



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση

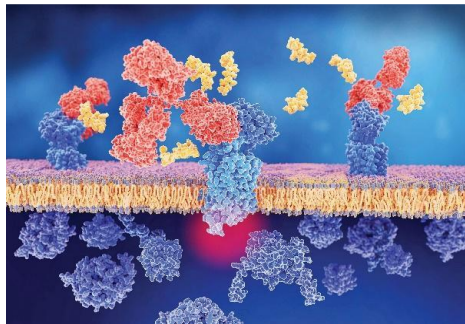


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Χαρακτηρισμός πρόσδεσης μονοκλωνικών αντισωμάτων
σε τομές εγκεφάλου επίμυος**

POST GRADUATE THESIS

**Characterization of monoclonal antibody binding to mouse brain sec-
tions**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

ΑΝΔΡΕΑΣ – ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΤΣΕΝΟΣ

ANDREAS – ALEXANDROS TSELOS

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΒΟΓΙΑΤΖΑΚΗ

CHRYSANTHI VOGIATZAKI

ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ 2023



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

Characterization of monoclonal antibody binding to mouse brain sections

ANDREAS – ALEXANDROS TSENOS

19015

alextsenos@hotmail.com

FIRST SUPERVISOR

CHRYSANTHI VOGIATZAKI

SECOND SUPERVISOR

PARASKEVI ZISIMOPOULOU

AIGALEO 2023

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 2/10/2023

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1 ^{ος} Εξεταστής	Χρυσάνθη Βογιατζάκη	
2 ^{ος} Εξεταστής	Πέτρος Καρκαλούσος	


Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Ανδρέας – Αλέξανδρος Τσένος του Ρόμπερτ, με αριθμό μητρώου 19015 φοιτητής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών

ΑΝΔΡΕΑΣ – ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΤΣΕΝΟΣ



Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στην κυρία Βογιατζάκη που με επέλεξε για τη μεταπτυχιακή διατριβή μου. Η εμπιστοσύνη της στις ικανότητές μου και η καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια αυτού του ερευνητικού ταξιδιού ήταν ανεκτίμητες. Η εμπειρία, η καθοδήγηση και η αμείωτη υποστήριξή της έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό αυτής της εργασίας και στην εξέλιξή μου ως επιστήμονας.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στην κυρία Ζησιμοπούλου για τη γενναιόδωρη πρόσβαση στο εργαστήριό της και στον εξοπλισμό, επιτρέποντάς να πραγματοποιήσω τα απαραίτητα πειράματα για αυτήν τη διατριβή. Η βοήθειά της, η τεχνική της, η εμπειρογνωμοσύνη και η προθυμία της να μοιραστεί τις γνώσεις της ήταν καθοριστικές για την επιτυχή υλοποίηση αυτής της έρευνας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους αφοσιωμένους εργαζομένους του εργαστηρίου που έχουν συμβάλει στο συνεργατικό περιβάλλον και παρείχαν πολύτιμες γνώσεις και βοήθεια καθ' όλη τη διάρκεια του έργου. Η επαγγελματική τους στάση, η ειδικεισή τους και η προθυμία τους να βοηθήσουν έχουν πλουτίσει σημαντικά την εμπειρία μου και έχουν διαμορφώσει τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας.

Είμαι πραγματικά ευγνώμον για την ευκαιρία να εργαστώ δίπλα σε ερευνητες σε αυτήν την ερευνητική προσπάθεια.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την θερμή μου εκτίμηση στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, και σε όλους όσους συνέβαλαν στην υλοποίηση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής. Η υποστήριξή τους και η επένδυσή τους στην επιστημονική έρευνα ήταν άξιες για την επίτευξη αυτού του έργου.

Για μία ακόμη φορά, εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες στην κυρία Βογιατζάκη, την κυρία Ζησιμοπούλου και σε όλα τα άτομα που συνέβαλαν στο σχηματισμό αυτής της διατριβής και στην επιστημονική μου εξέλιξη. Είμαι τιμημένος που ήμουν μέρος αυτής της συνεργατικής προσπάθειας και είμαι ευγνώμον για τις γνώσεις και τις εμπειρίες που αποκόμισα κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας.

Αφιερώσεις

Αφιερώνω αυτή την εργασία στο ευρύ πεδίο της επιστήμης, σε εκείνο το ατελείωτο πεδίο που προσκαλεί την περιέργεια. Είναι σε αυτήν την υψηλή προσπάθεια, αυτήν την αναζήτηση γνώσης και κατανόησης, που αφιερώνω με όλη μου την καρδιά τα αποτελέσματα της προσπάθειάς μου.

Κάθε υπόθεση που διατυπώθηκε, κάθε πείραμα που πραγματοποιήθηκε, κάθε δεδομένο που αναλύθηκε, αποτελεί μια απόδειξη της κοινής προσπάθειας γενεών επιστημόνων που μας προηγήθηκαν. Οι ακατάπαυστες προσπάθειές τους έχουν διαμορφώσει το μονοπάτι που ακολουθούμε τώρα, και είναι στην τιμή τους που πραγματοποιείται αυτή η εργασία.

Ας συνεισφέρει αυτή η διατριβή όχι μόνο στον αυξανόμενο κορμό της γνώσης μας, αλλά να εμπνεύσει και τους μελλοντικούς ερευνητές να συνεχίσουν αυτήν την ευγενή αναζήτηση. Προσφέρω αυτήν την εργασία ως μια ταπεινή συνεισφορά στη μεγαλοπρεπή ταπισερί της επιστημονικής προσπάθειας.

Στην επιστήμη, με όλες τις προκλήσεις και τις ανταμοιβές, τα μυστήρια και τις ανακαλύψεις, αφιερώνω αυτήν την εργασία. Μακάρι να μην χάσουμε ποτέ το αίσθημα της θαυμασμού και της διάθεσης να εξερευνήσουμε, να κατανοήσουμε και να αναπτυχθούμε. Είναι μέσα σε αυτό το ταξίδι της ανακάλυψης που βρίσκουμε όχι μόνο απαντήσεις, αλλά και τον εαυτό μας.

Περίληψη

Εισαγωγή: Οι νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης ανήκουν στην οικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη και μεσολαβούν στη χολινεργική νευρομετάδοση. Επιπλέον, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μάθηση, στη μνήμη, στην προσοχή και στον κινητικό έλεγχο. Ωστόσο, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας $\alpha_4\beta_2$ νικοτινικού υποδοχέα εμπλέκεται σε νευροπαθήσεις Myasthenia Gravis, Alzheimer, Parkinson, επιληψία και στην εξάρτηση από τη νικοτίνη. Τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του $\alpha_4\beta_2$ είναι πολύτιμα εργαλεία στην έρευνα του χολινεργικού συστήματος. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο χαρακτηρισμός της πρόσδεσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6) έναντι του $\alpha_4\beta_2$ νικοτινικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης σε ιστούς εγκεφάλου επίμυος για τη διερεύνηση των ιδιοτήτων τους.

Σκοπός: Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός της πρόσδεσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων NR1, NR2, NR3, NR4, NR5 και NR6 τα οποία αναγνωρίζουν την εξωκυτταρική περιοχή υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα $\alpha_4\beta_2$ της ακετυλοχολίνης, σε ιστούς εγκεφάλου επίμυος.

Μέθοδος: Καλλιέργεια των υβριδωμάτων σε θρεπτικά υλικά για την ανάκτηση των μονοκλωνικών αντισωμάτων που εκκρίνουν. Εφαρμογή της δοκιμασίας ELISA και Western blot, για τον έλεγχο της πρόσδεσης και ειδικότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6) στις υπομονάδες $\alpha_4\beta_2$ του νικοτινικού υποδοχέα. Σε κύτταρα HEK293 (ζωντανά και μονιμοποιημένα), διαμολυσμένα HEK293 (ζωντανά) και Sy5y (ζωντανά και μονιμοποιημένα) αναλύθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6) με ανεστραμμένο μικροσκόπιο. Με τη δοκιμασία έμμεσου ανοσοφθορισμού τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6) χαρακτηρίστηκαν σε τομές εγκεφάλου επίμυος με ανεστραμμένο μικροσκόπιο και με συνεστιακή μικροσκοπία.

Αποτελέσματα: Τα πέντε από τα έξι μονοκλωνικά αντισώματα έδειξαν ότι προσδένονται είτε με την α_4 είτε με τη β_2 μέσω της μεθόδου Western blot. Επιπρόσθετα, το mAbNR1 έδειξε ότι προσδέθηκε με την εξωκυτταρική περιοχή της υπομονάδας α_5 σε ELISA, με SY5Y κύτταρα και με νευρώνες του εγκεφάλου επίμυος. Αντίστοιχα, Το mAbNR2 έδειξε

πρόσδεση με την εξωκυτταρική περιοχή της β_2 σε ELISA, με SY5Y και σε νευρώνες του εγκεφάλου επίμυος και το mAbNR3 έδειξε σύνδεση με SY5Y. Ωστόσο, το mAbNR6 δεν έδειξε κάποιο αποτέλεσμα.

Συμπεράσματα: Με βάση των πειραματικών δεδομένων δείχνουν ότι το mAbNR1 και mAbNR2 εντοπίζουν τον $\alpha_4\beta_2$ νικοτινικό υποδοχέα στους ιστούς εγκεφάλου επίμυος. Επομένως, για την επιβεβαίωση των πειραμάτων με το mAbNR2 συνιστάται επανέλεγχος μετά από καθαρισμό του με τη μέθοδο ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών. Το mAbNR1 πιθανόν παρουσίασε σε μικρό βαθμό διασταυρούμενη πρόσδεση με α_3 υπομονάδα, που χρήζει περαιτέρω έρευνας σε Western blot. Τα υπόλοιπα mAbs δεν εντόπισαν τον $\alpha_4\beta_2$ υποδοχέα στους ιστούς εγκεφάλου επίμυος συνιστάται επανακαλλιέργεια των υβριδωμάτων με καλλιεργητικό μέσο Hybridoma.

Λέξεις κλειδιά: Western blot, κυτταροκαλλιέργεια, ELISA, ανοσοφθορισμός, mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5, mAbNR6, $\alpha_4\beta_2$

Abstract

Introduction: Nicotinic acetylcholine receptors belong to the family of transmembrane proteins that interact with the neurotransmitter acetylcholine and mediate cholinergic neurotransmission. In addition, they play an important role in learning, memory, attention, and motor control. However, several studies have shown that the nicotinic receptor $\alpha_4\beta_2$ receptor is involved in neuropathies such as Myasthenia Gravis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, epilepsy and nicotine dependence. Monoclonal antibodies against $\alpha_4\beta_2$ are valuable tools in cholinergic system research. The present study aimed to characterize the binding of monoclonal antibodies (mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5, and mAbNR6) against the $\alpha_4\beta_2$ nicotinic acetylcholine receptor in mouse brain tissues to investigate their properties.

Purpose: This thesis aims to characterize the binding of monoclonal antibodies NR1, NR2, NR3, NR4, NR5, and NR6, which recognize the extracellular domain of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha_4\beta_2$ subunits, in tissues of the mouse brain.

Method: The hybrid cells were cultured in a medium to extract the monoclonal antibodies secreted by them. The binding and specificity of the monoclonal antibodies (mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5, and mAbNR6) to the $\alpha_4\beta_2$ subunits of the nicotinic receptor were tested by ELISA and Western blot assays. The monoclonal antibodies were further analyzed in both live and fixed HEK293 cells as well as in transfected live HEK293 and Sy5y cells used by inverted microscopy. Lastly, the binding specificity of monoclonal antibodies onto the surface of neurons in the mouse brain tissues was deduced by indirect immunofluorescence binding assay under the inverted and confocal fluorescence microscope.

Results: Five of the six monoclonal antibodies were shown to bind to either α_4 or β_2 in Western blot. In addition, mAbNR1 was shown in ELISA that binds to the extracellular region of the α_5 subunit, SY5Y cells, and mouse brain neurons. Similarly, in ELISA mAbNR2 showed binding with the extracellular region of β_2 , with SY5Y, and with mouse brain neurons and mAbNR3 showed binding with SY5Y. However, mAbNR6 showed no effect.

Discussion: Based on experimental data show that mAbNR1 and mAbNR2 localize the $\alpha_4\beta_2$ nicotinic receptor in mouse brain tissues. Therefore, to confirm the experiments with mAbNR2 it is recommended to re-test after purification with fast protein liquid

chromatography. The mAbNR1 probably exhibited a small degree of cross-linking with the α_3 subunit, which needs further investigation with Western blot. The other mAbs did not localize the $\alpha_4\beta_2$ receptor in mouse brain tissues; re-cultivation of the hybrids with Hybridoma culture medium is recommended.

Key words: Western blot, cell culture, ELISA, mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 and mAbNR6 $\alpha_4\beta_2$

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	iv
Ευχαριστίες	v
Αφιερώσεις	vi
Περίληψη	vii
Abstract	ix
Συνοτομογραφίες	xiii
Πρόλογος.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο: ΝΙΚΟΤΙΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ	2
1.1 Γενικά Στοιχεία.....	2
1.2 Γενικά Χαρακτηριστικά Των nAChR Μυϊκού Τύπου	5
1.3 Γενικά Χαρακτηριστικά Των nAChR Νευρωνικού Τύπου	6
1.4 Η Νευρομυϊκή Σύναψη.....	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο: ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΜΕ ΤΟΥΣ ΝΙΚΟΤΙΝΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ	10
2.1 Myasthenia Gravis	10
2.2 Επιληψία	13
2.3 Νόσος Alzheimer	15
2.4 Νόσος Parkinson	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
4.1 Σκοπός	22
4.2 Συσκευές Και Υλικά.....	22
4.3 Πειραματική Μεθοδολογία	26
4.3.1 Καλλιέργεια Υβριδωμάτων (hybridoma cell culture)	26
4.3.2 Κρυοσυντήρηση Υβριδωμάτων (Ψύξη)	27
4.3.3 Ανοσοενζυμική Μέθοδος (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)	28
4.3.4 Συμπύκνωση Μονοκλωνικών Αντισωμάτων Με Κατακρήμιση Σε Θεϊκό Αμμώνιο	29
4.3.5 Συμπύκνωση Μονοκλωνικών Αντισωμάτων Με Φίλτρο Φυγοκέντρησης	29
4.3.6 Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών Με Φασματοφωτομέτρηση	29
4.3.7 Δοκιμασία έμμεσου Ανοσοφθορισμού Σε Κύτταρα (Cell Based Assay, CBA)	30
4.3.8 Απομόνωση Ανασυνδυασμένων Πρωτεϊνών σε Διαμολυσμένα Ανθρώπινα Εμβρυικά Νεφρικά Κύτταρα (HEK293)	31

4.3.9 Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών Με Φασματοφωτομέτρηση – Μέθοδος Bradford	32
4.3.10 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών Σε Γέλη Πολυακρυλαμιδίου Παρουσία Θεϊικού Δωδεκυλικού Νατρίου (SDS-PAGE)	33
4.3.11 Ανοσοαποτύπωση Πρωτεϊνών (Immunoblotting)	35
4.3.12 Δοκιμασία Έμμεσου Ανοσοφθορισμού Σε Ιστό (Indirect Immunofluorescence)	36
4.4 Αποτελέσματα	38
4.4.1 Χαρακτηρισμός Πρόσδεσης Μονοκλωνικών Αντισωμάτων Έναντι Της ΕΚΠ Του Συγκαταμερές β_2 - α_4 Σε Τομές Εγκεφάλου Επίμυος	38
4.4.2 Αποτελέσματα Χαρακτηρισμού Πρόσδεσης Των mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 Σε Ιστούς Εγκεφάλου Επίμυος	52
4.4.3 Αποτελέσματα Σε Συνοπτική Μορφή	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο : ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65
ΠΗΓΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	71

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
ACh	Acetylcholine	Ακετυλοχολίνη
ChAT	Choline Acetyltransferase	Ακετυλοτρανσφεράση Χολίνης
AChE	Acetylcholinesterase	Ακετυλοχολινεστεράση
nAChR	Nicotinic Acetylcholine Receptors	Νικοτινικοί Υποδοχείς Ακετυλοχολίνης
α-Bgtx	α-Bungarotoxin	α- Μπουγκαροτοξίνη
Ca	Calcium	Ασβέστιο
MG	Myasthenia Gravis	Μυασθένεια Gravis
AChR	Acetylcholine Receptor	Υποδοχείς ακετυλοχολίνης
MuSK	Muscle-Specific Kinase	Ειδική Μυϊκή Κινάση
EOM	Eye Muscle Involvement	Εμπλοκή Των Οφθαλμικών Μυών
oMG	ocular Myasthenia Gravis	οφθαλμική Μυασθένεια Gravis
ADNFLE	Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy	Αυτοσωμική Επικρατούσα Νυχτερινή Επιληψία Μετωπιαίου Λοβού
AD	Alzheimer Disease	Νόσος Αλτσχάιμερ
mAChRs	Muscarinic Acetylcholine Receptors	Μουσκαρινικοί Υποδοχείς Ακετυλοχολίνης
LGICs	Ligand-Gated Ion Channels	Πενταμερών Ιοντικών Καναλιών
IgH	Immunoglobulin Heavy Chain	Βαριά Αλυσίδα Ανοσοσφαιρινών
IgL	Immunoglobulin Light Chain	Ελαφριά Αλυσίδα Ανοσοσφαιρινών
V_L	Variant Light Chain domain	Μεταβλητή Επικράτεια Της Ελαφριάς Αλυσίδας
V_H	Variant Heavy Chain domain	Μεταβλητή Επικράτεια Της Βαριάς Αλυσίδας
C_H	Constant Heavy Chain	Σταθερή Επικράτεια Της Βαριάς Αλυσίδας
C_L	Constant Light Chain	Σταθερή Επικράτεια Της Ελαφριάς Αλυσίδας
Fc	Fragment Crystallizable	Κρυσταλλώσιμο Θραύσμα
Fab	Fragment Antigen Binding	Θραύσματα Πρόσδεσης Αντιγόνου

CDR	Complementarity-Determining Regions	Περιοχές Καθορισμού Συμπληρωματικότητας
RSSs	Recombination Signal Sequences	Αλληλουχίες Σηματοδότησης Ανασυνδυασμού
HVLs	Hypervariable Loops	Υπερμεταβλητές Περιοχές
J	Joining	Σύνδεση
DSB	Double-Strand break	Θραύσμα Διπλής-Έλικας
RAG	Recombination Activating Gene	Γονίδιο Ενεργοποίησης Του Ανασυνδυασμού
HMGB	High Mobility Group Box	Πρωτεΐνες Υψηλής Κινητικότητας Της Ομάδας Β
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	Καταλυτικές Υπομονάδες Εξαρτώμενες από DNA-Πρωτεϊνικής Κινάσης
NHEJ	Non-Homologous End Joining	Μη-Ομόλογης Τελικής Σύνδεσης
bp	Base Pair	Ζεύγη Βάσεων
HAT	Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine	Υποξανθίνη-Αμινοπτερίνη-Θυμιδίνη
HGPRT	Human Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase	Υποξανθίνη – Γουανίνη Φωσφοριβοζυλοτρανσφεράση
CD	Cluster Of Differentiation	Δείκτες Συμπλεγμάτων Διαφοροποίησης
CDC	Complement-Dependent cytotoxicity	Κυτταροτοξικότητα Εξαρτώμενης Από Το Συμπλήρωμα
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity	Εξαρτώμενης Από Αντισώματα Κυτταρικής Κυτταροτοξικότητας
ADCP	Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis	Κυτταρική Φαγοκυττάρωση Εξαρτώμενης Από Αντισώματα
NKs	Natural killers	Φυσικά Κύτταρα Φονείς
MAC	Membrane Attack Complex	Σύμπλεγμα Προσβολής της Μεμβράνης

Πρόλογος

Οι νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChRs) ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των πενταμερών ιοντικών καναλιών (LGICs). Οι nAChRs αποτελούνται από πέντε μεμονωμένες πρωτεϊνικές υπομονάδες και κάθε υπομονάδα διαθέτει μία αμινο-τελική εξωκυτταρική περιοχή (ΕΚΠ), στην οποία βρίσκεται η χαρακτηριστική Cys θηλιά της υπερ-οικογένειας, τέσσερις διαμεμβρανικές α -έλικες, μία μεγάλη κυτταροπλασματική περιοχή και μια μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή. Οι nAChRs είναι πρωτεϊνικά μόρια διαμεμβρανικά, δεσμεύουν την ακετυλοχολίνη ή άλλους αγωνιστές στην εξωκυτταρική τους περιοχή και μεταδίδουν αλλοστερικά το σήμα στο εσωτερικό του κυττάρου. Είναι απαραίτητοι στην ανταπόκριση του νευροδιαβιβαστή καθώς και για τη ρύθμιση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών, μεσολαβώντας στη μετάδοση σημάτων σε όλο το περιφερικό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Οι υπομονάδες διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους στην δομή και στις φυσιολογικές και φαρμακολογικές τους ιδιότητες. Γενικώς, οι nAChRs έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον, διότι έχουν συσχετιστεί με τη γνωστική λειτουργία, τη μάθηση, τη μνήμη, τη διέγερση, την ανταμοιβή και τον κινητικό έλεγχο. Επομένως, αυτοί οι υποδοχείς έχουν συνδεθεί με νευρολογικές παθήσεις όπως τη νόσο Alzheimer, τη νόσο Parkinson, τη σχιζοφρένεια, το άγχος, την κατάθλιψη και τον εθισμό στη νικοτίνη. Ωστόσο, παρά τον σημαντικό όγκο μελετών στους τομείς αυτούς, υπάρχει μικρή επιτυχία στην ανακάλυψη φαρμάκων που ρυθμίζουν τους nAChRs έναντι των παραπάνω ασθενειών και διαταραχών και επομένως για την εύρεση θεραπευτικών προσεγγίσεων θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω.

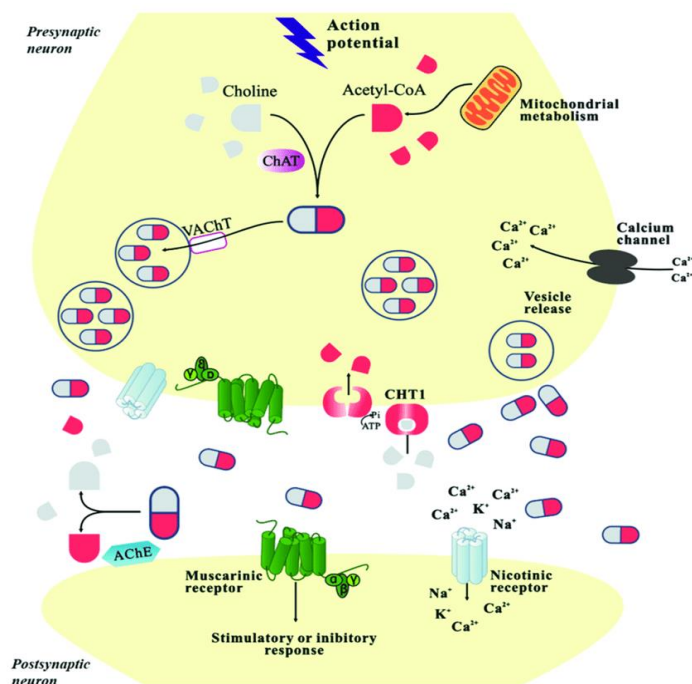
Η εργασία έχει ως στόχο το χαρακτηρισμό της πρόσδεσης μονοκλωνικών αντισωμάτων σε τομές εγκεφάλου επίμυος, τα οποία έχουν ήδη παραχθεί στο εργαστήριο Νευροβιολογίας και Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτο Παστέρ έναντι του συγκαταμερούς εξωκυττάριου τμήματος $\beta 2$ - $\alpha 4$ του nAChR. Τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν παραχθεί με ανοσοποίηση αρουραίων, εφαρμόζοντας την τεχνολογία υβριδωμάτων για την κυτταρική σύντηξη. Ο χαρακτηρισμός θα γίνει με ανοσολογικές μεθόδους, όπως ELISA, Western blot και δοκιμασία έμμεσου ανοσοφθορισμού σε κύτταρα και τομές ιστών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο: ΝΙΚΟΤΙΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ

1.1 Γενικά Στοιχεία

Ακετυλοχολίνη

Η ακετυλοχολίνη (Acetylcholine, ACh) είναι ένας από τους νευροδιαβιβαστές και ανάλογα με τους υποδοχείς του μετασυναπτικού κυττάρου είναι δυνατόν να δράσει διεγερτικά ή ανασταλτικά στο κεντρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Η χολίνη παράγεται στο νευρωνικό σώμα και μεταφέρεται στα άκρα του άξονα του νευρώνα (Εικόνα 1), όπου ακετυλιώνεται από το ένζυμο ακετυλοτρανσφεράση χολίνης (ChAT) και αποθηκεύεται σε διαυγή σφαιρικά κυστίδια με διάμετρο 40-50 nm. Οι κινητικοί νευρώνες παράγουν ACh, η οποία απελευθερώνεται σε όλες τις τελικές απολήξεις των νευρώνων αυτών, στα τελικά εκτελεστικά όργανα. Πολλοί παρασυμπαθητικοί και συμπαθητικοί γαγγλιακοί νευρώνες είναι χολινεργικοί και οι προγαγγλιακές ίνες στις συνάψεις στα παρασυμπαθητικά και συμπαθητικά γάγγλια απελευθερώνουν τον νευροδιαβιβαστή αυτόν (Rand, 2007)



Εικόνα 1: Μεταφορά και μετατροπή της χολίνης σε ακετυλοχολίνη. Η χολίνη μετά τη παραγωγή της στο σώμα του νευρικού κυττάρου μεταφέρεται στις αξονικές απολήξεις αυτού και αποθηκεύεται σε κυστίδια, ενώ παράλληλα υφίσταται τις απαραίτητες μετατροπές για την παραγωγή εξ αυτής ακετυλοχολίνης (Chen et al., 2022).

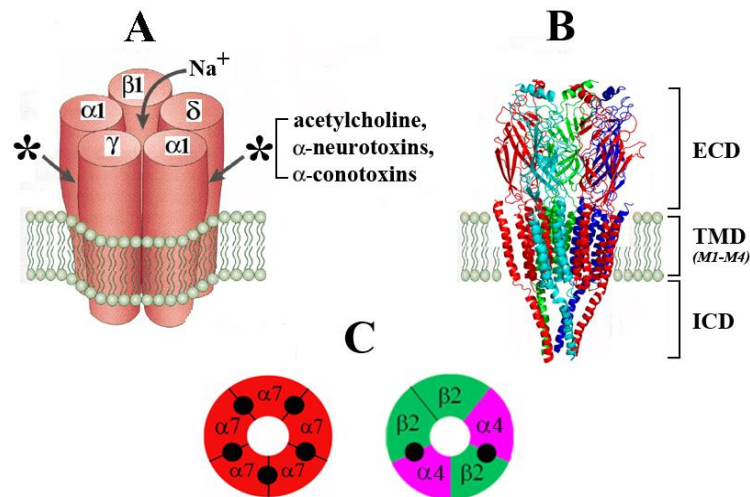
Επιπλέον η ACh παίζει βασικό ρόλο στη λειτουργία του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος, το οποίο αποτελεί τμήμα του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση ποικίλων φυσιολογικών διεργασιών στο σώμα, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που σχετίζονται με το καρδιαγγειακό σύστημα. Η ACh ευθύνεται για τη δράση στους λείους μύες, στα αιμοφόρα αγγεία και σε άλλους ιστούς του σώματος για να παράγει μια σειρά από αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένης της συστολής των λείων μυών, της διαστολής των αιμοφόρων αγγείων, της αυξημένης έκκρισης διαφόρων ουσιών και της επιβράδυνσης του καρδιακού ρυθμού. Αυτές οι δράσεις της ακετυλοχολίνης συμβάλλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης στο σώμα και υποστηρίζουν διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες (Rand, 2007; LeBouef et al., 2022; Sam, C., & Bordoni, B., 2022).

Όταν μια νευρική ώση φτάσει στο τελικό κομβίο ενός κινητικού νευρώνα, η ακετυλοχολίνη απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή και στη συνέχεια προσδένεται σε ένα μόριο υποδοχέα ο οποίος εντοπίζεται στην μετασυναπτική μεμβράνη μιας μυϊκής ίνας, η οποία ονομάζεται τελική κινητική πλάκα. Η σύνδεση αυτή μεταβάλλει τη διαπερατότητα της μεμβράνης, ανοίγοντας διαύλους που επιτρέπουν στα θετικά φορτισμένα ιόντα νατρίου να εισέλθουν στο μυϊκό κύτταρο (Sherwood, 2016). Όταν συσσωρεύεται υψηλή συχνότητα νευρικών ερεθισμάτων, οι δίαυλοι νατρίου κατά μήκος της μεμβράνης της τελικής κινητικής πλάκας γίνονται πλήρως ενεργοί, προκαλώντας συστολή των μυϊκών κυττάρων. Η ACh συνδέεται επίσης με το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (AChE), ένα αποικοδομητικό εξωκυτταρικό ένζυμο που καταλύει την ACh σε χολίνη και οξικό οξύ, καταστέλλοντας τη δράση της. (Sherwood, 2016).

Η ακετυλοχολίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Sherwood, 2016). Είναι γνωστό ότι παίζει βασικό ρόλο στη μνήμη και τη μάθηση και είναι σε ασυνήθιστα χαμηλή ποσότητα στους εγκεφάλους των ασθενών με τη νόσο Alzheimer (Sherwood, 2016).

Υποδοχείς ακετυλοχολίνης

Οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης, ή αλλιώς χολινεργικοί υποδοχείς, αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες προσδένουν την ACh που απελευθερώνεται, από τους χολινεργικούς νευρώνες (Carlson & Kraus, 2022). Ανήκουν σε μία μεγάλη οικογένεια υποδοχέων- διαύλων, των λεγόμενων συνδεόμενων με προσδέτη ιοντικών καναλιών. Αυτή η υπεροικογένεια υποδοχέων έχει μια θηλιά αποτελούμενη από 13 αμινοξέα στην εξωκυτταρική περιοχή κάθε υπομονάδας της, η οποία είναι τοποθετημένη ανάμεσα σε δύο κατάλοιπα κυστεΐνης που δημιουργούν έναν δισουλφιδικό δεσμό (Kalamida et al., 2007).



Εικόνα 2: Δομή νικοτινικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης του ηλεκτρικού χελιού *Torpedo*. **A.** $\alpha 1$, $\beta 1$, γ και δ υπομονάδες του νικοτινικού υποδοχέα **B** – Δομή nAChR από κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία που διευκρινίζεται η διαμεμβρανική (transmembrane domain, TMD), η εξωκυτταρική (extracellular domain, ECD) και ενδοκυτταρική περιοχή (intracellular domain, ICD). **C** – Νικοτινικοί υποδοχείς νευρωνικού τύπου που οργανώνονται σε ομοπενταμερή ($5\alpha_7$) και σε ετεροπενταμερή δομή ($3\beta_2 2\alpha_4$). * θέσεις πρόσδεσης των αγωνιστών (ACh) και ανταγωνιστών (α -νευροτοξίνες, α -κονοτοξίνες) ανάμεσα στις υπομονάδες $\alpha 1/\gamma$ και $\alpha 1/\delta$. (Heinbockel, T., 2014)

Οι χολινεργικοί υποδοχείς μπορούν να διακριθούν σε δύο υποκατηγορίες, ανάλογα με τη διαφορετική συγγένεια που έχουν σε αλκαλοειδή που μπορούν να μιμηθούν τη δράση της ακετυλοχολίνης, τις λεγόμενες χολινομιμητικές ουσίες. Οι δύο υποκατηγορίες είναι οι μουσκαρινικοί και οι νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης (Carlson & Kraus, 2022).

Οι νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης αποτελούνται από πέντε διαμεμβρανικές υπομονάδες που οργανώνονται από ένα σύνολο 17 ομόλογων πολυπεπτιδίων (α 1–10, β 1–4, γ , δ και ϵ) (Kalamida et al., 2007). Επίσης, υπάρχει μια ποικιλία υποτύπων nAChR, ο καθένας με ξεχωριστό αριθμό υπομονάδων που διαμεσολαβούν σε διαφορετικά παθοφυσιολογικά μονοπάτια. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς εκφράζονται σε όλο το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και διευκολύνουν τη συναπτική μετάδοση στη νευρομυϊκή σύναψη και στα γάγγλια στο Περιφερικό Νευρικό Σύστημα. Τα μη νευρωνικά/μη μυϊκά κύτταρα έχουν επίσης nAChRs (κερατινοκύτταρα, επιθήλια, μακροφάγα κ.λπ.).

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι nAChRs θεωρούνται σημαντικοί θεραπευτικοί στόχοι για μια ποικιλία διαταραχών, όπως η Μυασθένεια Gravis, οι ασθένειες Alzheimer και Parkinson, η σχιζοφρένεια και η διακοπή του καπνίσματος (Kalamida et al., 2007).

Οι nAChRs μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο διαφορετικές κατηγορίες, οι οποίες είναι οι εξής:

1. nAChRs νευρικού τύπου: Συναντώνται κατά κύριο λόγο στο Κεντρικό και το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα.
2. nAChRs μυϊκού τύπου: Βρίσκονται στους σκελετικούς μυς και στα ηλεκτρικά όργανα των ψαριών.

Υπάρχει ταξινόμηση των υποδοχέων αυτών με βάση τη δυνατότητα σύνδεσης των προσδετών τους. Έτσι, οι nAChRs μπορούν να διακριθούν σε αυτούς που δέχονται ως προσδέτη την α -μπουγκαροτοξίνη και σε αυτούς που δεν την προσδένουν (Lindstrom, 1997).

1.2 Γενικά Χαρακτηριστικά Των nAChR Μυϊκού Τύπου

Στους μυς των εμβρύων, καθώς και στα ηλεκτρικά όργανα των ψαριών, ο υποδοχέας nAChR παρουσιάζεται στοιχειομετρικά ως $(\alpha_1)_2\beta_1\gamma\delta$ (Kalamida et al., 2007) (Εικόνα 2, Α). Από την άλλη, οι μυς των ενηλίκων έχουν διαφορετική στοιχειομετρία ως προς αυτούς τους υποδοχείς, με αποτέλεσμα η θέση της γυπομονάδας να υποκαθίσταται από μία υπομονάδα ϵ , ώστε τελικά ο υποδοχέας να έχει τη στοιχειομετρία $(\alpha_1)_2\beta_1\epsilon\delta$. Η στοιχειομετρία αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στη διαμόρφωση των θέσεων πρόσδεσης των υποψηφίων συνδετών, καθώς και στο να διατηρηθούν οι συνεργικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις

α_1 υπομονάδες (Kalamida et al., 2007). Η θέση πρόσδεσης μεταξύ των υπομονάδων α και γ έχει διαφορετικές ιδιότητες από την θέση πρόσδεσης μεταξύ των υπομονάδων α και δ , γεγονός το οποίο ευθύνεται στο ότι η πρώτη παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για την ουσία τουβοκουραρίνη, η οποία είναι ανταγωνιστής της ακετυλοχολίνης. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι οι υποδοχείς nAChR εμβρυϊκού τύπου συνεχίζουν να υπάρχουν στον θύμο αδένα καθώς και σε μερικούς από τους κινητικούς μύες των οφθαλμών των ενηλίκων (Kalamida et al., 2007).

Ο μηχανισμός μετάβασης της νικοτινικής υπομονάδας γ στη υπομονάδα ϵ στον άνθρωπο δεν είναι προς το παρόν πλήρως κατανοητός (Ma et al., 2021). Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έδειξαν ότι κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, οι νευρομυϊκές συνδέσεις υφίστανται διάφορες αλλαγές καθώς ωριμάζουν και προκύπτει σχηματισμός των κυτταρικών μεμβρανών (σαρκείλημμα). Το σαρκείλημμα όταν εγκολπώνεται δημιουργούν μεγαλύτερη επιφάνεια προς τη συναπτική περιοχή (μετασυναπτικές πτυχές). Οι μετασυναπτικές πτυχές αρχίζουν να σχηματίζονται σε αναπτυσσόμενους μυοσωλήνες συσσωρεύοντας nAChRs στα κέντρα των μυοσωλήνων, σχηματίζοντας πρωτόγονες συστάδες (clusters). Αυτή η διαδικασία, είναι σημαντική για τη σωστή ανάπτυξη των νευρο-μυϊκών συνδέσεων και περιλαμβάνει το συντονισμό των δομικών και μοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κινητικών νευρώνων και των μυϊκών ινών (τελική κινητική πλάκα) (Rudolf & Straka 2019; Cetin et al., 2020). Γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι μέσω της νευρικής δραστηριότητας καταστέλλεται το γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα γ , ενώ ενεργοποιείται η μεταγραφή του γονιδίου που αντιστοιχεί στην υπομονάδα ϵ (Cetin et al., 2020).

1.3 Γενικά Χαρακτηριστικά Των nAChR Νευρωνικού Τύπου

Οι υποδοχείς nAChR νευρωνικού τύπου εκφράζονται σε όλο το νευρικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένων των περιφερικών γαγγλίων, περιοχών του εγκεφάλου καθώς σε επιθηλιακά κύτταρα και κύτταρα που ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα (Lindstrom, 1997). Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί εννέα α (α_2 - α_{10}) και τρία β (β_2 - β_4) γονίδια που κωδικοποιούν τις αντίστοιχες υπομονάδες. Οι α_7 - α_{10} υπομονάδες εμφανίζονται με δύο τρόπους, είτε ως ομοπενταμερή, δηλαδή πέντε υπομονάδες α_7 , α_8 ή α_9 , είτε σαν ετεροπενταμερή δηλαδή ως πέντε υπομονάδες των α_7/α_8 και α_9/α_{10} . Από την άλλη, οι υπομονάδες α_2 - α_6 και β_2 - β_4 οργανώνονται σε ετεροπενταμερή, ακολουθώντας τη

στοιχειομετρία $(\alpha\chi)_2(\beta\gamma)_3$ (Εικόνα 2, C). Επίσης, οι α_5 και β_3 υπομονάδες δεν είναι ικανές να σχηματίσουν λειτουργικούς υποδοχείς σε περίπτωση που εκφραστούν μόνες τους. Αυτό που κάνουν ωστόσο είναι να σχηματίζουν λειτουργικούς διαύλους μόνο σε περιπτώσεις όπου συνεκφράζονται μαζί με άλλους συνδυασμούς λειτουργικών υπομονάδων. Αυτός είναι και ο λόγος που οι υπομονάδες αυτές καλούνται τις περισσότερες φορές «βοηθητικές» υπομονάδες. Παρόλο που στην αρχή η επιστημονική κοινότητα θεώρησε ότι οι συγκεκριμένες υπομονάδες είχαν ρόλο δομικό, μεταγενέστερα δεδομένα απέδειξαν ότι είναι απαραίτητες για να δημιουργηθεί υποδοχέας και αυξάνοντας την συγκέντρωση του ασβεστίου, ο νικοτινικός προσδέτης θα έχει υψηλότερη συγγένεια. Πράγμα το οποίο αποδεικνύει ότι οι συγκεκριμένες υπομονάδες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην οργάνωση του λειτουργικού υποδοχέα με συγκεκριμένες στοιχειομετρίες, μαζί με τις φαρμακολογικές ιδιότητες των nAChRs και τον ρόλο τους για τις ιδιότητες πρόσδεσης του συνδέτη (Lindstrom, 1996; Jain et al., 2016). Η παλαιότερη ταξινόμηση των nAChRs βασίστηκε στις φαρμακολογικές τους ιδιότητες (Lindstrom, 1996). Ως αποτέλεσμα, οι nAChR νευρωνικού τύπου χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες:

- (α) Την κατηγορία δέσμευσης αγωνιστών υψηλής συγγένειας, που δεν δεσμεύουν α-μπουγκαροτοξίνη (α -Bgtx). Αργότερα βρέθηκε ότι είναι τα ετεροπενταμερή nAChR που σχηματίζονται από α_2 - α_6 και β_2 - β_4 υπομονάδες και
- (β) μια δεύτερη κατηγορία που δεσμεύει αγωνιστές με χαμηλότερες συγγένειες και δεσμεύει α -Bgtx όπου αργότερα αποδείχθηκε ότι είναι συνήθως ομοπενταμερή μόρια που σχηματίζονται από α_7 - α_9 υπομονάδες. Οι ομοπενταμερείς nAChRs πιστεύεται ότι έχουν πέντε πανομοιότυπες θέσεις δέσμευσης ACh ανά μόριο (μία σε κάθε διεπιφάνεια α υπομονάδας), ενώ οι ετεροπενταμερείς nAChRs έχουν δύο θέσεις δέσμευσης ACh, που βρίσκονται στη διεπιφάνεια μεταξύ μιας α και μιας β υπομονάδας (Lindstrom, 1996).

1.4 Η Νευρομυϊκή Σύναψη

Οι νευρομυϊκές συνάψεις αποτελούν συναπτικές συνδέσεις ανάμεσα στα τελικά κομβία ενός κινητικού νευρώνα και ενός μυός, είτε αυτός είναι σκελετικός, είτε καρδιακός είτε λείος μυς. Η νευρομυϊκή σύναψη αποτελεί το σημείο όπου το δυναμικό ενέργειας που παράγεται από τον νευρώνα μεταδίδεται στην μυϊκή ίνα.

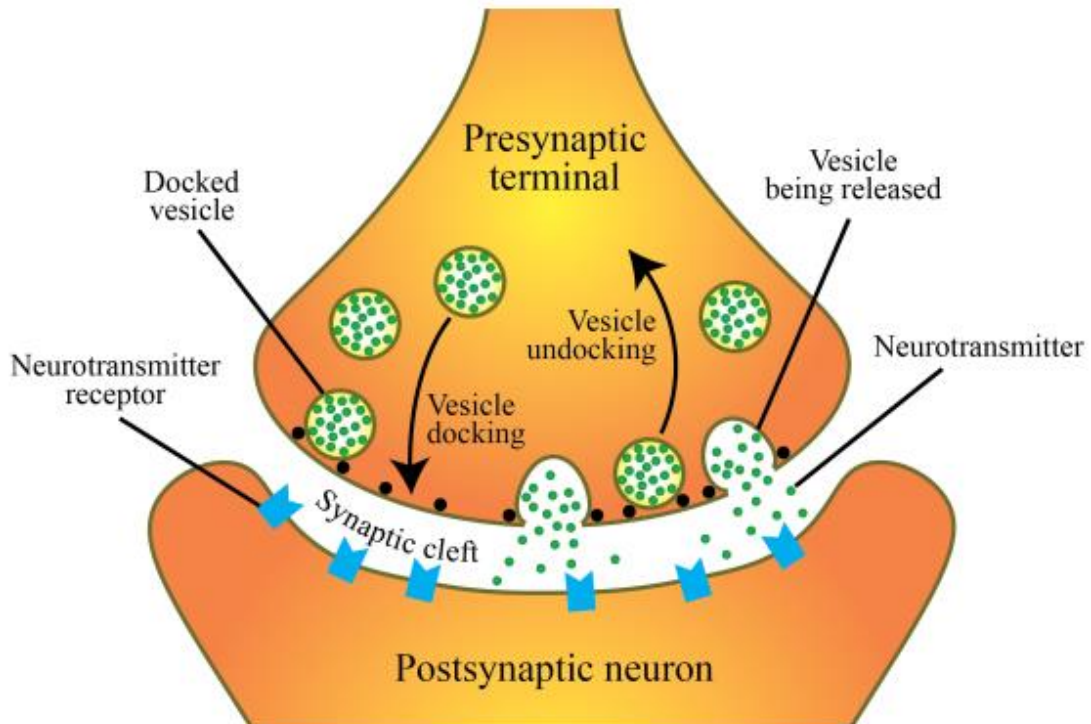
Προς ευκολότερη κατανόηση της δομής και της λειτουργίας των νευρομυϊκών συνάψεων, αυτές μπορούν να χωριστούν σε τρία ξεχωριστά τμήματα: την προσυναπτική περιοχή, τη μετασυναπτική περιοχή και τη συναπτική σχισμή.

Προσυναπτική περιοχή (ή αλλιώς τελικά κομβία του νευρώνα) (Εικόνα 3): Οι κινητικοί νευρώνες, περιβάλλονται από έλυτρα μυελίνης και από μικρές επαναλαμβανόμενες περιοχές σε ισομήκη διαστήματα χωρίς μυελίνη γνωστά ως κόμβιοι Ranvier που βοηθούν στη διευκόλυνση της αποτελεσματικής μετάδοσης των ηλεκτρικών σημάτων (Grider et al., 2022). Ωστόσο, οι κινητικοί νευρώνες καθώς ξεκινούν να δημιουργούν συνάψεις στις μυϊκές ίνες, χάνουν το περίβλημα μυελίνης και σχηματίζουν σύμπλεγμα 100-200 νευρικών απολήξεων που ονομάζονται τελικά κομβία (Omar, 2023). Η προσυναπτική μεμβράνη του νευρικού κυττάρου έχει περιοχές πάχυνσης της μεμβράνης που ονομάζονται ενεργές ζώνες. Οι ενεργές ζώνες περιλαμβάνουν μια οικογένεια πρωτεϊνών SNAP (συνταξίνες και συναπτοσωμική πρωτεΐνη 25) και σειρές τασεοελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου (Ca). Οι προσυναπτικές μεμβράνες εκτός αυτών περιλαμβάνουν διαύλους ιόντων καλίου, καθώς και άφθονα μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο και πολλά συναπτικά κυστίδια. Κάθε συναπτικό κυστίδιο έχει αποθηκευμένο στο εσωτερικό του περίπου 5000-10000 μόρια ακετυλοχολίνης, η οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί αποτελεί τον μοναδικό νευροδιαβιβαστή που ενεργεί στη μετάδοση μηνυμάτων στις νευρομυϊκές συνάψεις. Τα συναπτικά κυστίδια είναι συγκεντρωμένα γύρω από τις ενεργές ζώνες (Witzemann, 2006; Omar, 2023).

Καθώς ένα δυναμικό ενέργειας φθάσει στα τελικά κομβία, οι διάυλοι Ca ανοίγουν και έτσι το Ca λόγω της υψηλής του συγκέντρωσης στον εξωκυττάριο χώρο εισέρχεται αυθόρμητα μέσα στο κύτταρο. Το αυξημένο Ca εντός των τελικών κομβίων στη συνέχεια ακολουθεί η πρόσδεση των συναπτικών κυστιδίων στις ενεργές ζώνες και τα μόρια του νευροδιαβιβαστή διαχέονται στη συναπτική σχισμή με εξωκύτωση (Εικόνα 3) (Hall & Sanes, 1993).

Συναπτική σχισμή: Αποτελεί το πολύ μικρό διάστημα μεταξύ της προσυναπτικής μεμβράνης των νευρικών κυττάρων και της τελικής κινητικής πλάκας των μυϊκών ινών (Εικόνα 3). Η συναπτική σχισμή έχει μέγεθος περίπου 50 nm. Στο σημείο αυτό απελευθερώνονται τα μόρια του νευροδιαβιβαστή, δηλαδή η ACh. Στη συναπτική σχισμή

της νευρομυϊκής σύναψης βρίσκεται το ένζυμο AChE, το οποίο όπως έχει αναφερθεί είναι υπεύθυνο για τον καταβολισμό της ACh, έτσι ώστε η επίδρασή της στους μετασυναπτικούς υποδοχείς να μην παρατείνεται για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα από ό,τι είναι απαραίτητο (Sherwood, 2016).



Εικόνα 3: Απεικόνιση της προ- και μετά- συναπτικής περιοχής, μεταξύ των οποίων βρίσκεται η συναπτική σχισμή. Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών απελευθέρωσης συναπτικών κυστιδίων και νευρωνικής επικοινωνίας στις συνάψεις για τον ρόλο της πρόσδεσης, της αποδέσμευσης κυστιδίων και της πρόσδεσης νευροδιαβιβαστών. Οι θέσεις πρόσδεσης των κυστιδίων ορίζονται από πρωτεϊνικούς δακτυλίους, οι οποίοι αντιπροσωπεύονται από δύο μαύρες κουκκίδες σε κάθε προσδεμένο κυστίδιο στην εικόνα. (Zhang, C.& Peskin, C.S., 2020)

Τελική κινητική πλάκα: Αντιστοιχεί στη μετασυναπτική μεμβράνη της νευρομυϊκής σύναψης (Εικόνα 3). Αποτελεί τη κυτταρική μεμβράνη της μυϊκής ίνας που υφίσταται αναδιπλώσεις. Οι νευρικές απολήξεις δεν διαπερνούν την τελική κινητική πλάκα αλλά προσαρμόζονται στις πτυχές που δημιουργούνται εξαιτίας των αναδιπλώσεων. Η τελική κινητική πλάκα περιλαμβάνει σε αυτές τις περιοχές υποδοχείς ACh. Η σύνδεση της ACh σε αυτούς τους υποδοχείς προκαλεί τη διάνοιξη διαύλων ιόντων με αποτέλεσμα να εισέρχονται ιόντα νατρίου από το εξωκυττάριο υγρό στο εσωτερικό του μυϊκού κυττάρου.

Η διαδικασία αυτή τροποποιεί το δυναμικό της τελικής κινητικής πλάκας με αποτέλεσμα τη μετάδοση του νέου δυναμικού ενέργειας σε όλο το μυϊκό κύτταρο (Sherwood, 2016).

Στις νευρομυϊκές συνάψεις, το δυναμικό τελικής πλάκας είναι ικανό για τη δημιουργία ενός δυναμικού ενέργειας στη μεμβράνη του σκελετικού μύος, που τελικά οδηγεί σε μυϊκή συστολή. Για να αποφευχθεί η παρατεταμένη εκπόλωση και η συστολή των μυών, καθώς και για να επιτραπεί η επαναπόλωση, η ACh αποδομείται από τις υπομονάδες AChE, σε χολίνη και οξικό άλας. Η προκύπτουσα χολίνη μπορεί στη συνέχεια να επαναχρησιμοποιηθεί για την σύνθεση της ACh (Hall & Sanes, 1993).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΜΕ ΤΟΥΣ ΝΙΚΟΤΙΝΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ

2.1 Myasthenia Gravis

Η δέσμευση αυτοαντισωμάτων σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη σηματοδότηση της νευρομυϊκής σύναψης με αποτέλεσμα να προκαλούν δυσλειτουργία στη νευρομυϊκή μετάδοση των συνάψεων είναι η αιτία της αυτοάνοσης ασθένειας που είναι γνωστή ως Βαριά Μυασθένεια (Myasthenia Gravis, MG) (Conti-Fine et al., 2006). Για τη διαμόρφωση των λειτουργικών nAChRs που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό νευρομυϊκής σύναψης, εμπλέκονται διάφορες υπομονάδες nAChR, όπως α_2 , α_4 , α_5 , α_6 και α_7 , καθώς και συνδυασμοί με των υπομονάδων β_2 και β_4 (Lindstrom, 1996; Jain et al., 2016). Επιπλέον η ειδική μυϊκή κινάση (Muscle-specific kinase, MuSK) είναι μια πρωτεΐνη που αποτελεί κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη και στη διατήρηση της νευρομυϊκής σύναψης. Πιο ειδικά συμβάλλει στην ομαδοποίηση των nAChRs (Burden, Yumoto, & Zhang, 2013). Η MuSK εκφράζεται στους σκελετικούς μύες και ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη αγκρίνη, που παράγεται από τους κινητικούς νευρώνες και εκκρίνεται στη σύναψη (Kim et al., 2008). Κατά την ενεργοποίηση, η MuSK φωσφορυλιώνει μεταγενέστερες σηματοδοτικές πρωτεΐνες, όπως η ραψίνη, η οποία συγκεντρώνει τους nAChRs στην επιφάνεια των μυϊκών κυττάρων (Burden, Yumoto, & Zhang, 2013). Οι μηχανισμοί που υποστηρίζουν την αυτοανοχή, τον έλεγχο της σύνθεσης αντι-AChR Ab, την ομαδοποίηση AChR και τη

λειτουργία των AChR, καθώς και εκείνοι που επηρεάζουν τη νευρομυϊκή μετάδοση των συνάψεων μετά τη δέσμευση του Ab, είναι καλά κατανοητοί.

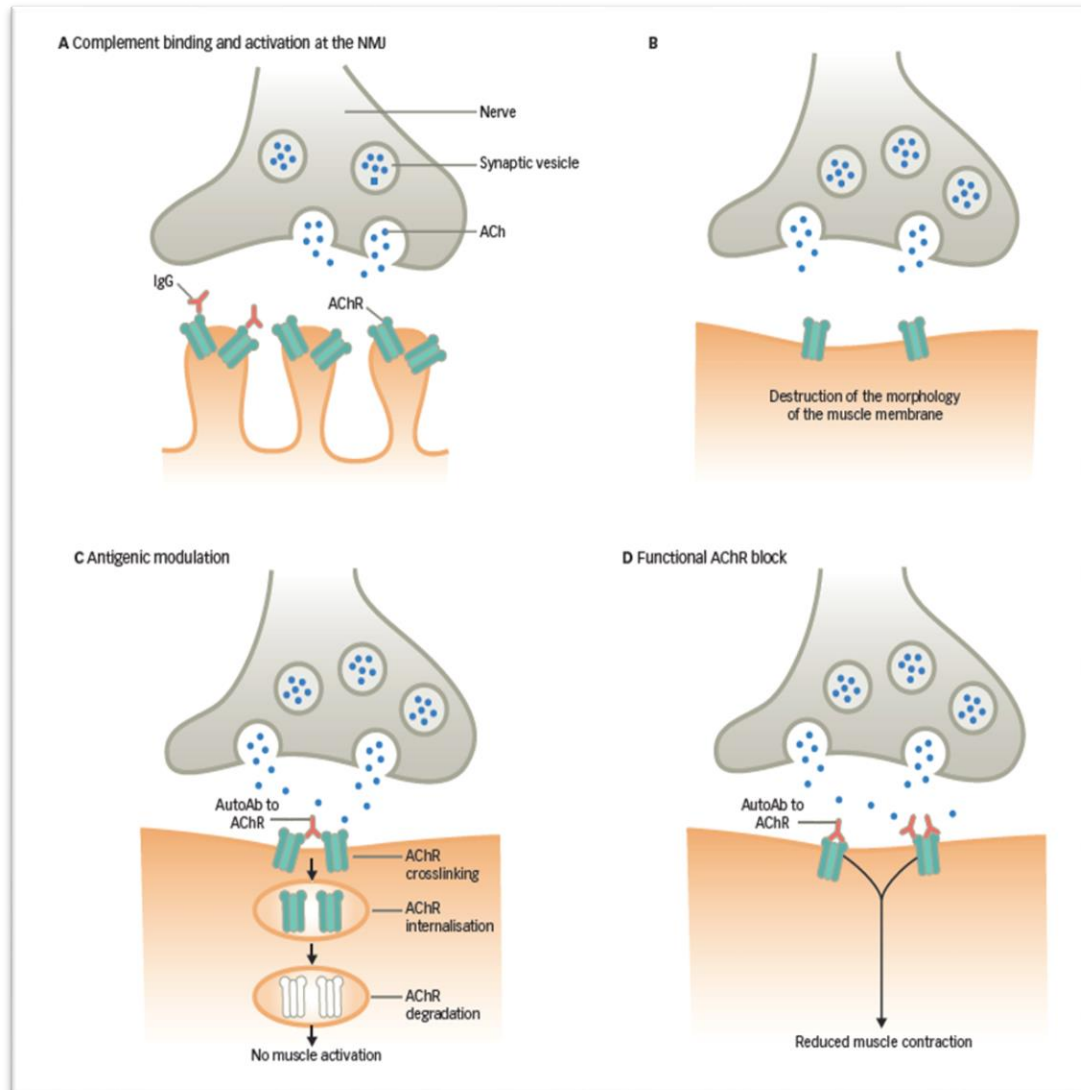
Δύο α υπομονάδες και μία από τις β-, γ-, δ- (εμβρυϊκός τύπος) ή ε-υπομονάδες (τύπος ενηλίκου) συνθέτουν το ετεροπενταμερές νικοτινικό AChR, το οποίο είναι διατεταγμένο γύρω από έναν κεντρικό πόρο (Albuquerque et al., 2009). Ένα δείγμα ορού από MG μπόρεσε να μπλοκάρει περισσότερο από το 80% των αποκρίσεων του AChR και το 50% των αντισωμάτων του δείγματος μπόρεσαν να συνδεθούν με τις α υπομονάδες του AChR, γεγονός που υποδηλώνει παρέμβαση στη λειτουργία του AChR. (Tzartos et al., 1998) και θεωρείται ότι είναι πιο επιβλαβή από εκείνα που στοχεύουν στη β-υπομονάδα (Kordas et al., 2014). Η κύρια ανοσογόνος περιοχή (MIR) είναι μια ειδική περιοχή στο εξωκυττάριο τμήμα των α₁ υπομονάδων. Η περιοχή MIR αναγνωρίζεται από τα αυτοαντισώματα έναντι των AChRs μυϊκού τύπου στη MG, με συνέπεια να επηρεάζεται αλλοστερικά η λειτουργία τους. Ο σαφής λόγος για τον οποίο τα αυτοαντισώματα της MG στοχεύουν την MIR του AChR είναι ακόμη άγνωστος (Lennon et al., 1985; Luo et al., 2009). Στη MG τα αυτοαντισώματα που παράγονται έναντι AChRs είναι υποτάξεις IgG1 και IgG3 (Lazaridis, K., & Tzartos, S. J., 2020).

Τα αντισώματα έναντι του AChR επιδεικνύουν τρεις παθογόνοι μηχανισμοί, αλλά όλα εμποδίζουν τη λειτουργία του υποδοχέα αλληλεπιδρώντας, αναστέλλοντας ή αλλάζοντας τη δραστηριότητα του υποδοχέα. Ένας από τους τρεις μηχανισμούς είναι η δέσμευση του αντισώματος στον AChR, η οποία προκαλεί την ενεργοποίηση του καταρράκτη της κλασσικής οδού του συμπληρώματος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία και εναπόθεση ενός πορώδους σχηματισμού, του συμπλέγματος προσβολής της μεμβράνης (Membrane Attack Complex - MAC), στη μετασυναπτική μεμβράνη καθώς και στις συναπτικές πτυχές που περιέχουν AChR και σχετικές πρωτεΐνες, όπως τα τασεο-ελεγχόμενα κλειστά κανάλια νατρίου (Εικόνα 4) (Morgan et al., 2006).

Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την αντιγονική διέργηση. Αυτό μπορεί να συμβεί όταν τα αντισώματα δεσμεύονται ταυτόχρονα σε πολλούς AChRs. Αυτή η διαδικασία, γνωστή ως διασταύρωση, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ενδοκυττάρωση και αποικοδόμηση των AChRs (Εικόνα 4).

Ο τελευταίος μηχανισμός αφορά στη σύνδεση των αυτοαντισωμάτων στους AChR τα οποία εμποδίζουν τη δέσμευση της ACh, αναστέλλουν τη νευρομυϊκή μετάδοση των συνάψεων προκαλώντας μείωση στις μυϊκές συσπάσεις (Εικόνα 5). Συνήθως ο πρώτος

και ο δεύτερος μηχανισμός παρουσιάζονται σε συνδυασμό στο 90% των περιπτώσεων με γενικευμένη MG. Ενώ στο 50% των ασθενών με γενικευμένη MG εμπλέκεται και ο τρίτος μηχανισμός παθογένειας της νόσου. (Howard et al., 1987; Jacob et al., 2018).



Εικόνα 4: Σχέση των υποδοχέων ακετυλοχολίνης με τα αυτοαντισώματα στη Μυασθένεια Gravis. A- Ενεργοποίηση των συμπληρωμάτων (C3a, C3b, C4b, C5a, C5b, C6, C7, C8 και C9) προκαλώντας κυτταρόλυση και καταστροφή των μετασυναπτικών μεμβρανών. B- Μετά τον πρώτο μηχανισμό ακολουθεί η αλλαγή της δομής των μετασυναπτικών μεμβρανών σε επίπεδη επιφάνεια. C- Η διασταυρούμενη σύνδεση προκαλείται από τη δέσμευση αυτοαντισωμάτων σε δύο AChRs, με αποτέλεσμα να ενδοκυτταρώνονται οι υποδοχείς και να οδηγεί σε μείωση του αριθμού τους. D- Ο τελευταίος μηχανισμός των αυτοαντισωμάτων που λειτουργούν ως εμπόδιο στη δεσμευση της ACh στους AChRs με αποτέλεσμα να οδηγεί σε μια σημαντική δυσλειτουργία της νευρομυϊκής μετάδοσης στους μυς. (Jacob, 2018).

2.2 Επιληψία

Αν και οι κληρονομικές επιληψίες είναι ασυνήθιστες, παρέχουν μια μοναδική ευκαιρία για έρευνα των οδών που προκαλούν επιληπτικές κρίσεις. Στις επιληψίες με γενετική βάση, ο εντοπισμός της συγκεκριμένης θέσης των κατεστραμμένων γονιδίων και ο εντοπισμός των συνοδευτικών ανωμαλιών έχει γίνει πιο απλός λόγω των πρόσφατων εξελίξεων στον προσδιορισμό της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος. Μια σημαντική εξέλιξη στη μελέτη της επιληψίας είναι η ανακάλυψη των μεταλλάξεων που προκαλούν αυτοσωμική επικρατούσα νυχτερινή επιληψία μετωπιαίου λοβού (Autosomal Dominant Nocturnal Frontal lobe Epilepsy, ADNFLE) (Scheffer et al., 1995).

Η πρώτη απόδειξη ότι η αλλαγή ενός διαύλου ιόντων ελεγχόμενος από συνδέτη θα μπορούσε να οδηγήσει σε επιληψία προήλθε από την ανακάλυψη ότι το ADNFLE συνδέεται με μια μετάλλαξη στο γονίδιο CHRNA4, το οποίο κωδικοποιεί μια υπομονάδα nAChR. Η γρήγορη νευροδιαβίβαση διαμεσολαβείται από διαύλους ιόντων που βρίσκονται στη μετασυναπτική μεμβράνη των νευρώνων.

Η οικογένεια των διεγερτικών διαύλων ιόντων με πύλη συνδέτη του νευροδιαβιβαστή περιλαμβάνει nAChRs νευρωνικού τύπου. Στους ανθρώπους, έχουν βρεθεί δεκαέξι γονίδια που κωδικοποιούν nAChR. Τα 11 γονίδια nAChR κωδικοποιούν nAChR νευρωνικού τύπου που εκφράζονται εκτενώς τόσο στο περιφερικό όσο και στο κεντρικό νευρικό σύστημα και πέντε γονίδια κωδικοποιούν νευρωνικού τύπου nAChR (Corringer et al., 2000).

Η πρώτη μετάλλαξη στο CHRNA4, που κωδικοποιεί την α_4 υπομονάδα, ανακαλύφθηκε, εγείροντας ανησυχίες για πιθανές λειτουργικές αλλαγές που προκαλούνται από μια τέτοια μετάλλαξη και τις επιπτώσεις τους στα νευρωνικά δίκτυα. Γνωρίζουμε προηγουμένως ότι, η στοιχειομετρία nAChR με υπομονάδες $\alpha_4\beta_2$ αποτελεί την υψηλότερη συγγένεια με την νικοτίνη στον εγκέφαλο. Οπότε ο φλοιός όσο και ο θάλαμος παρουσιάζουν υψηλή έκφραση αυτών των υποδοχέων. Σε ορισμένους ασθενείς έχει δείξει ότι στο μετωπιαίο λοβό τους, οι επιληπτικές κρίσεις ADNFLE αναπτύσσονται κυρίως κατά τη διάρκεια του ύπνου σταδίου II που μπορούν να εξαπλωθούν και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Όταν συμβαίνει αυτό, οι κρίσεις μπορεί να γίνουν πιο σοβαρές προκαλώντας επίσης τονικοκλονικές κρίσεις. (Hayman et al., 1997). Αν και η ηλικία έναρξης της ADNFLE ποικίλλει, συχνά ξεκινά την πρώτη ή τη δεύτερη δεκαετία της ζωής και διαρκεί το

υπόλοιπο της ζωής κάποιου. Μόνο περίπου το 70% των ατόμων με συγκεκριμένη μετάλλαξη στο CHRNA4 εμφανίζουν τις κλασικές διαταραχές του ύπνου.

Οι ακριβείς μηχανισμοί που διέπουν την ADNFLE δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί, αλλά πιστεύεται ότι σχετίζονται με μη φυσιολογικές δραστηριότητες στο κύκλωμα εγκεφαλικός φλοιός - βασικά γάγγλια – θαλάμος - εγκεφαλικός φλοιός οδηγεί στην παραγωγή υπνικών ατράκτων έχει αποδειχθεί με καταγραφές από διαταραχές ρυθμικής δραστηριότητας (θαλαμική δυσρυθμία) (McCormick et al., 1999). Έχει βρεθεί ότι μεταλλάξεις στους υποδοχείς $\alpha_4\beta_2$ nAChR αυξάνουν την αποτελεσματικότητα την απόκρισης τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις ACh, οδηγώντας σε αυξημένη διεγερσιμότητα στον νεοφλοιό και ενδεχομένως συμβάλλοντας στην ADNFLE. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητό πώς αυτές οι μεταλλάξεις προκαλούν τη νόσο και απαιτούνται περισσότερες έρευνες για να προσδιοριστεί ο ακριβής μηχανισμός (Indurthi et al., 2019).

Προκειμένου να κατανοηθεί πώς η μετάλλαξη επηρεάζει τη λειτουργία, χρησιμοποιήθηκαν ωκύτταρα *Xenopus* για να εκφράσουν φυσιολογικά ή μεταλλαγμένα nAChR και να καταγράψουν τα χαρακτηριστικά των υποδοχέων. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η ανταπόκριση του υποδοχέα στην ACh ή τη νικοτίνη μεταβάλλεται σημαντικά όταν προκύπτει η μετάλλαξη στην α_4 υπομονάδα (Figl et al., 1998). Δεδομένου ότι οι ασθενείς με ADNFLE είναι ετερόζυγοι, τόσο τα μη μεταλλαγμένα όσο και τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα πρέπει να εκφράζονται εξίσου στους νευρώνες εκτός εάν υπάρχει ανώμαλος έλεγχος της έκφρασης αλληλόμορφων.

Ωστόσο, πιο πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ότι μεταλλάξεις μπορεί να προκύψουν επίσης στα γονίδια CHRNA2 και CHRNB2 που αυτά μπορεί να οδηγήσουν σε ADNFLE. Στην πραγματικότητα, οποιαδήποτε αλλαγή σε μια υπομονάδα που μειώνει το ενεργειακό φράγμα μεταξύ της κλειστής και της ανοιχτής διαμόρφωσης καναλιών μπορεί να βελτιώσει την απόδοση του υποδοχέα. Ορισμένες περιπτώσεις ADNFLE έχουν άγνωστα αίτια και τα δεδομένα σχετικά με την κατάσταση αυτή δεν είναι ακόμη επαρκή για την πλήρη κατανόηση των προτύπων κληρονομικότητάς της. Ωστόσο, είναι επίσης πιθανό η ADNFLE να προκαλείται από άλλους παράγοντες, όπως περιβαλλοντικές εκθέσεις ή αυθόρμητες γενετικές μεταλλάξεις. Χρειάζεται περισσότερη μελέτη για την καλύτερη κατανόηση των αιτιών και των προτύπων κληρονομικότητας της ADNFLE (Kurahashi et al., 2018). Περαιτέρω μεταλλάξεις μπορεί να ανακαλυφθούν καθώς ελέγχονται επιπλέον οικογένειες που φέρουν ADNFLE.

2.3 Νόσος Alzheimer

Ο πιο κοινός τύπος γεροντικής άνοιας, η νόσος Alzheimer (AD), χαρακτηρίζεται από απώλεια νευρώνων, εξωκυτταρικές εναποθέσεις και νευροϊνιδιακές βλάβες. Συνοδεύεται από πτώση των επιπέδων ACh στον εγκέφαλο, που πιστεύεται ότι είναι η αιτία της γνωστικής έκπτωσης που παρατηρείται στην AD (Dharola et al., 2021).

Για τη συμπτωματική θεραπεία ασθενών με AD, τα τρέχοντα φάρμακα επικεντρώνονται μόνο στην αύξηση της χολινεργικής σηματοδότησης. Έχει αποδειχθεί ότι οι nAChR και το αμυλοειδές βήτα (amyloid beta) αλληλεπιδρούν, συμβάλλοντας στη παθοφυσιολογία της νόσου. Η απώλεια χολινεργικών νευρώνων στον βασικό πρόσθιο εγκέφαλο είναι μια άλλη σταθερή νευροπαθολογική πτυχή της AD (McGeer et al., 1984). Η ACh μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα διαφόρων συστημάτων στον εγκέφαλο επειδή οι χολινεργικοί νευρώνες συχνά νευρώνουν τα προσυναπτικά τελικά άκρα των νευρώνων που απελευθερώνουν άλλους νευροδιαβιβαστές (McGehee et al., 1995). Η ταυτόχρονη μετάδοση του GABA και της ACh είναι σημαντική, καθώς έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει αποτελεσματικά τα εγκεφαλικά κύματα και μειώνει την επιληπτική δραστηριότητα στον υπόκαμπο, υποδεικνύοντας έναν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της εγκεφαλικής δραστηριότητας και των καταστάσεων (Takács et al., 2018). Ως αποτέλεσμα, η διαταραχή του χολινεργικού συστήματος μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα άλλα συστήματα νευροδιαβιβαστών να γίνουν δυσλειτουργικά, κάτι που θα είχε αρνητικό αντίκτυπο στη λειτουργία του εγκεφάλου (Lindstrom, 1997).

Οι δύο κύριοι υποτύποι nAChR που βρέθηκαν στο ΚΝΣ είναι οι α_7 και $\alpha_4\beta_2$ (Wevers & Schroder, 1999). Αυτοί οι υποδοχείς υπερτερούν στις περιοχές του εγκεφάλου που εμφανίζουν νευροπαθολογία που σχετίζεται με AD. Οι μοριακές συνδέσεις μεταξύ του αμυλοειδούς βήτα, της χολινεργικής δυσλειτουργίας και των γνωστικών ελλειμμάτων δεν είναι πλήρως γνωστές, παρά το γεγονός ότι η συσσώρευση του αμυλοειδούς βήτα θεωρείται ένα από τα αρχικά στάδια στον καταρράκτη εξέλιξης της νόσου.

2.4 Νόσος Parkinson

Η νόσος του Πάρκινσον επηρεάζει το 2% των ατόμων άνω των 60 ετών και είναι η δεύτερη πιο διαδεδομένη νευροεκφυλιστική νόσος μετά τη νόσο του Alzheimer

(Mayeux, 2003), η οποία χαρακτηρίζεται από αστάθεια, βραδυκινησία, γενικά ασύμμετρη έναρξη τρόμου, ακαμψίας και μείωση εκφραστικότητας προσώπου.

Το πιο σοβαρά διαταραγμένο σύστημα νευροδιαβιβαστών στη νόσο του Πάρκινσον, η ντοπαμινεργική οδός της μέλαινας ουσίας, είναι υπεύθυνη για αυτά τα κινητικά συμπτώματα.

Επιπλέον, τα αυξανόμενα δεδομένα καταδεικνύουν ότι αυτή η κατάσταση οδηγεί σε ευρεία νευρωνική απώλεια τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα (Braak et al., 2002). Σε μικρότερο βαθμό από την ντοπαμινεργική οδό της μέλαινας ουσίας-ραβδωτού σώματος επίσης πολλά συστήματα νευροδιαβιβαστών δυσλειτουργούν, συμπεριλαμβανομένων των αδρενεργικών, χολινεργικών, σεροτονινεργικών, γλουταμινεργικών και GABA οδών.

Οι βλάβες στη διαδικασία μάθησης και μνήμης, στο συναίσθημα, στον ύπνο/εγρήγορη και στην αυτόνομη λειτουργία που αποτελούν μέρος της νόσου AD που περιλαμβάνει την γαστρεντερική, καρδιαγγειακή δυσλειτουργία, διαταραχές του ουροποιητικού συστήματος και μειωμένη λίμπιτο (Chen et al., 2020). Σύμφωνα με τους Ball et al. (2019), η πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ κληρονομικών και περιβαλλοντικών παραγόντων είναι η τρέχουσα καλύτερη εξήγηση για την αιτιολογία της νόσου του Πάρκινσον.

Η νόσος του Πάρκινσον έχει επίσης συνδεθεί με περιβαλλοντικούς παράγοντες εκτός από γενετικές αλλοιώσεις. Η έκθεση σε φυτοφάρμακα είναι ο πιο συχνά αναφερόμενος θετικός παράγοντας ως προς την ανάπτυξη της νόσου (Narayan et al., 2017). Από την άλλη πλευρά η έρευνα έχει δείξει ότι το κάπνισμα συνδέεται με χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης της νόσου του Πάρκινσον. Οι χημικές ουσίες του τσιγάρου μπορεί να έχουν προστατευτική επίδραση στους νευρώνες που παράγουν ντοπαμίνη, εξηγώντας ενδεχομένως την παρατηρούμενη αντίστροφη σχέση μεταξύ του καπνίσματος και της νόσου του Πάρκινσον (Marrin-Kasirer et al., 2020; Gu et al., 2022).

Το χολινεργικό και ντοπαμινεργικό σύστημα από κοινού μοιράζονται μεγάλο μέρος του ανατομικού και λειτουργικού χώρου στη οδό μέλαινας ουσίας-ραβδωτού σώματος, το οποίο εμπλέκεται στην εξέλιξη της νόσου του Πάρκινσον. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ουσίες όπως η νικοτίνη που αλληλεπιδρούν με τους nAChRs μπορούν να προσφέρουν προστασία έναντι της βλάβης στην οδό αυτή. Επιπλέον, οι παρενέργειες από την θεραπεία με ντοπαμίνη που προκαλεί δυσκινησία βελτιώνονται χορηγώντας νικοτίνη. Τελευταίο

αλλά εξίσου σημαντικό, οι γνωστικές και αντικαταθλιπτικές ιδιότητες των φαρμάκων nAChR αρχίζουν να αναγνωρίζονται ως θεραπείες για την άνοια και τα καταθλιπτικά συμπτώματα που συνδέονται με τη νόσο του Πάρκινσον (Quik et al., 2015).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

ΔΟΜΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Οι ανοσοσφαιρίνες, επίσης γνωστές ως αντισώματα, έχουν μια μοναδική δομή σε σχήμα Y που αποτελείται από δύο βαριές αλυσίδες (Immunoglobulin Heavy Chain, IgH) και δύο ελαφριές αλυσίδες (Immunoglobulin Light Chain, IgL). Στους ανθρώπους, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αλυσίδες IgH βρίσκονται στο χρωμόσωμα 14, ενώ τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αλυσίδες IgL βρίσκονται είτε στο χρωμόσωμα 2 (Igκ) είτε στο χρωμόσωμα 22 (Igλ). Ένα ετεροδιμερές ζεύγος που αποτελείται από μία IgH και μία IgL συνδέεται με ένα δεύτερο ετεροδιμερές με πανομοιότυπη αμινοξική αλληλουχία για να σχηματιστεί μια πλήρη ανοσοσφαιρίνη, μέσω δισουλφιδικών δεσμών και πολλαπλών μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Οι IgLs ανήκουν σε μία από τις δύο διακριτές δομές, κ ή λ, κάθε μία από τις οποίες διαθέτει μια σταθερή (Constant Light Chain Domain, C_L) και μια μεταβλητή επικράτεια (Variant Light Chain Domain, V_L). Ο τύπος της βαριάς αλυσίδας καθορίζει την τάξη και υποτάξη του αντισώματος. Στον άνθρωπο ανιχνεύονται πέντε τάξεις IgG (γ), IgA (α), IgM (μ), IgD (δ) και IgE (ε) με τέσσερις υποτάξεις της IgG (IgG1 (γ1), IgG2 (γ2), IgG3 (γ3) και IgG4 (γ4)) και δύο υποτάξεις της IgA (IgA1 (α1) και IgA2 (α2)). Συνολικά οι τάξεις και υποτάξεις των αντισωμάτων του ανθρώπου αντιπροσωπεύουν εννέα ισότυπους. Οι ισότυποι IgA, IgD και IgG αποτελούνται από τρεις σταθερές (C_H) επικράτειες και μία μεταβλητή (V_H) επικράτεια. Οι ισότυποι IgE και IgM, ωστόσο, περιλαμβάνουν μία V_H και τέσσερις C_H. Επιπλέον, οι ανοσοσφαιρίνες IgA και IgM ενσωματώνουν μια J αλυσίδα (Joining-chain, J-chain), επιτρέποντας τη δημιουργία διμέρων και πενταμέρων αντίστοιχα, ενώ οι υπόλοιποι ισότυποι αποτελούνται από ένα ζευγάρι IgH-IgL ως μονομερή. Η περιοχή V της βαριάς αλυσίδας κωδικοποιείται από τα γονιδιακά τμήματα V, D, και J, και της ελαφριάς αλυσίδας κωδικοποιείται από τα V και J, με την απουσία των γενετικών τόπων D. Ο γενετικός τόπος IgL περιέχει είτε ένα γονίδιο C_L ή C_κ. Ωστόσο, οι ισότυποι των ανοσοσφαιρινών έχουν τις περιοχές τους C

κωδικοποιημένες από διάφορα C_H εξόνια. Τα C_H εξόνια οργανώνονται στο γενετικό τόπο ως C_{μ} , C_{δ} , C_{γ} , C_{ϵ} , και C_{α} . Στο αναπτυσσόμενο λεμφοκύτταρο, μια ολοκληρωμένη ανοσοσφαιρίνη διαμορφώνεται από τον ανασυνδιασμό V(D)J, που ενώνει αυτά τα γονίδια (Chi et al., 2020).

Το 1959, ο Porter δημοσίευσε μια μελέτη στην οποία χρησιμοποίησε το ένζυμο παπαΐνη για να διασπάσει το μόριο του αντισώματος σε τρία κομμάτια, που αντιστοιχούσαν στα δύο θραύσματα πρόσδεσης αντιγόνου (Fragments antigen binding, Fabs) και στο σταθερό τμήμα που αποκαλείται κρυσταλλώσιμο θραύσμα (Fragment crystallizable region, Fc) (Ribatti et al., 2015).

Τα τμήματα Fabs συνδέονται με την περιοχή Fc μέσω μιας περιοχής που αποκαλείται αρμός (η διαφορετικά αρθρωτή περιοχή, Hinge region), παρέχοντας σημαντική ευελιξία στη διαμόρφωση των τμημάτων Fab σε σχέση με την Fc. Η περιοχή αρμού επιτρέπει τους Fab βραχίονες να προσδεθούν σε διαφορετικές συστοιχίες αντιγόνων (Delves et al., 2017). Επιπλέον, η περιοχή αρμού συμβάλλει στις λειτουργικές δράσεις του αντισώματος, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης της κλασσικής οδού του συμπληρώματος και της αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς που εκφράζονται στους ιστούς του ξενιστή. Η περιοχή αρμού είναι πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης περιέχει επίσης κατάλοιπα κυστεΐνης που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς συγκρατώντας τις δύο βαριές αλυσίδες (Deveuve et al., 2020). Η γλυκοζυλιωμένη περιοχή Fc, μπορεί να ενισχύσει τη χυμική ανοσία μέσω ενεργοποίησης του συστήματος του συμπληρώματος (Lofano et al., 2018). Κάθε περιοχή Fab αποτελείται από τρεις περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας (Complementarity-determining regions, CDR-L1, CDR-L2 και CDR-L3 για V_L και CDR-H1, CDR-H2 και CDR-H3 για V_H) η αλλιώς υπερμεταβλητές περιοχές (Hypervariable loops, HVLs). Τα HVLs είναι υπεύθυνα για την ειδική σύνδεση στους επίτοπους των αντιγόνων. Οι παράτοποι βρίσκονται εντός των CDRs που αλληλεπιδρούν απευθείας με τους επίτοπους. Τα φυσικά αντισώματα, καθώς διαφοροποιούνται, είναι ικανά να προσαρμόζουν τις μεταβλητές περιοχές τους, αλλάζοντας έτσι το σχήμα τους για να μπορούν να συνδεθούν σε διαφορετικούς στόχους όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια και απτένια (Vidarsson et al., 2014).

ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ V(D)J

Ο ανασυνδυασμός των V(D)J είναι ένα κρίσιμος, ειδικευμένος μηχανισμός αναδιάταξης που συμβαίνει κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των λεμφοκυττάρων B και T. Αυτή η διαδικασία είναι καίρια για την συναρμολόγηση των πλήρων γονιδίων του αντιγονικού υποδοχέα, συμβάλλοντας στην ποικιλομορφία που συναντάται στις ανοσοσφαιρίνες και στους αντιγονικούς υποδοχείς των B και T-κυττάρων. Ο ανασυνδυασμός V(D)J διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία ενός ευρέως φάσματος αντιγονικών υποδοχέων (ανοσολογικό ρεπερτόριο).

Για μισό αιώνα, η διαπίστωση ότι τα B κύτταρα μπορούσαν να παράγουν αντισώματα ενάντια σε μια πληθώρα χημικών δομών, δημιούργησε ενδιαφέρον για την κατανόηση των μηχανισμών πίσω από αυτήν την ποικιλομορφία. Η απάντηση βρισκόταν στην συναρμολόγηση των μεταβλητών περιοχών, των εξονίων που κωδικοποιούν τα τμήματα δέσμευσης του αντιγονικού υποδοχέα, μέσω αναδιάταξης και επανένωσης χρωμοσωμάτων σε αναπτυσσόμενα λεμφοκύτταρα.

Η διαδικασία της αναδιάταξης V(D)J εκτυλίσσεται σε τρία στάδια: την ανίχνευση των σημείων αναδιάταξης, τη θραύση διπλής-έλικας DNA (Double-strand break, DSB), και τελικά, και αναδιάταξη των διακοπτόμενων αλληλουχιών DNA. Η έναρξη της αναδιάταξης V(D)J ξεκινά με την αναγνώριση των αλληλουχιών σηματοδότησης ανασυνδυασμού (RSSs) στα τμήματα των γονιδίων V, D, και J που εντοπίζονται από τις πρωτεΐνες του γονιδίου ενεργοποίησης ανασυνδυασμού 1 και 2 (Recombination activating gene 1 and 2, RAG1 and RAG2). Συγκεκριμένα, το RAG1 και το RAG2 σχηματίζουν ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που δημιουργεί DSBs σε συγκεκριμένες RSSs όπου βρίσκονται δίπλα σε κάθε τμήμα γονιδίου V, D, και J, ακολουθώντας τον κανόνα 12/23 που απαιτεί ένα τμήμα RSS 12 ζευγών βάσεων (base pair, bp) και ένα τμήμα RSS 23-bp ως προς αναδιάταξη. Το σύμπλεγμα RAG εφόσον έχει συνδεθεί με 12-RSS ή 23-RSS, ξεκινά τη μονόκλωνη εντομή στο σημείο σύνδεσης μεταξύ του κωδικοποιημένου τμήματος και του RSS. Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται με ακρίβεια, διασφαλίζοντας ότι το DNA έχει υποστεί εγκοπή στη σωστή θέση. Οι πρωτεΐνες υψηλής κινητικότητας της ομάδας B1 ή B2 (High mobility group box 1 or 2, HMGB1 or HMGB2) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία. Έχει αποδειχθεί ότι διεγείρουν τη δραστηριότητα του συμπλέγματος RAG στη δέσμευση του DNA, στη δημιουργία της μονόκλωνης εντομής, και στη δημιουργία φουρκετών (Chi et al., 2020).

Το σύμπλεγμα Artemis με τις καταλυτικές υπομονάδες εξαρτώμενες από DNA-πρωτεϊνικής κινάσης (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs),

συμμετέχει στο μονοπάτι της μη-ομόλογης τελικής σύνδεσης (Non-homologous end joining, NHEJ) για την επισκευή των DSBs, στη συνέχεια ανοίγει και επεξεργάζεται τις φουρκέτες στα κωδικά άκρα (Christie et al., 2022).

Μετά την επεξεργασία των φουρκετών, οι γενετικοί τόποι V, D, και J συνδέονται μεταξύ τους από το μηχανισμό της NHEJ, όπου συμμετέχουν συστατικά όπως τα Ku70/Ku80, DNA-PKcs, XRCC4, και DNA λιγάση IV (Watanabe et al., 2022).

Συνοψίζοντας, ο ανασυνδυασμός V(D)J είναι ένας περίπλοκος και αυστηρά ρυθμιζόμενος μηχανισμός που είναι ουσιαστικός για την παραγωγή της ευρείας ποικιλίας των υποδοχέων αντιγόνων που χρειάζονται για τις ισχυρές ανοσολογικές αποκρίσεις.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Τα μονοκλωνικά αντισώματα προέρχονται από ένα κλώνο Β λεμφοκυττάρων, που προσδένονται ειδικά σε ένα συγκεκριμένο και μοναδικό αντιγονικό καθοριστή. Από τις τεχνικές που αναπτύχθηκαν για την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων, η τεχνολογία των υβριδωμάτων είναι μία από τις σημαντικότερες και πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές. Η παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων πραγματοποιείται με την ανοσοποίηση του πειραματόζωου με το υπό μελέτη αντιγόνο. Μία μεμονωμένη δόση από τα περισσότερα πειραματικά ανοσογόνα δεν είναι ικανή να επάγει ισχυρή απόκριση. Συνήθως, απαιτείται επαναληπτική χορήγηση του αντιγόνου ανά διαστήματα μερικών εβδομάδων. Αυτές οι επαναληπτικές χορηγήσεις ενισχύουν τον κλωνικό πολλαπλασιασμό των αντιγόνο-ειδικών Β και Τ κυττάρων και έτσι ενισχύουν την ανάπτυξη ειδικών, για το ανοσογόνο, λεμφοκυτταρικών πληθυσμών. Ακολουθεί λήψη των ανοσοποιημένων σπληνικών λεμφοκυττάρων και σύντηξη με μυελωματικά κύτταρα, για το σχηματισμό υβριδωμάτων. Τα υβριδώματα διατηρούν την ικανότητα παραγωγής αντισωμάτων διότι τα Β κύτταρα παρέχουν τα γονίδια για παραγωγή αντισωμάτων έναντι του επιτόπου (μνήμη και ικανότητα σύνθεσης μονοκλωνικών αντισωμάτων) ενώ τα κύτταρα του μυελώματος παρέχουν στο υβρίδωμα τα γονίδια για συνεχή κυτταρική διαίρεση. Ο διαχωρισμός των υβριδωμάτων από τα μυελωματικά κύτταρα επιτυγχάνεται με την προσθήκη στο υλικό καλλιέργειας HAT (υποξανθίνη-αμινοπτερίνη-θυμιδίνη). Τα μυελωματικά κύτταρα δεν περιέχουν το γονίδιο υποξανθίνη – γουανίνη φωσφοριβοζυλοτρανσφεράση (Human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase, HGPRT) και δεν επιβιώνουν με την παρουσία του HAT ενώ τα υβριδώματα εφόσον κατέχουν το

γονίδιο HGRPT λόγω των Β-λεμφοκυττάρων παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο HAT και παράλληλα πολλαπλασιάζονται. Τα Β-λεμφοκύτταρα λόγω ανικανότητας πολλαπλασιασμού *in vitro*, μετά από λίγες μέρες. Ακολουθεί ο έλεγχος ειδικότητας των αντισωμάτων επιλέγονται τα θετικά υβριδώματα που εκκρίνουν τα επιθυμητά μονοκλωνικά αντισώματα και αποθηκεύονται ξεχωριστά οι θετικοί κλώνοι σε υγρό άζωτο για μελλοντική χρήση (Mitra et al., 2021).

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΝΙΚΟΤΙΝΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Το μονοκλωνικό αντίσωμα 12H2 mAb (IgG1, κ) δημιουργήθηκε με τη χρήση τεχνολογίας των υβριδωμάτων, κατόπιν, ανοσοποίησης θηλυκών ποντικών με τον υποδοχέα $\alpha_4\beta_2$. Επιπλέον, απομονώθηκε Fab του 12H2 mAb που έπαιξε κρίσιμο ρόλο στη διάκριση των υπομονάδων α από τις υπομονάδες β εντός του ψευδοσυμμετρικού πενταμερούς του $\alpha_4\beta_2$ νικοτινικού υποδοχέα, το οποίο ήταν το κλειδί για τις δομικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε αυτή την έρευνα. Η χρήση του Fab 12H2 συνέβαλε καθοριστικά στη λήψη υψηλής ανάλυσης της δομής των στοιχειομετριών του νικοτινικού υποδοχέα $\alpha_4\beta_2$, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τις βιοφυσικές και φαρμακολογικές ιδιότητες (Walsh et al., 2018).

Ο Noridomi και συν., χρησιμοποίησαν το μονοκλωνικό αντίσωμα mAb35, στη μελέτη των μοριακών μηχανισμών της Μυασθένειας Gravis. Παρουσιάστηκε, η κρυσταλλική δομή της εξωκυτταρικής περιοχής της μεταλλαγμένης υπομονάδας α_1 nAChR συνδεδεμένο με το Fab του mAb35 (Fab35). Η δομή αυτή, αποκάλυψε για πρώτη φορά τις λεπτομερείς μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντισωμάτων MG και του κεντρικού πόρου στην υπομονάδα α_1 . Επομένως, αυτές οι αλληλεπιδράσεις, δείχνουν έναν σημαντικό μηχανισμό πρόσδεσης στο nAChR, που η αναστολή του οδηγεί στην αντιμετώπιση της MG. Επιπλέον, η μοντελοποίηση του fab35 με α_1 παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη διασταυρούμενη σύνδεση των nAChR με τη μεσολάβηση αντισωμάτων, η οποία είναι γνωστό ότι προκαλεί την αποικοδόμηση του υποδοχέα. Η μελέτη αυτή δημιουργεί ενδιαφέρον για περαιτέρω βιολογικές μελέτες και ανάπτυξη θεραπειών για τη MG (Noridomi et al., 2017).

Επίσης, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει στη β_2 υπομονάδα nAChR (CHRN2) ως θεραπεία για τον καρκίνο του στομάχου.

Η μειωμένη έκφραση του γονιδίου CHRNΒ2 οδήγησε σε μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ η εξαναγκασμένη υπερέκφραση κατέληξε σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η εξουδετέρωση του γονιδίου CHRNΒ2 επηρέασε την επιβίωση των μεταστατικών καρκινικών κυττάρων και τις λειτουργίες. Διαπιστώθηκε ότι το CHRNΒ2 διαταράσσει τα μονοπάτια σηματοδότησης PI3K-AKT και JAK-STAT. Τα αντισώματα που εμποδίζουν την έκφραση του CHRNΒ2 θα μπορούσαν να προσφέρουν έναν πιθανό τρόπο διαχείρισης της μετάστασης στον καρκίνο του στομάχου (Kanda et al., 2021).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Σκοπός

Σκοπός της εργασίας αποτελεί ο χαρακτηρισμός της πρόσδεσης, σε τομές εγκεφάλου επίμυος, των IgG μονοκλωνικών αντισωμάτων mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 τα οποία προσδένονται στην εξωκυτταρική περιοχή των υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα $\alpha_4\beta_2$ της ακετυλοχολίνης. Τα μονοκλωνικά αντισώματα παρήχθησαν στο εργαστήριο Μοριακής Νευροβιολογίας και Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (Κουτρομπή, 2012) με ανοσοποίηση αρουραίων χρησιμοποιώντας το ανασυνδυασμένο συγκαταμερές $\beta_2\text{-}\alpha_4$. Το συγκαταμερές $\beta_2\text{-}\alpha_4$ είναι το εξωκυττάριο τμήμα των υπομονάδων α_4 και β_2 που είχε εκφραστεί από ζυμομύκητα συνδεδεμένο με ένα πεπτίδιο συνδέτη που ενώνει τις υπομονάδες α_4 και β_2

4.2 Συσκευές Και Υλικά

ΣΥΣΚΕΥΕΣ-ΟΡΓΑΝΑ
Επωαστικός Κλίβανος 37°C, 5% CO ₂ , New Brunswick Galaxy 48S
Φυγόκεντρος, Unicen 21
Υδατόλουτρο, Memmert
Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής, Telstar AV - 100

<i>Ψυχόμενη φυγόκεντρος, Rotina 420r</i>
<i>Φασματοφωτόμετρο, NanoDrop 2000c Spectrophotometer</i>
<i>Ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού, Olympus IX73</i>
<i>Ηλεκτρονικός ζυγός, Kern ew 2200 – 2nm</i>
<i>Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, Mini-Protean III BIORAD</i>
<i>Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη, Mini Trans-Blot BIORAD</i>
<i>Συνεστιακό μικροσκόπιο, Leica TCS SP8</i>
<i>Φωτόμετρο για πλάκες ELISA, Biorad Model 680 Microplate Reader</i>
<i>Μικροσκόπιο αναστροφής φάσης, CK OLYMPUS TOKYO</i>

Πίνακας 1. Συσκευές και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ
<i>Δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου μιας χρήσης των 15 και 50ml, Falcon</i>
<i>Περιέκτες – Φίλτρα φυγοκέντρωσης, Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit 100kDa cutoff</i>
<i>Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας 100/20 mm, GreinerBio-One</i>
<i>Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας 150/20 mm, Sarstedt</i>
<i>Φίλτρα μεμβράνης πολυαιθεροσουλφόνης 0,22 μμπροσαρμοζόμενα σε συριγγα, Minisart Syringe Filter, Polyethersulfone (PES), Pore Size 0.22 μm</i>
<i>Πλάκες μικροτιτλοδότησης πολυστερίνης των 96 θέσεων, Pierce Polystyrene Plates 96-well</i>
<i>Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, Hybond P, Amersham Biosciences</i>
<i>Διηθητικό χαρτί, Whatman 3MM</i>
<i>10% διάλυμα φορμαλίνης, Sigma-Aldrich</i>

Κρυοφιαλίδια 1 ml, Cryovials Nunc 1 ml

Πίνακας 2. Αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM)	Gibco
Fetal Bovine Serum (FBS, Ορός εμβρύου βοός)	Gibco
Penicillin/Streptomycin (P/S, Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη)	Gibco
Dimethyl sulfoxide (DMSO, Διμεθυλοσουλφοξειδίου)	Sigma
Hybridoma – Serum Free Medium (SFM, υλικό καλλιέργειας χωρίς ορό)	Gibco
-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Τετραμεθυλοβενζιδίνη)	Thermo Scientific
Horse radish peroxidase (HRP, υπεροξειδάση της ραπανίδος)	Dako
Bovine Serum Albumin (BSA, Βόειος Αλβουμίνη Ορού)	Applichem
Χρωστική Ponceau-S	Sigma
Peroxide Solution (H ₂ O ₂)	Pierce
Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Δείκτης αναφοράς μοριακών βαρών)	Thermo Scientific PageRuler
Protein Assay Dye (PAD, Αντιδραστήριο της Bradford)	Biorad
Poly-L-lysine solution (Διάλυμα πολυλυσίνης)	Sigma
Protease inhibitor cocktail (αναστολείς πρωτεασών)	Halt

Hoechst 33342 (φθορίζουσα χρωστική DNA)	Biotium
Antibody-isotype rat IgG (anti-rat/HRP IgG, αντι-ισοτυπικά αντισώματα αρουραίου IgG με υπεροξειδάση της ραπανίδος)	Dako
Antibody-isotype rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed (anti-rabbit IgG ALEXA 555, αντι-ισοτυπικά αντισώματα έναντι κουνελιού IgG με ALEXA 555)	Invitrogen
Antibody-isotype rat IgG (anti-rat IgG CF 555, αντι-ισοτυπικά αντισώματα έναντι αρουραίου IgG με CF 555)	Biotium
Antibody-isotype rat IgG (anti-rat IgG ALEXA 488, αντι-ισοτυπικά αντισώματα έναντι αρουραίου IgG με ALEXA 488)	Invitrogen
ChAT polyclonal antibody IgG (rabbit anti-ChAT IgG, πολυκλωνικό αντίσωμα IgG CHAT κουνελιού)	Invitrogen
Antibody-isotype rat IgG (anti-rat IgG CF 488, αντι-ισοτυπικά αντισώματα έναντι αρουραίου IgG με CF 488)	Biotium
Antibody-isotype mouse IgG (anti-mouse/HRP IgG, αντισώματα ποντικού IgG συζευγμένα HRP)	Sigma
Monoclonal ANTI-FLAG M2 antibody IgG (μονοκλωνικά αντισώματα επίμοσος IgG έναντι FLAG)	Sigma

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν

4.3 Πειραματική Μεθοδολογία

4.3.1 Καλλιέργεια Υβριδωμάτων (hybridoma cell culture)

Πορεία Διεξαγωγής

Στο θάλαμο νηματικής ροής εκτελείται η απόψυξη και η ανακαλλιέργεια των υβριδωμάτων που εκκρίνουν το κάθε είδος τριών εκ των μελετώμενων μονοκλωνικών αντισώματων mAbNR1, mAbNR2 και mAbNR4. Πραγματοποιήθηκε η μαζική καλλιέργεια των υβριδωμάτων για την παραγωγή αυξημένης ποσότητας μονοκλωνικών αντισώματων από κάθε είδος για τη χρησιμοποίησή τους στις πειραματικές μελέτες. Για την απομάκρυνση του DMSO προστέθηκε, σε κάθε είδος μονοκλωνικού αντισώματος, ποσότητα 10ml από το υλικό καλλιέργειας κυττάρων DMEM, εμπλουτισμένο με εμβρυϊκό

ορό βοός 10% (v/v), και διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (1% v/v), θερμοκρασίας 37°C. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο Unicen (1200 rpm, 6 λεπτά της ώρας) και τα υβριδώματα που συσσωρεύθηκαν στο ίζημα, επαναιωρήθηκαν και διαμοιράσθηκαν σε τρυβλία 100 mm \varnothing (10ml/τρυβλίο) τα οποία διατηρήθηκαν σε κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας (37°C, 5% CO₂). Η ανακαλλιέργεια υβριδωμάτων (split) πραγματοποιούνταν όταν τα υβριδώματα είχαν καλύψει το 60-90% των επιφανειών των τρυβλίων κατόπιν ελέγχου σε οπτικό μικροσκόπιο αντίστροφης φάσης (CK OLYMPUS TOKYO) προκειμένου να διαπιστωθεί και η παρουσία ζώντων κυττάρων. Για την παραγωγή αυξημένης ποσότητας εκάστου εκ των μονοκλωνικών αντισωμάτων τα υβριδικά κύτταρα ανακαλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 150 mm \varnothing . Την 10^η μέρα της καλλιέργειας των κυττάρων συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα των υβριδωμάτων mAbNR1, mAbNR2 και mAbNR4 κατόπιν φυγοκέντρησης (1200 rpm, 6 λεπτά της ώρας) στα οποία προστέθηκε 0,02% αζίδιο του νατρίου, (Na N₃) (αναστολέας ανάπτυξης μικροοργανισμών). Το υλικό κυτταροκαλλιέργειας των υβριδωμάτων που εκκρίνουν mAbNR2, αντικαταστάθηκε σταδιακά με υλικό Hybridoma με 1% P/S, χωρίς την προσθήκη FBS. Τη 19^η μέρα της καλλιέργειας συλλέχθηκε το υπερκείμενο, κατόπιν φυγοκέντρησης σε φυγόκεντρο Rotina (2500 rpm, 20 λεπτά της ώρας, 4°C) και στη συνέχεια προστέθηκε 0,02% αζίδιο του νατρίου. Τα άλλα δύο υπερκείμενα των υπό μελέτη μονοκλωνικών αντισωμάτων mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 υπήρχαν ήδη σε ικανές ποσότητες και δεν χρειάστηκε να εφαρμοστεί η μαζική καλλιέργεια αυτών καθώς και ο έλεγχος έκκρισης των μονοκλωνικών αντισωμάτων με τη μέθοδο ELISA.

4.3.2 Κρυοσυντήρηση Υβριδωμάτων (Ψύξη)

Πορεία Διεξαγωγής

Για τη κρυοσυντήρηση υβριδωμάτων απορρίφθηκε το υπερκείμενο της ανακαλλιέργειας των υβριδωμάτων (mAbNR1, mAbNR2 και mAbNR4), κατόπιν φυγοκέντρησης στις 1200 rpm, 6 λεπτά της ώρας. Το ληφθέν κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε υλικό κρυοσυντήρησης DMEM, στο οποίο προστέθηκε 10% DMSO, 10% FBS και 1% P/S και ακολούθως τα κύτταρα διανεμήθηκαν σε κρυοφιαλίδια των 1 ml (Nunc), τα οποία τοποθετήθηκαν πρώτα στους -80°C και κατόπιν παρέλευσης τριών ημερών μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο (-170°C).

4.3.3 Ανοσοενζυμική Μέθοδος (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

Πορεία Διεξαγωγής

Για να επιβεβαιωθεί η έκκριση των mAbs από τα αντίστοιχα υβριδώματα, ελήφθησαν τα υπερκείμενα από την καλλιέργεια των υβριδωμάτων mAbNR1, mAbNR2 και mAbNR4 ενώ ως ειδικά αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν οι ανασυνδυασμένες υπομονάδες εξωκυτταρικών περιοχών του nAChR από *Escherichia coli*, (εργαστήριο Μοριακής Νευροβιολογίας και Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ) με τις εξής συγκεντρώσεις:

- υπομονάδα α_4 (ΕΚΠ) 2,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,
- υπομονάδα α_5 (ΕΚΠ) 0,63 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,
- υπομονάδα β_2 (ΕΚΠ) 0,45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,
- υπομονάδα ϵ (ΕΚΠ) 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ nAChR.

Τα αντιγόνα αραιώθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού-διττανθρακικού νατρίου 0,05 M, pH 9,6 και προσκολλήθηκαν σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 φρεατίων (0,1 $\mu\text{g}/100$ $\mu\text{l}/\text{φρεάτιο}$). Οι επιστρωμένες με τα αντιγόνα πλάκες διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα, ακολούθησε το στάδιο έκπλυσης των φρεατίων (3 εκπλύσεις, 5 λεπτά της ώρας /έκπλυση) με διάλυμα έκπλυσης (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05% Tween-20, pH 8), 150 $\mu\text{l}/\text{φρεάτιο}$, και ακολούθησε η κάλυψη των ενεργών περιοχών των φρεατίων, οι οποίες δεν έχουν καλυφθεί με αντιγόνο, με διάλυμα κορεσμού (50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA pH 8), 100 $\mu\text{l}/\text{φρεάτιο}$ (1 ώρα επώαση, θερμοκρασία δωματίου). Ακολούθως προστέθηκαν σε δύο θέσεις εξέτασης (100 $\mu\text{l}/\text{φρεάτιο}$) έκαστο εκ των υπερκείμενων των κυττακαλλιεργειών των υβριδωμάτων mAbNR1, mAbNR2 και mAbNR4, τα οποία ελέγχθηκαν παράλληλα και σε αραιώσεις 1:5 και 1:25 σε διάλυμα αραιώσης (50mM Tris, 0,14M NaCl, 1% BSA, 0,05% Tween-20 pH 8). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε το στάδιο της επώασης (2 ώρες, θερμοκρασία δωματίου), έγιναν 3 εκπλύσεις για την απομάκρυνση των μη προσδεμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων και προστέθηκε διάλυμα αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων αρουραίου αντί IgG συζευγμένων με υπεροξειδάση της ραπανίδος (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{l}/\text{φρεάτιο}$). Μετά το πέρας της επώασης (1 ώρα, θερμοκρασία δωματίου) έγιναν τρεις εκπλύσεις όπως περιγράφηκε ανωτέρω για την απομάκρυνση των μη προσδεμένων αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων και προστέθηκε υπόστρωμα τετραμεθυλβενζιδίνη και με προσθήκη 0,02% H_2O_2 για την ανίχνευση της

ενζυμικής δράσης της HRP (100 μl/φρεάτιο). Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 1 M HCl (50μl/φρεάτιο). Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των προϊόντων της αντίδρασης έγινε στα 450 nm σε φασματοφωτόμετρο BioRad.

4.3.4 Συμπύκνωση Μονοκλωνικών Αντισωμάτων Με Κατακρήμιση Σε Θεικό Αμμώνιο **Πορεία Διεξαγωγής**

Η εξαλάτωση είναι μια μέθοδος απομόνωσης πρωτεϊνών που βασίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να καθιζάνουν όταν η ιοντική ισχύς του μέσου αυξάνεται. Σε έκαστο εκ των δύο υπερκειμένων κυτταροκαλλιέργειας που περιέχουν mAbNR1 και mAbNR2 προστίθεται στάγδην ποσότητα υπό συνεχή ανάδευση κορεσμένου διαλύματος θεικού αμμωνίου, ώστε το διάλυμα mAbNR1 και mAbNR2 να περιέχει τελική συγκέντρωση 45% v/v θεικού αμμωνίου και 50% v/v θεικού αμμωνίου αντίστοιχα. Τα τελικά διαλύματα διατηρούνται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή για 18 ώρες στους 4°C και υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση (3000 rpm στους 4°C, 20 λεπτά της ώρας). Ακολούθησε η απόρριψη του υπερκείμενου και το ίζημα που προέκυψε επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS μέχρι πλήρους διαύγασης του διαλύματος.

4.3.5 Συμπύκνωση Μονοκλωνικών Αντισωμάτων Με Φίλτρο Φυγοκέντρησης

Πορεία διεξαγωγής

Η συμπύκνωση και ο καθαρισμός του υπερκείμενου διαλύματος mAbNR2 πραγματοποιήθηκε με φίλτρο φυγοκέντρησης. Το προς συμπύκνωση διάλυμα mAbNR2 τοποθετήθηκε σε φίλτρο Amicon και φυγοκεντρήθηκε 7 φορές (4000 rpm, 10 λεπτά της ώρας, 4°C).

4.3.6 Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών Με Φασματοφωτομέτρηση

Πορεία Διεξαγωγής

Το mAbNR1 όσο και το mAbNR2 μετά την συμπύκνωση μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop. Εφαρμόστηκε η μέτρηση A280 για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των mAbs και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 280 nm. Η μέτρηση ανέδειξε τα παρακάτω αποτελέσματα:

- mAbNR1 c = 9,2 μg/μl
- mAbNR2 c = 1,1 μg/μl.

4.3.7 Δοκιμασία έμμεσου Ανοσοφθορισμού Σε Κύτταρα (Cell Based Assay, CBA)

Πορεία Διεξαγωγής

Για τη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκαν ακέραια και μονιμοποιημένα HEK293 και SH-SY5Y κύτταρα. Τα SH-SY5Y κύτταρα νευροβλαστώματος που εκφράζουν nAChRs νευρωνικού τύπου χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η σύνδεση των mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 σε αυτά. Ως αρνητικός έλεγχος επιλέχθηκαν τα HEK293, ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν nAChR νευρωνικού τύπου. Τα mAbs επώαστηκαν με μονιμοποιημένα κύτταρα. Η διαδικασία μονιμοποίησης πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Πραγματοποιήθηκε επικάλυψη πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 φρεατίων με πολυλυσίνη (50μl/φρεάτιο) τοποθετώντας την πλάκα στο θάλαμο νηματικής ροής για δύο ώρες πριν την επίστρωση των κυττάρων. Αυτό επιτρέπει στην πολυλυσίνη να προσροφηθεί στην επιφάνεια των φρεατίων και να σχηματίσει ένα λεπτό στρώμα. Η πολυλυσίνη δημιουργεί ένα θετικό φορτίο που με αυτό το τρόπο τα κύτταρα μπορούν να προσκολληθούν στον πυθμένα των φρεατίων. Ακολουθεί έκπλυση με απιονισμένο νερό για να απομακρυνθεί η περίσσεια της πολυλυσίνης. Τα επιστρωμένα κύτταρα HEK293 και SH-SY5Y αποκολληθήκαν από τον πυθμένα του τρυβλίου με την προσθήκη διαλύματος θρυψίνης 10% σε υλικό καλλιέργειας DMEM (1 ml έως 3 ml/τρυβλίο). Τα εναιωρήματα των κυττάρων SH-SY5Y και HEK293 φυγοκεντρήθηκαν (1200 rpm, 6 λεπτά της ώρας), επαναιωρήθηκαν σε υλικό καλλιέργειας DMEM, και διαμοιράστηκαν ($2,5 \times 10^4$ κύτταρα σε 100μl/φρεάτιο) στα επιστρωμένα με πολυλυσίνη φρεάτια (18 ώρες, 37°C, 5% CO₂). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν 3 εκπλύσεις με PBS (120μl/φρεάτιο, 5 λεπτά της ώρας/έκπλυση), ακολούθησε η μονιμοποίηση των κυττάρων με προσθήκη φορμαλίνης 10% (50μl/φρεάτιο) και η επώαση της πλάκας (10 λεπτά της ώρας, θερμοκρασία δωματίου). Μετά το πέρας της επώασης έγιναν 3 εκπλύσεις με PBS (5 λεπτά της ώρας /έκπλυση) και ακολούθησε η προσθήκη διαλύματος κορεσμού (PBS, 5% BSA) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων σύνδεσης. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η σύνδεση εκάστου εκ των mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 σε 2 φρεάτια (50μl/φρεάτιο) σε αραιώση 1:2 σε διάλυμα κορεσμού και ακολούθησε επώαση της πλάκα για δύο ώρες (θερμοκρασία δωματίου). Ακολούθησαν, τρεις διαδοχικές εκπλύσεις με PBS (5 λεπτά της ώρας /έκπλυση) για την απομάκρυνση της περίσσειας των

μονοκλωνικών αντισωμάτων που δεν συνδέθηκαν με τα κύτταρα. Στη συνέχεια προστέθηκε, (50 μl/φρεάτιο), διάλυμα αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων αρουραίου αντι-IgG (anti-rat IgG CF555, Biotium) σημασμένα με τη φθορίζουσα χρωστική κυανίνη (CF), ακολούθησε, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, 1 ώρα), και τέλος έκλυση των φρεατίων με PBS. Έτσι, ολοκληρώνεται η διαδικασία CBA, επιτρέποντας τον *in situ* εντοπισμό των α_4 και β_2 υπομονάδων nAChR εντός των μονιμοποιημένων κυττάρων σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού.

Επιπλέον, εξετάστηκαν η σύνδεση των mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 σε ακέραια κύτταρα HEK293, SY5Y και σε ζωντανά διαμολυσμένα HEK293 κύτταρα που εκφράζουν τους νικοτινικούς υποδοχείς μυϊκού τύπου.

4.3.8 Απομόνωση Ανασυνδυασμένων Πρωτεϊνών σε Διαμολυσμένα Ανθρώπινα Εμβρυικά Νεφρικά Κύτταρα (HEK293)

Πορεία Διεξαγωγής

Χρησιμοποιήθηκαν διαμολυσμένα κύτταρα HEK293 (εργαστήριο Νευροβιολογίας και Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτο Παστέρ) τα οποία είχαν διαμολυνθεί με τα εξής πλασμίδια:

1. α_3 – myc flag
2. α_4 – myc flag
3. β_2 – myc flag
4. β_4

Ο σκοπός της απομόνωσης των ανασυνδυασμένων α_3 , α_4 , β_2 και β_4 υπομονάδων nAChR από τα κύτταρα HEK293 είναι η χρησιμοποίησή τους στην μέθοδο ανοσοαποτύπωσης προκειμένου να ελεγχθεί η πρόσδεση των mAbs mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6.

Το myc flag είναι δύο ξεχωριστές πεπτιδικές ετικέτες (myc-tag, flag-tag) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό για την επισήμανση των πρωτεϊνών. Το myc προέρχεται από το ογκογονίδιο c-Myc, αντιθέτως το flag είναι τεχνητή πεπτιδική ετικέτα. Οι πεπτιδικές ετικέτες εισάγονται στο αμινοτελικό ή στο καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης με τη τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Οι πεπτιδικές ετικέτες ανιχνεύουν την έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με Western Blot.

Τα 3 είδη διαμολυσμένων κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν εκφράζουν συνδυαστικά τις εξής πρωτεΐνες:

- $\alpha_4\beta_4$
- $\alpha_4\beta_2$
- $\alpha_3\beta_2$

Για την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε αρχικά λύση των διαμολυσμένων κυττάρων HEK293 με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος λύσης κυττάρων (0,5% Δεοξυχολικό νάτριο, 150mM NaCl, 50mM Tris – HCl, 1% Triton) και 1% αναστολεων πρωτεασών (Halt Protease inhibitor cocktail). Έκαστο ίζημα εκ των διαμολυσμένων κυττάρων ($3,8 \times 10^7$ κύτταρα / $\alpha_3\beta_2$, $2,5 \times 10^7$ κύτταρα / $\alpha_4\beta_2$, $3,5 \times 10^7$ κύτταρα / $\alpha_4\beta_4$) επαναιωρήθηκε, σε 800 μl ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, στο οποίο προστέθηκε 1 μl διάλυμα αναστολέων πρωτεασών (ανάδευση, 30 λεπτά της ώρας, 4°C) και υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση (12000 rpm, 30 λεπτά της ώρας, 4°C). Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης ελήφθησαν τα υπερκείμενα, ελέγχθηκαν για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των εκφρασμένων ανασυνδυασμένων υπομονάδων nAChR και χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της πρόσδεσης των mAbs με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης.

4.3.9 Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών Με Φασματοφωτομέτρηση – Μέθοδος Bradford

Πορεία Διεξαγωγής

Ο προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford βασίζεται στη μετατόπιση της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G, όταν αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον, από τα 465 nm (χρώση κόκκινη απουσία πρωτεΐνης) στα 595 nm (χρώση μπλέ παρουσία πρωτεΐνης). Οι υδρόφοβες όσο και οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούν την ανιονική μορφή της χρωστικής, προκαλώντας μια ορατή αλλαγή χρώματος. Επιλέχθηκε η δοκιμασία Bradford διότι κατά την απομόνωση των πρωτεϊνών προστέθηκε μη ιονικό απορρυπαντικό (0,5% άλας Νατρίου Δεοξυχολικού οξέος, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 1% Triton).

Σε κάθε υπερκείμενο που ελήφθη από τη λύση των διαμολυσμένων κυττάρων, προστέθηκαν 200 μl χρωστικής (Protein Assay Dye, Biorad), 780 μl απεσταγμένο νερό και

16 ml ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων. Ακολούθησε η μέτρηση των απορροφήσεων (595 nm) στο Nanodrop και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς:

- $\alpha_4\beta_4$ c = 4,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- $\alpha_4\beta_2$ c = 3,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- $\alpha_3\beta_2$ c = 3,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

4.3.10 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών Σε Γέλη Πολυακρυλαμιδίου Παρουσία Θεϊκού Δωδεκυλικού Νατρίου (SDS-PAGE)

Πορεία Διεξαγωγής

Παρασκευάστηκαν οι γέλες διαχωρισμού και συσσώρευσης πολυακρυλαμιδίου όπως φαίνεται στους πίνακες 4, 5, 6 και 7. Μετά από 15 λεπτά της ώρας αφού είχε πολυμεριστεί το διάλυμα διαχωρισμού, προστέθηκαν τα διαλύματα συσσώρευσης όπως φαίνεται στους πίνακες 1, 2 και 3. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης παρασκευάστηκε με την προσθήκη 890 ml dH₂O, 10 ml 10% SDS και 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος (25 mM Tris-base, 200 mM γλυκίνη, 1% SDS, pH 8,5). Στα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση, προστέθηκαν 3 ml/δείγμα ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (45 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% γλυκερόλη, 1% SDS, 0,01% κυανούν βρωμοφαινόλης, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη) και θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά της ώρας. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η τάση ρεύματος με σταθερή ρύθμιση στη διάρκεια ηλεκτροφόρησης 120 Volts για 75 λεπτά της ώρας. Η ηλεκτροφόρηση, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Mini-Protean III της BIORAD.

Κατά την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE η οποία εκτελέστηκε προκειμένου να ανιχνευτεί η παρουσία των mAbNR1 και mAbNR2 μετά τη συμπύκνωση τους, φορτώθηκαν στη γέλη συσσώρευσης ποσότητες 2,5 μg και 5 μg του mAbNR1 και του mAbNR2. Η γέλη διαχωρισμού παρασκευάστηκε με 12% ακρυλαμίδιο (acrylamide). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η γέλη τοποθετήθηκε σε διάλυμα χρωστικής (0,1% Coomassie R-250, 40% μεθανόλη, 10% CH₃COOH) για 30 λεπτά της ώρας στους 37°C και ακολούθως, αποχρωματίστηκε με διάλυμα αποχρωματισμού (10% CH₃COOH, 40% μεθανόλη) για 1 ώρα (θερμοκρασία δωματίου), προκειμένου να αξιολογηθεί η απόδοση της συμπύκνωσης των αντισωμάτων.

Κατά την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE η οποία εκτελέσθηκε προκειμένου να ανιχνευτεί η πρόσδεση των mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 σε νευρωνικούς $\alpha_4\beta_2$ nAChRs υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση σε γέλη διαχωρισμού πολυακρυλαμιδίου 10%, το υπερκείμενο και το ίζημα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος εγκέφαλου επίμυος (εργαστήριο Νευροβιολογίας και Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur), υπό αναγωγικές συνθήκες. Ακολούθησε η μέθοδος Western blot και η ανοσοαποτύπωση.

Κατά την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE η οποία εκτελέσθηκε προκειμένου να ανιχνευτεί η παρουσία των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών nAChR ($\alpha_3\beta_2$, $\alpha_4\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$), που παρήχθησαν από την καλλιέργεια των διαμολυσμένων HEK293, τα ανωτέρω πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φορτώθηκαν σε γέλη διαχωρισμού πολυακρυλαμιδίου 8%. Ο δείκτης αναφοράς μοριακού βάρους 10-180 kDa που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας ThermoFisher.

Γέλη διαχωρισμού πολυακρυλαμιδίου 8% (10 ml)	Ποσότητες
Acrylamide 30 % w/v/Bis-acrylamide 0,8 %w/v	2,6 ml
ddH2O	4,6 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,6 ml
10 % SDS (sodium dodecyl sulfate, θειικό δωδεκυλικό νάτριο)	0,1 ml
10 % APS	0,1 ml
TEMED	0,01 ml

Πίνακας 4: Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού 8%

Γέλη διαχωρισμού πολυακρυλαμιδίου 10% (10 ml)	Ποσότητες
Acrylamide 30 % w/v/Bis-acrylamide 0,8 %w/v	3,4 ml
ddH2O	3,8 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,6 ml
10 % SDS	0,1 ml
10 % APS	0,1 ml
TEMED	0,01 ml

Πίνακας 5: Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού 10%

Γέλη διαχωρισμού πολυακρυλαμιδίου 12% (10 ml)	Ποσότητες
--	------------------

Acrylamide 30 % w/v/Bis-acrylamide 0,8 %w/v	4 ml
ddH ₂ O	3,2 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,6 ml
10 % SDS	0,1 ml
10 % APS	0,1 ml
TEMED	0,01 ml

Πίνακας 6: Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού 12%

<u>Γέλη συσσώρευσης πολυακρυλαμιδίου 3 % (10 ml)</u>	<u>Ποσότητες</u>
Acrylamide 30 % w/v/ Bis-acrylamide 0,8 %w/v	1,33 ml
ddH ₂ O	6,1 ml
0,5 M Tris-HCl pH 7,8	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml
10 % APS	0,1 ml
TEMED	0,01 ml

Πίνακας 7: Σύσταση πηκτώματος συσσώρευσης 3%

4.3.11 Ανοσοαποτύπωση Πρωτεϊνών (Immunoblotting)

Πορεία Διεξαγωγής

Η μέθοδος περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών από τη γέλη διαχωρισμού πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western Blot) και την ανίχνευση τους με τη χρησιμοποίηση ειδικών αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών και ακολούθως την προσθήκη αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων συζευγμένων με ένζυμο:

Συγκεκριμένα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετήθηκε πάνω στη γέλη διαχωρισμού και εμβαπτίστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 25 mM Tris-base, 200 mM γλυκίνη και 20% μεθανόλη, pH 8,5 (Towbin et al., 1979). Τα αντιγόνα μεταφέρθηκαν ηλεκτροφορητικά από τη γέλη SDS-πολυακρυλαμιδίου στο χαρτί νιτροκυτταρίνης όπως περιγράφεται από Towbin et al. Η μεταφορά πρωτεϊνών στη συσκευή πραγματοποιήθηκε με ένταση ρεύματος 300mA για 1 ώρα στους 4°C. Ακολούθησε, εμβάπτιση λωρίδας της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, σε διάλυμα χρωστικής Ponceau S (0,5% w/v Ponceau, 1% οξικό οξύ) για 10 λεπτά της ώρας, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η μεταφορά όλων των ζωνών πρωτεϊνών. Η χρωστική Ponceau S είναι αρνητικά φορτισμένη και συνδέεται με τις

πρωτεΐνες που έχουν φορτιστεί θετικά κατά τη μεταφορά τους στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Το υπόλοιπο τμήμα της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με διάλυμα κορεσμού (PBS, 5% BSA, 0,05% Tween-20) για 60 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου ή 18 ώρες στους 4°C, για την κάλυψη των μη ενεργών θέσεων της νιτροκυτταρίνης που πιθανόν να αντιδράσουν με άλλες πρωτεΐνες και τεμαχίστηκε σε λεπτές λωρίδες, οι οποίες επώαστηκαν με τα προς εξέταση mAbs (18 ώρες, 4°C). Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις (10 λεπτά της ώρας /έκπλυση) με διάλυμα έκπλυσης (PBS, 0,05% Tween-20) και στη κάθε λωρίδα προστέθηκαν 5 ml διαλύματος αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων (1:2000 σε διάλυμα κορεσμού) ως εξής:

Στις λωρίδες νιτροκυτταρίνης που είχαν επωασθεί με τα mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 προστέθηκαν αντι-ισοτυπικά πολυκλωνικά αντισώματα anti-rat IgG/HRP (0,5μg/ml).

Στη λωρίδα που είχε επωαστεί με το mAb anti-flag προστέθηκε διάλυμα αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων ποντικού IgG/HRP (0,5 μg/ml), ακολούθησε το στάδιο της επώασης (1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν τρεις εκπλύσεις με διάλυμα έκπλυσης (10 λεπτά της ώρας/έκπλυση) και ακολούθως, προστέθηκε (5 ml/λωρίδα) διάλυμα υποστρώματος DAB (0,03% DAB, 0,03% NiCl₂, 0,009% H₂O₂), για την ανίχνευση της ενζυμικής δράσης της HRP και την εμφάνιση των ζωνών πρωτεϊνών που αναγνωρίστηκαν από τα mAbs. Η αντίδραση σταμάτησε μετά από 10-15 λεπτά της ώρας με προσθήκη δισ-απεσταγμένου νερού.

Τα mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 ελέγχθηκαν και σε αραιώση 1:2 με διάλυμα κορεσμού PBS. Το mAb anti-flag χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:2000 σε διάλυμα κορεσμού για την ανίχνευση της πεπτιδικής ετικέτας Flag-tag.

4.3.12 Δοκιμασία Έμμεσου Ανοσοφθορισμού Σε Ιστό (Indirect Immunofluorescence)

Πορεία Διεξαγωγής

Οι εγκέφαλοι των επίμυων εμβαπτίσθηκαν αρχικά σε διάλυμα φορμαλδεΐδης για μονιμοποίηση των ιστών προκειμένου να διατηρηθεί η μορφολογική και οντογονική τους ακεραιότητα και ακολούθησε κρυοσυντήρηση αυτών (-80°C). Προκειμένου να χαρακτηριστεί η πρόσδεση των mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5, mAbNR6 με τη δοκιμασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού, οι εγκέφαλοι τοποθετήθηκαν σε

κρυοπροστατευτικό υλικό, OCT (LEICA) και πραγματοποιήθηκαν σειριακές τομές πάχους 20 mm σε κρυοστάτη LEICA. Ως θετικός μάρτυρας του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα anti-ChAT IgG κουνελιού. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον εντοπισμό της κυτταρικής χρώσης με την ανίχνευση του φθορισμού.

Για την εκτέλεση του πειράματος, οι ληφθείσες τομές εγκεφάλου αφού ακινητοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες, επώαστηκαν σε διάλυμα κιτρικού οξέος (10 mM κιτρικό οξύ, pH 6) για 30 λεπτά της ώρας στους 70°C για την απομάκρυνση της φορμαλδεΐδης, η οποία παρεμποδίζει τη σύνδεση των αντισωμάτων στους νευρώνες του εγκεφάλου. Ακολούθως, οι τομές εγκεφάλου εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα κορεσμού (PBS, 2-3% FBS, 0,3% Triton, 0,02% NaN₃) για 60 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, για την κάλυψη μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης. Τα mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6, χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:2 και τα πολυκλωνικά αντισώματα anti-ChAT IgG (12,1 μg/ml) σε αραιώση 1:100. Τα αντισώματα αραιώθηκαν σε διάλυμα κορεσμού. Οι τομές εγκεφάλου, επώαστηκαν με ένα εκ των μελετώμενων mAbs για 18 ώρες στους 4°C. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν 3 εκπλύσεις με PBS (10 λεπτά της ώρας /έκπλυση) για την απομάκρυνση των μη προσδεδμένων mAbs και στη συνέχεια, προστέθηκαν αντι-ισοτυπικά αντισώματα αραιωμένα σε διάλυμα κορεσμού με τις εξής αραιώσεις:

Στις τομές που επώαστηκαν με τα mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 προστέθηκε

- διάλυμα αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων anti-IgG αρουραίου συζευγμένων με CF 555 σε αραιωση 1:500 (4 μg/ml) και DNA χρώση HOECHST 33342 σε αραιωση 1:1000 (10 μg/ml).
- διάλυμα DNA χρώση hoechst 33342 σε αραιώση 1:1000 (10 μg/ml).

Στις τομές που επώαστηκαν με mAbNR1 και πολυκλωνικά αντισώματα anti-ChAT προστέθηκε

- διάλυμα αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων anti-IgG κουνελιού σε αραιώση 1:500 (4 μg/ml), σηματοδοτημένα με ALEXA 555,
- διάλυμα αντι-ισοτοπικών αντισωμάτων anti-IgG αρουραίου σε αραιώση 1:500 (4 μg/ml) σηματοδοτημένων με CF 488
- διάλυμα DNA χρώση hoechst 33342 σε αραιώση 1:1000 (10 μg/ml).

Οι τομές που επώαστηκαν με mAbs (mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6), ελέγχθηκαν επίσης με διάλυμα αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων IgG αρουραίου σε αραιώση 1:500 (4 µg/ml) συζευγμένα με τη φθορίζουσα ουσία ALEXA 488.

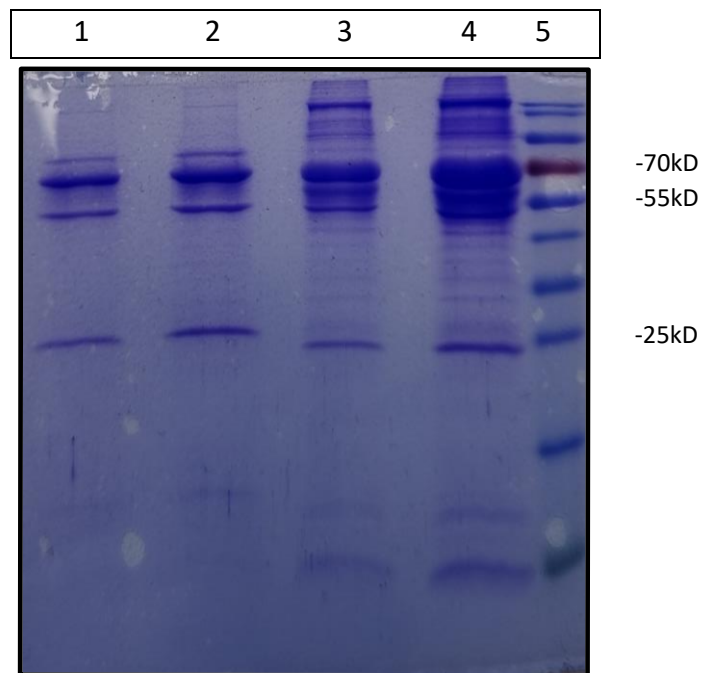
Ακολούθησε επώαση (2 ώρες, θερμοκρασία δωματίου), έκπλυση των πλακών με διάλυμα PBS (10 λεπτά της ώρας /έκπλυση x3), ενστάλαξη του μέσου έγκλισης Mowiol, επικάλυψη με καλυπτρίδες και διατήρηση των πλακών στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 μέρες, για να πραγματοποιηθεί η στερεοποίηση. Η παρατήρηση της φθορίζουσας ουσίας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ανεστραμμένης και συνεστιακής μικροσκοπίας.

4.4 Αποτελέσματα

4.4.1 Χαρακτηρισμός Πρόσδεσης Μονοκλωνικών Αντισωμάτων Έναντι Της ΕΚΠ Του Συγκαταμερές β₂-α₄ Σε Τομές Εγκεφάλου Επίµυος

4.4.1.1 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE mAbNR1 και mAbNR2 μετά από κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο

Μετά την καλλιέργεια υβριδωμάτων που εκκρίνουν τα μονοκλωνικά αντισώματα mAbNR1 και mAbNR2 συλλέχθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησε κατακρήμνιση των αντισωμάτων με θειικό αμμώνιο όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.3. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται τόσο ο μερικός καθαρισμός όσο και η αύξηση της συγκέντρωσης των αντισωμάτων. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 280 nm με συντελεστή μοριακής απόσβεσης ειδικό για τα IgG αντισώματα χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο (NanoDrop 2000c Spectrophotometer). Το εναιώρημα με το mAbNR1 είχε συγκέντρωση c = 9,2 µg/µl. Το εναιώρημα με το mAbNR2 μετά από την κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο, συμπυκνώθηκε περαιτέρω με φυγοκεντρικό φίλτρο και η τελική του συγκέντρωση ήταν c = 1,1 µg/µl. Μετά τη συμπύκνωση των mAbs, πραγματοποιήθηκε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και χρώση με Coomassie blue (ενότητα 4.3), ώστε να ελεγχθεί η παρουσία τόσο της ελαφριάς όσο και της βαριάς αλυσίδας αντισωμάτων, γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη και τον βαθμό καθαρισμού των mAbs. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5**, στη γέλη χρησιμοποιήθηκαν 2,5 µg και 5 µg mAbNR1 και mAbNR2 αντίστοιχα.



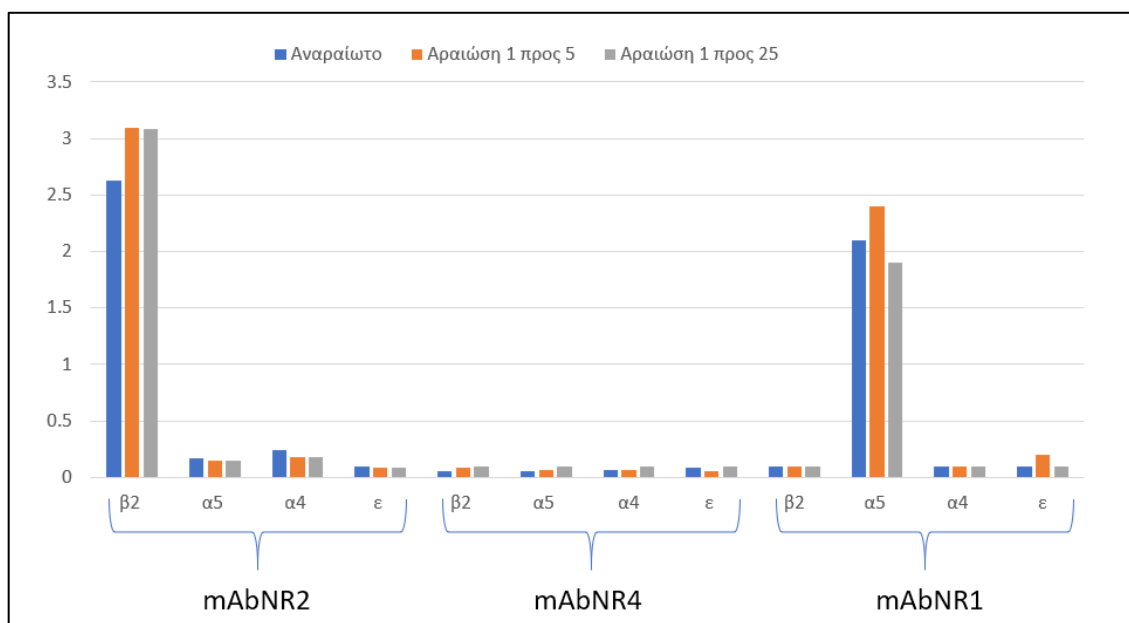
Εικόνα 5. SDS-PAGE Ηλεκτροφόρηση των mAbNR1 και mAbNR2 μιγμάτων μετά από καθαρισμό με θειικό αμμώνιο.

Στις θέσεις 1 και 2 τοποθετήθηκαν 2,5μg και 5μg mAbNR2, αντίστοιχα και στις θέσεις 3 και 4 mAbNR1. Στη θέση 5 φαίνεται μια σειρά έγχρωμων ζωνών που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους 15-180kD (δείκτης αναφοράς μοριακών βαρών) Σε όλα τα δείγματα φαίνονται ζώνες στα ~55kD (βαριά αλυσίδα) και στα ~25kD (ελαφριά αλυσίδα). Στα 70kD και άνω παρατηρήθηκαν ζώνες που οφείλονται στην παρουσία αλβουμίνης στο ελαιώρημα.

Η χρώση του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου αποκάλυψε τις κύριες ζώνες στα μοριακά βάρη ~55 και ~25kDa και ανήκουν στις βαριές και ελαφριές αλυσίδες των mAbNR1 και mAbNR2. Οι επιπλέον ζώνες οφείλονται στην παρουσία αλβουμίνης στο ελαιώρημα (**Εικόνα 5**). Ωστόσο, η αλβουμίνη δεν επηρεάζει τον χαρακτηρισμό πρόσδεσης mAbs σε περαιτέρω μελέτες.

4.4.1.2 Αποτελέσματα χαρακτηρισμού πρόσδεσης των mAbNR1, mAbNR2 και mAbNR4 σε εξωκυττάρια περιοχές των β_2 (ΕΚΠ), α_5 (ΕΚΠ), α_4 (ΕΚΠ) και ϵ (ΕΚΠ) nAChRs

Για να προσδιοριστεί η ειδικότητα πρόσδεσης των mAbNR1, mAbNR2 και mAbNR4, πραγματοποιήσαμε ανάλυση ELISA στα εναιωρήματα της κυτταροκαλλιέργειας που περιείχαν τα mAbNR1, mAbNR2 και mAbNR4. Η ανάλυση επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση της πρόσδεσης των mAbs στις εξωκυτταρικές περιοχές των υπομονάδων α_4 (ΕΚΠ), α_5 (ΕΚΠ), β_2 (ΕΚΠ) και ϵ (ΕΚΠ) χρησιμοποιώντας την μέθοδο ELISA (Ενότητα 4.3). Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης (**Εικόνα 6**) παρείχαν πληροφορίες σχετικές με την ειδικότητα πρόσδεσης των mAbs.



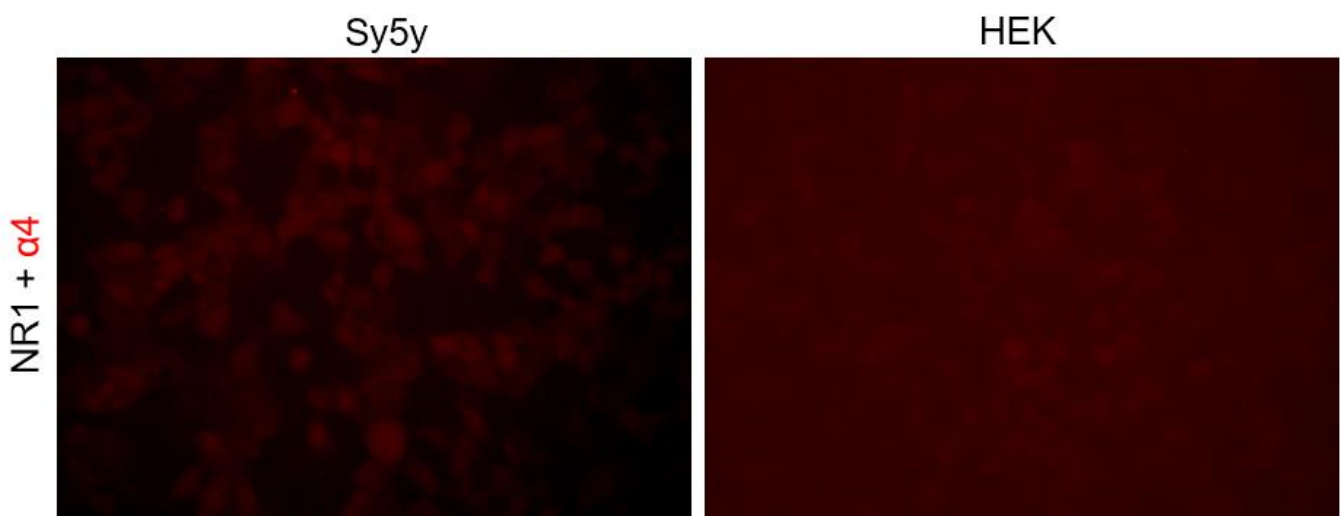
Εικόνα 6. Μέθοδος ELISA για χαρακτηρισμό πρόσδεσης mAbNR1, mAbNR2 και mAbNR4.

Τα mAbs χρησιμοποιήθηκαν αναραίωτα (μπλέ χρώμα), με αραιώση 1:5 (πορτοκαλί χρώμα) και 1:25 (γκρί χρώμα). Η υπομονάδα ϵ (ΕΚΠ) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Οι απορροφήσεις δείχνουν ότι το mAbNR1 προσδένεται με την υπομονάδα α_5 (ΕΚΠ) και στις 3 συγκεντρώσεις. Το mAbNR2 προσδένεται με την υπομονάδα β_2 (ΕΚΠ). Το mAbNR4 φαίνεται ότι δεν είναι ικανό να προσδεθεί με καμία από τις υπομονάδες.

Όπως έδειξαν οι μετρήσεις, (Εικόνα 6) το mAbNR2 προσδένει στη β_2 (ΕΚΠ) του nAChR, το mAbNR1 προσδένει στην α_5 (ΕΚΠ) του nAChR και όχι στην α_4 (ΕΚΠ) όπως περιμέναμε, αλλά αυτό εξηγείται διότι 1) στο συγκεκριμένο πείραμα, η ανασυνδυασμένη α_4 αποτελείται μόνο από ένα μέρος της ΕΚΠ και 2) Η α_5 (ΕΚΠ) έχει μεγάλη ομολογία με την α_4 (ΕΚΠ). Τέλος, το mAbNR4 δεν φαίνεται να προσδένει σε καμία από τις ΕΚΠ που χρησιμοποιήθηκαν.

4.4.1.3 Αποτελέσματα CBA: χαρακτηρισμός πρόσδεσης των mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 με τις υπομονάδες α_4 και β_2 nAChRs

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο εντοπισμός των υπομονάδων α_4 και β_2 nAChRs με

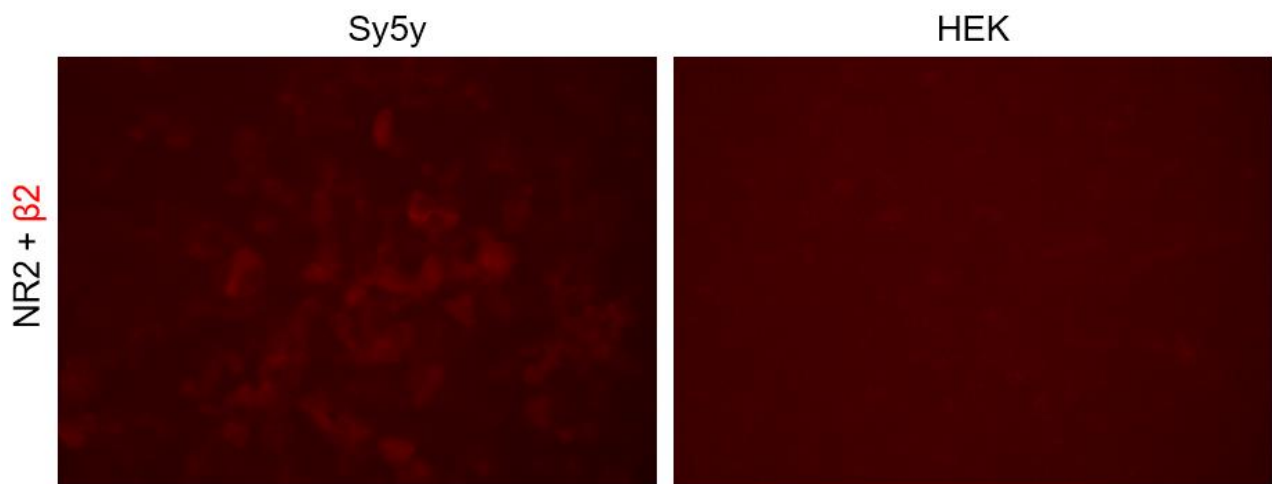


τη χρήση των mAbs (mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6). Τα mAbs χαρακτηρίστηκαν με τη δοκιμασία ανοσοφθορισμού σε ζωντανά (Live CBA) και μονιμοποιημένα κύτταρα (Fixed CBA) (Ενότητα 4.3). Στο Fixed CBA χρησιμοποιήθηκαν SH-SY5Y κύτταρα που εκφράζουν nAChRs νευρωνικού τύπου στην κυτταρική μεμβράνη και HEK293 κύτταρα για τον έλεγχο υποβάθρου (background).

Εικόνα 7. Εφαρμογή Fixed CBA σε κύτταρα SH-SY5Y και HEK293.

Τα κύτταρα SH-SY5Y και HEK293 επώαστηκαν με το mAbNR1. Με το anti-rat CF 555 (κόκκινη χρώση) σημαίνονται οι προσδέσεις των mAbNR1 με την υπομονάδα α_4 nAChR. Φαίνεται ότι το mAbNR1 προσδένεται στην υπομονάδα α_4 nAChR νευρωνικού τύπου στα SH-SY5Y κύτταρα και δεν προσδένεται στα κύτταρα HEK293. Οι φωτογραφίες πάρθηκαν σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού.

Χρησιμοποιώντας το εναιώρημα με το mAbNR1 στα μονιμοποιημένα κύτταρα SH-SY5Y και HEK293 εντοπίστηκε ομοιογενής τύπου φθορισμού στην κυτταρική μεμβράνη των

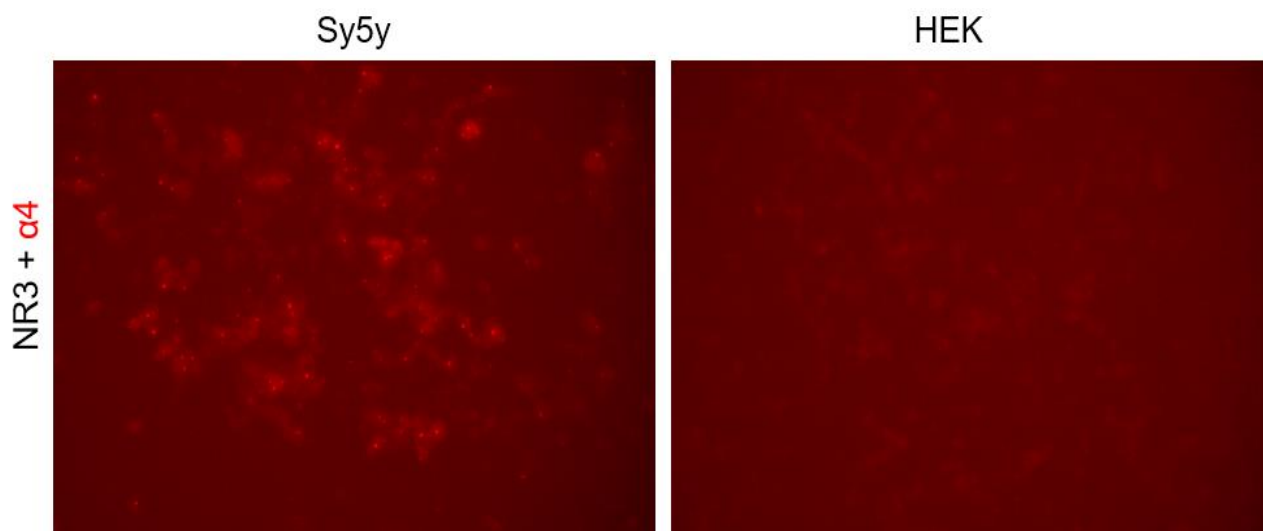


κυττάρων SH-SY5Y. Με βάση τα αποτελέσματα της ELISA και του Fixed CBA, το mAbNR1 προσδένεται στην υπομονάδα α_4 (**Εικόνα 7**).

Εικόνα 8. Εφαρμογή Fixed CBA σε κύτταρα SH-SY5Y και HEK293.

Τα κύτταρα SH-SY5Y και HEK293 επώαστηκαν με το mAbNR2. Με το anti-rat CF 555 (κόκκινη χρώση) σημαίνονται οι προσδέσεις των mAbNR2 με την υπομονάδα β_2 nAChR. Φαίνεται ότι το mAbNR2 προσδένεται στην υπομονάδα β_2 nAChR νευρωνικού τύπου στα SH-SY5Y κύτταρα και δεν προσδένεται στα κύτταρα HEK293.

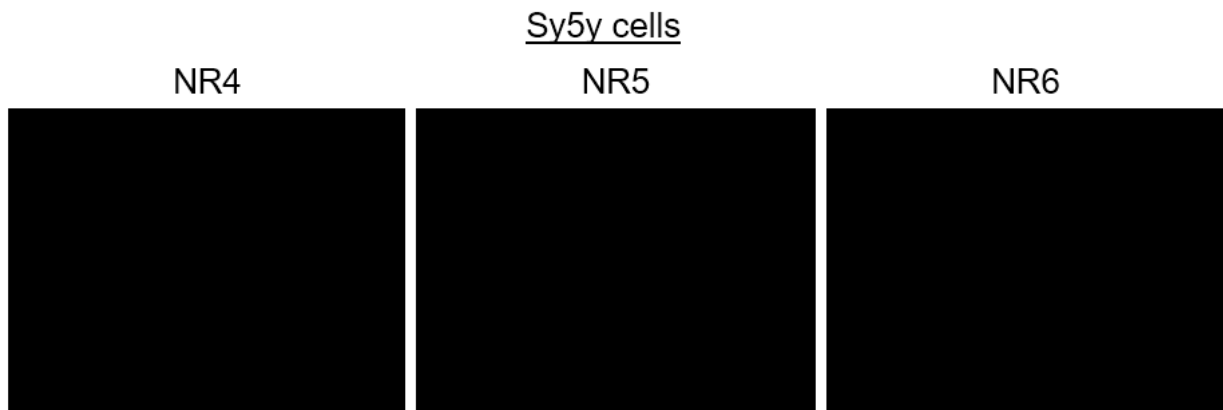
Χρησιμοποιώντας το εναιώρημα με το mAbNR2 στα μονιμοποιημένα κύτταρα SH-SY5Y και HEK293 εντοπίστηκε ομοιογενής στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων SH-SY5Y. Με βάση τα αποτελέσματα της ELISA και του Fixed CBA, το mAbNR2 φαίνεται να προσδένεται στην υπομονάδα β_2 (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 9. Εφαρμογή Fixed CBA σε κύτταρα SH-SY5Y και HEK293.

Τα κύτταρα SH-SY5Y και HEK293 επώαστηκαν με το mAbNR3. Με το anti-rat CF 555 (κόκκινη χρώση) σημαίνονται οι προσδέσεις των mAbNR1 με την υπομονάδα α_4 nAChR. Φαίνεται ότι το mAbNR3 προσδένεται στην υπομονάδα α_4 nAChR νευρωνικού τύπου στα SH-SY5Y κύτταρα και δεν προσδένεται στα κύτταρα HEK293.

Το mAbNR3 που χρησιμοποιήθηκε στα μονιμοποιημένα κύτταρα SH-SY5Y και HEK293 εντοπίστηκε σπικτός φθορισμός στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων SH-SY5Y (**Εικόνα 9**). Η ειδική πρόσδεση του mAbNR3 επιβεβαιώνεται περαιτέρω (ενότητα 4.4.1.4) με ανοσοαποτύπωση μετά από Western Blot.



Εικόνα 10. Εφαρμογή *Fixed CBA* σε κύτταρα SH-SY5Y.

Τα κύτταρα SH-SY5Y επώστηκαν με τα εναιωρήματα με τα mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6. Φαίνεται ότι τα mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 δεν προσδέονται στις υπομονάδα α_4 και β_2 nAChR.

Η χρήση των mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 σε μονιμοποιημένα κύτταρα SH-SY5Y δεν έδωσε θετικά αποτελέσματα, υποδεικνύοντας ότι τα αντισώματα αυτά δεν προσδέουν στις υπομονάδες α_4 ή β_2 (**Εικόνα 10**).

Προκειμένου να δείξουμε την ευαισθησία πρόσδεσης των mAbs (mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6) σε ατόφια αντιγόνα που ίσως να καταστρέφονται με την μονιμοποίηση των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν ζωντανά κύτταρα SH-SY5Y, HEK293 και HEK293 που εκφράζουν nAChRs μυϊκού τύπου. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ανοσοφθορισμού με ζωντανά κύτταρα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 11**.

Live CBA

	mAbNR1	mAbNR2	mAbNR3	mAbNR4	mAbNR5	mAbNR6
SY5Y	(+)	-	-	-	-	-

HEK293	(+)	-	-	-	-	-
HEK293+	(+)	-	-	-	-	-

Εικόνα 11. Εφαρμογή Live CBA.

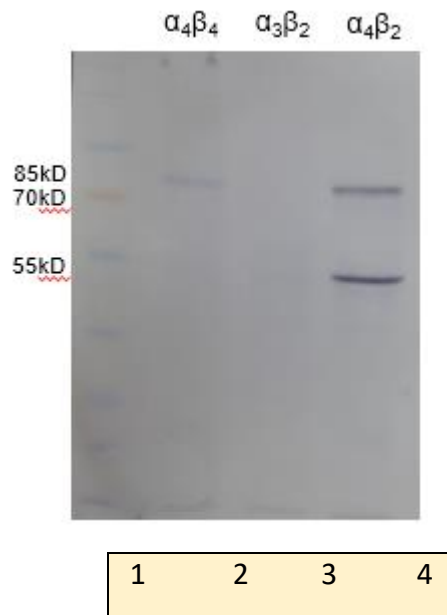
Τα κύτταρα επώστηκαν με τα mAbs (mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6). Με την ανάλυση φάνηκε ότι τα mAbs δεν προσδέονται σε ζωντανά κύτταρα και άρα είναι χαμηλής ειδικότητας.

(+) : στικτός φθορισμός

Οι υπομονάδες $\alpha_4\beta_2$ δεν εντοπίστηκαν από τα mAbs (mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6) στη μεμβράνη των ζωντανών κύτταρα SH-SY5Y, HEK293 και HEK293 που εκφράζουν nAChR μυϊκού τύπου. Υποδεικνύοντας ότι τα mAbs παρουσιάζουν χαμηλή ειδικότητα (**Εικόνα 11**).

4.4.1.4 Αποτελέσματα χαρακτηρισμού πρόσδεσης των mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, και mAbNR6 μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot

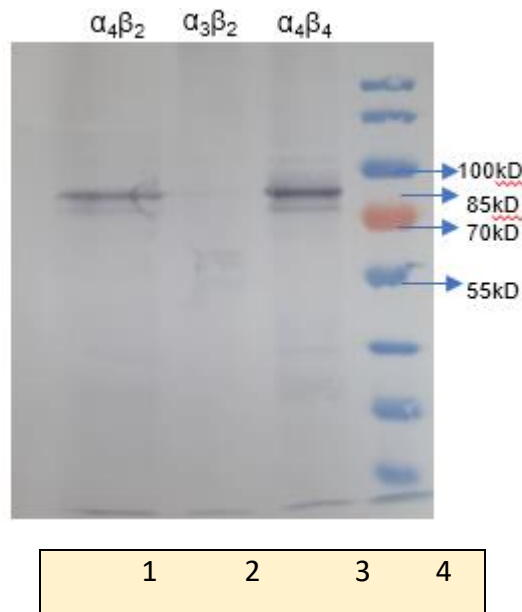
Στην παρούσα μελέτη, οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν από τα διαμολυσμένα κύτταρα HEK293 που εκφράζουν συνδιασμούς α_3 -myc-flag & β_2 -myc-flag, α_4 -myc-flag & β_2 -myc-flag και α_4 -myc-flag & β_4 nAChR. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες αυτές διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης με Western blot (Ενότητα 4.3). Στη συνέχεια, για να επιβεβαιωθεί η απομόνωση των α_3 -myc-flag & β_2 -myc-flag, α_4 -myc-flag & β_2 -myc-flag και α_4 -myc-flag & β_4 nAChR, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ανοσοαποτυπώθηκε με το mAb έναντι του πεπτιδίου flag. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης με $\alpha_3\beta_2$, $\alpha_4\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$ επώστηκαν ξεχωριστά με εναιωρήματα που περιέχουν mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6, προκειμένου να εντοπιστεί η ειδική πρόσδεση στις υπομονάδες α_4 και β_2 nAChRs.



Εικόνα 12. Ανοσοαποτύπωση με anti-flag των πρωτεϊνικών εκχέλισμάτων με τις υπομονάδες $\alpha_3\beta_2$, $\alpha_4\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$ nAChR από HEK293 σε μεμβράνη νικτροκυτταρίνης.

Στη θέση 2 έχει τοποθετηθεί το πρωτεϊνικό εκχέλισμα με τις υπομονάδες $\alpha_4\beta_4$ nAChR, στις θέσεις 3 και 4 οι $\alpha_3\beta_2$ και $\alpha_4\beta_2$, αντίστοιχα. Οι εμφανιζόμενες ζώνες δείχνουν ότι το anti-flag που χρησιμοποιήθηκε προσδένεται με την αντίστοιχη πρωτεΐνη-στόχο. Στη θέση 4 φαίνεται μια σειρά έγχρωμων ζωνών που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους 15-180 kDa (δείκτης αναφοράς μοριακών βαρών). Στις θέσεις 2 και 4 φαίνεται μία ζώνη στα ~85 kDa. Στη θέση 4 επίσης φαίνεται μια ζώνη στα ~55 kDa

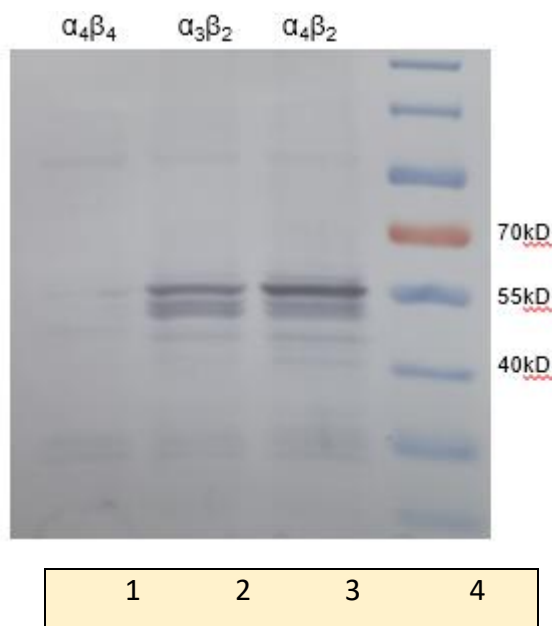
Τα αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης των υποδοχέων $\alpha_3\beta_2$, $\alpha_4\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$ με anti-flag έδειξαν ότι το anti-flag προσδένεται με την β_2 -myc-flag (μοριακό βάρος ~55 kDa) και με την α_4 -myc-flag (~85 kDa). Επιπλέον, το anti-flag δείχνει να μην είναι ικανό να προσδεθεί με την α_3 -myc-flag που προφανώς εκφράζεται σε πολύ μικρότερη ποσότητα. Η υπομονάδα α_4 nAChR που ανιχνεύεται με υψηλότερο μοριακό βάρος από το αναμενόμενο, είναι πιθανό να έχει υποστεί φωσφορυλίωση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του πραγματικού μοριακού της βάρους (**Εικόνα 12**).



Εικόνα 13. Ανοσοαποτύπωση με mAbNR1 των πρωτεϊνικών εκχειλισμάτων με τις υπομονάδες $\alpha_3\beta_2$, $\alpha_4\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$ nAChR από THEK293 σε μεμβράνη νικτροκυτταρίνης.

Στη θέση 1 έχει τοποθετηθεί το πρωτεϊνικό εκχέλισμα με τις υπομονάδες $\alpha_4\beta_2$ nAChR, στις θέσεις 2 και 3 $\alpha_3\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$ αντίστοιχα. Οι εμφανιζόμενες ζώνες δείχνουν ότι το mAbNR1 που χρησιμοποιήθηκε προσδένεται με την αντίστοιχη πρωτεΐνη-στόχο. Στη θέση 4 φαίνεται μια σειρά έγχρωμων ζωνών που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους 15-180 kDa (δείκτης αναφοράς μοριακών βαρών). Στις θέσεις 1 και 3 φαίνεται 1 ζώνη στα ~85 kDa.

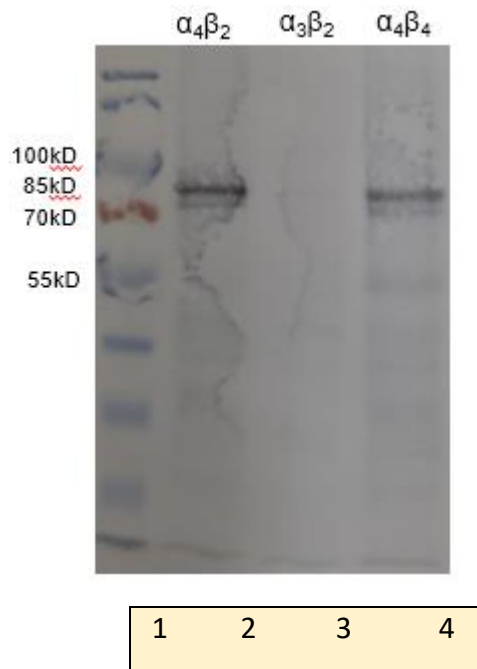
Τα ευρήματα από την ανάλυση ανοσοαποτύπωσης έδειξαν ότι το mAbNR1 δεσμεύει ειδικά την υπομονάδα α_4 nAChR, εφόσον εμφανίζει μία ζώνη στα 85 kDa, όπως και με το anti-flag (**Εικόνα 13**).



Εικόνα 14. Ανοσοαποτύπωση με mAbNR2 των πρωτεϊνικών εκχέλισμάτων με τις υπομονάδες $\alpha_3\beta_2$, $\alpha_4\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$ nA-ChR από THEK293 σε μεμβράνη νικτροκυτταρίνης.

Στη θέση 1 έχει τοποθετηθεί το πρωτεϊνικό εκχέλισμα με τις υπομονάδες $\alpha_4\beta_4$ nAChR, στις θέσεις 2 και 3 $\alpha_3\beta_2$ και $\alpha_4\beta_2$ αντίστοιχα. Οι εμφανιζόμενες ζώνες δείχνουν ότι το mAbNR2 που χρησιμοποιήθηκε προσδένεται με την αντίστοιχη πρωτεΐνη-στόχο. Στη θέση 4 φαίνεται μια σειρά έγχρωμων ζωνών που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους 15-180kDa (δείκτης αναφοράς μοριακών βαρών). Στις θέσεις 2 και 3 φαίνεται 1 ζώνη στα ~55kDa.

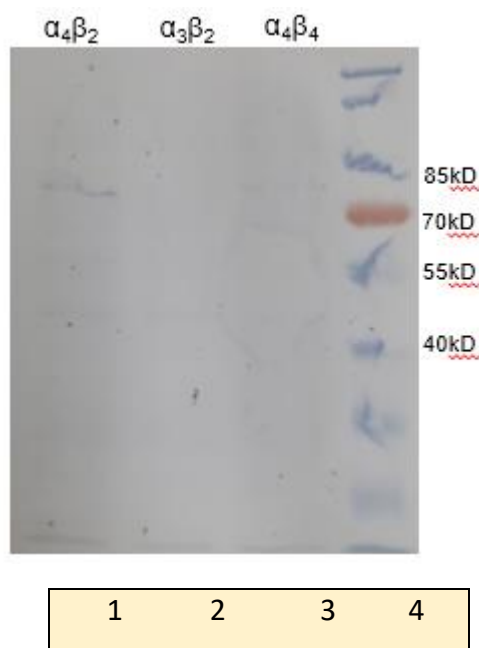
Τα ευρήματα από την ανάλυση ανοσοαποτύπωσης έδειξαν ότι το mAbNR2 δεσμεύει ειδικά την υπομονάδα β_2 nAChR, εφόσον εμφανίζει μία ζώνη στα 55kDa όπως και με το anti-flag (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 15. Ανοσοαποτύπωση με mAbNR3 των πρωτεϊνικών εκχέλισμάτων με τις υπομονάδες $\alpha_3\beta_2$, $\alpha_4\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$ nA-ChR από THEK293 σε μεμβράνη νικτροκυτταρίνης.

Στη θέση 2 έχει τοποθετηθεί το πρωτεϊνικό εκχέλισμα με τις υπομονάδες $\alpha_4\beta_2$ nAChR, στις θέσεις 3 και 4 $\alpha_3\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$ αντίστοιχα. Οι εμφανιζόμενες ζώνες δείχνουν ότι το mAbNR3 που χρησιμοποιήθηκε προσδένεται με την αντίστοιχη πρωτεΐνη-στόχο. Στη θέση 1 φαίνεται μια σειρά έγχρωμων ζωνών που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους 15-180 kDa (δείκτης αναφοράς μοριακών βαρών). Στις θέσεις 2 και 4 φαίνεται 1 ζώνη στα ~85 kDa.

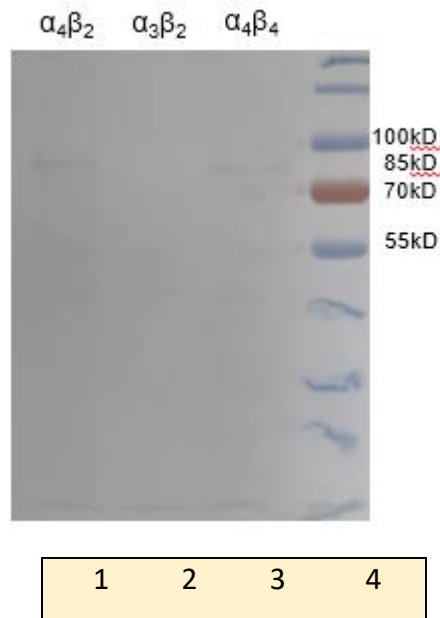
Το πόρισμα της ανοσοαποτύπωσης με mAbNR3 έδειξε ότι δεσμεύεται ειδικά στην υπομονάδα α_4 nAChR, όπως δείχνει σε σύγκριση με το anti-flag από την παρουσία μιας μοριακής ζώνης στα 85kDa περίπου (**Εικόνα 15**).



Εικόνα 16. Ανοσοαποτύπωση με mAbNR4 των πρωτεϊνικών εκχειλισμάτων με τις υπομονάδες $\alpha_3\beta_2$, $\alpha_4\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$ nAChR από THEK293 σε μεμβράνη νικτροκυτταρίνης.

Στη θέση 1 έχει τοποθετηθεί το πρωτεϊνικό εκχέλισμα με τις υπομονάδες $\alpha_4\beta_2$ nAChR, στις θέσεις 2 και 3 $\alpha_3\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$ αντίστοιχα. Οι εμφανιζόμενες ζώνες δείχνουν ότι το mAbNR4 που χρησιμοποιήθηκε προσδένεται με την αντίστοιχη πρωτεΐνη-στόχο. Στη θέση 4 φαίνεται μια σειρά έγχρωμων ζωνών που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους 15-180 kDa (δείκτης αναφοράς μοριακών βαρών). Στις θέσεις 1 και 3 φαίνεται αραιά 1 ζώνη στα ~85 kDa.

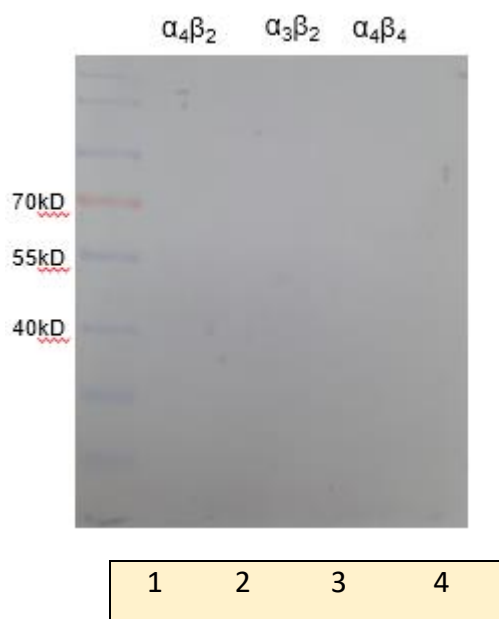
Το mAbNR4 προσδένεται ειδικά στην υπομονάδα α_4 nAChR, όπως δείχνει σε σύγκριση με το anti-flag από την παρουσία μιας μοριακής ζώνης στα 85 kDa περίπου (**Εικόνα 16**).



Εικόνα 17. Ανοσοαποτύπωση με mAbNR5 των πρωτεϊνικών εκχειλισμάτων με τις υπομονάδες $\alpha_3\beta_2$, $\alpha_4\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$ nAChR από THEK293 σε μεμβράνη νικτροκυταρίνης.

Στη θέση 1 έχει τοποθετηθεί το πρωτεϊνικό εκχείλισμα με τις υπομονάδες $\alpha_4\beta_2$ nAChR, στις θέσεις 2 και 3 αντίστοιχα $\alpha_3\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$. Οι εμφανιζόμενες ζώνες δείχνουν ότι το mAbNR5 που χρησιμοποιήθηκε προσδέεται με την αντίστοιχη πρωτεΐνη-στόχο. Στη θέση 4 φαίνεται μια σειρά έγχρωμων ζωνών που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους 15-180 kDa (δείκτης αναφοράς μοριακών βαρών). Στις θέσεις 1 και 3 φαίνεται 1 ζώνη στα ~85 kDa.

Το mAbNR5 προσδέεται ειδικά στην υπομονάδα α_4 nAChR, όπως δείχνει σε σύγκριση με το anti-flag από την παρουσία μιας μοριακής ζώνης στα 85 kDa περίπου (**Εικόνα 17**).

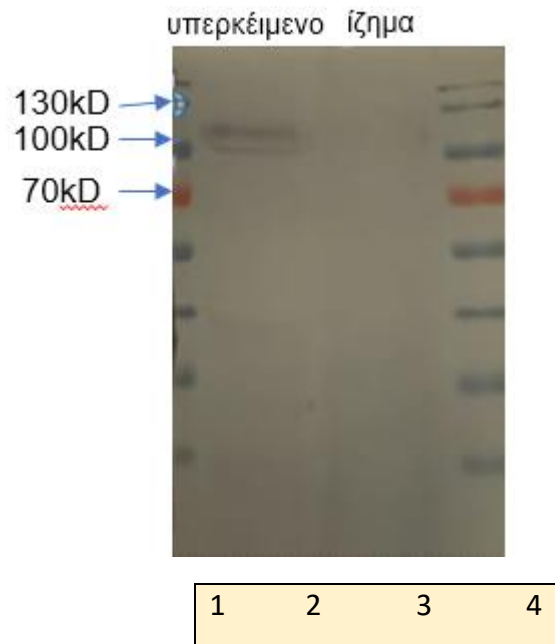


Εικόνα 18. Ανοσοαποτύπωση με mAbNR6 των πρωτεϊνικών εκχελισμάτων με τις υπομονάδες $\alpha_3\beta_2$, $\alpha_4\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$ nAChR από THEK293 σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Στη θέση 2 έχει τοποθετηθεί το πρωτεϊνικό εκχέλισμα με τις υπομονάδες $\alpha_4\beta_2$ nAChR, στις θέσεις 3 και 4 $\alpha_3\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$ αντίστοιχα. Στη θέση 4 φαίνεται μια σειρά έγχρωμων ζωνών που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους 15-180 kDa (δείκτης αναφοράς μοριακών βαρών). Στις θέσεις 2, 3 και 4 δεν παρουσιάζουν κάποια ζώνη πρόσδεσης

Αντιθέτως, τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης με την mAbNR6 έδειξαν έλλειψη ειδικής σύνδεσης στις υπομονάδες με συνδιασμούς $\alpha_3\beta_2$, $\alpha_4\beta_2$ και $\alpha_4\beta_4$ nAChR (**Εικόνα 18**).

Διεξήχθη πείραμα για τον έλεγχο της πρόσδεσης του mAbNR1 με το υπερκείμενο και το ίζημα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος εγκεφάλου επίμυος με ανοσοαποτύπωση (Ενότητα 4.3). Οι πρωτεΐνες από τα εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με το mAbNR1. Τα αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης παρουσιάζονται στην **Εικόνα 19**.



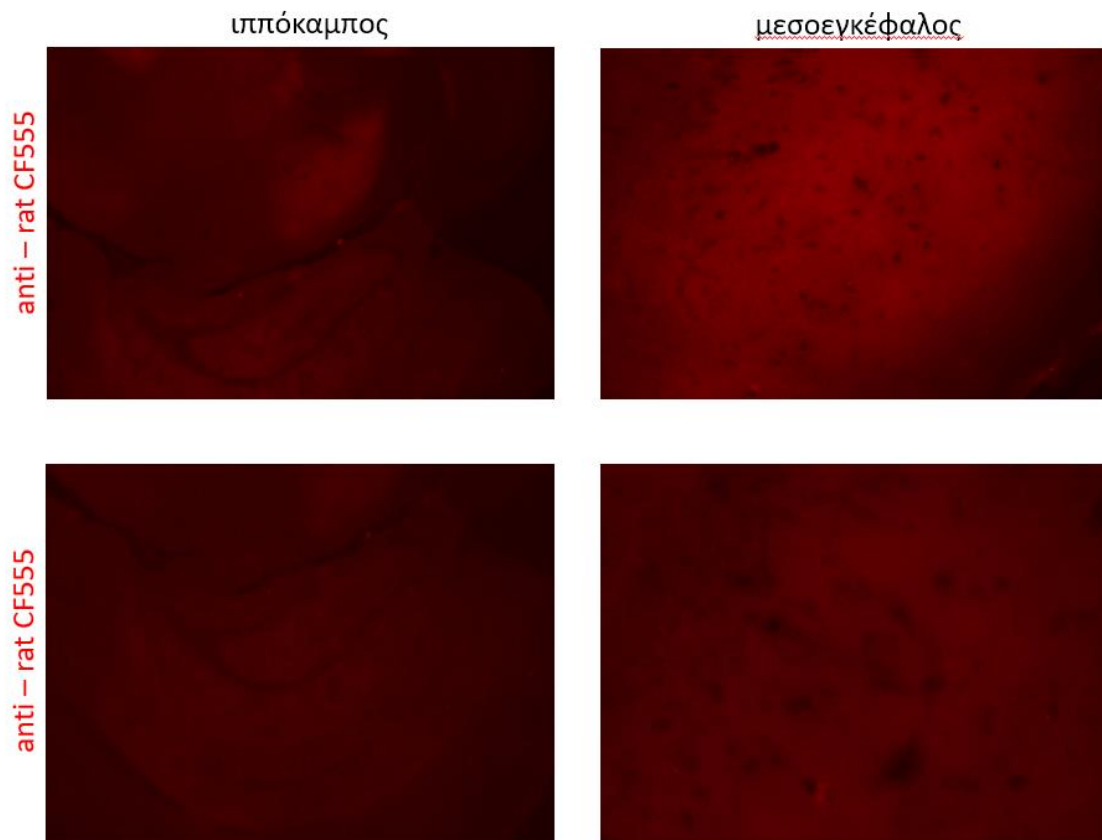
Εικόνα 19. Ανοσοαποτύπωση με mAbNR1 του υπερκείμενου και ιζήματος πρωτεϊνικού εκχειλίσματος εγκεφάλου επίμυος.

Στις θέσεις 2 και 3 έχει τοποθετηθεί αντίστοιχα το υπερκείμενο και το ιζημα του πρωτεϊνικού εκχειλίσματος. Οι εμφανιζόμενες ζώνες υποδεικνύουν ότι το mAbNR1 προσδένεται με την αντίστοιχη πρωτεΐνη-στόχο. Στη θέσεις 1 και 4 φαίνονται δύο σειρές έγχρωμων ζωνών που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους 15-180 kDa (δείκτης αναφοράς μοριακών βαρών). Στη θέση 2 φαίνονται 2 ζώνες περίπου στα 100-110 kDa.

Στο πείραμα αξιολογήθηκε η ειδικότητα πρόσδεσης του mAbNR1 στο υπερκείμενο και στο ιζημα του πρωτεϊνικού εκχειλίσματος που προέρχεται από τον εγκεφαλο επίμυος. Κατά την ανάλυση της ανοσοαποτύπωσης με mAbNR1, παρατηρήθηκε ειδική πρόσδεση σε μοριακό βάρος περίπου 100 kDa (**Εικόνα 19**).

4.4.2 Αποτελέσματα Χαρακτηρισμού Πρόσδεσης Των mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 ΚΑΙ mAbNR6 Σε Ιστούς Εγκεφάλου Επίμυος

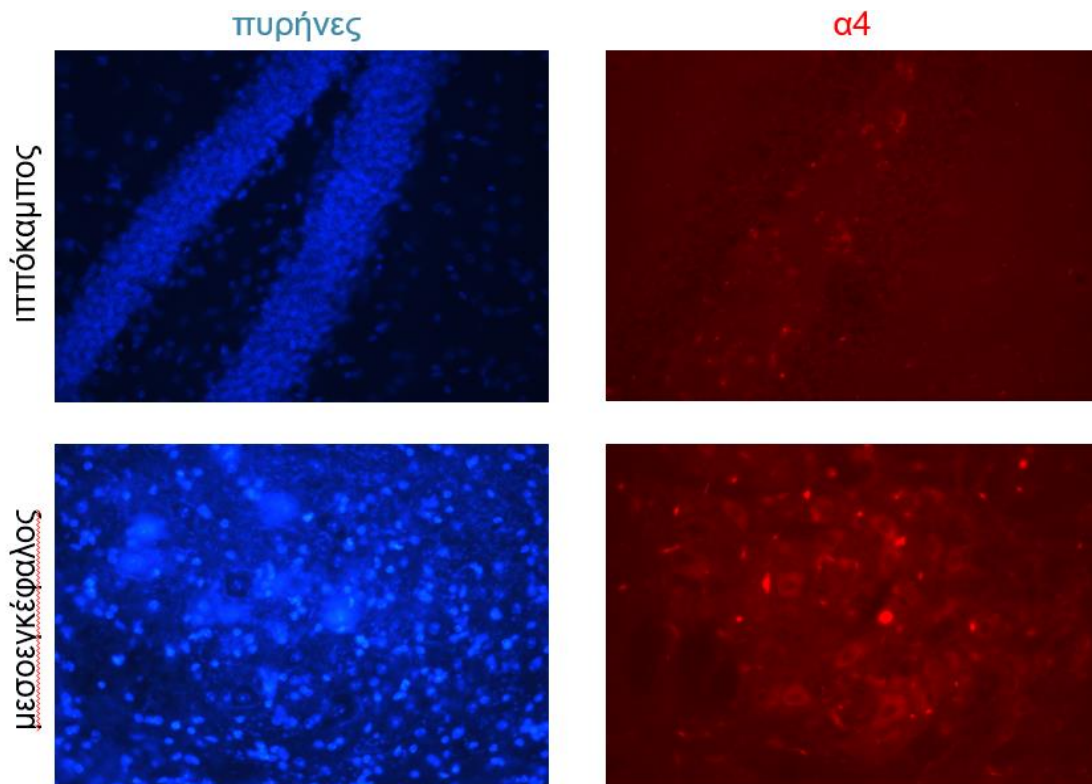
Χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία έμμεσου ανοσοφθορισμού που περιγράφεται στην ενότητα 4.3 για τον εντοπισμό των υπομονάδων α_4 και β_2 nAChRs σε ιστούς εγκεφάλου επίμυος άγριου τύπου με τη χρήση μιας ομάδας mAbs που περιλαμβάνει το mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και το mAbNR6.



Εικόνα 20. Αποτελέσματα εφαρμογής δοκιμασίας έμμεσου ανοσοφθορισμού σε τομές εγκεφάλου επίμυος.

Οι ιστοί εγκεφάλου επίμυος επώαστηκαν με αντισώματα έναντι αρουραίου IgG σηματοδοτημένο με CF 555 (κόκκινη χρώση). Όπως ήταν αναμενόμενο, δεν εμφανίστηκε σήμα πρόσδεσης σε καμία περιοχή του εγκεφάλου. Οι φωτογραφίες πάρθηκαν από ανεστραμμένο μικροσκόπιο.

Οι τομές επώαστηκαν μόνο με αντισώματα έναντι αρουραίου IgG σηματοδοτημένου με CF 555. Δεν παρουσιάστηκε σήμα φθορισμού όπως αναμενόταν από έναν αρνητικό μάρτυρα. Πιθανό σήμα υποβάθρου θα συγκρινόταν στη συνέχεια με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα mAbs (**Εικόνα 20**).

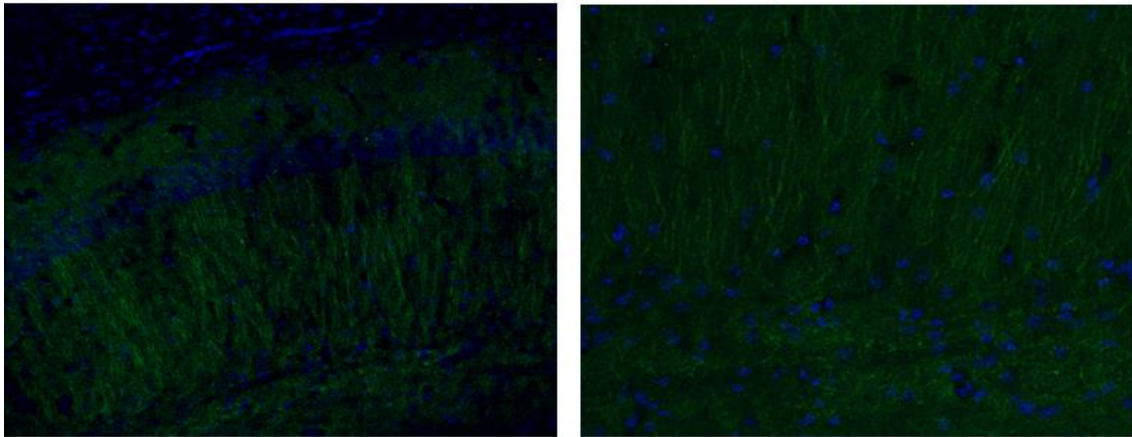


Εικόνα 21. Πρόσδεση mAbNR1 σε τομές εγκεφάλου επίμυος.

Η πρόσδεση του mAbNR1 σε ιστούς εγκεφάλου επίμυος φαίνεται με κόκκινη χρώση, ενώ με μπλε χρώση φαίνονται οι πυρήνες (Hoechst). Αριστερά παρουσιάζονται οι πυρήνες νευρώνων και δεξιά προβάλλεται η πρόσδεση του mAbNR1 στα σώματα των νευρώνων. Παρατηρήθηκε ισχυρή πρόσδεση στο σώμα των νευρώνων στο μεσοεγκέφαλο και κάποια πρόσδεση στον ιππόκαμπο.

Παρατηρήθηκε ότι το mAbNR1 δεσμεύεται ισχυρά στο σώμα των νευρώνων που βρίσκονται στο Μεσοεγκέφαλο και λιγότερα στον Ιππόκαμπο (Εικόνα 21).

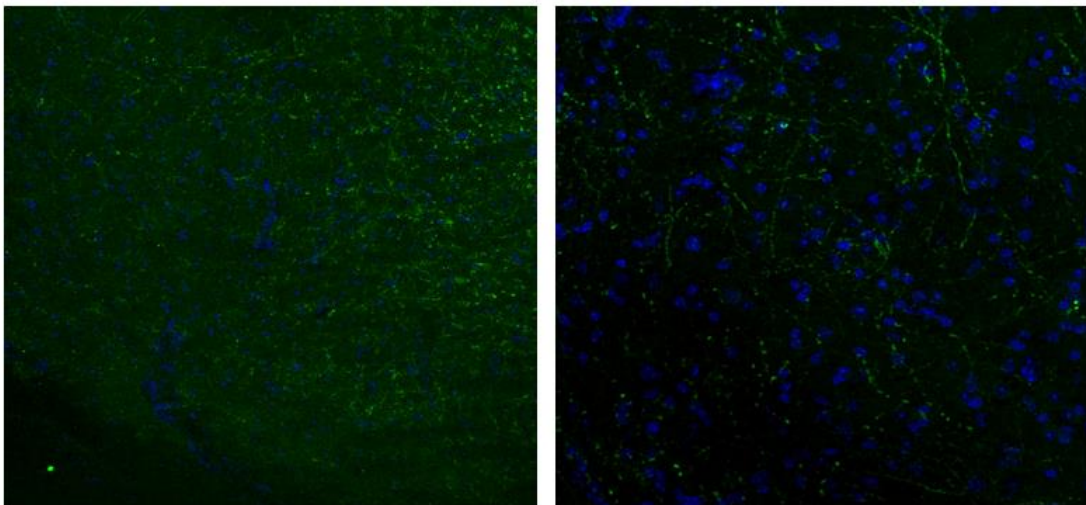
β₂ + Πυρήνες



Εικόνα 22. Πρόσδεση mAbNR2 σε τομές εγκεφάλου επίμυος.

Οι τομές εγκεφάλου επίμυος επώαστηκαν με mAbNR2, με το anti-rat ALEXA 488 (πράσινη χρώση) σημαίνονται οι προσδέσεις των mAbNR2 με την υπομονάδα β₂ nAChR ενώ με μπλε χρώση φαίνονται οι πυρήνες. Παρατηρήθηκε σύνδεση στους δενδρίτες των νευρώνων στον Ιππόκαμπο. Οι φωτογραφίες πάρθηκαν από τη συνεστιακή μικροσκοπία.

β₂ + Πυρήνες



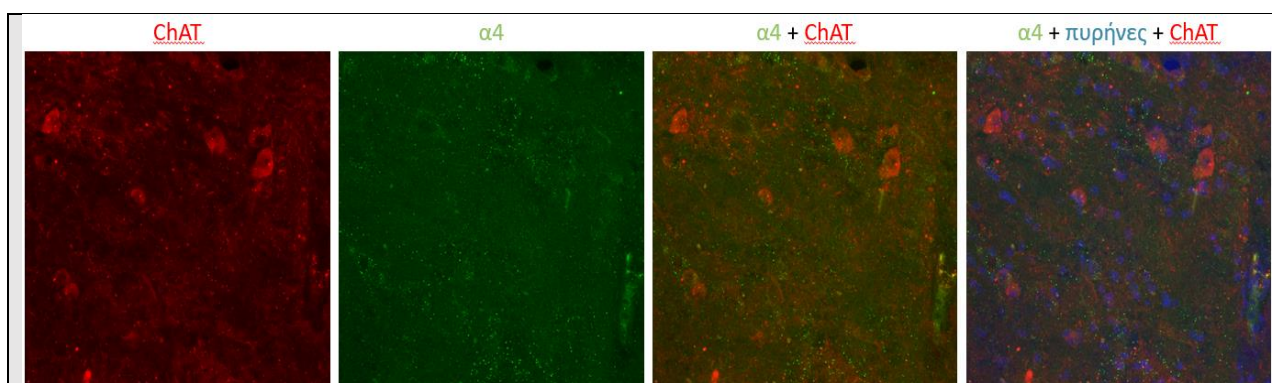
Εικόνα 23. Πρόσδεση mAbNR2 σε τομές εγκεφάλου επίμυος.

Η πρόσδεση του mAbNR2 σε ιστούς εγκεφάλου επίμυος φαίνεται με πράσινη χρώση, ενώ με μπλε χρώση φαίνονται οι πυρήνες. Παρατηρήθηκε σύνδεση στους δενδρίτες των νευρώνων στην Μέλαινα ουσία.

Η επώαση του mAbNR2 με τομές εγκεφάλου επίμυος έδειξε ότι η υπομονάδα β₂ του nAChR βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα στους δενδρίτες των νευρώνων στον Ιππόκαμπο (Εικόνα 22) και στη Μέλαινα Ουσία (Εικόνα 23).

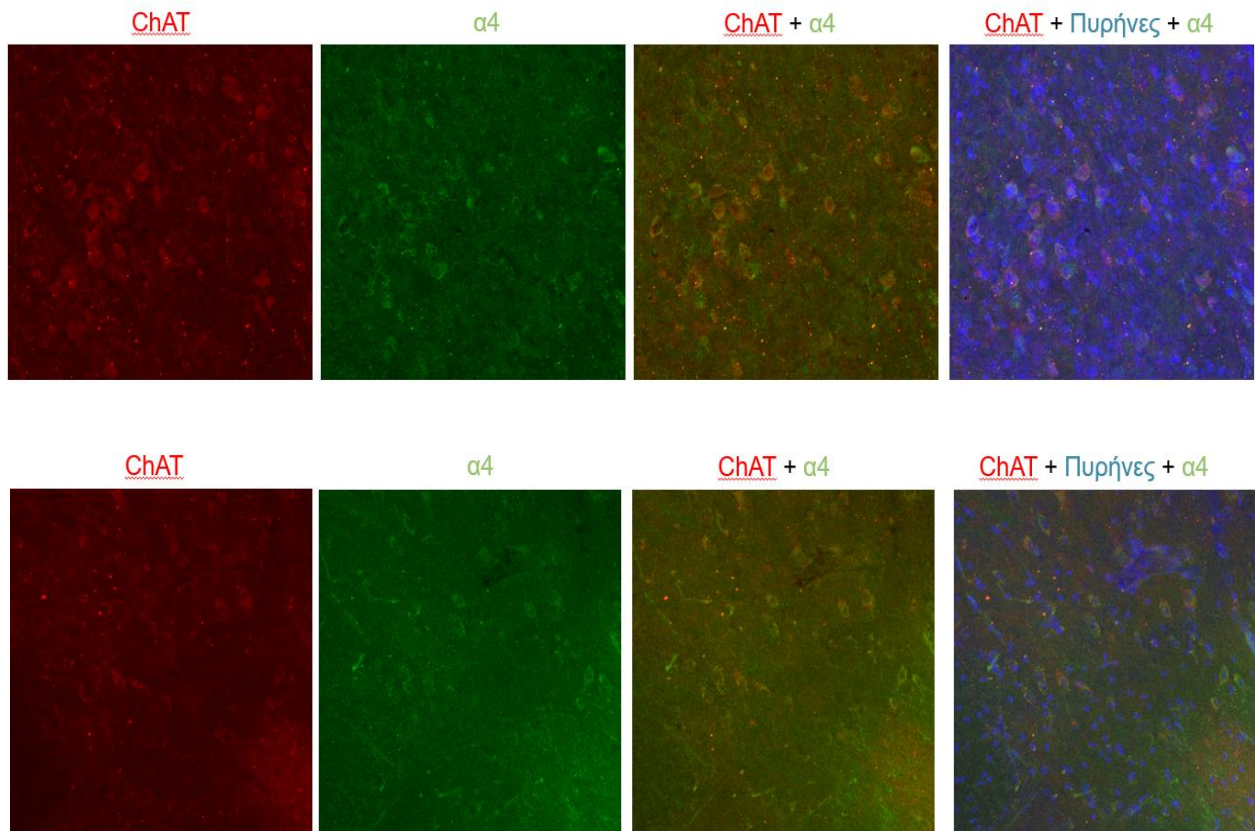
Ωστόσο, τα μονοκλωνικά αντισώματα mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 δεν έδειξαν να προσδένονται σε κάποια περιοχή του εγκεφάλου, και συνεπώς δεν είναι ικανά να συνδεθούν με τις υπομονάδες α_4 και β_2 του nAChR.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η πρόσδεση του mAbNR1 με την υπομονάδα α_4 του nAChR, χρησιμοποιήθηκε το anti-ChAT για τον συνεντοπισμό της έκφρασης του ενζύμου ChAT και της υπομονάδας α_4 nAChR στους ίδιους νευρώνες. Με βάση τη βιβλιογραφία, οι προ-συναπτικοί νευρώνες συνεκφράζουν nAChRs και ChAT.



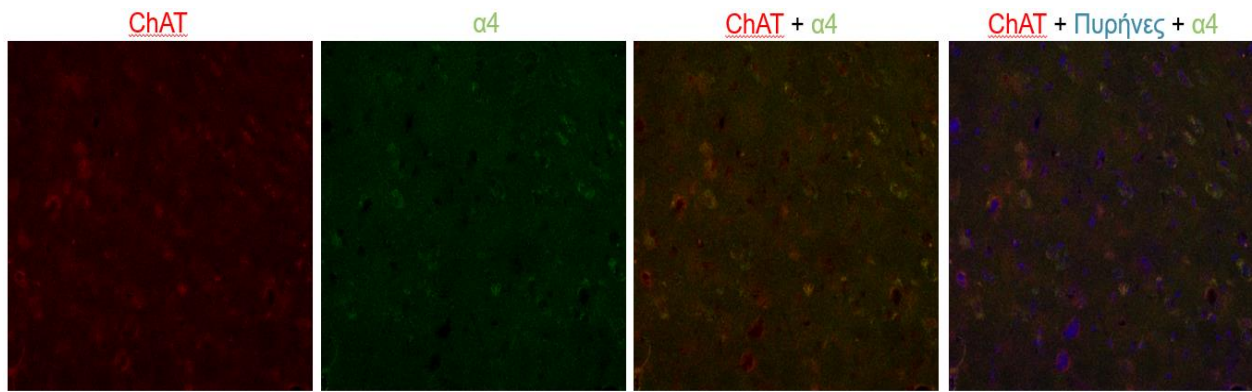
Εικόνα 24. Πρόσδεση mAbNR1 και anti-ChAT σε τομές εγκεφάλου επίμυος.

Η πρόσδεση του mAbNR1 σε ιστούς εγκεφάλου επίμυος φαίνεται με πράσινη χρώση (anti-rat CF 488), η πρόσδεση του anti-ChAT φαίνεται με κόκκινη χρώση (anti-rabbit ALEXA 555), ενώ με μπλε χρώση φαίνονται οι πυρήνες. Διαπιστώνεται ότι το σήμα πρόσδεσης του mAbNR1 με του anti-ChAT δεν συμπίπτουν στο Ραβδωτό σώμα. Οι φωτογραφίες πάρθηκαν από τη συνεστιακή μικροσκοπία.



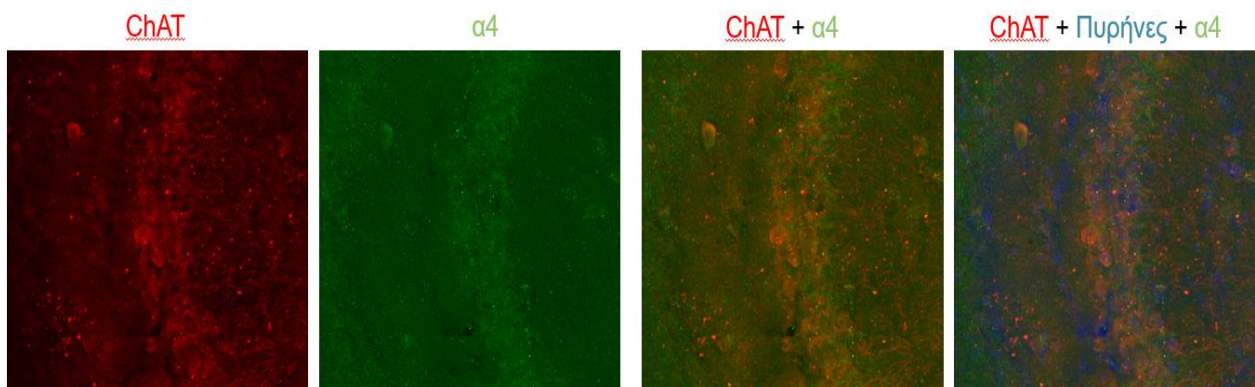
Εικόνα 25. Πρόσδεση mAbNR1 και anti-ChAT σε τομές εγκεφάλου επίμυος.

Η πρόσδεση του mAbNR1 σε ιστούς εγκεφάλου επίμυος φαίνεται με πράσινη χρώση, η πρόσδεση του anti-ChAT φαίνεται με κόκκινη χρώση, ενώ με μπλε χρώση φαίνονται οι πυρήνες. Διαπιστώνεται ότι το σήμα πρόσδεσης του mAbNR1 με του anti-ChAT συμπίπτουν κοινά στους νευρώνες της Μέλαινας ουσίας.



Εικόνα 26. Πρόσδεση mAbNR1 και anti-ChAT σε τομές εγκεφάλου επίμυος.

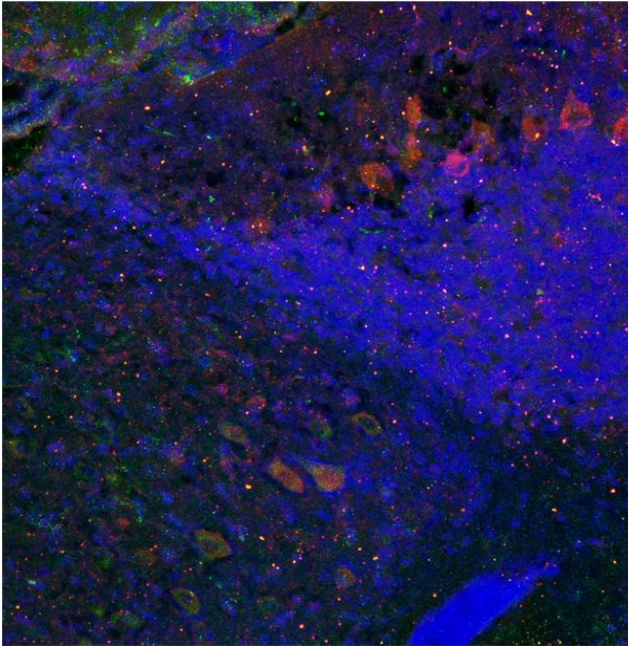
Η πρόσδεση του mAbNR1 σε ιστούς εγκεφάλου επίμυος φαίνεται με πράσινη χρώση, η πρόσδεση του anti-ChAT φαίνεται με κόκκινη χρώση (anti-rabbit ALEXA 555), ενώ με μπλε χρώση φαίνονται οι πυρήνες. Διαπιστώνεται ότι το σήμα πρόσδεσης του mAbNR1 με του anti-ChAT συμπίπτουν κοινά στους νευρώνες του Θαλάμου.



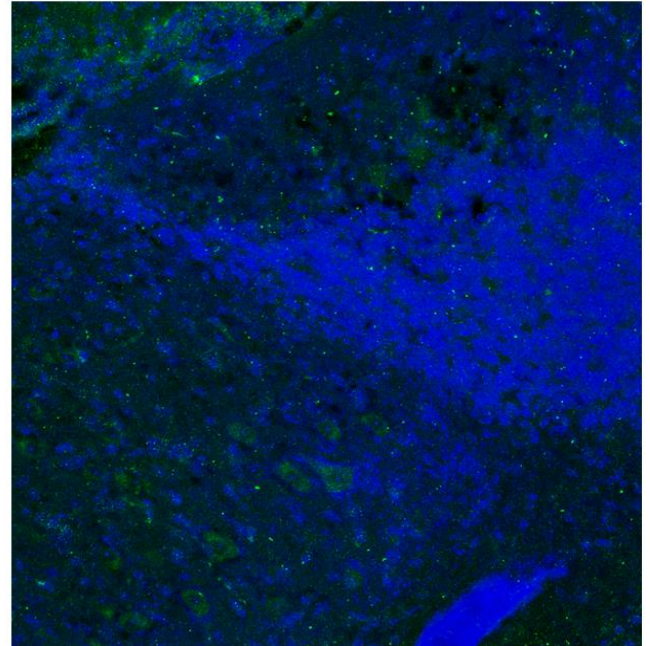
Εικόνα 27. Πρόσδεση mAbNR1 και anti-ChAT σε τομές εγκεφάλου επίμυος.

Η πρόσδεση του mAbNR1 σε ιστούς εγκεφάλου επίμυος φαίνεται με πράσινη χρώση, η πρόσδεση του anti-ChAT φαίνεται με κόκκινη χρώση (anti-rabbit ALEXA 555), ενώ με μπλε χρώση φαίνονται οι πυρήνες. Διαπιστώνεται ότι το σήμα πρόσδεσης του mAbNR1 με του anti-ChAT συμπίπτουν κοινά στους νευρώνες του Ιππόκαμπου.

β2 + Πυρήνες + ChAT



β2 + Πυρήνες



Εικόνα 28. Πρόσδεση mAbNR1 και anti-ChAT σε τομές εγκεφάλου επίμους.

Η πρόσδεση του mAbNR1 σε ιστούς εγκεφάλου επίμους φαίνεται με πράσινη χρώση, η πρόσδεση του anti-ChAT φαίνεται με κόκκινη χρώση (anti-rabbit ALEXA 555), ενώ με μπλε χρώση φαίνονται οι πυρήνες. Διαπιστώνεται ότι το σήμα πρόσδεσης του mAbNR1 με του anti-ChAT συμπίπτουν κοινά στους νευρώνες της Παρεγκεφαλίδας.

Το mAbNR1 βρέθηκε ικανό να συνδεθεί με την υπομονάδα α_4 nAChR σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου επίμους (Μέλαινα Ουσία, Θάλαμος και Ιππόκαμπος), όπως προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία έμμεσου ανοσοφθορισμού σε τομές του εγκεφάλου ποντικού. Η πρόσδεση επιβεβαιώθηκε με σύγκριση των αποτελεσμάτων με εκείνα που προέκυψαν με τη χρήση anti-ChAT (Εικόνα 25) (Εικόνα 26) (Εικόνα 27) (Εικόνα 28).

4.4.3 Αποτελέσματα Σε Συνοπτική Μορφή

	NR1	NR2	NR3	NR4	NR5	NR6
Sy5y fixed	+	+	(+)	-	-	-
Sy5y live	(+)	-	-	-	-	-
T.HEK (clusters)	(+)	-	-	-	-	-
Brain stain	+	+	-	-	-	-
ELISA	+	+		-		
Western Blot	+	+	+	+	+	-

+	θετικό σήμα
(+)	Στικτός φθορισμός
-	αρνητικό σήμα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι nAChRs είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ιοντικών διαύλων. Συμμετέχουν ενεργά σε διάφορες νευροφυσιολογικές διεργασίες, όπως η συναπτική μετάδοση, οι γνωστικές επιδόσεις, η μνήμη και η προσοχή. Ειδικότερα, ο $\alpha_4\beta_2$ nAChR είναι ιδιαίτερα σημαντικός λόγω της υψηλής συγγένειάς του με τη νικοτίνη και εμπλοκής σε νευρολογικές παθήσεις. Η μακροχρόνια αλληλεπίδραση ενός αγωνιστή με έναν υποδοχέα είναι γνωστό ότι προκαλεί μείωση της έκφρασης των υποδοχέων. Ωστόσο, αυτό δεν ισχύει για όλες τις υπομονάδες, ιδίως για τον $\alpha_4\beta_2$ nAChR, εφόσον διαπιστώθηκε ότι η χρόνια έκθεση στον αγωνιστή στην πραγματικότητα αυξάνει την έκφραση του $\alpha_4\beta_2$ nAChR (Melroy-Greif et al., 2016). Ωστόσο, οι μηχανισμοί που προάγουν την αύξηση των nAChRs παρουσία ενός αγωνιστή, όπως η νικοτίνη δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Η πλήρης κατανόηση της λειτουργίας του $\alpha_4\beta_2$ είναι απαραίτητη για τη διερεύνηση των περίπλοκων μηχανισμών του εγκεφάλου και την ανάπτυξη νέας θεραπείας για τη διαχείριση των νευροπαθειών. Η παραγωγή και ο χαρακτηρισμός των mAbs έναντι του $\alpha_4\beta_2$ nAChR μπορεί να συμβάλλει στη θεραπεία και διάγνωση των νευροπαθειών καθώς και στην έρευνα της δομής και της λειτουργίας των nAChRs.

Στο εργαστήριο Μοριακής Νευροβιολογίας και Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, δημιουργήθηκαν έξι διαφορετικά υβριδώματα, τα οποία εκκρίνουν μονοκλωνικά αντισώματα (mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6) κατά του $\alpha_4\beta_2$ nAChR και συντηρήθηκαν σε υγρό άζωτο. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να χαρακτηριστεί η πρόσδεση των mAbs σε ιστούς εγκεφάλου επίμυος.

Μετά τη καλλιέργεια των κλώνων mAbNR1, mAbNR2 και mAbNR4, τα εναιωρήματα δοκιμάστηκαν με τη μέθοδο ELISA. Όπως ήταν αναμενόμενο από προηγούμενες μελέτες, το mAbNR2 προσδέθηκε στην β_2 (ΕΚΠ), ενώ το mAbNR1 συνδέθηκε στην α_5 (ΕΚΠ) λόγω υψηλής ομολογίας με την α_4 (ΕΚΠ) (Κουτρομπή, 2012). Ωστόσο, το mAbNR1 δεν προσδέθηκε με την ανασυνδιασμένη α_4 (ΕΚΠ) καθώς η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη δεν περιέχει ολόκληρη την εξωκυτταρική περιοχή της α_4 . Το mAbNR4, από την άλλη πλευρά, δεν προσδέθηκε σε καμία από τις ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες, υποδηλώνοντας ότι ενδεχομένως κατά την καλλιέργεια των υβριδωμάτων, τα mAbNR4 δεν παρήχθησαν. Άλλες πιθανές αιτίες αποτυχίας στην ELISA μπορεί να ήταν ότι οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες δεν προσροφήθηκαν στα τοιχώματα των φρεατίων, ή ότι

το mAbNR4 εκπλύθηκε και δεν προσδέθηκε σε καμία από τις υπομονάδες (α_4 (ΕΚΠ), α_5 (ΕΚΠ), β_2 (ΕΚΠ), και ϵ (ΕΚΠ)).

Εκτός από τα mAbNR1 και το mAbNR2 που καλλιεργήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν και εναιωρήματα προς μελέτη που είχαν παρασκευαστεί προηγουμένως στο εργαστήριο. Τα εναιωρήματα (mAbNR1-mAbNR6) δοκιμάστηκαν με τη μέθοδο Western Blot. Τα αποτελέσματα του Western blot συγκρίθηκαν με αυτά του ελέγχου αναφοράς (μονοκλωνικό αντίσωμα anti-flag) και επιβεβαιώθηκε η πρόσδεση των mAbs στις ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες των υπομονάδων α_4 και β_2 του nAChR (Ενότητα 4.4.1.4). Συγκεκριμένα, τα mAbNR1, mAbNR3, mAbNR4 και mAbNR5 δεσμεύονται ειδικά στην υπομονάδα α_4 με μοριακό βάρος περίπου 85kDa. Με βάση τους Wecker et al., στην ώριμη κατάσταση του $\alpha_4\beta_2$ υποδοχέα, η υπομονάδα α_4 ανιχνεύεται στα 80-85kDa. Το mAbNR2 φαίνεται να δεσμεύεται ειδικά στη β_2 υπομονάδα nAChR με μοριακό βάρος περίπου 55 kDa. Το mAbNR6 δεν φαίνεται να δεσμεύεται ούτε στην α_4 ούτε στη β_2 υπομονάδα του nAChR. Αυτό είναι συμβατό με προηγούμενη παρατήρηση, η οποία αναφέρει ότι το mAbNR6 δεν δεσμεύεται στις υπομονάδες α_4 και β_2 του nAChR, καθώς ο επίτοπος στον οποίο δεσμεύεται το mAbNR6 αλλοιώνεται αποδιάταξης των υπομονάδων κατά την ηλεκτροφόρηση (Κουτρομπή, 2012). Στο πείραμα Western blot με το υπερκείμενο και το ίζημα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος εγκεφάλου επίμυος, το mAbNR1 φάνηκε να δεσμεύεται ειδικά περίπου στα 100kDa στο υπερκείμενο, το οποίο μπορεί να αναγνωρίζει την υπομονάδα α_4 του nAChR (Moser et al., 2007).

Στη συνέχεια, δοκιμάστηκαν τα mAbs (mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6) σε κύτταρα HEK293 (ζωντανά και μονιμοποιημένα), κύτταρα SH-SY5Y (ζωντανά και μονιμοποιημένα) και διαμολυσμένα κύτταρα HEK293 (ζωντανά), τα οποία εκφράζουν nAChR μυϊκού τύπου. Το mAbNR1 φαίνεται να έχει προσδεθεί στα μονιμοποιημένα κύτταρα SH-SY5Y, ωστόσο, σύμφωνα με τους Brown et al., τα κύτταρα SH-SY5Y δεν εκφράζουν α_4 υπομονάδες σε mRNA επίπεδο. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι το mRNA της α_4 υπομονάδας διασπάται και αποικοδομείται ταχύτερα κατά τη μεταγραφική ρύθμιση. Επίσης, είναι πιθανόν η πρόσδεση του mAbNR1 στα κύτταρα SH-SY5Y να προκύπτει από μια διασταυρούμενη αντίδραση, ιδιαίτερα με την υπομονάδα α_3 nAChR. Στα υπόλοιπα κύτταρα (HEK293 και διαμολυσμένα HEK293), το mAbNR1 δεν φαίνεται να προσδέθηκε, όπως ήταν αναμενόμενο. Το mAbNR2 φαίνεται να προσδέθηκε στην υπομονάδα β_2 στα μονιμοποιημένα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία σύμφωνα με τους

Brown et al., εκφράζουν $\alpha_3\beta_2$ nAChR στις κυτταρικές τους μεμβράνες. Αντιθέτως, το mAbNR2 δεν προσδέθηκε στα υπόλοιπα κύτταρα. Όπως και το mAbNR1, το mAbNR3 φαίνεται να έχει προσδεθεί στα μονιμοποιημένα κύτταρα SH-SY5Y. Από την άλλη πλευρά, τα mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6 δεν προσδέθηκαν σε κανένα από τα κύτταρα. Αυτό ίσως είναι αποτέλεσμα της χαμηλής συγκέντρωσης των mAbs στο εναιώρημα.

Τα αποτελέσματα από τον χαρακτηρισμό της πρόσδεσης των mAbs (mAbNR1, mAbNR2, mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6) σε ιστούς εγκεφάλου επίμυος έδειξαν ότι τα mAbNR1 και mAbNR2 είχαν προσδεθεί στους νευρώνες του εγκεφάλου. Χρησιμοποιώντας το ανεστραμμένο και το συνεστιακό μικροσκόπιο, παρατηρήθηκε ότι το mAbNR1 αναγνωρίζει α_4 nAChR στον Ιππόκαμπο. Εντούτοις, μόνο με τη χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου, παρατηρήθηκε πρόσδεση του mAbNR1 στις α_4 υπομονάδες των νευρώνων που βρίσκονται στη Μέλαινα ουσία, στο Θάλαμο και στην Παρεγκεφαλίδα. Αν και το ανεστραμμένο μικροσκόπιο εντόπισε την πρόσδεση του mAbNR1 στις α_4 στο Μεσοεγκέφαλο, το συνεστιακό μικροσκόπιο δεν εντόπισε ανάλογο σήμα πρόσδεσης στην ίδια περιοχή. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην μειωμένη ευαισθησία του συνεστιακού μικροσκοπίου στον εντοπισμό μεμβρανικών πρωτεϊνών, σε σχέση με το ανεστραμμένο. Παράλληλα, η ευαισθησία του συνεστιακού μικροσκοπίου στον εντοπισμό πρωτεϊνών σε υποκυτταρικό επίπεδο αυξάνεται, γεγονός που μας επέτρεψε να εντοπίσουμε τις α_4 υπομονάδες σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα από τα πειράματα του Fixed CBA και του έμμεσου ανοσοφθορισμού στους εγκεφάλους επίμυος, φαίνεται ότι το mAbNR1 μπορεί να δείχνει διασταυρούμενη πρόσδεση στις υπομονάδες α_4 και α_3 nAChR. Το mAbNR2 με τη χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου φαίνεται να αναγνωρίζει τις β_2 υπομονάδες στους δενδρίτες των νευρώνων που βρίσκονται στον Ιππόκαμπο και στη Μέλαινα ουσία.

Συνεπώς, τα υπόλοιπα mAbs (mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6) δεν αναγνώρισαν τις υπομονάδες α_4 ή β_2 nAChR στους νευρώνες εγκεφάλου επίμυος. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τα εναιωρήματα δεν περιείχαν αρκετή συγκέντρωση αντισώματος. Προτείνεται η επανακαλλιέργεια των υβριδωμάτων που εκκρίνουν τα mAbNR3, mAbNR4, mAbNR5 και mAbNR6, χρησιμοποιώντας καλλιεργητικό μέσο ειδικό για την παραγωγή IgG αντισωμάτων και συνεχή συμύκνωση των IgG με την χρήση θειικού αμμωνίου.

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία της Κουτρουμπή και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης (Ενότητα 4.4), το mAbNR1 πιθανότατα εμφανίζει μικρή διασταυρούμενη αλληλεπίδραση με την υπομονάδα α_7 και α_3 , όπως διαπιστώθηκε τόσο στις αναλύσεις Fixed CBA όσο και στις τομές του εγκεφάλου του ποντικού. Σε επόμενες ερευνητικές εργασίες, θα μπορούσε να επανεξεταστεί το mAbNR1 με Western blot χρησιμοποιώντας την υπομονάδα α_3 .

Το mAbNR2, βάσει της γενικής εικόνας που παρέχουν τα πειραματικά δεδομένα και η βιβλιογραφία της Κουτρουμπή, φαίνεται να είναι ειδικό για την υπομονάδα β_2 των nAChR. Συνιστάται περαιτέρω χαρακτηρισμός της πρόσδεσης του mAbNR2 μετά τον καθαρισμό του μέσω της μεθόδου FPLC, έτσι ώστε να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα διεξαχθέντα πειράματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbas A.K., Lichtman A.H., Βασική Ανοσολογία (2004). (επιμέλεια: Σ.Ι. Τζάρτος, Α. Μαμαλάκη), *Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης*
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological reviews*, 89(1), 73–120. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>
- Ball, N., Teo, W. P., Chandra, S., & Chapman, J. (2019). Parkinson's Disease and the Environment. *Frontiers in neurology*, 10, 218. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00218>
- Brown, J. L., & Wonnacott, S. (2015). Sazetidine-A Activates and Desensitizes Native $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Neurochemical research*, 40(10), 2047–2054. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1302-6>
- Burden, S. J., Yumoto, N., & Zhang, W. (2013). The role of MuSK in synapse formation and neuromuscular disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5), a009167. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009167>
- Carlson, A. B., & Kraus, G. P. (2022). Physiology, Cholinergic Receptors. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526134/>
- Cetin, H., Beeson, D., Vincent, A., & Webster, R. (2020). The Structure, Function, and Physiology of the Fetal and Adult Acetylcholine Receptor in Muscle. *Frontiers in molecular neuroscience*, 13, 581097. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.581097>
- Chen, Z., Li, G., & Liu, J. (2020). Autonomic dysfunction in Parkinson's disease: Implications for pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Neurobiology of disease*, 134, 104700. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104700>
- Chi, X., Li, Y., & Qiu, X. (2020). V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology*, 160(3), 233–247. <https://doi.org/10.1111/imm.13176>
- Christie, S. M., Fijen, C., & Rothenberg, E. (2022). V(D)J Recombination: Recent Insights in Formation of the Recombinase Complex and Recruitment of DNA Repair Machinery. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 886718. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.886718>

- Conti-Fine, B. M., Milani, M., & Kaminski, H. J. (2006). Myasthenia gravis: past, present, and future. *The Journal of clinical investigation*, 116(11), 2843–2854. <https://doi.org/10.1172/JCI29894>
- Corringer, P. J., Le Novère, N., & Changeux, J. P. (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 40, 431–458. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.431>
- Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., & Roitt, I. M. (2017). *Roitt's essential immunology* (13th ed.). Chichester, West Sussex. ISBN 978-1-118-41577-1. OCLC 949912256.
- Deveuve, Q., Lajoie, L., Barrault, B., & Thibault, G. (2020). The Proteolytic Cleavage of Therapeutic Monoclonal Antibody Hinge Region: More Than a Matter of Subclass. *Frontiers in immunology*, 11, 168. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00168>
- Dhapola, R., Hota, S. S., Sarma, P., Bhattacharyya, A., Medhi, B., & Reddy, D. H. (2021). Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, 29(6), 1669–1681. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00889-6>
- Figl, A., Viseshakul, N., Shafae, N., Forsayeth, J., & Cohen, B. N. (1998). Two mutations linked to nocturnal frontal lobe epilepsy cause use-dependent potentiation of the nicotinic ACh response. *The Journal of physiology*, 513 (Pt 3)(Pt 3), 655–670. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.655ba.x>
- Grider, M. H., Belcea, C. Q., Covington, B. P., Reddy, V., & Sharma, S. (2022). Neuroanatomy, Nodes of Ranvier. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537273/>
- Hall, Z. W., & Sanes, J. R. (1993). Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell*, 72 Suppl, 99–121. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(05\)80031-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(05)80031-5)
- Hayman, M., Scheffer, I. E., Chinvarun, Y., Berlangieri, S. U., & Berkovic, S. F. (1997). Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: demonstration of focal frontal onset and intrafamilial variation. *Neurology*, 49(4), 969–975. <https://doi.org/10.1212/wnl.49.4.969>
- Howard, F. M., Jr, Lennon, V. A., Finley, J., Matsumoto, J., & Elveback, L. R. (1987). Clinical correlations of antibodies that bind, block, or modulate human acetylcholine receptors in myasthenia gravis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 505, 526–538. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb51321.x>
- Indurthi, D. C., Qudah, T., Liao, V. W., Ahring, P. K., Lewis, T. M., Balle, T., Chebib, M., & Absalom, N. L. (2019). Revisiting autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE) mutations

in the nicotinic acetylcholine receptor reveal an increase in efficacy regardless of stoichiometry. *Pharmacological research*, 139, 215–227. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.031>

Jacob, S. (2018). Myasthenia Gravis – A Review of Current Therapeutic Options. *European Neurological Review*, 13. 86. <https://doi.org/10.17925/ENR.2018.13.2.86>

Jain, A., Kuryatov, A., Wang, J., Kamenecka, T. M., & Lindstrom, J. (2016). Unorthodox Acetylcholine Binding Sites Formed by $\alpha 5$ and $\beta 3$ Accessory Subunits in $\alpha 4\beta 2^*$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *The Journal of biological chemistry*, 291(45), 23452–23463. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.749150>

Kalamida, D., Poulas, K., Avramopoulou, V., Fostieri, E., Lagoumintzis, G., Lazaridis, K., Sideri, A., Zouridakis, M., & Tzartos, S. J. (2007). Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *The FEBS journal*, 274(15), 3799–3845. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05935.x>

Kanda, M., Shimizu, D., Nakamura, S., Sawaki, K., Umeda, S., Miwa, T., Tanaka, H., Inokawa, Y., Hattori, N., Hayashi, M., Tanaka, C., Nakayama, G., Iguchi, Y., Katsuno, M., & Kodera, Y. (2021). Blockade of CHRN2 signaling with a therapeutic monoclonal antibody attenuates the aggressiveness of gastric cancer cells. *Oncogene*, 40(36), 5495–5504. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01945-9>

Kim, N., & Burden, S. J. (2008). MuSK controls where motor axons grow and form synapses. *Nature neuroscience*, 11(1), 19–27. <https://doi.org/10.1038/nn2026>

Kordas, G., Lagoumintzis, G., Sideris, S., Poulas, K., & Tzartos, S. J. (2014). Direct proof of the in vivo pathogenic role of the AChR autoantibodies from myasthenia gravis patients. *PloS one*, 9(9), e108327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108327>

Kurahashi, H., & Hirose, S. (2023). Autosomal Dominant Sleep-Related Hypermotor (Hyperkinetic) Epilepsy. In M. P. Adam (Eds.) et. al., GeneReviews®. University of Washington, Seattle. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1169/>

Lazaridis, K., & Tzartos, S. J. (2020). Autoantibody Specificities in Myasthenia Gravis; Implications for Improved Diagnostics and Therapeutics. *Frontiers in immunology*, 11, 212. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00212>

LeBouef, T., Yaker, Z., & Whited, L. (2022). Physiology, Autonomic Nervous System. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538516/>

Lennon, V. A., McCormick, D. J., Lambert, E. H., Griesmann, G. E., & Atassi, M. Z. (1985). Region of peptide 125-147 of acetylcholine receptor alpha subunit is exposed at

neuromuscular junction and induces experimental autoimmune myasthenia gravis, T-cell immunity, and modulating autoantibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(24), 8805–8809. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.24.8805>

Lindstrom J. (1996). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Ion channels*, 4, 377–450. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1775-1_10

Lindstrom J. (1997). Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Molecular neurobiology*, 15(2), 193–222. <https://doi.org/10.1007/BF02740634>

Lofano, G., Gorman, M. J., Yousif, A. S., Yu, W. H., Fox, J. M., Dugast, A. S., Ackerman, M. E., Suscovich, T. J., Weiner, J., Barouch, D., Streeck, H., Little, S., Smith, D., Richman, D., Lauffenburger, D., Walker, B. D., Diamond, M. S., & Alter, G. (2018). Antigen-specific antibody Fc glycosylation enhances humoral immunity via the recruitment of complement. *Science immunology*, 3(26), eaat7796. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat7796>

Luo, J., Taylor, P., Losen, M., de Baets, M. H., Shelton, G. D., & Lindstrom, J. (2009). Main immunogenic region structure promotes binding of conformation-dependent myasthenia gravis autoantibodies, nicotinic acetylcholine receptor conformation maturation, and agonist sensitivity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(44), 13898–13908. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2833-09.2009>

Ma, K., Chen, Y., Zhou, L., Liu, Z., & Liu, Z. (2021). Cloning and characterization of nicotinic acetylcholine receptor γ -like gene in adult transparent *Pristella maxillaris*. *Gene*, 769, 145193. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145193>

Mappin-Kasirer, B., Pan, H., Lewington, S., Kizza, J., Gray, R., Clarke, R., & Peto, R. (2020). Tobacco smoking and the risk of Parkinson disease: A 65-year follow-up of 30,000 male British doctors. *Neurology*, 94(20), e2132–e2138. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000009437>

Marmaras, V. & Labropoulou-Marmara, M., (2000). *Cell biology. 5th Edition. Πατρα: Τυπογραμα Εκδόσεις*

Mayeux R. (2003). Epidemiology of neurodegeneration. *Annual review of neuroscience*, 26, 81–104. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.043002.094919>

McCormick D. A. (1999). Are thalamocortical rhythms the Rosetta Stone of a subset of neurological disorders?. *Nature medicine*, 5(12), 1349–1351. <https://doi.org/10.1038/70911>

- McGeer, P. L., McGeer, E. G., Suzuki, J., Dolman, C. E., & Nagai, T. (1984). Aging, Alzheimer's disease, and the cholinergic system of the basal forebrain. *Neurology*, 34(6), 741–745. <https://doi.org/10.1212/wnl.34.6.741>
- McGehee, D. S., Heath, M. J., Gelber, S., Devay, P., & Role, L. W. (1995). Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5231), 1692–1696. <https://doi.org/10.1126/science.7569895>
- Melroy-Greif, W. E., Stitzel, J. A., & Ehringer, M. A. (2016). Nicotinic acetylcholine receptors: upregulation, age-related effects and associations with drug use. *Genes, brain, and behavior*, 15(1), 89–107. <https://doi.org/10.1111/gbb.12251>
- Mitra, S., & Tomar, P. C. (2021). Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *Journal, genetic engineering & biotechnology*, 19(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00264-6>
- Morgan, B. P., Chamberlain-Banoub, J., Neal, J. W., Song, W., Mizuno, M., & Harris, C. L. (2006). The membrane attack pathway of complement drives pathology in passively induced experimental autoimmune myasthenia gravis in mice. *Clinical and experimental immunology*, 146(2), 294–302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03205.x>
- Moser, N., Mechawar, N., Jones, I., Gochberg-Sarver, A., Orr-Urtreger, A., Plomann, M., Salas, R., Molles, B., Marubio, L., Roth, U., Maskos, U., Winzer-Serhan, U., Bourgeois, J. P., Le Sourd, A. M., De Biasi, M., Schröder, H., Lindstrom, J., Maelicke, A., Changeux, J. P., & Wevers, A. (2007). Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures. *Journal of neurochemistry*, 102(2), 479–492. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04498.x>
- Narayan, S., Liew, Z., Bronstein, J. M., & Ritz, B. (2017). Occupational pesticide use and Parkinson's disease in the Parkinson Environment Gene (PEG) study. *Environment international*, 107, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.04.010>
- Noridomi, K., Watanabe, G., Hansen, M. N., Han, G. W., & Chen, L. (2017). Structural insights into the molecular mechanisms of myasthenia gravis and their therapeutic implications. *eLife*, 6, e23043. <https://doi.org/10.7554/eLife.23043>
- Omar, A., Marwaha, K., & Bollu, P. C. (2023). Physiology, Neuromuscular Junction. In StatPearls. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470413/>

- Quik, M., Bordia, T., Zhang, D., & Perez, X. A. (2015). Nicotine and Nicotinic Receptor Drugs: Potential for Parkinson's Disease and Drug-Induced Movement Disorders. *International review of neurobiology*, 124, 247–271. <https://doi.org/10.1016/bs.irm.2015.07.005>
- Rand J. B. (2007). Acetylcholine. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1–21. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.131.1>
- Ribatti D. (2015). Edelman's view on the discovery of antibodies. *Immunology letters*, 164(2), 72–75. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.02.005>
- Rudolf, R., & Straka, T. (2019). Nicotinic acetylcholine receptor at vertebrate motor endplates: Endocytosis, recycling, and degradation. *Neuroscience letters*, 711, 134434. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134434>
- Sam, C., & Bordoni, B. (2022). Physiology, Acetylcholine. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557825/>
- Scheffer, I. E., Bhatia, K. P., Lopes-Cendes, I., Fish, D. R., Marsden, C. D., Andermann, E., Andermann, F., Desbiens, R., Keene, D., & Cendes, F. (1995). Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. A distinctive clinical disorder. *Brain : a journal of neurology*, 118 (Pt 1), 61–73. <https://doi.org/10.1093/brain/118.1.61>
- Sherwood L. (2016). ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ Ακαδημαϊκές Εκδόσεις
- Takács, V. T., Cserép, C., Schlingloff, D., Pósfai, B., Szőnyi, A., Sos, K. E., Környei, Z., Dénes, Á., Gulyás, A. I., Freund, T. F., & Nyiri, G. (2018). Co-transmission of acetylcholine and GABA regulates hippocampal states. *Nature communications*, 9(1), 2848. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05136-1>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Tzartos, S. J., Barkas, T., Cung, M. T., Mamalaki, A., Marraud, M., Orlewski, P., Papanastasiou, D., Sakarellos, C., Sakarellos-Daitsiotis, M., Tsantili, P., & Tsikaris, V. (1998). Anatomy of the antigenic structure of a large membrane autoantigen, the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor. *Immunological reviews*, 163, 89–120. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1998.tb01190.x>

Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, 5, 520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>

Walsh, R. M., Jr, Roh, S. H., Gharpure, A., Morales-Perez, C. L., Teng, J., & Hibbs, R. E. (2018). Structural principles of distinct assemblies of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor. *Nature*, 557(7704), 261–265. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0081-7>

Watanabe, G., & Lieber, M. R. (2022). Dynamics of the Artemis and DNA-PKcs Complex in the Repair of Double-Strand Breaks. *Journal of molecular biology*, 434(23), 167858. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167858>

Wecker, L., Pollock, V. V., Pacheco, M. A., & Pastoor, T. (2010). Nicotine-induced up regulation of $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptors is mediated by the protein kinase C-dependent phosphorylation of $\alpha 4$ subunits. *Neuroscience*, 171(1), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.005>

Wevers, A., & Schröder, H. (1999). Nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 1(4-5), 207–219. <https://doi.org/10.3233/jad-1999-14-503>

Witzemann V. (2006). Development of the neuromuscular junction. *Cell and tissue research*, 326(2), 263–271. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0237-x>

Κουτρομπή, Σ. (2012). Παραγωγή, απομόνωση και χαρακτηρισμός της δράσης μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά νικοτινικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης. Πανεπιστήμιο Πατρών.

ΠΗΓΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Chen, Z.-R.; Huang, J.-B.; Yang, S.-L.; Hong, F.-F. Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecules* 2022, 27, 1816. <https://doi.org/10.3390/molecules27061816>

Εικόνα 2: Tsetlin, V., & Kasheverov, I. (2014). Peptide and Protein Neurotoxin Toolbox in Research on Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Neurochemistry*. doi: 10.5772/58240

Εικόνα 3: Zhang, C., & Peskin, C. S. (2020). Analysis, simulation, and optimization of stochastic vesicle dynamics in synaptic transmission. *Communications on Pure and Applied Mathematics*, 73, 3-62. <https://doi.org/10.1002/cpa.21847>

Εικόνα 4: Jacob, S. (2018). Myasthenia Gravis – A Review of Current Therapeutic Options. *European Neurological Review*, 13. 86. <https://doi.org/10.17925/ENR.2018.13.2.86>