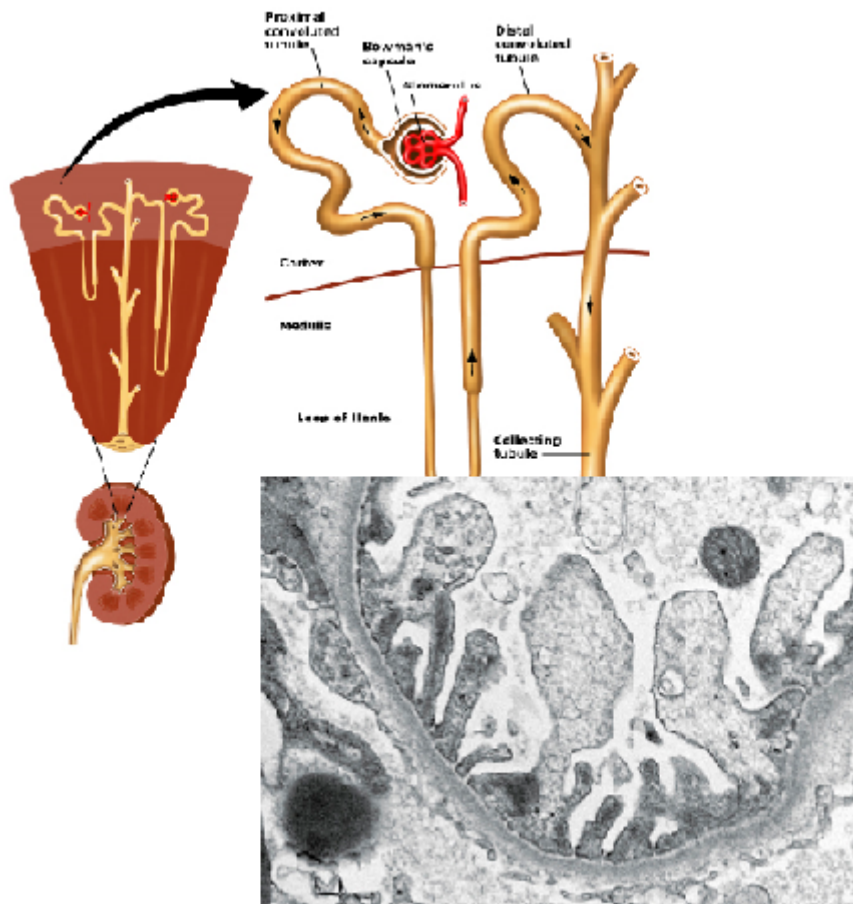




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΕ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΑΣ

Εντοπισμός πρωτεϊνικών μορίων με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού σε κύτταρα
νεφρών ποντικών



Ηράκλειο, Απρίλιος 2011

Τετραμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων Καθηγητής:

Κύριος Ευγένιος Δαφνής

Επιμελητής Νεφρολόγος:

Κύριος Κωνσταντίνος Στυλιανού

Επιβλέπων Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας:

Κύριος Χαλεπάκης Γεώργιος

Συνεργασία:

Παπαδογιοργάκη Σεβαστή

Πετράκης Ιωάννης

Μαυροειδή Βασιλική

Εργασία:

Ευθυμίου Γεώργιος

Αφιερωμένη στον παππού μου, Αλκιβιάδη, που δεν είναι πλέον μαζί μας.
- Το ότι μαθαίνω, το οφείλω σε σένα.

Ευχαριστίες

Ύστερα από το πέρας της εκπόνησης της παρούσας πτυχιακής εργασίας, αισθάνομαι την υποχρέωση και την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους με βοήθησαν και με στήριξαν με τον έναν ή τον άλλο τρόπο, σε αυτή μου την προσπάθεια.

Κατ' αρχήν να ευχαριστήσω τον καθηγητή κύριο Ευγένιο Δαφνή καθώς και τον κύριο Κώστα Στυλιανού που μου δώσανε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία σε έναν τομέα που όχι μόνο με ενδιέφερε αλλά αποτελεί και ένα πεδίο έρευνας με το οποίο λίγες μόνο ερευνητικές ομάδες έχουν ασχοληθεί. Υπήρξαν και οι δύο πρότυπα επιστημόνων που με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Εν συνεχεία, θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κύριο Γεώργιο Χαλεπάκη του οποίου η παρουσία ήταν καταλυτική στη μύησή μου στον επιστημονικό τρόπο σκέψης καθώς και στην πρώτη μου επαφή με το χώρο του εργαστηρίου. Αποτελεί για μένα παράδειγμα προς μίμηση ως καθηγητής, επιστήμονας και άνθρωπος με την αξιολογική έννοια του όρου. Να τον ευχαριστήσω επίσης για την προθυμία του να επιβλέψει την πτυχιακή μου εργασία ως υπεύθυνος για το τμήμα Βιολογίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες πρέπει να εκφράσω προς την κυρία Εύα Παπαδογιωργάκη που χωρίς την καθοδήγηση και την εμπειρία της δε θα είχα φτάσει στο επίπεδο ικανοτήτων που είναι απαραίτητες για τη διεκπεραίωση μιας τέτοιας εργασίας.

Να ευχαριστήσω επίσης την κυρία Σοφία Χαβάκη στην οποία οφείλω την κατοχή σημαντικών και πολύτιμων γνώσεων πρακτικών τεχνικών, όπως επίσης και όλα τα μέλη και των δύο εργαστηρίων που συνεργάστηκαν ώστε να προκύψει η παρούσα εργασία. Στο Εργαστήριο Μικροσκοπίας την κυρία Αλεξάνδρα Σιάκουλη και την κυρία Αλεξάνδρα Μανουσάκη που με καλωσόρισαν και με βοήθησαν να εγκλιματιστώ στο περιβάλλον του εργαστηρίου. Στο Εργαστήριο Νεφρολογίας το Γιάννη Πετράκη και τη Βασιλική Μαυροειδή για τη βοήθειά τους, την αμέριστη συμπαράστασή τους και τη μετάδοση γνώσεων που με βοήθησαν να κατανοήσω απόλυτα το περιεχόμενο, τους στόχους και ολόκληρη τη φιλοσοφία των πειραμάτων.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ, θέλω να αποδώσω στους γονείς μου, Βασίλη και Σοφία, για την αγάπη τους, τη στήριξή τους και την πίστη τους προς εμένα. Τους ευχαριστώ που μου δίνουν κουράγιο να συνεχίσω ακόμα κι όταν εγώ ο ίδιος πιστεύω ότι δε μου έχει απομείνει άλλη δύναμη για να προχωρήσω. Να ευχαριστήσω ακόμα και τη γιαγιά μου, την Ασημούλα, που πάντα πίστευε και συνεχίζει να πιστεύει σε μένα και σε αυτά που μπορώ να καταφέρω. Πολλές ευχαριστίες επίσης στον Άλκη, που ως μεγαλύτερος αδελφός ήταν και είναι πάντα δίπλα μου να με βοηθάει και να με προσέχει.

Να ευχαριστήσω ακόμα τους φίλους μου τόσο στο Ηράκλειο όσο και στα Ιωάννινα: τη Μαρία, τη Μαριλένα, τον Κωνσταντίνο, τους δύο Μάνους, τη Χριστίνα, την Ελεάννα, το Χάρη, τον Αλέξανδρο, το Βαγγέλη, τη Μαριάνθη, τη Ματίνα, το Στέλιο, την Ειρήνη, την Κατερίνα, την Ιουλία, το Χρήστο και όλους όσους με στήριξαν ψυχολογικά αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και να αφιερώσω αυτή μου την προσπάθεια στον παππού μου Αλκιβιάδη, που αν και δεν είναι κοντά μου εδώ και χρόνια, στάθηκε η αιτία για τις επιλογές μου.

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
Ο Νεφρός.....	1
Επισκόπηση των νεφρών.....	1
Λειτουργική ανατομική των νεφρών.....	2
Λεπτή δομή του νεφρώνα.....	3
Λεπτή δομή του νεφρικού σωματίου.....	5
Η παρασπειραματική συσκευή.....	7
Ποδοκύτταρα, μοριακή δομή ποδοκυττάρων και του λεπτού διαφράγματος και βιολογία του σπειραματικού ηθμού.....	8
Σπειραματική επιθηλιακά κύτταρα ή ποδοκύτταρα.....	8
Βασική μεμβράνη του σπειράματος.....	9
Μοριακή δομή των ποδοκυττάρων και σπειραματιός ηθμός.....	9
Οι πρωτεΐνες της πλαγίας επιφάνειας(Λεπτό διάφραγμα).....	9
Νεφρίνη.....	9
Η νεφρίνη είναι σηματοδοτικό μόριο.....	11
Ποδοσίνη.....	12
CD2AP.....	12
ZO – 1.....	13
FAT.....	13
P – καντερίνη.....	13
NEPH1.....	14
Densin.....	14
Πρωτεΐνες της κορυφαίας επιφάνειας.....	14
Ποδοκαλυξίνη.....	14
Εζρίνη.....	15
NHERF2.....	15
Μεγκαλίνη.....	15
Πρωτεΐνες της βασικής επιφάνειας.....	15
Ιντεγκρίνες.....	15
Δυστρογλυκάνη.....	15
Ρόλος των πρωτεϊνών της βασικής επιφάνειας.....	16
Κινάση συνδεόμενη με ιντεγκρίνη(ILK).....	16
Κυτταροσκελετός ποδοκυττάρων.....	17
Σπειραματική βασική μεμβράνη.....	18
Σηματοδότηση από την mTOR ενός κεντρικού ρυθμιστή της κυτταρικής αύξησης και πολλαπλασιασμού και σχέση αυτής με την κινάση AKT.....	19
Το σύμπλεγμα mTORC1.....	21
Το σύμπλεγμα mTORC2.....	22
Υπερκείμενοι ρυθμιστές της mTOR.....	22
Akt: η κινάση που συνδέει την PI3K με την mTOR.....	24
TSC1/TSC2.....	25
Rheb & Rag.....	26
Αντικατάσταση: Μονιμοποίηση, αφυδάτωση, έγκλειση.....	28
Μονιμοποίηση.....	28
Μονιμοποιητικά.....	28
Είδη μονιμοποίησης.....	29

Αφυδάτωση.....	30
Έγκλειση.....	30
Εποξικές ρητίνες.....	31
Ακρυλικές ρητίνες.....	31
Αντικατάσταση σε χαμηλές θερμοκρασίες.....	31
Ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία.....	32
Αντισώματα.....	33
Μη ειδική πρόσδεση.....	33
Κολλοειδής χρυσός.....	34
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ.....	36
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
Υλικά και συσκευές.....	37
Σειρές ποντικών.....	38
1. Έγκλειση ιστού ποντικού για παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με εποξική ρητίνη Durcupan ACMm Fluca(κλασσική έγκλειση).....	39
2. Έγκλειση ιστού ποντικού για παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με ρητίνη Lowicryl HM20 σε χαμηλή θερμοκρασία με τη βοήθεια συσκευής AFS.....	40
3. Έγκλειση ιστού ποντικού για παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με ρητίνη Lowicryl HM20 σε χαμηλή θερμοκρασία με τη βοήθεια συσκευής AFS(εναλλακτική εκδοχή της μεθόδου 2).....	45
4. Κατασκευή πλεγμάτων(grids) με μεμβράνη formvar για παρατήρηση τομών σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	46
5. Προετοιμασία των ιστών πριν την παρατήρηση: εστίαση στην επιθυμητή περιοχή, δημιουργία τομών.....	47
6. Εντοπισμός πρωτεϊνών νεφρικών κυττάρων με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού, σε υγιή ποντίκια, με τη χρήση αντισωμάτων για την πρωτεΐνη ποδοσίνη.....	47
7. Εντοπισμός πρωτεϊνών νεφρικών κυττάρων με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού, σε ασθενή ποντίκια, με τη χρήση αντισωμάτων για τις πρωτεΐνες ποδοσίνη και μη φωσφορυλιωμένη akt.....	48
8. Εντοπισμός πρωτεϊνών νεφρικών κυττάρων με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού, σε υγιή ποντίκια, με τη χρήση αντισωμάτων για την πρωτεΐνη p-akt _{thr308}	50
9. Χρώση τομών που έχουν υποστεί ανοσοεντοπισμό με διάλυμα οξικού ουρανιλίου για δημιουργία αντίθεσης.....	50
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	52
Έγκλειση ιστού με εποξική ρητίνη.....	52
Έγκλειση ιστού με AFS ύστερα από μονιμοποίηση για 1 ώρα σε μονιμοποιητή 2% PFA, 0,5% GDA σε 0,1M PBS με pH=7,4.....	57
Έγκλειση ιστού με AFS ύστερα από μονιμοποίηση σε 4% PFA για 1 ώρα και ανοσοεντοπισμός για την πρωτεΐνη ποδοσίνη με αραιώση αντισώματος 1:100 με βάση τη μέθοδο 6.....	58
Έγκλειση ιστού με AFS ύστερα από μονιμοποίηση σε 4% PFA και ανοσοεντοπισμός για την πρωτεΐνη ποδοσίνη με αραιώση αντισώματος 1:100 με βάση τη μέθοδο 6.....	61
Έγκλειση ιστού με AFS ύστερα από μονιμοποίηση σε 4% PFA και ανοσοεντοπισμός για την πρωτεΐνη akt _{thr308} με αραιώση αντισώματος 1:800 με βάση τη μέθοδο 8.....	63
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	65
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68

Εισαγωγή

Ο ΝΕΦΡΟΣ

Επισκόπηση των νεφρών

Οι νεφροί επιτελούν ρυθμιστικές και εκκριντικές λειτουργίες. Με τη ρύθμιση της αποβολής ύδατος και διαλυμένων ουσιών κατορθώνουν να διατηρούν τον όγκο και τη σύσταση των υγρών του σώματος μέσα σε ένα πολύ στενό φάσμα αποκλίσεων, παρ' όλο που η πρόσληψη ύδατος και τροφής εμφανίζουν μεγάλες μεταβολές. Αποτέλεσμα του ομοιοστατικού μηχανισμού των νεφρών είναι το γεγονός ότι οι ιστοί και τα κύτταρα του σώματος έχουν τη δυνατότητα να λειτουργούν φυσιολογικά μέσα σε σταθερό, σχετικά, περιβάλλον.

Ανάμεσα στις πολλές και σημαντικές λειτουργίες που επιτελούν οι νεφροί περιλαμβάνονται και οι εξής:

1. Η ρύθμιση του όγκου και της κατά βάρος ωσμωγραμμομοριακότητας των υγρών του σώματος.
2. Η ρύθμιση του ισοζυγίου των ηλεκτρολυτών.
3. Η ρύθμιση του οξεοβασικού ισοζυγίου.
4. Η απέκκριση μεταβολικών προϊόντων και ξένων ουσιών.
5. Η παραγωγή και έκκριση ορμονών.

Η ρύθμιση της κατά βάρος ωσμωγραμμομοριακότητας των υγρών του σώματος είναι απαραίτητη προκειμένου να διατηρηθεί φυσιολογικός ο όγκος των κυττάρων σε όλους τους ιστούς του σώματος. Η ρύθμιση του όγκου των υγρών του σώματος είναι απαραίτητη προκειμένου να υπάρχει φυσιολογική λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος. Οι νεφροί επιτυγχάνουν τους παραπάνω στόχους ρυθμίζοντας την απέκκριση ύδατος και NaCl, σε συνεργασία με το καρδιαγγειακό, το ενδοκρινικό και το κεντρικό νευρικό σύστημα.

Οι νεφροί παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση της συγκέντρωσης ορισμένων σημαντικών ανόργανων ιόντων του σώματος, όπως είναι το Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} και PO_4^{3-} . Προκειμένου να διατηρηθεί το κατάλληλο ισοζύγιο, η απέκκριση καθενός ηλεκτρολύτη πρέπει να ισούται με την ημερήσια πρόσληψή του. Εάν η πρόσληψη υπερβαίνει την απέκκριση, τότε δημιουργείται θετικό ισοζύγιο για το συγκεκριμένο ηλεκτρολύτη. Αντίθετα, αν η απέκκριση υπερβαίνει την πρόσληψη, η ποσότητα του συγκεκριμένου ηλεκτρολύτη μειώνεται και ο οργανισμός βρίσκεται σε αρνητικό ισοζύγιο. Για πολλούς ηλεκτρολύτες οι νεφροί είναι η πρωταρχική οδός απέκκρισής τους από το σώμα. Έτσι, το ηλεκτρολυτικό ισοζύγιο επιτυγχάνεται με μια επιμελημένη εναρμόνιση της ημερήσιας απέκκρισης με την πρόσληψη.

Πολλές από τις μεταβολικές λειτουργίες του σώματος είναι εξαιρετικά ευαίσθητες στο pH. Έτσι το pH πρέπει να διατηρείται μέσα σε πολύ στενά όρια. Αυτό επιτυγχάνεται με τα ρυθμιστικά διαλύματα των υγρών του σώματος και με τη συντονισμένη λειτουργία των πνευμόνων και των νεφρών.

Οι νεφροί απεκκρίνουν ορισμένα από τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού που είναι άχρηστα για τον οργανισμό. Σε αυτά, τα ονομαζόμενα κατάλοιπα, περιλαμβάνονται η ουρία(προέρχεται από το μεταβολισμό των αμινοξέων), το ουρικό οξύ(προέρχεται από το μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων), η κρεατινίνη(προέρχεται από το μεταβολισμό της κρεατίνης των μυών), τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού της αιμοσφαιρίνης και οι μεταβολίτες των ορμονών. Οι νεφροί απομακρύνουν αυτές τις ουσίες από τον οργανισμό με ρυθμό που αντιστοιχεί στο ρυθμό παραγωγής τους. Έτσι οι νεφροί ρυθμίζουν τη συγκέντρωσή τους στα υγρά του οργανισμού. Οι νεφροί αποτελούν επίσης οδό

απομάκρυνσης ξένων ουσιών από το σώμα, όπως είναι τα φάρμακα, τα παρασιτοκτόνα και άλλες ουσίες που προσλαμβάνονται με την τροφή.

Οι νεφροί είναι σημαντικά ενδοκρινή όργανα τα οποία συνθέτουν και εκκρίνουν ρενίνη, προσταγλανδίνες, κινίνες, διυδροξυβιταμίνη D₃ και ερυθροποιητίνη. Η ρενίνη ενεργοποιεί το σύστημα ρενίνης – αγγειοτασίνης – αλδοστερόνης, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, καθώς και στο ισοζύγιο του νατρίου και καλίου. Οι προσταγλανδίνες και οι κινίνες(π.χ. η βραδυκίνη) είναι αγγειοδραστικές ουσίες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση και στην τροποποίηση της νεφρικής ροής του αίματος, ενώ η D₃ είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική απορρόφηση των Ca²⁺ από το γαστρεντερικό σωλήνα και την εναπόθεσή τους στα οστά. Η ερυθροποιητίνη διεγείρει την παραγωγή των ερυθροκυττάρων στο μυελό των οστών.

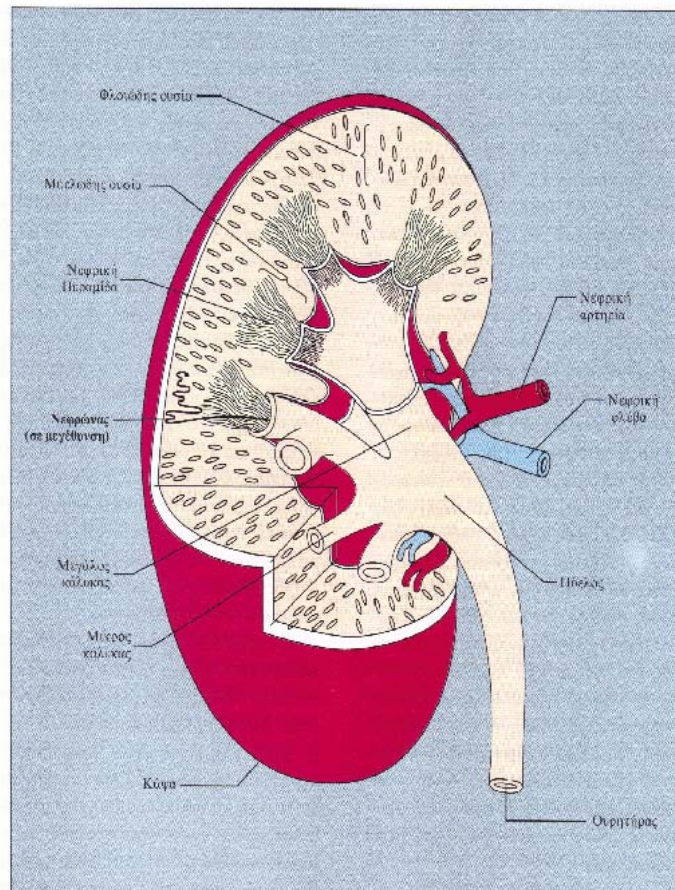
Λειτουργική ανατομική των νεφρών

Η δομή και η λειτουργία των νεφρών είναι συνδεδεμένες πολύ στενά. Αποτέλεσμα του γεγονότος αυτού είναι ότι η γνώση της ανατομικής και της ιστολογίας των νεφρών αποτελεί προϋπόθεση για την κατανόηση της λειτουργίας τους.

Αδρή ανατομική

Τα αδρά ανατομικά χαρακτηριστικά του νεφρού των θηλαστικών φαίνονται στην εικόνα 1. Στην έσω πλευρά του νεφρού υπάρχει μια εσοχή από όπου διέρχονται η νεφρική

αρτηρία, η νεφρική φλέβα, τα νεύρα και η πύελος. Στην επιφάνεια διατομής του νεφρού διακρίνουμε δύο μοίρες: μια εξωτερική που ονομάζεται φλοιώδης μοίρα και μια εσωτερική που ονομάζεται μυελώδης μοίρα. Η φλοιώδης και η μυελώδης μοίρες αποτελούνται από τους νεφρώνες(τις λειτουργικές μονάδες του νεφρού), αγγεία, λεμφαγγεία και νεύρα. Η μυελώδης μοίρα του νεφρού του ανθρώπου διαιρείται σε 8 έως 18 κωνοειδής προεκβολές, τις νεφρικές πυραμίδες. Η βάση κάθε πυραμίδας βρίσκεται στο όριο της φλοιώδους και της μυελώδους μοίρας, ενώ η κορυφή απολήγει στη θηλή η οποία βρίσκεται μέσα στον κάλυκα. Η πύελος αποτελεί την προς τα άνω προέκταση του ουρητήρα, ο οποίος μεταφέρει



Εικόνα 1: Η δομή του νεφρού του ανθρώπου, η τομή έχει γίνει για να φανούν οι εσωτερικές δομές. (Από Marsh DJ: Renal Physiology, New York 1983, Raven Press)

τα ούρα από την πύελο στην ουροδόχο κύστη. Στον νεφρό του ανθρώπου η πύελος διαιρείται σε τρεις ανοιχτές

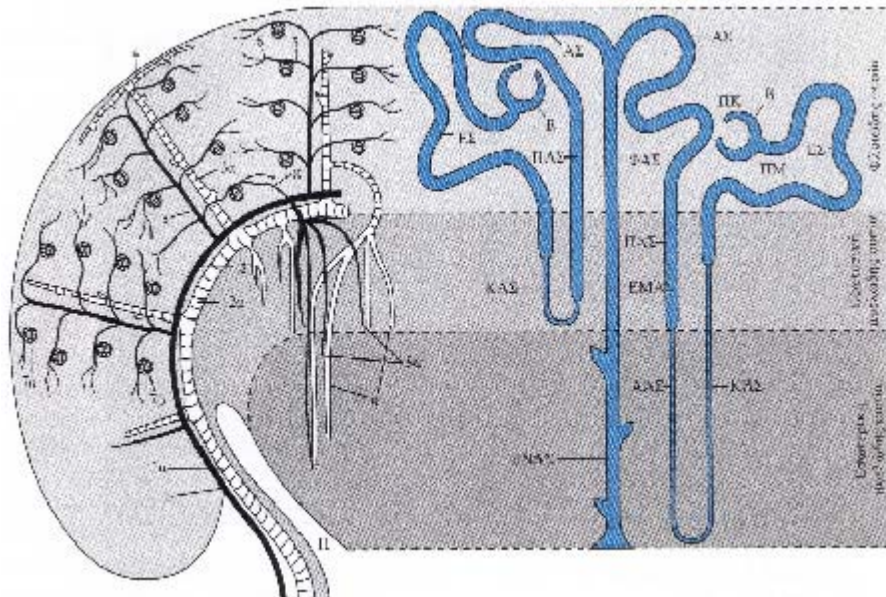
προεξοχές, τους κάλυκες, οι οποίοι επεκτείνονται έξω από το διευρυμένο άκρο της πυέλου. Κάθε μεγάλος κάλυκας υποδιαιρείται σε μικρότερους, οι οποίοι συλλέγουν τα ούρα από τις θηλές. Τα τοιχώματα των καλύκων, της πυέλου και των ουρητήρων περιέχουν λείες μυϊκές ίνες οι οποίες συσπώνται και εξωθούν τα ούρα στην ουροδόχο κύστη.

Η ροή του αίματος στους δύο νεφρούς είναι ίση με το 25% περίπου (1,25 L/min) της κατά λεπτό καρδιακής παροχής αίματος σε κατάσταση ηρεμίας. Εν τούτοις, οι νεφροί αποτελούν μόνο το 0,5% περίπου του σωματικού βάρους, με αποτέλεσμα να αποτελούν τα όργανα με την πλουσιότερη αιμάτωση ανά γραμμάριο ιστού, μετά τα επινεφρίδια. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1, η νεφρική αρτηρία εισέρχεται στο νεφρό μαζί με τον ουρητήρα και διακλαδίζεται προοδευτικά, προκειμένου να σχηματίσει τις μεσολόβιες, τις τοξοειδείς και τις μεσολοβίδιες αρτηρίες (ακτινωτές αρτηρίες της φλοιώδους ουσίας), καθώς και τα προσαγωγά αρτηρίδια, που απολήγουν στα σπειραματικά τριχοειδή (σπείραμα). Τα σπειραματικά τριχοειδή συγκλίνουν για να σχηματίσουν τα απαγωγά αρτηρίδια, τα οποία οδηγούν σε δεύτερο σύστημα τριχοειδών, τα περισωληναριακά τριχοειδή, τα οποία παρέχουν αίμα στο νεφρώνα. Τα αγγεία του φλεβικού συστήματος είναι παράλληλα με τα αρτηριακά αγγεία και συγκλίνουν για να σχηματίσουν προοδευτικά τις μεσολοβίδιες φλέβες, τις ακτινωτές φλέβες της φλοιώδους ουσίας, τις τοξοειδείς φλέβες, τις μεσολόβιες φλέβες και τη νεφρική φλέβα που οδεύει δίπλα στον ουρητήρα.

Λεπτή δομή του νεφρώνα

Λειτουργική μονάδα του νεφρού είναι ο νεφρώνας. Ο νεφρός του ανθρώπου περιέχει 1,2

εκατομμύρια περίπου νεφρώνες, που είναι σωληνάκια των οποίων το τοίχωμα αποτελείται από μία μόνο κυτταρική στιβάδα (Εικόνα 2). Οι νεφρώνες αποτελούνται από το νεφρικό ή μαλπιγγιανό σωματίο, από

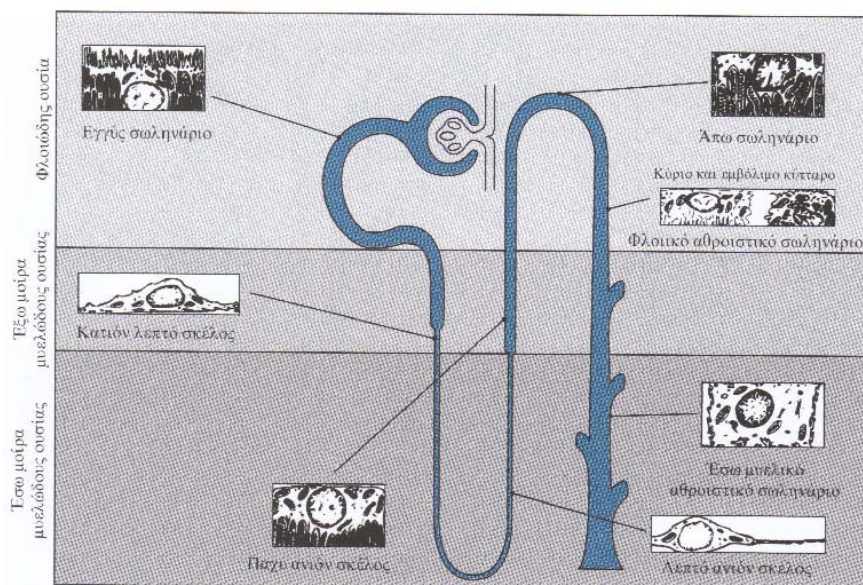


το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο ή εσπειραμένο σωληνάριο πρώτης τάξης, από την αγκύλη του Henle, από το άπω εσπειραμένο σωληνάριο ή εσπειραμένο

Εικόνα 2: Αριστερό μέρος. Οργάνωση του αγγειακού συστήματος στο νεφρό του ανθρώπου. Η νεφρική αρτηρία διακλαδίζεται στις μεσολόβιες αρτηρίες(1), από τις οποίες εκκινούν οι τοξοειδείς αρτηρίες(2). Οι τοξοειδείς αρτηρίες οδηγούν στις μεσολοβίδιες αρτηρίες(3), οι οποίες ανέρχονται προς την κάψα του νεφρού για να σχηματίσουν τα προσαγωγά αρτηρίδια(5). Τα προσαγωγά αρτηρίδια διακλαδίζονται και σχηματίζουν τα δίκτυα των σπειραματικών τριχοειδών(σπείραματα 7α, 7β), τα οποία κατόπιν συμβάλλουν προκειμένου να σχηματίσουν τα απαγωγά αρτηρίδια(6). Τα απαγωγά αρτηρίδια των εξωτερικών φλοικών νεφρώνων σχηματίζουν δίκτυα τριχοειδών(δε φαίνονται στην εικόνα), τα οποία περιλούουν τα κύτταρα της φλοιώδους ουσίας. Τα απαγωγά αρτηρίδια των επιφανειακών παραμυελικών νεφρώνων διαιρούνται, προκειμένου να σχηματίσουν τα ευθέα αγγεία(8), τα οποία σχηματίζουν δίκτυα τριχοειδών που παρέχουν αίμα στην εξωτερική και στην εσωτερική μυελώδη ουσία(8α). Το αίμα από τα περισωληναριακά τριχοειδή εισέρχεται διαδοχικά στην αστεροειδή φλέβα(1α). Το αίμα από τα ανιόντα ευθέα αγγεία(9) εισέρχεται στις τοξοειδείς και μεσολοβιδιακές φλέβες. Π: πυέλος. Δεξιό μέρος. Οργάνωση του νεφρώνα του ανθρώπου. Αριστερά βρίσκεται ένας επιφανειακός νεφρώνας. Δεξιά βρίσκεται ένας παραμυελικός νεφρώνας(ΠΜ). Β: έλυτρο Bowman, ΑΣ: άπω σωληνάριο, ΕΣ: εγγύς σωληνάριο, ΦΑΣ: φλοικό αθροιστικό σωληνάριο, ΠΑΣ: παχύ ανιόν σκέλος, ΚΛΣ: κατιόν λεπτό σκέλος, ΕΜΑΣ: έξω μυελικό αθροιστικό σωληνάριο, ΑΛΣ: ανιόν λεπτό σκέλος, ΕΝΑΣ: ενομομελικό αθροιστικό σωληνάριο, ΠΚ: πυκνή κηλίδα. Η αγκύλη του Henle περιλαμβάνει το ευθύ τμήμα του ΕΣ, το ΚΛΣ, το ΑΛΣ και το ΠΑΣ.

σωληνάριο δεύτερης τάξης και από το σύστημα των αθροιστικών σωληναρίων. Το νεφρικό σωματίο σχηματίζεται από το σπείραμα, το οποίο είναι ένας θύσανος από εξειδικευμένα τριχοειδή αγγεία και από το έλυτρο Bowman. Το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο στην αρχή του σχηματίζει αρκετές σπείρες και κατόπιν ακολουθεί μια ευθεία μοίρα, η οποία κατέρχεται προς τη μυελώδη ουσία. Το επόμενο τμήμα είναι η αγκύλη του Henle και το παχύ ανιόν σκέλος. Κοντά στο άκρο του παχέος ανιόντος σκέλους, ο νεφρώνας διέρχεται μεταξύ του προσαγωγού και του απαγωγού αρτηριδίου. Αυτή η βραχεία μοίρα του ανιόντος σκέλους ονομάζεται πυκνή κηλίδα. Το άπω εσπειραμένο σωληνάριο αρχίζει, σε μικρή απόσταση από την πυκνή κηλίδα, να επεκτείνεται μέχρι το σημείο της φλοιώδους ουσίας όπου δύο ή περισσότεροι νεφρώνες συναντώνται για να σχηματίσουν το φλοιικό αθροιστικό σωληνάριο. Το φλοιικό αθροιστικό σωληνάριο εισέρχεται στη μυελώδη ουσία, όπου συνεχίζεται ως έξω μυελικό αθροιστικό σωληνάριο και κατόπιν ως έσω μυελικό αθροιστικό σωληνάριο.

Κάθε μοίρα του νεφρώνα είναι συγκροτημένη από κύτταρα που επιτελούν ειδικές λειτουργίες μεταφοράς(Εικόνα 3). Τα κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου εμφα-



Εικόνα 3: Διάγραμμα του νεφρώνα στο οποίο περιλαμβάνεται και η λεπτή κυτταρική δομή του

κοειδών καταδύσεων, όπου αφθονούν τα μιτοχόνδρια. Αντίθετα, το καθιόν και το λεπτό τμήμα του ανιόντος σκέλους της αγκύλης του Henle εμφανίζουν πολύ λίγο αναπτυγμένη κορυφαία και βασεοπλευρική επιφάνεια και έχουν λίγα μιτοχόνδρια. Τα κύτταρα του παχέος ανιόντος σκέλους και του άπω σωληναρίου εμφανίζουν στη βασεοπλευρική μεμβράνη άφθονες μικρολάχνες και μιτοχόνδρια. Το αθροιστικό σωληνάριο περιέχει δύο κατηγορίες κυττάρων: τα κύρια και τα εμβόλιμα κύτταρα. Τα κύρια κύτταρα εμφανίζουν στη βασεοπλευρική τους μεμβράνη μέτριο εγκολεασμό και έχουν λίγα μιτοχόνδρια. Η τελική μοίρα του νεφρώνα, το έσω μυελικό αθροιστικό σωληνάριο, σχηματίζεται από τα κύτταρα του έσω μυελικού αθροιστικού σωληναρίου.

Οι νεφρώνες διακρίνονται σε επιφανειακούς και παραμυελικούς. Το νεφρικό σωματίο κάθε επιφανειακού νεφρώνα βρίσκεται στην εξωτερική μοίρα του φλοιού. Η αγκύλη του Henle είναι βραχεία και το απαγωγό αρτηρίδιό της διακλαδίζεται στα περισωληναριακά τριχοειδή, τα οποία περιβάλλουν τις σωληναριακές μοίρες του ίδιου νεφρώνα καθώς και των παρακείμενων νεφρώνων. Αυτό το δίκτυο τριχοειδών μεταφέρει οξυγόνο και σημαντικές θρεπτικές ουσίες στα διάφορα τμήματα των σωληναρίων, αφήνει στα σωληνάκια ουσίες για να απεκκριθούν(μετακίνηση μιας ουσίας από το αίμα στο υγρό των σωληναρίων)

νίζουν(προς την πλευρά των ούρων) μια πάρα πολύ εκτεταμένη κορυφαία κυτταρική μεμβράνη που ονομάζεται ψηκτροειδής παρυφή. Αυτή η μορφή μεμβράνης υπάρχει μόνο στα κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου. Η βασεοπλευρική μεμβράνη(προς την πλευρά του αίμα-

τος) εμφανίζει μεγάλο αριθμό θυλα-

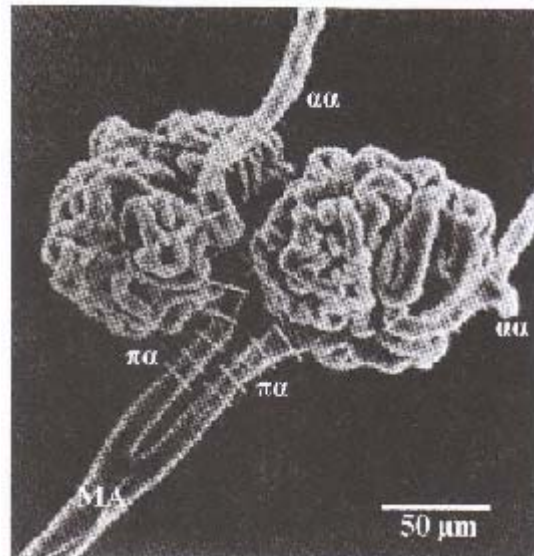
και χρησιμεύει ως οδός επαναφοράς του επαναρροφώμενου ύδατος και των διαλυμένων ουσιών στο κυκλοφορικό σύστημα. Ορισμένα είδη, μεταξύ των οποίων και ο άνθρωπος, έχουν και νεφρώνες με πολύ βραχείες αγκύλες του Henle, οι οποίες δε φτάνουν μέχρι τη μυελώδη μοίρα.

Το νεφρικό σωματίο βρίσκεται δίπλα στην περιοχή της φλοιώδους μοίρας δίπλα από τη μυελώδη μάζα. Τα ανατομικά χαρακτηριστικά των παραμυελικών νεφρώνων διαφέρουν από τα χαρακτηριστικά των επιφανειακών νεφρώνων σε τρία βασικά σημεία: 1) το νεφρικό σωματίο είναι μεγαλύτερο, 2) η αγκύλη του Henle έχει μεγαλύτερο μήκος και εισδύει βαθύτερα στη μυελώδη μοίρα και 3) το απαγωγό αρτηρίδιο δε σχηματίζει μόνο ένα δίκτυο περισωληναριακών τριχοειδών, αλλά και μια σειρά από αγγειακές αγκύλες που ονομάζονται ευθέα αγγεία. Τα ευθέα αγγεία καταδύονται στη μυελώδη μοίρα, όπου σχηματίζουν τριχοειδικά πλέγματα τα οποία περιβάλλουν τα αθροιστικά σωληνάκια και τα ανιόντα σκέλη των αγκυλών του Henle. Το αίμα επιστρέφει στη φλοιώδη μοίρα μέσω των ανιόντων σκελών των ευθέων αγγείων.

Μολονότι λιγότερο από το 0,7% της νεφρικής ροής αίματος εισέρχεται στα ευθέα αγγεία, τα αγγεία αυτά εξυπηρετούν πολύ σημαντικές λειτουργίες, όπως είναι η μεταφορά οξυγόνου και σημαντικών θρεπτικών ουσιών στα διάφορα τμήματα του νεφρώνα, η μεταφορά ουσιών στους νεφρώνες προκειμένου αυτές να εκκριθούν, η επαναφορά επαναρροφώμενου ύδατος και διαλυμένων ουσιών στην κυκλοφορία του αίματος και η συμπύκνωση και αραιώση των ούρων.

Λεπτή δομή του νεφρικού σωματίου

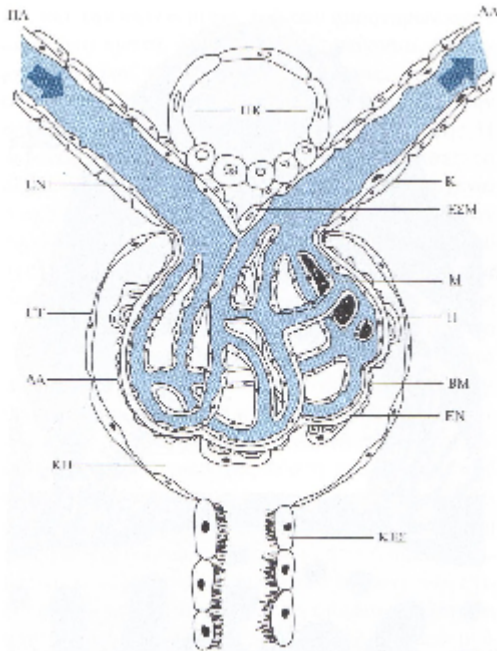
Το πρώτο στάδιο παραγωγής των ούρων αρχίζει με την υπερδιήθηση πλάσματος διά μέσου των σπειραματικών τριχοειδών του σπειράματος. Ο όρος «υπερδιήθηση» αναφέρεται στην παθητική κίνηση ενός υγρού χωρίς, σχεδόν, πρωτεΐνες από τα σπειραματικά τριχοειδή στην κοιλότητα Bowman. Προκειμένου να γίνει κατανοητή η διεργασία της υπερδιήθησης, πρέπει να περιγραφεί η λεπτή υφή του νεφρικού σωματίου. Το σπείραμα σχηματίζεται από ένα δίκτυο τριχοειδών τα οποία δέχονται αίμα από ένα προσαγωγό αρτηρίδιο και το διοχετεύουν στο απαγωγό αρτηρίδιο (Εικόνα 4). Κατά την ανάπτυξη, τα τριχοειδή περικλείονται σταδιακά μέσα στο κλειστό άκρο του εγγύς σωληναρίου, το οποίο σχηματίζει την κάψα του Bowman



του νεφρικού σωματίου. Τα τριχοειδή καλύπτονται από επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία ονομάζονται ποδοκύτταρα και σχηματίζουν το περισπλάγγνιο (έσω) πέταλο της κάψας του Bowman (Εικόνα 5). Τα επιθηλιακά κύτταρα που περιβάλλουν εξωτερικά το σπείραμα σχηματίζουν το τοιχωματικό (έξω) πέταλο της κάψας του Bowman. Ο χώρος μεταξύ του έξω και του έσω πετάλου του ελύτρου Bowman ονομάζεται κοιλότητα Bowman ή ουροφόρος κοιλότητα. Προς τον ουροφόρο πόλο του σπειράματος η κοιλότητα Bowman μεταπίπτει σε αυλό του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου.

Εικόνα 4: Μικροφωτογραφία με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης μιας μεσολοβιδιακής αρτηρίας (ΜΑ), προσαγωγών αρτηριδίων (πα), απαγωγών αρτηριδίων (εα) και σπειραμάτων. οι λευκές ράβδοι δείχνουν ότι η διάμετρος του προσαγωγού αρτηριδίου και του απαγωγού αρτηριδίου είναι 15 έως 20 μm. (Από Kimura K et al: Am J Physiol 259:F936, 1990).

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των σπειραματικών τριχοειδών επικάθονται στη βασική μεμβράνη των τριχοειδών, η οποία εξωτερικά περιβάλλεται από τα ποδοκύτταρα(Εικόνες 5, 6, 7). Το ενδοθήλιο των τριχοειδών, ο βασικός υμένας και οι ποδικές προεκβολές των ποδοκυττάρων σχηματίζουν τον ονομαζόμενο φραγμό διήθησης. Το ενδοθήλιο είναι διάτρητο(περιέχει σπές 700 Å) και πλήρως διαπερατό από το νερό, από μικρομοριακές διαλυμένες ουσίες, όπως π.χ. από νάτριο, ουρία και γλυκόζη, καθώς και από μικρά



Εικόνα 5: Λεπτή υφή του νεφρικού σωματίου και της παρασπειραματικής συσκευής. Η παρασπειραματική συσκευή αποτελείται από: (1) την πυκνή κηλίδα(ΠΚ) του παχέος ανιόντος σκέλους, (2) τα εξωσπειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα(ΕΣΜ) και (3) τα ρениνο-παραγωγά κοκκιώδη κύτταρα(Κ) των προσαγωγών(ΠΑ) και των απαγωγών(ΑΑ) αρτηριδίων. ΕΝ: ενδοθηλιακά κύτταρα, ΕΤ: επιθήλιο τοιχώματος, ΔΑ: δακτυλιοειδείς αποφυάδες, ΚΒ: κοιλότητα Bowman, ΚΕΣ: κύτταρο του εγγύς σωληναρίου, ΒΜ: βασικός υμένας, Π: ποδοκύτταρο, Μ: μεσαγγειακά κύτταρα. (Από Koushanpour E, Kriz W: Renal physiology principles, structure and function, ed 2, Berlin 1986, Springer-Verlag, τροποποιημένη)

πρωτεϊνικά μόρια. Επειδή οι σπές είναι σχετικά μεγάλες, το ενδοθήλιο δρα ως φραγμός μόνο για τα κύτταρα. Ο βασικός υμένας είναι ένας σημαντικός φραγμός της διήθησης στις πρωτεΐνες του πλάσματος. Τα ποδοκύτταρα που πραγματοποιούν ενδοκυττάρωση, έχουν δακτυλιοειδείς προεκβολές οι οποίες περιβάλλουν τελείως την εξωτερική επιφάνεια των τριχοειδών(Εικόνα 7). Οι αποφυάδες των ποδοκυττάρων καλύπτουν το βασικό υμένα με τη μορφή συμπλεκόμενων δακτύλων που διαχωρίζονται από ανοίγματα που ονομάζονται σχισμές διήθησης. Κάθε σχισμή διήθησης γεφυρώνεται από ένα λεπτό διάφραγμα που περιέχει πόρους διαστάσεων 40Å x 140Å. Έτσι οι σχισμές διήθησης επιβραδύνουν τη διήθηση ορισμένων πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων τα οποία διαπερνούν το ενδοθήλιο και το βασικό υμένα. Επειδή ο βασικός υμένας και οι σχισμές διήθησης περιέχουν αρνητικά φορτισμένες γλυκοπρωτεΐνες, ορισμένα μόρια κατακρατούνται ανάλογα με το μέγεθός τους και φορτίο τους. Έτσι μόρια με δραστική διάμετρο 18Å έως 36Å ή κατιοντικά μόρια διηθούνται πιο εύκολα παρά τα ανιοντικά μόρια.

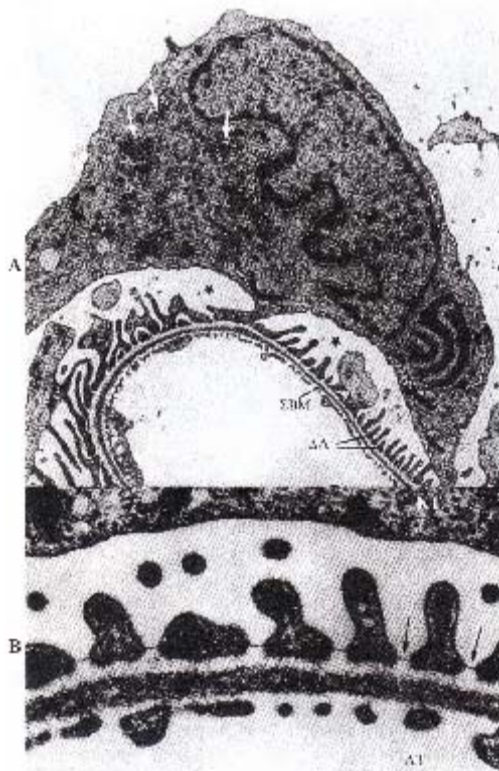
Μια άλλη σημαντική συνιστώσα του νεφρικού σωματίου είναι το μεσάγγειο, το οποίο αποτελείται από τα μεσαγγειακά κύτταρα και από τη μεσαγγειακή μήτρα(Εικόνα 5). Τα μεσαγγειακά κύτταρα περιβάλλουν τα σπειραματικά τριχοειδή,

παρέχουν σε αυτά δομική στήριξη, εκκρίνουν τις ουσίες που σχηματίζουν την εξωκυττάρια μήτρα, πραγματοποιούν φαγοκυτταρική δραστηριότητα και εκκρίνουν προσταγλανδίνες. Τα μεσαγγειακά κύτταρα συστέλλονται και, επειδή γειτνιάζουν με τα σπειραματικά τριχοειδή, μπορούν να επηρεάζουν το ρυθμό της σπειραματικής διήθησης, ρυθμίζοντας τη ροή του αίματος στα τριχοειδή ή μεταβάλλοντας τη επιφάνεια των τριχοειδών.

Τα μεσαγγειακά κύτταρα που βρίσκονται έξω από το σπείραμα(μεταξύ των προσαγωγών και των απαγωγών αρτηριδίων) ονομάζονται εξωσπειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα ή κύτταρα Goormaghtigh. Τα κύτταρα αυτά, όπως και τα μεσαγγειακά, ασκούν φαγοκυτταρικές λειτουργίες.

Η παρασπειραματική συσκευή

Οι δομές που συγκροτούν την παρασπειραματική συσκευή είναι: 1) η πυκνή κηλίδα του παχέος ανιόντος σκέλους, 2) τα εξωσπειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα και 3) τα ρενινο – παραγωγά κοκκιώδη κύτταρα του προσαγωγού και του απαγωγού αρτηριδίου(Εικόνα 5). Η πυκνή κηλίδα αποτελεί μορφολογικά διακριτή περιοχή του παχέος ανιόντος σκέλους και διέρχεται μέσα από τη γωνία που σχηματίζουν το προσαγωγό και το απαγωγό αρτηρίδιο. Τα κύτταρα της πυκνής κηλίδας εφάπτονται με τα εξωσπειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα του προσαγωγού και του απαγωγού αρτηριδίου. Τα κοκκιώδη κύτταρα του προσαγωγού και του απαγωγού αρτηριδίου είναι τροποποιημένες λείες μυϊκές ίνες που έχουν την



Εικόνα 6: Α. Μικροφωτογραφία, με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ενός ποδοκυττάρου που περιβάλλει ένα σπειραματικό τριχοειδές. Το κυτταρικό σώμα του ποδοκυττάρου περιέχει ένα μεγάλο πυρήνα με αυλακώσεις. Οι κυτταρικές αποφυάδες του ποδοκυττάρου σχηματίζουν τις συμπλεκόμενες δακτυλιοειδείς αποφυάδες(ΔΑ). Τα τόξα στο κλυτταρόπλασμα του ποδοκυττάρου δείχνουν την πολύ καλά αναπτυγμένη συσκευή Golgi. ΑΤ: αυλός του τριχοειδούς, ΣΒΜ: σπειραματικός βασικός υμένας. Οι αστερίσκοι δείχνουν την κοιλότητα Bowman(μεγέθυνση ~7600x). Β. Μικροφωτογραφία του φραγμού διήθησης ενός τριχοειδούς του σπειράματος. ΑΤ: αυλός του τριχοειδούς, ΚΤ: κυτταρικό σώμα του ποδοκυττάρου. Ο φραγμός διήθησης αποτελείται από τρεις στιβάδες: το ενδοθήλιο με μεγάλους πόρους, το βασικό υμένα και τις δακτυλιοειδείς αποφυάδες των ποδοκυττάρων. Σημειώνονται τα διαφράγματα που γεφυρώνουν το δάπεδο των σχισμών διήθησης(τόξα). (Μεγέθυνση ~42700x). (Από Kriz W, Kaissling B, Structural organisation of the mammalian kidney. In Seldin DW, Giebisch G, eds: The kidney physiology and pathophysiology, ed 2, New York, 1992, Raven Press)



Εικόνα 7: Α. Μικροφωτογραφία με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που δείχνει την εξωτερική επιφάνεια των σπειραματικών τριχοειδών. Αυτή είναι η όψη που θα έβλεπε κανείς από την κοιλότητα Bowman. Αποφυάδες(Α) των ποδοκυττάρων κατευθύνονται από το κυτταρικό σώμα(ΚΣ) προς τα τριχοειδή, όπου τελικά διαχωρίζονται σε δακτυλιοειδείς αποφυάδες. Η διαπλοκή των αποφυάδων δημιουργεί τις σχισμές διήθησης. (μεγέθυνση ~3400x). Β. Μικροφωτογραφία με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης της εσωτερικής επιφάνειας(αιμοφόρος πόλος) ενός σπειραματικού τριχοειδούς. Οι θυρίδες των ενδοθηλιακών κυττάρων φαίνονται σαν τρύπες μεγέθους 700Α. (Μεγέθυνση ~16000x). (Από Kriz W, Kaissling B: Structural organisation of the mammalian kidney. In Seldin DW Giebisch G eds: The kidney physiology and pathophysiology, ed 2, New York, 1992, Raven Press).

ιδιότητα να συνθέτουν, να αποθηκεύουν και να εκκρίνουν ρενίνη. Η ρενίνη συμμετέχει στην παραγωγή της αγγειοτασίνης II και, τελικά, στην έκκριση αλδοστερόνης. Η παρασπειραματική συσκευή είναι μία από τις συνιστώσες ενός σημαντικού αναδραστικού μηχανισμού(του σωληναριοσπειραματικού αναδραστικού μηχανισμού), ο οποίος παρεμβαίνει στην αυτορρύθμιση της νεφρικής αιματικής ροής και του ρυθμού της σπειραματικής διήθησης.

Ποδοκύτταρα, μοριακή δομή ποδοκυττάρων και του λεπτού διαφράγματος και βιολογία του σπειραματικού ηθμού

Σπειραματικά επιθηλιακά κύτταρα ή ποδοκύτταρα

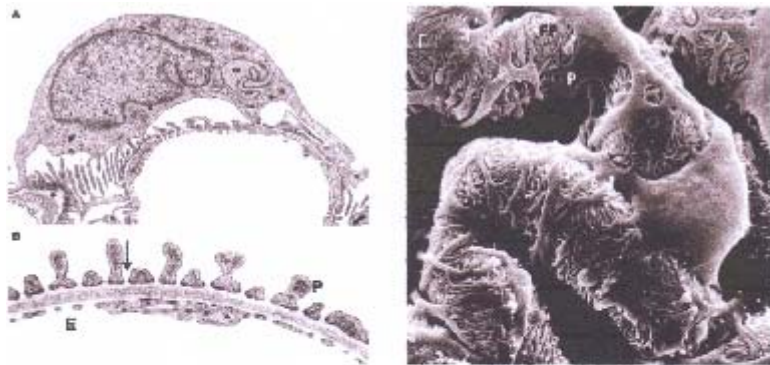
Τα ποδοκύτταρα είναι κύτταρα τελικής διαφοροποίησης με απουσία(ή πολύ αργό ρυθμό) κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Σχηματίζουν την εξωτερική στιβάδα του τοιχώματος

των τριχοειδών και προσκολλώνται στο εξωτερικό πέταλο της βασικής μεμβράνης του σπειράματος(Εικόνα 8). Ονομάστηκαν έτσι γιατί καλύπτουν τη βασική μεμβράνη του

σπειράματος με πλήθος κυτταροπλασματικών προεκβολών δίνοντας στα κύτταρα την εικόνα που έχουν τα πλοκάμια ενός χταποδιού. Από τις προεκβολές αυτές ξεκινά πλήθος δευτερευόντων μικρότερων προεκβολών που ονομάζονται ποδοκυτταρικές

εκβλαστήσεις ή ποδίσκοι οι οποίοι εισέρχονται στη βασική μεμβράνη σε βάθος 40 – 60nm. Οι ποδίσκοι διαπλέκονται με τους αντίστοιχους των παρακείμενων κυττάρων και αφήνουν μεταξύ τους μικρές σχισμές(slits) διαμέτρου έως και 40nm οι οποίες επιτρέπουν, όπως έχει προαναφερθεί, τη διήθηση νερού και ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους. Οι σχισμές αυτές καλύπτονται από το λεπτό διάφραγμα(ΛΔ). Ο κυτταροσκελετός του λεπτού διαφράγματος σε τρισδιάστατη απεικόνιση έχει εμφάνιση «φερμουάρ» κατά μήκος των ποδικών εκβλαστήσεων και δημιουργεί το φραγμό μεγέθους στη διήθηση ουσιών.

Τα ποδοκύτταρα έχουν ένα ογκώδες κυτταρόπλασμα, το οποίο βρίσκεται στον ουρικό χώρο της κάψας του Bowman. Περιέχουν ένα μεγάλο πυρήνα, πολύ αναπτυγμένο σύστημα Golgi και ενδοπλασματικό δίκτυο, χαρακτηριστικά λυσοσώματα και πολλά μιτοχόνδρια. Σε αντίθεση, οι ποδοκυτταρικές εκβλαστήσεις περιέχουν μόνο οργανίδια. Η πυκνότητα των οργανιδίων του κυτταροπλάσματος δείχνει τη μεγάλη μεταβολική δραστηριότητα του κυτταροπλάσματος. Τα ποδοκύτταρα συνθέτουν τα περισσότερα συστατικά της βασικής μεμβράνης του σπειράματος. Ο κυτταροσκελετός των ποδοκυττάρων δομείται από ένα πολύπλοκο δίκτυο μικροϊνιδίων και μικροσωληνίσκων, αποτελούμενο κυρίως από ακτίνη, συναπτοποδίνη και άλλες πρωτεΐνες. Τα μόρια αυτά συνδέονται με βασική μεμβράνη με συμπλέγματα $\alpha\beta 1$ – ιντεγκρινών αλλά και άλλες πρωτεΐνες. Ο σκελετός αυτός,



Εικόνα 8: Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου στην οποία απεικονίζονται: **A.** ποδοκύτταρο με τις προεκβολές του επί της βασικής μεμβράνης του σπειράματος. **B.** τα ενδοθηλιακά κύτταρα (E) και οι ποδίσκοι(P) των ποδοκυττάρων. Το βέλος δείχνει τη διηθητική σχισμή της μεμβράνης και το λεπτό διάφραγμα. **Γ.** εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Τα ποδοκύτταρα καλύπτουν τη βασική μεμβράνη με πλήθος κυτταροπλασματικών προεκβολών δίνοντας στα κύτταρα την εικόνα που έχουν τα πλοκάμια του χταποδιού.

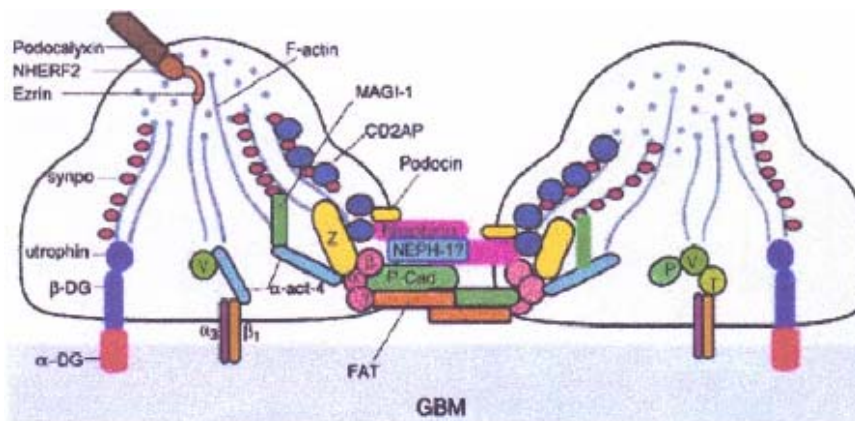
αντιδρώντας σε αγγειοδραστικές ορμόνες, επιτρέπει στα ποδοκύτταρα να διαδραματίζουν σοβαρό ρόλο στο σπειραματικό φραγμό διήθησης.

Βασική μεμβράνη του σπειράματος

Η βασική μεμβράνη του σπειράματος(ΣΒΜ) έχει πάχος 250 – 350nm και αποτελείται από τρεις διαφορετικές στιβάδες: μια παχιά κεντρική, το πυκνό πέταλο(lamina densa), το έσω πέταλο(lamina rara interna) που έρχεται σε επαφή με το ενδοθήλιο και το έξω πέταλο(lamina rara externa) που έρχεται σε επαφή με τα επιθηλιακά κύτταρα. Συντίθεται από τα ποδοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV και V, λαμινίνη, πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες.

Μοριακή δομή των ποδοκυττάρων και σπειραματικός ηθμός

Ο σπειραματικός ηθμός αποτελείται από το πορώδες ενδοθήλιο, τη σπειραματική βασική μεμβράνη(ΣΒΜ) και τις ποδοκυτταρικές εκβλαστήσεις με τα λεπτά διαφράγματα(ΛΔ) που τις γεφυρώνουν. Είναι ελεύθερα διαπερατός από το νερό και τους ηλεκτρολύτες ενώ για μεγαλύτερες ουσίες, όπως οι πρωτεΐνες, η διαπερατότητα καθορίζεται από το μέγεθος και το ηλεκτρικό φορτίο. Το λεπτό διάφραγμα συνιστά το φραγμό μεγέθους ενώ το αρνητικό φορτίο της επιφάνειας του ποδοκυττάρου και της βασικής μεμβράνης ου σπειράματος το φραγμό φορτίου. Το λεπτό διάφραγμα προέρχεται κατά την εμβρυογένεση από μεσοκυττάριο σύνδεσμο και περιέχει από νωρίς τη χαρακτηριστική πρωτεΐνη των στενοσυνδέσμων ZO – 1(zonula occludens) στην κυτταροπλασματική του επιφάνεια. Σε επιμήκεις τομές το λεπτό διάφραγμα εμφανίζει μορφολογικά χαρακτηριστικά κυτταρικού συνδέσμου με ευρύ μεσοκυττάριο χάσμα και μια κεντρική πυκνή γραμμή που διατρέχει τη λεπτή σχισμή καθ' όλο το μήκος των ποδικών εκβλαστήσεων. Τα τελευταία χρόνια έχει, σε μεγάλο βαθμό, αποσαφηνιστεί η μοριακή δομή του λεπτού διαφράγματος, με την ανακάλυψη διαφόρων μορίων όπως η ZO – 1, η νεφρίνη, η CD2AP, η FAT, η P – καντερίνη, η δεσμίνη και η ποδοσίνη. Πολλές από τις παραπάνω πρωτεΐνες(Εικόνα 9¹) παίζουν βασικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του λεπτού διαφράγματος.



Εικόνα 9: Εγκάρσια τομή δύο γειτονικών ποδικών εκβλαστήσεων συνοδευόμενες με το λεπτό διάφραγμα. Σημειώνονται οι διάφορες πρωτεΐνες και τα συστατικά του κυτταροσκελετού των ποδικυττάρων και του λεπτού διαφράγματος.

Οι πρωτεΐνες της πλαγίας επιφάνειας(Λεπτό διάφραγμα)

Νεφρίνη

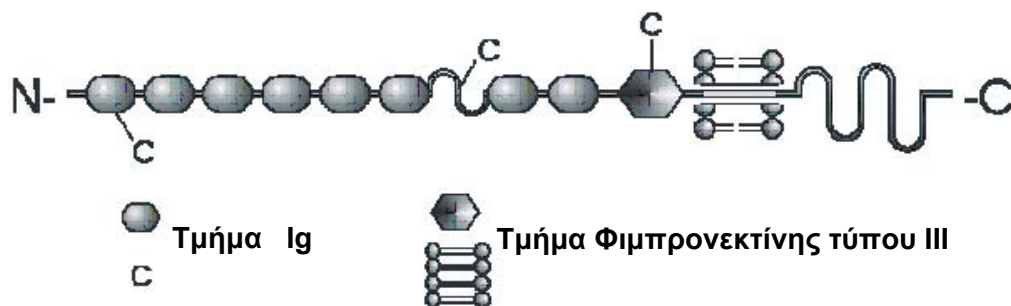
Το γονίδιο της νεφρίνης NPHS1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19q13, αποτελείται από 26kb και περιέχει 29 εξόνια². Το παραγόμενο mRNA έχει μήκος 4,3kb και μεταφράζεται σε μια πρωτεΐνη που ονομάζεται νεφρίνη. Μετάλλαξη του γονιδίου προκαλεί τον Φιλανδικό τύπο συγγενούς νεφρωσικού συνδρόμου(CNF) που κληρονομείται κατά τον αυτοσωμικό

υπολειπόμενο χαρακτήρα και εμφανίζεται σε 1/10.000 γεννήσεις στη Φιλανδία. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 50 μεταλλάξεις του γονιδίου. Οι συχνότερες μεταλλάξεις είναι: α) ο γονότυπος Fin – major που οφείλεται σε απαλοιφή 2bp στο εξόνιο 2 η οποία μεταβάλλει το αναγνωστικό πλαίσιο και εισαγάγει ένα κωδικόνιο τερματισμού στο ίδιο εξόνιο και β) ο γονότυπος Fin – minor που οφείλεται σε nonsense μετάλλαξη στο εξόνιο 26 και προκαλεί πρώιμη διακοπή της μετάφρασης στην θέση Arg-1109³. Η νεφρίνη έχει MB 180 και ανήκει στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Στο νεφρό εντοπίζεται αποκλειστικά και μόνο στα ποδοκύτταρα όπου συμμετέχει στο σχηματισμό του ΛΔ. Η τριτοταγής δομή και η διαμεμβρανική της εντόπιση καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από γλυκοζυλίωση σε θέσεις αζώτου⁴.

Μεταλλάξεις του γονιδίου NPHS1 χαρακτηρίζονται από μαζική πρωτεϊνουρία ήδη κατά την ενδομήτρια ζωή. Η θεραπεία των ασθενών με CNF συνίσταται σε πρώιμη νεφρεκτομή και αιμοκάθαρση έως ότου η ηλικία του παιδιού να καθιστά δυνατή τη νεφρική μεταμόσχευση. Η μεταμόσχευση εμφανίζει 20% ποσοστό υποτροπής του νεφρωσικού συνδρόμου εξαιτίας της δημιουργίας αντισωμάτων έναντι της νεφρίνης⁵.

Κατά την οργανογένεση στα ποντίκια, η νεφρίνη εμφανίζεται στο στάδιο της τριχοειδικής αγκύλης ταυτόχρονα με τη μετατροπή των διακυτταρικών συνδέσμων σε λεπτά διάφραγμα. Στον άνθρωπο το mRNA της νεφρίνης ανιχνεύεται στο τέλος του σταδίου του νεφρικού σωματίου σχήματος S μεταξύ της 13ης και 23ης εβδομάδας της κύησης⁶.

Η νεφρίνη αποτελείται από ένα εξωκυττάριο αμινοτελικό άκρο που περιέχει 8 Ig επαναλαμβανόμενα τμήματα και ένα τμήμα φιβρονεκτίνης τύπου III. Το ενδοκυττάριο τμήμα περιέχει 8 κατάλοιπα τυροσίνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η νεφρίνη εκτός από την κυτταρική πρόσφυση πιθανότατα συμμετέχει και στην κυτταρική επικοινωνία(εικόνα 10).



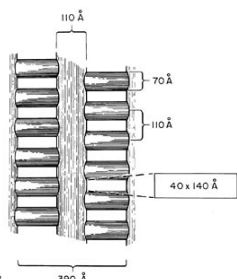
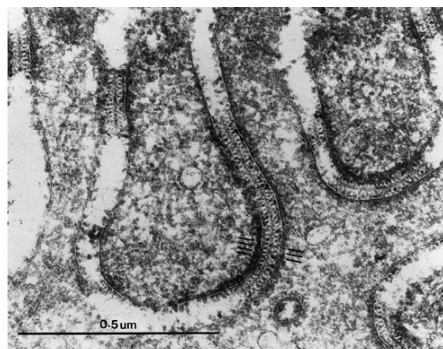
Εικόνα 10

Σε μελέτες με ΗΜ κατά τη διαφοροποίηση των ποδοκυττάρων η νεφρίνη είναι παρούσα σε συνδέσμους τύπου σκάλας και αργότερα εμφανίζεται στο λεπτό διάφραγμα καθώς οι σύνδεσμοι αυτοί αντικαθίστανται από λεπτό διάφραγμα. Η νεφρίνη εντοπίζεται επίσης στον εγκέφαλο και στα β κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος.

Σε πειράματα με μετάλλαξη του γονιδίου NPHS1 δεν εμφανίζονται ούτε οι σύνδεσμοι τύπου σκάλας ούτε λεπτό διάφραγμα, ενώ οι πρωτεΐνες ZO – 1 και P – καντερίνη εκφράζονται κανονικά. Πρώιμοι διακυτταρικοί σύνδεσμοι εμφανίζονται επίσης κανονικά στο στάδιο του νεφρώνα σχήματος S και στο στάδιο της τριχοειδικής αγκύλης γεγονός που σημαίνει ότι για το σχηματισμό των πρώιμων συνδέσμων δεν απαιτείται νεφρίνη. Η

νεφρίνη είναι απαραίτητη στα επόμενα στάδια ωρίμανσης κατά την μετατροπή των πρώιμων συνδέσμων σε λεπτό διάφραγμα και την μετανάστευσή τους από την κορυφαία επιφάνεια στην πλαγία για την κάλυψη της λεπτής σχισμής⁶.

Το αμινοτελικό άκρο της νεφρίνης με τις 8 ανοσοσφαιρικές επαναλήψεις(ICAM) αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό άκρο της νεφρίνης της απέναντι ποδικής εκβλάστησης. Τα μόρια αυτά διατάσσονται αλληλοδιαδοχικά και σχηματίζουν μια δομή σαν φερμουάρ⁷ (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Τα μόρια που συνιστούν το λεπτό διάφραγμα διατάσσονται αλληλοδιαδοχικά και σχηματίζουν μια δομή σαν φερμουάρ ανάμεσα σε δυο γειτονικές ποδικές εκβλαστήσεις

Σε ποντίκια που έχουν υποστεί ομόλογο ανασυνδυασμό του γονιδίου της νεφρίνης (knock out), παρουσιάζεται μαζική πρωτεϊνουρία ήδη πριν από τη γέννηση, ενώ πεθαίνουν αμέσως μετά τη γέννηση. Τα σπειράματα στερούνται ποδικών προεκβολών και λεπτού διαφράγματος. Στη βασική μεμβράνη του σπειράματος εκφράζεται φυσιολογικά η λαμινίνη, το κολλαγόνο τύπου IV και οι άλλες πρωτεΐνες. Η μόνη διαταραχή αφορά στο κεντρικό πυκνό πέταλο το οποίο είναι λεπτότερο. Οι ZO – 1, FAT και P – καντερίνη εκφράζονται κανονικά.

Ποντίκια Knock – out για την α3 αλυσίδα του κολλαγόνου – IV παρουσιάζουν διαταραχή στη σύνθεση των α3, α4, α5 αλυσίδων του κολλαγόνου καθώς και στη σύνθεση της λαμινίνης. Ωστόσο τις πρώτες 4 εβδομάδες μετά τη γέννηση δεν εμφανίζεται πρωτεϊνουρία. Την 5η εβδομάδα παρατηρείται σταδιακή εξαφάνιση της νεφρίνης, των λεπτών διαφραγμάτων, των ποδίσκων και μαζική πρωτεϊνουρία⁶. Το γεγονός ότι μόνο μετά την εξαφάνιση της νεφρίνης εμφανίζεται πρωτεϊνουρία, αποδεικνύει τον κεντρικό ρόλο της πρωτεΐνης αυτής

στη διατήρηση της ακεραιότητας του σπειραματικού ηθμού.

Η χορήγηση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του εξωκυττάριου τμήματος της νεφρίνης(Mab 5 – 1 – 6) προκαλεί πρωτεϊνουρία με εστιακή μόνο σύντηξη των εκβλαστήσεων. Θεωρείται πιθανό ότι η σύνδεση του αντισώματος στη νεφρίνη επάγει τη γένεση και μεταφορά σημάτων στο εσωτερικό του κυττάρου που προκαλούν αναδιάταξη του κυτταροσκελετού των ποδοκυττάρων και ελάττωση του ανιοντικού φορτίου της βασικής μεμβράνης του σπειράματος⁸.

Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν την αλληλεπίδραση που υπάρχει μεταξύ της ΣΒΜ, του κυτταροσκελετού, και των 3 λειτουργικών επιφανειών των ποδίσκων.

Η νεφρίνη είναι σηματοδοτικό μόριο

Η νεφρίνη όπως ήδη ειπώθηκε ανήκει στην οικογένεια ICAM(Ig Cellular Adhesion Molecules). Τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης συμβάλουν εκτός από την μηχανική σύνδεση των κυττάρων, στην επικοινωνία μεταξύ τους καθώς και στην επικοινωνία κυττάρων και θεμέλιας ουσίας. Τα σήματα αυτά είναι σημαντικά για την διατήρηση της πρόσφυσης, την κινητικότητα, την αύξηση και επιβίωση των κυττάρων.

Μεταλλάξεις που επηρεάζουν το ενδοκυττάριο τμήμα της νεφρίνης(σηματοδοτικό τμήμα πλούσιο σε κατάλοιπα τυροσίνης) όπως για παράδειγμα η μετάλλαξη C3325T που προκαλεί απαλοιφή των τελευταίων 132 αμινοξέων του καρβοξυτελικού ενδοκυττάριου τμήματος, οδηγούν σε πρωτεϊνουρία και εξάλειψη των ποδίσκων⁴.

Οι περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης όπου βρίσκεται η νεφρίνη είναι φτωχή σε χοληστερόλη. Ένα μικρό ποσοστό της νεφρίνης εντοπίζεται σε περιοχές πλούσιες σε χοληστερόλη και γαγγλιοσίδια στην κορυφαία επιφάνεια των ποδικών εκβλαστήσεων, όπου μαζί με την CD2AP συνδέεται στον κυτταροσκελετό. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται «λιπιδικές σχεδίες» και περιέχουν ομάδες πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην μετάδοση σημάτων προς το κύτταρο. Χορήγηση του αντισώματος 27A έναντι της GD3 γαγγλιοσίδης που εντοπίζεται στις λιπιδικές σχεδίες, προκαλεί πρωτεϊνουρία και τυροσινική φωσφορυλίωση της νεφρίνης^{9, 10}. Το ενδοκυττάριο τμήμα της νεφρίνης φωσφορυλιώνεται από κινάσες της οικογένειας src, όπως η κινάση Fyn και Yes που καθιζάνουν μαζί με τη νεφρίνη κατά τον κλασματικό διαχωρισμό των λιπιδικών σχεδιών¹¹. Η απαλοιφή της Fyn κινάσης σε ποντίκια, προκαλεί μεταβολές στη μορφολογία των ποδικών προεκβολών¹¹. Επίσης έχει βρεθεί ότι η νεφρίνη και η CD2AP αλληλεπιδρούν με την κινάση των φωσφοϊνοσιτιδίων PK13 και μαζί με την ποδοσίνη ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι AKT το οποίο προκαλεί φωσφορυλίωση πολλαπλών πρωτεϊνών στόχων στα ποδοκύτταρα περιλαμβανομένης της Bad¹².

Ποδοσίνη

Είναι μια πρωτεΐνη με MB 42KDa σε σχήμα φουρκέτας καθώς το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα όπως όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας των στοματινών – καβεολινών. Εντοπίζεται στο σημείο αγκυροβόλησης του λεπτού διαφράγματος στην κυτταρική μεμβράνη. Ολιγομερή της ποδοσίνης εντοπίζονται σε «λιπιδικές σχεδίες» όπου μέσω του καρβοξυτελικού τους άκρου συνδέονται με τη νεφρίνη και την CD2AP¹³. Άλλα μέλη της οικογένειας έχουν ανιχνευθεί σε κύτταρα του νευρικού ιστού, όπου συνδέουν ιοντικά κανάλια με τον κυτταροσκελετό. Παρόμοια λειτουργία είναι πιθανή και στα ποδοκύτταρα. Πέρα από τη δομική της λειτουργία φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη διευκόλυνση της σηματοδοτικής λειτουργίας της νεφρίνης. Το γονίδιο της ονομάζεται NPHS2, μεταλλάξεις του οποίου προκαλούν το ανθεκτικό στα στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο που κληρονομείται με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Το σύνδρομο αυτό εμφανίζεται στην παιδική ηλικία και εξελίσσεται γρήγορα σε τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Δεν συνοδεύεται από εξωνεφρικές εκδηλώσεις και δεν υποτροπιάζει μετά τη μεταμόσχευση νεφρού⁶.

CD2AP

Η πρωτεΐνη αυτή με MB 80KDa, εντοπίστηκε αρχικά στην κυτταρική μεμβράνη των T – λεμφοκυττάρων και κυττάρων φυσικών φονέων(NK), όπου συνδέεται με το ενδοκυττάριο τμήμα της CD2 συμβάλλοντας στην αγκυροβόληση της CD2 πάνω στη μεμβράνη. Η CD2 διευκολύνει την σύνδεση των παραπάνω κυττάρων με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα(ανοσολογική σύναψη).

Η CD2AP περιέχει 3 SH3 ομάδες με μία από τις οποίες συνδέεται με τη CD2. Με το αμινοτελικό της άκρο συνδέεται στον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Τέλος περιέχει μια περιοχή πλούσια σε προλίνη. Στο νεφρό εντοπίζεται στα ποδοκύτταρα και σε κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου και του αθροιστικού σωληναρίου¹⁴. Στα ποδοκύτταρα η CD2AP συνδέεται με τη νεφρίνη, την ακτίνη, την α – ακτινίνη – 4 και τις πρωτεΐνες δεματοποίησης της ακτίνης κορτακτίνη και ARP2/3¹⁵.

Σε CD2AP Knock – out ποντίκια, παρατηρείται πρωτεϊνουρία και νεφρική ανεπάρκεια. Κατά την γέννηση δεν παρατηρούνται διαταραχές στο σχηματισμό των ποδικών εκβλαστήσεων και του λεπτού διαφράγματος αλλά με την πάροδο του χρόνου τα ποντίκια χάνουν σταδιακά την νεφρίνη, μέχρις εξαφάνισης, από τα περισσότερα σπειράματα. Την 1η εβδομάδα μετά τη γέννηση παρατηρείται απώλεια των ποδικών εκβλαστήσεων που γενικεύεται την 2η εβδομάδα οπότε εμφανίζονται και μεσαγγειακές εναποθέσεις. Την 4η

εβδομάδα παρατηρείται σκλήρυνση των σπειραμάτων, διάταση των τριχοειδικών αγκυλών, επίταση των μεσαγγειακών εναποθέσεων και νεφρική ανεπάρκεια.

Τα γονίδια της CD2AP και της ποδοσίνης(NPHS2) περιέχουν ρυθμιστικές περιοχές που συνδέουν τον παράγοντα Lmx1b. Σε Lmx1b Knock – out ποντίκια, παρατηρείται μειωμένη έκφραση της CD2AP, της ποδοσίνης και της α4 αλυσίδας του κολλαγόνου τύπου IV. Στον άνθρωπο η μετάλλαξη του γονιδίου Lmx1b προκαλεί το σύνδρομο Neil – patella που χαρακτηρίζεται μεταξύ άλλων από σπειραματοπάθεια η οποία θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη μειωμένη έκφραση της CD2AP και της ποδοσίνης με επακόλουθο την αδυναμία σχηματισμού λεπτού διαφράγματος και ποδικών εκβλαστήσεων¹⁶.

Σε ποντίκια με μετάλλαξη του γονιδίου της β2 αλυσίδας της λαμινίνης παρατηρείται ανακατανομή των μορίων της CD2AP και άθροισή τους κατά ομάδες με ταυτόχρονη σύντηξη των ποδικών εκβλαστήσεων. Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η CD2AP είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ακεραιότητας του λεπτού διαφράγματος και της αρχιτεκτονικής του ποδοκυττάρου μετά τη γέννηση¹⁴.

ZO – 1

Η πρωτεΐνη αυτή έχει MB 225KDa και εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια των μεσοκυττάρων συνδέσμων. Ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών MAGUK(membrane associated guanylate kinase). Περιέχει 3 PDZ τμήματα και παίζει ρόλο στην κυτταρική επικοινωνία και στην οργάνωση διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Αλληλεπιδρά με άλλα συστατικά των διακυτταρικών συνδέσμων όπως η οκλουντίνη(occludin), η α – κατενίνη και η ZO – 2 καθώς και με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού όπως η ακτίνη και σπεκτρίνη. Στα ποδοκύτταρα εκφράζεται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια στα σημεία όπου το λεπτό διάφραγμα εισχωρεί στην κυτταρική μεμβράνη. Κατά την οργανογένεση εμφανίζεται ταυτόχρονα με τη νεφρίνη στο στάδιο του νεφρικού σωματίου σχήματος S. Σε νεφρά εμβρύων με CNF και γονότυπο Fin – major/Fin – major η ZO – 1 εκφράζεται κανονικά. Αντιθέτως κατά την χορήγηση σε αρουραίους μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της νεφρίνης, παρατηρείται σταδιακή μείωση της ZO – 1 και 5 μέρες μετά την πρόκληση του νεφρωσικού συνδρόμου δεν ανιχνεύεται καθόλου ZO – 1. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι η διαταραχή της λειτουργίας της νεφρίνης από το αντίσωμα πυροδοτεί στο εσωτερικό του ποδοκυττάρου σήματα που οδηγούν στην καταστολή της έκφρασης της ZO – 1¹⁷. Είναι ενδιαφέρον ότι σε ποντίκια MWF που εμφανίζουν ιδιοσυστασιακά πρωτεϊνουρία, παρατηρείται ανακατανομή της ZO – 1 χωρίς διαταραχή των ποδικών εκβλαστήσεων και του λεπτού διαφράγματος¹⁸.

FAT

Η FAT ανήκει στην οικογένεια των καντερινών(cadherins), έχει MB 516 KDa και περιέχει 34 διαδοχικές εξωκυττάρια επαναλήψεις τύπου καντερίνης. Εντοπίζεται μαζί με τη νεφρίνη στη βάση του λεπτού διαφράγματος, το δε ενδοκυττάριο τμήμα της συνδέεται με την ZO – 1¹⁹. Το μεγάλο εξωκυττάριο μήκος της FAT προσδίδει στο λεπτό διάφραγμα την ιδιαιτερότητα ότι είναι πολύ πιο ευρύ σε σχέση με τους κανονικούς συνδέσμους και δεσμοσώματα και γι' αυτό θεωρείται από τους περισσότερους συγγραφείς ένα είδος τροποποιημένου κυτταρικού συνδέσμου.

P – καντερίνη

Είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη MB 120 KDa. Περιέχει 5 διαδοχικά μόρια καντερίνης εξωκυττάρια και ένα ενδοκυττάριο τμήμα που συνδέεται στην α- β- και γ- κατενίνη. Το σύμπλεγμα αυτό συνδέεται στην ZO – 1 ή/και α – ακτινίνη – 4 συμβάλλοντας έτσι στη σύνδεση του λεπτού διαφράγματος με τον κυτταροσκελετό. Δυο μόρια P – καντερίνης συνδέονται μεταξύ τους γεφυρώνοντας την διαφραγματική σχισμή και σχηματίζουν τον

πυρήνα πάνω στον οποίο χτίζεται το λεπτό διάφραγμα. Παρά ταύτα, σε CNF νεφρά η P – καντερίνη εκφράζεται κανονικά και σε knock – out για την P – καντερίνη ποντίκια δεν εμφανίζεται νεφρωσικό σύνδρομο. Η παρουσία επομένως της P – καντερίνης δεν είναι ζωτικής σημασίας για την ομαλή λειτουργία του λεπτού διαφράγματος γεγονός που ισχύει και για το άλλο μέλος της οικογένειας, τη FAT.

NEPH1

Η NEPH1 παρουσιάζει ομολογία με τη νεφρίνη καθώς περιέχει 5 ανοσοσφαιρινικές επαναλήψεις. Φαίνεται πιθανό να συνδέεται ομοιοπολικά με άλλα μόρια NEPH1 ή και με την νεφρίνη δεδομένης της ομολογίας που εμφανίζουν. Μεταλλάξεις του γονιδίου της προκαλούν πρωτεϊνουρία και τήξη των εκβλαστήσεων. Σε knock – out ποντίκια παρατηρείται αυξημένη περιγεννητική θνησιμότητα και νεφρωσικό σύνδρομο με αύξηση της μεσαγγειακής θεμέλιας ουσίας και πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων.

Densin

Η densin απομονώθηκε αρχικά σε μετασυναπτικούς νευρώνες στον πρόσθιο εγκέφαλο των αρουραίων. Οι περιοχές αυτές εμφανίζονται ως μια πυκνή πάχυνση της μετασυναπτικής μεμβράνης στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (PSD : Post-Synaptic Density). Αποτελείται από 1495 αμινοξέα με εξωκυττάριο, διαμεμβρανικό και ενδοκυττάριο τμήμα και έχει MB 167 KDa. Η κύρια λειτουργία των PSD πρωτεϊνών πιστεύεται ότι είναι η διατήρηση της σύνδεσης της προσυναπτικής και μετασυναπτικής μεμβράνης σε γλουταμινεργικούς νευρώνες. Η densin ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών LAR από τα αρχικά LRR And PDZ καθώς περιέχει τμήματα LRR και PDZ. Τα LRR (leucine rich repeats) είναι τμήματα πλούσια σε λευκίνη, μικρά σε μέγεθος (20 – 22 αμινοξέα) και παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών μεταξύ τους, όπως π.χ. στη σύνδεση μιας ορμόνης στον υποδοχέα της, ρύθμιση ενζύμων, κυτταρική πρόσφυση και μεταφορά. Τα PDZ τμήματα αποτελούνται από 90 αμινοξέα και εντοπίζονται υπό μορφή επαναλήψεων στο καρβοξυτελικό τμήμα διαφόρων πρωτεϊνών, όπου παίζουν ρόλο σύνδεσης και οργάνωσης των πρωτεϊνών αυτών σε συμπλέγματα πάνω στην κυτταρική μεμβράνη. PDZ τμήματα βρέθηκαν αρχικά στην μετασυναπτική πρωτεΐνη PSD – 95, στην πρωτεΐνη DLG (disc large protein) της *Drosophila melanogaster* και στη ZO – 1. Από τα αρχικά αυτών των πρωτεϊνών πήραν το όνομά τους τα PDZ τμήματα. Εκτός από τα LRR και PDZ τμήματα η densin περιέχει και ένα τμήμα τύπου βλενίνης και ένα RGD πεπτίδιο το οποίο είναι τριπεπτίδιο αποτελούμενο από Arg – Gly – Asp που περιγράφηκε αρχικά στη φμπρονεκτίνη ως υπεύθυνο για τη σύνδεση με την κυτταρική μεμβράνη. Αργότερα βρέθηκε και σε άλλες πρωτεΐνες άσχετες με την κυτταρική πρόσφυση.

Πρόσφατα βρέθηκε, με τη χρήση της RT – PCR, ότι τα ποδοκύτταρα εκφράζουν mRNA της Densin. Με ανοσοφθορισμό βρέθηκε έντονη χρώση των σπειραμάτων για την densin και με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εντοπίστηκε στην περιοχή του λεπτού διαφράγματος όπου καθιζάνει μαζί με τη νεφρίνη. Σε CNF το mRNA της Densin καθώς και η πρωτεΐνη είναι αυξημένα²⁰.

Πρωτεΐνες της κορυφαίας επιφάνειας

Ποδοκαλυξίνη

Στην κορυφαία επιφάνεια των ποδικών προεκβολών το δίκτυο της ακτίνης συνδέεται σε διαμεμβρανικά μόρια υπεύθυνα για τη δημιουργία του αρνητικού φορτίου της επιφάνειας των ποδοκυττάρων. Η κυριότερη αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη της κορυφαίας επιφάνειας είναι η ποδοκαλυξίνη²¹. Ο μεταγραφικός παράγοντας WT1 ρυθμίζει την έκφραση της ποδοκαλυξίνης στα ποδοκύτταρα. Η ποδοκαλυξίνη είναι γλυκοζυλιωμένη από

υδατάνθρακες πλούσιους σε θεικές ομάδες και σιαλικό οξύ που της προσδίδουν έντονα αρνητικό φορτίο, το οποίο εξυπηρετεί όχι μόνο στην απώθηση αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών του πλάσματος αλλά και στη διατήρηση των ποδικών εκβλαστήσεων σε απόσταση μεταξύ τους ώστε να σχηματίζεται η λεπτή σχισμή διήθησης. Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια με ανεπαρκή έκφραση ποδοκαλυξίνης δεν αναπτύσσουν ποδικές προεκβολές και λεπτό διάφραγμα και πεθαίνουν στην περιγεννητική περίοδο. Σε διάφορες σπειραματοπάθειες η παρουσία ποδοκαλυξίνης στα ούρα σχετίζεται με τη βαρύτητα της βλάβης των ποδοκυττάρων²².

Εζρίνη

Η Εζρίνη συνδέει το κυτταροπλασματικό τμήμα της ποδοκαλυξίνης με τον κυτταροσκελετό. Ανήκει στην οικογένεια των συνδετικών πρωτεϊνών ERM(ezrin/radixin/moesin) που θεωρούνται υπεύθυνες για τη διατήρηση της πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων.

NHERF2

Ο ρυθμιστικός παράγοντας του ανταλλάκτη Na⁺/H⁺(NHERF2) είναι το δεύτερο μόριο του συμπλέγματος και συνδέεται μέσω PDZ επαναλήψεων στο αμινοτελικό άκρο της φωσφορυλιωμένης σε Tyr567 εζρίνης. Η χορήγηση πρωταμίνης, σιαλικού οξέος ή πουρομυκίνης σε αρουραίους έχει ως αποτέλεσμα την αποφωσφορυλίωση της εζρίνης και την αποσύνδεση του συμπλέγματος από τον κυτταροσκελετό.

Μεγκαλίνη

Άλλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη που θεωρείται υπεύθυνη για τη διαδικασία ενδοκυττάρωσης ποικίλων ουσιών είναι η μεγκαλίνη ή γλυκοπρωτεΐνη 330. Η μεγκαλίνη συνδέεται στο κυτταροσκελετό μέσω της Magi1. Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στην οικογένεια MAGUK οι οποίες αποτελούν ενδοκυττάρια πρωτεΐνες συγκέντρωσης, οργάνωσης και οριοθέτησης άλλων πρωτεϊνών πάνω στην κυτταρική μεμβράνη²³. Η Magi1 συνδέεται στον κυτταροσκελετό μέσω της συναπτοποδίνης και α – ακτινίνης – 4.

Πρωτεΐνες της βασικής επιφάνειας

Ιντεγκρίνες

Οι ιντεγκρίνες ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην προσκόλληση των κυττάρων στη θεμέλιο ουσία. Αποτελούνται από α και β υπομονάδες. Κάθε κυτταρικός τύπος εκφράζει χαρακτηριστικό συνδυασμό α και β υπομονάδων. Ο συνδυασμός α3β1 μπορεί να συνδεθεί με κολλαγόνο τύπου IV, φμπρονεκτίνη, λαμνίνη, εντακτίνη και νιδογόνο. Η σύνδεση των διμερών της ιντεγκρίνης με τα συστατικά της βασικής μεμβράνης επάγει την εστιακή άθροιση των μορίων ιντεγκρίνης, με τρόπο ώστε να σχηματίζονται εστιακές προσφύσεις στην κυτταρική μεμβράνη, όπου συγκλίνουν ενδοκυττάρια πρωτεΐνες (παξιλλίνη, ταλίνη, βινκουλίνη, α – ακτινίνη – 4) οι οποίες συνδέονται στη β1 υπομονάδα της ιντεγκρίνης και στον κυτταροσκελετό της ακτίνης.

Αντισώματα έναντι της β1 υπομονάδας προκαλούν αποκόλληση των ποδοκυττάρων και μαζική πρωτεϊνουρία. Ανάλογα ισχύουν για την α3 υπομονάδα. Η έκφραση της ιντεγκρίνης μελετήθηκε σε διάφορες σπειραματοπάθειες με πρωτεϊνουρία αλλά τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά. Ένα γενικό συμπέρασμα από τις μελέτες αυτές είναι ότι δεν αλλάζει η ποσοτική έκφραση της ιντεγκρίνης αλλά μάλλον τροποποιείται η λειτουργία της ως μόριο μετάδοσης σημάτων από και προς το ποδοκύτταρο.

Δυστρογλυκάνη

Αποτελεί και αυτή υποδοχέα της βασικής επιφάνειας των ποδίσκων που συνδέεται εξωτερικά με συστατικά της βασικής μεμβράνης του σπειράματος(λαμινίνη, αγκρίνη, περλεκάνη) και εσωτερικά με τον κυτταροσκελετό μέσω της ουτροφίνης. Η ποσοτική έκφραση του συμπλέγματος της δυστρογλυκάνης συσχετίζεται αρνητικά με τη δραστηριότητα της νόσου σε ζωικά μοντέλα πρωτεϊνουρίας και σε νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων σε ανθρώπους.

Ρόλος των πρωτεϊνών της βασικής επιφάνειας

Η μεταβολή της σύστασης της βασικής μεμβράνης του σπειράματος σε παθολογικές καταστάσεις όπως π.χ. στην anti – GBM νεφρίτιδα και στην νεφρίτιδα από πουρομυκίνη ακολουθείται από μεταβολές του κυτταροσκελετού που οδηγούν σε απώλεια των ποδίσκων και του λεπτού διαφράγματος. Κατά τη διαδικασία αυτή είναι σημαντικός ο ρόλος των ιντεγκρινών οι οποίες εκτός από μόρια μηχανικής σύνδεσης, αποτελούν και μόρια μετάδοσης σημάτων από και προς το κύτταρο.

Τα προερχόμενα από το κύτταρο σήματα ρυθμίζουν τον βαθμό συγγένειας και σύνδεσης των ιντεγκρινών με τη θεμέλιο ουσία και παίζουν σημαντικό ρόλο στην τρισδιάστατη δομή της βασικής μεμβράνης του σπειράματος.

Η κίνηση των εστιακών προσφύσεων(FAK) είναι τυροσινική κίνηση που συνδέεται με το ενδοκυττάριο τμήμα της β – ιντεγκρίνης. Όταν η ιντεγκρίνη συνδέεται στο υπόστρωμά της στη βασική μεμβράνη του σπειράματος προκαλεί αυτοφωσφορυλίωση της FAK και ενεργοποιεί το ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταφοράς σήματος Ras. Το ίδιο μονοπάτι χρησιμεύει και κατά την αντίστροφη μεταφορά σημάτων από το κύτταρο(Ras – FAK – ιντεγκρίνη) και η ενεργοποίηση του προκαλεί αύξηση της πρόσφυσης στη θεμέλιο ουσία. Τα επίπεδα και ο βαθμός φωσφορυλίωσης της FAK έχουν βρεθεί αυξημένα σε διάφορες σπειραματοπάθειες, όπως διαβητική νεφροπάθεια²⁴, anti – GBM νεφρίτιδα²⁵ και νεφρίτιδα του λύκου σε ποντίκια Ipr/Ipr²⁶.

Στη νεφρίτιδα από πουρομυκίνη τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ZO – 1 βρέθηκαν αυξημένα αλλά παραμένει άγνωστη η υπεύθυνη κίνηση. Σε ανθρώπινες βιοψίες από ασθενείς με νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων και μεμβρανώδη ΣΝΦ, τα επίπεδα των πρωτεϊνών FAK, ταλίνη, βινκουλίνη, παξιλλίνη, ιντεγκρίνη, ZO – 1 και ZO – 2 δεν μεταβλήθηκαν αλλά αυξήθηκε ο βαθμός φωσφορυλίωσής τους²⁷. Σε καλλιέργειες διαφοροποιημένων ποδοκυττάρων μετά από επώαση με πουρομυκίνη βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα ολικής φωσφοτυροσίνης(πρωτεΐνες φωσφορυλιωμένες σε θέσεις τυροσίνης) και το ίδιο παρατηρείται και στο in vivo μοντέλο. Ωστόσο παρά τις συνεχείς προσπάθειες δεν είναι ακόμα γνωστό ποιο ή ποια σηματοδοτικά μόρια είναι υπεύθυνα για την αυξημένη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών των ποδοκυττάρων και δεν είναι καν γνωστό αν πρόκειται μόνο για κινάσες ή και για αναστολείς φωσφατασών.

Κίνηση συνδεόμενη με ιντεγκρίνη (ILK)

Σε μια προσπάθεια να βρεθούν υποψήφια σηματοδοτικά μόρια σε καταστάσεις πρωτεϊνουρίας, έγινε έλεγχος σπειραμάτων σε παιδιά με συγγενές νεφρωσικό σύνδρομο(CNF). Από τον έλεγχο αυτό βρέθηκε ένα νέο σηματοδοτικό μόριο, η ILK, το mRNA της οποίας υπερεκφράζεται στα σπειράματα αυτά. Η ILK είναι κίνηση σερίνης – θρεονίνης που συνδέεται στο κυτταροπλασματικό άκρο της β1 – ιντεγκρίνης. Η σύνδεση της ιντεγκρίνης σε φυσιολογικά συστατικά της βασικής μεμβράνης καταστέλλει την κίνηση αυτή²⁸ ενώ η σύνδεση σε παθολογικά συστατικά(π.χ. κολλαγόνο τύπου I) την επάγει. Σε τρία μοντέλα σπειραματικής πρωτεϊνουρικής βλάβης(CNF, anti - GBM, FSGS) έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση του mRNA της ILK στα ποδοκύτταρα²⁹. Η υπερέκφραση της ILK σε κυτταροκαλλιέργειες προκαλεί μείωση της πρόσφυσης των ποδοκυττάρων και μέσω των

μονοπατιών Akt και GSK σε κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό³⁰. Η ILK σε κυτταρικό επίπεδο ρυθμίζεται επίσης από την PI3K και είναι σε θέση να φωσφορυλιώνει την Akt στη θέση Ser473³¹.

Η ILK συμμετέχει στην επικοινωνία μεταξύ της βασικής(ιντεγκρίνη – βασική μεμβράνη) και πλαγίας (λεπτό διάφραγμα) επιφάνειας των ποδίσκων προκαλώντας αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, μέσω του μονοπατιού Wnt, με μετακίνηση της β – κατενίνης και του LEF – 1 προς τον πυρήνα, καταστολή της P – καντερίνης και αύξηση των επιπέδων της MMP – 9³².

Φαινοτυπικά προκαλεί αλλαγή των ποδοκυττάρων από διαφοροποιημένα κύτταρα με εκβλαστήσεις σε αδιαφοροποίητα κύτταρα χωρίς εκβλαστήσεις και χωρίς λεπτό διάφραγμα. Επομένως η κινάση αυτή και γενικότερα ο μηχανισμός πρόσφυσης, εμπλέκεται όχι μόνο στην κυτταρική επικοινωνία και στήριξη αλλά και στη ρύθμιση της διαφοροποίησης και του κυτταρικού κύκλου των ποδοκυττάρων. Επιπρόσθετη απόδειξη της συμμετοχής των κινασών σερίνης – θρεονίνης, όπως η ILK, στην ρύθμιση του κυτταροσκελετού των ποδοκυττάρων αποτελεί το εύρημα ότι η χρησιμοποίηση μη ειδικών αναστολέων κινασών σερίνης – θρεονίνης ευνοεί την ανάπτυξη εκβλαστήσεων σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων³³.

Κυτταροσκελετός ποδοκυττάρων

Λειτουργίες: Η κυριότερες λειτουργίες του κυτταροσκελετού των ποδοκυττάρων είναι η σύνδεση του συμπλέγματος των πρωτεϊνών του λεπτού διαφράγματος με το σύστημα πρόσφυσης στη βασική μεμβράνη του σπειράματος, η διατήρηση της πολικότητας του ποδοκυττάρου, η απόσβεση των δυνάμεων διάτασης και η ομοιόμορφη κατανομή τους κατά μήκος του τριχοειδικού τοιχώματος και η μεταφορά κυστιδίων εντός του κυτταροπλάσματος. Αποτελεί ένα σύστημα ινιδίων με στατικές και δυναμικές λειτουργίες. Τα ινίδια αυτά είναι 3 ειδών: μικροϊνίδια(διαμέτρου 7 – 9nm), ενδιάμεσα ινίδια(διαμέτρου 10nm) και μικροσωληνίσκοι(24nm). Οι μικροσωληνίσκοι και τα ενδιάμεσα ινίδια σχηματίζουν το σκελετό πάνω στον οποίο στηρίζεται το κυτταρικό σώμα και οι πρωτογενείς εκβλαστήσεις. Οι ποδικές εκβλαστήσεις περιέχουν ένα πυκνό δίκτυο μικροϊνιδίων ακτίνης τα οποία συνδέονται στο λεπτό διάφραγμα και στις πρωτεΐνες αγκυροβόλησης μέσω πρωτεϊνών σύνδεσης(ενδιάμεσα συνδετικά μόρια, linker proteins or adapter molecules), όπως π.χ. οι πρωτεΐνες ZO – 1, οι κατενίνες και η CD2AP.

F-ακτίνη (πολυμερής ακτίνη): αποτελεί μια εξαιρετικά δυναμική δομή καθώς μπορεί να μεταβάλλεται ταχύτατα με προσθήκη ή αφαίρεση μονομερών ακτίνης. Έτσι τα ινίδια αυτά μπορούν να αυξάνονται σε μήκος, να διακλαδίζονται ή/και να αποσυναρμολογούνται. Μπορούν να σχηματίζουν χαλαρό δίκτυο ή παράλληλα δεμάτια με τη βοήθεια πρωτεϊνών δεματοποίησης. Τα δεμάτια αυτά σχηματίζουν αγκύλες που διατρέχουν κατά μήκος τις ποδικές εκβλαστήσεις. Οι δυο άκρες της αγκύλης συνδέονται στο πέλμα δύο διαδοχικών ποδίσκων με τις πρωτεΐνες αγκυροβόλησης και η κορυφή της συνδέεται στην ρίζα των ποδίσκων με τους μικροσωληνίσκους και τα ενδιάμεσα ινίδια των πρωτογενών εκβλαστήσεων. Η κινητήρια πρωτεΐνη μωσίνη επιτρέπει την ισομετρική ή ισοτονική σύσπαση των ινιδίων στα κύτταρα.

Συναπτοποδίνη: εκφράζεται στα ποδοκύτταρα και στο νευρικό ιστό και συνδέεται με την ακτίνη. Ο ρόλος της είναι ως επί το πλείστον άγνωστος, αλλά ομόζυγος απαλοιφή της σε ποντίκια προκαλεί αυξημένη ευαισθησία του σπειραματικού ηθμού σε βλαπτικούς παράγοντες.

α – ακτινίνη – 4: αποτελεί ένα νέο μόριο της οικογένειας της ακτίνης και συμβάλλει στη σύνδεση – δεματοποίηση των ινιδίων της ακτίνης. Στο πειραματικό νεφρωσικό σύνδρομο από πουρομικίνη και σε πειραματική anti – GBM νεφρίτιδα, παρατηρείται σημαντική αύξηση της α – ακτινίνης και αποδιάταξη των ινιδίων της ακτίνης πριν τη σύντηξη των εκβλαστήσεων^{34, 35}. Μεταλλάξεις του γονιδίου της (ACTN4), συνοδεύονται από οικογενή εστιακή και τμηματική σπειραματοσκλήρυνση όψιμης έναρξης, που μεταβιβάζεται κατά τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα³⁶.

Rho κινάση: Η εφαρμογή μηχανικού στρες σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων με κυκλική εναλλαγή διάτασης και χαλάρωσης του υποστρώματος, είχε ως αποτέλεσμα τα ποδοκύτταρα (και όχι τα ενδοθηλιακά ή μεσαγγειακά κύτταρα) να εμφανίζουν αναδιάταξη του κυτταροσκελετού με ελάττωση του μεγέθους του κυτταρικού σώματος, λέπτυνση των πρωτογενών εκβλαστήσεων και αύξηση των ινιδίων στρες της ακτίνης στις δευτερογενείς εκβλαστήσεις, μια διαδικασία εξαρτώμενη από ασβέστιο και την Rho κινάση³⁷. Η Rho κινάση προκαλεί δεματοποίηση των ινιδίων της ακτίνης και ανήκει στις μικρές GTPάσες οι οποίες ρυθμίζουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού. Αναστολή της Rho κινάσης συνοδεύεται από κατάργηση των μεταβολών που προκαλεί το μηχανικό στρες. Από την άλλη μεριά η υπερέκφραση της Rho κινάσης μέσω μετάλλαξης/απαλοιφής του αναστολέα της Rho – GDIa, προκαλεί επίσης βλάβη των εκβλαστήσεων με υπερβολική άθροιση δεματιών ακτίνης στις περιοχές της βλάβης³⁴.

Φωσφατάσες: Οι μεταβολές του κυτταροσκελετού που προκαλούνται από την πουρομικίνη και την πρωταμίνη χαρακτηρίζονται από συνολική αύξηση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού σε θέσεις τυροσίνης³⁸. Η χορήγηση βαναδίου (vanadate) που είναι μη ειδικός αναστολέας φωσφατασών επιφέρει παρόμοιο αποτέλεσμα. Σε καλλιέργειες ποδοκυττάρων έχει ανιχνευθεί μεγάλος αριθμός φωσφατασών μεταξύ των οποίων και η σπειραματική επιθηλιακή πρωτεΐνη (GLEPP1), των οποίων ο ρόλος στην οργάνωση του κυτταροσκελετού παραμένει ως επί το πλείστον άγνωστος. Στο μοντέλο του νεφρωσικού συνδρόμου από πουρομικίνη τα επίπεδα της GLEPP1 είναι μειωμένα γεγονός που εξηγεί ίσως την συνολική αύξηση της τυροσινικής φωσφορυλίωσης³⁹. Η GLEPP – 1 είναι μεμβρανική πρωτεΐνη των ποδοκυττάρων με ιδιότητες τυροσινικής φωσφατάσης. Πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στη δομή και τη λειτουργία του ποδοκυττάρου, ρυθμίζοντας το βαθμό τυροσινικής φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών του. Σε ποντίκια με ανεπάρκεια της GLEPP1, τα ποδοκύτταρα εμφανίζουν δομικές αλλαγές όπως άμβλυση των εκβλαστήσεων, ελάττωση των επιπέδων της νεφρίνης, ελάττωση της επιφάνειας διήθησης και του ρυθμού σπειραματικής διήθησης⁴⁰. Παρά ταύτα δεν ανιχνεύεται λευκωματουρία στα ποντίκια αυτά.

Σπειραματική βασική μεμβράνη

Κατά την νεφρογένεση η βασική μεμβράνη του σπειράματος δημιουργείται από 2 ξεχωριστά στρώματα που παράγονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα ποδοκύτταρα αντίστοιχα. Τα δυο αυτά στρώματα ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν την ώριμη βασική μεμβράνη του σπειράματος. Στο ώριμο σπείραμα τα ποδοκύτταρα συνεχίζουν να παράγουν συστατικά της βασικής μεμβράνης του σπειράματος, όπως κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη, εντακτίνη, αγκρίνη και περλεκάνη. Επιπλέον παράγουν και ένζυμα διάσπασης της θεμελίου ουσίας όπως η μεταλλοπρωτεάση MMP – 9, εξασφαλίζοντας έτσι τη συνεχή ανακατασκευή της βασικής μεμβράνης.

Από την άλλη μεριά, η βασική μεμβράνη του σπειράματος φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής των ποδοκυττάρων. Για παράδειγμα σε ποντίκια με

ανεπάρκεια σύνθεσης της β2 αλυσίδας της λαμινίνης παρατηρείται σύντηξη των ποδίσκων και πρωτεϊνουρία⁴¹.

Η λαμινίνη της βασικής μεμβράνης του σπειράματος είναι ετεροτριμερές αποτελούμενο από α, β και γ αλυσίδες. Συγκεκριμένα πρόκειται για λαμινίνη 11, αποτελούμενη από α5/β2/γ1 αλυσίδες. Έλλειψη οποιασδήποτε αλυσίδας οδηγεί σε νεφρωσικό σύνδρομο και μάλιστα η έλλειψη της α5 οδηγεί σε πρώιμη διακοπή της νεφρογένεσης.

Γενετική τροποποίηση του κολλαγόνου τύπου IV μέσω αδρανοποίησης της α3 αλυσίδας προκαλεί αντισταθμιστική αύξηση της παραγωγής α1 και α2 αλυσίδων και κλινική εικόνα παρόμοια με το σύνδρομο Alport. Ταυτόχρονα επηρεάζεται η σύσταση της λαμινίνης που οδηγεί σε σύντηξη των ποδικών εκβλαστήσεων⁴². Η ταυτόχρονη όμως αδρανοποίηση της α3 αλυσίδας του κολλαγόνου και της ιντεγκρίνης α3β1 δεν προκαλεί ούτε διαταραχή της παραγωγής λαμινίνης ούτε βλάβη των ποδίσκων. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι η πρωταρχική βλάβη της βασικής μεμβράνης του σπειράματος(κολλαγόνο, λαμινίνη) επιφέρει δευτερογενείς βλάβες στα ποδοκύτταρα, μέσω μετάδοσης μηνυμάτων από τη βασική μεμβράνη του σπειράματος προς το ποδοκύτταρο δια της ιντεγκρίνης α3β1. Ταυτόχρονη βλάβη της ιντεγκρίνης διακόπτει τη μεταφορά του σήματος στα ποδοκύτταρα γεγονός που εξηγεί τη διατήρηση της αρχιτεκτονικής τους στην περίπτωση της διπλής βλάβης.

Συμπερασματικά, σε κάθε ποδίσκο μπορούμε να διακρίνουμε 3 επιφάνειες ή λειτουργικά τμήματα: α) την πλάγια επιφάνεια στην οποία προσφύεται το λεπτό διάφραγμα που αποτελεί τον βασικό ηθμό μεγέθους καθώς και μηχανισμό κυτταρικής επικοινωνίας και στήριξης, β) τη βασική επιφάνεια η οποία εφάπτεται στη βασική μεμβράνη του σπειράματος μέσω πρωτεϊνών κυτταρικής πρόσφυσης και γ) την κορυφαία επιφάνεια η οποία φέρει πρωτεΐνες με ισχυρό αρνητικό φορτίο συμβάλλοντας στο φραγμό φορτίου και στη διατήρηση ανοικτής της λεπτής σχισμής. Τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα των τριών επιφανειών συνδέονται μεταξύ τους μέσω του κυτταροσκελετού και συμμετέχουν στη μεταφορά μηνυμάτων από και προς το κύτταρο. Διαταραχή της δομής ή της λειτουργίας των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων σε οποιαδήποτε από τις 3 επιφάνειες των ποδίσκων η στη βασική μεμβράνη του σπειράματος, οδηγεί σε μεταβολή της δομής του κυτταροσκελετού με επακόλουθη σύντηξη των προεκβολών και πρωτεϊνουρία.

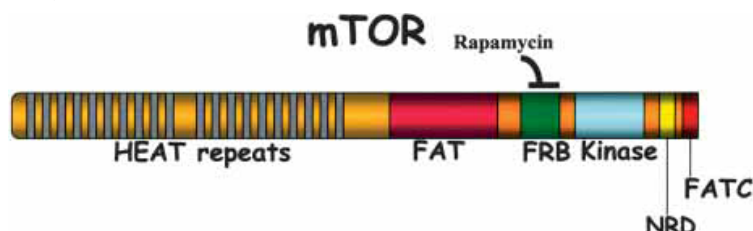
Σηματοδότηση από την mTOR ενός κεντρικού ρυθμιστή της κυτταρικής αύξησης και πολλαπλασιασμού και σχέση αυτής με την κινάση AKT

Στα κυριότερα επίπεδα ελέγχου του ρυθμού κυτταρικής αύξησης και πολλαπλασιασμού σε μύκητες, φυτά και θηλαστικά, φαίνεται να εμπλέκεται σταθερά η ίδια πάντα πρωτεΐνη, η κινάση σερίνης/θρεονίνης TOR(target of rapamycin). Η TOR είναι μια εξελικτικά διατηρημένη πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε κατά την προσπάθεια ανεύρεσης της πρωτεΐνης – στόχου του ανοσοκατασταλτικού και αντιβιοτικού φαρμάκου ραπαμυκίνη. Η ραπαμυκίνη απομονώθηκε από το βακτηρίδιο *Streptomyces hygroscopicus*, από δείγματα εδάφους του νησιού Rapa Nui(Easter Island, νησί του Πάσχα) που συνέλλεξαν Ολλανδοί ερευνητές⁴³. Η ουσία αυτή βρέθηκε αρχικά να αναστέλλει την ανάπτυξη των μυκήτων και λίγο αργότερα τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Το γονιδίωμα των μυκήτων κωδικοποιεί 2 πρωτεΐνες TOR, τις TOR1 και TOR2. Το γονιδίωμα των θηλαστικών και των μεταζώων, κωδικοποιεί μια μόνο πρωτεΐνη TOR(mammalian TOR, mTOR) με 42% ομολογία αμινοξέων με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες TOR1 και TOR2 των μυκήτων. Οι TORs είναι πρωτεΐνες υψηλού MW(289kDa, 2549 αμινοξέα) που περιλαμβάνουν πολλαπλά, διακριτά, δομικά και διατηρημένα εξελικτικά τμήματα.

Η mTOR κλωνοποιήθηκε και προσδιορίστηκε ανεξάρτητα, από τέσσερις ερευνητικές ομάδες λίγο μετά την ανακάλυψη των γονιδίων TOR1 και TOR2 στους μύκητες, κατά τη προσπάθεια ανεύρεσης των αιτιών αντίστασης του *Saccharomyces cerevisiae* στη ραπαμυκίνη^{44, 45, 46}. Ονομάστηκε αρχικά FRAP(FKBP – rapamycin – associated protein), RAFT1(rapamycin and FKBP target), ή RAPT1(rapamycin target) ενώ σήμερα έχει επικρατήσει ο όρος mTOR^{47, 48}.

Η ραπαμυκίνη ενεργεί με τη διαμόρφωση ενός ανασταλτικού συμπλέγματος με τον ενδοκυτταρικό δέκτη της, την FK506 – δεσμευτική πρωτεΐνη(FKBP12). Το σύμπλεγμα FKBP12 – ραπαμυκίνης συνδέεται στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών TOR(FRB τμήμα), εμποδίζοντας έτσι τη δραστηριότητα των TOR^{49, 50}.

Το αμινοτελικό άκρο της TOR αποτελείται από 20 επαναλαμβανόμενα τμήματα HEAT(Huntignton, EF3, A subunit of PP2A, TOR1) που εμπλέκονται σε



αλληλεπιδράσεις μεταξύ **Εικόνα 12: Η δομή της mTOR**

πρωτεϊνών (Εικόνα 12). Το

καρβοξυτελικό άκρο της TOR, περιλαμβάνει το τμήμα με δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης που, ενώ είναι παρόμοιο με το καταλυτικό τμήμα της κινάσης των φωσφοϊνσιτιδίων PI3K, ωστόσο δεν παρουσιάζει δραστηριότητα λιπιδικής κινάσης. Ακριβώς πριν το καταλυτικό τμήμα υπάρχει η θέση σύνδεσης FRB και ένα σχετικά μεγάλο τμήμα FAT(από FRAP, ATM, TRAP) που είναι κοινό σε όλες τις κινάσες της οικογένειας της PI3K(PIKK). Το καρβοξυτελικό άκρο περιέχει ένα ακόμα τμήμα FAT που ονομάζεται FATC και είναι απολύτως απαραίτητο για τη λειτουργία της κινάσης καθώς απαλοιφή ακόμα και ενός οποιουδήποτε αμινοξέος καταργεί τη δραστηριότητά της^{51, 52}. Τα τμήματα FAT & FATC αλληλεπιδρούν με τρόπο ώστε να μεταβάλλουν τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και να εκθέτουν το καταλυτικό της τμήμα. Τέλος υπάρχει ένα τμήμα με πιθανή αρνητική ρυθμιστική δράση(NRD)⁵³.

Η mTOR ρυθμίζει την σύνθεση των πρωτεϊνών, μέσω φωσφορυλίωσης – αδρανοποίησης μιας πρωτεΐνης σύνδεσης του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτικών κυττάρων(eukaryotic initiation factor 4E – binding protein(4E-BP1), και μέσω φωσφορυλίωσης – ενεργοποίησης της κινάσης S6(S6K). Έτσι η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών 4E – BP1 και S6K αποτελεί το δείκτη δραστηριότητας της mTOR in vivo. Η mTOR έχει ενδογενή δραστηριότητα κινάσης Ser/Thr που οδηγεί σε αυτοφωσφορυλίωση στη θέση Ser2481⁵¹. Δεν είναι γνωστό μέχρι σήμερα αν η αυτοφωσφορυλίωση της mTOR είναι ικανή να προκαλέσει πλήρη ενεργοποίησή της με επακόλουθο τη φωσφορυλίωση των σχετιζόμενων κατωφερέστερων πρωτεϊνών 4E – BP1 και S6K⁵⁴. Μετά την ανακάλυψή της έγινε γνωστό ότι η mTOR μπορεί να λειτουργήσει ως σκελετός σύνδεσης για άλλες πρωτεΐνες με καταλυτική δραστηριότητα όπως κινάσες και φωσφατάσες οι οποίες μπορούν να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα της mTOR, in vivo.

Η mTOR είναι παρούσα σε 2 πρωτεϊνικά συμπλέγματα, το mTORC1 που είναι ευαίσθητο και αναστέλλεται από τη ραπαμυκίνη και το mTORC2 που θεωρείται μη ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη και τουλάχιστον άμεσα, δεν αναστέλλεται από αυτήν. Όμως, έχει πρόσφατα βρεθεί ότι η παρατεταμένη θεραπεία με ραπαμυκίνη μπορεί έμμεσα να αναστείλει και το mTORC2 σε κάποια κύτταρα. Συγκεκριμένα η νεοσυντιθέμενη mTOR δεσμεύεται αμέσως από το σύμπλοκο FKBP12 – ραπαμυκίνης και αδυνατεί πλέον να σχηματίσει νέα συμπλέγματα με τις πρωτεΐνες που συνιστούν το mTORC2⁵⁵. Επίσης πρόσφατα βρέθηκε ότι σημαντικές λειτουργίες του mTORC1 εμφανίζουν αντοχή στην αναστολή από ραπαμυκίνη. Συγκεκριμένα σε ορισμένες κυτταρικές σειρές η ραπαμυκίνη ενώ αρχικά προκάλεσε μείωση

της φωσφορυλίωσης της 4E – BP1 στη συνέχεια και μετά από παρατεταμένη εφαρμογή οδήγησε σε υπερφωσφορυλίωσή της και ανάνηψη της *cap* – εξαρτώμενης πρωτεϊνοσύνθεσης. Αντίθετα η λειτουργικότητα της S6K παραμένει πάντα κατεσταλμένη με την εφαρμογή της ραπαμυκίνης⁵⁶. Σε άλλα πειράματα με τη χρήση περισσότερο ειδικών σε σχέση με τη ραπαμυκίνη αναστολέων της mTOR(πυραζολοπυριμιδίνες), βρέθηκε ότι η ραπαμυκίνη αποτελεί ασθενή αναστολέα της φωσφορυλίωσης της 4E – BP1, ενώ αντίθετα οι πυραζολοπυριμιδίνες προκαλούν πλήρη αναστολή της φωσφορυλίωσης της 4E – BP1. Αυτό είχε ως συνέπεια μια ασήμαντη μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης από τη ραπαμυκίνη σε αντίθεση με τις πυραζολοπυριμιδίνες που προκάλεσαν 30% μείωση της ολικής(πρακτικά της *cap* – εξαρτώμενης) πρωτεϊνοσύνθεσης.

Φαίνεται επομένως ότι η γενική αρχή πως το mTORC1 είναι ευαίσθητο στην αναστολή από ραπαμυκίνη δεν ευσταθεί πλήρως, αλλά και το ότι το mTORC2 είναι ανθεκτικό στην αναστολή από ραπαμυκίνη επίσης δεν ευσταθεί πλήρως.

Το σύμπλεγμα mTORC1

Το σύμπλεγμα mTORC1 αποτελείται από την mTOR, τη ρυθμιστική πρωτεΐνη της mTOR(Regulatory associated protein of mTOR, *Raptor*), την *mSIN1*(mammalian stress activated protein kinase [SAPK] – interacting protein), την *mLST8*(mammalian lethal with Sec13 protein 8), την proline rich AKT substrate 40kDa(*PRAS40*) και τέλος την DEP – domain – containing mTOR – interacting protein(*Deptor*)⁵⁷. Η *mLST8* γνωστή και ως GβL(G protein β – subunit – like protein) έχει MB 36kDa, περιέχει 7 WD-40 επαναλήψεις και έχει διατηρηθεί εξελικτικά σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η πρωτεΐνη *mLST8* δεν είναι απαραίτητη για όλες τις γνωστές λειτουργίες του συμπλέγματος καθώς απαλοιφή της δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα του mTORC1 *in vivo*⁵⁸.

Ο ρόλος της *mLST8* αναλύεται στην παρακάτω ενότητα για τη ρύθμιση του mTORC1 από τα θρεπτικά συστατικά. Η *PRAS40* και η *Deptor* θεωρούνται αρνητικοί ρυθμιστές του mTORC1. Όταν η δραστηριότητα του mTORC1 μειώνεται, τότε οι πρωτεΐνες *PRAS40* και *Deptor* συνδέονται στο σύμπλεγμα και επιφέρουν την πλήρη αναστολή του. Αντίθετα όταν ενεργοποιείται το mTORC1 τότε φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες *PRAS40* και *Deptor*, με αποτέλεσμα την αποσύνδεσή τους και την ελεύθερη πρόσβαση του mTORC1 στα υποστρώματά του. Ωστόσο ορισμένοι υπερκείμενοι ρυθμιστές του mTORC1(π.χ. η *Akt*) είναι σε θέση να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του συμπλέγματος και μέσω ρύθμισης της δραστηριότητας της *PRAS40*, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Σε μεγάλο αριθμό νεοπλασιών η έκφραση του *Deptor* είναι μειωμένη ως συνέπεια ενεργοποίησης των mTORC1 και mTORC2. Παρόλα αυτά η έκφραση του *Deptor* έχει βρεθεί αυξημένη σε μια υποκατηγορία ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα η οποία οδηγεί σε αναστολή της δράσης του mTORC1 και μείωση της δραστηριότητας της S6K. Η μειωμένη δραστηριότητα της S6K οδηγεί σε ανεμπόδιστη ενεργοποίηση της *Akt* από την PI3K με αποτέλεσμα ανεμπόδιστο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και καρκινογένεση, παρά την καταστολή του mTORC1⁵⁷.

Η *Raptor* είναι μια πρωτεΐνη MB 150kDa που περιέχει μια διατηρημένη περιοχή στο αμινοτελικό της άκρο, ακολουθούμενη από 3 επαναλήψεις HEAT και 7 επαναλήψεις WD – 40 στο καρβοξυτελικό της άκρο^{59, 60} και εκτός από την mTOR, μπορεί να συνδεθεί επίσης με την S6K1 και την 4E – BP1^{61, 62}. Το αμινοτελικό άκρο της mTOR(που περιέχει τις επαναλήψεις HEAT) είναι απαραίτητο για τη σύνδεση και την αποτελεσματική αλληλεπίδραση με τη *Raptor*. Όμως και το καρβοξυτελικό τμήμα της mTOR μπορεί να συνδεθεί ασθενώς με τη *Raptor*⁵⁹. Ποικίλες μεταλλάξεις της *Raptor* είτε στο αμινοτελικό άκρο της είτε στις επαναλήψεις HEAT διαταράσσουν την ικανότητα σύνδεσής της με την mTOR, υποδηλώνοντας έτσι ότι η *Raptor* αλληλεπιδρά με την mTOR μέσω πολλαπλών σημείων σύνδεσης. Η *Raptor* είναι απαραίτητη για την δραστηριότητα της mTOR όπως φάνηκε σε πειράματα απαλοιφής της *Raptor*(με παρεμβολή RNA) σε κύτταρα θηλαστικών⁵⁹.

⁶¹. Ενώ η Raptor θεωρείται θετικός ρυθμιστής της mTOR, σε μια αναφορά υποστηρίζεται ότι σε καταστάσεις στέρξης θρεπτικών συστατικών, οι δύο πρωτεΐνες (Raptor – mTOR) σταθεροποιούνται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε αναστέλλεται η δραστηριότητα της mTOR κινάσης⁵⁹. Η Raptor συνδέεται με την S6K και 4E – BP1 σε μια περιοχή 5 αμινοξέων, που ονομάζεται TOS (TOR signaling)⁶². Με τη σύνδεση αυτή η Raptor εξασφαλίζει την «επαφή» της mTOR με τα υποστρώματά της (S6K και 4E – BP1) και την επακόλουθη φωσφορυλίωσή τους από την mTOR. Μεταλλάξεις στο τμήμα TOS, μειώνουν σημαντικά την ικανότητα της mTOR να φωσφορυλιώνει τα υποστρώματά της⁶³.

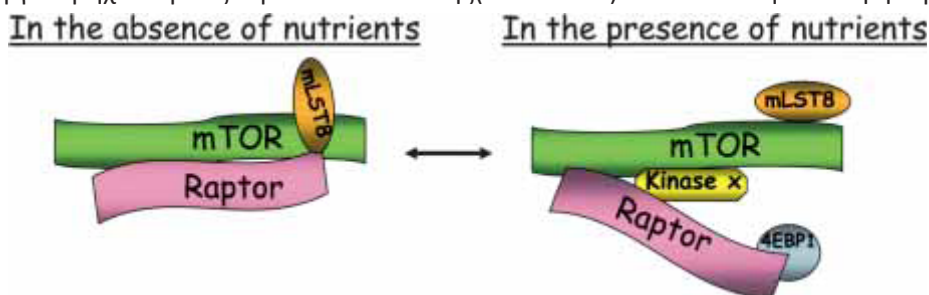
Το σύμπλεγμα mTORC2

Ο σχηματισμός του mTORC2 απαιτεί τη σύνδεση της mTOR με την πρωτεΐνη Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), την παρατηρούμενη με τη Rictor πρωτεΐνη [protein observed with Rictor-1 (Protor-1)], την mSIN1, την Deptor και την mLST8 η οποία είναι απαραίτητο δομικό και λειτουργικό συστατικό του mTORC2. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η Rictor και mSIN1 σταθεροποιούν η μια την άλλη και δημιουργούν το δομικό υπόβαθρο για τη δημιουργία του mTORC2⁶⁴. Κατ' αναλογία με το mTORC1, η Deptor αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της δραστηριότητας του mTORC2⁵⁷.

Υπερκείμενοι ρυθμιστές της mTOR

Η mTOR συγκεντρώνει ποικίλα εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια μηνύματα για τη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης και πολλαπλασιασμού που μπορούν να συνοψιστούν σε τέσσερις κύριες ομάδες: αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες, θρεπτικά συστατικά, ενέργεια και stress.

Ρύθμιση της mTOR από θρεπτικές ουσίες: Η δραστηριότητα των δύο πρωτεϊνών TOR των μυκήτων ρυθμίζεται από τις θρεπτικές ουσίες. Οι πρωτεΐνες TOR των μυκήτων ενεργοποιούνται όταν τα κύτταρα τους αναπτύσσονται σε θρεπτικό περιβάλλον πλούσιο σε άζωτο όπως για παράδειγμα γλουταμίνη και απενεργοποιούνται όταν τα θρεπτικά συστατικά μειωθούν^{65, 66, 67}. Στα κύτταρα των θηλαστικών, οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτοκίνες εκτός από τη ρύθμιση της λήψης θρεπτικών συστατικών ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που δρουν παράλληλα ή σε συμφωνία με τις θρεπτικές ουσίες. Έτσι η ρύθμιση της mTOR αποτελεί ένα εξαιρετικό παράδειγμα ρύθμισης από παράλληλες οδούς που δρουν συντονισμένα σε φυσιολογικές καταστάσεις: ρύθμιση από επάρκεια θρεπτικών ουσιών και παράλληλη ρύθμιση από παρουσία αυξητικών παραγόντων – κυτοκινών. Στη ρύθμιση της δραστηριότητας του mTORC1 από τις θρεπτικές ουσίες σημαντικό ρόλο παίζει η πρωτεΐνη mLST8/GβL. Η mLST8/GβL αλληλεπιδρά με το τμήμα κινάσης της mTOR, ανεξάρτητα από την Raptor και τροποποιεί την σύνδεση ανάμεσα στην mTOR και τη Raptor ανάλογα με τις συνθήκες θρέψης⁶⁸. Η επάρκεια αμινοξέων και άλλων θρεπτικών συστατικών τροποποιεί τη διαμόρφωση του συμπλόκου mLST8 – mTOR – Raptor και αυξάνει την ικανότητά του να φωσφορυλιώνει τις υποκείμενες κινάσες που θέτουν σε λειτουργία μηχανισμούς πρωτεϊνοσύνθεσης (Εικόνα 13). Αντίθετα η έλλειψη θρεπτικών

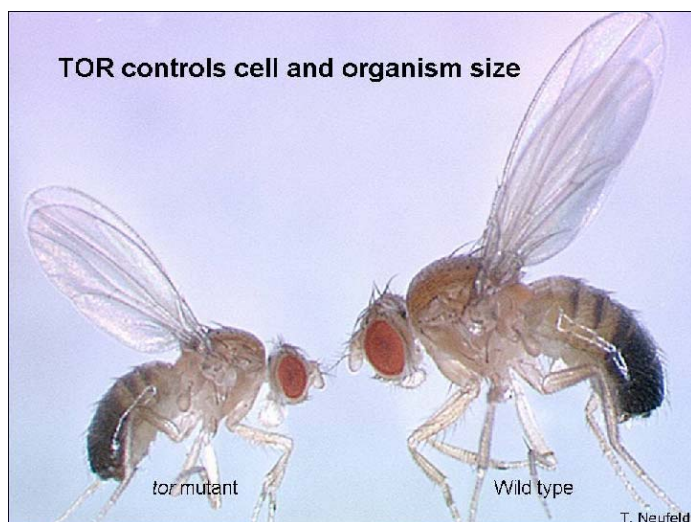


Εικόνα 13: Απουσία θρεπτικών συστατικών υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ mLST8-mTOR-Raptor που προλαμβάνει την επαφή της mTOR με τις κινάσες στόχους της. Επί παρουσίας θρεπτικών ουσιών προκαλείται αλλαγή στη στερεοδιάταξη και αποσύνδεση της mLST8 από τη Raptor. Η Raptor είναι σε θέση να συνδεθεί με τις κινάσες S6K και 4E-BP1, οι οποίες καθίστανται πλέον προσβάσιμες στην mTOR με επακόλουθο τη φωσφορυλίωσή τους.

συστατικών περιορίζει την ικανότητα του mTORC1 να φωσφορυλιώνει τις κινάσες S6K και 4E – BP1 και να θέτει σε λειτουργία μηχανισμούς πρωτεϊνοσύνθεσης. Η ανακάλυψη της σχέσης και της σύνδεσης των πρωτεϊνών mLST8 – mTOR – Raptor προσφέρει μια μερική εξήγηση για τον τρόπο με τον οποίο τα θρεπτικά συστατικά τροποποιούν τη δραστηριότητα του mTORC1. Υπάρχει όμως μια ουσιαστική διαφορά ανάμεσα στην αναστολή του mTORC1 από τη στέρηση θρεπτικών ουσιών και την αναστολή από χορήγηση ραπαμυκίνης: η στέρηση θρεπτικών ουσιών δεν διακόπτει τη σύνδεση της Raptor με την mTOR ενώ η ραπαμυκίνη προκαλεί αποσύνδεση των δυο πρωτεϊνών⁶⁹.

Ρύθμιση της mTOR από αυξητικούς παράγοντες:

Κινάση των φωσφο – ινοσιτιδίων – 3 – OH(PI3K): Το μονοπάτι της mTOR ανταποκρίνεται στους αυξητικούς παράγοντες μέσω της κινάσης των φωσφο – ινοσιτιδίων – 3 – OH(PI3K). Η σύνδεση της ινσουλίνης ή των προσομοιαζόντων στην ινσουλίνη αυξητικών παραγόντων (insulin – like growth factors IGFs) ή άλλων αυξητικών παραγόντων(PDGF, VEGF, TGF) στους υποδοχείς τους, οδηγεί σε φωσφορυλίωση του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης(insulin receptor substrate, IRS), και ακολούθως οδηγεί σε ενεργοποίηση της PI3K. Η PI3K μετατρέπει την 4, 5 διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη(PIP2) της κυτταρικής μεμβράνης σε 3, 4, 5 τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη(PIP3). Τη σύνθεση και άθροιση της PIP3 ανταγωνίζεται η φωσφατάση των λιπιδίων και ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PTEN(phosphate and tensin homolog on chromosome 10). Μεταλλάξεις της PTEN προκαλούν ανεμπόδιστη ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR όπως αποδεικνύεται από τα αυξημένα επίπεδα φωσφορυλιωμένης S6K και 4E – BP1^{70, 71}. Επίσης μεταλλάξεις που απενεργοποιούν την PTEN οδηγούν στην εμφάνιση καρκινογένεσης και αυτοανοσίας^{72, 73}. Στη *Drosophila* η απώλεια της PTEN προκαλεί αύξηση του μεγέθους των κυττάρων, ενώ η απώλεια της TOR προκαλεί μείωση του μεγέθους τους(Εικόνα 14). Κύτταρα με ταυτόχρονη απώλεια και της PTEN και της TOR παρουσιάζουν φαινότυπο όπως



Εικόνα 14: Το μέγεθος των κυττάρων και του οργανισμού συνολικότερα βρίσκεται από τον έλεγχο της TOR.

αυτά με έλλειψη μόνο της TOR γεγονός που αποδεικνύει τον επιστατικό ρόλο της TOR επί της PTEN ή διαφορετικά ότι βρίσκεται κατωφερέστερα στη μετάδοση του ενδοκυττάρου σήματος από την PI3K^{74, 75}.

Η χορήγηση των φαρμακολογικών αναστολέων της PI3K, βορτμανίνης(wortmannin) και LY294002, προκαλεί σημαντική μείωση της φωσφορυλίωσης των S6K και 4E – BP1^{76, 77, 78} με συνέπεια την μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Υπερέκφραση μιας μη λειτουργικής(dominant negative) ρυθμιστικής υπομονάδας της PI3K(p85) προκαλεί σημαντική ελάττωση της φωσφορυλίωσης της S6K από την ινσουλίνη⁷⁹. Επιπρόσθετα η υπερέκφραση της ενεργοποιημένης καταλυτικής υπομονάδας της PI3K(p110) σε κύτταρα HEK – 293 επάγει τη

φωσφορυλίωση της 4E – BP1 ακόμα και επί απουσίας ινσουλίνης ή αυξητικών παραγόντων, κατά τρόπο ευαίσθητο στην αναστολή από ραπαμυκίνη⁸⁰. Τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι η τροφική δράση της PI3K ασκείται μέσω της mTOR.

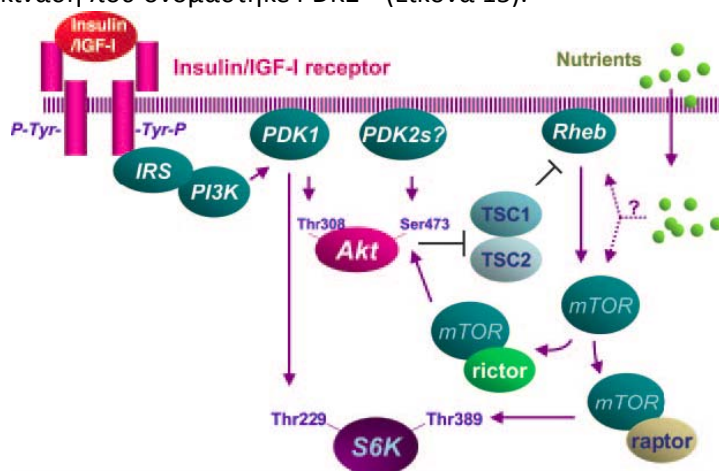
Akt: η κινάση που συνδέει την PI3K με την mTOR

Η παραγωγή PIP3 από την ενεργοποιημένη PI3K, προκαλεί μετανάστευση των κινασών PDK1(3 – phosphoinositide – dependent kinase 1) και Akt1 στην κυτταρική μεμβράνη και παράλληλα, φωσφορυλίωση της Akt1 στη θέση Thr308(καταλυτική περιοχή) από την PDK1.

Η Akt ανήκει στις πρωτεΐνες AGC(αρχικά για cAMP dependent, cGMP dependent, and protein kinase C) και είναι γνωστή επίσης ως πρωτεϊνική κινάση B(PKB). Στα κύτταρα των θηλαστικών εκφράζεται με 3 ισομορφές(Akt1, Akt2, Akt3) που κωδικοποιούνται από 3 διαφορετικά γονίδια. Άλλες κινάσες που ανήκουν στην ίδια οικογένεια AGC πρωτεϊνικών κινασών είναι η S6K και η SGK(serum and glucocorticoid protein kinase).

Υπερέκφραση μιας ενεργοποιημένης μορφής της Akt σε κύτταρα HEK – 293 προάγει τη φωσφορυλίωση της 4E – BP1 ακόμα και επί απουσίας αυξητικών παραγόντων και κατά τρόπο μη ευαίσθητο στη βορτμαννίνη και ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη⁸⁰. Τα ευρήματα αυτά τοποθετούν την Akt στην κατωφέρεια της PI3K και άνωθεν της mTOR στη μετάδοση του σήματος.

Η φωσφορυλίωση της Akt1 στη θέση Thr308 από την PDK1, έχει ως αποτέλεσμα τη μερική ενεργοποίηση της Akt1. Κατ' αναλογία η ενεργοποιημένη PDK1 προκαλεί άμεσα φωσφορυλίωση της S6K στην καταλυτική της περιοχή(Thr229) και μερική ενεργοποίηση αυτής. Η πλήρης ενεργοποίηση της Akt1 και της S6K απαιτεί μια δεύτερη φωσφορυλίωση στη θέση Ser473(για την Akt1) και Thr389(για την S6K) που βρίσκονται στις ρυθμιστικές υδρόφοβες περιοχές τους(HM), οι οποίες επιτελούνται από μια άγνωστη μέχρι πρότινος κινάση που ονομάστηκε PDK2⁸¹ (Εικόνα 15).



Εικόνα 15

Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί διάφορες κινάσες που μπορούν να παίξουν το ρόλο της PDK2 όπως για παράδειγμα η ίδια η PDK – 1, η συνδεόμενη με ιντεγκρίνες κινάση[integrin – linked kinase(ILK)], η ίδια η Akt, η DNA εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (DNA – dependent protein kinase), η πρωτεϊνική κινάση C(PKCβII), η κινάση 6 σχετιζόμενη με τη NIMA(never in mitosis gene A)(NEK6) και τέλος η mTOR(όταν είναι συνδεδεμένη με Rictor στο mTORC2)^{31, 82-87}. Από τις κινάσες αυτές η πλέον πιθανή για το ρόλο της PDK2 είναι η mTOR η οποία όταν συνδέεται στο Rictor προκαλεί φωσφορυλίωση του HM(Ser473) τόσο της Akt όσο και της SGK, ενώ όταν συνδέεται με το Raptor παίζει το ρόλο της PDK2(φωσφορυλίωση του HM) για την S6K⁸⁷ (Εικόνα 15).

Ένα σημαντικό πρόβλημα που προέκυψε από νεότερες έρευνες είναι ότι οι αναστολείς LY294002, PI – 103 και NVP – BEZ235 που εθεωρούντο ειδικοί για την PI3K, φαίνεται ότι

αναστέλλουν το ίδιο αποτελεσματικά και την mTOR. Επομένως δεν γνωρίζουμε σε ποιο βαθμό η ικανότητα αυτών των μορίων να αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση της Akt αντιπροσωπεύει μόνο αναστολή της PI3K ή επιπρόσθετα αναστολή και της mTOR και σε ποιο βαθμό. Η χρήση νεότερων ειδικών αναστολέων της mTOR όπως η πυραζολοπυριμιδίνες PP242 και PP30 κατέδειξε ότι η Ser473 φωσφορυλίωση της Akt ασκείται ειδικά από την mTOR(στο mTORC2) και είναι ανεξάρτητη από την Thr308 φωσφορυλίωση της Akt που ασκείται από την ενεργοποιημένη PI3K(ή πιο σωστά από την PDK1). Οι πυραζολοπυριμιδίνες είναι σε θέση να αναστείλουν και την Thr308 φωσφορυλίωση της Akt αλλά σε πολύ μεγαλύτερες δόσεις και με μια διαδικασία που εξαρτάται απόλυτα από την αναστολή της φωσφορυλίωσης στη θέση Ser473⁸⁸. Επίσης αναστέλλουν και όλες τις γνωστές λειτουργίες του mTORC1, οπότε θεωρούνται ειδικοί αναστολείς της mTOR είτε αυτή βρίσκεται στο mTORC1 είτε στο mTORC2. Σε in vivo πειράματα φάνηκε ότι η Ser473 φωσφορυλίωση στο λιπώδη και ηπατικό ιστό εξαρτάται απόλυτα από την ακεραιότητα του mTORC2 αλλά στο μυϊκό ιστό πρέπει να εμπλέκεται άλλη κινάση όπως η DNA – PK. Έτσι το πρόβλημα της φύσης της PDK2 φαίνεται να παραμένει ακόμα και σήμερα καθώς ενδέχεται η PDK2 να είναι διαφορετική στους διάφορους ιστούς.

Γενικά η 2^η φωσφορυλίωση της Akt στη θέση 473 θεωρείται ότι αυξάνει την ενεργότητα της κατά 5 φορές⁸⁶. Η πλήρως ενεργοποιημένη Akt, αναστέλλει το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της οζώδους σκλήρυνσης TSC1/TSC2(tuberous sclerosis complex 1/tuberous sclerosis complex 2). Το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του mTORC1 και ως εκ τούτου η αναστολή του από την Akt προκαλεί έμμεσα ενεργοποίηση του mTORC1^{81, 89}. Η Akt είναι όμως σε θέση να ενεργοποιήσει το mTORC1 και άμεσα, προκαλώντας φωσφορυλίωση της mTOR στη θέση Ser2448^{53, 90, 91, 92}.

Η απλή φωσφορυλίωση της Akt στη θέση Thr308(σε κύτταρα MEF mSIN-/- που δεν έχουν Ser473pAkt λόγω απώλειας του mTORC2) διατηρεί την ικανότητά της να φωσφορυλιώνει το TSC1/TSC2 και την GSK3, αλλά καταργεί την ικανότητά της να φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη FoxO στον πυρήνα των κυττάρων⁸⁸.

TSC1/TSC2

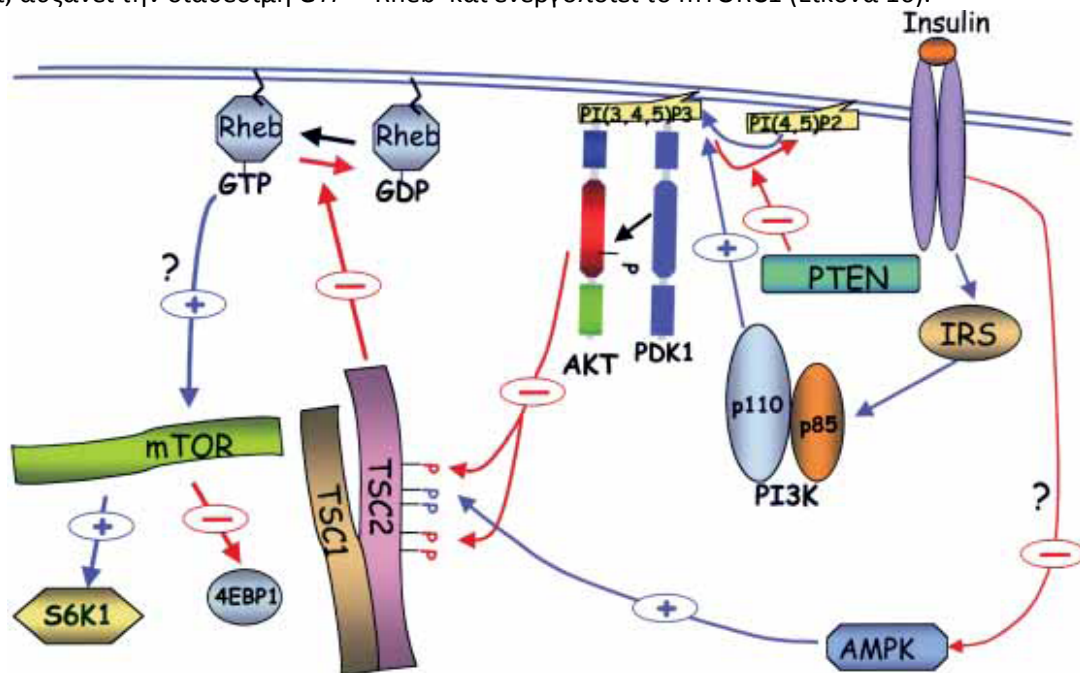
Οι πρωτεΐνες TSC1(hamartin) και TSC2(tuberin) κωδικοποιούνται από 2 ξεχωριστά γονίδια το *TSC1* και *TSC2* μεταλλάξεις των οποίων σχετίζονται με την εμφάνιση της οζώδους σκλήρυνσης, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία αμαρτωμάτων και πολύ μεγάλων κυττάρων σε διάφορα όργανα. Μεταλλάξεις στα γονίδια της *Drosophila* *dTSC1* και *dTSC2* προκαλούν αύξηση του μεγέθους των κυττάρων και των οργάνων παρόμοια με την αύξηση που παρατηρείται κατά την απαλοιφή του PTEN. Αντίθετα η ταυτόχρονη υπερέκφραση των γονιδίων *dTSC1* και *dTSC2* προκαλεί μείωση του μεγέθους και του αριθμού των κυττάρων καθώς και του μεγέθους των οργάνων στη *Drosophila*⁹³. Οι δύο πρωτεΐνες λειτουργούν ως ετεροδιμερές διότι υπερέκφραση μόνο της μιας εκ των δύο δεν επιφέρει καμία μεταβολή στο φαινότυπο. Γενετικές μελέτες επίστασης έδειξαν ότι το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 λειτουργεί ανάμεσα στην Akt και την S6K στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης⁹³. Η σύνδεση αυτή επιβεβαιώθηκε το 2002, όταν βρέθηκε ότι η Akt φωσφορυλιώνει άμεσα το TSC2 τόσο in vivo όσο και in vitro. Η απαλοιφή της TSC2 σε κύτταρα HEK – 293 προκαλεί μόνιμη φωσφορυλίωση των S6K και 4E – BP1 κατά τρόπο ευαίσθητο στη ραπαμυκίνη, ενώ η υπερέκφραση του συμπλέγματος TSC1/TSC2 στα ίδια κύτταρα αναστέλλει την από την ινσουλίνη επαγόμενη φωσφορυλίωση των S6K και 4E – BP1. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ένας από τους μηχανισμούς ενεργοποίησης της mTOR από την Akt είναι η φωσφορυλίωση και αδρανοποίηση του TSC1/TSC2. Υπάρχουν διάφορες πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης της ανθρώπινης TSC2 από την Akt, όπως η Ser939, η Ser1130 και η Thr1462. Η φωσφορυλίωση του TSC2 πιθανώς αποσταθεροποιεί το

σύμπλεγμα TSC1/TSC2, οδηγώντας σε αποδόμηση των συστατικών του, άρση της ανασταλτικής του δράσης επί του mTORC1 και τελικά φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών S6K και 4E – BP1⁹⁴. Εν τούτοις η απαλοιφή της Akt1 και Akt2 ενώ μειώνει σημαντικά τη φωσφορυλίωση των S6K και 4E – BP1(δηλαδή τη δράση του mTORC1), δεν προκαλεί σημαντική μείωση της φωσφορυλιωμένης TSC2⁹⁵ γεγονός που συνηγορεί υπέρ της παρουσίας πρόσθετων μηχανισμών είτε για τη φωσφορυλίωση της TSC2 είτε για την ρύθμιση του mTORC1 από την Akt. Το ερώτημα αυτό όμως, έχει μάλλον ήδη απαντηθεί καθώς είναι γνωστό ότι η Akt μπορεί να προκαλέσει άμεσα ενεργοποίηση του mTORC1, μέσω φωσφορυλίωσης της mTOR στη θέση Ser2448, όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα^{53, 90-92}.

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 παίζει καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση του mTORC2, καθώς η αναστολή της λειτουργικότητας του TSC1/TSC2 σε διάφορες κυτταρικές σειρές, προκάλεσε την πλήρη αναστολή της φωσφορυλίωσης Ser473 της Akt από το mTORC2. Έτσι το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του mTORC1 και θετικό ρυθμιστή του mTORC2⁹⁶.

Rheb & Rag

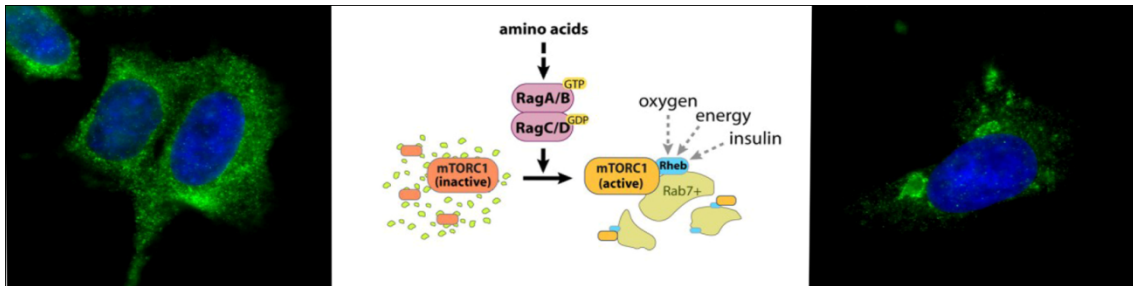
Ο μηχανισμός αναστολής του mTORC1 από το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 διευκρινίστηκε το 2003, με την ανακάλυψη ότι η μικρή GTP συνδεδεμένη πρωτεΐνη Rheb(Ras homolog enriched in brain) έχει επιστατικό ρόλο ανάμεσα στο TSC1/TSC2 και στο mTORC1⁹⁷. Όταν η Rheb βρίσκεται υπό τη μορφή GTP – Rheb ενεργοποιεί το mTORC1 ενώ υπό τη μορφή GDP – Rheb το αναστέλλει. Το TSC1/TSC2 λειτουργεί ως GTPάση(GAP) για την πρωτεΐνη Rheb μετατρέποντας την GTP μορφή σε GDP – Rheb και ως εκ τούτου αναστέλλει έμμεσα τη δραστηριότητα του mTORC1. Η αναστολή της GAP δραστηριότητας του TSC1/TSC2 από την Akt, αυξάνει την διαθέσιμη GTP – Rheb και ενεργοποιεί το mTORC1 (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Η ρύθμιση της δραστηριότητας της mTOR από αυξητικούς παράγοντες μεσολαβείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt. Η ενεργοποιημένη Akt φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την TSC2 αυξάνοντας έτσι τη GTP-Rheb που είναι ο τελικός ενεργοποιητής της mTOR με ένα άγνωστο μέχρι σήμερα μηχανισμό. Επιπρόσθετα η TSC2 ενεργοποιείται από την κινάση AMPK που αποτελεί αισθητήρα της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου.

Η απώλεια οποιασδήποτε από τις πρωτεΐνες TSC προκαλεί αυξημένη ενεργοποίηση του mTORC1 ακόμα και επί απουσίας των υπερκείμενων σημάτων που φυσιολογικά απαιτούνται για τη διατήρηση της δραστηριότητας του PI3K/Akt/mTORC1 μονοπατιού. Η

μόνη αξιοσημείωτη εξαίρεση είναι η παροχή αμινοξέων, καθώς το μονοπάτι του mTORC1 παραμένει ευαίσθητο στη στέρηση αμινοξέων(δηλαδή αναστέλλεται) ακόμα και σε κύτταρα που στερούνται είτε το TSC1 είτε το TSC2⁹⁸. Φαίνεται πως ανεξάρτητα από την παρουσία αυξητικών παραγόντων, ινσουλίνης ή ενεργοποιημένων πρωτεϊνών του σηματοδοτικού μονοπατιού(π.χ. PI3K, pAkt, TSC1/2, GTP – Rheb), το mTORC1 δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί σε καταστάσεις θρεπτικής στέρησης αμινοξέων. Επομένως η ενεργοποίηση του mTORC1 προϋποθέτει την ταυτόχρονη παρουσία αμινοξέων και αυξητικών παραγόντων για την ενεργοποίησή του. Η πρόσφατη ανακάλυψη ότι οι πρωτεΐνες Rag συνδέονται με το Raptor, βοήθησε στην εξακρίβωση του μηχανισμού της υποχρεωτικής απενεργοποίησης του mTORC1 σε συνθήκες έλλειψης αμινοξέων. Συγκεκριμένα, απουσία αμινοξέων το mTORC1 εντοπίζεται διάσπαρτο σε κυτταροπλασματικά οργανίδια όπως η συσκευή Golgi, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα ενδοσώματα. Η χορήγηση αμινοξέων γίνεται αντιληπτή από μικρές GTP συνδέουσες πρωτεΐνες της οικογένειας Ras(Rag a, b, c, d). Οι πρωτεΐνες Rag αφενός ρυθμίζουν την ενδοκυττάρια τακτοποίηση των περμεασών των αμινοξέων και την αυτοφαγία και αφετέρου προκαλούν μετανάστευση του mTORC1 σε πρώιμα ενδοσώματα και λυσοσώματα(Εικόνα 17). Όταν το mTORC1 μεταναστεύει στις θέσεις αυτές, συναντά την GTP – Rheb και δύναται, έτσι, να ενεργοποιηθεί. Απουσία αμινοξέων ή πρωτεϊνών Rag το mTORC1 δεν μεταναστεύει και αδυνατεί να ενεργοποιηθεί από αυξητικούς παράγοντες ή από ιδιοσυστασιακά ενεργοποιημένα τμήματα του μονοπατιού PI3K/Akt/TSC1 – 2/GTP – Rheb⁹⁸.



Εικόνα 17: Οι πρωτεΐνες Rag "αισθάνονται" την παρουσία αμινοξέων και προκαλούν τη μετανάστευση του mTORC1 από το ενδοπλασματικό δίκτυο σε πρώιμα ενδοσώματα και λυσοσώματα. Όταν μεταναστεύει στις θέσεις αυτές, το mTORC1 συναντά τη GTP-Rheb και μπορεί έτσι να ενεργοποιηθεί.

Σε κύτταρα *Drosophila* με ανεπαρκή έκφραση Rheb παρατηρείται, όπως είναι αναμενόμενο, μειωμένη δραστηριότητα mTORC1, αλλά το πιο ενδιαφέρον είναι ότι αυξάνεται η δραστηριότητα της Akt. Αντίστοιχα στα ίδια κύτταρα η υπερέκφραση της Rheb ενεργοποιεί το mTORC1 και αναστέλλει τη δραστηριότητα της Akt. Επίσης, σε κύτταρα στερούμενα TSC2, ξανά η δραστηριότητα του mTORC1 είναι αυξημένη και της Akt μειωμένη. Τα παραπάνω δείχνουν ότι υπάρχει ένας μηχανισμός παλίνδρομης ρύθμισης μεταξύ mTORC1 και Akt ο οποίος φαίνεται ότι ασκείται μέσω της S6K⁹⁹.

ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ, ΑΦΥΔΑΤΩΣΗ, ΕΓΚΛΕΙΣΗ

Προκειμένου να παρατηρηθεί ένα τμήμα ιστού σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, θα πρέπει αρχικά να υποστεί μια σειρά διαδικασιών που θα καταστήσουν τον ιστό ικανό να αντέξει τις συνθήκες στις οποίες υποβάλλεται κατά την παρατήρηση. Αρχικά το ιστοτεμάχιο θα πρέπει να μονιμοποιηθεί ή να στερεωθεί, στη συνέχεια αφυδατώνεται και τέλος εγκλείεται ή υφίσταται σκλήνωση. Οι διαδικασίες αυτές περιγράφονται παρακάτω.

Μονιμοποίηση

Η μονιμοποίηση ή στερέωση είναι το πρώτο βήμα στην προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων για παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Σκοπός της μονιμοποίησης είναι η σταθεροποίηση της κυτταρικής οργάνωσης σε τέτοιο βαθμό που οι υπερ – δομές να διατηρούνται παρά τη δραστική καταπόνηση του ιστού από την επικείμενη αφυδάτωση, έγκλειση και έκθεση στη δέσμη των ηλεκτρονίων. Είναι αναμενόμενο ότι κατά τη διαδικασία της μονιμοποίησης να τροποποιείται κάπως η δομή του ιστού. Παραδείγματος χάριν, κάποιοι μονιμοποιητές δημιουργούν ασυνέχειες σε μεμβράνες, ενώ άλλοι καταστρέφουν εντελώς κάποια κυτταρικά οργανίδια. Κάποια από τα αποτελέσματα που προκύπτουν εξαρτώνται τόσο από τη φύση του ιστού όσο και από το ίδιο το μονιμοποιητικό διάλυμα, κατ' επέκταση διάφορα κριτήρια λαμβάνονται υπόψη πριν την επιλογή του κατάλληλου μονιμοποιητή για το κάθε είδος ιστού.

Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει σε οποιαδήποτε διαδικασία το ιστοτεμάχιο να βρίσκεται σε κατάσταση η οποία να προσομοιάζει τις φυσικές του συνθήκες. Αυτό σημαίνει ότι θα πρέπει να ρυθμιστούν κατάλληλα συνθήκες όπως το pH και η ωσμωμοριακότητα του διαλύματος όπου θα γίνει η κάθε διαδικασία. Αυτό σημαίνει ότι θα πρέπει αρχικά να δημιουργηθεί ένα διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί ως βάση. Στο διάλυμα αυτό θα γίνει η μονιμοποίηση του δείγματος και με αυτό το διάλυμα επίσης θα γίνουν και τα απαραίτητα ξεπλύματα μετά από κάθε φάση. Τέτοια διαλύματα μπορεί να είναι φωσφορικά (phosphate buffers), κακοδυλικά (cacodylate buffers), καθώς και άλλα λιγότερο συνηθισμένα (veronal – acetate buffers, ρυθμιστικά διαλύματα κολλιδίνης κ. ά.) Στο διάλυμα που χρησιμοποιείται ως βάση, προστίθεται και το εκάστοτε χημικό που θα χρησιμοποιηθεί ως μονιμοποιητής.

Μονιμοποιητικά

Μονιμοποιητικά με βάση το τετροξείδιο του οσμίου: Η αξία του τετροξειδίου του οσμίου για τη διατήρηση της λεπτής δομής ήταν εμφανής από το 1927. Βρέθηκε ότι το τετροξείδιο του οσμίου ήταν το μόνο μονιμοποιητικό που διατηρούσε ευαίσθητες κυτταροπλασματικές λεπτομέρειες και δεν προκαλούσε μεταβολές σε μιτοχόνδρια και λιπосώματα. Ένα μειονέκτημα του τετροξειδίου του οσμίου είναι ότι διεισδύει και αντιδρά τόσο αργά με τα κύτταρα του ιστού που μέχρι να συντελεστεί ολική μονιμοποίηση συμβαίνουν σημαντικές αλλαγές στη δομή του κυττάρου. Το τετροξείδιο του οσμίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μονιμοποιητικό μαζί με ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν φωσφορικά ιόντα επειδή αυτός ο συνδυασμός είναι ο ιδανικότερος μια και τα φωσφορικά ρυθμιστικά διαλύματα ομοιάζουν κατά το πλείστον με τη φυσιολογική κατάσταση του ιστού. Επίσης, το τετροξείδιο του οσμίου χρησιμοποιείται και με κακοδυλικά ρυθμιστικά διαλύματα αλλά λιγότερο συχνά απ' ό,τι τα φωσφορικά καθώς και με άλλα ανάλογα με το είδος του ιστού και τον τρόπο της έγκλεισης που θα ακολουθήσει.

Μονιμοποιητικά με βάση τη γλουταραλδεϋδη: Είναι πλέον γνωστό ότι οι περισσότερες αλδεϋδες όταν χρησιμοποιούνται μόνες τους ως μονιμοποιητικά δε δίνουν ικανοποιητικά

αποτελέσματα καθώς η αντίθεση που επιτυγχάνεται είναι πολύ χαμηλή και δε λαμβάνεται η συμβατική εικόνα των μεμβρανών. Αξιοπρόσεκτο είναι εντούτοις το γεγονός πως η χρήση μιας αλδεΐδης και πιο συγκεκριμένα της γλουταραλδεΐδης ακολουθούμενη από μια δεύτερη μονιμοποίηση με τετροξειδίο του οσμίου δίνει αποτελέσματα εξίσου καλά όπως αυτά που προκύπτουν από τη χρήση του τετροξειδίου του οσμίου μόνο. Κατ' επέκταση έχει βρεθεί πως η διπλή αυτή μονιμοποίηση είναι άριστη για μια ευρεία ποικιλία δειγμάτων και πλέον η γλουταραλδεΐδη, είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με την παραφορμαλδεΐδη, είναι τα περισσότερο κοινώς χρησιμοποιούμενα μονιμοποιητικά για την ηλεκτρονική μικροσκοπία σήμερα. Η διπλή αυτή μονιμοποίηση προσφέρει την άνεση σχετικά με το μέγεθος των ιστοτεμαχίων αφού η γλουταραλδεΐδη είναι περισσότερο διεισδυτική και τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν σε ψυχρό περιβάλλον για περιόδους μέχρι και μερικούς μήνες για τις μετα – μονιμοποιητικές διεργασίες χωρίς αξιολογες μεταβολές στη λεπτή δομή. Τα εξαιρετικά αποτελέσματα που προκύπτουν από τη γλουταραλδεΐδη οφείλονται στο γεγονός ότι η γλουταραλδεΐδη αντιδρά γρήγορα με τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα και σταθεροποιεί τη δομή κάνοντας διασυνδέσεις (cross – linking) μεταξύ των μορίων.

Μονιμοποιητικά με βάση φορμαλδεΐδη: Η φορμαλδεΐδη ερευνήθηκε ως προς τη χρήση της ως μονιμοποιητικό στις αρχές της εξέλιξης της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αλλά τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι οι λαμβανόμενες εικόνες είναι χαμηλότερης ποιότητας από αυτές που προκύπτουν ύστερα από μονιμοποίηση με τετροξειδίο του οσμίου. Ακόμα και στην περίπτωση που γινόταν διπλή μονιμοποίηση με φορμαλδεΐδη και τετροξειδίο του οσμίου τα αποτελέσματα παρέμεναν φτωχά σε ποιότητα και λεπτομέρεια. Ο λόγος είναι ότι η φορμαλδεΐδη είναι μια μονο – αλδεΐδη της οποίας η αντίδραση είναι αργή και αντιστρεπτή. Αυτό οδηγεί στην καταστροφή των διασυνδέσεων των μορίων κατά τα πλυσίματα που ακολουθούν και φυσικά δεν είναι δυνατή η αποθήκευση επί μακρό χρονικό διάστημα.

Μονιμοποιητικά με βάση το υπερμαγγανικό: Οι μονιμοποιητές με βάση την υπερμαγγανική ρίζα είναι πολύ αποτελεσματικές στη διατήρηση και απεικόνιση μεμβρανών και χρησιμοποιούνται εναλλακτικά ως προς το τετροξειδίο του οσμίου σε ιστούς από φυτικούς οργανισμούς μια και διαθέτει υψηλή διεισδυτικότητα που το καθιστά ικανό να διαπερνά το παχύ κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων. Τέτοια μονιμοποιητικά που χρησιμοποιούνται συχνά είναι το υπερμαγγανικό κάλιο, το υπερμαγγανικό νάτριο, το υπερμαγγανικό λανθάνιο και άλλα που χρησιμοποιούνται λιγότερο συχνά ή και καθόλου στις μέρες μας όπως το υπερμαγγανικό ασβέστιο, βάριο και ο υπερμαγγανικός ψευδάργυρος.

Μονιμοποιητικά με βάση το οξικό ουρανύλιο: Το οξικό ουρανύλιο καθαυτό δε χρησιμοποιείται από μόνο του για πλήρη μονιμοποίηση ενός ιστοτεμαχίου. Περισσότερο χρησιμοποιείται συνδυαστικά με άλλα μονιμοποιητικά πριν τη διαδικασία της αφυδάτωσης προκειμένου να μονιμοποιήσει/σταθεροποιήσει το γενετικό υλικό καθώς επίσης και για αύξηση της αντίθεσης στη λαμβανόμενη εικόνα.

Υπάρχουν, τέλος, και άλλοι μονιμοποιητές ανάλογα με τη φύση του ιστού και το είδος της έγκλεισης που ακολουθείται, οι οποίοι είναι συνδυασμοί των προηγούμενων μονιμοποιητικών και άλλων χημικών. Παραδείγματα αποτελούν τα διαλύματα τετροξειδίου του οσμίου και διχρωμικού καλίου, γλουταραλδεΐδης και τετροξειδίου του οσμίου, μονιμοποιητικά που περιέχουν σιδηροκυανιούχο κάλιο, αλδεϊδικό μονιμοποιητές που περιέχουν τρινιτρο – ενώσεις κ. ά.

Είδη μονιμοποίησης

Η μονιμοποίηση μπορεί να γίνεται είτε σε ένα στάδιο (απλή μονιμοποίηση), είτε σε δύο στάδια (διπλή μονιμοποίηση) με τη μεσολάβηση των απαραίτητων σε αριθμό πλύσεων του δείγματος. Ο βέλτιστος χρόνος και θερμοκρασιακό εύρος εξαρτώνται από το εκάστοτε είδος

του ιστού και την προέλευση του, καθώς και από τον ίδιο το μονιμοποιητή. Παραδείγματος χάριν, μονιμοποίηση για δύο ώρες στους 0° C είναι πολύ κοινή τακτική όταν χρησιμοποιείται το τετροξείδιο του οσμίου.

Το πιο κοινό είδος μονιμοποίησης είναι αυτό στο οποίο ο ιστός τοποθετείται στο διάλυμα μονιμοποίησης. Η μέθοδος αυτή που αποκαλείται και μονιμοποίηση με καταβύθιση (ακριβώς επειδή το ιστοτεμάχιο καταβυθίζεται μέσα στο μονιμοποιητή) χρησιμοποιείται σε όργανα και ιστούς όπως το δέρμα που διατηρούν τη μορφή και τη λειτουργικότητά τους ακόμα και μετά τη διακοπή παροχής αίματος. Επομένως, στην περίπτωση αυτή το ζώο θανατώνεται και γίνεται εκτομή του επιθυμητού οργάνου ή ιστού.

Σε άλλες περιπτώσεις είναι επιθυμητό το εκάστοτε όργανο ή ιστός να αιματώνεται καθώς θα γίνεται η μονιμοποίηση, πράγμα που σημαίνει πως το ζώο θα πρέπει να είναι ζωντανό. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται η *in vivo* μονιμοποίηση κατά την οποία το ζώο αναισθητοποιείται, αποκαλύπτεται με τομή το εκάστοτε όργανο ή ιστός και ο μονιμοποιητής χορηγείται με ένεση στο όργανο ή στον ιστό.

Άλλα είδη μονιμοποίησης που αφορούν μονιμοποίηση κυτταροκαλλιιεργειών, πελετών κυττάρων, αποικιών, μονοστιβάδω κυττάρων, μονιμοποίηση εναιωρήματος κυττάρων κ. ά. δε θα αναλυθούν στην παρούσα εργασία.

Αφυδάτωση

Τα περισσότερα μέσα έγκλεισης δεν είναι διαλυτά στο νερό και συνεπώς τα μονιμοποιημένα δείγματα πρέπει να αφυδατωθούν προκειμένου να προχωρήσει σωστά η διαδικασία και να μη δημιουργηθούν προβλήματα στην απεικόνιση. Η αφυδάτωση γίνεται με την τοποθέτηση των δειγμάτων σε διαλύματα συναφή προς το τελικό υλικό έγκλεισης. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα χημικά αφυδάτωσης είναι η αιθανόλη και η ακετόνη που δίνουν περίπου τα ίδια αποτελέσματα αλλά γενικά η αιθανόλη προτιμάται μια και η ακετόνη πολλές φορές οδηγεί σε μερική αφυδάτωση λόγω του πολύ έντονου φαινομένου ενυδάτωσης της στο μοριακό επίπεδο.

Το πιο αξιοσημείωτο φαινόμενο κατά την αφυδάτωση είναι το γεγονός ότι ως άριστοι διαλύτες των λιπιδίων, η αιθανόλη και η ακετόνη, μπορούν να οδηγήσουν σε εκχύλιση λιπιδικών μορίων, ειδικότερα στις υψηλές συγκεντρώσεις του αφυδατικού παράγοντα. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με πρωτεϊνικά μόρια αλλά σε μικρότερες συγκεντρώσεις του αφυδατικού παράγοντα όπου το νερό είναι περισσότερο στο διάλυμα. Αποτέλεσμα της εκχύλισης λιπιδικών ή πρωτεϊνικών μορίων είναι η σμίκρυνση του ιστού και μείωση της δυνατότητας για παρατήρηση των μεμβρανών.

Επομένως ανάλογα με το είδος του ιστού και το ποιος αφυδατικός παράγοντας χρησιμοποιείται, εφαρμόζεται και διαφορετικό πρόγραμμα αφυδάτωσης. Γενικά, τα ιστοτεμάχια είναι καλό να παραμένουν όσο το δυνατόν λιγότερο στις χαμηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης ή ακετόνης, ανάλογα βέβαια πάντα με το τι ακριβώς μας ενδιαφέρει κάθε φορά να παρατηρήσουμε (αν προκειται να δούμε απλώς τη δομή, αν θέλουμε να κάνουμε ανοσοεντοπισμό κλπ).

Αμέσως μετά τη χρήση αιθανόλης ή ακετόνης τα δείγματα εκθέτονται σε κάποια χημική ουσία η οποία να είναι συναφής προς το υλικό έγκλεισης (ρητίνη) που θα ακολουθήσει στη συνέχεια. Τέτοιες ουσίες είναι για παράδειγμα η πολυαιθυλενική γλυκόλη, η αιθυλενική γλυκόλη, το οξείδιο του προπυλενίου και άλλες.

Έγκλειση

Στο τελικό στάδιο της προετοιμασίας ενός βιολογικού δείγματος για παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, αυτό πρέπει να είναι σε μια μορφή κατάλληλη για λεπτή κοπή.

Αυτό επιτυγχάνεται με τον εμποτισμό του δείγματος από κατάλληλο υγρό μέσο έγκλεισης το οποίο στη συνέχεια πολυμερίζεται και δημιουργεί ένα συμπαγές block.

Η ιδανική περίπτωση όσον αφορά σε ένα μέσο έγκλεισης είναι όταν αυτό φέρει τις εξής ιδιότητες:

1. Είναι εύκολα διαθέσιμο
2. Είναι διαλυτό από τον εκάστοτε αφυδατικό παράγοντα
3. Έχει χαμηλή συνάφεια ως μονομερές
4. Πολυμερίζεται σε όλη του την έκταση
5. Η μεταβολή του όγκου κατά τον πολυμερισμό είναι μικρή
6. Προσφέρει ευκολία στην κοπή τομών
7. Είναι σταθερό κατά την έκθεση στην ηλεκτρονιακή δέσμη

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες ρητινών εκ των οποίων οι κυριότερες είναι οι εποξικές(epoxy resins), οι πολυεστερικές(polyester resins) και οι διαφόρων ειδών ακρυλικές(acrylate-, methacrylate- based resins). Κανένα από τα υπάρχοντα μέσα έγκλεισης δεν κατέχει όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, ενώ κάποιες ιδιότητες τους μπορεί να μην είναι συμβατές με τις ιδιότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν σε προηγούμενα στάδια. Επομένως, ανάλογα με το είδος του ιστού και με το σκοπό για τον οποίο θα γίνει η έγκλειση(παρατήρηση δομής, διαγνωστικοί σκοποί, ανοσοεντοπισμός) χρησιμοποιείται και το αντίστοιχο μέσο έγκλεισης και κατ' επέκταση ακολουθείται και η αντίστοιχη διαδικασία.

Στην παρούσα εργασία θα γίνει αναφορά μόνο στις εποξικές ρητίνες, καθώς επίσης και στις ακρυλικές αφού αυτές ήταν το αντικείμενο της πειραματικής διαδικασίας.

Εποξικές ρητίνες

Οι εποξικές ρητίνες έχουν το πλεονέκτημα ότι πολυμερίζονται πλήρως με πολύ μικρή αύξηση του όγκου τους και είναι σχετικά σταθερές κατά την έκθεση στην ηλεκτρονιακή δέσμη. Το κύριο μειονέκτημα είναι η υψηλή τους συνάφεια που κάνει επιτακτική την ανάγκη για επί μακρό χρονικό διάστημα παραμονή των δειγμάτων στο στάδιο του εμποτισμού(infiltration). Από χημική σκοπιά, οι εποξικές ρητίνες είναι πολυαρυλικοί αιθέρες γλυκερόλης με ακραίες εποξυ – ομάδες. Προκειμένου να πολυμεριστούν, οι εποξικές ρητίνες τοποθετούνται σε κλίβανο σε υψηλή, σχετικά, θερμοκρασία για μερικές ώρες.

Ακρυλικές ρητίνες

Οι ακρυλικές ρητίνες και κυρίως οι ρητίνες Lowicryl, ένας τύπος εκ των οποίων ήταν που χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά στην πειραματική διαδικασία, σε αντίθεση με τις εποξικές ρητίνες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Πρόκειται για εστερικά παρασκευάσματα μεθ – ακρυλικών οξέων, που έχουν πολύ υψηλή διεισδυτικότητα και αυτή τους η ιδιότητα τις καθιστά ικανές να χρησιμοποιούνται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από τους – 90° C. Οι ακρυλικές ρητίνες φωτοπολυμερίζονται με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας σε χαμηλή θερμοκρασία αλλά μπορούν να πολυμεριστούν και χημικά στους 60° C. Οι ακρυλικές ρητίνες είναι ιδανικές για χρήση σε πειράματα ανοσοεντοπισμού και ανοσοφθορισμού. Ένα ακόμα πλεονέκτημα των ακρυλικών ρητινών είναι πως παρέχουν εικόνες υψηλής αντίθεσης στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης ακόμα κι αν οι τομές δεν υποστούν καμία απολύτως χρώση.

Αντικατάσταση σε χαμηλές θερμοκρασίες

Μέχρι τη δεκαετία του 1960 όλες οι μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων για ηλεκτρονική μικροσκοπία γίνονταν σε θερμοκρασία δωματίου. Από τη δεκαετία αυτή και έπειτα ξεκίνησε, αρχικά ως ιδέα η οποία στη συνέχεια υλοποιήθηκε, η χρήση εφαρμογών που

επέτρεπαν τις διαδικασίες μονιμοποίησης, αφυδάτωσης και έγκλεισης σε θερμοκρασίες μικρότερες της θερμοκρασίας δωματίου. Βασική ιδέα της καινοτομίας αυτής ήταν ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες θα μειώνεται η κινητικότητα των ενδοκυτταρικών μορίων και κατ' αυτό τον τρόπο θα μειώνεται η εκχύλισή τους κατά τα στάδια της μονιμοποίησης και αφυδάτωσης. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για ερευνητικούς σκοπούς, σε πειράματα ανοσοεντοπισμού, όπου ο εντοπισμός του επιθυμητού μορίου – αντιγόνου στο σωστό σημείο στο κύτταρο και στον ιστό γενικότερα είναι πρωταρχικής σημασίας.

Ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία

Όπως και με τον ανοσοφθορισμό στη φωτονική μικροσκοπία, τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιούνται στην ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία(ή τα δευτερογενή ή/και τριτογενή αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται έναντί τους) πρέπει να σημανθούν κατά τρόπο τέτοιο ο οποίος να επιτρέπει την οπτικοποίησή τους. Όσον αφορά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, αυτό σημαίνει ότι πρέπει να σημανθούν με μέταλλα(ή ουσίες που περιέχουν μέταλλα) ικανά να διακόψουν ολικώς ή μερικώς τη διέλευση της ηλεκτρονιακής δέσμης. Σφαιρικά σωματίδια κολλοειδούς χρυσού είναι η πιο κοινή επιλογή, άλλες επιλογές όμως, όπως η πρωτεΐνη φερρίνη που προσδένεται σε σίδηρο καθώς και συνθετικά πολυμερή που περιέχουν σίδηρο είναι επίσης διαθέσιμα.

Ένα συχνό πρόβλημα που παρατηρείται στην ανοσοσήμανση για ηλεκτρονική μικροσκοπία είναι αυτό που έχει να κάνει με τη μονιμοποίηση του ιστού. Αν και απαραίτητη για τη διατήρηση της υπερ – λεπτής δομής του ιστού, η μονιμοποίηση επιδρά σταδιακά καταστροφικά στους αντιγονικούς επιτόπους. Αυτό είναι πρόβλημα και στη φωτονική μικροσκοπία, αλλά στην ηλεκτρονική είναι ιδιαίτερα περίπλοκο θέμα. Ανεπαρκής μονιμοποίηση του δείγματος συχνά οδηγεί σε απώλεια της μικροσκοπικής λεπτομέρειας, η οποία δε φαίνεται με το οπτικό μικροσκόπιο. Από την άλλη πλευρά, υπερβολική έκθεση σε περιβάλλον μονιμοποίησης μπορεί να μειώσει τη δραστηριότητα των αντισωμάτων με τους αντιγονικούς επιτόπους εντός των υπερ – λεπτών τομών, όπου η πυκνότητά τους είναι περιορισμένη.

Η συμβατική έγκλειση δειγμάτων σε εποξικές ρητίνες δημιουργεί ένα πρόβλημα για τον ανοσοεντοπισμό, αποκλειστικό στην ηλεκτρονική μικροσκοπία. Σε αντίθεση με την παραφίνη η οποία αφαιρείται από τομές δείγματος για παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο με τη βοήθεια οργανικών διαλυτών και στη συνέχεια αντικαθίσταται με ένα υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα, η πολυμερισμένη ρητίνη παραμένει, πρακτικά, στην τομή για ηλεκτρονικό μικροσκόπιο καθ' όλη τη διάρκεια ζωής της τομής, επομένως μειώνεται με αυτό τον τρόπο η πρόσβαση των αντιδραστηρίων των αντισωμάτων στους αντιγονικούς καθοριστές του ιστού. Υπάρχουν μέθοδοι που χαλαρώνουν τους δεσμούς της πολυμερισμένης ρητίνης και επιτρέπουν μεγαλύτερη διείσδυση των αντισωμάτων εντός του σώματος της τομής και πρόσβαση στους αντιγονικούς επιτόπους, αλλά είναι από μόνες τους πολύ δραστικές και μπορεί να προκαλέσουν καταστροφή στους επιτόπους.

Τα προβλήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω μπορούν σε πολύ μεγάλο βαθμό να περιοριστούν με τη βοήθεια κρυο – μεθόδων όπως είναι η έγκλειση σε χαμηλή θερμοκρασία καθώς και η παραγωγή τομών σε πολύ ψυχρό περιβάλλον. Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται σε αυτή την περίπτωση είναι κατά κύριο λόγο πολύ πιο ήπια και φιλικά προς τον ιστό απ' ότι αυτά που χρησιμοποιούνται στη συνηθισμένη έγκλειση.

Ένας άλλος τρόπος να παρακαμφθεί η καταστροφή που μπορούν να υποστούν οι επίτοποι καθώς και η έλλειψη προσβασιμότητας προς αυτούς από τα αντισώματα, προβλήματα που οφείλονται κατά κύριο λόγο στη μονιμοποίηση, είναι να διεξαχθεί η ανοσοσήμανση πριν τις διαδικασίες της αντικατάστασης. Η προσέγγιση αυτή εφαρμόζεται

μόνο σε ιστούς που είναι γνωστό πως το μελετώμενο αντιγόνο βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνειά του. Διαφορετικά πρέπει να υποστεί ο ιστός διαδικασίες ώστε να γίνει διαπερατός από τα αντιδραστήρια που μας ενδιαφέρουν.

Αντισώματα

Πρωτογενή αντισώματα: Όταν περισσότερα από ένα αντισώματα έναντι στον προσδέτη που μας ενδιαφέρει είναι διαθέσιμα, υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την τελική επιλογή όπως είναι η φύση του αντισώματος: μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό, η απαραίτητη προετοιμασία και το κόστος. Οι οδηγίες του κατασκευαστή καθώς και υπάρχουσα βιβλιογραφία βοηθούν να καταλήξουμε στο καταλληλότερο αντίσωμα ή στο να αποκλείσουμε κάποιο άλλο, ακόμα και να προβλέψουμε μέσα σε κάποια όρια τη συμπεριφορά του εκάστοτε αντισώματος.

Αυτό το οποίο θεωρείται γενικά ως το πιο αποδεκτό είναι να δοκιμαστεί το αντίσωμα ή ένας αριθμός διαφορετικών σε διάφορους ιστούς οι οποίοι είναι ήδη γνωστό ότι φέρουν τον αντίστοιχο προσδέτη του αντισώματος(αντιγόνο) μέχρι να βρεθεί «ποιο δουλεύει». Ως δοκιμαστικός ιστός καλό είναι να χρησιμοποιείται ένας ιστός που διαθέτει σε υψηλή συγκέντρωση το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει ακόμα κι αν δεν πρόκειται για αυτό το είδος ιστού που μελετάται στο εκάστοτε πείραμα. Μια πρώτη δοκιμή του αντισώματος που μας ενδιαφέρει για ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία με κάποια μέθοδο που βασίζεται στην οπτική μικροσκοπία πάντα ενδείκνυται επειδή οι μέθοδοι αυτές είναι πολύ ευαίσθητες και εύκολες. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ο καθορισμός ορισμένων συνθηκών που είναι απαραίτητες ώστε να δοθούν ασφαλή και αποδεκτά αποτελέσματα.

Δευτερογενή αντισώματα: Η ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία μπορεί να διεξαχθεί χρησιμοποιώντας ένα πρωτογενές αντίσωμα το οποίο είναι άμεσα προσδεμένο με έναν ηλεκτρονιόπυκνο σημαντή, όπως είναι ο κολλοειδής χρυσός(άμεση ανοσοσήμευση). Για μια ευρεία ποικιλία λόγων όμως, είναι συνήθως περισσότερο πλεονεκτική η χρήση μιας έμμεσης μεθόδου στην οποία το πρωτογενές αντίσωμα δεν προσδέεται σε έναν άμεσα ανιχνεύσιμο σημαντή. Οι τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν την ανίχνευση των μη σημασμένων πρωτογενών αντιγόνων από αντιδραστήρια μεταλλο – συνδεδεμένων αντι – ανοσοσφαιρινών(αντι – αντισώματα) ή βακτηριακά προϊόντα με ιδιότητες πρόσδεσης ανοσοσφαιρίνης.

Οι μέθοδοι της έμμεσης ανοσοσήμευσης προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα. Κυριότερο αυτών είναι πως κάθε επίπεδο αντισώματος θεωρητικά επιτρέπει αύξηση του σήματος^{100, 101}. Αυτό είναι ιδιαίτερα θετικό στην περίπτωση που ο αντιγονικός καθοριστής που εξετάζεται κατανέμεται με μικρή συχνότητα στο σώμα της τομής ή το πρωτογενές αντίσωμα είναι χαμηλής ποιότητας. Επειδή τα υψηλής ποιότητας προσδεδεμένα με κολλοειδή χρυσό αντισώματα είναι συχνά ακριβά ή δύσκολα στην παρασκευή, η χρήση ενός μόνο δευτερογενούς αντιδραστηρίου με διάφορα διαφορετικά πρωτογενή αντισώματα προσφέρει αξιοσημείωτη οικονομία.

Από την άλλη πλευρά, οι τεχνικές έμμεσης ανοσοσήμευσης είναι εξ ορισμού περισσότερο πολύπλοκες και χρονοβόρες απ' ότι οι τεχνικές άμεσης ανοσοσήμευσης. Είναι δύσκολο να γίνουν ταυτόχρονα στον ίδιο ιστό πειράματα διπλής σήμευσης με δύο πρωτογενή αντισώματα του ίδιου είδους και ιστούπου. Τέλος, η ανάλυση στην τελική εικόνα μειώνεται λίγο με κάθε επιπλέον επίπεδο ανοσοσήμευσης, πράγμα που αποτελεί εμπόδιο αν ακριβής εντοπισμός των αντιγονικών επιτόπων είναι επιθυμητός.

Μη ειδική πρόσδεση

Εκτός από τις ιστο – ειδικές αλληλεπιδράσεις, ένα ή περισσότερα από τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία συχνά προσδένεται σε συστατικά του κυττάρου ή του ιστού με μη ειδικό τρόπο, όπως για παράδειγμα μέσω ηλεκτροστατικών ή υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων, ομοιοπολικών δεσμών με υπολείματα ενεργών αλδεϋδομάδων του μονιμοποιητή. Αυτό οδηγεί στη λεγόμενη background χρώση(χρώση του υποστρώματος/υποβάθρου ή του φόντου της εξεταζόμενης περιοχής) η οποία πρέπει να διαχωριστεί από την ειδική σήμανση. Η χρήση και εφαρμογή δοκιμών αρνητικού ελέγχου του πειράματος, είναι μια σημαντική μέθοδος αναγνώρισης της background χρώσης. Ένας άλλος τρόπος αναγνώρισης είναι η παρουσία σημαντή σε περιοχή όπου δεν υπάρχει ιστός ή σε ασυνέχειες του ιστού.

Δεν υπάρχει τρόπος να εξαλειφτεί τελείως η χρώση υποστρώματος, είναι όμως δυνατό να μειωθεί στο ελάχιστο δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στις λεπτομέρειες κατά την πειραματική διαδικασία. Εξάλλου, η παρουσία μη ειδικής πρόσδεσης δείχνει στην πράξη πως το δευτερογενές αντίσωμα έχει χορηγηθεί σωστά στις τομές. Είναι απαραίτητο πριν την προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος στις τομές, αυτό να υφίσταται φυγοκέντριση προκειμένου να καθιζάνουν τυχόν συσσωματώματα των μορίων του αντισώματος.

Μια αρχική επώαση των τομών σε διάλυμα μη αντιδρώσας πρωτεΐνης, όπως η BSA και επακόλουθη προσθήκη της πρωτεΐνης ως φορέα στο διαλύτη του αντιδραστηρίου μπορεί να μειώσει τη background χρώση δραστικά. Αυτή η πρακτική συχνά ονομάζεται αποκλεισμός με βάση το υψηλό μοριακό βάρος(high molecular weight blocking). Επίσης, μη ανοσοποιημένος ορός από το ίδιο είδος με αυτό από το οποίο προέρχεται το δευτερογενές αντίσωμα(επομένως είναι απίθανο να αντιδράσει μαζί του) είναι καλή επιλογή ως πρωτεΐνη φορέας. Τέλος, προσθήκη μικρής ποσότητας απορρυπαντικού στο διαλύτη, παραδείγματος χάριν 0,05% Tween – 20) μπορεί επίσης να βοηθήσει να μειωθεί η μη ειδική σήμανση.

Κολλοειδής χρυσός

Ο σημαντής που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο στη σύγχρονη ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία είναι ο κολλοειδής χρυσός¹⁰²⁻¹⁰⁷. Κάτω από τις σωστές συνθήκες τα άλατα χρυσού σχηματίζουν σταθερά σφαιρικά σωματίδια που μπορούν να καλυφθούν με μια ποικιλία πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων ανοσοσφαιρινών και προσδετών που συνδέονται σε ανοσοσφαιρίνες.

Τα σωματίδια του κολλοειδούς χρυσού μπορούν να παραχθούν σε ένα εύρος μεγεθών από λιγότερο του 1nm μέχρι και περίπου 250nm, αν και συχνότερα χρησιμοποιούνται σωματίδια της τάξης 5 – 20nm για την ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία. Σωματίδια διαφορετικών μεγεθών προσδεμένα σε διαφορετικό αντιδραστήριο(αντίσωμα) μπορούν να διακριθούν ως διαφορετικά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, επιτρέποντας έτσι την ταυτόχρονη χρώση για περισσότερα από ένα αντιγόνα που μας ενδιαφέρουν. Το μέγεθος των σωματιδίων του κολλοειδούς χρυσού μπορεί να καθοριστεί από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες το κολλοειδές παρασκευάζεται^{106, 107}. Αναγωγή χλωριούχου χρυσού με κίτρινο ή λευκό φώσφορο παράγει μικρά σωματίδια(περίπου 5nm), με ασκορβικό νάτριο παράγονται σωματίδια μεγέθους περίπου 12nm ενώ το κιτρικό νάτριο χρησιμοποιείται για να παράγει σωματίδια 16 – 150nm¹⁰⁶. Καθαρισμός των σωματιδίων χρυσού σε ένα μικρότερο εύρος μεγεθών μπορεί να επιτευχθεί με διαφορεική υπερφυγοκέντριση με διαβάθμιση συγκέντρωσης είτε σε γλυκερόλη είτε σε σουκρόζη¹⁰⁴.

Τα σωματίδια του κολλοειδούς χρυσού μπορούν να καλυφθούν με μια μεγάλη ποικιλία αντισωμάτων και πρωτεϊνών που προσδένουν αντισώματα, τα οποία προσροφώνται μη ομοιοπολικά στην επιφάνεια του σωματιδίου. Αυτή η επικάλυψη του σωματιδίου όχι μόνο προάγει την ειδική πρόσδεση των σωματιδίων στα αντιγόνα, αλλά και εμποδίζει τη σύντηξη

του ενός με το άλλο. Όλα τα σωματίδια θα φέρουν τυπικά στην επιφάνειά τους πολλαπλά μόρια ανοσοσφαιρίνης σε ποσότητα ανάλογη του εμβαδού της επιφάνειάς τους.

Σωματίδια χρυσού μικρότερα από 5nm σε διάμετρο μπορούν να κατασκευαστούν και έχουν το πλεονέκτημα της αυξημένης διεισδυτικότητας στο δείγμα. Τυπικά σωματίδια χρυσού μεγέθους 1 – 3nm σε διάμετρο ονομάζονται υπερμικρά σωματίδια χρυσού και παράγονται με τρόπο παρόμοιο με αυτόν για τα μεγαλύτερα σωματίδια¹⁰⁸. Μια δεύτερη οικογένεια σωματιδίων αποτελείται από έναν πυρήνα ατόμων χρυσού ενωμένων ομοιοπολικά σε ένα κάλυμμα οργανικών μορίων. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει το Nanogold: ένα σωματίδιο χρυσού διαμέτρου 1,4nm που περιέχει περίπου 67 άτομα χρυσού^{109, 110} και το undecagold: ένα σωματίδιο χρυσού που περιέχει 11 άτομα χρυσού^{110, 111}. Σε αντίθεση με τα τυπικά σωματίδια του κolloειδούς χρυσού, τα αντιδραστήρια συνδέονται με το nanogold και undecagold μέσω ομοιοπολικών δεσμών με οργανικούς συνδέτες στην επιφάνεια του σωματιδίου, με το πλεονέκτημα της σταθερότητας του σωματιδίου και το στοχευμένο προσανατολισμό του αντισώματος ώστε να είναι οι περιοχές πρόσδεσης εκτεθειμένες και προσβάσιμες.

Ερευνητικός στόχος

Έως τώρα πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με την ακριβή θέση των πρωτεϊνών στα διάφορα σημεία του σπειράματος του νεφρού των θηλαστικών. Οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί αλλά η τοπολογία τους εντός του σπειράματος παραμένει άγνωστη σε μικροσκοπικό επίπεδο. Πειράματα ανοσοφθορισμού, που περιλαμβάνουν την απεικόνιση σε οπτικό μικροσκόπιο, δείχνουν προσεγγιστικά που εντοπίζονται πολλές από τις πρωτεΐνες αυτές. Μόνο για την ποδοσίνη και τη νεφρίνη έχουν γίνει εκτεταμένες έρευνες και είναι πλέον γνωστή η θέση της εκατέρωθεν του λεπτού διαφράγματος.

Αποτέλεσμα του γεγονότος αυτού είναι πως η γνωστή θέση της ποδοσίνης θα βοηθήσει κατ' αρχήν να καθοριστεί ένα σύνολο από εξειδικευμένες τεχνικές έγκλεισης και ανοσοεντοπισμού αποκλειστικά και μόνο για ιστό από νεφρό θηλαστικών. Η τεχνικές αυτές θα είναι τέτοιες ώστε να συνδυάζουν καλή μορφολογική διατήρηση του ιστού, διατήρηση των αντιγονικών επιτόπων ώστε να προκύπτουν τα βέλτιστα αποτελέσματα.

Δευτερευόντως, αφού θα έχουν καθοριστεί αυτές οι σπάνια τεχνικές έγκλεισης και ανοσοεντοπισμού, θα είναι δυνατό να εφαρμοστούν σε πρωτεΐνες των οποίων η τοπολογία είναι άγνωστη. Στη συγκεκριμένη εργασία θα επικεντρωθούμε στο να εντοπίσουμε την ακριβή θέση της πρωτεΐνης Akt η οποία περιγράφηκε παραπάνω.

Υλικά και μέθοδοι

Υλικά και συσκευές

Στην παρούσα πτυχιακή χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

A. Χημικές ουσίες, διαλύματα, αντιδραστήρια, αντισώματα. Οι περισσότερες χημικές ουσίες είναι από τις εταιρίες Sigma – Aldrich, Tousimis, Scharlau, Agar Scientific, Polysciences, Fluka

- Απεσταγμένο νερό
- Νερό για HPLC(Chromasolv Plus)
- Αιθανόλη
- Ακετόνη
- Παραφορμαλδεΰδη
- Γλουταραλδεΰδη
- Τετροξείδιο του οσμίου
- Οξικό ουρανύλιο
- Εποξική ρητίνη
- Ρητίνη Lowicryl HM20
- Οξείδιο του προπυλενίου
- Διχλωροπροπυλένιο
- Formvar
- DPX mounting medium
- Μπλε του μεθυλενίου
- Διάλυμα κακοδυλικού νατρίου
- Δισόξινο φωσφορικό νάτριο
- Μονόξινο φωσφορικό νάτριο
- Υδροχλωρικό οξύ
- Goat serum 5% σε PBS
- Fab goat – anti – mouse 0,1mg/ml σε PBS
- Podocin Ab rabbit – anti – mouse
- Colloidal gold Ab goat – anti – rabbit 10nm (AURION, The Netherlands)
- Akt Ab rabbit – anti – mouse
- BSA
- Υγρό άζωτο

B. Υλικά

- Γυάλινα φιαλίδια(Glass vials, Agar Scientific Limited)
- Πιπέτες Pasteur
- Αναδευτήρες
- Eppendorf tubes(Micro tubes 1,5ml, 39x10mm, Sarstedt)
- Falcon tubes(Sarstedt)
- Γυάλινες φλάσκες(Immabor TGI, Germany)
- Ξύλινες σπάτουλες
- Cell culture plates(Disposables for cell culture, Nalge Nunc International, Denmark)
- Blue & yellow tips(Greiner Labortechnik)
- Διηθητικό χαρτί(Filter Paper 9.0cm Whatman)

- Φίλτρα διηθήσεως 0,2μm(Puradisc 25mm Whatman)
- Κέρινες πλάκες(Dental wax, Tousimis)
- Parafilm(American Can Company)
- Σύριγγες(5ml, BD Plastipak)
- Λαβίδες μη μαγνητικές(Dumont & Fils, Switzerland)
- Grids(Agar Scientific, G2300N, 300 Square Mesh, Nickel 3,05mm)
- Γυάλινα μαχαίρια μικροτόμου
- Αδαμάντινο μαχαίρι μικροτόμου Diatome Ultra 45°
- Beem capsules(Size 00, Agar Scientific)
- Gelatin capsules(Size 03, Agar Scientific)
- Gelatin capsules(Size 1, Leica Microsystems)
- Specimen processing capsules(Agar Scientific)
- Plastic capsules(D13xH18mm fine mesh base, Leica Microsystems)
- Plastic capsules(D5xH10mm, Leica Microsystems)
- Plastic beekers
- Plastic pipets(3ml, Leica Microsystems)
- Γάντια(Powderfree Gloves, Digitil N)
- Block matrix
- Αντικειμενοφόροι πλάκες(76x26mm, Labocon, Germany)
- Καλυπτρίδες(22x22mm, Ilmglas)
- Βλεφαρίδα

Γ. Συσκευές:

- Συσκευή κατασκευής γυάλινων μαχαριών LKB knifemaker 7800
- Οπτικό μικροσκόπιο Nikon eclipse E800
- Υπερμικροτόμος LKB 2088 Ultratome V
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης JEM – 100C, Jeol
- Πλάκα θέρμανσης LKB 2208 Multiplate
- Συσκευή έγκλεισης σε χαμηλή θερμοκρασία EMASF 1, Leica
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης JEM – 2100C, Jeol
- Κλίβανος υψηλής θερμοκρασίας L – C Oven, Lab – Line Instruments
- Λάμπα UV για πολυμερισμό, Leica Microsystems
- Πιπέτες Gilson(Gilson, France)
- Συσκευές ανάδευσης(shakers, mixers, Gallenkamp)
- Πεχάμετρο(sensION3, Hach)
- Ηλεκτρονικός ζυγός εργαστηρίου(FEJ – H, FWE)

Σειρές ποντικών

Για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες σειρές ποντικών: υγιή ποντίκια balb – c και ποντίκια NZBW – New Zealand Black & White πάσχοντα από συστηματικό ερυθματώδη λύκο. (υγιή ποντίκια balb-c και ποντίκια NZBW (New Zealand black&white) πάσχοντα από συστηματικό ερυθματώδη λύκο χωρίς θεραπεία, είτε μετά από θεραπεία με ραπαμυκίνη).

Πιο συγκεκριμένα, τα υγιή, ενήλικα balb – c ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν ως control για τα πειράματα. Τα δε NZBW διακρίθηκαν στις πιο κάτω κατηγορίες:

N19: είναι ενήλικα ποντίκια τα οποία πάσχουν από συστηματικό ερυθματώδη λύκο και παρουσιάζουν ήπια(μέτρια) μεσαγγειακή υπερτροφία, τμηματική σκλήρυνση, διάταση σωληναρίων και διάμεση φλεγμονή. Δεν έχουν λάβει θεραπευτική αγωγή.

N21: όπως και τα προηγούμενα, πάσχουν από συστηματικό ερυθματώδη λύκο και παρουσιάζουν σπειραματοσκλήρυνση, ατροφία καθώς και διάμεση φλεγμονή. Ούτε αυτά τα ποντίκια έχουν λάβει θεραπεία.

N28: ποντίκια πάσχοντα από συστηματικό ερυθματώδη λύκο αλλά έχουν λάβει θεραπεία με ραπαμυκίνη.

1. Έγκλειση ιστού ποντικού για παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με εποξική ρητίνη Durcupan ACMm Fluca(κλασσική έγκλειση)

Διαλύματα:

- Μονιμοποιητής 2% PFA, 2% GDA σε 0,1M PBS με pH=7,4
- PBS
- Τετροξείδιο του οσμίου σε PBS 1%
- Αιθανόλη 30%, 50%, 70%, 80%, 90% και 100%
- Ξηρή αιθανόλη
- Propylene oxide
- Διάλυμα 3/4 propylene oxide και 1/4 ρητίνης
- Διάλυμα 1/2 propylene oxide και 1/2 ρητίνης
- Διάλυμα 1/4 propylene oxide και 3/4 ρητίνης
- Ρητίνη 100%

1.1 Παρασκευή εποξικής ρητίνης

Για την παρασκευή της εποξικής ρητίνης χρησιμοποιούνται τέσσερα συστατικά σε συγκεκριμένες αναλογίες προκειμένου να παρασκευαστεί η ελάχιστη ποσότητα, όπως φαίνεται ακολούθως.

10gr από το μονό συστατικό A(single component A, M epoxy resin)

10gr από το μονό συστατικό B(single component B)

0,3gr από το μονό συστατικό C(single component C)

0,3gr από το μονό συστατικό D(single component S, plasticizer)

Επιπλέον ποσότητα μπορεί να παρασκευαστεί με το ίδιο πολλαπλάσιο της ποσότητας του κάθε επιμέρους συστατικού.

Σε ένα πλαστικό δοχείο, εντός απαγωγού, με τη βοήθεια ζυγαριάς ακριβείας, προστίθενται με τη σειρά τα συστατικά A και B. Το μείγμα αναδεύεται καλά με ξύλινη σπάτουλα, όσο το δυνατόν πιο ήπια, για να μη δημιουργούνται φυσαλίδες αέρα. Στη συνέχεια προστίθενται στο μείγμα τα συστατικά C και D και γίνεται και πάλι ανάδευση ήπια, όπως προηγουμένως. Με την ανάδευση το μείγμα θα αποκτήσει ένα πορτοκαλί χρώμα. Από το σημείο αυτό και έπειτα η ανάδευση με τη σπάτουλα γίνεται πιο έντονη έως ότου το μείγμα να αποκτήσει υφή γαλακτώματος. Στο τέλος, σκεπάζουμε το δοχείο της έτοιμης, πλέον, ρητίνης με αλουμινόχαρτο και το αφήνουμε ώστε να φύγουν οι φυσαλίδες αέρα που έχουν παγιδευτεί.

1.2 Μέθοδος

Η μέθοδος της έγκλεισης που ακολουθεί, είναι μια πολύ συνηθισμένη μορφή έγκλεισης, εξ' ου και κλασσική έγκλειση, η οποία χρησιμοποιείται σε μια ευρεία ποικιλία ιστών, τόσο ζωικών όσο και φυτικών με τη διαφορά ότι ανάλογα με το είδος επιτυγχάνεται διαφορετικό αποτέλεσμα τόσο στη μονιμοποίηση όσο και στην αντικατάσταση. Να σημειωθεί στο σημείο αυτό πως εφεξής ο όρος έγκλειση θα χρησιμοποιείται άτυπα ώστε να περιγράψει συνολικά τη διαδικασία μονιμοποίησης και αντικατάστασης που υφίσταται ένας ιστός.

Αφού πάρουμε το τμήμα ιστού που μας ενδιαφέρει από την πηγή, εν προκειμένω τμήματα νεφρού από ποντίκια, αυτός κόβεται σε μικρά τεμάχια και τοποθετείται σε διάλυμα μονιμοποιητή για χρονικό διάστημα 1 – 2 ωρών, ανάλογα με το αν τα ιστοτεμάχια είναι σε μέγεθος που επιτρέπει γρήγορη διείδυση του μονιμοποιητή ή πιο βραδεία. Μετά τη μονιμοποίηση, αφαιρείται το διάλυμα του μονιμοποιητή και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να εκπλυθούν τα ιστοτεμάχια από περίσσεια ποσότητας μονιμοποιητή. Η έκπλυση επαναλαμβάνεται δυο φορές σε θερμοκρασία 4°C από μισή ώρα η κάθε μία.

Μετά το buffer έκπλυσης σειρά έχει η χρήση διαλύματος τετροξειδίου του οσμίου. Το τετροξείδιο του οσμίου αποτελεί χρωστική ειδική για την ηλεκτρονική μικροσκοπία καθώς αντιδρά με τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών τα οποία διασυνδέονται δημιουργώντας αλυσίδες οσμικού οξέος. Αφού αφαιρεθεί το διάλυμα έκπλυσης, τοποθετείται διάλυμα τετροξειδίου του οσμίου στο οποίο ο ιστός παραμένει για περίπου 2 ώρες στους 4°C. Μετά τη χρώση οσμίου, γίνεται έκπλυση των ιστών 2 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PBS στους 4°C, από 20 λεπτά έκαστη.

Στο στάδιο της αφυδάτωσης που ακολουθεί, όπως έχει ήδη γίνει γνωστό, θα αντικατασταθεί η υδατική φάση από οργανική. Για το σκοπό αυτό τα ιστοτεμάχια εμβαπτίζονται σε διαδοχικά διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης ώστε η αντικατάσταση να γίνεται ήπια και σταδιακά. Πρώτα χρησιμοποιείται διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 30% και στη συνέχεια 50%. Στο επόμενο στάδιο χρησιμοποιείται διάλυμα 70% αιθανόλης και 7% οξικού ουρανυλίου. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται άυξηση της αντίθεσης κατά την παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Συνεχίζεται η διαδικασία της αφυδάτωσης με τους ιστούς να εμβαπτίζονται διαδοχικά σε διάλυμα αιθανόλης 70%, 80%, 90% και 100%. Το κάθε στάδιο διεξάγεται σε θερμοκρασία 4°C εκτός από το τελευταίο(100%) που γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και για χρονική διάρκεια 20 λεπτών. Εν συνεχεία οι ιστοί τοποθετούνται σε διάλυμα ξηρής αιθανόλης για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να μειωθούν στο ελάχιστο τυχόν υπόλοιπα νερού, στάδιο το οποίο επαναλαμβάνεται αυτούσιο μια ακόμα φορά.

Τα δείγματα πλέον είναι ελεύθερα υδατικής φάσης, επομένως είναι συμβατά με τη φύση της ρητίνης, στην οποία θα εγκλειστούν. Αρχικά πραγματοποιούνται δυο εκπλύσεις με οξείδιο του προπυλενίου για μισή ώρα έκαστη σε θερμοκρασία δωματίου και, ύστερα οι ιστοί τοποθετούνται διαδοχικά σε αυξανόμενη συγκέντρωση ρητίνης. Πρώτα τοποθετούνται σε διάλυμα που περιέχει 3 μέρη οξειδίου του προπυλενίου και 1 μέρος ρητίνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, έπειτα υπό τις ίδιες συνθήκες σε ένα δεύτερο διάλυμα που περιέχει 1 μέρος ρητίνης και 1 μέρος οξειδίου του προπυλενίου και τέλος σε ένα τρίτο διάλυμα που περιέχει 1 μέρος οξειδίου του προπυλενίου και 3 μέρη ρητίνης.

Μετά το στάδιο αυτό, που αποκαλείται στάδιο εμποτισμού(infiltration) οι ιστοί τοποθετούνται σε διάλυμα καθαρής ρητίνης σε θερμοκρασία δωματίου για ένα βράδυ σε συνεχή, ήπια ανάδευση.

Τέλος, τα δείγματα μεταφέρονται σε beem κάψουλες ή σε μια φόρμα(block matrix) και τοποθετούνται σε κλίβανο στους 50°C για τουλάχιστον 24 ώρες ώστε να πολυμεριστεί η ρητίνη και κάθε ιστοτεμάχιο να βρίσκεται στην άκρη ενός συμπαγούς block.

Τα έτοιμα block φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου, σε μέρος σκιερό χωρίς υγρασία.

2. Έγκλειση ιστού ποντικού για παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με ρητίνη Lowicryl HM20 σε χαμηλή θερμοκρασία με τη βοήθεια συσκευής AFS

Διαλύματα

- Μονιμοποιητής: 2% PFA, 0,5% GDA σε 0,1M PBS με pH=7,4
- 0,1M PBS με pH=7,4

- Αιθανόλη 30%, 50%, 70%, 100%
- Ξηρή αιθανόλη
- Διάλυμα 1/4 ρητίνης και 3/4 αιθανόλης
- Διάλυμα 1/2 ρητίνης και 1/2 αιθανόλης
- Διάλυμα 3/4 ρητίνης και 1/4 αιθανόλης
- Ρητίνη 100%

2.1 Παρασκευή ρητίνης Lowicryl

Η ρητίνη Lowicryl HM20 για να παρασκευαστεί χρειάζεται να συνδυαστούν τρία επιμέρους συστατικά στις ελάχιστες ποσότητες που αναφέρονται κάτωθι:

2,98gr από το συστατικό D(Crosslinker D)

17,02gr από το συστατικό E(Monomer E)

0,10gr από το συστατικό C(Initiator C)

Σε ένα πλαστικό δοχείο, εντός απαγωγού, με τη βοήθεια ζυγαριάς ακριβείας μετρώνται οι ποσότητες. Πρώτα προστίθεται στο δοχείο το συστατικό D με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur και στη συνέχεια το E. Το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται ήπια με ξύλινη σπάτουλα ή γυάλινη ράβδο μέχρι να προκύψει ένα διάλυμα ομοιόμορφο σε όλη του την έκταση, διαυγές και με χαμηλό ιξώδες, σχεδόν σαν νερό. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται ώστε κατά την ανάδευση να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες. Μετά από μερικά δευτερόλεπτα ανάδευσης, το δοχείο καλύπτεται με parafilm. Μετράται στη ζυγαριά η επιθυμητή ποσότητα του συστατικού C, και προστίθεται και αυτό στο διάλυμα των D και E. Γίνεται και πάλι ανάδευση όπως προηγουμένως έως ότου διαλυθεί πλήρως η σκόνη που προστέθηκε. Αφού η ρητίνη πλέον είναι έτοιμη, το περιέχον δοχείο σφραγίζεται καλά με parafilm και καπάκι και φυλάσσεται στο ψυγείο στους 4°C.

2.2 Μέθοδος

Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτού του τύπου της έγκλεισης είναι πως γίνεται εξ' ολοκλήρου σε θερμοκρασία κάτω της φυσιολογικής, με εξαίρεση τη μονιμοποίηση των ιστοτεμαχίων. Για το λόγο αυτό απαιτούνται ιδιαίτερες τεχνικές χειρισμού καθώς και η χρήση μιας συσκευής η αναλυτική χρήση της οποίας θα περιγραφεί παρακάτω.

Αφού γίνει η νεφρεκτομή, με τη βοήθεια νυστεριού κόβονται από την επιθυμητή περιοχή όσα ιστοτεμάχια μας ενδιαφέρουν σε μέγεθος που σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να ξεπερνούν το 1 κυβικό χιλιοστό. Τα ιστοτεμάχια τοποθετούνται σε διάλυμα μονιμοποιητή για 1 ώρα και στη συνέχεια εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα για 10 λεπτά. Ύστερα αφήνονται όλο το βράδυ σε buffer έκπλυσης. Οι τρεις αυτές διεργασίες γίνονται σε θερμοκρασία 4°C.

Στη συνέχεια ξεκινά το στάδιο της αφυδάτωσης με πρώτο βήμα την επώαση των ιστοτεμαχίων σε διαλύματα αιθανόλης. Πρώτα σε διάλυμα αιθανόλης 30% στους 0°C για 30 λεπτά, ύστερα σε διάλυμα αιθανόλης 50% στους -10°C για 30 λεπτά, σε διάλυμα αιθανόλης 70% στους -25°C για 30 λεπτά και τέλος ακολουθούν δύο διαδοχικές επώσεις σε αιθανόλη 100% για 30 λεπτά έκαστη, η πρώτη στους -40°C και η δεύτερη στους -50°C.

Στη φάση αυτή οι ιστοί είναι έτοιμοι, ελεύθεροι πλέον νερού, να έρθουν σε επαφή με τη ρητίνη. Το κάθε τεμάχιο ιστού τοποθετείται διαδοχικά σε διάλυμα αιθανόλης – ρητίνης για 1 ώρα στους -50°C. Πρώτα σε διάλυμα που περιέχει 1/4 ρητίνης και 3/4 αιθανόλης, ύστερα σε διάλυμα που περιέχει 1/2 ρητίνης και 1/2 αιθανόλης και τέλος σε διάλυμα που περιέχει 3/4 ρητίνης και 1/4 αιθανόλης. Ακολουθεί ένα στάδιο όπου οι ιστοί βρίσκονται σε καθαρή ρητίνη για 1 ώρα και τέλος τοποθετούνται σε νέα ρητίνη για ένα βράδυ ώστε να εμποτιστούν καλά. Τα δύο τελευταία βήματα, όπως και τα προηγούμενα της αφυδάτωσης διεξάγονται σε θερμοκρασία -50°C.

Την επόμενη μέρα, τα δείγματα υφίστανται ακόμα μια αλλαγή της καθαρής ρητίνης στην οποία επωάζονται για 1 ώρα, έπειτα τοποθετούνται στις κατάλληλα κατασκευασμένες κάψουλες ώστε να προκύψουν τα blocks για κοπή λεπτών τομών.

Οι κάψουλες αυτές, καθεμία με ένα ιστοτεμάχιο, τοποθετούνται όρθιες σε δοχείο με ξηρή αιθανόλη. Ολόκληρη η διάταξη τοποθετείται κάτω από λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και με αυτό τον τρόπο γίνεται ο πολυμερισμός της ρητίνης ο οποίος λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια: το πρώτο γίνεται στους -50°C για 48 ώρες και το δεύτερο στους 0°C για 24 ώρες.

Τα blocks πλέον είναι έτοιμα για κοπή σε μικροτόμο και φυλάσσονται μακριά από την υγρασία και την άμεση ηλιακή ακτινοβολία.

2.3 Περιγραφή της συσκευής AFS και ανάλυση της μεθόδου

Η συσκευή LEICA EMAFS1 είναι ένα μηχάνημα που βοηθάει σε μεθόδους έγκλεισης που απαιτούν συνθήκες πολύ χαμηλής θερμοκρασίας (κάτω των 0°C). Όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί, το AFS είναι μια διάταξη που περιλαμβάνει ένα δοχείο υγρού αζώτου, απαραίτητο για την επίτευξη των χαμηλών θερμοκρασιών και από έναν πάγκο εργασίας στο κέντρο του οποίου βρίσκεται ο ψυχρός θάλαμος, μέσα στον οποίο γίνονται όλοι οι χειρισμοί καθώς και οι επωάσεις των ιστών στα εκάστοτε χημικά που



χρησιμοποιούνται. Ο έλεγχος της συσκευής γίνεται από τον πίνακα ελέγχου, στα δεξιά του πάγκου εργασίας, απ' όπου ρυθμίζονται όλες οι συνθήκες για την διαδικασία.

Η μέθοδος που θα περιγραφεί είναι η λεγόμενη PLT (Progressive Lowering of Temperature) στην οποία γίνεται σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας έγκλεισης σε κάθε ένα στάδιο της όλης διαδικασίας.

Πριν γίνει αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας, σκόπιμο είναι να γίνει αναφορά στον επιμέρους εξοπλισμό που θα χρησιμοποιηθεί ώστε να είναι εκ των προτέρων γνωστή η χρήση των επιπλέον εξαρτημάτων και αναλώσιμων.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο πάγκος εργασίας διαθέτει στο κέντρο του τον ψυχρό θάλαμο. Μέσα στον ψυχρό θάλαμο τοποθετούνται οι ιστοί καθώς και τα υγρά στα οποία πρέπει να εμβαπτιστούν τα ιστοτεμάχια σε κάθε στάδιο της αντικατάστασης. Κάθε διαφορετικό χημικό που χρησιμοποιείται, τοποθετείται μέσα σε ένα λείο μεταλλικό δοχείο, το λείο beeker. Μέσα στο λείο beeker τοποθετούνται οι ιστοί μέσα σε ειδικά «καλαθάκια», δηλαδή κάψουλες με διάτρητο πυθμένα ώστε να υπάρχει συνεχής ροή διαλύματος αντικατάστασης μεταξύ του λείου beeker και της κάψουλας με τον ιστό. Μέσα σε κάθε λείο beeker τοποθετούνται μέχρι 3 καλαθάκια, με διαφορετικό είδος ιστού το καθένα, ενώ μέσα σε κάθε καλαθάκι τοποθετούνται όσα ιστοτεμάχια θέλουμε (πρακτικά ο αριθμός των ιστοτεμαχίων είναι πεπερασμένος, αφού αν υπάρχουν υπερβολικά τεμάχια ιστού μέσα στο καλαθάκι, δε θα γίνεται ανταλλαγή του διαλύματος εντός και εκτός του καλαθιού. Επίσης μέσα στον ψυχρό θάλαμο, έχουμε πάντα διηθητικό χαρτί η χρήση του οποίου θα φανεί στη συνέχεια, κατά την περιγραφή της μεθόδου.

Μια σημαντική παράμετρος στο AFS είναι η χρήση του κατάλληλου temperature range tube, το οποίο είναι ένα σωληνάριο που καθορίζει την παροχή αζώτου ανάλογα με την ελάχιστη θερμοκρασία που πρέπει να επιτευχθεί σε κάθε στάδιο, ώστε να ελαχιστοποιείται η κατανάλωση του αζώτου εντός του δοχείου (dewar). Ουσιαστικά, ακόμα κι αν δεν τοποθετηθεί κανένα tube θερμοκρασίας στην οπή παροχής αζώτου, η θερμοκρασία εντός του ψυχρού θαλάμου θα είναι η επιθυμητή κάθε φορά, απλώς η κατανάλωση αζώτου θα είναι πολύ μεγαλύτερη.

Άλλα εξαρτήματα που θα χρησιμοποιηθούν κατά τη διάρκεια της αντικατάστασης είναι δύο ειδών mat beeker, στο ένα εκ των οποίων τοποθετούνται ζελατινικές κάψουλες και στο άλλο πλαστικές κάψουλες που ουσιαστικά αποτελούν και το καλούπι για τη δημιουργία των blocks. Επίσης θα χρησιμοποιηθεί ένα ακτινωτό εξάρτημα που εφαρμόζει σε πλαστικές κάψουλες ώστε να μπορεί ο χρήστης να τις ανασύρει από το διάλυμα της ρητίνης καθώς και ένας άξονας με βάση που τοποθετείται σε λείο beeker και χρησιμοποιείται κατά τον πολυμερισμό.

Στο σημείο αυτό σκόπιμο είναι να αναφερθεί πως το AFS υποστηρίζει προγραμματισμό και δυνατότητα μνήμης, ώστε κάθε στάδιο της αντικατάστασης να είναι ένα ξεχωριστό πρόγραμμα και να μη χρειάζεται εκ νέου ρύθμιση των συνθηκών σε κάθε κύκλο έγκλεισης. Ο προγραμματισμός και οι ρύθμιση του μηχανήματος, όμως, δε θα περιγραφεί στην παρούσα εργασία.

Όλη η διαδικασία ξεκινάει από το στάδιο της αφυδάτωσης. Η μονιμοποίηση των δειγμάτων έχει ήδη γίνει καθώς και τα απαραίτητα ξεπλύματα και τα ιστοτεμάχια βρίσκονται πλέον σε ρυθμιστικό διάλυμα για συντήρηση. Σε ένα καθαρό λείο beeker προστίθεται ποσότητα αιθανόλης 30% και σε ένα άλλο λείο beeker τοποθετείται ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και κάψουλες με διάτρητο πυθμένα (εφεξής καλαθάκια) καθένα από τα οποία φέρει ετικέτα με το κωδικό όνομα του είδους του ιστού γραμμένο με μολύβι. Η ποσότητα του κάθε διαλύματος μέσα σε κάθε beeker είναι περίπου 5 έως και το πολύ 10ml. Στο λείο beeker με τα καλαθάκια τοποθετούνται προσεκτικά με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας ή σπάτουλας ένα – ένα τα ιστοτεμάχια σε κάθε αντίστοιχο καλαθάκι. Τα beekers τοποθετούνται στον ψυχρό θάλαμο, μαζί με διηθητικό χαρτί, ενώ επιλέγεται και το κατάλληλο tube θερμοκρασιακού εύρους και τοποθετείται στον αγωγό παροχής αζώτου. Στο σημείο αυτό ρυθμίζεται και ο διακόπτης TF ο οποίος καθορίζει την ποσότητα ατμών αζώτου που δημιουργούνται στο θάλαμο όσο αυτός παραμένει ανοιχτός, προκειμένου η θερμοκρασία του να παραμένει σταθερή ακόμα κι όταν υπάρχει ανταλλαγή θερμότητας με το περιβάλλον.

Ο θάλαμος κλείνει και στη συνέχεια επιλέγεται από τον πίνακα ελέγχου το επιθυμητό πρόγραμμα. Αρχικά θα γίνει αφυδάτωση, επομένως επιλέγεται το αντίστοιχο πρόγραμμα, στη συνέχεια επιλέγεται εκκίνηση του προγράμματος και αμέσως μετά παύση. Αυτό γίνεται διότι θα πρέπει ο ψυχρός θάλαμος να αποκτήσει σταδιακά τη θερμοκρασία των 0°C ώστε και τα ιστοτεμάχια να μην υποστούν θερμοκρασιακό σοκ με το να εκτεθούν σε τόσο μεγάλη διαφορά θερμοκρασίας σε μικρό χρονικό διάστημα. Εκκινώντας το πρόγραμμα η θερμοκρασία πέφτει σταδιακά, αλλά η παύση του προγράμματος εμποδίζει το χρόνο να «τρέχει».

Εφόσον επιτευχθεί η επιθυμητή θερμοκρασία των 0°C, γίνεται μεταφορά των δειγμάτων από το beaker με το ρυθμιστικό διάλυμα, στο άλλο beaker με το διάλυμα αιθανόλης 30%. Το κάθε καλάθι μεταφέρεται από το ένα beaker στο άλλο αφού πρώτα αποστραγγιστεί η περίσσεια διαλύματος έκπλυσης και αφού στη συνέχεια απορροφηθεί το υπόλειμμα διαλύματος από το διηθητικό χαρτί που βρίσκεται στο θάλαμο. Εφόσον γίνει η μεταφορά όλων των καλαθιών με τα ιστοτεμάχια, γίνεται συνέχιση του προγράμματος από την κατάσταση παύσης στην οποία βρισκόταν και με αυτό τον τρόπο ξεκινάει το στάδιο της αφυδάτωσης.

Το στάδιο της 30% αιθανόλης διαρκεί 30 λεπτά. Όταν αυτός ο χρόνος παρέλθει, η συσκευή, ούσα προγραμματισμένη, θα αρχίσει από μόνη της να μειώνει τη θερμοκρασία στο επίπεδο του επόμενου σταδίου, δηλαδή στους -10°C. Στο σημείο αυτό, σε ένα άλλο λείο beaker προστίθεται διάλυμα αιθανόλης 50% και τοποθετείται εντός του θαλάμου για να κρυώσει. Λόγω διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ του νέου λείου beaker που προστέθηκε στο θάλαμο και του θαλάμου, η θερμοκρασία θα σταματήσει να μειώνεται για κάποιο διάστημα. Όταν αρχίσει να μειώνεται ξανά σημαίνει ότι έχει πάρει τη θερμοκρασία του ψυχρού θαλάμου και επομένως μπορεί να γίνει η μεταφορά των δειγμάτων στο νέο διάλυμα αιθανόλης υψηλότερης συγκέντρωσης. Με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως, το κάθε καλάθι στραγγίζεται από το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται και αφήνεται πάνω σε διηθητικό χαρτί ώστε να φύγουν υπολείμματα διαλύματος, χωρίς βέβαια να στεγνώσουν. Το beaker με την 30% αιθανόλη αφαιρείται από το θάλαμο και πλένεται, ενώ εντός του θαλάμου προστίθεται διηθητικό χαρτί για επόμενη χρήση αν αυτό είναι απαραίτητο. Να σημειωθεί ότι υπάρχει η περίπτωση ο χρήστης να μην προλάβει να κάνει τις αλλαγές από το ένα διάλυμα στο άλλο στο χρόνο που του δίνει το μεσοδιάστημα μεταξύ των δύο σταδίων επώασης σε αιθανόλη. Στην περίπτωση αυτή ο χρήστης κάνει παύση του προγράμματος μέχρι να ολοκληρώσει την εργασία του, διαφορετικά το μηχάνημα θα προχωρήσει στο να «τρέξει» το χρόνο του επόμενου σταδίου αφυδάτωσης. Μετά το πέρας των αλλαγών, γίνεται συνέχιση του προγράμματος όπως προηγουμένως ώστε να επωαστούν οι ιστοί στο νέο διάλυμα.

Μισή ώρα μετά, το δεύτερο στάδιο της αφυδάτωσης έχει ολοκληρωθεί, επομένως με την ίδια διαδικασία που έχει περιγραφεί γίνεται μεταφορά των ιστών σε διάλυμα αιθανόλης 70% στην οποία τα δείγματα θα επωαστούν και πάλι για μισή ώρα στους -25°C.

Μετά το πέρας και του τρίτου σταδίου αφυδάτωσης η μείωση της θερμοκρασίας θα είναι περισσότερο δραστική, επομένως πρέπει να γίνει αλλαγή του σωληναρίου θερμοκρασιακού εύρους. Αφαιρείται το πρώτο από τον αγωγό αζώτου προσεκτικά επειδή λόγω χαμηλής θερμοκρασίας οι τριβές είναι μεγαλύτερες και υπάρχει κίνδυνος να ανασηκωθεί ολόκληρος ο θάλαμος από τη θέση του, γι' αυτό καλό είναι να εφαρμόζεται μια αντίθετης φοράς δύναμη, προς τα κάτω. Τοποθετείται το άλλο σωληνάριο θερμοκρασιών με προσοχή ώστε σταδιακά να συστέλλεται και να εισάγεται ομαλά στον αγωγό, τοποθετείται ένα νέο beaker με αιθανόλη 100%, γίνεται η μεταφορά των δειγμάτων και στη συνέχεια εκκινείται το πρόγραμμα. Σε αυτό το στάδιο είναι ιδιαίτερα σημαντικό πρώτα να γίνει η μεταφορά των δειγμάτων στο πυκνότερο διάλυμα και μετά να μειωθεί η θερμοκρασία αλλιώς αν τα δείγματα παραμείνουν στο αραιότερο, η δραστική μείωση

στους -40°C μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία κρυστάλλων από μόρια νερού που πιθανώς δεν αντικαταστάθηκαν ακόμα από οργανική φάση. Το στάδιο αυτό διαρκεί, όπως και τα προηγούμενα, 30 λεπτά.

Το τελευταίο στάδιο της αφυδάτωσης περιλαμβάνει την επώαση των δειγμάτων ξανά σε 100% αιθανόλη για μισή ώρα, στους -50°C αυτή τη φορά. Όπως έχει περιγραφεί, τα ιστοτεμάχια μεταφέρονται σε νέο διάλυμα απόλυτης αιθανόλης και «τρέχει», κατ' αυτό τον τρόπο, το τελευταίο στάδιο αφυδάτωσης. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι μεταξύ των δύο τελευταίων σταδίων δεν υπάρχει διαφορά θερμοκρασίας, πράγμα που σημαίνει ότι δε θα υπάρχει διαθέσιμος χρόνος μεταξύ των δύο σταδίων ώστε να γίνει η αλλαγή στα δείγματα. Κατά συνέπεια, θα πρέπει ο χρήστης να κάνει παύση του τελευταίου σταδίου και να κάνει τη μεταφορά των δειγμάτων προτού συνεχίσει το πρόγραμμα.

Στο σημείο αυτό, τα δείγματα έχουν ολοκληρώσει το στάδιο της αφυδάτωσης και σειρά έχει το στάδιο εμποτισμού στη ρητίνη. Επιλέγεται το αντίστοιχο πρόγραμμα και γίνεται παύση αυτού, ώστε να διατηρείται η θερμοκρασία του σταθερή στους -50°C . Στον ψυχρό θάλαμο τοποθετείται ένα νέο λείο beaker με την πρώτη αραιώση ρητίνης (1 μέρος ρητίνης και 3 μέρη αιθανόλης) και αφήνεται να κρυώσει. Ο χρήστης θα παρατηρήσει πως με την προσθήκη του νέου λείου beaker θα αυξηθεί η θερμοκρασία του θαλάμου κατά μερικούς βαθμούς C. Όταν η θερμοκρασία στο θάλαμο φτάσει πάλι τα κανονικά, για το στάδιο, επίπεδα, σημαίνει πως το προστεθέν αντικείμενο έχει φτάσει τη θερμοκρασία του θαλάμου. Τα δείγματα μεταφέρονται στην αραιώση της ρητίνης και γίνεται συνέχιση του προγράμματος το οποίο διαρκεί 1 ώρα. Στη συνέχεια μεταφέρονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που έχει περιγραφεί στη δεύτερη αραιώση ρητίνης (1 μέρος ρητίνης και 1 μέρος αιθανόλης), στάδιο το οποίο διαρκεί για 1 ώρα, επίσης, στους -50°C , η διαδικασία επαναλαμβάνεται ομοίως για την τρίτη αραιώση ρητίνης (3 μέρη ρητίνης και 1 μέρος αιθανόλης), ξανά για 1 ώρα στους -50°C . Στη συνέχεια σειρά έχει η επώαση των δειγμάτων σε καθαρή ρητίνη η οποία γίνεται σε 3 στάδια, στους -50°C για 1 ώρα, ολόκληρο το βράδυ και για 1 ώρα (την επόμενη μέρα), αντίστοιχα. Οι αλλαγές γίνονται με τον ίδιο τρόπο που έχει περιγραφεί επανειλημμένα.

Αφού τα δείγματα έχουν εμποτιστεί με καθαρή ρητίνη, είναι πλέον έτοιμα να τοποθετηθούν σε κάψουλες για τη δημιουργία των blocks. Η συσκευή προγραμματίζεται στο πρόγραμμα του πολυμερισμού ώστε η θερμοκρασία να μένει σταθερή στους -50°C . Στον ψυχρό θάλαμο τοποθετείται ένα λείο beaker με καθαρή ρητίνη η οποία θα χρησιμοποιηθεί ως stock διάλυμα. Τοποθετούνται, επίσης, ένα ματ beaker με ζελατινικές κάψουλες και ένα ματ beaker με κεντρικό στέλεχος. Στο δεύτερο αυτό beaker τοποθετούνται πλαστικές κάψουλες καθώς και ποσότητα ρητίνης. Αφού η θερμοκρασία τους πέσει στους -50°C , μεταφέρεται με προσοχή κάθε ιστοτεμάχιο σε μια πλαστική κάψουλα εντός του ματ beaker με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας. Στο σημείο αυτό απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή το άκρο της πιπέτας να μην απομακρύνεται από το μικροπεριβάλλον του θαλάμου γιατί δημιουργείται πάγος στα τοιχώματά της. Μετά την προσθήκη του ιστοτεμαχίου, καλό είναι να τοποθετείται και ένα κομμάτι χαρτί με την κωδική ονομασία του ιστού, γραμμένη με μολύβι, ώστε να είναι εύκολα αναγνωρίσιμος. Αφού και οι 8 πλαστικές κάψουλες έχουν καταληφθεί από ένα ιστοτεμάχιο η καθεμία, στη συνέχεια το ακτινωτό εξάρτημα εφαρμόζεται πάνω από κάθε κάψουλα και έτσι μεταφέρονται όλες στο beaker με τις ζελατινικές κάψουλες κατά τρόπο τέτοιο ώστε κάθε μια πλαστική κάψουλα να εισαχθεί σε μια ζελατινική ώστε να μην υπάρχει διαφυγή ρητίνης. Στη συνέχεια, αφαιρούνται από το θάλαμο όλα τα περιττά αντικείμενα, τοποθετείται ένα λείο beaker με κάθετο άξονα το οποίο έχουμε γεμίσει με ξηρή αιθανόλη και πάνω στον κάθετο άξονα στερεώνουμε το ακτινωτό εξάρτημα το οποίο τώρα φέρει στην κάτω πλευρά του τις κάψουλες με τα ιστοτεμάχια. Η ξηρή αιθανόλη χρησιμοποιείται για να δεσμεύει τυχόν υγρασία που μπορεί να υπάρχει στο θάλαμο αλλά και για τη δέσμευση

θερμότητας αφού ο πολυμερισμός είναι εξώθερμη αντίδραση. Τα blocks δεν κινδυνεύουν από την αιθανόλη γιατί είναι καλυμμένα από τις ζελατινικές κάψουλες. Σε αυτό το στάδιο έχει γίνει ήδη εκκίνηση του προγράμματος πολυμερισμού το οποίο βρίσκεται σε παύση, τοποθετείται πάνω από το θάλαμο ειδική λάμπα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας και με τη συνέχιση του προγράμματος η λάμπα ανάβει αυτόματα και πολυμερίζει την υγρή ρητίνη. Ο πολυμερισμός γίνεται σε δυο βήματα: Το πρώτο διεξάγεται στους -50°C για 48 ώρες και το δεύτερο στους 0°C για 24 ώρες. Μετά το στάδιο του πολυμερισμού, τα blocks είναι έτοιμα για κοπή σε μικροτόμο και περεταίρω διαδικασίες ανάλογα με τη φύση του πειράματος.

3. Έγκλειση ιστού ποντικού για παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με ρητίνη Lowicryl HM20 σε χαμηλή θερμοκρασία με τη βοήθεια συσκευής AFS(εναλλακτική εκδοχή της μεθόδου 2)

Η προκειμένη περίπτωση έγκλεισης, όπως αναφέρεται και στον τίτλο, είναι μια παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφηκε στο χωρίο 2. Όλες οι διαδικασίες αντικατάστασης είναι ίδιες, όμως η μονιμοποίηση έγινε με διαφορετικά μέσα. Ουσιαστικά χρησιμοποιήθηκαν τμήματα ιστού τα οποία μονιμοποιήθηκαν το καθένα με διαφορετικό είδος μονιμοποιητή και για διαφορετικούς χρόνους. Συγκεκριμένα, οι μονιμοποιητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μέθοδο είναι οι κάτωθι:

- PFA 4% σε PBS 0,1M με pH=7,4
- PFA 2% σε PBS 0,1M με pH=7,4
- PFA 1% σε PBS 0,1M με pH=7,4
- PFA 4% και GDA 0,25% σε PBS 0,1M με pH=7,4
- PFA 2% και GDA 0,25% σε PBS 0,1M με pH=7,4
- PFA 1% και GDA 0,25% σε PBS 0,1M με pH=7,4
- PFA 4% και GDA 0,1% σε PBS 0,1M με pH=7,4
- PFA 2% και GDA 0,1% σε PBS 0,1M με pH=7,4
- PFA 1% και GDA 0,1% σε PBS 0,1M με pH=7,4
- PFA 4% και GDA 0,05% σε PBS 0,1M με pH=7,4
- PFA 2% και GDA 0,05% σε PBS 0,1M με pH=7,4
- PFA 1% και GDA 0,05% σε PBS 0,1M με pH=7,4

Τα δείγματα χωρίστηκαν σε δυο ομάδες Α και Β και μονιμοποιήθηκαν για 1 ώρα και 2 ώρες αντίστοιχα.

Στη συνέχεια έγινε η έγκλειση με τη βοήθεια της συσκευής EMAFS με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που έχει περιγραφεί παραπάνω.

4. Κατασκευή πλεγμάτων(grids) με μεμβράνη formvar για παρατήρηση τομών σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

4.1 Γενικά

Ένα μειονέκτημα της ρητίνης Lowicryl, σε αντίθεση με τις εποξικές ρητίνες, είναι πως είναι πολύ ευαίσθητη στην υπέρθεση στην ηλεκτρονική δέσμη του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Συνέπεια της υπέρθεσης είναι η ρητίνη(και κατ' επέκταση ο ιστός) να καίγεται και συνεπώς η τομή να καταστρέφεται. Άμεση συνέπεια είναι ότι πρέπει να βρεθεί τρόπος ώστε οι τομές να μπορούν να ανθίστανται στην καταπόνηση από την ηλεκτρονική δέσμη. Ο τρόπος αυτός είναι η επένδυση της μιας πλευράς των grids με μεμβράνη formvar. Το formvar είναι ένα υλικό σε σκόνη, το οποίο διαλυόμενο σε 1,2-διχλωρο-αιθάνιο, δίνει ένα πολυμερές υλικό υπό τη μορφή λεπτής μεμβράνης κατά την επαφή του με το νερό.

4.2 Υλικά και διαλύματα

- Σκόνη Formvar
- 1,2-διχλωρο-αιθάνιο
- Απεσταγμένο νερό(nanopure)

4.3 Μέθοδος

Το formvar βρίσκεται σε μορφή σκόνης. Μετράται η επιθυμητή ποσότητα σκόνης formvar σε ζυγό εργαστηρίου και τοποθετείται σε γυάλινη φιάλη. Στη συνέχεια προστίθεται ο τελικός όγκος 1,2-διχλωρο-αιθανίου ανάλογα με την περιεκτικότητα σε formvar που είναι η επιθυμητή και τέλος γίνεται καλή ανάδευση ώστε να διαλυθεί πλήρως η σκόνη. Το παρασκεύασμα φυλάσσεται στους 4°C.

Στην παρούσα εργασία το διάλυμα formvar που χρησιμοποιήθηκε είναι περιεκτικότητας 0,7% w/v, η οποία δίνει μια μεμβράνη ικανοποιητικού πάχους για παρατήρηση.

Αρχικά, ένας ικανοποιητικός αριθμός από grids τοποθετείται σε ειδική μήτρα για grids, η οποία βρίσκεται στο κέντρο δοχείου με σιφώνιο και στρόφιγγα αποστράγγισης. Εντός του δοχείου υπάρχει απεσταγμένο νερό. Η μήτρα αυτή διαθέτει οπές διαμέτρου λίγο μικρότερης από τη διάμετρο ενός grid. Κάθε ένα grid τοποθετείται σε μια οπή. Εφόσον πάνω στη μήτρα υπάρχει ο επιθυμητός αριθμός από grids, αφήνεται η επιφάνεια του νερού να ηρεμήσει και στη συνέχεια, με τη βοήθεια μιας πιπέτας παστέρ, αφήνεται να πέσει μια σταγόνα από το διάλυμα formvar που προηγουμένως έχει παρασκευαστεί. Η άκρη της πιπέτας πρέπει να βρίσκεται σε απόσταση μερικών χιλιοστών από την επιφάνεια του νερού ώστε να μη δημιουργηθούν κύματα στην επιφάνεια από την πρόσκρουση της σταγόνας.

Μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα και από την κατάλληλη οπτική γωνία, φαίνεται η μεμβράνη που δημιουργήθηκε στην επιφάνεια του νερού, πάνω από τη μήτρα των grids. Με μια λαβίδα γίνεται έλεγχος αν η μεμβράνη είναι συνεχής σε όλη της την έκταση. Στο σημείο αυτό, ανοίγει η στρόφιγγα ώστε να φύγει σιγά – σιγά το νερό από το δοχείο. Έπειτα με τη βοήθεια λαβίδας ανασηκώνεται η μήτρα με τα grids προσεκτικά ώστε να μη φύγουν από τη θέση τους και τοποθετείται σε τριβλίο Petri στο οποίο προηγουμένως έχει τοποθετηθεί απορροφητικό χαρτί. Αφού τα grids στεγνώσουν καλά, αφήνονται πάνω στη μήτρα, μέσα στο τριβλίο καλυμμένα, ώστε να μη γεμίζουν με σκόνη και υγρασία.

5. Προετοιμασία των ιστών πριν την παρατήρηση: εστίαση στην επιθυμητή περιοχή, δημιουργία τομών

Αφού πλέον έχει ολοκληρωθεί η έγκλειση των ιστοτεμαχίων, τα οποία βρίσκονται τώρα ένα σε κάθε συμπαγές block, σειρά έχει η κοπή του κάθε block για τη δημιουργία τομών για παρατήρηση. Η πάγια τακτική που ακολουθείται και που ακολουθήθηκε και στην παρούσα εργασία είναι η εξής:

Αρχικά γίνεται κοπή του block κατά τέτοιο τρόπο ώστε ο ιστός να βρίσκεται στο άκρο ακριβώς του block ώστε όσες τομές κι αν προκύψουν να φέρουν και τμήμα ιστού. Ο ιστός κεντράρεται ώστε να διευκολύνει το χρήστη κατά την εργασία του. Αφού δοθεί στο άκρο του block που φέρει τον ιστό ένα συγκεκριμένο, διακριτό σχήμα – τραπέζιο συνήθως – λαμβάνονται μερικές τομές πάχους 1mm και τοποθετούνται σε μια σταγόνα ύδατος επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα η οποία αφήνεται επάνω σε θερμή πλάκα(hot plate). Όταν στεγνώσει το νερό, οι τομές βρίσκονται πάνω στην αντικειμενοφόρο σε πολύ κοντινή απόσταση η μια από την άλλη. Πάνω στις τομές προστίθεται μια σταγόνα χρωστικής methylene blue και αντικειμενοφόρος αφήνεται και πάλι να στεγνώσει. Αν το διάλυμα χρωστικής δεν είναι αραιωμένο, τότε απλώς προστίθεται μια σταγόνα χρωστικής και αφού περάσουν μερικά δευτερόλεπτα, ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό. Οι τομές πλέον είναι βαμμένες και παρατηρούνται εύκολα σε οπτικό μικροσκόπιο.

Κατά την παρατήρηση γίνεται προσπάθεια εντοπισμού της επιθυμητής περιοχής την οποία θέλουμε να μελετήσουμε. Στην παρούσα εργασία γίνεται μελέτη στα σπειράματα του νεφρού, επομένως το ενδιαφέρον εστιάζεται εκεί. Ο χρήστης του μικροσκοπίου σχεδιάζει την περιοχή που βλέπει καθώς και τις σχετικές θέσεις των σπειραμάτων. Στη συνέχεια γίνεται αντιστοίχιση του επί χάρτου σχεδίου και του σχήματος του block ώστε να εστιαστεί περισσότερο η περιοχή που περιέχει σπειράματα και να μειωθεί ταυτόχρονα και το εμβαδόν των τομών που θα προκύψουν για την παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Αφού γίνει η απαραίτητη εστίαση στο block, αρχίζει η διαδικασία του sectioning δηλαδή της κοπής υπερλεπτών τομών πάχους περίπου 40 – 50nm, οι οποίες συλλέγονται στην επιφάνεια του grid. Αν το grid είναι επικαλυμμένο με μεμβράνη formvar, οι τομές θα πρέπει να βρίσκονται στην πλευρά της μεμβράνης ώστε να σταθεροποιούνται απ' αυτή κατά την έκθεσή τους στην ηλεκτρονιακή δέσμη.

6. Εντοπισμός πρωτεϊνών νεφρικών κυττάρων με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού, σε υγιή ποντίκια, με τη χρήση αντισωμάτων για την πρωτεΐνη ποδοσίνη

Διαλύματα

- 0,5% Bovine Serum Albumin(BSA) σε PBS 0,1M με pH=7,4
- Πρωτογενές αντίσωμα για ποδοσίνη τύπου rabbit – anti – mouse 1:100 σε PBS 0,1M με pH=7,4
- Δευτερογενές αντίσωμα τύπου goat – anti – rabbit προσδεδεμένο με σωματίδια χρυσού 10nm αραιώσης 1:40 σε PBS 0,1M με pH=7,4
- Απεσταγμένο νερό

6.1 Γενικά

Η διαδικασία του ανοσοεντοπισμού για ηλεκτρονική μικροσκοπία αφορά τα τμήματα ιστού που βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια των grid. Επειδή αυτά είναι πολύ μικρές και ευαίσθητες δομές, όλη η διαδικασία γίνεται σε ειδικά δισκία(plates) τα οποία περιέχουν πηγαδάκια σε κάθε ένα από τα οποία εισάγεται το αντίστοιχο διάλυμα και τα grids τοποθετούνται διαδοχικά στα πηγαδάκια με τα αντίστοιχα διαλύματα. Το κάθε πηγαδάκι χωράει μια σταγόνα διαλύματος, δηλαδή 40μl, επομένως είναι δυνατόν να υπολογιστεί κάθε φορά ο συνολικός όγκος διαλυμάτων που είναι απαραίτητος ανάλογα με το πόσα δείγματα υπάρχουν και με το πόσες διαφορετικές συγκεντρώσεις αντισωμάτων μελετώνται.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση ανοσοεντοπισμού, στην οποία οι τομές προέκυψαν από ποντικό που ήταν υγιής, σε αντίθεση με την επόμενη περίπτωση όπου ο ποντικός ήταν ασθενής, δε θα χρησιμοποιηθούν καθόλου συστήματα blocking(αναλύεται παρακάτω) διότι στους νεφρούς υγιών ποντικών δεν παρατηρούνται ανοσοεναποθέσεις, άρα η μη ειδική πρόσδεση των πρωτογενών αντισωμάτων θα πρέπει κανονικά να είναι ελάχιστη. Βέβαια το BSA που χρησιμοποιείται για εκπλύσεις και για την αρχική «προσαρμογή» των τομών διαθέτει και δράση blocking κάτι που όμως δεν είναι αρνητικό.

6.2 Μέθοδος

Αφού έχουν ελεγχθεί προσεκτικά τα grids που θα χρησιμοποιηθούν ώστε να μην είναι τσακισμένα, να μην έχουν διπλωμένες τομές και να έχουν κάλυμμα formvar, ξεκινάει η διαδικασία του ανοσοεντοπισμού. Αρχικά οι τομές επωάζονται σε BSA για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και αφού αφαιρεθεί η περίσσεια διαλύματος με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού, τοποθετούνται στο διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος για την ποδοσίνη. Κατά τη μεταφορά των τομών από το ένα διάλυμα στο άλλο απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε με ένα απορροφητικό χαρτί να αφαιρεθεί από τα grids η περίσσεια του

προηγούμενου διαλύματος διότι αν δε γίνει αυτό, το επόμενο διάλυμα σε κάθε στάδιο θα αραιώνεται σημαντικά ή θα επιμολύνεται από το προηγούμενο. Σε αυτό το στάδιο το plate με τις τομές τοποθετείται σε κουτί στον πυθμένα του οποίου έχει επιστρωθεί νωπό χαρτί ώστε να υπάρχει υγρασία. Ολόκληρη η διάταξη τοποθετείται σε ψυγείο στους 4°C για ένα βράδυ για να δράσει το πρωτογενές αντίσωμα επί των πρωτεϊνών των ιστών. Την επόμενη μέρα οι τομές εκπλύνονται 3 φορές με διάλυμα BSA σε PBS από 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Επωάζονται, εν συνεχεία, στο δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση. Εκπλύνονται με BSA 3 φορές από 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση και τέλος γίνονται δύο πλύσεις με απεσταγμένο νερό από 5 λεπτά έκαστη.

Τα grids αφήνονται να στεγνώσουν και μπορούν να παρατηρηθούν την επόμενη μέρα.

7. Εντοπισμός πρωτεϊνών νεφρικών κυττάρων με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού, σε ασθενή ποντίκια, με τη χρήση αντισωμάτων για τις πρωτεΐνες ποδοσίνη και φωσφορυλιωμένη akt στη θέση 308(p-akt_{thr308})

Διαλύματα

- Goat Serum(GS) 5% σε PBS 0,1M με pH=7,4
- Fab goat – anti – mouse 0,1mg/ml σε PBS 0,1M με pH=7,4
- PBS 0,1M με pH=7,4
- Πρωτογενές αντίσωμα για ποδοσίνη τύπου rabbit – anti – mouse 1:50 σε PBS 0,1M με pH=7,4
- Πρωτογενές αντίσωμα για ποδοσίνη τύπου rabbit – anti – mouse 1:100 σε PBS 0,1M με pH=7,4
- Πρωτογενές αντίσωμα για p-akt_{thr308} τύπου rabbit – anti – mouse 1:50 σε PBS 0,1M με pH=7,4
- Πρωτογενές αντίσωμα για p-akt_{thr308} τύπου rabbit – anti – mouse 1:100 σε PBS 0,1M με pH=7,4
- Δευτερογενές αντίσωμα τύπου goat – anti – rabbit προσδεμένο με σωματίδια χρυσού 10nm αραιώσης 1:50 σε PBS 0,1M με pH=7,4
- Δευτερογενές αντίσωμα τύπου goat – anti – rabbit προσδεμένο με σωματίδια χρυσού 10nm αραιώσης 1:100 σε PBS 0,1M με pH=7,4
- Απεσταγμένο(nanopure) νερό

7.1 Γενικά

Τα διαλύματα GS και Fab που χρησιμοποιούνται καλούνται κοινώς συστήματα blocking ακριβώς επειδή μπλοκάρουν αντιγονικούς επιτόπους. Τα ποντίκια με νεφρικές παθήσεις παρουσιάζουν υψηλές συγκεντρώσεις ανοσοεναποθέσεων στα νεφρά, επομένως θα πρέπει να καλυφθούν όλες οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης πριν γίνει η επώαση των δειγμάτων στα πρωτογενή αντισώματα.

Το GS επιτυγχάνει κάλυψη των λεγόμενων παρατόπων, δηλαδή αντιγονικών επιτόπων οι οποίοι είναι μεν μη ειδικοί για το πρωτογενές αντίσωμα, λόγω υψηλής συγκέντρωσής τους όμως μπορεί αυτό να προσδεθεί πάνω τους μη ειδικά.

Το δε Fab χρησιμοποιείται προκειμένου να καλυφθούν επιπλέον αντιγονικές θέσεις μη ειδικής πρόσδεσης. Το διάλυμα Fab είναι τύπου goat – anti – mouse και περιέχει μόνο τις υπερμεταβλητές περιοχές ανοσοσφαιρίνης(εξ' ου και η ονομασία), οι οποίες συνδέονται σε διάφορες αντιγονικές επικράτειες ώστε να περιοριστεί η μη ειδική πρόσδεση του πρωτογενούς αντισώματος που θα χρησιμοποιηθεί. Ουσιαστικά, η δράση του Fab είναι συμπληρωματική προς αυτή του GS.

7.2 Μέθοδος

Αρχικά τα grids τοποθετούνται στο διάλυμα 5% goat serum σε PBS 0,1M για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα γίνεται αλλαγή του διαλύματος επώασης, το οποίο είναι το διάλυμα Fab 0,1mg/ml στο οποίο οι τομές παραμένουν για 1,5 ώρες ξανά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση στο Fab τα grids εκπλένονται 3 φορές επί 5 λεπτά έκαστη με διάλυμα PBS ώστε να ξεπλυθούν μόρια τα οποία δεν προσδέθηκαν πάνω στον ιστό. Οι εκπλύσεις γίνονται σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση του δισκίου που περιέχει τις τομές.

Μετά τις εκπλύσεις, τα grids τοποθετούνται στις δυο αραιώσεις του κάθε πρωτογενούς αντισώματος, δηλαδή για την ποδοσίνη και για την p-akt_{thr308}. Την επόμενη μέρα γίνονται 3 εκπλύσεις με PBS για 30 λεπτά το καθένα σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση και στη συνέχεια προστίθενται οι συγκεντρώσεις του δευτερογενούς αντισώματος το οποίο πρώτα φυγοκεντρείται προκειμένου να κατακρημνιστούν τυχόν συσσωματώματα σωματιδίων χρυσού. Η επώαση στις αραιώσεις του δευτερογενούς αντισώματος γίνεται για 1 ώρα με συνεχή ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα οι τομές εκπλένονται και πάλι 3 φορές από 30 λεπτά καθεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και τέλος για να ελευθερωθούν οι τομές από άλατα και σκόνες υφίστανται δυο εκπλύσεις με απεσταγμένο νερό, από 5 λεπτά η καθεμία με ανάδευση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Αφού οι τομές στεγνώσουν μπορούν να παρατηρηθούν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

8. Εντοπισμός πρωτεϊνών νεφρικών κυττάρων με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού, σε υγιή ποντίκια, με τη χρήση αντισωμάτων για την πρωτεΐνη p-akt_{thr308}

Διαλύματα

- BSA 0,5% σε PBS 0,1M με pH=7,4
- Πρωτογενές αντίσωμα για p-akt_{thr308} τύπου rabbit – anti – mouse 1:800 σε PBS 0,1M με pH=7,4
- Δευτερογενές αντίσωμα τύπου goat – anti – rabbit προσδεμένο με σωματίδια χρυσού 10nm αραιώσης 1:40 σε PBS 0,1M με pH=7,4
- Απεσταγμένο νερό

8.1 Γενικά

Η συγκεκριμένη μέθοδος έγινε, όπως αναφέρεται και στον τίτλο, σε υγιή ποντίκια και για το λόγο αυτό δε θα χρησιμοποιηθούν συστήματα blocking μια και τα ποντίκια δε θα φέρουν κανονικά στα νεφρά τους ανοσοεναποθέσεις.

Μια σημαντική διαφορά στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι πως αυτή τη φορά γίνεται προσπάθεια εντοπισμού της φωσφορυλιωμένης μορφής της κινάσης akt. Πιο ειδικά, θα χρησιμοποιηθεί αντίσωμα για την akt που είναι φωσφορυλιωμένη στη θέση Thr308.

Η μέθοδος που θα περιγραφεί είναι η ίδια με αυτή του χωρίου 6 με τη διαφορά ότι αλλάζουν οι χρόνοι των πλύσεων προς τα κάτω αλλά αυξάνονται οι επαναλήψεις τους ώστε να λαμβάνεται πιο ειδικό σήμα.

8.2 Μέθοδος

Αρχικά οι τομές επωάζονται σε διάλυμα BSA για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα μεταφέρονται στο διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος για όλη νύχτα στους 4°C στη διάταξη που έχει ήδη περιγραφεί. Ακολουθούν 4 εκπλύσεις των 20 λεπτών η καθεμία με BSA με ανάδευση. Σειρά έχει το δευτερογενές αντίσωμα, στο οποίο επωάζονται οι τομές για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου αναδεδόμενες. Ακολουθούν και πάλι 4 πλύσεις με

BSA με ανάδευση για 20 λεπτά η καθεμία σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος οι τομές τοποθετούνται σε απεσταγμένο νερό και να ξεπλυθούν από υπολείμματα BSA.

9. Χρώση τομών που έχουν υποστεί ανοσοεντοπισμό με διάλυμα οξικού ουρανυλίου για δημιουργία αντίθεσης

Υλικά και διαλύματα

- Διάλυμα οξικού ουρανυλίου 7%
- Απεσταγμένο νερό

9.1 Γενικά

Όπως έχει αναφερθεί και στην έγκλειση με εποξική ρητίνη, το οξικό ουρανύλιο χρησιμοποιείται για να αυξάνεται η αντίθεση στο βιολογικό παρασεκύασμα. Στην έγκλειση με AFS η χρήση οξικού ουρανυλίου είναι απαραίτητη καθώς ο ιστός δεν έχει υποστεί άλλου είδους χρώση επομένως η παρατήρηση θα είναι δύσκολη. Για το λόγο αυτό πρέπει να γίνει επώαση των τομών σε οξικό ουρανύλιο για 5 λεπτά το πολύ.

9.2 Μέθοδος

Μια κέρινη πλάκα, αρχικά, καλύπτεται με parafilm η καθαρή πλευρά του οποίου να βρίσκεται προς τα πάνω. Πάνω στην επιφάνεια του parafilm τοποθετούνται 6 διακριτές σταγόνες διαλύματος οξικού ουρανυλίου σε κάποια απόσταση μεταξύ τους και σκεπάζονται με κάποιο ειδικό αυτοσχέδιο κάλυμμα από αλουμινοχαρτο ώστε να μην έρχεται σε συνεχή επαφή ο χρήστης με την ακτινοβολία από το οξικό ουρανύλιο. Τοποθετείται πρώτα το πρώτο grid πάνω στην πρώτη σταγόνα με τις τομές προς τα κάτω(να ακουμπάνε δηλαδή στην επιφάνεια του διαλύματος) και αφού παρέλθει χρόνος 1 λεπτού τοποθετείται και δεύτερο grid στη δεύτερη σταγόνα διαλύματος και ούτω καθεξής μέχρι να καλυφθούν και οι έξι σταγόνες.

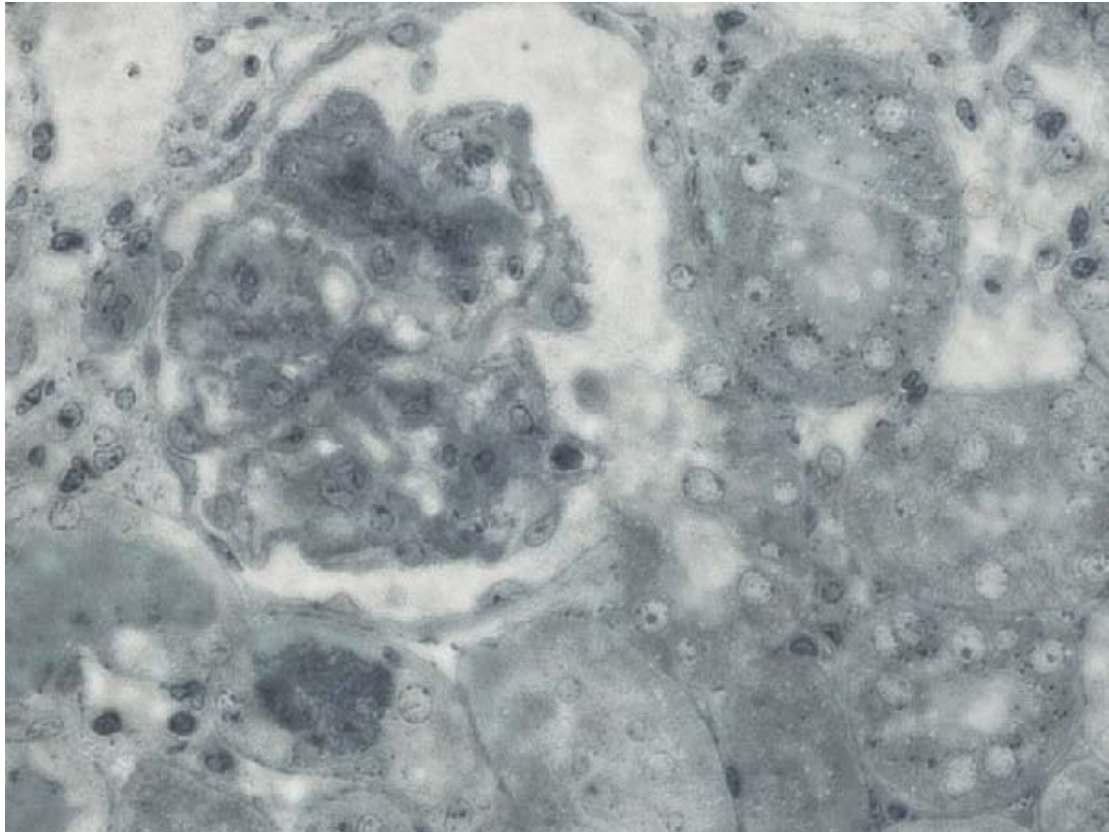
Αφού τοποθετηθεί και το έκτο grid στην έκτη σταγόνα, τότε το πρώτο grid θα έχει μείνει στο οξικό ουρανύλιο για 5 λεπτά, το δεύτερο για 4 κλπ. Επομένως το πρώτο αφαιρείται από το διάλυμα και ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό για να φύγουν υπολείμματα οξικού ουρανυλίου. Ύστερα από ένα λεπτό που διαρκεί το ξέπλυμα του πρώτου grid, το δεύτερο θα έχει συμπληρώσει 5 λεπτά στο διάλυμα επομένως αφαιρείται και ξεπλένεται κατά τον ίδιο τρόπο. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τα υπόλοιπα grids τα οποία στη συνέχεια αφήνονται στο grid box για να στεγνώσουν πριν την παρατήρηση. Αν υπάρχουν επιπλέον grids, ακολουθείται ακόμα ένας κύκλος επώασεων στο οξικό ουρανύλιο.

Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται ώστε οι τομές να μη μένουν επί μακρόν στο οξικό ουρανύλιο γιατί υπερβολική έκθεσή τους σε αυτό προκαλεί υπερχρώση και η τελική εικόνα που θα προκύπτει στο μικροσκόπιο είναι μια όπου όλες οι περιοχές είναι πολύ σκούρες, επομένως χάνεται η επιθυμητή πληροφορία.

Αποτελέσματα

1. Έγκλειση ιστού με εποξική ρητίνη

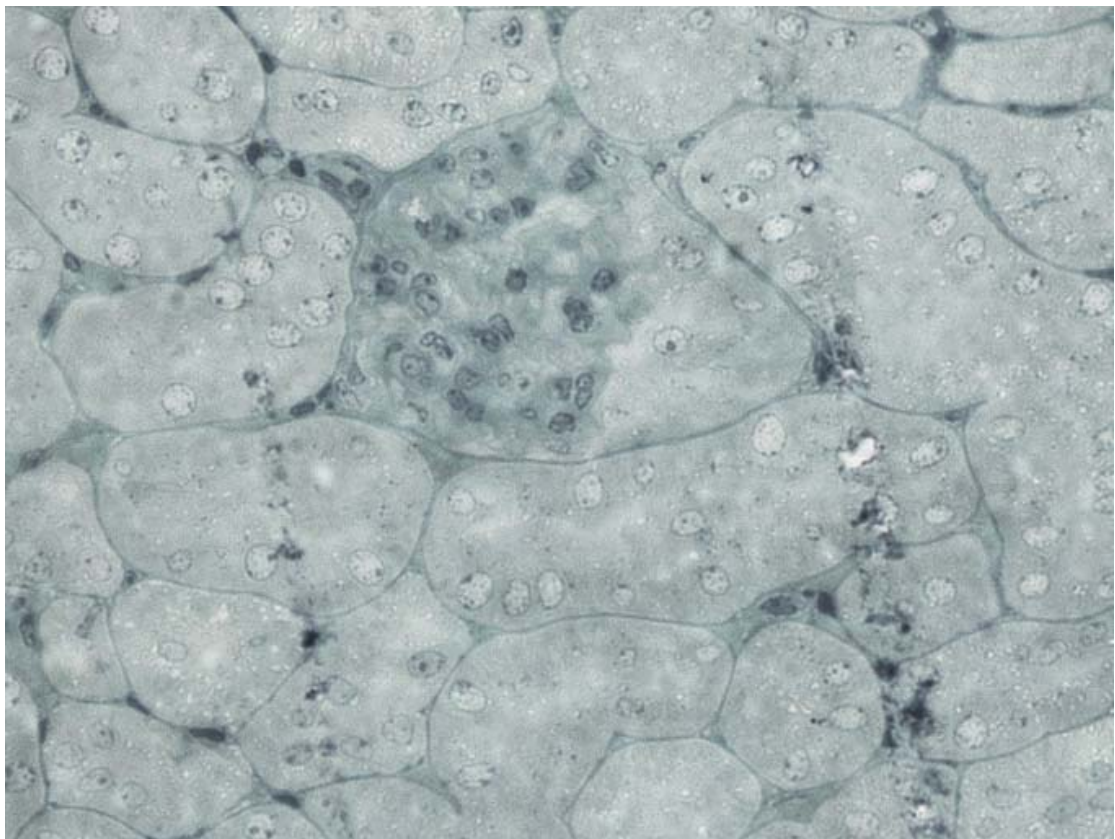
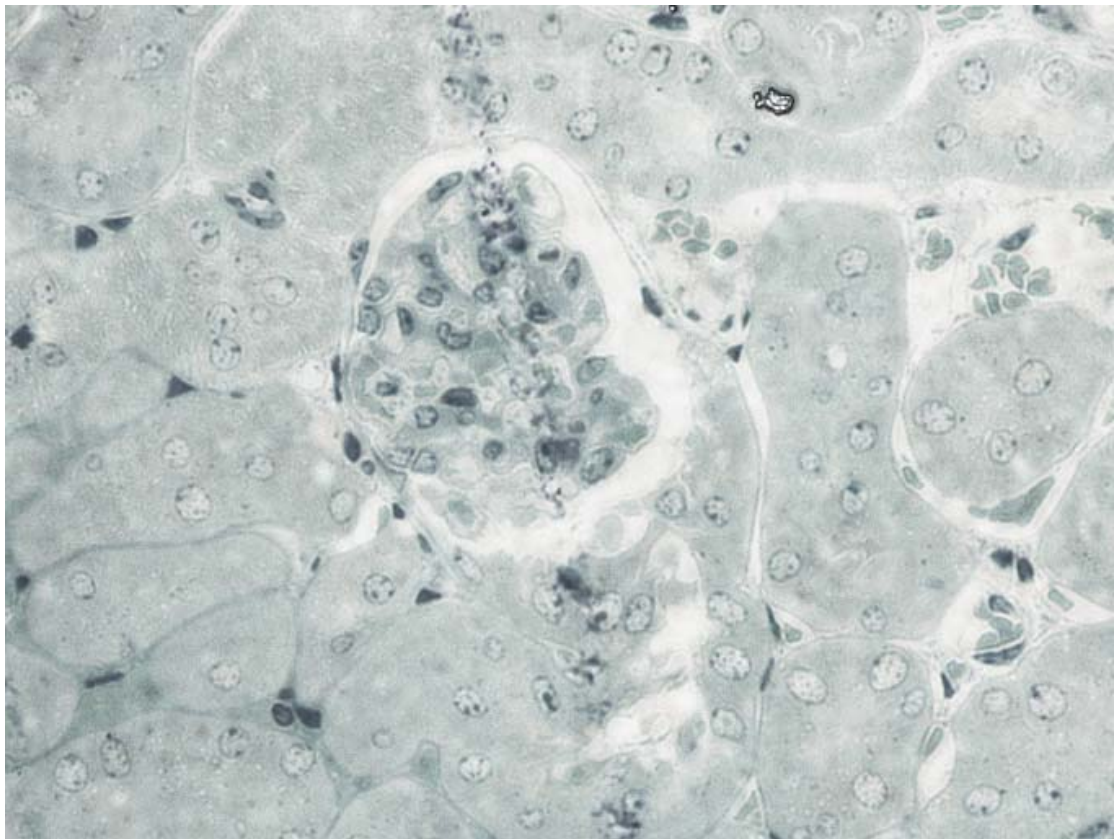
Η έγκλειση ιστού από νεφρό ποντικού με την κλασική μέθοδο της έγκλεισης με εποξική ρητίνη χρησιμοποιείται για παρατήρηση της δομής και της μορφολογίας του ιστού. Οι εικόνες που προκύπτουν τόσο σε φωτονική όσο και ηλεκτρονική μικροσκοπία απεικονίζουν αρκετά καλά τη διαμερισματοποίηση των κυττάρων του ιστού.



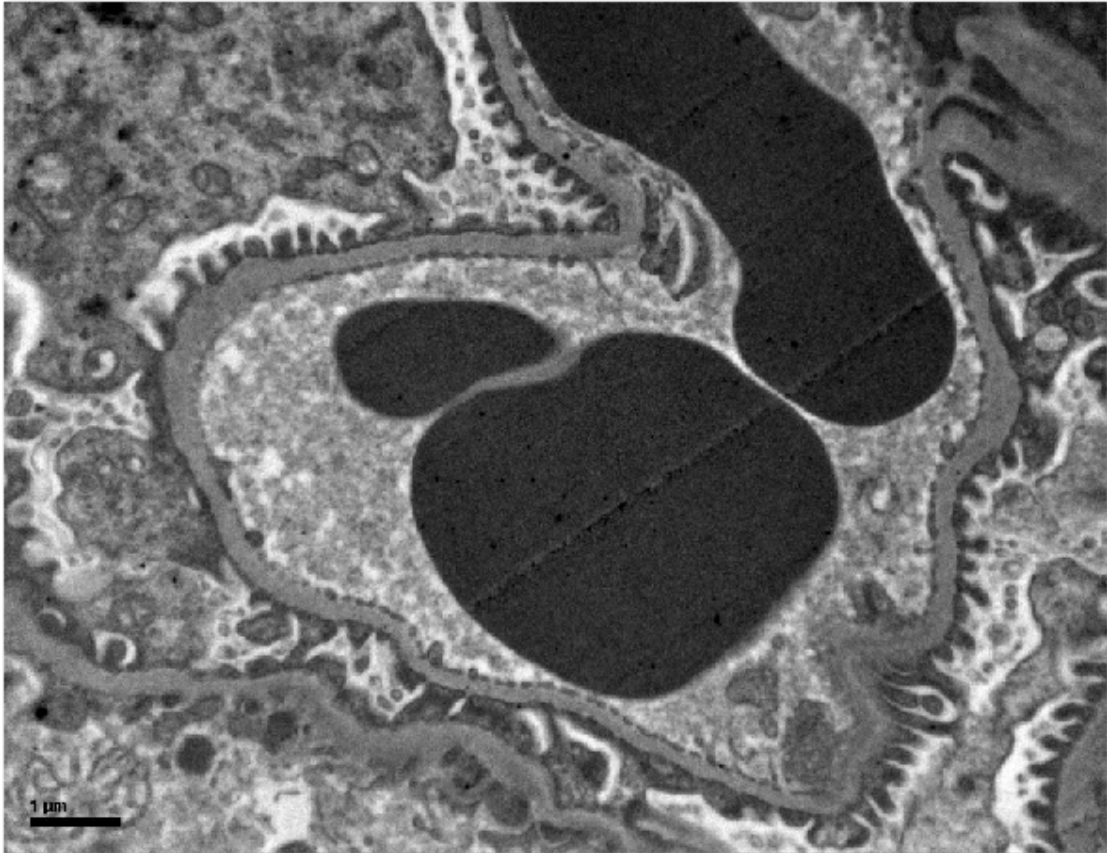
Εικόνα φωτονικού μικροσκοπίου όπου απεικονίζεται ξεκάθαρα ένα αγγειώδες σπείραμα σε μεγέθυνση 600x. Φαίνονται, επίσης, το έλυτρο Bowman καθώς και τα σωληναριακά κύτταρα που το περιβάλλουν και ενδοκυτταρικά οργανίδια των κυττάρων αυτών. Η φωτογραφία προέρχεται από νεφρό ποντικού με κωδικό N21, που υπέστη έγκλειση με εποξική ρητίνη.

Ακολουθούν δύο ακόμα εικόνες φωτονικού μικροσκοπίου που απεικονίζουν ιστό από νεφρό ποντικού με κωδικό N28 σε μεγέθυνση 600x, όπως η παραπάνω. Η έγκλειση έγινε και πάλι με εποξική ρητίνη και η μονιμοποίηση όπως αναφέρεται στο χωρίο «Έγκλειση ιστού ποντικού για παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με εποξική ρητίνη Durcupan ACMm Fluca(κλασική έγκλειση)». Φαίνεται πόσο καλά διατηρείται η μορφολογία και η δομή του ιστού καθώς και η άριστη απεικόνιση των κυτταρικών διαμερισμάτων.

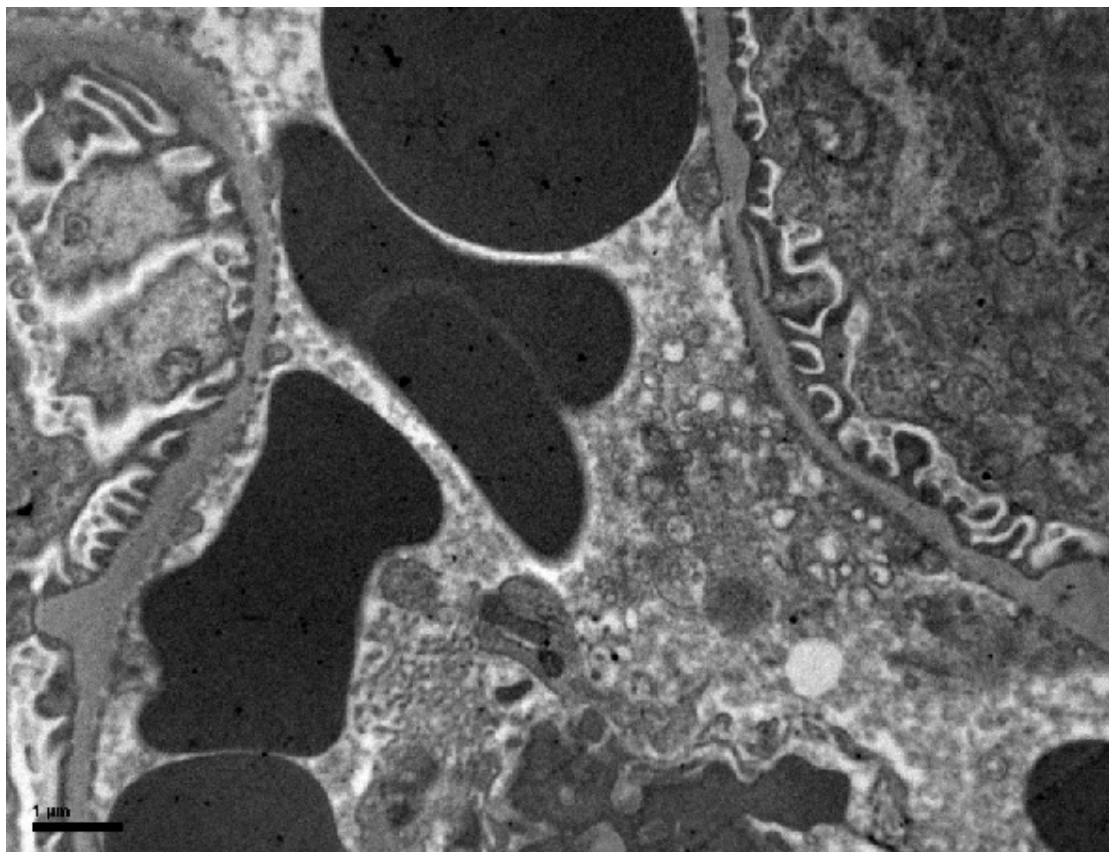
Στις δυο αυτές φωτογραφίες παρατηρούνται γραμμώσεις στην επιφάνεια της τομής οι οποίες θα μπορούσαν να παρερμηνευθούν ως αποτυχία της έγκλεισης. Ουσιαστικά πρόκειται για κακής ποιότητας μαχαίρι που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των τομών. Δεν επηρεάζεται, εν τούτοις, σε μεγάλο βαθμό η εικόνα που είναι επιθυμητή.



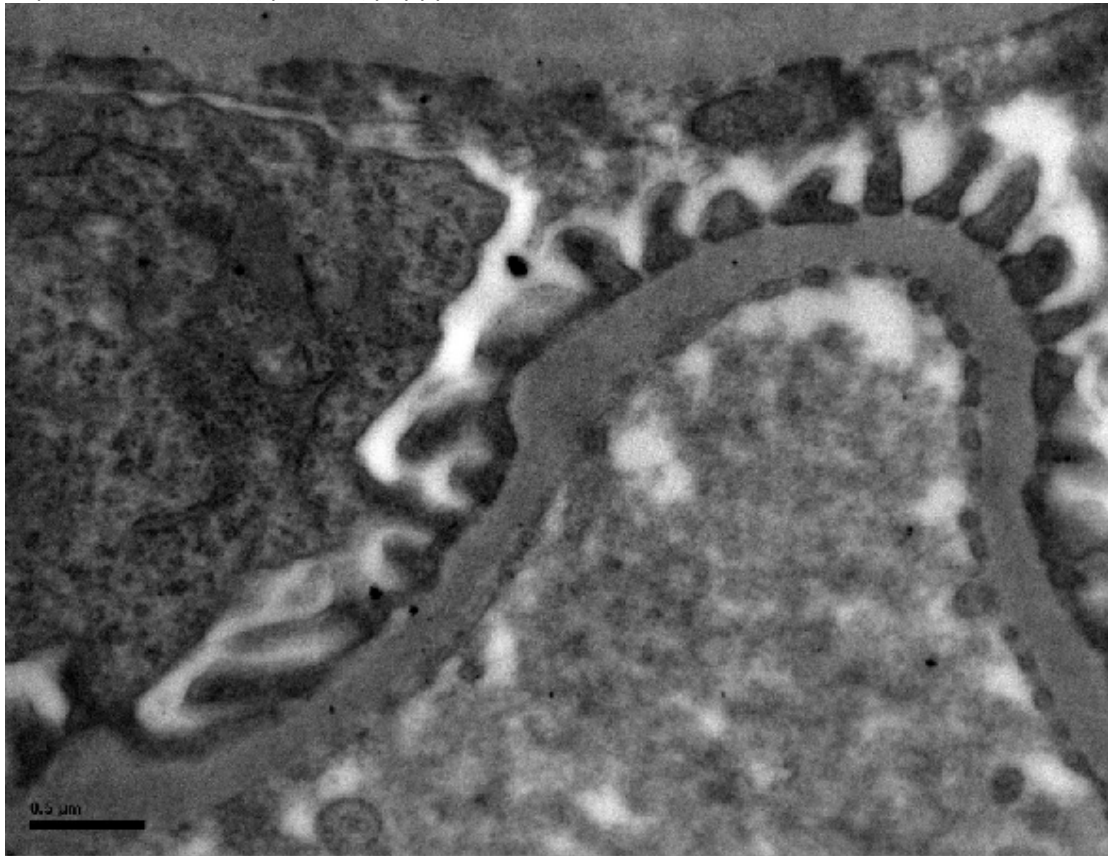
Ακολουθούν φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο από τομές ιστού από ποντίκι N19. Οι εικόνες απεικονίζουν το αγγειώδες σπείραμα, ποδικές εκβλαστήσεις και ποδοκύτταρα.



Στη φωτογραφία φαίνονται οι ποδικές εκβλαστήσεις καθώς και βασική μεμβράνη του σπειράματος, καθώς και ο αυλός του τριχοειδούς του σπειράματος με ερυθρά αιμοσφαίρια στο εσωτερικό. Ομοίως και στην επόμενη εικόνα.

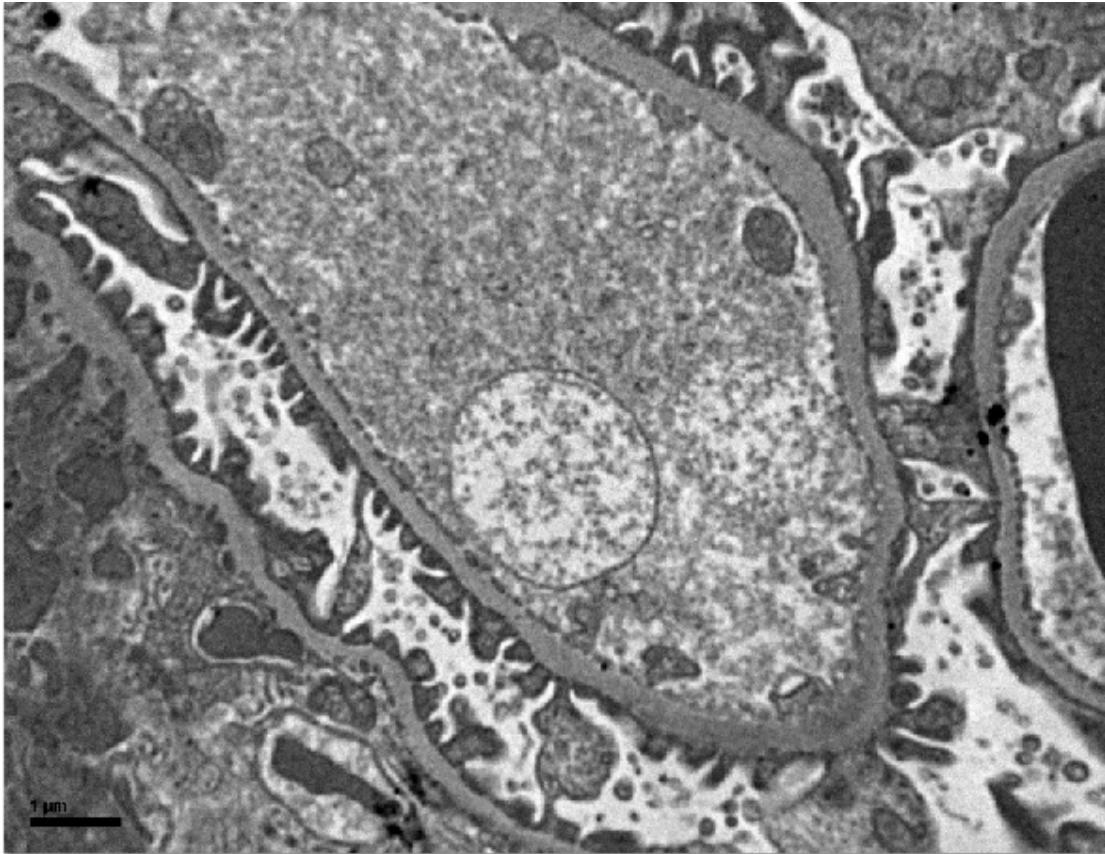


Στη φωτογραφία που ακολουθεί, σε μεγαλύτερη μεγέθυνση, φαίνεται και πάλι η βασική μεμβράνη του σπειράματος και η πολυπλοκότητα με την οποία περιπλέκονται οι ποδικές εκβλαστήσεις επί της βασικής μεμβράνης.



Σε μεγαλύτερη, ακόμα, μεγέθυνση στην κατωτέρω φωτογραφία φαίνεται και πάλι η βασική μεμβράνη με τις ποδικές εκβλαστήσεις.





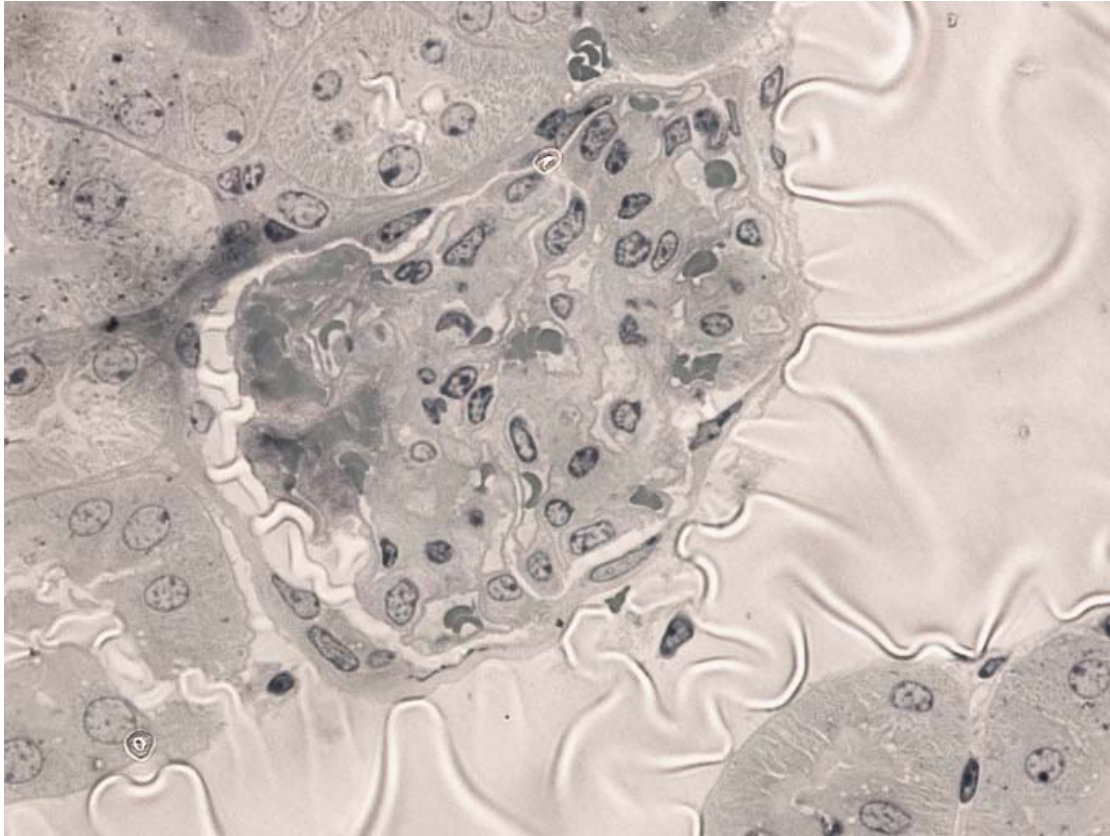
Άλλη μια γενική άποψη ενός ποδικού κυττάρου και της βασικής μεμβράνης με τις ποδοκυτταρικές εκβλαστήσεις. Στην εικόνα αυτή φαίνεται επίσης και τμήμα αγκύλης.

Όπως προκύπτει από τις ανωτέρω φωτογραφίες, είναι φανερό πως η εποξική ρητίνη είναι ιδανική για πειράματα παρατήρησης της δομής και της μορφολογίας ενός ιστού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια αρχική εκτίμηση για πιθανές παθολογικές καταστάσεις του ιστού.

Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα της εποξικής ρητίνης είναι η ανθεκτικότητα και η αντίστασή της κατά το βομβαρδισμό από την ηλεκτρονική δέσμη, κάτι που φαίνεται από το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκαν ασυνέχειες στις τομές λόγω υπερέκθεσης στη δέσμη.

2. Έγκλειση ιστού με AFS ύστερα από μονιμοποίηση για 1 ώρα σε μονιμοποιητή 2% PFA, 0,5% GDA σε 0,1M PBS με pH=7,4

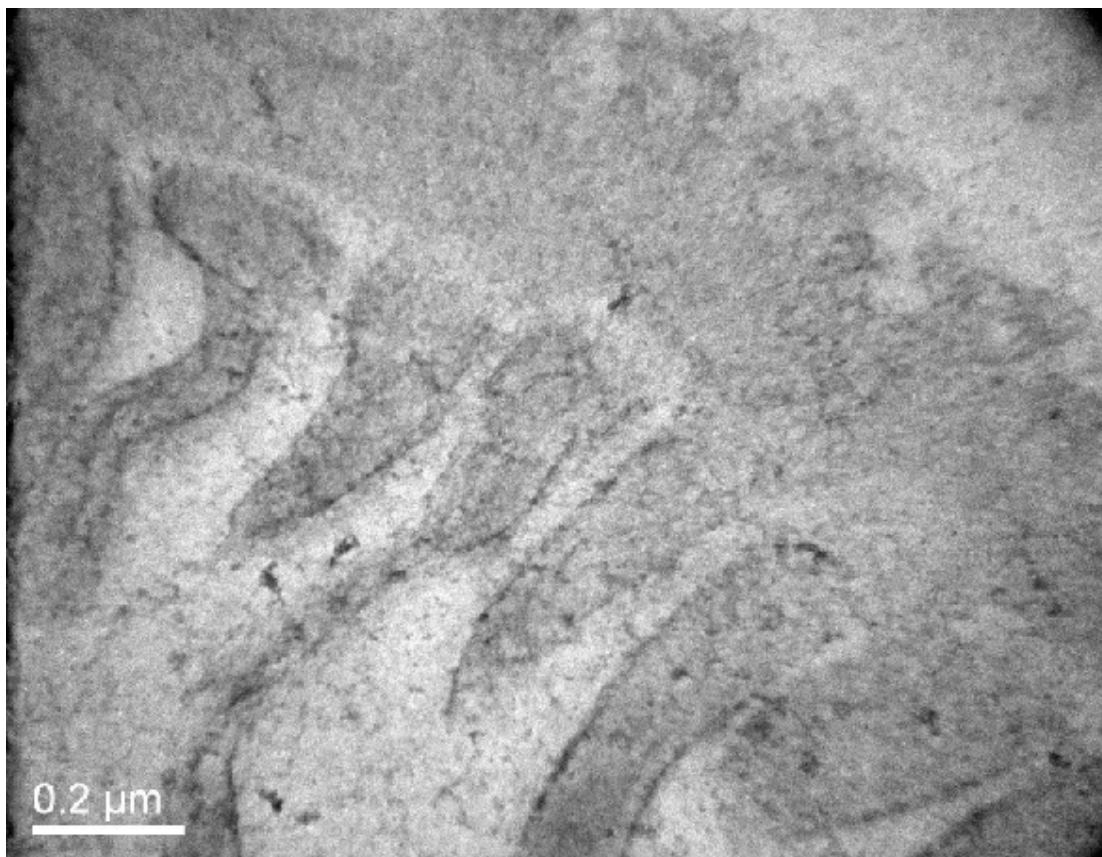
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η έγκλειση σε χαμηλή θερμοκρασία έχει το πλεονέκτημα της μέγιστης δυνατής διατήρησης των αντιγονικών επιτόπων και είναι κατάλληλη για πειράματα ανοσοεντοπισμού. Αρχικά, λοιπόν, είναι σκόπιμο να διαπιστωθεί το απεικονιστικό αποτέλεσμα αυτού του είδους της έγκλεισης.



Στην εικόνα αυτή φαίνεται σε μεγέθυνση 400x ένα σπείραμα από ιστό που έχει εγκλειστεί σε ρητίνη Lowicryl με τη βοήθεια συσκευής AFS. Η μορφολογία διατηρείται πολύ καλά σε επίπεδο φωτονικού μικροσκοπίου, είναι όμως φανερή η μικρότερη αντίθεση εν συγκρίσει με αυτή που παρέχει η εποξική ρητίνη. Επίσης, φαίνεται πως η τομή παρουσιάζει ζάρες σε διάφορες περιοχές άσχετα με το αν υπάρχει ιστός ή όχι. Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι κατά την παραγωγή των τομών έρχεται σε επαφή η υδρόφιλη ρητίνη προσωρινά με νερό και αυτό έχει το προαναφερόμενο αποτέλεσμα.

Το ποντίκι που αποτελεί την πηγή του ιστού είναι N21.

Στη συνέχεια ακολουθούν φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε τομές από ιστό ποντικού N19 που έχει εγκλειστεί σε Lowicryl.



Η παραπάνω εικόνα παρουσιάζει μια άποψη των ποδικών εκβλαστήσεων ενός ποδοκυττάρου.

Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την παρατήρηση, η ρητίνη Lowicryl τείνει να καίγεται και να δημιουργεί έντονες ασυνέχειες στην τομή λόγω υπερβολικής έκθεσης στην ακτινοβολία. Αυτό παρατηρήθηκε σε τομές οι οποίες τοποθετήθηκαν σε grids χωρίς μεμβράνη formvar και οι οποίες καταστράφηκαν εξ' ολοκλήρου.

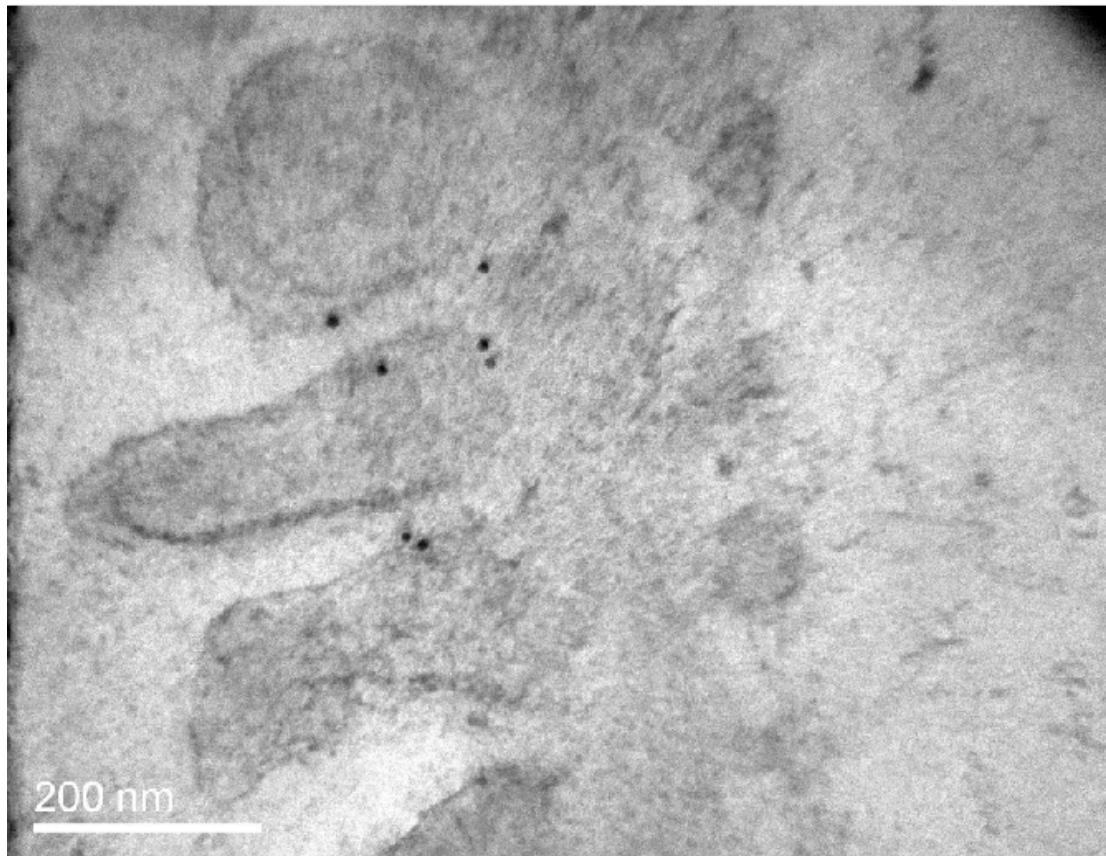
Συμπερασματικά λοιπόν, προκύπτει ότι και η ρητίνη Lowicryl δίνει καλή απεικόνιση της μορφολογίας, όχι όμως όπως η εποξική. Παρ' όλα αυτά το αποτέλεσμα είναι ικανοποιητικό μια και ο σκοπός που εξυπηρετεί είναι περισσότερο ο εντοπισμός πρωτεϊνικών μορίων, παρά η μελέτη της δομής.

3. Έγκλειση ιστού με AFS ύστερα από μονιμοποίηση σε 4% PFA για 1 ώρα και ανοσοεντοπισμός για την πρωτεΐνη ποδοσίνη με αραιώση αντισώματος 1:100 με βάση τη μέθοδο 6

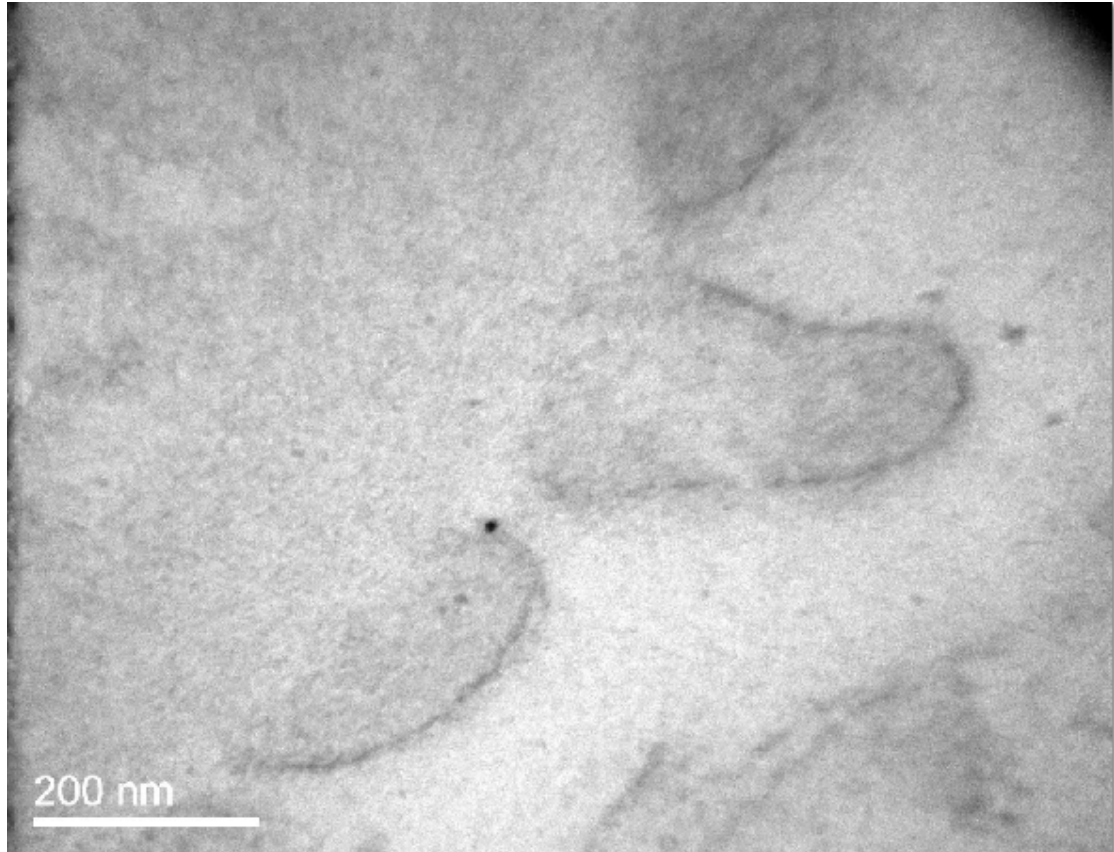
Οι φωτογραφίες που θα ακολουθήσουν από το σημείο και έπειτα αφορούν μόνο εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αφού πλέον το ενδιαφέρον εστιάζεται καθαρά και μόνο στο μικροσκοπικό επίπεδο εντοπισμού πρωτεϊνών. Το χωρίο αυτό καθώς και το επόμενο(4) είναι άμεσα σχετιζόμενα καθώς η μόνη τους διαφορά είναι η διάρκεια μονιμοποίησης των ιστοτεμαχίων. Όλες οι εικόνες παρουσιάζουν αγγειώδη σπειράματα, βασικές μεμβράνες, λεπτό διάφραγμα και η τάξη μεγέθους φαίνεται σε κάθε φωτογραφία. Το σωματίδιο του κολλοειδούς χρυσού φαίνεται ως ένα σημείο εντονότερο οπτικά σε σχέση με το περιβάλλον του.

Επειδή το σωματίδιο του κολλοειδούς χρυσού έχει ένα σημαντικό όγκο, σε μερικές φωτογραφίες μπορεί το σωματίδιο να φαίνεται ξεκάθαρα και το υπόβαθρο να είναι ολίγον θολό είτε και το αντίστροφο. Αυτό είναι απολύτως φυσιολογικό διότι λόγω της μάζας του, το σωματίδιο χρυσού βρίσκεται σε κατά τι υψηλότερο επίπεδο εστίασης από αυτό του ιστού. Επομένως, ανάλογα με το που γίνεται κάθε φορά η εστίαση, η προκύπτουσα εικόνα θα παρουσιάζει διαφορές στην ευκρίνειά της.

Όλες οι φωτογραφίες έχουν προκύψει από τομές ιστών υγιών balb – c ποντικών.

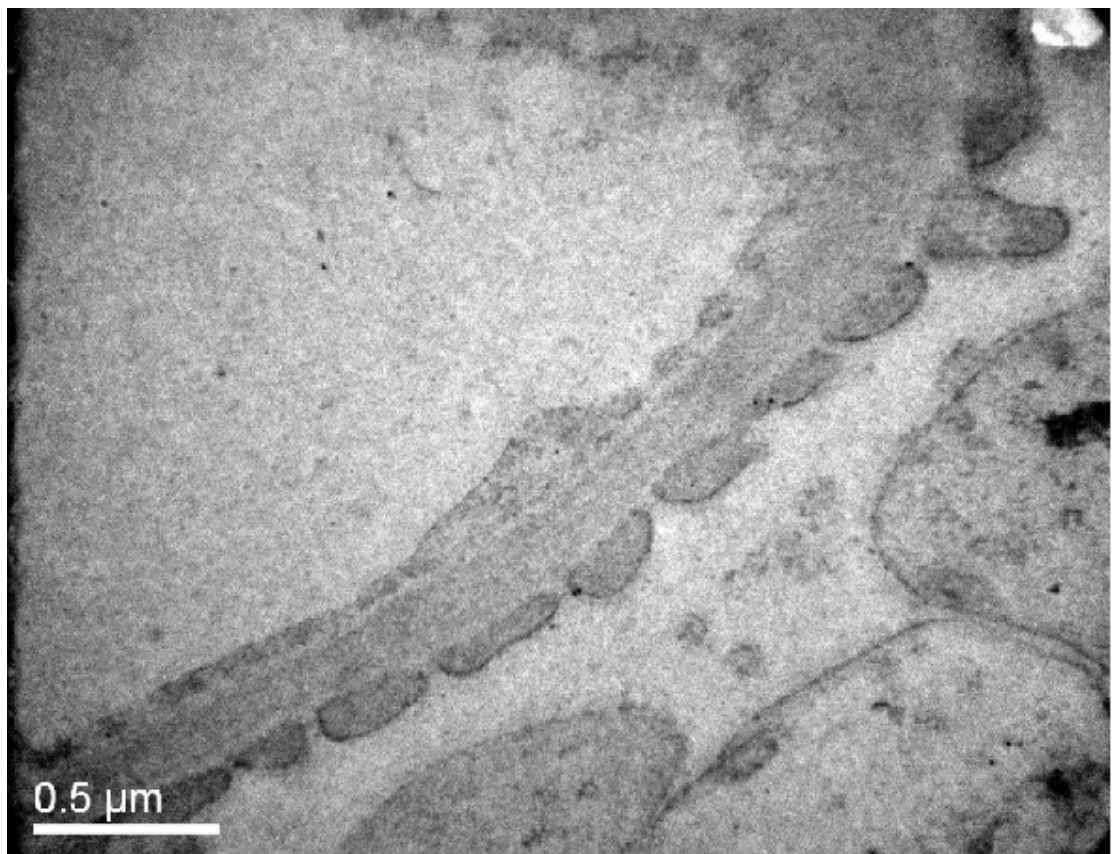


Στην παραπάνω φωτογραφία φαίνονται οι ποδοκυτταρικές προεκβολές πάνω στη βασική μεμβράνη του σπειράματος και με μικρή προσοχή μπορεί κανείς να παρατηρήσει και λεπτό διάφραγμα που φαίνεται αχνά. Στη συγκεκριμένη τομή λίγοι κόκκοι χρυσού έχουν προσδεθεί στη μια πλευρά του λεπτού διαφράγματος που ενώνει δύο προεκβολές. Με βάση την ισχύουσα γνώση, όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή, στη συγκεκριμένη τομή η ποδοσίνη έχει εντοπιστεί επιτυχώς. Με δεδομένο το πάχος της τομής (40nm) και τον αριθμό των μορίων ποδοσίνης εκατέρωθεν κάθε ενός λεπτού διαφράγματος μεταξύ δύο ποδοκυττάρων, είναι λογικό να ειπωθεί πως οι κόκκοι χρυσού είναι μάλλον πολλοί. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην αραιώση του αντισώματος η οποία να οδήγησε σε μη ειδική πρόσδεση λόγω αυξημένης συγκέντρωσης. Παρατηρείται ακόμα πως η διατήρηση της μορφολογίας είναι αρκετά καλή όπως έχει ήδη αναφερθεί στην προηγούμενη ενότητα.



Η φωτογραφία αυτή δείχνει ακριβώς τη θέση της ποδοσίνης στο σημείο που είναι γνωστό ότι βρίσκεται με βάση τη βιβλιογραφία. Παρατηρούνται οι ποδικές εκβλαστήσεις και ένα μόριο ποδοσίνης κοντά σε μια αχνή δομή που είναι προφανώς το λεπτό διάφραγμα.

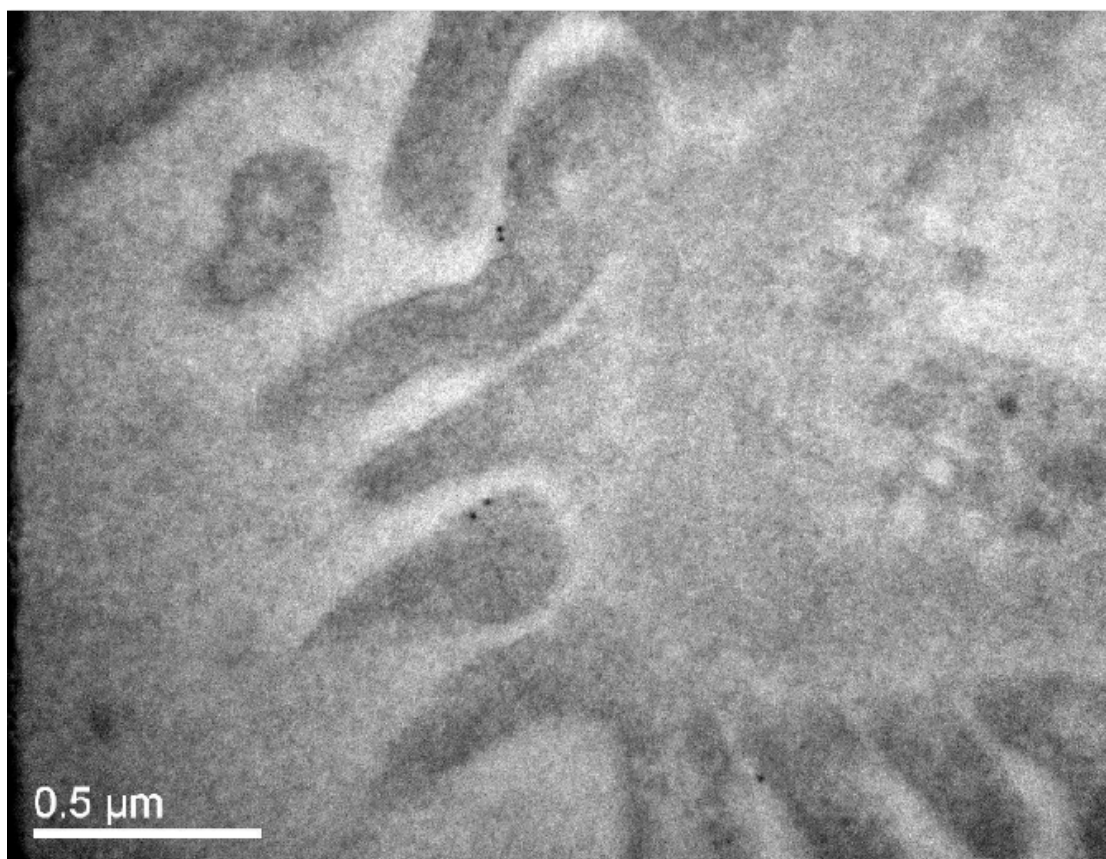
Η επόμενη φωτογραφία δείχνει μια γενικότερη άποψη ποδοκυττάρων στα οποία έχει γίνει επιτυχής εντοπισμός μορίων ποδοσίνης.



Συμπερασματικά μπορεί να ειπωθεί ότι με τις συνθήκες έγκλεισης που προηγήθηκαν, προέκυψαν αποτελέσματα τα οποία ήταν αναμενόμενα με βάση τη βιβλιογραφία.

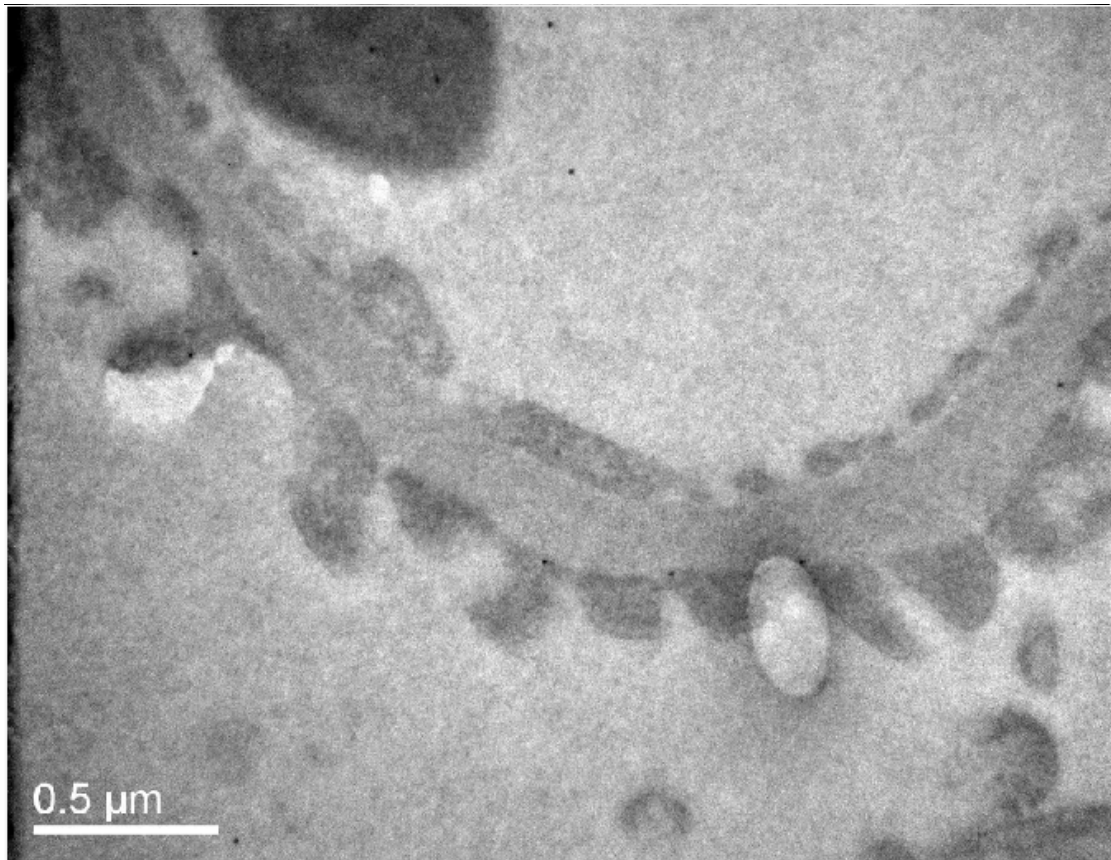
4. Έγκλειση ιστού με AFS ύστερα από μονιμοποίηση σε 4% PFA και ανοσοεντοπισμός για την πρωτεΐνη ποδοσίνη με αραιώση αντισώματος 1:100 με βάση τη μέθοδο 6

Εδώ παρατίθενται τα αποτελέσματα από ιστό που υπέστη την ίδια διαδικασία έγκλεισης και ανοσοεντοπισμού όπως στο προηγούμενο υποκεφάλαιο με τη διαφορά ότι η μονιμοποίηση διήρκεσε 2 ώρες αντί για 1. Με τον τρόπο αυτό γίνεται προσπάθεια να επιτευχθεί η βέλτιστη ποιότητα εικόνας και σήματος.

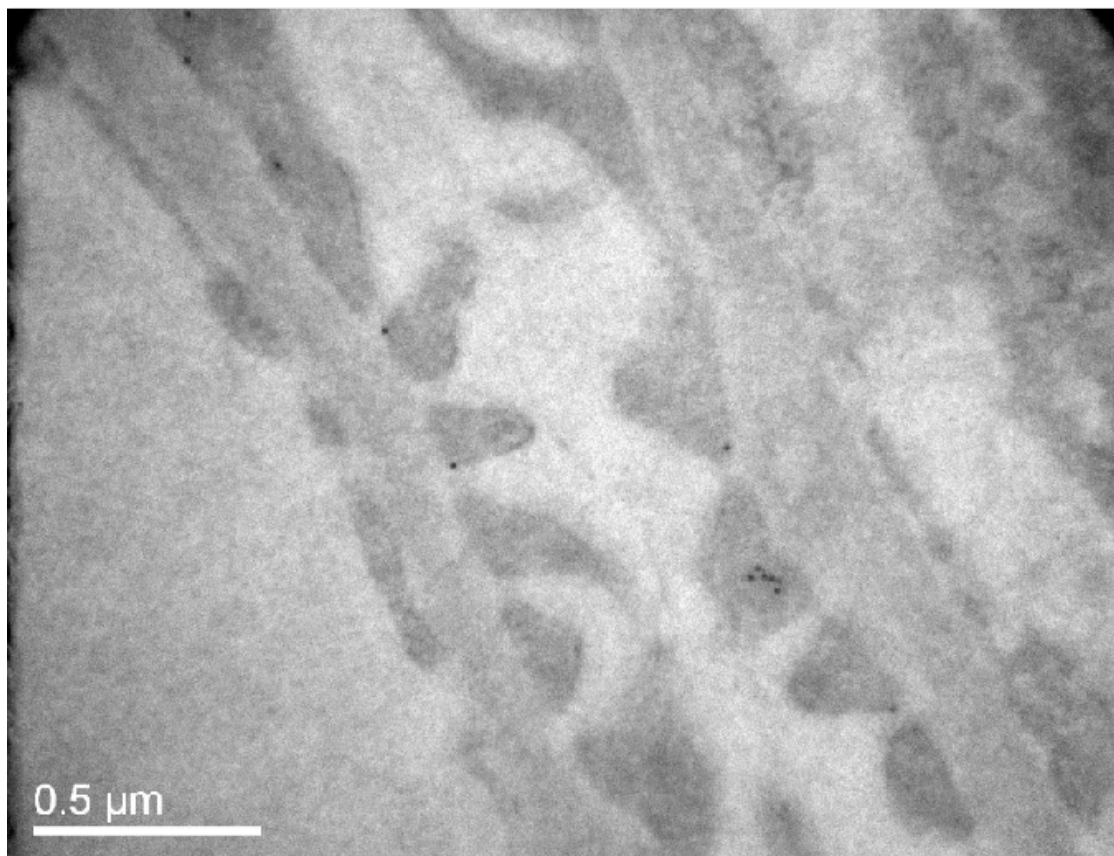


Η παρακάτω φωτογραφία δείχνει προεκβολές ποδοκυττάρων επί της βασικής μεμβράνης καθώς και τον εντοπισμό μορίων ποδοσίνης.

Ομοίως και στη φωτογραφία που ακολουθεί, όπου φαίνεται ξεκάθαρα και η βασική μεμβράνη.

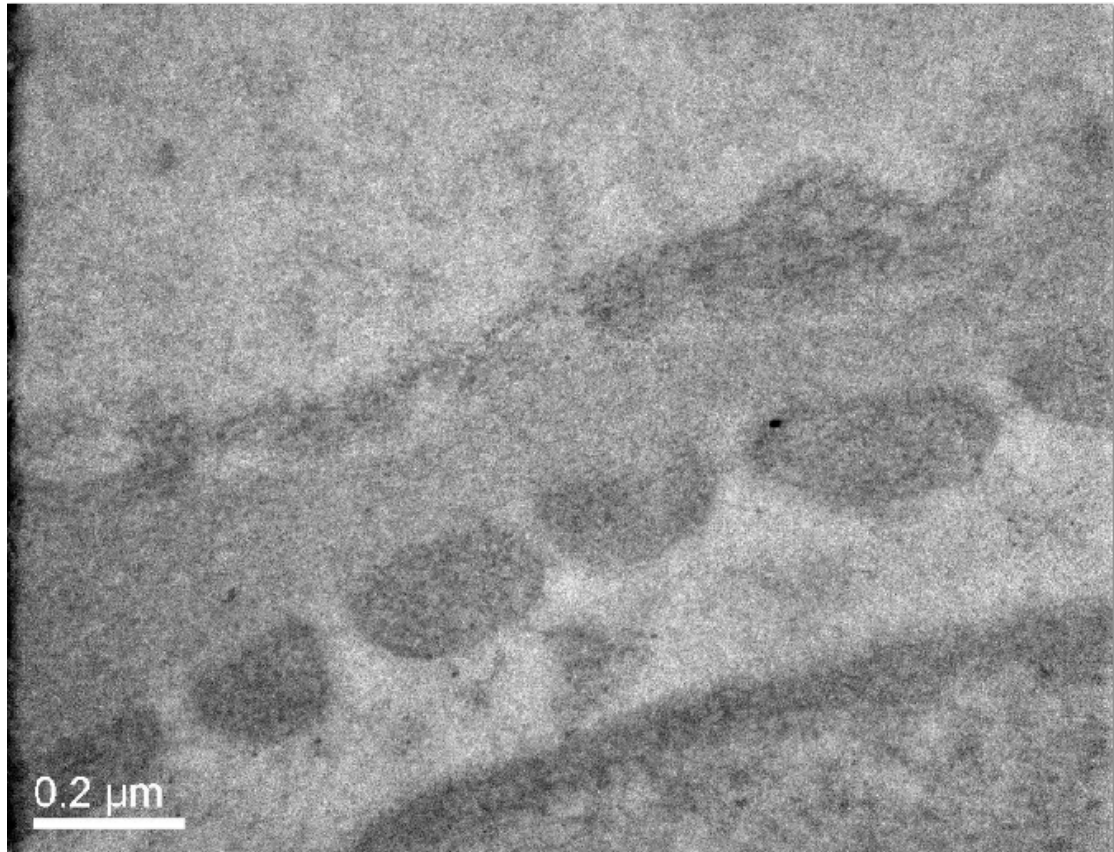


Στις δύο τελευταίες φωτογραφίες φαίνονται και πάλι ποδικές εκβλαστήσεις επάνω στη βασική μεμβράνη. Στην κάτω φωτογραφία παρατηρείται μια υψηλή συγκέντρωση σωματιδίων κολλοειδούς χρυσό σε ένα σημείο. Κατά πάσα πιθανότητα πρόκειται για μη ειδική πρόσδεση λόγω υψηλής συγκέντρωσης αντισώματος.

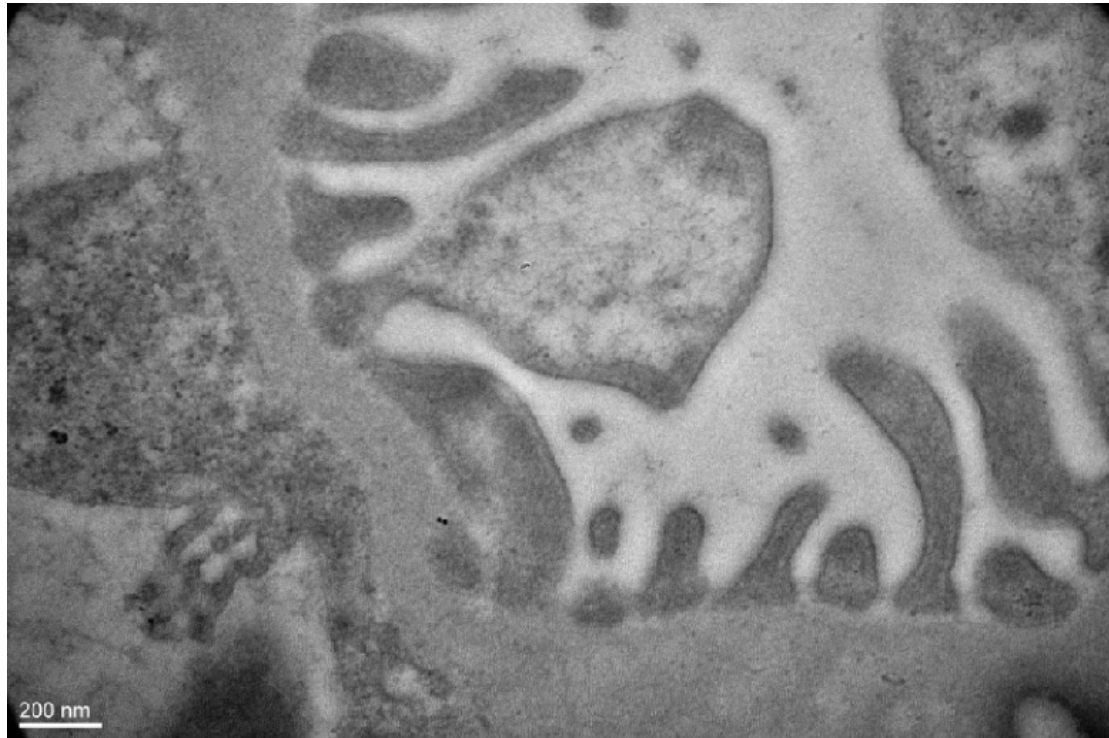


5. Έγκλειση ιστού με AFS ύστερα από μονιμοποίηση σε 4% PFA και ανοσοεντοπισμός για την πρωτεΐνη akt_{thr308} με αραιώση αντισώματος 1:800 με βάση τη μέθοδο 8

Μετά τον καθορισμό των συνθηκών που είναι οι βέλτιστες για την έγκλειση και τον ανοσοεντοπισμό νεφρικού ιστού από ποντικό, αυτές εφαρμόστηκαν για την έρευνα της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης akt στη θέση 308, σε κατάλοιπο θρεονίνης, ώστε να βρεθεί που εντοπίζεται στο σπείραμα του νεφρού. Ακολουθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν.



Φωτογραφία όπου απεικονίζονται ποδικές εκβλαστήσεις επί της βασικής μεμβράνης. Φαίνονται κάπως και τα λεπτά διαφράγματα μεταξύ των εκβλαστήσεων καθώς και ένα μόριο πρωτεΐνης φωσφορυλιωμένης akt στη μια πλευρά του λεπτού διαφράγματος.



Άλλη μια φωτογραφία βασικής μεμβράνης με τις ποδικές εκβλαστήσεις όπου φαίνονται να εντοπίζονται δύο μόρια πρωτεΐνης φωσφορυλιωμένης akt πολύ κοντά το ένα στο άλλο. Δε φαίνεται ξεκάθαρα αν στην περιοχή βρίσκονται δύο ποδικές εκβλαστήσεις που ενώνονται με λεπτό διάφραγμα, εκτός αν στη συγκεκριμένη περιοχή η τομή είναι εγκάρσια επί του λεπτού διαφράγματος.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι προέκυψαν και εικόνες(δεν έχουν παρατεθεί) οι οποίες παρουσίασαν έντονο σήμα σωματιδίων χρυσού σε σημεία που είναι μάλλον απίθανο να εντοπίζεται η υπό μελέτη πρωτεΐνη(akt, εν προκειμένω). Αυτό μπορεί αν διορθωθεί με την περαιτέρω αύξηση της αραίωσης του αντισώματος, ώστε το διάλυμα να μην είναι πολύ πυκνό από τα σωματίδια χρυσού, καθώς η μεμβράνη formvar που χρησιμοποιείται στα grids ώστε να μην καίγονται οι τομές, προκαλεί η ίδια τη μη ειδική πρόσδεση των σωματιδίων χρυσού πάνω της(και όχι των αντισωμάτων που φέρουν τα σωματίδια χρυσού).

Συμπεράσματα

Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

1. Η αντικατάσταση και η έγκλειση με εποξικές ρητίνες παρέχει σε γενικές γραμμές καλύτερη απεικόνιση της δομής και της μορφολογίας του ιστού.
2. Από την άλλη, η ακρυλική ρητίνη δίνει επίσης πολύ καλή εικόνα της δομής καθώς και δυνατότητα ανοσοεντοπισμού, παρά τη δυσκολία στο χειρισμό και την ανάγκη για γνώση ειδικών τεχνικών χειρισμού σε χαμηλή θερμοκρασία.
3. Όσον αφορά στο συγκεκριμένο είδος κυττάρων, λαμβάνοντας υπόψιν τη μορφολογία αλλά και το ποσοστό επιτυχίας του ανοσοεντοπισμού, προκύπτει ότι:
 - a. Μονιμοποίηση με 4% PFA παρέχει καλή εικόνα της μορφολογίας και δε δείχνει να επηρεάζει αρνητικά τον ανοσοεντοπισμό. Η χρονική διάρκεια, 1 ή 2 ώρες, δε φάνηκε να έχει ένα ιδιαίτερα έντονο οπτικό αποτέλεσμα στη δομή.
 - b. Η συγκέντρωση 1:800 της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης akt στη θέση 308, έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα, ενώ πιθανή μη ειδική πρόσδεση του δευτερογενούς αντισώματος ελαχιστοποιείται με επιπλέον εκπλύσεις των grids με buffer έκπλυσης.
 - c. Με βάση τα παραπάνω, η μέθοδος που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 8 μπορεί με ασφάλεια να χαρακτηριστεί πάγια για χρήση σε ιστό από νεφρό υγιών ποντικών για εντοπισμό πρωτεϊνών με τη μέθοδο του ανοσοχρυσού.
4. Απαιτούνται επιπλέον πειράματα για να μελετηθεί ο εντοπισμός των πρωτεϊνών του σπειράματος σε ποντίκια που πάσχουν από κάποια νόσο καθώς επίσης και να μελετηθούν περιπτώσεις όπου ως μονιμοποιητικά χρησιμοποιούνται συνδυασμοί χημικών, όπως αυτοί που αναφέρονται στο υποκεφάλαιο 3.

Συζήτηση

Οι τεχνικές της αντικατάστασης, της έγκλεισης και του ανοσοεντοπισμού για ηλεκτρονική μικροσκοπία βρίσκονται σε διαρκή εξέλιξη τα τελευταία πενήντα χρόνια. Το είδος των χημικών και το εκάστοτε πρωτόκολο εξαρτώνται από το είδος του ιστού που ενδιαφέρει το μελετητή καθώς και ο σκοπός για τον οποίο προορίζεται ο ιστός.

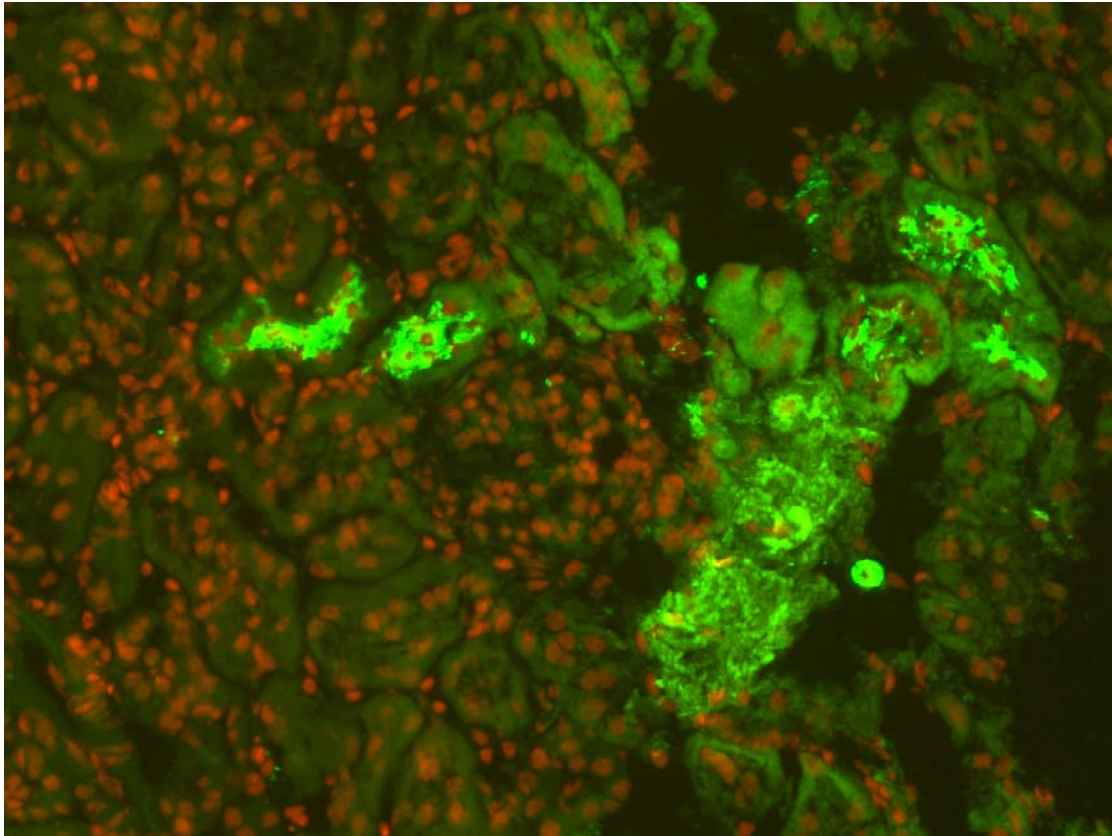
Ειδικά για τον ανοσοεντοπισμό υπάρχουν πολλές και διαφορετικές μέθοδοι, η φιλοσοφία της κάθε μιας από τις οποίες μπορεί να έρχεται σε αντίφαση με αυτή των υπολοίπων. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η χρήση γλουταραλδεΐδης κατά τη μονιμοποίηση. Σε σειρά πειραμάτων που διεξήχθησαν για την παρούσα εργασία δε διαπιστώθηκε κάποιο αξιοσημείωτο αποτέλεσμα σε ιστό που υπέστη ανοσοεντοπισμό ενώ είχε μονιμοποιηθεί με ποσότητα GDA(ποντίκια N21). Άλλοι μελετητές όμως υποστηρίζουν πως η γλουταραλδεΐδη "είναι καταστροφική για τον ανοσοχρυσό"(Γιαννακάκης, προσωπική επικοινωνία).

Άλλες μέθοδοι ανοσοεντοπισμού περιλαμβάνουν τη χρήση απορροπαντικών ενώσεων όπως το Triton X - 100, το οποίο δε χρησιμοποιήθηκε σε καμία σειρά πειραμάτων που αναφέρονται στην παρούσα εργασία. Οι απορροπαντικές ενώσεις χρησιμοποιούνται για να δημιουργούνται ανοίγματα στις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να αυξάνεται η διεισδυτικότητα των αντισωμάτων στα κύτταρα και να είναι πιο επιτυχής ο ανοσοεντοπισμός(Χαβάκη, προσωπική επικοινωνία), από την άλλη όμως, στις οδηγίες της ρητίνης αναφέρεται ότι αφού δημιουργηθεί το block δεν κινδυνεύει από κάποια επιφανειοδραστική ουσία εκτός αν αυτή είναι ο ίδιος της ο διαλύτης.

Σε κάθε περίπτωση πάντως θα πρέπει να γίνουν εκτενή πειράματα και δοκιμασίες τεχνικών οι οποίες θα αφορούν τη χρησιμοποίηση ενός και μόνο είδους ζώου το οποίο θα υποστεί ένα σύνολο εγκλείσεων με διαφορετικές παραμέτρους και στη συνέχεια το κάθε δείγμα που θα προκύψει θα πρέπει να υποστεί ανοσοεντοπισμό με κάθε πιθανό διαφορετικό πρωτόκολο ώστε με σιγουριά να μπορεί να πει κανείς ποια διαδικασία από όλες είναι η πιο σωστή και πλήρης για το συγκεκριμένο είδος ιστού.

Όσον αφορά στην εντόπιση της πρωτεΐνης Akt, θα έλεγε κανείς ότι τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία ήταν αρκετά ενθαρρυντικά. Για να υπάρχει μια ολοκληρωμένη εικόνα θα πρέπει ο αριθμός των δοκιμασιών να αυξηθεί και να συμπεριληφθούν και περιπτώσεις στις οποίες το ζώο είναι ασθενές ή έχει θεραπευθεί ώστε να ελεγχθούν και οι παθολογικές καταστάσεις. Η ακριβής θέση της φωσφορυλιωμένης μορφής της Akt στη θέση 308, με βάση πειράματα ανοσοεντοπισμού στο οπτικό μικροσκόπιο φαίνεται σε γενικές γραμμές να είναι η σωστή, μια και η akt φαίνεται να βρίσκεται στην ψυκτροειδή παρυφή αλλά και στα σπειράματα.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί, η φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης akt φαίνεται με πράσινο χρώμα, ενώ με κόκκινο φαίνονται οι πυρήνες.



Αυτή είναι και η μοναδική διαθέσιμη πληροφορία σχετικά με τον εντοπισμό της πρωτεΐνης akt αφού σε γενικότερο επίπεδο δεν έχουν γίνει μελέτες γύρω από το θέμα αυτό. Σε προηγούμενα πειράματα ανοσοφθορισμού ήμασταν σε θέση να ανακαλύψουμε ότι η akt εκφράζεται επίσης και στο σπείραμα αλλά δεν γνωρίζαμε σε ποιο ακριβώς κυτταρικό διαμέρισμα του σπείραματος.

Φαίνεται ξεκάθαρα πλέον από τα πειράματα ανοσοεντόπισης στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο ότι η akt εκφράζεται στις ποδικές εκβλαστήσεις των ποδοκυττάρων και μάλιστα σε περιοχή πλησίον του διαφράγματος της σχισμής διήθησης. Ενδέχεται επομένως η κινάση αυτή να υφίσταται φωσφορυλίωση από άλλες πρωτεΐνες του διαφράγματος όπως η νεφρίνη και ποδοσίνη.

Βιβλιογραφία

1. Mundel P, Shankland S. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 3005-3015.
2. Kestilä M, Männikkö M, Holmberg C, et al. Congenital nephrotic syndrome of the Finnish type maps to the long arm of chromosome 19. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 757-764.
3. Lenkkeri U, Männikkö M, McCready P, et al. Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 51-61.
4. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1: 575-582.
5. Patrakka J, Ruotsalainen V, Reponen P, et al. Recurrence of nephrotic syndrome in kidney grafts of patients with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type: role of nephrin. *Transplantation* 2002; 73: 394-403.
6. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83: 253-307.
7. Rodewald R, Karnovsky M. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 1974; 60: 423-433.
8. Topham P, Kawachi H, Haydar S, et al. Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin. *J Clin Invest* 1999; 104: 1559-1566.
9. Simons M, Schwarz K, Kriz W, et al. Involvement of lipid rafts in nephrin phosphorylation and organization of the glomerular slit diaphragm. *Am J Pathol* 2001; 159: 1069-1077.
10. Yuan H, Takeuchi E, Salant D. Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282: F585-591.
11. Verma R, Wharram B, Kovari I, et al. Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. *J Biol Chem* 2003; 278: 20716-20723.
12. Huber T, Hartleben B, Kim J, et al. Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 4917-4928.
13. Schwarz K, Simons M, Reiser J, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001; 108: 1621-1629.

14. Li C, Ruotsalainen V, Tryggvason K, et al. CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F785-792.
15. Shih N, Li J, Karpitskii V, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999; 286: 312-315.
16. Dreyer S, Zhou G, Baldini A, et al. Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat Genet* 1998; 19: 47-50.
17. Kawachi H, Kurihara H, Topham P, et al. Slit diaphragm-reactive nephritogenic MAb 5-1-6 alters expression of ZO-1 in rat podocytes. *Am J Physiol* 1997; 273: F984-993.
18. Macconi D, Ghilardi M, Bonassi M, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 477-489.
19. Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, et al. FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int* 2001; 59: 1003-1012.
20. Ahola H, Heikkilä E, Aström E, et al. A novel protein, densin, expressed by glomerular podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1731-1737.
21. Kerjaschki D, Sharkey D, Farquhar M. Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 1984; 98: 1591-1596.
22. Hara M, Yamamoto T, Yanagihara T, et al. Urinary excretion of podocalyxin indicates glomerular epithelial cell injuries in glomerulonephritis. *Nephron* 1995; 69: 397-403.
23. Patrie K, Drescher A, Goyal M, et al. The membrane-associated guanylate kinase protein MAGI-1 binds megalin and is present in glomerular podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 667-677.
24. Regoli M, Bendayan M. Expression of beta1 integrins in glomerular tissue of Streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Cell Biol* 1999; 77: 71-78.
25. Koukouritaki S, Tamizuddin A, Lianos E. Enhanced expression of the cytoskeleton-associated proteins paxillin and focal adhesion kinase in glomerular immune injury. *J Lab Clin Med* 1999; 134: 173-179.
26. Morino N, Matsumoto T, Ueki K, et al. Glomerular overexpression and increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase p125FAK in lupus-prone MRL/MP-lpr/lpr mice. *Immunology* 1999; 97: 634-640.
27. Bains R, Furness P, Critchley D. A quantitative immunofluorescence study of glomerular cell adhesion proteins in proteinuric states. *J Pathol* 1997; 183: 272-280.

28. Hannigan G, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, et al. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 1996; 379: 91-96.
29. Kretzler M, Teixeira V, Unschuld P, et al. Integrin-linked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria. *FASEB J* 2001; 15: 1843-1845.
30. Radeva G, Petrocelli T, Behrend E, et al. Overexpression of the integrin-linked kinase promotes anchorage-independent cell cycle progression. *J Biol Chem* 1997; 272: 13937-13944.
31. Delcommenne M, Tan C, Gray V, et al. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11211-11216.
32. Novak A, Hsu S, Leung-Hagesteijn C, et al. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 4374-4379.
33. Kobayashi N, Mominoki K, Wakisaka H, et al. Morphogenetic activity of extracellular matrices on cultured podocytes. Laminin accelerates podocyte process formation in vitro. *Ital J Anat Embryol* 2001; 106: 423-430.
34. Shirato I, Sakai T, Kimura K, et al. Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis. *Am J Pathol* 1996; 148: 1283-1296.
35. Whiteside C, Cameron R, Munk S, et al. Podocytic cytoskeletal disaggregation and basement-membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1993; 142: 1641-1653.
36. Kaplan J, Kim S, North K, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; 24: 251-256.
37. Endlich N, Kress K, Reiser J, et al. Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 413-422.
38. Reiser J, Pixley F, Hug A, et al. Regulation of mouse podocyte process dynamics by protein tyrosine phosphatases rapid communication. *Kidney Int* 2000; 57: 2035-2042.
39. Kim Y, Goyal M, Wharram B, et al. GLEPP1 receptor tyrosine phosphatase (Ptpro) in rat PAN nephrosis. A marker of acute podocyte injury. *Nephron* 2002; 90: 471-476.
40. Wharram B, Goyal M, Gillespie P, et al. Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptpro)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *J Clin Invest* 2000; 106: 1281-1290.

41. Noakes P, Miner J, Gautam M, et al. The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin beta 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta 1. *Nat Genet* 1995; 10: 400-406.
42. Cosgrove D, Rodgers K, Meehan D, et al. Integrin alpha1beta1 and transforming growth factor-beta1 play distinct roles in alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy. *Am J Pathol* 2000; 157: 1649-1659.
43. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998; 31: 335-340.
44. Brown E, Albers M, Shin T, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994; 369: 756-758.
45. Chiu M, Katz H, Berlin V. RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 12574-12578.
46. Sabatini D, Erdjument-Bromage H, Lui M, et al. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 1994; 78: 35-43.
47. Harris TE, Lawrence JC, Jr. TOR signaling. *Sci STKE* 2003; 2003: re15.
48. Jacinto E, Hall MN. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 117-126.
49. Chen J, Zheng X, Brown E, et al. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4947-4951.
50. Choi J, Chen J, Schreiber S, et al. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 1996; 273: 239-242.
51. Peterson R, Beal P, Comb M, et al. FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem* 2000; 275: 7416-7423.
52. Takahashi T, Hara K, Inoue H, et al. Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro. *Genes Cells* 2000; 5: 765-775.
53. Sekulić A, Hudson C, Homme J, et al. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res* 2000; 60: 3504-3513.

54. Brown E, Beal P, Keith C, et al. Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* 1995; 377: 441-446.
55. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006; 22: 159-168.
56. Choo A, Yoon S, Kim S, et al. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 17414-17419.
57. Peterson T, Laplante M, Thoreen C, et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 2009; 137: 873-886.
58. Guertin D, Stevens D, Thoreen C, et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* 2006; 11: 859-871.
59. Kim D, Sarbassov D, Ali S, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002; 110: 163-175.
60. Kim D, Sabatini D. Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; 279: 259-270.
61. Hara K, Maruki Y, Long X, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 2002; 110: 177-189.
62. Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem* 2003; 278: 15461-15464.
63. Beugnet A, Wang X, Proud C. Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian TOR-dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1. *J Biol Chem* 2003; 278: 40717-40722.
64. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 2006; 127: 125-137.
65. Hall M. The TOR signalling pathway and growth control in yeast. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 234-239.
66. Schmelzle T, Hall M. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000; 103: 253-262.
67. Crespo J, Hall M. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 579-591, table of contents.

68. Kim D, Sarbassov D, Ali S, et al. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 2003; 11: 895-904.
69. Oshiro N, Yoshino K, Hidayat S, et al. Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells* 2004; 9: 359-366.
70. Podsypanina K, Lee R, Politis C, et al. An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten+/- mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10320-10325.
71. Neshat M, Mellingerhoff I, Tran C, et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10314-10319.
72. Borlado LR, Redondo C, Alvarez B, et al. Increased phosphoinositide 3-kinase activity induces a lymphoproliferative disorder and contributes to tumor generation in vivo. *FASEB J* 2000; 14: 895-903.
73. Di Cristofano A, Kotsi P, Peng YF, et al. Impaired Fas response and autoimmunity in Pten+/- mice. *Science* 1999; 285: 2122-2125.
74. Oldham S, Montagne J, Radimerski T, et al. Genetic and biochemical characterization of dTOR, the Drosophila homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev* 2000; 14: 2689-2694.
75. Zhang H, Stallock J, Ng J, et al. Regulation of cellular growth by the Drosophila target of rapamycin dTOR. *Genes Dev* 2000; 14: 2712-2724.
76. Cheatham B, Vlahos C, Cheatham L, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4902-4911.
77. Chung J, Grammer T, Lemon K, et al. PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 1994; 370: 71-75.
78. Brunn G, Williams J, Sabers C, et al. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J* 1996; 15: 5256-5267.
79. Ueki K, Algenstaedt P, Mauvais-Jarvis F, et al. Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathways by three different gene products of the p85alpha regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 8035-8046.
80. Gingras A, Kennedy S, O'Leary M, et al. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 1998; 12: 502-513.
81. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; 18: 1926-1945.

82. Balendran A, Casamayor A, Deak M, et al. PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Curr Biol* 1999; 9: 393-404.
83. Chan TO, Tsichlis PN. PDK2: a complex tail in one Akt. *Sci STKE* 2001; 2001: PE1.
84. Feng J, Park J, Cron P, et al. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2004; 279: 41189-41196.
85. Kawakami Y, Nishimoto H, Kitauro J, et al. Protein kinase C beta11 regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J Biol Chem* 2004; 279: 47720-47725.
86. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; 307: 1098-1101.
87. Dong L, Liu F. PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E187-196.
88. Feldman M, Apsel B, Uotila A, et al. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* 2009; 7: e38.
89. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 2009; 122: 3589-3594.
90. Scott P, Brunn G, Kohn A, et al. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 7772-7777.
91. Reynolds Tt, Bodine S, Lawrence JJ. Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J Biol Chem* 2002; 277: 17657-17662.
92. Navé B, Ouwens M, Withers D, et al. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* 1999; 344 Pt 2: 427-431.
93. Potter C, Huang H, Xu T. *Drosophila* Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell* 2001; 105: 357-368.
94. Inoki K, Li Y, Zhu T, et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 648-657.

95. Peng X, Xu P, Chen M, et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev* 2003; 17: 1352-1365.
96. Huang J, Dibble C, Matsuzaki M, et al. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 4104-4115.
97. Saucedo L, Gao X, Chiarelli D, et al. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 566-571.
98. Sancak Y, Peterson T, Shaul Y, et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 2008; 320: 1496-1501.
99. Stocker H, Radimerski T, Schindelholz B, et al. Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 559-565.
100. Childs, G. V and Unabia G., Application of a rapid avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) technique to the localization of pituitary hormones at the electron microscopic level, *J. Histochem*, 30, 1320, 1982
101. Sternberger, L. A. et al., The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex(horse-radish peroxidase – antihorse-radish peroxidase) and its use in identification of spirochetes, *J. Histochem*, 18 315, 1970
102. Slot, J. W. and Geuze, H. J. , A new method of preparing gold probes for multi-labeling cytochemistry, *Eur. J. Cell Biol.*, 38, 87, 1985
103. Horisberger, M. and Rosset, J., Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy, *J. Cytochem.*, 25, 295, 1977
104. Slot, J. W. and Geuze, H. J. , Sizing of protein A-colloidal gold probes for immunoelectron microscopy, *J. Cell Biol.*, 90, 533, 1981
105. Horisberger, M., Colloidal gold: a cytochemical marker for light and fluorescent microscopy and for transmission and scanning electron microscopy, in *Scanning electron microscopy*, vol. 2, Johari, O., Ed., SEM Inc., AMF O'Hare, Chicago, 1981
106. Horisberger, M., Electron-opaque markers a review in *Immunolabeling for Electron Microscopy*, Polak, J. M. and Varndell, I. M., Eds., Elsevier, Amsterdam, 1984

107. Handley, D. A., Methods of synthesis of colloidal gold, in *Colloidal Gold, Principles, Methods and Applications*, vol. 1, Hayat, M. A., Ed., Academic Press, San Diego, 1989

108. Baschong, W. and Stierhof, Y. D., Preparation, use and enlargement of ultrasmall gold particles in immunoelectron microscopy, *Microsc. Res. Tech.*, 42, 66, 1998

109. Hainfeld, J. F. and Furuya, F. R., A 1.4-nm gold cluster covalently attached to antibodies improves immunolabeling, *J. Histochem. Cytochem.*, 40, 177, 1992

110. Hainfeld, J. F. and Powell, R. D., New frontiers in gold labeling, *J. Histochem. Cytochem.*, 48, 471, 2000

111. Hainfeld, J. F., A small gold-conjugated antibody label: improved resolution for electron microscopy, *Science*, 236, 450, 1987

112. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens, Audrey M. Glauert, 1975, North-Holland Publishing Company

113. Principles of physiology, second edition, Robert M. Berne, Matthew N. Levy, 1996, Mosby-Year Book Inc.