



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ  
ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
(Δ.Π.Μ.Σ.)  
«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

«Έκφραση της sPLA<sub>2</sub>-IIA σε κύτταρα του πνεύμονα μετά από επίδραση LPS  
διαφορετικής βιολογικής προέλευσης»

Χρήστος Βερβελιθάνος

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ  
ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
(Δ.Π.Μ.Σ.)

«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

«Έκφραση της sPLA<sub>2</sub>-IIA σε κύτταρα του πνεύμονα μετά από επίδραση LPS  
διαφορετικής βιολογικής προέλευσης»

Χρήστος Βερβελιθάνος

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

**Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ  
ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.) «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**του κ. Βερβελιθάνου Χρήστου**

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ: Καθηγήτρια Μαρία-Ελένη Λέκκα

Θέμα: «Έκφραση της sPLA<sub>2</sub>-IIA σε κύτταρα του πνεύμονα μετά από επίδραση LPS διαφορετικής βιολογικής προέλευσης»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από την Ε.Δ.Ε.:...<sup>A</sup>/...-...-...

1 Λέκκα Μαρία-Ελένη, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,  
(επιβλέπουσα)

2 Χατζηκακού Σωτήριος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων,  
(μέλος)

3 Σακαρέλου-Δατσιώτη Μαρία, Ομότιμη Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας,  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, (μέλος)

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις

---

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.  
Καθηγητής Χατζηκακού Σωτήριος

Ο/Η Γραμματέας

---

## Πίνακας Περιεχομένων

Πρόλογος.....	8
Περίληψη .....	10
Abstract .....	10
<b>1. Πνεύμονας και επιφανειοδραστικός παράγοντας .....</b>	<b>12</b>
1.1. Ο πνεύμονας .....	12
1.2. Κυψελιδικό επιθήλιο .....	13
1.3. Επιφανειοδραστικός παράγοντας .....	17
1.4. Σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα .....	19
1.4.1. Λιπίδια .....	19
1.4.2. Πρωτεΐνες .....	20
1.4.2.1. SP-A και SP-D .....	21
1.4.2.2. SP-B και SP-C .....	22
1.5 Επιφανειοδραστικός παράγοντας και πνευμονικές διαταραχές .....	23
<b>2. Φωσφολιπάσες <math>A_2</math> και sPLA<math>_2</math>-IIA .....</b>	<b>25</b>
2.1. Εισαγωγή στις φωσφολιπάσες .....	25
2.2. Κατηγορίες φωσφολιπασών $A_2$ .....	26
2.3. Δράση φωσφολιπασών $A_2$ .....	29
2.4. sPLA $_2$ -IIA .....	31
2.5. Καταλυτικός μηχανισμός της sPLA $_2$ -IIA .....	32
2.6. Κινητική του ενζύμου .....	34
2.7. Αντιβακτηριδιακή δράση της sPLA $_2$ -IIA .....	36
2.8. sPLA $_2$ -IIA και φλεγμονή .....	38
<b>3. Φλεγμονή και ARDS .....</b>	<b>39</b>
3.1. Φλεγμονή .....	39
3.2. Φλεγμονή και καρκίνος .....	41
3.3. Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) .....	42
3.4. Φάσεις του ARDS .....	43
3.5. Αιτίες πρόκλησης του ARDS .....	44

3.6. Φωσφολιπάσες A <sub>2</sub> και ARDS .....	45
<b>4. LPS και βιοσηματοδοτική πορεία .....</b>	<b>47</b>
4.1. Γενικά στοιχεία και δομή του LPS .....	47
4.2. Διαφορές μεταξύ των LPS που προέρχονται από διαφορετικά βακτήρια .....	49
4.3. Toll-like receptors (TLRs) .....	50
4.4. Σηματοδοτική πορεία του LPS .....	51
<b>5. Υλικά και μέθοδοι .....</b>	<b>55</b>
5.1. Καλλιέργεια κυττάρων A549 .....	55
5.2. Ενεργοποίηση της έκφρασης sPLA <sub>2</sub> -IIA με τη χρήση LPS στα A549 κύτταρα, λύση και συλλογή δειγμάτων .....	59
5.3. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς U937 .....	61
5.4. Ενεργοποίηση της έκφρασης sPLA <sub>2</sub> -IIA με τη χρήση LPS στα U937 κύτταρα, συλλογή δειγμάτων και λύση .....	66
5.5. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford .....	66
5.6. Ανοσοκαταβύθιση (Immunoprecipitation, IP) .....	68
5.7. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE) .....	74
5.8. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Immunoblotting, IB) .....	81
5.9. Απομόνωση ολικού RNA από A549 κύτταρα .....	86
5.10. Ποσοτικός προσδιορισμός περιεκτικότητας και έλεγχος καθαρότητας RNA .....	89
5.11. Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA (Reverse Transcription, RT) και ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR) .....	91
5.11.1. Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA (Reverse Transcription, RT) .....	91
5.11.2. Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR) .....	91
<b>6. Αποτελέσματα .....</b>	<b>95</b>
6.1. Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων .....	95
6.1.1. Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων A549 .....	95
6.1.2. Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων U937 .....	96

6.2. Επίδραση LPS σε κύτταρα U937 .....	97
6.2.1. Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης .....	97
6.3. Επίδραση LPS σε κύτταρα A549 .....	100
6.3.1. Ανοσοανίχνευση της sPLA <sub>2</sub> -IIA στα κύτταρα A549 .....	100
6.3.2. Ανοσοανίχνευση της sPLA <sub>2</sub> -IIA στα υπερκείμενα των κυττάρων A549 ....	101
6.3.3. Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου PLA2G2A με qRT-PCR .....	102
<b>7. Συμπεράσματα-Συζήτηση .....</b>	<b>105</b>
<b>8. Βιβλιογραφία .....</b>	<b>107</b>

## Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Ανόργανη Βιολογική Χημεία» του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων μέσω του οποίου μου δόθηκε η δυνατότητα να εκπονήσω την παρούσα διατριβή στο Εργαστήριο Βιοχημείας υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κα. Μαρίας-Ελένης Λέκκα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα. Μαρία-Ελένη Λέκκα, Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας για την καθοδήγηση, τις πολύτιμες επιστημονικές γνώσεις και συμβουλές, την στήριξη και συμπαράσταση καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας καθώς και την δυνατότητα που μου έδωσε μέσω του μεταπτυχιακού να ανοίξω τους ορίζοντες μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σωτήριο Χατζηκακού Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και την κα. Μαρία Σακαρέλου-Δατσιώτη Ομότιμη Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που δέχθηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ειρήνη Κητσιούλη για την εκπαίδευση μου και τις πολύτιμες συμβουλές της στις τεχνικές της απομόνωσης RNA και qRT-PCR, την κα. Μαργαρίτα Τενοπούλου για την εκπαίδευση μου στην καλλιέργεια κυττάρων U937 και τον Στυλιανό Παπαδόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια του και καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου και μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημείας για τη βοήθεια, τη συνεργασία και τις συμβουλές που μου έδωσαν όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω με όλη μου την καρδιά τους γονείς μου και τον αδερφό μου που με συμπαραστέκονταν και με βοηθούσαν όλα αυτά τα χρόνια καθώς



και τους φίλους μου και δικούς μου ανθρώπους που με βοήθησαν, με καθοδήγησαν και με υποστήριξαν σε όλες τις στιγμές.

Παράλληλα, μου δόθηκε η δυνατότητα να συμμετέχω και να εργαστώ στα ερευνητικά προγράμματα «Επεξεργασία των ηπειρωτικών κρεάτων με φαρμακευτικά φυτά και βότανα προς παραγωγή βιολειτουργικών κρεάτων (ηπειρωτικό κρέας με βότανα)» , «OPENSREEN-GR: ερευνητική υποδομή ανοιχτής πρόσβασης για στοχευμένες τεχνολογίες σάρωσης και ανακάλυψη βιοδραστικών μορίων για την προστασία της υγείας, της κτηνοτροφίας, της γεωργίας και του περιβάλλοντος - υποέργο 13» και «Ανάπτυξη ερευνητικών υποδομών για τον σχεδιασμό, την παραγωγή και την ανάδειξη των χαρακτηριστικών ποιότητας και ασφάλειας αγροδιατροφικών και βιολειτουργικών προϊόντων (ΕΥ-ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΗ) – MIS».

## Περίληψη

Οι φωσφολιπάσες είναι μια υπεροικογένεια ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων και επιτελούν πολλούς σημαντικούς βιολογικούς ρόλους. Ειδικότερα η sPLA<sub>2</sub>-IIA εκφράζεται σε συνθήκες οξείας φλεγμονής. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση της έκφρασης της πρωτεΐνης sPLA<sub>2</sub>-IIA σε κύτταρα του πνεύμονα έπειτα από επίδραση LPS διαφορετικής βιολογικής προέλευσης. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά A549 ως μοντέλο μελέτης των πνευμονοκυττάρων τύπου II καθώς και η κυτταρική σειρά U937 ως μοντέλο μελέτης των κυψελιδικών μακροφάγων. Πραγματοποιήθηκε επίδραση με 3 διαφορετικούς LPS σε διάφορες συγκεντρώσεις στις παραπάνω κυτταρικές σειρές με σκοπό την διερεύνηση των διαφορών που προκαλούν οι διαφορετικοί LPS στην παραγωγή και έκκριση της sPLA<sub>2</sub>-IIA. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης όσο και σε γονιδιακό επίπεδο με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR) για να διερευνηθεί η έκφραση του γονιδίου της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Στην ανοσοαποτύπωση παρατηρήθηκε ότι υπάρχει μεγαλύτερη έκφραση της sPLA<sub>2</sub>-IIA στα A549 κύτταρα έπειτα από ενεργοποίηση με LPS *E. coli* από ότι με LPS *Salmonella*. Το ίδιο συμβαίνει και σε γονιδιακό επίπεδο καθώς με την qRT-PCR διαπιστώθηκε ότι υπάρχει 23% περισσότερη έκφραση του γονιδίου PLA2G2A έπειτα από την επίδραση με τον LPS *E. coli* από ότι με τον LPS *Salmonella*.

## Abstract

Phospholipases are a superfamily of enzymes that catalyze the hydrolysis of phospholipids and perform many important biological roles. In particular, sPLA<sub>2</sub>-IIA is expressed in conditions of acute inflammation. The aim of this study was to investigate the expression of the sPLA<sub>2</sub>-IIA protein in lung cells after exposure to LPS of different biological origin. For this reason, the A549 cell line was used as a model for the study of type II pneumocytes as well as the U937 cell line as a model for the study of alveolar macrophages. These cell lines were treated with 3 different LPS at various concentrations in order to investigate the differences caused by different LPS in the production and secretion of sPLA<sub>2</sub>-IIA. This study was carried

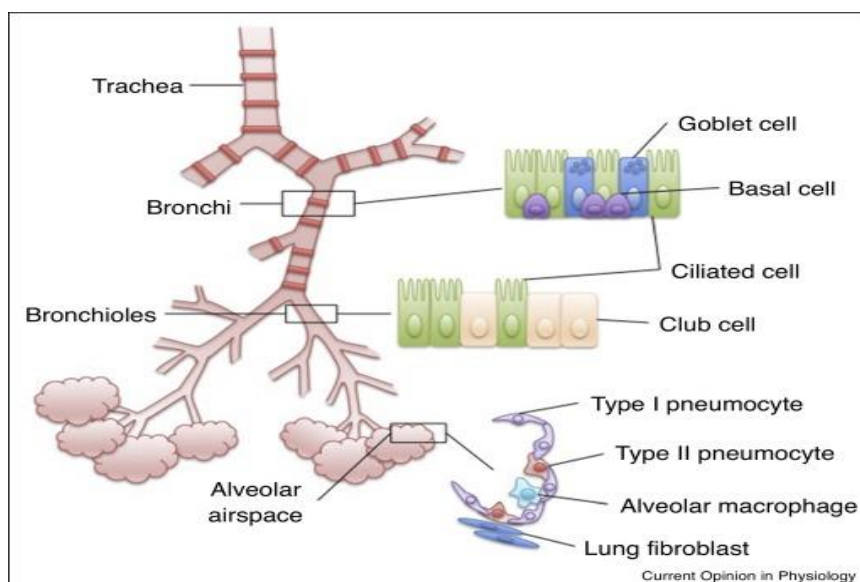
out both at the protein level with the immunoblotting method and at the gene level with the quantitative real-time PCR (qRT-PCR) method to investigate the gene expression of the specific protein. In immunoblotting it was observed that there is a greater expression of sPLA<sub>2</sub>-IIA in A549 cells after activation with LPS *E. coli* than with LPS Salmonella. The same is the case at the gene level as qRT-PCR found that there is 23% more expression of the PLA2G2A gene after exposure to LPS *E. coli* than to LPS Salmonella.

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>:

### Πνεύμονας και επιφανειοδραστικός παράγοντας

#### 1.1 Ο πνεύμονας

Ο πνεύμονας είναι ένα μεγάλο όργανο (6% του όγκου του σώματος, ανεξάρτητα από το σωματικό βάρος) με μεγάλη εσωτερική επιφάνεια και βρίσκεται συνεχώς σε επαφή με το περιβάλλον. Ο άνθρωπος διαθέτει δύο πνεύμονες όπου ο καθένας έχει βάρος 300-400 γραμμάρια. Ο αριστερός πνεύμονας χωρίζεται σε 2 λοβούς ενώ ο δεξιός χωρίζεται σε 3 λοβούς. Οι πνεύμονες των θηλαστικών είναι μεμβρανώδεις σάκοι χωρισμένοι σε κυψελίδες που αυξάνουν κατά πολύ τη διαθέσιμη επιφάνεια για ανταλλαγή αερίων. Η μέτρηση της επιφάνειας του ανθρώπινου πνεύμονα δείχνει ότι 1 cm<sup>3</sup> πνευμονικού ιστού έχει συνολική επιφάνεια ανταλλαγής αερίων 300 cm<sup>2</sup> [1]. Οι πνεύμονες αποτελούνται από ένα σύστημα διακλαδιζόμενων σωλήνων, το οποίο ξεκινά από την τραχεία και καταλήγει στις κυψελίδες (εικόνα 1). Η τραχεία διακλαδίζεται στον αριστερό και στον δεξιό βρόγχο. Αυτή η διαδικασία της διακλάδωσης συνεχίζεται σχηματίζοντας διαρκώς μικρότερους βρόγχους έως ότου σχηματιστούν τα βρογχιόλια. Στα βρογχιόλια κάνουν την εμφάνισή τους οι πρώτες κυψελίδες.



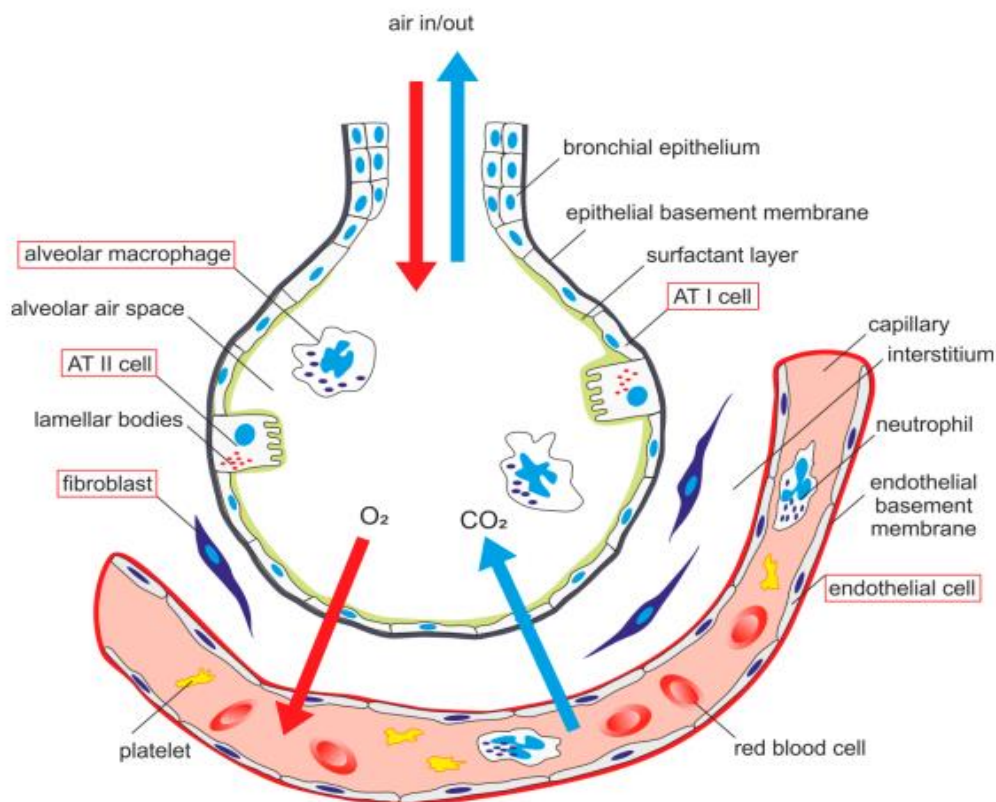
Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του βρογχικού δέντρου

Ince L. et al, Lung physiology and defense, Curr. Opin. Physiol., 2018, 5, 9-15

Η ανταλλαγή αερίων στον πνεύμονα πραγματοποιείται στις κυψελίδες. Οι κυψελίδες είναι σφαιρικά θυλάκια που αποτελούνται από επιθηλιακό ιστό και περιστοιχίζονται από ελαστική βασική μεμβράνη και επικοινωνούν μεταξύ τους. Έχουν σχήμα φουσαλίδας και υψηλή καμπυλότητα. Η κυψελιδική περιοχή που πραγματοποιείται η ανταλλαγή των αερίων ονομάζεται αναπνευστική ζώνη.. Το οξυγόνο μεταφέρεται από τις κυψελίδες στα τριχοειδή αγγεία και το διοξείδιο του άνθρακα απομακρύνεται από τα τριχοειδή αγγεία και διαχέεται στις κυψελίδες. [2].

## **1.2. Κυψελιδικό επιθήλιο**

Από ιστολογική όψη ο πνεύμονας είναι ένα πολύ περίπλοκο όργανο. Το κυψελιδικό επιθήλιο αποτελείται από 2 κύριους τύπους κυττάρων, τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου I (ΑΤΙ) και τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II (ΑΤΙΙ), που ονομάζονται αντίστοιχα και πνευμονοκύτταρα τύπου I και II. Τα ΑΤΙ μαζί με τα ΑΤΙΙ δημιουργούν μια πλήρη επιθηλιακή επένδυση στο περιφερειακό τμήμα των πνευμόνων και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην πνευμονική ομοιόσταση. Το κυψελιδικό επιθήλιο είναι ένα μηχανικό φράγμα, το οποίο προστατεύει τους πνεύμονες από περιβαλλοντικούς παράγοντες, συμμετέχει ενεργά στην ανοσολογική απόκριση των πνευμόνων και συντελεί στη διατήρηση της ισορροπίας του κυψελιδικού υγρού στην επιφάνεια. Το κυψελιδικό επιθήλιο βρίσκεται σε στενή επαφή με την ενδοθηλιακή μονοστοιβάδα του πνευμονικού τριχοειδούς δικτύου (εικόνα 2). Υπάρχουν κυψελιδικά μακροφάγα (ΑΜ) που βρίσκονται κοντά στην επιθηλιακή επιφάνεια και στα τριχοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο διάμεσος χώρος μεταξύ αυτών των δύο ειδών κυττάρων περιέχει τους πνευμονικούς ινοβλάστες.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του εσωτερικού μιας κυψελίδας

Nova Z., et al, Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 15;20(4):831. doi: 10.3390/ijms20040831. PMID: 30769918; PMCID: PMC6412348.

### Κυψελιδικά κύτταρα τύπου I (ATI)

Τα ATI καλύπτουν περίπου το 95% της κυψελιδικής επιφάνειας αποτελώντας περίπου το 8% του πληθυσμού των πνευμονικών κυττάρων. Τα ATI είναι μεμβρανώδη επίπεδα κύτταρα με διάμετρο μεταξύ 50 και 100  $\mu\text{m}$  [3], με επιφάνεια περίπου 5000  $\mu\text{m}^2$ , βρίσκονται πάνω από τα τριχοειδή αγγεία και παρέχουν την λεπτή επιφάνεια της κυψελίδας [4, 5]. Επίσης διαθέτουν μικρό αριθμό οργανιδίων. Το εξαιρετικά λεπτό κυτταρόπλασμα και ο περιορισμένος αριθμός μιτοχονδρίων που διαθέτουν, καθιστούν αυτά τα κύτταρα πολύ ευάλωτα σε τραυματισμό. Τα ATI αρχικά θεωρήθηκαν ως τερματικά διαφοροποιημένα κύτταρα χωρίς να έχουν την ικανότητα να διαιρούνται και να αλλάζουν τον φαινότυπο τους. Ωστόσο, πολύ πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τα ATI μπορούν να αλλάζουν τον φαινότυπο τους σε ATII και να πολλαπλασιαστούν.

Τα ΑΤΙ κύτταρα είναι εξαιρετικά εξειδικευμένα για την κύρια λειτουργία των πνευμόνων, η οποία είναι η ανταλλαγή αερίων μεταξύ των κυψελίδων και των τριχοειδών αγγείων. Βρίσκονται κοντά στα τριχοειδή αγγεία και σχηματίζουν το φράγμα μεταξύ αέρα και αίματος μέσω του οποίου διαχέονται τα αέρια και εξασφαλίζεται αποτελεσματική ανταλλαγή οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα μεταξύ των κυψελίδων και των τριχοειδών αγγείων [3]. Επιπλέον, συμβάλλουν στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, στη μεταφορά ιόντων, στη μεταφορά ιόντων και νερού, στον μεταβολισμό των πεπτιδίων, στη ρύθμιση της λειτουργίας των μακροφάγων και στα μονοπάτια σηματοδότησης στους πνεύμονες. Τα ΑΤΙ διαθέτουν όλες τις αντλίες για τη διακυτταρική μεταφορά νατρίου και παράλληλα εκφράζουν τόσο την ισομορφή  $\alpha 1$  όσο και την  $\alpha 2$  Na-ATPase, K-ATPase. Ακόμα δύο σημαντικές λειτουργίες των ΑΤΙ είναι η συμμετοχή τους στην έμφυτη ανοσολογική απόκριση των πνευμόνων καθώς και ότι εμπλέκονται στην προ-φλεγμονώδη απόκριση. Υπάρχει μεγάλη επιφάνεια επαφής με τα κυψελιδικά μακροφάγα. Τέλος, τα ΑΤΙ έχουν την ικανότητα να εκφράζουν υποδοχείς τύπου toll (TLRs) και να παράγουν έναν μεγάλο αριθμό προ-φλεγμονωδών κυτοκινών σε απόκριση τόσο κατά τη διέγερση τους από λιποπολυσακχαρίτη (LPS) όσο και κατά τη διάρκεια της πνευμονιοκοκκικής μόλυνσης.

### **Κυψελιδικά κύτταρα τύπου ΙΙ (ΑΤΙΙ)**

Τα ΑΤΙΙ καλύπτουν μόνο το 5% της κυψελιδικής επιφάνειας, αποτελώντας περίπου το 16% όλων των πνευμονικών κυττάρων. Τα ΑΤΙΙ είναι μικρά κυβοειδή κύτταρα με εμβαδόν επιφάνειας  $250 \mu\text{m}^2$ . Είναι μικρότερα από τα ΑΤΙ αλλά διαθέτουν μεγάλο πυρήνα. Επίσης έχουν χαρακτηριστική μορφολογία και μεγάλο αριθμό lamellar bodies.

Η κύρια λειτουργία των ΑΤΙΙ είναι η σύνθεση, η έκκριση και η ανακύκλωση του πνευμονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα, ο οποίος είναι απαραίτητος για την σωστή λειτουργία των πνευμόνων. Επιπλέον τα ΑΤΙΙ συνθέτουν και εκκρίνουν τις επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες SP-A , SP-B, SP-C και SP-D. Επίσης τα ΑΤΙΙ παράγουν κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Τα ΑΤΙΙ αντιπροσωπεύουν επίσης μια κυρία πηγή

ενδογενών αντιμικροβιακών πεπτιδίων στους πνεύμονες. Επομένως, αυτά τα κύτταρα μπορούν να αναφερθούν ως «υπερασπιστές της κυψελίδας». Τέλος, συμβάλλουν στη μεταφορά νατρίου μέσω αντλιών και έτσι βοηθούν στο να διατηρηθεί ο κυψελιδικός χώρος σχετικά ελεύθερος από υγρό.

Τα ΑΤΠ θεωρούνται ότι είναι πολυδύναμα κύτταρα με ικανότητες αυτό-αναγέννησης και διαφοροποίησης σε ΑΤΙ. Είναι υπεύθυνα για την αποκατάσταση του κατεστραμμένου ιστού. Επιπλέον η έλλειψη αυτού του κυτταρικού πληθυσμού μπορεί να οδηγήσει σε πολλές πνευμονικές ασθένειες. Για παράδειγμα, η βλάβη των ΑΤΠ παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (IPF). Η χορήγηση ΑΤΠ απευθείας στις κυψελίδες πιστεύεται ότι αποκαθιστά την ικανότητα αναγέννησης του επιθηλίου και ως εκ τούτου εξασθενεί ή ακόμη και αναστρέφει την εξέλιξη της IPF.

### **Κυψελιδικά μακροφάγα (AM)**

Τα κυψελιδικά μακροφάγα είναι η κύρια κυτταρική σειρά που εντοπίζεται στον βρογχοκυψελιδικό χώρο. Μαζί με τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα, παρέχουν την άμεση απόκριση σε τοξικές ουσίες και παθογόνους μικροοργανισμούς που φτάνουν στην κατώτερη αναπνευστική οδό. Ένας άλλος βασικός ρόλος των AM είναι η αποικοδόμηση του «χρησιμοποιούμενου» επιφανειοδραστικού παράγοντα, μέσω της οποίας αποτρέπουν την ενδοκυψελιδική συσσώρευση λιπιδίων και πρωτεϊνών και έτσι βοηθούν στη διατήρηση της ομοιόστασης των πνευμόνων.

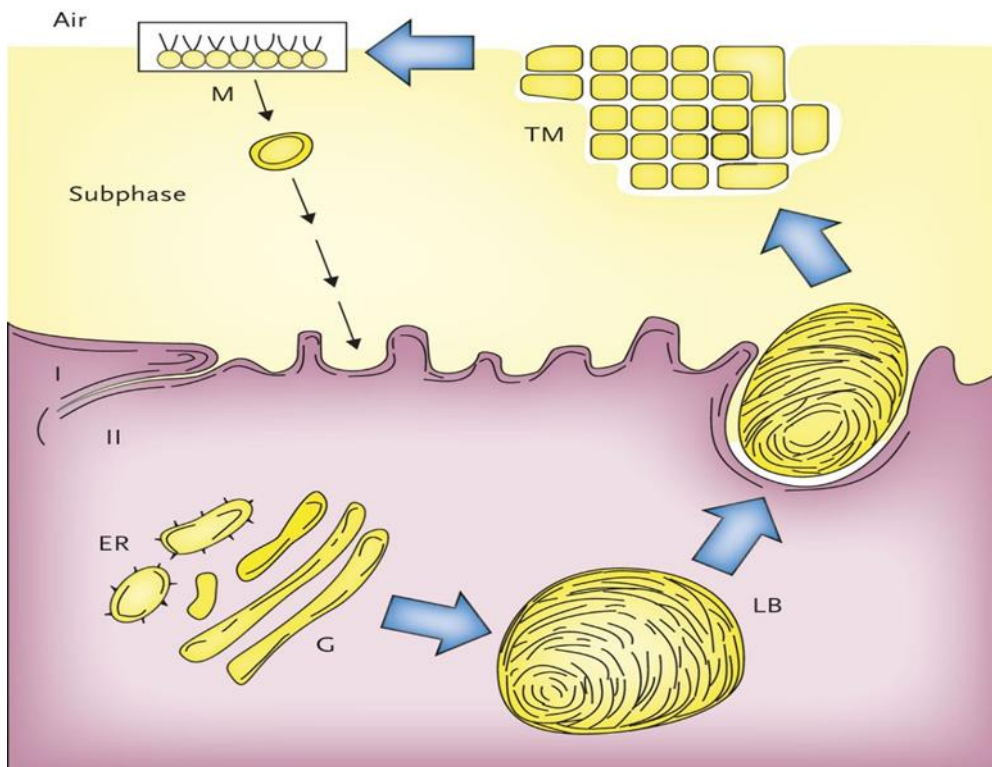
Τα AM είναι μεγάλα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα. Τα πρόδρομα τους, τα μονοκύτταρα δημιουργούνται από τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος. Τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα κατά τη μετανάστευση τους στους ιστούς. Υπάρχουν 3 βασικοί πληθυσμοί μακροφάγων με διαφορετικές λειτουργίες: τα M1, τα M2 και τα ρυθμιστικά μακροφάγα. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα M1, τα οποία παράγονται υπό την επίδραση IFN- $\gamma$ , διαθέτουν γενικά προ-φλεγμονώδεις ιδιότητες και συμβάλλουν στην άμυνα του ξενιστή έναντι διαφόρων βακτηρίων και ιών. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα M2, που επάγονται από τις κυτοκίνες IL-4 και IL-3 έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και ρυθμίζουν την επούλωση των πληγών. Τέλος τα ρυθμιστικά μακροφάγα εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες IL-10, η οποία είναι μια



αντιφλεγμονώδη κυτοκίνη που είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο των υπερβολικών φλεγμονοδών και αυτοάνοσων αντιδράσεων.

### **1.3. Επιφανειοδραστικός παράγοντας**

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων είναι ένα μίγμα λιπιδίων και πρωτεϊνών που παράγεται στους πνεύμονες από τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II και είναι απαραίτητος κατά την αναπνοή. Ως επί το πλείστον υπάρχουν δύο περιοχές στον οργανισμό όπου βρίσκεται ο επιφανειοδραστικός παράγοντας. Η μια είναι ενδοκυττάρια και η άλλη εξωκυττάρια. Το ενδοκυττάριο διαμέρισμα βρίσκεται στα πνευμονοκύτταρα τύπου II και αποτελείται από ελασματοειδή σωμάτια, η λειτουργία των οποίων είναι η αποθήκευση του επιφανειοδραστικού παράγοντα πριν απελευθερωθεί στον κυψελιδικό χώρο. Η εξωκυττάρια περιοχή αντίστοιχα είναι η κυψελιδική επιφάνεια στην οποία εκκρίνεται ο επιφανειοδραστικός παράγοντας [1]. Τα ελασματοειδή σωμάτια της ενδοκυττάριας περιοχής έχουν σφαιρικό σχήμα περιέχουν όλα τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα εξωκυτταρώνονται στην υδατική φάση του επιθηλίου όπου μετατρέπονται σε ένα σύμπλεγμα, το οποίο είναι γνωστό ως σωληνώδης μυελίνη (εικόνα 3) [6,7]. Έπειτα η σωληνώδης μυελίνη απλώνεται στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού, παίρνει την μορφή μονοστοιβάδας και καλύπτει τα κυψελιδικά τοιχώματα. Παράλληλα τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II έχουν την ικανότητα να επαναπροσλαμβάνουν το υλικό που δεν χρησιμοποιείται ή δεν περιλαμβάνεται στην μονοστοιβάδα και είτε να το επαναχρησιμοποιούν σε νέες βιοσυνθετικές πορείες είτε να το ενσωματώνουν στις αποθήκες των ελασματοειδών σωματίων μαζί με τον νεοσυντιθέμενο επιφανειοδραστικό παράγοντα [8].



Εικόνα 3: Σύνθεση και έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα

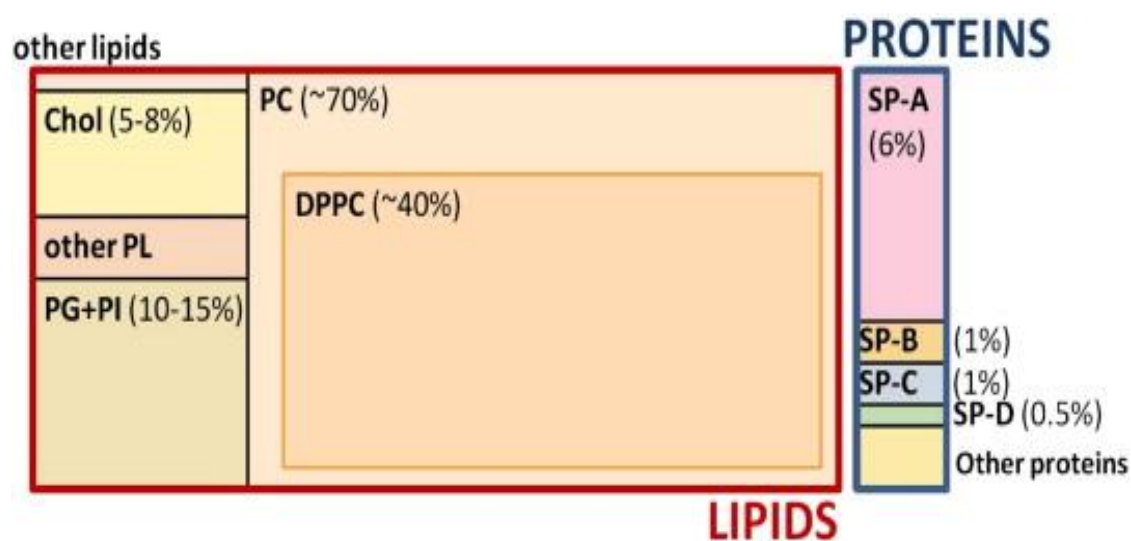
Chakraborty M., et all., Pulmonary surfactant in newborn infants and children, breathe, 2013, 9 (6), 476-488

Το βασικό συστατικό του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι η διπαλμιτυλοφωσφατίδυλο-χολίνη (DPPC). Τα μόρια της DPPC είναι υδρόφοβα στο ένα άκρο τους και υδρόφιλα στο άλλο. Η μονοστοιβάδα λιπιδίων στην επιφάνεια του υγρού γίνεται πλούσια σε μόρια DPPC έτσι ώστε οι μοριακές αποθητικές δυνάμεις να εναντιώνονται στις φυσιολογικές ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των μορίων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη της επιφανειακής τάσης [9]. Η κύρια λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι να μειώνει την επιφανειακή τάση στη διεπιφάνεια αέρα/υγρού εντός των κυψελίδων του πνεύμονα. Αυτό πραγματοποιείται χάρις την ύπαρξη των μορίων DPPC. Η χαμηλή επιφανειακή τάση έχει ως αποτέλεσμα να μειώσει το έργο της αναπνοής και να αποτρέψει την κατάρρευση των κυψελίδων στο τέλος της εκπνοής. Επιπλέον, ο επιφανειοδραστικός παράγοντας είναι το πρώτο εμπόδιο που συναντούν τα παθογόνα σε μια από τις μεγαλύτερες εκτεθειμένες επιφάνειες του ανθρώπινου σώματος. Επίσης, μια άλλη λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι να διατηρεί τις κυψελίδες ελεύθερες από υγρό. Οι δυνάμεις της επιφανειακής τάσης έχουν την τάση να προκαλέσουν κατάρρευση των κυψελιδικών τοιχωμάτων και παράλληλα απορρόφηση από τα κυψελιδικά

τριχοειδή στον κυψελιδικό χώρο. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας μειώνοντας αυτές τις δυνάμεις, προστατεύει από την εισροή υγρού στις κυψελίδες και τη δημιουργία πνευμονικού οιδήματος [10].

## 1.4. Σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων αποτελείται 90% από λιπίδια και 10% από πρωτεΐνες (εικόνα 4) [9]. Τα λιπίδια είναι κυρίως φωσφολιπίδια ενώ οι πρωτεΐνες είναι εξειδικευμένες επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες.



Εικόνα 5: Σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα

Lopez-Rodriguez E., et al, Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: from biophysics to therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1838(6):1568-85. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.01.028. Epub 2014 Feb 11. PMID: 24525076.

### 1.4.1. Λιπίδια

Τα κύρια συστατικά του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι τα λιπίδια. Τα φωσφολιπίδια είναι αμφιπαθητικά μόρια που έχουν πολικό και υδρόφιλο τμήμα και μη πολικές ή υδρόφοβες αλυσίδες. Αυτός ο τύπος μορίου υιοθετεί μια συγκεκριμένη διάταξη στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού, ελαχιστοποιώντας την επαφή μεταξύ της υδρόφοβης περιοχής και των μορίων νερού. Αυτό σημαίνει ότι τα φωσφολιπίδια έχουν έναν ενεργειακά ευνοϊκό προσανατολισμό, στρέφοντας τις πολικές κεφαλές

προς την υδατική φάση ενώ οι μη πολικές αλυσίδες προσανατολίζονται προς τον αέρα.

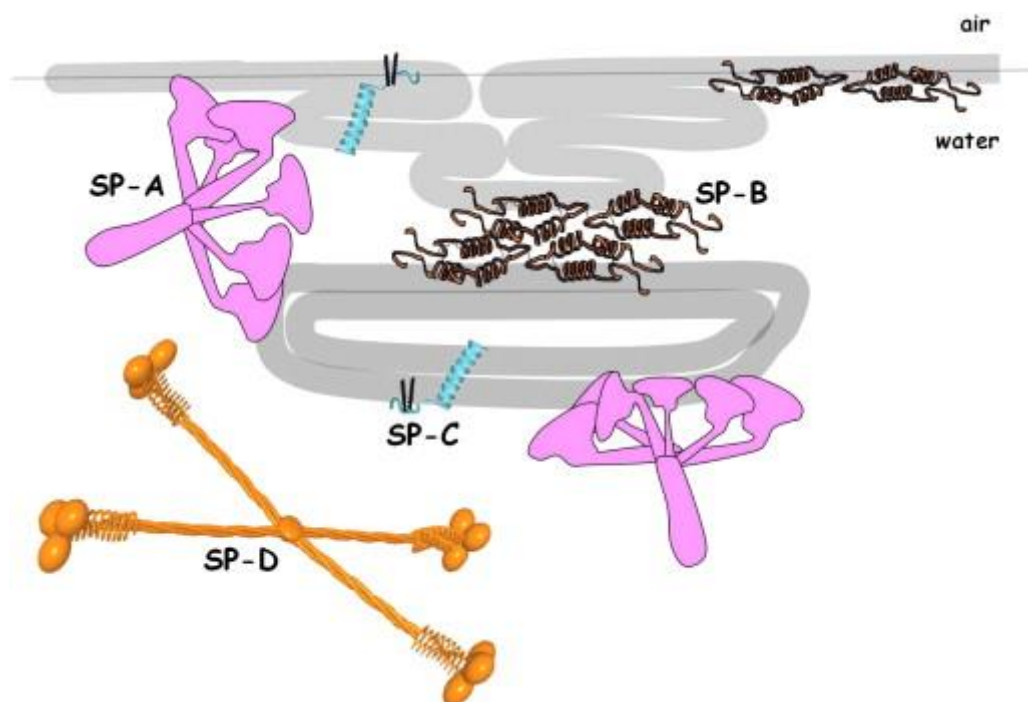
Η σύνθεση των επιφανειοδραστικών λιπιδίων είναι αρκετά διαφορετική από άλλων μεμβρανικών συστημάτων. Το επικρατέστερο φωσφολιπίδιο στον επιφανειοδραστικό παράγοντα είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC), η οποία βρίσκεται σε ποσοστό περίπου 70%. Περίπου το 40% της φωσφατιδυλοχολίνης είναι εστεροποιημένο και στις δύο θέσεις με παλμιτικό οξύ. Η διπαλμιτυλοφωσφατιδυλοχολίνη (DPPC) είναι το κύριο συστατικό του επιφανειοδραστικού παράγοντα, η οποία είναι απαραίτητη για την μείωση της επιφανειακής τάσης στον πνεύμονα κατά την συμπίεση. Η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) μαζί με την φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (PI) είναι δύο ανιονικά φωσφολιπίδια που καταλαμβάνουν το 10-15% του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Αυτά τα είδη συμμετέχουν σε επιλεκτικές αλληλεπιδράσεις με τις κατιονικές υδρόφοβες πρωτεΐνες. Οι υπόλοιποι τύποι φωσφολιπιδίων, που περιλαμβάνουν την φωσφατιδυλοσερίνη (PS), την φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) και το φωσφατιδικό οξύ (PA) βρίσκονται σε πολύ μικρές αναλογίες [9,11].

Η χοληστερόλη είναι το πιο άφθονο ουδέτερο λιπίδιο που υπάρχει στον πνευμονικό επιφανειοδραστικό παράγοντα. Όσο σημαντική και αν είναι η σύσταση των φωσφολιπιδίων, εξίσου σημαντική είναι και η παρουσία κατάλληλης αναλογίας χοληστερόλης στον παράγοντα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η περιεκτικότητα σε χοληστερόλη είναι 3-8%. Τα άλλα ουδέτερα λιπίδια που υπάρχουν σε ακόμα μικρότερες ποσότητες περιλαμβάνουν, εστέρες χοληστερόλης, τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα.

#### **1.4.2. Πρωτεΐνες**

Υπάρχουν τέσσερις επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες γνωστές και ως SP-A, SP-B, SP-C και SP-D (εικόνα 5), οι οποίες συνεισφέρουν σε κάποιο βαθμό στη ρύθμιση του μεταβολισμού και στις λειτουργίες του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες. Η SP-B και η SP-C είναι δύο μικρές υδρόφοβες πρωτεΐνες, οι οποίες συνεισφέρουν στη μείωση της επιφανειακής τάσης. Αντίθετα η SP-A και η SP-D είναι δύο μεγάλες υδρόφιλες πρωτεΐνες, οι οποίες

παίζουν σημαντικό ρόλο στην έμφυτη άμυνα του ξενιστή καθώς και στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης στους πνεύμονες [9,12].



Εικόνα 5: Δομές των επιφανειοδραστικών πρωτεϊνών

Lopez-Rodriguez E., et al, Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: from biophysics to therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jun;1838(6):1568-85. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.01.028. Epub 2014 Feb 11. PMID: 24525076.

#### 1.4.2.1. SP-A και SP-D

Οι SP-A και SP-D είναι υδρόφιλες πρωτεΐνες και συστατικά του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος, διότι είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης στον πνεύμονα. Ανήκουν σε μια οικογένεια πρωτεϊνών γνωστές και ως κολλεκτίνες. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν μια αμινοτελική περιοχή παρόμοια με το κολλαγόνο και μια C-τελική περιοχή λεκτίνης που δεσμεύει τους υδατάνθρακες με τρόπο εξαρτώμενο από το ασβέστιο. Είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση και την οψωνοποίηση μικροοργανισμών, παρουσιάζοντάς τους στα κυψελιδικά μακροφάγα. Επίσης, παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση απουσία κυττάρων του ανοσοποιητικού [9,11,]

Η κυρίαρχη πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον επιφανειοδραστικό παράγοντα είναι η γλυκοπρωτεΐνη SP-A. Η SP-A ήταν η πρώτη επιφανειοδραστική πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε. Η μονομερή της μορφή έχει μοριακό βάρος 26 kDa και η ανθρώπινη SP-A αποτελείται από 248 αμινοξέα. Η κύρια δομή της SP-A περιλαμβάνει τέσσερις περιοχές: μια αμινοτελική περιοχή, μια κολλαγονική περιοχή, μια περιοχή λαιμού και έναν τομέα αναγνώρισης υδατανθράκων. Η ενεργή της μορφή που απαντάται στους πνεύμονες είναι ένα δεκαοκταμερές που αποτελείται από έξι τριμερή, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω δισουλφιδικών γεφυρών και μη-ομοιοπολικών δεσμών στις περιοχές κολλαγόνου. Η SP-A συμμετέχει στον σχηματισμό της σωληνοειδούς μυελίνης, βοηθά στον ρυθμό απορρόφησης των λιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα και συνεισφέρει στην επιφανειοδραστική λειτουργία. Επιπλέον, η SP-A παίζει σημαντικό ρόλο στην έμφυτη άμυνα των πνευμόνων, καθώς περιορίζει την εγκαθίδρυση ενός ισχυρού φλεγμονώδους περιβάλλοντος. Τέλος, προσδένεται σε διάφορα λιπίδια συμπεριλαμβανομένων και της διπαλμιτυλοφωσφατιδυλοχολίνης και αλληλεπιδρά με υποδοχείς των κυψελιδικών κυττάρων τύπου II και των μακροφάγων [1,10].

Η άλλη υδρόφιλη επιφανειοδραστική γλυκοπρωτεΐνη είναι η SP-D. Η ανθρώπινη SP-D αποτελείται από 355 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 43 kDa υπό αναγωγικές συνθήκες. Δομικά είναι παρόμοια με την SP-A καθώς και αυτή αποτελείται από τις ίδιες τέσσερις περιοχές. Σε αντίθεση με την SP-A, η SP-D δεν συμμετέχει στην επιφανειοδραστική λειτουργία, καθώς δεν μειώνει την επιφανειακή τάση. Η SP-D είναι εξαρτώμενη από το ασβέστιο πρωτεΐνη που συνδέεται με υδατάνθρακες και ιδιαίτερα με α-γλυκοζυλικά κατάλοιπα. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με LPS διαφόρων βακτηρίων. Αυτό το γεγονός αποτρέπει την δέσμευση του LPS με τα granulocytes και κατά συνέπεια προστατεύει από σηπτικό σοκ. Τέλος, έχει την ικανότητα να δεσμεύεται σε ιούς και βακτήρια, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί και τα κυψελιδικά μακροφάγα [1].

#### **1.4.2.2. SP-B και SP-C**

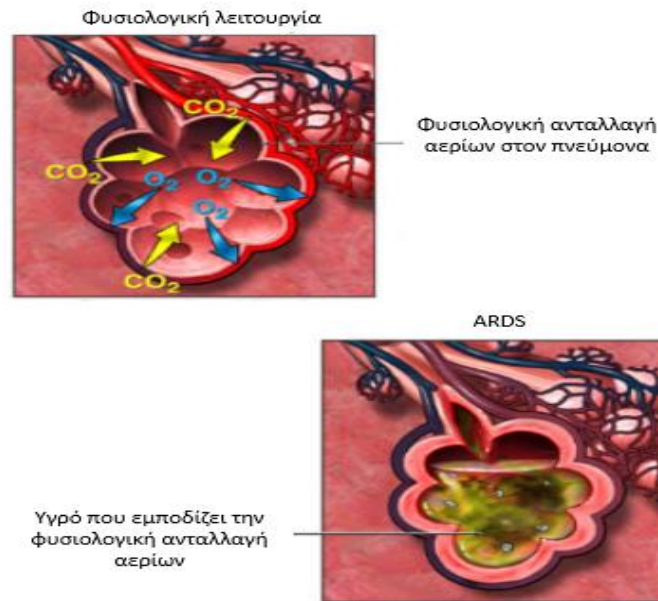
Η SP-B είναι μια ισχυρά υδρόφοβη πρωτεΐνη που αποτελείται από 79 αμινοξέα και σχηματίζει ένα ομοδιμερές με μοριακό βάρος 17 kDa. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της SP-B είναι ότι περιέχει τρεις ενδομοριακές δισουλφιδικές γέφυρες και μια

διαμοριακή, η οποία οδηγεί στη διμερή μορφή της πρωτεΐνης. Παράλληλα, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της σωληνώδους μυελίνης. Επίσης, έχει ισχυρό θετικό φορτίο και έτσι αλληλεπιδρά ειδικά με ανιονικά φωσφολιπίδια όπως η PG. Τέλος, η SP-B επάγει τη διαπερατότητα και τη συσσωμάτωση των φωσφολιπιδικών μεμβρανών.

Η SP-C είναι ένα μικρό υδρόφοβο πεπτίδιο που αποτελείται από 35 αμινοξέα με μοριακό βάρος 3,7 kDa. Το N-τελικό της άκρο έχει θετικό φορτίο χωρίς καθορισμένη δευτεροταγή δομή και περιλαμβάνει δύο υπολείμματα κυστεΐνης τα οποία έχουν υποστεί παλμιτοϋλίωση. Το θετικό φορτίο που διαθέτει η SP-C δημιουργεί αλληλεπιδράσεις με τα ανιονικά φωσφολιπίδια και η πρωτεΐνη φαίνεται να παρουσιάζει ειδική συμπεριφορά παρουσία χοληστερόλης. Η SP-C διευκολύνει την μεταφορά φωσφολιπιδίων στην αέρια-υγρή διεπιφάνεια και επιπλέον δεν φαίνεται να διαδραματίζει κάποιον ρόλο στο σχηματισμό της σωληνώδους μυελίνης.

### **1.5. Επιφανειοδραστικός παράγοντας και πνευμονικές διαταραχές**

Οι ανωμαλίες στην παραγωγή ή λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα σχετίζονται με αρκετές πνευμονικές ασθένειες. Ταυτόχρονα οι πνευμονικές λοιμώξεις τροποποιούν τον μεταβολισμό του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Η πιο γνωστή διαταραχή που οφείλεται στην ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (RDS) σε βρέφη που έχουν γεννηθεί πρόωρα, καθώς αυτά δεν έχουν προλάβει να συνθέσουν την απαιτούμενη ποσότητα. Στους ενήλικες ανθρώπους αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι σε άτομα με σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) τόσο η σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα όσο και η λειτουργία του έχουν τροποποιηθεί (εικόνα 6). Επίσης η ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα μπορεί να επηρεάσει την ισορροπία υγρών στον πνεύμονα μέσω επίδρασης στην πίεση του αίματος. Σε κατάσταση αναπνευστικής δυσχέρειας η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του αίματος ελαττώνεται και το αναπνευστικό σύνδρομο σχετίζεται με υποπρωτεΐναιμία.



Εικόνα 6: Διαφορά μεταξύ μιας φυσιολογικής κυψελίδας και μιας με ARDS

Han S., et al The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. Ann Am Thorac Soc. 2015 May;12(5):765-74. doi: 10.1513/AnnalsATS.201411-507FR. PMID: 25742123; PMCID: PMC4418337.

Αν και οι διαταραχές που αναφέρονται παραπάνω σχετίζονται με ανεπάρκεια ή δυσλειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα, η υπερβολική αφθονία του μπορεί επίσης να προκαλέσει κλινική ασθένεια. Η πνευμονική κυψελιδική πρωτεϊνωση είναι μια σπάνια ασθένεια που προκαλείται από μεταλλάξεις γονιδίων και έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση επιφανειοδραστικού παράγοντα στις κυψελίδες. Εξαιτίας αυτής της κατάστασης διαταράσσεται η φυσιολογική ανταλλαγή αερίων μεταξύ του πνεύμονα και των τριχοειδών αγγείων.

Ακόμα πολλές αναπνευστικές λοιμώξεις έχει αποδειχθεί ότι τροποποιούν τη σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Για παράδειγμα το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* μπλοκάρει τη βιοσύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, αποδυναμώνει την άμυνα του ξενιστή και εκκρίνει ελαστάση για την αποικοδόμηση των SP-A και SP-D. Επίσης, ο LPS αναστέλλει την σύνθεση και έκκριση φωσφολιπιδίων. Η αναστολή της βιοσύνθεσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα από βακτήρια φέρεται να σχετίζεται με κυτοκίνες του κυττάρου ξενιστή, όπως ο tumor necrosis factor a (TNF-a), ο οποίος οδηγεί σε αποδόμηση των βιοσυνθετικών ενζύμων του επιφανειοδραστικού παράγοντα [11].

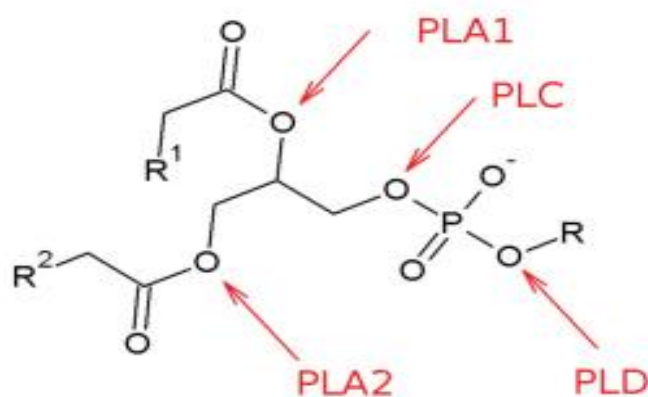


## Κεφάλαιο 2:

### Φωσφολιπάσες A<sub>2</sub> και sPLA<sub>2</sub>-IIA

#### 2.1. Εισαγωγή στις φωσφολιπάσες

Οι φωσφολιπάσες είναι μια υπεροικογένεια ενζύμων που έχουν όλα μια κοινή ιδιότητα η οποία είναι η υδρόλυση των φωσφολιπιδίων. Χωρίζονται σε τέσσερις κύριες οικογένειες (A, B, C και D) ανάλογα με τον δεσμό που διασπών στο φωσφολιπιδικό μόριο. Οι φωσφολιπάσες A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) και A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) υδρολύουν τις *sn*-1 και *sn*-2 ακυλικές αλυσίδες του φωσφολιπιδίου αντίστοιχα. Οι φωσφολιπάσες B (PLB) αποκόπτουν δύο λιπαρά οξέα. Οι φωσφολιπάσες C (PLC) με την ικανότητα φωσφοδιεστεράσης που διαθέτουν υδρολύουν τον γλυκεροφωσφορικό δεσμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό διακυλογλυκερόλης και φωσφορικού οξέος που περιέχει πολική ομάδα. Οι φωσφολιπάσες D (PLD) υδρολύουν τους δεσμούς μεταξύ των φωσφορικών ομάδων και των αλκοολών οδηγώντας στην απελευθέρωση φωσφατιδικού οξέος και αλκοόλης (εικόνα 7) [13]



Εικόνα 7: Απεικόνιση των δεσμών που διασπών οι φωσφολιπάσες στο φωσφολιπιδικό μόριο

Filkin S., et al, Phospholipase Superfamily: Structure, Functions, and Biotechnological Applications, Usp Biol Khim, 2020, 85, 177-195

Οι φωσφολιπάσες  $A_2$  είναι εστεράσες που καταλύουν την υδρόλυση των εστερικών δεσμών στην sn-2 θέση των γλυκεροφωσφολιπιδίων προς παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων και λυσοφωσφολιπιδίων μέσω ενός καταλυτικού μηχανισμού διεπιφανειακής ενεργοποίησης [14]. Από τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα και στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, ήταν γνωστό ότι οι  $PLA_2$  αποτελούν κύριο συστατικό του δηλητηρίου των φιδιών. Οι πρώτες φωσφολιπάσες που ανακαλύφθηκαν, προήλθαν από δηλητήριο φιδιών «Παλιού» (ομάδα I) και «Νέου Κόσμου» (ομάδα II). Οι  $PLA_2$  των φιδιών αυτών διαφέρουν ως προς το μοτίβο των δισουλφιδικών δεσμών που διαθέτουν. Αργότερα ανακαλύφθηκε ότι το κύριο ένζυμο που βοηθάει στην πέψη των θηλαστικών ήταν η παγκρεατική  $PLA_2$ . Το ένζυμο αυτό ήταν περισσότερο όμοιο με αυτό από τα φίδια του «Παλιού Κόσμου» όπως η ινδική κόμπρα (ομάδα IA) και για αυτό ονομάστηκε ομάδα IB. Το 1989 και το 1991, ανακαλύφθηκαν δύο ανθρώπινες  $PLA_2$ s, μια εκκρινόμενη και μια κυτοσολική αντίστοιχα. Η  $sPLA_2$  κατηγοριοποιήθηκε στην ομάδα II (αργότερα GIIA) και η  $cPLA_2$  σε ένα νέα ομάδα IV (αργότερα GIVA), ενώ όσο περισσότερα ένζυμα ερχόντουσαν στην επιφάνεια, τόσο περισσότερο μεγάλωναν οι ομάδες και δημιουργούνταν νέες υποομάδες. Πρόσφατα, οι  $PLA_2$  έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον ως βασικός παράγοντας για την παθογένεση του COVID-19 [15]. Αυτά τα ένζυμα μπορούν να ταξινομηθούν σε ομάδες με βάση τα βιοχημικά τους χαρακτηριστικά, τις ιδιότητες τους και το μέρος που εντοπίζονται [16,17].

## 2.2 Κατηγορίες φωσφολιπασών $A_2$

Με βάση τα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν παραπάνω οι φωσφολιπάσες  $A_2$  μπορούν να καταταχθούν στις παρακάτω κατηγορίες: **1)** τις εκκρινόμενες φωσφολιπάσες  $A_2$  ( $sPLA_2$ ), **2)** τις κυτοσολικές φωσφολιπάσες  $A_2$  ( $cPLA_2$ ), **3)** τις ενδοκυττάρειες ανεξάρτητες από ιόντα  $Ca^{2+}$  φωσφολιπάσες  $A_2$  ( $iPLA_2$ ), **4)** τις λυσοσωμικές φωσφολιπάσες  $A_2$  ( $aiPLA_2$  και  $LPLA_2$ ) και **5)** τις PAF-ακετυλυδρολάσες

### 1) Εκκρινόμενες φωσφολιπάσες $A_2$

Οι  $sPLA_2$ s είναι εκκρινόμενες πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους (14-57 kDa) οι οποίες περιλαμβάνουν 11 ισομορφές (πίνακας 1) [18]. Κάθε μια από αυτές περιέχει 5-

8 δισουλφιδικούς δεσμούς. Απαιτούν ιόντα  $Ca^{2+}$  σε συγκέντρωση millimolar (mM) για την δράση τους και διαθέτουν μια ιστιδίνη στο ενεργό τους κέντρο. Επιπλέον έχουν χαρακτηριστική τριτοταγή δομή, η οποία προσδίδει στα ένζυμα αυτά σταθερότητα έναντι της πρωτεόλυσης και αντίσταση στη μετουσίωση, με αποτέλεσμα να διατηρούν την ενεργότητά τους στα εξωκυττάρια υγρά όπου και βρίσκονται. Οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες  $A_2$  έχουν εκλεκτικότητα στην υδρόλυση των ανιονικών φωσφολιπιδίων, όπως η φωσφατιδυλοχολίνη και η φωσφατιδυλογλυκερόλη, τα οποία είναι κύρια συστατικά των φωσφολιπιδίων του πνευμονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα. Επομένως, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην άμυνα του πνεύμονα του ξενιστή. Σε αντίθεση με τις κυτοσολικές φωσφολιπάσες  $A_2$ , οι εκκρινόμενες δεν εμφανίζουν κάποια προτίμηση για αραχιδονικό οξύ στη θέση sn-2 των φωσφολιπιδίων. Παράλληλα, συμμετέχουν σε ένα πλήθος παθολογικών διαδικασιών μέσω της απελευθέρωσης του αραχιδονικού οξέος από τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια. Αυτό οδηγεί στην παραγωγή φλεγμονοδών λιπιδικών μεσολαβητών όπως προσταγλανδίνες, λευκοτριένια και θρομβοξάνες. Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για την sPLA<sub>2</sub>-IIA καθώς αποτελεί ρυθμιστή διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών [15,19]. Για την συγκεκριμένη πρωτεΐνη θα γίνει εκτενής αναφορά παρακάτω

Επίσημη ονομασία	Ενναλακτική ονομασία	Δισουλφιδικοί δεσμοί	Μοριακό βάρος (kDa)	Καταλυτικά αμινοξέα
PLA2G1B	sPLA2-1B, G1B PLA2, pancreatic PLA2	7	13-15	His/Asp
PLA2G2A	sPLA2-IIA, GIIA PLA2	7	13-15	His/Asp
PLA2G2C	sPLA2-IIC, GIIC PLA2	8	15	His/Asp
PLA2G2D	sPLA2-IIID, GIID PLA2	7	14-15	His/Asp
PLA2G2E	sPLA2-IIIE, GIIE PLA2	7	14-15	His/Asp
PLA2G2F	sPLA2-IIIF, GIIF PLA2	7	16-17	His/Asp
PLA2G3	sPLA2-III, GIII PLA2	5	Lizard/Bee: 15-18 Human/Murine: 55	His/Asp
PLA2G5	sPLA2-V, GV PLA2	6	14	His/Asp
PLA2G10	sPLA2-X, GX PLA2	8	14	His/Asp
PLA2G12A	sPLA2-XIIA, GXIIA PLA2	7	19	His/Asp
PLA2G12B	sPLA2-XIIB, GXIIB PLA2	7	19	Leucine/Asp

Πίνακας 1: Ισομορφές των εκκρινόμενων φωσφολιπασών

Kim R. R., et al, Structural and Functional Aspects of Targeting the Secreted Human Group IIA Phospholipase A<sub>2</sub>. *Molecules*. 2020 Sep 28;25(19):4459. doi: 10.3390/molecules25194459. PMID: 32998383; PMCID: PMC7583969.

## **2) Κυτοσολικές φωσφολιπάσες A<sub>2</sub>**

Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει διαλυτές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες με μεταβλητά μεγέθη (61-95 kDa). Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες απαιτούν την παρουσία ιόντων Ca<sup>2+</sup> σε συγκέντρωση 1mM για τη μέγιστη δράση τους και καταλύουν κατά προτίμηση την υδρόλυση του αραχιδονικού οξέος της sn-2 θέσης των φωσφολιπιδίων. Το ένζυμο cPLA<sub>2</sub>-IVA ή cPLA<sub>2</sub>α (γονίδιο PLA2G4A) ήταν το πρώτο που ανακαλύφθηκε από αυτή την κατηγορία πρωτεϊνών. Οι κυτοσολικές φωσφολιπάσες εκφράζονται στα μακροφάγα του ανθρώπινου πνεύμονα και συμβάλλουν στη μετανάστευση μονοκυττάρων σε θέσεις φλεγμονής, σε μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων. Τέλος εμφανίζουν δραστηριότητα λυσοφωσφολιπάσης και ο καταλυτικός μηχανισμός τους περιλαμβάνει μια δυάδα Ser/Asp [15,19,20].

## **3) Ενδοκυττάρειες ανεξάρτητες από ιόντα Ca<sup>2+</sup> φωσφολιπάσες A<sub>2</sub>**

Αυτή η ομάδα πρωτεϊνών που δεν απαιτεί ιόντα Ca<sup>2+</sup> συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση των μεμβρανών και στη δημιουργία του αραχιδονικού οξέος. Οι διάφορες ισομορφές των iPLA<sub>2</sub> χαρακτηρίζονται από διαφορετικό κυτταρικό εντοπισμό και διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην απόπτωση κατά τη διάρκεια του ER στρές. Επίσης ρυθμίζουν την επαγωγή της sPLA<sub>2</sub>-IIA και την ταχύτητα και κατεύθυνση των ανθρώπινων μονοκυττάρων κατά τη χημειοταξία προς τις φλεγμονώδεις περιοχές [15,21]

## **4) Λυσοσωμικές φωσφολιπάσες A<sub>2</sub>**

Η συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεϊνών αποτελείται από δύο ένζυμα: την aiPLA<sub>2</sub> και την LPLA<sub>2</sub>. Η aiPLA<sub>2</sub> (που ονομάζεται και υπεροξυρεδοξίνη-6) είναι ένα όξινο ένζυμο που δεν εξαρτάται από ιόντα Ca<sup>2+</sup> και έχει μια δράση υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Εκφράζεται από τα κυψελιδικά μακροφάγα και από το κυψελιδικό επιθήλιο των αεραγωγών και επίσης εντοπίζεται στα ελασματοειδή σωματίδια, στο κυτοσόλιο και στα εξωκυττάρια υγρά. Το άλλο ένζυμο αυτής της κατηγορίας, η LPLA<sub>2</sub> διαθέτει δραστηριότητα τρανσακυκλάσης και εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα κυψελιδικά μακροφάγα και στον πνευμονικό ιστό συνολικά. Τέλος συμβάλλει σημαντικά στην αποικοδόμηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα [15].

## 5) PAF-ακετυλδωρολάσες

Οι φωσφολιπάσες A<sub>2</sub> που δείχνουν προτίμηση στις βραχείες ακυλικές αλυσίδες της sn-2 θέσης των φωσφολιπιδίων είναι γνωστές ως ακετυλδωρολάσες που ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια (PAF-AH). Το όνομα αυτό προήλθε από τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (platelet activating factor, PAF) ο οποίος είναι ένας από τους πιο ισχυρούς λιπιδικούς μεσολαβητές της φλεγμονής. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η PAF-AH μπορούν εύκολα να υδρολύσουν βραχείες ακυλικές αλυσίδες που έχουν κατακερματιστεί κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες. Ωστόσο, η ευεργετική τους δράση στη σήψη αμφισβητείται από το γεγονός ότι η έγχυση PAF-AH δεν έφερε τα προσδοκόμενα αποτελέσματα, πιθανώς λόγω της τοξικότητας των προϊόντων που απελευθερώνουν [22].

### 2.3 Δράση φωσφολιπασών A<sub>2</sub>

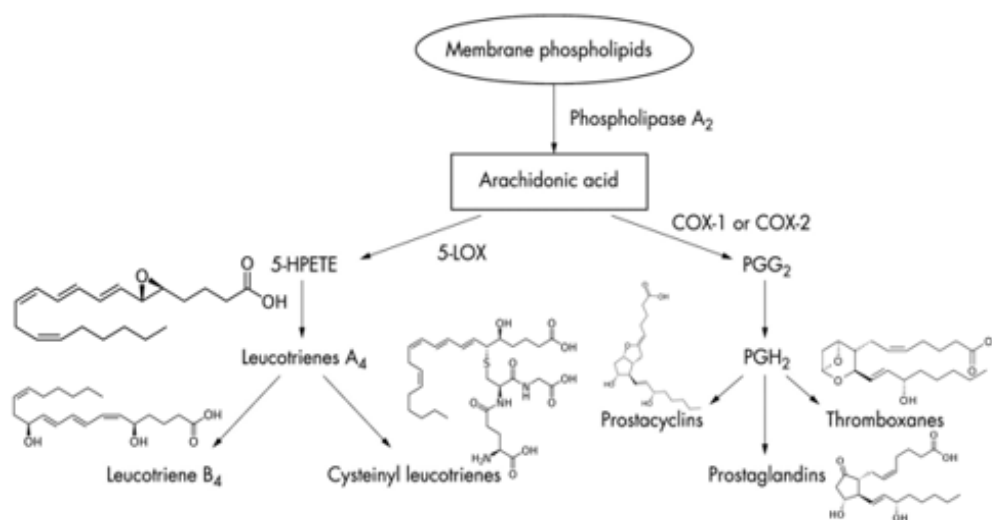
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η υδρόλυση των γλυκεροφωσφολιπιδίων στη θέση sn-2 από τις PLA<sub>2</sub> παράγει ελεύθερα λιπαρά οξέα και λυσοφωσφολιπίδια. Τα λυσοφωσφολιπίδια έχουν ισχυρή καταλυτική δράση και είναι το πρόδρομο μόριο του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων. Παράλληλα, ένα από τα πιο σημαντικά λιπαρά οξέα που παράγονται από αυτή τη διαδικασία είναι το αραχιδονικό οξύ, το οποίο αποτελεί το πρόδρομο μόριο των εικοσανοειδών. Οι δύο κύριες κατηγορίες που μεταβολίζουν άμεσα το αραχιδονικό οξύ είναι οι κυκλοξυγονάσες (COX) και οι λιποξυγονάσες (LOX), των οποίων τα προϊόντα τους μπορούν να μεταβολιστούν περαιτέρω από άλλα ένζυμα. Αυτά τα ένζυμα είναι που τελικά καθορίζουν τον τύπο των εικοσανοειδών που παράγονται [18].

Οι COX είναι γνωστές και ως συνθάσες προσταγλανδίνης- ενδοπεροξειδίου και οι επιδράσεις τους στον πόνο, στη φλεγμονή και στον έλεγχο της θερμοκρασίας είναι καλά τεκμηριωμένες. Υπάρχουν 2 υπότυποι των COX, η COX-1 και η COX-2, που έχουν χαρακτηριστεί ως προς την δομή και την λειτουργία τους. Οι μεταβολίτες που παράγονται από το μονοπάτι των COX είναι γνωστοί ως προστανοειδή και κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε προστακυκλίνες, προσταγλανδίνες και θρομβοξάνες. Η COX-1 είναι υπεύθυνη για την παραγωγή θρομβοξάνης A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)

στα αιμοπετάλια. Επίσης η COX-1 είναι συστατική, ενώ η COX-2 είναι επαγόμενη και ρυθμίζεται από κυτοκίνες [18].

Από αρκετές υποομάδες ενζύμων LOX που βρίσκονται στον άνθρωπο, η υποομάδα 5-LOX είναι αυτή που εμπλέκεται περισσότερο σε φλεγμονώδεις διαταραχές. Αυτό το ένζυμο οξειδώνει το αραχιδονικό οξύ και άλλα λιπαρά οξέα, παράγοντας μια ομάδα μεταβολιτών που ονομάζεται λευκοτριένια, τα οποία είναι σημαντικοί μεσολαβητές της σηματοδότησης των λιπιδίων στη φλεγμονή και ιδιαίτερα στο αναπνευστικό σύστημα [18].

Οι COX επιδρούν στο αραχιδονικό οξύ και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ασταθών ενδοπεροξειδίων προσταγλανδίνης, τα οποία μετατρέπονται σε PGH<sub>2</sub> και εν συνεχεία μπορούν να μετατραπούν σε περαιτέρω προστανοειδή όπως PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> (εικόνα 8). Αντίθετα η 5-LOX είναι ένα ένζυμο που απαιτεί ιόντα ασβεστίου και ενεργοποιείται μέσω ATP. Η κατάλυση του αραχιδονικού οξέος από την 5-LOX έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία του 5-υδροπεροξυεικοσατετραενοϊκού οξέος (5-HPETE). Το μόριο αυτό είναι ασταθές και μεταβολίζεται στη συνέχεια στο μόριο LTA<sub>4</sub>. Το συγκεκριμένο μόριο αποτελεί το υπόστρωμα για τα τελικά ένζυμα της οδού των λευκοτριενίων [18,23,24].



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος στη διαδικασία της φλεγμονής

J Martel- Pelletier et al, Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. Ann Rheum Dis. 2003 Jun;62(6):501-9. doi: 10.1136/ard.62.6.501. PMID: 12759283; PMCID: PMC1754580.

## 2.4 sPLA<sub>2</sub>-IIA

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η sPLA<sub>2</sub>-IIA (γονίδιο PLA2G2A) είναι η πιο μελετημένη ισομορφή από τις εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A<sub>2</sub>. Το ένζυμο αυτό ήταν η πρώτη θηλαστική, μη παγκρεατική φωσφολιπάση που αναγνωρίστηκε, καθώς αρχικά εντοπίστηκε στο αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, υποδηλώνοντας ότι εμπλέκεται σε καταστάσεις φλεγμονής. Η sPLA<sub>2</sub>-IIA είναι ένα ένζυμο εξαρτώμενο από τα ιόντα Ca<sup>2+</sup> με βέλτιστο pH 8-10. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη αποτελείται από 124 αμινοξέα, διαθέτει δομικά χαρακτηριστικά που είναι κοινά με άλλες φωσφολιπάσες και έχει ένα μοτίβο ημι-κυστίνης που είναι χαρακτηριστικό του δηλητηρίου των φιδιών της ομάδας II [19,25].

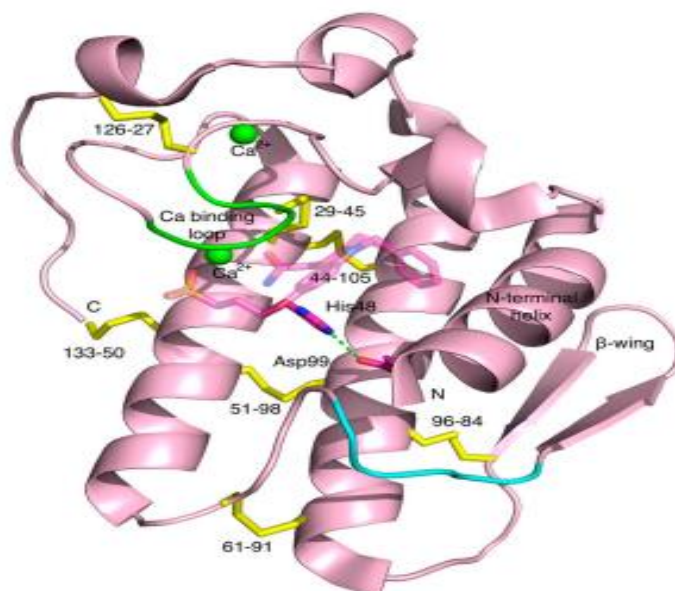
Η sPLA<sub>2</sub>-IIA είναι μια πρωτεΐνη οξείας φάσης υπάρχει στα αιμοπετάλια και εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα κυψελιδικά μακροφάγα μέσω ενός μοντέλου οξείας πνευμονικής βλάβης (ALI) που προκαλείται από LPS. Αποθηκεύεται στους εκκρινόμενους κόκκους των κυττάρων και εκφράζεται επίσης σε διάφορους ανθρώπινους ιστούς συμπεριλαμβανομένου και του πνεύμονα. Επιπλέον παίζει ρόλο στη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία, όπως στην αναδιαμόρφωση των λιπιδίων για την ομοίωση της κυτταρικής μεμβράνης, στην αντιπηκτική δράση, στην αντιμικροβιακή δράση και στην κυτταρική προσκόλληση. Επίσης έχει καταγραφεί στα βιολογικά υγρά ασθενών με φλεγμονώδεις ασθένειες όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα, παγκρεατίτιδα καρδιαγγειακές παθήσεις, σηπτικό σοκ και σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας [19].

Το ένζυμο αυτό έχει πολλά μοναδικά χαρακτηριστικά που δεν διαθέτουν τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των εκκρινόμενων φωσφολιπασών A<sub>2</sub>. Πρώτον, εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στην κυκλοφορία, αλλά αυξάνεται γρήγορα και έντονα σε καταστάσεις φλεγμονής ή μικροβιακής λοίμωξης. Δεύτερον, η sPLA<sub>2</sub>-IIA έχει εκλεκτικότητα σε ανιονικά φωσφολιπίδια όπως η φωσφατιδυλογλυκερόλη, η φωσφατιδυλοσερίνη και η καρδιολιπίνη. Η εξαιρετικά κατιοντική φύση του ενζύμου, δηλαδή ένα φορτίο περίπου +17 και η απουσία θρυπτοφάνης στη θέση δέσμευσης του ενζύμου είναι σημαντικά χαρακτηριστικά που προσδίδουν αυτή τη λιπιδική ιδιαιτερότητα. Τόσο η παρουσία της sPLA<sub>2</sub>-IIA σε εκκρίσεις όσο και η προτίμηση της σε ανιονικά φωσφολιπίδια συμβάλλουν στην εκλεκτικότητα του ενζύμου στις

βακτηριακές μεμβράνες και το ένζυμο έχει μικρή επίδραση στις μεμβράνες των κυττάρων του ξενιστή σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις [25].

## 2.5. Καταλυτικός μηχανισμός της sPLA<sub>2</sub>-IIA

Το εξαιρετικά διατηρημένο δομικό χαρακτηριστικό μεταξύ των ενζύμων των εκκρινόμενων PLA<sub>2</sub> είναι η καταλυτική δυάδα που αποτελείται από μια ιστιδίνη (His-48) και ένα ασπαραγινικό οξύ (Asp-99) και βρίσκεται στο ενεργό κέντρο των ενζύμων όπως φαίνεται και στην τρισδιάστατη δομή της sPLA<sub>2</sub>-IIA (εικόνα 9). Η δυάδα αυτή βρίσκεται στο εσωτερικό του ενζύμου, σε μικρή απόσταση από το ιόν ασβεστίου που είναι συνδεδεμένο με τον βρόγχο δέσμευσης ασβεστίου. Επειδή και τα δύο αμινοξέα είναι φορτισμένα, το ένα είναι βασικό και το άλλο είναι όξινο, υπάρχει ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ του δ ατόμου οξυγόνου του καρβοξυλίου του ασπαραγινικού οξέος (O<sup>δ1</sup>) και του ε ατόμου αζώτου του δακτυλίου της ιστιδίνης (N<sup>ε2</sup>). Η καταλυτική δυάδα His/Asp μοιάζει πολύ με την κλασσική καταλυτική τριάδα σε υδρολάσες σερίνης, η οποία αποτελείται από μια σερίνη, ένα βασικό και ένα όξινο αμινοξύ αλλά προφανώς λείπει η σερίνη που δρα ως πυρηνόφιλο και η οποία προσβάλλει το υπόστρωμα για να ξεκινήσει η υδρόλυση [18,26].

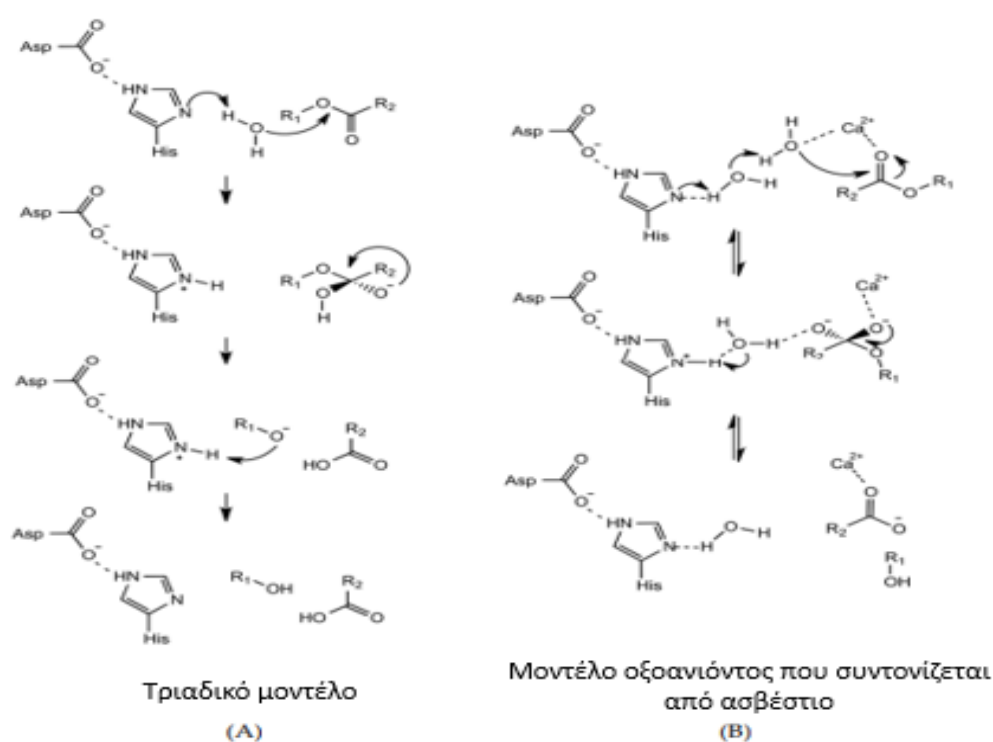


Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής της sPLA<sub>2</sub>-IIA

Kim R. R., et al, Structural and Functional Aspects of Targeting the Secreted Human Group IIA Phospholipase A2. *Molecules*. 2020 Sep 28;25(19):4459. doi: 10.3390/molecules25194459. PMID: 32998383; PMCID: PMC7583969.



Ένας από τους πρώτους προτεινόμενους καταλυτικούς μηχανισμούς της sPLA<sub>2</sub>-IIA είναι το τριαδικό μοντέλο (εικόνα 10). Το μόριο νερού δεσμεύεται στο N<sup>δ1</sup> άτομο της ιστιδίνης του ενεργού κέντρου. Το νερό κατέχει τον ρόλο του πυρηνόφιλου αντί για την σερίνη που λείπει και αφού έχει πολωθεί από το άζωτο της ιστιδίνης προσβάλλει την καρβοξυλομάδα του φωσφολιπιδικού υποστρώματος. Σε αυτό βοηθά εν μέρει και η παρουσία του ασπαρτικού στη καταλυτική δυάδα, καθώς η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση που δημιουργείται με το N<sup>ε2</sup> άτομο της ιστιδίνης κάνει το N<sup>δ1</sup> περισσότερο ηλεκτρονιόφιλο. Δύο ιόντα ασβεστίου βρίσκονται πλησίον του ενεργού κέντρου. Το ιόν που βρίσκεται πιο κοντά παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτόν τον μηχανισμό, καθώς συντονίζεται από τρία καρβονικά οξυγόνα (της His-28, της Gly-30 και της Gly-32) στον βρόγχο δέσμευσης ασβεστίου, αλλά και από τα καρβοξυλικά οξυγόνα του Asp-49. Το ιόν ασβεστίου σταθεροποιεί το ενδιάμεσο προϊόν της αντίδρασης συντονίζοντας την καρβονυλική ομάδα του φωσφολιπιδικού υποστρώματος και το αρνητικό φορτίο του φωσφορικού οξυγόνου [18].



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των προτεινόμενων μοντέλων του καταλυτικού μηχανισμού της sPLA<sub>2</sub>-IIA.

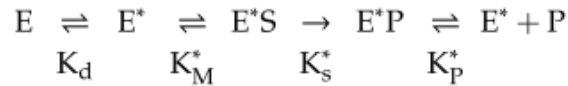
Kim R. R., et al, Structural and Functional Aspects of Targeting the Secreted Human Group IIA Phospholipase A2. *Molecules*. 2020 Sep 28;25(19):4459. doi: 10.3390/molecules25194459. PMID: 32998383; PMCID: PMC7583969.

Επίσης στην εικόνα 10, παρουσιάζεται ένας εναλλακτικός μηχανισμός, όπου εμπλέκεται στην κατάλυση και ένα επιπλέον μόριο νερού ( $H_2O-2$ ) το οποίο συντονίζεται με το ιόν ασβεστίου και βρίσκεται  $2.8 \text{ \AA}$  μακριά από το μόριο νερού ( $H_2O-1$ ) που δεσμεύεται με το  $N^{\delta 1}$  άτομο της ιστιδίνης. Το  $H_2O-2$  αλληλεπιδρά έμμεσα με το  $N^{\delta 1}$  σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου με το  $H_2O-1$ , το οποίο έπειτα συνδέεται με  $N^{\delta 1}$  άτομο της ιστιδίνης. Συνεπώς, όταν το  $N^{\delta 1}$  πρωτονιώνεται το  $H_2O-2$  πολώνεται και μπορεί να δράσει ως πυρηνόφιλο. Το πολωμένο νερό προσβάλλει την καρβονυλική ομάδα του υποστρώματος, σχηματίζοντας ένα οξοανιόν, που συντονίζει το ιόν ασβεστίου. Σε αντίθεση με τον πρώτο μηχανισμό, η εμπλοκή του δεύτερου μορίου νερού μειώνει την ενέργεια ενεργοποίησης που απαιτείται για τον τετραεδρικό σχηματισμό που πρωτονιώνει το  $N^{\delta 1}$  [18].

Για την λειτουργία του ενζύμου και για την πραγματοποίηση της υδρόλυσης, το ένζυμο αρχικά πρέπει να συνδεθεί στο φωσφολιπιδικό υπόστρωμα. Γενικά τα μόρια φωσφολιπιδίων δεν βρίσκονται ελεύθερα στον οργανισμό, αλλά με τη μορφή συσσωματωμάτων όπως μικκύλια ή διπλοστοιβάδες, δυσχεραίνοντας την διαδικασία, καθώς το ένζυμο πρέπει να προσροφηθεί στην επιφάνεια του υποστρώματος, σε όποια μορφή είναι αυτό [18].

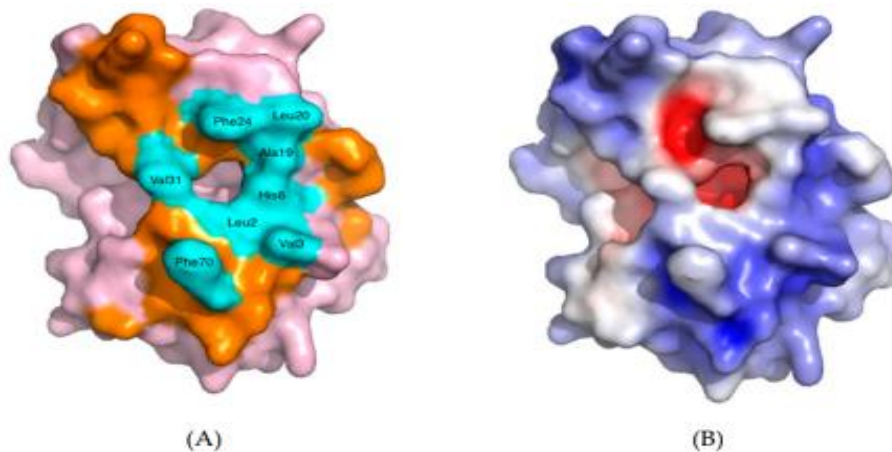
## 2.6 Κινητική του ένζυμου

Δύο μοντέλα κινητικής έχουν προταθεί για να περιγράψουν πως συμπεριφέρεται το ένζυμο μόλις προσροφηθεί στην επιφάνεια του υποστρώματος: το «hooping mode» και το «scooting mode». Στο μοντέλο «hooping mode» το ένζυμο δεσμεύεται στην επιφάνεια του υποστρώματος, υδρολύει μόνο ένα μόριο του υποστρώματος και στη συνέχεια θα αποσπαστεί από την επιφάνεια πριν βρει το επόμενο μόριο του υποστρώματος για να υδρολύσει. Αντίθετα στο μοντέλο «scooting mode» το ένζυμο ολοκληρώνει πολλαπλούς κύκλους υδρόλυσης των μορίων του υποστρώματος χωρίς να εκροφηθεί από την επιφάνεια του. Αμφότεροι οι μηχανισμοί, προτείνουν ότι το ελεύθερο ένζυμο ( $E$ ) πρέπει να σχηματίσει μια επιφανειακά δεσμευμένη μορφή ( $E^*$ ) πριν προχωρήσει με την κλασσική κινητική εξίσωση όπως απεικονίζεται παρακάτω [18].



Σύμφωνα με *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, φάνηκε πως η ενζυμική δραστηριότητα επιταχύνθηκε σημαντικά όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος έφτανε την κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων ή διπλοστοιβάδας, καθώς το ένζυμο στην ελεύθερη μορφή είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματικό στην κατάλυση. Επιπλέον, η ενζυμική κινητική των sPLA<sub>2</sub>s εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα του ενζύμου να προσροφάται στην επιφάνεια των φωσφολιπιδίων (K<sub>d</sub>) αλλά και από την ικανότητα που διαθέτει κάθε μεμονωμένο μόριο φωσφολιπιδίου να συνδεθεί στο ενεργό κέντρο πριν από την υδρόλυση (K<sub>M</sub><sup>\*</sup>).

Το τμήμα των sPLA<sub>2</sub> που αλληλεπιδρά με την επιφάνεια του φωσφολιπιδικού υποστρώματος, αποτελείται από αμινοξέα με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και ονομάζεται διεπιφανειακή επιφάνεια σύνδεσης (*i*-face). Αυτά τα αμινοξέα είναι ως επί το πλείστον υδρόφοβα και ασκούν ισχυρές υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις αλλά μπορεί επίσης να περιλαμβάνουν κατιονικά κατάλοιπα, τα οποία μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με ανιονικές ουσίες όπως στην περίπτωση της sPLA<sub>2</sub>-IIA. Μέσα στην *i*-face υπάρχουν αμινοξέα που σχηματίζουν την είσοδο για το ενεργό κέντρο και παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο αλληλοεπιδρώντας με το υπόστρωμα (εικόνα 11) [18].



Εικόνα 11: Α: Τα κυανά αμινοξέα σχηματίζουν την είσοδο για το ενεργό κέντρο. Το *i*-face απεικονίζεται με πορτοκαλί χρώμα. Β: Απεικόνιση του ηλεκτροστατικού φορτίου

Kim R. R., et al, Structural and Functional Aspects of Targeting the Secreted Human Group IIA Phospholipase A2. *Molecules*. 2020 Sep 28;25(19):4459. doi: 10.3390/molecules25194459. PMID: 32998383; PMCID: PMC7583969.

## 2.7 Αντιβακτηριακή δράση της sPLA<sub>2</sub>-IIA

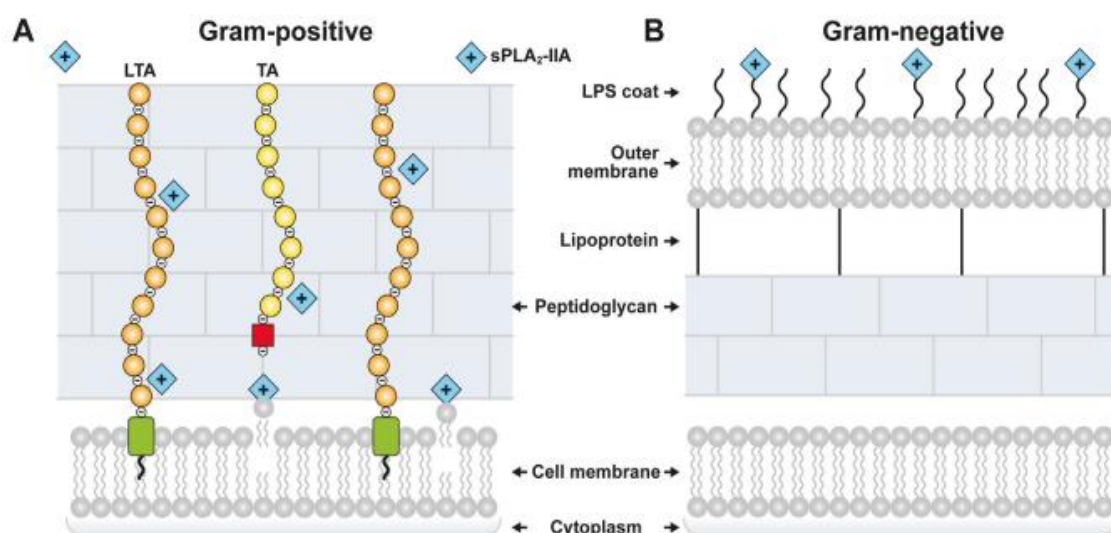
Η εγγενής προτίμηση της sPLA<sub>2</sub>-IIA στις βακτηριακές μεμβράνες και η παρουσία της στην κυκλοφορία του αίματος έχουν πυροδοτήσει μελέτες για τη διερεύνηση του ρόλου της στην άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού. Τέτοιες μελέτες έχουν ασχοληθεί κυρίως με το ρόλο της sPLA<sub>2</sub>-IIA στην άμυνα ενάντια στα παθογόνα βακτήρια που προκαλούν συστηματικές λοιμώξεις όπως ο στρεπτόκοκκος της ομάδας A και B, ο *Staphylococcus aureus* και διάφορα άλλα. Η έκφραση του ενζύμου αυτού στον άνθρωπο είναι υψηλή σε φυσιολογικές καταστάσεις σε σημεία φραγμού όπως είναι τα δάκρυα. Αυτό το γεγονός δείχνει ότι η sPLA<sub>2</sub>-IIA μπορεί να εξοντώσει άμεσα τα βακτήρια που εισβάλλουν στον οργανισμό και επίσης να παίζει ρόλο στη διαμόρφωση του μικροβιώματος [25,27]

Η sPLA<sub>2</sub>-IIA δρα επιλεκτικά στις βακτηριακές μεμβράνες σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις. Παρολαυτά δεν είναι ευαίσθητα όλα τα βακτήρια στην θανάτωση από την sPLA<sub>2</sub>-IIA. Διάφορα πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι τα Gram- αρνητικά βακτήρια είναι ανθεκτικά στη θανάτωση με ανασυνδυασμένη sPLA<sub>2</sub>-IIA. Τα βακτήρια αυτά διαθέτουν ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης, το οποίο καλύπτεται από μια εξωτερική μεμβράνη, η οποία είναι επικαλυμμένη με LPS. Η δομή αυτή είναι που αποτρέπει το ένζυμο να διεισδύσει στην μεμβράνη και να προκαλέσει τον θάνατο αυτών των βακτηρίων (εικόνα 12, σχήμα Β). Αυτή η αντίσταση μπορεί να ξεπεραστεί μόνο σε πολύπλοκα περιβάλλοντα με την συμβολή πρόσθετων παραγόντων. Αντίθετα σχεδόν όλα τα Gram-θετικά βακτήρια μπορούν να θανατωθούν με ανασυνδυασμένη sPLA<sub>2</sub>-IIA σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις *in vitro* [24,25].

Η ευαισθησία στην sPLA<sub>2</sub>-IIA διαφέρει πολύ ακόμα και μεταξύ των ειδών των Gram-θετικών βακτηρίων. Πρώτον, οι διαφορές στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, οι οποίες διευκολύνουν ή εμποδίζουν τη μεταφορά του ενζύμου στη μεμβράνη είναι καθοριστικός παράγοντας στη διαφορετική ευαισθησία. Δεύτερον, πολλά βακτήρια συμπεριλαμβανομένου του *Staphylococcus aureus* έχουν την ικανότητα να αντικαθιστούν ή να επιδιορθώνουν φωσφολιπίδια της μεμβράνης που υδρολύονται από την sPLA<sub>2</sub>-IIA. Επίσης η βακτηριακή ανάπτυξη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο

καθώς *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι βακτήρια που στερούνταν θρεπτικά συστατικά και βακτήρια που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με βακτηριοστατικά συστατικά παρουσιάζουν χαμηλότερη ευαισθησία στην sPLA<sub>2</sub>-IIA [24]

Η σύνδεση της sPLA<sub>2</sub>-IIA με τα βακτήρια εξαρτάται από το φορτίο. Το ένζυμο είναι θετικά φορτισμένο και απαιτεί για βέλτιστη δέσμευση αρνητικά φορτισμένες δομές όπως τα τειχοϊκά οξέα που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα των Gram-θετικών βακτηρίων. Η διείσδυση στο κυτταρικό τοίχωμα είναι πιθανότατα το πιο κρίσιμο βήμα για τον προσδιορισμό της διαφορετικής ευαισθησίας στην sPLA<sub>2</sub>-IIA μεταξύ διαφορετικών ειδών Gram-θετικών βακτηρίων. Παρόμοια με τη σύνδεση, η διείσδυση του ενζύμου εξαρτάται από το φορτίο και πιστεύεται ότι συμβαίνει μέσω μιας διαδικασίας «ανιονικής σκάλας» εκμεταλλευόμενη τα άφθονα αρνητικά φορτισμένα τειχοϊκά οξέα που εκτείνονται σε ολόκληρο το κυτταρικό τοίχωμα (εικόνα 12, σχήμα A) [24,27].



Εικόνα 12: A: Σχηματική αναπαράσταση της διείσδυσης της sPLA<sub>2</sub>-IIA στη μεμβράνη των Gram-θετικών βακτηρίων. B: Απεικόνιση της αντίστασης που συναντά η sPLA<sub>2</sub>-IIA από την εξωτερική μεμβράνη και τον LPS των Gram-αρνητικών βακτηρίων

Dore E. et al, Roles of secreted phospholipase A2 group IIA in inflammation and host defense. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019 Jun;1864(6):789-802. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.08.017. Epub 2018 Sep 13. PMID: 30905346.

## 2.8 sPLA<sub>2</sub>-IIA και φλεγμονή

Σημαντική επαγωγή του ενζύμου παρατηρείται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με την φλεγμονή. Το ένζυμο απελευθερώνεται ως απόκριση σε φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF) και βρίσκεται σε πολλά φλεγμονώδη υγρά και στο πλάσμα στις παθολογικές καταστάσεις [18].

Καθώς το ένζυμο ανακαλύφθηκε από τα αρθρικά υγρά των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, η συσχέτιση της sPLA<sub>2</sub>-IIA με την παθοφυσιολογία της ασθένειας είναι θεμελιώδη στη βιβλιογραφία. Στην αρθρίτιδα το ένζυμο αυξάνεται σημαντικά και η συγκέντρωση της μπορεί να είναι και αρκετά μικρογραμμάρια ανά χιλιοστόλιτρο. Η sPLA<sub>2</sub>-IIA μπορεί να χρησιμεύσει ως σημαντικός βιοδείκτης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας καθώς κλινικές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι υπάρχει αναλογική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του ενζύμου στον ορό και της σοβαρότητας της νόσου [28].

Σε αρκετές οξείες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως παγκρεατίτιδα, περιτονίτιδα και σηψαιμία έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα της sPLA<sub>2</sub>-IIA στον ορό. Το συνολικό επίπεδο της πρωτεΐνης σε άτομα που δεν έχουν φλεγμονώδη νόσο είναι χαμηλό, αλλά μπορεί να αυξηθεί πολύ γρήγορα έως και 1000 φορές εντός των πρώτων ημερών από την έναρξη της φλεγμονώδους νόσου. Επίσης τα επίπεδα της sPLA<sub>2</sub>-IIA είναι αυξημένα σε ορισμένες φλεγμονώδεις καταστάσεις του αναπνευστικού συστήματος. Τόσο η συγκέντρωση του ενζύμου όσο και του αραχιδονικού οξέος βρέθηκαν να είναι αυξημένα στο υγρό βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης (BAL) σε ασθενείς με άσθμα. Η sPLA<sub>2</sub>-IIA έχει την ικανότητα να αποικοδομεί τα φωσφολιπίδια του πνευμονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα. Τέλος η συγκέντρωση του ενζύμου είναι αυξημένη στο BAL ασθενών με ARDS και κυρίως σε ασθενείς με πρώιμο ARDS πράγμα που συνδέεται με το γεγονός ότι η sPLA<sub>2</sub>-IIA είναι πρωτεΐνη οξείας φάσης [14,18,29].

## Κεφάλαιο 3: Φλεγμονή και ARDS

### 3.1. Φλεγμονή

Ως φλεγμονή ορίζεται η τοπική ή συστηματική αντίδραση του οργανισμού σε τραυματισμό κυττάρων, ιστών και οργάνων. Η φλεγμονή είναι το κύριο συστατικό της έμφυτης ανοσίας και η καταστροφή των μικροοργανισμών είναι η κύρια λειτουργία της, μέσω της οποίας έρχονται σε επαφή τα παθογόνα που ζουν στο μολυσμένο ιστό με τα κύτταρα τελεστές. Συστατικά μικροβίων, όπως ο LPS που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων μπορούν να πυροδοτήσουν φλεγμονώδη απόκριση μέσω των αλληλεπιδράσεων τους με υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Η φλεγμονή ως απόκριση σε μικροοργανισμούς περιλαμβάνει την αυξημένη σύνθεση ενός αριθμού μεσολαβητών συμπεριλαμβανομένων των χημειοκινών και των κυτοκινών. Οι τελευταίες εμπεριέχουν την IL-1 και τον TNF- $\alpha$  [30,31].

Υπάρχουν δύο είδη φλεγμονής η οξεία και η χρόνια. Η οξεία φλεγμονή εκδηλώνεται μέσω τριών βασικών τρόπων:

1. Αλλαγές στη διάμετρο των αγγείων, που έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένη ροή αίματος στην εστία της φλεγμονής.
2. Δομικές αλλαγές στην κυκλοφορία που διευκολύνουν την έξοδο των πρωτεϊνών του πλάσματος και των λευκοκυττάρων από το αίμα στον ιστό.
3. Μετανάστευση των λευκοκυττάρων από την κυκλοφορία του αίματος και προσκόλληση τους στον ιστό, καθώς και η περαιτέρω ενεργοποίησή τους, η οποία επιτρέπει την εξάλειψη των επιβλαβών παραγόντων.

Μόλις η λοίμωξη εξαλειφθεί ή τουλάχιστον ελεγχθεί, ενεργοποιούνται μηχανισμοί που δρουν για να περιορίσουν κάθε τύπο επιθετικότητας εναντίον του ξενιστή και να ξεκινήσουν τη διαδικασία αποκατάστασης του ιστού.

Εάν η οξεία φλεγμονώδης απόκριση δεν καταφέρει να εξαλείψει το παθογόνο, η φλεγμονώδης διαδικασία επιμένει και αποκτά νέα χαρακτηριστικά. Εμφανίζεται μια χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση, που περιλαμβάνει το σχηματισμό κοκκιωμάτων. Η χρόνια φλεγμονή περιλαμβάνει τις προοδευτικές αλλαγές τόσο στα φλεγμονώδη κύτταρα όσο και στην καταστροφή και επιδιόρθωση των ιστών λόγω της

συνεχιζόμενης φλεγμονώδους διαδικασίας. Κατά συνέπεια η φλεγμονή μπορεί να γίνει παθολογική λόγω της απώλειας των ρυθμιστικών διεργασιών (εικόνα 13). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των φλεγμονωδών κυττάρων τόσο στην κυκλοφορία του αίματος όσο και στην περιοχή της βλάβης. Τέλος αυξάνονται πολύ οι συγκεντρώσεις των φλεγμονωδών βιοδεικτών στο πλάσμα του αίματος. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να παρατηρηθούν σε ασθενείς με χρόνιες παθήσεις όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα [30,32,33].

Το τελευταίο διάστημα έχει σημειωθεί τεράστια πρόοδος σχετικά με την κατανόηση των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που συμμετέχουν στην οξεία φλεγμονώδη απόκριση στη λοίμωξη και σε μικρότερο βαθμό, στην βλάβη των ιστών. Παρόλα αυτά πολύ λιγότερα είναι γνωστά για τις βιοχημικές μεταβολές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης, καθώς και για τις αιτίες και τους μηχανισμούς που οδηγούν σε χρόνια φλεγμονή. Τέλος, η χρόνια φλεγμονή φαίνεται μην προκαλείται από τους κλασικούς υποκινητές της φλεγμονής, αλλά να συνδέεται με διαταραχές των ομοιοστατικών μηχανισμών που συμβάλλουν στη δυσλειτουργία του ιστού [33,34].



Εικόνα 13: Αίτια, φυσιολογικός ρόλος και παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με τη φλεγμονή.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. 2008 Jul 24;454(7203):428-35. doi: 10.1038/nature07201. PMID: 1865091

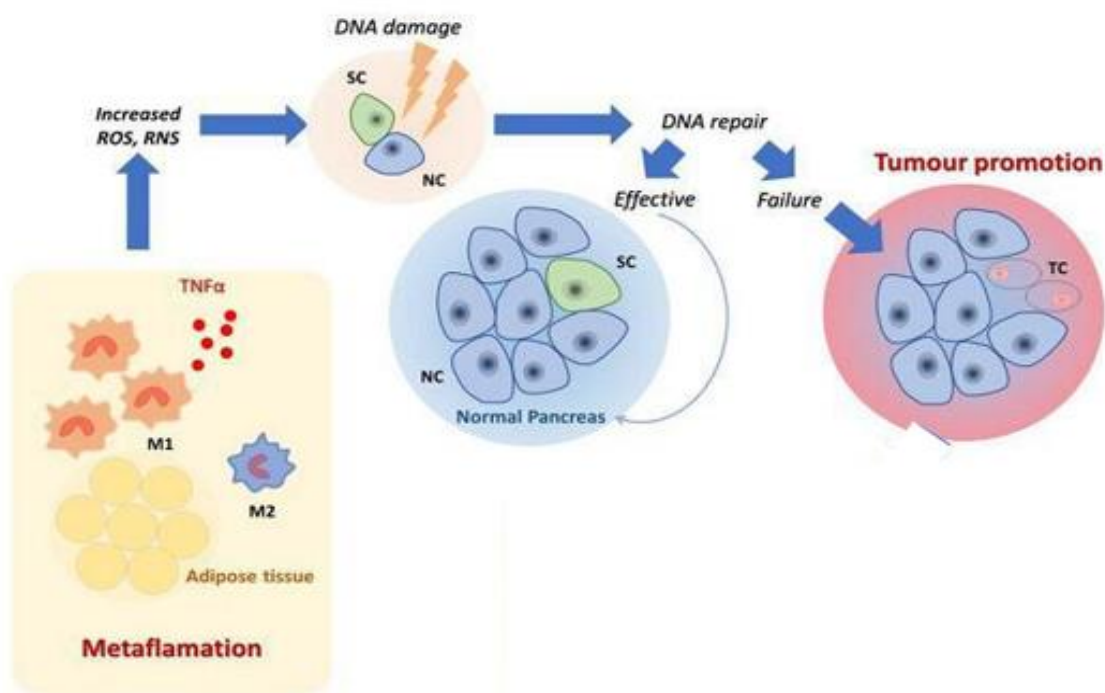


### 3.2 Φλεγμονή και καρκίνος

Η χρόνια φλεγμονή εμπλέκεται στον νεοπλασματικό μετασχηματισμό και στην ανάπτυξη του καρκίνου. Ήδη από το 1828 ο Jean Nicholas Marjolin παρείχε στοιχεία για την συμμετοχή της χρόνιας φλεγμονής στην ανάπτυξη του καρκίνου. Υπολογίζεται επί του παρόντος ότι το 25% των καρκίνων σχετίζεται με χρόνια φλεγμονή που προκαλείται από λοίμωξη ή φυσικοχημικούς παράγοντες. Η επίμονη γαστρίτιδα που προκαλείται από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου του στομάχου κατά 75%, ενώ οι τύποι ηπατίτιδας B και C προάγουν τον σχηματισμό ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Η στενότερη σχέση μεταξύ χρόνιας φλεγμονής και καρκίνου μπορεί να παρατηρηθεί στη χρόνια ελκώδη κολίτιδα και τη νόσο του Crohn, οι οποίες αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του εντέρου έως και δέκα φορές [35].

Οι όγκοι που βασίζονται στη φλεγμονή χαρακτηρίζονται από την παρουσία κυττάρων και φλεγμονοδών μεσολαβητών, υποδεικνύοντας έτσι ότι η φλεγμονή και ο καρκίνος μπορούν να συνδυαστούν με τις εξωγενείς και με τις ενδογενείς οδούς. Η ανάπτυξη του καρκίνου σχετίζεται με μια συνεχιζόμενη φλεγμονώδη κατάσταση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκαλούνται γενετικές αλλαγές που οδηγούν σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων και αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Κύτταρα με αλλοιωμένο φαινότυπο παράγουν φλεγμονώδεις μεσολαβητές οδηγώντας έτσι στην ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης και στην ανάπτυξη φλεγμονής [35,36]

Η ανάπτυξη του καρκίνου ξεκινά όταν η αλληλουχία του DNA στα φυσιολογικά κύτταρα υφίσταται γενετικές μεταλλάξεις που μπορεί να υπάρχουν σε υγιείς ιστούς και να παραμένουν κρυφές για πολλά χρόνια έως ότου ένα άλλο ερέθισμα ωθήσει τα κύτταρα στο στάδιο της «προαγωγής». Αυτή η διαδικασία μπορεί να συμβεί όταν τα μετασχηματισμένα κύτταρα εκτίθενται σε ερεθιστικούς παράγοντες όπως ουσίες που απελευθερώνονται στο σημείο του τραυματισμού, ορμόνες, χρόνιο ερεθισμό και φλεγμονή. Συνήθως μια μόνο αλλαγή στο DNA είναι ανεπαρκής, αλλά 4-5 μεταλλάξεις μπορούν να κατευθύνουν τα κύτταρα στο μονοπάτι του νεοπλασματικού μετασχηματισμού. Τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα απελευθερώνουν δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και δραστικά είδη αζώτου (RNS) τα οποία μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο DNA και αστάθεια του γονιδιώματος (εικόνα 14) [35,37].



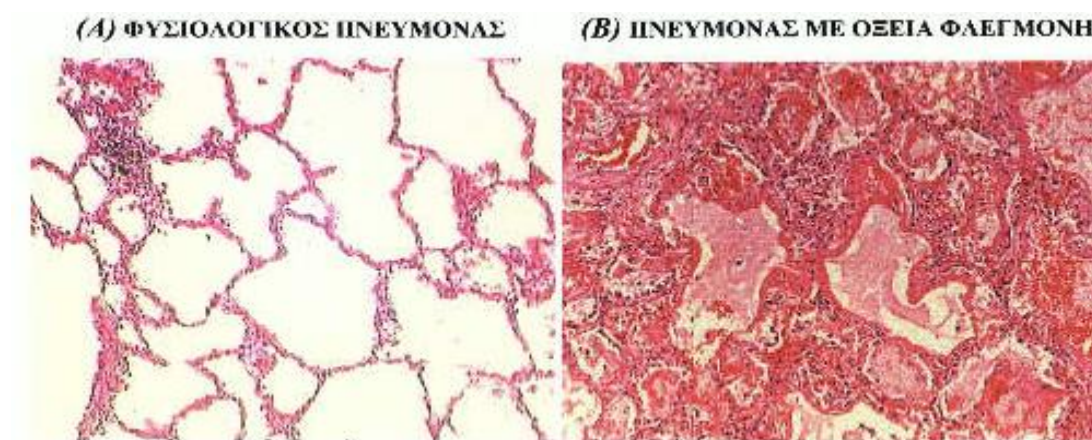
Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της μετατροπής των υγιών κυττάρων σε καρκινικά εξαιτίας της χρόνιας φλεγμονής.

Padoan A, Plebani M, Basso D. Inflammation and Pancreatic Cancer: Focus on Metabolism, Cytokines, and Immunity. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 5;20(3):676. doi: 10.3390/ijms20030676. PMID: 30764482; PMCID: PMC6387440.

### 3.3 Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS)

Ο όρος σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (acute respiratory distress syndrome, ARDS) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1967. Είναι η πιο σοβαρή μορφή της οξείας πνευμονικής βλάβης (acute lung injury, ALI) και είναι μια απειλητική κατάσταση για την ζωή με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Η παθοφυσιολογία του συνδρόμου αυτού χαρακτηρίζεται από οξεία έναρξη και υπερβολική φλεγμονή, που συνοδεύεται από αυξημένη διαπερατότητα της τριχοειδοκυψελιδικής μεμβράνης (εικόνα 15) η οποία παρουσιάζεται σε ήπιες, μέτριες ή σοβαρές μορφές [37,38]. Είναι γνωστό ότι η ανεπάρκεια πνευμονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα σχετίζεται με την παθογένεση του ARDS [39]. Αυτό συμβαίνει γιατί ο επιφανειοδραστικός παράγοντας είναι ένα σύμπλεγμα λιποπρωτεϊνών που εξισορροπεί την πίεση στις

κυψελίδες, αποτρέπει την δημιουργία κυψελιδικού οιδήματος και κατά συνέπεια προστατεύει τις κυψελίδες από την κατάρρευση [14].



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση κυψελίδων ενός φυσιολογικού πνεύμονα (Α) και ενός πνεύμονα με οξεία φλεγμονή (Β). Παρατηρείται η εισροή υγρού στις κυψελίδες του πνεύμονα (Β).

Bellingan GJ. The pulmonary physician in critical care \* 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. Thorax. 2002 Jun;57(6):540-6. doi: 10.1136/thorax.57.6.540. PMID: 12037231; PMCID: PMC1746355.

### 3.4 Φάσεις του ARDS

Το ARDS χωρίζεται σε 2 φάσεις το πρώιμο (early) και το όψιμο (late). Στην οξεία ή πρώιμη φάση του ARDS, η οποία διαρκεί μέχρι τρεις μέρες από την έναρξη της οξείας πνευμονικής βλάβης, συσσωρεύεται μη καρδιογενές πνευμονικό οίδημα και τα κύτταρα που βοηθούν στην άμυνα του οργανισμού μεταναστεύουν από την κυκλοφορία στις κυψελίδες. Σε αυτή τη φάση οι περισσότεροι ασθενείς επιβιώνουν (85-95%). Στη συνέχεια μεταξύ της τρίτης και έβδομης ημέρας από την έναρξη του συνδρόμου ακολουθεί η πολλαπλασιαστική φάση ή όψιμο ARDS. Το όψιμο ARDS συνδέεται συχνά με τραυματισμό πολλών συστημάτων [40]. Παρά το διαφορετικό φυσιολογικό υπόβαθρο μεταξύ των δύο φάσεων, τα ποσοστά θνησιμότητας δεν είναι σημαντικά διαφορετικά [41]. Έπειτα μερικοί ασθενείς μεταπίπτουν στην επόμενη φάση, η οποία χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό ινώδους ιστού στο διάμεσο ιστό και στις κυψελίδες. Αυτή η φάση ονομάζεται ινωτική (fibrotic). Σε άλλους ασθενείς, η εξέλιξη του όψιμου ARDS πραγματοποιείται προς την κατεύθυνση της

αποκατάστασης του ιστού, του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών και της πλήρους ίασης .

Όταν η διάχυτη κυψελιδική βλάβη εξελίσσεται μέχρι την ινωτική φάση, τότε η αναπνευστική λειτουργία δεν παρουσιάζει βελτίωση και η πρόγνωση είναι δυσοίωνη. Μετά από μια συνεχή περίοδο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης, σήψης και δυσλειτουργίας ή ανεπάρκειας πολλών οργάνων, παρά τη συνεχή μηχανική υποστήριξη της αναπνοής, οι περισσότεροι ασθενείς δεν επιβιώνουν. Σε αντίθεση, όσοι ασθενείς θεραπεύονται από την οξεία πνευμονική βλάβη, ανακτούν φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία [42].

### 3.5 Αιτίες πρόκλησης του ARDS

Το ARDS μπορεί να δημιουργηθεί είτε άμεσα, από τοπικές προσβολές, συμπεριλαμβανομένης της βακτηριακής ή ιογενούς πνευμονίας, της εισπνοής επιβλαβών ουσιών όπως ο καπνός, της αναρρόφησης οξέος, του πνιγμού και της θλάσης του πνεύμονα είτε έμμεσα ως αποτέλεσμα οξείας συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης συνήθως λόγω σήψης [πίνακας 2]. Στο άμεσο ARDS η σοβαρή βλάβη εκφράζεται κυρίως στο κυψελιδικό επιθήλιο και λιγότερο στο ενδοθήλιο, ενώ στο έμμεσο κυρίαρχη είναι η ενδοθηλιακή βλάβη. Η διαφοροποίηση του άμεσου από το έμμεσο ARDS με βάση την έκφραση των φωσφολιπασών A<sub>2</sub> είναι αρκετά περιορισμένη. Λαμβάνοντας υπόψη την PAF-AH, οι μελέτες έδειξαν ότι ήταν υψηλότερη σε ασθενείς με άμεσο σε σύγκριση με έμμεσο ARDS [14,43].

<b>Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης του ARDS</b>	
<b>άμεσοι</b>	<b>έμμεσοι</b>
εισρόφηση	σήψη
πνευμονική λοίμωξη	σοβαρός τραυματισμός
θλάση πνεύμονος	πολλαπλές μεταγγίσεις
εισπνοή τοξικών ουσιών	λιπώδης εμβολή
παρολίγον πνιγμός	οξεία παγκρεατίτιδα

Πίνακας 2: Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης του ARDS.

Εκτός από αυτούς τους παράγοντες κινδύνου, άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως η οξεία παγκρεατίτιδα και τα εγκαύματα έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του ARDS. Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί πολλές πειραματικές και κλινικές προσπάθειες για την αποτελεσματική αντιμετώπιση του συνδρόμου και τον ακριβή προσδιορισμό των αιτιολογικών παραγόντων. Ωστόσο η θνητότητα που οφείλεται στο σύνδρομο αυτό παραμένει υψηλή. Το κυριότερο εμπόδιο για να επιτευχθεί με τον καλύτερο τρόπο η φαρμακευτική παρέμβαση, αποτελεί το γεγονός ότι δεν υπάρχει συγκεκριμένη παθολογία που να χαρακτηρίζει το σύνδρομο, αλλά αντανάκλα την γενική απόκριση των πνευμόνων έναντι μιας πληθώρας προσβολών. Παρόλα αυτά η απώλεια της ακεραιότητας του τριχοειδοκυψελιδικού φραγμού παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις ARDS ανεξαρτήτως των παραγόντων εμφάνισης του συνδρόμου. Η έλλειψη αυτού του φραγμού συμβάλλει στην είσοδο στις κυψελίδες πρωτεϊνών, υγρού και στρατολόγηση κυττάρων δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο αρτηριακή υποξαιμία, οίδημα και μειωμένη πνευμονική ελαστικότητα [44].

### **3.6 Φωσφολιπάσες A<sub>2</sub> και ARDS**

Οι φωσφολιπάσες A<sub>2</sub> είναι ισχυροί μεσολαβητές στη φλεγμονή του πνεύμονα και προτείνεται η χρήση του συγκεκριμένου μοντέλου για τη διερεύνηση των κυτταρικών και βιοχημικών μηχανισμών που συσχετίζονται με την επικείμενη ανάπτυξη ARDS. Διάφοροι τύποι PLA<sub>2</sub> συμπεριλαμβανομένων των sPLA<sub>2</sub>-IIA, sPLA<sub>2</sub>-IID, sPLA<sub>2</sub>-IB και sPLA<sub>2</sub>-V έχουν εντοπιστεί σε χρόνιες και οξείες πνευμονικές παθήσεις.

Οι PLA<sub>2</sub> εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανοσολογικής κατάστασης του πνεύμονα μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών. Ο πρώτος είναι μέσω της καταλυτικής τους δραστηριότητας όπου μπορούν να υδρολύσουν βακτηριακές μεμβράνες, μεμβράνες κυττάρων του πνεύμονα καθώς και τον πνευμονικό επιφανειοδραστικό παράγοντα. Το παραγόμενο αραχιδονικό οξύ μπορεί να μεταβολιστεί σε εικοσανοειδή κυρίως μέσω κυκλοξυγονασών, λιποξυγονασών και κυτοχρώματος P450 και έχει μελετηθεί εκτενώς στο πλαίσιο της φλεγμονής των πνευμόνων. Η ειδική καταλυτική δράση των PLA<sub>2s</sub> υπογραμμίζει την εμπλοκή τους στη φλεγμονή και υποδεικνύει τις PLA<sub>2s</sub> ως τροποποιητές της ανοσοαπόκρισης λόγω της ενεργοποίησης της οδού σηματοδότησης των εικοσανοειδών. Επιπλέον, οι lysoPAF- ακέτυλοτρανσφεράσες ή

τρανσακετυλάσες μπορούν να καταλύσουν την παραγωγή του PAF. Αυτά τα μόρια μπορούν να προκαλέσουν αλλεργικές αποκρίσεις και φλεγμονώδεις αντιδράσεις στον πνεύμονα, όπως αυξημένη προσκόλληση λευκών αιμοσφαιρίων, χημειοταξία και αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, που οδηγεί σε δυσλειτουργία των πνευμόνων και τελικά σε ARDS τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά.

Ο δεύτερος μηχανισμός εμπλοκής των PLA<sub>2</sub>s είναι μέσω της ταυτόχρονης παραγωγής λυσοφωσφολιπιδίων, που οδηγούν στην διαταραχή της φυσικοχημικής ομοιόστασης των κυψελίδων. Έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (Lyso-PC) είναι αυξημένα στο BALF από ασθενείς με όψιμο ARDS. Τα επίπεδα Lyso-PC θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ενδεχομένως ως δείκτης για την διάκριση των φάσεων του ARDS. Πρόσφατη μελέτη για τη σήψη αναφέρει ότι οι συγκεντρώσεις της Lyso-PC στον ορό μπορούν να έχουν χρησιμότητα στην πρόβλεψη της σοβαρότητας της σήψης [14].

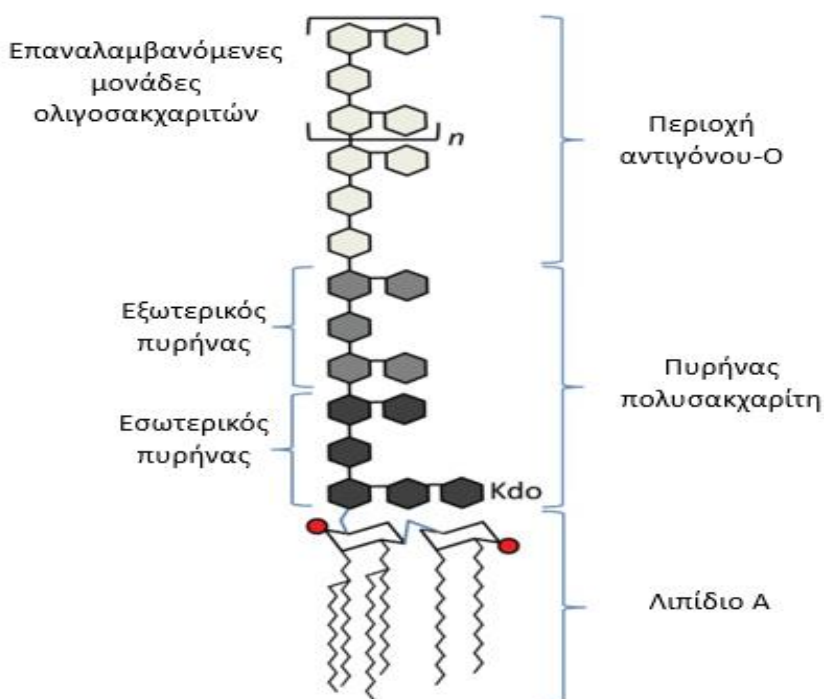
Η sPLA<sub>2</sub>-IIA εκφράζεται κατά τα δύο πρώτα εικοσιτετράωρα της πρώιμης φάσης (early phase), ενώ αργότερα δεν ανιχνεύεται πλέον στο BAL. Για το λόγο αυτό το συγκεκριμένο ένζυμο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώιμος διαγνωστικός δείκτης στο ARDS [13].

## Κεφάλαιο 4: LPS και βιοσηματοδοτική πορεία

### 4.1 Γενικά στοιχεία και δομή του LPS

Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), αποτελεί συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων και εκτελεί δύο κύριες λειτουργίες. Πρώτον, παρέχει προστασία στα Gram αρνητικά βακτήρια καθώς δρα ως αμυντικός μηχανισμός έναντι ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών. Αντικαθιστώντας τα τμήματα σακχάρου του λιπιδίου A με φωσφορικές ομάδες, το βακτήριο καταφέρνει να δημιουργήσει μια αρνητικά φορτισμένη εξωτερική μεμβράνη που μπορεί να αλληλεπιδράσει με δισθενή κατιόντα που βρίσκονται στο περιβάλλον. Αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην ακαμψία και την στεγανότητα της εξωτερικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να αναπτύσσεται βακτηριακή αντίσταση στους στρεσογόνους παράγοντες του περιβάλλοντος. Δεύτερον ο LPS είναι μια από τις πιο διατηρημένες δομές σε όλα τα Gram αρνητικά βακτήρια. Αυτό τον καθιστά ένα σημαντικό PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) που αναγνωρίζεται από το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών, με αποτέλεσμα να προκαλεί βακτηριακή λοίμωξη [45].

Ο LPS είναι ένα αμφιπαθητικό μόριο το οποίο αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές (εικόνα 16): α) το λιπίδιο A β) τον πυρήνα πολυσακχαρίτη γ) την περιοχή αντιγόνου-O.



## Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση της δομικής οργάνωσης του LPS

Maeshima N, Fernandez RC. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013 Feb 12;3:3. doi: 10.3389/fcimb.2013.00003. PMID: 23408095; PMCID: PMC3569842

Το λιπίδιο A είναι το φωσφολιπίδιο που είναι υπεύθυνο για τις ενδοτοξικές ικανότητες του LPS καθώς μπορεί να επιφέρει παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών. Αποτελείται από έναν β (1 → 6) συνδεδεμένο σκελετό δισακχαρίτη γλυκοζαμίνης ο οποίος είναι φωσφορυλιωμένος στις θέσεις 1 και 4 και ακυλιωμένος στις θέσεις 2 και 3 των μονοσακχαριτών. Συνήθως το λιπίδιο A αποτελείται από 6 ακυλικές αλυσίδες μεταβλητού μήκους που εστεροποιούνται με την ραχοκοκαλιά του λιπιδίου A. Επίσης, είναι ενσωματωμένο στην εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και κυρίως υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Τέλος, η δομή του λιπιδίου A διαμορφώνεται με βάση τους εκάστοτε περιβαλλοντικούς παράγοντες, οδηγώντας σε διαφοροποίηση της ενδοτοξικότητας και της αντίστασης του βακτηρίου σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες [45]

Ο πυρήνας πολυσακχαρίτη χωρίζεται σε εσωτερικό και εξωτερικό πυρήνα. Ο εσωτερικός πυρήνας χαρακτηρίζεται από πιο ασυνήθιστα σάκχαρα όπως είναι το 2-κέτο- 3-δεόξυ-οκτουλοσονικό οξύ (Kdo) και την επτόζη. Το Kdo υπάρχει σε κάθε LPS που έχει εξεταστεί μέχρι σήμερα και συνδέεται με τον σκελετό του δισακχαρίτη του λιπιδίου A. Ο δεσμός μεταξύ του Kdo και του λιπιδίου A είναι όξινης (pH < 4,4). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μπορεί να υδρολύεται εύκολα για να απελευθερωθεί ο πυρήνας πολυσακχαρίτη (και η περιοχή αντιγόνου-O) από το λιπίδιο A. Ο εξωτερικός πυρήνας αποτελείται από πιο κοινά σάκχαρα εξόζης όπως γλυκόζη, γαλακτόζη, N-ακέτυλο γλυκοζαμίνη και N-ακέτυλο γαλακτοζαμίνη και ως εκ τούτου αναφέρεται εναλλακτικά και ως περιοχή εξόζης.

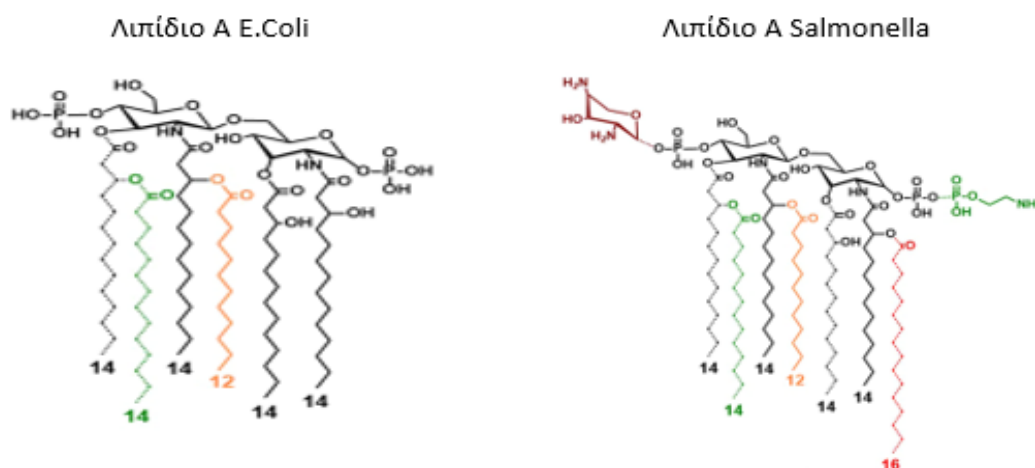
Η περιοχή αντιγόνου-O αποτελεί το εξωτερικό μέρος του μορίου του LPS που εκφράζεται σε βακτήρια και συνεπώς διαδραματίζει την αντιγονική περιοχή-στόχο των ανοσολογικών αποκρίσεων των ξενιστών. Επιπλέον, η περιοχή αυτή διαθέτει τεράστια ποικιλομορφία ακόμα και στο ίδιο είδος βακτηρίων [45].



## 4.2 Διαφορές μεταξύ των LPS που προέρχονται από διαφορετικά βακτήρια

Η δομή του LPS και ειδικά του λιπιδίου A διαφέρει μεταξύ διαφορετικών βακτηριακών ειδών. Πράγματι, η δομή του LPS και κυρίως του λιπιδίου A είναι αυτή που καθορίζει την ανοσογονικότητα του και κατά συνέπεια είναι καθοριστική για την λειτουργία του. Οι LPS που προκαλούν ισχυρή φλεγμονώδη απόκριση στα κύτταρα των ξενιστών ονομάζονται «αγωνιστές». Αντίθετα, υπάρχουν και LPS που προκαλούν αδύναμη φλεγμονώδη απόκριση εξαιτίας της διαφορετικής δομής του λιπιδίου A. Αυτοί ονομάζονται «ασθενείς αγωνιστές». Τέλος υπάρχουν και LPS, οι οποίοι μπλοκάρουν οποιαδήποτε φλεγμονώδη αντίδραση όταν δεσμεύονται στους αντίστοιχους υποδοχείς και ονομάζονται «ανταγωνιστές» [45].

Τα περισσότερα βακτήρια διαθέτουν λιπίδιο A με 6 ακυλικές αλυσίδες. Ένα από αυτά είναι ο LPS του *E. coli* ο οποίος είναι ένας από τους πιο ισχυρούς φλεγμονώδεις μεσολαβητές του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Ο αριθμός των ακυλικών αλυσίδων του λιπιδίου A σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα παραγωγής κυτοκινών. Το εξακυλιωμένο λιπίδιο A έχει βρεθεί ότι προάγει τις ισχυρότερες φλεγμονώδεις αποκρίσεις έπειτα από την πρόσδεση του στους TLR4 υποδοχείς. Όμως, υπάρχουν και LPS όπως αυτός από το βακτήριο της *Salmonella* που διαθέτουν 7 ακυλικές αλυσίδες στο λιπίδιο A (εικόνα 17). Έχει αποδειχθεί ότι αυτός ο LPS προκαλεί μικρότερη ενδοτοξική δράση στα κύτταρα του ξενιστή καθώς το λιπίδιο A δεν διαθέτει την βέλτιστη δομή κατά την πρόσδεση στους TLR4 υποδοχείς [48].



Εικόνα 17: Διαφορετικές δομές λιπιδίων A από διαφορετικά είδη βακτηρίων

Caroff M. , Novikov A. , Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identifications, OCL , 2020 , 27 , 10 pages

Εκτός από το λιπίδιο A διαφορές υπάρχουν και στην περιοχή αντιγόνου-O. Οι επαναλαμβανόμενες μονάδες σακχάρου της περιοχής την κάνει να διαφέρει μεταξύ στελεχών, μέσω των σακχάρων, της αλληλουχίας, της χημικής σύνδεσης, της υποκατάστασης και των μορφών δακτυλίων που χρησιμοποιούνται. Όπως αναμένεται, αυτό οδηγεί σε μια σχεδόν απεριόριστη ποικιλία δομής περιοχής αντιγόνου-O και επαληθεύεται στη φύση με την παρατήρηση εκατοντάδων ορότυπων για συγκεκριμένα Gram-αρνητικά βακτήρια . Πιο συγκεκριμένα, δύο LPS *E. coli* που προέρχονται από διαφορετικό ορότυπο μπορεί να προκαλούν διαφορετική ανοσολογική απόκριση έπειτα από την πρόσδεση τους στους TLR4 υποδοχείς εξαιτίας της διαφορετικής αλληλουχίας σακχάρων που διαθέτουν στην περιοχή αντιγόνου-O [45].

### 4.3 Toll-like receptors (TLRs)

Οι Toll-like receptors (TLRs) αναγνωρίζουν μια ποικιλία προϊόντων, από βακτήρια, ιούς και μύκητες τα οποία περιλαμβάνουν και δομικά μόρια του μικροβιακού κυτταρικού τοιχώματος όπως ο LPS. Με την αναγνώριση αυτών των προϊόντων οι TLR ενεργοποιούν την προαγωγή φλεγμονοδών μεσολαβητών που βοηθούν στην εξάλειψη της μόλυνσης. Μέχρι τώρα 13 TLRs έχουν ταυτοποιηθεί και έχουν περιγραφεί σε θηλαστικά, 12 από τους οποίους εκφράζονται σε ποντίκια και 10 σε ανθρώπους. Η ανακάλυψη του ρόλου των TLRs έχει προωθήσει πολύ τον τομέα της έμφυτης ανοσολογίας και τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel οι Jults Hoffmann και Bruce Beutler το 2011. Η ομάδα του Beutler ανακάλυψε ότι ο TLR4 ενεργοποιείται από τον LPS. Το λιπίδιο A είναι το πιο εξελικτικά διατηρημένο μέρος του LPS και είναι υπεύθυνο για την φλεγμονώδη δράση του LPS [49,50].

Ο TLR4 υποδοχέας εκφράζεται σε μυελοειδή κύτταρα καθώς και σε διάφορους άλλους τύπους κυττάρων όπως εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο TLR4 αποτελείται από μια εξωκυττάρια, μια διαμεμβρανική και μια ενδοκυττάρια περιοχή. Η εξωκυττάρια περιοχή αποτελείται 22 επαναλαμβανόμενες μονάδες πλούσιες σε λευκίνη, οι οποίες προσδίδουν ένα πεταλοειδές σχήμα. Η διαμεμβρανική περιοχή αποτελείται από 21 αμινοξέα και συνδέει την εξωκυττάρια

περιοχή του υποδοχέα με την ενδοκυττάρια. Η ενδοκυττάρια περιλαμβάνει περίπου 200 αμινοξέα και περιέχει μια περιοχή που ονομάζεται Toll/IL-1 receptor (TIR). Η περιοχή TIR είναι σημαντική για την μεταγωγή του σήματος [49].

#### 4.4 Σηματοδοτική πορεία του LPS

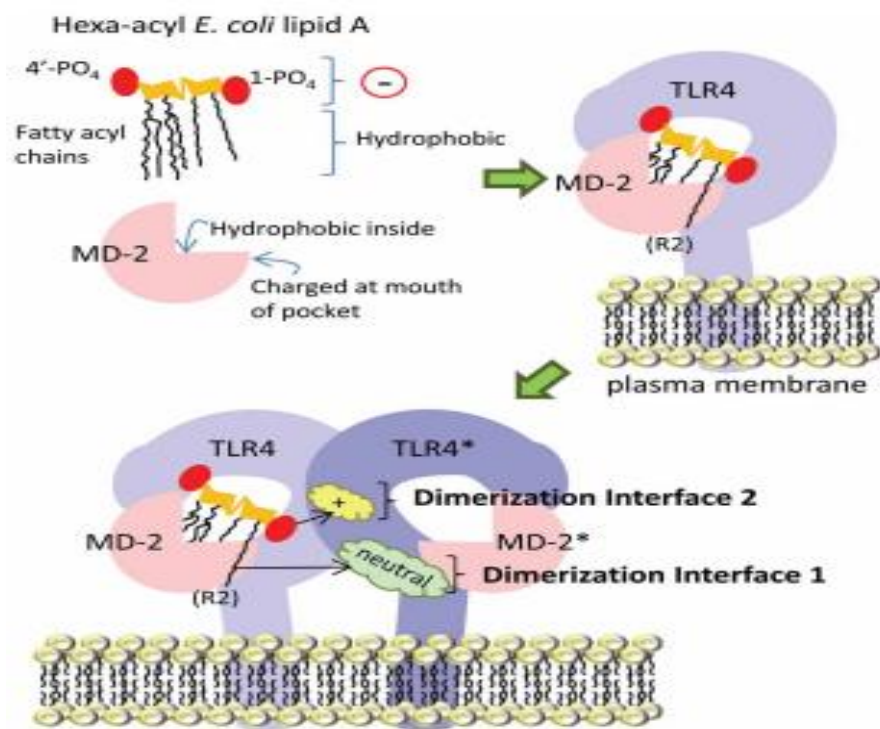
Η ενεργοποίηση των TLR4 απαιτεί μια σειρά γεγονότων που ξεκινούν από την αλληλεπίδραση του LPS με την πρωτεΐνη σύνδεσης του LPS (LBP) στον ορό. Η LBP συνδέεται σε μεμβράνες βακτηρίων που είναι πλούσιες σε LPS και σε συσσωματώματα LPS (μικκύλια) που σχηματίζονται από αυτό το αμφιπαθητικό μόριο σε υδατικά διαλύματα. Η LBP διευκολύνει την εξαγωγή μονομερών LPS από την πρωτεΐνη CD14 και την παράδοση τους στο σύμπλεγμα TLR4/MD-2 [51].

Η CD14 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται αγκυροβολημένη σε nanodomains στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης κυρίως μυελοειδών κυττάρων. Τα nanodomains είναι εμπλουτισμένα με χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια και ονομάζονται rafts, τα οποία θεωρούνται περιοχές ενεργοποίησης των TLR4. Ωστόσο, διαπιστώνονται επίσης μικρές ποσότητες της CD14 και σε ηπατοκύτταρα και σε εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Αυτά τα τελευταία κύτταρα παράγουν κυρίως μια διαλυτή μορφή CD14 που ονομάζεται sCD14. Η CD14 έχει σχήμα πετάλου και είναι ένα διμερές που αποτελείται από 22 επαναλαμβανόμενες μονάδες πλούσιες σε λευκίνη. Ο LPS συνδέεται στην N-τελική υδρόφοβη κοιλότητα της CD14. Η μεταφορά του LPS στη CD14 επιτυγχάνεται μέσω της αλβουμίνης, η οποία προστατεύει το υδρόφοβο λιπίδιο A όταν ο LPS κινείται στο υδατικό περιβάλλον. Στη συνέχεια η CD14 μεταφέρει τον LPS και πάλι με την βοήθεια της αλβουμίνης στον υδρόφοβο θύλακα MD-2 που είναι μέρος του συμπλόκου TLR4/MD-2 [51,52].

Τόσο η δεσμευμένη στη μεμβράνη όσο και η διαλυτή μορφή της CD14 μπορούν να μεταφέρουν το μόριο του LPS στο σύμπλεγμα TLR4/MD-2. Η υδρόφοβη κοιλότητα της CD14 φιλοξενεί ως και 5 ακυλικές αλυσίδες της ενδοτοξίνης, ενώ η υπόλοιπη διευκολύνει την σύνδεση του συμπλέγματος CD14-LPS με τον MD-2.

Τα περισσότερα από όσα είναι γνωστά για το πως αναγνωρίζεται το λιπίδιο A από το σύμπλεγμα TLR4/MD-2 σε κύτταρα έχουν μελετηθεί χρησιμοποιώντας εξαακυλιωμένο λιπίδιο A από το *E.coli*, το οποίο είναι ισχυρός αγωνιστής της σηματοδότησης. Μια κρυσταλλογραφική ανάλυση του ανθρώπινου συμπλέγματος

TLR4/MD-2 με δεσμευμένο τον LPS αποκάλυψε ότι πέντε από τις έξι ακυλικές αλυσίδες βρίσκονται στην υδρόφοβη κοιλότητα του MD-2 ενώ η έκτη αλληλεπιδρά με τον TLR4 ενός γειτονικού συμπλέγματος TLR4/MD-2. Επίσης ο διμερισμός του συμπλέγματος ενισχύεται από ιοντικούς δεσμούς μεταξύ της φωσφορικής ομάδας του λιπιδίου A και του γειτονικού μορίου TLR4 (εικόνα 18) [52,53].

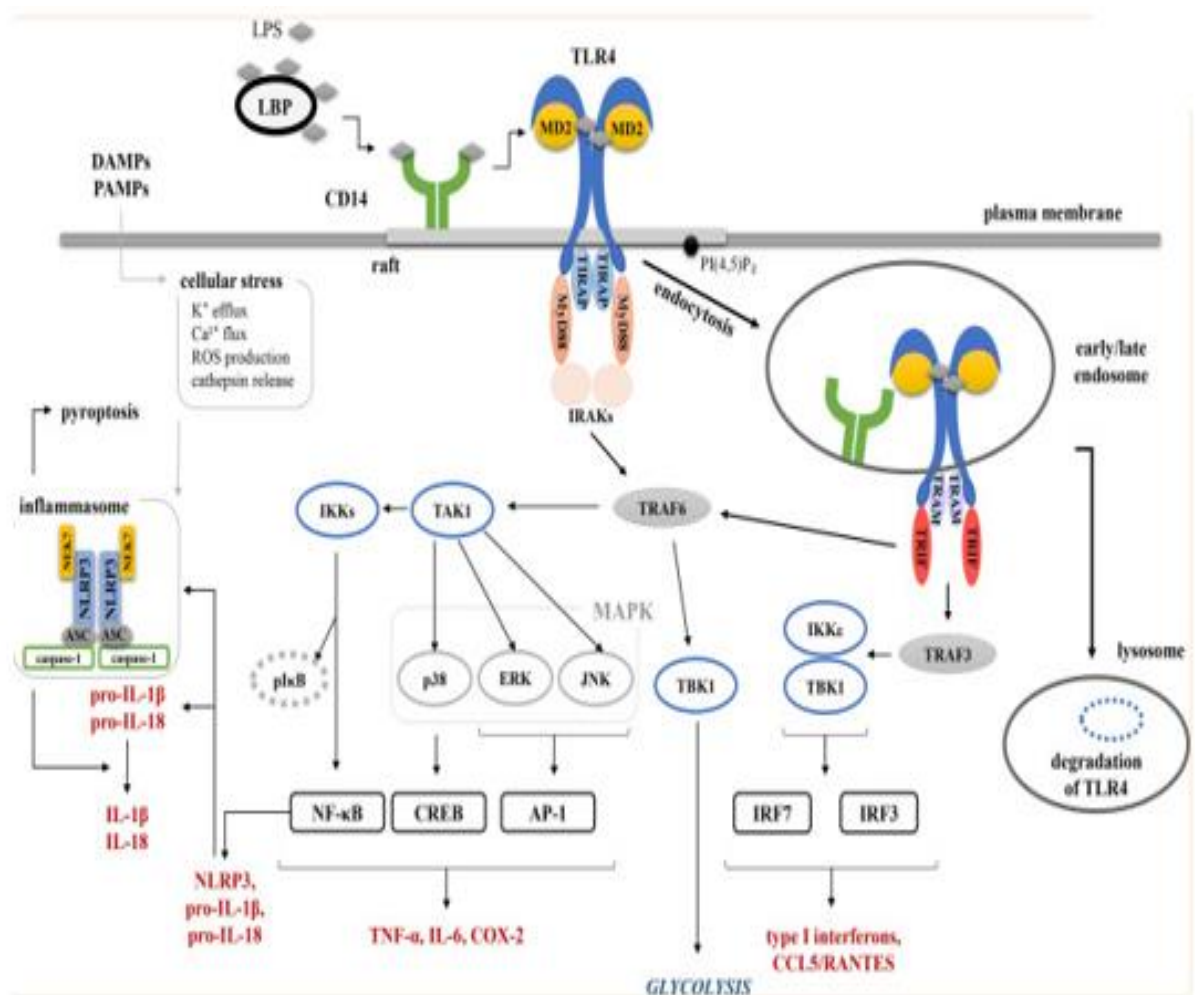


Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση του διμερισμού του συμπλέγματος TLR4/MD-2 έπειτα από την δέσμευση του LPS

Maeshima N, Fernandez RC. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013 Feb 12;3:3. doi: 10.3389/fcimb.2013.00003. PMID: 23408095; PMCID: PMC3569842.

Η αλληλεπίδραση του TLR4/MD-2 με δύο μόρια ενός αγωνιστικού είδους LPS προκαλεί τον διμερισμό των έξω-περιοχών δυο μορίων TLR4 που αποκτούν "σχήμα M" με τα ενδοκυττάρια θραύσματα να βρίσκονται αντικριστά. Κάθε ενδοκυττάριο θραύσμα διαθέτει μια ομόλογη περιοχή (TIR), η οποία είναι επιρρεπής σε ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις με TIR περιοχές τεσσάρων πρωτεϊνών προσαρμογής. Ο TLR4 αλληλεπιδρά με το πρώτο ζεύγος προσαρμογέων, τον TIRAP και τον MyD88. Εκτός από την περιοχή TIR, ο TIRAP φέρει επίσης μια περιοχή εμπλουτισμένη σε βασικά και αρωματικά κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με τις φωσφατιδυλοϊνositόλες και τις φωσφατιδυλοσερίνες. Στην πλασματική μεμβράνη ο TIRAP μπορεί να δεσμεύσει

τόσο τις φωσφατιδυλοσερίνες όσο και τη 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνositόλη, αλλά μόνο η τελευταία αλληλεπίδραση απαιτείται για τη σηματοδότηση του TLR4. Ο TIRAP που είναι συνδεδεμένος με τον TLR4 στρατολογεί τον MyD88, ο οποίος στη συνέχεια δεσμεύει την κινάση που σχετίζεται με τον υποδοχέα ιντερλευκίνης-1 (IRAK) 1 και 2 και σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα υπομεμβρανικής σηματοδότησης που ονομάζεται μυδόσωμα. Το μυδόσωμα προσλαμβάνει την λιγάση της E3 ουβικιτίνης που ονομάζεται TRAF6, η οποία πυροδοτεί ένα μονοπάτι σηματοδότησης που περιλαμβάνει την κινάση TAK1 και οδηγεί μέσω φωσφορύλιωσης και ενεργοποίησης των κινασών IκB α/β [IKKα/β] στην είσοδο του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στον πυρήνα (εικόνα 19) [52,54,55].



Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση της σηματοδοτικής πορείας του LPS

Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2021 Feb;78(4):1233-1261. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33057840; PMCID: PMC7904555.

Παράλληλα ένα άλλο μονοπάτι που συμμετέχουν η TRAF6 και η TAK1 είναι των MAP κινασών, οι οποίες φωσφορυλιώνονται για να ενεργοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 και CREB. Συλλογικά, το μονοπάτι σηματοδότησης που εξαρτάται από τον MyD88 επάγει την έκφραση γονιδίων όπως ο TNF-α, η IL-6, η COX-2, η sPLA<sub>2</sub>-IIA και οι ιντερφερόνες τύπου III, οι οποίες συμβάλλουν στην ακεραιότητα του επιθηλιακού φραγμού που είναι κρίσιμο για την άμυνα του ξενιστή.

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η επαγόμενη από τον LPS σηματοδότηση που εξαρτάται από τον MyD88 ενεργοποιεί και ρυθμίζει τον κυτταρικό μεταβολισμό. Αποδείχθηκε ότι η TRAF6 αλληλεπιδρά με την TBK1, η οποία είναι η κινάση που με τη σειρά της ενεργοποιεί την κινάση Akt οδηγώντας σε ταχεία ενίσχυση της γλυκόλυσης. Η επικείμενη σύνθεση του Acetyl-CoA και η de novo σύνθεση των λιπαρών οξέων μπορούν να διευκολύνουν αντίστοιχα, την ακετυλίωση ιστόνης που απαιτείται για τη γονιδιακή μεταγραφή και την επέκταση του ενδοπλασματικού δικτύου και της συσκευής Golgi, που είναι απαραίτητα για την έντονη παραγωγή και έκκριση κυτοκινών [52].

Επίσης υπάρχει και μονοπάτι σηματοδότησης το οποίο είναι ανεξάρτητο από τον MyD88 στο οποίο ο TLR4 δεσμεύει στο ενδόσωμα πρωτεΐνες προσαρμογείς που περιέχουν περιοχές TIR. Αυτοί οι προσαρμογείς είναι ο TRAM και ο TRIF. Ο TRAM είναι ένας προσαρμογέας που διευκολύνει την αλληλεπίδραση του TRIF με τον TLR4. Το μονοπάτι σηματοδότησης που εξαρτάται από τον TRIF περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της TRAF3 που ακολουθείται από την ενεργοποίηση των μη κανονικών κινασών TBK1 και IKKε. Η TBK1 φωσφορυλιώνει το μοτίβο pLxIS του TRIF που είναι απαραίτητο για την στρατολόγηση του ρυθμιστικού παράγοντα ιντερφερόνης IRF3. Ο IRF3 φωσφορυλιώνεται επίσης από την TBK1 και έπειτα διαχωρίζεται από τον TRIF, διμερίζεται και πηγαίνει στον πυρήνα. Επιπλέον, ο IRF3 και σε μικρότερο βαθμό ο IRF7, που ενεργοποιείται επίσης από τον TBK1, επάγουν την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν IFN τύπου I και τα ρυθμιζόμενα από ιντερφερόνη γονίδια όπως αυτά που κωδικοποιούν τη χημειοκίνη CXCL10/IP-10. Αυτό το μονοπάτι συμμετέχει επίσης στην παραγωγή της αντιφλεγμονώδης IL-10. Τέλος, ο TRIF προκαλεί καθυστερημένη ενεργοποίηση του NF-kB μέσω στρατολόγησης και ενεργοποίησης της TRAF6 [52].

## Πειραματικό μέρος

### Κεφάλαιο 5: Υλικά και μέθοδοι

#### 5.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς A549

Η κυτταρική σειρά A549 (ATCC CCL-185) δημιουργήθηκε το 1972 από τον D. J. Giard et al. από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων που απομονώθηκαν από πνεύμονα 58χρονου Καυκάσιου άνδρα. Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι περίπου 24 ώρες και αναπτύσσονται ως επιθηλιακά. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά έχει επίπεδο βιοασφάλειας I.

#### Αντιδραστήρια-Υλικά

- Ham's F12-K (Nutrient Mix, 1x, 21127-022, Gibco)
- Ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, 10270-106, Gibco), ή εναλλακτικά FBS (PAN Biotech P30-1985, ήδη απενεργοποιημένος).
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Dulbeco's Phosphate Buffered Saline, (PBS), D8537, Sigma)
- L-Γλουταμίνη (200 mM, 100x, X0550, Biowest)
- Αντιβιοτικό (Αντιβιοτικό-Αντικυκητιακό, περιέχει: 10.000 U/mL Penicillin G sodium, 10.000 µg/mL Streptomycin sulfate, 25 µg/mL Amphotericin B as fungizone, 15240-062, Gibco)
- Θρυψίνη-EDTA (1x, L0940, Biowest, 0,05%)
- Αιθανόλη 70% (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, 46,07 g/mol, Riedel-de Haën)
- DMSO (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, 78,13 g/mol, D8418, Sigma)
- Βαφή Trypan Blue (Blue Solution 0,4% in NaCl, C<sub>34</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>Na<sub>4</sub>O<sub>14</sub>S<sub>4</sub>, 960,81 g/mol, T-8154, Sigma)
- Αποστειρωμένα σιφόνια μίας χρήσης των 5, 10 και 25 mL (86.1253.001, 86.54.001 από Sarstedt και 4251 από Costar, αντίστοιχα)
- Αποστειρωμένα σωληνάκια φυγοκέντρησης των 15 και 50 mL (62.554.502 και 62.547.254, Starstedt)
- Αποστειρωμένα τρυβλία (100/20 mm sterile, 664160, Cellstar)

- Πολυτροβλία 6-θέσεων και 24-θέσεων (3516 από Costar και 83.3922 από Sarstedt, αντίστοιχα)
- Φιαλίδια φύλαξης των κυττάρων στο υγρό άζωτο (126263, Cellstar)
- Στυλικοί για υγρό άζωτο των 6 θέσεων, cryocane (5015-0002, Thermo)
- Ξέστρο, scrapper (541070, Cellstar)
- Αιματοκυτόμετρο (πλάκα Neubauer), καλυπτρίδες

## Συσκευές

- Θάλαμος επώασης. Η ανάπτυξη γίνεται σε επωαστήρα συστάσεως 5% CO<sub>2</sub> – 95% αέρα, θερμοκρασίας 37 °C (Incubator, RS, Biotech, Galaxy, R)
- Θάλαμος νηματόδους ροής (Laminar Flow, Hood Class II type A/B3, Nuair, Model No. 425-100, Ser. No. 27190AR)
- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (Ser. No. 1131010065, Cat. No. D-22976, Kruss, Hamburg, Germany)
- Φυγόκεντρος Hettich Rotofix 32
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης

## Διαλύματα

### 1. Αδρανοποίηση FBS

Ο FBS 10270-106, Gibco θερμαίνεται σε υδρόλουτρο στους 60°C για 30 λεπτά, για την αδρανοποίηση του συμπληρώματος. Στη συνέχεια διαμοιράζεται σε αποστειρωμένα πλαστικά corning/50 mL σε στείρες συνθήκες. Φυλάσσεται στους -20 °C. Ο PAN Biotock P30-1985 δεν απαιτεί απενεργοποίηση.

### 2. Πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων A549

Στα 500 mL θρεπτικού υλικού F12-K προστίθενται 50 mL αδρανοποιημένου FBS (10%), 5 mL L-γλουταμίνης (1%, τελική συγκέντρωση 2mM) και 5 mL (1%) αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4 °C.



### 3. Μη πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων A549

Στα 500 mL θρεπτικού υλικού F12-K προστίθενται 5 mL L-γλουταμίνης (1%) και 5 mL αντιβιοτικού (1%) σε στείρες συνθήκες. Το μη πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4 °C.

## **Πειραματική διαδικασία**

### ***I. Ξεπάγωμα κυτταρικής καλλιέργειας***

Γίνεται για την εκκίνηση νέας καλλιέργειας. Το σωληνάριο (cryovial) τοποθετείται απευθείας από το υγρό άζωτο σε υδρόλουτρο στους 37 °C μέχρι να ξεπαγώσει, περίπου 1 λεπτό. Με αυτόματη πιπέττα ή αποστειρωμένο σιφόνιο, τα κύτταρα αναδιασπείρονται προσεκτικά στον θάλαμο νηματώδους ροής. Σε ένα τρυβλίο (διάμετρος 10 εκ.) προστίθενται 10 mL πλήρους θρεπτικού υλικού και, στην συνέχεια, σε αυτό γίνεται ο εμβολιασμός των κυττάρων του cryovial. Γίνεται προσεκτική ανακίνηση του τρυβλίου, ώστε τα κύτταρα να κατανεμηθούν ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνειά του και έπειτα τοποθετείται στον επωαστικό θάλαμο για την ανάπτυξη των κυττάρων.

### ***II. 1<sup>η</sup> Ανακαλλιέργεια κυτταρικής καλλιέργειας***

Αρχικά, γίνεται μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων και εάν αυτά έχουν προσκολληθεί και αναπτυχθεί (περίπου 80 – 90 % πληρότητα ταπήτιου στο τρυβλίο) το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και απορρίπτεται. Τα προσκολλημένα στο ταπήτιο κύτταρα εκπλένονται με διάλυμα PBS το οποίο στην συνέχεια απορρίπτεται. Σε κάθε τρυβλίο προστίθενται 2 mL θρυψίνης (η θρυψίνη διασπά πεπτιδικές αλυσίδες στο καρβόξυ-τελικό άκρο των αμινοξέων λυσίνη και αργινίνη εκτός από τις περιπτώσεις που αυτά ακολουθούνται από προλίνη), και τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο για περίπου 8 λεπτά προκειμένου τα κύτταρα να αποκολληθούν. Ακολούθως, προστίθενται 8 mL πλήρους θρεπτικού υλικού σε κάθε τρυβλίο προκειμένου να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη. Το περιεχόμενο κάθε τρυβλίου μεταφέρεται σε

αποστειρώμενο σωλήνα corning των 15 mL και φυγοκεντρείται στα 800 x g, για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο κάθε corning απορρίπτεται με αποστειρωμένο σιφόνιο. Έπειτα, γίνεται καταμέτρηση των κυττάρων σε αιματοκυτόμετρο (όπως περιγράφεται παρακάτω στην παράγραφο: IV. Μέτρηση κυττάρων) προκειμένου να επιτευχθεί συγκέντρωση κυττάρων  $10^6$  κύτταρα / mL προσθέτοντας στο κυτταρικό ίζημα ανάλογο όγκο θρεπτικού υλικού. Όσον αφορά τα A549, τρυβλίο με 80 - 90% πληρότητα ταπητίου περιέχει περίπου  $8 - 9 \times 10^6$  κύτταρα συνεπώς, στο corning προστίθενται 4 mL θρεπτικού υλικού και ακολουθεί ήπια εναιώρηση αυτών. Ακολουθεί προσθήκη 9 mL πλήρους θρεπτικού υλικού σε 4 νέα τρυβλία 10ρια και εμβολιασμός με 1 mL εναιωρήματος κυττάρων από το corning. Με τον τρόπο αυτόν γίνεται ανακαλλιέργεια των κυττάρων σε αναλογία 1:4. Ο αριθμός κυττάρων επίστρωσης σε τρυβλίο 10 cm είναι  $2 \times 10^6$  κύτταρα, σε τελικό όγκο 10 ml. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο για την προσκόλληση και ανάπτυξη των κυττάρων.

### ***III. 2<sup>η</sup> Ανακαλλιέργεια κυτταρικής καλλιέργειας***

Πραγματοποιείται περίπου 4 ημέρες μετά την πρώτη ανακαλλιέργεια κι όταν το ταπήτιο του τρυβλίου έχει πληρότητα περίπου 80 - 90% με προσκολλημένα κύτταρα. Ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με την πρώτη ανακαλλιέργεια.

### ***IV. Μέτρηση κυττάρων***

Ακολουθείται η διαδικασία της ανακαλλιέργειας μέχρι και την φυγοκέντρηση των κυττάρων. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα των κυττάρων προστίθεται ο κατάλληλος όγκος θρεπτικού υλικού. Ο όγκος του θρεπτικού υλικού θα πρέπει να είναι ανάλογος του ιζήματος, αφού σκοπός είναι να μετρηθούν τα κύτταρα με ακρίβεια αποφεύγοντας να είναι πολύ αραιά ή πυκνά. Συνήθως, προστίθεται 4 mL πλήρους θρεπτικού υλικού και έπεται ήπια εναιώρηση των κυττάρων. Σε αποστειρωμένο σωλήνα erpendorf προστίθενται 10  $\mu$ L εναιωρήματος των κυττάρων και 10  $\mu$ L βαφής Trypan Blue. Το περιεχόμενο του erpendorf αναδεύεται και 10  $\mu$ L από αυτό τοποθετούνται σε αιμοκυτόμετρο (πλάκα Neubauer). Στην συνέχεια τα

κύτταρα καταμετρούνται στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Η συγκέντρωση των κυττάρων υπολογίζεται από την ακόλουθη σχέση:

**Συγκέντρωση κυττάρων = (αριθμός ζωντανών κυττάρων) x (συντελεστής αραιώση) x  $10^4$  / mL**

Μετά την μέτρηση, ακολουθεί προσθήκη κατάλληλου όγκου θρεπτικού υλικού στο corning ώστε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων να είναι  $10^6$  κύτταρα / mL θρεπτικού υλικού. Τέλος,  $2 \times 10^6$  κύτταρα εμβολιάζονται σε τρυβλίο σε τελικό όγκο 10 mL.

#### ***V. Πάγωμα κυτταρικής καλλιέργειας***

Γίνεται για την δημιουργία αποθεμάτων (stock). Αρχικά, παρασκευάζεται ένα υγρό παγώματος, το οποίο περιέχει 10% DMSO σε FBS (τροποποίηση από προηγούμενη version: 60% πλήρες θρεπτικό υλικό, 20% αδρανοποιημένου FBS και 20% αποστειρωμένου DMSO). Στην συνέχεια, χρησιμοποιείται ένα τρυβλίο με 80 - 90 % πληρότητα και ακολουθεί η διαδικασία της ανακαλλιέργειας. Τέλος, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται ήπια σε 2 mL ψυχρό υγρό παγώματος. Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε cryovial, 1 mL / cryovial (κάθε ένα cryovial τελικά θα περιέχει περίπου  $4 \times 10^6$  κύτταρα). Τα cryovials τοποθετούνται κατευθείαν σε πάγο για μερικά λεπτά. Ακολουθεί η αποθήκευσή τους στους  $-80$  °C για 48 ώρες και τέλος, στο υγρό άζωτο για μακρά φύλαξη.

## **5.2 Ενεργοποίηση της έκφρασης sPLA<sub>2</sub>-IIA με τη χρήση LPS στα A549 κύτταρα, λύση και συλλογή των δειγμάτων**

### **Αντιδραστήρια-Υλικά**

- Χλωριούχο νάτριο (NaCl, 58,44 g/mol, S3160, Fisher)
- Tris-HCl (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, 121,14 g/mol T1503, Sigma)
- Δωδεκυλο-σουλφονικό νάτριο, SDS (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S, 288,38 g/mol, A2263, AppliChem)

- Δεοξυχολικό νάτριο, NaDOC (C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>NaO<sub>4</sub>, 414,57 g/mol, 30970, Fluka)
- Triton X-100 (t-Oct-C<sub>6</sub>H<sub>40</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub> με x=9-10, T8787, Sigma)
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 292,24 g/mol, E6758, Sigma)
- Γλυκερόλη (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>, 92,02 g/mol, 101186M, AnalaR)
- Αναστολείς πρωτεασών (σε DMSO, S8820, Sigma)
- LPS *E. coli* (Sigma, L4005)
- LPS Salmonella (Sigma, L6143)
- LPS *E. coli* (Invitrogen, 004976-03)

### **Ρυθμιστικό διάλυμα λύσεως RIPA**

Η παρασκευή των διαλυμάτων stock γίνεται σε τελικό όγκο 50 mL ενώ το RIPA σε τελικό όγκο 100 mL, σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα αντιδραστηρίου για την παρασκευή 100 mL διαλύματος stock (γρ.)	Διάλυμα stock (100mL)	Όγκος διαλύματος stock για την παρασκευή 100 mL διαλύματος εργασίας (mL)	Τελική συγκέντρωση διαλύματος εργασίας (100 mL)
NaCl	29,2	5 M	3	150 mM
Tris (pH 7.6)	12,1	1M	5	50 mM
EDTA	14,6	0,5 M	0,4	2 mM
SDS	10	10 %	1	0,1 %
NaDOC	10	10 %	10	1 %
Triton X-100	10	10 %	10	1 %
Γλυκερόλη	-	100 %	10	10 %

Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C. Λίγο πριν την χρήση για την συλλογή των κυττάρων προστίθενται αναστολείς πρωτεασών σε τελική συγκέντρωση 1:250 (v/v).

## **Πειραματική διαδικασία**

### **Προσθήκη LPS για την ενεργοποίηση της έκφρασης sPLA<sub>2</sub>-IIA – Συλλογή των δειγμάτων**

Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλίο 6 θέσεων (σε συγκέντρωση  $10^6$  κύτταρα / mL, 1 mL / θέση) με την επιφάνεια του τρυβλίου να είναι καλυμμένη κατά 80-90 % από τα προσκολλημένα κύτταρα, το πλήρες θρεπτικό υλικό απορρίπτεται, τα κύτταρα εκπλένονται με 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (PBS), το οποίο στην συνέχεια απορρίπτεται και προστίθεται το μη πλήρες θρεπτικό υλικό για 2 ώρες, προκειμένου να σταματήσει ο κυτταρικός κύκλος. Ακολουθεί η προσθήκη του LPS για το απαραίτητο χρονικό διάστημα. Μετά την ολοκλήρωση της δράσης τους τα κύτταρα και τα υπερκείμενα συλλέγονται χωριστά. Τα υπερκείμενα συλλέγονται σε erpendorf και φυλάσσονται στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Τα κύτταρα είναι δυνατόν να συλλεχθούν με δύο τρόπους: α) προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  ψυχρού PBS το οποίο περιέχει αναστολείς πρωτεασών στο τρυβλίο και συλλογή με scraper, με επακόλουθη λύση σε υπερήχους, β) προσθήκη 300  $\mu\text{L}$  διαλύματος RIPA το οποίο περιέχει αναστολείς πρωτεασών και συλλογή των κυττάρων σε erpendorfs. Στην δεύτερη περίπτωση, ακολουθεί ανάδευση για 30 min σε ανακινούμενη βάση στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  και φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm για 20 min στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Τα υπερκείμενα (κυτταρόλυμα) μεταφέρονται σε καθαρά erpendorfs και φυλάσσονται στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ομοίως φυλάσσεται και το ίζημα.

### **5.3 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς U937**

Η κυτταρική σειρά U937 είναι μία ανθρώπινη σειρά με χαρακτηριστικά μονοκυττάρων και προέρχεται από ασθενή με μυελογενή λευχαιμία. Τα κύτταρα απομονώθηκαν από διάχυτο ιστοκυτταρικό λέμφωμα από 37χρονο Καυκάσιου άντρα (Sundstrom and Nilsson 1976). Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι περίπου 24 ώρες και αναπτύσσονται σε εναιώρημα. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά έχει επίπεδο βιοασφάλειας I.

#### **Αντιδραστήρια-Υλικά**

- RPMI-1640 (Gibco)

- Ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, 10270-106, Gibco), ή εναλλακτικά FBS (PAN Biotech P30-1985, ήδη απενεργοποιημένος).
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Dulbeco's Phosphate Buffered Saline, (PBS), D8537, Sigma)
- L-Γλουταμίνη (200 mM, 100x, X0550, Biowest)
- Αντιβιοτικό (Αντιβιοτικό-Αντικυκητιακό, περιέχει: 10.000 U/mL Penicillin G sodium, 10.000 µg/mL Streptomycin sulfate, 25 µg/mL Amphotericin B as fungizone, 15240-062, Gibco)
- Αιθανόλη 70% (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, 46,07 g/mol, Riedel-de Haën)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο αποστειρωμένο, DMSO (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, 78,13 g/mol, D8418, Sigma)
- Βαφή Trypan Blue (Blue Solution 0,4% in NaCl, C<sub>34</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>Na<sub>4</sub>O<sub>14</sub>S<sub>4</sub>, 960,81 g/mol, T-8154, Sigma)
- Αποστειρωμένα σιφόνια μίας χρήσης των 5, 10 και 25 mL (86.1253.001, 86.54.001 από Sarstedt και 4251 από Costar, αντίστοιχα)
- Αποστειρωμένα σωληνάκια φυγοκέντρησης των 15 και 50 mL (62.554.502 και 62.547.254, Starstedt)
- Αποστειρωμένες φλάσκες
- Πολυτρυβλία 6-θέσεων και 24-θέσεων (3516 από Costar και 83.3922 από Sarstedt, αντίστοιχα)
- Φιαλίδια φύλαξης των κυττάρων στο υγρό άζωτο (126263, Cellstar)
- Ειδικές θέσεις φύλαξης των κυττάρων στο υγρό άζωτο των 6 θέσεων, cryocane (5015-0002, Thermo)
- Ξέστρο, scrapper (541070, Cellstar)
- Αιμοκυτόμετρο (πλάκα Neubauer), καλυπτρίδες

### Συσκευές

- Θάλαμος επώασης. Η ανάπτυξη γίνεται σε επωαστήρα συστάσεως 5% CO<sub>2</sub> – 95% αέρα, θερμοκρασίας 37 °C (Incubator, RS, Biotech, Galaxy, R)
- Θάλαμος νηματώδους ροής (Laminar Flow, Hood Class II type A/B3, Nuair, Model No. 425-100, Ser. No. 27190AR)

- Ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (Ser. No. 1131010065, Cat. No. D-22976, Kruss, Hamburg, Germany)
- Φυγόκεντρος Hettich Rotofix 32 (δωμάτιο κυτταροκαλλιέργειών)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (autoclave)

## **Διαλύματα**

### 1. Αδρανοποίηση FBS

Ο FBS 10270-106, Gibco θερμαίνεται σε υδρόλουτρο στους 60°C για 30 λεπτά, για την αδρανοποίηση του συμπληρώματος. Στην συνέχεια μοιράζεται σε αποστειρωμένα πλαστικά corning/50 mL σε στείρες συνθήκες. Φυλάσσεται στους -20 °C. Ο PAN Bioteck P30-1985 δεν απαιτεί απενεργοποίηση.

### 2. Πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων U937

Στα 500 mL θρεπτικού υλικού RPMI προστίθενται 50 mL αδρανοποιημένου FBS (10%), 5 mL L-γλουταμίνης (τελική συγκέντρωση 2mM) και 5 mL αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4 °C.

### 3. Μη πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων U937

Στα 500 mL θρεπτικού υλικού RPMI προστίθενται 5 mL L-γλουταμίνης (1%) και 5 mL αντιβιοτικού (1%) σε στείρες συνθήκες. Το μη πλήρες θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4 °C.

## **Πειραματική διαδικασία**

### ***I. Ξεπάγωμα κυτταρικής καλλιέργειας***

Γίνεται για την εκκίνηση νέας καλλιέργειας. Το σωληνάριο (cryovial) τοποθετείται απευθείας από το υγρό άζωτο σε υδρόλουτρο στους 37 °C μέχρι να ξεπαγώσει, περίπου 1 λεπτό. Με αυτόματη πιπέττα ή αποστειρωμένο σιφόνιο, τα κύτταρα αναδιασπείρονται προσεκτικά στον θάλαμο νηματώδους ροής. Σε μία φλάσκα T75 (εμβαδό 75 cm<sup>2</sup>) προστίθενται 10 mL πλήρους θρεπτικού υλικού και, στην συνέχεια, σε αυτό γίνεται ο εμβολιασμός των κυττάρων του cryovial. Γίνεται προσεκτική ανακίνηση του τρυβλίου, ώστε τα κύτταρα να κατανεμηθούν ομοιόμορφα σε όλη την

επιφάνειά του και έπειτα τοποθετείται στον επωαστικό θάλαμο για την ανάπτυξη των κυττάρων.

## ***II. 1<sup>η</sup> Ανακαλλιέργεια κυτταρικής καλλιέργειας***

Αρχικά, γίνεται μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων και εάν αυτά έχουν αναπτυχθεί το περιεχόμενο κάθε φλάσκας μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα corning των 15 mL και φυγοκεντρείται στα 1000 x g για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο κάθε corning απορρίπτεται με αποστειρωμένο σιφόνιο. Στο corning προστίθενται 4 mL θρεπτικού υλικού και ακολουθεί ήπια εναιώρηση. Έπειτα, γίνεται καταμέτρηση των κυττάρων σε αιμοκυταρόμετρο (όπως περιγράφεται παρακάτω στην παράγραφο: IV. Μέτρηση κυττάρων). Στην συνέχεια προστίθεται στο κυτταρικό εναιώρημα ανάλογος όγκος θρεπτικού υλικού προκειμένου να επιτευχθεί συγκέντρωση κυττάρων  $2.5 \times 10^5$  κύτταρα / mL. Ο αριθμός κυττάρων επίστρωσης σε μία φλάσκα είναι  $2.5 \times 10^6$  κύτταρα, σε τελικό όγκο 10 ml. Ακολουθεί εμβολιασμός 10 mL εναιωρήματος κυττάρων από το corning σε νέα φλάσκα. Τέλος, η φλάσκα(ες) τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο για την ανάπτυξη των κυττάρων.

## ***III. 2<sup>η</sup> Ανακαλλιέργεια κυτταρικής καλλιέργειας***

Πραγματοποιείται περίπου 4 ημέρες μετά την πρώτη ανακαλλιέργεια. Ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με την πρώτη ανακαλλιέργεια μέχρι και την φυγοκέντρωση. Στο corning προστίθενται 4 mL θρεπτικού υλικού και ακολουθεί ήπια εναιώρηση. Ακολουθεί προσθήκη 9 mL πλήρους θρεπτικού υλικού σε 4 νέες φλάσκες και εμβολιασμός με 1 mL εναιωρήματος κυττάρων από το corning. Με τον τρόπο αυτόν γίνεται ανακαλλιέργεια των κυττάρων σε αναλογία 1:4. Ο αριθμός κυττάρων επίστρωσης σε μία φλάσκα είναι  $2.5 \times 10^6$  κύτταρα, σε τελικό όγκο 10 ml. Τέλος, οι φλάσκες τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο για την ανάπτυξη των κυττάρων.



#### ***IV. Μέτρηση κυττάρων***

Ακολουθείται η διαδικασία της ανακαλλιέργειας μέχρι και την φυγοκέντρηση των κυττάρων. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα των κυττάρων προστίθεται ο κατάλληλος όγκος θρεπτικού υλικού. Ο όγκος του θρεπτικού υλικού θα πρέπει να είναι ανάλογος του ιζήματος, αφού σκοπός είναι να μετρηθούν τα κύτταρα με ακρίβεια αποφεύγοντας να είναι πολύ αραιά ή πυκνά. Συνήθως, προστίθεται 4 mL πλήρους θρεπτικού υλικού και έπεται ήπια εναιώρηση των κυττάρων. Σε αποστειρωμένο σωλήνα erpendorf προστίθενται 10  $\mu$ L εναιωρήματος των κυττάρων και 10  $\mu$ L βαφής Trypan Blue. Το περιεχόμενο του erpendorf αναδεύεται και 10  $\mu$ L από αυτό τοποθετούνται σε αιμοκυτόμετρο (πλάκα Neubauer). Στην συνέχεια τα κύτταρα καταμετρούνται στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Η συγκέντρωση των κυττάρων υπολογίζεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\text{Συγκέντρωση κυττάρων} = (\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων}) \times (\text{συντελεστής αραίωση}) \times 10^4 / \text{mL}$$

Μετά την μέτρηση, ακολουθεί προσθήκη κατάλληλου όγκου θρεπτικού υλικού στο corning ώστε να επιτευχθεί η απαιτούμενη τελική συγκέντρωση των κυττάρων.

#### ***V. Πάγωμα κυτταρικής καλλιέργειας***

Γίνεται για την δημιουργία αποθεμάτων (stock). Αρχικά, παρασκευάζεται ένα υγρό παγώματος, το οποίο περιέχει 10% DMSO σε FBS (τροποποίηση από προηγούμενη version: 60% πλήρες θρεπτικό υλικό, 20% αδραντοποιημένου FBS και 20% αποστειρωμένου DMSO). Στην συνέχεια, χρησιμοποιείται μια φλάσκα στην οποία τα κύτταρα βρίσκονται σε εκθετική αύξηση (όταν θα ακολουθούσε κανονικά ανακαλλιέργεια) και ακολουθείται η διαδικασία της ανακαλλιέργειας. Τέλος, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται ήπια σε 2 mL ψυχρό υγρό παγώματος. Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε cryovial, 1 mL / cryovial (κάθε ένα cryovial τελικά θα περιέχει περίπου  $4 \times 10^6$  κύτταρα). Τα cryovials τοποθετούνται κατευθείαν σε πάγο για μερικά λεπτά. Ακολουθεί η αποθήκευσή τους στους  $-80^\circ\text{C}$  για 48 ώρες και τέλος, στο υγρό άζωτο για μακρά φύλαξη.

## **5.4 Ενεργοποίηση της έκφρασης sPLA<sub>2</sub>-IIA με τη χρήση LPS στα U937 κύτταρα, συλλογή των δειγμάτων και λύση**

### **Αντιδραστήρια-Υλικά**

- Αναστολείς πρωτεασών (σε DMSO, S8820, Sigma)
- LPS *E. coli* (Sigma, L4005)
- LPS Salmonella (Sigma, L6143)
- LPS *E. coli* (Invitrogen, 004976-03)

### **Πειραματική διαδικασία**

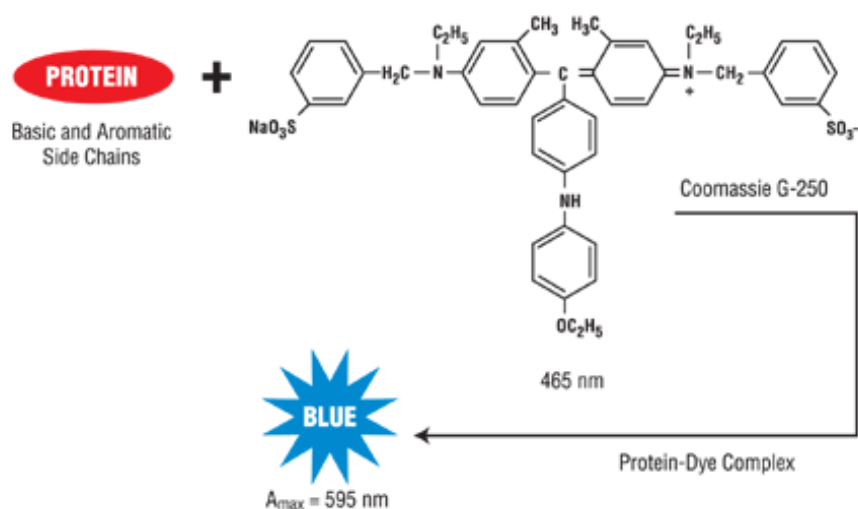
Αρχικά ακολουθείται η διαδικασία της ανακαλλιέργειας μέχρι τη φυγοκέντρηση. Μετά τη φυγοκέντρηση πραγματοποιείται απόρριψη του υπερκειμένου και εναιώρηση του ιζήματος με 5 mL PBS. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1000g για 5min. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα των κυττάρων προστίθεται ο κατάλληλος όγκος μη πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI. Ο όγκος του θρεπτικού υλικού θα πρέπει να είναι ανάλογος του ιζήματος, αφού σκοπός είναι να μετρηθούν τα κύτταρα με ακρίβεια αποφεύγοντας να είναι πολύ αραιά ή πυκνά. Συνήθως προστίθενται 10mL μη πλήρους θρεπτικού υλικού, έπεται ήπια εναιώρηση των κυττάρων και μέτρηση. Μετά την διαδικασία μέτρησης των κυττάρων, τα κύτταρα επιστρώνονται σε πολυτρυβλίο 6 θέσεων σε συγκέντρωση  $10^6$  κύτταρα / mL, 1 mL ανά θέση και αφήνονται για 2 ώρες στον επωαστικό θάλαμο, προκειμένου να σταματήσει ο κυτταρικός κύκλος. Ακολουθεί η προσθήκη του LPS για το απαραίτητο χρονικό διάστημα. Μετά το πέρας της ώρας πραγματοποιείται η συλλογή των δειγμάτων σε eppendorfs. Έπειτα γίνεται φυγοκέντρηση στα 1000g για 5min. Τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέο eppendorf και φυλάσσονται στους -20°C. Στα κύτταρα προστίθενται 500mL διαλύματος PBS που περιέχει αναστολείς πρωτεασών. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπερήχους. Τέλος καταψύχεται το κυτταρικό εκχύλισμα στους -20°C.

## **5.5 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford**

### **Αρχή μεθόδου**

Η μέθοδος Bradford είναι μια φασματοφωτομετρική μέθοδος, η οποία προσδιορίζει την ολική πρωτεΐνη ενός διαλύματος. Η αρχή μεθόδου αυτής, βασίζεται στη

συμπλοκοποίηση των πρωτεϊνών με την όξινη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο που απορροφά στα 595nm. Η Coomassie Blue G χρωστική πριν την δέσμευσή της με πρωτεΐνη είναι ισορροπημένη σε όξινο περιβάλλον και έχει κόκκινο χρώμα. Όταν η χρωστική αντιδράσει με πρωτεΐνη η ουσία της χρωστικής μετατοπίζεται και γίνεται μπλε. Δυο ειδών αντίδρασης έχουμε στην μέθοδο αυτή. Αρχικά η κόκκινη μορφή της χρωστικής ουσίας δίνει το ελεύθερο πρωτόνιο στις ιονιζόμενες ομάδες της πρωτεΐνης. Αυτό έχει σαν συνέπεια την αποδιοργάνωση της πρωτεΐνης και την έκθεση των υδροφοβικών ομάδων της πρωτεΐνης. Οι υδρόφοβες ομάδες δεσμεύονται μη ομοιοπολικά στις μη πολικές περιοχές της χρωστικής ουσίας μέσω δυνάμεων van der Waals. Η σύνδεση της πρωτεΐνης με την χρωστική είναι και ο λόγος της αλλαγής του χρώματος της χρωστικής ουσίας, και για αυτό η ένταση της μπλε ουσίας που θα παραχθεί είναι ανάλογη με την ποσότητα της πρωτεΐνης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών, γίνεται με πρότυπη καμπύλη, στην οποία μετριέται η απορρόφηση δειγμάτων γνωστής ποσότητας πρωτεΐνης.



Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση των 2 αντιδράσεων που πραγματοποιούνται κατά την διαδικασία της Bradford

### Αντιδραστήρια-Υλικά

- Αλβουμίνη ορού βόου (Bovine Serum Albumin, Cat. No. A-9647, Sigma)
- Βαφή Coomassie Brilliant Blue (G-250, C<sub>17</sub>H<sub>48</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>Na, MB: 8540, Cat. No. B0770, Sigma)
- Phosphate buffered saline – PBS (pH 7.4, Cat. No. 10010023, Gibco)

## Συσκευές

- Πλαστικά erpendorfs
- Πλάκα ELISA
- Φωτόμετρο EPOCH 2

## Διαλύματα εργασίας

### 1. Πρότυπο διάλυμα 1mg/mL BSA (stock)

50mg BSA διαλύθηκαν σε 50ml απεσταγμένου νερού υπό ανάδευση στους 37°C. Η φύλαξη γίνεται στους -20°C.

### 2. Αραιωμένο αντιδραστήριο Bradford

Το αντιδραστήριο Bradford αραιώνεται με απεσταγμένο νερό, σε αναλογία 2:1.

## Πειραματική πορεία

Για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης, δημιουργήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Stock (μL)	0	2.5	5	10	20	30	40	50	60	70	80
PBS (μL)	100	97.5	95	90	80	70	60	50	40	30	20
Συγκέντρωση πρωτεΐνης (μg/l)	0	0.025	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
Τελικός όγκος	100μl										
Πρωτεΐνη (μg)	0	0.25	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8

Από τα παραπάνω, πάρθηκαν 10μL τα οποία τοποθετήθηκαν σε μια πλάκα 96 θέσεων ELISA, τρεις φορές για κάθε συγκέντρωση. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200μL από το αραιωμένο αντιδραστήριο Bradford.

Τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 595nm σε φωτόμετρο EPOCH 2, όπου γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης.

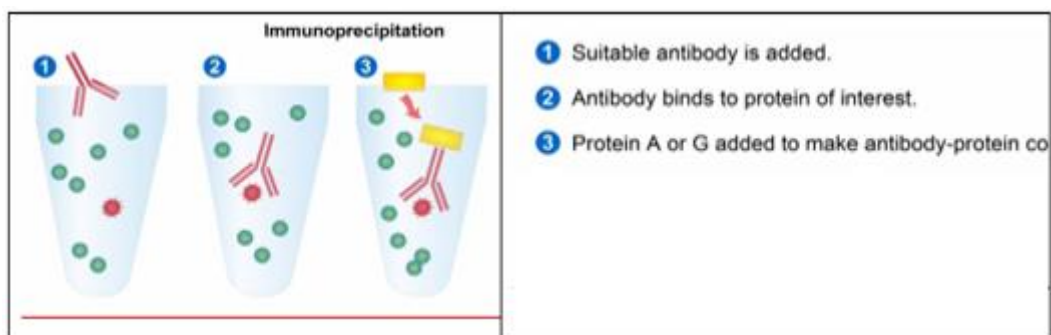
## 5.6 Ανοσοκαταβύθιση (immunoprecipitation, IP)

### Αρχή της μεθόδου

Η ανοσοκαταβύθιση είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική κατά την οποία καταβυθίζεται (συνήθως με την μορφή ιζήματος) σε ένα διάλυμα το αντιγόνο

(πρωτεΐνη) που θα μελετηθεί, με την βοήθεια ενός αντισώματος που αναγνωρίζει το συγκεκριμένο αντιγόνο. Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται για να απομονωθεί και να καθαριστεί ως έναν βαθμό η προς μελέτη πρωτεΐνη από το υπόλοιπο μίγμα.

Το όνομα της τεχνικής δεν είναι ακριβές, διότι η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με το αντίσωμα δεν προκαλεί την καθίζηση. Η «καθίζηση» προκαλείται από μία δεσμευτική πρωτεΐνη ανοσοσφαιρινών, όπως η πρωτεΐνη A ή G, που ακινητοποιείται σε μία στερεά υποστήριξη, τα σφαιρίδια αγαρόζης ή σεφαρόζης. Αυτές οι δεσμευτικές πρωτεΐνες αρχικά απομονώθηκαν από βακτήρια και αναγνώριζαν μια μεγάλη ποικιλία αντισωμάτων. Αφού δεσμευτεί η ακινητοποιημένη πρωτεΐνη A ή G με το αντίσωμα-αντιγόνο, τότε το σύμπλοκο κατακρημνίζεται, πλένεται πολλές φορές για να απομακρυνθούν τυχόν πρωτεΐνες, οι οποίες δεν δεσμεύτηκαν ειδικά με το αντίσωμα και παραλαμβάνεται. Μετά την παραλαβή των καταβυθισμένων πρωτεϊνών ακολουθεί η ανάλυσή τους με διάφορες τεχνικές όπως ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE), ανοσοαποτύπωση (Western Blotting), φασματομετρία μάζας (MS) και άλλες.



Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της ανοσοκαταβύθισης

Ανοσοκαταβύθιση μπορεί να επιτευχθεί μέσω δύο διαφορετικών προσεγγίσεων: I) Στην προσέγγιση του προ-ακινητοποιημένου αντισώματος, ένα αντίσωμα (εκλεκτικό έναντι μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης) είναι προ-ακινητοποιημένο πάνω σε ένα αδιάλυτο υπόστρωμα (όπως αγαρόζη ή σεφαρόζη) και κατόπιν επωάζεται με το κυτταρόλυμα που περιέχει την πρωτεΐνη στόχο. Κατά την διάρκεια της περιόδου επώασης, η ήπια ανάδευση επιτρέπει στο αντιγόνο-στόχο να συνδέεται με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. II) Στην προσέγγιση του ελεύθερου αντισώματος, το ελεύθερο αντίσωμα αφήνεται να σχηματίσει ανοσοσυμπλέγματα στο κυτταρόλυμα και τα σύμπλοκα, στην συνέχεια, ανακτώνται από τα σφαιρίδια (εικόνα 21). Η

προσέγγιση αυτή είναι επωφελέστερη εάν η πρωτεΐνη-στόχος είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιβεβαιωθούν τα βιοχημικά χαρακτηριστικά ταυτότητας ή μελέτης, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντος. Η διαδικασία διακρίνεται σε διάφορα στάδια: 1) προετοιμασία των δειγμάτων, 2) προ-καθαρισμός, 3) επώαση αντισωμάτων και σχηματισμός του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος, 4) κατακρήμνιση και 5) ανάλυση με western blotting, LC/MS κλπ. Το στάδιο του προ-καθαρισμού (pre-clearing) συμβάλλει στη μείωση της μη ειδικής δέσμησης καθώς και στην ελάττωση του background. Ωστόσο, εάν η τελική ανίχνευση της πρωτεΐνης γίνεται με ανοσοαποτύπωση, ο προ-καθαρισμός μπορεί να μην είναι απαραίτητος, εκτός εάν κάποια πρωτεΐνη παρεμβαίνει στην απεικόνιση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.

#### **Αντιδραστήρια-Υλικά**

- Χλωριούχο νάτριο (NaCl, 58,44 g/mol, S3160, Fisher)
- Tris-HCl (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, 121,14 g/molm T1503, Sigma)
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 292,24 g/mol, E6758, Sigma)
- Δωδεκυλο-σουλφονικό νάτριο, SDS (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S, 288,38 g/mol, A2263, AppliChem)
- Δεοξυχολικό νάτριο, NaDOC (C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>NaO<sub>4</sub>, 414,57 g/mol, 30970, Fluka)
- Triton X-100 (*t*-Oct-C<sub>6</sub>H<sub>40</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub> με x=9-10, T8787, Sigma)
- Γλυκερόλη (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>, 92,02 g/mol, 101186M, AnalaR)
- Νατραζίδιο (NaN<sub>3</sub>, 65,01 g/mol, S2002, Sigma)
- Αναστολείς πρωτεασών (σε DMSO, S8820, Sigma)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Dulbeco's Phosphate Buffered Saline, D8537, Sigma)
- Protein A-Sepharose from *Staphylococcus aureus* (lyophilized powder, P3391, Sigma)
- β-Μερκαπτοαιθανόλη (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, 78,13 g/mol, M3148, Sigma)
- Κυανό της βρωμοφαινόλης (C<sub>19</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>4</sub>NaO<sub>5</sub>S, 691,94 g/mol, 318744, Sigma)

## Αντισώματα

### Πρωτογενή Αντισώματα

- Mouse monoclonal anti-human sPLA2 type IIΑ (αραίωση 1:1000), (160500, Cayman)
- Rabbit polyclonal anti-human sPLA2 type IIΑ (αραίωση 1:1000), (ab23705, Abcam)

### Συσκευές

- Φυγόκεντρος για eppendorfs (MIKRO 20, Hettich zentrifugen)
- Ανακινούμενη βάση

## Διαλύματα Εργασίας

**1. Ρυθμιστικό διάλυμα λύσεως RIPA:** Η παρασκευή των διαλυμάτων stock γίνεται σε τελικό όγκο 50 mL ενώ το RIPA σε τελικό όγκο 100 mL, σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

Αντιδραστήριο	Διάλυμα stock (σε H <sub>2</sub> O)	Τελική Συγκέντρωση
NaCl	5 M	150 mM
Tris (pH 7.6)	1M	50 mM
EDTA	0,5 M	2 mM
SDS	10 %	0,1 %
NaDOC	10 %	1 %
Triton X-100	10 %	1 %
Γλυκερόλη	100 %	10 %

Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

**2. Ρυθμιστικό διάλυμα λύσεως RIPA + 0,02% NaN<sub>3</sub>:** Σε 50 mL διαλύματος λύσεως RIPA διαλύονται 0,001 g NaN<sub>3</sub>. Στο διάλυμα αυτό διατηρούνται τα σφαιρίδια σεφαρόζης στους 4 °C.

**3. Ρυθμιστικό διάλυμα λύσεως RIPA + αναστολείς πρωτεασών:** Λίγο πριν την χρήση για την συλλογή των κυττάρων στο RIPA buffer προστίθενται αναστολείς πρωτεασών σε τελική συγκέντρωση 1:250.

**4. Διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων (Sample Buffer) 2x:** Περιέχει 65,8 mM Tris-HCl, 26,3 % v/v γλυκερόλη, 2,1 % w/v SDS, 0,01 % w/v κυανό της βρωμοφαινόλης και 2 % v/v 2-μερκαπτοαιθανόλη. Αναμιγνύονται 398,6 mg Tris-HCl, 13,15 mL γλυκερόλης, 1,05 g SDS, 5,0 mg κυανού της βρωμοφαινόλης και 1 mL 2-μερκαπτοαιθανόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 mL με νερό και το pH ρυθμίζεται στην τιμή 6.8. Το διάλυμα διαμοιράζεται ανά 1,0 mL σε πλαστικά σωληνάκια, τα οποία φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **Πειραματική Διαδικασία**

### ***1. Προετοιμασία σφαιριδίων Protein A-Sepharose***

1. Ενυδάτωση των σφαιριδίων με απεσταγμένο νερό (2 mL dH<sub>2</sub>O στα 250 mg Protein A-Sepharose)
2. Μεταφορά εναιωρήματος σε erpendorf των 2 mL με τίρ που έχει μεγάλο ακροφύσιο
3. Παραμονή για 15 min τον πάγο
4. Φυγοκέντρωση στα 12.000 g για 1 min στους 4°C
5. Απόρριψη υπερκειμένου
6. Έκπλυση με 1 mL dH<sub>2</sub>O (τουλάχιστον 3 εκπλύσεις)
7. Φυγοκέντρωση στα 12.000 g για 1 min στους 4°C και απόρριψη υπερκειμένου κάθε φορά
8. Παραλαβή των σφαιριδίων σε ίσο όγκο RIPA + 0,02% NaN<sub>3</sub>
9. Διαμοιρασμός του διαλύματος ανά 50 μL σε erpendorfs
10. Φύλαξη των σφαιριδίων στους 4°C



## **II. Προετοιμασία Δειγμάτων**

1. Συλλογή υπερκείμενων των κυττάρων σε eppendorfs και φυγοκέντρηση στα 800 g για 5 min στους 4°C, προκειμένου να απομακρυνθούν νεκρά κύτταρα
2. Έκπλυση κυττάρων με 1 mL παγωμένου PBS (τουλάχιστον 3 εκπλύσεις)
3. Προσθήκη στα κύτταρα 200 μL παγωμένου RIPA + αναστολείς πρωτεασών (το eppendorf έχει τοποθετηθεί στον πάγο)
4. Συλλογή του εναιωρήματος των κυττάρων σε eppendorfs
5. Ανάδευση για 30 min στους 4°C
6. Φυγοκέντρηση στα 10.500 g (12.000 rpm) για 20 min στους 4°C
7. Μεταφορά υπερκείμενου (κυτταρόλυμα) σε νέο eppendorf ενώ το ίζημα εναιωρείται σε PBS
8. Φύλαξη των δειγμάτων στους -20°C

## **III. Ανοσοκαταβύθιση**

1. Στο κυτταρόλυμα (300 μL) και στο υπερκείμενο των κυττάρων (1 mL) προστίθενται 5 μL από το αντίσωμα της πρωτεΐνης προς καταβύθιση (anti-secretory phospholipase A<sub>2</sub>)
2. Επώαση overnight στους 4°C με ήπια ανάδευση
3. Προσθήκη 50 μL Protein A-Sepharose με tip που έχει μεγάλο ακροφύσιο
4. Επώαση για 6 h στους 4°C με ήπια ανάδευση
5. Φυγοκέντρηση στα 3.000 g (6.500 rpm) για 2 min στους 4°C
6. Το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο eppendorf και φυλάσσεται στους -20°C (IP supernatant)
7. Έκπλυση ιζήματος με 1 mL RIPA (τουλάχιστον 3 εκπλύσεις)
8. Φυγοκέντρηση στα 3.000 g (6.500 rpm) για 2 min στους 4°C
9. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα προστίθενται 20 μL sample buffer 2x
10. Ακολουθεί βρασμός για 5 min κι έπειτα φυγοκέντρηση στα 1.000 g (3.700 rpm) για 2 min στους 4°C. Λαμβάνεται το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης, το οποίο χρησιμοποιείται για SDS-PAGE/Immunoblotting
11. Το ίζημα εναιωρείται σε 20 μL RIPA και φυλάσσεται στους -20° C.

## 5.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

### Αρχή της Μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση υπό μετουσιωτικές συνθήκες είναι μία τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών ενός δείγματος σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου με βάση το μοριακό τους βάρος. Στην ηλεκτροφόρηση αυτή, χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο (SDS), ένα ανιονικό απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μίας πρωτεΐνης. Προστίθεται, επίσης, μερκαπτοαιθανόλη που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Το SDS, εκτός του ότι αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, δεσμεύεται πάνω σε αυτές σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1,4 g SDS/g πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS είναι επιμήκη, με σαφή και καθορισμένη μορφή και φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο. Η ηλεκτροφορητική ικανότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού βάρους.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου, το οποίο σχηματίζεται κατά τον συμπολυμερισμό του ακρυλαμιδίου ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) και του δις-ακρυλαμιδίου ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ). Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα πολυμερές πλέγμα που διαθέτει πόρους, με μέγεθος εξαρτώμενο από τον βαθμό πολυμερισμού και από την συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα. Η δημιουργία του πλέγματος γίνεται μέσω του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών με την προσθήκη του υπερθειϊκού αμμωνίου  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  για την έναρξη του μηχανισμού και του φωτοχημικού καταλύτη τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) για την διάδοσή του. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πήγματα, το *πήγμα επιστοίβαξης*, που είναι υπεύθυνο για την συμπύκνωση των πρωτεϊνών του δείγματος σε μία πολύ πολύ λεπτή στιβάδα, και το *πήγμα διαχωρισμού*, που είναι υπεύθυνο για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε λεπτές ζώνες κατά την κίνησή τους μέσα σε αυτό. Τα διαλύματα από τα οποία παρασκευάζονται τα δύο πήγματα είναι διαφορετικά ως προς το pH και την σύστασή τους.

## Αντιδραστήρια-Υλικά

- Tris-HCl ( $C_4H_{11}NO_3$ , 121,14 g/mol, T1503, Sigma)
- Σουλφονυλοδωδέκυλο νάτριο, SDS ( $C_{12}H_{25}NaO_4S$ , 288,38 g/mol, A2263, AppliChem)
- Ακρυλαμίδιο ( $C_3H_5NO$ , 71,08 g/mol, A3553, Sigma).
- *N,N'*-Methylene-bis-acrylamide ( $C_7H_{10}N_2O_2$ , 154,17 g/mol, 1610201, BioRad)
- Υπερθειτικό αμμώνιο, APS ( $(NH_4)_2S_2O_8$ , 228,20 g/mol, A3678, Sigma)
- Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη, TEMED ( $C_6H_{16}N_2$ , 116,20 g/mol, T9281, Sigma)
- Ισοβουτανόλη ( $C_4H_{10}O$ , 74,12 g/mol, 414264, Carlo Erba)
- Απόλυτη Αιθανόλη ( $CH_3CH_2OH$ , 46,07 g/mol, 1.00983.2511, Merck)
- Γλυκερόλη ( $C_3H_8O_3$ , 92,02 g/mol, 101186M, AnalaR)
- Κυανό της βρωμοφαινόλης, Bromophenol Blue Sodium Salt ( $C_{19}H_9Br_4O_5SNa$  691,94 g/mol, 318744, Sigma)
- 2-Μερκαπτοαιθανόλη ( $C_2H_6OS$ , 78,13 g/mol, M3148, Sigma)
- Γλυκίνη ( $C_2H_5O_2N$ , 75,05 g/mol, A1067, AppliChem)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 ( $C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$ , 825,97 g/mol, B0149, Sigma)
- Μεθανόλη ( $CH_4O$ , 32,04 g/mol, 32213, Riedel-de Haën)
- Οξικό Οξύ ( $C_2H_4O_2$ , 60,05 g/mol, 33209, Fluka)
- Πρότυπα Μοριακά Βάρη (Prestained protein ladder 10-170 kDa, 26618, Thermo)
- Σελοφάν για gels (Gel drying frames, Z377597, Sigma)

## Συσκευές

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini-PROTEAN II Cell, BioRad) που περιέχει μικρές γυάλινες πλάκες 7,3 cm x 10,2 cm, μεγάλες γυάλινες πλάκες 8,3 cm x 10,2 cm, διαχωριστές (spacers) πάχους 1,0 mm, κάρτα ευθυγράμμισης (alignment card), βάση στήριξης πλακών, ελάσματα καουτσούκ, χτένι 10 φρεατίων πάχους 1,0 mm, σύστημα σταθεροποίησης πλακών με σφιγκτήρες, δεξαμενή ηλεκτροφόρησης, σύστημα ηλεκτροδίων, καπάκι σύνδεσης με τα ηλεκτρόδια, τροφοδοτικό ρεύματος PowerPac HC
- Ανακινούμενη βάση

## Διαλύματα Εργασίας

**1. Ρυθμιστικό διάλυμα 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8:** Ζυγίζονται 6,0 g Tris-HCl και διαλύονται σε 100 mL νερού. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6.8 με διάλυμα 4 N HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

**2. Ρυθμιστικό διάλυμα 1,5 M Tris-HCl, pH 8.8:** Ζυγίζονται 18,15 g Tris-HCl και διαλύονται σε 100 mL νερού. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 8.8 με διάλυμα 4 N NaOH. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

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

**4. Διάλυμα 30 %/0,8 % w/v ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου:** Ζυγίζονται 29,2 g ακρυλαμιδίου και 0,8 g bis-ακρυλαμιδίου και διαλύονται σε 100 mL νερού. Το διάλυμα διηθείται και φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο στους 4°C.

**5. Διάλυμα 10 % w/v υπερθειικού αμμωνίου (APS):** Ζυγίζεται 0,1 g υπερθειικού αμμωνίου και διαλύεται σε 1 mL νερού. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του και στην συνέχεια απορρίπτεται.

**6. Διάλυμα φόρτωσης των δειγμάτων (Sample Buffer) 2x:** Περιέχει 65,8 mM Tris-HCl, 26,3 % v/v γλυκερόλη, 2,1 % w/v SDS, 0,01 % w/v κυανό της βρωμοφαινόλης και 2 % v/v 2-μερκαπτοαιθανόλη. Αναμιγνύονται 398,6 mg Tris-HCl, 13,15 mL γλυκερόλης, 1,05 g SDS, 5,0 mg κυανού της βρωμοφαινόλης και 1 mL 2-μερκαπτοαιθανόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 mL με νερό και το pH ρυθμίζεται στην τιμή 6.8. Το διάλυμα χωρίζεται ανά 1,0 mL σε πλαστικά σωληνάκια, τα οποία φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**7. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrode ή Running Buffer) 10x:** Περιέχει 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris-HCl και 0,1 % w/v SDS. Ζυγίζονται 144,1 g γλυκίνης, 30,3 g Tris-HCl και 10 g SDS και διαλύονται σε 1 L απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 8.8. Το διάλυμα φυλάσσεται στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

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

**9. Διάλυμα χρωματισμού πήγματος (Staining Buffer):** Περιέχει 0,1 % w/v Coomassie R-250, 40% v/v μεθανόλη και 10 % v/v οξικό οξύ. Ζυγίζεται 0,5 g Coomassie R-250 και διαλύεται σε 400 mL μεθανόλης και 100 mL οξικού οξέος. Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με νερό. Το διάλυμα αναδεύεται και διηθείται σε πτυχωτό ηθμό. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

**10. Διάλυμα αποχρωματισμού πήγματος (Destaining Buffer):** Περιέχει 40% v/v μεθανόλη και 10 % v/v οξικό οξύ. Αναμιγνύονται 400 mL μεθανόλης και 100 mL

οξικού οξέος και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1 L με νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

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

### Πειραματική Διαδικασία

Προετοιμάζεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης. Πλένονται οι γυάλινες πλάκες της συσκευής και τα spacers του kit με απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και απόλυτη αιθανόλη. Συναρμολογούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του kit. Για να ελεγχθεί εάν υπάρχει διαρροή, προστίθεται ποσότητα απεσταγμένου νερού μεταξύ το γυάλινων πλακών και αφήνεται για 15-20 min. Έπειτα η ποσότητα αυτή απομακρύνεται και η περίσσεια του νερού αφαιρείται με διηθητικό χαρτί.

#### 1. Παρασκευή πήγματος διαδρομής (Resolving ή Separating Gel)

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

Αντιδραστήρια	Πήγμα Διαδρομής 10%	Πήγμα Διαδρομής 12%	Πήγμα Διαδρομής 15%	Πήγμα Επιστοίβαξης 5%
dH <sub>2</sub> O	4 mL	3,4 mL	2,5 mL	3,5 mL
Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl 1,5 M, pH 8.8	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	-
Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-	-	-	-	3 mL

<b>HCl 0,5 M, pH 6.8</b>				
<b>10% SDS</b>	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	80 $\mu$ L
<b>30%/0,8% Acrylamide / Bis-acrylamide</b>	3,3 mL	4 mL	5 mL	1,3 mL
<b>10% Υπερθειικό Αμμώνιο (APS)</b>	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	80 $\mu$ L
<b>TEMED</b>	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	8 $\mu$ L

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

Τα διαλύματα υπερθειικού αμμωνίου και TEMED είναι υπεύθυνα για την έναρξη του πολυμερισμού γι' αυτό και προστίθενται στο τέλος. Αμέσως μετά την προσθήκη των διαλυμάτων, μεταφέρουμε το μίγμα του πήγματος ανάμεσα στις δυο γυάλινες πλάκες τις συσκευής ηλεκτροφόρησης έως ότου φτάσει σε επίπεδο 0,5 εκατοστού κάτω από το κτένι και 2 εκατοστά κάτω από το άνω όριο του μικρού τζαμιού. Στην συνέχεια προσθέτουμε ισοβουτανόλη στην επιφάνεια του πολυακρυλαμιδίου για την προστασία του από την επαφή με τον αέρα. Το μίγμα αφήνεται να πολυμεριστεί στους 37 °C για περίπου 1 ώρα.

## ***II. Παρασκευή πήγματος επιστοιβαξης (Stacking Gel)***

Μετά τον πολυμερισμό του πήγματος διαδρομής, απομακρύνεται η ισοβουτανόλη απότομα και έπειτα το πήγμα εκπλένεται με απεσταγμένο νερό. Η περίσσεια αφαιρείται χρησιμοποιώντας διηθητικό χαρτί. Σε πλαστικό σωληνάριο corning αναμιγνύονται τα αντιδραστήρια για την παρασκευή του πήγματος επιστοιβαξης, αφήνοντας πάλι τελευταία τα διαλύματα υπερθειικού αμμωνίου και TEMED, σύμφωνα με τον **Πίνακα**. Αμέσως μετά την ανάμιξη το μίγμα επιστοιβάζεται προσεκτικά στο πήγμα διαδρομής και στη συνέχεια προστίθεται το κτένι για την δημιουργία των θέσεων. Το μίγμα αφήνεται να πολυμεριστεί στους 37 °C για περίπου 45 λεπτά. Μετά τον πολυμερισμό, αφαιρούνται οι γυάλινες πλάκες από την συσκευή στήριξης και τοποθετούνται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το κτένι αφαιρείται και

στο χώρο ανάμεσα από τις γυάλινες πλάκες, στις θέσεις των δειγμάτων, αλλά και στον εξωτερικό χώρο του πήγματος, σε ύψος περίπου πέντε εκατοστών, τοποθετείται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1x.

### ***III. Προετοιμασία και τοποθέτηση των δειγμάτων***

Σε κατάλληλη ποσότητα δείγματος προστίθεται ποσότητα διαλύματος φόρτωσης (Sample Buffer) 2x σε πλαστικούς σωλήνες erpendorf. Ο μέγιστος όγκος που μπορεί να προστεθεί σε κάθε θέση είναι 45  $\mu\text{L}$  που αντιστοιχεί περίπου σε 180  $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης. Τα δείγματα θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 100  $^{\circ}\text{C}$ . Μετά το βρασμό τους, τα δείγματα τοποθετούνται με ειδικό ρύγχος μεγάλης απόληξης στις αντίστοιχες θέσεις του πήγματος. Στην πρώτη θέση συνήθως τοποθετούνται τα πρότυπα μοριακά βάρη. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 150 V για περίπου μια ώρα. Το πέρας της ηλεκτροφόρησης διαπιστώνεται όταν το μέτωπο της βαφής φτάσει στο τέλος του πήγματος της διαδρομής.

### ***IV. Χρώση πρωτεϊνών του πήγματος***

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι πλάκες αποσυνδέονται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το πήγμα μεταφέρεται σε γυάλινο δοχείο που περιέχει το διάλυμα χρωματισμού πήγματος (Staining Buffer) και αφήνεται υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, για μισή ώρα ή έως ότου οι πρωτεϊνικές ζώνες χρωματιστούν κυανές.

### ***V. Αποχρωματισμός του πήγματος***

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



## ***VI. Στέγνωμα και μονιμοποίηση του πήγματος***

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

## **5.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Immunoblotting, IB)**

### **Αρχή της Μεθόδου**

Η ανοσοαποτύπωση είναι μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Η τεχνική εφαρμόζεται προκειμένου να ανιχνευθεί εκλεκτικά μία πρωτεΐνη-αντιγόνο που έχει ακινητοποιηθεί σε μεμβράνη με την χρήση ειδικών αντισωμάτων, τα οποία έχουν παρασκευαστεί για το συγκεκριμένο αντιγόνο.

Τα στάδια της ανοσοαποτύπωσης είναι τα εξής:

- I. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών ενός δείγματος με ηλεκτροφόρηση υπό μετουσιωτικές συνθήκες.
- II. Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από το πήγμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη (νιτροκυτταρίνη ή PVDF). Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται υπό την μορφή συμπλόκου με το SDS και είναι αρνητικά φορτισμένες, μεταφέρονται από το πήγμα προς την μεμβράνη με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού.
- III. Ανοσοανίχνευση. Στο στάδιο αυτό γίνεται ο εντοπισμός μίας καθηλωμένης, στην μεμβράνη, πρωτεΐνης με την βοήθεια αντισώματος. Η καθηλωμένη πρωτεΐνη-αντιγόνο αλληλεπιδρά με το πρωτογενές αντίσωμα. Η αλληλεπίδραση αυτή ανιχνεύεται με την βοήθεια ενός δεύτερου αντισώματος, το οποίο είναι ικανό να αναγνωρίζει και να δεσμεύεται στο αρχικό. Το δευτερογενές αντίσωμα περιέχει στο μόριό του συζευγμένο

κάποιο ένζυμο-δείκτη, το οποίο αντιδρά με εξωγενώς προστιθέμενο υπόστρωμα (αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας) οπότε και επιτυγχάνεται η εμφάνιση των προσδιοριζόμενων πρωτεϊνών σε ειδικό φιλμ.

### **Αντιδραστήρια-Υλικά**

- Γλυκίνη ( $C_2H_5O_2N$ , 75,05 g/mol, A1067, AppliChem)
- Tris-HCl ( $C_4H_{11}NO_3$ , 121,14 g/mol, T1503, Sigma)
- Σουλφονυλοδωδέκυλο νάτριο, SDS ( $C_{12}H_{25}NaO_4S$ , 288,38 g/mol, A2263, AppliChem)
- Μεθανόλη ( $CH_3OH$ , 32,04 g/mol, 32213, Riedel-de Haën)
- Μεμβράνη μεταφοράς πρωτεϊνών PVDF (Polyvinylidene Difluoride, 140-150  $\mu g$  πρωτεΐνης/ $cm^2$  μεμβράνης, 1 roll, 26 cm x 3.3 m, 1620177, Bio-Rad)
- Διηθητικό χαρτί απλό
- Blotter paper (7,5 cm x 10 cm, 1703932, BioRad)
- Χλωριούχο νάτριο ( $NaCl$ , 58,44 g/mol, S3160, Fisher)
- Tween-20 (viscous liquid, P1379, Sigma)
- Διάλυμα 0,1 % χρωστικής Rouge Ponceau σε 5 % οξικό οξύ ( $C_{22}H_{12}N_4Na_4O_{13}S_4$ , 760,57 g/mol, P7170, Sigma)
- Σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου
- Διάλυμα χημειοφωταύγειας (Luminata Crescendo Western HRP Substrate, WBLUR0100, Merck)
- Κασετίνα εμφάνισης των φιλμ (X-Ray cassette, 15 cm x 30 cm, ZV0003, Kisker)
- Φιλμ (Fuji Film, 13 cm x 18 cm, 4741019230, Kisker)
- Υγρό εμφάνισης του φιλμ (Developer, DEV0103, Kisker)
- Υγρό μονιμοποίησης του φιλμ (Fixer, FIX0101, Kisker)
- 2-Μερκαπτοαιθανόλη ( $C_2H_6OS$ , 78,13 g/mol, M3148, Sigma)

### **Αντισώματα**

#### ***Πρωτογενή Αντισώματα***

- Mouse monoclonal anti-human sPLA<sub>2</sub> type IIA (αραίωση 1:1000), (160500, Cayman)

## ***Δευτερογενή Αντισώματα***

- Mouse m-IgGκ BP- HRP (αραίωση 1:7.000), (sc-516102, Santa Cruz Biotechnology)

## **Συσκευές**

- Συσκευή semi-dry μεταφοράς (Hoffer TE70 Semi-dry, Transfer unit, 80621034, Serial No. 20098784, Amersham Biosciences Corp, USA)
- Συσκευή wet ηλεκτρομεταφοράς (Mini Trans-Blot Transfer Cell, BioRad) που περιέχει σχάρα μεταφοράς (cassette), σπόγγι διαστάσεων 8 cm x 11 cm (fiber pad), δεξαμενή ηλεκτρομεταφοράς, παγοκύστη, σύστημα ηλεκτροδίων, καπάκι σύνδεσης με τα ηλεκτρόδια, τροφοδοτικό ρεύματος PowerPac HC
- Ανακινούμενη βάση

## **Διαλύματα Εργασίας**

**1. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10x:** Περιέχει 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris-Base. Ζυγίζονται 144,1 g γλυκίνης και 30,3 g Tris-Base και διαλύονται σε 1 L απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 8.3. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C. *Για πρωτεΐνες μεγαλύτερες από 80 kDa στο διάλυμα συμπεριλαμβάνεται και SDS σε τελική συγκέντρωση 0,1 % w/v.*

**2. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 1x:** 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς 10x αναμιγνύονται με 200 mL μεθανόλης και αραιώνονται σε τελικό όγκο 1 L με νερό. Το διάλυμα παρασκευάζεται πριν την χρήση του και έπειτα απορρίπτεται.

**3. Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης TBS 10x:** Περιέχει 1.5 M NaCl και 200 mM Tris- Base. Ζυγίζονται 87.7 g NaCl και 24.2 g Tris-Base και διαλύονται σε 1 L απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 7.6. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

**4. Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης Tween 20-TBS 1x:** 100 mL του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης TBS 10x αραιώνονται σε τελικό όγκο 1 L με νερό. Στη συνέχεια προστίθεται 0,1 % v/v Tween-20 (αναστολέας πρωτεασών). Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

**5. Διάλυμα 5% w/v γάλακτος (Blocking Buffer):** Ζυγίζονται 2,5 g σκόνης αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου και διαλύονται σε 50 mL διαλύματος

έκπλυσης εργασίας Tween 20-TBS 1x. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν από την χρήση του και έπειτα απορρίπτεται.

**6. Διάλυμα εμφάνισης φιλμ (Developer):** Γίνεται αραιώση του υγρού εμφάνισης σε αναλογία 1:5 (v/v). 50 mL υγρού εμφάνισης αραιώνονται με νερό σε τελικό όγκο 250 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο σε θερμοκρασία δωματίου στον σκοτεινό θάλαμο. Το διάλυμα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί 4-5 φορές.

**7. Διάλυμα μονιμοποίησης φιλμ (Fixer):** Γίνεται αραιώση του υγρού μονιμοποίησης σε αναλογία 1:5 (v/v). 50 mL υγρού μονιμοποίησης αραιώνονται με νερό σε τελικό όγκο 250 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο σε θερμοκρασία δωματίου στον σκοτεινό θάλαμο. Το διάλυμα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί 4-5 φορές.

**8. Ρυθμιστικό διάλυμα απογύμνωσης ανοσοαποτυπωμάτων (Striping Buffer):** Περιέχει 100 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 62,5 mM Tris-HCl και 2% w/v SDS. Ζυγίζονται 2,46 g Tris-HCl και διαλύονται σε 150 mL νερού. Το pH ρυθμίζεται στο 6.7. Στην συνέχεια προστίθενται 5,0 g SDS και 1,77 mL 2-μερκαπτοαιθανόλη. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 250 mL με νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

## **Πειραματική Διαδικασία**

### ***I. Προετοιμασία της μεμβράνης PVDF***

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήγμα, χρησιμοποιείται μεμβράνη PVDF. Η μεμβράνη πριν από την χρήση της, κόβεται σε διαστάσεις 6 cm x 9 cm, διαβρέχεται με μεθανόλη, στη συνέχεια εμβαπτίζεται πλήρως σε νερό και τελικά τοποθετείται σε ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς 1x, έως την χρήση της. Η μεμβράνη θα πρέπει να διαχειρίζεται πάντα με γάντια.

### ***II. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών***

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήγμα εμβαπτίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς 1x. Εκεί το τζάμι αναποδογυρίζεται έτσι ώστε το gel να είναι από κάτω. Έτσι ξεκολλάει. Η ηλεκτρομεταφορά μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο μεθόδους. Η πρώτη μέθοδος αφορά την semi-dry μεταφορά. Στη συσκευή μεταφοράς

τοποθετούνται με την ακόλουθη σειρά: δύο χοντρά διηθητικά χαρτιά, ένα απλό, η μεμβράνη PVDF, το πήγμα πολυακρυλαμιδίου, ένα απλό και δύο χοντρά διηθητικά χαρτιά που έχουν εμβαπτισθεί σε διάλυμα μεταφοράς. Προσοχή θα πρέπει να δοθεί ώστε να μην παγιδευτούν φυσαλίδες αέρα μεταξύ αυτών. Η PVDF βρίσκεται πάντα προς τη μεριά του θετικού πόλου (κόκκινος πόλος). Η μεταφορά επιτυγχάνεται στα 75 mA για ένα πήγμα ή στα 150 mA για δύο, για χρονικό διάστημα μεταξύ μιάμισης και δύο ωρών. Η δεύτερη μέθοδος αφορά την wet μεταφορά. Σε μία ειδική συσκευή, που ονομάζεται σχάρα μεταφοράς, τοποθετούνται με την σειρά, ως προς την σκουρόχρωμη πλευρά (κάθοδος), ένα στρώμα σπόγγου, ένα χοντρό διηθητικό χαρτί, το πήγμα πολυακρυλαμιδίου, η μεμβράνη PVDF, ένα χοντρό διηθητικό χαρτί και ένα στρώμα σπόγγου. Η wet μεταφορά πραγματοποιείται στα 90 V για 1 ώρα. Να σημειωθεί ότι η διάρκεια μεταφοράς εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών. Για μεγαλύτερο μοριακό μέγεθος, απαιτείται περισσότερος χρόνος. Επιπλέον, η μέθοδος ηλεκτρομεταφοράς που θα εφαρμοστεί εξαρτάται επίσης από το μέγεθος των πρωτεϊνών. Για πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους συνίσταται η semi-dry μεταφορά ενώ για μεγάλου μοριακού βάρους η wet μεταφορά. Μετά το πέρας της μεταφοράς το πήγμα τοποθετείται για χρώση για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας.

### ***III. Χρώση και αποχρωματισμός της μεμβράνης***

Μετά το πέρας της μεταφοράς αποσυνδέεται η συσκευή από το τροφοδοτικό. Η σχάρα μεταφοράς αποσυναρμολογείται και στο στάδιο αυτό μπορεί να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς με βάση το δείγμα των προχρωματισμένων πρότυπων πρωτεϊνών. Επιτυχής μεταφορά σημαίνει ότι οι ζώνες των πρότυπων πρωτεϊνών θα πρέπει να έχουν αποσπαστεί από το πήγμα του πολυακρυλαμιδίου και να είναι ορατές μόνο πάνω στην μεμβράνη PVDF. Με μία λαβίδα και φορώντας γάντια, η PVDF εμβαπτίζεται σε δοχείο που περιέχει το διάλυμα της χρωστικής Rouge Ponceau ώστε να καλυφθεί πλήρως. Η μεμβράνη ανακινείται για 1 min και στην συνέχεια, εκπλένεται με απεσταγμένο νερό έως ότου να γίνουν εμφανείς οι ζώνες των πρωτεϊνών. Η PVDF στεγνώνεται σε διηθητικό χαρτί και με ανεξίτηλο μαρκαδόρο σημειώνονται οι ζώνες των πρότυπων μοριακών βαρών. Η μεμβράνη σαρώνεται και στην συνέχεια, αποχρωματίζεται εξισορροπώντας την σε ρυθμιστικό διάλυμα αποχρωματισμού Tween 20-TBS, για 30 min με αλλαγές του διαλύματος ανά 10 min. Ακολουθεί η επώαση των μεμβρανών με αντισώματα.

#### ***IV. Σήμανση πρωτεϊνών στην μεμβράνη***

Μετά το πέρας της χρώσης, η μεμβράνη επωάζεται για μία έως τέσσερις ώρες σε ψυχρό περιβάλλον (4 °C) ή για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα 5% γάλακτος-διαλύματος έκπλυσης (Blocking Buffer) για κορεσμό των περιοχών της μεμβράνης όπου δεν υπάρχουν πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκπλένεται και επωάζεται για όλη τη νύχτα (overnight) σε αναδευτήρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή στον ψυχρό θάλαμο με το κατάλληλο μίγμα αντισωμάτων σε διάλυμα Tween 20-TBS. Ακολουθούν 3 δεκάλεπτες πλύσεις με Tween 20-TBS και δύο ώρες επώαση με το κατάλληλο δευτερεύον αντίσωμα σε ψυχρό περιβάλλον (4 °C), αντι-αντίσωμα, σε διάλυμα Tween 20-TBS. Το δευτερεύον αντίσωμα είναι συζευγμένο με κατάλληλο ένζυμο, το οποίο όταν διεγερθεί χημικά φωταυγάζει. Τέλος, η μεμβράνη εκπλένεται 3 φορές από 10 λεπτά.

#### ***V. Εμφάνιση πρωτεϊνών***

Η μεμβράνη τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί για την απομάκρυνση του διαλύματος, και επωάζεται για 1 λεπτό με το μίγμα των αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας (ECL). Στη συνέχεια τοποθετείται στην ειδική κασετίνα εμφάνισης. Στον σκοτεινό θάλαμο, κόβεται κομμάτι φιλμ, όμοιων διαστάσεων με την μεμβράνη, τοποθετείται πάνω στην μεμβράνη, σημειώνονται τα άκρα της με μαρκαδόρο και η κασετίνα κλείνεται. Το φιλμ παραμένει στην κασετίνα μερικά λεπτά (συνήθως 5-9 λεπτά). Στη συνέχεια, το φιλμ τοποθετείται στο διάλυμα εμφάνισης (Developer) για μερικά λεπτά έως ότου εμφανιστούν οι ζώνες, εκπλένεται καλά με νερό και τοποθετείται στο διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer). Τέλος, το φιλμ εκπλένεται με νερό και αφήνεται να στεγνώσει.

### **5.9 Απομόνωση ολικού RNA από A549 κύτταρα**

#### **Αρχή της μεθόδου**

Η απομόνωση RNA είναι μία ευαίσθητη μέθοδος, κρίσιμη για την εκτέλεση διαφόρων πειραμάτων μοριακής βιολογίας. Κατά την διαδικασία απομόνωσης, είναι σημαντικό να αποφευχθεί η αποδόμηση του RNA. Τα κύτταρα λύνονται με επώαση σε ένα διάλυμα που περιέχει μεγάλες ποσότητες χαστροπικών ιόντων. Αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης απενεργοποιεί αμέσως τις RNάσες και δημιουργεί

κατάλληλες συνθήκες δέσμευσης, οι οποίες ευνοούν την προσρόφηση του RNA στην μεμβράνη πυριτίου. Το DNA, το οποίο είναι επίσης δεσμευμένο στην μεμβράνη πυριτίου, απομακρύνεται από ένα διάλυμα rDNάσης, το οποίο εφαρμόζεται απευθείας στην μεμβράνη πυριτίου. Πλύσεις με δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα αφαιρούν τα άλατα, τους μεταβολίτες και τα μακρομοριακά κυτταρικά συστατικά. Το καθαρό RNA εκλούεται τελικά υπό συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος με νερό απαλλαγμένο από RNάσες.

### **Αντιδραστήρια-Υλικά**

- NucleoSpin RNA (50 preps, 740955.50. Macherey-Nagel)
- Απόλυτη Αιθανόλη (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, 46,07 g/mol, 1.00983.2511, Merck)
- Αιθανόλη 70% (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, 46,07 g/mol, Riedel-de Haën)
- 2-Μερκαπτοαιθανόλη (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, 78,13 g/mol, M3148, Sigma)
- RNase-free tips 0,1-10 µL (5 racks, 70.1130.200, Sarstedt)
- RNase-free tips 20-200 µL (5 racks, 70.760.202, Sarstedt)
- RNase-free eppendorfs (Certified PCR performance tested, 72.737.002, Sarstedt)

### **Συσκευές**

- Θάλαμος νηματώδους ροής (Laminar Flow, Hood Class II type A/B3, Nuair, Model No. 425-100, Ser. No. 27190AR)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (autoclave)
- Φυγόκεντρος για eppendorfs (MIKRO 20, Hettich zentrifugen)

### **Διαλύματα Εργασίας**

**1. Wash Buffer RA3:** Σε 12 mL του Buffer RA3 προστίθενται 48 mL απόλυτης αιθανόλης και το μίγμα αναδεύεται σχολαστικά. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και είναι σταθερό για περίπου έναν χρόνο.

**2. Recombinant DNase (rDNase):** Στο σωληνάριο με την λυοφιλοποιημένη rDNase προστίθενται 550 µL και ακολουθεί επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αναδεύεται προσεκτικά (όχι με vortex) ανά διαστήματα για την διάλυση της

rDNase. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε αποστειρωμένα nuclease-free eppendorfs, αποθηκεύεται στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  και είναι σταθερό για περίπου 6 μήνες. Το κάθε eppendorf δεν πρέπει να ξεπαγώσει περισσότερες από 3 φορές.

**3. DNase reaction mixture:** Σε αποστειρωμένο eppendorf προστίθενται για κάθε απομόνωση 10  $\mu\text{L}$  rDNase και 90  $\mu\text{L}$  Reaction Buffer for rDNase (από το kit). Το διάλυμα αναδεύεται προσεκτικά, παρασκευάζεται λίγο πριν από την χρήση του και έπειτα απορρίπτεται.

**4. Master premix Buffer RA1-Απόλυτη αιθανόλη:** Σε αποστειρωμένο σωλήνα των 15 ή 50 mL προετοιμάζεται διάλυμα Buffer RA1-απόλυτης αιθανόλης σε αναλογία 1:1. Για κάθε 100  $\mu\text{L}$  δείγματος αναμιγνύονται 300  $\mu\text{L}$  Buffer RA1 και 300  $\mu\text{L}$  απόλυτης αιθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται έντονα, παρασκευάζεται λίγο πριν από την χρήση του και έπειτα απορρίπτεται.

### Πειραματική Διαδικασία

1. *Απομόνωση κυττάρων:* Έπειτα από τις επιδράσεις με αναστολείς/ενεργοποιητές  $7 \times 10^6$  κύτταρα απομονώνονται με φυγοκέντρηση στα 800 g για 5 min σε αποστειρωμένα και RNase-free πλαστικά σωληνάκια. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης συλλέγεται και αποθηκεύεται στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  για μελλοντική απομόνωση RNA.
2. *Λύση των κυττάρων:* Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται 350  $\mu\text{L}$  RA1 (από το kit) και 3,5  $\mu\text{L}$  2-μερκαπτοαιθανόλη. Ανάδευση του διαλύματος σε vortex.
3. *Διήθηση λυμένων κυττάρων:* Το εναιώρημα μεταφέρεται στο *NucleoSpin Filter Unit* (από το kit), το οποίο τοποθετείται σε ένα σωληνάκι συλλογής και φυγοκεντρείται για 1 min στα 11.000 g.
4. *Καθορισμός συνθηκών πρόσδεσης RNA:* Το *NucleoSpin Filter Unit* αφαιρείται και προστίθενται 350  $\mu\text{L}$  αιθανόλης 70% στο σωληνάκι συλλογής. Ακολουθεί πολύ καλή εναιώρηση με πιπέτα.
5. *Πρόσδεση RNA:* Το *NucleoSpin RNA Column* (από το kit) τοποθετείται σε ένα σωληνάκι φυγοκέντρησης 2 mL (από το kit). Το εναιώρημα μεταφέρεται στο *NucleoSpin RNA Column* και φυγοκεντρείται για 30 sec στα 11.000 g. Το *NucleoSpin RNA Column* τοποθετείται σε καθαρό αποστειρωμένο σωληνάκι των 2 mL.



6. *Αφαλάτωση μεμβράνης silica*: Στο *NucleoSpin RNA Column* προστίθενται 350  $\mu\text{L}$  MDB και φυγοκεντρείται για 1 min στα 11.000 g για την ξήρανση της μεμβράνης.
7. *Πέψη DNA*: Προσθήκη 95  $\mu\text{L}$  DNase reaction mixture απ' ευθείας στο κέντρο της μεμβράνης silica της στήλης. Επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
8. *1<sup>η</sup> πλύση (ξήρανση της μεμβράνης)*: Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  από το Buffer RAW2 (από το kit) στο *NucleoSpin RNA Column*. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 sec στα 11.000 g και τοποθέτηση του *NucleoSpin RNA Column* σε καθαρό αποστειρωμένο σωληνάκι των 2 mL.
9. *2<sup>η</sup> πλύση*: Προσθήκη 600  $\mu\text{L}$  από το Buffer RA3 (από το kit) στο *NucleoSpin RNA Column*. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 sec στα 11.000 g. Το περιεχόμενο από το σωληνάκι απορρίπτεται και αυτό τοποθετείται ξανά κάτω από την στήλη.
10. *3<sup>η</sup> πλύση*: Προσθήκη 250  $\mu\text{L}$  από το Buffer RA3 στο *NucleoSpin RNA Column* και φυγοκέντρηση για 2 min στα 11.000 g, προκειμένου η μεμβράνη να ξηραθεί πλήρως.
11. *Έκλυση ολικού RNA*: Η στήλη τοποθετείται σε nuclease-free eppendorf (από το kit) και σε αυτήν προστίθενται 60  $\mu\text{L}$  RNase-free  $\text{H}_2\text{O}$  (από το kit). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 g για την εκχύλιση του RNA.

## **5.10 Ποσοτικός προσδιορισμός περιεκτικότητας και έλεγχος καθαρότητας RNA**

### **Αρχή της μεθόδου**

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

## Αντιδραστήρια-Υλικά

- Πλαστικά σωληνάκια πολυπροπυλενίου
- Γυάλινες κυψελίδες χαλαζία των 2 mL

## Συσκευές

- Φωτόμετρο UV/Vis (Shimadzu UV-1601)

## Πειραματική Διαδικασία

Η διαδικασία που ακολουθείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της περιεκτικότητας και τον έλεγχο της καθαρότητας των απομονωμένων RNAs είναι η εξής:

1. Ποσότητα ίση με 10  $\mu\text{L}$  από τα απομονωμένα RNAs αραιώνεται με δις-αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό σε αποστειρωμένο σωληνάκι eppendorf (αραίωση 100 φορές)
2. Για την φωτομέτρηση στο UV/Vis χρησιμοποιούνται δύο γυάλινες κυψελίδες χαλαζία. Η μια πάντα περιέχει δις-αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό, το οποίο χρησιμοποιείται για μηδενισμό (τυφλό), και η άλλη κυψελίδα περιέχει κάθε φορά το εκάστοτε δείγμα RNA.
3. Η απορρόφηση μετράται στα 260 nm (απορροφούν μέγιστα τα νουκλεϊνικά οξέα), αφού προηγουμένως έχει γίνει μηδενισμός σε αυτό το μήκος κύματος με την κυψελίδα που περιέχει δις-αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό.
4. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται στα 280 nm (απορροφούν μέγιστα οι πρωτεΐνες), αφού προηγουμένως έχει γίνει μηδενισμός σε αυτό το μήκος κύματος με την κυψελίδα που περιέχει δις-αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό.
5. Η συγκέντρωση του διαλύματος RNA υπολογίζεται θεωρώντας ότι τα 40  $\mu\text{g}$  RNA/mL δίνουν απορρόφηση ίση με την μονάδα στα 260 nm, με βάση την ακόλουθη σχέση:

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

Ο λόγος  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  δίνει πληροφορίες για την καθαρότητα του δείγματος και θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ του 1,5 και του 2,2. Τιμές μικρότερες του 1,5 υποδηλώνουν υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών στο εκχύλισμα RNA, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 2,2 φανερώνουν την παρουσία μη αμελητέας ποσότητας DNA στο εκχύλισμα RNA.

## **5.11 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA (Reverse Transcription, RT) και ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)**

### **5.11.1 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA (Reverse Transcription, RT)**

#### **Αρχή της μεθόδου**

Η αντίδραση της αντίδρασης μεταγραφής (reverse transcription, RT), δηλαδή η μεταγραφή του RNA σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA), βασίζεται στην δράση ενός ιικού ενζύμου, της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase, RTase). Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μια RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία δημιουργεί συμπληρωματικά μόρια DNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το RNA. Αρχικά, στα μόρια RNA υβριδοποιούνται μόρια κατάλληλου εκκινητή, στα οποία η RTase προσθέτει τα συμπληρωματικά με τα RNA δεοξυριβονουκλεοτίδια για την δημιουργία του cDNA. Όπως είναι εμφανές, ο εκκινητής αυτός καθορίζει την ειδικότητα της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης, δηλαδή ποια μόρια RNA μόρια θα μεταγραφούν αντίστροφα σε cDNA. Τρεις διαφορετικές κατηγορίες εκκινητών χρησιμοποιούνται στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής: τα τυχαία εξαμερή, τα ολιγομερή δεοξυθυμιδίνης (oligo-dT) και ο ειδικός εκκινητής για το συγκεκριμένο γονίδιο.

### **5.11.2 Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)**

#### **Αρχή της μεθόδου**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον εκθετικό πολλαπλασιασμό μικρών αλληλουχιών DNA από ένα μεγαλύτερο μόριο δίκλωνου DNA, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η PCR απαιτεί την χρήση ενός ζεύγους εκκινητών, που είναι συμπληρωματικά προς μια αλληλουχία που ορίζεται σε κάθε μία από τις δύο έλικες του DNA. Οι εκκινητές επιμηκύνονται με την δράση μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq polymerase) παρουσία των τεσσάρων τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων, έτσι ώστε ένα αντίγραφο να κατασκευάζεται από την καθορισμένη

αλληλουχία. Οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την σύνθεση του DNA. Αυτό οδηγεί σε λογαριθμική αύξηση.

Η PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR) βασίζεται σε φθορίζουσες χρωστικές ή σημασμένους ιχνηθέτες που εκπέμπουν σήμα φθορισμού μόνο όταν προσδεθούν στο δίκλωνο προϊόν της αντίδρασης, αντανακλώντας, έτσι, στην ποσότητα του σχηματιζόμενου προϊόντος. Η ποσότητα του προϊόντος που σχηματίζεται κατά την PCR σε πραγματικό χρόνο ανιχνεύεται με μέτρηση του φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, κι όχι στο τέλος της αντίδρασης, όπως δηλαδή συμβαίνει στην συμβατική PCR. Οι καμπύλες αναφοράς της αντίδρασης διαχωρίζονται κατά την λογαριθμική φάση της αντίδρασης, αντανακλώντας την διαφορά της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος. Όπως είναι αναμενόμενο, όσα περισσότερα μόρια υποστρώματος περιέχει το αρχικό μίγμα της αντίδρασης, τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται για την πρώτη ανίχνευση σήματος φθορισμού μεγαλύτερου από το σήμα του υποβάθρου. Με άλλα λόγια, στην PCR σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιείται ανίχνευση του σήματος στην λογαριθμική φάση της αντίδρασης, η οποία αντανακλά την αρχική ποσότητα του μορίου-στόχου στο μίγμα της αντίδρασης. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για την ανίχνευση σήματος φθορισμού μεγαλύτερου από το σήμα του υποβάθρου, είναι γνωστός ως «οριακός κύκλος».

Φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται στην PCR σε πραγματικό χρόνο είναι οι ασύμμετρες χρωστικές κυανίνης SYBR Green, LC Green, EVA Green, SYTO9, BEBO και BOXTO. Οι χρωστικές αυτές δεν φθορίζουν σχεδόν καθόλου όταν βρίσκονται ελεύθερες στο διάλυμα της αντίδρασης, όταν όμως προσδεθούν στην μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA φθορίζουν έντονα. Κατά την PCR, ο φθορισμός των χρωστικών αυξάνει καθώς συσσωρεύονται τα προϊόντα της PCR. Η χρωστική SYBR Green προσδέεται στην μικρή αύλακα του DNA, με αποτέλεσμα την αύξηση του φθορισμού της μέχρι και εκατό φορές. Πρόκειται για μια πολύ σταθερή χρωστική, αφού μόλις το 6 % της δράσης της χάνεται μετά από 30 θερμικούς κύκλους της PCR. Κατά το στάδιο της επέκτασης των εκκινητών και του σχηματισμού του δίκλωνου προϊόντος της PCR, μόρια της χρωστικής SYBR Green προσδέονται στο νεοσυντιθέμενο dsDNA, με αποτέλεσμα να αυξάνει και πάλι ο φθορισμός, το μέγεθος σήματος του οποίου εξαρτάται από την ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης σε κάθε κύκλο.

### **Αντιδραστήρια-Υλικά**

- KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR Kit (KK4651, KAPABIOSYSTEMS)
- Primers *PLA2G2A* (330001PPH05823B, Qiagen)
- Primers *GAPDH* (QT01192646, Qiagen)
- RNase-free tips 0,1-10 µL (5 racks, 70.1130.200, Sarstedt)
- RNase-free tips 20-200 µL (5 racks, 70.760.202, Sarstedt)
- RNase-free eppendorfs (Certified PCR performance tested, 72.737.002, Sarstedt)

### **Συσκευές**

- Θάλαμος νηματώδους ροής (Laminar Flow, Hood Class II type A/B3, Nuair, Model No. 425-100, Ser. No. 27190AR)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (autoclave)
- Mini Opticon PCR System (Real-time PCR System, BioRad)

### **Πειραματική Διαδικασία**

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκαν 100 ng απομονωμένου RNA από κάθε δείγμα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 20 µL. Σε κάθε σωληνάκι προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα RNA που να αντιστοιχεί στα 100 ng, 0,8 µL από τον εκκινητή (forward-reverse primers *PLA2G2A* και *GAPDH*), 10 µL μίγματος iTaq DNA πολυμεράσης, ιόντων Mg<sup>2+</sup>, dNTPs, σταθεροποιητών/αναστολέων και φθοριστικής SYBR Green και 0,4 µL αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase, RTase). Η ανάμιξη των παραπάνω αντιδραστηρίων γίνεται τους 4 οC για την αποφυγή της εκκίνησης των ενζυμικών αντιδράσεων μεταγραφής και πολλαπλασιασμού. Συνίσταται η παρασκευή δύο αρχικών μιγμάτων (master mix) ένα για κάθε εκκινητή πριν τον διαμοιρασμό σε κάθε σωληνάκι. Παράλληλα, ετοιμάστηκαν δείγματα ελέγχου: α) αρνητικό δείγμα ελέγχου χωρίς RNA: γίνεται έλεγχος των αντιδραστηρίων για επιμόλυνση και β) αρνητικό δείγμα ελέγχου χωρίς αντίστροφη μεταγραφάση: γίνεται έλεγχος για επιμόλυνση του δείγματος RNA με DNA. Τα σωληνάκια κλείνονται προσεκτικά και φορώντας πάντα γάντια και το περιεχόμενό τους αναδεύεται σε συσκευή vortex. Ακολούθως, τοποθετούνται στις κατάλληλες θέσεις της συσκευής PCR. Η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με

το πρωτόκολλο κατά το οποίο ο θερμοκυκλοποιητής ρυθμίζεται για 5 min στους 42 °C για την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής με την ενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης και στην συνέχεια για 3 min στους 95 °C για την ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης και την απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Ακολουθούν, 3 sec στους 95 °C, για την μετουσίωση των κλώνων του σχηματιζόμενου cDNA και έπειτα 20 sec στους 60 °C για την επέκταση των κλώνων. Πραγματοποιήθηκαν 42 κύκλοι ενίσχυσης του cDNA. Οι αλληλουχίες του cDNA αναλύθηκαν ημιποσοτικά έχοντας ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής-γλυκεραλδεΐδης (GAPDH). Να σημειωθεί ότι τα γονίδια σταθερής έκφρασης (housekeeping genes) χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ποιότητας και της ποσότητας του cDNA, που αντανακλά την ποιότητα του RNA, καθώς και την απόδοση της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής.

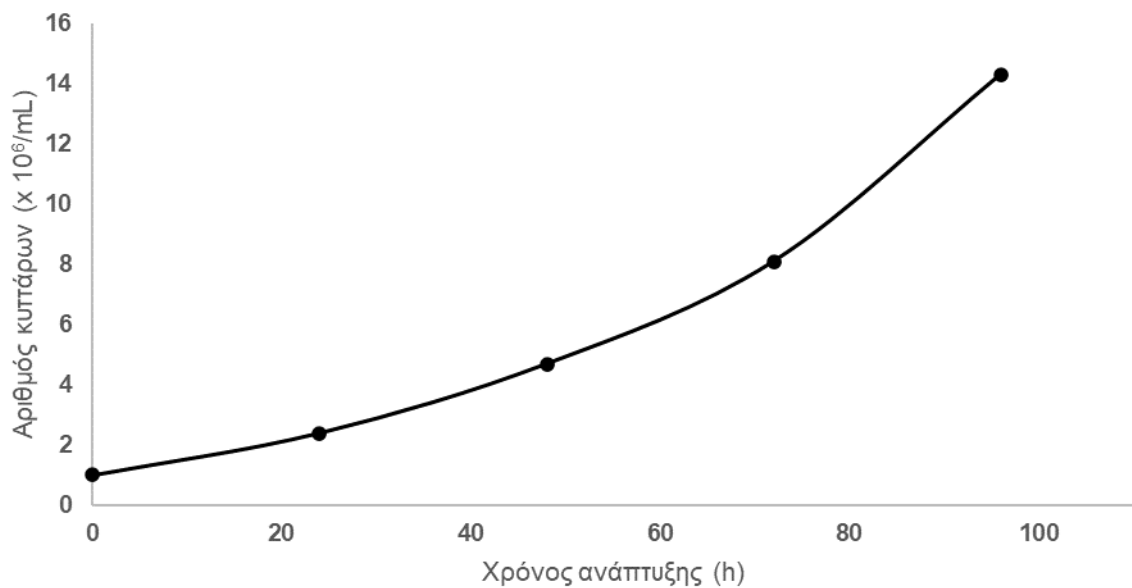
## Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα

### 6.1 Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων

Με σκοπό να μάθουμε τον χρόνο ανάπτυξης και διπλασιασμού των υπό εξέταση κυτταρικών μοντέλων (A549, U937), εκτελέστηκε μέτρηση της βιωσιμότητας του κυτταρικού πληθυσμού σε πλάκα Neubauer με την χρωστική Trypan Blue.

#### 6.1.1 Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων A549

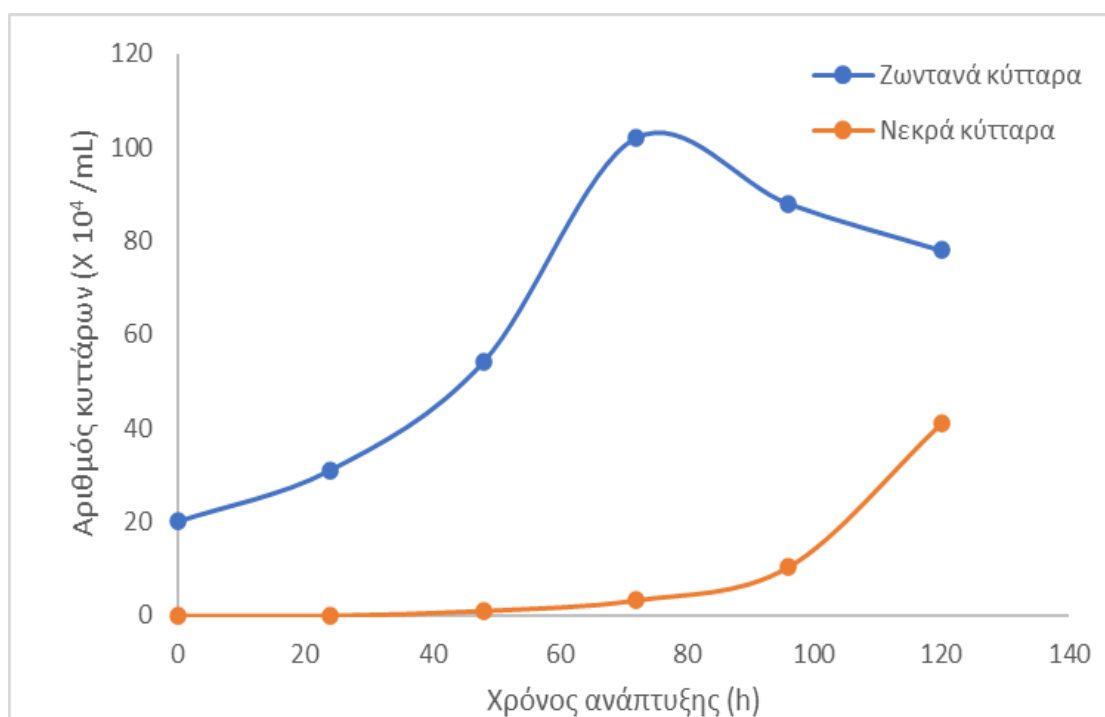
Πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων A549 σε τρυβλία με διάμετρο 10 cm, όπου αρχικά επιστρώθηκαν  $10^6$  κύτταρα και ανά 24 h συλλέγονταν τα κύτταρα με θρυψίνη και πραγματοποιούνταν μέτρηση του πληθυσμού τους. Στην παρακάτω **εικόνα** φαίνεται η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων από την οποία διαπιστώνεται ότι ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων A549 είναι οι 24 h.



**Εικόνα:** Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων A549

### 6.1.2 Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων U937

Πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων U937 σε πολυτρυβλίο των 6 θέσεων, όπου αρχικά επιστρώθηκαν  $2 \cdot 10^5$  κύτταρα ανά θέση. Ανά 24 h συλλέγονταν 10  $\mu\text{L}$  από το ελαιώρημα και πραγματοποιούνταν μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού. Στο παρακάτω **σχήμα** φαίνεται η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων, από την οποία διαπιστώνεται ότι ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων U937 είναι οι 25 h.



**Σχήμα:** Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων U937

#### Σχόλια-Παρατηρήσεις

Επίσης παρατηρήθηκε με βάση την καμπύλη ανάπτυξης ότι μετά από τις 72 h άρχισε να μειώνεται ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων και να αυξάνεται ο αριθμός των νεκρών κυττάρων. Αυτό συμβαίνει διότι η θέση που αναπτύσσονται τα κύτταρα έχει γεμίσει και δεν μπορούν να αναπτυχθούν άλλο με αποτέλεσμα να αρχίσουν να πεθαίνουν. Επιπλέον έχουν καταναλώσει πλήρως και το θρεπτικό τους υλικό.



## 6.2 Επίδραση LPS σε κύτταρα U937

Εκτελέστηκε επίδραση των κυττάρων U937 με 3 διαφορετικούς LPS. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν ήταν οι εξής : Control, LPS<sub>1</sub> Escherichia Coli, LPS<sub>2</sub> Escherichia Coli με διαφορετικό ορότυπο και LPS Salmonella. Η επίδραση με τους LPS διήρκησε 24h και χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις για κάθε LPS, 1 µg/mL και 25 µg/mL. Πραγματοποιήθηκαν διπλά δείγματα για κάθε συνθήκη.

### 6.2.1 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης

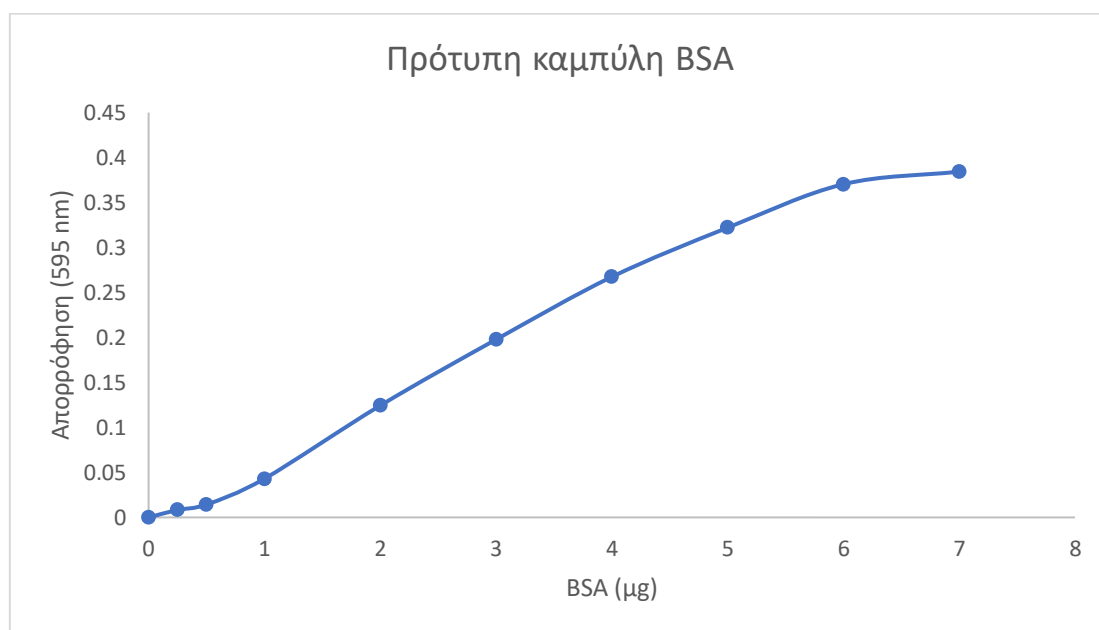
Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford στα κυτταρικά εκχυλίσματα των παραπάνω συνθηκών. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι απορροφήσεις για την πρότυπη καμπύλη που λήφθηκαν από το φωτόμετρο:

Πρωτεΐνη (µg)	Απορρόφηση 1	Απορρόφηση 2	Απορρόφηση 3	Μέσος όρος
0,25	0,006	0,010	0,009	0,008
0,5	0,019	0,014	0,010	0,014
1	0,043	0,044	0,042	0,043
2	0,131	0,132	0,111	0,124
3	0,192	0,199	0,202	0,198
4	0,251	0,289	0,262	0,267
5	0,305	0,324	0,345	0,322
6	0,347	0,382	0,382	0,370
7	0,370	0,392	0,391	0,384

**Πίνακας:** Τιμές απορροφήσεων των δειγμάτων για δημιουργία πρότυπης καμπύλης

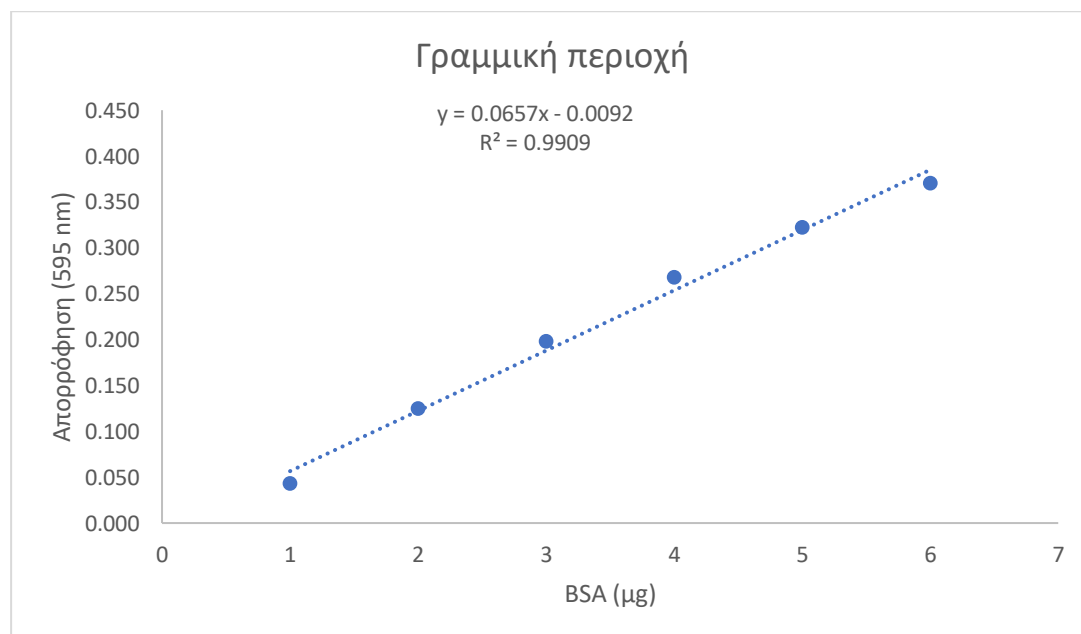
Παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις τιμές των απορροφήσεων των τριπλών δειγμάτων της κάθε συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

Η πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε φαίνεται στην παρακάτω **εικόνα**:



**Εικόνα:** Πρότυπη καμπύλη BSA

Από την παραπάνω πρότυπη καμπύλη δημιουργήθηκε **διάγραμμα** με την γραμμική περιοχή, από το οποίο με βάση την εξίσωση ευθείας που προέκυψε υπολογίστηκε η συνολική πρωτεΐνη κάθε δείγματος.



**Διάγραμμα:** Γραμμική περιοχή της πρότυπης καμπύλης BSA

Υπολογίστηκε η ολική πρωτεΐνη σε κάθε δείγμα κυτταρικού εκχυλίσματος όπως φαίνεται στον παρακάτω **πίνακα**. Κάθε δείγμα αραιώθηκε 1:1 με PBS.

Δείγμα	Απορρόφηση 1	Απορρόφηση 2	Μέσος Όρος	Πρωτεΐνη ( $\mu\text{g}$ )	Συγκέντρωση πρωτεΐνης ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Control	0,167	0,158	0,163	5,24	0,524
Control	0,147	0,143	0,145	4,7	0,470
LPS <sub>1</sub> E. coli 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,148	0,162	0,155	4,99	0,499
LPS <sub>1</sub> E. coli 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,201	0,190	0,196	6,24	0,624
LPS <sub>2</sub> E. coli 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,174	0,158	0,166	5,33	0,533
LPS <sub>2</sub> E. coli 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,177	0,186	0,182	5,82	0,582
LPS Salmonella 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,169	0,173	0,171	5,48	0,548
LPS Salmonella 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,168	0,159	0,164	5,28	0,528
LPS <sub>1</sub> E. coli 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,166	0,171	0,169	5,42	0,542
LPS <sub>1</sub> E. coli 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,145	0,135	0,140	4,54	0,454
LPS <sub>2</sub> E. coli 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,159	0,147	0,153	4,94	0,494
LPS <sub>2</sub> E. coli 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,136	0,138	0,137	4,46	0,446
LPS Salmonella 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,155	0,147	0,151	4,88	0,488
LPS Salmonella 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,182	0,173	0,178	5,7	0,570

**Πίνακας:** Απορροφήσεις και συγκέντρωση πρωτεΐνης των δειγμάτων

## **Σχόλια-Παρατηρήσεις**

Για την προετοιμασία των δειγμάτων πριν την ανοσοαποτύπωση ήταν απαραίτητος ο υπολογισμός της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα. Από την σύγκριση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο Control σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα που επωάστηκαν με τους αντίστοιχους LPS σε διάφορες συγκεντρώσεις, διαπιστώθηκε ότι οι LPS ανεξαρτήτως συγκεντρώσεων δεν επιδρούν στην έκφραση των πρωτεϊνών, αναφορικά με την ποσότητα ολικής πρωτεΐνης που βρίσκεται μέσα στο κύτταρο.

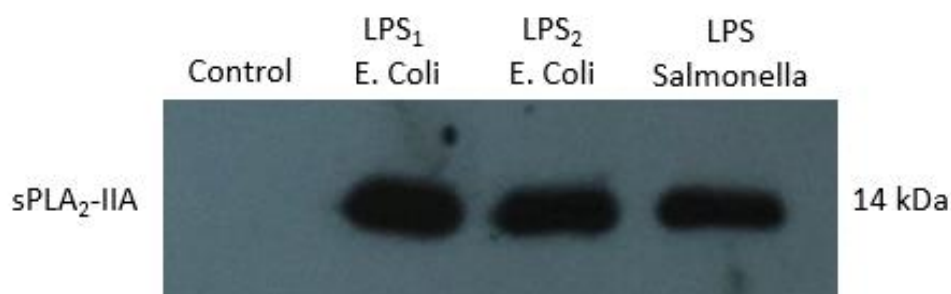
### **6.3 Επίδραση LPS σε κύτταρα A549**

Πραγματοποιήθηκε επίδραση με 3 διαφορετικούς LPS σε κύτταρα A549 με σκοπό την ανίχνευση με ανοσοαποτύπωση της πρωτεΐνης sPLA<sub>2</sub>-IIA. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν ήταν οι εξής : Control, LPS<sub>1</sub> Escherichia Coli, LPS<sub>2</sub> Escherichia Coli με διαφορετικό ορότυπο και LPS Salmonella. Η επίδραση με τους LPS διήρκησε 24h και η συγκέντρωση του κάθε LPS ήταν 1 µg/mL.

Επίσης έγινε και επίδραση με 2 διαφορετικούς LPS στα κύτταρα με σκοπό την απομόνωση RNA και την μελέτη έκφρασης του γονιδίου PLA2G2A. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν ήταν οι εξής: Control , LPS<sub>1</sub> Escherichia Coli και LPS Salmonella. Η επίδραση με τους LPS διήρκησε 24h και η συγκέντρωση του κάθε LPS ήταν 25 µg/mL.

#### **6.3.1 Ανοσοανίχνευση της sPLA<sub>2</sub>-IIA στα κύτταρα A549**

Πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> τύπου IIA στα A549 κύτταρα με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης αφού πρώτα προηγήθηκε η μέθοδος της ανοσοκαταβύθισης για την καταβύθιση του συγκεκριμένου ενζύμου.



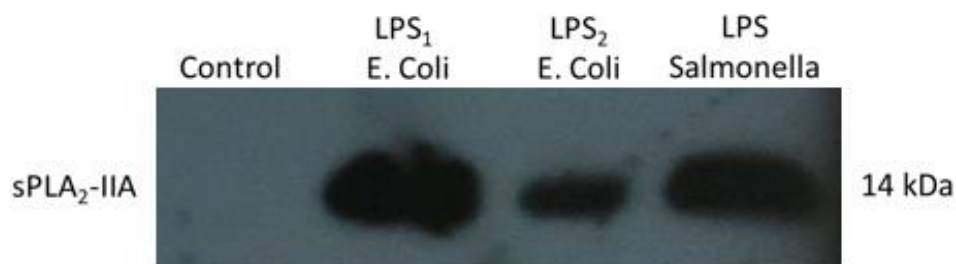
**Εικόνα:** Έκφραση της sPLA<sub>2</sub>-IIA σε κύτταρα A549 έπειτα από επίδραση με LPS διαφορετικής βακτηριακής προέλευσης.

### Σχόλια- Παρατηρήσεις

Παρατηρήθηκε έκφραση της sPLA<sub>2</sub>-IIA μόνο στα δείγματα των κυττάρων που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS οποιασδήποτε βακτηριακής προέλευσης, όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα. Υπάρχει ένδειξη ότι η sPLA<sub>2</sub>-IIA εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό έπειτα από την ενεργοποίηση των κυττάρων με τον LPS<sub>1</sub> *E. coli* και με τον LPS<sub>2</sub> *E. coli* από ότι με τον LPS Salmonella. Αυτή η ένδειξη συμβαδίζει και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα καθώς ο LPS *E. coli* διαθέτει εξακυλιωμένο λιπίδιο A, το οποίο διαθέτει την βέλτιστη δομή για την πρόσδεση στους TLR4 υποδοχείς και οδηγεί σε ισχυρή ανοσολογική απόκριση. Επίσης δεν φαίνεται κάποια σημαντική διαφορά στην έκφραση της sPLA<sub>2</sub>-IIA έπειτα από ενεργοποίηση των κυττάρων με τους LPS *E.coli*.

### 6.3.2 Ανοσοανίχνευση της sPLA<sub>2</sub>-IIA στα υπερκείμενα των κυττάρων A549

Ακολούθησε ανίχνευση της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> τύπου IIΑ στα υπερκείμενα των κυττάρων A549 με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης αφού πρώτα προηγήθηκε η μέθοδος της ανοσοκαταβύθισης για την καταβύθιση του συγκεκριμένου ενζύμου.



**Εικόνα:** Έκφραση της sPLA<sub>2</sub>-IIA σε υπερκείμενα των κυττάρων A549 έπειτα από επίδραση με LPS διαφορετικής βακτηριακής προέλευσης.

### Σχόλια-Παρατηρήσεις

Παρατηρήθηκε έκφραση της sPLA<sub>2</sub>-IIA μόνο στα δείγματα των κυττάρων που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS οποιασδήποτε βακτηριακής προέλευσης, όπως φαίνεται στην παραπάνω **εικόνα**. Επίσης υπάρχει ένδειξη ότι η sPLA<sub>2</sub>-IIA εκφράζεται στα υπερκείμενα των κυττάρων σε μεγαλύτερο βαθμό έπειτα από ενεργοποίηση των κυττάρων με τον LPS<sub>1</sub> *E. coli* από ότι με τον LPS<sub>2</sub> *E. coli* και τον LPS *Salmonella*. Επιπλέον φαίνεται ότι η sPLA<sub>2</sub>-IIA εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στα υπερκείμενα των κυττάρων έπειτα από ενεργοποίηση των κυττάρων με τον LPS *Salmonella* από ότι με τον LPS<sub>2</sub> *E. coli*.

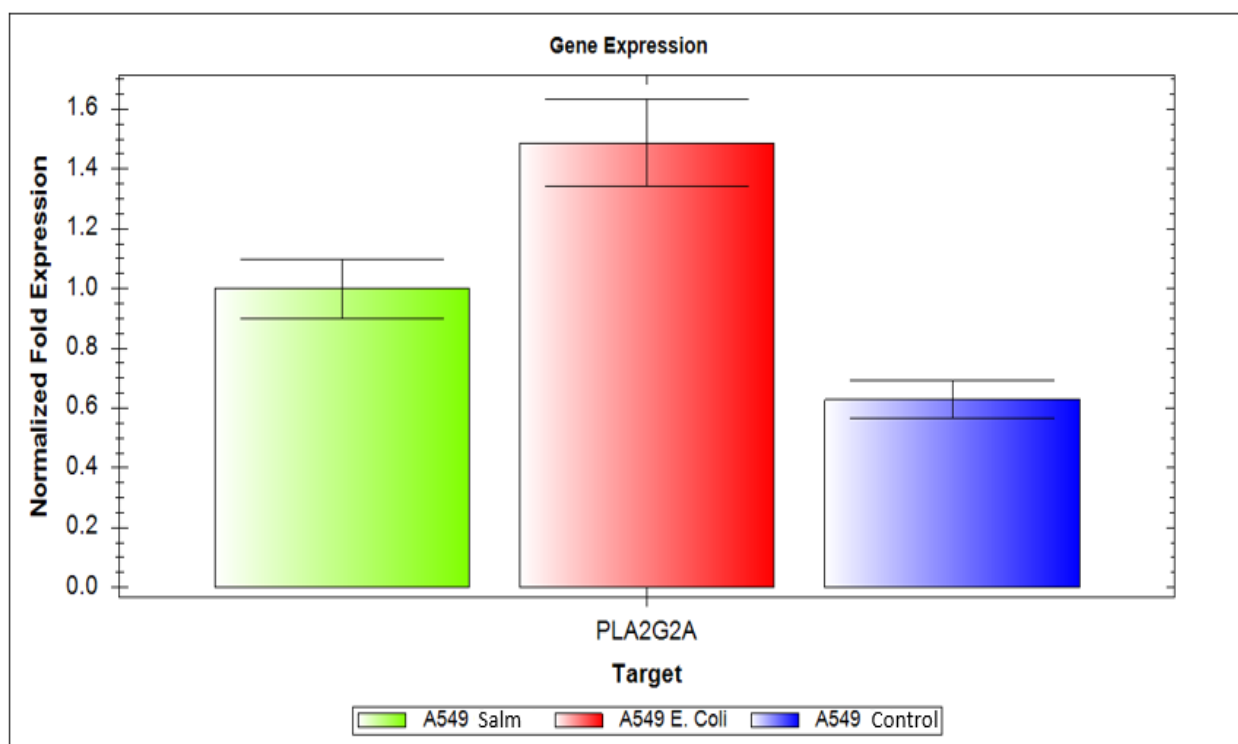
### 6.3.3 Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου PLA2G2A με qRT-PCR

Στη συνέχεια εκτελέστηκε μελέτη της έκφρασης του γονιδίου PLA2G2A σε κύτταρα A549 με τη μέθοδο qRT-PCR. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από τα κύτταρα αφού προηγήθηκε η επίδραση με 2 διαφορετικούς LPS. Ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός περιεκτικότητας και έλεγχος της καθαρότητας του RNA. Τα αποτελέσματα αυτά αποτυπώνονται στον παρακάτω **πίνακα**.

Δείγμα	Περιεκτικότητα σε RNA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Καθαρότητα απομονωμένου RNA
Control	882,4	1,56
LPS <sub>1</sub> E. Coli	746,8	1,57
LPS Salmonella	652,3	1,59

**Πίνακας:** Τιμές της περιεκτικότητας και της καθαρότητας του απομονωμένου RNA των δειγμάτων.

Έπειτα ακολούθησε η διαδικασία της qRT-PCR. Πραγματοποιήθηκαν διπλά δείγματα για κάθε δείγμα. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η GAPDH. Στο παρακάτω **σχήμα** φαίνεται η έκφραση του γονιδίου της sPLA<sub>2</sub>-IIA έπειτα από την επίδραση των LPS καθώς και στο Control. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.



**Σχήμα:** Έκφραση του γονιδίου της sPLA<sub>2</sub>-IIA σε κύτταρα A549 έπειτα από επίδραση LPS διαφορετικής βακτηριακής προέλευσης. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

## Σχόλια-Παρατηρήσεις

Με βάση τα παραπάνω πειράματα παρατηρήθηκε ότι υπάρχει 63% περισσότερη έκφραση του γονιδίου PLA2G2A έπειτα από την επίδραση με τον LPS<sub>1</sub> *E. coli* σε σχέση με το Control. Επίσης παρατηρήθηκε 40% περισσότερη έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου έπειτα από την επίδραση με τον LPS Salmonella σε σχέση με το Control. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι ο LPS<sub>1</sub> *E. coli* προκαλεί μεγαλύτερη έκφραση στο γονίδιο της sPLA<sub>2</sub>-IIA σε σχέση με τον LPS Salmonella. Το συμπέρασμα αυτό συμβαδίζει και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα καθώς ο LPS *E. Coli* διαθέτει εξακυλιωμένο λιπίδιο A, το οποίο διαθέτει την βέλτιστη δομή για την πρόσδεση στους TLR4 υποδοχείς και οδηγεί σε ισχυρή ανοσολογική απόκριση [45].



## Κεφάλαιο 7:

### Συμπεράσματα-Συζήτηση

Η παρουσία εκκρινόμενων φωσφολιπασών και ιδιαίτερα της sPLA<sub>2</sub>-IIA σε βιολογικά υγρά ασθενών με αρθρίτιδα, οξύ τραυματισμό του πνεύμονα και καρκίνο υποδεικνύει τη συμμετοχή της σε φλεγμονώδη νοσήματα. Αν και η sPLA<sub>2</sub>-IIA ήταν η πρώτη εκκρινόμενη φωσφολιπάση που ανακαλύφθηκε, ο μηχανισμός έκκρισης της από τα κύτταρα και η λειτουργία της δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως ακόμα.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης sPLA<sub>2</sub>-IIA σε κύτταρα του πνεύμονα, έπειτα από επίδραση LPS διαφορετικής βακτηριακής προέλευσης. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε παραγωγή και έκκριση της sPLA<sub>2</sub>-IIA μόνο στα A549 κύτταρα που είχαν ενεργοποιηθεί με LPS και όχι στο Control. Επίσης υπάρχει ένδειξη ότι μεταξύ του ίδιου βακτηριακού είδους LPS (*E. coli*) υπάρχει διαφορετική έκκριση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στα υπερκείμενα των κυττάρων A549 όπως φάνηκε με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Αυτό το γεγονός οφείλεται στην διαφορετική αλληλουχία σακχάρων στην περιοχή αντιγόνου-O, που υπάρχουν σε κάθε έναν βακτηριακό ορότυπο με αποτέλεσμα να υπάρχει διαφορετική ενεργοποίηση των κυττάρων. Επίσης, φαίνεται ότι η sPLA<sub>2</sub>-IIA παράγεται σε μεγαλύτερο βαθμό στα κύτταρα A549 έπειτα από την ενεργοποίηση των κυττάρων με τον LPS<sub>1</sub> *E. coli* και με τον LPS<sub>2</sub> *E. coli* από ότι με τον LPS Salmonella. Αυτή η ένδειξη συμβαδίζει και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα καθώς ο LPS *E. coli* διαθέτει εξασκυλιωμένο λιπίδιο A, το οποίο διαθέτει την βέλτιστη δομή για την πρόσδεση στους TLR4 υποδοχείς και οδηγεί σε ισχυρή ανοσολογική απόκριση.

Τέλος, σε γονιδιακό επίπεδο παρατηρήθηκε με την μέθοδο της qRT-PCR ότι με την επίδραση του LPS *E. coli* στα A549 κύτταρα αυξάνεται η έκφραση του γονιδίου PLA2G2A 63% περισσότερο σε σχέση με το Control, ενώ με την επίδραση του LPS Salmonella αυξάνεται 40% περισσότερο σε σχέση με το Control. Η παραπάνω παρατήρηση μας δείχνει ότι ο LPS *E. coli* ενεργοποιεί σε μεγαλύτερο βαθμό τα κύτταρα για την παραγωγή πληθώρας φλεγμονοδών μεσολαβητών σε σύγκριση με τον LPS Salmonella κάτι που είναι συμβατό και με την βιβλιογραφία καθώς αναφέρεται ότι ο LPS *E. coli* είναι ο πιο ισχυρός ενεργοποιητής του συγκεκριμένου βιοσηματοδοτικού μονοπατιού.

Από τα παραπάνω πειράματα και από την βιβλιογραφία συμπεραίνουμε ότι αν και το λιπίδιο A είναι το πιο ενεργό συστατικό του LPS, η περιοχή αντιγόνου-O συμμετέχει στην ανοσολογική απόκριση. Η λοιμογόνος δράση με τη μεσολάβηση LPS βρίσκεται τόσο στην ενδοτοξική δράση του λιπιδίου A όσο και στην ικανότητα της περιοχής αντιγόνου-O να παρέχει στο βακτήριο αντίσταση στους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Επομένως, χαρακτηριστικά του λιπιδίου A όπως η κατάσταση ακυλίωσης και φωσφορυλίωσης του και της περιοχής αντιγόνου-O όπως η ποικιλία των σακχάρων που διαθέτει μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στόχοι για την ανάπτυξη νέων παραγόντων ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος [56,57].

## **Κεφάλαιο 8:**

### **Βιβλιογραφία**

- 1) Creuwels LA, van Golde LM, Haagsman HP. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung*. 1997;175(1):1-39. doi: 10.1007/pl00007554. PMID: 8959671; PMCID: PMC8319874.
- 2) Hayek H, Kosmider B, Bahmed K. The role of miRNAs in alveolar epithelial cells in emphysema. *Biomed Pharmacother*. 2021 Nov;143:112216. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112216. Epub 2021 Sep 27. PMID: 34649347; PMCID: PMC9275516.
- 3) Nova Z, Skovierova H, Calkovska A. Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 15;20(4):831. doi: 10.3390/ijms20040831. PMID: 30769918; PMCID: PMC6412348.
- 4) Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, Amselem S, Clement A. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Nov;45(11):2568-73. doi: 10.1016/j.biocel.2013.08.009. Epub 2013 Aug 27. PMID: 23988571.
- 5) Chakraborty M., Kotecha S., Pulmonary surfactant in newborn infants and children, *breathe*, 2013, 9 (6), 476-488
- 6) Hidalgo A, Cruz A, Pérez-Gil J. Barrier or carrier? Pulmonary surfactant and drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015 Sep;95(Pt A):117-27. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.02.014. Epub 2015 Feb 20. PMID: 25709061.
- 7) Patterson CE., Davis KS, Rhoades RA., Regulation of fetal lung desaturated phosphatidylcholine synthesis by de novo palmitate supply, *Biochim Biophys Acta – Lipids and Lipid Metabolism*, 1988, 108, 375-393
- 8) Lopez-Rodriguez E, Pérez-Gil J. Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: from biophysics to therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1838(6):1568-85. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.01.028. Epub 2014 Feb 11. PMID: 24525076.

- 9) Veldhuizen EJ, Haagsman HP. Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Aug 25;1467(2):255-70. doi: 10.1016/s0005-2736(00)00256-x. PMID: 11030586.
- 10) Han S, Mallampalli RK. The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Ann Am Thorac Soc*. 2015 May;12(5):765-74. doi: 10.1513/AnnalsATS.201411-507FR. PMID: 25742123; PMCID: PMC4418337.
- 11) Kolomaznik M, Nova Z, Calkovska A. Pulmonary surfactant and bacterial lipopolysaccharide: the interaction and its functional consequences. *Physiol Res*. 2017 Sep 22;66(Suppl 2):S147-S157. doi: 10.33549/physiolres.933672. PMID: 28937231.
- 12) Filkin S., Lipkin A. V., Fedorov A. N., Phospholipase Superfamily: Structure, Functions and Biotechnological Applications, *Usp Biol Khim*, 2020, 85, 177-195
- 13) Papadopoulos S, Kazepidou E, Antonelou MH, Leondaritis G, Tsapinou A, Koulouras VP, Avgeropoulos A, Nakos G, Lekka ME. Secretory Phospholipase A2-IIA Protein and mRNA Pools in Extracellular Vesicles of Bronchoalveolar Lavage Fluid from Patients with Early Acute Respiratory Distress Syndrome: A New Perception in the Dissemination of Inflammation? *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020 Nov 23;13(11):415. doi: 10.3390/ph13110415. PMID: 33238426; PMCID: PMC7700412.
- 14) Kitsioulis E, Tenopoulou M, Papadopoulos S, Lekka ME. Phospholipases A2 as biomarkers in acute respiratory distress syndrome. *Biomed J*. 2021 Dec;44(6):663-670. doi: 10.1016/j.bj.2021.08.005. Epub 2021 Aug 31. PMID: 34478892; PMCID: PMC8847824.
- 15) Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl (Suppl): S237-42. doi: 10.1194/jlr.R800033-JLR200. Epub 2008 Nov 14. PMID: 19011112; PMCID: PMC2674709.
- 16) Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Nov;1761(11):1246-59. doi: 10.1016/j.bbalip.2006.07.011. Epub 2006 Aug 3. PMID: 16973413.
- 17) Kim RR, Chen Z, Mann TJ, Bastard K, F Scott K, Church WB. Structural and Functional Aspects of Targeting the Secreted Human Group IIA Phospholipase A2.

Molecules. 2020 Sep 28;25(19):4459. doi: 10.3390/molecules25194459. PMID: 32998383; PMCID: PMC7583969.

18) Kitsioulis E, Nakos G, Lekka ME. Phospholipase A2 subclasses in acute respiratory distress syndrome. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct;1792(10):941-53. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.06.007. Epub 2009 Jul 3. PMID: 19577642.

19) Ohto T, Uozumi N, Hirabayashi T, Shimizu T. Identification of novel cytosolic phospholipase A(2)s, murine cPLA(2){delta}, {epsilon}, and {zeta}, which form a gene cluster with cPLA(2){beta}. *J Biol Chem*. 2005 Jul 1;280(26):24576-83. doi: 10.1074/jbc.M413711200. Epub 2005 May 2. PMID: 15866882.

20) Lei X, Zhang S, Bohrer A, Ramanadham S. Calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2 beta)-mediated ceramide generation plays a key role in the cross-talk between the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria during ER stress-induced insulin-secreting cell apoptosis. *J Biol Chem*. 2008 Dec 12;283(50):34819-32. doi: 10.1074/jbc.M807409200. Epub 2008 Oct 20. PMID: 18936091; PMCID: PMC2596401.

21) Opal S, Laterre PF, Abraham E, Francois B, Wittebole X, Lowry S, Dhainaut JF, Warren B, Dugernier T, Lopez A, Sanchez M, Demeyer I, Jauregui L, Lorente JA, McGee W, Reinhart K, Kljucar S, Souza S, Pribble J; Controlled Mortality Trial of Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase in Severe Sepsis Investigators. Recombinant human platelet-activating factor acetylhydrolase for treatment of severe sepsis: results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Crit Care Med*. 2004 Feb;32(2):332-41. doi: 10.1097/01.CCM.0000108867.87890.6D. PMID: 14758145.

22) Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P, Pelletier JP. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis*. 2003 Jun;62(6):501-9. doi: 10.1136/ard.62.6.501. PMID: 12759283; PMCID: PMC1754580.

23) Dore E, Boilard E. Roles of secreted phospholipase A2 group IIA in inflammation and host defense. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019 Jun;1864(6):789-802. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.08.017. Epub 2018 Sep 13. PMID: 30905346.

- 24) van Hensbergen VP, Wu Y, van Sorge NM, Touqui L. Type IIA Secreted Phospholipase A2 in Host Defense against Bacterial Infections. *Trends Immunol.* 2020 Apr;41(4):313-326. doi: 10.1016/j.it.2020.02.003. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32151494.
- 25) Birts CN, Barton CH, Wilton DC. Catalytic and non-catalytic functions of human IIA phospholipase A2. *Trends Biochem Sci.* 2010 Jan;35(1):28-35. doi: 10.1016/j.tibs.2009.08.003. Epub 2009 Oct 8. PMID: 19818633.
- 26) Nevalainen TJ, Graham GG, Scott KF. Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jan-Feb;1781(1-2):1-9. doi: 10.1016/j.bbali.2007.12.001. Epub 2007 Dec 15. PMID: 18177747.
- 27) Chen D, Wei Y, Li X, Epstein S, Wolosin JM, Asbell P. sPLA2-IIa is an inflammatory mediator when the ocular surface is compromised. *Exp Eye Res.* 2009 May;88(5):880-8. doi: 10.1016/j.exer.2008.11.035. Epub 2008 Dec 16. PMID: 19116146; PMCID: PMC4001256.
- 28) Murakami M, Nakatani Y, Atsumi GI, Inoue K, Kudo I. Regulatory Functions of Phospholipase A2. *Crit Rev Immunol.* 2017;37(2-6):127-195. doi: 10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.20. PMID: 29773019.
- 29) Rogero MM, Calder PC. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients.* 2018 Mar 30;10(4):432. doi: 10.3390/nu10040432. PMID: 29601492; PMCID: PMC5946217.
- 30) Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2017 Dec 14;9(6):7204-7218. doi: 10.18632/oncotarget.23208. PMID: 29467962; PMCID: PMC5805548.
- 31) Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):771-6. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.006. PMID: 20303867.
- 32) Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):428-35. doi: 10.1038/nature07201. PMID: 18650913.

- 33) Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7. doi: 10.1038/nature01322. PMID: 12490959; PMCID: PMC2803035.
- 34) Korniluk A, Koper O, Kemon H, Dymicka-Piekarska V. From inflammation to cancer. *Ir J Med Sci*. 2017 Feb;186(1):57-62. doi: 10.1007/s11845-016-1464-0. Epub 2016 May 7. PMID: 27156054; PMCID: PMC5323483.
- 35) Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7. doi: 10.1038/nature01322. PMID: 12490959; PMCID: PMC2803035.
- 36) Padoan A, Plebani M, Basso D. Inflammation and Pancreatic Cancer: Focus on Metabolism, Cytokines, and Immunity. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 5;20(3):676. doi: 10.3390/ijms20030676. PMID: 30764482; PMCID: PMC6387440.
- 37) Tsangaris I, Lekka ME, Kitsioulis E, Constantopoulos S, Nakos G. Bronchoalveolar lavage alterations during prolonged ventilation of patients without acute lung injury. *Eur Respir J*. 2003 Mar;21(3):495-501. doi: 10.1183/09031936.03.00037902. PMID: 12662008.
- 38) Nakos G, Kitsioulis EI, Tsangaris I, Lekka ME. Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early intermediate and late phases of ARDS. Alterations in leukocytes, proteins, PAF and surfactant components. *Intensive Care Med*. 1998 Apr;24(4):296-303. doi: 10.1007/s001340050571. PMID: 9609406.
- 39) Touqui L, Arbibe L. A role for phospholipase A2 in ARDS pathogenesis. *Mol Med Today*. 1999 Jun;5(6):244-9. doi: 10.1016/s1357-4310(99)01470-7. PMID: 10366819.

- 40) Croce MA, Fabian TC, Davis KA, Gavin TJ. Early and late acute respiratory distress syndrome: two distinct clinical entities. *J Trauma*. 1999 Mar;46(3):361-6; discussion 366-8. doi: 10.1097/00005373-199903000-00001. PMID: 10088834.
- 41) Vincent JL, Sakr Y, Groeneveld J, Zandstra DF, Hoste E, Malledant Y, Lei K, Sprung CL. ARDS of early or late onset: does it make a difference? *Chest*. 2010 Jan;137(1):81-7. doi: 10.1378/chest.09-0714. Epub 2009 Oct 9. PMID: 19820081.
- 42) Swenson KE, Swenson ER. Pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19 Lung Injury. *Crit Care Clin*. 2021 Oct;37(4):749-776. doi: 10.1016/j.ccc.2021.05.003. Epub 2021 May 28. PMID: 34548132; PMCID: PMC8162817.
- 43) Calfee CS, Janz DR, Bernard GR, May AK, Kangelaris KN, Matthay MA, Ware LB. Distinct molecular phenotypes of direct vs indirect ARDS in single-center and multicenter studies. *Chest*. 2015 Jun;147(6):1539-1548. doi: 10.1378/chest.14-2454. PMID: 26033126; PMCID: PMC4451708.
- 44) Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, Arabi YM, Beitler JR, Mercat A, Herridge M, Randolph AG, Calfee CS. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Mar 14;5(1):18. doi: 10.1038/s41572-019-0069-0. PMID: 30872586; PMCID: PMC6709677.
- 45) Steimle A, Autenrieth IB, Frick JS. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2016 Aug;306(5):290-301. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.03.001. Epub 2016 Mar 5. PMID: 27009633.



- 46) Maeshima N, Fernandez RC. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013 Feb 12;3:3. doi: 10.3389/fcimb.2013.00003. PMID: 23408095; PMCID: PMC3569842.
- 47) Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med.* 2013 Dec 6;45(12):e66. doi: 10.1038/emm.2013.97. PMID: 24310172; PMCID: PMC3880462.
- 48) Caroff M. , Novikov A. , Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identifications, *OCL* , 2020 , 27 , 10 pages
- 49) Płóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2015 Feb;72(3):557-581. doi: 10.1007/s00018-014-1762-5. Epub 2014 Oct 22. PMID: 25332099; PMCID: PMC4293489.
- 50) Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol.* 2014 Jul 10;5:316. doi: 10.3389/fimmu.2014.00316. PMID: 25071777; PMCID: PMC4090903.
- 51) Płóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2015 Feb;72(3):557-581. doi: 10.1007/s00018-014-1762-5. Epub 2014 Oct 22. PMID: 25332099; PMCID: PMC4293489
- 52) Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2021 Feb;78(4):1233-1261. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33057840; PMCID: PMC7904555.

- 53) Maeshima N, Fernandez RC. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013 Feb 12;3:3. doi: 10.3389/fcimb.2013.00003. PMID: 23408095; PMCID: PMC3569842.
- 54) Mohan S, Gupta D. Crosstalk of toll-like receptors signaling and Nrf2 pathway for regulation of inflammation. *Biomed Pharmacother.* 2018 Dec;108:1866-1878. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.019. Epub 2018 Oct 23. PMID: 30372892.
- 55) Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2016 May;8(3):227-41. doi: 10.1002/wsbm.1331. Epub 2016 Mar 16. PMID: 26990581; PMCID: PMC8363188
- 56) Lin TL, Shu CC, Chen YM, Lu JJ, Wu TS, Lai WF, Tzeng CM, Lai HC, Lu CC. Like Cures Like: Pharmacological Activity of Anti-Inflammatory Lipopolysaccharides From Gut Microbiome. *Front Pharmacol.* 2020 Apr 30;11:554. doi: 10.3389/fphar.2020.00554. PMID: 32425790; PMCID: PMC7212368.
- 57) Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiol Rev.* 2016 Jul;40(4):480-93. doi: 10.1093/femsre/fuw007. Epub 2016 Apr 12. PMID: 27075488; PMCID: PMC4931227.

