



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΣΥΜΜΕΤΕΧΕΙ
Η ΝΕΥΡΟΕΙΔΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΒΜ88/CEND1**

Κωνσταντίνος Τσιώρας

Βιολόγος

Αθήνα, 2014



NATIONAL CAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
FACULTY OF SCIENCES
SCHOOL OF BIOLOGY
DEPARTMENT OF ANIMAL AND HUMAN PHYSIOLOGY

PhD THESIS

**SIGNALING PATHWAYS INVOLVING THE NEURONAL SPECIFIC
PROTEIN BM88/CEND1**

Konstantinos Tsioras

Biologist

Athens, 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δρ. Σπύρος Ευθυμιάπουλος, Καθηγητής (Επιβλέπων), Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρ. Αικατερίνη Γαϊτανάκη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρ. Ρεβέκκα Μάτσα, Ερευνήτρια Α΄, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δρ. Σπύρος Ευθυμιάπουλος, Καθηγητής (Επιβλέπων), Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρ. Αικατερίνη Γαϊτανάκη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρ. Κωνσταντίνος Βοργιάς, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρ. Ιωάννης Τρουγκάκος, Επικ. Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρ. Φωτεινή Στυλιανοπούλου, Καθηγήτρια, Τμήμα Νοσηλευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρ. Ρεβέκκα Μάτσα, Ερευνήτρια Α΄, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Δρ. Μαρία Γαϊτάνου, Ερευνήτρια Γ΄, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ υπό την επίβλεψη του τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επιβλέποντές μου Καθηγητές Σπύρο Ευθυμίου και Αικατερίνη Γαϊτανάκη, μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, για την συμβολή τους στην επιστημονική μου κατάρτιση, νωρίς από τις προπτυχιακές σπουδές έως και την υποστήριξη της διατριβής μου με ουσιαστικές και χρήσιμες υποδείξεις. Ευχαριστώ και τα μέλη της επταμελούς μου εξεταστικής επιτροπής Δρ. Κωνσταντίνο Βοργιά, Δρ. Ιωάννη Τρουγκάκο και Δρ. Φωτεινή Στυλιανοπούλου για τη δική τους συμβολή στην ολοκλήρωση της διατριβής. Ευχαριστώ ιδιαίτερος τις ερευνήτριες του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ Δρ. Ρεβέκκα Μάτσα, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας και Δρ. Μαρία Γαϊτάνου για την καθοριστική τους επίβλεψη και καθοδήγηση σε όλη την πορεία της διδακτορικής μου διατριβής, από τα πρώτα βήματά μου στον εργαστηριακό χώρο έως και την ολοκλήρωσή της. Θερμές ευχαριστίες και στους συναδέλφους Δρ. Φλωρεντία Παπαστεφανάκη και Δρ. Παναγιώτη Πολίτη μεταξύ άλλων και για την καίρια συνδρομή τους στη δημοσίευση της παρούσας μελέτης, καθώς επίσης και στη Δρ. Γεωργία Κουρούπη για το ενδιαφέρον και την εν γένει συνεισφορά της όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» οφείλω σαφώς σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, πρώην και νυν, για την πολύπλευρη προσφορά τους αλλά και τη μεταξύ μας αγαστή συνεργασία, παράγοντες που συνέβαλαν αποφασιστικά στην ομαλή διεξαγωγή του έργου μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Ευθύμιο και Ελένη και την αδελφή μου Μαριάννα, για την αμέριστη ηθική και οικονομική τους στήριξη, δίχως την οποία η παρούσα διατριβή δεν θα είχε εκπονηθεί, καθώς και τη Μαρκέλλα Ζαννίκου, συνοδοιπόρο μου σ' ένα μεγάλο μέρος αυτής της απαιτητικής περιόδου για την συμπαράσταση και την υπομονή της.

...στους γονείς μου, Ευθύμιο και Ελένη.

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

N. 5343/1932 άρθρο 202

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	1
1.2 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	3
1.2.1 Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)	3
1.2.2 Το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ)	5
1.3 Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	6
1.4 Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΣΗΣ	8
1.5 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗ ΓΕΝΕΑΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	11
1.5.1 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και κυτταρική διαφοροποίηση	12
<i>1.5.1.1 Κυκλίνες και κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες</i>	<i>14</i>
<i>1.5.1.2 Αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKis)</i>	<i>19</i>
1.5.2 Η ρύθμιση των επιπέδων της κυκλίνης D1 στη μετάβαση G1/S του κυτταρικού κύκλου	21
<i>1.5.2.1 Η εξαρτώμενη από την GSK3β αποικοδόμηση της κυκλίνης D1</i>	<i>21</i>
<i>1.5.2.2 Η ανεξάρτητη από την GSK3β αποικοδόμηση της κυκλίνης D1</i>	<i>22</i>
<i>1.5.2.2.1 Η κινάση Mirk/ Dyrk1B</i>	<i>25</i>
<i>1.5.2.2.2 Η κινάση Dyrk1A</i>	<i>26</i>
1.5.3 Μόρια-ρυθμιστές της μοίρας των νευρικών προγονικών κυττάρων	27
<i>1.5.3.1 Προνευρικά γονίδια: γενικά χαρακτηριστικά</i>	<i>27</i>
<i>1.5.3.1.1 Σημαντικά προνευρικά γονίδια που κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες</i>	<i>28</i>
<i>1.5.3.2 Τα μορφογόνα και ο ρόλος τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον καθορισμό της κυτταρικής ταυτότητας</i>	<i>31</i>
<i>1.5.3.2.1 Οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (Fibroblasts Growth Factors, FGFs)</i>	<i>32</i>

1.5.3.2.2 Το μονοπάτι σηματοδότησης <i>Sonic hedgehog (Shh)</i>	32
1.5.3.2.3 Το μονοπάτι σηματοδότησης των <i>Wnts</i>	33
1.5.3.2.4 Οι πρωτεΐνες <i>BMPs</i> δύνανται να ρυθμίζουν το μονοπάτι σηματοδότησης των <i>Wnts</i>	34
1.6 Η ΝΕΥΡΟΕΙΔΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ <i>BM88/CEND1</i>	35
1.7 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ <i>BM88/ CEND1</i>	40
1.7.1 Η πρωτεΐνη <i>RanBPM</i>: γενικά χαρακτηριστικά	40
1.7.2 Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της <i>RanBPM</i>	42
1.7.2.1 Συμμετοχή στη σταθερότητα αλληλεπιδρουσών πρωτεϊνών	42
1.7.2.2 Συμμετοχή στη ρύθμιση αναπτυσσιακών κυτταρικών διαδικασιών	43
1.7.2.3 Η <i>RanBPM</i> ως ρυθμιστική πρωτεΐνη της μεταγραφικής ενεργότητας	43
1.7.2.4 Η δράση της <i>RanBPM</i> σε κύτταρα του νευρικού συστήματος	45
1.7.2.5 Η δράση της <i>RanBPM</i> στον κυτταρικό κύκλο	46
1.7.2.6 Η αλληλεπίδραση της <i>RanBPM</i> με την <i>Mirk/Dyrk1B</i>	47
1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	47
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
2.1 ΥΛΙΚΑ	49
2.1.1 ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	49
2.1.1.1 Χημικά αντιδραστήρια	49
2.1.1.2 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας	49
2.1.1.3 Οροί	49
2.1.1.4 Ένζυμα	50
2.1.1.5 Αντισώματα και μόρια ιχνηθέτησης	50
2.1.1.6 Αντιβιοτικά	52
2.1.1.7 Ραδιενεργά υλικά	52
2.1.1.8 Αναισθητικά	52

2.1.1.9 Άλλα βιολογικά αντιδραστήρια	52
2.1.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	53
2.1.2.1 Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας	53
2.1.2.2 Θρεπτικά υλικά για βακτηριακές καλλιέργειες	53
2.1.2.3 Ρυθμιστικά διαλύματα	54
2.1.2.4 Διαλύματα τεχνικών πρωτεομικής	55
2.1.2.5 Διαλύματα ανοσοκυτταροχημείας και ανοσοφθορισμού	58
2.1.2.6 Αναστολείς	59
2.1.2.7 Διαλύματα GST-καταβυθίσεων	59
2.1.2.8 Διαλύματα απομόνωσης πρωτεϊνών από βακτηριακά έγκλειστα σωμάτια (<i>inclusion bodies</i>)	59
2.1.2.9 Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA σε μικρή και μεγάλη κλίμακα	60
2.1.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	61
2.1.4 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	62
2.1.5 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	62
2.1.6 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ	62
2.1.7 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	65
2.1.7.1 Όργανα και συσκευές	65
2.1.7.2 Γυαλικά, πλαστικά και λοιπά υλικά	66
2.1.7.3 Μικροσκόπια και λογισμικά επεξεργασίας εικόνας	67
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	68
2.2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	68
2.2.1.1 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών <i>Neuro-2a</i> και <i>HEK293T</i>	68
2.2.1.2 Παροδικός μετασχηματισμός της κυτταρικών σειρών <i>Neuro-2a</i> και <i>HEK293T</i> με πλασμιδιακούς φορείς για την εξωγενή υπερέκφραση πρωτεϊνών	68

2.2.1.3 Πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων φλοιού εγκεφάλου από έμβρυο ποντικού	69
2.2.2 ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	70
2.2.2.1 Χειρουργική αφαίρεση εγκεφάλων ποντικών	70
2.2.2.2 Παρασκευή πρωτεϊνικού ομογενοποιημάτος από εγκέφαλο ποντικού	70
2.2.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	71
2.2.3.1 Συλλογή και λύση κυττάρων για την παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος	71
2.2.3.2 Απομόνωση πυρηνικού και κυτταροπλασματικού κλάσματος κυττάρων <i>Neuro-2a</i>	71
2.2.3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο <i>Lowry</i>	72
2.2.3.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου, παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (<i>SDS</i>), (<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> , <i>SDS-PAGE</i>)	72
2.2.3.5 Χρώση των πρωτεϊνικών ζωνών με διάλυμα <i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	73
2.2.3.6 Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη και δημιουργία ανοσοαποτυπώματος (<i>western blot</i>)	73
2.2.3.7 Ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών: Μέθοδος ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (<i>Enhanced Chemo-Luminescence</i>)	74
2.2.3.8 Ανοσοκυτταροχημεία-Ανοσοφθορισμός	75
2.2.3.9 Συν-ανοσοκατακρημνίσεις	77
2.2.3.10 <i>GST</i> -κατακρημνίσεις	78
2.2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	79
2.2.4.1 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	79
2.2.4.2 Πέψη <i>DNA</i> με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	80
2.2.4.3 Καθαρισμός <i>DNA</i> από πήκτωμα αγαρόζης με τη συστηματοποιημένη μέθοδο <i>QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN Inc.)</i>	80
2.2.4.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (<i>PCR</i>)	81

2.2.4.5 Καθαρισμός προϊόντων αντίδρασης PCR με τη συστηματοποιημένη μέθοδο QIAquick purification kit (QIAGEN Inc.)	82
2.2.4.6 Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA	83
2.2.4.7 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA με τη χρήση T4 DNA λιγάσης	83
2.2.4.8 Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού σοκ	84
2.2.4.9 Παρασκευή και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με τη συστηματοποιημένη μέθοδο της QIAGEN Inc.	85
2.2.4.10 Παρασκευή και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxi prep)	86
2.2.4.11 Έκφραση και απομόνωση GST-χιμαιρικών πρωτεϊνών σε βακτήρια	87
2.2.4.12 In vitro σύνθεση ραδιενεργά σημασμένων πρωτεϊνών	89
2.2.4.13 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα Neuro-2a	90
2.2.4.14 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε προϊόν αντίστροφης μεταγραφής (Real-time RT-qPCR)	91
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	95
3.1 Η πρωτεΐνη BM88/Cend1 αλληλεπιδρά με την RanBPM	95
3.1.1 Η χιμαιρική πρωτεΐνη GST-Cend1 καταβυθίζει την in vitro συντιθέμενη και ραδιενεργά σημασμένη περιοχή ³⁵ S-SPRY-LiSH-CTLH της RanBPM	97
3.1.2 Η χιμαιρική πρωτεΐνη GST-RanBPM καταβυθίζει την BM88/Cend1 από ομογενοποίηση εγκεφάλου ενήλικου ποντικού	98
3.1.3 Η χιμαιρική πρωτεΐνη GST-Cend1 καταβυθίζει την FLAG-RanBPM από εκχύλισμα κυττάρων HEK293T	99
3.1.4 Η πρωτεΐνη BM88/Cend1 συν-ανοσοκατακρημνίζεται με την RanBPM σε κύτταρα HEK293T	100
3.1.5 Η πρωτεΐνη BM88/Cend1 συνεντοπίζεται ενδοκυτταρικά με την RanBPM σε κύτταρα Neuro-2a, όπου τα δύο μόρια συνεκφράζονται	102

3.2 Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών BM88/Cend1 και RanBPM οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της κυκλίνης D1 και αυξημένη ενσωμάτωση 5-βρωμο-2'-δεόξυ-ουριδίνης (BrdU)	104
3.3 Οι πρωτεΐνες Cend1, RanBPM και Mirk/Dyrk1B εκφράζονται στον εγκέφαλο του ποντικού και σχηματίζουν συμπλέγματα	108
3.4 In vitro μελέτη της δράσης της κινάσης Mirk/Dyrk1B στα Neuro-2a κύτταρα	112
3.5 Η RanBPM διευκολύνει την αποικοδόμηση της Dyrk1B μέσω πρωτεασώματος, σταθεροποιώντας την κυκλίνη D1	118
3.6 Οι λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Cend1, RanBPM και Dyrk1B επηρεάζουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1	122
3.7 Οι αλληλεπιδράσεις της RanBPM είτε με την Dyrk1B είτε με τη Cend1, επηρεάζουν τη διαφοροποίηση των Neuro-2a κυττάρων	124
3.8 Οι πρωτεΐνες Cend1, RanBPM και Dyrk1B εκφράζονται ενδογενώς σε πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιικών νευρώνων ποντικού	127
3.9 Μελέτη της έκφρασης των Cend1, RanBPM και Dyrk1B σε εγκεφάλους ποντικών αγρίου τύπου (wt) και ποντικών με κατεσταλμένο το γονίδιο της Cend1 (KO-Cend1)	129
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	132
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	141
6. ABSTRACT	144
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	146

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΜΒ	Μοριακό Βάρος
ΠΝΣ	Περιφερικό Νευρικό Σύστημα
ΑΡ	Androgen Receptor, υποδοχέας ανδρογόνων
BMPs	Bone morphogenetic proteins, πρωτεΐνες μορφογένεσης των οστών
BP	Basal Progenitors, βασικά προγονικά κύτταρα
bp	base pair, ζεύγος βάσεων
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine, 5-βρωμο-2-δεοξυουριδίνη
BSA	Bovine Serum Albumin, αλβουμίνη από ορό βοδιού
CDKs	Cyclin Dependent Kinases, κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες
CDKis	Cyclin Dependent Kinases inhibitors, αναστολείς κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών
CEND1	cell cycle exit and neuronal differentiation 1
cDNA	complementary DNA, συμπληρωματικό DNA
CITK	Citron Kinase
CMV	cytomegalovirus, κυτταρομεγαλοϊός
CTL	Control, μάρτυρας
CTLH	C-terminal to LisH (αμινοξικό μοτίβο)
CRA	CT11- RanBPM (αμινοξικό μοτίβο)
CREB	CAMP Response Element-Binding protein , μεταγραφικός παράγοντας που προσδένεται στις αλληλουχίες DNA CRE
d.d.H2O	deionised, distilled water, δισ-απεσταγμένο και απιονισμένο νερό
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethyl-sulfoxide, διμεθυλο-σουλφοξειδίο
DNA	Deoxyribonucleic acid, δεοξυ-ριβονουκλεϊκό οξύ
DNase	δεοξυριβονουκλεάση
dNTP	τριφωσφορικό δεοξυνοουκλεοτίδιο
DTT	διθειοθρεϊτόλη
EDTA	αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ

EGF	Epidermal growth factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
FCS	Foetal Calf Serum, ορός από έμβryo μοσχαριού
bFGF or FGF-2	basic fibroblast growth factor ή fibroblast growth factor-2, βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης
GLAST	Glutamate Aspartate Transporter, μεταφορέας γλουταμικού οξέος
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein, όξινη ινιδιακή πρωτεΐνη της γλοΐας
GFP	green fluorescent protein, πράσινη φθορίζουσα χρωστική
GR	Glucocorticoid Receptor, υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3β, κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου
GST	Glutathione S-transferase
HBS	Hepes buffer saline (ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα)
HDAC	Histone Deacetylase, αποακετυλάση των ιστονών
HEK293T	Human Embryonic Kidney 293T cells, ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού 293T
HGF	Hepatocyte Growth Factor, αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων
HNF1a	Hepatocyte Nuclear Factor 1a, μεταγραφικός παράγοντας ηπατοκυττάρων
IF	Immunofluorescence, ανοσοφθορισμός
Kb	kilo base pair
kDa	kilo Dalton
LB medium	Luria-Bertani medium (θρεπτικό υλικό βακτηρίων)
LFA-1	Lymphocyte-Function-Associated antigen 1
LisH	Lissencephaly type-1-like homology
MBP	myelin basic protein, βασική πρωτεΐνη της μυελίνης
Mgl-1	Mammalian lethal giant larvae-1
Mirk/Dyrk1B	Minibrain related kinase/ Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1B
mRNA	messenger RNA, αγγελιαφόρο RNA
NCAM	neural cell adhesion molecule, νευρικό μόριο κυτταρικής συνάφειας

NE	Neuroepithelial cells, νευροεπιθηλιακά κύτταρα
NGF	Nerve Growth Factor, αυξητικός νευρικός παράγοντας
NGS	normal goat serum, ορός αίγας
NLS	Nuclear localization signal, σήμα πυρηνικού εντοπισμού
NPCs	Neural Progenitor Cells, Νευρικά Προγονικά Κύτταρα
NTs	Neurotrophins, νευροτροφίνες
OD	Optical Density, οπτική πυκνότητα
O/N	Over-night, κατά τη διάρκεια της νύχτας (12ωρη επώαση)
p75NTR	pan-neurotrophin receptor 75 kDa
PBS	Phosphate Buffered Saline
pCMV	porcine cytomegalovirus
PCR	Polymerase Chain reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl Fluoride
Prox1	Prospero-related homeobox 1
RanBPM	Ran Binding Protein M
Rb	Retinoblastoma protein, πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος
RG	Radial Glial cells, ακτινωτά κύτταρα γλοίας
RNA	Ribonucleic acid, ριβονουκλεϊκό οξύ
RNAasin	RNase inhibitor, αναστολέας ριβονουκλεασών
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε προϊόν αντίστροφης μεταγραφής
SDS	sodium-dodecyl-sulphate, δωδεκυλικό σουλφοξείδιο του νατρίου
SDS-PAGE	sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου με SDS
SH3	Src homology 3 (αμινοξικό μοτίβο)
Shh	Sonic hedgehog
shRNA	small hairpin RNA, μικρού μεγέθους RNA με μορφή φουρκέτας
siRNA	small interfering RNA, μικρό παρεμποδιστικό RNA
SPRY	Spore lysis A and ryanodine receptor domain (αμινοξικό μοτίβο)
TAFs	TBP-associated factors, παράγοντες συνεργαζόμενοι με την πρωτεΐνη TBP
TBE	Tris Borate-EDTA buffer

TBP	TATA-binding protein, πρωτεΐνη που προσδέεται στην αλληλουχία TATA
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris/EDTA buffer
TEMED	N,N,N,N'-τετραμεθυλική διαμίνη
TR	Thyroid hormone Receptor, υποδοχέας θυρεοειδικών ορμονών
Trk	Tropomyosin-receptor-kinase, υποδοχέας κινάσης τυροσίνης των νευροτροφινών
USP11	ubiquitin specific peptidase 11, ειδική πεπτιδάση ουβικιτινών
UV	Ultra-violet, υπεριώδης
WB	Western blot, ανοσοαποτύπωμα
YPEL	yippee-like protein

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μελέτη ενός ιδιαίτερα πολύπλοκου Συστήματος όπως το Νευρικό που ελέγχει τόσο βασικές όσο και ανώτερες πνευματικές λειτουργίες του ανθρώπου, αποτελεί αναμφίβολα ένα συναρπαστικό πεδίο συστηματικής και διαρκώς εξελισσόμενης έρευνας. Η ανάπτυξη των κυττάρων του νευρικού ιστού, η διαφοροποίησή τους προς συγκεκριμένους τύπους και ο σχηματισμός πολύπλοκων δικτύων μεταξύ τους, είναι ζωτικής σημασίας για τους οργανισμούς, καθώς ρυθμίζουν μεταξύ άλλων την κίνηση, την εύρυθμη λειτουργία εσωτερικών οργάνων, την πρόσληψη ερεθισμάτων απ' το περιβάλλον, την απόκρισή τους σε αυτά. Ανώτερες νοητικές διεργασίες όπως η σκέψη, η μνήμη, η μάθηση, η ομιλία, τα συναισθήματα που στο σύνολό τους συνιστούν τη συμπεριφορά, εδράζονται σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου και κατέστησαν τον άνθρωπο το καλύτερα προσαρμοσμένο είδος κατά τη διάρκεια της εξελικτικής του πορείας. Η αποκρυπτογράφηση των σηματοδοτικών μηχανισμών που - ούτε λίγο ούτε πολύ- καθορίζουν την ίδια την ύπαρξη του ανθρώπου, αναμένεται να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες τόσο για τη φυσιολογία του Νευρικού Συστήματος όσο και για την επιδιόρθωση παθολογικών καταστάσεων που ανακύπτουν σε περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, ή βλάβης των επιμέρους δομών του.

1.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Η πολυπλοκότητα της λειτουργίας του Νευρικού Συστήματος, αντικατοπτρίζεται στην ποικιλία και την εξειδίκευση των κυττάρων που το απαρτίζουν. Βάσει των χαρακτηριστικών και του ρόλου τους, τα κύτταρα του Νευρικού συστήματος κατατάσσονται σε δύο κύριες κατηγορίες: α) στους *νευρώνες* και β) στα *κύτταρα γλοίας*.

Οι *νευρώνες*, οι βασικές μονάδες μετάδοσης νευρικών σημάτων-ώσεων στο νευρικό σύστημα, ποικίλλουν ως προς τη μορφή και το μέγεθος και διαθέτουν τέσσερις μορφολογικά διακριτές περιοχές: το *κυτταρικό σώμα*, τους *δενδρίτες*, το *νευράξονα* και τα *προσυναπτικά τελικά κομβία*. Το κυτταρικό σώμα, περιέχει τον πυρήνα και τα ριβοσώματα, ενώ οι денδρίτες σχηματίζουν μια σειρά από εκβλαστήσεις με πολλές διακλαδώσεις κατάλληλα διαμορφωμένες ώστε να δέχονται ένα μεγάλο αριθμό τελικών απολήξεων από άλλα κύτταρα. Ο νευράξονας, που συχνά αποκαλείται και νευρική ίνα, είναι μια μονήρης μακριά αποφυάδα που εκτείνεται από το κυτταρικό σώμα μέχρι τα κύτταρα-στόχους. Μάλιστα, όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός διακλάδωσης του κυρίου άξονα και των

παράπλευρων νευραξόνων του, τόσο μεγαλύτερη είναι και η σφαίρα επιρροής ενός κυττάρου. Κάθε κλάδος τερματίζει σε μία *αξονική απόληξη* (ή αξονικό τερματικό ή τελικό κομβίο) που είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών (Arthur J. Vander 2001).

Οι νευρώνες διαιρούνται λειτουργικά σε τρεις κατηγορίες: τους *προσαγωγούς* ή *κεντρομόλους*, τους *απαγωγούς* ή *φυγόκεντρους* και τους *διανευρώνες* ή *διάμεσους νευρώνες*. Οι προσαγωγοί, μεταφέρουν πληροφορίες από τους ιστούς και τα όργανα στο ΚΝΣ, ενώ οι απαγωγοί άγουν ηλεκτρικές ώσεις από το ΚΝΣ προς την περιφέρεια, τα εκτελεστικά κύτταρα. Τέλος, οι διανευρώνες, συνδέουν νευρώνες μέσα στο ΚΝΣ και αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα, καθώς υπολογίζεται πως σε κάθε προσαγωγό νευρώνα που εισέρχεται στο ΚΝΣ, αντιστοιχούν 10 απαγωγοί και 200.000 διανευρώνες.

Η ανατομικά εξειδικευμένη σύνδεση μεταξύ δύο νευρώνων, όπου ο ένας τροποποιεί τη δραστηριότητα του άλλου ονομάζεται *σύναψη*. Ο νευρώνας που άγει σήματα προς μία σύναψη ονομάζεται *προσυναπτικός*, ενώ εκείνος που απομακρύνει σήματα από μία σύναψη *μετασυναπτικός*. Στις περισσότερες συνάψεις, το σήμα μεταδίδεται από τον ένα νευρώνα στον άλλον με τη βοήθεια νευροδιαβιβαστών (χημικές συνάψεις), σε αντίθεση με τις ηλεκτρικές όπου οι κυτταροπλασματικές μεμβράνες των προ- και μετα-συναπτικών νευρώνων ενώνονται με χασματικές συνδέσεις, επιτρέποντας στα τοπικά ηλεκτρικά ρεύματα να μετακινηθούν μέσω των συνδετικών διαύλων σε μια από τις δύο κατευθύνσεις (Arthur J. Vander 2001).

Οι νευρώνες αποτελούν περίπου το 10% των κυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Τα υπόλοιπα είναι **νευρογλοιακά κύτταρα ή νευρογλοία** που υποστηρίζουν φυσιολογικά και μεταβολικά τους νευρώνες. Υπάρχουν τέσσερις βασικοί τύποι γλοιοκυττάρων:

1) Τα *αστροκύτταρα*, που εμφανίζουν πολυάριθμες αποφύσεις ακτινωτά γύρω από το κύτταρο, δίνοντας την εικόνα αστεριού. Μέσα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), κάποιες από τις απολήξεις καταλήγουν στην επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων. Τα αστροκύτταρα που εδρεύουν στη λευκή ουσία του εγκεφάλου καλούνται *ινώδη (fibrous astrocytes)*, λόγω του μεγάλου αριθμού των νευροϊνιδίων που είναι παρόντα στο κυτταρόπλασμα του σώματος και των αποφύσεων. Εκείνα πάλι που εντοπίζονται στη φαιά ουσία, διαθέτουν λιγότερα νευροϊνίδια και καλούνται *πρωτοπλασματικά (protoplasmic astrocytes)*. Τα αστροκύτταρα, συμβάλλουν στην ομοίωση της συγκέντρωσης του καλίου και του γλουταμικού οξέος στον εξωκυττάριο χώρο του CNS. Επιπρόσθετα, παρέχουν δομική στήριξη στους νευρώνες, ενώ συμμετέχουν και σε επιδιορθωτικές διεργασίες σε περιπτώσεις τραυματισμού των προαναφερθέντων.

2) Τα *ολιγοδενδροκύτταρα*, που φέρουν λιγότερους και λεπτότερους βραχίονες συγκριτικά με τα αστροκύτταρα και διαθέτουν σχετικά μικρό ποσό νευροϊνιδίων. Βασική τους λειτουργία είναι ο σχηματισμός μυελίνης που περιβάλλει τους άξονες στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), ενώ έχει προταθεί και η «συμβιωτική» τους σχέση με ορισμένους νευρώνες, υπό την έννοια της μεταξύ τους ανταλλαγής μεταβολικών προϊόντων.

3) Η *μικρογλοία*, που είναι υπεύθυνη για τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος στο ΚΝΣ. Πιο συγκεκριμένα, αποτελείται από μικρά κύτταρα, διάσπαρτα μέσα στο νευρικό σύστημα, τα οποία, οπουδήποτε υφίσταται τραυματισμός ή εκφυλισμός, πολλαπλασιάζονται, μετασχηματίζονται σε μεγάλα μακροφάγα και μετακινούμενα, φαγοκυτταρώνουν κάθε κυτταρικό ή άλλο θραύσμα.

4) Τα *κύτταρα Schwann*, τα νευρογλοιακά κύτταρα του περιφερικού νευρικού συστήματος, που έχουν τις περισσότερες από τις ιδιότητες της νευρογλοίας του κεντρικού νευρικού συστήματος, με σημαντικότερη εκείνη της κατασκευής μυελίνης γύρω από τους άξονες των νευρώνων.

1.2 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Οι δομές του Νευρικού Συστήματος αν και στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους, διακρίνονται στο *Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)*, που περιλαμβάνει αδρά τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό και το *Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ)* που περιλαμβάνει τα νεύρα που εκτείνονται από τον εγκέφαλο ή το νωτιαίο μυελό προς την περιφέρεια (μυς, αδένες, αισθητήρια όργανα).

1.2.1 Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)

Τα κύρια μέρη από τα οποία απαρτίζεται το ΚΝΣ είναι: 1) *ο νωτιαίος μυελός*, 2) *το εγκεφαλικό στέλεχος*, 3) *η παρεγκεφαλίδα* και 4) *ο πρόσθιος εγκέφαλος* (Εικ.1.1) (Arthur J. Vander 2001).

Ο *νωτιαίος μυελός*, αποτελεί το πιο ουραίο τμήμα του ΚΝΣ που δέχεται και επεξεργάζεται αισθητικές πληροφορίες από το δέρμα, τις αρθρώσεις και τους μυς των άκρων και του κορμού ελέγχοντας τις κινήσεις αυτών. Υποδιαιρείται σε αυχενική, θωρακική, οσφυϊκή και ιερή μοίρα.

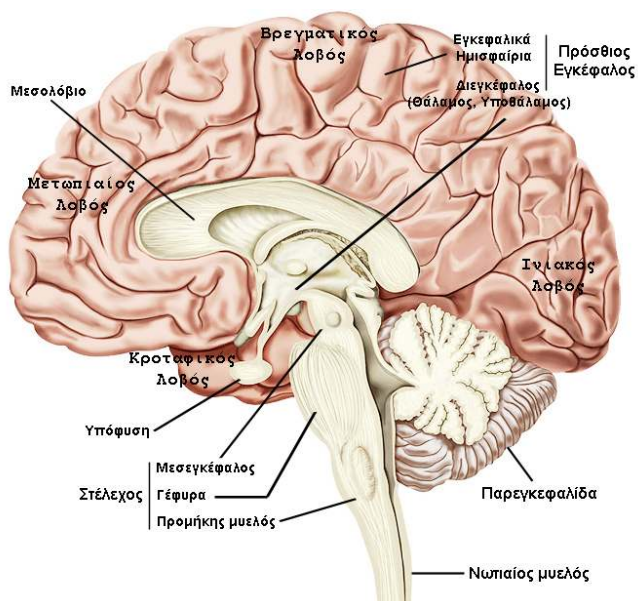
Το *εγκεφαλικό στέλεχος* συνίσταται από τον *προμήκη μυελό*, τη *γέφυρα* και το *μεσεγκέφαλο* και από αυτό διέρχονται όλες οι νευρικές ίνες που φέρουν πληροφορίες μεταξύ νωτιαίου μυελού, πρόσθιου εγκεφάλου και παρεγκεφαλίδας. Ο προμήκης μυελός, βρίσκεται ακριβώς επάνω από το νωτιαίο μυελό και περιλαμβάνει κέντρα υπεύθυνα για αρκετές ζωτικές αυτόνομες λειτουργίες όπως η πέψη, η

αναπνοή και ο έλεγχος του καρδιακού ρυθμού. Η γέφυρα, μεταφέρει πληροφορίες σχετικές με την κίνηση από τα εγκεφαλικά ημισφαίρια προς την παρεγκεφαλίδα, ενώ ο μεσεγκέφαλος ή μέσος εγκέφαλος τοποθετείται πάνω από τη γέφυρα και ελέγχει πολλές αισθητικές και κινητικές λειτουργίες, περιλαμβανομένων των οφθαλμικών κινήσεων και του συντονισμού των οπτικών και ακουστικών αντανακλαστικών.

Η *παρεγκεφαλίδα*, βρίσκεται πίσω από το στέλεχος και αποτελεί κέντρο του συντονισμού των κινήσεων και του ελέγχου της στάσης και της ισορροπίας. Λαμβάνει πληροφορίες από τους μυς και τις αρθρώσεις, το δέρμα, τους οφθαλμούς και τα ότα, τα σπλάχνα και από τα μέρη του εγκεφάλου που παίζουν ρόλο στον έλεγχο της κίνησης.

Ο *πρόσθιος εγκέφαλος* αποτελείται από τα δύο *εγκεφαλικά ημισφαίρια* στο μεγαλύτερο μέρος του και από το *διεγκέφαλο* στο κεντρικό του τμήμα. Τα εγκεφαλικά ημισφαίρια συνίστανται από τον εγκεφαλικό φλοιό, ένα εξωτερικό κέλυφος φαιάς ουσίας (αθροίσματα σωμάτων των νευρώνων) που καλύπτει τη λευκή ουσία (εμμύελες νευρικές ίνες). Οι εγκεφαλικές λειτουργίες που σχετίζονται με τις γνωστικές μας ικανότητες εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Σε κάθε ένα από τα ημισφαίρια, ο φλοιός διαιρείται σε τέσσερις ανατομικά διακριτούς λοβούς: το μετωπιαίο, το βρεγματικό, τον κροταφικό και τον ινιακό, τα ονόματα των οποίων προκύπτουν από τα αντίστοιχα των υπερκείμενων οστών του κρανίου. Οι λοβοί αυτοί έχουν εξειδικευμένες λειτουργίες. Ο μετωπιαίος λοβός σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τον προγραμματισμό της μελλοντικής δράσης και με τον έλεγχο της κίνησης. Ο βρεγματικός λοβός σχετίζεται με τη σωματική αισθητικότητα και τη σωματική εικόνα, ενώ ο ινιακός με την όραση. Τέλος ο κροταφικός λοβός σχετίζεται με την ακοή και μέσω των εν τω βάθει δομών -του ιπποκάμου και της αμυγδαλής- με πλευρές της μάθησης, της μνήμης και του συναισθήματος. Αν και το πάχος του είναι μόνο 3 mm κατά μέσο όρο, ο εγκεφαλικός φλοιός παρουσιάζει πολλές αναδιπλώσεις με αποτέλεσμα ν' αυξάνει το εμβαδό του χωρίς να μεταβάλλεται ο όγκος του. Τα χαρακτηριστικά ελικοειδή επάρματα που σχηματίζονται από τις αναδιπλώσεις ονομάζονται έλικες και μεταξύ αυτών παρεμβάλλονται οι αύλακες. Οι υποφλοιικοί πυρήνες είναι ετερογενείς ομάδες φαιάς ουσίας, που βρίσκονται βαθιά μέσα στα εγκεφαλικά ημισφαίρια. Τα βασικά γάγγλια κατέχουν εξέχουσα θέση μεταξύ των πυρήνων των ημισφαιρίων, παίζοντας σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της κίνησης και της στάσης αλλά και σε πιο σύνθετες συμπεριφορές. Ο *διεγκέφαλος* ή *διάμεσος εγκέφαλος*, η δεύτερη σημαντική δομή του προσθίου εγκεφάλου, συνίσταται από το *θάλαμο* και τον *υποθάλαμο*. Ο *θάλαμος* επεξεργάζεται τις περισσότερες από τις πληροφορίες που φθάνουν στο φλοιό των ημισφαιρίων προερχόμενες από το υπόλοιπο

νευρικό σύστημα ενώ συμμετέχει και στη μη ειδική εγρήγορση και την προσήλωση της προσοχής. Ο υποθάλαμος βρίσκεται κάτω από το θάλαμο και περιέχει διαφορετικές κυτταρικές ομάδες και οδούς που αποτελούν το κέντρο ελέγχου του νευρικού και ενδοκρινικού συντονισμού. Αποτελεί τη μόνη και πλέον σημαντική περιοχή ελέγχου της της ομοιοστατικής ρύθμισης και των λειτουργιών που σχετίζονται με την αυτοσυντήρηση (πρόσληψη τροφής και νερού, αναπαραγωγή). Στο κάτω μέρος του υποθαλάμου, προσκολλημένη μέσω ενός μίσχου, εντοπίζεται η υπόφυση, μία σημαντική δομή του ενδοκρινικού συστήματος.



Εικ.1.1 Σχηματική απεικόνιση σε επιμήκη τομή των βασικών περιοχών του εγκεφάλου.

1.2.2 Το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ)

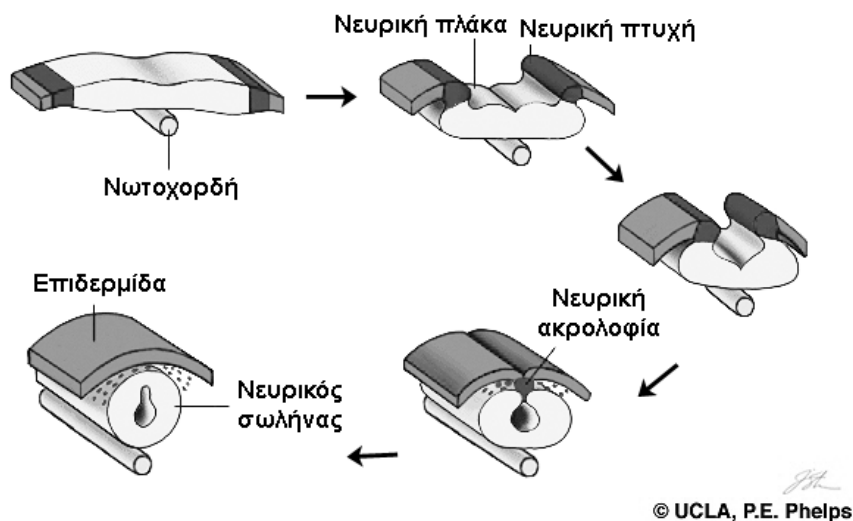
Οι νευρικές ίνες του Περιφερικού Νευρικού Συστήματος μεταφέρουν σήματα μεταξύ του ΚΝΣ και των αισθητήρων και εκτελεστικών οργάνων από την περιφέρεια. Οι νευρικές ίνες συνιστούν δέσμες που καλούνται νύρα και το ΠΝΣ αποτελείται από 43 ζεύγη νύρων: 12 ζεύγη εγκεφαλικών (κρανιακών) και 31 ζεύγη νωτιαίων, εκπορευόμενων από το νωτιαίο μυελό. Κάθε νύρο περιλαμβάνει νευρικές ίνες που είναι άξονες απαγωγών ή προσαγωγών νευρώνων ή και των δύο και κάθε νευρική ίνα περιβάλλεται από ένα κύτταρο Schwann. Οι προσαγωγοί νευρώνες μεταφέρουν πληροφορίες από τους αισθητήρες των περιφερικών τους απολήξεων στο ΚΝΣ, ενώ οι απαγωγοί μεταφέρουν σήματα έξω από το ΚΝΣ προς τους μυς και τους αδένες. Το απαγωγό σκέλος του ΠΝΣ είναι περισσότερο

σύνθετο από το προσαγωγό και διαιρείται περαιτέρω σε *σωματικό* και *αυτόνομο* νευρικό σύστημα. Η απλούστερη διάκριση μεταξύ των δύο παραπάνω υποδιαιρέσεων είναι πως οι νευρώνες του σωματικού νευρικού συστήματος νευρώνουν τους σκελετικούς μυς ενώ εκείνοι του αυτόνομου, τους αδένες, τους λείους μυς, το μυοκάρδιο και τους νευρώνες στο γαστρεντερικό σωλήνα.

1.3 Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Κατά την ανάπτυξη του εμβρύου και ειδικότερα μετά τις διαδοχικές διαιρέσεις του ζυγωτού, θα προκύψει το πολυκύτταρο γαστρίδιο, στο οποίο τρεις διαφορετικοί τύποι κυττάρων (εξωδερμικά, μεσοδερμικά και ενδοδερμικά), διατάσσονται ιεραρχικά και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προκειμένου να σχηματίσουν τα όργανα του σώματος, σε μία διαδικασία που καλείται οργανογένεση. Τόσο το Νευρικό Σύστημα όσο και η επιδερμίδα προέρχονται από το εξώδερμα (Gilbert 2000).

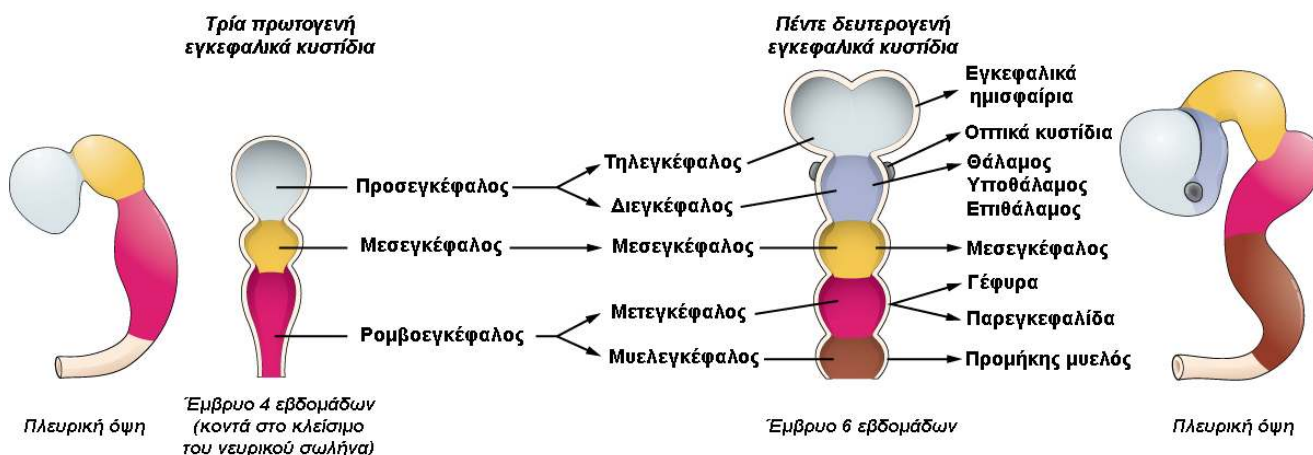
Στα πρώτα στάδια της νευριδίωσης, της δημιουργίας, δηλαδή, του νευρικού συστήματος, μία ομάδα εξωδερμικών κυττάρων στη ραχιαία πλευρά του εμβρύου διαφοροποιείται και σχηματίζει τη νευρική πλάκα (neural plate) (Εικ. 1.2). Ο σχηματισμός της νευρικής πλάκας λαμβάνει χώρα με σημαντική επιμήκυνση του μεσοπλευρικού άξονα των τοπικών κυττάρων, ενώ τα επαγωγικά σήματα που απαιτούνται για το συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο καθώς και για την επακόλουθη δημιουργία του νευρικού σωλήνα, προέρχονται από κύτταρα της υποκείμενης νωτιαίας χορδής, μεσοδερμικής προέλευσης. Σύντομα, πλευρικά και κατά μήκος της νευρικής πλάκας αναπτύσσονται οι νευρικές πτυχές (neural folds). Η νευρική πλάκα αρχίζει να βυθίζεται και ονομάζεται πλέον νευρική αύλακα (neural groove) ενώ οι νευρικές πτυχές ανυψώνονται, συγκλίνουν και συντήκονται στη ραχιαία πλευρά σχηματίζοντας το νευρικό σωλήνα (neural tube). Κατά τη σύντηξη των νευρικών πτυχών, μία ομάδα κυττάρων αποχωρίζεται από τη ραχιαία πλευρά του νευρικού σωλήνα και σχηματίζει τη νευρική ακρολοφία. Τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας πολύ γρήγορα μετά το σχηματισμό της, αρχίζουν να μεταναστεύουν από τη ραχιαία επιφάνεια του νευρικού σωλήνα προς διάφορες κατευθύνσεις και διαφοροποιούνται σ' έναν μεγάλο αριθμό κυτταρικών τύπων, δίδοντας -μεταξύ πολλών άλλων- κύτταρα Schwann, κρανιακά, ραχιαία, εντερικά και αυτόνομα γάγγλια καθώς και μελανοκύτταρα της επιδερμίδας. Τα σήματα που δέχονται απ' το περιβάλλον κατά τη μετανάστευσή τους, είναι και εκείνα που καθορίζουν την αναπτυξιακή τους τύχη (Gilbert 2000; Κουσουλάκος 2002).



Εικ.1.2 Σχηματική απεικόνιση των κυριότερων σταδίων της νευριδίωσης.

Η διαδικασία ανάπτυξης και διαφοροποίησης του νευρικού σωλήνα, λαμβάνει χώρα σε τρία επίπεδα: σε επίπεδο ανατομικό, με το νευρικό σωλήνα να αναδιαμορφώνεται προκειμένου να σχηματίσει τις δομές του ΚΝΣ, σε επίπεδο ιστολογικό, με τους κυτταρικούς πληθυσμούς στα τοιχώματα του νευρικού σωλήνα ν' ανακατανέμονται ώστε να διαμορφώσουν τις επιμέρους λειτουργικές περιοχές του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού και σε επίπεδο κυτταρικό με τα νευροεπιθηλιακά κύτταρα να διαφοροποιούνται σε πολυάριθμους τύπους νευρώνων και γλοιοκυττάρων. Σε αντίθεση με τα αμφίβια όπου ο νευρικός σωλήνας σχηματίζεται σχεδόν ταυτόχρονα σε όλο το μήκος του εμβρύου, στα αμνιωτά ζώα η νευριδίωση αρχίζει στο πρόσθιο τμήμα του σώματος και προχωρεί σταδιακά προς τα πίσω. Έτσι, ενώ ο νευρικός σωλήνας έχει κλείσει στο πρόσθιο τμήμα του εμβρύου, στο οπίσθιο μόλις αρχίζουν να εγείρονται οι νευρικές πτυχές. Κατά το κλείσιμο του νευρικού σωλήνα στα αμνιωτά ζώα, το πρόσθιο και το οπίσθιο τμήμα παραμένουν για μικρό χρονικό διάστημα ανοικτά και συνιστούν τον πρόσθιο και οπίσθιο νευριδιοπόρο (ή νευροπόρο) αντίστοιχα. Λόγω του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των νευρώνων, τα τοιχώματα του νευρικού σωλήνα παχύνουν και εκείνος διαφοροποιείται σε επόμενα στάδια σε *προσεγκέφαλο*, *μεσεγκέφαλο* και *ρομβοεγκέφαλο* (**Εικ.1.3**). Μετά το ρομβοεγκέφαλο ακολουθεί ο νωτιαίος μυελός. Ο *προσεγκέφαλος* διακρίνεται περαιτέρω σε *τηλεγκέφαλο* και *διεγκέφαλο*: από τον *τηλεγκέφαλο* θα προκύψουν οι οσφρητικοί λοβοί του εγκεφάλου και τα εγκεφαλικά ημισφαίρια (αίσθηση, κίνηση, συνειρμός, μνήμη, κ.ά), ενώ από το *διεγκέφαλο* οι οφθαλμικοί κάλυκες, ο

επιθάλαμος (επίφυση και σταθμοί οσφρητικών οδών), ο θάλαμος (σταθμός οπτικών και ακουστικών πληροφοριών) και ο υποθάλαμος (θερμορρύθμιση, αναπνοή, ρυθμός ύπνου, οπτικό χιάσμα, ορμονικές λειτουργίες). Ο *μεσεγκέφαλος* διαφοροποιείται σε εγκεφαλικά σκέλη (*crura cerebri*, νευρικές οδοί μεταξύ προσθίου και οπισθίου εγκεφάλου) και οπτική οροφή (*optic tectum*, όπου λαμβάνουν χώρα οπτικά αντανάκλαστικά). Τέλος, ο *ρομβοεγκέφαλος* διαφοροποιείται σε μετεγκέφαλο και μυελεγκέφαλο, με τον πρώτο να δίδει την παρεγκεφαλίδα (συντονισμός πλύπλοκων μυϊκών κινήσεων) και το δεύτερο τον προμήκη μυελό (κέντρα αναπνοής, καρδιακής λειτουργίας, κά) (Gilbert 2000; Κουσουλάκος 2002).



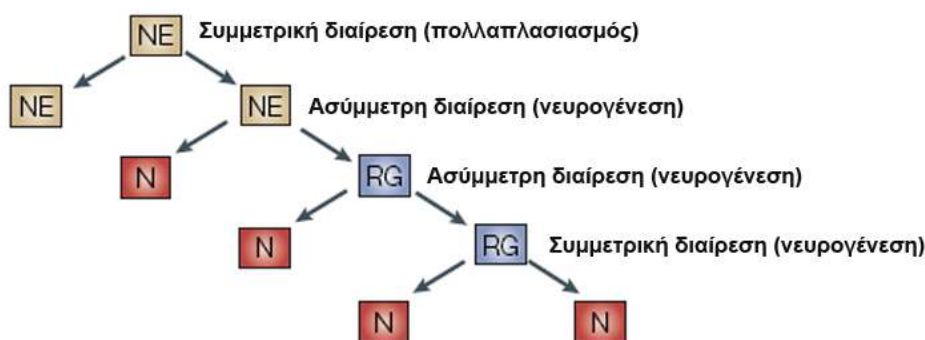
Εικ.1.3 Σχηματική απεικόνιση της διαφοροποίησης του νευρικού σωλήνα στις επιμέρους δομές του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού.

1.4 Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΣΗΣ

Κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, τα νευρικά βλαστικά κύτταρα δίνουν γένεση σε όλους τους νευρώνες του ΚΝΣ των θηλαστικών. Αποτελούν ακόμη την πηγή των δύο τύπων μακρογλοιακών κυττάρων του ΚΝΣ, των αστροκυττάρων και των ολιγοδενδροκυττάρων. Δύο βασικά κριτήρια χρησιμοποιούνται προκειμένου να χαρακτηριστεί ένα κύτταρο ως βλαστικό: η αυτοανανέωσή του μέσα από έναν απεριόριστο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων και η πολυδυναμικότητά του, η ικανότητά του δηλαδή να δίνει γένεση σε ποικίλους τύπους διαφοροποιημένων κυττάρων. Η αυτοανανέωση των νευρικών βλαστικών κυττάρων λαμβάνει χώρα

είτε μέσω συμμετρικών διαιρέσεων απ' όπου προκύπτουν δύο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα, είτε μέσω ασύμμετρων διαιρέσεων απ' όπου προκύπτουν ένα κύτταρο πανομοιότυπο με το μητρικό κι ένα δεύτερο διαφορετικού τύπου (Gotz and Huttner 2005; Salomoni and Calegari 2010).

Στη διάρκεια της ανάπτυξης και πριν τη νευρογένεση, τα νευροεπιθηλιακά κύτταρα τα οποία μπορούν να θεωρηθούν ως βλαστικά, συνιστούν μία μονή στιβάδα, το *νευροεπιθήλιο*, που καλύπτει τόσο τη νευρική πλάκα όσο και το νευρικό σωλήνα. Τα νευροεπιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν χαρακτηριστικά επιθηλιακών κυττάρων, διαθέτοντας μία βασική και μία κορυφαία πλευρά, μεταξύ των οποίων οι πυρήνες των κυττάρων μεταναστεύουν κατά τον κυτταρικό κύκλο (Huttner and Brand 1997). Προς την κορυφαία πλευρά και πλαγίως της πλασματικής μεμβράνης (μεταξύ γειτονικών κυττάρων) παρατηρούνται στενοσύνδεσμοι (tight junctions). Ο ρόλος αυτών των συνδέσμων είναι να εμποδίζουν τη διακίνηση (διάχυση) των διαμεμβρανικών συστατικών (υποδοχέων, ενζύμων κλπ) από τη μία πλευρά του κυττάρου στην άλλη, διατηρώντας έτσι μία πολικότητα στη κατανομή τους. Τα νευροεπιθηλιακά κύτταρα υφίστανται αρχικά συμμετρικές διαιρέσεις αυξάνοντας τον αριθμό τους και στη συνέχεια, μέσω ασύμμετρων διαιρέσεων, δίνουν γένεση σε πιο διαφοροποιημένους τύπους κυττάρων όπως μη βλαστικά προγονικά νευρικά κύτταρα (ακτινωτά κύτταρα γλοίας, *Radial Glial cells*) ή νευρώνες (**Εικ.1.4**). Τα μη βλαστικά προγονικά νευρικά κύτταρα, υφίστανται κατόπιν ασύμμετρες ή συμμετρικές διαιρέσεις μέσω των οποίων προκύπτουν διαφοροποιημένα μετα-μιτωτικά κύτταρα

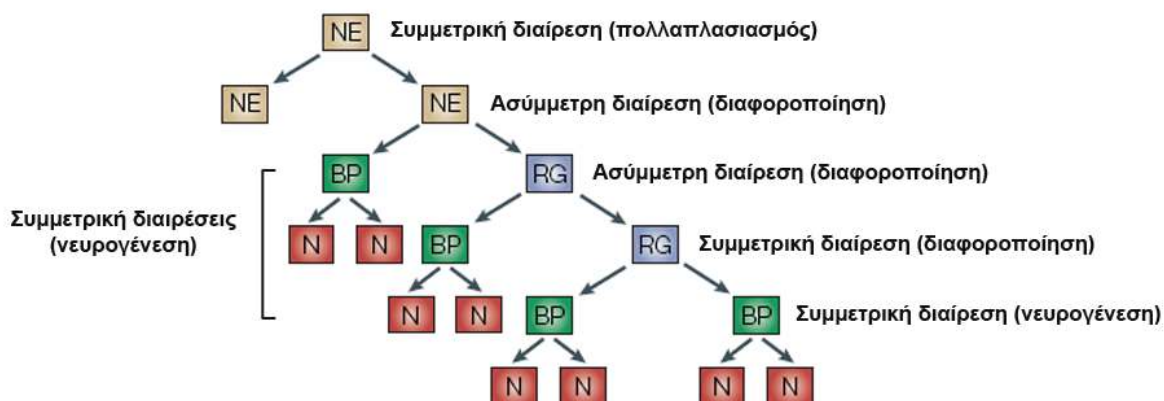


Εικ.1.4 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της νευρογένεσης. Τα νευροεπιθηλιακά κύτταρα (Neuroepithelial cells, NE), πολλαπλασιάζονται μέσω συμμετρικών διαιρέσεων, αυξάνοντας τον αριθμό τους, ενώ μέσω ασύμμετρων διαιρέσεων δίνουν γένεση σε ακτινωτά κύτταρα γλοίας (Radial Glial cells, RG), ή νευρώνες (Neurons, N). Τροποποιημένο από (Gotz and Huttner 2005).

Με την έναρξη της νευρογένεσης, στα νευροεπιθηλιακά κύτταρα εξαλείφονται σταδιακά κάποια χαρακτηριστικά επιθηλιακών κυττάρων όπως οι στενοσύνδεσμοι ή η πολικότητα ως προς την κατανομή των συστατικών τους μεταξύ κορυφαίας και βασικής πλευράς τους και χαρακτηριστικά αστρογλοιακής φύσης κάνουν την εμφάνισή τους. Οι νέοι κυτταρικοί τύποι που προκύπτουν καλούνται ακτινωτά κύτταρα γλοίας (*Radial Glial cells, RG*) και θεωρούνται πλέον προγονικά κύτταρα δεσμευμένα προς συγκεκριμένη γενεαλογία, παρά νευροεπιθηλιακά, δίνοντας γένεση είτε άμεσα είτε έμμεσα σε όλους σχεδόν τους νευρώνες του εγκεφάλου. Συγχρόνως, το νευροεπιθήλιο, μεταμορφώνεται σε έναν ιστό με πολλαπλές στιβάδες, με εκείνη που βρίσκεται πλησιέστερα της κοιλίας και περιέχει τα κυτταρικά σώματα των περισσότερων προγονικών κυττάρων, να αποτελεί την *κοιλιακή ζώνη* (Gotz and Huttner 2005).

Τα ακτινωτά κύτταρα γλοίας συνεχίζουν να εκφράζουν πρωτεΐνες των επιθηλιακών κυττάρων όπως η *νεστίνη* (*nestin*, πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων), ενώ διατηρούν ως ένα βαθμό την πολικότητά τους. Επιπλέον, ο πυρήνας τους μετακινείται κατά τη μίτωση προς την κορυφαία πλευρά της κοιλιακής ζώνης και κατά την S φάση του κύκλου μεταναστεύει προς τη βασική. Σε αντίθεση πάλι με τα νευροεπιθηλιακά, τα ακτινωτά κύτταρα γλοίας αρχίζουν να εκφράζουν κατά τη νευρογένεση πρωτεΐνες των αστροκυττάρων, όπως τον ειδικό μεταφορέα γλουταμικού οξέος (*GLAST*), την πρωτεΐνη *S100β* που δεσμεύει ασβέστιο ή την πρωτεΐνη των ινιδίων γλοίας (*GFAP*).

Τα *βασικά προγονικά κύτταρα* (*Basal progenitors*) αποτελούν έναν ακόμη τύπο προγονικών νευρικών κυττάρων που εμφανίζεται κατά την έναρξη της νευρογένεσης και προέρχονται από μιτωτικές διαιρέσεις τόσο των νευροεπιθηλιακών όσο και των ακτινωτών κυττάρων γλοίας στο επίπεδο της κοιλιακής ζώνης (**Εικ.1.5**). Σε μεταγενέστερα στάδια της νευρογένεσης, τα βασικά προγονικά κύτταρα συνιστούν την *υποκοιλιακή ζώνη* (*subventricular zone*), μία κυτταρική στιβάδα στη βάση της κοιλιακής ζώνης που εντοπίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου και μέσω συμμετρικών διαιρέσεων, συνεισφέρουν στην περαιτέρω αύξηση του αριθμού των νευρώνων (Gotz and Huttner 2005).

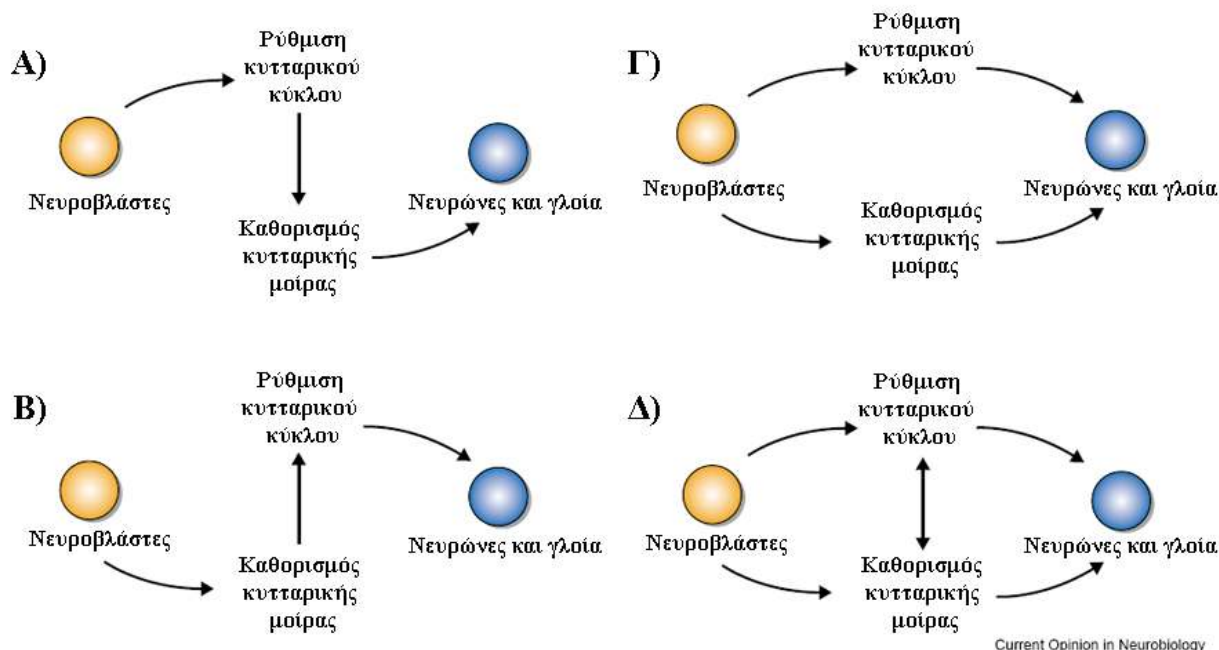


Εικ.1.5 Η παρουσία των βασικών προγονικών κυττάρων (*Basal Progenitors, BP*) στην πορεία της νευρογένεσης. Τα νευροεπιθηλιακά κύτταρα (*Neuroepithelial cells, NE*), μέσω ασύμμετρων διαιρέσεων δίνουν γένεση στα περισσότερα διαφοροποιημένα ακτινωτά κύτταρα γλοίας (*Radial Glial cells, RG*) και βασικά προγονικά κύτταρα (*BP*). Τα τελευταία μέσω συμμετρικών κυτταρικών διαιρέσεων δίνουν γένεση σε νευρώνες (*N*). Τροποποιημένο από (Gotz and Huttner 2005).

1.5 ΣΗΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗ ΓΕΝΕΑΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.

Στο νευρικό σύστημα σχεδόν όλων των ειδών, συγκεκριμένοι τύποι νευρώνων προέρχονται από κύτταρα που διαιρούνται σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους. Στα σπονδυλωτά, αυτό είναι εμφανές ιστολογικά από την αρχιτεκτονική των βασικών δομών του νευρικού συστήματος, όπου διαφορετικές κυτταρικές στιβάδες συνίστανται από κύτταρα διαφορετικής χρονικής προέλευσης. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του εγκεφαλικού φλοιού, με τα πιο πρώιμα κύτταρα να εντοπίζονται σε βαθύτερα στρώματα και τα μεταγενέστερα σε πιο επιφανειακά. Έτσι, διαφορετικές γενεαλογίες καθορίζονται σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια ή μετά από ένα ορισμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Εντούτοις, δεν υπάρχουν απλοί κανόνες που ακολουθούνται στη λήψη αποφάσεων για την πορεία των προγονικών νευρικών κυττάρων. Η δέσμευση για παράδειγμα ενός προγονικού κυττάρου είτε σε πρόδρομο νευρωνικό είτε σε πρόδρομο κύτταρο γλοίας, μπορεί να καθορίζεται κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού του, ενώ η απόφαση για το λειτουργικό είδος του νευρώνα (νευρώνας αμφιβληστροειδούς ή νωτιαίου μυελού) μπορεί να λαμβάνεται κατά τον τελευταίο κυτταρικό κύκλο. Γενικότερα, έχει δειχθεί πως υπάρχει άμεση αλληλεξάρτηση της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου με το μηχανισμό καθορισμού της μοίρας των κυττάρων (**Εικ.1.6**). Τα προϊόντα έκφρασης, δηλαδή, των γονιδίων που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, ρυθμίζουν τα προϊόντα έκφρασης των

υπεύθυνων γονιδίων για τον καθορισμό της μοίρας των κυττάρων και αντίστροφα (Ohnuma, Philpott, and Harris 2001).



Εικ.1.6 Πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και του καθορισμού της νευρωνικής διαφοροποίησης: **(Α)** Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου υπερισχύει του καθορισμού της κυτταρικής μοίρας, ελέγχοντάς την άμεσα και περιορίζοντας τα πλαίσια δράσης παραγόντων διαφοροποίησης. Το αντίστροφο συμβαίνει στην περίπτωση **(Β)**. Στην περίπτωση **(Γ)** Οι δύο διαδικασίες ρυθμίζονται ανεξάρτητα, ενώ στη **(Δ)**, όπου απεικονίζεται και ο επικρατέστερος μηχανισμός, η νευρική διαφοροποίηση είναι προϊόν συνέργειας και των δύο διαδικασιών (Ohnuma, Philpott, and Harris 2001).

1.5.1 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και κυτταρική διαφοροποίηση.

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, η ακριβής ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης είναι καθοριστική για τη διαμόρφωση του μεγέθους και του σχήματος κάθε ιστού. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ελέγχεται από ένα πολύπλοκο δίκτυο σηματοδοτικών μονοπατιών που επηρεάζονται τόσο από εξωκυττάρια σήματα σχετιζόμενα με την ταυτότητα και το πλήθος των γειτονικών κυττάρων όσο και από ενδοκυττάρια, σχετιζόμενα με το αναπτυξιακό πρότυπο του ίδιου κυττάρου. Ο κυτταρικός κύκλος διαθέτει δύο κενά (*gaps*), τα *G1* και *G2* που διαχωρίζουν τη φάση

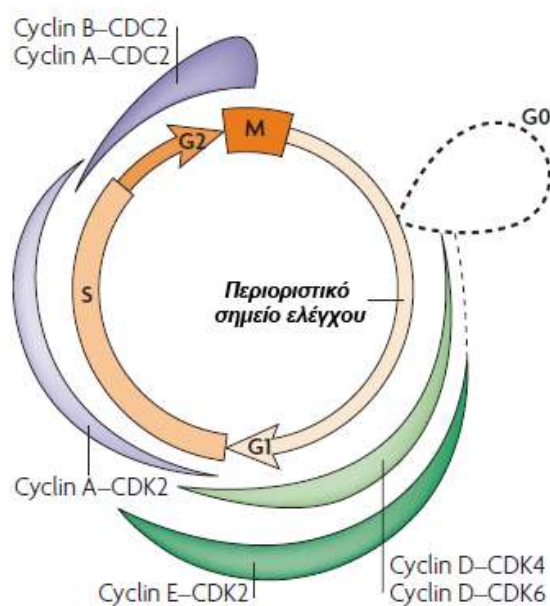
σύνθεσης του DNA (φάση S μεταξύ G1 και G2) από εκείνη της κυτταρικής διαίρεσης/κυτοκίνησης (φάση M μεταξύ G2 και G1) (Εικ.1.7).

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν στον κυτταρικό κύκλο των θηλαστικών, έχουν πραγματοποιηθεί σε καλλιέργειες κυττάρων με χρήση συγκεκριμένων αυξητικών παραγόντων (μιτογόνα) στο θρεπτικό υλικό, οι οποίοι επάγουν τον πολλαπλασιασμό (Harvey Lodish 2000). Η δέσμευση των αυξητικών παραγόντων σε ειδικούς υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πολλαπλών μονοπατιών σηματοδότησης με τελική κατάληξη τη μεταγραφή γονιδίων σχετικών με τη ρύθμιση του κύκλου. Τα κύτταρα ανταποκρίνονται στην παρουσία ή απουσία μιτογόνων στο περιβάλλον τους στην πρώιμη G1 φάση, ενώ σε άλλα χρονικά στάδια, τα μιτογόνα δεν φαίνεται να επηρεάζουν την πρόοδο του κύκλου, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να προχωρούν κανονικά στις φάσεις S, G2, και M. Κάτω από συνθήκες μεγάλης κυτταρικής πυκνότητας ή απουσίας αυξητικών παραγόντων, τα κύτταρα εισέρχονται σε μία φάση αδράνειας (G0), από την οποία ενδέχεται και να επιστρέψουν στο φυσιολογικό τους κύκλο.

Η έξοδος των κυττάρων από τον κύκλο προηγείται της διαφοροποίησής τους και ο μηχανισμός συντονισμού των δύο αυτών διαδικασιών ελέγχεται από ένα πλήθος παραγόντων, πολλοί εκ των οποίων καθορίζουν και τη γενεαλογία των πρόδρομων νευρικών κυττάρων (Hindley and Philpott 2012). Για τη διαφοροποίηση των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, η G1 αποτελεί αναμφίβολα την πιο ενδιαφέρουσα φάση του κύκλου, όχι μόνο γιατί χαρακτηρίζεται από τις περισσότερες μεταβολές κατά την ανάπτυξη αλλά και γιατί εκεί λαμβάνεται η απόφαση για το αν τα κύτταρα θα εξακολουθήσουν να πολλαπλασιάζονται ή θα εισέλθουν στη φάση αδράνειας G0 (Blomen and Boonstra 2007). Έχει προταθεί πως η διάρκεια της φάσης G1 από μόνη της, δύναται να επηρεάζει τη διαφοροποίηση ορισμένων τύπων βλαστικών κυττάρων: αυξανόμενης της διάρκειάς της, ευνοείται η συγκέντρωση περισσότερων παραγόντων απαραίτητων για τη διαφοροποίηση, κάτι που δεν συμβαίνει όταν είναι σύντομη, οπότε και διατηρείται μία κατάσταση αυτο-ανανέωσης και πολυδυναμικότητας (Lange and Calegari 2010). Πρόκειται για μία υπόθεση αρκετά δύσκολη στο να ελεγχθεί επαρκώς, καθώς πέρα από τους αποκλειστικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου όπως οι κυκλίνες και οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες, ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων που επάγουν τη διαφοροποίηση, επίσης υπεισέρχεται και στην πρόοδο του κύκλου (βλ.παρ. 1.5.3).

Σε αντίθεση με ορισμένους τύπους διαφοροποιημένων κυττάρων, όπως οι ινοβλάστες και τα λεμφοκύτταρα, που δύνανται υπό την επίδραση κατάλληλων ερεθισμάτων να εισέλθουν και πάλι στον κύκλο και να πολλαπλασιαστούν, τα κύτταρα που έχουν εξέλθει οριστικά του κύκλου καλούνται μετα-

μιτωτικά. Η μετάβαση μεταξύ των φάσεων του κύκλου, διαμεσολαβείται από τα καλά χαρακτηρισμένα σύμπλοκα κυκλινών (*Cyclins*) και κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών σερίνης/θρεονίνης (*Cyclin Dependent Kinases, CDKs*) καθώς και από τους αναστολείς αυτών (*Cyclin Dependent Kinases inhibitors, CDKis*), που στο σύνολό τους συνιστούν τους «ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου» (*cell cycle regulators*).

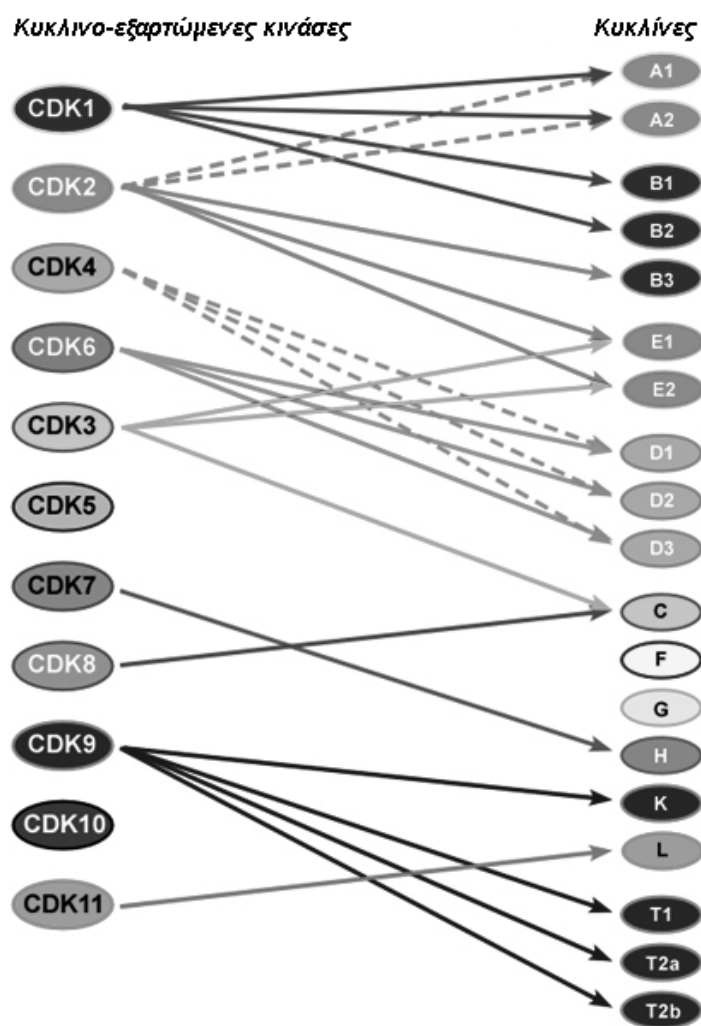


Εικ.1.7 Σχηματική απεικόνιση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και των βασικότερων ρυθμιστικών συμπλόκων κυκλινών-κινασών σε καθεμία από αυτές. Το περιοριστικό σημείο ελέγχου κατά το οποίο τα κύτταρα «λαμβάνουν την απόφαση» να ολοκληρώσουν τον κύκλο τους, μη ανταποκρινόμενα πλέον σε εξωκυττάρια σήματα, βρίσκεται εντός της φάσης G1. Πριν το σημείο αυτό, τα κύτταρα ενδέχεται να εισέλθουν σε ένα στάδιο αδρανοποίησης (G0) από το οποίο και επανέρχονται με τη δράση των συμπλόκων *Cyclin D-CDK4* και *Cyclin D-CDK6*. Τροποποιημένο από (Coller 2007).

1.5.1.1 Κυκλίνες και κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες.

Στους ζυμομύκητες, εκφράζεται μία κύρια κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση, η Cdk1 (ανάλογη των p34^{Cdc28} στον *S.cerevisiae* και p34^{Cdc2} στον *S.pombe*), η οποία ρυθμίζει τόσο τη μετάβαση G1/S όσο και τη G2/M, συνεργαζόμενη κάθε φορά με διαφορετικές κυκλίνες. Στους ανώτερους εξελικτικά οργανισμούς, έχουν ταυτοποιηθεί λειτουργικά ομόλογες με την Cdk1 και εξειδικευμένες για κάθε φάση του κύκλου κινάσες. Η ανακάλυψη 20 περίπου Cdk-σχετιζόμενων πρωτεϊνών, οδήγησε στο

σκεπτικό ότι στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα, ο κύκλος ρυθμίζεται από πολυάριθμους συδυασμούς κυκλινών (A1-2, B1-3, C, D1-3, E1-2, F) και κινασών (Cdk 1-8) παρέχοντας επιπρόσθετο έλεγχο σε κάθε στάδιο (Εικ.1.8).



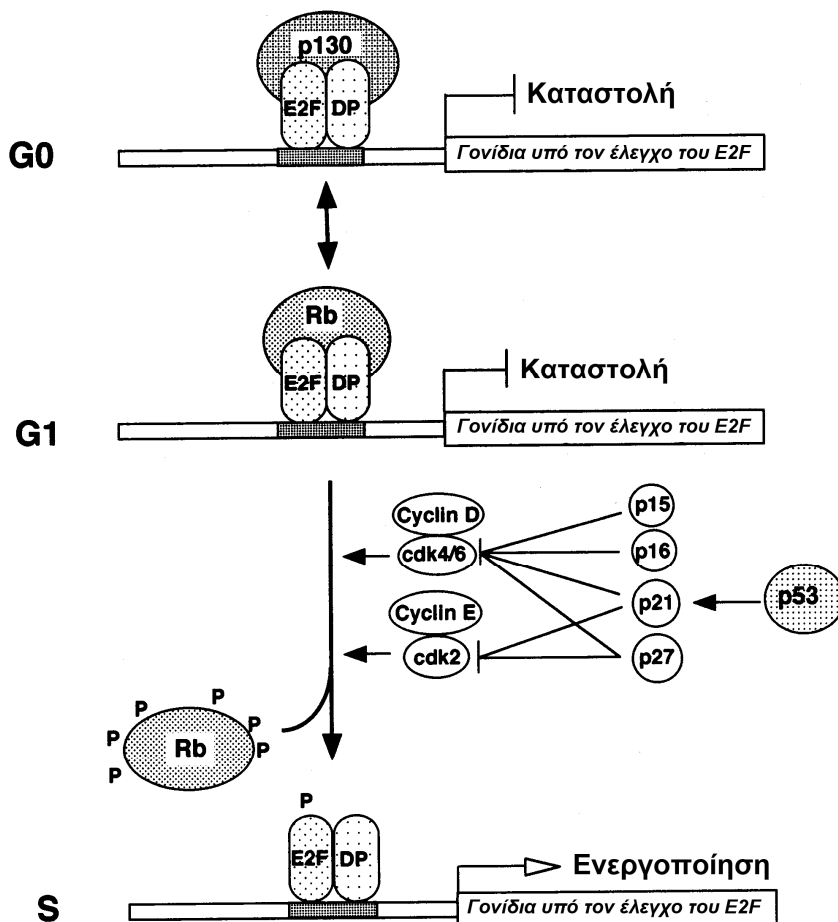
Εικ.1.8 Τα μέλη της οικογένειας των Cdk των θηλαστικών και οι αλληλεπιδρώσεις με αυτά κυκλίνες. Παρόλο που έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 20 κινάσες, εδώ απεικονίζονται εκείνες των οποίων η δράση στον κυτταρικό κύκλο έχει μελετηθεί εκτενώς (Τροποποιημένο από Satyanarayana A. and Kaldis P., 2009).

Σύμφωνα με το συγκεκριμένο μοντέλο, στην πρώιμη G1 φάση, η Cdk4 ή/και η Cdk6 ενεργοποιούνται από τις κυκλίνες τύπου D και φωσφορυλιώνουν τα μέλη της οικογένειας της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) (Rb, p107 και p130) (Sherr and Roberts 2004, 1999). Τα μέλη

της οικογένειας αυτής, διαθέτουν λειτουργικές περιοχές (περιοχές-θύλακες, pocket domains) με τις οποίες αλληλεπιδρούν με πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο E2F.

Ο E2F σε ετεροδιμερές σύμπλοκο με την πρωτεΐνη DP (Dimerization Partner Protein), αναγνωρίζει και δεσμεύεται στην αλληλουχία TTT(G:C)(G:C)CG(G:C) των υποκινητών πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA, όπως η DNA πολυμεράση ή η κινάση θυμιδίνης καθώς και άλλων που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση όπως το c-myc, αλλά και ο ίδιος ο E2F1. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται και η ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων E2F περιλαμβάνει πέντε μέλη εκ των οποίων τα τρία πρώτα (E2F1-3) δεσμεύονται εκλεκτικά στην πρωτεΐνη Rb και τα υπόλοιπα δύο (E2F4 και E2F5) στις p107 και p130 και λιγότερο στην Rb. Η φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση της Rb, ρυθμίζει την πρόσδεσή της στον παράγοντα E2F: στην υποφωσφορυλιωμένη της μορφή κατά τη G1 φάση, είναι δεσμευμένη στον E2F καταστέλλοντας τη μεταγραφική του ενεργότητα και εμποδίζοντας τα κύτταρα να εισέλθουν στην S φάση. Αντίθετα, στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, προς το τέλος της G1 φάσης, οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες Cdk4/6 και Cdk2 σε σύμπλοκο με τις αντίστοιχες κυκλίνες D και E, φωσφορυλιώνουν την Rb με αποτέλεσμα η τελευταία να απομακρύνεται από τον E2F και ο κύκλος να προχωρά στην επόμενη φάση (Yoshikawa 2000) (**Εικ.1.9**).

Η Cdk2 διαδραματίζει κατόπιν σημαντικό ρόλο και στην πρόοδο της S φάσης, ως σύμπλοκο με την κυκλίνη A. Οι κυκλίνες τύπου A, συντίθενται στην έναρξη της S φάσης και φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες εμπλεκόμενες στην αντιγραφή του DNA (Petersen et al. 1999; Coverley et al. 2000). Κατά τη μετάβαση G2/M, η ενεργότητα του συμπλόκου Cdk1/cyclin A είναι απαραίτητη για την έναρξη της πρόφασης (Furuno, den Elzen, and Pines 1999), ενώ τα σύμπλοκα Cdk1/cyclin B, συμμετέχουν ενεργά στην ολοκλήρωση της μίτωσης (Riabowol et al. 1989).



Εικ.1.9 Παράγοντες ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου κατά τη μετάβαση G1/S. Στην υποφωσφορυλιωμένη της μορφή, η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος Rb διατηρεί σε καταστολή το ετεροδιμερές σύμπλοκο E2F/DP, άρα και την καταλυτική του ενεργότητα. Τα σύμπλοκα Cyclins/Cdks, φωσφορυλιώνουν την Rb και την απομακρύνουν από τον E2F, επιτρέποντας τη μεταγραφή των απαραίτητων για την S φάση γονιδίων που βρίσκονται υπό τον έλεγχό του. Οι αναστολείς p15, p16, p21 επιδρούν στις κινάσες cdk4/6 ενώ οι p21 και p27 στη Cdk2. Η κύρια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 επάγει την έκφραση της p21 και κατ' επέκταση τη φωσφορυλίωση της Rb. Σημειώνεται πως κατά τη φάση G0 ο παράγοντας E2F μπορεί να καταστέλλεται από την πρωτεΐνη p130 (Yoshikawa 2000).

Οι κυκλίνες, παράγονται και αποικοδομούνται σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και φαίνεται να συνεισφέρουν στη συνολική λειτουργικότητα του συμπλόκου (ενεργοποίηση, απενεργοποίηση, εντοπισμός), καθώς και στην εξειδικευμένη αλληλεπίδραση αυτού με το υπόστρωμα (Satyanarayana and Kaldis 2009). Εκτεταμένες μελέτες σε μοντέλα διαγονιδιακών ποντικών, έδειξαν πως η απουσία μεμονομένων κυκλινών δεν έχει σημαντική επίδραση στη ρύθμιση του κυτταρικού

κύκλου ή την επιβίωση των οργανισμών, καθώς κάθε οικογένεια κυκλινών αποτελείται από πολυάριθμα μέλη με αντισταθμιστική μεταξύ τους δράση. Στα κύτταρα των θηλαστικών έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις κύριες τάξεις (D,E,A,B) που εμφανίζουν δυναμική ενδοκυττάρια κατανομή με τις τύπου B να είναι κυρίως κυτταροπλασματικές και τις υπόλοιπες κυρίως πυρηνικές (Pines and Hunter 1991; Ohtsubo et al. 1995; Sherr 1993). Οι κυκλίνες D (D1, D2, D3) εκφράζονται σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους και ιστούς και η D1 ειδικότερα είναι η πιο συχνά απαντώμενη.

Επιπρόσθετα της γενικής τους συμμετοχής στη διάρκεια της φάσης G1 του κύκλου, οι κυκλίνες τύπου D έχει δείχθει πως διαθέτουν διακριτούς ρόλους, εντός του νευρικού συστήματος, ως προς τη διατήρηση του πληθυσμού των προγονικών κυττάρων και τον καθορισμό της μετέπειτα ταυτότητάς τους. Για παράδειγμα, η κυκλίνη D1 (cyclin D1) εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον αμφιβληστροειδή και την παρεγκεφαλίδα κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και όταν απαλείφεται σε διαγονιδιακά ποντίκια (Cyclin D1^{-/-}), αυτά εμφανίζουν μειωμένο πάχος στις κυτταρικές στιβάδες του αμφιβληστροειδούς (Ma, Papermaster, and Cepko 1998; Sicinski et al. 1995). Παράλληλα, σε διαγονιδιακά ποντίκια που έχει απαλειφθεί το γονίδιο της κυκλίνης D2 (Cyclin D2^{-/-}) παρατηρείται μειωμένος αριθμός κοκκιωδών κυττάρων στην παρεγκεφαλίδα και πλήρης απουσία ενδιάμεσων νευρώνων αστεροειδούς μορφής (*stellate interneurons*), γεγονός που καταδεικνύει την ικανότητα της κυκλίνης να καθορίζει τους νευρωνικούς υποτύπους (Huard et al. 1999). Εντούτοις, σε μία πρόσφατη μελέτη (Leto et al. 2011), υποστηρίχθηκε πως η συγκεκριμένη κυκλίνη είναι περισσότερο υπεύθυνη για τη δυναμική του κυτταρικού κύκλου και τη διατήρηση του πληθυσμού των προγονικών νευρικών κυττάρων, παρά για τον καθορισμό του τύπου τους. Από την άλλη πλευρά, η έκφραση της κυκλίνης D3 καταστέλλεται ειδικά στα κύτταρα γλοίας Müller του αμφιβληστροειδούς (Dyer and Cepko 2000; Sun et al. 1996).

Αξίζει να σημειωθεί πως βιβλιογραφικά, πέρα από τη δεδομένη δράση της, η κυκλίνη D1 εμφανίζεται –παραδόξως- να επάγει τη νευρωνική διαφοροποίηση, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Στην περίπτωση των PC12 κυττάρων (Yan and Ziff 1995), υπό την επίδραση παραγόντων διαφοροποίησης όπως ο NGF ή ο FGF, τα επίπεδα της κυκλίνης αυξήθηκαν δραματικά, κάτι που δεν παρατηρήθηκε υπό την επίδραση παραγόντων πολλαπλασιασμού όπως ο EGF ή η ινσουλίνη. Στο νωτιαίο μυελό εμβρύων ποντικού και κοτόπουλου, η υπερ-έκφραση της κυκλίνης D1 δύναται να επάγει τη νευρική διαφοροποίηση, ενώ η υπερ-έκφραση της D2 διατηρεί τα κύτταρα στον κύκλο. Επιπρόσθετα, η καταστολή της έκφρασης της D1 στο νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου μείωσε τον πληθυσμό των προγονικών κυττάρων που είναι δεσμευμένα προς διαφοροποίηση (NeuroM⁺/Olig2⁺) καθώς επίσης

και τον αριθμό των διαφοροποιημένων νευρώνων. Με εξωγενή έκφραση της D1, όχι όμως και της D2, ο φαινότυπος αποκαταστάθηκε, δηλώνοντας έτσι έναν μηχανισμό ρύθμισης της διαφοροποίησης, ανεξάρτητο εκείνου του κυτταρικού κύκλου (Lukaszewicz and Anderson 2011).

Και η κυκλίνη E (*Cyclin E*) φαίνεται να διαδραματίζει πολλαπλούς ρόλους, πέραν της ρύθμισης της φάσης G1 του κύκλου. Στη *Drosophila melanogaster* η κυκλίνη E συμμετέχει στον καθορισμό της μοίρας των νευροβλαστών NB6-4, δρώντας αναρροϊκά των γονιδίων *prospero* και *GCM* (*glial cells missing*), τα οποία είναι υπεύθυνα για τη νευρωνική διαφοροποίηση (Berger et al. 2005). Στους μεταμιτωτικούς νευρώνες, συμβάλλει στη διατήρηση των κυττάρων εκτός του κύκλου, καθώς αλληλεπιδρά και καταστέλλει την ενεργότητα κινάσης της CDK5. Η απενεργοποίηση της CDK5 απαιτείται για την αποτελεσματική συναπτογένεση, γι' αυτό και τα επίπεδα της κυκλίνης E παραμένουν σε υψηλά επίπεδα στον εγκέφαλο του ποντικού, εν αντιθέσει με τα υπόλοιπα όργανα (Odajima et al. 2011). Μάλιστα, η απαλοιφή του γονιδίου της κυκλίνης E ή η υπερ-έκφραση της CDK5 στους νευρώνες υποκάμπου ποντικού, οδήγησε σε μείωση του αριθμού των σχηματιζόμενων συνάψεων.

1.5.1.2 Αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKis).

Η δραστηριότητα των συμπλόκων Cdk/cyclin τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε συνθήκες στρες (π.χ. καταστροφή DNA, δυσλειτουργία τελομερών), ρυθμίζεται από δύο οικογένειες αναστολέων κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKis): την INK4 (p16^{INK4a}, p15INK4b, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}) και την Cip/Kip (p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}) (Satyanarayana and Kaldis 2009). Τα μέλη της πρώτης οικογένειας, δεσμεύονται ειδικά στις κινάσες Cdk4 και Cdk6, εμποδίζοντας την ενεργότητα των κυκλινών τύπου D ενώ εκείνα της δεύτερης αναστέλλουν την ενεργότητα των συμπλόκων Cdk2/cyclinE, Cdk2/cyclinA, Cdk1/cyclinA και Cdk1/cyclinB (Toyoshima and Hunter 1994; Aprelikova, Xiong, and Liu 1995; O'Connor 1997). Οι αναστολείς, επάγουν την έξοδο των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο εμποδίζοντας τη δέσμευση ATP από τα σύμπλοκα κυκλινών-κινασών, αναστέλλοντας έτσι την καταλυτική τους ικανότητα (Sherf and Roberts 1999). Επιπρόσθετα, η έκφρασή τους βρίσκεται υπό τον άμεσο έλεγχο μεταγραφικών παραγόντων που αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 που επάγει τη μεταγραφή της p21 με αποτέλεσμα την επιμήκυνση του κύκλου και τη μείωση του πληθυσμού των νευρικών προγονικών κυττάρων στον αναπτυσσόμενο (Francoz et al. 2006) και ενήλικο (Medrano et al. 2009) εγκέφαλο. Αντίστροφα, η απώλεια της p53 οδήγησε σε αυξημένο κυτταρικό

πολλαπλασιασμό τόσο στον εμβρυικό (Armesilla-Diaz et al. 2009) όσο και στον ενήλικο (Meletis et al. 2006) εγκέφαλο, με επακόλουθη υπερπλασία, φαινόμενο που οφείλεται και σε μειωμένη απόπτωση.

Η διάρκεια της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου, είναι κρίσιμη για τη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ του αριθμού των προγονικών κυττάρων και των διαφοροποιημένων νευρώνων. Ειδικότερα, η αναστολή της έκφρασης ή η παρεμπόδιση της δράσης παραγόντων που προάγουν τον κυτταρικό κύκλο, οδηγούν σε αυξημένη διαφοροποίηση των κυττάρων και μείωση του πληθυσμού των προγονικών. Όπως έχει δειχθεί, κατά την εμβρυική ανάπτυξη, οι αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKis) συσσωρεύονται στα προγονικά κύτταρα κατόπιν αλληπάλληλων διαιρέσεων, με αποτέλεσμα ν' αυξάνουν σταδιακά τη διάρκεια της G1 φάσης (Durand, Gao, and Raff 1997; Fero et al. 1996; Kiyokawa et al. 1996). Από *in vitro* μελέτες σε κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος αρουραίου (PC12), φάνηκε πως η χημική αναστολή ή η καταστολή της έκφρασης της CDK i p21^{cip1}, οδήγησε σε αυξημένη νευρική διαφοροποίηση (Dobashi et al. 2000; Yan and Ziff 1995), ενώ σε μία σχετικά πρόσφατη *in utero* μελέτη, δείχθηκε πως η υπερέκφραση του συμπλόκου CyclinD1/CDK4 στο φλοιό του αναπτυσσόμενου εμβρύου ποντικού, καθυστερεί τη νευρογένεση και ενισχύει τον πληθυσμό των βασικών προγονικών κυττάρων. Αντίθετα, η καταστολή της έκφρασης του συμπλόκου με shRNA (small hairpin RNA), αυξάνει τον αριθμό των διαφοροποιημένων νευρώνων κατά 40% (Lange, Huttner, and Calegari 2009).

Ο p27^{Kip1} θεωρείται ο σημαντικότερος αναστολέας στην ανάπτυξη του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Σε ποντικούς που έχει απαλειφθεί το γονίδιο p27 (p27^{-/-}), παρατηρείται έντονος κυτταρικός πολλαπλασιασμός που αντικατοπτρίζεται σε αύξηση του μεγέθους του εγκεφάλου (Fero et al. 1996). Αναλυτική μελέτη της λειτουργίας του p27^{Kip1} στον εμβρυικό φλοιό πρωτευόντων, έδειξε πως η έκφρασή του στα προγονικά κύτταρα του φλοιού, σχετίζεται τόσο με τη διάρκεια του κύκλου, όσο και με την πιθανότητα εξόδου των κυττάρων από αυτόν, επομένως και με τη γένεση ώριμων νευρώνων (Lukaszewicz et al. 2005; Caviness et al. 2003). Μάλιστα, η έκφρασή του ποικίλει μεταξύ των περιοχών του φλοιού, γεγονός που σχετίζεται ενδεχομένως και με τοπολογικές διαφορές στην παραγωγή των νευρώνων. Αξίζει να σημειωθεί πως η έκφραση του p27^{Kip1} δεν περιορίζεται στα προγονικά κύτταρα, αλλά συνεχίζεται και στους μετα-μιτωτικούς νευρώνες κατά τη μετανάστευση και διαφοροποίησή τους (van Lookeren Campagne and Gill 1998), δηλώνοντας πως ο συγκεκριμένος αναστολέας δύναται να επηρεάσει αρκετά στάδια της νευρογένεσης ανεξάρτητα του ρόλου που διατηρεί στον κυτταρικό κύκλο.

Όσον αφορά στον p57^{Kip2} της ίδιας οικογένειας, έχει δειχθεί τόσο *in vivo* σε εγκεφάλους εμβρύων αρουραίου όσο και *in vitro* σε πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιικών προγονικών νευρικών κυττάρων εμβρύων ποντικού και αρουραίου, πως η υπερέκφραση του αναστολέα οδηγεί σε έξοδο των πρόδρομων κυττάρων από τον κύκλο και επάγει τη νευρωνική διαφοροποίηση. Το αντίθετο παρατηρείται σε καλλιέργειες φλοιικών προγονικών νευρικών κυττάρων όπου έχει κατασταλεί η έκφραση του p57^{Kip2} (Tury, Mairet-Coello, and DiCicco-Bloom 2011). Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε συγκριτικά και η δράση του p27^{Kip1} στο φαινόμενο της διαφοροποίησης *in vitro*. Φάνηκε πως ενώ ο p57^{Kip2} ήταν πιο αποτελεσματικός στην επαγωγή νευρικού φαινοτύπου, εμποδίζοντας τη διαφοροποίηση προς την κατεύθυνση κυττάρων γλοίας, ο p27^{Kip1} λειτουργούσε κατ' αντίστροφο τρόπο. Συνεπώς αν και οι δύο αναστολείς κατέχουν παρόμοιο ρόλο στον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίηση, εντούτοις παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς την κατεύθυνση και την αποτελεσματικότητα της τελευταίας. Η επίδραση αυξητικών παραγόντων καθώς και το αναπτυξιακό στάδιο του οργανισμού, οπωσδήποτε συμβάλλουν καθοριστικά στη δράση των υπό εξέταση αναστολέων.

1.5.2 Η ρύθμιση των επιπέδων της κυκλίνης D1 στη μετάβαση G1/S του κυτταρικού κύκλου.

Η κυκλίνη D1, όπως αναφέρθηκε εκτενώς και παραπάνω, κατέχει κομβικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ειδικότερα κατά τη μετάβαση G1/S. Βάσει άλλων μελετών, συμβάλλει επιπρόσθετα και στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων, αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες καθώς και με την αποακετυλάση των ιστονών 3 (HDAC3), επηρεάζοντας την ενεργότητά τους (Coqueret 2002). Η κυκλίνη D1 έχει δειχθεί πως είναι ασταθής, με μικρό χρόνο ημιζωής (~24 λεπτά) και αποικοδομείται κυρίως μέσω του 26S πρωτεασώματος κατά τρόπο εξαρτώμενο από ουβικιτίνη (Diehl, Zindy, and Sherr 1997). Διάφορες πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί να σχηματίζουν σύμπλοκα και να λειτουργούν ως E3 λιγάσες, μεταφέροντας μόρια ουβικιτίνης στη φωσφορυλιωμένη κυκλίνη D1 προκειμένου εκείνη ν' αποικοδομηθεί (Yu, Gervais, and Zhang 1998; Lin et al. 2006; Okabe et al. 2006).

1.5.2.1 Η εξαρτώμενη από την GSK3β αποικοδόμηση της κυκλίνης D1.

Τα επίπεδα της κυκλίνης D1 αρχίζουν ν' αυξάνονται νωρίς κατά την G1 φάση και προς το τέλος αυτής γρήγορα ελαττώνονται προκειμένου να επιτευχθεί η μετάβαση στη φάση S. Η αποικοδόμηση

της κυκλίνης είναι αναγκαία για την πρόοδο του κύκλου, καθώς έχειδειχθεί πως ινοβλάστες στους οποίους η κυκλίνη D1 υπερεφράστηκε εξωγενώς, δεν κατάφεραν να εισέλθουν στη φάση S (Fukami-Kobayashi and Mitsui 1999; Pagano et al. 1994). Πιο συγκεκριμένα, η κυκλίνη δεσμευόμενη στο πυρηνικό αντιγόνο PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) και τη cdk2, εμπόδιζε ευθέως τη σύνθεση του DNA.

Η αποικοδόμηση της κυκλίνης D1 μέσω πρωτεασώματος σχετίζεται άμεσα με τη φωσφορυλίωσή της στη θρεονίνη 286 (T286), όπως είχε φανεί σε κάποιες αρχικές μελέτες (Diehl, Zindy, and Sherr 1997). Παρατηρήθηκε ακόμη πως η φωσφορυλίωση της κυκλίνης ενισχύεται απ' τη δέσμευσή της στη cdk4, ενώ η μεταλλαγή της θρεονίνης 286 σε αλανίνη (T286A) αυξάνει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης, διατηρώντας τον πυρηνικό της εντοπισμό καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου. Η κινάση που διαμεσολαβεί για τη φωσφορυλίωση της κυκλίνης, την έξοδό της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και την αποικοδόμησή της από το 26S πρωτεάσωμα, είναι η GSK3β (Glycogen synthase kinase 3β) (Diehl et al. 1998) (**Εικ1.10**) και καθώς εκείνη ρυθμίζεται αρνητικά από το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras-PI3K-Akt (Cross et al. 1994; Saito, Vandenheede, and Cohen 1994), όλα τα παραπάνω ευρήματα συνδέουν τη σταθερότητα της κυκλίνης D1 με τη δράση αυξητικών παραγόντων (μιτογόνων).

1.5.2.2 Η ανεξάρτητη από την GSK3β αποικοδόμηση της κυκλίνης D1: ο ρόλος των κινασών Mirk/Dyrk.

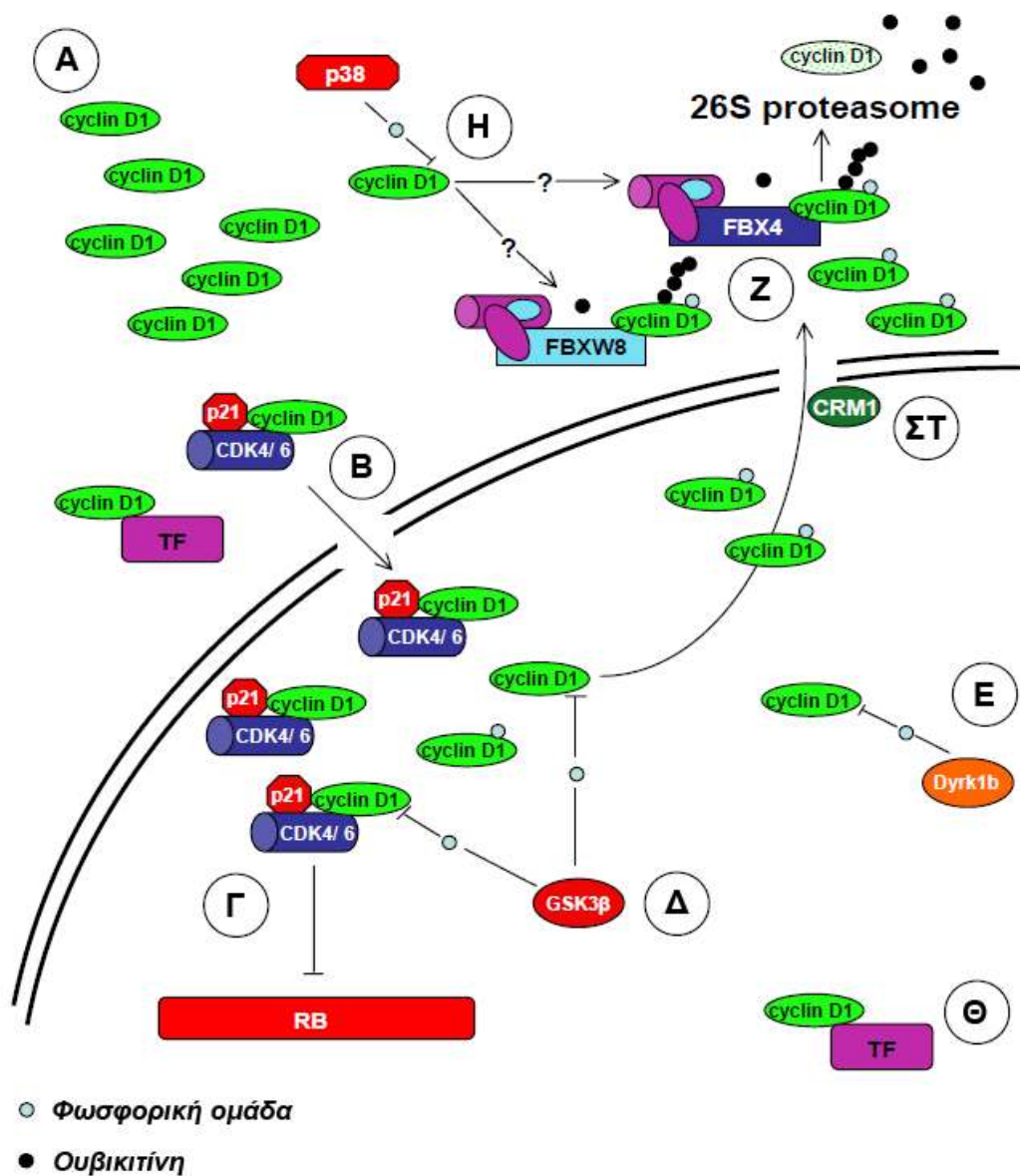
Η κυκλίνη D1 δύναται να αποικοδομείται μέσω του πρωτεασώματος και ανεξάρτητα της κινάσης GSK3β, όπως έδειξαν σχετικές μελέτες (Germain et al. 2000). Ειδικότερα, δύο μεταλλαγμένες μορφές της κυκλίνης D1, η T286A και η D1-KE η οποία δεν μπορεί να προσδεθεί στη cdk4, εξακολουθούσαν να υφίστανται ουβικιτίνωση και επακόλουθη αποικοδόμηση απ' το πρωτεάσωμα. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την παρουσία και ενός δεύτερου μονοπατιού ανακύκλωσης της κυκλίνης, που δεν απαιτεί αφ' ενός τη φωσφορυλίωση στη θρεονίνη T286, ρυθμίζει αφ' ετέρου τα κυτταρικά επίπεδα της ελεύθερης μορφής της από σύμπλοκα με τη cdk4.

Οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης που ρυθμίζονται από φωσφορυλίωση σε κατάλοιπο τυροσίνης DYRKs (Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases), συνιστούν μία εξελικτικά συντηρημένη οικογένεια κινασών με κοινά δομικά, βιοχημικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά ανάμεσα σε σπονδυλωτούς, ασπόνδυλους και κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Aranda, Laguna, and de la Luna 2011). Τα μέλη της οικογένειας των DYRKs διαθέτουν σημαντικό ρόλο στον

έλεγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης, φωσφορυλιώνοντας διάφορα υποστρώματα συμπεριλαμβανομένων κρίσιμων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου όπως η κυκλίνη D1 και ο αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p27^{Kip1}. Οι συγκεκριμένες κινάσες ενεργοποιούνται με αυτοφωσφορυλίωση σε κατάλοιπο τυροσίνης και επάγουν τη διαφοροποίηση σε διάφορους ιστούς και τύπους κυττάρων όπως τα μυικά (Mirk/Dyrk1B) (Mercer et al. 2005), τα νευρικά (Dyrk1A) (Tejedor et al. 1995; Arron et al. 2006), τα ερυθροποιητικά (Dyrk3) (Geiger et al. 2001; Li et al. 2002) και τα σπερματικά (Dyrk4) (Sacher et al. 2007).

Η κινάση Mirk/Dyrk1B (**M**inibrain-**r**elated **k**inase/**d**ual-specificity tyrosine-regulated **k**inase 1) που είναι ενεργή κατά την G0/πρώιμη G1 φάση του κύκλου, δείχθηκε να φωσφορυλιώνει την κυκλίνη D1 στη θρεονίνη T288, σε επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα (Mv1Lu) (Zou et al. 2004). Η καταστολή της κινάσης οδήγησε σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κυκλίνης, χωρίς όμως να επηρεαστούν τα επίπεδα του mRNA. Επιπρόσθετα, η μείωση των επιπέδων της κυκλίνης D1 λόγω της Mirk/ Dyrk1B, δεν παρεμποδίστηκε από χλωριούχο λίθιο (LiCl), έναν αναστολέα της GSK3β, γεγονός που υποδηλώνει ένα συμπληρωματικό/αντισταθμιστικό ρόλο των δύο κινασών ως προς τη ρύθμιση της κυκλίνης (Euk1.10). Ανάλογη ρύθμιση των επιπέδων της κυκλίνης D1 μέσω της Mirk/ Dyrk1B έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα HeLa (Takahashi-Yanaga et al. 2006) αλλά και στην ανθρώπινη καρκινική σειρά επιθηλιακών κυττάρων εντέρου, HD6 (Jin et al. 2009).

Αξίζει να σημειωθεί πως στα κύτταρα των θηλαστικών, οι βλάβες στο DNA, το περιβαλλοντικό στρες και οι ιικές επιμολύνσεις, επίσης επάγουν την αποικοδόμηση της κυκλίνης D1 από το 26S πρωτεάσωμα μέσω ουβικιτίνωσης. Κατόπιν έκθεσης των κυττάρων σε ιονίζουσα ακτινοβολία, ενεργοποιείται η πρωτεόλυση της κυκλίνης, όμως στην περίπτωση αυτή απαραίτητη είναι η παρουσία του συμπλόκου επαγωγής της ανάφασης (Anaphase Promoting Complex, APC) και λαμβάνει χώρα ανεξάρτητα της GSK3β (Agami and Bernards 2000). Από την άλλη πλευρά, σε συνθήκες οσμωτικού στρες ή επίδρασης υπερϊώδους ακτινοβολίας, η φωσφορυλίωση της κυκλίνης D1 στη θρεονίνη T286 και η επακόλουθη αποικοδόμησή της, πραγματοποιείται από μία διαφορετική κινάση, την p38^{MAPK} (**Euk1.10**). Συμπερασματικά, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1, ρυθμίζονται αναλόγως της φάσης του κύκλου που βρίσκεται το κύτταρο και των περιβαλλοντικών του συνθηκών, από διαφορετικές κάθε φορά κινάσες και μέσω περισσοτέρων του ενός σηματοδοτικών μονοπατιών.



Εικ.1.10 Ρύθμιση της αποικοδόμησης της κυκλίνης D1. **(Α)** Η κυκλίνη D1 δεν περιέχει στην αλληλουχία της σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal, NLS) γι' αυτό και αθροίζεται στο κυτταρόπλασμα. **(Β)** Η κυκλίνη μεταφέρεται στον πυρήνα σε σύμπλοκο με πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά (π.χ. *cdk4*, μεταγραφικοί παράγοντες, transcription factors, TF). **(Γ,Δ,ΣΤ)** Μέσα στον πυρήνα οι ενεργές κινάσες *cdk4* ή *cdk6* φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb), επάγοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα, η κινάση GSK3β φωσφορυλιώνοντας την κυκλίνη D1 στη θρεονίνη T286 και στέλνοντάς την στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση, εμποδίζει την είσοδο του κυττάρου στην φάση S του κύκλου. Η μετατόπιση της φωσφορυλιωμένης κυκλίνης από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα λαμβάνει χώρα με τη συνδρομή ειδικών υποδοχέων στην πυρηνική μεμβράνη όπως η CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1, exportin1). **(Ζ)** Στο κυτταρόπλασμα, οι πρωτεΐνες FBX4 και FBXW8 που λειτουργούν ως E3 λιγάσες,

ουβικιτινώνουν τη φωσφορυλιωμένη κυκλίνη D1, στέλνοντάς την στο 26S πρωτεάσωμα. **(H)** Είναι άγνωστο αν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες (FBX4 και FBXW8) συσχετίζονται με την επαγόμενη από την κινάση p38^{MARK} αποικοδόμηση της κυκλίνης. **(E)** Εναλλακτικά, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1 ρυθμίζονται και μέσω της κινάσης Mirk/Dyrk1B, η οποία φωσφορυλιώνει την πρώτη στη θρεονίνη T288 επάγοντας την αποικοδόμησή της. **(Θ)** Εντός του πυρήνα η κυκλίνη D1 δύναται να επηρεάζει την ενεργότητα διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων (TF), ανεξάρτητα του ρόλου που διαδραματίζει σε σύμπλοκο με τις cdk. Τροποποιημένο από (Alao 2007)

1.5.2.2.1 Η κινάση Mirk/ Dyrk1B

Η κινάση Mirk/Dyrk1B, εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο σκελετικό μυ συγκριτικά με άλλους φυσιολογικούς ιστούς. Η ωρίμανση των μυικών κυττάρων ρυθμίζεται σ' ένα μεγάλο ποσοστό από το μεταγραφικό παράγοντα MyoD, δομής έλικας-θηλιάς-έλικας (bHLH), ο οποίος ενεργοποιείται από την GTPάση Rho. Η ίδια GTPάση επάγει και την έκφραση της κινάσης Mirk/Dyrk1B, δεκαπλασιάζοντας τα επίπεδα της τελευταίας κατά τη διαφοροποίηση (Deng et al. 2003). Η Mirk δρα επίσης και ως μεταγραφικός ενεργοποιητής για τον παράγοντα HNF1α (Lim, Jin, and Friedman 2002) καθώς και για τον MEF2, ο οποίος εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των μυοβλαστών (Deng et al. 2005).

Σε κυτταρική σειρά μυοβλαστών C2C12 και σε συνθήκες στρες (αφαίρεση ορού από το υλικό καλλιέργειας), η Mirk/Dyrk1B οδήγησε τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα στη φάση αδράνειας G0, φωσφορυλιώνοντας τόσο την κυκλίνη D1 στη θρεονίνη T288 και επάγοντας την αποικοδόμησή της, όσο και την p27^{kip1} στη σερίνη S10 και επάγοντας τη σταθεροποίησή της (Deng et al. 2004). Καθώς τα φυσιολογικά κύτταρα σε αδράνεια ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια σαν το προαναφερθέν για την προστασία τους από το μεταβολικό στρες, φαίνεται πως και υποπληθυσμοί καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιούν παρόμοιους μηχανισμούς για την επιβίωσή τους. Από μελέτες καταστολής της σε καρκινικά κύτταρα διαφόρων τύπων (εντερικά, παγκρεατικά, ωοθηκικά), έχειδειχθεί πως η Mirk/Dyrk1B συμμετέχει σ' ένα ανεξάρτητο μονοπάτι προκειμένου τα κύτταρα να εξέρχονται της φάσης αδράνειας G0 μέσω ρύθμισης της αποικοδόμησης της κυκλίνης D1 και της σταθεροποίησης της p27^{kip1} (Hu, Nakhla, and Friedman 2011; Jin et al. 2009; Deng, Ewton, and Friedman 2009). Ειδικότερα, στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων του εντέρου (κυτταρικές σειρές HD6, SW480 και colo320) η καταστολή της έκφρασης της Mirk/Dyrk1B οδήγησε τα κύτταρα ν' αποκτήσουν βιοχημικά χαρακτηριστικά, όμοια με εκείνα που διαθέτουν τα κύτταρα στη φάση G1 του κύκλου: αυξημένα επίπεδα των κυκλινών D1 και D3, αυξημένη ενεργότητα των συμπλόκων CDK4/cyclin D

και αυξημένη φωσφορυλίωση των στόχων των CDK4, p130/Rb2. Τέλος, σε μία αρκετά πρόσφατη μελέτη (Gao et al. 2013) διαπιστώθηκε πως σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ωοθηκών και πνεύμονα, όπου η κινάση Mirk/Dyrk1B εκφράζεται ευρέως, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της τελευταίας βρίσκονται σε θετική συσχέτιση με τα αντίστοιχα της ενεργοποιημένης κινάσης ERK1/2, υποδηλώνοντας πως το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK/ERK ενδεχομένως να εμπλέκεται στη δράση της κινάσης Mirk/Dyrk1B.

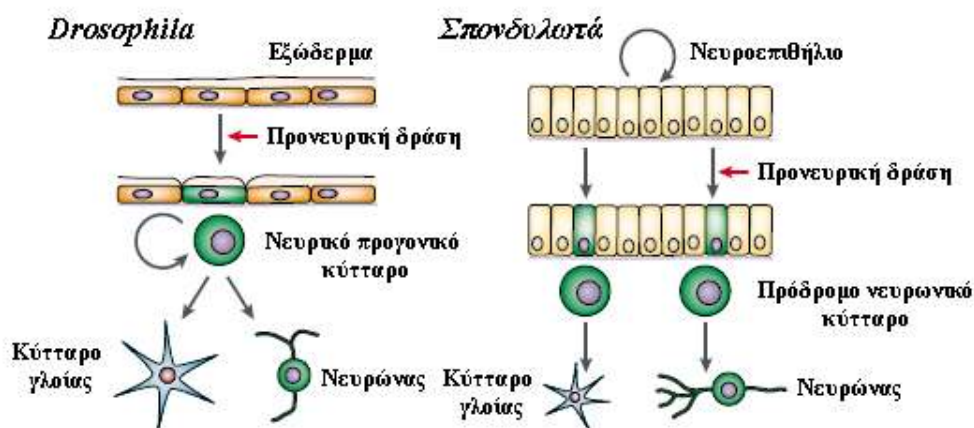
1.5.2.2.2 Η κινάση Dyrk1A

Η Mnb/Dyrk1A αποτελεί ένα από τα καλύτερα χαρακτηρισμένα μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας των κινασών. Εκφράζεται σε αφθονία στο νευρικό σύστημα συμμετέχοντας σε σημαντικές διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η νευρωνική διαφοροποίηση, η συναπτογένεση αλλά και ο κυτταρικός θάνατος (Tejedor and Hammerle 2011). Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την Dyrk1A εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 21 και επομένως υπερεκφράζεται στο σύνδρομο Down (τρισωμία 21) (Dowjat et al. 2007). Ενδείξεις από διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών, καθώς και από μελέτες στο κοτόπουλο και τη μύγα *Drosophila* (όπου το ορθόλογο γονίδιο της Dyrk1A ονομάζεται Minibrain), οδήγησαν στο συμπέρασμα πως τόσο η υπερ-έκφραση όσο και η καταστολή της έκφρασης της Dyrk1A συμβάλλουν σε νευροαναπτυξιακές διαταραχές, λόγω απορρύθμισης της νευρογένεσης. Από *in vivo* και *in vitro* πειράματα φάνηκε πως η υπερέκφραση της Dyrk1A επάγει πρόωμη διαφοροποίηση των νευρικών προγονικών κυττάρων καθώς και των κυττάρων PC12 (Kelly and Rahmani 2005; Yabut, Domogauer, and D'Arcangelo 2010). Επιπλέον, έχει δειχθεί πως συντονίζει την έξοδο των πρόδρομων νευρωνικών κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο με τη νευρωνική διαφοροποίηση, μέσω επαγωγής της έκφρασης της p27^{kip1} και καταστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch (Hammerle et al. 2011). Σε μία αρκετά πρόσφατη μελέτη (Soppa et al. 2014) διαπιστώθηκε πως η υπερέκφραση της Dyrk1A σε ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y, αναστέλλει την πρόοδο του κύκλου στη φάση G1, οδηγώντας τα κύτταρα σε νευρωνική διαφοροποίηση. Πιο συγκεκριμένα, μέσω φωσφορυλίωσης η Dyrk1A επάγει την αποικοδόμηση της κυκλίνης D1 και παράλληλα τη σταθεροποίηση της p27^{kip1}.

1.5.3 Μόρια-ρυθμιστές της γενεαλογίας των νευρικών προγονικών κυττάρων.

1.5.3.1 Προνευρικά γονίδια: γενικά χαρακτηριστικά.

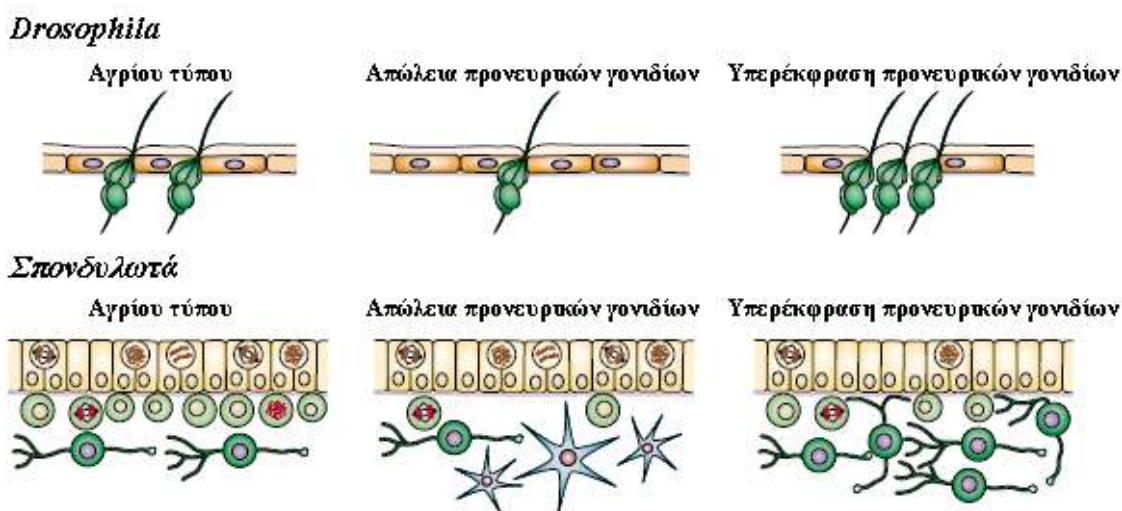
Ακόμη και σε οργανισμούς πολύ διαφορετικούς μεταξύ τους, όπως η μύγα ή ο ποντικός, τα προνευρικά γονίδια διαθέτουν παρόμοια δράση. Και στα δύο είδη είναι απαραίτητα για την επιλογή και τη διαφοροποίηση προγονικών κυττάρων προς μία ορισμένη γενεαλογία, λειτουργία που επιτελείται εν μέρει από την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του Notch. Εντούτοις, υπάρχουν σημαντικές διαφορές σε κυτταρικό επίπεδο ανάμεσα στη *Drosophila* και τους σπονδυλωτούς οργανισμούς ως προς τις αποφάσεις που λαμβάνονται με τη συμμετοχή των προνευρικών γονιδίων. Στη *Drosophila*, τα προνευρικά γονίδια εκφράζονται αρχικά σε εξωδερμικά κύτταρα που έχουν δυναμικό τόσο επιδερμικής όσο και νευρωνικής διαφοροποίησης. Η δράση τους οδηγεί στην επιλογή προγονικών κυττάρων δεσμευμένων σε νευρική μοίρα που παραμένουν όμως πολυδύναμα, δίνοντας γένεση σε νευρώνες αλλά και κύτταρα γλοίας. Αντίθετα, στους σπονδυλωτούς οργανισμούς τα προνευρικά γονίδια εκφράζονται αρχικά σε αυτο-ανανεούμενα νευροεπιθηλιακά κύτταρα των οποίων η νευρική μοίρα είναι ήδη καθορισμένη (**Εικ.1.11**). Η δράση τους οδηγεί στη γένεση πρόδρομων κυττάρων δεσμευμένων σε νευρωνική κατεύθυνση με περιορισμένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό (Bertrand, Castro, and Guillemot 2002).



Εικ.1.11 Σχηματική απεικόνιση του ρόλου των προνευρικών γονιδίων στη *Drosophila* και στους σπονδυλωτούς οργανισμούς (Bertrand, Castro, and Guillemot 2002).

Απώλεια της λειτουργικότητας των προνευρικών γονιδίων στη *Drosophila* επιφέρει μεταβολές στην κυτταρική ταυτότητα, με τα κύτταρα που προορίζονταν ν'αποτελέσουν μέρος των αισθητηρίων

οργάνων, να μετατρέπονται σε επιδερμικά (Dominguez and Campuzano 1993) (Εικ.1.12). Στην περίπτωση πάλι της εκτοπικής έκφρασης προνευρικών γονιδίων, λαμβάνει χώρα το αντίστροφο φαινόμενο (Rodriguez et al. 1990). Στον ποντικό, η απώλεια της προνευρικής λειτουργικότητας, οδηγεί σε αδυναμία των νευροεπιθηλιακών κυττάρων να δώσουν γένεση σε πρόδρομα νευρωνικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση πρόδρομων κυττάρων γλοίας (Guillemot et al. 1993; Ma et al. 1999). Στο κοτόπουλο, η πρόωμη έκφραση προνευρικών γονιδίων προκαλεί παύση του πολλαπλασιασμού των νευροεπιθηλιακών κυττάρων και πρόωρη νευρωνική διαφοροποίηση. Επομένως, ο καθορισμός της κυτταρικής μοίρας μέσω της δράσης των προνευρικών πρωτεϊνών εξαρτάται τόσο από το είδος του οργανισμού, όσο και από τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των κυτταρικών τύπων εντός του ίδιου οργανισμού.



Εικ.1.12 Απώλεια ή υπερέκφραση των προνευρικών γονιδίων οδηγεί σε διαταραχή της κυτταρικής γενεαλογίας. Στην επάνω σειρά (*Drosophila*) με πράσινο χρώμα σημαίνονται τα κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων, ενώ με πορτοκαλί τα επιδερμικά κύτταρα. Στην κάτω σειρά (Σπονδυλωτά), με κίτρινο χρώμα σημαίνονται τα νευροεπιθηλιακά κύτταρα, με ανοικτό πράσινο τα πρόδρομα νευρωνικά, με σκούρο πράσινο οι νευρώνες και με θαλασσί τα κύτταρα γλοίας (Bertrand, Castro, and Guillemot 2002).

1.5.3.1.1 Σημαντικά προνευρικά γονίδια που κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες.

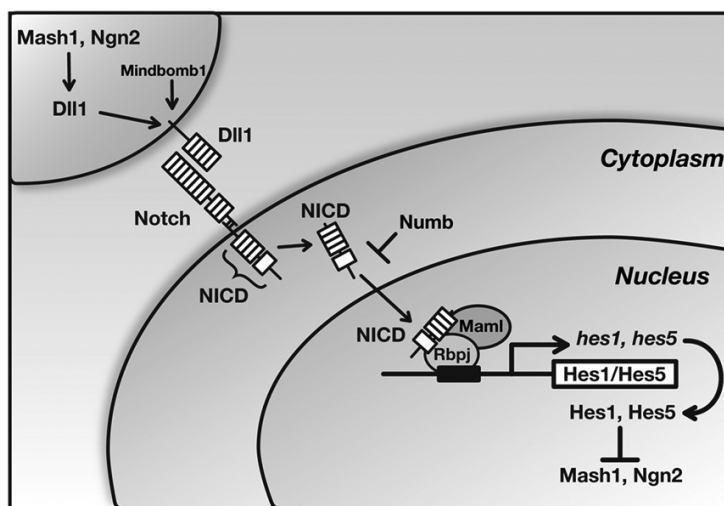
Ο ομοιωτικός μεταγραφικός παράγοντας Prospero που εκφράζεται στη *Drosophila*, αποτελεί έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρυθμιστή της ισορροπίας μεταξύ της αυτοανάνεωσης των νευρικών βλαστικών

κυττάρων και της διαφοροποίησής τους (Li and Vaessin 2000; Choksi et al. 2006). Η απώλεια του συγκεκριμένου γονιδίου οδηγεί σε αποκλίνουσα έκφραση γονιδίων του κυτταρικού κύκλου (*cyclin A*, *cyclin E* και *γονίδια string*) και εκτοπικό πολλαπλασιαστικό δυναμικό. Γι' αυτό και νευροβλάστες από τους οποίους εκλείπει ο Prospero, σχηματίζουν όγκους στο εμβρυϊκό νευρικό σύστημα της *Drosophila*. Αντίθετα, η εκτοπική έκφραση του prospero προκαλεί μεταγραφική καταστολή των ρυθμιστικών γονιδίων του κύκλου (όσα αναφέρθηκαν παραπάνω και του μεταγραφικού παράγοντα E2F) και πρόωμη λήξη της κυτταρικής διαίρεσης.

Στα θηλαστικά, δύο γονίδια, το *Prox1* (Prospero-related homeobox 1) και το *Mash1* (Mammalian achaete-scute homolog 1), κατέχουν κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη και διαμόρφωση του νευρικού συστήματος. Το *Mash1* είναι το ομόλογο του συμπλέγματος *achaete-scute (AS-C)* στη *Drosophila*, το οποίο εκφράζεται στους νευροβλάστες καθώς και στα δευτερογενή πρόδρομα κύτταρα GMCs (gaglion mother cells), συμμετέχοντας σε διάφορα στάδια της νευρογένεσης. Ομοίως, το *Mash1* εκφράζεται στο αναπτυσσόμενο Περιφερικό Νευρικό Σύστημα και ειδικότερα θεωρείται απαραίτητο για τη διαμόρφωση του αυτόνομου συστήματος (Sommer et al. 1995). Παρόλο που η έκφραση του *Mash1* είναι ευρεία και στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, δεν έχουν παρατηρηθεί, ιστολογικά, ανωμαλίες στον εγκέφαλο ποντικών στους οποίους έχει απαλειφθεί το συγκεκριμένο γονίδιο (*Mash1* knock-out mice), εκτός από κάποιες περιπτώσεις οσφρητικών και νοραδρενεργικών νευρώνων (Guillemot et al. 1993; Hirsch et al. 1998). Για το λόγο αυτό, δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητό πώς η *Mash1* εμπλέκεται στη νευρογένεση του ΚΝΣ. Το γονίδιο *Prox-1* κωδικοποιεί για μία ομοιωτική πρωτεΐνη ομόλογη της Prospero στη *Drosophila* και δρα καταρροϊκά των προνευρικών γονιδίων κατά τη νευρογένεση. Σε μία πρόσφατη μελέτη (Kaltezioti et al. 2010), δείχθηκε πως ο μεταγραφικός παράγοντας Prox-1 κατέχει θεμελιώδη ρόλο στη μετάβαση προς τη διαφοροποίηση. Ειδικότερα, καταστέλλει στα παραγόμενα πρόδρομα νευρωνικά κύτταρα την έκφραση του υποδοχέα Notch1, εμποδίζοντάς τα να λαμβάνουν ανασταλτικά σήματα (για τη διαφοροποίηση) από τα προσδέματα του Notch1 υποδοχέα, που είναι παρόντα σε γειτονικά κύτταρα. Αυτή η μεταγραφική καταστολή δύναται να ρυθμίζει την έξοδο απ' τον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίηση των νευρικών προγονικών κυττάρων (NPCs, Neural Progenitor Cells) κατά τη μετανάστευσή τους στις διαφορετικές περιοχές του νευρικού συστήματος και την απόκτηση της τελικής τους ταυτότητας.

Η συνδρομή του σηματοδοτικού μονοπατιού του Notch1 είναι καθοριστική για τη διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των νευρικών προγονικών κυττάρων (NPCs) και την αναστολή της νευρωνικής διαφοροποίησης. Όπως έχει περιγραφεί και στις αρχικές ενότητες, στο αναπτυσσόμενο

νευρικό σύστημα, τα νευρικά προγονικά κύτταρα υφίστανται αρχικά συμμετρικές διαιρέσεις αυξάνοντας τον πληθυσμό τους και στη συνέχεια κατά τη φάση της νευρογένεσης προχωρούν σε ασύμμετρες, από τις οποίες προκύπτει ένα προγονικό κι ένα πρόδρομο νευρωνικό κύτταρο που προορίζεται για νευρώνας. Σ' αυτούς τους πρώιμους νευρώνες, τα προνευρικά γονίδια επάγουν την έκφραση των προσδεμάτων του Notch1, Delta1 και Jagged, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν το Notch1 στα γειτονικά νευρικά προγονικά κύτταρα. Η αλληλεπίδραση του Notch1 με τα προσδέματά του οδηγεί σε αποκοπή του ενδοκυττάριου τμήματος του Notch (Notch intracellular domain, NICD) από το σύμπλεγμα πρεσενιλίνης/γ-σεκρετάσης (presenilin/γ-secretase) και τη μετατόπισή του στον πυρήνα όπου σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη RBP-J (CBF1). Το τελευταίο σύμπλοκο ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων Hes1 και Hes5 τα οποία δρουν καταρροϊκά του Notch1 καταστέλλοντας την έκφραση των προνευρικών γονιδίων και εμποδίζοντας τη νευρογένεση (Selkoe and Korsmeyer 2003). Με αυτή τη διαδικασία γνωστή και ως πλευρική αναστολή (lateral inhibition), οι νέοι νευρώνες που παράγονται εμποδίζουν τα γειτονικά νευρικά προγονικά κύτταρα να διαφοροποιηθούν, ελέγχοντας έτσι τον αριθμό των νευρώνων που γενώνται σε δεδομένη χρονική περίοδο και διατηρώντας έναν πληθυσμό προγονικών κυττάρων με δυναμικό μεταγενέστερης διαφοροποίησης είτε σε νευρώνες είτε σε κύτταρα γλοίας (**Εικ.1.13**).



Εικ.1.13 Σχηματική απεικόνιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του Notch1. Προνευρικά γονίδια όπως η Mash1 ή η Ngn2 επάγουν την έκφραση των προσδεμάτων Delta-like1 (Dll1) και Jagged1, τα οποία ενεργοποιούν τον υποδοχέα Notch σε γειτονικά κύτταρα. Το ενδοκυττάριο τμήμα του τελευταίου, κατόπιν αποκοπής του, μεταφέρεται στον πυρήνα όπου και σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη Rbpj που προσδένεται στο DNA και τον μεταγραφικό ενεργοποιητή Maml. Το σύμπλοκο NICD-Rbpj-Maml επάγει την

έκφραση μεταγραφικών καταστολέων των προνευρικών γονιδίων, όπως οι *Hes1* και *Hes5* (Shimojo, Ohtsuka, and Kageyama 2011).

Η *Neurogenin 2* (*Ngn2*), ένας ιστοειδικός μεταγραφικός παράγοντας δομής έλικας-θηλειάς-έλικας (*basic Helix-Loop-Helix, bHLH*), κρίνεται απαραίτητος για την ανάπτυξη των κρανιακών και αισθητικών γαγγλίων του νωτιαίου μυελού. Παράλληλα, έχει δειχθεί πως στον εμβρυϊκό εγκέφαλο ποντικού, συμμετέχει στη δέσμευση των προγονικών κυττάρων σε νευρωνική κατεύθυνση, με αναστολή της αστροκυτταρικής μοίρας καθώς επίσης και στη διαφοροποίηση των γλουταματεργικών νευρώνων. Η *Ngn2* επάγει τη μεταγραφή πολλών γονιδίων-στόχων μεταξύ των οποίων και ο μεταγραφικός παράγοντας *Neuro D*. Η μελέτη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στη *Ngn2* έχει αναδείξει σημαντικές πτυχές στη λειτουργικότητά της. Η φωσφορυλίωση, για παράδειγμα, στην τυροσίνη Y241, συνδέεται με τη μετανάστευση και τη διαμόρφωση του δενδριτικού πλέγματος των φλοιϊκών νευρώνων (Hand et al. 2005). Δύο ακόμη φωσφορυλιώσεις σε ισάριθμες σερίνες του καρβοξυτελικού της άκρου (S231 και S234), έχει δειχθεί να συμβάλλουν στον καθορισμό της ταυτότητας των κινητικών νευρώνων, διευκολύνοντας πιθανότατα την αλληλεπίδραση της *Ngn2* με τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας LIM (Ma et al. 2008). Ως ιδιαίτερης σημασίας αξιολογούνται οι πολλαπλές φωσφορυλιώσεις σε κατάλοιπα σερίνης της *Ngn2* από κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs), οι οποίες αναστέλλουν τη μεταγραφική της ικανότητα γονιδίων που επάγουν τη νευρωνική διαφοροποίηση (Ali et al. 2011). Πρόκειται μάλιστα για μία ενδεικτική περίπτωση, κατά την οποία η διάρκεια της φάσης G1 επηρεάζει τη διαφοροποίηση: όταν η G1 είναι μικρής διάρκειας, οι CDKs αθροίζονται γρήγορα και φωσφορυλιώνουν τη *Ngn2*, περιορίζοντας έτσι τη μεταγραφική ικανότητα της τελευταίας. Αντίστροφα, με την επιμήκυνση της φάσης G1, τα επίπεδα των CDKs παραμένουν χαμηλά και η υπο-φωσφορυλιωμένη *Ngn2* επάγει τη νευρωνική διαφοροποίηση, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων.

1.5.3.2 Τα μορφογόνα και ο ρόλος τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον καθορισμό της κυτταρικής ταυτότητας.

Τα μορφογόνα αποτελούν εξωκυττάρια σηματοδοτικά μόρια που δρουν σε απόσταση από το σημείο παραγωγής τους και σε βαθμίδωση συγκέντρωσης, επηρεάζοντας το πρότυπο της διαφοροποίησης κυτταρικών πληθυσμών στον αναπτυσσόμενο ιστό (Ulloa and Briscoe 2007). Επιπλέον, πολλά μορφογόνα έχει δειχθεί να λειτουργούν και ως μιτογόνοι παράγοντες, οδηγώντας στο

συμπέρασμα πως ο πολλαπλασιασμός και η κυτταρική διαφοροποίηση δύνανται να ρυθμίζονται από τα ίδια μόρια.

1.5.3.2.1 Οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (*Fibroblasts Growth Factors, FGFs*).

Οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (*Fibroblasts Growth Factors, FGFs*), συνιστούν μία μεγάλη οικογένεια εκκρινόμενων πρωτεϊνών που δεσμεύονται σε υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και είναι γνωστοί πρωτίστως για τη μιτογόνο δράση τους. Η τελευταία, επεκτείνεται και στα νευρικά προγονικά κύτταρα, καθώς η σηματοδότηση μέσω των FGFs είχε δειχθεί από αρκετά χρόνια πριν να εμπλέκεται στην ανάπτυξη *in vitro* των νευρικών βλαστικών κυττάρων (Vescovi et al. 1993). Επιπρόσθετα του ρόλου τους στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού, οι FGFs διαθέτουν πολλαπλούς ρόλους κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη συμπεριλαμβανομένων και γεγονότων διαμόρφωσης και κυτταρικής εξειδίκευσης του κεντρικού νευρικού συστήματος (Thisse and Thisse 2005). Κατά το σχηματισμό του νευρικού σωλήνα, ένας πληθυσμός νευρικών προγονικών κυττάρων στην ουραία περιοχή διατηρείται μέσω σηματοδότησης των FGFs (και ειδικότερα μέσω του FGF8) σε αδιαφοροποίητη κατάσταση (Delfino-Machin et al. 2005). Μέσα στη βλαστική αυτή ζώνη, εμποδίζεται η έκφραση ενός αριθμού γονιδίων υπεύθυνων για τη διαμόρφωση του ραχιαίο-κοιλιακού άξονα (π.χ. *Pax6*, *Irx3* και *Dbx1/2*), η οποία επάγεται αργότερα κατά τη διαφοροποίηση. Όταν τα συγκεκριμένα προγονικά κύτταρα εκτίθενται κατόπιν σε ρετινοϊκό οξύ (RA) παραγόμενο από τους παρακείμενους σωμίτες, η επίδραση του FGF ελαττώνεται με αποτέλεσμα εκείνα να απελευθερώνονται από την ανασταλτική του δράση και να ανταποκρίνονται σε σήματα διαφοροποίησης σε νευρώνες (π.χ. *Shh*) (Diez del Corral and Storey 2004). Σημειώνεται ακόμη πως στην παρεγκεφαλίδα, ο FGF αναστέλλει τη σηματοδότηση του *Shh* μέσω των κινασών ERK και JNK, αναρροϊκά των μεταγραφικών παραγόντων Gli οι οποίοι ελέγχονται από το *Shh* (Fogarty et al. 2007).

1.5.3.2.2 Το μονοπάτι σηματοδότησης *Sonic hedgehog (Shh)*.

Το μορφογόνο *Sonic hedgehog (Shh)* είναι ένα μέλος της οικογένειας *hedgehog* των εκκρινόμενων γλυκοπρωτεϊνών, που επηρεάζουν την ανάπτυξη πολλών κυτταρικών ομάδων και οργάνων. Εκφράζεται στη νωτοχορδή, κοιλιακά του νευρικού σωλήνα και ο ρόλος του είναι κρίσιμος για τη γένεση πέντε υποτύπων νευρικών προγονικών κυττάρων (Briscoe and Ericson 2001). Το *Shh* δρα μέσω του συμπλέγματος υποδοχέων Patched 1 (Ptc1)–Smoothed (Smo), ώστε να ενεργοποιηθεί καταρροϊκά το μονοπάτι σηματοδότησής του. Τα κύτταρα που ανταποκρίνονται στο *Shh*, αυξάνουν

την έκφραση του τύπου zinc-finger μεταγραφικού παράγοντα Gli1, ενώ δύο ακόμη μέλη τα Gli2 και Gli3 συμμετέχουν συνδυαστικά στη μεταγωγή του σήματος: τα Gli1 και Gli2 ενισχύουν περαιτέρω τη δράση του Shh ενώ το Gli3 (και ορισμένες φορές μεμονωμένα το Gli2) την ανταγωνίζεται (Ruiz i Altaba, Palma, and Dahmane 2002). Η υπερέκφραση του Shh ραχιαία του νευρικού σωλήνα, προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όμως από ένα σημείο και μετά τα κύτταρα σταματούν να διαιρούνται, παρά το γεγονός ότι το μονοπάτι του Shh διατηρείται ενεργό. Από την άλλη πλευρά, η τελική νευρωνική διαφοροποίηση των μεταμιτωτικών κυττάρων σε κύτταρα θετικά για το νευρωνικό μάρτυρα Tuj1, αναστέλλεται από την υπερέκφραση του Shh υποδεικνύοντας πως το συγκεκριμένο μορφογόνο έχει διττό ρόλο: αφ'ενός ενεργοποιεί τον κυτταρικό κύκλο, αφ'ετέρου αναστέλλει τη διαφοροποίηση (Rowitch et al. 1999). Ομοίως, το Shh εμποδίζει τη διαφοροποίηση και επάγει τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων κοκκιωδών κυττάρων στην αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα (Wechsler-Reya and Scott 1999). Κοιλιακά του νευρικού σωλήνα, το Shh καθορίζει την κυτταρική μοίρα διαφόρων τάξεων νευρώνων κατά τρόπο εξαρτώμενο της συγκέντρωσής του: υψηλή συγκέντρωση του Shh επάγει διαφοροποίηση σε κινητικούς νευρώνες, όταν όμως το σηματοδοτικό του μονοπάτι μπλοκάρεται τότε γενώνται διάμεσοι νευρώνες (Briscoe et al. 2000). Ιδιαίτερα σημαντική κρίνεται η συνδρομή του Shh στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και τη διατήρηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων, τόσο στον εμβρυικό όσο και στον ενήλικο εγκέφαλο (Palma and Ruiz i Altaba 2004; Palma et al. 2005).

1.5.3.2.3 Το μονοπάτι σηματοδότησης των *Wnts*.

Ο πολλαπλασιασμός των νευρικών προγονικών κυττάρων εξασφαλίζεται από επιπρόσθετα μιτογόνα μόρια, όπως οι εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες της οικογένειας Wnt, που εκφράζονται στον αναπτυσσόμενο νευρικό σωλήνα κι έχει δειχθεί να συμμετέχουν στον καθορισμό του κεφαλουραίου του άξονα και το σχηματισμό της νευρικής ακρολοφίας. Επιπλέον τα μέλη Wnt1 και Wnt3a που εμφανίζουν υψηλή έκφραση ραχιαία του νευρικού σωλήνα, συμμετέχουν σε αναπτυξιακές διαδικασίες και κατά το ραχιαίο-κοιλιακό άξονα του νωτιαίου μυελού (Ciani and Salinas 2005). Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την κυτταρική επιβίωση είναι καλά μελετημένος σε διάφορα συστήματα. Ποντίκια στα οποία είχε απαλειφθεί το γονίδιο Wnt1 εμφάνισαν σημαντικές ανωμαλίες στη διαμόρφωση μεγάλου μέρους του εγκεφάλου (μεσεγκέφαλος, πρόσθιος εγκέφαλος) και την παρεγκεφαλίδα (Thomas and Capocchi 1990; McMahon and Bradley 1990). Από την άλλη πλευρά, κάτι αντίστοιχο συνέβη με τον ιππόκαμπο στην περίπτωση ποντικών

στους οποίους είχε απαλειφθεί το γονίδιο Wnt3a (Lee et al. 2000). Στο διαμορφούμενο νωτιαίο μυελό, οι εκκρινόμενες με βαθμίδωση στη συγκέντρωσή τους Wnts (κυρίως οι Wnt1 και Wnt3a), έχει προταθεί να ρυθμίζουν τον πληθυσμό των νευρικών προγονικών κυττάρων, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό τους και εμποδίζοντας την έξοδό τους από τον κυτταρικό κύκλο (Megasan and McMahon 2002). Αυτό λαμβάνει χώρα εν μέρει μέσω της μεταγραφικής ρύθμισης των κυκλινών D1 και D2. Το σηματοδοτικό μονοπάτι που ξεκινά από το μορφογόνα wnts, περιλαμβάνει το μεταγραφικό συν-ενεργοποιητή β-catenin, ο οποίος μετατοπίζεται στον πυρήνα και ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες της οικογένειας TCF/Lef. Έτσι, στο νευρικό σωλήνα οι παράγοντες Wnt-β-catenin επάγουν την έκφραση των κυκλινών της φάσης G1 του κύκλου (Cyclin D1 και Cyclin D2) προκειμένου να τα κύτταρα να παραμείνουν στον κύκλο, όχι όμως κι εκείνες της φάσης G2/M (Cyclin A1 ή Cyclin B3). Σημειώνεται δε, πως η κυτταρική απόκριση στα συγκεκριμένα μιτογόνα σινιάλα, ενδέχεται να πραγματοποιείται και μέσω άλλων στόχων και όχι αποκλειστικά των κυκλινών.

1.5.3.2.4 Οι πρωτεΐνες BMPs δύνανται να ρυθμίζουν το μονοπάτι σηματοδότησης των Wnts.

Οι πρωτεΐνες μορφογένεσης των οστών (Bone morphogenetic proteins, BMPs), είναι πολυ-λειτουργικοί αυξητικοί παράγοντες που ανήκουν στην υπερ-οικογένεια του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (Transforming Growth Factor beta, TGFbeta). Μαζί με τα σηματοδοτικά μόρια Wnts φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του ραχιαιο-κοιλιακού άξονα του νευρικού σωλήνα και ειδικότερα στο σωστό καθορισμό των τοπικών κυτταρικών τύπων (Wine-Lee et al. 2004). Δύο τάξεις υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης μετάγουν το σήμα των BMPs στους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας Smad, οι οποίοι στην ενεργή (φωσφορυλιωμένη) τους μορφή εισέρχονται στον πυρήνα και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση. Σημειώνεται πως οι BMPs συμμετέχουν στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των νευρικών προγονικών κυττάρων και μάλιστα το επιτυγχάνουν σε αλληλεπίδραση με το σηματοδοτικό μονοπάτι των Wnts: η μεταγραφή των Wnt1 και Wnt3a καθώς και άλλων μορίων του μονοπατιού, επάγεται από τις BMPs και αντίστροφα η μεταγραφή των τελευταίων επάγεται από τις Wnts (Chesnutt et al. 2004; Ille et al. 2007). Αυτή η στενή σχέση των δύο μονοπατιών καθιστά πολύπλοκη την ερμηνεία δεδομένων που προκύπτουν από τη μελέτη καθενός ξεχωριστά. Πρόσφατες σχετικά μελέτες αναδεικνύουν μία ανταγωνιστική δράση των εν λόγω μορίων κατά την ανάπτυξη του νευρικού σωλήνα. Η BMP2, μειώνει τα επίπεδα της επαγόμενης από Wnt κυκλίνης D1 σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευροσφαιρών από νωτιαίο μυελό αρουραίου. Αντίστροφα, κάτω από τις ίδιες συνθήκες,

το μιτογόνο Wnt1 ανταγωνίζεται την επαγόμενη από BMP2 νευρωνική διαφοροποίηση (Ille et al. 2007).

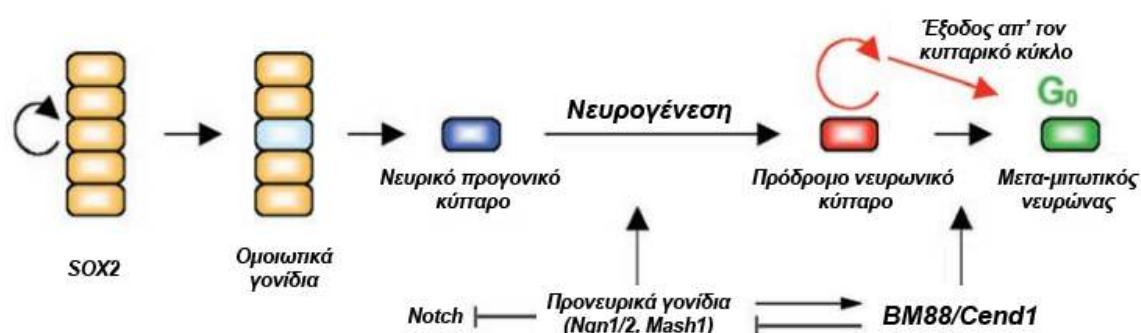
1.6 Η ΝΕΥΡΟΕΙΔΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ BM88/CEND1

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η έξοδος απ' τον κυτταρικό κύκλο των πρόδρομων νευρικών κυττάρων που πρόκειται να δώσουν γένεση σε νευρώνες, συνοδεύεται από την απόκτηση και διατήρηση ενός νευρωνικού φαινοτύπου. Σ' αυτήν την προκαθορισμένη και καλά οργανωμένη διαδικασία εμπλέκεται ένας μεγάλος αριθμός εκφραζόμενων γονιδίων, μεταξύ των οποίων τα προνευρικά καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας «έλικας-θηλειάς-έλικας» (helix-loop-helix). Επίσης, συμμετέχουν πρωτεΐνες που επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο και εδράζονται είτε στον πυρήνα του κυττάρου είτε στο κυτταρόπλασμα. Ως ιδιαίτερης σημασίας κρίνεται ο τελευταίος κύκλος των πρόδρομων κυττάρων για το είδος της νευρωνικής μοίρας που πρόκειται ν' ακολουθηθεί, γι' αυτό και η μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στη συγκεκριμένη φάση αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Η πρωτεΐνη BM88/Cend1 (cell cycle exit and neuronal differentiation), ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος στο εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (Patsavoudi, Hurel, and Matsas 1989). Εντοπίζεται τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών όπως του ποντικού, του αρουραίου, του κουνελιού, του χοίρου και του ανθρώπου (Gaitanou et al. 2001; Patsavoudi et al. 1995), ενώ σχετικά πρόσφατα απομονώθηκε το cDNA της BM88/Cend1 και από το κοτόπουλο (Politis, Rohrer, and Matsas 2007). Πρόκειται για διαμεμβρανική πρωτεΐνη αποτελούμενη από δύο όμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους 22-23 kDa ανάλογα με το είδος του ζώου, οι οποίες δεν είναι γλυκοζυλιωμένες και συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό (Patsavoudi, Hurel, and Matsas 1991). Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε εγκέφαλο ενήλικου αρουραίου, έδειξαν ότι η BM88/Cend1 εντοπίζεται κυρίως στη μεμβράνη ενδοκυτταρικών οργανιδίων όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα συναπτικά κυστίδια και στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Patsavoudi et al. 1995). Αξίζει να σημειωθεί πως το ανθρώπινο γονίδιο της Cend1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11p15.5, σε μία περιοχή που συνδέεται με γενετικές διαταραχές και διαφόρους τύπους καρκίνων (Gaitanou et al. 2001). Η ανάλυση του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της Cend1, ανέδειξε την Sp1 ως υπεύθυνο μεταγραφικό παράγοντα για την ενεργοποίησή του σε πρωτογενείς

καλλιέργειες νευρώνων (Papadodima et al. 2005), ενώ είναι γνωστό πως δυσλειτουργίες σηματοδοτικών μονοπατιών εξαρτώμενων από την Sp1, βρίσκονται στη βάση νευροεκφυλιστικών νόσων.

Η BM88/Cend1 εντοπίστηκε αρχικά σε ώριμους νευρώνες. Σε επόμενες μελέτες όμως, φάνηκε πως σηματοδοτεί τα νευρωνικά κύτταρα καθ' όλη τη διάρκεια της γενεαλογίας τους. Η έκφρασή της είναι χαμηλή στα προγονικά νευρικά κύτταρα και κατόπιν αυξάνεται κατά τη νευρογένεση στα πρόδρομα κύτταρα που είναι δεσμευμένα ν' ακολουθήσουν τη νευρωνική κατεύθυνση (**Εικ.1.14**). Τα επίπεδα της Cend1 παραμένουν υψηλά στους πρώιμους αλλά και στους ώριμους μεταμιτωτικούς νευρώνες, ενώ στον ενήλικο εγκέφαλο η Cend1 ανιχνεύεται και στα πρόδρομα νευρωνικά κύτταρα των περιοχών όπου λαμβάνει χώρα η δευτερογενής νευρογένεση, δηλαδή στην υποκοιλιακή ζώνη και τον ιππόκαμπο (Katsimpardi et al. 2008; Koutmani et al. 2004). Σημειώνεται πως η Cend1 δεν ανιχνεύεται σε κύτταρα γλοίας, τόσο πρόδρομα όσο και ώριμα, στον εγκέφαλο εμβρύου αλλά και νεογέννητου αρουραίου (Koutmani et al. 2004). Στοιχειοθετείται συνεπώς μία ενδιαφέρουσα σύνδεση μεταξύ της έκφρασης της Cend1 και της διαφοροποίησης των πρόδρομων νευρικών κυττάρων προς τη νευρωνική κατεύθυνση. Το γεγονός μάλιστα ότι η Cend1 σχετίζεται *in vivo* με ασύμετρες κυτταρικές διαιρέσεις από τις οποίες προκύπτει ένα προγονικό κύτταρο όμοιο με το μητρικό και ένα κύτταρο της νευρωνικής γενεαλογίας (Koutmani et al. 2004), ενώ επάγει *in vitro* τη διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος ποντικού (Neuro 2a) (Mamalaki et al. 1995), υποστηρίζει ακόμη περισσότερο την πιθανή λειτουργική δράση της στις εν λόγω αναπτυξιακές διαδικασίες.



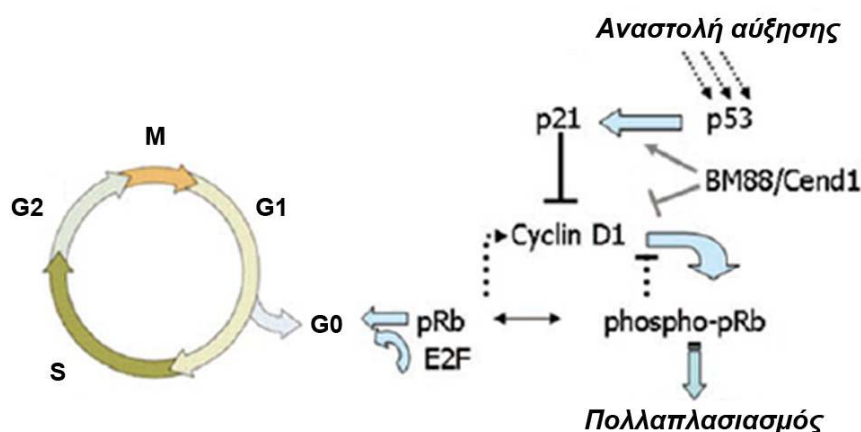
Εικ.1.14 Σχηματική απεικόνιση της δράσης της Cend1 στη ρύθμιση της εξόδου απ' τον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίηση των πρόδρομων νευρωνικών κυττάρων. Στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των σπονδυλωτών, η διαδικασία που οδηγεί από τα πολυδύναμα νευρικά βλαστικά κύτταρα (neural stem cells) στα νευρικά προγονικά κύτταρα και στη συνέχεια στα δεσμευμένα προς νευρωνική μοίρα πρόδρομα κύτταρα, ελέγχεται

ιεραρχικά από μία ποικιλία μεταγραφικών παραγόντων. Τα προνευρικά γονίδια έχουν την ικανότητα να επάγουν τη νευρογένεση, ενώ η *Cend1* δρώντας κατά πάσα πιθανότητα καταρροϊκά αυτών των γονιδίων, ρυθμίζει την έξοδο απ' τον κυτταρικό κύκλο και τη νευρωνική διαφοροποίηση. Τροποποιημένο από (Politis et al. 2007).

Περαιτέρω *in vitro* μελέτη σε κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού, έδειξε ότι η *Cend1* συμμετέχει στην ολοκλήρωση της εξόδου από τον κυτταρικό κύκλο και στη διαφοροποίηση των Neuro 2a κυττάρων, ενεργοποιώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι των p53-pRb. Επιπρόσθετα, η αντι-πολλαπλασιαστική δράση της *Cend1* συνδυάζεται με μείωση των επιπέδων της κυκλίνης D1 και μετατόπιση της τελευταίας στο κυτταρόπλασμα καθώς και με αύξηση της υποφωσφορυλιωμένης μορφής της pRb (Georgoroulou et al. 2006) (Εικ.1.15). *In vivo* πειράματα σε έμβρυο κοτόπουλου επιβεβαίωσαν το ρόλο της *Cend1* ως προς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση: η εκτοπική έκφραση της *Cend1* στο νευρικό σωλήνα του εμβρύου (ηλικιακό στάδιο HH 12-13), είχε ισχυρή αντι-πολλαπλασιαστική δράση, οδηγώντας τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα σε πρόωρη έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και τη δέσμευσή τους σε μονοπάτια διαφοροποίησης. Ειδικότερα, η *Cend1* οδήγησε τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα να ξεπεράσουν το φραγμό στη διαφοροποίησή τους λόγω πλευρικής αναστολής, καταστέλλοντας το Notch1 και την εκτελεστική πρωτεΐνη αυτού Hes5. Προέκυψε έτσι ένας σημαντικός αριθμός γειτονικών μετα-μιτωτικών νευρώνων σε μία περιοχή της κοιλιακής ζώνης (VZ) στην οποία φυσιολογικά εκφραζόταν το Notch1. Αξίζει να σημειωθεί πως η ταυτότητα των εκτοπικών νευρώνων δεν επηρεάστηκε από την έκφραση της *Cend1* αλλά από την τοπολογία τους, υποδηλώνοντας πως η *Cend1* σχετίζεται με τη γενικότερη νευρωνική διαφοροποίηση και όχι με τη γένεση εξειδικευμένων νευρωνικών υποτύπων. Αντίστροφα, η καταστολή της έκφρασης της *Cend1* με χρήση siRNA (μικρού μεγέθους RNAs που μπλοκάρουν ειδικά τη μετάφραση των mRNAs της *Cend1*) σε καλλιέργειες νευρικών προγονικών κυττάρων από νωτιαίο μυελό εμβρύου ποντικού (E12.5), ενίσχυσαν τον πολλαπλασιασμό και εμπόδισαν την νευρωνική διαφοροποίηση (Politis et al. 2007).

Από την άλλη πλευρά, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* μελέτες παρέχουν ενδείξεις πως η *Cend1* αποτελεί μέρος ενός σηματοδοτικού μονοπατιού ενεργοποιούμενο από προνευρικά γονίδια ώστε να πυροδοτηθεί η νευρωνική διαφοροποίηση (Papadodima et al. 2005; Politis et al. 2007). Στον αναπτυσσόμενο νευρικό σωλήνα του κοτόπουλου, η *Cend1* φαίνεται να επάγεται κατόπιν υπερέκφρασης του προνευρικού γονιδίου Mash1 (Papadodima et al. 2005; Politis et al. 2007). Επιπλέον, ο πλησιέστερος υποκινητής του ανθρώπινου γονιδίου της *Cend1*, περιέχει τη

χαρακτηριστική αλληλουχία-μοτίβο E-box που αποτελεί σημείο πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων τύπου έλικας-θηλειάς-έλικας (bHLH). Πράγματι, η neurogenin1 που ανήκει στη συγκεκριμένη κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων, έχει δειχθεί να ενεργοποιεί τον υποκινητή της Cend1 (Papadodima et al. 2005), υποδηλώνοντας πως η τελευταία τοποθετείται καταρροϊκά της δράσης προνευρικών γονιδίων, χωρίς όμως να αποκλείεται και το ενδεχόμενο μιας θετικής ή αρνητικής ανάδρασης (Εικ.1.14).

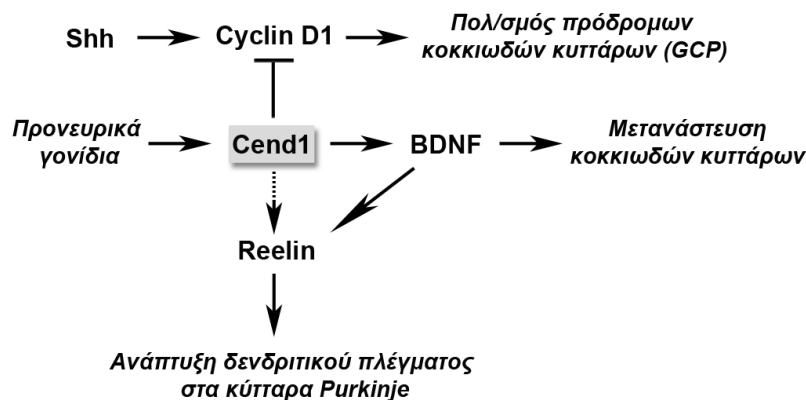


Εικ.1.15 Η BM88/Cend1 εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι p53-cyclin D1-pRb οδηγώντας σε αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0. Ειδικότερα, η BM88/Cend1 επάγει τη δράση της p53 και του αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών CDK4/CDK6 p21, ο οποίος βρίσκεται υπό τον έλεγχο της p53, ενώ παρεμβαίνει και στη σηματοδότηση της κυκλίνης D1.

Ο φυσιολογικός ρόλος της Cend1 μελετήθηκε και στο μοντέλο της παρεγκεφαλίδας, μιας περιοχής του εγκεφάλου όπου η έκφρασή της είναι ιδιαίτερα υψηλή. Πιο συγκεκριμένα, σε διαγονιδιακά ποντίκια, στα οποία είχε απαλειφθεί πλήρως το γονίδιο της Cend1 (Cend1^{-/-}), διαπιστώθηκε εντονότερος πολλαπλασιασμός πρόδρομων κοκκιωδών κυττάρων, καθυστερημένη μετανάστευση κοκκιωδών κυττάρων από την έξω στην έσω κοκκιώδη στιβάδα της παρεγκεφαλίδας, καθώς και ελλιπής ανάπτυξη του δενδριτικού πλέγματος των κυττάρων Purkinje (Sergaki, Guillemot, and Matsas 2010). Οι αναπτυξιακές αυτές βλάβες αποτυπώνονταν στην κινητική συμπεριφορά των Cend1^{-/-} ποντικών, οι οποίοι εμφάνιζαν αταξική βάδιση και προβλήματα στο συντονισμό των κινήσεων. Περαιτέρω μελέτη με βιοχημικές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους, της παρεγκεφαλίδας των Cend1^{-/-} ποντικών συγκριτικά με τους αγρίου τύπου (wild type), ανέδειξε ενδιαφέρουσες διαφορές στην έκφραση γονιδίων σχετικών με τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση.

Πιο συγκεκριμένα, τα πρωτεϊνικά αλλά και τα επίπεδα mRNA της κυκλίνης D1 εμφανίστηκαν αυξημένα στους *Cend1*^{-/-} ποντικούς, ενώ δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στα επίπεδα της *p27*^{kip1}. Καθώς ο μιτογόνο παράγοντας Sonic hedgehog (Shh) αποτελεί το βασικό σήμα πολλαπλασιασμού των πρόδρομων κοκκιωδών κυττάρων της παρεγκεφαλίδας (GCP) και ελέγχει την έκφραση της κυκλίνης D1 (Corrales et al. 2006), διερευνήθηκε το μονοπάτι αυτό και στους *Cend1*^{-/-} ποντικούς. Παρόλο που δεν διαπιστώθηκαν μεταβολές στα επίπεδα mRNA του Shh ανάμεσα στις δύο ομάδες ποντικών (*Cend1*^{-/-} και wt), τα επίπεδα mRNA του υποδοχέα Patched1 του Shh, εμφανίστηκαν μειωμένα κατά τη γέννηση (P0) των *Cend1*^{-/-}. Από την άλλη πλευρά, όταν εξετάστηκε η έκφραση του νευροτροφικού παράγοντα BDNF ο οποίος έχει δείχθει να επάγει τη μετανάστευση των κοκκιωδών κυττάρων (GC) (Borghesani et al. 2002), βρέθηκε ελαττωμένη στους *Cend1*^{-/-} ποντικούς συγκριτικά με τους wt, υποδηλώνοντας μία συσχέτιση της μειωμένης έκφρασής του με την προβληματική μετανάστευση των κυττάρων. Σημειώνεται ακόμη πως η απαλοιφή του γονιδίου της *Cend1* οδήγησε σε ελλιπή διαφοροποίηση των κυττάρων Purkinje, με εμφανώς μειωμένη έκταση του δενδριτικού τους πλέγματος, ένας φαινότυπος που απαντάται και κατοπιν καταστολής της πρωτεΐνης reelin (Trommsdorff et al. 1999). Η reelin εμπλέκεται στην ωρίμανση των δενδριτών όχι μόνο των κυττάρων Purkinje της παρεγκεφαλίδας, αλλά και εκείνων των νευρώνων του ιπποκάμπου (Niu et al. 2004) και η έκφρασή της μειώθηκε σημαντικά στους *Cend1*^{-/-} ποντικούς.

Ο μηχανισμός μιας πιθανής συνδυασμένης δράσης των *Cend1*, BDNF και reelin κατά την ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας δεν είναι γνωστός. Εντούτοις, βάσει των προαναφερθέντων ενδείξεων θα υποθέταμε πως η ρύθμιση της έκφρασης ή η σταθεροποίηση του BDNF από την *Cend1* στα κοκκιώδη κύτταρα και ίσως στα κύτταρα Purkinje, λαμβάνει χώρα μέσω σηματοδότησης ασβεστίου (Kokubo et al. 2009; Masgrau et al. 2009). Όπως φαίνεται σχηματικά στην εικόνα **Εικ.1.16**, η έκκριση του BDNF επάγει τη μετανάστευση των κοκκιωδών κυττάρων (Borghesani et al. 2002), δύναται όμως και να επηρεάζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων Purkinje είτε άμεσα κατά αυτοκρινή/παρακρινή τρόπο, είτε έμμεσα ρυθμίζοντας την έκφραση της reelin στα πρόδρομα κοκκιώδη κύτταρα η οποία με τη σειρά της ελέγχει την ανάπτυξη των κυττάρων Purkinje. Εναλλακτικά, είναι πιθανό οι αλλαγές στο σηματοδοτικό μονοπάτι *shh/cyclin D1* αλλά και στα επίπεδα έκφρασης της reelin, να οφείλονται στην παρατεταμένη παραμονή των πρόδρομων κοκκιωδών κυττάρων στην εξωτερική κοκκιώδη στιβάδα (EGL). Πράγματι, έχει δείχθει πως τα τελευταία εξακολουθούν να πολλαπλασιάζονται όταν εκτίθενται σε μιτογόνα σινιάλα στην εξωτερική κοκκιώδη στιβάδα, ενώ οδηγούνται σε έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο καθώς μεταναστεύουν μακριά από τη συγκεκριμένη περιοχή (Choi et al. 2005).



Εικ.1.16 Σχηματική απεικόνιση της συμμετοχής της Cend1 στα πιθανά σηματοδοτικά μονοπάτια ανάπτυξης της παρεγκεφαλίδας.

1.7 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ BM88/ CEND1.

Αν και η δράση της BM88/Cend1 έχειδειχθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, λίγα είναι γνωστά για τις φυσικές της αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες και κατ' επέκτασιν για το σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει προκειμένου να επιτελέσει το διπλό της ρόλο. Προς την κατεύθυνση εξεύρεσης αλληλεπιδρούσων πρωτεϊνών με την BM88/Cend1, προκαταρκτικές μελέτες σάρωσης cDNA βιβλιοθήκης από εγκέφαλο ενήλικου ποντικού σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων, ανέδειξαν την πρωτεΐνη RanBPM (Ran-Binding Protein M) ως αλληλεπιδρούσα με την Cend1.

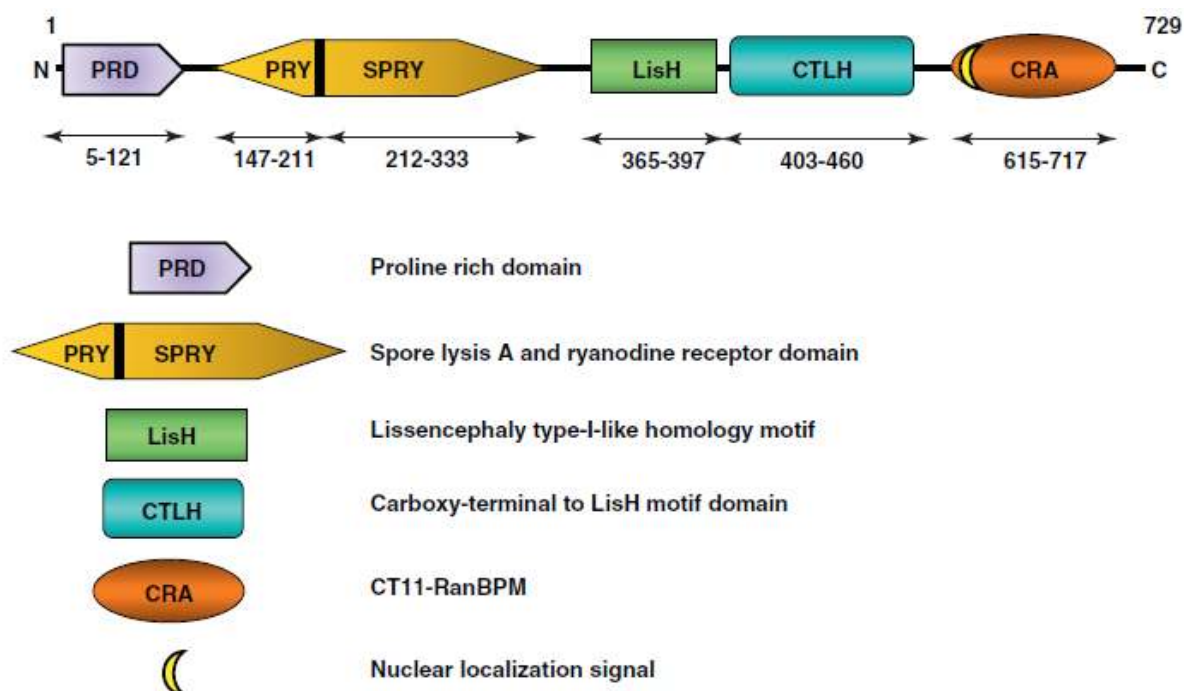
1.7.1 Η πρωτεΐνη RanBPM: γενικά χαρακτηριστικά.

Η RanBPM λειτουργεί ως μόριο-ικρίωμα πολλών πρωτεϊνικών συμπλόκων, λαμβάνοντας μέρος σε ποικίλα μονοπάτια σηματοδότησης κυττάρων τόσο του ανοσοποιητικού όσο και του νευρικού συστήματος (Suresh, Ramakrishna, and Baek 2012; Murrin and Talbot 2007). Η RanBPM ταυτοποιήθηκε αρχικά ως μία πρωτεΐνη μεγέθους 55 kDa (Nakamura et al. 1998), στη συνέχεια όμως από μελέτες της ίδιας ερευνητικής ομάδας φάνηκε πως το μέγεθός της είναι 90 kDa περιέχοντας πολλά κατάλοιπα προλίνης και γλουταμίνης στο αμινοτελικό της άκρο (Nishitani et al. 2001). Παράλληλα, εμφάνιζε ασθενή αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη Ran και ο ενδοκυτταρικός της εντοπισμός δεν περιοριζόταν στην περιοχή οργάνωσης των μικροσωληνίσκων, στο κεντρόσωμα, όπως αρχικά είχε διαπιστωθεί. Από τα δέκα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στη Ran

Ran-Binding Proteins), η RanBPM (RanBP9) και η RanBP10 διαφοροποιούνται στο ότι αφ' ενός δεν λειτουργούν ως μεταφορείς υποστρωμάτων από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και αντίστροφα, αφ' ετέρου δεν αλληλεπιδρούν με τη Ran.

Η RanBPM εμφανίζεται καλά συντηρημένη ανάμεσα στα είδη όπως: ο βάτραχος, ο ποντικός, ο πίθηκος και ο άνθρωπος. Εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και τις κυτταρικές σειρές των θηλαστικών και περισσότερο στην καρδιά, τους νεφρούς και τον εγκέφαλο (Rao et al. 2002; Wang, Li, et al. 2002). Η κατανομή της ενδοκυτταρικά είναι πρωτίστως κυτταροπλασματική και δευτερευόντως πυρηνική.

Η ανάλυση της δομής της RanBPM σε συνδυασμό με περαιτέρω λειτουργικές μελέτες, υποστήριξαν ένα ρόλο της συμπληρωματικό στη δράση υποδοχέων και άλλων σημαντικών σηματοδοτικών πρωτεϊνών. Από την αμινοξική της αλληλουχία (**Εικ1.17**), εντοπίστηκαν πολλαπλές περιοχές που παρέχουν θέσεις πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Το πλούσιο σε προλίνες αμινοτελικό της άκρο περιέχει έξι θέσεις δέσμευσης SH3 περιοχών, ενώ το μοτίβο SPRY αποτελεί τη θέση αλληλεπίδρασης της RanBPM με τον υποδοχέα τυροσινικής κινάσης του αυξητικού παράγοντα ηπατοκυττάρων MET (Wang, Li, et al. 2002). Επιπρόσθετα, η RanBPM περιέχει τα μοτίβα LisH/CTLH (Lissencephaly type-1-like homology/C-terminal to LisH) που ρυθμίζουν τη δέσμευση στους μικροσωληνίσκους κι επομένως την αγκυροβόληση της πρωτεΐνης στον κυτταροσκελετό, ενώ το ίδιο μοτίβο έχει δειχθεί πως εμπλέκεται στον ομοδιμερισμό πρωτεϊνών που το φέρουν (Mateja et al. 2006). Ένα τέταρτο μοτίβο, το CRA (CT11- RanBPM) (Menon, Gibson, and Pastore 2004) που αποτελείται από εκατό περίπου αμινοξέα στο καρβοξυ-τελικό άκρο της RanBPM, κρίνεται σημαντικό για την αλληλεπίδραση αυτής με την πρωτεΐνη FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein), χωρίς όμως να του έχει αποδοθεί ακόμη κάποια επιπλέον ιδιότητα.



Drug Discovery Today

Εικ1.17 Σχηματική απεικόνιση των χαρακτηριστικών δομικών μοτίβων αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες της ανθρώπινης RanBPM (Suresh, Ramakrishna, and Baek 2012).

1.7.2 Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της RanBPM.

1.7.2.1 Συμμετοχή στη σταθερότητα πρωτεϊνών.

Η RanBPM έχει χαρακτηριστεί ως ενεργοποιητής αποπτωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών στα κύτταρα HeLa (Atabakhsh et al. 2009). Η υπερέκφρασή της ενεργοποιεί τη δραστηριότητα της κασπάσης-3 και επάγει τον κυτταρικό θάνατο, ενώ η καταστολή της αυξάνει την κυτταρική επιβίωση σε συνθήκες έντονου στρες (ακτινοβολία). Κατόπιν ακτινοβόλησης των κυττάρων και βλάβης του DNA, παρατηρήθηκε μετατόπιση της RanBPM από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που υποστηρίζει τη δράση της ως ρυθμιστής ενδογενών μονοπατιών κυτταρικού θανάτου. Ως προαποπτωτική πρωτεΐνη, η RanBPM δεσμεύεται και τροποποιεί τη λειτουργικότητα και τη σταθερότητα άλλων πρωτεϊνών που ελέγχουν την απόπτωση όπως η p73. Η αλληλεπίδραση των δύο αυτών πρωτεϊνών, οδηγεί σε μετατόπιση της RanBPM από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και σταθεροποίηση της p73 μέσω παρεμπόδισης της αποικοδόμησής της από το πρωτεάσωμα (Kramer et al. 2005).

Σε μία ανεξάρτητη, σχετικά πρόσφατη μελέτη, δείχθηκε πως η RanBPM αλληλεπιδρά με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη Mgl-1 (mammalian lethal giant larvae-1), ενισχύοντας τα πρωτεϊνικά της επίπεδα και επεκτείνοντας το χρόνο ημιζωής της, μέσω παρεμπόδισης της αποικοδόμησής της (Suresh et al. 2010). Οι δύο προαναφερθείσες αλληλεπιδράσεις με την p73 και την Mgl-1, θα μπορούσαν ν'αποδώσουν στη RanBPM ένα ρόλο πρωτεϊνικού σταθεροποιητή. Λαμβάνοντας ακόμη υπ'όψιν και την αλληλεπίδραση της τελευταίας με το ένζυμο απο-ουβικιτίνωσης USP11 (Ideguchi et al. 2002), θα προέκυπτε ένα υποθετικό μοντέλο δράσης, σύμφωνα με το οποίο η RanBPM διαμεσολαβεί ενδεχομένως στην προσέγγιση της USP11 με τις p73 και Mgl-1 κι επομένως στην αναστολή αποικοδόμησής τους.

1.7.2.2 Συμμετοχή στη ρύθμιση αναπτυξιακών κυτταρικών διαδικασιών.

Το γονίδιο της RanBPM έχει αναγνωρισθεί ως απαραίτητο για τη φυσιολογική ανάπτυξη των γονάδων και στα δύο φύλα (Puverel et al. 2011). Αρσενικοί ποντικοί στους οποίους το γονίδιο της RanBPM είχε απαλειφθεί (RanBPM^{-/-}), εμφάνισαν ατροφία στις γονάδες και κατά συνέπεια μειωμένο πολλαπλασιασμό των σπερματογονίων μετά τη γέννησή τους. Ομοίως και στα θηλυκά ποντίκια, η απαλοιφή της RanBPM, οδήγησε σε μη φυσιολογικό σχηματισμό των ωοθηκών λόγω απώλειας πληθυσμού των γεννητικών κυττάρων στο τέλος της πρόφασης I.

Και στην περίπτωση όμως της ανάπτυξης των μωινιδίων στο γραμμωτό μυ, η RanBPM φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, αλληλεπιδρώντας με την περιοχή Rho-GEF (Rho-guanine nucleotide exchange factor) της πρωτεΐνης obscurin, η οποία ρυθμίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι της μορφογένεσης του μυός (Bowman et al. 2008).

1.7.2.3 Η RanBPM ως ρυθμιστική πρωτεΐνη της μεταγραφικής ενεργότητας.

Η RanBPM αλληλεπιδρά με πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες, επάγοντας ή καταστέλλοντας την ενεργότητά τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο υποδοχέας ανδρογόνων (androgen receptor, AR), ένας μεταγραφικός παράγοντας με δράση εξαρτώμενη από το υπόστρωμά του, απαραίτητος για τη φυσιολογική ανάπτυξη του προστάτη αδένου. Ανήκει σε μία μεγάλη οικογένεια υποδοχέων στεροειδών μαζί με τον υποδοχέα προγεστερόνης και τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR). Η RanBPM, υπερεκφραζόμενη σε κυτταρική σειρά προστάτη (PC3) επάγει ειδικά τόσο την ενεργοποίηση του υποδοχέα ανδρογόνων, αλληλεπιδρώντας μαζί του σε πολλαπλές περιοχές, όσο και εκείνη του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Αντίθετα, καμία μεταβολή

δεν παρατηρείται στην ενεργότητα του υποδοχέα οιστρογόνων (Rao et al. 2002). Η RanBPM επιπρόσθετα, μέσω του αμινοτελικού της άκρου, αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της ορμόνης του θυρεοειδούς (thyroid hormone receptor, TR) ενεργοποιώντας τον, κατά τρόπο ανεξάρτητο της πρόσδεσης σε αυτόν υποστρώματος (Poirier, Laflamme, and Langlois 2006).

Η RanBPM έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά με μόρια κυτταρικής συνάφειας (Denti et al. 2004; Cheng, Lemmon, and Lemmon 2005). Το αντιγόνο LFA-1 (Leukocyte- or lymphocyte-function-associated antigen 1) είναι ένα μέλος της οικογένειας των ιντεγκρινών, απαραίτητο σε πολλά στάδια της ανοσολογικής απόκρισης και εμπλεκόμενο άμεσα στην αιτιολογία διαφόρων φλεγμονωδών νόσων. Ειδικότερα, η LFA-1, διαμεσολαβεί στις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις και ως υποδοχέας σηματοδοτικού μονοπατιού, ρυθμίζει την κυκλοφορία και ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων. Στη μελέτη των Denti S. και συνεργατών, διαπιστώθηκε η φυσική αλληλεπίδραση των RanBPM και LFA-1 και πως η πρώτη υπερ-εκφραζόμενη σε κύτταρα COS7 επάγει τη μεταγραφική ενεργότητα της δεύτερης. Φάνηκε επίσης πως στην υπερ-φωσφορυλιωμένη της μορφή η ενδογενής RanBPM εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ στη μη φωσφορυλιωμένη στο κυτταρόπλασμα, καθιστώντας την έτσι ένα μόριο που λειτουργεί ιδανικά ως πλατφόρμα σύνδεσης ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών που ξεκινούν από το περιβάλλον του κυττάρου και καταλήγουν στον πυρήνα. Κάτι τέτοιο παρατηρείται και στα Β-λεμφοκύτταρα, όπου η RanBPM αλληλεπιδρώντας με το αντιγόνο CD39 μέσω του μοτίβου της SPRY, συμμετέχει και πάλι σε μηχανισμούς φλεγμονής (Wu et al. 2006).

Το συγκεκριμένο μοτίβο SPRY, χρησιμεύει όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, για την αλληλεπίδραση της RanBPM, *in vitro* και *in vivo*, με τον υποδοχέα τυροσινικής κινάσης του αυξητικού παράγοντα ηπατοκυττάρων MET (Wang, Li, et al. 2002). Ο αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων HGF (hepatocyte growth factor), είναι μία πολυλειτουργική κυτοκίνη που ελέγχει την αύξηση, τη μορφογένεση και την κινητικότητα των κυττάρων. Ο υποδοχέας MET φαίνεται να υπερ-εκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου του ανθρώπου, ενώ η RanBPM μέσω της φυσικής της αλληλεπίδρασης, η οποία ενισχύεται ακόμη περισσότερο παρουσία του HGF, ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras-Erk-SRE, στρατολογώντας την πρωτεΐνη Sos.

1.7.2.4 Η δράση της RanBPM σε κύτταρα του νευρικού συστήματος.

Σε πολλές μελέτες έχει επισημανθεί ο σημαντικός ρόλος των αλληλεπιδράσεων της RanBPM με πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε λειτουργίες των κυττάρων του νευρικού συστήματος. Οι νευροτροφίνες (Neurotrophins, NTs) είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική ανάπτυξη και την ωρίμανση του νευρικού συστήματος και η βιολογική τους δράση εξαρτάται από δύο τύπους υποδοχέων: εκείνους της οικογένειας Trk (tropomyosin-related kinases) (Yuan et al. 2006) και τον p75NTR (pan-neurotrophin receptor 75 kDa) (Bai, Chen, and Huang 2003). Αλληλεπιδρώντας η RanBPM με τον TrkA, παρεμποδίζει την επαγόμενη από το νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF, nerve growth factor) μεταγραφή γονιδίων. Αντίθετα, στην περίπτωση αλληλεπίδρασης με τον TrkB, η RanBPM ενισχύει το επαγόμενο από τον BDNF (brain-derived neurotrophic factor) σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK (mitogen-activated protein kinase)/Akt (Yin et al. 2010). Σημειώνεται πως ο νευροτροφικός παράγοντας BDNF εμπλέκεται σε διαδικασίες νευρωνικής επιβίωσης σε συνθήκες στρες, διαφοροποίησης και μορφογένεσης, γι' αυτό και η περαιτέρω μελέτη της RanBPM ως ρυθμιστικού μορίου τέτοιων μηχανισμών αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Η RanBPM αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα Plexin-A, διαμεσολαβώντας στο μονοπάτι των εκκρινόμενων πρωτεϊνών Semaphorin3A, οι οποίες λειτουργούν ως σήματα καθοδήγησης των αξόνων των κυττάρων κατά τη νευρωνική μετανάστευση (Togashi, Schmidt, and Strittmatter 2006). Παράλληλα, έχει δείχθει ν' αλληλεπιδρά και με την L1, ένα μόριο προσκόλλησης των νευρικών κυττάρων, που συμμετέχει κι εκείνο σε αναπτυξιακές διαδικασίες όπως ο σχηματισμός των νευριτών, η δημιουργία δεσμίδων αξόνων, η μυελινοποίηση και η μετανάστευση των πρόδρομων νευρωνικών κυττάρων (Cheng, Lemmon, and Lemmon 2005). Ειδικότερα για την ανάπτυξη των νευριτών, η L1 ενεργοποιεί το μονοπάτι ERK και η RanBPM, υπερ-εκφραζόμενη σε πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων, εν μέρει το αναστέλλει.

Η RanBPM εκφράζεται σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου, μεταξύ των οποίων και στον αμφιβληστροειδή. Εκεί, περιορίζεται σε μία εσωτερική κυτταρική στιβάδα που χαρακτηρίζεται από πολυάριθμες συνάψεις και συν-εντοπίζεται με σημαντικό αριθμό ισομορφών υποδοχέων γλουταμικού οξέος (mGlu). Η αλληλεπίδρασή της με τους περισσότερους από αυτούς τους υποδοχείς, υποδηλώνει κι έναν ενδεχόμενο ρόλο της RanBPM στη ρύθμιση της συναπτικής διαβίβασης (Seebahn, Rose, and Enz 2008).

Μία ακόμη ενδιαφέρουσα αλληλεπίδραση της RanBPM είναι εκείνη με τον παράγοντα ενεργοποίησης της μεταγραφής TAF4. Ο TAF4 ανήκει σε μία ομάδα εξελικτικά συντηρημένων πρωτεϊνών (TBP-associated factors, TAFs) και μαζί με την πρωτεΐνη TBP (TATA-binding protein), αποτελούν τα κυρίαρχα συστατικά του συμπλέγματος με το μεταγραφικό παράγοντα IID (transcription factor IID, TFIID). Έτσι, οι πρωτεΐνες TAFs συμμετέχουν άμεσα στην αναγνώριση του υποκινητή ή την τροποποίηση γενικών μεταγραφικών παραγόντων, ώστε να διευκολυνθεί η έναρξη της μεταγραφής. Ο TAF4 συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων μέσω αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα CREB, ο οποίος με τη σειρά του εμπλέκεται στην ανάπτυξη και επιμήκυνση των νευριτών κατά τη νευρωνική διαφοροποίηση. Σημειώνεται πως ο TAF4 σχετίζεται και με μηχανισμούς νευροεκφυλισμού, καθώς αλληλεπιδρά με τη χαντιγκτίνη (Huntingtin) τροποποιώντας την εξαρτώμενη από CREB και Sp1 μεταγραφή γονιδίων. Η RanBPM συν-εντοπίζεται και αλληλεπιδρά με την TAF4 *in vitro* και *in vivo* στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ, ενώ η υπερ-έκφραση των δύο μορίων σε νευρικά βλαστικά κύτταρα από εγκέφαλο αρουραίου, ανέδειξε τη συνεργιστική τους δράση στην αύξηση του αριθμού των νευριτών, όχι όμως και του συνολικού μήκους αυτών (Brunkhorst et al. 2005).

1.7.2.5 Η δράση της RanBPM στον κυτταρικό κύκλο.

Ο ρόλος της RanBPM στον κυτταρικό κύκλο είναι συνυφασμένος με την κινάση CITK (citron kinase), η οποία έχειδειχθεί να συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των πρόδρομων νευρικών κυττάρων και πιο συγκεκριμένα σε μιώσεις που συνδυάζονται με νευρογένεση. Μεταλλαγές στη CITK οδηγούν σε μη ομαλή μίτωση, αποτυχημένη κυτοκίνηση και κυτταρικό θάνατο των πρόδρομων νευρικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ. Η RanBPM αλληλεπιδρά με τη CITK, αποκτώντας έναν επιπλέον ρόλο στην πρόοδο του κύκλου των πρόδρομων κυττάρων του νεοφλοιού, στην επιφάνεια της κοιλιακής ζώνης (Chang et al. 2010). Η καταστολή της ενδογενούς RanBPM στον αναπτυσσόμενο νεοφλοιό αρουραίου, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται στη μίτωση με σύγχρονη επιβράδυνση της εισόδου τους στην κυτοκίνηση. Ο μηχανισμός λειτουργίας της RanBPM, βάσει και του υποθετικού μοντέλου που προτείνεται στη μελέτη αυτή, φαίνεται να είναι τόσο εξαρτώμενος όσο και ανεξάρτητος της κινάσης CITK.

Η YPEL5 αποτελεί ένα μέλος της οικογένειας των YPEL γονιδίων που είναι καλά συντηρημένα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και σχετίζονται με διαδικασίες κυτταρικής διαίρεσης. Σε μία

πρόσφατη σχετικά μελέτη τόσο η RanBPM όσο και η RanBP10 ταυτοποιήθηκαν ως άμεσα αλληλεπιδρούσες πρωτεΐνες με την YPEL5, παρέχοντας περαιτέρω ενδείξεις για ενδεχόμενο ρυθμιστικό ρόλο τους στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Hosono et al. 2010).

1.7.2.6 Η αλληλεπίδραση της RanBPM με την Mirk/Dyrk1B.

Όπως αναφέρθηκε και στη παράγραφο 1.5.2.2, η κινάση Mirk/Dyrk1B κατέχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, ενώ έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά και με τη RanBPM (Zou et al. 2003). Πρόκειται για μία κινάση σερίνης-θρεονίνης, που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο φυσιολογικό σκελετικό μυ, σε πολλές καρκινικές σειρές και σε χαμηλότερα σε άλλους φυσιολογικούς ιστούς. Πέραν της κυκλίνης D1 την οποία φωσφορυλιώνει στην T288 επάγοντας την αποικοδόμησή της, υποστρώματα της Mirk/Dyrk1B αποτελούν επίσης η MBP (Myelin Basic Protein) ή ο μεταγραφικός παράγοντας HNF1a. Στη ίδια μελέτη των Zou και συνεργατών (Zou et al. 2003), η RanBPM, μέσω της φυσικής της αλληλεπίδρασης με την κινάση Mirk/Dyrk1B, παρεμποδίζει τη δράση της τελευταίας και ενισχύει ακόμη περισσότερο το σηματοδοτικό μονοπάτι που ξεκινά από τον υποδοχέα MET και ρυθμίζει την κινητικότητα των επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα Mv1Lu. Επιπλέον, λόγω της αλληλεπίδρασής της και με την κινάση Dyrk1A, μέλος την ευρύτερης οικογένειας των κινασών *mini*brain, η οποία εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον εγκέφαλο, ο ρόλος της RanBPM επεκτείνεται και στα κύτταρα του νευρικού συστήματος.

1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.

Σκοπό της παρούσας διατριβής, απετέλεσε η ταυτοποίηση των άγνωστων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της νευροειδικής πρωτεΐνης BM88/Cend1, προκειμένου να διαλευκανθεί το σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω του οποίου επιτελεί το διπλό της ρόλο: την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο των πρόδρομων νευρωνικών κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους σε ώριμους νευρώνες. Βάσει προγενέστερων μελετών του εργαστηρίου, είχε δειχθεί *in vitro* και *in vivo* πως δύο είναι τα κυριότερα μονοπάτια στα οποία φαίνεται να εμπλέκεται η Cend1: εκείνο της cyclin D1/pRb που διαδραματίζει κομβικό ρόλο κατά τη μετάβαση G1/S του κυτταρικού κύκλου και εκείνο του Notch που θεωρείται από τα σημαντικότερα στη διαδικασία της διαφοροποίησης.

Καθώς η πρωτεΐνη RanBPM είχε αναδειχθεί από προκαταρκτικές μελέτες ως υποψήφια αλληλεπιδρούσα με τη Cend1, επιχειρήθηκε αρχικά η επιβεβαίωση αυτής της αλληλεπίδρασης με βιοχημικές μεθόδους και στη συνέχεια μελετήθηκε *in vitro* το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των

δύο μορίων στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση σε κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού Neuro-2a.

Προκειμένου να ερμηνευθεί περαιτέρω ο μηχανισμός με τον οποίο οι Cend1 και RanBPM παρεμβαίνουν στον κυτταρικό κύκλο, αναζητήθηκαν βιβλιογραφικά επιπρόσθετοι πρωτεϊνικοί συνεργάτες της RanBPM, με το ενδιαφέρον να εστιάζεται στην κινάση σερίνης/θρεονίνης Mirk/Dyrk1B, η οποία συμμετέχει σ' ένα εναλλακτικό μονοπάτι ρύθμισης των επιπέδων της κυκλίνης D1. Ως επόμενος στόχος της διατριβής, τέθηκε η διερεύνηση του ρόλου της Mirk/Dyrk1B στα κύτταρα Neuro-2a, καθώς και η συνδυασμένη δράση της με τις RanBPM και Cend1 ως προς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση.

Τέλος, η έκφραση των τριών πρωτεϊνών εξετάστηκε και σε πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιικών νευρώνων αλλά και σε εγκεφάλους ποντικών αγρίου τύπου και Cend1^{-/-} ως ένα πρώτο βήμα μελλοντικής τους μελέτης *in vivo*.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

2.1.1.1 Χημικά αντιδραστήρια

- Κοινά χημικά αναλυτικού βαθμού (BDH, Sigma, Biorad, Merk, Promega) καθώς και χημικά υψηλού βαθμού καθαρότητας 99%, ελεύθερα από DNAάσες και RNAάσες, χρησιμοποιήθηκαν για τις τεχνικές Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας.
- Οι στρογγυλές καλυπτρίδες που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων επιστρώθηκαν με διάλυμα υδροβρωμίδιου της πολύ-L-λυσίνης (poly-L-lysine Hydrobromide) από την εταιρία Sigma.
- Ως αναστολέας της ενεργότητας της κινάσης Dyk1B, χρησιμοποιήθηκε η χημική ουσία χαρμίνη (Harmine) από την εταιρία Ascent Scientific.
- Για την εμφάνιση των ανοσοαποτυπωμάτων και αυτοραδιογραφιών χρησιμοποιήθηκαν υγρά εμφάνισης Kodak (X-Ray developer, X-Ray fixer).
- Για όλα τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκε δις-απεσταγμένο και απιονισμένο νερό (d.d.H₂O). Όπου χρειαζόταν ακολουθούσε υγρή αποστείρωση σε κλίβανο για 20 λεπτά υπό πίεση 15 lb/in² ή φιλτράρισμα μέσα από φίλτρα με διάμετρο πόρων 0,2 μm (Sterile Acrodisc, Gelman).

2.1.1.2 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας

- **DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) από την εταιρία Gibco.

2.1.1.3 Οροί

- **FCS** (Fetal Calf Serum, ορός από έμβρυο βοδιού) από την εταιρία Gibco.
- **NGS** (Normal Goat Serum, ορός αίγας) από την εταιρία Chemicon.
- **NDS** (Normal Donkey Serum, ορός όνου) από την εταιρία Chemicon

2.1.1.4 Ένζυμα

- Για την αποκόλληση των ευκαρυωτικών κυττάρων από το υπόστρωμα των φλασκών καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Τρυψίνη/EDTA της εταιρίας Gibco.
- Περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI*, *EcoRI*, *SmaI*, *XhoI*, *HindIII*, και άλλες από την εταιρία New England Biolabs.
- Phusion DNA πολυμεράση, από την εταιρία Finnzymes.
- Αλκαλική φωσφατάση από την εταιρία Roche.
- T4 DNA λιγάση από την εταιρία Roche.
- T7 RNA πολυμεράση από την εταιρία Promega.

2.1.1.5 Αντισώματα και μόρια ιχνηθέτησης

Για τις τεχνικές ανοσοφθορισμού σε κύτταρα καθώς και για τα ανοσοαποτυπώματα (western blot) χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που αναγράφονται στους παρακάτω πίνακες:

• Πίνακας 2.1. Πρωτογενή αντισώματα

Αντιγόνο	Χαρ/κά Αντιγόνου	Ξενιστής	Τύπος αντισώματος	Εταιρεία
Cend1/BM88	Νευροειδική πρωτεΐνη	Κουνέλι	Πολυκλωνικό	Παρασκευάζεται στο εργαστήριο
Dyrk1B	Κινάση σερίνης/θρεονίνης	Κουνέλι	Πολυκλωνικό	Cell Signaling
Dyrk1B	Κινάση σερίνης/θρεονίνης	Κουνέλι	Μονοκλωνικό	Abcam
Dyrk1A	Κινάση σερίνης/θρεονίνης	Κουνέλι	Πολυκλωνικό	Cell Signaling
FLAG	Επίτοπος χιμαιρικών πρωτεϊνών	Ποντικός	Μονοκλωνικό	Sigma-Aldrich
FLAG M2 FITC conjugated	Επίτοπος χιμαιρικών πρωτεϊνών	Ποντικός	Μονοκλωνικό	Sigma-Aldrich
FLAG M2 HRP conjugated	Επίτοπος χιμαιρικών πρωτεϊνών	Ποντικός	Μονοκλωνικό	Sigma-Aldrich
RanBPM	Πρωτεΐνη με πυρηνικό και κυτταροπλασματικό εντοπισμό	Αίγα	Πολυκλωνικό	Abcam
Cyclin D1	Κυκλίνη με κομβικό ρόλο στην G1/S φάση του κυτταρικού κύκλου	Ποντικός	Μονοκλωνικό	Santa Cruz
β-tubulin	Πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού	Κουνέλι	Πολυκλωνικό	Santa Cruz
β-actin	Πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού	Αίγα	Πολυκλωνικό	Santa Cruz
GAPDH	Ένζυμο της γλυκόλυσης	Ποντικός	Μονοκλωνικό	Santa Cruz
PH3	Πρωτεΐνη νουκλεοσωμάτων	Κουνέλι	Πολυκλωνικό	Upstate
BrdU	Μάρτυρας πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων	Αρουραίος	Πολυκλωνικό	Oxford biotechnology

• Πίνακας 2.2. Δευτερογενή αντισώματα

Αντίσωμα	Συζευγμένος ιχνηθέτης	Ξενιστής	Αραίωση	Εταιρεία
Rabbit IgG (H+L)	HRP	Αίγα	1/1000 (WB)	Thermo
Mouse IgG (H+L)	HRP	Αίγα	1/1000 (WB)	Thermo
Goat IgG	HRP	Όνος	1/2000 (WB)	Santa Cruz Biotechnology
Mouse IgG	AlexaFluor 488 (πράσινο)	Αίγα	1/300 (IF)	Molecular Probes (Invitrogen)
Mouse IgG	AlexaFluor 546 (κόκκινο)	Αίγα	1/300 (IF)	Molecular Probes (Invitrogen)
Mouse IgG	AlexaFluor 647 (μπλε)	Όνος	1/300 (IF)	Molecular Probes (Invitrogen)
Rabbit IgG	AlexaFluor 488 (πράσινο)	Αίγα	1/300 (IF)	Molecular Probes (Invitrogen)
Rabbit IgG	AlexaFluor 546 (κόκκινο)	Αίγα	1/300 (IF)	Molecular Probes (Invitrogen)
Rabbit IgG	AlexaFluor 647 (μπλε)	Όνος	1/300 (IF)	Molecular Probes (Invitrogen)
Rat IgG	AlexaFluor 488 (πράσινο)	Αίγα	1/300 (IF)	Molecular Probes (Invitrogen)
Rat IgG	AlexaFluor 546 (κόκκινο)	Αίγα	1/300 (IF)	Molecular Probes (Invitrogen)
Goat IgG	AlexaFluor 488 (πράσινο)	Όνος	1/300 (IF)	Molecular Probes (Invitrogen)
Goat IgG	AlexaFluor 546 (κόκκινο)	Όνος	1/300 (IF)	Molecular Probes (Invitrogen)

- Για την ιχνηθέτηση των πυρήνων των κυττάρων με σκοπό την παρατήρησή τους σε μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιήθηκαν οι χρωστικές Hoechst (bisbenzimidazole) και TO-PRO-3 της εταιρίας Molecular Probes.

2.1.1.6 Αντιβιοτικά

- Για την προστασία των καλλιιεργειών ευκαρυωτικών κυττάρων, από βακτηριακές μολύνσεις, χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη της εταιρίας Gibco.
- Για τις βακτηριακές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (Bristol).

2.1.1.7 Ραδιενεργά υλικά

- 20 μCi ^{35}S -methionine

2.1.1.8 Αναισθητικά

- Isoflurane (Forenium, από την εταιρία ABBOTT), αναισθητικό δι' εισπνοής, για την αναισθητοποίηση των ποντικών

2.1.1.9 Άλλα βιολογικά αντιδραστήρια

- Αντιδραστήρια της QIAGEN (Maxi and mini Plasmid Purification Kit) για τη συστηματοποιημένη μέθοδο απομόνωσης σε μεγάλη κλίμακα, πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες.
- Αντιδραστήρια της QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit) για τη συστηματοποιημένη μέθοδο απομόνωσης DNA από πηκτώματα αγαρόζης.
- Αντιδραστήρια της QIAGEN (QIAquick PCR Purification Kit) για τη συστηματοποιημένη μέθοδο καθαρισμού των προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με σκοπό τη χρήση τους σε κλωνοποίηση.
- Αντιδραστήρια της BioRad (Dc Protein Assay), για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε κυτταρικά εκχυλίσματα, κατά Lowry.

- Για την ανίχνευση αντιγόνων από συν-ανοσοκατακρημνίσεις, που έχουν διαχωριστεί σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης κι έχουν αποτυπωθεί σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο της Thermo, Clean Blot IP Detection reagent.
- Για την *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση ραδιενεργά σεσημασμένων πρωτεϊνών, σε σύστημα δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού, χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια της Promega (TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System).
- Για τα πειράματα ανοσοκατακρημνίσεων χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια αγαρόζης με πρωτεΐνη A από την εταιρία Thermo.
- Για τα πειράματα GST-καταβυθίσεων, χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια σεφαρόζης με γλουταθειόνη από την εταιρία GE Healthcare.
- Πρωτεϊνικοί δείκτες με εύρος 10-170 kDa από την εταιρία Fermentas, χρησιμοποιήθηκαν για τις ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης.
- Δείκτες νουκλεϊκών οξέων με εύρος 100 bp-1,5 Kb και 500 bp-10 Kb από την εταιρία New England Biolabs, χρησιμοποιήθηκαν για τις ηλεκτροφορήσεις νουκλεϊκών οξέων σε πηκτώματα αγαρόζης.

2.1.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

2.1.2.1 Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας

DMEM χωρίς ορό

DMEM	500 ml
Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη	1 % κ.ό

DMEM με ορό

DMEM	500 ml
Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη	1% κ.ό
FCS	10% κ.ό

2.1.2.2 Θρεπτικά υλικά για βακτηριακές καλλιέργειες

LB (Luria-Bertani) pH 7.5 (1 lt)

NaCl	10 g
Bacto-tryptone	10 g
Yeast-extract	5 g

Για τις στερεές καλλιέργειες προστίθενται 15 g Agar/lit υλικού

2.1.2.3 Ρυθμιστικά διαλύματα**10X TBE (Διάλυμα ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων) (1L)**

Tris	108 g
Boric acid	55 g
EDTA	7,5 g
ή διάλυμα EDTA (pH 8.0)	40 ml

10X PBS (pH 7.4)(1L)

NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄ x (2H ₂ O)	14,4 g
ή Na ₂ HPO ₄ x (7H ₂ O)	10,84 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g

10X TBS (pH 7.4)(1L)

Tris	60,75 g
NaCl	87,66 g

2X HBS (pH 7.05)

HEPES (pH 7.05)	
KCl	10 mM
Dextrose	12 mM
NaCl	280 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM

TE (1:0.1)

Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
EDTA (pH 8.0)	1 mM

10X ρυθμιστικό διάλυμα Klenow

Tris-HCl (pH 7.5)	0,5 mM
MgCl ₂	0,1 mM
DTT	10 mM
BSA	0,5 mg/ml

5X Ρυθμιστικό διάλυμα λγάσης

Tris-Cl, pH 7.6	250 mM
MgCl ₂	50 mM
ATP	5 mM

DTT	25% κ.β.
PEG 8.000	5 mM
10X Ρυθμιστικό διάλυμα αποφωσφορυλίωσης	
Tris-Cl (pH 8.5)	0,5 M
EDTA (pH 8.0)	1 mM
10X cocktail inhibitors (μίγμα αναστολέων πρωτεασών)	
Tris pH 7.4 (1M)	100 mM
EDTA pH 8.0 (0.5 M)	10 mM
Aprotinin (5 mg/ml)	50 μg/ml
Pepstatin A (5 mg/ml)	50 μg/ml
Leupeptin (5 mg/ml)	50 μg/ml
PMSF (100 mM)	0,5 mM
6X ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων DNA (DNA loading buffer)	
Bromophenol blue	0,25% κ.ό
Σακχαρόζη	40% κ.ό
6X ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων RNA (RNA loading buffer) (10 ml)	
Φορμαμίδιο	4.8 ml
MOPS 10x	1,066 ml
Φορμαλδεΰδη 37%	1,733 ml
H ₂ O	1,733 ml
Γλυκερόλη 100%	668 μl
Bromophenol blue	0,1% κ.ό
2.1.2.4 Διαλύματα τεχνικών πρωτεομικής	
Διάλυμα ακρυλαμίδιου 30% κ.ό	
Ακρυλαμίδιο	29,2% κ.ό
N,N-μεθυλεν-δις-ακρυλαμίδιο	0,8% κ.ό
Πήκτωμα διαχωρισμού 12% κ.ό (1 gel)	
dH ₂ O	1,6 ml
Tris-HCl (pH 8.8)	1,3 ml
Διάλυμα ακρυλαμίδιου (30% κ.ό)	2 ml
SDS (10%)	50ml
Υπερθεϊκό αμμώνιο (APS)(10%)	50ml
TEMED	2ml

Πήκτωμα συμπύκνωσης 5% κ.ό (1 gel)

dH ₂ O	1,4 ml
Tris-HCl (pH 6.8)	250 μl
Διάλυμα ακρυλαμιδίου (30% κ.ό)	330 μl
SDS (10%)	20ml
Υπερθειικό αμμώνιο (APS)(10%)	20ml
TEMED	2ml

Διάλυμα ηλεκτροδίων (Electrode buffer)

Tris-HCl (pH 8.65)	0,025 M
Γλυκίνη	0,192 M
SDS	0,1% κ.ό

Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών 3X (SDS loading buffer)

Tris- HCl pH 6.8	0,24 M
SDS	3% κ.ό
β-μερκαπτοαιθανόλη	15% κ.ό
Γλυκερόλη	30% κ.ό
Μπλε της βρωμοφαινόλης	0,05% κ.ό

Διάλυμα χρώσης (Stain solution)

Ισοπροπανόλη	25% κ.ό
Οξικό οξύ	10% κ.ό
Coomassie brilliant blue R-250	0,06% κ.ό

Διάλυμα αποχρωματισμού (Destain solution)

Ισοπροπανόλη	5% κ.ό
Οξικό οξύ	10% κ.ό

Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer Buffer)

Γλυκίνη	192 mM
Tris	25 mM
Μεθανόλη	20% κ.ό
Το pH του παραπάνω διαλύματος ρυθμίζεται με HCl σε 8.65	

Διάλυμα Ponceau S για τη χρώση πρωτεϊνικών στρωμάτων

Ponceau S	0,2% κ.ό
TCA (τριχλωροξικό οξύ)	3% κ.ό

Διάλυμα αποχρωματισμού χρώσης Ponceau S

1X TBS

Διάλυμα κυτταρικής λύσης I (Mild lysis buffer)

Tris-Cl (pH 7.4)	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	0,1 mM
NP40	0,1% κ.ό
Cocktail inhibitors	1X

Διάλυμα κυτταρικής λύσης II (RIPA buffer)

Hepes (pH 7.6)	10 mM
NaCl	100 mM
NaF	1 mM
Na ₃ Vo ₄	2 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Cocktail inhibitors	1X
Glycerol	10%
Sodium Deoxycholate	1%
SDS	0,10%
Triton X-100	1%

Υποτονικό διάλυμα κλασμάτωσης A (Buffer A)

HEPES (pH 7.9) (1 M)	10 mM
MgCl ₂ (1 M)	1.5 mM
KCl (2.5 M)	10 mM
DTT (1 M)	0,5 mM
Coctail inhibitors	1X
dH ₂ O έως τον τελικό όγκο	

Διάλυμα σουκρόζης S1

Σουκρόζη (2,5 M)	0,25 mM
MgCl ₂ (1 M)	10 mM
Coctail inhibitors	1X
dH ₂ O έως τον τελικό όγκο	

Διάλυμα σουκρόζης S3

Σουκρόζη (2,5 M)	0,88 mM
MgCl ₂ (1 M)	0,5 mM
Coctail inhibitors	1X

ddH₂O έως τον τελικό όγκο

Διάλυμα χημειοφωταύγειας I (10ml)

Tris-Cl (pH 8.8) 1.5 M	0,67 ml
Luminol (250 mM in DMSO)	100 μl
Coumaric acid (90 mM in DMSO)	44 μl
Μέχρι τα 10 ml το διάλυμα συμπληρώνεται με ddH ₂ O	

Διάλυμα χημειοφωταύγειας II (10ml)

Tris-Cl (pH 8.8) 1.5 M	0,67 ml
H ₂ O ₂ (30%)	7 μl
Μέχρι τα 10 ml το διάλυμα συμπληρώνεται με ddH ₂ O	

2.1.2.5 Διαλύματα ανοσοκυτταροχημείας και ανοσοφθορισμού

Διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων (Mabs)[1]

FCS	10% κ.ό.
Λυσίνη	1,23% κ.ό.
σε PBS	

Διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων με ορό αίγας (Normal Goat Serum Blocking solution)

NGS	5% κ.ό.
Αζίδιο του Νατρίου	0,02% κ.ό.
σε PBS	

Διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων με ορό όνου (Normal Donkey Serum Blocking solution)

NGS	5% κ.ό.
Αζίδιο του Νατρίου	0,02% κ.ό.
σε PBS	

Διάλυμα επικάλυψης παρασκευασμάτων για μικροσκοπία (Mowiol)

MOWIOL 4-88 (Calbiochem)	2,4 g
Γλυκερόλη	6 g
ddH ₂ O	6 ml
Tris-Cl 2M (pH 8.5)	12 ml

[1] Όταν πρόκειται να γίνει ανίχνευση ενδοκυτταρικών αντιγόνων, στα διαλύματα κάλυψης προστίθεται το απορρυπαντικό Triton X-100 στη συγκέντρωση που αναφέρεται στο αντίστοιχο κείμενο.

2.1.2.6 Αναστολείς

Αναστολέας 26S πρωτεασώματος MG132 (30 μM Cτελ)

Αναστολέας Dyrk κινασών χαρμίνη (10 μM Cτελ)

2.1.2.7 Διαλύματα GST-καταβυθίσεων

GST solution (20 ml)

20 mM Tris-Cl (pH 7.5) (1 M)	400 μl
150 mM NaCl (5 M)	600 μl
1 mM DTT (1 M)	20 μl
1 mM EDTA (0,5 M)	40 μl
0.1% Triton X-100 (10%)	200 μl
1 mM PMSF (0,1 M)	200 μl
1X cocktail inhibitors (10x)	2 ml

TNT binding buffer (25 ml)

20 mM Hepes pH 7.6 (1 M)	500 μl
150 mM NaCl (5 M)	700 μl
10 mM KCl (2.5 M)	100 μl
2.5 mM MgSO ₄ (1 M)	62,5 μl
0.5 mM DTT (1 M)	12,5 μl
1% NP40 (10%)	25 μl
0.1 mM ATP (100 mM)	2,5 ml

2.1.2.8 Διαλύματα απομόνωσης πρωτεϊνών από βακτηριακά έγκλειστα σωμάτια (inclusion bodies)

Διάλυμα επαναδιάλυσης (Solution buffer) pH 8,0 (50 ml)

1 M Tris-Cl pH 8.0	2,5 ml
1 M DTT	500 μl
0.5 M NaEDTA pH 8.0	100 μl
2% NaAzide	2,5 ml
25% sucrose	12,5 g

Διάλυμα λύσης (Lysis buffer) pH 8.0 (50 ml)

1 M Tris-Cl pH 8.0	2,5 ml
20% Triton X-100	2,5 ml
10% Na deoxycholate	5 ml
5 M NaCl	1 ml

1 M DTT	2,5 ml
2% NaAzide	500 µl

Διάλυμα πλύσης με απορρυπαντικό (Wash buffer with Triton) pH 8,0 (50 ml)

1 M Tris-Cl pH 8.0	2,5 ml
20% Triton X-100	2,5 ml
1 M DTT	1 ml
0,5 M NaEDTA pH 8.0	100 µl
2% NaAzide	2,5 ml
5 M NaCl	50 µl

Διάλυμα πλύσης χωρίς απορρυπαντικό (Wash buffer without Triton) pH 8,0 (50 ml)

1 M Tris-Cl pH 8.0	2,5 ml
5 M NaCl	1 ml
1 M DTT	100 µl
2% NaAzide	2,5 ml
0.5 M NaEDTA pH 8.0	50 µl

Διάλυμα επαναπύκνωσης (Refolding buffer) (50 ml)

1 M Tris-Cl pH 8.0	5 ml
L-Arginine	4,214 g
0.5 M NaEDTA pH 8.0	200 µl
1 M DTT	500 µl
1X cocktail inhibitors (10X)	5 ml

2.1.2.9 Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA σε μικρή και μεγάλη κλίμακα

Διάλυμα P1 (resuspension buffer)

50 mM Tris-Cl (pH 8.0)
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A

Διάλυμα P2 (lysis buffer)

200 mM NaOH
1% SDS (w/v)

Διάλυμα P3 (neutralization buffer)

3.0 M potassium acetate (pH 5.5)

Διάλυμα QBT (equilibration buffer)

750 mM NaCl
50 mM MOPS (pH 7.0)
15% isopropanol (v/v)
0,15% Triton X-100 (v/v)

Διάλυμα QC (wash buffer)

1.0 M NaCl
50 mM MOPS (pH 7.0)
15% isopropanol (v/v)

Διάλυμα QF (elution buffer)

1,25 M NaCl
50 mM Tris-Cl (pH 8.5)
15% isopropanol (v/v)

2.1.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Τα πειραματόζωα προέρχονται από το Τμήμα Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Χρησιμοποιήθηκαν ποντικοί της σειράς C57BL/6J, αγρίου τύπου και διαγονιδιακοί, στους οποίους έχει απαλειφθεί το γονίδιο *Cend1/BM88*. Οι ποντικοί θυσιάστηκαν σε διάφορες ηλικίες μετά τη γέννησή τους προκειμένου ν' αφαιρεθούν οι εγκέφαλοι και να παρασκευαστεί πρωτεϊνικό ομογενοποίημα ή να γίνουν πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιοικών νευρώνων. Η παρούσα μελέτη διεξήχθη σε αυστηρή συμμόρφωση σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή και Εθνική Νομοθεσία για τα Εργαστηριακά Ζώα (Οδηγία 2010/63/ΕΕ και του Ελληνικού Νόμου 161/91), και σύμφωνα με τις προτάσεις του FELASA για την ευθανασία και τον Οδηγό για την Φροντίδα και Χρήση των Πειραματόζωων των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας. Όλοι οι χειρισμοί στα πειραματόζωα διεξήχθησαν σύμφωνα με πειραματικά πρωτόκολλα που εγκρίθηκαν από την Υγειονομική υπηρεσία και την Επιτροπή Χρήσης Πειραματοζώων του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur (Animal House, Κωδικός: EL 25 BIO 013). Επιπρόσθετα η απαραίτητη Άδεια Πειραματισμού με αριθμό:2375/04-04-2012 εκδόθηκε από την Ελληνικές Αρχές, και συγκεκριμένα το Τμήμα Κτηνιατρικών Θεμάτων της Αθήνας.

2.1.4 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής κυτταρικές σειρές:

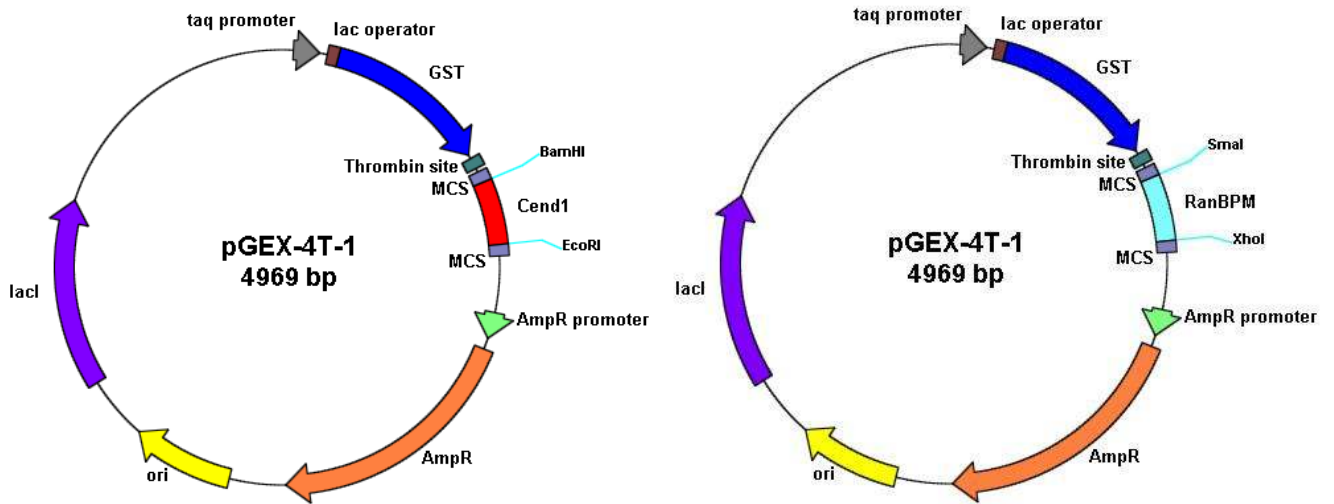
- Neuro-2a κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ποντικού.
- HEK 293T κυτταρική σειρά ανθρώπινων εμβρυικών κυττάρων νεφρού.

2.1.5 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

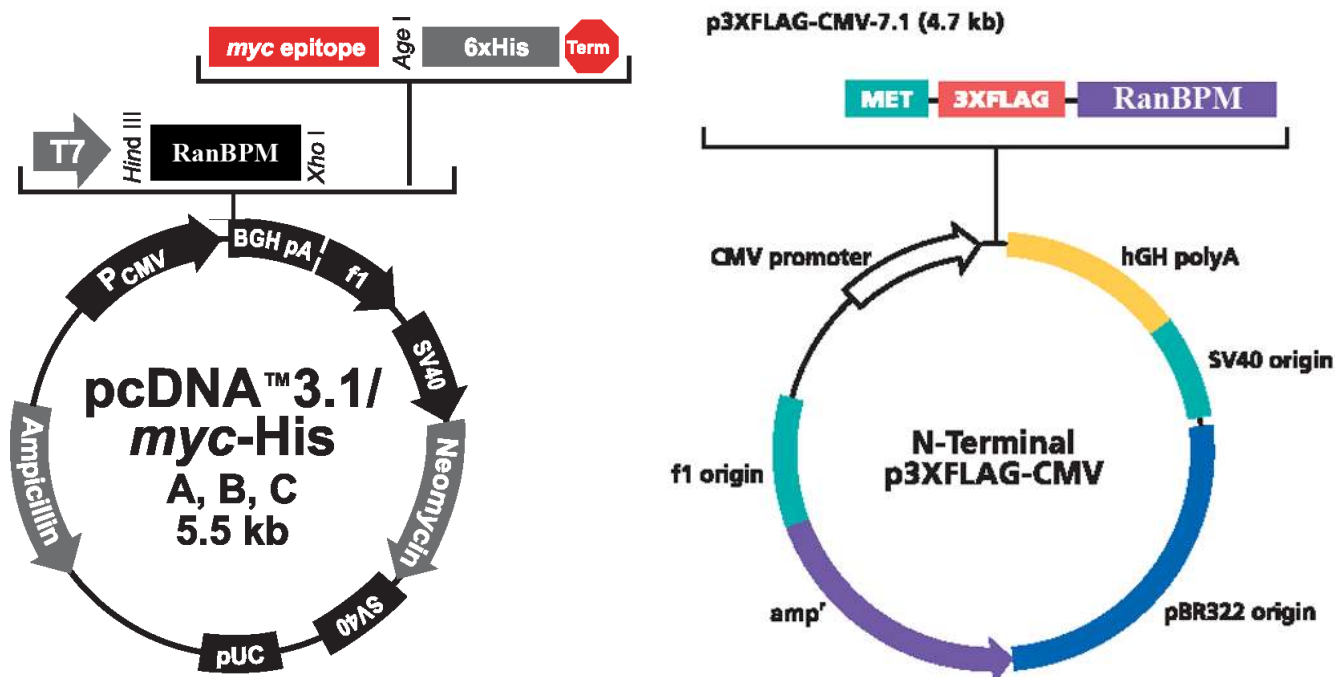
Χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια του στελέχους της *E.coli* XL10 από τη Stratagene (XL10 Gold[®] Ultracompetent Cells), DH5A και TOP10 από την Invitrogen, για το μετασχηματισμό τους με πλασμιδιακές κατασκευές (προϊόντα κλωνοποίησης ή και απλά υπερελικωμένα πλασμίδια) και κατόπιν την παραγωγή και απομόνωση αυτών σε μεγάλη κλίμακα. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν τα βακτήρια του στελέχους της *E.coli* BL21, για την έκφραση, παραγωγή και απομόνωση σε μεγάλη κλίμακα των χημικών πρωτεϊνών GST-Cend1, GST-RanBPM και της GST.

2.1.6 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

Η κωδική περιοχή (cDNA) του γονιδίου του ποντικού της *Cend1*, χωρίς το τμήμα εκείνο που κωδικοποιεί για το διαμεμβρανικό κομμάτι της και την καρβοξυτελική της «ουρά» απομονώθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και τη χρήση εκκινητών M88FOR και M88REV (βλ. πίνακα 2.3). Το προϊόν της αντίδρασης (PCR product 375 bp) κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-4T-1 (Amersham), στις θέσεις πέψης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *BamHI* και *EcoR I* στο ίδιο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης με την κωδική περιοχή του επιτόπου GST και της θρομβίνης. Η συγκεκριμένη πλασμιδιακή κατασκευή, στην οποία πραγματοποιήθηκε και αλληλούχιση, χρησίμευσε στο μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων του στελέχους BL21 για την παραγωγή της χημικής πρωτεΐνης GST-Cend1. Κατά τον ίδιο τρόπο, αλλά στις θέσεις των περιοριστικών ενδονουκλεασών *Sma I* και *Xho I*, κλωνοποιήθηκαν δύο διαφορετικές κωδικές περιοχές της RanBPM (981 bp και 1731 bp) με τη χρήση των εκκινητών RanBPM FORA/ RanBPM REVA (981 bp) και RanBPM FOR A/ RanBPM REVB (1731 bp) (βλ. πίνακα 2.3). Σχηματικά οι παραπάνω πλασμιδιακές κατασκευές απεικονίζονται ως ακολούθως:



Για την έκφραση σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών, η κωδική περιοχή του γονιδίου της *Cend1* κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3 (Invitrogen) ενώ σε ορισμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή RV-pCAG-IRES-GFP, στην οποία το γονίδιο της *Cend1* βρίσκεται κάτω από τον υποκινητή της β-ακτίνης με τον ενισχυτή του κυτταρομεγαλοϊού (pCAG) και εκφράζεται μαζί με την φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (ευγενική προσφορά της Κ. Αραβαντινού-Φατώρου, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ). Όσον αφορά στη RanBPM, ένα μικρότερο τμήμα της κωδικής της περιοχής (942 bp) που εκφράζει τις σημαντικές για τις αλληλεπιδράσεις της περιοχές SPRY-LISH-CTLH, κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pcDNA3.1- Myc-His (A) στις θέσεις *Xho I* και *Hind III* με τη χρήση των εκκινητών RanBPM FORB/ RanBPM REVC (βλ. πίνακα 2.3). Παράλληλα, για τους μετασχηματισμούς στα κύτταρα HEK293T χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο p3xFLAG-CMV7.1 (Sigma) που περιείχε ολόκληρη την κωδική περιοχή της «ανθρώπινης» RanBPM, ενωμένη με τον επίτοπο FLAG για την ανίχνευσή της. Ο κλώνος αυτός, ήταν μια ευγενική προσφορά της Δρ. Sang-Ohk Shim (*Department of Neurology, School of Medicine, Yale University, USA*). Σχηματικά, οι προαναφερθείσες πλασμιδιακές κατασκευές απεικονίζονται ως ακολούθως:



Για την έκφραση του γονιδίου της κινάσης Dyrk1B στα κύτταρα Neuro-2a και HEK293T, χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος pCMV-SPORT6-Dyrk1B (mouse cDNA) από την εταιρεία U.K. Human Genome Mapping Project Resource Centre (Hinxton, Cambridge).

- Πίνακας 2.3. Εκκινητές των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
M88FOR	5'-CGCGGATCCATGGAATCCCGAGGAAAGTC-3'
M88REV	5'-CCGGAATTCTCACAGCAAAGGGGTCAAGTT-3'
RanBPM FORA	5'-TCCCCCGGGACGCCTCTACCCGGCTGTGGAT-3'
RanBPM REVA	5'-CCGCTCGAGTCGGCCTCCCAAACACCGCAC-3'

RanBPM REVB	5'-CCGCTCGAGATGTAGGTAGTCTTCCACTGTGGCAAA-3'
RanBPM FORB	5'-CCGCTCGAGATGCGCCTCTACCCGGCTGTG-3'
RanBPM REVC	5'-CCCAAGCTTTCGGCCTCCCAAACACCGCAC-3'.

2.1.7 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

2.1.7.1 Όργανα και συσκευές.

- Επωαστήρας καλλιιεργειών ευκαρυωτικών κυττάρων Heraeus B5060 EK/CO₂.
- Θάλαμος κάθετης ροής Hera Safe KS12.
- Φυγόκεντροι πάγκου της εταιρίας Beckman, μοντέλο CPR και της εταιρίας Jouan, μοντέλο CR412.
- Φυγόκεντρος Sorvall, της εταιρίας DuPont (RC-5C).
- Φυγόκεντρος Kubota (7780).
- Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος της εταιρίας Eppendorf (5417C).
- Επιτραπέζια ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος της εταιρίας Eppendorf (5417R).
- Φυγόκεντρος εξάχνωσης υπό κενό Eppendorf concentrator 5301.
- Επωαστήρας βακτηριακών καλλιιεργειών με βάση ανακίνησης-ανάδευσης από την εταιρία Gallenkamp.
- Συσκευή υπερήχων για λύση βακτηριακών κυττάρων Misonix 3000.
- Συσκευές οριζόντιας ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης, της εταιρίας BRL.
- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου πρωτεϊνών της εταιρίας Biorad μοντέλο Mini Protean II.
- Συσκευή για τη μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη της εταιρίας Biorad μοντέλο Mini Trans-Blot.
- Τροφοδοτικά LKB, Biorad, Pharmacia.
- Αφυγραντήρας υπό κενό για ξήρανση και μονιμοποίηση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου, της εταιρίας Biorad (Gel Dryer Model 583).
- Θάλαμος Biorad (Biorad Universal Hood II SN 765), με λάμπα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας μήκους κύματος 302 nm και προσαρμοσμένη κάμερα, για την οπτικοποίηση και φωτογράφιση

ηλεκτροφορήσεων νουκλεϊκών οξέων σε πηκτώματα αгарόζης κατόπιν ιχνηθέτησης με βρωμιούχο αιθίδιο.

- Φωτόμετρο ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας BioRad Smartspec Plus.
- Καταψύκτες -20°C (Liebherr) και -70°C (New Brunswick Scientific και Forma Scientific).
- Θερμικός κυκλοποιητής (συσκευή PCR) της εταιρίας MJ Research (μοντέλο PTC-200).
- Θερμαινόμενη πλάκα με εύρος θερμοκρασίας 20°C-100°C, με υποδοχείς για σωληνάρια τύπου erppendorf χωρητικότητας 1,5 ml και για σωληνάρια τύπου falcon, της εταιρίας Falc (TD 150 P2).
- Μηχανικές πιπέττες Gilson.
- Ηλεκτρονικό pHμετρο ORION 3 STAR από την εταιρία Thermo.
- Υδατόλουτρο JULABO.
- Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας STUART SB162.
- Επιτραπέζιοι αναδευτήρες από τις εταιρίες GFL (3005) και Heidolph.
- Επιτραπέζιος περιστροφικός αναδευτήρας (spiramix).
- Ηλεκτρικός αναδευτήρας (vortex) από την εταιρία IKA (Genius 3).
- Ηλεκτρονικός ζυγός από την εταιρία Mettler (PE 3600).
- Ηλεκτρονικός μικροζυγός από την εταιρία Adam Equipment (ESJ-205).
- Φούρνος Heraeus Function Line.
- Φούρνος μικροκυμάτων DAEWOO (KOG-892X).
- Ηλεκτρικός σακουλοποιός της εταιρίας Severin, για την έγκλειση, μέσα σε σακουλάκια, μεμβρανών νιτροκυτταρίνης μαζί με το αραιωμένο αντίσωμα, για επώαση.

2.1.7.2 Γυαλικά, πλαστικά και λοιπά υλικά.

- Πλαστικά ακρορύγχια (tips) των εταιριών Greiner Bio-one.
- Πλαστικά ακρορύγχια με φίλτρο (filter tips) της εταιρίας Sarstedt.
- Πλαστικοί σωλήνες (τύπου erppendorf) χωρητικότητας 1,5 ml των εταιριών Greiner Bio-one.
- Προαποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου με βιδωτό πώμα, όγκου 15 και 50 ml (Falcon tubes) των εταιριών Sarstedt.
- Αποστειρωμένες πλαστικές πιπέττες των 1, 2, 5, 10 ml των εταιριών Sarstedt.
- Αποστειρωμένες πλαστικές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας, εμβαδού 75 cm², της εταιρίας Costar.

- Αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας, διαμέτρου 35 και 65 mm, της εταιρίας Corning.
- Αποστειρωμένες πλαστικές πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 6, 24 ή 48 πηγαδιών από τις εταιρίες Costar και Nunc.
- Αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία για καλλιέργειες βακτηρίων, διαμέτρου 10 cm, bacterial grade, της εταιρίας VIVE.
- Πλαστικοί και γυάλινοι ογκομετρικοί κύλινδροι 10-100-250-1000-2000 ml.
- Πλαστικά και γυάλινα ποτήρια ζέσεως 100-500-1000-2000 ml.
- Μαγνήτες διαφόρων μεγεθών για ανάδευση διαλυμάτων.
- Γυάλινος ομογενοποιητής χειρός Wheaton.
- Αντικειμενοφόρες πλάκες και καλυπτρίδες της εταιρίας Knittel-Glässer.
- Φίλτρα αποστείρωσης με διάμετρο πόρων 0,45/0,2 μm (από την εταιρία PALL) και 0,45 μm (από την εταιρία Schleicher schuell).
- Πλαστικές κυψελίδες μίας χρήσης για φωτομέτρηση από την εταιρία Sarstedt.
- Μεταλλικές λαβίδες (απλές και τύπου McDonald), ψαλίδια και νυστέρια για χειρουργική αφαίρεση εγκεφάλων ποντικών.
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης της εταιρίας Biorad (0,45 μm), για τη μεταφορά πρωτεϊνών.
- Φίλμ αυτοραδιογραφίας από τις εταιρίες Kodak (X-Ray X-Omat AR) και Santa-Cruz Biotechnology (Ultra-Cruz Autoradiography Film Blue) .
- Κασέτα αυτοραδιογραφίας για την έκθεση των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης (που φέρουν ραδιενεργά σημασμένες πρωτεΐνες) σε φίλμ.

2.1.7.3 Μικροσκόπια και λογισμικά επεξεργασίας εικόνας.

- Ανάστροφο μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου και αντίθεσης φάσης της εταιρίας Zeiss, μοντέλο ID02 για την παρατήρηση ζωντανών κυττάρων.
- Ανάστροφο μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου, αντίθεσης φάσης και φθορισμού της εταιρίας Leica.
- Ορθό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου, αντίθεσης φάσης και φθορισμού Zeiss-Axiophot.
- Συνεστιακό ορθό μικροσκόπιο σάρωσης laser (Confocal Laser Scanning Microscope) της εταιρίας Leica, μοντέλο TCP-SP, εξοπλισμένο με λογισμικό τρισδιάστατης ανάλυσης (Leica 3D analysis software).

- Σύστημα επεξεργασίας και ποσοτικής ανάλυσης εικόνας Image Pro Plus.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

2.2.1.1 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών *Neuro-2a* και *HEK293T*.

Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν γίνεται σε θρεπτικό υλικό DMEM με 10% κ.ό ορό και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά), σε αποστειρωμένες πλαστικές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας 25 cm² ή 75 cm², μέσα σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C, υγρασίας και συγκέντρωσης CO₂ 5% κ.ό. Όταν τα κύτταρα σχηματίζουν πλήρες ταπήτιο, χρησιμοποιείται διάλυμα τρυψίνης/EDTA (TE) για 1-2 λεπτά, για την αποκόλληση τους από τον πυθμένα της φλάσκας καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα κύτταρα επαναιωρούνται σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και επιστρώνονται σε καινούργια φλάσκα. Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι απαραίτητο τα κύτταρα να επιστρωθούν σε συγκεκριμένο αριθμό ανά μονάδα επιφάνειας οπότε, μετά την επαναραίωσή τους, ο αριθμός τους ανά μονάδα όγκου του υλικού προσδιορίζεται με τη βοήθεια του αιματοκυτταρομέτρου, τύπου Neubauer και καθορίζεται έτσι ο νέος όγκος στον οποίο θα επαναιωρηθούν για να επιστρωθούν.

Σε περίπτωση που η απαιτούμενη πυκνότητα των κυττάρων είναι μικρότερη από την πυκνότητα που αποκτάται με την επαναδιάλυσή τους, τότε τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται σε φυγόκεντρο Beckman για 10 λεπτά στις 1200 rpm. Στη συνέχεια το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται στον κατάλληλο όγκο.

Όταν τα κύτταρα πρόκειται να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα, μετά την αποκόλλησή τους επαναιωρούνται σε υλικό καλλιέργειας στο οποίο προστίθεται 20% κ.ό FCS και 10% κ.ό DMSO (dimethylsulfoxide) και φυλάσσονται σε βαθιά κατάψυξη -80°C ή σε δεξαμενή υγρού αζώτου μέσα σε ειδικά φιαλίδια κρυοπροστασίας όγκου 1,8 ml.

2.2.1.2 Παροδικός μετασχηματισμός της κυτταρικών σειρών *Neuro-2a* και *HEK293T* με πλασμιδιακούς φορείς για την εξωγενή υπερέκφραση πρωτεϊνών.

Ο παροδικός μετασχηματισμός των κυττάρων *Neuro-2a* και *HEK293T* πραγματοποιείται με την τεχνική του γλωριούχου ασβεστίου, βάσει της οποίας το πλασμιδιακό DNA αναμιγνύεται με

χλωριούχο ασβέστιο σε διάλυμα που περιέχει φωσφορικά ιόντα. Τα προκύπτοντα φωσφορικά ασβέστια δημιουργούν σύμπλοκα με το DNA και προσκολλώνται στην κυτταρική μεμβράνη, εισερχόμενα κατόπιν στο κυτταρόπλασμα με ενδοκύτωση. Συνοπτικά, πραγματοποιούνται τα εξής βήματα:

- Τα κύτταρα Neuro-2a επιστρώνονται σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας με συγκέντρωση $2,5 \times 10^5$ κύτταρα/πηγάδι 35 mm, σε όγκο θρεπτικού υλικού 1 ml.
- 48 ώρες μετά, 5-10 µg DNA διαλύονται σε 2M $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}$ μέχρι τελικού όγκου 75 µl. Ακολουθεί προσθήκη 75 ml διαλύματος 2X HBS (pH 7,05) κάνοντας, ταυτόχρονα, φυσαλίδες στο διάλυμα. Αμέσως μετά (μέσα σε 1-2 λεπτά) το διάλυμα με το DNA προστίθεται στα κύτταρα.
- 5 ώρες αργότερα, το διάλυμα του μετασχηματισμού απομακρύνεται από τα κύτταρα και αντικαθίσταται με 1 ml θρεπτικού υλικού.
- Την επόμενη μέρα και πιο συγκεκριμένα 16 ώρες μετά, τα κύτταρα συλλέγονται με κρύο PBS 1X, πλένονται με το ίδιο διάλυμα προκειμένου ν' απομακρυνθούν υπολείμματα θρεπτικού υλικού, φυγοκεντρώνονται στα 250 g και έπεται η λύση τους για απομόνωση του συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με κατάλληλο διάλυμα (lysis buffer).

Στην περίπτωση που η επίστρωση των κυττάρων πραγματοποιείται σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας petri των 100 mm, ώστε να απομονώσουμε μεγαλύτερο ποσό πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, η ποσότητα (µg) του DNA καθώς και ο όγκος των λοιπών διαλυμάτων προσαρμόζονται ανάλογα.

Στην περίπτωση των κυττάρων HEK293T των οποίων το πολλαπλασιαστικό δυναμικό είναι υψηλότερο από εκείνο των Neuro-2a, η επίστρωσή τους πραγματοποιείται σε χαμηλότερη συγκέντρωση.

2.2.1.3 Πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων φλοιού εγκεφάλου από έμβρυο ποντικού.

Οι πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων φλοιού εγκεφάλου προήλθαν από έμβρυα ποντικών ηλικίας E16.5. Οι έγκυες θυσιάστηκαν δι' εισπνοής ισοφλουρανίου και στη συνέχεια τα έμβρυα απομονώθηκαν από τη μήτρα. Μετά την εκτομή του εγκεφάλου από κάθε έμβρυο, ο φλοιός των ημισφαιρίων τεμαχίστηκε και επώαστηκε σε διάλυμα πέψης (0.025% τρυψίνη σε HBSS) για 15 λεπτά, στους 37°C. Η ενζυμική αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 1 ml θρεπτικού υλικού DMEM με ορό και η διάσπαση του ιστού συνεχίστηκε μηχανικά, με γυάλινη πιπέττα παστέρ της οποίας το στόμιο είχε λειανθεί σε φλόγα και η διάμετρός του έχει μειωθεί ώστε να διευκολύνεται ο διαχωρισμός των

κυττάρων χωρίς να προκαλείται ο θάνατός τους. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα $800 \times g$ για 10 λεπτά και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε υλικό κυτταροκαλλιέργειας Neurobasal/ B-27/ 2 mM L-glutamine/ αντιβιοτικά (όλα από Invitrogen). Κατόπιν, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε μία συγκέντρωση 2×10^5 κύτταρα/cm² είτε σε στρογγυλές καλυπτρίδες επικαλυμμένες με πολύ-L-λυσίνη (PLL) (για ανοσοκυτταροχημεία), είτε σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 6 πηγαδιών (6-well plates) (για ανοσοαποτύπωμα κατά western). Αφού αφέθηκαν στην καλλιέργεια για 8 ημέρες, με ανοσοφορισμό έναντι του νευρωνικού δείκτη βIII-σωληνίνη (βIII-tubulin) και του δείκτη αστροκυττάρων GFAP, διαπιστώθηκε πως η καθαρότητα του νευρωνικού πληθυσμού έφτανε το 90%, γεγονός που οφείλεται στο επιλεκτικό για νευρώνες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε.

2.2.2 ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

2.2.2.1 Χειρουργική αφαίρεση εγκεφάλων ποντικών.

Ενήλικοι ποντικοί του στελέχους C57BL/6J, επιλέγονται για τη χειρουργική αφαίρεση των εγκεφάλων τους και την παρασκευή πρωτεϊνικού ομογενοποιηήματος. Ειδικότερα, οι ποντικοί αναισθητοποιούνται δι' εισπνοής με ισοφλουράνιο και στη συνέχεια θυσιάζονται με σύνθλιψη της σπονδυλικής τους στήλης. Κατόπιν, με τη χρήση ψαλιδιού και λαβίδας, αφού αφαιρεθεί το τριχωτό της κεφαλής, κόβεται περιμετρικά το κρανίο ξεκινώντας από τη βάση του στο ύψος του προμήκου και ανοίγεται το άνω μέρος του, αποκαλύπτοντας τον εγκέφαλο. Ο τελευταίος αφαιρείται με λαβίδα McDonald και τοποθετείται ταχέως σε κωνικό δοκιμαστικό σωλήνα τύπου falcon, μέσα σε πάγο, όπου και διατηρείται μέχρι τα επόμενα στάδια παρασκευής του ομογενοποιηήματος.

2.2.2.2 Παρασκευή πρωτεϊνικού ομογενοποιηήματος από εγκέφαλο ποντικού.

Οι εγκέφαλοι, ξεπλένονται τρεις φορές μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα με κρύο διάλυμα TBS 1X, ζυγίζονται και τοποθετούνται σε τρυβλίο petri μέσα σε φελιζόλ με πάγο, όπου και τεμαχίζονται σε μικρά κομμάτια με χρήση νυστεριού. Στη συνέχεια, ομογενοποιούνται σε διάλυμα Tris pH 7,4 που περιέχει μίγμα αναστολέων πρωτεασών και σε όγκο δέκα φορές μεγαλύτερο του βάρους τους. Η ομογενοποίηση λαμβάνει χώρα σε γυάλινο ομογενοποιητή χειρός Wheaton. Το προκύπτον ομογενοποίημα, διαλυτοποιείται σε αναλογία 1:1 με διάλυμα TNT. Κατόπιν, αφήνεται για 3 ώρες να αναδεύεται σε επιτραπέζιο περιστροφικό αναδευτήρα (spiramix) μέσα στον ψυχρό θάλαμο (4°C) και στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο που

περιέχει το σύνολο των πρωτεϊνών, είτε χρησιμοποιείται άμεσα, είτε διαχωρίζεται σε πλαστικούς σωλήνες (τύπου erpendorf) χωρητικότητας 1,5 ml και φυλάσσεται στους -80°C .

2.2.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.3.1 Συλλογή και λύση κυττάρων για την παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.

Προκειμένου να αναλυθούν οι πρωτεΐνες των κυττάρων Neuro-2a και HEK293T με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης και του ανοσοαποτυπώματος (Western blot), τα κύτταρα που καλλιεργούνται είτε σε τρυβλίο διαμέτρου 100 mm, είτε σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας έξι πηγαδιών (6-well plate), ξεπλένονται δύο φορές με παγωμένο PBS και συλλέγονται με μηχανική πιπέττα Gilson ή με πλαστική πιπέττα των 5-10 ml σε πλαστικούς σωλήνες τύπου erpendorf ή falcon, αναλόγως την περίπτωση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1500 rpm, για 15 λεπτά στους 4°C και το προκύπτον ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα λύσης (lysis buffer) και παραμένει υπό ανάδευση σε επιτραπέζιο περιστροφικό αναδευτήρα (spigamix) μέσα στον ψυχρό θάλαμο (4°C) για τρεις ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C και μία ποσότητα από το υπερκείμενο πρωτεϊνικό εκχύλισμα, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry.

2.2.3.2 Απομόνωση πυρηνικού και κυτταροπλασματικού κλάσματος κυττάρων Neuro-2a.

Προκειμένου ν' απομονωθεί ξεχωριστά το πρωτεϊνικό εκχύλισμα του κυτταροπλάσματος κι εκείνο του πυρήνα, ακολουθείται το πρωτόκολλο των Sutherland H.G. και συν. (2004). Εν συντομία, τα κύτταρα πλένονται αρχικά με κρύο PBS και στη συνέχεια με πενταπλάσιο όγκο (σε σχέση με το ίζημα που σχηματίζουν) υποτονικού διαλύματος (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 1X μίγμα αναστολέων πρωτεασών). Στο ίδιο υποτονικό διάλυμα και σε τριπλάσιο όγκο, τα κύτταρα παραμένουν στον πάγο για 10 λεπτά και ακολουθεί λύση αυτών με έντονο πιετάρισμα και φυγοκέντρηση στα $3300 \times g$ για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο, φυλάσσεται ως το κυτταροπλασματικό κλάσμα ενώ το ίζημα που συνίσταται από τους πυρήνες επαναδιαλύεται σε ίσο όγκο διαλύματος χαμηλής αλατότητας (20 mM HEPES pH 7,9, 25% glycerol, 1,5 mM MgCl_2 , 0,02 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 1X μίγμα αναστολέων πρωτεασών). Κατόπιν, προστίθεται σταγόνα-σταγόνα διάλυμα υψηλής αλατότητας, ίσου όγκου με το ίζημα (σ.σ. ως προς τη

σύσταση είναι ίδιο με εκείνο της χαμηλής αλατότητας και έχει επιπρόσθετα και 0,4 M KCl), και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 4°C για μισή ώρα. Το πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα συλλέγεται μετά από φυγκέντρωση στα $25.000 \times g$ στο υπερκείμενο

2.2.3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, ακολουθήθηκε η μέθοδος Lowry χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια της Biorad (Biorad Dc Protein Assay). Ο χημικός μηχανισμός της μεθόδου εξελίσσεται σε δύο στάδια: στο πρώτο, πραγματοποιείται σε αλκαλικές συνθήκες ο σχηματισμός κυανέρυθρων συμπλόκων μεταξύ ιόντων Cu^{2+} και πρωτεϊνών. Στο δεύτερο, οι τυροσίνες και οι τρυπτοφάνες του πρωτεϊνικού μέρους του συμπλόκου, ανάγουν τα φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά άλατα του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και παράγεται ένα επιπρόσθετο έντονο μπλε-πράσινο χρώμα το οποίο εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 750 nm. Για τον προσδιορισμό της άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεϊνών σ' ένα εκχύλισμα, απαιτείται η κατασκευή πρότυπης καμπύλης με τιμές που προκύπτουν από την φωτομέτρηση και ποσοτικοποίηση ενός διαλύματος πρωτεΐνης, γνωστής αρχικής συγκέντρωσης και σε διάφορες αραιώσεις. Εδώ χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αλβουμίνης από ορρό βοδιού (BSA), σ' ένα εύρος συγκεντρώσεων 0,156-2,5 mg/ml.

Αφού ετοιμαστούν τα δείγματα, τόσο της πρότυπης καμπύλης όσο και του άγνωστου πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (έχοντας πάντα κι ένα δείγμα-μάρτυρα), προστίθενται τα αντιδραστήρια της εταιρίας στην αναλογία που υποδεικνύει το πρωτόκολλο και μόλις το πρωτεϊνικά δείγματα λάβουν το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα, αφήνονται στο σκοτάδι για δέκα λεπτά προκειμένου να φθάσει στο 90% η απόδοση της χημικής αντίδρασης (αναγωγής). Κατόπιν, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 750 nm και προσδιορίζεται η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.

2.2.3.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου, παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS), (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE).

Για την ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Η ομοιόμορφη δέσμευση του φορτισμένου απορρυπαντικού SDS στις πρωτεΐνες τις κάνει να αποκτήσουν σταθερό αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα, παρουσία ηλεκτρικού πεδίου, η κινητικότητα τους να εξαρτάται μόνο από το μοριακό βάρος τους. Η ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος, το οποίο ρυθμίζεται με τη μεταβολή της

περιεκτικότητας του σε ακρυλαμίδιο. Χρησιμοποιήθηκαν μικρά πήκτωμα διαχωρισμού, συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου 12% κ.ό (mini gel). Τα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα αφού προστεθεί σε αυτά το ειδικό διάλυμα φόρτωσης δείγματος (loading buffer). Τα δείγματα βράζονται για 5 λεπτά στους 95°C για να αποδιαταχθούν. Η παρουσία του DTT (διθειοθρεϊτόλη) ή εναλλακτικά της β-μερκαπτοαιθανόλης στο διάλυμα φόρτωσης προκαλεί την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών της πρωτεΐνης. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου στο οποίο φορτώνονται τα δείγματα είναι συγκέντρωσης 4% κ.ό και καλείται πήκτωμα συμπίκνωσης. Η ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 160 Volt για 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ των μικρών σε τάση 200 Volt για μιάμιση περίπου ώρα, επίσης σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα κατεργάζεται με έναν από τους δύο ακόλουθους τρόπους:

1. Εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών με διάλυμα χρώσης και αποχρωματισμού (Stain-Destain solution).
2. Ηλεκτροφορητική μεταφορά κατά western των πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη και δημιουργία ανοσοαποτυπώματος με τη χρήση αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

2.2.3.5 Χρώση των πρωτεϊνικών ζωνών με διάλυμα Coomassie Brilliant Blue R-250.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου εμβαπτίζεται σε διάλυμα Coomassie Brilliant Blue R-250 και επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά. Κατόπιν, μεταφέρεται σε διάλυμα αποχρωματισμού όπου και αναδεύεται ήπια για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια σε δις-απεσταγμένο νερό μέχρι την επόμενη ημέρα. Το πήκτωμα αφού αποχρωματιστεί, προκειμένου να διατηρηθεί, αποξηραίνεται με τη χρήση συσκευής αφύγρανσης υπό κενό σε ένα κομμάτι χαρτί Whatmann 3MM ίσης περίπου διάστασης.

2.2.3.6 Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη και δημιουργία ανοσοαποτυπώματος (western blot).

Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (Towbin, Staehelin, and Gordon 1979). Ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης (Nitrocellulose membrane 0.45 μM, Biorad) και δύο κομμάτια χαρτιού Whatmann 3MM κόβονται σε μέγεθος λίγο μεγαλύτερο από το πήκτωμα και εμβαπτίζονται στη συνέχεια στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα. Στην πλάκα όπου θα εφαρμοστεί το ηλεκτρόδιο του αρνητικού πόλου τοποθετούνται με την ακόλουθη σειρά: ένα απορροφητικό χαρτί Whatmann, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (χωρίς να εγκλωβιστούν φυσαλίδες αέρα), η

νιτροκυτταρίνη κι ένα απορροφητικό χαρτί Whatmann . Τέλος τοποθετείται η πλάκα όπου θα εφαρμοστεί το ηλεκτρόδιο του θετικού πόλου. Η ηλεκτρική μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται στους 4°C με ρεύμα σταθερής έντασης 300 mA. Η διάρκεια της ηλεκτρομεταφοράς καθορίζεται από το μέγεθος των πρωτεϊνών. Για πρωτεΐνες M.B. 10-100 kD, αρκούν 2 ώρες ηλεκτρομεταφοράς. Οι ζώνες των πρωτεϊνών γίνονται ορατές με χρώση της νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S, ώστε να επιβεβαιωθεί και η επιτυχής μεταφορά τους και στη συνέχεια ο αποχρωματισμός της μεμβράνης πραγματοποιείται με διάλυμα TBS 1X.

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώάζεται στη συνέχεια με 5% κ.ό λυοφιλιωμένο γάλα σε 1X TBS, για 30 λεπτά στους 37°C. Με τη διαδικασία αυτή, παρεμποδίζεται η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Κατόπιν, λαμβάνει χώρα επώαση της νιτροκυτταρίνης με πρώτο αντίσωμα έναντι του υπό ανίχνευση αντιγόνου στους 4°C, για 16 ώρες υπό συνεχή και ήπια ανάδευση. Το αντίσωμα αραιώνεται σε 2,5% κ.ό. λυοφιλιωμένο γάλα σε 1X TBS. Ακολουθούν την επόμενη ημέρα 3 πλυσίματα των 10 λεπτών με διάλυμα 1X TBS-Tween 0.1% και επώαση με δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP- Horse Radish Peroxidase) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιείται αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες του ποντικού ή του κουνελιού, ανάλογα με το είδος του πρωτογενούς αντισώματος. Ακολουθούν 3 πλυσίματα των 10 λεπτών με διάλυμα 1X TBS-Tween 0.1% και εμφάνιση των υπό ανίχνευση πρωτεϊνικών ζωνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

2.2.3.7 Ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών: Μέθοδος ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemo-Luminescence).

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, λαμβάνει χώρα σε σκοτεινό θάλαμο και απαιτεί τη χρήση συγκεκριμένων αντιδραστηρίων για την ολοκλήρωση της βιοχημικής αντίδρασης (λουμινόλη, κουμαρικό οξύ, υπεροξειδίο του υδρογόνου) καθώς επίσης φιλμ αυτοραδιογραφίας και διαλύματα για την ανάπτυξη και μονιμοποίηση του σήματος της χημειοφωταύγειας επάνω στο φιλμ.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ της λουμινόλης και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, που καταλύεται από το συζευγμένο στο δεύτερο αντίσωμα ένζυμο της υπεροξειδάσης. Το διεγερμένο χημικό ενδιάμεσο που παράγεται από την παραπάνω αντίδραση, μεταπίπτει στη συνέχεια σε μία κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας εκπέμποντας φως. Η παρουσία ενισχυτικών υποστρωμάτων όπως είναι το κουμαρικό οξύ, αυξάνει έως και 1000 φορές την ένταση του

εκπεμπόμενου φωτός το οποίο και αποτυπώνεται στο φιλμ. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που φέρει τις αποδιαταγμένες πρωτεΐνες, εμβαπτίζεται στο διάλυμα των αντιδραστηρίων και παραμένει για ένα με δύο λεπτά. Κατόπιν, τυλίγεται σε πλαστική μεμβράνη και από πάνω τοποθετείται το φιλμ υπό πίεση προκειμένου ν' αποτυπωθεί το σήμα της χημειοφωταύγειας. Ο χρόνος έκθεσης της μεμβράνης στο φιλμ ποικίλλει ανάλογα με την ένταση του σήματος και κυμαίνεται από ένα έως και είκοσι λεπτά. Πέραν αυτού του χρονικού διαστήματος το σήμα έχει αποδυναμωθεί πλήρως και δεν δύναται να μας προσφέρει κάποια επιπρόσθετη πληροφορία για το πείραμά μας. Η εμφάνιση των σεσημασμένων από τη φωταύγεια πρωτεϊνικών ζωνών, πραγματοποιείται με την εμβάπτιση του φιλμ σε διάλυμα ανάπτυξης (GDX Developer, Kodak) και στη συνέχεια σε διάλυμα μονιμοποίησης (GBX Fixer, Kodak), ούτως ώστε να διατηρηθεί η εικόνα που λαμβάνουμε.

2.2.3.8 Ανοσοκυτταροχημεία-Ανοσοφθορισμός.

Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού επιτρέπει την ανίχνευση ενός αντιγόνου και τον εντοπισμό της θέσης του σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο αλλά και σε επίπεδο ιστών. Στηρίζεται στη χρήση ιχνηθετημένων με φθορίζουσες ουσίες δευτερογενών αντισωμάτων τα οποία αναγνωρίζουν και προσδένονται στη σταθερή περιοχή των πρωτογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται για τη δέσμευση του επιθυμητού αντιγόνου. Σε συνδυασμό με την τεχνολογία της συνεστιακής μικροσκοπίας και ανάλυσης εικόνας, ο ανοσοφθορισμός επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση δύο ή περισσότερων αντιγόνων, καθώς και την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασής τους. Προκειμένου να γίνουν πειράματα ανοσοφθορισμού σε κύτταρα θα πρέπει αυτά να επιστρωθούν σε γυάλινες καλυπτρίδες που έχουν προηγουμένως επικαλυφθεί με πολυ-L-λυσίνη. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα αποκολλώνται είτε μηχανικά είτε ενζυμικά από το τρυβλίο καλλιέργειάς τους και επιστρώνονται σε συγκεκριμένη πυκνότητα, π.χ. 20.000 κύτταρα ανά καλυπτρίδα διαμέτρου 10 mm, με τη μορφή σταγόνας όγκου 50-80 μl, μέσα σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 48-θέσεων. Όταν τα κύτταρα προσκολληθούν στο υπόστρωμα, προστίθεται θρεπτικό υλικό μέχρις όγκου 200 μl και ακολουθεί επώαση για 24-48 ώρες. Μετά από το χρονικό αυτό διάστημα, το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS. Ακολουθεί η μονιμοποίηση των κυττάρων για 20 λεπτά με διάλυμα 2 ή 4% κ.ό παραφορμαλδεΐδη (αναλόγως το πρωτογενές αντίσωμα) σε PBS και 3 πλυσίματα με PBS. Στη συνέχεια γίνεται η κάλυψη των μη-ειδικών αντιγονικών θέσεων με επώαση των κυττάρων για μία ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα Mabs το οποίο περιέχει ορό μοσχαριού και λυσίνη.

Ακολουθεί η επώαση των κυττάρων με το διάλυμα των πρωτογενών αντισωμάτων. Η αραίωση των αντισωμάτων γίνεται στο ίδιο διάλυμα με το οποίο έγινε η κάλυψη των μη-ειδικών θέσεων, προκειμένου να περιοριστεί ο «θόρυβος». Τα πρωτογενή αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμούς ανά δύο ή ακόμα και ανά τρία αρκεί να έχουν παραχθεί σε διαφορετικό ξενιστή και να αντιδρούν κατόπιν κοινής επεξεργασίας των δειγμάτων (π.χ. μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-Cyclin D1 που έχει παραχθεί σε ποντικό και πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-Dyrk1B που έχει παραχθεί σε κουνέλι). Ο διαφορετικός ξενιστής εξασφαλίζει ότι στο επόμενο στάδιο που είναι η αντίδραση της σταθερής περιοχής του πρωτογενούς αντισώματος με το δευτερογενές, συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική, αντίσωμα θα υπάρξει εξειδίκευση των δύο δευτερογενών αντισωμάτων [π.χ. goat anti-mouse IgG-AlexaFluor 488 (πράσινο) και goat anti-rabbit IgG-AlexaFluor 546 (κόκκινο)]. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον **πίνακα 2.1**, όπου αναφέρεται και η αραίωση για το καθένα από αυτά (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά στο κείμενο) και οι συνδυασμοί τους για το κάθε πείραμα αναφέρονται στα αντίστοιχα πεδία της ενότητας των αποτελεσμάτων. Η επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα γίνεται για 12-16 ώρες στους 4°C, σε ειδικό δοχείο με υγρασία.

Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα ξεπλένονται 3 φορές με PBS και ακολουθεί η επώαση με τον κατάλληλο συνδυασμό δευτερογενών αντισωμάτων, συζευγμένων με φθορίζουσες χρωστικές, ώστε να επιτευχθεί διπλός ανοσοφθορισμός. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον **πίνακα 2.2** και οι συνδυασμοί τους για κάθε πείραμα αναφέρονται στα αντίστοιχα πεδία της ενότητας των αποτελεσμάτων. Η επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα γίνεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, σε ειδικό φωτοστεγές δοχείο με υγρασία. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που επώαστηκαν μόνο με δεύτερο αντίσωμα. Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα ξεπλένονται 3 φορές με PBS και μία φορά με d.d.H₂O και ακολουθεί η τοποθέτησή τους σε αντικειμενοφόρες πλάκες με τη μέσολάβηση του υλικού Mowiol. Όταν τα παρασκευάσματα στεγνώσουν είναι έτοιμα για παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Ειδικές τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου

- Για την ανίχνευση του BrdU που έχει ενσωματωθεί στο DNA των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, μετά τη μονιμοποίηση, τα κύτταρα επώάζονται με 2N HCl, 0,1% κ.ό Triton X-100 για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επώαση με ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης βορικού οξέος 0,1 M για 20 λεπτά και 3 πλυσίματα με PBS, πριν από την επώαση κάλυψης των μη-ειδικών θέσεων.

2.2.3.9 Συν-ανοσοκατακρήμνισεις.

Με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης, που βασίζεται στη χημική συγγένεια μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος, πεπτίδια ή πρωτεΐνες δύνανται ν' απομονωθούν. Η κατακρήμνιση του συμπλέγματος πρωτεΐνης-αντισώματος πραγματοποιείται με την προσθήκη στο διάλυμα αδιάλυτων σφαιριδίων αγαρόζης που φέρουν στην επιφάνειά τους πρωτεΐνη A (protein A) ή πρωτεΐνη G (protein G) ανάλογα με τον ισότυπο του πρώτου αντισώματος που χρησιμοποιείται. Οι τελευταίες, δεσμεύουν το αντίσωμα και μαζί με το αντιγόνο που αυτό φέρει, το κατακρημνίζουν μετά από φυγοκέντρηση. Στην περίπτωση μελέτης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων ενός μορίου, ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποκτά και η συν-κατακρήμνιση, η ανίχνευση δηλαδή πιθανών πρωτεϊνικών συνεργατών που συμπαρασύρονται λόγω αλληλεπίδρασης με το αντιγόνο που δεσμεύει το αντίσωμα. Η επιλογή της ακινητοποιημένης στα σφαιρίδια πρωτεΐνης, σχετίζεται με το είδος του οργανισμού στο οποίο έχει παραχθεί το αντίσωμα. Έτσι, η πρωτεΐνη A δεσμεύει καλά τα IgGs αντισώματα από κουνέλι, γάτα, άνθρωπο και χοίρο καθώς και τα IgG2a και IgG2b από ποντίκι. Η πρωτεΐνη G δεσμεύει ισχυρά τα IgGs αντισώματα από αγελάδα, κατσίκια, πρόβατο, άλογο και τα IgG1 και IgG3 από ποντίκι.

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα (~2 mg) που απομονώνεται είτε από παροδικά μετασχηματισμένα κύτταρα είτε από ομογενοποίημα εγκεφάλου ποντικού, υπόκειται σε καθαρισμό με 40 μl σφαιριδίων αγαρόζης που φέρουν πρωτεΐνη A ούτως ώστε ν' απομακρυνθούν μόρια που θα δεσμεύονταν μη ειδικά στα σφαιρίδια κατά την ανοσοκατακρήμνιση. Η διαδικασία πραγματοποιείται στους 4°C για 2 ώρες υπό ανάδευση. Στη συνέχεια το εκχύλισμα φυγοκεντρείται στις 1000 rpm για 5 λεπτά και το υπερκείμενο χρησιμοποιείται για την ανοσοκατακρήμνιση. Η ποσότητα του αντισώματος που συνίσταται για την κατακρήμνιση του αντιγόνου που δεσμεύει, από τη συγκεκριμένη ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (~2 mg), είναι περίπου 10 μg, αλλά εξαρτάται και από τη σχετική αφθονία της πρωτεΐνης στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Το εκχύλισμα επωάζεται υπό ανάδευση στους 4°C για 12-16 ώρες, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες της κατακρήμνισης χρησιμοποιούνται ένα τυχαίο αντίσωμα καθώς και δείγμα χωρίς αντίσωμα παρά μόνο με την προσθήκη σφαιριδίων. Την επόμενη ημέρα, προστίθενται 40-50 μl σφαιριδίων αγαρόζης με πρωτεΐνη A και το εκχύλισμα επωάζεται για 2 ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Τα σφαιρίδια αφήνονται να πέσουν με τη δύναμη της βαρύτητας και πλένονται τρεις φορές με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ώστε ν' απομακρυνθούν διάφορες προσμίξεις. Κατόπιν, οι πρωτεΐνες που έχουν κατακρημνιστεί συλλέγονται με το διάλυμα

φόρτωσης πρωτεϊνών (SDS-loading buffer), με σκοπό την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και τη δημιουργία ανοσοαποτυπώματος κατά western.

2.2.3.10 GST-κατακρημνίσεις.

Μία μέθοδος εξακρίβωσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο πρωτεϊνών, είναι και η χρωματογραφία συγγένειας, η οποία, βασίζεται στην υψηλή χημική συγγένεια που αναπτύσσεται ανάμεσα σε δύο συγκεκριμένες πρωτεΐνες σε σχέση με τις υπόλοιπες ενός μίγματος. Εφαρμογή της μεθόδου αυτής, αποτελούν οι GST-κατακρημνίσεις που χρησίμευσαν για την ανίχνευση των αλληλεπιδράσεων του αντιγόνου Cend1 με άλλες πρωτεΐνες από εκχύλισμα κυττάρων HEK293T ή ομογενοποίηση εγκεφάλου ποντικού.

Βάσει της συγκεκριμένης τεχνικής, χημικές πρωτεΐνες που φέρουν τον επίτοπο GST, χρησιμοποιούνται ως δολώματα για την κατακρήμιση πρωτεϊνών με τις οποίες ενδεχομένως αλληλεπιδρούν, ενώ βασική προϋπόθεση αποτελεί η χρήση σφαιριδίων σεφαρόζης με συζευγμένη γλουταθειόνη, η οποία δεσμεύει τον GST επίτοπο.

Αρχικά, οι χημικές πρωτεΐνες που έχουν παραχθεί και απομονωθεί σε μεγάλη κλίμακα από το βακτηριακό στέλεχος BL21 της *E.coli*, προσδένονται στα σφαιρίδια σεφαρόζης με γλουταθειόνη, ύστερα από επώαση υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα σφαιρίδια πλένονται τρεις φορές με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (GST wash buffer) προκειμένου ν' απομακρυνθούν προσμίξεις και μία μικρή ποσότητα αυτών, διαλυτοποιείται σε διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (SDS-loading buffer). Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και χρώση με Coomassie Brilliant Blue, ώστε να διαπιστωθεί η επιτυχής δέσμευση των χημικών πρωτεϊνών στα σφαιρίδια. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια που φέρουν δεσμευμένες τις χημικές πρωτεΐνες, προστίθενται στο εκχύλισμα κυττάρων ή ομογενοποιημένου εγκεφάλου (~50 μl σφαιριδίων/2 mg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος) και επωάζονται υπό ανάδευση για 12-16 ώρες στους 4°C. Σημειώνεται πως το πρωτεϊνικό εκχύλισμα, προτού χρησιμοποιηθεί στη συγκεκριμένη δοκιμασία, έχει επωαστεί για 3 ώρες υπό ανάδευση στους 4°C με 50 μl σφαιριδίων σεφαρόζης με γλουταθειόνη ούτως ώστε ν' απομακρυνθούν μόρια που προσδένονται μη ειδικά. Μετά τη GST-κατακρήμιση ακολουθεί πλύσιμο των σφαιριδίων που φέρουν τις χημικές πρωτεΐνες και ό,τι έχουν εκείνες καταβυθίσει, διαλυτοποίηση αυτών σε διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (SDS-loading buffer) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Στο ανοσοαποτύπωμα κατά western που έπεται, χρησιμοποιείται αντίσωμα έναντι της πιθανής αλληλεπιδρώσας πρωτεΐνης με την Cend1, ώστε να επιβεβαιωθεί ή όχι η

παρουσία της στην συν-ανοσοκαταβύθιση. Ως αρνητικός μάρτυρα του πειράματος χρησιμοποιείται σκέτη GST πρωτεΐνη αντί του «δολώματος» GST- Cend1 ή GST-RanBPM αντίστοιχα .

2.2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

2.2.4.1 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των μορίων DNA πραγματοποιείται με βάση το μοριακό τους βάρος, με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (ηλεκτροφόρηση) σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης (φυτικός πολυσακχαρίτης). Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα μόρια DNA τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω του ιονισμού των φωσφορικών ομάδων τους μετακινούνται προς το θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Ανάλογα με το μέγεθος των προς ανάλυση μορίων DNA, χρησιμοποιούνται και διαφορετικής συγκέντρωσης σε αγαρόζη πήκτώματα. Μεγάλου μεγέθους μόρια DNA απαιτούν χαμηλή συγκέντρωση αγαρόζης, 0,8% κ.β. προκειμένου να μπορούν να μετακινηθούν μέσω των πόρων του πηκτώματος. Αντίθετα, μικρού μεγέθους μόρια, της τάξεως λίγων εκατοντάδων bp, χρειάζονται αρκετά πυκνό πήκτωμα, 2% κ.β. σε αγαρόζη, το οποίο θα τα συγκρατήσει και δε θα τ' αφήσει να διαφύγουν στο ρυθμιστικό διάλυμα κατά την ηλεκτροφόρηση. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι TBE 1X με βρωμιούχο αιθίδιο 0,5 μg/ml.

Τα δείγματα DNA μετά από προσθήκη διαλύματος φόρτωσης δείγματος (loading buffer) ($V_{\text{loading buffer}}/V_{\text{ολικό}} = 1/10$) ηλεκτροφορούνται υπό σταθερή τάση 150 Volts, σε θερμοκρασία δωματίου. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα, στο πήκτωμα ηλεκτροφορείται κι ένας μάρτυρας (DNA ladder) γνωστών μοριακών μεγεθών. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) μήκους κύματος 302 nm, εντός κατάλληλου θαλάμου (Gel Doc™ XR/BIORAD), όπου λόγω της φθορίζοντος βρωμιούχου αιθιδίου που ενσωματώνεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA, τα μόρια DNA σχηματίζουν ορατές ζώνες στις θέσεις που έχουν μεταναστεύσει με βάση το μοριακό τους βάρος. Η εικόνα του πηκτώματος αγαρόζης λαμβάνεται μέσω προσαρμοσμένης κάμερας σε H/Y και εν συνεχεία με κατάλληλο λογισμικό (Gel Doc XR), οι ζώνες δύνανται να ποσοτικοποιηθούν. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης, εφαρμόζεται επίσης και κατά τη διαδικασία της απομόνωσης και καθαρισμού των μορίων DNA. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιούνται παρασκευαστικά πηκτώματα αγαρόζης, από τα οποία αποκόβονται τα τμήματα εκείνα που περιέχουν τις επιθυμητές ζώνες του DNA και κατόπιν εφαρμόζονται μέθοδοι καθαρισμού DNA.

2.2.4.2 Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που προέρχονται από μικροοργανισμούς, τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες και κόβουν το DNA σπάζοντας ένα φωσφοδιεστερικό δεσμό σε συγκεκριμένη θέση, σε κάθε αλυσίδα. Το πρότυπο πέψης ενός μορίου DNA με μία ειδική ενδονουκλεάση χρησιμοποιείται ευρέως, τόσο για την ταυτοποίηση όσο και για την απομόνωση συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Οι πέψεις πραγματοποιούνται σε περιβάλλον (ιοντική ισχύς, θερμοκρασία, pH, παρουσία ή απουσία απορρυπαντικού, κλπ.) που ευνοεί την δράση του εκάστοτε ενζύμου. Οι συνθήκες αυτές καθορίζονται από την εταιρεία παρασκευής του εκάστοτε ενζύμου. Σε μία τυπική αντίδραση πέψης 1 μg DNA επώάζεται στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με 3-5 μονάδες ενεργότητας ενζύμου, στην κατάλληλη θερμοκρασία για 2 ώρες και σε τελικό όγκο πέψης 20 μl. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.2.4.3 Καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης με τη συστηματοποιημένη μέθοδο QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN Inc.).

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιούνται κολώνες QIAquick spin columns ικανές να δεσμεύσουν μέχρι 10 μg δίκλωνου DNA (dsDNA) μεγέθους 70 bp-10 kb. Το καθαρό DNA που ανακτάται φτάνει το 70-80% της αρχικής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε.

- Αρχικά, κόβεται και ζυγίζεται η επιθυμητή ζώνη του DNA από το παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης.
- Προστίθεται διάλυμα QG (διάλυμα χαοτροπικών αλάτων) σε όγκο τριπλάσιο από τη μάζα του τμήματος του πηκτώματος αγαρόζης (π.χ. για 100 mg πηκτώματος, προστίθενται 300 μl διαλύματος QG). Το διάλυμα QG συμβάλλει στη διαλυτοποίηση του τμήματος του πηκτώματος και παρέχει τις κατάλληλες συνθήκες για τη δέσμευση του DNA στη μεμβράνη της κολώνας. Επιπρόσθετα, περιέχει δείκτη που προσδίδει κίτρινο χρώμα στο διάλυμα όταν το pH λαμβάνει τιμές $\leq 7,5$, δηλώνοντας πως είναι εφικτή η προσρόφηση του DNA.
- Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 10 λεπτά προκειμένου να διαλυθεί τελείως η αγαρόζη.
- Τοποθετείται το δείγμα στην κολώνα και φυγοκεντρείται για 60 sec (το DNA δεσμεύεται στην κολώνα).

- Απομακρύνεται το εκλούμενο κλάσμα και η κολώνα πλένεται με προσθήκη 0,75 ml διαλύματος PE που περιέχει 80% αιθανόλη (η σύνθεση του διαλύματος δεν αναφέρεται από τον κατασκευαστή). Η πλύση πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση για 60 sec.
- Απομακρύνεται το εκλούμενο κλάσμα και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό επιπλέον στις 13000 rpm.
- Τοποθετείται η κολώνα σ' ένα καθαρό erpendorf και η έκλυση του DNA λαμβάνει χώρα με 50 μl ddH₂O και φυγοκέντρηση για 60 sec.

Η συγκέντρωση και η ποιότητα του απομονωμένου DNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.2.4.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Η τεχνική αυτή (Saiki et al. 1986) χρησιμοποιείται με σκοπό τον πολλαπλασιασμό *in vitro* μιας περιοχής ενός μορίου DNA (μήτρα), με τη βοήθεια δύο ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών συμπληρωματικών προς κάθε μία από τις δύο αλυσίδες του προς ενίσχυση τμήματος DNA. Κατά την αντίδραση, ξεκινώντας από τους δύο εκκινητές, πραγματοποιείται συγχρόνως επιμήκυνση και των δύο αλυσίδων με τη βοήθεια ειδικής θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης. Η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία dNTP και ιόντων Mg²⁺. Κάθε νεοσχηματιζόμενη αλυσίδα χρησιμοποιείται με τη σειρά της σαν μήτρα με αποτέλεσμα η συγκεκριμένη περιοχή του DNA να πολλαπλασιάζεται εκθετικά. Συνοπτικά ο κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα εξής στάδια: (α) αποδιάταξη της μήτρας, (β) αναδιάταξη των μονόκλωνων αλυσίδων του DNA με τα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές και (γ) επιμήκυνση της νέας αλυσίδας. Αναλυτικά, σε μία τυπική αντίδραση χρησιμοποιούνται τα εξής:

Μήτρα: 10-100 ng πλασμιδιακού DNA ή 100-500 ng χρωμοσωμικού DNA χρησιμοποιούνται σαν μήτρα.

Εκκινητές: 0,2-0,5 pmol/μl από κάθε εκκινητή. Οι δύο εκκινητές που χρησιμοποιούνται έχουν αντιπαράλληλη κατεύθυνση και είναι συμπληρωματικοί για την κάθε μία αλυσίδα του DNA. Το μήκος τους κυμαίνεται μεταξύ 15-30 βάσεων και δεν πρέπει να υπάρχουν τμήματα συμπληρωματικά μεταξύ τους, είτε μεταξύ τμημάτων του ίδιου εκκινητή. Επιπλέον, στο 3' άκρο είναι επιθυμητή η ύπαρξη ενός δινουκλεοτιδίου GC, που σταθεροποιεί την υβριδοποίηση του εκκινητή στη μήτρα. Η διαφορά των σημείων τήξης (Tm) μεταξύ των δύο εκκινητών δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 5°C. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή αναφέρονται στην παράγραφο 2.1.6.

Ενζυμο πολυμερισμού του DNA. Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η θερμοανθεκτική Phusion DNA πολυμεράση της εταιρείας Finnzymes που παρουσιάζει βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού του DNA στους 72°C, ενδείκνυται για μεγάλου μήκους μήτρες (έως 3 Kb). και επιπλέον χαρακτηρίζεται από πιστότητα στην αντιγραφή (proofreading polymerase).

Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 10X, το οποίο εξασφαλίζει περιβάλλον αντίδρασης με τις βέλτιστες συνθήκες δράσης του ενζύμου. Το διάλυμα αυτό διαφέρει ανάλογα με το συγκεκριμένο ένζυμο και προμηθεύεται από την κάθε εταιρία μαζί με το ένζυμο. Απαραίτητη σε κάθε περίπτωση είναι η παρουσία ιόντων Mg^{2+} . Το ρυθμιστικό διάλυμα που συνοδεύει την πολυμεράση Phusion της εταιρείας Finnzymes αποτελεί ευρεσιτεχνία της εταιρείας. Η συγκέντρωσή του ως προς το $MgCl_2$ είναι τέτοια ώστε να παρέχει στην αντίδραση τελική συγκέντρωση ίση με 1,5 mM.

Μίγμα των τεσσάρων δεοξυνουκλεοτιδίων, τελικής συγκέντρωσης 250 μM ανά δεοξυνουκλεοτίδιο.

Σε ειδικά σωληνάκια λεπτού τοιχώματος και χωρητικότητας 200 μl προστίθενται όλα τα παραπάνω συστατικά. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 50 μl . Στις αντιδράσεις PCR περιλαμβάνεται πάντα ένα δείγμα χωρίς DNA, μόνο με νερό, ως αρνητικός μάρτυρας. Ένα τυπικό πρόγραμμα PCR έχει ως εξής: 1 λεπτό στους 94°C, 1 λεπτό συνήθως στους 55-68°C, όπου η θερμοκρασία εξαρτάται από τους εκάστοτε εκκινήτες, 1-3 λεπτά στους 72°C, όπου ο χρόνος εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος που θα ενισχυθεί. Τα βήματα αυτά επαναλαμβάνονται συνήθως για 30 κύκλους. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στους 72 °C όπου συμπληρώνονται τυχόν τμήματα των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων που δεν έχουν ολοκληρωθεί. Τέλος, τα δείγματα διατηρούνται στους 4°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

2.2.4.5 Καθαρισμός προϊόντων αντίδρασης PCR με τη συστηματοποιημένη μέθοδο QIAquick purification kit (QIAGEN Inc.).

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται κολώνες QIAquick spin columns, ικανές να δεσμεύσουν μέχρι 10 μg DNA μεγέθους 100 bp-10 kb, για τον καθαρισμό του προϊόντος της αντίδρασης PCR από τα εναρκτήρια μόρια, τα ελεύθερα μονονουκλεοτίδια και το ένζυμο (πολυμεράση). Το καθαρό DNA που ανακτάται φτάνει το 90-95% της αρχικής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε.

- Αρχικά προστίθενται 5 μl διαλύματος PB (η σύνθεση του διαλύματος δεν αναφέρεται από τον κατασκευαστή) για κάθε μl προϊόντος αντίδρασης PCR.

- Τοποθετείται το δείγμα στην κολώνα και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 60 sec. σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το εκλούμενο κλάσμα απομακρύνεται, προστίθεται στην κολώνα 0,75 ml διαλύματος PE και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 60 sec. σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το εκλούμενο κλάσμα απομακρύνεται και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για επιπλέον 60 sec.
- Η κολώνα τοποθετείται σε καθαρό eppendorf και η έκλυση του DNA πραγματοποιείται με 50 μl ddH₂O, φυγοκεντρώντας στις 13.000 rpm για 60 sec.

2.2.4.6 Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA.

Σε ορισμένες περιπτώσεις κλωνοποίησης, εισαγωγής δηλαδή μίας αλληλουχίας DNA σ' ένα πλασμιδιακό φορέα, δύναται ο τελευταίος να διαθέτει ισοτελή άκρα ή να έχει κοπεί με ένα μόνο περιοριστικό ένζυμο που δημιουργεί συμπληρωματικά κολλώδη άκρα. Υπάρχει συνεπώς η πιθανότητα κατά την αντίδραση σύνδεσης του πλασμιδίου με το προς κλωνοποίηση μόριο, τα άκρα αυτά να επανασυνδεθούν μεταξύ τους (self-ligation) αποκλείοντας την επιτυχή είσοδο του DNA στον πλασμιδιακό φορέα. Προκειμένου ν' αποφευχθεί κάτι παρόμοιο, χρησιμοποιείται το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης από έντερο μοσχαριού (calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP), το οποίο αποφωσφορυλιώνει τα 5' άκρα του γραμμικού πλασμιδιακού DNA. Για κάθε μg πλασμιδιακού DNA απαιτούνται περίπου 3 units ενζύμου και η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 37°C για 15 λεπτά. Το ένζυμο κατόπιν, πρέπει ν' απενεργοποιηθεί πριν την κλωνοποίηση γι' αυτό και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 65°C για 15 λεπτά. Ακολουθεί καθαρισμός τόσο του πλασμιδιακού φορέα όσο και του προς κλωνοποίηση μορίου DNA (insert) με τη συστηματοποιημένη μέθοδο QIAquick purification kit (QIAGEN Inc.) και τέλος η αντίδραση συνένωσής τους (ligation).

2.2.4.7 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA με τη χρήση T4 DNA λιγάσης.

Κατά την αντίδραση σύνδεσης των μορίων DNA, πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν η φύση των άκρων τόσο στο τμήμα DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί όσο και στο πλασμιδιακό DNA. Τα δύο μόρια DNA μετά την πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες υπάρχει πιθανότητα να διαθέτουν συμπληρωματικά κολλώδη άκρα (cohesive ends) ή /και ισοτελή άκρα (blunt ends). Στην πρώτη

περίπτωση, η αναλογία μορίων του προς κλωνοποίηση τμήματος DNA και του πλασμιδίου που εφαρμόζεται είναι 1:1 ή 3:1. Στη δεύτερη περίπτωση η αναλογία γίνεται 10:1.

Η αντίδραση σύνδεσης των μορίων DNA πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10-30 μ l, αναμιγνύοντας 200 ng γραμμικού πλασμιδιακού DNA με την κατάλληλη ποσότητα του προς κλωνοποίηση μορίου DNA. Προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης το οποίο περιέχει ATP (συμπαράγοντας για τη λειτουργία του ενζύμου) και στη συνέχεια 1 μ l (1 U) διαλύματος T4 DNA λιγάσης. Το μίγμα επωάζεται στους 16°C O/N. Παράλληλα, πραγματοποιείται μία αντίδραση-μάρτυρας στην οποία δεν προστίθεται το προς κλωνοποίηση μόριο DNA. Στην αντίδραση αυτή ελέγχεται κατά πόσο σ' ένα πλασμίδιο που διαθέτει αποφωσφορυλιωμένα ισοτελή ή συμπληρωματικά κολλώδη άκρα ή ακόμη και ετερόλογα άκρα που έχουν προκύψει από δύο διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα, γίνεται επανασύνδεση των άκρων του (self-ligation). Μετά το τέλος της επώασης, η αντίδραση χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό βακτηρίων.

2.2.4.8 Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού σοκ.

Για την παραγωγή και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα, ακολουθείται ο μετασχηματισμός βακτηρίων υψηλά δεκτικών στην εξωγενή πρόσληψη γενετικού υλικού, με τη μέθοδο του θερμικού σοκ. Η αρχή της μεθόδου, βασίζεται στην αύξηση της διαπερατότητας της βακτηριακής μεμβράνης για το DNA, παρουσία κατιόντων (π.χ. ασβέστιο, μαγνήσιο), κατά την απότομη αύξηση της θερμοκρασίας (για σύντομο χρονικό διάστημα) από τους 4°C (πάγος) στους 42°C. Πιο συγκεκριμένα, επιλέγεται το στέλεχος της *E.coli* XL10 (XL10-Gold Ultracompetent cells-Stratagene) που διαθέτει ιδιαίτερα υψηλή δεκτικότητα ($\geq 5 \times 10^9$ cfu. μ g pUC18 DNA). Τα βακτήρια επωάζονται μαζί με το DNA (πλασμιδιακό ή το προϊόν της αντίδρασης σύνδεσης /ligation) για 30 λεπτά στους 4°C παρουσία CaCl_2 και αναδεύονται ήπια ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιείται κυμαίνεται από 0,1 έως 50 ng και εξαρτάται από το εάν θέλουμε να μετασχηματίσουμε τα βακτήρια μ' ένα απλό υπερελικωμένο πλασμίδιο (οπότε μία μικρή ποσότητα είναι αρκετή) ή με το προϊόν της αντίδρασης σύνδεσης. Κατόπιν, το μίγμα μεταφέρεται στους 42°C για 30 sec και αμέσως μετά πάλι στον πάγο. Ακολουθεί εμβολιασμός των μετασχηματισμένων βακτηρίων σε 1 ml θρεπτικού υλικού LB χωρίς αντιβιοτικό και επώαση στους 37°C για 1 ώρα υπό ανάδευση. Το υλικό στη συνέχεια επιστρώνεται σε βακτηριακά πιάτα που περιέχουν LB-άγαρ με το κατάλληλο αντιβιοτικό, ώστε να γίνει η επιλογή των βακτηρίων (θα επιβιώσουν στην καλλιέργεια τα βακτήρια

που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο, το οποίο φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας έναντι του συγκεκριμένου αντιβιοτικού). Τα πιάτα αφήνονται για επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες και όταν αναπτυχθούν οι επιθυμητές αποικίες, ανακαλλιεργούνται με σκοπό να απομονωθεί σε μεγάλη ποσότητα το πλασμιδιακό DNA (ανασυνδυασμένο ή μη) που μας ενδιαφέρει.

2.2.4.9 Παρασκευή και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με τη συστηματοποιημένη μέθοδο της QIAGEN Inc.

Με τη μέθοδο αυτή, απομονώνεται γρήγορα μικρή ποσότητα μερικώς μόνο καθαρισμένου πλασμιδιακού DNA από υγρές καλλιέργειες εμβολιασμένες με αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων. Το πλασμιδιακό DNA ελέγχεται στη συνέχεια με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και εντοπίζονται έτσι οι κλώνοι που φέρουν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

- Αρχικά εμβολιάζονται 3 ml διαλύματος θρεπτικού υλικού που περιέχει αμπικιλίνη (Cτελική = 100 µg/ml) με μία αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων. Ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37°C για 12-16 ώρες.
- Μεταφορά 1,5 ml από τη βακτηριακή καλλιέργεια σε σωλήνα erpendorf και φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 30 sec. σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπόλοιπο της βακτηριακής καλλιέργειας φυλάσσεται στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναδιαλύεται με προσθήκη 100 µl κατάλληλου διαλύματος (resuspension buffer P1) και έντονη ανάδευση. Κατόπιν, προστίθενται 200 µl διαλύματος λύσης (lysis buffer P2) και τέλος 150 µl διαλύματος εξουδετέρωσης του όξινου pH (neutralization buffer P3). Ακολουθεί ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 rpm.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθεται 1 ml αιθανόλης 100%. Η ανάμιξη πραγματοποιείται με αναστροφή των σωλήνων erpendorf και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στο φούρνο στους 55°C.
- Η επαναδιάλυση του DNA γίνεται σε 50 µl ddH₂O.

Όπως αναφέρθηκε και στην αρχή, μία ποσότητα του απομονωμένου DNA (10 µl) θα υποστεί πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, προκειμένου να διαπιστωθεί στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ποιοι κλώνοι φέρουν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

2.2.4.10 Παρασκευή και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxi prep).

Με τη μέθοδο αυτή, απομονώνεται μεγάλη ποσότητα υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακού DNA.

- Έχοντας εκ των προτέρων προσδιορίσει με απομόνωση σε μικρή κλίμακα, ποια αποικία-κλώνος φέρει το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, μεταφέρουμε μέρος της αρχικής μικρής υγρής καλλιέργειας των 3 ml σε 500 ml θρεπτικού διαλύματος LB που έχει εμβολιαστεί με αμπικιλίνη (Cτελική = 100 µg/ml). Ακολουθεί επώαση με ανάδευση στους 37°C για 12-16 ώρες.
- Την επόμενη μέρα, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα (βακτηριακά κύτταρα) επαναδιαλύεται σε 10 ml κατάλληλου διαλύματος (resuspension buffer P1).
- Προστίθενται 10 ml διαλύματος λύσης (lysis buffer P2) και μετά από ήπια ανάδευση επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Προστίθενται 10 ml διαλύματος εξουδετέρωσης του όξινου pH (neutralization buffer P3) και μετά από ήπια ανάδευση επωάζουμε στον πάγο για 20 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C, σε φυγόκεντρο Sorvall SS-34. Το ίζημα απορρίπτεται και το υπερκείμενο που περιέχει το πλασμιδιακό DNA επαναφυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις ίδιες συνθήκες.
- Σε κολώνα QIAGEN-tip 500 προστίθενται 10 ml διαλύματος εξισορρόπησης (equilibration buffer QBT) το οποίο διαμορφώνει τις κατάλληλες συνθήκες αλατότητας και pH προκειμένου στη συνέχεια, κατά το «πέρασμα» του δείγματος να συγκρατηθεί από το φίλτρο μόνο το πλασμιδιακό DNA, ενώ άλλες προσμίξεις όπως κυτταρικές πρωτεΐνες ή μεταβολίτες ν' απομακρυνθούν. Αφήνουμε το διάλυμα QBT να περάσει από την κολώνα με τη δύναμη της βαρύτητας.
- Στη συνέχεια, προστίθεται στην κολώνα το υπερκείμενο της τελευταίας φυγοκέντρησης το οποίο και πάλι περνά με τη δύναμη της βαρύτητας.
- Η κολώνα ξεπλένεται δύο φορές με 30 ml, την καθεμία, διαλύματος πλύσης (wash buffer QC) το οποίο απομακρύνει οποιαδήποτε πρόσμιξη χωρίς να επηρεάζει τη δέσμευση του πλασμιδιακού DNA. Επιπρόσθετα, εμποδίζει τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις και απομακρύνει τις πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA, χωρίς τη χρήση φαινόλης.
- Η έκλυση του DNA λαμβάνει χώρα με 15 ml κατάλληλου διαλύματος (elution buffer QF). Κατόπιν, το DNA κατακρημνίζεται με 10,5 ml ισοπροπανόλης και φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C.

- Προσεκτικά απομακρύνεται το υπερκείμενο και ο γυάλινος σωλήνας φυγοκέντρωσης (cortex), αφήνεται να στεγνώσει στο φούρνο στους 65°C.

Το DNA που έχει συγκεντρωθεί στα τοιχώματα του σωλήνα, επαναδιαλύεται σε διάλυμα Tris-EDTA 1:0,1, δηλαδή Tris 1mM pH 7,5:EDTA 0,1 mM pH 8. Η μικρή συγκέντρωση σε EDTA εξυπηρετεί στο ν' αποφευχθούν προβλήματα στις πέψεις με ένζυμα (το EDTA προστατεύει το DNA από τη δράση DNAασών όπως οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, δεσμεύοντας ιόντα-συμπαράγοντες).

2.2.4.11 Έκφραση και απομόνωση GST-χιμαιρικών πρωτεϊνών σε βακτήρια.

Ανάπτυξη μετασχηματισμένων κυττάρων

Τα μετασχηματισμένα βακτήρια *E.coli* BL-21 με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pGEX-4T-1 που φέρει το επιθυμητό γονίδιο, αφού αναπτυχθούν σε μικρές υγρές καλλιέργειες και εξακριβωθεί μετά από απομόνωση του πλασμιδιακού τους DNA και πέψη με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, πως φέρουν πραγματικά τον επιθυμητό κλώνο, ανακαλλιεργούνται σε μεγαλύτερη κλίμακα ως εξής: εμβολιάζεται αρχικά μία καλλιέργεια των 50 ml 2X Y.T.+ αμπικιλίνη, με 500 μl μικρής υγρής καλλιέργειας. Ακολουθεί επώαση με ανάδευση για 12-16 ώρες στους 37°C και την επόμενη μέρα 25 ml από την καλλιέργεια, μεταφέρονται σε μία νέα των 450 ml (2X Y.T.+ 50 μg/ml αμπικιλίνη). Έπεται νέα επώαση υπό ανάδευση στους 30°C για 2-3 ώρες έως ότου η οπτική πυκνότητα στα 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) λάβει τιμές ανάμεσα σε 0,5-2. Τότε τα βακτήρια βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους και στην καλλιέργεια προστίθεται ο παράγοντας ενεργοποίησης του υποκινητή, IPTG (β-ισοπροπυλο-D-θειογαλακτοζίδιο) 100 mM, σε τελική συγκέντρωση 0,2 mM. Πραγματοποιείται επώαση υπό ανάδευση στους 30°C για επιπλέον 3 h.

Απομόνωση χιμαιρικής πρωτεΐνης στο υπερκείμενο της βακτηριακής καλλιέργειας

Προκειμένου ν' απομονωθεί η παραγόμενη χιμαιρική πρωτεΐνη, ακολουθείται η εξής πορεία: 200 ml από τη βακτηριακή καλλιέργεια φυγοκεντρώνται στους 4°C για 15 min στις 2000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε παγωμένο GST solution buffer (50 μl GST solution buffer ανά ml καλλιέργειας). Ακολουθεί σπάσιμο των κυττάρων με υπερήχους (sonication), τρεις φορές από 2 min. Κατόπιν, προστίθενται 10% Triton σε τελική συγκέντρωση 1% και 100% γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 10%, ώστε να διευκολυνθεί το σπάσιμο των κυττάρων. Η διαλυτοποίηση πραγματοποιείται με ανάδευση στο spigamix για 30 min στους 4°C. Στη συνέχεια,

πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm, στους 4°C για 30 min. Κρατάμε το υπερκείμενο για τη δέσμευσή του στα σφαιρίδια σεφαρόζης και το ίζημα απορρίπτεται.

Απομόνωση χιμαιρικής πρωτεΐνης από βακτηριακά έγκλειστα σωμάτια (inclusion bodies)

Όταν επάγεται η έκφραση μιας πρωτεΐνης σε βακτηριακή καλλιέργεια με τη χρήση IPTG, συμβαίνει συχνά να μην είναι δυνατόν να ληφθεί η πρωτεΐνη αυτή στο υπερκείμενο της καλλιέργειας, μετά από φυγοκέντρηση. Τούτο οφείλεται στο γεγονός, ότι όταν υπερεκφράζεται μια πρωτεΐνη και μάλιστα ξένη για το βακτήριο, αυτή μπορεί ν' αποβεί τοξική για το τελευταίο, εμποδίζοντας την ανάπτυξη και επιβίωσή του. Ως άμυνά του το βακτήριο, εγκλείει τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη σε ειδικά σωμάτια (inclusion bodies), τα οποία κατά τη φυγοκέντρηση μεταφέρονται στο ίζημα μαζί με άλλα κυτταρικά συστατικά. Τέτοια περίπτωση αποτελεί η έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης GST-RanBPM, η απομόνωση της οποίας από παρόμοια έγκλειστα σωμάτια απαιτεί την εφαρμογή ειδικού πρωτοκόλλου:

- Το ίζημα της βακτηριακής καλλιέργειας 1 lt, επαναδιαλύεται σε 13 ml κατάλληλου διαλύματος (solution buffer) και μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα φυγοκέντρησης των 30 ml (correx).
- Πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με υπερήχους (sonication σε 3 περιόδους των 30 sec).
- Προστίθενται 100 μl λυσοζύμη, 250 μl DNAase I και 50 μl MgCl₂ και έπεται ανάδευση (vortex).
- Προστίθενται 12,5 ml διαλύματος λύσης και ακολουθεί σύντομη ανάδευση (vortex).
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 30-60 λεπτά.
- Προσθήκη 350 μl NaEDTA.
- Πάγωμα σε υγρό άζωτο (το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα έχει μεταφερθεί σε πλαστικό κωνικό σωλήνα τύπου falcon των 50 ml, ο οποίος ολόκληρος εμβαπτίζεται στο υγρό άζωτο). Αμέσως μετά, μεταφορά σε υδατόλουτρο στους 37°C για 30 min.
- Προσθήκη 200 μl MgCl₂.
- Αναμονή για 30-60 λεπτά έως ότου μειωθεί το ιξώδες.
- Προσθήκη 350 μl NaEDTA.

Από το σημείο αυτό και μετά, όλες οι διαδικασίες πρέπει να γίνονται υποχρεωτικά στον πάγο.

- Φυγοκέντρηση στις 11.000 rpm, για 20 λεπτά στους 4°C. Φυλάσσεται ένα δείγμα από το υπερκείμενο (S1) και το υπόλοιπο απορρίπτεται.

- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10 ml διαλύματος πλύσης (wash buffer) με Triton.
- Sonication σε τρεις περιόδους των 30 sec.
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 rpm, για 20 λεπτά στους 4°C. Φυλάσσεται ένα δείγμα από το υπερκείμενο (S2) και το υπόλοιπο απορρίπτεται..
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10 ml διαλύματος πλύσης (wash buffer) χωρίς Triton.
- Sonication σε τρεις περιόδους των 30 sec.
- Φυγοκέντρηση στις 11.000 rpm, για 20 λεπτά στους 4°C. Φυλάσσεται ένα δείγμα από το υπερκείμενο (S3) και το υπόλοιπο απορρίπτεται..
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 12 ml 8 M ουρίας σε θερμοκρασία δωματίου (RT) που έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη της χιμαιρικής πρωτεΐνης.
- Η επαναπτύχωσή της (refolding) πραγματοποιείται ως εξής: σε 4 ml διαλύματος επαναπτύχωσης (refolding buffer) προστίθενται σταγόνα-σταγόνα με σύριγγα του 1 ml, 2 ml από τα 12 του διαλύματος ουρίας. Το νέο μίγμα αναδεύεται για 3 ώρες στους 4°C στο spiramix.
- Λαμβάνεται δείγμα από το διάλυμα επαναπτύχωσης και εν συνεχεία αναμιγνύεται με σφαιρίδια σεφαρόζης με γλουταθειόνη προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πρόσδεση της GST-χιμαιρικής πρωτεΐνης σ' αυτά.

2.2.4.12 *In vitro* σύνθεση ραδιενεργά σημασμένων πρωτεϊνών.

Στην περίπτωση της *in vitro* σύνθεσης ραδιενεργά σεσημασμένης πρωτεΐνης, ακολουθήθηκε η συστηματοποιημένη μέθοδος της Promega (TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate Systems). Το σύστημα περιλαμβάνει εκχύλισμα δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού, T7 RNA πολυμεράση, μίγμα αμινοξέων από το οποίο απουσιάζει η μεθειονίνη κι έναν αναστολέα RNAσών. Για τη διεξαγωγή του πειράματος απαιτείται επιπρόσθετα ραδιενεργός μεθειονίνη (³⁵S-Methionine) καθώς και το πλασμιδιακό DNA που φέρει την κωδική περιοχή του επιθυμητού γονιδίου καταρροϊκά του υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση του cDNA της RanBPM που έχει εισαχθεί στο πλασμίδιο. Η ραδιενεργός μεθειονίνη, ενσωματώνεται στη συντιθέμενη πρωτεΐνη με αποτέλεσμα εκείνη ν' ανιχνεύεται με αυτοραδιογραφία. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε μικρό όγκο (50 μl), για 90 λεπτά στους 30°C και απαιτεί 1 μg πλασμιδίου και 20 μCi ³⁵S-Methionine. Σαν θετικός μάρτυρας της αντίδρασης, χρησιμοποιείται πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της

λουσιφεράσης υπό τον υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης. Ένα μέρος της αντίδρασης, ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και υπόκειται σε αυτοραδιογραφία προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχής σύνθεση της ραδιενεργά σεσημασμένης πρωτεΐνης. Εν συντομία, το πήκτωμα αποξηράνεται υπό κενό στον αφυγραντήρα, τοποθετείται επάνω του ένα φιλμ αυτοραδιογραφίας και εσωκλείεται μέσα σε μία «κασέτα». Η τελευταία, εισάγεται και παραμένει στους -80°C για τρεις ημέρες, ώστε να αποτυπωθεί πλήρως η εκπεμπόμενη γ -ακτινοβολία στο φιλμ, η οποία και εμφανίζεται στη συνέχεια με τη χρήση των κατάλληλων διαλυμάτων (X-Ray Developer, X-Ray Fixer) στο σκοτεινό θάλαμο. Έχοντας πλέον επιβεβαιώσει την παρουσία της σεσημασμένης πρωτεΐνης, συνεχίζουμε στη δοκιμασία της GST-κατακρήμνισης, με τη χρήση GST-Cend1 χιμαιρικής πρωτεΐνης και με τρόπο όμοιο με εκείνον που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.3.9.

2.2.4.13 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα Neuro-2a.

Ολικό RNA απομονώθηκε από κύτταρα Neuro-2a, μονά μετασχηματισμένα είτε με το πλασμίδιο που κωδικοποιεί για τη Cend1, είτε για το αντίστοιχο που κωδικοποιεί για την Dyrk1B καθώς επίσης και διπλά μετασχηματισμένα για τους συνδυασμούς πλασμιδίων Cend1/RanBPM-FLAG, Dyrk1B/RanBPM-FLAG, Dyrk1B/GFP. Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Trizol (Ambion), του οποίου η σύσταση (φαινόλη, ισοθειοκυανική γουανιδίνη και άλλα έκδοχα), όχι μόνο διευκολύνει την απομόνωση του RNA αλλά διασφαλίζει και την ακεραιότητά του, χάρη στην ανασταλτική του δραστηριότητα έναντι των ενζύμων που το διασπούν (RNAases). Το πρωτόκολλο απομόνωσης που ακολουθήθηκε ήταν το παρεχόμενο από την εταιρία. Εν συντομία, αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υλικό των κυττάρων, 1 ml αντιδραστηρίου Trizol προστέθηκε σε κάθε πηγάδι διαμέτρου 35 mm από το πιάτο κυτταροκαλλιέργειας 6 πηγαδίων (6 well plate) και ακολούθησε λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός των φάσεων των ομογενοποιημάτων ως εξής:

1. Τα δείγματα επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να λυθούν ολοκληρωτικά τα νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα.
2. Προστέθηκαν 0.2 mL χλωροφορμίου για κάθε 1 mL του αντιδραστηρίου TRIzol[®].
3. Τα δείγματα ανακινήθηκαν έντονα για 15 δευτερόλεπτα.
4. Ακολούθησε επώαση για 2–3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα $12.000 \times g$ για 15 λεπτά στους 4°C .

Μετά τη φυγοκέντρωση, παρατηρήθηκε πως τα μίγματα διαχωρίζονται σε φάσεις: μία κατώτερη ερυθρού χρώματος που συνίσταται από φαινόλη-χλωροφόρμιο, μία ενδιάμεση και μία ανώτερη υδατική που περιέχει αποκλειστικά το RNA. Αφού αφαιρέθηκε προσεκτικά η υδατική φάση, ώστε να μην υπάρξει πρόσμιξη από τις υπόλοιπες, ακολούθησε η απομόνωση του RNA:

1. Προστέθηκε 0.5 mL 100% ισοπροπανόλη στην υδατική φάση, για κάθε 1 mL αντιδραστηρίου TRIzol[®] που είχε χρησιμοποιηθεί στην ομογενοποίηση.
3. Τα δείγματα επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Κατόπιν, φυγοκεντρήθηκαν στα $12,000 \times g$ για 10 λεπτά στους 4°C

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πλύσεις του ιζήματος που περιέχει το RNA με 1 mL 75% αιθανόλη για κάθε 1 mL αντιδραστηρίου TRIzol[®] που είχε χρησιμοποιηθεί στην ομογενοποίηση. Ακολούθησε έντονη ανακίνηση των δειγμάτων (vortex) και φυγοκέντρωση στα $7500 \times g$ για 5 λεπτά στους 4°C .

Τα ιζήματα, αφέθηκαν να στεγνώσουν για 10 λεπτά και επαναδιαλύθηκαν σε 50 μl υπερ-καθαρού νερού, ελεύθερου RNAσών.

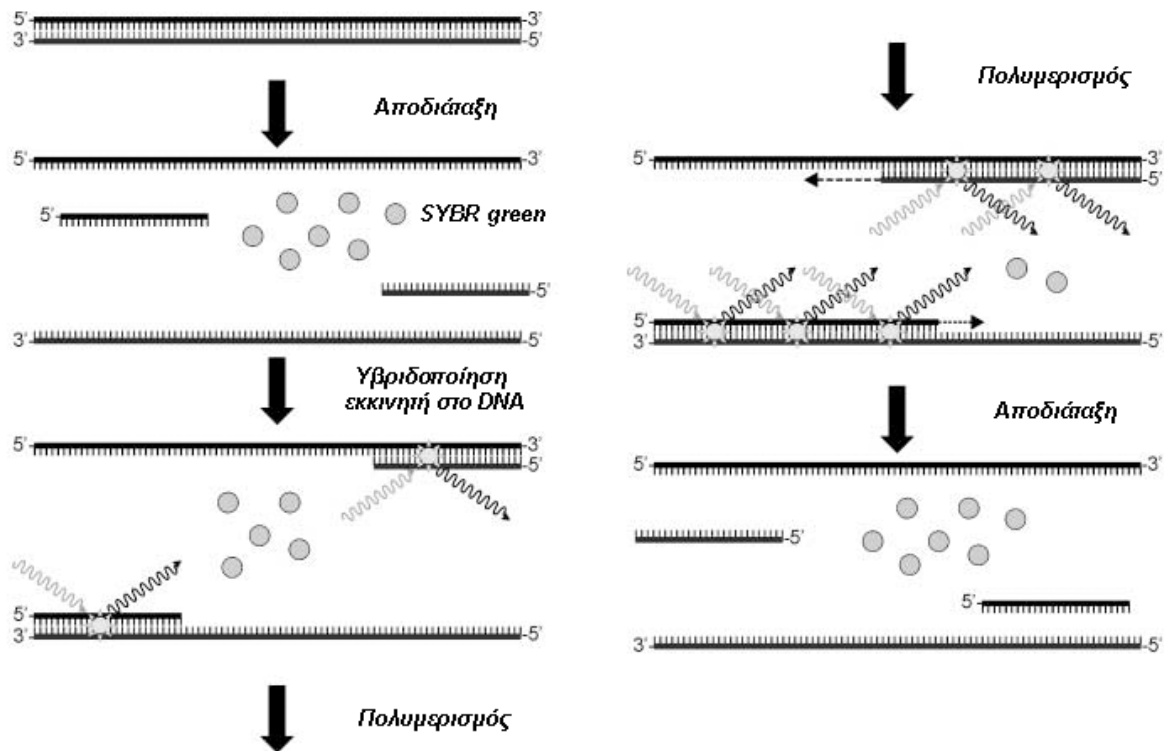
2.2.4.14 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε προϊόν αντίστροφης μεταγραφής (Real-time RT-qPCR).

Για την αντίστροφη μεταγραφή του RNA και τη σύνθεση συμπληρωματικού μονόκλωνου DNA (cDNA), χρησιμοποιήθηκε 1μg απομονωμένου RNA από κύτταρα Neuro 2a. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε, βασίστηκε στη συστηματοποιημένη μέθοδο της εταιρίας Takara (PrimeScript RT reagent Kit). Εν συντομία, παρασκευάστηκε ένα μίγμα που περιείχε το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (PrimeScriptTM RT Enzyme), το κατάλληλο διάλυμα-buffer που απαιτείται για την ενζυμική αντίδραση ($5 \times$ PrimeScriptTM Buffer) και τα τυχαία εξαμερή-εκκινητές τα οποία υβριδοποιούνται με το RNA και συμμετέχουν στο σχηματισμό του cDNA παρουσία της αντίστροφης μεταγραφάσης. Στο μίγμα αυτό προστέθηκε η απαιτούμενη ποσότητα του απομονωμένου RNA (1μg) και ο τελικός όγκος της αντίδρασης συμπληρώθηκε με νερό ελεύθερο RNAσών. Συνοπτικά, οι ποσότητες των συστατικών του μίγματος με τις τελικές τους συγκεντρώσεις παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

<i>Υλικό</i>	<i>Ποσότητα</i>	<i>Τελική Συγκέντρωση</i>
5 × PrimeScript™ Buffer	2 μl	1x
PrimeScript™ RT Enzyme	0.5 μl	
Random 6 mers (100 μM)	0.5 μl	50 pmol
Ολικό RNA	1 μg	
RNase Free dH₂O		
Σύνολο	10 μl	

Στη συνέχεια και προκειμένου να λάβει χώρα η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, το μίγμα επωάστηκε στους 37°C για 15 λεπτά, ενώ ακολούθησαν και 5 δευτερόλεπτα θέρμανσης στους 85°C ώστε ν' απενεργοποιηθεί το ένζυμο.

Για την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time qPCR), ακολουθήθηκε η μέθοδος με τη χρωστική SYBR green, χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο πρωτόκολλο της εταιρίας Takara [SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (TaKaRa Cat.#RR041A)]. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη δέσμευση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green στο DNA και την ανίχνευση του εκπεμπόμενου σήματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης του πολυμερισμού. Στο διάλυμα της αντίδρασης, τα αδέσμευτα μόρια της χρωστικής φθορίζουν ελάχιστα ενώ κατά τη φάση της επιμήκυνσης, δεσμεύονται στο δίκλωνο DNA, με αποτέλεσμα να αποτυπώνεται σε πραγματικό χρόνο στο κατάλληλο μηχάνημα (ABI Prism SDS 7000) μία αύξηση του φθορισμού (**Εικ.2.1**). Η αύξηση αυτή, σηματοδοτεί ουσιαστικά και την αύξηση των αντιγράφων των περιοχών του DNA που έχουν «ενισχυθεί» παρουσία της πολυμεράσης, σε πραγματικό χρόνο. Όταν πάλι το DNA αποδιατάσσεται κατά τους προγραμματισμένους κύκλους του πολυμερισμού, ο φθορισμός μειώνεται.



Εικ.2.1 Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με τη χρήση της χρωστικής SYBR green. Όσο διαρκεί η αντίδραση πολυμερισμού του DNA, τόσο περισσότερα μόρια χρωστικής δεσμεύονται ανάμεσα στις δύο έλικες και εντονότερος γίνεται ο φθορισμός που ανιχνεύεται μέσω κατάλληλου μηχανήματος (ABI Prism SDS 7000). Αντίθετα, στη φάση της αποδιάταξης του DNA, τα μόρια της χρωστικής παραμένουν ελεύθερα στο διάλυμα της αντίδρασης και ο φθορισμός είναι ελάχιστος. Τροποποιημένο από (Bustin 2000).

- Πίνακας 2.5. Εκκινήτες των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) πραγματικού χρόνου σε προϊόν αντίστροφης μεταγραφής.

Όνομα εκκινήτη	Αλληλουχία
mDyrk1B FOR	5' - GGCCTTTCTCTGGCTTTCC -3'
mDyrk1B REV	5' - TTGATGAGGTCCACCGAGA -3'
mCyclinD1 FOR	5' - TAGGCCCTCAGCCTCACTC -3'

mCyclinD1 REV 5'- CCACCCCTGGGATAAAGCA - 3'

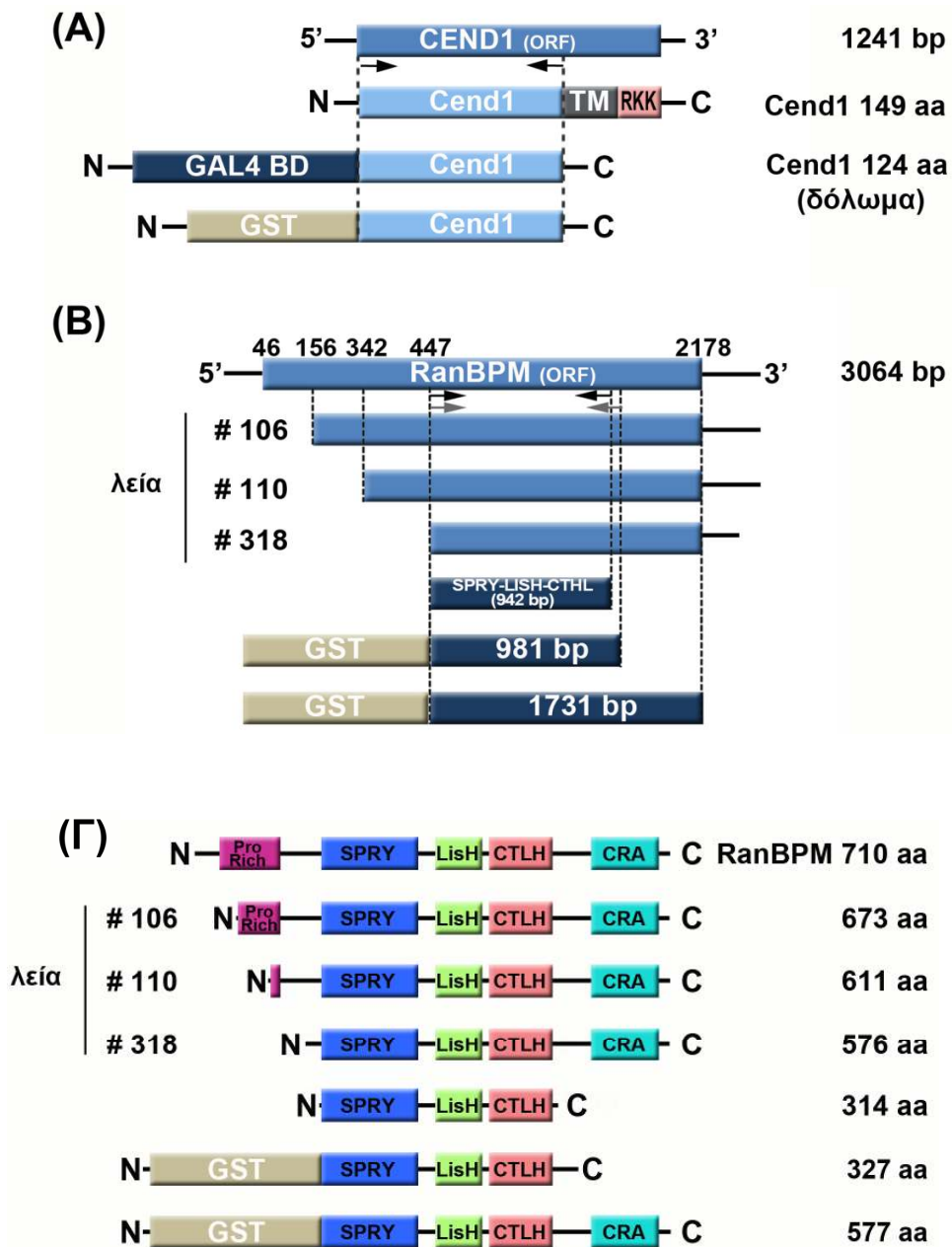
mGAPDH FOR 5'- AACTTTGGCATTGTGGAAGG -3'

mGAPDH REV 5'- GGATGCAGGGATGATGTTCT -3'

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η πρωτεΐνη BM88/Cend1 αλληλεπιδρά με την RanBPM.

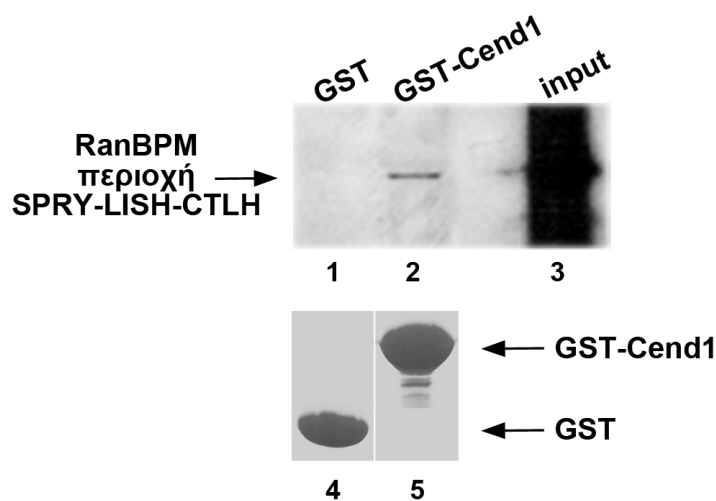
Η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης RanBPM ως αλληλεπιδρώσας με την BM88/Cend1, είχε πραγματοποιηθεί μετά από σάρωση cDNA βιβλιοθήκης έκφρασης εγκεφάλου ενήλικου ποντικού σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων. Ως «δόλωμα» χρησιμοποιήθηκε το cDNA της BM88/Cend1 του ποντικού που κωδικοποιεί για το τμήμα της πρωτεΐνης που βρίσκεται εκτεθειμένο εντός του κυτταροπλάσματος και παρέχει μια «επιφάνεια» αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες. Από το τμήμα της πρωτεΐνης BM88/Cend1 που χρησιμοποιήθηκε ως «δόλωμα» απουσίαζε η περιοχή εκείνη που κωδικοποιεί για το υδρόφοβο διαμεμβρανικό κομμάτι της πρωτεΐνης των 20 αμινοξέων, καθώς επίσης και για το καρβοξυτελικό μοτίβο των τριών θετικά φορτισμένων αμινοξικών καταλοίπων RKK, που χρησιμεύουν για την ενδοκυττάρια στόχευση της BM88/Cend1 πρωτεΐνης στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Gaitanou and Matsas, αδημοσίευτα αποτελέσματα) (**Εικ. 3.1Α**). Συγκεκριμένα, συνολικά 3×10^6 ανεξάρτητοι κλώνοι σαρώθηκαν και από αυτούς απομονώθηκαν 13 θετικοί κλώνοι. Ακολούθησε ανάλυση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας και εύρεση ομολογίας με ήδη γνωστές cDNA αλληλουχίες με τη χρήση του αλγορίθμου BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Από την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των θετικών κλώνων που απομονώθηκαν, προέκυψαν τρεις κλώνοι που αντιστοιχούν στο cDNA της πρωτεΐνης RanBPM. Κανένας από τους τρεις κλώνους της RanBPM που απομονώθηκαν δεν ήταν πλήρους μεγέθους. Αναλυτικότερα, οι τρεις ανεξάρτητοι κλώνοι της RanBPM που απομονώθηκαν (#106, #110, #318) ήταν επικαλυπτόμενοι και διέφεραν σε μήκος στο 5' άκρο τους [από το μεγαλύτερο κλώνο (#106) έλειπαν τα πρώτα 37 αμινοξέα, ενώ από τους δύο μικρότερους (#110 και #318) τα πρώτα 99 και 134 αμινοξέα αντίστοιχα], γεγονός που υποδεικνύει ότι τα πρώτα 134 αμινοξέα της πρωτεΐνης RanBPM δεν είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδρασή της με την BM88/Cend1. Επιπλέον και οι τρεις επικαλυπτόμενοι κλώνοι κωδικοποιούσαν για τα χαρακτηριστικά μοτίβα SPRY-LiSH-CTLH-CRA που διαμεσολαβούν στις περισσότερες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της RanBPM με άλλες πρωτεΐνες (**Εικ. 3.1Β & 3.1Γ**). Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής αρχικά έλαβε χώρα, η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των δύο παραπάνω πρωτεϊνών *in vitro* και *in vivo*, μέσω βιοχημικών μεθόδων όπως οι GST-καταβυθίσεις (GST- pull down) και οι συν-ανοσοκατακρημνίσεις (co-immunoprecipitations).



Εικ.3.1 Σχηματική αναπαράσταση των *Cend1* και *RanBPM* κλώνων καθώς και των αντίστοιχων πρωτεϊνικών τμημάτων που κωδικοποιούν. **(Α)** Το κυτταροπλασματικό τμήμα της *Cend1* (τα πρώτα 124 αμινοξέα), χρησιμοποιήθηκε τόσο ως «δόλωμα» στη σάρωση βιβλιοθήκης ζύμης δύο υβριδίων όσο και στην κατασκευή *GST*-χιμαιρικής πρωτεΐνης για τις δοκιμασίες των *GST*-καταβυθίσεων. **(Β-Γ)** Οι τρεις επικαλυπτόμενοι κλώνοι της *RanBPM* (#106, #110, #318, «λεία» στη σάρωση βιβλιοθήκης ζύμης δύο υβριδίων), κωδικοποιούν για τα χαρακτηριστικά μοτίβα *SPRY-LisH-CTLH-CRA*, ενώ για την κατασκευή *GST*-χιμαιρικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τμήματα εντός των απομονωμένων κλώνων #318 και #110 μεγέθους 981 και 1731 bp που κωδικοποιούν αντίστοιχα για 327 και 577 αμινοξέα.

3.1.1 Η χιμαιρική πρωτεΐνη GST-Cend1 καταβυθίζει την *in vitro* συντιθέμενη και ραδιενεργά σημασμένη περιοχή ^{35}S -SPRY-LiSH-CTLH της RanBPM.

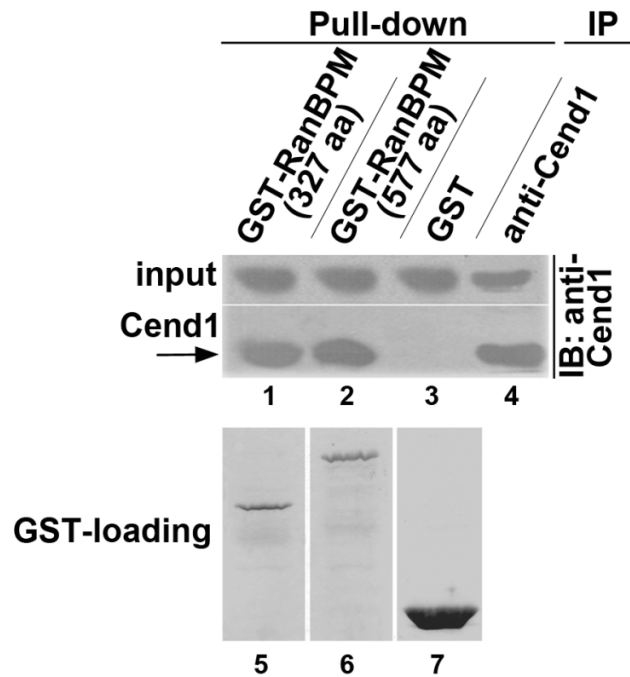
Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη RanBPM αλληλεπιδρά με μια πληθώρα πρωτεϊνών σε διάφορους ιστούς (Murrin and Talbot 2007), μέσω της περιοχής της που εμπεριέχει τα χαρακτηριστικά μοτίβα SPRY-LiSH-CTLH καθώς και ότι και οι τρεις επικαλυπτόμενοι κλώνοι της RanBPM που απομονώθηκαν από το σύστημα ζύμης δύο υβριδίων εμπεριείχαν τα συγκεκριμένα μοτίβα, διερευνήθηκε αρχικά εάν η περιοχή αυτή είναι ικανή και επαρκής για την αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη BM88/Cend1. Η *in vitro* επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως: ένα μικρό τμήμα της RanBPM (942 bp) που περιέχει τα μοτίβα SPRY-LiSH-CTLH (314 αμινοξέα) (**Εικόνα 3.1 Β,Γ**), συντέθηκε *in vitro* και σημάνθηκε με ραδιενεργή μεθειονίνη, σύμφωνα με τη συστηματοποιημένη μέθοδο της Promega και όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.4.12. Το διάλυμα που περιείχε την *in vitro* συντιθέμενη και ραδιενεργά σεσημασμένη περιοχή ^{35}S -SPRY-LiSH-CTLH της RanBPM επώαστηκε με την χιμαιρική GST-BM88/Cend1 πρωτεΐνη και μετά την καταβύθιση ακολούθησε μονοδιάστατη ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και αυτοραδιογραφία. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.2**, η περιοχή ^{35}S -SPRY-LiSH-CTLH της RanBPM καταβυθίζεται ειδικά από τη GST-BM88/Cend1, όχι όμως και από την GST (αρνητικός μάρτυρας του πειράματος). Ως εκ τούτου η περιοχή SPRY-LiSH-CTLH της πρωτεΐνης RanBPM είναι επαρκής για την δέσμευση-πρόσδεση της RanBPM στην πρωτεΐνη BM88/Cend1 και καταβυθίζονται μαζί *in vitro* σε ένα σύστημα ελεύθερο κυττάρων, υποδεικνύοντας επιπλέον το άμεσο της αλληλεπίδρασής τους χωρίς τη μεσολάβηση άλλου παράγοντα.



Εικ.3.2 Αυτοραδιογραφία καταβύθισης του ραδιενεργά σεσημασμένου τμήματος SPRY-LiSH-CTLH, με ³⁵S-μεθειονίνη, της πρωτεΐνης RanBPM, από τη χιμαιρική πρωτεΐνη GST-Cend1. Στη **διαδρομή 3**, αποτυπώνεται η ραδιενεργά σημασμένη RanBPM στο διάλυμα της *in vitro* σύνθεσής της (*input*), καθώς επίσης και μετά την καταβύθισή της από την GST-Cend1 (**διαδρομή 2**). Όταν για την καταβύθιση χρησιμοποιείται σκέτη GST πρωτεΐνη (αρνητικός μάρτυρας), η RanBPM δεν ανιχνεύεται (**διαδρομή 1**). Στις **διαδρομές 4 και 5**, παρατίθενται οι GST-Cend1 και GST πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα καταβύθισης, μετά από ηλεκτροφόρησή τους υπό αποδιατακτικές συνθήκες και χρώση Coomassie.

3.1.2 Η χιμαιρική πρωτεΐνη GST-RanBPM καταβυθίζει την BM88/Cend1 από ομογενοποίηση εγκεφάλου ενήλικου ποντικού.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί περαιτέρω η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν αντίστροφες GST-καταβυθίσεις. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν δύο περιοχές του cDNA της RanBPM, μεγέθους 981 bp και 1731 bp, που περιείχαν την περιοχή SPRY-LiSH-CTLH και SPRY-LiSH-CTLH-CRA αντίστοιχα (**Εικ.3.1B,Γ**), και χρησίμευσαν για την παραγωγή GST-RanBPM χιμαιρικών πρωτεϊνών σε βακτήρια του στελέχους BL21 της *Escherichia.coli*. Η παραγωγή και απομόνωση των πρωτεϊνών αυτών, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναλύθηκε στην παράγραφο 2.2.4.11. Κατόπιν, οι χιμαιρικές πρωτεΐνες προσδέθηκαν σε σφαιρίδια σεφαρόζης με γλουταθειόνη και χρησιμοποιήθηκαν ως «δόλωμα» σε ομογενοποίηση εγκεφάλου ενήλικου ποντικού, προκειμένου να καταβυθίσουν ειδικά την πρωτεΐνη BM88/Cend1. Ως αρνητικός μάρτυρας του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε η GST πρωτεΐνη προσδεμένη σε σφαιρίδια σεφαρόζης με γλουταθειόνη, ενώ ως θετικός μάρτυρας του πειράματος, πραγματοποιήθηκε αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης (IP), με τη χρήση ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης BM88/Cend1. Όπως φαίνεται και στο ανοσοαποτύπωμα, η BM88/Cend1 καταβυθίζεται ειδικά από το πολυκλωνικό ανοσοκαθαρισμένο BM88 αντίσωμα όσο και από την GST-RanBPM (τόσο από το μεγάλο τμήμα της των 577 αμινοξέων όσο και από το μικρότερο των 327 αμινοξέων), όχι όμως και από την GST πρωτεΐνη (**Εικόνα 3.3**).

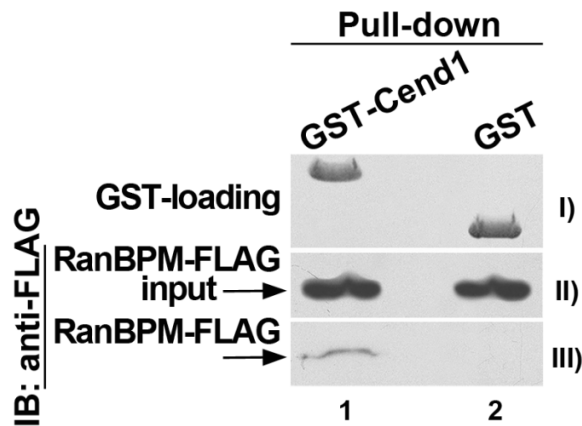


Εικ.3.3 Ανοσοαποτύπωμα κατά western με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Cend1, κατόπιν κατακρήμνισής της από πρωτεϊνικό ομογενοποίημα εγκεφάλου. Στις **διαδρομές 1-3** (άνω μέρος, input), ελέγχθηκε η έκφραση της Cend1 στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα εγκεφάλου ποντικού στο οποίο έχουν προστεθεί ξεχωριστά η χιμαιρική πρωτεΐνη GST-RanBPM (327 αα, **διαδρομή 1**), GST-RanBPM (577 αα, **διαδρομή 2**) και η GST πρωτεΐνη (αρνητικός μάρτυρας του πειράματος, **διαδρομή 3**). Ως θετικός μάρτυρας της GST-καταβύθισης, προστέθηκε στο ομογενοποίημα ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της Cend1 με σκοπό την ανοσο-κατακρήμνισή της (IP, **διαδρομή 4**). Όπως φαίνεται στο κάτω μέρος των **διαδρομών 1-4**, η Cend1 ανιχνεύεται μόνο κατόπιν καταβύθισής της (Pull-down) από την RanBPM (**1,2**), καθώς και από το ειδικό αντίσωμα (**4**). Στις **διαδρομές 5-7**, παρίστανται οι χιμαιρικές πρωτεΐνες GST-RanBPM (327 αμινοξέα), GST-RanBPM (577 αμινοξέα) και η GST μετά από ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες και χρώση Coomassie (GST-loading).

3.1.3 Η χιμαιρική πρωτεΐνη GST-Cend1 καταβυθίζει την FLAG-RanBPM από εκχύλισμα κυττάρων HEK293T.

Η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών *in vitro*, επιβεβαιώθηκε και κατ' αντίστροφο τρόπο, ελέγχοντας αν η Cend1 χρησιμοποιούμενη ως δόλωμα, δύναται να καταβυθίσει επιλεκτικά την RanBPM από απομονωμένο κυτταρικό εκχύλισμα. Τα ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού της σειράς HEK293T εμφανίζουν υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό και μετασχηματίζονται εξωγενώς σε μεγάλο ποσοστό, γι' αυτό και επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος. Αρχικά, μετασχηματίστηκαν παροδικά με το πλασμίδιο p3xFLAG-CMV7.1 (Sigma) που περιείχε ολόκληρη την κωδική περιοχή της «ανθρώπινης» RanBPM, ενωμένη με τον επίτοπο FLAG (μια ευγενική

προσφορά της Dr. Sang-Ohk Shim). Το κυτταρικό εκχύλισμα απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε σε GST-καταβύθισεις με τη χρήση χιμαιρικής GST-BM88/Cend1 πρωτεΐνης και αρνητικό μάρτυρα σκέτη GST πρωτεΐνη. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.4**, στο ανοσοαποτύπωμα κατά western, μόνο η GST-BM88/Cend1, καταβυθίζει ειδικά την FLAG -RanBPM.

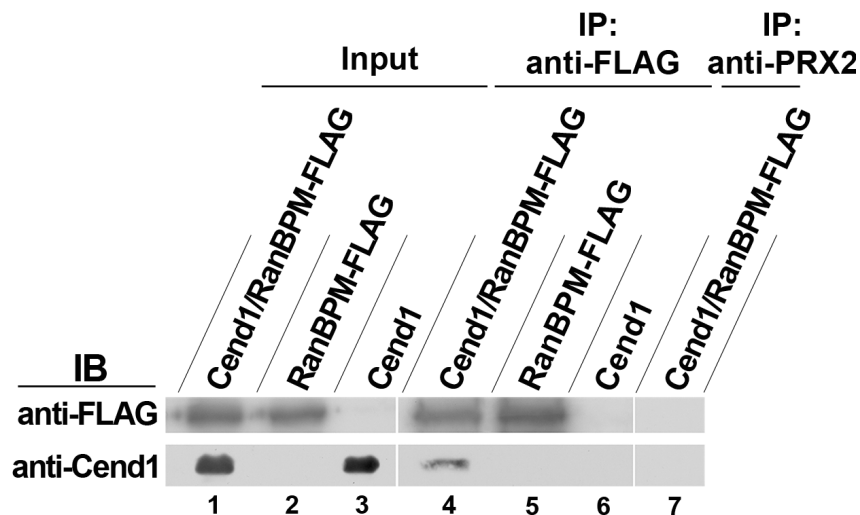


Εικ.3.4 Ανοσοαποτύπωμα κατά western με αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG της χιμαιρικής FLAG-RanBPM πρωτεΐνης, κατόπιν καταβύθισής της από τη χιμαιρική GST-Cend1 πρωτεΐνη. Στο πλαίσιο **I)** παρίστανται οι πρωτεΐνες GST-Cend1 (**διαδρομή 1**) και GST (**διαδρομή 2**) όπως αυτές χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα καταβύθισης, μετά από ηλεκτροφόρησή τους υπό αποδιατακτικές συνθήκες και χρώση Coomassie. Στο πλαίσιο **II)** η εξωγενώς εκφρασμένη FLAG-RanBPM πρωτεΐνη, ανιχνεύεται στο κυτταρικό εκχύλισμα HEK293T κυττάρων, στο οποίο πραγματοποιείται καταβύθιση είτε με την GST-Cend1 (**1**), είτε με την GST (**2**). Στο πλαίσιο **III)** δείχνεται πως η FLAG-RanBPM- καταβυθίζεται μόνο από την GST-Cend1.

3.1.4 Η πρωτεΐνη BM88/Cend1 συν-κατακρημνίζεται με την RanBPM σε κύτταρα HEK293T.

Η δοκιμασία της συν-κατακρήμνισης αποτελεί ίσως την ισχυρότερη ένδειξη αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο πρωτεϊνών, λόγω χρήσης ειδικού αντισώματος έναντι της μιας προκειμένου να κατακρημνιστεί και στη συνέχεια ανίχνευση της άλλης ως μέρος ενός συμπλόκου που καταβυθίζεται. Κύτταρα της σειράς HEK293T, μετασχηματίστηκαν παροδικά με τα πλασμίδια p3xFLAG-RanBPM-CMV7.1 και pcDNA3-BM88/Cend1, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό. 48 ώρες μετά το μετασχηματισμό, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και υπέστησαν λύση σε κατάλληλο διάλυμα (lysis buffer) για 3 ώρες στους 4°C. Στο κυτταρικό εκχύλισμα που απομονώθηκε, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη συστηματοποιημένη μέθοδο Lowry ενώ παράλληλα δείγμα του εκχυλίσματος υποβλήθηκε σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωμα κατά western ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία των πρωτεϊνών με ειδικό αντίσωμα για καθεμία από αυτές. Στην ανοσοκατακρήμνιση που

ακολούθησε (βλ. παρ. 2.2.3.8), χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG της πρωτεΐνης FLAG-RanBPM. Σε μία ξεχωριστή αντίδραση-αρνητικό μάρτυρα του πειράματος-χρησιμοποιήθηκε ένα τυχαίο αντίσωμα εταιρείας (anti-PRDX2). Όπως φαίνεται και στο ανοσοαποτύπωμα κατά western της **Εικόνας 3.5**, το anti-FLAG αντίσωμα καταβυθίζει ειδικά την RanBPM, όπου εκείνη εκφράζεται και μαζί της συν-ανοσοκατακρημνίζεται και η BM88/Cend1 όπου συνεκφράζεται μαζί με την RanBPM. Αντίθετα, στην περίπτωση του αρνητικού μάρτυρα, το τυχαίο αντίσωμα δεν αναγνωρίζει και ως εκ τούτου δεν καταβυθίζει την FLAG-RanBPM αλλά ούτε και την αλληλεπιδρούσα BM88/Cend1.

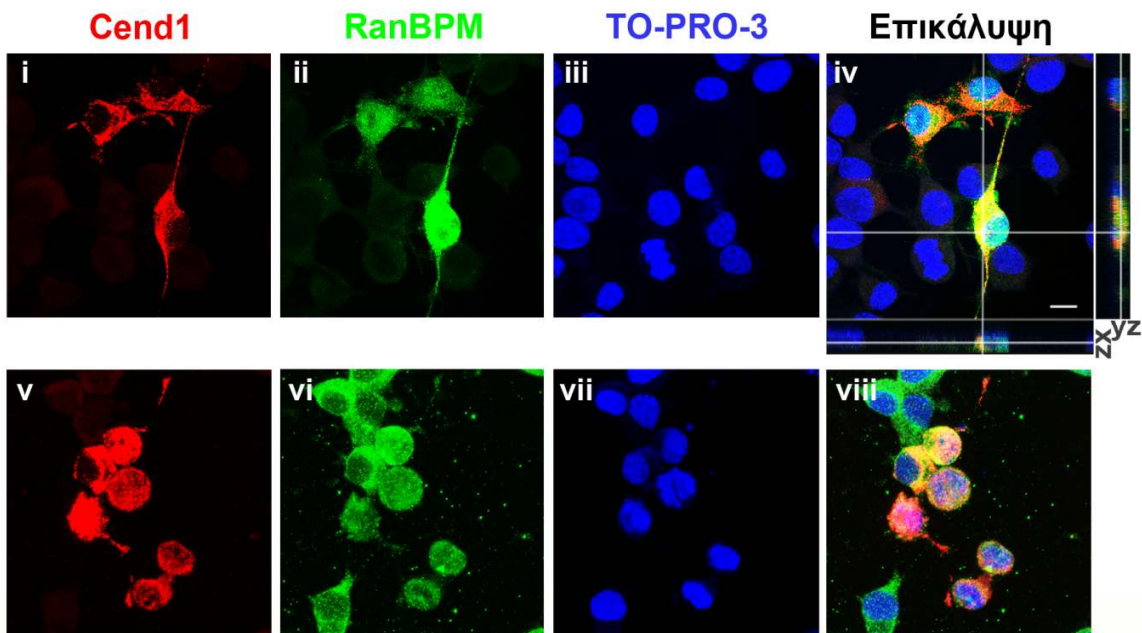


Εικ.3.5 Ανοσοαποτύπωμα (IB) κατά western, κατόπιν συν-ανοσοκατακρήμνισης (IP) της Cend1 από τη RanBPM-FLAG. Στις **διαδρομές 1-3**, οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται στο εκχύλισμα κυττάρων HEK293T στα οποία εκφράζονται εξωγενώς, είτε η καθεμία πρωτεΐνη ξεχωριστά (**2,3**) είτε και οι δύο μαζί (**1**). Στις διαδρομές **4-6**, η FLAG-RanBPM ανιχνεύεται κατόπιν ανοσοκατακρήμνισής της, σε εκχύλισμα κυττάρων μετασηματισμένων είτε μόνο με FLAG-RanBPM (**διαδρομή 5**), είτε με FLAG-RanBPM και Cend1 (**διαδρομή 4**). Αντίθετα, η Cend1 ανιχνεύεται μόνο κατόπιν συν-ανοσοκατακρήμνισης σε διπλά μετασηματισμένα κύτταρα με FLAG-RanBPM (**διαδρομή 4**). Όπως είναι αναμενόμενο, σε κύτταρα που εκφράζουν εξωγενώς μόνο τη Cend1, καμία από τις δύο πρωτεΐνες δεν ανοσοκατακρημνίζεται (**διαδρομή 6**). Η συν-ανοσοκατακρήμνιση της Cend1 από την FLAG-RanBPM είναι ειδική, καθώς όταν χρησιμοποιείται για την αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης ένα τυχαίο αντίσωμα εταιρείας (αντί-PRX2), η Cend1 δεν ανιχνεύεται στο ανοσοαποτύπωμα (**διαδρομή 7**). Για την ανοσοκατακρήμνιση καθώς και για την ανίχνευση της RanBPM χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του επιτόπου της FLAG.

3.1.5 Η πρωτεΐνη BM88/Cend1 συνεντοπίζεται ενδοκυτταρικά με την RanBPM σε κύτταρα Neuro-2a, όπου τα δύο μόρια συνεκφράζονται.

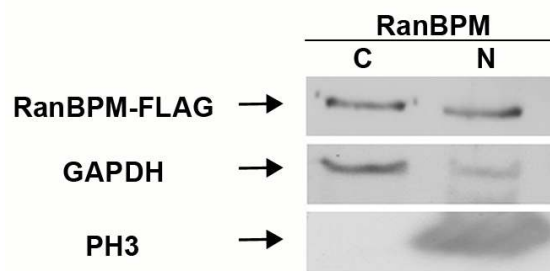
Ο ενδοκυτταρικός συνεντοπισμός δύο ή και περισσότερων μορίων αποτελεί βασική προϋπόθεση μιας ενδεχόμενης μεταξύ τους αλληλεπίδρασης. Από παλαιότερες βιβλιογραφικές αναφορές, έχει δειχθεί πως η μεμβρανική πρωτεΐνη Cend1 είναι αγκυροβολημένη μέσω μιας διαμεμβρανικής περιοχής μήκους 20 υδρόφοβων αμινοξέων, που εδράζεται στο καρβοξυτελικό της άκρο, στις μεμβράνες των ενδοκυττάρων οργανιδίων των νευρώνων, με κυριώτερο τον εντοπισμό της στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Gaitanou et al. 2001; Mamalaki et al. 1995; Patsavouidi et al. 1995). Προκειμένου να εξεταστεί ο κυτταρικός συνεντοπισμός της RanBPM με τη Cend1, κύτταρα της σειράς νευροβλαστώματος του ποντικού Neuro-2a, μετασηματίστηκαν παροδικά, με τα πλασμίδια p3xFLAG-RanBPM-CMV7.1 και pcDNA3-BM88/Cend1. Σημειώνεται πως τα κύτταρα Neuro-2a εκφράζουν ενδογενώς σε χαμηλά επίπεδα την πρωτεΐνη BM88/Cend1, όπως έχει δειχθεί με ανοσοαποτύπωμα και ανοσοκυτταροχημεία (Georgoroulou et al. 2006; Mamalaki et al. 1995) ενώ δεν φαίνεται να εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη RanBPM, όπως προκύπτει με ανοσοαποτύπωμα του κυτταρικού τους εκχυλίσματος και τη χρήση ειδικού αντι-RanBPM αντισώματος (Abcam), (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται). Συγκεκριμένα, 48 ώρες μετά τον παροδικό μετασηματισμό των Neuro-2a κυττάρων με τα πλασμίδια p3xFLAG-RanBPM-CMV7.1 και pcDNA3-BM88/Cend1 μαζί, ακολουθήθηκε η διαδικασία της ανοσοκυτταροχημείας/ανοσοφθορισμού όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.3. Πραγματοποιήθηκαν διπλές χρώσεις με τη χρήση πρωτογενών αντισωμάτων έναντι της BM88/Cend1 και της FLAG-RanBPM. Για την ανίχνευση της RanBPM χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG αλλά και ειδικό αντίσωμα αντι-RanBPM έναντι της πρωτεΐνης RanBPM. Η ανίχνευση των πρωτογενών αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δευτερογενών αντισωμάτων συζευγμένων με φθοριοχρώματα Alexa-488 (πράσινο), Alexa-546 (κόκκινο). Για τη σήμανση των πυρήνων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική TO-PRO-3. Οι εικόνες των φθορίζοντων κυττάρων ελήφθησαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Confocal Microscopy).

Συμβατά με όσα ήταν ήδη γνωστά από τη βιβλιογραφία (Denti et al. 2004; Nakamura et al. 1998; Nishitani et al. 2001; Zou et al. 2003) και δεδομένης της αλληλεπίδρασής της με τη BM88/Cend1, η RanBPM εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα μαζί με την BM88/Cend1, αλλά ανιχνεύεται εν μέρει και στον πυρήνα ιδίως με τη χρήση του αντι-FLAG αντισώματος (**Εικόνα 3.6 i-iv**). Ο υποκυττάριος εντοπισμός της RanBPM στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα επιβεβαιώθηκε περαιτέρω και με τη χρήση του ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος του εμπορίου αντι-RanBPM (**Εικόνα 3.6 v-viii**).



Εικ.3.6 Ανοσοφθορισμός σε διπλά μετασηματισμένα με *Cend1* και *RanBPM* κύτταρα *Neuro 2a*. Η πρωτεΐνη *Cend1* εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (**i,v**) ενώ η *RanBPM* τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα (**ii,vi**). Οι πυρήνες των κυττάρων έχουν σημειωθεί με τη χρωστική *TO-PRO-3* (**iii, vii**), ενώ στις φωτογραφίες (**iv, viii**) παρατηρούμε τον κυτταροπλασματικό συνεντοπισμό των δύο μορίων. Η ανίχνευση της *RanBPM*, επιβεβαιώθηκε τόσο με τη χρήση αντι-FLAG αντισώματος (**i-iv**), όσο και με τη χρήση αντι-*RanBPM* αντισώματος (**v-viii**), που παρέχει ισχυρότερο κυτταροπλασματικό παρά πυρηνικό σήμα. Κλίμακα: 10 μm .

Επιπρόσθετα, η ενδοκυττάρια κατανομή της *RanBPM* ταυτοποιήθηκε και με διαχωρισμό του κυτταροπλασματικού και πυρηνικού κλάσματος πρωτεϊνικού εκχυλίσματος παροδικά μετασηματισμένων *Neuro 2a* κυττάρων με το πλασμίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη *RanBPM*. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.7** στο ανοσοαποτύπωμα κατά western, που ακολούθησε την κλασμάτωση, η *RanBPM* ανιχνεύεται τόσο στο κυτταροπλασματικό όσο και στο πυρηνικό κλάσμα των κυττάρων, ενώ ως μάρτυρες της καθαρότητας των κλασμάτων χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της κυτταροπλασματικής δεϋδρογενάσης της 3-φωσφορο-γλυκεραλδεϋδης (*GAPDH*) και της πυρηνικής φωσφο-ιστόνης-3 (*PH3*).

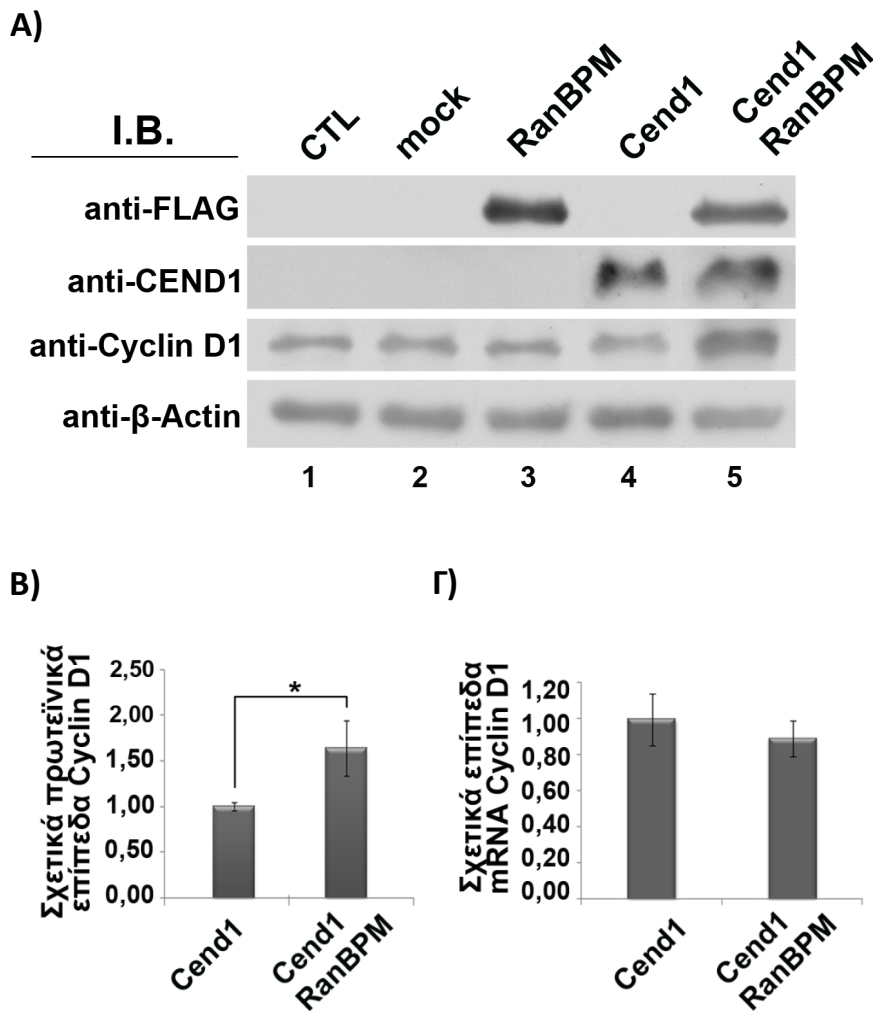


Εικ.3.7 Ανοσοαποτύπωμα κατά western με αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG της χμιαϊρικής FLAG-RanBPM πρωτεΐνης, για ανίχνευσή της τόσο στο κυτταροπλασματικό (**C**) όσο και στο πυρηνικό (**N**) κλάσμα των μετασχηματισμένων Neuro 2a κυττάρων. Ως μάρτυρες της καθαρότητας των κλασμάτων, χρησιμοποιούνται αντισώματα έναντι της κυτταροπλασματικής δεϋδρογενάσης της 3-φωσφορο-γλυκεραλδεϋδης (GAPDH) και της πυρηνικής φωσφο-ιστόνης-3 (PH3).

3.2 Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών BM88/Cend1 και RanBPM οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της κυκλίνης D1 και αυξημένη ενσωμάτωση 5-βρωμο-2'-δεόξυ-ουριδίνης (BrdU).

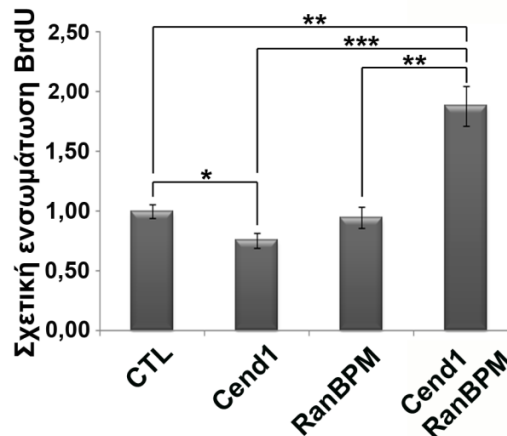
Όπως έχει δειχθεί σε προγενέστερες μελέτες, η υπερέκφραση της BM88/Cend1 σε κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού Neuro 2a, οδηγεί σε μείωση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των κυττάρων με σύγχρονη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κυκλίνης D1. Το αντίθετο φαινόμενο παρατηρείται με την αποσιώπηση της ενδογενούς έκφρασης της BM88/Cend1, στην ίδια κυτταρική σειρά (BM88/Cend1 knock-down) (Georgoroulou et al. 2006; Politis et al. 2008). Προκειμένου να ερμηνευθεί η λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Cend1 και RanBPM, τα Neuro 2a κύτταρα μετασχηματίστηκαν παροδικά με τα πλασμίδια που εκφράζουν τις πρωτεΐνες Cend1 και RanBPM, είτε ξεχωριστά, είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους (και σε αναλογία 1:1), χρησιμοποιώντας σε κάθε περίπτωση έναν κενό πλασμιδιακό φορέα έκφρασης ως αρνητικό μάρτυρα του πειράματος. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν 48 ώρες μετά το μετασχηματισμό τους και αφού υπέστησαν λύση, το πρωτεϊνικό τους εκχύλισμα ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες κι ακολούθησε ανάλυση κατά western. Η ανίχνευση των πρωτεϊνικών μορίων, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων. Όπως φάνηκε, η υπερέκφραση μόνο της RanBPM δεν επηρέασε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1 εν συγκρίσει με τα κύτταρα που είτε δεν είχαν υποστεί παροδικό μετασχηματισμό, είτε είχαν μετασχηματιστεί με έναν κενό πλασμιδιακό φορέα. Αντίθετα, ο παροδικός μετασχηματισμός με την Cend1 μείωσε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1 κατά 20% σε σχέση με τα μητρικά Neuro 2a κύτταρα, γεγονός που αναστράφηκε στα διπλά μετασχηματισμένα κύτταρα με Cend1 και RanBPM (**Εικ. 3.8Α**). Ειδικότερα,

από την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κυκλίνης D1 και την κανονικοποίηση αυτών ως προς τα επίπεδα της α-ακτίνης, προέκυψε πως η κυκλίνη D1 αυξήθηκε κατά 1,6 φορές στα διπλά μετασχηματισμένα Neuro 2a κύτταρα με Cend1 και RanBPM, συγκριτικά με τα μονά μετασχηματισμένα με Cend1 Neuro 2a κύτταρα (Εικ. 3.8B, $p=0.0226$). Από την άλλη πλευρά, βάσει της ποσοτικοποίησης των επιπέδων του mRNA της κυκλίνης D1 που πραγματοποιήθηκε με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε προϊόν αντίστροφης μεταγραφής (*real-time RT-qPCR*), δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή ανάμεσα στις δύο συνθήκες (μονά μετασχηματισμένα με Cend1 και διπλά μετασχηματισμένα με Cend1 και RanBPM κύτταρα) (Εικ. 3.8Γ). Από τα παραπάνω συνάγεται πως η δράση της RanBPM στην κυκλίνη D1, λαμβάνει χώρα σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο.



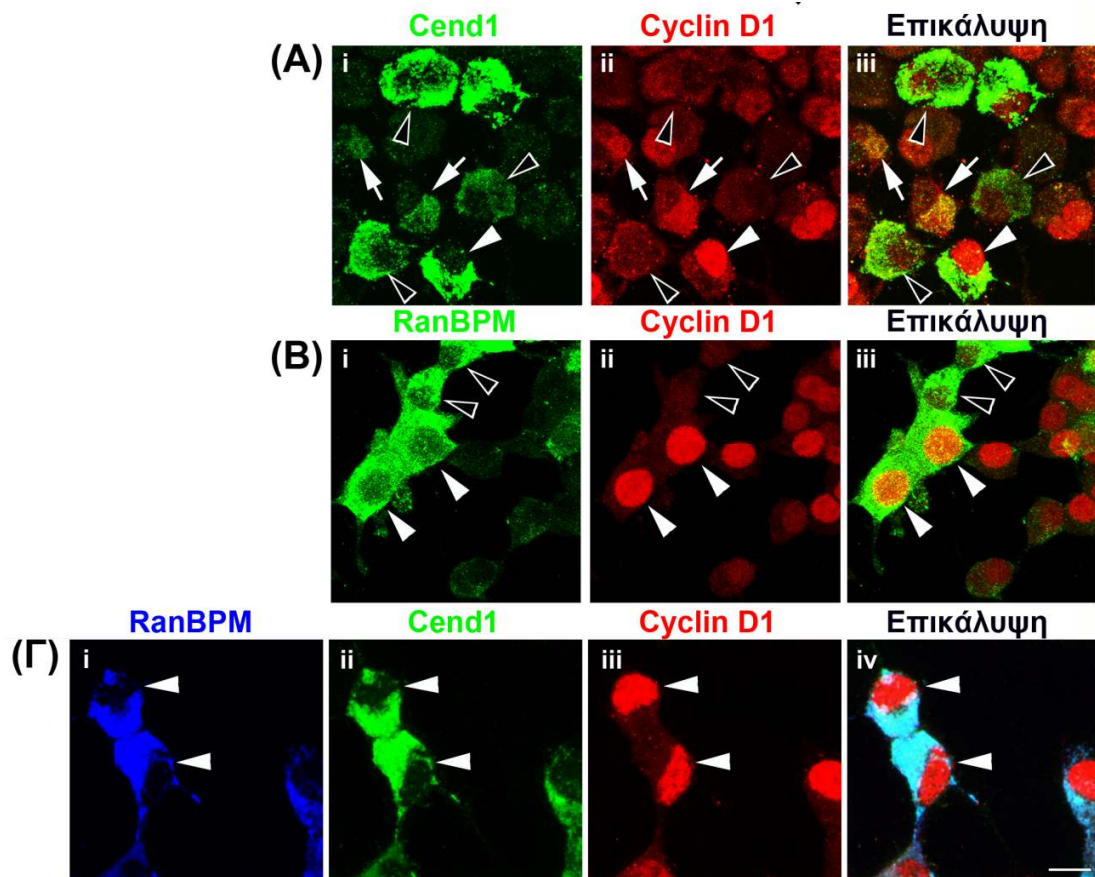
Εικ.3.8 Το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Cend1 και RanBPM στην κυκλίνη D1. **(Α)** Ανοσοαποτύπωμα κατά western εκχυλισμάτων κυττάρων τα οποία είναι: μη μετασχηματισμένα (CTL, **διαδρομή 1**), μετασχηματισμένα με πλασμίδιο που δεν διαθέτει κωδική περιοχή (mock, **διαδρομή 2**), μετασχηματισμένα μόνο με το πλασμίδιο της RanBPM (**διαδρομή 3**), μετασχηματισμένα μόνο με το πλασμίδιο της Cend1 (**διαδρομή 4**), μετασχηματισμένα και με τα δύο πλασμίδια (**διαδρομή 5**). Όπως φαίνεται, τα επίπεδα της κυκλίνης D1 δεν μεταβάλλονται στη διαδρομή 3 σε σχέση με τις διαδρομές 1,2, ενώ εντυπωσιακή είναι η διαφορά στη διαδρομή 5 εν συγκρίσει με τη διαδρομή 4. **(Β-Γ)** Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κυκλίνης D1 (με χρήση του προγράμματος imageJ) και των επιπέδων mRNAs (με real-time RT-qPCR) υποδεικνύει πως η δράση της RanBPM στα διπλά μετασχηματισμένα κύτταρα με Cend1 σε σχέση με τα μονά μετασχηματισμένα με Cend1, λαμβάνει χώρα σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Στα γραφήματα απεικονίζεται και το τυπικό σφάλμα (standard error). Η στατιστική ανάλυση έγινε με Student's t test, * $p < 0.001$.

Καθώς η κυκλίνη D1 αποτελεί βασικό ρυθμιστή της μετάβασης G1/S του κυτταρικού κύκλου, φαίνεται πως η λειτουργική αλληλεπίδραση της RanBPM με την Cend1 επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε πως κάτι τέτοιο όντως λαμβάνει χώρα, μετρήσαμε με τεχνικές ανοσοκυτταροχημείας/ανοσοφθορισμού, την ενσωμάτωση 5-βρωμο-2'-δεόξυ-ουριδίνης (BrdU) έπειτα από χορήγησή της για μία ώρα, σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα Neuro-2a, μη μετασχηματισμένα (κύτταρα-μάρτυρες), αλλά και μετασχηματισμένα, είτε με καθένα από τα δύο μόρια ξεχωριστά (RanBPM, Cend1), είτε σε συνδυασμό (RanBPM/Cend1). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μη μετασχηματισμένων κυττάρων και εκείνων που είχαν μετασχηματιστεί μόνο με RanBPM. Αντίθετα, μία μείωση της τάξης του 25% ως προς την ενσωμάτωση BrdU, παρατηρήθηκε στα μετασχηματισμένα κύτταρα με Cend1, συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες. Σημειώνεται πως οι μετρήσεις για τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα-μάρτυρες αφορούσαν στον πληθυσμό των θετικών για BrdU κυττάρων (BrdU⁺) ως προς το συνολικό πληθυσμό των κυττάρων ($32.15 \pm 1.79 \% \text{ BrdU}^+$), ενώ για τα μετασχηματισμένα κύτταρα (είτε με RanBPM, είτε με Cend1), αφορούσαν στον πληθυσμό των BrdU⁺ κυττάρων, ως προς τον πληθυσμό των κυττάρων που ήταν θετικός για καθένα από τα δύο μόρια [$30.48 \pm 2.79 \% \text{ BrdU}^+/\text{RanBPM}^+$ ($p=0.6288$, $n=6$) και $24.24 \pm 1.94\% \text{ BrdU}^+/\text{Cend1}^+$ ($p=0.0171$, $n=6$) αντίστοιχα]. Η ενσωμάτωση BrdU ήταν υψηλότερη κατά 2.5 φορές στα διπλά μετασχηματισμένα κύτταρα (RanBPM/Cend1), συγκριτικά με τα μονά μετασχηματισμένα με Cend1. Ειδικότερα, οι μετρήσεις που ελήφθησαν ήταν οι ακόλουθες: $60.46 \pm 5.48 \% \text{ BrdU}^+/\text{Cend1}^+/\text{RanBPM}^+$ συγκριτικά με $24.24 \pm 1.94 \% \text{ BrdU}^+/\text{Cend1}^+$ ($p=0.0008$, $n=6$). Η αυξημένη ενσωμάτωση BrdU στα διπλά μετασχηματισμένα κύτταρα είναι ενδεικτική του αυξημένου πολλαπλασιασμού, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και μία ενδεχόμενη αύξηση στη διάρκεια της S-φάσης του κυτταρικού κύκλου.



Εικ.3.9 Η συνέκφραση των *Cend1/RanBPM* ενισχύει την ενσωμάτωση *BrdU* στα *Neuro-2a* κύτταρα. Η εκτίμηση της ενσωμάτωσης *BrdU* στην καλλιέργεια-μάρτυρα (CTL), πραγματοποιήθηκε μετρώντας *BrdU*⁺ κύτταρα ως προς το σύνολο των κυττάρων. Στα μονά μετασχηματισμένα κύτταρα (με *Cend1* ή *RanBPM*) μετρώντας *BrdU*⁺/*Cend1*⁺ ή *RanBPM*⁺ ως προς το σύνολο των *Cend1*⁺ ή *RanBPM*⁺, ενώ στα διπλά μετασχηματισμένα κύτταρα (με *Cend1* και *RanBPM*) μετρώντας *BrdU*⁺/*Cend1*⁺/*RanBPM*⁺ ως προς το σύνολο των *Cend1*⁺/*RanBPM*⁺ κυττάρων.

Η ενεργός κυκλίνη D1 κατά τη διάρκεια της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου εντοπίζεται στον πυρήνα ενώ η απενεργοποίησή της λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα μέσω αποικοδόμησης από το πρωτεάσωμα (Alao 2007). Στα κύτταρα *Neuro-2a*, η κυκλίνη D1 εντοπίζεται στον πυρήνα πρακτικά όλων των διπλά μετασχηματισμένων κυττάρων *Cend1-RanBPM*, γεγονός που υποδηλώνει ότι η λειτουργική αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών σταθεροποιεί την κυκλίνη D1 στον πυρήνα (**Εικ. 3.10Γ**). Από την άλλη πλευρά, όπως έχει δειχθεί και σε προγενέστερες μελέτες (Georgoroulou et al. 2006), σε *Neuro-2a* κύτταρα μετασχηματισμένα με *Cend1*, η κυκλίνη D1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των μισών περίπου *Cend1* θετικών κυττάρων και περιστασιακά μόνο στον πυρήνα τους, ενώ σε άλλα από αυτά εξαφανίζεται (**Εικ. 3.10Α**). Τέλος, σε κύτταρα μετασχηματισμένα μόνο με *RanBPM*, η κυκλίνη D1 βρίσκεται είτε στον πυρήνα είτε στο κυτταρόπλασμα παρόμοια με ότι συμβαίνει στα κύτταρα-μάρτυρες (**Εικ. 3.10Β**).



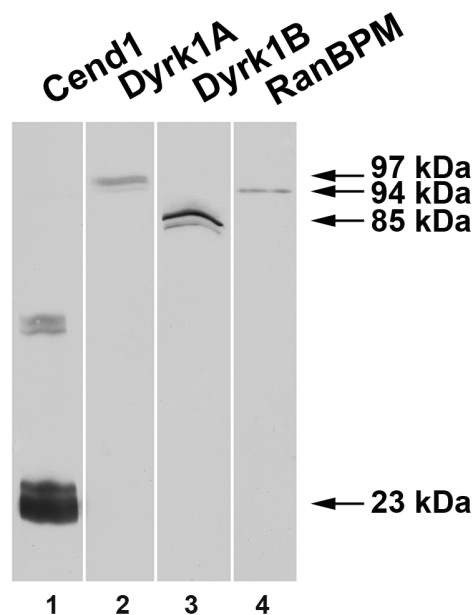
Εικ.3.10 Η συνέκφραση των *Cend1* και *RanBPM*, σταθεροποιεί την κυκλίνη *D1* στον πυρήνα. **(Α)** Σε κύτταρα *Neuro-2a* παροδικά μετασηματισμένα με *Cend1*, η κυκλίνη *D1* είτε εξαφανίζεται (μαύρες κεφαλές βελών) είτε εξέρχεται του πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (λευκά βέλη) και μόνο περιστασιακά διατηρείται στον πυρήνα των *Cend1+* κυττάρων. **(Β)** Στα μονά μετασηματισμένα με *RanBPM* κύτταρα, η κυκλίνη *D1* εντοπίζεται στον πυρήνα (λευκές κεφαλές βελών) ή εξαφανίζεται (μαύρες κεφαλές βελών), όπως συμβαίνει και στα μη μετασηματισμένα κύτταρα-μάρτυρες. **(Γ)** Αντίθετα, σε όλα τα διπλά μετασηματισμένα κύτταρα για *Cend1* και *RanBPM*, η κυκλίνη *D1* εμφανίζεται στον πυρήνα (λευκές κεφαλές βελών). Κλίμακα: 10 μm .

3.3 Οι πρωτεΐνες *Cend1*, *RanBPM* και *Mirk/Dyrk1B* εκφράζονται στον εγκέφαλο του ποντικού και σχηματίζουν συμπλέγματα.

Προκειμένου να διερευνηθεί πώς η αλληλεπίδραση της *RanBPM* με τη *Cend1* αναστρέφει τη δράση της *Cend1* στα *Neuro-2a* κύτταρα επηρεάζοντας θετικά την κυκλίνη *D1* και κατ' επέκταση τον κυτταρικό κύκλο, αναζητήθηκαν βιβλιογραφικά άλλες πρωτεΐνες-συνεργάτες της *RanBPM* που θα σχετίζονταν άμεσα ή έμμεσα και με το λειτουργικό ρόλο της *Cend1*. Μεταξύ αυτών η κινάση σερίνης/θρεονίνης *Mirk/Dyrk1B* (Zou et al. 2003) που φωσφορυλιώνει διάφορα υποστρώματα όπως

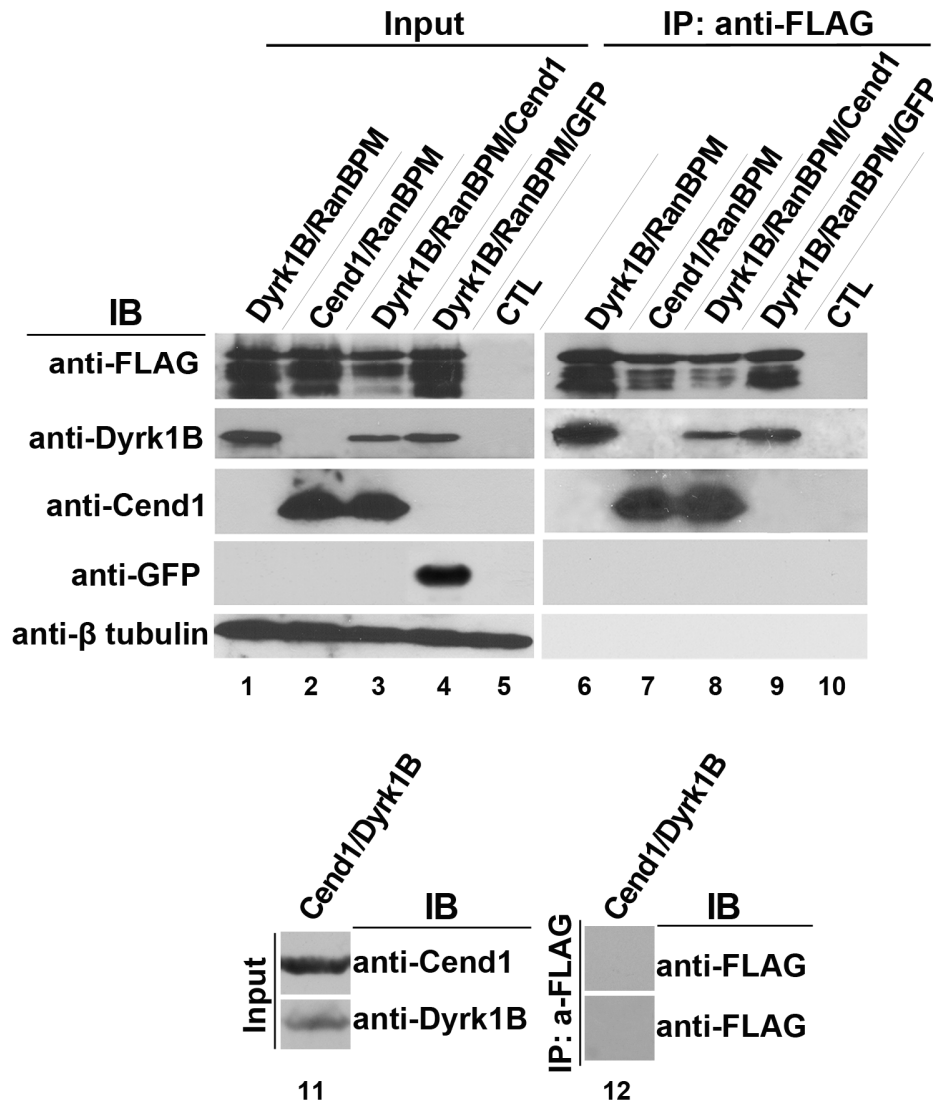
τον πυρηνικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων 1α (Hepatocyte Nuclear Factor 1α, HNF1α) ή τη βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (myelin basic protein, MBP), απέκτησε ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς η δράση της τελευταίας αναστέλλεται μέσω της φυσικής της αλληλεπίδρασης με τη RanBPM. Επιπρόσθετα, έχει ήδη αναφερθεί, ότι η συγκεκριμένη κινάση, φωσφορυλιώνει την κυκλίνη D1 στη θρεονίνη T288 επάγοντας τη μετατόπισή της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και τελικά την αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα, προκαλώντας έτσι την έξοδο των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο (Zou et al. 2004).

Αρχικά, επιβεβαιώθηκε η έκφραση και των τριών πρωτεϊνών Cend1, RanBPM και Mirk/Dyrk1B σε ομογενοποίηση εγκεφάλου ενήλικου ποντικού με τη χρήση ανοσοαποτυπώματος κατά western καθώς και η έκφραση της συγγενικής της κινάσης Dyrk1A, η οποία ανήκει στην ίδια οικογένεια με την Mirk/Dyrk1B και έχει δειχθεί πως σχετίζεται επίσης με την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίηση των πρόδρομων νευρωνικών κυττάρων (Hammerle et al. 2011; Yabut, Domogauer, and D'Arcangelo 2010) (**Εικόνα 3.11**).



Εικ.3.11 Ανοσοαποτύπωμα στο οποίο απεικονίζεται η έκφραση των πρωτεϊνών Cend1, RanBPM, Dyrk1B στον εγκέφαλο του ποντικού. Τέσσερα ξεχωριστά δείγματα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος εγκεφάλου ποντικού (60 μg έκαστο), ηλεκτροφορήθηκαν υπό αποδιατακτικές συνθήκες και με τα κατάλληλα αντισώματα έναντι των Cend1 (**διαδρομή 1**), RanBPM (**διαδρομή 4**), Dyrk1B (**διαδρομή 3**), Dyrk1A (**διαδρομή 2**), ανιχνεύθηκε σε ανοσοαποτύπωμα κατά western η έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Στην **διαδρομή 1**, η μπάνα των 23 kDa αντιστοιχεί στη μία από τις δύο όμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες της Cend1, που συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό.

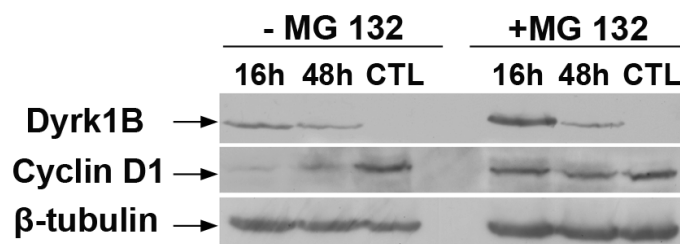
Στη συνέχεια, με σκοπό να διερευνηθεί η πιθανή τριμερής αλληλεπίδραση μεταξύ των Cend1, RanBPM και Mirk/Dyrk1B εξετάστηκε αρχικά αν η RanBPM συν-κατακρημνίζεται με τις άλλες δύο πρωτεΐνες σε ομογενοποίηση εγκεφάλου ποντικού. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα διαθέσιμο πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της RanBPM (goat polyclonal anti-RanBPM, Abcam), το οποίο όμως δεν ήταν ικανό να κατακρημνίσει την πρωτεΐνη RanBPM από ομογενοποίηση εγκεφάλου ποντικού. Εξαιτίας αυτού πραγματοποιήθηκαν διπλοί και τριπλοί μετασχηματισμοί κυττάρων HEK293T με τα πλασμίδια που εκφράζουν τις πρωτεΐνες Cend1, RanBPM και Mirk/Dyrk1B και στη συνέχεια ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του FLAG επιτόπου της FLAG-RanBPM πρωτεΐνης και ανοσοαποτύπωμα. Εδώ αξίζει να σημειωθεί πως οι RanBPM και Mirk/Dyrk1B πρωτεΐνες δεν ήταν εφικτό να ανιχνευθούν ενδογενώς στα HEK293T κύτταρα με τα διαθέσιμα αντισώματα του εμπορίου. Ως αρνητικός μάρτυρας της ανοσοκατακρήμνισης, χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα τριπλά μετασχηματισμένων κυττάρων, στα οποία εκφράστηκε η GFP πρωτεΐνη αντί της Cend1 (**Εικόνα 3.12**). Επιπρόσθετα, σε κύτταρα που συνέκφραζαν μόνο Cend1 και Dyrk1B, επιχειρήθηκε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG της RanBPM, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι εκείνο δεν δεσμεύεται μη ειδικά σε κάποιο από τα δύο μόρια. Όπως φαίνεται από το ανοσοαποτύπωμα κατά western της **Εικόνας 3.12**, η RanBPM συν-κατακρημνίζεται είτε με τη Dyrk1B (**διαδρομή 6**), είτε με τη Cend1 (**διαδρομή 7**) στα διπλά μετασχηματισμένα κύτταρα. Στα τριπλά μετασχηματισμένα κύτταρα και οι τρεις πρωτεΐνες συν-κατακρημνίζονται (**διαδρομή 8**) και εφ' όσον η Cend1 απαντάται στο κυτταρόπλασμα ενώ η Dyrk1B στον πυρήνα, θα μπορούσε να υποστηριχθεί πως η RanBPM έχει την ικανότητα να σχηματίζει ανεξάρτητα ετεροδιμερή σύμπλοκα (RanBPM/Cend1, RanBPM/Dyrk1B). Στις **διαδρομές 1-4**, ανιχνεύεται η έκφραση των πρωτεϊνών στα διπλά και τριπλά μετασχηματισμένα κύτταρα ενώ η **διαδρομή 5** φέρει το εκχύλισμα μη μετασχηματισμένων κυττάρων- αρνητικών μαρτύρων της δοκιμασίας. Όπως ήταν αναμενόμενο, καμία πρωτεΐνη δεν ανοσοκατακρημνίζεται από το εκχύλισμα των μη μετασχηματισμένων κυττάρων με τη χρήση αντί-FLAG αντισώματος (**διαδρομή 10**), ενώ το ίδιο συμβαίνει και στα διπλά μετασχηματισμένα με Cend1 και Dyrk1B κύτταρα (**διαδρομή 12**).



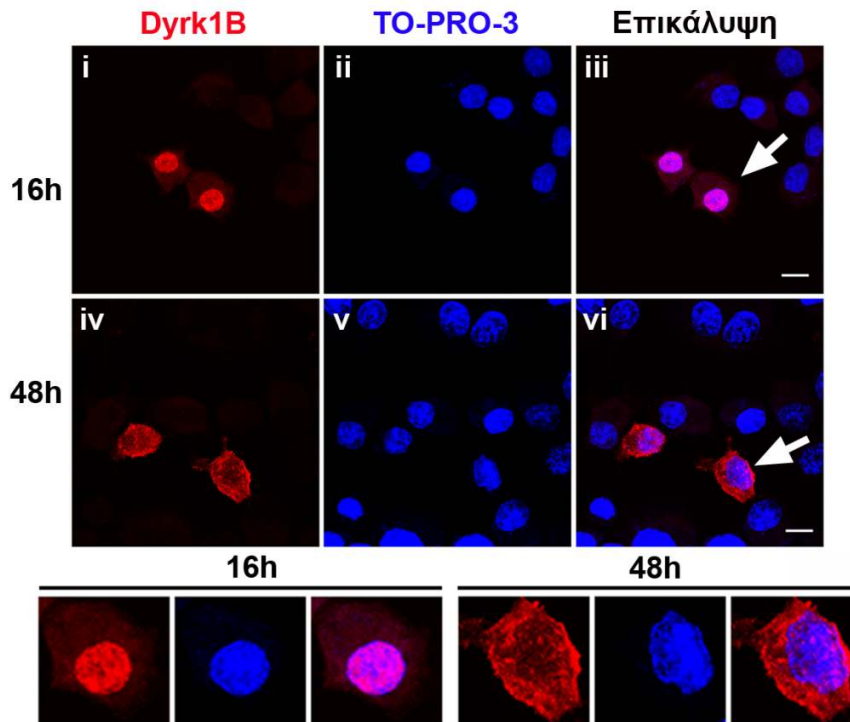
Εικ.3.12 Ανοσοαποτύπωμα κατά western κατόπιν συν-ανοσοκατακρήμνισης των Cend1-Dyrk1B από την RanBPM-FLAG. Στις **διαδρομές 1-4**, ανιχνεύονται οι πρωτεΐνες που εκφράζονται στα διπλά και τριπλά μετασηματισμένα κύτταρα HEK293T (input), ενώ στις **διαδρομές 6-9** οι πρωτεΐνες που συν-ανοσοκατακρημνίζονται με τη RanBPM-FLAG (IP). Οι διαδρομές **5** και **10** αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες της δοκιμασίας (μη μετασηματισμένα κύτταρα). Προκειμένου να ελεγχθεί η ειδικότητα δέσμευσης του anti-FLAG αντισώματος στη RanBPM-FLAG το αντίσωμα χρησιμοποιείται για ανοσοκατακρήμνιση σε εκχύλισμα κυττάρων που εκφράζουν μόνο Cend1 και Dyrk1B (**διαδρομή 12**) και όπως είναι αναμενόμενο καμία από τις δύο πρωτεΐνες δεν ανοσοκατακρημνίζεται. Η έκφραση των πρωτεϊνών στο συγκεκριμένο κυτταρικό εκχύλισμα απεικονίζεται στη **διαδρομή 11**.

3.4 *In vitro* μελέτη της δράσης της κινάσης Mirk/Dyrk1B στα Neuro-2a κύτταρα.

Βάσει των παραπάνω δεδομένων, πραγματοποιήθηκε αρχικά η *in vitro* μελέτη της δράσης της Dyrk1B κινάσης στα Neuro-2a κύτταρα και στη συνέχεια η μελέτη της συνδυασμένης δράσης των τριών πρωτεϊνών (Cend1-RanBPM-Dyrk1B) στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, με επίκεντρο τη μετάβαση G1/S, όπου κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζει η κυκλίνη D1. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η ενδογενής έκφραση της Dyrk1B δεν ήταν ανιχνεύσιμη στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά των Neuro-2a κυττάρων με το αντίσωμα αντι-Dyrk1B του εμπορίου (rabbit polyclonal anti-Dyrk1B, Cell Signaling) και για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε παροδικός μετασχηματισμός των Neuro-2a κυττάρων χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο έκφρασης της Dyrk1B κινάσης. Παρατηρήθηκε πως η έκφρασή της Dyrk1B πρωτεΐνης ήταν μέγιστη στις 16 ώρες μετά τον παροδικό μετασχηματισμό, ενώ στη συνέχεια μειωνόταν μέχρι τις 48 ώρες, οπότε και ανιχνευόταν με ανοσοαποτύπωμα κατά western σε χαμηλά επίπεδα (**Εικ. 3.13**). Το γεγονός αυτό δεν συμβάδιζε με την έκφραση των Cend1 και RanBPM, οι οποίες 48 ώρες μετά το μετασχηματισμό συνέχιζαν να εκφράζονται ισχυρά. Παράλληλα, με τεχνικές ανοσοφθορισμού και λήψη εικόνων συνεστισκής μικροσκοπίας, φάνηκε πως στα μονά μετασχηματισμένα Neuro-2a κύτταρα με την Dyrk1B, η Dyrk1B είχε αποκλειστικά πυρηνικό εντοπισμό 16 ώρες μετά το μετασχηματισμό, ενώ στις 48 ώρες ανιχνευόταν στο κυτταρόπλασμα (**Εικ. 3.14**). Επιπλέον ποσοτική μελέτη των επιπέδων έκφρασης του mRNA της Dyrk1B, που πραγματοποιήθηκε με ποσοτική PCR ανάλυση σε πραγματικό χρόνο κατόπιν αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR), έδειξε μια στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων του mRNA της Dyrk1B από τις 16 στις 48 ώρες μετά το μετασχηματισμό. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τη λογικά αναμενόμενη εξάλειψη του εξωγενούς cDNA με το χρόνο στα παροδικά μετασχηματισμένα κύτταρα καθώς και της έκφρασης του mRNA της Dyrk1B, ανεξάρτητα της σταθερότητας και του χρόνου ζωής της πρωτεΐνης Dyrk1B (**Εικόνα 3.16A**).



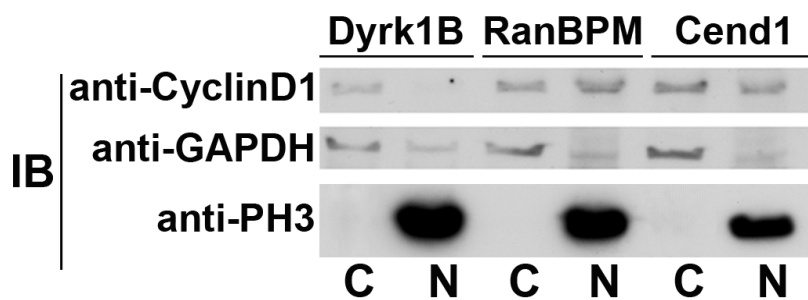
Εικ.3.13 Η έκφραση της εξωγενούς *Dyrk1B* και της ενδογενούς κυκλίνης *D1* σε κύτταρα *Neuro-2a*, απουσία και παρουσία του αναστολέα του πρωτεασώματος *MG132*, με ανοσοαποτύπωμα κατά western. Η κινάση *Dyrk1B* δεν ανιχνεύεται ενδογενώς στα μη μετασχηματισμένα κύτταρα-μάρτυρες (CTL) με το διαθέσιμο αντίσωμα αντι-*Dyrk1B* του εμπορίου, ενώ όταν εκφράζεται εξωγενώς σε κύτταρα *Neuro-2a*, τα επίπεδά της μειώνονται από τις 16 έως τις 48 ώρες με σύγχρονη αύξηση των επιπέδων της ενδογενούς κυκλίνης *D1*. Παρουσία του αναστολέα *MG132*, τόσο η *Dyrk1B* (περισσότερο στις 16 ώρες και λιγότερο στις 48 ώρες) όσο και η κυκλίνη *D1* αυθροίζονται, υποδηλώνοντας την εξαρτώμενη από το πρωτεάσωμα αποικοδόμησή τους.



Εικ.3.14 Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας, όπου με ανοσοφθορισμό η κινάση *Dyrk1B* ανιχνεύεται 16 ώρες μετά τον μετασχηματισμό των *Neuro-2a* κυττάρων στον πυρήνα τους, ενώ 48 ώρες μετά τον μετασχηματισμό ανιχνεύεται στο κυτταρόπλασμα. Να σημειωθεί ότι η κινάση *Dyrk1B* με τη χρήση του συγκεκριμένου αντισώματος δεν ανιχνεύεται στα μη μετασχηματισμένα *Neuro-2a* κύτταρα. Τα κύτταρα που επισημαίνονται με άσπρα βέλη παρίστανται από κάτω σε μεγαλύτερη μεγέθυνση. Με *TO-PRO-3* σημαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων. Κλίμακα: 10μm.

Σε συμφωνία με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τη δράση της κινάσης *Dyrk1B* ως προς την έξοδο των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο λόγω φωσφορυλίωσης της κυκλίνης *D1* και της ακόλουθης μετατόπισής της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, με τελικό αποτέλεσμα την αποικοδόμησή της από το 26S πρωτεάσωμα (Aranda, Laguna, and de la Luna 2011), τα επίπεδα της κυκλίνης *D1* εμφανίζονται μειωμένα στα μονά μετασχηματισμένα με *Dyrk1B* *Neuro-2a* κύτταρα 16 ώρες μετά τον παροδικό μετασχηματισμό τους, συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες (**Εικ. 3.13**). Αξίζει να σημειωθεί πως τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης *D1*, αυξάνονται 48 ώρες μετά το

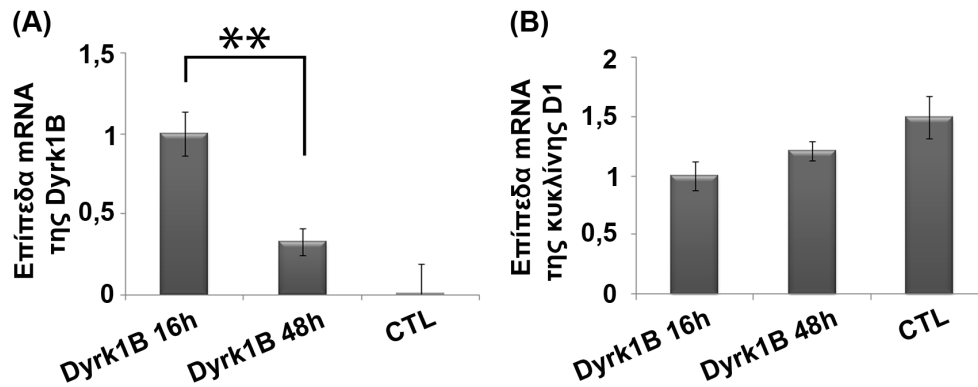
μετασχηματισμό, οπότε και τα αντίστοιχα της Dyrk1B έχουν μειωθεί (**Εικ. 3.13**). Επιπρόσθετα, η κυκλίνη D1 συγκεντρώνεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων αυτών, όπως φάνηκε από την κλασμάτωση του πρωτεϊνικού τους εκχυλίσματος σε κυτταροπλασματικό και πυρηνικό κλάσμα και στη συνέχεια με ανοσοαποτύπωμα κατά western (**Εικ. 3.15**). Μια αντίστοιχη μετατόπιση της κυκλίνης στο κυτταρόπλασμα, σε μικρότερη ίσως έκταση, φαίνεται να λαμβάνει χώρα και στα μονά μετασχηματισμένα με Cend1 κύτταρα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει περαιτέρω τη δράση της Cend1 επί της κυκλίνης D1, όπως έχει προκύψει από παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου (Georgoroulou et al. 2006). Όσον αφορά τα μετασχηματισμένα με RanBPM κύτταρα, εκεί παρατηρείται η κυκλίνη D1 να ανιχνεύεται περισσότερο στο πυρηνικό κλάσμα από ότι στο κυτταροπλασματικό, υποδηλώνοντας σταθεροποίηση της κυκλίνης D1 από τη RanBPM και παραμονή των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο, ενώ στα μονά μετασχηματισμένα με Cend1 κύτταρα φαίνεται να υπάρχει περισσότερη κυκλίνη D1 στο κυτταρόπλασμα από ότι στον πυρήνα (**Εικ. 3.15**).



Εικ.3.15 Ανάλυση κλασμάτων μονά μετασχηματισμένων Neuro-2a κυττάρων με ανοσοαποτύπωμα. Στα μονά μετασχηματισμένα με Dyrk1B κύτταρα, η κυκλίνη D1 ανιχνεύεται αποκλειστικά στο κυτταροπλασματικό (C) κλάσμα, ενώ στα αντίστοιχα με RanBPM κυρίως στο πυρηνικό (N). Τέλος, στα μονά μετασχηματισμένα με Cend1 κύτταρα, το μεγαλύτερο ποσοστό της κυκλίνης D1 έχει κυτταροπλασματικό εντοπισμό (C). Ως δείκτες καθαρότητας των κλασμάτων, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης GAPDH και της πυρηνικής PH3.

Με τη χρήση του ειδικού αναστολέα του 26S πρωτεασώματος MG132, ο οποίος προστέθηκε στο υλικό καλλιέργειας των κυττάρων 6 ώρες πριν τη συλλογή τους, παρατηρήθηκε μία άθροιση τόσο της κυκλίνης D1 όσο και της Dyrk1B, σε μικρότερο βαθμό, με ανοσοαποτύπωμα κατά western, υποδεικνύοντας έτσι πως η αποικοδόμηση και των δύο πρωτεϊνών είναι εξαρτώμενη από το πρωτεάσωμα (**Εικ. 3.13**). Από την άλλη πλευρά, καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή δεν βρέθηκε στα ενδογενή επίπεδα του mRNA της κυκλίνης D1 μεταξύ των 16 και 48 ωρών μετά τον παροδικό

μετασχηματισμό των Neuro-2a κυττάρων με την κινάση Dyrk1B, γεγονός που υποστηρίζει την επίδραση της Dyrk1B στην κυκλίνη D1 σε μετα-μεταγραφικό στάδιο (**Εικ. 3.16B**).

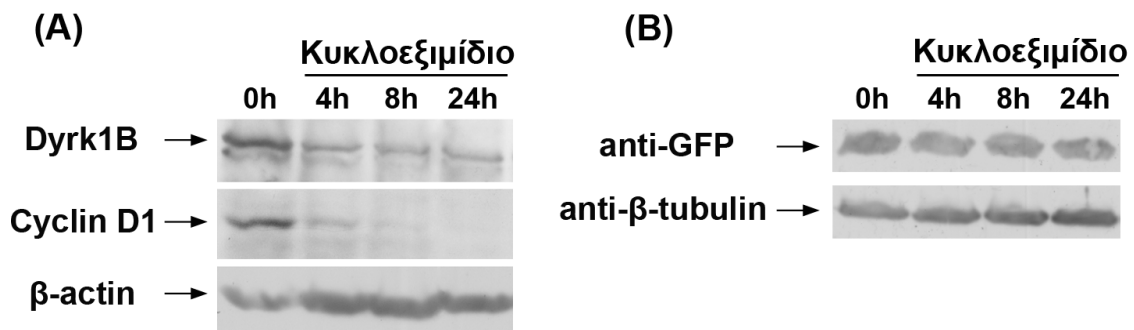


Εικ.3.16 (A,B) Ανάλυση των επιπέδων mRNA της κινάσης Dyrk1B και της κυκλίνης D1, 16 και 48 ώρες μετά τον παροδικό μετασχηματισμό Neuro-2a κυττάρων με Dyrk1B. Τα επίπεδα mRNA της Dyrk1B εμφανίζουν στατιστικά σημαντική μείωση μεταξύ 16 και 48 ωρών σε σχέση με τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα-μάρτυρες (CTL), κάτι που δεν συμβαίνει με τα αντίστοιχα επίπεδα της κυκλίνης D1 (** $p < 0.01$, $n = 3$).

Υποστηρικτικές των όσων αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι και οι παρατηρήσεις της συνεστιακής μικροσκοπίας που ακολούθησαν την ανοσοϊστοχημεία και δείχνουν την κυτταροπλασματική μετατόπιση από τον πυρήνα της Dyrk1B στις 48 ώρες μετά τον μετασχηματισμό (**Εικ. 3.13B**), την αποκλειστική άθροιση-εντοπισμό της κυκλίνης D1 στο κυτταρόπλασμα στα μονά μετασχηματισμένα Dyrk1B-Neuro-2a κύτταρα (**Εικ. 3.14**), καθώς και τη δραματική μείωση της κυκλίνης D1 στα Dyrk1B-Neuro-2a κυττάρα (**Εικ. 3.19**).

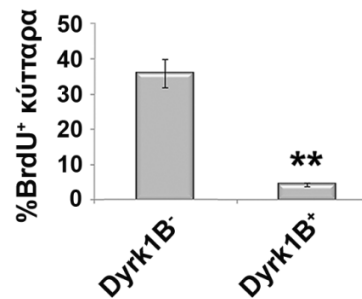
Στη συνέχεια εξετάστηκε περαιτέρω η σταθερότητα και ο χρόνος ζωής της κινάσης Mirk/Dyrk1B καθώς και του φυσικού της υποστρώματος για φωσφορλίωση, της κυκλίνης D1. Η μελέτη της σταθερότητας των πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση του αναστολέα της πρωτεϊνικής βιοσύνθεσης, κυκλοεξιμίδιο, το οποίο υπεισέρχεται στη φάση της επιμήκυνσης κατά τη μετάφραση του mRNA. Κύτταρα Neuro-2a μετασχηματίστηκαν παροδικά με το cDNA της Dyrk1B και 16 ώρες μετά το μετασχηματισμό, χρόνος στον οποίο είχε παρατηρηθεί το μέγιστο της έκφρασης για την πρωτεΐνη Dyrk1B, προστέθηκε στο υλικό της καλλιέργειας κυκλοεξιμίδιο σε τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν κατόπιν σε διάφορους χρόνους ($t=4$, $t=8$, $t=24$ ώρες, που αντιστοιχούν σε 20, 24 και 40 ώρες συνολικά μετά τον παροδικό μετασχηματισμό των κυττάρων με την κινάση Dyrk1B) και ακολούθησε ανοσοαποτύπωμα κατά western (**Εικ. 3.17A**). Ως αρνητικός μάρτυρας του πειράματος,

συλλέχθηκαν μετασηματισμένα κύτταρα με Dyrk1B, πριν την προσθήκη κυκλοεξιμιδίου (t=0). Επιπρόσθετα, κύτταρα Neuro-2a μετασηματίστηκαν μόνο με το cDNA της GFP, προκειμένου να αξιολογηθεί η δράση του κυκλοεξιμιδίου στην Dyrk1B συγκριτικά και με μία ανεξάρτητη, εξωγενώς εκφραζόμενη πρωτεΐνη (**Εικ. 3.17B**). Φάνηκε, λοιπόν, πως η κινάση Dyrk1B και ακόμη περισσότερο η κυκλίνη D1, διαθέτουν μειωμένο χρόνο ζωής και υπόκεινται σε γρήγορη ανακύκλωση (protein turnover) σε σχέση με την παρατηρούμενη σταθερότητα της GFP έως και 24 ώρες μετά τη δράση του κυκλοεξιμιδίου (40 ώρες δηλαδή συνολικά μετά τον παροδικό μετασηματισμό των κυττάρων με την GFP).



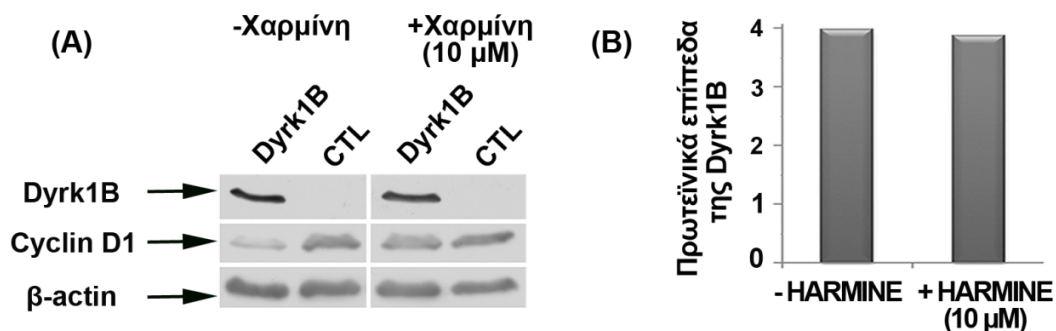
Εικ.3.17 (A) Μελέτη του χρόνου ημιζωής των πρωτεϊνών Dyrk1B και κυκλίνης D1 με τη χρήση κυκλοεξιμιδίου και ανοσοαποτύπωμα. **(B)** Η εξωγενώς εκφραζόμενη πρωτεΐνη GFP παραμένει σταθερή έως και 24 ώρες μετά τη δράση του κυκλοεξιμιδίου, συγκριτικά με τις Dyrk1B και κυκλίνη D1.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, όλα τα λειτουργικά πειράματα που ακολούθησαν στα Neuro-2a κύτταρα, πραγματοποιήθηκαν 16 ώρες μετά τον παροδικό μετασηματισμό τους, οπότε και η κινάση Dyrk1B εμφάνιζε το μέγιστο της έκφρασής της. Σε αυτό το χρονικό σημείο και σε συμφωνία με την επαγόμενη από την Dyrk1B μείωση των επιπέδων της κυκλίνης D1, η ενσωμάτωση της 5-βρωμο-2-δεοξυ-ουριδίνης (BrdU) στα παροδικά μετασηματισμένα με Dyrk1B Neuro-2a κύτταρα, μειώθηκε κατά 8,4 φορές σε σχέση με τα μη μετασηματισμένα ($4.23 \pm 0.06\%$ BrdU⁺/Dyrk1B⁺ κύτταρα ως προς το σύνολο των Dyrk1B⁺ κυττάρων συγκριτικά με $35.68 \pm 0.04\%$ BrdU⁺/Dyrk1B⁻ κύτταρα ως προς το σύνολο των Dyrk⁻ κυττάρων, $p=0.00146$, $n=5$) (**Εικ. 3.18**).



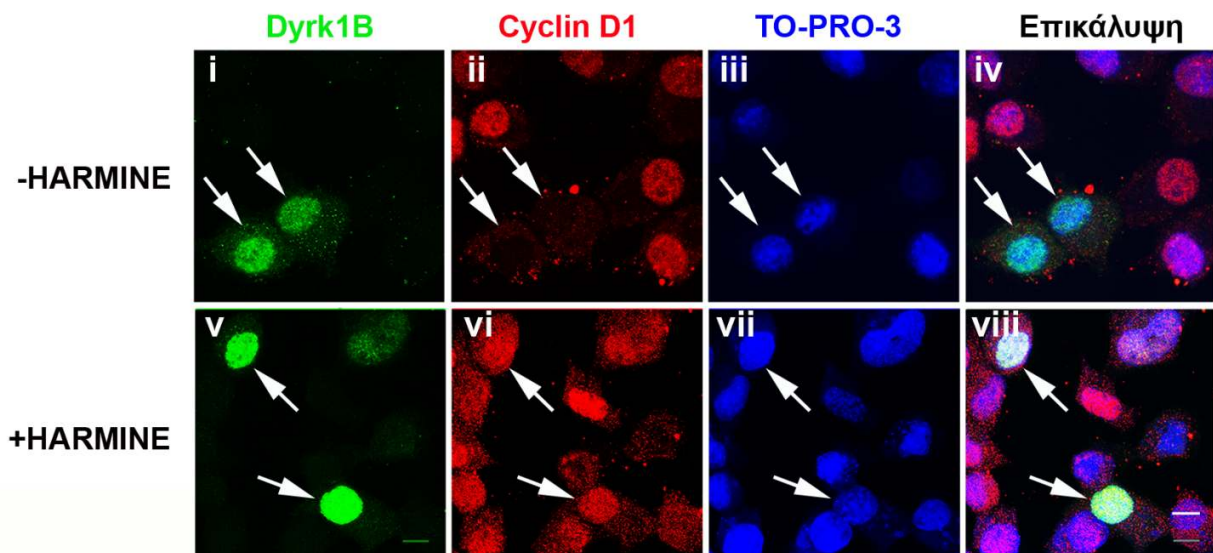
Εικ.3.18 Η έκφραση της κινάσης Dyrk1B ελαττώνει την ενσωμάτωση BrdU σε παροδικά μετασχηματισμένα Dyrk1B-Neuro-2a κύτταρα στις πρώτες 16 ώρες της έκφρασής της. Student's t-test: ** $p=0.00146$, $n=5$.

Όπως έχει αναφερθεί η φωσφορυλίωση της κυκλίνης D1 στη θρεονίνη T288 από την κινάση Mirk/Dyrk1B, στην κυτταρική σειρά επιθηλίων πνεύμονα (Mv1Lu) επάγει την αποικοδόμησή της μέσω πρωτεασώματος (Zou et al. 2004). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί πως κάτι παρόμοιο συμβαίνει και στα Neuro-2a κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε ένας υψηλής συγγένειας αναστολέας για την οικογένεια των Dyrk κινασών, η χαρμίνη (Frost D. et al., 2011). Τα Neuro-2a κύτταρα μετασχηματίστηκαν παροδικά με το cDNA της Dyrk1B και αφού αφαιρέθηκε το μίγμα του μετασχηματισμού, προστέθηκε στο υλικό της καλλιέργειας η χαρμίνη σε τελική συγκέντρωση 10 μ M. 16 ώρες μετά και αφού η Dyrk1B είχε εκφραστεί στο μέγιστό της, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε ανοσοαποτύπωμα καθώς και ανοσοκυτταροχημεία/ανοσοφθορισμός. Παρατηρήθηκε πως η χαρμίνη μπορούσε ν' αναστείλει αποτελεσματικά την ενεργότητα της Dyrk1B, καθώς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1 παρέμεναν σταθερά στο ανοσοαποτύπωμα (**Εικ. 3.19A**). Η ειδικότητα της δράσης της χαρμίνης επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι καμία διαφορά δεν υπήρξε στα μη μετασχηματισμένα κύτταρα-μάρτυρες απουσία ή παρουσία του αναστολέα, ενώ και στις δύο συνθήκες τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Dyrk1B παρέμειναν ανεπηρέαστα (**Εικ. 3.19 A,B**).



Εικ.3.19 (Α) Ανοσοαποτύπωμα κατά western στο οποίο επιβεβαιώνεται πως η εξαρτώμενη από την Dyrk1B μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κυκλίνης D1 (αριστερή κολώνα), αναστέλλεται από τη χαρμίνη (δεξιά κολώνα). **(Β)** Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Dyrk1B, τα οποία απουσία ή παρουσία χαρμίνης παραμένουν ανεπηρέαστα.

Τα δεδομένα αυτά υποστηρίχθηκαν περαιτέρω με πειράματα ανοσοκυτταροχημείας/ ανοσοφθορισμού και εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας, όπου διαπιστώθηκε πως στα παροδικά μετασχηματισμένα με Dyrk1B κύτταρα παρουσία χαρμίνης, η κυκλίνη D1 παρέμενε σταθερά στον πυρήνα, ενώ απουσία αυτής εξαφανιζόταν (**Εικ. 3.20**). Συμπερασματικά, η κινάση Dyrk1B στοχεύει την κυκλίνη D1, πυροδοτώντας την κυτταροπλασματική της μετατόπιση και την αποικοδόμησή της μέσω του πρωτεασώματος.

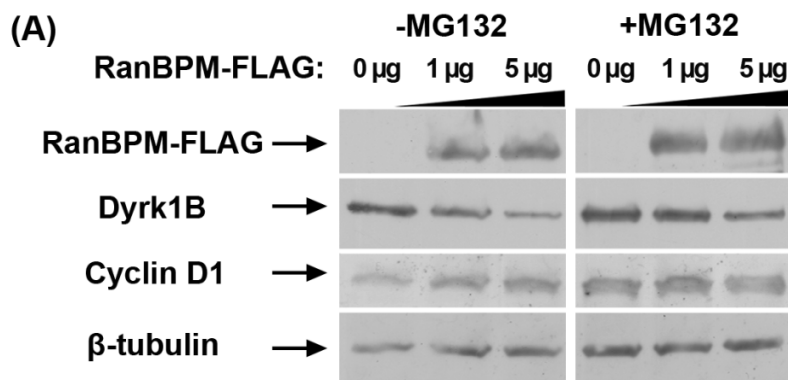


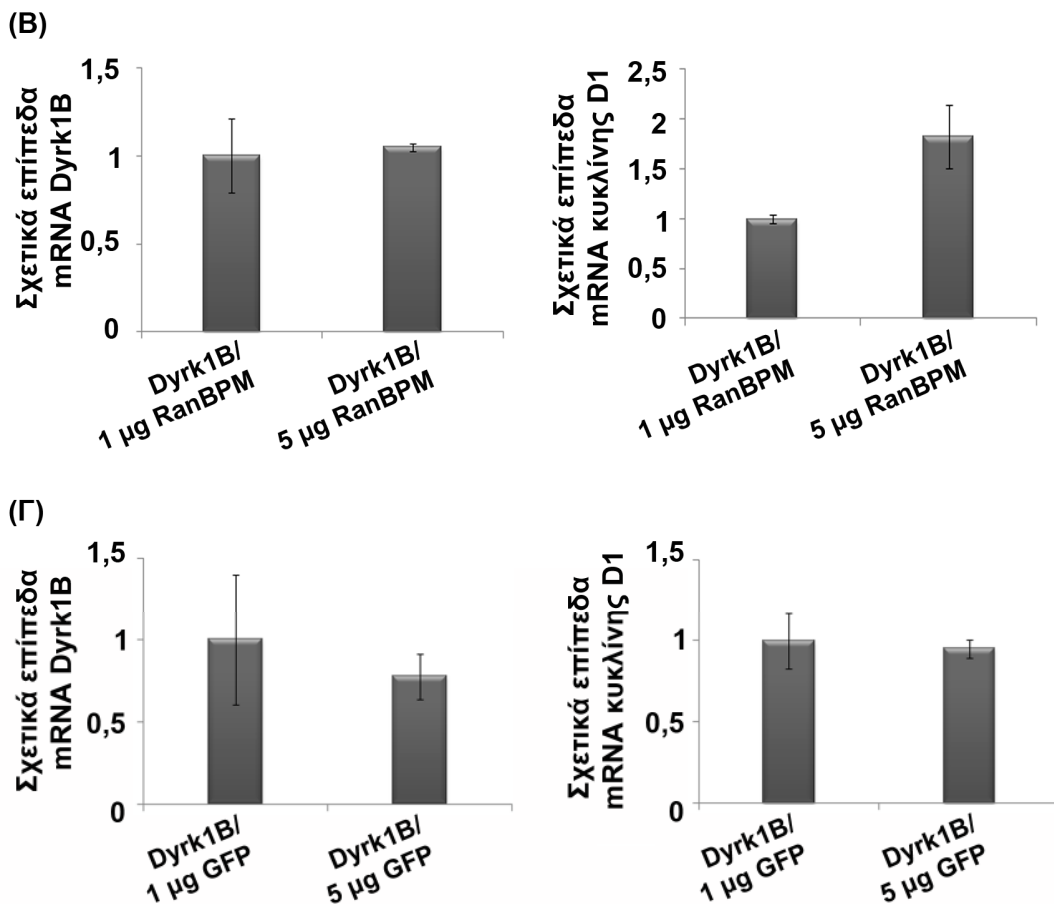
Εικ.3.20 Η κυκλίνη D1 εξαφανίζεται από τον πυρήνα των Dyrk1b+ παροδικά μετασχηματισμένων κυττάρων (βέλη i-iv), αλλά παραμένει παρουσία χαρμίνης (βέλη v-viii). Τα κύτταρα είναι διπλά σημασμένα για Dyrk1B (πράσινο) και κυκλίνη D1 (κόκκινο), ενώ οι πυρήνες σημαίνονται με TO-PRO-3 (μπλε). Κλίμακα: 8μm.

3.5 Η RanBPM διευκολύνει την αποικοδόμηση της Dyrk1B μέσω πρωτεασώματος, σταθεροποιώντας την κυκλίνη D1.

Όπως έχει αναφερθεί και βιβλιογραφικά, η αλληλεπίδραση της RanBPM με την Dyrk1B αναστέλλει την ενεργότητα της τελευταίας ως προς διάφορα φυσικά της υποστρώματα όπως η MBP (Myelin Basic Protein) ή ο μεταγραφικός παράγοντας HNF1a (Zou et al. 2003). Έχοντας μελετήσει την έκφραση της

Dyrk1B στα Neuro-2a κύτταρα, τη σταθερότητά της αλλά και την επίδραση αυτής στην κυκλίνη D1 και κατά συνέπεια στον κυτταρικό κύκλο, ακολούθησε η αποσαφήνιση της λειτουργικής αλληλεπίδρασης της RanBPM με την Dyrk1B στα Neuro-2a κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν διπλοί μετασχηματισμοί κυττάρων με σταθερή ποσότητα πλασμιδίου Dyrk1B (5μg) και αξανόμενη από το μηδέν ποσότητα πλασμιδίου RanBPM (0, 1, 5μg). Ως μάρτυρες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν αξανόμενες ποσότητες πλασμιδίου που εκφράζει GFP το οποίο αντικατέστησε τη RanBPM σε διπλά μετασχηματισμένα με Dyrk1B κύτταρα. Το πείραμα έλαβε χώρα εις διπλούν, απουσία και παρουσία του αναστολέα MG132, ο οποίος και προστέθηκε στο υλικό της καλλιέργειας 6 ώρες πριν τη συλλογή των κυττάρων. Σε ανοσοαποτύπωμα κατά western που ακολούθησε, διαπιστώθηκε απροσδόκητα πως η RanBPM ενίσχυσε την πρωτεϊνική αποικοδόμηση της Dyrk1B κατά ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, φαινόμενο που αναστράφηκε με τη χρήση του αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 (Εικ. 3.21Α). Επιπρόσθετα, η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Dyrk1B, συνοδεύτηκε από αύξηση των αντίστοιχων επιπέδων της κυκλίνης D1. Παράλληλα, η ποσοτικοποίηση των επιπέδων του mRNA τόσο της Dyrk1B όσο και της κυκλίνης D1, δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές μεταβολές, υποδηλώνοντας πως η δράση της RanBPM στη Dyrk1B και κατ' επέκτασιν στην κυκλίνη D1, λαμβάνει χώρα μετά την μεταγραφή σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Εικ. 3.21Β). Και στην περίπτωση όμως του διπλού μετασχηματισμού με αξανόμενη ποσότητα GFP, τα επίπεδα mRNAs των Dyrk1B και κυκλίνης D1 παρέμειναν πρακτικά αμετάβλητα (Εικ. 3.21Γ).

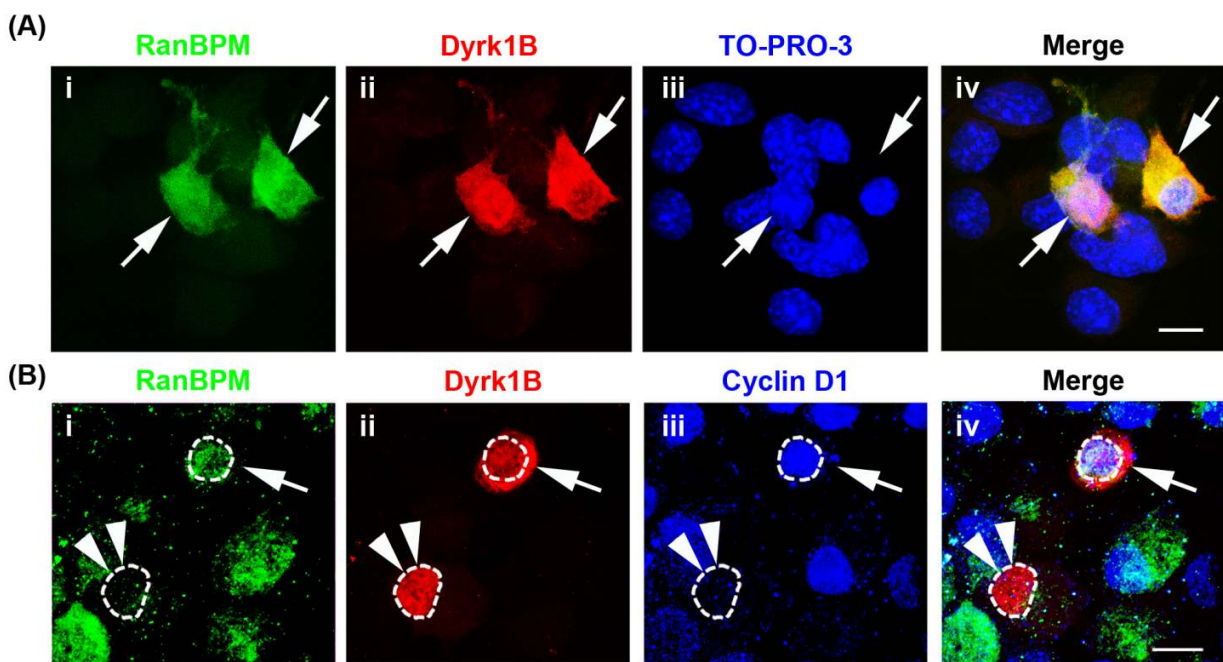




Εικ.3.21 (Α) Ανοσοαποτύπωμα κατά western εκχυλίσματος κυττάρων *Neuro-2a*, παροδικά μετασχηματισμένων με *Dyrk1B* (5 μg πλασμιδίου) και αυξανόμενες ποσότητες *RanBPM* (0,1,5 μg πλασμιδίου αντίστοιχα) απουσία ή παρουσία αναστολέα του πρωτεασώματος (*MG132*). Απουσία του αναστολέα η *RanBPM* οδηγεί την *Dyrk1B* σε αποικοδόμηση κατά ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, ενώ τα επίπεδα της κυκλίνης *D1* αυξάνονται. Όταν το πρωτεάσωμα μπλοκάρεται, παρατηρείται άθροιση της *Dyrk1B*, με σύγχρονη άθροιση και της κυκλίνης *D1* η οποία επίσης αποικοδομείται μέσω του πρωτεασώματος. **(Β)** Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των mRNAs τόσο της *Dyrk1B* όσο και της κυκλίνης *D1* στα διπλά μετασχηματισμένα με *Dyrk1B/RanBPM* *Neuro-2a* κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει πως η δράση της *RanBPM* στη *Dyrk1B* και κατά συνέπεια στην κυκλίνη, είναι μετα-μεταγραφικού τύπου. **(Γ)** Καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα mRNAs των *Dyrk1B* και κυκλίνης *D1* στην περίπτωση των διπλά μετασχηματισμένων κυττάρων με *GFP* αντί της *RanBPM*.

Περαιτέρω μελέτη των διπλά μετασχηματισμένων κυττάρων *RanBPM⁺/Dyrk1B⁺* με ανοσοκυτταροχημεία/ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία, έδειξε πως η *RanBPM* διευκολύνει τη μετατόπιση της *Dyrk1B* από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, 16 ώρες μετά το μετασχηματισμό. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν αυτή η μετατόπιση της κινάσης *Dyrk1B* επηρεάζει

την κυκλίνη D1, πραγματοποιήθηκε τριπλή χρώση για τα δύο εξωγενώς εκφραζόμενα μόρια (Dyrk1B και RanBPM) και την ενδογενή κυκλίνη D1 (**Εικ.3.22**). Στα $RanBPM^+/Dyrk1B^+$ κύτταρα, η Dyrk1B παρουσία της RanBPM φαίνεται να μετατοπίζεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (**Εικ.3.22A**) όπως συμβαίνει όταν η Dyrk1B εκφράζεται μόνη της 48 ώρες μετά τον μετασχηματισμό των κυττάρων, ενώ στα ίδια κύτταρα η κυκλίνη D1 σταθεροποιείται στον πυρήνα (**Εικ.3.22B**, λευκά βέλη). Από την άλλη πλευρά, σε κύτταρα τα οποία εκφράζουν μόνο την κινάση Dyrk1B (πυρηνική), η κυκλίνη D1 εξαφανίζεται από τον πυρήνα (**Εικ.3.21B**, κεφαλές λευκών βελών).

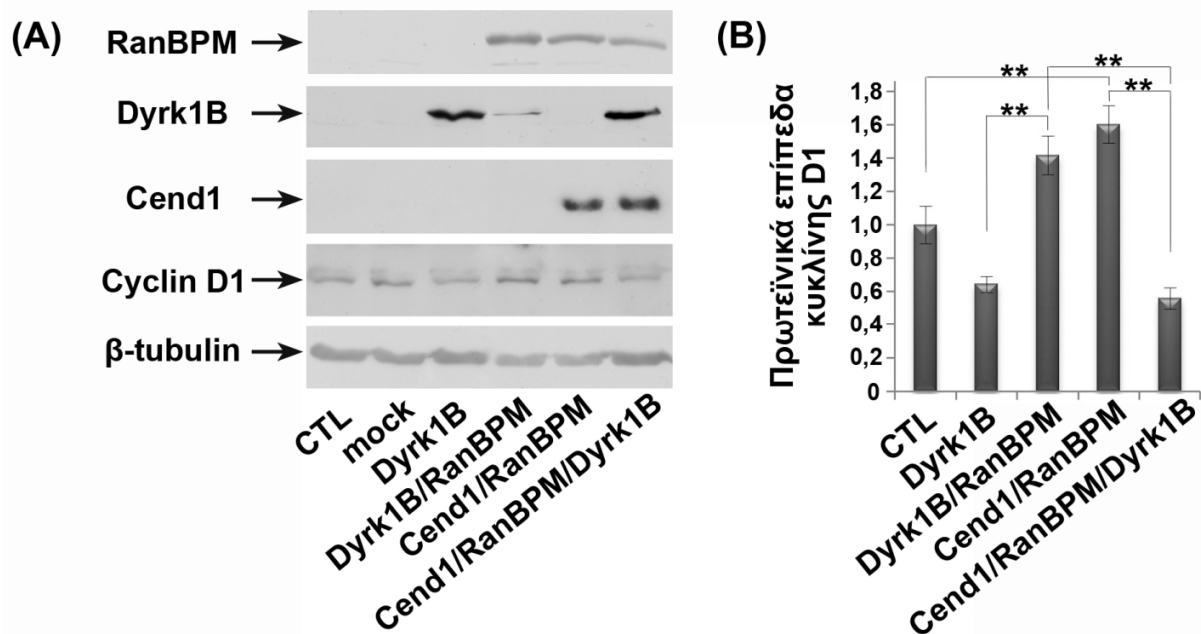


Εικ.3.22 Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης από διπλούς και τριπλούς ανοσοφθορισμούς για τις *RanBPM*, *Dyrk1B*, κυκλίνη *D1*. **(A)** Η *RanBPM* επάγει τη μετατόπιση της *Dyrk1B* από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα στα διπλά μετασχηματισμένα $RanBPM^+/Dyrk1B^+$ κύτταρα. **(B)** Στα κύτταρα αυτά η κυκλίνη *D1* σταθεροποιείται στον πυρήνα (λευκά βέλη), ενώ στα αντίστοιχα που εκφράζουν μόνο *Dyrk1B*, η κυκλίνη δεν ανιχνεύεται στον πυρήνα (B, κεφαλές βελών). Κλίμακα: 8 μm .

Συνεκτιμώντας όλα τα παραπάνω δεδομένα από τις διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις (ανοσοαποτύπωμα κατά western, Real-time RT-qPCR, συνεστιακή μικροσκοπία), θα μπορούσε να υποστηριχτεί πως η *RanBPM* ουδετεροποιεί τη δράση κινάσης της *Dyrk1B* στην κυκλίνη *D1*, επάγοντας τη μετατόπιση της κινάσης στο κυτταρόπλασμα και την αποικοδόμησή της από το 26S πρωτεάσωμα. Η κυκλίνη συνεπώς, παραμένει ανεπηρέαστη στον πυρήνα του κυττάρου συμμετέχοντας στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσω της μετάβασης G1/S.

3.6 Οι λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Cend1, RanBPM και Dyrk1B επηρεάζουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1.

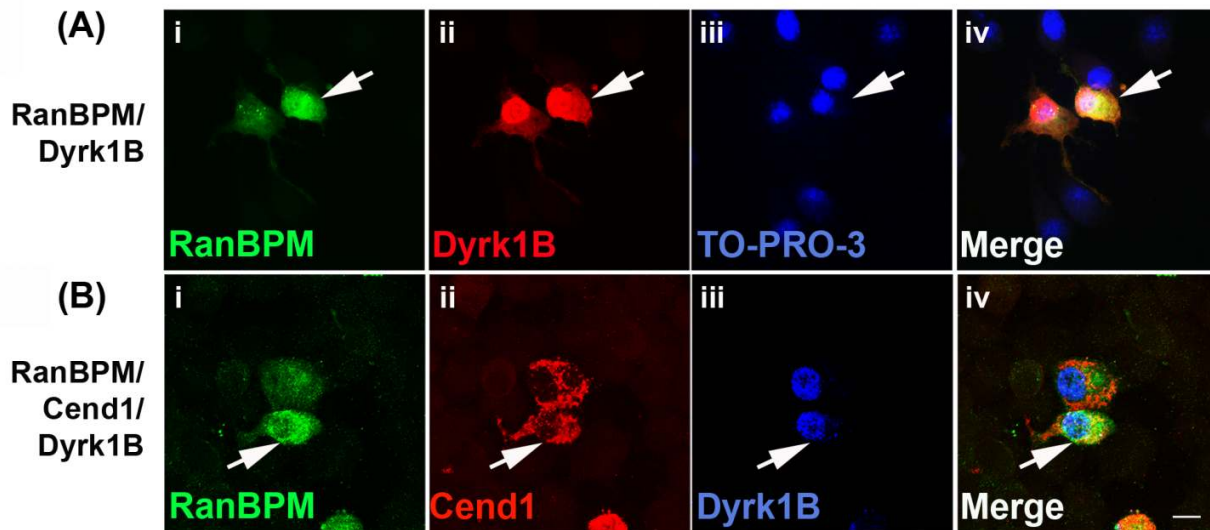
Προκειμένου να μελετηθεί η συνεργιστική δράση και των τριών υπό εξέταση μορίων (Cend1, RanBPM και Dyrk1B) στην κυκλίνη D1 και κατ'επέκταση στον κυτταρικό κύκλο, πραγματοποιήθηκε ο τριπλός μετασχηματισμός των Neuro-2a κυττάρων με τα αντίστοιχα πλασμίδια έκφρασης και 16 ώρες μετά τον μετασχηματισμό, το εκχύλισμά τους αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωμα. Επειδή το ποσοστό του παροδικού μετασχηματισμού των Neuro-2a κυττάρων δεν ξεπερνά το 20-30% του συνολικού πληθυσμού, ενώ τα επίπεδα της ενδογενούς κυκλίνης D1 που εξετάστηκαν αναφέρονται σε όλο τον πληθυσμό των κυττάρων, τα αποτελέσματα που αφορούν τη δράση των εξωγενώς εκφρασμένων πρωτεϊνών Cend1, RanBPM και Dyrk1B πάνω στην κυκλίνη D1 μπορεί να είναι υπό-εκτιμημένα. Όπως έχει ήδη παρατηρηθεί, στα διπλά μετασχηματισμένα με τη RanBPM κύτταρα (Dyrk1B/RanBPM ή Cend1/RanBPM) τα επίπεδα της κυκλίνης D1 αυξάνονται σημαντικά σε σχέση είτε με τα μονά μετασχηματισμένα (Dyrk1B ή Cend1), είτε με τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα-μάρτυρες (**Εικ. 3.23 A,B**). Κατόπιν ποσοτικοποίησης, η κυκλίνη D1, εμφανίστηκε αυξημένη στα διπλά μετασχηματισμένα Dyrk1B/RanBPM κύτταρα κατά 2,2 φορές συγκριτικά με τα μονά Dyrk1B μετασχηματισμένα κύτταρα και κατά 1,4 φορές συγκριτικά με τα μη μετασχηματισμένα Neuro-2a (**Εικ. 3.23 B**). Από την άλλη πλευρά, στην περίπτωση των τριπλά μετασχηματισμένων κυττάρων (Cend1/RanBPM/Dyrk1B), η κυκλίνη D1 ελαττώνεται στα επίπεδα των μονών μετασχηματισμένων με Dyrk1B κυττάρων (**Εικ. 3.23 A,B**), χωρίς όμως να μεταβληθούν τα επίπεδα της Dyrk1B, όπως ήταν άλλωστε αναμενόμενο. Σημειώνεται πως σε κάθε περίπτωση, οι παρατηρούμενες μεταβολές αναφέρονται στα συνολικά πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1 και όχι στη φωσφορυλιωμένη ή μη μορφή της. Το διαθέσιμο ειδικό αντίσωμα του εμπορίου αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη κυκλίνη D1 στην T286 και όχι στην T288 όπου και φωσφορυλιώνεται από την Dyrk1B, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η ανίχνευσή της.



Εικ.3.23 Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των *Cend1-RanBPM-Dyrk1B*, επηρεάζουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης *D1*. **(A)** Μονοί, διπλοί και τριπλοί μετασχηματισμοί με τα πλασμίδια των *Cend1-RanBPM-Dyrk1B* πραγματοποιήθηκαν σε *Neuro-2a* κύτταρα. 16 ώρες μετά το μετασχηματισμό, το κυτταρικό εκχύλισμα απομονώθηκε και ακολούθησε ανοσοαποτύπωμα κατά western, με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. **(B)** Για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κυκλίνης *D1* σε σχέση με τη β-τουμπουλίνη, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό *ImageJ* (**Student's *t*-test, $p < 0.01$, $n = 10$). Είναι εμφανής η αύξηση της κυκλίνης *D1* στα διπλά μετασχηματισμένα με *RanBPM* κύτταρα συγκριτικά με τα μονά με *Dyrk1B*, ενώ στα τριπλά μετασχηματισμένα η κυκλίνη μειώνεται στα επίπεδα των μονών μετασχηματισμένων με *Dyrk1B*. CTL: μη μετασχηματισμένα κύτταρα, *mock*: κύτταρα με πλασμίδιο άνευ κωδικής περιοχής.

Τα δεδομένα αυτά, υποστηρίζουν πως όταν η *Cend1*, η *Dyrk1B* και η *RanBPM* συν-εκφράζονται στα *Neuro-2a*, η ικανότητα της *RanBPM* να σταθεροποιεί την κυκλίνη *D1* ελαττώνεται. Μία πιθανή εξήγηση είναι πως η *Cend1* ανταγωνίζεται την *Dyrk1B* ως προς τη δέσμευσή της στην *RanBPM*, με αποτέλεσμα η κινάση *Dyrk1B* να παραμένει στον πυρήνα και να φωσφορυλιώνει την κυκλίνη *D1* επάγοντας την αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα (Zou et al. 2004). Προκειμένου να διερευνηθεί ένα τέτοιο ενδεχόμενο, παρατηρήθηκε η τοπολογία της *Dyrk1B* με ανοσοκυτταροχημεία/ανοσοφθορισμό στα διπλά μετασχηματισμένα με *Dyrk1B/RanBPM* και τριπλά μετασχηματισμένα με *Dyrk1B/RanBPM/Cend1* *Neuro-2a* κύτταρα. Πράγματι, από εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας δείχθηκε πως στα διπλά μετασχηματισμένα κύτταρα, η παρουσία της *RanBPM* διευκολύνει τη μετατόπιση της *Dyrk1B* από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Εικ. 3.24A). Αντίθετα, όταν τα *Neuro-2a* συν-εκφράζουν και τις τρεις πρωτεΐνες (*Dyrk1B/RanBPM/Cend1*), η

κινάση Dyrk1B ανιχνεύεται στον πυρήνα των κυττάρων 16 ώρες (Εικ. 3.24B), αλλά ακόμα και 48 ώρες μετά το μετασχηματισμό τους (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως η παρουσία της Cend1 σταθεροποιεί και διασώζει την Dyrk1B από τη δράση της RanBPM διατηρώντας την στον πυρήνα (Εικ. 3.24B).



Εικ.3.24 Διπλοί και τριπλοί ανοσοφθορισμοί μετασχηματισμένων *Neuro-2a* κυττάρων με *Dyrk1B* και *RanBPM* ή με *Dyrk1B*, *RanBPM* και *Cend1* αντίστοιχα. **(A)** Στα διπλά μετασχηματισμένα κύτταρα, η *RanBPM* (πράσινο) διευκολύνει τη μετατόπιση της *Dyrk1B* (κόκκινο) στο κυτταρόπλασμα ενώ στα τριπλά μετασχηματισμένα **(B)** η παρουσία της *Cend1* (κόκκινο) σταθεροποιεί την *Dyrk1B* κινάση (μπλε) στον πυρήνα στις 16 ώρες μετά τον παροδικό μετασχηματισμό των *Neuro-2a* κυττάρων.

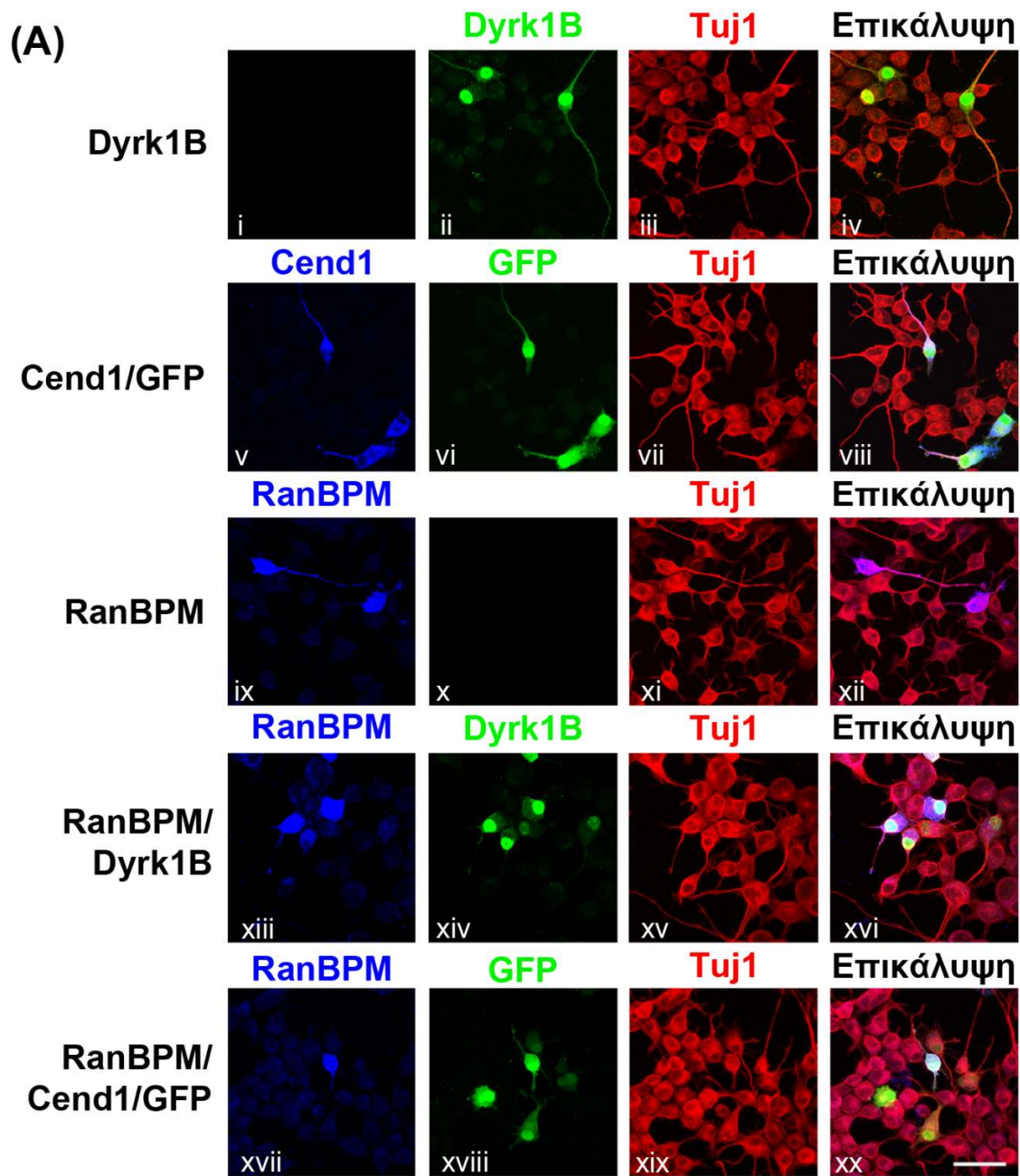
3.7 Οι αλληλεπιδράσεις της *RanBPM* είτε με την *Dyrk1B* είτε με τη *Cend1*, επηρεάζουν τη διαφοροποίηση των *Neuro-2a* κυττάρων.

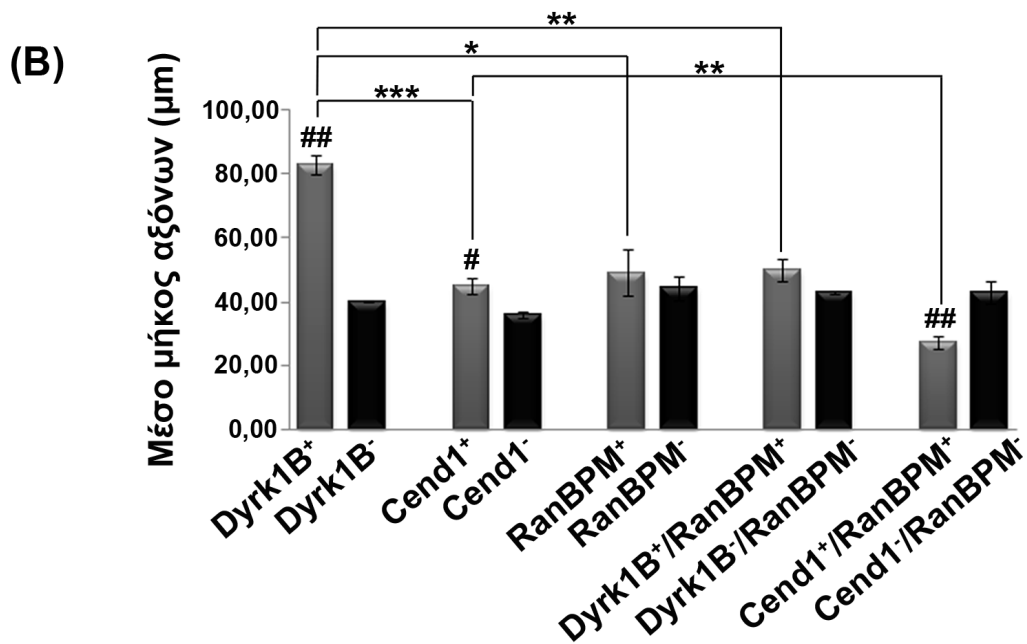
Καθώς η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου και η έξοδος από αυτόν είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την κυτταρική διαφοροποίηση, η δέσμευση της *RanBPM* είτε στην *Dyrk1B* είτε στη *Cend1*, θα μπορούσε ενδεχομένως να επιδράσει στη διαφοροποίηση των *Neuro-2a* κυττάρων. Προκειμένου να εξεταστεί ένα τέτοιο ενδεχόμενο, μετασχηματίστηκαν παροδικά τα *Neuro-2a* κύτταρα: α) με το πλασμίδιο που εκφράζει την *Dyrk1B*, β) με το πλασμίδιο pCAG-*Cend1*-IRES-GFP που εκφράζει συγχρόνως τη *Cend1* και τη GFP, γ) με τα πλασμίδια που εκφράζουν την *Dyrk1B* και τη *RanBPM* (διπλός μετασχηματισμός), δ) με τα πλασμίδια που εκφράζουν τη *Cend1*-GFP και τη *RanBPM* (διπλός

μετασχηματισμός). 16 ώρες μετά το μετασχηματισμό και αφού οι πρωτεΐνες είχαν παραχθεί, προστέθηκαν στην καλλιέργεια 20 μM ρετινοϊκού οξέος (RA) σε υλικό που περιείχε 2% ορρό (FCS), ώστε τα κύτταρα να κατευθυνθούν προς διαφοροποίηση. 48 ώρες μετά τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και με ανοσοφθορισμό ανιχνεύθηκαν τα μόρια Cend1, Dyrk1B, RanBPM καθώς και ο μάρτυρας νευρωνικής διαφοροποίησης β III-σωληνίνη (β III-tubulin, Tuj1) (**Εικ. 3.25A**).

Σε δύο ανεξάρτητα πειράματα παρατηρήθηκε πως στα μονά μετασχηματισμένα με Dyrk1B κύτταρα, το ποσοστό το κυττάρων που εκφράζουν Dyrk1B (Dyrk1B^+) και έχουν διαφοροποιηθεί είναι 68% ενώ στα διπλά μετασχηματισμένα $\text{Dyrk1B}^+/\text{RanBPM}^+$ κύτταρα το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 38% (μείωση >40%). Στην περίπτωση των μονά μετασχηματισμένων με Cend1, το ποσοστό διαφοροποίησης των Cend1+ κυττάρων ήταν $59,5 \pm 2,6\%$ και μειωνόταν στο $30,2 \pm 2,2\%$ στα διπλά μετασχηματισμένα $\text{Cend1}^+/\text{RanBPM}^+$ κύτταρα ($n=3$, $p=0,00097$) (~50% μείωση).

Στη συνέχεια, ακολούθησε η εκτίμηση του μέσου μήκους των νευριτών τόσο στους μετασχηματισμένους όσο και στους μη μετασχηματισμένους πληθυσμούς κυττάρων (**Εικ. 3.25B**). Διαπιστώθηκε πως το μέσο μήκος των νευριτών στην περίπτωση των μονά μετασχηματισμένων Dyrk1B^+ κυττάρων, ήταν σημαντικά υψηλότερο από το αντίστοιχο των μη μετασχηματισμένων ($83.21 \pm 2.99 \mu\text{m}$ συγκριτικά με $40.14 \pm 0.17 \mu\text{m}$, $n=3$, $p= 0.00481$). Παράλληλα, μία μικρότερη αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στο μήκος των νευριτών των μονά μετασχηματισμένων Cend1^+ κυττάρων σε σχέση με το αντίστοιχο των μη μετασχηματισμένων ($44.97 \pm 2.59 \mu\text{m}$ συγκριτικά με $36.23 \pm 0.94 \mu\text{m}$, $n=3$, $p= 0.05$), ενώ δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των μονά μετασχηματισμένων με RanBPM^+ κυττάρων και των κυττάρων-μαρτύρων ($p= 49.18 \pm 7.28 \mu\text{m}$ συγκριτικά με $44.31 \pm 3.74 \mu\text{m}$, $n=3$, $p= 0.59332$). Αξίζει να σημειωθεί πως τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα-μάρτυρες, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των διαφορετικών εξεταζόμενων ομάδων. Όσον αφορά στα διπλά μετασχηματισμένα κύτταρα $\text{Dyrk1B}^+/\text{RanBPM}^+$, διαπιστώθηκε μία δραματική μείωση του μήκους των νευριτών σε σχέση με το αντίστοιχο εκείνων των μονά μετασχηματισμένων Dyrk1B^+ ($83.21 \pm 2.99 \mu\text{m}$ στα Dyrk1B^+ κύτταρα συγκριτικά με $50.03 \pm 3.28 \mu\text{m}$ στα $\text{Dyrk1B}^+/\text{RanBPM}^+$ κύτταρα, $n=3$, $p= 0.00171$). Ομοίως και τα διπλά μετασχηματισμένα $\text{Cend1}^+/\text{RanBPM}^+$ κύτταρα, εμφάνισαν σημαντική μείωση στο μήκος των αξόνων τους συγκρινόμενα με τα μονά Cend1^+ κύτταρα ($44.97 \pm 2.59 \mu\text{m}$ στα Cend1^+ συγκριτικά με $27.11 \pm 2.19 \mu\text{m}$ στα $\text{Cend1}^+/\text{RanBPM}^+$, $n=3$, $p= 0.00628$). Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν τη θετική δράση τόσο της Dyrk1B όσο και της Cend1 στη διαφοροποίηση των Neuro-2a κυττάρων, ενώ το φαινόμενο αυτό ανστρέφεται κατόπιν αλληλεπίδρασης καθενός μορίου ξεχωριστά με τη RanBPM.



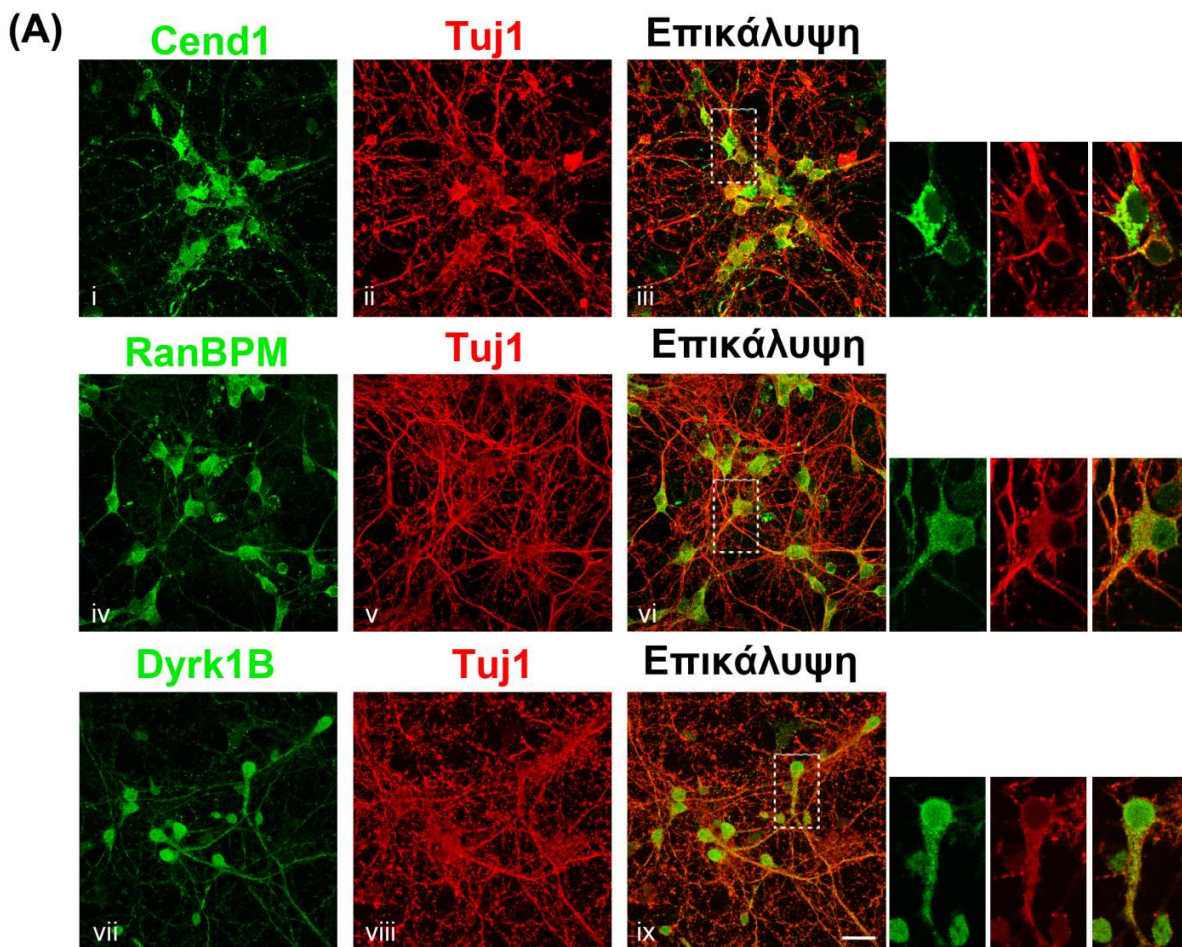


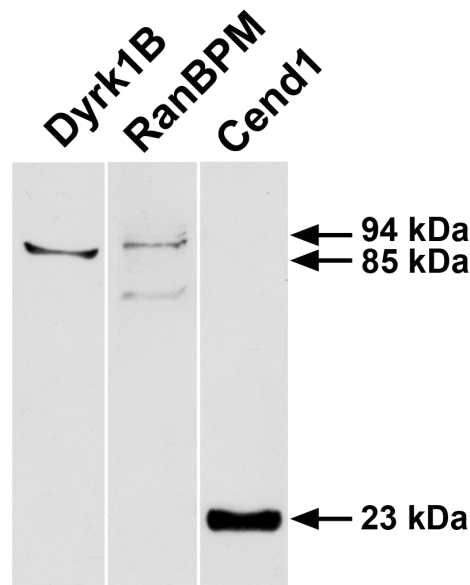
Εικ.3.25 Η αλληλεπίδραση της RanBPM είτε με την Dyrk1B είτε με τη Cend1, επηρεάζει αρνητικά τη διαφοροποίηση των *Neuro-2a* κυττάρων. (A) Μονά και διπλά παροδικά μετασχηματισμένα κύτταρα με Cend1-GFP, RanBPM, Dyrk1B όπου φαίνεται η αρνητική δράση της RanBPM στην κυτταρική διαφοροποίηση όταν αλληλεπιδρά με την Dyrk1B (xiii-xvi συγκριτικά με i-iv) ή τη Cend1 (xvii-xx συγκριτικά με v-viii). Ως μάρτυρας της νευρωνικής διαφοροποίησης έχει επιλεγεί η βIII-τουμπουλίνη (κόκκινο). Η συνέκφραση της Cend1 με την GFP από το ίδιο πλασμίδιο, διευκολύνει την ανίχνευση των Cend1 θετικών κυττάρων. Κλίμακα: 40 μm. (B) Ποσοτικοποίηση του μέσου μήκους των αξόνων στα μονά και διπλά μετασχηματισμένα κύτταρα, καθώς και σε μη μετασχηματισμένα κύτταρα-μάρτυρες. #: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μετασχηματισμένων και μη μετασχηματισμένων κυττάρων της ίδιας ομάδας *: στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μετασχηματισμένων κυττάρων διαφορετικών ομάδων. Η σύγκριση μεταξύ διαφορετικών ομάδων πραγματοποιείται στατιστικά με «Ανάλυση διακύμανσης μιας διαδρομής» (one-way ANOVA) ακολουθούμενη από Student's t-test: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 3$.

3.8 Οι πρωτεΐνες Cend1, RanBPM και Dyrk1B εκφράζονται ενδογενώς σε πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιικών νευρώνων ποντικού.

Οι λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τριών πρωτεϊνών (Cend1, RanBPM και Dyrk1B) και ο πιθανός τους ρόλος στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τη νευρωνική διαφοροποίηση, μελετήθηκαν, έως ένα βαθμό, *in vitro* στο κυτταρικό σύστημα του νευροβλαστώματος ποντικού (*Neuro-2a*). Προκειμένου να εξεταστεί εάν τα ευρήματα της παραπάνω μελέτης, αποκτούν κάποια σημασία *in vivo* ως προς τη φυσιολογία των νευρώνων, πραγματοποιήθηκε σ' ένα πρώτο στάδιο η καλλιέργεια νευρώνων από φλοιό εμβρύων ποντικών ηλικίας E16.5. Οι φλοιικοί νευρώνες, καλλιεργήθηκαν για 8 ημέρες *in vitro* και ακολούθησαν διπλοί ανοσοφθορισμοί (για καθένα από τα

υπό εξέταση μόρια μαζί με το μάρτυρα νευρωνικής διαφοροποίησης βIII-τουμπουλίνη) και συνεστιακή μικροσκοπία (Εικ. 3.26A). Σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις στα Neuro-2a κύτταρα, η πρωτεΐνη Cend1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ενώ η RanBPM, αν και κυρίως κυτταροπλασματική, ανιχνεύεται και στον πυρήνα των νευρώνων. Από την άλλη πλευρά, η κινάση Dyrk1B είναι πρωτίστως πυρηνική και σε μικρότερο βαθμό κυτταροπλασματική. Η ανίχνευση των τριών πρωτεϊνών στους φλοιικούς νευρώνες πραγματοποιήθηκε και με ανοσοαποτύπωμα κατά western (Εικ. 3.26B).



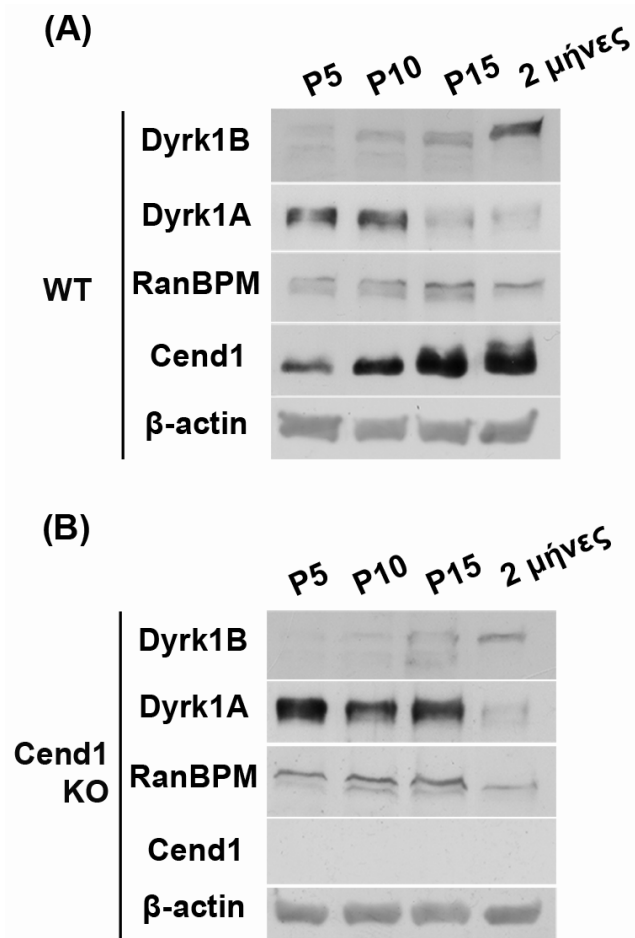


Εικ.3.26 Εμβρυικοί φλοιικοί νευρώνες σε καλλιέργεια εκφράζουν *Cend1*, *RanBPM* και *Dyrk1B*. **(A)** Ανοσοφθορισμός και ανάλυση με συνεστιακή μικροσκοπία εμβρυικών φλοιικών νευρώνων E16.5, σε καλλιέργεια 8 ημερών *in vitro*. Οι νευρώνες σημάνθηκαν για τις *Cend1*, *RanBPM* και *Dyrk1B* (πράσινο), σε συνδυασμό με το μάρτυρα νευρωνικής διαφοροποίησης βIII-τουμπουλίνη (*Tuj1*). Δεξιά των εικόνων που δείχνουν την επικάλυψη των ανιχνευόμενων μορίων, παρατίθεται σε μεγέθυνση η περιοχή που εσωκλείεται στο λευκό πλαίσιο με τις διακεκομμένες γραμμές. Κλίμακα: 20 μm . **(B)** Ανοσοαποτύπωμα κατά western σε κυτταρικό εκχύλισμα εμβρυικών φλοιικών νευρώνων (E16.5), όπου επιβεβαιώνεται η έκφραση των τριών υπό εξέταση πρωτεϊνών.

3.9 Μελέτη της έκφρασης των *Cend1*, *RanBPM* και *Dyrk1B* σε εγκεφάλους ποντικών αγρίου τύπου (wt) και ποντικών με κατεσταλμένο το γονίδιο της *Cend1* (KO-*Cend1*).

Όπως έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά, διαγονιδιακοί ποντικοί του στελέχους C57BL/6J, στους οποίους έχει απαλειφθεί το γονίδιο *bm88/cend1* (KO-*Cend1*), εμφανίζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό των πρόδρομων κοκκιωδών κυττάρων της παρεγκεφαλίδας (συνοδευόμενο από υψηλά επίπεδα της κυκλίνης D1), καθώς και προβληματική διαφοροποίηση των κυττάρων Purkinje (Sergaki, Guillemot, and Matsas 2010). Σε ένα τελευταίο στάδιο της παρούσας μελέτης, επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένοι ποντικοί προκειμένου να εξεταστούν συγκριτικά με τους αντίστοιχους αγρίου τύπου (wt), ως προς την έκφραση των *Cend1*, *RanBPM* και *Dyrk1B*, σε διάφορα ηλικιακά στάδια μετά τη γέννηση. Πρωτεϊνικά ομογενοποιήματα από εγκεφάλους ποντικών wt και KO-*Cend1*, ηλικίας P5, P10, P15 και 2 μηνών, παρασκευάστηκαν και υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες και ανάλυση κατά western. Με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων, διαπιστώθηκε πως στους ποντικούς αγρίου

τύπου (wt), η έκφραση των Cend1 και Dyrk1B πρωτεϊνών αυξάνεται με την ηλικία, άρα και όσο προχωρά η νευρωνική διαφοροποίηση, ενώ εκείνη της RanBPM δεν παρουσίαζε σημαντικές μεταβολές (Εικ. 3.27A). Αντίθετα, η κινάση Dyrk1A που αποτελεί το νευροειδικό μέλος της οικογένειας των Dyrk κινασών, φαίνεται να εκφράζεται πρωτίστως στον εμβρυϊκό εγκέφαλο (δεδομένα που δεν παρατίθενται) και έως τις πρώτες 10 ημέρες μετά τη γέννηση, ενώ στη συνέχεια η έκφρασή της φθίνει σημαντικά. Όσον αφορά στους ποντικούς KO-Cend1, η έκφραση της Dyrk1B παρουσιάζεται μειωμένη συγκριτικά με τους wt, ιδίως 2 μήνες μετά τη γέννηση, με σύγχρονη ενίσχυση της έκφρασης της Dyrk1A, η οποία παραμένει σταθερά έντονη μέχρι και 15 ημέρες μετά τη γέννηση (Εικ. 3.27B). Σημαντικές μεταβολές της RanBPM δεν σημειώνονται ούτε στην περίπτωση των KO-Cend1 ποντικών. Βάσει λοιπόν των παραπάνω δεδομένων, διαφαίνεται μία συνεισφορά της Cend1 στη διατήρηση των επιπέδων της κινάσης Dyrk1B, ενώ μία πιθανή αντισταθμιστική δράση της Dyrk1A ως προς την Dyrk1B, ιδιαίτερα στα πρώτα ηλικιακά στάδια μετά τη γέννηση και ιδίως στην ηλικία P15 στα KO-Cend1 ποντίκια, θα μπορούσε επίσης να προταθεί.



Εικ.3.27 (A, B) Αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης των μορίων *Cend1*, *RanBPM*, *Dyrk1B* σε εγκεφάλους ποντικών αγρίου τύπου (*wt*) και ποντικών στους οποίους έχει απαλοιφθεί το γονίδιο της *Cend1* (*KO-Cend1*), σε διάφορες ηλικίες μετά τη γέννηση. Με ανοσοαποτύπωμα κατά *western* και τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων, ανιχνεύεται η έκφραση των υπό εξέταση πρωτεϊνών σε ομογενοποιημένα εγκεφάλων διαφόρων ηλικιών μετά τη γέννηση.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ρύθμιση της εξόδου των πρόδρομων νευρωνικών κυττάρων απ' τον κυτταρικό κύκλο, θεωρείται κρίσιμη για την επακόλουθη διαφοροποίησή τους και τη δημιουργία πληθυσμών ώριμων νευρώνων στον κατάλληλο τόπο και χρόνο. Η πρωτεΐνη BM88/Cend1 που ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε πρόδρομα κύτταρα νευρωνικής γενεαλογίας ενώ αυξάνεται στους διαφοροποιημένους νευρώνες κι έχει δειχθεί *in vitro* και *in vivo* ότι σηματοδοτεί την έξοδο των πρόδρομων νευρωνικών κυττάρων απ' τον κυτταρικό κύκλο, ευνοώντας τη διαφοροποίησή τους (Georgopoulou et al. 2006; Katsimpardi et al. 2008; Mamalaki et al. 1995; Politis et al. 2007; Sergaki, Guillemot, and Matsas 2010; Wakabayashi et al. 2010). Βάσει των συγκεκριμένων μελετών, φάνηκε πως η ανασταλτική δράση της BM88/Cend1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σχετίζεται με το σηματοδοτικό μονοπάτι της κυκλίνης D1, η οποία κατέχει κομβικό ρόλο στη μετάβαση G1/S του κυτταρικού κύκλου. Παράλληλα, η συμμετοχή της Cend1 στη νευρωνική διαφοροποίηση συνδυάζεται και με την καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του Notch και την ενεργοποίηση προνευρικών γονιδίων. Εντούτοις, ο ακριβής μηχανισμός δράσης της BM88/Cend1 παρέμενε άγνωστος, καθώς δεν είχαν προσδιοριστεί οι άμεσες αλληλεπιδράσεις της με άλλες πρωτεΐνες, που θα διαλεύκαναν το σηματοδοτικό της μονοπάτι.

Σκοπός της παρούσας διατριβής, ήταν η ταυτοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν άμεσα με την BM88/Cend1 και η συσχέτισή της με σηματοδοτικά μόρια που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Ήδη, προς την κατεύθυνση αυτή, αποτελέσματα από προκαταρκτικά πειράματα σάρωσης cDNA βιβλιοθήκης έκφρασης εγκεφάλου ποντικού σε σύστημα ζύμης δύο υβριδίων, είχαν αναδείξει την πρωτεΐνη RanBPM ως υποψήφια προς αλληλεπίδραση με τη Cend1. Στα πλαίσια της διατριβής, η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση επιβεβαιώθηκε *in vitro* και μελετήθηκε ο λειτουργικός ρόλος της σε κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού Neuro-2a. Δείχθηκε πως η RanBPM μέσω της πρόσδεσής της αναστρέφει τη δράση της Cend1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1, ενώ και η κινάση σερίνης-θρεονίνης Mirk/Dyrk1B συμμετέχει λειτουργικά στον παραπάνω μηχανισμό. Η κινάση Mirk/Dyrk1B, έχει ταυτοποιηθεί ως πρωτεϊνικός συνεργάτης της RanBPM σε επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα, όπου ρυθμίζει αρνητικά τη δράση της κυκλίνης D1 φωσφορυλιώνοντάς την στη θρεονίνη T288 (Zou et al. 2004). Από την άλλη πλευρά, η RanBPM μέσω

φυσικής αλληλεπίδρασης, αναστέλλει την ενεργότητα κινάσης της Mirk/Dyrk1B έναντι διαφόρων υποστρωμάτων της, όπως ο HNF1α ή η MBP (Zou et al. 2003). Συνεπώς, βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων ο ρόλος των τριών πρωτεϊνών και η συνδυαστική τους δράση, απέκτησαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον αναφορικά με τη μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού της Cend1.

Αρχικά διαπιστώθηκε πως και οι τρεις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν, οι Cend1, RanBPM και Mirk/Dyrk1B, εκφράζονται στον εγκέφαλο του ενήλικου ποντικού καθώς και σε φλοϊκούς νευρώνες εγκεφάλου εμβρύου ποντικού που καλλιεργούνται *in vitro*, ενώ η RanBPM δύναται να σχηματίζει σύμπλοκα τόσο με τη Cend1 όσο και με την Dyrk1B. Ενδιαφέρον ήταν το εύρημα ότι η Dyrk1B μειώνει δραματικά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1, όταν εκφράζεται εξωγενώς στα κύτταρα Neuro-2a, αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και όπως και στην περίπτωση της Cend1, το φαινόμενο αναστρέφεται όταν συνεκφράζεται με τη RanBPM. Όπως δείχθηκε στην παρούσα μελέτη, το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η RanBPM διευκολύνει την αποικοδόμηση της κινάσης Dyrk1B από το 26S πρωτεάσωμα, σταθεροποιώντας έτσι τα επίπεδα της κυκλίνης D1 στον πυρήνα του κυττάρου. Τέλος, δείχθηκε πως η επαγόμενη αποικοδόμηση της κινάσης Dyrk1B από τη RanBPM, αναστέλλεται παρουσία της Cend1, σε τριπλά μετασχηματισμένα κύτταρα Neuro-2a. Βάσει των προαναφερθέντων, προκύπτει μία σειρά λειτουργικών αλληλεπιδράσεων που αφ' ενός ρυθμίζουν τα επίπεδα της κυκλίνης D1 και κατ' επέκταση την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού, αφ' ετέρου επηρεάζουν τη διαδικασία της διαφοροποίησης σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων. Για μία ακόμη φορά επιβεβαιώνεται η στενή σύνδεση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τη νευρωνική διαφοροποίηση, καθώς και η συνδρομή της Cend1 στον έλεγχο της ισορροπίας των δύο διαδικασιών.

Από προγενέστερες μελέτες του εργαστηρίου, έχει δειχθεί πως η Cend1 εκφράζεται εκτενώς στο αναπτυσσόμενο νευροεπιθήλιο των σπονδυλωτών κατά τη νευρογένεση και πως η έκφρασή της στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα του ποντικού και του κοτόπουλου συνδέεται με τη νευρωνική, όχι όμως και με την αστρογλοιακή ή την ολιγοδενδριτική γενεαλογία των προγονικών νευρικών κυττάρων (Koutmani et al. 2004; Politis, Rohrer, and Matsas 2007). Παράλληλα, η έκφρασή της βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα στα πρόδρομα νευρωνικά κύτταρα και σε υψηλότερα επίπεδα στους διαφοροποιημένους νευρώνες, γεγονός που ενισχύει τον ενδεχόμενο ρόλο της στην έξοδο απ' τον κυτταρικό κύκλο και τη διαφοροποίηση. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η εκτοπική έκφραση της Cend1 *in vitro* σε κύτταρα Neuro-2a ή σε νευρικά βλαστικά κύτταρα αλλά και *in vivo* στο νευρικό σωλήνα του κοτόπουλου, παρείχε ενδείξεις πως, πράγματι, η υπερ-έκφραση της Cend1 επάγει την

έξοδο των κυττάρων απ' τον κύκλο, οδηγώντας τα σε νευρωνική διαφοροποίηση (Georgoroulou et al. 2006; Katsimpardi et al. 2008; Makri et al. 2010). Το αντίθετο συμβαίνει με την siRNA σίγαση της Cend1 σε νευρικά προγονικά κύτταρα ή με την απαλοιφή του γονιδίου σε διαγονιδιακά ποντίκια (Cend1^{-/-}) (Katsimpardi et al. 2008; Sergaki, Guillemot, and Matsas 2010). Ειδικότερα, στην περίπτωση των Cend1^{-/-} ποντικών, παρατηρήθηκε αυξημένος πολλαπλασιασμός των πρόδρομων κοκκιωδών κυττάρων της παρεγκεφαλίδας στην εξωτερική βλαστική στιβάδα, με αποτέλεσμα να καθυστερεί η ακτινωτή μετανάστευσή τους καθώς και ελλιπής διαφοροποίηση των κυττάρων Purkinje, φαινόμενα που συνοδεύονταν από προβλήματα στη βάδιση και στο συντονισμό της κίνησης.

Όπως αναφέρθηκε αρχικά, το σηματοδοτικό μονοπάτι p53/cyclin D1/pRb είναι κρίσιμο για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα και συμβάλλει μεταξύ άλλων και στην επιβίωση των νεο-σχηματιζόμενων νευρώνων (Sumrejkanchanakij et al. 2003; Das et al. 2009). Η αύξηση της έκφρασης της Cend1 κατά τη νευρωνική διαφοροποίηση, συνδέεται λειτουργικά με μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κυκλίνης D1 τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Georgoroulou et al. 2006; Katsimpardi et al. 2008; Politis et al. 2007). Στην παρούσα μελέτη, η αλληλεπίδραση της RanBPM με τη Cend1 ήταν επαρκής για να αυξήσει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1 στα κύτταρα Neuro-2a όπου συνεκφοράζονταν οι δύο πρωτεΐνες, συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα μάρτυρες. Το γεγονός μάλιστα πως τα επίπεδα mRNA της κυκλίνης D1 παρέμειναν αμετάβλητα, υποδηλώνει ότι η ρύθμιση γίνεται σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε αύξηση της ενσωμάτωσης της 5-βρωμο-2-δεοξυ-ουριδίνης (BrdU), στα διπλά μετασχηματισμένα Neuro-2a κύτταρα με Cend1 και RanBPM, σε σχέση με τα μονά μετασχηματισμένα αλλά και τα κύτταρα μάρτυρες, χαρακτηριστική της ενίσχυσης του πολλαπλασιασμού τους (Εικ. 3.8, 3.9). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, συνεπάγεται ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ Cend1 και RanBPM σταθεροποιεί την κυκλίνη D1 στον πυρήνα, ώστε να οδηγηθούν τα κύτταρα από την G1 στην S φάση του κύκλου.

Σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας διατριβής, η RanBPM έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες να υπεισέρχεται στην πρόοδο του κύκλου των πρόδρομων νευρωνικών κυττάρων (Chang et al. 2010), καθώς επίσης και να αλληλεπιδρά με τις κινάσες HIPK2 (Homeodomain-interacting protein kinase-2), και Mirk/Dyrk1B, οι οποίες διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Wang, Marion Schneider, et al. 2002; Zou et al. 2003). Από τη στιγμή που η Mirk/Dyrk1B κινάση έχει δειχθεί να στοχεύει άμεσα και να φωσφορυλιώνει την κυκλίνη D1 στη θρεονίνη T288, επάγοντας την αποικοδόμησή της μέσω του πρωτεασώματος (Zou et al. 2004), αποφασίστηκε να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτισή της με τις πρωτεΐνες Cend1 και RanBPM και η

ενδεχόμενη αλληλεπίδραση των τριών μορίων στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τη διαφοροποίηση. Ανάλογη ρύθμιση των επιπέδων της κυκλίνης D1 μέσω της Mirk/Dyrk1B έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα HeLa (Takahashi-Yanaga, Mori et al. 2006), αλλά και στην ανθρώπινη καρκινική σειρά HD6 (Jin, Ewton et al. 2009). Η επαγόμενη από τη Mirk/Dyrk1B φωσφορυλίωση και αποικοδόμηση της κυκλίνης D1, θεωρείται ως εναλλακτικό μονοπάτι ρύθμισης της προόδου του κύκλου σε σχέση με το αντίστοιχο, καλά μελετημένο μονοπάτι της GSK3β, η οποία φωσφορυλιώνει την κυκλίνη D1 στη θρεονίνη T286. Αξίζει να σημειωθεί πως η κινάση Dyrk1B, λόγω της υψηλότερης έκφρασής της στο σκελετικό μυ συγκριτικά με τους υπόλοιπους φυσιολογικούς ιστούς, έχει διερευνηθεί εκτενώς σε κυτταρικά συστήματα μυοβλαστών και άλλων καρκινικών σειρών για τη συμμετοχή της στο μηχανισμό πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησής τους. Στα νευρικά κύτταρα η δράση της Dyrk1B παραμένει άγνωστη, σε αντίθεση με την κινάση Dyrk1A της οποίας η έκφραση στο νευρικό σύστημα είναι σαφώς υψηλότερη και ο ρόλος της στη νευρωνική διαφοροποίηση μελετημένος τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Park et al. 2010; Yabut, Domogauer, and D'Arcangelo 2010). Πιο συγκεκριμένα, στα κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού Neuro-2a η υπερέκφραση της Dyrk1A οδήγησε την κυκλίνη D1 σε έξοδο από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα (Yabut, Domogauer, and D'Arcangelo 2010).

Αντίστοιχα, όπως φάνηκε και στην παρούσα μελέτη, στην ίδια κυτταρική σειρά (Neuro-2a) η εξωγενής έκφραση της Dyrk1B είχε ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της κυκλίνης D1 από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα φαινόμενο άμεσα εξαρτώμενο από την ενεργότητα κινάσης της Dyrk1B. Προς υποστήριξη, όταν η ενεργότητα κινάσης παρεμποδίστηκε με τη χρήση ειδικού αναστολέα της οικογένειας των Dyrk κινασών, τη χαρμίνη, η κυκλίνη D1 παρέμεινε στον πυρήνα (**Εικ. 3.19, 3.20**). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η RanBPM, στα διπλά μετασηματισμένα Dyrk1B⁺/RanBPM⁺ κύτταρα διευκόλυε τη μετατόπιση της Dyrk1B από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και την αποικοδόμησή της από το 26S πρωτεάσωμα, όπως φάνηκε με τη χρήση του αναστολέα MG132 (**Εικ. 3.21**). Ως αποτέλεσμα, η κυκλίνη D1 παρέμεινε άθικτη στον πυρήνα επάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (**Εικ. 3.22**). Τα δεδομένα μας αναφορικά με το ρόλο της RanBPM, βρίσκονται σε συμφωνία με προγενέστερες αναφορές βάσει των οποίων η RanBPM συμβάλλει στη σταθερότητα και το χρόνο ημιζωής άλλων πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας p73 και η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη των θηλαστικών Mgl-1 (Kramer et al. 2005; Suresh et al. 2010). Από την άλλη πλευρά, οι Zou και συνεργάτες σε δική τους μελέτη (Zou et al. 2003) είχαν επισημάνει ότι η RanBPM αναστέλλει την ενεργότητα κινάσης της Dyrk1B

όταν προσδένεται σε αυτήν. Καθώς όμως τα αποτελέσματά τους είχαν προκύψει από βιοχημικές δοκιμασίες ενεργότητας κινάσης με χρήση χημικών GST πρωτεϊνών εκτός κυτταρικού περιβάλλοντος (cell free), δεν είχαν τη δυνατότητα να ελέγξουν σε κυτταρικό επίπεδο την επαγόμενη από τη RanBPM αποικοδόμηση της Dyrk1B μέσω του πρωτεασώματος. Συνεπώς τα ευρήματα, της παρούσας διατριβής συμπληρώνουν τα προαναφερθέντα των Ζου και συνεργατών και αναδεικνύουν το διπλό ρόλο της RanBPM σε κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού όπου, αφ' ενός αναστέλλει την ενεργότητα κινάσης της Dyrk1B και αφ' ετέρου διευκολύνει την αποικοδόμησή της μέσω του πρωτεασώματος.

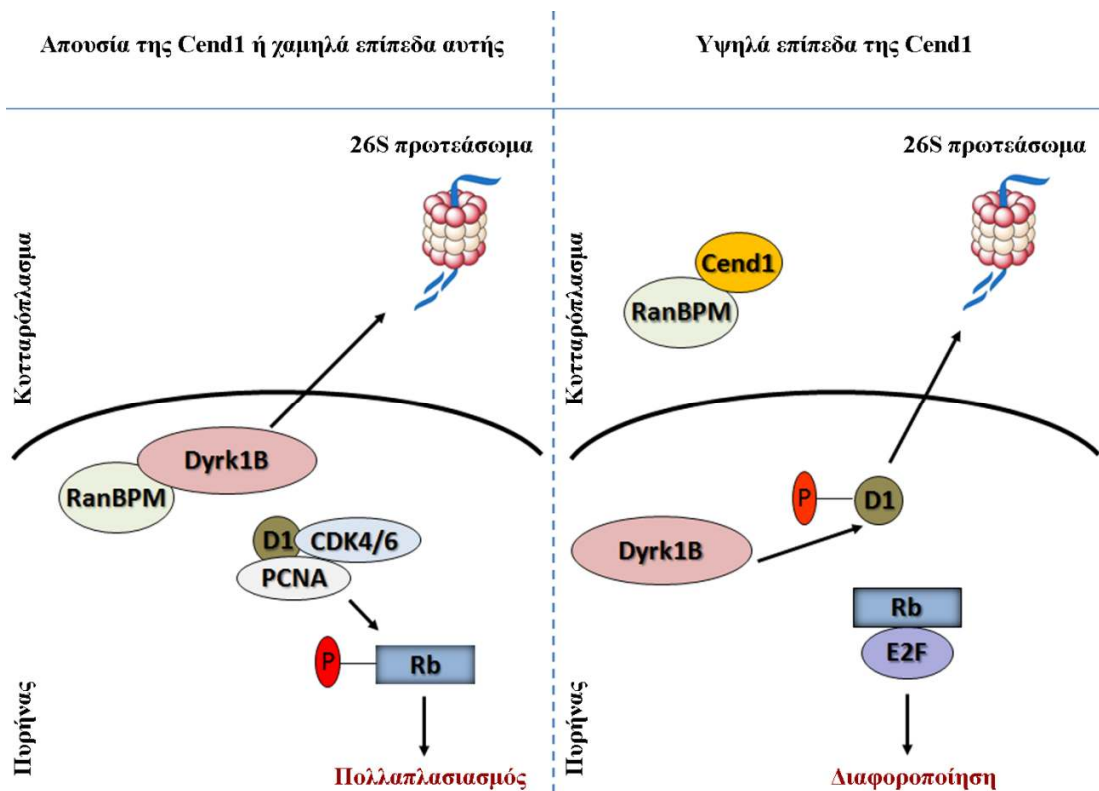
Η επαγόμενη από τη RanBPM αποικοδόμηση της Dyrk1B αναστέλλεται από την παρουσία της Cend1, σε τριπλά μετασηματισμένα Neuro-2a κύτταρα. Στην περίπτωση αυτή, η κινάση Dyrk1B παραμένει στον πυρήνα όπου και φωσφορυλιώνει την κυκλίνη D1 επάγοντας με τον τρόπο αυτόν την αποικοδόμησή της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης D1 να μειώνονται και πάλι και να εμφανίζονται αντίστοιχα με εκείνα που παρατηρούνται στα μονά μετασηματισμένα με Dyrk1B κύτταρα Neuro-2a. (Εικ. 3.23, 3.24).

Καθώς η έξοδος απ' τον κυτταρικό κύκλο συνδέεται άμεσα με τη νευρωνική διαφοροποίηση, εξετάστηκε το αποτέλεσμα της συνδυασμένης δράσης των τριών πρωτεϊνών και στη συγκεκριμένη διαδικασία. Πράγματι, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού των διαφοροποιημένων κυττάρων στα διπλά μετασηματισμένα με RanBPM Neuro-2a κύτταρα (Dyrk1B⁺/RanBPM⁺, Cend1⁺/RanBPM⁺) σε σχέση με τα μονά μετασηματισμένα (Dyrk1B⁺, Cend1⁺). Επιπρόσθετα, το μήκος των νευριτών στα διπλά μετασηματισμένα κύτταρα εμφάνισε δραματική μείωση συγκριτικά με το αντίστοιχο εκείνων των μονά μετασηματισμένων, καταδεικνύοντας έτσι τη θετική συνεισφορά τόσο της Cend1 όσο και της Dyrk1B στο φαινόμενο της διαφοροποίησης, όπως και την αναστροφή αυτού παρουσία της RanBPM.

Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες Cend1 και Dyrk1B ανταγωνίζονται μεταξύ τους αναφορικά με την πρόσδεση της RanBPM, παρ'ότι εδράζονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Είναι γνωστό ότι η RanBPM έχει την ιδιότητα να μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και αντίστροφα, όπου αντίστοιχα προσδένεται σε διαφορετικά μόρια διαμεσολαβώντας με τον τρόπο αυτό την πληθώρα των δράσεών της στο κύτταρο (Murrin and Talbot 2007; Suresh, Ramakrishna, and Baek 2012). Από την άλλη πλευρά, η Cend1 βρίσκεται αγκυροβολημένη στην εξωτερική μεμβράνη υποκυτταρικών οργανιδίων με το μεγαλύτερο τμήμα της στραμμένο προς το κυτταρόπλασμα, ενώ η Dyrk1B περιορίζεται λειτουργικά στον πυρήνα. Τα αποτελέσματά μας

προτείνουν ένα μοριακό μηχανισμό σύμφωνα με τον οποίο η επιλεκτική πρόσδεση της RanBPM από τη Cend1 εμποδίζει τη μετατόπισή της στον πυρήνα κι επομένως αναστέλλει την πρόσδεσή της στη Dygk1B. Σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο, η Dygk1B μη συνδεδεμένη με την RanBPM, παραμένει ενεργή στον πυρήνα και οδηγεί στην αποικοδόμηση της κυκλίνης D1 και την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο. Αντίστροφα, η αποσύνδεση της RanBPM από τη Cend1 έχει ως συνέπεια την απρόσκοπτη μετατόπισή της στον πυρήνα όπου αφού προσδεθεί στην Dygk1B επάγει την αποικοδόμησή της, σταθεροποιώντας έτσι την κυκλίνη D1 και την πρόοδο του πολλαπλασιασμού.

Η έκφραση των Cend1, RanBPM και Dygk1B στους νευρώνες του εγκεφάλου υποδηλώνει ότι η τριμερής συσχέτιση των εν λόγω πρωτεϊνών, πιθανόν να έχει βιολογική σημασία κατά τη διαφοροποίηση των συγκεκριμένων κυττάρων. Προτείνεται ότι στα νευρικά βλαστικά ή πρόδρομα κύτταρα όπου η έκφραση της Cend1 είναι χαμηλή, η RanBPM αλληλεπιδρά με την Dygk1B και ευνοεί την αποικοδόμησή της από το 26S πρωτεάσωμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η κυκλίνη D1 να παραμένει άθικτη και να είναι ενεργή στον πυρήνα όπου σε σύμπλοκο με τις CDK4/6-PCNA φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb) επάγοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Από την άλλη πλευρά, όταν τα πρόδρομα νευρωνικά κύτταρα οδεύουν προς τις τελικές τους διαιρέσεις, τα επίπεδα των πρωτεϊνών που συμβάλλουν στη νευρωνική διαφοροποίηση όπως η Cend1 αυξάνονται. Στην περίπτωση αυτή η RanBPM δεσμεύεται από τη Cend1 στο κυτταρόπλασμα, κατά συνέπεια η κινάση Dygk1B διατηρείται άθικτη στον πυρήνα όπου και φωσφορυλιώνει την κυκλίνη D1 επάγοντας την αποικοδόμησή της και επομένως την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Εικ. 4.1).



Εικ.4.1 Προτεινόμενο μοντέλο δράσης των τριών αλληλεπιδρουσών πρωτεϊνών Cend1, RanBPM και Dyrk1B στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου και της εξόδου από αυτόν.

Όπως αναφέρθηκε και αρχικά, η μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της Cend1 με απώτερο σκοπό την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της, κατέστη ο βασικός άξονας της παρούσας διατριβής. Το *in vitro* σύστημα των κυττάρων νευροβλαστώματος ποντικού Neuro-2a, αποτέλεσε ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της άμεσης επίδρασης των τριών πρωτεϊνών, ξεχωριστά αλλά και σε συνδυασμό, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Τα ευρήματα που προέκυψαν κυρίως από πειράματα εκτοπικής έκφρασης των υπό εξέταση μορίων, παρείχαν βάσιμες ενδείξεις για την ύπαρξη του μηχανισμού δράσης στο συγκεκριμένο σύστημα της κυτταρικής σειράς και πιθανόν κατά τη διαφοροποίηση των νευρικών προδρομικών κυττάρων. Καθώς μελλοντικά η επιβεβαίωση ενός παρόμοιου μηχανισμού και *in vivo* θ' αποκτούσε ιδιαίτερο ενδιαφέρον, επιχειρήθηκε σ' ένα πρώτο στάδιο η ανίχνευση της ενδογενούς έκφρασης των τριών πρωτεϊνών σε πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων εμβρύου ποντικού. Στις καλλιέργειες αυτές διαπιστώθηκε ότι και οι τρεις πρωτεΐνες εκφράζονται ενδογενώς και η τοπολογία τους συνάδει με αυτή των κυττάρων Neuro-2a. Για την περαιτέρω μελέτη των αναπτυξιακών μηχανισμών *in vivo*, στους οποίους συμμετέχουν τα μόρια

της παρούσας διατριβής, ένα κυτταρικό σύστημα αναφοράς που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί είναι εκείνο των νευρικών βλαστικών κυττάρων (neural stem cells). Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα απομονώνονται από την υποκοιλιακή ζώνη (Subventricular zone, SVZ) του φλοιού του εγκεφάλου εμβρύου ποντικού και δύνανται να καλλιεργηθούν *in vitro* σε συνθήκες που ευνοούν τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και τη διαφοροποίησή τους. Με την καταστολή ή την εκτοπική έκφραση των ενδογενών Cend1, Dyrk1B και RanBPM, ξεχωριστά ή σε συνδυασμό, θα ληφθούν περισσότερες πληροφορίες για το ρόλο των λειτουργικών τους αλληλεπιδράσεων στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης.

Επιπρόσθετα, σε εξεταζόμενους εγκεφάλους ποντικών διαφόρων ηλικιών μετά τη γέννηση, στους οποίους είχε απαλειφθεί το γονίδιο της Cend1 (Cend1^{-/-} ποντίκια), παρατηρήθηκαν μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της Dyrk1B, συγκριτικά με τις αντίστοιχες ηλικίες ποντικών αγρίου τύπου. Αντίθετα, τα επίπεδα της Dyrk1A, του νευροειδικού μέλους της οικογένειας Dyrk, εμφανίστηκαν αυξημένα στα Cend1^{-/-} ποντίκια, ιδιαίτερα στην ηλικία των 15 ημερών μετά τη γέννηση, υποδηλώνοντας μία αντισταθμιστική δράση της κινάσης Dyrk1A. Υπενθυμίζεται πως στους διαγονιδιακούς Cend1^{-/-} ποντικούς, τα πρόδρομα κοκκιώδη κύτταρα της παρεγκεφαλίδας καθυστερούν να εξέλθουν του κυτταρικού κύκλου, ενώ τα κύτταρα Purkinje, εμφανίζουν ελλιπή διαφοροποίηση. Συνεπώς, φαίνεται στις διαδικασίες αυτές να υπάρχει και *in vivo* μία συσχέτιση της Cend1 με την Dyrk1B, η οποία πιθανότατα να επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο, τουλάχιστον στο εξεταζόμενο σύστημα της παρεγκεφαλίδας. Σε κάθε περίπτωση, η επιβεβαίωση των παραπάνω αρχικών ενδείξεων προϋποθέτει περαιτέρω μελέτη των διαγονιδιακών ποντικών, ενδεχομένως και σε περισσότερα ηλικιακά στάδια. Η χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων θα παρείχε ακόμη μία σαφέστερη εικόνα της ενδοκυττάριας τοπολογίας των εξεταζόμενων μορίων καθώς και του πιθανού συνεντοπισμού τους.

Παρόμοιος φαινότυπος μη ομαλής ανάπτυξης της παρεγκεφαλίδας και συνεπακόλουθης αταξίας, χαρακτηρίζει και το σύνδρομο Joubert, μία αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή του νευρικού συστήματος, που σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο της Ahi1 (Abelson helper integration site gene) (Ferland et al. 2004). Η πρωτεΐνη Ahi1 είναι κυτταροπλασματική και διαθέτει χαρακτηριστικές αμινοξικές αλληλουχίες που διαμεσολαβούν στις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της, όπως οι WD40 και SH3. Παράλληλα, πολυμορφισμοί στο γονιδίο της, έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά να εμπλέκονται και σε περιπτώσεις σχιζοφρένειας ή αυτισμού (Torri et al. 2010; Alvarez Retuerto et al. 2008). Η πρόσφατη αναφορά της αλληλεπίδρασης της Ahi1 με τη Cend1 (Weng et al. 2013),

επιβεβαιώνει και επεκτείνει τις προοπτικές για τον πιθανό ρόλο της Cend1 σε νευροαναπτυξιακές διαταραχές. Στη συγκεκριμένη ανεξάρτητη μελέτη, φάνηκε μεταξύ άλλων πως η εκτοπική έκφραση της Cend1 σε υποθαλαμικούς νευρώνες Ahi1^{-/-} ποντικών με προβληματική ανάπτυξη των νευριτών, οδήγησε σε διάσωση του νευρωνικού τους φαινοτύπου, υποστηρίζοντας έτσι τη δράση της Cend1 στη διαδικασία της διαφοροποίησης. Από την άλλη πλευρά, στους εγκεφάλους διαγονιδιακών ποντικών Ahi1⁷⁷ οι οποίοι εμφάνιζαν καθυστερημένη ανάπτυξη, δείχθηκε πως τα επίπεδα της Cend1 ήταν μειωμένα συγκριτικά με τους εγκεφάλους ποντικών αγρίου τύπου. Συνεπώς, η συσχέτιση της Cend1 με έναν παθολογικό αναπτυξιακό μηχανισμό, καθιστά ακόμη πιο σημαντική την περαιτέρω διαλεύκανση του σηματοδοτικού της μονοπατιού, με απώτερο σκοπό τόσο την καλύτερη κατανόηση τη φυσιολογικής της δράσης, όσο και την εξεύρεση πιθανών θεραπευτικών στόχων.

Άλλωστε, προς την κατεύθυνση αποσαφήνισης της σηματοδότησης της πρωτεΐνης Cend1, πραγματοποιούνται και βρίσκονται σε εξέλιξη πειράματα φασματογραφίας μάζας, σε συνεργασία με τη Μονάδα Πρωτεωμικής του Ιδρύματος Ιατρο-Βιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Δρ. Τσάγκαρης Γ.). Πιο συγκεκριμένα, σε ομογενοποιημένα εγκεφάλου ποντικών αγρίου τύπου πραγματοποιούνται GST καταβυθίσεις με τη χημική GST-Cend1 πρωτεΐνη και τη σκέτη GST ως μάρτυρα, ακολουθούμενες από δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση και φασματογραφία μάζας (MALDI-TOF) προκειμένου ν' αποκαλυφθούν και άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν ειδικά με τη Cend1. Η ταυτοποίηση νέων μορίων, που σχετίζονται ενδεχομένως και με ρυθμιστικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων, θα συμβάλλει αναμφίβολα στο σχηματισμό μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας της δράσης της νευροειδικής πρωτεΐνης Cend1 στην παθοφυσιολογία του εγκεφάλου.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την ανάπτυξη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, η συντονισμένη ρύθμιση της εξόδου από τον κυτταρικό κύκλο και της διαφοροποίησης των πρόδρομων νευρωνικών κυττάρων αποτελεί προϋπόθεση για την παραγωγή του απαιτούμενου αριθμού νευρώνων στο σωστό τόπο και χρόνο. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα κύρια ρυθμιστικά μόρια που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου επηρεάζουν την κυτταρική μοίρα και τη νευρωνική διαφοροποίηση ενώ, αντίστροφα, μόρια που καθορίζουν την κυτταρική μοίρα και επάγουν τη διαφοροποίηση ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο.

Η νευροειδική πρωτεΐνη BM88/**Cend1** (cell cycle exit and neuronal differentiation1) συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια που συντονίζουν την έξοδο των προγονικών νευρικών κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο και επάγουν τη νευρωνική διαφοροποίηση. Ο μοριακός χαρακτηρισμός της Cend1, όπως πραγματοποιήθηκε μετά από κλωνοποίηση από τον εγκέφαλο χοίρου, ποντικού, ανθρώπου και κοτόπουλου, έδειξε ότι πρόκειται για διαμεμβρανική πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δύο όμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους 22-23 kDa, που συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό. Μελέτες οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Cend1 εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη ενδοκυττάρων οργανιδίων, όπως τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και άλλα κυστίδια. Η Cend1 είναι αγκυροβολημένη στις μεμβράνες των οργανιδίων αυτών μέσω του καρβοξυτελικού άκρου κατά τέτοιο τρόπο ώστε το αμινοτελικό της τμήμα που περιλαμβάνει το κύριο σώμα της πρωτεΐνης και διαμεσολαβεί τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, να βρίσκεται στραμμένο προς το κυτταρόπλασμα.

Η Cend1 παρουσιάζει δυναμικό πρότυπο έκφρασης κατά την ανάπτυξη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος: εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα των βλαστικών στιβάδων του εγκεφάλου και αυξάνεται σε υψηλότερα επίπεδα καθώς τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα οδηγούνται σε έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο ενώ διατηρείται σε υψηλά επίπεδα και στους διαφοροποιημένους νευρώνες. Από την άλλη πλευρά παύει να εκφράζεται στα προγονικά κύτταρα που πρόκειται να ακολουθήσουν γενεαλογία κυττάρων γλοίας.

Λειτουργικές μελέτες υπερέκφρασης της Cend1 σε νευρικά βλαστικά κύτταρα εγκεφάλου ή ωτιαίου μυελού εμβρύου ποντικού και κοτόπουλου καθώς και σε βλαστικά κύτταρα της μεταγεννητικής υποκοιλιακής ζώνης του εγκεφάλου ποντικού, έδειξαν ότι έχει αρνητική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ επάγει τη νευρωνική διαφοροποίηση. Αντίστροφα, η σίγαση της έκφρασης της Cend1 με τη χρήση μικρών παρεισφρητικών μορίων RNA (siRNAs) ή η γενετική απαλοιφή του γονιδίου σε ποντικούς (KO-Cend1), οδήγησαν στον αντίστροφο φαινότυπο. Τα

ευρήματα αυτά υποδεικνύουν πως τα επίπεδα της Cend1 είναι σημαντικά για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού έναντι της διαφοροποίησης των πρόδρομων νευρικών κυττάρων. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές αποκαλύφθηκε ότι η αρνητική επίδραση της Cend1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό λαμβάνει χώρα μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της κυκλίνης D1 και της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (cyclin D1/pRb) που ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ κυτταρικού κύκλου και διαφοροποίησης ενώ η ικανότητά της να επάγει τη νευρωνική διαφοροποίηση σχετίζεται με την καταστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch και την ενεργοποίηση προνευρικών γονιδίων. Παρά την κατ' αρχήν διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης της, οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν άμεσα με τη Cend1 παρέμεναν άγνωστες.

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η πρωτεΐνη Ran-binding protein M (RanBPM) ως μόριο που αλληλεπιδρά άμεσα με τη Cend1. Η πρωτεϊνική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο μορίων προσδιορίστηκε με την εφαρμογή συστήματος ζύμης δύο υβριδίων και στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε με βιοχημικές μεθόδους. Η RanBPM χαρακτηρίζεται ως «μόριο-ικρίωμα» με κομβικό ρόλο τόσο στο νευρικό όσο και το ανοσοποιητικό σύστημα όπου συμμετέχει σε πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών. Αλληλεπιδρά με πολλές και διαφορετικές πρωτεΐνες, όπως μεταγραφικοί παράγοντες, άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες, κυτταροπλασματικές κινάσες, υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης κ.α. Έτσι συμμετέχει σε διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος από τον εξωκυττάριο χώρο προς το κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα και αντίστροφα. Μεταξύ αυτών, υπάρχουν ενδείξεις για συμμετοχή της στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των πρόδρομων νευρικών κυττάρων μέσω άγνωστου μέχρι στιγμής μηχανισμού ενώ σε επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα έχει ταυτοποιηθεί ως πρωτεϊνικός συνεργάτης της η διπλής εξειδίκευσης κινάση σερίνης/θρεονίνης Mirk/Dyrk1B. Η Dyrk1B ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των Dyrk κινασών (**d**ual **s**pecificity **t**yrosine-**p**hosphorylation **r**egulated **k**inases) που περιλαμβάνει ορθόλογα μέλη στα σπονδυλωτά, τα ασπόνδυλα και τους κατώτερους ευκαρυώτες, χαρακτηριζόμενα από ισχυρά συντηρημένη ομολογία των αλληλουχιών τους, ιδίως των τμημάτων που σχετίζονται με τη λειτουργία της κινάσης. Οι κινάσες των θηλαστικών Dyrk1A και Dyrk1B, καθώς και εκείνη της μύγας *Drosophila*, έχειδειχθεί ότι επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και/ή τη διαφοροποίηση σε μία ποικιλία κυτταρικών τύπων, ρυθμίζοντας τα επίπεδα της κυκλίνης D1. Εντούτοις, η έκφραση και ο ρόλος της Dyrk1B στο νευρικό σύστημα παραμένει αδιευκρίνιστος.

Στα πλαίσια διατριβής, μελετήθηκε η συνδυασμένη δράση των τριών πρωτεϊνών Cend1, RanBPM και Dyrk1B στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των νευρικών κυττάρων. Αρχικά δείχθηκε πως και οι τρεις πρωτεΐνες εκφράζονται στον εγκέφαλο του ποντικού καθώς και σε πρωτογενείς καλλιέργειες

φλοιικών νευρώνων εμβρύου ποντικού, ενώ δύνανται να σχηματίζουν σύμπλοκα όταν εκφράζονται εξωγενώς σε κύτταρα HEK293T. Στη συνέχεια, με πειράματα συνέκφρασης σε παροδικά μετασχηματισμένα κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού Neuro-2a, διαπιστώθηκε πως η επαγόμενη από την Cend1 ή την Dyrk1B μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κυκλίνης D1, αναστρέφεται παρουσία της RanBPM. Ειδικότερα, η αλληλεπίδραση της RanBPM είτε με την Cend1 είτε με την Dyrk1B, σταθεροποιεί την κυκλίνη D1 στον πυρήνα, ευνοώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των Dyrk1B και RanBPM, αυτό συμβαίνει γιατί η RanBPM διευκολύνει την αποικοδόμηση της κινάσης Dyrk1B από το 26S πρωτεάσωμα. Όταν πάλι και οι τρεις πρωτεΐνες συνεκφράζονται στα κύτταρα Neuro-2a, η Dyrk1B διασώζεται στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνει την κυκλίνη D1 και καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό. Επιπρόσθετα, η αλληλεπίδραση της RanBPM είτε με την Cend1 είτε με την Dyrk1B, φάνηκε να επηρεάζει αρνητικά τη διαφοροποίηση των κυττάρων Neuro-2a παρουσία ρετινοϊκού οξέος, σε σύγκριση με κύτταρα μετασχηματισμένα με καθεμία από τις τρεις πρωτεΐνες ξεχωριστά. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν πως η αλληλεπίδραση των τριών πρωτεϊνών επηρεάζει την ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης σε κύτταρα Neuro-2a. Η μελέτη μας ανέδειξε ένα νέο ρυθμιστικό σηματοδοτικό μονοπάτι που είναι πιθανόν να ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη νευρωνική διαφοροποίηση στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα.

6. ABSTRACT

During development of the central nervous system (CNS), coordinated regulation of cell cycle progression/exit and differentiation of neuronal precursors is essential for generation of appropriate number of neurons at the right time and place. A number of studies have shown that key regulators of cell cycle progression influence neural cell fate and differentiation and conversely, cell fate determinants and differentiation-inducing proteins regulate the cell cycle.

BM88/Cend1 is a neuronal-lineage specific modulator participating in signaling pathways which affect the coordination of cell cycle exit and neuronal differentiation of neural stem/precursor cells. Cend1 displays a dynamic expression pattern during central nervous system development: it is expressed at low levels in neurogenic progenitors residing at germinal layers and is upregulated as neuronal precursors exit the cell cycle and differentiate, while it persists at high levels in differentiated neurons. Accordingly, Cend1 ceases to be expressed in neural stem/progenitor cells when they switch from a neurogenic to a gliogenic fate. Gain- of-function approaches in neural stem/precursor cells generated from the embryonic brain and spinal cord or the postnatal subventricular zone, demonstrated that Cend1 negatively regulates proliferation, while promoting a neuronal fate. Conversely, Cend1 silencing using RNA interference or Cend1 ablation in Cend1-null mice resulted in the opposite phenotype. These findings suggest that Cend1 levels are important for controlling proliferation versus differentiation of neuronal precursors. The negative influence of Cend1 on cell proliferation is mediated through the cyclin D1/pRb signaling pathway that controls the balance between cell cycle progression and exit while its neuronal differentiation-promoting activity involves downregulation of Notch signaling and activation of proneural gene networks and downstream signaling pathways. However, the protein partners interacting directly with Cend1 were not known.

Cend1 cloned from porcine, mouse, human and chick brain is an integral membrane protein composed of two 22-23 kDa polypeptide chains linked together by disulphide bridges. Cend1 is C-tail anchored to the outer membrane of intracellular organelles, such as mitochondria, the endoplasmic reticulum and other electrolucent vesicles, with the bulk of the protein facing the cytoplasm.

In the present study we have identified Ran-binding protein M (RanBPM) as direct interacting partner for Cend1 using a yeast-two hybrid system. RanBPM is a multi-domain intracellular protein that shuttles between the cytoplasm and the nucleus and has been shown to act as a scaffold for signal transduction for several receptors, nuclear proteins, transcription factors and cytoplasmic kinases in the immune and nervous systems. Interestingly, RanBPM has been implicated in cell cycle progression of

neuronal precursors via an as yet unknown mechanism while it has been identified as a binding partner for the growth arrest protein Dyrk1B in lung epithelial cells. Dyrk1B belongs to the nuclear family of dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinases which include several vertebrate, invertebrate and lower eukaryotic orthologs characterized by highly conserved Dyrk homology and kinase domains. Mammalian Dyrk1A and Dyrk1B and the *Drosophila* Minibrain kinases have been shown to affect proliferation and/or differentiation in a variety of cell types by regulating cyclin D1 levels. However, the expression and role of Dyrk1B in neuronal cells remain elusive.

Here we investigated the possible cross-talk between Cend1, RanBPM and Dyrk1B in cell cycle progression/exit of neuronal cells. First we showed that Cend1, RanBPM and Dyrk1B are expressed in mouse brain and in cultured embryonic cortical neurons while they can form complexes when expressed in HEK293T cells. Further, by co-expression experiments in transiently transfected mouse neuroblastoma Neuro 2a cells, we found that the Cend1-dependent or Dyrk1B-dependent down-regulation of cyclin D1 is reversed following their interaction with RanBPM. More specifically, binding of RanBPM with either Cend1 or Dyrk1B stabilizes cyclin D1 in the nucleus and enhances cellular proliferation. In the case of Dyrk1B-RanBPM interaction this occurs because RanBPM facilitates Dyrk1B proteasomal turnover. However, when all three proteins are co-expressed Dyrk1B is rescued in the nucleus to target cyclin D1 and exert its antiproliferative function. Additionally, coexpression of RanBPM with either BM88/Cend1 or Dyrk1B also had a negative effect on Neuro 2a cell differentiation in the presence of retinoic acid as compared with cells expressing each protein separately. Our results show that the functional interaction between Cend1, RanBPM and Dyrk1B influences the balance between cellular proliferation and differentiation in Neuro 2a cells. This novel regulatory signaling pathway may also be operative in neuronal precursors to control the balance between cellular proliferation and neuronal differentiation.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agami, R., and R. Bernards. 2000. Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell* 102 (1):55-66.
- Alao, J. P. 2007. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer* 6:24.
- Ali, F., C. Hindley, G. McDowell, R. Deibler, A. Jones, M. Kirschner, F. Guillemot, and A. Philpott. 2011. Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Development* 138 (19):4267-77.
- Alvarez Retuerto, A. I., R. M. Cantor, J. G. Gleeson, A. Ustaszewska, W. S. Schackwitz, L. A. Pennacchio, and D. H. Geschwind. 2008. Association of common variants in the Joubert syndrome gene (AHI1) with autism. *Hum Mol Genet* 17 (24):3887-96.
- Aprelikova, O., Y. Xiong, and E. T. Liu. 1995. Both p16 and p21 families of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent kinases by the CDK-activating kinase. *J Biol Chem* 270 (31):18195-7.
- Aranda, S., A. Laguna, and S. de la Luna. 2011. DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J* 25 (2):449-62.
- Armesilla-Diaz, A., P. Bragado, I. Del Valle, E. Cuevas, I. Lazaro, C. Martin, J. C. Cigudosa, and A. Silva. 2009. p53 regulates the self-renewal and differentiation of neural precursors. *Neuroscience* 158 (4):1378-89.
- Arron, J. R., M. M. Winslow, A. Polleri, C. P. Chang, H. Wu, X. Gao, J. R. Neilson, L. Chen, J. J. Heit, S. K. Kim, N. Yamasaki, T. Miyakawa, U. Francke, I. A. Graef, and G. R. Crabtree. 2006. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441 (7093):595-600.
- Arthur J. Vander, James H. Sherman, Dorothy S. Luciano. 2001. *Φυσιολογία του Ανθρώπου* Translated by Γ. Ν.-Τ. Μ. Vol. I: Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη.
- Atabakhsh, E., D. M. Bryce, K. J. Lefebvre, and C. Schild-Poulter. 2009. RanBPM has proapoptotic activities that regulate cell death pathways in response to DNA damage. *Mol Cancer Res* 7 (12):1962-72.
- Bai, D., H. Chen, and B. R. Huang. 2003. RanBPM is a novel binding protein for p75NTR. *Biochem Biophys Res Commun* 309 (3):552-7.
- Berger, C., S. K. Pallavi, M. Prasad, L. S. Shashidhara, and G. M. Technau. 2005. A critical role for cyclin E in cell fate determination in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Nat Cell Biol* 7 (1):56-62.
- Bertrand, N., D. S. Castro, and F. Guillemot. 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3 (7):517-30.
- Blomen, V. A., and J. Boonstra. 2007. Cell fate determination during G1 phase progression. *Cell Mol Life Sci* 64 (23):3084-104.
- Borghesani, P. R., J. M. Peyrin, R. Klein, J. Rubin, A. R. Carter, P. M. Schwartz, A. Luster, G. Corfas, and R. A. Segal. 2002. BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Development* 129 (6):1435-42.
- Bowman, A. L., D. H. Catino, J. C. Strong, W. R. Randall, A. Kontrogianni-Konstantopoulos, and R. J. Bloch. 2008. The rho-guanine nucleotide exchange factor domain of obscurin regulates assembly of titin at the Z-disk through interactions with Ran binding protein 9. *Mol Biol Cell* 19 (9):3782-92.
- Briscoe, J., and J. Ericson. 2001. Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* 11 (1):43-9.

- Briscoe, J., A. Pierani, T. M. Jessell, and J. Ericson. 2000. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101 (4):435-45.
- Brunkhorst, A., M. Karlen, J. Shi, M. Mikolajczyk, M. A. Nelson, M. Metsis, and O. Hermanson. 2005. A specific role for the TFIID subunit TAF4 and RanBPM in neural progenitor differentiation. *Mol Cell Neurosci* 29 (2):250-8.
- Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25 (2):169-93.
- Caviness, V. S., Jr., T. Goto, T. Tarui, T. Takahashi, P. G. Bhide, and R. S. Nowakowski. 2003. Cell output, cell cycle duration and neuronal specification: a model of integrated mechanisms of the neocortical proliferative process. *Cereb Cortex* 13 (6):592-8.
- Chang, Y., M. Paramasivam, M. J. Girenti, R. S. Walikonis, E. Bianchi, and J. J. LoTurco. 2010. RanBPM regulates the progression of neuronal precursors through M-phase at the surface of the neocortical ventricular zone. *Dev Neurobiol* 70 (1):1-15.
- Cheng, L., S. Lemmon, and V. Lemmon. 2005. RanBPM is an L1-interacting protein that regulates L1-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* 94 (4):1102-10.
- Chesnutt, C., L. W. Burrus, A. M. Brown, and L. Niswander. 2004. Coordinate regulation of neural tube patterning and proliferation by TGFbeta and WNT activity. *Dev Biol* 274 (2):334-47.
- Choi, Y., P. R. Borghesani, J. A. Chan, and R. A. Segal. 2005. Migration from a mitogenic niche promotes cell-cycle exit. *J Neurosci* 25 (45):10437-45.
- Choksi, S. P., T. D. Southall, T. Bossing, K. Edoff, E. de Wit, B. E. Fischer, B. van Steensel, G. Micklem, and A. H. Brand. 2006. Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in Drosophila neural stem cells. *Dev Cell* 11 (6):775-89.
- Ciani, L., and P. C. Salinas. 2005. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci* 6 (5):351-62.
- Coller, H. A. 2007. What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (8):667-70.
- Coqueret, O. 2002. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 299 (1-2):35-55.
- Corrales, J. D., S. Blaess, E. M. Mahoney, and A. L. Joyner. 2006. The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Development* 133 (9):1811-21.
- Coverley, D., C. Pelizon, S. Trewick, and R. A. Laskey. 2000. Chromatin-bound Cdc6 persists in S and G2 phases in human cells, while soluble Cdc6 is destroyed in a cyclin A-cdk2 dependent process. *J Cell Sci* 113 (Pt 11):1929-38.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, J. R. Vandenheede, H. E. McDowell, H. S. Hundal, and P. Cohen. 1994. The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem J* 303 (Pt 1):21-6.
- Das, G., Y. Choi, P. Sicinski, and E. M. Levine. 2009. Cyclin D1 fine-tunes the neurogenic output of embryonic retinal progenitor cells. *Neural Dev* 4:15.
- Delfino-Machin, M., J. S. Lunn, D. N. Breitreuz, J. Akai, and K. G. Storey. 2005. Specification and maintenance of the spinal cord stem zone. *Development* 132 (19):4273-83.
- Deng, X., D. Z. Ewton, and E. Friedman. 2009. Mirk/Dyrk1B maintains the viability of quiescent pancreatic cancer cells by reducing levels of reactive oxygen species. *Cancer Res* 69 (8):3317-24.
- Deng, X., D. Z. Ewton, S. E. Mercer, and E. Friedman. 2005. Mirk/dyrk1B decreases the nuclear accumulation of class II histone deacetylases during skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 280 (6):4894-905.

- Deng, X., D. Z. Ewton, B. Pawlikowski, M. Maimone, and E. Friedman. 2003. Mirk/dyrk1B is a Rho-induced kinase active in skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 278 (42):41347-54.
- Deng, X., S. E. Mercer, S. Shah, D. Z. Ewton, and E. Friedman. 2004. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G(0) by Mirk/dyrk1B kinase. *J Biol Chem* 279 (21):22498-504.
- Denti, S., A. Sirri, A. Cheli, L. Rogge, G. Innamorati, S. Putignano, M. Fabbri, R. Pardi, and E. Bianchi. 2004. RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1. *J Biol Chem* 279 (13):13027-34.
- Diehl, J. A., M. Cheng, M. F. Roussel, and C. J. Sherr. 1998. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12 (22):3499-511.
- Diehl, J. A., F. Zindy, and C. J. Sherr. 1997. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 11 (8):957-72.
- Diez del Corral, R., and K. G. Storey. 2004. Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *Bioessays* 26 (8):857-69.
- Dobashi, Y., M. Shoji, M. Kitagawa, T. Noguchi, and T. Kameya. 2000. Simultaneous suppression of cdc2 and cdk2 activities induces neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem* 275 (17):12572-80.
- Dominguez, M., and S. Campuzano. 1993. asense, a member of the Drosophila achaete-scute complex, is a proneural and neural differentiation gene. *EMBO J* 12 (5):2049-60.
- Dowjat, W. K., T. Adayev, I. Kuchna, K. Nowicki, S. Palmiello, Y. W. Hwang, and J. Wegiel. 2007. Trisomy-driven overexpression of DYRK1A kinase in the brain of subjects with Down syndrome. *Neurosci Lett* 413 (1):77-81.
- Durand, B., F. B. Gao, and M. Raff. 1997. Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation. *EMBO J* 16 (2):306-17.
- Dyer, M. A., and C. L. Cepko. 2000. Control of Muller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat Neurosci* 3 (9):873-80.
- Ferland, R. J., W. Eyaid, R. V. Collura, L. D. Tully, R. S. Hill, D. Al-Nouri, A. Al-Rumayyan, M. Topcu, G. Gascon, A. Bodell, Y. Y. Shugart, M. Ruvolo, and C. A. Walsh. 2004. Abnormal cerebellar development and axonal decussation due to mutations in AH11 in Joubert syndrome. *Nat Genet* 36 (9):1008-13.
- Fero, M. L., M. Rivkin, M. Tasch, P. Porter, C. E. Carow, E. Firpo, K. Polyak, L. H. Tsai, V. Broudy, R. M. Perlmutter, K. Kaushansky, and J. M. Roberts. 1996. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85 (5):733-44.
- Fogarty, M. P., B. A. Emmenegger, L. L. Grsfeder, T. G. Oliver, and R. J. Wechsler-Reya. 2007. Fibroblast growth factor blocks Sonic hedgehog signaling in neuronal precursors and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (8):2973-8.
- Francoz, S., P. Froment, S. Bogaerts, S. De Clercq, M. Maetens, G. Doumont, E. Bellefroid, and J. C. Marine. 2006. Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (9):3232-7.
- Fukami-Kobayashi, J., and Y. Mitsui. 1999. Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2. *Exp Cell Res* 246 (2):338-47.
- Furuno, N., N. den Elzen, and J. Pines. 1999. Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol* 147 (2):295-306.
- Gaitanou, M., P. Buanne, C. Pappa, N. Georgopoulou, A. Mamalaki, F. Tirone, and R. Matsas. 2001. Cloning, expression and localization of human BM88 shows that it maps to chromosome

- 11p15.5, a region implicated in Beckwith-Wiedemann syndrome and tumorigenesis. *Biochem J* 355 (Pt 3):715-24.
- Gao, J., Y. Zhao, Y. Lv, Y. Chen, B. Wei, J. Tian, Z. Yang, F. Kong, J. Pang, J. Liu, and H. Shi. 2013. Mirk/Dyrk1B mediates G0/G1 to S phase cell cycle progression and cell survival involving MAPK/ERK signaling in human cancer cells. *Cancer Cell Int* 13 (1):2.
- Geiger, J. N., G. T. Knudsen, L. Panek, A. K. Pandit, M. D. Yoder, K. A. Lord, C. L. Creasy, B. M. Burns, P. Gaines, S. B. Dillon, and D. M. Wojchowski. 2001. mDYRK3 kinase is expressed selectively in late erythroid progenitor cells and attenuates colony-forming unit-erythroid development. *Blood* 97 (4):901-10.
- Georgopoulou, N., C. Hurel, P. K. Politis, M. Gaitanou, R. Matsas, and D. Thomaidou. 2006. BM88 is a dual function molecule inducing cell cycle exit and neuronal differentiation of neuroblastoma cells via cyclin D1 down-regulation and retinoblastoma protein hypophosphorylation. *J Biol Chem* 281 (44):33606-20.
- Germain, D., A. Russell, A. Thompson, and J. Hendley. 2000. Ubiquitination of free cyclin D1 is independent of phosphorylation on threonine 286. *J Biol Chem* 275 (16):12074-9.
- Gilbert, Scott F. 2000. *Developmental Biology* 6th ed: Sinauer Associates Inc., U.S.
- Gotz, M., and W. B. Huttner. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (10):777-88.
- Guillemot, F., L. C. Lo, J. E. Johnson, A. Auerbach, D. J. Anderson, and A. L. Joyner. 1993. Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75 (3):463-76.
- Hammerle, B., E. Ulin, J. Guimera, W. Becker, F. Guillemot, and F. J. Tejedor. 2011. Transient expression of Mnb/Dyrk1a couples cell cycle exit and differentiation of neuronal precursors by inducing p27KIP1 expression and suppressing NOTCH signaling. *Development* 138 (12):2543-54.
- Hand, R., D. Bortone, P. Mattar, L. Nguyen, J. I. Heng, S. Guerrier, E. Boutt, E. Peters, A. P. Barnes, C. Parras, C. Schuurmans, F. Guillemot, and F. Polleux. 2005. Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* 48 (1):45-62.
- Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. 2000. *Molecular Cell Biology*: New York: W. H. Freeman. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>.
- Hindley, C., and A. Philpott. 2012. Co-ordination of cell cycle and differentiation in the developing nervous system. *Biochem J* 444 (3):375-82.
- Hirsch, M. R., M. C. Tiveron, F. Guillemot, J. F. Brunet, and C. Goridis. 1998. Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. *Development* 125 (4):599-608.
- Hosono, K., S. Noda, A. Shimizu, N. Nakanishi, M. Ohtsubo, N. Shimizu, and S. Minoshima. 2010. YPEL5 protein of the YPEL gene family is involved in the cell cycle progression by interacting with two distinct proteins RanBPM and RanBP10. *Genomics* 96 (2):102-11.
- Hu, J., H. Nakhla, and E. Friedman. 2011. Transient arrest in a quiescent state allows ovarian cancer cells to survive suboptimal growth conditions and is mediated by both Mirk/dyrk1b and p130/RB2. *Int J Cancer* 129 (2):307-18.
- Huard, J. M., C. C. Forster, M. L. Carter, P. Sicinski, and M. E. Ross. 1999. Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *Development* 126 (9):1927-35.
- Huttner, W. B., and M. Brand. 1997. Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Curr Opin Neurobiol* 7 (1):29-39.

- Ideguchi, H., A. Ueda, M. Tanaka, J. Yang, T. Tsuji, S. Ohno, E. Hagiwara, A. Aoki, and Y. Ishigatsubo. 2002. Structural and functional characterization of the USP11 deubiquitinating enzyme, which interacts with the RanGTP-associated protein RanBPM. *Biochem J* 367 (Pt 1):87-95.
- Ille, F., S. Atanasoski, S. Falk, L. M. Ittner, D. Marki, S. Buchmann-Moller, H. Wurdak, U. Suter, M. M. Taketo, and L. Sommer. 2007. Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord. *Dev Biol* 304 (1):394-408.
- Jin, K., D. Z. Ewton, S. Park, J. Hu, and E. Friedman. 2009. Mirk regulates the exit of colon cancer cells from quiescence. *J Biol Chem* 284 (34):22916-25.
- Kaltezioti, V., G. Kouroupi, M. Oikonomaki, E. Mantouvalou, A. Stergiopoulos, A. Charonis, H. Rohrer, R. Matsas, and P. K. Politis. 2010. Prox1 regulates the notch1-mediated inhibition of neurogenesis. *PLoS Biol* 8 (12):e1000565.
- Katsimpardi, L., M. Gaitanou, C. E. Malnou, P. M. Lledo, P. Charneau, R. Matsas, and D. Thomaidou. 2008. BM88/Cend1 expression levels are critical for proliferation and differentiation of subventricular zone-derived neural precursor cells. *Stem Cells* 26 (7):1796-807.
- Kelly, P. A., and Z. Rahmani. 2005. DYRK1A enhances the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells by forming a complex with Ras, B-Raf, and MEK1. *Mol Biol Cell* 16 (8):3562-73.
- Kiyokawa, H., R. D. Kineman, K. O. Manova-Todorova, V. C. Soares, E. S. Hoffman, M. Ono, D. Khanam, A. C. Hayday, L. A. Frohman, and A. Koff. 1996. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85 (5):721-32.
- Kokubo, M., M. Nishio, T. J. Ribar, K. A. Anderson, A. E. West, and A. R. Means. 2009. BDNF-mediated cerebellar granule cell development is impaired in mice null for CaMKK2 or CaMKIV. *J Neurosci* 29 (28):8901-13.
- Koutmani, Y., C. Hurel, E. Patsavoudi, M. Hack, M. Gotz, D. Thomaidou, and R. Matsas. 2004. BM88 is an early marker of proliferating precursor cells that will differentiate into the neuronal lineage. *Eur J Neurosci* 20 (10):2509-23.
- Kramer, S., T. Ozaki, K. Miyazaki, C. Kato, T. Hanamoto, and A. Nakagawara. 2005. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* 24 (5):938-44.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-5.
- Lange, C., and F. Calegari. 2010. Cdks and cyclins link G1 length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 9 (10):1893-900.
- Lange, C., W. B. Huttner, and F. Calegari. 2009. Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell* 5 (3):320-31.
- Lee, S. M., S. Tole, E. Grove, and A. P. McMahon. 2000. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* 127 (3):457-67.
- Leto, K., A. Bartolini, A. Di Gregorio, D. Imperiale, A. De Luca, E. Parmigiani, R. K. Filipkowski, L. Kaczmarek, and F. Rossi. 2011. Modulation of cell-cycle dynamics is required to regulate the number of cerebellar GABAergic interneurons and their rhythm of maturation. *Development* 138 (16):3463-72.
- Li, K., S. Zhao, V. Karur, and D. M. Wojchowski. 2002. DYRK3 activation, engagement of protein kinase A/cAMP response element-binding protein, and modulation of progenitor cell survival. *J Biol Chem* 277 (49):47052-60.
- Li, L., and H. Vaessin. 2000. Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during Drosophila neurogenesis. *Genes Dev* 14 (2):147-51.

- Lim, S., K. Jin, and E. Friedman. 2002. Mirk protein kinase is activated by MKK3 and functions as a transcriptional activator of HNF1alpha. *J Biol Chem* 277 (28):25040-6.
- Lin, D. I., O. Barbash, K. G. Kumar, J. D. Weber, J. W. Harper, A. J. Klein-Szanto, A. Rustgi, S. Y. Fuchs, and J. A. Diehl. 2006. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF(FBX4-alphaB crystallin) complex. *Mol Cell* 24 (3):355-66.
- Lukaszewicz, A. I., and D. J. Anderson. 2011. Cyclin D1 promotes neurogenesis in the developing spinal cord in a cell cycle-independent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (28):11632-7.
- Lukaszewicz, A., P. Savatier, V. Cortay, P. Giroud, C. Huissoud, M. Berland, H. Kennedy, and C. Dehay. 2005. G1 phase regulation, area-specific cell cycle control, and cytoarchitectonics in the primate cortex. *Neuron* 47 (3):353-64.
- Ma, C., D. Papermaster, and C. L. Cepko. 1998. A unique pattern of photoreceptor degeneration in cyclin D1 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (17):9938-43.
- Ma, Q., C. Fode, F. Guillemot, and D. J. Anderson. 1999. Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev* 13 (13):1717-28.
- Ma, Y. C., M. R. Song, J. P. Park, H. Y. Henry Ho, L. Hu, M. V. Kurtev, J. Zieg, Q. Ma, S. L. Pfaff, and M. E. Greenberg. 2008. Regulation of motor neuron specification by phosphorylation of neurogenin 2. *Neuron* 58 (1):65-77.
- Makri, G., A. A. Lavdas, L. Katsimpardi, P. Charneau, D. Thomaidou, and R. Matsas. 2010. Transplantation of embryonic neural stem/precursor cells overexpressing BM88/Cend1 enhances the generation of neuronal cells in the injured mouse cortex. *Stem Cells* 28 (1):127-39.
- Mamalaki, A., E. Boutou, C. Hurel, E. Patsavoudi, S. Tzartos, and R. Matsas. 1995. The BM88 antigen, a novel neuron-specific molecule, enhances the differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 270 (23):14201-8.
- Masgrau, R., C. Hurel, F. Papastefanaki, N. Georgopoulou, D. Thomaidou, and R. Matsas. 2009. BM88/Cend1 regulates stimuli-induced intracellular calcium mobilization. *Neuropharmacology* 56 (3):598-609.
- Mateja, A., T. Cierpicki, M. Paduch, Z. S. Derewenda, and J. Otlewski. 2006. The dimerization mechanism of LIS1 and its implication for proteins containing the LisH motif. *J Mol Biol* 357 (2):621-31.
- McMahon, A. P., and A. Bradley. 1990. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62 (6):1073-85.
- Medrano, S., M. Burns-Cusato, M. B. Atienza, D. Rahimi, and H. Scrable. 2009. Regenerative capacity of neural precursors in the adult mammalian brain is under the control of p53. *Neurobiol Aging* 30 (3):483-97.
- Megason, S. G., and A. P. McMahon. 2002. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* 129 (9):2087-98.
- Meletis, K., V. Wirta, S. M. Hede, M. Nister, J. Lundeberg, and J. Frisen. 2006. p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development* 133 (2):363-9.
- Menon, R. P., T. J. Gibson, and A. Pastore. 2004. The C terminus of fragile X mental retardation protein interacts with the multi-domain Ran-binding protein in the microtubule-organising centre. *J Mol Biol* 343 (1):43-53.
- Mercer, S. E., D. Z. Ewton, X. Deng, S. Lim, T. R. Mazur, and E. Friedman. 2005. Mirk/Dyrk1B mediates survival during the differentiation of C2C12 myoblasts. *J Biol Chem* 280 (27):25788-801.
- Murrin, L. C., and J. N. Talbot. 2007. RanBPM, a scaffolding protein in the immune and nervous systems. *J Neuroimmune Pharmacol* 2 (3):290-5.

- Nakamura, M., H. Masuda, J. Horii, K. Kuma, N. Yokoyama, T. Ohba, H. Nishitani, T. Miyata, M. Tanaka, and T. Nishimoto. 1998. When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol* 143 (4):1041-52.
- Nishitani, H., E. Hirose, Y. Uchimura, M. Nakamura, M. Umeda, K. Nishii, N. Mori, and T. Nishimoto. 2001. Full-sized RanBPM cDNA encodes a protein possessing a long stretch of proline and glutamine within the N-terminal region, comprising a large protein complex. *Gene* 272 (1-2):25-33.
- Niu, S., A. Renfro, C. C. Quattrocchi, M. Sheldon, and G. D'Arcangelo. 2004. Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron* 41 (1):71-84.
- O'Connor, P. M. 1997. Mammalian G1 and G2 phase checkpoints. *Cancer Surv* 29:151-82.
- Odajima, J., Z. P. Wills, Y. M. Ndassa, M. Terunuma, K. Kretschmannova, T. Z. Deeb, Y. Geng, S. Gawrzak, I. M. Quadros, J. Newman, M. Das, M. E. Jecrois, Q. Yu, N. Li, F. Bienvenu, S. J. Moss, M. E. Greenberg, J. A. Marto, and P. Sicinski. 2011. Cyclin E constrains Cdk5 activity to regulate synaptic plasticity and memory formation. *Dev Cell* 21 (4):655-68.
- Ohnuma, S., A. Philpott, and W. A. Harris. 2001. Cell cycle and cell fate in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 11 (1):66-73.
- Ohtsubo, M., A. M. Theodoras, J. Schumacher, J. M. Roberts, and M. Pagano. 1995. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15 (5):2612-24.
- Okabe, H., S. H. Lee, J. Phuchareon, D. G. Albertson, F. McCormick, and O. Tetsu. 2006. A critical role for FBXW8 and MAPK in cyclin D1 degradation and cancer cell proliferation. *PLoS One* 1:e128.
- Pagano, M., A. M. Theodoras, S. W. Tam, and G. F. Draetta. 1994. Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts. *Genes Dev* 8 (14):1627-39.
- Palma, V., D. A. Lim, N. Dahmane, P. Sanchez, T. C. Brionne, C. D. Herzberg, Y. Gitton, A. Carleton, A. Alvarez-Buylla, and A. Ruiz i Altaba. 2005. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132 (2):335-44.
- Palma, V., and A. Ruiz i Altaba. 2004. Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* 131 (2):337-45.
- Papadodima, O., M. Sergaki, C. Hurel, A. Mamalaki, and R. Matsas. 2005. Characterization of the BM88 promoter and identification of an 88 bp fragment sufficient to drive neurone-specific expression. *J Neurochem* 95 (1):146-59.
- Park, J., Y. Oh, L. Yoo, M. S. Jung, W. J. Song, S. H. Lee, H. Seo, and K. C. Chung. 2010. Dyrk1A phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells. *J Biol Chem* 285 (41):31895-906.
- Patsavoudi, E., C. Hurel, and R. Matsas. 1989. Neuron- and myelin-specific monoclonal antibodies recognizing cell-surface antigens of the central and peripheral nervous system. *Neuroscience* 30 (2):463-78.
- Patsavoudi, E., C. Hurel, and R. Matsas. 1991. Purification and characterization of neuron-specific surface antigen defined by monoclonal antibody BM88. *J Neurochem* 56 (3):782-8.
- Patsavoudi, E., E. Merkouri, D. Thomaidou, F. Sandillon, G. Alonso, and R. Matsas. 1995. Characterization and localization of the BM88 antigen in the developing and adult rat brain. *J Neurosci Res* 40 (4):506-18.
- Petersen, B. O., J. Lukas, C. S. Sorensen, J. Bartek, and K. Helin. 1999. Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J* 18 (2):396-410.
- Pines, J., and T. Hunter. 1991. Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 115 (1):1-17.
- Poirier, M. B., L. Laflamme, and M. F. Langlois. 2006. Identification and characterization of RanBPM, a novel coactivator of thyroid hormone receptors. *J Mol Endocrinol* 36 (2):313-25.

- Politis, P. K., S. Akrivou, C. Hurel, O. Papadodima, and R. Matsas. 2008. BM88/Cend1 is involved in histone deacetylase inhibition-mediated growth arrest and differentiation of neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 582 (5):741-8.
- Politis, P. K., G. Makri, D. Thomaidou, M. Geissen, H. Rohrer, and R. Matsas. 2007. BM88/CEND1 coordinates cell cycle exit and differentiation of neuronal precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (45):17861-6.
- Politis, P. K., H. Rohrer, and R. Matsas. 2007. Expression pattern of BM88 in the developing nervous system of the chick and mouse embryo. *Gene Expr Patterns* 7 (1-2):165-77.
- Puverel, S., C. Barrick, S. Dolci, V. Coppola, and L. Tessarollo. 2011. RanBPM is essential for mouse spermatogenesis and oogenesis. *Development* 138 (12):2511-21.
- Rao, M. A., H. Cheng, A. N. Quayle, H. Nishitani, C. C. Nelson, and P. S. Rennie. 2002. RanBPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 277 (50):48020-7.
- Riabowol, K., G. Draetta, L. Brizuela, D. Vandre, and D. Beach. 1989. The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. *Cell* 57 (3):393-401.
- Rodriguez, I., R. Hernandez, J. Modolell, and M. Ruiz-Gomez. 1990. Competence to develop sensory organs is temporally and spatially regulated in Drosophila epidermal primordia. *EMBO J* 9 (11):3583-92.
- Rowitch, D. H., S. Jacques B, S. M. Lee, J. D. Flax, E. Y. Snyder, and A. P. McMahon. 1999. Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J Neurosci* 19 (20):8954-65.
- Ruiz i Altaba, A., V. Palma, and N. Dahmane. 2002. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* 3 (1):24-33.
- Sacher, F., C. Moller, W. Bone, U. Gottwald, and M. Fritsch. 2007. The expression of the testis-specific Dyrk4 kinase is highly restricted to step 8 spermatids but is not required for male fertility in mice. *Mol Cell Endocrinol* 267 (1-2):80-8.
- Saito, Y., J. R. Vandenheede, and P. Cohen. 1994. The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase 3 in A431 cells. *Biochem J* 303 (Pt 1):27-31.
- Salomoni, P., and F. Calegari. 2010. Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1. *Trends Cell Biol* 20 (5):233-43.
- Satyanarayana, A., and P. Kaldis. 2009. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 28 (33):2925-39.
- Seebahn, A., M. Rose, and R. Enz. 2008. RanBPM is expressed in synaptic layers of the mammalian retina and binds to metabotropic glutamate receptors. *FEBS Lett* 582 (16):2453-7.
- Selkoe, D., and R. Kopan. 2003. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26:565-97.
- Sergaki, M. C., F. Guillemot, and R. Matsas. 2010. Impaired cerebellar development and deficits in motor coordination in mice lacking the neuronal protein BM88/Cend1. *Mol Cell Neurosci* 44 (1):15-29.
- Sherr, C. J. 1993. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73 (6):1059-65.
- Sherr, C. J., and J. M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13 (12):1501-12.
- Sherr, C. J., and J. M. Roberts. 2004. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 18 (22):2699-711.
- Shimojo, H., T. Ohtsuka, and R. Kageyama. 2011. Dynamic expression of notch signaling genes in neural stem/progenitor cells. *Front Neurosci* 5:78.

- Sicinski, P., J. L. Donaher, S. B. Parker, T. Li, A. Fazeli, H. Gardner, S. Z. Haslam, R. T. Bronson, S. J. Elledge, and R. A. Weinberg. 1995. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 82 (4):621-30.
- Sommer, L., N. Shah, M. Rao, and D. J. Anderson. 1995. The cellular function of MASH1 in autonomic neurogenesis. *Neuron* 15 (6):1245-58.
- Soppa, U., J. Schumacher, V. Florencio Ortiz, T. Pasqualon, F. J. Tejedor, and W. Becker. 2014. The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27 and Cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle* 13 (13).
- Sumrejkanchanakij, P., M. Tamamori-Adachi, Y. Matsunaga, K. Eto, and M. A. Ikeda. 2003. Role of cyclin D1 cytoplasmic sequestration in the survival of postmitotic neurons. *Oncogene* 22 (54):8723-30.
- Sun, W., D. K. Lee, C. C. Lee, and K. Kim. 1996. Differential expression of D-type G1 cyclins during mouse development and liver regeneration in vivo. *Mol Reprod Dev* 43 (4):414-20.
- Suresh, B., S. Ramakrishna, and K. H. Baek. 2012. Diverse roles of the scaffolding protein RanBPM. *Drug Discov Today* 17 (7-8):379-87.
- Suresh, B., S. Ramakrishna, Y. S. Kim, S. M. Kim, M. S. Kim, and K. H. Baek. 2010. Stability and function of mammalian lethal giant larvae-1 oncoprotein are regulated by the scaffolding protein RanBPM. *J Biol Chem* 285 (46):35340-9.
- Takahashi-Yanaga, F., J. Mori, E. Matsuzaki, Y. Watanabe, M. Hirata, Y. Miwa, S. Morimoto, and T. Sasaguri. 2006. Involvement of GSK-3beta and DYRK1B in differentiation-inducing factor-3-induced phosphorylation of cyclin D1 in HeLa cells. *J Biol Chem* 281 (50):38489-97.
- Tejedor, F. J., and B. Hammerle. 2011. MNB/DYRK1A as a multiple regulator of neuronal development. *FEBS J* 278 (2):223-35.
- Tejedor, F., X. R. Zhu, E. Kaltenbach, A. Ackermann, A. Baumann, I. Canal, M. Heisenberg, K. F. Fischbach, and O. Pongs. 1995. minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila. *Neuron* 14 (2):287-301.
- Thisse, B., and C. Thisse. 2005. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol* 287 (2):390-402.
- Thomas, K. R., and M. R. Capecchi. 1990. Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* 346 (6287):847-50.
- Togashi, H., E. F. Schmidt, and S. M. Strittmatter. 2006. RanBPM contributes to Semaphorin3A signaling through plexin-A receptors. *J Neurosci* 26 (18):4961-9.
- Torri, F., A. Akelai, S. Lupoli, M. Sironi, D. Amann-Zalcenstein, M. Fumagalli, C. Dal Fiume, E. Ben-Asher, K. Kanyas, R. Cagliani, P. Cozzi, G. Trombetti, L. Strik Lievers, E. Salvi, A. Orro, J. S. Beckmann, D. Lancet, Y. Kohn, L. Milanesi, R. B. Ebstein, B. Lerer, and F. Macciardi. 2010. Fine mapping of AHI1 as a schizophrenia susceptibility gene: from association to evolutionary evidence. *FASEB J* 24 (8):3066-82.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (9):4350-4.
- Toyoshima, H., and T. Hunter. 1994. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78 (1):67-74.
- Trommsdorff, M., M. Gotthardt, T. Hiesberger, J. Shelton, W. Stockinger, J. Nimpf, R. E. Hammer, J. A. Richardson, and J. Herz. 1999. Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97 (6):689-701.

- Tury, A., G. Mairet-Coello, and E. DiCicco-Bloom. 2011. The cyclin-dependent kinase inhibitor p57Kip2 regulates cell cycle exit, differentiation, and migration of embryonic cerebral cortical precursors. *Cereb Cortex* 21 (8):1840-56.
- Ulloa, F., and J. Briscoe. 2007. Morphogens and the control of cell proliferation and patterning in the spinal cord. *Cell Cycle* 6 (21):2640-9.
- van Lookeren Campagne, M., and R. Gill. 1998. Tumor-suppressor p53 is expressed in proliferating and newly formed neurons of the embryonic and postnatal rat brain: comparison with expression of the cell cycle regulators p21Waf1/Cip1, p27Kip1, p57Kip2, p16Ink4a, cyclin G1, and the proto-oncogene Bax. *J Comp Neurol* 397 (2):181-98.
- Vescovi, A. L., B. A. Reynolds, D. D. Fraser, and S. Weiss. 1993. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11 (5):951-66.
- Wakabayashi, T., J. Kosaka, M. Mochii, Y. Miki, T. Mori, Y. Takamori, and H. Yamada. 2010. C38, equivalent to BM88, is developmentally expressed in maturing retinal neurons and enhances neuronal maturation. *J Neurochem* 112 (5):1235-48.
- Wang, D., Z. Li, E. M. Messing, and G. Wu. 2002. Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J Biol Chem* 277 (39):36216-22.
- Wang, Y., E. Marion Schneider, X. Li, I. Duttenhofer, K. Debatin, and H. Hug. 2002. HIPK2 associates with RanBPM. *Biochem Biophys Res Commun* 297 (1):148-53.
- Wechsler-Reya, R. J., and M. P. Scott. 1999. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22 (1):103-14.
- Weng, L., Y. F. Lin, A. L. Li, C. E. Wang, S. Yan, M. Sun, M. A. Gaertig, N. Mitha, J. Kosaka, T. Wakabayashi, X. Xu, B. Tang, S. Li, and X. J. Li. 2013. Loss of Ahi1 Affects Early Development by Impairing BM88/Cend1-Mediated Neuronal Differentiation. *J Neurosci* 33 (19):8172-8184.
- Wine-Lee, L., K. J. Ahn, R. D. Richardson, Y. Mishina, K. M. Lyons, and E. B. Crenshaw, 3rd. 2004. Signaling through BMP type 1 receptors is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal cord. *Development* 131 (21):5393-403.
- Wu, Y., X. Sun, E. Kaczmarek, K. M. Dwyer, E. Bianchi, A. Usheva, and S. C. Robson. 2006. RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity. *Biochem J* 396 (1):23-30.
- Yabut, O., J. Domogauer, and G. D'Arcangelo. 2010. Dyrk1A overexpression inhibits proliferation and induces premature neuronal differentiation of neural progenitor cells. *J Neurosci* 30 (11):4004-14.
- Yan, G. Z., and E. B. Ziff. 1995. NGF regulates the PC12 cell cycle machinery through specific inhibition of the Cdk kinases and induction of cyclin D1. *J Neurosci* 15 (9):6200-12.
- Yin, Y. X., Z. P. Sun, S. H. Huang, L. Zhao, Z. Geng, and Z. Y. Chen. 2010. RanBPM contributes to TrkB signaling and regulates brain-derived neurotrophic factor-induced neuronal morphogenesis and survival. *J Neurochem* 114 (1):110-21.
- Yoshikawa, K. 2000. Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons. *Neurosci Res* 37 (1):1-14.
- Yu, Z. K., J. L. Gervais, and H. Zhang. 1998. Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21(CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (19):11324-9.
- Yuan, Y., C. Fu, H. Chen, X. Wang, W. Deng, and B. R. Huang. 2006. The Ran binding protein RanBPM interacts with TrkA receptor. *Neurosci Lett* 407 (1):26-31.
- Zou, Y., D. Z. Ewton, X. Deng, S. E. Mercer, and E. Friedman. 2004. Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by phosphorylation at threonine 288. *J Biol Chem* 279 (26):27790-8.
- Zou, Y., S. Lim, K. Lee, X. Deng, and E. Friedman. 2003. Serine/threonine kinase Mirk/Dyrk1B is an inhibitor of epithelial cell migration and is negatively regulated by the Met adaptor Ran-binding protein M. *J Biol Chem* 278 (49):49573-81.

Κουσουλάκος, Στ. 2002. *Εισαγωγή στην Αναπτυξιακή Βιολογία και Ιστολογία*: Πανεπιστήμιο Αθηνών.