



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Νίκος Σακελλαρίδης



**ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΡΚC-ε ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ
ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟ ΚΝΣ**

ΞΕΝΗ ΚΟΛΙΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΣΣΑΛΙΑ 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΡΚC-ε ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ
ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟ ΚΝΣ**

**ΞΕΝΗ ΚΟΛΙΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΝΕΥΡΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΘΕΣΣΑΛΙΑ 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- Νίκος Σακελλαρίδης, MD, PhD
Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

- Δήμητρα Μάγκουρα, MD, PhD
Καθηγήτρια- Ερευνήτρια Α' Διευθύντρια του Κέντρου Προληπτικής
Ιατρικής, Νευροεπιστημών, και Κοινωνικής Ψυχιατρικής του Ιδρύματος
Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

- Νικόλαος Πιτσίκας, PhD
Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- Νίκος Σακελλαρίδης, MD, PhD
Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Δήμητρα Μάγκουρα, MD, PhD
Καθηγήτρια- Ερευνήτρια Α' Διευθύντρια του Κέντρου Προληπτικής Ιατρικής, Νευροεπιστημών, και Κοινωνικής Ψυχιατρικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών
- Νικόλαος Πισίκας, PhD
Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Γεώργιος Κουκούλης, MD, PhD
Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Γεώργιος Σίμος, PhD
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Άννα Βασιλάκη, PhD
Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Κωνσταντίνος Δήμας, PhD
Λέκτορας Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στον ήρωά μου, τη μητέρα μου και
τον πιο κοντινό μου άνθρωπο, την αδερφή μου

Στους αφανείς μαχητές της καθημερινότητας,
τα άτομα με Πολλαπλή Σκλήρυνση

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	8
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1. Νευρικό Σύστημα και Καρκίνος	14
1.1.1. Γενικά	14
1.1.2. Καρκίνοι του Νευρικού Συστήματος.....	15
1.2. Ογκοκατασταλτικά γονίδια και Πυρρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση.....	18
1.2.1. Ογκογονίδια και Ογκοκατασταλτικά γονίδια.....	18
1.2.2. Πυρρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών	22
1.3. Ras/Raf/MAPK μονοπάτι μεταγωγής σήματος.....	26
1.3.1. Κυτταρική διαφοροποίηση και μονοπάτι Ras/Raf/MAPK.....	26
1.3.2. Ογκογένεση και μονοπάτι Ras/Raf/MAPK.....	27
1.4. Ras/Raf/MAPK μονοπάτι μεταγωγής σήματος και ρύθμιση από PKC.....	29
1.5. Πρωτεϊνικές Κινάσες C	30
1.5.1. Δομή.....	30
1.5.2. Ενεργοποίηση	32
1.5.3. Ρύθμιση Ενεργοποίησης	33
1.5.4. Υποκυτταρικός Εντοπισμός.....	34
1.5.5. Λειτουργία	35
1.6. Συμμετοχή της PKCε ισομορφής στη Λειτουργία και τη Διαφοροποίηση του Νευρικού Συστήματος	36
1.6.1. PKCε και Νευρικό Σύστημα	36
1.6.2. PKCε και Διαφοροποίηση Νευρικών κυττάρων	37
1.7. PKCε και Ογκογένεση	38
1.8. Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 και γονίδιο <i>NF1</i>	42
1.8.1. Νευροϊνωμάτωση τύπου 1	42
1.8.2. Το γονίδιο <i>NF1</i>	46
1.8.3. Μεταλλαγές στο γονίδιο <i>NF1</i>	49
1.8.4. Διαγονιδιακά Μοντέλα Μυών	52

1.9.	Νευροϊνιδίνη	53
1.9.1.	Δομή.....	54
1.9.2.	Φωσφορυλίωση από PKC.....	58
1.10.	Συμμετοχή της Νευροϊνιδίνης στη Διαφοροποίηση και την Ογκογένεση.....	60
1.10.1.	Διαφοροποίηση	60
1.10.2.	Ογκογένεση.....	61
1.11.	Πυρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση της Νευροϊνιδίνης	63
	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	66
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	68
2.1.	Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων έκφρασης και βακτηριακές καλλιέργειες	68
2.1.1.	Πλασμιδιακοί φορείς.....	68
2.1.2.	Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	70
2.1.3.	Αποφωσφορυλίωση του φορέα έκφρασης	71
2.1.4.	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	72
2.1.5.	Απομόνωση τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης.....	73
2.1.6.	Επίδεση των ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα (ligation).....	73
2.1.7.	Παρασκευή δεκτικών μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων.....	73
2.1.8.	Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με θερμικό σοκ	74
2.1.9.	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής και μεσαίας κλίμακας από βακτηριακή καλλιέργεια	75
2.1.10.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA.....	76
2.2.	Καλλιέργειες και χειρισμοί κυττάρων	77
2.2.1.	Απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών κυττάρων	77
2.2.1.1.	Καλλιέργεια πρωτογενών νευρώνων όρνιθας	77
2.2.1.2.	Καλλιέργεια πρωτογενών αστροκυττάρων επίμυος.....	78
2.2.1.3.	Καλλιέργεια κυττάρων Schwann ανθρώπου και εμβρυϊκών ινοβλαστών μύος.....	78
2.2.2.	Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών.....	79
2.2.3.	Παροδική διαμόλυνση κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση	81
2.2.4.	Κατασκευή διπλά σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών	81
2.2.4.1.	Σύστημα Tet-Off	82
2.2.4.2.	Διαμόλυνση και επιλογή σταθερά διαμολυσμένων κλώνων Tet-Off ...	84

2.2.4.3 Διαμόλυνση και επιλογή σταθερά διαμολυσμένων κλώνων pTRE-Tight-PKCe και pTRE-Tight- DNPΚCe	86
2.2.5. Χορήγηση αγωνιστών, ανταγωνιστών και αναστολέων	87
2.2.6. Συγχρονισμός κυττάρων	87
2.2.7. Δοκιμασία διεισδυτικότητας Matrigel	88
2.3. Ανάλυση επιπέδων mRNA	89
2.3.1. Απομόνωση ολικού RNA	89
2.3.2. Αντίστροφη μεταγραφή και Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)	89
2.4. Επεξεργασία και Ανάλυση Πρωτεϊνών	92
2.4.1. Απομόνωση πρωτεϊνών	92
2.4.2. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών	93
2.4.3. Υποκυτταρική κλασμάτωση	94
2.4.4. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry	95
2.4.5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)	96
2.4.6. Ανοσοσύπωση κατά Western (Western blot)	97
2.4.6.1. Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transfer)	97
2.4.6.2. Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών	98
2.4.7. Δοκιμασία αλκαλικής φωσφατάσης (SAP assay)	100
2.4.8. Πυκνομετρική και στατιστική ανάλυση	100
2.4.9. Ανοσοκυτταροχημεία φθορισμού	101
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	104
3.1. Μελέτη της ενεργοποίησης και των αλληλεπιδράσεων της PKCe στη διαφοροποίηση μετασχηματισμένων κυττάρων του ΠΝΣ	104
3.1.1. Ο ρόλος της ενεργοποίησης της PKCe στη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης μετασχηματισμένων Schwann κυττάρων	106
3.1.2. Δημιουργία πρότυπων διπλά σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών με επαγόμενη έκφραση της PKCe και της κυρίαρχα αρνητικής μορφής της (σύστημα Tet-Off)	111
3.1.3. Αλληλεπίδραση PKCe, νευροϊνιδίνης και Ras/MAPK μονοπατιού κατά τη διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος	114

3.2.	Ρύθμιση της αφθονίας και της πυρηνο-κυτταροπλασματικής διακίνησης της νευροϊνιδίνης σε πρωτογενείς καλλιέργειες μετα-μιτωτικών νευρώνων, μέσω φωσφορυλίωσης από την PKCε.....	120
3.2.1.	Η PKCε-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης ως μηχανισμός ελέγχου της πυρηνο-κυτταροπλασματικής διακίνησής της	121
3.2.2.	Διερεύνηση των μονοπατιών της πυρηνο-κυτταροπλασματικής διακίνησης της νευροϊνιδίνης	126
3.2.3.	Αποικοδόμηση της νευροϊνιδίνης από το πρωτεάσωμα του πυρήνα και ρύθμιση από PKCε-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση.....	132
3.3.	Μελέτη των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων και της σημασίας της πυρηνο-κυτταροπλασματικής διακίνησης της νευροϊνιδίνης κατά τον κυτταρικό κύκλο κυττάρων γλοίας	141
3.3.1.	Ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης και της αλληλεπίδραση της PKCε και της νευροϊνιδίνης κατά τον κυτταρικό κύκλο κυττάρων γλοιοβλαστώματος	142
3.3.2.	Πυρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση της νευροϊνιδίνης και αλληλεπίδρασή της με την πυρηνική θεμέλια ουσία κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.....	151
3.3.3.	Καινοφανείς λειτουργίες της νευροϊνιδίνης κατά τη διάρκεια της μίτωσης φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων	157
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	168
4.1.	Ο Ρόλος της PKCε στη διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων του ΠΝΣ.....	169
4.2.	Λειτουργική αλληλεπίδραση της PKCε και της νευροϊνιδίνης σε μετα-μιτωτικούς νευρώνες.....	175
4.3.	Σημασία της αλληλεπίδρασης της PKCε με τη νευροϊνιδίνη στη διαδικασία πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων γλοίας.....	181
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	192
	SUMMARY	194
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	195
	ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	227

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας και Νευροχημείας του Κέντρου Προληπτικής Ιατρικής, Νευροεπιστημών, και Κοινωνικής Ψυχιατρικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003 με τίτλο «Διεπιστημονική μελέτη της ΡΚCε σε νευροβλάστες και νευρώνες: έκφραση, ρύθμιση δραστηριότητας και συμμετοχή στο μηχανισμό διαφοροποίησης και στη λειτουργία των κυκλωμάτων μνήμης» και επιστημονική υπεύθυνη τη Δρ. Δήμητρα Μάγκουρα. Το έργο πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τομέα Βασικών Επιστημών του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Νίκου Σακελλαρίδη.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν, καθένας σε διαφορετικό επίπεδο, στην υλοποίησή της. Καταρχήν, ευχαριστώ θερμά την επιστημονική υπεύθυνη του έργου Δρ. Δήμητρα Μάγκουρα για την εμπιστοσύνη της, τη διδασκαλία της και την καθοδήγησή της όλα αυτά τα χρόνια. Η οξυδέρκεια και η κριτική της σκέψη ήταν καθοριστικής σημασίας τόσο για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης όσο και για την ερευνητική μου εξέλιξη. Ευχαριστώ, επίσης, το Δρ. Γεώργιο Νασιούλα για την υπόδειξη του θέματος, την εμπιστοσύνη του, καθώς και τη βοήθειά του στα πρώτα στάδια της διατριβής αυτής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή Νίκο Σακελλαρίδη για την επίβλεψη της παρούσας διατριβής, τις εύστοχες υποδείξεις και τη βοήθειά του όποτε το είχα ανάγκη. Το χιούμορ του συνέβαλε στο να ξεπεραστούν και οι πιο δύσκολες καταστάσεις. Ευχαριστώ πολύ τον Επίκουρο Καθηγητή Νικόλαο Πιτσικά για τις παρατηρήσεις, τις χρήσιμες συμβουλές και την ενθάρρυνσή του σε κάθε μας συνάντηση. Εκφράζω, επίσης, τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τον πολύτιμο χρόνο τους.

Κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής είχα την τύχη να συνεργαστώ με εξαιρετικούς επιστήμονες και ανθρώπους τους οποίους οφείλω να ευχαριστήσω. Ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου την Όλγα Ασημάκη και τη Σοφία Καρουζάκη με τις οποίες μοιραστήκαμε εκτός από τους πάγκους και τα αντιδραστήρια, τους φόβους και τις ανησυχίες μας και τα ξεπεράσαμε όλα

παρέα. Τις ευχαριστώ που εκτός από εξαιρετικές συνάδελφοι ήταν και είναι πολύ σημαντικές φίλες. Μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Εμμανουέλλα Τσιριμονάκη, την καλύτερη τεχνικό εργαστηρίου όλων των εποχών, για τη στήριξή της, την ανιδιοτελή βοήθειά της και τις όμορφες κουβέντες, επιστημονικές και προσωπικές, σε όλη μου την πορεία. Ευχαριστώ τον Κωνσταντίνο Φαιδωνίδη για τις πολύ εποικοδομητικές συζητήσεις, την άψογη συνεργασία και τη συμπαράστασή του, τη Θεοδώρα Καλπαχίδου γιατί έδινε στις εργαστηριακές, και όχι μόνο, ώρες γέλιο και αισιοδοξία, καθώς και όλους όσους βοήθησαν κατά καιρούς με αντιδραστήρια, ιδέες και συζητήσεις.

Ειδικές ευχαριστίες οφείλω στο Δρ. Γεώργιο Λεονταρίτη για την εκπληκτική συνεργασία μας, την ακούραστη βοήθειά του, τις συναρπαστικές επιστημονικές συζητήσεις μας, τις ψυχαναλύσεις και... την Πανόρμου. Ήταν μεγάλη χαρά να δουλεύω μαζί του.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τη Δρ. Ελένη Ρηγανά και τον Δρ. Σταμάτη Παγκάκη (Biological Imaging Unit, BRFAA) για τη βοήθειά τους με τη συνεστιακή μικροσκοπία καθώς και με τα λογισμικά επεξεργασίας εικόνας. Αισθάνομαι, επίσης, την ανάγκη να ευχαριστήσω τη Δρ. Άντζελα Απέσσου και το Δρ. Μάρκο Μιχαλάτο που όταν δευτεροετής φοιτήτρια μπήκα πρώτη φορά σε εργαστήριο μου έμαθαν, εκτός από το πώς να κρατάω την πιπέτα, να δουλεύω στον εργαστηριακό πάγκο με αποτελεσματικότητα και αξιοπρέπεια. Δε θα σας ξεχάσω ποτέ.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω το δάσκαλό μου στο Iaido, Ναύαρχο Σπύρο Δροσουλάκη που μου έμαθε να δίνω τις μάχες μου με σθένος και τιμή και τους πολύ κοντινούς μου ανθρώπους Ντόρα Κορκίδη και Μιχάλη Παπαγεωργίου. Η συμπαράστασή τους και η πραγματική φιλία τους μου έδωσαν δύναμη να ξεπεράσω όλες τις δυσκολίες που προέκυψαν.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένειά μου και ειδικά στη μητέρα μου Μαρία και την αδερφή μου Κατερίνα για την απεριόριστη υλική μα πάνω από όλα ψυχική υποστήριξή τους. Η αγάπη, η συμπαράσταση και οι αξίες τους με έχουν κάνει αυτό που είμαι. Τέλος, Σουπ, τίποτα δε θα ήταν ίδιο χωρίς εσένα.

Ξένη Κολιού

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AP:	Αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase)
APC:	Adenomatous Polyposis Coli
aPKCs:	Άτυπες ισομορφές πρωτεϊνικής κινάσης C (Atypical PKCs)
APS:	Υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium Persulfate)
ATP:	5'-Τριφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine-5'-triphosphate)
BSA:	Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin)
cAMP:	Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (Cyclic Adenosine Monophosphate)
Cdk:	Κινάση εξαρτώμενη από κυκλίνη (Cyclin-dependent kinase)
cDNA:	Συμπληρωματικό DNA (Complementary DNA)
cPKCs:	Κλασσικές ισομορφές πρωτεϊνικής κινάσης C (Classical PKCs)
CSRD:	Περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες και σερίνες (Cysteine/Serine Rich Domain)
CTD:	C-καρβοξυτελική περιοχή (C-Terminal Domain)
C-terminus:	Καρβοξυλικό άκρο (Carboxyl-terminus)
DAG:	Διακυλογλυκερόλη (Diacylglycerol)
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO:	Διμεθυλο-σουλφοξειδίο (Dimethyl Sulfoxide)
DNA:	Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (Deoxyribonucleic Acid)
DSP:	Διθειούχος ηλεκτρημιδικός εστέρας του προπιονικού οξέως (Dithiolbis[succinimidyl propionate])
DTT:	Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol)
ECL:	Ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (Enhanced Chemiluminescence)
EDTA:	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediamine Tetraacetic Acid)
EGF:	Επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (Epidermal Growth Factor)
EGFR:	Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor)
ERK1/2:	Ρυθμιζόμενες από εξωκυττάρια σήματα κινάσες (Extracellular signal-Regulated Kinases)
EtBr:	Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide)
FBS:	Ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum)

FGFR:	Υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor Receptor)
FSNF:	Οικογενής Νευροϊνωμάτωση της Σπονδυλικής Στήλης (Familial Spinal Neurofibromatosis)
GAP:	Πρωτεΐνη που ενεργοποιεί GTPάσες (GTPase-Activating Protein)
GDP	Διφωσφορική γουανοσίνη (Guanosine Diphosphate)
GEF:	Παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (Guanine nucleotide Exchange Factor)
GFAP:	Όξινη ινιδιακή πρωτεΐνη της γλοίας (Glial Fibrillary Acidic Protein)
GFP:	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein)
GRD:	Περιοχή σχετιζόμενη με την ενεργότητα GAP (GAP Related Domain)
GST:	Μεταφοράση του γλουταθείου (Glutathione S-transferase)
GTP:	5'-Τριφωσφορική γουανοσίνη (Guanosine-5'-Triphosphate)
h:	Ώρες (hours)
HBSS:	Hank's Buffered Salt Solution
HNPCC:	Κληρονομούμενος μη πολυποδιακός καρκίνος του παχέως εντέρου (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer)
IP:	Ανοσοκατακρήμνιση (Immunoprecipitation)
JNK:	Jun N-terminal Kinase
LMB:	Λεπτομυκίνη Β (Leptomycin B)
LOH:	Απώλεια και των δύο αλληλόμορφων (Loss Of Heterozygosity)
LRD:	Περιοχή με επαναλαμβανόμενες λευκίνες (Leucine Repeat Domain)
MAPK:	Ενεργοποιούμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MARCKS:	Υπόστρωμα C-κινασών πλούσιο σε αλανίνη (Myristoylated Alanine-Rich C-kinase Substrate)
MEN1:	Πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία τύπου 1 (Multiple Endocrine Neoplasia type 1)
min:	Λεπτά (minutes)
MBP:	Βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (Myelin Basic Protein)

MPZ:	Myelin Protein Zero
MPNST:	Κακοήθης όγκος των περιφερικών νευρικών ελύτρων (Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor)
mRNA:	Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊνικό οξύ (Messenger ribonucleic acid)
NES:	Σήμα πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export Signal)
NF-1:	Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (Neurofibromatosis type 1)
<i>NF1</i> :	Γονίδιο της Νευροϊνωμάτωσης τύπου-1 (Neurofibromatosis type 1 gene)
NFNS:	Σύνδρομο Νευροϊνωμάτωση-Noonan (Neurofibromatosis-Noonan syndrome)
NGF:	Νευρικό αυξητικό παράγοντα (Nerve Growth Factor)
NLS:	Σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal)
NMDA:	N-μεθυλ-D-ασπαρτικό οξύ (N-Methyl-D-aspartic acid)
nPKCs:	Νεοφανείς ισομορφές πρωτεϊνικής κινάσης C (Novel PKCs)
NSCs:	Νευρικά βλαστικά κύτταρα (Neural Stem Cells)
N-terminal:	Αμινοτελικό άκρο (Amino-terminus)
OMGP:	Γλυκοπρωτεΐνη της ολιγοδενδροκυτταρομελίνης (Oligodendrocyte myelin Glycoprotein)
PAGE:	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis)
PBS:	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Phosphate Buffered Saline)
PCR:	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)
PDK1:	Εξαρτώμενη από φωσφοϊνοσιτίδιο κινάση 1 (Phosphoinositide Dependent Kinase 1)
PFA:	Παραφορμαλδεΐδη (Paraformaldehyde)
PH:	Περιοχή με ομολογία πλεξτρίνης (Pleckstrin Homology domain)
PI3K:	Κινάση 3 φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (Phosphoinositide 3 Kinase)
PIP2:	4,5-Διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (Phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate)
PKA:	Πρωτεϊνική κινάση A (Protein Kinase A)
PKC:	Πρωτεϊνική κινάση C (Protein Kinase C)
PLC:	Φωσφολιπάση C (Phospholipase C)

PLD:	Φωσφολιπάση D (Phospholipase D)
PMSF:	Φθοριούχος μεθανοσουλφονικός φαινυλεστέρας (Phenylmethanesulphony Fluoride)
PTEN:	Ομόλογο φωσφατάσης και τενσίνης (Phosphatase and Tensin homolog)
RACK:	Υποδοχέας για ενεργοποιημένη κινάση C (Receptor for Activated Protein Kinase C)
RFP:	Κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Red Fluorescent Protein)
RNA:	Ριβονουκλεϊνικό οξύ (Ribonucleic Acid)
RTKs:	Υποδοχείς με εσωτερική δράση κινάσης τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases)
RT-PCR:	Αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase PCR)
SAP:	Αλκαλική φωσφατάση γαρίδας (Shrimp Alkaline Phosphatase)
SDS:	Θειικό δωδεκανοϊκό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate)
sec:	Δευτερόλεπτα (seconds)
siRNA:	Μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (Small interfering RNA)
TBST:	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris που περιέχει Triton X-100 (Tris Buffered Saline-Triton X-100)
TEMED:	N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)
TGF-β:	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού βήτα (Transforming growth factor beta)
TPA:	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
Tris:	Τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο (Tris Hydroxymethyl-aminomethane)
WHO:	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization)
WS:	Το σύνδρομο Watson (Watson Syndrome)
εV1-2:	Ειδικό πεπτιδίο αναστολέας της PKCε (Specific PKCε inhibitor peptide CYGRKKRRQRRR-NH ₂ (TAT) \SS/ EAVSLKPT)
ΚΝΣ:	Κεντρικό νευρικό σύστημα (Central Nervous System, CNS)
ΠΝΣ:	Περιφερικό νευρικό σύστημα (Peripheral Nervous System, PNS)
ψεRACK:	Ειδικό πεπτιδίο ενεργοποιητής (Specific PKCε activator peptide CYGRKKRRQRRR-NH ₂ (TAT) \SS/ CHDAPIGYD -COOH)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Νευρικό Σύστημα και Καρκίνος

1.1.1. Γενικά

Το νευρικό σύστημα είναι το σύστημα που ελέγχει και συντονίζει τη λειτουργία όλων των οργάνων του ανθρωπίνου σώματος. Αποτελεί την έδρα των ψυχικών λειτουργιών και, μέσω των αισθητήριων οργάνων, συμβάλλει στην αντίληψη του περιβάλλοντος από τον άνθρωπο. Οι ποικίλες δομές του νευρικού συστήματος, αν και συνδέονται στενά μεταξύ τους, διακρίνονται σε δύο μέρη: **1)** το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) που αποτελείται από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό και **2)** το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ) που αποτελείται από νεύρα εκτεινόμενα από τον εγκέφαλο ή το νωτιαίο μυελό ως τους μύες, τους αδένες και τα αισθητήρια όργανα. Η βασική δομική και λειτουργική μονάδα του νευρικού συστήματος είναι το νευρικό κύτταρο ή νευρώνας. Τα νευρικά κύτταρα λειτουργούν με τη γένεση ηλεκτρικών σημάτων και την απελευθέρωση χημικών μηνυμάτων προκειμένου να επικοινωνήσουν με άλλα κύτταρα. Λαμβάνοντας σήματα από την περιφέρεια, οι νευρώνες επεξεργάζονται τα εισερχόμενα μηνύματα που φτάνουν στους δενδρίτες και στέλνουν τα κατάλληλα εξερχόμενα μηνύματα με τους άξονες, λειτουργώντας έτσι ως ολοκληρωτές. Οι νευρώνες αποτελούν περίπου το 10% των κυττάρων του νευρικού συστήματος. Το υπόλοιπο ποσοστό είναι νευρογλοιακά κύτταρα (ή γλοία) που υποστηρίζουν φυσιολογικά και μεταβολικά τους νευρώνες.

Η γλοία του ΚΝΣ αποτελείται από ολιγοδενδροκύτταρα, που σχηματίζουν τη μυελίνη που περιβάλλει τους άξονες, μικρογλοία, που ελέγχει τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος στο ΚΝΣ και αστροκύτταρα. Τα νευρογλοιακά κύτταρα της τελευταίας, αυτής, κατηγορίας συντελούν στην ομοίωση K^+ και γλουταμινικού οξέως στον εξωκυττάριο χώρο και υποστηρίζουν μεταβολικά τους νευρώνες, ενώ, κατά την εμβρυογένεση, καθοδηγούν τη μετανάστευση και διεγείρουν την αύξηση των νευρώνων με την έκκριση αυξητικών παραγόντων [1, 2]. Τελευταία, υπάρχουν επιστημονικές εργασίες που αναφέρουν ότι τα αστροκύτταρα μπορεί να

λαμβάνουν μέρος και στην μετάδοση πληροφορίας στον εγκέφαλο [3]. Η νευρογλοία του ΠΝΣ αποτελείται από τα κύτταρα Schwann τα οποία έχουν τις περισσότερες από τις ιδιότητες της νευρογλοίας του ΚΝΣ συμπεριλαμβανομένης και της παραγωγής του στρώματος μυελίνης που καλύπτει τις περιφερικές νευρικές ίνες.

1.1.2. Καρκίνοι του Νευρικού Συστήματος

Ο όρος «καρκίνος» καθιερώθηκε από την εποχή του Γαληνού (130-200 μ.Χ.), ο οποίος παρομοίασε την κεντρική μάζα ενός όγκου σαν το σώμα του ζώου καρκίνου (κάβουρας) και τις πέριξ του όγκου διογκωθείσες φλέβες σαν τα πόδια του ζώου αυτού [4]. Ο όρος καρκίνος χρησιμοποιείται σήμερα ως γενικός προσδιορισμός ενός κακοήθους νεοπλασματος αποτελούμενου από μετασχηματισμένα κύτταρα που **α)** πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, **β)** διεισδύουν, **γ)** στερούνται της ικανότητας προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, **δ)** παρουσιάζουν γενετικές ανωμαλίες και **ε)** παραμένουν σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Η καρκινογένεση μπορεί να οφείλεται σε γενετικές (π.χ. μεταλλάξεις) και επιγενετικές (π.χ. μεθυλίωση) αλλαγές οι οποίες οδηγούν σε ακατάλληλη έκφραση ή ενεργοποίηση των κυτταρικών πρωτο-ογκογονιδίων ή σε απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα κύτταρα των όγκων (νεοπλασματικά ή μετασχηματισμένα κύτταρα) μπορούν να προκύψουν από οποιοδήποτε εμπύρνηνο κύτταρο του οργανισμού που εξαιτίας των παραπάνω αλλαγών καταργεί τους φυσιολογικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς κυτταρικής αύξησης και οδηγείται σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό.

Οι πρωτογενείς όγκοι του ΚΝΣ μπορεί να αποτελούν μόλις το 2% των όγκων αλλά το ποσοστό αυτό αυξάνεται τα τελευταία χρόνια και, πιο σημαντικά, είναι η δεύτερη αιτία θανάτου από όγκο στα παιδιά (με πρώτη τη λευχαιμία) [5]. Η ταξινόμηση των νεοπλασμάτων του νευρικού συστήματος είναι υψίστης σημασίας αφού βοηθά στην επιλογή κατάλληλης θεραπείας αλλά και στην πρόγνωση του όγκου. Όλες οι ταξινομήσεις έχουν σαν άξονα την ιστοική προέλευση, την ανατομική εντόπιση και την κλινική πορεία των όγκων. Οι δύο ευρύτερα αποδεκτές ταξινομήσεις έχουν γίνει από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO), ο οποίος

στην πιο πρόσφατη αναθεώρησή του (2007) χωρίζει τους όγκους σε νευροεπιθηλιακούς και μη νευροεπιθηλιακούς και τους κατατάσσει σε κατηγορίες όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, [6] και το St. Anne/Mayo σύστημα το οποίο βασίζεται στην κυτταρική ατυπία, τις μτώσεις, την ενδοθηλιακή υπερπλασία και τις νεκρώσεις [7]. Τα δύο προαναφερθέντα ταξινομικά συστήματα μοιράζονται τα ίδια ιστολογικά κριτήρια.

Κατηγορία	Ταξινόμηση κατά WHO
Αστροκυτταρικοί όγκοι	
Πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα	I
Πιλοβλενώδες αστροκύττωμα	II
Διάχυτο αστροκύττωμα	II
Πλειόμορφο ξανθοαστροκύττωμα	II
Αναπλαστικό αστροκύττωμα	III
Γλοιοβλάστωμα	IV
Ολιγοδενδρογλοιακοί όγκοι	
Ολιγοδενδρογλοίωμα	II
Αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα	III
Όγκοι επενδύματος	
Υποεπενδύωμα	I
Βλενοθηλωματώδες επενδύωμα	I
Επενδύωμα	II
Αναπλαστικό επενδύωμα	III
Όγκοι χοριοειδών πλεγμάτων	
Θήλωμα χοριοειδών πλεγμάτων	I
Ατυπικό θήλωμα χοριοειδών πλεγμάτων	II
Καρκίνωμα χοριοειδών πλεγμάτων	III
Νευρωνικοί και Μικτοί Νευρωνικοί-Νευρογλοιακοί όγκοι	
Γαγγλιογλοίωμα	I
Αναπλαστικό γαγγλιογλοίωμα	III
Δυσεμβρυοπλαστικός νευροεπιθηλιακός όγκος	I

Νευροκύττωμα	II
Όγκοι κωνοειδούς παρεγχύματος	
Κωνοειδοκύττωμα	I
Κωνοειδοβλάστωμα	IV
Θηλωματώδης όγκος κωνοειδούς παρεγχύματος	II/III
Εμβρυϊκοί όγκοι	
Μυελοβλάστωμα	IV
Υπερσκηνίδιος αρχέγονος νευροεκτοδερμικός όγκος	IV
Ατυπικός τερατοειδής/ραβδοειδής όγκος	IV
Όγκοι του τουρκικού εφιππίου	
Κρανιοφαρυγγίωμα	I
Όγκοι των Περιφερικών Νεύρων	
Σβάνωμα	I
Νευροϊνώμα	I
Κακοήθης όγκος των περιφερικών νευρικών ελύτρων	II-IV
Μηνιγγιακοί όγκοι	
Μηνιγγίωμα	I
Ατυπικό Μηνιγγίωμα	II
Αναπλαστικό Μηνιγγίωμα	III
Αιμαγγειοπερικύττωμα	II
Αναπλαστικό αιμαγγειοπερικύττωμα	III
Αιμαγγειοβλάστωμα	I
Όγκοι γεννητικών κυττάρων	
Τεράτωμα	
Χοριοκαρκίνωμα	
Γερμίνωμα	
Εμβρυϊκό καρκίνωμα	
Όγκος λεκιθικού ασκού	

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των νεοπλασμάτων του νευρικού συστήματος σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας

Τα γλοιβλαστώματα (ή γλοιώματα) είναι ο συχνότερος τύπος πρωτογενούς καρκίνου του ΚΝΣ και προέρχονται από καρκινική εξαλλαγή κυττάρων γλοίας, ενώ η πλειονότητα των όγκων του ΠΝΣ προέρχονται από κύτταρα Schwann ή τα πρόδρομα κύτταρα αυτών.

1.2. Ογκοκατασταλτικά γονίδια και Πυρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση

1.2.1. Ογκογονίδια και Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Η γενετική των νεοπλασματικών νοσημάτων τις τελευταίες δεκαετίες παρουσίασε αλματώδη εξέλιξη. Πρώτος ο Γερμανός παθολογοανατόμος David Von Hansemann, το 1890, παρατήρησε ανωμαλίες κατά τη διαίρεση των νεοπλασματικών κυττάρων και συμπέρανε ότι μπορεί να σχετίζονται άμεσα με την έναρξη και την ανάπτυξη του καρκίνου. Αργότερα, το 1914, ο Theodor Boveri διατύπωσε τη θεωρία ότι οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες αποτελούν την αιτία της νεοπλασίας. Σταθμό στην εξέλιξη της γενετικής του καρκίνου αποτέλεσε η περιγραφή του χρωμοσώματος Φιλαδέλφειας (Ph) απ' τους Nowell και Hungerford, στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία [8]. Η διαπίστωση ύπαρξης μιας σταθερής σύνδεσης του χρωμοσώματος Ph με τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, ώθησε τους ερευνητές στην αναζήτηση σταθερών χρωμοσωματικών ανωμαλιών και σε άλλα νεοπλασματικά νοσήματα. Εκτενείς μελέτες σε διάφορα νεοπλάσματα του ανθρώπου έδειξαν σταθερά επαναλαμβανόμενες ανωμαλίες ορισμένων χρωμοσωμάτων σε ειδικούς τόπους νεοπλασίας. Έτσι, οι επιστήμονες οδηγήθηκαν στην υπόθεση, ότι υπάρχουν γενετικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ανάπτυξη νεοπλασίας και στη συνέχεια στην απομόνωση και μελέτη ειδικών γονιδίων, σχετιζόμενων με την καρκινογένεση. Είναι γνωστό σήμερα ότι ο καρκίνος αποτελεί μια πολυγονιδιακή και πολυσταδιακή ανωμαλία, προερχόμενη από άθροιση κληρονομούμενων ή/και επίκτητων μεταλλάξεων σε διάφορα γονίδια, τα οποία μπορεί να ανήκουν σε διάφορες λειτουργικές κατηγορίες [9]. Η μετάλλαξη η οποία αρχίζει την αλυσίδα των γενετικών αλλαγών και οδηγεί σε ειδικούς τύπους καρκίνου φαίνεται ότι παρουσιάζει ειδικότητα ως προς το είδος του γονιδίου και τον τύπο του ιστού.

Οι τύποι γονιδίων που έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με τον καρκίνο είναι τα πρωτο-ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα ογκογονίδια προκύπτουν από ενεργοποίηση φυσιολογικών γονιδίων του κυττάρου, των πρωτο-ογκογονιδίων, μετά από μεταλλαγές ενίσχυσης λειτουργίας (gain-of-function mutations). Η φυσιολογική λειτουργία των πρωτο-ογκογονιδίων σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων, αφού οι πρωτεΐνες που παράγουν είναι αυξητικοί παράγοντες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και ορμονών, μόρια μεταγωγής σήματος και μεταγραφικοί παράγοντες. Η δράση των ογκογονιδίων διαφέρει εκείνης των πρωτο-ογκογονιδίων, δεδομένου ότι τα πρώτα έχουν την ικανότητα να μετασχηματίζουν φυσιολογικά κύτταρα σε καρκινικά. Το πρωτο-ογκογονίδιο H-Ras είναι το πρώτο γονίδιο που απομονώθηκε από καρκίνο ουροδόχου κύστης και για το οποίο διαπιστώθηκε ότι η ενεργοποίησή του οφείλεται σε μία μόνο σημειακή μετάλλαξη [10]. Μάλιστα, ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού καρκινωμάτων πνεύμονος και εντέρου, οδήγησε στην απομόνωση κι άλλων ενεργοποιημένων μελών της οικογένειας Ras, ήτοι H-Ras, K-Ras και N-Ras [11].

Ενδείξεις για την ύπαρξη γονιδίων, τα οποία μπορεί να αναστείλουν την ανάπτυξη του όγκου, υπήρξαν κατά καιρούς από καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων. Η ύπαρξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων απεδείχθη με πρώτο το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb) [12]. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν κατασταλτική επίδραση στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ή/και προάγουν τη διαδικασία της απόπτωσης. Οι λειτουργίες των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών συνολικά σχετίζονται με: **α)** Καταστολή γονιδίων που είναι σημαντικά για τη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης. **β)** Σύνδεση του κυτταρικού κύκλου με τη βλάβη του DNA (DNA damage). Σε περίπτωση που υπάρχει βλάβη στο DNA, το κύτταρο δε διαιρείται. Η διαίρεση συνεχίζεται μόνο όταν και αν η βλάβη επιδιορθωθεί. **γ)** Έναρξη απόπτωσης (προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου) σε περιπτώσεις ανεπανόρθωτων κυτταρικών βλαβών. **δ)** Παρεμπόδιση καρκινικών κυττάρων από τη μετανάστευση, τη διείσδυση και τελικά τη μετάσταση, μέσω πρωτεϊνών κυτταρικής προσκόλλησης. Οι πρωτεΐνες, αυτές, είναι γνωστές και ως καταστολείς μετάστασης [13, 14]. **ε)** Επιδιόρθωση βλαβών του DNA.

Μεταλλαγές σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA (π.χ. HNPCC, MEN1 και BRCA) αυξάνουν την πιθανότητα καρκινογένεσης [15]. Πολλά ογκοκατασταλτικά γονίδια φαίνεται να λειτουργούν ως «φύλακες» για έναν ειδικό τύπο ιστού και μεταλλαγές στην αλληλουχία τους τα κάνουν τα κατ' εξοχήν συνδεδεμένα γονίδια με τα οικογενή καρκινικά σύνδρομα. Ενδεικτικά παραδείγματα τέτοιων γονιδίων αποτελούν το γονίδιο της οικογενούς αδενωματούδους πολυποδίασης (*APC*), το γονίδιο *VHL* στη νόσο του Von Hippel-Lindau, το γονίδιο *p53* στο σύνδρομο Li-Fraumeni και το γονίδιο *NF1* στη Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (αναλυτικά στον Πίνακα 2).

Σύνδρομα	Γονίδια	Είδος νεοπλασματος	Λειτουργία/Προϊόν
Πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία τύπου 1	<i>MEN1</i>	Πρωτοπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός, καρκίνος παγκρέατος, υπόφυσης	Ρόλος στην οδό TGF-β, μέσω Smad3
Πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία τύπου 2	<i>RET</i>	Μυελοειδές καρκίνωμα θυρεοειδούς, καρκίνωμα παραθυρεοειδούς, φαιχρωμοκύττωμα	Υποδοχέας κινάσης τυροσίνης
Ρετινοβλάστωμα	<i>Rb</i>	Όγκος αμφιβληστροειδούς	Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου
Οικογενής αδενωματούδης πολυποδίαση εντέρου	<i>APC</i>	Αδενωματούδεις πολύποδες εντέρου	Αποστολή σήματος, μέσω μορίων προσκόλλησης, στον πυρήνα
Κληρονομικός μη πολυποδοειδής καρκίνος εντέρου	<i>hMSH2</i> <i>hMSH6</i> <i>hMLH1</i> <i>hPMS1</i> <i>hPMS2</i>	Καρκίνος εντέρου, ενδομητρίου	Επιδιόρθωση DNA
Νεανική πολυποδίαση εντέρου	<i>SMAD4</i> / <i>DPC4</i>	Πολύποδες γαστρεντερικού, καρκίνος εντέρου	Κυτταροπλαστικός μεσολαβητής TGF-β
Peutz-Jeghers	<i>STK11</i> / <i>LKB1</i>	Καρκίνος γαστρεντερικού, καρκίνος μαστού, όρχεως, γυναικολογικές κακοήθειες	Κινάση σερίνης-θρεονίνης

Von Hippel Lindau	<i>VHL</i>	Καρκίνωμα νεφρού, αιμαγγειοβλαστώματα ΚΝΣ	Ουβικιτινυλίωση του HIF-1a
Όγκος Wilms	<i>WT</i>	φαιχωροκύττωμα, όγκοι νεφρού	Ρύθμιση μεταγραφής
Νευροϊνωμάτωση τύπου 1	<i>NF1</i>	Νευροϊνωμα, αστροκύττωμα, γλοιοβλάστωμα, σουάνωμα, λευχαιμία	Αρνητικός ρυθμιστής του Ras
Νευροϊνωμάτωση τύπου 2	<i>NF2</i>	Σουάνωμα, μηνιγγίωμα, όγκοι νωτιαίου σωλήνα, καρκίνος δέρματος	Αναστολή συγκόλλησης κυττάρων
Καρκίνος μαστού/ ωοθήκης	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i>	Καρκίνος μαστού/ωοθήκης	Επιδιόρθωση DNA
Σύνδρομο Cowden	<i>PTEN/MM</i> <i>AC1/TP1</i>	Καρκίνος μαστού, θυρεοειδούς, ενδομητρίου, πολύποδες εντέρου	Φωσφατάση τυροσίνης
Οικογενές μελάνωμα	<i>CDKN2A</i> <i>CDK4</i>	Δερματικό κακοήθες μελάνωμα, καρκίνος παγκρέατος	Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου
Κληρονομικό θηλώδες καρκίνωμα νεφρού	<i>MET</i>	Θηλώδες καρκίνωμα νεφρού	Υποδοχέας κινάσης τυροσίνης
Κληρονομικό παραγαγγλίωμα και φαιχωροκύττωμα	<i>SDHD</i> <i>SDHC</i> <i>SDHB</i>	Παραγαγγλίωμα και φαιχωροκύττωμα	Όχι απόλυτα γνωστή
Σύνδρομο Li- Fraumeni	<i>p53</i>	Καρκίνος μαστού, σαρκώματα, όγκοι εγκεφάλου, λευχαιμία	Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου, απόπτωση

Πίνακας 2. Κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα που προκύπτουν από μεταλλαγές σε ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Μηχανιστικά, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια αποτελούν μέρος της καρκινογένεσης εξαιτίας μεταλλαγών απώλειας λειτουργίας (loss-of-function mutations) και, σε αντίθεση με τα ογκογονίδια, γενικά ακολουθούν την υπόθεση των «δύο χτυπημάτων» του Knudson (“two-hit” hypothesis) [16], πράγμα που σημαίνει ότι σε ετεροζυγώτες ασθενείς, χρειάζεται δεύτερο

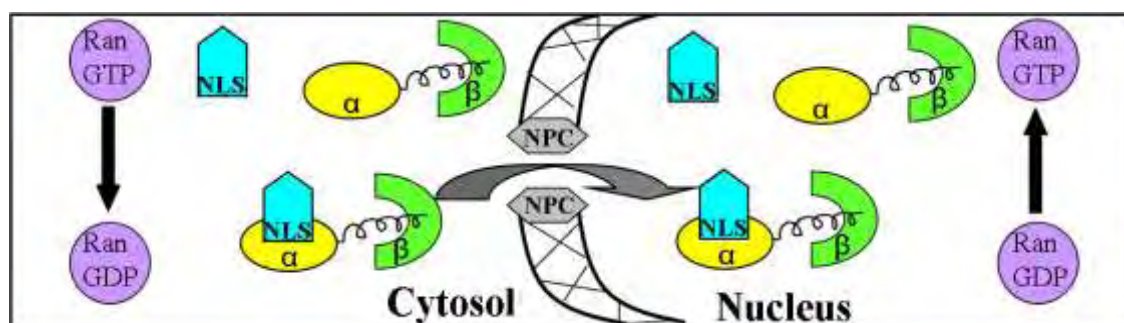
γενετικό λάθος για να δημιουργηθεί όγκος. Αυτό, πρακτικά, σημαίνει ότι οι μεταλλαγές των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι συνήθως υπολειπόμενες, ενώ, των ογκογονιδίων είναι τυπικά επικρατείς. Εξαίρεση στον κανόνα των «δύο χτυπημάτων» αποτελούν συγκεκριμένες μεταλλαγές στο γονίδιο *p53* οι οποίες, αν και πλήττουν το ένα μόνο αλληλίο, δρουν ως κυρίαρχα αρνητικές και εμποδίζουν και τη δράση του φυσιολογικού αλληλίου [17].

1.2.2. Πυρρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών.

Πολλές ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων οι *p53*, *p73*, *p21*, *BRCA1*, *APC*, *VHL*, *Smad4*, *PTEN* [18] και *NF2* [19], μεταφέρονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και αντίστροφα [20]. Η πυρηνική μεταφορά έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας θεμελιώδης και κρίσιμος μηχανισμός για τη ρύθμιση όχι μόνο του εντοπισμού αλλά και της λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτών [20]. Όταν εισέρχονται, λοιπόν, στον πυρήνα εκτελούν δραστηριότητες «περιφρούρησης» δηλαδή αλληλεπιδρούν με τις πυρηνικές πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA, συμβάλλοντας έτσι σημαντικά στη χρωμοσωμική σταθερότητα, την επιδιόρθωση του DNA, την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και συνολικά στην κυτταρική σταθερότητα [21]. Επομένως, δεν προκαλεί έκπληξη ότι η απορρύθμιση της πυρηνικής μεταφοράς έχει ως αποτέλεσμα τη λανθασμένη στόχευση (*mistargeting/mislocalization*) και διαταραχή της λειτουργίας μιας πληθώρας πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων και των ογκοκατασταλτικών. Η λανθασμένη στόχευση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, μπορεί να έχει ολέθριες κυτταρικές συνέπειες και δυνητικά οδηγεί στην έναρξη και εξέλιξη του καρκίνου [18].

Οι μικρές πρωτεΐνες (έως 45 kDa), μπορούν ελεύθερα να διαχέονται από και προς τον πυρήνα, ενώ, πρωτεΐνες με μεγαλύτερη μοριακή μάζα μεταφέρονται μέσω των πυρηνικών πόρων με μια αυστηρά ελεγχόμενη και ειδική διαδικασία, μετά από δαπάνη ενέργειας. Για τη μεταφορά αυτή οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες διαθέτουν σήμα πυρηνικού εντοπισμού (*Nuclear Localization Signal, NLS*), μοτίβα που αποτελούνται από βασικά, θετικά φορτισμένα αμινοξέα, όπως η λυσίνη και η αργινίνη [22]. Μηχανιστικά, οι *NLS* αλληλουχίες αναγνωρίζονται από έναν υποδοχέα *NLS*, ένα ετεροδιμερές αποτελούμενο από τις ιμπορτίνες α/β , ο οποίος δένεται στην

πρωτεΐνη και διευκολύνει τη μεταφορά της, δια μέσω του πυρηνικού πόρου, στον πυρήνα [23]. Η διαδικασία της μεταφοράς διαμεσολαβείται από την υδρόλυση του GTP, στην οποία συμμετέχει η μικρή GTPάση Ran [24], (Σχήμα 1).

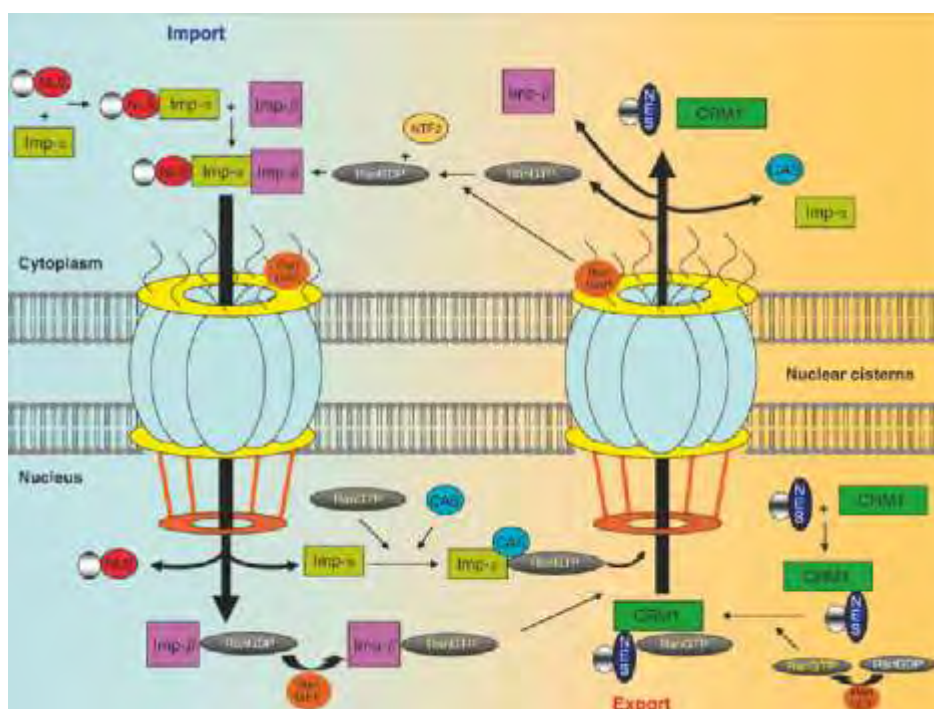


Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση της εξαρτώμενης από Ran πυρηνικής εισόδου των πρωτεϊνών που φέρουν NLS. α: ιμφορτίνη-α, β: ιμφορτίνη-β, NPC: σύμπλεγμα πυρηνικού πόρου (Nuclear Pore Complex).

Παρά το γεγονός ότι τα NLS είναι ο πιο κοινός τύπος στοιχείων πυρηνικής εισαγωγής, υπάρχουν και άλλες αλληλουχίες που συχνά χρησιμεύουν για τη στοχοθέτηση πρωτεϊνών στον πυρήνα [25, 26]. Τα καρκινικά κύτταρα, όμως, φαίνεται να αποκτούν ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς, ώστε να εξάγουν διαρκώς τις πυρηνικές αντικαρκινικές πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα [27]. Από αυτό προκύπτει ότι αν εμποδίσουμε ή ρυθμίσουμε την πυρηνική εξαγωγή αυτών των πρωτεϊνών, μπορούμε να αποκαταστήσουμε τη διαδικασία της ογκοκαταστολής.

Για τη μεταφορά πολλών ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα απαιτείται η ύπαρξη μίας (ή περισσότερων) αλληλουχίας-σήματος πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export Signal, NES). Η πιο συνήθης αλληλουχία NES περιλαμβάνει μία μικρή περιοχή της πρωτεΐνης με πολλά υδροφοβικά αμινοξέα, όπως η λευκίνη και η ισολευκίνη [28]. Το NES αναγνωρίζεται και προσδένεται στον υποδοχέα εξόδου CRM1/exportin [28]. Η αλληλεπίδραση του NES με το CRM1 προϋποθέτει τον σχηματισμό συμπλόκου με τη RanGTP για την απελευθέρωση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα [28]. Ένας σημαντικός φαρμακολογικός παράγοντας για την αναγνώριση πρωτεϊνών που χρησιμοποιούν το CRM1-εξαρτώμενο μονοπάτι πυρηνικής εξόδου είναι η λεπτομυκίνη B (LMB) [29-30]. Πρόκειται για έναν

ισχυρό και ειδικό αναστολέα της πυρηνικής εξαγωγής, ο οποίος αλκυλιώνει και αναστέλει την πρόσδεση στην εξαπορτίνη CRM1 [31], οπότε πρωτεΐνες που περιέχουν σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (Nuclear Export Signal -NES) συσσωρεύονται μέσα σε αυτόν. Η πλειονότητα των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν την πυρηνο-κυτταροπλασματική τους μετακίνηση με τουλάχιστον ένα NES παρόλα αυτά, και άλλες αλληλουχίες πυρηνικής εξαγωγής έχουν χαρτογραφηθεί σε μια μικρή ομάδα πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων των μορίων που επεξεργάζονται RNA hnRNP A1 [32], hnRNP K [32, 33] και Hur [34]. Οι αλληλουχίες που εντοπίστηκαν σε αυτές τις πρωτεΐνες είναι αρκετά μεγάλες και ελλιπώς χαρακτηρισμένες αλλά είναι γνωστό ότι δεν ανταποκρίνονται στη λεπτομυκίνη B και ως εκ τούτου δε χρησιμοποιούν τη CRM1 οδό [35]. Στο Σχήμα 2 [36] παρουσιάζεται σχηματικά ο τρόπος εισόδου και εξόδου στον πυρήνα πρωτεϊνών που διαθέτουν NLS και NES, αντίστοιχα.



Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση της εξαρτώμενης από Ran πυρηνο-κυτταροπλασματικής διακίνησης.

Η πυρηνο-κυτταροπλασματική μεταφορά των πρωτεϊνών ρυθμίζεται με ένα πλήθος μηχανισμών. Η συγκάλυψη των σημάτων πυρηνικής εισόδου και εξόδου είτε εξαιτίας αλλαγών στην πρωτεϊνική αναδίπλωση, είτε εξαιτίας σύνδεσης με άλλη πρωτεΐνη προσφέρει ένα γρήγορο και αποτελεσματικό

μηχανισμό για την αποτροπή της αναγνώρισης του σήματος από τα μόρια πυρηνικής μεταφοράς και έχει δείχθει ότι ρυθμίζει τον εντοπισμό των μεταγραφικών παραγόντων NF-AT [37] και PBX1/EXD [38]. Η διακίνηση πρωτεϊνών από και προς τον πυρήνα επηρεάζεται, επίσης, από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μέσα ή κοντά στις αλληλουχίες εισόδου/εξόδου. Στις τροποποιήσεις αυτές περιλαμβάνονται φωσφορυλιώσεις, ουβικιτινυλιώσεις, γλυκοζυλιώσεις και σουμouλιώσεις, οι οποίες ελέγχονται από πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια [20]. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στη στερεοδιάταξη των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την αποκάλυψη ή απόκρυψη κάποιου επίτοπου, δημιουργώντας τη δυνατότητα νέων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων [18]. Η δυνατότητα νέων αλληλεπιδράσεων μπορεί να επιτρέψει στο NLS ή το NES να αναγνωριστούν από τους υποδοχείς τους, ή μπορεί να απομονώσει την πρωτεΐνη, σε κάποιο κυτταρικό διαμέρισμα, εμποδίζοντας την να εισέλθει ή να εξέλθει από τον πυρήνα [18]. Η απομόνωση μιας πρωτεΐνης σε κάποιο κυτταρικό διαμέρισμα μπορεί να γίνει μέσω αλληλεπίδρασης με τον κυτταροσκελετό [39] ή και μεμβρανικούς υποδοχείς [40].

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πυρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση, εκτός από τη ρύθμιση της λειτουργίας μιας ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης, μπορεί να σχετίζεται και με τη ρύθμιση των επιπέδων της. Μελέτες στις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες APC και BRCA1 έδειξαν ότι οι αλληλεπιδράσεις τους με άλλα μόρια που ρυθμίζουν την πυρηνο-κυτταροπλασματική τους μετακίνηση, ρυθμίζουν επίσης και την αποικοδόμησή τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σύμπλοκο BRCA1/BARD1 το οποίο συναντάται μόνο μέσα στον πυρήνα [26] και είναι πολύ πιο σταθερό από τα ελεύθερα BRCA1 ή BARD1 [41]. Μάλιστα, όταν το ουβικιτινυλιωμένο BRCA1 αποσυνδέεται από το BARD1, εξέρχεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου και αποικοδομείται [42].

1.3. Ras/Raf/MAPK μονοπάτι μεταγωγής σήματος

Τα διάφορα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια συμμετέχουν σε πληθώρα μονοπατιών μεταγωγής σήματος και ρυθμίζουν διαδικασίες που σχετίζονται με την καρκινογένεση όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η κυτταρική προσκόλληση. Το μονοπάτι Ras/Raf/MAPK είναι ένα ζωτικής σημασίας μονοπάτι μεταγωγής σήματος, στο οποίο λαμβάνουν μέρος η σημαντικότερη, ίσως, οικογένεια ογκογονιδίων, η Ras, καθώς και μια σχετιζόμενη με καρκινικό σύνδρομο ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, η νευροϊνιδίνη. Οι Ras GTPάσες είναι μόρια κλειδιά για τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης μέσω του μονοπατιού των τριών κινάσων MAPK που αποτελείται από τις πρωτεϊνικές κινάσες: Rafs (MAPKKK), MEK1/2 (MAPKK), και ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases, MAPK) [43]. Όλες οι Ras πρωτεΐνες, ήτοι H-, N- και K-Ras, εναλλάσσονται μεταξύ της ενεργής, προσδεμένης σε GTP, και της μη ενεργής, προσδεμένης σε GDP, μορφής. Μετά από διέγερση των μεμβρανικών υποδοχέων, ενεργοποιούνται οι GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) οι οποίες προωθούν την ανταλλαγή του GDP με GTP και, έτσι, την ενεργοποίηση του Ras [44]. Το αντίθετο γεγονός ελέγχεται από τις GAPs (GTPase-Activating Proteins) οι οποίες ενεργοποιούν την εγγενή ενεργότητα GTPάσης του Ras και οδηγούν στην υδρόλυση του GTP και, κατά συνέπεια, την απενεργοποίηση του Ras [45]. Η Ras-GTP μορφή στρατολογεί το Raf στη μεμβράνη και μαζί με άλλες κινάσες ενεργοποιεί την ενεργότητα κινάσης του [46]. Ακολούθως, αλληπάλληλες φωσφορυλιώσεις μέσω των MEKs έχουν σαν αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της ERK, που θεωρείται ο τελικός αποδέκτης του μονοπατιού [43]. Η ERK μεταφέρεται στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί γονίδια τα οποία ρυθμίζουν ποικίλες κυτταρικές διεργασίες όπως πολλαπλασιασμός, μετανάστευση και διαφοροποίηση.

1.3.1. Κυτταρική διαφοροποίηση και μονοπάτι Ras/Raf/MAPK

Πολλές μελέτες σε ινοβλάστες [47], T λεμφοκύτταρα [48] και μεγακαρυοκύτταρα [49] απέδειξαν ότι η παρατεταμένη ενεργοποίηση του ERK μονοπατιού προηγείται της διαφοροποίησης. Εξάλλου, όλα τα βασικά μόρια μεταγωγής σήματος του Ras/ERK μονοπατιού, ήτοι Ras και Raf, είναι ικανοί

επαγωγείς διαφοροποίησης και νευριτικής ανάπτυξης σε διάφορες νευρωνικές κυτταρικές σειρές [50-52]. Όμως, καθοριστικό ρόλο στο βιολογικό αποτέλεσμα παίζει η ένταση και η διάρκεια ενεργοποίησης του Ras/ERK μονοπατιού. Τέτοιου είδους παρατηρήσεις έγιναν για πρώτη φορά σε PC12 κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος που επωάστηκαν με επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF) ή νευρικό αυξητικό παράγοντα (Nerve Growth Factor, NGF). Οι δύο αυτοί αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν το ίδιο Ras/ERK μονοπάτι, εν τούτοις, παροδική ενεργοποίηση της ERK από EGF επάγει κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ παρατεταμένη ενεργοποίησή της από NGF επάγει νευριτική ανάπτυξη και διαφοροποίηση [53]. Έτσι, ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) στρατολογεί το σύμπλεγμα Grb2-Sos με αποτέλεσμα την παροδική ενεργοποίηση της ERK, ενώ ο, ενεργοποιούμενος από NGF, υποδοχέας Trk στρατολογεί το σύμπλεγμα Shc-Grb2-Sos, με αποτέλεσμα την παρατεταμένη ενεργοποίηση της ERK [44, 54, 55]. Οι λόγοι αυτών των θεμελιωδών διαφορών ακόμα συζητούνται [56, 57]. Άλλωστε, παρατεταμένη ενεργοποίηση της ERK καταλήγει στη μετατόπισή της στον πυρήνα, γεγονός που διευρύνει τα υποστρώματά της, σε σύγκριση με την παροδικά ενεργοποιημένη κυτταροπλασματική ERK [58].

1.3.2. Ογκογένεση και μονοπάτι Ras/Raf/MAPK

Το μονοπάτι της ERK1/2, αρχικά, αναγνωρίστηκε ως μονοπάτι που προάγει την κυτταρική ανάπτυξη αφού τα βασικότερα μόρια που το απαρτίζουν σχετίζονται με την κυτταρική ανάπτυξη και την ογκογένεση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι οι μεταλλαγμένες μορφές των Ras και Raf που κωδικοποιούνται από ογκογονίδια ρετροϊών και το γεγονός ότι η συνεχώς ενεργή (constitutively active) μορφή της MEK1 προάγει τον κυτταρικό καρκινικό μετασχηματισμό, ενώ η κυρίαρχα αρνητική (dominant negative) μορφή της τον καταστέλλει [59-61]. Ουσιαστικά, ο καρκίνος είναι μη φυσιολογικός κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η ERK εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο με αρκετούς, διακριτούς μηχανισμούς. Καταρχήν έχει δειχθεί ότι υποστηρίζει τη σύνθεση DNA κατά τη διάρκεια της S φάσης [62]. Επίσης, καταστέλλει τη δράση των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου είτε ενεργοποιώντας την p90RSK, που με τη σειρά της μεσολαβεί για να

απενεργοποιηθεί η MYT1, μια ανασταλτική για τον κυτταρικό κύκλο κινάση [63], είτε προωθώντας την αποδόμηση του p27Kip1 αναστολέα της εξαρτώμενης από κυκλίνης κινάσης (Cyclin-dependent kinase, Cdk) [64]. Επιπλέον, η ERK1/2, μέσω της κυκλίνης D1 και ενεργοποίηση του PI3K μονοπατιού, ελέγχει τη G1/S μετάβαση [65] ενώ, σε κάποιες κυτταρικές σειρές, και την πρόοδο στη G2 φάση [66]. Αναλόγως, η ενεργοποιημένη ERK έχει βρεθεί ότι συνδέεται με τους κινητοχώρους και τους πόλους της μιτωτικής ατράκτου αλλά και το ενδιάμεσο σώμα στα τελευταία στάδια της μίτωσης [67, 68], όλα ενδεικτικά των πολλαπλών λειτουργιών της ERK κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Παραδόξως, όμως, παρατεταμένη ενεργοποίηση των άνωθεν ρυθμιστών της ERK, Ras και Raf-1, έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της αύξησης (growth arrest), πιθανότατα λόγω αύξησης στην έκφραση αναστολέων της προόδου του κυτταρικού κύκλου (π.χ. p53, p21Waf/Cip1, p16) εξαιτίας των δεδομένων συνθηκών [69, 70]. Μάλιστα, έχει δειχθεί ότι υπερ-ενεργοποίηση της ERK μπορεί να σταματήσει τον κυτταρικό κύκλο στις G1/S και G2/M μεταβάσεις [71]. Εξάλλου, η υπερ-ενεργοποίηση αυτή προκαλεί παράκαμψη των σημείων ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου και κατά συνέπεια χρωμοσωμικές παρεκκλίσεις [72]. Παρομοίως, παρατεταμένη ενεργοποίηση της Raf σε ινοβλάστες πνεύμονα [73], ή υπερ-ενεργοποίηση της ERK, μέσω μείωσης της φωσφατάσης διπλής ειδικότητας VHR [71], είχε ως αποτέλεσμα την πρόωμη έναρξη κυτταρικού γήρατος (senescence).

Ένα, λοιπόν, μονοπάτι μεταγωγής σήματος, το Ras/ERK, ρυθμίζει δύο «αντίθετες» κυτταρικές διαδικασίες, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση, διατάραξη των οποίων σχετίζεται άμεσα με την καρκινογένεση. Μια υψηλή αλλά παροδική ενεργοποίηση προκαλεί τον πολλαπλασιασμό κυττάρων, ενώ μια συνεχής, ήπια ενεργοποίηση προκαλεί διαφοροποίηση. Σημαντικοί ρυθμιστές του μονοπατιού αυτού και του βιολογικού αποτελέσματός του φαίνεται να είναι οι καινοφανείς PKCs (nPKCs) [56] και η RasGAP νευροϊνιδίνη [57]. Για το λόγο αυτό, η διαλεύκανση του ρόλου της PKCε, της σημαντικότερης από τις καινοφανείς PKCs, και της νευροϊνιδίνης, που έχει χαρακτηριστεί ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, στις θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες της διαφοροποίησης και του

πολλαπλασιασμού είναι υψίστης σημασίας για την κατανόηση των μηχανισμών της καρκινογένεσης.

1.4. Ras/Raf/MAPK μονοπάτι μεταγωγής σήματος και ρύθμιση από PKC

Σημαντικός ρυθμιστής του Ras/Raf/MAPK μονοπατιού είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης-θρεονίνης C (PKC). Μηχανιστικά, η ενεργοποίηση της PKC είναι απαραίτητη για το σχηματισμό συμπλεγμάτων μεταξύ του Ras και του ενεργού Raf-1 [74-76]. Οι PKCs μπορούν να φωσφορυλιώσουν κατευθείαν ισομορφές του Ras, όπως το K-Ras, [77] το Raf [78], τις RasGEFs [79-81], και τις RasGAPs [82-84], ρυθμίζοντας, ως εκ τούτου, τη ροή μεταγωγής σήματος του Ras/ERK μονοπατιού σε πολλαπλά επίπεδα.

PKCs και RasGEFs: Οι RasGEFs, μέλη της οικογένειας των GRP, έχουν στη δομή τους τη C1 περιοχή που αναγνωρίζει το, παραγόμενο μετά από διέγερση των μεμβρανικών υποδοχέων, DAG (diacylglycerol) και μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων μετατοπίζεται στη μεμβράνη [79]. Η GEF ενεργότητα των RasGRP1,3 ενισχύεται δραματικά μέσω φωσφορυλίωσης από, ενεργοποιούμενων από DAG, ηPKCs τουλάχιστον σε T- και B-λεμφοκύτταρα [80, 81]. Επίσης, οι PKCs έχει βρεθεί ότι μπορούν να ενεργοποιήσουν τη SOS1, τη δεύτερη σημαντική RasGEF, φωσφορυλιώνοντάς την άμεσα [85] ή έμμεσα, με τη στρατολόγηση συμπλεγμάτων Grb2/SOS1 μέσω της κινάσης τυροσίνης Syk [86].

PKCs και RasGAPs: Το μεγαλύτερο μέρος της RasGAP δραστηριότητας στο κύτταρο αποδίδεται στην p120GAP και τη νευροϊνιδίνη, και, μάλιστα, προηγούμενες μελέτες έχουν προτείνει την PKC-εξαρτώμενη αναστολή της RasGAP δραστηριότητας σε κάποιους κυτταρικούς τύπους [87, 88]. Έχει δειχθεί ότι οι PKCs διαφοροποιούν έμμεσα την ενεργότητα GAP της p120GAP, μέσω της αλληλεπίδρασης με RACK1 [89], ενώ, ρυθμίζουν άμεσα τη νευροϊνιδίνη που είναι η κυρίαρχη νευρωνική RasGAP.

Συμπερασματικά, οι PKCs έχουν τη δυνατότητα να επηρεάζουν άμεσα την κατάσταση ενεργοποίησης του Ras μεταβάλλοντας την ενεργότητα τόσο των GEFs όσο και των GAPs με ποικίλους τρόπους. Εδώ, πρέπει να

σημειωθεί ότι σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές η, εξαρτώμενη από PKC, ενεργοποίηση της ERK μπορεί να συμβεί ανεξάρτητα από το Ras, αφού, έχει δειχθεί ότι η κυρίαρχα αρνητική μορφή του Ras (RasS17N), που δεν ενεργοποιείται από GEFs, δεν αναστέλλει την εξαρτώμενη από TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) ενεργοποίηση της ERK [75, 78]. Συνολικά, οι c/ηPKCs, όπως οι PKCα, PKCη, PKCδ και PKCε, αλλά και οι aPKCs έχει προταθεί ότι έχουν σημαντική συμμετοχή στην ενεργοποίηση του ERK μονοπατιού [74, 78, 90].

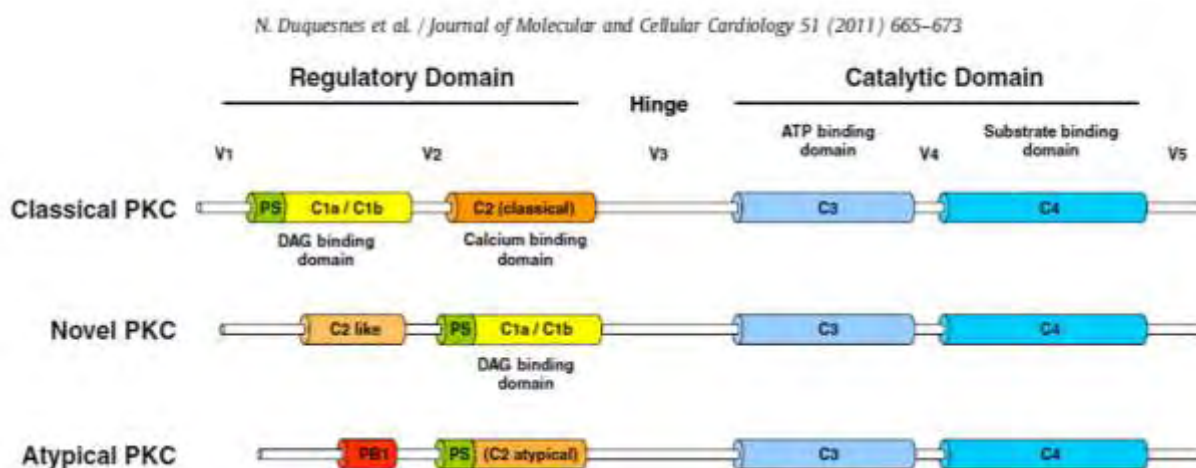
1.5. Πρωτεϊνικές Κινάσες C

1.5.1. Δομή

Οι πρωτεϊνικές κινάσες C (PKC) αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια κινασών σερίνης-θρεονίνης [91] η οποία στα θηλαστικά περιλαμβάνει τουλάχιστον 11 ισομορφές με μεγάλο εύρος κατανομής στους ιστούς και διαφορετικούς κυτταρικούς εντοπισμούς [92]. Η ύπαρξη τόσων πολλών ισομορφών υποδεικνύει ότι οι ξεχωριστές ισομορφές είναι δυνατόν να εκπληρώνουν εξειδικευμένες λειτουργίες στον οργανισμό. Η οικογένεια των PKCs μπορεί να χωριστεί σε 3 υποομάδες με βάση τη δομή και τους απαιτούμενους για την ενεργοποίησή τους συμπαράγοντες: οι κλασσικές PKCs (cPKCs: α, βI, βII, γ) που ενεργοποιούνται από ασβέστιο (Ca^{2+}) και διακυλογλυκερόλη (diacylglycerol, DAG), οι νεοφανείς PKCs (ηPKCs: δ, ε, η, θ) που ενεργοποιούνται μόνο από DAG, και οι ατυπικές PKCs (aPKCs: ι, ζ και μ) που δεν αντιδρούν σε Ca^{2+} ή DAG αλλά ενεργοποιούνται από το σύμπλεγμα Par6–Cdc42 [93, 94]. Οι PKCs θεωρούνται κομβικά σημεία μονοπατιών μεταγωγής σήματος των συζευγμένων με G πρωτεΐνες (G protein-coupled) και κινασών τυροσίνης (tyrosine kinase) υποδοχέων [93, 95], αφού είναι αποδεδειγμένο ότι συνδέουν την εξαρτώμενη από υποδοχέα παραγωγή DAG από τις φωσφολιπάσες C και D, με την ενεργοποίηση του Ras και του Raf που είναι το γεγονός κλειδί για την τροποποίηση του ERK μονοπατιού [96, 97]. Εξαιτίας των, μεγάλης έκτασης, αποτελεσμάτων από την ενεργοποίηση των PKC, ένας μεγάλος αριθμός επιστημονικών μελετών έχει διερευνήσει την εμπλοκή των PKC ισομορφών στην ογκογένεση αλλά και σε

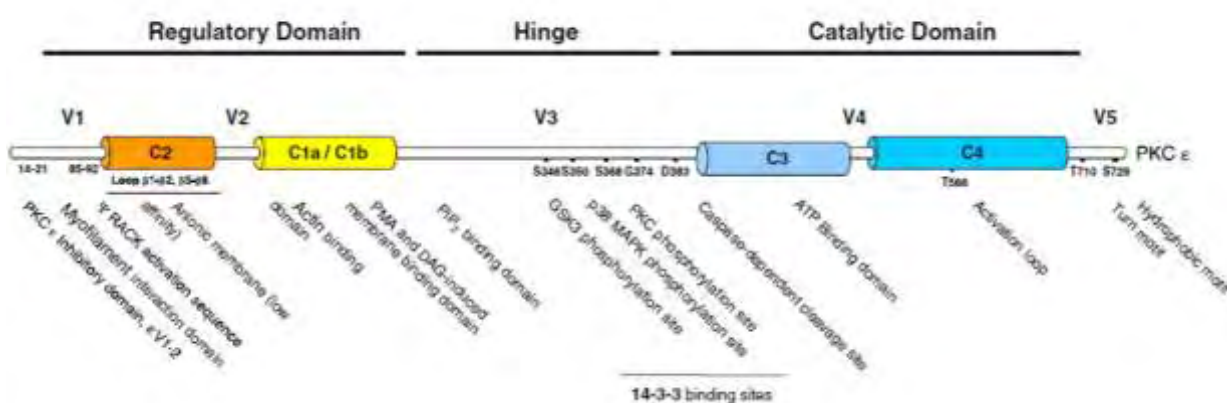
φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες όπως η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός, η πόλωση, η μετακίνηση, η απόπτωση και η επιβίωση [94, 98, 99].

Οι PKCs είναι ιδρυτικά μέλη της οικογένειας των AGC κινασών και μοιράζονται παρόμοια δομή αποτελούμενη από μια συντηρημένη C-τελική καταλυτική περιοχή και από μια, αποκλίνουσα στη βασική δομή, N-τελική ρυθμιστική περιοχή (Σχήμα 3). Η ρυθμιστική περιοχή περιλαμβάνει τα C1 και C2 τμήματα (cPKC and nPKCs) και μια ψευδοϋποστρωματική αλληλουχία που αλληλεπιδρά με τα σημεία πρόσδεσης υποστρώματος της καταλυτικής περιοχής και έχει αυτοανασταλτική λειτουργία. Το τμήμα C1 περιλαμβάνει περίπου 50 αμινοξέα και περιέχει ένα μοτίβο πλούσιο σε κυστεΐνες με δύο προσδεμένα ιόντα Zn^{2+} . Η περιοχή, αυτή, αναγνωρίζει φορβικούς εστέρες, καθώς και τους δευτερογενείς αγγελιοφόρους DAG/φωσφολιπίδια. Σε πολλά ισόενζυμα, υπάρχουν δύο αντίγραφα της περιοχής C1, γνωστές ως περιοχές C1A και C1B (ή επίσης ως Cys1- και Cys-2 στοιχεία). Στο τμήμα C2, το οποίο δε βρίσκεται σε όλα τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνικών κινασών C, έχει βρεθεί η θέση πρόσδεσης του Ca^{2+} και οξικών φωσφολιπιδίων. Τα συντηρημένα τμήματα C3 και C4 σχηματίζουν την καταλυτική περιοχή με τις θέσεις πρόσδεσης για το ATP και τις υποστρωματικές πρωτεΐνες.



Σχήμα 3. Απεικόνιση της δομής των 3 υποομάδων της οικογένειας PKC [100].

Η PKCε μοιράζεται πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας PKC. Ειδικότερα, περιέχει ένα C1 τμήμα με δύο μοτίβα πλούσια σε κυστεΐνες που δένουν διακυλογλυκερόλες, ένα όμοιο με C2 τμήμα (C2-like) που δένει φωσφολιπίδια, μια ψευδοϋποστρωματική περιοχή, C3 και C4 καταλυτικά τμήματα που περιέχουν θέση δέσμησης του ATP, βρόχο ενεργοποίησης και θέση αναγνώρισης υποστρώματος (Σχήμα 4). Μοναδικό χαρακτηριστικό της PKCε είναι μια αλληλουχία 6 αμινοξέων μεταξύ των C1 και C1b υποτμημάτων που αποτελούν το μοτίβο πρόσδεσης σε ακτίνη [101].



Σχήμα 4. Απεικόνιση της δομής της PKCε ισομορφής [100].

1.5.2. Ενεργοποίηση

Όπως αναφέρθηκε, απουσία των ενεργοποιητικών συμπαραγόντων, η καταλυτική περιοχή των PKC αυτοαναστέλλεται από ένα μοτίβο αλληλουχίας που λειτουργεί ως ψευδοϋπόστρωμα και βρίσκεται στη ρυθμιστική περιοχή [102]. Αυτό, μοιάζει στην κοινή αλληλουχία υποστρώματος με θέσεις φωσφορυλίωσης της πρωτεϊνικής κινάσης C, καταλαμβάνει το ενεργό κέντρο της κινάσης αλλά δεν έχει κατάλοιπο Ser ούτε Thr για φωσφορυλίωση. Οι φορβικοί εστέρες όπως το TPA, γνωστό και ως PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) είναι ισχυροί ενεργοποιητές των c/n αλλά όχι των αPKCs [103]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η ενεργοποίηση των PKC συμβαίνει ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες. Είναι γνωστό ότι οι α-αδρενεργικοί υποδοχείς είναι οι κύριοι ενεργοποιητές της φωσφολιπάσης C μέσω των Gα πρωτεϊνών. Μετά την ενεργοποίησή της η φωσφολιπάση C (PLC) παράγει,

από τα λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης, DAG και τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3). Η DAG ενεργοποιεί c/nPKC, ενώ η IP_3 απελευθερώνει Ca^{2+} από τις κυτταρικές αποθήκες το οποίο με τη σειρά του ενισχύει την ενεργοποίηση των cPKC [91]. Εκτός από την PLC έχει προταθεί ότι υπάρχουν και άλλα μεμβρανικά φωσfolιπίδια, ειδικά τα φωσfolιπίδια χολίνης που παράγονται από τις φωσfolιπάσες D και A2 [103], που μπορεί να παίρνουν μέρος στη μεταγωγή σήματος, παρατείνοντας τη δράση των PKC σε μακροπρόθεσμες αποκρίσεις όπως στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση.

Πρόσφατες μελέτες [100, 104] έδειξαν ότι η ενεργοποίηση της PKCε είναι δυνατή και με την ενεργοποίηση β-αδρενεργικών υποδοχέων, μέσω ενός νέου μονοπατιού PLC που περιλαμβάνει τον E_{pac} , έναν cAMP-ενεργοποιούμενο παράγοντα ανταλλαγής (cAMP-activated exchange factor) των μικρών GTPασών της οικογένειας Rap [105, 106]. Μέχρι τώρα, καμία άλλη PKC ισομορφή δεν έχει δείχθει ότι μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω αυτού του μονοπατιού.

1.5.3. Ρύθμιση Ενεργοποίησης

Μηχανιστικά, πρόσδεση δευτερογενών αγγελιοφόρων ή αλλοστερικών ρυθμιστών στα C1/C2 τμήματα της ρυθμιστικής περιοχής έχει σαν αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της PKC, αφήνοντας το ενεργό κέντρο προσιτό στις υποστρωματικές πρωτεΐνες, την αλληλεπίδραση με την πλασματική μεμβράνη και τελικά την ενεργοποίηση [93, 95]. Ο συσχετισμός με τη μεμβράνη, και έτσι η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C, ελέγχονται από τους συμπαραγόντες Ca^{2+} , DAG και φωσφατιδυλσερίνη. Ένας ειδικός ρόλος ανατίθεται στην ένταση και τη συχνότητα των σημάτων του Ca^{2+} και της DAG. Πρόσδεση του Ca^{2+} στη C2 περιοχή οδηγεί σε αυξημένο συσχετισμό με τη μεμβράνη και σε ενεργοποίηση απαλλάσσοντας το ενεργό κέντρο από το ψευδοϋπόστρωμα. Περαιτέρω ενεργοποίηση συμβαίνει με πρόσδεση της DAG στη C1 περιοχή και πρόσδεση της φωσφατιδυλσερίνης στην C2 περιοχή, προσδέτες που λειτουργούν ως άγκυρα για το συσχετισμό με τη μεμβράνη. Η χρησιμοποίηση των δύο περιοχών C1 και C2 που στοχεύουν στη μεμβράνη βοηθά να εξασφαλιστεί υψηλή συγγένεια, εξειδίκευση και ρύθμιση της μεμβρανικής αλληλεπίδρασης.

Οι PKCs ρυθμίζονται, επίσης, από συγκεκριμένα γεγονότα φωσφορυλίωσης που «ετοιμάζουν» την κινάση για ενεργοποίηση. Υπάρχουν τρεις ξεχωριστές θέσεις φωσφορυλίωσης στην καταλυτική περιοχή της κινάσης οι οποίες έχουν εξαιρετικά συντηρημένες αλληλουχίες και περιβάλλονται από κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης [106, 107]. Συγκεκριμένα, όπως σε όλες τις AGC κινάσες, η πρώτη φωσφορυλίωση συμβαίνει στο βρόχο ενεργοποίησης (activation loop) και η φωσφορυλίωση, αυτή, βοηθά να ευθυγραμμιστούν τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου. Η PDK1 (phosphoinositide dependent kinase 1) έχει δειχθεί ότι φωσφορυλιώνει θρεονίνες (Thr) στο βρόχο ενεργοποίησης σχεδόν όλων των PKC ισομορφών (Thr566 στην PKCε) [108] και επιπλέον Thr και σερίνες (Ser) στο μοτίβο turn (turn motif, ένα κατάλοιπο SerThr πλαισιωμένο από ένα κατάλοιπο προλίνης, Thr710 στην PKCε). Επίσης, κατάλοιπα στο C-τελικό υδροφοβικό μοτίβο των c/hPKCs (Ser729 στην PKCε) συχνά φωσφορυλιώνονται από το mTORC2 complex [109]. Οι φωσφορυλιώσεις, αυτές, η ακολουθία των οποίων εξαρτάται από την κατάληψη του ενεργού κέντρου από ATP [110], σταθεροποιούν την ενεργή διαμόρφωση των PKCs και έχουν ως αποτέλεσμα μια πλήρως «έτοιμη» κινάση για ενεργοποίηση. Επιπρόσθετες αυτο- ή trans-φωσφορυλιώσεις από άλλες PKC ισομορφές μπορεί να έχουν μικρότερες επιδράσεις όπως διαφοροποίηση της καταλυτικής ενεργότητας, πρωτεϊνική σταθεροποίηση ή δέσμευση σε άλλες πρωτεΐνες [109]. Συγκεκριμένα για την PKCε, φωσφορυλίωση του καταλοίπου Ser368 στη ρυθμιστική περιοχή από cPKCs υποδηλώνει υψηλό επίπεδο λειτουργικής διασταυρούμενης επικοινωνίας (crosstalk) μεταξύ των μελών της οικογένειας των PKC [111].

1.5.4. Υποκυτταρικός Εντοπισμός

Οι PKCs απαντώνται σε πολλά κυτταρικά διαμερίσματα όπως η πλασματική μεμβράνη, τα μιτοχόνδρια [112, 113], τα ενδοσώματα [114, 115], το Golgi [116] και ο πυρήνας [117]. Ο εντοπισμός τους καθορίζεται από τα ικριώματα στα οποία συμμετέχουν, αλλά και από την εγγενή πληροφορία που περιέχει κάθε ισομορφή, όπως σήμα πυρηνικού εντοπισμού ή πυρηνικής εξόδου (NLS/NES). Ένας τρόπος κυτταρικής μετατόπισης των PKC είναι η ενεργοποίησή τους. Για παράδειγμα, μετά από ενεργοποίηση από DAG, οι c/hPKCs μετατοπίζονται από το κυτταρόπλασμα στην πλασματική μεμβράνη

[118]. Βέβαια, οι διάφορες ισομορφές παρουσιάζουν ιστο-ειδικές λειτουργίες και μάλιστα, ακόμα και στο ίδιο κύτταρο, μετά από ενεργοποίηση από φορβικούς εστέρες, μετατοπίζονται σε διαφορετικά κυτταρικά οργανίδια [119]. Είναι ενδιαφέρον ότι ο εντοπισμός των PKC εκτός από τον ιστό, το κύτταρο και τον τύπο της διέγερσης εξαρτάται και από τη λιπιδική σύσταση της πλασματικής μεμβράνης, η οποία μπορεί να μεταβάλλεται με διαιτητικές αλλαγές [120]. Όλες αυτές οι διαφορές που εξαρτώνται από μοντέλα και ειδικές συνθήκες κάνουν αδύνατη την ολοκληρωμένη ανασκόπηση στον εντοπισμό των PKC και συστήνουν ιδιαίτερη προσοχή στην αναγωγή ευρημάτων ενός συστήματος σε άλλες συνθήκες ή συστήματα.

1.5.5. Λειτουργία

Με την οξεία και αναστρέψιμη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της φωσφορυλίωσης οι PKCs ρυθμίζουν την ενεργότητα και τον υποκυτταρικό εντοπισμό πολλών πρωτεϊνικών υποστρωμάτων τους. Άλλωστε, οι PKCs εντοπίζονται σε πολλαπλά κυτταρικά διαμερίσματα, φωσφορυλιώνοντας μια πληθώρα υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένων μεταγραφικών παραγόντων, υποδοχέων, κανάλια ιόντων, και κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών [83, 93, 96, 99, 122]. Σε πολλές περιπτώσεις, όμως, οι αποδείξεις για άμεση, *in vivo* φωσφορυλίωση υποστρωμάτων από PKC είναι περιορισμένες κι έτσι πολλά μόρια θεωρούνται έμμεσοι στόχοι. Οι PKCs δρουν, επίσης, και ως ικριώματα αφού αλληλεπιδρούν με πολλές πρωτεΐνες ανεξάρτητα από την ενεργότητα κινάσης τους [122, 123].

Μηχανιστικά και φαρμακολογικά σημαντικές πρωτεΐνες που συνδέονται σε PKC είναι οι RICKs (Receptors for Inactive C-Kinases) που λειτουργούν πριν την ενεργοποίηση των PKC και περιορίζουν την πρόσβαση σε υποστρώματα και μεμβράνη, και οι RACKs (Receptors for Activated C-Kinases), οι οποίες σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση των ενεργοποιημένων PKC με την πλασματική μεμβράνη [124]. Μελέτες της Mochly-Rosen και των συνεργατών της στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ PKC και RACK έχουν δείξει ότι μπορούν να σχεδιαστούν με ακρίβεια ειδικοί ενεργοποιητές ή αναστολείς όλων των ισομορφών. Πρόκειται για πεπτίδια 7-8 αμινοξέων για κάθε PKC ή για τα αντίστοιχα RACKs [125, 126]. Έτσι, τα πεπτίδια εV1-2 και ψεRACK, ειδικός αναστολέας και ενεργοποιητής, αντίστοιχα, για την PKCε και ανάλογα

πεπτιδία για άλλες PKC ισομορφές, έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες με μεγάλη επιτυχία [127-129]. Εκτός από την ενεργότητα κινάσης Ser/Thr οι PKCs παρουσιάζουν, ακόμη, ενεργότητα ATPάσης και φωσφατάσης. Το ένζυμο καταλύει μια εξαρτώμενη από συμπαράγοντες και προερχόμενη από υπόστρωμα υδρόλυση του ATP [130] αλλά σε περίσσεια ADP η αντίδραση αντιστρέφεται (δρα ως φωσφατάση) [102].

1.6. Συμμετοχή της PKCε ισομορφής στη Λειτουργία και τη Διαφοροποίηση του Νευρικού Συστήματος

1.6.1. PKCε και Νευρικό Σύστημα

Πειράματα ανοσοϊστοχημείας και *in situ* υβριδοποίησης δείχνουν ότι η PKCε εκφράζεται άφθονα στον υποθάλαμο, τα οσφρητικά φυμάτια (olfactory tubercle) και της νησίδες Calleja, ενώ, παρουσιάζει μεσαία επίπεδα έκφρασης στον εγκεφαλικό φλοιό, τον πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα (anterior olfactory nucleus), τον επικλινή πυρήνα (accumbens nucleus), τον πλάγιο διαφραγματικό πυρήνα (lateral septal nucleus), και σε δομές του ραβδωτού σώματος (striatum) του εγκεφάλου [131]. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της PKCε στον εγκέφαλο, σε σύγκριση με άλλους ιστούς όπως η καρδιά και οι νεφροί, υποδεικνύουν ότι η συγκεκριμένη ισομορφή παίζει σημαντικό ρόλο στο νευρικό σύστημα. Πράγματι, η PKCε εμπλέκεται σε πολλές και σημαντικές διαδικασίες του κεντρικού αλλά και του περιφερικού νευρικού συστήματος, όπως αναφέρονται παρακάτω.

Η PKCε είναι παρούσα στα τερματικά των νευρώνων και εντοπίζεται στις προ-συνάψεις των βρυωδών ινών (mossy fibers), εντοπισμός συνεπής με το ρόλο της στη μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση (Long-Term Potentiation, LTP) των MF-CA3 συνάψεων πυραμιδικών κυττάρων [131, 132]. Πραγματικά, η PKCε των νευρικών τερματικών εμπλέκεται στην εξαρτώμενη από φορβικούς εστέρες ενίσχυση της εξωκύτωσης γλουταμικού οξέως [133] καθώς και την συναπτική ενδυνάμωση [134]. Η προσυναπτική PKCε είναι, επίσης, σημαντική για τη συναπτική ωρίμανση [135].

Ένας ακόμη ρόλος που έχει αποδοθεί στην PKCε, είναι η διαμεσολάβηση της στις δράσεις της αιθανόλης. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι

η ρυθμιζόμενη έκφραση της PKCε στον πρόσθιο εγκέφαλο, την αμυγδαλή και την παρεγκεφαλίδα μυών, στους οποίους έχει αποσιωπηθεί η PKCε, σώζει από την υπερευαισθησία και αποκαθιστά την κατανάλωση αιθανόλης [136].

Η εμπλοκή της PKCε στην ισχαιμική προετοιμασία (preconditioning) εδραιώθηκε σε καρδιακά κύτταρα, με τη χρήση ειδικών πεπτιδικών ενεργοποιητών και αναστολέων [137, 138], και επιβεβαιώθηκε με μοντέλα γονιδιακής αποσιώπησης σε μύες (PKCε knockout mice) [139]. Παρόλο που τα αποτελέσματα, αυτά, αποκτήθηκαν σε ένα μη νευρικό σύστημα, η δράση της PKCε είναι παρόμοια και στους νευρώνες. Ειδικότερα, ο ρόλος της PKCε στη νευρική προετοιμασία (neural preconditioning) εξετάστηκε με τη χρήση ειδικών πεπτιδικών ενεργοποιητών και αναστολέων σε τομές ιππόκαμπου [140, 141] και πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων [142, 143]. Σύμφωνα με αυτές τις μελέτες η ενεργοποίηση της PKCε είναι απαραίτητη για την εξαρτώμενη από NMDA και υποδοχέα της αδενosίνης νευρική προετοιμασία. Ο μηχανισμός, όμως, της PKCε-μεσολαβούμενης προετοιμασίας δεν είναι γνωστός αν και έχει προταθεί ότι σχετίζεται με την ERK [141]. Γίνεται, λοιπόν, κατανοητό ότι η PKCε μπορεί να έχει προστατευτικό ρόλο σε περίπτωση εγκεφαλικού επεισοδίου.

Εκτός από τους νευρώνες του ΚΝΣ, η PKCε εντοπίζεται και σε περιφερικούς νευρώνες όπως τους αλγαισθητικούς (nociceptive neurons). Μάλιστα, η PKCε έχει αναφερθεί ότι παίζει κύριο και εξαιρετικά ειδικό ρόλο στην αλγαισθητική ευαισθητοποίηση [144, 145] και μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο για τον έλεγχο του υποδοχέα της καψαϊκίνης (capsaicin receptor, TRPV1) και τον πόνο [146, 147]. Άλλες λειτουργίες που φαίνεται να εμπλέκεται η PKCε είναι στη ρύθμιση των καναλιών Na⁺ σε νευρώνες ιππόκαμπου [148] (μελέτες σε knockout μύες) και στην εξαρτώμενη από φορβικούς εστέρες έκκριση της πρόδρομης πρωτεΐνης του β-αμυλοειδούς (β-amyloid precursor protein) [149].

1.6.2. PKCε και Διαφοροποίηση Νευρικών κυττάρων

Πολλές μελέτες σε κυτταρικές σειρές νευρικής προέλευσης αλλά και σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων έχουν συσχετίσει τις περισσότερες PKC ισομορφές με τους μηχανισμούς της κυτταρικής επιβίωσης και διαφοροποίησης [150-153]. Στην πλειονότητά τους οι PKCs έχει αποδειχθεί

ότι έχουν θετικό ρόλο στη νευριτική ανάπτυξη, εν τούτοις, μια πρόσφατη μεγάλου βαθμού ανάλυση σε νευρώνες ιππόκαμπου έδειξε ότι οι PKCι και PKCη σκόραραν ως ικανοί αρνητικοί ρυθμιστές της νευριτικής ανάπτυξης [154]. Η PKCε, όμως, είναι η ισομορφή που σχετίζεται πολύ ειδικά με τη διαφοροποίηση των νευρώνων του ΚΝΣ και του ΠΝΣ [99, 121, 150, 151, 153]. Για την ακρίβεια, στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο όρνιθας είναι η βασική ισομορφή που απαντάται σε πρώιμους μετα-μιτωτικούς νευρώνες μόλις αρχίζουν να διαφοροποιούνται [150]. Έτσι, έχει προταθεί ότι η PKCε εμπλέκεται στη λειτουργία των νευριτών. Βρέθηκε ότι η υπερέκφραση της PKCε προάγει την εξαρτώμενη από νευρικό αυξητικό παράγοντα, NGF, νευριτική ανάπτυξη, ενώ η καταστολή της την μπλοκάρει [151]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το φαινόμενο αυτό είναι ανεξάρτητο της καταλυτικής της ενεργότητας αφού έκφραση μόνον της ρυθμιστικής περιοχής έχει το ίδιο αποτέλεσμα [155]. Ο Zeidman και οι συνεργάτες του [156] έδειξαν ότι το σημείο πρόσδεσης σε ακτίνη, που βρίσκεται μεταξύ των C1A και C1B τμημάτων, είναι σημαντικό για τις μορφολογικές αλλαγές στους νευρώνες. Μηχανιστικά, η PKCε ενεργοποιείται από ορμόνες και διαβιβαστές, συμπεριλαμβανομένου και του NGF, αλλάζει διαμόρφωση, και μετατοπίζεται στη μεμβράνη. Εκεί, αλληλεπιδρά με ακτίνη, RhoGAP και PIP2 και προάγει τη νευριτική ανάπτυξη μέσω αναστολής του RhoA-ROCK μονοπατιού, ενεργοποίησης του Cdc42 και κυτταροσκελετικών αναδιατάξεων [157-160]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η PKCε ρυθμίζει, ως ένα βαθμό, και τη διαφοροποίηση των αστροκυττάρων [161]. Τα πολυδύναμα πρόδρομα νευρικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε αστροκύτταρα μετά από επώαση με TPA και υπερέκφραση της PKCε, διαδικασία που παρεμποδίζεται με υπερέκφραση μιας μεταλλαγμένης, ανεπαρκούς ως προς την ενεργότητα κινάσης, μορφής της [161].

1.7. PKCε και Ογκογένεση

Λαμβάνοντας υπόψη την πληθώρα υποστρωμάτων που φωσφορυλιώνουν σε ξεχωριστά στάδια διαφόρων μονοπατιών μεταγωγής σήματος, γίνεται αντιληπτό ότι οι PKCs ελέγχουν πολλαπλές λειτουργίες στο

κύτταρο. Έχει δειχθεί ότι οι PKCs εμπλέκονται στην απευαισθητοποίηση υποδοχέων, τροποποιούν μεμβρανικά γεγονότα, ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων, μεσολαβούν σε ανοσολογικές αποκρίσεις, ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη και σχετίζονται με τη μάθηση και τη μνήμη. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι PKCs συνδέονται και με την καρκινογένεση. Άλλωστε, οι καρκινικοί υποκινητές (π.χ. TPA) επιφέρουν παρατεταμένη ενεργοποίηση του ενζύμου [162]. Η συνεχής ενεργοποίηση των PKCs έχει προταθεί ότι επηρεάζει μακροπρόθεσμα το κύτταρο, μεταβάλλοντας τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση, διαδικασίες που σχετίζονται άμεσα με τη δημιουργία νεοπλασίας [163]. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι η δημιουργία μιας κακοήθειας μπορεί να διευκολύνεται είτε μέσω ενεργοποίησης συγκεκριμένων PKC ισομορφών είτε μέσω διαφορετικού προφίλ έκφρασης σε σύγκριση με τον αρχικό υγιή ιστό. Μάλιστα, το προφίλ αυτό μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με το στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο όγκος [164-166].

Για την PKCε, συγκεκριμένα, πολλές μελέτες έχουν διερευνήσει την εμπλοκή της στις διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού και ογκογένεσης. Άλλωστε η PKCε είναι η πρώτη ισομορφή που αποδείχθηκε ότι σε κάποιους ιστούς συμπεριφέρεται σαν ογκοπρωτεΐνη [167, 168]. Η πρώτη ένδειξη ότι η PKCε μπορεί να εμπλέκεται στην ανάπτυξη κακοήθειας ήρθε από τη μελέτη του Baxter και των συνεργατών του που έδειξαν ότι η συγκεκριμένη ισομορφή είναι συνεχώς ενεργή σε κυτταρική σειρά μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα [169]. Λίγο αργότερα, μελέτες έδειξαν ότι υπερέκφραση της PKCε σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών, από άνθρωπο και επίμυ, προκαλεί ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση, ανάπτυξη σε μαλακό άγαρ, και δημιουργία όγκων σε γυμνά ποντίκια (nude mice) [167, 168]. Η ενεργοποίηση της PKCε μελετήθηκε και σε μοντέλο ξενομοσχεύματος όπου και βρέθηκε ότι είναι ογκογόνος παράγοντας και σε επιθηλιακά κύτταρα του παχέως εντέρου [170, 171]. Η PKCε έχει, ακόμα, σχετιστεί και με άλλες μορφές καρκίνου όπως ο καρκίνος του προστάτη [172], του μαστού [173], των νεφρών [174], και το ακανθωκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος [175]. Κανείς θα πίστευε ότι η PKCε οφείλει την ογκογόνα δραστηριότητά της αποκλειστικά στην καταλυτική της ενεργότητα, ωστόσο, και η ρυθμιστική περιοχή της μπορεί να εμπλακεί και μάλιστα ανεξάρτητα από την καταλυτική. Με τη χρήση αμοιβαίων χιμαιρών, (reciprocal chimeras) των ρυθμιστικών και καταλυτικών περιοχών της PKCε,

δείχθηκε ότι τόσο η καταλυτική όσο και η ρυθμιστική περιοχή προάγει τον καρκινικό μετασχηματισμό των NIH 3T3 ινοβλαστών, εντούτοις, μόνο η καταλυτική περιοχή είναι υψηλής σημασίας για την προκαλούμενη από PKCε ογκογένεση σε γυμνά ποντίκια [176]. Επίσης, η N-τελική περιοχή της PKCε, που περιέχει μέρος της ρυθμιστικής περιοχής της, έχει σχετιστεί με τον καρκίνο του θυρεοειδή [177].

Εκτός από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, η διαταραχή της κυτταρικής προσκόλλησης και κινητικότητας είναι βασικά στοιχεία ενός μεταστατικού φαινοτύπου. Η ικανότητα του καρκινικού κυττάρου να μεταναστεύει είναι ουσιώδης για την εισβολή του όγκου σε παρακείμενους ιστούς αλλά και την εξάπλωση σε μακρινά σημεία. Είναι, πλέον, αποδεκτό ότι η PKCε σχετίζεται με τη διείσδυση και τη μετάσταση των όγκων. Συγκεκριμένα, οι NIH 3T3 ινοβλάστες που υπερεκφράζουν PKCε είναι διεισδυτικοί και παρουσιάζουν μια πολωμένη μορφολογία [178]. Επίσης, αποσιώπηση της PKCε με RNAi μειώνει την *in vitro* διεισδυτικότητα και κινητικότητα [173, 179], και σε προ-κλινικό ζωικό μοντέλο καρκίνου του μαστού παρεμποδίζει τη μετάσταση στον πνεύμονα [173]. Η συσχέτιση, αυτή, φαίνεται λογική μιας και στη ρυθμιστική περιοχή της PKCε υπάρχει μια θέση πρόσδεσης σε ακτίνη και η άμεση αλληλεπίδραση της PKCε με τον κυτταροσκελετό είναι απαραίτητη για την καρκινική διεισδυτικότητα και μεταστατικότητα *in vitro* και *in vivo* [178].

Όσον αφορά στους καρκίνους του νευρικού συστήματος, τα επίπεδα της PKCε έχουν βρεθεί ανεβασμένα σε πρωτογενείς, υψηλού βαθμού (high grade), αστρογλοιακούς, εγκεφαλικούς όγκους [180] αλλά και σε αστροκυτταρικές κυτταρικές σειρές που προέρχονται από καρκίνους του εγκεφάλου. Επιπλέον, υπερέκφραση κυρίαρχα αρνητικής PKCε μορφής παρεμπόδισε τον πολλαπλασιασμό των U-373MG κυττάρων γλοιοβλαστώματος [181]. Υπό το πρίσμα της κυτταρικής κινητικότητας, η PKCε έχει δειχθεί ότι προάγει την κυτταρική μετανάστευση σε κύτταρα γλοιώματος [182, 183]. Μάλιστα, σε δοκιμασίες προσκόλλησης, τα κύτταρα που υπερεκφράζουν PKCε προσκολλούνταν σε λαμινίνη, βιτρονεκτίνη και φιμπρονεκτίνη σε μικρότερους αριθμούς από τους μάρτυρες [183]. Η υπερέκφραση της PKCε είναι, επίσης, υπεύθυνη για τη δημιουργία ελασματοποδίων (lamellipodia).

Ένας, ακόμη, τρόπος που έχει προταθεί ότι η PKCε συνεισφέρει στην ογκογένεση είναι μέσω παρεμπόδισης του κυτταρικού θανάτου- χαρακτηρίζεται, μάλιστα, ως κινάση επιβίωσης. Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η PKCε φαίνεται να αλλάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της (πιθανή ενεργοποίηση) κατά τη διάρκεια της απόπτωσης [184], ενώ υπερέκφρασή της σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες επίμυος παρεμποδίζει την προκαλούμενη από cisplatin απόπτωση [185]. Τέλος, εισαγωγή κυρίαρχα αρνητικής μορφής ή αναστολή της λειτουργίας του γονιδίου της (knockdown) PKCε καθιστά τα κύτταρα γλοιοβλαστώματος ευαίσθητα σε απόπτωση.

Δεκαετίες πειραμάτων έχουν δείξει, με σαφήνεια, ότι οι PKC ισομορφές έχουν διαφορετικούς, πολύπλοκους και πολλές φορές αντίθετους ρόλους στη δημιουργία και ανάπτυξη όγκων. Για παράδειγμα, υπερέκφραση της PKCβ1 σε ινοβλάστες επίμυος είχε ως αποτέλεσμα το μετασχηματισμό των κυττάρων, την ανεξάρτητη από προσκόλληση ανάπτυξή τους και τελικά τη δημιουργία όγκων σε γυμνούς μύες [186]. Ενώ, υπερέκφραση της ίδιας ισομορφής, έκανε τα κύτταρα του καρκίνου του παχέως εντέρου λιγότερο ικανά να σχηματίζουν όγκο σε γυμνούς μύες [187, 188]. Μια ακόμα ισομορφή για την οποία υπάρχουν αντικρουόμενα πειραματικά ευρήματα είναι η PKCδ. Πολλές πειραματικές μελέτες, συμπεριλαμβανομένων και ζωικών μοντέλων καρκίνου του δέρματος [189], υποστηρίζουν ότι η PKCδ είναι ένα αντι-πολλαπλασιαστικό μόριο. Μάλιστα, έχειδειχθεί ότι η έκφραση της PKCδ μπορεί να επαναστρέψει μετασχηματισμένα επιθηλιακά κύτταρα του παχέως εντέρου προς τον φαινότυπο του αγρίου τύπου [190]. Σε αντίθεση με αυτές τις μελέτες, άλλα εργαστήρια έδειξαν ότι η PKCδ προάγει την επιβίωση των κυττάρων του καρκίνου του μαστού και του πνεύμονα [191, 192]. Ακόμα και για την PKCε, τη χαρακτηριζόμενη ως ογκοπρωτεΐνη, υπάρχουν αντικρουόμενα στοιχεία. Η N-τελική περιοχή της PKCε, που περιέχει μέρος της ρυθμιστικής περιοχής, έχει σχετιστεί με την θυρεοειδική ογκογένεση [177]. Σε θυλακιώδες θυρεοειδές καρκίνωμα, το γονίδιο της PKCε είναι πολλαπλασιασμένο και αναδιατεταγμένο και προκαλεί υπερέκφραση μιας κολοβής πρωτεΐνης (Tr-PKCε), που δρα ως κυρίαρχα αρνητική μορφή στην ενεργοποίηση της αγρίου τύπου PKCε. Υπερέκφραση της Tr-PKCε προκάλεσε αύξηση στην πυκνότητα κορεσμού (saturation density) και μείωση στην απόπτωση αλλά δεν είχε καμία επίδραση στην, ανεξάρτητη από

προσκόλληση, ανάπτυξη ή τη δημιουργία όγκων. Τα αποτελέσματα, αυτά, προτείνουν ότι ο κυτταρικός μετασχηματισμός και η καρκινογένεση μπορεί να είναι ασύνδετα. Ωστόσο, στους καρκίνους του θυρεοειδούς, παρόλο που τα επίπεδα της πρωτεΐνης ήταν σημαντικά μειωμένα, δε βρέθηκαν μεγάλης κλίμακας γονιδιακές αναδιατάξεις στο γονίδιο της PKCε, σε σύγκριση με υγιείς ιστούς [165]. Έτσι, παραδόξως, μειωμένη έκφραση της PKCε σχετίζεται με την καρκινογένεση του θυρεοειδή. Αυτές οι ασυμφωνίες αποκαλύπτουν την πολυπλοκότητα των PKC ισομορφών στο πλαίσιο της ογκογένεσης. Η άφθονη βιβλιογραφία επί του θέματος καθιστά σαφές ότι η λειτουργία των PKCs γενικά, αλλά και της PKCε ειδικά, στην ογκογένεση εξαρτάται σημαντικά από το μελετώμενο ιστό και για αυτό θα πρέπει να εξετάζεται στο κατάλληλο κυτταρικό περιβάλλον.

Όπως αναλύθηκε παραπάνω η PKCε πραγματοποιεί πολλές από τις λειτουργίες της στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση στο ΚΝΣ μέσω ενεργοποίησης των Ras GTPασών, μιας και τα συγκεκριμένα μόρια εμπλέκονται σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ελέγχουν τις δύο αυτές κυτταρικές διεργασίες. Η νευροϊνιδίνη, η σημαντικότερη RasGAP, αποτελεί εξαιρετικό κάτωθεν στόχο της PKCε στο Ras/Raf/MAPK μονοπάτι. Η αλληλεπίδραση της PKCε με την νευροϊνιδίνη πιθανώς παίζει ρόλο κλειδί στη ρύθμιση μηχανισμών ογκογένεσης του νευρικού συστήματος. Άλλωστε η νευροϊνιδίνη ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη έχει συνδεθεί άμεσα με τη δημιουργία όγκων στη Νευροϊνωμάτωση τύπου 1, μια συχνή, κληρονομούμενη πάθηση του Κεντρικού και Περιφερικού Νευρικού συστήματος.

1.8. Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 και γονίδιο NF1

1.8.1. Νευροϊνωμάτωση τύπου 1

Η Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (Neurofibromatosis type 1, NF-1) ή αλλιώς ασθένεια του von Recklinghausen, είναι μία γενετική νόσος που προσβάλλει το νευρικό σύστημα και παρουσιάζει πληθώρα κλινικών εκδηλώσεων και ποικίλη εξέλιξη [193]. Αποτελεί μία από τις συχνότερες, επικρατώς κληρονομούμενες ασθένειες, με συχνότητα επίπτωσης 1:3000-

3500 παγκοσμίως, δεν εξαρτάται από εθνικά και φυλετικά χαρακτηριστικά, ενώ, προσβάλλει εξίσου τα δύο φύλα [194]. Κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, αλλά στο 50% των ασθενών παρατηρούνται νέες μεταλλάξεις [195].

Οι ασθενείς με NF-1 εμφανίζουν χαρακτηριστικές μελαγχρωστικές ανωμαλίες στις οποίες περιλαμβάνονται καφεγαλακτόχρες δερματικές κηλίδες, φακίδωση των δερματικών πτυχών και αμαρτώματα της ίριδας ή οζίδια του Lisch [196]. Επιπροσθέτως, ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των παιδιών με NF-1 αναπτύσσουν μαθησιακές δυσκολίες [197]. Στον πίνακα 3 αναφέρονται τα διεθνή διαγνωστικά κριτήρια των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας (National Institutes of Health, NIH) για τη διάγνωση της NF-1.

Έξι ή περισσότερες καφεγαλακτόχρες κηλίδες μέγιστης διαμέτρου άνω των 5 mm σε προεφηβικούς ασθενείς και άνω των 15 mm σε άτομα μετεφηβικής ηλικίας
Δύο ή περισσότερα νευροϊνώματα οποιοδήποτε τύπου ή ένα ή περισσότερα πλεγματοειδή νευροϊνώματα
Μασχαλιαία ή βουβωνική φακίδωση
Ένας όγκος της οπτικής οδού (οπτικό γλοίωμα)
Μία διακριτή οστική αλλοίωση, όπως δυσπλασία του σφηνοειδούς οστού ή λέπτυνση του φλοιού μακρών οστών (με ή χωρίς ψευδάρθρωση)
Ένα συγγενή πρώτου βαθμού με Νευροϊνωμάτωση τύπου 1

Πίνακας 3. **Διεθνή διαγνωστικά κριτήρια των NIH για τη διάγνωση της NF-1.**

Σοβαρές επιπλοκές της νόσου αποτελούν οι όγκοι του νευρικού συστήματος, ευδιάκριτες σκελετικές ανωμαλίες, καρδιαγγειακές δυσλειτουργίες και άλλοι τύποι κακοήθων νεοπλασιών, όπως το φαιοχρωμοκύτωμα και η χρόνια μυελογενής λευχαιμία [198]. Ο πιο συχνά συναπαντώμενος όγκος σε ασθενείς με NF-1 είναι τα νευροϊνώματα του περιφερικού νευρικού συστήματος, τα οποία αποτελούνται από κύτταρα Schwann, ινοβλάστες, περινευρικά και σιτευτικά (mast cells) κύτταρα [199]. Μοριακές αναλύσεις έχουν αποδείξει ότι τα νευροϊνώματα προέρχονται από κύτταρα Schwann τα οποία έχουν υποστεί απώλεια ετερωζυγωτίας στο γονίδιο της Νευροϊνωμάτωσης [200]. Τα επιδερμικά νευροϊνώματα χαρακτηρίζονται ως καλοήθη νεοπλάσματα, είναι συνήθως υποδόρια και σχετίζονται άμεσα με ένα περιφερικό νεύρο [199]. Ο αριθμός τους μπορεί να φτάσει από μερικές εκατοντάδες έως χιλιάδες και παρουσιάζονται στην πλειονότητα των ασθενών. Από την άλλη, τα πλεγματοειδή νευροϊνώματα, τα οποία παρουσιάζονται στο 1/3 των ασθενών με NF-1, εντοπίζονται σε μεγαλύτερο βάθος, είναι διάχυτα, σχετίζονται με πολλαπλά περιφερικά νεύρα, ενώ, στο 10% των περιπτώσεων μπορούν να υποστούν εξαλλαγή προς κακοήθεις όγκους των περιφερικών νευρικών ελύτρων (Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors, MPNSTs) [198].

Οι δεύτεροι πιο συχνά συναπαντώμενοι όγκοι σε ασθενείς με NF-1 είναι τα γλοιοβλαστώματα του ΚΝΣ. Το γλοιοβλάστωμα της οπτικής οδού παρουσιάζεται στο 20% των παιδιών με NF-1, συνήθως μέχρι το έκτο έτος, και είναι ένα πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα σχετικά περιγεγραμμένο με καλοήθη βιολογική συμπεριφορά, που όμως, συχνά, υποστρέφει [201]. Αν και είναι όγκος υψηλής διαφοροποίησης (WHO I), που δεν απαιτεί χημειοθεραπεία, πολλές φορές προκαλεί συμπτώματα, εξαιτίας της πίεσης που ασκεί στους ιστούς που προσβάλλει (οπτικό νεύρο, οπτικό χίασμα και υποθάλαμο), και έτσι τελικά απαιτείται ραδιοθεραπεία ή χημειοθεραπεία. Αυτοί οι ασθενείς, αλλά και άλλοι χωρίς αστροκυτώματα παιδικής ηλικίας, σαν ενήλικες πολύ συχνά παρουσιάζουν διηθητικά αστροκυτώματα ή γλοιοβλαστώματα (WHO II-IV) με πολύ πτωχή πρόγνωση [202].

Πρόσφατα, δείχτηκε ότι σε γλοιώματα του γενικού πληθυσμού, το ποσοστό μετάλλαξης του *NF1* (40%) είναι περίπου σαν του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και παρουσιάζει

απενεργοποιητικές σωματικές μεταλλαγές ή ελλείψεις στο 23% των ανθρώπων που τα αναπτύσσουν [203], επιβεβαιώνοντας το σημαντικό ρόλο του γονιδίου της Νευροϊνωμάτωσης και καθιστώντας το *NF1* ένα bona fide ογκοκατασταλτικό γονίδιο γλοιομάτων (tumor suppressor gene, TSG). Μέχρι σήμερα θεραπεία για τη νόσο δεν έχει βρεθεί. Οι ασθενείς με *NF-1* πρέπει να υπόκεινται σε τακτικές εξετάσεις, οι οποίες καθορίζουν την περαιτέρω διαχείριση των συμπτωμάτων και επιπτώσεων της ασθένειας. Σε περιπτώσεις καλοηθών όγκων, οι οποίοι συμπιέζουν εσωτερικά όργανα (φαινόμενα πίεσης), η αντιμετώπιση είναι χειρουργική. Τα γλοιοβλαστώματα στους ενήλικες ασθενείς είναι συνήθως διάχυτα και για αυτό ανεγχείρητα, ενώ, και για τους άλλους όγκους που εμφανίζονται σε ασθενείς με *NF-1* όπως οι MPNSTs, τα φαιοχρωμοκυτώματα και οι όγκοι του γαστρεντερικού είναι ιδιαίτερα σημαντική η έγκαιρη διάγνωση και η ολική, ει δυνατόν, εκτομή τους πριν δώσουν μεταστάσεις ή εξαπλωθούν σε ζωτικούς ιστούς οπότε και καθίσταται αδύνατη η αφαίρεση τους [204].

Η Νευροϊνωμάτωση στην Ελλάδα δεν έχει λάβει τη δέουσα προσοχή και ακόμα και όταν προκύπτουν νέες διαγνωστικές εξετάσεις και θεραπείες δεν διατίθενται άμεσα στους ασθενείς, που υπολογίζονται σε περισσότερα από 4000 άτομα. Επειδή, δε, ο φαινότυπος της νόσου ποικίλλει, οι ασθενείς συχνά διαγιγνώσκονται λανθασμένα, με τις μαθησιακές δυσκολίες των παιδιών να αναγνωρίζονται και να αντιμετωπίζονται ως δυσλεξία ή αυτισμός. Ακόμα, όμως, και μετά από κλινική διάγνωση της νόσου, δεν υπάρχει η δυνατότητα περαιτέρω μοριακού ελέγχου. Η αδυναμία θεραπείας της νόσου της Νευροϊνωμάτωσης τύπου 1 καθιστά προφανές ότι η μελέτη και περαιτέρω κατανόηση της παθολογίας της ασθένειας είναι ιδιαίτερα σημαντική για την εύρεση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Ιδιαίτερα σημαντική κρίνεται και η διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών δράσης και σηματοδότησης της πρωτεΐνης του γονιδίου της Νευροϊνωμάτωσης (νευροϊνιδίνη, neurofibromin), λόγω του ότι στο μέλλον μπορεί να αποφέρει νέες φαρμακολογικές θεραπείες παραλείποντας τις σημερινές παρεμβατικές μεθόδους αντιμετώπισης της νόσου.

1.8.2. Το γονίδιο NF1

Η Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 προκύπτει από μεταλλαγές στην αλληλουχία ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου του γονιδίου της Νευροϊνωμάτωσης τύπου 1 (Neurofibromatosis type 1 gene, *NF1*) το οποίο πήρε την ονομασία του από την ασθένεια που προκαλεί και εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του ανθρώπινου χρωμοσώματος 17 (17q11.2) όπου αναγνωρίστηκε με κλωνοποίηση θέσης το 1990 [205]. Το *NF1* γονίδιο διαθέτει 60 εξώνια τα οποία εκτείνονται σε περισσότερα από 350 kb γενωμικού DNA και δίνουν εναλλακτικά μετάγραφα mRNA 11-13 kb [206]. Το πρώτο μετάγραφο που ανακαλύφθηκε, το τύπου I, αποτελείται από ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 8457 bp και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 2818 αμινοξέων, με υπολογιζόμενο μοριακό βάρος 327 kDa. Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε νευροϊνιδίνη (neurofibromin) [207]. Από τότε, πολλά εναλλακτικά μετάγραφα του *NF1* έχουν ανιχνευτεί μέχρι σήμερα [208, 209]. Τα δύο καλύτερα χαρακτηρισμένα διαφέρουν στη συμπερίληψη ή αποκλεισμό του εξωνίου 23a που βρίσκεται εντός της περιοχής GRD (GAP Related Domain). Το ονομαζόμενο GRDII μετάγραφο περιλαμβάνει το, μήκους 63bp, εξώνιο 23a που εισάγει τα επιπλέον 21 αμινοξέα στη νευροϊνιδίνη, ενώ, στο GRDI μετάγραφο το εξώνιο αυτό αποκλείεται [210]. Η έκφραση των GRDI και GRDII μεταγράφων φαίνεται να ρυθμίζεται ανάλογα με τον ιστό και το αναπτυξιακό του στάδιο [211-215]. Το mRNA του *NF1* (μετάγραφο τύπου I) εκφράζεται σε όλους τους ιστούς κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Προοδευτικά, τα επίπεδα αυτά πέφτουν στους περισσότερους ιστούς, ενώ, παραμένουν αυξημένα στους νευρώνες, τα κύτταρα Schwann, τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα λευκοκύτταρα [216]. Το μετάγραφο τύπου 2 ή GRDII έχει βρεθεί να έχει μειωμένη καταλυτική ενεργότητα GAP, σε σύγκριση με το μετάγραφο τύπου I, και εκφράζεται σε διαφοροποιημένα κύτταρα και όγκους στον εγκέφαλο [217].

Εκτός από τα μετάγραφα που διαφέρουν στη GRD περιοχή, έχουν αναγνωρισθεί αρκετά ακόμα που διαφέρουν σε άλλες κωδικοποιούμενες περιοχές. Ένα τέτοιο μετάγραφο, περιέχει ένα επιπλέον εξώνιο, το 9b, μεταξύ των εξωνίων 9 και 10a και εκφράζεται αποκλειστικά στον εγκέφαλο [218]. Η έκφραση του συγκεκριμένου μεταγράφου, παραμένει συντηρημένη στο μυ και ως εκ τούτου υποστηρίζει την ιδέα ότι η λειτουργία του, αν και άγνωστη ως

τώρα, είναι σημαντική. Ακόμα ένα γεγονός εναλλακτικού ματίσματος, που συμβαίνει στο 3' άκρο, παράγει ένα μετάγραφο που περιλαμβάνει το εξώνιο 48a και το οποίο παρατηρείται σε αναπτυσσόμενους και ενήλικες σκελετικούς και καρδιακούς μύες [219-221]. Η συγκεκριμένη ιστολογική κατανομή φαίνεται να έχει νόημα μιας και έχει βρεθεί ότι η έκφραση του *NF1* γονιδίου σχετίζεται με τη σωστή ανάπτυξη των μυών, ειδικά στην καρδιά [222]. Τα μετάγραφα που περιέχουν το εξώνιο 48a και όχι το 23a ονομάζονται τύπου 3, ενώ αυτά που περιέχουν και τα δύο 48a και 23a, τύπου 4. Ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον μετάγραφο είναι η N-ισομορφή αφού σε αυτό απουσιάζει εντελώς η GRD περιοχή. Πιο συγκεκριμένα, η N-ισομορφή περιέχει την, μήκους 547 αμινοξέων, αμινο-τελική περιοχή, στερείται τη GRD περιοχή, και περιέχει ακόμα 4 αμινοξέα που βρίσκονται φυσιολογικά στο καρβοξυ-τελικό άκρο [223]. Η έκφραση αυτής της κεντρικά «κολοβής» πρωτεΐνης έχει παρατηρηθεί τόσο σε φυσιολογικούς όσο και καρκινικούς ιστούς εγκεφάλου, όμως η λειτουργία της και ο πιθανός ρόλος της στη ρύθμιση της έκφρασης της νευροϊνιδίνης παραμένει αδιευκρίνιστος [214].

Εξαιρετικής σημασίας, τουλάχιστον για *NF-1* παθολογικούς ιστούς, μετάγραφα είναι αυτά στα οποία συμπεριλαμβάνεται ή απαλείφεται το εξώνιο 43 (ΔΕ43). Το εξώνιο αυτό βρίσκεται στο C-τελικό άκρο του *NF1* και περιλαμβάνει μια λειτουργική αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS) [224]. Τα μετάγραφα που περιλαμβάνουν το NLS είναι συντηρημένα σε θηλαστικά, ψάρια, και όρνιθα αλλά απουσιάζουν από τη δροσόφιλα (μη δημοσιευμένη *in silico* ανάλυση με AlignX, VestroNTI). Η έκφρασή των NLS-μεταγράφων είναι κυρίαρχη σε εμβρυικούς και ενήλικες ιστούς εγκεφάλου, ενώ τα ΔΕ43 μετάγραφα εκφράζονται κυρίως σε ιστούς που δε σχετίζονται με την παθογένεια της Νευροϊνωμάτωσης τύπου 1 [225]. Τα σημαντικότερα μετάγραφα του *NF1* γονιδίου αναφέρονται στον πίνακα 4 [208].

Μετάγραφο	Εξώνιο που προστίθεται ή απουσιάζει	Ιστοί έκφρασης	Σχέση με τη Νευροϊνιδίνη (Τύπου 1)
9br	9br	Μόνο στο ΚΝΣ, μειωμένη έκφραση σε νεοπλάσματα εγκεφάλου	Προσθήκη 10 αμινοξέων
GRDII	23a	Σε όλους τους ιστούς, αυξημένη έκφραση σε νεοπλάσματα εγκεφάλου	Προσθήκη 21 αμινοξέων
Τύπος 3	48a	Σε εμβρυϊκούς και ενήλικες γραμμωτούς μύες (σκελετικούς, καρδιακούς)	Προσθήκη 18 αμινοξέων
Τύπος 4	23a και 48a	Σε εμβρυϊκούς και ενήλικες γραμμωτούς μύες (σκελετικούς, καρδιακούς)	Προσθήκη 21 αμινοξέων στο GRD και 18 αμινοξέων στο καρβοξυ-τελικό άκρο
N-ισομορφή	11 έως και 49	Στο ΚΝΣ και σε νεοπλάσματα εγκεφάλου	Απαλοιφή των αμινοξέων 548-2815
ΔΕ43	43	Κυρίως σε ιστούς που δε σχετίζονται με την παθογένεια της NF-1	Απαλοιφή 41 αμινοξέων

Πίνακας 4. Τα σημαντικότερα μετάγραφα του *NF1* γονιδίου.

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του γονιδίου *NF1* είναι η ύπαρξη τριών γονιδίων στη μη κωδική αλυσίδα του ιντρονίου 27b, που ονομάζονται OMGP [226], EVI2A [227] και EVI2B [228]. Η OMGP (oligodendrocyte myelin glycoprotein) είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται στο ανθρώπινο ΚΝΣ κατά τη διάρκεια της μυελινοποίησης και φαίνεται να λειτουργεί ως μόριο προσκόλλησης. Θεωρείται ένας σημαντικός αναστολέας πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών και των νευροβλαστών *in vitro* [229, 230]. Τα δύο άλλα γονίδια, EVI2A και EVI2B (ecotropic viral integration site), είναι ανθρώπινα ομόλογα των *Env-2A* και *Env-2B* του μύ που εμπλέκονται στην ανάπτυξη λευχαιμίας. Είναι πιθανό ότι τα γονίδια αυτά συνδέονται με τη λευχαιμία που παρουσιάζουν κάποιοι ασθενείς με *NF-1*, ωστόσο, δεν υπάρχουν σαφείς αποδείξεις έως τώρα [231].

1.8.3. Μεταλλαγές στο γονίδιο *NF1*

Το ανθρώπινο γονίδιο *NF1* θεωρείται ογκοκατασταλτικό γονίδιο και έλλειψη της αγρίου τύπου μορφής του μπορεί να προκαλέσει κακοήθεια [232]. Συγκεκριμένα, μεταλλαγές σε αυτό έχουν συσχετιστεί με διάφορες νόσους όπως αναφέρεται παρακάτω:

- Είναι η αιτία της, κληρονομούμενης ασθένειας, Νευροϊνωμάτωσης τύπου 1 (Neurofibromatosis type 1, *NF-1*, OMIM:162200); γνωστή και ως σύνδρομο von Recklinghausen.
- Αποτελούν αιτία της Χρόνιας Μυελογενής Λευχαιμίας (Juvenile Myelomonocytic Leukemia, JMML, OMIM:607785). Κληρονομούμενες μεταλλαγές του γονιδίου *NF1* συνδέουν τη JMML με την *NF-1*.
- Είναι η αιτία για το σύνδρομο Watson (Watson Syndrome, WS, OMIM:193520). Το WS θεωρείται άτυπη μορφή της *NF-1*.
- Αποτελούν αιτία της Οικογενούς Νευροϊνωμάτωσης της Σπονδυλικής Στήλης (Familial Spinal Neurofibromatosis, FSNF, OMIM:162210). Η FSNF θεωρείται εναλλακτική μορφή Νευροϊνωμάτωσης με την εμφάνιση πολλαπλών όγκων στη σπονδυλική στήλη.
- Είναι μία από τις αιτίες του συνδρόμου Νευροϊνωμάτωση-Noonan (Neurofibromatosis-Noonan syndrome, NFNS, OMIM:601321). Το

NFNS χαρακτηρίζεται από συμπτώματα τόσο της NF-1 όσο και του Noonan syndrome (NS).

- Μπορεί να είναι μία αιτία για τον Καρκίνο του Παχέως Εντέρου (Colorectal Cancer, CRC, OMIM:114500).

Η συχνότητα μετάλλαξης του γονιδίου *NF1* είναι μία από τις υψηλότερες που έχει παρατηρηθεί σε ανθρώπινα γονίδια. Ο λόγος για την ιδιαίτερα υψηλή αυτή συχνότητα δεν έχει προσδιοριστεί. Στο γονίδιο *NF1* έχουν ανιχνευτεί περισσότερες από 500 διαφορετικές μεταλλάξεις, από τις οποίες οι περισσότερες είναι μοναδικές για συγκεκριμένες οικογένειες ασθενών. Η πλειοψηφία των μεταλλαγών του *NF1* έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή “κολοβής” (truncated) πρωτεΐνης. Όπως και στην περίπτωση άλλων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην απενεργοποίηση του *NF1* γονιδίου περιλαμβάνουν ενδογονιδιακές μεταλλάξεις, όπως εισαγωγή κωδικονιού λήξης (μη νοηματικές μεταλλάξεις), αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift), λάθη στο μάτισμα (splice-site mutations), αλλαγή νουκλεοτιδίων (παρανοηματικές μεταλλάξεις), μικρές εντός πλαισίου ανάγνωσης απαλοιφές (deletions) και προσθήκες (insertions) και απώλεια ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity) μέσω μερικής ή ολικής απαλοιφής του χρωμοσώματος ή και μιτωτικού ανασυνδυασμού [233]. Τα ποσοστά της κάθε κατηγορίας φαίνονται στον Πίνακα 5 όπως περιγράφονται από δύο διαφορετικές πηγές.

Τύπος Μεταλλαγής	NF-1 Genetic Analysis Consortium (Korf, 1998)	Fahsold et al., 2000
Χρωμοσωμικές ανωμαλίες	1,6%	No appropriate method
Απαλοιφή ολόκληρου του <i>NF1</i> γονιδίου	7,2%	estimated ~10%
Απαλοιφή εξωνίων	15,5%	19,8%
Μικρές ελλείψεις	22,4%	28%
Μεγάλες προσθήκες	1,2%	-
Μικρές προσθήκες	11%	11,5%

Μη-νοηματικές μεταλλαγές	17,5%	10,2%
Παρα-νοηματικές μεταλλαγές	11,8%	10,1%
Μεταλλαγές που επηρεάζουν το μάτισμα του mRNA	10,2%	19,8%
Μεταλλαγές στη 3'-UTR περιοχή	1,6%	-

Πίνακας 5. Ποσοστά των διαφορετικών ειδών μεταλλαγών που απαντώνται στο γονίδιο *NF1*.

Φαίνεται πιθανό ότι όλες οι περιοχές του γονιδίου *NF1* υπόκεινται σε μεταλλαγές σε παρόμοιο βαθμό [234]. Ωστόσο, αν οι αριθμοί των μεταλλαγών κανονικοποιηθούν με το μέγεθος του εξωνίου στο οποίο βρίσκονται, τα εξώνια 4b και 37 ξεχωρίζουν ως θέσεις αυξημένης πυκνότητας μετάλλαξης [234]. Αυτό μπορεί να συμβαίνει εξαιτίας κάποιων δομικών στοιχείων επιρρεπών σε μετάλλαξη όπως μιας μικρής επαναλαμβανόμενης επανάληψης στο εξώνιο 4b [235] και ενός σχεδόν συμμετρικού στοιχείου (quasi-symmetric element) στο εξώνιο 37 [236, 237]. Τα συγκεκριμένα εξώνια, λοιπόν, μπορούν να θεωρηθούν ήσσονος σημασίας «hotspots».

Πάρα πολλά άρθρα στη βιβλιογραφία έχουν περιγράψει μεταλλαγές στο γονίδιο *NF1* και έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν το γονότυπο με το φαινότυπο. Ωστόσο, μια καλά καθορισμένη συσχέτιση δεν έχει επιτευχθεί, εκτός από μια μικρή μειοψηφία περιπτώσεων με μεγάλες γονιδιακές ελλείψεις. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ποικιλία των συμπτωμάτων που παρατηρείται όχι μόνο σε ασθενείς που φέρουν διαφορετικές αλλά ακόμα και σε αυτούς με πανομοιότυπες μεταλλαγές που προέρχονται από διαφορετικές ή και την ίδια οικογένεια [238, 239].

1.8.4. Διαγονιδιακά Μοντέλα Μυών

Από την ανακάλυψη του γονιδίου *NF1* έως σήμερα, έχουν αναπτυχθεί διάφορα διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα προκειμένου να κατανοηθεί ο ρόλος του γονιδίου αυτού. Ομόζυγη απενεργοποίησή του (*Nf1*^{-/-}) σε μύες είχε ως αποτέλεσμα τον θάνατο *in utero* κατά τις εμβρυϊκές μέρες 12,5-13,5 [222] υποδεικνύοντας ότι το γονίδιο αυτό είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη. Μετά από ετερόζυγη απενεργοποίηση του *Nf1* (*Nf1*^{+/-}) οι μύες γεννιούνται υγιείς αλλά στη συνέχεια αναπτύσσουν φαιοχρωμοκύττωμα, λευχαιμία και μαθησιακές δυσκολίες. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι οι *Nf1*^{+/-} μύες, αν και γενετικά μοιάζουν στους ασθενείς με Νευροϊνωμάτωση, δεν αναπτύσσουν σοβαρές επιπλοκές όπως δερμικά ή υποδόρια νευροϊνώματα ή αστροκυτώματα [222, 240, 241].

Υπάρχουν, όμως, και ασθενείς που μπορεί να παρουσιάσουν όγκους εξαιτίας επιπλέον γενετικών αλλοιώσεων. Μάλιστα έχει προταθεί ότι η ανάπτυξη καλοήθων ή/και κακοήθων όγκων σε ασθενείς με Νευροϊνωμάτωση ίσως ακολουθεί την υπόθεση «των δύο χτυπημάτων» (“two-hit” hypothesis) του Knudson, κατά την οποία, σε ετεροζυγώτες ασθενείς, χρειάζεται δεύτερο γενετικό λάθος για να δημιουργηθεί όγκος [242-244]. Το δεύτερο, αυτό, χτύπημα μπορεί να αφορά άλλο γονίδιο ή το έτερο αλληλόμορφο *NF1* οπότε και δημιουργείται απώλεια ετεροζυγωτίας (Loss Of Heterozygosity, LOH). Πειραματικά δεδομένα, από μελέτες σε χιμαιρικά ποντίκια, έχουν δείξει ότι πληθυσμοί *Nf1*^{-/-} κυττάρων εξελίσσονται σε πλεγματοειδή νευροϊνώματα μόνο σε κυτταρικό περιβάλλον με *Nf1*^{+/-} [200]. Το μοντέλο αυτό απέδειξε την αναγκαιότητα της απλοανεπάρκειας των «υποστηρικτικών» κυττάρων στο σχηματισμό των νευροϊνωμάτων, διότι στην περίπτωση που γειτονικά κύτταρα παρουσίαζαν απλοανεπάρκεια, σε όλους τους μύες παρατηρήθηκαν πλεγματοειδή νευροϊνώματα [200]. Όσον αφορά τις επιπλέον μεταλλάξεις σε γονίδια διαφορετικά από αυτό της *NF-1*, όπως το *p53*, αναπτύχθηκε ένα ζωικό μοντέλο για MPNSTs, στο οποίο οι μύες είχαν μεταλλάξεις στα γονίδια *Nf1* και *p53* (*Nf1*^{+/-}, *p53*^{+/-}). Οι μύες αυτοί ανέπτυξαν σαρκώματα και MPNSTs στα κύτταρα που προέρχονταν από τη νευρική ακρολοφία [245]. Το συγκεκριμένο ζωικό μοντέλο κατέδειξε ότι, η κακοήθης εξαλλαγή των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας, εκτός από τη μετάλλαξη του *Nf1*, απαιτεί επιπρόσθετη μετάλλαξη στο *p53* [245].

Έχουν δημιουργηθεί, επίσης, υπό συνθήκη ελλειμματικοί μύες (conditional knockout mice), στους οποίους απουσιάζει το *Nf1* γονίδιο από τα αστροκύτταρα. Οι μύες αυτοί παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού των αστροκυττάρων αλλά δεν εμφανίζουν γλοιώματα [246]. Από την άλλη, ετερόζυγοι μύες (*Nf1*+/-) στους οποίους, ταυτόχρονα, απουσιάζει εντελώς το *Nf1* γονίδιο (*Nf1*-/-) από τα αστροκύτταρα αναπτύσσουν γλοιώματα της οπτικής οδού [247]. Όλα αυτά τα διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα καταδεικνύουν ότι η απώλεια και των δύο αλληλόμορφων (LOH) ή η δόση του γονιδίου είναι σημαντική για την έναρξη παθολογίας και βέβαια ότι οι ιδιότητες της ολικής δομής της πρωτεΐνης είναι απαραίτητες για την φυσιολογική λειτουργία της. Παράλληλα, για την κακοήγη εξαλλαγή ενός νεοπλασματος είναι απαραίτητη η συσσώρευση μεταλλαγών σε άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως το *p53*.

Δυστυχώς, μέχρι σήμερα δεν έχει αναπτυχθεί κάποιο ζωικό μοντέλο για τη Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 που να είναι αντιπροσωπευτικό των παθολογικών χαρακτηριστικών της νόσου στον άνθρωπο.

1.9. Νευροϊνιδίνη

Το γονίδιο της Νευροϊνωμάτωσης, *NF1*, κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 2818 αμινοξέων, τη νευροϊνιδίνη (neurofibromin) [207]. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του cDNA της νευροϊνιδίνης προβλέπει μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 327 kDa [248], που, όμως, σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης, αναγνωρίζεται στα 220-250 kDa, πιθανόν λόγω πρωτεϊνικής αναδίπλωσης [216]. Η νευροϊνιδίνη εκφράζεται σε όλους τους ιστούς αλλά τα πρωτεϊνικά της επίπεδα ποικίλουν ανάλογα με τον ιστό, το στάδιο ανάπτυξης και το στάδιο διαφοροποίησης. Στην ενήλικη ζωή του ανθρώπου εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς σε πολύ χαμηλά επίπεδα, εκτός από τους νευρώνες, τα κύτταρα Schwann, τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα λευκοκύτταρα, στα οποία η έκφραση της παραμένει αυξημένη [216, 224, 249]. Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της Νευροϊνιδίνης του ανθρώπου με την ομόλογη πρωτεΐνη άλλων οργανισμών, όπως των *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Fugu rubripes* και *Drosophila melanogaster* αποκάλυψαν

αμινοξική ομολογία 96%, 97%, 91,5% και 54%, αντίστοιχα [250]. Ιδιαίτερα στην RasGAP περιοχή παρατηρήθηκαν 12 αμινοξέα, τα οποία ήταν απόλυτα συντηρημένα από τη *Drosophila* έως τον άνθρωπο. Μεταλλαγές σε αυτά τα αμινοξέα φαίνεται ότι επηρεάζουν τη δραστικότητα RasGAP αλλά και τη σταθερότητα της πρωτεΐνης [250]. Ακόμη μία εξαιρετικά συντηρημένη αλληλουχία στα σπονδυλωτά είναι το NLS, αλλά δεν εμφανίζεται στην ομόλογη πρωτεΐνη της νευροϊνιδίνης στη *Drosophila* [251, 252].

Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντίσωμα για την ανίχνευση της νευροϊνιδίνης είναι το neurofibromin (D): sc-67 (GRP-D) της εταιρείας Santa Cruz, το οποίο αναγνωρίζει έναν επίτοπο στο C-καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Πειράματα στο εργαστήριο μας αποκάλυψαν ότι επίδραση με TPA στα SHSY5Y κύτταρα νευροβλαστώματος προκαλεί μεταβολή, και συγκεκριμένα μείωση, των επιπέδων της νευροϊνιδίνης, όταν αυτά ανιχνεύονται σε ανοσοσύτωση κατά Western με το αντίσωμα sc-67 [84]. Περαιτέρω ανάλυση, έδειξε ότι το sc-67 αντίσωμα είναι φωσφοευαίσθητο, δηλαδή δεν αναγνωρίζει με την ίδια ειδικότητα τη φωσφορυλιωμένη και τη μη φωσφορυλιωμένη νευροϊνιδίνη, λόγω φαινομένου συγκάλυψης της αντιγονικής θέσης δέσμησης (epitope masking) [84]. Επομένως, η μείωση της ανοσοδραστικότητας του sc-67 αντισώματος αντικατοπτρίζει τη φωσφορυλίωση του C-τελικού άκρου της Νευροϊνιδίνης και όχι τη μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης. Η διαπίστωση αυτή μας έδωσε τη δυνατότητα να μελετήσουμε με έναν εύκολο και ειδικό τρόπο τη φωσφορυλίωση του C-τελικού άκρου της Νευροϊνιδίνης.

1.9.1. Δομή

Το μεγάλο μέγεθος της πρωτεΐνης μαζί με το γεγονός ότι η πλειονότητα των μεταλλαγών που ανιχνεύονται είναι σημειακές, καταδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης στην ανάπτυξη της ασθένειας. Η κατανόηση της κυτταρικής λειτουργίας της νευροϊνιδίνης θα οδηγήσει στην αιτιολόγηση της σχέσης γονότυπου-φαινότυπου όπως επίσης και σε πιθανή θεραπεία της Νευροϊνωμάτωσης. Η μέχρι τώρα γνώση για τη λειτουργία της νευροϊνιδίνης έχει προκύψει κυρίως από πειράματα που βασίστηκαν στην αναγνώριση μοτίβων και προτύπων σε περιοχές της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης, μετά από σχετική κλωνοποίηση, διαμόλυνση σε κύτταρα και ανάλυση των

ιδιοτήτων τους συμπεριλαμβανομένων και κρυσταλλογραφικών μελετών. Συνολικά έχει βρεθεί ότι η νευροϊνιδίνη αποτελείται από τις εξής περιοχές (Σχήμα 5):



Σχήμα 5. Απεικόνιση των περιοχών της νευροϊνιδίνης.

1) CSRD

Πρόκειται για τη Ν-αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης, αμινοξέα 543-909, η οποία είναι πλούσια σε κυστεΐνες και σερίνες (N-terminus Cysteine/Serine Rich Domain, CSRD) [82]. Είναι η περιοχή στην οποία παρουσιάζονται πολλές παρανοηματικές μεταλλαγές που σχετίζονται με την ασθένεια της Νευροϊνωμάτωσης, χαρακτηρίζοντάς την ως ένα ήπιο hot spot μεταλλαξιγένεσης [234]. Η CSRD περιοχή της Νευροϊνιδίνης διαθέτει πολλαπλά αμινοξικά κατάλοιπα που μπορούν να φωσφορυλιωθούν και πειράματα από το εργαστήριο μας έχουν αποδείξει ότι, μετά από επίδραση με EGF, η CSRD περιοχή φωσφορυλιώνεται από την PKC α και η φωσφορυλίωση αυτή αυξάνει τόσο την αλληλεπίδραση της νευροϊνιδίνης με τον κυτταροσκελετό ακτίνης, όσο και τη Ras-GAP δραστηριότητα της GRD περιοχής [83]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν τη συμμετοχή της νευροϊνιδίνης στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού και της κυτταρικής κινητικότητας [83]. Μάλιστα, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η CSRD περιοχή της νευροϊνιδίνης εμπλέκεται ενεργά στην κυτταρική προσκόλληση και τη μετανάστευση, δρώντας ως αρνητικός ρυθμιστής του σηματοδοτικού μονοπατιού Rac1/Pak1/LIMK1/cofilin, ανεξάρτητα της GRD περιοχής [253].

2) GRD

Πρόκειται για μία περιοχή 360 αμινοξέων, αμινοξέα 1235-1451, ομόλογη με την p120Ras-GAP των θηλαστικών (GAP-Related Domain, GRD) [205]. Μεταξύ των RasGAPs, συγκαταλέγονται η p120GAP στα θηλαστικά, οι

IRA1 και IRA2 στο *Saccharomyces cerevisiae*, και η GAP1 στη *Drosophila*. Πράγματι, με την ανακάλυψη του Ras-GAP μοτίβου της Νευροϊνιδίνης, και την επακόλουθη κλωνοποίηση, διαμόλυνση κυττάρων και ανάλυση των ιδιοτήτων του, αποδείχτηκε ότι η νευροϊνιδίνη είναι μία RasGAP πρωτεΐνη *in vitro* και *in vivo* [254], λειτουργώντας ως αρνητικός ρυθμιστής του σήματος που διαμεσολαβείται από το Ras [254].

Οι Ras, GTPάσες που διαμεσολαβούν το σήμα από τους υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης προς ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης, όπως αναφέρθηκε, ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την κυτταρική κινητικότητα και την απόπτωση μέσω πολλών μονοπατιών, μεταξύ των οποίων τα Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt και Ral GTPάσης. Το Ras είναι εμπλουτισμένο στην πλασματική μεμβράνη και τα μεμβρανικά οργανίδια (ενδοπλασματικό δίκτυο και μιτοχόνδρια), όπως και η νευροϊνιδίνη [255]. Διαμέσου της GRD περιοχής της, η νευροϊνιδίνη προάγει τη μετατροπή της ενεργής, συνδεδεμένης με GTP, μορφής του Ras στην ανενεργή, συνδεδεμένη με GDP, μορφή [205, 207, 254]. Συγκεκριμένα, για να σχηματιστεί το σύμπλεγμα Ras-νευροϊνιδίνη, το ενεργοποιημένο Ras δεσμεύεται σε ένα αυλάκι της κεντρικής καταλυτικής περιοχής της νευροϊνιδίνης μέσω αλληλεπίδρασης των περιοχών switch I και II του Ras και ενός δάκτυλου αργινίνης (arginine finger) της νευροϊνιδίνης [256]. Βιοχημικά και δομικά δεδομένα έχουν δείξει ότι αυτή η αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα τη, διεγερμένη από GAP, υδρόλυση του GTP. Η υδρόλυση, αυτή, εξαρτάται: **α)** από τη σταθεροποίηση των καταλοίπων (π.χ. γλουταμίνη-61) στις περιοχές switch I και II που δίνουν στο Ras μια ενζυμικά δεκτική διαμόρφωση και **β)** από τη σταθεροποίηση της κατάστασης μετάβασης στην υδρόλυση του GTP που εκτελείται από το θετικά φορτισμένο δάκτυλο αργινίνης ο οποίος εισέρχεται στο ενεργό κέντρο του Ras. Ο δάκτυλος αργινίνης εξουδετερώνει τα αρνητικά φορτία που αναπτύσσονται στο GTP κατά τη διάρκεια μεταφοράς φωσφόρων [257-260]. Αυξημένη ενεργοποίηση του Ras και των κάτωθεν τελεστών του έχει παρατηρηθεί σε νεοπλάσματα σχετιζόμενα με NF-1 και σε κύτταρα *NF1-/-* [261-263]. Με βάση τα παραπάνω, η νευροϊνιδίνη δρα ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, μιας και η απουσία της έχει ως αποτέλεσμα την απορύθμιση της λειτουργίας του Ras και συνεπώς της κυτταρικής αύξησης.

Η RasGAP είναι η μόνη λειτουργία που έχει αποδοθεί στην νευροϊνιδίνη μέχρι σήμερα [264]. Όμως, η GAP περιοχή της νευροϊνιδίνης αποτελεί μόλις το 13% της πρωτεΐνης και τόσο το ιδιαίτερα μεγάλο μέγεθος της πρωτεΐνης και το γεγονός ότι οι μεταλλαγές που παρουσιάζονται στους ασθενείς βρίσκονται κατά μήκος ολόκληρης της νευροϊνιδίνης, όσο και η πληθώρα βιβλιογραφίας για την αλληλεπίδραση της νευροϊνιδίνης με πολλές πρωτεΐνες, συνηγορούν στην άποψη ότι η νευροϊνιδίνη διαθέτει πρόσθετες βιολογικές λειτουργίες, άγνωστες μέχρι στιγμής, οι οποίες σχετίζονται με τη δράση των άλλων πρωτεϊνικών μοτίβων της και αναπτύσσονται παρακάτω. Παράλληλα έχει ήδη βρεθεί, τουλάχιστον για τις περιοχές CSRD [83] και SEC14 [265] ότι δρουν αλλοστερικά στην GRD περιοχή τροποποιώντας τη RasGAP δραστηριότητα της νευροϊνιδίνης.

3) SEC14-PH

Πρόκειται για μία περιοχή, άνωθεν του C-καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης, με επαναλαμβανόμενες λευκίνες (Leucine Repeat Domain, LRD), στην οποία εντοπίζονται: **α)** μία περιοχή SEC14 [266, 267], αμινοξέα 1539-1735, και **β)** μία περιοχή με ομολογία πλεξτρίνης (pleckstrin homology domain, PH) [267], αμινοξέα 1736-1837. Το SEC14 μοτίβο παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την προσδεδεμένη σε λιπίδια πρωτεΐνη SEC14p του *Saccharomyces cerevisiae* [266, 267] η οποία μεταφέρει και ανταλλάσσει φωσφολιπίδια, μεταξύ μεμβρανών [268]. Μελέτες έδειξαν ότι με τη χρήση λιπιδίων αναστέλλεται η δραστηριότητα RasGAP της νευροϊνιδίνης υποδεικνύοντας ότι η λειτουργία της πρωτεΐνης ως Ras-GTPάσης μπορεί να ρυθμίζεται και από την SEC14, αμινοξέα 1562-1714, περιοχή της Νευροϊνιδίνης [269, 270]. Πολύ πρόσφατες μελέτες από το εργαστήριο μας έδειξαν ότι η SEC14 περιοχή αυξάνει τη Ras-GAP δραστηριότητα της GRDI περιοχής [265], με έναν μηχανισμό ανεξάρτητο από τη δέσμευση λιπιδίων, αλλά οφειλόμενο σε αλλοστερική τροποποίηση, μέσω αλληλεπίδρασης της SEC14 με το Ras [265]. Παράλληλα, η SEC14 περιοχή αλληλεπικαλύπτεται από μία περιοχή που περιέχει 4 μοτίβα πρόσδεσης με καβεολίνες, αμινοξέα 1601-2110 [271], πρωτεΐνες που μέσω μικροδομών της κυτταρικής μεμβράνης πλούσιες σε χοληστερόλη, των λιπιδικών σχεδίων, προσδένονται σε σηματοδοτικά μόρια όπως το Ras [272, 273].

4) CTD

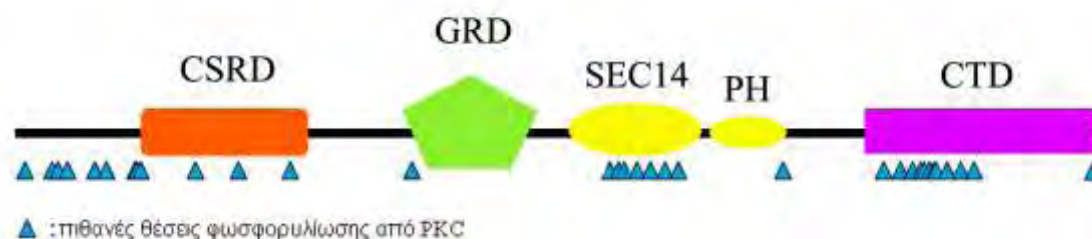
Πρόκειται για την C-καρβοξυτελική περιοχή (C-Terminal Domain, CTD), αμινοξέα 2260-2818, στην οποία εντοπίζεται η λειτουργική και συντηρημένη αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS, αμινοξέα 2555-2571) [209, 224] της νευροϊνιδίνης. Η, ως τότε, κυτταροπλασματική νευροϊνιδίνη βρέθηκε για πρώτη φορά στον πυρήνα το 2001 και υποτέθηκε ότι διαθέτει λειτουργικό μοτίβο NLS [224]. Ένα χρόνο μετά, αναγνωρίστηκε ένα εναλλακτικό μετάγραφο του γονιδίου της νευροϊνιδίνης, το NF1-ΔΕ43, από το οποίο απουσιάζει το εξώνιο 43 και άρα το NLS και δεν εντοπίζεται στον πυρήνα, προτείνοντας ότι ο εντοπισμός της Νευροϊνιδίνης ρυθμίζεται στο επίπεδο του mRNA, με εναλλακτικό μάτισμα [209]. Μάλιστα, το NF1-ΔΕ43 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο συκώτι, τους σκελετικούς μύες, τους νεφρούς, τον πλακούντα και τους πνεύμονες [209], όλοι ιστοί που δεν εμπλέκονται στην παθολογία της NF-1, αναδεικνύοντας τον πυρηνικό εντοπισμό της νευροϊνιδίνης ως ιδιαίτερα σημαντικό στα νευρικά κύτταρα.

1.9.2. Φωσφορυλίωση από PKC

Μία δεύτερη ομάδα από σημαντικές παρατηρήσεις για τη νευροϊνιδίνη προέρχονται από μελέτες των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που ρυθμίζουν τη λειτουργία της, όπως οι φωσφορυλιώσεις. Η νευροϊνιδίνη, έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνεται σε πολλαπλά κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης [274]. Οι κινάσες που φαίνεται να εμπλέκονται στη φωσφορυλίωση της είναι η PKA [82] και οι PKCs [83, 83, 224]. Παλαιότερες μελέτες, έδειξαν ότι οι περιοχές CSRD και CTD φωσφορυλιώνονται *in vitro* από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), φαινόμενο που εντείνεται με την προσθήκη της ουσίας forskolin, που ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση [82]. Η φωσφορυλίωση από PKA φαίνεται να προάγει την σύνδεση της CTD περιοχής της νευροϊνιδίνης με την πρωτεΐνη 14-3-3 [275], αλληλεπίδραση που ρυθμίζει αρνητικά την RasGAP δραστηριότητά της [275].

Εν τούτοις, τα *in vitro* πειραματικά δεδομένα PKA εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης, δείχνουν ότι υπάρχουν και άλλες κινάσες οι οποίες φωσφορυλιώνουν διαφορετικά αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία, έπειτα από χορήγηση TPA ή EGF, δεν ανταποκρίνονταν σε αναστολείς της PKA [82]. Πράγματι, μετέπειτα μελέτες απέδειξαν την άμεση φωσφορυλίωση

της νευροϊνιδίνης από PKCα και PKCε σε νευρώνες και κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος και γλοιοβλαστώματος [83]. Συγκεκριμένα, η εξαρτώμενη από EGF ενεργοποίηση της PKCα, σε νευρώνες και αστροκύτταρα, επέφερε τη φωσφορυλίωση σερινών της CSRD περιοχής της νευροϊνιδίνης και οδήγησε σε αλλοστερική ενεργοποίηση της δραστηριότητας RasGAP, ενώ, αύξησε και την αλληλεπίδραση της νευροϊνιδίνης με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, δημιουργώντας ένα αρνητικό κύκλωμα ανάδρασης στο Ras [83]. Εκτός από τη CSRD περιοχή [83], η νευροϊνιδίνη έχει θέσεις φωσφορυλίωσης από PKC και στη C-τελική της περιοχή [84 και Σχημα 6]. Το κατάλοιπο Ser2808 στη C-ουρά της νευροϊνιδίνης είναι μια ειδική θέση φωσφορυλίωσης από PKC και η φωσφορυλίωσή του συσχετίζεται καλά με ενισχυμένη μεταγωγή σήματος μέσω του Ras/ERK μονοπατιού σε SH-SY5Y κύτταρα νευροβλαστώματος, μετά από επώαση με TPA [84]. Φωσφορυλίωση στην ίδια θέση πιθανώς σχετίζεται και με την πυρηνο-κυτταροπλασματική μεταφορά της νευροϊνιδίνης [84].



Σχήμα 6. Πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης των διαφόρων περιοχών της νευροϊνιδίνης από PKC.

Είναι ενδιαφέρον ότι μελέτες σε κύτταρα ή όγκους γλοιοβλαστώματος έχουν δείξει ότι η PKCα προάγει την -εξαρτώμενη από πρωτεάσωμα- αποδόμηση της νευροϊνιδίνης και ως εκ τούτου τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αφού η RasGAP ενεργότητά της είναι ανεπαρκής για να ελέγξει το Ras [276]. Σε έντονη αντίθεση, η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης, από PKC, σε μη καρκινικά κύτταρα όπως μελανοκύτταρα [277] και νευρώνες [83] προσφέρει στην πρωτεΐνη αυξημένη σταθερότητα.

Συμπερασματικά, είναι φανερό ότι η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης από PKC σε διαφορετικά αμινοξικά κατάλοιπα, ρυθμίζει αλλοστερικά τη RasGAP ενεργότητά της, επηρεάζει την αλληλεπίδρασή της με άλλες

πρωτεΐνες και τον κυτταροσκελετό, μεταβάλλει την αφθονία της στο κύτταρο και, πιο σημαντικά, έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της λειτουργίας της.

1.10. Συμμετοχή της Νευροϊνιδίνης στη Διαφοροποίηση και την Ογκογένεση

1.10.1. Διαφοροποίηση

Υπερέκφραση του ενεργοποιημένου Ras έχει συσχετιστεί με κυτταρικό μετασχηματισμό και ογκογένεση, εν τούτοις, σε πρωτογενή κύτταρα επάγει κυτταρική γήρανση ή παύση της κυτταρικής ανάπτυξης [278, 279]. Έτσι, παρατεταμένη ενεργοποίηση του Ras/Raf/ERK μονοπατιού μεταγωγής σήματος προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου σε καλλιεργούμενα κύτταρα Schwann [278, 280], ενώ, τα *NF1*^{-/-} κύτταρα Schwann παρουσιάζουν μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού *in vitro* [262] και είναι συνεπώς, ανίκανα να δημιουργήσουν όγκο. Γίνεται, λοιπόν, κατανοητό ότι αυξημένη μεταγωγή σήματος από το Ras προκαλεί αποδιαφοροποίηση και μετασχηματισμό των κυττάρων Schwann, αλλά υπέρμετρη μεταγωγή σήματος από το Ras εμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Είναι σαφές ότι η ποσότητα της νευροϊνιδίνης -και συνεπώς του ενεργοποιημένου Ras- αλλά και η διάρκεια ενεργοποίησης -φωσφορυλίωση από PKC- καθορίζουν το βιολογικό αποτέλεσμα του MAPK μονοπατιού.

Στοιχεία για το συγκεκριμένο ρόλο της νευροϊνιδίνης στη νευρωνική διαφοροποίηση προκύπτουν από αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι η έκφρασή της είναι αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη στο ΚΝΣ και τα γάγγλια ραχιαίας ρίζας εμβρύων μύς και όρνιθας και μάλιστα η κορύφωση της έκφρασής της συμπίπτει με την έναρξη της νευρωνικής διαφοροποίησης [224, 281]. Μελέτες σε μύες που η νευροϊνιδίνη έχει μηδενική έκφραση, μετά από γενετική αφαίρεση κεντρικών εξωνίων που καθιστούν την πρωτεΐνη ασταθή (λειτουργικό knockout), έχουν αποκαλύψει το σημαντικό ρόλο της νευροϊνιδίνης στην εξάρτηση των νευρώνων του ΠΝΣ από νευροτροφίνες [281]. Συγκεκριμένα, μεγαλύτεροι αριθμοί αισθητικών και συμπαθητικών νευρώνων επιβιώνουν και συνεχίζουν να διαφοροποιούνται, απουσία NGF, στην καλλιέργεια [281, 282], με έναν εξαρτώμενο από Ras τρόπο [282].

Ανάλυση σε μοντέλο PC12 κυττάρων, μετά από αποσιώπηση της νευροϊνιδίνης με siRNA ή υπερέκφραση κυρίαρχα αρνητικών πλασμιδίων, απέφερε κάπως αντιφατικά αποτελέσματα. Σε μία μελέτη, η αποσιώπηση της νευροϊνιδίνης δεν επηρέασε την NGF-εξαρτώμενη διαφοροποίηση αλλά κατέστησε ικανό τον EGF να προάγει μερική διαφοροποίηση [57]. Σε άλλες μελέτες, υπερέκφραση του κυρίαρχα αρνητικού πλασμιδίου, που αυξάνει τα επίπεδα του RasGTP και της pERK, ή αποσιώπηση με siRNA της νευροϊνιδίνης παρεμπόδισε την NGF-εξαρτώμενη διαφοροποίηση [283, 284]. Αυτά τα αποκλίνοντα αποτελέσματα μπορεί να προέρχονται από διαφορές στην περίοδο αποσιώπησης με siRNA, στο βαθμό καταστολής της νευροϊνιδίνης, και στις συγκεντρώσεις και τους χρόνους της επώασης με NGF. Αυτές οι μελέτες αποδεικνύουν μια μεταμεταφραστικά τροποποιημένη, αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη, κινητή πρωτεΐνη, η οποία -υπό τον έλεγχο της PKC- συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια, ελέγχοντας τόσο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και τη διαφοροποίηση.

1.10.2. Ογκογένεση

Ασθενείς με μεταλλαγές στο γονίδιο *NF1* παρουσιάζουν προδιάθεση για μια σειρά από κακοήθειες του Κεντρικού και του Περιφερικού νευρικού συστήματος. Η συχνή εμφάνιση όγκων αποδίδεται στην ογκοκατασταλτική ιδιότητα της νευροϊνιδίνης, να απενεργοποιεί τη σηματοδοτική ογκοπρωτεΐνη Ras η οποία ελέγχει τη δραστικότητα των MAPK σηματοδοτικών ενδοκυττάρων μονοπατιών. Ογκογόνες μεταλλαγές στο γονίδιο του Ras και μειωμένη ή ανύπαρκτη νευροϊνιδίνη ευνοούν την ενεργή μορφή p21Ras με αποτέλεσμα τη μόνιμη διέγερση του Raf/MEK/ERK μονοπατιού που οδηγεί σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό [285]. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι απώλεια της νευροϊνιδίνης σχετίζεται με υψηλά επίπεδα RasGTP σε αρκετούς τύπους καρκίνου [261, 262, 286-291]. Είναι ενδιαφέρον, ότι μειωμένη (*NF1+/-*) ή ανύπαρκτη (*NF1-/-*) έκφραση νευροϊνιδίνης σε νευρικά βλαστικά κύτταρα (neural stem/progenitor cells, NSCs) καταλήγει σε ουσιαδώς μειωμένο πολλαπλασιασμό *in vitro*, ως συνέπεια της διαταραχής στη ρύθμιση του Ras [204]. Συγκεκριμένα τα (*NF1-/-*) κύτταρα είχαν, επιπλέον, ανωμαλίες στη διαφοροποίηση και πλεονεκτήματα επιβίωσης έναντι των NSCs αγρίου τύπου [204]. Εκτός από το MAPK μονοπάτι, το Ras ενεργοποιεί και άλλα μόρια

τελεστές όπως την κινάση φωσφατυδιλινοσιτόλης 3 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K), το Rac (rho family, small GTP-binding protein Rac1) και το διεγέρτη αποσύνδεσης από GDP Ral (GDP-dissociation stimulator, Ral-GDS), όλα μόρια που σχετίζονται με πολλαπλασιασμό ή αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού [292].

Εκτός, όμως, από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, η διαταραχή της κυτταρικής προσκόλλησης και κινητικότητας, μέσω αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού, είναι βασικά στοιχεία του καρκινικού μετασχηματισμού των κυττάρων. Η νευροϊνιδίνη έχει βρεθεί ότι συνδέεται στις συνδεκάνες [255], διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση και τη διακυτταρική μεταγωγή σήματος [293, 294]. Μάλιστα, σε νευρώνες ιππόκαμπου, το σηματοδοτικό μονοπάτι νευροϊνιδίνης-PKA διαμεσολαβεί στη μεταγωγή σήματος κάτωθεν της συνδεκάνης-2 [295]. Η ίδια μελέτη έδωσε ενδείξεις για την εμπλοκή της νευροϊνιδίνης στο σχηματισμό των δενδριτικών ακάνθων [295]. Η πρόσδεση της νευροϊνιδίνης στις συνδεκάνες, παρέχει άλλον ένα πιθανό μηχανισμό για τον εντοπισμό της σε ειδικές μοριακές μικροδομές, στις οποίες συνεντοπίζονται υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης και άλλα μόρια μεταγωγής σήματος. Μια από τις σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις της νευροϊνιδίνης είναι με τον κυτταροσκελετό, αφού, έχει βρεθεί να σχετίζεται και με τα τρία βασικά συστήματά του, δηλαδή, τους μικροσωληνίσκους, τα ινίδια ακτίνης και τα ενδιάμεσα ινίδια. Αρχικά, διαπιστώθηκε ότι η νευροϊνιδίνη αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους τουμπουλίνης *in vitro* [296] και *in vivo* [297], και η αλληλεπίδραση αυτή μειώνει τη RasGAP δραστικότητα της [296]. Μετέπειτα μελέτες απέδειξαν ότι η αλληλεπίδραση της νευροϊνιδίνης με τον κυτταροσκελετό είναι αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη, τουλάχιστον σε νευρώνες, αφού στα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης τελεγκεφαλικών νευρώνων, η νευροϊνιδίνη συνεντοπίζεται με τα ινίδια ακτίνης, ενώ, μετέπειτα ο συνεντοπισμός αυτός μετατοπίζεται προς τη τουμπουλίνη, υποδεικνύοντας ότι η νευροϊνιδίνη παίζει σημαντικό ρόλο στη νευρωνική ανάπτυξη [224]. Πιο σημαντικά, έχει αποδειχθεί ότι η αλληλεπίδραση της νευροϊνιδίνης ελέγχεται από την PKC, αφού PKC-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης επάγει την αλληλεπίδρασή της με την ακτίνη σε νευρώνες [83]. Η αλληλεπίδραση της Νευροϊνιδίνης με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς στην ίδια μελέτη

οι συγγραφείς κατάφεραν, μετά από μείωση της δραστηριότητας της PKCa (24 ώρες έκθεση των κυττάρων σε TPA), να αναστρέψουν το μη μιτωτικό φαινότυπο των C62B κυττάρων γλοιώματος σε μιτωτικό μετά από επίδραση με EGF [83]. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι η μείωση της νευροϊνιδίνης, ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι Rho-ROCK-LIMK2, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την εξαρτώμενη από φωσφορυλίωση απενεργοποίηση της cofilin, τροποποιώντας με αυτόν τον τρόπο τον κυτταροσκελετό των ινιδίων ακτίνης προς ιδιαίτερα διηθητικό φαινότυπο σε κύτταρα HeLa και HT1080 [298]. Τα αποτελέσματα αυτά, κατέδειξαν ότι η νευροϊνιδίνη σχετίζεται τόσο με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ως RasGAP, όσο και με την κυτταρική μετανάστευση, κομβικές διαδικασίες που διαταράσσονται κατά τη δημιουργία νεοπλασίας [298].

1.11. Πυρρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση της Νευροϊνιδίνης

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της Νευροϊνιδίνης ποικίλλει στους διάφορους τύπους κυττάρων και μπορεί να εκτείνεται από τη πλασματική μεμβράνη μέχρι τον πυρήνα. Ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, έχει βρεθεί στην πλασματική μεμβράνη [255], στα κυτταρικά οργανίδια, όπως, το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο [224], στα μιτοχόνδρια [299], τα μελανοσώματα [300] και τον κυτταροσκελετό [224]. Επί σειρά ετών, η νευροϊνιδίνη αντιμετωπιζόταν από τους ερευνητές ως μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη. Για πρώτη φορά το 2001, αποδείχθηκε η ύπαρξη της νευροϊνιδίνης στον πυρήνα νευρώνων εγκεφαλικού φλοιού και, μάλιστα, ότι αυτή εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο του νευρώνα [224]. Πράγματι, σε τερματικά διαφοροποιημένους νευρώνες που δεν διαιρούνται πλέον, η νευροϊνιδίνη εντοπίζεται κατ' εξοχήν στον πυρήνα ενώ το κυτταροπλασματικό της κλάσμα προσδένεται στους μικροσωληνίσκους. Αποδείχθηκε, λοιπόν, ότι η προβλεπόμενη με βιοπληροφορική προσέγγιση NLS αλληλουχία, στην πρωτοταγή ακολουθία της νευροϊνιδίνης, είναι λειτουργική [224]. Μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι το εναλλακτικό μετάγραφο ΔΕ43 της νευροϊνιδίνης, που λείπει το NLS, εκφράζεται σε ιστούς, οι οποίοι δεν εμπλέκονται στην παθολογία της NF-1 [209]. Πρόσφατες μελέτες από το εργαστήριό μας, έδειξαν ότι στα κύτταρα

νευροβλαστώματος SH-SY5Y ο πυρηνικός εντοπισμός της νευροϊνιδίνης ρυθμίζεται από τη φωσφορυλίωση της, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης τους, μετά από παρατεταμένη ενεργοποίηση της PKC [84]. Μάλιστα, η φωσφορυλίωση αυτή συμβαίνει στο κατάλοιπο Ser2808 του C-τελικού άκρου από την PKC. Αυτή είναι η πρώτη φορά που αποδεικνύεται ότι η νευροϊνιδίνη μετακινείται ενεργά μέσα στο κύτταρο ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, εν τούτοις, τόσο ο ρόλος της πυρηνο-κυτταροπλασματικής της διακίνησης όσο και η λειτουργία της στον πυρήνα παραμένουν άγνωστα.

Ο ρόλος της νευροϊνιδίνης στον πυρήνα και η σημασία της πυρηνο-κυτταροπλασματική της διακίνησης δεν έχει αποσαφηνιστεί, ακόμα, και έχει προταθεί ότι η λειτουργία αυτή είναι εντελώς διαφορετική από τη λειτουργία της στο κυτταρόπλασμα, όπως συμβαίνει με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PTEN [21]. Η PTEN, στο κυτταρόπλασμα, είναι το κεντρικό μόριο που ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι σηματοδότησης της PI3K, ενώ, στον πυρήνα αλληλεπιδρά με πυρηνικές πρωτεΐνες και χρωμοσωμικό DNA, παίζοντας ρόλο στη χρωμοσωμική σταθερότητα, την επισκευή βλαβών του DNA και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου [21]. Η είσοδος της νευροϊνιδίνης στον πυρήνα γίνεται μέσω αναγνώρισης του NLS μοτίβου που διαθέτει, από τον NLS υποδοχέα, ιμφορτίνη α/β . Για τον τρόπο που εξέρχεται η νευροϊνιδίνη από τον πυρήνα δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα. *In silico* μελέτη της αλληλουχίας της νευροϊνιδίνης προβλέπει την ύπαρξη δύο υποθετικών αλληλουχιών NES της μορφής [L]-xx-[LIVFM]-xx-[L]-x-[LI] στο τέλος της PH περιοχής της (LLNIALLNL, αμινοξέα 1831-1842) και στην αρχή της C-τελικής περιοχής της (LHTLDSLRI, αμινοξέα 2321-2335) ωστόσο, ως σήμερα, δεν έχει εξεταστεί αν οι αλληλουχίες αυτές είναι λειτουργικές. Όσο για τη ρύθμιση της πυρηνο-κυτταροπλασματικής της διακίνησης, όπως αναφέρθηκε, η PKC εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της C-τελικής περιοχής της νευροϊνιδίνης φαίνεται να σχετίζεται με τον υποκυτταρικό εντοπισμό της [84]. Υποθέτουμε ότι η πυρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση έχει ιδιαίτερα σημαντική βιολογική σημασία για τη μεταγωγή σήματος διαμέσου της νευροϊνιδίνης και είναι πιθανό να οδηγήσει στην αποκάλυψη του ρόλου της νευροϊνιδίνης στον πυρήνα.

Συνοψίζοντας, με δεδομένα το μεγάλο μέγεθος της πρωτεΐνης, τη στενή συσχέτιση της με τις υποκυτταρικές δομές σε συνέχεια με τον πυρήνα και μέσα στον πυρήνα, τα πειραματικά δεδομένα μας από τις μελέτες στο μόριο της και βέβαια τις δυσλειτουργίες που έχουν τα κύτταρα των ανθρώπων με NF-1, έχουμε δημιουργήσει την υπόθεση ότι η νευροϊνιδίνη, πέρα από το ρόλο της ως RasGAP, πρέπει να έχει και επιπλέον πυρηνικούς ρόλους που μπορεί να σχετίζονται με την οργάνωση σηματοδοτικών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων που σχετίζονται με διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό και ρυθμίζονται από την PKCε. Έτσι, στην περίπτωση της μεταλλαγμένης μορφής της νευροϊνιδίνης ή μειωμένων επιπέδων νευροϊνιδίνης ή μη φυσιολογικής μετακίνησης της, μπορεί να ασκηθεί πίεση για μη φυσιολογική μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ή στη διαφοροποίησή τους.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η πλειονότητα των καρκίνων του νευρικού συστήματος δημιουργείται από μεταλλαγές στην αλληλουχία ογκοκατασταλτικών γονιδίων τα οποία συμμετέχουν σε πληθώρα μονοπατιών μεταγωγής σήματος και ρυθμίζουν διαδικασίες που σχετίζονται με την καρκινογένεση όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η κυτταρική προσκόλληση. Το μονοπάτι Ras/Raf/MAPK είναι ένα ζωτικής σημασίας μονοπάτι μεταγωγής σήματος, στο οποίο λαμβάνει μέρος μια πολύ σημαντική, σχετιζόμενη με καρκινικό σύνδρομο, ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη η νευροϊνιδίνη. Το Ras/ERK μονοπάτι ρυθμίζει δύο «αντίθετες» κυτταρικές διαδικασίες, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό, διατάραξη των οποίων σχετίζεται άμεσα με την καρκινογένεση. Θεωρώντας τις PKC και τη νευροϊνιδίνη σημαντικούς ρυθμιστές του μονοπατιού και του βιολογικού αποτελέσματός του εξετάσαμε το ρόλο της PKCε και της νευροϊνιδίνης καθώς και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης στις θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού.

Ο πρώτος στόχος, λοιπόν, ήταν η διαλεύκανση της σημασίας ενεργοποίησης καθώς και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις της PKCε στη διαφοροποίηση καρκινικών σειρών του νευρικού συστήματος. Για το σκοπό αυτό, αρχικά, εξετάστηκαν οι καρκινικές ιδιότητες των κυττάρων κακοήθους όγκου των περιφερικών νευρικών ελύτρων μετά από φαρμακολογική ενεργοποίηση της ενδογενούς PKCε και στη συνέχεια μελετήθηκε το Ras/MAPK μονοπάτι μεταγωγής σήματος και η ρύθμισή του από την PKCε κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης κυττάρων νευροβλαστώματος. Στα πλαίσια του στόχου αυτού κατασκευάστηκαν διπλά σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές επιθηλιακής και νευρικής προέλευσης που επαγόμενα εκφράζουν την PKCε και την κυρίαρχα αρνητική μορφή της.

Επόμενος βασικός στόχος της διατριβής ήταν να διευκρινιστεί η σημασία της φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης από την PKCε σε μεταμιτωτικό, τερματικά διαφοροποιημένο περιβάλλον. Η επίτευξη του στόχου έγινε με τη χρήση πρωτογενών καλλιιεργειών φλοιικών νευρώνων όρνιθας και φαρμακολογικές προσεγγίσεις.

Τελικός σημαντικός στόχος ήταν η μελέτη του ρόλου της νευροϊνιδίνης στον πολλαπλασιασμό καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων γλοίας και η ρύθμιση της από PKCε-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση. Ο στόχος επιτεύχθηκε με μελέτη της αφθονίας, των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, του υποκυτταρικού εντοπισμού και της κατάστασης φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης σε συγχρονισμένους πληθυσμούς κυττάρων γλοιοβλαστώματος και αστροκυττάρων.

Η διαλεύκανση της εμπλοκής της νευροϊνιδίνης στις διαδικασίες της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού καθώς και η ρύθμισή της από την PKCε θα προσφέρουν σημαντική νέα γνώση σχετικά με την ανάπτυξη και την εξέλιξη των καρκίνων του νευρικού συστήματος, η οποία με τη σειρά της μπορεί να αποτελέσει έναυσμα για την ανάπτυξη νέων φαρμακολογικών στόχων.

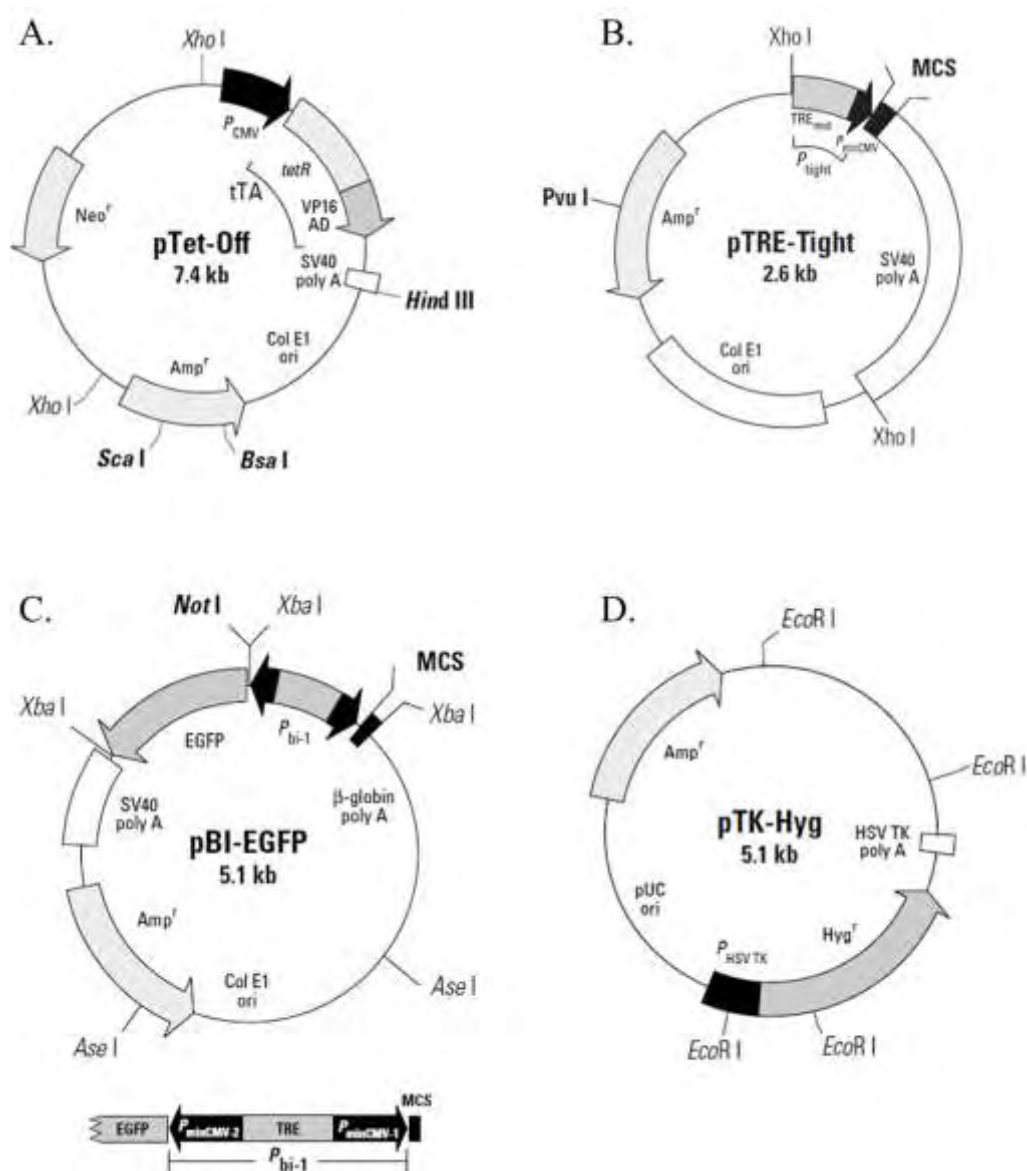
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων έκφρασης και βακτηριακές καλλιέργειες

2.1.1. Πλασμιδιακοί φορείς

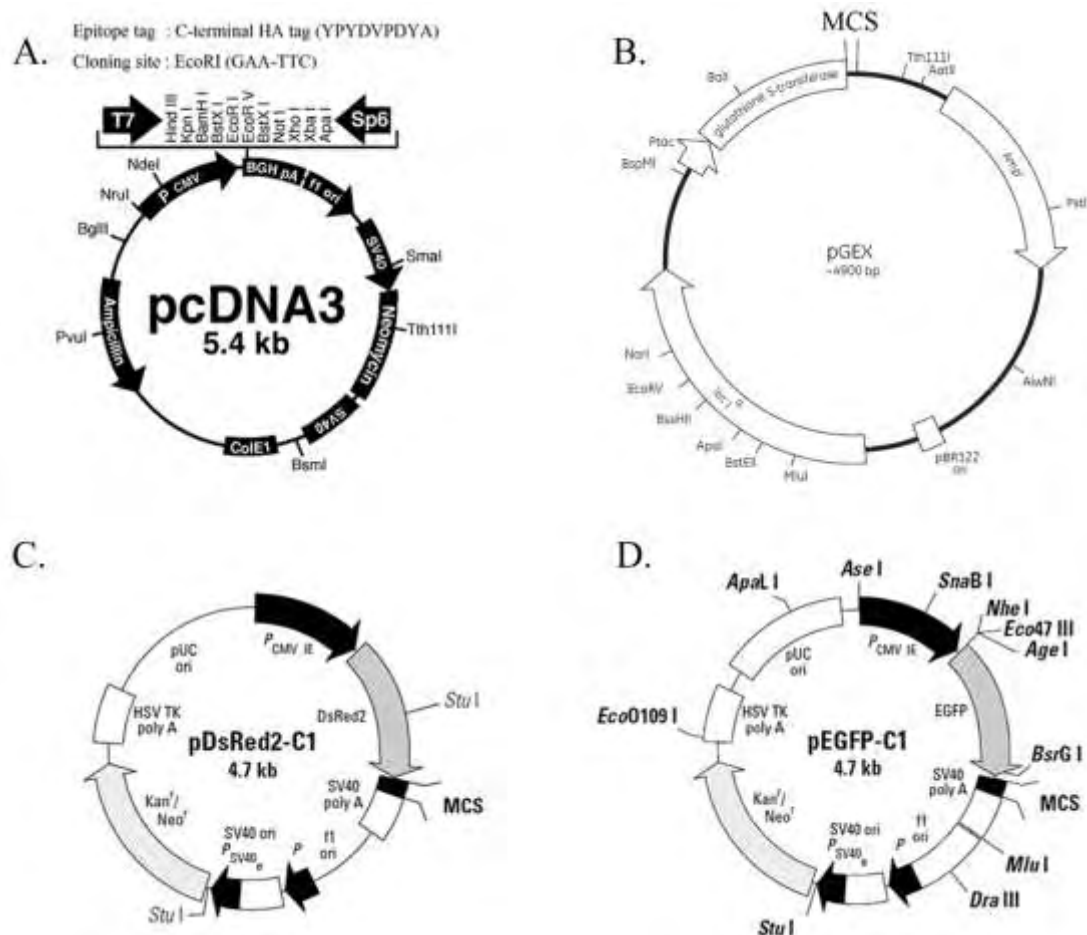
Τα πλασμίδια είναι δίκλωνα και συνήθως κυκλικά μόρια DNA, ξεχωριστά από το χρωμοσωμικό DNA, που μπορούν να αντιγράφονται αυτόνομα σε κατάλληλους ξενιστές. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται στη γενετική μηχανική ονομάζονται φορείς (vectors), χρησιμοποιούνται για να πολλαπλασιάζουν ή να εκφράζουν συγκεκριμένα γονίδια και είναι εμπορικά διαθέσιμα από διάφορους κατασκευαστές. Το γονίδιο ενδιαφέροντος κλωνοποιείται σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα που φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό. Συγκεκριμένα, το γονίδιο εισάγεται σε ειδική περιοχή του φορέα, τη λεγόμενη πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (Multiple Cloning Site, MCS), η οποία είναι μια μικρή περιοχή που περιέχει αρκετές κοινώς χρησιμοποιούμενες περιοριστικές θέσεις επιτρέποντας την εύκολη εισαγωγή ενός κομματιού DNA μετά από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και επανακυκλοποίηση με τη λιγάση του DNA. Στη συνέχεια, τα πλασμίδια εισάγονται σε βακτήρια με μια διαδικασία που ονομάζεται μετασχηματισμός και τα βακτήρια εκτίθενται στα κατάλληλα αντιβιοτικά, ώστε να επιβιώσουν μόνο αυτά που φέρουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό και άρα το πλασμίδιο. Τα βακτήρια μεγαλώνουν, συλλέγονται και λύνονται προκειμένου να απομονωθεί το πλασμίδιο ενδιαφέροντος και να χρησιμοποιηθεί για διαμολύνσεις σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι φορείς και έγιναν οι κλωνοποιήσεις όπως περιγράφονται παρακάτω. Τα χρησιμοποιούμενα στο σύστημα Tet-Off πλασμίδια ήτοι pTet-Off, pBI-EGFP, pTREtight και pTK-Hyg ήταν της Clontech. Τα πλασμίδια pHACE-PKCε-wild type και pHACE-PKCε-DN (K437R) ήταν προσφορά του Dr. Weinstein [301] και τα cDNA των PKCε-wild type και PKCε-DN (K437R) συζευγμένα με το HA κλωνοποιήθηκαν στο MCS του φορέα pTREtight. Τα πλασμίδια pGEX-6P2-Ran-wild type, pGEX-6P2-Ran-active (Q69L) και pGEX-6P2-Ran-inactive (T24N) ήταν προσφορά της

Dr. Yixian Zheng [302] και τα cDNA των Ran-wild type, Ran-active (Q69L) και Ran-inactive (T24N) κλωνοποιήθηκαν στο MCS του φορέα pDsRed2-C1. Τα πλασμίδια pEGFP-CTD, pEGFP-GRDI, pEGFP-GRDII, pEGFP-sec14, pEGFP-GRDIsec14 βρίσκονται στο φορέα pEGFP-C1 (Clontech) και είναι όλα ιδιοκτησία του εργαστηρίου της Dr. Δήμητρας Μάγκουρα. Στα σχήματα που ακολουθούν φαίνονται οι πλασμιδιακοί χάρτες όλων των χρησιμοποιούμενων φορέων έκφρασης (Σχήμα 7 σύστημα Tet-Off, Σχήμα 8 οι υπόλοιποι) με τους υποκινητές, το MCS, τη συζευγμένη πρωτεΐνη και το γονίδιο ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά όπως παρέχονται από την εκάστοτε εταιρεία κατασκευής.



Σχήμα 7. Οι χρησιμοποιούμενοι πλασμιδιακοί φορείς στο σύστημα Tet-Off. Α. Ο φορέας pTet-Off χρησιμοποιήθηκε αυτούσιος για την πρώτη σταθερή διαμόλυνση στο σύστημα Tet-Off. Β. Ο φορέας pTREtight στον οποίο κλωνοποιήθηκαν τα γονίδια

ενδιαφέροντος και χρησιμοποιήθηκε για τη δεύτερη σταθερή διαμόλυνση. C. Ο φορέας ρBI-EGFP χρησιμοποιήθηκε ως βοηθητικό πλασμίδιο στην επιλογή των βέλτιστων Tet-Off κλώνων. D. Ο φορέας ρTK-Hyg χρησιμοποιήθηκε ως βοηθητικό πλασμίδιο στην επιλογή των Tet-Off ρTREtight κλώνων.



Σχήμα 8. Οι λοιποί χρησιμοποιούμενοι πλασμιδιακοί φορείς. A. Ο φορέας ρHACE προέκυψε από τον πλασμιδιακό φορέα ρcDNA 3 μετά από προσθήκη του επίτοπου HA και έφερε τα cDNA των PKCε και DNPΚCε. B. Ο φορέας ρGEX-6P2 έφερε τα cDNA των Ran, RanQ69L και RanT24N. C. Ο φορέας ρDsRed2-C1 χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των Ran, RanQ69L και RanT24N. D. Ο φορέας ρEGFP-C1 έφερε τα cDNA των GRDI, GRDII, sec14, GRDIsec14, CTD, CTD-A, CTD-D.

2.1.2. Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια και αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες, μήκους 4-8

νουκλεοτιδίων, οποιουδήποτε κομματιού DNA. Έχουν την ικανότητα να προκαλούν πέψη του DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, εντός της αλληλουχίας αναγνώρισης ή σε γειτονικό της σημείο, οδηγώντας στο σχηματισμό 5' ή 3' προεξεχόντων άκρων ή στο σχηματισμό μη προεξεχόντων (τυφλών) άκρων. Μετά την πέψη δύο διαφορετικών κομματιών DNA με το ίδιο ένζυμο αφήνονται, συνήθως, συμπληρωματικά άκρα γεγονός που εξυπηρετεί στην επίδεση των δύο αυτών κομματιών μεταξύ τους. Κατά κανόνα γίνεται πέψη 1μg DNA με 1 U ενζύμου στα 20 μl τελικού όγκου αντίδρασης. Στην αντίδραση της πέψης προστίθεται, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, στο οποίο το ένζυμο παρουσιάζει τη βέλτιστη δραστηριότητα, ενώ, ορισμένα ένζυμα απαιτούν, επιπλέον, την προσθήκη αλβουμίνης βόειου ορού σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml. Η θερμοκρασία επώασης της αντίδρασης εξαρτάται από τη θερμοκρασία στην οποία το ένζυμο εμφανίζει τη βέλτιστη δραστηριότητα και για τα περισσότερα ένζυμα είναι οι 37°C. Για την κατασκευή των pTREtight-PKCe και pTREtight-DNPKCe πραγματοποιήθηκε πέψη με τα ένζυμα KpnI και NotI στους 37°C, με BSA, για 4 h τουλάχιστον. Τα cDNA των Ran, RanQ69L και RanT24N λήφθηκαν από το φορέα pGEX-6P2 μετά από PCR με τους εκκινητές Forward: 5'-GTACTCGAGAAGCTGCGCAGGGAGAGCCC-3', στον οποίο έχει προστεθεί η θέση πέψης του περιοριστικού ενζύμου XhoI, και Reverse: 5'-GTACCGCGGCAGGTCATCATCCTCATCC-3', στον οποίο έχει προστεθεί η θέση πέψης του περιοριστικού ενζύμου SacII. Στη συνέχεια, κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pDsRed2-C1 με πέψη χρησιμοποιώντας τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και SacII στους 37 °C, με BSA, για 4 h τουλάχιστον.

2.1.3. Αποφωσφορυλίωση του φορέα έκφρασης

Μετά την πέψη με ενδονουκλεάσες, τα μεγάλα μεγέθους πλασμίδια είναι απαραίτητο να αποφωσφορυλιωθούν στα άκρα τους, ώστε αυτά να μην επανενωθούν. Συγκεκριμένα, στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε βακτηριακή αλκαλική φωσφατάση (Sigma-Aldrich) που αφαιρεί τις 5'-φωσφορικές ομάδες. Αναλυτικά, στην αντίδραση προστέθηκαν 100 ng πλασμιδιακού φορέα (μετά την πέψη), ειδικό διάλυμα αποφωσφορυλίωσης (dephosphorylation buffer), 2 U αλκαλική φωσφατάση (1 U/μl) και dH₂O μέχρι τελικό όγκο 10 μl. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση στους 37°C για 15 min και η αντίδραση

τερματίστηκε με θέρμανση στους 65°C για 15 min. Μετά το τέλος της αντίδρασης αποφωσφορυλίωσης, το προϊόν φυλάχθηκε στους 4°C.

2.1.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης

Προκειμένου να επιτευχθεί η ανίχνευση και ο διαχωρισμός των προϊόντων της PCR ή της πέψης με ενδονουκλεάσες πραγματοποιήθηκε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Μόρια DNA μήκους 0,1 - 20 Kb μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε 0,8-2% οριζόντιες πηκτές αγαρόζης. Συγκέντρωση αγαρόζης 1% είναι κατάλληλη για το διαχωρισμό 500-7000 βάσεις (π.χ. πλασμιδιακός φορέας και ένθεμα), ενώ 2% για 20-500 βάσεις (π.χ. προϊόν RT-PCR). Συγκεκριμένα, κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (1% - 2% w/v, CAMBREX) διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris 2 M, AcCOOH 905 mM, Na₂H₂O EDTA 100 mM) και το διάλυμα θερμάνθηκε στους 100°C μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και να γίνει διαυγές. Όταν η θερμοκρασία της υγρής αγαρόζης έφτασε τους 50-60°C προστέθηκε 0,5 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε υποδοχή με ειδικά χτενάκια και αφέθηκε να στερεοποιηθεί. Το βρωμιούχο αιθίδιο χρησιμεύει στην οπτικοποίηση των κομματιών DNA αφού παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και έχει την ιδιότητα όταν απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία, να εκπέμπει στο κόκκινο του ορατού φάσματος. Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε το TAE. Πριν φορτωθούν στην πήκτη, τα δείγματα αναμιγνύονται με διαλύματος φόρτωσης (σε αναλογία 5:1). Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει 40% w/v σουκρόζη που, λόγω ειδικού βάρους, επιτρέπει την ευκολότερη τοποθέτηση των δειγμάτων στα φρεάτια και 0,42% κυανό του ξυλενίου το οποίο είναι χρωστική, ελαφρώς αρνητικά φορτισμένη, που στην ηλεκτροφόρηση κινείται στην ίδια κατεύθυνση με το DNA και επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας του μετώπου της ηλεκτροφόρησης. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα αναλύεται και κατάλληλος μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών DNA. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 90 Volt. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα παρατηρείται υπό υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφίζεται (Dolphin-Doc Pro system, Wealtec).

2.1.5. Απομόνωση τμημάτων DNA από πηκτική αγαρόζη

Η απομόνωση και ο καθαρισμός των κομματιών DNA από την πηκτική αγαρόζη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του διαθέσιμου στο εμπόριο QIAquick Gel Extraction Kit (Cat.No. 28704) της εταιρείας QIAGEN, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, μετά την ηλεκτροφόρηση, τα κομμάτια DNA που ήταν προς απομόνωση χαράχθηκαν και αφαιρέθηκαν από την πηκτική αγαρόζη με αποστειρωμένο νυστέρι υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Τα απομονωμένα τμήματα αγαρόζης που περιείχαν το επιθυμητό DNA θερμάνθηκαν, μαζί με κατάλληλο διάλυμα, στους 50°C για 10 min ώσπου η αγαρόζη να διαλυτοποιηθεί και το DNA να απελευθερωθεί στο διάλυμα. Στη συνέχεια ακολούθησε δέσμευση σε ειδική ιοντοανταλλακτική στήλη και αλληπάλληλες πλύσεις και φυγοκεντρήσεις για το δυνατό καλύτερο καθαρισμό του DNA. Τέλος, η έκλουση του DNA από τη στήλη έγινε με 30 μl διάλυμα TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH8.0).

2.1.6. Επίδεση των ενθέματων στον πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Προκειμένου να ανασυνδεθούν δύο γραμμικά τμήματα DNA με συμβατά άκρα (ένθεμα και πλασμίδιο) χρησιμοποιήθηκε η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 (Takara Biotechnology). Το ένζυμο, αυτό, καταλύει την αντίδραση δημιουργίας φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ 3'-υδροξυλικών και 5'-φωσφορικών άκρων. Σε τελικό όγκο αντίδρασης 10μl προστέθηκαν, με αναλογία 1:3, 60ng ενθέματος και 20ng φορέα (που είχαν προηγουμένως απομονωθεί από πηκτική αγαρόζη), 1 U T4 λιγάσης, ειδικό buffer και dH₂O. Η αντίδραση περατώθηκε στους 37°C για 16 h.

Η ταυτοποίηση της εισαγωγής του ενθέματος έγινε με πέψη του προϊόντος επίδεσης με τα αντίστοιχα ένζυμα επίδεσης (New England Biotechnologies), ενώ, περαιτέρω επιβεβαίωση της αλληλουχίας έγινε με αυτόματη αλληλούχιση (sequencing).

2.1.7. Παρασκευή δεκτικών μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων

Για την κατασκευή επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν δύο κλώνοι βακτηριακών στελεχών του *Escherichia coli* (*E. coli*), ήτοι DH5a και GM2163 (Life Technologies). Τα βακτήρια

καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένο υλικό καλλιέργειας Luria Broth (LB) (Sigma) ενώ η καλλιέργεια σε τρυβλία Petri έγινε με καλλιεργητικό υλικό LB Agar (Sigma). Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε με αποστειρωμένα υλικά και υπό στείρες συνθήκες. Σκοπός της διαδικασίας είναι οι μεμβράνες ενός μέρους των βακτηρίων να γίνονται διαπερατές σε DNA. Έτσι, βακτηριακά κύτταρα από stock γλυκερόλης επιστρώθηκαν σε τρυβλίο, LB Agar απουσία αντιβιοτικού για τα DH5a, παρουσία χλωραμφενικόλης (30 µg/ml) για τα GM2163, και καλλιεργήθηκαν στους 37°C για 16 h. Στη συνέχεια, επιλέχθηκε από το τρυβλίο μια αποικία η οποία ενοφθαλμίστηκε σε 5 ml LB broth, και καλλιεργήθηκε στους 37°C για 16 h, υπό συνεχή ανάδευση. 1 ml της καλλιέργειας, αυτής, επανακαλλιεργήθηκε σε 50-100 ml LB broth στους 37°C, υπό ανάδευση, μέχρι η οπτική πυκνότητα OD550 να φτάσει τιμές 0.5-1.0. Έπειτα, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm, για 20 min στους 0°C και το ίζημα, αφού επαναδιαλύθηκε σε 25 ml παγωμένου 0.1 M CaCl₂, παρέμεινε στον πάγο για 15 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm, για 15 min στους 0°C, και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 3.3 ml (1/15 του όγκου) παγωμένου διαλύματος 0.1 M CaCl₂-15% γλυκερόλης. Τέλος, το διάλυμα των κυττάρων παρέμεινε στον πάγο για 4-20 h και στη συνέχεια μοιράστηκε σε erpendorfs, σε κλάσματα των 100 µl, και φυλάχθηκε στους -80°C.

2.1.8. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με θερμικό σοκ

Η διαδικασία του μετασχηματισμού μπορεί να γίνει μόνο σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα και επιτρέπει την είσοδο πλασμιδιακού DNA σε αυτά. Συγκεκριμένα, σε κλάσματα 100 µl επιδεκτικών προς μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων προστέθηκαν περίπου 100 ng πλασμιδιακού DNA (που φέρει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό) και επωάστηκαν για 30 min στον πάγο. Ακολούθησε θερμικό σοκ στους 42°C διάρκειας 1,5-2 min και τα κύτταρα επέστρεψαν στον πάγο για ακόμα 2 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 900 µl καλλιεργητικού μέσου LB broth και τα κύτταρα επωάστηκαν 37°C για 1 h. Τελικά, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με κατάλληλο αντιβιοτικό (25 µg/ml) το οποίο επωάστηκε στους 37°C για 16 h. Μετά τις 16 h, στο τρυβλίο μεγαλώνουν μόνο τα βακτήρια που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμιδιακό DNA και συνεπώς παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό.

2.1.9. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής και μεσαίας κλίμακας από βακτηριακή καλλιέργεια

Για να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA από τα μετασχηματισμένα βακτήρια, επιλέχθηκαν μία ή περισσότερες μετασχηματισμένες αποικίες οι οποίες, υπό στείρες συνθήκες και παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού, ενοφθαλμίστηκαν σε 5 ml LB broth. Οι μικρής κλίμακας καλλιέργειες αναπτύχθηκαν για 16 h, στους 37°C, υπό ανάδευση (250 rpm). Για την ανάπτυξη καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας, μεταφέρθηκε 1 ml της μικρής καλλιέργειας σε 50-100 ml LB broth, παρουσία αντιβιοτικού, και επωάστηκε, υπό ανάδευση, στους 37°C για 16 h. Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας έγινε με τη μέθοδο βρασμού (boiling prep) ή με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit NucleoSpin (MACHEREY-NAGEL) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Μικρής κλίμακας απομόνωση DNA- Μέθοδος βρασμού

Πρόκειται για μια ταχεία, αξιόπιστη και ανέξοδη μέθοδο απομόνωσης που παράγει υψηλής ποσότητας αλλά μέτριας ποιότητας πλασμιδιακού DNA. Έτσι, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε μόνο για τον έλεγχο εισαγωγής των ενθεμάτων στους φορείς κλωνοποίησης και όχι σε περιπτώσεις που το DNA προοριζόταν για κυτταρικές διαμολύνσεις ή άλλες διεργασίες που η καθαρότητα του πρέπει να είναι η καλύτερη δυνατή. Για τη μέθοδο βρασμού χρησιμοποιήθηκαν 3 ml μικρής κλίμακας καλλιέργειας (όπως περιγράφηκε παραπάνω) τα οποία φυγοκεντρήθηκαν σε μικροφυγόκεντρο στις 5000 rpm για 15 min. Η υπόλοιπη καλλιέργεια μπορεί να φυλαχθεί στους 4°C για τουλάχιστον μία εβδομάδα. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 200 μl διαλύματος STET (8% σουκρόζη, 0,5% Triton X-100, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA). Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 μl λυσοζύμης (10 mg/ml) και τα κύτταρα αναδεύθηκαν έντονα. Το μίγμα τοποθετήθηκε για 1 min σε νερό που βράζει και έπειτα φυγοκεντρήθηκε, σε θερμοκρασία δωματίου, για 6 min στις 13000 rpm. Το ίζημα απορρίφθηκε και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf όπου προστέθηκαν 500 μl απόλυτης αιθανόλης για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA. Το μίγμα αναδεύθηκε και τοποθετήθηκε στους -80°C για 5 min. Τελικά, φυγοκεντρήθηκε, στους 4°C,

στις 13000 g για 15 min και το ίζημα ξηράνθηκε και διαλύθηκε σε 50 μl διαλύματος TE.

Μεσαίας κλίμακας απομόνωση DNA- Midi prep

Η απομόνωση μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA έγινε με εμπορικά διαθέσιμη στήλη ανιονικής ρητίνης και κατάλληλα διαλύματα (NucleoBond Plasmid DNA Purification Kit, MACHEREY-NAGEL) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος βασίζεται σε μια τροποποιημένη διαδικασία αλκαλικής/SDS λύσης [303]. Το σύστημα επιτρέπει ανάκτηση που αντιστοιχεί σε 500 μg- 2 mg DNA για βακτηριακή καλλιέργεια 100-500 ml. Η όλη διαδικασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, υπό αλκαλικές συνθήκες, τα βακτηριακά κύτταρα λύθηκαν απελευθερώνοντας το πλασμιδιακό DNA το οποίο στη συνέχεια δεσμεύθηκε στη ρητινική στήλη ανιονικής ανταλλαγής υπό συνθήκες χαμηλής αλατότητας και pH. Ακολούθησαν πολλαπλές πλύσεις και εκλούσεις με κατάλληλα διαλύματα με σκοπό την απομάκρυνση του RNA ή άλλων προσμίξεων. Το πλασμιδιακό DNA εκλούσθηκε από τη στήλη, υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας, και κατακρίμνηστηκε με προσθήκη ισοπροπανόλης και γλυκογόνου και φυγοκέντρωση, στους 4°C, σε 15000 g για 15 min. Τα άλατα απομακρύνθηκαν μετά από πλύση με 70% αιθανόλη και φυγοκέντρωση σε 15000 g για 5min (4°C). Μόλις το ίζημα στέγνωσε, αναδιαλύθηκε σε 150 μl TE.

2.1.10. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA

Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίζεται με βάση την οπτική πυκνότητα του διαλύματος, όπως αυτή υπολογίζεται από φασματοφωτόμετρο UV-VIS. Το διάλυμα του DNA αραιώθηκε 100 φορές με dH₂O, τοποθετήθηκε σε κυψελίδες χαλαζία και μετρήθηκε η απορρόφησή του στα 260nm και 280nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται από την απορρόφηση OD₂₆₀ x 50 (σταθερά για τη μετατροπή σε συγκέντρωση δίκλωνων μορίων DNA) x 100 (η αραιώση). Ο λόγος των οπτικών απορροφήσεων OD₂₆₀/OD₂₈₀ αποτελεί δείκτη της καθαρότητας του DNA και πρέπει να είναι κοντά στο 2.

2.2. Καλλιέργειες και χειρισμοί κυττάρων

Όλοι οι χειρισμοί που αφορούν τις καλλιέργειες κυτταρικών σειρών ή πρωτογενών κυττάρων γίνονται, υπό στείρες συνθήκες, σε θάλαμο νηματικής ροής, με αποστειρωμένα υλικά. Η αποστείρωση του θαλάμου νηματικής ροής επιτεύχθηκε με υπεριώδη ακτινοβολία για 15 min, ενώ για τοπική αποστείρωση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αιθανόλης 70%. Η αποστείρωση των υλικών πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο στους 120°C και πίεση 1 k_p/cm² για 2 h. Υγρά υλικά που καταστρέφονται σε υψηλές θερμοκρασίες αποστειρώθηκαν με στείρα διήθηση μέσα από φίλτρα 0,22 μm. Όλα τα κύτταρα φυλάχθηκαν σε κλίβανο επώασης σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

2.2.1. Απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών κυττάρων

2.2.1.1. Καλλιέργεια πρωτογενών νευρώνων όρνιθας

Η απομόνωση και διατήρηση πρωτογενών καλλιεργείων φλοιϊκών νευρώνων εμβρύου όρνιθας έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται από την ομάδα της Dr. Μάγκουρα [121, 304]. Αναλυτικά, έμβρυα όρνιθας 8^{ης} εμβρυϊκής μέρας θυσιάστηκαν και τα εγκεφαλικά ημισφαίρια αφαιρέθηκαν κάτω από άσηπτες συνθήκες. Ακολούθησε αφαίρεση των μηνίγγων και πλύση με αποστειρωμένο διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Phosphate Buffer Saline, PBS) για τη απομάκρυνση των αιμοσφαιρίων. Εν συνεχεία, τα ημισφαίρια διαχωρίστηκαν μηχανικά μετά από διέλευση μέσα από ειδική μεμβράνη (mesh) με πόρους διαμέτρου 48 μm και τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία επικαλυμμένα με πολυλυσίνη. Τα τρυβλία είναι απαραίτητο να επιστρωθούν με πολυλυσίνη (poly-L-lysine, 100 μg/ml) για 4-5 h και στη συνέχεια να πλυθούν με PBS και dH₂O. Μετά τις πλύσεις προστέθηκε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 4.5 g/L και 20% (v/v) ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS). Η προσθήκη του ορού σε μεγάλη συγκέντρωση για τουλάχιστον τρεις ώρες κρίνεται απαραίτητη για την προσκόλληση θρεπτικών στοιχείων (αυξητικών παραγόντων κ.α.) πάνω στην ήδη προσκολλημένη πολυλυσίνη του υποστρώματος. Οι νευρώνες καλλιεργήθηκαν σε DMEM με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 4.5 g/L και τελική συγκέντρωση ορού εμβρύου

βοός 1-5% (v/v). Οι επωάσεις και οι κλασματώσεις πραγματοποιήθηκαν σε νευρώνες μετά από 3 ημέρες σε καλλιέργεια (culture day 3, C3).

2.2.1.2. Καλλιέργεια πρωτογενών αστροκυττάρων επίμυος

Η απομόνωση πρωτογενών αστροκυττάρων νεογνού επίμυος έγινε όπως έχει προηγουμένα περιγραφεί [305]. Συγκεκριμένα, νεογνοί επίμυος 4^{ης} ημέρας θυσιάστηκαν και τα εγκεφαλικά ημισφαίρια αφαιρέθηκαν κάτω από άσηπτες συνθήκες. Στη συνέχεια τα ημισφαίρια κυλίστηκαν σε χαρτί Whatmann, ώστε να απομακρυνθούν οι μεμβράνες, μεταφέρθηκαν σε 50 ml DMEM χωρίς ορό και τοποθετήθηκαν στον πάγο. Εκεί, κόπηκαν σε όσο το δυνατό μικρότερα κομμάτια με λεπίδα ξυραφιού και επωάστηκαν με 100 μl 1mg/ml DNάση και 1 ml 2,5% τρυψίνη, σε καλλιεργητικό κλίβανο, για 30 min. Έπειτα, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν, σε θερμοκρασία δωματίου και 1000 rpm για 5 min, και τοποθετήθηκαν σε T75 φλάσκες που είχαν προηγουμένως επιστρωθεί με πολυλυσίνη, όπως περιγράφεται παραπάνω. Το καλλιεργητικό μέσο των αστροκυττάρων ήταν: DMEM (1 g/l) με 10% FBS και μίγμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης και γενταμυκίνης. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν το 80% της φλάσκας, οι καλλιέργειες αναδιανέμονταν όπως περιγράφεται παρακάτω. Οι αναλύσεις ανοσοκυτταροχημείας πραγματοποιήθηκαν σε αδιαφοροποίητα (C4), μετρίως διαφοροποιημένα (C9) ή πλήρως διαφοροποιημένα αστροκύτταρα (C14-C21).

2.2.1.3. Καλλιέργεια κυττάρων Schwann ανθρώπου και εμβρυϊκών ινοβλαστών μύος

Κύτταρα Schwann: ανθρώπινα. Απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν όπως έχει προηγουμένα περιγραφεί [306].

MEFs: Εμβρυϊκοί ινοβλάστες μύος (Mouse Embryonic Fibroblasts). Απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν όπως έχει προηγουμένα περιγραφεί [307].

2.2.2. Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες κυτταρικές σειρές:

90-8: ανθρώπινα. Πρόκειται για κακοήγη όγκο των περιφερικών νευρικών ελύτρων (MPNST) επιθηλιακής μορφολογίας από ασθενή με Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (*NF1*-/-). Καλλιεργούνται σε DMEM υψηλής περιεκτικότητας γλυκόζης (4.5 g/l) με 10% FBS και μίγμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης.

SH-SY5Y: ανθρώπινα (Καυκάσια θήλυ). Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y αποτελεί έναν από τους τρεις διαδοχικά απομονωμένους κλώνους της κυτταρικής σειράς ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-SH, η οποία δημιουργήθηκε το 1970 από βιοψία μεταστατικού νευροβλαστώματος στο μυελό των οστών. Καλλιεργούνται σε RPMI εμπλουτισμένο με 10% FBS, L-γλουταμίνη και μίγμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης.

MCF7: ανθρώπινα (Καυκάσια θήλυ). Πρόκειται για αδenoκαρκίνωμα μαστού (από υδροθώρακα), επιθηλιακής μορφολογίας. Έχουν υποδοχέα οιστρογόνων και παρουσιάζουν ορμονική ευαισθησία. Καλλιεργούνται σε DMEM χαμηλής περιεκτικότητας γλυκόζης (1 g/l) με 10% FBS και μίγμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης.

PC3: ανθρώπινα (Καυκάσιος άρρεν). Πρόκειται για αδenoκαρκίνωμα προστάτη επιπέδου IV, επιθηλιακής μορφολογίας. Δεν ανταποκρίνονται σε θεραπεία ανδρογόνων. Καλλιεργούνται σε RPMI με 10% FBS, L-γλουταμίνη και μίγμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης.

TM31: ανθρώπινα (Γιαπωνέζα θήλυ). Πρόκειται για αστροκύττωμα, προερχόμενο από ασθενή με Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (*NF1*+/-), επιθηλιακής μορφολογίας. Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε φαρμακολογικά προωθούμενη μορφολογική διαφοροποίηση. Καλλιεργούνται σε MEMα (Minimum Essential Media alpha) με 10% FBS και μίγμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης.

PC12: κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος αρουραίου. Καλλιεργούνται σε RPMI με 10% ορό αλόγου (Horse Serum, HS), 5% FBS και μίγμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης. Μεγαλώνουν σε τρυβλία καλλιέργειας που έχουν επιστρωθεί με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I για 3 h σε θερμοκρασία δωματίου και εκπλυθεί με διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline,

PBS). Το κολλαγόνο φτιάχτηκε από ουρές ποντικού σε οξικό οξύ και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:50 (1 ml κολλαγόνο, 13 ml αιθανόλη και 36 ml H₂O).

SF268: ανθρώπινα (Καυκάσια θήλυ). Πρόκειται για γλοιοβλάστωμα, δεσμιδωτής μορφολογίας. Παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης EGFR αφού το γονίδιο του EGFR κωδικοποιεί μη ενεργή πρωτεΐνη. Καλλιεργούνται σε RPMI με 10% FBS, L-γλουταμίνη και μίγμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης.

Όλα τα θρεπτικά μέσα προήλθαν από την εταιρεία Life Technologies και σε αυτά προστέθηκε 100 µg/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Biochrom AG). Οι οροί FBS και HS ήταν από τη Biowest. Η L-γλουταμίνη (2 mM) από Life Technologies. Αλλαγή του θρεπτικού υλικού πραγματοποιούνταν κάθε δύο μέρες με εξαίρεση τις πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν το 80% της επιφάνειας των τρυβλίων, οι καλλιέργειες αναδιανέμονταν ώστε να διατηρηθούν σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Κατά τη διαδικασία της αναδιανομής (cell passage) τα κύτταρα αρχικά ξεπλένονταν με PBS και στη συνέχεια προστίθετο διάλυμα τρυψίνης/EDTA (Life Technologies) για ~5 min. Όταν τα κύτταρα είχαν αποκολληθεί από την επιφάνεια των τρυβλίων, προστίθετο ίσος όγκος θρεπτικού μέσου για την εξουδετέρωση της τρυψίνης και τα κύτταρα φυγοκεντρούνταν στις 1000 rpm για 5min. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυόταν σε θρεπτικό μέσο και πραγματοποιούνταν αναδιανομή του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε καινούρια τρυβλία.

Απόθεμα κυττάρων κρατήθηκε από όλες τις κυτταρικές σειρές και φυλάχθηκε στους -80°C. Η διαδικασία παγώματος των κυττάρων είναι όμοια με αυτή της αναδιανομής με τη διαφορά ότι, μετά τη φυγοκέντρηση, τα κύτταρα αναδιαλύονταν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο κατάψυξης που περιείχε 70% θρεπτικό μέσο, 20% FBS, 5% DMSO και 5% γλυκερόλη. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρονταν σε ειδικά ψαλίδια (cryovials) και τοποθετούνταν σε κουτί από φελιζόλ στους -80°C ώστε να παγώσουν σταδιακά. Την επόμενη μέρα φυλάσσονταν σε κουτί στους -80°C ή μεταφέρονταν σε υγρό άζωτο για μακροχρόνια αποθήκευση.

2.2.3. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

Τα κύτταρα SF268 διαμολύνθηκαν παροδικά με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα A 023 της τεχνολογίας Amaxa (Biosystems), το οποίο και επιλέχθηκε μετά από προκαταρκτικά πειράματα. Τα SF268 διαμολύνθηκαν με τα RFP-Ran wild type, RFP-RanT24N, RFP-RanQ69L, GFP-CTD, GFP-GRDI, GFP-GRDII, GFP-sec14, GFP-GRDIsec14 και GFP-C1 (2 µg/35 mm culture dish) σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή. Εν συντομία, τα κύτταρα ενός 35mm τρυβλίου με πυκνότητα 80% εκπλύθηκαν με PBS και επώαστηκαν με τρυψίνη/EDTA για ~5min στους 37°C. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε 1000 rpm και το ίζημα των κυττάρων πλύθηκε σε 4 ml PBS και ξαναφυγοκεντρήθηκε. Το ίζημα που προέκυψε αναδιαλύθηκε σε 100 µl PBS και αναμείχθηκε με το αντίστοιχο πλασμιδιακό DNA. Τα εκάστοτε εναιωρήματα που προέκυψαν (>100 µl το καθένα) ηλεκτροδιατρήθηκαν με τη χρήση ειδικών κυββετών ηλεκτροδιάτρησης. Μετά την ηλεκτροδιάτρηση τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 35 mm (για βιοχημικές αναλύσεις) ή καλυπτρίδες 18 mm (για αναλύσεις ανοσοκυτταροχημείας). Τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C σε 5% CO₂ και την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού μέσου. Τυπικά, τα κύτταρα συλλέγονταν για ανάλυση 48 h μετά από τη διαμόλυνση. Η απόδοση της διαμόλυνσης με ηλεκτροδιάτρηση (τυπικά ~70%) εκτιμήθηκε με GFP ή RFP ανοσοφθορισμό και ανάλυση ανοσοσύτωσης κατά Western με κατάλληλα αντισώματα.

2.2.4. Κατασκευή διπλά σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών

Στην παρούσα εργασία κατασκευάστηκαν τουλάχιστον 6 διπλά σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές στις οποίες τα γονίδια ενδιαφέροντος βρισκόντουσαν υπό τον έλεγχο δοξυκυκλίνης. Συγκεκριμένα, οι MCF7-PKCε wild type, MCF7-DNPKCε, PC3-PKCε wild type, PC3-DNPKCε, 90-8-PKCε wild type, 90-8-DNPKCε και PC12-PKCε wild type, PC12-DNPKCε. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η κυτταρική σειρά PC12 αγοράστηκε με σταθερή διαμόλυνση του πλασμιδίου Tet-Off (ATCC) και έτσι σε αυτήν πραγματοποιήθηκε μόνο η δεύτερη σταθερή διαμόλυνση με τα πλασμίδια της PKCε.

2.2.4.1. Σύστημα Tet-Off

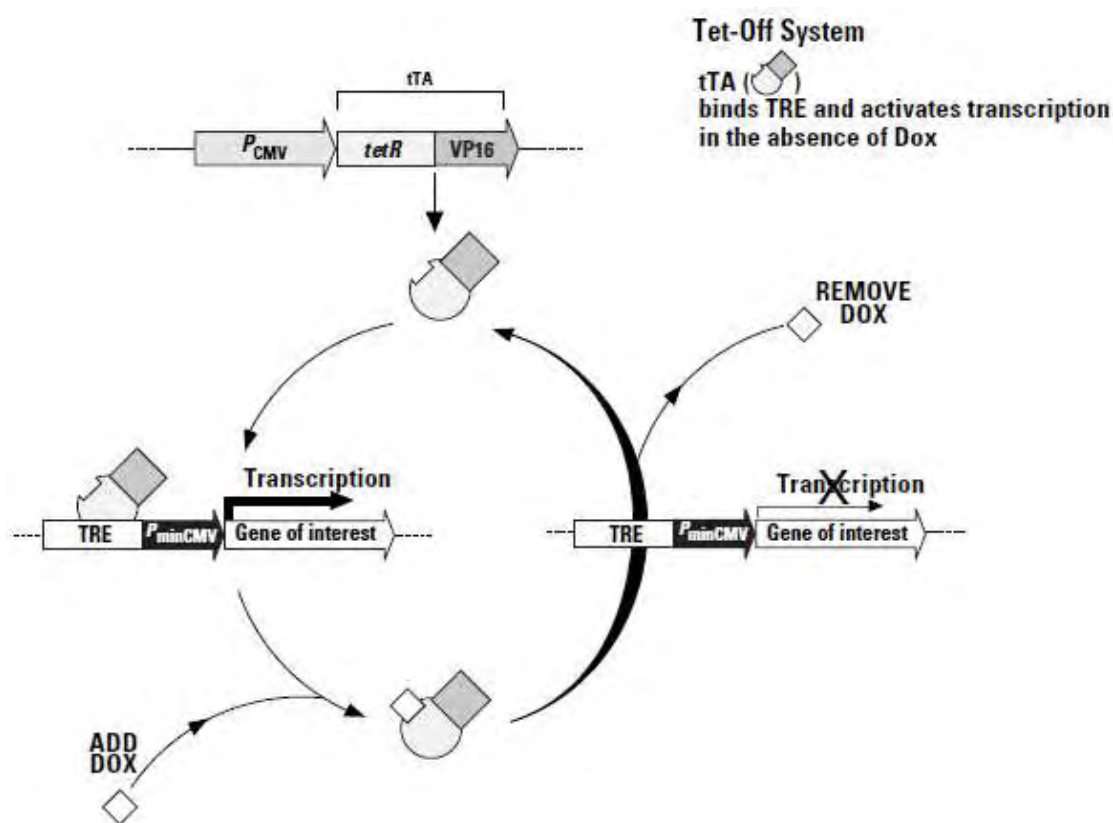
Το Tet-Off σύστημα ελεγχόμενης γονιδιακής έκφρασης βασίζεται στο αυστηρά ρυθμιζόμενο, υψηλής γονιδιακής έκφρασης σύστημα που περιγράφηκε από τους Gossen και Bujard [308] με τροποποιήσεις που έγιναν από τον Urlinger και τους συνεργάτες του [309]. Στο Tet-Off σύστημα η βασική κατάσταση έκφρασης του γονιδίου ενδιαφέροντος διατηρείται παρουσία δοξυκυκλίνης (doxycycline, Dox, παράγωγο της τετρακυκλίνης) στο καλλιεργητικό μέσο, ενώ αφαίρεση της δοξυκυκλίνης έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή υπερέκφρασης. Η “On/Off” απόδοση του Tet-Off συστήματος επιτρέπει την αυστηρά ρυθμιζόμενη γονιδιακή έκφραση ως απόκριση σε ποικίλες συγκεντρώσεις δοξυκυκλίνης. Τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ενδιαφέροντος, απουσία Dox, είναι πολύ υψηλά και συγκρίνονται ευνοϊκά με δυνατούς υποκινητές θηλαστικών όπως ο CMV [310]. Σε αντίθεση με άλλα ρυθμιζόμενα συστήματα γονιδιακής έκφρασης, η γονιδιακή ρύθμιση στα Tet συστήματα είναι εξαιρετικά ειδική έτσι ώστε τα αποτελέσματα να μην περιπλέκονται με πλειοτροπικές επιδράσεις ή μη ειδική επαγωγή.

Στο *E. coli*, η Tet κατασταλτική πρωτεΐνη (Tet repressor protein, TetR) ρυθμίζει αρνητικά τα γονίδια του ανθεκτικού σε τετρακυκλίνη οπερονίου του Tn10 τρανσποζονίου. Απουσία τετρακυκλίνης (tetracycline, Tc), η TetR δεσμεύεται στις Tet ρυθμιστικές αλληλουχίες (Tet operator sequences, tetO) και παρεμποδίζει τη μεταγραφή αυτών των γονιδίων. Παρουσία Tc, η TetR αποσυνδέεται από το tetO και η μεταγραφή των γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη ξεκινά. Οι TetR και tetO παρέχουν τη βάση για τα Tet-Off και Tet-On συστήματα που χρησιμοποιούνται σε κύτταρα θηλαστικών: η TetR πρωτεΐνη μετατράπηκε σε ενεργοποιητή μεταγραφής και οι tetO αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία επαγόμενου υποκινητή. Οι κεντρικές έννοιες του Tet-Off συστήματος συζητούνται παρακάτω.

Ο Tet-Off ενεργοποιητής (transactivator, tTA): Ένα βασικό στοιχείο του Tet-Off συστήματος είναι η tTA πρωτεΐνη σύντηξης που ενεργοποιεί τη μεταγραφή [309]. Αυτός ο ρυθμιζόμενος από τετρακυκλίνη ενεργοποιητής αποτελείται από την TetR, συμπεριλαμβανομένων των περιοχών δέσμησης σε DNA (DNA binding domain, BD), συντηγμένη με τρεις μικρές τύπου «F» περιοχές ενεργοποίησης (activation domains, AD) που προέρχονται από τον

ιό του έρπητα (herpes simplex virus) VP16 [311, 312]. Όπως και η TetR, έτσι και η tTA είναι ανίκανη να δεσμεύσει τις tetO αλληλουχίες παρουσία Tc ή Dox.

Το πλασμίδιο ρυθμιστής pTRE-Tight: Το δεύτερο βασικό στοιχείο του Tet-Off συστήματος είναι το pTRE-Tight πλασμίδιο το οποίο και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου ενδιαφέροντος (gene of interest, GOI) (Clontech, April 2003). Ο σύνθετος υποκινητής του TRE-Tight αποτελείται από ένα τροποποιημένο στοιχείο απόκρισης Tet (Tet-Responsive Element, TREmod), φτιαγμένο από 7 διαδοχικές επαναλήψεις μιας διαφοροποιημένης tetO αλληλουχίας, ενωμένο με έναν τροποποιημένο CMV υποκινητή (P_{min}CMVΔ). Το πλασμίδιο TRE-Tight δεν έχει σημεία δέσμευσης για ενδογενείς μεταγραφικούς παράγοντες, συνεπώς είναι πρακτικά σιωπηλό απουσία επαγωγής. Στο Σχήμα 9 συνοψίζεται ο τρόπος λειτουργίας του συστήματος Tet-Off.



Σχήμα 9. Απεικόνιση της επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης στο σύστημα Tet-Off (Clontech). Στο Tet-Off σύστημα, τα, μη-επαγόμενα, βασικά επίπεδα έκφρασης διατηρούνται με την προσθήκη δοξυκυκλίνης, η οποία παρεμποδίζει την tTA ρυθμιστική πρωτεΐνη από το να προσδεθεί στις TREmod αλληλουχίες του πλασμιδίου pTREtight. Αφαίρεση της δοξυκυκλίνης από το

καλλιεργητικό μέσο επιτρέπει ισχυρή πρόσδεση στις TREmod αλληλουχίες και επάγει υψηλών επιπέδων μεταγραφή.

Το Tet-Off σύστημα ανταποκρίνεται εξίσου σε τετρακυκλίνη και δοξυκυκλίνη. Οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις είναι πολύ χαμηλότερες από τα κυτταροτοξικά επίπεδα, ωστόσο ο χρόνος ημιζωής της Dox (24 h) είναι μεγαλύτερος της Tc (12 h) για αυτό και χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά η πρώτη.

2.2.4.2. Διαμόλυνση και επιλογή σταθερά διαμολυσμένων κλώνων Tet-Off

Στην αρχή πραγματοποιήθηκαν πιλοτικά πειράματα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Clontech) για να εξακριβωθεί: 1) αν ο χρησιμοποιούμενος ορός είναι συμβατός με το σύστημα Tet-Off και βρήκαμε ότι ο ορός που χρησιμοποιήθηκε (Biowest, 4808) δεν περιέχει ίχνη δοξυκυκλίνης ή τετρακυκλίνης. 2) ποια είναι η κατάλληλη συγκέντρωση για τα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά geneticin (Applichem, G418) και υδρομυκίνη (Life Technologies). Πραγματοποιώντας τιτλοδότηση (καμπύλες θανάτου) βρήκαμε ότι οι κατάλληλες συγκεντρώσεις για τις χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές είναι:

Κυτταρική σειρά	Συγκέντρωση G418	Συγκέντρωση υδρομυκίνης
MCF7	1mg/ml	600μg/ml
PC3	500μg/ml	200μg/ml
90-8	500μg/ml	300μg/ml
PC12	-	300μg/ml

Η διαδικασία δημιουργίας της πρώτης σταθερής διαμόλυνσης των κυττάρων με το πλασμίδιο pTet-Off που περιέχει το tTA στοιχείο και οι επιλογή των κλώνων έγινε με τη χρήση της λιποφεκταμίνης (Lipofectamine™, Life Technologies) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, μια μέρα πριν τη διαμόλυνση, 2×10^6 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε 60 mm τρυβλίο, με το σύννηθες καλλιεργητικό μέσο αλλά χωρίς αντιβιοτικά, ώστε να καλύπτουν περίπου το 80% του τρυβλίου τη στιγμή της διαμόλυνσης. Για κάθε

συνθήκη σε 60 mm τρυβλίο προετοιμάστηκαν τα ακόλουθα συμπλέγματα: α) 3 μg DNA διαλύθηκαν σε 300 μl Opti-MEM I Reduced Serum Medium χωρίς ορό και ακολούθησε ήπια ανάδευση, β) 6 μl λιποφεκταμίνης διαλύθηκαν, επίσης, σε 300 μl Opti-MEM και ακολούθησε ήπια ανάδευση, γ) Τα διαλυμένα DNA και λιποφεκταμίνη αναμίχθηκαν, ανακινήθηκαν ήπια και επωάστηκαν, σε θερμοκρασία δωματίου, για 40 min, δ) Για κάθε διαμόλυνση προστέθηκε 0,6 ml Opti-MEM στα συμπλέγματα (τελικός όγκος: 1,2 ml) και ακολούθησε ήπια ανακίνηση. Μετά τη δημιουργία των συμπλεγμάτων, το καλλιεργητικό μέσο των κυττάρων αντικαταστάθηκε από 0,6 ml μέσου, χωρίς ορό, συν τα 1,2 ml των συμπλεγμάτων και το τρυβλίο ανακινήθηκε ήπια. Τα κύτταρα επωάστηκαν, στους 37°C, σε CO₂ κλίβανο για 4 h και στη συνέχεια προστέθηκαν επιπλέον 0,6 ml καλλιεργητικού μέσου με ορό και η επώαση συνεχίστηκε για ακόμα 16 h. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα πλύθηκαν και προστέθηκε το σύνηθες καλλιεργητικό μέσο με 5% ορό και αντιβιοτικά. Ακολούθησε επώαση σε καλλιεργητικό κλίβανο για 72 h ώστε να πραγματοποιηθούν τουλάχιστον δύο γύροι κυτταρικής διαίρεσης, αφού τόσες είναι οι απαραίτητες διαιρέσεις μετά τη διαμόλυνση προκειμένου να επιτραπεί η έκφραση της ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αναδιανεμήθηκαν αραιά (1:10) σε 100 mm τρυβλία με το αντίστοιχο καλλιεργητικό τους μέσο και προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα G418. Το καλλιεργητικό μέσο και το αντιβιοτικό αντικαθίστατο κάθε τέσσερις ημέρες. Ύστερα από πέντε μέρες τα κύτταρα στα οποία δεν ενσωματώθηκε το πλασμίδιο ξεκίνησαν να πεθαίνουν. 2-4 εβδομάδες αργότερα άρχισαν να εμφανίζονται οι πρώτες ανθεκτικές σε G418 αποικίες. Με τη χρήση αποστειρωμένων κυλίνδρων απομονώθηκαν τουλάχιστον 20 μεγάλες και υγιείς αποικίες οι οποίες τοποθετήθηκαν σε καλλιεργητικά πιάτα 24 θέσεων (24-well plate) παρουσία 500 μg/ml G418. Όταν αναπτύχθηκαν τόσο ώστε να καλύψουν την επιφάνεια των πηγαδιών κατά 80% αναδιανεμήθηκαν σε μεγαλύτερα τρυβλία παρουσία 500 μg/ml G418.

Όταν μεγάλωσαν οι υποψήφιοι Tet-Off κυτταρικοί κλώνοι πραγματοποιήθηκαν παροδικές διαμολύνσεις με ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιώντας το pBI-EGFP πλασμίδιο για να διαπιστωθεί ποιοί είναι οι κλώνοι που πληρούν καλύτερα τα κριτήρια για τη δημιουργία σταθερών διαμολυσμένων Tet-Off κυτταρικών σειρών. Συνοπτικά, ένα 35 mm τρυβλίο

από κάθε κλώνο, κάθε κυτταρικής σειράς διαμολύνθηκε με 2 μg pBI-EGFP με τη χρήση των παρακάτω προγραμμάτων στο προϊόν Amaxa, MCF7: G-013, PC3: O-003, 90-8: A-023, PC12: A-023. Μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα χωρίστηκαν σε 2 διαφορετικά 35 mm τρυβλία και προστέθηκε ή όχι 100 ng/ml Dox (Sigma) ώστε να διακοπεί η έκφραση του GFP. 48–72 h μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα λύθηκαν και αναλύθηκαν για την έκφραση ή μη του GFP. Επιλέχθηκαν οι κλώνοι που παρουσίασαν τη μέγιστη επαγωγή (μέγιστη έκφραση του GFP και ελάχιστο background) και κρατήθηκαν άμεσα στοκ στους -80°C.

2.2.4.3. Διαμόλυνση και επιλογή σταθερά διαμολυσμένων κλώνων pTRE-Tight-PKCε και pTRE-Tight-DNPKCε

Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία Amaxa, ένας επιλεγμένος κλώνος Tet-Off από κάθε κυτταρική σειρά διαμολύνθηκε με το ανασυνδυασμένο pTRE-Tight πλασμίδιο, που περιείχε την PKCε αγρίου τύπου (PKCε wild type) ή τη κυρίαρχα αρνητική μορφή της (DNPKCε), μαζί με ένα πλασμίδιο που φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη (pTK-Hyg). Τα δύο πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν σε αναλογία 20:1. Η διαμόλυνση στις διάφορες κυτταρικές σειρές, έγινε με τα προγράμματα που προαναφέρθηκαν. Τα διαμολυσμένα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία και για την επιλογή των κλώνων ακολουθήθηκε διαδικασία όμοια με την επιλογή των Tet-Off κλώνων με τη διαφορά ότι το χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό ήταν η υδρομυκίνη και ότι στο καλλιεργητικό μέσο προστέθηκε 100 ng/ml Dox ώστε να μην εκφραστεί το κατά περίπτωση γονίδιο ενδιαφέροντος. 4-6 εβδομάδες μετά τη διαμόλυνση οι κλώνοι απομονώθηκαν με αποστειρωμένους κυλίνδρους και μεταφέρθηκαν σε ξεχωριστά καλλιεργητικά πιάτα. Τουλάχιστον 20 κλώνοι εξετάστηκαν ως προς την έκφραση της PKCε παρουσία ή απουσία 100 ng/ml Dox για 48 h με ανοσοσύτρωση κατά Western. Όπως και στις Tet-Off κυτταρικές σειρές, επιλέχθηκαν οι κλώνοι με τη μεγαλύτερη δυνατή επαγωγή και το μικρότερη δυνατή background έκφραση της PKCε.

2.2.5. Χορήγηση αγωνιστών, ανταγωνιστών και αναστολέων

Ο αναστολέας των κλασικών PKC Gö6976 (3 μ M) ήταν προϊόν της Calbiochem, ο ειδικός και αντιστρεπτός αναστολέας του πρωτεασώματος MG132 (1 μ M) και το ρετινοϊκό οξύ (Retinoic Acid, RA, 10 μ M) προήλθε από τη Sigma, ο αναστολέας του CRM1-εξαρτώμενου μονοπατιού πυρηνικής εξόδου λεπτομυκίνη B (Leptomycin B, LMB, 20ng/ml) ήταν της LC Laboratories, ενώ ο ενεργοποιητής κλασικών και νεοφανών PKC, ο φορβικός εστέρας TPA (100 nM) και ο αναστολέας των φωσφατασών calyculin A (1 nM) προήλθαν από την Alexis. Οι αναστολείς του κυτταρικού κύκλου θυμιδίνη (2,5 mM) και νοκοδαζόλη (nocodazole, 400 ng/ml) ήταν της MP Biomedicals. Το ειδικό για την PKCε πεπτίδιο ενεργοποιητής ψεRACK [CYGRKKRRQRRR-NH₂ (TAT) \S-S/CHDAPIGYD –COOH] (1 μ M) και το PKCε ειδικό πεπτίδιο αναστολέας εV1-2 [CYGRKKRRQRRR-NH₂ (TAT) \S-S/EAVSLKPT] (1 μ M) [313] συντέθηκαν στο Biopolymer Facility του Πανεπιστημίου της Maryland. Τα κύτταρα προεπώαστηκαν με Gö6976 και εV1-2 για 20 min πριν την προσθήκη TPA. Όλες οι υπόλοιπες επωάσεις με αναστολείς ή ενεργοποιητές έγιναν όπως επισημαίνονται στα αποτελέσματα. Οι φαρμακολογικοί παράγοντες προστέθηκαν σε στείρο περιβάλλον και τα κύτταρα αμέσως τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο των 37°C και 5% CO₂.

2.2.6. Συγχρονισμός κυττάρων

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες πολλαπλασιασμού (proliferation assays) ώστε να διαπιστωθεί ο χρόνος διπλασιασμού και η διάρκεια κάθε φάσης του κυτταρικού κύκλου των SF268 κυττάρων. Συγκεκριμένα, 10⁵ κύτταρα τοποθετήθηκαν σε κάθε ένα από 10 x 35 mm τρυβλία. Κάθε 6 h τα κύτταρα από ένα τρυβλίο συλλέγονταν και μετρούνταν σε αιματοκυτόμετρο. Για τον συγχρονισμό στην αρχή της S φάσης τροποποιήθηκε και διαμορφώθηκε ένα προηγούμενα γνωστό πρωτόκολλο θυμιδίνης [314]. Εν συντομία, 2x10⁵ κύτταρα τοποθετήθηκαν σε 100 mm καλλιεργητικά πιάτα. Την επόμενη μέρα, το καλλιεργητικό μέσο αντικαταστάθηκε με RPMI που περιείχε 2,5 mM θυμιδίνη (MP Biomedicals) και 5% FBS και τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 h (G1/S σημείο). Το καλλιεργητικό μέσο με τη θυμιδίνη αφαιρέθηκε και τα κύτταρα, αφού

πλύθηκαν δύο φορές με PBS, τοποθετήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό που περιείχε 10% FBS. Για τις επόμενες 12 h τα απελευθερωμένα κύτταρα, που έμπαιναν στην S φάση, συλλέχθηκαν κάθε 4 h (σημεία S1, S2, S3). Όταν τα κύτταρα έφτασαν στην G2 φάση, προστέθηκε νοκοδαζόλη με τελική συγκέντρωση 400 ng/ml σε μέσο που περιείχε 5% FBS και η καλλιέργεια συνεχίστηκε για 2,5 (G2a σημείο), 5 (G2b σημείο) ή 8 h (G2/M σημείο). Τα στρογγυλά μιτωτικά κύτταρα συλλέχθηκαν με τη διαδικασία shake-off. Μέρος των κυττάρων επανατοποθετήθηκαν σε τρυβλίο με φρέσκο θρεπτικό μέσο και 10% FBS, ώστε να απελευθερωθούν από την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, και συνέχισαν στη μίτωση για 30 (M1 σημείο) ή 60 min (M2 σημείο) και τη G1 φάση για 5 h. Η επιβεβαίωση ότι το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο συγχρονίζει τα κύτταρα έγινε με ανοσοσύτωση κατά Western με ειδικούς δείκτες του κυτταρικού κύκλου (cyclin B1, cyclin D1, cRaf1).

2.2.7. Δοκιμασία διεισδυτικότητας Matrigel

Το MatrigelTM είναι μια βασική μεμβράνη που προέρχεται από τα EHS κύτταρα σαρκώματος και περιέχει στοιχεία της βασικής μεμβράνης (κολλαγόνα, λαμινίνη και πρωτεογλυκάνες) αλλά και αποικοδομητικά ένζυμα της θεμέλιας ουσίας (matrix degrading enzymes). Η δοκιμασία διεισδυτικότητας Matrigel χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό της διεισδυτικής ικανότητας καρκινικών κυττάρων μετά από φαρμακολογικές επιδράσεις. Η διαδικασία έχει ως εξής: 0,3 ml Matrigel (10 mg/ml, BD Biosciences) προστέθηκε σε τρυβλία 24 θέσεων και επωάστηκε, στους 37°C, για 15 min προκειμένου να στερεοποιηθεί. $6,25 \times 10^3$ κύτταρα μετρήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε κάθε θέση του τρυβλίου. Ο ενεργοποιητής της PKCε, ψεRACK, προστέθηκε ή όχι στο καλλιεργητικό μέσο κάθε 24 h για συνολικά 72 h. Η μορφολογία των κυτταρικών δικτύων αναλύθηκε μικροσκοπικά με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου (Leica DM IRB).

2.3. Ανάλυση επιπέδων mRNA

2.3.1. Απομόνωση ολικού RNA

Ολικό RNA απομονώθηκε από πληθώρα κυτταρικών σειρών με το αντιδραστήριο TRIzol (Life Technologies), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το TRIzol είναι ένα ομογενές διάλυμα φαινόλης με αποδιατάκτες και αναστολείς RNAσών ευρέως χρησιμοποιούμενο σε απομονώσεις ολικού RNA. Συγκεκριμένα, ένα 100 mm τρυβλίο με προσκολλημένα ευκαρυωτικά κύτταρα πλύθηκε με PBS και προστέθηκε 1 ml TRIzol. Τα κύτταρα αποξέθηκαν από την επιφάνεια του τρυβλίου μεταφέρθηκαν σε eppendorf όπου παρέμειναν, σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 min. Στη συνέχεια, για κάθε ml TRIzol, προστέθηκαν 0,2 ml βρωμοχλωροπροπάνιο και το διάλυμα αναδεύτηκε καλά και επωάστηκε, σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση, στους 4°C και 12000 g, για 20 min. Μετά τη φυγοκέντρηση το μίγμα διαχωρίστηκε σε τρεις φάσεις, την άνω φάση που είναι υδατική και περιέχει το RNA, τη μεσαία που περιέχει τις πρωτεΐνες και την κάτω στην οποία βρίσκεται η φαινόλη. Η υδατική φάση συλλέχθηκε με προσοχή, μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf και ακολούθησε κατακρήμνιση του RNA με την προσθήκη 0,5 ml ισοπροπανόλης για κάθε 1 ml TRIzol. Το μίγμα επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min, φυγοκεντρήθηκε, στους 4°C και 12000 g, για 20 min και το ίζημα πλύθηκε με 1 ml αιθανόλης 75% και φυγοκεντρήθηκε ξανά για 10 min. Τελικά, το ίζημα του RNA στεγνώθηκε και αναδιαλύθηκε σε 50 μl, ελεύθερο ριβονουκλεάσης, ddH₂O (double distilled H₂O). Η ποσότητά του προσδιορίστηκε με μέτρηση της οπτικής του πυκνότητας στα 260 nm. Η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε από την απορρόφηση OD₂₆₀ x 40 (σταθερά για τη μετατροπή σε συγκέντρωση μονόκλωνων μορίων RNA) x 100 (η αραίωση). Ο λόγος των οπτικών απορροφήσεων OD₂₆₀/OD₂₈₀ αποτελεί δείκτη της καθαρότητας του RNA και πρέπει να είναι κοντά στο 2.

2.3.2. Αντίστροφη μεταγραφή και Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενζυματική

ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA ή cDNA. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των μεταγραφικών επιπέδων πληθώρας γονιδίων. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA που απομονώθηκε από διάφορες κυτταρικές σειρές, μεταγράφηκε αντίστροφα (Reverse Transcribed, RT) σε cDNA και υπεβλήθη σε PCR με ειδικούς, για συγκεκριμένα γονίδια, εκκινητές. Αναλυτικά, σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα προστέθηκαν 1 µg ολικού RNA, 10 ng/ml τυχαίων εκκινητών (random primers) (Life Technologies), 1 µM dNTPs (PROMEGA) και ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 12 µl. Το μίγμα αποδιατάχθηκε στους 65°C για 5 min και τοποθετήθηκε, απευθείας, σε πάγο. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 4 µl ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος (5X First-Strand Buffer), 2 µl 0,1 M DTT, και 1 µl RNaseOUT (40 U/µl), όλα από την Life Technologies, και το μίγμα επωάστηκε στους 25°C για 2 min. Τελικά, προστέθηκε 0,5 µl (100 U) της αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript™ II RT (Life Technologies), το διάλυμα αναδεύτηκε και επωάστηκε διαδοχικά στους 25°C για 10 min, στους 42°C για 50 min και στους 70°C για 15 min (ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο). Μετά το πέρας της αντίδρασης τα cDNA φυλάχθηκαν στους -20°C.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε με αντιδραστήρια της HyTest Taq και ειδικούς, σε κάθε περίπτωση, εκκινητές. Συγκεκριμένα, σε τελικό όγκο αντίδρασης 10µl, χρησιμοποιήθηκαν: 0,5 µg cDNA, ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (1x PCR Buffer), 1,5 mM MgCl₂, 0.25mM dNTPs (κάθε ένα), 0,2 µM πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή, 1 U Taq Πολυμεράση και ddH₂O. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, υπό τις ακόλουθες συνθήκες:

1. Αποδιάταξη στους 94°C για 5 min
2. Αποδιάταξη στους 94°C για 1 min
3. Υβριδοποίηση σε κατάλληλη, κατά περίπτωση, θερμοκρασία για 1 min
4. Επιμήκυνση στους 72°C για 2 min
5. Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 min

Τα βήματα 2-4 επαναλήφθηκαν με κατάλληλο αριθμό κύκλων ώστε τα παραγόμενα προϊόντα της PCR να βρίσκονται στην εκθετική φάση σύνθεσης και η PCR να θεωρείται ημι-ποσοτική.

Στον πίνακα 6 που ακολουθεί φαίνονται οι αλληλουχίες όλων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, τα γονίδια που αφορούν, το μέγεθος των προϊόντων, η θερμοκρασία τήξεώς τους (melting temperature, T_m) και ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων κύκλων αποδιάταξης-υβριδοποίησης-επιμήκυνσης σε κάθε περίπτωση. Η οπτικοποίηση των προϊόντων της PCR έγινε σε πηκτή αγαρόζης με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου.

Γονίδιο	Αλληλουχία 5'- 3'	Προϊόν	T _m x Κύκλοι
PKC α	F: CGAGGAAGGAAACATGGAAGCTCAG	193bp	56°C x 35
	R: CCTGTCCGGCAAGCATCACCTTT		
PKC β I	F: AGAGACAAGAGAGACACCTCCAAC	218bp	53°C x 35
	R: GAATTGATACATACGCTTGGCTTG		
PKC β II	F: TGTGGGCGAAATGCTGAAAACCTTCGACCGA	275bp	58°C x 35
	R: GTCTCATCAGAAAATCAAACATGGATGCAACTTGGC		
PKC γ	F: TGACGAAACAGAAGACCCGAAC	320bp	58°C x 35
	R: CTCATACAATTCCAGGGGGTAGTT		
PKC δ	F: GCATCGCCTTCAACTCCTATGAGCT	249bp	60°C x 35
	R: ACACACCCACGGTCACCTCAGA		
PKC ϵ	F: TCAATGGCCTTCTTAAGATCAAAA	388bp	58°C x 35
	R: CCTGAGAGATCGATGATCACATAC		
PKC ζ	F: CCGAGCACCCCTGAGCAGCCTG	321bp	62°C x 35
	R: GTCGGCGTCCTCGTTCTTGTCGTCT		
PKC η	F: AACGAGGAGTTTTGCGCTAA	259bp	58°C x 35
	R: TGGTAAAATGTTTGAAGATCCG		
PKC θ	F: CTCGTCAAAGAGTATGTCTGAATCA	309bp	54°C x 35
	R: AATTCATTCATGTCCTTTGTGTCACTCA		
PKC ι	F: TGTGTTCCCTTGTGTACCAGAACGT	292bp	57°C x 35
	R: CATCACTGGTTCCTGTGGCAAAG		
PKC μ	F: TATCCAGGAAGGCGATCTTATTGAAGTG	236bp	56°C x 35
	R: GCCTCACACCGCTGCAATTGTTG		
GAPDH	F: ATGGTGAAAGTCGGAGTCAA	200bp	51°C x 22
	R: ATCACAAGTTTCCCGTTCTC		
β -actin	F: TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA	600bp	56°C x 22
	R: CTAGAAGCAGCGGTGGAGGATGGAGGG		

ki-67	F: ACCCTGCGACTCTCCACAGT	464bp	54°C x 26
	R: GCTCCTTCTGTACGTCCCTTTT		
MPZ	F: TCATCCAGCCCCAGCCCTAT	260bp	56°C x 40
	R: CCCACCTCGTCAATGTAGGG		
S-100b	F: ATGTCTGAGCTGGAGAAGGC	201bp	53°C x 36
	R: GCCGTCTCCATCATTGTCCA		
MBP	F: GCCGAAGGCCAGAGACCAGGATTT	300bp	58°C x 40
	R: AAGTCCAAGGGTGGAGGGGTGAAC		
GFAP	F: GGGAGGCGGCCAGTTATCAGGA	300bp	58°C x 36
	R: CCAGCAGAGGCGGAGCAACTATC		
NF1- Δex43	F: ACAGCCTTCTCAGGCCAACAC	299bp/	53°C x 36
	R: CCAGTGTAGCCAGAACAGTAAGAAGC	176bp	
NF1- NLS	F: ACAGCCTTCTCAGGCCAACAC	108bp	53°C x 36
	R: GGGTGTGTGATCCCTGATTCC		
GRDI/II	F: ATTGTGATCACATCCTCTGATTGG	355bp/	52°C x 35
	R: CATGATTGGCAATACTCTGAA	418bp	

Πίνακας 6. Λίστα χρησιμοποιούμενων εκκινήτων και κατάλληλες συνθήκες του εκάστοτε PCR.

2.4. Επεξεργασία και Ανάλυση Πρωτεϊνών

2.4.1. Απομόνωση πρωτεϊνών

Κατάλληλη ποσότητα κυττάρων (όχι λιγότερα από 5×10^6 κύτταρα) υποβλήθηκε στις επιθυμητές συνθήκες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και οι πρωτεΐνες εκχυλίσθηκαν με τη χρήση δύο εναλλακτικών διαλυμάτων το RIPA (10 mM Tris pH 7.5, 158 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton-X-100, 1% NaDoc) για όλα τα πειράματα ανοσοσύτωσης κατά Western ή το NP-40 (50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1% NP-40, pH 8.0) για τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Στα δύο, αυτά, διαλύματα προστέθηκαν αναστολείς φωσφατασών (ocadaic acid 1 nM, sodium orthovanadate 1 mM, NaF 2 mM) και πρωτεασών (1 mM PMSF και κοκτέιλ αναστολέων από Sigma). Η απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε όπως έχει

προηγούμενως περιγραφεί [83, 315]. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με παγωμένο PBS και, αφού προστέθηκε RIPA ή NP-40, αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο με τη χρήση scraper και συλλέχθηκαν με σύριγγα ινσουλίνης 27G. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε erpendorf και ομογενοποιήθηκαν με υπερήχηση (sonication) (4 x 5 sec) ή με τη χρήση της σύριγγας. Ακολούθησε υπό ανάδευση επώαση των δειγμάτων, στους 4°C, για 20 min, φυγοκέντρηση, στους 4°C και 13000 rpm, για 20 min και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα erpendorf. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε στον πάγο.

2.4.2. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών

Η ανοσοκατακρήμνιση είναι η μέθοδος με την οποία πρωτεϊνικά αντιγόνα ενός διαλύματος προσδένονται σε κατάλληλα αντισώματα δημιουργώντας ανοσοσύμπλοκα τα οποία κατακρημνίζονται προκειμένου να μελετηθούν για την ύπαρξη άλλων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με αυτά. Η συγκεκριμένη διαδικασία είναι κατάλληλη ώστε να απομονωθεί και να συμπυκνωθεί μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη από δείγμα που μπορεί να περιέχει χιλιάδες διαφορετικών πρωτεϊνών. Η ανοσοκατακρήμνιση προϋποθέτει ότι το αντίσωμα θα δεσμευτεί σε σταθερό υπόστρωμα σε κάποιο σημείο της διαδικασίας το οποίο αποτελείται από σφαιρίδια αγαρόζης τα οποία φέρουν πρωτεΐνες G και έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών τάξης G, και να σχηματίζουν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες. Τα κύτταρα λύθηκαν σε διάλυμα NP-40 με τη διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω. Ταυτόχρονα με την προετοιμασία του κυτταρικού εκχυλίσματος, σφαιρίδια αγαρόζης-πρωτεΐνης G (UBI) πλύθηκαν με PBS εξισορροπήθηκαν σε NP-40 με αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών. Το εκχύλισμα επώαστηκε με 20 μl σφαιριδίων αγαρόζης (50%) για 30 min (pre-clearing) και ακολούθησε απομάκρυνση των σφαιριδίων με φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 1 min. Μετά την απομάκρυνση των σφαιριδίων, προσδιορίστηκε η πρωτεϊνική συγκέντρωση και το εκχύλισμα επώαστηκε με 0,2 μg κατάλληλου αντισώματος/200 μg ολικής πρωτεΐνης, στους 4°C, για 16 h υπό συνεχή ανάδευση. Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος κατακρημνίστηκε με τη βοήθεια νέων σφαιριδίων, τα οποία επώαστηκαν με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα, υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C, για 4 h. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις

6000 rpm για 2 min, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα ξεπλύθηκε τρεις φορές με διάλυμα NP-40. Προκειμένου να εκλουσθούν οι, δεσμευμένες στα σφαιρίδια αγαρόζης, πρωτεΐνες το ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα 2 x Laemmli και επωάστηκε στους 95°C για 5 min. Τελικά, φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο αναλύθηκε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).

2.4.3. Υποκυτταρική κλασμάτωση

Για την απομόνωση πυρηνικών και κυτταροπλασματικών κλασμάτων, τουλάχιστον 10^7 κύτταρα υποβλήθηκαν στις επιθυμητές συνθήκες, πλύθηκαν με παγωμένο PBS και στη συνέχεια συλλέχθηκαν σε PBS με μηχανικό τρόπο (scraper). Το εναιώρημα κυττάρων φυγοκεντρήθηκε, στους 4°C και 270 g, για 5 min και πλύθηκε ακόμα δύο φορές με PBS. Το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύθηκε σε 3 ml υποτονικό διάλυμα HLB (10 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1% NP40), που περιείχε αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών, και επωάστηκε σε πάγο για 10-20 min, έως ότου παρατηρηθεί εξόγκωση των κυττάρων στο μικροσκόπιο λόγω ωσμωτικών φαινομένων. Στη συνέχεια, το διάλυμα των κυττάρων ομογενοποιήθηκε σε ομογενοποιητή τύπου Dounce (τουλάχιστον 100 χτυπήματα), φυλάχθηκε μια μικρή ποσότητα (100 μl) ως ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (total cell lysate) και το υπόλοιπο φυγοκεντρήθηκε, στους 4°C και 270g, για 5min. Το υπερκείμενο που προκύπτει αποτελεί το κυτταροπλασματικό κλάσμα, ενώ το ίζημα το πυρηνικό. Το ίζημα αναδιαλύθηκε σε διάλυμα RIPA με αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών. Τόσο για το κυτταροπλασματικό όσο και για το πυρηνικό κλάσμα ακολουθήθηκε η διαδικασία απομόνωσης πρωτεϊνών όπως έχει περιγραφεί με τη διαφορά ότι η ομογενοποίηση έγινε με επαναλαμβανόμενους γύρους υπερήχησης (8 x 8 sec). Για τα πειράματα υποπυρηνικής κλασμάτωσης το ολικό πυρηνικό κλάσμα κλασματώθηκε περαιτέρω σε Triton X-100-διαλυτό, Dnase-διαλυτό και NaCl-διαλυτό κλάσμα όπως έχει προηγούμενα περιγραφεί [316].

2.4.4. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

Η μέθοδος Lowry είναι μια βιοχημική διαδικασία για τον προσδιορισμό των συνολικών επιπέδων πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα και είναι κατάλληλη για πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις 0,01-1,0 mg/ml. Πήρε το όνομά της από τον βιοχημικό Oliver H. Lowry που ανακάλυψε τη μέθοδο το 1957. Στη μέθοδο αυτή, η συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης αποκαλύπτεται από την αλλαγή χρώματος του δείγματος αναλογικά με τη συγκέντρωση πρωτεΐνης σε αυτό, όπως μετράται με χρωματομετρικές τεχνικές και υπολογίζεται μετά από σύγκριση με γνωστή καμπύλη συγκέντρωσης της αλβουμίνης ορού του βοδιού (BSA). Συγκεκριμένα, η μέθοδος συνδυάζει την αντίδραση ιόντων χαλκού με τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών σε αλκαλικό περιβάλλον (δοκιμασία Biuret) μαζί με οξειδωση των πρωτεϊνικών αρωματικών καταλοίπων. Στην αντίδραση προστίθεται φωσφομολυβδαινικό-φωσφοβολφραμικό αντιδραστήριο (φαινολικό αντιδραστήριο Folin Ciocalteu), το οποίο ανάγεται από το σχηματιζόμενο σύμπλοκο χαλκού-πρωτεΐνης προς κυανούν του μολυβδαινίου και κυανούν του βολφραμίου, έγχρωμα σύμπλοκα που απορροφούν σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (595 nm). Στην παρούσα εργασία η μέθοδος Lowry πραγματοποιήθηκε με αντιδραστήρια της Bio-Rad Laboratories (Dc kit), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, σε πλακίδια 96 θέσεων (96-well plate) προστέθηκαν 5 μl δείγματος και 45 μl dH₂O τα οποία αναμίχθηκαν με διάλυμα θειικού χαλκού (0,5% CuSO₄·5H₂O σε 1% τρυγικό καλιονάτριο) υπό αλκαλικές συνθήκες (2% NaCO₃ σε 0,1M NaOH). Στη συνέχεια, προστέθηκε αντιδραστήριο Folin Ciocalteu, τα δείγματα αναδεύτηκαν και μετρήθηκε η απορρόφηση των έγχρωμων συμπλόκων σε φωτόμετρο Elisa (PR2100 reader). Ταυτόχρονα, κατασκευάστηκε και η πρότυπη καμπύλη BSA στην οποία χρησιμοποιήθηκαν γνωστές συγκεντρώσεις BSA (0, 5, 10, 20, 25 μg/ml) και 5 μl διαλύματος ομογενοποίησης και dH₂O έως τελικό όγκο 50 μl. Με δεδομένο τις τιμές απορρόφησης των συμπλόκων της γνωστής ποσότητας της πρωτεΐνης BSA σχεδιάζεται η πρότυπη καμπύλη, σύμφωνα με την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος.

2.4.5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με κάθετη ηλεκτροφόρηση παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (sodium dodecyl sulfate, SDS) ενός ανιοντικού παράγοντα που αποδιατάσσει και φορτίζει τις πρωτεΐνες αρνητικά, ώστε, παρουσία ηλεκτρικού πεδίου, να διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Η πηκτή πολυακρυλαμίδης σχηματίζεται με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και bis-ακρυλαμίδης, σε θερμοκρασία δωματίου, μετά από προσθήκη υπερθειικού αμμωνίου (APS) και TEMED και αποτελείται από την πηκτή επιστοιβάξης στην οποία τα δείγματα συμπυκνώνονται ώστε να εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται. Το μοριακό βάρος της προς εξέταση πρωτεΐνης, καθορίζει την τελική συγκέντρωση ακρυλαμίδης/ bis-ακρυλαμίδης μεταβάλλοντας το μέγεθος των πόρων της πηκτής διαχωρισμού.

Αναλυτικά, δύο ειδικά τζάμια καθαρίστηκαν με μεθανόλη και τοποθετήθηκαν σε κατάλληλη συσκευή στήριξης (BioRad). Αρχικά ετοιμάστηκε το διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού με την κατάλληλη συγκέντρωση ακρυλαμίδης, σύμφωνα με τον πίνακα που ακολουθεί. Μόλις το διάλυμα τοποθετήθηκε ανάμεσα στα τζάμια, επιστοιβάχτηκε ισοβουτανόλη ώστε η επιφάνεια της πηκτής να παρουσιάζει ομοιομορφία. Μετά τον πολυμερισμό του διαλύματος διαχωρισμού, η ισοβουτανόλη απορρίφθηκε και η πηκτή πλύθηκε με dH₂O. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε η πηκτή επιστοιβάξης (σύμφωνα με τον πίνακα), η οποία περιέχει σταθερή συγκέντρωση ακρυλαμίδης, και τοποθετήθηκε πάνω από την πηκτή διαχωρισμού. Αμέσως μετά, τοποθετήθηκε το ειδικό χτενάκι για το σχηματισμό των θέσεων φόρτωσης των δειγμάτων. Μετά τον πολυμερισμό της πηκτής, τα τζάμια μεταφέρθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης (BioRad), στην οποία προστέθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (PAGE buffer: 125 mM Tris, 1 M glycine, 0,5% w/v SDS). Σε 25 mg ολικής πρωτεΐνης, των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων, προστέθηκε διάλυμα Laemmli (Laemmli sample buffer: 10% SDS, 50% Glycerol, 1% Bromophenol blue διαλυμένο σε 10% EtOH, 1M Tris pH 6.8) σε τελική συγκέντρωση 1x που περιέχει 5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη και ακολούθησε θέρμανση στους 95°C για 5 min για την πλήρη αποδιάταξη της πρωτεΐνης. Σε μία από τις διαδρομές φορτώθηκε

δείκτης μοριακών βαρών (molecular weight marker). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε υπό σταθερή τάση 180 Volts έως ότου η ενδεικτική χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης που εμπεριέχεται στο διάλυμα Laemmli μετανάστευσε στην άκρη της πηκτής στο θετικό πόλο.

Πηκτή Διαχωρισμού (10 ml)			
	8%	10%	12%
H ₂ O	4,6	4,0	3,3
30% acrylamide mix	2,7	3,3	4,0
1.5 M Tris pH 8.8	2,5	2,5	2,5
10% SDS	0,1	0,1	0,1
10% APS	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,006	0,004	0,004

Πηκτή Επιστοίβαξης (3 ml)	
H ₂ O	2,1
30% acrylamide mix	0,5
1M Tris pH 6.8	0,38
10% SDS	0,03
10% APS	0,03
TEMED	0,003

2.4.6. Ανοσοσύπωση κατά Western (Western blot)

Με την τεχνική αυτή, μπορούν να ανιχνευθούν πολύ μικρές ποσότητες μιας πρωτεΐνης σε ένα μίγμα πρωτεϊνών. Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται με τη χρήση ηλεκτρικού ρεύματος σε νιτροκυτταρίνη, απ' όπου ανιχνεύονται με την χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος μπορεί να ανιχνευθεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος, ειδικού για το πρώτο. Ένα ένζυμο που βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το δεύτερο αντίσωμα δημιουργεί ένα έγχρωμο προϊόν παρουσία του κατάλληλου υποστρώματος.

2.4.6.1. Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transfer)

Μόλις οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου, ηλεκτρομεταφέρθηκαν, με μη ομοιοπολικούς δεσμούς, σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην οποία είναι εφικτή η ανίχνευσή τους με τη χρήση ειδικών

αντισωμάτων. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υγρής (wet) μεταφοράς σε ειδική συσκευή. Συγκεκριμένα, μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτική διαχωρισμού, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Whatman, Protran, pore size 0.45 μm) και 4 φύλλα χαρτιού Whatman 3MM εξισορροπήθηκαν σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer: 50 mM Tris, 380 mM Glycine, 20% Methanol, 0.4% w/v SDS). Στη συνέχεια, 2 φύλλα Whatman, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η πηκτική διαχωρισμού και ακόμα 2 φύλλα Whatman τοποθετήθηκαν, με αυτή τη σειρά, προς τον θετικό πόλο μέσα στην ειδική πλάκα της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, στους 4°C με ρεύμα σταθερής τάσης 400 mA. Η διάρκειά της προσαρμόστηκε στο μέγεθος των προς μελέτη πρωτεϊνών, αφού οι πρωτεΐνες με μοριακό βάρος έως 70 kDa ηλεκτρομεταφέρθηκαν για μία και μισή ώρα, οι πρωτεΐνες έως 150 kDa για 2 ώρες, ενώ, οι πρωτεΐνες με μοριακό βάρος έως 250 kDa για τέσσερις ώρες.

2.4.6.2. Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών

Μετά την ηλεκτρομεταφορά, η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα κορεσμού 5% BSA (Sigma) ή γάλακτος (στην περίπτωση της PKCε) σε TBST (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20), για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να καλυφθούν οι ελεύθερες θέσεις δέσμησης της μεμβράνης και να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμευση των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν (blocking). Έπειτα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με διάλυμα κορεσμού που περιείχε συγκεκριμένο πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει συγκεκριμένο επίτοπο της πρωτεΐνης-στόχου. Η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα πραγματοποιήθηκε για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου ή 16-18 h στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις των 10 min σε διάλυμα TBST για να απομακρυνθεί το περιττό αντίσωμα και η μεμβράνη επώαστηκε, για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου, με διάλυμα TBST που περιείχε το δευτερογενές αντίσωμα. Το αντίσωμα, αυτό, αναγνωρίζει κάποια συντηρημένη περιοχή του πρωτογενούς αντισώματος και παράλληλα φέρει ένα μόριο ιχνηθέτη (υπεροξειδάση του ραπανιού ή αλκαλική φωσφατάση), καθιστώντας δυνατή την ανίχνευση της προς μελέτη πρωτεΐνης με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) ή με τη μέθοδο της

αλκαλικής φωσφατάσης (Alkaline Phosphatase, AP). Ακολούθησαν τρεις πλύσεις των 10min με TBST.

Στην περίπτωση της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης διαβρέχτηκε με μίγμα αντιδραστηρίων ECL (Santa-Cruz, Luminol Reagent) για 1 min και εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ (Fuji). Στην περίπτωση της αλκαλικής φωσφατάσης η μεμβράνη πλύθηκε με ειδικό αλκαλικό διάλυμα (130 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9.5) για 10 min και προστέθηκαν κατάλληλα αντιδρώντα της αλκαλικής φωσφατάσης, ήτοι 33 μl 0,5% w/v 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλο-φωσφορικό (BCIP) που είναι το υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης και 66 μl 0,5% w/v της χρωστικής κυανό του νιπροτετραζολίου (NBT). Η αντίδραση επωάστηκε έως ότου εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες και τερματίστηκε με προσθήκη 50 mM EDTA.

Τα πρωτοταγή αντισώματα και οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις τους ήταν:

Μονοκλωνικά αντισώματα μυός: PKCε (1:500), c-Raf1 (1:1000), p120GAP (1:1000), P-ERK1/2 (1:1000), lamin A/C (1:1000), cyclin B1 (1:1000) από τη Santa Cruz, PKCα (1:1000) από την Transduction, α-, β-tubulin (1:2000), actin (1:3000) από τη Sigma και γ- tubulin από την Abcam (1:10000).

Πολυκλωνικά αντισώματα αίγας: P-Ser729 PKCε (1:1000) από τη Santa Cruz και κονίκλου: GFP (1:1000), P-MARCKS (1:1000), Neurofibromin sc-67 και sc-68 (1:1000), cyclin D1 (1:500), karyopherin β3 (1:1000) από τη Santa Cruz, RFP (1:1000) Chromotek και lamin B (Sigma).

Τα δευτεροταγή αντισώματα και οι χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις τους ήταν:

Συζευγμένα με υπεροξειδάση του ραπανιού (Horseradish Peroxidase, HRP): goat anti mouse και goat anti rabbit σε συγκεντρώσεις 1:14000 (Santa Cruz), rabbit anti goat σε συγκέντρωση 1:40000 (Sigma).

Συζευγμένα με αλκαλική φωσφατάση: goat anti mouse και goat anti rabbit σε συγκεντρώσεις 1:3000, όλα από τη Santa Cruz.

2.4.7. Δοκιμασία αλκαλικής φωσφατάσης (SAP assay)

Η αλκαλική φωσφατάση είναι ένα υδρολυτικό ένζυμο που αφαιρεί ομάδες φωσφόρου από πολλούς τύπους μορίων όπως νουκλεοτίδια, αλκαλοειδή και πρωτεΐνες με μια διαδικασία γνωστή ως αποφωσφορυλίωση. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί [84]. Εν συντομία, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν στην ίδια πηκτή 8% ακρυλαμίδης και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κατά τα γνωστά. Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πλύθηκε διαδοχικά με: διάλυμα TBST για 10 min (δύο φορές), διάλυμα 0.1M Tris pH 8.8, για 10 min, διάλυμα 0.1 M Tris pH 8.8, 5 mM MgCl₂. Έπειτα, η μεμβράνη επώαστηκε, για 4 h στους 37 °C, με διάλυμα 0.1 M Tris pH 8.8, 5 mM MgCl₂, το οποίο περιείχε ή όχι αλκαλική φωσφατάση γαρίδας (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) σε τελική συγκέντρωση 10 U/ml. Τέλος, μετά την επώαση πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις των 10 min σε TBST και ακολούθησε ανοσοσύτρωση κατά Western με το neurofibromin sc-67 αντίσωμα, όπως έχει περιγραφεί.

2.4.8. Πυκνομετρική και στατιστική ανάλυση

Τα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα κάθε γονιδίου ενδιαφέροντος ποσοτικοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Image J του NIH το οποίο μετράει τη σχετική φωτεινότητα των διαφορετικών ζωνών. Στις μετρήσεις συναξιολογήθηκε η επιφάνεια κάθε ζώνης και η φωτεινότητα του υποβάθρου (background). Όλες οι μετρήσεις κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα γονιδίων που συντηρούν την κυτταρική λειτουργία (housekeeping genes) όπως η ακτίνη, η τουμπουλίνη, και η αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) ή γονίδια των οποίων τα επίπεδα δεν αλλάζουν με τις διάφορες επώσεις και χειρισμούς, όπως η p120GAP.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 3-8 φορές με παρόμοια αποτελέσματα και τα αριθμητικά δεδομένα αναλύθηκαν στατιστικά με τη μέθοδο ανάλυσης της διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA).

2.4.9. Ανοσοκυτταροχημεία φθορισμού

Η τεχνική της ανοσοκυτταροχημείας φθορισμού χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση της ύπαρξης και κατανομής μιας πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο και εκμεταλλεύεται την ειδικότητα που παρουσιάζουν τα αντισώματα ενάντια σε επίτοπους πρωτεϊνών ώστε φθορίζουσες χρωστικές να οδηγηθούν σε συγκεκριμένους βιομοριακούς στόχους. Ο ανοσοφθορισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλες μη-ανοσολογικές μεθόδους χρώσης όπως με χρωστικές που βάφουν το DNA (Hoechst ή DAPI) ή φαλλοϊδίνες που φέρουν φθορίζοντα ανάλογα και δένονται στην F-ακτίνη. Συγκεκριμένα, 10^4 κύτταρα επιστρώνονται σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες 18 mm εντός τρυβλίου 12 θέσεων και αφήνονται με θρεπτικό μέσο. Την επόμενη μέρα, τα κύτταρα υποβάλλονται στις επιθυμητές συνθήκες ή χειρισμούς και υπόκεινται σε ανοσοκυτταροχημεία φθορισμού. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα ανοσοφθορισμού για κύτταρα και πυρήνες κυττάρων τα οποία διαφέρουν στη χρήση ή μη ουσίας δημιουργίας σταυροειδών δεσμών (crosslinker) και στην ισχυρότητα του πρωτοκόλλου διαπερατότητας.

Πρωτόκολλο χωρίς crosslinker

Για την οπτικοποίηση κυτταροπλασματικών, διαλυτών πρωτεϊνών, τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS Ca^{2+}/Mg^{2+} και μονιμοποιήθηκαν με 4% PFA (paraformaldehyde, PFA) σε PBS, σε θερμοκρασία δωματίου, για 20 min. Έπειτα, οι καλυπτρίδες πλύθηκαν τρεις φορές με PBS για 5 min κάθε φορά και ακολούθησε επώαση με διάλυμα 0.1% Triton-X σε PBS για 3 min ώστε η μεμβράνη των κυττάρων να γίνει διαπερατή σε αντισώματα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν, αρχικά, με διάλυμα 3% φυσιολογικού ορού αίγας (Normal Goat Serum, NGS) σε PBS για 30 min, ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των πρωτογενών αντισωμάτων (blocking) και ακολούθως με τα πρωτογενή αντισώματα διαλυμένα σε διάλυμα blocking, στους 4°C, για 16 h. Την επόμενη μέρα έγιναν τρεις πλύσεις των 5 min με PBS και οι καλυπτρίδες επώαστηκαν με κατάλληλα δευτερογενή αντισώματα που ήταν συνδεδεμένα με ροδαμίνη (Rhodamine, κόκκινο) ή fluorescein isothiocyanate (FITC, πράσινο), σε θερμοκρασία δωματίου, για 1 h. Οι πυρήνες οπτικοποιήθηκαν με τη χρωστική Hoechst 33258 (Pharmingen,

μπλε) και η F-ακτίνη με φαλλοϊδίνη (Alexa Fluor, μωβ). Τέλος, τα κύτταρα πλύθηκαν ξανά με PBS και οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με ειδικό διάλυμα επικόλλησης (mounting media) και σφραγίστηκαν με μανό για μακροχρόνια συντήρηση.

Για ανοσοφθορισμό σε απομονωμένους πυρήνες, 10^4 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε 18 mm καλυπτρίδες, επιστρωμένες με L-πολυλυσίνη, για 16 h και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε διαδοχικά διαλύματα εκχύλισης των μεμβρανών, του κυτταροπλάσματος και των κυτταρικών οργανιδίων όπως έχει προηγουμένα περιγραφεί [317]. Οι εναπομείναντες πυρήνες μονιμοποιήθηκαν και βάφτηκαν όπως αναφέρεται παραπάνω.

Πρωτόκολλο με crosslinker DSP

Η λειτουργία μιας πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται από σημαντικές αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες μπορεί να είναι παροδικές και ημι-σταθερές. Ο χημικός σχηματισμός σταυροειδών δεσμών, χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια που έχουν στο μόριο τους ενεργές τελικές ομάδες, οι οποίες αντιδρούν με λειτουργικές ομάδες, προσφέρει μια άμεση μέθοδο για αναγνώριση παροδικών, ημι-σταθερών και σταθερών αντιδράσεων. Στο πρωτόκολλο, αυτό, εκχυλίζεται το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος, ενώ, παράλληλα χρησιμοποιείται ως crosslinker η ουσία disuccinimidyl propionate (DSP, Lomant's Reagent), γεγονός που το κάνουν το πλέον κατάλληλο για την οπτικοποίηση κυτταροσκελετικών δομών (ακτίνη και τουμπουλίνη) αλλά και σχετιζόμενων με αυτές πρωτεϊνών. Αναλυτικά, Τα θρεπτικό μέσο των κυττάρων αντικαταστάθηκε με διάλυμα 1 mM DSP (Pierce) σε HBSS, σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 min ώστε να δημιουργηθούν σταυροειδείς δεσμοί μεταξύ πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν. Έπειτα, το διάλυμα αντικαταστάθηκε με 1 mM DSP σε TSB (0.5% Triton-X σε SB) και τα κύτταρα επώαστηκαν, στους 37°C, για 10 min ώστε να γίνει η εκχύλιση του κυτταροπλάσματος. Στη συνέχεια έγιναν δύο πλύσεις με TBS για 1 min η κάθε μία και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 4% PFA σε SB (1 mM EGTA, 4% Polyethylene Glycol 8000, 0.0015% phenol red, 100 mM PIPES, pH 6.9), σε θερμοκρασία δωματίου, για 20 min. Ακολούθως, οι καλυπτρίδες επώαστηκαν με 3% NGS σε PHEM (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2mM MgCl₂, pH 6.9) για 30 min και στη συνέχεια το διάλυμα blocking

αντικαταστάθηκε από τα πρωτογενή αντισώματα, στους 10°C (σε χαμηλότερες θερμοκρασίες οι μικροσωληνίσκοι αποπολυμερίζονται), για 16 h. Στη συνέχεια, έγιναν τρεις πλύσεις των 5 min με PHEM, ακολούθησε επώαση με δευτερογενή αντισώματα, Hoechst και φαλλοϊδίνη, σε θερμοκρασία δωματίου, για 1 h και επανάληψη των πλύσεων με PHEM.

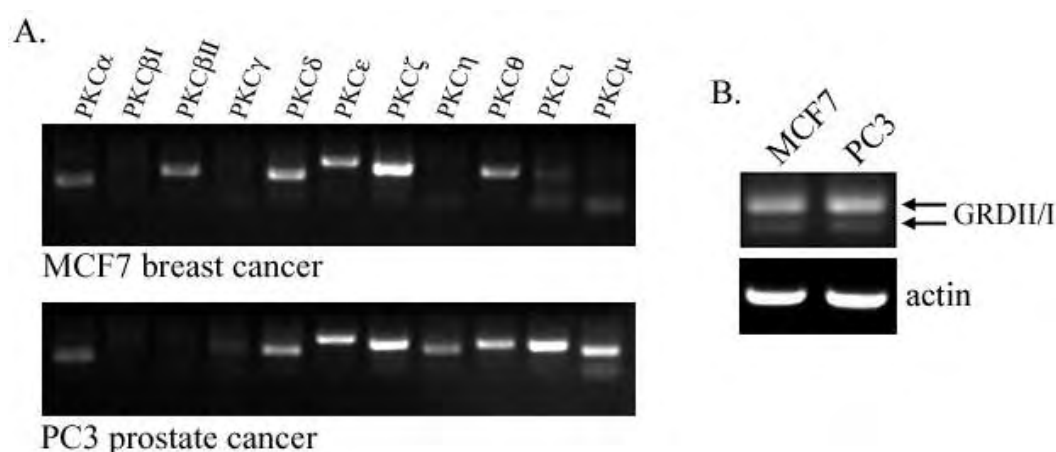
Σε περιπτώσεις διαμόλυνσης με πλασμίδια που φέρουν φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP ή RFP) το πρωτόκολλο τροποποιήθηκε ώστε να πραγματοποιείται μερική μόνο εκχύλιση κυτταροπλάσματος και οι πρωτεΐνες, αυτές, να οπτικοποιούνται επαρκώς. Συγκεκριμένα, η εκχύλιση έγινε με 0,1% Triton-X σε SB, σε θερμοκρασία δωματίου, για 3 min. Όλες οι υπόλοιπες διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφονται παραπάνω.

Ο φθορισμός οπτικοποιήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axiovert 200M χρησιμοποιώντας αντικειμενικούς φακούς 20x, 40x ή 63x Plan Zeiss Aplanachromat NA 1.4 με Orca-ER CCD κάμερα και Slidebook™ 4.0 λογισμικό (Εργαστήριο Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας, ΙΙΒΕΑΑ) ή σε ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5 με αυτοματοποιημένη τράπεζα, AOBIS, εξοπλισμένο με 63x HC PL APO CS φακό, Tandem Scanner και LAS AF λογισμικό (Μονάδα Βιολογικής Απεικόνισης, ΙΙΒΕΑΑ). Για κάθε φθορόχρωμα λήφθηκαν διαδοχικές Z-τομές πάχους 0.5 μm οι οποίες προβλήθηκαν με τη χρήση του εκάστοτε λογισμικού και εξήχθησαν ως αρχεία tiff.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μελέτη της ενεργοποίησης και των αλληλεπιδράσεων της PKCε στη διαφοροποίηση μετασχηματισμένων κυττάρων του ΠΝΣ

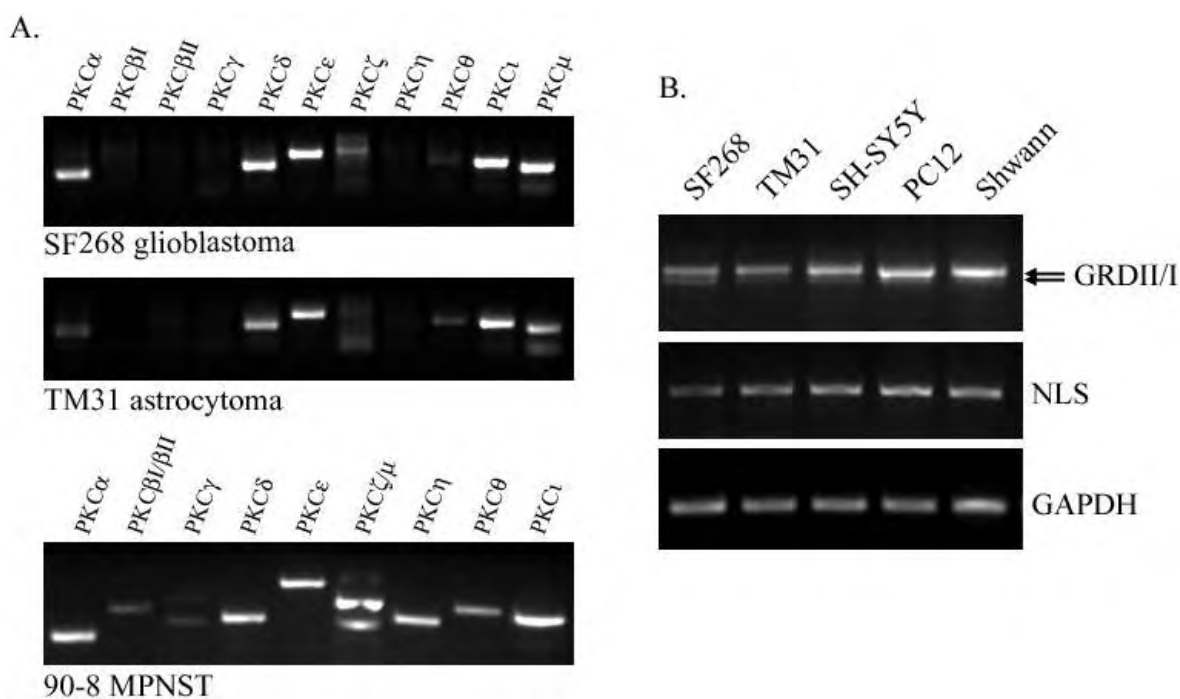
Προκειμένου να διαλευκανθεί η συσχέτιση της PKC με την ογκογένεση και τη διαφοροποίηση, αλλά και η αλληλεπίδρασή της με τη νευροϊνιδίνη, αρχικά εξακριβώθηκε το μεταγραφικό προφίλ όλων των PKC ισομορφών αλλά και των GRDI/GRDII και NLS μεταγράφων της νευροϊνιδίνης σε πληθώρα καρκινικών κυτταρικών σειρών. Καλλιεργήθηκαν κυτταρικές σειρές επιθηλιακής προέλευσης, καρκίνου του μαστού (MCF7) και του προστάτη (PC3) (Σχήμα 10), καθώς και νευρικής προέλευσης, γλοιοβλαστώματος (SF268), αστροκυτώματος (TM31), φαιοχρωμοκυτώματος (PC12) και κακοήθους όγκου των περιφερικών νευρικών ελύτρων (90-8) (Σχήμα 11). Με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR), αποδείξαμε ότι οι επιθηλιακού τύπου κυτταρικές σειρές εκφράζουν πληθώρα PKC ισομορφών, με την PKCε να μεταγράφεται σε υψηλά επίπεδα (Σχήμα 10 A), ενώ τα μεταγγραφα GRDII/I της νευροϊνιδίνης παράγονται σε αφθονία έχοντας αναλογία 2:1 (Σχήμα 10 B).



Σχήμα 10. Η PKCε και η νευροϊνιδίνη παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα μεταγραφής σε επιθηλιακής προέλευσης καρκινικές κυτταρικές σειρές. 1μg ολικού mRNA μεταγράφηκε αντίστροφα και το cDNA που προέκυψε υπεβλήθη σε ημιποσοτικό PCR με δημοσιευμένους εκκινητές. Μελετήθηκε το μεταγραφικό προφίλ

A) όλων των PKC ισομορφών και B) των μεταγράφων GRDI και GRDII της νευροϊνιδίνης. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς.

Παρόμοια αποτελέσματα πήραμε και όταν εξετάσαμε το μεταγραφικό προφίλ των PKC ισομορφών και των μεταγράφων GRDII/I και NLS σε καρκινικές κυτταρικές σειρές νευρικής προέλευσης (Σχήμα 11). Η PKCε εξακολουθεί να παράγεται σε υψηλά επίπεδα σε όλες τις υπό μελέτη καρκινικές σειρές, ενώ οι περισσότερες άλλες ισομορφές διαφοροποιούνται στην ύπαρξη τους ή μη αλλά και στα επίπεδα έκφρασής τους (Σχήμα 11 A). Εξαιτίας της υψηλής συχνότητας των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων της νευροϊνιδίνης (RNA editing) στις νευρικής προέλευσης καρκινικές σειρές εξετάστηκε και η 3' περιοχή της νευροϊνιδίνης που φέρει το NLS (Σχήμα 11B). Τέλος, για τα μετάγραφα της νευροϊνιδίνης ελέγχθηκε και η καρκινική σειρά φαιοχρωμοκυττώματος PC12 αλλά και φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα Schwann (Σχήμα 11 B). Η καρκινική κυτταρική σειρά 90-8 δεν εξετάστηκε ως προς τα μεταγραφικά επίπεδα της νευροϊνιδίνης αφού ο συγκεκριμένος όγκος προήλθε από απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) στο γονίδιο της νευροϊνιδίνης [286, 318] και συνεπώς δεν περιμένουμε ανίχνευση μεταγράφων.



Σχήμα 11. Η PKCε και η νευροϊνιδίνη παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα μεταγραφής σε νευρικής προέλευσης καρκινικές κυτταρικές σειρές. 1μg ολικού mRNA μεταγράφηκε αντίστροφα και το cDNA που προέκυψε υπεβλήθη σε

ημιποσοτικό PCR με δημοσιευμένους εκκινητές. Μελετήθηκε το μεταγραφικό προφίλ Α. όλων των PKC ισομορφών και Β. των μεταγράφων GRDI και GRDII της νευροϊνιδίνης. Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς.

Όπως αναλύθηκε εκτεταμένα στην εισαγωγή, η PKCε προάγει τη διαφοροποίηση σε φυσιολογικά κύτταρα του νευρικού συστήματος. Για να διαπιστωθεί ο ρόλος της στη διαδικασία διαφοροποίησης μετασχηματισμένων κυττάρων του ΠΝΣ επιλέχθηκαν δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, νευρικής προελεύσεως, και μελετήθηκε το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της ενδογενούς PKCε. Η μελέτη της λειτουργίας της ενδογενούς PKCε κρίνεται εξαιρετικά σημαντική αφού με αυτό τον πειραματικό σχεδιασμό, αποσαφηνίζεται ο ρόλος της στη διαφοροποίηση χωρίς να γίνονται μεγάλες παρεμβάσεις στα κύτταρα όπως στην περίπτωση της διαμόλυνσης με πλασμίδια.

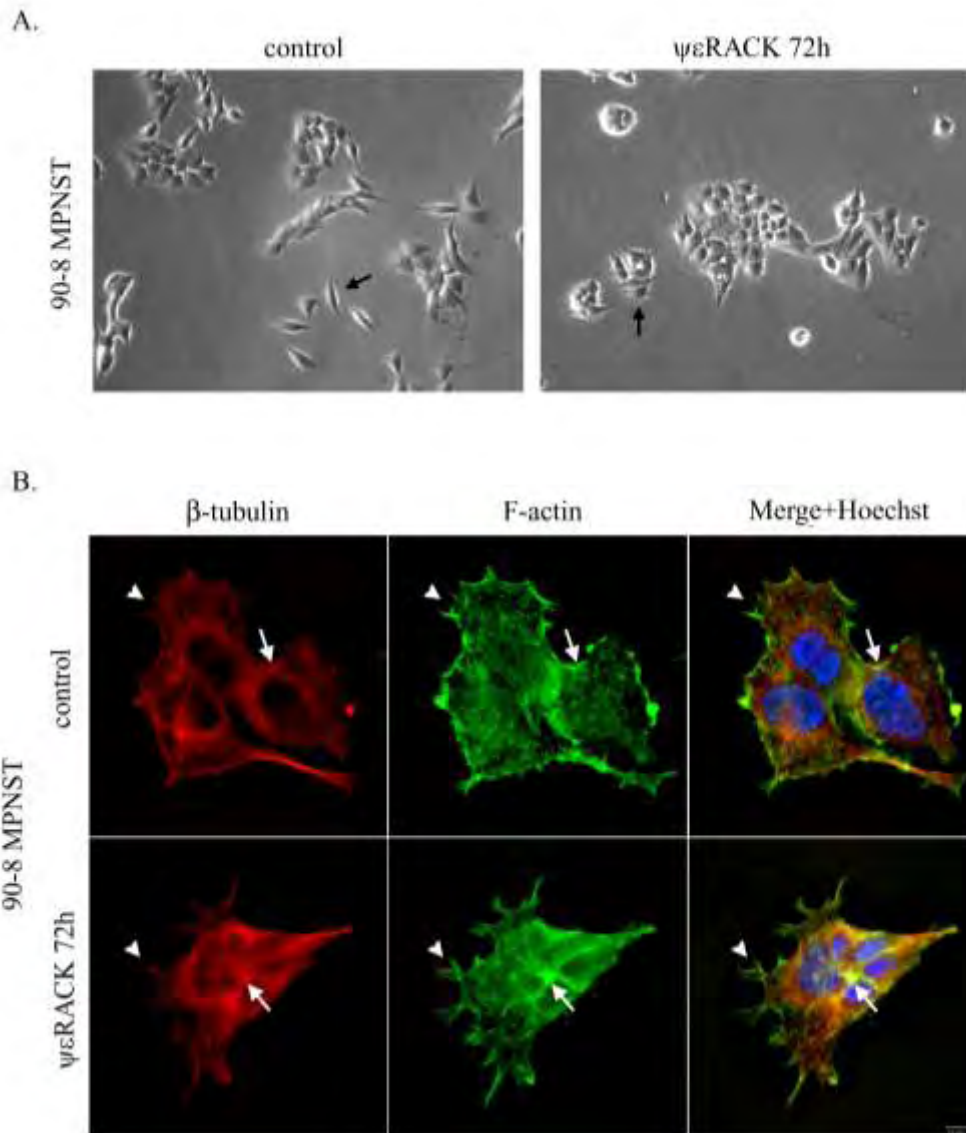
3.1.1. Ο ρόλος της ενεργοποίησης της PKCε στη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης μετασχηματισμένων Schwann κυττάρων

Τα κύτταρα Schwann αποτελούν την κύρια γλοία του ΠΝΣ. Η ανάπτυξη των κυττάρων αυτών είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει πολλαπλές μεταβατικές φάσεις. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα νευρικής ακρολοφίας, που έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν, δίνουν τα ειδικά για γλοία πρόδρομα κύτταρα και, αυτά με τη σειρά τους, τους ώριμους τύπους κυττάρων Schwann που μπορεί να παράγουν μυελίνη ή όχι. Η συντριπτική πλειοψηφία των όγκων που εμφανίζονται στο ανθρώπινο ΠΝΣ προέρχονται από τα κύτταρα Schwann ή τα πρόδρομα αυτών. Έχει αποδειχθεί ότι τα εξαπλωμένα Schwann κύτταρα, που δεν παράγουν μυελίνη, μπορούν να αποτελέσουν αρχικού σταδίου καρκινικά κύτταρα και παρουσιάζουν μορφολογία ενδιάμεσα σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα Schwann και κύτταρα νευροϊνώματος. Τα νεοπλασμάτα που δημιουργούνται και συνολικά ονομάζονται όγκοι των περιφερικών νευρικών ελύτρων, περιλαμβάνουν τα νευροϊνώματα, τα σουανώματα και τους κακοήθεις όγκους των περιφερικών νευρικών ελύτρων (MPNSTs). Τα MPNSTs αντιπροσωπεύουν τον πιο ορατό κίνδυνο για τους ασθενείς με NF-1 επειδή στην πλειονότητά τους εμφανίζονται μετά από κακοήθη εξαλλαγή εν τω βάθει πλεγματοειδών νευροϊνωμάτων,

δηλαδή όγκων που αναφύονται από τα νευρικά έλυτρα των περιφερικών νεύρων, συνήθως αμέσως μετά την έξοδο τους από την σπονδυλική στήλη. Στο γενικό πληθυσμό τα MPNSTs αποτελούν το 10% όλων των σαρκωμάτων μαλακών ιστών και η πρόγνωσή τους είναι κακή με το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης να κυμαίνεται μόνο στο 16-45% [319].

Η PKCε αποτελεί κόμβο μεταγραφής γονιδίων και μεταγωγής σήματος, ειδικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης όπου και παίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του ΚΝΣ. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για το ρόλο της ενεργοποίησης της PKCε στο ΠΝΣ. Για να διαλευκάνουμε το ρόλο της PKCε στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των κυττάρων του ΠΝΣ, χρησιμοποιήσαμε την ανθρώπινη κυτταρική σειρά MPNST 90-8 που προέρχεται από μετασχηματισμένα κύτταρα Schwann. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά έχει χαρακτηριστικά συνεπή με τα χαρακτηριστικά κυττάρων Schwann που έχουν μετασχηματιστεί σε κακοήθεια, εξαιτίας της απώλειας της νευροϊνιδίνης, και είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη κυτταρικών καλλιιεργειών κυττάρων Schwann σε υπόβαθρο MPNST.

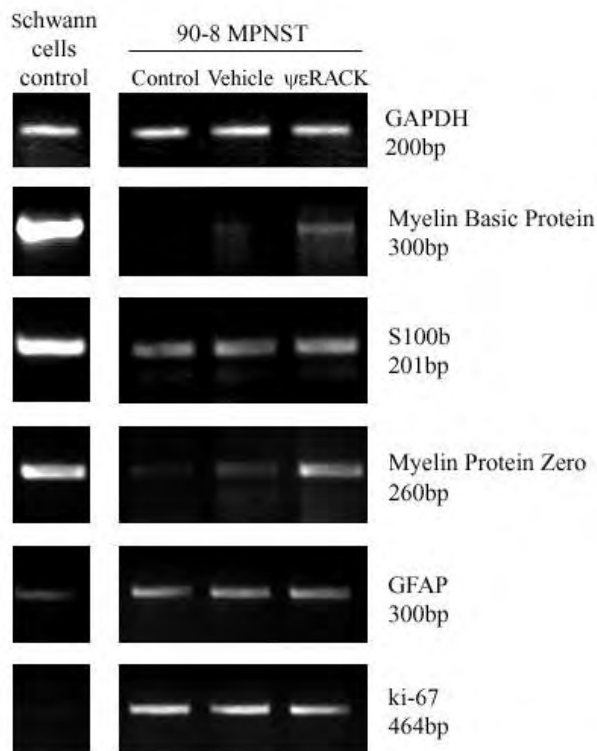
Μελετήσαμε τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα της PKCε στο φαινότυπο των MPNST μετά από ενεργοποίηση της συγκεκριμένης ισομορφής με το ειδικό για PKCε πεπτιδίιο ενεργοποίησης ψεRACK. Το πεπτιδίιο αυτό είναι συζευγμένο με το πεπτιδίιο μεταφοράς Tat, γεγονός που επιτρέπει τη ραγδαία και ποσοτική εισαγωγή του πεπτιδίου στα κύτταρα χωρίς σημαντικές παρενέργειες. Τα κύτταρα που επωάστηκαν με ψεRACK, αντίθετα με αυτά που επωάστηκαν μόνο με το φορέα, εμφάνισαν έντονα μορφολογικά χαρακτηριστικά διαφοροποίησης που χαρακτηρίζονται από πολλαπλές διακλαδούμενες αποφύσεις (Σχήμα 12 Β, κεφαλές βελών) και ένα επιμηκυσμένο κυτταρικό σώμα, σε αντίθεση με το προηγούμενο σφαιρικό σώμα και τις περιστασιακές στελεχώδεις αποφύσεις (Σχήμα 12 Α). Μελέτη του κυτταροσκελετού ακτίνης με πειράματα ανοσοφθορισμού επιβεβαίωσαν περαιτέρω τη διαφοροποίηση αφού τα κύτταρα που επωάστηκαν με ψεRACK παρουσίασαν εστιακή προσκόλληση, που αποτελεί ενδεικτικό στοιχείο της διαδικασίας της διαφοροποίησης, ενώ τα κύτταρα μάρτυρες, έχοντας αυξημένη κινητικότητα, παρουσίασαν έντονες ίνες στρες (Σχήμα 12 Β, βέλη).



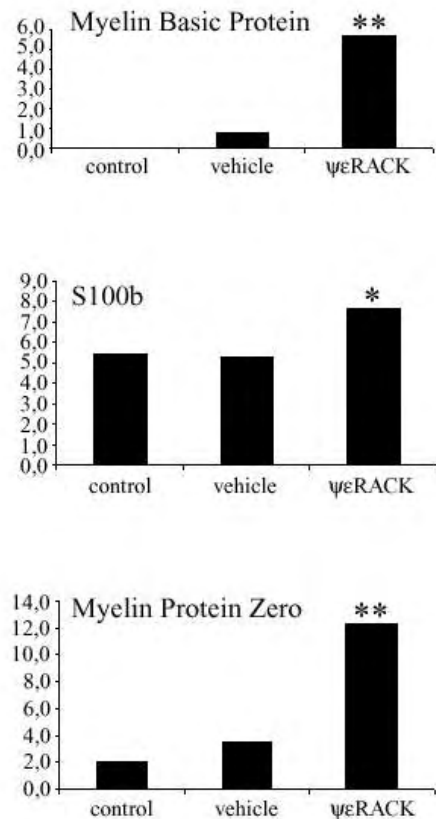
Σχήμα 12. Η ενεργοποίηση της PKCε επάγει την εμφάνιση έντονων μορφολογικών χαρακτηριστικών διαφοροποίησης. Αντιπροσωπευτικό δείγμα 90-8 MPNST κυττάρων που επωάστηκαν με φορέα (control) ή με ψεRACK (συζευγμένο με TAT· 1 μg/ml) για 72 ώρες. Α. Εικόνες αντίθεσης-φάσης κυττάρων 90-8 όπως απεικονίζονται σε 40X μεγέθυνση. Β. Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι της β-τουμπουλίνης και ακόλουθη σήμανση με κόκκινο φθορόχρωμα (rhodamine) και την ακτίνη-φαλλοϊδίνη (πράσινο). Οι εικόνες είναι προβολές 5 Z-τομών πάχους 0,5 μm, οι οποίες αποσυσχετίστηκαν (deconvolution) με τον αλγόριθμο του κοντινότερου γείτονα (nearest-neighbour algorithm). Οι κεφαλές των βελών δείχνουν διακλαδούμενες αποφύσεις. Τα βέλη, στα κύτταρα μάρτυρες, δείχνουν ίνες στρες, ενώ, στα κύτταρα που επωάστηκαν με ψεRACK, το σημείο εστιακής προσκόλλησης.

Οι παρατηρούμενες μορφολογικές αλλαγές πιθανώς να σχετίζονται καταρχήν με τη μοναδική ιδιότητα της PKCε να προσδένει ακτίνη και τη στενή σχέση που παρουσιάζει και με τα υπόλοιπα στοιχεία του κυτταροσκελετού, αλλά, και με αλλαγή που πιθανώς προκαλεί στο μεταγραφικό προφίλ των κυττάρων. Οι αλλαγές στο μεταγραφικό πρόγραμμα, που προβλέφθηκαν από τη μορφολογική διαφοροποίηση, επιβεβαιώθηκαν με την ανίχνευση του μηνύματος αρκετών ειδικών, για διαφοροποιημένα κύτταρα Schwann, δεικτών όπως η πρωτεΐνη S-100b, η βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (Myelin Basic Protein, MBP), η Myelin Protein Zero (MPZ), η όξινη ινιδιακή πρωτεΐνη της γλοίας (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP) αλλά και του αντιγόνου ki-67 που εκφράζεται μόνο σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται (Σχήμα 13). Για θετικό μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε ανθρώπινα κύτταρα Schwann που απομονώθηκαν από διαφοροποιημένο νευροϊνωμα ασθενούς με Νευροϊνωμάτωση. Συγκεκριμένα, μετά από επώαση με ψεRACK οι πρωτεΐνες-δείκτες της διαφοροποίησης S-100b, MBP και MPZ αυξήθηκαν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες, πλησιάζοντας μάλιστα τα επίπεδα έκφρασης που έχουν στο θετικό μάρτυρα (Schwann) (Σχήμα 13 B). Αντίθετα, οι πρωτεΐνες GFAP και ki-67 δε φαίνεται να μεταβάλλονται σημαντικά. Κατά τη διαφοροποίηση θα περιμέναμε την GFAP να αυξάνεται, μιας και η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελεί ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη διαφοροποίησης κυττάρων γλοίας, και το αντιγόνο ki-67 να μειώνεται αφού κατά τη διαδικασία διαφοροποίησης τα κύτταρα παύουν να πολλαπλασιάζονται. Πιθανώς, λοιπόν, η αλλαγή σε αυτά τα μόρια να συμβαίνει αργότερα κατά τη διαφοροποίηση (Σχήμα 13 A).

A.



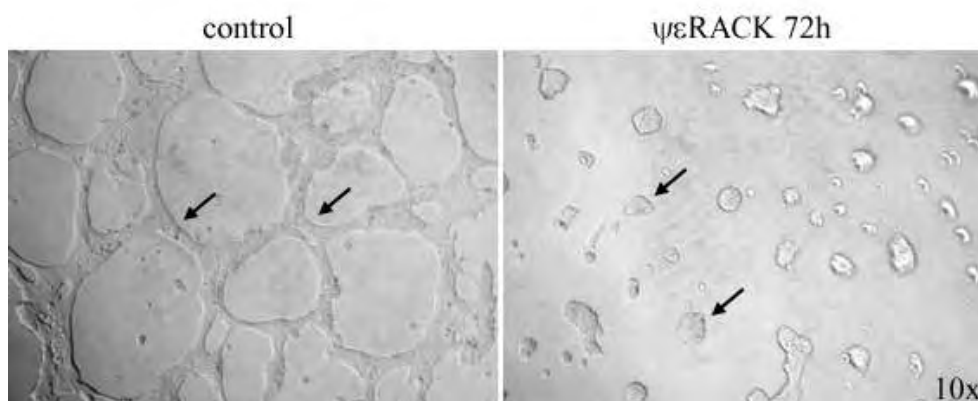
B.



Σχήμα 13. Η ενεργοποίηση της PKCε αλλάζει το μεταγραφικό πρόγραμμα ειδικών δεικτών διαφοροποίησης στα 90-8 κύτταρα. Α. Τα 90-8 κύτταρα επωάστηκαν με φορέα (vehicle), ψεRACK ή τίποτα από τα δύο (control). 1 μg ολικού RNA υπεβλήθη σε ημιποσοτικό RT-PCR για ειδικούς δείκτες νευρογλοιακής διαφοροποίησης και τα ενισχυμένα προϊόντα οπτικοποιήθηκαν σε πηκτική αгарόζης 2% μετά από χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Schwann. Τα επίπεδα του GAPDH χρησιμεύουν ως μάρτυρας ίσης ποσότητας RNA μεταξύ των συνθηκών. Β. Ποσοτικοποίηση με πυκνομετρική ανάλυση της αύξησης των δεικτών διαφοροποίησης εκφραζόμενη ως ο λόγος της έκφρασης του κάθε δείκτη προς τα επίπεδα του GAPDH. *P<0,05 και **P<0,01.

Μια άλλη έκφανση της διαφοροποίησης καρκινικών κυττάρων είναι η απώλεια της διεισδυτικής και μεταστατικής τους ικανότητας. Προκειμένου να εξετάσουμε αν η ενεργοποίηση της PKCε οδηγεί σε ένα λιγότερο μεταστατικό φαινότυπο πραγματοποιήσαμε δοκιμές matrigel και αποκαλύψαμε δραστικές

αλλαγές στη διεισδυτική ικανότητα των επωασμένων με ψεRACK κυττάρων. Στα κύτταρα, λοιπόν, που η PKCε ήταν ενεργοποιημένη παρατηρήθηκε η απώλεια δημιουργίας κυτταρικών προεκβολών, άρα και κυτταρικών δικτύων (Σχήμα 14) αποτέλεσμα που υποδεικνύει ότι η PKCε θα μπορούσε να αποτελέσει μώριο κλειδί στη διαδικασία διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων του ΠΝΣ.

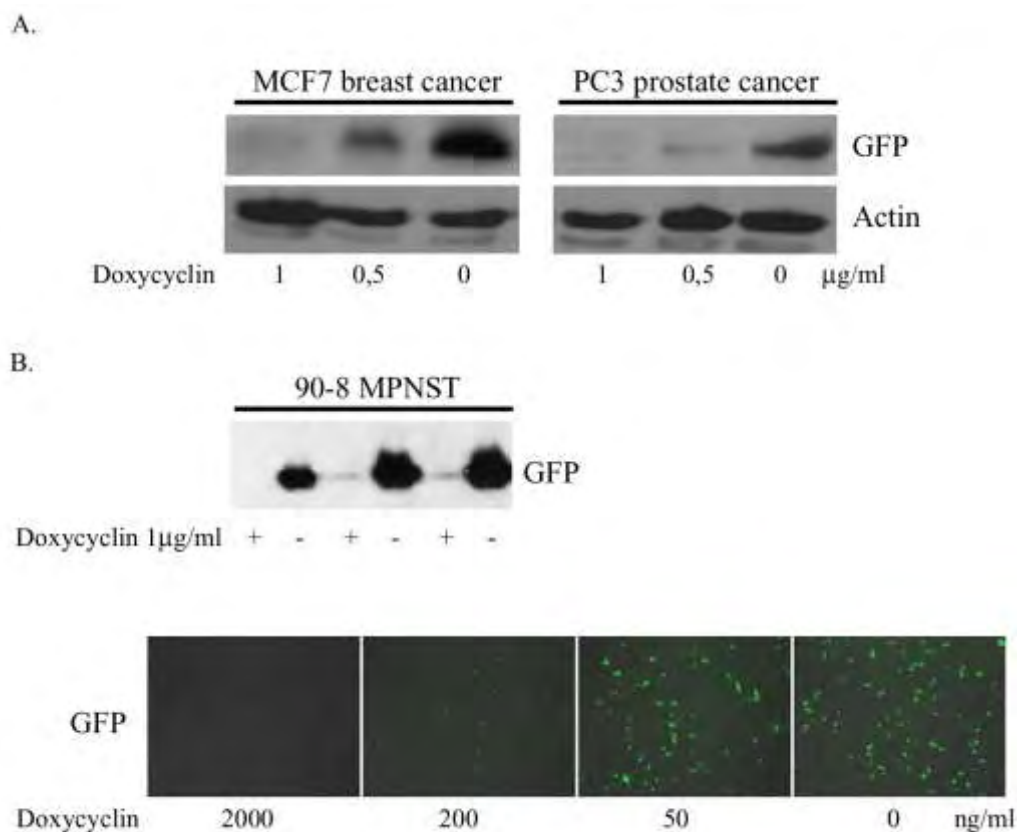


Σχήμα 14. Η ενεργοποίηση της PKCε οδηγεί σε έναν λιγότερο διεισδυτικό φαινότυπο των 90-8 καρκινικών κυττάρων. Εικόνες αντίθεσης φάσης των 90-8 κυττάρων που επώαστηκαν με φορέα (control) ή ψεRACK για 72 ώρες μετά από δοκιμασία matrigel.

3.1.2. Δημιουργία πρότυπων διπλά σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών με επαγόμενη έκφραση της PKCε και της κυρίαρχα αρνητικής μορφής της (σύστημα Tet-Off)

Με σκοπό να μελετήσουμε τη σημασία της PKCε στη διαφοροποίηση και την ογκογένεση σε οργανισμικό επίπεδο, δημιουργήσαμε διπλά σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την αγρίου τύπου PKCε ή την κυρίαρχα αρνητική μορφή της (DNPKCε) υπό τον έλεγχο δοξυκυκλίνης (σύστημα Tet-Off). Οι κυτταρικές, αυτές, σειρές δημιουργήθηκαν προκειμένου να ενεθούν σε γυμνά ποντίκια ώστε να δημιουργηθούν ξενομοσχεύματα και στη συνέχεια να μελετηθεί η επίδραση της PKCε και της DNPKCε στην εξέλιξη της ογκογένεσης *in vivo*. Η δημιουργία διπλά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών με τη χρήση του Tet-Off συστήματος είναι μια πολύπλοκη και εξαιρετικά χρονοβόρα διαδικασία (όπως αναλύεται στο τμήμα «Υλικά και Μέθοδοι»). Συνοπτικά, επιλέχθηκαν δύο κυτταρικές σειρές επιθηλιακής (MCF7 και PC3) και δύο νευρικής προέλευσης (90-8 και PC12) ώστε να

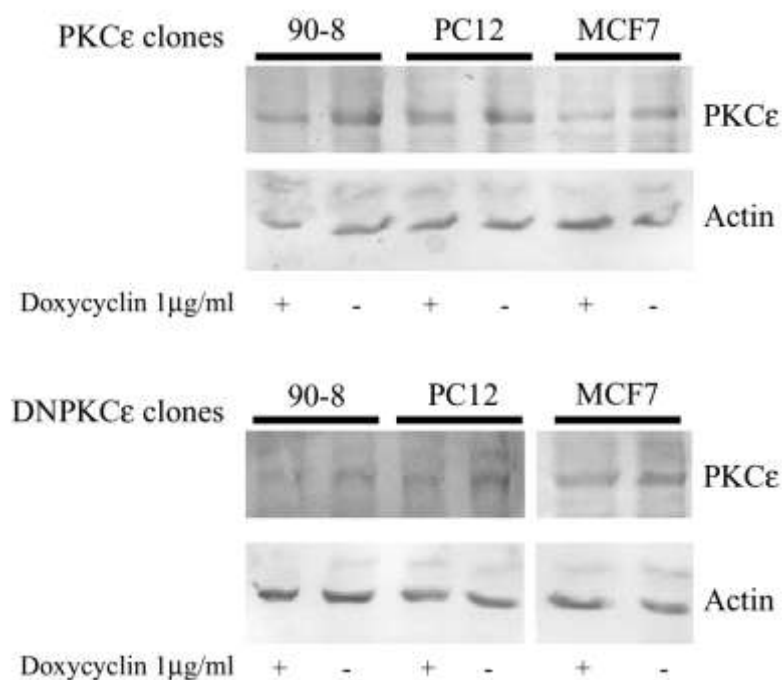
διαπιστωθεί αν η επίδραση της PKCε εξαρτάται από την ιστική προέλευση του όγκου. Τα PC12 κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος αποκτήθηκαν από την Clontech όντας ήδη διαμολυσμένα με το πρώτο πλασμίδιο (Tet-Off). Στις υπόλοιπες καρκινικές κυτταρικές σειρές ήτοι στον καρκίνο του μαστού (MCF7) του προστάτη (PC3) και το MPNST (90-8), μετά τη σταθερή διαμόλυνση με το Tet-Off πλασμίδιο επιλέχθηκαν οι κλώνοι οι οποίοι βρίσκονται υπό τον ειδικότερο έλεγχο δοξυκυκλίνης μετά από παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο pBI-EGFP (Σχήμα 15). Συγκεκριμένα, οι σταθερά διαμολυσμένοι κλώνοι των κυτταρικών σειρών MCF7-TetOff, PC3-TetOff και 90-8-TetOff διαμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο pBI-EGFP το οποίο εκφράζει την πράσινη πρωτεΐνη φθορισμού υπό τον έλεγχο δοξυκυκλίνης και στη συνέχεια επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις δοξυκυκλίνης (από 0-2 μg/μl).



Σχήμα 15. **Επιλογή κλώνων καρκινικών κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν σταθερά το πλασμίδιο Tet-Off και υπόκεινται σε ρύθμιση από δοξυκυκλίνη.** Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF7, PC3, και 90-8 διαμολύνθηκαν σταθερά με το πλασμίδιο pTet-Off και στη συνέχεια οι ληφθέντες κλώνοι υποβλήθηκαν σε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο pBI-EGFP και επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις δοξυκυκλίνης. A. Ανοσοσύπωση κατά Western με

αντίσωμα ενάντια σε GFP στις καρκινικές κυτταρικές σειρές επιθηλιακή προέλευσης MCF7 και PC3 (άνω πάνελ). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη (κάτω πάνελ). B. Ανοσοσύτρωση κατά Western σε διαφορετικούς κλώνους της 90-8-TetOff κυτταρικής σειράς μετά από 48 h επώαση με 1 μg/ml δοξυκυκλίνη (άνω πάνελ) και ανάλυση ανοσοφθορισμού μετά από υποβολή του επιλεγθέντος κλώνου σε διάφορες συγκεντρώσεις δοξυκυκλίνης (κάτω πάνελ).

Αρχικά, επιλέχθηκαν οι κλώνοι στους οποίους η επώαση με 1 μg/ml για 48 h είναι αρκετή ώστε να παρεμποδίσει πλήρως την έκφραση του GFP για τα MCF7, PC3 (δεν δείχνονται αποτελέσματα) και 90-8 (Σχήμα 15 B, άνω πάνελ). Στη συνέχεια, οι επιλεγθέντες κλώνοι ελέγχθηκαν για την ορθή απόκρισή τους στις διάφορες συγκεντρώσεις δοξυκυκλίνης με ανοσοσύτρωση κατά Western (Σχήμα 15 A) και ανοσοκυτταροχημεία (Σχήμα 15 B). Είναι φανερό ότι οι τελικοί κλώνοι αποκρίνονται στις διάφορες συγκεντρώσεις δοξυκυκλίνης μεταβάλλοντας την έκφραση του GFP αναλόγως.



Σχήμα 16. **Επιλογή κλώνων καρκινικών κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν σταθερά της PKCε και DNPKCε και υπόκεινται σε ρύθμιση από το σύστημα Tet-Off.** Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF7-TetOff, PC12-TetOff, και 90-8-TetOff διαμολύνθηκαν σταθερά με τα πλασμίδια pTREtight-PKCε και pTREtight-

DNPΚCε και στη συνέχεια οι ληφθέντες κλώνοι υποβλήθηκαν σε ανοσοσύτωση κατά Western με αντίσωμα ενάντια στην ΡΚCε παρουσία ή απουσία 1 μg/ml δοξουκυκλίνης. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη.

Αφού επιλέχθηκαν οι αρτιότεροι, σταθερά διαμολυσμένοι, Tet-Off κλώνοι πραγματοποιήθηκαν νέες σταθερές διαμολύνσεις με τα πλασμίδια pTREtight-PΚCε και pTREtight-DNPΚCε. Συνεπώς, από κάθε Tet-Off κυτταρική σειρά προέκυψαν δύο διπλά σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές στις οποίες οι ΡΚCε και DNPΚCε βρίσκονταν υπό τον ειδικό έλεγχο δοξουκυκλίνης. Τελικά, οι κλώνοι που επιλέχθηκαν εκφράζουν σε αυξημένα επίπεδα τις ΡΚCε και DNPΚCε απουσία δοξουκυκλίνης, ενώ παρουσία δοξουκυκλίνης ανιχνεύεται μόνο η ενδογενής ΡΚCε (Σχήμα 16).

Πριν, όμως, προχωρήσουμε στη μελέτη του ρόλου της ΡΚCε στη διαφοροποίηση και την ογκογένεση σε οργανισμικό επίπεδο, θεωρήσαμε σημαντικό να διαλευκάνουμε το μηχανισμό δράσης και τις αλληλεπιδράσεις της σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο. Για το σκοπό, αυτό, επιλέξαμε ένα καλά μελετημένο μοντέλο διαφοροποίησης, αυτό των SHSY-5Y κυττάρων νευροβλαστώματος.

3.1.3. Αλληλεπίδραση ΡΚCε, νευροϊνιδίνης και Ras/MAPK μονοπατιού κατά τη διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει ασχοληθεί με το ρόλο της ΡΚCε σε γεγονότα προ-διαφοροποίησης με τη χρήση διαφόρων κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος. Προκειμένου να διαλευκάνουμε το μηχανισμό που εμπλέκεται η ΡΚCε στη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων του ΠΝΣ επιλέξαμε τα κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y που είναι ένα εξαιρετικά χρήσιμο μοντέλο μελέτης γιατί, εκτός του ότι είναι καλά χαρακτηρισμένα κύτταρα, έχει αποδειχθεί ότι διαφοροποιούνται εμφανώς μετά από επώαση με ρετινοϊκό οξύ (RA) ή TPA, το φορβικό εστέρα που ενεργοποιεί τις ΡΚC. Υπάρχει αφθονία στοιχείων στη βιβλιογραφία σχετικά με την απαίτηση για ΡΚC κατά τη διαφοροποίηση νευροβλαστωμάτων. Επιπλέον, η δραστηριότητα των ΡΚC εμπλέκεται σε μηχανισμούς διαφοροποίησης νευροβλαστώματος που τίθενται σε κίνηση από αυξητικούς παράγοντες,

νευροτροφικούς παράγοντες και αγωνιστές GPCR [320-323]. Σε κάποιες περιπτώσεις, μάλιστα, η PKCε έχει αναγνωριστεί ως η κρίσιμη ισομορφή [320, 321]. Η ανάγκη για αναγνώριση προγνωστικών δεικτών και θεραπευτικών στόχων μας οδήγησε να μελετήσουμε τους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν την RA- και TPA-εξαρτώμενη διαφοροποίηση των κυττάρων νευροβλαστώματος.

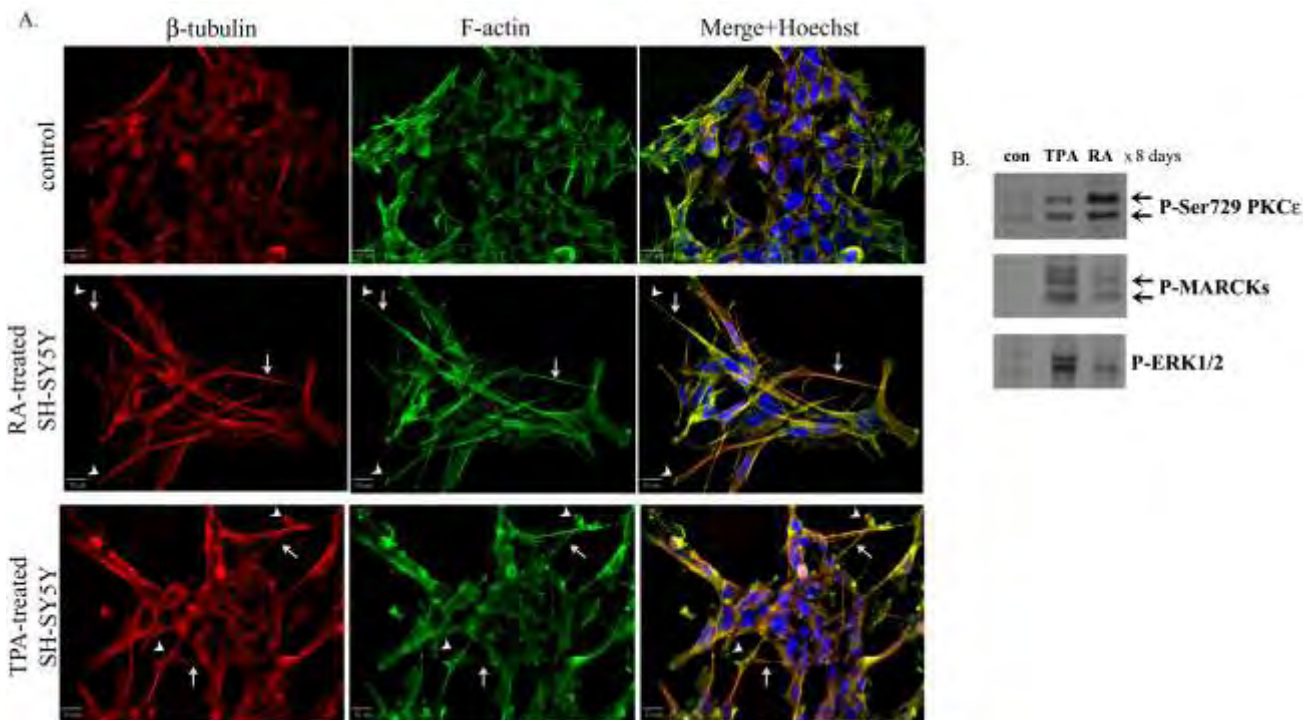
Στοιχεία από έρευνες δείχνουν ότι μόρια όπως το Ras και το Raf αλλά και η παρατεταμένη ενεργοποίηση της ERK έχουν θετικό ρόλο στη διαφοροποίηση των PC12 κυττάρων φαιοχρωμοκυτώματος, όμως η κατάσταση περιπλέκεται στην περίπτωση RA-εξαρτώμενης διαφοροποίησης των κυττάρων νευροβλαστώματος. Είναι γνωστό ότι το RA ενεργοποιεί την ERK βραχυπρόθεσμα [324] ή μακροπρόθεσμα [325, 326], εν τούτοις αναστολή της MEK, κινάση που ενεργοποιεί την ERK, είχε αντιφατικά αποτελέσματα για το αν η RA-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της ERK είναι αναγκαία για τη νευριτική ανάπτυξη σε SH-SY5Y και SK-N-BE(2)C κύτταρα [325, 326]. Πειραματικά στοιχεία μετά από βιοχημική αναστολή ή υπερέκφραση κυρίαρχα αρνητικών μορφών έχουν υποδείξει την εμπλοκή αρκετών PKC ισομορφών, κυρίως νεοφανών, στην RA-εξαρτώμενη διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, χρήση αναστολέων c/nPKC μείωσε σημαντικά τη RA-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της ERK, την κυτταρική επιβίωση και τη νευριτική ανάπτυξη σε SH-SY5Y κύτταρα [326]. Επιπλέον, πεπτιδίο της PKCε, που απομονώθηκε από τη θέση πρόσδεσης ακτίνης, έχει αποδειχθεί ότι μετριάζει την RA-εξαρτώμενη νευριτική ανάπτυξη στα SK-N-BE κύτταρα, ενώ επώαση με RA είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των μορίων PKCε που συνδέονται με τον κυτταροσκελετό [156].

Από την άλλη, ο φορβικός εστέρας TPA, δρώντας ως ανάλογο DAG, δένεται και ενεργοποιεί απευθείας τις c/nPKCs, που αποτελούν τους βασικούς μορφοτροπείς του TPA-εξαρτώμενου σήματος διαφοροποίησης. Ο εξέχων ρόλος των PKCs στη TPA-εξαρτώμενη διαφοροποίηση των SH-SY5Y κυττάρων έχει εδραιωθεί σε πολλές μελέτες [99, 327] όπου υπογραμμίζεται ότι η PKCε είναι η πρωτίστως σημαντική ισομορφή για τη διαφοροποίηση και ειδικά για την επαγωγή της νευριτικής ανάπτυξης.

Παράλληλα, η νευροϊνιδίνη υποδεικνύεται ως μια σημαντική πρωτεΐνη μεταγωγής σήματος, τοποθετημένη στη διασταύρωση των μονοπατιών

διαφοροποίησης, αφού **α)** δρα ως ρεοστάτης στην ενεργοποίηση του Ras/ERK μονοπατιού [83, 315, 328], **β)** είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη νευροβλαστώματος με ποσοστό μόνο 50% των κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος να έχουν 2 φυσιολογικά αλληλία και 6% να φέρουν γενωμικές παρεκτροπές στο *NF1* [329], **γ)** αποτελεί εξαιρετικό υπόστρωμα φωσφορυλίωσης από την PKC [83] αφού φωσφορυλιώνεται διαρκώς και εντόνως στην ειδική για PKC θέση που βρίσκεται στο C-τελικό κατάλοιπο Ser2808, όταν τα SH-SY5Y κύτταρα διαφοροποιούνται από TPA [84], **δ)** παρέχει ανταπόκριση σε RA [329]. Ωστόσο, η επίδραση των διαφόρων παραγόντων διαφοροποίησης στην αφθονία, τη φωσφορυλίωση από PKC και την ενεργότητα RasGAP, όλες κρίσιμες πτυχές της λειτουργίας της ως διαμορφωτής του Ras/ERK μονοπατιού, δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά.

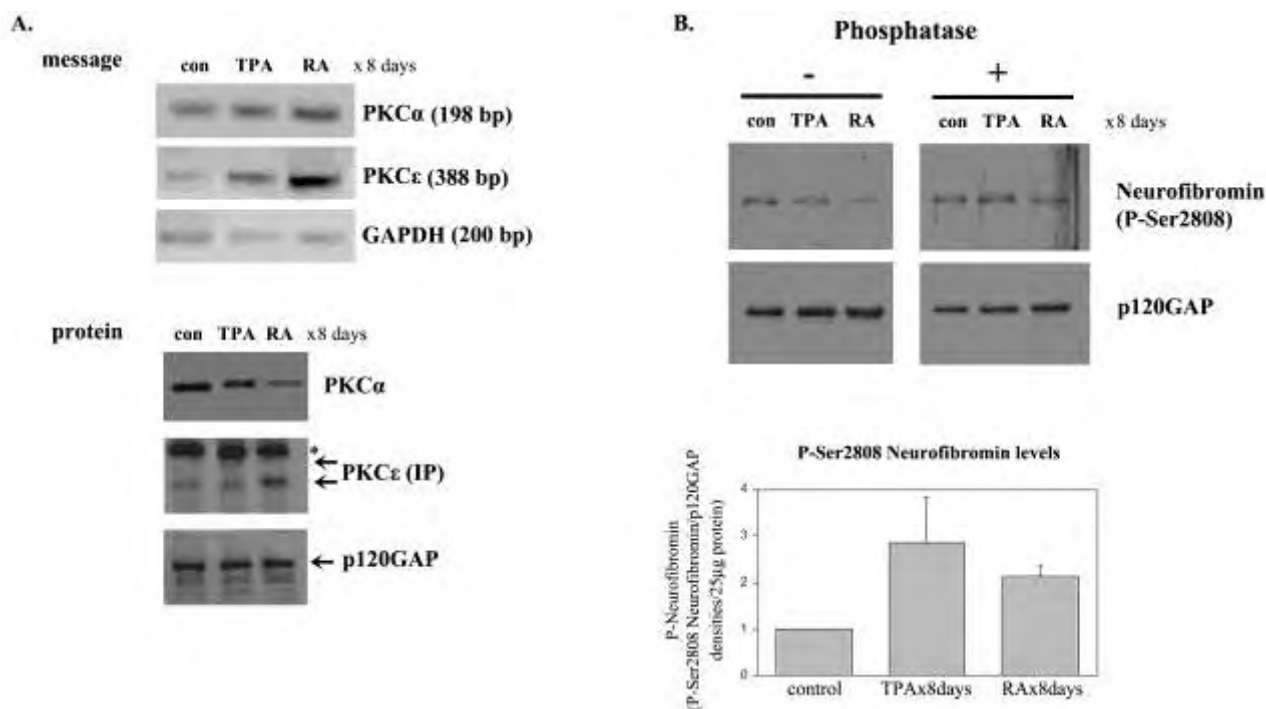
Μακροχρόνια επώαση (8 ημέρες) των SH-SY5Y κυττάρων νευροβλαστώματος με TPA ή RA έχει ως αποτέλεσμα την έντονη μορφολογική διαφοροποίηση. Τα κύτταρα μοιάζουν με νευρώνες με μακριές προεκβολές, βαριά διακοσμημένες με β-τουμπουλίνη (Σχήμα 17 A, βέλη) και F-ακτίνη στα αναπτυσσόμενα νευριτικά άκρα (Σχήμα 17 A, κεφαλές βελών), τα οποία με τη σειρά τους σχεδόν μοιάζουν με οργανωμένους αυξητικούς κώνους αξόνων. Τα χαρακτηριστικά αυτά απουσιάζουν από τα κύτταρα μάρτυρες (Σχήμα 17 A, άνω πάνελ). Πιο σημαντικά, η φωσφορυλίωση της PKCε στη Ser729, το κατάλοιπο στο υδροφοβικό μοτίβο που αποτελεί σημαντικό έναυσμα για την καταλυτική ικανότητά της, αυξάνεται σημαντικά στα TPA- και RA-διαφοροποιημένα κύτταρα (Σχήμα 17 B, άνω πάνελ). Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της MARCKS, η οποία μπορεί αξιόπιστα να χρησιμεύσει ως δείκτης της συνολικής ενεργότητας των PKC, επίσης αυξάνεται σε TPA- και RA-διαφοροποιούμενα κύτταρα (Σχήμα 17 B μεσαίο πάνελ). Αυξήσεις σημειώνονται και στη φωσφορυλιωμένη ERK1/2 (Σχήμα 17 B κάτω πάνελ) γεγονός που υποδηλώνει ότι το MAPK μονοπάτι μεταγωγής σήματος, υπό τον έλεγχο της PKCε, ενεργοποιείται και πιθανώς ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων νευροβλαστώματος.



Σχήμα 17. Η διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος συσχετίζεται με την ενεργοποίηση της PKCε. Α. Τα κύτταρα επώαστηκαν με καλλιεργητικό μέσω απουσία (control, άνω πάνελ) ή παρουσία 10 μ M RA (μεσαίο πάνελ), ή 20 nM TPA (κάτω πάνελ) για 8 μέρες. Η μονιμοποίηση και η χρώση έγιναν όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι εικόνες είναι προβολές 5 Z-τομών πάχους 0,5 μ m, οι οποίες αποσυσχετίστηκαν (deconvolution) με τον αλγόριθμο του κοντινότερου γείτονα (nearest-neighbour algorithm). Β. Η αφθονία και η φωσφορυλίωση των αναγραφόμενων πρωτεϊνών αναλύθηκαν με ανοσοσύτπωση κατά Western σε 25 μ g ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων που επώαστηκαν με μάρτυρα (con), TPA ή RA σε χρόνους και συγκεντρώσεις που έχουν ήδη αναφερθεί. Αντισώματα ενάντια στις πρωτεΐνες p-Ser729 PKCε, p-MARCKs και p-ERK1/2 χρησιμοποιήθηκαν όπως έχει αναφερθεί.

Είναι γνωστό, πως διέγερση με EGF ή TPA έχει ως αποτέλεσμα την οξεία ενεργοποίηση της κλασσικής PKCα και της νεοφανούς PKCε σε νευρικά κύτταρα [305]. Με σκοπό να επιβεβαιώσουμε την εμπλοκή της PKCε και να εξετάσουμε την πιθανή εμπλοκή της PKCα μελετήσαμε τα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα των δύο κινασών και βρήκαμε ότι σε μακροπρόθεσμη επώαση, τα επίπεδα mRNA της PKCα αυξάνονται ελαφρά σε TPA- και RA-διαφοροποιημένα κύτταρα (2-3 φορές πάνω από το μάρτυρα), ταυτόχρονα με την εκτεταμένη αύξηση των επιπέδων mRNA της PKCε (>10 φορές πάνω

από το μάρτυρα) (Σχήμα 18 A, άνω πάνελ). Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, όμως, η διαφοροποίηση συνοδεύεται από αμοιβαίες αλλαγές στην αφθονία και τη λειτουργία των PKCα και PKCε: τα επίπεδα έκφρασης της PKCα μειώνονται ουσιαστικά, ενώ της PKCε αυξάνονται σημαντικά, τουλάχιστον στα RA-διαφοροποιημένα κύτταρα (Σχήμα 18 A, κάτω πάνελ).



Σχήμα 18. Τα TPA και RA-διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα παρουσιάζουν παρόμοια μοτίβα φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης και έκφρασης και ενεργοποίησης των PKCα/PKCε. A. Τα μεταγραφικά επίπεδα των PKCα, PKCε, και GAPDH μετρήθηκαν όπως έχει περιγραφεί. Η αφθονία των PKCα και p120GAP αναλύθηκαν με ανοσοσύτπωση κατά Western σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα. Η PKCε ανοσοκατακρήμνιστηκε (IP) από ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα κυττάρων που επώαστηκαν με μάρτυρα (con), TPA ή RA σε χρόνους και συγκεντρώσεις που έχουν ήδη αναφερθεί. Ο αστερίσκος υποδεικνύει μια πρωτεΐνη διασταυρούμενης αντίδρασης της ανοσοκατακρήμνισης. B. Η φωσφορυλίωση του καταλοίπου Ser2808 της νευροϊνιδίνης μελετήθηκε με τη χρήση του φωσφοευσταθιστήτου sc-67 αντισώματος σε δοκιμές φωσφατάσης, ανοσοσύτπωσης κατά Western. Είναι φανερό πως σημειώνονται σημαντικά κέρδη σε ανοσοδραστικότητα του sc-67 αντισώματος στα δείγματα που αρχικά επώαστηκαν με TPA και RA και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε δοκιμασία φωσφατάσης (δεξί πάνελ). Τα κέρδη σε ανοσοδραστικότητα του sc-67 αντισώματος προσδιορίζουν τα επίπεδα

φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης στο κατάλοιπο Ser2808. Η ποσοτικοποίηση με πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων τριών διαφορετικών πειραμάτων δείχνει ότι η φωσφορυλίωση στη σερίνη 2808 της νευροϊνιδίνης από PKC αυξάνεται 2-3 φορές στα διαφοροποιημένα κύτταρα σε σχέση με το μάρτυρα (κάτω πάνελ).

Η επίδραση της ενεργοποίησης της PKC στον κυτταροσκελετό και τη νευριτική ανάπτυξη κατά τη διαφοροποίηση νευροβλαστώματος σε όλα τα κυτταροσκελετικά συστήματα, ήτοι μικροσωληνίσκοι, F-ακτίνη, και ενδιάμεσα ινίδια, είναι πια εδραιωμένη. Ο κυτταροσκελετός F-ακτίνης φλοιού μπορεί να θεωρηθεί, ως ένας άμεσος στόχος της διαδικασίας της διαφοροποίησης [121]. Η νευροϊνιδίνη είναι ένα από τα υποστρώματα της PKC που μπορεί να σχετίζεται με τον κυτταροσκελετό ακτίνης σε νευρώνες και κύτταρα γλοιοβλαστώματος [83, 224]. Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι η νευροϊνιδίνη φωσφορυλιώνεται σημαντικά (2-3 φορές πάνω από το μάρτυρα) στην ειδική για PKC θέση Ser2808 και παραμένει φωσφορυλιωμένη ακόμα και μετά από 8 μέρες διαφοροποίησης με TPA ή RA (Σχήμα 18 Β). Έτσι, επίμονη PKC-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης φαίνεται να είναι κοινό χαρακτηριστικό της TPA- και RA-εξαρτώμενης διαφοροποίησης των SH-SY5Y κυττάρων.

Αποδείξαμε, λοιπόν, ότι η διαφοροποίηση των SH-SY5Y κυττάρων χαρακτηρίζεται από έντονη PKCε-εξαρτώμενη μεταγωγή σήματος που επηρεάζει άμεσα τη φωσφορυλίωση κάτωθεν στόχων όπως της ογκοκατασταλτικής νευροϊνιδίνης (Σχήμα 18 Α) και της ERK (Σχήμα 18 C). Συνολικά, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω πειραματικά στοιχεία, προτείνουμε ότι η ενεργοποίηση της PKCε, η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης στο PKC κατάλοιπο Ser2808, και τελικά η ενεργοποίηση της ERK είναι όλα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα, σαφώς σχετιζόμενα με τη διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων νευροβλαστώματος. Έτσι, μεταξύ όλων αυτών των γεγονότων μεταγωγής σήματος, μεταγραφής και μετάφρασης, η ρύθμιση της PKCε φαίνεται ως κομβικό και θεμελιώδες χαρακτηριστικό της διαδικασίας της διαφοροποίησης σε καρκινικά κύτταρα του ΠΝΣ. Γίνεται σαφές ότι τα αποτελέσματά μας, για την ενεργοποίηση και τις αλληλεπιδράσεις της PKCε κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, μπορούν να αποτελέσουν έναυσμα για την ανάπτυξη φαρμακολογικών στόχων, έτσι

ώστε οι όγκοι του ΠΝΣ να διαφοροποιούνται και να γίνονται λιγότερο επιθετικοί και διεισδυτικοί και κατά συνέπεια να υπάρξει επιτέλους αντιμετώπιση για τους καρκίνους του ΠΝΣ.

3.2. Ρύθμιση της αφθονίας και της πυρηνο-κυτταροπλασματικής διακίνησης της νευροϊνιδίνης σε πρωτογενείς καλλιέργειες μετα-μιτωτικών νευρώνων, μέσω φωσφορυλίωσης από την PKCε

Τα πειράματα που πραγματοποιήσαμε στα κύτταρα του ΠΝΣ επιβεβαίωσαν την αρχική υπόθεσή μας ότι, δηλαδή, η PKCε και η νευροϊνιδίνη είναι δύο κρίσιμα μόρια στη διαδικασία της διαφοροποίησης. Μάλιστα, αλληλεπιδρούν ώστε να προάγουν τη διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων στο ΠΝΣ. Στη συνέχεια, θέλοντας να μελετήσουμε το ρόλο και την αλληλεπίδραση των μορίων, αυτών, αλλά και τη σημασία της PKCε-εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης στους καρκίνους του ΚΝΣ, αποφασίσαμε αρχικά να μελετήσουμε ένα φυσιολογικό (μη καρκινικό) αναπτυξιακό μοντέλο, αυτό των εμβρυϊκών νευρώνων φλοιού όρνιθας. Εξάλλου, η νευροϊνιδίνη παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης τόσο στο Περιφερικό όσο και στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και ενώ είναι μια bona fide ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη γλοιοβλαστώματος, ο ρόλος της σε μετα-μιτωτικά κύτταρα, όπως οι νευρώνες, παραμένει αδιευκρίνιστος. Είναι, όμως, γνωστό ότι, μέσω της ρύθμισης του Ras, η νευροϊνιδίνη ελέγχει σημαντικά μονοπάτια νευρωνικής διαφοροποίησης και επιβίωσης. Μελέτες από την ομάδα μας και άλλους, έχουν αποδείξει ότι και άλλες περιοχές της νευροϊνιδίνης έχουν σημαντικούς ρόλους στη RasGAP ενεργότητα της αλλά και σε φαινομενικά ανεξάρτητες από το Ras λειτουργίες [83]. Συγκεκριμένα, έχουμε δείξει ότι: **α)** η νευροϊνιδίνη εντοπίζεται σε διαφορετικά ενδοκυττάρια διαμερίσματα συμπεριλαμβανομένης της πλασματικής μεμβράνης, του κυτταροσκελετού, του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα και **β)** ότι η φωσφορυλίωση από PKC αποτελεί εξαιρετικά σημαντική μετα-μεταφραστική τροποποίηση της νευροϊνιδίνης που μεταβάλλει τη RasGAP ενεργότητά της και τον υποκυτταρικό εντοπισμό της. Άλλωστε, τα τελευταία χρόνια, η πυρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση αποδεικνύεται ότι είναι θεμελιώδης μηχανισμός

για τη λειτουργία των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών και στις περισσότερες περιπτώσεις ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν το p53 και η κυτταροπλασματική φωσφατάση PTEN που πρέπει να είναι παρόντα στον πυρήνα για να πραγματοποιήσουν λειτουργίες αστυνόμευσης. Εξάλλου, οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες μπορεί να πραγματοποιούν διακριτές και μη σχετιζόμενες λειτουργίες στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα.

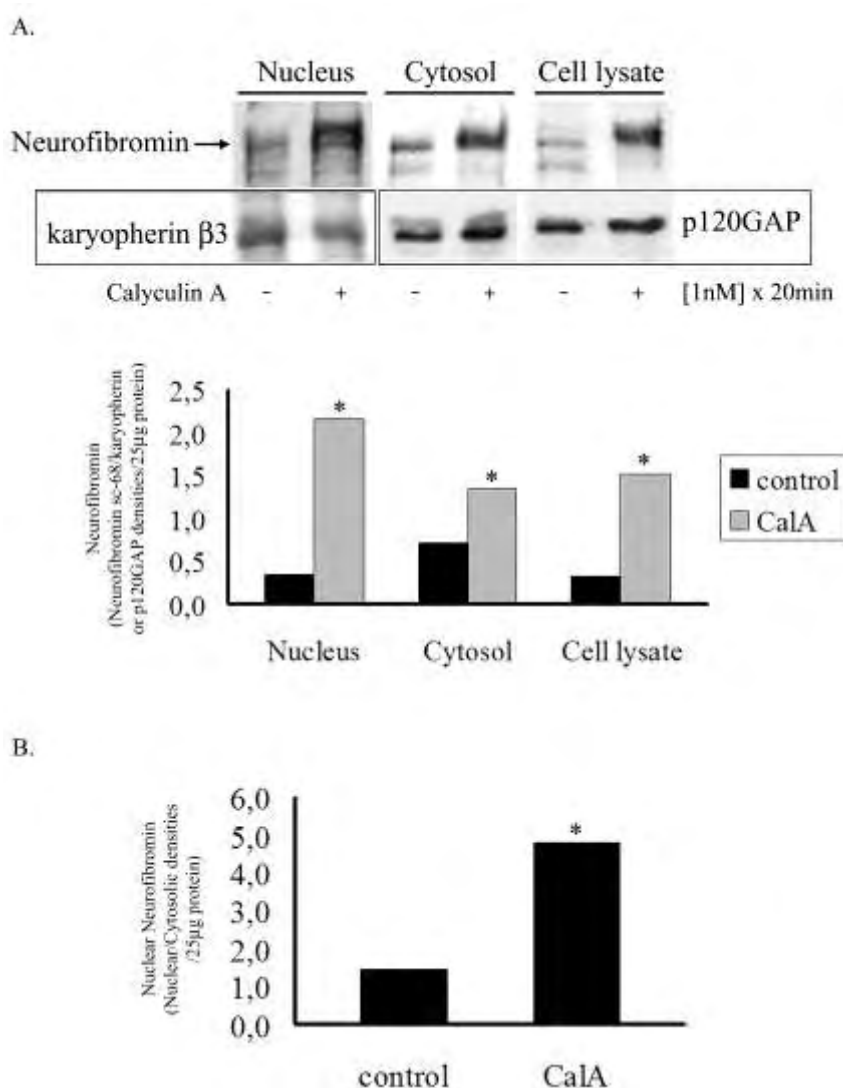
Συνοψίζοντας, η νευροϊνιδίνη είναι μια μετα-μεταφραστικά τροποποιημένη, αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη, κινητή πρωτεΐνη, η οποία -υπό τον έλεγχο της PKC- συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια, ελέγχοντας τόσο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και τη διαφοροποίηση του ΠΝΣ και ΚΝΣ.

Για να μελετήσουμε τον τρόπο με τον οποίο η PKCε-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης ρυθμίζει τη λειτουργία της και τη μετακίνησή της μέσα στο κύτταρο, διαλέξαμε το μοντέλο εμβρυϊκών νευρώνων φλοιού όρνιθας. Το μοντέλο, αυτό, είναι εξαιρετικά χρήσιμο αφού έχει αποδειχθεί ότι η νευροϊνιδίνη είναι αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη πρωτεΐνη και η κορύφωση της έκφρασής της συσχετίζεται καλά με την έναρξη της νευρωνικής διαφοροποίησης και ότι, σε ανώριμους νευρώνες, συνεντοπίζεται με την F-ακτίνη στις νευρικές αποφύσεις και τους αυξητικούς κώνους του μεμβρανικού κυτταροσκελετού [224], η οποία σχηματίζει δίκτυα που είναι σημαντικά για τη νευριτική επιμήκυνση, τη νευρωνική μετακίνηση και τη ρυθμιζόμενη έκκριση [304]. Η PKCε, από την άλλη, θεωρείται ως η κύρια ισομορφή που εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των νευρώνων [96, 99, 121, 151, 153].

3.2.1. Η PKCε-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης ως μηχανισμός ελέγχου της πυρηνο-κυτταροπλασματικής διακίνησής της

Για να μελετήσουμε τη σημαντικότητα της φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης, πραγματοποιήσαμε πειράματα με ένα ειδικό αναστολέα φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης, την καλικουλίνη A (calyculin A) σε πρωτογενείς καλλιέργειες τελεγκεφαλικών νευρώνων που απομονώθηκαν από τα εγκεφαλικά ημισφαίρια εμβρύου όρνιθας 8 ημερών. Είναι σαφές ότι απενεργοποίηση των φωσφατασών, και συνεπώς υπερενεργοποίηση των κινασών, έχει ως αποτέλεσμα τη μαζική φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης

από πληθώρα κινασών σερίνης/θρεονίνης (όπως η PKC). Μετά από μαζική φωσφορυλίωση, λοιπόν, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της νευροϊνιδίνης αυξάνονται σημαντικά (Σχήμα 19 A) σε όλα τα υποκυτταρικά κλάσματα (αριστερό και μεσαίο πάνελ) αλλά και σε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (δεξί πάνελ). Εκτός, όμως, από την αύξηση των επιπέδων της, η φωσφορυλίωση προκαλεί και την εισροή της νευροϊνιδίνης στον πυρήνα (Σχήμα 19 B). Συνεπώς, επιβεβαιώνεται ακόμα μια φορά η σημαντικότητα της φωσφορυλίωσης ως μετα-μεταφραστική τροποποίηση στο μόριο της νευροϊνιδίνης, ως τρόπος ρύθμισης του υποκυτταρικού εντοπισμού αλλά και των πρωτεϊνικών επιπέδων της.

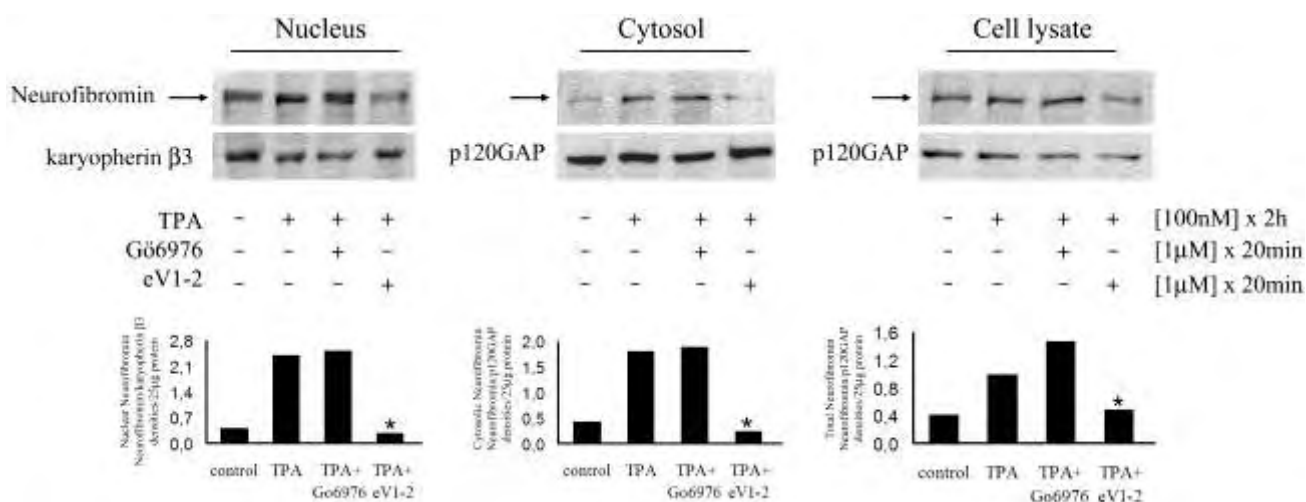


Σχήμα 19. Η φωσφορυλιωμένη νευροϊνιδίνη συσσωρεύεται στον πυρήνα. A. Πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων επώαστηκαν με φορέα ή 1 nM calyculin A για 20 λεπτά. Η αφθονία της νευροϊνιδίνης ανιχνεύθηκε στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα με ανοστυπωση κατά Western χρησιμοποιώντας το μη φωσφο-

ευαίσθητο sc-68 αντίσωμα (άνω πάνελ). Τα επίπεδα της καρυοφερίνης β3 και της p120GAP χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ίσης ποσότητας πρωτεΐνης (κάτω πάνελ). Το διάγραμμα απεικονίζει την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με πυκνομετρική ανάλυση, εκφρασμένη ως το λόγο της πυκνότητας της νευροϊνιδίνης προς την καρυοφερίνη β3 (πυρηνικό κλάσμα) ή προς την p120GAP (κυτταροπλασματικό κλάσμα και ολικό κυτταρικό εκχύλισμα). Β. Το διάγραμμα απεικονίζει την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με πυκνομετρική ανάλυση, εκφρασμένη ως το λόγο της πυκνότητας της πυρηνικής προς την κυτταροπλασματική νευροϊνιδίνη.

Δεδομένης της αλληλεπίδρασης της νευροϊνιδίνης με τις PKC και των ενδείξεων που είχαμε ότι αυτή ρυθμίζει την πυρηνοκυτταροπλασματική διακίνηση της πρωτεΐνης [84], υποθέσαμε ότι η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης πραγματοποιείται από μέλη της οικογένειας των PKC. Προκειμένου να διερευνήσουμε την υπόθεση μας αλλά και να αναγνωρίσουμε τη συγκεκριμένη PKC ισομορφή που εμπλέκεται στη ρύθμιση, πραγματοποιήσαμε επώσεις με TPA, παρουσία ή απουσία ειδικών για PKC αναστολέων. Το TPA, είναι ένας φορβικός εστέρας που ενεργοποιεί κλασσικές και νεοφανείς PKC. Η ιδιότητα της οικογένειας των PKC να ενεργοποιείται από προαγωγούς όγκων, όπως οι φορβικοί εστέρες, είναι ιδιαίτερα πολύτιμη για την ταυτοποίηση και το χαρακτηρισμό τους. Η PKC προσδένεται στο TPA με υψηλή συγγένεια και ενεργοποιείται. Η εξειδικευμένη ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C από φορβολεστέρες είναι σημαντικό εργαλείο για την απόδειξη της εμπλοκής τους στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Με εξωτερική προσθήκη TPA, είναι πιθανό να χρησιμοποιήσουμε συστήματα κυτταρικών μοντέλων για να εξετάσουμε ποιες βιολογικές αποκρίσεις ενός μονοπατιού μεταγωγής σήματος περιλαμβάνονται και ελέγχονται από την πρωτεϊνική κινάση C. Πριν την έναρξη και κατά τη διάρκεια της επώασης με TPA, χρησιμοποιήσαμε τον ειδικό φαρμακολογικό αναστολέα, των κλασσικών PKC, Gö6976 και το ειδικό για PKCε πεπτίδιο αναστολής εV1-2, (αμινοξέα 14-21 της PKCε του αρουραίου) (Σχήμα 20). Ήταν σαφές ότι πρόκειται για ισομορφή των κλασσικών ή νεοφανών PKC, μιας που μόνο αυτές οι υποομάδες έχει δειχθεί ότι φωσφορυλιώνουν τη νευροϊνιδίνη *in vivo* [83, 84]. Ο λόγος που εξετάσαμε μόνο την εμπλοκή της PKCε ισομορφής, από όλες τις νεοφανείς PKC, είναι ότι η PKCε αποτελεί την

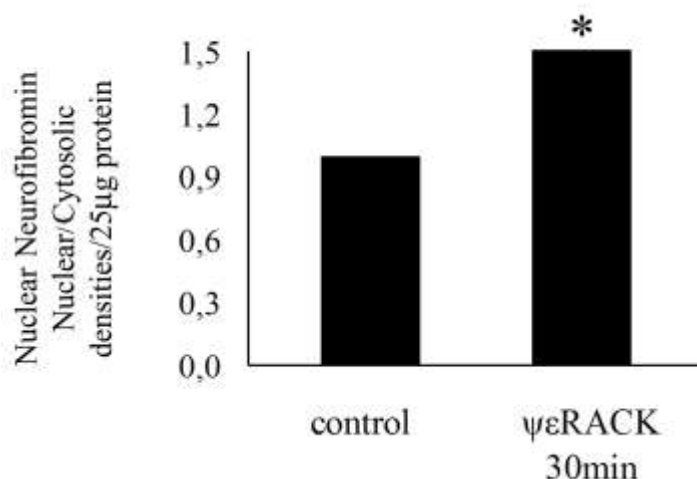
κυρίαρχη ισομορφή στους νευρώνες φλοιού όρνιθας και ότι φωσφορυλιώνει τη νευροϊνιδίνη *in vitro* και *in vivo* [83]. Επώαση μόνο με TPA είχε σαν αποτέλεσμα, όπως αναμέναμε, την αύξηση των επιπέδων της νευροϊνιδίνης στο πυρηνικό και κυτταροπλασματικό κλάσμα (αριστερό και μεσαίο πάνελ) αλλά και στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (δεξί πάνελ). Ταυτόχρονη επώαση με Gö6976 και TPA δε μετέβαλε σημαντικά την αφθονία της νευροϊνιδίνης στα διάφορα κλάσματα, υποδεικνύοντας ότι οι κλασσικές PKC ισομορφές δεν εμπλέκονται στην PKC-εξαρτώμενη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της νευροϊνιδίνης. Όμως, επώαση με το ειδικό για την PKCε πεπτιδίο αναστολής εV1-2, είχε σαν αποτέλεσμα τη δραματική μείωση των επιπέδων της νευροϊνιδίνης, όλων των κυτταρικών κλασμάτων, σε βασικά επίπεδα. Επομένως, το εV1-2 είναι ο αναστολέας που ανέκοψε το αποτέλεσμα του TPA, αποδεικνύοντας ότι η PKCε είναι η ισομορφή που αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της νευροϊνιδίνης και πιθανώς ρυθμίζει τον εντοπισμό της στον πυρήνα.



Σχήμα 20. Η φωσφορυλίωση από PKCε αυξάνει τα επίπεδα της νευροϊνιδίνης στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Οι νευρώνες επωάστηκαν με φορέα (λωρίδα 1) και TPA, 100 nM για 2 h (λωρίδες 2, 3, 4) παρουσία ή απουσία του αναστολέα των κλασσικών PKC Go6976, 1μM ή του ειδικού για την PKCε πεπτιδικού αναστολέα eV1-2. Οι αναστολείς προστέθηκαν 30 λεπτά πριν τη διέγερση με TPA. Τα επίπεδα της ολικής νευροϊνιδίνης ανιχνεύθηκαν στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (άνω πάνελ), ενώ η καρυοφερίνη β3 και η p120GAP χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ίσης ποσότητας πρωτεΐνης (κάτω πάνελ). Τα διαγράμματα απεικονίζουν την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με

πυκνομετρική ανάλυση, εκφρασμένη ως το λόγο της πυκνότητας της νευροϊνιδίνης προς την καρυοφερίνη β3 (πυρηνικό κλάσμα) ή προς την p120GAP (κυτταροπλασματικό κλάσμα και ολικό κυτταρικό εκχύλισμα). ** P<0.01 σημαντικότητα προς την επώαση με TPA.

Για να μελετήσουμε την εμπλοκή της PKCε στην πυρηνοκυτταροπλασματική διακίνηση της νευροϊνιδίνης, πραγματοποιήσαμε επώαση με τον ειδικό για PKCε πεπτιδικό ενεργοποιητή ψεRACK (αμινοξέα 85-92 της PKCε του αρουραίου) και υποκυτταρική κλασμάτωση σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων. Αποδείξαμε ότι η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης από PKCε προκαλεί την πυρηνική συσσώρευση της νευροϊνιδίνης (Σχήμα 21).



Σχήμα 21. Η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης από την PKCε είναι υπεύθυνη για την πυρηνική συσσώρευση της. Το διάγραμμα απεικονίζει την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με πυκνομετρική ανάλυση, εκφρασμένη ως το λόγο της πυκνότητας της πυρηνικής προς την κυτταροπλασματική νευροϊνιδίνη.

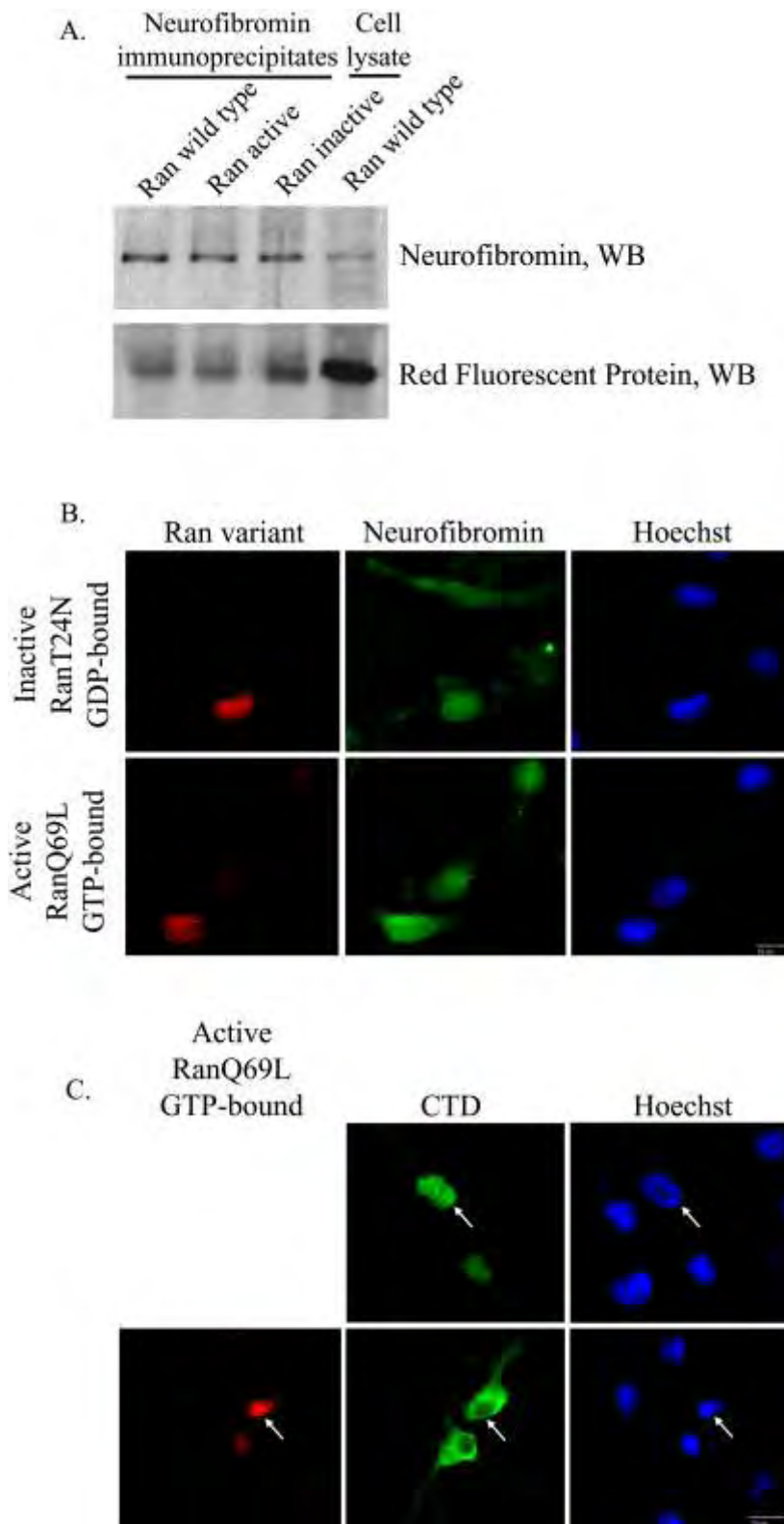
3.2.2. Διερεύνηση των μονοπατιών της πυρηνο-κυτταροπλασματικής διακίνησης της νευροϊνιδίνης

Αποδείξαμε, λοιπόν ότι ο πυρηνικός εντοπισμός της νευροϊνιδίνης ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης από την PKCε. Το επόμενο λογικό ερώτημα που προέκυψε ήταν ποιος είναι ο μηχανισμός της πυρηνο-κυτταροπλασματικής διακίνησης της ενδογενούς νευροϊνιδίνης. Η ενεργή μεταφορά στον πυρήνα, σε πρωτεΐνες άνω των 40 kDa, συνήθως διαμεσολαβείται από το NLS που φέρουν στην αλληλουχία τους. Πρόσφατα, πειράματα από το εργαστήριό μας απέδειξαν ότι η αλληλουχία NLS είναι αναγκαία και επαρκής για να οδηγήσει τη νευροϊνιδίνη στον πυρήνα (Kalpachidou and Leondaritis, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Για το σκοπό αυτό, κατασκευάστηκε ένα πλασμίδιο της C-τελικής περιοχής (C-Terminal Domain, CTD) της νευροϊνιδίνης που περιέχει την αλληλουχία NLS. Όταν αυτό το, συζευγμένο με GFP, πλασμίδιο υπερεκφράζεται σε SF268 κύτταρα ή άλλες κυτταρικές σειρές, εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά μέσα στον πυρήνα (Σχήμα 22 C, άνω πάνελ). Η πυρηνική μεταφορά των περισσότερων μεσαίου και μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεϊνών, που περιέχουν NLS, απαιτεί την ενεργοποίηση της Ran, μιας μικρής GTPάσης και των ρυθμιστών της. Για να εξετάσουμε αν η νευροϊνιδίνη χρησιμοποιεί αυτό τον ενεργειο-εξαρτώμενο μηχανισμό για να εισέλθει στον πυρήνα χρησιμοποιήσαμε μεταλλαγμένα πλασμίδια της Ran που έχουν ανεπαρκή ενεργότητα GTPάσης. Συγκεκριμένα, το πλασμίδιο RFP-RanT24N που έχει μεταλλαγή από θρεονίνη σε ασπαραγίνη στο αμινοξικό κατάλοιπο 24 και εμποδίζει την πυρηνική έξοδο και το πλασμίδιο RFP-RanQ69L που έχει μεταλλαγή από γλουταμίνη σε λυσίνη στο αμινοξικό κατάλοιπο 69 και εμποδίζει την πυρηνική είσοδο. Σε καλλιεργούμενα κύτταρα η νευροϊνιδίνη εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα και συνδέεται με οργανίδια όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο.

Αρχικά, υπερεκφράσαμε τα μεταλλαγμένα Ran πλασμίδια σε SF268 κύτταρα και μελετήσαμε την κατανομή της ενδογενούς νευροϊνιδίνης στο κύτταρο. Παρατηρήσαμε ότι μετά από υπερέκφραση του RanT24N πλασμιδίου, η ενδογενής νευροϊνιδίνη συσσωρεύεται στον πυρήνα (Σχήμα 22 B, άνω πάνελ). Αναλόγως, μετά από υπερέκφραση του RanQ69L, η νευροϊνιδίνη τείνει να συσσωρεύεται γύρω και έξω από τον πυρήνα, σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν έχουν διαμολυνθεί με το πλασμίδιο του Ran

(Σχήμα 22 Β, κάτω πάνελ). Επιπλέον, ταυτόχρονη υπερέκφραση των πλασμιδίων CTD και RanQ69L είχε ως αποτέλεσμα τον αποκλεισμό της πυρηνικής εισόδου του CTD (Σχήμα 22 C, κάτω πάνελ). Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι το πλασμίδιο RanQ69L, ενώ, εξαιρεί εντελώς από τον πυρήνα το πλασμίδιο CTD, παρεμποδίζει μερικώς, μόνο, την είσοδο της ενδογενούς νευροϊνιδίνης σε αυτόν. Το «παράδοξο» αυτό, αντιστακτά το γεγονός ότι η πλήρους μήκους πρωτεΐνη είναι δεσμευμένη σε συμπλέγματα μεταγωγής σήματος και άλλες πρωτεΐνες, ενώ ένα μόνο μέρος της (εδώ η C-τελική περιοχή της) κινείται πιο ελεύθερα μέσα στο κύτταρο. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω αποτελέσματα, σε κύτταρα SF268 που υπερεκφράζουν παροδικά την αγρίου τύπου Ran (Ranwt GTPase), το RanQ69L (GTP-bound Ran), και το RanT24N (GDP-bound Ran), πραγματοποιήσαμε ανοσοκαθίζηση της ενδογενούς νευροϊνιδίνης και εξετάσαμε την έκφραση της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (Red Fluorescent Protein, RFP). Χρησιμοποιήσαμε αντίσωμα ενάντια σε RFP αφού όλα τα Ran πλασμίδια είναι συζευγμένα με αυτό. Βρήκαμε ότι η νευροϊνιδίνη συν-ανοσοκαθίζει με το GTP- αλλά και το GDP-δεσμευμένο πλασμίδιο καθώς και με την αγρίου τύπου μορφή του Ran (Σχήμα 22 Α), αποδεικνύοντας ότι η νευροϊνιδίνη εισέρχεται στον πυρήνα υπό τη ρύθμιση του ενεργειο-εξαρτώμενου μονοπατιού του Ran.

Μετά την αναγνώριση της ενεργής πυρηνικής εισόδου της νευροϊνιδίνης και την εξακρίβωση του μονοπατιού που αυτή χρησιμοποιεί, θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν η νευροϊνιδίνη μεταφέρεται ενεργά από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Για το σκοπό, αυτό, χρησιμοποιήσαμε τη λεπτομυκίνη Β (LMB), έναν ισχυρό και ειδικό αναστολέα της πυρηνικής εξαγωγής, ο οποίος αλκυλιώνει και αναστέλλει την, κύρια πρωτεΐνη εξαγωγής, εξπορτίνη CRM1 [31], οπότε πρωτεΐνες που περιέχουν σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (NES) θα συσσωρευτούν μέσα σε αυτόν.

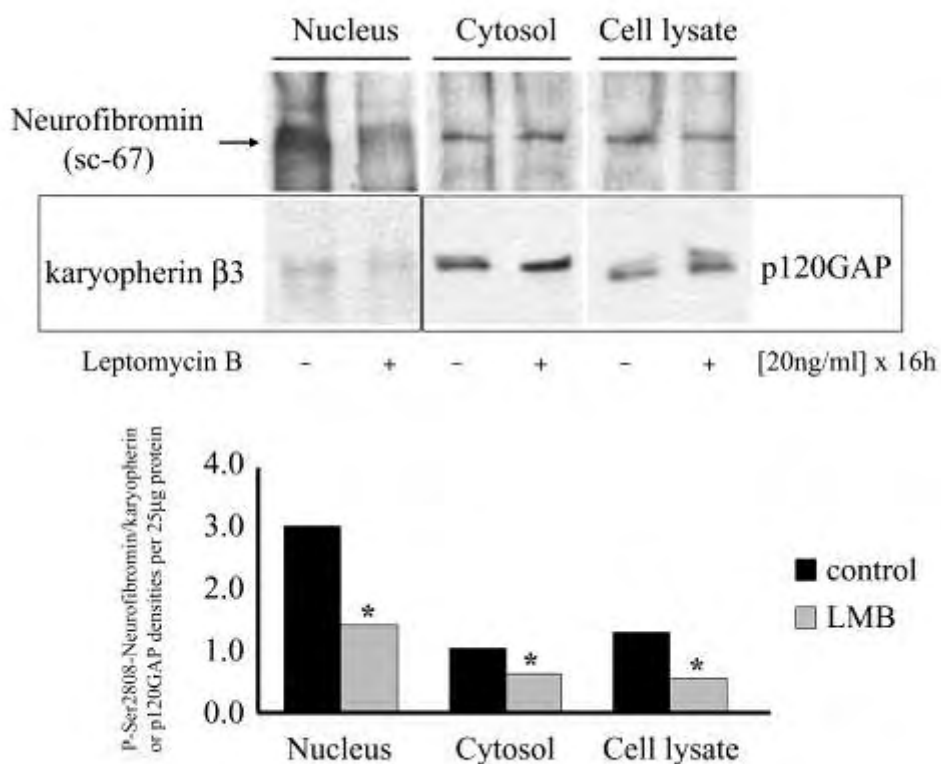


Σχήμα 22. Η νευροϊνιδίνη χρησιμοποιεί το εξαρτώμενο από Ran μονοπάτι πυρηνικής εισόδου. Α. Η νευροϊνιδίνη συν-ανοσοκατακρημνίζεται με τη Ran. Τα SF268 κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια Ran αγρίου τύπου (Ranwt), Ran-Q69L, ή Ran-T24N και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς νευροϊνιδίνης. Για να οπτικοποιηθεί η αλληλεπίδραση, τα

ανοσοσύμπλοκα (λωρίδες 1-4) ή το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (λωρίδα 5) ανοσοσυμπώθηκαν με ειδικό αντίσωμα ενάντια στην κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Red Fluorescent Protein, RFP) (κάτω πάνελ), ενώ, ειδικό αντίσωμα ενάντια στην νευροϊνιδίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ίσων επιπέδων ανοσοκατακρήμνισης (άνω πάνελ). Β. Τα SF268 κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια Ran-T24N ή Ran-Q69L, που είναι μεταλλαγμένες μορφές της Ran, και μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός της νευροϊνιδίνης με ανοσοκυταροχημεία. Οι εικόνες δείχνουν με κόκκινο: τα μεταλλαγμένα Ran πλασμίδια, Ran-T24N (άνω πάνελ) και RanQ69L (κάτω πάνελ), με πράσινο: την ενδογενή νευροϊνιδίνη, με μπλε: πυρηνική χρώση με Hoechst 33258. C. Τα SF268 κύτταρα διαμολύνθηκαν με CTD μόνο (άνω πάνελ) ή με συνδυασμό CTD και Ran-Q69L (κάτω πάνελ). Οι εικόνες δείχνουν με πράσινο: το CTD πλασμίδιο, με κόκκινο: το Ran-Q69L πλασμίδιο, με μπλε: πυρηνική χρώση με Hoechst 33258. Τα βέλη σημειώνουν ενδεικτικούς πυρήνες κυττάρων. Όλες οι εικόνες είναι προβολές 5 Z-τομών πάχους 0,5 μm, οι οποίες αποσυσχετίστηκαν (deconvoluted) με τον αλγόριθμο του κοντινότερου γείτονα (nearest-neighbour algorithm).

In silico μελέτη της αλληλουχίας της νευροϊνιδίνης προβλέπει την ύπαρξη δύο υποθετικών αλληλουχιών NES στο τέλος της PH και στην αρχή της C-τελικής περιοχής της. Προκειμένου να εξεταστεί αν οι αλληλουχίες NES της νευροϊνιδίνης είναι λειτουργικές, καλλιεργήθηκαν τελεγκεφαλικοί νευρώνες που απομονώθηκαν από τα εγκεφαλικά ημισφαίρια εμβρύου όρνιθας 8 ημερών και επώαστηκαν με φορέα ή LMB για 16 ώρες. Ακολούθησε υποκυτταρική κλασμάτωση και ανιχνεύθηκε η ποσότητα της νευροϊνιδίνης στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και το ολικό κυτταρικό κλάσμα με ανοσοσύτπωση κατά Western και ειδικό αντίσωμα έναντι της νευροϊνιδίνης (Σχήμα 23). Εξετάζοντας κάθε υποκυτταρικό κλάσμα ξεχωριστά βλέπουμε ότι: **α)** τα επίπεδα της νευροϊνιδίνης μειώνονται στο κυτταρόπλασμα, γεγονός συμβατό με την πυρηνική συσσώρευση της νευροϊνιδίνης, υποδεικνύοντας ότι η νευροϊνιδίνη χρησιμοποιεί το CRM1-εξαρτώμενο τρόπο πυρηνικής εξόδου, αλλά **β)** τα επίπεδά της επίσης μειώνονται στο πυρηνικό κλάσμα, αποτέλεσμα αντίθετο από την αναμενόμενη αύξηση που θα προϋπόθετε η επώαση με LMB, αλλά συμβατό με την **γ)** μείωση των επιπέδων της νευροϊνιδίνης στο ολικό κυτταρικό κλάσμα, υποδεικνύοντας πυρηνική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης. Η πυκνομετρική ανάλυση των επιπέδων της νευροϊνιδίνης

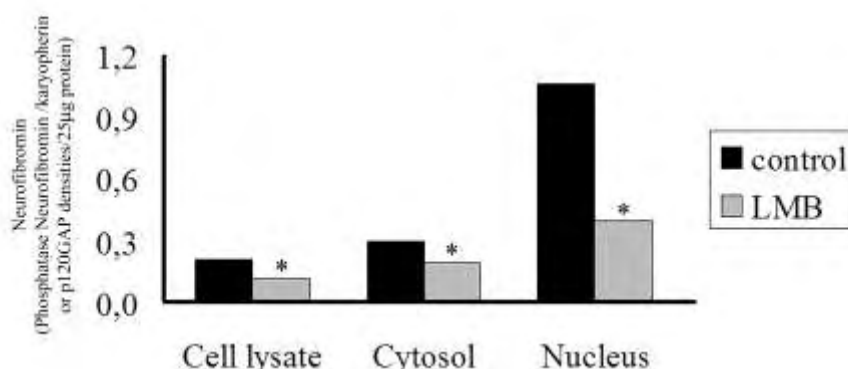
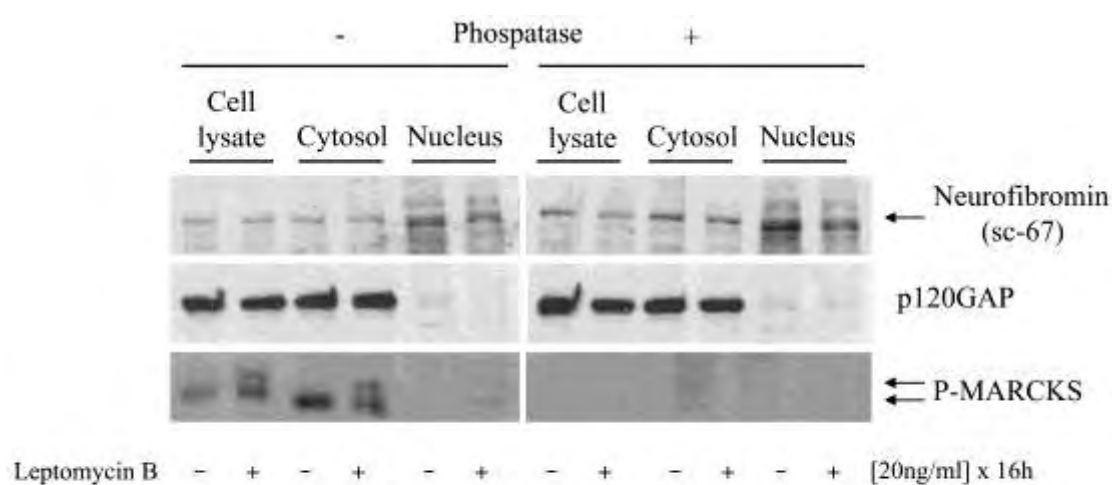
αποκαλύπτει ότι η μείωση των επιπέδων της νευροϊνιδίνης είναι σημαντική σε όλα τα υποκυτταρικά κλάσματα (Σχήμα 23, διάγραμμα).



Σχήμα 23. Η νευροϊνιδίνη χρησιμοποιεί το CRM1-εξαρτώμενο μονοπάτι πυρηνικής εξόδου αλλά επώαση με LMB έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της. Πρωτογενείς νευρώνες 8^{ης} εμβρυϊκής ημέρας (E8) επώαστηκαν ή όχι με 20 ng/ml λεπτομυκίνη B (LMB). Τα κύτταρα κλασματώθηκαν και η αφθονία της νευροϊνιδίνης ανιχνεύθηκε σε όλα τα υποκυτταρικά κλάσματα με ανοσοσύτωση κατά Western και χρήση του φωσφο-ευαίσθητου αντισώματος sc-67 (άνω πάνελ). Η p120GAP, μια κυτταροπλασματική RasGAP, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ίσων πρωτεϊνικών επιπέδων στο κυτταροπλασματικό και το ολικό κυτταρικό κλάσμα (μεσαίο πάνελ). Η καρυοφερίνη β3, μια ιμπορτίνη, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ίσων πρωτεϊνικών επιπέδων στο πυρηνικό κλάσμα. Η p120GAP αποτελεί, επίσης, δείκτη ορθής υποκυτταρικής κλασμάτωσης.

Πειράματα στο εργαστήριο μας αποκάλυψαν ότι επίδραση με TPA, στα κύτταρα SH-SY5Y προκαλεί μεταβολή, και συγκεκριμένα μείωση, των επιπέδων της νευροϊνιδίνης, όταν αυτά ανιχνεύονται σε ανοσοσύτωση κατά Western με το αντίσωμα sc-67. Περαιτέρω ανάλυση, έδειξε ότι το sc-67 αντίσωμα είναι φωσφο-ευαίσθητο, δηλαδή δεν αναγνωρίζει με την ίδια

ειδικότητα τη φωσφορυλιωμένη και τη μη φωσφορυλιωμένη νευροϊνιδίνη, λόγω φαινομένου συγκάλυψης της αντιγονικής θέσης δέσμευσης (epitope masking). Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση αφορά το κατάλοιπο Ser2808 το οποίο είναι εξαιρετική θέση φωσφορυλίωσης από PKC [84]. Για να αποδείξουμε ότι η μείωση, που παρατηρήσαμε στα υποκυτταρικά κλάσματα με το αντίσωμα sc-67, δεν είναι αποτέλεσμα φαινομένου αντιγονικής συγκάλυψης, πραγματοποιήσαμε δοκιμασία SAP, κατά την οποία η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται με αλκαλική φωσφατάση και έτσι οι ομάδες φώσφορου απομακρύνονται και το αντίσωμα αποκτά κανονική αντιγονική δέσμευση στην πρωτεΐνη.



Σχήμα 24. Η μείωση των επιπέδων της νευροϊνιδίνης δεν οφείλεται σε φαινόμενα αντιγονικής συγκάλυψης. Πρωτογενείς νευρώνες 8^{ης} εμβρυϊκής ημέρας E8 επωάστηκαν ή όχι με 20 ng/ml λεπτομυκίνη B (LMB). Τα κύτταρα κλασματώθηκαν σε κυτταροπλασματικό, πυρηνικό και ολικό κυτταρικό κλάσμα και οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε πηκτή αποδιατακτικής πολύ-ακρυλαμίδης. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και υπέστησαν δοκιμασία SAP. Η αφθονία της νευροϊνιδίνης ανιχνεύθηκε σε όλα τα υποκυτταρικά κλάσματα με

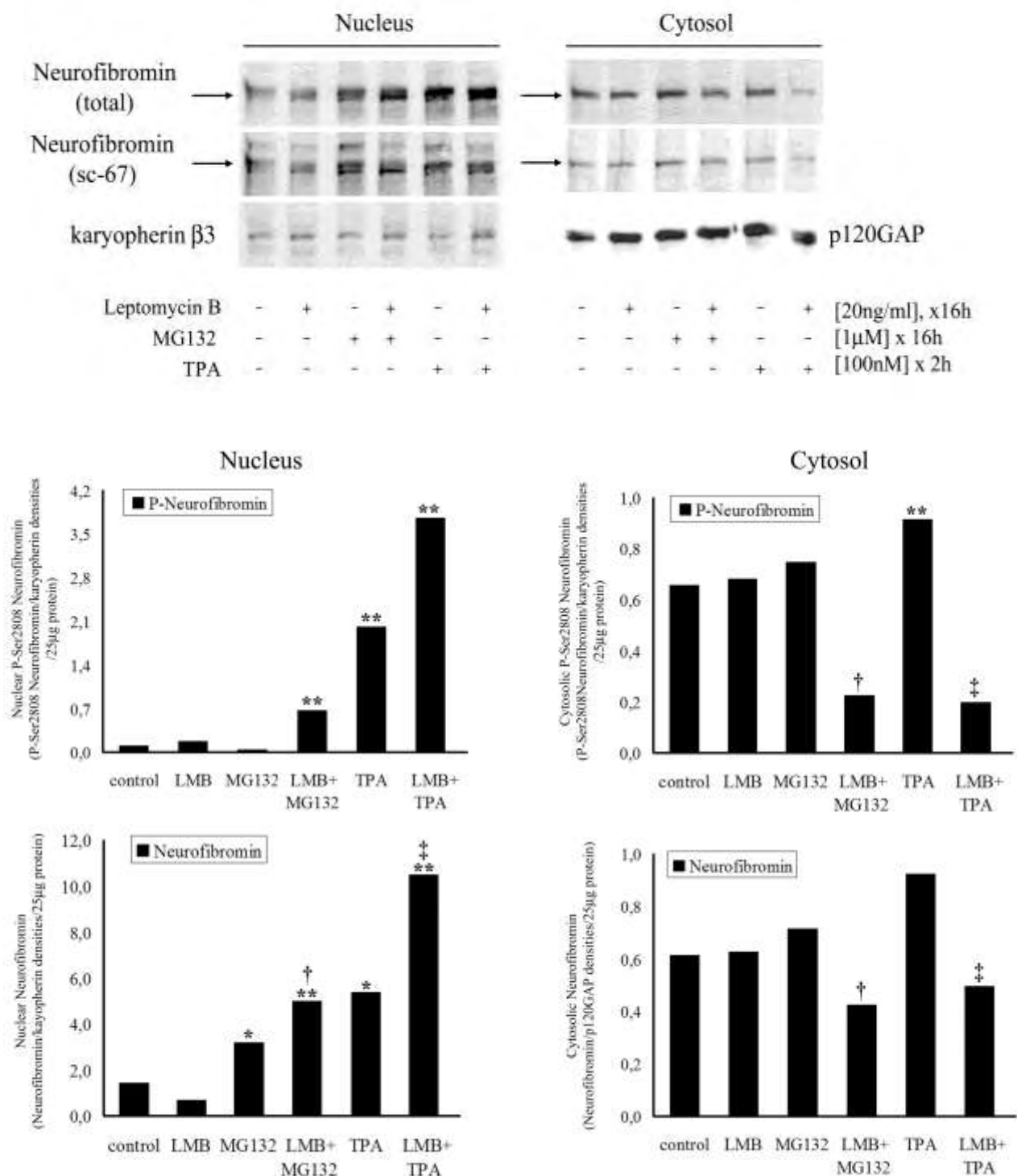
ανοσοσύπωση κατά Western και χρήση του φωσφο-ευαίσθητου αντισώματος sc-67 (άνω πάνελ). Η p120GAP χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ίσων πρωτεϊνικών επιπέδων στο κυτταροπλασματικό και το ολικό κυτταρικό κλάσμα (μεσαίο πάνελ). Η pMARCKs, το φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα των PKC, χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης επιτυχούς δοκιμασίας SAP και συσσώρευσης στον πυρήνα εξαιτίας της επώασης με LMB.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 24, η σημαντική μείωση των επιπέδων της νευροϊνιδίνης εντοπίζεται τόσο στη μεμβράνη που έχει επωαστεί με φωσφατάση (δεξί πάνελ) όσο και στη μεμβράνη μάρτυρα (αριστερό πάνελ), γεγονός που αποδεικνύει ότι η μείωση είναι πραγματική και δεν οφείλεται σε αντιγονική συγκάλυψη λόγω φωσφορυλίωσης. Η πρωτεΐνη pMARCKs είναι το φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα των PKC και χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης επιτυχούς δοκιμασίας SAP. Είναι φανερό ότι στη μεμβράνη που επώαστηκε με φωσφατάση η pMARCKs δεν αναγνωρίζεται από το ειδικό, για αυτήν, αντίσωμα (δεξί κάτω πάνελ) μιας και όλες οι ομάδες φωσφόρου έχουν αφαιρεθεί. Η ίδια πρωτεΐνη χρησιμεύει και ως δείκτης επιτυχούς επώασης με LMB αφού μόνο μετά από επώαση με LMB, η κυτταροπλασματική pMARCKs, ανιχνεύεται και στον πυρήνα (αριστερό κάτω πάνελ).

3.2.3. Αποικοδόμηση της νευροϊνιδίνης από το πρωτεάσωμα του πυρήνα και ρύθμιση από PKCε-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση

Εδραιώσαμε έως τώρα ότι η μείωση των επιπέδων της νευροϊνιδίνης είναι πραγματική και σημαντική. Υποθέσαμε, λοιπόν, ότι η νευροϊνιδίνη συσσωρεύεται στον πυρήνα όπου και αποικοδομείται. Για να ελέγξουμε τον τρόπο με τον οποίο γίνεται αυτή η αποικοδόμηση και αν σχετίζεται με την κατάσταση φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης από PKC πραγματοποιήσαμε επώσεις με, τον ειδικό αναστολέα πρωτεασώματος, MG132 ή το φορβικό εστέρα TPA, παρουσία ή απουσία LMB (Σχήμα 25). Ο MG132 είναι ένας ειδικός, ισχυρός, αναστρέψιμος και κυτταρο-διαπερατός αναστολέας του πρωτεασώματος και δρα μειώνοντας την αποικοδόμηση των συζευγμένων με ουμπικουιτίνη πρωτεϊνών.

Έτσι, λοιπόν, η αφθονία της νευροϊνιδίνης αυξάνεται σημαντικά, μετά από επώαση με MG132, στον πυρήνα (αριστερό πάνελ) αλλά όχι στο κυτταρόπλασμα (δεξί πάνελ) γεγονός που αποδεικνύει ότι η νευροϊνιδίνη αποικοδομείται μέσω του πυρηνικού πρωτεασώματος. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της νευροϊνιδίνης αυξάνονται σημαντικά και μετά από επώαση με TPA. Η αύξηση αυτή συμβαίνει στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα υποδεικνύοντας ότι η φωσφορυλίωση από PKC προσφέρει κάποιου είδους σταθερότητα στη νευροϊνιδίνη. Η σταθερότητα, αυτή, αφορά τη νευροϊνιδίνη σε πρωτεϊνικό επίπεδο και δε σχετίζεται με αυξημένη σύνθεση, αφού μελέτες από το εργαστήριό μας, με χρήση S^{35} -μεθειονίνης, έδειξαν ότι ακόμα και μακροχρόνια επώαση με TPA δε μεταβάλλει τα επίπεδα σύνθεσης της πρωτεΐνης [84]. Όταν οι νευρώνες επωάστηκαν ταυτόχρονα με LMB και MG132 τα πυρηνικά επίπεδα της νευροϊνιδίνης αυξήθηκαν σημαντικά (αριστερό πάνελ), ενώ τα κυτταροπλασματικά επίπεδά της μειώθηκαν σημαντικά (δεξί πάνελ) σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης μετά από επώαση μόνο με MG132. Το ίδιο παρατηρήθηκε και μετά από ταυτόχρονη επώαση με TPA και LMB γεγονός που επιβεβαιώνει περαιτέρω ότι η πυρηνική έξοδος της νευροϊνιδίνης εξαρτάται από το CRM1 μονοπάτι. Τα παραπάνω αποτελέσματα λήφθηκαν με τη χρήση τόσο του φωσφο-ευαίσθητου sc-67 (μεσαίο πάνελ), όσο και του μη φωσφο-ευαίσθητου sc-68 (άνω πάνελ) αντισωμάτων ενάντια της νευροϊνιδίνης. Μάλιστα, τα κέρδη σε ανοσοδραστικότητα του sc-68 αντισώματος μετά από επώαση με TPA αντικατοπτρίζουν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης από PKC στο κατάλοιπο Ser2808. Μελέτη με το sc-68 αντίσωμα έδειξε ότι τα μόρια της νευροϊνιδίνης που δεν είναι φωσφορυλιωμένα, τουλάχιστον στη Ser2808, αποικοδομούνται στον πυρήνα, αφού επώαση με πρωτεασωμικό αναστολέα αυξάνει πολύ σημαντικά τα επίπεδά τους (Σχήμα 25).

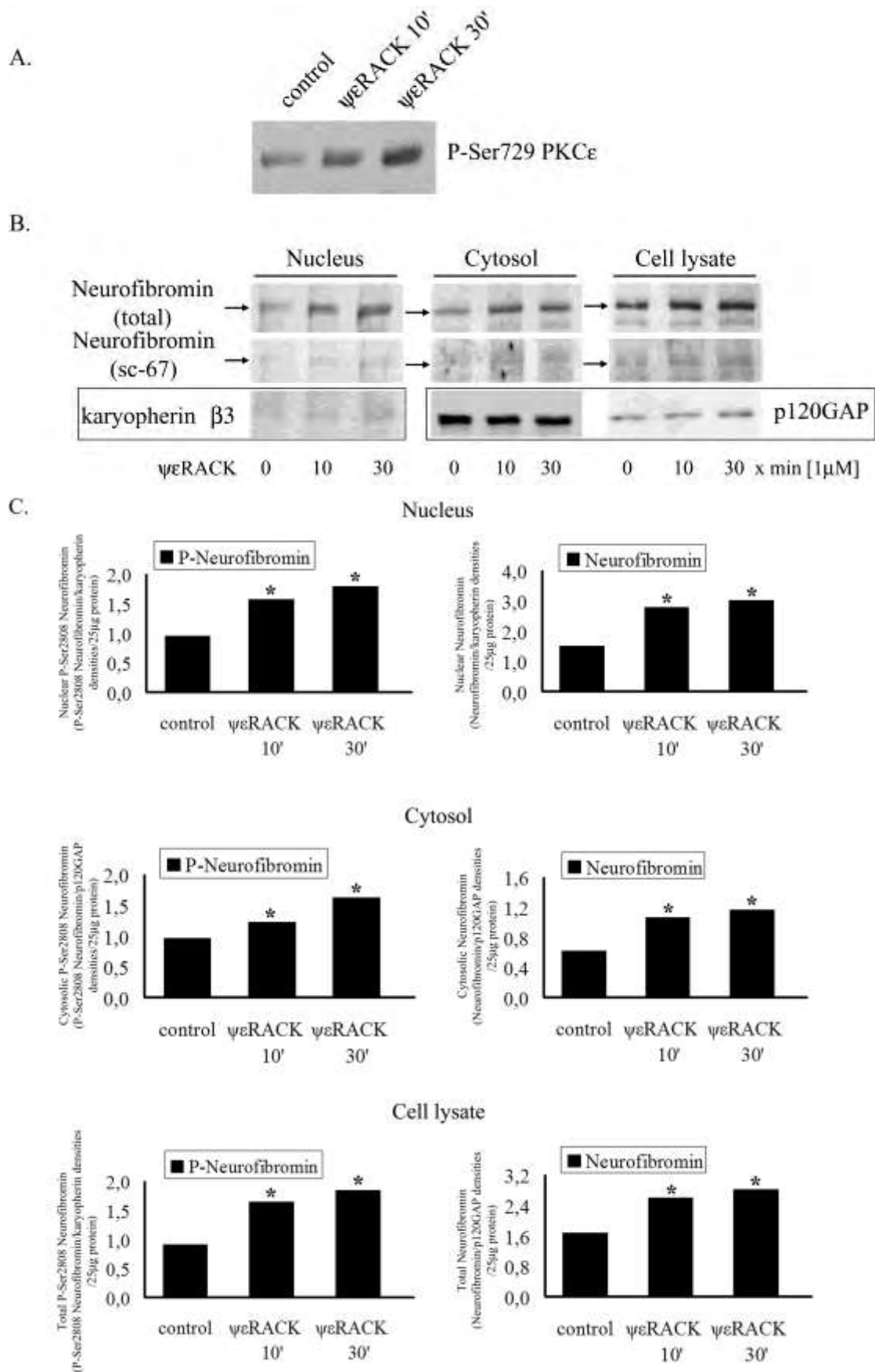


Σχήμα 25. Η αποικοδόμηση της νευροϊνιδίνης εξαρτάται από το πυρηνικό πρωτεάσωμα και από PKC-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση. Οι νευρώνες επώαστηκαν με φορέα (λωρίδες 1, 2) ή 1 μM MG132 για 16 h (λωρίδες 3, 4) ή 100 nM TPA για 2 h (λωρίδες 5, 6) παρουσία ή απουσία 20 ng/ml LMB. Τα επίπεδα της νευροϊνιδίνης ανιχνεύθηκαν στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα με

ανοσοσύπωση κατά Western με ειδικό φωσφο-ευαίσθητο αντίσωμα (μεσαίο πάνελ) και μη φωσφο-ευαίσθητο αντίσωμα (άνω πάνελ). Η καρυοφερίνη β3 και η p120GAP χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ίσης ποσότητας πρωτεΐνης (κάτω πάνελ), στο πυρηνικό και το κυτταροπλασματικό κλάσμα αντίστοιχα, αλλά και ως δείκτες επιτυχούς υποκυτταρικής κλασμάτωσης. Τα διαγράμματα απεικονίζουν την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με πυκνομετρική ανάλυση, εκφρασμένη ως το λόγο της πυκνότητας της νευροϊνιδίνης προς την καρυοφερίνη β3 (πυρηνικό κλάσμα) ή προς την p120GAP (κυτταροπλασματικό κλάσμα). Τα αποτελέσματα είναι μέσοι όροι \pm s.e. 3-5 δειγμάτων από 3-7 διαφορετικά πειράματα: * $P < 0.05$ και ** $P < 0.01$ σημαντικότητα προς μάρτυρα, † $P < 0.05$ προς MG132, και ‡ $P < 0.05$ προς TPA.

Στη συνέχεια για να επιβεβαιώσουμε περαιτέρω την εμπλοκή της PKCε στη σταθεροποίηση της νευροϊνιδίνης αλλά και για να διαπιστώσουμε την συμμετοχή της στη διαδικασία της πρωτεασωμικής αποικοδόμησης, πραγματοποιήσαμε επώσεις με τον ειδικό για PKCε πεπτιδικό ενεργοποιητή ψεRACK (αμινοξέα 85-92 της PKCε του αρουραίου) (Σχήμα 26). Τα επίπεδα της p-Ser729 PKCε, στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα, αυξάνονται ανάλογα με το χρόνο επώασης με ψεRACK και επιβεβαιώνουν ότι η επώαση αυτή ενεργοποίησε την PKCε στο χρόνο και ήταν επιτυχής (Σχήμα 26 A). Ακολούθως, ανιχνεύσαμε τα επίπεδα της νευροϊνιδίνης με το φωσφο-ευαίσθητο αντίσωμα sc-67 (μεσαίο πάνελ). Στον πυρήνα (αριστερό πλαίσιο), τα επίπεδα της μη φωσφορυλιωμένης νευροϊνιδίνης, αυξάνονται σημαντικά μόνο μετά από 30 λεπτά επώασης με ψεRACK, ενώ στο κυτταρόπλασμα (μεσαίο πλαίσιο) σημαντική αύξηση της μη φωσφορυλιωμένης νευροϊνιδίνης προκαλείται μόνο στα 10 και όχι στα 30 λεπτά επώασης με ψεRACK. Στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (δεξί πλαίσιο), η επίδραση με ψεRACK δε φαίνεται να έχει κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα, τουλάχιστον στην ομάδα μορίων της νευροϊνιδίνης που δε φωσφορυλιώνονται στο εξεταζόμενο κατάλοιπο. Συνδυάζοντας τα παραπάνω, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η νευροϊνιδίνη, που δε φωσφορυλιώνεται στη θέση Ser2808, αλλά μπορεί να φωσφορυλιώνεται σε άλλα κατάλοιπα, μετά από 30 λεπτά ενεργοποίησης της PKCε πιθανώς εισρέει στον πυρήνα. Συνεπώς, η παρατηρούμενη αύξηση, μετά από φωσφορυλίωση, μάλλον σχετίζεται με μετακίνηση της πρωτεΐνης στον πυρήνα.

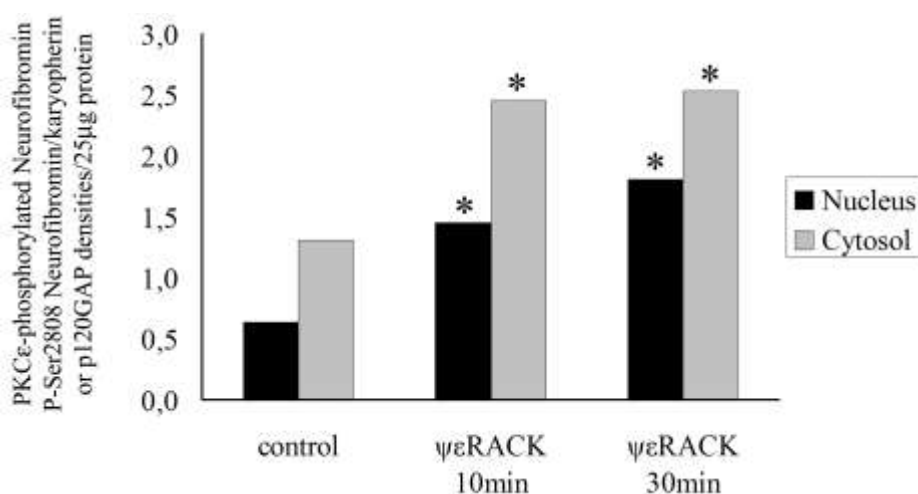
Όταν, στις ίδιες μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, χρησιμοποιήσαμε το μη φωσφο-ευαίσθητο αντίσωμα sc-68 (που αναγνωρίζει τόσο τη φωσφορυλιωμένη όσο και τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της νευροϊνιδίνης) τα αποτελέσματα που πήραμε διέφεραν σημαντικά σε όλα τα κλάσματα (άνω πάνελ). Καταρχήν, παρατηρούμε σημαντικό κέρδος σε ανοσοδραστικότητα sc-68 έναντι του sc-67 αντισώματος, γεγονός που αποδεικνύει ότι η PKCε φωσφορυλιώνει τη νευροϊνιδίνη στο κατάλοιπο Ser2808 *in vivo*. Επίδραση με ψεRACK στον πυρήνα (αριστερό πλαίσιο) έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση των επιπέδων της νευροϊνιδίνης και μάλιστα με τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο. Συγκεκριμένα, τα πυρηνικά επίπεδα της νευροϊνιδίνης αυξάνονται σημαντικά μετά από 10 λεπτά επώασης με ψεRACK αλλά αυξάνονται περαιτέρω όταν η επώαση γίνεται για 30 λεπτά όπου το ποσοστό των ενεργοποιημένων PKCε μορίων -και συνεπώς της φωσφορυλιωμένης νευροϊνιδίνης- είναι μεγαλύτερο. Στο κυτταρόπλασμα, τώρα, τα επίπεδα της νευροϊνιδίνης, μετά τη φωσφορυλίωση του καταλοίπου Ser2808 από PKCε, αυξάνονται σημαντικά και παραμένουν αυξημένα και μετά από 30 λεπτά επίδρασης με ψεRACK. Εν τούτοις, τα επίπεδα μεταξύ της επίδρασης των 10 και των 30 λεπτών δε διαφέρουν σημαντικά, αποτέλεσμα που πιθανώς σχετίζεται με πυρηνική εισροή της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης. Στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (δεξί πλαίσιο), όπως ήταν αναμενόμενο, τα επίπεδα της νευροϊνιδίνης αυξάνονται μετά από επίδραση με ψεRACK, αφού σε αυτό αντικατοπτρίζονται τόσο οι αλλαγές στον πυρήνα, όσο και στο κυτταρόπλασμα.



Σχήμα 26. Η φωσφορυλίωση, στο κατάλοιπο Ser2808, από PKCε προσφέρει πρωτεϊνική σταθερότητα στη νευροϊνιδίνη, με τρόπο εξαρτώμενο

από το χρόνο και την ποσότητα φωσφορυλιωμένης PKCε. Πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων επώαστηκαν με φορέα (λωρίδα 1), ή 1μM ειδικό για την PKCε πεπτιδίο ενεργοποίησης, ψεRACK (λωρίδες 2, 3). Α. Η ενεργοποίηση της PKCε μετρήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος σε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα. Β. Η αφθονία της νευροϊνιδίνης ανιχνεύθηκε στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα με ανοστίπωση κατά Western χρησιμοποιώντας το φωσφο-ευαίσθητο sc67 αντίσωμα (μεσαίο πάνελ) και το μη φωσφο-ευαίσθητο sc68 αντίσωμα (άνω πάνελ). Τα επίπεδα της καρυοφερίνης β3 και της p120GAP χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ίσης ποσότητας πρωτεΐνης (κάτω πάνελ). C. Τα διαγράμματα απεικονίζουν την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με πυκνομετρική ανάλυση, εκφρασμένη ως το λόγο της πυκνότητας της νευροϊνιδίνης προς την καρυοφερίνη β3 (πυρηνικό κλάσμα) ή προς την p120GAP (κυτταροπλασματικό κλάσμα και ολικό κυτταρικό εκχύλισμα). Τα αποτελέσματα είναι μέσοι όροι \pm s.e. 3-5 δειγμάτων από 3-7 διαφορετικά πειράματα: * $P < 0.05$ και ** $P < 0.01$ σημαντικότητα προς μάρτυρα.

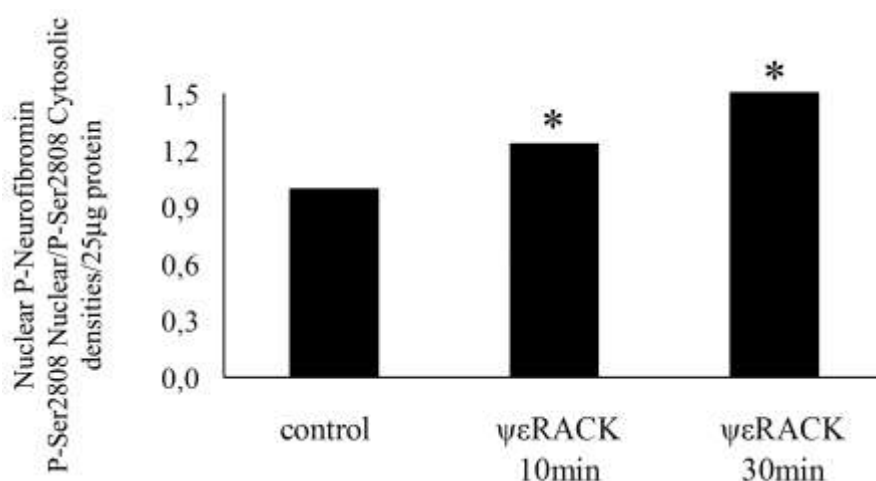
Για την διεξοδικότερη διερεύνηση της φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης στη θέση Ser2808 από την PKCε, συγκρίναμε τη πυκνότητα της μη φωσφορυλιωμένης με αυτή της φωσφορυλιωμένης νευροϊνιδίνης στο πυρηνικό και το κυτταροπλασματικό κλάσμα. Το Σχήμα 27 καθιστά σαφές ότι η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης στο εξεταζόμενο κατάλοιπο συμβαίνει τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα και μάλιστα, όπως αναμέναμε, αυξάνεται όσο αυξάνεται ο χρόνος επίδρασης με το πεπτιδίο ψεRACK.



Σχήμα 27. Η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης στη θέση Ser2808 από την PKCε εξαρτάται από το χρόνο. Το διάγραμμα απεικονίζει την ποσοτικοποίηση

των αποτελεσμάτων με πυκνομετρική ανάλυση, εκφρασμένη ως την αφαίρεση της πυκνότητας της νευροϊνιδίνης του μη φωσφο-ευαίσθητου αντισώματος sc-68 μείον την πυκνότητα του φωσφο-ευαίσθητου sc-67 αντισώματος στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα.

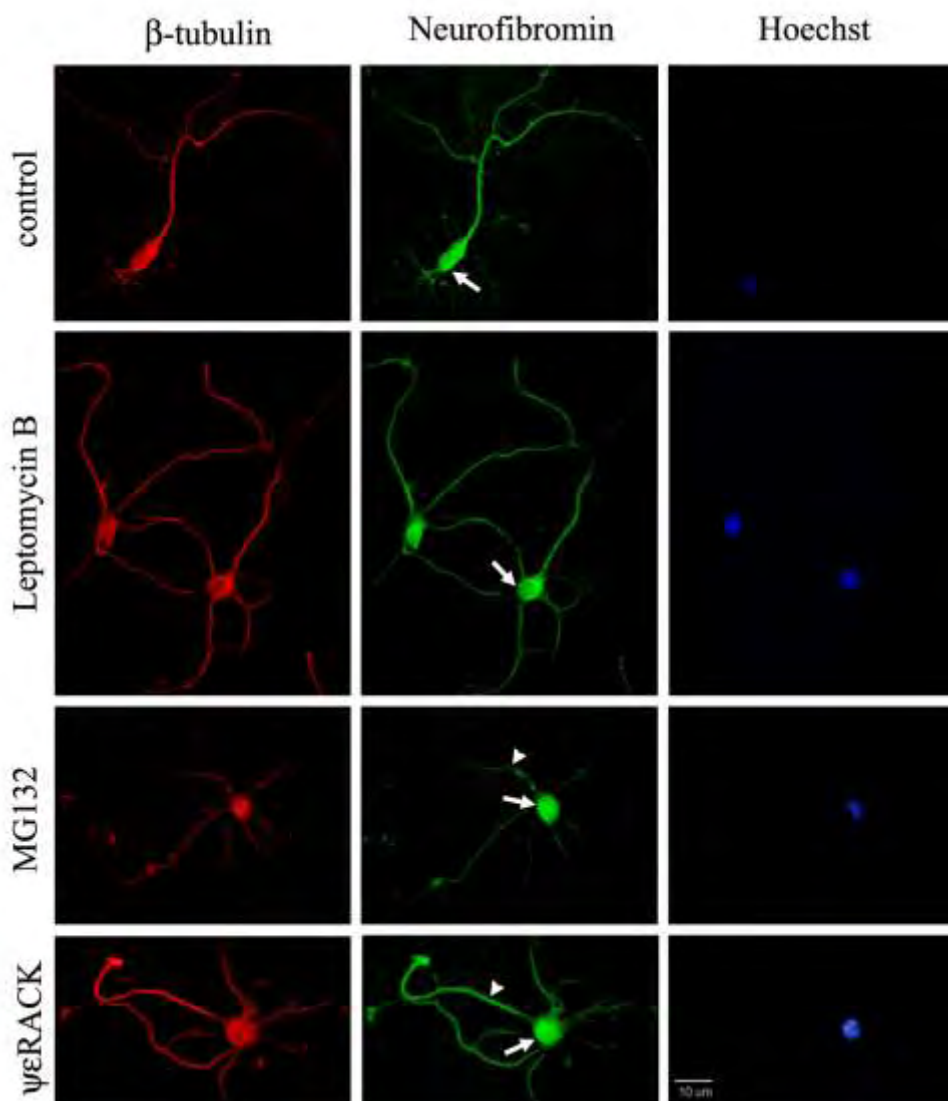
Στη συνέχεια, εξετάσαμε τον τρόπο που η φωσφορυλίωση στο συγκεκριμένο κατάλοιπο (Ser2808) επηρεάζει την πυρηνοκυτταροπλασματική διακίνηση της νευροϊνιδίνης -γνωρίζοντας ότι η φωσφορυλίωση από PKCε συσσωρεύει τη νευροϊνιδίνη στο πυρήνα- και βρήκαμε ότι η PKCε-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης στη Ser2808 είναι υπεύθυνη για την είσοδο και τη διατήρηση της νευροϊνιδίνης στον πυρήνα (Σχήμα 28).



Σχήμα 28. Η φωσφορυλίωση στη θέση Ser2808 από την PKCε είναι υπεύθυνη για την πυρηνική συσώρευση της νευροϊνιδίνης. Το διάγραμμα απεικονίζει την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με πυκνομετρική ανάλυση, εκφρασμένη ως το λόγο της πυκνότητας της φωσφορυλιωμένης πυρηνικής προς τη φωσφορυλιωμένη κυτταροπλασματική νευροϊνιδίνη.

Τέλος, τα βιοχημικά αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με ανάλυση μονήρων κυττάρων μετά από ανοσοφθορισμό και παρατήρηση στο μικροσκόπιο (Σχήμα 29). Σε ηρεμία, η νευροϊνιδίνη βρίσκεται εντός και εκτός του πυρήνα νευρώνων εμβρύου όρνιθας (πάνελ 1, βέλος). Με επίδραση LMB, αντί για την αναμενόμενη πυρηνική συσώρευση εξαιτίας της αναστολής των μονοπατιών πυρηνικής εξόδου, παρατηρήσαμε μείωση των επιπέδων της πυρηνικής νευροϊνιδίνης (πάνελ 2, βέλος). Επίδραση με τον αναστολέα του

πρωτεασώματος MG132 είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της πυρηνικής (πάνελ 3, βέλος) αλλά όχι της κυτταροπλασματικής (πάνελ 3, κεφαλή βέλους) νευροϊνιδίνης, ενώ η επώαση με ψεRACK αυξάνει τα επίπεδα της πυρηνικής (πάνελ 4, βέλος) αλλά και της κυτταροπλασματικής (πάνελ 4, κεφαλή βέλους) νευροϊνιδίνης των μετα-μιτωτικών νευρώνων.



Σχήμα 29. Η κατανομή και αφθονία της νευροϊνιδίνης σε πρωτογενείς νευρώνες, μετά από φαρμακολογικές επιδράσεις, επιβεβαιώνεται και με πειράματα ανοσοφθορισμού. Οι νευρώνες επώαστηκαν με φορέα (πάνελ 1), 20 ng/ml LMB για 16 ώρες (πάνελ 2), 1 μ M MG132 για 16 ώρες (πάνελ 3) ή 1 μ M ψεRACK για 30 λεπτά (πάνελ 4). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε ανάλυση ανοσοκυταροχημείας. Αντιπροσωπευτικές εικόνες, προβολές 5 Z-τομών πάχους 0,5 μ m, β -τουμπουλίνης (κόκκινο), νευροϊνιδίνης (πράσινο) και DAPI (μπλε).

Η παρουσία ή μη και η αφθονία της νευροϊνιδίνης στον πυρήνα υποδηλώνεται με τα βέλη, ενώ στο κυτταρόπλασμα με τις κεφαλές βελών.

Συνολικά, λοιπόν, αποδείξαμε ότι η επώαση με το πεπτίδιο ψεRACK ενεργοποιεί την PKCε, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τη νευροϊνιδίνη στο κατάλοιπο Ser2808, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση και συνεπώς την αύξηση της αφθονίας της νευροϊνιδίνης στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα με τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο και τη φωσφορυλίωση. Επιπλέον, ότι η συγκεκριμένη φωσφορυλίωση, αποτελεί πιθανό μηχανισμό ρύθμισης της πυρηνο-κυτταροπλασματικής διακίνησης της νευροϊνιδίνης με τα φωσφορυλιωμένα μόρια πρωτεΐνης να συσσωρεύονται στον πυρήνα.

3.3. Μελέτη των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων και της σημασίας της πυρηνο-κυτταροπλασματικής διακίνησης της νευροϊνιδίνης κατά τον κυτταρικό κύκλο κυτάρων γλοίας

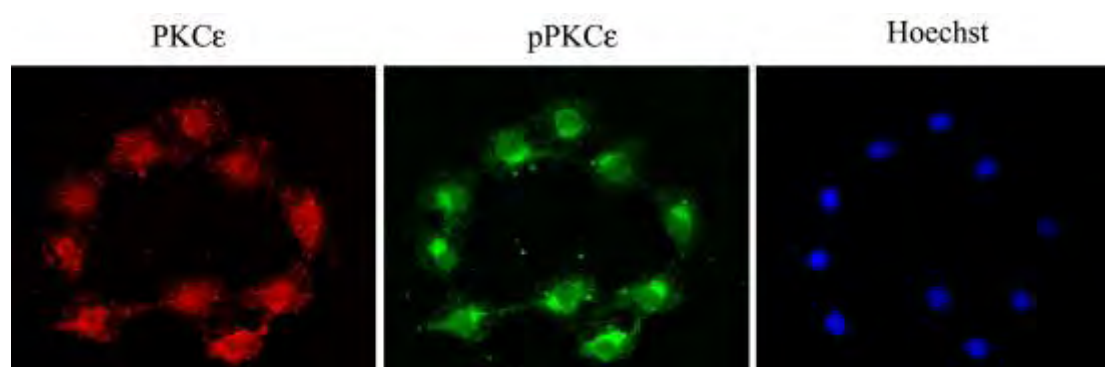
Στην εισαγωγή καταστήσαμε σαφές ότι η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός αποτελούν τις δύο όψεις του ίδιου νομίσματος, δηλαδή της καρκινικής εξαλλαγής. Ως τώρα, μελετήσαμε το ρόλο της PKCε στη διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων και συσχέτισαμε τη λειτουργία της με τη ρύθμιση της ογκοκατασταλτικής νευροϊνιδίνης σε μετα-μιτωτικό περιβάλλον. Είναι γνωστό πως κατά τη νευρωνική διαφοροποίηση τα κύτταρα βγαίνουν από τον κυτταρικό κύκλο (Go withdrawal). Επόμενο λογικό βήμα, λοιπόν, ήταν να μελετήσουμε τις σημαντικές, αυτές, πρωτεΐνες και την αλληλεπίδρασή τους σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται. Η μετάβαση των κυττάρων από την αδράνεια στην επανεισαγωγή τους στον κυτταρικό κύκλο και τον πολλαπλασιασμό, δηλαδή η μετάβαση από την G0 στην G1 φάση και στη συνέχεια υποχρεωτικά στις φάσεις του κύκλου G1-S-G2-Μίτωση, είναι συγκεκριμένη φυσιολογική διαδικασία, δυσλειτουργία της οποίας είναι το κύριο χαρακτηριστικό ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της ογκογένεσης [330]. Η διαδικασία αυτή, στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ελέγχεται με δύο θεμελιώδεις μηχανισμούς. Καταρχήν, ελέγχεται από την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος που

συνδέεται με την ενεργοποίηση ή αδρανοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι στη συνέχεια οδηγούν σε τροποποιημένα προγράμματα γονιδιακής έκφρασης, ωθώντας τα κύτταρα στον πολλαπλασιασμό [331]. Τα μόρια που ελέγχουν τα συγκεκριμένα μονοπάτια μεταγωγής σήματος είναι οι κυκλίνες (Cyclins) και οι κινάσες που εξαρτώνται από κυκλίνες (Cyclin-dependent kinases, Cdk). Ο δεύτερος μηχανισμός ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου είναι με την ύπαρξη δύο κρίσιμων σημείων ελέγχου στην πορεία από τη φάση G1 προς τη μίτωση [332], δηλαδή, στις μεταβάσεις G1/S, που το κύτταρο ελέγχει ότι έχει το κατάλληλο μέγεθος και δεν υπάρχει βλάβη στο DNA, και G2/M, που ελέγχει ότι η S φάση έχει ολοκληρωθεί, δεν υπάρχει βλάβη στο DNA και το κύτταρο είναι έτοιμο να εισέλθει στη μίτωση. Έχουν βρεθεί ακόμα δύο σημεία ελέγχου, το G0/G1 όπου αποφασίζεται αν το κύτταρο θα διαιρεθεί ή θα παραμείνει εκτός κυτταρικού κύκλου και το σημείο ελέγχου μετάφρασης όπου βεβαιώνεται ότι τα χρωμοσώματα είναι ευθυγραμμισμένα στη μιτωτική πλάκα και βρίσκονται υπό διπολική ένταση. Είναι σαφές, ότι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη και ακριβής διαδικασία. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια, πλήθος ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, όπως το APC και το BRCA1, φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμισή του [333, 334].

3.3.1. Ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης και της αλληλεπίδραση της PKCε και της νευροϊνιδίνης κατά τον κυτταρικό κύκλο κυτάρων γλοιοβλαστώματος

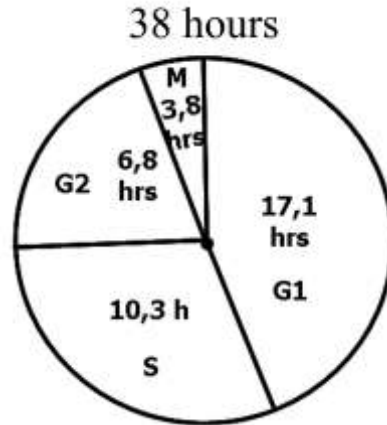
Ένα σημαντικό ζητούμενο, λοιπόν, είναι να μελετηθεί ο κυτταρικός κύκλος καρκίνων του ΚΝΣ και ο ρόλος των PKCε και νευροϊνιδίνης σε αυτόν. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος SF268. Τα γλοιοβλαστώματα είναι ο συνηθέστερος τύπος πρωτογενών καρκίνων του εγκεφάλου και, εξαιτίας του γρήγορου ρυθμού πολλαπλασιασμού τους, συχνά έχουν κακή πρόγνωση για τους ασθενείς. Η περίπλοκη κυτταρική τους σύνθεση, η διάχυτη διεισδυτικότητά τους, και η μη απόκρισή τους σε θεραπείες αποτελούν πρόκληση για τους ερευνητές εδώ και δεκαετίες και παρεμποδίζουν την πρόοδο προς μια αποτελεσματική θεραπεία. Ένας ακόμη λόγος που επιλέχθηκε ο καρκίνος του γλοιοβλαστώματος σα μοντέλο μελέτης είναι ότι πρόσφατες γενωμικές μελέτες προφίλ έδειξαν ότι η νευροϊνιδίνη είναι μια bona fide ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη γλοιοβλαστώματος, αφού ένα

σημαντικό ποσοστό των σποραδικών γλοιοβλαστωμάτων έχουν σωματικές μεταλλαγές στο γονίδιο της νευροϊνωμάτωσης. Άλλωστε, τα κύτταρα SF268, όπως είχαμε δείξει και με RT-PCR εκφράζουν μεγάλες ποσότητες PKCε, γεγονός που επιβεβαιώσαμε και με ανάλυση ανοσοκυτταροχημείας (Σχήμα 30). Υπό φυσιολογικές συνθήκες μάλιστα, δηλαδή χωρίς καμία επίδραση εξωγενών παραγόντων, ανιχνεύεται και η ενεργοποιημένη μορφή της PKCε (pPKCε).



Σχήμα 30. Τα SF268 κύτταρα νευροβλαστώματος εκφράζουν υψηλά επίπεδα της PKCε αλλά και της ενεργοποιημένης μορφής της (pPKCε), σε φυσιολογικές συνθήκες. Μικροσκοπία ανοσοφθορισμού με αντισώματα έναντι της PKCε και της pPKCε και ακόλουθη σήμανση με κόκκινο (Rhodamine) ή πράσινο (FITC) φθορόχρωμα, αντίστοιχα. Με μπλε φαίνονται οι πυρήνες μετά από χρώση με Hoechst. Οι εικόνες είναι προβολές 5 Z-τομών πάχους 0,5 μm, οι οποίες τραβήχτηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

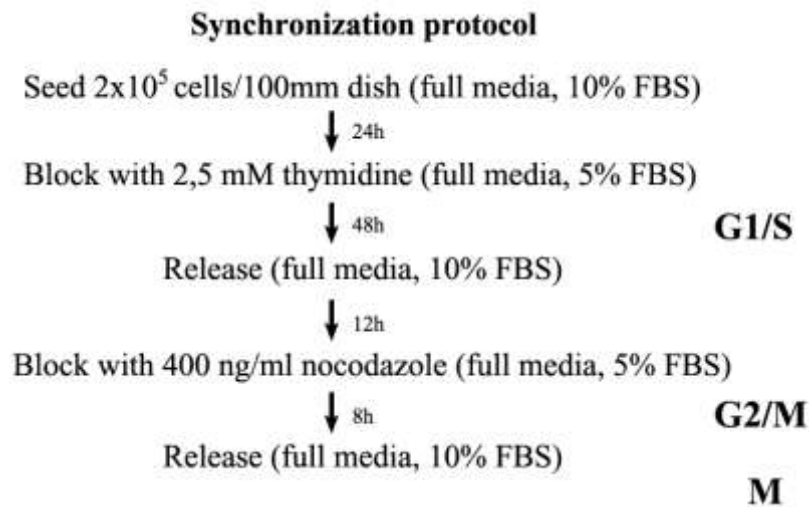
Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες πολλαπλασιασμού (proliferation assays) ώστε να διαπιστωθεί ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων SF268 και να υπολογιστεί κατά προσέγγιση η διάρκεια της κάθε φάσης του κυτταρικού κύκλου. Αποδείξαμε ότι ο χρόνος διπλασιασμού των SF268 κυττάρων είναι 38 ώρες, η G1 φάση διαρκεί 17,1 ώρες, η S φάση 10,3 ώρες, η G2 φάση 6,8 ώρες και η μίτωση 3,8 ώρες (Σχήμα 31).



Σχήμα 31. Σχηματική απεικόνιση της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου και των επιμέρους φάσεων του στα SF268 κύτταρα γλοιοβλαστώματος.

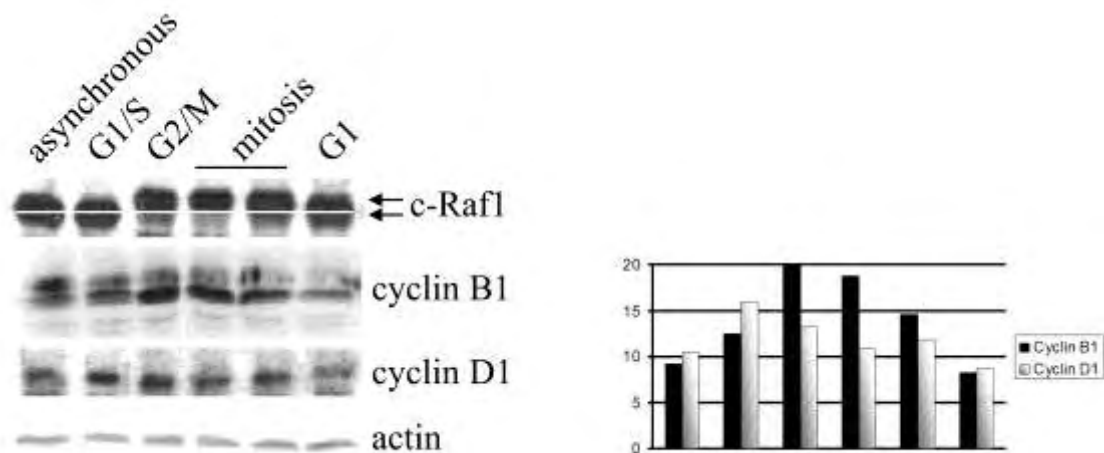
Για να μελετήσουμε τα γεγονότα του κυτταρικού κύκλου αποφασίσαμε να συγχρονίσουμε τα κύτταρα χρησιμοποιώντας ένα δημοσιευμένο πρωτόκολλο διπλού μπλοκ θυμιδίνης και νοκοδαζόλης (nocodazole) [314]. Η θυμιδίνη (ή δεοξυθυμιδίνη) είναι ένα πυριμιδικό δεοξυνουκλεοτίδιο. Συγκεκριμένα, η δεοξυθυμιδίνη είναι το (T) νουκλεοτίδιο του DNA, που συνδυάζεται με τη δεοξυαδενοσίνη (A) στη διπλή έλικα του DNA. Στην κυτταρική βιολογία, όμως, χρησιμοποιείται για το συγχρονισμό των κυττάρων στην αρχή της S φάσης (μετάβαση G1/S), αφού σε περίσσεια αναστέλλει την αντιγραφή του DNA. Η νοκοδαζόλη είναι αντινεοπλασματικός φαρμακολογικός παράγοντας που παρεμποδίζει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και, συνεπώς, σταματά τον κυτταρικό κύκλο πριν τη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου (μετάβαση G2/M). Το πρωτόκολλο αυτό είχε χρησιμοποιηθεί σε άλλη καρκινική σειρά και έπρεπε, με βάση τις μετρήσεις από τις δοκιμασίες πολλαπλασιασμού, να προσαρμόσουμε κατάλληλα τους χρόνους επώασης με τους φαρμακολογικούς παράγοντες.

Στο Σχήμα 32 φαίνεται το τελικό πρωτόκολλο συγχρονισμού των SF268 κυττάρων όπως διαμορφώθηκε μετά από πολλαπλές δοκιμές σε συγκεντρώσεις και χρόνους.



Σχήμα 32. Διαγραμματική απεικόνιση του βελτιστοποιημένου για SF268 κύτταρα γλοιοβλαστώματος, πρωτόκολλου συγχρονισμού.

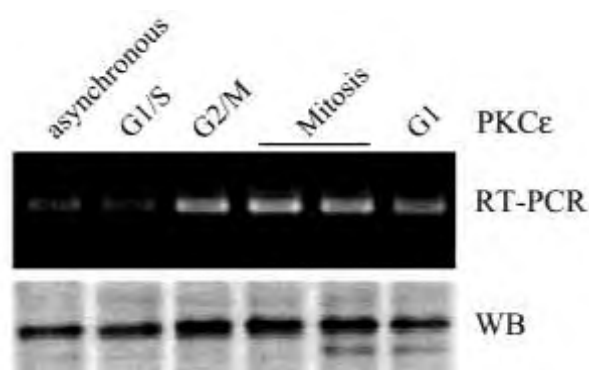
Για να διαπιστώσουμε ότι το προσαρμοσμένο πρωτόκολλο συγχρονίζει την καρκινική κυτταρική σειρά SF268 εξετάσαμε ειδικούς δείκτες συγκεκριμένων φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Είναι φανερό (Σχήμα 33) ότι η κυκλίνη D1 (πάνελ 3) παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αύξηση κατά τη μετάβαση G1/S ενώ η κυκλίνη B1 (πάνελ 2) αυξάνεται στη μετάβαση G2/M και παραμένει σε υψηλά επίπεδα σε όλη τη διάρκεια της μίτωσης. Οι διαπιστώσεις αυτές συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η κινάση σερίνης/θρεονίνης c-Raf1 ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της μίτωσης [335]. Η ενεργοποίηση αυτή οφείλεται στη φωσφορυλίωσή της και γίνεται εμφανής με αλλαγή κινητικότητας (mobility shift) στο Western blot (πάνελ 1). Οι δείκτες του κυτταρικού κύκλου στην ανοσοσύτρωση κατά Western αποδεικνύουν ότι το πρωτόκολλο του συγχρονισμού ήταν επιτυχές και τα κύτταρα είναι όντως συγχρονισμένα.



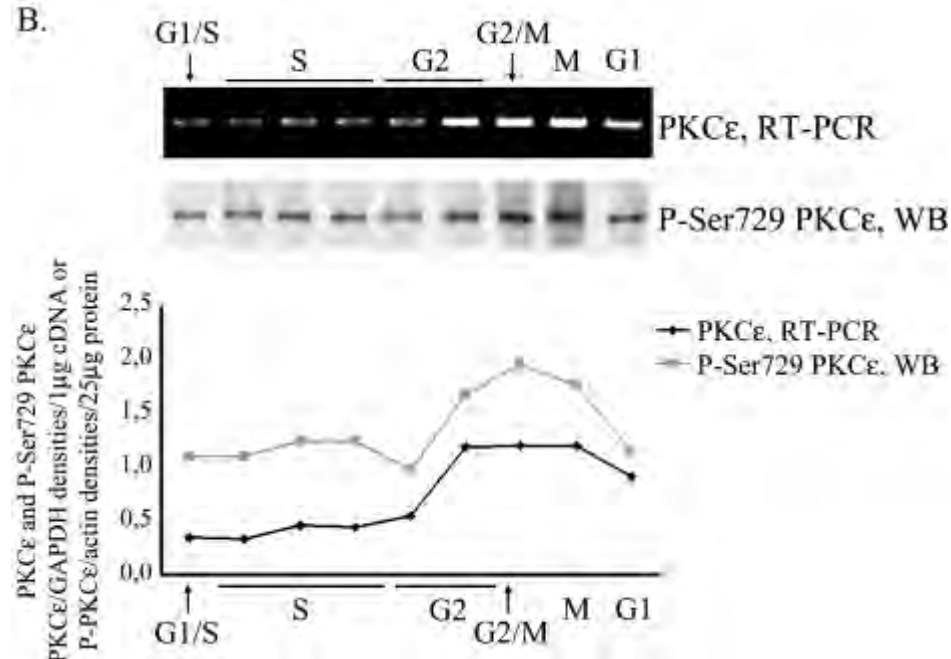
Σχήμα 33. Το πρωτόκολλο διπλού μπλοκ θυμιδίνης και nocodazole συγχρονίζει την καρκινική κυτταρική σειρά SF268. Τα κύτταρα συγχρονίστηκαν με το πρωτόκολλο διπλού μπλοκ θυμιδίνης και νοκοδαζόλη στις μεταβάσεις G1/S και G2/M και μετά απελευθερώθηκαν σε θρεπτικό μέσο. Έπειτα, σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία που αντιστοιχούσαν στις μεταβάσεις G1/S (λωρίδα 2), G2/M (λωρίδα 3), τη μίτωση (λωρίδες 4, 5) και τη G1 φάση (λωρίδα 6) τα συγχρονισμένα κύτταρα καθώς και ασυγχρόνιστα (λωρίδα 1) συλλέχθηκαν και 25 μg πρωτεΐνης υποβλήθηκαν σε ανοσοσύτπωση κατά Western με αντισώματα ενάντια σε δείκτες του κυτταρικού κύκλου.

Έχοντας επιτύχει τον συγχρονισμό των SF268 κυττάρων, εξετάσαμε τα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα της ενδογενούς PKCε κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 34). Τόσο τα μεταγραφικά (Σχήμα 34 A, άνω πάνελ), όσο και τα πρωτεϊνικά (Σχήμα 34 A, κάτω πάνελ) επίπεδα της PKCε είναι χαμηλά στη G1/S μετάβαση, αλλά αυξάνονται κατά τη G2/M μετάβαση και διατηρούνται υψηλά μέχρι και το πέρας της μίτωσης, για να μειωθούν πάλι στη G1 φάση. Προκειμένου να προσδιορίσουμε τις συνολικές αυξομειώσεις στα επίπεδα της PKCε σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, επεκτείναμε το συγχρονισμό σε περισσότερες φάσεις και συλλέξαμε περισσότερα χρονικά σημεία (Σχήμα 34 B). Τα επίπεδα μεταγραφής της PKCε παραμένουν χαμηλά σε όλη τη διάρκεια της σύνθεσης, αλλά, μετά την είσοδο στη G2 φάση αυξάνονται δραματικά και παραμένουν υψηλά μέχρι και το πέρας της μίτωσης. Πιο σημαντικά, η φωσφορυλίωση της PKCε στη Ser729, το κατάλοιπο στο υδροφοβικό μοτίβο που αποτελεί σημαντικό έναυσμα για την καταλυτική ενεργότητά της, ακολουθεί το ίδιο μοτίβο.

A.



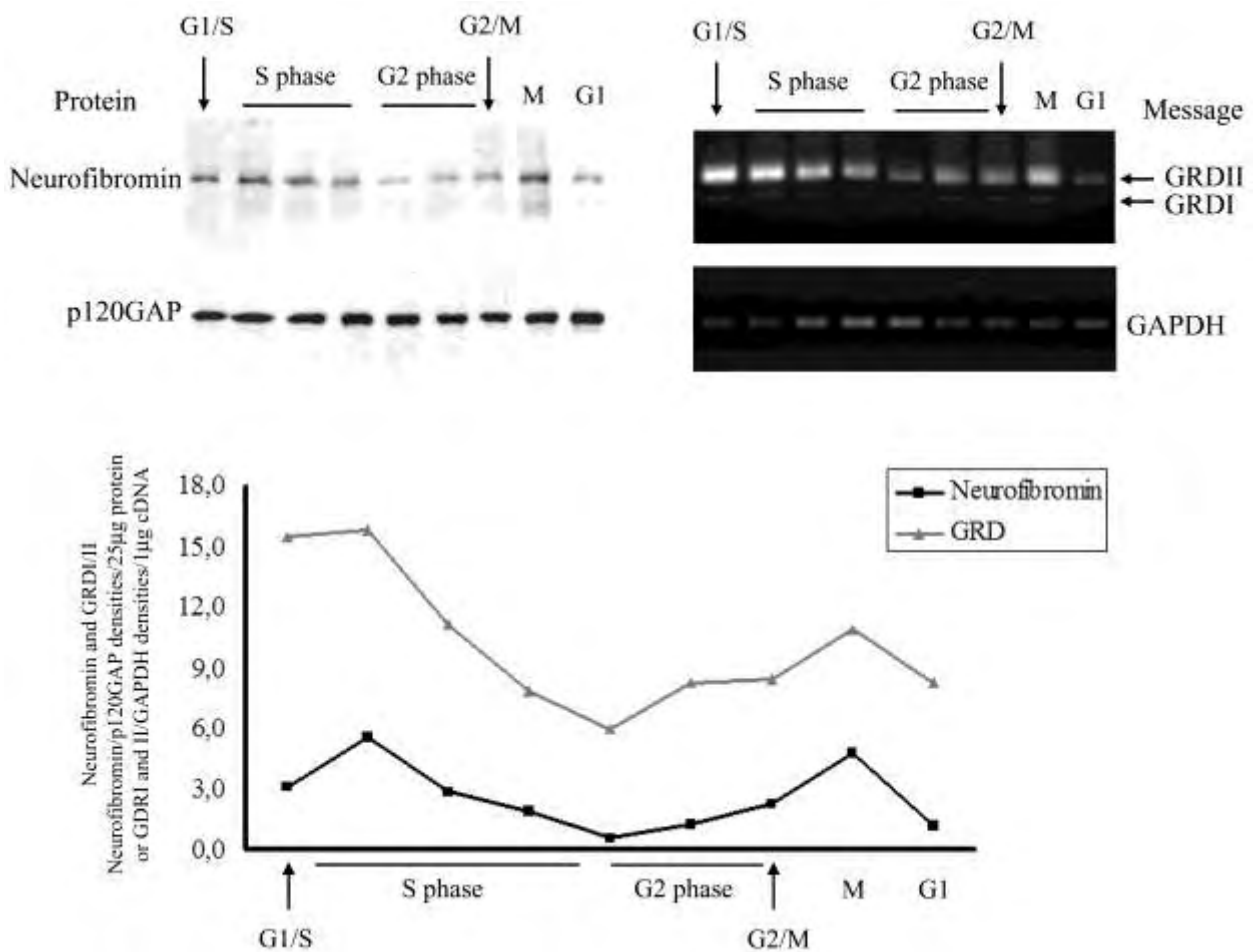
B.



Σχήμα 34. Τα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα της PKCε μεταβάλλονται όμοια κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Τα SF268 κύτταρα γλοιοβλαστώματος συγχρονίστηκαν ή όχι, συλλέχθηκαν σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και υποβλήθηκαν σε ημιποσοτική RT-PCR (A και B άνω πάνελ) ή ανοσοσύτπωση κατά Western (A και B κάτω πάνελ) ώστε να προσδιοριστούν τα μεταγραφικά και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PKCε αλλά και της καταλυτικά ενεργής μορφής της (P-Ser729 PKCε). Το διάγραμμα απεικονίζει την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με πυκνομετρική ανάλυση, εκφρασμένη ως το λόγο της πυκνότητας της PKCε προς το GAPDH ή της P-Ser729 PKCε ως προς την ακτίνη.

Δείξαμε, λοιπόν, ότι τα επίπεδα της PKCε αλλάζουν ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου που βρίσκεται το κύτταρο. Για να εξετάσουμε αν συμβαίνει το ίδιο και στην περίπτωση της νευροϊνιδίνης πραγματοποιήσαμε

ανοσοσύτρωση κατά Western και ημιοσοτική RT-PCR, και βρήκαμε ότι η πρωτεΐνη και το μήνυμα της νευροϊνιδίνης αυξομειώνονται ομοίως (Σχήμα 35). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των μεταγράφων GRDII και GRDI της νευροϊνιδίνης, διατηρώντας τη 2:1 αναλογία τους, παρέμειναν υψηλά από τη G1/S μετάβαση έως το μέσο της S φάσης, μειώθηκαν σημαντικά από το τέλος της S φάσης και σε όλη τη διάρκεια της G2, ενώ αυξήθηκαν δραματικά στη μίτωση. Ωστόσο, μετά το τέλος της μίτωσης και την εισαγωγή στη G1 φάση τα επίπεδα των μεταγράφων μειώθηκαν πάλι. Αντίστοιχες αυξομειώσεις παρατηρήθηκαν και στα επίπεδα έκφρασης της νευροϊνιδίνης. Μάλιστα, εξετάζοντας τα επίπεδα, της δεύτερης πιο γνωστής RasGAP, της p120GAP δεν παρατηρήσαμε αλλαγές κατά τον κυτταρικό κύκλο, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ρύθμιση της νευροϊνιδίνης είναι ειδική και πιθανώς ανεξάρτητη του Ras.



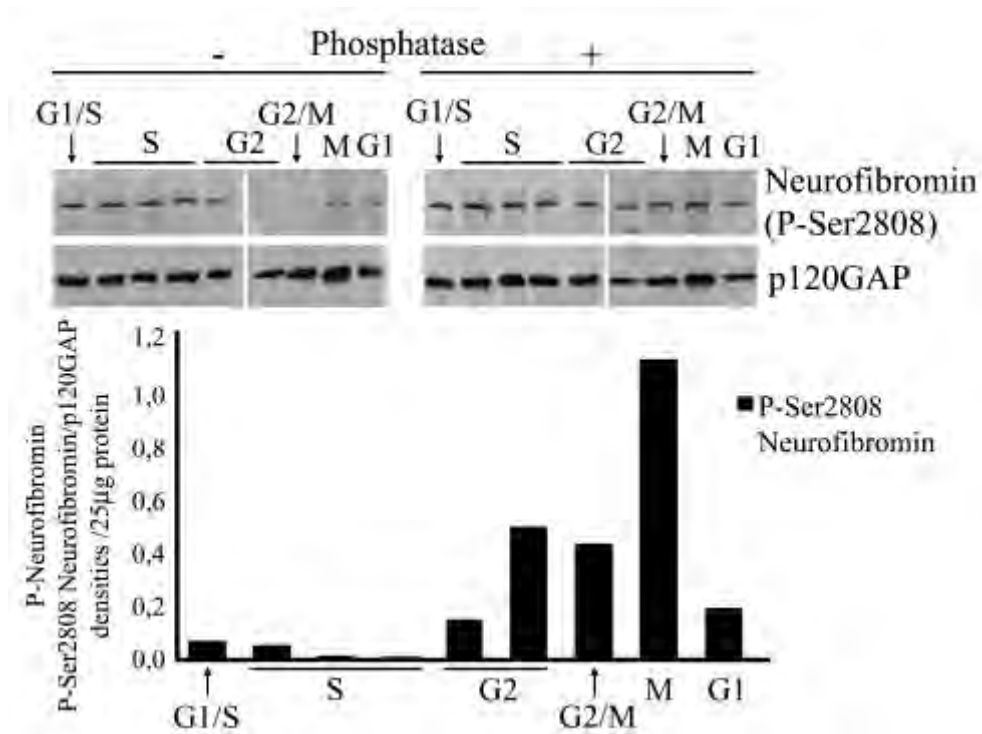
Σχήμα 35. Η αφθονία της νευροϊνιδίνης αλλάζει κατά τη διάρκεια των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Τα SF268 κύτταρα γλοιοβλαστώματος

συγχρονίστηκαν και συλλέχθηκαν σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (από τη μετάβαση G1/S έως και τη μετά τη μίτωση είσοδο στη G1). Τα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα της νευροϊνιδίνης μελετήθηκαν με ημιποσοτική RT-PCR (άνω δεξί πάνελ) και κατάλληλους υποκινητές για τα GRDI και GRDII μετάγραφα ή ανοσοσύτρωση κατά Western (άνω αριστερό πάνελ) και αντίσωμα ενάντια στη νευροϊνιδίνη αντίστοιχα. Τα επίπεδα του GAPDH (RT-PCR) και της p120GAP (Western blot) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ίσης ποσότητας πρωτεΐνης (κάτω πάνελ). Τα διαγράμματα απεικονίζουν την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με πυκνομετρική ανάλυση, εκφρασμένη ως το λόγο της πυκνότητας του αθροίσματος των μεταγράφων GRDI και GRDII προς το GAPDH (γκρι σημεία) ή της νευροϊνιδίνης προς την p120GAP (μαύρα σημεία).

Παρόλο που τόσο η αφθονία της PKCε όσο και της νευροϊνιδίνης εξαρτάται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου, οι χρονικές στιγμές αυξομείωσης δε φαίνεται να συμπίπτουν για τις δύο πρωτεΐνες. Προκειμένου να εξετάσουμε αν οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, εξετάσαμε την κατάσταση φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης από PKC κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 36). Η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης από PKC στο κατάλοιπο Ser2808 μπορεί εύκολα να ανιχνευθεί με τη δοκιμασία φωσφατάσης στην ανοσοσύτρωση κατά Western (όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι»). Εν συντομία, τα δείγματα φορτώθηκαν σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και υποβλήθηκαν ή μη στη δοκιμασία φωσφατάσης. Στη συνέχεια, εκμεταλλευθήκαμε το φαινόμενο αντιγονικής συγκάλυψης του sc-67 αντισώματος, το οποίο δεν αναγνωρίζει τη νευροϊνιδίνη όταν είναι φωσφορυλιωμένη στην, ειδική για PKC, θέση Ser2808, γεγονός, όμως, που αποφεύγεται όταν η μεμβράνη επωάζεται με φωσφατάση. Συνεπώς, συγκρίναμε κάθε λωρίδα της μεμβράνης που επώαστηκε με φωσφατάση (δεξί πάνελ) με την αντίστοιχη λωρίδα της μεμβράνης που επώαστηκε με το φορέα (αριστερό πάνελ). Τα κέρδη σε ανοσοδραστικότητα στη δεξιά μεμβράνη αποδεικνύουν φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης στη Ser2808 από PKC. Είναι φανερό ότι από τη G1/S μετάβαση αλλά και σε όλη την S φάση, τα κέρδη σε ανοσοδραστικότητα είναι από μικρά έως ασήμαντα. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι με την είσοδο των κυττάρων στην G2 φάση η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης στη Ser2808 αυξάνεται δραματικά και κορυφώνεται στην αρχή

της μίτωσης. Μάλιστα, μετά το τέλος της μίτωσης και την είσοδο στη G1 φάση τα επίπεδα φωσφορυλίωσης μειώνονται πάλι και πλησιάζουν τα επίπεδα της S φάσης. Μια άλλη RasGAP, η p120GAP, αποτελεί μάρτυρα ότι τα κέρδη σε ανοσοδραστικότητα είναι ειδικά για τη νευροϊνιδίνη και οφείλονται στη δοκιμασία αλκαλικής φωσφατάσης και όχι σε θέματα ποσότητας πρωτεΐνης.

Η υπερφωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης στη G2 φάση και τη μίτωση συμπίπτει με τη δραματική άνοδο των επιπέδων της PKCε, γεγονός που υποδεικνύει ότι η υπεύθυνη, για τη φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης, ισομορφή είναι η PKCε. Συνεπώς, υπάρχουν ενδείξεις ότι η νευροϊνιδίνη και η PKCε αλληλεπιδρούν και κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων γλοιοβλαστώματος. Επιπλέον, η υπερφωσφορυλίωση στο συγκεκριμένο κατάλοιπο από PKCε έχουμε, προηγουμένως, αποδείξει ότι σχετίζεται με αυξημένη πρωτεϊνική σταθερότητα της νευροϊνιδίνης. Έτσι, λοιπόν, οδηγηθήκαμε στην υπόθεση ότι η νευροϊνιδίνη πρέπει να συντελεί σημαντικό ρόλο στη μίτωση και για αυτό παραμένει στη μέγιστη δυνατή πρωτεϊνική σταθερότητα (μέσω φωσφορυλίωσης από PKC).



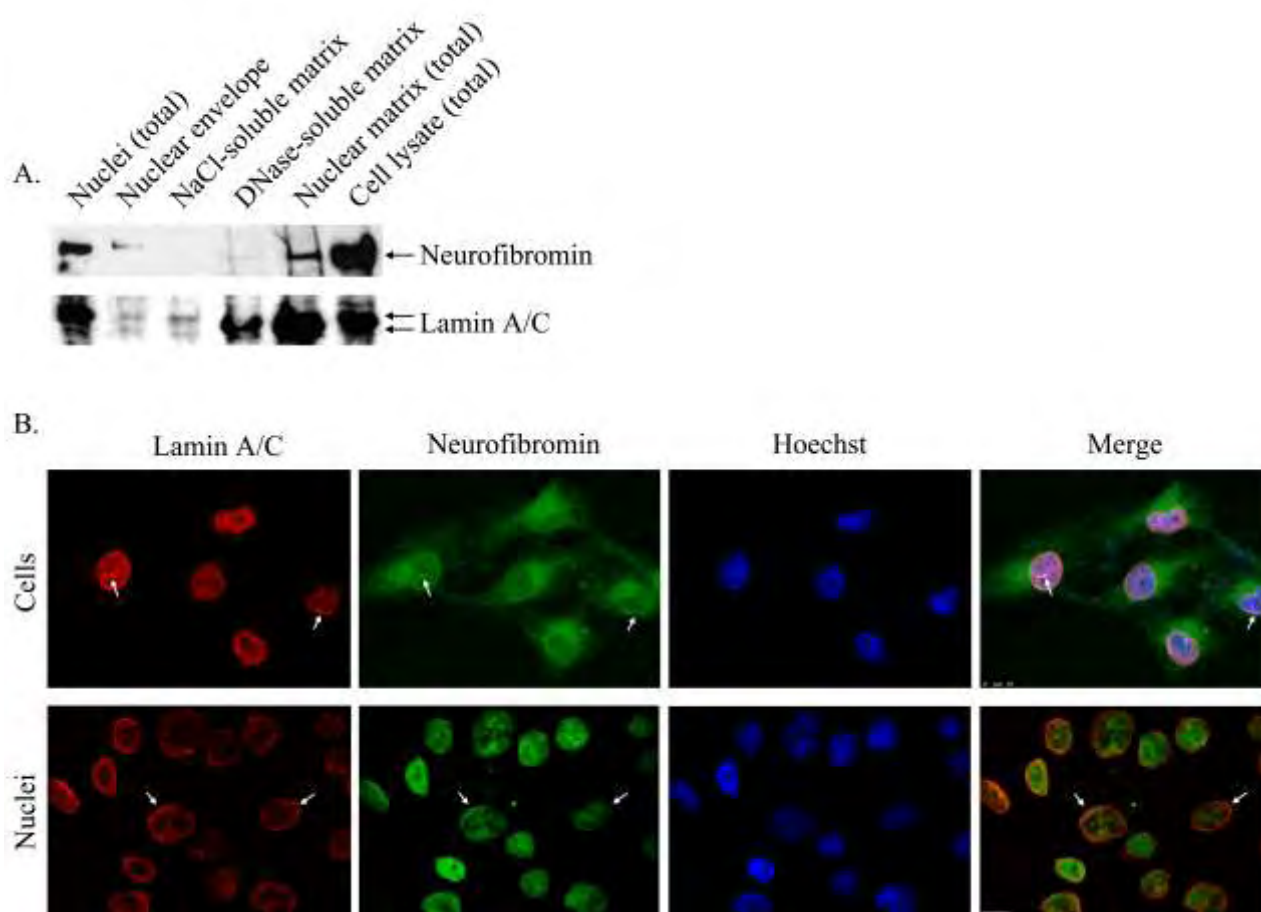
Σχήμα 36. Η νευροϊνιδίνη παραμένει υπερφωσφορυλιωμένη στο, ειδικό για PKC, κατάλοιπο Ser2808 σε όλη τη G2 φάση και τη μίτωση. Η φωσφορυλίωση

του καταλοίπου Ser2808 της νευροϊνιδίνης μελετήθηκε με τη χρήση του φωσφο-ευαίσθητου sc-67 αντισώματος σε δοκιμές φωσφατάσης, ανοσοσύτωσης κατά Western. Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από συγχρονισμένα SF268 κύτταρα διαχωρίστηκαν σε SDS-PAGE και ηλεκτρομεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Πανομοιότυπες μεμβράνες επώαστηκαν με φορέα (αριστερό πάνελ) ή αλκαλική φωσφατάση (δεξί πάνελ) για 4 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια ανοσοσυτώθηκαν με το φωσφο-ευαίσθητο αντίσωμα νευροϊνιδίνης sc-67 και το αντίσωμα μάρτυρα p120GAP. Η ποσοτικοποίηση με πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων δείχνει ότι η φωσφορυλίωση στη σερίνη 2808 της νευροϊνιδίνης από PKC αυξάνεται 4-10 φορές στα κύτταρα που βρίσκονται στη G2 φάση ή τη μίτωση σε σχέση με τις υπόλοιπες φάσεις (διάγραμμα).

3.3.2. Πυρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση της νευροϊνιδίνης και αλληλεπίδρασή της με την πυρηνική θεμέλια ουσία κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η νευροϊνιδίνη φαίνεται να έχει μια νέα λειτουργία στο κυτταρικό κύκλο -ανεξάρτητη με τις μέχρι τώρα λειτουργίες της- μαζί με το γεγονός ότι εντοπίζεται στον πυρήνα φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων [84, 224], δημιουργήσαμε την υπόθεση ότι ο πυρηνικός εντοπισμός της νευροϊνιδίνης μπορεί να σχετίζεται με καινοφανείς λειτουργίες της. Προκειμένου να εξερευνήσουμε το ρόλο της πυρηνικής νευροϊνιδίνης στον κυτταρικό κύκλο, αρχικά εξετάσαμε τον υποπυρηνικό εντοπισμό της. Αποδείξαμε ότι το μεγαλύτερο μέρος της πυρηνικής νευροϊνιδίνης συνεντοπίζεται με τις λαμίνες στην πυρηνική θεμέλια ουσία (nuclear matrix) (Σχήμα 37). Πραγματοποιώντας πειράματα υποπυρηνικής κλασμάτωσης (Σχήμα 37 A) αποδείξαμε ότι η νευροϊνιδίνη εντοπίζεται κυρίως στην πυρηνική θεμέλια ουσία, όπου οι λαμίνες A και C είναι επίσης εμπλουτισμένες (Σχήμα 37 A, κάτω πάνελ), και στο κλάσμα του πυρηνικού φακέλου (nuclear envelope) (Σχήμα 37 A, άνω πάνελ). Ο εντοπισμός της νευροϊνιδίνης στο διαλυτό σε DNάση κλάσμα (DNase-soluble) είναι φτωχός, ενώ η πρωτεΐνη απουσιάζει εντελώς από το διαλυτό σε άλας (salt-soluble) κλάσμα. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με ανοσοκυταροχημική ανάλυση τόσο σε ολόκληρα κύτταρα (Σχήμα 37 B) όσο και σε απομονωμένους πυρήνες (Σχήμα 37 C). Είναι φανερό ότι σε κάθε περίπτωση, ένα μέρος των μορίων της νευροϊνιδίνης συνεντοπίζεται με μόρια λαμίνης A

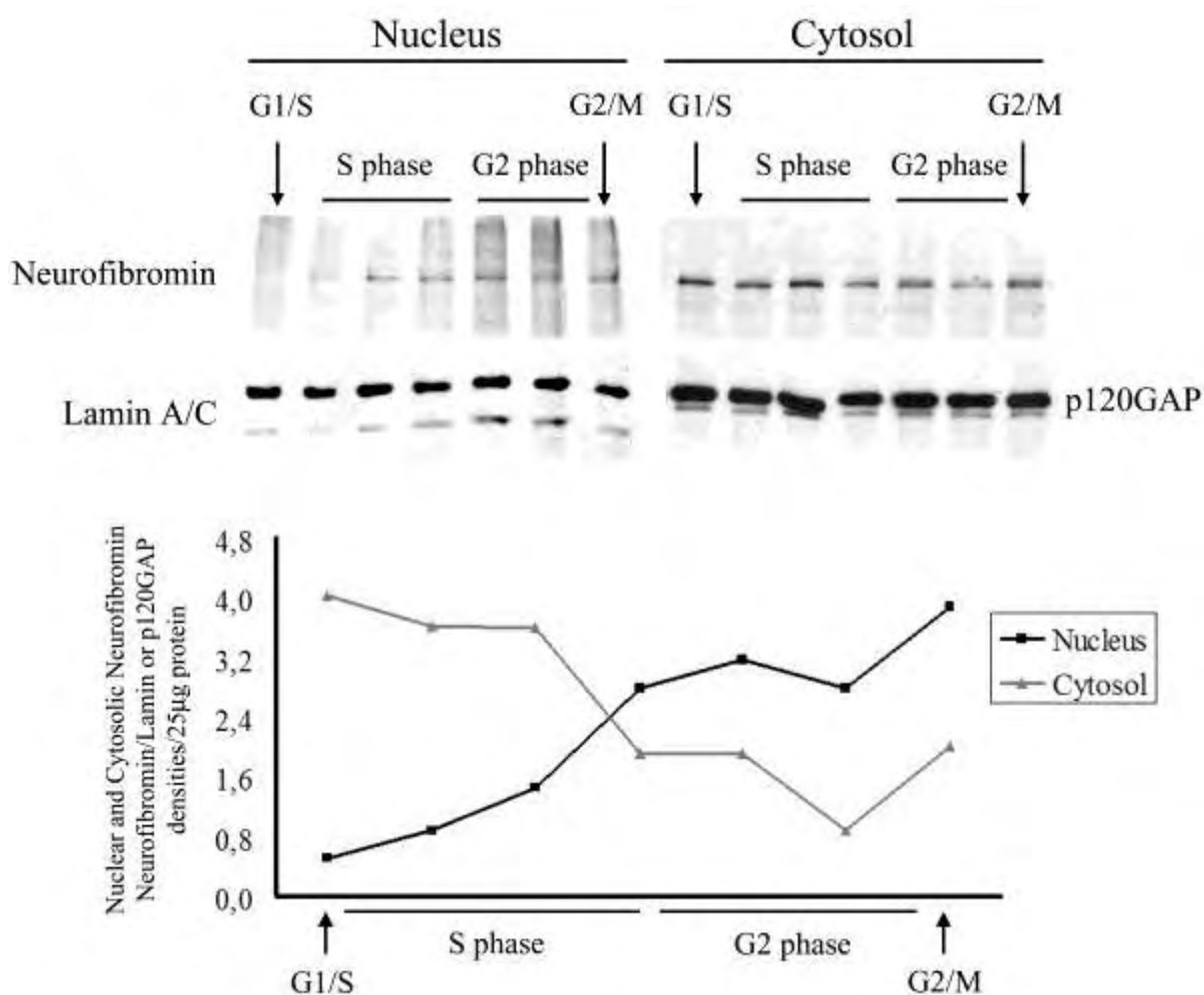
και C (Σχήμα 37 B, C βέλη). Οι πυρηνικές λαμίνες, γνωστές και ως κλάσης V ενδιάμεσα ινίδια, είναι ινώδεις πρωτεΐνες που παρέχουν δομική στήριξη και μεταγραφική ρύθμιση στον πυρήνα των κυττάρων. Αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεμβράνη, σχηματίζουν το πυρηνικό έλασμα (nuclear lamina) στο εσωτερικό του πυρηνικού φακέλου. Λειτουργικά, έχουν σχετιστεί με την κατάρρευση και αναμόρφωση του πυρηνικού φακέλου κατά τη διάρκεια της μίτωσης, αλλά και με τη σωστή τοποθέτηση των πυρηνικών πόρων. Στον άνθρωπο, υπάρχουν δύο τύποι λαμινών, οι λαμίνες A τύπου (A και C) και οι λαμίνες B τύπου (B1, B2) που διαφέρουν στο μήκος και το ισοηλεκτρικό σημείο τους.



Σχήμα 37. Ένα μέρος των μορίων της νευροϊνιδίνης συνεντοπίζεται με την πυρηνική θεμέλια ουσία. (A) SF268 κύτταρα κλασματώθηκαν σε ολικό πυρηνικό κλάσμα (nuclei), πυρηνικό φάκελο (nuclear envelope), πυρηνική θεμέλια ουσία (nuclear matrix), κλάσμα διαλυτό σε άλας (NaCl-soluble) και κλάσμα διαλυτό σε DNάση (Dnase-soluble). Οι πρωτεΐνες από όλα τα κλάσματα, συμπεριλαμβανομένου και ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος (cell lysate)

ανοσοσυττώθηκαν με αντισώματα ενάντια στη νευροϊνιδίνη και τις λαμίνες A/C. Πυρηνική κατανομή της νευροϊνιδίνης στα SF268 κύτταρα όπως αποκαλύφθηκε από ανοσοκυτταροχημεία σε κύτταρα (B) ή απομονωμένους πυρήνες (C). Τα κύτταρα υπέστησαν χρώση με λαμίνες A/C (κόκκινο), νευροϊνιδίνη (πράσινο) και Hoechst 33258 (μπλε). Τα βέλη δείχνουν ενδεικτικά σημεία συνεντοπισμού νευροϊνιδίνης και λαμινών A/C. Οι εικόνες είναι προβολές 5 Z-τομών πάχους 0,5 μm, οι οποίες τραβήχτηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

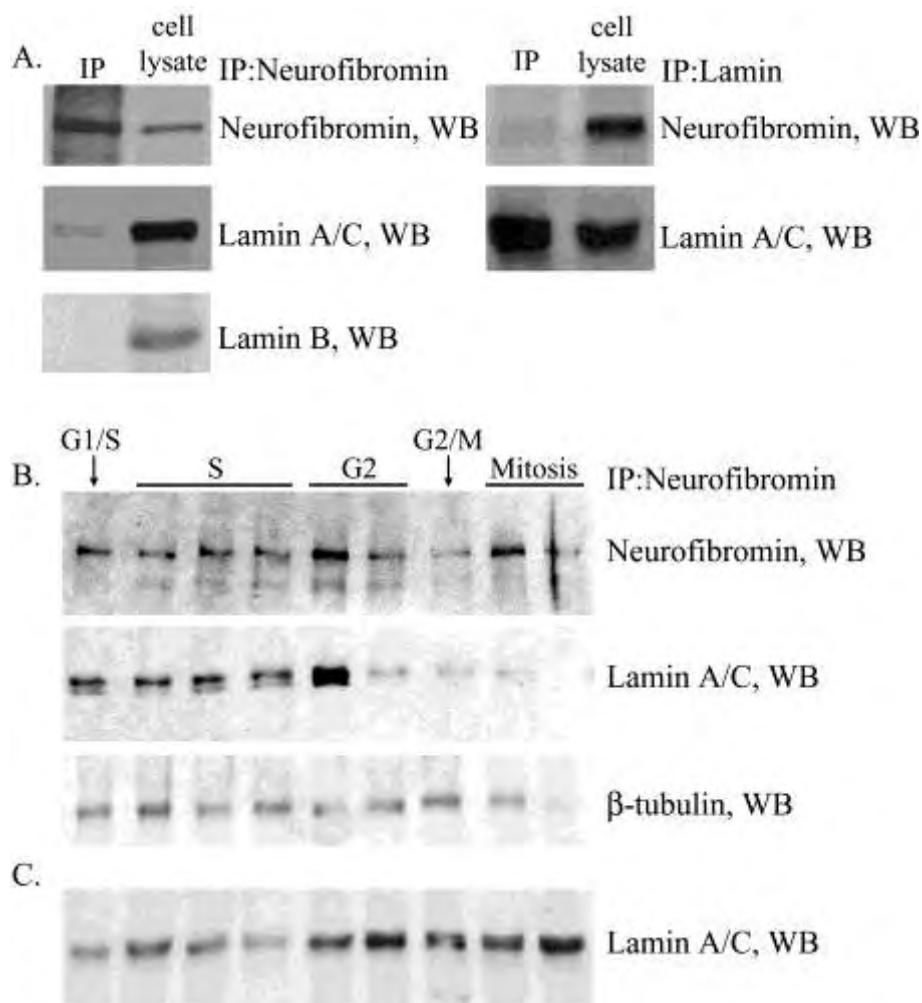
Προηγούμενες μελέτες από το εργαστήριό μας, με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας, ανέφεραν ότι η υποκυτταρική μετακίνηση της νευροϊνιδίνης σε μετα-μιτωτικούς νευρώνες ρυθμίζεται αναπτυξιακά [224]. Σε ασυγχρόνιστες καλλιέργειες διαιρούμενων κυττάρων, η νευροϊνιδίνη εντοπίζεται σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα εκτεινόμενα από τη μεμβράνη ως τον πυρήνα. Το σημαντικό, όμως, είναι ότι ο εντοπισμός της νευροϊνιδίνης μπορεί να ποικίλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των κυττάρων από κυρίως πυρηνικός σε αποκλειστικά κυτταροπλασματικός. Τη διαπίστωση, αυτή, την επιβεβαιώσαμε σε πληθώρα διαφορετικών κυτταρικών υποβάθρων συμπεριλαμβανομένων Εμβρυϊκών Ινοβλαστών Μυός (Mouse Embryonic Fibroblasts), TM-31 αστροκύττωμα, SF268 γλοιοβλάστωμα, MCF-7 καρκίνος του μαστού και PC-3 καρκίνος του προστάτη (τα δεδομένα δεν εμφανίζονται). Υποθέσαμε, λοιπόν, ότι η παρατηρούμενη ετερογένεια, ακόμα και στην ίδια κυτταρική σειρά, θα μπορούσε να αποδοθεί στη διαφορετική φάση του κυτταρικού κύκλου που βρίσκεται κάθε κύτταρο. Πράγματι, πειράματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης έδειξαν ότι η νευροϊνιδίνη έχει μια δυναμική υποκυτταρική κατανομή που ρυθμίζεται από τον κυτταρικό κύκλο (Σχήμα 38). Συγκεκριμένα, η νευροϊνιδίνη απουσιάζει από το πυρηνικό κλάσμα (αριστερό, άνω πάνελ) κατά τη G1/S μετάβαση, αλλά με την είσοδο στην S φάση τα επίπεδά της σταδιακά αυξάνονται και στη G2 φάση κορυφώνονται. Ανάλογα, τα κυτταροπλασματικά επίπεδα της νευροϊνιδίνης (δεξί, άνω πάνελ) σταδιακά μειώνονται όσο οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου προχωρούν στη μίτωση. Συνεπώς, η νευροϊνιδίνη είναι αποκλειστικά κυτταροπλασματική στη G1/S μετάβαση αλλά καθώς τα κύτταρα περνούν στην S φάση αρχίζει να εισέρχεται στον πυρήνα για να γίνει κυρίως πυρηνική κατά τη διάρκεια της G2 φάσης και μέχρι την G2/M μετάβαση όπου ο πυρηνικός φάκελος διαλύεται.



Σχήμα 38. Η νευροϊνιδίνη διακινείται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα με τρόπο που εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο. Τα SF268 κύτταρα συγχρονίστηκαν σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και κλασματώθηκαν σε πυρηνικό (αριστερό πάνελ) και κυτταροπλασματικό (δεξί πάνελ) κλάσμα. Τα επίπεδα της νευροϊνιδίνης ανιχνεύθηκαν στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα με ανοσοσύτωση κατά Western με ειδικό αντίσωμα (άνω πάνελ). Οι λαμίνες A/C και η p120GAP χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ίσης ποσότητας πρωτεΐνης (κάτω πάνελ), στο πυρηνικό και το κυτταροπλασματικό κλάσμα αντίστοιχα, αλλά και ως δείκτες επιτυχούς υποκυτταρικής κλασμάτωσης. Το διάγραμμα απεικονίζει την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με πυκνομετρική ανάλυση, εκφρασμένη ως το λόγο της πυκνότητας της νευροϊνιδίνης προς τις λαμίνες A/C (πυρηνικό κλάσμα, μαύρα σημεία) ή προς την p120GAP (κυτταροπλασματικό κλάσμα, γκρι σημεία).

Με σκοπό να διερευνήσουμε το ρόλο της πυρηνικής εισόδου της νευροϊνιδίνης και λαμβάνοντας υπόψη ότι συνεντοπίζεται με την πυρηνική θεμέλια ουσία μαζί με το γεγονός ότι στο κυτταρόπλασμα αλληλεπιδρά με τα ενδιάμεσα ινίδια του κυτταροσκελετού, υποθέσαμε ότι η νευροϊνιδίνη πιθανώς συνδέεται με το πυρηνικό έλασμα. Πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης της νευροϊνιδίνης με τις λαμίνες A, B και C έδειξαν ότι η νευροϊνιδίνη αλληλεπιδρά μόνο με τις λαμίνες τύπου A και, πιο σημαντικά, απέδειξαν ότι η αλληλεπίδραση αυτή εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο (Σχήμα 39). Αρχικά, αποδείξαμε ότι η νευροϊνιδίνη συν-ανοσοκατακρημνίζεται με τις λαμίνες A και C, αλλά όχι τη λαμίνη B (Σχήμα 39 A), αλληλεπίδραση που επιβεβαιώθηκε μετά από ανοσοκατακρήμνιση νευροϊνιδίνης και ανοσοσύτωση λαμινών A/C (Σχήμα 39 A, αριστερό πάνελ), αλλά και μετά από ανοσοκατακρήμνιση λαμινών A/C και ανοσοσύτωση για νευροϊνιδίνη (Σχήμα 39 A, δεξί πάνελ).

Στη συνέχεια, εξετάσαμε αν η αλληλεπίδραση της νευροϊνιδίνης με τις λαμίνες τύπου A εξαρτάται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Βρήκαμε ότι, σε συγχρονισμένα SF268 κύτταρα, η νευροϊνιδίνη αλληλεπιδρά με τις λαμίνες A και C από τη G1/S μετάβαση και σε όλη τη διάρκεια της S φάσης, η αλληλεπίδραση κορυφώνεται κατά την έναρξη της G2 φάσης, όπου η νευροϊνιδίνη είναι κυρίως πυρηνική, ενώ, στη συνέχεια της ίδιας φάσης μειώνεται και τελικά παύει να υφίσταται με την έναρξη αλλά και σε όλη τη διάρκεια της μίτωσης, όπου ο πυρηνικός φάκελος διαλύεται (Σχήμα 39 B). Οι λαμίνες τύπου A αποπολυμερίζονται και παραμένουν εντελώς διαλυτές κατά τη διάρκεια της μίτωσης, γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι το αντίσωμα ίσως να μην αναγνωρίζει τα αποσυναρμολογημένα ενδιάμεσα ινίδια. Για να αποδείξουμε ότι η παρατηρούμενη απουσία αλληλεπίδρασης, μεταξύ νευροϊνιδίνης και λαμίνης κατά τη μίτωση, δεν είναι θέμα συγγένειας αντισώματος με το υπόστρωμα, ανοσοστυπώσαμε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, συγχρονισμένων SF268 κυττάρων, και βρήκαμε ότι, πράγματι, το αντίσωμα είναι ικανό να αναγνωρίζει την πρωτεΐνη ακόμα και όταν το πυρηνικό έλασμα είναι αποδιοργανωμένο (Σχήμα 39 C). Σε αντίθεση με τις λαμίνες A και C η αλληλεπίδραση της νευροϊνιδίνης με την β-τουμπουλίνη, μόριο που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τη νευροϊνιδίνη στο κυτταρόπλασμα, παραμένει σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ακόμα και στη μίτωση.

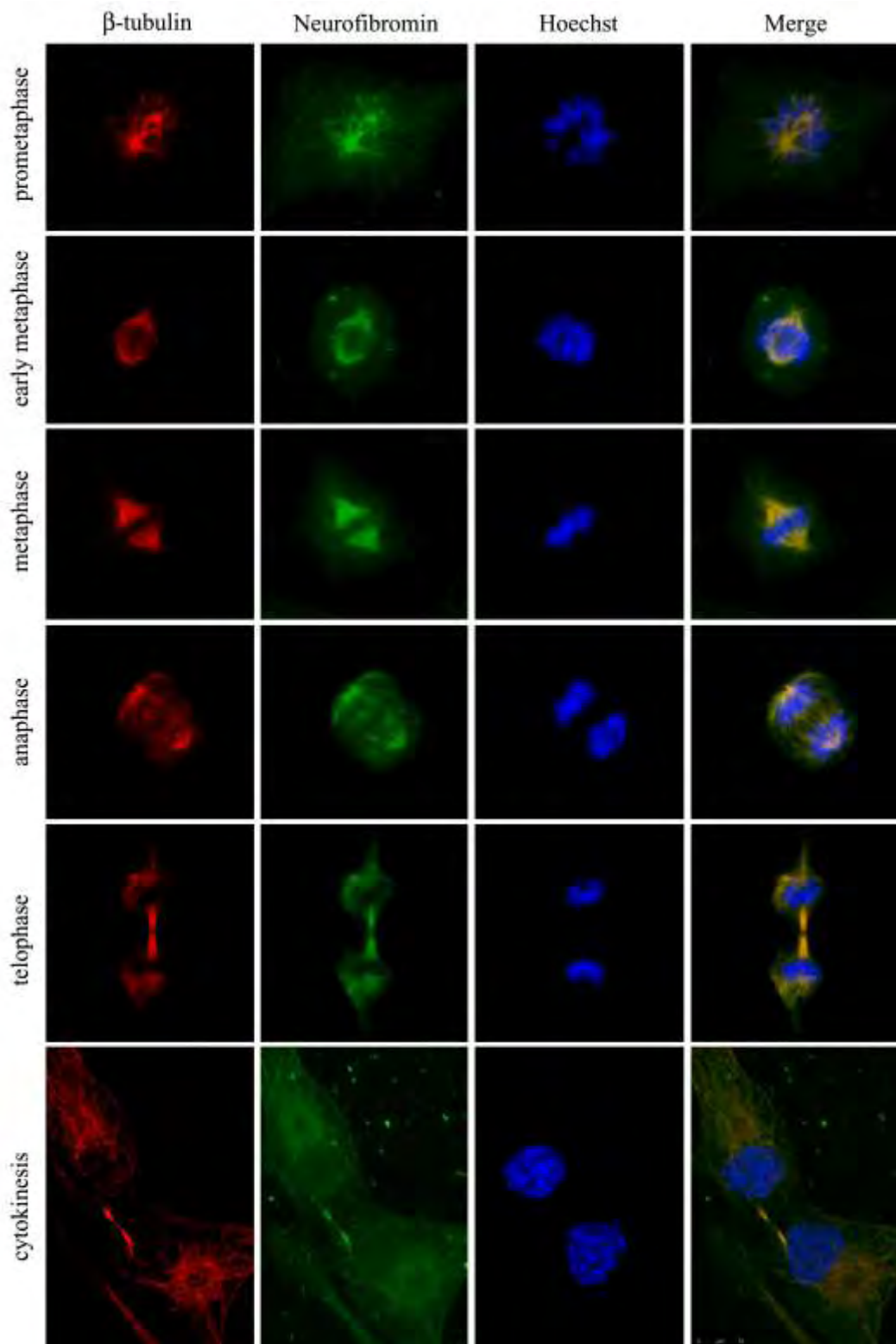


Σχήμα 39. Η αλληλεπίδραση της νευροϊνιδίνης με τις λαμίνες A και C ρυθμίζεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. A. Η νευροϊνιδίνη (αριστερό πάνελ) ή οι λαμίνες A και C (δεξί πάνελ) ανοσοκατακρημνίστηκαν και τα ανοσοσυμπλέγματα αναλύθηκαν με ανοσοσύτπωση κατά Western για περιεκτικότητα σε λαμίνες A, C και νευροϊνιδίνη. Η λαμίνη B εξετάστηκε μόνο για συνανοσοκατακρήμιση με νευροϊνιδίνη. B. Τα κύτταρα συγχρονίστηκαν σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, συλλέχθηκαν και ακολούθησε ανοσοκατακρήμιση της νευροϊνιδίνης. Τα ανοσοσυμπλέγματα αναλύθηκαν με ανοσοσύτπωση κατά Western για περιεκτικότητα σε νευροϊνιδίνη (άνω πάνελ) λαμίνες A και C (μεσαίο πάνελ) ή β-τουμπουλίνη (κάτω πάνελ). C. Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από συγχρονισμένα SF268 κύτταρα ανοσοσυτπώθηκαν με αντίσωμα ενάντια στις λαμίνες A/C για να διαπιστωθεί ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες αναγνωρίζονται κανονικά από το αντίσωμα ακόμα και κατά τη διάρκεια της μίτωσης όταν η πυρηνική θεμέλια ουσία διαλύεται.

3.3.3. Καινοφανείς λειτουργίες της νευροϊνιδίνης κατά τη διάρκεια της μίτωσης φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων

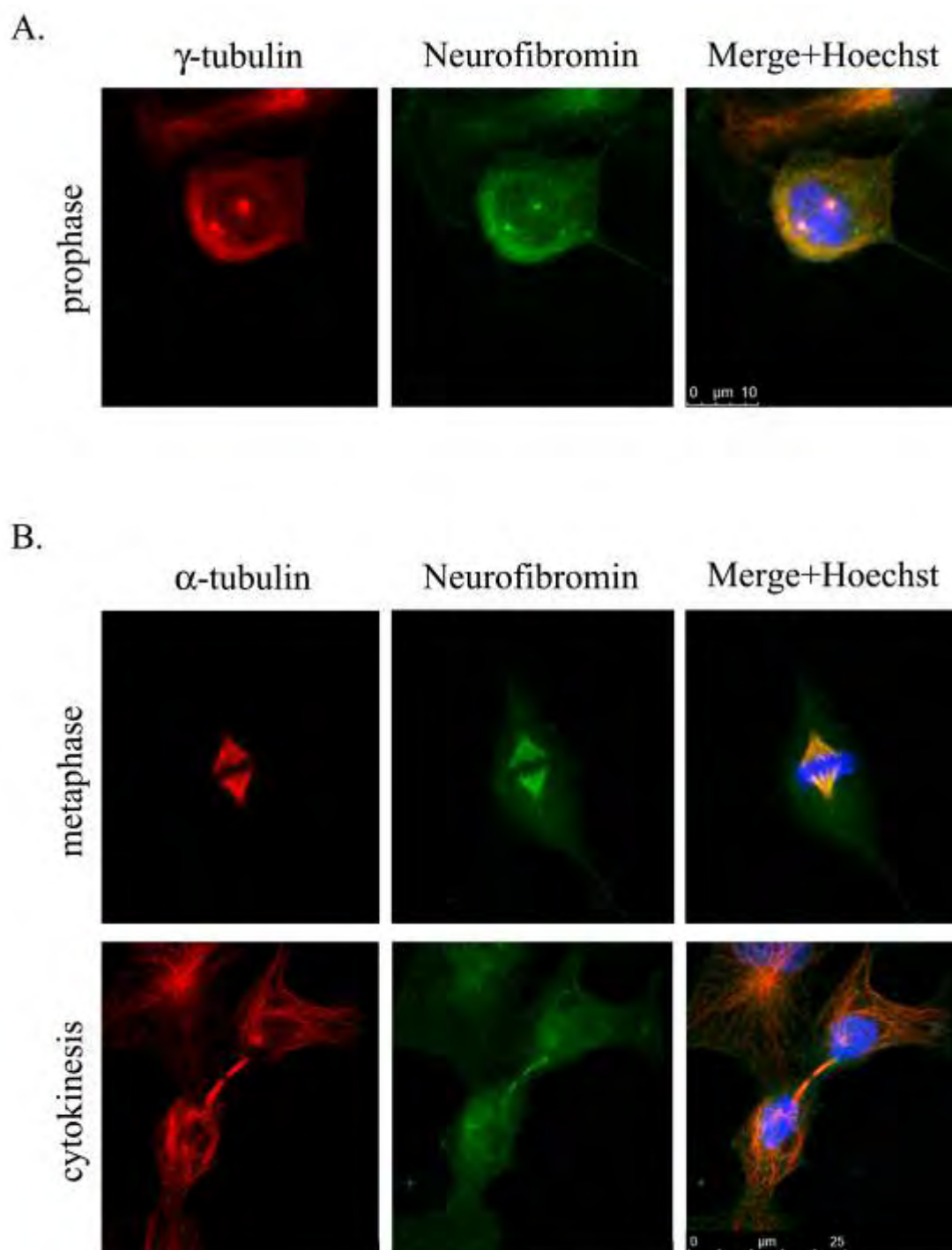
Δεδομένων των υψηλών επιπέδων της νευροϊνιδίνης κατά τη διάρκεια της μίτωσης, της αυξημένης πυρηνικής εισόδου της στη G2 φάση, ακριβώς πριν τη μίτωση και της συνεχούς αλληλεπίδρασής της με τη β-τουμπουλίνη, εξετάσαμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό της νευροϊνιδίνης σε μιτωτικά κύτταρα με ανοσοκυτταροχημεία. Με ενδιαφέρον, διαπιστώσαμε ότι η νευροϊνιδίνη συνεντοπίζεται με τη β-τουμπουλίνη στη μιτωτική συσκευή (Σχήμα 40). Στην πρόφαση, η νευροϊνιδίνη εντοπίζεται στα κεντροσώματα που είναι το κύριο κέντρο οργάνωσης των μικροσωληνίσκων. Όσο η μίτωση προχωράει η νευροϊνιδίνη συνεντοπίζεται με όλους τους αστρικούς, πολικούς και μικροσωληνίσκους κινητοχώρων της μιτωτικής ατράκτου κατά την προμετάφαση, τη μετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση. Αν και ο συνεντοπισμός είναι σχεδόν πλήρης, η νευροϊνιδίνη φαίνεται να απουσιάζει από τον εσωτερικό κινητοχώρο, το σημείο που η τουμπουλίνη δεσμεύεται στο κεντρομερίδιο των συσπειρωμένων χρωμοσωμάτων. Στην κυτοκίνηση η νευροϊνιδίνη συνεντοπίζεται, επίσης, με τους μικροσωληνίσκους της ενδιάμεσης ζώνης (midzone) που προάγουν τη δημιουργία του αυλακιού κατάτμησης (cleavage furrow) και την ολοκλήρωση της κυτταρικής διαίρεσης.

Μάλιστα, επιπλέον πειράματα ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι η νευροϊνιδίνη συνεντοπίζεται εξίσου και με την α- και γ-τουμπουλίνη στη μιτωτική άτρακτο (Σχήμα 41). Η γ-τουμπουλίνη, είναι σημαντική για την πυρήνωση και τον πολικό προσανατολισμό των μικροσωληνίσκων. Συναντάται, κυρίως, στα κεντροσώματα και τα σώματα των μιτωτικών πόλων. Η α-τουμπουλίνη, σχηματίζει διμερή με τη β-τουμπουλίνη ώστε να διαμορφώσουν τους μικροσωληνίσκους. Συναντάται όπου και η β-τουμπουλίνη, δηλαδή σε όλες τις εκφάνσεις της μιτωτικής συσκευής. Είναι εμφανές, ότι η νευροϊνιδίνη συνεντοπίζεται με τη γ-τουμπουλίνη, κατά την πρόφαση, στα κεντροσώματα (Σχήμα 41 A), ενώ ο συνεντοπισμός με την α-τουμπουλίνη είναι συνεχής σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 41 B, εδώ ενδεικτικά φωτογραφίες μετάφασης και κυτοκίνησης).



Σχήμα 40. Η νευροϊνιδίνη είναι μέρος της μιτωτικής συσκευής. Τα SF268 κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν, με ανοσοκυτταροχημεία, για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της νευροϊνιδίνης (πράσινο), της β -τουμπουλίνης (κόκκινο) και του πυρηνικού DNA (μπλε) όπως περιγράφηκε. Οι εικόνες είναι προβολές

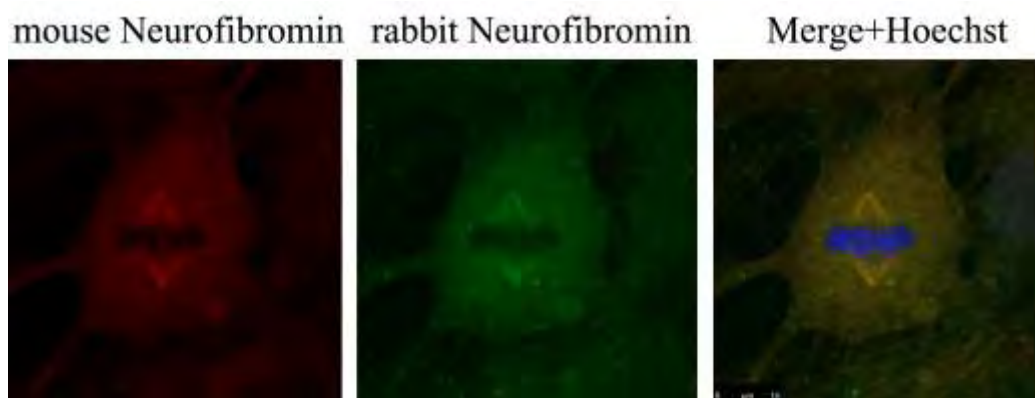
διαδοχικών Z-τομών, πάχους 0.5 μ m, οι οποίες τραβήχτηκαν σε συνεσιακό μικροσκόπιο.



Σχήμα 41. Η νευροϊνιδίνη συνεντοπίζεται με την γ - και α -τουμπουλίνη κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Τα SF268 κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν, με ανοσοκυτταροχημεία, για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της νευροϊνιδίνης (πράσινο), της γ - (A) ή της β -τουμπουλίνης (B) (κόκκινο) και του

πυρηνικού DNA (μπλε). Οι εικόνες είναι προβολές διαδοχικών Z-τομών, πάχους 0.5μm, οι οποίες τραβήχτηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

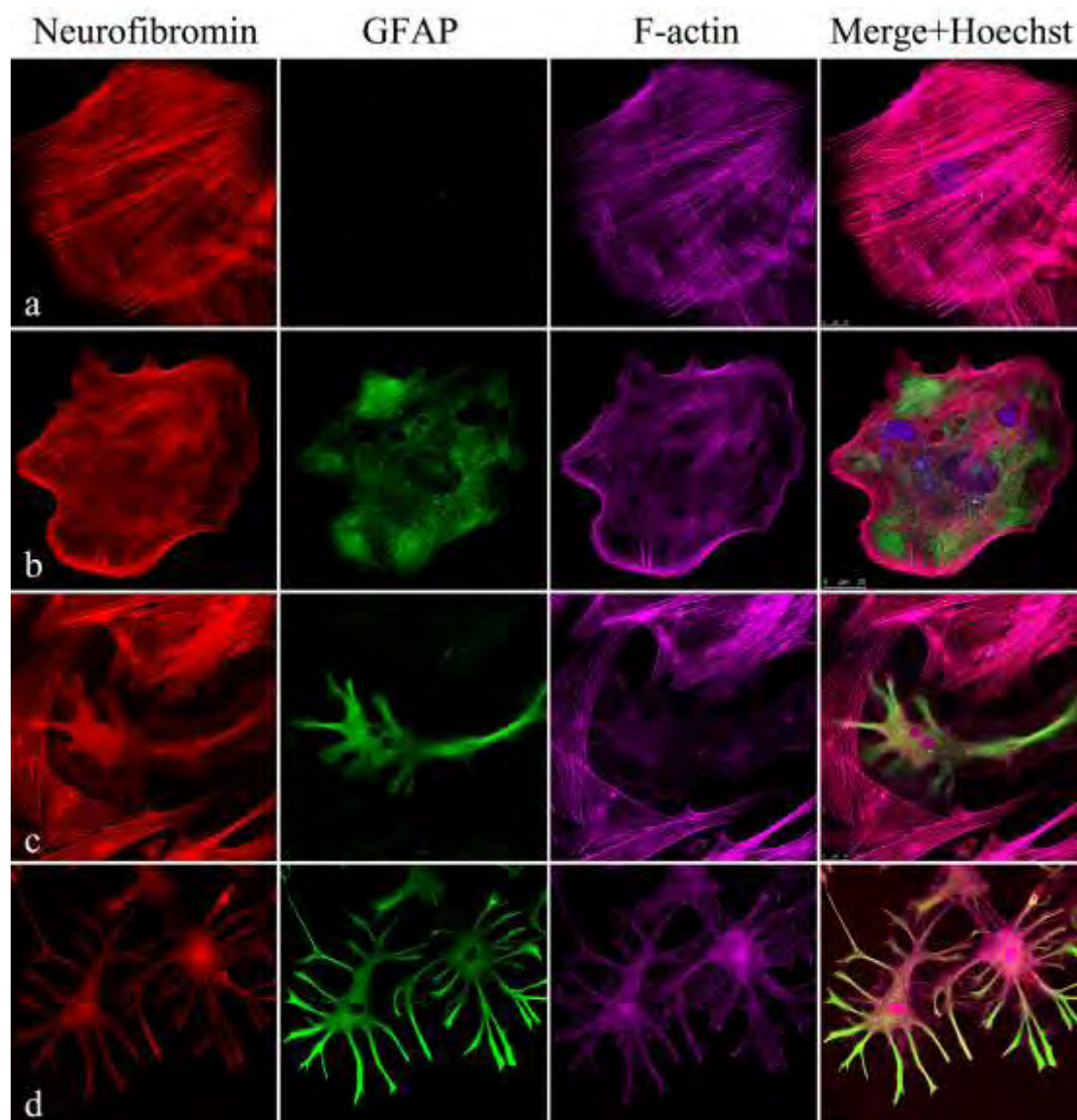
Για να επιβεβαιώσουμε, περαιτέρω, τον εντοπισμό της νευροϊνιδίνης στη μιτωτική συσκευή χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικά, ως προς το είδος και τον επίτοπο που αναγνωρίζουν, αντισώματα (Σχήμα 42). Το πρώτο αντίσωμα είναι μονοκλωνικό, μεγαλωμένο σε μυ (mouse) και ο επίτοπος που αναγνωρίζει βρίσκεται στο N-τελικό άκρο της νευροϊνιδίνης (αριστερή εικόνα), ενώ το δεύτερο αντίσωμα είναι πολυκλωνικό, μεγαλωμένο σε κόνικλο (rabbit) και ο επίτοπος που αναγνωρίζει βρίσκεται στο C-τελικό άκρο (μεσαία εικόνα). Η χρήση των δύο αυτών αντισωμάτων σε αναλύσεις ανοσοφθορισμού, απέδειξε ότι ο εντοπισμός της νευροϊνιδίνης στη μιτωτική άτρακτο είναι ανεξάρτητος του χρησιμοποιούμενου αντισώματος.



Σχήμα 42. **Ο εντοπισμός της νευροϊνιδίνης στη μιτωτική άτρακτο είναι ανεξάρτητος του χρησιμοποιούμενου αντισώματος.** Τα SF268 κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν, με ανοσοκυτταροχημεία, για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της νευροϊνιδίνης στη μίτωση, με χρήση μονοκλωνικού αντισώματος sc-20017 ενάντια στο N-τελικό άκρο (κόκκινο), ή πολυκλωνικού αντισώματος (sc-67) ενάντια στο C-τελικό άκρο (πράσινο) της πρωτεΐνης. Έγινε, επίσης, χρώση με Hoechst 33258 για την ανίχνευση του πυρηνικού DNA (μπλε). Οι εικόνες είναι προβολές διαδοχικών Z-τομών, πάχους 0.5μm, οι οποίες τραβήχτηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

Το επόμενο λογικό ερώτημα που γεννήθηκε ήταν αν ο εντοπισμός της νευροϊνιδίνης στη μιτωτική συσκευή είναι ίδιον των καρκινικών κυττάρων ή συμβαίνει και σε φυσιολογικά κύτταρα. Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η

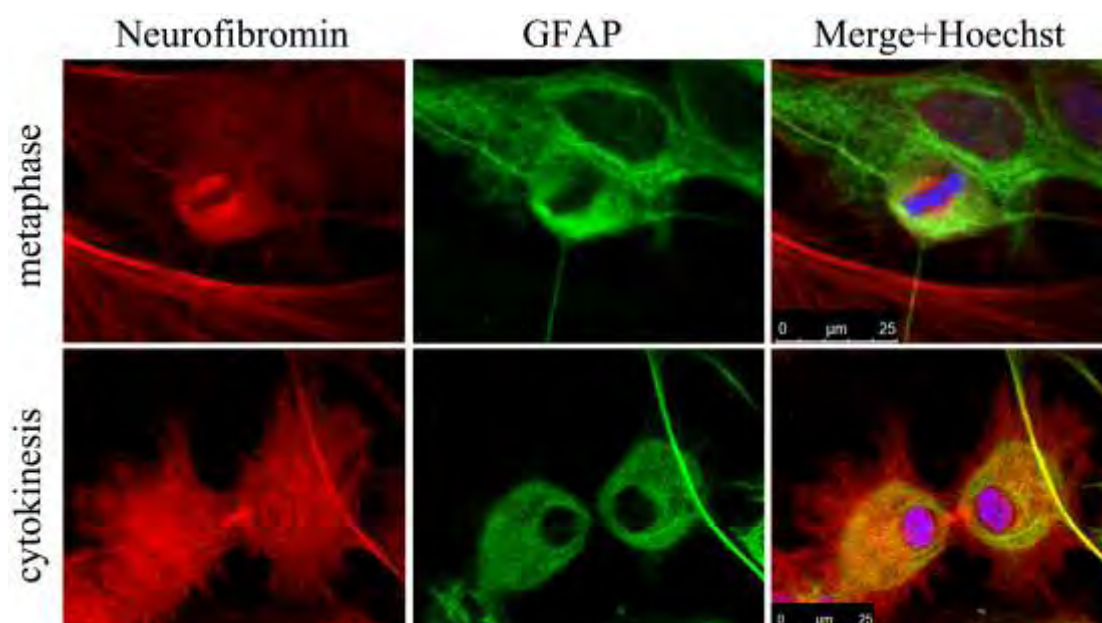
νευροϊνιδίνη συμμετέχει στη μίτωση εξαιτίας της καρκινικής εξαλλαγής που έχουν υποστεί τα κύτταρα, πραγματοποιήσαμε πρωτογενείς καλλιέργειες αστροκυττάρων (απομονωμένες από 3 ημερών νεογέννητους επίμυες). Αρχικά, μελετήσαμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό της νευροϊνιδίνης σε αστροκύτταρα που βρίσκονται σε διάφορες φάσεις διαφοροποίησης, μετά από 5, 10, 18, ή 30 μέρες στην καλλιέργεια. Άλλωστε, μετά από αρκετές μέρες στην καλλιέργεια οι επίπεδοι, άμορφοι αστροβλάστες, προοδευτικά εκφράζουν την όξινη ινιδιακή πρωτεΐνη της γλοίας (GFAP), ένα ενδιάμεσο ινίδιο, και διαφοροποιούνται σε αστροκύτταρα που φέρουν προεκβολές [336]. Τα ενδιάμεσα ινίδια αποτελούν μία μεγάλη ετερόλογη οικογένεια γονιδίων, τα οποία ποσοτικά και πιο σημαντικά ποιοτικά εκφράζονται κατά τρόπο ειδικό για τον τύπο του κυττάρου αλλά και του σταδίου διαφοροποίησης [337], για αυτό, άλλωστε, η όξινη ινιδιακή πρωτεΐνη της γλοίας είναι από τους σημαντικότερους δείκτες αναγνώρισης ώριμων κυττάρων γλοίας. Στους ιδιαίτερα κινητικούς αστροβλάστες, που δεν εκφράζουν GFAP, η νευροϊνιδίνη συν-εντοπίζεται με τις ίνες στρες της F-ακτίνης (Σχήμα 43-a), ενώ δε φαίνεται καθαρά στον πυρήνα, εύρημα σε συμφωνία με ό,τι έχουμε προηγουμένως δείξει σε αστροβλάστες εμβρύου όρνιθας [224]. Καθώς οι αστροβλάστες διαφοροποιούνται σε αστροκύτταρα και αρχίζουν να εκφράζουν GFAP (Σχήμα 43-b), η νευροϊνιδίνη εξακολουθεί να απουσιάζει από τον πυρήνα αλλά συνεχίζει να εντοπίζεται με τον κυτταροσκελετό ακτίνης, συμπεριλαμβανομένων των περιμετρικά προσανατολισμένων δεσμών μικροϊνιδίων. Ωστόσο, η περίτεχνη οργάνωση των μικροϊνιδίων εξαφανίζεται κατά την πρόοδο της διαφοροποίησης, αφού τα στατικά αστροκύτταρα έχουν λίγη πολυμερισμένη ακτίνη. Σε αυτά τα ινώδη αστροκύτταρα ο πυρηνικός εντοπισμός της νευροϊνιδίνης είναι πολύ σαφής, ενώ ο συν-εντοπισμός με την ακτίνη περιορίζεται στις περιφερειακές δέσμες (Σχήμα 43-c, d).



Σχήμα 43. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της νευροϊνιδίνης σε διαφοροποιούμενα αστροκύτταρα εξαρτάται από το στάδιο της διαφοροποίησης. Αστροκύτταρα απομονώθηκαν από 3 ημερών νεογέννητους επίμυες και καλλιεργήθηκαν για 5 (a), 10 (b), 18 (c), ή 30 (d) μέρες. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν, με ανοσοκυτταροχημεία, για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της νευροϊνιδίνης (κόκκινο) και την έκφραση ή μη της GFAP (πράσινο). Έγινε, επίσης, χρώση με ακτίνη-φαλλοϊδίνη (μωβ) και Hoechst 33258 (μπλε). Οι εικόνες είναι προβολές διαδοχικών Z-τομών, πάχους 0,5 μm, οι οποίες τραβήχτηκαν σε συνεσιακό μικροσκόπιο.

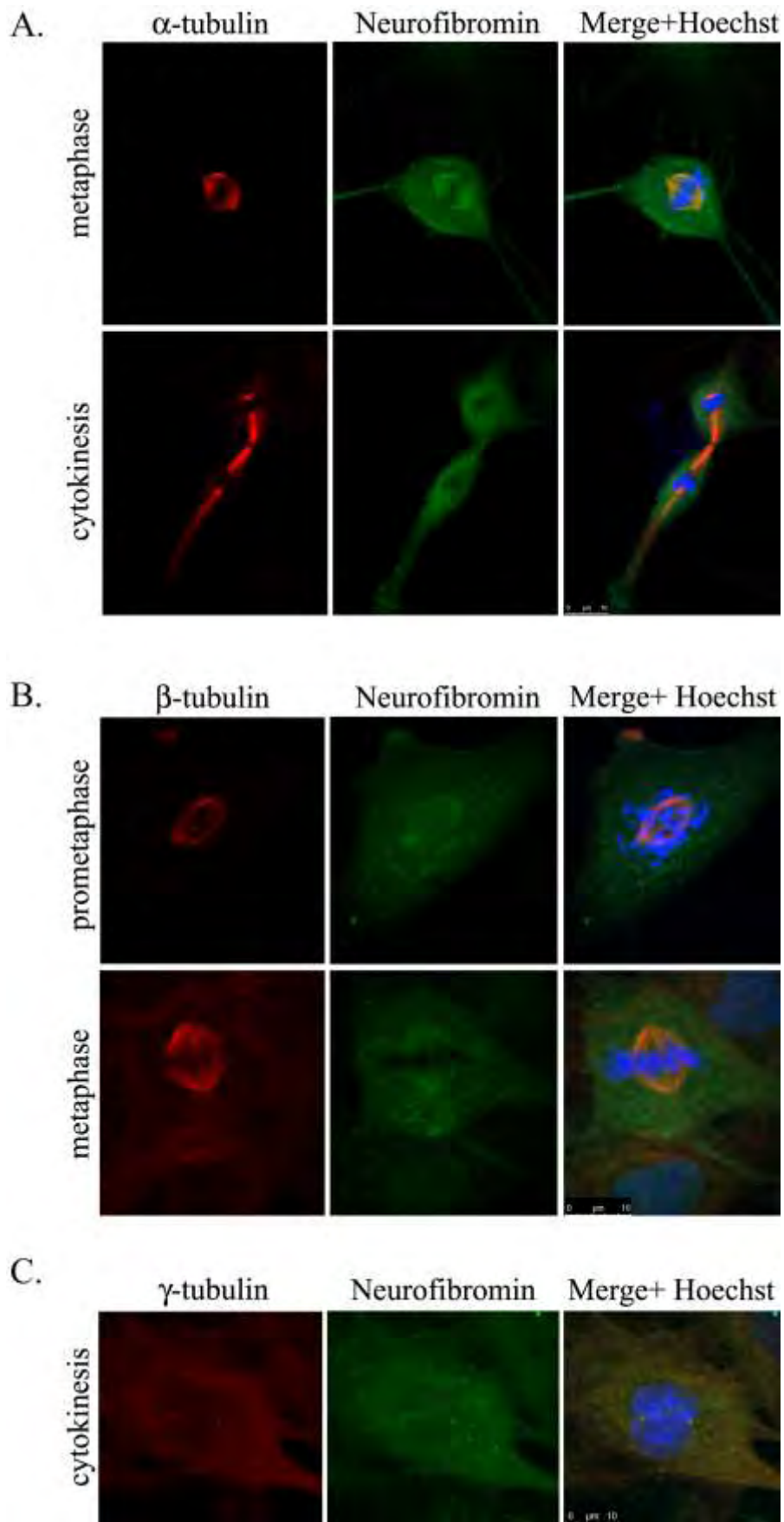
Αφού εδραιώσαμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό της νευροϊνιδίνης κατά τη διάρκεια της αστροκυτταρικής διαφοροποίησης, εξετάσαμε τον εντοπισμό της πρωτεΐνης σε διαφοροποιημένα, μιτωτικά αστροκύτταρα που εκφράζουν

GFAP και αποδείξαμε ότι η νευροϊνιδίνη συμμετέχει εξίσου και στο μιτωτικό μηχανισμό φυσιολογικών κυττάρων γλοίας (Σχήμα 44). Τα αστροκύτταρα, αφού καλλιεργήθηκαν για 10 ημέρες, μονιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν με ανοσοφθορισμό για τον εντοπισμό της ενδογενούς νευροϊνιδίνης και την έκφραση της GFAP. Αποδείξαμε ότι η νευροϊνιδίνη συμμετέχει σε όλες τις φάσεις της μίτωσης (εδώ ενδεικτικά μετάφαση και κυτοκίνηση).



Σχήμα 44. Η νευροϊνιδίνη εντοπίζεται στη μιτωτική συσκευή μη καρκινικών κυττάρων γλοίας. Πρωτογενείς καλλιέργειες αστροκυττάρων απομονώθηκαν από 3 ημερών επίμυες και καλλιεργήθηκαν για 10 ημέρες. Στη συνέχεια, μονιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν με ανοσοκυτταροχημεία για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της νευροϊνιδίνης (κόκκινο), της όξινης ινδιακής πρωτεΐνης της γλοίας (GFAP) (πράσινο) και του πυρηνικού DNA (μπλε). Οι εικόνες είναι προβολές διαδοχικών Z-τομών, πάχους 0.5μm, οι οποίες τραβήχτηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

Μάλιστα, η νευροϊνιδίνη, και πάλι, συν-εντοπίζεται με τις α- και β-, τουμπουλίνη από την πρόφαση ως την κυτοκίνηση όπως αποκάλυψαν πειράματα ανοσοκυτταροχημείας και συνεστιακής μικροσκοπίας (Σχήμα 45 A, B). Επίσης, όπως και στα SF268 κύτταρα, η νευροϊνιδίνη βρίσκεται στα κεντροσώματα κατά την έναρξη της μίτωσης των αστροκυττάρων όπου και συν-εντοπίζεται με τη γ-τουμπουλίνη στην πρόφαση (Σχήμα 45 C).

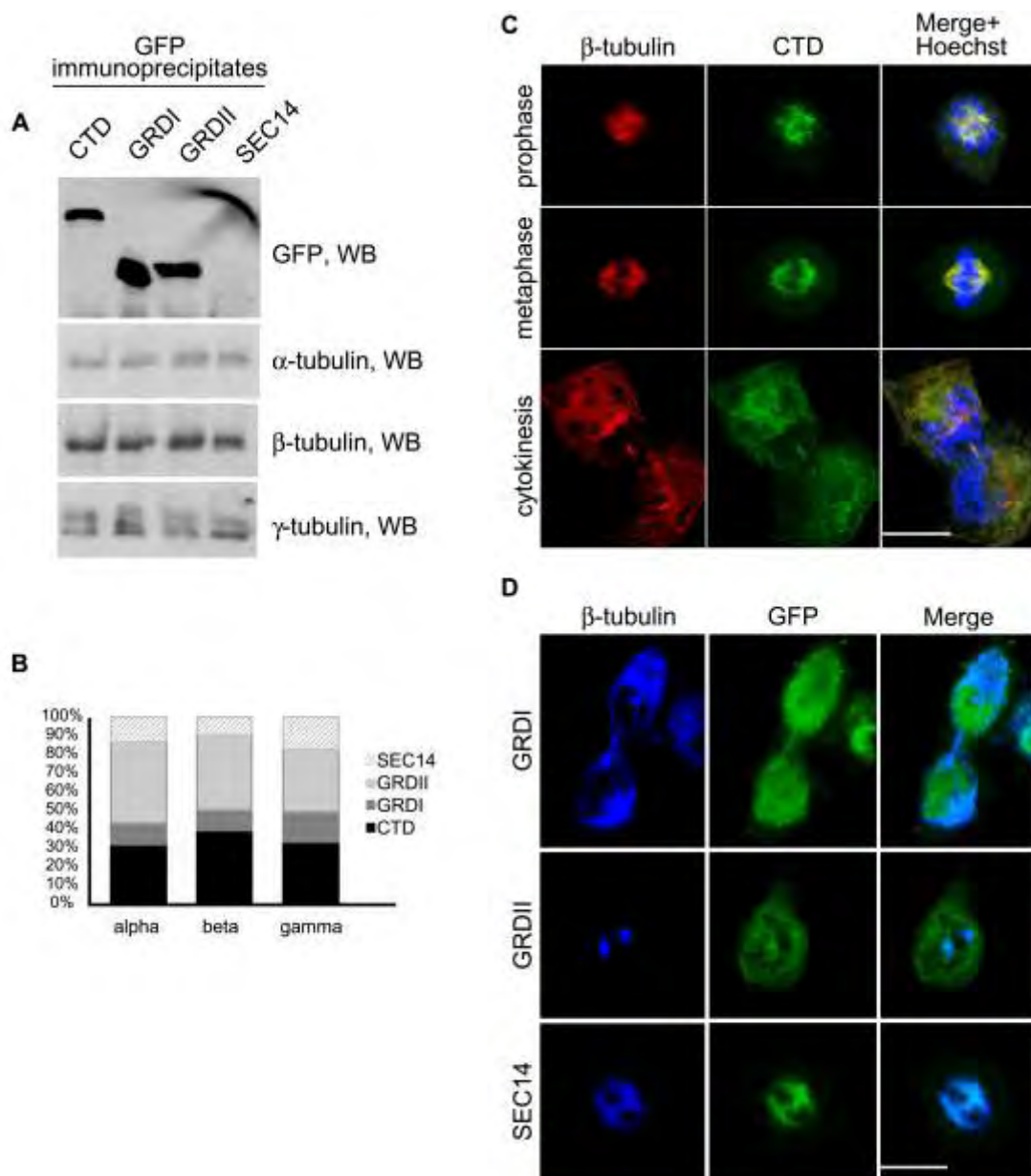


Σχήμα 45. Η νευροϊνιδίνη είναι μέρος του μιτωτικού μηχανισμού κυττάρων γλοίας. Τα αστροκύτταρα μονιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν, με

ανοσοκυτταροχημεία, για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της νευροϊνιδίνης (πράσινο), της α- (A) β- (B) ή γ-τουμπουλίνης (C) (κόκκινο) και του πυρηνικού DNA (μπλε) όπως περιγράφηκε. Οι εικόνες είναι προβολές διαδοχικών Z-τομών, πάχους 0,5 μm, οι οποίες τραβήχτηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε περαιτέρω τα αποτελέσματα που λάβαμε μελετώντας την ενδογενή νευροϊνιδίνη και με σκοπό να αναγνωρίσουμε τις περιοχές της νευροϊνιδίνης που αλληλεπιδρούν με τη μιτωτική συσκευή, αναλύσαμε την έκφραση και τον εντοπισμό αρκετών, συζευγμένων με GFP, θραυσμάτων της νευροϊνιδίνης. Άλλωστε, δυστυχώς, δεν υπάρχει ακόμα πλασμίδιο που να περιέχει την πλήρους μήκους νευροϊνιδίνη όπως έχουμε προηγούμενα συζητήσει [265]. Με σκοπό να εξετάσουμε αν οι διαφορετικές περιοχές της νευροϊνιδίνης μπορούν να δεσμεύσουν την τουμπουλίνη, υπερεκφράσαμε παροδικά, σε ασυγχρόνιστα SF268 κύτταρα, πλασμίδια που κωδικοποιούν τις CTD, GRDI, GRDII, και SEC14 περιοχές της νευροϊνιδίνης και πραγματοποιήσαμε συνανοσοκαθιζήσεις και ανοσοσύτπωση κατά Western για τις α-, β- και γ-τουμπουλίνη (Σχήμα 46 A). Βρήκαμε ότι όλες οι CTD, GRDI, GRDII, και SEC14 περιοχές σχηματίζουν σύμπλοκα με τις εξετασθείσες ισομορφές της τουμπουλίνης, σε ασυγχρόνιστα κύτταρα. Συγκεκριμένα, οι GRDI και GRDII περιοχές δένονται περίπου το ίδιο στις α και β ισομορφές της τουμπουλίνης αλλά δε συμβαίνει το ίδιο και στη γ-τουμπουλίνη όπου η δέσμευση του GRDI σε αυτήν αυξάνεται, ενώ του GRDII ελατώνεται (Σχήμα 46 B). Η SEC14 περιοχή δεσμεύεται επί το πλείστον στη γ-τουμπουλίνη, ενώ η CTD περιοχή δεσμεύεται ισχυρά και στις τρεις εξετασθείσες ισομορφές (Σχήμα 46 B). Στη συνέχεια, εξετάσαμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πλασμιδίων με ανοσοκυτταροχημεία, σε μιτωτικά SF268 κύτταρα. Με τη βοήθεια της συνεστιακής μικροσκοπίας δείξαμε ότι ο εντοπισμός ή μη του κάθε πλασμιδίου στη μιτωτική συσκευή εξαρτάται από την περιοχή που αυτό κωδικοποιεί αλλά και τη φάση της μίτωσης. Συγκεκριμένα, όλα τα μόρια του CTD πλασμιδίου δεσμεύονται ισχυρά στη μιτωτική τουμπουλίνη σε όλες τις μιτωτικές φάσεις (Σχήμα 46 C) συμπεριλαμβανομένων των κεντροσωμάτων στην πρόφαση. Αντίθετα, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός μορίων των πλασμιδίων που κωδικοποιούν τις GRDI και GRDII περιοχές βρέθηκαν στην

μιτωτική συσκευή (Σχήμα 46 D). Συγκεκριμένα, τα πλασμίδια, αυτά, συν-εντοπίζονται ασθενώς με τη μιτωτική τουμπουλίνη στα κεντροσώματα κατά την πρόφαση και στο ενδιάμεσο σώμα (midbody) κατά την κυτοκίνηση, ενώ κατά τη μετάφαση και την ανάφαση δεν εντοπίζονται στο υλικό της ατράκτου αλλά διασκορπίζονται σε όλο το κύτταρο.



Σχήμα 46. Αναγνώριση των περιοχών της νευροϊνιδίνης που συνδέονται με τα κεντροσώματα και τους μιτωτικούς μικροσωληνίσκους. Α. Όλες οι CTD, SEC14, GRDI και GRDII περιοχές της νευροϊνιδίνης δεσμεύουν την τουμπουλίνη. Ασυγχρόνιστα SF268 κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με τα

πλασμίδια CTD, GRDI, GRDII και SEC14 και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση του GFP. Για να οπτικοποιηθεί η αλληλεπίδραση, τα ανοσοσύμπλοκα ανοσοσυμπύκνωσαν με ειδικά αντίσωμα ενάντια στις α -, β -, και γ -τουμπουλίνη, ενώ, ειδικό αντίσωμα ενάντια στο GFP χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας επιτυχούς ανοσοκατακρήμνισης (άνω πάνελ). Β. Διαγραμματική απεικόνιση των ποσοστών δέσμευσης των α , β και γ ισομορφών της τουμπουλίνης στις CTD, GRDI, GRDII και SEC14 περιοχές της νευροϊνιδίνης. C. Τα SF268 κύτταρα διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο CTD και μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός της περιοχής κατά τη διάρκεια της μίτωσης με ανοσοκυταροχημεία. Οι εικόνες δείχνουν με κόκκινο: τη β -τουμπουλίνη, με πράσινο: το, συζευγμένο με GFP, CTD, με μπλε: τους πυρήνες (χρώση με Hoechst 33258). D. Τα SF268 κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με τα GRDI, GRDII και SEC14 πλασμίδια και στη συνέχεια μελετήθηκε ο εντοπισμός των περιοχών αυτών κατά τη μίτωση. Οι εικόνες δείχνουν με πράσινο: το GFP, με μπλε: τη β -τουμπουλίνη. Όλες οι εικόνες είναι προβολές 5 Z-τομών πάχους 0,5 μm , οι οποίες τραβήχτηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο, μπάρα=10 μm .

Η SEC14 περιοχή, παρόλο που συν-ανοσοκατακρημνίζεται με τη γ -τουμπουλίνη, συν-εντοπίζεται έντονα με τη μιτωτική συσκευή μόνο κατά τη μετάφαση και την κυτοκίνηση (Σχήμα 46 D), ενώ ο συν-εντοπισμός με τα κεντροσώματα ήταν ασθενής υποδηλώνοντας ότι η συγκεκριμένη περιοχή πιθανώς πραγματοποιεί ανεξάρτητες από τη μίτωση λειτουργίες στο κέντρο οργάνωσης των μικροσωληνίσκων MTOC (Microtubule Organizing Center). Τα αποτελέσματα, αυτά, δείχνουν ότι οι διαφορετικές περιοχές της νευροϊνιδίνης συνεισφέρουν ή ρυθμίζουν τις μιτωτικές λειτουργίες της πρωτεΐνης, υποδεικνύοντας ότι κατά τη μίτωση η νευροϊνιδίνη πιθανώς έχει και άλλες, πρόσθετες στην ενεργότητα RasGAP, λειτουργίες.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πλειονότητα των καρκίνων του νευρικού συστήματος δημιουργείται από μεταλλαγές στην αλληλουχία ογκοκατασταλτικών γονιδίων οι οποίες συχνά προκαλούν την απορρύθμιση της πυρηνικής μεταφοράς και τη διαταραχή της λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, με συνέπεια την έναρξη και εξέλιξη του καρκίνου. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια συμμετέχουν σε πληθώρα μονοπατιών μεταγωγής σήματος και ρυθμίζουν διαδικασίες που σχετίζονται με την καρκινογένεση όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η κυτταρική προσκόλληση. Το μονοπάτι Ras/Raf/MAPK είναι ένα ζωτικής σημασίας μονοπάτι μεταγωγής σήματος, στο οποίο λαμβάνει μέρος μια πολύ σημαντική ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που, μάλιστα, σχετίζεται με καρκινικό σύνδρομο, η νευροϊνιδίνη. Το Ras/ERK, μονοπάτι ρυθμίζει δύο «αντίθετες» κυτταρικές διαδικασίες, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση, διατάραξη των οποίων σχετίζεται άμεσα με την καρκινογένεση. Μια υψηλή αλλά παροδική ενεργοποίηση του μονοπατιού προκαλεί τον πολλαπλασιασμό κυτάρων, ενώ μια συνεχής, ήπια ενεργοποίηση προκαλεί διαφοροποίηση. Σημαντικοί ρυθμιστές του μονοπατιού αυτού και του βιολογικού αποτελέσματός του φαίνεται να είναι οι καινοφανείς PKCs και η RasGAP νευροϊνιδίνη. Άλλωστε, η λειτουργία της αναπτυξιακά ρυθμιζόμενης νευροϊνιδίνης εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση διακριτών περιοχών της από PKC, φωσφορυλίωση που εκτρέπει το βιολογικό αποτέλεσμα του αυξητικού παράγοντα EGF από διαφοροποίηση σε πολλαπλασιασμό. Στην παρούσα εργασία, αποδείξαμε ότι: **α)** η ενεργοποίηση της ενδογενούς PKCε προάγει τη διαφοροποίηση καρκινικών κυτάρων του ΠΝΣ. Διαδικασία που στα κύτταρα νευροβλαστώματος διαμεσολαβείται μέσω αλληλεπίδρασης με το Ras/ERK μονοπάτι και φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης, **β)** η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης από την PKCε σε εμβρυϊκούς φλοιικούς νευρώνες ρυθμίζει τη σταθερότητα και την πυρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση της, διαδικασίες εξαιρετικής σημασίας για τη λειτουργία της πρωτεΐνης, και **γ)** η ρύθμιση των λειτουργιών της νευροϊνιδίνης από την PKCε σχετίζεται με την ενεργή συμμετοχή της στη διαδικασία της μίτωσης καρκινικών και φυσιολογικών κυτάρων γλοίας.

4.1. Ο Ρόλος της PKCε στη διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων του ΠΝΣ

Αρχικά εξακριβώθηκε το μεταγραφικό προφίλ όλων των PKC ισομορφών αλλά και των GRDI/GRDII και NLS μεταγράφων της νευροϊνιδίνης σε πληθώρα καρκινικών κυτταρικών σειρών επιθηλιακής και νευρικής προέλευσης. Βρέθηκε ότι η PKCε παράγεται σε υψηλά επίπεδα σε όλες τις υπό μελέτη καρκινικές σειρές, ενώ η πλειονότητα των υπολοίπων ισομορφών διαφοροποιείται στην ύπαρξη τους ή μη αλλά και στα επίπεδα έκφρασής τους (Σχήμα 10). Είναι γνωστό ότι η PKCε είναι η πρώτη ισομορφή που αποδείχθηκε ότι σε κάποιους ιστούς συμπεριφέρεται σαν ογκοπρωτεΐνη [167, 168]. Άλλωστε η συγκεκριμένη ισομορφή είναι συνεχώς ενεργή σε κυτταρική σειρά μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα [169], ενώ αυξημένα επίπεδα έκφρασης και ενεργοποίησής της έχουν παρατηρηθεί σε επιθηλιακά κύτταρα του παχέως εντέρου [170, 171], στον καρκίνο του προστάτη [172], του μαστού [173], των νεφρών [174], και του ακανθωκυτταρικού καρκινώματος του δέρματος [175]. Όσον αφορά τους καρκίνους του νευρικού συστήματος, τα επίπεδα της PKCε έχουν βρεθεί ανεβασμένα σε πρωτογενείς, υψηλού βαθμού (high grade), αστρογλοιακούς, εγκεφαλικούς όγκους [180] αλλά και σε αστροκυτταρικές κυτταρικές σειρές που προέρχονται από καρκίνους του εγκεφάλου. Συνεπώς, τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με την προϋπάρχουσα βιβλιογραφία προσθέτοντας πληροφορίες για κυτταρικές σειρές που δεν είχαν προηγουμένως εξεταστεί. Επιπλέον, η έκφραση της ογκοκατασταλτικής νευροϊνιδίνης ανιχνεύθηκε σε όλες τις εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές (Σχήμα 11).

Στη συνέχεια θελήσαμε να συσχετίσουμε τα αυξημένα επίπεδα της PKCε και την πιθανώς αυξημένη ενεργοποίησή της με την αλλαγή στη διαφοροποίηση ή τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυτταρικών σειρών του νευρικού συστήματος. Η PKCε αποτελεί κόμβο μεταγωγής σήματος και μεταγραφής γονιδίων, ειδικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης όπου και παίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του ΚΝΣ, ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για το ρόλο της ενεργοποίησης της PKCε στο ΠΝΣ. Πρόσφατα, δείχθηκε ότι η PKCε ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Schwann μέσω της ERK1/2 χρησιμοποιώντας ένα ανεξάρτητο από

MEK και εξαρτώμενο από p56Lck μονοπάτι [338]. Η συντριπτική πλειοψηφία των όγκων που εμφανίζονται στο ανθρώπινο ΠΝΣ προέρχονται από τα κύτταρα Schwann ή τα πρόδρομα αυτών. Για να διαπιστωθεί ο ρόλος της PKCε στη διαδικασία διαφοροποίησης μετασχηματισμένων κυττάρων του ΠΝΣ επιλέχθηκε η 90-8 κυτταρική σειρά, που προέρχεται από κακοήγη όγκο των περιφερικών νευρικών ελύτρων (MPNST), και μελετήθηκε το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της ενδογενούς PKCε. Η μελέτη της λειτουργίας της ενδογενούς PKCε κρίνεται εξαιρετικά σημαντική αφού με αυτόν τον πειραματικό σχεδιασμό, αποσαφηνίζεται ο ρόλος της στη διαφοροποίηση χωρίς να γίνονται μεγάλες παρεμβάσεις στα κύτταρα όπως στην περίπτωση της διαμόλυνσης με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης. Μελετήσαμε τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα της PKCε στο φαινότυπο των MPNST μετά από ενεργοποίησή της συγκεκριμένης ισομορφής με το ειδικό για PKCε πεπτιδίο ενεργοποίησης ψεRACK και βρήκαμε ότι η ενεργοποίηση της PKCε είχε ως αποτέλεσμα την έντονη μορφολογική διαφοροποίηση των κυττάρων όπως αυτή αποκαλύφθηκε με την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης αλλά και των μικροσωληνίσκων (Σχήμα 12). Συνεπώς, η ενεργοποίηση της PKCε έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή των κυτταροσκελετικών στοιχείων του κυττάρου. Ο κυτταροσκελετός αποτελείται από τρία δομικά πρωτεϊνικά στοιχεία: τους μικροσωληνίσκους, τα ενδιάμεσα ινίδια και τα μικροϊνίδια ακτίνης. Η PKCε ρυθμίζει τη λειτουργία και των τριών αυτών δομικών στοιχείων [339] αλληλεπιδρώντας και σε μερικές περιπτώσεις φωσφορυλιώνοντας τις πρωτεΐνες που σχηματίζουν αυτές τις δομές (περιφερίνη, βιμεντίνη, κερατίνη, ακτίνη) [83, 121, 305, 340]. Επιπλέον, μοναδικό χαρακτηριστικό της PKCε είναι μια αλληλουχία 6 αμινοξέων μεταξύ των C1 και C1b υποτομημάτων που αποτελεί το μοτίβο πρόσδεσης στην ακτίνη [101]. Συνεπώς, οι παρατηρούμενες μορφολογικές αλλαγές πιθανώς σχετίζονται με τη μοναδική ιδιότητα της PKCε να προσδένει ακτίνη και τη στενή σχέση που παρουσιάζει και με τα υπόλοιπα στοιχεία του κυτταροσκελετού.

Οι μορφολογικές αλλαγές που παρατηρήσαμε στα κύτταρα βρήκαμε ότι πιθανώς προκύπτουν ή προκαλούν αλλαγές στο μεταγραφικό προφίλ αρκετών ειδικών, για διαφοροποιημένα κύτταρα Schwann, δεικτών (Σχήμα 13). Συγκεκριμένα, μετά από επώαση με ψεRACK οι πρωτεΐνες-δείκτες της

διαφοροποίησης S-100b, MBP και MPZ αυξήθηκαν σημαντικά σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες GFAP και ki-67 δε φαίνεται να μεταβάλλονται σημαντικά. Κατά τη διαφοροποίηση θα περιμέναμε την GFAP να αυξάνεται, μιας και η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελεί ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη διαφοροποίησης κυττάρων γλοίας, και το αντιγόνο ki-67 να μειώνεται αφού κατά τη διαδικασία διαφοροποίησης τα κύτταρα παύουν να πολλαπλασιάζονται. Πιθανώς, λοιπόν, η αλλαγή σε αυτά τα μόρια να συμβαίνει αργότερα κατά τη διαφοροποίηση.

Μια άλλη έκφραση της διαφοροποίησης καρκινικών κυττάρων είναι η απώλεια της διεισδυτικής και μεταστατικής τους ικανότητας. Προκειμένου να εξετάσουμε αν η ενεργοποίηση της PKCε οδηγεί σε ένα λιγότερο μεταστατικό φαινότυπο πραγματοποιήσαμε δοκιμές matrigel και αποκαλύψαμε δραστικές αλλαγές στη διεισδυτική ικανότητα των επωασμένων με ψεRACK κυττάρων. Στα κύτταρα, λοιπόν, που η PKCε ήταν ενεργοποιημένη παρατηρήθηκε η απώλεια της ικανότητας δημιουργίας κυτταρικών προεκβολών, άρα και κυτταρικών δικτύων (Σχήμα 14). Η συσχέτιση, αυτή, φαίνεται λογική εξαιτίας της προαναφερθείσας θέσης πρόσδεσης σε ακτίνη και της άμεσης αλληλεπίδρασης της PKCε με τον κυτταροσκελετό, στοιχεία απαραίτητα για την καρκινική διεισδυτικότητα και μεταστατικότητα *in vitro* και *in vivo* [178]. Εν τούτοις, πληθώρα ερευνών αναφέρουν ότι η PKCε είναι ογκοπρωτεΐνη για πολλούς καρκίνους επιθηλιακής αλλά και νευρικής προέλευσης και έχουν συσχετίσει την έκφραση της με αυξημένη διεισδυτικότητα των NIH 3T3 ινοβλαστών [178] και μεταστατικότητα σε προ-κλινικό ζωικό μοντέλο καρκίνου του μαστού [173, 179]. Παράλληλα, η PKCε έχει δείχθει ότι προάγει την κυτταρική μετανάστευση σε κύτταρα γλοιώματος [182, 183]. Σε πλήρη αντίθεση, μελέτες από το εργαστήριό μας και από άλλους έχουν δείξει ότι η PKCε είναι η ισομορφή που σχετίζεται πολύ ειδικά με τη διαφοροποίηση στο νευρικό σύστημα [96, 99, 121, 151, 153]. Συγκεκριμένα, στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο όρνιθας είναι η βασική ισομορφή που απαντάται σε πρώιμους μεταμυωτικούς νευρώνες που μόλις αρχίζουν να διαφοροποιούνται [96], ενώ, υπερέκφραση της PKCε προάγει την εξαρτώμενη από νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF) νευρική ανάπτυξη και καταστολή της την μπλοκάρει [341].

Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της PKCε στη διαφοροποίηση αλλά και την ογκογένεση σε οργανισμικό επίπεδο, δημιουργήσαμε διπλά

σταθερά διαμολυσμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την αγρίου τύπου PKCε ή την κυρίαρχα αρνητική μορφή της DNPKCε υπό τον έλεγχο δοξουκυκλίνης (σύστημα Tet-Off). Οι κυτταρικές, αυτές, σειρές δημιουργήθηκαν προκειμένου να ενεθούν σε γυμνά ποντίκια ώστε να δημιουργηθούν ξενομοσχεύματα και στη συνέχεια να μελετηθεί η επίδραση της PKCε και της DNPKCε στην εξέλιξη της ογκογένεσης *in vivo*. Συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές επιθηλιακής (MCF7 και PC3) και δύο νευρικής προέλευσης (90-8 και PC12) ώστε να διαπιστωθεί αν η επίδραση της PKCε εξαρτάται από την ιστική προέλευση του όγκου. Οι πρότυπες αυτές κυτταρικές σειρές αποτελούν πολύ σημαντικά μοριακά εργαλεία, για φαρμακολογική χρήση και περαιτέρω έρευνα του μηχανισμού έναρξης της καρκινογένεσης.

Προτού, όμως, προχωρήσουμε στη μελέτη του ρόλου της PKCε σε οργανισμικό επίπεδο, διερευνήσαμε το μηχανισμό δράσης και τις αλληλεπιδράσεις της σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο. Για το σκοπό, αυτό, επιλέξαμε ένα καλά μελετημένο μοντέλο διαφοροποίησης, αυτό των SHSY-5Y κυττάρων νευροβλαστώματος. Τα SH-SY5Y κύτταρα νευροβλαστώματος είναι ένα εξαιρετικά χρήσιμο μοντέλο μελέτης γιατί, εκτός του ότι είναι επαρκώς χαρακτηρισμένα, έχει αποδειχθεί ότι διαφοροποιούνται εμφανώς μετά από επώαση με ρετινοϊκό οξύ (RA) ή TPA, το φορβικό εστέρα που ενεργοποιεί τις PKC. Μακροχρόνια επώαση (8 ημέρες) των SH-SY5Y κυττάρων νευροβλαστώματος με TPA ή RA είχε ως αποτέλεσμα την έντονη μορφολογική τους διαφοροποίηση (Σχήμα 17). Πιο σημαντικά, οι μορφολογικές αυτές αλλαγές συνοδεύτηκαν από αυξημένη φωσφορυλίωση της PKCε, της MARCKS και της ERK1/2 (Σχήμα 17) γεγονότα που υποδεικνύουν ότι το MAPK μονοπάτι μεταγωγής σήματος, υπό τον έλεγχο της PKCε, ενεργοποιείται και ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων νευροβλαστώματος. Ο προεξέχων ρόλος των PKC στην εξαρτώμενη από TPA διαφοροποίηση των SH-SY5Y κυττάρων έχει συζητηθεί σε αρκετές μελέτες [99, 327] στις οποίες σημειώνεται ότι η PKCε είναι ο κύριος υπεύθυνος της TPA-επαγόμενης διαφοροποίησης, ειδικά για την νευριτική ανάπτυξη. Χαρακτηριστικά, διαμολύνσεις με πλασμίδια που περιέχουν διάφορα κομμάτια της PKC υπέδειξαν τον κυρίαρχο ρόλο της ρυθμιστικής περιοχής της PKCε αλλά και της, μοναδικής ανάμεσα σε όλες τις ισομορφές,

ιδιότητάς της να προσδένεται σε ακτίνη, στην επαγωγή της νευριτικής ανάπτυξης [155, 156]. Έτσι, τα αποτελέσματα προ-διαφοροποίησης της PKCε πιθανώς περιλαμβάνουν μηχανισμούς που δεν εμπλέκουν άμεσα τη δραστικότητα κινάσης [155, 342]. Εν τούτοις, η δραστικότητα κινάσης είναι επίσης πολύ σημαντική αφού οι αναστολείς των c/nPKC έχει επανειλημμένως δειχθεί ότι αναστέλλουν την επαγόμενη από TPA ενεργοποίηση της ERK [84, 343, 344], τη φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης [84] την επαγόμενη από TPA νευριτική ανάπτυξη, την έκφραση νευρωνικών δεικτών καθώς και τη μείωση του νευροδιαβιβαστικού περιεχομένου [320, 343-345].

Η επίδραση της ενεργοποίησης της PKC στον κυτταροσκελετό και τη νευριτική ανάπτυξη κατά τη διαφοροποίηση νευροβλαστώματος είναι πια εδραιωμένη. Ο κυτταροσκελετός F-ακτίνης φλοιού μπορεί να θεωρηθεί, ως ένας άμεσος στόχος της διαδικασίας της διαφοροποίησης [121]. Η νευροϊνιδίνη είναι ένα από τα υποστρώματα της PKC που μπορεί να σχετίζεται με τον κυτταροσκελετό ακτίνης σε νευρώνες και SH-SY5Y κύτταρα [83, 224]. Έτσι, εξετάσαμε την κατάσταση φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και βρήκαμε ότι μετά από 8 ημέρες διαφοροποίησης η νευροϊνιδίνη φωσφορυλιώνεται σημαντικά στην ειδική για PKC θέση Ser2808 (Σχήμα 18). Στα SH-SY5Y κύτταρα, η TPA-εξαρτώμενη, οξεία φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης στο κατάλοιπο Ser2808 φαίνεται να διαμεσολαβείται κυρίως από κλασσικές PKCs [84]. Μελετώντας, όμως, τα μεταγραφικά και πρωτεϊνικά επίπεδα των PKCα και PKCε βρήκαμε ότι σε μακροπρόθεσμη επώαση μόνο τα επίπεδα της PKCε αυξάνονται σημαντικά σε σχέση με το μάρτυρα (Σχήμα 18), γεγονός που επιβεβαιώνει και την εκτεταμένη φωσφορυλίωση της PKCε στη Ser729, το κατάλοιπο στο υδροφοβικό μοτίβο που αποτελεί σημαντικό έναυσμα για την καταλυτική ικανότητά της (Σχήμα 18).

Η PKCε αναμένεται να επηρεάζει σημαντικά τη διαφοροποίηση των νευροβλαστωμάτων μέσω τόσο των καταλυτικών όσο και των ικριωματικών ιδιοτήτων της οι οποίες, άλλωστε, λειτουργούν ταυτόχρονα. Προφανώς, οι cPKCs και nPKCs (PKCδ) πρέπει να είναι σημαντικές για τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των νευροβλαστωμάτων και πιθανώς ρυθμίζονται από την PKCε. Μεγάλης κλινικής σημασίας είναι και το γεγονός ότι η PKCε μπορεί να τροποποιεί την αντίδραση των κυττάρων νευροβλαστώματος έναντι

κυτταροτοξικών φαρμάκων [346]. Ένα δεύτερο σημείο, όσον αφορά την PKCε, είναι ο χαρακτηρισμός της ως ογκογονίδιο σε μη νευρικούς καρκίνους [98, 347]. Η εκκεντρικότητα, αυτή, της PKCε συναντάται και σε άλλα μέλη των μηχανισμών μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση νευροβλαστωμάτων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το γνωστό σε όλους ογκογονίδιο H-Ras, το οποίο αποτελεί αίσιο προγνωστικό δείκτη για MYCN-αρνητικούς όγκους νευροβλαστώματος, ή το TrkA, που αν και, επίσης, ογκογονίδιο είναι αίσιος δείκτης όταν παρουσιάζει υψηλή έκφραση σε νευροβλαστώματα [348]. Και οι δύο, αυτές, πρωτεΐνες είναι ζωτικής σημασίας για τη νευρωνική διαφοροποίηση και επιβίωση, όπως και η PKCε. Για το λόγο αυτό υποθέτουμε ότι οι παρατηρούμενες αυξήσεις της PKCε σε μη νευροβλαστικούς καρκίνους μπορεί να αντικατοπτρίζουν την προσπάθεια του κυττάρου να μειώσει τον πολλαπλασιασμό του αυξάνοντας τη διαφοροποίησή του.

Συνολικά, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω πειραματικά στοιχεία, προτείνουμε ότι η ενεργοποίηση της PKCε, η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης στο PKC κατάλοιπο Ser2808, και τελικά η ενεργοποίηση της ERK είναι όλα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα, σαφώς σχετιζόμενα με τη διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων νευροβλαστώματος. Έτσι, μεταξύ όλων αυτών των γεγονότων μεταγωγής σήματος, μεταγραφής και μετάφρασης, η ρύθμιση της PKCε φαίνεται ως κομβικό και θεμελιώδες χαρακτηριστικό της διαδικασίας της διαφοροποίησης σε καρκινικά κύτταρα του ΠΝΣ. Γίνεται σαφές ότι τα αποτελέσματά μας, για την ενεργοποίηση και τις αλληλεπιδράσεις της PKCε κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, μπορούν να αποτελέσουν έναυσμα για την ανάπτυξη φαρμακολογικών στόχων, έτσι ώστε οι όγκοι του ΠΝΣ να διαφοροποιούνται και να γίνονται λιγότερο επιθετικοί και διεισδυτικοί και κατά συνέπεια να υπάρξει επιτέλους αποτελεσματική αντιμετώπιση των καρκίνων του ΠΝΣ.

4.2. Λειτουργική αλληλεπίδραση της PKCε και της νευροϊνιδίνης σε μετα-μιτωτικούς νευρώνες.

Θέλοντας να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση της PKCε και της νευροϊνιδίνης, αλλά και τη σημασία της PKCε-εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης στους καρκίνους του ΚΝΣ, αποφασίσαμε αρχικά να μελετήσουμε ένα φυσιολογικό (μη καρκινικό) αναπτυξιακό μοντέλο, αυτό των εμβρυϊκών νευρώνων φλοιού όρνιθας. Το μοντέλο, αυτό, είναι εξαιρετικά χρήσιμο αφού έχει αποδειχθεί ότι η νευροϊνιδίνη είναι αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη πρωτεΐνη και η κορύφωση της έκφρασής της συσχετίζεται καλά με την έναρξη της νευρωνικής διαφοροποίησης και ότι, σε ανώριμους νευρώνες συνεντοπίζεται με την F-ακτίνη στις νευρικές αποφύσεις και τους αυξητικούς κώνους του μεμβρανικού κυτταροσκελετού [224]. Στα σημεία αυτά, η F-ακτίνη σχηματίζει δίκτυα που είναι σημαντικά για τη νευριτική επιμήκυνση, τη νευρωνική μετακίνηση και τη ρυθμιζόμενη έκκριση [304]. Παρόλα αυτά, ο ρόλος της νευροϊνιδίνης σε μετα-μιτωτικά κύτταρα, όπως οι νευρώνες, παραμένει αδιευκρίνιστος. Η PKCε, από την άλλη, θεωρείται ως η κύρια ισομορφή που εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των νευρώνων [96, 99, 121, 151, 153].

Με τη χρήση ενός ειδικού αναστολέα φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης, την καλικουλίνη Α (calyculin A), δείξαμε ότι η μαζική φωσφορυλίωση στα κατάλοιπα αυτά προκαλεί σημαντική αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της νευροϊνιδίνης σε όλα τα υποκυτταρικά κλάσματα αλλά και σε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (Σχήμα 19). Πέραν της αύξησης των επιπέδων της, η φωσφορυλίωση προκαλεί και την εισροή της νευροϊνιδίνης στον πυρήνα (Σχήμα 19). Συνεπώς, επιβεβαιώνεται ακόμα μια φορά η σημασία της φωσφορυλίωσης ως μετα-μεταφραστική τροποποίηση στο μόριο της νευροϊνιδίνης αλλά, πιο σημαντικά, ως τρόπος ρύθμισης του υποκυτταρικού εντοπισμού αλλά και των πρωτεϊνικών επιπέδων της. Μάλιστα, με φαρμακολογικές προσεγγίσεις, βρήκαμε ότι η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης διαμεσολαβείται από PKC, αφού με εξωτερική προσθήκη TPA (του φορβικού εστέρα που ενεργοποιεί κλασσικές και νεοφανείς PKC) σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων λάβαμε αποτελέσματα συμβατά με αυτά που προέκυψαν από την επώαση με την καλικουλίνη Α (Σχήμα 20). Άλλωστε,

είναι δεδομένη πια η αλληλεπίδραση της νευροϊνιδίνης με τις PKC [83, 84, 276] και μελέτες από το εργαστήριό μας υποδεικνύουν ότι η PKC πιθανώς ρυθμίζει την πυρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση της πρωτεΐνης [84].

Πριν την έναρξη και κατά τη διάρκεια της επώασης με TPA, χρησιμοποιήσαμε τον ειδικό φαρμακολογικό αναστολέα, των κλασικών PKC, Gö6976 και το ειδικό για PKCε πεπτιδίο αναστολής εV1-2 (Σχήμα 20) και αποδείξαμε ότι η PKCε είναι η ισομορφή που αυξάνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της νευροϊνιδίνης και πιθανώς ρυθμίζει τον εντοπισμό της στον πυρήνα. Ήταν σαφές ότι πρόκειται για ισομορφή των κλασικών ή νεοφανών PKC, μιας που μόνο αυτές οι υποομάδες έχει δειχθεί ότι φωσφορυλιώνουν τη νευροϊνιδίνη *in vivo* [83, 84]. Ο λόγος που εξετάσαμε μόνο την εμπλοκή της PKCε ισομορφής, από όλες τις νεοφανείς PKC, είναι ότι η PKCε αποτελεί την κυρίαρχη ισομορφή στους νευρώνες φλοιού όρνιθας και ότι φωσφορυλιώνει τη νευροϊνιδίνη *in vitro* και *in vivo* [83].

Η εμπλοκή της PKCε στην πυρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση της νευροϊνιδίνης, επιβεβαιώθηκε με τη χρήση του ειδικού για PKCε πεπτιδικού ενεργοποιητή ψεRACK, αφού ενεργοποίηση της PKCε και επακόλουθη φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης έχει ως αποτέλεσμα την πυρηνική συσσώρευση της νευροϊνιδίνης (Σχήμα 21). Άλλωστε, τα τελευταία χρόνια, η πυρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση αποδεικνύεται ότι είναι θεμελιώδης μηχανισμός για τη λειτουργία των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών και στις περισσότερες περιπτώσεις ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης [18, 19, 20,]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η κυτταροπλασματική φωσφατάση PTEN που πρέπει να βρίσκεται στον πυρήνα για να πραγματοποιεί λειτουργίες αστυνόμευσης [21]. Εξάλλου, είναι πλέον αποδεκτό ότι οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες μπορεί να πραγματοποιούν διακριτές και μη σχετιζόμενες λειτουργίες στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα.

Αν και αρχικά θεωρούνταν κυτταροπλασματική, τα τελευταία χρόνια αποδεικνύεται ότι η νευροϊνιδίνη εντοπίζεται σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα από τη μεμβράνη μέχρι τον πυρήνα. Εν τούτοις, η σημασία του πυρηνικού εντοπισμού της νευροϊνιδίνης παραμένει άγνωστη. Η ενεργή μεταφορά από και προς τον πυρήνα, σε πρωτεΐνες άνω των 40 kDa, συνήθως διαμεσολαβείται από τα NLS και NES σήματα που φέρουν στην αλληλουχία τους. Η νευροϊνιδίνη περιέχει ένα διμερές NLS [224] στο εξώνιο 43 της C-

τελικής περιοχής της που έχει δείχθει ότι είναι αναγκαίο και επαρκές για να στοχεύσει την πρωτεΐνη στον πυρήνα [225, Kalrachidou and Leondaritis, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα]. Σε ιστούς οι οποίοι δεν εμπλέκονται με την παθολογία της NF1 το εξώνιο 43, και συνεπώς το NLS, ματίζονται παράγοντας το κυτταροπλασματικό ΔΕ43 μετάγραφο της νευροϊνιδίνης [209]. Αντίθετα, σε κυτταρική σειρά αστροκυττώματος, η νευροϊνιδίνη εντοπίζεται στον πυρήνα και συν-εντοπίζεται μερικώς με τα σωμάτια PML (promyelocytic leukemia) [349] υποδεικνύοντας ότι ο πυρηνικός εντοπισμός της νευροϊνιδίνης σχετίζεται με την ανάπτυξη όγκων στους ασθενείς με NF-1. Η πυρηνική μεταφορά των περισσότερων μεσαίου και μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεϊνών, που περιέχουν NLS, απαιτεί την ενεργοποίηση της Ran, μιας μικρής GTPάσης και των ρυθμιστών της. Για να εξετάσουμε αν η νευροϊνιδίνη χρησιμοποιεί αυτό τον ενεργειο-εξαρτώμενο μηχανισμό για να εισέλθει στον πυρήνα χρησιμοποιήσαμε τα RanT24N και RanQ69L μεταλλαγμένα πλασμίδια της Ran που έχουν ανεπαρκή ενεργότητα GTPάσης. Παρατηρήσαμε ότι μετά από υπερέκφραση του RanT24N πλασμιδίου, η ενδογενής νευροϊνιδίνη συσσωρεύεται στον πυρήνα (Σχήμα 22) ενώ, μετά από υπερέκφραση του RanQ69L, η νευροϊνιδίνη τείνει να συσσωρεύεται γύρω και έξω από τον πυρήνα, σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν έχουν διαμολυνθεί με το πλασμίδιο του Ran (Σχήμα 22), αποτελέσματα συμβατά με τη χρήση του Ran μονοπατιού από τη νευροϊνιδίνη. Επιπλέον, ταυτόχρονη υπερέκφραση των πλασμιδίων CTD και RanQ69L είχε ως αποτέλεσμα τον αποκλεισμό της πυρηνικής εισόδου του CTD (Σχήμα 22). Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι το πλασμίδιο RanQ69L, ενώ, εξαιρεί εντελώς από τον πυρήνα το πλασμίδιο CTD, παρεμποδίζει μερικώς, μόνο, την είσοδο της ενδογενούς νευροϊνιδίνης σε αυτόν. Το «παράδοξο» αυτό, αντανακλά το γεγονός ότι η πλήρους μήκους πρωτεΐνη είναι δεσμευμένη σε συμπλέγματα μεταγωγής σήματος και άλλες πρωτεΐνες, ενώ ένα θραύσμα της κινείται πιο ελεύθερα μέσα στο κύτταρο.

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με πειράματα συν-ανοσοκαθίζησης μεταξύ της ενδογενούς νευροϊνιδίνης και των Ran πλασμιδίων (Σχήμα 22). Μάλιστα, η νευροϊνιδίνη συν-ανοσοκαθίζει με το RanT24N (GDP-bound Ran) και το RanQ69L (GTP-bound Ran), γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη είναι ικανή για είσοδο και έξοδο από τον πυρήνα

μέσω του Ran μονοπατιού. Το γεγονός ότι η νευροϊνιδίνη χρησιμοποιεί ένα ενεργειο-εξαρτώμενο μονοπάτι για την είσοδο και έξοδο της από τον πυρήνα είναι άκρως αναμενόμενο αφού πρόκειται για μια πρωτεΐνη μεγάλου μεγέθους (~250 kDa) που θα ήταν αδύνατο απλώς να διαχυθεί μέσω των πυρηνικών πόρων.

Χρησιμοποιώντας *in silico* ανάλυση [350, 351], για πρώτη φορά προβλέψαμε την ύπαρξη δύο υποθετικών NESs (το NES1 στην PH περιοχή και το NES2 στη CTD περιοχή) στην αλληλουχία της νευροϊνιδίνης. Θεωρήσαμε ότι οι NES αλληλουχίες χρησιμοποιούνται από τη μεγάλη σε μέγεθος (2818 aa) νευροϊνιδίνη για να δένεται στο CRM-1 ώστε να διέρχεται μέσα από τους πυρηνικούς πόρους και να εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Τα NLS και NES2 σήματα βρίσκονται στη C-τελική περιοχή της νευροϊνιδίνης, ωστόσο, υπερέκφραση της περιοχής αυτής σε SF268 (Σχήμα 22) και COS-7 [225] κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα τον ισχυρό πυρηνικό και αδύναμο κυτταροπλασματικό εντοπισμό της. Το παράδοξο, αυτό, επισημαίνει την ύπαρξη επιπλέον μηχανισμών, όπως οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίοι καλύπτουν είτε το ένα είτε το άλλο σήμα ελέγχοντας, έτσι, την υποκυτταρική διακίνηση της νευροϊνιδίνης.

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την ικανότητα της νευροϊνιδίνης να εξέρχεται από τον πυρήνα και να διαπιστώσουμε αν τα υποθετικά NES της αλληλουχίας της είναι και λειτουργικά, χρησιμοποιήσαμε τη λεπτομυκίνη B (LMB), έναν ισχυρό και ειδικό αναστολέα της εξαρτώμενης από CRM1 πυρηνικής εξαγωγής [31]. Μετά την επώαση πρωτογενών καλλιιεργειών νευρώνων με λεπτομυκίνη B οι πρωτεΐνες που περιέχουν σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (NES) θα συσσωρευτούν μέσα τον πυρήνα. Πειράματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης (Σχήμα 23) έδειξαν ότι: **α)** τα επίπεδα της νευροϊνιδίνης μειώνονται στο κυτταρόπλασμα, γεγονός συμβατό με την πυρηνική συσσώρευση της νευροϊνιδίνης, υποδεικνύοντας ότι η νευροϊνιδίνη χρησιμοποιεί το CRM1-εξαρτώμενο μονοπάτι πυρηνικής εξόδου, αλλά **β)** τα επίπεδά της επίσης μειώνονται στο πυρηνικό κλάσμα, αποτέλεσμα αντίθετο από την αναμενόμενη αύξηση που θα προϋπόθετε η επώαση με LMB, αλλά συμβατό με την **γ)** μείωση των επιπέδων της νευροϊνιδίνης στο ολικό κυτταρικό κλάσμα, υποδεικνύοντας πυρηνική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης. Η υπόδειξη της πυρηνικής αποικοδόμησης ενισχύθηκε με την απόδειξη ότι η

μείωση αυτή είναι πραγματική και όχι αποτέλεσμα φαινομένου αντιγονικής συγκάλυψης (Σχήμα 24).

Έχει αποδειχθεί ότι σε καρκινικά κύτταρα η νευροϊνιδίνη χρησιμοποιεί το πρωτεάσωμα για την αποικοδόμησή της [328]. Είναι ενδιαφέρον, μάλιστα, ότι μελέτες σε κύτταρα ή όγκους γλοιοβλαστώματος έχουν δείξει ότι η PKCα προάγει την -εξαρτώμενη από πρωτεάσωμα- αποδόμηση της νευροϊνιδίνης και ως εκ τούτου τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αφού η RasGAP ενεργότητά της είναι ανεπαρκής για να ελέγξει το Ras [276]. Προκειμένου να ελέγξουμε αν η πρωτεασωμική αποικοδόμηση της νευροϊνιδίνης ισχύει σε μετα-μιτωτικούς νευρώνες και πως σχετίζεται με την κατάσταση φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης από PKC πραγματοποιήσαμε επώσεις με, τον ειδικό αναστολέα πρωτεασώματος, MG132 ή το φορβικό εστέρα TPA, παρουσία ή απουσία LMB (Σχήμα 25). Δείξαμε ότι, μετά από επώαση με MG132, η αφθονία της νευροϊνιδίνης αυξάνεται σημαντικά μόνο στον πυρήνα γεγονός που αποδεικνύει για πρώτη φορά ότι η νευροϊνιδίνη αποικοδομείται μέσω του πυρηνικού πρωτεασώματος. Ειδικότερα, η σταθερότητα της νευροϊνιδίνης φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την κατάσταση φωσφορυλίωσής της από PKC, αφού επώαση με TPA αυξάνει σημαντικά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Ο μηχανισμός, αυτός πιθανώς είναι ανεξάρτητος από την πρωτεασωμική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα, όπου η αποικοδόμηση της πρωτεΐνης μπορεί να πραγματοποιείται και από άλλους μηχανισμούς αποικοδόμησης (π.χ. λυσόσωμα). Η σταθερότητα, αυτή, αφορά τη νευροϊνιδίνη σε πρωτεϊνικό επίπεδο και δε σχετίζεται με αυξημένη σύνθεση, αφού μελέτες από το εργαστήριό μας, με χρήση S^{35} -μεθειονίνης, έδειξαν ότι ακόμα και μακροχρόνια επώαση με TPA δε μεταβάλλει τα επίπεδα σύνθεσης της πρωτεΐνης [84]. Επιπλέον, ταυτόχρονη επώαση με LMB και MG132 ή TPA και LMB επιβεβαίωσε ότι η πυρηνική έξοδος της νευροϊνιδίνης εξαρτάται από το CRM1 μονοπάτι (Σχήμα 25). Τα παραπάνω αποτελέσματα λήφθηκαν με τη χρήση τόσο του φωσφο-ευαίσθητου sc-67, όσο και του μη φωσφο-ευαίσθητου sc-68 αντισώματος ενάντια της νευροϊνιδίνης. Μάλιστα, τα κέρδη σε ανοσοδραστικότητα του sc-68, έναντι του sc-67 αντισώματος, μετά από επώαση με TPA αντικατοπτρίζουν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης από PKC στο κατάλοιπο Ser2808. Μελέτη με το sc-68 αντίσωμα

έδειξε ότι τα μόρια της νευροϊνιδίνης που δεν είναι φωσφορυλιωμένα, τουλάχιστον στη Ser2808, αποικοδομούνται στον πυρήνα, αφού επώαση με πρωτεασωμικό αναστολέα αυξάνει πολύ σημαντικά τα επίπεδά τους (Σχήμα 25).

Η σημασία της φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης από PKC, και ειδικότερα από την PKCε ισομορφή, μελετήθηκε περαιτέρω με το πεπτιδίο ψεRACK και τη χρήση ειδικών φωσφο-ευαίσθητων ή μη αντισωμάτων. Αποδείχθηκε ότι η PKCε φωσφορυλιώνει τη νευροϊνιδίνη στο κατάλοιπο Ser2808 *in vivo* με αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση των επιπέδων της νευροϊνιδίνης στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα και μάλιστα με τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο ενεργοποίησης της PKCε. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης στο εξεταζόμενο κατάλοιπο συμβαίνει τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα και μάλιστα, όπως αναμέναμε, αυξάνεται όσο αυξάνεται ο χρόνος επίδρασης με το πεπτιδίο ψεRACK (Σχήμα 27). Τα πυρηνικά επίπεδα της νευροϊνιδίνης αυξάνονται σημαντικά μετά από 10 λεπτά επώασης με ψεRACK αλλά αυξάνονται περαιτέρω όταν η επώαση γίνεται για 30 λεπτά όπου το ποσοστό των ενεργοποιημένων PKCε μορίων - και συνεπώς της φωσφορυλιωμένης νευροϊνιδίνης- είναι μεγαλύτερο (Σχήμα 26). Στο κυτταρόπλασμα, τώρα, τα επίπεδα της νευροϊνιδίνης, μετά τη φωσφορυλίωση του καταλοίπου Ser2808 από PKCε, αυξάνονται σημαντικά και παραμένουν αυξημένα ακόμη και μετά από 30 λεπτά επίδρασης με ψεRACK. Εν τούτοις, τα επίπεδα μεταξύ της επίδρασης των 10 και των 30 λεπτών δε διαφέρουν σημαντικά, αποτέλεσμα που πιθανώς σχετίζεται με πυρηνική εισροή της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, εξετάσαμε τον τρόπο με τον οποίο η φωσφορυλίωση στο συγκεκριμένο κατάλοιπο (Ser2808) επηρεάζει την πυρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση της νευροϊνιδίνης -γνωρίζοντας ότι η φωσφορυλίωση από PKCε συσσωρεύει τη νευροϊνιδίνη στο πυρήνα- και βρήκαμε ότι η PKCε-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης στη Ser2808 είναι υπεύθυνη για την είσοδο και τη διατήρηση της νευροϊνιδίνης στον πυρήνα (Σχήμα 28). Τέλος, τα βιοχημικά αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με ανάλυση μονήρων κυττάρων μετά από ανοσοφθορισμό και παρατήρηση στο μικροσκόπιο του υποκυτταρικού εντοπισμού της νευροϊνιδίνης (Σχήμα 29).

Συνολικά, λοιπόν, αποδείξαμε ότι η PKCε φωσφορυλιώνει τη νευροϊνιδίνη στο κατάλοιπο Ser2808, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση και συνεπώς την αύξηση της αφθονίας της νευροϊνιδίνης στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα με τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο. Τα αποτελέσματά μας προσδίδουν ένα διαφορετικό ρόλο στη φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης από PKC που αρχικά διαφωνεί με τη διαπίστωση ότι η PKCα προάγει την - εξαρτώμενη από πρωτεάσωμα- αποδόμηση της νευροϊνιδίνης [276]. Δεν πρέπει, όμως, να λησμονούμε ότι η φωσφορυλίωση που οδηγεί στην αποικοδόμηση της νευροϊνιδίνης μπορεί να μην αφορά στο κατάλοιπο Ser2808 και να συμβαίνει στην πληθώρα άλλων θέσεων φωσφορυλίωσης από PKC που περιέχει η νευροϊνιδίνη. Άλλωστε, η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης, από PKC και ειδικά PKCε, σε μη καρκινικά κύτταρα όπως μελανοκύτταρα [277] και νευρώνες [83] έχειδειχθεί ότι προσφέρει στην πρωτεΐνη αυξημένη σταθερότητα.

Επιπλέον, προτείνουμε ότι η συγκεκριμένη φωσφορυλίωση, αποτελεί πιθανό μηχανισμό ρύθμισης της πυρηνο-κυτταροπλασματικής διακίνησης της νευροϊνιδίνης με τα φωσφορυλιωμένα μόρια πρωτεΐνης να συσσωρεύονται στον πυρήνα. Εξάλλου, είναι πλέον αποδεκτό ότι η διακίνηση πρωτεϊνών από και προς τον πυρήνα επηρεάζεται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μέσα ή κοντά στις αλληλουχίες εισόδου/εξόδου. Στις τροποποιήσεις αυτές περιλαμβάνονται φωσφορυλιώσεις, ουβικιτινυλιώσεις, γλυκοζυλιώσεις και σουμοϋλιώσεις, οι οποίες ελέγχονται από πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια [20]. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στη στερεοδιάταξη των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την αποκάλυψη ή απόκρυψη κάποιου επίτοπου, δημιουργώντας τη δυνατότητα νέων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων [18].

4.3. Σημασία της αλληλεπίδρασης της PKCε με τη νευροϊνιδίνη στη διαδικασία πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων γλοίας

Αφού εδραιώσαμε το ρόλο της PKCε στη διαφοροποίηση καρκινικών κυττάρων και συσχέτισαμε τη λειτουργία της με τη ρύθμιση της ογκοκατασταλτικής νευροϊνιδίνης σε μετα-μιτωτικό περιβάλλον θελήσαμε να

μελετήσουμε τις σημαντικές, αυτές, πρωτεΐνες και την αλληλεπίδρασή τους σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται. Εξάλλου, η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός αποτελούν τις δύο όψεις του ίδιου νομίσματος, δηλαδή της καρκινικής εξαλλαγής. Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη και ακριβής διαδικασία. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια, πλήθος ογκοκατασταλικών πρωτεϊνών, όπως το BRCA1 και το APC, φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμισή του [333, 334]. Ένα σημαντικό ζητούμενο, λοιπόν, ήταν να μελετηθεί ο κυτταρικός κύκλος καρκίνων του ΚΝΣ και ο ρόλος των PKCε και νευροϊνιδίνης σε αυτόν.

Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος SF268 αφού τα γλοιοβλαστώματα είναι ο συνηθέστερος τύπος πρωτογενών καρκίνων του εγκεφάλου, ενώ, πρόσφατες γενωμικές μελέτες προφίλ έδειξαν ότι η νευροϊνιδίνη είναι μια *bona fide* ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη γλοιοβλαστώματος [203]. Άλλωστε, τα κύτταρα SF268 εκφράζουν σε ηρεμία μεγάλες ποσότητες PKCε αλλά και την ενεργοποιημένη μορφή της, P-PKCε (Σχήμα 30). Πραγματοποιώντας δοκιμασίες πολλαπλασιασμού (proliferation assays) κατορθώσαμε να υπολογίσουμε με ακρίβεια το χρόνο διπλασιασμού και τη διάρκεια της κάθε φάσης του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων SF268 (Σχήμα 31). Προκειμένου να μελετηθούν τα γεγονότα του κυτταρικού κύκλου τα κύτταρα συγχρονίστηκαν με τη χρήση ενός δημοσιευμένου πρωτόκολλου διπλού μπλοκ θυμιδίνης και νοκοδαζόλης [314] το οποίο και προσαρμόστηκε στον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων SF268 (Σχήμα 32). Το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο συγχρόνισε τα κύτταρα γλοιοβλαστώματος επιτυχώς όπως αποδείχθηκε εξετάζοντας ειδικούς δείκτες του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 33).

Μελέτη των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων της PKCε σε συγχρονισμένα κύτταρα έδειξε όμοιο μοτίβο ρύθμισης (Σχήμα 34). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της PKCε παραμένουν χαμηλά σε όλη τη διάρκεια της σύνθεσης, αλλά, αυξάνονται δραματικά μετά την είσοδο των κυττάρων στη G2 φάση και παραμένουν υψηλά μέχρι και το πέρας της μίτωσης. Πιο σημαντικά, η φωσφορυλίωση της PKCε στη Ser729, το κατάλοιπο στο υδροφοβικό μοτίβο που αποτελεί σημαντικό έναυσμα για την καταλυτική ενεργότητά της, ακολουθεί το ίδιο μοτίβο (Σχήμα 34). Πολλές μελέτες έχουν συνδέσει την PKCε με ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση και δημιουργία όγκων

σε γυμνά ποντίκια [167, 168]. Η ισομορφία αυτή φαίνεται να παίζει ρόλο στον κυτταρικό κύκλο αφού υπερέκφραση της κυρίαρχα αρνητικής μορφής της παρεμπόδισε τον πολλαπλασιασμό των U-373MG κυττάρων γλοιοβλαστώματος [181], ενώ, σε ινοβλάστες, υπερέκφραση της συνεχώς ενεργούς μορφής της PKCε είχε ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη μεταγραφή της κυκλίνης D1 [301], η οποία φαίνεται ότι διαμεσολαβείται από το μετασχηματισμένο Ha-Ras και είναι εξαρτώμενη από MEK και Rac [352]. Αντίθετα, σε χαμηλή πυκνότητα πληθυσμού NIH3T3 ινοβλαστών, η PKCε είναι υπεύθυνη για την προκαλούμενη από TPA αναστολή ανάπτυξης [353]. Η αυξημένη έκφραση και ενεργοποίηση της PKCε που παρατηρήθηκε κατά τη μίτωση πιθανώς σχετίζεται με το γεγονός ότι σε μίτωτικά κύτταρα πραγματοποιείται μια σειρά φωσφορυλιώσεων (εξαρτώμενες από p38, GSK3 και PKC) που ενεργοποιούν την PKCε και επάγουν τη δέσμευσή της στην 14-3-3-β πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα την ανεξάρτητη από λιπίδια ενεργότητα της κινάσης [122]. Πιο σημαντικά, απώλεια ή αναστολή αυτού του λειτουργικού συμπλέγματος μεταξύ των δύο πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της αποκοπής των θυγατρικών κυττάρων κατά την κυτοκίνηση [122, 354].

Στη συνέχεια, αποδείξαμε ότι η πρωτεΐνη και το μήνυμα της νευροϊνιδίνης αυξομειώνονται ομοίως κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 35). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των μεταγράφων GRDII και GRDI της νευροϊνιδίνης, διατηρώντας τη 2:1 αναλογία τους, παρέμειναν υψηλά από τη G1/S μετάβαση έως το μέσο της S φάσης, μειώθηκαν σημαντικά από το τέλος της S φάσης και σε όλη τη διάρκεια της G2, ενώ αυξήθηκαν δραματικά στη μίτωση. Ωστόσο, μετά το τέλος της μίτωσης και την εισαγωγή στη G1 φάση τα επίπεδα των μεταγράφων μειώθηκαν πάλι. Αντίστοιχες αυξομειώσεις παρατηρήθηκαν και στα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της νευροϊνιδίνης (Σχήμα 35). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p120GAP, η δεύτερη πιο γνωστή RasGAP, δεν αλλάζουν σημαντικά κατά τον κυτταρικό κύκλο (Σχήμα 35) υποδεικνύοντας ότι η ρύθμιση της νευροϊνιδίνης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου είναι ειδικό γεγονός και δεν αντικατοπτρίζει μια γενική επίδραση στις RasGAPs του κυττάρου.

Άλλωστε, αυτή δε είναι η πρώτη φορά που παρατηρείται διαφορετική ρύθμιση των δύο βασικότερων RasGAP του κυττάρου κατά τη διάρκεια του

πολλαπλασιασμού. Κατά τη μετάβαση ανθρωπίνων ινοβλαστών από τον πολλαπλασιασμό στη φάση G0 όπου σταματά η ανάπτυξη (G0/G1), η ποσότητα της p120GAP μειώνεται στο μισό, ενώ, τα επίπεδα της νευροϊνιδίνης παραμένουν σταθερά [355]. Στην ίδια μελέτη, διαφορές παρατηρήθηκαν και στη συνεισφορά κάθε μιας από τις δύο πρωτεΐνες στη συνολική ενεργότητα RasGAP, με την p120GAP να κατέχει το 84% της ενεργότητας σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και το 53% σε κύτταρα που βρίσκονται στη G0 φάση και τη νευροϊνιδίνη να συνεισφέρει μόλις το 15% της RasGAP ενεργότητας ανεξάρτητα της εξόδου από τον πολλαπλασιασμό [355].

Ασθενείς με μεταλλαγές στο γονίδιο *NF1*, που κωδικοποιεί τη νευροϊνιδίνη, παρουσιάζουν προδιάθεση για μια σειρά από κακοήθειες του Κεντρικού και του Περιφερικού νευρικού συστήματος. Απλοανεπάρκεια του γονιδίου *NF1* επιτρέπει την ανάπτυξη ογκογενούς περιβάλλοντος μεταβάλλοντας τα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια [200, 356], ωστόσο, οι υπεύθυνοι για την καρκινογόνο δράση ενδοκυττάριοι μηχανισμοί είναι ασαφείς. Συγκεκριμένα στον εγκέφαλο απώλεια του ενός αλληλίου της νευροϊνιδίνης έχει ως αποτέλεσμα τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των αστροκυττάρων [357], αύξηση που αφορά μόνο τα μεταλλαγμένα κύτταρα, και όχι κύτταρα παρακείμενων ιστών (cell-autonomous), και πραγματοποιείται μέσω των μονοπατιού μεταγωγής σήματος που εμπλέκεται το p21-Ras [246]. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα, ογκογόνες μεταλλαγές στο γονίδιο του Ras και μειωμένη ή ανύπαρκτη νευροϊνιδίνη ευνοούν τη μόνιμη διέγερση του Raf/MEK/ERK μονοπατιού που οδηγεί σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό [285, 286]. Έτσι, λοιπόν, προτάθηκε ότι η συχνή εμφάνιση όγκων οφείλεται στην ογκοκατασταλτική ιδιότητα της νευροϊνιδίνης, να απενεργοποιεί την σηματοδοτική ογκοπρωτεΐνη Ras η οποία ελέγχει τη δραστικότητα των MAPK. Εκτός, όμως, από το MAPK μονοπάτι, το Ras ενεργοποιεί και άλλα μόρια τελεστές όπως την κινάση φωσφατυδιλινοσιτόλης 3 (PI3K), το Rac και το διεγέρτη αποσύνδεσης από GDP Ral, όλα μόρια που σχετίζονται με πολλαπλασιασμό ή αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού [292]. Μάλιστα, έχει δειχθεί ότι ο εξαρτώμενος από Ras υπερπολλαπλασιασμός των μαστικών κυττάρων που είναι ετερόζυγα για *NF1* διαμεσολαμβάνεται από την, αιματοποιητική Rho GTPase, Rac 2 η οποία αποτελεί ρυθμιστή της

διασταυρούμενης αλληλεπίδρασης των PI3K και Ras-Raf-MEK-ERK μονοπατιών [358]. Εν τούτοις, δεν έχει διαπιστωθεί αν η νευροϊνιδίνη σχετίζεται άμεσα με τη ρύθμιση τον κυτταρικού κύκλου. Πολύ πρόσφατα, μελέτες του μεταγραφικού προφίλ ολόκληρου του γονιδιώματος σε σωματικά, μη καρκινικά κύτταρα λεμφοβλαστώματος από ανθρώπους και μύες (*NF1+/-*) που πάσχουν από *NF1* έδειξαν αυξημένη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, τη μίτωση, αλλά και την επιδιόρθωση του DNA [359].

Παρόλο που τόσο η αφθονία της PKCε όσο και της νευροϊνιδίνης εξαρτάται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου, οι χρονικές στιγμές αυξομείωσης δε φαίνεται να συμπίπτουν για τις δύο πρωτεΐνες. Προκειμένου να εξετάσουμε αν οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, μελετήσαμε την κατάσταση φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης από PKC κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 36). Βρήκαμε ότι τα βασικά επίπεδα φωσφορυλίωσης, στη Ser2808, που παρατηρούνται από τη G1/S μετάβαση αλλά και σε όλη την S φάση αυξάνονται σημαντικά με την είσοδο των κυττάρων στην G2 φάση, ενώ, η αύξηση κορυφώνεται στην αρχή της μίτωσης. Μάλιστα, μετά το τέλος της μίτωσης και την είσοδο στη G1 φάση τα επίπεδα φωσφορυλίωσης μειώνονται πάλι και πλησιάζουν τα επίπεδα της S φάσης (Σχήμα 36). Η έντονη φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης στη G2 φάση και τη μίτωση συμπίπτει απόλυτα με τη δραματική άνοδο των επιπέδων και την ενεργοποίηση της PKCε (Σχήμα 34), γεγονός που υποδεικνύει ότι η υπεύθυνη, για τη φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης, ισομορφή πιθανώς είναι η PKCε. Συνεπώς, υπάρχουν ενδείξεις ότι η νευροϊνιδίνη και η PKCε αλληλεπιδρούν και κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων γλοιοβλαστώματος. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση στο συγκεκριμένο κατάλοιπο από PKCε έχουμε, προηγουμένως, αποδείξει ότι σχετίζεται με αυξημένη πρωτεϊνική σταθερότητα της νευροϊνιδίνης. Έτσι, λοιπόν, οδηγηθήκαμε στην υπόθεση ότι η νευροϊνιδίνη πρέπει να συντελεί σημαντικό ρόλο στη μίτωση και για αυτό παραμένει στη μέγιστη δυνατή πρωτεϊνική της σταθερότητα (μέσω φωσφορυλίωσης από PKC).

Η μόνη λειτουργική ιδιότητα που έχει αποδοθεί ως τώρα στη νευροϊνιδίνη είναι αυτή της RasGAP. Με τα αποτελέσματά μας, για πρώτη φορά αποδεικνύουμε ότι η ογκοκατασταλτική νευροϊνιδίνη ρυθμίζεται με

τρόπο εξαρτώμενο από τον κυτταρικό κύκλο. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η νευροϊνιδίνη φαίνεται να έχει μια νέα λειτουργία στο κυτταρικό κύκλο - ανεξάρτητη με τις μέχρι τώρα λειτουργίες της- μαζί με το γεγονός ότι εντοπίζεται στον πυρήνα φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων [84, 224], δημιουργήσαμε την υπόθεση ότι ο πυρηνικός εντοπισμός της νευροϊνιδίνης μπορεί να σχετίζεται με καινοφανείς λειτουργίες της. Προκειμένου να εξερευνήσουμε το ρόλο της πυρηνικής νευροϊνιδίνης στον κυτταρικό κύκλο, αρχικά εξετάσαμε τον υποπυρηνικό εντοπισμό της. Αποδείξαμε ότι το μεγαλύτερο μέρος της πυρηνικής νευροϊνιδίνης συνεντοπίζεται με τις λαμίνες στην πυρηνική θεμέλια ουσία (Σχήμα 37). Πραγματοποιώντας πειράματα υποπυρηνικής κλασμάτωσης και ανοσοκυτταροχημείας αποδείξαμε ότι η νευροϊνιδίνη εντοπίζεται κυρίως στην πυρηνική θεμέλια ουσία, όπου οι λαμίνες A και C είναι επίσης εμπλουτισμένες και στο κλάσμα του πυρηνικού φακέλου. Την τελευταία δεκαετία, αυξανόμενο πλήθος μελετών έχει αποδείξει ότι πολλές ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων οι p53, BRCA1, PTEN [18] και NF2 [19], μπορούν να εκτελούν διακριτές και ανεξάρτητες λειτουργίες εντός και εκτός του πυρήνα. Η πυρηνική μεταφορά, λοιπόν, έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας θεμελιώδης και κρίσιμος μηχανισμός για τη ρύθμιση όχι μόνο του εντοπισμού αλλά και της λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτών [20]. Μάλιστα, η απορρύθμιση της πυρηνικής μεταφοράς έχει ως αποτέλεσμα τη λανθασμένη στόχευση και διαταραχή της λειτουργίας μιας πληθώρας πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων και των ογκοκατασταλτικών. Η λανθασμένη στόχευση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, μπορεί να έχει ολέθριες συνέπειες για το κύτταρο και δυνητικά οδηγεί στην έναρξη και εξέλιξη του καρκίνου [18].

Προηγούμενες μελέτες από το εργαστήριό μας, με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας, ανέφεραν ότι η υποκυτταρική μετακίνηση της νευροϊνιδίνης σε μετα-μιτωτικούς νευρώνες ρυθμίζεται αναπτυξιακά [224]. Σε ασυγχρόνιστες καλλιέργειες διαιρούμενων κυττάρων, η νευροϊνιδίνη συνεντοπίζεται και δεσμεύεται με τον κυτταροσκελετό και είναι εμπλουτισμένη στην πλασματική μεμβράνη, τα μεμβρανικά οργανίδια, τα μιτοχόνδρια καθώς και τον πυρήνα. Το σημαντικό, όμως, είναι ότι ο εντοπισμός της νευροϊνιδίνης μπορεί να ποικίλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των κυττάρων, από κυρίως πυρηνικός σε αποκλειστικά κυτταροπλασματικός. Αποδείξαμε ότι η

παρατηρούμενη ετερογένεια, ακόμα και στην ίδια κυτταρική σειρά, μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική φάση του κυτταρικού κύκλου που βρίσκεται κάθε κύτταρο. Πειράματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης έδειξαν ότι η νευροϊνιδίνη έχει μια δυναμική υποκυτταρική κατανομή που ρυθμίζεται από τον κυτταρικό κύκλο (Σχήμα 38). Η νευροϊνιδίνη είναι αποκλειστικά κυτταροπλασματική κατά τη G1/S μετάβαση, αλλά καθώς τα κύτταρα περνούν στην S φάση αρχίζει να εισέρχεται στον πυρήνα για να γίνει κυρίως πυρηνική κατά τη διάρκεια της G2 φάσης και μέχρι την G2/M μετάβαση. Τα τελευταία χρόνια αποδεικνύεται ότι όλο και περισσότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια ρυθμίζουν την πυρηνο-κυτταροπλασματική τους διακίνηση με βάση τον κυτταρικό κύκλο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η merlin το προϊόν του γονιδίου της Νευροϊνωμάτωσης τύπου 2 [360], το TTC4 (Tetratricopeptide Repeat Domain Protein 4) που σχετίζεται με το μετασχηματισμό των μελανοκυττάρων [361], η σχετιζόμενη με το ρετινοβλάστωμα πρωτεΐνη p130/RBL2 [362], και το ογκοκατασταλτικό WTX του όγκου Wilms [363]. Είναι σαφές ότι η αυξημένη πυρηνική εισροή και κατακράτηση της νευροϊνιδίνης στη G2 φάση συμπίπτει με τη σημαντική αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσής της από PKC (Σχήμα 36). Η φωσφορυλίωση, ειδικά κοντά σε πυρηνικά σήματα εισόδου ή εξόδου, έχει δείξει ότι ρυθμίζει την πυρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση μεταγραφικών παραγόντων και ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών [364, 365]. Συγκεκριμένα, η, εξαρτώμενη από Akt, φωσφορυλίωση της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων FOXO επάγει την έξοδό τους από τον πυρήνα [366, 367]. Ομοίως, η, επαγόμενη από βλάβη στο DNA, φωσφορυλίωση του p53 στις θέσεις Ser15 και Ser20, που βρίσκονται μέσα στο N-τελικό NES της πρωτεΐνης, εμποδίζει την πυρηνική εξαγωγή [368] υποδεικνύοντας κάλυψη του NES (NES masking). Από την άλλη, φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο Ser2054, που είναι πιθανή θέση φωσφορυλίωσης από πρωτεϊνική κινάση A (PKA), του Adenomatous Polyposis Coli (APC) επηρεάζει αρνητικά την πυρηνική εισαγωγή της πρωτεΐνης [369]· ενώ, CK2-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση στη θέση Ser2034 προάγει τον πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης [370]. Όσον αφορά τη νευροϊνιδίνη, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι φωσφορυλίωση από PKC στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης σχετίζεται με τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό της πρωτεΐνης [84].

Με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου της πυρηνικής εισόδου της νευροϊνιδίνης και λαμβάνοντας υπόψη το συνεντοπισμό της με την πυρηνική θεμέλια ουσία, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης της νευροϊνιδίνης με τις λαμίνες A, B, C που έδειξαν ότι η νευροϊνιδίνη αλληλεπιδρά μόνο με τις λαμίνες τύπου A και, πιο σημαντικά, απέδειξαν ότι η αλληλεπίδραση αυτή εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο (Σχήμα 39). Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση διαρκεί από τη G1/S μετάβαση και σε όλη τη διάρκεια της S φάσης, κορυφώνεται κατά την έναρξη της G2 φάσης, όπου η νευροϊνιδίνη είναι κυρίως πυρηνική, ενώ, στη συνέχεια της ίδιας φάσης μειώνεται και τελικά παύει να υφίσταται με την έναρξη αλλά και σε όλη τη διάρκεια της μίτωσης, όπου ο πυρηνικός φάκελος διαλύεται. Αν και η νευροϊνιδίνη συσχετίζεται στενά με τον κυτταροσκελετό και μάλιστα έχει βρεθεί ότι δεσμεύει τα ενδιάμεσα ινίδια των κερατινών [371], αυτή είναι η πρώτη φορά που περιγράφεται *in vivo* αλληλεπίδραση με τα πυρηνικά ενδιάμεσα ινίδια.

Δεδομένων των υψηλών επιπέδων έκφρασης και φωσφορυλίωσης της νευροϊνιδίνης κατά τη διάρκεια της μίτωσης καθώς και της αυξημένης πυρηνικής εισόδου της στη G2 φάση, ακριβώς πριν τη μίτωση, εξετάσαμε τον υποκυτταρικό εντοπισμό της νευροϊνιδίνης σε μιτωτικά κύτταρα με ανοσοκυτταροχημεία. Αποδείξαμε για πρώτη φορά ότι η νευροϊνιδίνη αποτελεί μέρος του μιτωτικού μηχανισμού. Διαπιστώσαμε ότι η νευροϊνιδίνη συνεντοπίζεται με τις α- β- και γ-τουμπουλίνες στη μιτωτική συσκευή (Σχήμα 40) κατά τη διάρκεια όλων των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Μάλιστα, η ιδιότητα, αυτή, της νευροϊνιδίνης να εντοπίζεται στη μιτωτική συσκευή δεν είναι ίδιοι των καρκινικών κυττάρων αφού όμοια αποτελέσματα λάβαμε μετά από μελέτη GFAP θετικών αστροκυττάρων επίμυος (Σχήματα 44 και 45). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, η νευροϊνιδίνη έχει αναγνωρισθεί με πρωτεομική ανάλυση ως πρωτεΐνη που εντοπίζεται στη μιτωτική άτρακτο [372] και μάλιστα έχουν ανιχνευθεί πλήθος φωσφορυλιωμένων σερινών και θρεονινών στις CSRD και CTD περιοχές της κατά τη διάρκεια της μίτωσης [372, 373, 374]. Δύο χαρακτηριστικές θέσεις φωσφορυλίωσης στο CTD αποτελούν οι Ser2521 [373] και Ser2597 [374], οι οποίες είναι προβλεπόμενες θέσεις φωσφορυλίωσης από τη μιτωτική κινάση Aurora A. Επιπλέον, η Ser2188 της νευροϊνιδίνης, ένα κατάλοιπο ακριβώς πριν τη C-

τελική περιοχή της πρωτεΐνης και μία προβλεπόμενη θέση φωσφορυλίωσης από CamKII, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της μίτωσης αφού: **α)** τουλάχιστον τρεις διαφορετικές μελέτες έχουν ανιχνεύσει τη θέση αυτή φωσφορυλιωμένη κατά τη διάρκεια της μίτωσης [372, 373, 374] και μάλιστα στη νευροϊνιδίνη που βρίσκεται πάνω στη μιτωτική άτρακτο [372] και **β)** σε φωσφοπρωτεομική ανάλυση της πρώιμης μιτωτικής ατράκτου, προτάθηκε ότι η συγκεκριμένη φωσφορυλίωση διαμεσολαβείται από ή συμβαίνει υπό τον έλεγχο της κεντροσωματικής κινάσης Plk1 (Polo-like kinase 1) [375]. Η έκφραση, η ενεργότητα και ο εντοπισμός της Plk1 ρυθμίζονται δυναμικά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και, ανάμεσα σε άλλες λειτουργίες της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η Plk-1 επάγει την είσοδο των κυττάρων στη μίτωση ενεργοποιώντας το σύμπλεγμα Cyclin B/Cdk1, ρυθμίζει το σχηματισμό της ατράκτου μέσω της ωρίμανσης και του διαχωρισμού των κεντροσωμάτων αλλά και με απευθείας αλληλεπίδραση με την τουμπουλίνη, και ελέγχει την ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων [376].

Άλλωστε, ο εντοπισμός των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών στη μιτωτική άτρακτο και ο συσχετισμός τους με τους μικροσωληνίσκους είναι συχνό φαινόμενο. Οι BRCA1, merlin και APC έχει δειχθεί ότι εντοπίζονται στη μιτωτική άτρακτο. Η BRCA1 αλληλεπιδρά με το BARD1 για να προάγει τη συναρμολόγηση των μιτωτικών πόλων και τη συσσώρευση του TPX2, ενός σημαντικού οργανωτή της ατράκτου, σε αυτούς. Η λειτουργία, αυτή, είναι ανεξάρτητη από το κεντρόσωμα και εξαρτάται από την ενεργότητα λιγάσης του BRCA1/BARD1 συμπλέγματος [377]. Το APC είναι απαραίτητο για το σχηματισμό γερών ατράκτων σε εκχυλίσματα από αυγά *Xenopus*, αφού αφαίρεση του μειώνει τον αριθμό των μικροσωληνίσκων και αλλάζει τη μορφολογία του δικτύου τους στις ατράκτους [378]. Μάλιστα, το APC έχει αποδειχθεί ότι δεσμεύει και σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους *in vitro* and *in vivo* [379] με έναν εξαρτώμενο από importin-b-RanGTP τρόπο [380]. Τέλος, η merlin δεσμεύεται και αυξάνει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων [381].

Η αλληλεπίδραση της νευροϊνιδίνης με τους μικροσωληνίσκους είναι πια εδραιωμένη [224, 297]. Έχουν βρεθεί τουλάχιστον 2 περιοχές της νευροϊνιδίνης, η RasGAP [382] και η SEC14 [265] που δεσμεύονται στην τουμπουλίνη. Μάλιστα, η δέσμευση στην τουμπουλίνη έχει αποδειχθεί ότι

αναστέλλει την ενεργότητα RasGAP της GRDI περιοχής και της ενδογενούς νευροϊνιδίνης *in vitro* [269, 296]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η νευροϊνιδίνη, όπως και η merlin που επίσης εντοπίζεται στη μιτωτική άτρακτο κατά τη μίτωση [360, 381], αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη κινεσίνη-1 (kinesin-1), η οποία είναι κινητική πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων [383]. Εξετάζοντας ξεχωριστά τις περιοχές της νευροϊνιδίνης βρήκαμε ότι όλες οι CTD, GRDI, GRDII, και SEC14 περιοχές σχηματίζουν σύμπλοκα με τις α-, β- και γ-ισομορφές της τουμπουλίνης, σε ασυγχρόνιστα κύτταρα (Σχήμα 46).

Η νευροϊνιδίνη έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά άμεσα με τη CRMP-2 (Collapsin response mediator protein-2) στον εγκέφαλο [384], αλληλεπίδραση που έχει ως αποτέλεσμα της φωσφορυλίωση της CRMP-2 και τη νευριτική ανάπτυξη σε διαφοροποιούμενα PC12 κύτταρα [284]. Μηχανιστικά, η διαμεσολαβούμενη από νευροϊνιδίνη και CRMP-2 νευριτική ανάπτυξη συμβαίνει εξαιτίας της ικανότητας της CRMP-2, που επίσης έχει ενεργότητα GAP, να προάγει τη συναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων [385] αλλάζοντας την ενεργότητα GTPάσης της τουμπουλίνης στον αναπτυσσόμενο άξονα [386]. Με δεδομένη την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών σε διαφοροποιημένα κύτταρα, τη στενή σχέση τους με την τουμπουλίνη και το γεγονός ότι η CRMP-2 έχει βρεθεί ότι εντοπίζεται στη μιτωτική άτρακτο [387] και ρυθμίζει τον πολυμερισμό των αστρικών μικροσωληνίσκων και τη θέση των πόλων της ατράκτου [388], είναι πιθανό ότι η νευροϊνιδίνη μπορεί να ρυθμίζει τις μιτωτικές δράσεις της CRMP-2. Άλλωστε, η τουμπουλίνη είναι μια GTPάση και είναι δελεαστικό να προταθεί ότι η αλληλεπίδραση νευροϊνιδίνης και τουμπουλίνης οφείλεται στη GAP ενεργότητα της πρώτης. Ανεξαρτήτως του μηχανισμού δέσμευσης στους μικροσωληνίσκους, είναι πιθανό ότι η πλειονότητα των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών που δένονται σε αυτούς, δρουν ως ασθενείς σταθεροποιητές τους. Έτσι, απώλεια της λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών μειώνει τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων σε βαθμό που επηρεάζει τις κυτταρικές διεργασίες, αλλά, δε μετασχηματίζει το κύτταρο σε κακοήθες. Αυτή η παρατήρηση εξηγεί επίσης το λόγο που ο σχηματισμός όγκων στη Νευροϊνωμάτωση ακολουθεί την υπόθεση «δύο-χτυπημάτων» του Knudson.

Το ερώτημα που μένει να απαντηθεί είναι αν οι μιτωτικές δράσεις τις νευροϊνιδίνης, υπό τον έλεγχο της PKCε, σχετίζονται με τη RasGAP

ενεργότητά της ή εισαγάγουν μια νέα λειτουργία της πρωτεΐνης ανεξάρτητη από το Ras. Έχει αποδειχθεί ότι προκειμένου να ρυθμιστεί η οργάνωση του κυτταροσκελετού, στο *S. pombe*, το Ras1 αλληλεπιδρά με τη Scd1, πρωτεΐνη που έχει ενεργότητα GEF, εντοπίζεται και επηρεάζει τη διαμόρφωση της μιτωτικής ατράκτου [389, 390]. Στα θηλαστικά, ακόμη ένας ρυθμιστής του Ras, ο RGS14 (Regulator of G-Protein Signaling 14) [391], αποτελεί μία πρωτεΐνη της μιτωτικής ατράκτου και μάλιστα σημαντική για την πρώτη διαίρεση του ζυγωτού [392]. Το ίδιο το Ras δεν έχει βρεθεί ποτέ στη μιτωτική άτρακτο αλλά έχει αποδειχθεί ότι οξεία ενεργοποίηση του ογκογόνου H-Ras^{V12} αυξάνει τη συχνότητα της χρωμοσωμικής απόκλισης (misalignment), το σχηματισμό πολλαπλών μιτωτικών ατράκτων, τον πολλαπλασιασμό των κεντροσωμάτων και το σχηματισμό μικρο-πυρήνων (micronuclei) στους πρώτους κυτταρικούς κύκλους των PCCL3 κυτάρων θυρεοειδούς [393], ενώ είναι υπεύθυνο για την επιταχυμένη μετάβαση από τη G2 στη μίτωση και προκαλεί ατέλειες στα σημεία ελέγχου της G2, της βλάβης DNA και της μιτωτικής ατράκτου [394]. Επιπλέον, μονοπάτια που ελέγχει το Ras έχουν συσχετιστεί άμεσα με ατέλειες της μιτωτικής διαδικασίας [395]. Μελλοντικά πειράματα αναμένεται να υποδείξουν επιπλέον αλληλεπιδράσεις και τροποποιήσεις της νευροϊνιδίνης που πιθανόν θα αναδείξουν τον ακριβή ρόλο της πρωτεΐνης στη μιτωτική διαδικασία.

Μεταξύ όλων αυτών των γεγονότων μεταγωγής σήματος, υποκυτταρικού εντοπισμού, και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, η ρύθμιση της νευροϊνιδίνης από την PKCε φαίνεται ως κομβικό και θεμελιώδες χαρακτηριστικό, σε δύο από τις βασικότερες κυτταρικές διαδικασίες, της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα του νευρικού συστήματος. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αφενός προσθέτουν νέα γνώση για την αλληλεπίδραση της PKCε και της νευροϊνιδίνης σε αυτές τις θεμελιώδεις διεργασίες, διατάραξη των οποίων οδηγεί στην ογκογένεση, και αφετέρου αποτελούν έναυσμα για περαιτέρω μελέτη ενός νέου και ανεξερεύνητου ρόλου της ογκοκατασταλτικής νευροϊνιδίνης στη μιτωτική διαδικασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η εμπλοκή της PKCε στην ογκογένεση του νευρικού συστήματος μέσω αλληλεπίδρασής της με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη νευροϊνιδίνη και το MAPK/ERK μονοπάτι μεταγωγής σήματος και ρύθμισης των διαδικασιών του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Αρχικά, χρησιμοποιώντας φαρμακολογικές προσεγγίσεις, μελετήθηκε το πώς επιδρά η ενεργοποίηση της ενδογενούς PKCε σε ένα συχνό και με κακή πρόβλεψη καρκίνο του ΠΝΣ, τον κακοήγη όγκο των περιφερικών νευρικών ελύτρων. Αποδείχθηκε ότι η ενεργοποίηση της PKCε προάγει την κυτταρική διαφοροποίηση και την απώλεια του διεισδυτικού φαινοτύπου στα μετασχηματισμένα Schwann κύτταρα. Προκειμένου να μελετηθεί η σημασία αυτής της ενεργοποίησης σε οργανισμικό επίπεδο, κατασκευάστηκαν πολύ σημαντικοί, για φαρμακολογική χρήση και περαιτέρω έρευνα, διπλά σταθερά διαμολυσμένοι καρκινικοί κλώνοι επιθηλιακής και νευρικής προελεύσεως (MCF7, PC3, 90-8 και PC12), όπου η έκφραση της PKCε και της κυρίαρχα αρνητικής μορφής της βρίσκεται υπό το ρυθμιζόμενο έλεγχο δοξυκυκλίνης (Σύστημα Tet-Off). Πριν, όμως μελετηθεί ολόκληρος ο οργανισμός, διαλευκάνθηκε ο μηχανισμός δράσης και οι αλληλεπιδράσεις της PKCε κατά τη διαφοροποίηση σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο. Μελετώντας ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο διαφοροποίησης, αυτό των SHSY-5Y κυττάρων νευροβλαστώματος, δείχθηκε ότι η διαφοροποίηση των κυττάρων νευροβλαστώματος χαρακτηρίζεται από PKCε-εξαρτώμενη μεταγωγή σήματος με ταυτόχρονη εμπλοκή της ERK. Πιο σημαντικά, η φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης από PKC αναγνωρίσθηκε ως κομβικό σημείο στη διαφοροποίηση του νευροβλαστώματος. Η αλληλεπίδραση τη νευροϊνιδίνης και της PKCε μελετήθηκε διεξοδικότερα σε τερματικά διαφοροποιημένους εμβρυικούς νευρώνες φλοιού εγκεφάλου όρνιθας. Βρέθηκε, για πρώτη φορά, ότι η αφθονία της νευροϊνιδίνης στο ΚΝΣ ελέγχεται μέσω της πρωτεασωμικής αποικοδόμησής της στον πυρήνα των νευρώνων υπό τη ρύθμιση της PKCε-εξαρτώμενης φωσφορυλίωσής της στο κατάλοιπο Ser2808. Η φωσφορυλίωση στο συγκεκριμένο κατάλοιπο από PKCε, φαίνεται να ρυθμίζει και την πυρηνο-κυτταροπλασματική διακίνηση της νευροϊνιδίνης. Μελέτη του ρόλου της νευροϊνιδίνης και της φωσφορυλίωσης από PKCε στον πολλαπλασιασμό κυττάρων γλοιοβλαστώματος, ενός καρκίνου του ΚΝΣ, έδειξε, για πρώτη φορά, ότι η νευροϊνιδίνη αυξομειώνεται,

αλλάζει υποκυτταρικό εντοπισμό και αλληλεπιδρά με διαφορετικά μόρια κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Μάλιστα, οι αλλαγές αυτές συνοδεύονται από αντίστοιχες αλλαγές στην PKCε-εξαρτώμενη φωσφορυλίωσή της στη C-τελική ουρά της πρωτεΐνης. Πιο σημαντικά, ανακαλύψαμε ότι η νευροϊνιδίνη συνεντοπίζεται με τη μιτωτική άτρακτο σε όλη τη διάρκεια της μίτωσης των κυττάρων γλοιοβλαστώματος, εύρημα που παρατηρείται και σε φυσιολογικά κύτταρα γλοίας. Συνολικά, τα αποτελέσματά μας απέδειξαν ότι η ενεργοποίηση της PKCε και η αλληλεπίδραση της με τη νευροϊνιδίνη, ρυθμίζει τη διαδικασία της διαφοροποίησης σε μετασχηματισμένα κύτταρα του ΠΝΣ, ενώ, στο ΚΝΣ η PKCε-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της νευροϊνιδίνης στο κατάλοιπο Ser2808 ρυθμίζει την πυρηνική αποικοδόμησή της σε νευρώνες αλλά πιο σημαντικά, τη συμμετοχή της στη θεμελιώδη διαδικασία του πολλαπλασιασμού τόσο φυσιολογικών αστροκυττάρων όσο και καρκινικών κυττάρων γλοιοβλαστώματος.

SUMMARY

In the present study we investigated the involvement of PKC ϵ in nervous system tumorigenesis through its interaction with neurofibromin, a tumor suppressor protein, and MAPK/ERK signaling pathway during proliferation and differentiation processes. Using pharmacological approaches, we first studied the result of endogenous PKC ϵ activation in malignant peripheral nerve sheath tumor, a PNS cancer, and showed that PKC ϵ activation induces cellular differentiation and loss of invasiveness in transformed Schwann cells. To study the significance of this activation in an organismal level we constructed double stable cancer clones of epithelial and neuronal origin, where PKC ϵ and dominant negative PKC ϵ are under doxycycline regulation (Tet-Off system). Before proceeding in animal experiments we elucidated the mechanisms of action and intermolecular interactions of PKC ϵ during neuroblastoma cell differentiation. We found that differentiation in SHSY-5Y cells is characterized by intense, PKC ϵ -dependent signaling and ERK activation. More importantly, PKC-dependent phosphorylation of neurofibromin was recognized as a focal point in neuroblastoma differentiation. We further studied PKC ϵ interaction with neurofibromin in terminally differentiated chick embryo neurons and showed that neurofibromin abundance in the CNS is controlled by nuclear proteasomal degradation, under PKC ϵ regulation. Namely, PKC ϵ -dependent phosphorylation of neurofibromin at Ser2808 offers protein stability and regulates nucleocytoplasmic shuttling of neurofibromin. We, next, assessed the implication of neurofibromin and the importance of its phosphorylation by PKC ϵ in glioblastoma proliferation. We showed, for the first time, that neurofibromin abundance, subcellular localization and intermolecular interactions are regulated during the cell cycle of SF268 CNS tumor cells. Interestingly, we recorded corresponding changes in PKC ϵ -dependent phosphorylation at the C-tail of neurofibromin. More importantly, we showed that neurofibromin co-localizes with the mitotic apparatus during all mitotic phases of both transformed and normal glial cells. Taken together our results proved that PKC ϵ activation and interaction with neurofibromin regulates differentiation of transformed PNS cells, while in the CNS, PKC ϵ -dependent phosphorylation at Ser2808 offers stability and regulates nucleocytoplasmic shuttling of neurofibromin for functions related to mitosis.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kaur G, Han SJ, Yang I, Crane C. Microglia and central nervous system immunity. *Neurosurg Clin N Am* 2010;21(1):43-51.
2. Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT. The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J Clin Neurosci* 2010;17(1):6-10
3. Gourine AV, Kasparov S. Astrocytes as brain interoceptors. *Exp Physiol* 2011;96(4):411-416.
4. Συμεωνίδης Α. Εισαγωγή εις τα νεοπλάσματα, Θεσσαλονίκη 1971
5. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol* 2002;4(4):278-99.
6. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109.
7. Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH. Central nervous system tumors. *Mayo Clin Proc* 2007;82(10):1271-1286.
8. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 1960;25:85-109.
9. Pearson PL, van der Luit RB. The genetic analysis of cancer. *J Int Med* 1998;243(6):413-417.
10. Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M. Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 1982;300(5894):762-765.
11. Shimizu K, Goldfarb M, Suard Y, Perucho M, Li Y, Kamata T, Feramisco J, Stavnezer E, Fogh J, Wigler MH. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80(8):2112-2116.
12. Lee WH. The molecular basis of cancer suppression by the retinoblastoma gene. *Princess Takamatsu Symp.* 1989;20:159-170.
13. Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR, Rinker-Schaeffer CW. Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(21):1717-1730.
14. Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003;94(7):575-581.
15. Markowitz S. DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancers. *J Clin Oncol* 2000;18(21 Suppl):75S-80S.
16. Knudson AG Jr: Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 1985;45(4):1437-1443.

17. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53". *Science* 1990;249(4971):912-915.
18. Fabbro M, Henderson BR. Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Exp Cell Res* 2003;282(2):59-69.
19. Kressel M, Schmucker B. Nucleocytoplasmic transfer of the NF2 tumor suppressor protein merlin is regulated by exon 2 and a CRM1-dependent nuclear export signal in exon 15. *Hum Mol Genet* 2002;11(19):2269-2278.
20. Hood JK, Silver PA. Diverse nuclear transport pathways regulate cell proliferation and oncogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2000;1471(1) M31-M41.
21. Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci* 2008;121(3):249-253.
22. Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 1984;39(3 Pt 2):499-509.
23. Corbett AH, Silver PA. Nucleocytoplasmic transport of macromolecules. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61(2):193-211.
24. Moore MS, Blobel G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* 1993;365(6447):661-663.
25. Fagotto F, Glück U, Gumbiner BM. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol* 1998;8(4):181-190.
26. Fabbro M, Rodriguez JA, Baer R, Henderson BR. BARD1 induces BRCA1 intranuclear foci formation by increasing RINGdependent BRCA1 nuclear import and inhibiting BRCA1 nuclear export. *J Biol Chem* 2002;277(24):21315-21324.
27. Vousden KH, Woude GF. The ins and outs of p53. *Nat Cell Biol* 2000;2(10):E178-80.
28. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj JW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 1997;90(6):1051-1060.
29. Wolff B, Sanglier JJ, Wang Y. Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: Inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Rev protein and Revdependent mRNA. *Chem Biol* 1997;4(2):139-147.
30. Kudo N, Wolff B, Sekimoto T, Schreiner EP, Yoneda Y, Yanagida M, Horinouchi S, Yoshida M. Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res* 1998;242(2):540-547.
31. Yang J, Bardes ES, Moore JD, Brennan J, Powers MA, Kornbluth S. Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* 1998;12(14):2131-43.

32. Michael WM, Choi M, Dreyfuss G. A nuclear export signal in hnRNPA1: A signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 1995;83(3):415-422.
33. Michael WM, Eder PS, Dreyfuss G. The K nuclear shuttling domain: A novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J* 1995;16(12) 3587-3598.
34. Fan XC, Steitz JA. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(26):15293-15298.
35. Henderson BR, Eleftheriou A. A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Exp Cell Res* 2000;256(1) 213-224.
36. Faustino RS, Nelson TJ, Terzic A, Perez-Terzic C. Nuclear transport: target for therapy. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81(6):880-886.
37. Zhu J, McKeon F. NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature* 1999;398(6724):256-260.
38. Berthelsen J, Kilstrup-Nielsen C, Blasi F, Mavilio F, Zappavigna V. The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes Dev* 1999;13(8):946-953.
39. Smith KJ, Levy DB, Maupin P, Pollard TD, Vogelstein B, Kinzler KW. Wild-type but not mutant APC associates with the microtubule cytoskeleton. *Cancer Res* 1994;54(14):3672-3675.
40. Sengupta S, Vonesch JL, Waltzinger C, Zheng H, Wasylyk B. Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells. *EMBO J* 2000;19(22):6051-6064.
41. Joukov V, Chen J, Fox EA, Green JB, Livingston DM. Functional communication between endogenous BRCA1 and its partner, BARD1, during *Xenopus laevis* development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(21):12078-12083.
42. Chen A, Kleiman FE, Manley JL, Ouchi T, Pan ZQ. Autoubiquitination of the BRCA1/BARD1 RING ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2002;277(24):22085-22092.
43. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007;26(22):3100-3112.
44. Buday L, Downward J. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 1993;73(3):611-20.
45. Scheffzek K, Ahmadian MR, Wittinghofer A. GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem Sci* 1998;23(7):257-262.

46. Stokoe D, McCormick F. Activation of c-Raf-1 by Ras and Src through different mechanisms: activation in vivo and in vitro. *EMBO J* 1997;16(9):2384-2396.
47. Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 1994;265(5174):966-970.
48. Sharp LL, Schwarz DA, Bott CM, Marshall CJ, Hedrick SM. The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment. *Immunity* 1997;7(5):609-18.
49. Whalen AM, Galasinski SC, Shapiro PS, Nahreini TS, Ahn NG. Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Cell Biol* 1997;17(4):1947-58.
50. Wood KW, Qi H, D'Arcangelo G, Armstrong RC, Roberts TM, Halegoua S. The cytoplasmic raf oncogene induces a neuronal phenotype in PC12 cells: a potential role for cellular raf kinases in neuronal growth factor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(11):5016-5020
51. Olsson AK, Nanberg E. A functional role for ERK in gene induction but not in neurite outgrowth in differentiating neuroblastoma cells. *Exp Cell Res* 2001;265(1):21-30.
52. Hynds DL, Spencer ML, Andres DA, Snow DM. Rit promotes MEK-independent neurite branching in human neuroblastoma cells. *J Cell Sci* 2003;116(10):1925-1935.
53. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signalling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 1995;80(2):179-185.
54. Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, Pawson T, Greene LA, Kaplan DR. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* 1994;12(3):691-705.
55. Obermeier A, Bradshaw RA, Seedorf K, Choidas A, Schlessinger J, Ullrich A. Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. *Embo J* 1994;13(7):1585-90.
56. Santos SD, Verveer PJ, Bastiaens PI. Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat Cell Biol* 2007;9(3):324-330.
57. von Kriegsheim A, Baiocchi D, Birtwistle M, Sumpton D, Bienvenut W, Morrice N, Yamada K, Lamond A, Kalna G, Orton R, Gilbert D, Kolch W. Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nat Cell Biol* 2009;11(12):1458-1464.
58. Dikic I, Schlessinger J, Lax I. PC12 cells overexpressing the insulin receptor undergo insulin-dependent neuronal differentiation. *Current Biol* 1994;4(8):702-708.
59. Seger R, Seger D, Reszka AA, Munar ES, Eldar-Finkelman H, Dobrowolska G, Jensen AM, Campbell JS, Fischer EH, Krebs EG. Overexpression of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) and its mutants in NIH 3T3 cells. Evidence that MAPKK

- involvement in cellular proliferation is regulated by phosphorylation of serine residues in its kinase subdomains VII and VIII. *J Biol Chem* 1994;269(41):25699-25709.
60. Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(18):8319-23.
 61. Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 1994;77(6):841-852.
 62. Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, Huang M, Lazarowski E, Pope RM, Collins MA, Dahlstrand EN, Earp HS 3rd, Evans DR. Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* 2000;403(6767):328-332.
 63. Palmer A, Gavin AC, Nebreda AR. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *Embo J* 1998;17(17):5037-5047.
 64. Kawada M, Yamagoe S, Murakami Y, Suzuki K, Mizuno S, Uehara Y. Induction of p27Kip1 degradation and anchorage independence by Ras through the MAP kinase signaling pathway. *Oncogene* 1997;15(6):629-637.
 65. Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 1996;271(34):20608-20616.
 66. Wright JH, Munar E, Jameson DR, Andreassen PR, Margolis RL, Seger R, Krebs EG. Mitogenactivated protein kinase kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(20):11335-11340.
 67. Zecevic M, Catling AD, Eblen ST, Renzi L, Hittle JC, Yen TJ, Gorbsky GJ, Weber MJ. Active MAP kinase in mitosis: localization at kinetochores and association with the motor protein CENP-E. *J Cell Biol* 1998;142(6):1547-1558.
 68. Shapiro PS, Vaisberg E, Hunt AJ, Tolwinski NS, Whalen AM, McIntosh JR, Ahn NG. Activation of the MKK/ERK pathway during somatic cell mitosis: direct interactions of active ERK with kinetochores and regulation of the mitotic 3F3/2 phosphoantigen. *J Cell Biol* 1998;142(6):1533-1545.
 69. Woods D, Parry D, Cherwinski H, Bosch E, Lees E, McMahon M. Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* 1997;17(9):5598-5611.
 70. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 1998;12(19):3008-3019.

71. Rahmouni S, Cerignoli F, Alonso A, Tsutji T, Henkens R, Zhu C, Louis-dit-Sully C, Moutschen M, Jiang W, Mustelin T. Loss of the VHR dual-specific phosphatase causes cell-cycle arrest and senescence. *Nat Cell Biol* 2006;8(5):524-531.
72. Eves EM, Shapiro P, Naik K, Klein UR, Trakul N, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein regulates aurora B kinase and the spindle checkpoint. *Mol Cell* 2006;23(4):561-74.
73. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* 1998;12(19):2997-3007.
74. Schönwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol* 1998;18(2):790-798.
75. Chiloechos A, Paterson HF, Marais R, Clerk A, Marshall CJ, Sugden PH. Regulation of Ras. GTP loading and Ras-Raf association in neonatal rat ventricular myocytes by G protein-coupled receptor agonists and phorbol ester. Activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by phorbol ester is mediated by Ras. *J Biol Chem* 1999;274(28):19762-19770.
76. Hamilton M, Liao J, Cathcart MK, Wolfman A. Constitutive association of c-N-Ras with c-Raf-1 and protein kinase C epsilon in latent signaling modules. *J Biol Chem* 2001;276(31):29079-29090.
77. Bivona TG, Quatela SE, Bodemann BO, Ahearn IM, Soskis MJ, Mor A, Miura J, Wiener HH, Wright L, Saba SG, Yim D, Fein A, Pérez de Castro I, Li C, Thompson CB, Cox AD, Philips MR. PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol Cell* 2006;21(4) 481-493.
78. Ueda Y, Hirai S, Osada S, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S. Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem* 1996;271(38):23512-23519.
79. Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, Stone JC. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 1998;280(5366):1082-1086.
80. Roose JP, Mollenauer M, Gupta VA, Stone J, Weiss A.A. Diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol Cell Biol* 2005;25(11):4426-4441.
81. Zheng Y, Liu H, Coughlin J, Zheng J, Li L, Stone JC. Phosphorylation of RasGRP3 on threonine 133 provides a mechanistic link between PKC and Ras signaling systems in B cells. *Blood* 2005;105(9):3648-3654.

82. Izawa I, Tamaki N, Saya H. Phosphorylation of neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) by cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* 1996;382(1-2):53-59.
83. Mangoura D, Sun Y, Li C, Singh D, Gutmann DH, Flores A, Ahmed M, Vallianatos G. Phosphorylation of neurofibromin by PKC is a possible molecular switch in EGF receptor signaling in neural cells. *Oncogene* 2006;25(5):735-745.
84. Leondaritis G, Petrikkos L, Mangoura D. Regulation of the Ras-GTPase activating protein neurofibromin by C-tail phosphorylation: implications for protein kinase C/Ras/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway signaling and neuronal differentiation. *J Neurochem*. 2009;109(2):573-583.
85. Rubio I, Rennert K, Wittif U, Beer K, Durst M, Stang SL, Stone J, Wetzker R. Ras activation in response to phorbol ester proceeds independently of the EGFR via an unconventional nucleotide-exchange factor system in COS-7 cells. *Biochem J* 2006;398(2):243-256.
86. Kawakami Y, Kitaura J, Yao L, McHenry RW, Kawakami Y, Newton AC, Kang S, Kato RM, Leitges M, Rawlings DJ, Kawakami T. A Ras activation pathway dependent on Syk phosphorylation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(16):9470-9475.
87. Downward J, Graves JD, Warne PH, Rayter S, Cantrell DA. Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* 1990;346(6286):719-23.
88. Schubert C, Carel K, DePaolo D, Leitner W, Draznin B. Interactions of protein kinase C with insulin signaling. Influence on GAP and Sos activities. *J Biol Chem* 1996;271(26):15311-15314.
89. Koehler JA, Moran MF. RACK1, a protein kinase C scaffolding protein, interacts with the PH domain of p120GAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283(4):888-895.
90. Paruchuri S, Hallberg B, Juhas M, Larsson C, Sjölander A. Leukotriene D(4) activates MAPK through a Ras-independent but PKCepsilon-dependent pathway in intestinal epithelial cells. *J Cell Sci* 2002;115(9):1883-1893.
91. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992;258(5082):607-614.
92. Wetsel WC, Khan WA, Merchenthaler I, Rivera H, Halpern AE, Phung HM, Negro-Vilar A, Hannun YA. Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol* 1992;117(1):121-131
93. Parker PJ, Murray-Rust J. PKC at a glance. *J Cell Sci* 2004;117(2):131-132.
94. Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJ, Boeckeler K, Parker PJ. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11(2):103-112.
95. Griner EM, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7(4):281-294.

96. Mangoura D, Dawson G. Opioid peptides activate phospholipase D and protein kinase C-epsilon in chicken embryo neuron cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(7):2915-2919.
97. Marais R, Light Y, Mason C, Paterson H, Olson MF, Marshall CJ. Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science* 1998;280(5360):109-112.
98. Bosco R, Melloni E, Celeghini C, Rimondi E, Vaccarezza M, Zauli G. Fine tuning of protein kinase C (PKC) isoforms in cancer: shortening the distance from the laboratory to the bedside. *Mini Rev Med Chem* 2011;11(3):185-199.
99. Larsson C. Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal* 2006;18(3):276-284.
100. Duquesnes N, Lezoualc'h F, Crozatier B. PKC-delta and PKC-epsilon: foes of the same family or strangers? *J Mol Cell Cardiol* 2011;51(5):665-73.
101. Prekeris R, Mayhew MW, Cooper JB, Terrian DM. 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):77-90.
102. Newton AC. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(2):161-167
103. Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 1995;9(7):484-496.
104. Oestreich EA, Malik S, Goonasekera SA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka AV. Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca²⁺ release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II. *J Biol Chem* 2009;284(3):1514-22.
105. de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 1998;396(6710):474-7.
106. Schmidt M, Evellin S, Weernink PA, von Dorp F, Rehmann H, Lomasney JW, Jakobs KH. A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat Cell Biol* 2001;3(11):1020-1024.
107. Keranen LM, Dutil EM, Newton AC. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* 1995;5:1394-1403.
108. Toker A, Newton AC. Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 2000;103(2):185-188.
109. Freeley M, Kelleher D, Long A. Regulation of Protein kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. *Cell Signal* 2011;23(5):753-762.

110. Cameron AJ, Escribano C, Saurin AT, Kostecky B, Parker PJ. PKC maturation is promoted by nucleotide pocket occupation independently of intrinsic kinase activity. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16(6):624-630.
111. Durgan J, Cameron AJ, Saurin AT, Hanrahan S, Totty N, Messing RO, Parker PJ. The identification and characterization of novel PKCepsilon phosphorylation sites provide evidence for functional cross-talk within the PKC superfamily. *Biochem J* 2008;411(2):319-331.
112. Baines CP, Song CX, Zheng YT, Wang GW, Zhang J, Wang OL, Guo Y, Bolli R, Cardwell EM, Ping P. Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ Res* 2003;92(8):873-880.
113. Majumder PK, Pandey P, Sun X, Cheng K, Datta R, Saxena S, Kharbanda S, Kufe D. Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275(29):21793-21796.
114. Sanchez P, De Carcer G, Sandoval IV, Moscat J, Diaz-Meco MT. Localization of atypical protein kinase C isoforms into lysosome-targeted endosomes through interaction with p62. *Mol Cell Biol*. 1998;18(5):3069-3080.
115. Becker KP, Hannun YA. cPKC-dependent sequestration of membrane-recycling components in a subset of recycling endosomes. *J Biol Chem* 2003;278(52):52747-52754.
116. Schultz A, Ling M, Larsson C. Identification of an amino acid residue in the protein kinase C C1b domain crucial for its localization to the Golgi network. *J Biol Chem* 2004;279(30):31750-60.
117. Martelli AM, Evangelisti C, Nyakern M, Manzoli FA. Nuclear protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761(5-6):542-551.
118. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984;308(5961):693-698.
119. Goodnight JA, Mischak H, Kolch W, Mushinski JF. Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J Biol Chem* 1995;270(17):9991-10001.
120. Judé S, Martel E, Vincent F, Besson P, Couet C, Ogilvie GK, Pinault M, De Chalendar C, Bougnoux P, Richard S, Champeroux P, Crozatier B, Le Guennec JY. Dietary long-chain n-3 fatty acids modify blood and cardiac phospholipids and reduce protein kinase-C-delta and protein kinase-C-epsilon translocation. *Br J Nutr* 2007;98(6):1143-1151.

121. Mangoura D. μ -Opioids activate tyrosine kinase focal adhesion kinase and regulate cortical cytoskeleton proteins cortactin and vinculin in chick embryonic neurons. *J Neurosci Res* 1997;50(3):391-401.
122. Saurin AT, Durgan J, Cameron AJ, Faisal A, Marber MS, Parker PJ. The regulated assembly of a PKCepsilon complex controls the completion of cytokinesis. *Nat Cell Biol* 2008;10(8):891-901.
123. Bass-Zubek AE, Hobbs RP, Amargo EV, Garcia NJ, Hsieh SN, Chen X, Wahl JK 3rd, Denning MF Green KJ. Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly. *J Cell Biol* 2008;181(4):605-613.
124. Schechtman D, Mochly-Rosen D. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene* 2001;20(44):6339-6347.
125. Budas GR, Koyanagi T, Churchill EN, Mochly-Rosen D. Competitive inhibitors and allosteric activators of protein kinase C isoenzymes: a personal account and progress report on transferring academic discoveries to the clinic. *Biochem Soc Trans* 2007;35(5):1021-1026.
126. Csukai M, Mochly-Rosen D. Pharmacologic modulation of protein kinase C isozymes: the role of RACKs and subcellular localisation. *Pharmacol Res* 1999;39(4):253-259.
127. Deuse T, Koyanagi T, Erben RG, Hua X, Velden J, Ikeno F, Reichenspurner H, Robbins RC, Mochly-Rosen D, Schrepfer S. Sustained inhibition of epsilon protein kinase C inhibits vascular restenosis after balloon injury and stenting. *Circulation* 2010;122(11 Suppl):S170-178.
128. Asimaki O, Mangoura D. Cannabinoid receptor 1 induces a biphasic ERK activation via multiprotein signaling complex formation of proximal kinases PKC ϵ , Src, and Fyn in primary neurons. *Neurochem Int* 2011;58(2):135-144.
129. Wang Q, Li X, Chen Y, Wang F, Yang Q, Chen S, Min Y, Li X, Xiong L. Activation of epsilon protein kinase C-mediated anti-apoptosis is involved in rapid tolerance induced by electroacupuncture pretreatment through cannabinoid receptor type 1. *Stroke* 2011;42(2):389-396.
130. O'Brian C, Ward NE. Stimulation of the ATPase activity of rat brain protein kinase C by phospho acceptor substrates of the enzyme. *Biochemistry* 1991;30(9):2549-2554.
131. Saito N, Itouji A, Totani Y, Osawa I, Koide H, Fujisawa N, Ogita K, Tanaka C. Cellular and intracellular localization of e-subspecies of protein kinase C in the rat brain; presynaptic localization of the e-subspecies. *Brain Res* 1993;607(1-2):241-248.
132. Koide H, Ogita K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Isolation and characterization of the e subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(4):1149-1153.

133. Saitoh N, Hori T, Takahashi T. Activation of the epsilon isoform of protein kinase C in the mammalian nerve terminal. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(24):14017-14021.
134. Dumus A, Sebben M, Haynes L, Pin JP, Bockaert J. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature* 1988;336(6194):68-70.
135. Hama H, Hara C, Yamaguchi K, Miyawaki A. PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron* 2004;41(3):405-415.
136. Choi DS, Jahan DW, Dadgar J, Chang WS, Messing RO. Conditional rescue of protein kinase C ϵ regulates ethanol preference and hypnotic sensitivity in adult mice. *J Neurosci* 2002;22(22):9905-9911.
137. Armstrong SC. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004;61(3):427-436.
138. Murriel CL, Mochly-Rosen D. Opposing roles of δ and ϵ PKC in cardiac ischemia and reperfusion: targeting the apoptotic machinery. *Arc Biochem Biophys* 2003;420(2):246-254.
139. Saurin AT, Pennington DJ, Raat NJH, Latchman DS, Owen MJ, Marber M. Targeted disruption of the protein kinase C epsilon gene abolishes the infarct size reduction that follows ischemic preconditioning of isolated buffer-perfusion mouse hearts. *Cardiovasc Res* 2002;55(3):672-680.
140. Raval AP, Dave KR, Mochly-Rosen D, Sick TJ, Perez-Pinzon MA. ϵ PKC is required for the induction of tolerance by ischemic and NMDA-mediated preconditioning in the organotypic hippocampal slice. *J Neuroscience* 2003;23(2):384-391.
141. Lange-Asschenfeldt C, Raval AP, Dave KR, Mochly-Rosen D, Sick TJ, Perez-Pinzon MA. 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):636-645.
142. Di-Capua N, Sperling O, Zoref-Shani E. 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):409-412.
143. Wang J, Bright R, Mochly-Rosen D, Giffard RG. Cell-specific role for ϵ - and β 1-protein kinase C isozymes in protecting cortical neurons and astrocytes from ischemia-like injury. *Neuropharmacology* 2004;47(1):136-145.
144. Premkumar LS, Ahern GP. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 2000;408(6815):985-990.

145. Tominaga M, Wada M, Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptor as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(12):6951-6956.
146. Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C ϵ and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* 2002;277(16):13375-13378.
147. Mandadi S, Tominaga T, Numazaki M, Murayama N, Saito N, Armati PJ, Roufogails B, Tominaga M. Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKC ϵ -mediated phosphorylation at S800. *Pain* 2006;123(1-2):106-116.
148. Chen Y, Cantrell AR, Messing RO, Saecker T, Catterall WA. Specific modulation of Na⁺ channels in hippocampal neurons by protein kinase C ϵ . *J Neurosci* 2005;25(2):507-513.
149. Zhu G, Wang D, Lin YH, McMahon T, Koo EH, Messing RO. Protein kinase C epsilon suppresses Abeta production and promotes activation of alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285(4):997-1006.
150. Mangoura D, Sogos V, Dawson G. Protein kinase C-epsilon is a developmentally regulated, neuronal isoform in the chick embryo central nervous system. *J Neurosci Res* 1993;35(5):488-498.
151. Hundle B, McMahon T, Dadgar J, Chen CH, Mochly-Rosen D, Messing RO. An Inhibitory Fragment Derived from Protein Kinase C ϵ Prevents Enhancement of Nerve Growth Factor Responses by Ethanol and Phorbol Esters. *J Biol Chem* 1997;272(23):15028-15035.
152. Lallemand F, Hadjab S, Hans G, Moonen G, Lefebvre PP, Malgrange B. Activation of protein kinase C β 1 constitutes a new neurotrophic pathway for deafferented spiral ganglion neurons. *J Cell Sci* 2005;118(19):4511-4525.
153. Shirai Y, Adachi N, Saito N. Protein kinase C epsilon: function in neurons. *FEBS J* 2008;275(16):3988-3994.
154. Buchser WJ, Slepak TI, Gutierrez-Arenas O, Bixby JL, Lemmon VP. Kinase/phosphatase overexpression reveals pathways regulating hippocampal neuron morphology. *Mol Syst Biol* 2010;6:391.
155. Zeidman R, Lofgren B, Pahlman S, Larsson C. PKC ϵ , via its regulatory domain and independently of its catalytic domain, induces neurite-like processes in neuroblastoma cells. *J Cell Biol* 1999;145(4):713-726.
156. Zeidman R, Troller U, Raghunath A, Pahlman S, Larsson C. Protein kinase C ϵ actin-binding site is important for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Mol Biol Cell* 2002;13(1):12-24.

157. Lingm M, Troller U, Zeidman R, Lundberg C, Larsson C. Induction of neurites by the regulatory domains of PKC δ and ϵ is counteracted by PKC catalytic activity and by the RhoA pathway. *Exp Cell Res* 2004;292(1):135-150.
158. Troller U, Larsson C. A possible role for p190RhoGAP in PKC ϵ -induced morphological effects. *Cellular Signal* 2004;16(2):245-252.
159. Troller U, Larsson C. Cdc42 is involved in PKC ϵ - and δ -induced neurite outgrowth and stress fibre dismantling. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349(1):91-98.
160. Shirai Y, Murakami T, Kuramasu M, Iijima L, Saito N. A novel PIP₂ binding of ePKC and its contribution to the neurite induction ability. *J Neurochem* 2007;102(5):1635-1644.
161. Steinhart R, Kazimirsky G, Okhrimenko H, Ben-Hur T, Broudei C. PKC ϵ induces astrocytes differentiation of multipotential neural precursor cells. *Glia* 2007;55(2):224-232.
162. Lu Z, Liu D, Hornia A, Devonish W, Pagano M, Foster DA. Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 1998;18(2):839-845.
163. Koivunen J, Aaltonen V, Peltonen J. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Letters* 2006;235(1):1-10.
164. Platet N, Prévostel C, Derocq D, Joubert D, Rochefort H, Garcia M. Breast cancer cell invasiveness: correlation with protein kinase C activity and differential regulation by phorbol ester in estrogen receptor-positive and -negative cells. *Int J Cancer* 1998;75(5):750-756.
165. Knauf JA, Ward LS, Nikiforov YE, Nikiforova M, Puxeddu E, Medvedovic M, Liron T, Mochly-Rosen D, Fagin JA. Isozyme-specific abnormalities of PKC in thyroid cancer: evidence for post-transcriptional changes in PKC epsilon. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(5):2150-2159.
166. Gonzalez-Guerrico AM, Meshki J, Xiao L, Benavides F, Conti CJ, Kazanietz MG. Molecular mechanisms of protein kinase C-induced apoptosis in prostate cancer cells. *J Biochem Mol Biol* 2005;38(6):639-645.
167. Cacace AM, Guadagno SN, Krauss RS, Fabbro D, Weinstein IB. *Oncogene* 1993;8(8):2095-2104.
168. Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron G, Schaehtle C, Kazanietz MG, Blumberg PM, Pierce JH, Mushinski JF. Overexpression of protein kinase C- δ and - ϵ in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem* 1993;268(9):6090-6.
169. Baxter G, Oto E, Daniel-Issakani S, Strulovici B. Constitutive presence of a catalytic fragment of protein kinase C epsilon in a small cell lung carcinoma cell line. *J Biol Chem* 1992;267(3):1910-1917.

170. Perletti GP, Folini M, Lin HC, Mischak H, Piccinini F, Tashjian AH Jr. Overexpression of protein kinase C epsilon is oncogenic in rat colonic epithelial cells. *Oncogene* 1996;12(4):847-854.
171. Perletti GP, Concari P, Brusaferrri S, Marras E, Piccinini F, Tashjian AH Jr. Protein kinase Cepsilon is oncogenic in colon epithelial cells by interaction with the ras signal transduction pathway. *Oncogene* 1998;16(25):3345-3348.
172. Wu D, Foreman TL, Gregory CW, McJilton MA, Wescott GG, Ford OH, Alvey RF, Mohler JL, Terrian DM. *Cancer Res* 2002;62(8):2423-2429.
173. Pan Q, Bao LW, Kleer CG, Sabel MS, Griffith KA, Teknos TN, Merajver SD. 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):8366-71.
174. Engers R, Mrzyk S, Springer E, Fabbro D, Weissgerber G, Gernharz CD, Gabbert HE. Protein kinase C in human renal cell carcinomas: role in invasion and differential isoenzyme expression. *Br J Cancer* 2000;82(5):1063-1069.
175. Verma AK, Wheeler DL, Aziz MH, Manoharan H. Protein kinase Cepsilon and development of squamous cell carcinoma, the nonmelanoma human skin cancer. *Mol Carcinog* 2006;45(6):381-388.
176. Wang QJ, Acs P, Goodnight J, Blumberg PM, Mischak H, Mushinski JF. The catalytic domain of PKC-epsilon, in reciprocal PKC-delta and -epsilon chimeras, is responsible for conferring tumorigenicity to NIH3T3 cells, whereas both regulatory and catalytic domains of PKC-epsilon contribute to in vitro transformation. *Oncogene* 1998;16(1):53-60.
177. Knauf JA, Elisei R, Mochly-Rosen D, Liron T, Chen XN, Gonsky R, Korenberg JR, Fagin JA. Involvement of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon) in thyroid cell death. A truncated chimeric PKCepsilon cloned from a thyroid cancer cell line protects thyroid cells from apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274(33):23414-23425.
178. Tachado SD, Mayhew MW, Wescott GG, Foreman TL, Goodwin CD, McJilton MA, Terrian DM. Regulation of tumor invasion and metastasis in protein kinase C epsilon-transformed NIH3T3 fibroblasts. *J Cell Biochem* 2002;85(4):785-797.
179. Pan Q, Bao LW, Teknos TN, Merajver SD. Targeted disruption of protein kinase C epsilon reduces cell invasion and motility through inactivation of RhoA and RhoC GTPases in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2006;66(19):9379-9384.
180. Sharif TR, Sharif M. Overexpression of protein kinase C epsilon in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples. *Int J Oncol* 1999;15(2):237-243.

181. Sharif TR, Sasakawa N, Sharif M. Regulated expression of a dominant negative protein kinase C epsilon mutant inhibits the proliferation of U-373MG human astrocytoma cells. *Int J Mol Med* 2001;7(4):373-80.
182. Besson A, Davy A, Robbins SM, Yong VW: Differential activation of ERKs to focal adhesions by PKC epsilon is required for PMA-induced adhesion and migration of human glioma cells. *Oncogene* 2001;20(50):7398-7407.
183. Besson A, Wilson TL, Yong VW. The anchoring protein RACK1 links protein kinase Cepsilon to integrin beta chains. Requirements for adhesion and motility. *J Biol Chem* 2002;277(24):22073-22084.
184. Sawai H, Okazaki T, Takeda Y, Tashima M, Sawada H, Okuma M, Kishi S, Umehara H, Domae N. Ceramide-induced translocation of protein kinase C-delta and -epsilon to the cytosol. Implications in apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272(4):2452-2458.
185. Basu A, Cline JS. Oncogenic transformation alters cisplatin-induced apoptosis in rat embryo fibroblasts. *Int J Cancer*. 1995;63(4):597-603.
186. Borner C, Ueffing M, Jaken S, Parker PJ, Weinstein IB. Two closely related isoforms of protein kinase C produce reciprocal effects on the growth of rat fibroblasts. Possible molecular mechanisms. *J Biol Chem* 1995;270(1):78-86.
187. Choi PM, Tchou-Wong KM, Weinstein IB. Overexpression of protein kinase C in HT29 colon cancer cells causes growth inhibition and tumor suppression. *Mol Cell Biol* 1990;10(9):4650-4657.
188. Goldstein DR, Cacace AM, Weinstein IB. Overexpression of protein kinase C h 1 in the SW480 colon cancer cell line causes growth suppression. *Carcinogenesis* 1995;16(5):1121-1126.
189. Reddig PJ, Dreckschmidt NE, Ahrens H, Simsiman R, Tseng CP, Zou J, Oberley TD, Verma AK. Transgenic mice overexpressing protein kinase Cdelta in the epidermis are resistant to skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 1999;59(22):5710-5718.
190. Perletti GP, Marras E, Concari P, Piccinini F, Tashjian AH Jr. PKCdelta acts as a growth and tumor suppressor in rat colonic epithelial cells. *Oncogene* 1999;18(5):1251-1256.
191. Clark AS, West KA, Blumberg PM, Dennis PA: Altered protein kinase C (PKC) isoforms in non-small cell lung cancer cells: PKCdelta promotes cellular survival and chemotherapeutic resistance. *Cancer Res* 2003;63(4):780-786.
192. McCracken MA, Miraglia LJ, McKay RA, Strobl JS. Protein kinase C delta is a prosurvival factor in human breast tumor cell lines. *Mol Cancer Ther* 2003;2(3):273-281.

193. Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS. A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *J Med Genet* 1989;26(11):704-711.
194. Szudek J, Birch P, Riccardi VM, Evans DG, Friedman JM. Associations of clinical features in neurofibromatosis 1 (NF1). *Genet. Epidemiol.* 2000;19(4):429-439.
195. Yohay KH. The genetic and molecular pathogenesis of NF1 and NF2. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13(1):21-26.
196. Riccardi VM. Neurofibromatosis: past, present, and future. *N Engl J Med* 1991; 324(18):1283-1285.
197. Hyman SL, Shores A, North KN. The nature and frequency of cognitive deficits in children with neurofibromatosis type 1. *Neurology* 2005;65(7):1037-1044.
198. Dasgupta B, Gutmann DH. Neurofibromatosis 1: closing the GAP between mice and men. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13(1):20-27.
199. Rubin JB, Gutmann DH. Neurofibromatosis type 1 -a model for nervous system tumour formation? *Nat Rev Cancer* 2005;5(7):557-564.
200. Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF. Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science* 2002;296(5569):920-922.
201. Listernick R, Louis DN, Packer RJ, Gutmann DH. Optic pathway gliomas in children with neurofibromatosis 1: consensus statement from the NF1 Optic Pathway Glioma Task Force *Ann Neurol* 1997;41(2):143-149.
202. Gutmann DH, Rasmussen SA, Wolkenstein P, MacCollin MM, Guha A, Inskip PD, North KN, Poyhonen M, Birch PH, Friedman JM. Gliomas presenting after age 10 in individuals with neurofibromatosis type 1 (NF1). *Neurology* 2002;59(5):759-761.
203. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455(7216):1061-1068.
204. Dasgupta B, Gutmann DH. Neurofibromin regulates neural stem cell proliferation, survival, and astroglial differentiation in vitro and in vivo. *J Neurosci* 2005;25(23):5584-5594.
205. Xu GF, Lin B, Tanaka K, Dunn D, Wood D, Gesteland R, White R, Weiss R, Tamanoi F. The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of *S. cerevisiae*. *Cell* 1990;63(4):835-841.
206. Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL, et al. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 1990;249(4965):181-186.

207. Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, Collins F. The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* 1990;63(4):851-859.
208. Skuse GR, Cappione AJ. RNA processing and clinical variability in neurofibromatosis type I (NF1). *Hum Mol Genet* 1997;6(10):1707-1712.
209. Vandenbroucke I, Vandesompele J, De Paepe A, Messiaen L. Quantification of NF1 transcripts reveals novel highly expressed splice variants. *FEBS Lett* 2002;522(1-3):71-76.
210. Nishi T, Lee PSY, Oka K, Levin VA, Tanase S, Morino Y, Saya H. Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene transcripts related to neuronal differentiation. *Oncogene* 1991;6(9):1555-1559.
211. Suzuki, Y, Suzuki H, Kayama T, Yoshimoto T, Shibahara S. Brain tumors predominantly express the neurofibromatosis type 1 gene transcripts containing the 63 base insert in the region coding for the GTPase activating protein-related domain. *Biochem Biophys Res Comm* 1991;181(3):955-961.
212. Teinturier C, Danglot G, Slim R, Pruliere D, Launay JM, Bernheim, A. The neurofibromatosis 1 gene transcripts expressed in peripheral nerve and neurofibromas bear the additional exon in the GAP domain. *Biochem Biophys Res Comm* 1992;188(2):851-857.
213. Uchida T, Matozaki T, Suzuki T, Matsuda K, Wada K, Nakano O, Konda Y, Nishisaki H, Nagao M, Sakamoto C, Kasuga M. Expression of two types of neurofibromatosis type 1 gene transcripts in gastric cancers and comparison of GAP activities. *Biochem Biophys Res Comm* 1992;187(1):332-339.
214. Takahashi K, Suzuki H, Kayama T, Suki Y, Yoshimoto T, Sasano H, Shibahara S. Multiple transcripts of the neurofibromatosis type I gene in human brain and in brain tumours. *Clin Sci* 1994;87(5):481-485.
215. Scheurlen WG, Senf L. (1995) Analysis of the GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene in childhood brain tumors. *Int J Cancer* 1995;64(4):234-238.
216. Gutmann DH, Wood DL, Collins FS. Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1991;88(21):9658-9662.
217. Andersen LB, Ballester R, Marchuk DA, Chang E, Gutmann DH, Saulino AM, Camonis J, Wigler M, Collins FS. A conserved alternative splice in the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produces two neurofibromin isoforms, both of which have GTPase-activating protein activity. *Mol Cell Biol* 1993;13(1):487-495.

218. Danglot G, Regnier V, Fauvet D, Vassal G, Kujas M, Bernheim A. Neurofibromatosis 1 (NF1) mRNAs expressed in the central nervous system are differentially spliced in the 54 part of the gene. *Hum Mo Genet* 1995;4(5):915-920.
219. Huynh DP, Nechiporuk T, Pulst SM. Differential expression and tissue distribution of type I and type II neurofibromins during mouse fetal development. *Developmental Biol* 1994;161(2):538-551.
220. Gutmann DH, Andersen LB, Cole JL, Swaroop M, Collins FS. An alternatively spliced mRNA in the carboxy terminus of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene is expressed in muscle *Hum Mol Genet* 1993;2(7):989-992.
221. Gutmann DH, Geist RT, Wright DE, Snider WD. Expression of the neurofibromatosis 1 (NF1) isoforms in developing and adult rat tissues. *Cell Growth Diff* 1995;6(3):315-323.
222. Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS, Ratner N, Nordlund ML, Reid SW, Buchberg AM, Jenkins NA, Parada LF, Copeland NG. Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes Develop* 1994;8(9):1019-1029.
223. Suzuki H, Takahashi K, Kubota Y, Shibahara S. Molecular cloning of a cDNA coding for neurofibromatosis type 1 protein isoform lacking the domain related to ras GTPase-activating protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1992;187(2):984-990.
224. Li C, Cheng Y, Gutmann DA, Mangoura D. 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):231-248.
225. Vandembroucke I, Van Oostveldt P, Coene E, De Paepe A, Messiaen, L. Neurofibromin is actively transported to the nucleus. *FEBS Lett* 2004;560(1-3):98-102.
226. Viskochil D, Cawthon R, O'Connell P, Xu GF, Stevens J, Culver M, Carey J, White R. The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. *Mol Cell Biol* 1991;11(2):906-912.
227. Cawthon RM, O'Connell P, Buchberg AM Viskochil D, Weiss RB, Culver M, Stevens J, Jenkins NA, Copeland NG, White R. Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EV12 and mapping of other transcripts. *Genomics* 1990;7(4):555-565.
228. Cawthon RM, Andersen LB, Buchberg AM, Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Weiss RB, Wallace MR, Marchuk DA, Culver M, et al. cDNA sequence and genomic structure of EV12B, a gene lying within an intron of the neurofibromatosis type 1 gene. *Genomics* 1991;9(3):446-460.
229. Habib AA, Gulcher JR, Hognason T, Zheng L, Stefánsson K. The OMgp gene, a second growth suppressor within the NF1 gene. *Oncogene* 1998;16(12):1525-1531.

230. Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z. Oligodendrocyte myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 2002;417(6892):941-944.
231. Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J Med Genet* 1996;33(1):2-17.
232. Cichowski K, Jacks T. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell* 2001;104(4):593-604.
233. Brems H, Beert E, de Ravel T, Legius E. Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1. *Lancet Oncol* 2009;10(5):508-515.
234. Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C, Küçükceylan N, Abdel-Nour M, Gewies A, Peters H, Kaufmann D, Buske A, Tinschert S, Nürnberg P. Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am J Hum Genet* 2000;66(3):790-818.
235. Toliat MR, Erdogan F, Gewies A, Fahsold R, Buske A, Tinschert S, Nürnberg P. Analysis of the NF1 gene by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) reveals a high incidence of mutations in exon 4b. *Electrophoresis* 1999;2(3):541-544.
236. Robinson PN, Böddrich A, Peters H, Tinschert S, Buske A, Kaufmann D, Nürnberg P. Two recurrent nonsense mutations and a 4 bp deletion in a quasi-symmetric element in exon 37 of the NF1 gene. *Hum Genet* 1995;96(1):95-98.
237. Böddrich A, Robinson PN, Schulke M, Buske A, Tinschert S, Nürnberg P. New evidence for a mutation hotspot in exon 37 of the NF1 gene. *Hum Mutat* 1997;9(4):374-377.
238. McGaughan JM, Harris DI, Donnai D, Teare D, MacLeod R, Westerbeek R, Kingston H, Super M, Harris R, Evans DG. A clinical study of type 1 neurofibromatosis in north west England. *J Med Genet* 1999;36(3):197-203.
239. Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, Van Roy N, Speleman F, Paepe AD. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat* 2000;15(6):541-555.
240. Jacks T, Shih TS, Schmitt EM, Bronson RT, Bernards A, Weinberg RA. Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nat Genet* 1994;7(3):353-361.
241. Gutmann DH, Giovannini M. Mouse models of neurofibromatosis 1 and 2. *Neoplasia* 2002;4(4):279-290.
242. Frahm S, Mautner VF, Brems H, Legius E, Debiec-Rychter M, Friedrich RE, Knöfel WT, Peiper M, Kluwe L. Genetic and phenotypic characterization of tumor cells derived

- from malignant peripheral nerve sheath tumors of neurofibromatosis type 1 patients. *Neurobiol Dis* 2004;16(1):85-91.
243. Wu J, Williams JP, Rizvi TA, Kordich JJ, Witte D, Meijer D, Stemmer-Rachamimov AO, Cancelas JA, Ratner N. Plexiform and dermal neurofibromas and pigmentation are caused by Nf1 loss in desert hedgehog-expressing cells. *Cancer Cell* 2008;13(2):105-116.
244. Steinmann K, Kluwe L, Friedrich RE, Mautner VF, Cooper DN, Kehrer-Sawatzki H. Mechanisms of loss of heterozygosity in neurofibromatosis type 1-associated plexiform neurofibromas. *J Invest Dermatol* 2009;129(3):615-21.
245. Vogel KS, Klesse LJ, Velasco-Miguel S, Meyers K, Rushing EJ, Parada LF. Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1. *Science* 1999;286(5447):2176-2179.
246. Bajenaru ML, Donahoe J, Corral T, Reilly KM, Brophy S, Pellicer A, Gutmann DH: Neurofibromatosis 1 (NF1) heterozygosity results in a cell autonomous growth advantage for astrocytes. *Glia* 2001;33(4):314-323.
247. Bajenaru, M.L., Hernandez, M.R., Perry, A., Zhu, Y., Parada, L.F., Garbow, J.R. and Gutmann, D.H. Optic nerve glioma in mice requires astrocyte Nf1 gene inactivation and Nf1 brain heterozygosity. *Cancer Res* 2003;63(24):8573-8577.
248. Marchuk DA, Saulino AM, Tavakkol R, Swaroop M, Wallace MR, Andersen LB, Mitchell AL, Gutmann DH, Boguski M, Collins FS. cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product. *Genomics* 1991;11(4):931-940.
249. Daston MM, Scrabble H, Nordlund M, Sturbaum AK, Nissen LM, Ratner N. The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron* 1992;8(3):415-428.
250. Trovó-Marqui AB, Tajara EH. Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet* 2006;70(1):1-13.
251. The I, Hannigan GE, Cowley GS, Reginald S, Zhong Y, Gusella JF, Hariharan IK, Bernards A. Rescue of a Drosophila NF1 mutant phenotype by protein kinase A. *Science* 1997;276(5313):791-794.
252. Guo HF, The I, Hannan F, Bernards A, Zhong Y. Requirement of Drosophila NF1 for activation of adenylyl cyclase by PACAP38-like neuropeptides. *Science* 1997;276(5313):795-798.
253. Starinsky-Elbaz S, Faigenbloom L, Friedman E, Stein R, Kloog Y. The pre-GAP-related domain of neurofibromin regulates cell migration through the LIM kinase/cofilin pathway. *Mol Cell Neurosci* 2009;42(4):278-287.
254. Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, Conroy L, Clark R, O'Connell P, Cawthon RM, et al. The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 1990;63(4):843-849.

255. Hsueh YP, Roberts AM, Volta M, Sheng M, Roberts RG. Bipartite interaction between neurofibromatosis type I protein (neurofibromin) and syndecan transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *J Neurosci* 2001;21(11):3764-3770.
256. Milburn MV, Tong L, deVos AM, Brünger A, Yamaizumi Z, Nishimura S, Kim SH. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 1990;247(4945):939-945.
257. Ahmadian MR, Stege P, Scheffzek K, Wittinghofer A. Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat Struct Biol* 1997;4(9):686-689.
258. Ahmadian MR, Kiel C, Stege P, Scheffzek K. Structural fingerprints of the Ras-GTPase activating proteins neurofibromin and p120GAP. *J Mol Biol* 2003;329(4):699–710.
259. Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 1997;277(5324):333-338.
260. Resat H, Straatsma TP, Dixon DA, Miller JH. The arginine finger of RasGAP helps Gln-61 align the nucleophilic water in GAP-stimulated hydrolysis of GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(11):6033-6038.
261. Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J. Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature* 1992;356(6371):713-715.
262. Kim HA, Rosenbaum T, Marchionni MA, Ratner N, DeClue JE. Schwann cells from neurofibromin deficient mice exhibit activation of p21ras, inhibition of cell proliferation and morphological changes. *Oncogene* 1995;11(2):325-335.
263. Johannessen CM, Reczek EE, James MF, Brems H, Legius E, Cichowski K. The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2005;102(24):8573-8578.
264. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006;441(7092):424-430.
265. Leondaritis G, Mangoura D. The Sec14 domain of neurofibromin allosterically regulates the analog RasGAP activity of the adjacent GAP-related domain. 2012 (submitted)
266. Aravind L, Neuwald AF, Ponting CP. Sec14p-like domains in NF1 and Dbl-like proteins indicate lipid regulation of Ras and Rho signaling. *Curr Biol* 1999;9(6):R195-197.
267. D'Angelo I, Welti S, Bonneau F, Scheffzek K. A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein. *EMBO Rep* 2006;7(2):174-179.
268. Bankaitis VA, Aitken JR, Cleves AE, Dowhan W. An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature* 1990;347(6293):561-562.

269. Bollag G, McCormick F. Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature* 1991;351(6327):576-579.
270. Golubić M, Roudebush M, Dobrowolski S, Wolfman A, Stacey DW. Catalytic properties, tissue and intracellular distribution of neurofibromin. *Oncogene* 1992;7(11):2151-2159.
271. Boyanapalli M, Lahoud OB, Messiaen L, Kim B, Anderle de Saylor MS, Duckett SJ, Somara S, Mikol DD. Neurofibromin binds to caveolin-1 and regulates ras, FAK, and Akt. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340(4):1200-1208.
272. Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 1995;6(7):911-927.
273. Song KS, Li S, Okamoto T, Quilliam LA, Sargiacomo M, Lisanti MP. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem* 2006;271(16):9690-9697.
274. Gutmann DH, Collins FS. The neurofibromatosis type 1 gene and its protein product, neurofibromin. *Neuron* 1993;10(3):335-343.
275. Feng L, Yunoue S, Tokuo H, Ozawa T, Zhang D, Patrakitkomjorn S, Ichimura T, Saya H, Araki N. PKA phosphorylation and 14-3-3 interaction regulate the function of neurofibromatosis type I tumor suppressor, neurofibromin. *FEBS Lett* 2004;557(1-3):275-282.
276. McGillicuddy LT, Fromm JA, Hollstein PE, Kubek S, Beroukhim R, De Raedt T, Johnson BW, Williams SM, Nghiemphu P, Liao LM, Cloughesy TF, Mischel PS, Parret A, Seiler J, Moldenhauer G, Scheffzek K, Stemmer-Rachamimov AO, Sawyers CL, Brennan C, Messiaen L, Mellinghoff IK, Cichowski K. Proteasomal and genetic inactivation of the NF1 tumor suppressor in gliomagenesis. *Cancer Cell* 2009;16(1):44-54.
277. Kaufmann D, Junge I, Bartelt B, Latke H, Müller R. On the lysosomal degradation of neurofibromin and its phosphorylation in cultured melanocytes. *Biol Chem* 1999;380(9):1071-1078.
278. Ridley AJ, Paterson HF, Noble M, Land H. Ras-mediated cell cycle arrest is altered by nuclear oncogenes to induce Schwann cell transformation. *EMBO J* 1988;7(6):1635-1645.
279. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88(5):593-602.

280. Lloyd AC, Obermuller F, Staddon S, Barth CF, McMahon M, Land H. Cooperating oncogenes converge to regulate cyclin/cdk complexes. *Genes Dev* 1997;11(5):663-77.
281. Vogel KS, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Parada LF. Loss of neurofibromin results in neurotrophin-independent survival of embryonic sensory and sympathetic neurons. *Cell* 1995;8;82(5):733-42.
282. Vogel KS, El-Afandi M, Parada LF. Neurofibromin Negatively Regulates Neurotrophin Signaling through p21ras in Embryonic Sensory Neurons. *Mol Cell Neurosci* 2000;15(4):398-407.
283. Yunoue S, Tokuo H, Fukunaga K, Feng L, Ozawa T, Nishi T, Kikuchi A, Hattori S, Kuratsu J, Saya H, Araki N. Neurofibromatosis type I tumor suppressor regulates neuronal differentiation via its GTPase-activating protein function toward Ras. *J Biol Chem* 2003;278(29):26958-26969.
284. Patrakitkomjorn S, Kobayashi D, Morikawa T, Wilson MM, Tsubota N, Irie A, Ozawa T, Aoki M, Arimura N, Kaibuchi K, Saya H, Araki N. Neurofibromatosis type 1 (NF1) tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neuronal differentiation of PC12 cells via its associating protein, CRMP-2. *J Biol Chem* 2008;283(14):9399-413.
285. Weiss B, Bollag G, Shannon K. Hyperactive Ras as a therapeutic target in neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet* 1999;89(1):14-22.
286. DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA et al. Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell* 1992;69(2):265-273.
287. Bollag G, Clapp DW, Shih S, Adler F, Zhang YY, Thompson P, Lange BJ, Freedman MH, McCormick F, Jacks T, Shannon K. Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells. *Nat Genet* 1996;12(2):144-148.
288. Guha A, Lau N, Huvar I, Gutmann D, Provias J, Pawson T, Boss G. Ras-GTP levels are elevated in human NF1 peripheral nerve tumors. *Oncogene* 1996;12(3):507-513.
289. Feldkamp MM, Angelov L, Guha A. Neurofibromatosis type 1 peripheral nerve tumors: aberrant activation of the Ras pathway. *Surg Neurol* 1999;51(2):211-218.
290. Lau N, Feldkamp MM, Roncari L, Loehr AH, Shannon P, Gutmann DH, Guha A. Loss of neurofibromin is associated with activation of RAS/MAPK and PI3-K/AKT signaling in a neurofibromatosis 1 astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59(9):759-767.
291. Sherman LS, Atit R, Rosenbaum T, Cox AD, Ratner N. Single cell Ras-GTP analysis reveals altered Ras activity in a subpopulation of neurofibroma Schwann cells but not fibroblasts. *J Biol Chem* 2000;275(39):30740-30745.
292. Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773(8):1161-1176.

293. Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem. J* 1997;327(1):1-16.
294. Perrimon N, Bernfield M. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* 2000;404(6779):725-728.
295. Lin Y, Lei Y, Hong C, Hsueh Y. Syndecan-2 induces filopodia and dendritic spine formation via the neurofibromin-PKA-Ena/VASP pathway. *J. Cell Biol* 2007;177(5):829-841.
296. Bollag G, McCormick F, Clark R. Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity. *EMBO J* 1993;12(5):1923-1927.
297. Gregory PE, Gutmann DH, Mitchell A, Park S, Boguski M, Jacks T, Wood DL, Jove R, Collins FS. Neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) associates with microtubules. *Somat Cell Mol Genet.* 1993;19(3):265-274.
298. Ozawa T, Araki N, Yunoue S, Tokuo H, Feng L, Patrakitkomjorn S, Hara T, Ichikawa Y, Matsumoto K, Fujii K, Saya H. The neurofibromatosis type 1 gene product neurofibromin enhances cell motility by regulating actin filament dynamics via the Rho-ROCK-LIMK2-cofilin pathway. *J Biol Chem* 2005;280(47):39524-39533.
299. Roudebush M, Slabe T, Sundaram V, Hoppel CL, Golubic M, Stacey DW. Neurofibromin colocalizes with mitochondria in cultured cells. *Exp Cell Res* 1997;236(1):161-172.
300. De Schepper S, Boucneau JM, Westbroek W, Mommaas M, Onderwater J, Messiaen L, Naeyaert JM, Lambert JL. Neurofibromatosis type 1 protein and amyloid precursor protein interact in normal human melanocytes and colocalize with melanosomes. *J Invest Dermatol* 2006;126(3):653-659.
301. Soh JW, Weinstein IB. Roles of specific isoforms of protein kinase C in the transcriptional control of cyclin D1 and related genes. *J Biol Chem* 2003;278(36):34709-34716.
302. Tsai MY, Wang S, Heidinger JM, Shumaker DK, Adam SA, Goldman RD, Zheng Y. A mitotic lamin B matrix induced by RanGTP required for spindle assembly. *Science* 2006;311(5769):1887-1893.
303. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7(6):1513-23.
304. Cheng Y, Leung S, Mangoura D. Transient suppression of cortactin ectopically induces large telencephalic neurons towards a GABAergic phenotype. *J Cell Sci* 2000;113(18):3161-3172.
305. Mangoura D, Sogos V, Dawson G. 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):1-11.

306. Jessen KR, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, Gavrilovic J. The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron* 1994;12(3):509-527.
307. McElroy SL, Reijo Pera RA .Preparation of mouse embryonic fibroblast feeder cells for human embryonic stem cell culture. *CSH Protoc* 2008;2008:pdb.prot5041.
308. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(12):5547-5551.
309. Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(14):7963-7968.
310. Yin DX, Zhu L, Schimke RT. Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression. *Anal Biochem* 1996;235(2):195-201.
311. Baron U, Gossen M, Bujard H. Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res* 1997;25(14):2723-2729.
312. Triezenberg SJ, LaMarco KL, McKnight SL. Evidence of DNA: protein interactions that mediate HSV-1 immediate early gene activation by VP16. *Genes Dev* 1988;2(6):730-742.
313. Mochly-Rosen D, Wu G, Hahn H, Osinska H, Liron T, Lorenz JN, Yatani A, Robbins J, Dorn GW 2nd. Cardioprotective effects of protein kinase C epsilon: analysis by in vivo modulation of PKCepsilon translocation. *Circ Res* 2000;86(11):1173-9.
314. Kimura K, Tsuji T, Takada Y, Miki T, Narumiya S. Accumulation of GTP-bound RhoA during cytokinesis and a critical role of ECT2 in this accumulation. *J Biol Chem* 2000;275(23):17233-1726.
315. Mangoura D, Theofilopoulos S, Karouzaki S, Tsirimonaki E. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-dependent up-regulation of dopaminergic gene expression requires Ras and neurofibromin in human IMR-32 neuroblastoma. *J Neurochem.* 2006;97(Suppl 1):97-103.
316. Takemoto A, Kimura K, Yokoyama S, Hanaoka F. Cell cycle-dependent phosphorylation, nuclear localization, and activation of human condensin. *J Biol Chem* 2004;279(6):4551-9.
317. Bajetto A, Barbero S, Bonavia R, Chimini G, Schettini G. Immunofluorescence and biochemical techniques to detect nuclear localization of ciliary neurotrophic factor in glial cells. *Brain Res Brain Res Protoc* 2000;5(3):273-81.

318. Barkan B, Starinsky S, Friedman E, Stein R, Kloog Y. The Ras Inhibitor Farnesylthiosalicylic Acid as a Potential Therapy for Neurofibromatosis Type 1 Clin Cancer Res 2006;12(18):5533-5542.
319. Cashen DV, Parisien RC, Raskin K, Hornicek FJ, Gebhardt MC, Mankin HJ. Survival data for patients with malignant schwannoma. Clin Orthop Relat Res 2004;(426):69-73.
320. Fagerström S, Pålman S, Gestblom C, Nånberg E. Protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells. Cell Growth Differ 1996;7(6):775-785.
321. Silei V, Politi V, Lauro GM. Uridine induces differentiation in human neuroblastoma cells via protein kinase C epsilon. J Neurosci Res 2000;61(2):206-211.
322. Canals M, Angulo E, Casadó V, Canela EI, Mallol J, Viñals F, Staines W, Tinner B, Hillion J, Agnati L, Fuxe K, Ferré S, Lluís C, Franco R. Molecular mechanisms involved in the adenosine A and A receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures. J Neurochem 2005;92(2):337-348.
323. Monaghan TK, Mackenzie CJ, Plevin R, Lutz EM. PACAP-38 induces neuronal differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells via cAMP-mediated activation of ERK and p38 MAP kinases. J Neurochem 2008;104(1):74-88.
324. Delaune A, Corbière C, Benjelloun FD, Legrand E, Vannier JP, Ripoll C, Vasse M. Promyelocytic leukemia-nuclear body formation is an early event leading to retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells. J Neurochem 2008;104(1):89-99.
325. Lee JH, Kim KT. Induction of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 through the extracellular-signal-regulated kinase and protein kinase A pathways during retinoic-acid mediated neuronal differentiation in human neuroblastoma SK-N-BE(2)C cells. J Neurochem 2004;91(3):634-647.
326. Miloso M, Villa D, Crimi M, Galbiati S, Donzelli E, Nicolini G, Tredici G. Retinoic acid-induced neuritogenesis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is ERK independent and PKC dependent. J Neurosci Res 2004;75(2):241-252.
327. Edsjö A, Holmquist L, Pålman S. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. Semin Cancer Biol 2007;17(3):248-256.
328. Cichowski K, Santiago S, Jardim M, Johnson BW, Jacks T. Dynamic regulation of the Ras pathway via proteolysis of the NF1 tumor suppressor. Genes Dev 2003;17(4):449-454.
329. Hölzel M, Huang S, Koster J, Ora I, Lakeman A, Caron H, Nijkamp W, Xie J, Callens T, Asgharzadeh S, Seeger RC, Messiaen L, Versteeg R, Bernards R. NF1 is a tumor suppressor in neuroblastoma that determines retinoic acid response and disease outcome. Cell 2010;142(2):218-229.

330. Ho A, Dowdy SF. Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12(1):47-52.
331. Zhen Y, Sørensen V, Jin Y, Suo Z, Wiedłocha A. Indirubin-3'-monoxime inhibits autophosphorylation of FGFR1 and stimulates ERK1/2 activity via p38 MAPK. *Oncogene.* 2007;26(44):6372-6385.
332. Rani CS, Abe A, Chang Y, Rosenzweig N, Saltiel AR, Radin NS, Shayman JA. Cell cycle arrest induced by an inhibitor of glucosylceramide synthase. Correlation with cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 1995;270(6):2859-2867.
333. MacLachlan TK, Somasundaram K, Sgagias M, Shifman Y, Muschel RJ, Cowan KH, El-Deiry WS. BRCA1 effects on the cell cycle and the DNA damage response are linked to altered gene expression. *J Biol Chem.* 2000;275(4):2777-2785.
334. Wang Y, Azuma Y, Moore D, Osheroff N, Neufeld KL. Interaction between tumor suppressor adenomatous polyposis coli and topoisomerase IIalpha: implication for the G2/M transition. *Mol Biol Cell* 2008;19(10):4076-85.
335. Laird AD, Taylor SJ, Oberst M, Shalloway D. Raf-1 is activated during mitosis. *J Biol Chem* 1995;270(45):26742-26745.
336. Kalnins VI, Opas M, Ahmet I, Fedoroff S. Astrocyte cell lineage. IV. Changes in the organization of microfilaments and adhesion patterns during astrocyte differentiation in culture. *J Neurocytol* 1984;13(6):867-82.
337. Kim S, Coulombe PA. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev.* 2007;21(13):1581-1597.
338. Tapinos N, Rambukkana A. Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk1/2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(26):9188-9193.
339. Akita Y. Protein kinase Cepsilon: multiple roles in the function of, and signaling mediated by, the cytoskeleton. *FEBS J* 2008;275(16):3995-4004.
340. Asimaki O, Leondaritis G, Lois G, Sakellaridis N, Mangoura D. Cannabinoid 1 receptor-dependent transactivation of fibroblast growth factor receptor 1 emanates from lipid rafts and amplifies extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in embryonic cortical neurons. *J Neurochem* 2011;116(5):866-873.
341. Hundle B, McMahon T, Dagar J, Messing RO. Overexpression of e-protein kinase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth. *J Biol Chem* 1995;270(50):30134-30140.
342. Ling M, Trollér U, Zeidman R, Stensman H, Schultz A, Larsson C. 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):17910-17919.

343. Olsson AK, Vadhammar K, Nånberg E. Activation and protein kinase C-dependent nuclear accumulation of ERK in differentiating human neuroblastoma cells. *Exp Cell Res* 2000;256(2):454-467.
344. Troller U, Zeidman R, Svensson K, Larsson C. A PKCbeta isoforms mediates phorbol ester-induced activation of Erk1/2 and expression of neuronal differentiation genes in neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 2001;508(1):126-130.
345. Heikkila J, Jalava A, Eriksson K. The selective protein kinase C inhibitor GF109203X inhibits phorbol ester-induced morphological and functional differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197(3):1185-1193.
346. Mattingly RR, Milstein ML, Mirkin BL. Down-regulation of growth factor-stimulated MAP kinase signaling in cytotoxic drug-resistant human neuroblastoma cells. *Cell Signal* 2001;13(7):499-505.
347. Basu A, Sivaprasad U. Protein kinase C ϵ makes the life and death decision. *Cell Signal* 2008;19(8):1633-1642.
348. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3(3):203-216.
349. Godin F, Villette S, Vallée B, Doudeau M, Morisset-Lopez S, Ardourel M, Hevor T, Pichon C, Bénédicti H. A fraction of neurofibromin interacts with PML bodies in the nucleus of the CCF astrocytoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;24;418(4):689-94.
350. Balla S, Thapar V, Verma S, Luong T, Faghri T, Huang CH, Rajasekaran S, del Campo JJ, Shinn JH, Mohler WA, Maciejewski MW, Gryk MR, Piccirillo B, Schiller SR, Schiller MR. Minomotif Miner: a tool for investigating protein function. *Nat Methods* 2006;3(3):175-7.
351. Mi T, Merlin JC, Deverasetty S, Gryk MR, Bill TJ, Brooks AW, Lee LY, Rathnayake V, Ross CA, Sargeant DP, Strong CL, Watts P, Rajasekaran S, Schiller MR. Minomotif Miner 3.0: database expansion and significantly improved reduction of false-positive predictions from consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 2012;40 (Database issue):D252-60.
352. Kampfner S, Windegger M, Hochholdinger F, Schwaiger W, Pestell RG, Baier G, Grunicke HH, Uberall F. Protein kinase C isoforms involved in the transcriptional activation of cyclin D1 by transforming Ha-Ras. *J Biol Chem* 2001;276(46):42834-42842.
353. Petrovics G, Bird T, Lehel C, Oravec T, Anderson WB. Protein kinase Cepsilon mediates PMA-induced growth inhibition of low population density NIH 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 2002;397(2):217-223.

354. Saurin AT, Brownlow N, Parker PJ. Protein kinase C epsilon in cell division: control of abscission. *Cell Cycle* 2009;8(4):549-55.
355. Kobayashi M, Hashimoto N, Hoshino M, Hattori S, Iwashita S. Differential contribution of M(r) 120 kDa rasGTPase-activating protein and neurofibromatosis type 1 gene product during the transition from growth phase to arrested state in human fibroblasts accompanied by a unique rasGTPase-activating activity. *FEBS Lett* 1993;327(2):177-182.
356. Yang FC, Ingram DA, Chen S, Zhu Y, Yuan J, Li X, Yang X, Knowles S, Horn W, Li Y, Zhang S, Yang Y, Vakili ST, Yu M, Burns D, Robertson K, Hutchins G, Parada LF, Clapp DW. Nf1-dependent tumors require a microenvironment containing Nf1 +/- and c-kit-dependent bone marrow. *Cell* 2008;135(3):437-448.
357. Gutmann DH, Loehr A, Zhang Y, Kim J, Henkemeyer M, Cashen A. Haploinsufficiency for the neurofibromatosis 1 (NF1) tumor suppressor results in increased astrocyte proliferation. *Oncogene* 1999;18(31):4450-4459.
358. Ingram DA, Hiatt K, King AJ, Fisher L, Shivakumar R, Derstine C, Wenning MJ, Diaz B, Travers JB, Hood A, Marshall M, Williams DA, Clapp DW. Hyperactivation of p21(ras) and the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, cooperate to alter the proliferation of neurofibromin-deficient mast cells in vivo and in vitro. *J Exp Med* 2001;194(1):57-69.
359. Pemov A, Park C, Reilly KM, Stewart DR. Evidence of perturbations of cell cycle and DNA repair pathways as a consequence of human and murine NF1-haploinsufficiency. *BMC Genomics* 2010;11:194.
360. Muranen T, Grönholm M, Renkema GH, Carpén O. Cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling of the neurofibromatosis 2 tumour suppressor merlin. *Oncogene* 2005;24(7):1150-1158.
361. Dmitriev RI, Okkelman IA, Abdulin RA, Shakhparonov MI, Pestov NB. Nuclear transport of protein TTC4 depends on the cell cycle. *Cell Tissue Res* 2009;336(3):521-527.
362. Chestukhin A, Litovchick L, Rudich K, DeCaprio JA. Nucleocytoplasmic shuttling of p130/RBL2: novel regulatory mechanism. *Mol Cell Biol* 2002;22(2):453-468.
363. Rivera MN, Kim WJ, Wells J, Stone A, Burger A, Coffman EJ, Zhang J, Haber DA. The tumor suppressor WTX shuttles to the nucleus and modulates WT1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(20):8338-43.
364. Kang J, Goodman B, Zheng Y, Tantin D. Dynamic regulation of Oct1 during mitosis by phosphorylation and ubiquitination. *PLoS One* 2011;6(8):e23872.
365. Prus W, Zabka M, Bieganski P, Filippek A. Nuclear translocation of Sgt1 depends on its phosphorylation state. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43(12):1747-1753.

366. Zhang X, Gan L, Pan H, Guo S, He X, Olson ST, Mesecar A, Adam S, Unterman TG. Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem* 2002;22;277(47):45276-84.
367. Gan L, Zheng W, Chabot JG, Unterman TG, Quirion R. Nuclear/cytoplasmic shuttling of the transcription factor FoxO1 is regulated by neurotrophic factors. *J Neurochem* 2005;93(5):1209-19.
368. Zhang Y, Xiong Y. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 2001;8;292(5523):1910-5.
369. Zhang F, White RL, Neufeld KL. Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;7;97(23):12577-82.
370. Zhang F, White RL, Neufeld KL. Cell density and phosphorylation control the subcellular localization of adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell Biol* 2001;21(23):8143-56.
371. Malminen M, Peltonen S, Koivunen J, Peltonen J. Functional expression of NF1 tumor suppressor protein: association with keratin intermediate filaments during the early development of human epidermis. *BMC Dermatol* 2002;2:10.
372. Nousiainen M, Silljé HH, Sauer G, Nigg EA, Körner R. Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(14):5391-5396.
373. Dephoure N, Zhou C, Villén J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;(5):105(31):10762-7.
374. Daub H, Olsen JV, Bairlein M, Gnad F, Oppermann FS, Körner R, Greff Z, Kéri G, Stemmann O, Mann M. Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Mol Cell*. 2008;(8):31(3):438-48.
375. Santamaria A, Wang B, Elowe S, Malik R, Zhang F, Bauer M, Schmidt A, Silljé HH, Körner R, Nigg EA. The Plk1-dependent phosphoproteome of the early mitotic spindle. *Mol Cell Proteomics* 2011;(1):M110.004457.
376. van de Weerd BC, Medema RH. Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle* 2006;5(8):853-64.
377. Joukov V, Groen AC, Prokhorova T, Gerson R, White E, Rodriguez A, Walter JC, Livingston DM. The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly. *Cell* 2006;127(3):539-552.

378. Dikovskaya D, Newton IP, Nathke IS. The adenomatous polyposis coli protein is required for the formation of robust spindles formed in CSF *Xenopus* extracts. *Mol Biol Cell* 2004;15(6):2978-2991.
379. Zumbunn J, Kinoshita K, Hyman AA, N athke IS. Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation *Curr Biol*. 2001;(9):11(1):44-9.
380. Dikovskaya D, Li Z, Newton IP, Davidson I, Hutchins JR, Kalab P, Clarke PR, N athke IS. Microtubule assembly by the Apc protein is regulated by importin-beta--RanGTP. *J Cell Sci* 2010;(1):123(Pt 5):736-46.
381. Muranen T, Gr nholm M, Lampin A, Lallemand D, Zhao F, Giovannini M, Carp n O. The tumor suppressor merlin interacts with microtubules and modulates Schwann cell microtubule cytoskeleton. *Hum Mol Genet* 2007;(1)5:16(14):1742-51.
382. Xu H, Gutmann DH. Mutations in the GAP-related domain impair the ability of neurofibromin to associate with microtubules. *Brain Res*. 1997;759(1):149-152.
383. Hakimi MA, Speicher DW, Shiekhattar R. The motor protein kinesin-1 links neurofibromin and merlin in a common cellular pathway of neurofibromatosis. *J Biol Chem* 2002;277(40):36909-36912.
384. Lin YL, Hsueh YP. Neurofibromin interacts with CRMP-2 and CRMP-4 in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;369(2):747-752.
385. Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, M nager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, Kaibuchi K. CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* 2002;4(8):583-591.
386. Chae YC, Lee S, Heo K, Ha SH, Jung Y, Kim JH, Ihara Y, Suh PG, Ryu SH. Collapsin response mediator protein-2 regulates neurite formation by modulating tubulin GTPase activity. *Cell Signal* 2009;21(12):1818-1826.
387. Gu Y, Ihara Y. Evidence that collapsin response mediator protein-2 is involved in the dynamics of microtubules. *J Biol Chem* 2000;275(24):17917-17920.
388. Lin PC, Chan PM, Hall C, Manser E. Collapsin response mediator proteins (CRMPs) are a new class of microtubule-associated protein (MAP) that selectively interacts with assembled microtubules via a taxol-sensitive binding interaction. *J Biol Chem* 2011;286(48):41466-41478.
389. Chen CR, Li YC, Chen J, Hou MC, Papadaki P, Chang EC. Moe1, a conserved protein in *Schizosaccharomyces pombe*, interacts with a Ras effector, Scd1, to affect proper spindle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(2):517-22.
390. Li YC, Chen CR, Chang EC. Fission yeast Ras1 effector Scd1 interacts with the spindle and affects its proper formation. *Genetics* 2000;156(3):995-1004.

391. Willard FS, Willard MD, Kimple AJ, Soundararajan M, Oestreich EA, Li X, Sowa NA, Kimple RJ, Doyle DA, Der CJ, Zylka MJ, Snider WD, Siderovski DP. Regulator of G-protein signaling 14 (RGS14) is a selective H-Ras effector. *PLoS One* 2009;4(3):e4884.
392. Martin-McCaffrey L, Willard FS, Oliveira-dos-Santos AJ, Natale DR, Snow BE, Kimple RJ, Pajak A, Watson AJ, Dagnino L, Penninger JM, Siderovski DP, D'Souza SJ. RGS14 is a mitotic spindle protein essential from the first division of the mammalian zygote. *Dev Cell* 2004;7(5):763-769.
393. Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, Wang J, Ouyang B, Elisei R, Stambrook PJ, Fagin JA. The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. *Oncogene*. 2000;19(34):3948-3954.
394. Knauf JA, Ouyang B, Knudsen ES, Fukasawa K, Babcock G, Fagin JA. Oncogenic RAS induces accelerated transition through G2/M and promotes defects in the G2 DNA damage and mitotic spindle checkpoints. *J Biol Chem*. 2006;281(7):3800-3809.
395. Tang N, Marshall WF, McMahon M, Metzger RJ, Martin GR. Control of mitotic spindle angle by the RAS-regulated ERK1/2 pathway determines lung tube shape. *Science* 2011;(15):333(6040):342-5.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	Κολιού Ξένη
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	20/07/1983
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	Χολαργός, Αττικής
ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ	Ελληνική
ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ	Βιολόγος
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ	Β. Μελά 27, Χολαργός, 15562, Αθήνα
E-MAIL:	xenia.koliou@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2006-Σήμερα	Υποψήφια Διδάκτωρ του Τομέα Βασικών Επιστημών του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
2001-2006	Πτυχίο Βιολογίας, Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό «Λίαν Καλώς». Διπλωματική εργασία με θέμα «Μοριακή ανάλυση του γονιδίου MEFV στον Οικογενή Μεσογειακό Πυρετό».
2001	Απολυτήριο Ενιαίου Λυκείου από το 3ο Ενιαίο Λύκειο Χολαργού με γενικό βαθμό «Άριστα» και διαγωγή Κοσμιωτάτη.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2006-Σήμερα	Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο εργαστήριο Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας και Νευροχημείας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) με θέμα: «Αναστολή της PKC-ε και μηχανισμοί ογκογένεσης στο ΚΝΣ» υπό την επίβλεψη της Δρ. Δ. Μάγκουρα και του Καθηγητή Ν. Σακελλαρίδη.
2008	Ειδική Τεχνικός Επιστήμων στο διαγνωστικό κέντρο "Genekor".

- 2005-2006 Ειδική Τεχνικός Επιστήμων στο τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Διάγνωσης του Δ.Θ.Κ.Α «ΥΓΕΙΑ».
- 2004-2005 Εκπόνηση εξωτερικής διπλωματικής εργασίας με θέμα: «Μοριακή ανάλυση του γονιδίου MEFV στον Οικογενή Μεσογειακό Πυρετό» στον Τομέα Μοριακής Βιολογίας του Δ.Θ.Κ.Α «ΥΓΕΙΑ» υπό την επίβλεψη του Δρ. Γ. Νασιούλα και της Καθηγήτριας Κ. Λάμνησου.
- 2003 Οκτάμηνη απασχόληση στον Οργανισμό Τηλεπικοινωνιών Ελλάδος στην τηλεφωνική εξυπηρέτηση πελατών.

ΒΡΑΒΕΙΑ

- 2011 Υποτροφία από την Πανερωπαϊκή Ένωση των Βιοχημικών Οργανισμών (FEBS) για συμμετοχή και παρουσίαση ερευνητικής εργασίας στο 36^ο Συνέδριο FEBS, Ιούνιος 2011, Τορίνο.
- 2010 Βραβείο αναρτημένης ανακοίνωσης από την Ελληνική Εταιρεία Νευροεπιστημών.
- 2009 Υποτροφία από την Πανερωπαϊκή Ένωση των Βιοχημικών Οργανισμών (FEBS) για συμμετοχή και παρουσίαση ερευνητικής εργασίας στο 34^ο Συνέδριο FEBS, Ιούλιος 2009, Πράγα.
- 2009 Υποτροφία από την GENICA (Genomic instability in Cancer and Precancer) για την παρακολούθηση του 2^{ου} GENICA/CANGENIN Genomic instability workshop, Μάιος 2009, Αθήνα
- 2006-2009 Υποτροφία ΠΕΝΕΔ από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας για εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Koliou X, Fedonidis K, Tsimonaki E, Sakellaridis N, and Mangoura D. PKCε phosphorylation induces nuclear localization of the tumor suppressor neurofibromin in post-mitotic neurons and prevents its proteasomal degradation. In preparation for Biochem. J.

Koliou X and Mangoura D. Neurofibromin is a centrosome and spindle protein and its cell cycle-dependent nuclear shuttling requires PKCε and Ran. Plos Biology, submitted

Leondaritis G, **Koliou X**, Johnson S, Li C, Florakis A, Dimas K, Sakellaridis N, Mangoura D. Interplay between protein kinase C isoforms alpha and epsilon, neurofibromin, and the Ras/MAPK pathway in neuroblastoma differentiation. Neuroblastoma, Intech. 2011; ISBN:978-953-307-796-3.

Chalevelakis G, Apostolakis I, **Koliou X**, Apeessos A, Kyriakopoulou V, Vrakidou E, Vasilopoulou A, Lamnisou K, Nasioulas G. Different intrafamilial clinical presentation of FMF mutation carriers. Genet Test. 2008;12(1):125-7.

Κυριακοπούλου Β, Λουδάρος Ε, Σακκά Π, Απέσσου Α, **Κολιού Ξ**, Νασιούλας Γ. Γονιδιακή ανάλυση για τη νόσο Alzheimer. Ιατρικά Ανάλεκτα 2005;2(6):152.

Παπαδοπούλου Ε, **Κολιού Ξ**, Καρυδά Ε, Αγγελάκης Φ, Δαρδούφας Κ, Σωτηρίου Β, Δαβίλας Η, Νασιούλας Γ. Ανίχνευση καρκινικού DNA στο πλάσμα: Ένας νέος καρκινικός δείκτης. Ιατρικά Ανάλεκτα 2005;2(7):128.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

Koliou X, Karouzaki S, Leondaritis G, Kalpachidou T, Sakellaridis N, Mangoura D. Intracellular mobilization of neurofibromin in neurons: role of phosphorylation on distinct domains and sites. Soc. Neurosci., Washington, 2011.

- Koliou X**, Mangoura D. PKC ϵ regulates the nucleocytoplasmic shuttling of neurofibromin in post-mitotic neurons. 23rd ISN-ESN Biennial Meeting, Athens, 2011.
- Fedonidis C, **Koliou X**, Asimaki O, Alexakis N, Mangoura D. Ghrelin regulates energy balance through hypothalamic receptors in a rat obesity model. ISN-ESN 23rd Biennial Meeting, Athens, 2011.
- Koliou X**, Sakellaridis N, Mangoura D. Nucleocytoplasmic shuttling of neurofibromin in post-mitotic neurons. 36th FEBS Congress, Torino, 2011.
- Fedonidis C, **Koliou X**, Asimaki O, Albanopoulos K, Alexakis N, Mangoura D. Ghrelin regulates obesity-related receptors in a rat obesity model. 36th FEBS Congress, Torino, 2011.
- Fedonidis C, **Koliou X**, Stergiopoulos C, Asimaki O, Albanopoulos K, Leandros E, Alexakis N, Mangoura D. Sleeve gastrectomy induces weight loss and long-term molecular changes in the gut-brain axis in a rat obesity model. 27th Panhellenic Congress of Surgery, International Surgical Forum, Athens, 2010.
- Koliou X**, Dimas K, Sakellaridis N, Mangoura D. PKC ϵ regulates differentiation in Peripheral Nervous System tumor cells. Symposium of Hellenic Society for Neuroscience, Athens, 2010. ***Poster presentation received HSN Prize**
- Fedonidis C, **Koliou X**, Stergiopoulos C, Asimaki O, Alexakis N, Mangoura D. Ghrelin hormone regulates body weight in a rat obesity model. Symposium of Hellenic Society for Neuroscience, Athens, 2010. ***Poster presentation received HSN Prize**
- Koliou X**, Leondaritis G, Sakellaridis N, Mangoura D. Nucleocytoplasmic shuttling of neurofibromin in gliomas is regulated by phosphorylation. Soc. Neurosci., Chicago, 2009.
- Koliou X**, Leondaritis G, Mangoura D. Nuclear intermolecular interactions of neurofibromin during the cell cycle. 34th FEBS Congress, Prague, 2009

Koliou X, Nasioulas G, Sakellaridis N, Mangoura D. Transcriptional regulation of PKC isoforms during cell cycle in MCF7 and PC3 cancer cell lines. 59th Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Athens, 2007.

ΕΙΔΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

- Άριστη γνώση Αγγλικών, κάτοχος Michigan Certificate of Proficiency in English.
- Ικανοποιητική γνώση Γαλλικών, κάτοχος Delf.
- Άριστη γνώση Η/Υ.
- Κάτοχος 2 Dan (Nidan) στην Ιαπωνική πολεμική τέχνη Iaido.