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση (Effectene[®] Transfection Reagent). Η μόνη διαφορά σε σχέση με τα όσα προτείνουν οι κατασκευαστές ήταν ότι αποφεύχθηκαν οι έντονες αναδεύσεις (vortexing). Διαγραμματικά η διαδικασία της διαμόλυνσης παρίσταται ως εξής:

Προσθήκη του DNA (0,2 μg ανά δείγμα) σε ρυθμιστικό διάλυμα C

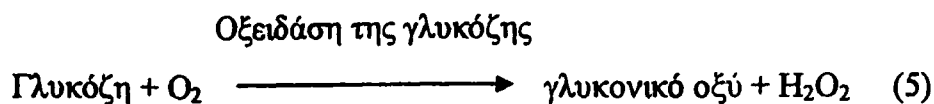


Καλλιέργεια των κυττάρων στις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας τους για 24 ή 48 ώρες.



2.5 Έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂

Στα πειράματα της παρούσας μελέτης, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε H₂O₂ το οποίο παραγόταν με συνεχή και σταθερό ρυθμό με τη δράση του ενζύμου “οξειδάση της γλυκόζης”. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τη γλυκόζη και το O₂ και παράγει γλυκονικό οξύ και H₂O₂ σύμφωνα με την αντίδραση 5.



Σε ορισμένα πειράματα τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 0,25 mM H₂O₂ το οποίο προστέθηκε άμεσα στην κυτταρική καλλιέργεια.

2.6 Μέτρηση του ρυθμού παραγωγής H₂O₂ από την οξειδάση της γλυκόζης

Ο ρυθμός παραγωγής H₂O₂ από την οξειδάση της γλυκόζης προσδιορίστηκε σε φωτόμετρο (Schimadzu UV-3000, Kyoto, Japan). Διάφορες ποσότητες του ενζύμου προστέθηκαν σε 1 ml διαλύματος γλυκόζης (5 mM γλυκόζη σε PBS) σε θερμοκρασία 37 °C και καταγράφηκε η απορρόφηση του μίγματος στα 240 nm για 15 περίπου λεπτά. Από την κλίση της ευθείας υπολογίστηκε ο ρυθμός παραγωγής του H₂O₂ (εκφρασμένος σε μM ανά λεπτό). Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του H₂O₂ στα 240 nm είναι 43.6 M⁻¹cm⁻¹.

2.7 Ηλεκτροφόρηση μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης (comet assay)

Η εκτίμηση των βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H₂O₂ έγινε χρησιμοποιώντας την τεχνική της “ηλεκτροφόρησης μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης” η οποία είναι γνωστή και ως “comet assay”. Η comet assay είναι μία απλή, εύχρηστη και ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης σχάσεων στη μία αλυσίδα του κυτταρικού DNA. Ένα επίσης σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι δίνει τη δυνατότητα να μελετηθεί η βλάβη του κάθε κυττάρου ξεχωριστά. Η comet assay περιγράφηκε αρχικά από τους Ostling και Johanson οι οποίοι δημοσίευσαν μία μέθοδο για την ανίχνευση των βλαβών στο κυτταρικό DNA

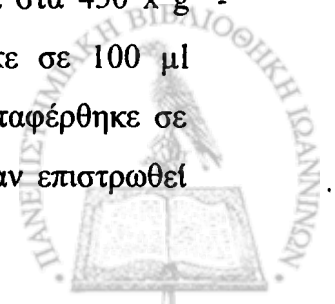


μετά από έκθεση των κυττάρων σε ιονίζουσα ακτινοβολία (Ostling and Johanson, 1984). Λίγα χρόνια αργότερα οι Singh και συνεργάτες (Singh et al., 1988) τροποποίησαν την αρχική μορφή των Ostling και Johanson και έβαλαν τη βάση για τη μετέπειτα εξέλιξη της μεθόδου. Από τη στιγμή που εμφανίστηκε μέχρι σήμερα η μέθοδος έχει υποστεί διάφορες αλλαγές με τις οποίες αυξήθηκαν σημαντικά τόσο η ευαισθησία όσο και η χρησιμότητα της. Έτσι, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες η comet assay ανιχνεύει σχάσεις στις μονές ή τις διπλές αλυσίδες του DNA αλλά και οξειδωμένες βάσεις του DNA, οι οποίες μετά από επώαση με κατάλληλα ένζυμα που τις αναγνωρίζουν απομακρύνονται και με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται σχάσεις στο DNA οι οποίες στη συνέχεια ανιχνεύονται με την comet assay.

Με την παραλλαγή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν οι σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA. Προκειμένου να γίνει αυτό, το DNA ηλεκτροφορήθηκε κάτω από ισχυρά αλκαλικές συνθήκες ($\text{pH} > 13$) με αποτέλεσμα τη μετουσίωση του (λύση των δεσμών υδρογόνου και αποδιάταξη του δίκλωνου DNA προς μονόκλωνο). Η παρουσία σχάσεων στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA επιτρέπει την μετατόπιση του αρνητικά φορτισμένου DNA προς την άνοδο κατά την ηλεκτροφόρηση με αποτέλεσμα να προκύπτουν διάφοροι σχηματισμοί του DNA που μοιάζουν με κομήτες. Μάλιστα, το ποσοστό του DNA που μετατοπίζεται είναι ανάλογο με τον αριθμό των σχάσεων του. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ανιχνεύονται επίσης και απουρινικές ή απυριμιδινικές περιοχές (AP sites), οι οποίες σε υψηλό pH μετατρέπονται σε σχάσεις (alkali labile sites). Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι δίκλωνες αλυσίδες του DNA που δεν έχουν μετατοπιστεί κατά την ηλεκτροφόρηση επανασχηματίζονται. Έτσι, οι σχηματισμοί που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο μετά από τη χρώση του DNA είναι στην πράξη “θηλιές” του DNA που απελευθερώνονται από ένα υψηλά υπερελικομένο σύμπλοκο DNA-πρωτεϊνών (nucleoids).

2.7.1 Πειραματική διαδικασία

Με το πέρας της έκθεσης των κυττάρων σε H_2O_2 , τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αφού αναμίχθηκαν με ψυχρό PBS φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα $450 \times g$ (centrifuge 5415D, Eppendorf). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl διαλύματος αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (1% σε PBS) και μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου, οι οποίες προηγουμένως είχαν επιστρωθεί



με αγαρόζη κανονικού σημείου τήξεως (1% σε PBS), και σκεπάστηκε με καλυπτρίδα 2 x 2 cm. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν στους 4 °C για δέκα λεπτά ώστε να σχηματιστεί η πηκτή και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν για 60 λεπτά σε διάλυμα λύσης (2,5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 μM Tris-Cl, 1% Triton X-100, pH 10) στους 4 °C. Στο στάδιο αυτό απομακρύνονται τα περισσότερα κυτταρικά συστατικά αλλά το DNA παραμένει υπερελικομένο και συσκευασμένο σε μία πυρηνοειδή (nucleus-like) δομή. Εν συνεχεία, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε μία οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε ψυχρό διάλυμα αποδιάταξης (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) για 40. Η ηλεκτροφόρηση του DNA πραγματοποιήθηκε στο ίδιο διάλυμα (30V, 300 mA) για 30 λεπτά και ακολούθησε ουδετεροποίηση σε PBS (3 φορές από 5 λεπτά η κάθε μία) (Panayiotidis et al., 1999).

2.7.2 Εκτίμηση της βλάβης

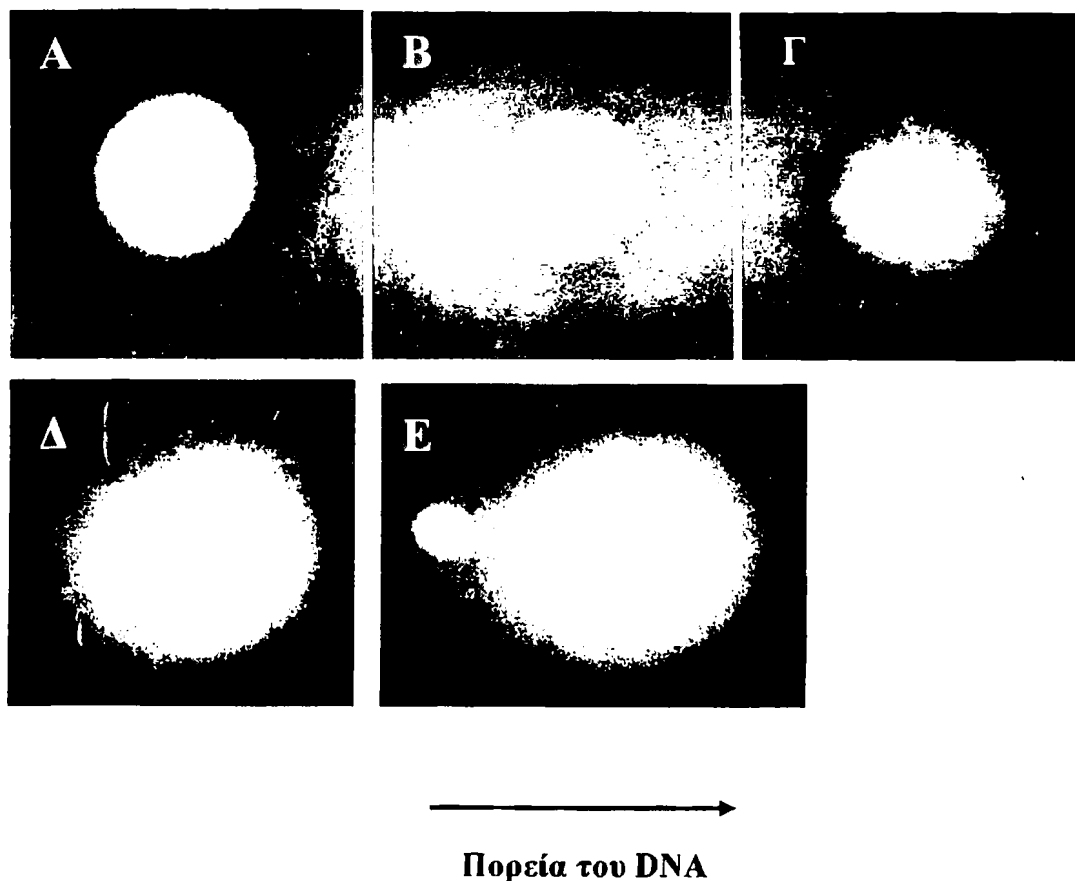
Το κυτταρικό DNA βάφτηκε με την προσθήκη 40 μl ανά πλάκα, διαλύματος της φθορίζουσας χρωστικής Hoechst 33342 (2,5 μg/ml σε PBS) και την παραμονή στο σκοτός για 10 περίπου λεπτά. Στη συνέχεια, οι πλάκες εμβαπτίστηκαν σε PBS και η πηκτή καλύφθηκε με καλυπτρίδα. Οι πλάκες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρο διέγερσης 490 nm και σε μεγέθυνση 400. Η βλάβη δεν ήταν ομοιογενής και η οπτική της εκτίμηση για κάθε δείγμα βασίστηκε στο χαρακτηρισμό 100 τυχαίων σχηματισμών. Κάθε σχηματισμός κατατάχτηκε σε μία από τις πέντε τάξεις (0-4) ανάλογα με τα μορφολογικά του γνωρίσματα (σχήμα 11). Η βλάβη σε κάθε δείγμα εκφράστηκε ολικά πολλαπλασιάζοντας το ποσοστό των σχηματισμών ανά τάξη με τον αριθμό της τάξης που ανήκε και εκφράζοντας τη βλάβη σε αυθαίρετες μονάδες. Έτσι, η βλάβη του DNA λαμβάνει τιμές από 0 (όλοι οι σχηματισμοί στην τάξη 0) έως 400 (όλοι οι σχηματισμοί στην τάξη 4) αυθαίρετες μονάδες (Panayiotidis et al., 1999).

2.8 Ανοσοφθορισμός

Η ανοσοχημεία επιτρέπει την *in situ* ανίχνευση βιολογικών μορίων με μεγάλη ακρίβεια και εξειδίκευση. Η μέθοδος στηρίζεται στην σύνδεση του αντιγόνου-αντισώματος και στην ανίχνευση του συμπλόκου με δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με ουσίες που επιτρέπουν την παρατήρηση του σε μικροσκόπιο φθορισμού. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή αποτελείται από τα εξής στάδια. Κύτταρα

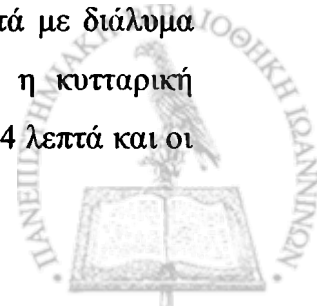


HeLa (8×10^4 ανά φρεάτιο πλακιδίου 24 θέσεων) αναπτύχθηκαν για 24 ώρες προσκολλημένα σε στρογγυλές καλυπτρίδες και στη συνέχεια διαμολύνθηκαν με τα γονίδια των πρωτεϊνών dynamin και Rab5. Σαράντα οκτώ ώρες αργότερα το καλλιεργητικό υλικό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με PBS και μονιμοποιήθηκαν για 15 λεπτά με διάλυμα παραφορμαλδεύδης (4% σε PBS) σε



Σχήμα 11: Μορφολογική κατάταξη των σχηματισμών του DNA στις διάφορες τάξεις. Επιλεγμένοι μορφολογικοί σχηματισμοί που δείχνουν αυξανόμενη βλάβη του DNA Jurkat κυττάρων πριν και μετά την έκθεση τους σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 για 10 λεπτά (απευθείας προσθήκη στο καλλιεργητικό υλικό $0.2 \mu\text{g/ml}$ οξειδάσης της γλυκόζης ικανή να δημιουργεί περίπου $4 \mu\text{M}$ H_2O_2 ανά ml). (A) τάξη 0, (B) τάξη 1, (Γ) τάξη 2, (Δ) τάξη 3, (E) τάξη 4

θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με PBS και η ελεύθερη παραφορμαλδεύδη αδρανοποιήθηκε με επώαση για 15 λεπτά με διάλυμα NH_4Cl (50 mM σε PBS) σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως η κυτταρική μεμβράνη έγινε διαπερατή με διάλυμα 0.1% Triton X-100 σε PBS για 4 λεπτά και οι



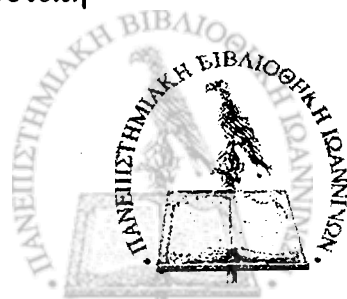
μη ειδικές συνδέσεις ελαχιστοποιήθηκαν με επώαση των κυττάρων για 20 λεπτά με 10% FCS σέ PBS. Εν' συνεχεία τα κύτταρα επώαστηκαν για 20 λεπτά με τα πρώτα αντισώματα (τελική αραιώση 1:200 με 5% FCS σε PBS) σε θερμοκρασία δωματίου. Οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν 3 φορές με PBS (5 λεπτά την κάθε φορά) και προστέθηκαν τα δεύτερα αντισώματα σε τελική αραιώση 1:200 στο ίδιο διάλυμα με αυτό που χρησιμοποιήθηκε για τα πρώτα αντισώματα. Σαράντα πέντε λεπτά αργότερα, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 5 φορές με PBS (3 λεπτά το καθένα) και στη συνέχεια οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου για οπτική παρατήρηση.

Οι καλυπτρίδες εξετάστηκαν σε μικροσκόπιο συνεστιασμού Leica TCS-SP (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany) και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή κάμερα (Leica TCS NT camera).

2.9 Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα και προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών

Τα κύτταρα πλύθηκαν μία φορά με PBS και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 700 x g. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 30 μl διαλύματος λύσης (50 mM Tris-Cl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 100 mM EDTA, 1mM PMSF, 10 μg/ml pepstatin A, 10 μg/ml aprotinin, 20 μg/ml leupeptin) και παρέμεινε στον πάγο για 20 λεπτά. Εν συνεχεία το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά στα 16000 x g στους 4 °C και συλλέχθηκε το υπερκείμενο το οποίο περιείχε τις πρωτεΐνες.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford η οποία στηρίζεται στην αλλαγή του χρώματος της χρωστικής coomassie brilliant blue G-250 όταν αυτή συνδέεται στις πρωτεΐνες σε όξινο pH (Bradford, 1976). Μικρός όγκος του κυτταρικού εκχυλίσματος (3-5 μl) αραιώθηκε με νερό μέχρι όγκου 800 μl και το μίγμα αυτό αναμίχθηκε με 200 μl αντιδραστήριου Bradford υπό έντονη ανάδευση. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm σε φωτόμετρο. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε από πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη ορού βοός (0-16 μg/ml).

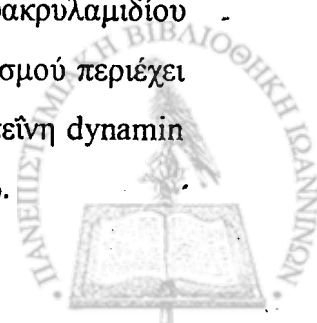


2.10 Ηλεκτροφόρηση, μεταφορά και ανίχνευση πρωτεϊνών

2.10.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών και τον προσδιορισμό του μοριακού τους βάρους. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται κατά την κίνηση τους μέσα στους πόρους του πολυακρυλαμιδίου υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η πηκτή σχηματίζεται με συμπολυμερισμό ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και N,N' μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). Η πρώτη ουσία με πολυμερισμό δημιουργεί το πολυακρυλαμίδιο, ενώ η δεύτερη συνδέει τις αλυσίδες του πολυακρυλαμιδίου δημιουργώντας έτσι το τρισδιάστατο πλέγμα της πηκτής. Για την έναρξη του πολυμερισμού χρησιμοποιείται το $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ενώ για την επιτάχυνση του πολυμερισμού χρησιμοποιείται η N,N,N',N'-τετραμέθυλο-αιθυλοδιαμίνη (TEMED). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες παρουσία δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (SDS). Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που έχει την ικανότητα να αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και να δεσμεύεται μ' αυτές σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1,4 g SDS/g πρωτεΐνης) σχηματίζοντας επιμήκη σύμπλοκα με καθορισμένη δομή. Η δέσμευση αυτή προσδίδει στις πρωτεΐνες καθαρό αρνητικό φορτίο που είναι ανάλογο του μοριακού τους βάρους. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων σ' αυτό το σύστημα είναι ανάλογη του μοριακού τους βάρους.

Το σύστημα της ηλεκτροφόρησης που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη ήταν ασυνεχές σύστημα και αποτελούνταν από την πηκτή επιστοιβάξης και την πηκτή διαχωρισμού οι οποίες παρασκευάστηκαν όπως αναφέρεται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Maniatis et al., 1989). Στην πηκτή επιστοιβάξης γίνεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματος πριν αυτές εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού και περιέχει 5% ακρυλαμίδιο (w/v), 0,125 M Tris pH=6,8 και 0,1% (w/v) APS και 0.1% SDS. Οι πρωτεΐνες εισέρχονται στη συνέχεια στην πηκτή διαχωρισμού η οποία έχει την κατάλληλη ποσότητα πολυακρυλαμιδίου για το διαχωρισμό τους. Εκτός του πολυακρυλαμιδίου η πηκτή διαχωρισμού περιέχει 0,39 M Tris pH=8,8, 0.1% SDS και APS. Συγκεκριμένα, για την πρωτεΐνη dynamin χρησιμοποιήθηκε πηκτή SDS-ακρυλαμιδίου 10% ενώ για την Rab5 15%.



Τα δείγματα των πρωτεϊνών (50 μg) μεταφέρθηκαν στην πηκτή αφού προηγουμένως μετουσιώθηκαν με βρασμό επί 3 λεπτά στους 100 $^{\circ}\text{C}$, με το διάλυμα διαλυτοποίησης (0,25 M Tris pH=6.8, 9,2% SDS, 40% (v/v) γλυκερόλη, 0,2% κυανούν της βρωμοφαινόλης) παρουσία 5% (v/v) β -μερκαπτοαιθανόλης, η οποία ανάγει τυχόν δισουλφιδικούς δεσμούς και διαχωρίζει τις πρωτεΐνες στις υπομονάδες τους.

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε σε διάλυμα που περιείχε 0,025 M Tris, 0,192 M γλυκίνη, 0,1% SDS, στα 120 V μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής σε συσκευή της BioRad.

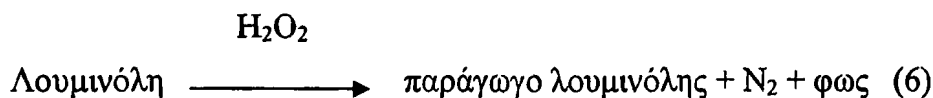
2.10.2 Μεταφορά και ανοσοαποτύπωση (Western blot) πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη

Αφού διαχωρίστηκαν οι πρωτεΐνες σε SDS ηλεκτροφόρηση ακρυλαμιδίου, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης τοποθετήθηκε πάνω στην πηκτή ενώ και τα δύο μαζί τοποθετήθηκαν ανάμεσα σε δυτλό χαρτί Whatman. Το σάντουιτς που σχηματίστηκε τοποθετήθηκε σε συσκευή μεταφοράς με τη μεμβράνη προς το θετικό πόλο. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν από την πηκτή στη μεμβράνη με την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος (200 mA, για 60 λεπτά), σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνης (25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη). Μετά το τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη πλύθηκε με PBS και επώαστηκε με 0.2 % Ponceau S σε 1% οξικό οξύ για 5 λεπτά προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν. Ο αποχρωματισμός των πρωτεϊνών έγινε με πλύση της μεμβράνης με δις-απεσταγμένο νερό και επώαση για 5-10 λεπτά με PBS. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε για 1-2 ώρες με το διάλυμα δέσμευσης (blocking buffer) που περιείχε 5% άπαχο γάλα σε TBST (20 mM Tris, 0,9% NaCl, 0,5% Tween 20) προκειμένου να δεσμευτούν οι ελεύθερες θέσεις πάνω στη νιτροκυτταρίνη. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης υπό ανατάραξη για 1 ώρα με αντισώματα κατά των πρωτεϊνών Rab5, επιτόπου myc, hemagglutinin (HA), πλύσιμο 5 φορές από 5 λεπτά με TBST και επώαση για 1 ώρα με τα δεύτερα αντισώματα τα οποία ήταν συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (horseraddish peroxidase, HRP). Στη συνέχεια η μεμβράνη πλύθηκε όπως και προηγουμένως.



2.10.3 Ανίχνευση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας στηρίζεται στην ανίχνευση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται κατά την αποδιέγερση ενός παραγώγου της λουμινόλης. Η υπεροξειδάση παρουσία H_2O_2 σε αλκαλικό περιβάλλον οξειδώνει τη λουμινόλη σύμφωνα με την αντίδραση 6:



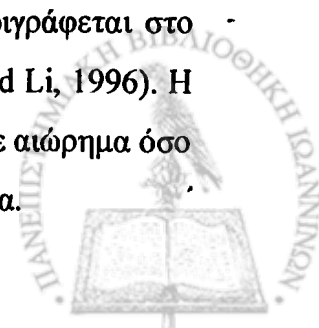
Αμέσως μετά την αντίδραση η λουμινόλη βρίσκεται σε διηγεμένη κατάσταση και επιστρέφοντας στη θεμελιώδη της εκπέμπει ακτινοβολία. Η ακτινοβολία ενισχύεται σε ένταση και διάρκεια εξαιτίας της παρουσίας χημικών ενισχυτικών (όπως φαινόλες) κάνοντας δυνατή την αποτύπωση της σε φιλμ.

Για την ανίχνευση του σήματος με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, η μεμβράνη μετά την επεξεργασία με τα αντισώματα επώαστηκε με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης για 1-5 λεπτά. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε κασέτα εμφάνισης και εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ (Kodak X-OMAT/AR). Η εμφάνιση του φιλμ έγινε με τοποθέτηση του στο διάλυμα εμφάνισης (Kodak LX24, x-ray developer) ενώ το σήμα σταθεροποιήθηκε με τοποθέτηση του φιλμ στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak AL 4, X-ray fixer).

2.11 Κυτταρομετρία ροής

2.11.1 Ανάλυση της περιεκτικότητας των κυττάρων σε DNA

Κατά τη διαδικασία της απόπτωσης η ενεργοποίηση των ενδονουκλεασών οδηγεί στην θραυσματοποίηση του πυρηνικού DNA με σχηματισμό μόνο- και ολιγονουκλεοτιδίων (Arends et al., 1990). Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση του DNA με κατάλληλες φθορίζουσες ουσίες μπορεί να ξεχωρίσει ένα πληθυσμό κυττάρων τα οποία περιέχουν μικρότερο ποσό DNA από τα φυσιολογικά κύτταρα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται στο βιβλίο "Techniques in Apoptosis. A User's Guide" (Darzynkiewicz and Li, 1996). Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη τόσο για κύτταρα που αναπτύσσονται σε αιώρημα όσο και γι' αυτά που αναπτύσσονται προσκολλημένα σε σταθερό υπόστρωμα.

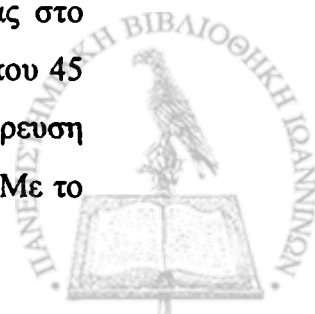


Κυτταρικό εναιώρημα (1.5×10^6 κύτταρα ανά ml) μονιμοποιήθηκε με 9 ml ψυχρής αιθανόλης (70%, 4°C) για τουλάχιστον 12 ώρες στους 4°C . Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν μία φορά με PBS και στη συνέχεια επαναιωρήθηκαν σε 0.5 ml PBS όπου και προστέθηκε 1 ml διαλύματος εκχύλισης (192 mM NaH_2PO_4 , 8 mM citric acid, pH 7.8). Ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να εκχειλιστεί από τα κύτταρα το χαμηλού μοριακού βάρους DNA. Μετά το στάδιο αυτό τα αποπτωτικά κύτταρα έχουν μικρότερη περιεκτικότητα σε DNA σε σχέση με τα φυσιολογικά. Μετά από φυγοκέντρηση, τα κύτταρα επώαστηκαν για 45 λεπτά με 0.5 ml διαλύματος χρώσης (10 $\mu\text{g/ml}$ PI, 100 $\mu\text{g/ml}$ RNA-se A, σε PBS). Το διάλυμα χρώσης απομακρύνθηκε μετά από φυγοκέντρηση των κυττάρων τα οποία επαναιωρήθηκαν σε 0.5 ml PBS και τοποθετήθηκαν σε πάγο μέχρι την ανάλυσή τους σε κυτταρόμετρο ροής FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

2.11.2 Προσδιορισμός της σταθερότητας της μεμβράνης των λυσοσωματίων

Η σταθερότητα των λυσοσωματίων προσδιορίστηκε σε κυτταρόμετρο ροής εξετάζοντας την μετατόπιση της φθορίζουσας ουσίας πορτοκαλί της ακριδίνης (acridine orange, AO) από τα λυσοσωμάτια στο κυτταρόπλασμα (Yu et al., 2003, Person et al., 2003). Το AO είναι φθορίζουσα ουσία η οποία σε υψηλές συγκεντρώσεις έχει κόκκινο φθορισμό ενώ σε χαμηλές πράσινο (metachromatic fluorophore). Το AO είναι μία ασθενής βάση (pKa περίπου 10) η οποία πρωτονιώνεται ελάχιστα σε φυσιολογικό pH αλλά πρωτονιώνεται και συσσωρεύεται σε οργανίδια με χαμηλό pH όπως τα λυσοσωμάτια (pH περίπου 4.5). Σε ανέπαφα κύτταρα, το μεγαλύτερο μέρος του AO συσσωρεύεται στα λυσοσωμάτια και φθορίζει έντονα κόκκινο και μόνο ένα μικρό του μέρος υπάρχει στο κυτταρόπλασμα έχοντας ασθενή πράσινο φθορισμό. Επομένως, ο πράσινος φθορισμός του AO μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της σταθερότητας των λυσοσωματίων αφού η αύξηση του θα σημαίνει τη μετανάστευση του AO από τα λυσοσωμάτια στο κυτταρόπλασμα και κατά συνέπεια την αποσταθεροποίηση των οργανιδίων αυτών.

Πειραματικά η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η παρακάτω: Αρχικά τα κύτταρα επώαστηκαν για 15 λεπτά με 0.1 $\mu\text{g/ml}$ AO (προστέθηκε απευθείας στο καλλιεργητικό υλικό) στους 37°C και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν για περίπου 45 λεπτά σε θρεπτικό μέσο χωρίς AO ούτως ώστε να δοθεί χρόνος για τη συσσώρευση του AO στα λυσοσωμάτια και ακολούθησε η έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 . Με το



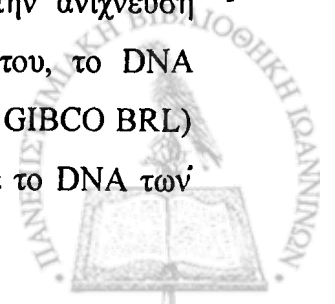
πέρας της έκθεσης αυτής, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αφού ξεπλύθηκαν μία φορά με PBS επαναιωρήθηκαν σε 0.5 ml PBS και τοποθετήθηκαν σε πάγο μέχρι την ανάλυση τους. Η ανάλυση έγινε σε κυτταρόμετρο ροής FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) και ο φθορισμός του AO καταγράφηκε με το πρόγραμμα CellQuest.

2.11.3 Μέτρηση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού

Το διαμεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων (mitochondrial transmembrane potential) $\Delta\psi_m$ είναι αποτέλεσμα της ασύμμετρης κατανομής πρωτονίων και άλλων ιόντων στις δύο πλευρές της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Για την εκτίμηση του $\Delta\psi_m$ χρησιμοποιούνται συνήθως κατιονικές λιπόφιλες φθορίζουσες χρωστικές ουσίες οι οποίες συσσωρεύονται στην εσωτερική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης εξαιτίας του αρνητικού της φορτίου (Kroemer et al. 1997). Για την εκτίμηση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού χρησιμοποιήθηκε το λιπόφιλο κατιόν 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) και ακολουθήθηκε η μέθοδος που περιγράφηκε από την Cossarizza και τους συνεργάτες (Cossarizza et al., 1993). Με το πέρας της έκθεσης σε H_2O_2 , τα κύτταρα πλύθηκαν αρχικά με PBS και στη συνέχεια επαναιωρήθηκαν σε 0.3 ml διαλύματος χρώσης (1 $\mu g/ml$ JC-1 σε PBS). Η επώαση με το διάλυμα χρώσης πραγματοποιήθηκε για 15 λεπτά στους $37^\circ C$ και στη συνέχεια τα κύτταρα αφού φυγοκεντρήθηκαν επαναιωρήθηκαν σε 0.5 ml PBS και παρέμειναν στον πάγο μέχρι την ανάλυση τους με κυτταρομετρία ροής. Στα φυσιολογικά κύτταρα όπου το μεμβρανικό δυναμικό είναι υψηλό το JC-1 συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια και σχηματίζει συσσωματώματα (JC-1 aggregates) φθορίζοντας έντονα στο κόκκινο ενώ όταν το μεμβρανικό δυναμικό είναι χαμηλό η συγκέντρωση του JC-1 στα μιτοχόνδρια μειώνεται. Στην περίπτωση αυτή το JC-1 βρίσκεται στη μονομερή του μορφή φθορίζοντας στο πράσινο.

2.12 Απομόνωση και ηλεκτροφόρηση κυτταρικού DNA σε πηκτή αγαρόζης

Πρόκειται για μία ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ανίχνευση σχάσεων στις διπλές αλυσίδες του DNA. Μετά την απομόνωση του, το DNA ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης (συσκευή της Life Technologies, GIBCO BRL) και στη συνέχεια παρατηρείται σε λάμπα φθορισμού. Σε αντίθεση με το DNA των



κυττάρων μαρτύρων, το οποίο κατά την ηλεκτροφόρηση δεν μετακινείται, στο DNA των αποπτωτικών κυττάρων ανιχνεύονται χαρακτηριστικές ζώνες (laddering), οι οποίες είναι τμήματα DNA πολλαπλάσια των 180-200 ζευγών βάσεων και σχηματίζονται εξαιτίας της δράσης ειδικών ενδονουκλεασών (Enari et al., 1998). Αντίθετα, στο DNA νεκρωτικών κυττάρων προκαλείται τυχαία θραυσματοποίηση με αποτέλεσμα κατά την ηλεκτροφόρηση του DNA να μην παρατηρείται το χαρακτηριστικό laddering αλλά να σχηματίζεται μια συνεχής ζώνη (smear).

2.12.1 Απομόνωση κυτταρικού DNA

Μετά την έκθεση σε διάφορους παράγοντες (H_2O_2 , δεσφεριοξαμίνη), τα κύτταρα συλλέχθηκαν, ξεπλύθηκαν με PBS και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 700 x g. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 2 ml διαλύματος εκχύλισης (0.1 M NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 1% SDS, 0,2 mg/ml πρωτεΐνάσης K) και αφέθηκαν στους 55 °C για 12 ώρες. Τα δείγματα αναμείχθηκαν με 2 ml TEN (0.1 M NaCl, 20 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8) 4ml φαινόλης και 4 ml μίγματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και αναδεύτηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το γαλάκτωμα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 700 x g με αποτέλεσμα να διαχωριστούν η υδατική φάση (περιείχε το DNA), η οργανική φάση και μία ενδιάμεση στοιβάδα η οποία περιείχε τις πρωτεΐνες. Η υδατική φάση αναμείχθηκε στη συνέχεια με ίσο όγκο μίγματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης και το τελικό μίγμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από νέα φυγοκέντρηση συλλέχθηκε η υδατική φάση και το DNA κατακρημνίσθηκε με την προσθήκη δύο όγκων ψυχρής απόλυτης αιθανόλης και μεταφορά των δειγμάτων στους -20 °C για τουλάχιστον 4 ώρες. Εν συνεχεία, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στα 3000 x g στους 4 °C και αφού απομακρύνθηκε η αιθανόλη επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε ορισμένο όγκο TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8). Για την απομάκρυνση του RNA τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 60 λεπτά στους 37 °C παρουσία 2 mg/ml RNase-A.

2.12.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA, τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 260 και 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε από την τιμή της



απορρόφησης στα 260 nm γνωρίζοντας ότι η τιμή της απορρόφησης για 50 µg/ml DNA ισούται με ένα. Ο λόγος των απορροφήσεων στα 260 και 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) δίνει προσεγγιστικά την καθαρότητα του δείγματος. Οι τιμές του για καθαρά δείγματα DNA κυμαίνονται μεταξύ 1.8 και 2.0 ενώ παρουσία πρωτεϊνών ή φαινόλης ο λόγος λαμβάνει μικρότερες τιμές.

2.12.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση του DNA έγινε σε πηκτή αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (89 mM Tris, 89 mM βορικό οξύ, 2 mM EDTA). Η θέση του DNA στην πηκτή εντοπίστηκε με τη χρησιμοποίηση βρωμιούχου αιθιδίου το οποίο παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας φθορίζει. Η κινητικότητα του DNA σε πηκτή εξαρτάται από το μέγεθος του, την μορφή του και από την περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 2% στην οποία προστέθηκαν 0.4 µg/ml βρωμιούχου αιθιδίου. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν για την ηλεκτροφόρηση ως εξής: Δεκαπέντε µg DNA κάθε δείγματος αναμίχθηκαν με 3 µl διαλύματος χρώσης (50% γλυκερόλη, 1 mM EDTA, 0.4% κυανούν της βρωμοφαινόλης) και ο όγκος ρυθμίστηκε στα 20 µl με δις-απεσταγμένο νερό. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου με σταθερή τάση 110 V. Η πηκτή παρατηρήθηκε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας και φωτογραφήθηκε με ηλεκτρονική κάμερα Kodak (Kodak DC 120).

2.13 Μέτρηση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου

Τα επίπεδα του ενδοκυττάρου σιδήρου προσδιορίστηκαν με φθορισμόμετρο εξετάζοντας την αύξηση του φθορισμού της φθορίζουσας ουσίας καλσεΐνης, μετά την προσθήκη του ισχυρού σιδηροδεσμευτικού μορίου SIH (Epsztejn et al., 1997). Η καλσεΐνη αποτελείται από ένα μόριο φλουοροσκεΐνης συνδεδεμένο με ένα μόριο EDTA. Το μόριο αυτό φέρει μία εστερική ομάδα (ακετομεθόξυ εστέρας της καλσεΐνης) προκειμένου να διαχέεται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Στο εσωτερικό του κυττάρου, ο εστερικός δεσμός υδρολύεται από μη εξειδικευμένες εστεράσες και αναστέλλεται η ικανότητα της καλσεΐνης να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια συσσώρευση της. Επιπλέον, η

απομάκρυνση της ομάδας αυτής την καθιστά ικανή να φθορίζει. Η σύνδεση της καλσεΐνης με ιόντα μετάλλων, κυρίως δισθενή, (αναλογία 1:1) έχει ως συνέπεια τη μείωση του φθορισμού της. Με προσθήκη ισχυρότερων δεσμευτών σιδήρου από αυτή, η καλσεΐνη χάνει το σίδηρο που έχει προηγουμένως δεσμεύσει και τότε αυξάνεται ο φθορισμός της ανάλογα με το ποσό του σιδήρου που ήταν συνδεδεμένο σε αυτή (Kakhlon et al., 2002). Η μεταβολή αυτή παρατηρείται και καταγράφεται σε φθορισμόμετρο.

Η πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή είναι η ακόλουθη: Το καλλιεργητικό υλικό απομακρύνθηκε, τα κύτταρα πλύθηκαν μία φορά με PBS και στη συνέχεια επώαστηκαν για 10 λεπτά σε διάλυμα καλσεΐνης (0.15 μM καλσεΐνη-AM, 1 mg/ml BSA, 20 mM HEPES pH 7.3, σε PBS) στους 37 °C. Ακολούθησε συλλογή των κυττάρων, φυγοκέντρηση στα 450 x g για 5 λεπτά και πλύσιμο τους με το παραπάνω διάλυμα χωρίς καλσεΐνη. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 2.2 ml του παραπάνω διαλύματος (1 mg/ml BSA, 20 mM HEPES pH 7.3 σε PBS) και μεταφέρθηκαν στο φθορισμόμετρο (HITACHI, F2500, Japan). Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37 °C και τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής ήταν 488 nm και 517 nm αντίστοιχα. Τα επίπεδα του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου εκτιμήθηκαν από την αύξηση του φθορισμού της καλσεΐνης μετά την προσθήκη 11 μM του ισχυρού σιδηροδεσμευτικού μορίου SIH.



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εκτίμηση της πρόκλησης σχάσεων στο πυρηνικό DNA

Η ικανότητα του H_2O_2 να προκαλεί σχάσεις στο πυρηνικό DNA εκτιμήθηκε με την τεχνική single cell gel electrophoresis (SCGE) η οποία είναι επίσης γνωστή και ως "comet assay". Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε σχετικά πρόσφατα και είναι η πιο ευαίσθητη από τις μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων το οποίο έχει προηγουμένως εγκλωβιστεί σε πηκτή αγαρόζης (Singh et al., 1988). Ανάλογα με τον αριθμό των σχάσεων, ένα μέρος του αρνητικά φορτισμένου DNA μετακινείται προς την άνοδο με αποτέλεσμα να παρατηρούνται διαφορετικοί σχηματισμοί μετά από χρώση με φθορίζουσες ουσίες. Το ανέπαφο DNA κάθε κυττάρου εμφανίζεται σφαιρικό, έντονα φωτεινό (σχήμα 11A) ενώ DNA στο οποίο υπάρχουν σχάσεις εμφανίζεται κατ' αρχήν σαν νέφος γύρω από την κεντρική κεφαλή (σχήμα 11B) και όσο οι σχάσεις αυξάνουν ένα μέρος του αρνητικά φορτισμένου DNA μετατοπίζεται προς την άνοδο σχηματίζοντας μία ουρά (tail) (σχήματα 11Γ, 11Δ). Όταν οι βλάβες στο DNA είναι εκτεταμένες οι σχηματισμοί παίρνουν την μορφή κομήτη, εξού και το όνομα comet assay (σχήμα 11E).

Στο σχήμα 12 απεικονίζεται η κατάταξη σε κύτταρα Jurkat πριν (σχήμα 12A) και μετά από την έκθεση τους σε H_2O_2 (σχήμα 12B). Σε κύτταρα μάρτυρες, το μεγαλύτερο μέρος των σχηματισμών κατατάσσεται στην τάξη 1 (περίπου 90 %) υποδηλώνοντας μία μικρή βλάβη η οποία μπορεί να είναι ενδογενής και να προέρχεται από H_2O_2 το οποίο είναι γνωστό ότι παράγεται συνεχώς σε μικρές ποσότητες στα κύτταρα (Schoene et al., 1999), είτε βλάβες που δημιουργήθηκαν κατά την επεξεργασία των δειγμάτων στην εκτέλεση του πειράματος. Σε κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε H_2O_2 οι σχηματισμοί έχουν μετατοπιστεί σε ανώτερες τάξεις γεγονός που υποδηλώνει τη δημιουργία νέων σχάσεων στο DNA. Για την ποσοτική εκτίμηση των βλαβών σε ένα πληθυσμό κυττάρων ο κάθε σχηματισμός κατατάσσεται σε μία από 5 προκαθορισμένες τάξεις (0 έως 4) ανάλογα με τη μορφολογία του και το ποσοστό της κάθε τάξης πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό της τάξης. Με τον τρόπο αυτό η ολική βλάβη σε ένα δείγμα κυττάρων μπορεί να εκφραστεί σε αυθαίρετες μονάδες σε μία κλίμακα από 0 (όλοι οι σχηματισμοί στην τάξη 0) έως 400 (όλοι οι σχηματισμοί στην τάξη 4). Στη συνέχεια η βλάβη του DNA θα υπολογίζεται

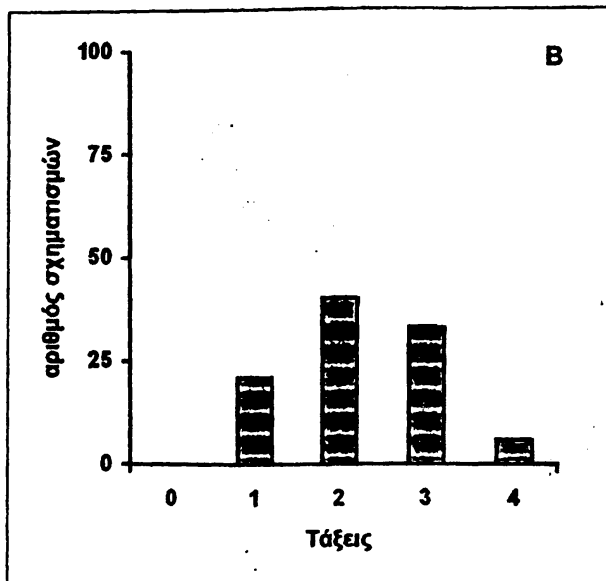
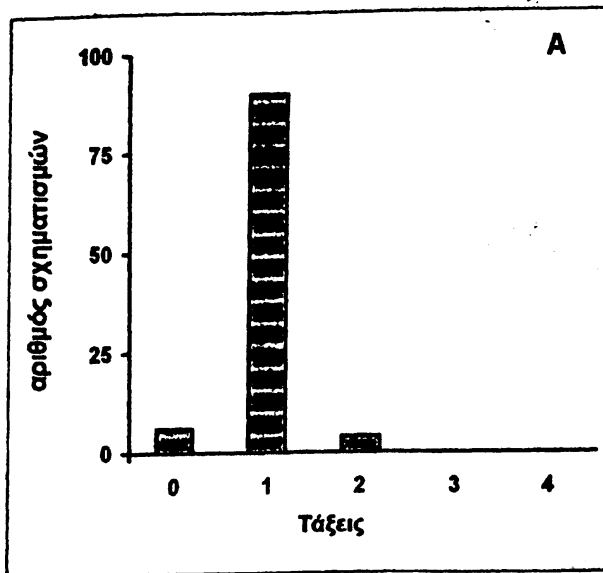


σύμφωνα με τον παραπάνω τρόπο και θα εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες. Το γεγονός ότι σε έναν πληθυσμό κυττάρων οι αλλαγές δεν είναι ομοιογενείς αλλά το κάθε κύτταρο αντιδρά διαφορετικά φαίνεται να υποδηλώνει την διαφορετική ικανότητα του κάθε κυττάρου να αποκρίνεται στο H_2O_2 .

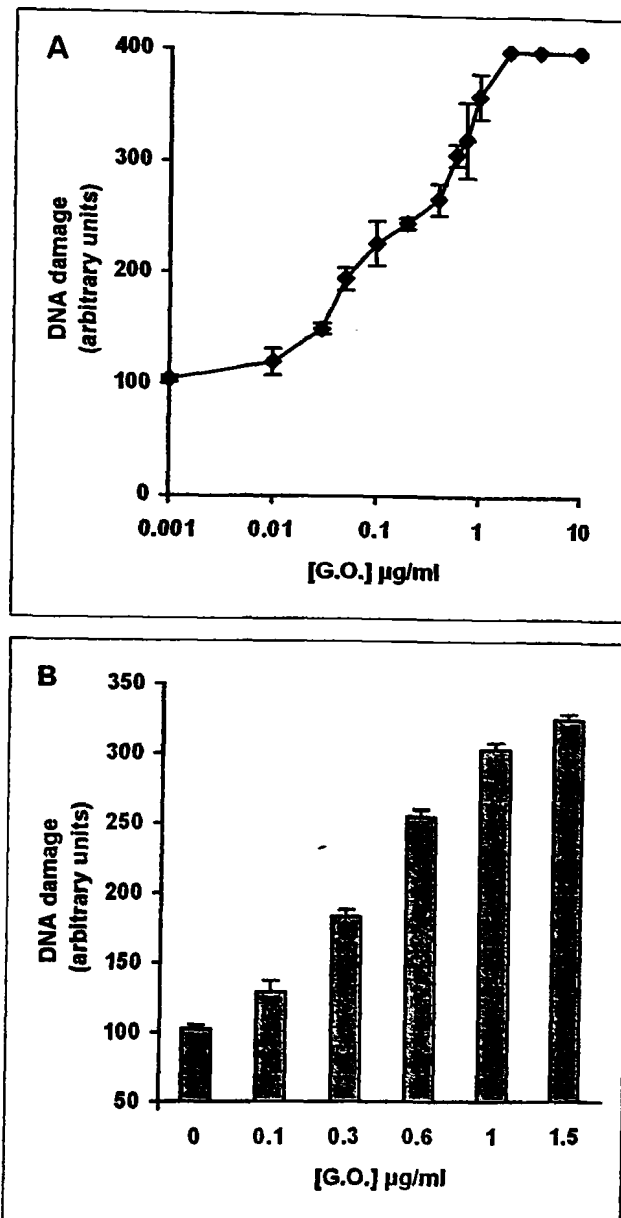
3.2 Πρόκληση σχέσεων στο πυρηνικό DNA από συνεχώς παραγόμενο H_2O_2

Στη συνέχεια εκτιμήθηκαν οι επιπτώσεις στο DNA κυττάρων Jurkat (T-λεμφοκυτταρική σειρά) και HeLa (επιθηλιακά κύτταρα) μετά από έκθεση τους σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συνεχώς παραγόμενου H_2O_2 (σχήμα 13). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 δεν παρατηρείται σημαντική βλάβη αλλά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις η βλάβη στο κυτταρικό DNA αυξάνεται σταδιακά και φτάνει στο ανώτερο όριο της κλίμακας που χρησιμοποιείται στη μέθοδο αυτή (σχήμα 13). Τα κύτταρα Jurkat ήταν αρκετά πιο ευαίσθητα στη δράση του H_2O_2 αφού οι βλάβες στο DNA τους εμφανιζόταν σε συγκέντρωση ενζύμου 0,01 $\mu\text{g/ml}$ ενώ για τα κύτταρα HeLa απαιτούνταν 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ή περισσότερο. Επιπλέον, σε κάθε μία από τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις τα επίπεδα της βλάβης των κυττάρων Jurkat ήταν υψηλότερα αυτών των κυττάρων HeLa. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι το DNA είναι εξαιρετικά ευαίσθητο και ότι τα κύτταρα HeLa διαθέτουν πιο αποτελεσματικούς μηχανισμούς προστασίας. Η ευαισθησία του κυτταρικού DNA έναντι του H_2O_2 έχει αποδοθεί στα ιόντα σιδήρου ή χαλκού τα οποία είναι συνδεδεμένα στο DNA (Halliwell and Gutteridge, 1999). Τα ιόντα αυτά αλληλεπιδρούν με το H_2O_2 και καταλύουν το σχηματισμό των εξαιρετικά δραστικών και τοξικών $\cdot\text{OH}$ επάνω στο DNA. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ενδείξεις ότι, σε ορισμένες περιπτώσεις η πρόκληση βλαβών στο DNA από το H_2O_2 διαμεσολαβείται από τη δράση και άλλων παραγόντων (Cantoni et al., 1989, Panayiotidis et al., 1999).





Σχήμα 12: Κατανομή των σχηματισμών του DNA στις διάφορες τάξεις. Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 κύτταρα ανά ml) εκτέθηκαν σε PBS (A), ή PBS που περιείχε 0.2 $\mu\text{g/ml}$ οξειδάσης της γλυκόζης (B) για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και η εκτίμηση της βλάβης του DNA τους πραγματοποιήθηκε με την τεχνική comet assay όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Μετρήθηκαν 100 τυχαίοι σχηματισμοί οι οποίοι κατατάχτηκαν σε τάξεις από 0 έως 4 σύμφωνα με τη μορφολογία τους όπως περιγράφηκε στο σχήμα 11.



Σχήμα 13: Πρόκληση βλαβών στο πυρηνικό DNA μετά από έκθεση κυττάρων σε H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 ανά ml) (A) ή HeLa (8×10^4 ανά 2 cm^2) (B), εκτέθηκαν για 10 λεπτά σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 με την απευθείας προσθήκη στο καλλιεργητικό υλικό αυξανόμενων συγκεντρώσεων του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης (G.O.). Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν και η βλάβη του DNA προσδιορίστηκε με την τεχνική comet assay όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο \pm SD τριπλών μετρήσεων δύο διαφορετικών πειραμάτων.

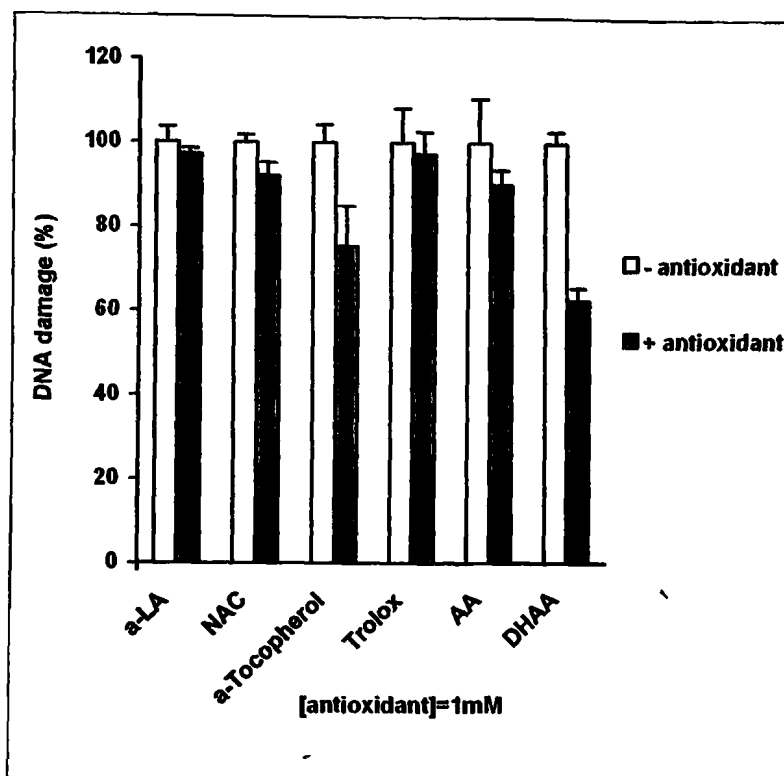


3.3 Προστασία από αντιοξειδωτικές ενώσεις

Οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να αποδίδουν ηλεκτρόνια και κατ' αυτόν τον τρόπο να εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες και να προστατεύουν τα διάφορα κυτταρικά συστατικά από την ανεξέλεγκτη δράση των ελευθέρων ριζών. Έχει προταθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις δρουν αποτρεπτικά έναντι της δημιουργίας μεταλλάξεων οι οποίες συσχετίζονται με την εξέλιξη ασθενειών και ιδιαίτερα του καρκίνου (Ames, 1983, Duthie et al., 1996).

Με βάση τα παραπάνω θεωρήθηκε λογικό να εξεταστεί εάν η παρουσία των κλασικών αντιοξειδωτικών παραγόντων (α-λιποϊκό οξύ, N-ακέτυλοκυστεΐνη, τροlox, α-τοκοφερόλη, ασκορβικό και δεϋδροασκορβικό οξύ) θα ήταν ικανή να προστατεύσει το DNA των κυττάρων από τη δράση του H_2O_2 . Αρχικά τα κύτταρα προεπώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του κάθε αντιοξειδωτικού παράγοντα ξεχωριστά προκειμένου να ανιχνευτεί το εύρος των δραστικών συγκεντρώσεων του, ενώ σε άλλα πειράματα μελετήθηκε η δράση του κάθε μορίου σε συνάρτηση με το χρόνο πρόεπώασης. Όπως φαίνεται στο σχήμα 14, η παρουσία των α-λιποϊκό οξύ, η N-ακέτυλο-κυστεΐνης και τροlox δεν ήταν ικανή να προσφέρει παρά ελάχιστη προστασία. Μια μικρή μείωση της βλάβης (περίπου 25%) παρατηρήθηκε στα κύτταρα που προεπώαστηκαν με α-τοκοφερόλη μόνο στην περίπτωση που η προεπώαση διήρκεσε για περισσότερο από 12 ώρες. Μικρή αλλά όχι στατιστικά σημαντική προστασία έδειξε και το ασκορβικό οξύ (AA) ενώ με έκπληξη παρατηρήθηκε ότι το οξειδωμένο παράγωγο του ασκορβικού οξέως, το δεϋδροασκορβικό οξύ (DHAA) ήταν πολύ πιο αποτελεσματικό (περίπου 40% προστασία) (σχήμα 14). Η εξήγηση της παρατήρησης αυτής θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι το DHAA σε αντίθεση με το ασκορβικό οξύ έχει την ικανότητα να προσλαμβάνεται γρήγορα από τα κύτταρα χρησιμοποιώντας τους μεταφορείς γλυκόζης GLUT1-1 και GLUT1-4 (Vera, et al. 1993, Rivas et al., 1997). Ενδοκυττάρια, το DHAA ανάγεται εύκολα σε ασκορβικό με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια συσσώρευση του. Η αυξημένη προστατευτική δράση του DHAA σε σχέση με το ασκορβικό είναι πιθανόν ότι εκφράζει τη διαφορά στην ταχύτητα πρόσληψης τους από τα συγκεκριμένα κύτταρα. Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες γενικά προσφέρουν μικρή ή καθόλου προστασία στο DNA των κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 , ενώ για τη δράση του ασκορβικού είναι απαραίτητη η μεταφορά του διαμέσου της μεμβράνης.





Σχήμα 14: Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών παραγόντων στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5×10^5 κύτταρα ανά 100μl) εκτέθηκαν για 10 λεπτά σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 με την απευθείας προσθήκη στο καλλιεργητικό υλικό 0.6 μg/ml του ενζύμου οξειδάσης της γλυκόζης (ικανή να δημιουργεί περίπου 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό) παρουσία (γρι στήλες) ή απουσία (λευκές στήλες) του αντίστοιχου αντιοξειδωτικού μορίου. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και η βλάβη του DNA προσδιορίστηκε με την τεχνική comet assay. Τα α-λιποϊκό οξύ, N-ακτέτυλο-κυστεΐνη, trolox, ασκορβικό και δεύδροασκορβικό οξύ προστέθηκαν στην κυτταρική καλλιέργεια 15 λεπτά πριν από την έκθεση σε H_2O_2 ενώ η α-τοκοφερόλη προεπώαστηκε για 24 ώρες. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο \pm SD τριπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.



3.4 Δεσμευτές ιόντων σιδήρου

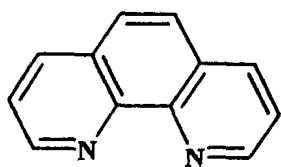
3.4.1 Δεσμευτές που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη

Αντίθετα με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες, όλες οι σιδηροδεσμευτικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν (σχήμα 15) έδειξαν ισχυρή προστατευτική δράση. Οι παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν μπορούν να χωριστούν σε αυτούς που μπορούν να διαπεράσουν διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης και σε αυτούς που δεν έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη.

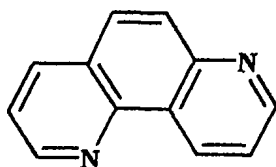
Προεπώαση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1,10-φαινανθρολίνης για 15 λεπτά πριν από την έκθεση στο H_2O_2 προσέφερε μία δόσο-εξαρτώμενη προστασία μέχρι τα 0,3 mM όπου και παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη προστασία (περίπου 65%) (σχήμα 16A). Αντίθετα με την 1,10-φαινανθρολίνη, η 1,7-φαινανθρολίνη δεν έδειξε καμία προστασία. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι 1,10- και 1,7-φαινανθρολίνη διαφέρουν μόνο στη θέση ενός ατόμου αζώτου. Η συγκεκριμένη δομική διαφορά καθιστά την πρώτη ισχυρό δεσμευτή σιδήρου ενώ η δεύτερη δεν έχει την ικανότητα αυτή (Boumans et al., 1997). Από την παρατήρηση αυτή γίνεται φανερό ότι η δέσμευση των ιόντων σιδήρου και όχι κάποια άλλη ιδιότητα του μορίου της 1,10-φαινανθρολίνης είναι υπεύθυνη για την προστασία του DNA. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύθηκε επίσης και από την παρατήρηση ότι η ένωση 2,2'-dipyridyl, η οποία είναι γνωστός δεσμευτής σιδήρου και έχει δύο άτομα αζώτου στην ίδια διάταξη με αυτά της 1,10-φαινανθρολίνης, παρείχε και αυτή σημαντική προστασία στο κυτταρικό DNA (σχήμα 16B).

Η εμπλοκή των ιόντων σιδήρου στην γενεοτοξική δράση του H_2O_2 υπογραμμίστηκε περαιτέρω από την προστατευτική δράση των ενώσεων TPEN, HBED και SIH οι οποίες είναι επίσης εξειδικευμένες δεσμευτές ιόντων σιδήρου με διαφορετική χημική δομή η καθεμία (σχήμα 15). Και οι τρεις αυτοί δεσμευτές, προστάτευαν το κυτταρικό DNA ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους (σχήμα 17). Πιο ισχυρή προστατευτική δράση είχε το SIH με το IC_{50} του μορίου αυτού να είναι περίπου 1 μM (σχήμα 17Γ) ενώ των άλλων δύο δεσμευτών ήταν τουλάχιστον 50 μM (σχήματα 17Α και 17Β). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν χωρίς καμία αμφιβολία ότι μόρια τα οποία έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ιόντα σιδήρου έχουν παράλληλα και την ικανότητα να προστατεύουν το κυτταρικό DNA.

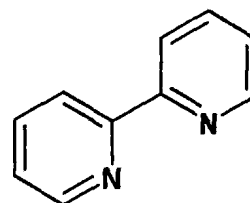




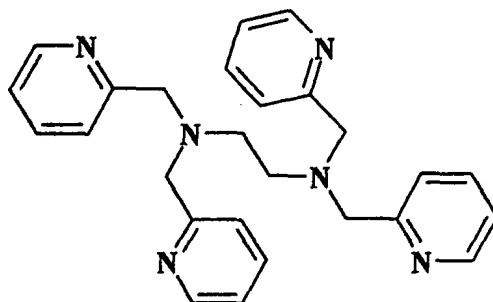
1,10-phenanthroline



1,7-phenanthroline

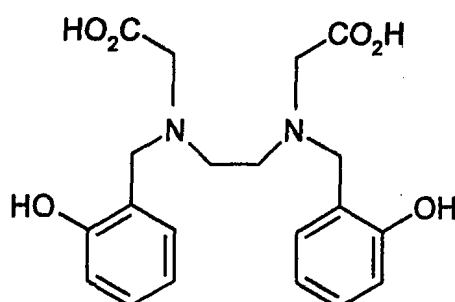


2,2' dipyridyl



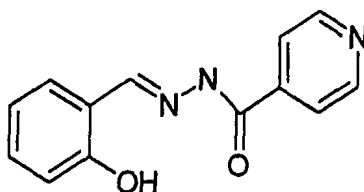
TPEN

(N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridyl-methyl)ethylenediamine)



HBED

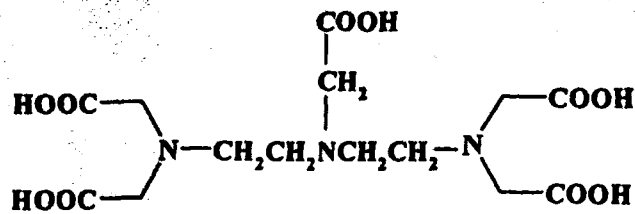
N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid



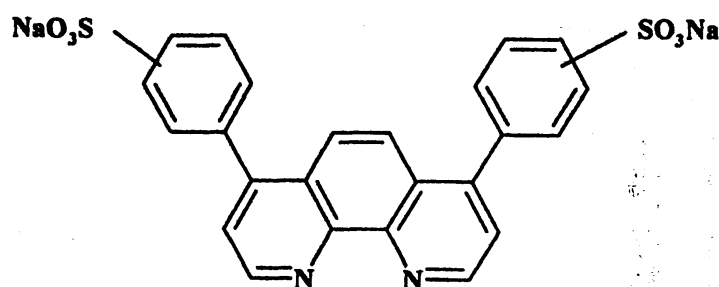
Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH)

Σχήμα 15: Δεσμευτές σιδήρου που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη.

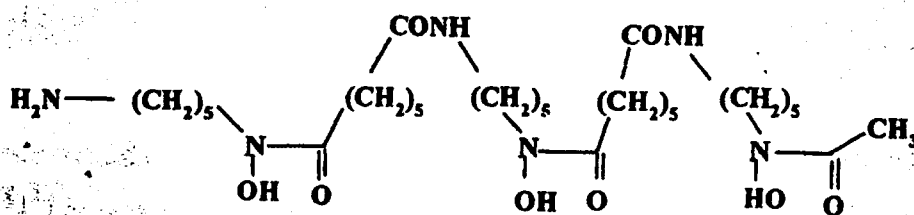




Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)



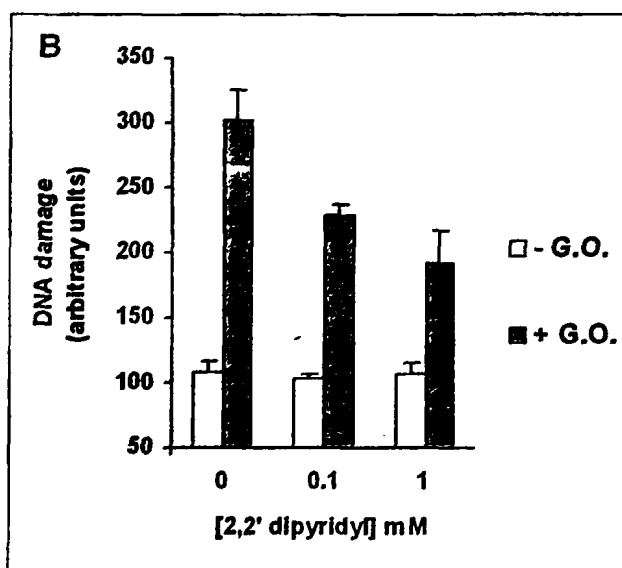
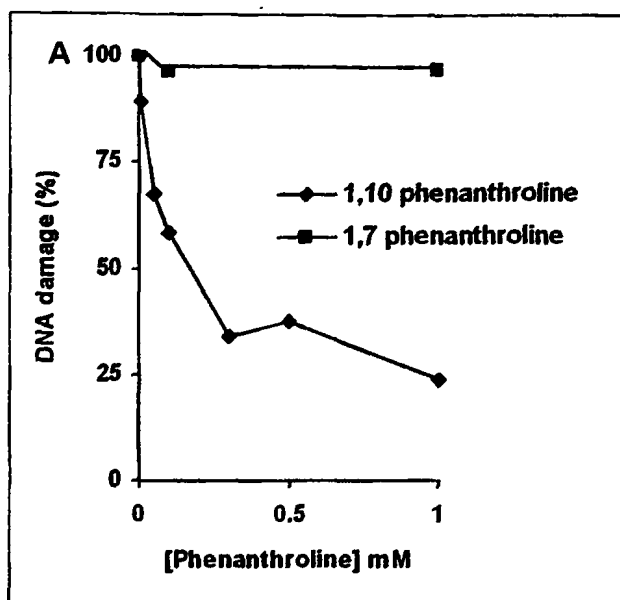
Bathophenanthroline sulfonic acid (BPS)



Desferrioxamine (DFO)

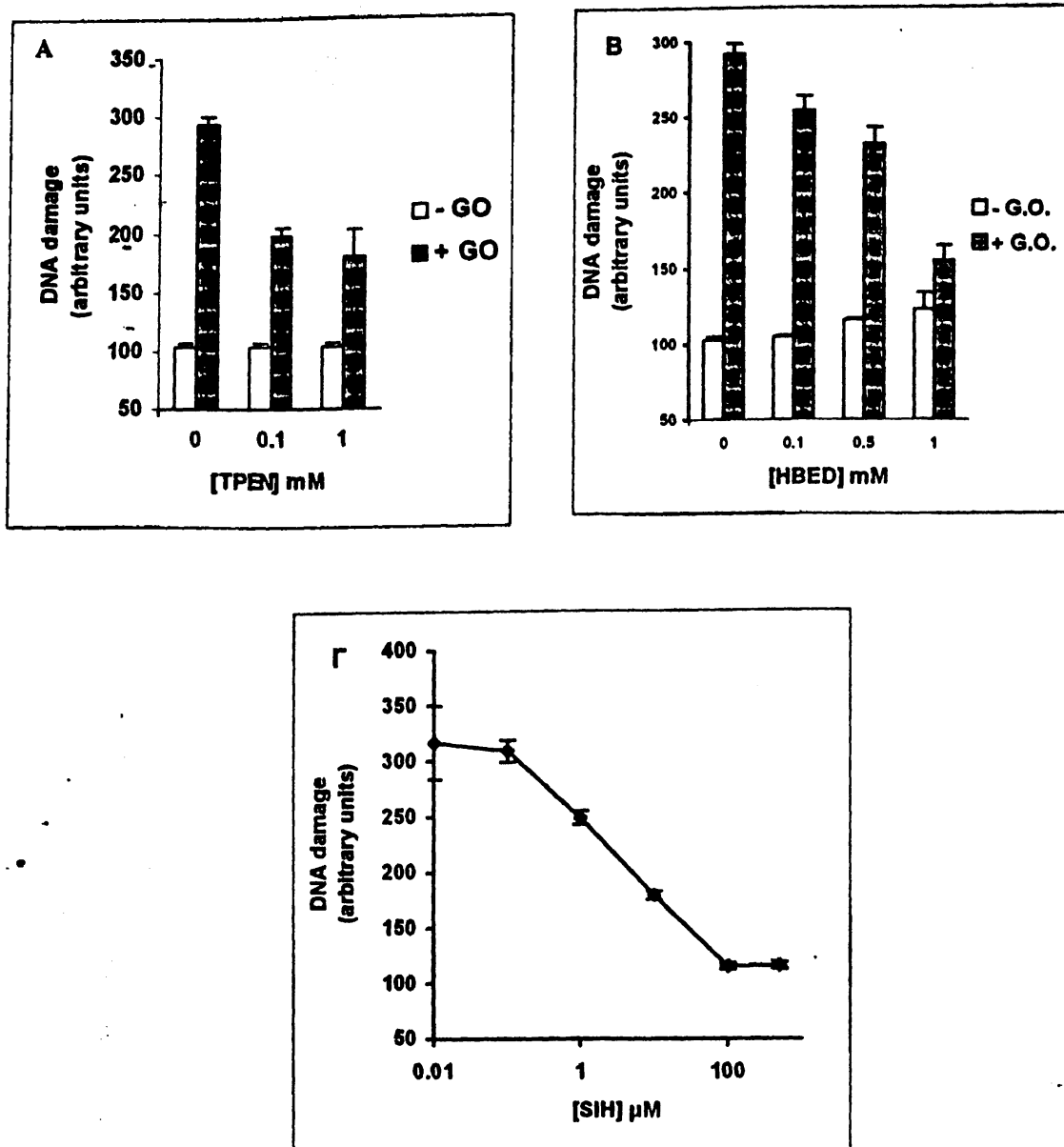
Σχήμα 15 (συνέχεια): Δεσμευτές σιδήρου που δεν διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη.





Σχήμα 16: Ο ρόλος των δεσμευτών σιδήρου στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5×10^5 ανά 100μl) προεπωάστηκαν για 15 λεπτά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των 1,7- (τετράγωνα) ή 1,10-φαινανθρολίνης (ρόμβοι) (A), 2,2'-διπυριδιλής (B) και στη συνέχεια εκτέθηκαν για 10 λεπτά σε H_2O_2 (προσθήκη στο καλλιεργητικό υλικό 0.6 μg/ml του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης). Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και η βλάβη του DNA προσδιορίστηκε με την τεχνική comet assay. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο \pm SD τριών μετρήσεων.





Σχήμα 17: Ο ρόλος των δεσμευτών σιδήρου στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5×10^5 ανά 100μl) προεπώαστηκαν για 15 λεπτά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των TPEN (A), HBED (B), SIH (Γ) και στη συνέχεια εκτέθηκαν για 10 λεπτά σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 (προσθήκη στο καλλιεργητικό υλικό 0.6 μg/ml του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και η βλάβη του DNA προσδιορίστηκε με την τεχνική comet assay. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τριών διαφορετικών μετρήσεων \pm SD.

Κατά συνέπεια, αποδεικνύεται ότι τα ιόντα σιδήρου εμπλέκονται άμεσα στους μηχανισμούς πρόκλησης βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H_2O_2 αν και οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι.

3.4.2 Δεσμευτές που δεν διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη

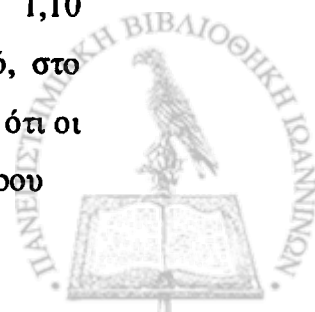
Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι στα παραπάνω πειράματα η έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 έγινε σε καλλιεργητικό υλικό εμπλουτισμένο κατά 10% με ορό εμβρύου μόσχου (FCS). Ο ορός περιέχει τρανσφερίνη, η οποία δεσμεύει τα ιόντα σιδήρου που βρίσκονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον και τα καθιστά μη ικανά να αντιδρούν με το H_2O_2 . Επομένως, είναι φυσικό να υποθέσει κανείς ότι η προστατευτική δράση των παραπάνω δεσμευτών ήταν το αποτέλεσμα της δέσμευσης των ενδοκυττάρων οξειδοαναγωγικά ενεργών ιόντων σιδήρου μετά την πρόσληψη τους από τα κύτταρα. Παρόλα αυτά, όμως, όταν εξετάστηκε ένα δομικό ανάλογο της 1,10-φαινανθρολίνης, το 4,7-διφαινύλ-1,10 φαινανθρολίνη σουλφονικό οξύ (BPS) (σχήμα 15), το οποίο πιθανά δεν έχει την ικανότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη λόγω του ότι είναι φορτισμένο με σουλφονικές ομάδες, παρατηρήθηκε ότι το μόριο αυτό είχε την ικανότητα να προστατεύει το DNA (σχήμα 18). Η προστασία αυτή όμως, σε αντίθεση με αυτή των δεσμευτών που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη εκτός της συγκεντρώσεως ήταν ανάλογη και του χρόνου προεπάσης με τα κύτταρα. Η προστατευτική δράση του BPS ήταν μη αναμενόμενη αλλά έδειχνε ότι με κάποιο άγνωστο τόπο το μόριο αυτό προσλαμβάνεται από τα κύτταρα και δρούσε ενδοκυττάρια. Παρόμοια δράση με το BPS έδειξε και η δεσφериοξαμίνη (desferal ή DFO) η οποία είναι επίσης ένας ισχυρός δεσμευτής σιδήρου. Η δομή της δεσφериοξαμίνης (σχήμα 15) δείχνει ότι πρόκειται για ένα υδρόφιλο μόριο το οποίο κατά πάσα πιθανότητα δεν είναι ικανό να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Παρόλα αυτά, και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε ότι προεπάση Jurkat κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφериοξαμίνης παρείχε προστασία, η οποία ήταν συνάρτηση τόσο της συγκέντρωσης όσο και του χρόνου προεπάσης της με τα κύτταρα (σχήμα 19). Επομένως, όμοια με το BPS, και η προστατευτική δράση της δεσφериοξαμίνης υποδήλωνε την ενδοκυττάρια πρόσληψη της αλλά ο μηχανισμός πρόσληψης της παρέμενε και στην περίπτωση αυτή άγνωστος. Τα αποτελέσματα της δεσφериοξαμίνης είναι επιπλέον ιδιαίτερα σημαντικά λόγω του ότι το μόριο αυτό χρησιμοποιείται εκτενώς στην κλινική πράξη

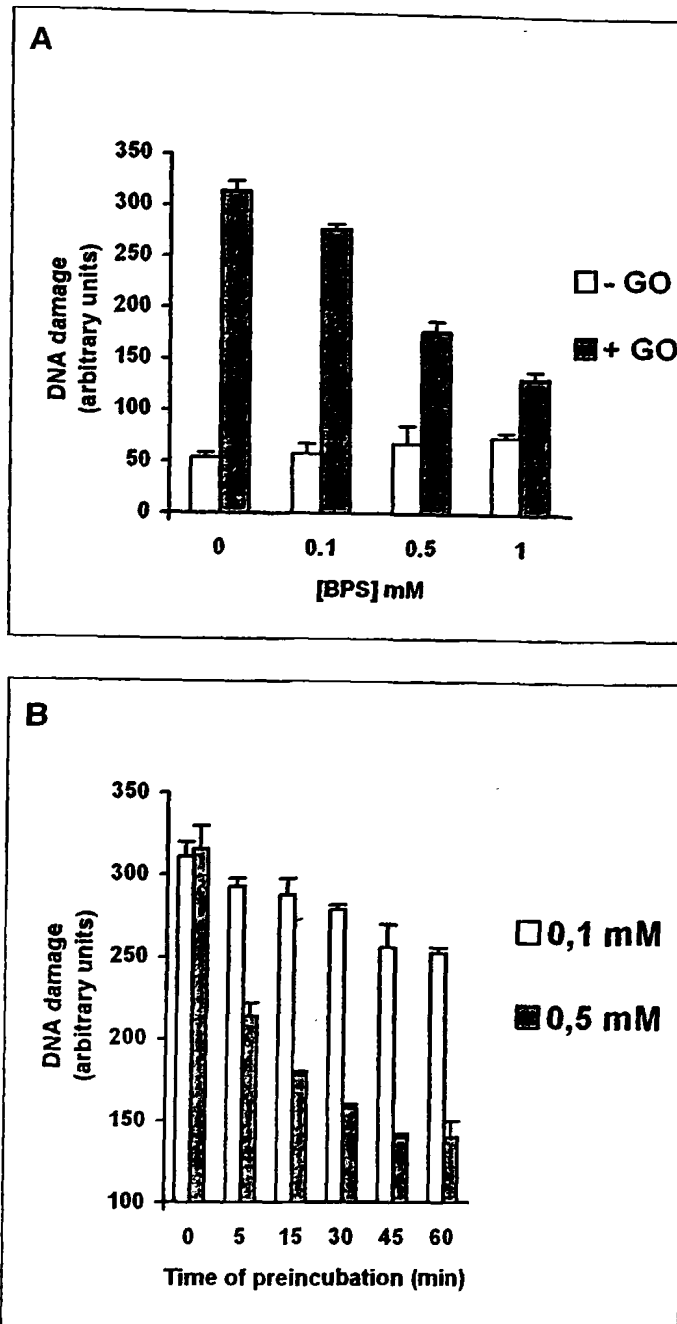
για την απομάκρυνση του πλεονάζοντος σιδήρου σε καταστάσεις υπερσιδήρωσης. Μια άλλη σιδηροδεσμευτική ένωση, το DTPA (diethylenetriaminopentaacetic acid) είναι επίσης ένα υδρόφιλο και φορτισμένο μόριο (φέρει πέντε αρνητικά φορτία) γεγονός που καθιστά μάλλον αδύνατη τη διέλευση του δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Προεπώαση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις DTPA για 15 λεπτά δεν ήταν ικανή να παρέχει καμία προστασία (σχήμα 20A). Περιορισμένη προστασία παρατηρήθηκε στα κύτταρα που προεπώαστηκαν με DTPA για περισσότερο από 60 λεπτά (περίπου 10%), η οποία με την πάροδο του χρόνου αυξήθηκε σταδιακά μέχρι και τις 6 ώρες (περίπου 40%) (σχήμα 20B). Όμοια με τα BPS και DFO η προστατευτική δράση του DTPA υποδεικνύει ότι με κάποιο τρόπο το μόριο αυτό εισερχόταν στο εσωτερικό του κυττάρου.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι εκτός από τα σιδηροδεσμευτικά μόρια που έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να προστατεύουν το κυτταρικό DNA, προστατευτική δράση έχουν επίσης και μόρια τα οποία δεν έχουν την ικανότητα να διέρχονται ελεύθερα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι τα μόρια αυτά με κάποιο τρόπο προσλαμβάνονται στο εσωτερικό του κυττάρου και δεσμεύοντας τα ιόντα σιδήρου προστατεύουν το DNA από το H_2O_2 . Στο κεφάλαιο 3.6, εξετάστηκε λεπτομερώς ο μηχανισμός πρόσληψης ενός από τα μόρια αυτά, της δεσφεριωξαμίνης.

3.5 Δεσμευτές ιόντων χαλκού

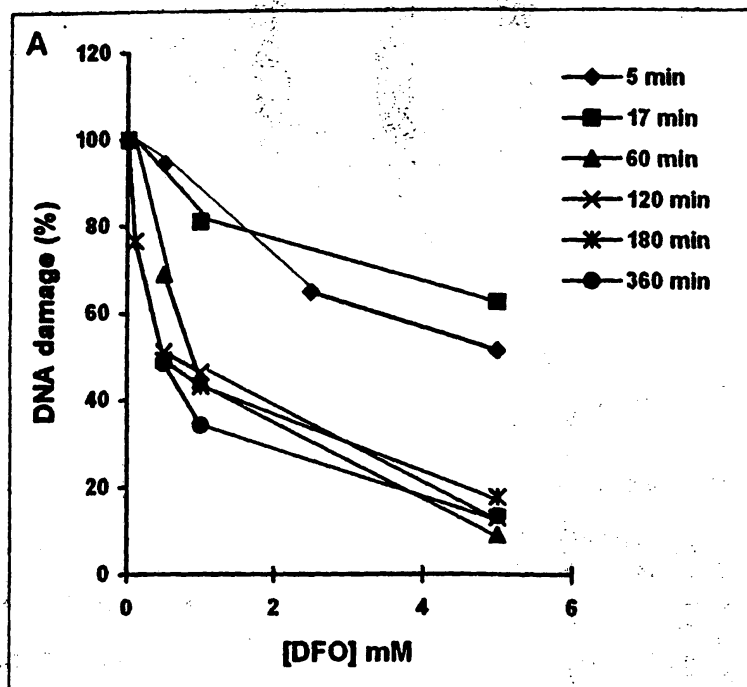
Παράλληλα με τα ιόντα σιδήρου εξετάστηκε το ενδεχόμενο της εμπλοκής των ιόντων χαλκού στους μηχανισμούς δράσης του H_2O_2 μιας και τα ιόντα αυτά καταλύουν επίσης την αντίδραση Fenton και μάλιστα με μεγαλύτερη ικανότητα από τα ιόντα σιδήρου ($k_{Cu} = 4700 M^{-1}s^{-1}$, $k_{Fe} = 76 M^{-1}s^{-1}$) (Halliwell and Gutteridge, 1999). Δηλαδή, κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες τα ιόντα χαλκού είναι περίπου 62 φορές πιο αποτελεσματικά στη δημιουργία $\cdot OH$ από ότι τα ιόντα σιδήρου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ειδικές χαλκοδεσμευτικές ενώσεις (σχήμα 21) οι οποίες προεπώαστηκαν με τα κύτταρα πριν αυτά εκτεθούν σε H_2O_2 . Η 2,9-διμέθυλ-1,10-φαινανθρολίνη (νεοκουπρεΐνη, NC) είναι ένα δομικό ανάλογο της 1,10-φαινανθρολίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε παραπάνω σαν σιδηροδεσμευτικό, στο οποίο στις θέσεις 2 και 9 έχουν προστεθεί δύο μεθυλομάδες. Ήταν ήδη γνωστό ότι οι προσθήκες αυτές αναστέλλουν την ικανότητα του μορίου να συνδέει ιόντα σιδήρου



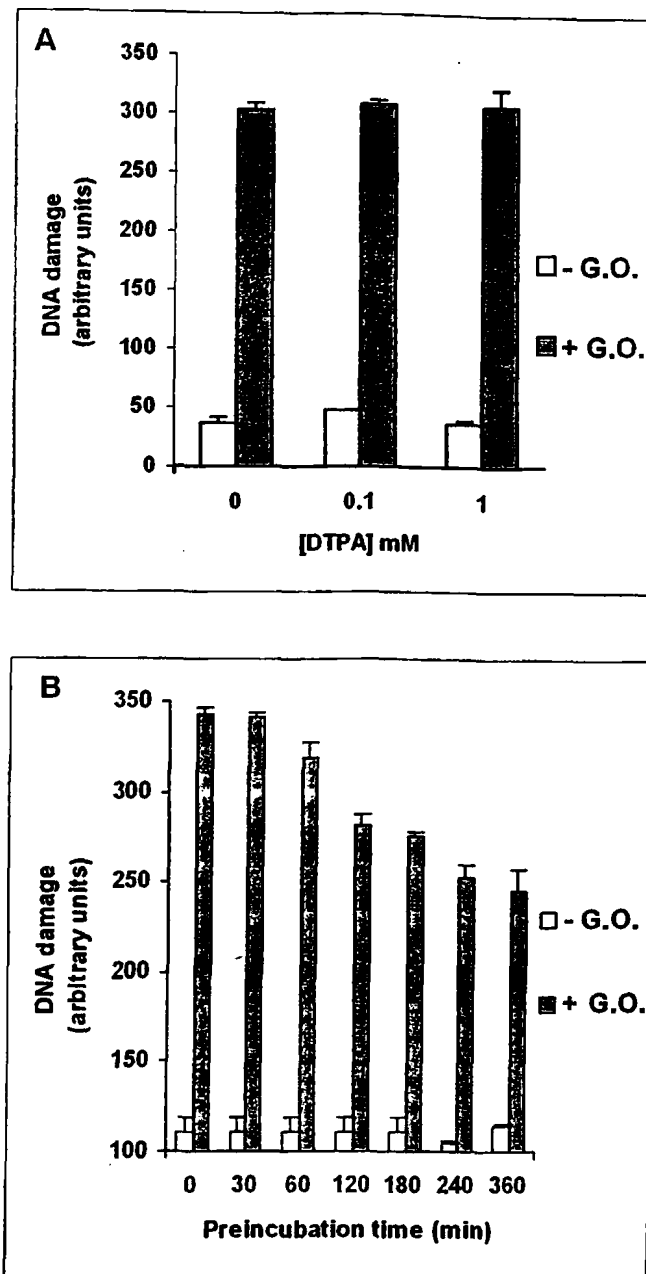


Σχήμα 18: Ο ρόλος του BPS στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5×10^5 ανά $100 \mu\text{l}$) προεπώστηκαν για 30 λεπτά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις BPS (A) ή με 0.1 ή με 0.5 mM BPS για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα (B). Στη συνέχεια τα κύτταρα εκτέθηκαν για 10 λεπτά σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 με την απευθείας προσθήκη στο καλλιεργητικό υλικό 0.6 $\mu\text{g/ml}$ οξειδάσης της γλυκόζης. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και η βλάβη του DNA τους προσδιορίστηκε με την τεχνική comet assay. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο τριών μετρήσεων \pm SD.





Σχήμα 21: Ο ρόλος της δεσφεριοξαμίνης (DFO) στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5×10^5 ανά 100μl) προεπώαστηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφεριοξαμίνης και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H_2O_2 για 10 λεπτά με την απευθείας προσθήκη στο καλλιεργητικό υλικό 0.6 μg/ml οξειδάσης της γλυκόζης (ικανή να δημιουργεί 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και η βλάβη του DNA προσδιορίστηκε με την τεχνική comet assay. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών μετρήσεων \pm SD.



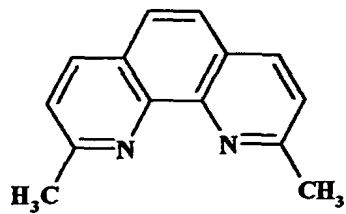
Σχήμα 20: Ο ρόλος του Diethylenetriaminopentaacetic acid (DTPA) στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5×10^5 ανά 100 μ l) προεπώστηκαν με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις DTPA για 15 λεπτά (A), ή με 1 mM DTPA για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα (B) και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε H_2O_2 για 10 λεπτά με την απευθείας προσθήκη στο καλλιεργητικό υλικό 0.6 μ g/ml οξειδάσης της γλυκόζης (ικανή να δημιουργεί 12 μ M H_2O_2 ανά λεπτό). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και η βλάβη του DNA προσδιορίστηκε με την τεχνική comet assay. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τριών μετρήσεων \pm SD.



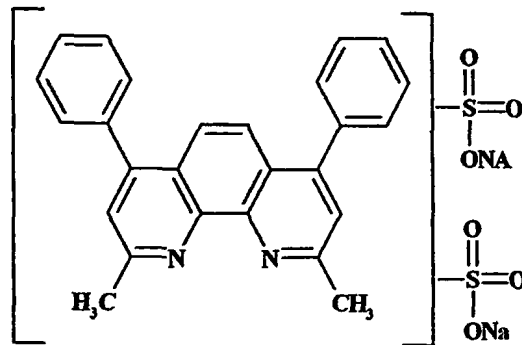
αλλά του προσδίδουν την ικανότητα να δεσμεύει εξειδικευμένα τα ιόντα χαλκού (Mello Filho et al., 1985). Προεπάωση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις νεοκουπρεΐνης δεν έδειξε καμία προστασία ενώ αντίθετα προκάλεσε βλάβες στο κυτταρικό DNA από μόνη της απουσία H_2O_2 (σχήμα 22A).

Ένα άλλο ανάλογο της νεοκουπρεΐνης, το 2,9-διμέθυλο-4,7-διφαινύλο-1,10-φαινανθρολίνη-σουλφονικό οξύ (BCS), το οποίο λόγω του ότι είναι αρνητικά φορτισμένο δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, δεν παρείχε καμία προστασία αλλά αντίθετα δεν είχε ούτε τοξική δράση (σχήμα 22B). Οι παραπάνω παρατηρήσεις φαίνεται να υποδηλώνουν ότι τα ιόντα χαλκού δεν εμπλέκονται στους μηχανισμούς πρόκλησης σχάσεων στο DNA οι οποίες προκαλούνται από το H_2O_2 μιας και η δέσμευση τους δεν παρέχει στα κύτταρα καμία προστασία. Επιπλέον, οι δεσμευτές χαλκού οι οποίοι έχουν την ικανότητα να διαχέονται διαμέσου της κυτταρικής δράσης όπως η νεοκουπρεΐνη, έχουν γενετοξικές ιδιότητες ενώ όταν δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη δεν έχουν γενετοξικές ιδιότητες. Τα παραπάνω συμπεράσματα ενισχύονται επιπλέον από την παρατήρηση ότι δύο άλλοι χαλκοδεσμευτικοί παράγοντες με εντελώς διαφορετική χημική δομή το διεθύλο-δίθειοκαρβαμίδιο (DDC) και το πυρολιδίνο-δίθειοκαρβαμίδιο (PDTC), τα οποία όμοια με τη νεοκουπρεΐνη έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, όταν προστέθηκαν σε κύτταρα πριν την έκθεση τους σε H_2O_2 αφενός δεν έδειξαν καμία προστασία αφετέρου είχαν και τα δύο γενετοξική δράση απουσία H_2O_2 (σχήμα 23). Η τοξική δράση των δεσμευτών χαλκού που παρατηρήθηκε στα προηγούμενα πειράματα έχει παρατηρηθεί και από άλλους και έχει αποδοθεί στην ικανότητα των μορίων αυτών να λειτουργούν ως μεταφορείς ιόντων χαλκού από το εξωκυττάριο περιβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου (Meshnick et al., 1990, Mohindru et al., 1983, Nobel et al., 1995, Zhu et al., 2001). Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν και στην περίπτωση της μελέτης αυτής οι γενετοξικές ιδιότητες των νεοκουπρεΐνης, PDTC και DDC σχετιζόταν με την παραπάνω πρόταση εξετάστηκε εάν η δέσμευση των εξωκυττάρων ιόντων χαλκού με BCS θα ήταν ικανή να αναστείλει την τοξικότητα των τριών προαναφερθέντων χαλκοδεσμευτικών ενώσεων. Στο σχήμα 24A φαίνεται ότι και οι τρεις δεσμευτές έδρασαν τοξικά παρά την παρουσία του BCS γεγονός που υποδηλώνει ότι η παραπάνω πρόταση δεν ισχύει. Αντίθετα με το BCS, η προεπάωση των κυττάρων με σιδηροδεσμευτικά μόρια, για

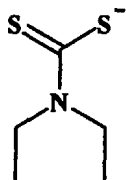




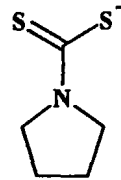
Neocuproine (NC)



Bathocuproine disulfonate (BCS)

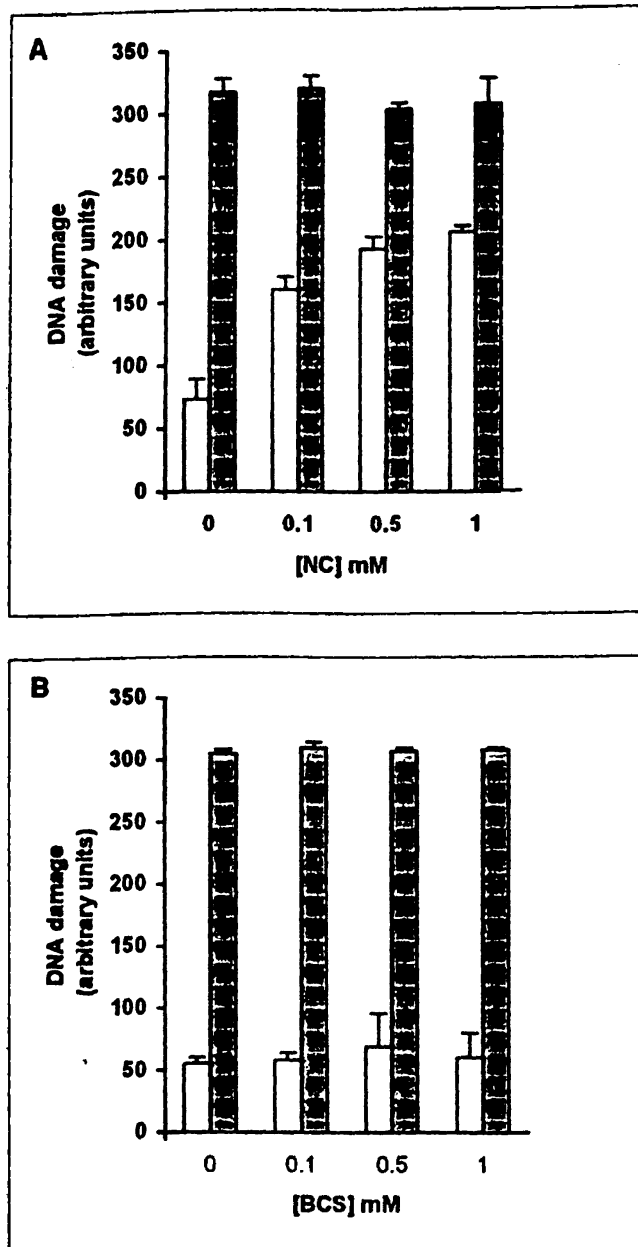


Diethyldithiocarbamate (DDC)



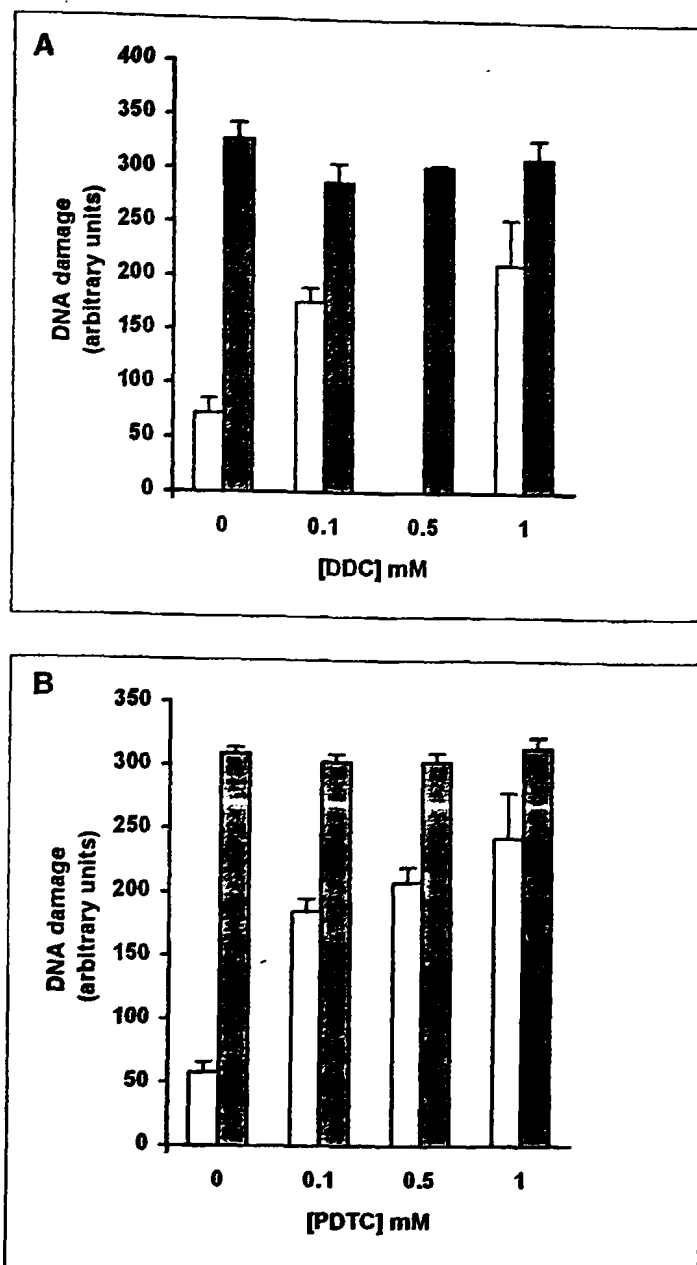
Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)

Σχήμα 21: Χημικές δομές δεσμευτών χαλκού.



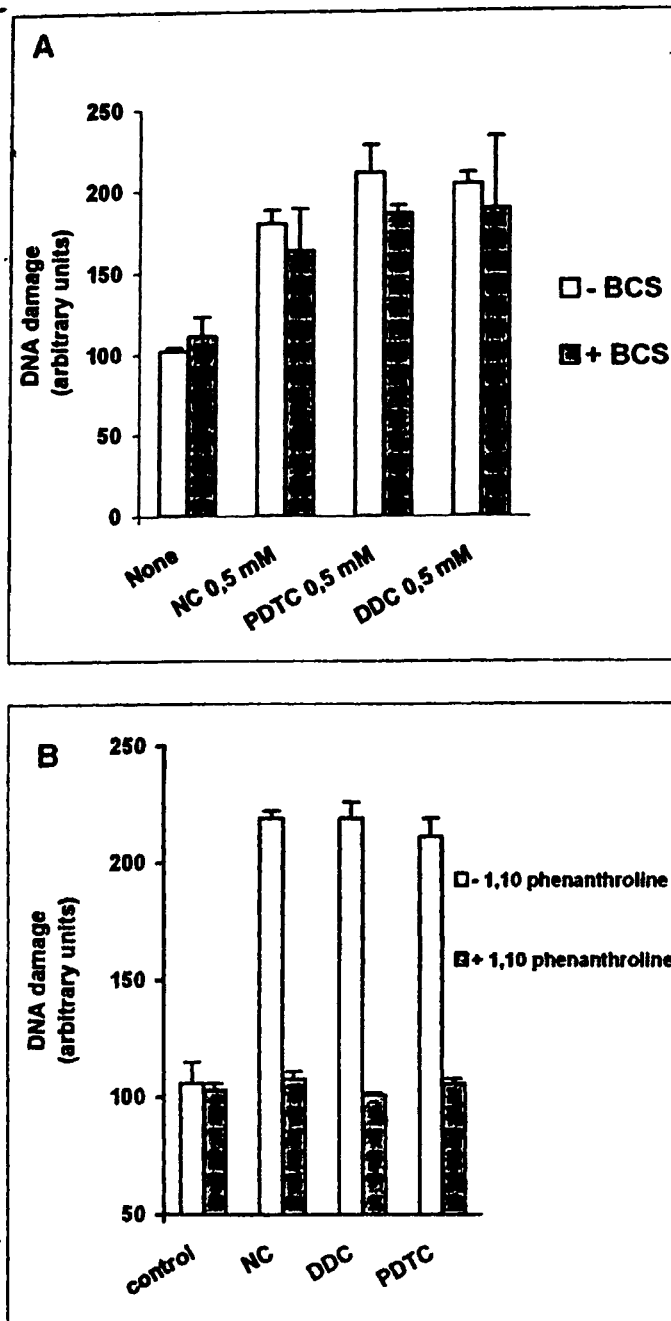
Σχήμα 22: Ο ρόλος των νεοκουπρεΐνης (NC) και 2,9-διμέθυλο-4,7-διφαινόλο-1,10-φαινανθρολίνη-σουλφονικό οξύ (BCS) στην προστασία του DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H₂O₂. Κύτταρα Jurkat (1.5 x 10⁵ ανά 100μl) προεπεώστηκαν για 15 λεπτά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των νεοκουπρεΐνης (A) ή BCS (B) και στη συνέχεια εκτέθηκαν για 10 λεπτά είτε σε PBS (λευκές στήλες) ή σε συνεχώς παραγόμενο H₂O₂ με την απευθείας προσθήκη στο καλλιεργητικό υλικό 0.6 μg/ml οξειδάσης της γλυκόζης (γκρίζες στήλες). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και η βλάβη του DNA προσδιορίστηκε με την τεχνική comet assay. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο τριπλών μετρήσεων ± SD.





Σχήμα 23: Ο ρόλος των διέθυλο-δίθειοκαρβαμίδιο (DDC) και πυρολιδινό-δίθειοκαρβαμίδιο (PDTC) στην προστασία του DNA κοτιάρων που εκτίθενται σε H₂O₂. Κύτταρα Jurkat (1.5 x 10⁵ ανά 100μl) προεπώαστηκαν για 15 λεπτά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις DDC (A) ή PDTC (B) και στη συνέχεια εκτέθηκαν για 10 λεπτά είτε σε PBS (λευκές στήλες) ή σε H₂O₂ με την προσθήκη στο καλλιεργητικό τους υλικό 0.6 μg/ml οξειδάσης της γλυκόζης (γκρίζες στήλες). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και η βλάβη του DNA προσδιορίστηκε με την τεχνική comet assay. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τριπλών μετρήσεων ± SD.





Σχήμα 24: Η επίδραση των BCS και 1,10-φαινανθρολίνης στην τοξική δράση των δεσμευτών χαλκού. Κύτταρα Jurkat (1.5×10^5 ανά 100 μ l) προεπώαστηκαν με 0.5 mM BCS για 30 λεπτά (A) ή με 1 mM 1,10 φαινανθρολίνης για 15 λεπτά (B) και στη συνέχεια εκτέθηκαν για 15 επιπλέον λεπτά σε 0.5 mM NC, PDTC ή DDC. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και η βλάβη του DNA των κυττάρων προσδιορίστηκε με την τεχνική comet assay. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο τριών μετρήσεων \pm SD.

παράδειγμα με 1,10-φαινανθρολίνη, πριν από την προσθήκη των νεοκουπρεΐνης, PDTC και DDC ανέστειλε την τοξικότητα των τριών δεσμευτών χαλκού υποδηλώνοντας ότι η τοξικότητα των μορίων αυτών σχετίζεται με κάποιο τρόπο με τα ενδοκυττάρια ιόντα σιδήρου (σχήμα 24B) αν και ο ακριβής μηχανισμός παραμένει προς το παρόν άγνωστος και χρίζει περαιτέρω διερεύνησης.

3.6 Περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου δράσης της δεσφεριοξαμίνης

3.6.1 Προστασία του DNA

Στο κεφάλαιο 3.4.2 εξετάστηκε η δράση σιδηροδεσμευτικών ενώσεων οι οποίες αν και δεν είναι ικανές να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη παρείχαν προστασία ανάλογα με τη συγκέντρωση και το χρόνο προεπάσης με τα κύτταρα (σχήματα 18, 19 και 20). Προκειμένου να ερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης αυτών των μορίων επιλέχθηκε και εξετάστηκε λεπτομερώς ένα από αυτά, η δεσφεριοξαμίνη.

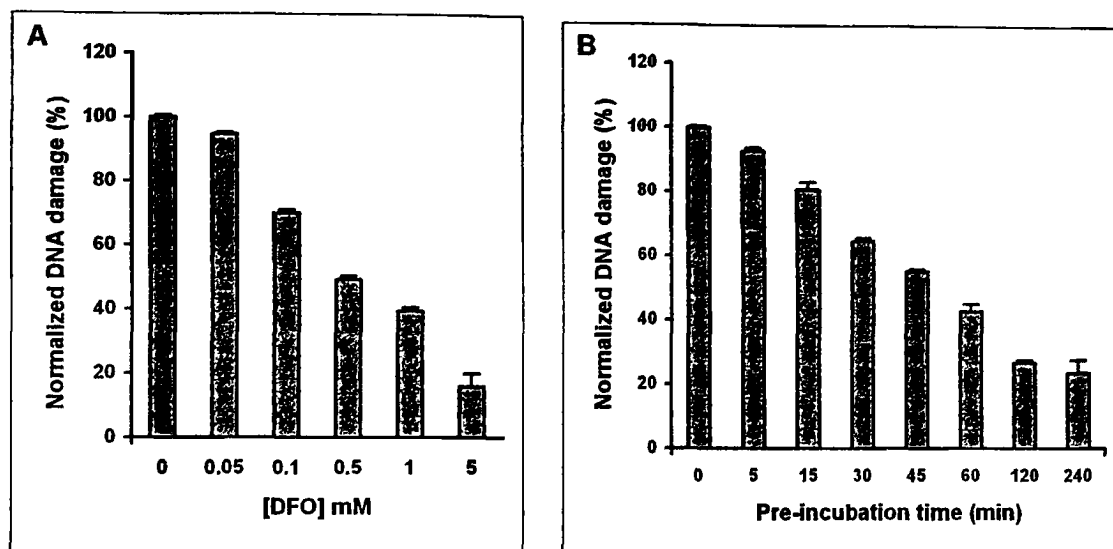
Λόγω τεχνικών δυσκολιών που αντιμετωπίστηκαν με τη διαμόλυνση κυττάρων Jurkat με γονίδια πρωτεϊνών που ήταν απαραίτητες για την εκτέλεση των παρακάτω πειραμάτων, στο τμήμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa (επιθηλιακά κύτταρα). Όπως και στα κύτταρα Jurkat προεπάση κυττάρων HeLa με δεσφεριοξαμίνη παρείχε μία χρόνο- και δόσο-εξαρτώμενη προστασία (σχήματα 25A και 25B). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η προστατευτική ικανότητα της δεσφεριοξαμίνης αυξήθηκε σημαντικά ακόμα και όταν προεπώαστηκε μόνο για 60 λεπτά και η έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 πραγματοποιήθηκε 60 λεπτά μετά την απομάκρυνση της από το καλλιεργητικό υλικό με ξέπλυμα των κυττάρων. Στην πράξη, η παρουσία ή η απουσία της δεσφεριοξαμίνης κατά τη δεύτερη ώρα πριν την έκθεση σε H_2O_2 δεν διαφοροποίησε την προστασία που παρείχε ($73.3 \pm 0.9\%$ και $71.3 \pm 2.4\%$ αντίστοιχα από $57 \pm 2\%$ που παρατηρείται στα 60 λεπτά προεπάσης). Η παραπάνω παρατήρηση μπορεί να εξηγηθεί εάν υποθεθεί ότι η δεσφεριοξαμίνη προσλαμβάνεται από τα κύτταρα με ενδοκύτωση και κατά τη δεύτερη ώρα προεπάσης φθάνει σε νέα κυτταρικά διαμερίσματα μέσω ενδοκυττάριας επικοινωνίας κυστιδίων. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται επίσης και από αποτελέσματα στα οποία εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην προστατευτική δράση των ενώσεων 1,10-φαινανθρολίνης και δεσφεριοξαμίνης. Παρατηρήθηκε ότι ενώ προεπάση των κυττάρων με 1,10-φαινανθρολίνη ή δεσφεριοξαμίνη στους $37^\circ C$, όπως ήταν αναμενόμενο, παρείχε σημαντική προστασία στο DNA τους, στους $4^\circ C$ η

προστατευτική δράση της δεσφεριοξαμίνης αναστέλλεται ενώ δεν επηρεάζεται σημαντικά αυτή της 1,10-φαινανθρολίνης (σχήμα 26). Όπως προαναφέρθηκε, η 1,10-φαινανθρολίνη εισέρχεται στα κύτταρα με διάχυση διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, και για το λόγο αυτό δεν επηρεάστηκε η προστατευτική της δράση από τη θερμοκρασία. Αντίθετα με την 1,10-φαινανθρολίνη, η αναστολή της προστατευτικής ικανότητας της δεσφεριοξαμίνης στους 4 °C αφενός αποκλείει το ενδεχόμενο της εισόδου της στα κύτταρα με διάχυση, αφετέρου ενισχύει την υπόθεση της πρόσληψης της με μηχανισμό που απαιτεί ενζυμική δράση, όπως είναι η ενδοκύτωση.

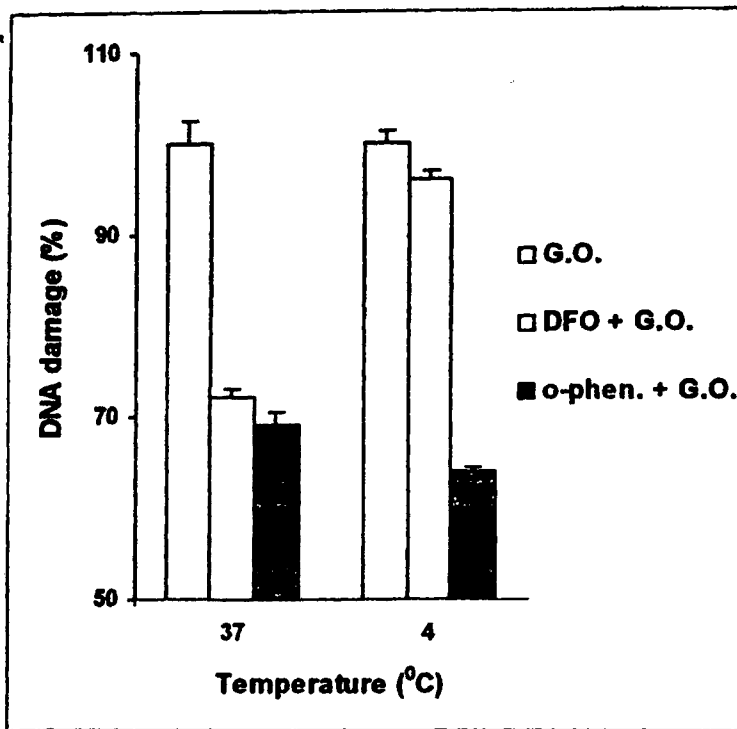
3.6.2 Πρόσληψη της δεσφεριοξαμίνης από τα κύτταρα μέσω ενδοκύτωσης

Προκειμένου να εξεταστεί εάν η δεσφεριοξαμίνη προσλαμβάνεται από τα κύτταρα μέσω ενδοκύτωσης, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με γονίδια που κωδικοποιούν επικρατούσες μεταλλαγμένες μορφές των πρωτεϊνών dynamin και Rab5. Η πρωτεΐνη dynamin επηρεάζει την ενδοκύτωση μέσω καλυμμένων κυστιδίων κλαθρίνης και caveolae (Damke et al., 1994, Henley et al., 1998) ενώ αντίθετα δεν επηρεάζει την ενδοκύτωση υγρής φάσης (fluid phase endocytosis) (Damke et al., 1994, Damke et al., 1995). Από την άλλη, η Rab5 παίζει ουσιαστικό ρόλο στο μηχανισμό τόσο της ενδοκύτωσης μέσω καλυμμένων κυστιδίων κλαθρίνης όσο και της ενδοκύτωσης υγρής φάσης (Bucci et al., 1992, McLauchlan et al., 1998). Παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση των dynamin (K44A) και dynamin (K694A), οι οποίες αναστέλλουν ή επιταχύνουν αντίστοιχα τα μονοπάτια που αναφέρθηκαν παραπάνω (Damke et al., 1994, Oh et al., 1998, Sever et al., 1999), δεν επηρέασε καθόλου τη δράση της δεσφεριοξαμίνης (σχήματα 27A και 27B). Αντίθετα με τη dynamin, υπερέκφραση της Rab5 (S34N), η οποία αναστέλλει και την ενδοκύτωση μέσω καλυμμένων κυστιδίων κλαθρίνης και την ενδοκύτωση υγρής φάσης (Lanzetti et al., 2000) ανέστειλε την ικανότητα της δεσφεριοξαμίνης να προστατεύει το κυτταρικό DNA (σχήμα 27A). ενώ η υπερέκφραση της Rab5 (Q79L), η οποία ενισχύει τη λειτουργία της Rab5 (Simonsen et al., 1998) επιταχύνοντας την ενδοκύτωση αύξησε σημαντικά την προστασία της δεσφεριοξαμίνης (σχήμα 27B). Η έκφραση και η λειτουργικότητα των Rab5 (S34N) και Rab5 (Q79L) επιβεβαιώθηκε με πειράματα που έγιναν σε μικροσκόπιο συνεστιασμού (σχήμα 28). Κύτταρα μάρτυρες μετά από ταυτόχρονη επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του επιτόπου Myc και πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης EEA1, η οποία

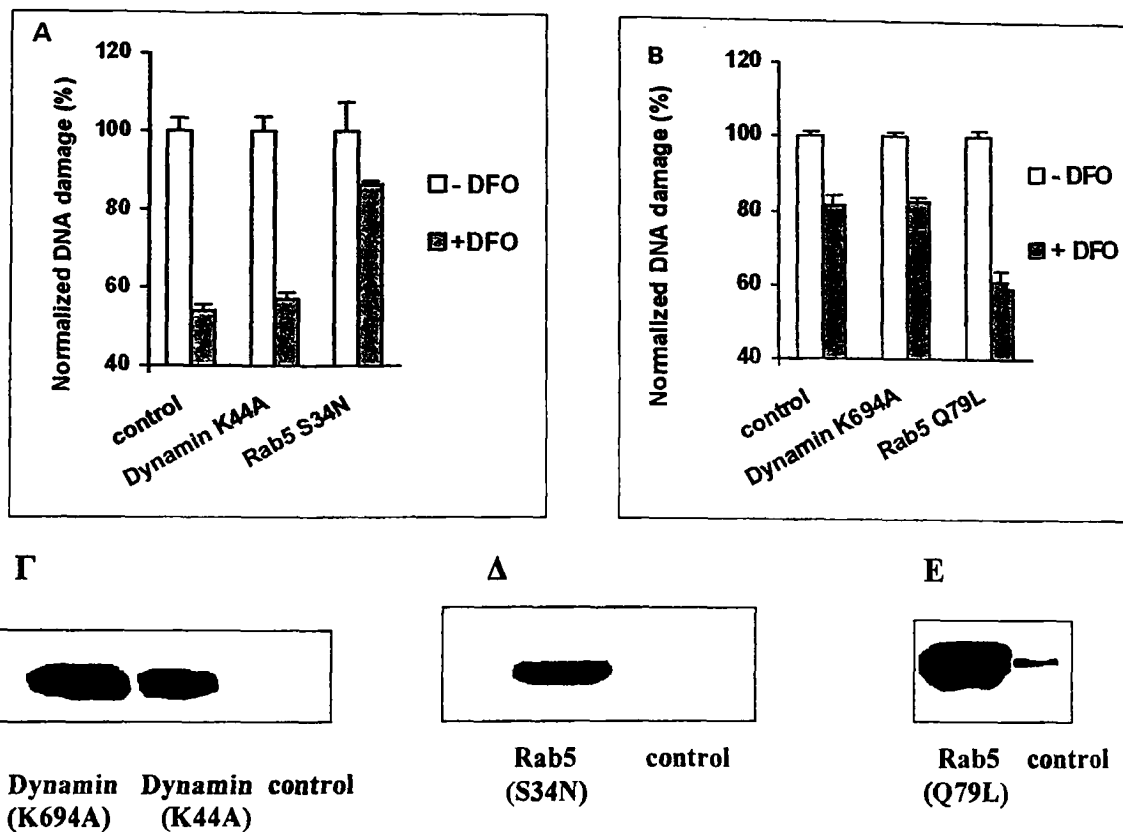




Σχήμα 25: Ο ρόλος της δεσφεριοξαμίνης στην προστασία του DNA κυττάρων HeLa που εκτίθενται σε H_2O_2 . Κύτταρα HeLa (8×10^4 ανά 2 cm^2) προεπώσθησαν για 2 ώρες με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δεσφεριοξαμίνης (A) ή με 1 mM δεσφεριοξαμίνης για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα (B) και στη συνέχεια εκτέθηκαν για 10 λεπτά σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 με την απευθείας προσθήκη στο καλλιεργητικό τους υλικό 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ οξειδάσης της γλυκόζης (ικανή να παράγει περίπου 20 μM H_2O_2 ανά λεπτό). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση και η βλάβη του DNA προσδιορίστηκε με την τεχνική comet assay. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριπλών μετρήσεων \pm SD.



Σχήμα 26: Η επίδραση της θερμοκρασίας στην προστατευτική δράση των σιδηροδεσμευτικών ενώσεων 1,10-φαινανθρολίνης και δεσφεριοξαμίνης. Κύτταρα HeLa (8×10^4 ανά 2 cm^2) προεπώστηκαν στους 37 ή τους 4 °C με PBS (λευκές στήλες), με 1 mM δεσφεριοξαμίνης για 60 λεπτά (ανοικτές γκρι στήλες), με 0.5 mM 1,10-φαινανθρολίνης για 15 λεπτά (σκούρες γκρι στήλες). Στη συνέχεια, τα κύτταρα εκτέθηκαν για 10 λεπτά σε φρέσκο καλλιεργητικό υλικό το οποίο περιείχε 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ οξειδάσης της γλυκόζης. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με χρήση θρυψίνης και η βλάβη του DNA προσδιορίστηκε με την τεχνική comet assay. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο τριπλών μετρήσεων \pm SD.



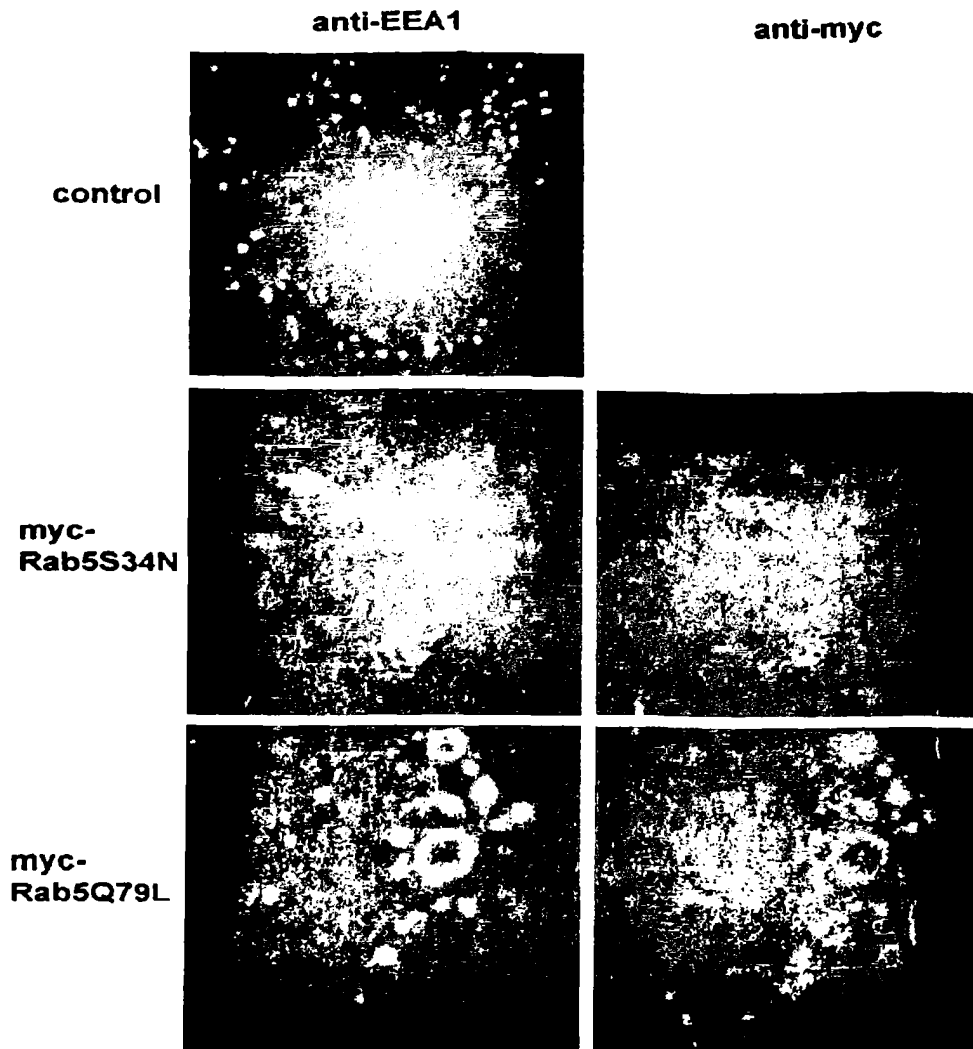
Σχήμα 27: Ο ρόλος των *dynamin* και *Rab5* στην προστατευτική δράση της δεσφεριοξαμίνης. (A) Κύτταρα μάρτυρες καθώς και κύτταρα που υπερέκφραζαν τις αρνητικά κυρίαρχες μορφές των πρωτεϊνών *dynamin* και *Rab5* (K44A και S34N αντίστοιχα) εκτέθηκαν για 10 λεπτά σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 διαμέσου της προσθήκης 1 $\mu g/ml$ οξειδάσης της γλυκόζης, υπό την απουσία (λευκές στήλες) ή την παρουσία (γκρίζες στήλες) 1mM δεσφεριοξαμίνης η οποία προστέθηκε στην κυτταρική καλλιέργεια 60 λεπτά πριν την έκθεση σε H_2O_2 . (B) Κύτταρα μάρτυρες καθώς και κύτταρα που υπερέκφραζαν τις θετικά κυρίαρχες μορφές των *dynamin* και *Rab5* (K694A και Q79L αντίστοιχα) εκτέθηκαν σε H_2O_2 (όμοια με προηγούμενα) είτε απουσία (λευκές στήλες) ή παρουσία (γκρίζες στήλες) 0.5 mM δεσφεριοξαμίνης η οποία προστέθηκε στο καλλιεργητικό υλικό 15 λεπτά πριν την έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 . Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση και ο προσδιορισμός της βλάβης του DNA έγινε με την τεχνική comet assay. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο τριών μετρήσεων \pm SD. (Gamma), (Delta) και (E): Ανάλυση κατά Western με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων (κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι) επιβεβαιώνει την υπερέκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών.



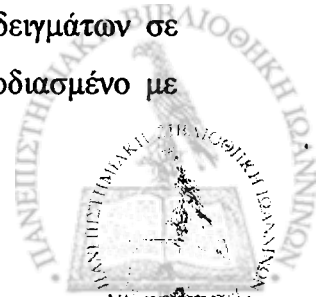
φυσιολογικά εντοπίζεται στη μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωματίων και αλληλεπιδρά με την Rab5 (Simmons et al., 1998), έδειξαν χαρακτηριστική χρώση των ενδοσωματίων (σχήμα 28, επάνω σειρά). Υπερέκφραση της Rab5 (S34N), σημασμένη με τον επίτοπο της πρωτεΐνης Myc, είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της EEA1 από τα ενδοσωμάτια και την εμφάνιση της στο κυτταρόπλασμα γεγονός που ήταν σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις (Simmons et al., 1998). Παρόμοια κυτταροπλασματική χρώση παρατηρήθηκε και για την Rab5 λόγω της ανενεργούς μορφής (GDP) στην οποία βρίσκεται (σχήμα 28 στο κέντρο). Στα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκαν λίγα και μικρά σε μέγεθος ενδοσωμάτια γεγονός που υποδήλωνε την αναστολή της ενδοκύτωσης. Αντίθετα, κύτταρα που υπερεκφράζαν τη Rab5 (Q79L), είχαν μεγάλα πρώιμα ενδοσωμάτια στα οποία εντοπιζόταν τόσο η EEA1 όσο και η Rab5 γεγονός που υποδήλωνε υψηλό ρυθμό ενδοκύτωσης (σχήμα 28, κάτω σειρά). Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι μεταλλαγμένες μορφές της Rab5 εκφράζονται λειτουργικά.

Τα πειράματα των σχημάτων 27 και 28 δείχνουν χωρίς αμφιβολία ότι η δεσφεριοξαμίνη προσλαμβάνεται από τα κύτταρα με μηχανισμό ο οποίος ελέγχεται από την Rab5 αλλά είναι ανεξάρτητος της dynamin. Κατά συνέπεια, προσλαμβάνεται από τα κύτταρα μέσω fluid phase endocytosis. Εάν ληφθεί υπόψη ότι η δεσφεριοξαμίνη είναι υδρόφιλο μόριο και έχει σχετικά υψηλό μοριακό βάρος (περίπου 600 Da) φαίνεται λογικό να υποθέσει κανείς ότι δεν θα πρέπει να διαπερνά τις μεμβράνες των ενδοσωματίων και λυσοσωματίων και συνεπώς να δρα δεσμεύοντας αποκλειστικά τα ιόντα σιδήρου των οργανιδίων αυτών (Cable et al., 1999, Kurz et al., 2003). Τα αποτελέσματα αυτά επίσης υπογραμμίζουν τη σπουδαιότητα των ιόντων σιδήρου των οργανιδίων αυτών στους μηχανισμούς δράσης του H_2O_2 . Σε αντίθεση με την επικρατούσα άποψη ότι το H_2O_2 αλληλεπιδρά με τα ιόντα σιδήρου ή χαλκού που είναι συνδεδεμένα στο DNA, από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η αρχική αλληλεπίδραση μεταξύ H_2O_2 και ιόντων σιδήρου συμβαίνει στα ενδοσωμάτια και τα λυσοσωμάτια και οδηγεί στη βλάβη του DNA με έναν μέχρι στιγμής άγνωστο μηχανισμό που χρίζει περαιτέρω διερεύνησης.





Σχήμα 28: Έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών Rab5 (S34N) και Rab5 (Q79L) και επιπτώσεις στη μορφολογία των πρώιμων ενδοσωματίων κυττάρων HeLa. Κύτταρα μάρτυρες ή κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τις Rab5 (S34N) και Rab5 (Q79L) σημασμένες με τον επίτοπο του Myc προετοιμάστηκαν για ανάλυση με ανοσοφθορισμό όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Οι επιπτώσεις της υπερέκφρασης των μεταλλαγμένων μορφών της Rab5 στη μορφολογία και σύντηξη των πρώιμων ενδοσωματίων ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας αντίσωμα κουνελιού κατά της πρωτεΐνης EEA1 (αριστερή στήλη), και αντίσωμα ποντικού κατά του επιτόπου Myc (δεξιά στήλη). Ακολούθησε ταυτόχρονη επώαση με αντίσωμα κατά των ανοσοσφαιρινών ποντικού σημασμένο με FITC και αντίσωμα κατά των ανοσοσφαιρινών κουνελιού σημασμένο με TRITC και εξέταση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο συνεστιασμού (Zeiss Axiovert, Göttingen, Germany) εφοδιασμένο με ψηφιακή κάμερα (COHU digital camera).



3.6.3 Προστασία της μεμβράνης των λυσοσωματίων μετά από έκθεση κυττάρων σε H_2O_2

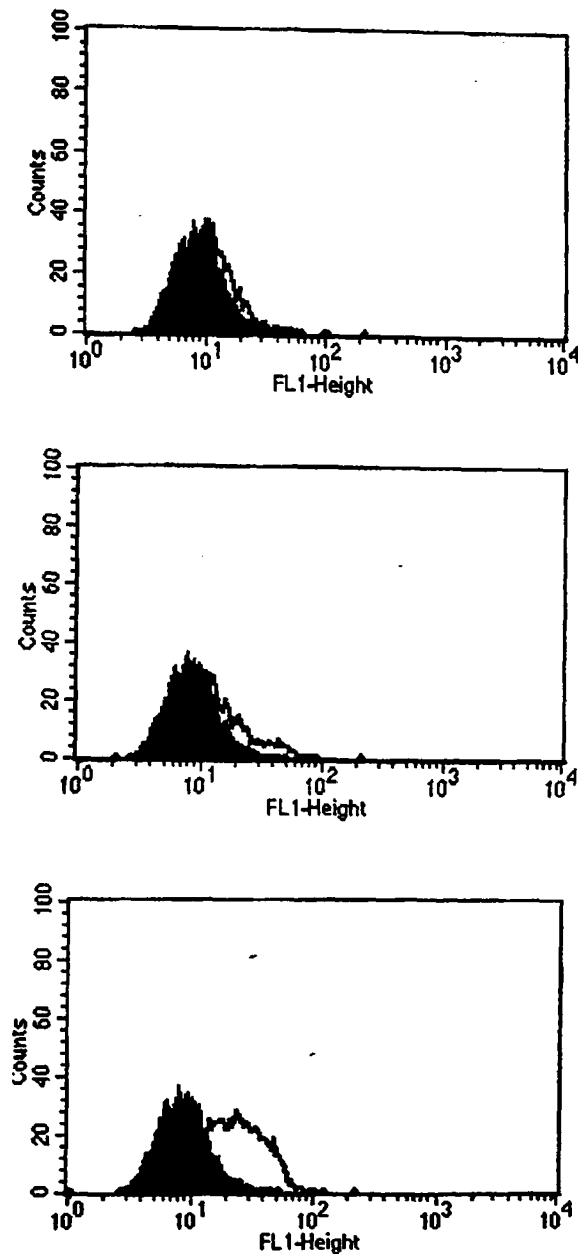
Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι επιπτώσεις στην ακεραιότητα των λυσοσωματίων μετά από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 καθώς και η εμπλοκή των ιόντων σιδήρου των οργανιδίων αυτών. Η ακεραιότητα των λυσοσωματίων προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής εξετάζοντας την απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα της φθορίζουσας χρωστικής acridine orange (AO) η οποία είχε προηγουμένως συσσωρευτεί στα λυσοσωμάτια. Στο σχήμα 29 φαίνεται ότι η έκθεση κυττάρων σε H_2O_2 για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα οδήγησε στην μετατόπιση του AO από τα λυσοσωμάτια στο κυτταρόπλασμα όπως υποδηλώνει η αύξηση φθορισμού στο πράσινο. Η αύξηση του φθορισμού ήταν φανερή 15 λεπτά μετά από την προσθήκη του H_2O_2 και συνεχίζει να αυξάνεται σταδιακά με το χρόνο υποδηλώνοντας αυξημένη απελευθέρωση AO στο κυτταρόπλασμα δηλαδή αύξηση των βλαβών της μεμβράνης των λυσοσωματίων (σχήματα 29B και 29Γ). Προεπώαση των κυττάρων με το σιδηροδεσμευτικό δεσφεριοξαμίνη, η οποία όπως αναφέρθηκε παραπάνω δεσμεύει ιόντα σιδήρου στα ενδοσωμάτια και λυσοσωμάτια, απέτρεψε την απελευθέρωση του AO από τα λυσοσωμάτια στο κυτταρόπλασμα υποδηλώνοντας έτσι την άμεση εμπλοκή των ιόντων σιδήρου των ενδοσωματίων και των λυσοσωματίων στους μηχανισμούς που οδηγούν στην αποσταθεροποίηση τους από το H_2O_2 (σχήμα 30).

Η διαφορετική κινητική της εμφάνισης των βλαβών στο DNA (περίπου 2 λεπτά, Panayiotidis et al., 1999) και των αντίστοιχων στις μεμβράνες των λυσοσωματίων (περίπου 15 λεπτά) μπορεί να εξηγηθεί εάν θεωρηθεί ότι η αρχική αλληλεπίδραση του H_2O_2 με τα ιόντα σιδήρου των λυσοσωματίων αρχικά οδηγεί στην απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα μορίων σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους, όπως H^+ , Ca^{2+} και Fe^{2+} , ενώ τα μόρια με σχετικά υψηλό μοριακό βάρος όπως το AO (περίπου 500 Da) απελευθερώνονται σε μεγαλύτερους χρόνους έκθεσης όταν και οι βλάβες της μεμβράνης των λυσοσωματίων είναι πιο εκτενείς.

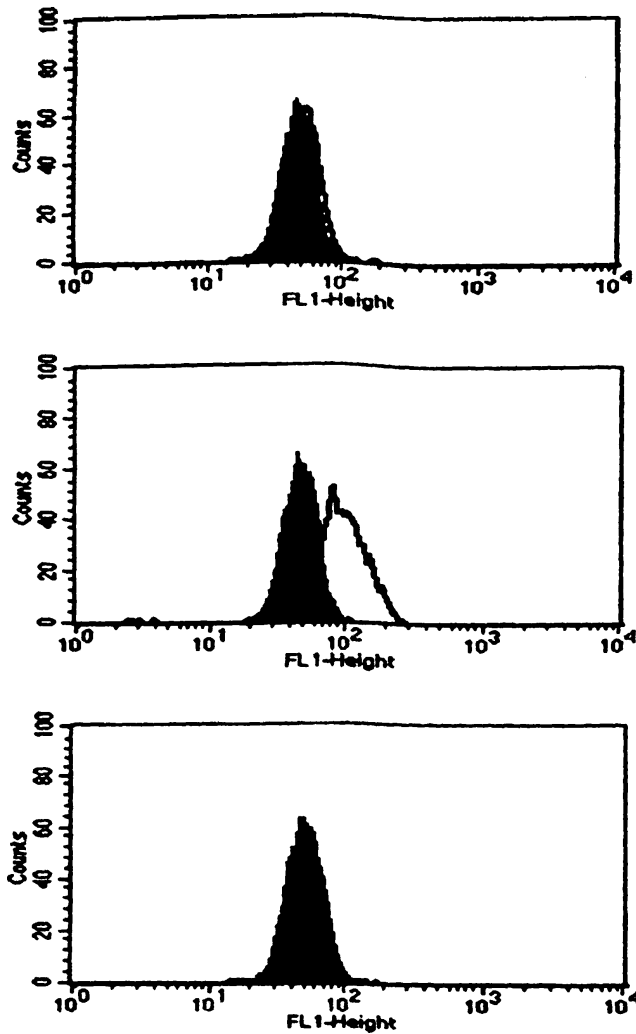
3.6.4 Προστασία σε συνθήκες διαταραχής της ομοιοστασίας του σιδήρου

Στην εισαγωγή (κεφάλαιο 1.4) περιγράφηκε ο ρόλος των πρωτεϊνών ρύθμισης του σιδήρου (iron regulatory proteins, IRPs) στους μηχανισμούς ρύθμισης των



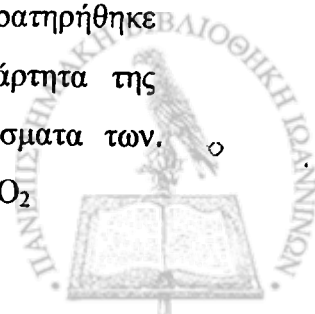


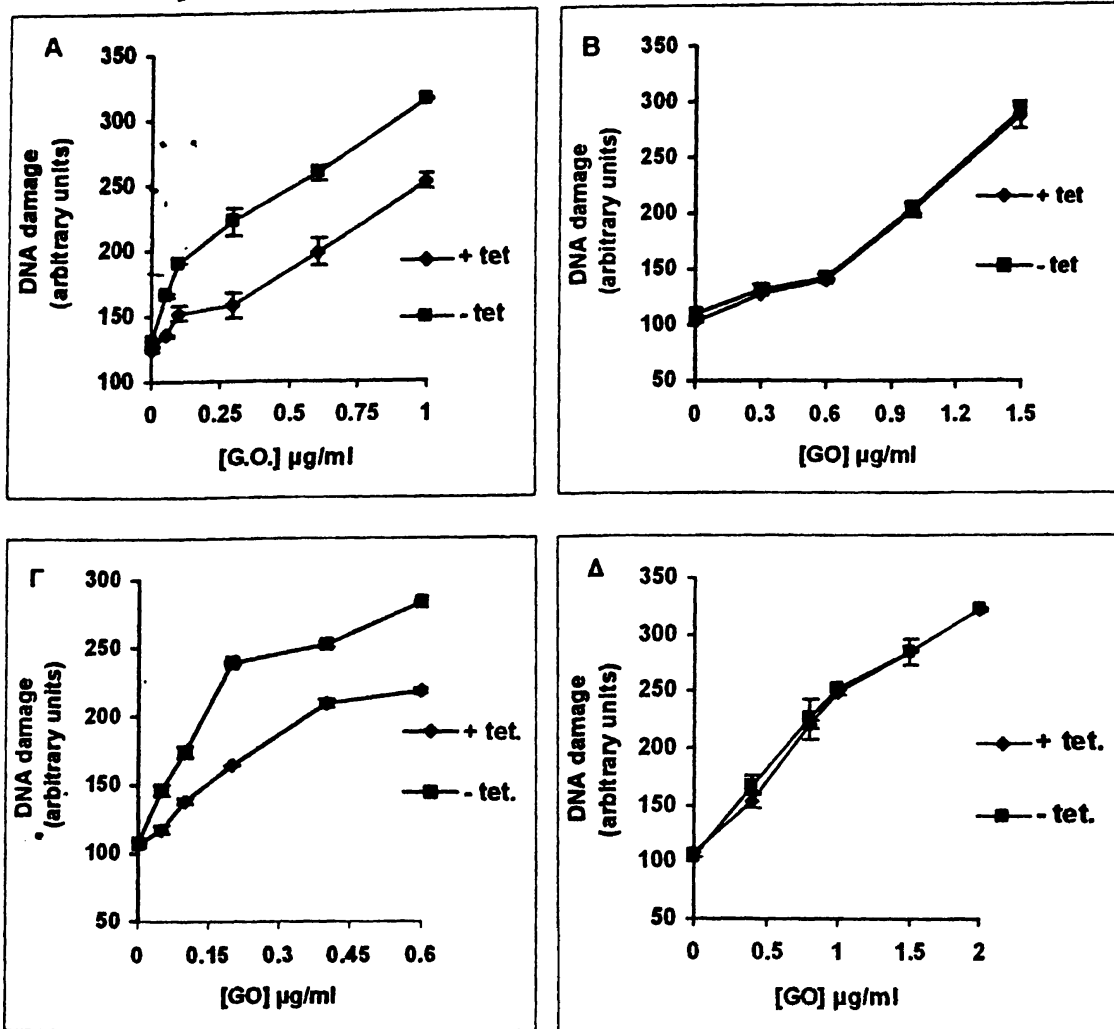
Σχήμα 29: Επιπτώσεις στην ακεραιότητα των λυσοσωματίων μετά από έκθεση κυττάρων σε H_2O_2 . Κύτταρα HeLa (8×10^4 ανά 2 cm^2) προεπώαστηκαν με $0.1 \mu\text{g/ml}$ acridine orange για 15 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 (προσθήκη $0.6 \mu\text{g/ml}$ οξειδάσης της γλυκόζης ικανή να παράγει $12 \mu\text{M}$ H_2O_2 ανά λεπτό). Στα αντίστοιχα χρονικά σημεία τα κύτταρα συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση και ο φθορισμός του AO στο πράσινο προσδιορίστηκε σε κυτταρόμετρο ροής FACSscan Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA) ενώ η καταγραφή και ανάλυση του έγινε με το πρόγραμμα Cell Quest. Το σκούρο ιστόγραμμα αντιστοιχεί στο προφίλ φθορισμού κυττάρων μαρτύρων και η μαύρη γραμμή στο προφίλ κυττάρων που εκτέθηκαν σε H_2O_2 για 15 λεπτά (A), 30 λεπτά (B), 60 λεπτά (Γ).



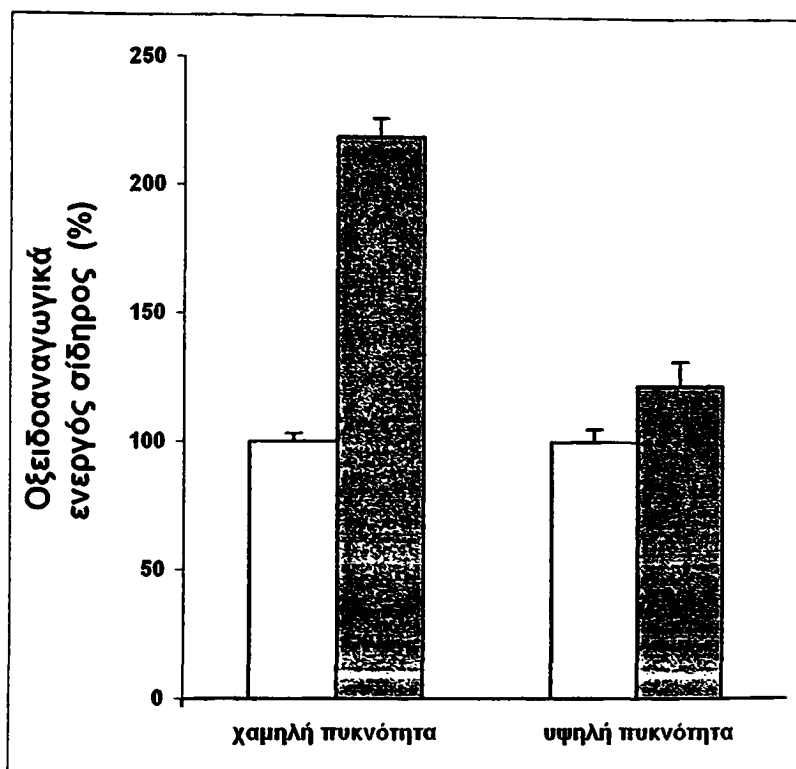
Σχήμα 30: Προστασία της ακεραιότητας των λυσοσωματίων από δεσφεριοξαμίνη. Κύτταρα HeLa (8×10^4 ανά 2 cm^2) προεπώαστηκαν με $0.1 \mu\text{g/ml}$ acridine orange για 15 λεπτά και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε φρέσκο καλλιεργητικό υλικό υπό την απουσία ή την παρουσία 1 mM δεσφεριοξαμίνης για 2 ώρες. Ακολούθως, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 με την απευθείας προσθήκη στο καλλιεργητικό υλικό $0.6 \mu\text{g/ml}$ οξειδάσης της γλυκόζης. Εξήντα λεπτά αργότερα τα κύτταρα συλλέχτηκαν με χρήση θρυψίνης και ο φθορισμός του AO στο πράσινο μετρήθηκε σε κυτταρόμετρο ροής FACSscan ενώ η καταγραφή και ανάλυση του έγινε με το πρόγραμμα Cell Quest. (A) κύτταρα μάρτυρες (σκούρο ιστόγραμμα) και κύτταρα που εκτέθηκαν σε 1 mM DFO (μαύρη γραμμή). (B) κύτταρα μάρτυρες (σκούρο ιστόγραμμα) και κύτταρα που εκτέθηκαν σε H_2O_2 (μαύρη γραμμή). (Γ) κύτταρα που προεπώαστηκαν με 1 mM DFO (σκούρο ιστόγραμμα) και κύτταρα που προεπώαστηκαν με 1 mM DFO και εκτέθηκαν σε H_2O_2 (μαύρη γραμμή).

επιπέδων του ενδοκυττάρου σιδήρου καθώς και οι μηχανισμοί ελέγχου της δράσης των πρωτεϊνών αυτών (κεφάλαιο 1.4). Αναφέρθηκε ότι η λειτουργία της IRP1 καθορίζεται από τον σχηματισμό και την αποικοδόμηση ενός συμπλόκου σιδήρου θείου (4Fe-4S) στο μόριο της πρωτεΐνης. Σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του συμπλόκου αυτού παίζουν μεταξύ των άλλων τρία υπολείμματα κυστεϊνών στις θέσεις 437, 503 και 506 (Hirling et al., 1994, Philpott et al., 1993). Στα επόμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (H1299) και μαστού (MCF-7) τα οποία είχαν διαμολυνθεί με κατάλληλο συμπληρωματικό DNA ώστε να υπερεκφράζουν την IRP-1 στην οποία η κυστεΐνη 437 είχε αντικατασταθεί με σερίνη Η έκφραση της πρωτεΐνης ρυθμιζόταν από έναν υποκινητή ευαίσθητο στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη (tet off system). Τα κύτταρα αυτά αναπτύχθηκαν από κ. Παντόπουλο. Έχει ήδη περιγραφεί ότι ενώ σε χαμηλής πυκνότητας καλλιέργειες των παραπάνω κυττάρων η υπερέκφραση της IRP1_{C437S} διαταράσσει την ομοιοστασία του σιδήρου, η καλλιέργεια των κυττάρων αυτών σε υψηλή πυκνότητα τα βοηθά να ξεπερνούν τις επιπτώσεις της υπερέκφρασης της IRP1_{C437S} (Wang et al., 2002). Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω κύτταρα παρατηρήθηκε ότι μετά από έκθεση σε H₂O₂, αυτά που καλλιεργήθηκαν σε χαμηλή πυκνότητα απουσία τετρακυκλίνης παρουσίαζαν υψηλότερη βλάβη στο DNA τους γεγονός που υποδήλωνε ότι η υπερέκφραση της IRP1_{C437S} έκανε τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στο H₂O₂ (σχήματα 31A και 31Γ). Όταν τα ίδια κύτταρα όμως καλλιεργήθηκαν σε υψηλή πυκνότητα, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ευαισθησία (σχήματα 31B και 31Δ). Στα ίδια κύτταρα, παράλληλα με τη βλάβη του DNA εκτιμήθηκαν και τα επίπεδα του ενδοκυττάρου σιδήρου. Ο προσδιορισμός των επιπέδων του ενδοκυττάρου σιδήρου έγινε σε φθορισμόμετρο εξετάζοντας την αύξηση του φθορισμού της χρωστικής ουσίας καλσεΐνης μετά από την προσθήκη του ισχυρού σιδηροδεσμευτικού μορίου SIH. Παρατηρήθηκε ότι σε H1299 κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε χαμηλή πυκνότητα απουσία τετρακυκλίνης, η αύξηση του φθορισμού της καλσεΐνης ήταν περίπου 2.2 φορές μεγαλύτερη από αυτή κυττάρων που καλλιεργήθηκαν παρουσία τετρακυκλίνης γεγονός που υποδήλωνε ότι τα κύτταρα που υπερεκφράζαν την IRP1_{C437S} είχαν περίπου 2.2 φορές υψηλότερα επίπεδα ενδοκυττάρου σιδήρου (σχήμα 32). Όταν όμως τα ίδια κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε υψηλή πυκνότητα τότε δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα του ενδοκυττάρου σιδήρου ανεξάρτητα της απουσίας ή της παρουσία τετρακυκλίνης (σχήμα 32). Τα αποτελέσματα των σχημάτων 31 και 32 υποδηλώνουν ότι η ευαισθησία των κυττάρων στο H₂O₂

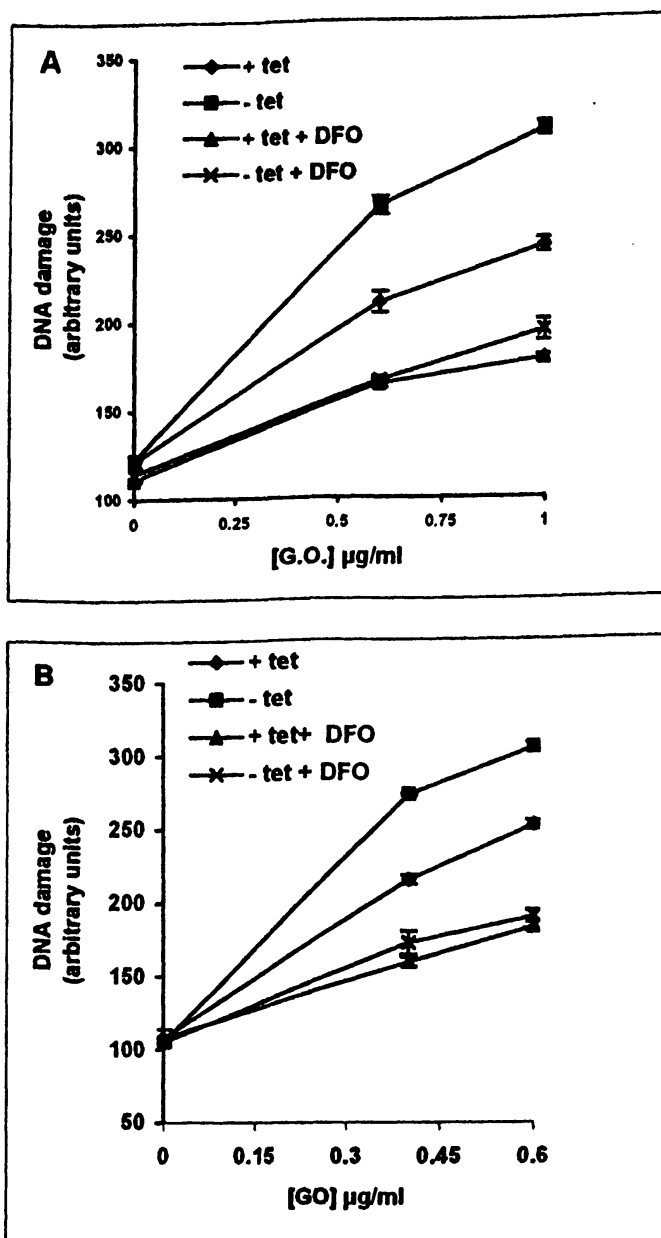




Σχήμα 31: Πρόκληση βλαβών στο DNA κυττάρων που υπερεκφράζουν την *IRP1_{C437S}*, μετά από έκθεση σε H_2O_2 . Κύτταρα H1299 (A, B) και MCF7 (Γ, Δ) τα οποία είχαν διαμολυνθεί με την *IRP1_{C437S}*, καλλιεργήθηκαν σε χαμηλή πυκνότητα (3×10^4 ανά 2 cm^2) (A, Γ) ή υψηλή πυκνότητα (8×10^4 ανά 2 cm^2) (B, Δ) για 48 ώρες απουσία (-■-) ή παρουσία (-◆-) 2 μg/ml τετρακυκλίνης. Στη συνέχεια, τα κύτταρα εκτέθηκαν για 10 λεπτά σε φρέσκο καλλιεργητικό υλικό το οποίο περιείχε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις οξειδάσης της γλυκόζης. Μετά το πέρας της έκθεσης σε H_2O_2 , τα κύτταρα συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση και η βλάβη του DNA προσδιορίστηκε με την τεχνική comet assay. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο τριών διαφορετικών μετρήσεων \pm SD.



Σχήμα 32: Εκτίμηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου σιδήρου κύτταρα που υπερεκφράζουν την IRP1_{C437S}. Κύτταρα H1299, τα οποία είχαν διαμολυνθεί με την IRP1_{C437S}, καλλιεργήθηκαν σε χαμηλή πυκνότητα (3×10^4 ανά 2 cm^2) ή υψηλή πυκνότητα (8×10^4 ανά 2 cm^2) για 48 ώρες παρουσία (λευκές στήλες) ή απουσία (γκρι στήλες) 2 $\mu\text{g/ml}$ τετρακυκλίνης. Στη συνέχεια, το καλλιεργητικό υλικό απομακρύνθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά με διάλυμα καλσεΐνης (0.15 μM καλσεΐνης, 1 mg/ml BSA, 20 mM HEPES, pH 7.3 σε PBS) στους 37 °C. Με το πέρας της επώασης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση και τα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου εκτιμήθηκαν σε φθορισμόμετρο (HITACHI, F2500) από την αύξηση του φθορισμού της καλσεΐνης μετά από προσθήκη 11 μM του ισχυρού σιδηροδεσμευτικού μορίου SIH. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο τριπλών μετρήσεων \pm SD.



Σχήμα 33: Ο ρόλος της δεσφериοξαμίνης στην προστασία του DNA κυττάρων που υπερεκφράζουν την $IRP1_{C437S}$, από το H_2O_2 . Κύτταρα H1299 (A) και MCF-7 (B) (3×10^4 ανά 2 cm^2) τα οποία είχαν διαμολυνθεί με την $IRP1_{C437S}$ καλλιεργήθηκαν απουσία (-■-), (-x-) ή παρουσία (-◆-), (-▲-) 2 µg/ml τετρακυκλίνης για 48 ώρες. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις οξειδάσης της γλυκόζης για 10 λεπτά απουσία (-■-), (-◆-) ή παρουσία (-x-), (-▲-) 1 mM δεσφериοξαμίνης η οποία προστέθηκε 60 λεπτά πριν την έκθεση σε H_2O_2 . Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση και η βλάβη του DNA εκτιμήθηκε με την τεχνική comet assay. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο τριπλών μετρήσεων \pm SD:



οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου σιδήρου η οποία προκαλείται από την υπερέκφραση της IRP1_{C437S}. Προεπώαση των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε χαμηλή πυκνότητα με δεσφεριοξαμίνη πριν από την έκθεση τους σε H₂O₂ μείωσε τη βλάβη του DNA στα ίδια επίπεδα ανεξάρτητα της απουσίας ή της παρουσίας τετρακυκλίνης (σχήμα 33). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η δέσμευση των ιόντων σιδήρου από τη δεσφεριοξαμίνη στα ενδοσωμάτια και τα λυσοσωμάτια επηρέασε με κάποιο τρόπο τα επίπεδα του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου όλου του κυττάρου και μείωσε την ευαισθησία τους στο H₂O₂. Θα μπορούσε να υποθέσει κανείς βασιζόμενος στις παραπάνω παρατηρήσεις ότι τα ενδοσωμάτια και τα λυσοσωμάτια αποτελούν μέρος κάποιου μηχανισμού ρύθμισης των επιπέδων του ενδοκυττάριου σιδήρου και ότι η παρουσία της δεσφεριοξαμίνης σε αυτά διακόπτει το μηχανισμό αυτό μειώνοντας τα οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα σιδήρου σε όλο το κύτταρο.

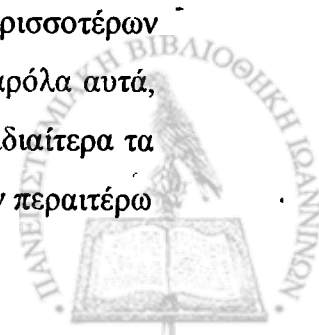
3.6.5 Επιπτώσεις στην απόπτωση

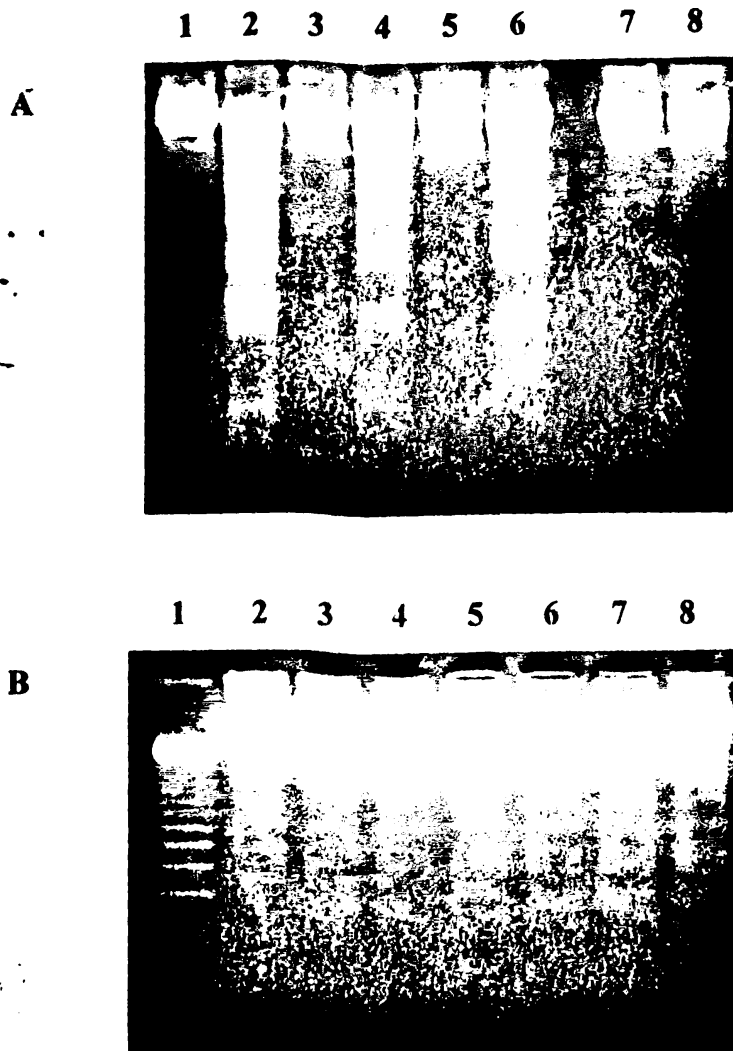
Επειδή σε προηγούμενα κεφάλαια παρατηρήθηκε ότι η δεσφεριοξαμίνη προστατεύει το κυτταρικό DNA από το H₂O₂ θεωρήθηκε λογικό να εξεταστεί εάν θα ήταν ικανή να προστατεύσει και από την απόπτωση που προκαλείται από το H₂O₂.

Έκθεση Jurkat κυττάρων σε 250 μM H₂O₂ για 6 ώρες οδήγησε στο σχηματισμό του χαρακτηριστικού laddering το οποίο υποδηλώνει σχάση του DNA σε τμήματα πολλαπλάσια των 180-200 ζευγών βάσεων, δηλαδή τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (σχήμα 34A διαδρομή 2). Προεπώαση με δεσφεριοξαμίνη σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100 μM ανέστειλε τελείως την απόπτωση (διαδρομή 8) υποδηλώνοντας την εμπλοκή των ιόντων σιδήρου στους μηχανισμούς πρόκλησης απόπτωσης από το H₂O₂. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, 500, 1000 και 5000 μM η δεσφεριοξαμίνη προκαλούσε από μόνη της απόπτωση (σχήμα 34B).

3.6.6 Ο ρόλος των ιόντων σιδήρου των λυσοσωματίων στην μείωση του μεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν το σημείο σύγκλισης των περισσότερων αποπτωτικών δρόμων που ενεργοποιούνται από διάφορα ερεθίσματα. Παρόλα αυτά, οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί ενεργοποίησης των δρόμων αυτών και ιδιαίτερα τα βήματα πριν τα μιτοχόνδρια, παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι και χρίζουν περαιτέρω





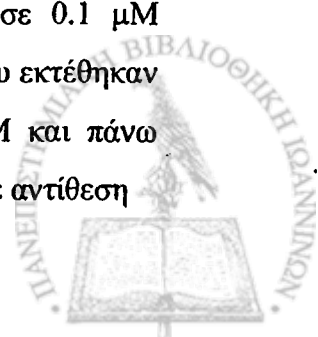
Σχήμα 34: Δεσφериοξαμίνη και απόπτωση. (A) Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 κύτταρα ανά ml) προεπώαστηκαν για 60 λεπτά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δεσφериοξαμίνης και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε 250 μM H_2O_2 για έξι ώρες. Διαδρομή 1: κύτταρα μάρτυρες, διαδρομή 2: κύτταρα που εκτέθηκαν σε H_2O_2 , διαδρομές 3, 5 και 7: 50, 100 και 250 μM δεσφериοξαμίνης αντίστοιχα. Διαδρομές 4, 6 και 8: 250 μM H_2O_2 υπό την παρουσία 50, 100 και 250 μM δεσφериοξαμίνης αντίστοιχα. (B) Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 κύτταρα ανά ml) εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφериοξαμίνης. Διαδρομή 1: Πρότυπα μοριακά βάρη, Διαδρομή 2: Κύτταρα μάρτυρες, Διαδρομές 3-8: Κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία 50, 100, 250, 500, 1000 και 5000 μM δεσφериοξαμίνης αντίστοιχα. Έξι ώρες μετά την προσθήκη του H_2O_2 (A), ή της δεσφериοξαμίνης (B) τα κύτταρα συλλέχθηκαν και το κυτταρικό DNA απομονώθηκε και ηλεκτοφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Τα ίδια πειράματα επαναλήφθηκαν δύο ακόμα φορές με τα ίδια περίπου αποτελέσματα.

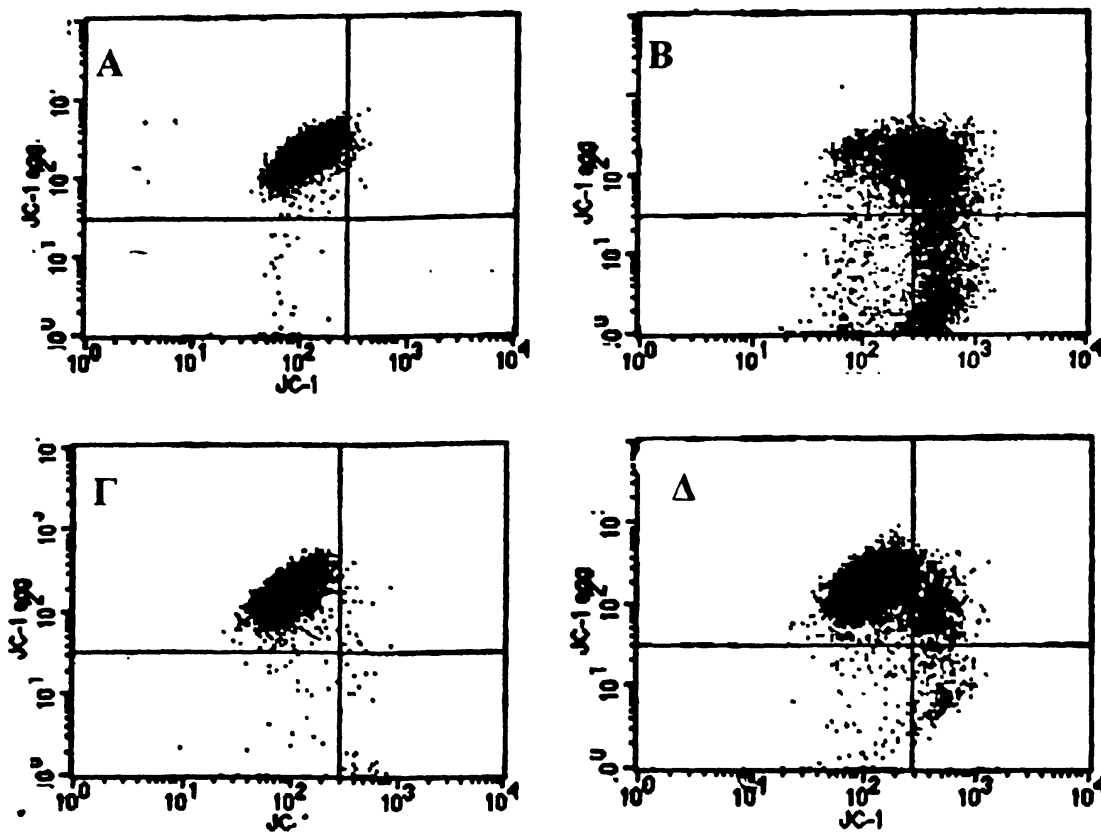


διερεύνησης. Στο πείραμα του σχήματος 35 εκτιμήθηκαν οι επιπτώσεις στο μεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων μετά από έκθεση Jurkat κυττάρων σε H_2O_2 . Το μεμβρανικό δυναμικό προσδιορίστηκε σε κυτταρόμετρο ροής εξετάζοντας την αλλαγή του φθορισμού της χρωστικής JC-1. Παρατηρήθηκε ότι έκθεση κυττάρων για 5 ώρες σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 (προσθήκη 0.1 $\mu\text{g/ml}$ οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να δημιουργεί 2 μM H_2O_2 ανά λεπτό) οδήγησε σε μείωση του μεμβρανικού δυναμικού όπως υποδηλώνει η μετατόπιση του κυτταρικού πληθυσμού σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (σχήματα 35A και 35B). Προεπώαση με δεσφεριοξαμίνη, η οποία όπως προαναφέρθηκε δεσμεύει ιόντα σιδήρου στα ενδοσωμάτια και τα λυσοσωμάτια αφενός δεν επηρέασε το μεμβρανικό δυναμικό από μόνη της, αφετέρου ανέστειλε τη μείωση του δυναμικού που προκαλεί η έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 (σχήματα 35Γ και 35Δ). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει την εμπλοκή των ιόντων σιδήρου των ενδοσωματίων και των λυσοσωματίων στους μηχανισμούς που οδηγούν στην μείωση του μεμβρανικού δυναμικού από το H_2O_2 . Σε αντίθεση με την επικρατούσα άποψη που θεωρεί τα μιτοχόνδρια ως τον πρωταρχικό στόχο της προαποπτωτικής δράσης του H_2O_2 τα αποτελέσματα των παραγράφων 3.6.5 και 3.6.6 υποδηλώνουν ότι η αποπτωτική δράση του H_2O_2 οφείλεται αρχικά στην αλληλεπίδραση του με τα οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα σιδήρου τα οποία ευρίσκονται στα ενδοσωμάτια και τα λυσοσωμάτια. Αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής είναι ο σχηματισμός δραστικών παραγόντων όπως οι $\cdot\text{OH}$ οι οποίες προκαλούν βλάβες στη μεμβράνη των οργανιδίων αυτών και στη συνέχεια με κάποιο άγνωστο μέχρι στιγμής μηχανισμό προκαλείται βλάβη στα μιτοχόνδρια και απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων από αυτά.

3.6.7 Ο ρόλος της δεσφεριοξαμίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

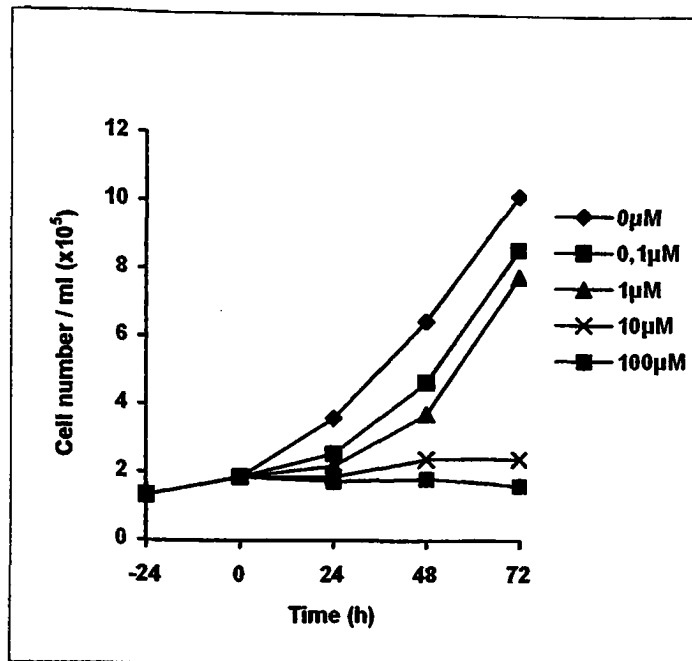
Εκτός των επιπτώσεων που περιγράφηκαν στα παραπάνω πειράματα, έκθεση κυττάρων σε δεσφεριοξαμίνη έδειξε ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση. Κύτταρα HeLa που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις δεσφεριοξαμίνης από 0.1 έως 100 μM έδειξαν μία δοσο-εξαρτώμενη αναστολή του πολλαπλασιασμού τους. Μία μικρή αναστολή παρατηρήθηκε αρχικά στα κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν σε 0.1 μM δεσφεριοξαμίνης και η αναστολή αυτή ήταν μεγαλύτερη στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε 1 μM δεσφεριοξαμίνης ενώ συγκεντρώσεις δεσφεριοξαμίνης 10 μM και πάνω ανέστειλαν ολοκληρωτικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (σχήμα 36). Σε αντίθεση





Σχήμα 35: Ο ρόλος της δεσφεριοξαμίνης στην προστασία των μιτοχονδρίων σε κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2 . Κύτταρα Jurkat (1.5×10^6 κύτταρα ανά ml) καλλιεργήθηκαν απουσία (Α και Β) ή παρουσία (Γ και Δ) 1 mM δεσφεριοξαμίνης για 2 ώρες και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν για 5 επιπλέον ώρες απουσία (Α και Γ) ή παρουσία (Β και Δ) 0.1 $\mu\text{g/ml}$ οξειδάσης της γλυκόζης (ικανή να δημιουργεί 2 μM H_2O_2 ανά λεπτό). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και στη συνέχεια επώαστηκαν για 15 λεπτά στους 37°C με 0.3 ml διαλύματος χρώσης (1 $\mu\text{g/ml}$ JC-1 σε PBS). Ο πράσινος (JC-1) και κόκκινος (JC-1 aggregates) φθορισμός του JC-1 μετρήθηκε σε κυτταρόμετρο ροής FACScan Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA) ενώ η καταγραφή και ανάλυση του έγινε με το πρόγραμμα CellQuest. Υψηλή ένταση κόκκινου φθορισμού υποδηλώνει κανονικό μεμβρανικό δυναμικό ενώ χαμηλή ένταση κόκκινου φθορισμού και παράλληλα υψηλή πράσινου φθορισμού υποδηλώνει μείωση του μεμβρανικού δυναμικού. Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε δύο ακόμα φορές με τα ίδια αποτελέσματα.



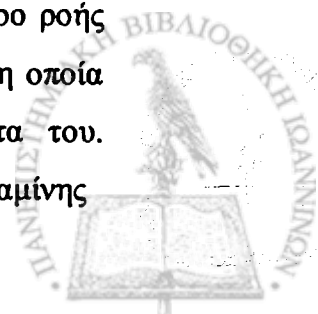


Σχήμα 36: Η επίδραση της δεσφεριοξαμίνης στην ανάπτυξη των κυττάρων. Κύτταρα HeLa (4×10^5 ανά φρεάτιο πλακιδίου 6 θέσεων) καλλιεργήθηκαν στις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας για 24 ώρες προκειμένου να προσκολληθούν στον πυθμένα του πλακιδίου. Στο χρονικό σημείο 0 το καλλιεργητικό υλικό αντικαταστάθηκε από φρέσκο που περιείχε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις δεσφεριοξαμίνης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβανόταν κάθε 24 ώρες ενώ ο αριθμός των κυττάρων προσδιοριζόταν σε αιματοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer. Το πείραμα αυτό είναι αντιπροσωπευτικό τριών διαφορετικών πειραμάτων με τα ίδια αποτελέσματα.

με τα κύτταρα Jurkat, στα οποία προηγουμένως παρατηρήθηκε ότι η έκθεση τους σε δεσφεριοξαμίνη κάτω από ορισμένες συνθήκες τα οδηγεί στην απόπτωση, τα κύτταρα HeLa φαίνεται ότι ήταν πιο ανθεκτικά μιας και σε καμία περίπτωση κατά τη διάρκεια των 72 ωρών δεν παρατηρήθηκε εμφανής τοξικότητα και θάνατος των κυττάρων με νέκρωση ή με απόπτωση (σχήμα 37). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι η δέσμευση των ιόντων σιδήρου αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων HeLa χωρίς να επηρεάζει τη βιωσιμότητα τους τουλάχιστον στις συγκεκριμένες συνθήκες.

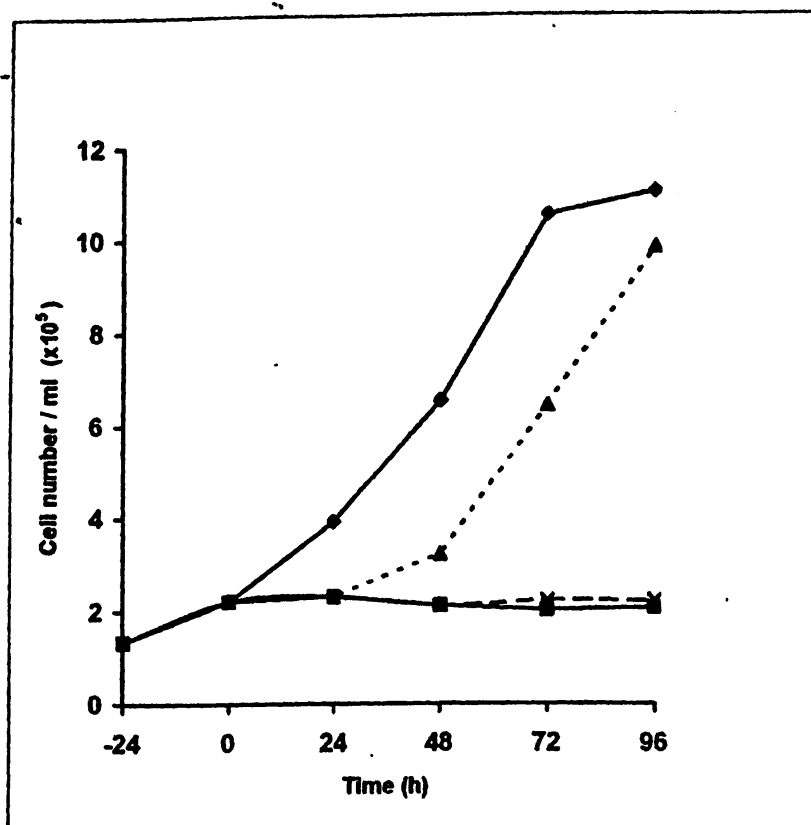
Απομάκρυνση της δεσφεριοξαμίνης με αλλαγή του καλλιεργητικού υλικού 24 ώρες μετά την αρχική της προσθήκη είχε σαν αποτέλεσμα την επανάκτηση της ικανότητας των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται ακριβώς όπως και οι μάρτυρες. Όταν όμως, τα κύτταρα εκτέθηκαν για 48 ώρες σε δεσφεριοξαμίνη και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν χωρίς αυτή δεν παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού τους υποδηλώνοντας μία μη αντιστρεπτή αναστολή της ικανότητας των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται (σχήμα 38).

Στο σχήμα 39 φαίνεται ότι τα κύτταρα μάρτυρες καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος είχαν φυσιολογική μορφολογία και με την πάροδο του χρόνου κάλυπταν όλο και μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του ταπητίου (σχήματα 39A, 39B και 39Γ). Αντίθετα με τους μάρτυρες, η μορφολογία των κυττάρων που εκτέθηκαν σε 100 μM δεσφεριοξαμίνης για 24, 48 και 72 ώρες ήταν μεγεθυσμένη και πεπλατυσμένη με σταδιακά αυξανόμενο μέγεθος που συνήθως συναντάται στο φαινότυπο γηρασμένων κυττάρων (senescence cells), ενώ και η πυκνότητα των κυττάρων παρέμενε αμετάβλητη (σχήματα 39Δ, 39Ε και 39Ζ). Όταν όμως η δεσφεριοξαμίνη απομακρύνθηκε 24 ώρες μετά την αρχική της προσθήκη και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν χωρίς αυτή για επιπλέον 24 ώρες, η μορφολογία τους πλέον έμοιαζε με αυτή των κυττάρων μαρτύρων ενώ αυξήθηκε και η πυκνότητα τους υποδηλώνοντας την επανάκτηση της ικανότητας των κυττάρων αυτών να πολλαπλασιάζονται (σχήμα 39Η). Αντίθετα με την παραπάνω περίπτωση, η παρουσία της δεσφεριοξαμίνης στην κυτταρική καλλιέργεια για 48 ώρες είχε μη αντιστρεπτές επιπτώσεις τόσο στη μορφολογία όσο και στην ανάπτυξη των κυττάρων (σχήμα 39Θ). Στο επόμενο πείραμα εξετάστηκε σε ποίο σημείο του κυτταρικού κύκλου επιδρά η δεσφεριοξαμίνη. Ο κυτταρικός κύκλος μελετήθηκε σε κυτταρόμετρο ροής εξετάζοντας την ένταση φθορισμού της χρωστικής ιωδιούχο προπίδιο (PI), η οποία συνδέεται στο πυρηνικό DNA και φθορίζει ανάλογα με την ποσότητα του. Παρατηρήθηκε ότι η έκθεση των κυττάρων για 24 ώρες σε 100 μM δεσφεριοξαμίνης

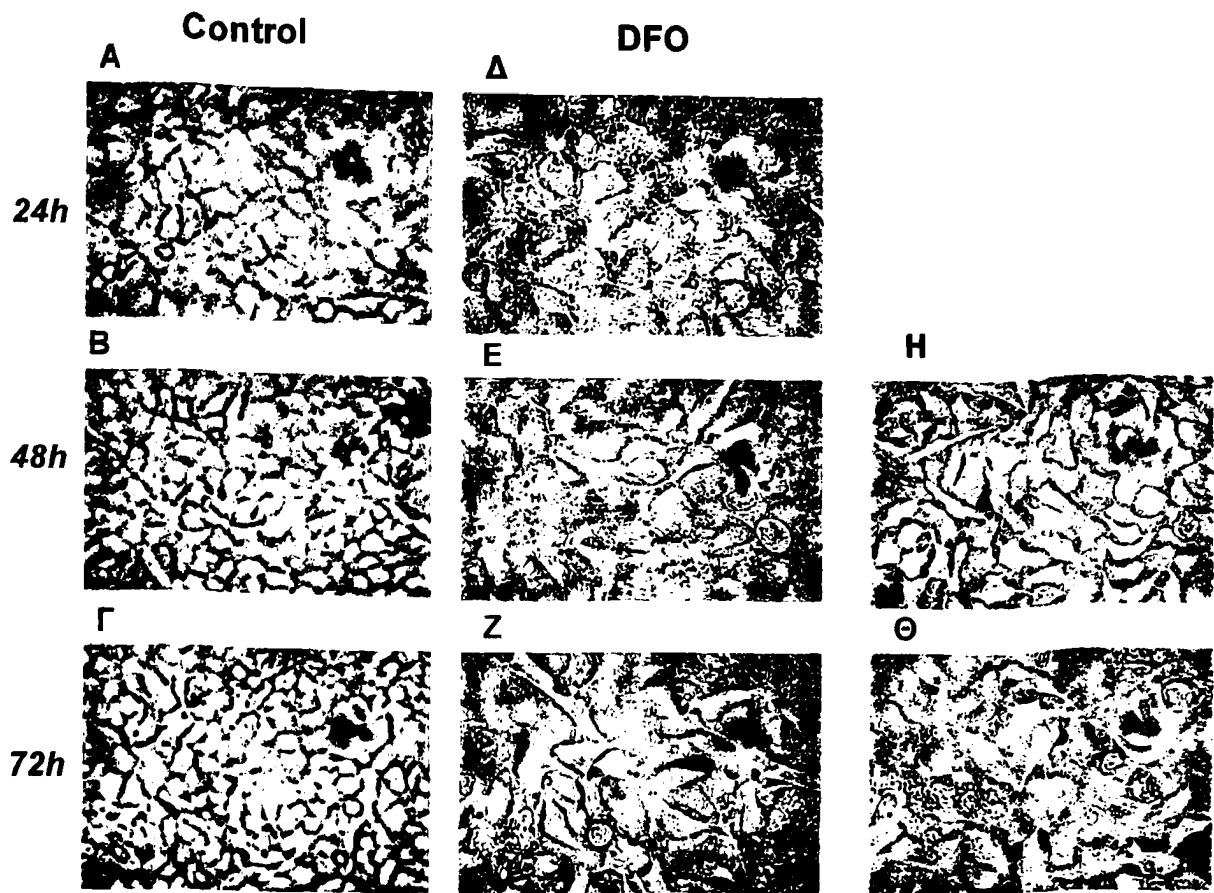




Σχήμα 37: Εξέταση της πρόκλησης ενδοουκλεοσωμικών σχάσεων στο DNA κυττάρων *HeLa* από δεσφεριοξαμίνη. Οι συνθήκες καλλιέργειας και έκθεσης σε δεσφεριοξαμίνη ήταν οι ίδιες με αυτές του σχήματος 25. Στα αντίστοιχα χρονικά σημεία τα κύτταρα συλλέχθηκαν με θρυσινοποίηση και το κυτταρικό DNA απομονώθηκε και ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Οι διαδρομές 1 έως 5 αντιστοιχούν σε δείγματα τα οποία επώαστηκαν με 0, 0.1, 1, 10 και 100 μM δεσφεριοξαμίνης για 24 ώρες, ενώ οι διαδρομές 6-10 και 11-15 αντιστοιχούν σε επώσεις 48 και 72 ωρών αντίστοιχα.



Σχήμα 38: Εξέταση της αντιστρεψιμότητας της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τη δεσφεριοξαμίνη. Κύτταρα HeLa (4×10^5 ανά φρεάτιο πλακιδίου 6 θέσεων) καλλιεργήθηκαν στις συνήθειες συνθήκες καλλιέργειας για 24 ώρες προκειμένου να προσκολληθούν στον πυθμένα του πλακιδίου. Στο χρονικό σημείο 0 τα κύτταρα εκτέθηκαν σε $100 \mu\text{M}$ δεσφεριοξαμίνης η οποία απομακρύνθηκε μετά από 24 (--▲--) ή 48 (--x--). Στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα τα κύτταρα συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση και ο αριθμός τους προσδιορίστηκε σε αιματοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer. Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε 2 ακόμη φορές με τα ίδια αποτελέσματα.

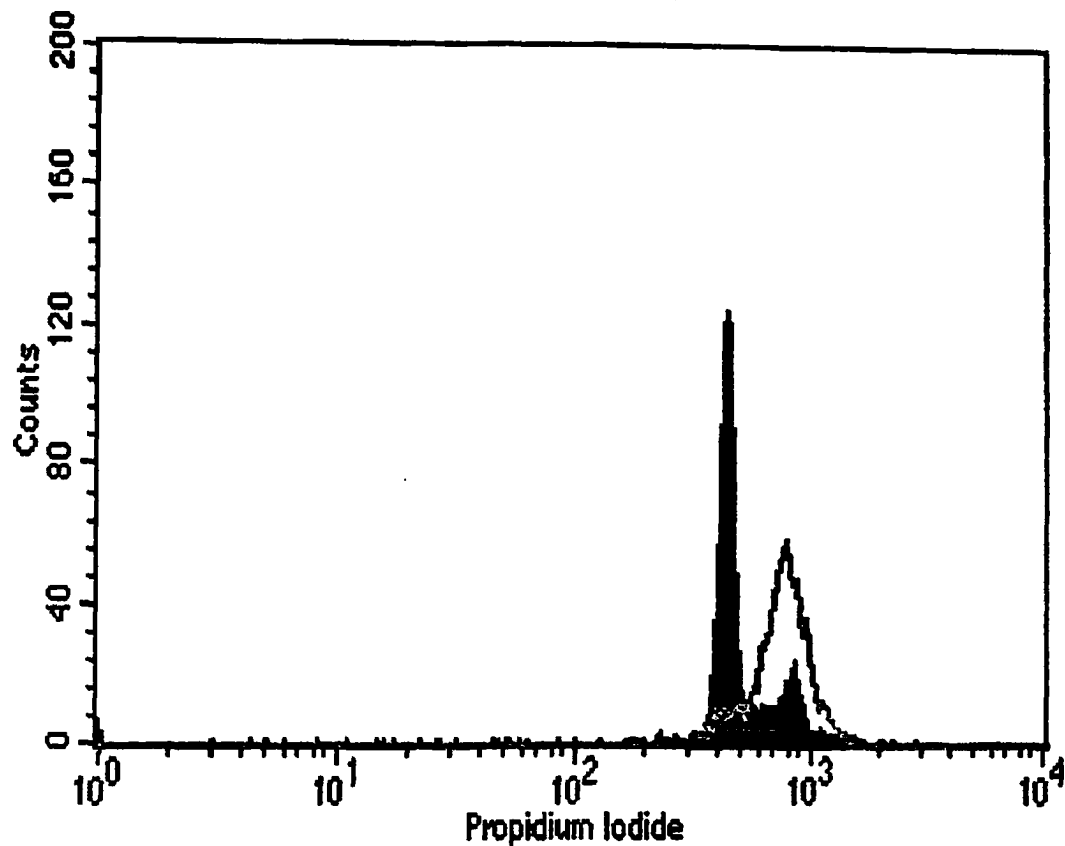


Σχήμα 39: Επίδραση της δεσφεριοξαμίνης στην μορφολογία των κυττάρων. Κύτταρα HeLa (4×10^5 ανά φρεάτιο πλακιδίου 6 θέσεων) καλλιεργήθηκαν αρχικά για 24 ώρες στις συνθήκες συνθήκες καλλιέργειας ώστε να προσκολληθούν στον πυθμένα του πλακιδίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία (Α, Β, Γ) ή παρουσία (Δ, Ε, Ζ) 100 μM δεσφεριοξαμίνης για 24, 48 και 72 ώρες αντίστοιχα. Σε ορισμένες περιπτώσεις η δεσφεριοξαμίνη απομακρύνθηκε 24 ώρες (Η) ή 48 ώρες (Θ) μετά την αρχική της προσθήκη. Στα αντίστοιχα χρονικά σημεία τα κύτταρα εξετάστηκαν σε μικροσκόπιο ορατού φωτός και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή κάμερα (COHU digital camera).

οδήγησε στη συσσώρευση σχεδόν όλων των κυττάρων στη φάση G2/M τη στιγμή που σε κύτταρα μάρτυρες το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού κατανέμεται στη φάση G0/G1 και μόνο ένα μικρό του μέρος στις φάσεις S και G2/M (σχήμα 40). Η παρατήρηση-αυτή είναι αντίθεση με την επικρατούσα άποψη που θεωρεί ότι η έκθεση των κυττάρων σε σιδηροδεσμευτικούς παράγοντες αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G0/G1, κυρίως λόγω της αναστολής του ενζύμου αναγωγάσης των ριβονουκλεοτιδίων (ribonucleotide reductase, RR), το οποίο απαιτεί την ύπαρξη ενός ατόμου σιδήρου στο ενεργό του κέντρο προκειμένου να δράσει (Le et al., 2002).

Προκειμένου να εξεταστεί κατά πόσο η αντιπολλαπλασιαστική δράση της δεσφериοξαμίνης εξαρτάται από την πρόσληψη της μέσω ενδοκύτωσης, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν παροδικά μόνο με φορέα έκφρασης ή με φορέα που περιείχε την σημειακά μεταλλαγμένη και ανενεργή πρωτεΐνη Rab5 (S34N). Εικοσιτέσσερις ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε φρέσκο καλλιεργητικό υλικό που περιείχε 100 μM δεσφериοξαμίνης και ο πολλαπλασιασμός τους εξετάστηκε 24 ώρες αργότερα προσδιορίζοντας τον αριθμό των κυττάρων. Αύξηση στον αριθμό των κυττάρων (86,8%) παρατηρήθηκε σε καλλιέργειες που διαμολύνθηκαν μόνο με φορέα έκφρασης και ο πολλαπλασιασμός ανεστάλλει εντελώς με την ταυτόχρονη παρουσία της δεσφериοξαμίνης. Η ανάπτυξη των κυττάρων που υπερέκφραζαν την Rab5 (S34N) ήταν κάπως πιο αργή (αύξηση 66% σε 24 ώρες) και η ταυτόχρονη παρουσία δεσφериοξαμίνης στην περίπτωση αυτή ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μόνο κατά 32%. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι το ποσοστό διαμόλυνσης ήταν περίπου 70% όπως εκτιμήθηκε σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με την green fluorescence protein (GFP) κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Τα αποτελέσματα αυτά χωρίς αμφιβολία υποδεικνύουν ότι η ενδοκύτωση της δεσφериοξαμίνης και κατά συνέπεια η δέσμευση των ιόντων σιδήρου των ενδοσωματίων και των λυσοσωματίων είναι υπεύθυνη για την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.





Σχήμα 40: Επίδραση της δεσφериοξαμίνης στο κυτταρικό κύκλο. Κύτταρα HeLa (4×10^5 ανά φρεάτιο πλακιδίου 6 θέσεων) καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες στις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων και στη συνέχεια το καλλιεργητικό τους υλικό αντικαταστάθηκε από φρέσκο που περιείχε 100 μM δεσφериοξαμίνης. Εικοσιτέσσερις ώρες αργότερα τα κύτταρα συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση και η κατανομή των κυττάρων στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση του DNA με ιωδιούχο προπίδιο (PI) όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Ο φθορισμός του PI καταγράφηκε και αναλύθηκε με το πρόγραμμα CellQuest. Το σκούρο ιστόγραμμα αναπαριστά το φθορισμό κυττάρων απουσία δεσφериοξαμίνης ενώ η γκριζα γραμμή το φθορισμό κυττάρων μετά από έκθεση σε 100 μM δεσφериοξαμίνης για 24 ώρες.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Πρόκληση βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H_2O_2

Είναι γνωστό ότι η έκθεση κυττάρων σε διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες οδηγεί στην πρόκληση βλαβών σχεδόν σε όλα τα κυτταρικά συστατικά όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, τα σάκχαρα και το DNA. Ειδικότερα το DNA, αν και θεωρείται το σημαντικότερο από τα κυτταρικά συστατικά μιας και μεταφέρει τις απαραίτητες πληροφορίες για τη διατήρηση και την εξέλιξη της ζωής, είναι ιδιαίτερα ευάλωτο στη δράση των παραγόντων αυτών. Σε προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο μας έχει παρατηρηθεί ότι η έκθεση ανθρωπίνων κυττάρων σε διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες οδηγεί στην δημιουργία σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA όπως αυτές ανιχνεύτηκαν με την τεχνική comet assay (Barbouti et al., 2001, Barbouti et al., 2002, Doulias et al., 2001, Panayiotidis et al., 1999, Tselepis et al., 2001). Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε διεξοδικά ο μηχανισμός με τον οποίο το μόριο αυτό προκαλεί βλάβες στο κυτταρικό DNA. Παρατηρήθηκε ότι η έκθεση διαφορετικών τύπων κυττάρων σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 οδήγησε στην πρόκληση σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA (σχήμα 13) γεγονός που υποδηλώνει την ευαισθησία του πυρηνικού DNA έναντι του H_2O_2 . Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι οι επιπτώσεις της έκθεσης σε H_2O_2 δεν είναι οι ίδιες για όλα τα είδη κυττάρων. Σε κάποια κύτταρα οι βλάβες εμφανίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 ενώ σε κάποια άλλα τα ίδια επίπεδα βλάβης παρατηρούνται σε αρκετά υψηλότερες συγκεντρώσεις. Είναι γνωστό ότι όταν το H_2O_2 προστίθεται εξωγενώς σε καλλιέργεια κυττάρων εξαιτίας της ικανότητας του να διαχέεται σχεδόν ελεύθερα διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών εισέρχεται γρήγορα στο εσωτερικό του κυττάρου όπου ένα μέρος του γρήγορα απομακρύνεται εξαιτίας της δράσης ενζύμων όπως καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και μέλη της οικογένειας των περόξυ-ρεδοξινών. Κατά συνέπεια, θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι η ευαισθησία ορισμένων κυττάρων στο H_2O_2 σε σχέση με κάποια άλλα πιθανά αντικατοπτρίζει τη διαφορά στην ικανότητα καταβολισμού του H_2O_2 μεταξύ των κυττάρων αυτών.

Ένα άλλο σημαντικό ερώτημα αφορά τη φύση της βλάβης που προκαλείται από την έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 . Είναι γνωστό ότι το H_2O_2 δεν αντιδρά άμεσα με το κυτταρικό DNA αλλά τη γενεοτοξική του δράση την οφείλει κυρίως στο σχηματισμό $\cdot OH$, οι οποίες στη συνέχεια αντιδρούν τόσο με τις βάσεις του DNA όσο



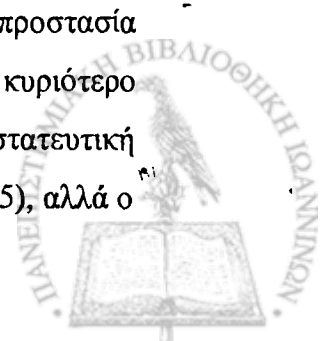
και με τη δεοξυριβόζη και τις πυρινηκές πρωτεΐνες. Η προσβολή των βάσεων του DNA από τις $\cdot\text{OH}$ οδηγεί στην οξειδωτική τροποποίηση τους ενώ η αντίδραση των $\cdot\text{OH}$ με τη δεοξυριβόζη συνήθως οδηγεί στην πρόκληση σχάσης στη μία αλυσίδα του DNA. Όπως περιγράφηκε στην Εισαγωγή, η οξειδωτική τροποποίηση των βάσεων του DNA ενεργοποιεί τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, οι οποίοι αναγνωρίζουν και απομακρύνουν την κατεστραμμένη βάση είτε απομακρύνοντας το τμήμα του DNA το οποίο περιέχει τη βάση αυτή είτε απομακρύνοντας μόνο την βάση που έχει υποστεί βλάβη. Η μεν απομάκρυνση ενός τμήματος του DNA δημιουργεί σχάση στη μία αλυσίδα του DNA ενώ η απομάκρυνση μίας βάσεως δημιουργεί μία απουρινική ή απυριμιδινική θέση. Η comet assay στη μορφή της που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή εκτός από τις σχάσεις στη μία αλυσίδα του DNA ανιχνεύει και τις απουρινικές και απυριμιδινικές θέσεις του DNA μιας και οι θέσεις αυτές σε αλκαλικές συνθήκες μετατρέπονται σε σχάσεις. Κατά συνέπεια οι βλάβες που ανιχνεύονται μετά την έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 μπορεί να είναι είτε άμεσες (σχάση του δεσμού δεοξυριβόζης και φωσφορικού οξέως) είτε το επακόλουθο της δράσης των επιδιορθωτικών μηχανισμών του κυττάρου.

4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την πρόκληση βλαβών στο DNA

4.2.1 Αντιοξειδωτικές ενώσεις

Τα αντιοξειδωτικά μόρια χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να αποδίδουν ηλεκτρόνια και με τον τρόπο αυτό να εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες και να αναστέλλουν την τοξική τους δράση. Επειδή η πρόκληση βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H_2O_2 αποδίδεται στη δράση των $\cdot\text{OH}$ εξετάστηκε εάν η παρουσία αντιοξειδωτικών παραγόντων θα ήταν ικανή να αναστείλει το φαινόμενο αυτό.

Παρατηρήθηκε ότι τα α-λιποϊκό οξύ, Trolox και N-ακέτυλοκυστεΐνη αν και είναι ικανοί εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών δεν παρείχαν καμία προστασία (σχήμα 14) γεγονός που υποδηλώνει ότι τη στιγμή του σχηματισμού των $\cdot\text{OH}$ δεν βρίσκονται στο σημείο που σχηματίζονται προκειμένου να τις εκκαθαρίσουν. Μικρή προστασία παρατηρήθηκε στην περίπτωση της α-τοκοφερόλης, η οποία αποτελεί τον κυριότερο εκκαθαριστή των ελευθέρων ριζών στις μεμβράνες των κυττάρων. Η προστατευτική δράση της α-τοκοφερόλης έχει περιγραφεί και από άλλους (Leist et al., 1995), αλλά ο

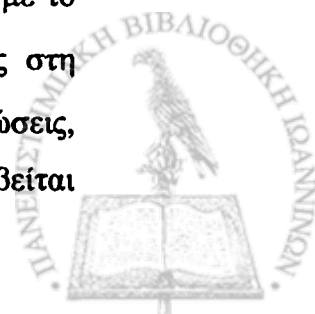


μηχανισμός της δράσης αυτής δεν είναι γνωστός και χρίζει διερεύνησης. Η περιορισμένη προστατευτική δράση του ασκορβικού οξέως σε σχέση με το οξειδωμένο παράγωγο του το δευδροασκορβικό οξύ μπορεί να εξηγηθεί με βάση το γεγονός ότι σε αντίθεση με το ασκορβικό οξύ τα κύτταρα διαθέτουν συστήματα με τα οποία προδλαμβάνουν ενδοκυττάρια το δευδροασκορβικό οξύ (Bergsten et al., 1990, May et al., 1995, Welch et al., 1995, Vera et al., 1993). Στο εσωτερικό του κυττάρου, το δευδροασκορβικό οξύ ανάγεται εύκολα προς ασκορβικό οξύ με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια συσσώρευση του. Η προστατευτική του δράση μπορεί να αποδοθεί στη μερική αναστολή του μονοπατιού που οδηγεί στη βλάβη του DNA.

Η ανύπαρκτη ή η περιορισμένη προστατευτική δράση των κλασικών αντιοξειδωτικών μορίων φαίνεται να υποδηλώνει ότι για την προστασία του κυτταρικού DNA το προς εξέταση μόριο θα πρέπει να έχει κάποιες άλλες ιδιότητες, οι οποίες δεν φαίνεται να σχετίζονται με την ικανότητα εκκαθάρισης των ελευθέρων ριζών.

4.2.2 Ιόντα μετάλλων μετάπτωσης

Σε αντίθεση με τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες, όλες οι σιδηροδεσμευτικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν έδειξαν σημαντική προστασία (σχήματα 17-21). Γενικά, τα σιδηροδεσμευτικά μόρια έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ιόντα σιδήρου κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αναστέλλεται η αλληλεπίδραση των ιόντων αυτών με το H_2O_2 . Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως για την αποτελεσματική σύνδεση του σιδήρου χρειάζονται περισσότερα του ενός μόρια του δεσμευτή γεγονός που εξαρτάται από τον αριθμό των διαθέσιμων θέσεων πρόσδεσης του σιδήρου στο μόριο του δεσμευτή. Για παράδειγμα οι 1,10- φαινανθρολίνη και 2,2' dipyridyl δεσμεύουν το σίδηρο με αναλογία 3 μόρια δεσμευτή προς 1 μόριο μετάλλου, ενώ για τη δεσφериοξαμίνη και το DTPA η αναλογία είναι 1:1 (Halliwell and Gutteridge, 1999). Παρόμοια δράση δεσμευτών σιδήρου έχει παρατηρηθεί προηγουμένως και από άλλες ερευνητικές ομάδες (Mello Filho et al., 1984a, Meneghini, 1997) και αποδόθηκε στην ικανότητα των μορίων αυτών να δεσμεύουν οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα σιδήρου που ευρίσκονται συνδεδεμένα επάνω στο DNA. Τα ιόντα αυτά αλληλεπιδρούν με το H_2O_2 και καταλύουν το σχηματισμό $\cdot OH$ πολύ κοντά στο DNA, οι οποίες στη συνέχεια αντιδρούν με αυτό και του προκαλούν βλάβες. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όμως, υπάρχουν ενδείξεις που δείχνουν ότι η δράση του H_2O_2 δεν διαμεσολαβείται



από τα ιόντα σιδήρου που είναι συνδεδεμένα στο DNA και κατά συνέπεια αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των ιόντων σιδήρου που διαμεσολαβούν στην τοξική δράση του H_2O_2 . Σημαντικό ρόλο στην διαλεύκανση της ενδοκυττάριας θέσης των ιόντων σιδήρου παίζουν σιδηροδεσμευτικά μόρια τα οποία έχουν κατάλληλες ιδιότητες που τους επιτρέπουν να συσσωρεύονται και να δεσμεύουν ιόντα σιδήρου σε συγκεκριμένα ενδοκυττάρια οργανίδια. Εξετάζοντας στη συνέχεια τις επιπτώσεις της δέσμευσης των ιόντων αυτών στην ικανότητα του H_2O_2 να προκαλεί βλάβες στο κυτταρικό DNA, είναι δυνατή η εκτίμηση του ρόλου των ιόντων σιδήρου των οργανιδίων αυτών στην παραπάνω διαδικασία.

Από τις σιδηροδεσμευτικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή τα 1,10-φαινανθρολίνη, 2,2' dipyridyl, SIH, TPEN και HBED είναι λιπόφιλα μόρια τα οποία διαχέονται ελεύθερα διαμέσου της εξωτερικής και των άλλων μεμβρανών του κυττάρου. Η ικανότητα των μορίων αυτών να έχουν πρόσβαση σε όλα τα ενδοκυττάρια οργανίδια τους προσδίδει μεν την ικανότητα να δεσμεύουν ιόντα σιδήρου σε όλο το κύτταρο αλλά ταυτόχρονα τα καθιστά μη χρήσιμα ως εργαλεία για τον εντοπισμό της ενδοκυττάριας θέσης των ιόντων σιδήρου που διαμεσολαβούν την τοξική δράση του H_2O_2 .

Αντίθετα με τις παραπάνω ενώσεις, τα BPS, δεσφεριοξαμίνη και DTPA είναι υδρόφιλα και σχετικά μεγάλα σε μέγεθος μόρια με συνέπεια να μην είναι ικανά να διαχέονται ελεύθερα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Σε αντίθεση με τα λιπόφιλα μόρια τα οποία προστατεύουν σημαντικά μετά από 15 λεπτά προεπώασης, η προστατευτική δράση των παραπάνω μορίων αυξάνεται σταδιακά σε συνάρτηση με την αύξηση του χρόνου προεπώασης τους με τα κύτταρα. Η εξάρτηση της προστατευτικής δράσης των μορίων αυτών από το χρόνο προεπώασης πιθανά υποδηλώνει ότι τα μόρια αυτά προσλαμβάνονται από τα κύτταρα με κάποιο άλλο μηχανισμό, ίσως μέσω ενδοκύτωσης. Επιπλέον ενδείξεις που ενισχύουν την υπόθεση της πρόσληψης των μορίων αυτών μέσω ενδοκύτωσης είναι το γεγονός ότι η προστασία τους σε αντίθεση με την αντίστοιχη των λιπόφιλων μορίων, αναστέλλεται στους 4 °C. Στη θερμοκρασία αυτή αναστέλλονται οι διαδικασίες που απαιτούν ενζυμική δράση και είναι γνωστό ότι η διαδικασία της ενδοκύτωσης απαιτεί και αυτή την δράση ενζύμων.

Σε αντίθεση με τους δεσμευτές σιδήρου, οι δεσμευτές χαλκού δεν ήταν σε καμία περίπτωση ικανοί να προστατέψουν το κυτταρικό DNA από την τοξική δράση του H_2O_2 (σχήματα 22 και 23) γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ιόντα χαλκού δεν



εμπλέκονται στους μηχανισμούς δράσης του H_2O_2 . Παρόλο που υπάρχουν μελέτες οι οποίες αναφέρουν ότι τα ιόντα χαλκού είναι πιο ικανά από τα ιόντα σιδήρου να διαμεσολαβούν την πρόκληση βλαβών του DNA από το H_2O_2 (Burkitt et al., 1994, Chevion, 1988, Halliwell and Gutteridge, 1999, Llyod et al., 1999, Oikawa et al., 1998, Stohs et al., 1995) θα πρέπει να σημειωθεί ότι στις συγκεκριμένες μελέτες η διαμεσολαβητική δράση των ιόντων χαλκού εξετάζεται σε απομονωμένο DNA και όχι σε ανέπαφα κύτταρα. Σε αντίθεση με τις μελέτες αυτές, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν καθαρά ότι σε ανέπαφα κύτταρα η αλληλεπίδραση αυτή δεν είναι εφικτή επειδή ενδοκυττάρια δεν φαίνεται να υπάρχει “ελεύθερος χαλκός” (Rae et al., 1999).

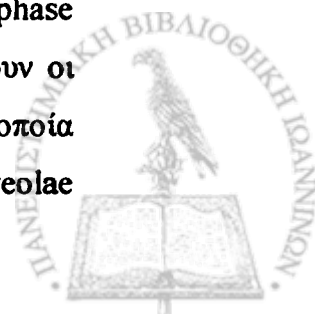
Συμπερασματικά προκύπτει ότι τα ιόντα σιδήρου αλλά όχι του χαλκού παίζουν κεντρικό ρόλο στους μοριακούς μηχανισμούς πρόκλησης βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H_2O_2 .

4.3 Δεσφериοξαμίνη

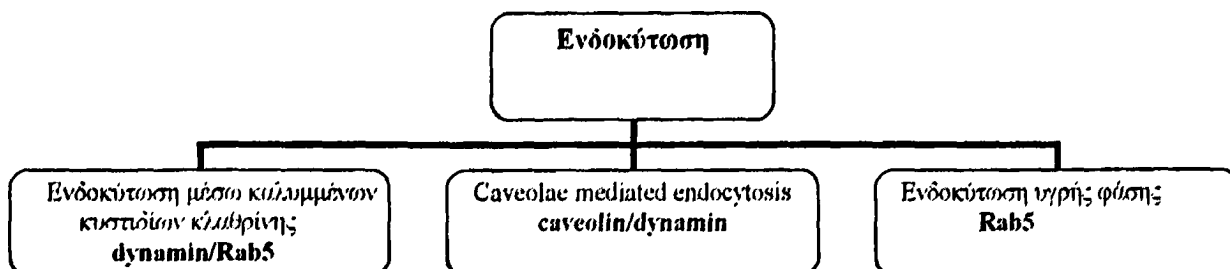
4.3.1 Προστασία του κυτταρικού DNA.

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η ενδοκύτωση αποτελεί το μηχανισμό της ενδοκυττάριας πρόσληψης των μορίων που δεν διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη εξετάστηκε λεπτομερώς ο μηχανισμός πρόσληψης ενός από τα παραπάνω μόρια, της δεσφериοξαμίνης.

Η ενδοκύτωση είναι μία διαδικασία με την οποία τα κύτταρα προσλαμβάνουν διάφορα μόρια από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Κατά τη διαδικασία αυτή, κυστίδια που περιέχουν το κατάλληλο φορτίο, αποκόπτονται από την κυτταρική μεμβράνη και μεταφέρουν το περιεχόμενό τους στα διάφορα ενδοκυττάρια οργανίδια. Όμως, ανάλογα με το φορτίο που πρέπει να μεταφερθεί υπάρχουν διάφορα μονοπάτια ενδοκύτωσης, τα οποία εκκινούν από διαφορετικό σημείο της κυτταρικής μεμβράνης και σε ορισμένες περιπτώσεις καταλήγουν και σε διαφορετικά ενδοκυττάρια οργανίδια (Robinson et al., 1996). Τα πιο καλά μελετημένα από αυτά είναι η ενδοκύτωση μέσω καλυμμένων κυστιδίων κλαθρίνης (clathrin coated vesicles), η ενδοκύτωση μέσω caveolae και η ενδοκύτωση υγρής φάσης (fluid phase endocytosis). Έχει αναφερθεί ότι ρυθμιστικό ρόλο στα μονοπάτια αυτά παίζουν οι πρωτεΐνες dynamin και Rab5. Η πρωτεΐνη dynamin είναι μια GTP-αση η οποία εμπλέκεται στην ενδοκύτωση μέσω καλυμμένων κυστιδίων κλαθρίνης και caveolae

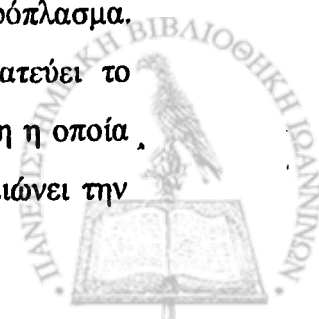


(Damke et al., 1994, Henley et al., 1998). Η πρωτεΐνη Rab5 είναι μία μικρή GTP-άση, η οποία παίζει ρόλο τόσο στην ενδοκύτωση μέσω καλυμμένων κυστιδίων κλαθρίνης (Bucci et al., 1992) όσο και στην ενδοκύτωση υγρής φάσης (McLauchlan et al., 1998) (σχήμα 42).



Σχήμα 41: Τα διάφορα μονοπάτια της ενδοκύτωσης καθώς και πρωτεΐνες που επηρεάζουν τη λειτουργία τους.

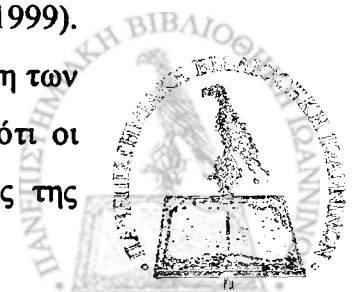
Προκειμένου λοιπόν να μελετηθεί ο ακριβής μηχανισμός πρόσληψης της δεσφεριοξαμίνης, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με κατάλληλα γονίδια ώστε να υπερεκφράζουν μεταλλαγμένες επικρατούσες μορφές των πρωτεϊνών dynamin και Rab5 και στη συνέχεια εξετάστηκαν οι επιπτώσεις της υπερέκφρασης αυτής στην προστατευτική δράση της δεσφεριοξαμίνης. Η παρατήρηση ότι η υπερέκφραση των μεταλλαγμένων μορφών της Rab5 αλλά όχι της dynamin, επηρεάζει την προστατευτική δράση της δεσφεριοξαμίνης (σχήμα 27) δείχνει καθαρά ότι το μόριο αυτό προσλαμβάνεται από τα κύτταρα μέσω ενδοκύτωσης υγρής φάσης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η δεσφεριοξαμίνη είναι υδρόφιλο μόριο και έχει σχετικά υψηλό μοριακό βάρος, φαίνεται λογικό ότι το μόριο αυτό δεν θα διαπερνά τις μεμβράνες των ενδοσωματίων και των λυσοσωματίων και συνεπώς θα δρα δεσμεύοντας αποκλειστικά τα ιόντα σιδήρου των οργανιδίων αυτών (Cable et al., 1999). Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη των Kurz και συνεργατών η δεσφεριοξαμίνη, MB 600 Da, συνδέθηκε με άμυλο με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μεγάλου μορίου (περίπου 75 kDa), το οποίο είναι πρακτικά αδύνατο να διαχέεται ελεύθερα διαμέσου της μεμβράνης των λυσοσωματίων και να ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Παρατηρήθηκε ότι το μόριο αυτό είχε την ίδια ικανότητα να προστατεύει το κυτταρικό DNA από τη δράση του H₂O₂ σε σχέση με την δεσφεριοξαμίνη η οποία δεν είχε συνδεθεί με άμυλο (Kurz et al., 2003). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την



υπόθεση ότι η δράση της δεσφериοξαμίνης οφείλεται στην αποκλειστική δέσμευση των ιόντων σιδήρου των ενδοσωματίων και των λυσοσωματίων.

4.3.2 Λυσοσωμάτια και μοριακοί μηχανισμοί πρόκλησης βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H_2O_2 .

Σε αντίθεση με την επικρατούσα άποψη που θεωρεί ότι το H_2O_2 αλληλεπιδρά με τα ιόντα σιδήρου που βρίσκονται συνδεδεμένα στο DNA, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν καθαρά ότι η αρχική αλληλεπίδραση μεταξύ του H_2O_2 και των ιόντων σιδήρου λαμβάνει χώρα στα λυσοσωμάτια και στη συνέχεια προκαλείται η βλάβη στο DNA με κάποιο άγνωστο μέχρι στιγμής μηχανισμό. Τα λυσοσωμάτια είναι οργανίδια πλούσια σε σίδηρο διότι αποτελούν το σημείο κατακερματισμού τόσο των πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο αλλά και ολόκληρων οργανιδίων όπως τα μιτοχόνδρια (Ollinger et al., 1995, Yu et al., 2003, Person et al., 2003). Το χαμηλό pH που υπάρχει στο εσωτερικό των λυσοσωματίων διευκολύνει την αλληλεπίδραση μεταξύ του H_2O_2 και των ιόντων σιδήρου (Schafer et al., 2000), ενώ η κυστεΐνη που υπάρχει σε υψηλή συγκέντρωση στα λυσοσωμάτια διευκολύνει την αναγωγή του σιδήρου στη μορφή Fe^{2+} και τον καθιστά ικανό να καταλύει άμεσα αντιδράσεις τύπου Fenton. Εάν στα παραπάνω προστεθεί και το ότι τα λυσοσωμάτια δεν περιέχουν τα ένζυμα μεταβολισμού του H_2O_2 υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και καταλάση (Antunes and Cadenas, 2000), εύλογα συμπεραίνει κανείς ότι τα οργανίδια αυτά είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στη δράση του H_2O_2 . Η ευαισθησία των λυσοσωματίων έναντι του H_2O_2 επιβεβαιώθηκε από τα πειράματα στα οποία εξετάστηκε η σταθερότητα των οργανιδίων αυτών μετά από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 . Παρατηρήθηκε ότι οι βλάβες της μεμβράνης των λυσοσωματίων ήταν ορατές μετά από 15 λεπτά έκθεσης σε H_2O_2 και αυξήθηκαν σημαντικά με την πάροδο του χρόνου (σχήμα 29). Όμως, η παρουσία της δεσφериοξαμίνης στα λυσοσωμάτια προστάτευσε τις μεμβράνες τους από τη δράση του H_2O_2 (σχήμα 30) γεγονός που υποδηλώνει την άμεση εμπλοκή των ιόντων σιδήρου των οργανιδίων αυτών στους μηχανισμούς που οδηγούν στην αποσταθεροποίησή τους από το H_2O_2 . Σε πρόσφατη πειραματική μελέτη έχει παρατηρηθεί ότι οι σχάσεις στο κυτταρικό DNA ανιχνεύονται από τα πρώτα 2 λεπτά μετά την έκθεση των κυττάρων στο H_2O_2 (Panayiotidis et al., 1999). Συγκρίνοντας το χρόνο αυτό με τον αντίστοιχο που απαιτείται για την ανίχνευση των βλαβών της μεμβράνης των λυσοσωματίων (περίπου 15 λεπτά) προκύπτει ότι οι βλάβες του DNA εμφανίζονται χρονικά πολύ πιο σύντομα από τις βλάβες της



μεμβράνης των λυσοσωματίων. Η διαφορά αυτή μπορεί να εξηγηθεί εάν θεωρηθεί ότι μετά την αρχική αλληλεπίδραση του H_2O_2 με τα ιόντα σιδήρου των λυσοσωματίων προκαλούνται μικρές βλάβες στη μεμβράνη των οργανιδίων αυτών ή σε εξειδικευμένες αντλίες οι οποίες επιτρέπουν τη διαφυγή στο κυτταρόπλασμα μικρών σε μέγεθος μορίων όπως H^+ , Ca^{2+} και Fe^{2+} τα οποία υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις στα λυσοσωμάτια. Τα μόρια αυτά στη συνέχεια παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην πρόκληση βλαβών του DNA από το H_2O_2 . Για παράδειγμα τα ιόντα σιδήρου που ελευθερώνονται πιθανά θα μεταναστεύουν στον πυρήνα και θα προσδένονται στο DNA καταλύοντας το σχηματισμό $\cdot OH$ επάνω σε αυτό. Από την άλλη, η αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα πιθανά ενεργοποιεί ασβέστιο-εξαρτώμενες ενδονουκλεάσες οι οποίες στη συνέχεια σχάζουν το DNA. Όμως, η δέσμευση των ιόντων σιδήρου των λυσοσωματίων από τη δεσφεριοξαμίνη αποτρέπει την αλληλεπίδραση των ιόντων αυτών με το H_2O_2 και κατά συνέπεια και την αποσταθεροποίηση των οργανιδίων αυτών. Στην περίπτωση αυτή η απελευθέρωση μικρών μορίων (H^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+}) αναστέλλεται ή είναι σημαντικά περιορισμένη και για το λόγο αυτό αναστέλλεται σημαντικά και η βλάβη του DNA. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι τα λυσοσωμάτια αποτελούν τμήμα ενός μηχανισμού ανακύκλωσης του σιδήρου από την φερριτίνη και τις άλλες μεταλλοπρωτεΐνες στις νέο-συντιθέμενες πρωτεΐνες που περιέχουν σίδηρο (Radisky et al., 1998, Kwok et al., 2004). Κατά τη διαδικασία αυτή, η φερριτίνη καθώς και μεταλλοπρωτεΐνες προσλαμβάνονται στο εσωτερικό των λυσοσωματίων με μία διαδικασία που ονομάζεται αυτοφαγοκύτωση, και στη συνέχεια κατακερματίζονται με τη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων που υπάρχουν στα λυσοσωμάτια. Ο σίδηρος που ελευθερώνεται μεταφέρεται στη συνέχεια στο κυτταρόπλασμα και χρησιμοποιείται για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Όμως, στην περίπτωση που η δεσφεριοξαμίνη είναι παρούσα στα λυσοσωμάτια θα δεσμεύει το σίδηρο που θα ελευθερώνεται και κατά συνέπεια με την πάροδο του χρόνου τα κύτταρα θα “αδειάζουν” από σίδηρο ο οποίος θα συσσωρεύεται στα λυσοσωμάτια. Αυτό θα έχει ως συνέπεια τη μείωση των επιπέδων του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου με αποτέλεσμα να μειώνεται και η ικανότητα του H_2O_2 να προκαλεί βλάβες στο DNA. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από τη δράση της δεσφεριοξαμίνης στα κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν την IRP1_{C437S}. Όπως προαναφέρθηκε η υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής σε κύτταρα που καλλιεργούνται σε χαμηλή πυκνότητα, διαταράσσει



την ομοιοστασία του ενδοκυττάρου σιδήρου με αποτέλεσμα στα κύτταρα αυτά να ανιχνεύονται υπερδιπλάσια επίπεδα οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου σε σχέση με αυτά που δεν την υπερεκφράζουν (σχήμα 32). Συνέπεια αυτού είναι ότι και το DNA των κυττάρων αυτών να είναι πιο ευαίσθητο στο H_2O_2 (σχήματα 31Α και 31Γ). Όμως, παρουσία δεσφериοξαμίνης, η ευαισθησία των παραπάνω κυττάρων αναστέλλεται γεγονός που υποδηλώνει ότι η δέσμευση των ιόντων σιδήρου των ενδοσωματίων και των λυσοσωματίων από τη δεσφериοξαμίνη μειώνει με κάποιο τρόπο τα επίπεδα του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου όλου του κυττάρου.

4.3.3 Δεσφериοξαμίνη και κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Εκτός των επιπτώσεων που περιγράφηκαν στις προηγούμενες ενότητες παρατηρήθηκε ότι η έκθεση των κυττάρων σε δεσφериοξαμίνη έδειξε ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση. Κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφериοξαμίνης έδειξαν μία δοσο-εξαρτώμενη αναστολή του πολλαπλασιασμού τους (σχήμα 36) χωρίς όμως να επηρεάζεται η βιωσιμότητά τους (σχήμα 37). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι η απομάκρυνση της δεσφериοξαμίνης 24 ώρες μετά την αρχική της προσθήκη επιτρέπει στα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν εκ νέου ενώ η απομάκρυνση της 48 ώρες μετά την αρχική της προσθήκη δεν οδηγεί στην εκ νέου ανάπτυξη των κυττάρων (σχήμα 38). Στην τελευταία περίπτωση η μορφολογία των κυττάρων είναι μεγεθυμένη και πεπλατυσμένη, χαρακτηριστικά που συναντώνται στο φαινότυπο των γηρασμένων κυττάρων (σχήμα 39). Παρόμοια δράση της δεσφериοξαμίνης περιγράφηκε πρόσφατα και σε Chang κύτταρα τα οποία είναι αθανατοποιημένα κύτταρα του ήπατος (Yoon et al., 2002). Όμως, αντίθετα με τα κύτταρα HeLa όπου η έκθεση σε δεσφериοξαμίνη τα συσσωρεύει στη φάση G2/M (σχήμα 40), η έκθεση των κυττάρων Chang σε δεσφериοξαμίνη διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1. Στην περίπτωση των κυττάρων Chang η δράση της δεσφериοξαμίνης είναι ανεξάρτητη του p53 αλλά διαμεσολαβείτε από το p27^{Kip1}. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η έκθεση κυττάρων νευροβλαστώματος σε δεσφериοξαμίνη μειώνει σημαντικά τα επίπεδα των mRNA και πρωτεΐνης του ογκογονιδίου N-myc, χωρίς να επηρεάζει την έκφραση άλλων σημαντικών γονιδίων για την ομοιοστασία των κυττάρων (Fan et al., 2001). Επιπλέον, η σύντομη απενεργοποίηση του ογκογονιδίου *myc* οδηγεί στην απώλεια του φαινότυπου των καρκινικών κυττάρων (Jain et al., 2002). Με βάση τα παραπάνω



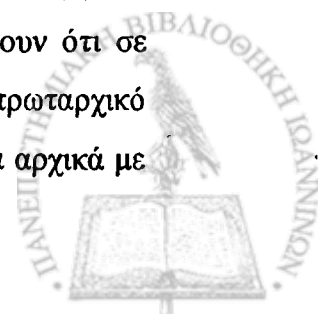
μπορεί να υποτεθεί ότι η αντιπολλαπλασιαστική δράση της δεσφεριοξαμίνης στα κύτταρα HeLa πιθανά σχετίζεται με την απενεργοποίηση του *myc* το οποίο είναι απαραίτητο για την διατήρηση του φαινότυπου των καρκινικών κυττάρων. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι έχει ήδη περιγραφεί η ικανότητα της δεσφεριοξαμίνης καθώς και άλλων δεσμευτών σιδήρου να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, ενώ ορισμένοι από αυτούς ήδη χρησιμοποιούνται ως κυτταροστατικά σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο (Abeyasinghe et al., 2001, Gao et al., 2001, Hoyes et al., 1992, Le et al., 2002, Renton et al., 1996). Όμως, σχεδόν σε όλες τις μελέτες αυτές η αντιπολλαπλασιαστική δράση των δεσμευτών σιδήρου αποδίδεται στην αναστολή του ενζύμου αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων (ribonucleotide reductase, RR) και κατά συνέπεια στην αναστολή της σύνθεσης του DNA.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει ότι ο σχεδιασμός και η χρήση σιδηροδεσμευτικών ενώσεων οι οποίες θα αναστέλλουν επιλεκτικά τα ογκογονιδια όπως το *myc* ίσως να αποτελέσουν ένα σημαντικό θεραπευτικό εργαλείο για την θεραπεία του καρκίνου.

4.3.4 Λυσοσωμάτια και απόπτωση

Εκτός της προστασίας του κυτταρικού DNA από το H_2O_2 και της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία της δεσφεριοξαμίνης ήταν ικανή να αναστείλει και την απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 (σχήμα 34). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την άμεση εμπλοκή των ιόντων σιδήρου στους μηχανισμούς πρόκλησης απόπτωσης από το H_2O_2 . Τα μιτοχόνδρια θεωρούνται ως το σημείο σύγκλισης σχεδόν όλων των αποπτωτικών οδών που ενεργοποιούνται από διάφορα ερεθίσματα, αν και οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί ενεργοποίησης των δρόμων αυτών και ιδιαίτερα τα βήματα πριν από τα μιτοχόνδρια παραμένουν εν πολλοίς άγνωστα.

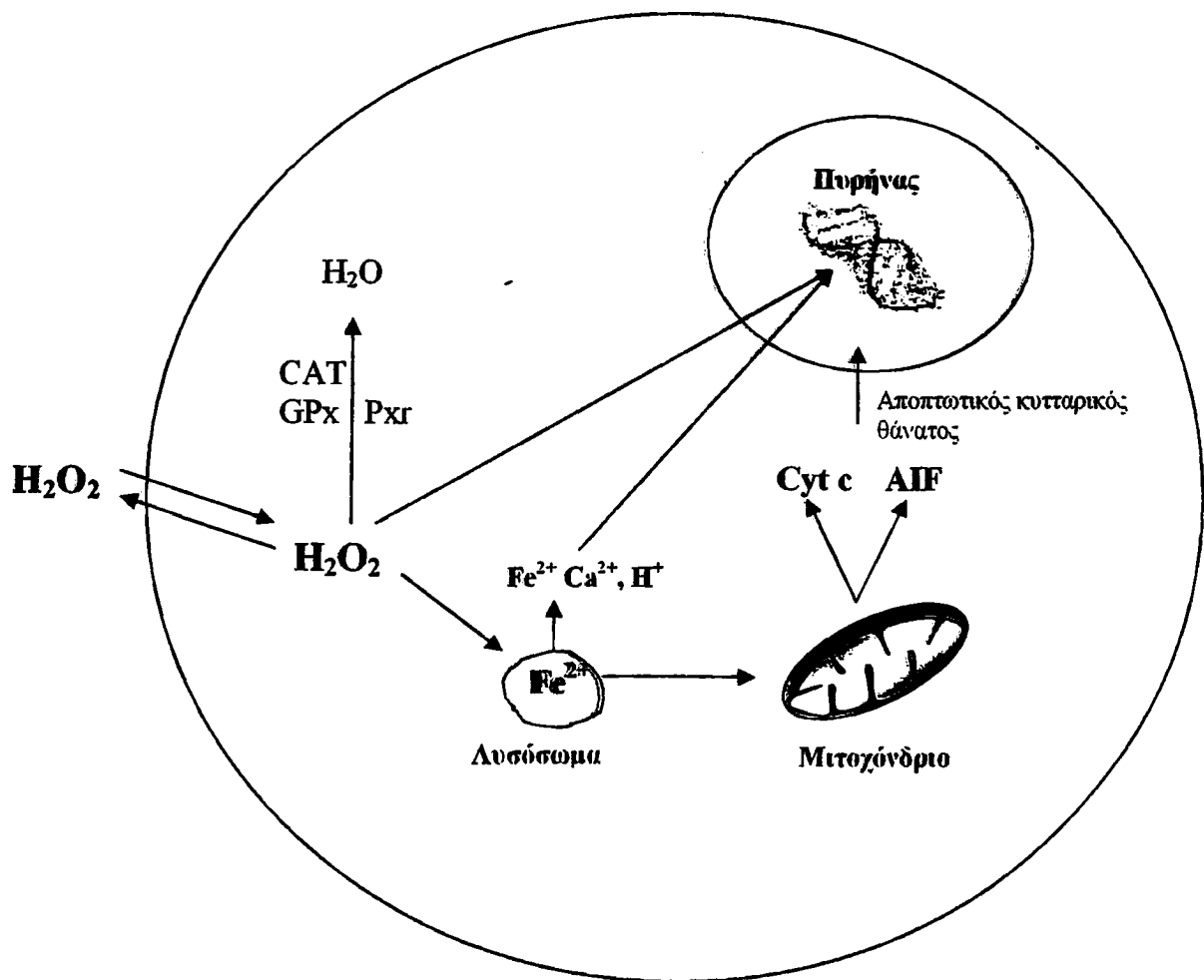
Έκθεση των κυττάρων Jurkat σε H_2O_2 προκάλεσε καταστροφή του μεμβρανικού δυναμικού ενώ η προεπάση των κυττάρων αυτών με δεσφεριοξαμίνη ανέστειλε και στην περίπτωση αυτή σε σημαντικό βαθμό τη δράση του H_2O_2 (σχήμα 35). Τα πειράματα της μελέτης αυτής (σχήματα 34 και 35) υποδηλώνουν ότι σε αντίθεση με την επικρατούσα άποψη που θεωρεί τα μιτοχόνδρια ως τον πρωταρχικό στόχο της προαποπτωτικής δράσης του H_2O_2 , το μόριο αυτό αλληλεπιδρά αρχικά με



τα ιόντα σιδήρου των ενδοσωματίων και λυσοσωματίων. Αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής είναι ο σχηματισμός $\cdot\text{OH}$, οι οποίες στη συνέχεια προκαλούν βλάβες στην μεμβράνη των λυσοσωματίων με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση των οργανιδίων αυτών (σχήμα 30). Έχει προταθεί ότι αποτέλεσμα της αποσταθεροποίησης των λυσοσωματίων είναι η απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα πρωτεολυτικών λυσοσωμικών ενζύμων όπως οι καθεψίνες τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ενεργοποιούν διάφορα μονοπάτια αποπτωτικού θανάτου. Έχει αναφερθεί ότι τα λυσοσωμικά ένζυμα προκαλούν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, είτε δρώντας άμεσα στα οργανίδια αυτά (Antunes et al., 2001, Li et al., 2000, Roberg et al., 1998, Roberg et al., 1999, Roberg, 2001, Zhao et al., 2001a, Zhao et al., 2001b) είτε ενεργοποιώντας την κυττατροπλασματική πρωτεΐνη Bid (Stoka et al., 2001), η οποία στη συνέχεια μεταναστεύει στα μιτοχόνδρια και διαμεσολαβεί την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Luo et al., 1998). Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα σηματοδοτεί μία αλληλουχία γεγονότων που τελικά οδηγούν στον αποπτωτικό θάνατο (Barbouti, 2004, Hu et al., 1999). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι τα λυσοσωμικά ένζυμα έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν απευθείας τις πρωτεϊνάσες κασπάσες οι οποίες όταν ενεργοποιούνται διαμεσολαβούν σε διάφορα αποπτωτικά μονοπάτια (Ishisaka et al., 1999, Katunuma et al., 2001, Katunuma et al., 1999, Zhou et al., 1997). Σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες, μία πολύ πρόσφατη μελέτη της ομάδας του Kroemer δείχνει ότι η απόπτωση που προκαλείται λόγω της αποσταθεροποίησης των λυσοσωματίων είναι ανεξάρτητη της δράσης των καθεψινών (Boya et al., 2003). Λαμβάνοντας υπόψη την τελευταία παρατήρηση φαίνεται πιθανό ότι κάποιος άλλος παράγοντας ο οποίος βρίσκεται στα λυσοσωμάτια είναι αυτός που διαφεύγει από τα οργανίδια αυτά και ενεργοποιεί την διαδικασία της απόπτωσης. Ένας τέτοιος παράγοντας θα μπορούσε να είναι ο σίδηρος. Σύμφωνα με το σενάριο αυτό η αρχική αλληλεπίδραση του H_2O_2 με τα ιόντα σιδήρου των λυσοσωματίων θα οδηγεί στο σχηματισμό $\cdot\text{OH}$ οι οποίες στη συνέχεια θα προκαλούν βλάβες στη μεμβράνη των οργανιδίων αυτών με επακόλουθο την απελευθέρωση ιόντων σιδήρου στο κυτταρόπλασμα. Τα ιόντα αυτά στη συνέχεια είναι πιθανό να συνδέονται χαλαρά στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων καταλύοντας έτσι το σχηματισμό $\cdot\text{OH}$ επάνω στα οργανίδια αυτά. Αποτέλεσμα του σχηματισμού των $\cdot\text{OH}$ θα είναι η πρόκληση βλαβών στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων και η επακόλουθη απελευθέρωση αποπτωτικών



πρωτεϊνών όπως το κυτόχρωμα c και ο AIF (Barbouti et al., 2002, Barbouti, 2004, Τεπορουλου et al. 2004). Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες αυτές θα ενεργοποιούν τα διάφορα αποπτωτικά μονοπάτια (Barbouti, 2004) (σχήμα 42). Αντίθετα, η παρουσία δεσφεριοξαμίνης στα λυσοσωμάτια πιθανά αποτρέπει την αρχική αλληλεπίδραση του H_2O_2 με τα ιόντα σιδήρου και αναστέλλει ή περιορίζει σημαντικά τον καταρράκτη των γεγονότων που οδηγούν στην απόπτωση.



Σχήμα 42: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού πρόκλησης βλαβών στο κυτταρικό DNA και απόπτωσης σε κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2 .

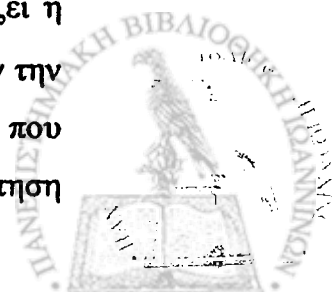


5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ρόλος σιδηροδεσμευτικών παραγόντων στους μοριακούς μηχανισμούς πρόκλησης βλαβών στο κυτταρικό DNA και απόπτωσης, σε κύτταρα που εκτίθενται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου.

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), ένα ενδιάμεσο μόριο της αναγωγής του οξυγόνου σε νερό, σχηματίζεται και απομακρύνεται συνεχώς σε όλα τα είδη κυττάρων ακόμα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει κατανοητό ότι χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 συμμετέχουν στα διάφορα μονοπάτια μεταγωγής του σήματος και κατά συνέπεια και σε σημαντικές φυσιολογικές διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις όμως το H_2O_2 μπορεί να προκαλεί βλάβες σε όλα τα κυτταρικά συστατικά όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο είτε με απόπτωση είτε με νέκρωση. Ειδικά το DNA, αν και είναι το βασικότερο από τα κυτταρικά συστατικά, είναι ιδιαίτερα ευάλωτο στην δράση του H_2O_2 . Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί πρόκλησης βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H_2O_2 παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι και χρίζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια διαλεύκανσης των μοριακών μηχανισμών πρόκλησης βλαβών στο DNA μετά από έκθεση κυττάρων σε συνεχώς παραγόμενο H_2O_2 . Παρατηρήθηκε ότι κλασικά αντιοξειδωτικά μόρια δεν παρείχαν καμία προστασία ενώ αυτά που προστάτευαν το έκαναν σε περιορισμένο βαθμό και υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Σε αντίθεση με τα αντιοξειδωτικά μόρια, σιδηροδεσμευτικές ενώσεις έδειξαν ισχυρή προστατευτική δράση, γεγονός που υποδηλώνει την άμεση εμπλοκή των ιόντων σιδήρου στους μηχανισμούς δράσης του H_2O_2 . Αντίθετα, οι ενώσεις που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν χαλκό δεν έδειξαν καμία προστασία παρόλο που τα ιόντα χαλκού έχουν επίσης την ικανότητα να καταλύουν το σχηματισμό $\cdot OH$ από το H_2O_2 . Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η δράση σιδηροδεσμευτικών ενώσεων που δεν έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη. Η προστασία από τα μόρια αυτά, σε αντίθεση με αυτά που διαχέονται ελεύθερα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, αυξάνεται σε συνάρτηση



τόσο της συγκέντρωσης όσο και του χρόνου προεπάσης με τα κύτταρα. Επιπλέον, η προστασία τους σε αντίθεση με την αντίστοιχη αυτών που διαχέονται ελεύθερα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, αναστέλλεται στους 4 °C γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενδοκυττάρια πρόσληψη τους γίνεται με μηχανισμό που απαιτεί ενζυμική δράση όπως είναι η ενδοκύτωση. Προκειμένου να εξεταστεί εάν η ενδοκύτωση αποτελεί το μηχανισμό πρόσληψης των μορίων αυτών, εξετάστηκε η πρόσληψη ενός από αυτά, της δεσφεριοξαμίνης. Για το σκοπό αυτό κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με κατάλληλα γονίδια ώστε να υπερεκφράζουν επικρατούσες μεταλλαγμένες μορφές των πρωτεϊνών *dynamitin* και *Rab5*, οι οποίες παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στα διάφορα μονοπάτια της ενδοκύτωσης. Η παρατήρηση ότι υπερέκφραση της *Rab5* αλλά όχι της *dynamitin* επηρεάζει την προστατευτική δράση της δεσφεριοξαμίνης υποδηλώνει ότι το μόριο αυτό προσλαμβάνεται από τα κύτταρα μέσω ενδοκύτωσης υγρής φάσης και δρα δεσμεύοντας τα οξειδοαναγωγικά ιόντα σιδήρου των ενδοσωματίων και των λυσοσωματίων. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η προεπάση των κυττάρων με δεσφεριοξαμίνη προστατεύει σημαντικά το DNA τους από το H₂O₂ υποδηλώνει τη σπουδαιότητα των οξειδοαναγωγικά ενεργών ιόντων σιδήρου των ενδοσωματίων και λυσοσωματίων στους μοριακούς μηχανισμούς πρόκλησης βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H₂O₂.

Εκτός της προστασίας του DNA, παρατηρήθηκε ότι η έκθεση των κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφεριοξαμίνης (από 0.1 έως 100 μM) ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με τρόπο που εξαρτάται από την ενδοκύτωση υγρής φάσης. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι η έκθεση των κυττάρων για 24 ώρες σε 100 μM δεσφεριοξαμίνης αναστέλλει παροδικά τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2/M, ενώ η έκθεση σε δεσφεριοξαμίνη για 48 ώρες προκαλεί μόνιμη αναστολή του κύκλου. Επίσης, η δεσφεριοξαμίνη ήταν ικανή να αναστέλλει τόσο τον σχηματισμό των ενδονουκλεοσωμικών σχάσεων όσο και την καταστροφή του μεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων μετά από έκθεση κυττάρων σε H₂O₂ γεγονός που υποδηλώνει την άμεση εμπλοκή των ιόντων σιδήρου των λυσοσωματίων και στους μοριακούς μηχανισμούς πρόκλησης απόπτωσης από το H₂O₂.

Συμπερασματικά φαίνεται ότι τα ιόντα σιδήρου των λυσοσωματίων παίζουν κεντρικό ρόλο στους μοριακούς μηχανισμούς πρόκλησης βλαβών στο κυτταρικό DNA και απόπτωσης σε κύτταρα που εκτίθενται σε H₂O₂.

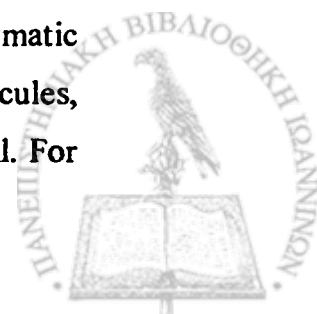


6. SUMMARY

Studies on the role of iron chelators in the molecular mechanisms of DNA damage and apoptosis, in cells exposed to hydrogen peroxide

Hydrogen peroxide (H_2O_2), an intermediate form of the reduction of oxygen to water, is continuously generated and removed in all cell types even under physiological conditions. At relatively low intracellular levels it has been proposed to play a crucial role in signal transduction pathways and therefore, to modulate basic cellular functions such as cell proliferation and differentiation. However, at higher concentrations, it can induce damage to all cellular components, including lipids, proteins and DNA with consequent cell death either by apoptosis or necrosis. Even though cellular DNA is the most important among cellular components, it seems to be especially sensitive to the action of H_2O_2 . Although extensively studied, the molecular mechanisms of H_2O_2 -induced DNA damage still remain unclear and need further investigation in order to be elucidated.

The present study was focused on the investigation of the molecular mechanisms of induction of DNA damage in cells exposed to continuously generated H_2O_2 . Classical antioxidants like lipoic acid (LA), N-acetyl-cysteine (NAC), trolox and ascorbic acid (AA) did not offer any protection, while α -tocopherol and dehydroascorbic acid (DHAA) only decreased the DNA damage slightly. In contrast to antioxidant molecules, iron chelators, were able to protect effectively cellular DNA, indicating the crucial role of iron ions on the molecular mechanisms of H_2O_2 -induced DNA damage. On the contrary, copper chelators did not show any protection, even though copper ions are more effective than iron ions to interact with H_2O_2 and catalyze the formation of $\cdot OH$. Of particular interest was the action of iron chelators which are unable to penetrate the cellular membrane. The protective effect of these molecules was dose- and pre-incubation time-dependent. Moreover, their protection was totally inhibited at 4 °C while the protection of membrane permeable chelators was not affected under the same conditions. These observations indicate that the uptake of membrane-impermeable molecules by cells may involve enzymatic activities. In order to examine if endocytosis was involved, one of these molecules, desferrioxamine, was used, and its uptake mechanism was investigated in detail. For



this purpose HeLa cells were transiently transfected with vectors encoding dominant mutants of dynamin and Rab5 proteins which are involved in the regulation of various routes of endocytosis. The observation that mutants overexpressing Rab5, but not dynamin, affected the protective effect of desferrioxamine indicates that this molecule is taken up by the cells by fluid phase endocytosis. Consequently, it is plausible to suggest that it exerts its effects by chelating “redox active iron” into endosomal and lysosomal cell compartments, which indicates the importance of endosomal/lysosomal redox active iron in this process.

Apart from its effects on protection of DNA, exposure of cells to desferrioxamine in a range of concentrations (0.1 to 100 μM) inhibited cell proliferation in a fluid phase endocytosis-dependent manner. Flow cytometric analysis of cells exposed to 100 μM desferrioxamine for 24 h showed that the cell cycle was transiently interrupted at the G₂/M phase, while treatment for 48 h led to permanent cell arrest. Desferrioxamine was also able to prevent both DNA fragmentation and the destruction of mitochondrial membrane potential in cells exposed to H₂O₂. This indicates that lysosomal iron may participate in the molecular mechanisms of H₂O₂-induced apoptosis.

Collectively, the results of the present study clearly show that iron ions located in endosomal/lysosomal cell compartments play crucial roles in the molecular mechanisms of induction of DNA damage and apoptosis in cells exposed to H₂O₂. However, further experimental efforts are needed for the clarification of the entire cascade of the consecutive steps involved in these mechanisms.



7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abeyasinghe, R.D.; Greene, B.T.; Haynes, R.; Willingham, M.C.; Turner, J.; Planalp, R.P.; Brechbiel, M.W.; Torti, F.M.; Torti, S.V. (2001). p53-independent apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator. *Carcinogenesis*, **22**: 1607-1614.

Ai, L.-S.; Chau, L.-Y. (1999). Post-transcriptional regulation of H-ferritin mRNA. Identification of a pyrimidine-rich sequence in the 3'-untranslated region associated with message stability in human monocytic TPH-1 cells. *J. Biol. Chem.*, **274**: 30209-30214.

Alnemri, E.; Livingston, D.J.; Nicholson, D.W.; Salvesen, G.; Thornberry, N.A.; Wong, W.W.; Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87**: 171.

Altman, S.A.; Zastawny, T.H.; Randers-Eichhorn, L.; Cacciuttolo, M.A.; Akman, S.A., Dizdaroglu, M.; Rao, G. (1995). Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. *Free Radic. Biol. Med.*, **19**: 897-902.

Alvarez, E.; Girones, N.; Davis, R.J. (1990). A point mutation in the cytoplasmic domain of the transferrin receptor inhibits endocytosis. *Biochem J.*, **267**: 31-35.

Ames B. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, **221**:1256-1264.

Ames, B.; Shigenaga, M.; Hagen, T. (1993). Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**: 7915-7922.

Antunes, F.; Cadenas, E. (2000). Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett.*, **475**: 121-126.



Antunes, F.; Cadenas, E.; Brunk, U.T. (2001). Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture.

Biochem J., **356**: 549-555.

Arends, M.; Morris, R.G.; Wyllie, A.H. (1990). Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.*, **136**: 593-608.

Arosio, P.; Levi, S. (2002). Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**: 457-463.

Bae, Y.S.; Kang, S.W.; Seo, M.S.; Baines, I.C.; Tekle, E.; Chock, P.B.; Rhee, S.G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **272**: 217-221.

Balentine, J. (1982). Pathology of Oxygen Toxicity. New York: Academic Press, pp.305-348

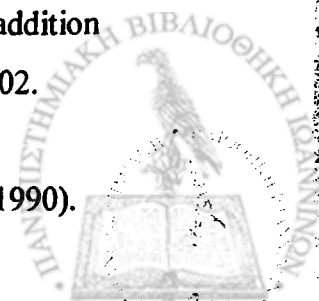
Bali, P.; Harris, W.R. (1990). Site-specific rate constants for iron removal from diferric transferrin by nitrilotris(methylenephosphonic acid) and pyrophosphate. *Arch Biochem. Biophys.*, **281**: 251-256.

Balla, J.; Jacob, H.S.; Balla, G.; Nath, K.; Vercellotti, G.M. (1992). Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction by heme proteins: a possible mechanism limiting shock damage. *Trans Assoc. Am. Physicians*, **105**:1-6.

Barbouti, A. (2004). Studies on the role of hydrogen peroxide on the molecular mechanisms of apoptotic cell death. University of Ioannina, Medical School. p. 162.

Barbouti, A.; Doulias, P.-T.; Nouis, L.; Tenopoulou, M.; Galaris, D. (2002). DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H₂O₂. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**: 691-702.

Bergsten, P.; Amitai, G.; Kehrl, J.; Dhariwal, K.; Klein, H.; Levine, M. (1990).



Millimolar concentrations of ascorbic acid in purified human mononuclear leukocytes. Depletion and reaccumulation. *J. Biol. Chem.*, **265**: 2584-2587.

Bonicel, A.; Mariaggi, N.; Hughes, E.; Teoule, R. (1980). In vitro gamma irradiation of DNA: identification of radioinduced chemical modifications of the adenine moiety. *Radiat Res.*, **83**: 19-26.

Borutaite, V.; Brown, G.C. (2001). Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide. *FEBS Lett.*, **500**: 114-118.

Boumans, H.; van Gaalen, M.C.M.; Grivell, L.A.; Berden, J.A. (1997). Differential inhibition of the yeast bcl complex by phenanthrolines and ferroin. Implications for structure and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.*, **272**: 16753-16760.

Boveris, A.; Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.*, **134**: 707-716.

Boya, P.; Andreau, K.; Poncet, D.; Zamzami, N.; Perfettini, J.-L.; Metivier, D.; Ojcius, D.M.; Jaattela, M.; Kroemer, G. (2003). Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J. Exp. Med.*, **197**: 1323-1334.

Bradford M.M. (1976). 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.

Brazzolotto, X.; Gaillard, J.; Pantopoulos, K.; Hentze, M.W.; Moulis, J.-M. (1999). Human cytoplasmic aconitase (Iron Regulatory Protein 1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide in vitro but is not activated for iron-responsive element binding. *J. Biol. Chem.*, **274**: 21625-21630.

Breen, A.P.; Murphy, J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.*, **18**: 1033-1077.



Brodie, A.; Reed, D.J. (1987). Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.*, **148**: 120-125.

Brown, N.M.; Anderson, S.A.; Steffen, D.W.; Carpenter, T.B.; Kennedy, M.C.; Walden, W.E.; Eisenstein, R.S. (1998). Novel role of phosphorylation in Fe-S cluster stability revealed by phosphomimetic mutations at Ser-138 of iron regulatory protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**:15235-15240.

Bruyninckx, W.; Mason, H.S.; Morse, S.A. (1978). Are physiological oxygen concentrations mutagenic? *Nature*, **274**: 606-607.

Bucci, C.; Parton, R.G.; Mather, I.H.; Stunnenberg, H.; Simons, K.; Hoflack, B.; Zerial, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, **70**: 715-28.

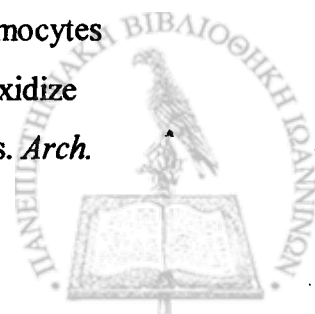
Burdon, R.H.; Gill, V.; Rice-Evans, C. (1990). Cell proliferation and oxidative stress. *Free Radic Res Commun.*, **7**: 149-59.

Burdon, R.H.; Gill, V.; Rice-Evans, C. (1990). Oxidative stress and tumor cell proliferation. *Free Radic. Res. Commun.*, **11**: 65-76.

Burdon, R.H.; Gill, V.; Alliangana, D. (1996). Hydrogen peroxide in relation to proliferation and apoptosis in BHK-21 hamster fibroblasts. *Free Radic. Res. Commun.*, **24**: 81-93.

Burdon, R.H.; Rice-Evans, C. (1989). Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic. Res. Commun.*, **6**: 345-358.

Burkitt, M.J.; Bishop, H.S.; Milne, L.; Tsang, S.Y.; Provan, G.J.; Nobel, C.S.I.; Orrenius, S.; Slater, A.F.G. (1998). Dithiocarbamate toxicity towards thymocytes involves their copper-catalyzed conversion to thiuram disulfides, which oxidize glutathione in a redox cycle without the release of reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.*, **353**: 73-84.



Cable, H.; Lloyd, J.B. (1999). Cellular uptake and release of two contrasting iron chelators. *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**: 131-134.

Cairo, G.; Pietrangelo, A. (2000). Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochem. J.*, **352**: 241-250.

Cairo, G.; Recalcati, S.; Pietrangelo, A.; Minotti, G. (2002). The iron regulatory proteins: targets and modulators of free radical reactions and oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.*, **32**: 1237-1243.

Cantoni, O.; Sestili, P.; Cattabeni, F.; Bellomo, G.; Pou, S.; Cohen, M.; Cerutti, P. (1989). Calcium chelator Quin 2 prevents hydrogen-peroxide-induced DNA breakage and cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.*, **182**: 209-212.

Carballo, M.; Conde, M.; El Bekay, R.; Martin-Nieto, J.; Camacho, M.J.; Monteseirin, J.; Conde, J.; Bedoya, FJ; Sobrino, F. (1999). Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, **274**:17580-17586.

Caselli, A.; Marzocchini, R.; Camici, G.; Manao, G.; Moneti, G.; Pieraccini, G.; Ramponi, G. (1998). The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H_2O_2 . *J. Biol. Chem.*, **273**: 32554-32560.

Casey, J.; Koeller, D.M.; Ramin, V.C.; Klausner, R.D.; Harford, J.B. (1989). Iron regulation of transferrin receptor mRNA levels requires iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the 3' untranslated region of the mRNA. *EMBO J.*, **8**: 3693-3699.

Caskey, J.; Jones, C.; Miller, Y.E.; Seligman, P.A. (1983). Human ferritin gene is assigned to chromosome 19. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**: 482-486.

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



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

Chetsanga, C.; Grigorian, C. (1983). A dose-response study on opening of imidazole ring of adenine in DNA by ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **44**: 321-331.

Chevion, M. (1988). A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radic. Biol. Med.*, **5**: 27-37.

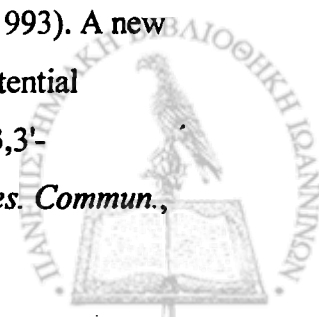
Claiborne, A.; Miller, H.; Parsonage, D.; Ross, R.P. (1993). Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation. *FASEB J.*, **7**: 1483-1490.

Collawn, J.; Lai, A.; Domingo, D.; Fitch, M.; Hatton, S.; Trowbridge, I.S. (1993). YTRF is the conserved internalization signal of the transferrin receptor, and a second YTRF signal at position 31-34 enhances endocytosis. *J. Biol. Chem.*, **268**: 21686-21692.

Collawn, J.; Stangel, M.; Kuhn, L.A.; Esekogwu, V.; Jing, S.Q.; Trowbridge, I.S.; Tainer, J.A. (1990). Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell*, **63**: 1061-1072.

Corsi, B.; Cozzi, A.; Arosio, P.; Drysdale, J.; Santambrogio, P.; Campanella, A.; Biasiotto, G.; Albertini, A.; Levi, S. (2002). Human mitochondrial ferritin expressed in HeLa cells incorporates iron and affects cellular iron metabolism. *J. Biol. Chem.*, **277**: 22430-22437.

Cossarizza, A.; Baccaranicontri, M.; Kalashnikova, G.; Franceschi, C. (1993). A new method for the cytofluorometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,



197: 40-45.

Cozzi, A.; Corsi, B.; Levi, S.; Santambrogio, P.; Albertini, A.; Arosio, P. (2000). Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells. In vivo role of ferritin ferroxidase activity. *J. Biol. Chem.*, **275**: 25122-25129.

Damke, H.; Baba, T.; van der Blik, A.M.; Schmid, S.L. (1995). Clathrin independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J. Cell Biol.*, **131**: 69-80.

Damke, H.; Baba, T.; Warnock, D.E.; Schmid, S.L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.*, **127**: 915-934.

Darzynkiewicz, Z.; Li, X. (1996). Measurements of cell death by flow cytometry. In: *Techniques in Apoptosis*. Cotter TG, Martin, S.J., editor.. London: Portland Press, pp.71-106

Das, S.; White, A.C.; Fanburg, B.L. (1992). Modulation of transforming growth factor-beta 1 antiproliferative effects on endothelial cells by cysteine, cystine, and N-acetylcysteine. *J. Clin. Invest.*, **90**: 1649-1656.

Dean, R.; Fu, S.; Stocker, R.; Davies, M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.*, **324**: 1-18.

Denu, J.; Tanner, K.G. (1998). Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry*, **37**: 5633-5642.

Dizdaroglu, M.; Schulte-Frohlinde, D.; von Sonntag, C. (1975). Radiation chemistry of DNA, II. Strand breaks and sugar release by gamma-irradiation of DNA in aqueous solution. The effect of oxygen. *Z. Naturforsch [C]*, **30**: 826-828.



Dizdaroglu, M.; Schulte-Frohlinde, D.; von Sonntag, C. (1977). gamma-Radiolyses of DNA in oxygenated aqueous solution. Structure of an alkali-labile site. *Z. Naturforsch [C]*, **32**: 1021-1022.

Dizdaroglu, M. (1985a). Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on gamma-irradiation in aqueous solution. *Biochemistry*, **24**: 4476-4481.

Dizdaroglu, M. (1985b). Application of capillary gas chromatography-mass spectrometry to chemical characterization of radiation-induced base damage of DNA: implications for assessing DNA repair processes. *Anal. Biochem.*, **144**: 593-603.

Dizdaroglu, M. (1994). Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Enzymol.*, **234**: 3-16.

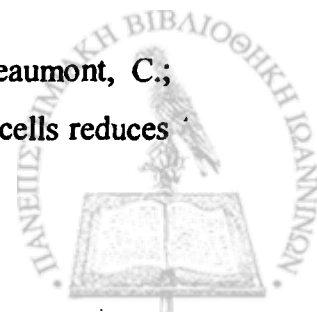
Doulias, P.-T.; Nousis, L.; Zhu, B.-Z.; Frei, B.; Galaris, D. (2004). Protection by tropolones against H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis in cultured Jurkat cells. *Free Radic. Res.*, **In Press**.

Duthie, S.; Ma, A.; Ross, M.A.; Collins, A.R. (1996). Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res.*, **56**: 1291-1295.

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

Enns, C.; Suomalainen, H.A.; Gebhardt, J.E.; Schroder, J.; Sussman, H.H. (1982). Human transferrin receptor: expression of the receptor is assigned to chromosome 3. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**: 3241-3245.

Epsztejn, S.; Glickstein, H.; Picard, V.; Slotki, I.N.; Breuer, W.; Beaumont, C.; Cabantchik, Z.I. (1999). H-Ferritin subunit overexpression in erythroid cells reduces



the oxidative stress response and induces multidrug resistance properties. *Blood*, **94**: 3593-3603.

Epsztejn, S.; Kakhlon, O.; Glickstein, H.; Breuer, W.; Cabantchik, Z.I. (1997). Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal. Biochem.*, **248**: 31-40.

Esposito, B.P.; Epsztejn, S.; Breuer, W.; Cabantchik, Z.I. (2002). A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids. *Anal. Biochem.*, **304**: 1-18.

Fan, L.; Iyer, J.; Zhu, S.; Frick, K.K.; Wada, R.K.; Eskenazi, A.E.; Berg, P.E.; Ikegaki, N.; Kennett, R.H.; Frantz, C.N. (2001). Inhibition of N-myc expression and induction of apoptosis by iron chelation in human neuroblastoma cells. *Cancer Res.*, **61**: 1073-1079.

Fenton, H.J.H. (1894). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soci.*, **65**: 899-910.

Ferreira, C.; Bucchini, D.; Martin, M.-E.; Levi, S.; Arosio, P.; Grandchamp, B.; Beaumont, C. (2000). Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *J. Biol. Chem.*, **275**: 3021-3024.

Fillebeen, C.; Chahine, D.; Caltagirone, A.; Segal, P.; Pantopoulos, K. (2003). A phosphomimetic mutation at ser-138 renders iron regulatory protein 1 sensitive to iron-dependent degradation. *Mol. Cell. Biol.*, **23**: 6973-6981.

Flint, D.; Tuminello, J.; Emptage, M. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.*, **268**: 22369-22376.

Frazzon, J.; Dean, D.R. (2001). Feedback regulation of iron-sulfur cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**: 14751-14753.

Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.*, **44**: 147-159.



Fujita, S.; Steenken, S. (1981). Pattern of $\cdot\text{OH}$ radical addition to uracil and methyl- and carboxyl-substituted uracils. Electron transfer of $\cdot\text{OH}$ adducts with N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine and tetranitromethane. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**: 2540-2545.

Galey, J. (1997). Potential use of iron chelators against oxidative damage. *Adv. Pharmacol.*, **38**: 167-203.

Gao, J.; Richardson, D.R. (2001). The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents, IV: the mechanisms involved in inhibiting cell-cycle progression. *Blood*, **98**: 842-850.

Gardner, P.; Nguyen, D.; White, C. (1994). Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 12248-12252.

Ghosh, S.; Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, **190** (Suppl): S81-S96.

Goldberg, I. (1987). Free radical mechanisms in neocarzinostatin-induced DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.*, **3**: 41-54.

Goodfellow, P.; Banting, G.; Sutherland, R.; Greaves, M.; Solomon, E.; Povey, S. (1982). Expression of human transferrin receptor is controlled by a gene on chromosome 3: assignment using species specificity of a monoclonal antibody. *Somatic Cell Genet.*, **8**: 197-206.

Gorlach, A.; Diebold, I.; Schini-Kerth, V.B.; Berchner-Pfannschmidt, U.; Roth, U.; Brandes, R.P.; Kietzmann, T.; Busse, R. (2001). Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: role of the p22phox-containing NADPH oxidase. *Circ. Res.*, **89**: 47-54.



Gotoh, Y.; Cooper, J.A. (1998). Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **273**: 17477-17482.

Greenberg, G.R.; Wintrobe, M.M. (1946). A labile iron pool. *J. Biol. Chem.*, **165**: 397-398.

Griendling, K.K.; Harrison, D.G. (1999). Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circ. Res.*, **85**: 562-563.

Gunshin, H.; Mackenzie, B.; Berger U.V.; Gunshin, Y.; Romero, M.F.; Boron, W.F.; Nussberger, S.; Gollan, J.L.; Hediger, M.A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, **388**: 482-488.

Gutteridge, J. (1982). The role of superoxide and hydroxyl radicals in phospholipid peroxidation catalysed by iron salts. *FEBS Lett.*, **150**: 454-458.

Gutteridge, J. (1986). Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett.*, **201**: 291-305.

Gutteridge, J.; Nagy, I.; Maitt, L.; Floyd, R.A. (1990). ADP-iron as a Fenton reactant: radical reactions detected by spin trapping, hydrogen abstraction, and aromatic hydroxylation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **277**: 422-428.

Gutteridge, J.; Stocks, J. (1981). Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **14**: 257-329.

Gutteridge, J.; Winyard, P.G.; Blake, D.R.; Lunec, J.; Brailsford, S.; Halliwell, B. (1985). The behaviour of caeruloplasmin in stored human extracellular fluids in relation to ferroxidase II activity, lipid peroxidation and phenanthroline-detectable copper. *Biochem J.*, **230**: 517-523.



Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.; Aruoma, O.I. (1987). The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.*, **165**: 215-219.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods Enzymol.*, **182**: 1.

Halliwell, B.; Aruoma, O.I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.*, **281**: 9-19.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1992a). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods Enzymol.*, **186** :1-85.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. (1992b). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.*, **307**: 108-112.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*: Oxford Science Press, pp

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

Harris, E. (1995). The iron-copper connection: the link to ceruloplasmin grows stronger. *Nutr. Rev.*, **53**: 170-173.

Hayakawa, H.; Taketomi, A.; Sakumi, K.; Kuwano, M.; Sekiguchi, M. (1995). Generation and elimination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate, a mutagenic substrate for DNA synthesis, in human cells. *Biochemistry*, **34**: 89-95.

Hayes, G.; Enns, C.A.; Lucas, J.J. (1992). Identification of the O-linked glycosylation site of the human transferrin receptor. *Glycobiology*, **2**: 355-359.



Hazra, D.K.; Steenken, S. (1983). Pattern of ·OH addition to cytosine and 1-, 3-, 5-, and 6-substituted cytosines. Electron transfer and dehydration reactions of the ·OH adducts. *J. Am. Chem. Soc.*, **105**: 4380-4386.

Helbock, H.J.; Beckman, K.B.; Shigenaga, M.K.; Walter, P.B.; Woodall, A.A.; Yeo, H.C.; Ames, B.N. (1998). DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**: 288-293.

Hems, G. (1960). Chemical effects of ionizing radiation on deoxyribonucleic acid in dilute aqueous solution. *Nature*, **186**: 710-712.

Henle, E.S.; Han, Z.; Tang, N.; Rai, P.; Luo, Y.; Linn, S. (1999). Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated Fenton reactions has possible biological implications. *J. Biol. Chem.*, **274**: 962-971.

Henley, J.R.; Krueger, E.W.A.; Oswald, B.J.; McNiven, M.A. (1998). Dynamamin-mediated internalization of caveolae. *J. Cell Biol.*, **141**: 85-99.

Hentze, M.W.; Kuhn, L.C. (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**: 8175-8182.

Hirling, H.; Henderson, B.R.; Kuhn, L.C. (1994). Mutational analysis of the [4Fe-4S]-cluster converting iron regulatory factor from its RNA-binding form to cytoplasmic aconitase. *EMBO J.*, **13**: 453-461.

Hoyes, K.; Hider, R.C., Porter, J.B. (1992). Cell cycle synchronization and growth inhibition by 3-hydroxypyridin-4-one iron chelators in leukemia cell lines. *Cancer Res.*, **52**: 4591-4599.

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



Imlay, J.; Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, **240**: 1302-1309.

Ishisaka, R.; Utsumi, T.; Kanno, T.; Arita, K.; Katunuma, N.; Akiyama, J.; Utsumi, K. (1999). Participation of a cathepsin L-type protease in the activation of caspase-3. *Cell Struct. Funct.*, **24**: 465-470.

Iwai, K.; Drake, S.K.; Wehr, N.B.; Weissman, A.M.; LaVaute, T.; Minato, N.; Klausner, R.D.; Levine, R.L.; Rouault, T.A. (1998). Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: Implications for degradation of oxidized proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**: 4924-4928.

Jacobson, M.; Weil, M.; Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, **88**: 347-354.

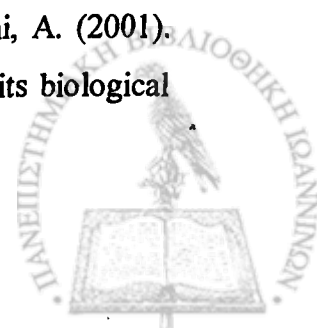
Jain, M.; Arvanitis, C.; Chu, K.; Dewey, W.; Leonhardt, E.; Trinh, M.; Sundberg, C.D.; Bishop, JM; Felscher DW. (2002). Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science*, **297**: 102-104.

Jing, S.; Trowbridge, I. (1990). Nonacylated human transferrin receptors are rapidly internalized and mediate iron uptake. *J. Biol. Chem.*, **265**: 11555-11559.

Kakhlon, O.; Cabantchik, Z.I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**: 1037-1046.

Kasai, H.; Tanooka, H.; Nishimura, S. (1984). Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation. *Gann.*, **75**: 1037-1039.

Katunuma, N.; Matsui, A.; Le, Q.T.; Utsumi, K.; Salvesen, G.; Ohashi, A. (2001). Novel procaspase-3 activating cascade mediated by lysoapoptases and its biological significances in apoptosis. *Adv. Enzyme Regul.*, **41**: 237-250.



Katz J. (1961). Iron and protein kinetics studied by means of doubly labelled human crystalline transferrin. *J. Clin. Invest.*, **40**: 2143-2152.

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

Koziol, J.A.; Ho, N.J.; Felitti, V.J.; Beutler, E. (2001). Reference centiles for serum ferritin and percentage of transferrin saturation, with application to mutations of the HFE gene. *Clin. Chem.*, **47**: 1804-1810.

Kroemer, G.; Zamzami, N.; Susin, S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today*, **18**: 44-51.

Kuhn, L.; McClelland, A.; Ruddle, F.H. (1984). Gene transfer, expression, and molecular cloning of the human transferrin receptor gene. *Cell*, **37**: 95-103.

Kurz, T.; Leake, A.; Zglincki, T.V.; Brunk, U.T. (2004). Relocalized redox-active lysosomal iron is an important mediator of oxidative stress-induced DNA damage. *Biochem. J.*, **378**: 1039-1045

Kwok, J.C.; Richardson, D.R. (2004). Examination of the mechanism(s) involved in doxorubicin-mediated iron accumulation in ferritin: studies using metabolic inhibitors, protein synthesis inhibitors, and lysosomotropic agents. *Mol. Pharmacol.*, **65**: 181-195.

Land, T.; Rouault, T.A. (1998). Targeting of a human iron-sulfur cluster assembly enzyme, nifs, to different subcellular compartments is regulated through alternative AUG utilization. *Mol. Cell*, **2**: 807-815.

Lando, D.; Peet, D.J.; Whelan, D.A.; Gorman, J.J.; Whitelaw, M.L. (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*, **295**: 858-861.



Lanzetti, L.; Rybin, V.; Malabarba, M.G.; Christoforidis, S.; Scita, G.; Zerial, M.; Di Fiore, P.P. (2000). The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature*, **408**: 374-377.

Le, N.T.V.; Richardson D.R. (2002). The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1603**: 31-46.

Lee, S.; Kwon, K.S.; Kim, S.R.; Rhee, S.G. (1998). Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, **273**: 15366-15372.

Levi, S.; Corsi, B.; Bosisio, M.; Invernizzi, R.; Volz, A.; Sanford, D.; Arosio, P.; Drysdale, J. (2001). A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J. Biol. Chem.*, **276**: 24437-24440.

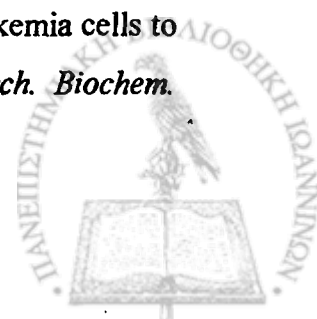
Levi, S.; Santambrogio, P.; Cozzi, A.; Rovida, E.; Corsi, B.; Tamborini, E.; Spada, S.; Albertini, A.; Arosio, P. (1994). The role of the L-chain in ferritin iron incorporation : studies of homo and heteropolymers. *J. Mol. Biol.*, **238**: 649-654.

Li, N.; Karin, M. (1999). Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J.*, **13**: 1137-1143.

Li, W.; Yuan, X.; Nordgren, G.; Dalen, H.; Dubowchik, G.M.; Firestone, R.A.; Brunk, U.T. (2000). Induction of cell death by the lysosomotropic detergent MSDH. *FEBS Lett.*, **470**: 35-39.

Lin, F.; Girotti, A.W. (1997). Elevated ferritin production, iron containment, and oxidant resistance in hemin-treated Leukemia Cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **346**: 131-141.

Lin, F.; Girotti, A.W. (1998). Hemin-enhanced resistance of human leukemia cells to oxidative killing: antisense determination of ferritin involvement. *Arch. Biochem. Biophys.*, **352**: 51-58.



Lipschitz, D.; Cook, J.D.; Finch, C.A. (1974). A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *N. Engl. J. Med.*, **290**: 1213-1216.

Lloyd, D.; Phillips, D.H. (1999). Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat. Res.*, **424**: 23-36.

Lohse, D.; Denu, J.M.; Santoro, N.; Dixon, J.E. (1997). Roles of aspartic acid-181 and serine-222 in intermediate formation and hydrolysis of the mammalian protein-tyrosine-phosphatase PTP1. *Biochemistry*, **36**: 4568-4575.

MacGillivray, R.; Mendez, E.; Shewale, J.; Sinha, S.; Lineback-Zins J.; Brew, K. (1983). The primary structure of human serum transferrin. The structures of seven cyanogen bromide fragments and the assembly of the complete structure. *J. Biol. Chem.*, **258**: 3543-3553.

May, J.; Qu, Z.C.; Whitesell, R.R. (1995). Ascorbic acid recycling enhances the antioxidant reserve of human erythrocytes. *Biochemistry*, **34**: 12721-12728.

McBride, H.; Rybin, V.; Murphy, C.; Giner, A.; Teasdale, R.; Zerial, M. (1999). Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell*, **98**: 377-386.

McClelland, A.; Kuhn, L.C.; Ruddle, F.H. (1984). The human transferrin receptor gene: genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence. *Cell*, **39**: 267-274.

McConkey, D.; Hartzell, P.; Nicotera, P.; Wyllie, A.H.; Orrenius, S. (1988). Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicol. Lett.*, **42**: 123-130.

McCord, J. (1974). Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, **185**: 529-531.



McCord, J.M.; Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**: 6049-6055.

McLauchlan, H.; Newell, J.; Morrice, N.; Osborne, A.; West, M.; Smythe, E. (1998). A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Curr. Biol.*, **8**: 34-45.

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

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

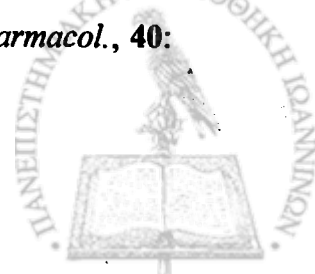
Mello Filho, A.; Hoffmann, M.E.; Meneghini, R. (1984a). Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem. J.*, **218**: 273-275.

Mello Filho, A.; Hoffmann, M.E.; Meneghini, R. (1985). Protection of mammalian cells by o-phenanthroline from lethal and DNA-damaging effects produced by active oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta*, **847**: 82-89.

Mello Filho, A.; Meneghini, R. (1984b). In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **781**: 56-63.

Meneghini R. (1997). Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.*, **23**: 783-792.

Meshnick, S.; Scott, M.D.; Lubin, B.; Ranz, A.; Eaton, J.W. (1990). Antimalarial activity of diethyldithiocarbamate. Potentiation by copper. *Biochem. Pharmacol.*, **40**: 213-216.



- Mohindru, A.; Fisher, J.M.; Rabinovitz, M. (1983). 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline (neocuproine): a potent, copper-dependent cytotoxin with anti-tumor activity. *Biochem. Pharmacol.*, **32**: 3627-3632.
- Mullner, E.; Neupert, B.; Kuhn, L.C. (1989). A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. *Cell*, **58**: 373-382.
- Nassi-Calo, L.; Mello-Filho, C.; Meneghini, R. (1989). o-Phenanthroline protects mammalian cells from hydrogen peroxide-induced gene mutation and morphological transformation. *Carcinogenesis*, **10**: 1055-1057.
- Nobel, C.S.I.; Kimland, M.; Lind, B.; Orrenius, S.; Slater, AFG. (1995). Dithiocarbamates induce apoptosis in thymocytes by raising the intracellular level of redox-active copper. *J. Biol. Chem.*, **270**: 26202-26208.
- Nunez, M.; Gaete, V.; Watkins, J.; Glass, J. (1990). Mobilization of iron from endocytic vesicles. The effects of acidification and reduction. *J. Biol. Chem.*, **265**: 6688-6692.
- Oh, P.; McIntosh, D.P.; Schnitzer, J.E. (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell Biol.*, **141**: 101-114.
- Oikawa, S.; Kawanishi, S. (1999). Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett.*, **453**: 365-368.
- Ollinger, K.; Brunk, U.T. (1995). Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage. *Free Radic. Biol. Med.*, **19**: 565-574.
- Orino, K.; Lehman, L.; Tsuji, Y.; Ayaki, H.; Torti, S.; Torti, F. (2001). Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem. J.*, **357**: 241-247.



- Ostling, O.; Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**: 291-298.
- Paller, M.; Jacob, H. (1994). Cytochrome P-450 mediates tissue-damaging hydroxyl radical formation during reoxygenation of the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 7002-7006.
- Panayiotidis, M.; Tsolas, O.; Galaris, D. (1999). Glucose oxidase-produced H₂O₂ induces Ca²⁺-dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, **26**: 548-56.
- Pantopoulos, K.; Hentze, M.W. (1998). Activation of iron regulatory protein-1 by oxidative stress in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**: 10559-10563.
- Patterson, C.; Ruef, J.; Madamanchi, N.R.; Barry-Lane, P.; Hu, Z.; Horaist, C.; Ballinger, C.A.; Brasier, A.R.; Bode, C.; Runge, M.S. (1999). Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47phox may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, **274**: 19814-19822.
- Persson, H.L.; Yu, Z.; Tirosh, O.; Eaton, J.W.; Brunk, U.T. (2003). Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators. *Free Radic. Biol. Med.*, **34**: 1295-1305.
- Petrat, F.; Groot, H.D.; Sustmann, R.; Rauen, U. (2002). The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol. Chem.*, **383**: 489-502.
- Philpott, C.; Haile, D.; Rouault, T.; Klausner, R. (1993). Modification of a free Fe-S cluster cysteine residue in the active iron responsive element-binding protein prevents RNA binding. *J. Biol. Chem.*, **268**: 17655-17658.



Picard, V.; Epsztejn, S.; Santambrogio, P.; Cabantchik, Z.I., Beaumont, C. (1998). Role of ferritin in the control of the labile iron pool in murine erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.*, **273**: 15382-15386.

Picard, V.; Renaudie, F.; Porcher, C.; Hentze, M.W.; Grandchamp, B.; Beaumont, C. (1996). Overexpression of the ferritin H subunit in cultured erythroid cells changes the intracellular iron distribution. *Blood*, **87**: 2057-2064.

Radisky, D.; Kaplan, J. (1998). Iron in cytosolic ferritin can be recycled through lysosomal degradation in human fibroblasts. *Biochem J.*, **336**: 201-205.

Rae, T.; Schmidt, P.J.; Pufahl, R.A.; Culotta, V.C.; O'Halloran, T.V. (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, **284**: 805-808.

Rao, G.N.; Katki, K.A.; Madamanchi, N.R.; Wu, Y.; Birrer, M.J. (1999). JunB forms the majority of the AP-1 complex and is a target for redox regulation by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor agonists in smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **274**: 6003-6010.

Rathmell, J.; Thompson, C.B. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*, **109**: S97-S107.

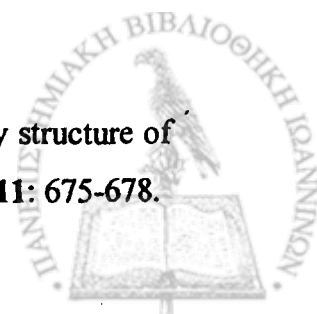
Renton, F.J.; Jeitner, T.M. (1996). Cell cycle-dependent inhibition of the proliferation of human neural tumor cell lines by iron chelators. *Biochem. Pharmacol.*, **51**: 1553-1561.

Rivas, C.; Vera, J.; Guaiquil, V.; Velasquez, F.; Borquez-Ojeda, O.; Carcamo, J.; Concha, I.; Golde, D. (1997). Increased uptake and accumulation of vitamin C in human immunodeficiency virus 1-infected hematopoietic cell lines. *J. Biol. Chem.*, **272**: 5814-5820.

Roberg, K. (2001). Relocalization of cathepsin D and cytochrome c early in apoptosis revealed by immunoelectron microscopy. *Lab. Invest.*, **81**: 149-158.



- Roberg, K.; Ollinger, K. (1998). Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Am. J. Pathol.*, **52**: 1151-1156.
- Robinson, M.; Watts, C.; Zerial, M. (1996). Membrane dynamics in endocytosis. *Cell*, **84**: 13-21.
- Rodriguez, H.; Drouin, R.; Holmquist, G.P.; O'Connor, T.R.; Boiteux, S.; Laval, J.; Doroshov, J.H.; Akman, S.A. (1995). Mapping of copper/hydrogen peroxide-induced DNA damage at nucleotide resolution in human genomic DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.*, **270**: 17633-17640.
- Rothenberger, S.; Iacopetta, B.J.; Kuhn, L.C. (1987). Endocytosis of the transferrin receptor requires the cytoplasmic domain but not its phosphorylation site. *Cell*, **49**: 423-431.
- Saitoh, M.; Nishitoh, H.; Fujii, M.; Takeda, K.; Tobiume, K.; Sawada, Y.; Kawabata, M.; Miyazono, K.; Ichijo, H. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1 *EMBO J.*, **17**: 2596-2606.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Harbor, vol 3.
- Santambrogio, P.; Levi, S.; Arosio, P.; Palagi, L.; Vecchio, G.; Lawson, D.; Yewdall, S.; Artymiuk, P.; Harrison, P.; Jappelli, R. (1992). Evidence that a salt bridge in the light chain contributes to the physical stability difference between heavy and light human ferritins. *J. Biol. Chem.*, **267**: 14077-14083.
- Schafer, F.Q.; Buettner, G.R. (2000). Acidic pH amplifies iron-mediated lipid peroxidation in cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **28**:1175-81.
- Schneider, C.; Owen, M.J.; Banville, D.; Williams, J.G. (1984). Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature*, **311**: 675-678.



Schoene, N.; Kamara, K.S. (1999). Population doubling time, phosphatase activity, and hydrogen peroxide generation in Jurkat cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**: 364-369.

Semenza, G. (2001). HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell*, **107**: 1-3.

Sever, S.; Muhlberg, A.B.; Schmid, S.L. (1999). Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature*, **398**: 481-486.

Shibanuma, M.; Kuroki, T.; Nose, K. (1990). Stimulation by hydrogen peroxide of DNA synthesis, competence family gene expression and phosphorylation of a specific protein in quiescent Balb/3T3 cells. *Oncogene*, **5**: 1025-1032.

Shigenaga, M.; Hagen, T.; Ames, B. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**: 10771-10778.

Sies, H. (1985). *Oxidative Stress*. Academic Press. London

Simon, A.; Vikis, H.G.; Stewart, S.; Fanburg, B.L.; Cochran, B.H.; Guan, K.L. (2000). Regulation of STAT3 by direct binding to the Rac1 GTPase. *Science*, **290**: 144-147.

Simonsen, A.; Lippe, R.; Christoforidis, S.; Gaullier, J.M.; Brech, A.; Callaghan, J.; Toh, B.H.; Murphy, C.; Zerial, M.; Stenmark, H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*, **394**: 494-498.

Singh, N.; McCoy, MT; Tice, R.R.; Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, **175**: 184-191.

Sipe, D.; Murphy, R. (1991). Binding to cellular receptors results in increased iron release from transferrin at mildly acidic pH. *J. Biol. Chem.*, **266**: 8002-8007.



Sonntag v. (1987). *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor and Francis. London, UK

Spencer, J.P.E.; Jenner, A.; Chimel, K.; Aruoma, O.I.; Cross, C.E.; Wu, R.; Halliwell, B. (1995a). DNA damage in human respiratory tract epithelial cells: damage by gas phase cigarette smoke apparently involves attack by reactive nitrogen species in addition to oxygen radicals. *FEBS Lett.*, **375**: 179-182.

Stenken, S. (1989). Purine bases, nucleosides and nucleotides: Aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e^- and $\cdot\text{OH}$ adducts. *Chemic. Rev.*, **89**: 503-520.

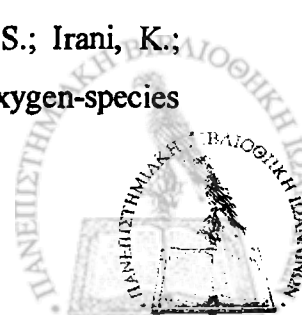
Stenmark, H.; Vitale, G.; Ullrich, O.; Zerial, M. (1995). Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell*, **83**: 423-432.

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

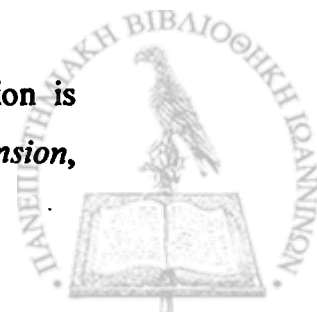
Stoka, V.; Turk, B.; Schendel, S.L.; Kim, T.-H.; Cirman, T.; Snipas, S.J.; Ellerby, L.M.; Bredesen, D.; Freeze, H.; Abrahamson, M.; Bromme, D.; Krajewski, S.; Reed, J.C.; Yin, X.-M.; Turk, V.; Salvesen, G.S. (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J. Biol. Chem.*, **276**: 3149-3157.

Stridh, H.; Kimland, M.; Jones, D.P.; Orrenius, S.; Hampton, M.B. (1998). Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis. *FEBS Lett.*, **429**: 351-355.

Sundaresan, M.; Yu, Z.X.; Ferrans, V.J.; Sulciner, D.J.; Gutkind, J.S.; Irani, K.; Goldschmidt-Clermont, P.J.; Finkel, T. (1996). Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J.*, **318**: 379-382.



- Sutton, H.; Winterbourn, C.C. (1989). On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Radic. Biol. Med.*, **6**: 53-60.
- Szabo, C.; Zingarelli, B.; O'Connor, M.; Salzman, A.L. (1996). DNA strand breakage, activation of poly(ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity in macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc. Natl. Acad. Sc.*, **93**: 1753-1758.
- Tabuchi, M.; Yoshimori, T.; Yamaguchi, K.; Yoshida, T.; Kishi, F. (2000). Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEP-2 cells. *J. Biol. Chem.*, **275**: 22220-22228.
- Tenopoulou, M.; Doulias, P.-T.; Barbouti, A.; Brunk, U.T.; Galaris, D. (2004). The role of compartmentalized redox-active iron on hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem. J.* In press.
- Thannickal, V.J.; Aldweib, K.D.L.; Fanburg, B.L. (1998). Tyrosine phosphorylation regulates H₂O₂ production in lung fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta 1. *J. Biol. Chem.*, **273**: 23611-23615.
- Thompson, C. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**: 1456-1462.
- Torti, S.; Kwak, E.; Miller, S.; Miller, L.; Ringold, G.; Myambo, K.; Young, A.; Torti, F. (1988). The molecular cloning and characterization of murine ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor-inducible gene. *J. Biol. Chem.*, **263**: 12638-12644.
- Torti, S.; Torti, F.M. (1994). Iron and ferritin in inflammation and cancer. *Adv. Inorg. Biochem.*, **10**: 119-137.
- Touyz, R.M.; Schiffrin, E.L. (1999). Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **34**: 976-982.



Trowbridge, I.; Omary, M.B. (1981). Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sc.*, **78**: 3039-3043.

Tsuji, Y.; Akebi, N.; Lam, T.; Nakabeppu, Y.; Torti, S.; Torti, F. (1995). FER-1, an enhancer of the ferritin H gene and a target of E1A-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 5152-5164.

Tsuji, Y.; Ayaki, H.; Whitman, S.P.; Morrow, C.S.; Torti, S.V.; Torti, F.M. (2000). Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 5818-5827.

Tsuji, Y.; Kwak, E.; Saika, T.; Torti, S.; Torti, F. (1993). Preferential repression of the H subunit of ferritin by adenovirus E1A in NIH-3T3 mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **268**: 7270-7275.

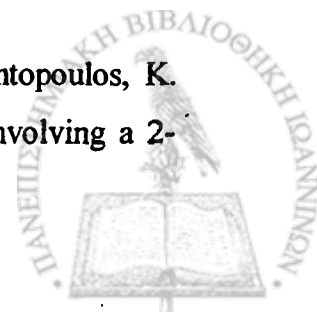
Ushio-Fukai, M.; Alexander, RW; Akers, M.; Griending, KK. (1998). p38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.*, **273**: 15022-15029.

Ushio-Fukai, M.; Alexander, R.W.; Akers, M.; Yin, Q.; Fujio, Y.; Walsh, K.; Griending, K.K. (1999). Reactive oxygen species mediate the activation of akt/protein kinase B by angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.*, **274**: 22699-22704.

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

Vera, J.; Rivas, CI; Fischbarg, J.; Golde, DW. (1993). Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature*, **364**: 79-82.

Wang, J.; Chen, G.; Muckenthaler, M.; Galy, B.; Hentze, M.W.; Pantopoulos, K. (2004). Iron-mediated degradation of IRP2, an unexpected pathway involving a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase activity. *Mol. Cell Biol.*, **24**: 954-965.



Wardrop, S.; Richardson D.R. (1999). The effect of intracellular iron concentration and nitrogen monoxide on Nramp2 expression and non-transferrin-bound iron uptake. *Eur. J. Biochem.*, **263**: 41-49.

Wardrop, S.; Richardson, D.R. (2000). Interferon- γ and lipopolysaccharide regulate the expression of Nramp2 and increase the uptake of iron from low molecular mass complexes by macrophages. *Eur. J. Biochem.*, **267**: 6586-6593.

Wei, Y.; Miller, S.C.; Tsuji, Y.; Torti, S.V.; Torti, F.M. (1990). Interleukin 1 induces ferritin heavy chain in human muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**: 289-296.

Welch, R.W.; Wang, Y.; Crossman Jr, A, Park, J.B.; Kirk, K.L.; Levine, M. (1995). Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **270**: 12584-12592.

Wiseman, H.; Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, **313**: 17-29.

Wood, Z.A.; Poole, L.B.; Karplus, P.A. (2003). Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*, **300**: 650-653.

Worwood, M.; Brook, J.D.; Cragg, S.J.; Hellkuhl, B.; Jones, B.M.; Perera, P.; Roberts, S.H.; Shaw, D.J. (1985). Assignment of human ferritin genes to chromosomes 11 and 19q13.3----19qter. *Hum. Genet.*, **69**: 371-374.

Wu, K.; Polack, A.; Dalla-Favera, R. (1999). Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science*, **283**: 676-679.

Wyllie, A. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**: 555-556.



Xanthoudakis, S.; Miao, G.; Wang, F.; Pan, Y.C.; Curran, T. (1992). Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.*, **11**: 3323-3335.

Yoon, G.; Kim, H.-J.; Yoon, Y.-S.; Cho, H.; Lim, I.K.; Lee, J.-H. (2002). Iron chelation-induced senescence-like growth arrest in hepatocyte cell lines: association of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1)-mediated p27Kip1 expression. *Biochem J.*, **366**: 613-621.

Young, S.; Bomford, A.; Madden, A.D.; Garratt, R.C.; Williams, R.; Evans, R.W. (1984). Abnormal in vitro function of a variant human transferrin. *Br. J. Haematol.*, **56**: 581-587.

Yu, Z.; Persson, H.L.; Eaton, J.W.; Brunk, U.T. (2003). Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic. Biol. Med.*, **34**: 1243-1252.

Zhang, Z.; Dixon, J.E. (1993). Active site labeling of the Yersinia protein tyrosine phosphatase: the determination of the pKa of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402. *Biochemistry* **32**: 9340-9345.

Zhao, M.; Brunk, U.T.; Eaton, J.W. (2001a). Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2. *FEBS Lett.*, **509**: 399-404.

Zhao, M.; Eaton, J.W.; Brunk, U.T. (2001b). Bcl-2 phosphorylation is required for inhibition of oxidative stress-induced lysosomal leak and ensuing apoptosis. *FEBS Lett.*, **509**: 405-412.

Zhou, Q.; Salvesen, W.G.S. (1997). Activation of pro-caspase-7 by serine proteases includes a non-canonical specificity. *Biochem. J.*, **324**: 361-364.

Zhu, B.-Z.; Chevion, M. (2000). Copper-mediated toxicity of 2,4,5-trichlorophenol: biphasic effect of the copper(I)-specific chelator neocuproine*1. *Arch. Biochem. Biophys.*, **380**: 267-273.

