



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Νικόλαος ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

**"Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΨΙΛΟΝ ΙΣΟΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ C-E ΣΤΟ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΒΛΑΣΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΝΕΥΡΩΝΩΝ."**

υπό

ΑΝΔΡΕΑ Α. ΦΛΩΡΑΚΗ

Βιολόγος, Ψυχίατρος, Επιμελητής Β' ΓΝ Ελευσίνας «Θριάσιο» 2012

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2012

© 2012 Ανδρέας Φλωράκης

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (12^ο/14-12-2011 ΓΣΕΣ):

**1^ο Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Δρ. Νικόλαος **Σακελλαρίδης**
Καθηγητής, Διευθυντής Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^ο Εξεταστής

Δρ. Δήμητρα **Μάγκουρα**
Ερευνήτρια Α', Διευθύντρια του Εργαστηρίου Αναπτυξιακής
Νευροβιολογίας και Νευροχημείας του Κέντρου Νευροεπιστημών
του Ινστιτούτου Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας
Αθηνών

3^ο Εξεταστής

Δρ. Ν. **Πιτσιάκας**
Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

4^ο Εξεταστής

Δρ. Δημήτριος **Αρβανίτης**
Καθηγητής του Εργαστηρίου Ανατομίας – Ιστολογίας -
Εμβρυολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

5^ο Εξεταστής

Δρ. Γεώργιος **Νταλέκος**
Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

6^ο Εξεταστής

Δρ. Α. **Βασιλάκη**
Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

7^ο Εξεταστής

Δρ. Κ. **Δήμας**
Λέκτορας Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας και Νευροχημείας του Κέντρου Νευροεπιστημών του Ινστιτούτου Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών και αρχικά βασίστηκε στη σκέψη και σε προηγούμενες επιστημονικές εργασίες της Δρ. Μάγκουρα.

Τον πρώτο χρόνο χρηματοδοτήθηκε από το ΙΙΒΕΑΑ και στη συνέχεια από το ΠΕΝΕΔ, του οποίου επιστημονικός υπεύθυνος ήταν η Δρ. Μάγκουρα.

Οι συγγραφείς του ΠΕΝΕΔ ήταν: Δήμητρα Μάγκουρα Ερευνήτρια Α', MD, PhD, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας και Νευροχημείας του Κέντρου Νευροεπιστημών του Ινστιτούτου Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, Νικόλαος Σακελλαρίδης Καθηγητής, MD, PhD, Διευθυντής Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Ν. Πιτσίκας Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Κωνσταντίνος Βεκρέλλης Ερευνητής Γ', PhD, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών-Ακαδημία Αθηνών, Κέντρο Νευροεπιστημών, Εργαστήριο Νευροεκφυλιστικών Νόσων και άλλων Νευρολογικών παθήσεων, Γεώργιος Λεονταρίτης, PhD, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών-Ακαδημία Αθηνών Κέντρο Νευροεπιστημών, Εργαστήριο Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας και Νευροχημείας, Χατζηιωάννου Σοφία, MD, PhD, Διευθύντρια του Τμήματος Πυρηνικής Ιατρικής, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΕΑ), Γιώργος Νασιούλας, PhD, Διαγνωστικό και Θεραπευτικό Κέντρο «Υγεία», Διευθυντής Μοριακής Βιολογίας, Ερευνητικό και Διαγνωστικό Εργαστήριο.

Μέλη του εργαστηρίου που βοήθησαν σε διάφορα στάδια της εργασίας μου: Δοξάκης Επαμεινώνδας PhD, MBA, Λυκίδης Αθανάσιος PhD, Λεονταρίτης Γεώργιος PhD, Βαλλιανάτος Γεώργιος PhD, Τσιριμονάκη Εμμανουέλα MSc.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής.

Ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής.

Ευχαριστώ τα μέλη του επιστημονικού, τεχνικού και διοικητικού προσωπικού του ΙΙΒΕΑΑΑ.

Ευχαριστώ την κ. Μαρία Παυλάκη, PhD για την πολύτιμη βοήθειά της.

Ευχαριστώ την κ. Ξένια Κολιού, PhD για την βοήθειά της σε διαδικαστικά θέματα του ΠΕΝΕΔ.

Ευχαριστώ την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση.

Ανδρέας Φλωράκης

Στη μνήμη της μητέρας μου

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑ: ΑΝΔΡΕΑΣ
ΕΠΩΝΥΜΟ: ΦΛΩΡΑΚΗΣ
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΕΡΑ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ
ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΕΡΑΣ: ΑΡΤΕΜΙΣ
ΧΡΟΝΟΛΟΓΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 15 ΜΑΙΟΥ 1969
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: ΚΑΡΑΪΣΚΑΚΗ 16, 13451, ΑΘΗΝΑ
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: 6945605389, 2109015655
E MAIL: florakis@otenet.gr
ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΕΣ ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ: Εκπληρωμένες
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Έγγαμος με ένα παιδί

ΣΠΟΥΔΕΣ

- 1988-1993 Σχολή **Βιολογίας** Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθήνας. Βαθμός Πτυχίου: «Λίαν Καλώς». Τρόπος εισαγωγής: Πανελλαδικές εξετάσεις.
- 1995-2000 **Ιατρική** Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Βαθμός Πτυχίου: «Λίαν Καλώς». Τρόπος εισαγωγής: Κατατακτήριες Εξετάσεις.
- 30/6/2004-9^{ος}/2012 **Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής** στο Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας, με θέμα: «Ο ρόλος της έμφιλον ισομορφής της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC-ε) στο μηχανισμό διαφοροποίησης των νευροβλαστών και των νευρώνων». Η εκπόνηση της διατριβής πραγματοποιείται στο Ινστιτούτο Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών στο Κέντρο Νευροεπιστημών, Εργαστήριο Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας και Νευροχημείας, Δ/ντρια Δρ. Δ. Μάγκουρα
- 12/2005-6/2006 Παρακολούθηση του Εκπαιδευτικού προγράμματος για την «**Προαγωγή της Ψυχικής Υγείας**». Οργανωτές: Ψυχιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Institute of Psychiatry, King's College, London και E.T.H.I.C.S.
- 11/2006-6/2007 Παρακολούθηση εκπαιδευτικού σεμιναρίου στην **Κλινική Ψυχοπαθολογία**.

Οργανωτής: Ψυχιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο.
Διάρκεια: 72 εκπαιδευτικές ώρες.

11/2006-
6/2007

Παρακολούθηση εκπαιδευτικού σεμιναρίου με θέμα: «**Σεμινάριο Φιλοσοφίας και Μεθοδολογίας της Ψυχιατρικής και της Ψυχοθεραπείας**». Οργανωτής: Ψυχιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο. Διάρκεια: 48 εκπαιδευτικές ώρες.

9/2007-
6/2009

Παρακολούθηση του Εκπαιδευτικού προγράμματος για την «**Εναισθητοποίηση στην Ομαδική Ψυχαναλυτική Ψυχοθεραπεία**». Οργανωτής: Ψυχιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Εταιρεία Ομαδικής ψυχαναλυτικής Ψυχοθεραπείας.

10/2007-
6/2008

Παρακολούθηση του δεύτερου κύκλου του εκπαιδευτικού σεμιναρίου στην **Κλινική Ψυχοπαθολογία**. Οργανωτής: Ψυχιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο. Διάρκεια: 30 εκπαιδευτικές ώρες.

10/2007-
6/2008

Παρακολούθηση του πρώτου κύκλου εκπαίδευσης στη **Γνωσιακή Ψυχοθεραπεία**. Οργανωτής: Ψυχιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Τμήμα Γνωσιακής Ψυχοθεραπείας.
Διάρκεια: 100 ώρες (50 θεωρητικές, 50 πρακτικές).

10/2008-
6/2010

Παρακολούθηση του 2ετούς Μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου με θέμα «**Θεραπείες Συμπεριφοράς των Διαταραχών Άγχους**». Οργανωτές: ΕΠΨΥ, Μονάδα Θεραπείας Συμπεριφοράς της Α΄ Ψυχιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

8/2006-
2/2010

Εκπαίδευση στην **Ψυχιατρική Κλινική του Αιγινήτειου Νοσοκομείου**, με στόχο την απόκτηση τίτλου ειδικότητας στη Ψυχιατρική. Στα πλαίσια της εκπαίδευσής μου, μεταξύ άλλων, εργάστηκα σε κλειστό Ψυχιατρικό Τμήμα για 12 μήνες, στο Τμήμα Βραχείας Νοσηλείας για 13 μήνες, στο Κέντρο Κοινωνικής Ψυχικής Υγιεινής Βύρωνα Καισαριανής για 10 μήνες.

6^{ος}/2010

Απόκτηση τίτλου **Ειδικότητας στην Ψυχιατρική**.

10/2010- Έναρξη παρακολούθησης του δεύτερου κύκλου εκπαίδευσης στη **Γνωσιακή Ψυχοθεραπεία**. Οργανωτής: Ψυχιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, ΕΠΨΥ, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Τμήμα Γνωσιακής Ψυχοθεραπείας

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

1992-1993 **Διπλωματική εργασία** στο Εργαστήριο της Φυσικής Ανθρωπολογίας του τομέα Ζωολογίας της Σχολής Βιολογίας.

1994 **Εκπαίδευση στο εργαστήριο Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ** στη μελέτη του μοριακού και του κυτταρικού φαινότυπου των κυττάρων Swann, σε υγιή και τραυματισμένα ισχιακά νεύρα κατά τον εκφυλισμό και την αναγέννησή τους.

1996-1999 **Συμμετοχή στις εφημερίες της Ψυχιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**, υπό την καθοδήγηση του ψυχιάτρου Επιμελητού Β΄ κου Χ. Μαντά.

1997 **Εργασία στα πλαίσια του μαθήματος «Ψυχοσωματική»** με θέμα: «Κληρονομικότητα και Σχιζοφρένεια». Περιελάμβανε βιβλιογραφική αναζήτηση και παρουσίαση.

1998 **Εργασία στα πλαίσια του μαθήματος «Κοινωνική Ψυχιατρική»** με θέμα: «Ίδρυματισμός». Περιελάμβανε μετάφραση και ελεύθερη απόδοση του βιβλίου «Institutional Neurosis» του Dr Russel Barton (1959).

1999 **Εργασία με αντικείμενο την Ψυχιατρική εκτίμηση ασθενών, οι οποίοι προσήλθαν για εξέταση στην Ψυχιατρική κλινική του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων μετά από εισαγγελική παραγγελία, κατά το διάστημα 1996-1998.**

2000-2001 **Στρατιωτική θητεία** ως «Ιατρός άνευ Ειδικότητας». Στις αρμοδιότητές μου περιλαμβάνονταν η περίθαλψη των στρατιωτών και των στρατιωτικών καθώς και ο έλεγχος των συνθηκών υγιεινής των στρατοπέδων στα οποία υπηρέτησα.

10^{ος} /2001-
12^{ος} /2002 **Εκπαίδευση στην Καρδιολογική, Χειρουργική και Παθολογική Κλινική του Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων «Χατζηκώστα»**, στα πλαίσια της εκπαίδευσης για την απόκτηση τίτλου ειδικότητας στην Ψυχιατρική.

2002 **Εκπλήρωση Ιατρικής Υπηρεσίας Υπαίθρου** στο Άγιο Περιφερειακό Ιατρείο Ρωμανού Ιωαννίνων.

- 6^{ος} /2003-
9^{ος} /2003 **Εκπαίδευση στην Παθολογική κλινική του «Ματζαβινάτειου» Νοσοκομείου Ληξουρίου** στα πλαίσια της εκπαίδευσης για την απόκτηση τίτλου ειδικότητας στην Ψυχιατρική.
- 2003- 2004,
2006-2007 Εθελοντική **Ιατρική υπηρεσία σε τοξικομανείς**, στα πλαίσια του προγράμματος «Δρόμοι της Αθήνας» της οργάνωσης «Γιατροί του Κόσμου».
- 10^{ος} /2003- **Ιατρός Αγώνων** στο πρωτάθλημα ποδοσφαίρου που διοργανώνει η 12^{ος} /2003
Εταιρεία Ποδοσφαιρικών Σωματείων Αθήνας.
- 2004 **Εκπαίδευση στη Νευρολογική Κλινική του Νοσοκομείου «Ευαγγελισμός»**, στα πλαίσια απόκτησης τίτλου ειδικότητας στην Ψυχιατρική.
- 12^{ος} /2003-
30/6/2004 **Εκπαίδευση στο Ινστιτούτο Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών** σε τεχνικές Μοριακής Βιολογίας, ως άμισθος επιστημονικός συνεργάτης στο Κέντρο Νευροεπιστημών, Εργαστήριο Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας και Νευροχημείας, Δ/ντρια Δρ. Δ. Μάγκουρα.
- 30/6/2004- **Έναρξη εκπόνησης διδακτορικής διατριβής** στο Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας, με θέμα: «Ο ρόλος της έψιλον ισομορφής της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PKC-ε) στο μηχανισμό διαφοροποίησης των νευροβλαστών και των νευρώνων».
- 14/1/2005-
13/1/2006 **Υποτροφία** από το Ινστιτούτο Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών ως οικονομική ενίσχυση για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.
- 14/1/2006-
23/8/2006 Χρηματοδότηση της διδακτορικής μου διατριβής από το πρόγραμμα **ΠΕΝΕΔ 2003**. Υπεύθυνος για την κατάρτιση και την ολοκλήρωση της χρηματοδοτούμενης μελέτης: Δρ. Δ. Μάγκουρα. Η χρηματοδότηση διακόπηκε λόγω της έναρξης της εκπαίδευσής μου στην Ψυχιατρική Κλινική του Αιγινήτειου Νοσοκομείου.
- 2^{ος} /2010-
6^{ος} /2010 Παράταση ειδικότητας στην Ψυχιατρική κλινική του Αιγινήτειου Νοσοκομείου.

- 8^{ος} /2010-
6^{ος} /2011 Έναρξη συνεργασίας με την **Εταιρεία Περιφερικής Ανάπτυξης και Ψυχικής Υγείας (ΕΠΑΨΥ)**, ως Ειδικός Ψυχίατρος, με αρμοδιότητα την **παροχή κλινικού έργου στα νησιά Σέριφο, Κύθνο και Κέα.**
- 10^{ος} /2010-
6^{ος} /2011 Έναρξη συνεργασίας με την **Εταιρεία Περιφερικής Ανάπτυξης και Ψυχικής Υγείας (ΕΠΑΨΥ)**, ως Ειδικός Ψυχίατρος, με αρμοδιότητα την **παροχή κλινικού έργου στα Οικοτροφεία της Λαμίας και της Χαλκίδας.**
- 9^{ος} /2010-
6^{ος} /2011 Εργάζομαι ως ψυχίατρος στο **ιδιωτικό μου ιατρείο**, στην Αθήνα.
- 6^{ος} /2011-
Σήμερα Εργάζομαι ως Ψυχίατρος **Επιμελητής Β΄** στο Γ.Ν. Ελευσίνας «**Θριάσιο**».

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 1990-1998,
2005-2006 Διδασκαλία σε μαθητές δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης στα μαθήματα Φυσική, Χημεία, Βιολογία.
- 10/2008-
6/2009 Συμμετοχή στην ομάδα Διδασκαλίας του εκπαιδευτικού σεμιναρίου στην **Κλινική Ψυχοπαθολογία**. Υπεύθυνοι προγράμματος: Π. Ουλής Επίκουρος Καθηγητής Ψυχιατρικής του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου της Αθήνας. Οργανωτής: Ψυχιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο.

ΓΛΩΣΣΕΣ: Αγγλικά. Κάτοχος TOEFL .

ΧΡΗΣΗ P/C: M/S Office.

ΜΕΛΟΣ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

Οργάνωση «Διεθνής Αμνηστία».

Ιατρικός Σύλλογος της Αθήνας.

Οργάνωση «Γιατροί του Κόσμου».

Ελληνική Ψυχιατρική Εταιρεία

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειακών Εγκεφαλικών Νόσων. Θεσσαλονίκη
13/10/2004-15/10/2004.

19^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες. Πάτρα
30/9/05-2/10/05.

57^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας.
Αθήνα 9/12/05-11/12/05.

5th Forum of European Neuroscience. Βιέννη 8/7/06-12/7/06.

1st European Congress of the international Neuropsychiatric Association and 2nd
Mediterranean Congress of the World Federation of Societies of Biological
Psychiatry. Αθήνα 7/12/2006-10/12/2006.

Διεπιστημονική Συνάντηση με θέμα: «Διαπολιτισμικότητα: Ψυχοκοινωνικές
Θεωρήσεις». Αθήνα 25/1/2007.

20^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ψυχιατρικής. Κρήτη 14-18/5/2008.
Psychosis Masterclass II. September 27-28/2008. Athens. Greece.

22nd Conference of the Hellenic Society for Neuroscience. Athens, October 16-19,
2008.

Τρεις Ημερίδες του Κλάδου Ψυχοθεραπείας της Ελληνικής Ψυχιατρικής
Εταιρείας με τίτλο: «Ψυχοθεραπευτικές προσεγγίσεις σε ψυχοπαθολογικές
εκφάνσεις: εποπτείες σε κλινικό υλικό. Αθήνα 4/10/2009, 9/5/2009, 13/6/2009.

2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γνωσιακών Ψυχοθεραπειών. Αθήνα 13-15/10/2009.

«Ενσωμάτωση της Ψυχικής Υγείας στην Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας».
Αθήνα 6-7/10/2010.

Psychiatry Masterclass VI. Athens 30/6-1/7/2012.

Πρόληψη και Προαγωγή Υγείας των κατοίκων της Δυτικής Αττικής. Από τη θεωρία στην πράξη. Ελευσίνα 7/3/2012.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

Ν. Μπιλανάκης, Α. Φλωράκης, Ν. Λιόντος, Α. Λιάκος. Ψυχιατρική εκτίμηση μετά από εισαγγελική παραγγελία κατά το διάστημα 1996-1998 στην Ψυχιατρική Κλινική του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Επιστημονικό Συνέδριο για την Ψυχιατρική Μεταρρύθμιση στην Ελλάδα. Ιωάννινα 24-26 Ιουνίου 1999. Οργανωτές: Ψυχιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Κέντρο Αποκατάστασης Θυμάτων βασανιστηρίων. Δημοσιεύτηκε στο Βιβλίο Πρακτικών του Συνεδρίου στη σελίδα 22.

Χ. Ζαρούλη, Α. Ταβερναράκης, Α. Φλωράκης, Δ. Καραλάτσιου, Ν. Ματίκας. Νευρολογική Κλινική ΓΝΑ «Ευαγγελισμός». Η αξία του Διοισοφαγείου Ηχοκαρδιογραφήματος στη διερεύνηση των Ισχαμικών Αγγειακών Εγκεφαλικών Επεισοδίων. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειακών Εγκεφαλικών Νόσων. Θεσσαλονίκη 13/10/2004-15/10/2004. Οργανωτής: Ελληνική Εταιρεία Αγγειακών Εγκεφαλικών Νόσων. Δημοσιεύτηκε στο Βιβλίο Περιλήψεων του Συνεδρίου στη σελίδα 47. Αναρτημένη Ανακοίνωση.

Α. Φλωράκης, Α. Ταβερναράκης, Γ. Κόκκορης, Χ. Ζαρούλη, Δ. Κραβαρίτης, Ν. Ματίκας. Νευρολογική Κλινική ΓΝΑ «Ευαγγελισμός». ΑΕΕ σε ασθενή 39 ετών ως πρώτη εκδήλωση οζώδους πολυαρτηρίτιδας. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειακών Εγκεφαλικών Νόσων. Θεσσαλονίκη 13/10/2004-15/10/2004. Οργανωτής: Ελληνική Εταιρεία Αγγειακών Εγκεφαλικών Νόσων. Δημοσιεύτηκε στο Βιβλίο Περιλήψεων του Συνεδρίου στη σελίδα 52. Αναρτημένη Ανακοίνωση.

Andreas Florakis, Shalini Johnson, and Dimitra Mangoura. ROLE OF PROTEIN KINASE C-EPSILON IN THE NEURONAL DIFFERENTIATION OF EMBRYONIC STEM CELLS. 19^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες. Δημοσιεύτηκε στο Βιβλίο Περιλήψεων του Συνεδρίου στη σελίδα 47. Αναρτημένη ανακοίνωση. *Η εργασία βραβεύτηκε.*

Andreas Florakis and Dimitra Mangoura. ROLE OF PROTEIN KINASE C-EPSILON IN THE NEURONAL DIFFERENTIATION. 57^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας. Δημοσιεύτηκε στο Βιβλίο Περιλήψεων του Συνεδρίου στη σελίδα 73. Ομιλία.

Florakis A, Sakellaridis N, Mangoura D. PROTEIN KINASE C- EPSILON INDUCES NEURONAL DIFFERENTIATION IN EMBRYONIC STEM CELLS. 5th Forum of European Neuroscience. Δημοσιεύτηκε στο Βιβλίο Περιλήψεων του Συνεδρίου στη σελίδα 111. Αναρτημένη ανακοίνωση.

Leondaritis, G., Karouzaki, S., Florakis, A., Tsirimonaki, E. and Mangoura, D. Expression of neurofibromin during neuronal differentiation of mouse neural stem cells. Soc. Neurosci. Abs. 2006. Washington. Αναρτημένη ανακοίνωση.

Epaminondas Doxakis, Emmanuella Tsirimonaki, Andreas Florakis, George Leondaritis, Kostas Vougas, Athanasios K. Anagnostopoulos, George Th. Tsagaris, Dimitra Mangoura. Proteome analysis of mouse E14 embryonic stem cells. 58th Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology. Δημοσιεύτηκε στο Βιβλίο Περιλήψεων του Συνεδρίου στη σελίδα 53. Αναρτημένη ανακοίνωση.

Florakis, A., Sakellaridis, N. and Mangoura, D. Differential role of wild-type and kinase dead PKC-ε in neuronal induction of embryonic stem cells and embryonic hippocampal neurons. J. Neurochem 102 (Suppl.1), p29, 2007. Cancun. Αναρτημένη ανακοίνωση.

Masdrakis VG, Oulis P, Florakis A, Valamoutopoulos T, Markatou M, Papadimitriou GN. The Safety of the Electroconvulsive Therapy-Escitalopram Combination. J ECT. 2008 Jul 2.

Oulis P, Florakis A, Tzanoulinos G, Papadimitriou GN. Pregabalin in the treatment of benzodiazepine-induced obsessive-compulsive disorder. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2008 Aug 28.

Oulis P, Masdrakis VG, Florakis A, Papadimitriou GN. Fluvaxamine in the treatment of corticosteroid-induced obsessive-compulsive disorder. Clin Neuropharmacol. 2009 May-Jun;32(3):176-7.

Masdrakis VG, Florakis A, Tzanoulinos G, Markatou M, Oulis P. Safety of electroconvulsive therapy-ziprasidone combination. J ECT. 2010 Jun;26(2):139-42.

Ψυχικές Διαταραχές και Εργασία. Ομιλία. Πρόληψη και Προαγωγή Υγείας των κατοίκων της Δυτικής Αττικής. Από τη θεωρία στην πράξη. Ελευσίνα 7/3/2012.

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

Andreas Florakis, Shalini Johnson, and Dimitra Mangoura. ROLE OF PROTEIN KINASE C-EPSILON IN THE NEURONAL DIFFERENTIATION OF EMBRYONIC STEM CELLS. 19ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες. Δημοσιεύτηκε στο Βιβλίο Περιλήψεων του Συνεδρίου στη σελίδα 47. Αναρτημένη ανακοίνωση. *Η εργασία βραβεύτηκε.*

Εύφημη μνεία για την προσφορά μου στη λειτουργία της Ψυχιατρικής κλινικής του Γ.Ν. Ελευσίνας «Θριάσιο». Ελευσίνα 18/7/2012.

**"Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΨΙΛΟΝ ΙΣΟΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ C-E ΣΤΟ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΒΛΑΣΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΝΕΥΡΩΝΩΝ."**

ΑΝΔΡΕΑ Α. ΦΛΩΡΑΚΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Νικόλαος Σακελλαρίδης**, Καθηγητής, Διευθυντής Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας - **(Επιβλέπων)**,
2. **Δρ. Δήμητρα Μάγκουρα**, Ερευνήτρια Α', Διευθύντρια του Εργαστηρίου Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας και Νευροχημείας του Κέντρου Νευροεπιστημών του Ινστιτούτου Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών
3. **Δρ. Ν. Πιτσιάκας**, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Η νευρωνική διαφοροποίηση είναι στενά συνδεδεμένη με την πολικότητα των κυττάρων και την μη συμμετρική κατανομή των κυκλωμάτων σηματοδότησης. Ο έλεγχος της σηματοδότησης διαφοροποιεί την μετάφραση των γονιδίων και οδηγεί στη διαφοροποίηση των νευρώνων στη διαίρεσή τους και στην προστασία τους. Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι η PKC-ε συμβάλλει στη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων. Χρησιμοποιώντας εμβρυικά βλαστικά κύτταρα E14/T και το πρωτόκολλο διαφοροποίησης 4-/4+ για τη διαφοροποίησή τους επιτεύχθηκε η δημιουργία γλουταμεργικών νευρώνων. Με την τεχνική RT-PCR φάνηκε η διαφοροποίηση των επιπέδων του mRNA των διαφορετικών PKC στα διάφορα στάδια διαφοροποίησης προς νευρώνες. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η PKC-ε αυξάνεται σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης κατά τα στάδια διαφοροποίησης των εμβρυικών βλαστικών σε νευρώνες. Με μικροσκόπηση αποπεριέλιξης και συνεστίασης διαπιστώθηκε ότι η PKC-ε μεταφέρεται κατά την διάρκεια της δημιουργίας του κεντρικού νευράξονα στο σύστημα Golgi. Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι σε εκείνο το τμήμα του κυττάρου γίνονται οι διεργασίες που είναι απαραίτητες για την επιμήκυνση του νευράξονα. Για να διευκρινισθεί αυτό διαμολώναμε νευρώνες ιππόκαμπου από έμβρυα 16 ημερών με τον άγριο τύπο και με μεταλλάξεις του γονιδίου της PKC-ε. Βρέθηκε ότι ο άγριος τύπος και

η συνεχώς ενεργοποιημένη μορφή της πρωτεΐνης αύξησαν το μήκος των νευριτών και τις διακλαδώσεις τους. Η απενεργοποιημένη μορφή της πρωτεΐνης αύξησε τις διακλαδώσεις. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η PKC-ε παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των νευρώνων.

SUMMARY

Neuronal development is tightly coupled to cell polarity and asymmetric distribution of signaling complexes. This spatial control of signaling alters gene transcription to guide neurons through divisions, differentiation, and neuroprotection. Previous work by and others has shown that PKCs, in particular PKC- ϵ may regulate interactions of signalosomes with the cytoskeleton and transcription. Using the E14/T Embryonic Stem Cell (ESC) line and RT-PCR in undifferentiated ESCs, after formation of embryoid bodies (EBs), when EBs were neuronally induced with retinoic acid (RA), and after differentiation onto glutamergic neurons, we found that each developmental stage exhibited a characteristic PKC isoform profile. Moreover, while no PKC- ϵ expression was detected in ESCs or EBs, its expression was induced with RA, reaching a significant 100-fold increase with neuronal differentiation; this exponential increase was confirmed by immunoblotting and immunocytochemistry. Deconvolution imaging showed that the subcellular localization of PKC- ϵ is developmentally regulated and that it is polarized during process outgrowth. We obtained similar patterns in embryonic (E16) rat hippocampal neurons in culture. We then examined whether PKC- ϵ affected development in these neurons early in culture, using nucleofection of PKC- ϵ variants, tubulin (TUJ1)

immunocytochemistry, and imaging. We found that both the wild type PKC-ε and constitutively active PKC-ε significantly induced neuritic length and arborization. Importantly, the dominant negative, kinase-dead form of PKC-ε, increased only the number of bifurcations, suggesting a different role for the kinase and the protein as a scaffold. Taken together these data strongly indicate that PKC-ε may play a crucial role in the expression of the neuron-specific gene program.

Περιεχόμενα

Συντηρήσεις.....	28
1. Εισαγωγή.....	39
1.1 Πρωτεϊνικές Κινάσες C.....	39
1.2 Πρωτεϊνική Κινάση-έψιλον (PKC-ε).....	47
1.2.1 Ο ρόλος της PKC-ε στα κύτταρα.....	50
1.2.1.1 Δράση στα κυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης.....	50
1.2.1.2 Η PKC-ε έχει ρόλο στην προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμά τους.....	51
1.2.1.3 Η PKC-ε συμμετέχει στο μηχανισμό της κυτταρικής κίνησης.....	53
1.2.1.4 Η PKC-ε εμπλέκεται στη ρύθμιση των συνδέσεων μεταξύ των Κυττάρων.....	55
1.2.1.5 Ρόλος της PKC-ε στην καρκινογένεση.....	56
1.2.1.6 Ο ρόλος της PKC-ε στη λειτουργία των μυοϊνιδίων.....	59
1.2.1.7 Προστασία στην ισχαιμία του μυοκαρδίου και του εγκεφαλικού ιστού.....	61
1.2.1.8 Ο ρόλος της PKC-ε στην καρδιακή υπερτροφία και την Καρδιομυοπάθεια.....	62
1.2.2 Δράση στο νευρικό σύστημα.....	64

1.2.2.1 Δράση στην ανάπτυξη νευριτών.....	64
1.2.2.2 Προσυναπτική Δράση.....	69
1.2.2.3 Δράση σχετιζόμενη με την αιθανόλη.....	71
1.2.2.6 Πόνος.....	72
1.2.2.7 Έκφραση της PKC-ε στον εγκέφαλο.....	73
1.2.3 Άλλες Λειτουργίες.....	75
1.3 Εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα.....	77
1.3.1 Ορισμοί.....	77
1.3.2 Ιστορικά στοιχεία-Εμβρυϊκά Καρκινικά κύτταρα.....	78
1.3.3 Παραγωγή των Εμβρυϊκών Βλαστικών κυττάρων.....	80
1.3.4 Εμβρυϊκά Βλαστικά Κύτταρα προερχόμενα από μύ.....	81
1.3.5 Εμβρυϊκά Σπερματικά Κύτταρα.....	86
1.3.6 Μοριακοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την ιδιότητα των Εμβρυϊκών Βλαστικών Κυττάρων, που προέρχονται από μύ να παράγουν πανομοιότυπους απογόνους και να συμπεριφέρονται ως ολοδύναμα κύτταρα.....	87
1.3.6.1 Το μεταβολικό μονοπάτι LIF-STAT3.....	88
1.3.6.2 Το μεταβολικό μονοπάτι MAPK-ERK.....	92
1.3.6.3 Το μεταβολικό μονοπάτι PI3K.....	93
1.3.6.4 Το μεταβολικό μονοπάτι Wnt.....	95
1.3.6.5 Τα μεταβολικά μονοπάτια της οικογένειας TGFβ.....	96

1.3.6.6 Το μεταβολικό μονοπάτι του bFGF.....	98
1.3.6.7 Μεταγραφικοί παράγοντες.....	99
1.3.6.8 Κυτταρικός κύκλος.....	103
1.3.6.9 Αλλαγές στη χρωματίνη και επιγενετικές αλλαγές.....	104
1.3.6.10 Μικρο-RNA.....	106
1.3.7 Προοπτική για θεραπεία με εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα.....	107
1.4 Μοριακοί μηχανισμοί που σχετίζονται με τη διαδικασία διαφοροποίησης προς νευρώνες στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών.....	113
1.5 Δημιουργία δενδριτών και νευράξονα στα νευρικά κύτταρα	128
1.6 Ανάλυση των νευρώνων με τη μέθοδο Sholl.....	139
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	142
2.1 Κυτταροκαλλιέργεια των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού και πρωτόκολλο διαφοροποίησής τους προς νευρώνες.....	142
2.2 Πρωτογενής καλλιέργεια νευρώνων ιπποκάμπου.....	145
2.3 Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς COS-7.....	146
2.4 Διαμόλυνση των Νευρώνων Ιπποκάμπου.....	147
2.5 Μέτρηση της ποσότητας του mRNA.....	148
2.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης διαλύματος μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA και RNA.....	151
2.7 Απομόνωση ολικού RNA και αντιδράσεις RT-PCR.....	152

2.8 Δημιουργία H ₂ O για τη διάλυση του RNA.....	153
2.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό συνθήκες αποδιάταξης (SDS-PAGE).....	153
2.9.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος.....	153
2.9.2 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση.....	154
2.9.3 Προετοιμασία πηκτώματος.....	155
2.9.4 Ηλεκτροφόρηση.....	155
2.10 Ανοσοαποτύπωση – Western Blot.....	156
2.10.1 Μεταφορά πρωτεϊνών από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης (Western Blot) κατά Towbin et al., 1979.....	156
2.10.2 Διαδικασία ανοσοανίχνευσης.....	157
2.10.3 Απομόνωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών από κυτταρικό εκχύλισμα.....	159
2.11 Ανοϊστοχημεία.....	160
2.12 Μικροσκόπηση.....	161
2.13 Πλασμίδια.....	162
2.14 Καλλιέργεια βακτηρίων Escherichia coli (E. Coli).....	164
2.15 Δημιουργία βακτηριακών αποθεμάτων με τη χρήση γλυκερόλης.....	165

2.16 Δημιουργία βακτηρίων Escherichia Coli (E. Coli) που έχουν μετασχηματιστεί ώστε να έχουν αυξημένη ικανότητα για να προσλαμβάνουν εξωγενές DNA (competent cells).....	165
2.17 Μετασχηματισμός βακτηρίων E. coli (transformation).....	166
2.18 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεσαίας κλίμακας (medium scale plasmid DNA preparation).....	167
2.19 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (mini scale plasmid preparation).....	168
2.20 Άλλες μέθοδοι.....	169
3. Αποτελέσματα.....	170
3.1 Βελτιστοποίηση της μεθόδου κυτταροκαλλιέργειας των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού και διαφοροποίησής τους προς νευρώνες.....	170
3.2 Μεταβολή των επιπέδων του mRNA των PKC κατά τα στάδια διαφοροποίησης των ESc σε νευρώνες. Μεταβολή των επιπέδων της PKC-ε σε πρωτεϊνικό επίπεδο.....	187
3.3 Η PKC-ε εντοπίζεται στο σύστημα Golgi κατά το σχηματισμό του κεντρικού νευρίτη.....	199
3.4 Διαμόλυνση των νευρώνων ιπποκάμπου.....	204
4. Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	217

4.1 Διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού E14/T σε νευρώνες.....	217
4.2 Μεταβολή των επιπέδων του mRNA των PKC κατά τα στάδια διαφοροποίησης των ESc σε νευρώνες. Μεταβολή των επιπέδων της PKC-ε σε πρωτεϊνικό επίπεδο-Αποτελέσματα.....	221
4.3 Η PKC-ε εντοπίζεται στο σύστημα Golgi που συμμετέχει στο σχηματισμό του κεντρικού νευρίτη-Αποτελέσματα.....	227
4.4 Διαμόλυνση των νευρώνων ιπποκάμπου-Αποτελέσματα.....	229
5. Βιβλιογραφία	234

Συντμήσεις

Aes1: Πρωτεΐνη ενισχυτής της αναστολής έκφρασης των γονιδίων μέσω του RNA

Akt: Πρωτεϊνική κινάση B (PKB)

AMP: Μονοφωσφορική αδενοσίνη

ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη

Ascl1: Achaete-scute ομόλογη πρωτεΐνη-1 (Mash1)

aPKC: Άτυπη Πρωτεϊνική Κινάση C

β-catenin: β-κατενίνη

BDNF: Εγκεφαλικός νευροτροφικός αυξητικός παράγοντας

bFGF: Βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών

bHLH: Μεταγραφικοί παράγοντες που συνδέονται με το DNA και και στο μόριό τους περιέχουν το μοτίβο βασική έλικα-θλειά-έλικα

BMI-1: Μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στη οικογένεια polycomb

BMP: Μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών

Brachyury: Γονίδιο των «βραχύουρων ποντικών», το οποίο περιέχει T-κουτί (T-box)

BrdU: Βρώμο-δεόξυ-ουριδίνη

cAMP: Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CD34: αντιγόνο που ανήκει στην κατηγορία των αντιγόνων διαφοροποίησης και απαντάται στα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα και τα κύτταρα του ενδοθηλίου των τριχοειδών

Cdc42: Πρωτεΐνη ελέγχου του κυτταρικού κύκλου 42 (cell division cycle)

Cdk2: Κινάση εξαρτώμενη από τις κυκλίνες-2

Cdk4: Κινάση εξαρτώμενη από τις κυκλίνες-4

c-fos: Πρωτοογκογονόδιο που κωδικοποιεί τον ομώνυμο μεταγραφικό παράγοντα

c-Myc: Μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στην οικογένεια των Myc πρωτεϊνών που έχουν στο κάρβοξυτελικό τους άκρο περιοχή φερμουάρ λευκίνης

CpG: 5'-κυτοσίνη-φώσφο-γουανίνη

cPKC: Κλασική Πρωτεϊνική Κινάση C

c-Raf: Πρωτεϊνική κινάση c-Raf

CREB: Παράγοντας πρόσδεσης στο στοιχείο απάντησης προς το κυκλικό AMP

CRMP2: Πρωτεΐνη διαμεσολαβητής στην ανταπόκριση στην κολλαψίνη

cTnI: Καρδιακή τροπονίνη I

cyclinA: Κυκλίνη A

cyclinD: Κυκλίνη D

cyclinE: Κυκλίνη E

DAG: Διάκυλο-γλυκερόλη

DAPI: 4',6'-διάμινο-2-φαινυλινδόλη

dBcAMP: Δυβουτυρικό κυκλικό AMP

DG: Οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπτου

DISC1: Διαταραγμένη στη Σχιζοφρένεια-1 (disrupted in schizophrenia-1)

Dlx2: Μεταγραφικός παράγοντας «άπω-λιγότερο» 2 (Distal-less 2)

DNA: Δεόξυ-ριβονουκλεϊνικό οξύ

Dnmt1: Μέθυλ-τρανσφεράση του DNA-1

Dnmt3a: Μέθυλ-τρανσφεράση του DNA-3a

Dnmt3b: Μέθυλ-τρανσφεράση του DNA-3b

DOCK7: Πρωτεΐνη εξειδικευμένη στην κυτοκίνηση-7

E2F: Μεταγραφικοί παράγοντες που αρχικά αναγνωρίστηκαν από το ρόλο τους στη μεταγραφική ενεργοποίηση του αδενοϊού E2

EB1, EB3: Πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο θετικό άκρο των μικροσωληνίσκων

EBs: Εμβρυοειδή συσσωματώματα (Embryoid bodies)

EGF: Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας

EGFR: Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα

Esg-1: Γονίδιο που είναι ειδικό για τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα-1

ERK: Εξωγενώς ρυθμιζόμενη κινάση (Externally Regulated Kinase)

ESc: Εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem cells)

FAK: Κινάση των εστιακών προσκολλήσεων (Focal Adhesion Kinase)

FBS: Ορός εμβρύου βόας

FGF-2: Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών-2

FGFR: Υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών

Flk-1: Υποδοχέας του VEGF

Flt-1: Υποδοχέας του VEGF

FMRP: Μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών της νοητικής υστέρησης του συνδρόμου εύθραυστο X.

FoxD3: Κουτί που περιέχει περιοχή κεφαλής διχάλας-Δ3 (forkhead box D3)

FRET : Ανάλυση Συντονισμού Φθορισμού Μεταφοράς Ενέργειας

GABA: γ-άμινο-βουτυρικό οξύ

GADD45b: Η πρωτεΐνη που ενεργοποιείται με τη διακοπή της ανάπτυξης και τη βλάβη του DNA 45 b

GAP 43: Σχετιζόμενη με την ανάπτυξη πρωτεΐνη 43 (Growth Associated Protein 43)

GAPDH: Δεϋδρογενάση της 3-φωσφορικής Γλουταραλαδεϋδη

Gata: Οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, που περιέχουν δακτύλιο ψευδαργύρου, προσδένονται σε υποκινητές που περιέχουν την αλληλουχία GAT A

GDF3: Παράγοντας αύξησης/διαφοροποίησης-3

GFAP: Ινώδης όξινη πρωτεΐνη της γλοίας

GH4C₁: Κυτταρική σειρά των κυττάρων της υπόφυσης που παράγουν μειωμένα επίπεδα αυξητικής ορμόνης

gp130: Γλυκοπρωτεΐνη 130

GSK3β: Κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου-3β

H3K4me3: Τιμεθυλιωμένη ιστόνη H3 στη λυσίνη 4

H3K27me3: Τριμεθυλιωμένη ιστόνη H3 στη λυσίνη 27

HDAC1: Αποακετυλάση της ιστόνης-1

HDAC2: Αποακετυλάση της ιστόνης-2

HSCs: Αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα

Id1: Αναστολέας της σύνδεσης στο DNA-1 ή αναστολέας της διαφοροποίησης-1

Id2: Αναστολέας της σύνδεσης στο DNA-2 ή αναστολέας της διαφοροποίησης-2

IGF-1: Αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης-1

IL-6: Ιντερλευκίνη – 6

ILK: Ιντεγκρίνη-συνδεόμενη κινάση

IMR32: Κυτταρική σειρά ανθρωπίνου Νευροβλαστώματος

iPSCs: Επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (induced pluripotent stem cells)

IQGAP1: Ενεργοποιούμενη από GTPάση πρωτεΐνη -1

JAK: Κινάση της τυροσίνης Janus

JNK: Κινάσες του άζω-τελικού άκρου των c-jun πρωτεϊνών

Klf4: Πρωτεΐνη σημαντική για τη βιολογία των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Kruppel-like factor 4)

ΚΝΣ: Κεντρικό νευρικό σύστημα

LIF: Ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας (Leukemia Inhibitory Factor)

LIFR: Υποδοχέας του LIF

LIMK1: Κινάση με LIM περιοχή-1

Lin28: Πρωτεΐνη που έχει ρόλο στην ιδιότητα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων να δίνουν πανομοιότυπους απογόνους

LKB1: Κινάση του ήπατος-1

LPR5/6: Συν-υποδοχέας του υποδοχέα της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών 5/6

LTP: Μακράς διάρκειας ενίσχυση (Long Term Potentiation)

MAPK: Πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα

MAPs: Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με μικροσωληνίσκους

MAP1B: Πρωτεΐνη που αντιδρά με τους μικροσωληνίσκους-1B

MARCKS: Μυριστυλιωμένο, πλούσιο σε αλανίνη, υπόστρωμα της πρωτεϊνικής κινάσης C

MARK: Κινάση που ελέγχει τη συγγένεια των μικροσωληνίσκων

MBD1: Η προσδεόμενη στη μέθυλο-CpG-περιοχή πρωτεΐνη-1

MeCP2: Προσδεόμενη στο μέθυλο-CpG πρωτεΐνη-2

MEK1: Ενεργοποιούμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση 1

MEKK1: Κινάση της Ενεργοποιούμενης από μιτογόνα πρωτεϊνικής κινάσης 1

miRNAs: Μικρο-RNA

MLL1: Μέθυλ τρανσφεράση των ιστονών μικτής-σειράς λευχαιμία-1

MSCs: Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα

MTOC: Κέντρο οργάνωσης των μικροσωληνίσκων

mTOR: Κινάση-μηχανιστικός στόχος της ραπαμυκίνης (mechanistic target of rapamycin)

NIH3 T3: Κυτταρική σειρά εμβρυϊκής προέλευσης ινοβλαστών μυός

Nanog: Μεταγραφικός παράγοντας που περιέχει ομοιωτική περιοχή (homeodomain), με ρόλο στον ολοδύναμο χαρακτήρα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων

NG108-15: Υβρίδια που έχουν προέλθει από κύτταρα νευροβλαστώματος μυός και κύτταρα γλοιώματος επίμυος.

NGF: Νευρικός αυξητικός παράγοντας

NICD: Το ενδοκυττάριο τμήμα των Notch υποδοχέων που προκύπτει μετά από πέψη με γ-σεκρετάση

NMDA: N-μέθυλο-D-ασπαρτικό οξύ

NT-3: Νευροτροφίνη-3

nPKC: Καινοφανής Πρωτεϊνική Κινάση C αποακετυλάση της ιστόνης-2 (HDAC2)

NODE: Σύμπλοκο αποακετυλίωσης Nanog-Oct4

NuRD: Σύμπλοκο αποακετυλάσης των ιστόνων και αναδιάταξης των νουκλεοσωμάτων

Oct4: Μεταγραφικός παράγοντας που προσδένεται σε οκτανουκλεοτίδιο-4

p16^{ink4a}: Αναστολέας της εξαρτώμενης από τις κυκλίνες κινάσης-2A

p32 (gC1qBP): Πρωτεΐνη δέσμευσης των πρωτεϊνικών κινασών C

p38MAPK: P38 πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα

p53: Φωσφοπρωτεΐνη, προϊόν ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου

Par: Πρωτεΐνες ατελούς διαίρεσης (partition-defective)

PBS: Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών

PC: Κύτταρα τερατώματος μύος

PC12: Κυτταρική σειρά φαιοχρωμοκυττώματος επίμυος

PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

PDK-1: Φωσφοϊνσιτο-Εξαρτώμενη Κινάση 1

PI3K: Κινάση της 1, 4, 5 τριφώσφο-φωσφατίδυλο-ινοσιτόλης

PIP2: 4, 5 διφώσφο-φωσφατίδυλο-ινοσιτόλη

PKA: Πρωτεϊνική Κινάση A

PKD: Πρωτεϊνική κινάση D

PKC: Πρωτεϊνική Κινάση C

PcG: Οικογένεια των πρωτεϊνών polycomb

POU domain: Διατηρημένη πρωτεϊνική περιοχή 150 αμινοξέων, στόχος ορισμένων μεταγραφικών παραγόντων

PRC1: Συσσωμάτωμα των polycomb πρωτεϊνών-1

PRC2: Σύσσωμάτωμα των polycomb πρωτεϊνών-2

PRKCBP: Υποδοχέας για την ενεργοποιημένη κινάση C

PS: Φωσφατίδυλο-ινοσιτόλη

PSA-NCAM: Πολυσιαλικό μόριο προσκόλλησης νευρωνικών κυττάρων

Rac-1: G πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των Rho πρωτεϊνών

RACKS: Υποδοχείς ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης C (Receptor of Activated C Kinase)

Ras: Πρωτεΐνη με δράση GTPάσης

Rb: Ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος

RBPj: Πρωτεΐνη ανασυνδιασμένου σήματος συνδεόμενη στη J περιοχή της K ανασοσφαιρίνης

RhoA: GTP προσδένουσα πρωτεΐνη RhoA

RNA: Ριβονουκλεϊνικό οξύ

ROCK: Κινάσες σερίνης /θρεονίνης που ενεργοποιούνται από τη Rho

RT-PCT: Αντίστροφη μεταγραφή- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

SAD: Πρωτεΐνη πρόσδεσης στο DNA

SEK1: Ενεργοποιούμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση 4 (MAP2K4)

SGZ: Υποκοκκιώδη περιοχή της οδοντωτής έλικας

Smad: Ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες που διαμεσολαβούν στη σηματοδότηση από διαμεμβρανικούς υποδοχείς προς τον πυρήνα

SnoN: Ski σχετιζόμενη καινοφανής πρωτεΐνη N

Sox2: Μεταγραφικός παράγοντας που έχει ρόλο στη διατήρηση του ολοδύναμου χαρακτήρα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων

SRE: Αλληλουχία απόκρισης στον ορό (Serum Response Element)

SRF: Παράγοντας απόκρισης στον ορό (Serum Response Factor)

STAT: Μεταβιβαστής σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής (signal transducer and activator of transcription)

SVZ: Υποκοιλιακή περιοχή των πλάγιων κοιλιών

Tau-1: Πρωτεΐνη Tau-1

TCF: Παράγοντας των T-Λεμφοκυττάρων

TCF/LEF: Παράγοντας των T-λεμφοκυττάρων/λεμφικός παράγοντας ενίσχυσης της σύνδεσης

Tctex-1: Κυτταροπλασματική πρωτεΐνη με ελαφρά αλυσίδα δυνεΐνης

TGFβ: Αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης-β

Tlx: Ορφανός πυρηνικός υποδοχέας Tlx

TPA : 12-O-τετραδεκανούλ-φορβολο-13-οξικό οξύ

TRH: Θυρεοτροπίνη

TrkB: Υποδοχέας του BDNF

TrkC: Υποδοχέας της NT-3

TRPV1: Υποδοχέας της καψαϊκίνης

Tuj-1: Αντίσωμα ενάντια στη β-τουμπουλίνη-τάξης III

VEGF: Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

vGlut1: Κυστικός μεταφορέας του γλουταμικού οξέος-1

Wnt: Οικογένεια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σημαντικές για τη μορφογένεση

1.Εισαγωγή

1.1 Πρωτεϊνικές Κινάσες C

Η οικογένεια των Πρωτεϊνικών Κινασών C (PKCs) είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Αποτελούνται από 13 ισομορφές, οι οποίες κατατάσσονται σε τέσσερις ομάδες. Στην ομάδα των κλασικών PKCs (cPKCs) που αποτελείται από τις ισομορφές α, β1, β2 και γ που απαιτούν ασβέστιο, διάκυλο-γλυκερόλη (DAG) και φωσφατίδυλ-σερίνη (PS) για την ενεργοποίησή τους. Στην ομάδα των καινοφανών PKCs (nPKCs), η οποία περιλαμβάνει την υποτύπους δ, ε, η και θ που απαιτούν PS και DAG για την ενεργοποίησή τους. Στην ομάδα των άτυπων PKCs (aPKCs) που περιλαμβάνει τις ισομορφές ζ και ι / λ και η ομάδα των συσχετιζομένων με τις PKC κινασών μ/D, ν που απαιτούν PS και DAG για την ενεργοποίησή τους (da Rocha, Mans et al. 2002).

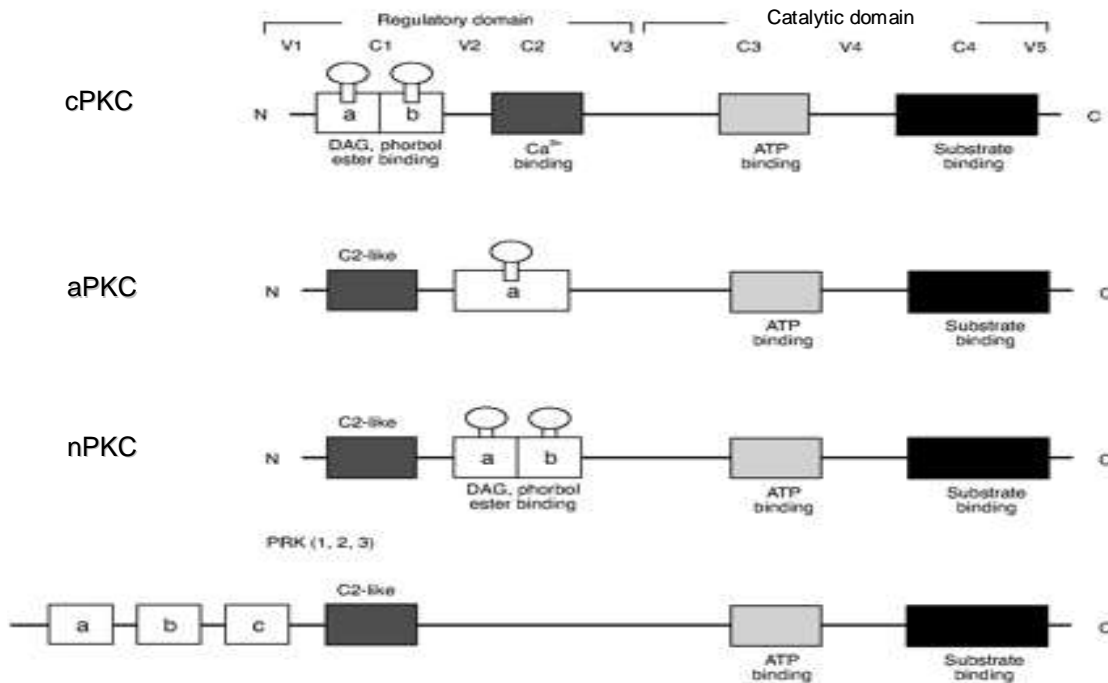
Όλες οι PKCs αποτελούνται από δύο λειτουργικά διακριτές περιοχές. Εκείνη που βρίσκεται πλησιέστερα στο άμινο-τελικό άκρο και έχει ρυθμιστικό λειτουργικό ρόλο και εκείνη που βρίσκεται πλησιέστερα στο κάρβοξυ-τελικό άκρο και ασκεί την καταλυτική λειτουργία της πρωτεΐνης (Wang, Lu et al. 2004).

Κάθε PKC αποτελείται από τέσσερις συντηρητικές περιοχές (C1-C4) που εναλλάσσονται με πέντε μεταβλητές περιοχές (V1-V5), κατά την πρωτοταγή ακολουθία των αμινοξέων.

Η ρυθμιστική περιοχή των κλασικών και των καινοφανών ισομορφών περιέχει ένα τμήμα δέσμευσης Ca^{+2} που εδράζεται στη C2 περιοχή και δύο τμήματα στη C1 περιοχή όπου δεσμεύονται η DAG και οι εστέρες της φορβόλης. Ανάλογα με τον τύπο PKC η C1 περιοχή αποτελείται από ένα (aPKCs) ή δύο (cPKCs και nPKCs) δακτυλίους ψευδαργύρου. Κάθε δακτύλιος ψευδαργύρου αποτελείται από ένα μοτίβο κυστεΐνης και ιστιδίνης το οποίο δημιουργεί ένα θώκο που καταλαμβάνεται από δύο Zn^{+2} . Η πρωτοταγής δομή της ακολουθίας των αμινοξέων του δακτυλίου ψευδαργύρου είναι η εξής: H-X12 -C-X2-C-X13/14-C-X2-C-X4-H-X2-C-X7-C, όπου H είναι ιστιδίνη, C είναι κυστεΐνη και X είναι κάθε άλλο αμινοξύ.

Σε κάθε δακτύλιο ψευδαργύρου δεσμεύεται αποκλειστικά DAG ή εστέρας της φορβόλης. Στις aPKCs ο μοναδικός δακτύλιος ψευδαργύρου δε δεσμεύει DAG (Mellor and Parker 1998; Newton 2001; Colon-Gonzalez and Kazanietz 2006). Η δέσμευση της DAG ή των εστέρων της φορβόλης δεν αλλάζει σημαντικά τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης στο χώρο, αλλά δημιουργεί στην επιφάνεια του C1 τμήματος μια συνεχόμενη υδρόφοβη επιφάνεια (Brose and Rosenmund 2002). Η δέσμευση των Ca^{+2} , που είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση των cPKCs πραγματοποιείται στο C2 τμήμα της πρωτεΐνης. Αυτή η περιοχή έχει μορφή κυπέλου, αποτελείται από πέντε κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος που σχηματίζουν φάκελο μέσα στον οποίο δεσμεύονται τα Ca^{+2} . Η ένωση των Ca^{+2} σε αυτή την

περιοχή εκκινεί αλλαγές του μορίου της πρωτεΐνης στο χώρο και ανοίγει ένα σημείο σύνδεσης με το όξινο τμήμα ενός λιπαρού οξέος, που εδράζεται στην κυτταροπλασματική σε άλλες μεμβράνες του κυττάρου. Στις PKC το C2 τμήμα δε δεσμεύει Ca^{+2} , έχει όμως μορφολογία που του επιτρέπει να μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες που αποτελούν τα υποστρώματά τους (π.χ. η GAP-43) (Mellor and Parker 1998; Newton 2001). Η καταλυτική περιοχή της PKCs αποτελείται από τα C3 και C4 τμήματα τα οποία σχηματίζουν ένα πυρήνα στον οποίο γίνεται η δέσμευση του ATP-και του υποστρώματος της κινάσης (Taylor and Radzio-Andzelm 1994; Newton 1995).

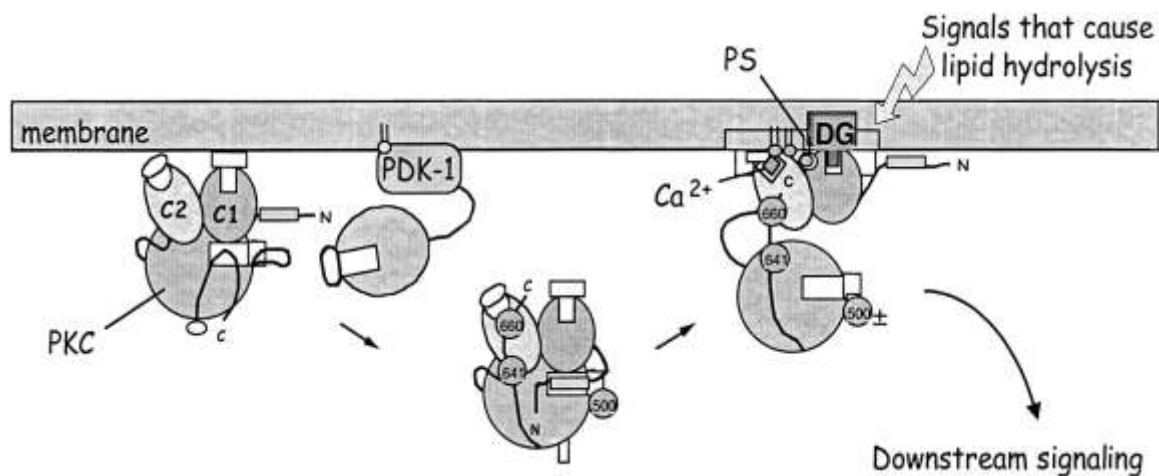


Εικόνα 1.1: Σχηματική παράσταση της πρωτοταγούς δομής των PKC. cPKC: Κλασική PKC, aPKC: Άτυπη PKC, nPKC: Καινοφανής PKC, V₁-V₅: Μεταβλητές περιοχές των PKC, C₁-C₄: Συντηρητικές δομές των PKC, ATP binding: Περιοχή δέσμευσης του ATP, Substrate binding: Περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος, Ca²⁺binding: Περιοχή δέσμευσης των ιόντων ασβεστίου, DAG, phorbol ester binding: Περιοχή δέσμευσης της DAG και των εστέρων της φορβόλης. (Dempsey et al 2000)

Σε αυτή την περιοχή υπάρχει ένα διατηρημένο μοτίβο T-θηλειάς στο οποίο πραγματοποιείται η φωσφορυλίωση (μια από τις τρεις που χρειάζονται για να έχει

η πρωτεΐνη τις ιδιότητες της κινάσης), από την Φωσφοϊνοσιτο-Εξαρτώμενη Κινάση 1 (PDK-1).

Στη βιβλιογραφία αυτή η πρωτεΐνη προτείνεται ως πιθανότερη για τη φωσφορυλίωση όλων των PKCs. Η φωσφορυλίωση της T-θηλειάς των PKCs από την PDK-1 φαίνεται ότι αποτελεί το πρωταρχικό βήμα για να αποκτήσει το μόριο την καταλυτική του δράση.

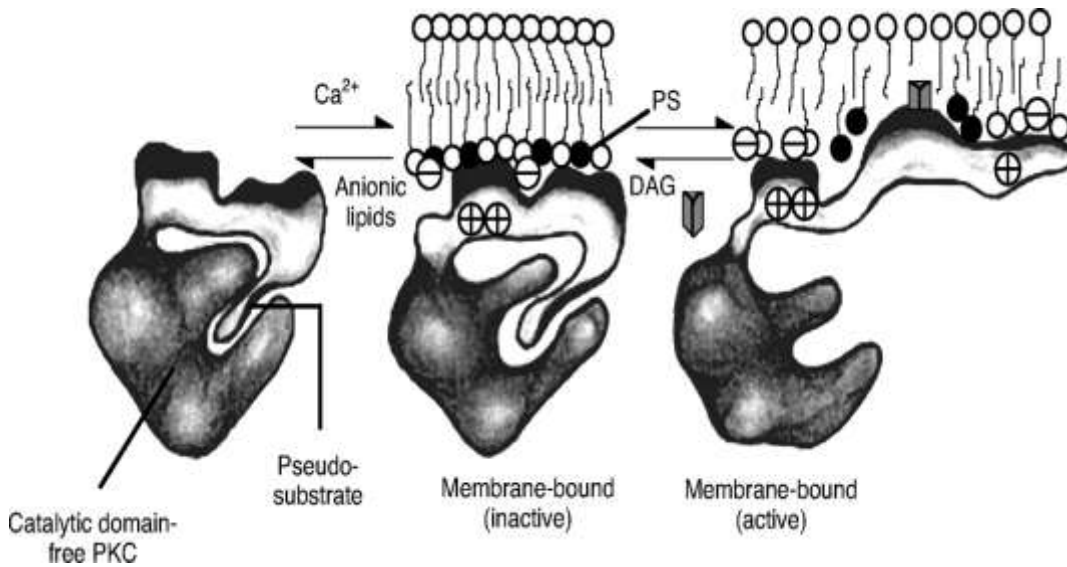


Εικόνα 1.2: Φωσφορυλίωση της PKC από την PDK-1: Η ενεργοποιημένη PDK-1 φωσφορυλιώνει την PKC στην T-θηλιά. Η χημική αντίδραση πραγματοποιείται σε μεμβρανικούς σχηματισμούς. Στη συνέχεια η ενεργοποίηση της PKC ολοκληρώνεται και ενώνεται με την DAG για να ακολουθήσει, στη συνέχεια η συμμετοχή της στα μονοπάτια σηματοδότησης. (Dempsey et al 2000)

Οι άλλες δύο φωσφορυλιώσεις, που είναι αναγκαίες για την απόκτηση από το μόριο της καταλυτικής του λειτουργίας, πραγματοποιούνται με

αυτοφωσφορυλίωση στο αζω-τελικό και στο κάρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Επομένως για επιτευχθεί η ενεργοποίηση των cPKCs είναι αναγκαία η αύξηση των επιπέδων των Ca^{+2} ή / και της DAG και η δέσμευσή τους στα C2 και C1 τμήματα της πρωτεΐνης, αντίστοιχα. Αυτή η δέσμευση οδηγεί στη μεταφορά της PKC στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση του μορίου που καταλήγει στην αποκάλυψη της καταλυτικής περιοχής της πρωτεΐνης και επιτρέπει την ενζυμική της δράση.

Ταυτόχρονα για την ενεργοποίηση της PKC είναι απαραίτητη η αποδέσμευση ενός πεπτιδίου που αποτελεί το ψευδοϋπόστρωμα της πρωτεΐνης. Η σύνδεση της PKC με το ψευδοϋπόστρωμά της αποτρέπει την ενεργοποίησή της.



Εικόνα 1.3: Η δέσμευση του ψευδοϋποστρώματος της PKC στο ενεργό της κέντρο εμποδίζει την ενεργοποίησή της. Η αποδέσμευσή του πραγματοποιείται όταν η πρωτεΐνη συνδέεται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και με τη βοήθεια της DAG. Η αποδέσμευση του ψευδοϋποστρώματος από το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης επιτρέπει την έναρξη της ενζυμικής της δράσης (Dempsey et al 2000).

Παρόμοιος μηχανισμός είναι πιθανό ότι ισχύει και για τις nPKCs, με την εξαίρεση ότι είναι δε χρειάζονται τα Ca^{2+} . Πολλές μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι εκτός από την ενεργοποίηση της PKC μετά από τη σύνδεσή της με την κυτταροπλασματική μεμβράνη ένωση, η λειτουργία της ρυθμίζεται επίσης από την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες ή πεπτιδία, τα οποία είτε θα τροποποιήσουν τη διάπλαση της

PKC στο χώρο επιτρέποντας την έναρξη της ενζυμική της δραστηριότητας, είτε θα βοηθήσουν στη σταθεροποίηση της ενεργοποιημένης μορφής της πρωτεΐνης.

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι πρωτεΐνες υποδοχείς των PKCs που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς για τις ενεργοποιημένες κινάσες C (RACKS).

Οι RACKS ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών που παρουσιάζουν το μοτίβο των 40 επαναλήψεων τρυπτοφάνη-ασπαρτικό οξύ (WD40) και δρουν ως ενδοκυτταρικά ικρίωματα. Φαίνεται πως οι RACKS παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς την ισομορφή της PKC. Μέχρι στιγμής, έχουν περιγραφεί τέσσερις RACK πρωτεΐνες. Η RACK1 δεσμεύει κατά προτίμηση τη PKC-β2. Η RACK2 (β'-COP) αλληλεπιδρά με την PKC-ε. Η PRKCBP1 είναι πιθανά η πρωτεΐνη που είναι εξειδικευμένη για την για PKC-β1, ενώ p32 (gC1qBP) δεσμεύει την ενεργοποιημένη PKC-δ.

Ένας βασικός ρυθμιστής της εξειδίκευσης της καταλυτικής δράσης των PKCs in vivo είναι η ενδοκυτταρική κατανομή τόσο του ενζύμου όσο και του υποστρώματος. Οι διάφορες ισομορφές των PKCs κατανέμονται με διαφορετικό τρόπο στα διαμερίσματα του κυττάρου και με διαφορετικό τρόπο στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Εξαιτίας αυτού παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία στις πρωτεΐνες που φωσφορυλιώνουν. Η μετατόπιση των PKCs εντός του κυττάρου ρυθμίζεται επίσης από αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, όπως οι RACKS που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Οι PKCs εμπλέκονται σε πολλά ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης με συνέπεια να επηρεάζουν μεγάλο αριθμό κυτταρικών λειτουργιών. Ειδικά στα νευρικά κύτταρα συμμετέχουν στην επιτέλεση λειτουργιών όπως η συστολή, η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η έκκριση. Ανάμεσα στα μόρια που φωσφορυλιώνονται από αυτές είναι τα: SRE, c-Raf, MEK1, ERK, TCF, MEKK1, SEK1, JNK και RhoA (Soh, Lee et al. 1999).

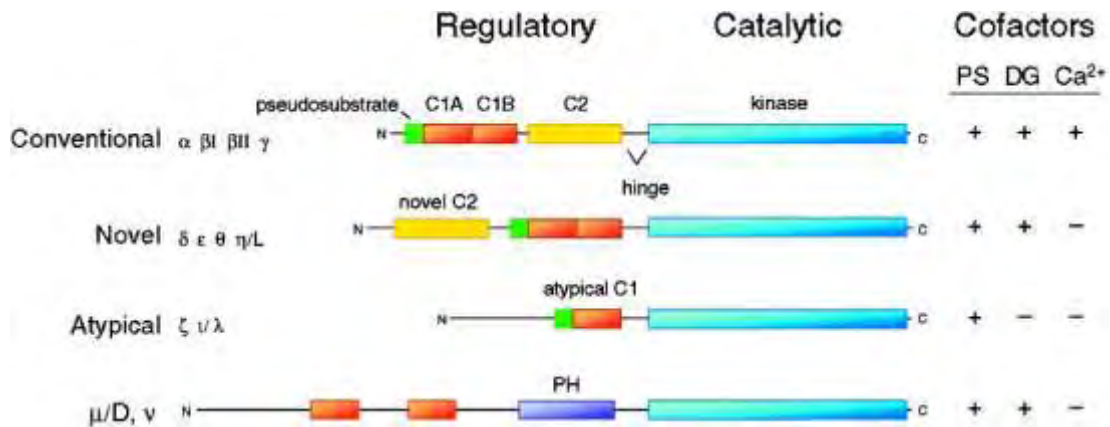
1.2 Πρωτεϊνική Κινάση-έψιλον (PKC-ε).

Πρωτεΐνη σερίνης/θρεονίνης που ανήκει στις ηPKC. Αποτελείται από 737 αμινοξέα. Το μοριακό της βάρος είναι 83kD. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2 στη θέση p21 (2p21).

Οι θέσεις στις οποίες φωσφορυλιώνεται είναι η Thr⁵⁶⁶ (θρεονίνη στη θέση 566), η οποία βρίσκεται στη T-θηλειά του ενεργού κέντρου, η Thr⁷¹⁰ (θρεονίνη στη θέση 710), η οποία βρίσκεται στην ακολουθία που συμβάλλει στη στροφή του μορίου στο χώρο και στη Ser⁷²⁹ (σερίνη στη θέση 729), η οποία βρίσκεται στο καρβοξυτελικό υδρόφοβο, άκρο του μορίου. Η φωσφορυλίωση στις θέσεις Ser⁷²⁹, Thr⁵⁶⁶ και Thr⁷¹⁰ έχει ως συνέπεια την αύξηση του μοριακού της βάρους στα 92 kDa.

Το μοντέλο που προτείνεται για τη φωσφορυλίωση του μορίου είναι το εξής: Η PDK-1 φωσφορυλιώνει τη PKC-ε στη Thr⁵⁶⁶ και στη συνέχεια ακολουθεί η

φωσφορυλίωση στη Ser⁷²⁹, η οποία πραγματοποιείται με αυτοφωσφορυλίωση. Η αυτοφωσφορυλίωση είναι πιθανό πραγματοποιείται με ενδομοριακή αντίδραση (cis) ή από μια άλλη PKC-ε που γειτονεύει με αυτή που φωσφορυλιώνεται (trans). Η φωσφορυλίωση στη Thr⁵⁶⁶ και η σύνδεση με τη φωσφατίδυλο-σερίνη και τη διάκυλο-γλυκερόλη διευκολύνει τη φωσφορυλίωση στη Thr⁷¹⁰ (Newton 2001). Για την ενεργοποίηση της χρειάζεται DAG και PS αλλά όχι ιόντα Ca⁺⁺, όπως συμβαίνει με όλες τις καινοφανείς PKC (Εικόνα 1.4). Από τις RACK η ειδική για την PKC-ε είναι η RACK2 (β'-COP). Η σύνδεσή της με την PKC-ε γίνεται μέσω της V₁ περιοχής στο κάρβοξυ-τελικό άκρο της PKC-ε. Όμως έχει βρεθεί ότι η PKC-ε συνδέεται και με το άμινο-τελικό άκρο της RACK2, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρέπει να υπάρχουν και τμήματα στο μόριο της PKC-ε που αλληλεπιδρούν με τη RACK2. Η RACK2 είναι η υπεύθυνη πρωτεΐνη για τη μεταφορά της PKC-ε στο σύστημα Golgi (Csukai, Chen et al. 1997).



Εικόνα 1.4: Σχηματική παράσταση των πρωτοταγών δομών των PKC που δείχνει τη σύνθεση των τμημάτων τους και τους ενεργοποιητές τους. Στο άζω-τελικό άκρο βρίσκονται οι ρυθμιστικές περιοχές: το σημείο σύνδεσης του ψευδοϋποστρώματος (πράσινο), τα C1 και C2 τμήματα που συνδέουν PS και σε όλες εκτός των άτυπων μορφών DAG και εστέρες της φορβόλης (πορτοκαλί), το C2 τμήμα που συνδέεται με τα αρνητικά φορτισμένα τμήματα των λιπιδίων ακι στις συντηρητικές PKC με τα Ca⁺⁺ (κίτρινο) και η περιοχή PH που προσδένει φωσφοϊνοσιτίδια (μωβ). Στο κάρβοξυ-τελικό άκρο του μορίου βρίσκεται το καταλυτικό κέντρο (μπλε). DAG: διάκυλο-γλυκερόλη, PS ; φωσφατίδυλο-σερίνη, Ca⁺⁺: ιόντα ασβεστίου (Newton and Johnson 1998).

Η PKC-ε έχει πολλαπλές δράσεις στα κύτταρα. Ανάλογα νε τη δράση της εξειδικεύεται και το υπόστρωμά της. Παρακάτω αναφέρονται οι δράσεις της στα κύτταρα με μεγαλύτερη έμφαση στα νευρικά κύτταρα.

1.2.1 Ο ρόλος της PKC-ε στα κύτταρα

1.2.1.1 Δράση στα κυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης

Η PKC-ε αλληλεπιδρά με τη σφαιρική και τη νηματοειδή μορφή της ακτίνης, μέσω της ακολουθίας δέσμευσης της ακτίνης (αμινοξέα 223-228) (Prekeris, Mayhew et al. 1996; Hernandez, Wescott et al. 2001), που εμπεριέχεται στο μόριό της. Ταυτόχρονα μπορεί να αντιδρά με το ικρίωμα που σχηματίζει η ακτίνη στο κυτταρόπλασμα εμμέσως, μέσω των ιντεγκρινών και των υποδοχέων για την ενεργοποιημένη C-κινάση (RACKS) (Besson, Wilson et al. 2002). Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς επιφανειακοί κυτταρικοί υποδοχείς που συνδέονται, στο κυτταροπλασματικό τους τμήμα, με το σκελετό της ακτίνης, μέσω της β-υπομονάδας τους. Έχουν ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση και στην κυτταρική μετακίνηση, επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων και των κυττάρων με το υπόστρωμά τους. Σχηματίζουν ικρίωμα όπου δεσμεύονται μόρια που συμμετέχουν στο σχηματισμό του ενδοκυτταρικού σκελετού και επιπρόσθετα λειτουργεί ως επιφάνεια στην οποία συνδέονται ένζυμα που συμμετέχουν στα μονοπάτια σηματοδότησης. Σε αυτές τις λειτουργίες σημαντικό ρόλο έχει η κινάση των εστιακών προσκολλήσεων (FAK).

Η PKC-ε φαίνεται ότι κατέχει σημαντικό ρόλο στα ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης που εξαρτώνται από τις ιντεγκρίνες (Melendez, Welch et al. 2002; Mansour, de Tombe et al. 2004).

1.2.1.2 Η PKC-ε έχει ρόλο στην προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμά τους

Η προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμά τους προϋποθέτει το «άπλωμα» τους, που ως λειτουργία είναι αναγκαία για τη μετανάστευση, την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους (Berrier, Mastrangelo et al. 2000).

Η PKC-ε με την αλληλεπίδρασή της με τις ιντεγκρίνες, συμμετέχει στη ρύθμιση της προσκόλλησης σε διάφορα είδη κυττάρων. Στους καρδιακούς ινοβλάστες έχει ρόλο στην προσκόλληση τους στο κολλαγόνο τύπου 1, μετά από ενεργοποίηση από την αγγειοτενσίνη 2 . (Chun, Ha et al. 1996; Stawowy, Margeta et al. 2005)

Επίσης η προσκόλληση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων στο κολλαγόνο τύπου 4 εξαρτάται από την PKC-ε. Έχει βρεθεί ότι σε αυτά τα κύτταρα η επίδραση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως το λινολεϊκό και το αραχιδονικό οξύ, ενεργοποιεί το μηχανισμό προσκόλλησης τους στο κολλαγόνο τύπου 4, στον οποίο συμμετέχουν οι ιντεγκρίνες β1, με τη συμμετοχή της πρωτεϊνικής κινάσης D (PKD) που είναι γνωστό ότι φωσφορυλιώνεται από την PKC-ε (Palmantier, George et al. 2001).

Στα ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του μαστού η διέγερση των υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνες προκαλεί τη φωσφορυλίωση της PKD από την PKC-ε στις σερίνες που βρίσκονται στις θέσεις 744 και 748, οι οποίες βρίσκονται μέσα στο ενεργό κέντρο του μορίου (Rozenfurt, Rey et al. 2005).

Τα κυτταροπλασματικά τμήματα των β-ιντεγκρινών είναι πολύ σημαντικά στη ρύθμιση του μηχανισμού της προσκόλλησης των κυττάρων. Η λειτουργικότητα αυτών των τμημάτων εξαρτάται από την ενεργότητα των πρωτεϊνών R-Ras, Rac1, κινάση της 3-φωσφατίδυλο-ινισιτόλης και της PKC-ε. Ειδικότερα, αναφέρεται ότι σε αυτό το μονοπάτι η Rac1 είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της 3-φωσφατίδυλο-ινισιτόλης και της PKC-ε (Berrier, Mastrangelo et al. 2000).

Το μυριστυλιωμένο πλούσιο σε αλανίνη υπόστρωμα της πρωτεϊνικής κινάσης C (MARCKS) έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στο μηχανισμό της προσκόλλησης των κυττάρων, του σχηματισμού των ινών τάσης (stress-fibres) και στη δόμηση των σημείων της εστιακής προσκόλλησης (focal adhesion), εντός των κυττάρων.

Στα μυοκαρδιακά κύτταρα του επίμυος η επίδραση με φαινυλεφρίνη, αγγειοτενσίνη II και ενδοθερίνη, οδηγεί στη διεύρυνση της βάσης των κυττάρων, που είναι αναγκαία για την προσκόλληση των κυττάρων με μηχανισμό που περιλαμβάνει ενεργοποίηση της PKC-ε, που φωσφορυλιώνει τη MARCKS και που με τη σειρά της ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση της FAK (Heidkamp, Iyengar et al. 2007).

Στα μυϊκά κύτταρα, η ενεργοποίηση της PKC-ε είναι πιθανό να προκαλεί την ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης των ιντεγκρινών που οδηγεί στην διεύρυνση των κυττάρων, μέσω της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών MARCKS και FAK. Επίσης το σύμπλεγμα PKC-ε ακτίνης-μυοσίνης είναι πιθανό να συμμετέχει στη διεύρυνση των ινοβλαστών (Brose and Rosenmund 2002).

1.2.1.3 Η PKC-ε συμμετέχει στο μηχανισμό της κυτταρικής κίνησης

Τα κύτταρα που μετακινούνται εκτείνουν προεκβολές και σχηματίζουν νέα σημεία προσκόλλησης στην επιφάνεια του κυττάρου που βρίσκεται εγγύτερα στη θέση προορισμού του (πρόσθια επιφάνεια). Κατά την εγκατάσταση στη νέα θέση του γίνεται μεταφορά ιντεγκρινών από την πλασματική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα, στην οπίσθια επιφάνεια του κυττάρου και συγχρόνως πραγματοποιείται η στοχοκατευθυνόμενη διακίνησή τους με τα εκκριτικά κυστίδια στην πρόσθια επιφάνεια.

Οι PKC-α και PKC-ε έχουν ρόλο σε αυτή τη διαδικασία. Η PKC-α συμμετέχει στη μεταφορά της β1-ιντεγκρίνης από την κυτταρική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα, μετά από την προκαλούμενη από το TPA (12-O-τετραδεκανούλ-φορβολο-13-οξικό οξύ) μετανάστευση των ινοβλαστών. Η PKC-ε φωσφορυλιώνει τη βιμεντίνη που με τη σειρά της συμμετέχει στη μεταφορά της β1-ιντεγκρίνης από τα κυστίδια που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μια

διαδικασία που είναι αναγκαία για να επιτευχθεί η κυτταρική κίνηση (Ivaska, Vuoriluoto et al. 2005).

Σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος η PKC-ε δεσμεύεται μέσω της RACK1 στα σημεία εστιακής προσκόλλησης και στη συνέχεια ασκεί επίδραση στην κυτταρική κίνηση και προσκόλληση φωσφορυλιώνοντας την εξωγενώς ρυθμιζόμενη κινάση (ERK) (Fincham, James et al. 2000; Kermorgant, Zicha et al. 2004). Στα κύτταρα HeLa η ERK1/2 συμμετέχει στη μετακίνηση που προκαλείται από την επίδραση του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση η PKC-ε επιδρά ευεργετικά στη συσσώρευση της ERK1/2 (Kermorgant, Zicha et al. 2004).

Η κυτταρική μετανάστευση είναι σημαντική στη διαδικασία επούλωσης στον επιθηλιακό ιστό. Στα επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς του ανθρώπου η διαδικασία επούλωσης που ενεργοποιείται από τον αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων πραγματοποιείται μετά από την ενεργοποίηση της PKC-ε.

Στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου η μετανάστευση των κυττάρων κατά την επούλωση του ιστού πραγματοποιείται μετά από την ενεργοποίηση της PKC-ε. Σε αυτή την περίπτωση ο επιθηλιακός αυξητικός παράγοντας 8 που βρίσκεται στις σφαιρίνες του γάλακτος/λακταντερίνη, προσδένεται στην φωσφατίδυλοσερίνη με συνέπεια να αλλάζει ο προσανατολισμός της ακτίνης και να ενεργοποιείται η κυτταρική μετανάστευση, μέσω της ενεργοποίησης της PKC-ε (Bu, Zuo et al. 2007; Sharma, Kakazu et al. 2007).

1.2.1.4 Η PKC-ε εμπλέκεται στη ρύθμιση των συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων

Οι δομές ισχυρής σύνδεσης και τα δεσμοσώματα που συνδέουν τα μεσεγγυματικά και τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση και στη λειτουργία της επιδιόρθωσης σε ιστικές βλάβες (Fukata, Kuroda et al. 1999). Στο σχηματισμό αυτών των δομικών κατασκευών συμμετέχουν εκτός της ακτίνης και των ενδιάμεσων ινιδίων και άλλες πρωτεΐνες όπως πλακογλουβίνη, IQGAP1, η E-καντχερίνη, η β-κατένιν, η Cdc42, και η Rac1.

Στα επιθηλιακά κύτταρα η PKC-ε φωσφορυλιώνει την IQGAP1, στη σερίνη 1443, με συνέπεια να προκαλεί αλλαγές στη σύνδεσή της με τη Cdc42. Τελικά αυτό οδηγεί στην αναστολή της δημιουργίας συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων. Η τελευταία είναι αναγκαίο να προϋπάρξει προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μετανάστευση των κυττάρων και η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Kuroda, Fukata et al. 1998; Grohmanova, Schlaepfer et al. 2004; Li, McNulty et al. 2005).

Ένα επιπλέον παράδειγμα στο οποίο φαίνεται ότι η PKC-ε έχει ρόλο στις κυτταρικές συνδέσεις αποτελούν τα GH₄C₁ κύτταρα της υπόφυσης. Σε αυτά η ενεργοποίηση με Θυρεοτροπίνη (TRH) οδηγεί στη μετακίνηση της PKC-ε στην κυτταρική μεμβράνη, στις θέσεις που βρίσκονται οι σχηματισμοί σύνδεσης των κυττάρων και φαίνεται να συνεντοπίζεται με την Κερατίνη 8, την οποία

φωσφορυλιώνει στις σερίνες που βρίσκονται στις θέσεις 23 και 8 (Quittau-Prevostel, Delaunay et al. 2004; Akita, Kawasaki et al. 2007).

Στα φωτοκύτταρα η φωσφορυλίωση της σερίνης 23 συνεπάγεται τη δέσμευση της κερατίνης 8 στις δεσμοπλακίνες που βρίσκονται στα δεσμοσώματα (Loranger, Gilbert et al. 2006).

Τα παραπάνω δείχνουν ότι η PKC-ε έχει ρόλο στη δημιουργία των σχηματισμών σύνδεσης και ιδιαίτερα των δεσμοσωμάτων, μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, των κυττάρων της υπόφυσης και των ηπατοκυττάρων (van Hengel, Gohon et al. 1997; Kitajima 2002) . Σε αυτή τη λειτουργία της φαίνεται να είναι σημαντική η φωσφορυλίωση από αυτή της κερατίνης 8.

1.2.1.5 Ρόλος της PKC-ε στην καρκινογένεση

Η PKC-ε έχει ρόλο στην εισβολή, τη μετάσταση, την επιβίωση και την ανθεκτικότητα στα φάρμακα, των καρκινικών κυττάρων. Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της πρωτεΐνης αυξάνονται στα κύτταρα των επιθετικών μορφών γλοιώματος, στα καρκινικά κύτταρα του καρκίνου του στήθους και στα κύτταρα της λευχαιμίας εκ τριχωτών κυττάρων (Besson, Wilson et al. 2002; Okhrimenko, Lu et al. 2005; Pan, Bao et al. 2005; Slupsky, Kamiguti et al. 2007) . Οι ινοβλάστες NIH3 T3, που υπερεκφράζουν την PKC-ε παρουσιάζουν

προσεκβολές και πολικότητα αντίστοιχες με αυτές που παρατηρούνται σε ινοβλάστες που υπερεκφράζουν τη *ras* πρωτεΐνη (Perletti, Folini et al. 1996).

Το C1 ρυθμιστικό τμήμα της πρωτεΐνης φαίνεται ότι είναι σημαντικό για τη δημιουργία των προσεκβολών που είναι αναγκαίες για την εισβολή των καρκινικών κυττάρων στους υγιείς ιστούς, για την αυξημένη δράση των εξωκυττάρων μεταλλοπρωτεασών.

Τα κύτταρα της υπόφυσης αρουραίου CH₄C₁, τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και οι ινοβλάστες NIH3 T3, που υπερεκφράζουν την PKC-ε παρουσιάζουν μορφολογικές αλλαγές παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται στα κύτταρα που είναι *ras*-μεταλλαγμένα και παρουσιάζουν μικρότερη προσκολλητική ικανότητα. Στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την PKC-ε, η τελευταία παρουσιάζει συνεντόπιση με την ακτίνη στις περιοχές που τα κύτταρα συνδέονται στη βασική μεμβράνη και με την κερατίνη 8 στις περιοχές που τα κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους.

Τα δεδομένα από τη μελέτη της PKC-ε στα καρκινικά κύτταρα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η τελευταία έχει ρόλο στη διαδικασία της μετάστασης και εισόδου στους υγιείς ιστούς, των καρκινικών κυττάρων, μέσω της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο δίκτυο της ακτίνης και της κερατίνης, όπως η MARCKS, η IQGAP1 και η βιμεντίνη (Akita, Kawasaki et al. 2000; Akita, Kawasaki et al. 2007).

Σε μερικά είδη καρκινικών κυττάρων, τα επίπεδα της PKC-ε αποτελούν δείκτη της ανθεκτικότητάς τους στην εφαρμοζόμενη χημειοθεραπεία (Flescher and Rotem 2002; Wu, Thakore et al. 2004). Αυτό συμβαίνει στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη στα οποία η αποτυχία της ορμονικής θεραπείας έχει συσχετιστεί με την αύξηση των επιπέδων της. Σε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα προστάτη, στα οποία το γονίδιο της PKC-ε δεν εκφράζονταν, παρατηρήθηκε μείωση του πολλαπλασιασμού και της μετάστασης (Hafeez, Zhong et al.).

Στα τριχωτά κύτταρα της χρόνιας Β-Λεμφογενούς Λευχαιμίας η επιβίωση και οι κυτταροσκελετικές διαμορφώσεις εξαρτώνται από τη δράση των πρωτεϊνών ERK και Rac1, αντίστοιχα. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες φωσφορυλιώνονται από την PKC-ε. Επομένως φαίνεται ότι η PKC-ε συμμετέχει στους μηχανισμούς επιβίωσης και διαμόρφωσης του κυτταροσκελετού των τριχωτών κυττάρων της χρόνιας Β-Λεμφογενούς Λευχαιμίας (Wu, Thakore et al. 2004; Slupsky, Kamiguti et al. 2007; Yonekawa and Akita 2008).

Τα δεδομένα αυτά έχουν μετατρέψει την PKC-ε σε δείκτη αξιολόγησης της «επιθετικότητας» ενός είδους καρκίνου καθώς και σε δείκτη επιτυχίας της αντικαρκινικής θεραπείας (Pan, Bao et al. 2005; Liron, Chen et al. 2007).

Επίσης έχει βρεθεί ότι η PKC-ε έχει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Caino, Lopez-Haber et al.)

Τα επίπεδα της PKC-ε είναι υψηλά στο πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου. Δρα ελεγχοντας τη δράση της Akt, Stat3 και τις Rho GTPάσες. Τα επίπεδά τη μειώνονται όταν στα κύτταρα εκφράζεται το μικρο-RNA 107. Όταν πραγματοποιείται η μείωση των επιπέδων της επιτυγχάνεται η μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Για αυτό το λόγο η PKC-ε αποτελεί θεραπευτικό στόχο για αυτή τη μορφή καρκίνου με το μικρο-RNA 107 να αποτελεί πιθανό φάρμακο (Datta, Smith et al.).

1.2.1.6 Ο ρόλος της PKC-ε στη λειτουργία των μυοϊνιδίων

Η PKCε είναι πιθανό ότι ρυθμίζει διάφορες λειτουργίες των καρδιακών κυττάρων, όπως η διεγερσιμότητα και η ανάπτυξη και εμπλέκεται στο μηχανισμό που στοχεύει στην προστασία τους από τις βλάβες που προκαλούνται από την ισχαιμία.

Ο ρόλος της PKC-ε στην προστασία των καρδιακών κυττάρων από την ισχαιμία έχει μελετηθεί εκτενώς (Chou and Messing 2005; Inagaki, Churchill et al. 2006; Yonekawa and Akita 2008).

Η λειτουργική μονάδα του καρδιακού μυός είναι το σαρκομερίδιο. Στα άκρα το σαρκομεριδίου, κατά τον εγκάρσιο άξονά του, βρίσκονται οι Z-δίσκοι, οι οποίοι συμμετέχουν στην οργάνωση και στη λειτουργία του σαρκομεριδίου και είναι σημαντικοί για τη σύσπαση του καρδιακού μυός. Σε αυτούς συνδέονται μικροϊνίδια που η βάση της κατασκευής τους είναι η ακτίνη, η α-ακτινών και η κονεκτίνη που προσδένει μακροϊνίδια που έχουν ως βάση κατασκευής τους τη μυοσίνη (Huang and Walker 2004).

Η PKC-ε ενεργοποιείται από το αραχιδονικό οξύ, το οποίο παράγεται στις καρδιακές ίνες. Η ενεργοποιημένη PKC-ε εντοπίζεται στους Z-δίσκους και συνδέεται με την F-ακτίνη μέσω της RACK2, είτε με τη β'-COP η οποία είναι μεμβρανική πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο σύστημα Golgi είτε μέσω κάποιας άλλης πρωτεΐνης (Csukai, Chen et al. 1997; Huang and Walker 2004).

Η μυϊκή σύσπαση επιτυγχάνεται όταν αλληλεπιδρούν τα μικροϊνίδια που έχουν ως βάση κατασκευής την ακτίνη τα μακροϊνίδια που έχουν ως βάση κατασκευής τη μυοσίνη. Η καρδιακή τροπονίνη I (cTnI) αποτελεί ρυθμιστική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τα μικροϊνίδια της ακτίνης ώστε να προσδώσει την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με τα νημάτια της μυοσίνης μετά από την επίδραση των ιόντων ασβεστίου. Η cTnI φωσφορυλιώνεται από την PKC-ε (σερίνη43, σερίνη45, θρεονίνη144) γεγονός που καταδεικνύει το ρόλο της PKC-ε στην κατασκευή και στη λειτουργία των μυοϊνιδίων (Burkart, Sumandea et al. 2003).

1.2.1.7 Προστασία στην ισχαιμία του μυοκαρδίου και του εγκεφαλικού ιστού

Η υποκλινική και η ήπια ισχαιμία στην καρδιά και στον εγκέφαλο βοηθά στην «προετοιμασία» των κυττάρων για να αντέξουν τις συνέπειες ενός σοβαρού ισχαιμικού επεισοδίου. Σε βιοχημικό επίπεδο εμπλέκονται πολλά μόρια μεταξύ των οποίων και οι PKC (Murriel and Mochly-Rosen 2003; Armstrong 2004; Chou and Messing 2005).

Η δράση της PKC-ε στην «προετοιμασία» των κυττάρων για την αντοχή στην ισχαιμία έχει αποδειχθεί στα καρδιακά κύτταρα με τη χρήση ενεργοποιητών και αναστολέων της δράσης της πρωτεΐνης και με τις παρατηρήσεις σε επίμυες που έχουν υποστεί μεταλλαγή στο γενετικό τους υλικό ώστε να μη παράγουν την πρωτεΐνη (Saurin, Pennington et al. 2002; Murriel and Mochly-Rosen 2003; Armstrong 2004; Chou and Messing 2005).

Στους τελευταίους έχει παρατηρηθεί ότι το μέγεθος του εμφράκτου που πραγματοποιείται στο εργαστήριο με αναδιάχυση (reperfusion) δε μειώνεται όταν απουσιάζει πλήρως η PKC-ε. Αυτές οι παρατηρήσεις αφορούν σε πειράματα που δεν έχουν γίνει σε νευρικό ιστό.

Όμως από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι η PKC-ε προστατεύει τον νευρικό ιστό από τις βλάβες που προκαλεί η ισχαιμία. Μελέτες που χρησιμοποίησαν τομές ιστού από ιππόκαμπο αναστολείς και ενεργοποιητές της ενζυμικής δράσης της PKC-ε καταδεικνύουν ότι ενεργοποιείται κατά την «προετοιμασία» των νευρικών

κυττάρων για την ισχαιμία, μέσω των NMDA υποδοχέων και των υποδοχέων της αδενοσίνης (Di-Capua, Sperling et al. 2003; Raval, Dave et al. 2003; Lange-Asschenfeldt, Raval et al. 2004; Wang, Bright et al. 2004). Κατά την «προετοιμασία» από τους υποδοχείς της αδενοσίνης είναι σημαντικό να είναι ενεργοποιημένη η πρωτεΐνη ERK (extracellular signal-regulated kinase, πρωτεΐνη που ρυθμίζεται από εξωκυττάρια μηνύματα) (Lange-Asschenfeldt, Raval et al. 2004).

Επιπλέον φαίνεται ότι η PKC-ε βρίσκεται σε μικρότερη ποσότητα στο κέντρο του νευρικού ιστού που έχει υποστεί την ισχαιμία και ότι αυτή η μείωση αποφεύγεται σε συνθήκες υποθερμίας. Έως τώρα δεν είναι γνωστό με ποιο τρόπο η υποθερμία οδηγεί σε αποτροπή της μείωσης των επιπέδων της PKC-ε κατά την ισχαιμία (Wang, Bright et al. 2004).

1.2.1.8 Ο ρόλος της PKC-ε στην καρδιακή υπερτροφία και την καρδιομυοπάθεια

Η υπερτροφία του μυοκαρδίου αποτελεί προσαρμοστική απόκριση στην ανάγκη της καρδιάς να ανταποκριθεί στις συνθήκες του αυξημένου φορτίου, που προκαλούνται σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Στην υπερτροφία του μυοκαρδίου συμβαίνει αναδιαμόρφωση των μυϊκών καρδιακών κυττάρων, που συνίσταται στην αύξηση του μήκους ή του πλάτους τους χωρίς να επηρεάζεται το μήκος των σαρκομεριδίων κατά την ηρεμία. Η ύπαρξη σταθερού

μήκους των σαρκομεριδίων κατά την ηρεμία είναι σημαντική για την εκτέλεση της συστολικής λειτουργίας (Knoll, Hoshijima et al. 2002).

Για τη διατήρηση της σταθερότητας του μήκους του σαρκομεριδίου χρειάζεται η ενεργοποίηση της PKC-ε και της FAK. Η ενεργοποίηση της FAK είναι απαραίτητη για την επιβίωση των καρδιακών μυϊκών κυττάρων και για τη διάταξη των σαρκομεριδίων κατά την υπερτροφία του μυοκαρδίου που προκαλείται από την επίδραση της ενδοθερίνης (Heidkamp, Bayer et al. 2003). Σε αυτή την πειραματική διαδικασία η ενεργοποίηση της FAK εξαρτάται από τη δράση της PKC-ε και διαμεσολαβείται από τις πρωτεϊνικές κινάσες που σχετίζονται με τη Rho πρωτεΐνη. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη-1, που αποτελεί συστατικό του μυϊκού δακτυλίου αναστέλλει τη δράση της PKCε, εμποδίζοντας κατά πάσα πιθανότητα τη σύνδεσή της με τη RACK-1 (Arya, Kedar et al. 2004). Η πρωτεΐνη-1 ενεργοποιείται με στόχο να εμποδιστεί η υπερτροφία του μυοκαρδιακού ιστού, η οποία είναι πιθανό να συμβεί, όταν στα μυοκαρδιακά κύτταρα δρα η φαιτυλεφρίνη.

Στην υπερτροφική καρδιομυοπάθεια παραβλάπεται ο κυτταροσκελετός των μυοκαρδιακών κυττάρων. Η εξέλιξη της νόσου οδηγεί σε καρδιακή ανεπάρκεια. Η πιθανότητα να συμβεί καρδιακή ανεπάρκεια αυξάνεται όσο μεγαλύτερο είναι το στρες που ασκείται στα κύτταρα. Κατά το μηχανικό στρες παρατηρείται αύξηση

της δράσης της PKCε με φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης c TnI στη σερίνη 43 ή 45.

1.2.2 Δράση στο νευρικό σύστημα

1.2.2.1 Δράση στην ανάπτυξη νευριτών

Η PKC-ε εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στον εγκέφαλο σε σύγκριση με άλλους ιστούς, όπως η καρδιά και τα νεφρά και παρουσιάζει αύξηση των επιπέδων της κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου της όρνιθας (Mangoura, Sogos et al. 1993). Οι παρατηρήσεις αυτές, σε συνδυασμό με επιπλέον πειραματικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι η PKC-ε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο νευρικό σύστημα.

Επιπλέον πειράματα που έχουν γίνει σε επίμυες δείχνουν ότι τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης της PKC-ε, αυξάνουν στο αναπτυξιακό στάδιο του εγκεφάλου στο οποίο δημιουργούνται συνάψεις (Shirai, Adachi et al. 2008).

Πειράματα στην κυτταρική σειρά του φαιοχρωμοκυττώματος επίμυος PC12, δείχνουν ότι υπάρχει αύξηση της ανάπτυξης των νευριτών όταν υπερεκφράζεται η PKCε και αναστολή της ανάπτυξης νευριτών όταν χρησιμοποιούνται αναστολείς του ενζύμου (Hundle, McMahon et al. 1995).

Πειράματα σε κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος έχουν καταδείξει ότι η PKC-ε και ιδιαίτερα το ρυθμιστικό τμήμα της έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη νευριτικών προσεκβολών (Zeidman, Lofgren et al. 1999). Μεταξύ των τμημάτων C1A και C1B, τα οποία βρίσκονται στη ρυθμιστική περιοχή, φαίνεται ότι βρίσκεται το τμήμα της πρωτεΐνης που προσδένεται στην F-ακτίνη. Αυτή η σύνδεση επιτρέπει τις αλλαγές που γίνονται στην ακτίνη κατά το σχηματισμό των νευριτικών προσεκβολών και πιθανολογείται ότι ευνοεί την ανοιχτή στερεοδιάταξη της PKC-ε (Zeidman, Troller et al. 2002).

Όμως η PKC-ε συμβάλλει στη δημιουργία των νευριτικών προσεκβολών αναστέλλοντας και το ενδοκυτταρικό μονοπάτι της Rho-A πρωτεΐνης, το οποίο δρα ανασταλτικά στη δημιουργία νευριτικών προσεκβολών. Η ανοιχτή διαμόρφωση της PKC-ε ευνοεί τη σύνδεσή της με τη 4,5διφώσφο-φωσφατίδυλο-ινοσιτόλη (PIP2). Η σύνδεση αυτή επιτρέπει τη σύνδεση της PKC-ε με τις μεμβράνες και επομένως και τη μεταφορά της σε εκείνα τα κυτταρικά διαμερίσματα στα οποία συντελούνται οι διεργασίες για τη νευριτική ανάπτυξη. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η PIP2 είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση της Rho-A. Επομένως η σύνδεση του μορίου με την PKC-ε μειώνει τη διαθεσιμότητά του για τη Rho-A, με συνέπεια να μην ενεργοποιείται εκείνο το μονοπάτι που δρα εμποδίζοντας την ανάπτυξη των νευριτικών προσεκβολών και επιπλέον επιτρέπει την ενδοκυττάρια κατανομή της πρωτεΐνης στα κυτταρικά διαμερίσματα όπου

πραγματοποιείται η νευριτική ανάπτυξη (Ling, Troller et al. 2004; Troller and Larsson 2006).

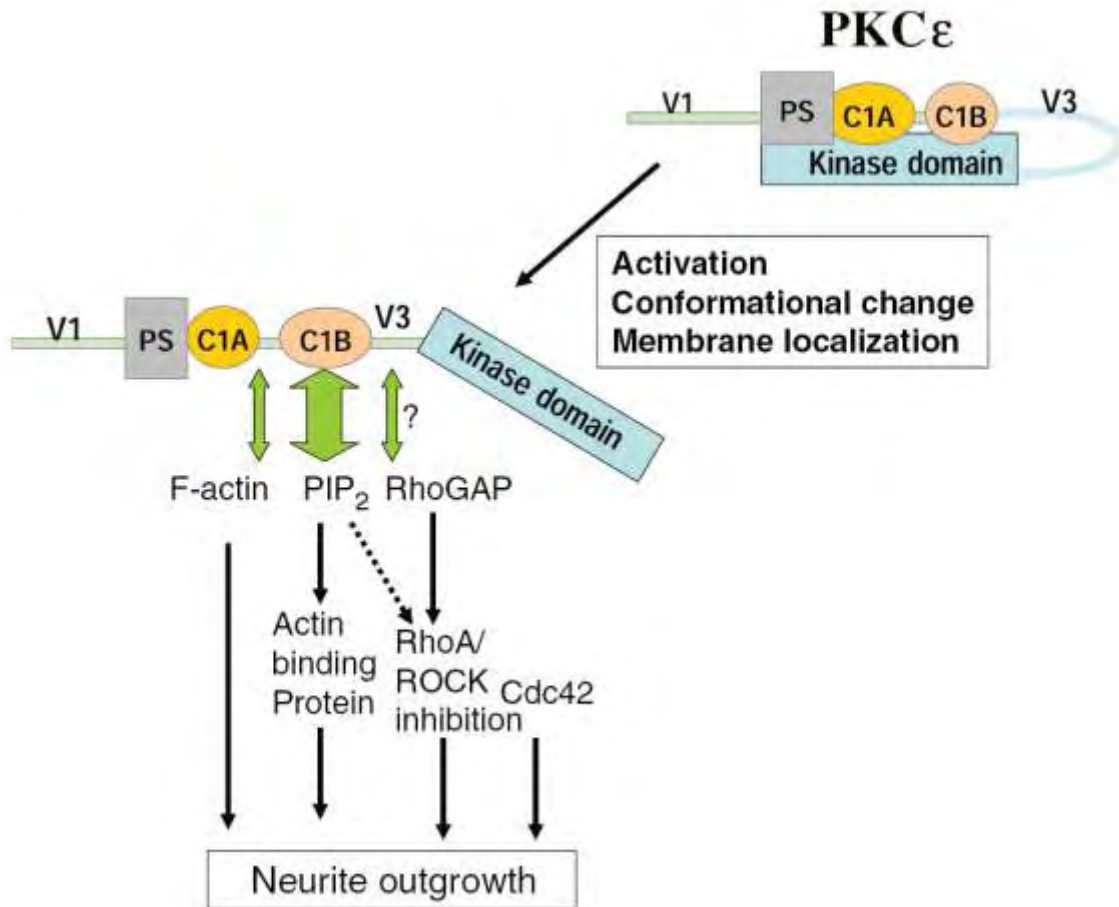
Μια επιπλέον δράση της PIP2 είναι η σύνδεσή της με πρωτεΐνες που δεσμεύουν ακτίνη με στόχο την ευόδωση της δράσης τους. Πιθανολογείται ότι αυτή της η ιδιότητα αξιοποιείται και κατά τη σύνδεσή της με την PKC-ε (Shirai, Murakami et al. 2007).

Ταυτόχρονα έχει βρεθεί ότι η ανοιχτή στερεοδιάταξη της PKC-ε δεσμεύει τη Rho-GAP και ότι αυτή η δέσμευση ευνοεί το σχηματισμό νευριτικών προσεκβολών. Η υπόθεση είναι ότι αυτή η λειτουργία μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της ανασταλτικής δράσης της PKC-ε στο μονοπάτι της Rho πρωτεΐνης.

Επομένως, η υπόθεση που έχει διαμορφωθεί είναι ότι κατά τη δημιουργία των νευριτικών σχηματισμών η PKC-ε συνδέεται με την F-ακτίνη δρώντας ευοδωτικά στην αναδιοργάνωση της ακτίνης που απαιτείται κατά το σχηματισμό νευριτικών σχηματισμών. Η σύνδεση με την ακτίνη ευνοεί την ανοιχτή στερεοδιάταξη του ενζύμου. Η ανοιχτή στερεοδιάταξη ευνοεί τη σύνδεση της PKC-ε με την 4,5διφώσφο-φωσφατίδυλο-ινοσιτόλη μειώνοντας τις διαθέσιμες ποσότητες του μορίου από το μονοπάτι της Rho πρωτεΐνης, που είναι αυτό που ασκεί ανασταλτικό ρόλο στο σχηματισμό νευριτικών συνάψεων. Επιπρόσθετα η ανοιχτή στερεοδιάταξη της PKC-ε ευνοεί τη σύνδεσή της με τη Rho-GAP πρωτεΐνη που και αυτή είναι αναγκαία για την αποτελεσματικότητα του μονοπατιού της Rho

πρωτεΐνης προκαλώντας μείωση των διαθέσιμων ποσοτήτων σε αυτό το ενδοκυτταρικό μονοπάτι (Faure, Vignais et al. 1999; Troller, Raghunath et al. 2004; Ling, Troller et al. 2005).

Έχει βρεθεί ότι ένας επιπλέον τρόπος με τον οποίο η PKC-ε δρα στη δημιουργία νευριτικών σχηματισμών είναι μέσω της ενεργοποίησης της Cdc 42 πρωτεΐνης, με μηχανισμό ο οποίος δεν είναι ακόμα γνωστός.



Εικόνα 1.4: Προτεινόμενο μοντέλο για τον τρόπο με τον οποίο δρα η PKC-ε στην ανάπτυξη νευριτών. Η ενεργοποίηση της PKC-ε οδηγεί σε αλλαγές στη στερεοδομή της πρωτεΐνης και στη μεταφορά της στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στη συνέχεια αντιδρά, μέσω της περιοχής δέσμευσης της ακτίνης και των V1 και V3 περιοχών, με την ακτίνη και τις RhoGAP και PIP₂ με συνέπεια να δρα ανασταλτικά στο RhoA-ROCK ενδοκυττάριο μονοπάτι, να ενεργοποιεί τη Cdc42 και να συμμετέχει στις κυτταροσκελετικές ανακατατάξεις. Με αυτούς τους τρόπους επιδρά στην ανάπτυξη νευριτών (Shirai, Adachi et al. 2008).

1.2.2.2 Προσυναπτική Δράση

Η μακράς διάρκειας ενίσχυση (potentiation) (Long Term Potentiation, LTP) έχει σημαντικό ρόλο στη μάθηση και στη μνήμη. Η LTP παρατηρείται σε διάφορα τμήματα του εγκεφάλου αλλά έχει μελετηθεί στον ιππόκαμπο κυρίως.

Στον ιππόκαμπο έχουν παρατηρηθεί δύο είδη LTP. Το πρώτο αφορά στην οδό που εκκινεί από τα Schaffer βοηθητικά κύτταρα προς τα κύτταρα της CA1 στοιβάδας του ιπποκάμπου (SCCA1). Το δεύτερο αφορά στην οδό που εκκινεί από τα κύτταρα με τις πυκνές νευρικές ίνες προς τα κύτταρα της CA3 στοιβάδας του ιπποκάμπου (MF-CA3). Το τελευταίο σχετίζεται με διεργασίες που πραγματοποιούνται προσυναπτικά ενώ το πρώτο χρειάζεται ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) και πραγματοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσης των υποδοχέων N-μέθυλ-d-ασπαρτικού οξέος (NMDA), από την PKC- γ (Saito and Shirai 2002; Hussain and Carpenter 2005).

Η PKC- ϵ έχει υψηλή συγκέντρωση στις προσυναπτικές ίνες των κυττάρων του ιπποκάμπου με τις πυκνές νευρικές ίνες. Υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν την ανάμειξή της στη διαδικασία της, εξαρτώμενης από τους εστέρες της φορβόλης, εξωκύτωσης του γλουταμικού και στο μηχανισμό της, εξαρτώμενης από τους εστέρες της φορβόλης, συναπτική ενδυνάμωση. Επομένως μια λογική υπόθεση είναι ότι η PKC- ϵ συμβάλλει στην LTP της MF-CA3 οδού μέσω της

αύξησης της προσυναπτικής εξωκύπτωσης του γλουταμικού (Dumuis, Sebben et al. 1988; Saitoh, Hori et al. 2001).

Ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό δεν είναι γνωστός. Μία υπόθεση εμπλέκει το αραχιδονικό οξύ που έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί την PKC-ε. Το αραχιδονικό οξύ παράγεται από τους μετασυναπτικούς νευρώνες μετά από ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση το αραχιδονικό οξύ διαχέεται στο συναπτικό χώρο και περνά στον προσυναπτικό νευρώνα, όπου και ενεργοποιεί την PKC-ε (Dumuis, Sebben et al. 1988; Kasahara and Kikkawa 1995; Prekeris, Mayhew et al. 1996).

Οι PKC φαίνεται να είναι σημαντικές στην ωρίμανση των συνάψεων. Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι η σύγχρονη καλλιέργεια των νευρικών κυττάρων με αστροκύτταρα και η επαφή μεταξύ τους βοηθά στη δημιουργία συνάψεων με ενισχυτική λειτουργία (Hama, Hara et al. 2004). Επίσης έχει βρεθεί ότι οι αναστολείς των PKC εμποδίζουν τη δημιουργία των ενισχυτικών συνάψεων. Στη διαδικασία ωρίμανσης των νευρικών συνάψεων σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το αραχιδονικό οξύ, το οποίο παράγεται από τη δράση της φωσφολιπάσης A₂ (Dumuis, Sebben et al. 1988).

Από τις PKC φαίνεται ότι η PKC-ε έχει το σημαντικότερο ρόλο σε αυτή τη διαδικασία ωρίμανσης των συνάψεων και τη δημιουργία συνάψεων με ενισχυτική λειτουργία. Αυτό φαίνεται ότι οφείλεται στο ότι το αραχιδονικό οξύ, που είναι

σημαντικό σε αυτή τη διαδικασία, ενεργοποιεί εκλεκτικά την PKC-ε (Dumuis, Sebben et al. 1988).

1.2.2.3 Δράση σχετιζόμενη με την αιθανόλη

Η PKC-ε σχετίζεται με τη δράση της αιθανόλης με στα κύτταρα και στον οργανισμό.

Η αιθανόλη προκαλεί τη μετατόπιση της PKC-ε στην κυτταροπλασματική μεμβράνη στα NG108-15 κύτταρα (Gordon, Yao et al. 1997). Τα κύτταρα NG108-15 είναι υβρίδια που έχουν προέλθει από κύτταρα νευροβλαστώματος μυός και κύτταρα γλοιώματος επίμουσ. Η χρόνια επίδραση με αιθανόλη αυξάνει την ποσότητα της στα NG108-15 και στα PC κύτταρα (Messing, Petersen et al. 1991; Coe, Yao et al. 1996) Τα PC είναι κύτταρα τερατώματος, μυός. Επίμους στους οποίους δεν εκφράζεται η PKC-ε παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στις άμεσες επιπτώσεις της πρόσληψης αιθανόλης και στην επιθυμία για κατανάλωση αλκοόλης (Hodge, Mehmert et al. 1999). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά ποντίκια (Choi, Wang et al. 2002). Η ελεγχόμενη έκφραση της πρωτεΐνης στην κογχική περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού, στην αμυγδαλή και στην παρεγκεφαλίδα αποκαθιστά την ανταπόκριση των πειραματόζων στην πρόσληψη αιθανόλης.

Η PKC-ε φωσφορυλιώνει απευθείας τη C2 υπομονάδα των GABA_A υποδοχέων επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο την, εξαρτώμενη από τους GABA υποδοχείς, ροή Cl στο κύτταρο. Είναι πιθανό ότι αυτός είναι ο μηχανισμός με τον οποίο η PKC-ε επηρεάζει την αντοχή στις επιπλοκές της πρόσληψης της αιθανόλης και στην κατανάλωση της από τα πειραματόζωα (Qi, Song et al. 2007).

Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η χρόνια κατανάλωση αιθανόλης αυξάνει τα επίπεδα των N-τύπου καναλιών ασβεστίου και ότι αυτό το φαινόμενο ελέγχεται από την PKC-ε (McMahon, Andersen et al. 2000).

Τα παραπάνω ευρήματα οδηγούν σε υποθέσεις που εμπλέκουν την PKC-ε στην αντιμετώπιση του αλκοολισμού.

1.2.2.6 Πόνος

Η PKC-ε εντοπίζεται στους περιφερικούς αισθητικούς νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για το αίσθημα του πόνου. Σε αυτά τα νευρικά κύτταρα εκφράζεται ο κατιονικός υποδοχέας TRPV1 ο οποίος ενεργοποιείται από την καψαϊκίνη και σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από 43°C. Ο TRPV1 είναι υπεύθυνος για την αίσθηση του πόνου που οφείλεται στη θερμότητα (Davis, Gray et al. 2000) και στη φλεγμονή. Κατά τις βιοχημικές διαδικασίες που προηγούνται της εκδήλωσης της φλεγμονής ενεργοποιείται από διάφορα μόρια, μεταξύ των οποίων το ATP και η

βραδυκινίνη, με μηχανισμό ο οποίος εξαρτάται από τη δράση των PKC (Premkumar and Ahern 2000; Tominaga, Wada et al. 2001).

Η PKC-ε φαίνεται ότι εμπλέκεται στο μηχανισμό της αίσθησης του πόνου με δύο τρόπους. Έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνει τον TRPV1 στις σερίνες που βρίσκονται στις θέσεις 502 και 800 (Ser⁵⁰² και Ser⁸⁰⁰, αντίστοιχα) (Numazaki, Tominaga et al. 2002) (Mandadi, Tominaga et al. 2006). Η φωσφορυλίωση στη Σερ800, μέσω της PKC-ε, αποτελεί ένα τρόπο απενεργοποίησης του υποδοχέα TRPV1. Επιπρόσθετα, η PKC-ε φαίνεται ότι συμβάλλει στην ενεργοποίηση του TRPV1 μέσω του μηχανισμού του υποδοχέα που ενεργοποιείται από την πρωτεΐνωση (Dai, Moriyama et al. 2004).

Τα παραπάνω δίνουν στην PKC-ε ένα πιθανό ρόλο στην αναζήτηση φαρμακευτικών λύσεων για την αντιμετώπιση του πόνου.

1.2.2.7 Έκφραση της PKC-ε στον εγκέφαλο

Ανάλυση με Northern αποτύπωση έχει αναδείξει αυξημένα επίπεδα του mRNA της PKC-ε στον εγκέφαλο. Αντίστοιχα αναλύσεις με ανοσοαποτύπωση έχουν αναδείξει αυξημένα επίπεδα και της πρωτεΐνης στον εγκέφαλο (Ono, Fujii et al. 1988; Wetsel, Khan et al. 1992). Ανοσοϊστοχημική ανάλυση στο εγκέφαλο επίμυος δείχνουν ότι η PKC-ε παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα στον ιππόκαμπο, στο οσφρητικό φύμα, στα νησίδια του Calleja, μετρίως αυξημένα επίπεδα στον

εγκεφαλικό φλοιό, στον πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα, στον επικλινή πυρήνα, τον πλάγιο διαφραγματικό πυρήνα και στο κέλυφος του κερκοφόρου πυρήνα. Η κατανομή της πρωτεΐνης και του RNA που αποκαλύπτεται με τις παραπάνω τεχνικές επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα του υβριδισμού in situ (Saito, Itoji et al. 1993).

Όσον αφορά στην ενδοκυττάρια κατανομή της πρωτεΐνης στα νευρικά κύτταρα φαίνεται ότι έχει παρουσία στις νευρικές ίνες, ενώ παρατηρήσεις με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αναδεικνύουν προσυναπτική εντόπιση (Saito, Itoji et al. 1993; Tanaka and Nishizuka 1994).

Τα αποτελέσματα στην κατανομή της PKC-ε στον εγκέφαλο και στο νευρικό κύτταρο δίνουν σοβαρές πιθανότητες να εμπλέκεται στην ανάπτυξη των νευρικών απολήξεων και στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών στον μετασυναπτικό νευρώνα.

Ποσοτικές μετρήσεις της PKC-ε κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου, έχουν δείξει αλλαγές κατά τα διαφορετικά στάδια. Στον εγκέφαλο του επίμουσ παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης στο πρόσθιο εγκεφαλικό κυστίδιο κατά το χρονικό διάστημα μεταξύ 5 έως 7 ημερών. Επίσης αύξηση παρατηρείται στον ρομβοειδή εγκέφαλο στο χρονικό διάστημα μεταξύ 7 έως 14 ημερών (Shirai, Adachi et al. 2008).

Καθώς η αύξηση των επιπέδων της PKC-ε στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο συμπορεύεται με τα στάδια της δημιουργίας συνάψεων, δημιουργείται η υπόθεση ότι αυτή η πρωτεΐνη έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος (Shirai, Adachi et al. 2008).

1.2.3 Άλλες Λειτουργίες

Η PKC-ε ρυθμίζει τη ροή ιόντων νατρίου (Na^+) στους νευρώνες του ιπποκάμπου (Chen, Cantrell et al. 2005).

Η πρόσδεση της ακέτυλο-χολίνης στους μουσκαρινικούς υποδοχείς έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ροής των Na^+ , αφού έχει προηγηθεί η ενεργοποίηση της PKC-ε, των G πρωτεϊνών και της φωσφολιπάσης C.

Αυτή η μείωση δεν παρατηρείται σε επίμυες που δεν εκφράζουν το γονίδιο της PKC-ε, γεγονός που σημαίνει ότι η PKC-ε συμμετέχει στη ρύθμιση της λειτουργία των καναλιών του Na^+ . Με τη συμμετοχή της σε αυτή τη λειτουργία είναι πιθανό να επηρεάζει την πόλωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των δενδριτών και επομένως και τη μεταφορά ή την ταχύτητα μεταφοράς του νευρικού σήματος.

Επιπλέον η PKC-ε συμμετέχει στη ρύθμιση της ενεργοποίησης της έκκρισης της πρόδρομης μορφής της πρωτεΐνης του β-αμυλοειδούς από τους εστέρες της φορβόλης και στη μείωση των πεπτιδίων του β-αμυλοειδούς). Η PKC-ε φαίνεται ότι είναι μια από τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες της α-σεκρετάσης και επομένως και

των πεπτιδίων του β-αμυλοειδούς (Zhu, Wang et al. 2001). Η υπερέκφραση της PKC-ε μειώνει την ποσότητα των πεπτιδίων του β-αμυλοειδούς που παράγονται από τη δράση του μετατρεπτικού ενζύμου της ενδοθελίνης (Choi, Wang et al. 2006).

Εκτός από τα νευρικά κύτταρα, η PKC-ε έχει ιδιαίτερη σημασία και για τα αστροκύτταρα. Η υπερέκφρασή της και η σύγχρονη ενεργοποίησή της από τον εστέρα της φορβόλης, 4β-φορβολο-12 μυριστικο-13 οξικό οξύ σε πολυδύναμα νευρωνικά βλαστικά κύτταρα, οδηγεί σε διαφοροποίησή τους σε αστροκύτταρα (Steinhart, Kazimirsky et al. 2007). Σε αυτή τη διαδικασία φαίνεται ότι ιδιαίτερο ρόλο έχει και η πρωτεΐνη Notch.

Σε πείραμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν μύες που έπασχαν από κατάθλιψη, η χορήγηση ανιτριπτυλλίνης, ενός τρικυκλικού αντικαταθλιπτικού, η οποία είχε θεραπευτικά αποτελέσματα, οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού φωσφορυλίωσης της PKC-ε και της p38 πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνα (p38MAPK). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η θεραπευτική δράση της αμιτριπτυλλίνης επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης των PKC-ε και της p38MAPK (Galeotti and Ghelardini).

1.3 Εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα

1.3.1 Ορισμοί

Εμβρυϊκό κύτταρο: Κύτταρο το οποίο μπορεί να διαιρείται διαρκώς και να δημιουργεί πανομοιότυπους απογόνους.

Πρόδρομο κύτταρο (progenitor ή precursor): Προγονικό κύτταρο το οποίο διαιρείται και αναπαράγεται προκειμένου να παράγει ένα συγκεκριμένο τύπο κυττάρου.

Παντοδύναμο κύτταρο (totipotent): Κύτταρο που ανήκει σε ομογενή πληθυσμό ο οποίος μπορεί να διαφοροποιηθεί σε όλους τους τύπους των κυττάρων και των ιστών συμπεριλαμβανομένων και των εξωεμβρυονικών ιστών.

Ολοδύναμο κύτταρο (pluripotent): Κύτταρο που δεν ανήκει σε ομογενή πληθυσμό, και που μπορεί να διαφοροποιηθεί σε όλους τους τύπους των κυττάρων και των ιστών, με την εξαίρεση των εξωεμβρυονικών ιστών.

Πολυδύναμο κύτταρο (multipotent): Προγονικό κύτταρο που μπορεί να διαφοροποιηθεί σε ποικίλους κυτταρικού τύπους ως αποτέλεσμα απάντησης σε κατάλληλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. (Fischbach and Fischbach 2004)

1.3.2 Ιστορικά στοιχεία-Εμβρυϊκά Καρκινικά κύτταρα

Η ενασχόληση με τα Εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα ξεκίνησε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, όταν ο δαρβινιστής Ernst Haeckel χρησιμοποίησε ορολογία από τη φυλογένεση και την οντογένεση για να περιγράψει το stammzelle (εμβρυϊκό κύτταρο). Σύμφωνα με την εισήγησή του, πρόκειται για αρχέγονο κύτταρο που έδωσε γέννηση σε όλους τους μονοκύτταρους και πολυκύτταρους οργανισμούς. Τα συμπεράσματά του ο Haeckel τα έβγαλε από τις παρατηρήσεις του στην ανάπτυξη των εμβρύων και σε γονιμοποιημένα και μη γονιμοποιημένα αυγά (Brunt, Weisel et al.).

Οι εμβρυολόγοι-ιστολόγοι Boveri T. και Haecker V. απέδωσαν στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα τις ιδιότητες της δημιουργίας πανομοιοτύπων απογόνων και της δυνατότητάς τους να διαφοροποιούνται. Επιπρόσθετα εισήγαγαν τον όρο ολοδύναμο κύτταρο (Maehle).

Από το 1907 οι αιματολόγοι A. Papanheim και J. Conheim είχαν εισάγει την ιδέα της συσχέτισης των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων με τη δημιουργία όγκων των συμπαγών οργάνων και λευχαιμίας (Brunt, Weisel et al.). Αρκετά αργότερα διαπιστώθηκε ότι η λευχαιμία είναι δυνατό να μεταφερθεί από έναν οργανισμό σε άλλο με τον πολλαπλασιασμό ενός καρκινικού κυττάρου. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαίωσε την ύπαρξη της ιδιότητας της δημιουργίας πανομοιοτύπων απογόνων (Furth 1937).

Το 1970 παρατηρήθηκε ότι όταν έμβρυα μυός σε πρώιμα στάδια εξέλιξης, πριν το στάδιο της γαστρούλας, εμφυτεύονται σε ενήλικα άτομα οδηγούν στο σχηματισμό τερατοκαρκινωμάτων (Solter, Skreb et al. 1970; Stevens 1970). Τα τερατοκαρκινώματα αποτελούνται από καρκινικά κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται, αλλά και από αδιαφοροποίητα κύτταρα.

Τα αδιαφοροποίητα κύτταρα αποκαλούνται εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα διατηρούν την ιδιότητα να αναπαράγονται δίνοντας πανομοιότυπους απογόνους, διατηρούν την ιδιότητά τους για διαφοροποίηση προς κύτταρα και των τριών βλαστικών δερμάτων (εξώδερμα, μεσόδερμα και ενδόδερμα) και είναι εφικτό να αναπαραχθούν στην καλλιέργεια (Kleinsmith and Pierce 1964; Martin and Evans 1975). Είναι ανευπλοειδικά και δε διαιρούνται με μείωση, οπότε και δεν παράγουν γαμέτες. Ως προς τις ιδιότητές τους μοιάζουν με τα κύτταρα της επιβλάστης, η οποία είναι η εξωτερική κυτταρικά στοιβάδα του εξωδέρματος (Diwan and Stevens 1976; Martin 1980).

Έχει βρεθεί ότι όταν τα εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα εμφυτευθούν στο αναπτυσσόμενο έμβρυο συμμετέχουν στη δημιουργία ιστών, διαφοροποιούμενα, σε ένα μικρό ποσοστό. Όμως το σύνηθες είναι να μην παρουσιάζουν τάσεις για διαφοροποίηση in vivo και in vitro (Smith 2001).

Οι παρατηρήσεις που αφορούσαν στα εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα, η ικανότητά τους να αυτοαναπαράγονται συνεχώς, η δυναμική πιθανότητα της

διαφοροποίησής τους και η προέλευσή τους από έμβρυο θηλαστικών, έγειραν πολλά ερωτήματα που σχετίζονταν με τους κυτταρικούς μηχανισμούς διαφοροποίησης και την αξιοποίησή τους.

Ένα από τα ευρήματα που οδήγησαν στην εύρεση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ήταν η παρατήρηση ότι τα εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα παρουσίαζαν μεγαλύτερη βιωσιμότητα και αύξαναν την ικανότητά τους για διαφοροποίηση όταν καλλιεργούνταν μαζί με μιτωτικά απενεργοποιημένους ινοβλάστες (Martin 1975; Martin, Wiley et al. 1977). Η εξήγηση που δόθηκε ήταν ότι οι ινοβλάστες παρείχαν τα απαραίτητα θρεπτικά υλικά και χαρακτηρίστηκαν ως κύτταρα τροφοί. Επιπλέον είχε παρατηρηθεί ότι τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν ομοιότητες με τα εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα ως προς τη μορφολογία, τη συμπεριφορά στην καλλιέργεια, την έκφραση των αντιγόνων που χρησιμοποιούνται ως δείκτες για τη διαφοροποίηση και την ικανότητά τους να δίνουν γένεση σε τερατοκινώματα (Evans M.J. 1983).

1.3.3 Παραγωγή των Εμβρυϊκών Βλαστικών κυττάρων

Η παραγωγή των εμβρυϊκών Βλαστικών κυττάρων επιτεύχθηκε για πρώτη φορά το 1981 (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). Τα πρωτόκολλα για την απομόνωση των ESc είναι σχετικά απλά και ακολουθούν την ίδια μεθοδολογία από το 1987. Τα έμβρυα στη φάση της βλαστοκύστης τοποθετούνται στα τρυβλία,

είτε ακέραια, είτε η εσωτερική επιφάνεια της βλαστοκύστης. Η καλλιέργεια γίνεται σε τρυβλία στα οποία καλλιεργούνται τροφικά κύτταρα. Στο θρεπτικό μέσο προστίθεται β-μερκαπτοαιθανόλη και ορός από έμβρυο βοός σε συγκέντρωση 10-20%. Μετά από αρκετές ημέρες στη καλλιέργεια η κυτταρική μάζα μεταφέρεται σε καινούργια τρυβλία. Σε αυτή παρατηρούνται αποικίες κυττάρων με μορφολογία που δείχνει ότι έχουν υποστεί διαφοροποίηση, αλλά και αποικίες κυττάρων που δείχνουν αδιαφοροποίητα. Τα τελευταία απομονώνονται αποδιατάσσεται η αποικία και τα κύτταρα επανατοποθετούνται στη καλλιέργεια. Από αυτή την καλλιέργεια απομονώνονται τα αδιαφοροποίητα κύτταρα και από αυτά δημιουργείται νέα καλλιέργεια (Smith 2001).

1.3.4 Εμβρυϊκά Βλαστικά Κύτταρα προερχόμενα από μυ

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται διαρκώς και να επιτυγχάνουν εμβρυογένεση ακόμα και μετά από πολλαπλή εργαστηριακή χρήση. Η αξιοποίηση αυτών των ιδιοτήτων τους με διάφορες τεχνικές, επιτρέπει την ελεγχόμενη διαφοροποίησή τους προς όλους του εμβρυϊκούς ιστούς συμπεριλαμβανομένων των μεσοδερμικών κυττάρων της ληκύθου, των κυττάρων του αμνίου και της αλλαντοΐδας (Bradley, Evans et al. 1984). Εξαιτίας της προέλευσής τους από την επιβλάστη παρουσιάζουν αδυναμία να διαφοροποιούνται σε κύτταρα του εξωεμβρυϊκού ενδοδέρματος και μερική

ικανότητα να διαφοροποιούνται σε κύτταρα της τροφοβλάστης (Beddington and Robertson 1989).

Τα Εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα είναι ικανά να δίνουν γένεση σε ενεργούς γαμέρες, εξαιτίας του ότι διατηρούν το διπλοειδικό χαρακτήρα τους (Bradley, Evans et al. 1984). Για να διατηρήσουν αυτή την ικανότητά τους τα Εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα, είναι αναγκαίο να τηρούνται με ευλάβεια οι κανόνες της καλλιέργειάς τους και να χρησιμοποιούνται καλλιέργειες στις οποίες τα κύτταρα να μην έχουν ανακαλλιεργηθεί πολλές φορές. Παρ'όλα αυτά είναι σχεδόν απίθανο να μην δημιουργηθούν μεταλλάξεις και επιγενετικά φαινόμενα (Dean, Bowden et al. 1998).

Η δημιουργία γαμετών από τα Εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα βρίσκει εφαρμογή στην εισαγωγή γενετικού υλικού σε αυτά με σκοπό την παραπέρα μελέτη τους (Joyner 1991; Bradley, Hasty et al. 1992; Zheng, Sage et al. 2000).

Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων του μύος είναι 40. Στην πλειοψηφία τους τα Εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα, έχουν το φυλετικό χρωμόσωμα Υ. Στα κύτταρα που έχουν χρωμοσωμικό τύπο ΧΧ και τα δύο χρωμοσώματα είναι ενεργά όπως συμβαίνει στα κύτταρα της επιβλάστης. Όμως η ενεργότητα και των δύο Χ χρωμοσωμάτων δεν ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Εξαιτίας αυτού του λόγου, υπάρχει η αριθμητική επικράτηση των ΧΥ κυττάρων (Rastan and Robertson 1985).

Σε κάθε περίπτωση, ο καρυότυπος XY πλεονεκτεί στην κληρονομική μεταβίβαση μέσω των σπερματοκυττάρων, για δύο λόγους. Αρχικά, επειδή εξασφαλίζει μεγαλύτερο αριθμό σπερματοκυττάρων. Σε δεύτερο λόγο, η μεταμόσχευση των XY σπερματοκυττάρων σε θηλυκό έμβρυο (γονότυπος 40XX), είναι δυνατό να οδηγήσει σε δημιουργία αρσενικών γενετικών οργάνων. Επειδή τα XX σπερματοκύτταρα δεν αναπτύσσονται σε αρσενικές γονάδες, αυτή η αλλαγή στο φύλο οδηγεί στη δημιουργία σπερματοκυττάρων τα οποία προέρχονται από τα μεταμοσχευθέντα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Bradley, Evans et al. 1984).

Τα Εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από το μυ δεν έχουν την ικανότητα παραγωγής των κυττάρων του τροφοεξωδέρματος. Επομένως δε μπορούν να παράγουν κύτταρα της βλαστοκύστης και άρα και έμβρυο. Για αυτό το λόγο κάποιες φορές στη βιβλιογραφία τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του μυός αναφέρονται ως ολοδύναμα και όχι ως παντοδύναμα (Smith 2001).

Στον αντίποδα αυτής της άποψης βρίσκεται η παρατήρηση ότι όταν εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα μεταμοσχευθούν σε τετραπλοειδικά έμβρυα παρατηρείται φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου. Σε αυτή την περίπτωση τα τετραπλοειδικά κύτταρα είχαν σχηματίσει τους εξωεμβρυϊκούς ιστούς, ενώ οι υπόλοιποι ιστοί σχηματίστηκαν από τα μεταμοσχευθέντα διπλοειδικά εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, τα οποία υπερέκλυαν σε αριθμό τα τετραπλοειδικά κύτταρα. Επομένως μπορεί να ειπωθεί ότι τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από το μυ είναι

ικανά να οδηγήσουν στη δημιουργία εμβρύου όταν η επιβλάστη αποτελείται από τετραπλοειδικά κύτταρα (Nagy, Gocza et al. 1990; Nagy, Rossant et al. 1993). Όμως σε αυτές τις περιπτώσεις η εσωτερική επιφάνεια της επιβλάστης ήταν επενδεδυμένη από τετραπλοειδικά κύτταρα τα οποία αντικαταστάθηκαν από τα μεταμοσχευθέντα διπλοειδικά, μόνο κατά ένα ποσοστό. Από αυτά τα δεδομένα συνάγεται ότι τα κύτταρα της εσωτερικής επιφάνειας της επιβλάστης του εμβρύου δέκτη, έχουν την ιδιότητα να τροποποιούν το σήμα κατά την οντογένεση του οργανισμού, με τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται η διαφοροποίηση και η ανάπτυξη. Τα έμβρυα που προκύπτουν από αυτή τη διαδικασία πεθαίνουν στην μήτρα, ή κατά τη διάρκεια του τοκετού, ή αμέσως μετά τον τοκετό. Εάν όμως τα έμβρυα προκύπτουν από μεταμόσχευση διπλοειδικών εμβρυϊκών κυττάρων σε διπλοειδική επιβλάστη σχηματιζόμενου εμβρύου, έχουν μακρύτερο χρόνο επιβίωσης. Η εξήγηση σε αυτό το φαινόμενο ίσως να βρίσκεται στην τύχη που έχουν οι αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων και των μεταλλάξεων που συμβαίνουν στο DNA των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων κατά τον πολλαπλασιασμό τους.

Είναι πιθανό ότι κατά τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων συμβαίνουν επιγενετικές αλλαγές ή/και μεταλλάξεις (Dean, Bowden et al. 1998). Στην περίπτωση που τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα έχουν μεταμοσχευθεί και πολλαπλασιάζονται σε ήδη σχηματισμένη διπλοειδική

επιβλάστη δημιουργείται μία διπλοειδική χίμαιρα. Οι αλλαγές στο γενετικό υλικό και στη γονιδιακή έκφραση που συμβαίνουν στα μεταμοσχευθέντα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα της διπλοειδικής χίμαιρας δεν εκδηλώνονται φαινοτυπικά ιδιαίτερα αν δεν ευνοούν την κυτταρική αυτονομία. Η υπόθεση που επιχειρεί να εξηγήσει αυτό το γεγονός είναι ότι τέτοιου είδους αλλαγές καλύπτονται από τα κύτταρα που προέρχονται από την επιβλάστη.

Οι τετραποειδικές χίμαιρες προέρχονται από τη μεταμόσχευση διπλοειδικών εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε τετραπλοειδική επιβλάστη. Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα τα οποία έχουν προέλθει από διπλοειδικές χίμαιρες και δημιουργούν υγιείς αποικίες σωματικών και γενετικών κυττάρων δεν επιτυγχάνουν ανάπτυξη σε τετραπλοειδικές χίμαιρες (Nagy, Rossant et al. 1993). Επίσης, οργανισμοί που έχουν προέλθει από μεταβίβαση γενετικού υλικού που προέρχεται από τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν μικρής διάρκειας επιβίωση. Επιπρόσθετα έχει βρεθεί στην περίπτωση που οι οργανισμοί που έχουν μακρά διάρκεια επιβίωσης και προέρχονται από τετραποειδικές χίμαιρες ή από μεταβίβαση γενετικού υλικού τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα που έχουν χρησιμοποιηθεί έχουν καταγωγή από διπλοειδικές χίμαιρες (Rideout, Wakayama et al. 2000). Ενδεχομένως λοιπόν η αύξηση του χρόνου επιβίωσης να σχετίζεται με το γεγονός ότι τα κύτταρα της διπλοειδικής επιβλάστης επικαλύπτουν τον πολλαπλασιασμό των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων που έχουν υποστεί

αλλαγή στην έκφραση του γενετικού τους υλικού, με συνέπεια να περιορίζονται οι συγγενείς ανωμαλίες που θα μείωναν τις βραχυπρόθεσμες πιθανότητες για επιβίωση.

1.3.5 Εμβρυϊκά Σπερματικά Κύτταρα

Η παρατήρηση ότι τερατοκαρκινώματα αναπτύσσονται και στους όρχεις των μυών στο εργαστήριο (ιδιαίτερα στους μύες 129), δημιούργησε ερωτήματα σχετικά με το εάν είναι δυνατό να δημιουργηθούν εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα από τα σπερματικά κύτταρα.

Η κλωνοποίηση του αναπτυξιακού παράγοντα Steel και του παράγοντα αναστολής της λευχαιμίας (LIF) έκαναν δυνατή την καλλιέργεια των σπερματικών κυττάρων του μυός (Matsui, Toksoz et al. 1991).

Κατόπιν βρέθηκε ότι η προσθήκη στην καλλιέργεια του βασικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF-2) είχε σα συνέπεια τη μετατροπή των αρχέγονων σπερματικών κυττάρων του μυός, σε κύτταρα που είχαν παρόμοιες ιδιότητες με τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Matsui, Zsebo et al. 1992).

Αυτά τα κύτταρα ονομάστηκαν εμβρυϊκά σπερματικά κύτταρα, για να επισημαίνεται η καταγωγή τους. Κάποιες σειρές από αυτά τα κύτταρα παρουσιάζουν την ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται σε χίμαιρες και να δίνουν γένεση σε οργανισμούς (Labosky, Barlow et al. 1994; Stewart, Gadi et al. 1994).

Σε αυτές τις περιπτώσεις φάνηκε ότι οι οργανισμοί που προέρχονται από εμβρυϊκά σπερματικά κύτταρα, τα οποία δημιουργούνται από αρσενικούς ή θηλυκούς γαμέτες, δε διαφέρουν (Tada, Tada et al. 1998). Τα εμβρυϊκά σπερματικά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να αλλάζουν τις περιοχές μεθυλίωσης του γενετικού τους υλικού των γαμετών από τους οποίους έχουν προέλθει έτσι ώστε να καταφέρουν να αναπρογραμματιστούν για να έχουν τις ολοδύναμες ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων (Tada, Tada et al. 1997).

1.3.6 Μοριακοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την ιδιότητα των Εμβρυϊκών Βλαστικών Κυττάρων που προέρχονται από μυ, να παράγουν πανομοιότυπους απογόνους και να συμπεριφέρονται ως ολοδύναμα κύτταρα.

Η κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα επιτυγχάνουν τη δημιουργία πανομοιότυπων απογόνων και συντηρούν την ιδιότητά τους να δίνουν γένεση σε όλους τους ιστούς εκτός από τους εξωεμβρυϊκούς, δεν είναι γνωστοί. Η γνώση αυτών των μηχανισμών θα βοηθήσει στη βελτίωση των τεχνικών καλλιέργειας και στην κατανόηση του θεραπευτικού δυναμικού τους. Επιπρόσθετα, η γνώση των ίδιων μηχανισμών θα συμβάλλει στην κατανόηση των ενδοκυτταρικών μονοπατιών διαφοροποίησης, που με τη σειρά της θα βοηθήσει στην στοχευμένη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων για θεραπευτικούς λόγους (Armstrong, Hughes et al. 2006).

Οι μελέτες έχουν αναδείξει ότι στην ολοδύναμη συμπεριφορά των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων συμβάλλουν πρωτεΐνες σηματοδότησης, μεταγραφική παράγοντες, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, μικρο-RNA, γονίδια που η έκφρασή τους οδηγεί στη σταθεροποίηση των χρωμοσωμάτων και στη μεθυλίωση του DNA.

1.3.6.1 Το μεταβολικό μονοπάτι LIF-STAT3

Έρευνες έχουν δείξει ότι τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από το μυ, μπορούν να πολλαπλασιάζονται συνεχώς σε τρυβλία που καλλιεργούνται συγχρόνως απενεργοποιημένοι εμβρυϊκοί ινοβλάστες. Τα κύτταρα που προκύπτουν με αυτό τον τρόπο έχουν ιδιότητες ολοδύναμων κυττάρων (Evans and Kaufman 1981). Η πρωτεΐνη που έχει βρεθεί ότι είναι σημαντική για τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλει τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων είναι ο ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας (LIF), οποίος ανήκει στην οικογένεια των κυτταροκινών της ιντερλευκίνης – 6 (IL-6) (Smith, Heath et al. 1988; Williams, Hilton et al. 1988). Όταν στους ινοβλάστες δεν εκφράζεται το γονίδιο του LIF, τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται (Stewart, Kaspar et al. 1992). Όταν από το υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας αφαιρεθεί ο LIF ή αφαιρεθούν οι ινοβλάστες από την καλλιέργεια, τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται αλλά χάνουν τις ιδιότητες τους και διαφοροποιούνται.

Ο LIF ενεργοποιεί τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του μυός μέσω της γλυκοπρωτεΐνης 130 (gp130) (Yoshida, Chambers et al. 1994). Η gp130 είναι διαμεμβρανικός υποδοχέας των κυτοκινών. Η δέσμευση του LIF επιτυγχάνεται όταν η gp130 σχηματίζει ετεροδιμερές με τον υποδοχέα του LIF (LIFR). Η ενεργοποίηση της gp130, μετά τη δέσμευση του LIF, οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης της τυροσίνης Janus (JAK) και στην πρωτεΐνη μεταβίβασης σήματος και ενεργοποίησης της μεταγραφής (STAT). Η ιδιότητα του LIF να συντηρεί την ικανότητα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων του να αναπαράγονται δίνοντας πανομοιότυπους απογόνους, πραγματώνεται μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης STAT3 (Niwa, Burdon et al. 1998). Η STAT3 εμποδίζει τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων του μυός παρουσία ορού στο θρεπτικό μέσω καλλιέργειας τους (Matsuda, Nakamura et al. 1999).

Εκτός από την ενεργοποίηση της STAT3 ο LIF προκαλεί την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνα (MAPK), η οποία ευοδώνει τη διαφοροποίηση. Η καταστολή του μονοπατιού σηματοδότησης της MAPK (ή αλλιώς ERK), συντηρεί την ιδιότητα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων να παραμένουν αδιαφοροποίητα (Burdon, Stracey et al. 1999). Ενδεχομένως η ιδιότητα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων να μη διαφοροποιούνται, παρουσία του LIF, να είναι αποτέλεσμα μιας ισορροπίας των παρεπομένων από την ενεργοποίηση των STAT3 και MAPK.

Η ιδιότητα του LIF και της STAT3 να αναστέλουν τη διαφοροποίηση φαίνεται ότι είναι περιορισμένη στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του μυός. Τα δύο μονοπάτια έχουν διάφορες δράσεις σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων με τη προαγωγή της διαφοροποίησης να είναι η κυριότερη (Kishimoto, Taga et al. 1994). Παραδείγματα κυττάρων στα οποία τα δύο μονοπάτια προωθούν τη διαφοροποίηση είναι τα μυελοειδή κύτταρα και τα πρόδρομα κύτταρα των αστροκυττάρων, ενώ στα ηπατοκύτταρα προκαλούν την παραγωγή των πρωτεϊνών οξείας φάσης (Liu, Lu et al. 2007).

Παρόλο που τα φαινοτυπικά αποτελέσματα της δράσης του LIF και της STAT3 στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα είναι γνωστά, δεν έχει διευκρινισθεί ποια είναι τα γονίδια των οποίων η έκφραση επηρεάζεται, καθώς και τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται, από τη δράση αυτών των μορίων.

Πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα που είχαν ωθηθεί σε διαφοροποίηση είτε με απόσυρση του LIF από το θρεπτικό τους μέσο, είτε με αναστολή της δράσης της STAT3, έχουν δείξει ότι η STAT3 επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων των πρωτεϊνών Id1 (Αναστολέας της σύνδεσης στο DNA-1) και Id2 (Αναστολέας της σύνδεσης στο DNA-2) και τη δράση της πρωτεΐνης Aes1 (πρωτεΐνη ενισχυτής της αναστολής έκφρασης των γονιδίων μέσω του RNA) (Liu, Lu et al. 2007), η οποία ίσως να αποτελεί άμεσο στόχο της (Sekkaï, Gruel et al. 2005).

Επιπλέον ενδείξεις για το ότι η STAT3 συμμετέχει στο μοριακό μηχανισμό που συντηρεί την ιδιότητά τους να είναι ολοδύναμα, προέρχονται από πειράματα που επιδεικνύουν ότι ελέγχει άμεσα ή έμμεσα την έκφραση του γονιδίου που είναι ειδικό για τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Esg-1), με τρόπο που δεν είναι γνωστός (Tanaka, Kunath et al. 2002).

Ο μεταγραφικός παράγοντας c-Myc συνδέεται με το μονοπάτι σηματοδότησης LIF-STAT3, με λειτουργικό ρόλο που επηρεάζει την ιδιότητα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων για να αναπαράγουν πανομοιότυπους απογόνους. Η μετάφραση του γονιδίου c-Myc μειώνεται 36 ώρες μετά την απόσυρση του LIF από το θρεπτικό μέσο των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, ενώ η έκφρασή του αποδίδει στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα την ιδιότητά τους να δίνουν πανομοιότυπους απογόνους, ανεξάρτητα από την ύπαρξη του LIF στο θρεπτικό μέσο. Επιπρόσθετα η επικρατής αρνητική μορφή της c-Myc πρωτεΐνης ανταγωνίζεται τη δημιουργία πανομοιότυπων απογόνων και προωθεί τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Cartwright, McLean et al. 2005). Τα αποτελέσματα αυτά, είναι σε συνέχεια με προηγούμενα δεδομένα που αφορούν στην ιδιότητα της c-Myc να συντηρεί την ιδιότητα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων για να πολλαπλασιάζονται διαρκώς, επιδρώντας στη ρυθμιστική περιοχή της τελομεράσης (Wang, Xie et al. 1998).

Σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα μύος τα οποία έχουν μετασχηματιστεί ώστε να παράγουν τη χειμερινή πρωτεΐνη BCR-ABL παρατηρείται ότι συντηρούν τη μορφολογία τους παρόλο που έχει αποσυρθεί ο LIF από το θρεπτικό τους μέσο (Corro, Dusanter-Fourt et al. 2003). Σε αυτή τη διαδικασία φαίνεται ότι η MEKK1 έχει κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση της STAT3 και στη διατήρηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε αδιαφοροποίητο στάδιο (Nakamura, Yujiri et al. 2005). Επομένως η MEKK1 αποτελεί ένα επιπλέον μόριο που συμμετέχει στην εκδήλωση του φαινοτυπικού χαρακτήρα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

Στα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα εκφράζεται η gp130 και ο LIFR και ασκούν λειτουργικό έλεγχο στη STAT3 (Daheron, Opitz et al. 2004). Όμως σε αυτά τα κύτταρα η ενεργοποίηση του μεταβολικού μονοπατιού LIF-STAT δεν συνδράμει στην απουσία διαφοροποίησης στα κύτταρα, *in vitro* (Humphrey, Beattie et al. 2004). Η πιθανότερη εξήγηση αυτού του φαινομένου είναι ότι τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του ανθρώπου και του μύος βρίσκονται σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο.

1.3.6.2 Το μεταβολικό μονοπάτι MAPK-ERK

Υπάρχουν ενδείξεις ότι αυτό το μεταβολικό μονοπάτι έχει ρόλο στη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του μυός παρουσιάζουν αύξηση της δραστηριότητας της ERK κατά τη διαφοροποίησή τους, ενώ ο περιορισμός της μεταβολικής δραστηριότητας της ERK συμβάλλει στη συντήρηση του αδιαφοροποίητου χαρακτήρα τους. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών (BMP), σε συνδιασμό με την ύπαρξη του LIF στο θρεπτικό μέσο των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων αναστέλει τη διαφοροποίησή τους, με μηχανισμό που περιλαμβάνει την απενεργοποίηση της ERK και την έκφραση των αναστολέων σύνδεσης στο DNA (Burdon, Stracey et al. 1999; Qi, Li et al. 2004; Lodge, McWhir et al. 2005).

Στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, υπάρχει αυξημένη δραστηριότητα της ERK κατά το αδιαφοροποίητο στάδιο, κυρίως επειδή ενεργοποιείται από το μεταβολικό μονοπάτι του βασικού FGF (bFGF ή FGF2) (Dvorak and Hampl 2005; Kang, Kim et al. 2005; Levenstein, Ludwig et al. 2006).

1.3.6.3 Το μεταβολικό μονοπάτι PI3K

Το μεταβολικό μονοπάτι της κινάσης της 1,4,5 τριφώσφο-φωσφατίδυλο-ινοσιτόλης (PI3K) έχει ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη συντήρηση του ολοδύναμου χαρακτήρα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του μυός εκφράζουν ένα γονίδιο τύπου Ras που έχει ονομαστεί ERas και προκαλεί την ενεργοποίηση της PI3K η οποία δρα θετικά

στον πολλαπλασιασμό των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Takahashi, Mitsui et al. 2003). Για τη διατήρηση του αδιαφοροποίητου φαινότυπου και του ολοδύναμου χαρακτήρα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, είναι αναγκαία και η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB ή Akt), με μηχανισμό που δεν εξαρτάται από την ύπαρξη του LIF (Paling, Wheadon et al. 2004; Kim, Cheon et al. 2005; Takahashi, Murakami et al. 2005) και είναι ανεξάρτητος από το μεταβολικό μονοπάτι Wnt/ β -catenin (Watanabe, Umehara et al. 2006). Η ενεργοποίηση αυτού σηματοδοτικού μονοπατιού ελέγχεται από αυξητικούς παράγοντες, όπως ο LIF και ο bFGF (Jirmanova, Afanassieff et al. 2002; Xu, Peck et al. 2005).

Από τα μόρια που ακολουθούν στο μεταβολικό μονοπάτι PI3K/Akt η κινάση-μηχανιστικός στόχος της ραπαμυκίνης (mTOR), φαίνεται ότι έχει ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αλλά δε συμβάλλει στη συντήρηση του ολοδύναμου χαρακτήρα τους (Watanabe, Umehara et al. 2006).

Η PI3K και η Akt συμβάλλουν στην ιδότητα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται δίνοντας πανομοιότυπους απογόνους με ένα επιπλέον μηχανισμό στον οποίο συμμετέχουν οι πρωτεΐνες p53, η Nanog και η κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου-3 β (GSK3 β) (Takahashi, Mitsui et al. 2003). Το προτεινόμενο μοντέλο είναι το εξής: Η GSK3 β υφίσταται αρνητική ρύθμιση από τις PI3K/Akt (Hay and Sonenberg 2004). Αυτό έχει σαν συνέπεια να μη

φωσφορυλιώνεται η p53 στη Ser³¹⁵ (Watcharasit, Bijur et al. 2002; Qu, Huang et al. 2004), με άμεση συνέπεια να μειώνεται η αναστολή της δράσης της Nanog (Lin, Chao et al. 2005). Η Nanog είναι πρωτεΐνη που δρα συμβάλλοντας στη αποτροπή της διαφοροποίησης των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Liu, Lu et al. 2007).

1.3.6.4 Το μεταβολικό μονοπάτι Wnt

Το Wnt/β-catenin μεταβολικό μονοπάτι δεν παρουσιάζει λειτουργικές διαφορές στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του ανθρώπου και του μύος. Έχει παρατηρηθεί ότι αταστέλλεται κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Sato, Meijer et al. 2004). Η ενεργοποίησή του αυξάνει την έκφραση της STA3, γεγονός που αναδεικνύει τη συνεργιστική του σχέση με το μεταβολικό μονοπάτι LIF/STAT3 (Hao, Li et al. 2006). Ένα επιπλέον δεδομένο που επιβεβαιώνει την ύπαρξη αυτής της σχέσης μεταξύ των δύο μεταβολικών μονοπατιών, είναι ότι η ενεργοποίηση του Wnt ευοδώνει τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα c-Myc, ο οποίος έχει βρεθεί ότι συμβάλλει στις ιδιότητες των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται δίνοντας πανομοιότυπους απογόνους (Cartwright, McLean et al. 2005; Kristensen, Kalisz et al. 2005).

1.3.6.5 Τα μεταβολικά μονοπάτια της οικογένειας TGFβ

Ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης-β (TGFβ) ανήκει στην ομώνυμη υπερικογένεια πρωτεϊνών στην οποία περιλαμβάνονται περίπου 40 μέλη που έχουν ρόλο στην ανάπτυξη και τη κυτταρική διαφοροποίηση. Στην υπερικογένεια αυτή ανήκουν εκτός από τον TGFβ και η ακτιβίνη (activin), η nodal, και οι BMPs. Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς στους οποίους προσδένονται είναι οι TGFβ-I και TGFβ-II. Πρόκειται για ετεροδιμερή με δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης, από τους οποίους ξεκινά μεταβολικό μονοπάτι που περνά στον πυρήνα μεταβάλλοντας τη γονιδιακή έκφραση (Liu, Lu et al. 2007). Οι TGFβ και η activin, συνδέονται με τον υποδοχέα TGFβ-II και δε παρουσιάζουν συγγένεια με τον TGFβ-I. Οι BMPs παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τον TGFβ-I συγκριτικά με τον TGFβ-II (Valdimarsdottir and Mummery 2005).

Η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών-4 (BMP4), συμβάλλει στη διατήρηση της ιδιότητας των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων του μυός, να πολλαπλασιάζονται σε πανομοιότυπους απογόνους, παρουσία του LIF. Αυτό φαίνεται ότι πραγματοποιείται με τρεις μηχανισμούς.

Ο πρώτος μηχανισμός αφορά στη φωσφορυλίωση των Smad 1 και 5 από την BMP4. Οι ενεργοποιημένες Smad 1 και 5 αυξάνουν την έκφραση των πρωτεϊνών Id (αναστολέας της σύνδεσης στο DNA ή αναστολέας της διαφοροποίησης), οι οποίες ανταγωνίζονται λειτουργικά τη δράση των νευρογενών bHLH

μεταγραφικών παραγόντων και επομένως αναστέλουν τη διαφοροποίηση προς κύτταρα του νευρικού συστήματος (Ying, Nichols et al. 2003; Gerrard, Rodgers et al. 2005).

Ο άλλος τρόπος με τον οποίο δρα η BMP4 για τη συντήρηση του ολοδύναμου χαρακτήρα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων του μυός, είναι μέσω της αναστολής του καταρράκτη σηματοδότησης της MAPK (Qi, Li et al. 2004).

Σε ένα τρίτο μηχανισμό φαίνεται να εμπλέκεται ο παράγοντας αύξησης/διαφοροποίησης-3 (GDF3). Ο GDF3 πιθανόν να είναι αναστολέας της δράσης της BMP4 και στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του μυός η μειωμένη έκφραση του γονιδίου του ευνοεί τον ολοδύναμο φαινότυπο (Levine and Brivanlou 2006).

Στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα η BMP4 προωθεί τη διαφοροποίηση των κυττάρων της τροφοβλάστης προς κύτταρα με χαρακτηρισές ενδοδέρματος (Xu, Inokuma et al. 2001). Εδώ σε αντίθεση με τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του μυός η υπερέκφραση του GDF3 οδηγεί στη διατήρηση του αδιαφοροποίητου χαρακτήρα (Levine and Brivanlou 2006).

Στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα το μεταβολικό μονοπάτι TGFβ/activin/nodal είναι αυτό που ενεργοποιείται για τη διατήρηση του ολοδύναμου χαρακτήρα τους. Οι πρωτεΐνες τους έχουν αυξημένα επίπεδα στα αδιαφοροποίητα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Sato, Sanjuan et al.

2003). Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται μέσω των μεταγραφικών παραγόντων Smad2 και Smad3. Η ενεργοποίηση των παραγόντων αυτών οδηγεί σε καταστολή της ενεργοποίησης των Smad1 και Smad5 και επομένως το μονοπάτι TGFβ/activin/nodal ασκεί αρνητική ρύθμιση στη BMP4 στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Beattie, Lopez et al. 2005; James, Levine et al. 2005).

1.3.6.6 Το μεταβολικό μονοπάτι του bFGF

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από μύ συντηρούν τον ολοδύναμο χαρακτήρα τους με την παρουσία του LIF στο θρεπτικό τους μέσο. Στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών έχει το σημαντικότερο ρόλο στη διατήρηση του ολοδύναμου χαρακτήρα τους (Xu, Inokuma et al. 2001). Από τους τέσσερις υποδοχείς του bFGF, ο FGFR-I ανευρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Σε πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς του υποδοχέα του FGFR, όπως ο SU5402, στις καλλιέργειες των ανθρωπίνων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, προκλήθηκε διαφοροποίηση (Dvorak and Hampl 2005).

Τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα καλλιεργούνται σε σύγχρονες καλλιέργειες με ινοβλάστες, οι οποίοι σχηματίζουν την τροφική στοιβάδα,

παρουσία bFGF σε συγκέντρωση 4ng/ml (Liu, Lu et al. 2007). Όταν δε χρησιμοποιείται σύγχρονη καλλιέργεια, η ιδιότητα των ανθρωπίνων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων να είναι ολοδύναμα συντηρείται με τη χρήση bFGF σε συγκεντρώσεις 8ng/ml (Rosler, Fisk et al. 2004), 40ng/ml παρουσία νογκίνης (noggin) (Dvorak, Dvorakova et al. 2005; Wang, Zhang et al. 2005; Xu, Peck et al. 2005), η οποία είναι αναστολέας της BMP4 και 100ng/ml (Xu, Rosler et al. 2005).

Πιστεύεται ότι το μεταβολικό μονοπάτι του bFGF περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της MAPK και την αύξηση του γονιδίου c-fos (Dvorak, Dvorakova et al. 2005; Kang, Kim et al. 2005). Επίσης υπάρχει η υπόθεση ότι αναστέλει τη μετάβαση στον πρήνα του φωσφορυλιωμένου μεταγραφικού παράγοντα Smad1 αναστέλλοντας τη δράση της BMP (Xu, Peck et al. 2005).

1.3.6.7 Μεταγραφικοί παράγοντες

Οι μεταγραφικός παράγοντας προσδένεται σε οκτανουκλεοτίδιο-4 (Oct4) και ο Nanog, είναι οι κυριώτεροι που φαίνεται να έχουν ρόλο στη διατήρηση του ολοδύναμου χαρακτήρα και της ιδιότητας των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται συνεχώς.

Ο Oct4 κωδικοποιείται από το γονίδιο POU5F1. Προσδένεται στο οκτανουκλεοτίδιο ATGCAAAT. Εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά στα εμβρυϊκά

βλαστικά κύτταρα και η έκφρασή του μειώνεται όταν αυτά χάνουν τον ολοδύναμο χαρακτήρα τους. Η έλλειψη του Oct4 οδηγεί στη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε κύτταρα του τροφοεξωδέρματος, ενώ η υπερέκφρασή του οδηγεί στη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε κύτταρα του ενδοδέρματος και του μεσοδέρματος (Yeom, Fuhrmann et al. 1996; Niwa 2001).

Η έκφραση του γονιδίου του Oct4 επηρεάζεται από ενισχυτές στους οποίους προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες, που την επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά (Pan, Chang et al. 2002). Ένας από αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες είναι και ο ίδιος ο Oct4 (Chew, Loh et al. 2005; Okumura-Nakanishi, Saito et al. 2005).

Ο βαθμός έκφρασης του γονιδίου του Oct4 είναι σημαντικός για την πορεία της διαφοροποίησης. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης πρέπει να βρίσκονται μεταξύ ενός συγκεκριμένου ορίου ώστε να συντηρείται ο ολοδύναμος χαρακτήρας των κυττάρων. Ρυθμιστικοί παράγοντες είναι και οι Nanog και FoxD3 (Forkhead box D3) (Pan, Li et al. 2006).

Ο Oct4 ρυθμίζει μεταξύ άλλων γονιδίων και την έκφραση του Sox2 (Nishimoto, Fukushima et al. 1999). Ο Sox2 ανήκει στους ρυθμιστικούς παράγοντες που συμβάλλουν στη διατήρηση της ολοδυναμίας των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

Ο LIF δεν προκαλεί ρύθμιση του Sox2 και το μονοπάτι jak-STAT δε ρυθμίζεται από το Sox2. Υπάρχει η υπόθεση ότι οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες δρουν συνδράμοντας. Παράδειγμα που να αποδεικνύει αυτή την υπόθεση είναι το ειδικό για τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα γονίδιο-1 (Esg1). Η έκφραση του γονιδίου αυτού μειώνεται όσο προχωρά η διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Αυτό παρατηρείται στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του μύος και του ανθρώπου. Το Esg1 αποτελεί στόχο και της STAT3 και του Oct4, χωρίς να είναι γνωστός ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό (Tanaka, Kunath et al. 2002; Ginis, Luo et al. 2004).

Ο μεταγραφικός παράγοντας Nanog συμμετέχει στη διατήρηση του ολοδύναμου χαρακτήρα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων και λιγότερο στη δυνατότητά τους να πολλαπλασιάζονται διαρκώς (Chambers, Colby et al. 2003). Υπάρχουν διάφορα πειραματικά δεδομένα που αποκαλύπτουν μέρος του μηχανισμού με τον οποίο πραγματοποιείται αυτό.

Έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση του Nanog συμβάλλει στη έκφραση των πρωτεϊνών Id, οι οποίοι συνδέονται με το μεταβολικό μονοπάτι της BMP4 (Ying, Nichols et al. 2003). Αυτό μπορεί να συμβαίνει με τη δέσμευσή της με την πρωτεΐνη Smad1 (Suzuki, Raya et al. 2006).

Ένας επιπλέον τρόπος με τον οποίο ο Nanog συμβάλλει στη συντήρηση του ολοδύναμου χαρακτήρα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, είναι η

απενεργοποίηση των γονιδίων των μεταγραφικών παραγόντων Gata4 και Gata6 (Chambers, Colby et al. 2003; Mitsui, Tokuzawa et al. 2003). Η ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών έχει ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση.

Επιπρόσθτα η δράση του Nanog επιτυγχάνεται ενεργοποιώντας τον υποκινητή του γονιδίου της πρωτεΐνης Rex1 (Pan and Pei 2005; Shi, Wang et al. 2006). Για να επιτευχθεί αυτό είναι αναγκαίο το κάρβοξυ-τελικό άκρο του μορίου του Nanog και υποβοηθείται από τη σύνδεσή του με το μεταγραφικό παράγοντα Sox2 (Shi, Wang et al. 2006). Ο υποκινητής του γονιδίου της Rex1 ενεργοποιείται και από το μεταγραφικό παράγοντα Oct4 (Shi, Wang et al. 2006). Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι ο υποκινητής του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα Oct4 ενεργοποιείται από το Nanog (Pan, Li et al. 2006). Τα παραπάνω δείχνουν και τον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρούν οι Nanog, Oct4 και Sox2.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφραση του Nanog είναι πιθανό να ελέγχεται από τη STAT3 και το γονίδιο των «βραχύουρων ποντικών» (brachyury). Η έκφραση του τελευταίου είναι ενδεχόμενο να ελέγχεται από το μεταβολικό μονοπάτι Wnt/ β -catenin (Liu, Lu et al. 2007). Επομένως, ο μεταγραφικός παράγοντας Nanog εμπλέκεται στα μεταβολικά μονοπάτια LIF-STAT3 και Wnt/ β -catenin.

Μία επιπλέον πρωτεΐνη που φαίνεται ότι εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των εβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, είναι η φωσφοπρωτεΐνη p53. Η ενεργοποίησή της

καταστέλλει την έκφραση του Nanog, με συνέπεια να ευνοείται η διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Lin, Chao et al. 2005).

1.3.6.8 Κυτταρικός κύκλος

Ένα από τα χαρακτηριστικά των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων είναι ότι ο κυτταρικός τους κύκλος διαφέρει από αυτό των σωματικών κυττάρων. Η σημαντικότερη από τις διαφορές είναι η μικρότερη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ο κυτταρικός κύκλος διαρκεί 15-16 ώρες και στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του μύος 10 ώρες. Η μικρή διάρκεια αποδίδεται κατά κύριο λόγο στη σύντομη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου.

Έχει βρεθεί ότι τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα είναι περισσότερο ευαίσθητα στη δράση του LIF ως παράγοντα διαφοροποίησης κατά τη διάρκεια της G1 φάσης (Lukaszewicz, Savatier et al. 2005). Επομένως μπορεί να υποθεθεί ότι η μικρή διάρκεια της G1 φάσης μειώνει τις πιθανότητες για διαφοροποιηθούν τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα.

Σε μοριακό επίπεδο οι διαφορές στον κυτταρικό κύκλο μεταξύ σωματικών και εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων αποδίδονται στο ότι στα σωματικά κύτταρα ο κυτταρικός κύκλος εξαρτάται από το μεταβολικό μονοπάτι p16^{ink4a}/cyclin D:Cdk4/Rb:E2F (Savatier, Lapillonne et al. 1996; Burdon, Smith et al. 2002;

White, Stead et al. 2005). Στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα τα σύμπλοκα cyclinE:Cdk2 και cyclinA:Cdk1 φαίνεται ότι είναι διαρκώς ενεργά με συνέπεια ο μιτωτικός κύκλος να συνεχώς προανατολισμένος στη διαίρεση του DNA (Stead, White et al. 2002).

1.3.6.9 Αλλαγές στη χρωματίνη και επιγενετικές αλλαγές

Κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης γίνονται αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων που εξαρτώνται και από ανακατατάξεις μεταξύ ευχρωματίνης και ετεροχρωματίνης. Κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων με ρετινοϊκό οξύ, παρατηρείται αύξηση στη τρι-μεθυλιωμένη λυσίνη 9 της ιστόνης H3, που αποτελεί δείκτη ετεροχρωματίνης και ταυτόχρονα παρατηρείται μείωση των επιπέδων των ακετυλιωμένων ιστονών H3 και H4, που αποτελούν δείκτη της ευχρωματίνης (Lee, Hart et al. 2004; Meshorer and Misteli 2006).

Η αποακετυλίωση στα μόρια λυσίνης των ιστονών οδηγεί σε σιώπηση της έκφρασης γονιδίων στην περιοχή της αποακετυλίωσης. Η αποακετυλάση της ιστόνης-1 (HDAC1) είναι από τα μόρια που έχουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των γονιδίων κατά στο ζυγωτό (Ma and Schultz 2008). Συμμετέχει μαζί με την αποακετυλάση της ιστόνης-2 (HDAC2) στο σχηματισμό του συμπλόκου NuRD (σύμπλοκο αποακετυλάσης των ιστονών και αναδιάταξης των νουκλεοσωμάτων) και ελέγχει τη γονιδιακή έκφραση, παρουσιάζοντας δράση

αποακετυλίωσης και μεθυλίωσης (Zhang, Ng et al. 1999). Το γεγονός αυτό του δίνει σημαντικό ρόλο στη βιολογία των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, οι HDAC1 και HDAC2 είναι συστατικά του συμπλόκου αποακετυλίωσης Nanog-Oct4 (NODE), το οποίο ελέγχει την έκφραση γονιδίων που έχουν ρόλο στη διατήρηση ιδιότητας των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων να μη δαιφοροοιούνται (Liang, Wan et al. 2008).

Έχει βρεθεί ότι στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα και στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του μυός, υπάρχει μια δυναμική κατάσταση μεταξύ της τριμεθυλιωμένης ιστόνης H3 στη λυσίνη 27 (H3K27me3) και της τριμεθυλιωμένης ιστόνης H3 στη λυσίνη 4 (H3K4me3). Η H3K4e3 ευνοεί την έκφραση των γονιδίων, ενώ η H3K27me3 την καταστέλλει (Bernstein, Mikkelsen et al. 2006; Pan, Tian et al. 2007; Zhao, Han et al. 2007). Η έκφραση των γονιδίων της οικογένειας Hox, η λειτουργία των οποίων σχετίζεται με την ανάπτυξη του οργανισμού κατά τον επιμήκη άξονα, επηρεάζεται από αυτή τη δυναμική μεταβολή της χρωματίνης (Boyer, Lee et al. 2005; Boyer, Plath et al. 2006; Lee, Jenner et al. 2006).

Η δράση των πρωτεϊνών της οικογένειας Polycomb (PcG), φαίνεται ότι έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των ιδιοτήτων των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται δίνοντας πανομοιότυπους απογόνους και να είναι ολοδύναμα. Οι PcG διευκολύνουν την ανακατάταξη της χρωματίνης και τη

δημιουργία των νουκλεοσωμάτων. Σχηματίζουν δύο κύρια συσσωματώματα που έχουν ανασταλτικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση, τα PRC1 και PRC2. Τα συσσωματώματα αυτά λειτουργούν αναστέλλοντας την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων και πρωτεϊνών που επάγουν τη διαφοροποίηση. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται και οι Nanog και Oct4 (Bernstein, Mikkelsen et al. 2006; Boyer, Plath et al. 2006; Buszczak and Spradling 2006; Lee, Jenner et al. 2006).

Ένας επιπλέον επιγενετικός μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η σιώπηση της έκφρασης των γονιδίων και επομένως και η ρύθμισή της, είναι η μεθυλίωση του DNA. Η μεθυλίωση πραγματοποιείται από τις μέθυλ-τρανσφεράσες του DNA (Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b) στα νησίδια 5'-κυτοσίνης-φώσφο-γουανίνης (CpG), με μεθυλίωση της κυτοσίνης. Κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων παρατηρείται μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων των Nanog και Oct4 (Li, Pu et al. 2007).

1.3.6.10 Μικρο-RNA

Τα μικρο-RNA (miRNAs) είναι προϊόντα μεταγραφής που αποτελούνται από 20-25 νουκλεοτίδια, δε μεταφράζονται και λειτουργούν ελέγχοντας την έκφραση άλλων γονιδίων.

Έχουν βρεθεί miRNAs τα οποία φαίνεται ότι σχετίζονται με την κατάσταση έλλειψης διαφοροποίησης των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Τα miRNAs

φαίνεται ότι συνδέονται με τους υποκινητές των γονιδίων των μεταγραφικών παραγόντων που έχουν λειτουργικό ρόλο στη συντήρηση των ιδιοτήτων των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, όπως ο Nanog, ο Oct4 και ο Sox2 (Tay, Zhang et al. 2008). Ταυτόχρονα, οι ίδιοι μεταγραφικοί παράγοντες ελέγχουν την έκφραση των miRNAs (Marson, Levine et al. 2008; Barroso-del Jesus, Lucena-Aguilar et al. 2009).

Κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων με ρετινοϊκό οξύ παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των miRNAs miR-134, mir-296 και miR-470, τα οποία συνδέονται με τους υποκινητές των μεταγραφικών παραγόντων Nanog, Oct4 και Sox2 (Tay, Tam et al. 2008). Το miR-290 ρυθμίζει τη μεθυλίωση του γονιδίου του Oct4 κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Sinkkonen, Hugenschmidt et al. 2008). Επιπλέον, το miR-124 φαίνεται να σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων προς κύτταρα του νευρικού συστήματος (Visvanathan, Lee et al. 2007).

1.3.7 Προοπτική για θεραπεία με εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα

Η μεταμόσχευση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων για τη θεραπεία ασθενειών ή την αποκατάσταση τραυμάτων αποτελεί ζητούμενο και αντικείμενο μελέτης. Στα πλεονεκτήματά τους περιλαμβάνονται ο ολοδύναμος χαρακτήρας τους, η ικανότητά τους να «διορθώνουν» μεταλλάξεις που οδηγούν σε γενετικές

ανωμαλίες και οι μεγάλες δυνατότητες εφευρεσιμότητας που έχουν. Στα μειονεκτήματά τους περιλαμβάνονται το μικρό ποσοστό επιβίωσης όταν μεταμοσχεύονται, η πιθανότητα να προκαλέσουν αντίδραση απόρριψης στον ξενιστή, η πιθανότητα επιμόλυνσης από υλικά της κυτταροκαλλιέργειας ή από κύτταρα της τροφικής στοιβάδας, η πιθανότητα να εξελιχθούν σε τερατώματα μετά τη μεταμόσχευσή τους, η πιθανότητα να μην αποκτήσουν λειτουργικότητα (Bel, Planat-Bernard et al.; Dai, Huang et al.; Deuse, Seifert et al.; Lin, Fu et al.; Martinez-Morales, Revilla et al.; Song, Yoon et al.; Xiong, Hill et al.; Smith 2001; Rideout, Hochedlinger et al. 2002; Swijnenburg, Schrepfer et al. 2008; Swijnenburg, Schrepfer et al. 2008).

Εκτός από τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα στις μεταμοσχεύσεις χρησιμοποιούνται και τα επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs). Έχουν προέλθει από ινοβλάστες στους οποίους έχει με τεχνικά πραγματοποιείται υπερέκφραση των γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων. Στα ανθρώπινα iPSCs υπερεκφράζονται οι Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 (Kruppel-like factor 4) και c-Myc ή εναλλακτικά οι Nanog και Lin28 (Takahashi, Tanabe et al. 2007; Yu, Vodyanik et al. 2007). Η χρήση αυτών των κυττάρων πλεονεκτεί στην έρευνα, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλα για πειράματα στο εργαστήριο δίνοντας μεγαλύτερη αξιοπιστία στα αποτελέσματα. Επιπρόσθετα δίνεται η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν για αυτόλογη μεταμόσχευση. Στα μειονεκτήματά τους

συγκαταλέγεται το γεγονός ότι κατά την αυτόλογη μεταμόσχευσή τους μεταφέρουν τυχόν μεταλλάξεις που ήδη υπάρχουν στο άτομο που πάσχει καθώς προέρχονται από τον πάσχοντα οργανισμό. Επίσης παρουσιάζουν πολύπλοκους μηχανισμούς διαφοροποίησης γεγονός που δυσκολεύει τη πιθανότητα να ελεγχθούν κατά τη διαφοροποίησή τους, παρουσιάζουν μικρό ποσοστό επαγωγής και υπάχει ο κίνδυνος να εξελιχθούν σε τεράτωμα (Brunt, Weisel et al.; Martinez-Morales, Revilla et al.; Maherali and Hochedlinger 2008). Η γνώση για τα iPSCs και η εξέλιξη της έρευνας για αυτά γίνεται με γρήγορους ρυθμούς. Επιπλέον έχει επιτευχθεί η δημιουργία μυ προερχομένου από iPSCs, περίπου τρία χρόνια μετά την εφεύρεσή τους (Boland, Hazen et al. 2009; Kang, Wang et al. 2009; Zhao, Li et al. 2009).

Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) αποτελούν μία επιπλέον πηγή βλαστικών κυττάρων για μεταμόσχευση για θεραπευτικούς σκοπούς. Είναι πολυδύναμα και έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε κύτταρα της ερυθράς, λεμφικής και μυελικής σειράς (Martinez-Morales, Revilla et al.; Kondo, Wagers et al. 2003). Η λήψη τους μπορεί να γίνει από το περιφερικό αίμα, το μυελό των οστών και από την κυκλοφορία του ομφάλιου λώρου. Η απομόνωση και αναγνώρισή τους γίνεται με τη βοήθεια επιφανειακών αντιγόνων, όπως το CD34. Τα πλεονεκτήματά τους είναι ότι είναι πολυδύναμα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αυτόλογη μεταμόσχευση, υπάρχουν τρόποι απομόνωσής

τους και έχουν πολλές δυνατότητες εφαρμογών. Τα μειονεκτήματά τους είναι ότι περιορίζονται μόνο στις αιμοποιητικές σειρές, είναι δύσκολο να συντηρηθούν εκτός του οργανισμού, απομονώνονται σε μικρούς αριθμούς και μεταφέρουν τις πιθανές μεταλλαγές του DNA του πάσχοντα οργανισμού, στην περίπτωση της αυτόλογης μεταμόσχευσης (Brunt, Weisel et al.; Ha, Klemen et al.; Li, Cohen et al.; Sun, Zhang et al.; Nygren, Jovinge et al. 2004; Fujita, Mori et al. 2007; Templin, Kotlarz et al. 2008). Οι έρευνες σε πειραματόζωα δείχνουν ότι τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τη θεραπεία σε παθήσεις του νευρικού συστήματος, όπως οι τραυματικές βλάβες της σπονδυλικής στήλης, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και η νόσος Alzheimer's (Borlongan, Glover et al.; Martinez-Morales, Revilla et al.; Taguchi, Soma et al. 2004; Nishio, Koda et al. 2006; Nikolic, Hou et al. 2008).

Μια επιπλέον πηγή πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων είναι τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs). Απομονώνονται από το μυελό των οστών, το περιφερικό αίμα, το λιπώδη ιστό, το αίμα που κυκλοφορεί στα αγγεία του ομφάλιου λώρου. Έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε ιστούς που προέρχονται από το μεσέγχυμα (οστικός, χονδρικός, λιπώδης) (Joyce, Annett et al.; Zhang, Tan et al.). Αναφέρεται ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν σε χολινεργικούς (Zhang, Tan et al.) και ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Barzilay, Kan et al. 2008; Chen, He et al. 2009). Έχουν παρακρινικές και αυτοκρινικές ιδιότητες

και παράγουν τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), τον ηπατικό αυξητικό παράγοντα (HGF) και το αυξητικό παράγοντα τύπου ινσουλίνης (IGF), οι οποίοι συμβάλλουν στην αγγειογένεση και την επιδιόρθωση των ιστών (Hoch, Binder et al.; Martinez-Morales, Revilla et al.; Park, Lim et al.; Park, Kim et al.). Εκτός της παρακρινικής και αυτοκρινικής ιδιότητάς τους τα πλεονεκτήματα της χρήσης τους είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αυτόλογη μεταμόσχευση, μπορούν να μεταναστεύουν στους κατεστραμένους ιστούς (Teo, Ankrum et al.; Karp and Leng Teo 2009) και υπάρχουν δοκιμασμένοι μέθοδοι απομόνωσής τους. Τα μειονεκτήματα της χρήσης τους είναι ότι μεταφέρουν τις πιθανές μεταλλαγές του DNA του πάσχοντα οργανισμού, στην περίπτωση της αυτόλογης μεταμόσχευσης, η απομόνωσή τους παρουσιάζει δυσκολίες και έχουν μικρό ποσοστό διαφοροποίησης (Brunt, Weisel et al.; Lee, Shah et al.; Miyahara, Nagaya et al. 2006; Hare, Traverse et al. 2009). Χρησιμοποιούνται στην έρευνα για την αποκατάσταση των βλαβών που έχει υποστεί το μυοκάρδιο μετά από έμφραγμα (Miyahara, Nagaya et al. 2006; Hare, Traverse et al. 2009) Στο νευρικό σύστημα χρησιμοποιούνται στην έρευνα για την αποκατάσταση του εγκεφαλικού ιστού μετά από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (Martinez-Morales, Revilla et al.; Tang, Yasuhara et al. 2007).

Μια άλλη μορφή πολυδύναμων κυττάρων, τα οποία χρησιμοποιούνται στην έρευνα των κυτταρικών μεταμοσχεύσεων είναι τα ενδοθηλιακά προγονικά

κύτταρα. Προέρχονται από κύτταρα του μυελού που έχουν περάσει στην αγγειακή κυκλοφορία. Έχει βρεθεί ότι έχουν ιδιότητες αγγειογένεσης (Werner, Kosiol et al. 2005). Διαθέτουν παρακρινικές ιδιότητες όπως τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα. Η χρήση τους μειωνεκτεί ως προς το γεγονός ότι αποτελούν ένα μεικτό πληθυσμό που είναι δύσκολο να διαχωριστεί, υπάρχουν δυσκολίες να καθοριστούν αντιγόνα επιφανείας που να επιτρέπουν το διαχωρισμό τους, υπάρχουν σε μικρές ποσότητες και μεταφέρουν τις πιθανές μεταλλαγές του DNA του πάσχοντα οργανισμού, στην περίπτωση της αυτόλογης μεταμόσχευσης (Brunt, Weisel et al.; Richardson and Yoder). Εξαιτίας των δυνατοτήτων τους για αγγειογένεση χρησιμοποιούνται στην έρευνα για την αποκατάσταση βλαβών που προέρχονται από την ισχαιμική καρδιοπάθεια (Richardson and Yoder).

Τέλος αντικείμενο των ερευνών για μεταμόσχευση αποτελούν τα πρόδρομα κύτταρα που είναι ειδικά για συγκεκριμένα όργανα. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα καρδιακά βλαστικά κύτταρα, τα παγκρεατικά βλαστικά κύτταρα, τα νευρικά βλαστικά κύτταρα, οι μυοβλάστες του ερειστικού συστήματος. Γίνονται έρευνες με στόχο τη θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας, της ιστικής βλάβης που προέρχεται από το έμφραγμα του μυοκαρδίου, το σακχαρώδη διαβήτη, τις μυοπάθειες, τις βλάβες που δημιουργούνται σε αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, σε τραυματισμούς του νωτιαίου μυελού, στη νόσο Alzheimer's. Χρησιμοποιούνται για αυτόλογη μεταμόσχευση και όπως αναφέρθηκε παρουσιάζουν εξειδίκευση ως

προς το όργανο στο οποίο δρουν. Η χρήση τους μειονεκτεί ως προς το γεγονός ότι μεταφέρουν τις πιθανές μεταλλαγές του DNA του πάσχοντα οργανισμού, στην περίπτωση της αυτόλογης μεταμόσχευσης, βρίσκονται σε μικρές ποσότητες, υπάρχουν προβλήματα στην ταυτοποίησή τους και εξαιτίας και αυτού του λόγου υπάρχουν δυσκολίες στην απομόνωσή τους (Lee, White et al.; Leri, Kajstura et al.) (Smukler, Arntfield et al.).

1.4 Μοριακοί μηχανισμοί που σχετίζονται με τη διαδικασία διαφοροποίησης προς νευρώνες στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών

Η νευρογένεση στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών είναι μια σύνθετη διαδικασία που πειλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό νευρικών βλαστικών κυττάρων, την εξειδίκευση της διαφοροποίησης προς συγκεκριμένη νευρωνική σειρά, τη διαδικασία της διαφοροποίησης, τη μετανάστευση, την απόκτηση λειτουργικότητας και τη συμμετοχή στο νευρωνικό δίκτυο (Gage 2000).

Η νευρογένεση στον εγκέφαλο του ενήλικου θηλαστικού συμβαίνει σε δύο, κυρίως, περιοχές του εγκεφάλου. Στην υποκοιλιακή περιοχή των πλάγιων κοιλιών (SVZ) και στην υποκοκκιώδη περιοχή (SGZ) της οδοντωτής έλικας (DG) του ιπποκάμπου (Ming and Song).

Στην SVZ περιοχή τα επενδυματικά κύτταρα των πλάγιων κοιλιών και τα υποεπενδυματικά κύτταρα, που εκφράζουν στην επιφάνειά τους τις πρωτεΐνες

GFAP και προμινίνη-1 (prominin-1), ονομάζονται κύτταρα τύπου B και έχουν ρόλο εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Διαιρούνται ασύμμετρα στο τοίχωμα των πλάγιων κοιλιών και δίνουν γένεση στα κύτταρα που ενισχύουν τη μετανάστευση και ονομάζονται κύτταρα τύπου C. Αυτά εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και διαιρούνται στα κύτταρα τύπου A που εκφράζουν στην επιφάνειά τους το πολυσιαλικό μόριο προσκόλλησης νευρωνικών κυττάρων (PSA-NCAM) τα οποία μεταναστεύουν στο οσφρητικό βολβό και δίνουν διαφοροποιούνται σε γκαμπαεργικούς και ντοπαμινεργικούς διάμεσους νευρώνες (Faigle and Song).

Στην SGZ περιοχή τα ακτινωτά κύτταρα τύπου γλοίας έχουν ιδιότητες νευρικών βλαστικών κυττάρων. Εκφράζουν τις πρωτεΐνες Nestin, GFAP και Sox2 και είναι ικανά για να διαφοροποιηθούν προς νευρώνες και αστροκύτταρα (Bonaguidi, Wheeler et al.). Η ασυμμετρική τους διαίρεση οδηγεί στη δημιουργία των κυττάρων τύπου 2, τα οποία μπορούν να δώσουν γένεση μόνο σε νευρικά κύτταρα. Εκφράζουν τις πρωτεΐνες Nestin και Sox2 αλλά όχι τη GFAP (Kempermann, Jessberger et al. 2004). Η διαίρεση των κυττάρων τύπου 2, δίνει γένεση στους νευροβλάστες οι οποίοι εκφράζουν τις πρωτεΐνες διπλοκορτίνη (doublecortin) και PSA-NCAM. Αυτά τα κύτταρα διαφοροποιούνται, στη συνέχεια, στα γλουταμεργικά κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου (Seki and Arai 1993; Encinas and Enikolopov 2008).

Η νευρογένεση στον εγκέφαλο του ενηλικού θηλαστικού ελέγχεται από ένα σύνολο από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες οι οποίοι δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον, που την ευνοούν και που ονομάζεται χαρακτηριστικά, «νευρογενής κόγχη» (neurogenic niche). Τα μικροπεριβάλλοντα στις SVZ και SGZ περιοχές επιτρέπουν τη διαφοροποίηση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων σε νευρώνες (Faigle and Song). Δεδομένα από πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο δείχνουν ότι σε αυτή τη διαδικασία σημαντικό ρόλο έχουν τα αστροκύτταρα του ιπποκάμπου στα ενήλικα θηλαστικά (Song, Stevens et al. 2002). Στη διαδικασία του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των προγονικών κυττάρων των νευρώνων έχουν ρόλο αρκετά μόρια. Παρακάτω γίνεται αναφορά σε αυτά και στον τρόπο που επηρεάζουν τη νευρογένεση.

Η οικογένεια των πρωτεϊνών Wnt αποτελείται από ένα σύνολο από γλυκοπρωτεΐνες που έχουν αυτοκρινή και παρακρινή δάση. Η σύνδεση του συνδέτη Wnt με τον υποδοχέα του Frizzled και η μετέπειτα σύνδεση αυτού του συμπλέγματος με τον συν-υποδοχέα του υποδοχέα της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών 5/6 (LPR5/6), οδηγεί στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Dishevelled (Dvl). Αυτή με τη σειρά της απενεργοποιεί την κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου-3β (GSK3β) με συνέπεια να μην καταβολίζεται η β-κατενίνη (β-catenin). Η β-catenin περνά στον πυρήνα και συνδέεται με τον παράγοντα των T-λεμφοκυττάρων/λεμφικό παράγοντα ενίσχυσης της σύνδεσης (TCF/LEF). Αυτό το

σύμπλεγμα ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων Wnt (Faigle and Song). Η Wnt3 εκφράζεται έντονα στα κύτταρα της DG, ενώ έχει αποδειχθεί δραστηριότητα του μεταβολικού μονοπατιού Wnt/ β -catenin σε κύτταρα ιπποκάμπου που καλλιεργούνται σε τρυβλίο, καθώς και στα κοκκιώδη κύτταρα της SGZ περιοχής (Lie, Colamarino et al. 2005).

Η ενεργοποίηση του μεταβολικού μονοπατιού Wnt/ β -catenin στα αστροκύτταρα ευνοεί το πολλαπλασιασμό των νευροβλαστών στην SGZ περιοχή (Lie, Colamarino et al. 2005). Φαίνεται ότι σε αυτό το μηχανισμό χρειάζεται η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Διαταραγμένη στη Σχιζοφρένεια-1 (disrupted in schizophrenia-1, DISC1), η οποία αναστέλλει τη δράση της GSK3 β (Mao, Ge et al. 2009). Επίσης στο μοριακό μηχανισμό του πολλαπλασιασμού των νευροβλαστών της SGZ περιοχής συμμετέχει και ο ορφανός πυρηνικός υποδοχέας Tlx, ο οποίος ενεργοποιεί τη γονιδιακή έκφραση του Wnt7a (Qu, Sun et al.).

Εκτός από τον πολλαπλασιασμό το μεταβολικό μονοπάτι Wnt/ β -catenin οδηγεί στη διαφοροποίηση των προδρόμων κυττάρων των νευρώνων της SGZ περιοχής, με τη συμμετοχή του μεταγραφικού παράγοντα NeuroD1 (Kuwabara, Hsieh et al. 2009). Αυτός ο μηχανισμός δεν ισχύει σε εκείνα τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα που εκφράζουν τη Sox2 (Kuwabara, Hsieh et al. 2009). Το μεταβολικό μονοπάτι Wnt/ β -catenin συμμετέχει και στη νευρογένεση στην SGZ περιοχή,

όπως φαίνεται από πειράματα υπερέκφρασης των πρωτεϊνών Wnt3a και Wnt5a (Yu, Kim et al. 2006).

Ένα επιπλέον μεταβολικό μονοπάτι που συμμετέχει στη νευρογένεση είναι αυτό των πρωτεϊνών Notch. Οι Notch είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που συνδέονται με τα μόρια-προσδέτες τους που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη των γειτονικών κυττάρων. Η σύνδεση αυτή ενεργοποιεί τη γ-σεκρετάση με συνέπεια να καταβολίζεται ο υποδοχέας και να ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα το ενδοκυττάριο τμήμα του (NICD) Αυτό μεταφέρεται στον πυρήνα όπου σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη ανασυνδιασμένου σήματος συνδεόμενη στη J περιοχή της K ανοσοσφαιρίνης (RBPj). Το σύμπλοκο αυτό δρα ως μεταγραφικός παράγοντας (Faigle and Song).

Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι το μονοπάτι Notch είναι ενεργό στις SVZ και SGZ ζώνες κυττάρων των ενηλίκων θηλαστικών (Imayoshi, Sakamoto et al.; Stump, Durrer et al. 2002; Breunig, Silbereis et al. 2007). Πειράματα στα οποία έγινε σίγαση του γονιδίου της RBPj, έδειξαν ότι το Notch μονοπάτι είναι αναγκαίο για τη διαφοροποίηση των τύπου B κυττάρων της SVZ περιοχής σε κύτταρα τύπου C (Imayoshi, Sakamoto et al.). Επιπρόσθετα το Notch μεταβολικό μονοπάτι χρειάζεται για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της περιοχής SGZ που εκφράζουν nestin, τόσο στο εργαστήριο όσο και στον οργανισμό (Ables, Decarolis et al.). Στα ίδια κύτταρα η υπερέκφραση του NICD τμήματος οδήγησε

σε πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων στην SGZ περιοχή (Breunig, Silbereis et al. 2007). Στην ίδια κυτταρική περιοχή η απενεργοποίηση της πρωτεΐνης RBPj οδήγησε στη διαφοροποίηση των προδρόμων νευρικών κυττάρων (Ehm, Goritz et al.).

Τέλος το μεταβολικό μονοπάτι Notch φαίνεται να έχει ρόλο στη δημιουργία των νευριτών. Πειράματα σίγασης του Notch-1 γονιδίου στα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου έδειξαν μείωση στις δενδριτικές διακλαδώσεις, ενώ η υπερέκφραση του ίδιου γονιδίου στα ίδια κύτταρα οδήγησε σε αύξηση των δενδριτικών διακλαδώσεων (Ables, Decarolis et al.).

Η πρωτεΐνη (Shh) έχει ρόλο στη νευρωνική διαφοροποίηση του προμετωπιαίου λοβού, τη ντοπαμινεργική διαφοροποίηση του μεσεγκέφαλου και στον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων νευρικών κυττάρων στην παρεγκεφαλίδα (Ericson, Muhr et al. 1995; Hynes, Porter et al. 1995; Wechsler-Reya and Scott 1999). Διαθέτει δύο υποδοχείς τον Ptc (Patched) και τον Smo (Smoothened). Ο τελευταίος είναι συζευγμένος με G-πρωτεΐνη. Απουσία της Shh ο Ptc αναστέλλει το μεταβολικό μονοπάτι που ξεκινά από τον Smo (Faigle and Song).

Οι υποδοχείς της Shh εκφράζονται στα κύτταρα του ιπποκάμπου και στα προγονικά νευρικά κύτταρα που βρίσκονται σε αυτόν (Traiffort, Charytoniuk et al. 1998; Lai, Kaspar et al. 2003). Υπερέκφραση της Shh στα κύτταρα της οδοντωτής έλικας οδήγησε σε πολλαπλασιασμό τα προγονικά νευρικά κύτταρα

της περιοχής αυτής (Lai, Kaspar et al. 2003). Αλλά και στην SVZ περιοχή η αναστολή του μεταβολικού μονοπατιού με σίγαση του γονιδίου του Smo, οδήγησε σε μείωση του ποσοστού πολλαπλασιασμού των προγονικών νευρικών κυττάρων (Machold, Hayashi et al. 2003). Επομένως η Shh έχει λειτουργικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των προγονικών νευρικών κυττάρων στην SGV και στην SVZ περιοχή. Επίσης το μεταβολικό μονοπάτι της Shh, ρυθμίζει εκτός από τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων τύπου A στην SGZ περιοχή προς το οσφρητικό βολβό (Balordi and Fishell 2007; Angot, Loulier et al. 2008).

Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες φαίνεται να ρυθμίζουν τη νευρογένεση. Ο εγκεφαλικός νευροτροφικός αυξητικός παράγοντας (BDNF) είναι ένας από αυτούς. Σε πειράματα στα οποία έγινε έγχυση του BDNF στις πλάγιες κοιλίες ή υπερέκφρασή του στα κύτταρα της SVZ περιοχής παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού της νευρογένεσης (Zigova, Pencea et al. 1998; Benraiss, Chmielnicki et al. 2001). Ο TrkB είναι υποδοχέας του BDNF και ανήκει στην κατηγορία των υποδοχέων της τυροσίνης. Πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν προγονικά νευρικά κύτταρα τα οποία στερούνταν τον TrkB έδειξαν ότι το μεταβολικό μονοπάτι που ξεκινά από αυτόν είναι σημαντικό για την επιβίωση, τον αριθμό των διακλαδώσεων των νευριτών, και τη λειτουργικότητα των νεοδημιουργούμενων νευρώνων (Bergami, Rimondini et al. 2008).

Ένας επιπλέον νευροτροφικός παράγοντας είναι η νευροτροφίνη-3 (NT-3). Ο υποδοχέας της είναι ο TrkC. Πειράματα με πειραματόζωα στα οποία εφαρμόστηκε η τεχνική της ελεγχόμενης σίγασης έδειξαν ότι η έλλειψη της NT-3 επιδρά αρνητικά στη διαφοροποίηση αλλά όχι στον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων του ιπποκάμπτου (Shimazu, Zhao et al. 2006).

Ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών-2 (FGF-2) και ο υποδοχέας του FGFR1 φαίνεται ότι επηρεάζουν τη νευρογένεση στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου. Έγχυση του FGF-2 στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό των πλάγιων κοιλιών οδήγησε σε νευρογένεση, ενώ η σίγαση του γονιδίου του FGFR1 σε μύες, προκάλεσε μείωση του ποσοστού πολλαπλασιασμού των προγονικών νευρικών κυττάρων καθώς και μείωση της νευρογένεσης (Rai, Hattiangady et al. 2007; Zhao, Li et al. 2007).

Ο αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης-1 (IGF-1) έχει ρόλο στη νευρογένεση. Υποδόρια ή ενδοκοιλιακή έγχυση του IGF-1 σε επίμυες έχει ως συνέπεια την αύξηση του ποσοστού νευρογένεσης στην SGZ περιοχή (Aberg, Aberg et al. 2000; Lichtenwalner, Forbes et al. 2001). Επιπλέον ο IGF-1 συμμετέχει στον έλεγχο της μετανάστευσης των νευροβλαστών από την SVZ περιοχή στον οσφρητικό βολβό (Hurtado-Chong, Yusta-Boyo et al. 2009). Στο εργαστήριο ο IGF-1 προωθεί τον πολλαπλασιασμό των προγονικών νευρικών κυττάρων μέσω ενός ενδοκυττάρου μηχανισμού που εξαρτάται από τη δράση της MAPK (Aberg, Aberg et al. 2003).

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) συμμετέχει στον έλεγχο της νευρογένεσης. Διαθέτει δύο υποδοχείς με δράση κινάσης της τυροσίνης, τους Flk-1 και Flt-1 (Faigle and Song). Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι ο VEGF επάγει τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων των νευρώνων στις SVZ και SGZ περιοχές, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει τον Flk-1 υποδοχέα του (Jin, Zhu et al. 2002). Επίσης η έγχυση VEGF στις πλάγιες κοιλίες του εγκεφάλου σε ενήλικες επίμυες, συνεπάγεται την αύξηση του ποσοστού της νευρογένεσης στις SVZ και SGZ περιοχές (Jin, Zhu et al. 2002).

Οι μορφογεννητικές πρωτεΐνες των οστών (BMPs) αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών με πάνω από 20 μέλη, που ανήκουν στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης-β (TGFβ) (Faigle and Song). Η ύπαρξή τους στο μικροπεριβάλλον διαφοροποίησης, ευνοεί την διαφοροποίηση προς κύτταρα γλοίας και αναστέλλει τη διαφοροποίηση προς νευρώνες (Lim, Tramontin et al. 2000; Bonaguidi, McGuire et al. 2005). Η παραγωγή της Noggin από τα επενδυματικά κύτταρα των πλάγιων κοιλιών, έχει σα συνέπεια την αναστολή της δράσης των BMPs και τη μετατροπή των πρόδρομων κυττάρων της SVZ περιοχής σε νευρώνες (Lim, Tramontin et al. 2000).

Οι νευριδιαβιβαστές είναι μικρά μόρια το οποία αποτελούν τη βάση για τη χημική επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων. Στη νευρογένεση εμπλέκονται το γλουταμικό οξύ, το γ-άμινο-βουτυρικό οξύ (GABA) και η ντοπαμίνη (Faigle and Song).

Σε πειράματα σίγασης του γονιδίου των NMDA υποδοχέων του γλουταμικού οξέος, στα κύτταρα της SVZ περιοχής, οι νευροβλάστες οδηγήθηκαν σε απόπτωση. Φαίνεται λοιπόν ότι το γλουταμικό οξύ που παράγεται από τα αστροκύτταρα σε αυτή την περιοχή συνδράμει, μέσω των NMDA υποδοχέων του στην επιβίωση των νευροβλαστών (Platel, Dave et al.). Επιπρόσθετα με μεθόδους στις οποίες γίνεται σίγαση του γονιδίου του NMDA υποδοχέα σε ξεχωριστά κύτταρα, βρέθηκε ότι η επιβίωση των νεοδημιουργούμενων νευρώνων, λίγες ώρες μετά τη γένεσή τους, εξαρτάται από τη δραστηριότητα του γλουταμικού οξέος, μέσω των δικών τους NMDA υποδοχέων (Tashiro, Sandler et al. 2006).

Ο GABA είναι ο κύριος νευροδιαβιβαστής που η σύνδεσή του στο νευρώνα προκαλεί μείωση της νευρωνικής του δραστηριότητας. Ο υποδοχέας του GABA που φαίνεται να έχει το σημαντικότερο ρόλο στη νευρογένεση, είναι ο GABA_A. Πρόκειται για ιονοτρόπο υποδοχέα οποίος μετά τη σύνδεση με το GABA επιτρέπει τη διέλευση ιόντων χλωρίου (Faigle and Song).

Σε κύτταρα της SVZ περιοχής που προέρχονται από νεογέννητους μύες, έχει βρεθεί ότι η απελευθέρωση του GABA από τους νευροβλάστες συνεπάγεται τον περιορισμό του ποσοστού πολλαπλασιασμού των κυττάρων τύπου B που εκφράζουν GFAP. Αυτό γίνεται μέσω του υποδοχέα GABA_A (Markwardt, Wadiche et al. 2009). Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένας αναδραστικός μηχανισμός ελέγχου του πολλαπλασιασμού των νευροβλαστών. Σε ενήλικους

μύες οι διάμεσοι νευρώνες που εκφράζουν παραλβουμίνη παράγουν GABA το οποίο συντηρεί τα ακτινωτά τύπου γλοίας κύτταρα, σε κατάσταση αναμονής ως προς τον πολλαπλασιασμό τους (Song, Zhong et al.). Σε αυτή τη διαδικασία σημαντικό ρόλο έχει η γ -2 υπομονάδα του GABA_A (Song, Zhong et al.).

Η ντοπαμίνη είναι κατεχολαμίνη και εμπλέκεται στην οντογένεση του οργανισμού των θηλαστικών και στην κίνηση, το συναίσθημα και στο σύστημα επιβράβευσης στον εγκέφαλο των ενηλίκων. Οι υποδοχείς της διακρίνονται στους τύπου D1 (D1 και D5) και στους τύπου D2 (D2, D3 και D4) (Faigle and Song). Σε πείραμα στο οποίο τα κύτταρα τύπου C της SVZ περιοχής που εκφράζουν τον EGFR, έχουν υποστεί απονεύρωση των ντοπαμινεργικών απολήξεων, παρατηρήθηκε μείωση στο ποσοστό πολλαπλασιασμού των προδρόμων νευρικών κυττάρων (Baker, Baker et al. 2004; Winner, Geyer et al. 2006). Αντίθετα ερεθισμός των τύπου D2 υποδοχέων στα κύτταρα τύπου C που εκφράζουν τον EGFR, συνεπάγεται αύξηση του ποσοστού πολλαπλασιασμού των πρόδρομων νευρικών κυττάρων στην SVZ περιοχή (Hoglinger, Rizk et al. 2004). Αντίστοιχα φαινόμενα παρατηρούνται στην SGZ περιοχή όταν ντοπαμινεργικά σήματα μεταφέρονται σε αυτή από την κοιλιακή περιοχή της καλύπτρας (Hoglinger, Rizk et al. 2004).

Ένα σύνολο από μεταγραφικούς παράγοντες φαίνεται να έχουν σημασία στη νευρογένεση. Ο παράγοντας πρόσδεσης στο στοιχείο απάντησης προς το κυκλικό AMP (CREB), είναι μεταγραφικός παράγοντας και αποτελεί τελικό στόχο

φωσφορυλίωσης σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια, όπως το cAMP/PKA, το μεταβολικό μονοπάτι του NMDA υποδοχέα που διαμεσολαβείται από την καλμοδουλίνη, το μεταβολικό μονοπάτι των Trk υποδοχέων που διαμεσολαβείται από την MAP κινάση (Faigle and Song). Έχει βρεθεί ότι στον ιππόκαμπο η φωσφορυλίωση του CREB ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων των νευρώνων, και ευνοεί τη επιβίωση των νεοδημιουργημένων νευρώνων (Nakagawa, Kim et al. 2002; Nakagawa, Kim et al. 2002; Fujioka, Fujioka et al. 2004; Jagasia, Steib et al. 2009). Σε αυτό το συμπέρασμα έχουν οδηγήσει και πειράματα στα οποία έχει χρησιμοποιηθεί η απενεργοποιημένη μορφή του CREB (Jagasia, Steib et al. 2009). Αντίστοιχα και στην SVZ περιοχή η φωσφορυλίωση του CREB ευνοεί την επιβίωση, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των νευροβλαστών προς νευρώνες (Herold, Jagasia et al.; Giachino, De Marchis et al. 2005; Chiaramello, Dalmasso et al. 2007).

Ο Pax6 είναι μεταγραφικός παράγοντας που διαθέτει ομοιωτικό κουτί (homeobox). Υπερέκφραση της Pax6 σε κυτταρική καλλιέργεια νευροβλαστών που προέρχονταν από τον τελεγκέφαλο, οδήγησε αποκλειστικά σε διαφοροποίηση προς νευρώνες (Hack, Sugimori et al. 2004). Επίσης και στον εγκέφαλο των θηλαστικών δρα με τρόπο που δεσμεύει τους νευροβλάστες να διαφοροποιούνται αποκλειστικά σε νευρώνες (Hack, Saghatelyan et al. 2005).

Η πρωτεΐνη Achaete-scute ομόλογο-1 (Ascl1), είναι μεταγραφικός παράγοντας που έχει δομή έλικα-θηλειά-έλικα και φαίνεται να έχει ρόλο στη νευρογένεση (Faigle and Song). Στην SVZ περιοχή εκφράζεται αποκλειστικά σε κύτταρα τύπου C που διαφοροποιούνται σε διάμεσους νευρώνες γκαμπαεργικούς νευρώνες (Kim, Leung et al. 2007). Στην SGZ περιοχή εκφράζεται προσωρινά σε κύτταρα τύπου 2 τα οποία τελικά διαφοροποιούνται σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Kim, Leung et al. 2007). Η υπερέκφραση της Ascl1 στα προγονικά κύτταρα της SGZ περιοχής οδηγεί σε κύτταρα με ολιγοδενδρικό χαρακτήρα, παρά σε γλουταμεργικούς νευρώνες (Jessberger, Toni et al. 2008). Αυτό το δεδομένο είναι πολύ σημαντικό καθώς καταδεικνύει ότι η έκφραση ενός γονιδίου είναι ικανή να καθορίσει το δρόμο της διαφοροποίησης (Faigle and Song).

Ένας επιπλέον μεταγραφικός παράγοντας που έχει ρόλο στη νευρογένεση είναι ο «άπω-λιγότερο» 2 (Distal-less 2, Dlx2). Η δράση του περιορίζεται στην SVZ περιοχή (Brill, Snaryan et al. 2008). Συμβάλλει στη μετατροπή των κυττάρων τύπου B σε κύτταρα τύπου C (Suh, Obernier et al. 2009). Επίσης συμβάλλει στη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων της SVZ περιοχής σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Brill, Snaryan et al. 2008).

Ο πυρηνικός υποδοχέας Tlx συμβάλλει στη συντήρηση της ιδιότητας των νευρικών βλαστικών κυττάρων της SVZ περιοχής να πολλαπλασιάζονται και να και να μη διαφοροποιούνται (Liu, Belz et al. 2008). Υπάρχουν δεδομένα που

δείχνουν ότι αυτό επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση του μεταβολικού μονοπατιού Wnt/ β -catenin (Qu, Sun et al.).

Η νευρογένεση ρυθμίζεται και από την οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων Sox (Faigle and Song). Ο Sox2 είναι αναγκαίος για τον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων (Ferri, Cavallaro et al. 2004). Στην SVZ περιοχή η διαφοροποίηση των νευροβλαστών επιτυγχάνεται μετά από την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της Sox9, από το μικρο-RNA-124 (Cheng, Pastrana et al. 2009).

Ο μεταγραφικός παράγοντας «T-κουτί» εγκεφαλική πρωτεΐνη-2 (Tbr2), επηρεάζει τη νευρογένεση καθώς η παρουσία του είναι αναγκαία για τη διαφοροποίηση ακτινωτών κυττάρων τύπου γλοίας της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου, να διαφοροποιηθούν σε νευροβλάστες (Hodge, Nelson et al.).

Η νευρογένεση επηρεάζεται και από τη επίδραση του περιβάλλοντος. Επομένως, σε μοριακό επίπεδο εξαρτάται από τους επιγενετικούς μηχανισμούς της μεθυλίωσης του DNA και της ακετυλίωσης των ιστονών (Faigle and Song).

Η προσδεόμενη στη μέθυλο-CpG-περιοχή πρωτεΐνη-1 (MBD1), επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση εμποδίζοντας την προσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή. Η MBD1 προσδέεται στον υποκινητή του FGF-2 επιτρέποντας στο προγονικά κύτταρα της SGZ περιοχής να διαφοροποιηθούν (Li, Barkho et al. 2008). Ένας επιπλέον τρόπος με τον οποίο ευνοεί τη διαφοροποίηση είναι η

συμβολή της στη μείωση της έκφρασης του γονιδίου του μικρο-RNA-184 (Liu, Teng et al.).

Η προσδεόμενη στο μέθυλ-CpG πρωτεΐνη-2 (MeCP2) εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα των θηλαστικών. Η έλλειψή της στα κύτταρα της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου προκαλεί σοβαρά προβλήματα στην ωρίμανση των νευρώνων και στη δημιουργία συνάψεων (Smrt, Eaves-Egenes et al. 2007). Σε συνδιασμό με το Sox2 καταστέλλει την έκφραση του μικρο-RNA-137 με αποτέλεσμα να ευνοεί τη διαφοροποίηση προς νευρώνες (Szulwach, Li et al.).

Η πρωτεΐνη που ενεργοποιείται με τη διακοπή της ανάπτυξης και τη βλάβη του DNA 45 b (GADD45b) δρα υπέρ του πολλαπλασιασμού των προγονικών κυττάρων στον ιππόκαμπο και της δημιουργίας νευριτών στους νεοδημιουργηθέντες νευρώνες, μέσω της απομεθυλίωσης που προκαλεί σε γονίδια στόχους των μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιούνται από την επίδραση του BDNF και του FGF (Ma, Jang et al. 2009).

Ο BMI-1 είναι μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στη οικογένεια polycomb. Έχει δράση στα νευρικά βλαστικά κύτταρα ευνοώντας το πολλαπλασιασμό τους, καθώς καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου του αναστολέα της κινάσης εξαρτώμενης από την κυκλίνη, p16^{ink4a} (Molofsky, Pardal et al. 2003; Molofsky, He et al. 2005).

Η μέθυλτρανσφεράση των ιστονών μικτής-σειράς λευχαιμία-1(MLL1), έχει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των κυττάρων στην SVZ περιοχή, αλλά όχι στον πολλαπλασιασμό των νευροβλαστών, όπως δείχνουν πειράματα σε διαγονιδιακούς μύες. Σε αυτή τους τη λειτουργία είναι αναγκαία η ενεργοποίηση του γονιδίου του Sox2 (Lim, Huang et al. 2009).

FMRP είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών της νοητικής υστέρησης του συνδρόμου εύθραυστο X. Απώλεια της λειτουργικότητάς της στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπτου οδηγεί σε αύξηση της διαφοροποίησης προς αστροκύτταρα, και προκαλεί σοβαρές ελλείψεις στη διαδικασία της μάθησης (Guo, Allan et al.; Luo, Shan et al.). Στα νευρώνες του οσφρητικού βολβού είναι αναγκαία για τη δημιουργία των νευριτών (Scotto-Lomassese, Nissant et al.).

1.5 Δημιουργία δενδριτών και νευράξονα στα νευρικά κύτταρα

Οι νευρώνες αποτελούν τυπικό παράδειγμα κυττάρων που παρουσιάζουν πολικότητα. Συνήθως αποτελούνται από έναν άξονα που είναι μακρύς και λεπτός και από έναν ή περισσότερους δενδρίτες που κοντύτεροι και έχουν μεγαλύτερο πάχος. Στον τυπικό νευρώνα των θηλαστικών ο άξονας μεταφέρει την πληροφορία προς το στόχο και οι δενδρίτες υποδέχονται και προωθούν την εισερχόμενη πληροφορία (Caceres, Ye et al.).

Η δημιουργία του άξονα και των δενδριτών στους νευρώνες διέρχεται τρεις φάσεις. Η φάση 1 περιλαμβάνει μόνο το στάδιο 1. Η φάση 2 περιλαμβάνει τα στάδια 2 και 3. Η φάση 3 περιλαμβάνει τα στάδια 4 και 5 (εικόνα 1.5).

Φάση1

Σε αυτή τη φάση δημιουργείται ο πρώτος νευρίτης. Πειράματα σε νευρώνες ιπποκάμπου που αναπτύσσονταν σε καλλιέργεια έδειξαν ότι ο πρώτος νευρίτης έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να εξελιχθεί σε άξονα (de Anda, Meletis et al.; de Anda, Pollarolo et al. 2005; Calderon de Anda, Gartner et al. 2008) και ότι το σημείο που σχηματίζεται ο πρώτος νευρίτης καθορίζει και το σημείο στο οποίο θα αναπτυχθεί ο δεύτερος νευρίτης (Menchon, Gartner et al.; Calderon de Anda, Gartner et al. 2008). Επίσης αυτή η πρώτη πολικότητα που παρουσιάζει το κύτταρο φαίνεται να καθορίζει τη μετανάστευσή του και τη θέση του στον εγκέφαλο (Barnes and Polleux 2009).

Υπάρχουν έρευνες που δείχνουν ότι η θέση της ανάπτυξης του πρώτου νευρίτη καθορίζεται από τη θέση του συμπλέγματος κεντρόσωμα/κέντρο οργάνωσης των μικροσωληνίσκων (MTOC), του συμπλέγματος Golgi και των ενδοσωμάτων (de Anda, Meletis et al.; de Anda, Pollarolo et al. 2005; Calderon de Anda, Gartner et al. 2008).

Όμως υπάρχουν και έρευνες που δείχνουν ότι το σημείο του σχηματισμού του πρώτου νευρίτη δεν καθορίζεται από την ύπαρξη του κεντροσώματος (Stiess,

Maghelli et al.; Basto, Lau et al. 2006). Επίσης υπάρχουν έρευνες που δείχνουν ότι και το MTOC δεν καθορίζει τη θέση δημιουργίας του πρώτου νευρίτη (Distel, Hocking et al.). Σε συμφωνία με τα παραπάνω έχει δειχθεί ότι το MTOC και το σύμπλεγμα Golgi μετακινούνται προς την περιοχή δημιουργίας του πρώτου νευρίτη αφού έχει ξεκινήσει η διαδικασία (Gartner, Fornasiero et al.; Pollarolo, Schulz et al.).

Είναι επομένως ενδεχόμενο το κεντρόσωμα να μην καθορίζει τη θέση δημιουργίας του πρώτου νευρίτη. Μπορεί όμως και αυτό να ισχύει για ορισμένη κατηγορία νευρώνων και επομένως να είναι αναγκαία και άλλα πειράματα προτού να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα (Caceres, Ye et al.).

Η δημιουργία των νευριτών επηρεάζεται από την ύπαρξη της λαμινίνης και της καντερίνης (cadherin) που αποτελούν μόρια προσκόλλησης (Gartner, Fornasiero et al.; Pollarolo, Schulz et al.; Randlett, Poggi et al.). Ειδικά για τους νευρώνες που προέρχονται από τη Δροσόφιλα φαίνεται η συσσώρευση της καντερίνης στο σημείο δημιουργίας του νευρίτη προηγείται της συγκέντρωσης σε αυτό το σημείο του πρωτεϊνικού συμπλέγματος Par3/Bazooka, το οποίο προηγείται της συγκέντρωσης στο ίδιο σημείο της 4,5 διφώσφο-φωσφατίδουλο-ινοσιτόλης (Pollarolo, Schulz et al.). Έχει παρατηρηθεί ότι το σημείο στο οποίο συγκεντρώνεται το σύμπλεγμα προσκόλλησης ταυτίζεται με το επίπεδο της προηγούμενης μιτωτικής διαίρεσης (Pollarolo, Schulz et al.). Η υπόθεση είναι ότι

για τη δημιουργία του πρώτου νευρίτη χρησιμοποιούνται τα ένζυμα που είχαν χρησιμοποιηθεί για την κυτοκίνηση. Ένα από αυτά τα ένζυμα είναι το Aurora A, το οποίο είναι πρωτεΐνη σερίνης/θρεονίνης και φωσφορυλιώνει την Par3 (Khazaei and Puschel 2009).

Φάση 2

Αποτελείται από τα στάδια 2 και 3. Σε αυτή τη φάση γίνεται η μετάβαση από το συμμετρικό σχήμα στο ασυμμετρικό (εικ. 1.5). Ξεκινά με κυτταροσκελετικές αλλαγές και αλλαγές στην οργάνωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που συμβαίνουν στον αυξητικό κώνο του νευρίτη που θα εξελιχθεί στο μελλοντικό άξονα (Conde and Caceres 2009; Pfenninger 2009). Ο αυξητικός κώνος είναι ένας αγκαθωτός σχηματισμός στην άκρη του νευρίτη που κατευθύνει την αύξησή του. Στο μοριακό επίπεδο η μετάβαση στα στάδια 2 και 3 γίνεται με τη συγκέντρωση και ενεργοποίηση στον αυξητικό κώνο του μελλοντικού άξονα ενός συνόλου από συστατικά στα οποία περιλαμβάνονται ένας τουλάχιστον αυξητικός παράγοντας (TGFβ ή/και IGF-1) (Yi, Barnes et al.; Sosa, Dupraz et al. 2006), PI3K (Shi, Jan et al. 2003; Menager, Arimura et al. 2004; Shi, Cheng et al. 2004; Sosa, Dupraz et al. 2006), το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών ατελούς διαίρεσης (Par), το οποίο αποτελείται από τις Par1, Par2, Par3, Par4, Par5 Par6 και μία aPKC (Shi, Jan et al. 2003; Shi, Cheng et al. 2004; Suzuki and Ohno 2006) και τις πρωτεΐνες Rho (Pertz; Arimura and Kaibuchi 2007). Οι πρωτεΐνες που

επηρεάζονται από τη δράση των παραπάνω μορίων έχουν ρόλο στη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού και στη δημιουργία των συστατικών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αυτές είναι η πρωτεΐνη διαμεσολαβητής στην ανταπόκριση στην κολλαψίνη (CRMP2) (Fukata, Itoh et al. 2002), την πρωτεΐνη εξειδικευμένη στην κυτοκίνηση-7 (DOCK7) (Watabe-Uchida, John et al. 2006), τη σταθμίνη (stathmin) (Watabe-Uchida, John et al. 2006), την κινάση του ήπατος (LKB1) (Shelly and Poo), την GSK3β (Shi, Cheng et al. 2004; Jiang, Guo et al. 2005), και το εξωκυστικό συστατικό exo-70 (Dupraz, Grassi et al. 2009). Σε πειράματα που έχουν γίνει σε καλλιέργειες νευρώνων ιπποκάμπου, η έλλειψη οποιουδήποτε από τα παραπάνω συστατικά οδηγεί σε διακοπή της δημιουργίας του άξονα, ενώ η υπερέκφρασή τους συνεπάγεται την ανάπτυξη πολλών νευριτών τύπου άξονα θετικών στην Tau-1 (Caceres, Ye et al.).

Στην περίπτωση των νευρώνων που έχουν έναν άξονα μπορεί να υποθέσει κανείς ότι υπάρχουν μηνύματα που επιβάλλουν τη συγκέντρωση των συστατικών που αναφέρθηκαν σε ένα αυξητικό κώνο. Νεώτερα πειραματικά δεδομένα στηρίζουν την υπόθεση της επικοινωνίας του άξονα με τους δενδρίτες, με στόχο τη δημιουργία ενός μοναδικού άξονα, μέσω δραστηριότητας των cAMP, PKA και cGMP (Shelly, Cancedda et al.; Shelly, Lim et al.; Shelly, Cancedda et al. 2007). Η επίδραση στους νευρώνες αγωνιστών της PKA, συνεπάγεται την ανάπτυξη ενός μοναδικού άξονα. Σε πειράματα που χρησιμοποιήθηκε Ανάλυση

Συντονισμού Φθορισμού Μεταφοράς Ενέργειας (FRET) έχειδειχθεί ότι η ενεργοποίηση του cAMP σε ένα νευρίτη οδηγεί σε αναστολή της δραστηριότητας του cAMP στους άλλους νευρίτες του ίδιου κυττάρου (Shelly, Lim et al.). Ταυτόχρονα, η εξαρτώμενη από το cAMP/PKA φωσφορυλίωση της LKB1 και η ενεργοποίηση μέσω αυτής των SAD και MARK (Κινάση που ελέγχει τη συγγένεια των μικροσωληνίσκων), ελέγχει την ανάπτυξη του άξονα (Shelly and Poo). Όμως και αυτός ο μηχανισμός προϋποθέτει την ύπαρξη ενός προγράμματος που θα ενεργοποιήσει το μεταβολικό μονοπάτι cAMP/PKA ώστε να δημιουργηθεί, ένας μόνο νευρίτης (Caceres, Ye et al.). Ταυτόχρονα με αυτό το μηχανισμό δρα και η Rho πρωτεΐνη αναστέλλοντας την ανάπτυξη των υπόλοιπων νευριτών σε άξονες. Απόδειξη για αυτό αποτελεί το πειραματικό εύρημα ότι η αναστολή της δράσης της πρωτεΐνης Lfc, που είναι παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίου γουανίνης, σε νευρώνες ιπποκάμπου που αναπτύσσονται στην καλλιέργεια, οδηγεί σε καταστολή της δράσης της RhoA, με συνέπεια οι νευρώνες να εμφανίζουν αύξηση του άξονα ή /και μετατροπή πολλών νευριτών σε τύπου άξονα θετικού στην Tau-1(Conde, Arias et al.)

Σε όλη αυτή τη διαδικασία μεγάλη σημασία έχει η δυναμική μετατροπή της ακτίνης από την σφαιρική στην ινώδη μορφή της και το αντίστροφο στον αυξητικό κώνο. Τα δεδομένα δείχνουν ότι η αύξηση στη δυναμική της ακτίνης είναι αναγκαία για ξεκινήσει η δημιουργία του άξονα (Conde, Arias et al.). (Bradke and Dotti 1999;

Kunda, Paglini et al. 2001). Όταν χρησιμοποιούνται αναστολείς της Rho η ποσότητα της ινώδους ακτίνης μειώνεται στον αυξητικό κώνο (Da Silva, Medina et al. 2003; Chuang, Yeh et al. 2005).

Η δυναμική της ακτίνης στον αυξητικό κώνο, επηρεάζεται από τη δράση του μεταβολικού μονοπατιού RhoA-ROCK. Τη δράση αυτού του μονοπατιού ελέγχουν η προφιλίνη ΙΙα, η LIMK1 και το αυτοενισχυόμενο σύμπλοκο Cdc42-Par3-Par6-Rac-PI3K. Τα παραπάνω μόρια φαίνεται να ελέγχουν, εκτός από τη δυναμική της ακτίνης, τη νευρογένεση και το σχηματισμό του άξονα (Conde, Arias et al.; Da Silva, Medina et al. 2003; Rosso, Bollati et al. 2004; Conde and Caceres 2009). Επίσης η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη με ελαφρά αλυσίδα δυνεΐνης, Tctex-1, είναι αναγκαία για να σχηματιστεί ο άξονας, προωθεί τη δράση της Rac και δρα ευνοώντας το σχηματισμό πολλών αξόνων (Chuang, Yeh et al. 2005). Το τελευταίο επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασής της με τη Lfc, που έχει ως συνέπεια η τελευταία να μην ενεργοποιεί τη RhoA, να χάνει δηλαδή τη δράση της ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (Conde, Arias et al.). Σε συστήματα μελέτης διαφορετικά από την καλλιέργεια νευρώνων ιπποκάμπου, όπως οι αναπτυσσόμενοι εντερικοί νευρώνες από τρωκτικά, η αναστολή της δράσης της RhoA, προωθεί την ανάπτυξη του άξονα αλλά όχι τη δημιουργία πολλών αξόνων (Vohra, Fu et al. 2007).

Φάση 3

Περιλαμβάνει τα στάδια 4 και 5 (εικ. 1.5). Σε αυτή τη φάση οι εξελισσόμενοι δενδρίτες και άξονες αποκτούν την τελική αρχιτεκτονική τους δομή, με μοριακή οργάνωση που να επιτρέπει τη σωστή λειτουργία τους. Αμέσως μετά την δημιουργία τους, η μορφολογία και η οργάνωση των αξόνων και των δενδριτών είναι όμοια, με εξαίρεση το μήκος τους. Αντίθετα στους ώριμους νευρώνες υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των δενδριτών και των αξόνων (Caceres, Ye et al.).

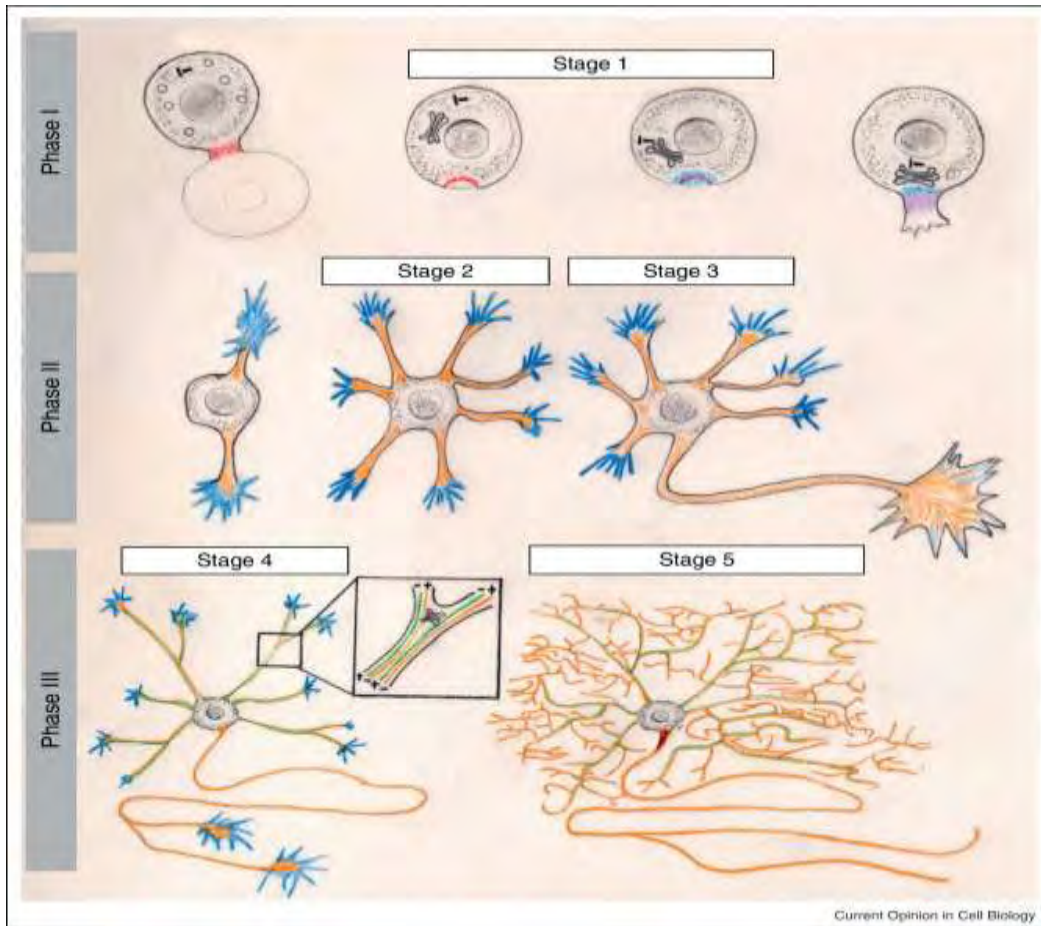
Μια σημαντική διαφοροποίηση που συμβαίνει κατά τη φάση 3 και οδηγεί στις τελικές διαφορές μεταξύ δενδριτών και αξόνων, αφορά στην οργάνωση των μικροσωληνίσκων (Conde and Caceres 2009). Αρχικά, στους δενδρίτες το άκρο των μικροσωληνίσκων, που πολυμερίζεται πιο αργά, βρίσκεται μακριά από το σώμα του νευρώνα, προς το άκρο του δενδρίτη (Baas and Lin). Αυτό το γεγονός είναι πιθανό ότι οδηγεί σε μεταφορά των οργανιδίων και των πρωτεϊνών με τρόπο που να προκαλείται μια «πολική» ενδοκυττάρια κατανομή (Sharp, Yu et al. 1997; Yu, Cook et al. 2000; Zheng, Wildonger et al. 2008). Αυτή η διαφορά στην πολικότητα των μικροσωληνίσκων μεταξύ δενδριτών και αξόνων, έπεται της μορφολογικής τους διαφοροποίησης και αυτό σημαίνει ότι είναι μέρος ενός προκαθορισμένου μηχανισμού που διαγράφει τη μελλοντική εξέλιξη των ανώριμων μορφών των δενδριτών και των αξόνων στις ώριμες μορφές τους (Baas, Black et al. 1989). Μία επιπλέον διαφορά αποτελεί η διαβάθμιση στις

φωσφορυλιωμένες μορφές της Tau και της πρωτεΐνης που αντιδρά με τους μικροσωληνίσκους-1B (MAP1B), που ακολουθεί το πρότυπο από το κέντρο προς την περιφέρεια. Αυτό το γεγονός είναι πιθανό να καθορίζει την είσοδο, διατήρηση και την αποφυγή πρωτεϊνών και λιπιδίων και τελικά να συμβάλλει στην απόκτηση των ώριμων χαρακτηριστικών των αξόνων και των νευριτών (Mandell and Banker 1996). Επιπρόσθετα, και τα μεμβρανικά συστήματα έκκρισης και ενδοκύτωσης, συμβάλλουν στην ωρίμανση των αξόνων και των νευριτών (Wang, Liu et al.; Ye, Zhang et al. 2007).

Η ωρίμανση των δενδριτών και των αξόνων που συμβαίνει στη φάση 3 χρειάζεται και τη δράση εξειδικευμένων μεταγραφικών προγραμμάτων. Για παράδειγμα ο μεταγραφικός παράγοντας SnoN (Ski σχετιζόμενη καινοφανής πρωτεΐνη N) ελέγχει αποκλειστικά την αύξηση των αξόνων στους νευρώνες των θηλαστικών (Stegmuller, Konishi et al. 2006; Stegmuller, Huynh et al. 2008). Αντίθετα στους νευρώνες της Δροσόφιλας, ο *Dar1* επηρεάζει αποκλειστικά την αύξηση των δενδριτών, ασκώντας δράση στους μικροσωληνίσκους αλλά όχι στην ακτίνη (Ye, Kim et al.).

Κλειδί για την ωρίμανση του άξονα αποτελεί το αρχικό τμήμα του άξονα. Πρόκειται για λειτουργικό σχηματισμό που εμποδίζει μεμβρανικές και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες να εισέλθουν στον άξονα (Winckler, Forscher et al. 1999; Song, Wang et al. 2009). Για το σχηματισμό αυτού του τμήματος είναι

σημαντική η πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, αγκυρίνη-G (ankyrin-G). Η σίγαση του γονιδίου της προκαλεί διάλυση του αρχικού τμήματος του άξονα και κάνει τον άξονα να μοιάζει, σε μοριακό επίπεδο, με τους δενδρίτες (Hedstrom, Ogawa et al. 2008). Η αγκυρίνη φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους, μέσω των πρωτεϊνών EB-1 και EB-3, οι οποίες εντοπίζονται στο θετικό άκρο των μικροσωληνίσκων (Leterrier, Vacher et al.). Επομένως σύμφωνα με τα παραπάνω η αγκυρίνη και ίσως και το αρχικό τμήμα του άξονα, έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ταυτότητας του άξονα (Rasband).



Εικ. 1.5 Οι τρεις φάσεις δημιουργίας του άξονα και των δένδριτών στον νευρώνα.

Phase 1, 2, 3: Φάση 1, 2, 3. Stage 1, 2, 3, 4, 5: Στάδιο 1, 2, 3, 4, 5. Φάση 1:

ο σχηματισμός του πρώτου νευρίτη. Το μοντέλο στηρίζεται σε παρατηρήσεις στους αισθητικούς νευρώνες της Δροσόφιλας και στους νευρώνες ιπποκάμπου στην καλλιέργεια. Στη Δροσόφιλα, ο νεός νευρώνας «κληρονομεί» υλικά από το δαχτυλίδι της κυτοκίνησης (κόκκινο), που έχουν την ιδιότητα να προκαλέσουν τοπικές αλλαγές στον κυτταροσκελετό και τη συσσώρευση της 4,5 διφώσφο- φωσφατίδουλο-ινοσιτόλης (ανοιχτό μπλέ). Σχηματίζεται ένα δαχτυλίδι σύνδεσης μεταξύ κυττάρων (μωβ). Σε αυτό το σημείο δημιουργείται ο πρώτος νευρίτης που

στους νευρώνες του ιπποκάμπτου θα εξελιχθεί σε άξονα. Οργανίδια όπως η συσκευή Golgi μετακινούνται σε αυτή την περιοχή. **Φάση 2:** Δημιουργία του άξονα. Στο στάδιο 2 όλοι οι νευρίτες έχουν τα συστατικά για αυξηθούν με γρήγορους ρυθμούς. Η ινώδης μορφή της ακτίνης (μπλε) μεταφέρεται στην άκρη κάθε νευρίτη. Οι μικροσωληνίσκοι (πορτοκαλί) προσανατολίζονται με το θετικό άκρο μακριά από το σώμα. Η διακοπή της ανασταλτικής δράσης της RhoA σε ένα νευρίτη θα οδηγήσει στη δημιουργία του άξονα (σταδιο 3). **Φάση 3:** Στο στάδιο 4 δημιουργούνται οι δενδρίτες. Οι μικροσωληνίσκοι στους δενδρίτες (πράσινο) προσανατολίζονται με το αρνητικό άκρο μακριά από το σώμα. Στους δενδρίτες, αλλά όχι στον άξονα, υπάρχουν συμπλέγματα Golgi. Στο στάδιο 5 πραγματοποιείται η ωρίμανση των δενδριτών και του άξονα (Caceres, Ye et al.).

1.6 Ανάλυση των νευρώνων με τη μέθοδο Sholl

Η ανάλυση των νευρώνων σύμφωνα με τη μέθοδο του Sholl (Sholl 1953), αποτελεί μέθοδο για την ποσοτική ανάλυση των δενδριτικών σχηματισμών των νευρικών κυττάρων. Συνίσταται σε: α) κατασκευή από ομόκεντρους κύκλους (σε δυσδιάστατη ανάλυση) ή σφαίρες (σε τρισδιάστατη ανάλυση), που ισαπέχουν μεταξύ τους, με κέντρο στο σώμα του νευρικού κυττάρου, β) μέτρηση του αριθμού των τομών μεταξύ των δενδριτών με την περιφέρεια των κύκλων/σφαιρών, γ) καθορισμό μεταβλητών που χρησιμοποιούν για τον υπολογισμό τους την ακτίνα

του κύκλου/σφαίρας και τον αριθμό των τομών μεταξύ των δενδριτών, δ) παρουσίαση των αποτελεσμάτων με μαθηματικό τρόπο (π.χ. ιστογράμματα) (Ristanovic, Milosevic et al. 2006). Υπάρχουν τρεις παραλλαγές της μεθόδου του Sholl: α) η γραμμική ανάλυση κατά Sholl που αποδίδεται με το γράφημα που παρουσιάζει τον αριθμό των τομών σε κάθε περιφέρεια ή κυκλική περιοχή διά την ακτίνα, β) η ημιλογαριθμική ανάλυση κατά Sholl που αποδίδεται με το γράφημα που παρουσιάζει το λογάριθμο του αριθμού των τομών σε κάθε περιφέρεια ή κυκλική περιοχή διά την ακτίνα και γ) η λογαριθμική ανάλυση κατά Sholl που αποδίδεται με το γράφημα που παρουσιάζει το λογάριθμο του αριθμού των τομών σε κάθε περιφέρεια ή κυκλική περιοχή διά το λογάριθμο της ακτίνας. Στην ημιλογαριθμική και στη λογαριθμική ανάλυση οι τιμές βρίσκονται σε μία ευθεία και η εφαπτομένη της γωνίας της ευθείας δίνει πληροφορίες για τη μορφολογία των νευρώνων που μελετούνται (Sholl 1953). Αναφέρεται ότι οι δύο αυτές μέθοδοι αναπαράστασης των αποτελεσμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διαφορετικούς τύπους νευρώνων (Sholl 1953). Ο Sholl (1953) χρησιμοποίησε τη λογαριθμικό τύπο αναπαράστασης των δεδομένων για νευρώνες που παρουσιάζουν ένα κύριο δενδρίτη, ενώ την ημιλογαριθμική για πυραμιδικούς νευρώνες. Όμως δεν υπάρχουν κριτήρια για το ποιος τύπος αναπαράστασης των δεδομένων, από τους δύο είναι καταλληλότερος. Για αυτό το λόγο αμφισβητείται η

αξία της χρησιμοποίησής τους (Lima and Coimbra 1986; Ristanovic, Milosevic et al. 2006).

Παρά τις αντιρρήσεις για τη χρήση της λογαριθμικής και της ημιλογαριθμικής αναπαράστασης των αποτελεσμάτων η μέθοδος Sholl για την ανάλυση των νευρώνων είναι μία από τις περισσότερο χρησιμοποιημένες, θεωρείται αξιόπιστη και έχει συμβάλει σημαντικά στη μελέτη των κυττάρων του νευρικού συστήματος και στην αλλαγές που συμβαίνουν στη μορφολογία τους σε καταστάσεις όπως η υποξία, η περιβαλλοντική ψυχική πίεση, η νοητική υστέρηση που οφείλεται στη νόσο του εύθραυστου Χ και παθήσεις όπως η νόσος Alzheimer's, η νόσος Huntington's, το γλαύκωμα (Beauquis, Pavia et al.; Lerner, Trejo Martinez Ldel et al.; Li, Liu et al.; Torres-Garcia, Solis et al.; Vazquez-Roque, Solis et al.; Duan, Wearne et al. 2003; Cook and Wellman 2004; Vega, Gomez-Villalobos Mde et al. 2004; Kheirandish, Gozal et al. 2005; Martinez-Tellez, Gomez-Villalobos Mde et al. 2005; Gatto and Broadie 2009).

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Κυτταροκαλλιέργεια των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού και πρωτόκολλο διαφοροποίησής τους προς νευρώνες.

Χρησιμοποιήθηκαν τα E14/T εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα μυός.

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα αναπτύσσονται σε τρυβλία τα οποία έχουν επιστρωθεί με gelatin 0,2% σε θρεπτικό μέσο που συνίσταται σε DMEM-4500mg Glucose + pyruvate + 15% FBS κατάλληλο για εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα + 1% πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη + 1% μη απαραίτητα αμινοξέα + 2mM L-Glutamine + β-μερκαπτοαιθανόλη 1μM +Ανασταλτικός παράγοντας της Λευχαιμίας (LIF) 1000 U/ml. Η επίστρωση των κυττάρων γίνεται σε πυκνότητα 190000 κύτταρα/cm². Κατά την καλλιέργεια των ESc γινόταν καθημερινή παρατήρηση στο μικροσκόπιο, για τη μορφολογία τους και την πυκνότητά τους στο τρυβλίο. Τα ESc παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στις αλλαγές του pH και του CO₂ και για αυτό κάθε έξοδο από τον επωαστήρα γινόταν με προσοχή, για σύντομο χρονικό διάστημα και με φειδώ.

Για να διαφοροποιηθούν τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs) σε νευρώνες πρέπει να παρεμβληθεί το στάδιο των εμβρυοειδών συσσωματωμάτων (EBs) τα οποία σχηματίζονται όταν μεταφερθούν τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα σε 100mm τρυβλία βακτηρίων σε πυκνότητα 3×10^6 κύτταρα/τρυβλίο Το θρεπτικό μέσο που

χρησιμοποιείται είναι αυτό των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων χωρίς τον LIF. Την 5η ημέρα της καλλιέργειας των εμβρυοειδών συσσωματωμάτων μετατρέπεται η συγκέντρωση του FBS σε 10% και προτίθεται 0,5μM all trans ρετινοϊκό οξύ. Σε αυτό το θρεπτικό μέσο τα εμβρυοειδή συσσωματώματα παραμένουν για 4 ημέρες. Την 8^η ημέρα γίνεται αποδιάταξη των εμβρυοειδών συσσωματωμάτων σε μονήρη κύτταρα, τα οποία επιστρώνονται σε τρυβλία επικαλυμμένα με πολυ-D-λυσίνης (poly-D-lysine) 10μg/ml και laminin 0.5 μg/cm², και σε πυκνότητα 500000 κύτταρα/cm². Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται την πρώτη ημέρα συνίσταται σε DMEM-4500mg Glucose + F-12 σε αναλογία 1:1 + N2 1% + 2mM L-Glutamine. Το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται αρχικά στις 2 ώρες και έπειτα στις 24 ώρες. Τη δεύτερη ημέρα γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε B18, όπως περιγράφεται από τον Brewer G. Το θρεπτικό μέσο ανανεωνόταν κάθε 48 ώρες. Τα διαλύματα που χρησίμευαν ως απόθεμα συντηρούνταν σε θερμοκρασία -80°C και ανανεώνονταν κάθε 30 ημέρες (Πίνακας 2.1).

Υλικό	Τελική συγκέντρωση
DMEM /F12 Hams 3:1	
Βιοτίνη	0,4 μM
L-καρνπίνη	12 μM
Αιθανολαμίνη	16 μM
D(+)-γαλακτόζη	83 μM
L-Γλουταμίνη	3000 μM
Πουτρεσκίνη	75 μM
Πυρουβικό νάτριο	183 μM
Σελήνιο	0,083 μM
Λινολείκό οξύ	3,5 μM
Λινολενικό οξύ	3,5 μM
Προγεστερόνη	0,020 μM
Trans-Ρετινόλη	0,3 μM
Οξικό ρετινύλιο	0,2 μM
D-L- α -Τοκοφερόλη	2,3 μM
D-L- α -Οξική Τοκοφερόλη	2,1 μM
Αλβουμίνη, βοός	37 μM
Καταλάση	0,010 μM
Γλουταθιόνη	3,2 μM
Ινσουλίνη	0,6 μM
Υπεροξειδίο της Δισμουτάσης	0,077 μM
Τρανσφερρίνη	0,062 μM

Πίνακας 2.1: Θρεπτικό μέσο B16. Τα υλικά από τα οποία αποτελείται. Τα πρωταρχικά διακύματα φυλασσόταν στους -80°C και ανανεώνονταν κάθε 30 ημέρες.

Οι κυτταρικές καλλιέργειες έγιναν σε θερμοκρασία 37°C και σε ατμόσφαιρα 7% CO_2 .

2.2 Πρωτογενής καλλιέργεια νευρώνων ιπποκάμπου

Οι πρωτογενείς καλλιέργειες των νευρώνων ιπποκάμπου δημιουργήθηκαν από έμβρυα επιμύων ηλικίας 16 ημερών. Οι ιππόκαμποι απομονώθηκαν και διατηρήθηκαν αρχικά σε διάλυμα HBSS που περιείχε 2 mM Γλουταμίνη και 1mM HEPES. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες πάγου. Στη συνέχεια και αφού είχαν αφαιρεθεί οι μήνιγγες, οι ιππόκαμποι επωάζονταν με διάλυμα θρυψίνης 0,05% και EDTA 0.02% σε Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (PBS) για 10 min στους 37°C . Έπειτα, προστιθόταν ίσος όγκος διαλύματος αναστολέα θρυψίνης για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 1400rpm για 5 λεπτά, αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 4ml θρεπτικού μέσου DMEM High Glucose+ pyruvate /F12 Ham's (Gibco) σε αναλογία 1:1 που περιείχε 10% ορού εμβρύου βοός (FBS). Ακολουθούσε η ομογενοποίηση του ιστού αρχικά με πλαστική και

στη συνέχεια με γυάλινη πιπέτα Pasteur, της οποίας τα άκρα είχαν λειανθεί, και ακολουθεί φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, γινόταν μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με Trypan Blue (Sigma) χρησιμοποιώντας αιμοκυττόμετρο τύπου Neubauer. Αναλόγως το πείραμα, ακολουθούσε επίστρωση των κυττάρων σε καλλιεργητικά τρυβλία ή ηλεκτροδιάτρηση. Η επίστρωση των κυττάρων γινόταν σε πυκνότητα 200 κύτταρα/mm². Σε κάθε περίπτωση το μέσο καλλιέργειας των κυττάρων ήταν αρχικά DMEM High Glucose+ pyruvate /F12 Ham's (Gibco), σε αναλογία 1:1 που περιείχε 10% FBS. Σε 6 ώρες γίνονταν αντικατάσταση του θρεπτικού μέσου Neurobasal που περιείχε 2% B-27, 1 mM HEPES και 2mM L-γλουταμίνη. Στη περίπτωση, που τα κύτταρα παρέμεναν σε καλλιέργεια περισσότερες από 3 μέρες, προστιθόταν και αραβινοσική κυτοσίνη (cytosine arabinoside, AraC) σε συγκέντρωση 2μM ώστε να ανασταλεί ο πολλαπλασιασμός των αστροκυττάρων. Η αλλαγή του θρεπτικού μέσου γινόταν κάθε τρεις μέρες.

2.3 Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς COS-7

Τα κύτταρα COS-7 προέρχονται από νεφρικά κύτταρα του Πράσινου Αφρικανικού Πιθήκου, *Cercopithecus aethiops*, τα οποία έχουν διαμολυνθεί από τον ιό SV40. Από φαινοτυπική άποψη είναι ινοβλάστες που μοιάζουν με ανθρώπινους ινοβλάστες.

Τα COS-7 κύτταρα διατηρούνταν σε μονοστοιβάδες μέσα σε πλαστικά τρυβλία, διαμέτρου 100mm (Corning), σε συνθήκες υγρασίας με περιεκτικότητα 7% CO₂ και θερμοκρασία 37°C. Ο επωαστήρας ήταν της Forma Scientific, Ohio, USA.. Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας αποτελούνταν από DMEM (Gibco) εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 50 IU/ml πενικιλίνη και 50ng/ml στρεπτομυκίνη. Το θρεπτικό μέσο ανανεωνόταν κάθε 48. Για την ανακαλλιέργεια, όταν οι καλλιέργειες έφταναν σε πλήρη ανάπτυξη (90%-100% πληρότητα στην επιφάνεια καλλιέργειας), γινόταν αφαίρεση του θρεπτικού μέσου, έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS) και εν συνεχεία τα κύτταρα επωάζονταν σε 2ml διάλυμα θρυψίνης 0,25% σε διαλύτη PBS που περιείχε 5mM EDTA. Η επώαση διαρκούσε 2 λεπτά στο περιβάλλον του επωαστήρα (37°C, 7% CO₂). Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη 2ml θρεπτικού μέσου και τα κύτταρα αναδιασπειρόνταν με χρήση σύριγγας 16 Gauge. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 1000rpm για 5 λεπτά, αναδιασπορά σε θρεπτικό μέσο και δημιουργία νέων καλλιιεργειών με αραιώση 1:20.

2.4 Διαμόλυνση των Νευρώνων Ιπποκάμπου

Ακολουθήθηκε η διαδικασία της ηλεκτροδιαβίβασης με τη συσκευή Nucleofector I της Amaxa. Μετά τη διαμόλυνση οι νευρώνες μεταφέρθηκαν σε καλυπτρίδες που είχαν κατεργαστεί με πολύ-L-λυσίνη, σε πυκνότητα 200 κύτταρα/mm². Αρχικά, το

θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν DMEM High Glucose:F12 σε αναλογία 1:1 που περιείχε FBS10%. Η επώαση έγινε σε περιβάλλον που περιείχε 7% CO₂ και σε θερμοκρασία 37°C. Έξι ώρες αργότερα έγινε αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε Neurobasal που περιείχε 2% B-27, 1 mM HEPES και 2mM L-γλουταμίνη.

2.5 Μέτρηση της ποσότητας του mRNA

Το ολικό RNA απομονώθηκε από το κυτταρικό εκχύλισμα. Η ποσότητα του συνολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,5 μg. Το πρωτόκολλο της αντίστροφης μεταγραφής που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SuperScript III της Invitrogen. Χρησιμοποιήθηκαν τυχαίοι εκκινητές σε συγκέντρωση 150 ng/μl. Για την πραγματοποίηση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιούνταν 1 μl του DNA που δημιουργήθηκε από την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής, MgCl₂ σε τελική συγκέντρωση 1.5mM, dNTPs σε τελική συγκέντρωση 0.2mM, 10μmole από κάθε ειδικό εκκινητή και 2 διεθνείς μονάδες (IU) πολυμεράσης Taq (Invitrogen). Τα τμήματα του DNA, των οποίων η έκφραση ενισχύθηκε μέσω της διαδικασίας της PCR, ανιχνεύθηκαν σε γέλη αγαρόζης με τη βοήθεια βρωμιούχου εθιδίου. Ο ημιποσοστικός προσδιορισμός των επιπέδων του μορίου του προς εξέταση RNA, έγινε σε σύγκριση με τα επίπεδα της Δεϋδρογενάσης της 3-φωσφορικής Γλυκεριναλδεϋδης (GAPDH). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: PKC-α: νοηματικός 5'-

TGAATCCTCAGTGGAATGAGT-3' και αντινοηματικός 5'-
 GGTTGCTTTCTGTCTTCTGAA-3', PKC-β: νοηματικός 5'-
 CCCGAAGGAAGCGAGGGCAATGAAG-3'
 και αντινοηματικός 5'-AGTTCATCTGTACCCTTCCGCTCTG-3', PKC-γ:
 νοηματικός 5'-CGGGCTCCTACGTCGGATGAG-3' και αντινοηματικός 5'-
 GCAGGCGTCCTGGGCTGGCACC-3', PKC-δ: νοηματικός 5'-
 CACCATCTTCCAGAAAGAACG-3' και αντινοηματικός 5'-
 CTTGCCATAGGTCCAGTTGTTG-3', PKC-ε: νοηματικός 5'-
 CATCGATCTCTCGGGATCATCG-3' και αντινοηματικός 5'-
 CGGTTGTCAAATGACAAGGCC-3', PKC-η: νοηματικός 5'-
 AGCTAGCCGTCTTCCACGAGACGC-3' και αντινοηματικός 5'-
 GGACGACGCAGGTGCACACTTGG-3', PKC-θ: νοηματικός 5'-
 TTGATCTTTCCAGAGCCACG-3' και αντινοηματικός 5'-
 CTTGCGATCTCCTAGCATG-3', PKC-ι/λ: νοηματικός 5'-
 CGTTGGGAGCTCTGACAATC-3' και αντινοηματικός 5'-
 ACCTGCTTTTGCTCCATCATG-3', PKC-ζ: νοηματικός 5'-
 CGATGGGGTGGATGGGATCAAAA-3' και αντινοηματικός 5'-
 GTGTTTCATGTCAGGGTTGTCCG-3'. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη
 GAPDH ήταν: νοηματικός 5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTC-3' και
 αντινοηματικός 5'-CATCACCATCTTCCAGGAGCG-3'.

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ήταν: 94°C για 2 λεπτά, 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 55°C για 55 δευτερόλεπτα, 72°C για 1 λεπτό. Επανάληψη των παραπάνω συνθηκών για αριθμό κύκλων που είναι συγκεκριμένος για κάθε μόριο. Τέλος μετά την ολοκλήρωση των κύκλων παραμονή στους 72°C για 10 λεπτά. Ο αριθμός των κύκλων για κάθε περίπτωση ήταν: 23 για την GAPDH, 35 για την PKC-α, 31 για την PKC-β, 35 για την PKC-γ, 28 για την PKC-δ, 41 για την PKC-ε, 32 για την PKC-ζ, 30 για την PKC-η, 35 για την PKC-θ και 25 για την PKC-ι/λ.

Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης διαχωρίζονταν σε πηκτή αγαρόζης 1% . Η ανίχνευσή τους έγινε με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου.

Τα DNA μόρια που λαμβάνονται από τη χρήση αυτών των εκκινήτων είναι:
αριθμός βάσεων του μορίου DNA που προκύπτει από την PCR αντίδραση για την PKC ε: 732 (384-1115) bp, αριθμός βάσεων του μορίου DNA που προκύπτει από την PCR αντίδραση για την PKC α: 325 bp (656-980), αριθμός βάσεων του μορίου DNA που προκύπτει από την PCR αντίδραση για την PKC γ: 544bp (496-1039), αριθμός βάσεων του μορίου DNA που προκύπτει από την PCR αντίδραση για την PKC δ: 352bp (664-1016), αριθμός βάσεων του μορίου DNA που προκύπτει από την PCR αντίδραση για την PKC ζ: 681bp (728-1408), αριθμός βάσεων του μορίου DNA που προκύπτει από την PCR αντίδραση για την PKC θ1: 179bp (1427-1605), αριθμός βάσεων του μορίου DNA που προκύπτει από

την PCR αντίδραση για την PKC α : 240bp (1335-1574), αριθμός βάσεων του μορίου DNA που προκύπτει από την PCR αντίδραση για την PKC η : 384bp (307-690), αριθμός βάσεων του μορίου DNA που προκύπτει από την PCR αντίδραση για την PKC β 1: 228bp (873-1100), αριθμός βάσεων του μορίου DNA που προκύπτει από την PCR αντίδραση για την PKC β 2: 227bp (922-1148), αριθμός βάσεων του μορίου DNA που προκύπτει από την PCR αντίδραση για την GAPDH: 357bp (219-569).

Για την εύρεσή τους ανέτρεξα στη διεθνή βιβλιογραφία (Gangeswaran and Jones 1997; Alden, Goldspink et al. 2002; Shen, Bai et al. 2002) και τους έλεγξα χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Vector NTI8.

2.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης διαλύματος μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA και RNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης διαλύματος DNA στηρίζεται στην ιδιότητα των βάσεων των νουκλεοτιδίων να απορροφούν το υπεριώδες φως. Το διάλυμα μορίων DNA ή RNA του οποίου τη συγκέντρωση θέλουμε να προσδιορίσουμε, αραιώνεται σε τελικό όγκο 1ml και η απορρόφηση του αραιωμένου δείγματος μετράται σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 260nm. Χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Lambda 15, Perkin- Elmer. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αρχικού διαλύματος (C) χρησιμοποιείται ο τύπος: $C =$

$(c \cdot A_{260} \cdot d) / 1000$, όπου C η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος σε μg/μl, A₂₆₀ η απορρόφηση που μετρήθηκε, d η αραίωση του δείγματος και c ένας συντελεστής ο οποίος αντιστοιχεί στην ποσότητα του DNA σε μg που είναι διαλυμένη σε 1000μl και δίνει απορρόφηση 1. Η τιμή του c είναι 30 για μονόκλωνο DNA ή RNA και 50 για δίκλωνο DNA.

2.7 Απομόνωση ολικού RNA και αντιδράσεις RT-PCR

Η απομόνωση ολικού RNA από τα κύτταρα γινόταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο και τα αντιδραστήρια του RNAWiz®. Τα κύτταρα συλλέγονταν με το προτεινόμενο από την εταιρεία αντιδραστήριο, χωρίς να προηγηθεί έκπλυση με PBS, χρησιμοποιώντας σύριγγα 21 G. Κατόπιν, απομονωνόταν το RNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ή εναλλακτικά το μείγμα φυλασσόταν στους -80°C για μελλοντική απομόνωση. Η απομάκρυνση τυχόν επιμολυσμένου DNA από το RNA γινόταν με το σύστημα DNA-free™ DNase Treatment & Removal Reagent (Ambion) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Η παραγωγή cDNA από ολικό RNA γινόταν με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript III (Invitrogen). Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνταν 0,5μg RNA με τυχαίους εκκινητές Oligo(dT)₁₈ (Invitrogen) σε τελική συγκέντρωση 150ng/μl. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνει η εταιρεία. Ακολουθούσε η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).

2.8 Δημιουργία H₂O για τη διάλυση του RNA

Το H₂O που χρησιμοποιούταν για την αποθήκευση του RNA καθώς και για τις αντιδράσεις της αντίστροφης μεταγραφής είχε κατάλληλα επεξεργαστεί για την απενεργοποίηση των ενζύμων που διασπούν το RNA (RNAσες) ως εξής: στο H₂O προστίθετο Diethyl Pyrocarbonate (DEPC, Sigma) σε συγκέντρωση 0.1% και το διάλυμα αφηνόταν με συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 14-16 ώρες και έπειτα αποστειρωνόταν σε αυτόκαυστο.

2.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό συνθήκες αποδιάταξης (SDS-PAGE)

2.9.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε κυτταρικό εκχύλισμα που περιέχει απορρυπαντικά, χρησιμοποιείται το σύστημα DC Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Palo Alto, CA, USA), το οποίο βασίζεται σε τροποποίηση της μεθόδου Lowry et al., 1951, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Συγκεκριμένα, 10μl κάθε δείγμα κυτταρικού εκχυλίσματος συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος του δείγματος να είναι 50μl. Στο κάθε

δείγμα προστίθεται 25μl διαλύματος Α' (Α': 20μl αντιδραστήριο S σε 1ml αντιδραστήριο A) και, αφού ακολουθήσει ισχυρή ανάδευση, προστίθενται και 200μl αντιδραστηρίου B (αντιδραστήριο Folin). Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται σε ένα τρυβλίο των 96 θέσεων και η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετράται στα 595nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα δείγματα, χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη, η οποία δημιουργείται με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης BSA (Bovine Serum Albumin) που έχουν ετοιμαστεί όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.9.2 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Στα πρωτεϊνικά δείγματα προστίθεται ίσος όγκος αποδιατακτικού διαλύματος 2X (sample buffer: Tris-HCL 0.125 M, pH:6.8, SDS 4% w/v, β-μερκαπτοαιθανόλη 0.57 M, Γλυκερόλη 1% v/v, Bromophenol blue 0.02% w/v) και ακολούθως θερμαίνονται στους 100°C για 5 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η πλήρης μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών και η κάλυψή τους από μόρια SDS έχει σαν συνέπεια η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα μέσα στο πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης να εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους κατά μήκος του πηκτώματος.

2.9.3 Προετοιμασία πηκτώματος

Για την προετοιμασία των πηκτωμάτων αναμειγνύονται όλα τα συστατικά του διαλύματος, εκτός του APS και του TEMED, τα οποία προστίθενται λίγο πριν την έκχυση και λειτουργούν σαν καταλύτες για την έναρξη και την διατήρηση του πολυμερισμού αντίστοιχα. Το πήκτωμα εκχύνεται στον κενό χώρο, που δημιουργείται μεταξύ δύο γυάλινων πλακών που διαχωρίζονται με τμήματα πλαστικού (spacers) πάχους 1.5mm. Αρχικά, εκχύνεται το πήκτωμα διαχωρισμού στο οποίο η πυκνότητα πολυακρυλαμίδης (SDS) είναι 8%w/v (Tris-HCL 0.375 M pH:8.8, SDS 0.1% w/v, APS 0.1% w/v, TEMED 0.03% v/v). Μετά το πολυμερισμό του, προστίθεται το πήκτωμα επιστοιβάξης με πυκνότητα SDS 4% (Tris-HCL 0.125 M pH:6.8, SDS 0.1% w/v, APS 0.1% w/v, TEMED 0.05% v/v) μέσα στο οποίο τοποθετείται το «χτένι» για το σχηματισμό θέσεων (πηγάδια). Αφού πολυμερισθεί και το πήκτωμα επιστοιβάξης, το «χτένι» αφαιρείται και τα δείγματα τοποθετούνται στις θέσεις που έχουν δημιουργηθεί.

2.9.4 Ηλεκτροφόρηση

Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων, τοποθετείται στα δοχεία των ηλεκτροδίων της συσκευής (Amersham Pharmacia Biotech) διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X . Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10X συνίσταται σε: Γλυκίνη 1.92 M, TRIZMA-base

0.25M, SDS 1% w/v. Το pH ρυθμίζεται αλλά ώστε να είναι 8.3. Στα πήκτωμα εφαρμόζεται σταθερή τάση 150V έως ότου τα δείγματα εισέλθουν στο πήκτωμα διαχωρισμού, οπότε η τάση αυξάνεται στα 200V και παραμένει σταθερή μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης. Για να αποφευχθεί το φαινόμενο της υπερθέρμανσης των πηκτωμάτων, οι συσκευές ήταν τοποθετημένες σε δοχείο με πάγο κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια και αφού απομακρυνθεί το πήκτωμα επιστοιβάξης, το πήκτωμα χρησιμοποιείται για ανοσοαποτύπωση (Western-Blot).

2.10 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

2.10.1 Μεταφορά πρωτεϊνών από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης κατά Towbin et al., 1979

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης, συναρμολογείται το «σάντουιτς» μεταφοράς ως εξής: μεταξύ δύο σπόγγων της συσκευής, τοποθετούνται κατά σειρά δύο χαρτιά Whatman, το πήκτωμα, η μεμβράνη και τα άλλα χαρτιά Whatman, όλα εμβαπτισμένα σε διάλυμα μεταφοράς και με προσοχή ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες μεταξύ τους. Το «σάντουιτς» τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς των πρωτεϊνών (Amersham Pharmacia Biotech ή BioRad) στην οποία έχει ήδη τοποθετηθεί το διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer: μεθανόλη 20% v/v, διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10X 10% v/v), με το πήκτωμα προς

την κάθοδο. Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο (περίπου 800mA) για 1 ½ ώρα. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς, η συσκευή διατηρείται σε πάγο.

2.10.2 Διαδικασία ανοσοανίχνευσης

Η μέθοδος ανοσοανίχνευσης στηρίζεται στη σύνδεση του αντισώματος με την πρωτεΐνη που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε και βρίσκεται ακινητοποιημένη στη μεμβράνη. Η ταυτοποίηση και η πυκνότητα της PKC-ε πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο, με τη χρήση αντισώματος που προήλθε από κουνέλι, στο οποίο είναι προσδεμένη υπεροξειδάση.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται ανοσοσφαιρίνη κατά αντιορού του ζώου-ξενιστή που έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του πρώτου αντισώματος, η οποία αναγνωρίζει την ανοσοσφαιρίνη του πρώτου ειδικού αντισώματος και συνδέεται με αυτό. Στη δεύτερη αυτή ανοσοσφαιρίνη έχει συνδεθεί μέσω χημικού δεσμού το ένζυμο της υπεροξειδάσης (Horseradish Peroxidase, HRP) ή της αλκαλικής φωσφατάσης (Alkaline Phosphatase, AP). Για την ανίχνευση της υπεροξειδάσης και, κατά συνέπεια, της πρωτεΐνης που ανιχνεύεται, χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο ECL (Western Blotting detection kit, Santa Cruz Biotechnology), ενώ για την ανίχνευση της αλκαλικής φωσφατάσης το Alkaline Phosphatase kit (Biorad). Τελική συνέπεια της αντίδρασης του υποστρώματος με την

υπεροξειδάση είναι η παραγωγή χημειοφωταύγειας (chemiluminescence), η οποία ανιχνεύεται με τη χρήση του ειδικού φιλμ Hyperfilm ECL.

Η αντίδραση του υποστρώματος με την αλκαλική φωσφατάση έχει σαν συνέπεια την εμφάνιση των πρωτεϊνών με πιο άμεσο τρόπο. Η πρωτεΐνη εμφανίζεται πάνω στη μεμβράνη ανοσοαποτύπωσης -και όχι σε φιλμ- με χρώμα μωβ, λόγω της αντίδρασης του δευτεροταγούς αντισώματος με το υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης.

Συγκεκριμένα και σε περίπτωση που δεν αναφέρεται διαφορετικά, όλες οι διεργασίες γίνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και όλες οι εκπλύσεις με TBS-T (20mM Tris-HCl, 137mM NaCl, 0.05% v/v Tween-20, pH=7.6). Αρχικά, η μεμβράνη αναδεύεται σε διάλυμα 5% w/v αλβουμίνης ορού βοός (Bovine serum Albumin, BSA) σε TBS-T (blocking buffer) είτε για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είτε για περίπου 16 ώρες στους 4°C. Έπειτα από 3 εκπλύσεις με διάλυμα PBS, 10 λεπτών η κάθε μία, η μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, στην κατάλληλη αραιώση του πρώτου αντισώματος. Ακολουθούν νέες πλύσεις, η μεμβράνη εκπλένεται, όπως αναφέρεται παραπάνω, και επωάζεται για 1 ώρα με το δεύτερο αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη περίπτωση που η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται με τη δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης, η τελευταία έκπλυση πριν την προσθήκη του υποστρώματος γίνεται στο ρυθμιστικό διάλυμα (NaCl 100mM,

MgCl₂ 5mM, Tris-Cl 100mM, pH 9.5). Σε αυτό το διάλυμα διαλύεται το υπόστρωμα (1% BCIP και 1.5% NBT) της αλκαλικής φωσφατάσης και πραγματοποιείται, έπειτα, η αντίδραση σε θερμοκρασία δωματίου.

2.10.3 Απομόνωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών από κυτταρικό εκχύλισμα

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 35mm, 60mm ή 100mm. Μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας και την έκπλυση των κυττάρων 1 φορά με PBS προεπωασμένο σε πάγο, ακολουθεί απόξεση των κυττάρων μέσα σε 100μl ή 300μl ή 1000μl (αντίστοιχα και ανάλογα με το μέγεθος του τρυβλίου που χρησιμοποιήθηκε) διαλύματος λύσης (Tris-HCl 50mM, pH: 7.5, Triton-X-100 1%, NaCl 150mM, MgCl₂ 5mM, 10% γλυκερίνη, aprotinin/leupeptin 10μg/ml, PMSF 1mM). Όλη η διαδικασία γίνεται πάνω σε πάγο. Ακολουθεί η λύση των κυττάρων με σύριγγα 25 Gauge, από την οποία το κυτταρικό εναιώρημα περνιέται έξι φορές. Στη συνέχεια το κυτταρικό εκχύλισμα αναδεύεται για περίπου 30 λεπτά στους 4⁰C, για να επιτευχθεί η καλύτερη λύση των πλασματικών μεμβρανών, και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο για 5 λεπτά στις 13,000rpm στους 4⁰C. Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τις ολικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες χρησιμοποιείται άμεσα για την προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση και Western Blot ή φυλάσσεται στους -80⁰C για

μετέπειτα χρήση αφού γίνει ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στην περίπτωση που το διάλυμα λύσης είναι αυτό της Ουρίας (Ουρία 8 M, SDS 1%, ορθοβαναδικό νάτριο 1mM), η παραλαβή των κυτταρικών εκχυλισμάτων γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα εκχυλίσματα δε φυγοκεντρώνονται, αλλά μπορούν να φυλαχθούν στους 4°C για μετέπειτα ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών, ενώ σε μέρος αυτών προστίθεται 5x διάλυμα Laemli και αφού επωασθούν για 5 min στους 100°C φυλάσσονται σε θερμοκρασία 4°C ώστε να ηλεκτροφορηθούν όταν χρειαστεί.

2.11 Ανοϊστοχημεία

Κύτταρα, που είχαν αναπτυχθεί πάνω σε καλυπτρίδες εκπλένονταν με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, που περιείχε 1mM Ca²⁺, 1mM Mg²⁺ και στη συνέχεια προστίθετο διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% σε PBS με 0.1% γλουταραλδεΐδη (Sigma-Aldrich) για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αφαιρούνταν το διάλυμα μονιμοποίησης και γίνονταν 3 εκπλύσεις με PBS διάρκειας τριών λεπτών, η καθεμία. Για τη διαδικασία της διαπερατότητας προστιθόταν διάλυμα 0,5% Triton-X σε PBS για 10 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, γινόταν επώαση σε διάλυμα PBS με 3% ορού αίγας, 0,1% Tween 20, για 30 λεπτά. Ακολουθούσαν 3 εκπλύσεις με PBS διάρκειας 3 λεπτών, η κάθε μία. Ακολουθούσε, επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, για τουλάχιστον, 12 ώρες, στους 4°C. Τα αντισώματα που

χρησιμοποιήθηκαν και οι αναλογίες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ήταν: αντι-β-τουμπουλίνη τάξης III σε αναλογία 1:500 (Tuj1 Covance, Princeton), αντι-tau σε αναλογία 1:1000 (T-5530 Sigma), αντι-nestin σε αναλογία 1:200 (MABB5326 Chemicon), αντι-PKC-ε σε αναλογία 1:100 (Santa Cruz), αντι-β-COP σε αναλογία 1:100 (ABR). Στο τέλος της επώασης τα κύτταρα ξεπλένονταν με PBS τρεις φορές, για 10 λεπτά κάθε φορά. Το δευτερογενές αντίσωμα, με ειδικότητα σε ορό μυός ή κόνικλου, συζευγμένου με ισοθιοκυανική φλουερεσκεΐνη ή ροδαμίνη (FITC ή TRITC) σε αραιώση 1:200 σε PBS, προστιθόταν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δευτερογενή αντισώματα προήλθαν από την εταιρία Dako. Η χρώση των πυρήνων πραγματοποιούνταν με επώαση με 4,6-διάμινο-2-φαινυλνδόλη (DAPI) (Sigma), σε αραιώση 1:500 για 30 λεπτά.

2.12 Μικροσκόπηση

Η συνεστιακή μικροσκόπηση πραγματοποιήθηκε σε συνεστιακό λέιζερ μικροσκόπιο της Zeiss SP14 με διπλό διατεταγμένο σε σειρά, μηχανισμό σάρωσης. Τα μήκη κύματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 488 nm από τη διέγερση αργού, 405nm από τη διέγερση διόδου 405 και 560nm από τη διέγερση DPSS 561. για τη μικροσκόπηση αποπεριέλιξης χρησιμοποιήθηκε το ανάστροφο μικροσκόπιο Axiovert 200 εφοδιασμένο με κάμερα Hamamatsu Orca-ER CCD. Η επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Slidebook™

2.13 Πλασμίδια

Τα πλασμίδια του άγριου τύπου της PKC-ε (WT), το επικρατές αρνητικό (DN), η συνθετική ενεργή μορφή της PKC-ε ΔNPS και η συνθετική ενεργή μορφή της PKC-ε CAT, εξήχθησαν από το πλασμίδιο ρHACE και τοποθετήθηκαν στο πλασμίδιο ρCMS-EGFP, με τη χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoR1, αφού είχε προηγηθεί ο πολλαπλασιασμός των πλασμιδίων σε βακτήρια, τα οποία είχαν μετασχηματιστεί ώστε να έχουν αυξημένη ικανότητα για να προσλαμβάνουν εξωγενές DNA. Όταν τα γονίδια των διαφορετικών μεταλλάξεων και του άγριου τύπου της PKC-ε εκφράζονται στο πλασμίδιο ρCMS-EGFP, εκφράζουν στο κάρβοξυ-τελικό άκρο τους, την Πράσινη Φθορίζουσα Πρωτεΐνη (GFP).

Το πλασμίδιο ρHACE έχει προέλθει από μετατροπή του πλασμιδίου ρcDNA3. Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα vectorNTI 8 και ανατρέχοντας στα πληροφοριακά έντυπα των εταιρειών που διαθέτουν τα δύο πλασμίδια, έκανα εικονική αναπαράσταση, σε επίπεδο ακολουθίας νουκλεοτιδίων, του τρόπου με τον οποία κατασκευάστηκε το ρHACE. Αυτή η διαδικασία κρίθηκε αναγκαία για είναι εφικτό να βρεθούν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει η κλωνοποίηση των μορίων από το ρHACE στο ρCMS-EGFP, καθώς και εκείνες που θα χρησιμοποιούνταν προκειμένου να ταυτοποιηθεί ότι τα μόρια έχουν τοποθετηθεί σωστά στο ρCMS-EGFP.

Επειδή η περιοριστική ενδονουκλεάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ίδια και για τα δύο άκρα των γονιδίων που κλωνοποιούνταν ήταν αναγκαίο να ελεγχθεί ο προσανατολισμός τους μέσα στο πλασμίδιο. Για επιτευχθεί αυτό μετά από κάθε κλωνοποίηση με το πλασμίδιο pCMS-EGFP γινόταν πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoR1 και Xho1. Η Xho1 δρα στην αρχή του γονιδίου των γονιδίων της PKC-ε που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα, και επικαλύπτει τη δράση της EcoR1 στην αρχή του γονιδίου αλλά όχι στο τέλος του, όπου δρα αποκλειστικά η EcoR1. Στην περίπτωση που το γονίδιο έχει το σωστό προσανατολισμό μετά την πέψη με τις EcoR1 και Xho1 παίρνουμε τρία κομμάτια DNA: το άδειο πλασμίδιο με μήκος 5.5kb, ένα τμήμα του πλασμιδίου με μήκος 44 bp και το γονίδιο που έχει κλωνοποιηθεί. Στην περίπτωση που το γονίδιο δεν είχε το σωστό προσανατολισμό παίρνουμε ένα τμήμα 44bp και το πλασμίδιο με το κλωνοποιημένο γονίδιο ακέραιο.

Το μήκος των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν είναι: Άγριος τύπος της PKC-ε: 736 bp. DN: 736 bp, ΔNPS: 574 bp, CAT: 343 bp.

Τα παραγόμενα πλασμίδια ανιχνεύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η απομόνωση από το πήκτωμα αγαρόζης γινόταν με το σύστημα NucleospinExtract της εταιρίας Macherey-Nagel.

Για να επιβεβαιωθεί ότι τα πλασμίδια περιέχουν τα σωστά γονίδια, έγινε έλεγχός τους με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών και με σύστημα αυτόματης αλληλούχισης (Macrogen, Korea).

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν για διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς των νεφρικών κυττάρων του πράσινου αφρικανικού πιθήκου COS-7. Τα κύτταρα αναπαράχθηκαν και αναπτύχθηκαν σε ικανό αριθμό και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών. Ακολούθησε ανάλυση με τη χρήση Western Blot και χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της PKC-ε. Το πείραμα ανέδειξε ότι στα Cos-7 εκφράζονταν και τα τέσσερα πλασμίδια που είχαν κατασκευαστεί. Με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώθηκε η ικανότητα των πλασμιδίων να εκφράζονται σε ευκαριωτικά κύτταρα.

2.14 Καλλιέργεια βακτηρίων *Escherichia coli* (E. Coli)

Για την ανάπτυξη των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν υγρή και στερεή καλλιέργεια βακτηρίων.

Η υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων πραγματοποιούνταν στους 37⁰ C υπό μορφή αιωρήματος μέσα σε γυάλινη αποστειρωμένη κωνική φλάσκα ή δοκιμαστικό σωλήνα, με συνεχή ανάδευση στους 250 κύκλους/λεπτό, ώστε να επιτυγχάνονται καλές αερόβιες συνθήκες. Χρησιμοποιήθηκε το LB που συνίσταται σε 1% w/v tryptone, 0.5% w/v yeast extract, 0,5% w/v NaCl. Σε αυτό προστιθόταν 50μg/ml

αμπικικιλίνη. Για την καλλιέργεια σε στερεό μέσο χρησιμοποιούνται τα τρυβλία Petri με LB-άγαρ παρουσία αντιβιοτικού. Για την ανάπτυξη των βακτηριακών αποικιών, μικρή ποσότητα από καλλιέργεια περιορισμένης κλίμακας απλώνεται στο τρυβλίο με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου και κατόπιν το τρυβλίο επωάζεται στους 37°C για περίπου 16 ώρες.

2.15 Δημιουργία βακτηριακών αποθεμάτων με τη χρήση γλυκερόλης

Για τη δημιουργία αποθεμάτων γλυκερόλης αναμιγνύονται ίσοι όγκοι βακτηριακής καλλιέργειας και γλυκερόλης 50%. Μετά την ανάμιξη τα αποθέματα φυλάσσονται κατευθείαν στους -80°C.

2.16 Δημιουργία βακτηρίων Escherichia Coli (E. Coli) που έχουν μετασχηματιστεί ώστε να έχουν αυξημένη ικανότητα για να προσλαμβάνουν εξωγενές DNA (competent cells)

Κύτταρα στελέχους του E.Coli απλώνονται σε τρυβλίο LB-άγαρ και επωάζονται για περίπου 16 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, επιλέγεται μια αποικία βακτηρίων και επωάζεται σε LB με συνεχή ανάδευση στους 37°C για περίπου 16 ώρες. Την επόμενη μέρα, ποσότητα 1ml από την καλλιέργεια μεταφερόταν σε κωνική φλάσκα που περιείχε 50ml LB. Η καλλιέργεια επωαζόταν, με συνεχή ανάδευση μέχρι η οπτική απορρόφηση (O.D.) να βρίσκεται μεταξύ 0.5-1.0. Στη συνέχεια,

πραγματοποιούνταν φυγοκέντρηση της καλλιέργειας. Το ίζημα αναδιαλύονταν προσεκτικά σε στείρο διάλυμα 0.1M CaCl₂ που είχε προηγουμένως επωαστεί σε πάγο. Το εναιώρημα που δημιουργούταν επωαζόταν σε πάγο για 15 λεπτά. Πραγματοποιούνταν φυγοκέντρηση και το ίζημα αναδιαλύονταν προσεκτικά σε 3.3ml κρύου διαλύματος 0.1 M CaCl₂ και 15% γλυκερόλης. Πραγματοποιούνταν επώαση για 4 ώρες σε πάγο και κατόπιν το εναιώρημα διαμοιραζόταν σε στείρα σωληνάρια erpendorf. Τα σωληνάρια εμβαπτίζονται σε διάλυμα ξηρού πάγου και αιθανόλης ώστε να παγώσουν γρήγορα και φυλάσσονται κατευθείαν στους -80°C.

2.17 Μετασχηματισμός βακτηρίων E.coli (transformation)

Χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια E.coli μετασχηματισμένα ώστε να έχουν αυξημένη ικανότητα για να προσλαμβάνουν εξωγενές DNA. Σε σωληνάριο όγκου 15ml αναμιγνύονται 100μl βακτηρίων με 0.5-1μg του πλασμιδίου. Μετά από επώαση μισής ώρας στον πάγο, τα βακτήρια υφίστανται θερμικό σοκ με επώαση στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, προστίθεται στα βακτήρια 900μl θρεπτικού μέσου SOC (tryptone 2% w/v, yeast extract 0.5%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM, γλυκόζη 20mM), και καλλιεργούνται για 1 ώρα στους 37°C. Στη συνέχεια 100μl της καλλιέργειας απλωνόταν σε τρυβλίο LB-

άγαρ, το οποίο είχε επιστρωθεί με αμπικιλίνη. Η διαδικασία γινόταν σε στείρες συνθήκες.

2.18 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεσαίας κλίμακας (medium scale plasmid DNA preparation)

Η απομόνωση έγινε με χρωματογραφία χρησιμοποιώντας το σύστημα Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Germany), σε κάποια πειράματα και το NucleoBond® Plasmid PC-100 (Macherey-Nagel) με βάση τις οδηγίες των εταιριών. Εν συντομία, τα βακτήρια αναπτύσσονται σε καλλιέργεια των 50ml για περίπου 16 ώρες, με την παρουσία αμπικιλίνης και κατόπιν συλλέγονται με φυγοκέντρηση 15 λεπτών στις 5000rpm στους 4°C. Ακολουθεί αλκαλική λύση των κυττάρων, συλλογή του πλασμιδιακού DNA από τη στήλη χρωματογραφίας και κατακρήμνιση με προσθήκη 8ml ισοπροπανόλης (0.7 του όγκου) παρουσία γλυκογόνου συγκέντρωσης 2μg/ml. Κατόπιν, ακολουθεί φυγοκέντρηση 30 λεπτών στις 10,000rpm στους 4°C. Το ίζημα που προκύπτει εκπλένεται με διάλυμα 70% αιθανόλης, αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου, στη συνέχεια επαναδιαλύεται σε 100μl διαλύματος Tris-Cl pH 8.0 και φυλάσσεται στους 4°C.

2.19 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (mini scale plasmid preparation)

Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε καλλιέργεια των 3ml με την παρουσία αμπικιλίνης και το DNA απομονώνεται με το σύστημα Nucleobond PC 20 (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας στη περίπτωση που χρειάζεται υψηλής καθαρότητας DNA ή με τη μέθοδο του Στα πειράματα ελέγχου της ενσωμάτωσης του γονιδίου του άγριου τύπου της PKC-ε και των τριών μεταλλαγών αυτού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του βρασμού. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, 3ml βακτηριακής καλλιέργειας επωάζονται υπό συνεχή ανάδευση παρουσία αμπικιλίνης, στους 37°C για περίπου 16 ώρες. Στη συνέχεια, 1.5ml από αυτή την καλλιέργεια τοποθετείται σε σωληνάρια erpendorf, φυγοκεντρούταν για 3 λεπτά στα 13.000g και το ίζημα αναδευόταν ισχυρά σε 200μl ρυθμιστικού διαλύματος STET (σουκρόζη 8%, Triton-X 0.5%, Tris-HCl 50mM pH 8, EDTA 50mM). Τα σωληνάρια τοποθετούνταν σε νερό, που βράζει για 1,5 λεπτό και φυγοκεντρούνταν για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η πελέττα αφαιρούταν με μια αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και στο υπερκείμενο προστιθέταν 3ml απόλυτης αιθανόλης. Στη συνέχεια, τα σωληνάρια φυγοκεντρούνταν για 15 λεπτά. Το ίζημα που προέκυπτε αφηνόταν να αποξηρανθεί, και επαναδιαλυόταν σε ρυθμιστικό διάλυμα TE (Tris-HCl 10mM pH 8, 1mM EDTA).

2.20 Άλλες μέθοδοι

Η ποσοτικοποίηση των ζωνών που συνδέθηκαν με το αντίσωμα στην ανοσοαποτύπωση κατά Western καθώς και της αμαύρωσης του φιλμ στην αυτοραδιογραφία έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα ImageJ (NIH).

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με την δοκιμασία t-τέστ. Τα κριτήρια σημαντικότητας που χρησιμοποιήθηκαν είναι της τάξεως $P < 0,05$.

Στην περίπτωση των νευρώνων του ιπποκάμπου, η ανάλυση της ανάπτυξης των δενδριτών και των διακλαδώσεων έγινε με το λογισμικό MatLabR2009a (MathWorks) βάσει της ανάλυσης κατά Scholl.

Για το σχεδιασμό και τη δημιουργία των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Vector NTI 8.

3. Αποτελέσματα

3.1 Βελτιστοποίηση της μεθόδου κυτταροκαλλιέργειας των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού και διαφοροποίησής τους προς νευρώνες

Χρησιμοποιήθηκαν τα E14/T Εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα (ESc) μυός.

Τα ESc πλεονεκτούν σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές για τη διαφοροποίηση προς νευρώνες επειδή είναι ευπλοειδή, με τη χρήση κατάλληλων μέσων καλλιέργειας μπορούν να συντηρούν την ικανότητά τους να αυτοαναπαράγονται δημιουργώντας πανομοιότυπους απογόνους, και υπάρχει η δυνατότητα να ταυτοποιείται το είδος των κυττάρων που δημιουργείται στα διάφορα στάδια της διαφοροποίησής τους με τη χρήση αντισωμάτων διαφορετικών πρωτεϊνών (Smith 2001).

Το πρωτόκολλο διαφοροποίησης είναι παραλλαγή του πρωτοκόλλου που στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως 4-/4+. Σύμφωνα με αυτό τα EBs αναπτύσσονται σε μέσο στο οποίο έχει αφαιρεθεί ο LIF για τέσσερις ημέρες και έπειτα για επιπλέον τέσσερις ημέρες σε μέσο στο οποίο έχει προστεθεί ρετινοϊκό οξύ σε συγκέντρωση 0,5-1μM (Bain, Kitchens et al. 1995). Η μέθοδος ξεκίνησε από πειράματα νευρωνικής διαφοροποίησης κυττάρων τερατοκαρκινώματος (Jones-Villeneuve, McBurney et al. 1982). Βελτιστοποιήθηκε από τον Gottlieb και

συνεργάτες ώστε να επιτυγχάνεται η διαφοροποίηση των ESc σε νευρώνες (Gottlieb and Huettner 1999).

Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι η εφαρμογή του πρωτοκόλλου 4-/4+, οδηγεί στη δημιουργία νευρώνων σε ποσοστό 50%-95%. Οι νευρώνες που προκύπτουν από την εφαρμογή αυτού του πρωτοκόλλου είναι γλουταμεργικοί και γκαμπαεργικοί (Jones-Villeneuve, McBurney et al. 1982; Bibel, Richter et al. 2004).

Παρουσιάζουν ιοντοτρόπους διαύλους ιόντων ασβεστίου (Ca^{++}), νατρίου (Na^{++}) και καλίου (K^{+}) και σχηματίζουν ενεργές συνάψεις μεταξύ τους. Ηλεκτροφυσιολογικές μετρήσεις στο μετασυναπτικό νευρώνα έχουν δείξει ότι οι μεταξύ τους γλουταμεργικές και γκαμπαεργικές συνάψεις είναι ενεργές και δημιουργούνται δυναμικά ενεργείας που υπακούουν στην απελευθέρωση του γλουταμεργικού ή του γ-άμινο-βουτυρικού οξέος στη σύναψη (Strubing, Ahnert-Hilger et al. 1995; Bibel, Richter et al. 2004)

Πραγματοποίησα μια σειρά πειραμάτων για την επίτευξη της τελειοποίησης της μεθόδου κυτταροκαλλιέργειας των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού και διαφοροποίησής τους προς νευρώνες. Ο στόχος αυτών των πειραμάτων ήταν η αύξηση της βιωσιμότητας των νευρικών κυττάρων που προκύπτουν με αυτή τη μέθοδο διαφοροποίησης περισσότερες από τρεις ημέρες, που αποτελούσε το όριο βιωσιμότητας αρχικά.

Η αύξηση της βιωσιμότητας των νευρώνων μετατρέπει το σύστημα μελέτης που είχε επιλεγεί σε ένα αναπτυσσόμενο σύστημα. Αντίθετα η μικρή επιβίωση των κυττάρων υποδηλώνει ένα θνησιγενές σύστημα και επομένως οι μηχανισμοί και τα κυτταρικά μονοπάτια που χρησιμοποιεί είναι αναμενόμενο να αντιστοιχούν σε μηχανισμούς που συμμετέχουν στην κυτταρική απόπτωση ή τη νέκρωση των κυττάρων. Για την οργάνωση και πραγματοποίησή τους ανέτρεξα στη διεθνή βιβλιογραφία.

Τα πειράματα περιελάμβαναν: Δοκιμή τριών διαφορετικών ορών FBS κατάλληλων για την καλλιέργεια εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, σύμφωνα με τις προδιαγραφές που δίνουν οι εταιρείες εκμετάλλευσης τους. έλεγχος της αναγκαιότητας της χρήσης της β-μερκαπτοαιθανόλης και των μη απαραίτητων αμινοξέων στη φάση της καλλιέργειας των εμβρυοειδών συσσωματωμάτων. Δοκιμή διαφορετικών συγκεντρώσεων FBS και all trans ρετινοϊκού οξέος στο θρεπτικό μέσο στο ίδιο στάδιο διαφοροποίησης.

Η αξιολόγηση γινόταν στο στάδιο της επίστρωσης των κυττάρων των EBs για να δημιουργηθούν νευρώνες. Σε όλες τις περιπτώσεις υπολογίστηκε η βιωσιμότητα, σε ημέρες, των νευρώνων που προέκυπταν από την εφαρμογή των διαφορετικών πειραματικών διαδικασιών.

Από τους ορούς που χρησιμοποιήθηκαν δεν προέκυψε διαφορά που να επηρεάζει στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αυτό που προέκυψε από αυτές τις

πειραματικές δοκιμές είναι ότι είναι αναγκαίο η συγκέντρωση του ορού να είναι 15% κατά τη φάση ανάπτυξης των Εμβρυϊκών Βλαστικών κυττάρων (ESc) και των Εμβρυοειδών συσσωματωμάτων (EBs). Μικρότερες συγκεντρώσεις προκαλούσαν σοβαρή μείωση στη βιωσιμότητα των νευρώνων που δημιουργούνταν από τα ESc. Οι ημέρες επιβίωσης ήταν τρεις ή λιγότερες.

Οι συγκεντρώσεις της β-μερκαπτοαιθανόλης που δοκιμάστηκαν ήταν 0,875μM και 1μM. Δε βρέθηκε διαφορά μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων. Επιλέχθηκε η συγκέντρωση 1μM β-μερκαπτοαιθανόλης.

Οι συγκεντρώσεις του all trans ρετινοϊκού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,25μM, 0,5μM και 1μM. Τα καλύτερα αποτελέσματα στη βιωσιμότητα των κυττάρων έδωσε η συγκέντρωση 0,5μM. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις οι νευρώνες που προέρχονταν από τα ESc επιβίωναν τρεις ημέρες ή λιγότερες. Επιλέχθηκε η συγκέντρωση 0,5μM all trans ρετινοϊκού οξέος.

Δοκιμάστηκαν διαφορετικές πυκνότητες κυττάρων κατά τη δημιουργία των EBs. Οι πυκνότητες που δοκιμάστηκαν ήταν 2×10^6 κύτταρα/cm², 2.5×10^6 κύτταρα/cm², 3×10^6 κύτταρα/cm², 3.25×10^6 κύτταρα/cm², 3.75×10^6 κύτταρα/cm², 5×10^6 κύτταρα/cm². Η βιωσιμότητα των νευρώνων που προέρχονταν από τη διαφοροποίηση των ESc ξεπερνούσε τις 3 ημέρες όταν η πυκνότητα των κυττάρων ήταν 3×10^6 κύτταρα/cm² ή μεγαλύτερη. Επιλέχθηκε η πυκνότητα κυττάρων 3×10^6 κύτταρα/cm² για τη δημιουργία των EBs από τα ESc.

Επιπλέον δοκιμάστηκαν διαφορετικές πυκνότητες κυττάρων κατά την επίστρωση των κυττάρων των EBs σε επιφάνεια καλλιέργειας που προηγουμένως είχε επιστρωθεί με λαμινίνη (laminin), κατά το τελευταίο στάδιο τη διαφοροποίησης των ESc σε νευρώνες. Οι πυκνότητες των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν $2,5 \times 10^5$ κύτταρα/cm², $3,75 \times 10^5$ κύτταρα/cm² και 5×10^5 κύτταρα/cm². Σε όλες τις περιπτώσεις η βιωσιμότητα των κυττάρων ξεπερνούσε τις τρεις ημέρες. Επιλέχθηκε η κυτταρική πυκνότητα 5×10^5 κύτταρα/cm², η οποία χρησιμοποιούνταν κυρίως και ήταν η περισσότερο δοκιμασμένη, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Bibel, Richter et al. 2004).

Κατά τις δοκιμές για τα μη απαραίτητα αμινοξέα στο στάδιο διαφοροποίησης των EBs αποδείχθηκε ότι είναι αναγκαία για την επιτυχή διαφοροποίηση των ESc σε νευρώνες.

Οι παρατηρήσεις κατά την κυτταροκαλλιέργεια κατέδειξαν ότι η μορφολογία των EBs σχετίζεται με την επιτυχημένη διαφοροποίηση των ESc σε νευρώνες. Στην περίπτωση που οι νευρώνες που δημιουργούνταν δεν επιβίωναν περισσότερο από τρεις ημέρες τα EBs είχαν υποκίτρινο χρώμα και κολώδη όψη. Αυτή η μορφολογία γινόταν εμφανής μετά την 5^η ημέρα οπότε και προστιθόταν το ρετινοϊκό οξύ.

Κατά την καλλιέργεια των ESc γινόταν καθημερινή παρατήρηση στο μικροσκόπιο, για τη μορφολογία τους και την πυκνότητά τους στο τρυβλίο. Τα ESc

παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στις αλλαγές του pH και του CO₂ και για αυτό κάθε έξοδο από τον επωαστήρα γινόταν με προσοχή, για σύντομο χρονικό διάστημα και με φειδώ.

Επίσης ευαισθησία σε οποιαδήποτε περιβαλλοντική αλλαγή παρουσιάζουν και οι νευρώνες που προέρχονται από τα ESc. Για αυτό το λόγο και σε αυτή την περίπτωση οι παρατηρήσεις γινόταν με φειδώ, όταν το πειραματικό πρωτόκολλο το επέτρεπε.

Με τις βελτιώσεις που εφάρμοσα στο πειραματικό πρωτόκολλο επιτεύχθηκε η επιβίωση των νευρώνων για περισσότερο από 12 ημέρες. Ταυτόχρονα επιτεύχθηκε να έχουμε καλλιέργεια στην οποία τα κύτταρα ήταν νευρώνες σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% για τουλάχιστον 8 ημέρες.

Το πρωτόκολλο στο οποίο κατέληξα και το οποίο εφάρμοσα είναι το εξής:

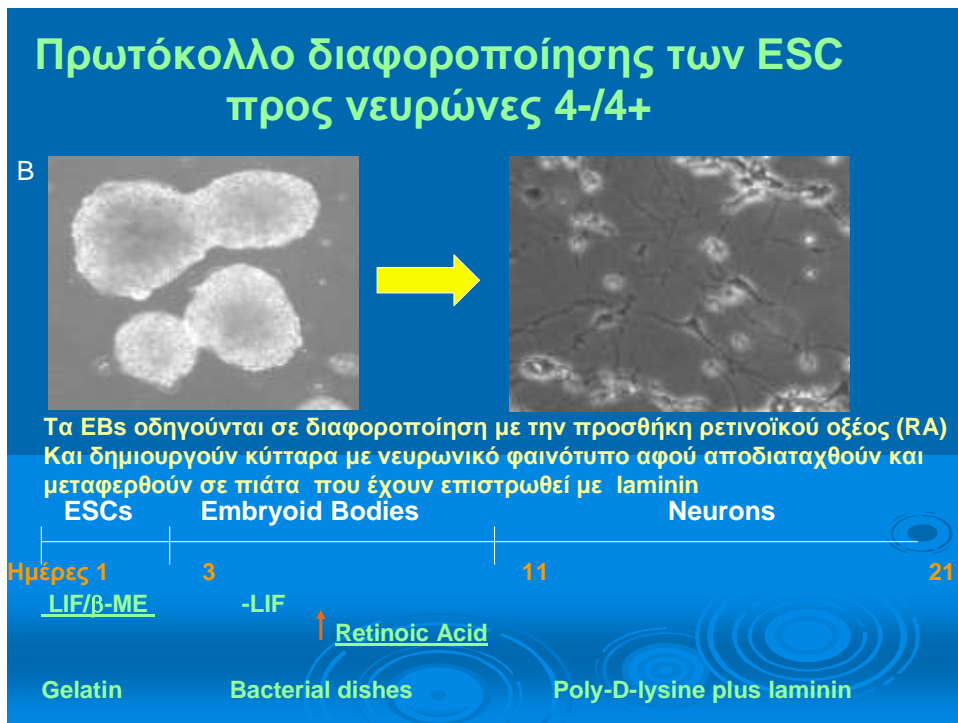
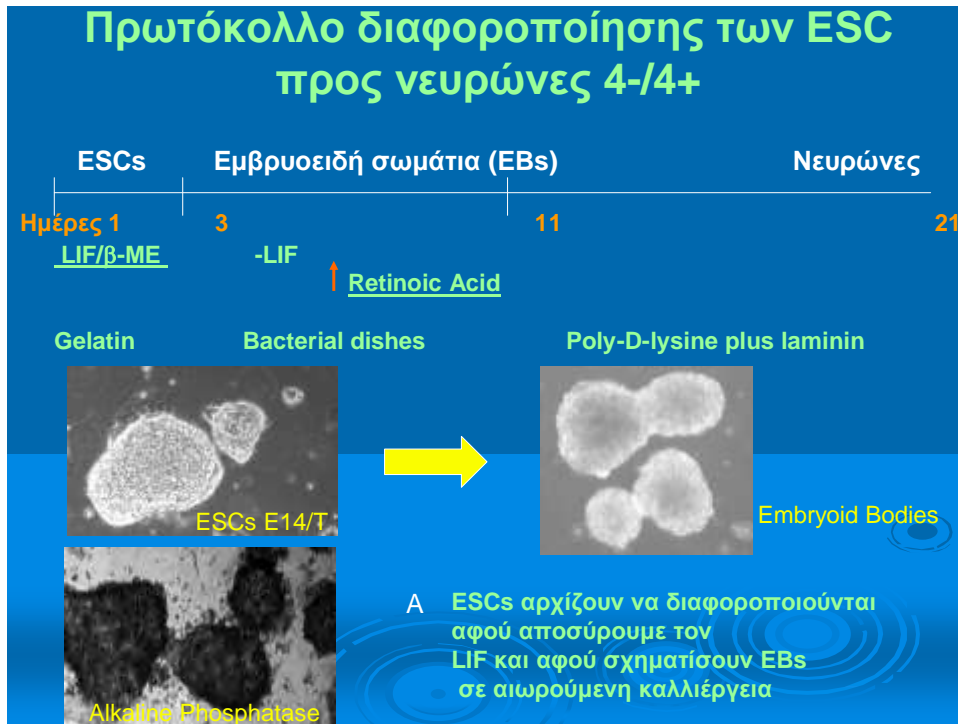
Τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα αναπτύσσονται σε τρυβλία τα οποία έχουν επιστρωθεί με gelatin 0,2% σε θρεπτικό μέσο που συνίσταται σε DMEM-4500mg Glucose + pyruvate + 15% FBS κατάλληλο για εμβρυικά βλαστικά κύτταρα + 1% πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη + 1% μη απαραίτητα αμινοξέα + 2mM L-Glutamine + β-μερκαπτοαιθανόλη 1μM +Ανασταλτικός παράγοντας της Λευχαιμίας (LIF) 1000 U/ml. Η επίστρωση των κυττάρων γίνεται σε πυκνότητα 190000κύτταρα/cm².

Όταν τα ESc αποκτούσαν την κατάλληλη πυκνότητα στα τρυβλία μεταφέρονταν σε 100mm τρυβλία βακτηρίων σε πυκνότητα 3x10⁶ κύτταρα/τρυβλίο προκειμένου

να δημιουργηθούν τα EBs. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται είναι αυτό των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων χωρίς τον LIF. Την 5η ημέρα της καλλιέργειας των εμβρυοειδών συσσωματωμάτων μετατρέπεται η συγκέντρωση του FBS σε 10% και προτίθεται 0,5μM all trans ρετινοϊκό οξύ. Σε αυτό το θρεπτικό μέσο τα εμβρυοειδή συσσωματώματα παραμένουν για 4 ημέρες.

Την 8^η ημέρα γίνεται αποδιάταξη των εμβρυοειδών συσσωματωμάτων σε μονήρη κύτταρα, τα οποία επιστρώνονται σε τρυβλία επικαλυμμένα με πολυ-D-λυσίνης (poly-D-lysine) 10μg/ml και laminin 0.5 μg/cm², και σε πυκνότητα 500000 κύτταρα/cm². Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται την πρώτη ημέρα συνίσταται σε DMEM-4500mg Glucose + F-12 σε αναλογία 1:1 + N2 1% + 2mM L-Glutamine. Το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται αρχικά στις 2 ώρες και έπειτα στις 24 ώρες. Τη δεύτερη ημέρα γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε B18, όπως περιγράφεται από τον Brewer G. Το θρεπτικό μέσο ανανεωνόταν κάθε 48 ώρες.

(Εικόνα 3.1)



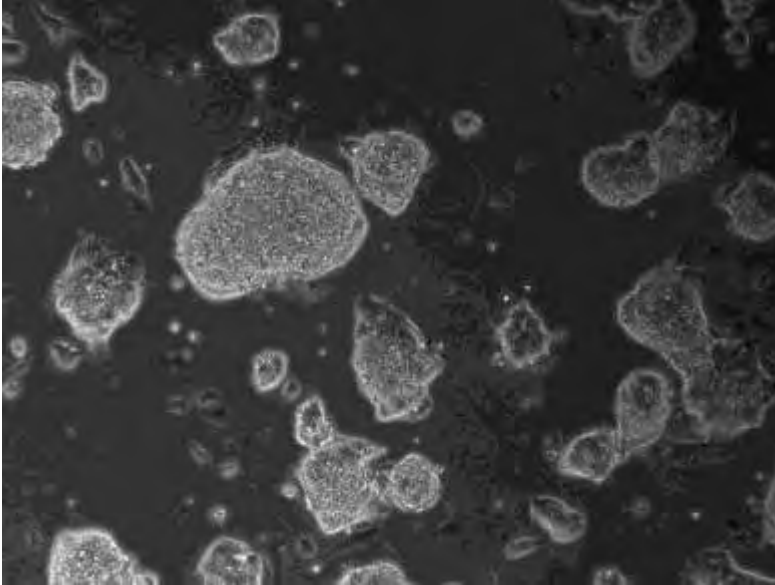
Εικόνα 3.1: Σχηματική παράσταση του πρωτοκόλλου διαφοροποίησης των ESC σε νευρώνες. **A:** Στάδιο διαφοροποίησης των ESC σε EBs. Τα ESC αναπτύσσονται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο που περιέχει και LIF και σε τρυβλία που έχουν

κατεργαστεί με gelatin. Τα ESc εξετάζονταν για τον εμβρυϊκό τους χαρακτήρα με την αντίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης. Όταν τα ESc φθάσουν στην κατάλληλο αριθμό στο τρυβλίο, ακολουθείται η διαδικασία μετατροπής τους σε EBs και στο θρεπτικό προστίθεται all trans ρετινοϊκό οξύ και αφαιρείται ο LIF. **B:** Μετατροπή των EBs σε νευρώνες: Το ρετινοϊκό οξύ αφαιρείται μετά από 4 ημέρες και τα EBs παραμένουν στην καλλιέργεια για επιπλέον 4 ημέρες. Την 9^η ημέρα της καλλιέργειάς τους τα EBs αποδιατάσσονται και επιστρώνονται σε τρυβλία ώστε να διαφοροποιηθούν σε νευρώνες. β-ME: β-μερκαπτοαιθανόλη.

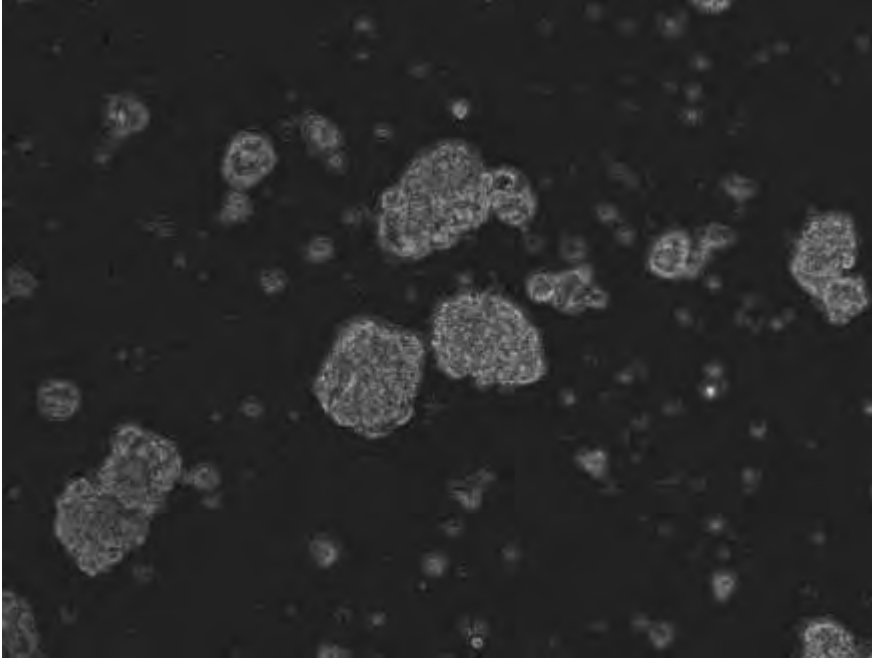
Το παραπάνω πρωτόκολλο έχει στηριχθεί σε προηγούμενη δημοσιευμένη εργασία (Bibel, Richter et al. 2004) σύμφωνα με την οποία επιτυγχάνεται η διαφοροποίηση των ESc σε νευρώνες σε ποσοστό που ξεπερνά το 95%. Παράλληλα επιτεύχθηκε η επιβίωση των νευρώνων στο τρυβλίο, για περισσότερες από 4 ημέρες.

Από την πρώτη ημέρα καλλιέργειας στα κύτταρα που προέρχονταν από τα EBs ανιχνευόταν, με ανοσοϊστοχημεία, η πρωτεΐνη νεστίνη (nestin) σε ποσοστό 95% των κυττάρων (Εικόνα 3.2). Η νεστίνη είναι ενδιάμεσο ινίδιο που εκφράζεται στα νευρικά επιθηλιακά κύτταρα και αποτελεί δείκτη διαφοροποίησης (Shakhona and Sommer 2008). Επομένως από τις πρώτες ώρες της καλλιέργειας το 95% των κυττάρων παρουσίαζαν φαινότυπο νευροεπιθηλιακών κυττάρων. Το αποτέλεσμα

αυτό είναι συμβατό με αποτελέσματα από άλλες ερευνητικές εργασίες (Gottlieb and Huettner 1999; Bibel, Richter et al. 2004).

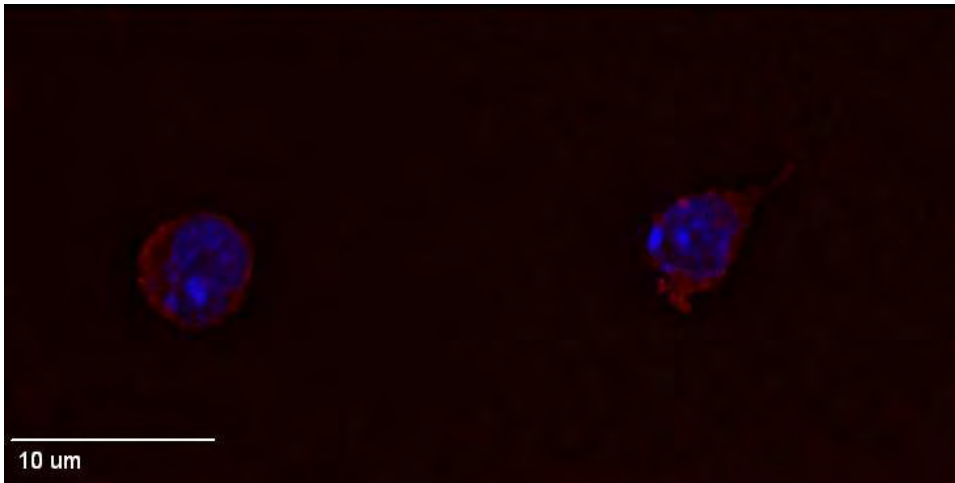


Εικόνα 3.2: Εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα (ESc). Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε αποικίες. Μικροσκόπηση φάσης. Μεγέθυνση 10X.

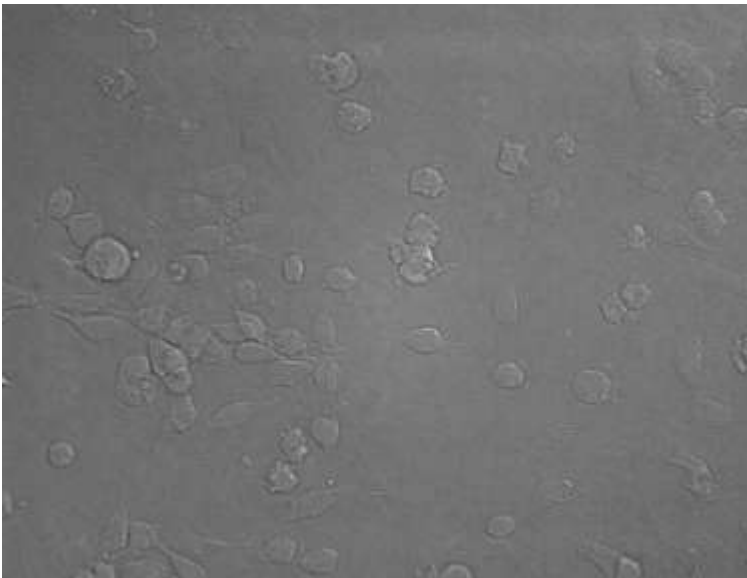


Εικόνα 3.3: Εμβρυοειδή συσσωματώματα. Οι αποικίες των κυτάρων αναπτύσσονται σε τρυβλία βακτηρίων, αιωρούμενες μέσα στο θρεπτικό μέσο. Μικροσκόπηση φάσης. Μεγέθυνση 10X.

A



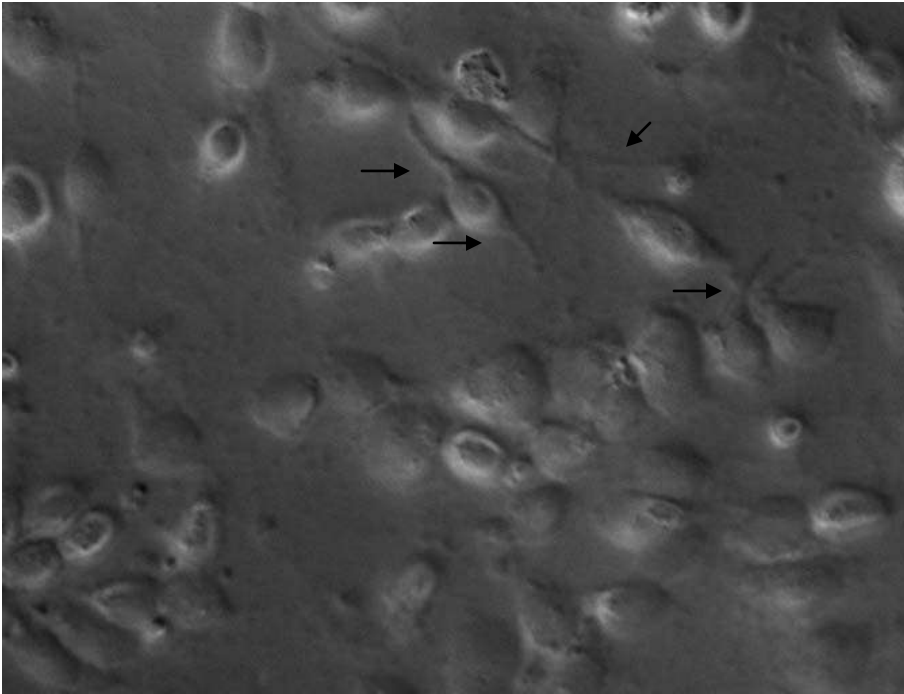
B



Εικόνα 3.4: Νευρωνικά κύτταρα προερχόμενα από τη διαφοροποίηση των Esc, 6 ώρες στην καλλιέργεια. **A:** Ανοσοϊστοχημεία. Τα κύτταρα εκφράζουν νεστίνη από τις πρώτες 6 ώρες στην καλλιέργεια. Μικροσκόπηση με μικροσκόπιο

αποπεριέλιξης. Μεγέθυνση 100X. Κόκκινο: νεστίνη, Μπλε: DAPI. **B:** Κάποια από τα κύτταρα έχουν αρχίσει να παρουσιάζουν νευριτικές προσεκβολές.

Μικροσκόπηση phase με τεχνική αποπεριέλιξης. Μεγέθυνση 63X.



Εικόνα 3.5: Νευρικά κύτταρα προερχόμενα από τη διαφοροποίηση των ESc, μετά από 24 ώρες στην καλλιέργεια. Τα κύτταρα σχηματίζουν νευριτικές προσεκβολές (βέλη). Μικροσκόπηση διαφορικής ανάμειξης αντίθεσης φάσης (DIC) με τεχνική αποπεριέλιξης. Μεγέθυνση 100X.

Μετά από τις πρώτες 24 ώρες από την αποδιάταξη των EBs και την επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία τα οποία είχαν προηγουμένως κατεργαστεί με πόλυ-D-

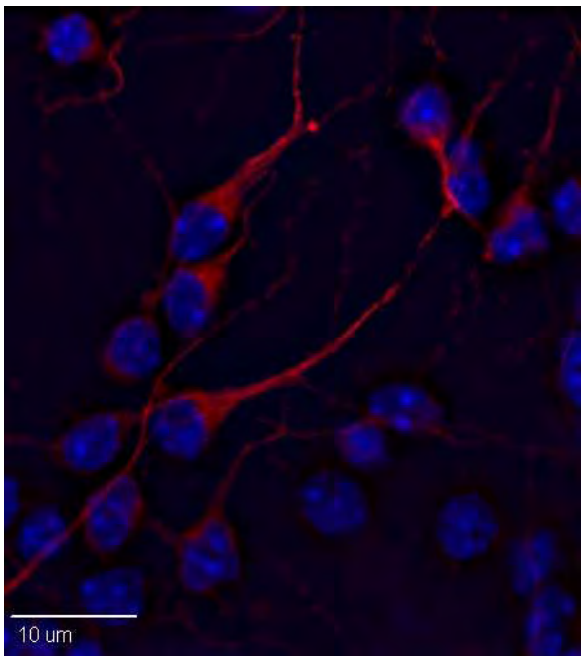
λυσίνη και λαμινίνη, για να διαφοροποιηθούν σε νευρώνες, τα κύτταρα που προέκυπταν παρουσίαζαν νευρωνικό χαρακτήρα.

Από τη μελέτη των Bibel και συνεργατών φαίνεται ότι οι νευρώνες που προκύπτουν από την εφαρμογή αυτού του πρωτοκόλλου είναι πυραμυδικοί νευρώνες που χρησιμοποιούν το γλουταμικό οξύ ως νευροδιαβιβαστή. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση και η μελέτη των νευρώνων που προέκυψαν από την διαφοροποίηση των ESc.

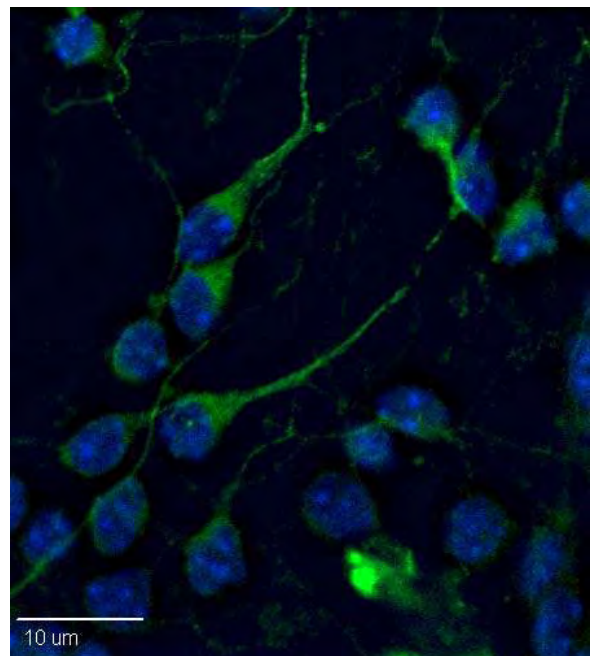
Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ενάντια στη β-τουμπουλίνη-τάξης III, (tubj-1) και ενάντια στο κυστικό μεταφορέα του γλουταμικού οξέος-1(vGlut1). Η β-τουμπουλίνη-τάξης III είναι πρωτεΐνη που παράγεται στους νευρώνες του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος και έχει ρόλο στο σχηματισμό των μικροσωληνίσκων στο σώμα και τους νευράξονες των νευρικών κυττάρων. Ο vglut1 είναι μεμβρανική πρωτεΐνη που προσλαμβάνει το γλουταμικό οξύ και το μεταφέρει από το συναπτικό χώρο στα κυστίδια. Εκφράζεται από τα περισσότερα πυραμυδικά κύτταρα στο ιππόκαμπο και στον εγκεφαλικό φλοιό (Fremeau, Troyer et al. 2001). Η ανοσοϊστοχημεία στους νευρώνες που προήλθαν από τη διαφοροποίηση των ESc έδειξε ότι τα κύτταρα έκφραζαν τη β-τουμπουλίνη-τάξης III και η vglut1 μετά από το πρώτο 24ωρο στην καλλιέργεια.

Μετά από το 48 ώρες στην καλλιέργεια το ποσοστό των νευρώνων στους οποίους ανιχνεύονταν η β -τουμπουλίνη-τάξηςIII και η vglut1 ήταν περισσότερο από 95% (Εικόνες 3.6, 3.7).

A

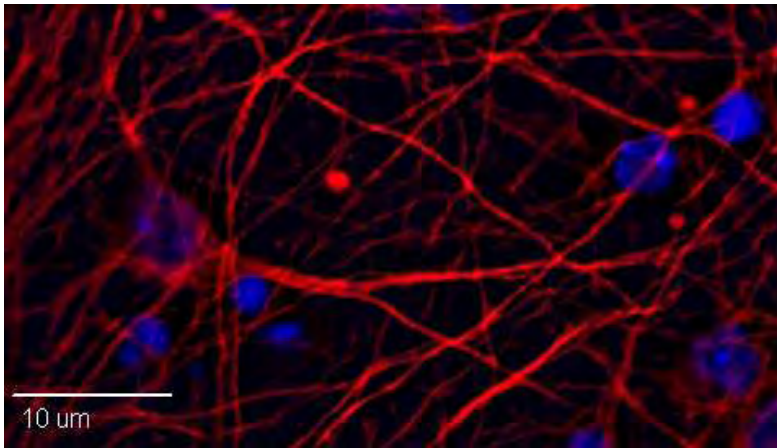


B

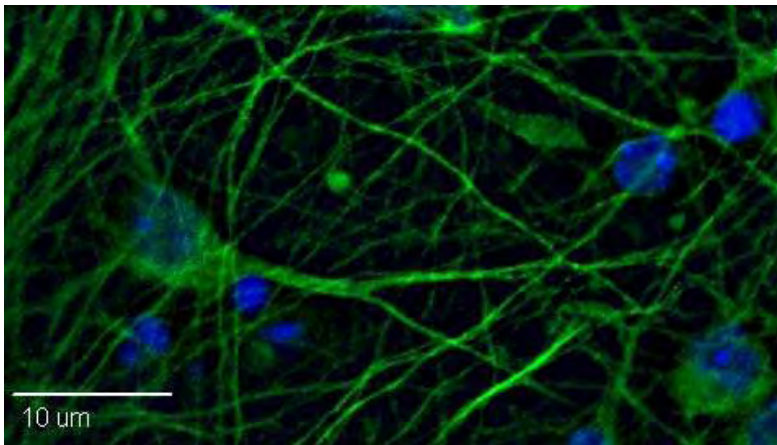


Εικόνα 3.6: Νευρώνες προερχόμενοι από τη διαφοροποίηση των ESc δύο ημέρες στην καλλιέργεια μετά από την αποδιάταξη των EBs. **A:** Τα κύτταρα εκφράζουν την πρωτεΐνη β -τουμπουλίνη-τάξηςIII (κόκκινο). **B:** Τα κύτταρα εκφράζουν την πρωτεΐνη vglut1(πράσινο). Μπλε: DAPI. Μικροσκόπηση με ανοσοφθορισμό και τεχνική αποπεριέλιξης. Μεγέθυνση 100X.

A



B



Εικόνα 3.7: Νευρώνες προερχόμενοι από τη διαφοροποίηση των ESc επτά ημέρες στην καλλιέργεια μετά από την αποδιάταξη των EBs. **A:** Τα κύτταρα εκφράζουν την πρωτεΐνη β-τουμπουλίνη-τάξηςIII (κόκκινο). **B:** Τα κύτταρα εκφράζουν την πρωτεΐνη vglut1(πράσινο). Μπλε: DAPI. Μικροσκόπηση με ανοσοφθορισμό και τεχνική αποπεριέλιξης. Μεγέθυνση 100X. Μετά από 48 ώρες στην καλλιέργεια το 95% των νευρώνων έκφραζαν τις δυο πρωτεΐνες.

Συμπερασματικά: Σκοπός αυτών των πειραμάτων δεν ήταν η ανακάλυψη ενός νέου πρωτοκόλλου διαφοροποίησης των ESc σε νευρώνες. Τα πειράματα έγιναν ώστε να προσαρμοστεί το πρωτόκολλο στις συνθήκες του εργαστηρίου. Ο στόχος ήταν να δημιουργηθεί ένα κυτταρικό μοντέλο διαφοροποίησης για να διερευνηθεί ο ρόλος της PKC-ε.

Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο 4-/4+ για τη διαφοροποίηση των ESc σε νευρώνες, όπως εφαρμόστηκε από τους Bibel και συνεργάτες με κάποιες παραλλαγές. Οι νευρώνες που προέκυψαν με την εφαρμογή αυτού του πρωτοκόλλου αποτελούσαν ποσοστό μεγαλύτερο από 95% των κυτάρων της καλλιέργειας. Επίσης σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% έκφραζαν την πρωτεΐνη vGlut1 που χαρακτηρίζει τους γλουταμινεργικούς νευρώνες. Επιπλέον με κάποιες βελτιώσεις επιτεύχθηκε η επιβίωση των κυτάρων για περισσότερο από 12 ημέρες στην καλλιέργεια. Ταυτόχρονα επιτεύχθηκε να έχουμε καλλιέργεια στην οποία τα κύτταρα ήταν νευρώνες σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% για τουλάχιστον 8 ημέρες.

Επιτεύχθηκε λοιπόν η σωστή εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου που αποτελεί το εργαλείο με το οποίο επιχείρησα να μελετήσω τη ρόλο της PKC-ε σε ένα μοντέλο διαφοροποίησης των ESc σε νευρώνες.

3.2 Μεταβολή των επιπέδων του mRNA των PKC κατά τα στάδια διαφοροποίησης των ESc σε νευρώνες. Μεταβολή των επιπέδων της PKC-ε σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

Προκειμένου να διερευνήσουμε εάν τα επίπεδα των mRNA των PKC μεταβάλλονται κατά τη διαφοροποίηση των ESc σε νευρώνες χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ημιποσοτικού προσδιορισμού με RT-PCR. Αρχικά έγινε απομόνωση του ολικού RNA από τα κύτταρα των διαφόρων σταδίων της διαφοροποίησης των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Έπειτα δημιουργήθηκε το συμπληρωματικό DNA και στη συνέχεια έγινε η αντίδραση PCR. Οι τεχνικές περιγράφονται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι».

Κατά τη μέθοδο του ημιποσοτικού προσδιορισμού είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί εκείνος ο αριθμός των κύκλων στους οποίους το παραγόμενο προϊόν να βρίσκεται στη φάση της εκθετικής του αύξησης. Για επιτευχθεί αυτό, βρήκα για το κάθε μόριο το αριθμό των κύκλων στο οποίο το παραγόμενο προϊόν φθάνει στο σημείο στο οποίο επιπλέον αντίδραση δεν προκαλεί αύξηση του επιπέδου του, όπως απεικονίζεται στη γέλη αγαρόζης. Αυτό έγινε για κάθε PKC και για τη GAPDH.

Ο αριθμός των κύκλων της PCR αντίδρασης στους οποίους κατέληξα φαίνονται στον πίνακα 3.1.

Πρωτεΐνη	Αριθμός κύκλων στην PCR αντίδραση
PKC-α	31
PKC-β	31
PKC-γ	35
PKC-δ	28
PKC-ε	41
PKC-ζ	32
PKC-η	30
PKC-θ	35
PKCι/λ	25
GAPDH	23

Πίνακας 3.1: Ο αριθμός των κύκλων που χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει ο ημιποσοτικός προσδιορισμός της μεταβολής των mRNA των PKC κατά τα στάδια της διαφοροποίησης των ESc σε νευρώνες.

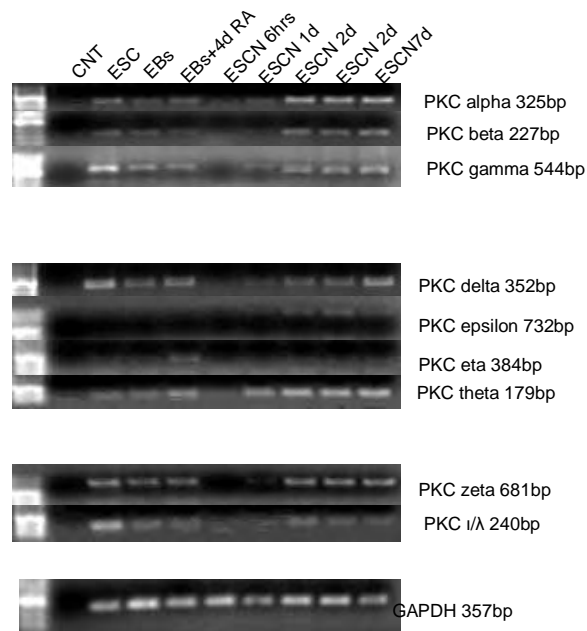
Για τον προσδιορισμό του αριθμού των κύκλων χρησιμοποιήθηκαν το ολικό RNA που είχε εξαχθεί από του νευρώνες 8 ημερών στο τρυβλίο. Η επιλογή έγινε με βάση τα αποτελέσματα των PCR αντιδράσεων που πέραμαμε για την PKC-ε, επειδή αυτή ήταν η πρωτεΐνη του βασικού ενδιαφέροντος. Το προϊόν της κάθε

αντίδρασης PCR , για κάθε συμπληρωματικό DNA στο mRNA της κάθε πρωτεΐνης, για κάθε στάδιο διαφοροποίησης, υπολογίστηκε για τη φωτεινότητά του, όπως απεικονιζόταν στη γέλη αγαρόζης 1%, με τη χρήση του προγράμματος Image J. Η φωτεινότητα σε αυτά τα πειράματα αντιστοιχεί, ποιοτικά, στην ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης και κατά επέκταση στην αρχική ποσότητα του mRNA που υπήρχε στο κύτταρο.

Η GAPDH είναι ένα μόριο που θεωρείται ότι παραμένει σταθερό στους διάφορους τύπους των κυττάρων και δε μεταβάλλεται αισθητά κατά τη διαφοροποίηση. Ο λόγος της φωτεινότητας του προς εξέταση μορίου προς τη φωτεινότητα της GAPDH θεωρείται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να υπάρξει ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων και να μετριάσουν τα σφάλματα που προκύπτουν από τις εκάστοτε συνθήκες του πειράματος.

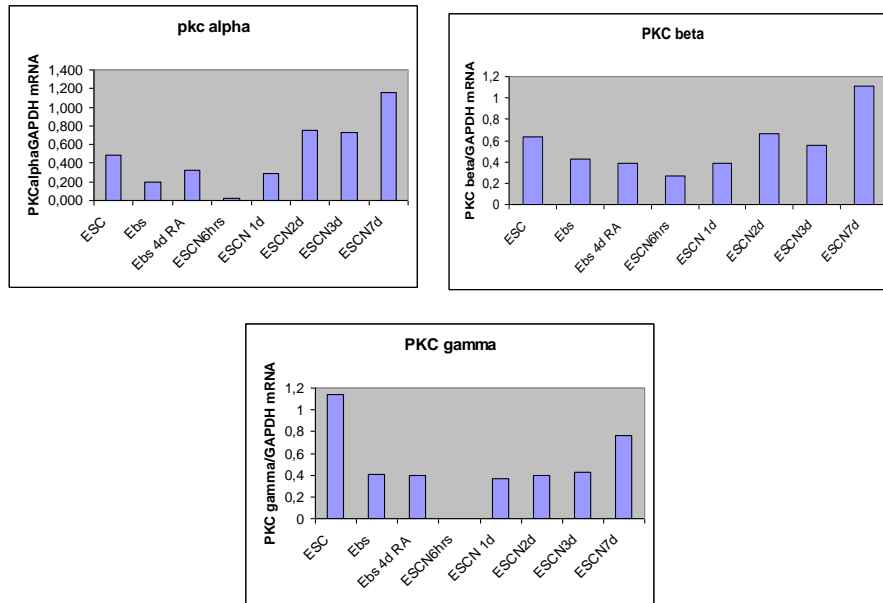
Επομένως προκειμένου να επιτύχουμε τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των mRNA των διαφορετικών PKC στα διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης σχηματίσαμε το λόγο της φωτεινότητας του προς εξέταση μορίου προς αυτή της GAPDH.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στις εικόνες 3.8 και 3.9

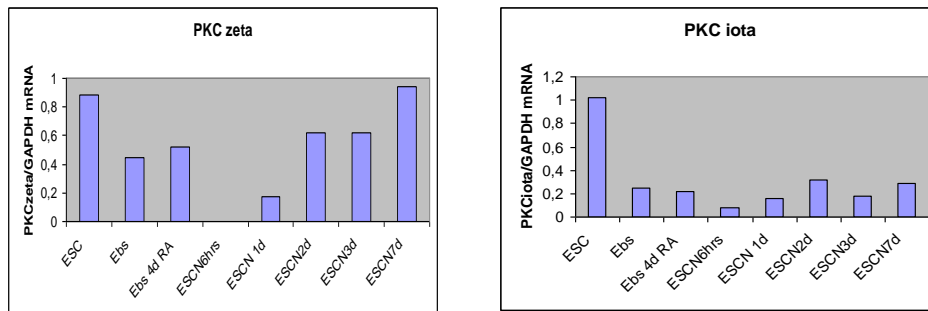


Εικόνα 3.8: Τα αποτελέσματα της RT-PCR μεθόδου για το mRNA για κάθε PKC και για τη GAPDH. Τα δείγματα έχουν διαχωριστεί σε πηκτή αγαρόζης 1%. CNT: control, ESC: Εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα EBs: Εμβρυοειδή συσσωματώματα, EBs+4d RA: Εμβρυοειδή συσσωματώματα στα οποία έχει προστεθεί ρετινοϊκό οξύ για 4 ημέρες, ESCN6hrs: Νευρώνες 6 ώρες στην καλλιέργεια, ESCN1d: Νευρώνες 1 ημέρα στην καλλιέργεια, ESCN2d: Νευρώνες 2 ημέρες στην καλλιέργεια, ESCN3d: Νευρώνες 3ημέρες στην καλλιέργεια, ESCN7d: Νευρώνες 7 ημέρες στην καλλιέργεια.

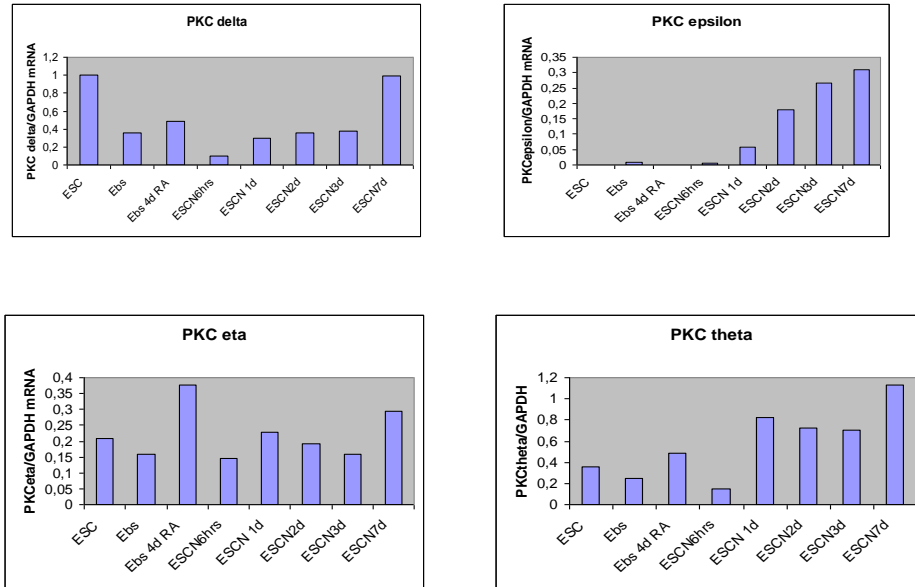
A: Κλασικές PKC



Γ: Άτυπες PKC



B: Καινοφανείς PKC

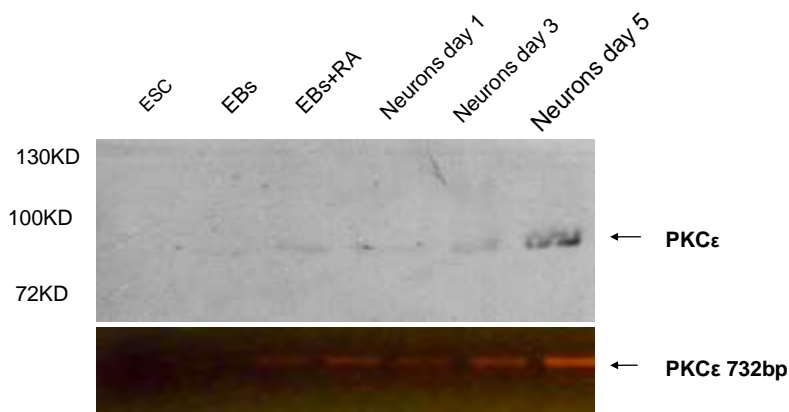


Εικόνα 3.9: Ημιποσοτικός προσδιορισμός του λόγου της έντασης της φωτεινότητας στα προϊόντα της RT-PCR αντίδρασης της κάθε PKC προς την ένταση της φωτεινότητας στο προϊόν της RT-PCR αντίδρασης της GAPDH, στο κάθε στάδιο διαφοροποίησης. CNT: control, ESC: Εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα Ebs: Εμβρυοειδή συσσωματώματα, EBs+4d RA: Εμβρυοειδή συσσωματώματα στα οποία έχει προστεθεί ρετινοϊκό οξύ για 4 ημέρες, ESCN6hrs: Νευρώνες 6 ώρες στην καλλιέργεια, ESCN1d: Νευρώνες 1 ημέρα στην καλλιέργεια, ESCN2d: Νευρώνες 2 ημέρες στην καλλιέργεια, ESCN3d: Νευρώνες 3ημέρες στην καλλιέργεια, ESCN7d: Νευρώνες 7 ημέρες στην καλλιέργεια. **A:** Κλασικές PKC, **B:** Καινοφανείς PKC, **Γ:** Άτυπες PKC.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το mRNA της PKC-ε αυξάνεται όσο οι νευρώνες προχωρούν προς τη διαφοροποίησή τους. Στις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα του mRNA της PKC-ε ξεκινούν από σχεδόν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στα ESc σε υψηλά επίπεδα στους νευρώνες που βρίσκονται για 7 ημέρες στο τρυβλίο. Επομένως προϊούσας της διαδικασίας διαφοροποίησης φαίνεται ότι τα κύτταρα παρουσιάζουν αύξηση στην ανάγκη για μεταγραφή του γονιδίου της PKC-ε. Αυτό συμβαδίζει με τα αποτελέσματα που έχουν δημοσιευτεί και τα οποία δείχνουν αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης στα διάφορα στάδια διαφοροποίησης των νευρώνων στο ΚΝΣ του εμβρύου όρνιθας (Mangoura, Sogos et al. 1993).

Η αύξηση των επιπέδων του mRNA παρατηρείται από τις πρώτες 6 ώρες των κυττάρων στην καλλιέργεια, οπότε και έχουν κυρίως νευροεπιθηλιακό χαρακτήρα. Ακόμα και σε αυτό το στάδιο όμως το mRNA βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε σχέση με τα επίπεδα που φθάνει όταν αποκτηθεί ο νευρωνικός χαρακτήρας, όπως εκδηλώνεται με την έκφραση της β-τουμπουλίνης-τάξης III και της vGLUT1. Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα του PCR και στο πρωτεϊνικό επίπεδο έκανα Western Blot ανάλυση χρησιμοποιώντας αντίσωμα για την PKC-ε. (Εικόνα 3.10).

Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης στα διάφορα στάδια διαφοροποίησης των ESC προς νευρώνες ακολουθούν το ίδιο πρότυπο μεταβολής με το mRNA. Και στο επίπεδο της πρωτεΐνης η PKC-ε αυξάνεται, εντός του πρώτου 24ώρου από την αποδιάταξη των EBs. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει και ενισχύει το αποτέλεσμα που έδειξε ο ημιποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων του mRNA (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10: Τα επίπεδα της πρωτεΐνης της PKC-ε ακολουθούν το πρότυπο μεταβολής των επίπεδα του mRNA της. ESC: Εμβρυϊκά Βλαστικά κύτταρα EBs: Εμβρυοειδή συσσωματώματα, EBs+4d RA: Εμβρυοειδή συσσωματώματα στα οποία έχει προστεθεί ρετινοϊκό οξύ για 4 ημέρες, N1d: Νευρώνες 1 ημέρα στην καλλιέργεια, ESCN3d: Νευρώνες 3ημέρες στην καλλιέργεια, ESCN5d: Νευρώνες

5 ημέρες στην καλλιέργεια. Σε κάθε στάδιο χρησιμοποιήθηκαν 20μgr ολικής πρωτεΐνης.

Μεταβολές παρουσιάζουν και οι υπόλοιπες PKC.

PKC-α: Η pKC-α εμπλέκεται σε ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών λειτουργιών. Η λειτουργία της καθορίζεται από το τύπο του κυττάρου. Έτσι στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού δρα ευοδωτικά στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ σε κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων του μαζικού αδένου δρα ανασταλτικά στην κυτταρική διαίρεση. Επίσης έχει ρόλο στην απόπτωση την οποία προωθεί ή αναστέλλει ανάλογα με το τύπο των κυττάρων. Προάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων των αιμοποιητικών σειρών και φαίνεται να έχει ρόλο στη δημιουργία καρκινικών κυττάρων στο μαζικό αδένου, στο κεντρικό νευρικό σύστημα στην υπόφυση στο θυρεοειδή αδένου. Τέλος εμπλέκεται στην υπερτροφία του μυοκαρδίου και στις διαδικασίες της φλεγμονής (Nakashima 2002). Σε προηγούμενες εργασίες έχειδειχθεί ότι η διαφοροποίηση των κυττάρων του νευροβλαστώματος πραγματοποιείται όταν η PKC-α έχει λειτουργική δράση στο κύτταρο. Όταν η δράση της κατασταλεί, με επίδραση στα κύτταρα TPA σε συγκέντρωση 1,6μM τότε διακόπτεται και η διαφοροποίηση των κυττάρων. Επίσης στην ίδια εργασία φαίνεται ότι μετά την επίδραση με TPA 16nM στα κύτταρα νευροβλαστώματος, η PKC-α παραμένει ενεργή για επιπλέον 4 ημέρες

μετά από τη λήξη της κατεργασίας με TPA. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η PKC-α έχει ένα ευρύτερο ρόλο στη διαφοροποίηση των κυττάρων νευροβλαστώματος (Parrow, Nanberg et al. 1992).

Στο αποτέλεσμα του ημιποσοτικού υπολογισμού του mRNA της PKC-α φαίνεται να ακολουθεί πτωτική πορεία στα στάδια από τα ESc έως και την κατεργασία των EBs με ρετινοϊκό και ανοδική πορεία μετά από το πρώτο 24ωρο μετά την αποδιάταξη των EBs. Η κατανομή αυτή δείχνει ότι πιθανά να σχετίζεται με τη διαδικασία της διαφοροποίησης προς νευρώνες. Η υπόθεση ενισχύεται και από τα αποτελέσματα της μελέτης των Parrow και συνεργατών.

PKC-β: Ακολουθεί το ίδιο πρότυπο μεταβολής με την PKC-α. Πειράματα που έχουν γίνει σε κύτταρα νευροβλαστώματος έχουν δείξει ότι προάγει τη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων και αυξάνει το μήκος των προσεκβολών τους (Kawakami, Kawakami et al. 2002). Η αύξησή της στη φάση της διαφοροποίησης προς νευρώνες είναι πιθανό να σχετίζεται με αυτή τη δράση της.

PKC-γ: Η PKC-γ ισομορφή εντοπίζεται κυρίως στον εγκέφαλο. Έχει βρεθεί ότι ευοδώνει τη λειτουργία της LTP (Saito and Shirai 2002). Ακολουθεί και αυτή το ίδιο πρότυπο μεταβολής με τις PKC-α και PKC-β. Καθώς πρόκειται για πρωτεΐνη που εντοπίζεται κυρίως στο εγκέφαλο και με βάση τις παραπάνω δημοσιευμένες μελέτες φαίνεται να είναι αυξημένη η πιθανότητα για συμμετοχή της στην διαφοροποίηση των νευρώνων.

PKC-δ: Η PKC-δ εμπλέκεται ευοδωτικά στη διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος όταν αυτά διαφοροποιούνται υπό την επίδραση του ρετινοϊκού οξέος (Nitti, Furfaro et al.). Στα δικά μας αποτελέσματα η PKC-δ αυξάνει την έκφρασή της στο μεταγραφικό επίπεδο προοιούσας της διαδικασίας της διαφοροποίησης των νευρώνων. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι στα αποτελέσματά μου το mRNA της PKC-δ μειώνεται όταν έχει προστεθεί το ρετινοϊκό οξύ, κάτι που δεν είναι αναμενόμενο με βάση την προαναφερόμενη ανακοίνωση. Η υπόθεση μπορεί να σημαίνει ότι ο μηχανισμός δράσης της είναι διαφορετικός στους νευρώνες σε σχέση με τα κύτταρα του νευροβλαστώματος.

PKC-ζ: Το πρότυπο που παρουσιάζει δείχνει ότι η έκφρασή της καταστέλλεται από το ρετινοϊκό οξύ, στη φάση των EBs, αλλά τα επίπεδά της αυξάνουν σταδιακά μετά την αποδιάταξή τους. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι σε κύτταρα νευροβλαστώματος τα οποία διαφοροποιούνται με τη βοήθεια του νευρικού παράγοντα αύξησης (NGF), η PKC-ζ αυξάνεται σε πρωτεϊνικό επίπεδο και μένει ενεργή στο κυτταρόπλασμα (Wooten, Zhou et al. 1994). Ενδεχομένως η αύξηση που παρατηρείται στο mRNA της να σημαίνει ότι συμβάλλει στη διαφοροποίηση των νευρώνων.

PKC-η: Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η PKC-η αλληλεπιδρά με την GAP-43, σε κύτταρα της κυτταρικής σειράς του εμβρυϊκού καρκινώματος PCC7-Mz, όταν αυτά κατεργάζονται με ρετινοϊκό οξύ προκειμένου να διαφοροποιηθούν

(Esdar, Oehrlein et al. 1999). Στο πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε τα επίπεδα του mRNA της PKC-η δε φαίνεται να μεταβάλλονται ακολουθώντας συγκεκριμένο πρότυπο, που να παραπέμπει σε ρόλο κατά τη διαφοροποίηση των ESc σε νευρώνες.

PKC-θ: Έχει βρεθεί ότι η PKC-θ αυξάνει σε επίπεδο mRNA κατά τη διαφοροποίηση της PC-12 κυτταρικής σειράς κατόπιν κατεργασίας με NGF. Επίσης στην ίδια έρευνα φαίνεται ότι τα επίπεδα του mRNA της πρωτεΐνης παύουν να αυξάνονται όταν η διαφοροποίηση έχει φθάσει στο τελικό της στάδιο (Sparatore, Patrone et al. 2000). Κατά τον ημιποσοτικό προσδιορισμό του mRNA της PKC-θ στη διαφοροποίηση των ESc φαίνεται ότι τα επίπεδα του mRNA αυξάνονται. Αυτό σε σχέση με τα δεδομένα προηγούμενης εργασίας θέτει την υπόθεση ότι είναι πιθανό να έχει κάποιο ρόλο στη διαφοροποίηση των νευρώνων.

PKC-ι/λ: Η PKC-ι/λ φαίνεται να έχει ρόλο στη δημιουργία ενός συνόλου από κακοήθειες όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, του στήθους, του εντέρου του οισοφάγου, του εγκεφάλου. Αναφέρεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την πρόγνωση κάποιων μορφών κακοήθειας (Murray, Kalari et al.). Στο πείραμα του ημιποσοτικού προσδιορισμού του mRNA της κατά τα στάδια διαφοροποίησης των ESc σε νευρώνες φαίνεται ότι έχει αυξημένα επίπεδα στο στάδιο των ESc και

ότι αμέσως μετά τη δημιουργία των EBs τα επίπεδά της πέφτουν και από εκείνο το σημείο παραμένουν σχεδόν σταθερά.

3.3 Η PKC-ε εντοπίζεται στο σύστημα Golgi κατά το σχηματισμό του κεντρικού νευρίτη.

Ορισμοί: Λαμελιπόδιο: Προσεκβολή του κυττάρου που μοιάζει με ανοικτό πανί και περιέχει δίκτυο από F-ακτίνη. Βρίσκεται στα όρια του κυττάρου και συχνά σχετίζεται με τη μετανάστευση του..

Φιλοπόδιο: Μακριά και λεπτή προσεκβολή που βρίσκεται στο όριο του κυττάρου ή στον αυξητικό κώνο και αποτελείται από δέσμες F-ακτίνης (da Silva and Dotti 2002; de Anda, Pollarolo et al. 2005).

Από τα έως τώρα δεδομένα φαίνεται ότι ο σχηματισμός του κεντρικού νευρίτη στους νευρώνες ιπποκάμπου, στην καλλιέργεια, συμβαίνει στο σημείο που είναι συγκεντρωμένα το σύστημα Golgi και το κεντρόσωμα. Ο κεντρικός νευρίτης θα εξελιχθεί στη συνέχεια στο νευράξονα. Κύτταρα με περισσότερα του ενός κεντροσώματα θα έχουν περισσότερους από ένα νευράξονες. Η ύπαρξη του Golgi στο σημείο της δημιουργίας του κεντρικού νευρίτη γίνεται για να καλυφθούν οι ανάγκες του κυττάρου για τη δημιουργία του κεντρικού νευρίτη, ο οποίος εξ' ορισμού έχει το μεγαλύτερο μήκος (de Anda, Pollarolo et al. 2005).

Η ειδική RACK για την PKC-ε είναι η RACK2 (β' -Cop). Η RACK2 είναι η υπεύθυνη πρωτεΐνη για τη μεταφορά της PKC-ε στο σύστημα Golgi. Η σύνδεσή της με την PKC-ε γίνεται μέσω της V₁ περιοχής στο κάρβοξυ-τελικό άκρο της PKC-ε. Όμως έχει βρεθεί ότι η PKC-ε συνδέεται και με το αμινο-τελικό άκρο της RACK2, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρέπει να υπάρχουν και άλλα τμήματα στο μόριο της PKC-ε που αλληλεπιδρούν με τη RACK2. (Csukai, Chen et al. 1997)

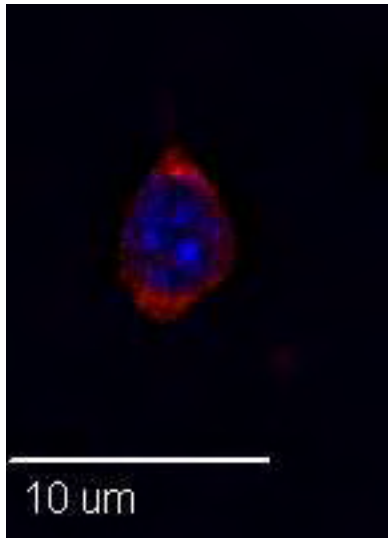
Η υπόθεση που έκανα είναι ότι οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο Golgi που εντοπίζεται στη βάση του κεντρικού νευρίτη έχουν ενζυμικό και δομικό ρόλο στη δημιουργία αυτού. Εάν η PKC-ε εντοπίζεται σε αυτό το σημείο τότε αυτό μπορεί να σημαίνει ότι έχει συμμετοχή στο σχηματισμό του κεντρικού νευρίτη.

Στους νευρώνες που προέρχονται από τη διαφοροποίηση των ESc υπάρχει συνήθως ένας νευράξονας, ο οποίος αρχίζει να δημιουργείται την 1^η ημέρα στην καλλιέργεια.

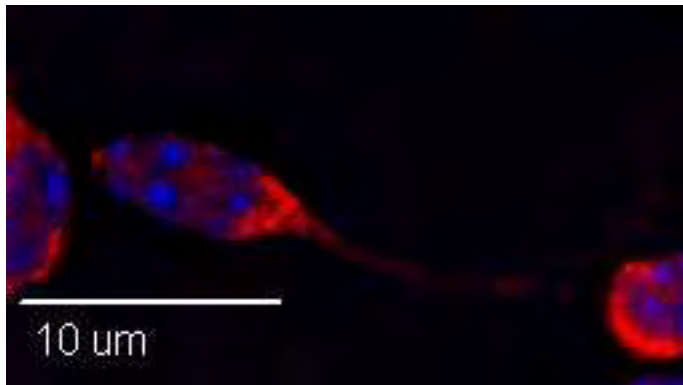
Χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημεία και αντίσωμα κατά της PKC-ε παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο νευρώνες που προέρχονταν από τη διαφοροποίηση των ESc.

Τα αποτελέσματα έδειξαν αρχικά και πριν το σχηματισμό του νευρίτη η PKC-ε κατανέμονταν περιπυρηνικά. Όταν σχηματιζόταν ο νευρίτης η PKC-ε συγκεντρωνόταν κυρίως στο σημείο της δημιουργίας του (Εικόνα 3.11).

A



B



Εικόνα 3.11: Κατανομή της PKC-ε σε διαφορετικές ημέρες ανάπτυξης των νευρώνων που προέρχονται από τη διαφοροποίηση των ESc. **A:** Νευρώνες δυο ημέρες στην καλλιέργεια. **B:** Νευρώνες τρεις ημέρες στην καλλιέργεια. Πριν το σχηματισμό του νευρίτη η PKC-ε εντοπίζεται περιπυρηνικά. Μετά το σχηματισμό του νευρίτη εντοπίζεται κυρίως στη βάση του σχηματισμού του. Κόκκινο: PKC-ε. Μπλε: DAPI. Ανοσοφθορισμός με τεχνική αποπεριέλιξης. Μεγέθυνση 100X.

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε να απαντηθεί το ερώτημα για το αν η PKC-ε εντοπίζεται στο Golgi που βρίσκεται στη βάση του σχηματιζόμενου κύριου νευρίτη.

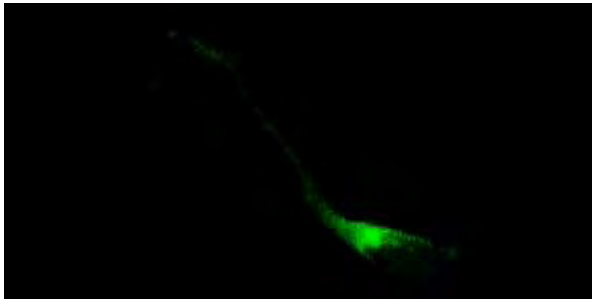
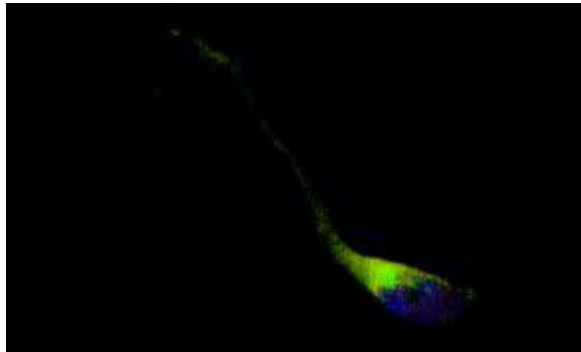
Χρησιμοποιήθηκαν νευρώνες ιπποκάμπου από έμβryo αρουραίου 16 ημερών. Οι νευρώνες διαμολύνθηκαν με το άγριο τύπο του γονιδίου της PKC-ε, το οποίο είναι συνδεδεμένο με EGFP, ώστε να φθορίζει. Ταυτόχρονα στα ίδια κύτταρα έγινε σήμανση με φθορίζων αντίσωμα ενάντια στη β-Cop.

Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό φθορίζων μικροσκόπιο στο οποίο λαμβάνονταν τομές 0,3μm στο οριζόντιο επίπεδο του κυττάρου. Τα παραπάνω έγιναν σύμφωνα με τις τεχνικές που περιγράφονται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι».

Η β-Cop είναι πρωτεΐνη και αποτελεί κύριο συστατικό των κυστιδίων που προέρχονται από το Golgi, και δεν έχουν κλαθρίνη στο περίβλημά τους. Επομένως η εντόπισή τους με φθορίζων μικροσκόπιο δείχνει έμμεσα την εντόπιση του Golgi.

Στα πειράματα που πραγματοποίησα φάνηκε ότι η PKC-ε συνυπάρχει με τη β-Cop και επομένως ότι βρίσκεται στο Golgi (Εικόνα 3.12).

Η εφαρμογή της συνεστιακής μικροσκόπησης αποκλείει την περίπτωση να λαμβάνεται φθορίζων σήμα από τις δύο πρωτεΐνες χωρίς να βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο.

A**B****Γ**

Εικόνα 3.12: Συνεστιακή μικροσκόπηση νευρώνων ιππόκαμπου από έμβρυο επίμυ 16 ημερών. Κόκκινο: PKC-ε. Πράσινο: β-Cop. Μπλε; DAPI. Μεγέθυνση 100X. Z-stack 0,3μm. Το σύστημα Golgi εντοπίζεται στη περιοχή της βάσης του σχηματιζόμενου κύριου νευρίτη. Στο ίδιο σημείο εντοπίζεται και η PKC-ε.

Συμπερασματικά: Η PKC-ε εντοπίζεται στη βάση του κύριου νευρίτη όπου γίνονται οι διεργασίες για το σχηματισμό του. Δημιουργείται επομένως ισχυρή υπόθεση ότι συμμετέχει στις διεργασίες του σχηματισμού του κεντρικού νευρίτη.

3.4 Διαμόλυνση των νευρώνων ιπποκάμπτου

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

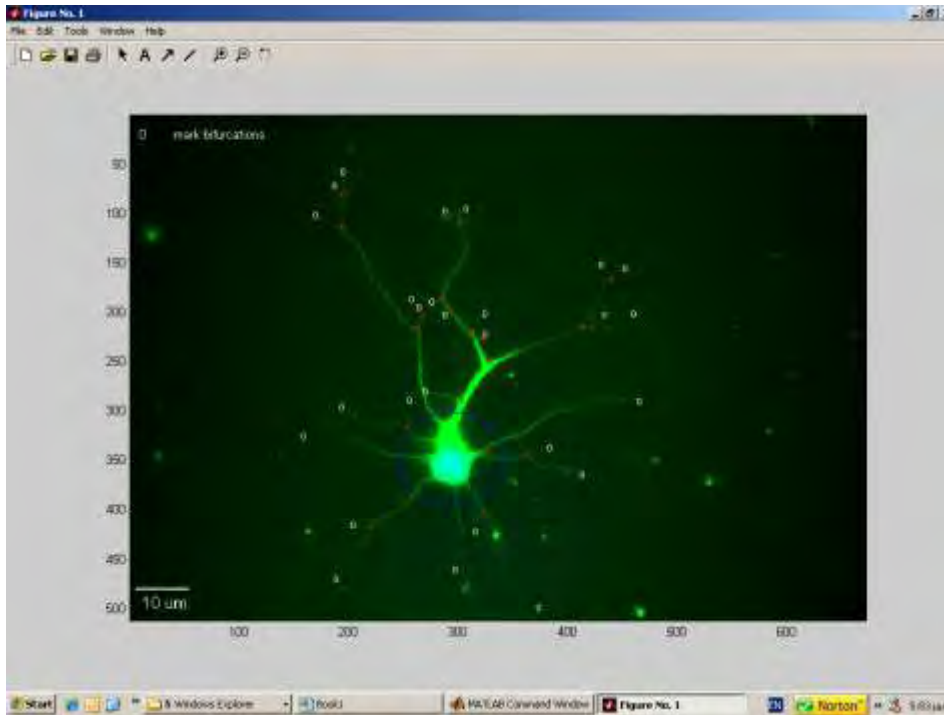
PKC-εWT-EGFP: Άγριου τύπου πρωτεΐνη. Αλληλουχία αμινοξέων 2-732.

PKC-εDN-EGFP: Επικρατές αρνητικό. Χωρίς καταλυτική δράση. Αλληλουχία αμινοξέων 2-732. Στη θέση 437 υπάρχει σημειακή μετάλλαξη με αντικατάσταση μιας λυσίνης από αργινίνη ή μεθειονίνη.

PKC-εΔNPS-EGFP: Συνεχώς ενεργή. Παρουσιάζει έλλειψη ενός τμήματος της πρωτεΐνης. Αλληλουχία αμινοξέων 164-732. Περιέχει τα ρυθμιστικά τμήματα C1a και C1b.

PKC-εCAT-EGFP: Συνεχώς ενεργή. Παρουσιάζει έλλειψη ενός τμήματος της πρωτεΐνης. Αλληλουχία αμινοξέων 395-732. Είναι το κάρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Δεν περιέχει τα ρυθμιστικά τμήματα C1a και C1b.

Διαμολύνθηκαν οι νευρώνες ιπποκάμπτου από έμβρυο 16 ημερών και αφέθηκαν στην καλλιέργεια για 3 ημέρες, σύμφωνα με τις τεχνικές που έχουν περιγραφθεί στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι». Στη συνέχεια μετρήθηκε το συνολικό μήκος των νευριτών τους με τη μέθοδο κατά Sholl και την εφαρμογή του προγράμματος MatLab (Εικόνα 3.13).



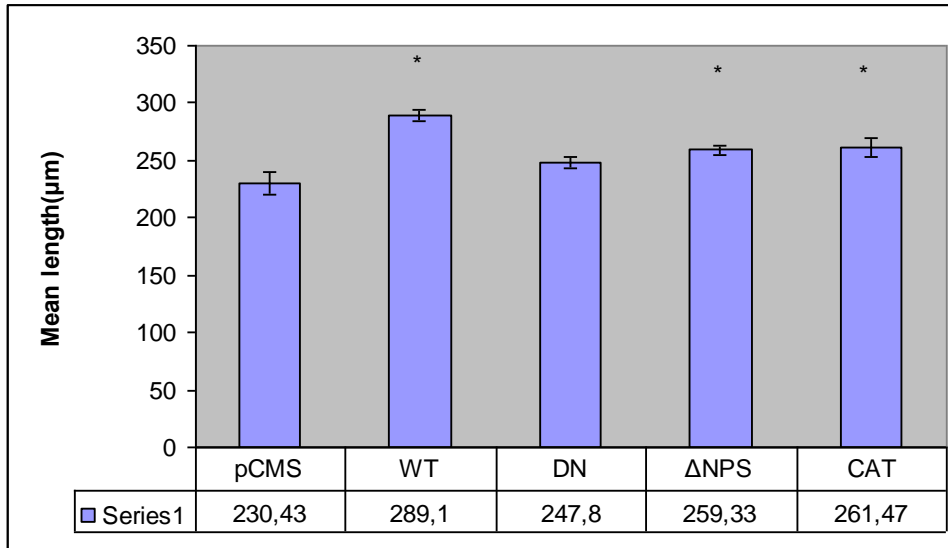
Εικόνα 3.13: Το κύτταρο όπως αναλύεται κατά τη μέθοδο Sholl με το πρόγραμμα MatLab. Λευκό σημείο: Τα τελικά άκρα των νευριτών. Κόκκινο σημείο: Τα σημεία των διακλαδώσεων.

Σε κάθε πείραμα μετρήθηκαν 100 κύτταρα από κάθε πλασμίδιο, συμπεριλαμβανομένου και του άδειου πλασμιδίου (pCMS-EGFP). Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα. Συνολικά μετρήθηκαν περισσότερα από 1500 κύτταρα. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test.

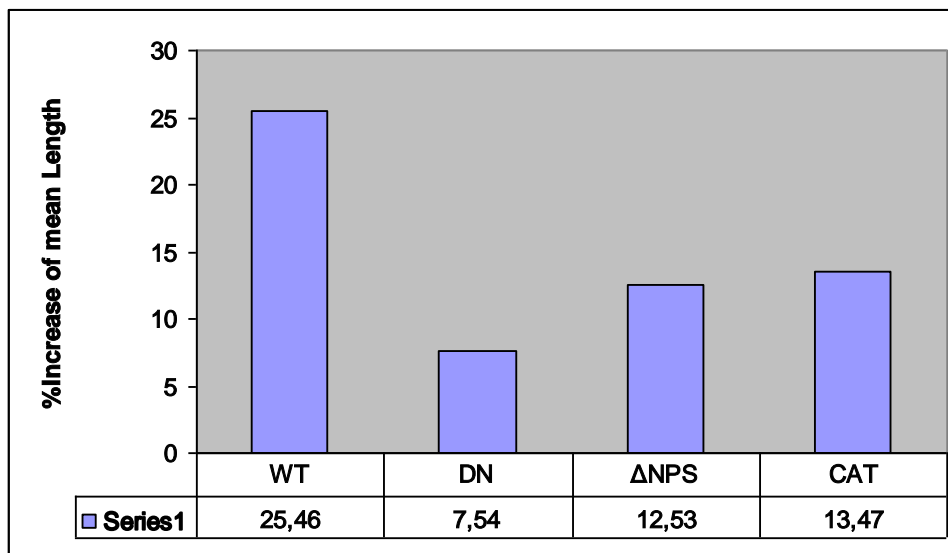
Σε κάθε περίπτωση μετρήθηκαν ο αριθμός των νευριτών. Ο αριθμός των διακλαδώσεων, ο αριθμός των διακλαδώσεων/ νευρίτη και το συνολικό μήκος των

νευριτών. Τα αποτελέσματα για κάθε μετάλλαξη συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα του άδειου πλασμιδίου, στο ίδιο πείραμα.

A

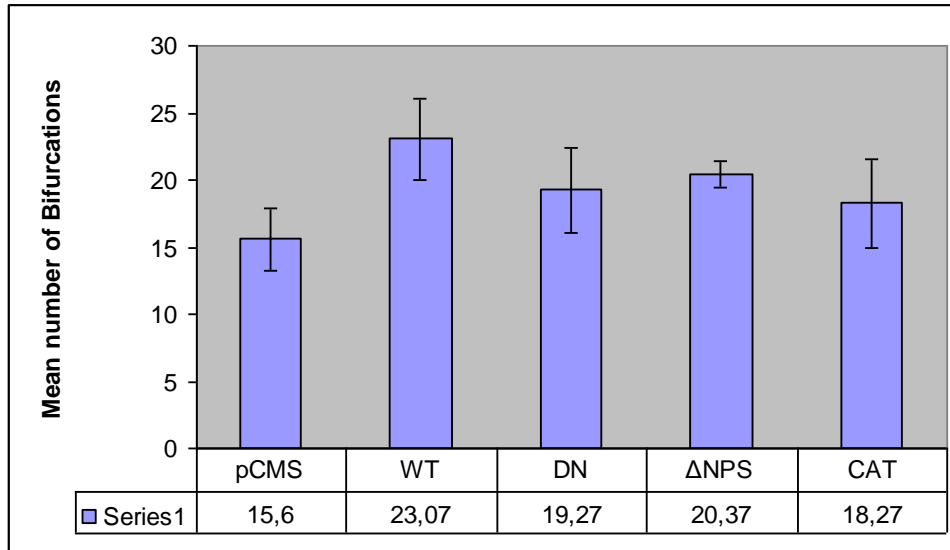
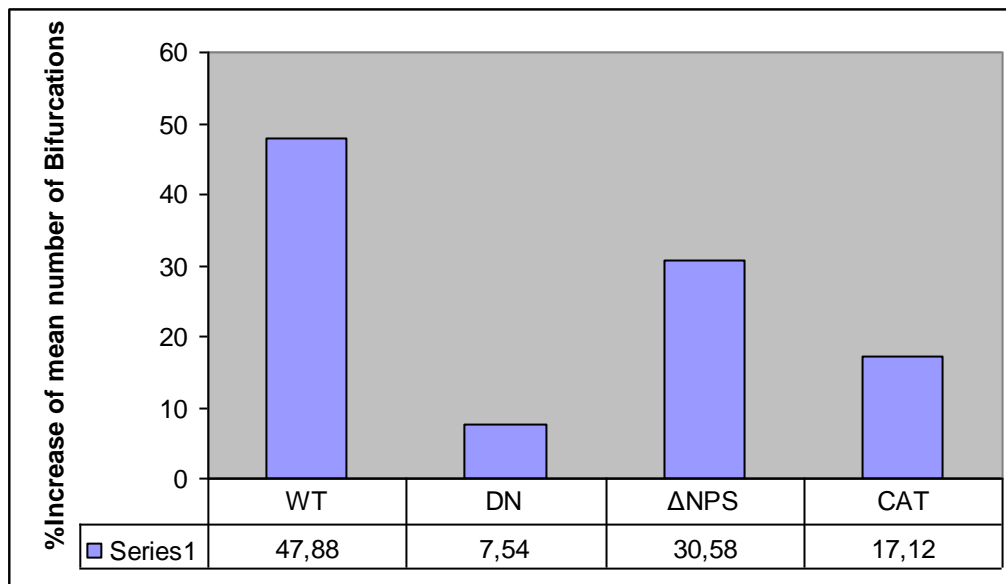


B



Εικόνα 3.14: A: Μέσο μήκος των νευριτών. B: % μεταβολή σε σχέση με το μέσο μήκος των νευρώνων που φέρουν το άδειο πλασμίδιο. Στο A φαίνεται το τυπικό σφάλμα. Όπου * $p < 0,05$.

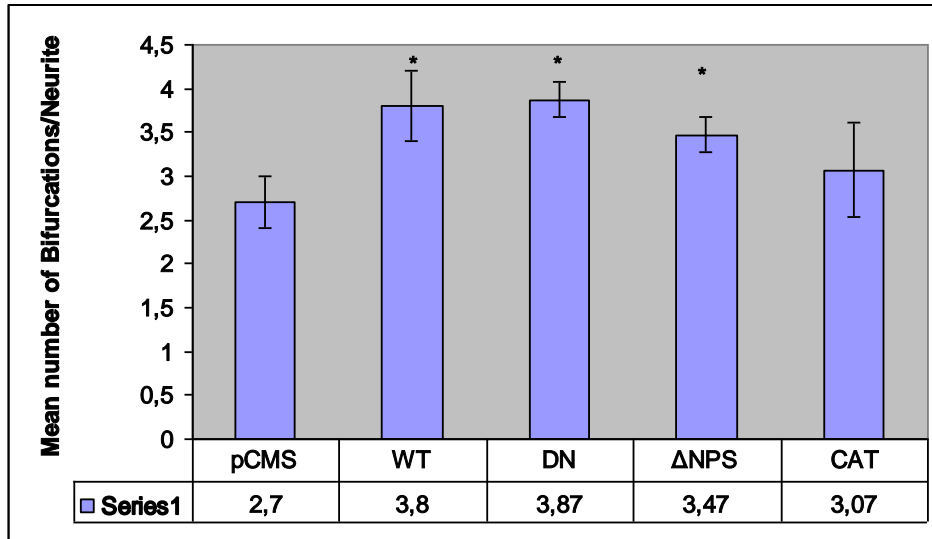
Από την εικόνα 3.14 φαίνεται ότι το μέσο μήκος των νευρώνων που έχουν διαμολυνθεί με τα PKC-εWT-EGFP, PKC-εΔNPS-EGFP, PKC-εCAT-EGFP έχουν στατιστικά σημαντικά, μεγαλύτερο μήκος σε σχέση με το κενό πλασμίδιο. Το PKC-εDN-EGFP δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση.

A**B**

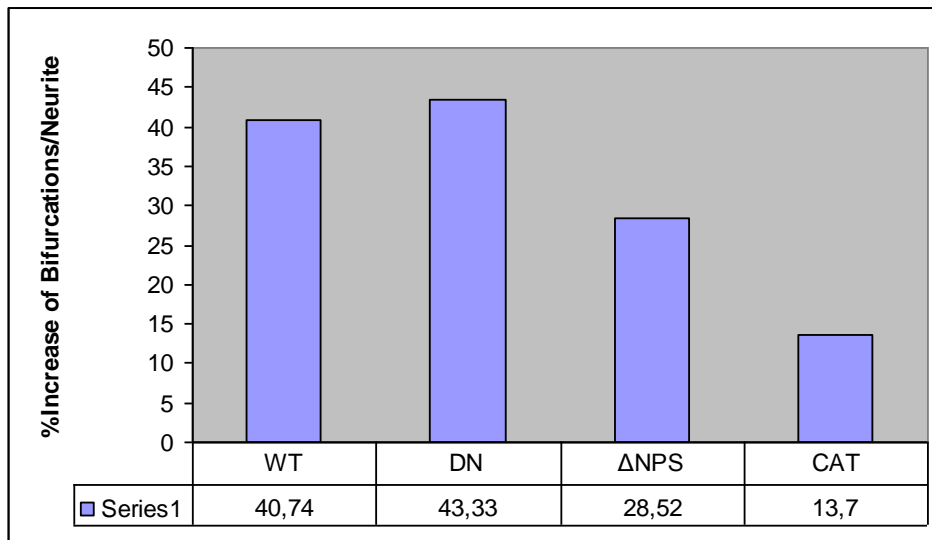
Εικόνα 3.15: A; Μέσος αριθμός διακλαδώσεων. **B:** % μεταβολή σε σχέση με τον αριθμό διακλαδώσεων των νευρώνων που φέρουν το άδειο πλασμίδιο. Στο A φαίνεται το τυπικό σφάλμα.

Από την εικόνα 3.15 φαίνεται ότι δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέσο αριθμό διακλαδώσεων σε καμία από τις μεταλλαγές και τον άγριο τύπο της PKC-ε σε σχέση με το κενό πλασμίδιο.

A



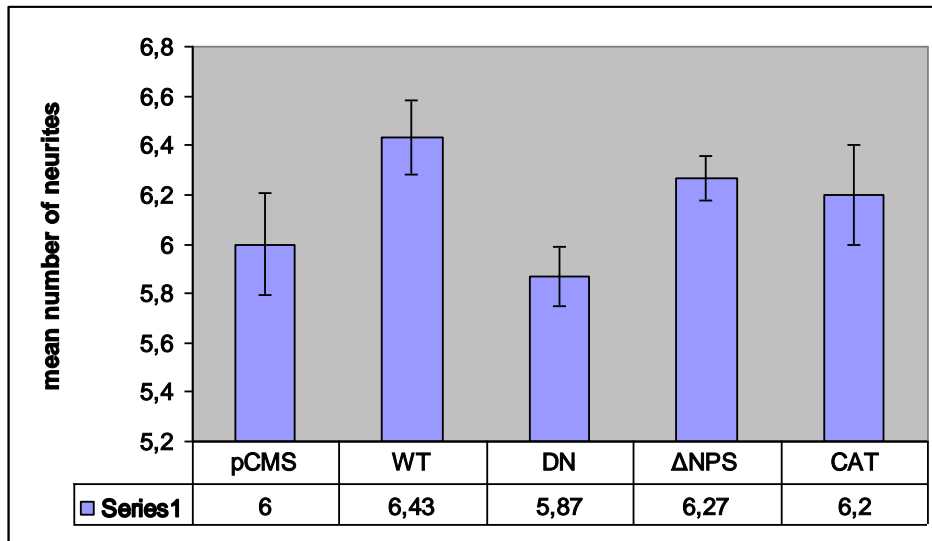
B



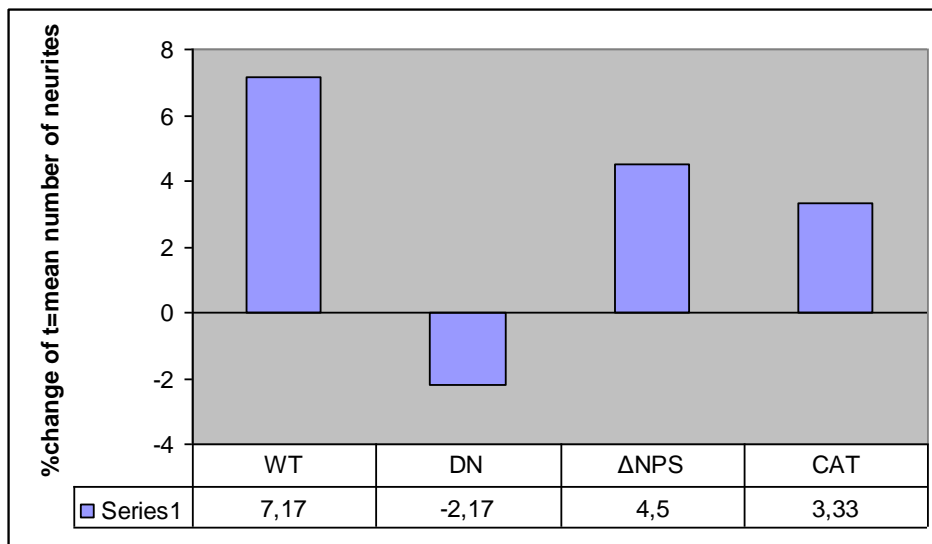
Εικόνα 3.16: **A:** Μέσος αριθμός διακλαδώσεων/νευρίτη. **B:** % μεταβολή σε σχέση με το μέσο αριθμό διακλαδώσεων/νευρίτη των νευρώνων που φέρουν το άδειο πλασμίδιο. Στο A φαίνεται το τυπικό σφάλμα. Όπου * $p < 0,05$.

Από τη εικόνα 3.16 φαίνεται ότι παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των διακλαδώσεων/νευρίτη σε σχέση με το άδειο πλασμίδιο στα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με PKC-εWT-EGFP, PKC-εΔNPS-EGFP, PKC-εDN-EGFP.

A



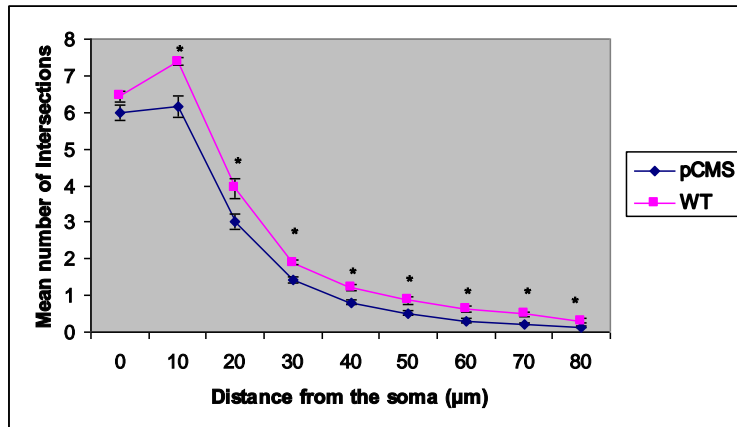
B



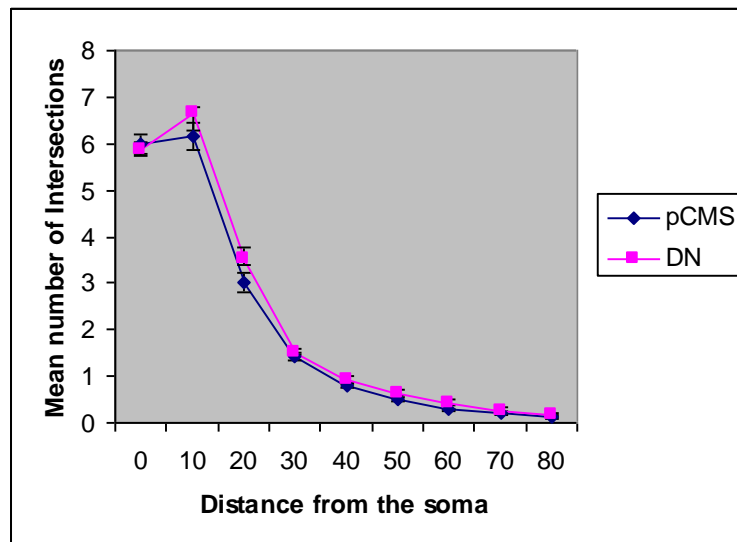
Εικόνα 3.17: A: Μέσο αριθμός των νευριτών. **B:** % μεταβολή σε σχέση με το μέσο αριθμό των νευριτών των νευρώνων που φέρουν το άδειο πλασμίδιο. Στο A φαίνεται το τυπικό σφάλμα.

Από την εικόνα 3.17 φαίνεται ότι δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέσο αριθμό των νευριτών σε καμία από τις μεταλλαγές και τον άγριο τύπο της PKC-ε σε σχέση με το κενό πλασμίδιο.

A

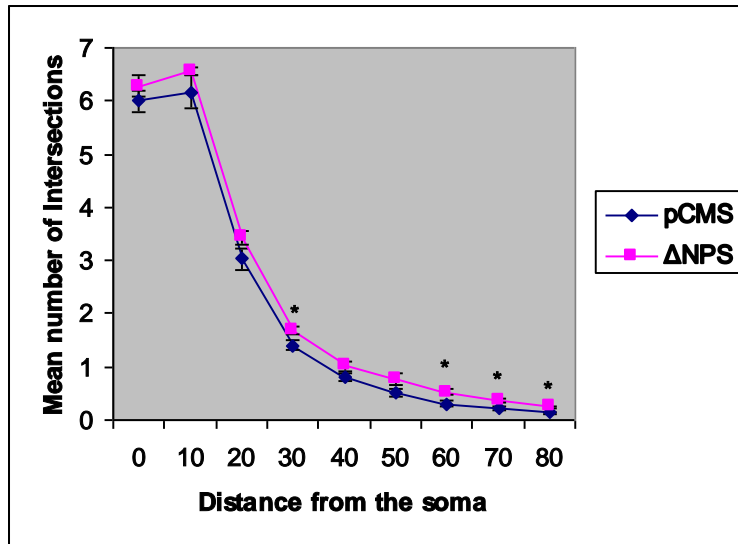


B

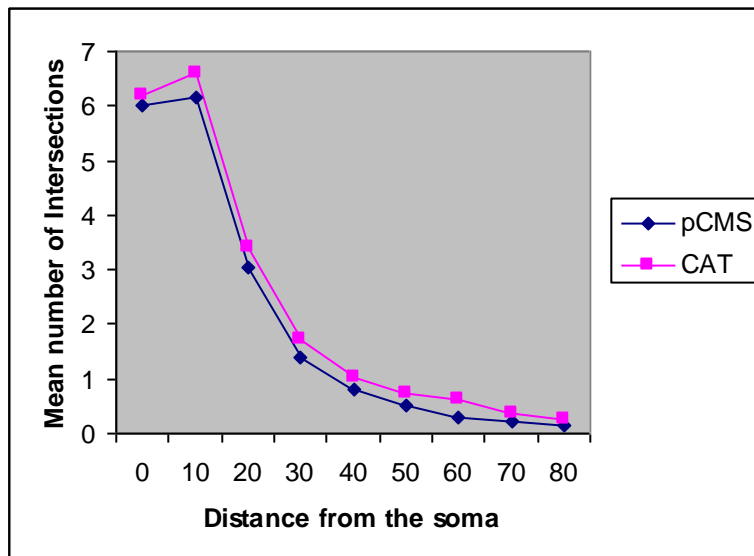


Εικόνα 3.18: Sholl Ανάλυση στους νευρώνες που έχουν διαμολυνθεί με το πλασμίδια **A**:PKC-εWT-EGFP, **B**: PKC-εDN-EGFP. Γίνεται σύγκριση με τους νευρώνες που έχουν διαμολυνθεί με το κενό πλασμίδιο. Όπου * $p < 0,05$.

A



B



Εικόνα 3.19: Sholl Ανάλυση στους νευρώνες που έχουν διαμολυνθεί με το πλασμίδια **A**: PKC-εΔNPS-EGFP, **B**: PKC-εCAT-EGFP. Γίνεται σύγκριση με τους νευρώνες που έχουν διαμολυνθεί με το κενό πλασμίδιο. Όπου * $p < 0,05$.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω βγαίνουν τα εξής συμπεράσματα:

Οι νευρώνες οι οποίοι διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο PKC-εWT-EGFP παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στο μέσο μήκος, και στον αριθμό των διακλαδώσεων/νευρίτη, σε σχέση με τους νευρώνες που είχαν διαμολυνθεί με το κενό πλασμίδιο.

Οι νευρώνες οι οποίοι διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο PKC-εDN-EGFP παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στον αριθμό των διακλαδώσεων/νευρίτη, σε σχέση με τους νευρώνες που είχαν διαμολυνθεί με το κενό πλασμίδιο.

Οι νευρώνες οι οποίοι διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο PKC-εΔNPS-EGFP παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στο μέσο μήκος, και στον αριθμό των διακλαδώσεων/νευρίτη, σε σχέση με τους νευρώνες που είχαν διαμολυνθεί με το κενό πλασμίδιο.

Οι νευρώνες οι οποίοι διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο PKC-εCAT-EGFP παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στο μέσο μήκος, σε σχέση με τους νευρώνες που είχαν διαμολυνθεί με το κενό πλασμίδιο.

4. Συζήτηση – Συμπεράσματα

4.1 Διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων μυός, E14/T, σε νευρώνες

Για τη μελέτη του ρόλου της pKC-ε στη διαδικασία της διαφοροποίησης σε νευρώνες αναζητήθηκε ένα μοντέλο που να ταιριάζει περισσότερο στις συνθήκες διαφοροποίησης στον οργανισμό. Επιλέχθηκε το μοντέλο της διαφοροποίησης των ESc σε νευρώνες επειδή τα ESc είναι ευπλοειδή, με τη χρήση κατάλληλων μέσων καλλιέργειας μπορούν να συντηρούν την ικανότητά τους να αυτοαναπαράγονται δημιουργώντας πανομοιότυπους απογόνους, και υπάρχει η δυνατότητα να ταυτοποιείται το είδος των κυττάρων που δημιουργείται στα διάφορα στάδια της διαφοροποίησης τους με τη χρήση αντισωμάτων διαφορετικών πρωτεϊνών (Smith 2001). Για τους παραπάνω λόγους πλεονεκτούν σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές στη μελέτη της διαφοροποίησης προς νευρώνες.

Το πρωτόκολλο διαφοροποίησης είναι παραλλαγή του πρωτοκόλλου που στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως 4-/4+. Σημαντικό στη μεθοδολογία αυτού του πρωτοκόλλου είναι ότι τα EBs αναπτύσσονται σε μέσο στο οποίο έχει αφαιρεθεί ο LIF για τέσσερις ημέρες και έπειτα για επιπλέον τέσσερις ημέρες σε μέσο στο

οποίο έχει προστεθεί ρετινοϊκό οξύ σε συγκέντρωση 0,5-1μM (Bain, Kitchens et al. 1995).

Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι η εφαρμογή του πρωτοκόλλου 4-/4+, οδηγεί στη δημιουργία νευρώνων σε ποσοστό 50%-95%. Οι νευρώνες που προκύπτουν από την εφαρμογή αυτού του πρωτοκόλλου είναι γλουταμεργικοί και γκαμπαεργικοί (Jones-Villeneuve, McBurney et al. 1982; Bibel, Richter et al. 2004). Παρουσιάζουν ιοντοτρόπους διαύλους ιόντων ασβεστίου (Ca⁺⁺), νατρίου (Na⁺⁺) και καλίου (K⁺) και σχηματίζουν ενεργές συνάψεις μεταξύ τους. Ηλεκτροφυσιολογικές μετρήσεις στο μετασυναπτικό νευρώνα έχουν δείξει ότι οι μεταξύ τους γλουταμεργικές και γκαμπαεργικές συνάψεις είναι ενεργές και δημιουργούνται δυναμικά ενεργείας που υπακούουν στην απελευθέρωση του γλουταμεργικού ή του γ-άμινο-βουτυρικού οξέος στη σύναψη (Strubing, Ahnert-Hilger et al. 1995; Bibel, Richter et al. 2004).

Έχει βρεθεί ότι το ρετινοϊκό οξύ έχει σημασία κατά τη νευρωνική διαφοροποίηση όταν δημιουργείται ο προμήκης μυελός και ο νωτιαίος μυελός. Επίσης έχει βρεθεί ότι τα πρωτόκολλα στα οποία χρησιμοποιείται ρετινοϊκό οξύ οδηγούν στο σχηματισμό κινητικών νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού και του νωτιαίου μυελού και διάμεσων νευρώνων (Wichterle, Lieberam et al. 2002). Το ρετινοϊκό οξύ είναι ισχυρό μορφογόνο και στα πρωτόκολλα που χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση των ESc τα αποτελέσματα που δίνει είναι επαναλήψιμα. Έχει

βρεθεί ότι την 8^η ημέρα τα κύτταρα στα EBs εκφράζουν δείκτες για μεταμιτωτικούς νευρώνες σε ποσοστό 5-10% (Gottlieb and Huettner 1999). Φαίνεται επομένως ότι οι νευρώνες που παράγονται από την εφαρμογή αυτού του πρωτοκόλλου δε βρίσκονται στο ίδιο στάδιο διαφοροποίησης και αυτό είναι κάτι που πρέπει να το λαμβάνουμε υπόψη (Du and Zhang 2004).

Από την εργασία των Bibel και συνεργατών φαίνεται ότι οι νευρώνες που προκύπτουν από την εφαρμογή αυτού του πρωτοκόλλου είναι πυραμυδικοί που χρησιμοποιούν το γλουταμικό οξύ ως νευροδιαβιβαστή. Ταυτόχρονα απέδειξαν ότι σχηματίζουν ενεργές συνάψεις. Στα αποτελέσματά τους αναφέρουν ότι στην καλλιέργεια τους εμφανίζονταν αστροκύτταρα, όπως έδειξε η ανοσοϊστοχημεία για την GFAP, σε ποσοστό 1-2%.

Στην εργασία μου στηρίχτηκα στα δικά τους δημοσιευμένα συμπεράσματα και βελτιστοποίησα την τεχνική ώστε οι νευρώνες να επιβιώνουν στο τρυβλίο για τουλάχιστον 12 ημέρες και ταυτόχρονα επιτεύχθηκε η δημιουργία καλλιέργειας στην οποία τα κύτταρα ήταν νευρώνες σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% για τουλάχιστον 8 ημέρες. Οι νευρώνες που δημιουργήθηκαν από το πρωτόκολλο που εφάρμοσα εξέφραζαν την vGlut1, όπως και στην εργασία των Bibel και συνεργατών και την ήταν θετικοί στο αντίσωμα tuJ1.

Επειδή στο εργαστήριο δεν είχαμε τη δυνατότητα εφαρμογής τεχνικών ηλεκτροφυσιολογίας, δεν έγιναν δοκιμασίες για να εξακριβωθεί εάν οι νευρώνες εμφάνιζαν συναπτική δραστηριότητα.

Η καθαρότητα της καλλιέργειας σε νευρώνες διαταρασσόταν μετά από 8 ημέρες, στη χειρότερη περίπτωση. Οι ημέρες καθαρότητας μειώνονταν όσο αυξανόταν το passage των κυττάρων. Στην εργασία των Bibel και συνεργατών αναφέρεται ότι ακόμα και μετά από τρεις εβδομάδες στην καλλιέργεια, το ποσοστό καθαρότητας σε νευρώνες είναι υψηλό. Δεν αναφέρεται το passage των κυττάρων που χρησιμοποιούσαν.

Συμπερασματικά: Σκοπός αυτών των πειραμάτων δεν ήταν η ανακάλυψη ενός νέου πρωτοκόλλου διαφοροποίησης των ESc σε νευρώνες. Τα πειράματα έγιναν ώστε να βελτιστοποιηθεί το πρωτόκολλο. Ο στόχος ήταν να δημιουργηθεί ένα κυτταρικό μοντέλο διαφοροποίησης για να διερευνηθεί ο ρόλος της PKC-ε.

Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο 4-/4+ για τη διαφοροποίηση των ESc σε νευρώνες, όπως εφαρμόστηκε από τους Bibel και συνεργάτες με κάποιες παραλλαγές. Οι νευρώνες που προέκυψαν με την εφαρμογή αυτού του πρωτοκόλλου αποτελούσαν ποσοστό μεγαλύτερο από 95% των κυττάρων της καλλιέργειας. Επίσης σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% έκφραζαν την πρωτεΐνη vGlut1 που χαρακτηρίζει τους γλουταμινεργικούς νευρώνες. Επιπλέον με κάποιες βελτιώσεις επιτεύχθηκε η επιβίωση των κυττάρων για περισσότερο από 12

ημέρες σε καλλιέργεια στην οποία τα κύτταρα ήταν νευρώνες και ταυτόχρονα επιτεύχθηκε η δημιουργία καλλιέργειας στην οποία τα κύτταρα ήταν νευρώνες σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% για τουλάχιστον 8 ημέρες.

Επιτεύχθηκε λοιπόν η σωστή εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου που αποτελεί το εργαλείο με το οποίο επιχείρησα να μελετήσω τη ρόλο της PKC-ε σε ένα μοντέλο διαφοροποίησης των ESc σε νευρώνες.

4.2 Μεταβολή των επιπέδων του mRNA των PKC κατά τα στάδια διαφοροποίησης των ESc σε νευρώνες. Μεταβολή των επιπέδων της PKC-ε σε πρωτεϊνικό επίπεδο-Αποτελέσματα

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το mRNA της PKC-ε αυξάνεται όσο οι νευρώνες προχωρούν προς τη διαφοροποίησή τους. Στις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα του mRNA της PKC-ε ξεκινούν από σχεδόν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στα ESc σε υψηλά επίπεδα στους νευρώνες που βρίσκονται για 7 ημέρες στο τρυβλίο. Επομένως προϊούσας της διαδικασίας διαφοροποίησης φαίνεται ότι τα κύτταρα παρουσιάζουν αύξηση στην ανάγκη για μεταγραφή του γονιδίου της PKC-ε. Αυτό συμβαδίζει με τα αποτελέσματα που έχουν δημοσιευτεί και τα οποία δείχνουν αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης στα διάφορα στάδια διαφοροποίησης των νευρώνων στο ΚΝΣ του εμβρύου όρνιθας (Mangoura, Sogos et al. 1993). Επίσης ένα σύνολο από εργασίες

αναδεικνύουν ότι η PKC-ε λόγω της καταλυτικής της δράσης αλλά και και μέσω του C1 τμήματος του μορίου της έχει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των κυττάρων του νευροβλαστώματος (Zeidman, Lofgren et al. 1999; Giorgione, Hysell et al. 2003; Troller and Larsson 2006). Σε αυτό το μηχανισμό φαίνεται να έχει σημασία η αναστολή της δράσης της RhoA και η ενεργοποίηση της Rac-1 και της Cdc42 (Troller and Larsson 2006).

Η αύξηση των επιπέδων του mRNA της PKC-ε παρατηρείται από τις πρώτες 6 ώρες των κυττάρων στην καλλιέργεια, οπότε και έχουν κυρίως νευροεπιθηλιακό χαρακτήρα. Ακόμα και σε αυτό το στάδιο όμως το mRNA βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε σχέση με τα επίπεδα που φθάνει όταν αποκτηθεί ο νευρωνικός χαρακτήρας, όπως εκδηλώνεται με την έκφραση της β-τουμπουλίνης-τάξης III και της vGLUT1. Η ανάλυση κατά Western Blot έδειξε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης, στα διάφορα στάδια διαφοροποίησης των ESc προς νευρώνες, ακολουθούν το ίδιο πρότυπο μεταβολής με το mRNA. Και στο επίπεδο της πρωτεΐνης η PKC-ε αυξάνεται, εντός του πρώτου 24ώρου από την αποδιάταξη των EBs. Στο στάδιο των ESc τα επίπεδα τη πρωτεΐνης και του mRNA κυμαίνονται σε σχεδόν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα.

Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι υπάρχει σαφής θετική συσχέτιση της διαδικασίας διαφοροποίησης των ESc σε νευρώνες με την ένταση της μεταγραφής και της μετάφρασης του γονιδίου της PKC-ε.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη των μεταβολών των υπολοίπων PKC κατά τη διαφοροποίηση των ESc σε νευρώνες.

PKC-α: Σε προηγούμενες εργασίες έχει δειχθεί ότι η διαφοροποίηση των κυττάρων του νευροβλαστώματος πραγματοποιείται όταν η PKC-α έχει λειτουργική δράση στο κύτταρο. Όταν η δράση της κατασταλεί, με επίδραση στα κύτταρα TPA σε συγκέντρωση 1,6μM τότε διακόπτεται και διαφοροποίηση των κυττάρων. Επίσης στην ίδια εργασία φαίνεται ότι μετά την επίδραση με TPA 16nM στα κύτταρα νευροβλαστώματος, η PKC-α παραμένει ενεργή για επιπλέον 4 ημέρες μετά από τη λήξη της κατεργασίας με TPA. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η PKC-α έχει ένα ευρύτερο ρόλο στη διαφοροποίηση των κυττάρων νευροβλαστώματος (Parrow, Nanberg et al. 1992).

Στο αποτέλεσμα του ημιποσοτικού υπολογισμού του mRNA της PKC-α φαίνεται να ακολουθεί πτωτική πορεία στα στάδια από τα ESc έως και την κατεργασία των EBs με ρετινοϊκό και ανοδική πορεία μετά από το πρώτο 24ωρο μετά την αποδιάταξη των EBs. Η κατανομή αυτή δείχνει ότι πιθανά να σχετίζεται με τη διαδικασία της διαφοροποίησης προς νευρώνες. Η υπόθεση ενισχύεται και από τα αποτελέσματα της μελέτης των Parrow και συνεργατών.

PKC-β: Ακολουθεί το ίδιο πρότυπο μεταβολής με την PKC-α. Πειράματα που έχουν γίνει σε κύτταρα νευροβλαστώματος έχουν δείξει ότι προάγει τη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων και αυξάνει το μήκος των προσεκβολών

τους (Kawakami, Kawakami et al. 2002). Η αύξησή της στη φάση της διαφοροποίησης προς νευρώνες είναι πιθανό να σχετίζεται με αυτή τη δράση της.

PKC-γ: Η PKC-γ ισομορφή εντοπίζεται κυρίως στον εγκέφαλο. Έχει βρεθεί ότι ευοδώνει τη λειτουργία της LTP (Saito and Shirai 2002). Ακολουθεί και αυτή το ίδιο πρότυπο μεταβολής με τις PKC-α και PKC-β. Καθώς πρόκειται για πρωτεΐνη που εντοπίζεται κυρίως στο εγκέφαλο και με βάση τις παραπάνω δημοσιευμένες μελέτες φαίνεται να είναι αυξημένη η πιθανότητα για συμμετοχή της στην διαφοροποίηση των νευρώνων.

PKC-δ: Η PKC-δ εμπλέκεται ευοδωτικά στη διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος όταν αυτά διαφοροποιούνται υπό την επίδραση του ρετινοϊκού οξέος (Nitti, Furfaro et al.). Στα δικά μας αποτελέσματα η PKC-δ αυξάνει την έκφρασή της στο μεταγραφικό επίπεδο προιούσας της διαδικασίας της διαφοροποίησης των νευρώνων.

PKC-ζ: Το πρότυπο που παρουσιάζει δείχνει ότι η έκφρασή της καταστέλλεται από το ρετινοϊκό οξύ, στη φάση των EBs, αλλά τα επίπεδά της αυξάνουν σταδιακά μετά την αποδιάταξή τους. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι σε κύτταρα νευροβλαστώματος τα οποία διαφοροποιούνται με τη βοήθεια του νευρικού παράγοντα αύξησης (NGF), η PKC-ζ αυξάνεται σε πρωτεϊνικό επίπεδο και μένει ενεργή στο κυτταρόπλασμα (Wooten, Zhou et al. 1994). Ενδεχομένως η

αύξηση που παρατηρείται στο mRNA της να σημαίνει ότι συμβάλλει στη διαφοροποίηση των νευρώνων.

PKC-η: Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η PKC-η αλληλεπιδρά με την GAP-43, σε κύτταρα της κυτταρικής σειράς του εμβρυϊκού καρκινώματος PCC7-Mz, όταν αυτά κατεργάζονται με ρετινοϊκό οξύ προκειμένου να διαφοροποιηθούν (Esdar, Oehrlein et al. 1999). Στο πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε τα επίπεδα του mRNA της PKC-η δε φαίνεται να μεταβάλλονται ακολουθώντας συγκεκριμένο πρότυπο, που να παραπέμπει σε ρόλο κατά τη διαφοροποίηση των ESc σε νευρώνες.

PKC-θ: Έχει βρεθεί ότι η PKC-θ αυξάνει σε επίπεδο mRNA κατά τη διαφοροποίηση της PC-12 κυτταρικής σειράς κατόπιν κατεργασίας με NGF. Επίσης στην ίδια έρευνα φαίνεται ότι τα επίπεδα του mRNA της πρωτεΐνης παύουν να αυξάνονται όταν η διαφοροποίηση έχει φθάσει στο τελικό της στάδιο (Sparatore, Patrone et al. 2000). Κατά τον ημιποσοτικό προσδιορισμό του mRNA της PKC-θ στη διαφοροποίηση των ESc φαίνεται ότι τα επίπεδα του mRNA αυξάνονται. Αυτό σε σχέση με τα δεδομένα προηγούμενης εργασίας θέτει την υπόθεση ότι είναι πιθανό να έχει κάποιο ρόλο στη διαφοροποίηση των νευρώνων.

PKC-ι/λ: Στο πείραμα του ημιποσοτικού προσδιορισμού του mRNA της κατά τα στάδια διαφοροποίησης των ESc σε νευρώνες φαίνεται ότι έχει αυξημένα επίπεδα

στο στάδιο των ESc και ότι αμέσως μετά τη δημιουργία των EBs τα επίπεδά της πέφτουν και από εκείνο το σημείο παραμένουν σχεδόν σταθερά. Αυτό θέτει την υπόθεση ότι μπορεί να έχει ανασταλτικό ρόλο στη διαφοροποίηση.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι οι κλασικές PKC ακολουθούν το ίδιο μοτίβο μεταβολής του mRNA τους κατά τα στάδια διαφοροποίησης των ESc προς νευρώνες. Επίσης με τον ίδιο τρόπο μεταβάλλεται το mRNA στις PKC-δ (καινοφανής) και στην PKC-ζ (άτυπη). Οι κλασικές PKC χρειάζονται Ca^{++} , PS και DAG για να ενεργοποιηθούν. Οι καινοφανείς PS και DAG και οι άτυπες PS. Αν θεωρήσουμε ότι η αύξηση των επιπέδων του mRNA αντανακλά και σε λειτουργικό επίπεδο τότε μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο τρόπος με το οποίο επηρεάζει το κάθε μόριο και η κάθε κατηγορία των PKC, στη διαφοροποίηση είναι διαφορετικός.

Σε όλες τις PKC εκτός της PKC-ε, όπου τα επίπεδα παραμένουν μάλλον τα ίδια, τα επίπεδα του mRNA τους μειώνονται όταν σχηματίζονται τα EBs. Ενδεχομένως αυτό να σχετίζεται με τις μεταβολές του κυτταροσκελετού που συμβαίνουν στα κύτταρα όταν βρίσκονται σε αιωρούμενη καλλιέργεια και δεν είναι προσκολλημένα στο τρυβλίο.

Περιορισμός στο πείραμα του ημιποσοτικού προσδιορισμού του mRNA είναι ότι δεν έγινε μελέτη του σημείου κορεσμού στην ποσότητα του RNA σε κάθε στάδιο διαφοροποίησης για κάθε PKC.

Συμπερασματικά: Η αύξηση των επιπέδων της PKC-ε σε επίπεδο μετάφρασης και μεταγραφής, σε συνδυασμό με τη προηγούμενη βιβλιογραφία αποτελεί ισχυρή βάση για στηριχτεί η υπόθεση ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των ESc προς νευρώνες.

4.3 Η PKC-ε εντοπίζεται στο σύστημα Golgi που συμμετέχει στο σχηματισμό του κύριου νευρίτη-Αποτελέσματα

Έρευνες έχουν δείξει ότι ο σχηματισμός του κεντρικού νευρίτη στους νευρώνες ιπποκάμπου, στην καλλιέργεια, συμβαίνει στο σημείο που είναι συγκεντρωμένα το σύστημα Golgi και το κεντρόσωμα. Ο κεντρικός νευρίτης θα εξελιχθεί στη συνέχεια στο νευράξονα. Η ύπαρξη του Golgi στο σημείο της δημιουργίας του κεντρικού νευρίτη γίνεται για να καλυφθούν οι ανάγκες του κυττάρου για τη δημιουργία του κεντρικού νευρίτη, ο οποίος εξ' ορισμού έχει το μεγαλύτερο μήκος (de Anda, Pollarolo et al. 2005).

Η ειδική RACK για την PKC-ε είναι η RACK2 (β'-Cop). Η RACK2 είναι η υπεύθυνη πρωτεΐνη για τη μεταφορά της PKC-ε στο σύστημα Golgi. Η σύνδεσή της με την PKC-ε γίνεται μέσω της V₁ περιοχής στο κάρβοξυ-τελικό άκρο της PKC-ε. Όμως έχει βρεθεί ότι η PKC-ε συνδέεται και με το άμινο-τελικό άκρο της RACK2, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρέπει να υπάρχουν και άλλα τμήματα στο μόριο της PKC-ε που αλληλεπιδρούν με τη RACK2. (Csukai, Chen et al. 1997).

Επομένως η ενδογενής PKC-ε συνδέεται στο Golgi. Αυτό φαίνεται και από τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας με νευρώνες που προέρχονται από τη διαφοροποίηση των ESc.

Σε αυτά τα πειράματα φάνηκε ότι αρχικά και πριν το σχηματισμό του νευρίτη η PKC-ε κατανέμονταν περιπυρηνικά. Όταν σχηματιζόταν ο νευρίτης η PKC-ε συγκεντρωνόταν κυρίως στη βάση της περιοχής δημιουργίας του.

Στη συνέχεια έγιναν πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν νευρώνες ιπποκάμπου από έμβρυο αρουραίου 16 ημερών τα οποία είχαν διαμολυνθεί με το άγριο τύπο του γονιδίου της PKC-ε, το οποίο είναι συνδεδεμένο με EGFP, ώστε να φθορίζει. Ταυτόχρονα στα ίδια κύτταρα έγινε σήμανση με φθορίζων αντίσωμα ενάντια στη β-Cop. Τα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκαν με συνεστιακή μικροσκόπηση.

Στα πειράματα που πραγματοποιήσα φάνηκε ότι η PKC-ε συνυπάρχει με τη β-Cop και επομένως ότι βρίσκεται στο Golgi. Στο σημείο δηλαδή στο οποίο γίνονται οι διεργασίες για το σχηματισμό του κεντρικού νευρίτη.

Εφόσον η PKC-ε εντοπίζεται στο Golgi στη θέση σχηματισμού του κεντρικού νευρίτη οδηγούμαστε στο ασφαλές συμπέρασμα ότι συμμετέχει στις διεργασίες σχηματισμού του.

4.4 Διαμόλυνση των νευρώνων ιπποκάμπου-Αποτελέσματα

Από τα αποτελέσματα της διαμόλυνσης των νευρώνων ιπποκάμπου με τον άγριο τύπο και τις μεταλλάξεις της PKC-ε φαίνεται ότι οι τρεις καταλυτικά ενεργές μορφές (WT, ΔNPS και CAT) αυξάνουν το μήκος των νευριτών των κυττάρων. Οι δύο μορφές που είναι συνεχώς ενεργές (CAT, ΔNPS) δεν αυξάνουν περισσότερο το μήκος των νευριτών από ότι ο άγριος τύπος. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε επειδή εξαντλούνται τα υλικά των κυττάρων και επομένως οι συνεχώς ενεργείς μορφές δεν μπορούν να δώσουν το ενζυμικό τους αποτέλεσμα. Ένας άλλος λόγος μπορεί να είναι ότι η CAT συνεχώς ενεργή μορφή στερείται την ακολουθία 6 αμινοξέων στις θέσεις 223 έως 228. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι στις θέσεις αυτές προσδένεται η F-ακτίνη (Prekeris, Mayhew et al. 1996; Prekeris, Hernandez et al. 1998). Η δέσμευση αυτή σταθεροποιεί την F-ακτίνη και την PKC-ε. Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι για να αναπτυχθεί ο κεντρικός νευρίτης πρέπει να σταθεροποιηθεί αρχικά η F-ακτίνη στα λαμελιπόδια και στα φιλοπόδια (Bradke and Dotti 1999). Επίσης στο στάδιο 2 της δημιουργίας των νευριτών παρατηρείται συσσώρευση F-ακτίνης στην κορυφή τους (Caceres, Ye et al.). Επομένως θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η CAT συνεχώς ενεργή μορφή δεν μπορεί να έχει μεγαλύτερη καταλυτική δράση από τον άγριο τύπο επειδή δεν συνδέεται με την F-ακτίνη, που αυτό έχει σαν αποτέλεσμα και η ίδια να μην είναι

σταθερή αλλά και να μην μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις αρχικές διεργασίες για την δημιουργία του κεντρικού νευρίτη.

Η επικρατούσα αρνητική μορφή η οποία δεν έχει καταλυτική δράση φαίνεται ότι αυξάνει τον αριθμό των διακλαδώσεων / νευρίτη. Το ίδιο φαίνεται ότι προκαλεί και ο άγριος τύπος και η ΔNPS μορφή της PKC-ε. Αυτό δεν το προκαλεί η CAT μορφή της PKC-ε. Η τελευταία λόγω της κατασκευής της στερείται τις ρυθμιστικές περιοχές C1a και C1b. Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι αυτή η περιοχή της πρωτεΐνης μπορεί να προκαλέσει επιμήκυνση των νευριτών σε κύτταρα νευροβλαστώματος, χωρίς να χρειάζεται η καταλυτική δράση της πρωτεΐνης. Είναι επομένως πιθανό η ύπαρξη αυτής της περιοχής να είναι υπεύθυνη για την αύξηση του αριθμού των διακλαδώσεων / νευρίτη.

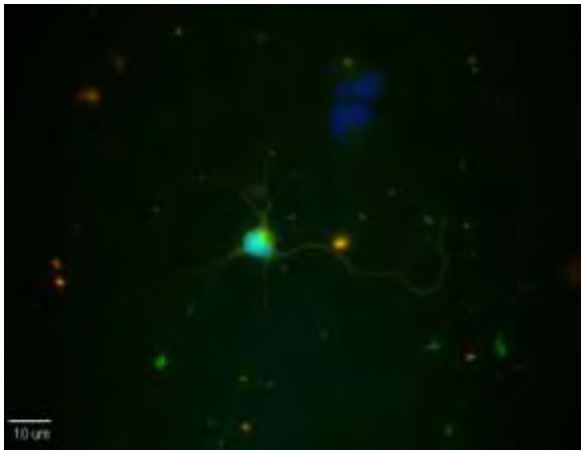
Όσον αφορά στη συνεχώς ενεργή μορφή ΔNPS της PKC-ε το γεγονός ότι δεν αυξάνει περισσότερο το μήκος των νευριτών στους νευρώνες, σε σχέση με τον άγριο τύπο, μπορεί να οφείλεται στο ότι στερείται την V1 περιοχή με την οποία η PKC-ε προσδένεται στην RACK2.

Η συνεχώς ενεργή μορφή CAT επίσης στερείται την V1 περιοχή και επομένως και αυτή είναι πιθανό να μην προσδένεται στο σύστημα Golgi. Αυτός είναι ένας επιπρόσθετος λόγος για τον οποίο είναι πιθανό να μην αυξάνεται το μήκος των νευριτών περισσότερο από τον άγριο τύπο.

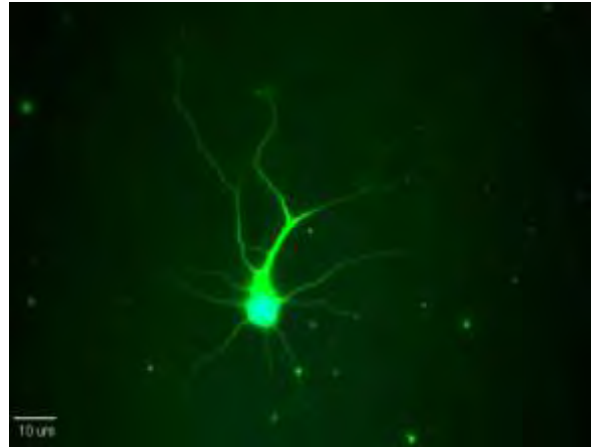
Σε αυτή την εργασία έχει δειχθεί ότι ο άγριος τύπος της PKC-ε προσδένεται στο σύστημα Golgi που βρίσκεται στη βάση του αρχόμενου κεντρικού νευρίτη. Είναι λοιπόν πιθανό ότι για να μπορέσει η PKC-ε να αυξήσει το μήκος των νευριτών να είναι αναγκαίο όχι μόνο να έχει καταλυτική δράση αλλά και να προσδεθεί στο σύστημα Golgi.

Ο τρόπος με τον οποίο δρα η PKC-ε σε αυτά τα πειράματα είναι μέσω της ενεργοποίησης της Akt. Η Akt ενεργοποιείται από την PI3K, την κινάση εξαρτώμενη από το φωσφοϊνοσιτίδιο και την ιντεγκρίνη-συνδεόμενη κινάση (ILK). Η ενεργοποίησή της επιτυγχάνεται με τη φωσφορυλίωσή της στις Thr³⁰⁸ και Ser⁴⁷³ (Scheid and Woodgett 2001; Hannigan, Troussard et al. 2005). Η συνεχώς ενεργοποιημένη μυριστυλιωμένη Akt οδηγεί σε σχηματισμό πολλών αξόνων (Jiang, Guo et al. 2005). Η GSK-3β είναι συνεχώς ενεργή. Οι ενεργοποιημένες Akt και ILK φωσφορυλιώνουν την GSK-3β στη Ser⁹ με συνέπεια να απενεργοποιείται (Grimes and Jope 2001). Η καταστολή της δράσης της GSK-3β είναι αναγκαία για τη δημιουργία των νευριτών (Jiang, Guo et al. 2005; Yoshimura, Kawano et al. 2005). Η PKC-ε φωσφορυλιώνει την Akt στη Ser⁴⁷³ (Newton and Messing; Zhou, Karliner et al. 2002). Επομένως είναι πιθανό να εισέρχεται στο μεταβολικό μονοπάτι Akt/ILK/ GSK-3β και να αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης νευριτών.

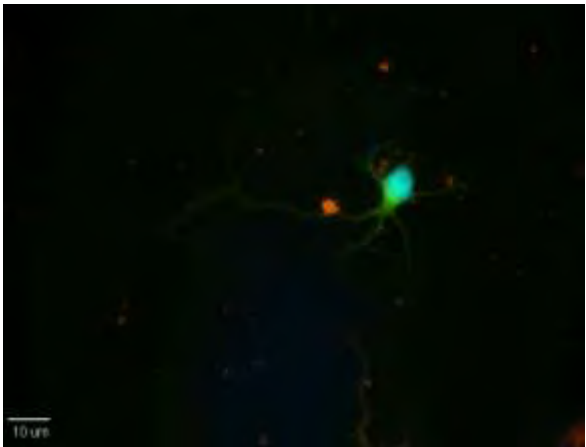
A



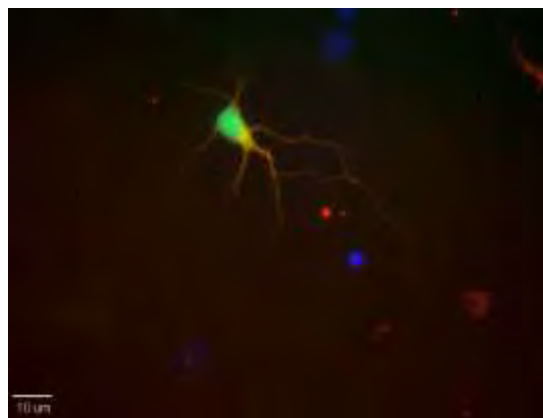
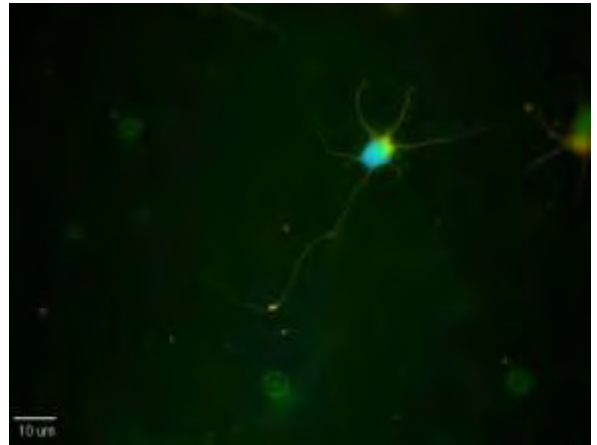
B



Γ



Δ



E

Εικόνα 4.1: Αντιπροσωπευτικές εικόνες των διαμολυσμένων κυττάρων

ιπποκάμπου. Α : Κενό πλασμίδιο, Β: WT, Γ: DN, Δ: ΔNPS, Ε: CAT. Μικροσκόπιο
φθορισμού. Μεγέθυνση 63X.

5. Βιβλιογραφία

1. Aberg, M.A., et al., Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 2000. 20(8): p. 2896-903.
2. Aberg, M.A., et al., IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*, 2003. 24(1): p. 23-40.
3. Ables, J.L., et al., Notch1 is required for maintenance of the reservoir of adult hippocampal stem cells. *J Neurosci*. 30(31): p. 10484-92.
4. Akanuma, H., et al., Identification of Stage-Specific Gene Expression Signatures in Response to Retinoic Acid during the Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Front Genet*. 3: p. 141.
5. Akita, Y., Protein kinase C-epsilon (PKC-epsilon): its unique structure and function. *J Biochem*, 2002. 132(6): p. 847-52.
6. Akita, Y., et al., Protein kinase C epsilon phosphorylates keratin 8 at Ser8 and Ser23 in GH4C1 cells stimulated by thyrotropin-releasing hormone. *FEBS J*, 2007. 274(13): p. 3270-85.
7. Akita, Y., et al., Involvement of protein kinase C epsilon in thyrotropin-releasing hormone-stimulated phosphorylation of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate in rat pituitary clonal cells. *Electrophoresis*, 2000. 21(2): p. 452-9.
8. Alden, K.J., et al., Enhancement of L-type Ca(2+) current from neonatal mouse ventricular myocytes by constitutively active PKC-beta11. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. 282(4): p. C768-74.
9. Amadio, M., F. Battaini, and A. Pascale, The different facets of protein kinases C: old and new players in neuronal signal transduction pathways. *Pharmacol Res*, 2006. 54(5): p. 317-25.
10. Angot, E., et al., Chemoattractive activity of sonic hedgehog in the adult subventricular zone modulates the number of neural precursors reaching the olfactory bulb. *Stem Cells*, 2008. 26(9): p. 2311-20.

11. Arimura, N. and K. Kaibuchi, Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 2007. 8(3): p. 194-205.
12. Armstrong, L., et al., The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Hum Mol Genet*, 2006. 15(11): p. 1894-913.
13. Armstrong, S.C., Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2004. 61(3): p. 427-36.
14. Arya, R., et al., Muscle ring finger protein-1 inhibits PKC{epsilon} activation and prevents cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol*, 2004. 167(6): p. 1147-59.
15. Baas, P.W., M.M. Black, and G.A. Banker, Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol*, 1989. 109(6 Pt 1): p. 3085-94.
16. Baas, P.W. and S. Lin, Hooks and comets: The story of microtubule polarity orientation in the neuron. *Dev Neurobiol*. 71(6): p. 403-18.
17. Bain, G., et al., Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol*, 1995. 168(2): p. 342-57.
18. Baker, S.A., K.A. Baker, and T. Hagg, Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci*, 2004. 20(2): p. 575-9.
19. Balendran, A., et al., Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms. *FEBS Lett*, 2000. 484(3): p. 217-23.
20. Balordi, F. and G. Fishell, Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J Neurosci*, 2007. 27(22): p. 5936-47.
21. Barnes, A.P. and F. Polleux, Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci*, 2009. 32: p. 347-81.

22. Barroso-del Jesus, A., G. Lucena-Aguilar, and P. Menendez, The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. *Cell Cycle*, 2009. 8(3): p. 394-8.
23. Barzilay, R., et al., Induction of human mesenchymal stem cells into dopamine-producing cells with different differentiation protocols. *Stem Cells Dev*, 2008. 17(3): p. 547-54.
24. Basto, R., et al., Flies without centrioles. *Cell*, 2006. 125(7): p. 1375-86.
25. Beattie, G.M., et al., Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells*, 2005. 23(4): p. 489-95.
26. Beauquis, J., et al., Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 239: p. 28-37.
27. Beddington, R.S. and E.J. Robertson, An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development*, 1989. 105(4): p. 733-7.
28. Bel, A., et al., Composite cell sheets: a further step toward safe and effective myocardial regeneration by cardiac progenitors derived from embryonic stem cells. *Circulation*. 122(11 Suppl): p. S118-23.
29. Benraiss, A., et al., Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci*, 2001. 21(17): p. 6718-31.
30. Bergami, M., et al., Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(40): p. 15570-5.
31. Bernstein, B.E., et al., A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 2006. 125(2): p. 315-26.

32. Berrier, A.L., et al., Activated R-ras, Rac1, PI 3-kinase and PKCepsilon can each restore cell spreading inhibited by isolated integrin beta1 cytoplasmic domains. *J Cell Biol*, 2000. 151(7): p. 1549-60.
33. Besson, A., T.L. Wilson, and V.W. Yong, The anchoring protein RACK1 links protein kinase Cepsilon to integrin beta chains. Requirements for adhesion and motility. *J Biol Chem*, 2002. 277(24): p. 22073-84.
34. Bhattacharya, S., D. Dey, and S.S. Roy, Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci*, 2007. 32(2): p. 405-13.
35. Bibel, M., et al., Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat Neurosci*, 2004. 7(9): p. 1003-9.
36. Bogatkevich, G.S., et al., Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem*, 2001. 276(48): p. 45184-92.
37. Boland, M.J., et al., Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009. 461(7260): p. 91-4.
38. Bonaguidi, M.A., et al., LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. *Development*, 2005. 132(24): p. 5503-14.
39. Bonaguidi, M.A., et al., In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*. 145(7): p. 1142-55.
40. Borlongan, C.V., et al., The great migration of bone marrow-derived stem cells toward the ischemic brain: therapeutic implications for stroke and other neurological disorders. *Prog Neurobiol*. 95(2): p. 213-28.
41. Boyer, L.A., et al., Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 2005. 122(6): p. 947-56.
42. Boyer, L.A., et al., Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, 2006. 441(7091): p. 349-53.
43. Bradke, F. and C.G. Dotti, The role of local actin instability in axon formation. *Science*, 1999. 283(5409): p. 1931-4.

44. Bradke, F. and C.G. Dotti, Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 2000. 10(5): p. 574-81.
45. Bradley, A., et al., Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 1984. 309(5965): p. 255-6.
46. Bradley, A., et al., Modifying the mouse: design and desire. *Biotechnology (N Y)*, 1992. 10(5): p. 534-9.
47. Breunig, J.J., et al., Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(51): p. 20558-63.
48. Brewer, G.J. and C.W. Cotman, Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. *Brain Res*, 1989. 494(1): p. 65-74.
49. Brill, M.S., et al., A *dlx2*- and *pax6*-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb. *J Neurosci*, 2008. 28(25): p. 6439-52.
50. Brose, N. and C. Rosenmund, Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 23): p. 4399-411.
51. Brunt, K.R., R.D. Weisel, and R.K. Li, Stem cells and regenerative medicine - future perspectives. *Can J Physiol Pharmacol*. 90(3): p. 327-35.
52. Bu, H.F., et al., Milk fat globule-EGF factor 8/lactadherin plays a crucial role in maintenance and repair of murine intestinal epithelium. *J Clin Invest*, 2007. 117(12): p. 3673-83.
53. Burdon, T., A. Smith, and P. Savatier, Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol*, 2002. 12(9): p. 432-8.

54. Burdon, T., et al., Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*, 1999. 210(1): p. 30-43.
55. Burkart, E.M., et al., Phosphorylation or glutamic acid substitution at protein kinase C sites on cardiac troponin I differentially depress myofilament tension and shortening velocity. *J Biol Chem*, 2003. 278(13): p. 11265-72.
56. Buszczak, M. and A.C. Spradling, Searching chromatin for stem cell identity. *Cell*, 2006. 125(2): p. 233-6.
57. Caceres, A., B. Ye, and C.G. Dotti, Neuronal polarity: demarcation, growth and commitment. *Curr Opin Cell Biol*. 24(4): p. 547-53.
58. Caino, M.C., et al., Non-small cell lung carcinoma cell motility, rac activation and metastatic dissemination are mediated by protein kinase C epsilon. *PLoS One*. 7(2): p. e31714.
59. Calderon de Anda, F., et al., Pyramidal neuron polarity axis is defined at the bipolar stage. *J Cell Sci*, 2008. 121(Pt 2): p. 178-85.
60. Cartwright, P., et al., LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, 2005. 132(5): p. 885-96.
61. Cesare, P., et al., Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron*, 1999. 23(3): p. 617-24.
62. Chambers, I., et al., Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 2003. 113(5): p. 643-55.
63. Chen, C. and A.J. Sytkowski, Erythropoietin activates two distinct signaling pathways required for the initiation and the elongation of c-myc. *J Biol Chem*, 2001. 276(42): p. 38518-26.
64. Chen, L., D.M. He, and Y. Zhang, The differentiation of human placenta-derived mesenchymal stem cells into dopaminergic cells in vitro. *Cell Mol Biol Lett*, 2009. 14(3): p. 528-36.

65. Chen, Y., et al., Specific modulation of Na⁺ channels in hippocampal neurons by protein kinase C epsilon. *J Neurosci*, 2005. 25(2): p. 507-13.
66. Cheng, L.C., et al., miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci*, 2009. 12(4): p. 399-408.
67. Chew, J.L., et al., Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(14): p. 6031-46.
68. Chiaramello, S., et al., BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci*, 2007. 26(7): p. 1780-90.
69. Choi, D.S., et al., Conditional rescue of protein kinase C epsilon regulates ethanol preference and hypnotic sensitivity in adult mice. *J Neurosci*, 2002. 22(22): p. 9905-11.
70. Choi, D.S., et al., PKCepsilon increases endothelin converting enzyme activity and reduces amyloid plaque pathology in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(21): p. 8215-20.
71. Chou, W.H. and R.O. Messing, Protein kinase C isozymes in stroke. *Trends Cardiovasc Med*, 2005. 15(2): p. 47-51.
72. Chuang, J.Z., et al., The dynein light chain Tctex-1 has a dynein-independent role in actin remodeling during neurite outgrowth. *Dev Cell*, 2005. 9(1): p. 75-86.
73. Chun, J.S., M.J. Ha, and B.S. Jacobson, Differential translocation of protein kinase C epsilon during HeLa cell adhesion to a gelatin substratum. *J Biol Chem*, 1996. 271(22): p. 13008-12.
74. Coe, I.R., et al., The role of protein kinase C in cellular tolerance to ethanol. *J Biol Chem*, 1996. 271(46): p. 29468-72.
75. Colon-Gonzalez, F. and M.G. Kazanietz, C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1761(8): p. 827-37.

76. Conde, C., et al., Evidence for the involvement of Lfc and Tctex-1 in axon formation. *J Neurosci.* 30(19): p. 6793-800.
77. Conde, C. and A. Caceres, Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci*, 2009. 10(5): p. 319-32.
78. Cook, S.C. and C.L. Wellman, Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol*, 2004. 60(2): p. 236-48.
79. Coppo, P., et al., Constitutive and specific activation of STAT3 by BCR-ABL in embryonic stem cells. *Oncogene*, 2003. 22(26): p. 4102-10.
80. Csukai, M., et al., The coatomer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase Cepsilon. *J Biol Chem*, 1997. 272(46): p. 29200-6.
81. da Rocha, A.B., et al., Targeting protein kinase C: new therapeutic opportunities against high-grade malignant gliomas? *Oncologist*, 2002. 7(1): p. 17-33.
82. da Silva, J.S. and C.G. Dotti, Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci*, 2002. 3(9): p. 694-704.
83. Da Silva, J.S., et al., RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin Ila-mediated control of actin stability. *J Cell Biol*, 2003. 162(7): p. 1267-79.
84. Daheron, L., et al., LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2004. 22(5): p. 770-8.
85. Dai, B., et al., Reduced collagen deposition in infarcted myocardium facilitates induced pluripotent stem cell engraftment and angiomyogenesis for improvement of left ventricular function. *J Am Coll Cardiol.* 58(20): p. 2118-27.
86. Dai, Y., et al., Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J Neurosci*, 2004. 24(18): p. 4293-9.

87. Dailey, M.E. and S.J. Smith, The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci*, 1996. 16(9): p. 2983-94.
88. Datta, J., et al., microRNA-107 functions as a candidate tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma by downregulation of protein kinase C ϵ . *Oncogene*. 31(36): p. 4045-53.
89. Davis, J.B., et al., Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 2000. 405(6783): p. 183-7.
90. de Anda, F.C., et al., Centrosome motility is essential for initial axon formation in the neocortex. *J Neurosci*. 30(31): p. 10391-406.
91. de Anda, F.C., et al., Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature*, 2005. 436(7051): p. 704-8.
92. Dean, W., et al., Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. *Development*, 1998. 125(12): p. 2273-82.
93. Dekker, L.V. and P.J. Parker, Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci*, 1994. 19(2): p. 73-7.
94. Dempsey, E.C., et al., Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. 279(3): p. L429-38.
95. Deuse, T., et al., Human leukocyte antigen I knockdown human embryonic stem cells induce host ignorance and achieve prolonged xenogeneic survival. *Circulation*. 124(11 Suppl): p. S3-9.
96. Di-Capua, N., O. Sperling, and E. Zoref-Shani, Protein kinase C- ϵ is involved in the adenosine-activated signal transduction pathway conferring protection against ischemia-reperfusion injury in primary rat neuronal cultures. *J Neurochem*, 2003. 84(2): p. 409-12.
97. Distel, M., et al., The centrosome neither persistently leads migration nor determines the site of axonogenesis in migrating neurons in vivo. *J Cell Biol*. 191(4): p. 875-90.

98. Diwan, S.B. and L.C. Stevens, Development of teratomas from the ectoderm of mouse egg cylinders. *J Natl Cancer Inst*, 1976. 57(4): p. 937-42.
99. Du, Z.W. and S.C. Zhang, Neural differentiation from embryonic stem cells: which way? *Stem Cells Dev*, 2004. 13(4): p. 372-81.
100. Duan, H., et al., Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cereb Cortex*, 2003. 13(9): p. 950-61.
101. Dumuis, A., et al., NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature*, 1988. 336(6194): p. 68-70.
102. Dupraz, S., et al., The TC10-Exo70 complex is essential for membrane expansion and axonal specification in developing neurons. *J Neurosci*, 2009. 29(42): p. 13292-301.
103. Dutil, E.M., A. Toker, and A.C. Newton, Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol*, 1998. 8(25): p. 1366-75.
104. Dvorak, P., et al., Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005. 23(8): p. 1200-11.
105. Dvorak, P. and A. Hampl, Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. *Folia Histochem Cytobiol*, 2005. 43(4): p. 203-8.
106. Ehm, O., et al., RBPJkappa-dependent signaling is essential for long-term maintenance of neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci*. 30(41): p. 13794-807.
107. Encinas, J.M. and G. Enikolopov, Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods Cell Biol*, 2008. 85: p. 243-72.
108. England, K., et al., PKC epsilon is associated with myosin IIA and actin in fibroblasts. *Cell Signal*, 2002. 14(6): p. 529-36.

109. Ericson, J., et al., Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell*, 1995. 81(5): p. 747-56.
110. Esdar, C., et al., The protein kinase C (PKC) substrate GAP-43 is already expressed in neural precursor cells, colocalizes with PKC ϵ and binds calmodulin. *Eur J Neurosci*, 1999. 11(2): p. 503-16.
111. Evans M.J., K.M., Pluripotential cells growth directly from normal mouse embryos. *Cancer Survey*, 1983. 2: p. 185-208.
112. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981. 292(5819): p. 154-6.
113. Faigle, R. and H. Song, Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1830(2): p. 2435-48.
114. Farese, R.V. and M.P. Sajan, Atypical protein kinase C in cardiometabolic abnormalities. *Curr Opin Lipidol*. 23(3): p. 175-81.
115. Faure, J., P.V. Vignais, and M.C. Dagher, Phosphoinositide-dependent activation of Rho A involves partial opening of the RhoA/Rho-GDI complex. *Eur J Biochem*, 1999. 262(3): p. 879-89.
116. Ferri, A.L., et al., Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, 2004. 131(15): p. 3805-19.
117. Fincham, V.J., et al., Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *EMBO J*, 2000. 19(12): p. 2911-23.
118. Fischbach, G.D. and R.L. Fischbach, Stem cells: science, policy, and ethics. *J Clin Invest*, 2004. 114(10): p. 1364-70.
119. Flescher, E. and R. Rotem, Protein kinase C epsilon mediates the induction of P-glycoprotein in LNCaP prostate carcinoma cells. *Cell Signal*, 2002. 14(1): p. 37-43.

120. Flint, A.J., R.D. Paladini, and D.E. Koshland, Jr., Autophosphorylation of protein kinase C at three separated regions of its primary sequence. *Science*, 1990. 249(4967): p. 408-11.
121. Fossey, S.C., et al., Identification and characterization of PRKCBP1, a candidate RACK-like protein. *Mamm Genome*, 2000. 11(10): p. 919-25.
122. Fremeau, R.T., Jr., et al., The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*, 2001. 31(2): p. 247-60.
123. French, A.J., et al., Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells*, 2008. 26(2): p. 485-93.
124. Fujioka, T., A. Fujioka, and R.S. Duman, Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus. *J Neurosci*, 2004. 24(2): p. 319-28.
125. Fujita, J., et al., Administration of granulocyte colony-stimulating factor after myocardial infarction enhances the recruitment of hematopoietic stem cell-derived myofibroblasts and contributes to cardiac repair. *Stem Cells*, 2007. 25(11): p. 2750-9.
126. Fukata, M., et al., Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. *J Biol Chem*, 1999. 274(37): p. 26044-50.
127. Fukata, Y., et al., CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol*, 2002. 4(8): p. 583-91.
128. Gage, F.H., Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000. 287(5457): p. 1433-8.
129. Galeotti, N. and C. Ghelardini, Selective modulation of the PKCvarepsilon/p38MAP kinase signalling pathway for the antidepressant-like activity of amitriptyline. *Neuropharmacology*. 62(1): p. 289-96.
130. Gangeswaran, R. and K.T. Jones, Unique protein kinase C profile in mouse oocytes: lack of calcium-dependent conventional isoforms

- suggested by rtPCR and Western blotting. *FEBS Lett*, 1997. 412(2): p. 309-12.
131. Garczarczyk, D., et al., Signal transduction of constitutively active protein kinase C epsilon. *Cell Signal*, 2009. 21(5): p. 745-52.
 132. Gartner, A., et al., N-cadherin specifies first asymmetry in developing neurons. *EMBO J*. 31(8): p. 1893-903.
 133. Gatto, C.L. and K. Broadie, The fragile X mental retardation protein in circadian rhythmicity and memory consolidation. *Mol Neurobiol*, 2009. 39(2): p. 107-29.
 134. Gerrard, L., L. Rodgers, and W. Cui, Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling. *Stem Cells*, 2005. 23(9): p. 1234-41.
 135. Giachino, C., et al., cAMP response element-binding protein regulates differentiation and survival of newborn neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci*, 2005. 25(44): p. 10105-18.
 136. Ginis, I., et al., Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*, 2004. 269(2): p. 360-80.
 137. Giorgione, J., et al., Contribution of the C1A and C1B domains to the membrane interaction of protein kinase C. *Biochemistry*, 2003. 42(38): p. 11194-202.
 138. Gordon, A.S., et al., Ethanol alters the subcellular localization of delta- and epsilon protein kinase C in NG108-15 cells. *Mol Pharmacol*, 1997. 52(4): p. 554-9.
 139. Gottlieb, D.I. and J.E. Huettner, An in vitro pathway from embryonic stem cells to neurons and glia. *Cells Tissues Organs*, 1999. 165(3-4): p. 165-72.
 140. Grimes, C.A. and R.S. Jope, The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*, 2001. 65(4): p. 391-426.

141. Grohmanova, K., et al., Phosphorylation of IQGAP1 modulates its binding to Cdc42, revealing a new type of rho-GTPase regulator. *J Biol Chem*, 2004. 279(47): p. 48495-504.
142. Guo, W., et al., Ablation of Fmrp in adult neural stem cells disrupts hippocampus-dependent learning. *Nat Med*. 17(5): p. 559-65.
143. Ha, S.P., et al., Transplantation of mouse HSCs genetically modified to express a CD4-restricted TCR results in long-term immunity that destroys tumors and initiates spontaneous autoimmunity. *J Clin Invest*. 120(12): p. 4273-88.
144. Hack, M.A., et al., Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci*, 2005. 8(7): p. 865-72.
145. Hack, M.A., et al., Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. *Mol Cell Neurosci*, 2004. 25(4): p. 664-78.
146. Hafeez, B.B., et al., Genetic ablation of PKC epsilon inhibits prostate cancer development and metastasis in transgenic mouse model of prostate adenocarcinoma. *Cancer Res*. 71(6): p. 2318-27.
147. Hama, H., et al., PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron*, 2004. 41(3): p. 405-15.
148. Hannigan, G., A.A. Troussard, and S. Dedhar, Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(1): p. 51-63.
149. Hao, J., et al., WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*, 2006. 290(1): p. 81-91.
150. Hare, J.M., et al., A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2009. 54(24): p. 2277-86.

151. Hay, N. and N. Sonenberg, Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 2004. 18(16): p. 1926-45.
152. Hedstrom, K.L., Y. Ogawa, and M.N. Rasband, AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *J Cell Biol*, 2008. 183(4): p. 635-40.
153. Heidkamp, M.C., et al., Activation of focal adhesion kinase by protein kinase C epsilon in neonatal rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285(4): p. H1684-96.
154. Heidkamp, M.C., et al., Protein kinase Cepsilon-dependent MARCKS phosphorylation in neonatal and adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. 42(2): p. 422-31.
155. Hernandez, R.M., et al., Biochemical and morphogenic effects of the interaction between protein kinase C-epsilon and actin in vitro and in cultured NIH3T3 cells. *J Cell Biochem*, 2001. 83(4): p. 532-46.
156. Herold, S., et al., CREB signalling regulates early survival, neuronal gene expression and morphological development in adult subventricular zone neurogenesis. *Mol Cell Neurosci*. 46(1): p. 79-88.
157. Hoch, A.I., et al., Differentiation-dependent secretion of proangiogenic factors by mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 7(4): p. e35579.
158. Hodge, C.W., et al., Supersensitivity to allosteric GABA(A) receptor modulators and alcohol in mice lacking PKCepsilon. *Nat Neurosci*, 1999. 2(11): p. 997-1002.
159. Hodge, R.D., et al., Tbr2 is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to intermediate progenitors and neurons. *J Neurosci*. 32(18): p. 6275-87.
160. Hoglinger, G.U., et al., Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci*, 2004. 7(7): p. 726-35.
161. Hongpaisan, J., M.K. Sun, and D.L. Alkon, PKC epsilon activation prevents synaptic loss, Abeta elevation, and cognitive deficits in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Neurosci*. 31(2): p. 630-43.

162. Huang, K.P., et al., Autophosphorylation of rat brain Ca²⁺-activated and phospholipid-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 1986. 261(26): p. 12134-40.
163. Huang, X. and J.W. Walker, Myofilament anchoring of protein kinase C-epsilon in cardiac myocytes. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 10): p. 1971-8.
164. Humphrey, R.K., et al., Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells*, 2004. 22(4): p. 522-30.
165. Hundle, B., et al., Overexpression of epsilon-protein kinase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth. *J Biol Chem*, 1995. 270(50): p. 30134-40.
166. Hurtado-Chong, A., et al., IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone. *Eur J Neurosci*, 2009. 30(5): p. 742-55.
167. Hussain, R.J. and D.O. Carpenter, A comparison of the roles of protein kinase C in long-term potentiation in rat hippocampal areas CA1 and CA3. *Cell Mol Neurobiol*, 2005. 25(3-4): p. 649-61.
168. Hynes, M., et al., Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron*, 1995. 15(1): p. 35-44.
169. Ikeda, Y., et al., Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance in *Psammomys obesus*: overexpression of protein kinase Cepsilon in skeletal muscle precedes the onset of hyperinsulinemia and hyperglycemia. *Diabetes*, 2001. 50(3): p. 584-92.
170. Imayoshi, I., et al., Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci*. 30(9): p. 3489-98.
171. Inagaki, K., E. Churchill, and D. Mochly-Rosen, Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart. *Cardiovasc Res*, 2006. 70(2): p. 222-30.
172. Ivaska, J., et al., PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J*, 2005. 24(22): p. 3834-45.

173. Jagasia, R., et al., GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*, 2009. 29(25): p. 7966-77.
174. James, D., et al., TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*, 2005. 132(6): p. 1273-82.
175. Jessberger, S., et al., Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci*, 2008. 11(8): p. 888-93.
176. Jiang, H., et al., Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators. *Cell*, 2005. 120(1): p. 123-35.
177. Jin, K., et al., Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(18): p. 11946-50.
178. Jirmanova, L., et al., Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells. *Oncogene*, 2002. 21(36): p. 5515-28.
179. Johnson, J.A., et al., A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function. *J Biol Chem*, 1996. 271(40): p. 24962-6.
180. Jones-Villeneuve, E.M., et al., Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol*, 1982. 94(2): p. 253-62.
181. Joyce, N., et al., Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med*. 5(6): p. 933-46.
182. Joyner, A.L., Gene targeting and gene trap screens using embryonic stem cells: new approaches to mammalian development. *Bioessays*, 1991. 13(12): p. 649-56.

183. Kang, H.B., et al., Basic fibroblast growth factor activates ERK and induces c-fos in human embryonic stem cell line MizhES1. *Stem Cells Dev*, 2005. 14(4): p. 395-401.
184. Kang, L., et al., iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*, 2009. 5(2): p. 135-8.
185. Karp, J.M. and G.S. Leng Teo, Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*, 2009. 4(3): p. 206-16.
186. Kasahara, K. and U. Kikkawa, Distinct effects of saturated fatty acids on protein kinase C subspecies. *J Biochem*, 1995. 117(3): p. 648-53.
187. Kashiwagi, K., et al., Importance of C1B domain for lipid messenger-induced targeting of protein kinase C. *J Biol Chem*, 2002. 277(20): p. 18037-45.
188. Kawakami, T., Y. Kawakami, and J. Kitaura, Protein kinase C beta (PKC beta): normal functions and diseases. *J Biochem*, 2002. 132(5): p. 677-82.
189. Kempermann, G., et al., Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 2004. 27(8): p. 447-52.
190. Kermorgant, S., D. Zicha, and P.J. Parker, PKC controls HGF-dependent c-Met traffic, signalling and cell migration. *EMBO J*, 2004. 23(19): p. 3721-34.
191. Kewalramani, G., et al., Palmitate-activated macrophages confer insulin resistance to muscle cells by a mechanism involving protein kinase C theta and epsilon. *PLoS One*. 6(10): p. e26947.
192. Khasar, S.G., et al., A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron*, 1999. 24(1): p. 253-60.
193. Khazaei, M.R. and A.W. Puschel, Phosphorylation of the par polarity complex protein Par3 at serine 962 is mediated by aurora a and regulates its function in neuronal polarity. *J Biol Chem*, 2009. 284(48): p. 33571-9.
194. Kheirandish, L., et al., Intermittent hypoxia during development induces long-term alterations in spatial working memory, monoamines, and dendritic branching in rat frontal cortex. *Pediatr Res*, 2005. 58(3): p. 594-9.

195. Kim, E.J., et al., In vivo analysis of Ascl1 defined progenitors reveals distinct developmental dynamics during adult neurogenesis and gliogenesis. *J Neurosci*, 2007. 27(47): p. 12764-74.
196. Kim, M., et al., Regulation of mouse embryonic stem cell neural differentiation by retinoic acid. *Dev Biol*, 2009. 328(2): p. 456-71.
197. Kim, S.J., et al., Contribution of the PI3K/Akt/PKB signal pathway to maintenance of self-renewal in human embryonic stem cells. *FEBS Lett*, 2005. 579(2): p. 534-40.
198. Kinouchi, T., et al., Conventional protein kinase C (PKC)-alpha and novel PKC epsilon, but not -delta, increase the secretion of an N-terminal fragment of Alzheimer's disease amyloid precursor protein from PKC cDNA transfected 3Y1 fibroblasts. *FEBS Lett*, 1995. 364(2): p. 203-6.
199. Kishimoto, T., T. Taga, and S. Akira, Cytokine signal transduction. *Cell*, 1994. 76(2): p. 253-62.
200. Kitajima, Y., Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. *Clin Exp Dermatol*, 2002. 27(8): p. 684-90.
201. Knoll, R., et al., The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*, 2002. 111(7): p. 943-55.
202. Koike, C., et al., Function of atypical protein kinase C lambda in differentiating photoreceptors is required for proper lamination of mouse retina. *J Neurosci*, 2005. 25(44): p. 10290-8.
203. Kolkova, K., et al., Distinct roles of PKC isoforms in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Neurochem*, 2005. 92(4): p. 886-94.
204. Kondo, M., et al., Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*, 2003. 21: p. 759-806.
205. Kristensen, D.M., M. Kalisz, and J.H. Nielsen, Cytokine signalling in embryonic stem cells. *APMIS*, 2005. 113(11-12): p. 756-72.

206. Kunda, P., et al., Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *J Neurosci*, 2001. 21(7): p. 2361-72.
207. Kuroda, S., et al., Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science*, 1998. 281(5378): p. 832-5.
208. Kuwabara, T., et al., Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci*, 2009. 12(9): p. 1097-105.
209. Labosky, P.A., D.P. Barlow, and B.L. Hogan, Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development*, 1994. 120(11): p. 3197-204.
210. Lai, K., et al., Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci*, 2003. 6(1): p. 21-7.
211. Lange-Asschenfeldt, C., et al., Epsilon protein kinase C mediated ischemic tolerance requires activation of the extracellular regulated kinase pathway in the organotypic hippocampal slice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004. 24(6): p. 636-45.
212. Larsson, C., Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal*, 2006. 18(3): p. 276-84.
213. Le Good, J.A., et al., Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science*, 1998. 281(5385): p. 2042-5.
214. Lee, C.H., et al., CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model. *J Clin Invest*. 120(9): p. 3340-9.
215. Lee, J.H., S.R. Hart, and D.G. Skalnik, Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis*, 2004. 38(1): p. 32-8.

216. Lee, S.T., et al., Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 57(4): p. 455-65.
217. Lee, T.I., et al., Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, 2006. 125(2): p. 301-13.
218. Lehel, C., et al., Protein kinase C epsilon is localized to the Golgi via its zinc-finger domain and modulates Golgi function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(5): p. 1406-10.
219. Leri, A., J. Kajstura, and P. Anversa, Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology. *Circ Res.* 109(8): p. 941-61.
220. Lerner, R.P., et al., Striatal atrophy and dendritic alterations in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Brain Res Bull.* 87(6): p. 571-8.
221. Letierrier, C., et al., End-binding proteins EB3 and EB1 link microtubules to ankyrin G in the axon initial segment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(21): p. 8826-31.
222. Levenstein, M.E., et al., Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*, 2006. 24(3): p. 568-74.
223. Levine, A.J. and A.H. Brivanlou, GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. *Development*, 2006. 133(2): p. 209-16.
224. Li, B., et al., Mobilized human hematopoietic stem/progenitor cells promote kidney repair after ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 121(20): p. 2211-20.
225. Li, C., et al., Differential localization of the neurofibromatosis 1 (NF1) gene product, neurofibromin, with the F-actin or microtubule cytoskeleton during differentiation of telencephalic neurons. *Brain Res Dev Brain Res*, 2001. 130(2): p. 231-48.

226. Li, J.Y., et al., Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog. *Mol Cell Biol*, 2007. 27(24): p. 8748-59.
227. Li, X., et al., Epigenetic regulation of the stem cell mitogen Fgf-2 by Mbd1 in adult neural stem/progenitor cells. *J Biol Chem*, 2008. 283(41): p. 27644-52.
228. Li, Z., et al., IQGAP1 promotes neurite outgrowth in a phosphorylation-dependent manner. *J Biol Chem*, 2005. 280(14): p. 13871-8.
229. Li, Z., M.H. Theus, and L. Wei, Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells. *Dev Growth Differ*, 2006. 48(8): p. 513-23.
230. Li, Z.W., et al., Tracking dendritic shrinkage of retinal ganglion cells after acute elevation of intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 52(10): p. 7205-12.
231. Liang, J., et al., Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2008. 10(6): p. 731-9.
232. Lichtenwalner, R.J., et al., Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*, 2001. 107(4): p. 603-13.
233. Lie, D.C., et al., Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 2005. 437(7063): p. 1370-5.
234. Lim, D.A., et al., Chromatin remodelling factor Mll1 is essential for neurogenesis from postnatal neural stem cells. *Nature*, 2009. 458(7237): p. 529-33.
235. Lim, D.A., et al., Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 2000. 28(3): p. 713-26.
236. Lima, D. and A. Coimbra, A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. *J Comp Neurol*, 1986. 244(1): p. 53-71.

237. Lin, Q., et al., Tumourigenesis in the infarcted rat heart is eliminated through differentiation and enrichment of the transplanted embryonic stem cells. *Eur J Heart Fail.* 12(11): p. 1179-85.
238. Lin, T., et al., p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol.* 2005. 7(2): p. 165-71.
239. Ling, M., et al., Induction of neurites by the regulatory domains of PKCdelta and epsilon is counteracted by PKC catalytic activity and by the RhoA pathway. *Exp Cell Res.* 2004. 292(1): p. 135-50.
240. Ling, M., et al., Identification of conserved amino acids N-terminal of the PKC epsilon C1b domain crucial for protein kinase C epsilon-mediated induction of neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 2005. 280(18): p. 17910-9.
241. Liron, T., et al., Rational design of a selective antagonist of epsilon protein kinase C derived from the selective allosteric agonist, pseudo-RACK peptide. *J Mol Cell Cardiol.* 2007. 42(4): p. 835-41.
242. Liu, C., et al., Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell Stem Cell.* 6(5): p. 433-44.
243. Liu, H.K., et al., The nuclear receptor tailless is required for neurogenesis in the adult subventricular zone. *Genes Dev.* 2008. 22(18): p. 2473-8.
244. Liu, N., et al., Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Cell Physiol.* 2007. 211(2): p. 279-86.
245. Lodge, P., et al., Increased gp130 signaling in combination with inhibition of the MEK/ERK pathway facilitates embryonic stem cell isolation from normally refractory murine CBA blastocysts. *Cloning Stem Cells.* 2005. 7(1): p. 2-7.
246. Loranger, A., et al., Keratin 8 modulation of desmoplakin deposition at desmosomes in hepatocytes. *Exp Cell Res.* 2006. 312(20): p. 4108-19.
247. Lu, S., et al., Engineered heart tissue graft derived from somatic cell nuclear transferred embryonic stem cells improve myocardial performance in infarcted rat heart. *J Cell Mol Med.* 14(12): p. 2771-9.

248. Lukaszewicz, A., et al., G1 phase regulation, area-specific cell cycle control, and cytoarchitectonics in the primate cortex. *Neuron*, 2005. 47(3): p. 353-64.
249. Luo, Y., et al., Fragile x mental retardation protein regulates proliferation and differentiation of adult neural stem/progenitor cells. *PLoS Genet*. 6(4): p. e1000898.
250. Ma, D.K., et al., Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science*, 2009. 323(5917): p. 1074-7.
251. Ma, P. and R.M. Schultz, Histone deacetylase 1 (HDAC1) regulates histone acetylation, development, and gene expression in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol*, 2008. 319(1): p. 110-20.
252. Machold, R., et al., Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron*, 2003. 39(6): p. 937-50.
253. Maden, M., Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 2002. 3(11): p. 843-53.
254. Maherali, N. and K. Hochedlinger, Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008. 3(6): p. 595-605.
255. Mandadi, S., et al., Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain*, 2006. 123(1-2): p. 106-16.
256. Mandell, J.W. and G.A. Banker, A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci*, 1996. 16(18): p. 5727-40.
257. Mangoura, D., Molecular mediation of neural differentiation. *Int J Dev Neurosci*, 2000. 18(7): p. 619.
258. Mangoura, D., V. Sogos, and G. Dawson, Protein kinase C-epsilon is a developmentally regulated, neuronal isoform in the chick embryo central nervous system. *J Neurosci Res*, 1993. 35(5): p. 488-98.

259. Mangoura, D., V. Sogos, and G. Dawson, Phorbol esters and PKC signaling regulate proliferation, vimentin cytoskeleton assembly and glutamine synthetase activity of chick embryo cerebrum astrocytes in culture. *Brain Res Dev Brain Res*, 1995. 87(1): p. 1-11.
260. Mangoura, D., et al., 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-dependent up-regulation of dopaminergic gene expression requires Ras and neurofibromin in human IMR-32 neuroblastoma. *J Neurochem*, 2006. 97 Suppl 1: p. 97-103.
261. Mansour, H., et al., Restoration of resting sarcomere length after uniaxial static strain is regulated by protein kinase Cepsilon and focal adhesion kinase. *Circ Res*, 2004. 94(5): p. 642-9.
262. Mao, Y., et al., Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell*, 2009. 136(6): p. 1017-31.
263. Markwardt, S.J., J.I. Wadiche, and L.S. Overstreet-Wadiche, Input-specific GABAergic signaling to newborn neurons in adult dentate gyrus. *J Neurosci*, 2009. 29(48): p. 15063-72.
264. Marson, A., et al., Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 2008. 134(3): p. 521-33.
265. Martin, G.R., Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia. *Cell*, 1975. 5(3): p. 229-43.
266. Martin, G.R., Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science*, 1980. 209(4458): p. 768-76.
267. Martin, G.R., Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78(12): p. 7634-8.
268. Martin, G.R. and M.J. Evans, Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. 72(4): p. 1441-5.

269. Martin, G.R., L.M. Wiley, and I. Damjanov, The development of cystic embryoid bodies in vitro from clonal teratocarcinoma stem cells. *Dev Biol*, 1977. 61(2): p. 230-44.
270. Martinez-Morales, P.L., et al., Progress in Stem Cell Therapy for Major Human Neurological Disorders. *Stem Cell Rev*.
271. Martinez-Tellez, R., J. Gomez-Villalobos Mde, and G. Flores, Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Brain Res*, 2005. 1048(1-2): p. 108-15.
272. Matsuda, T., et al., STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*, 1999. 18(15): p. 4261-9.
273. Matsui, Y., et al., Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature*, 1991. 353(6346): p. 750-2.
274. Matsui, Y., K. Zsebo, and B.L. Hogan, Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 1992. 70(5): p. 841-7.
275. Matsushima, H., et al., Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent protein kinase C changes in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 1996. 67(1): p. 317-23.
276. Maulon, L., et al., Differential requirements for ERK1/2 and P38 MAPK activation by thrombin in T cells. Role of P59Fyn and PKCepsilon. *Oncogene*, 2001. 20(16): p. 1964-72.
277. McMahon, T., et al., Protein kinase C epsilon mediates up-regulation of N-type calcium channels by ethanol. *Mol Pharmacol*, 2000. 57(1): p. 53-8.
278. Melendez, J., et al., Activation of pyk2/related focal adhesion tyrosine kinase and focal adhesion kinase in cardiac remodeling. *J Biol Chem*, 2002. 277(47): p. 45203-10.
279. Mellor, H. and P.J. Parker, The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*, 1998. 332 (Pt 2): p. 281-92.

280. Menager, C., et al., PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *J Neurochem*, 2004. 89(1): p. 109-18.
281. Menchon, S.A., et al., Neuronal (bi)polarity as a self-organized process enhanced by growing membrane. *PLoS One*. 6(9): p. e24190.
282. Meshorer, E. and T. Misteli, Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(7): p. 540-6.
283. Messing, R.O., P.J. Petersen, and C.J. Henrich, Chronic ethanol exposure increases levels of protein kinase C delta and epsilon and protein kinase C-mediated phosphorylation in cultured neural cells. *J Biol Chem*, 1991. 266(34): p. 23428-32.
284. Ming, G.L. and H. Song, Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 70(4): p. 687-702.
285. Mischak, H., et al., Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem*, 1993. 268(9): p. 6090-6.
286. Mitsui, K., et al., The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 2003. 113(5): p. 631-42.
287. Miyahara, Y., et al., Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*, 2006. 12(4): p. 459-65.
288. Mizui, T., et al., Overexpression of drebrin A in immature neurons induces the accumulation of F-actin and PSD-95 into dendritic filopodia, and the formation of large abnormal protrusions. *Mol Cell Neurosci*, 2005. 30(4): p. 630-8.
289. Mochly-Rosen, D., Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*, 1995. 268(5208): p. 247-51.
290. Mochly-Rosen, D. and D.E. Koshland, Jr., Domain structure and phosphorylation of protein kinase C. *J Biol Chem*, 1987. 262(5): p. 2291-7.

291. Mohib, K., et al., Embryonic stem cell-derived factors inhibit T effector activation and induce T regulatory cells by suppressing PKC-theta activation. *PLoS One*. 7(3): p. e32420.
292. Molofsky, A.V., et al., Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev*, 2005. 19(12): p. 1432-7.
293. Molofsky, A.V., et al., Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature*, 2003. 425(6961): p. 962-7.
294. Murray, N.R., K.R. Kalari, and A.P. Fields, Protein kinase C α expression and oncogenic signaling mechanisms in cancer. *J Cell Physiol*. 226(4): p. 879-87.
295. Murriel, C.L. and D. Mochly-Rosen, Opposing roles of delta and epsilonPKC in cardiac ischemia and reperfusion: targeting the apoptotic machinery. *Arch Biochem Biophys*, 2003. 420(2): p. 246-54.
296. Nagy, A., et al., Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*, 1990. 110(3): p. 815-21.
297. Nagy, A., et al., Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(18): p. 8424-8.
298. Nakagawa, S., et al., Localization of phosphorylated cAMP response element-binding protein in immature neurons of adult hippocampus. *J Neurosci*, 2002. 22(22): p. 9868-76.
299. Nakagawa, S., et al., Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci*, 2002. 22(9): p. 3673-82.
300. Nakamura, Y., et al., MEK kinase 1 is essential for Bcr-Abl-induced STAT3 and self-renewal activity in embryonic stem cells. *Oncogene*, 2005. 24(51): p. 7592-8.

301. Nakashima, S., Protein kinase C alpha (PKC alpha): regulation and biological function. *J Biochem*, 2002. 132(5): p. 669-75.
302. Nelson, A.J., et al., Neuroplastic adaptations to exercise: neuronal remodeling in cardiorespiratory and locomotor areas. *J Appl Physiol*, 2005. 99(6): p. 2312-22.
303. Nelson, T.J., et al., Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 2009. 120(5): p. 408-16.
304. Nelson, T.J., et al., Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. *Eur J Pharmacol*, 2008. 585(1): p. 76-87.
305. Newton, A.C., Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, 1995. 270(48): p. 28495-8.
306. Newton, A.C., Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev*, 2001. 101(8): p. 2353-64.
307. Newton, A.C. and J.E. Johnson, Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim Biophys Acta*, 1998. 1376(2): p. 155-72.
308. Newton, A.C. and D.E. Koshland, Jr., Protein kinase C autophosphorylates by an intrapeptide reaction. *J Biol Chem*, 1987. 262(21): p. 10185-8.
309. Newton, P.M. and R.O. Messing, The substrates and binding partners of protein kinase Cepsilon. *Biochem J*. 427(2): p. 189-96.
310. Nikolic, W.V., et al., Peripherally administered human umbilical cord blood cells reduce parenchymal and vascular beta-amyloid deposits in Alzheimer mice. *Stem Cells Dev*, 2008. 17(3): p. 423-39.
311. Nishimoto, M., et al., The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a

- complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(8): p. 5453-65.
312. Nishio, Y., et al., The use of hemopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood to promote restoration of spinal cord tissue and recovery of hindlimb function in adult rats. *J Neurosurg Spine*, 2006. 5(5): p. 424-33.
 313. Nitti, M., et al., PKC delta and NADPH oxidase in retinoic acid-induced neuroblastoma cell differentiation. *Cell Signal*. 22(5): p. 828-35.
 314. Niwa, H., Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct*, 2001. 26(3): p. 137-48.
 315. Niwa, H., et al., Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, 1998. 12(13): p. 2048-60.
 316. Numazaki, M., et al., Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem*, 2002. 277(16): p. 13375-8.
 317. Nygren, J.M., et al., Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*, 2004. 10(5): p. 494-501.
 318. Oehrlein, S.A., A. Maelicke, and T. Herget, Expression of protein kinase C gene family members is temporally and spatially regulated during neural development in vitro. *Eur J Cell Biol*, 1998. 77(4): p. 323-37.
 319. Okhrimenko, H., et al., Protein kinase C-epsilon regulates the apoptosis and survival of glioma cells. *Cancer Res*, 2005. 65(16): p. 7301-9.
 320. Okumura-Nakanishi, S., et al., Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2005. 280(7): p. 5307-17.
 321. Omary, M.B., et al., "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci*, 2006. 31(7): p. 383-94.

322. Ono, Y., et al., The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. *J Biol Chem*, 1988. 263(14): p. 6927-32.
323. Orr, J.W., Jr., et al., The efficacy and safety of the cytotbrush during pregnancy. *Gynecol Oncol*, 1992. 44(3): p. 260-2.
324. Orr, J.W. and A.C. Newton, Intrapeptide regulation of protein kinase C. *J Biol Chem*, 1994. 269(11): p. 8383-7.
325. Paling, N.R., et al., Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem*, 2004. 279(46): p. 48063-70.
326. Palmantier, R., et al., Cis-polyunsaturated fatty acids stimulate beta1 integrin-mediated adhesion of human breast carcinoma cells to type IV collagen by activating protein kinases C-epsilon and -mu. *Cancer Res*, 2001. 61(6): p. 2445-52.
327. Pan, G., et al., A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *FASEB J*, 2006. 20(10): p. 1730-2.
328. Pan, G. and D. Pei, The stem cell pluripotency factor NANOG activates transcription with two unusually potent subdomains at its C terminus. *J Biol Chem*, 2005. 280(2): p. 1401-7.
329. Pan, G., et al., Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2007. 1(3): p. 299-312.
330. Pan, G.J., et al., Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res*, 2002. 12(5-6): p. 321-9.
331. Pan, Q., et al., Protein kinase C epsilon is a predictive biomarker of aggressive breast cancer and a validated target for RNA interference anticancer therapy. *Cancer Res*, 2005. 65(18): p. 8366-71.

332. Park, H.W., et al., Human mesenchymal stem cell-derived Schwann cell-like cells exhibit neurotrophic effects, via distinct growth factor production, in a model of spinal cord injury. *Glia*. 58(9): p. 1118-32.
333. Park, K.S., et al., Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation. *Transplantation*. 89(5): p. 509-17.
334. Parrow, V., et al., Protein kinase C remains functionally active during TPA induced neuronal differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol*, 1992. 152(3): p. 536-44.
335. Paschaki, M., et al., Retinoic acid-dependent signaling pathways and lineage events in the developing mouse spinal cord. *PLoS One*. 7(3): p. e32447.
336. Perletti, G.P., et al., Protein kinase Cepsilon is oncogenic in colon epithelial cells by interaction with the ras signal transduction pathway. *Oncogene*, 1998. 16(25): p. 3345-8.
337. Perletti, G.P., et al., Overexpression of protein kinase C epsilon is oncogenic in rat colonic epithelial cells. *Oncogene*, 1996. 12(4): p. 847-54.
338. Pertz, O., Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *J Cell Sci*. 123(Pt 11): p. 1841-50.
339. Pfenninger, K.H., Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task. *Nat Rev Neurosci*, 2009. 10(4): p. 251-61.
340. Pilpel, Y. and M. Segal, Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. *Eur J Neurosci*, 2004. 19(12): p. 3151-64.
341. Platel, J.C., et al., NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. *Neuron*. 65(6): p. 859-72.
342. Pollarolo, G., et al., Cytokinesis remnants define first neuronal asymmetry in vivo. *Nat Neurosci*. 14(12): p. 1525-33.

343. Prekeris, R., et al., Molecular analysis of the interactions between protein kinase C-epsilon and filamentous actin. *J Biol Chem*, 1998. 273(41): p. 26790-8.
344. Prekeris, R., et al., Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J Cell Biol*, 1996. 132(1-2): p. 77-90.
345. Premkumar, L.S. and G.P. Ahern, Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature*, 2000. 408(6815): p. 985-90.
346. Qi, X., et al., BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(16): p. 6027-32.
347. Qi, Z.H., et al., Protein kinase C epsilon regulates gamma-aminobutyrate type A receptor sensitivity to ethanol and benzodiazepines through phosphorylation of gamma2 subunits. *J Biol Chem*, 2007. 282(45): p. 33052-63.
348. Qu, L., et al., Endoplasmic reticulum stress induces p53 cytoplasmic localization and prevents p53-dependent apoptosis by a pathway involving glycogen synthase kinase-3beta. *Genes Dev*, 2004. 18(3): p. 261-77.
349. Qu, Q., et al., Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal. *Nat Cell Biol*. 12(1): p. 31-40; sup pp 1-9.
350. Quittau-Prevostel, C., et al., Targeting of PKCalpha and epsilon in the pituitary: a highly regulated mechanism involving a GD(E)E motif of the V3 region. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 1): p. 63-72.
351. Rai, K.S., B. Hattiangady, and A.K. Shetty, Enhanced production and dendritic growth of new dentate granule cells in the middle-aged hippocampus following intracerebroventricular FGF-2 infusions. *Eur J Neurosci*, 2007. 26(7): p. 1765-79.
352. Randlett, O., et al., The oriented emergence of axons from retinal ganglion cells is directed by laminin contact in vivo. *Neuron*. 70(2): p. 266-80.

353. Rasband, M.N., The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci.* 11(8): p. 552-62.
354. Rastan, S. and E.J. Robertson, X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *J Embryol Exp Morphol*, 1985. 90: p. 379-88.
355. Raval, A.P., et al., Epsilon PKC is required for the induction of tolerance by ischemic and NMDA-mediated preconditioning in the organotypic hippocampal slice. *J Neurosci*, 2003. 23(2): p. 384-91.
356. Reyland, M.E., Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci*, 2009. 14: p. 2386-99.
357. Richardson, M.R. and M.C. Yoder, Endothelial progenitor cells: quo vadis? *J Mol Cell Cardiol.* 50(2): p. 266-72.
358. Rideout, W.M., 3rd, et al., Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell*, 2002. 109(1): p. 17-27.
359. Rideout, W.M., 3rd, et al., Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nat Genet*, 2000. 24(2): p. 109-10.
360. Ristanovic, D., N.T. Milosevic, and V. Stulic, Application of modified Sholl analysis to neuronal dendritic arborization of the cat spinal cord. *J Neurosci Methods*, 2006. 158(2): p. 212-8.
361. Robles-Flores, M., et al., p32 (gC1qBP) is a general protein kinase C (PKC)-binding protein; interaction and cellular localization of P32-PKC complexes in ray hepatocytes. *J Biol Chem*, 2002. 277(7): p. 5247-55.
362. Ron, D., et al., Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(3): p. 839-43.
363. Rosler, E.S., et al., Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn*, 2004. 229(2): p. 259-74.

364. Rosso, S., et al., LIMK1 regulates Golgi dynamics, traffic of Golgi-derived vesicles, and process extension in primary cultured neurons. *Mol Biol Cell*, 2004. 15(7): p. 3433-49.
365. Rozengurt, E., O. Rey, and R.T. Waldron, Protein kinase D signaling. *J Biol Chem*, 2005. 280(14): p. 13205-8.
366. Saito, N., et al., Cellular and intracellular localization of epsilon-subspecies of protein kinase C in the rat brain; presynaptic localization of the epsilon-subspecies. *Brain Res*, 1993. 607(1-2): p. 241-8.
367. Saito, N. and Y. Shirai, Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. *J Biochem*, 2002. 132(5): p. 683-7.
368. Saitoh, N., T. Hori, and T. Takahashi, Activation of the epsilon isoform of protein kinase C in the mammalian nerve terminal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(24): p. 14017-21.
369. Sato, N., et al., Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*, 2004. 10(1): p. 55-63.
370. Sato, N., et al., Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev Biol*, 2003. 260(2): p. 404-13.
371. Saurin, A.T., et al., Targeted disruption of the protein kinase C epsilon gene abolishes the infarct size reduction that follows ischaemic preconditioning of isolated buffer-perfused mouse hearts. *Cardiovasc Res*, 2002. 55(3): p. 672-80.
372. Savatier, P., et al., Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene*, 1996. 12(2): p. 309-22.
373. Schechtman, D. and D. Mochly-Rosen, Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene*, 2001. 20(44): p. 6339-47.
374. Scheid, M.P. and J.R. Woodgett, PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(10): p. 760-8.

375. Scotto-Lomassese, S., et al., Fragile X mental retardation protein regulates new neuron differentiation in the adult olfactory bulb. *J Neurosci.* 31(6): p. 2205-15.
376. Scruggs, S.B., et al., Partial replacement of cardiac troponin I with a non-phosphorylatable mutant at serines 43/45 attenuates the contractile dysfunction associated with PKCepsilon phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*, 2006. 40(4): p. 465-73.
377. Seki, T. and Y. Arai, Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci*, 1993. 13(6): p. 2351-8.
378. Sekkai, D., et al., Microarray analysis of LIF/Stat3 transcriptional targets in embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2005. 23(10): p. 1634-42.
379. Shakhova, O. and L. Sommer, Neural crest-derived stem cells. 2008.
380. Sharma, G.D., A. Kakazu, and H.E. Bazan, Protein kinase C alpha and epsilon differentially modulate hepatocyte growth factor-induced epithelial proliferation and migration. *Exp Eye Res*, 2007. 85(2): p. 289-97.
381. Sharp, D.J., et al., Identification of a microtubule-associated motor protein essential for dendritic differentiation. *J Cell Biol*, 1997. 138(4): p. 833-43.
382. Shelly, M., et al., LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell*, 2007. 129(3): p. 565-77.
383. Shelly, M., et al., Semaphorin3A regulates neuronal polarization by suppressing axon formation and promoting dendrite growth. *Neuron*. 71(3): p. 433-46.
384. Shelly, M., et al., Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation. *Science*. 327(5965): p. 547-52.
385. Shelly, M. and M.M. Poo, Role of LKB1-SAD/MARK pathway in neuronal polarization. *Dev Neurobiol*. 71(6): p. 508-27.
386. Shen, F., et al., Inhibitory effect of 3,4-diaryl-3-pyrrolin-2-one derivatives on cyclooxygenase 1 and 2 in murine peritoneal macrophages. *Acta Pharmacol Sin*, 2002. 23(8): p. 762-8.

387. Shi, S.H., et al., APC and GSK-3beta are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr Biol*, 2004. 14(22): p. 2025-32.
388. Shi, S.H., L.Y. Jan, and Y.N. Jan, Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell*, 2003. 112(1): p. 63-75.
389. Shi, W., et al., Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem*, 2006. 281(33): p. 23319-25.
390. Shimazu, K., et al., NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learn Mem*, 2006. 13(3): p. 307-15.
391. Shimohata, T., H. Zhao, and G.K. Steinberg, Epsilon PKC may contribute to the protective effect of hypothermia in a rat focal cerebral ischemia model. *Stroke*, 2007. 38(2): p. 375-80.
392. Shirai, Y., N. Adachi, and N. Saito, Protein kinase Cepsilon: function in neurons. *FEBS J*, 2008. 275(16): p. 3988-94.
393. Shirai, Y., et al., A novel PIP2 binding of epsilonPKC and its contribution to the neurite induction ability. *J Neurochem*, 2007. 102(5): p. 1635-44.
394. Sholl, D.A., Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, 1953. 87(4): p. 387-406.
395. Sinkkonen, L., et al., MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2008. 15(3): p. 259-67.
396. Skaper, S.D., S.E. Moore, and F.S. Walsh, Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues. *Prog Neurobiol*, 2001. 65(6): p. 593-608.
397. Slupsky, J.R., et al., Central role of protein kinase Cepsilon in constitutive activation of ERK1/2 and Rac1 in the malignant cells of hairy cell leukemia. *Am J Pathol*, 2007. 170(2): p. 745-54.

398. Smart, N., et al., De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature*. 474(7353): p. 640-4.
399. Smith, A.G., Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001. 17: p. 435-62.
400. Smith, A.G., et al., Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 1988. 336(6200): p. 688-90.
401. Smrt, R.D., et al., Mecp2 deficiency leads to delayed maturation and altered gene expression in hippocampal neurons. *Neurobiol Dis*, 2007. 27(1): p. 77-89.
402. Smukler, S.R., et al., The adult mouse and human pancreas contain rare multipotent stem cells that express insulin. *Cell Stem Cell*. 8(3): p. 281-93.
403. Soh, J.W., et al., Novel roles of specific isoforms of protein kinase C in activation of the c-fos serum response element. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(2): p. 1313-24.
404. Solter, D., N. Skreb, and I. Damjanov, Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. *Nature*, 1970. 227(5257): p. 503-4.
405. Song, A.H., et al., A selective filter for cytoplasmic transport at the axon initial segment. *Cell*, 2009. 136(6): p. 1148-60.
406. Song, H., C.F. Stevens, and F.H. Gage, Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 2002. 417(6884): p. 39-44.
407. Song, H., et al., Interrogating functional integration between injected pluripotent stem cell-derived cells and surrogate cardiac tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(8): p. 3329-34.
408. Song, J., et al., Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*. 489(7414): p. 150-4.
409. Sosa, L., et al., IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nat Neurosci*, 2006. 9(8): p. 993-5.

410. Sparatore, B., et al., Human neuroblastoma cell differentiation requires protein kinase C-theta. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 279(2): p. 589-94.
411. Sparatore, B., et al., Neuronal differentiation of PC12 cells involves changes in protein kinase C-theta distribution and molecular properties. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 275(1): p. 149-53.
412. Stawowy, P., et al., Protein kinase C epsilon mediates angiotensin II-induced activation of beta1-integrins in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 2005. 67(1): p. 50-9.
413. Stead, E., et al., Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene*, 2002. 21(54): p. 8320-33.
414. Stegmuller, J., et al., TGFbeta-Smad2 signaling regulates the Cdh1-APC/SnoN pathway of axonal morphogenesis. *J Neurosci*, 2008. 28(8): p. 1961-9.
415. Stegmuller, J., et al., Cell-intrinsic regulation of axonal morphogenesis by the Cdh1-APC target SnoN. *Neuron*, 2006. 50(3): p. 389-400.
416. Steinhart, R., et al., PKCepsilon induces astrocytic differentiation of multipotential neural precursor cells. *Glia*, 2007. 55(2): p. 224-32.
417. Stevens, L.C., The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Dev Biol*, 1970. 21(3): p. 364-82.
418. Stewart, C.L., I. Gadi, and H. Bhatt, Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Dev Biol*, 1994. 161(2): p. 626-8.
419. Stewart, C.L., et al., Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 1992. 359(6390): p. 76-9.
420. Stiess, M., et al., Axon extension occurs independently of centrosomal microtubule nucleation. *Science*. 327(5966): p. 704-7.

421. Strubing, C., et al., Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev*, 1995. 53(2): p. 275-87.
422. Stump, G., et al., Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain. *Mech Dev*, 2002. 114(1-2): p. 153-9.
423. Suh, Y., et al., Interaction between DLX2 and EGFR regulates proliferation and neurogenesis of SVZ precursors. *Mol Cell Neurosci*, 2009. 42(4): p. 308-14.
424. Sun, M.K. and D.L. Alkon, Pharmacology of protein kinase C activators: cognition-enhancing and antidementic therapeutics. *Pharmacol Ther*. 127(1): p. 66-77.
425. Sun, Z., Intervention of PKC-theta as an immunosuppressive regimen. *Front Immunol*. 3: p. 225.
426. Sun, Z., et al., An adult uterine hemangioblast: evidence for extramedullary self-renewal and clonal bilineage potential. *Blood*. 116(16): p. 2932-41.
427. Suzuki, A. and S. Ohno, The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 6): p. 979-87.
428. Suzuki, A., et al., Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(27): p. 10294-9.
429. Swijnenburg, R.J., et al., In vivo imaging of embryonic stem cells reveals patterns of survival and immune rejection following transplantation. *Stem Cells Dev*, 2008. 17(6): p. 1023-9.
430. Swijnenburg, R.J., et al., Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(35): p. 12991-6.
431. Szulwach, K.E., et al., Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *J Cell Biol*. 189(1): p. 127-41.

432. Tachado, S.D., et al., Regulation of tumor invasion and metastasis in protein kinase C epsilon-transformed NIH3T3 fibroblasts. *J Cell Biochem*, 2002. 85(4): p. 785-97.
433. Tada, M., et al., Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J*, 1997. 16(21): p. 6510-20.
434. Tada, T., et al., Epigenotype switching of imprintable loci in embryonic germ cells. *Dev Genes Evol*, 1998. 207(8): p. 551-61.
435. Taguchi, A., et al., Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest*, 2004. 114(3): p. 330-8.
436. Takahashi, K., K. Mitsui, and S. Yamanaka, Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 2003. 423(6939): p. 541-5.
437. Takahashi, K., M. Murakami, and S. Yamanaka, Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. *Biochem Soc Trans*, 2005. 33(Pt 6): p. 1522-5.
438. Takahashi, K., et al., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007. 131(5): p. 861-72.
439. Tanaka, C. and Y. Nishizuka, The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci*, 1994. 17: p. 551-67.
440. Tanaka, T.S., et al., Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res*, 2002. 12(12): p. 1921-8.
441. Tang, Y., et al., Transplantation of bone marrow-derived stem cells: a promising therapy for stroke. *Cell Transplant*, 2007. 16(2): p. 159-69.
442. Tashiro, A., et al., NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature*, 2006. 442(7105): p. 929-33.
443. Tay, Y., et al., MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 2008. 455(7216): p. 1124-8.

444. Tay, Y.M., et al., MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1. *Stem Cells*, 2008. 26(1): p. 17-29.
445. Taylor, S.S. and E. Radzio-Andzelm, Three protein kinase structures define a common motif. *Structure*, 1994. 2(5): p. 345-55.
446. Templin, C., et al., Ex vivo expanded hematopoietic progenitor cells improve cardiac function after myocardial infarction: role of beta-catenin transduction and cell dose. *J Mol Cell Cardiol*, 2008. 45(3): p. 394-403.
447. Teo, G.S., et al., Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor-alpha-activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms. *Stem Cells*. 30(11): p. 2472-86.
448. Toivola, D.M., et al., Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol*, 2005. 15(11): p. 608-17.
449. Tominaga, M., M. Wada, and M. Masu, Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(12): p. 6951-6.
450. Torres-Garcia, M.E., et al., Dendritic morphology changes in neurons from the prefrontal cortex, hippocampus and nucleus accumbens in rats after lesion of the thalamic reticular nucleus. *Neuroscience*. 223: p. 429-38.
451. Toton, E., et al., Protein kinase Cepsilon as a cancer marker and target for anticancer therapy. *Pharmacol Rep*. 63(1): p. 19-29.
452. Traiffort, E., et al., Regional distribution of Sonic Hedgehog, patched, and smoothened mRNA in the adult rat brain. *J Neurochem*, 1998. 70(3): p. 1327-30.
453. Troller, U. and C. Larsson, Cdc42 is involved in PKCepsilon- and delta-induced neurite outgrowth and stress fibre dismantling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 349(1): p. 91-8.

454. Troller, U., A. Raghunath, and C. Larsson, A possible role for p190RhoGAP in PKCepsilon-induced morphological effects. *Cell Signal*, 2004. 16(2): p. 245-52.
455. Troller, U., et al., A PKCbeta isoform mediates phorbol ester-induced activation of Erk1/2 and expression of neuronal differentiation genes in neuroblastoma cells. *FEBS Lett*, 2001. 508(1): p. 126-30.
456. Valdimarsdottir, G. and C. Mummery, Functions of the TGFbeta superfamily in human embryonic stem cells. *APMIS*, 2005. 113(11-12): p. 773-89.
457. van Hengel, J., et al., Protein kinase C activation upregulates intercellular adhesion of alpha-catenin-negative human colon cancer cell variants via induction of desmosomes. *J Cell Biol*, 1997. 137(5): p. 1103-16.
458. Vazquez-Roque, R.A., et al., Dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex and ventral hippocampus of rats with neonatal amygdala lesion. *Synapse*. 66(5): p. 373-82.
459. Vega, E., J. Gomez-Villalobos Mde, and G. Flores, Alteration in dendritic morphology of pyramidal neurons from the prefrontal cortex of rats with renovascular hypertension. *Brain Res*, 2004. 1021(1): p. 112-8.
460. Visvanathan, J., et al., The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev*, 2007. 21(7): p. 744-9.
461. Vohra, B.P., M. Fu, and R.O. Heuckeroth, Protein kinase Czeta and glycogen synthase kinase-3beta control neuronal polarity in developing rodent enteric neurons, whereas SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1 promotes neurite growth but does not influence polarity. *J Neurosci*, 2007. 27(35): p. 9458-68.
462. Wachira, S.J., et al., Evidence for the interaction of protein kinase C and melanocortin 3-receptor signaling pathways. *Neuropeptides*, 2003. 37(4): p. 201-10.

463. Wang, G., et al., Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 330(3): p. 934-42.
464. Wang, J., et al., Cell-specific role for epsilon- and beta-protein kinase C isozymes in protecting cortical neurons and astrocytes from ischemia-like injury. *Neuropharmacology*, 2004. 47(1): p. 136-45.
465. Wang, J., et al., Myc activates telomerase. *Genes Dev*, 1998. 12(12): p. 1769-74.
466. Wang, Q.J., et al., The V5 domain of protein kinase C plays a critical role in determining the isoform-specific localization, translocation, and biological function of protein kinase C-delta and -epsilon. *Mol Cancer Res*, 2004. 2(2): p. 129-40.
467. Wang, T., et al., Lgl1 activation of rab10 promotes axonal membrane trafficking underlying neuronal polarization. *Dev Cell*. 21(3): p. 431-44.
468. Watabe-Uchida, M., et al., The Rac activator DOCK7 regulates neuronal polarity through local phosphorylation of stathmin/Op18. *Neuron*, 2006. 51(6): p. 727-39.
469. Watanabe, S., et al., Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene*, 2006. 25(19): p. 2697-707.
470. Watcharasit, P., et al., Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(12): p. 7951-5.
471. Wechsler-Reya, R.J. and M.P. Scott, Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*, 1999. 22(1): p. 103-14.
472. Werner, N., et al., Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*, 2005. 353(10): p. 999-1007.
473. Wetsel, W.C., et al., Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol*, 1992. 117(1): p. 121-33.

474. White, J., et al., Developmental activation of the Rb-E2F pathway and establishment of cell cycle-regulated cyclin-dependent kinase activity during embryonic stem cell differentiation. *Mol Biol Cell*, 2005. 16(4): p. 2018-27.
475. Wichterle, H., et al., Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*, 2002. 110(3): p. 385-97.
476. Wierda, K.D., et al., Interdependence of PKC-dependent and PKC-independent pathways for presynaptic plasticity. *Neuron*, 2007. 54(2): p. 275-90.
477. Williams, R.L., et al., Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 1988. 336(6200): p. 684-7.
478. Winckler, B., P. Forscher, and I. Mellman, A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature*, 1999. 397(6721): p. 698-701.
479. Winner, B., et al., Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Exp Neurol*, 2006. 197(1): p. 113-21.
480. Wood, C.D., et al., Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1)-independent activation of the protein kinase C substrate, protein kinase D. *FEBS Lett*, 2007. 581(18): p. 3494-8.
481. Wooten, M.W., et al., A role for zeta protein kinase C in nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Cell Growth Differ*, 1994. 5(4): p. 395-403.
482. Wu, D., et al., Protein kinase cepsilon has the potential to advance the recurrence of human prostate cancer. *Cancer Res*, 2002. 62(8): p. 2423-9.
483. Wu, D., et al., Integrin signaling links protein kinase Cepsilon to the protein kinase B/Akt survival pathway in recurrent prostate cancer cells. *Oncogene*, 2004. 23(53): p. 8659-72.

484. Xiong, Q., et al., A fibrin patch-based enhanced delivery of human embryonic stem cell-derived vascular cell transplantation in a porcine model of postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells*. 29(2): p. 367-75.
485. Xu, C., et al., Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2001. 19(10): p. 971-4.
486. Xu, C., et al., Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells*, 2005. 23(3): p. 315-23.
487. Xu, R.H., et al., Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods*, 2005. 2(3): p. 185-90.
488. Xu, T.R., et al., Phosphorylation at Ser729 specifies a Golgi localisation for protein kinase C epsilon (PKCepsilon) in 3T3 fibroblasts. *Cell Signal*, 2007. 19(9): p. 1986-95.
489. Ye, B., et al., Differential regulation of dendritic and axonal development by the novel Kruppel-like factor Dar1. *J Neurosci*. 31(9): p. 3309-19.
490. Ye, B., et al., Growing dendrites and axons differ in their reliance on the secretory pathway. *Cell*, 2007. 130(4): p. 717-29.
491. Yeom, Y.I., et al., Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*, 1996. 122(3): p. 881-94.
492. Yi, J.J., et al., TGF-beta signaling specifies axons during brain development. *Cell*. 142(1): p. 144-57.
493. Ying, Q.L., et al., BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 2003. 115(3): p. 281-92.
494. Yonekawa, H. and Y. Akita, Protein kinase Cepsilon: the mitochondria-mediated signaling pathway. *FEBS J*, 2008. 275(16): p. 4005-13.

495. Yoshida, K., et al., Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. *Mech Dev*, 1994. 45(2): p. 163-71.
496. Yoshimura, T., et al., GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*, 2005. 120(1): p. 137-49.
497. Yu, J., et al., Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007. 318(5858): p. 1917-20.
498. Yu, J.M., et al., Increase in proliferation and differentiation of neural progenitor cells isolated from postnatal and adult mice brain by Wnt-3a and Wnt-5a. *Mol Cell Biochem*, 2006. 288(1-2): p. 17-28.
499. Yu, W., et al., Depletion of a microtubule-associated motor protein induces the loss of dendritic identity. *J Neurosci*, 2000. 20(15): p. 5782-91.
500. Zeidman, R., et al., PKCepsilon, via its regulatory domain and independently of its catalytic domain, induces neurite-like processes in neuroblastoma cells. *J Cell Biol*, 1999. 145(4): p. 713-26.
501. Zeidman, R., et al., Protein kinase Cepsilon actin-binding site is important for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(1): p. 12-24.
502. Zhang, L., et al., In vitro differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs), derived from Wharton's jelly, into choline acetyltransferase (ChAT)-positive cells. *Int J Dev Neurosci*. 30(6): p. 471-7.
503. Zhang, Y., et al., Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*, 1999. 13(15): p. 1924-35.
504. Zhao, X.D., et al., Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2007. 1(3): p. 286-98.
505. Zhao, X.Y., et al., iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009. 461(7260): p. 86-90.

506. Zheng, B., et al., Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(2): p. 648-55.
507. Zheng, Y., et al., Dynein is required for polarized dendritic transport and uniform microtubule orientation in axons. *Nat Cell Biol*, 2008. 10(10): p. 1172-80.
508. Zhou, H.Z., J.S. Karliner, and M.O. Gray, Moderate alcohol consumption induces sustained cardiac protection by activating PKC-epsilon and Akt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. 283(1): p. H165-74.
509. Zhu, G., et al., Protein kinase C epsilon suppresses Abeta production and promotes activation of alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 285(4): p. 997-1006.
510. Zigova, T., et al., Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci*, 1998. 11(4): p. 234-45.