



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Θέμα: Κατασκευή και χαρακτηρισμός πλασμιδιακού φορέα
έκφρασης του KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) σε
καρκινικά κύτταρα.**

Κυριάκου Παναγιώτα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ευφροσύνη Παρασκευά, Καθηγήτρια Κυτταρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Π. Θ. (Επιβλέπουσα)
- Λεωνίδας Δημήτριος, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ. (Συνεπιβλέπον)
- Ψαρρά Άννα-Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Λάρισα, Σεπτέμβριος, 2023



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

DISSERTATION

TITLE: Construction and characterization of a mammalian expression vector of KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) in cancer cells.

By

Kyriakou Panagiota

Examining Committee:

- Efrosyni Paraskeva, Professor of Cellular Physiology, Faculty of Medicine, University of Thessaly (supervisor)
- Leonidas Dimitrios, Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly (co-supervisor)
- Psarra Anna-Maria, Associate Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly

Larissa, September 2023

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια των σπουδών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την κυρία Ευφροσύνη Παρασκευά, η οποία ήταν η επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τα πειράματά μου και για το χρόνο που αφιέρωσε να με καθοδηγήσει κατά την εκπόνηση της πτυχιακής μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κύριο Δημήτριο Λεωνίδα και κυρία Άννα – Μαρία Ψαρρά για τη συμμετοχή τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας για την άριστη συνεργασία και τη στήριξη κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΟΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη	6
Abstract	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1. Το σύστημα NRF2/KEAP1	8
1.2. Δομή του παράγοντα NRF2.....	8
1.3. Δομή του παράγοντα KEAP1	8
1.4. Ρύθμιση του μονοπατιού NRF2/KEAP1	10
1.4.1. Ρύθμιση του μονοπατιού NRF2/KEAP1 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.....	10
1.4.2. Γονίδια στόχοι του μονοπατιού NRF2/KEAP1	12
1.5. Ρόλος του μονοπατιού NRF2/KEAP1	12
1.5.1. Ρόλος του μονοπατιού NRF2/KEAP1 σε ασθένειες.....	12
1.5.2. Ρόλος του μονοπατιού NRF2/KEAP1 στον καρκίνο.....	13
1.6. Κοκκία του στρες.....	15
1.6.1. Σχηματισμός κοκκίων του στρες.....	15
1.6.2. Δράσεις κοκκίων του στρες.....	15
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	17
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
3.1. Πλασμιδιακοί φορείς.....	18
3.2. Μοριακή υποκλωνοποίηση.....	20
- Μετασχηματισμός βακτηρίων με θερμικό σοκ.....	20
- Απομόνωση αποικιών βακτηρίων από τρυβλίο.....	21
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (minipreparation).....	21
- Μέτρηση συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων με Nanodrop	21
- Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού.....	22
- Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 1%.....	22
- Ανάκτηση DNA από πηκτή αγαρόζης.....	23
- Αντίδραση λιγάσης.....	23
3.3. Κυτταροκαλλιέργειες.....	24
- Καλλιέργεια κυττάρων.....	24
- Πάγωμα κυττάρων από καλλιέργεια και επανέναρξη καλλιιεργειών.....	24
- Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer με χρωστική Trypan Blue.....	25
- Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων.....	25
3.4. Ανάλυση πρωτεϊνών.....	26

- Παρασκευή πρωτεϊνικού κυτταρικού εκχυλίσματος.....	26
- Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	26
- Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (Western blotting).....	27
- Ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	28
- Ανοσοαποτύπωση.....	29
- Ανίχνευση πρωτεϊνών με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια.....	29
- Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	31
3.5. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).....	32
- Απομόνωση ολικού RNA από βιολογικά δείγματα.....	32
- Παρασκευή DNA.....	32
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time Quantitative Polymerase chain reaction/RT-qPCR).....	33
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
4.1. Κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα pcDNA3-C4-EGFP-KEAP1.....	36
4.2. Έλεγχος της έκφρασης και του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης EGFP-KEAP1.....	43
4.3. Μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης EGFP-KEAP1 στο μεταγραφικό παράγοντα NRF2.....	45
4.4. Μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης EGFP-KEAP1 στον σχηματισμό κοκκίων του στρες σε κύτταρα A549.....	46
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι οργανισμοί, συχνά εκτίθενται σε συνθήκες και τοξικές ουσίες, που διαταράσσουν τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων τους. Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, προκαλούνται βλάβες στα νουκλεϊκά οξέα, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια των μεμβρανών. Τα κύτταρα για την προσαρμογή και την επιβίωσή τους, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας, οι οποίοι συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης. Το βασικότερο σύστημα άμυνας που συμβάλλει στην ενεργοποίηση και τη ρύθμιση των κυτταροπροστατευτικών αποκρίσεων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες είναι το μονοπάτι KEAP1-NRF2, ενεργοποιώντας την έκφραση γονιδίων για το μεταβολισμό σιδήρου και αμινοξέων και την επιδιόρθωση του DNA, που συμβάλλουν στην επιβίωση των κυττάρων. Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο παράγοντας NRF2, που εκφράζεται συνεχώς, συνδέεται με τον παράγοντα KEAP1 και οδηγείται σε αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Αντίθετα, όταν το κύτταρο εκτίθεται σε δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), ο NRF2 απελευθερώνεται από τον KEAP1, σταθεροποιείται, εισέρχεται στον πυρήνα των κυττάρων και ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων στόχων. Μελέτες έχουν δείξει πως μεταλλάξεις στο σύστημα KEAP1-NRF2 είναι άμεσα συνδεδεμένες με την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών, όπως διάφοροι τύποι καρκίνου.

Στόχοι της παρούσας εργασίας, ήταν η μελέτη της επίδρασης του NRF2-KEAP1 σε καρκινικά κύτταρα A549. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε πλασμιδιακός φορέας pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1, για την υπερέκφραση του KEAP1 σε σύντηξη με την πρωτεΐνη EGFP. Μετά από έλεγχο της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης EGFP-KEAP1, ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1 χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης για τη μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης KEAP1 στο μεταγραφικό παράγοντα NRF2 και στην έκφραση των γονιδίων στόχων του. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης EGFP-KEAP1 οδήγησε στη μείωση της μεταγραφικής δράσης του NRF2, όπως φαίνεται από τη μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου στόχου του NQO1 σε κύτταρα A549.

Συνεπώς, ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1, είναι κατάλληλος να χρησιμοποιηθεί στη διερεύνηση της ρύθμισης του συστήματος KEAP1-NRF2 και της απόκρισης των καρκινικών κυττάρων A549 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

ABSTRACT

Organisms are often exposed to conditions and toxic substances, which disrupt cell physiological function. Nucleic acids, proteins and membrane lipids are damaged during oxidative stress. To adapt and survive under these conditions, cells have developed defense mechanisms, which participate in maintaining cellular homeostasis. The NRF2-KEAP1 pathway is a key system in activating the expression of genes responsible for iron metabolism, amino acid metabolism and DNA repair for the survival of the cell. Under normal conditions, NRF2 which is consecutively expressed, is driven to degradation by subsequent ubiquitination of KEAP1. However, when cells are exposed to ROS, NRF2 is stabilized, it enters the cell's nucleus and activates the expression of its target genes. Studies have shown that mutations in the NRF2-KEAP1 system are directly associated with the occurrence of various diseases, while they have a leading role in the development and metastasis of different types of cancer.

The aim of this study was to investigate the effect of the NRF2-KEAP1 pathway in the A549 cancer cell line. For this purpose, we constructed a plasmid vector, for the overexpression of protein KEAP1 in fusion with EGFP. After confirming the overexpression of the EGFP-KEAP1 protein, the pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1 plasmid vector was used in transient transfection experiments to study the effect of the KEAP1 protein on the expression of NRF2 and its target genes. Overexpressing EGFP-KEP1 protein led to reducing NRF2 transcriptional level, which is verified by the reduction in mRNA levels of NQO1 gene in A549.

Therefore, the pcDNA3-EGFP-C4-KEAP plasmid vector is suitable for regulating the expression of the NRF2-KEAP1 system. It can also be used to research the cellular response of A549 during oxidative stress.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το σύστημα NRF2/KEAP1

Το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη και την εξέλιξη χρόνιων ασθενειών, όπως ο διαβήτης, ο καρκίνος και διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσοι. Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες αυξάνονται η παραγωγή και η συγκέντρωση ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species), οι οποίες σε υψηλές συγκεντρώσεις αντιδρούν με κυτταρικά μακρομόρια και μεταβάλλουν τις βιοχημικές και φυσικές τους ιδιότητες, με αποτέλεσμα την κυτταρική δυσλειτουργία και το θάνατο.^{[1][3]} Έχει βρεθεί ότι το μονοπάτι NRF2/KEAP1 (Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2/Kelch-like ECH-associated protein 1) συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων για την προστασία των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Οι κύριες πρωτεΐνες του συστήματος είναι ο μεταγραφικός παράγοντας NRF2 (Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2) και η πρωτεΐνη KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)^[2].

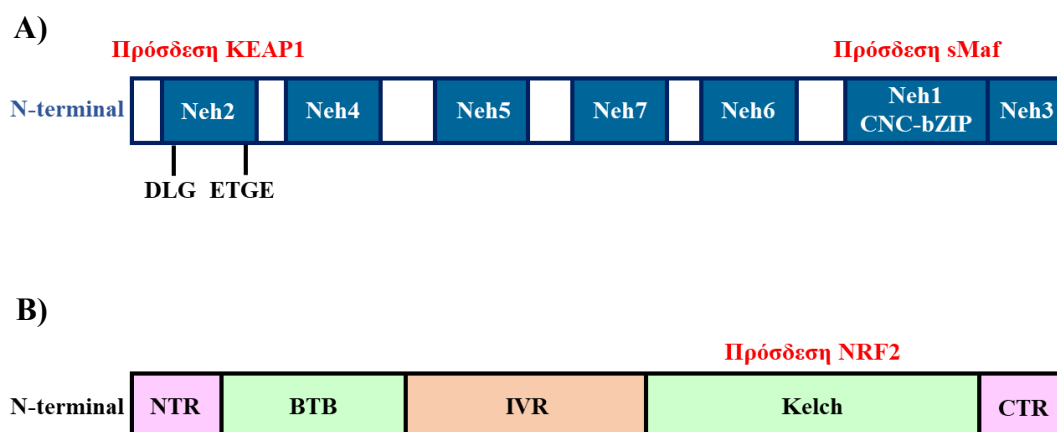
1.2. Δομή του παράγοντα NRF2

Ο μεταγραφικός παράγοντας NRF2 αποτελεί μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων cap'n'collar (CNC) basic-region leucine zipper. Αποτελείται από 589 αμινοξέα. Παρουσιάζει 7 εξελικτικά διατηρημένες επικράτειες, Neh1-7. Η Neh1 επικράτεια, περιέχει τη βασική περιοχή ομολογίας CNC και το μοτίβο bZip (δομή φερμουάρ λευκίνης L-Zip). Η περιοχή αυτή, που παρουσιάζει ομολογία με τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-E2 p45, NRF1, NRF2, NRF3, BACH1, BACH2^[1], είναι απαραίτητη για την αναγνώριση του DNA και για το διμερισμό του NRF2 με μικρές πρωτεΐνες της οικογένειας του μυοαπονευρωτικού ινοσαρκώματος (sMaf proteins).^{[2][4]} Η περιοχή Neh6 μεσολαβεί για την αποικοδόμηση του NRF2 μέσω της πρόσδεσης με τις β-TrCP πρωτεΐνες (β-transducin repeat-containing protein). Οι περιοχές Neh4, 5 συμμετέχουν στην πρόσδεση του παράγοντα με τις πρωτεΐνες CBP (cAMP response element-binding protein (CREB)-binding protein) και την RAC3 (receptor-associated coactivator 3), για την ενεργοποίησή του. Η επικράτεια Neh7, έχει αποδειχθεί απαραίτητη για την πρόσδεση αρνητικών ρυθμιστών του NRF2. Τέλος, η επικράτεια Neh2, που βρίσκεται κοντά στο αμινοτελικό άκρο (N-terminal), περιλαμβάνει τις ETGE και DLG, περιοχές απαραίτητες για την αλληλεπίδρασή του με τον KEAP1 και μία υδρόφιλη περιοχή από 7 κατάλοιπα λυσίνης που συμμετέχουν στην εξαρτώμενη από τον KEAP1 πολυουβικουτίνωση και αποικοδόμηση του NRF2 (Εικόνα 1Α)^{[2][4]}.

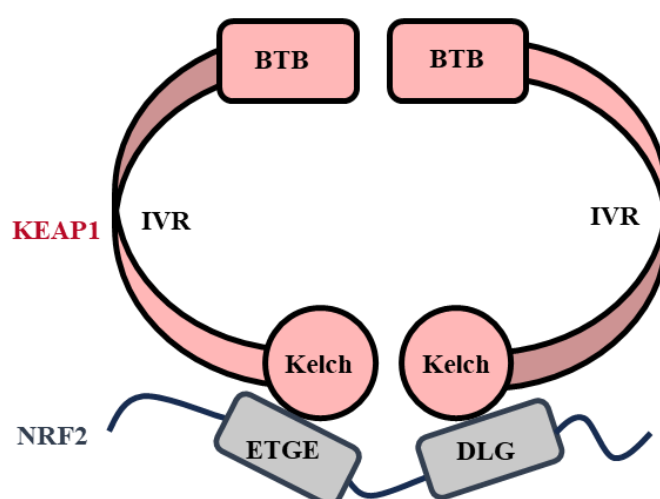
1.3. Δομή του παράγοντα KEAP1

Η πρωτεΐνη KEAP1 αποτελείται από 624 αμινοξέα και 5 επικράτειες. Δίπλα στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης βρίσκεται η επικράτεια BTB (Tramtrack and Bric a brac domain), η οποία ελέγχει τον ομοδιμερισμό του KEAP1 και την πρόσδεση με την

πρωτεΐνη cullin3 (cul3). Στο άλλο άκρο βρίσκεται η επικράτεια Kelch η οποία είναι αναγκαία για την αλληλεπίδραση με την Neh2 επικράτεια του παράγοντα NRF2. Οι δύο επικράτειες διαχωρίζονται από την ενδιάμεση περιοχή (IVR). Ο παράγοντας KEAP1 είναι πλούσιος σε κατάλοιπα κυστεΐνης, τα οποία συμβάλλουν στις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με τον παράγοντα NRF2, με αποτέλεσμα μεταλλάξεις στα κατάλοιπα αυτά επακολουθούν δυσλειτουργία του συστήματος NRF2/KEAP1 (Εικόνα 1B)^{[1][2]}.



Εικόνα 1: A) Δομή του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 και οι περιοχές αλληλεπίδρασής του με άλλες πρωτεΐνες. B) Δομή του μεταγραφικού παράγοντα KEAP1 και οι περιοχές αλληλεπίδρασής του με άλλες πρωτεΐνες. NTR (amino-terminal region), CTR (carboxyl terminal region).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 με την πρωτεΐνη KEAP1 για την ενεργοποίηση του μονοπατιού και την αποικοδόμηση του NRF2.

1.4. Ρύθμιση του μονοπατιού NRF2/KEAP1

Σε φυσιολογικές συνθήκες ο παράγοντας NRF2 είναι μία ασταθής πρωτεΐνη που εκφράζεται συνεχώς και οδηγείται σε αποικοδόμηση στο κυτταρόπλασμα, ενώ ένα μικρό ποσοστό μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων στόχων συμμετέχοντας στη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων^[2]. Αυτό συμβαίνει κυρίως επειδή οι επικράτειες ETGE και DLG του παράγοντα NRF2 αναγνωρίζονται από την επικράτεια Kelch του KEAP1. Έτσι, σχηματίζεται ένα σύμπλοκο με δύο μόρια της πρωτεΐνης KEAP1 και ένα μόριο του NRF2. Σε αυτή τη διαμόρφωση ο NRF2 αναγνωρίζεται από την Cul3/Rbx1 της E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης και οδηγείται σε αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα, ενώ ο KEAP1 είναι ελεύθερος ξανά να προσδεθεί με νέο μόριο NRF2 (Εικόνα 2).

Εκτός από το βασικό σύστημα ρύθμισης μέσω του KEAP1, έχουν αναγνωριστεί άλλα δύο συστήματα λιγάσης της ουβικουιτίνης για την αποικοδόμηση του NRF2^[4]. Ένα από αυτά αποτελεί το μονοπάτι GSK-3/β-TrCP, μέσω του οποίου η κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου GSK3 (glycogen synthase kinase 3) φωσφορυλιώνει συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης στην Neh6 επικράτεια του NRF2. Έτσι, ο παράγοντας αναγνωρίζεται από τη β-TrCP λιγάση της ουβικουιτίνης και οδηγείται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα μέσω του συμπλόκου Skp1-Cullin1/Rbx1^{[4][31][32]}. Στο δεύτερο μονοπάτι ο NRF2 οδηγείται σε αποικοδόμηση μέσω της λιγάσης Hrd1 (3-hydroxy-3-methylglutaryl reductase degradation 1) στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER-endoplasmic reticulum), η οποία γενικά συμμετέχει στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών που δεν είναι σωστά αναδιπλωμένες^{[4][32]}. Συνεπώς, ο NRF2 αναγνωρίζει και προσδένεται, μέσω των Neh4 και 5 επικρατειών του, στην καρβοξυτελική περιοχή (C-terminal) της μεμβρανικής πρωτεΐνης HRD1 και οδηγείται σε αποικοδόμηση^[33].

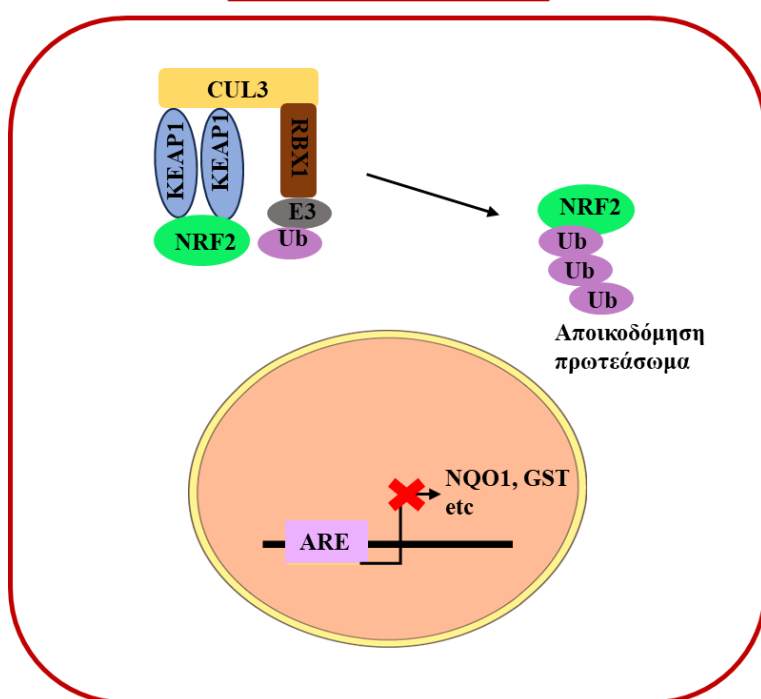
1.4.1. Ρύθμιση του μονοπατιού NRF2/KEAP1 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες

Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες η λειτουργία του KEAP1 απενεργοποιείται, ώστε να είναι αδύνατον να προσδεθεί στον NRF2, με αποτέλεσμα ο μεταγραφικός παράγοντας NRF2 να είναι ελεύθερος να μεταβεί στον πυρήνα και να ενεργοποιήσει γονίδια στόχους που σχετίζονται με την επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες στρες. Τα κατάλοιπα κυστεΐνης που βρίσκονται στην ενδιάμεση περιοχή (IVR) και στην επικράτεια BTB, παίζουν το βασικότερο ρόλο στην αλληλεπίδραση του KEAP1 με τον NRF2. Έχουν βρεθεί τα κατάλοιπα Cys273 και Cys288 στην περιοχή IVR και το κατάλοιπο Cys151 στην επικράτεια BTB, τα οποία συμμετέχουν στην παραπάνω αλληλεπίδραση, λειτουργούν ως αισθητήρες οξειδωτικού στρες και μεταβάλλουν τη σχηματική αναδιαμόρφωση του KEAP1, υπό αυτές τις συνθήκες. Το κατάλοιπο Cys151 λειτουργεί ως κύριος αισθητήρας του οξειδωτικού στρες, ανακόπτει την αλληλεπίδραση μεταξύ KEAP1 και Cul3 και οδηγεί στην απομάκρυνση του NRF2 από τον KEAP1. Ως συνέπεια, ανακόπτεται η πρόσδεση του συμπλόκου KEAP1-Cul3 με τον NRF2 και ο παράγοντας είναι ελεύθερος να εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου και να ενεργοποιήσει την έκφραση των γονιδίων στόχων του^{[18][19]}.

Εκτός από τη τροποποίηση του KEAP1 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, διάφορες μεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσουν σε συνεχή ενεργοποίηση του NRF2. Υπάρχουν δύο γνωστοί τύποι ενεργοποίησης του NRF2. Μεταλλάξεις σε ομάδες θειόλης του KEAP1 ανακόπτουν την αλληλεπίδρασή του με τον NRF2. Έτσι ο παράγοντας δεν μπορεί να αναγνωρισθεί από το σύμπλοκο E3 λιγάσης και να πολυουβικουτινωθεί. Το δεύτερο γνωστό μονοπάτι αφορά μεταλλάξεις στα κατάλοιπα κυτεΐνης του KEAP1, που έχουν ως αποτέλεσμα το σύμπλοκο Cul3 της E3 λιγάσης να αποσυνδέεται από το σύμπλοκο NRF2/KEAP1 και δεν οδηγείται για αποικοδόμηση. Έχουν βρεθεί, επίσης, πρωτεΐνες, όπως οι p21 και p62, οι οποίες προσδένονται στον NRF2 ή τον KEAP1 εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων^[2].

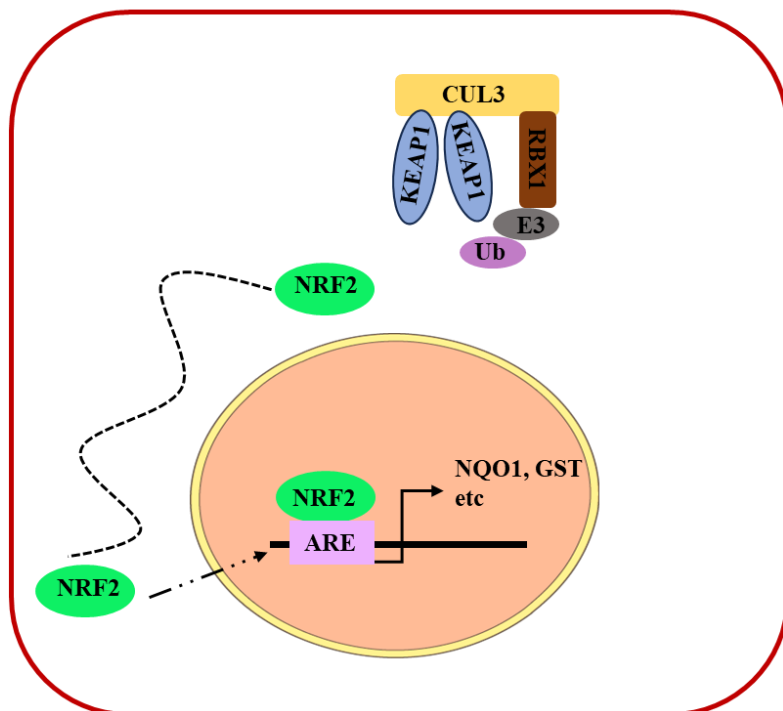
A)

Φυσιολογικές συνθήκες



B)

Σήματα οξειδωτικού στρες
(Ενεργοποίηση)



Εικόνα 3: Ρύθμιση της λειτουργίας του μονοπατιού NRF2/KEAP1 σε: Α) Φυσιολογικές συνθήκες και Β) Συνθήκες οξειδωτικού στρες.

1.4.2. Γονίδια στόχοι του μονοπατιού NRF2/KEAP1

Σε συνθήκες στρες, στον πυρήνα των κυττάρων ο NRF2 σταθεροποιείται, προσδένεται με πρωτεΐνες sMaf, μετατοπίζεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με μεταβολικές και κυτταροπροστατευτικές διαδικασίες^[6]. Τα γονίδια στόχοι του NRF2 περιλαμβάνουν ενισχυτές με αλληλουχίες AREs (antioxidant response elements). Συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης, στο μεταβολισμό φαρμάκων, στο μεταβολισμό των λιπιδίων, των υδατανθράκων, των αμινοξέων και του σιδήρου, στην επιδιόρθωση του DNA, στην αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα, στην προστασία από τη γήρανση και στη λειτουργία των μιτοχονδρίων^{[7][8]}. Μερικά παραδείγματα αυτών των γονιδίων αποτελούν τα NQO1 (NAD(P)H quinone oxidoreductase 1), HMOX1 (heme oxygenase 1), GCL (glutamate-cysteine ligase), PRDX1 (Peroxiredoxin 1), GST (glutathione S transferases) και MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog - avian)^{[9][10]}.

1.5. Ρόλος του μονοπατιού NRF2/KEAP1

1.5.1. Ρόλος του μονοπατιού NRF2/KEAP1 σε ασθένειες

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ο παράγοντας NRF2 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση ενός μεγάλου δικτύου γονιδίων που

κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στην προστασία των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες. Έτσι, η ενεργοποίησή του επιτρέπει την αντιμετώπιση διαφόρων τύπων κυτταρικού στρες. Μεταλλάξεις, που προκαλούν δυσλειτουργία του συστήματος NRF2/KEAP1 και μειωμένη ενεργοποίηση του NRF2 αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης διαφόρων ασθενειών του οργανισμού^{[4][22][23][24]}. Μελέτες έχουν δείξει πως η μειωμένη ενεργοποίηση του NRF2 οδηγεί στη μειωμένη έκφραση των γονιδίων στόχων και την αυξημένη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες. Ασθένειες που έχει παρατηρηθεί αυτό είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, η στεφανιαία καρδιακή νόσος, ο αυτισμός και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Πάρκινσον^{[20][21][26][27][30]}. Άλλες ασθένειες είναι αναπνευστικές ανεπάρκειες, όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και το εμφύσημα λόγω καπνίσματος, η λοιμώδης γαστρεντερική φλεγμονή, διάφορες νευρολογικές παθήσεις, όπως η αταξία Friedreich, η νόσος Huntington και η φυματίωση^{[11][12][25][28][29]}.

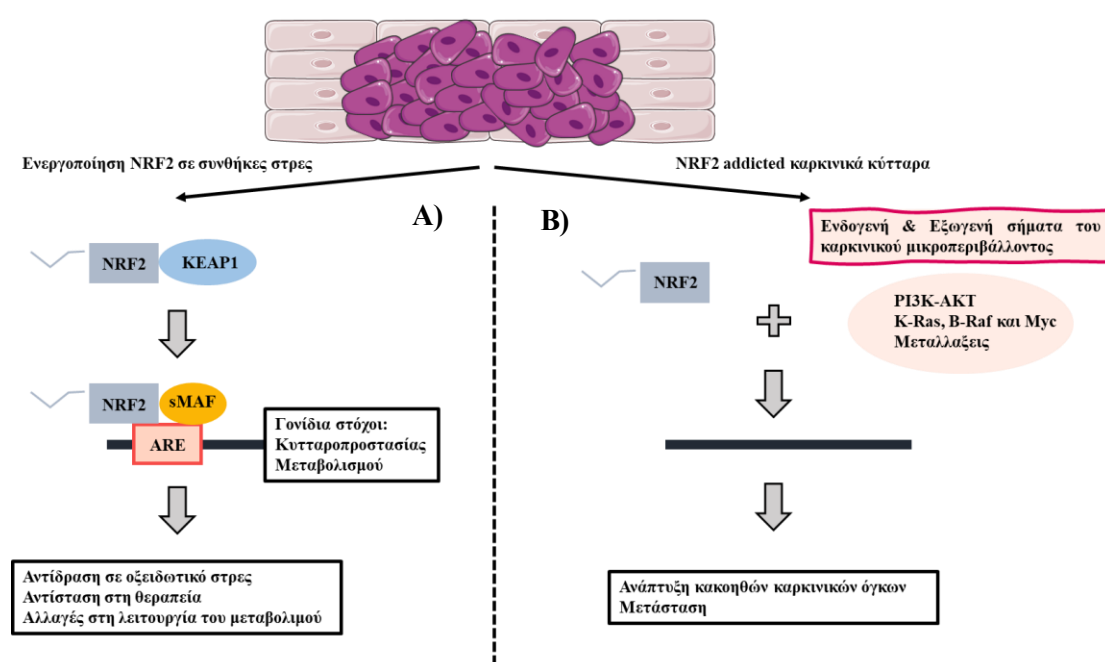
1.5.2. Ρόλος μονοπατιού NRF2/KEAP1 στον καρκίνο

Από τη βιβλιογραφία έγινε γνωστό ότι σε φυσιολογικές, μικρές συγκεντρώσεις NRF2 είναι επαρκείς για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης. Ο NRF2 αναστέλλει τη δημιουργία και τη μετάσταση καρκινικών όγκων, εξουδετερώνοντας καρκινογόνες ουσίες, τοξικές ρίζες οξυγόνου (ROS) και άλλους παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA^[2]. Ωστόσο, σε πολλούς τύπους καρκίνων έχουν μελετηθεί μεταλλάξεις στα γονίδια των πρωτεϊνών του συστήματος NRF2/KEAP1, που ενισχύουν την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, προκαλώντας συνεχή έκφραση και σταθεροποίηση του NRF2 και ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του. Τέτοιου τύπου σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια των NRF2 και KEAP1 έχουν εντοπιστεί στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, σε καρκίνους του μαστού, της χοληδόχου κύστης, του οισοφάγου και του δέρματος. Επίσης, μεταλλάξεις του συστήματος CuI3 της E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης, εντοπίστηκαν σε καρκίνους των κυττάρων των νεφρών και σε κεφαλικά και αυχενικά καρκινώματα^[13].

Η αυξημένη έκφραση του NRF2 σε καρκινικά κύτταρα προκαλεί μεταβολικές αλλαγές σε καρκινικά κύτταρα, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη αναπαραγωγή των καρκινικών κυττάρων και την αντίσταση σε χημειοθεραπείες, σε ακτινοβολίες και φάρμακα. Επιπλέον, όγκοι με υψηλά επίπεδα NRF2 παρουσιάζουν αυξημένη μεταστατική ικανότητα και χαμηλή ανταπόκριση σε θεραπείες. Τα καρκινικά κύτταρα αυτών των όγκων αναφέρονται ως NRF2-addicted καρκινικά κύτταρα^[13].

Μελέτες έχουν βρει πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς που προκαλούν συνεχή ενεργοποίηση του NRF2, όπως σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου του KEAP1 και των περιοχών DLG και ETGE του γονιδίου του NRF2. Επιπλέον, έχουν βρεθεί μορφές του NRF2 που στερούνται το εξόνιο 2, οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν με τον KEAP1. Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τη λειτουργία του συστήματος NRF2/KEAP1 είναι τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA. Σε διάφορους τύπους καρκίνων,

έχουν παρατηρηθεί τέτοιες επιγενετικές τροποποιήσεις, με αποτέλεσμα την αυξημένη ενεργοποίηση του NRF2. Τέλος, έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης PI3K-AKT προκαλεί την αυξημένη ενεργοποίηση του παράγοντα NRF2. Αυτό συμβαίνει καθώς η κινάση AKT φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση GSK3, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η ενεργοποίηση των β -TrCP-Cul1 μέσω φωσφορυλίωσης. Επομένως, ο NRF2 δεν πολυουβικουτινώνεται και δεν οδηγείται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα^[6]. Παράλληλα, υπάρχουν και πολλοί ογκογόνοι παράγοντες όπως οι K-Ras, B-Raf και Myc που οδηγούν σε υπερβολική έκφραση του NRF2 στα καρκινικά κύτταρα^[9]. Συμπερασματικά, η αυξημένη ενεργοποίηση και σταθεροποίηση του παράγοντα NRF2 σε καρκινικά κύτταρα, λόγω διαφόρων μεταλλάξεων, οδηγεί στην ενίσχυση των κακοήθων καρκινικών φαινοτύπων, μόνο κατά την παρουσία εξωγενών ή ενδογενών ογκογόνων σημάτων^[6].



Εικόνα 4: Ρύθμιση και δράση του NRF2 σε καρκινικά κύτταρα A) Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και B) Συνθήκες συνεχούς ενεργοποίησης.

Λόγω του ενεργού ρόλου του μονοπατιού NRF2/KEAP1 στην προστασία των κυττάρων και στην εξέλιξη και τη μετάσταση των καρκινικών όγκων, η μελέτη και η εύρεση φαρμάκων που στοχεύουν στις δύο βασικές πρωτεΐνες του μονοπατιού NRF2 και KEAP1, αλλά και των παραγόντων που σχετίζονται με την ομαλή λειτουργία του, είναι καθοριστικής σημασίας^[6]. Έχουν μελετηθεί φάρμακα αναστολείς του NRF2, τα οποία ενεργοποιούν το μηχανισμό αποικοδόμησης του NRF2 μέσω του KEAP1 και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διάφορων τύπων καρκίνου, όπως καρκίνος του δέρματος, του μαστού και του πνεύμονα. Από την άλλη, έχουν βρεθεί φάρμακα ενεργοποιητές του NRF2, τα οποία λειτουργούν ως αναστολείς του KEAP1, αλλά και φάρμακα τα οποία ενεργοποιούν την έκφραση των γονιδίων στόχων του NRF2 (όπως

το NQO1), και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία ασθενειών όπως παθήσεις του αναπνευστικού, διάφορες αλλεργίες και διαβήτης^{[4][8][14][15]}.

1.6. Κοκκία του στρες

Τα κοκκία του στρες είναι μη μεμβρανικά, κυτταροπλασματικά οργανίδια, τα οποία σχηματίζονται όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε συνθήκες στρες και συσσωρεύουν διάφορα μόρια στο εσωτερικό τους, για την προσαρμογή και την επιβίωση των κυττάρων σε αυτές τις συνθήκες. Τέτοια μόρια είναι ριβονουκλεοπρωτεϊνικά αγγελιοφόρα σύμπλοκα (mRNPs), πρωτεΐνες πρόσδεσης RNA (RBPs), μη μεταφραζόμενα RNAs, ριβοσωμικές υπομονάδες, μεταγραφικούς παράγοντες και διάφορες άλλες μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες^{[34][41]}. Από τις πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο εσωτερικό των SGs είναι οι TIA-1 (T-cell-restricted intracellular antigen-1), G3BP1 (Ras-GTPaseactivating protein SH3-domain-binding protein 1) και οι m6A πρωτεΐνες πρόσδεσης mRNA (YTHDF1/2/3)^{[36][41]}.

Ωστόσο, η σύσταση των SGs διαφέρει πολλές φορές και η αναλογία του RNA-πρωτεϊνών εξαρτάται από τους διαφορετικούς τύπους στρες, το χρόνο έκθεσης στις συνθήκες κυτταρικού στρες και τον τύπο του κυττάρου^[35].

1.6.1. Σχηματισμός stress granules

Σχηματισμός κοκκίων του στρες εκκινείται σε συνθήκες κυτταρικού στρες, όπως έλλειψη γλυκόζης, θερμικό σοκ, οξειδωτικό, ωσμωτικό, χημικό στρες, συνθήκες ανοξίας, UV ακτινοβολία και ιογενείς λοιμώξεις. Ο σχηματισμός των SGs αποτελεί μία διαδικασία διαχωρισμού υγρής φάσης που ονομάζεται liquid-liquid phase separation (LLPS)^[36]. Αρχικά, διάφορα είδη στρες οδηγούν στη φωσφορυλίωση του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF2A, με αποτέλεσμα την αναστολή της μετάφρασης. Τα μη μεταφρασμένα mRNPs σχηματίζουν ολιγομερή μέσω συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων^{[34][42]}. Επίσης, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό των SGs διαθέτουν περιοχές IDPs (protein intrinsically disordered regions / intrinsically disordered proteins), LCDs (low-complexity domains) και PrLDs (prion-like domains), οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με μόρια και συμμετέχουν στην LLPS^[36-38]. Ο σχηματισμός των κοκκίων του στρες εξαρτάται από τις ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές συνθήκες, όπως θερμοκρασία, pH και συγκέντρωση μορίων στο κύτταρο.

Με την απομάκρυνση των βλαβερών ερεθισμάτων, τα πολυμερή των stress granules, διαχωρίζονται στα μονομερή στοιχεία τους και αποκαθίσταται η μετάφραση των mRNA ^[39].

1.6.2. Δράσεις κοκκίων του στρες

Η ενεργοποίηση των SGs έχει βρεθεί ότι βελτιώνει την επιβίωση των κυττάρων, σε δυσμενείς συνθήκες, μέσω της διακοπής της μετάφρασης και ενδοκυτταρικής

μεταφοράς μορίων. Μελέτες έχουν δείξει πως τα κοκκία του στρες συμμετέχουν στην επιβίωση των κυττάρων σε τέτοιες συνθήκες, συσσωρεύοντας πρωτεΐνες και δεσμεύοντας μόρια απαραίτητα για την αντιμετώπιση των συνθηκών. Επίσης, συμβάλλει στην αναστολή της απόπτωσης, αναστέλλοντας προαποπτωτικά μονοπάτια^[39].

Από την άλλη, ανωμαλίες στο σχηματισμό των κοκκίων του στρες έχει συνδεθεί στο παρελθόν με την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νόσων, όπως η οικογενής αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (familial amyotrophic lateral sclerosis - ALS), νόσος του Huntington και η νόσος Αλτσχάιμερ, αυτοάνοσων νοσημάτων και καρκίνου, καθώς μελέτες έχουν βρει μειωμένα επίπεδα SGs σε οργανισμούς που βρίσκονται σε τέτοιες παθολογικές καταστάσεις^[38].

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση του μονοπατιού NRF2-KEAP1 και συγκεκριμένα του παράγοντα KEAP1 σε καρκινικά κύτταρα A549. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε πλασμιδιακός φορέας για την υπερέκφραση του KEAP1, σε σύντηξη με την πρωτεΐνη EGFP. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης EGFP-KEAP1 ελέγχθηκε σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα A549. Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1 χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης KEAP1 στο μεταγραφικό παράγοντα NRF2 και στην έκφραση των γονιδίων στόχων του αλλά και στην ανάπτυξη κοκκίων του στρες σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

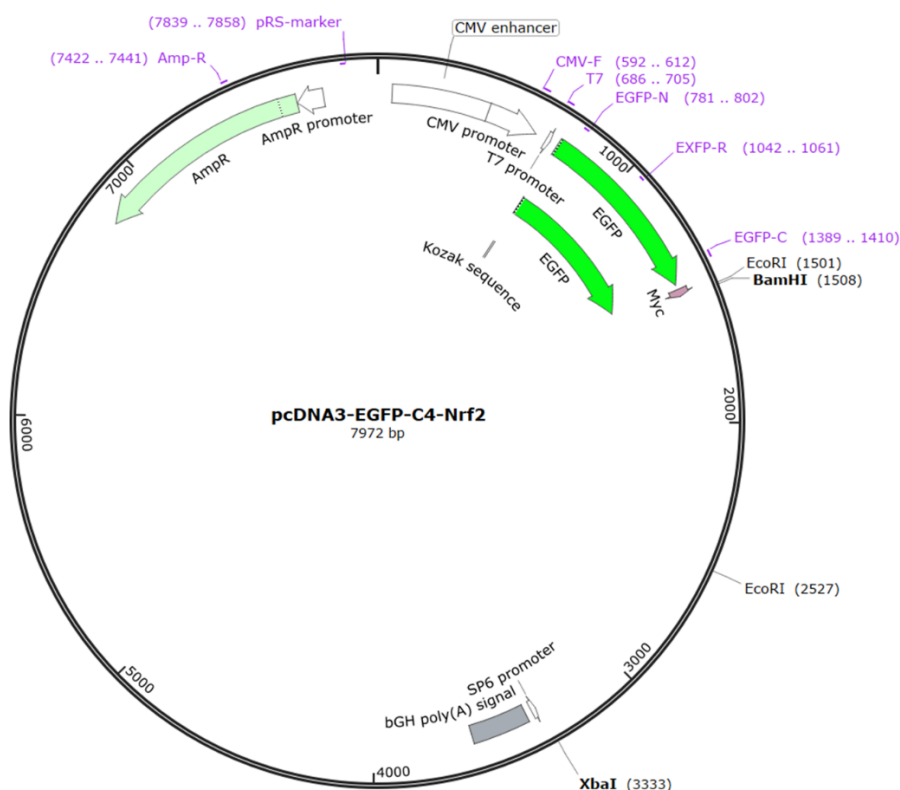
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Πλασμιδιακοί φορείς

Χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς της εταιρείας Addgene:

- pcDNA3-EGFP-C4-NRF2

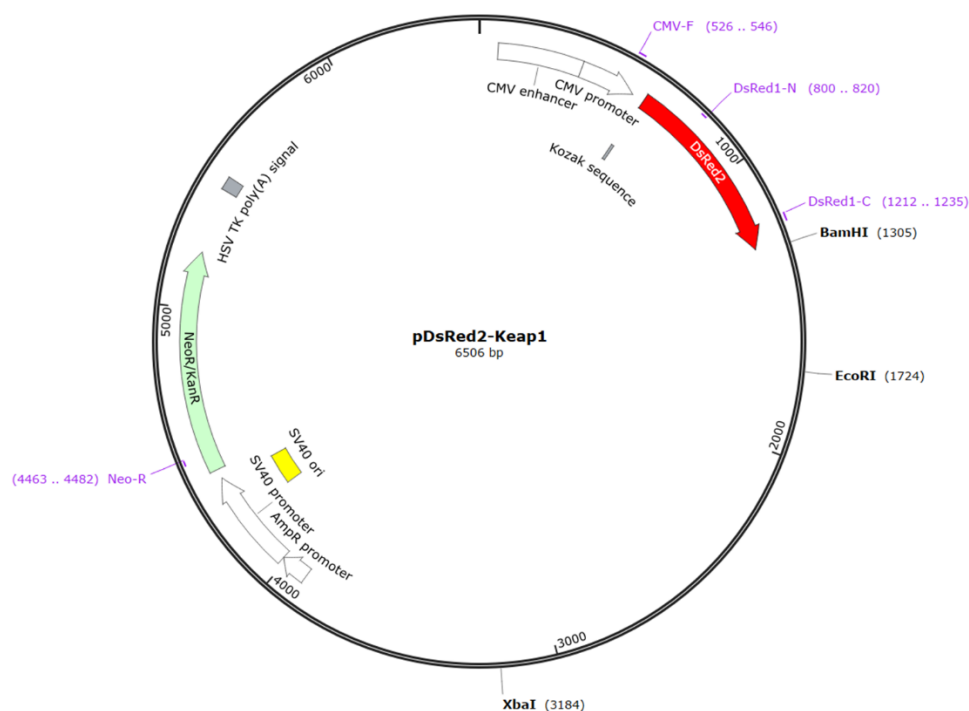
Το πλασμίδιο pcDNA3-EGFP-C4-NRF2 αποτελείται από 7972 βάσεις και περιέχει το γονίδιο για τον μεταγραφικό παράγοντα NRF2 (nuclear factor (erythroid-derived 2) - like 2). Ο φορέας του πλασμιδίου αποτελείται από 6112 βάσεις, στις οποίες περιέχεται και το γονίδιο αναφοράς για τη φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP. Η κλωνοποίηση του ενθέματος πραγματοποιήθηκε με πέψεις στο 5' άκρο με το ένζυμο περιορισμού BamHI και στο 3' άκρο με το XbaI. Το πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για την υποκλωνοποίηση του φορέα και την έκφραση της πρωτεΐνης EGFP σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικικίνη (*Εικόνα από Addgene*).



- pDsRed2-KEAP1

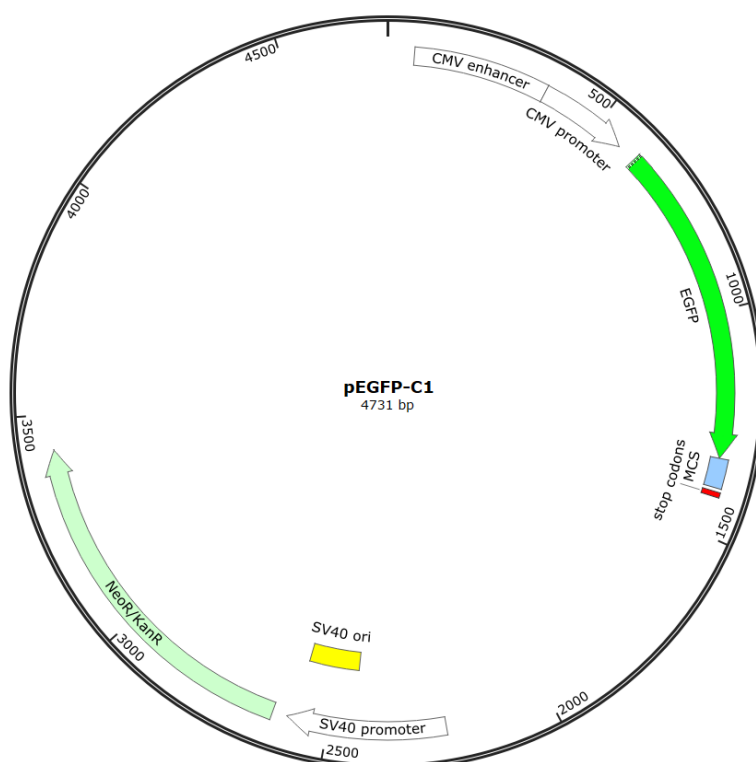
Το πλασμίδιο pDsRed2-KEAP1 αποτελείται από 6506 βάσεις. Περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη KEAP1 (kelch-like ECH-associated protein 1). Το ένθεμα που χρησιμοποιήθηκε για την υποκλωνοποίηση του γονιδίου keap1 αποτελείται από 1879 βάσεις. Η κλωνοποίηση του ενθέματος πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα περιορισμού BamHI στο 5' άκρο και XbaI στο 3' άκρο. Το πλασμίδιο περιέχει γονίδιο

αναφοράς για την πρωτεΐνη DsRed2 και γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (Εικόνα από Addgene).



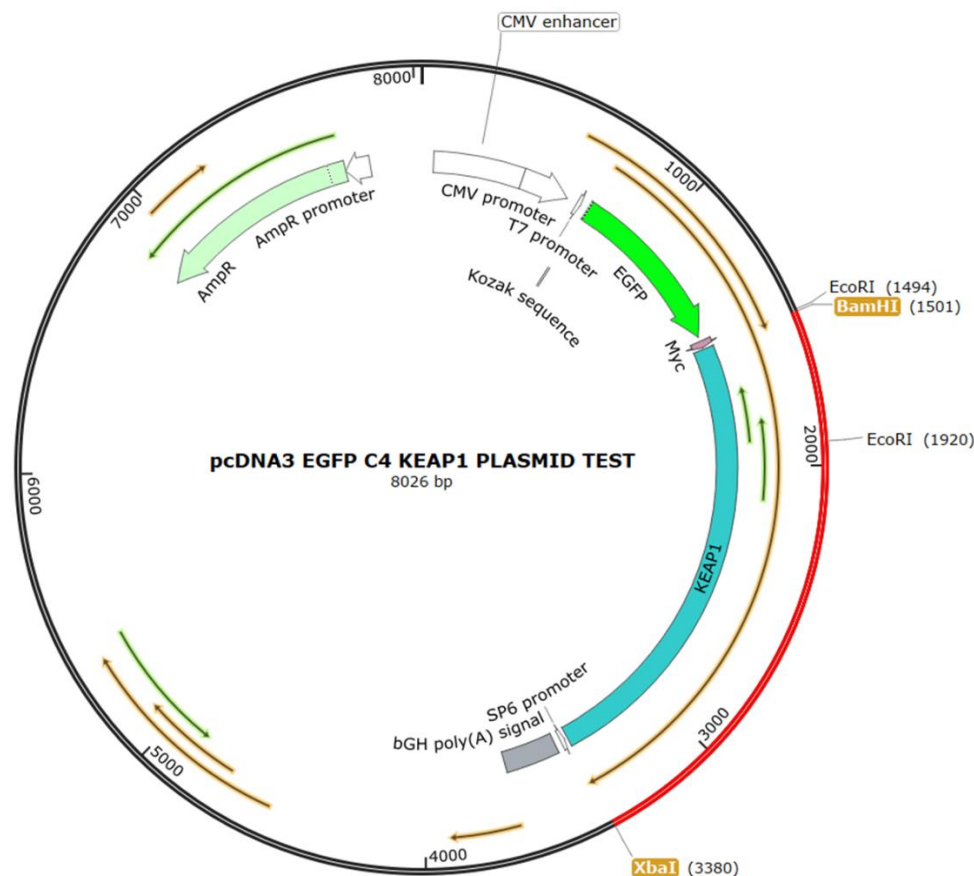
■ pEGFP-C1

Το πλασμίδιο pEGFP-C1 αποτελείται από 4731 βάσεις και περιέχει το γονίδιο αναφοράς για τη φθορίζουσα χρωστική EGFP. Χρησιμοποιήθηκε ως πλασμίδιο αναφοράς κατά τον μετασχηματισμό ευκαρυωτικών κυττάρων. Περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμυκίνη (Εικόνα από Addgene).



▪ pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1

Το πλασμίδιο pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1 αποτελείται από 8026 βάσεις. Δημιουργήθηκε από την υποκλωνοποίηση του φορέα pcDNA3-EGFP-C4 του πλασμιδίου pcDNA3-EGFP-C4-NRF2 και του ενθέματος KEAP1 του πλασμιδίου pDsRed-KEAP1, η οποία πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και XbaI. Χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της πρωτεΐνης KEAP1 και την αναγνώρισή της σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων γίνεται με βάση το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη.



3.2. Μοριακή υποκλωνοποίηση

Μετασχηματισμός βακτηρίων με θερμικό σοκ

Χρησιμοποιήθηκαν δεκτικά βακτήρια Escherichia coli (E.coli) TOP10. Για το μετασχηματισμό, προστέθηκαν 0,5μg πλασμδιακού DNA ή κατάλληλος όγκος από αντίδραση λιγάσης σε 100μl βακτηρίων E.coli σε σωληνάρια τύπου erppendorf και αναδεύτηκαν ελαφρώς. Επώαστηκαν αρχικά, σε πάγο για 30 λεπτά κι έπειτα στους 42°C για 1 λεπτό. Ακολούθησε προσθήκη 500μl θρεπτικού υλικού LB (1% bactotryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0,5% NaCl) και επώαση στους 37°C για 45 λεπτά. Κατάλληλος όγκος των αντιδράσεων επιστρώθηκε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό LB Agar, το οποίο περιείχε το αντιβιοτικό επιλογής αμικικιλίνη ή

καναμυκίνη (0,1 mg/ml). Τα τρυβλία επώαστηκαν ολονύχτια στους 37°C. Την επόμενη μέρα ελέγχθηκε η ανάπτυξη των αποικιών. Τα τρυβλία αποθηκεύτηκαν στους 4°C.

Απομόνωση αποικιών βακτηρίων από τρυβλίο

Σε αποστειρωμένα σωληνάρια προστέθηκαν 5ml θρεπτικού υλικού LB, το οποίο περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής (αμπικιλίνη ή καναμυκίνη). Με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες επιλέχθηκαν από το τρυβλίο μεμονωμένες αποικίες, οι οποίες μεταφέρθηκαν στα σωληνάρια και επώαστηκαν ολονύχτια στους 37°C σε ανάδευση στις 160rpm.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας κλίμακας (minipreparation)

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoSpin Plasmid της εταιρείας Macherey-Nagel. Για τη διαδικασία 3ml της υγρής αποικίας φυγοκεντρήθηκαν στις 11000rpm για 30 δευτερόλεπτα και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, το ίζημα επαναιωρήθηκε με 250μl του Buffer A1. Η λύση των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με 250μl του Buffer A2, με ελαφριά ανάδευση 6-8 φορές και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο διάλυμα που προέκυψε προστέθηκαν 300μl του Buffer A3 κι έγινε ανάδευση. Τελικά, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11000rpm για 5 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάριο.

Ακολούθησε μεταφορά του υπερκείμενου στις ειδικές στήλες του kit, και φυγοκέντρωση στις 11000rpm για 1 λεπτό. Το διάλυμα που διέρρευσε μέσα από τις στήλες απορρίφθηκε. Πραγματοποιήθηκε πλύση των στηλών με 500μl του Buffer AW και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11000rpm και με 600μl του Buffer A4 και φυγοκέντρωση ομοίως στις 11000rpm για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, οι στήλες φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου για 2 λεπτά στις 11000rpm για την απομάκρυνση του διαλύματος πλύσης και τοποθετήθηκαν σε καθαρά σωληνάρια eppendorf. Τελικά πραγματοποιήθηκε έκλυση του DNA από τις στήλες. Χρησιμοποιήθηκαν 50μl από το Buffer AE, με επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11000rpm. Η έκλυση επαναλήφθηκε ώστε να απομονωθεί μεγαλύτερη ποσότητα DNA. Τέλος, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του DNA που απομονώθηκε και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Μέτρηση συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων με Nanodrop

Το NanoDrop αποτελεί φασματοφωτόμετρο UV-Vis πλήρους φάσματος για τη μέτρηση δειγμάτων και χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση DNA, RNA και πρωτεϊνών. Μετρήθηκαν η συγκέντρωση του DNA και του RNA και οι λόγοι A260/A280 και A260/A230. Οι πρωτεΐνες απορροφούν σε μήκος κύματος $\lambda_{\max}=280\text{nm}$ και διάφορα χαοτροπικά άλατα και απορρυπαντικά απορροφούν στα $\lambda_{\max}=230\text{nm}$, ενώ

τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν σε $\lambda_{\max}=260\text{nm}$. Τα παραπάνω χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων. Η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων καθορίζεται:

- Για το RNA: Η απορρόφηση 1 unit στα 260nm αντιστοιχεί σε 40μg του RNA ανά ml ($A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}$).
- Για το DNA: Η απορρόφηση 1 unit στα 260nm αντιστοιχεί σε 50μg του DNA ανά ml ($A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$).

Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού

Η πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο των πλασμιδίων και την υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς. Κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης πραγματοποιείται πέψη του τμήματος DNA και του πλασμιδιακού φορέα με το ίδιο ένζυμο περιορισμού και ένωση με αντίδραση λιγάσης.

Στο πείραμα πραγματοποιήθηκαν πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού BamHI, XbaI, EcoRI και τη διπλή πέψη BamHI-XbaI, με το buffer Cutsmart (10x) της εταιρείας Biolabs. Οι αντιδράσεις περιείχαν:

Περιεχόμενα αντιδράσεων	Πέψεις μικρής κλίμακας	Παρασκευαστικές πέψεις
Πλασμιδιακό DNA (μg)	0,4	2
Ένζυμο περιορισμού (units)	BamHI: 0,5μl XbaI: 1μl	BamHI: 1μl XbaI: 1,5μl
Ρυθμιστικό διάλυμα – buffer 10X (μl)	2	4
H ₂ O σε τελικό όγκο	20 μl	40 μl

Πίνακας 1: Οι αντιδράσεις επωάστηκαν στους 37°C για 15 λεπτά σε ανάδευση.

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης 1%

Η ηλεκτροφόρηση DNA και νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αгарόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού των μορίων DNA ή RNA ανάλογα με το μέγεθός τους. Βασίζεται στο διαχωρισμό φορτισμένων μορίων κατά την κίνησή τους μέσα σε στερεό πώδες υπόστρωμα αгарόζης στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα μόρια διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός του. Τα τμήματα DNA γίνονται ορατά με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), μια ουσία που προσδένεται μεταξύ των δύο αλυσίδων του DNA. Τα μόρια του EtBr φθορίζουν κατά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

Για τη δημιουργία πηκτής αгарόζης, αναμείχθηκαν σε κωνική φιάλη κατάλληλες ποσότητες αгарόζης και ρυθμιστικού διαλύματος TAE (0,04M Tris-οξικό,

0,001M EDTA pH 8), τα οποία θερμάνθηκαν στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει η αгарόζη. Έπειτα προστέθηκε το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) (0,5μg/ml). Η πηκτή τοποθετήθηκε στη συσκευή και αφέθηκε να πήξει. Για την προετοιμασία των δειγμάτων προστέθηκε κατάλληλος όγκος του διαλύματος επιφόρτωσης Purple dye (6x B7024A της εταιρείας BioLabs). Στην πηκτή ηλεκτροφόρησης φορτώθηκε ο μάρτυρας GeneRuler 1 kb DNA Ladder της εταιρείας ThermoFisher Scientific, για τον υπολογισμό του μεγέθους του DNA. Η πηκτή ηλεκτροφόρήθηκε στα 100V και οι ζώνες DNA παρατηρήθηκαν με ακτινοβολία UV και φωτογραφήθηκαν με τη συσκευή απεικόνισης Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System.

Ανάκτηση DNA από πηκτή αгарόζης

Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoSpin PCR clean-up protocol (Macherey-Nagel, MN). Μετά την ηλεκτροφόρηση, τα τμήματα της πηκτής παρατηρήθηκαν σε λάμπα UV, αποκόπηκαν, ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια, στα οποία προστέθηκαν 200μl buffer NT1 ανά 100mg πηκτής. Τα τμήματα της πηκτής επώαστηκαν για 5-10 λεπτά στους 50°C σε ανάδευση και vortex ανά 2-3 λεπτά μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αгарόζη. Στις ειδικές στήλες μεταφέρθηκαν 700μl δείγματος και φυγοκεντρήθηκαν για 30 δευτερόλεπτα στις 11000rpm. Το διάλυμα που διέρρευσε από τις στήλες απορρίφθηκε. Πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με 700μl buffer NT3 και φυγοκέντρωση για 30 δευτερόλεπτα στις 11000rpm. Οι στήλες φυγοκεντρήθηκαν ξανά για 1 λεπτό. Αφού η στήλη τοποθετηθεί σε καινούργιο σωληνάριο προστέθηκαν 15-30μl από το buffer NE. Οι στήλες επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου κι έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό. Τα δείγματα του DNA που απομονώθηκαν αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Τα δείγματα που απομονώθηκαν ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε τζελ αгарόζης και η συγκέντρωσή τους μετρήθηκε στο Nanodrop.

Αντίδραση λιγάσης

Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με το ένζυμο DNA λιγάση για την υποκλωνοποίηση και την ένωση των τμημάτων των πλασμιδίων που προέκυψαν από τις πέψεις με ένζυμα περιορισμού. Στην αντίδραση τοποθετήθηκαν ο φορέας των πλασμιδίων και το ένθεμα με μοριακή αναλογία 1 : 3. Στις αντιδράσεις προστέθηκαν:

Συστατικά αντιδράσεων λιγάσης	Ποσότητες
Ρυθμιστικό διάλυμα buffer (μl)	2
Φορέας (vector)	50 ng για κάθε 4kb
Ένθεμα (insert)	37,5 ng για κάθε 1kb

T4 DNA λιγάση (μl)	1
H ₂ O χωρίς νουκλεάσες σε τελικό όγκο	20 μl

Πίνακας 2: Αντιδράσεις λιγάσης του φορέα με το ένθεμα για σχηματισμό νέου πλασμιδίου.

Οι αντιδράσεις επώστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και στη συνέχεια, στους 65°C για 10 λεπτά για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Αφού τοποθετήθηκαν στον πάγο μέχρι να κρυώσουν, αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

3.3. Κυτταροκαλλιέργειες

Καλλιέργεια κυττάρων

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα:

- Αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα A549

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε υγρή καλλιέργεια με θρεπτικό υλικό DMEM (10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100U/ml πενικιλίνη και 100 mg/ml στρεπτομυκίνη) σε ειδικό κλίβανο τους 37°C σε 5% CO₂. Όλες οι διεργασίες πραγματοποιήθηκαν σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Το θρεπτικό υλικό στις καλλιέργειες ανανεώνεται κάθε 48-72 ώρες περίπου ανάλογα με την πληρότητα της επιφάνειας των τρυβλίων των καλλιιεργειών.

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σε διαφορετικές συνθήκες σε πιάτα με αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 12mm:

1. Φυσιολογική κατάσταση
2. NaAsO₂ για 1h στους 37°C και 5% O₂.

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε:

1. Αφαίρεση του προϋπάρχοντος θρεπτικού υλικού.
2. Πλύση κυττάρων με διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,46mM KH₂PO₄).
3. Προσθήκη θρυψίνης και επώαση μέχρι να παρατηρηθεί αποκόλληση των κυττάρων από το τρυβλίο.
4. Μεταφορά των κυττάρων σε νέο τρυβλίο σε κατάλληλη αραίωση και προσθήκη θρεπτικού υλικού.

Πάγωμα κυττάρων από καλλιέργεια και επανέναρξη καλλιιεργειών

Για το πάγωμα των κυττάρων ακολουθείται η διαδικασία που γίνεται για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Μετά την τελική προσθήκη του DMEM (10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100U/ml πενικιλίνη και 100 mg/ml στρεπτομυκίνη), το διάλυμα με τα κύτταρα τοποθετήθηκε σε ειδικό σωληνάριο falcon και φυγοκεντρήθηκε στις

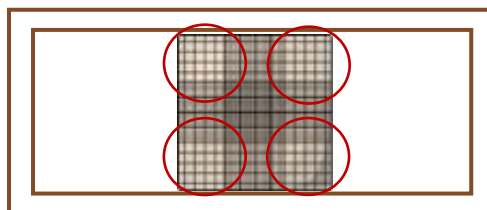
1200rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Πραγματοποιήθηκε αναρρόφηση του υπερκείμενου και επαναιώρηση με διάλυμα ορού FBS με 10% DMSO. Το DMSO αποτελεί οργανικό διαλύτη που εμποδίζει τη δημιουργία κρυστάλλων νερού μέσα στα κύτταρα. Τελικά, τα κύτταρα μοιράστηκαν σε ειδικούς μικροσωλήνες (cryotubes) και τοποθετήθηκαν αρχικά στους -20°C και στη συνέχεια, αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Για την επανέναρξη καλλιέργειας από παγωμένα κύτταρα χρειάζεται αρχικά, απόψυξη των κυττάρων που βρίσκονται στους -80°C σε cryotubes. Με την προσθήκη μικρής ποσότητας θρεπτικού μέσου στα cryotubes, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε φλάσκα. Προστέθηκαν 10ml θρεπτικό και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν. Επώαστηκαν στους 37°C σε 5% CO₂.

Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer με χρωστική Trypan Blue

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται σε πλάκα – αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Για τη διαδικασία αυτή, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν και επαναιωρήθηκαν με θρεπτικό υλικό, όπως αναφέρεται παραπάνω. Σε σωληνάρια τύπου erpendorf συλλέχθηκαν 100μl των κυττάρων, τα οποία αραιώθηκαν σε 300μl διαλύματος PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,46mM KH₂PO₄). Τελικά, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 100μl της χρωστικής Trypan Blue. Με τη χρωστική βάφονται μπλε τα νεκρά κύτταρα ώστε να διαχωρίζονται από τα ζωντανά. Το διάλυμα που δημιουργήθηκε τοποθετήθηκε σε πλάκα Neubauer, και τα κύτταρα μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο.

Στο μικροσκόπιο μετρούνται τα κύτταρα που βρίσκονται στα τέσσερα εξωτερικά τετράγωνα της πλάκας, που φαίνονται στην *Εικόνα 5*:



Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων

Για την παροδική διαμόλυνση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο **jetPRIME® (Polyplus)**.

Τα κύτταρα επιστρώθηκαν στο πιάτο ώστε να καλύπτουν το 60-80% της επιφάνειας για τη διαμόλυνση με 2ml θρεπτικού μέσου DMEM (10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 100U/ml πενικιλίνη και 100 mg/ml στρεπτομυκίνη). Για τη διαμόλυνση σε τρυβλία επιφάνειας 35mm (6well plate) ή τρυβλία 24 θέσεων (24 well), αναμίχθηκαν στις ποσότητες πλασμιδιακού DNA που αναγράφονται στον *πίνακα* το jetPrime® buffer, πραγματοποιήθηκε vortex και φυγοκέντρωση για 10 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη του αντιδραστήριου jetPrime®, vortex και φυγοκέντρωση για 10 δευτερόλεπτα και οι αντιδράσεις επώαστηκαν για 10 λεπτά σε

θερμοκρασία δωματίου. Μετά την αλλαγή του θρεπτικού μέσου των κυττάρων, το μίγμα της διαμόλυνσης προστέθηκε στα κύτταρα, τα οποία επώαστηκαν για 4 ώρες στους 37°C και 5% CO₂. Στις 4 ώρες αντικαταστάθηκε το θρεπτικό υλικό των κυττάρων και τοποθετήθηκαν ξανά για επώαση.

	Θρεπτικό μέσο (DMEM)	Ποσότητα DNA	Buffer	Αντιδραστήριο JetPrime
Τρυβλίο 35mm (6 well)	2 ml	2 µg	200 µl	4 µl
Τρυβλίο (24 well)	0,5 ml	0.5 µg	50 µl	1 µl

Πίνακας 3: Αντιδράσεις διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων με jetPRIME®.

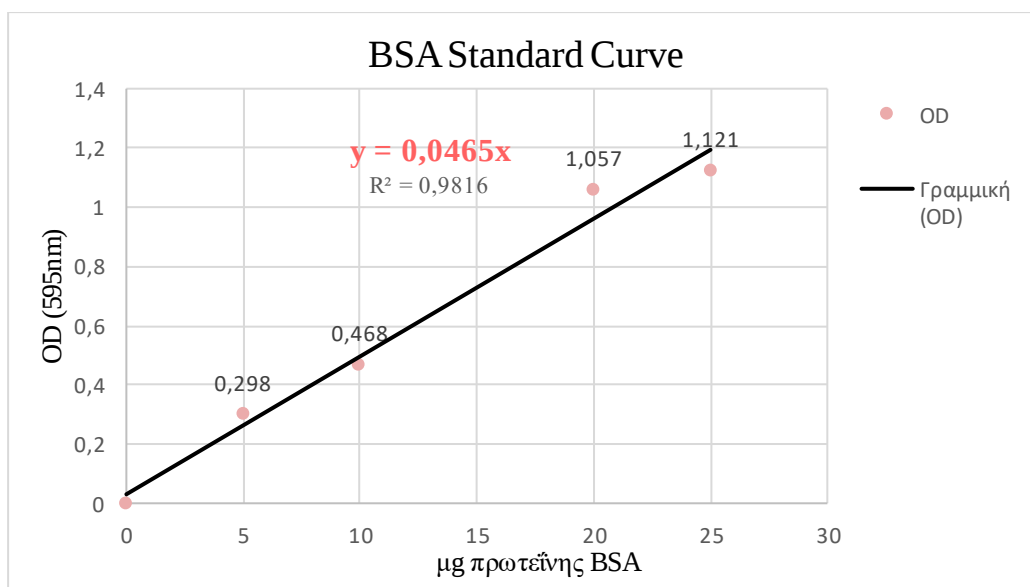
3.4. Ανάλυση πρωτεϊνών

Παρασκευή πρωτεϊνικού κυτταρικού εκχυλίσματος

Σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 35mm (6well plate), έγινε πλύση με PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,46mM KH₂PO₄) και προστέθηκαν 120µl από το διάλυμα λύσης (25mM Tris-Cl pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 0,5mM DTT, 0,2mM PMSF). Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με ειδική σπάτουλα και το λύμα μεταφέρθηκε σε σωληνάρια. Για την απομάκρυνση των κυτταρικών μεμβρανών, έγινε επώαση στον πάγο για 10 λεπτά και φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στους 4°C στις 10000rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια. Από αυτό, χρειάστηκαν 5µl για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών. Το υπόλοιπο χρησιμοποιήθηκε για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση με την προσθήκη του διαλύματος φόρτωσης (SDS loading buffer 4X) σε αναλογία 1:3 (loading buffer : διάλυμα κυττάρων). Επώαστηκαν στους 95°C για 2 λεπτά και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο Bradford, κατά την οποία χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Biorad που περιέχει τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην πρόσδεση των αμινοξέων των πρωτεϊνών με τη χρωστική, σε όξινο περιβάλλον, προκαλώντας αλλαγή στο χρώμα από καφέ σε μπλε. Η μέτρηση γίνεται στο φωτόμετρο στα 595nm. Στο πείραμα, προστέθηκαν 795µl H₂O στα 5µl από το υπερκείμενο του διαλύματος των πρωτεϊνών, από τη λύση των κυττάρων και 200µl από το αντιδραστήριο Biorad. Οι τιμές της απορρόφησης μετατράπηκαν σε τιμές συγκέντρωσης πρωτεϊνών με πρότυπη καμπύλη αναφοράς της αλβουμίνης (BSA).



Ποσότητα BSA (μg)	Απορρόφηση (OD) στα 595nm
0	0
5	0,298
10	0,468
20	1,057
25	1,121

Πίνακας 4: Τιμές για σχηματισμό πρότυπης καμπύλης BSA.

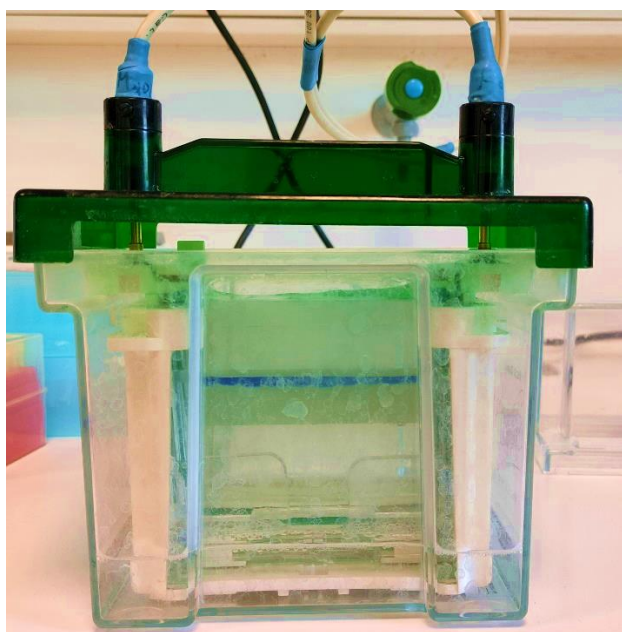
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Western blotting)

Η τεχνική επιτρέπει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών από ένα ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών, που απομονώθηκε από κύτταρα, με βάση το μοριακό τους βάρος μέσω ηλεκτροφόρησης. Η πηκτή που χρησιμοποιείται περιέχει μόρια ακρυλαμιδίου και bis-ακρυλαμιδίου, που σχηματίζουν ένα πλέγμα, του οποίου το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Οι μεγάλες πρωτεΐνες κινούνται προς το θετικό πόλο πιο αργά από τις μικρές στην πηκτή όταν τη διαπερνά ηλεκτρικό ρεύμα. Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πηκτώματα:

1. Πήκτωμα επιστοιβάξης (upper gel/stacking gel buffer): 40% ακρυλαμίδιο, 0,125M Tris pH 6,8, 2mM EDTA, 0,1% SDS, 10% APS και 25μl TEMED.
2. Πήκτωμα διαχωρισμού (lower gel/separation gel buffer): 40% ακρυλαμίδιο, 0,375M Tris-HCl pH 8,8, 2mM EDTA 0,1% SDS, 10% APS και 20μl TEMED.

Για την ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα επεξεργάστηκαν με διάλυμα επιστοιίβαξης, το οποίο είναι ένα απορρυπαντικό που, σε συνδυασμό με την υψηλή θερμοκρασία αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Συνεπώς, με την προσθήκη, τα ανιόντα του SDS (δωδεκακυλοθειικού νατρίου) δεσμεύονται στις πρωτεΐνες με αναλογία 1 μόριο SDS ανά 2 αμινοξέα της πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (SDS running buffer).

Για το πείραμα, τα δείγματα φορτώθηκαν στην πηκτή επιστοιίβαξης. Ως μάρτυρας των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το blue star prestained protein marker (Nipon Genetics), το οποίο περιέχει 10 προχρωματισμένες πρωτεΐνες που καλύπτουν μεγάλο εύρος μοριακών βαρών (από 10kDa μέχρι 180kDa). Το τροφοδοτικό ρυθμίστηκε στα 200V, 400mA για 50 λεπτά.



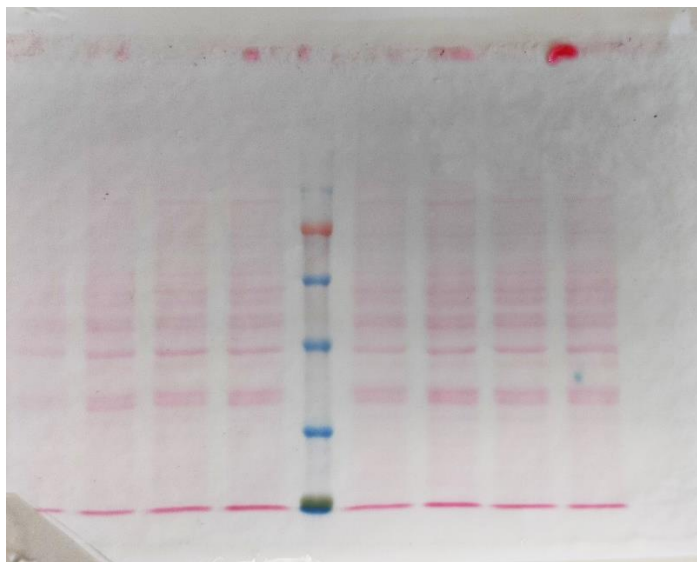
Εικόνα 6: Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

Ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Οι πρωτεΐνες μετά το διαχωρισμό τους από την ηλεκτροφόρηση στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, σε ημίξηρες συνθήκες, μέσω της εφαρμογής ηλεκτρικού ρεύματος (semi-dry electroblotting). Σε αυτού του τύπου την ηλεκτρομεταφορά το ηλεκτρικό ρεύμα διαπερνά την πηκτή, μεγιστοποιώντας την ταχύτητα της μεταφοράς των πρωτεϊνών. Στην ειδική συσκευή τοποθετήθηκαν διαδοχικά διηθητικό χαρτί (3mm), η μεμβράνη, η πηκτή και από πάνω το διηθητικό χαρτί, τα οποία είχαν εμβαπτιστεί σε ειδικό διάλυμα μεταφοράς (39mM glycine, 48mM Tris, 0,037% SDS και 20% μεθανόλη). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε στα 75V, 80mA για 1 ώρα.

Μετά το πέρας της μεταφοράς η μεμβράνη βάφτηκε με τη χρωστική Ponceau για να γίνει έλεγχος της επιτυχίας της μεταφοράς των πρωτεϊνών. Η χρώση

αντιστρέφεται με την πλύση της μεμβράνης με αποσταγμένο νερό και στη συνέχεια με 1x TBS-0,1% Tween 20.



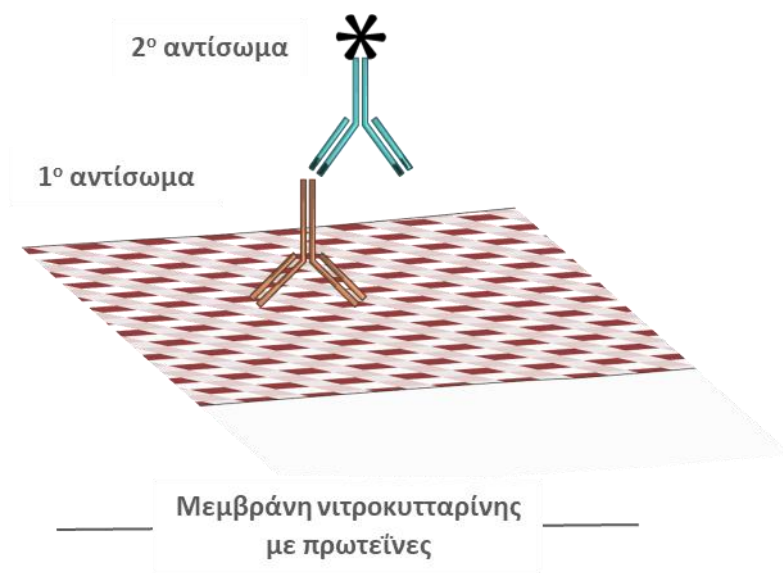
Εικόνα 7: Χρώση των πρωτεϊνών με χρωστική ponceau στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Ανοσοαποτύπωση

Για την αναγνώριση των πρωτεϊνών που μεταφέρθηκαν στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Αρχικά χρησιμοποιείται ένα αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη που μελετάται, και στη συνέχεια το δεύτερο αντίσωμα, που φέρει φθορίζουσα ομάδα και αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα. Η μεμβράνη επώαστηκε με ανάδευση για 5 λεπτά σε διάλυμα κορεσμού (1x TBS - 0,1% Tween20 και 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη), για να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Η μεμβράνη επώαστηκε με το πρώτο αντίσωμα ολονύχτια στους 4°C υπό ανάδευση και την επόμενη μέρα, αφού έγιναν 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα 1x TBS - 0,1% Tween20, επώαστηκε με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Τελικά πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις ομοίως με πριν για την απομάκρυνση του δεύτερου αντισώματος.

Ανίχνευση πρωτεϊνών με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια

Η ανίχνευση γίνεται με έκλυση φωτός από χημική αντίδραση κατά την οποία η λουμινόλη οξειδώνεται από την υπεροξειδάση σε αλκαλικό περιβάλλον, με επίδραση του H_2O_2 και ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων. Η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα λουμινόλης (Immobilon® Crescendo Western HRF Substrate - Millipore) για 3 λεπτά. Το σήμα ανιχνεύτηκε σε συσκευή ανίχνευσης χημειοφωταύγειας (UVItect chemiluminescence Imager).



Εικόνα 8: Ενισχυμένη χημειοφωταύγεια – αντισώματα αναγνωρίζουν πρωτεΐνες μεμβράνης.

1° αντίσωμα	Αραίωση	2° αντίσωμα	Αραίωση
Anti-NRF2 (rabbit)	1:750	Anti-rabbit IgG	1:3000
Anti-EGFP (rabbit)	1:2000	Anti-rabbit igG	1:3000
Anti-tubulin (mouse)	1:10000	Anti-mouse HRP	1:3000

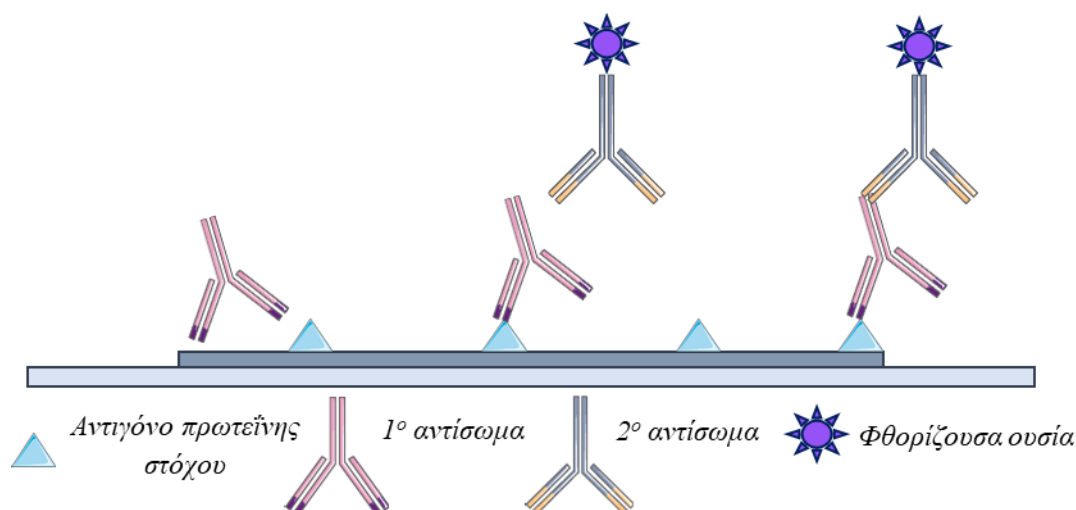
Πίνακας 5: Αραιώσεις αντισωμάτων για την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

Για τα πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 10mm. Το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε από τις καλλιέργειες και πραγματοποιήθηκε πλύση με 1x PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,46mM KH₂PO₄). Στη συνέχεια, έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων με PBS-3% φορμαλδεΰδη για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για τη σταθεροποίηση των εσωτερικών δομών των κυττάρων.

Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα επιστοιβάξης Mowiol με τη φθορίζουσα χρωστική 49,6-diamidino-2-phenylindole DAPI (20 µg/ml) για τη χρώση των πυρήνων των κυττάρων και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού επιτρέπει την ενδοκυτταρική ανίχνευση πρωτεϊνών με τη χρήση αντισωμάτων. Αρχικά χρησιμοποιείται ένα αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη που μελετάται, και στη συνέχεια το δεύτερο αντίσωμα, που φέρει φθορίζουσα ομάδα και αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρα κατάλληλου μήκους κύματος.



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας του έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων, όπως περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο, ακολούθησαν 3 πλύσεις για 5 λεπτά με 1x PBS και επώαση των κυττάρων για 15 λεπτά σε διάλυμα 1xPBS-1% Triton X - 100 στους 4°C, για να γίνουν διαπερατές οι κυτταρικές μεμβράνες. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με 1xPBS - 0.1% Tween 20 και έγινε επώαση των κυττάρων σε διάλυμα κορεσμού 1xPBS - 0.1% Tween 20 - 1% BSA για 1 ώρα στους 37°C.

Στα κύτταρα προστέθηκε το πρώτο αντίσωμα anti - G3BP1 mouse της εταιρείας Santa Cruz Biotechnology, INC, σε αραιώση 1:1000 και επώαστηκε στο σκοτάδι ολονύχτια στους 4°C. Πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με 1xPBS - 0.1% Tween 20 και έγινε προσθήκη του δεύτερου αντισώματος το anti - mouse IgG rabbit της εταιρείας abcam, με αραιώση 1:500. Το αντίσωμα περιείχε τη φθορίζουσα ομάδα HRP (horseradish peroxidase - υπεροξειδάση αγριοραπανιού) για την ανίχνευση. Επώαστηκε για 60 λεπτά στο σκοτάδι. Όπως και με το πρώτο αντίσωμα πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις με 1xPBS - 0.1% Tween 20 και μετά την τελευταία πλύση οι καλυπτρίδες εμβαπτίστηκαν στιγμιαία σε H₂O, για την τοποθέτησή τους σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα επιστοίβαξης Mowiol με τη φθορίζουσα χρωστική DAPI (20 µg/ml). Τελικά, οι πλάκες αποθηκεύτηκαν για 20-30 λεπτά στο σκοτάδι μέχρι να στεγνώσει το διάλυμα επιστοίβαξης και τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axio Imager. Z2).

3.5. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

Απομόνωση ολικού RNA από βιολογικά δείγματα

Για την απομόνωση του ολικού RNA από κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoZOL protocol της εταιρείας Macherey-Nagel. Στο πείραμα αρχικά έγινε αφαίρεση του θρεπτικού υλικού των κυττάρων. Τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν με 500μl από το αντιδραστήριο ανά 5×10^6 κύτταρα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200μl H₂O για κάθε 500μl nucleosol. Τα δείγματα, ανακατεύθηκαν έντονα για 15 δευτερόλεπτα, επώστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 12000rpm. Η κατακρήμνιση του RNA επιτεύχθηκε με μεταφορά του υπερκείμενου της φυγοκέντρωσης σε καθαρό σωληνάριο και προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης 100%. Τα δείγματα επώστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά 12000rpm και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Για τις πλύσεις του ιζήματος RNA χρησιμοποιήθηκαν 500μl αιθανόλης 75% και έγινε φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 3000rpm. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Η πλύση επαναλήφθηκε. Τελικά, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα H₂O. Το RNA επαναιωρήθηκε με vortex για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η συγκέντρωση του RNA που απομονώθηκε μετρήθηκε στο NanoDrop.

Παρασκευή cDNA

Κατά τη σύνθεση του cDNA παράγονται δίκλωνα μόρια DNA (cDNA), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το RNA που έχει απομονωθεί, με τη βοήθεια του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Τα μόρια DNA που παράγονται χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των δειγμάτων στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction - PCR). Στις αντιδράσεις της μεταγραφής (Πίνακας 6) προστέθηκαν το cDNA, το prime script buffer 5x, που περιέχει τα νουκλεοτίδια για τη σύνθεση του DNA, κατάλληλοι εκκινητές (oligo dT primers, random 6mers) και το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (prime script RT enzyme). Για τον έλεγχο της σωστής λειτουργίας της διαδικασίας δημιουργήθηκε ένα δείγμα, ως αρνητικός μάρτυρας, με όλα τα συστατικά της αντίδρασης εκτός από το ένζυμο. Τα δείγματα επώστηκαν στους 25°C για 1 λεπτό, στους 37°C για 15 λεπτά και στους 85°C για 5 λεπτά. Τελικά, επώστηκαν στους 4°C, προστέθηκαν 90μl H₂O και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Συστατικά αντίδρασης	1x (μl)	1x (μl) -RT
5X Prime script Buffer	2	2
Prime script RT enzyme	0,5	-
oligo dT primers	0,5	0,5

Random 6mers	0,5	0,5
H₂O	1,5	2
Δείγμα RNA	5	5
Τελικός όγκος	5	5

Πίνακας 6: Οι ποσότητες των αντιδράσεων για την παρασκευή του cDNA.

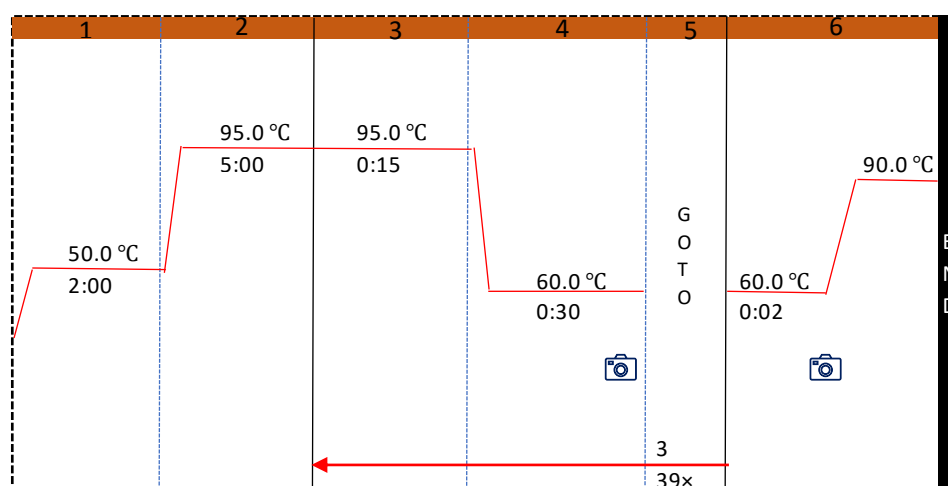
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time Quantitative Polymerase chain reaction RT-qPCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, αποτελεί μία από τις πιο ευαίσθητες τεχνικές για την ποσοτικοποίηση του mRNA κι επομένως, των επιπέδων της έκφρασης των γονιδίων. Το πλεονέκτημα της qPCR, σε σχέση με την κλασική PCR, είναι ότι επιτρέπει την ταχεία και υψηλής απόδοσης ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη αλληλουχιών του DNA σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η ακριβής ανίχνευση των δειγμάτων επιτυγχάνεται με την προσθήκη του φθορίζοντος μορίου αναφοράς SYBR Green, που προσδένεται στο DNA. Το σύμπλοκο χρωστικής – DNA απορροφά το μπλε φως και εκπέμπει έντονο πράσινο φως στα 520nm. Όσα περισσότερα μόρια DNA σχηματίζονται στην PCR, αυξάνεται ο φθορισμός. Η διαδικασία αποτελείται από δύο φάσεις, την εκθετική όπου το DNA διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο και μία μη εκθετική φάση όπου η αντίδραση παρέρχεται σε ένα σημείο κορεσμού, αφού έχουν καταναλωθεί τα περισσότερα συστατικά της αντίδρασης.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων NRF2 και NQO1. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ακτίνης-β ACTB. Για την πραγματοποίηση του πειράματος, στα cDNA που δημιουργήθηκαν προστέθηκαν τα συστατικά της αντίδρασης, εκκινητές (forward και reverse) και το μίγμα της φθορίζουσας χρωστικής που περιέχει τα νουκλεοτίδια για την αντίδραση και το ένζυμο της πολυμεράσης (Πίνακας 7). Δημιουργήθηκε μία αντίδραση για κάθε συνθήκη, που χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό, το οποίο περιείχε όλα τα συστατικά της αντίδρασης με τους εκκινητές χωρίς το cDNA. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

1. 50°C για 2 λεπτά
2. 95°C για 5 λεπτά
3. 95°C για 15 δευτερόλεπτα
4. 60°C για 30 δευτερόλεπτα
5. Επανάληψη για 40 κύκλους

Στην *Εικόνα 10* φαίνεται η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο. Απεικονίζονται, επίσης, οι στιγμές όπου μετρίεται ο φθορισμός από τη SYBR Green.



Εικόνα 10: Απεικόνιση του πρωτοκόλλου της RT-PCR.

Οι αντιδράσεις της RT-qPCR περιείχαν τις ποσότητες που φαίνονται στον *Πίνακα 7*:

Αντίδραση RT-qPCR 1X	Ποσότητες (μl)
H ₂ O	1,5
Εκκινητές (forward) 10μM	0,5
Εκκινητές (reverse) 10μM	0,5
SYBR Green mix	5
cDNA	2,5

Πίνακας 7: Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων της RT-qPCR.

Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων της PCR χρησιμοποιείται ο τύπος:

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(treatment) - \Delta Ct(control)$, όπου ως

$\Delta Ct(target) = Ct(target\ control) - Ct(reference\ control)$ και

$\Delta Ct(treatment) = Ct(target\ treatment) - Ct(reference\ treatment)$

Η αναλογία της έκφρασης ορίζεται ως η σχέση στη γονιδιωματική έκφραση μεταξύ του γονιδίου αναφοράς και του γονιδίου στόχου και προκύπτει από τον τύπο:

Αναλογία έκφρασης = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Έλεγχος των εκκινήτων και την έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων

Εκκινήτες	Αλληλουχίες
Hs actin-β Forward	CCAACCGCGAGAAGATGA
Hs actin-β Reverse	CCAGAGGCGTAC AGGGATAG
hNRF2 Forward	TCATGATGGACTTGGAGCTG
hNRF2 Reverse	CATACTCTTTCCGTCGCTGA
hNQO1 Forward	CAAAAGAAGCTGGAAGCCGC
hNQO1 Reverse	GCCTTCTTACTCCGGAAGGG

Πίνακας 8: Αλληλουχία εκκινήτων F (forward) και R (reverse) των γονιδίων για την PCR.

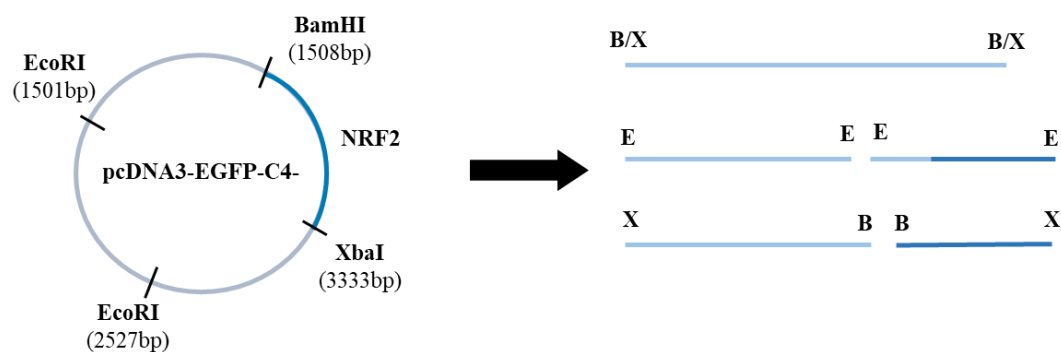
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για τη μελέτη της επίδρασης του παράγοντα KEAP1 στην απόκριση των καρκινικών κυττάρων στο οξειδωτικό στρες, το γονίδιο του KEAP1 υποκλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα που επιτρέπει την έκφραση της πρωτεΐνης KEAP1 σε σύντηξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP. Στη συνέχεια, η νέα πλασμιδιακή κατασκευή ελέγχθηκε ως προς την έκφραση του KEAP1 και την επίδρασή του στη δράση του NRF2.

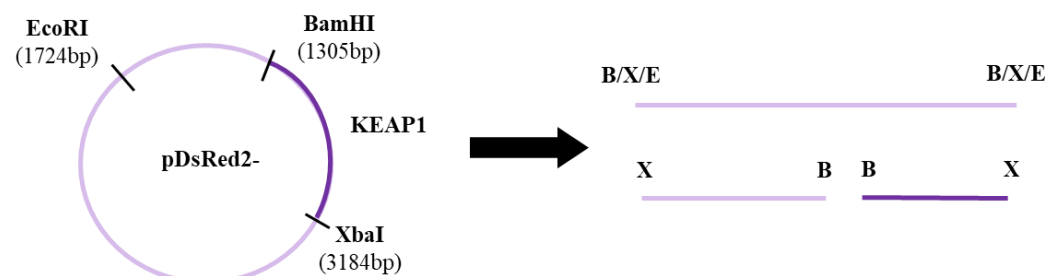
4.1. Κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα *pcDNA3-C4-EGFP-KEAP1*

Για την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα *pcDNA3-C4-EGFP-KEAP1* χρησιμοποιήθηκαν οι φορείς *pDsRed2-KEAP1* και *pcDNA3-EGFP-C4-NRF2*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των πλασμιδίων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν αναλυτικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού *Bam*HI, *Xba*I και *Eco*RI και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Χρησιμοποιήθηκαν 0,4μg πλασμιδιακού DNA. Οι προβλεπόμενες ζώνες για τα πλασμίδια *pcDNA3-EGFP-C4-NRF2* και *pDsRed2-KEAP1* φαίνονται στην *Εικόνα 11* και στους *Πίνακες*:

A) *pcDNA3-EGFP-C4-NRF2*



B) *pDsRed2-KEAP1*



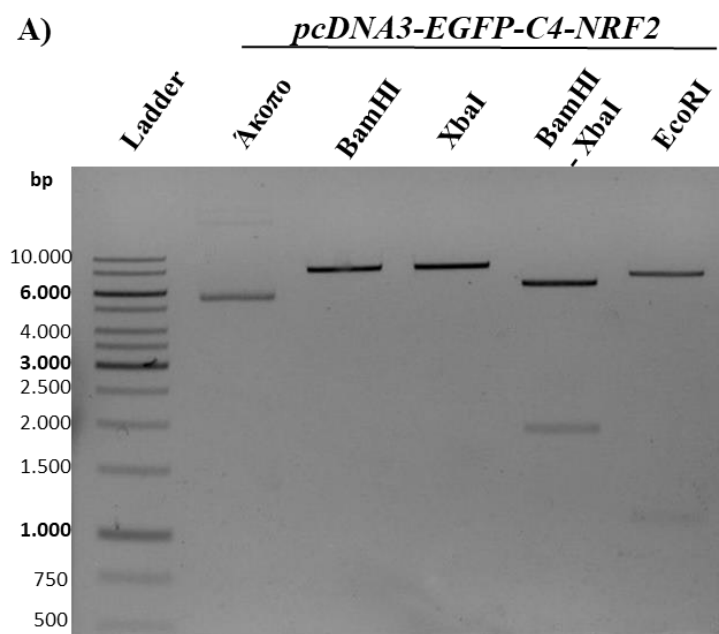
*Εικόνα 11: Αναπαράσταση των πλασμιδίων A) pcDNA3-EGFP-C4-NRF2 και B) pDsRed2-KEAP1, τα σημεία που κόβουν τα ένζυμα και οι θέσεις που αναγνωρίζουν τα ένζυμα περιορισμού Bam*HI, *Xba*I και *Eco*RI.

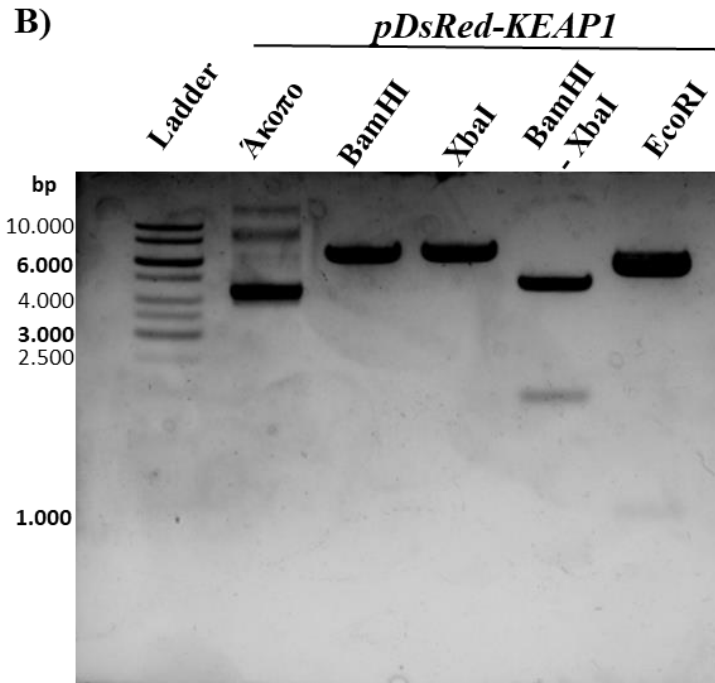
Ένζυμα περιορισμού	Αριθμός βάσεων (bp) pcDNA3-EGFP-C4-NRF2
BamHI	7972
XbaI	7972
BamHI-XbaI	1825 και 6147
EcoRI	1026 και 6946

Πίνακας 9: Βάσεων πλασμιδιακού DNA *pcDNA3-EGFP-C4-NRF2* μετά από πέψεις με ένζυμα περιορισμού *BamHI*, *XbaI*, *EcoRI*.

Ένζυμα περιορισμού	Αριθμός βάσεων (bp) pDsRed2-KEAP1
BamHI	6506
XbaI	6506
BamHI-XbaI	1879 και 4627
EcoRI	925 και 5581

Πίνακας 10: Αριθμός βάσεων πλασμιδιακού DNA *pDsRed2-KEAP1* στην πηκτική αγαρόζης μετά από πέψεις με ένζυμα περιορισμού *BamHI*, *XbaI*, *EcoRI*.

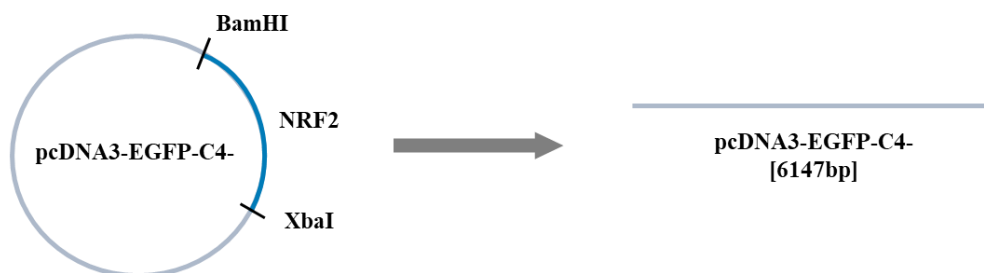




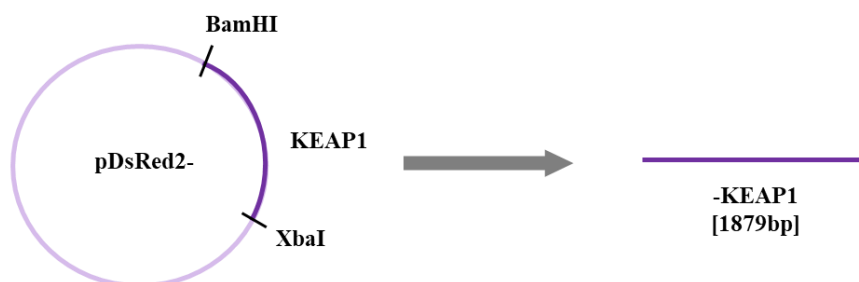
Εικόνα 14: Έλεγχος των αρχικών πλασμιδίων με πέψεις με *Bam*HI, *Xba*I και *Eco*RI. **A)** Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδίου *pcDNA3-EGFP-C4-NRF2* σε πηκτή αгарόζη; 1%. **B)** Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδίου *pDsRed2-KEAP1* σε πηκτή αгарόζης 1%.

Ως πηγή του φορέα χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο *pcDNA3-EGFP-C4-NRF2* και για το ένθεμα το πλασμίδιο *pDsRed2-KEAP1*. Η υποκλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε με πέψεις των δύο πλασμιδίων με τα ένζυμα περιορισμού *Bam*HI και *Xba*I, όπως φαίνεται στην Εικόνα 14. Για την απομόνωση του φορέα και του ενθέματος πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική πέψη 2μg των δύο πλασμιδίων σε τελικό όγκο αντίδρασης 40μl. Οι αντιδράσεις αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% ώστε να διαχωριστούν τα προϊόντα της πέψης. Οι επιθυμητές ζώνες ανακτήθηκαν από την πηκτή που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 15).

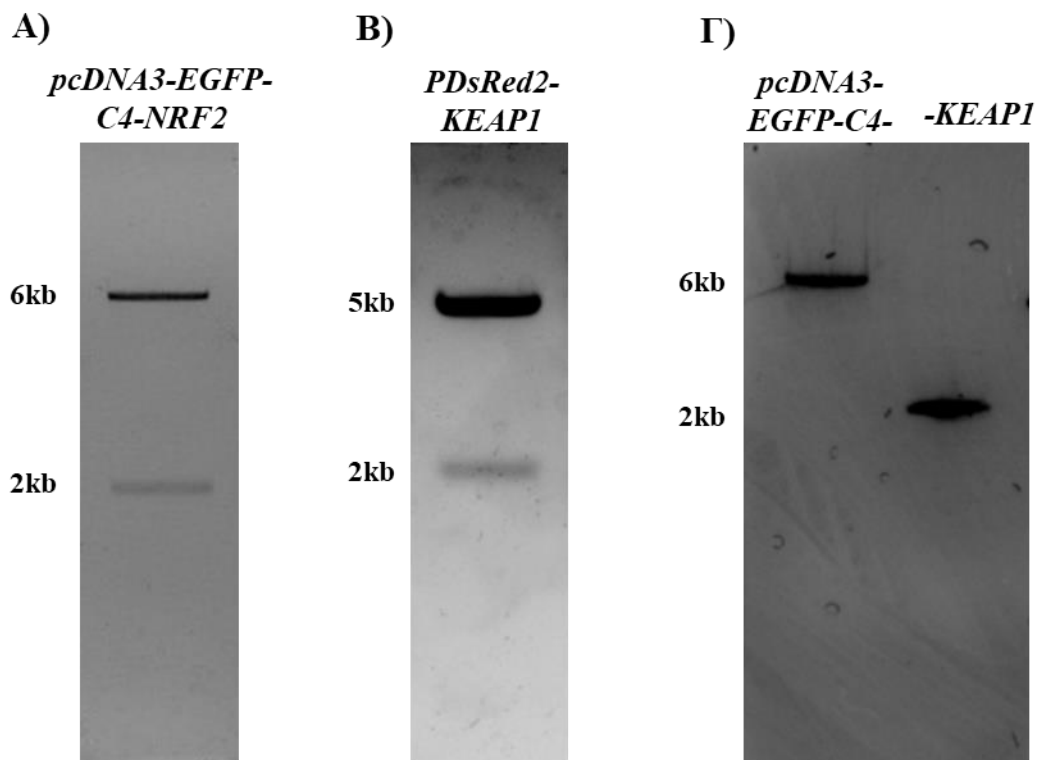
A) pcDNA3-EGFP-C4-NRF2



B) pDsRed-KEAP1

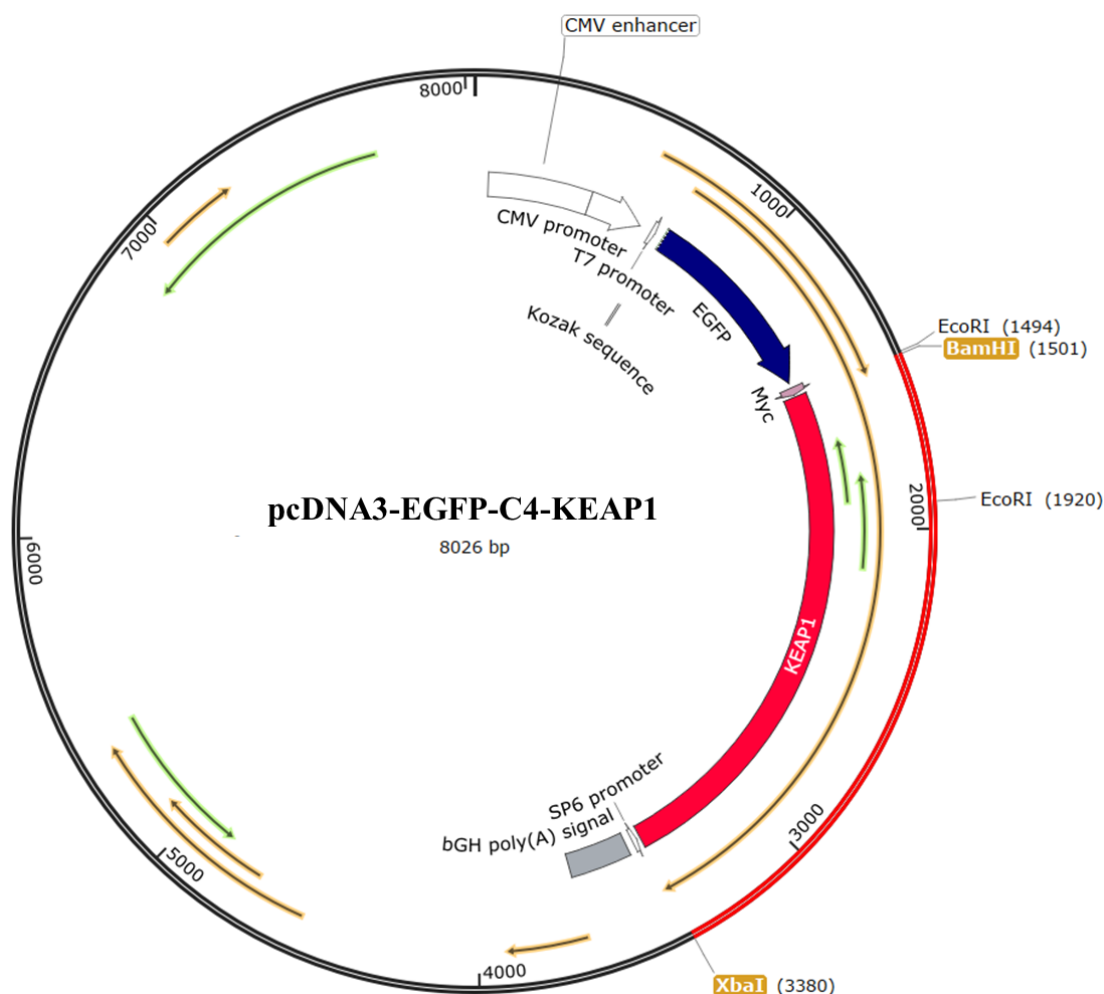


Εικόνα 13: Γραφική αναπαράσταση των πλασμιδίων, που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του νέου πλασμιδίου *pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1*. **A)** *pcDNA3-EGFP-C4-NRF2* και **B)** *pDsRed-KEAP1*



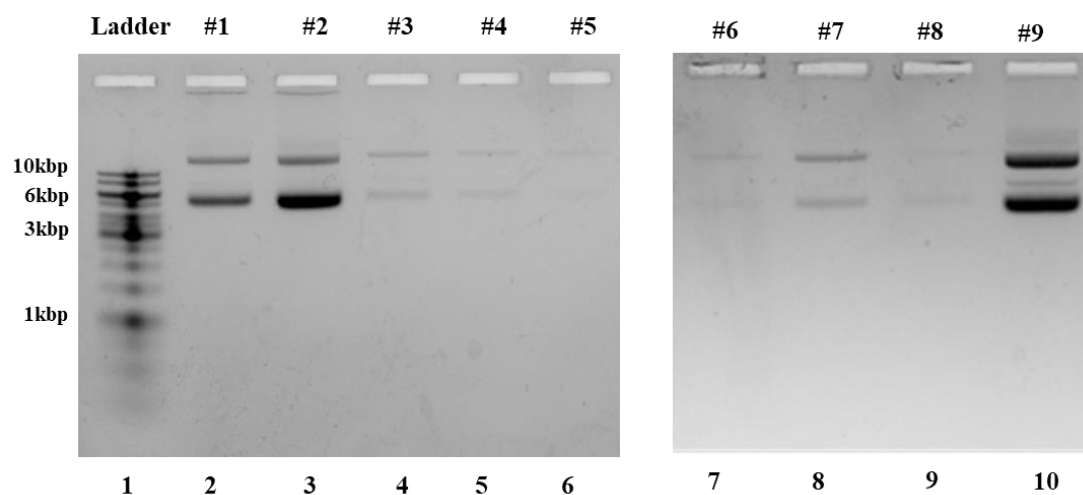
Εικόνα 14: Πέψη πλασμιδίου με *Bam*HI και *Xba*I και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%: **A)** *pcDNA3-EGFP-C4-NRF2* και **B)** *pDsRed2-KEAP1*. **Γ)** Τμήματα του ενθέματος και του φορέα μετά από ανάκτηση από πηκτή αгарόζης.

Στα τμήματα που ανακτήθηκαν από την πηκτή αгарόζης χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση T4 λιγάσης για την ένωση του φορέα με το ένθεμα και τη δημιουργία του νέου πλασμιδίου. Εκτός από την αντίδραση λιγάσης για την εισαγωγή του ενθέματος στο φορέα, πραγματοποιήθηκε και μία αντίδραση για τον πλασμιδιακόφορέα ως αρνητικός μάρτυρας, για να ελεγχθεί η επανακυκλοποίηση του φορέα.



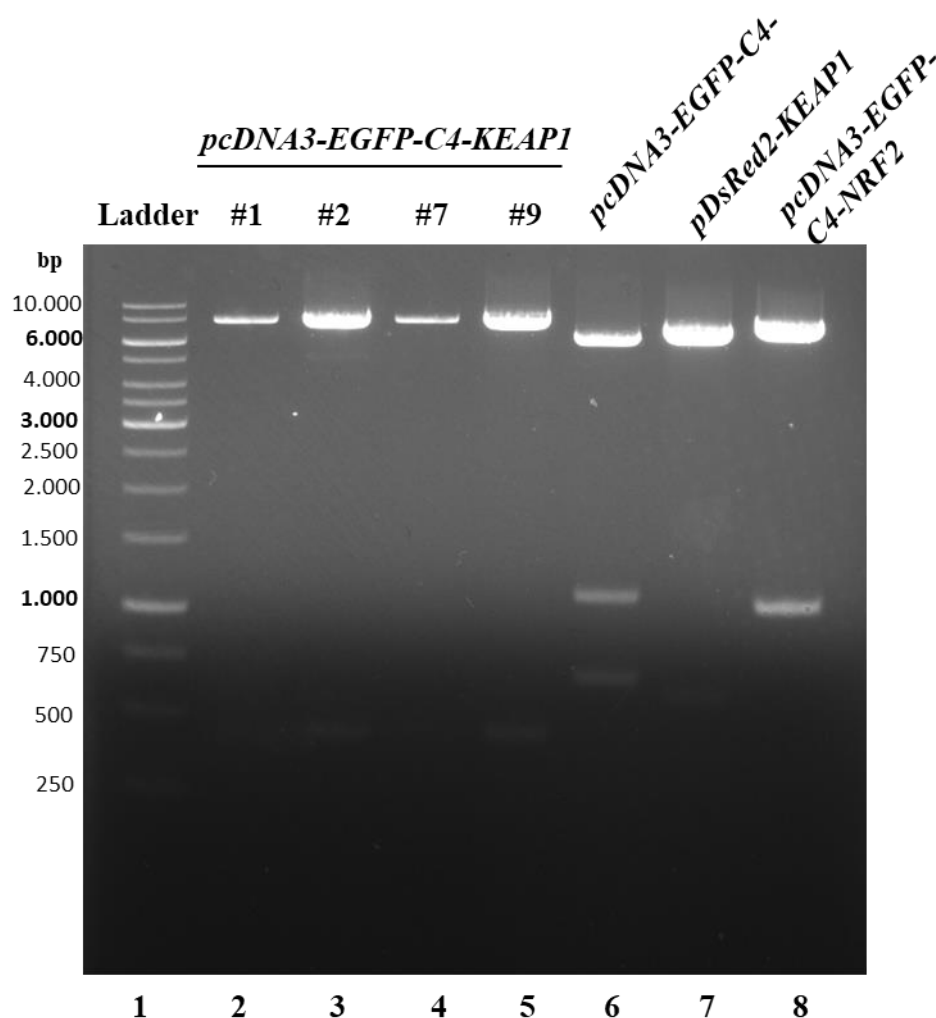
Εικόνα 15: Σχηματική παρουσίαση του υπό κατασκευή πλασμιδιακού φορέα pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1.

Η αντίδραση λιγάσης χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηρίων *E. coli* Top10. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιστρώθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό LB Agar με αμπικιλίνη, το αντιβιοτικό επιλογής του φορέα pcDNA3-EGFP-C4 και επώαστηκαν ολονύχτια στους 37°C. Από τις θετικές αποικίες, αναπτύχθηκαν υγρές καλλιέργειες και απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA (Εικόνα 16). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πέψεις με το ένζυμο περιορισμού EcoRI στις αποικίες #1, #2, #7 και #9 και ηλεκτροφόρηση, για να ελεγχθεί η παρουσία ενθέματος (Εικόνα 17). Οι προβλεπόμενες ζώνες μετά την πέψη του πλασμιδίου pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1 με το ένζυμο περιορισμού EcoRI είναι στις 7600bp και στις 426bp.



Εικόνα 16: Έλεγχος απομόνωσης πλασμιδιακού DNA αποικιών #1-#9 με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1%.

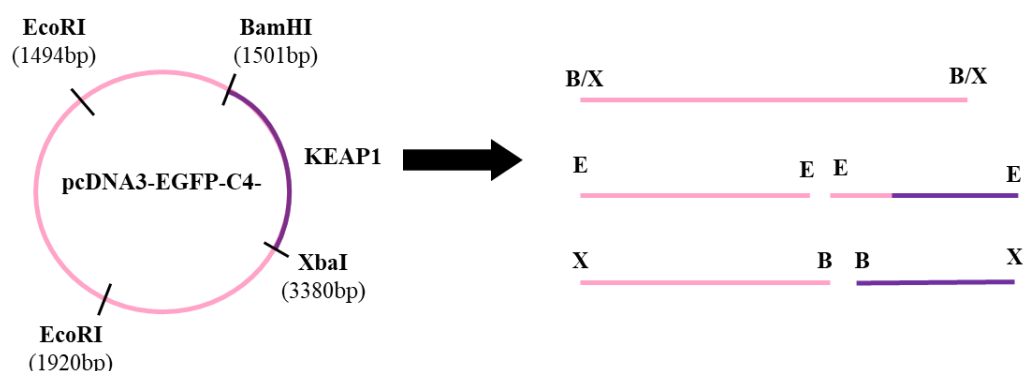
Επιλέχθηκαν οι αποικίες για την πέψη ελέγχου με το ένζυμο περιορισμού EcoRI και την ηλεκτροφόρηση. Οι πέψεις παρουσιάζονται στην εικόνα παρακάτω:



Εικόνα 17: 2-5) Έλεγχος των αποικιών pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1 με πέψεις με *EcoRI* και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Ελέγχθηκαν οι αποικίες 1,2,7,9 και 10. 6) Ηλεκτροφόρηση του φορέα pcDNA3-EGFP-C4-. 7) Πέψη του πλασμιδίου pDsRed2-KEAP1 με το ένζυμο *EcoRI* και ηλεκτροφόρηση και 8) Πέψη του πλασμιδίου pcDNA3-EGFP-C4-NRF2 με *EcoRI* και ηλεκτροφόρηση.

Από την ηλεκτροφόρηση επιλέχθηκαν οι αποικίες #2 και #9, στις πέψεις των οποίων προκύπτουν οι επιθυμητές ζώνες. Πραγματοποιήθηκε εκ νέου απομόνωση του πλασμιδιακού DNA των αποικιών αυτών, οι οποίες ελέγχθηκαν με πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού *BamHI*, *XbaI* και *EcoRI*, και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Οι προβλεπόμενες ζώνες μετά τις πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού φαίνονται παρακάτω:

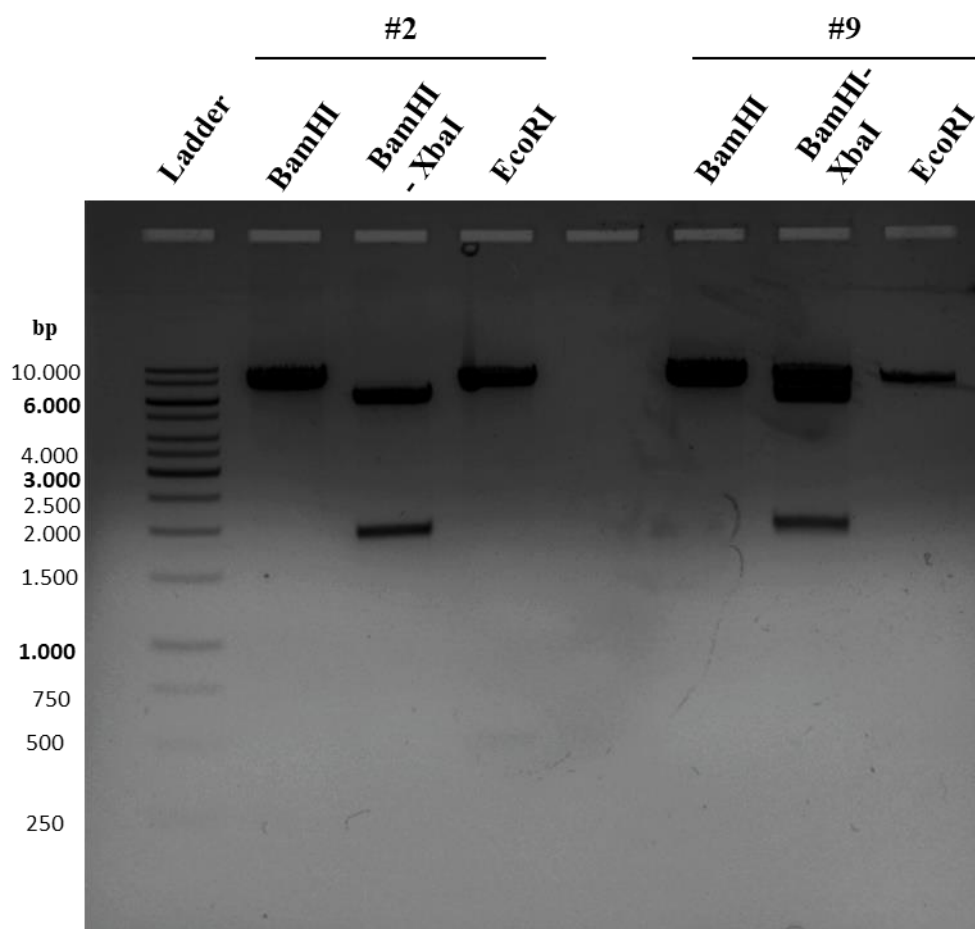
pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδίου pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1 και τα σημεία πέψεις των ενζύμων περιορισμού *BamHI*, *XbaI* και *EcoRI*, που χρησιμοποιήθηκαν για τις πέψεις ελέγχου.

Ένζυμο περιορισμού	Αριθμός βάσεων (bp) pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1
<i>BamHI</i>	8026
<i>BamHI-XbaI</i>	6112 και 1879
<i>EcoRI</i>	7600 και 426

Πίνακας 11: Αριθμός βάσεων των ζωνών της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1% του πλασμιδίου pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1 μετά από πέψεις με *BamHI*, *XbaI* και *EcoRI*.

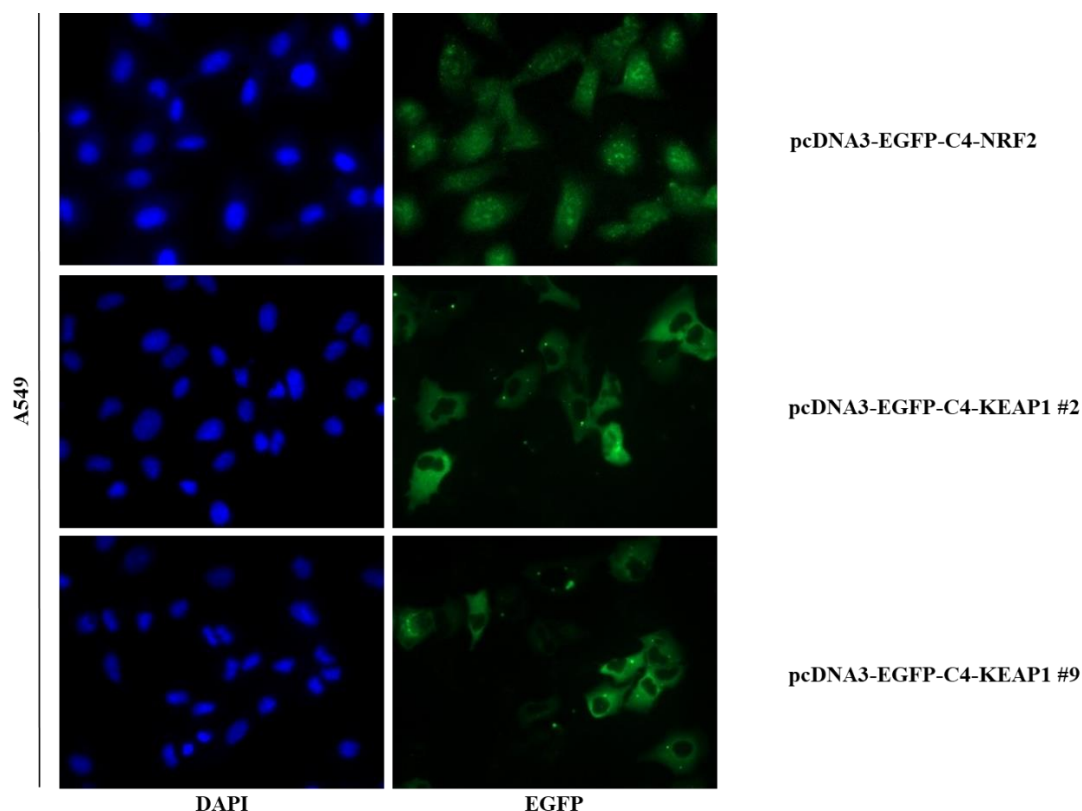


Εικόνα 19: Έλεγχος αποικιών #2 και #9 με πέψεις με *Bam*HI, *Xba*I και *Eco*RI και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 1%.

4.2. Έλεγχος της έκφρασης και του υποκυτταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης EGFP-KEAP1

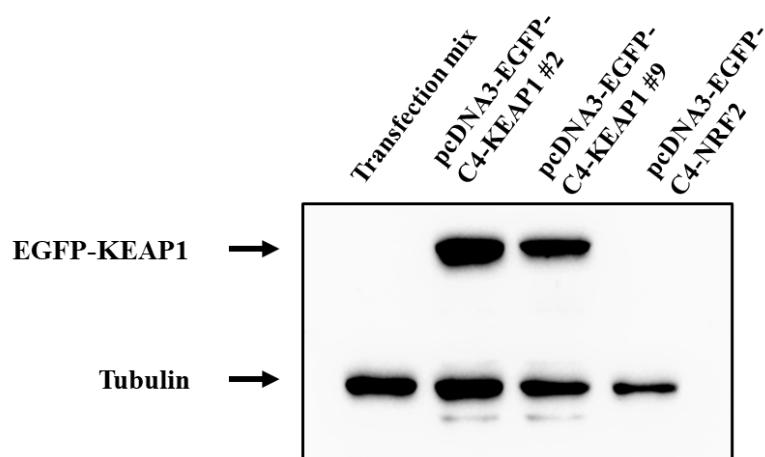
Στη συνέχεια, το πλασμίδιο pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1 χρησιμοποιήθηκε για την παροδική διαμόλυνση καρκινικών κυττάρων A549, προκειμένου να ελεγχθεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός και η έκφραση της χημειοκινικής πρωτεΐνης EGFP-KEAP1 με μικροσκοπία φθορισμού και με ανοσοαποτύπωση κατά Western, αντίστοιχα. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο pcDNA3-EGFP-C4-NRF2 ως θετικό μάρτυρα.

Για την παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα επιστοιβάξης Mowiol με τη φθορίζουσα χρωστική DAPI. Με την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, επιβεβαιώθηκε η επιτυχημένη έκφραση της πρωτεΐνης EGFP-KEAP1, η οποία παρατηρείται να σχηματίζει συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Ανάλυση με μικροσκοπία φθορισμού της έκφρασης της πρωτεΐνης EGFP-KEAP1 σε κύτταρα A549. Η διαμόλυνση έγινε με το αντιδραστήριο jetPRIME® (Polyplus) και τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες πριν τη μονιμοποίηση. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI.

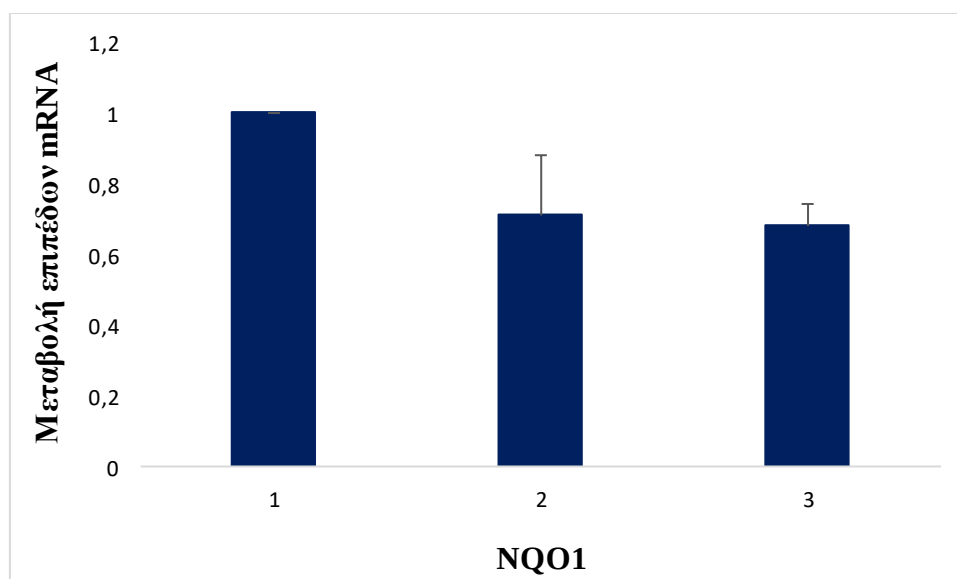
Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης EGF-KEAP1, παρασκευάστηκαν ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών, από κύτταρα A549 και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του γονιδίου της τουμπουλίνης. Η μεμβράνη επώαστηκε με τα αντισώματα, anti-EGFP rabbit και anti-tubulin mouse και στη συνέχεια, με τα αντισώματα anti-rabbit IgG και anti-mouse HRP αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη EGFP-KEAP1 ανιχνεύεται στα κύτταρα που είχε πραγματοποιηθεί διαμόλυνση με τις αποικίες #2 και #9 του πλασμιδιακού φορέα pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1 και όχι στον αρνητικό μάρτυρα. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε η πρωτεΐνη EGFP-NRF2 στα κύτταρα με το πλασμίδιο pcDNA3-EGFP-C4-NRF2, γιατί τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης NRF2 είναι πιθανώς πολύ χαμηλά (Εικόνα 21).



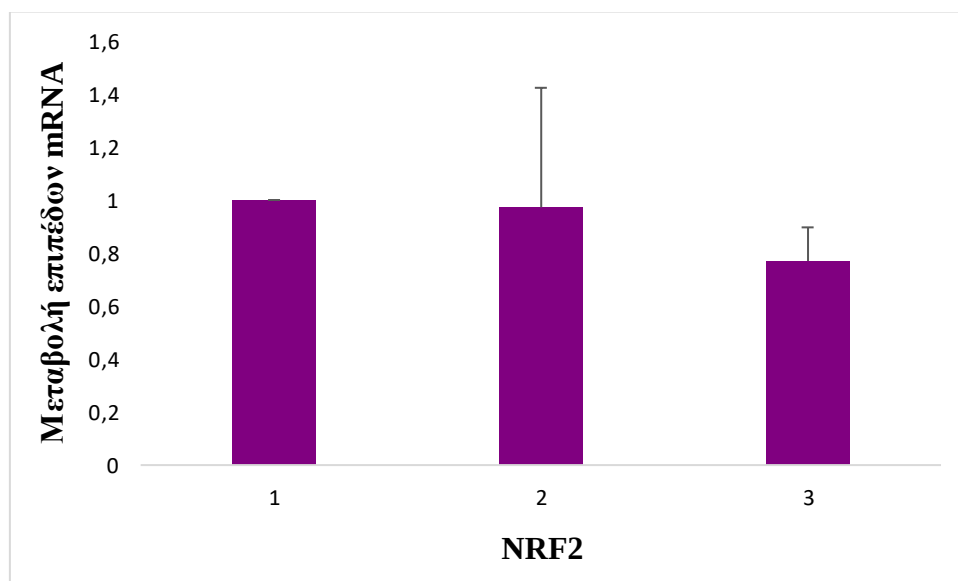
Εικόνα 21: Έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης EGFP-KEAP1 με της ανοσοαποτύπωση κατά western. 1) Transfection mix, 2) pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1 #2, 3) pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1 #9 και 4) pcDNA3-EGFP-C4-NRF2. Η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης.

4.3.Μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης EGFP-KEAP1 στο μεταγραφικό παράγοντα NRF2

Αφού παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη EGFP-KEAP1 εκφράζεται κι εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων A549, μελετήθηκε η επίδραση της πρωτεΐνης στη μεταγραφική ενεργότητα του NRF2 σε δείγματα κυττάρων A549. Για το σκοπό αυτό, έγινε έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου στόχου του NQO1 (κυτταροπλασματική 2-electron reductase), γονίδιο στόχο του NRF2 με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν επίσης, τα επίπεδα έκφρασης των mRNA των γονιδίων του NRF2 και NQO1. Το γονίδιο της β-ακτίνης (ACTB) χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 22: Σχετική έκφραση του *NQO1* σε κύτταρα *A549* με ποσοτική RT-PCR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (πλσμίδιο *EGFP-C1*) και είναι ο μέσος όρος 4 αντιδράσεων. Κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το γονίδιο της β -ακτίνης.

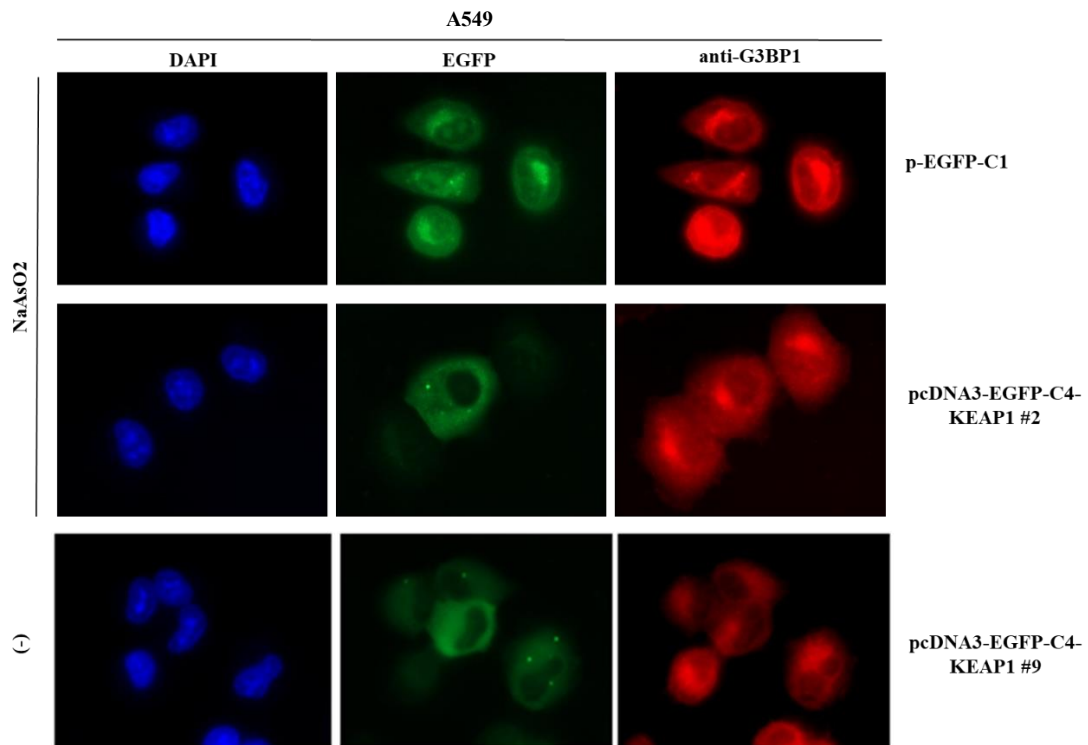


Εικόνα 23: Σχετική έκφραση του *NRF2* σε κύτταρα *A549* με ποσοτική RT-PCR. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (πλσμίδιο *pEGFP-C1*) και είναι ο μέσος όρος 2 αντιδράσεων. Κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το γονίδιο της β -ακτίνης.

Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων του mRNA του γονιδίου *NQO1* στα κύτταρα όπου είχε πραγματοποιηθεί διαμόλυνση με το πλασμίδιο *pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1*, σε σχέση με τα κύτταρα που περιείχαν το πλασμίδιο *pEGFP-C1*, που ήταν η συνθήκη αναφοράς (Εικόνα 22). Από την άλλη δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα του mRNA του *NRF2* (Εικόνα 23).

4.4. Μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης *EGFP-KEAP1* στο σχηματισμό κοκκίων του στρες σε κύτταρα *A549*

Για τη μελέτη της επίδρασης του παράγοντα *KEAP1* στο σχηματισμό των κοκκίων του στρες έγινε παροδική διαμόλυνση κυττάρων *A549* με τα πλασμίδια *pEGFP-C1* και *pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1* #2 και #9 σε τρυβλίο 24well. Στη συνέχεια, 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα επώαστηκαν για 1 ώρα με 0,5 mM NaAsO_2 , για την πρόκληση οξειδωτικού στρες. Ως μάρτυρας σχηματισμού κοκκίων στρες χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη *G3BP1*. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα ενάντια στη *G3BP1* για τον εντοπισμό των stress granules, με έμμεσο ανοσοφθορισμό, ενώ η έκφραση του *EGFP-KEAP1* εντοπίστηκε με το φθορισμό της *EGFP*. Στις εικόνες απεικονίζονται τα stress granules και η πρωτεΐνη *KEAP1*.



Εικόνα 24: Μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού με αντίσωμα anti-G3BP1 mouse και αντίσωμα anti-mouse IgG rabbit. Η διαμόλυνση των κυττάρων έγινε με το αντιδραστήριο jetPRIME® (Polyplus) και τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες πριν τον ανοσοφθορισμό. Η χρώση των πυρήνων έγινε με τη χρωστική DAPI.

Δεν παρατηρείται διαφορά στο σχηματισμό των κοκκίων του στρες στα κύτταρα διαμολυσμένα με το πλασμίδιο pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1 σε σχέση με αυτά με το πλασμίδιο pEGFP-C1. Επίσης, διαφορά δεν παρατηρείται και στα κύτταρα στις συνθήκες NaAsO₂ σε σχέση με τα κύτταρα στη συνθήκη αναφοράς (control) (Εικόνα 24).

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων των οργανισμών επηρεάζεται από διαφορετικά εξωκυτταρικά και εσωτερικά ερεθίσματα. Ένα από αυτά αποτελεί το οξειδωτικό στρες. Σε τέτοιες συνθήκες προκαλούνται βλάβες σε διάφορα συστατικά των κυττάρων, όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια των μεμβρανών αλλά και διαταράσσονται μεταβολικά μονοπάτια, μεταβάλλοντας τη σωστή λειτουργία των κυττάρων. Τα κύτταρα, λοιπόν, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας για την επιβίωσή τους. Ένας από αυτούς είναι το μονοπάτι NRF2-KEAP1, το οποίο ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη διατήρηση της ομοιόστασης και την επιβίωση του κυττάρου. Ο παράγοντας NRF2 εκφράζεται συνεχώς και σε φυσιολογικές συνθήκες οδηγείται προς αποικοδόμηση από τον KEAP1 στο πρωτεάσωμα. Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες ο KEAP1 καθίσταται ανενεργός και ο NRF2 είναι ελεύθερος να ενεργοποιήσει τα γονίδια στόχους του. Το μονοπάτι NRF2-KEAP1, είναι από τα βασικότερα μονοπάτια για την επιβίωση των κυττάρων, καθώς μεταλλάξεις σε παράγοντες που σχετίζονται με το μονοπάτι και οδηγούν σε απορρυθμισμό του μονοπατιού, έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών και την ανάπτυξη κα μετάσταση κακοήθων καρκινικών όγκων.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του παράγοντα KEAP1 στα καρκινικά κύτταρα A549. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε πλασμιδιακός φορέας pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1, για την υπερέκφραση του KEAP1. Πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων A549, ελέγχθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης EGFP-KEAP1, ο πλασμιδιακός φορέας χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του KEAP1 στον NRF2 και σε γονίδια στόχους του (NQO1). Με μικροσκοπία φθορισμού πραγματοποιήθηκε υποκυτταρικός εντοπισμός του NRF2 στον πυρήνα των A549 και του KEAP1 στο κυτταρόπλασμα, όπου παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κοκκίων του KEAP1, με την υπερέκφρασή του, όπως επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία^[7,43,44]. Με ανοσοαποτύπωση κατά Western ελέγχθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης του KEAP1. Από την άλλη, έγινε προσπάθεια μέτρησης των επιπέδων του NRF2 χωρίς επιτυχία, λόγω πιθανής αποικοδόμησης του παράγοντα στα κύτταρα. Επίσης, μετρήθηκαν με ποσοτική RT-PCR τα επίπεδα των mRNA του NRF2 και του NQO1. Οι μεταβολές στα επίπεδα του mRNA του NRF2 δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές στα δείγματα, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων του NQO1 στα κύτταρα με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1, σε σχέση με τα κύτταρα με το πλασμίδιο αναφοράς pEGFP-C1. Τέλος, ερευνήθηκε η επίδραση του παράγοντα KEAP1 στο σχηματισμό κοκκίων του στρες στα κύτταρα A549 μετά από επώαση για 1 ώρα σε NaAsO₂. Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στον αριθμό ή στο μέγεθος των stress granules, ενώ παρατηρήθηκε και ασθενής ανάπτυξη των SGs. Έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μειωμένη ανάπτυξη των κοκκίων του στρες, το οποίο πιθανώς να δείχνει ότι για το σχηματισμό stress granules απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση NaAsO₂ ή έκθεση σε αυτές τις συνθήκες για περισσότερη ώρα.

Συνοψίζοντας φαίνεται πως η υπερέκφραση του KEAP1, ύστερα από διαμόλυνση με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1, μειώνει τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2, στα καρκινικά κύτταρα, καθώς μειώνει τα επίπεδα των mRNA του γονιδίου στόχου, του NQO1 σε κύτταρα A549. Κατά συνέπεια ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3-EGFP-C4-KEAP1 που κατασκευάστηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της ρύθμισης του συστήματος NRF2-KEAP1.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Baird, L. Yamamoto, M. (2020), The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway, *Molecular and Cellular Biology*, vol. 40 (13), doi: [10.1128/MCB.00099-20](https://doi.org/10.1128/MCB.00099-20).
2. Kansanen, E. Kuosmanen, S. M. Leinonen, H. Levonen, A. L. (2013), The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer, *Redox Biology*, pp. (46-49), doi: [http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001](https://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001).
3. Farooq, M. A. Niazi, A. K. Akhtar, J. et al, (2019) Acquiring control: The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses, *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 141, pp. (353-369), doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.039>.
4. Kostova-Dinkova, A. T. (2023), KEAP1/NRF2 as a druggable target, *Arh. Farm*, v. 73 pp. (89-108), doi: <https://doi.org/10.5937/arhfarm73-43475>.
5. Tossetta, G. Marzioni, D. (2023), Targeting the NRF2/KEAP1 pathway in cervical and endometrial cancers, *European Journal of Pharmacology*, v. 941, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175503>.
6. Kitamura, H. Motohashi, H. (2018), NRF2 addiction in cancer cells, *Cancer Science*, v. 109 (4), doi: 10.1111/cas.13537.
7. Dodson, M. Dai, W. Anandhan, A. Schmidlin, C. et al, (2022), CHML is an NRF2 target gene that regulates mTOR function, *Molecular Oncology*, v. 18 (8), pp. (1714-1727), doi: 10.1002/1878-0261.13194.
8. Rojo de la Vega, M. Chapman, E. Zhang, D., (2018), NRF2 and the Hallmarks of Cancer, *Cancer Cell*, v. 34, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.022>.
9. Suzuki, T. Motohashi, H. Yamamoto, M. (2013), Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway, *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 34 (6), pp. (340-346), DOI: [10.1016/j.tips.2013.04.005](https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.04.005).
10. Soghli, N. et al, (2023), NRF2 signaling pathway: A comprehensive prognostic and gene expression profile analysis in breast cancer, *Pathology – Research and Practice*, v. 243, doi: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154341>.
11. Chen, Y. C., Wu, Y. R., Wu, Y. C., Lee-Chen, G. J., & Chen, C. M. (2013). Genetic analysis of NFE2L2 promoter variation in Taiwanese Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, v.19 (2), pp. (247-250), doi: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.10.018>.
12. Gui, YaXing & Zhang, LiShan & Lv, Wen & Zhang, WenMing & Zhao, JinJia & Hu, XingYue, (2016), NFE2L2 variations reduce antioxidant response in patients with Parkinson disease, *Oncotarget*, v.7 (10), doi: 18632/oncotarget.7353.
13. Yamamoto, M. Kensler, T. W. Motohashi, H. (2018), THE KEAP1-NRF2 SYSTEM: A THIOL-BASED SENSOR-EFFECTOR APPARATUS FOR MAINTAINING REDOX HOMEOSTASIS, *Physiol Rev*, v.98, pp. (1169-1203), doi:10.1152/physrev.00023.2017.
14. Cuadrado, A. et al, (2019), Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases, *Nature Reviews Drug Discovery*, v.18, pp. (295-317), doi: <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0008-x>.
15. Adinolfi, S. Patinen, T. Patinen, T. Deen, A. J. Pitakanen, S. Harkonen, J. Kansanen, E. Kublbeck, J. Levonen, A., (2023), The KEAP1-NRF2 pathway:

- Targets for therapy and role on cancer, *Redox Biol.* v.63, doi: 10.1016/j.redox.2023.102726.
16. Taguchi, Y. Yamamoto, M. (2017), The KEAP1-NRF2 System in Cancer, *Frontiers in Oncology*, v.7 (85), doi: 10.3389/fonc.2017.00085.
 17. Gazaryan, I. G. Thomas, B. (2016), The status on Nrf2-based therapeutics: current perspective and future prospects, *Neural Regen Res*, v.11 (11), pp. (1708-1711), doi: 10.4103/1673-5374.194706.
 18. Yu, C. Xiao, J. H. (2021), The Keap1-Nrf2 System: A Mediator between Oxidative Stress and Aging, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2021, doi: <https://doi.org/10.1155/2021/6635460>.
 19. Criman, E. Duarte P. Leon, R. et al, (2022), KEAP1-NRF2 protein–protein interaction inhibitors: Design, pharmacological properties and therapeutic potential, *Medical Research Reviews*, v. 43 (1), pp. (237-287), doi: <https://doi.org/10.1002/med.21925>.
 20. Shin, J. H., Lee, K.-M., Shin, J., Kang, K. D., Nho, C. W., & Cho, Y. S. (2019). Genetic risk score combining six genetic variants associated with the cellular NRF2 expression levels correlates with Type 2 diabetes in the human population. *Genes & Genomics*. doi:10.1007/s13258-019-00791-0.
 21. Shimizu S, Mimura J, Hasegawa T, Shimizu E, Imoto S, Tsushima M, Kasai S, Yamazaki H, Ushida Y, Suganuma H, Tomita H, Yamamoto M, Nakaji S, Itoh K. (2020) Association of single nucleotide polymorphisms in the NRF2 promoter with vascular stiffness with aging. *PLoS One*, v. 15 (8) doi: 10.1371/journal.pone.0236834.
 22. Jia, C. Wang, R. et al (2022), NRF2 Genetic Polymorphism Modifies the Association of Plasma Selenium Levels with Incident Coronary Heart Disease Among Individuals with Type 2 Diabetes, *Diabetes*, v. 71 (9), doi: <https://doi.org/10.2337/db21-1124>.
 23. Hua CC, Chang LC, Tseng JC, Chu CM, Liu YC, Shieh WB. Functional haplotypes in the promoter region of transcription factor Nrf2 in chronic obstructive pulmonary disease. *Dis Markers*. (2010) 28 (3) pp. (185-93), doi: 10.3233/DMA-2010-0700.
 24. Sugitani, A., Asai, K., Watanabe, T. et al. A Polymorphism rs6726395 in Nrf2 Contributes to the Development of Emphysema-Associated Age in Smokers Without COPD. *Lung* **197**, 559–564 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00408-019-00251-2>.
 25. Arisawa T, Tahara T, Nakamura M. [A genetic background of ulcer diseases induced by NSAID/aspirin]. *Nihon Rinsho*. (2010) v.68 (11), pp (2113-8).
 26. Ji G, Zhang M, Liu Q, Wu S, Wang Y, Chen G, Sandford AJ, He JQ. (2021) Functional Polymorphism in the *NFE2L2* Gene Associated with Tuberculosis Susceptibility. *Front Immunol*. V. 24 (12), doi: [10.3389/fimmu.2021.660384](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.660384).
 27. von Otter, M., Landgren, S., Nilsson, S. et al. (2010) Association of Nrf2-encoding *NFE2L2* haplotypes with Parkinson's disease. *BMC Med Genet*, v. 11 (36), doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-36>.
 28. Paupe V, Dassa EP, Goncalves S, Auchère F, Lönn M, Holmgren A, Rustin P. (2009) Impaired nuclear Nrf2 translocation undermines the oxidative stress

- response in Friedreich ataxia. *PLoS One*. v. 4 (1), doi: [10.1371/journal.pone.0004253](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004253).
29. Quinti L, Dayalan Naidu S, Dinkova-Kostova AT, et al. (2017) KEAP1-modifying small molecule reveals muted NRF2 signaling responses in neural stem cells from Huntington's disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 114 (23), doi: [10.1073/pnas.1614943114](https://doi.org/10.1073/pnas.1614943114).
 30. Nadeem, A. Ahmad, S. F. Al-Harbi, N. O. (2022), Dysregulated Nrf2 signaling in response to di(2-ethylhexyl) phthalate in neutrophils of children with autism, *International Immunopharmacology*, v. 106, doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108619>.
 31. Cuadrado, A. (2015). Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3/ β -TrCP. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 88, pp. (147–157), doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.029](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.029).
 32. Li, R. Jia, Z. Zhu, H. (2019), Regulation of NRF2 Signaling, *React Oxyg Species*, v. 8 (24), pp. (312-322).
 33. Wu T, Zhao F, Gao B, Tan C, Yagishita N, Nakajima T, Wong PK, Chapman E, Fang D, Zhang DD., (2014), Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis, *Genes Dev.*, v. 28 (7), pp. (708-722), doi: [10.1101/gad.238246.114](https://doi.org/10.1101/gad.238246.114).
 34. Gao, X. Jiang, L. Chen, X. Ying, M. Zhu, H. He, Q. Yang, B. Cao, J. (2019), Stress granule: A promising target for cancer treatment, *Br J Pharmacol*, pp. (4421-4433), doi: 10.1111/bph.14790.
 35. Campos-Melo, D. Hawley, Z. C. E., Droppelmann, C. A. Strong, M J. (2021), The Integral Role of RNA in Stress Granule Formation and Function, *Frontiers in Cell and Development Biology*, v.9, doi: 10.3389/fcell.2021.621779.
 36. Cao, X. Jin, X. Liu, B. (2020), The involvement of stress granules in aging and aging-associated diseases, *Aging Cell*, v.19, doi: <https://doi.org/10.1111/acer.13136>.
 37. Asadi, M. R. Rahmanpour, D. Moslehian, M. S. Sabaie, H. Hassani, M. Ghafouri-Fard, S. Taheri, M. Razazadeh, M. (2021), Stress Granules Involved in Formation, Progression and Metastasis of Cancer: A Scoping Review, *Frontiers in Cell and Development Biology*, v.9, doi: 10.3389/fcell.2021.745394.
 38. Kuechler, E. R. Budzynska, P. M. et al, (2020), Distinct Features of Stress Granule Proteins Predict Localization in Membraneless Organelles, *Journal of Molecular Biology*, v.432, pp. (2349-2368), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.02.020>.
 39. Wang, L. Yang, W. Li, B. Yuan, S. Wang, F. (2021), Response to stress in biological disorders: Implications of stress granule assembly and function, *Cell Proliferation*, v.54, doi: <https://doi.org/10.1111/cpr.13086>.
 40. Glauninger, H., Wong Hickernell, C. J., Bard, J. A.M., Drummond, D. A., (2023), Stressful steps: progress and challenges in understanding stress-induced mRNA condensation and accumulation in stress granules, *Mol Cell.*, v.82 (14), pp. (2544-2556), doi: 10.1016/j.molcel.2022.05.014.

41. Tolay, N., Buchberger, A. (2022), Role of the Ubiquitin System in Stress Granule Metabolism, *International Journal of Molecular Sciences*, v.23 (7), doi: <https://doi.org/10.3390/ijms23073624>.
42. Buchan, J. R., Parker, R. (2009), Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation, *Molecular Cell*, v.36 (6), pp. (932-941), doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.11.020>.
43. Wu, B. Yang, S. Sun, H. Sun, T., et al, (2018), Keap1 Inhibits Metastatic Properties of NSCLC Cells by Stabilizing Architectures of F-Actin and Focal Adhesions, *Mol. Cancer Res*, v.16 (3), pp. (508-516), doi: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0544>.
44. Hwang, S-K. Jeong, Y-J, Chang, Y.-C, (2020), PDCD4 inhibits lung tumorigenesis by the suppressing p62-Nrf2 signaling pathway and upregulating Keap1 expression, *Am J Cancer Res*, v.10 (2), pp. (424-439).