



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Νίκος Σακελλαρίδης

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ (PKC)
ΑΠΟ ΔΙΑΚΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΗ ΚΑΙ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ
ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΪΝΙΔΙΝΗΣ

ΣΟΦΙΑ ΚΑΡΟΥΖΑΚΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΣΣΑΛΙΑ 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ (PKC)
ΑΠΟ ΔΙΑΚΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΗ ΚΑΙ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΗΣ
ΝΕΥΡΟΪΝΙΔΙΝΗΣ

ΣΟΦΙΑ ΚΑΡΟΥΖΑΚΗ

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:

- Νικόλαος 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
- Αλέξανδρος Παπαδημητρίου, PhD
Καθηγητής Νευρολογίας 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 του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	9
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
1.1. Ιστορικά στοιχεία	14
1.2. Η Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (NF-1)	15
1.3. Το γονίδιο της νευροϊνωμάτωσης τύπου 1, NF1.....	18
1.3.1. Μετάγραφα του γονιδίου της NF-1	19
1.4. Η πρωτεΐνη Νευροϊνιδίνη.....	20
1.4.1. Υποκυτταρικός εντοπισμός της Νευροϊνιδίνης	21
1.4.2. Πρωτεϊνικά μοτίβα της Νευροϊνιδίνης.....	21
1.4.3. Ενεργοποίηση του Ras από RasGEFs.....	24
1.4.4. Αλληλεπιδράσεις της Νευροϊνιδίνης	27
1.4.5. Φωσφορύλιωση της Νευροϊνιδίνης.....	29
1.4.6. Νευροϊνιδίνη μνήμη και μάθηση	30
1.4.7. Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης σε άξονες και δενδρίτες.	31
1.5. Πρωτεϊνική κινάση C (PKC).....	33
1.5.1. Δομή και λειτουργία της Πρωτεϊνικής Κινάσης C E (PKCε)	35
1.6. Οργάνωση κυτταρικής μεμβράνης	37
1.6.1. Μοντέλο ρευστού μωσαϊκού	37
1.6.2. Κύρια λιπιδικά συστατικά της πλασματικής μεμβράνης: φωσφολιπίδια σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη.	38
1.7. Λιπιδικές σχεδίες	41
1.7.1. Καβεολίνες	43
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	46
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
2.1. Πλασμίδια και καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων	47
2.1.1. Πλασμίδια.....	47
2.1.2. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με τη χρήση θερμικού σοκ ..	47
2.1.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής και μεσαίας κλίμακας από βακτηριακή καλλιέργεια	47
2.1.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA	48
2.1.5. Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	48

2.1.6. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης.....	48
2.2. Κυτταροκαλλιέργειες.....	49
2.2.1. Απομόνωση εγκεφαλικού ιστού νεοσσών.....	49
2.2.2. Απομόνωση και Καλλιέργεια Πρωτογενών Νευρώνων και Αστροκυττάρων	49
2.2.3. Καλλιέργεια Ευκαριωτικών Κυττάρων.....	50
2.2.4. Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τεχνολογία ηλεκτροδιάτρησης (AMAXA).	50
2.2.5. Χορήγηση αγωνιστών και αναστολέων	51
2.2.6. Απομόνωση ολικού RNA από ευκαριωτικά κύτταρα.....	52
2.2.7. Αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR).....	52
2.2.8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	53
2.4. Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών	54
2.4.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών	54
2.4.2. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών	55
2.4.3. Υποκυτταρική κλασμάτωση - Απομόνωση πυρήνων.....	55
2.4.4. Απομόνωση μικροσωμάτων	56
2.4.5. Απομόνωση αστροκυττάρων με φυγοκέντρηση πυκνότητας.....	56
2.4.6. Απομόνωση λιπιδικών σχεδίων	57
2.4.7. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry.....	58
2.4.8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)	58
2.4.9. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot).....	59
2.5. Δοκιμασία Δραστικότητας Ras (RBD pull down assay)	61
2.6. In vitro δοκιμασία κινάσης.....	62
2.7. Προσδιορισμός χοληστερόλης	64
2.8. Μέθοδος χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας TLC	64
2.9. Δοκιμασία ανοσοκυτταροχημείας φθορισμού	66
2.10. Πυκνομετρική ανάλυση των ζωνών ηλεκτροφόρησης.....	67
2.11. Φασματογραφία Μάζας	68
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	69
3.1. Ανάλυση της έκφρασης των επίπεδων της πρωτεΐνης Νευροϊνιδίνης και του γονιδίου της NF1 κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης	69

3.1.1. Η έκφραση της πρωτεΐνης Νευροϊνιδίνης και της Ha-Ras κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης του κεντρικού νευρικού συστήματος	69
3.1.2. Η έκφραση του ενζύμου Υδροξυλάση της Τυροσίνης που ρυθμίζει το βιοχημικό φαινότυπο των νευρώνων, αυξάνεται κατά τη διαδικασία διαφοροποίησης κυττάρων IMR-32 νευροβλαστώματος	71
3.1.3. Η έκφραση των μεταγράφων NF1-GRD τύπου I και II καθώς και του NF1-NLS κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης	73
3.2. Υποκυτταρικός εντοπισμός της Νευροϊνιδίνης.....	76
3.2.1. Η Νευροϊνιδίνη ανιχνεύεται σε πολλαπλά οργάνδια και εξειδικευμένες περιοχές των κυττάρων	76
3.2.2. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της Νευροϊνιδίνης με ακτίνη και τουμπουλίνη σε πρωτογενείς καλλιέργειες και εμβρυϊκό ιστό.	79
3.3. Λιπιδικές σχεδίες	81
3.3.1. Βιοχημικός χαρακτηρισμός λιπιδικών σχεδίων από εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού (ESCs)	81
3.3.2. Η Νευροϊνιδίνη ανευρίσκεται στις λιπιδικές σχεδίες νευρώνων και αστροκυττάρων	87
3.3.3. Η κατανομή της ενδογενούς Νευροϊνιδίνης σε λιπιδικές σχεδίες διαφοροποιείται μετά από υπερέκφραση των περιοχών της GRDI, GRDII, SEC14, GRDI+SEC14.....	89
3.3.4. Φωσφορυλίωση της Νευροϊνιδίνης από την PKCε προκαλεί την επιστράτευση της στις λιπιδικές σχεδίες	92
3.3.5. Οι ενεργοποιημένες PKCε και Ras ανευρίσκονται στις λιπιδικές σχεδίες	95
3.3.6. Η ενεργοποίηση της PKCε προκαλεί την απομάκρυνση της RasGEF Sos1 από τις λιπιδικές σχεδίες.	97
3.4. Ανάλυση του ρόλου των ισομορφών GRDI και GRDII της Νευροϊνιδίνης στη διαφοροποίηση των νευρώνων.....	98
3.4.1. Φαινοτυπική ανάλυση της υπερέκφρασης των GRDI και GRDII σε πρωτογενείς νευρώνες.	98
3.4.2. Η GRDI και GRDII περιοχή της Νευροϊνιδίνης συνεντοπίζεται με τους κυτταροσκελετούς ακτίνης και μικροσωλινίσκων.	101
3.5. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της Νευροϊνιδίνης και συμβολή τους στο μηχανισμό διαφοροποίησης.	105

3.5.1. Μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων της Νευροϊνιδίνης κατά την διαδικασία της διαφοροποίησης των SHSY5Y κυττάρων νευροβλαστώματος.	105
3.5.2. Οι περιοχές της Νευροϊνιδίνης GRDI και GRDII παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα σύζευξης με την ακτίνη.....	108
3.5.3. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της Νευροϊνιδίνης στον ιππόκαμπο και εγκεφαλικό φλοιό αρουραίου.....	110
3.5.4. Η δέσμευση της Νευροϊνιδίνης σε πρωτεΐνες των μετασυναπτικών πυκνοτήτων της προσδίδουν καθοριστικό ρολό στη νευρική διαφοροποίηση και πιθανόν στην λειτουργία των συνάψεων	111
3.5.5. Επίδραση EGF σε SHSY5Y διαφοροποιημένα κύτταρα επάγει την ενεργοποίηση της ERK.....	113
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	115
4.1. Μεταγραφική ρύθμιση της Νευροϊνιδίνης κατά την ανάπτυξη.	115
4.2. Μηχανισμός και σημασία υποκυτταρικής στόχευσης της Νευροϊνιδίνης.....	118
4.3. Νευροϊνιδίνη και νευρωνική διαφοροποίηση.	122
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	126
SUMMARY	128
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	130
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	156

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) κατά τη χρονική περίοδο 05/2006 – 06/2012. Εκπονήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003 με τίτλο «Διεπιστημονική μελέτη της PKCε 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.

Στη μακρά διαδρομή που διανύεται μέχρι την περάτωση μιας διατριβής υπήρξαν πολλοί άνθρωποι που συνέβαλαν ο καθένας με τον τρόπο του. Πρώτη οφείλω να ευχαριστήσω την επιστημονική υπεύθυνη του έργου Δρ. Δήμητρα Μάγκουρα για την αρχική ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στη συγκεκριμένη μελέτη και τη δυνατότητα να οικοδομήσω μια σχέση εμπιστοσύνης στα πλαίσια ενός απαιτητικού ερευνητικού περιβάλλοντος. Η καθοδήγησή της όλα αυτά τα χρόνια υπήρξε καθοριστική και η τεράστια εμπειρία της ήταν σταθερά ένα ασφαλές καταφύγιο στις καθημερινές δυσκολίες του ερευνητικού έργου. Τέλος η ενθάρρυνση και η υποστήριξη της Δρ. Μάγκουρα τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο, ήταν καταλυτικής σημασίας στον τρόπο που πλέον προσεγγίζω τόσο τις απογοητεύσεις όσο και τις επιτυχίες στα πλαίσια της μακράς περιπέτειας της έρευνας.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Νίκο Σακελλαρίδη που με τη θέληση και την καλή του διάθεση συνέβαλε ουσιαστικά στην εκπόνηση της εργασίας αυτής με τις πολύτιμες ιδέες, τις επιστημονικές συμβουλές και τις εύστοχες υποδείξεις του.

Εκφράζω, επίσης, τις ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Πιτσικά για τις παρατηρήσεις του και την ενθάρρυνση που έλαβα από μέρους του.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά για τη διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που στην κρίση τους υποβάλλεται αυτή η διατριβή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τις αγαπημένες φίλες και, επίσης, διδάκτορες Ξένια Κολιού και Όλγα Ασημάκη για την άριστη συνεργασία εντός και εκτός εργαστηρίου. Μαζί μοιραστήκαμε ευχάριστες και δυσάρεστες στιγμές, καθεμία από αυτές πολύτιμες κατά την παράλληλη πορεία των διατριβών και ζωών μας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας και Νευροχημείας και συγκεκριμένα στην αναντικατάστατη φίλη, τεχνικό του εργαστηρίου και υποψήφια διδάκτωρ Εμμανουέλλα Τσιριμωνάκη για όλα όσα με μεγάλη υπομονή και κατανόηση που μου υπέδειξε και την τεράστια στήριξή της σε όλη την πορεία της διατριβής, στον υποψήφιο διδάκτορα Κων. Φαιδωνίδη, στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Θεοδώρα Καλπαχίδου και στη φοιτήτρια Άρτεμης Ευστρατίου για την πολύπλευρη συμπαράσταση και βοήθειά τους κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο Δρ. Γ. Λεονταρίτη τόσο για τις πολύτιμες υποδείξεις και την αμέριστη βοήθειά του σε επιστημονικό επίπεδο όσο και για την ηθική του υποστήριξη σε όλη την πορεία της διατριβής. Το αμείωτο ενδιαφέρον του στάθηκε για εμένα πολύτιμος σύμμαχος για την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στους γονείς μου Δήμητρα και Μανώλη και στην αδελφή μου Μαρία και στον σύζυγο της Απόστολο για την ηθική συμπαράσταση αλλά και την υπομονή που έδειξαν στις δύσκολες ώρες έως ότου ολοκληρώσω το στόχο μου.

Σοφία Καρουζάκη,
Ιούνιος 2012

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AP:	Αλκαλική φωσφατάση (Alkaline phosphatase)
APS:	Υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium persulfate)
BSA:	Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine serum albumin)
cDNA:	Συμπληρωματικό DNA (Complementary DNA)
CL:	Καρδιολιπίνη
CNS, ΚΝΣ:	Κεντρικό νευρικό σύστημα (Central nervous system)
CSRD:	N-terminus cysteine/serine rich domain
CTD:	Καρβοξυλική περιοχή (Carboxyl-terminus domain)
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA:	Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (Deoxyribonucleic acid)
ECL:	Ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (Enhanced Chemiluminescence)
EDTA:	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediamine tetraacetic acid)
EGF:	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor)
EGFP:	Ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Enhanced Green Fluorescent Protein)
EGTA:	Δις-(β-αμινοαιθυλαιθερο)-αιθυλενο-γλυκολο-N,N,N',N'-τετραοξικό οξύ (Ethylene glycol tetraacetic acid)
ER:	Ενδοπλασματικό δίκτυο (Endoplasmatic Reticulum)
ERK:	Ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια σήματα κινάση (extracellular signal-regulated kinase)
ERK1/2:	Ρυθμιζόμενες από εξωκυττάρια σήματα κινάσες (Extracellular signal-regulated ERK1/2)
EVI2A:	Ecotropic viral insertion site2 protein A
EVI2B:	Ecotropic viral insertion site2 protein B
ESC:	Εμβρυικό βλαστικό κύτταρο (embryonic stem cell)
FBS:	Ορός εμβρύου βοός (Fetal bovine serum)
FTI:	Farnesyl transferase inhibitor
GAP:	GTPase activating protein

GAP-43:	Αυξητική συσχετιζόμενη πρωτεΐνη 43 (Growth associated protein 43)
GDP:	Διφωσφορική γουανοσίνη (Guanosine diphosphate)
GFP:	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green fluorescent protein)
GRD:	Περιοχή σχετιζόμενη με δραστικότητα GAP (GAP-related domain)
GST:	Μεταφοράση του γλουταθείου (Glutathione S-transferase)
GTP:	Τριφωσφορική γουανοσίνη (Guanosine triphosphate)
HBSS:	Hank's Buffered Salt Solution
IPTG:	Ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτοσίδιο (Isopropyl-β-D-thiogalactoside)
LPC:	Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
LRD:	Επαναλαμβανόμενες λευκίνες (leucine repeat domain)
mRNA:	Αγγελιαφόρο ριβονουκλεϊνικό οξύ (Messenger ribonucleic acid)
MBP:	Βασική πρωτεΐνη μυελίνης (Myelin Basic Protein)
MβCD:	Μεθυλική β κυκλοδεξτρίνη (Methyl-beta-cyclodextrin)
NBO:	Neurofibromatosis Bright Objects
NES:	Nuclear Export Signal
NGF:	Νευρικός αυξητικός παράγοντας (Nerve Growth Factor)
NF-1:	Η ασθένεια της Νευροϊνωμάτωσης τύπου 1 (Neurofibromatosis type 1)
<i>NF1</i> :	Το γονίδιο της Νευροϊνωμάτωσης τύπου 1 (Neurofibromatosis type 1 gene)
NLS:	Αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear localization Sequence)
OMGP:	oligodendrocyte- myelin glycoprotein - πρωτεΐνη της πλασματικής μεμβράνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα,
PAGE:	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS:	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Phosphate buffered saline)
PC:	Φωσφατιδυλοχολίνη
PCR:	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction)
PE:	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PFA:	Παραφολμαδεϋδη (Paraformaldehyde)

PG:	Φωσφατιδυλογλυκερόλη
PI:	Φωσφατιδυλνοσιτόλη
PKA:	Πρωτεϊνική κινάση A (Protein kinase A)
PKC:	Πρωτεϊνική κινάση C (Protein kinase C)
PKCε:	Πρωτεϊνική κινάση Cα (Protein kinase Cε)
PS:	Φωσφατιδυλοσερίνη
PSD:	Μετασυναπτική πυκνότητα (post-synaptic density)
RA:	Ρετινοϊκό οξύ (retinoic acid)
RBD:	Ras binding domain
RNA:	Ριβονουκλεϊνικό οξύ (ribonucleic acid)
RT-PCR:	Αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcriptase PCR)
SDS:	Θειϊκό δωδεκανοϊκό νάτριο (Sodium dodecyl sulfate)
SM:	Σφιγγομυελίνη
Sos:	Son of sevenless
TH:	Υδροξυλάση της Τυροσίνης (Tyrosine Hydroxylase)
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)
TLC:	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography)
TNF:	Total Nuclear Fraction
UBO:	Unidentified Bright Objects – αγνώστου ταυτότητας φωτεινά αντικείμενα
ψεRACK:	Specific PKCε activator peptide CYGRKKRRQRRR–NH ₂ (TAT) \\SS/CHDAPIGYD –COOH

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ιστορικά στοιχεία

Η ασθένεια της νευροϊνωμάτωσης τύπου 1 γνωστή και ως ασθένεια του von Recklinghausen, έχει προσδιοριστεί με κλινικά κριτήρια μόλις από το 1988, όταν το εθνικό ινστιτούτο υγείας των ΗΠΑ διατύπωσε σαφώς τα διαγνωστικά κριτήρια της ασθένειας [1,2]. Όμως υπάρχουν ενδείξεις από καταγραφές ασθενών που παρουσίαζαν ανάλογα συμπτώματα, ότι η ασθένεια υπήρχε ήδη από τον 13^ο αιώνα [3]. Συνήθως τα συμπτώματα αυτά περιλαμβάνουν, περιοχές υπερχρωματισμού του δέρματος και όγκους αυτού, που προέρχονται από το περιφερικό νευρικό σύστημα. Το 1882, ο Friedrich Daniel von Recklinghausen εξέδωσε το σύγγραμμά του με τίτλο “*Ueber die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuromen*” [4]. Στο σύγγραμμα αυτό ο Recklinghausen καταγράφει την ανατομία δυο ασθενών με μελανοχρωστικές ανωμαλίες του δέρματος και όγκους, ενώ για πρώτη φορά διαπιστώνει ότι οι όγκοι αυτοί αποτελούνται από νευρωνικά κύτταρα και κύτταρα του συνδετικού ιστού, ονομάζοντάς τα νευροϊνώματα. Αργότερα, παρατηρήσεις των Crowe, Shull και Neel σε ασθενείς, οδήγησε στην καθιέρωση των καφεγαλακτόχρωων δερματικών κηλίδων ως ένα από τα συμπτώματα της ασθένειας. Ο Lisch το 1937 διαπίστωσε ότι οι ασθενείς με νευροϊνωμάτωση εμφανίζουν αμαρτώματα της ίριδας, και αποτελούν ένα από τα βασικά χαρακτηρίστηκα της ασθένειας. Η ύπαρξη κληρονομικότητας της ασθένειας διαπιστώθηκε από τους Preiser και Davenport το 1918, ενώ αργότερα οι Crow, Schull και Neel το επιβεβαίωσαν, καθώς και την υψηλή συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας και την ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα *de novo* μεταλλάξεων που οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου.[1]

Το 1987 το γονίδιο, μεταλλαγή του οποίου οδηγεί στην εμφάνιση της νόσου, χαρτογραφήθηκε στο μακρύ βραχίονα του ανθρώπινου χρωμοσώματος 17 (17;11.2) και αναγνωρίστηκε με την τεχνική κλωνοποίησης θέσης το 1990 [5].

1.2. Η Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (NF-1)

Σήμερα, η νευροϊνωμάτωση τύπου 1 ή NF-1 αποτελεί την πιο συχνή, επικρατώς κληρονομούμενη ασθένεια, με συχνότητα επίπτωσης 1:3000-3500 παγκοσμίως. Δεν εξαρτάται από εθνικά και φυλετικά χαρακτηριστικά, ενώ προσβάλλει εξίσου τα δύο φύλα [6,7]. Κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, αλλά στο 50% των ασθενών παρατηρούνται νέες μεταλλάξεις [8]. Οι ασθενείς με NF-1 παρουσιάζουν χαρακτηριστικά όπως καφεγαλακτόχρωες δερματικές κηλίδες, φακίδες των δερματικών πτυχών και αμαρτώματα της ίριδας ή οζίδια του Lisch [9]. Επιπροσθέτως, ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των παιδιών NF-1 αναπτύσσουν μαθησιακές δυσκολίες [10]. Τα διεθνή διαγνωστικά κριτήρια για την ασθένεια της νευροϊνωμάτωσης σύμφωνα με το εθνικό ινστιτούτο των ΗΠΑ παρουσιάζονται στη συνέχεια.

1. Έξι ή περισσότερες cafe-au-lait κηλίδες > 5 mm
2. Δύο ή περισσότερα νευροϊνώματα οποιουδήποτε τύπου ή μόνο μία plexiform neurofibroma
3. Δύο ή περισσότερα lisch οζίδια (ίριδα αμαρτώματα)
4. Φακίδες στη μασχάλη ή στις βουβωνικές περιοχές
5. Οπτικών γλοίωμα νεύρου
6. Μια χαρακτηριστική βλάβη των οστών, όπως η σφηνοειδής πτέρυγα δυσπλασία
7. Συγγενής πρώτου βαθμού με NF-1

Τα διεθνή διαγνωστικά κριτήρια του NIH για τη νευροϊνωμάτωση τύπου 1. Η NF-1 διαγιγνώσκεται σε έναν ασθενή όταν πληρεί δύο ή περισσότερα από τα παραπάνω κριτήρια. NIH Consensus Statement. 1988. *Arch Neurol*. p 575.

Νευροϊνώματα. Οι πιο συνήθεις όγκοι που παρουσιάζουν οι ασθενείς με νευροϊνωμάτωση είναι τα νευροϊνώματα του περιφερικού νευρικού συστήματος, τα οποία αποτελούνται από Schwann cells, ινοβλάστες, περινευρικά και σιτευτικά κύτταρα (Mast cells) [11,12]. Οι αργά-αυξανόμενοι αυτοί όγκοι μπορούν να εμφανιστούν σε πολλαπλές περιοχές του σώματος όπως τα άκρα το κεφάλι και το στήρνο [13]. Τα νευροϊνώματα μπορεί να είναι επιδερμικά, κυρίως καλοήγη νεοπλάσματα, αλλά και πλεγματοειδή νευροϊνώματα [14]. Τα επιδερμικά νευρώματα είναι υποδόρια και εμφανίζονται στην αρχή της εφηβείας, ενώ η συνεχής αύξηση του όγκου τους μπορεί να οδηγήσει σε παραμόρφωση. Τα πλεγματοειδή νευρώματα, τα

οποία εμφανίζονται στο 1/3 των ασθενών είναι διάχυτα και περίπου το 10% αυτών, μπορεί να υποστούν εξαλλαγή προς κακοήθεις όγκους των περιφερικών νευρικών ελύτρων (Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors, MPNSTs [15]. Έρευνες έχουν διαπιστώσει ότι τα νευροϊνώματα προέρχονται από την απώλεια ετεροζυγωτίας στο γονίδιο της Νευροϊνιδίνης σε κύτταρα Schwann.

Οπτικά Γλοιώματα Τα οπτικά γλοιώματα είναι πυλοσιτικά αστροκυττώματα του οπτικού νεύρου που εμφανίζονται κυρίως στην παιδική ηλικία (παρουσιάζεται στο 20% των παιδιών με νευροϊνωμάτωση), μπορούν να προκαλέσουν ανωμαλίες στην όραση και πρόωμη εφηβεία, ενώ παρουσιάζουν καλοήγη βιολογική συμπεριφορά που συχνά υποστρέφει [7].

Οζίδια του Lisch (Lisch nodules). Αποτελούν καλοήγη αμαρτώματα της ίριδας και αποτελούνται από μελανοκύτταρα. Αρχίζουν να αναπτύσσονται στην παιδική ηλικία, εμφανίζονται συνήθως και στα δυο μάτια, ενώ αυξάνονται με την ηλικία. Αποτελούν βασικό χαρακτηριστικό της ασθένειας της νευροϊνωμάτωσης αφού σπάνια απαντώνται στο γενικό πληθυσμό [16].

Καφεγαλακτόχροες δερματικές κηλίδες (café-au-lait spots. Αποτελούν υπερχρωσικές κηλίδες που εμφανίζονται από τους πρώτους μήνες ζωής του ασθενούς και συνεχίζουν να αυξάνονται μέχρι τα δυο πρώτα έτη. Οι δερματικές αυτές κηλίδες προκαλούνται από αυξημένο αριθμό μελανοκυττάρων και μελανοσωμάτων Για την ασφαλή διάγνωση της νόσου απαιτούνται πάνω από έξι [16,2].

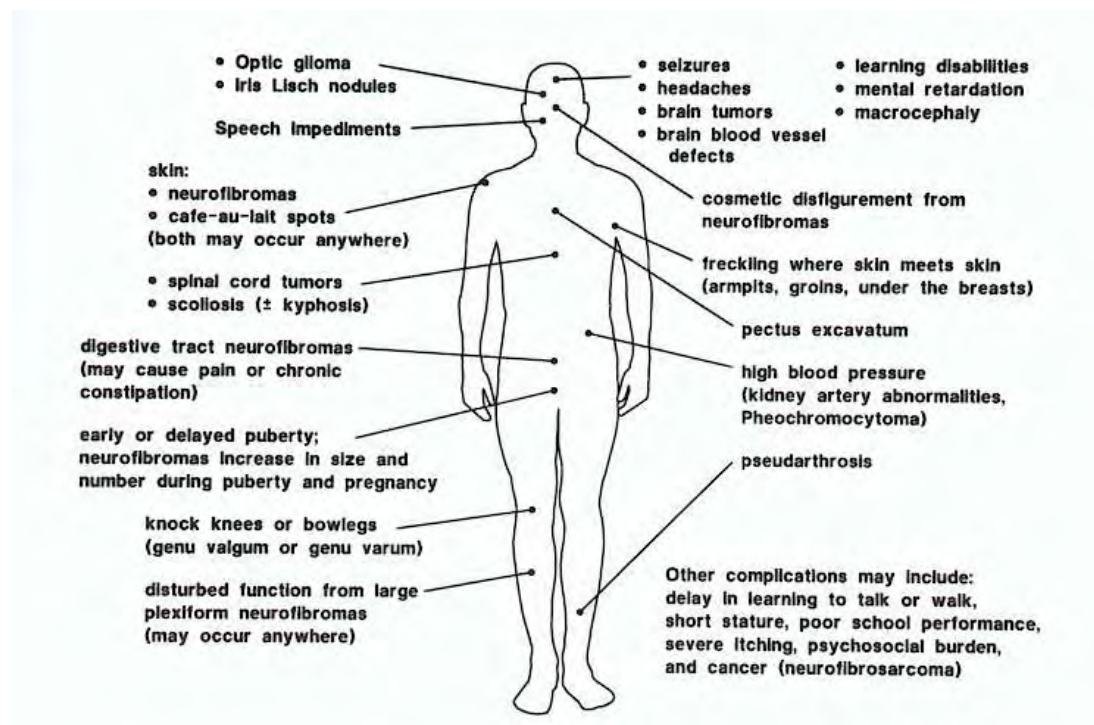
Φακίδωση. Ένα επίσης ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της ασθένειας της νευροϊνωμάτωσης αποτελεί η φακίδωση. Οι κηλίδες αυτές έχουν μικρότερο μέγεθος από ότι οι καφεγαλακτόχροες δερματικές κηλίδες, ενώ παρουσιάζονται σε συστάδες. Η φακίδωση εμφανίζεται κυρίως στην μασχालιά και βουβωνική περιοχή των ασθενών καθώς και στην βάση του λαιμού και στα άνω βλέφαρα [2].

Οι ασθενείς με νευροϊνωμάτωση παρουσιάζουν και κάποια επιπλέον κλινικά χαρακτηριστικά όπως οι σκελετικές αλλοιώσεις που περιλαμβάνουν ετερόπλευρη δυσπλασία του σφηνοειδούς οστού, σκολίωση (ποσοστό 6%) λόγω δυσπλασίας των σπονδυλικών σωμάτων καθώς και κύρτωση ή και ψευδάρθρωση της κνήμης σε ποσοστό 4% των ασθενών, ενώ συχνά οι πάσχοντες έχουν χαμηλό ανάστημα [17]. Επίσης, η νευροϊνωμάτωση επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό και το κεντρικό νευρικό

σύστημα. Πολλοί ασθενείς παρουσιάζουν μεγαλοκεφαλία, διαταραχές μετανάστευσης νευρώνων, στένωση του υδραγωγού αλλά και νεοπλασίες [2]. Ποσοστό 5% εμφανίζει επιληψία, ενώ μαθησιακές δυσκολίες, με ή χωρίς ελλειμματική προσοχή, παρατηρούνται στο 45% των παιδιών. Το νοητικό πηλίκο είναι ελαφρά χαμηλότερο του συνήθους (μέση τιμή 93). Τα παιδιά αυτά παρουσιάζουν μειωμένη οπτική αντίληψη, ψυχοκινητικές διαταραχές, διαταραχή ελλειμματικής προσοχής με υπερκινητικότητα ενώ το 5- 10% εμφανίζει νοητική υστέρηση [18]. Στην απεικόνιση του εγκεφάλου με μαγνητικό συντονισμό (ιδιαίτερα στην ακολουθία T2) σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% των ασθενών, εμφανίζονται περιοχές παθολογικού σήματος στα βασικά γάγγλια, την έσω κάψα, την παρεγκεφαλίδα και το στέλεχος. Τα ευρήματα αυτά δεν απεικονίζονται στην αξονική υπολογιστική τομογραφία και ονομάζονται UBO (Unidentified Bright Objects – αγνώστου ταυτότητας φωτεινά αντικείμενα) ή NBO (Neurofibromatosis Bright Objects –φωτεινά αντικείμενα της νευροϊνωμάτωσης). Δεν ενισχύονται μετά τη χορήγηση παραμαγνητικής ουσίας και δεν εμφανίζουν χωροκατακτητικές ιδιότητες. Πιστεύεται ότι πρόκειται για αμαρτώματα ή πιθανότερα για περιοχές με παθολογική σύσταση της μυελίνης [19]. Έχει υποστηριχθεί ότι ανεύρεση μεγάλου αριθμού UBOs συνδυάζεται με μαθησιακές δυσκολίες, όμως η παρατήρηση αυτή δεν φαίνεται να ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις. Ενδιαφέρον είναι ότι οι περιοχές αυτές, παθολογικού σήματος στην μαγνητική τομογραφία, τείνουν να εξαφανισθούν μετά την ενηλικίωση [20].

Ένα από τα κυριότερα εμπόδια στη μη ή έγκαιρη διάγνωση της ασθένειας της νευροϊνωμάτωσης είναι η μεγάλη ποικιλία φαινοτύπων που παρουσιάζει. Η έκφραση των συμπτωμάτων της ασθένειας μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ασθενών, μεταξύ των μελών της ίδιας οικογένειας ή ακόμα και στον ίδιο τον ασθενή κατά τη διάρκεια της ζωής του [21]. Έχουν προταθεί πολλοί μηχανισμοί που θα μπορούσαν να εξηγήσουν την αιτία του φαινομένου αυτού, όπως γενετικοί παράγοντες, τύπος μετάλλαξης, απώλεια ετεροζυγωτίας, περιβαλλοντικοί παράγοντες, στοχαστικοί παράγοντες ή/και ο συνδυασμός όλων αυτών. Ο Szudek et al. παρατήρησε ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ τριών ομάδων συμπτωμάτων που σχετίζονται με την ασθένεια και που είναι στατιστικά πιθανό να εμφανιστούν μαζί: υπερχρωμικές ανωμαλίες (café-au-lait spots, φακίδωση), νευροϊνώματα (δερματικά, υποδόρια, πλεγματοδή) και διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (μεγαλοκεφαλία, οπτικά γλοιώματα).

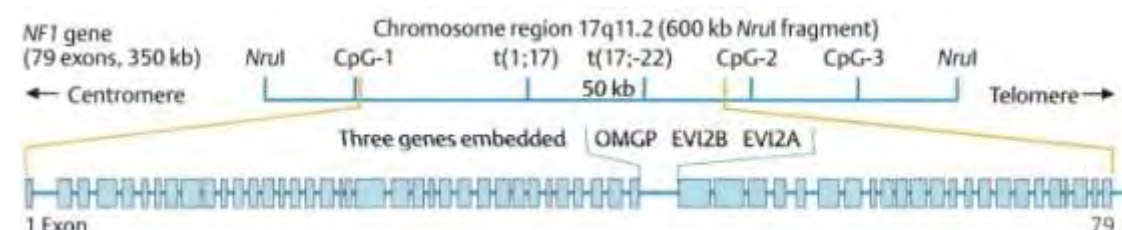
Όμως, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει σαφής εξήγηση για αυτήν την ποικιλομορφία στην εκδήλωση της ασθένειας.



Σχήμα 1 Σχηματική Αναπαράσταση των κλινικών συμπτωμάτων της νευροϊνωμάτωσης

1.3. Το γονίδιο της νευροϊνωμάτωσης τύπου 1, NF1.

Το γονίδιο της νευροϊνωμάτωσης τύπου 1, *NF1*, αναγνωρίστηκε με την τεχνική κλωνοποίησης θέσης το 1990 [22, 23, 24], εκτείνεται σε πάνω από 350kb γενομικού DNA [25] και το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσής του έχει 8454 νουκλεοτίδια. Ο εκκινητής του γονιδίου βρίσκεται σε πλούσια CpG περιοχή ενώ δεν υπάρχει TATA ή CCAAT περιοχή, χαρακτηριστικό των γονιδίων με χαμηλή έκφραση (low – expression genes) [26]. Το γονίδιο *NF1* αποτελείται από 60 εξόνια, τα οποία δίνουν εναλλακτικά μετάγραφα mRNA 11-13kb [5, 27, 28].



Σχήμα 2 Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου της NF1.

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 [29]. Ιδιαίτερα στην Ras-GAP περιοχή παρατηρήθηκαν 12 αμινοξέα, τα οποία ήταν απόλυτα συντηρημένα από τη *Drosophila* έως τον άνθρωπο [29].

Υπάρχουν τρία ακόμη λειτουργικά γονίδια που βρίσκονται μέσα στο ιντρόνιο 27b του ανθρώπινου γονιδίου NF1 που μεταγράφονται με αντίθετη φορά από αυτό το γονίδιο OMGP (oligodendrocyte- myelin glycoprotein), EVI2B (ecotropic viral insertion site2 protein B) και EVI2A (ecotropic viral insertion site2 protein A) [30, 31, 32]. Η OMGP είναι πρωτεΐνη της πλασματικής μεμβράνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ενώ αποτελεί σημαντικό αναστολέα της αύξησης των νευριτών [33]. Η EVI2B και EVI2A πρωτεΐνες εκφράζονται κυρίως στο μυελό των οστών, τους ινοβλάστες, τα περιφερικά κύτταρα αίματος, και τα κερατινοκύτταρα. Η EVI2B πρωτεΐνη πιστεύεται ότι συμμετέχει στην διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων [34], ενώ η λειτουργία της EVI2A παραμένει άγνωστη ακόμα και σήμερα.

1.3.1. Μετάγραφο του γονιδίου της NF-1

Το *NF1* γονίδιο έχει τρεις εναλλακτικά συμπεριλαμβανόμενες κασέτες εξονίων, τις 9br, 23a και 48a [35]. Οι ισόμορφες αυτές έχουν ανιχνευτεί και σε επίπεδο πρωτεϊνών [36]. Τα περισσότερο μελετημένα μετάγραφα είναι του τύπου 1 και τύπου 2, τα οποία διαφέρουν ως προς την προσθήκη 63bp, δηλαδή του εξονίου 23a στο μετάγραφο τύπου 2. Το μετάγραφο αυτό απαντάται και σε άλλους οργανισμούς όπως επίμυς και νεοσσούς όρνιθας [37, 38, 39, 40, 41], ενώ η νουλεοτιδική αλληλουχία των 63bp της προσθήκης (GRDII) είναι απολύτως συντηρημένη μεταξύ ανθρώπου και όρνιθας. Το mRNA του *NF1* (μετάγραφο τύπου 1) εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και ειδικότερα στον εγκέφαλο όπου υπερτερεί κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, σε σχέση με το μετάγραφο τύπου II που εκφράζεται κυρίως στους πνεύμονες, καρδιά, νεφρά, αλλά και σε όγκους όπως αστροκυττώματα, και γλοιβλαστώματα. Προοδευτικά, τα επίπεδα του μεταγραφου τύπου I πέφτουν στους περισσότερους ιστούς, ενώ παραμένουν αυξημένα στα κύτταρα Schwann, τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα λευκοκύτταρα και στους νευρώνες, που αποτελούν την

κυρίαρχη μορφή [42]. Το μετάγραφο τύπου 2 ή GRDII έχει βρεθεί να έχει μειωμένη καταλυτική ενεργότητα GAP, σε σύγκριση με το μετάγραφο τύπου I.

1.4. Η πρωτεΐνη Νευροϊνιδίνη

Το προϊόν του γονιδίου *NFI* ονομάζεται Νευροϊνιδίνη και έχει ανακαλυφθεί εδώ και δεκαπέντε χρόνια, όμως ακόμα και σήμερα δεν έχει διαμορφωθεί σαφής εικόνα για την κυτταρική της λειτουργία. Η Νευροϊνιδίνη είναι μια μεγάλη κυτταροπλασματική πρωτεΐνη της οποίας το πλέον καλά χαρακτηρισμένο τμήμα της βρίσκεται στο μέσο της αμινοξική της αλληλουχία και συμμετέχει στη ρύθμιση αναστολής του πρώτο-ογκονιδίου *RAS* (proto-oncogene). Επομένως, η πρωτεΐνη αυτή χαρακτηρίζεται και ως ογκοκατασταλτική. Σημαντικά στοιχεία για την λειτουργικότητα της Νευροϊνιδίνης μπορούν να εκμαιευτούν από τα επίπεδα έκφρασής της, τη δομή/λειτουργία των πρωτεϊνικών της τμημάτων (domains, motifs) τον υποκυτταρικό της εντοπισμό, αλλά και την αλληλεπίδραση της με άλλες πρωτεΐνες.

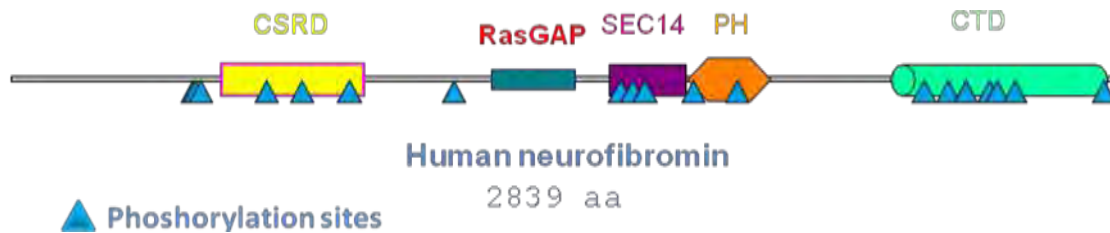
Η Νευροϊνιδίνη αποτελείται από 2839 αμινοξέα [43] και εμφανίζεται/ αναγνωρίζεται σε γέλη ακρυλαμίδης ως πρωτεΐνη 220-250kD αν και η πραγματική της μοριακή μάζα είναι περίπου 327kD [27]. Η Νευροϊνιδίνη εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, ωστόσο η έκφρασή της διαφέρει ανάλογα τον ιστό, το στάδιο ανάπτυξης αλλά και διαφοροποίησης. Η έκφραση της Νευροϊνιδίνης στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης είναι μικρή, αλλά στη συνέχεια αυξάνονται μέχρι την τελική διαφοροποίηση. Έχειδειχτεί ότι σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων τα επίπεδα έκφρασης της Νευροϊνιδίνης αυξάνονται με ένα διφασικό τρόπο. Αρχικά έχουμε μια αύξηση στη δέκατη εμβρυακή ημέρα και αργότερα μια εντονότερη αύξηση τη 18^η εμβρυακή ημέρα σε σχέση με τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης (έκτη εμβρυακή ημέρα, E6) [44]. Κατά την E6, το 90% όλων των τελεγκεφαλικών νευρώνων έχει δημιουργηθεί και αρχίζει να διαφοροποιείται, ενώ κατά E10 αρχίζουν να δημιουργούνται τα αστροκύτταρα [45, 46]. Άρα, κάθε κορύφωση της έκφρασης που παρουσιάζει η πρωτεΐνη εμφανίζεται μετά τον πολλαπλασιασμό νευρώνων και αστροκυττάρων και σχετίζεται απόλυτα με την αρχή της διαφοροποίησης τους.

1.4.1. Υποκυτταρικός εντοπισμός της Νευροϊνιδίνης

Η Νευροϊνιδίνη έχει εντοπιστεί σε πολλαπλές δομές του κυττάρου. Ο εντοπισμός της πολλές φορές εξαρτάται από το είδος κυττάρου που εξετάζεται. Έχει εντοπιστεί στην κυτταρική μεμβράνη [47], στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, [44], στα μιτοχόνδρια [48], τα μελανοσώματα [49] και τον κυτταροσκελετό [50]. Επίσης, ανιχνεύετε στον πυρήνα νεαρών νευρώνων [44], σε έναν υποπληθυσμό γαγγλιακών νευρώνων του ραχιαίου κέρατος σε ενήλικους επίμυες [51], σε NIH3T3 ινοβλάστες [52], σε διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα [53], σε COS7 κύτταρα [54], σε κύτταρα νευροβλαστώματος SHSY5Y [55] καθώς και σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος SF268 (Koliou 2012 υπό δημοσίευση). Επίσης είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η Νευροϊνιδίνη εντοπίζεται και στις ειδικές δομές της πλασματικής μεμβράνης γνωστές και ως λιπιδικές σχεδίες, lipid rafts [56].

1.4.2. Πρωτεϊνικά μοτίβα της Νευροϊνιδίνης

Η ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της Νευροϊνιδίνης έδειξε ότι διαθέτει τα εξής πρωτεϊνικά μοτίβα: μία N-αμινοτελική περιοχή, αμινοξέα 543-909, πλούσια σε κυστεΐνες και σερίνες (N-terminus cysteine/serine rich domain, CSRD) [57] μία περιοχή 360 αμινοξέων, αμινοξέα 1235-1451, ομόλογη με την p120Ras-GAP των θηλαστικών (NF1 GAP-related domain, NF1-GRD) [5], μία περιοχή άνωθεν του C-καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης με επαναλαμβανόμενες λευκίνες (leucine repeat domain, LRD), στην οποία εντοπίζονται μία περιοχή SEC14 [58, 59], αμινοξέα 1539-1735, και μία περιοχή με ομολογία πλεξτρίνης (pleckstrin homology domain, PH) [58], αμινοξέα 1736-1837, και μία C-καρβοξυτελική περιοχή (C-terminal domain), στην οποία εντοπίζεται μία λειτουργική αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Sequence, NLS, CTD-NLS) [44, 60].



Σχήμα 3 Σχηματική απεικόνιση των επικρατειών της Νευροϊνιδίνης και τα πιθανά σημεία φωσφορυλίωσης από την PKC

NF1-CSRD

Η CSRD περιοχή της Νευροϊνιδίνης είναι πλούσια σε κυστεΐνες και σερίνες και αποτελεί ένα hot spot μεταλλαξιγένεσης της πρωτεΐνης [61]. Η περιοχή αυτή της πρωτεΐνης είναι σημαντική γιατί πολλά από τα αμινοξικά της κατάλοιπα μπορούν να φωσφορυλιωθούν. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στο δικό μας εργαστήριο έδειξαν ότι η CSRD περιοχή της Νευροϊνιδίνης μπορεί να φωσφορυλιωθεί μετά από επίδραση με EGF από την πρωτεϊνική κινάση Ca (PKCa) και ε (PKCε). Ταυτόχρονα, δείχθηκε για πρώτη φορά η αλληλεπίδραση της Νευροϊνιδίνης με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Η φωσφορυλίωση της CSRD περιοχής από την PKCε, αύξησε παράλληλα τη RAS-GAP δραστηριότητά της [50]. Ακόμα, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η CSRD περιοχή της Νευροϊνιδίνης εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση, δρώντας ως αρνητικός ρυθμιστής του σηματοδοτικού μονοπατιού Rac1/Pak1/LIMK1/cofilin, ανεξάρτητα της GRD περιοχής [62].

NF1-SEC14-PH

Στην αλληλουχία της Νευροϊνιδίνης υπάρχει ένα πρωτεϊνικό μοτίβο SEC14 και ένα παρακείμενο μοτίβο PH. Το SEC14 μοτίβο έχει μεγάλη ομολογία με την προσδεδεμένη σε λιπίδια πρωτεΐνη SEC14p του *Saccharomyces cerevisiae* [59, 58]. Η SEC14p μεταφέρει και ανταλλάσσει φωσφολιπίδια, μεταξύ μεμβρανών [63]. Αναστολή της δραστηριότητας RasGAP της Νευροϊνιδίνης, με τη χρήση λιπιδίων, έδειξε ότι η λειτουργία της Νευροϊνιδίνης ως Ras-GTPάσης μπορεί να ρυθμίζεται και από την SEC14. [64, 52]. Επίσης, μελέτες από το εργαστήριο μας έχουν δείξει ότι η SEC14 περιοχή αυξάνει τη Ras-GAP δραστηριότητα της GRDI περιοχής [65], ωστόσο, ο μηχανισμός φαίνεται να είναι ανεξάρτητος από τη δέσμευση λιπιδίων και οφείλεται σε αλλοστερική τροποποίηση, μέσω αλληλεπίδρασης της SEC14 με το Ras [65]. Η

SEC14 περιοχή της Νευροϊνιδίνης αλληλοεπικαλύπτεται από μία περιοχή που περιέχει 4 μοτίβα πρόσδεσης με καβεολίνες [56].

NF1-NLS

Η Νευροϊνιδίνη διαθέτει το πρωτεϊνικό μοτίβο NLS και η παρουσία της στον πυρήνα επιβεβαιώθηκε για πρώτη φορά το 2001, οπότε και αποδείχθηκε ότι δεν είναι αποκλειστικά κυτταροπλασματική πρωτεΐνη [44]. Επίσης, πρόσφατες έρευνες από το εργαστήριο μας, έδειξαν την έντονη παρουσία της Νευροϊνιδίνης στον πυρήνα κυττάρων νευροβλαστώματος και γλοιβλαστώματος. Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι έχει ήδη αναγνωριστεί ένα εναλλακτικό μετάγραφο του γονιδίου της Νευροϊνιδίνης, το ΔNLS, από το οποίο απουσιάζει, εντός του πλαισίου ανάγνωσης, το εξώνιο 43 [60, 66]. Το ΔNLS δεν εντοπίζεται στον πυρήνα, προτείνοντας ότι ο εντοπισμός της Νευροϊνιδίνης ρυθμίζεται στο επίπεδο του mRNA, με εναλλακτικό μάτισμα [60]. Επιπροσθέτως, το NF1-ΔE43 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε ιστούς που δεν εμπλέκονται στην παθολογία της νευροϊνωμάτωσης, όπως συκώτι, σκελετικοί μύς, νεφρά, και πνεύμονες καταδεικνύοντας τον πυρηνικό εντοπισμό της Νευροϊνιδίνης ιδιαίτερα σημαντικό [60]. Ακόμα, σε εγκεφαλικό φλοιό εμβρύου όρνιθας, η έκφραση του μοτίβου NLS αυξάνει με την ανάπτυξη. Επίσης, στα τελικά στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης, ένα μέρος των κυττάρων του φλοιού δεν διαθέτει αυτό το εξώνιο (ΔNLS). Η είσοδος της Νευροϊνιδίνης στον πυρήνα γίνεται μέσω αναγνώρισης του NLS μοτίβου που διαθέτει, από τον NLS υποδοχέα, importin α/β. Για τον τρόπο που εξέρχεται η Νευροϊνιδίνη από τον πυρήνα δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα. Σε μία πρόσφατη μελέτη προτάθηκε, ότι η PKC εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της C-καρβοξυτελικής περιοχής της σχετίζεται με τον υποκυτταρικό εντοπισμό της [55]. Συγκεκριμένα, αναγνωρίστηκε ότι η φωσφορυλίωση των Ser του C-καρβοξυτελικού άκρου από την PKC, ωθεί την Νευροϊνιδίνη από τον πυρήνα προς την κυτταρική μεμβράνη SHSY5Y κυττάρων [55].

NF1-GRD

Το πιο καλά μελετημένο τμήμα της Νευροϊνιδίνης αποτελεί το τμήμα της GRD της πρωτεΐνης. Ανάλυση της αλληλουχίας της έδειξε ότι το τμήμα αυτό είναι ομόλογο μιας μεγάλης οικογένειας πρωτεϊνών γνωστές και ως Ras-GTPase ενεργές πρωτεΐνες (Ras-GAPs), οι οποίες λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές του πρωτο-ογκογονιδίου

Ras [67]. Οι Ras είναι πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους 21kD που δεσμεύουν GTP (GTP-binding protein) και λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες αλλάζοντας από την ενεργή GTP (Ras-GTP) στην ανενεργή Ras-GDP μορφή (Σχ. 4). Η εναλλαγή αυτή καταλύεται από τις αλληλεπιδράσεις του Ras με πρωτεΐνες Ras (GRas nucleotide Exchange Factors, GEFs) που ανταλλάσσουν GDP με GTP και GAPs (GTPase Activating Proteins, GAPs) που ανταλλάσσουν GTP με GDP [68].

1.4.3. Ενεργοποίηση του Ras από RasGEFs

Η Νευροϊνιδίνη ανήκει στην οικογένεια των RasGAP κύρια λειτουργία της οποίας είναι η αναστολή της δραστηριότητας Ras. Όμως η ενεργοποίηση του γίνεται από τις πρωτεΐνες RasGEFs. Κάθε κύτταρο θηλαστικού περιέχει τρία ογκογονίδια RAS, τα οποία κωδικοποιούν τέσσερις συγγενείς αλλά όχι ταυτόσημες πρωτεΐνες, τις Ha-Ras, N-Ras, Ki-Ras4A και Ki-Ras4B. Το γονίδιο Ki-RAS υπόκειται στη διαδικασία εναλλακτικού ματίσματος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία των πρωτεϊνών Ki-Ras4A και Ki-RAS4B. Η ικανότητα των πρωτεϊνών Ras να σηματοδοτούν για διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες, πολλές φορές ακόμα και αντικρουόμενες, εξαρτάται κυρίως από το εναρκτήριο σήμα (π.χ. παράγοντας αύξησης), τους μηχανισμούς ενεργοποίησης και απενεργοποίησής τους, τη συνομιλία τους με άλλα μονοπάτια σηματοδότησης και τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους. Σε συνθήκες ηρεμίας οι πρωτεΐνες Ras βρίσκονται ως συμπλέγματα με GDP. Εξωκυτταρικά σήματα, όπως αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες, ορμόνες, νευροδιαβιβαστές, ενεργοποιούν υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, όπως υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης (YKT-RTK), υποδοχείς χωρίς δράση κινάσης τυροσίνης, καθώς και διαμεμβρανικούς υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες.

Η ενεργοποίηση του Ras ρυθμίζεται από τις οικογένειες των GEFs, οι οποίες περιλαμβάνουν την οικογένεια Sos (Son of sevenless) Sos1 και Sos2 που συνδέονται με υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και την οικογένεια των RasGRP (Ras Guanyl nucleotide-Releasing Protein) (RasGRP1-4) που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς G πρωτεϊνών μέσω της φωσφολιπάσης C (PLC) και την οικογένεια των RasGRF πρωτεϊνών, RasGRF1 και RasGRF2, οι οποίες επιτρέπουν την ενεργοποίηση του Ras μέσω ειδικών υποδοχέων νευροδιαβιβαστών με παράλληλη αύξηση των επιπέδων ασβεστίου στο κύτταρο. Οι RasGRFs συμμετέχουν σχεδόν αποκλειστικά στη νευρωνική σηματοδότηση. Όλα τα μέλη των RasGEFs περιέχουν αρκετά

συντηρημένα τμήματα. Δυο από αυτά είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση των μελών της οικογένειας Ras και περιλαμβάνουν το μοτίβο REM (Ras Exchange Motif) που σταθεροποιεί τη δέσμευση με το Ras, και τη CDC25 περιοχή που περιλαμβάνει το καταλυτικό τμήμα.[69]. Μελέτες έδειξαν ότι ο μηχανισμός δέσμευσης και ενεργοποίησης του Ras είναι όμοιος για όλες τις RasGEFs. Η ανακάλυψη και ο μετέπειτα χαρακτηρισμός των GEFs έγινε για πρώτη φορά σε κύτταρα ζύμης.

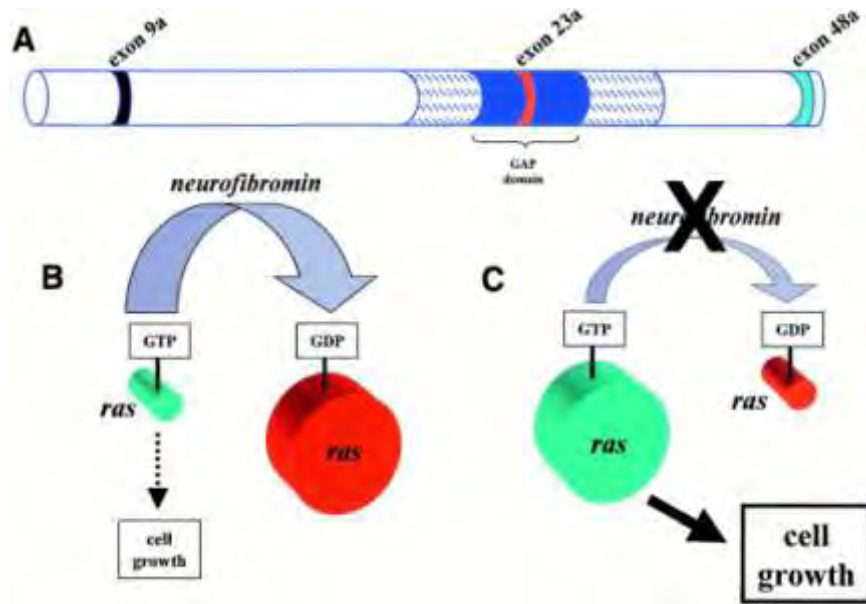
Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Sos αποτελεί το καλύτερα μελετημένο μονοπάτι μεταγωγής σήματος και περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ενός Υποδοχέα Κινάσης Τυροσίνης (YKT), όπως ο EGFR. Η πρόσδεση του παράγοντα EGF στον υποδοχέα του έχει ως αποτέλεσμα το διμερισμό του υποδοχέα και την ενεργοποίηση της κινάσης της τυροσίνης [70]. Ακολουθεί αυτό-φωσφορυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων τυροσίνης στο ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία θέσεων σύνδεσης SH2 για GRB2 και SHC [71]. Ο παράγοντας SHC αυτό-φωσφορυλιώνεται συνδεδεμένος με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία θέσεων αναγνώρισης για την περιοχή SH2 του παράγοντα GRB2. Η πρωτεΐνη GRB2 βρίσκεται μονίμως συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη Sos. Ως αποτέλεσμα της δημιουργίας κατάλληλων θέσεων αναγνώρισης στον υποδοχέα, η πρωτεΐνη Sos μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη μέσω των μορίων GRB2. Η μετατόπιση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση της πρωτεΐνης RAS από το GDP και την πρόσδεση στο GTP. Οι Sos πρωτεΐνες μπορούν να καταλύουν την αντίδραση GDP/GTP σε όλες τις πρωτεΐνες Ras (H-Ras> N Ras> K-Ras) [72], ενώ η αντίδραση αυτή μπορεί να γίνει τόσο στην πλασματική μεμβράνη όσο και στο ER. Η Sos1 εμπλέκεται σε μικρή (short-term) αλλά και σε παρατεταμένη (long-term) ενεργοποίηση του Ras-ERK μονοπατιού, σε αντίθεση με την Sos2 που συμμετέχει μόνο σε μικρής διάρκειας ενεργοποίηση [73].

Οι RasGRF1 εκφράζετε κυρίως στον εγκέφαλο ενώ η RasGRF2 μπορεί να ανιχνευτεί και σε άλλα όργανα όπως οι πνεύμονες και η σπλήνα σε χαμηλότερα επίπεδα [74, 75]. Εκτός από τα τμήματα REM και CDC25, οι RasGRFs διαθέτουν ένα τμήμα πλεξτρίνης (PH) και ένα μοτίβο ισολευκίνης-γλουταμίνης (IQ). Το IQ μοτίβο είναι υπεύθυνο για τις αλληλεπιδράσεις με την καλμοδουλίνη. Η αύξηση των επιπέδων ασβεστίου μετά από ενεργοποίηση των υποδοχέων νευροδιαβιβαστών έχει ως αποτέλεσμα τη δέσμευση καλμοδουλίνης στο IQ μοτίβο και στη συνέχεια την

ενεργοποίηση τους. Οι ενεργοποιημένες RasGRFs μεταφέρονται στη μεμβράνη μέσω των IQ και PH μοτίβων τους, και ακολουθεί ενεργοποίηση των RasGTPases. Το μοτίβο PH του RasGRF2 έχει επίσης την ιδιότητα να δεσμεύει τις β και γ υπομονάδες των υποδοχέων G πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη RasGRF1 περιέχει και ένα νευρωνικό μοτίβο (neuronal domain) το οποίο μπορεί και δεσμεύεται στην NR2B υπομονάδα του NMDA υποδοχέα. Έχει αποδειχτεί ότι η δέσμευση του μοτίβου αυτού στον NMDAR προκαλεί τη μείωση των επιπέδων έκφρασης της ERK [76]. Η RasGRF1 μπορεί να δράσει σε H-Ras και R-Ras μόρια ενώ η RasGRF2 σε N-H-και K-Ras μόρια [77, 78].

Οι RasGRPs διαθέτουν στο μόριο τους ένα ζευγάρι EF hands, τα οποία είναι σχηματισμοί δέσμευσης ασβεστίου, καθώς και ένα τμήμα C1 όμοιο με το τμήμα C1 των PKC (Ενότητα 1.4.1), το οποίο μπορεί και δεσμεύει διακυλογλυκερόλη (Diacylglycerol-DAG). Η ενεργοποίηση των περισσότερων μελών της οικογένειας των RasGRPs ρυθμίζεται από την φωσφωλιπάση Cγ (PLCγ) και την επακόλουθη παραγωγή DAG [79]. Η δέσμευση της DAG στη C1 περιοχή προκαλεί την μεταφορά των RasGRPs στη μεμβράνη και ακλουθεί ενεργοποίηση της Ras [82]. Οι RasGRPs μπορούν να ενεργοποιήσουν μόρια H-N K και R-Ras.

Η ενεργή πρωτεΐνη Ras (Ras-GTP), στη συνέχεια, ρυθμίζει διάφορους τελεστές, οι οποίοι συνδέονται με μονοπάτια μεταγωγής σήματος, τα οποία καταλήγουν στη μεταγραφική ρύθμιση διαφόρων γονιδίων. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η ενεργοποίηση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος είναι παροδική, καθώς η πρωτεΐνη Ras επανέρχεται στην ανενεργή μορφή της μέσω της υδρόλυσης του προσδεμένου μορίου GTP, η οποία καταλύεται από τις πρωτεΐνες GAP, όπως η πρωτεΐνη Νευροϊνιδίνη. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης RAF, η οποία είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης στην πλασματική μεμβράνη. Η κινάση RAF, στη συνέχεια, ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης δύο MAPK κινάσες (MEK1 και MEK2), οι οποίες λειτουργούν ως κινάσες διπλής εξειδίκευσης, φωσφορυλιώνοντας κατάλοιπα θρεονίνης και τυροσίνης δύο MAP κινάσων που αναφέρονται ως ERKs (p42MAPK/ERK-2, p44MAPK/ERK-1). Μετά την ενεργοποίησή τους, οι MAP κινάσες μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου ενεργοποιούν ποικιλία τελεστών φωσφορυλιώνοντάς τους.



Σχήμα 4 (Α) Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου της *NFI* και (Β) της Νευροϊνιδίνης ως ρυθμιστής του Ras

1.4.4. Αλληλεπιδράσεις της Νευροϊνιδίνης

Η Νευροϊνιδίνη όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως σχετίζεται άμεσα με συστήματα του κυτταροσκελετού όπως η τουμπουλίνη, τα ινίδια της ακτίνης και τα ενδιάμεσα ινίδια. Αρχικά διαπιστώθηκε ότι η Νευροϊνιδίνη αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους τουμπουλίνης *in vitro* [81] και *in vivo* [82], και προτάθηκε ότι η αλληλεπίδραση αυτή μειώνει την Ras-GAP δραστικότητα της Νευροϊνιδίνης [81]. Στη συνέχεια, πειράματα σε πρώιμους νευρώνες (έκτης εμβρυακής ημέρας, E6) έδειξαν ότι η Νευροϊνιδίνη συνεντοπίζεται με ινίδια της ακτίνης, ενώ αργότερα σε ανεπτυγμένους νευρώνες η Νευροϊνιδίνη συνεντοπίζεται με τη τουμπουλίνη δείχνοντας ότι η αλληλεπίδραση της με τμήματα του κυτταροσκελετού είναι σημαντική για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των νευρώνων [44]. Η Νευροϊνιδίνη δεν διαθέτει μοτίβα δέσμησης με την ακτίνη ή την τουμπουλίνη (actin binding motifs), υποδηλώνοντας ότι ο μηχανισμός πρόσδεσης της στον κυτταροσκελετό μπορεί να οφείλεται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης όπως η φωσφορυλίωση. Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης Νευροϊνιδίνης και ακτίνης πραγματοποιήθηκαν σε νευρώνες μετά από την επώασή τους με TPA, που οδηγεί στην ενεργοποίηση της PKC [50].

Η Νευροϊνιδίνη εκτός από τον κυτταροσκελετό, έχει συνδεθεί και με άλλες πρωτεΐνες, όπως η Κινεσίνη, [83], η Συνδεκάνη [47, 84], και η VCP (valosin-containing proteins) [85].

Με τη χρήση των μεθόδων της πρωτεομικής, αποδείχτηκε ότι η πρωτεΐνη VCP συνδέεται με την Νευροϊνιδίνη. Η VCP γνωστή και ως πρωτεΐνη p97 είναι μια πολύ-λειτουργική πρωτεΐνη που συμμετέχει σε ένα πλήθος κυτταρικών λειτουργιών όπως στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, τις μεμβρανικές συμφύσεις, την αποδόμηση πρωτεϊνών μέσω του ER και την αυτοφαγία [86, 87, 88]. Η πρωτεΐνη VCP έχει συνδεθεί επίσης και με πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες [89] ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεΐνης αποτελεί την αιτία εκδήλωσης της ασθένειας ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis) σε ποσοστό 1%-2%. Οι ερευνητές για να επιβεβαιώσουν τη σύνδεση μεταξύ των δυο πρωτεϊνών πραγματοποίησαν πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης και απέδειξαν ότι VCP συνδέεται με την Νευροϊνιδίνη μέσω του LRD μοτίβου της. Επίσης, στην έρευνα αυτή διαπιστώθηκε ότι η δημιουργία ικριώματος μεταξύ των δυο πρωτεϊνών είναι σημαντική για την ρύθμιση της πυκνότητας των δενδριτικών ακανθών.

Μια ακόμα πρωτεΐνη που έχει αποδειχτεί ότι συνδέεται η Νευροϊνιδίνη είναι και η Συνδεκάνη 2. Οι Συνδεκάνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και διαδραματίζουν ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση και τη διακυτταρική μεταγωγή σήματος, μέσω περιοχών πρόσδεσης αυξητικών παραγόντων ή παραγόντων διαφοροποίησης, αλλά και ως συνυποδοχείς κλασσικών υποδοχέων [90], ειδικότερα για την Συνδεκάνη 2 έχει διαπιστωθεί ότι τα επίπεδα έκφρασής της αυξάνονται κατά τη διάρκεια της συναπτογένεσης. Η σύνδεση της Νευροϊνιδίνης με την Συνδεκάνη 2 αποδείχτηκε με τη χρήση του συστήματος δυο υβριδίων του ζυμομύκητα (yeast two hybrid system). Πρόσφατη μελέτη έδειξε, σε κύτταρα HEK293 και νευρώνες ιππόκαμπου, ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Νευροϊνιδίνης -PKA διαμεσολαβεί στη μεταγωγή σήματος κάτωθεν της Συνδεκάνης-2 [84]. Επιπροσθέτως, η ίδια μελέτη έδωσε ενδείξεις για την εμπλοκή της Νευροϊνιδίνης στο σχηματισμό των δενδριτικών ακανθών [84]. Η πρόσδεση της Νευροϊνιδίνης στις Συνδεκάνες, παρέχει άλλον ένα πιθανό μηχανισμό για τον εντοπισμό της Νευροϊνιδίνης σε ειδικές μοριακές μικροδομές, στις οποίες συνεντοπίζονται υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης και άλλα μόρια μεταγωγής σήματος.

Ακόμα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η Νευροϊνιδίνη μπορεί να δένεται υπό συγκεκριμένες συνθήκες με τη πρωτεΐνη, Neuroligin 3. Πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης σε κύτταρα νευροβλαστώματος SHSY5Y, έπειτα από διαφοροποίηση με ρετινοϊκό οξύ, η Νευροϊνιδίνη δένεται με την Neuroligin 3 [91]. Η Neuroligin 3 είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Neuroligins (NL1, NL2, NL3), και λειτουργεί ως πρωτεΐνη κυτταρικής προσκόλλησης της μετασυναπτικής πυκνότητας (post-synaptic density, PSD) [92] που εμφανίζεται τόσο στις διεγερτικές όσο και στις ανασταλτικές συνάψεις. Διαθέτει ένα μικρό κυτταροπλασματικό τμήμα και ένα εξωκυτταρικό που εμφανίζει 30% ομολογία με την ασετυλ-χολινεστεράση (acetylcholinesterase AChE), χωρίς όμως να παρουσιάζει κάποια αντίστοιχη δραστικότητα. Οι Neuroligins συνδέονται με τις πρωτεΐνες της προ-συναπτικής μεμβράνης Neurexins, και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και λειτουργία της σύναψης. Μεταλλάξεις στο γονίδιο που εκφράζει τις Neuroligins, έχουν συνδεθεί με την ασθένεια του αυτισμού.

1.4.5. Φωσφορυλίωση της Νευροϊνιδίνης

Η Νευροϊνιδίνη μπορεί να φωσφορυλιωθεί σε πολλά κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης [93]. *In silico* μελέτες αποδεικνύουν ότι υπάρχουν τουλάχιστον 170 πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης κατά μήκος της πρωτεΐνης. Οι περιοχές με την μεγαλύτερη πιθανότητα είναι η CSRD και η CTD περιοχή [57]. Οι κινάσες που μπορούν εν δυνάμει να φωσφορυλιώσουν τη Νευροϊνιδίνη είναι αρκετές κυριότερες αυτών όμως είναι οι PKCs [44, 50, 55], και η PKA [57]. Παλαιότερες μελέτες, έδειξαν *in vitro* ότι οι περιοχές CSRD και CTD φωσφορυλιώνονται από την πρωτεϊνική κινάση PKA και το φαινόμενο αυτό εντείνει με την προσθήκη της ουσίας forskolin, η οποία ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση [57]. Επίσης, η πρωτεΐνη 14-3-3 προσδένεται στη CTD περιοχή της Νευροϊνιδίνης και η εξαρτώμενη από PKA φωσφορυλίωση της Νευροϊνιδίνης προάγει αυτήν την αλληλεπίδραση [94]. Παράλληλα, οι Mangoura et. al., (2006) απέδειξε ότι η Νευροϊνιδίνη φωσφορυλιώνεται από τις PKCs, και συγκεκριμένα τις PKCα και PKCε. Επιπρόσθετα, η φωσφορυλίωση/εις αυτές στην CSRD περιοχή οδήγησε στην αλλοστερική ενεργοποίηση, αύξηση, της Ras-Gap δραστικότητας της πρωτεΐνης, αλλά και την δέσμευσή της με το κυτταροσκελετό της ακτίνης. Ακόμα, μία πρόσφατη μελέτη αναγνώρισε και χαρακτήρισε *in vivo*, μία PKC εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της Νευροϊνιδίνης σε κατάλοιπα Ser στο C-καρβοξυτελικό άκρο, η οποία σχετίζεται με την πυρρηνο-κυτταροπλασματική

μεταφορά της Νευροϊνιδίνης [55] . Σήμερα, είναι γνωστό ότι η σύνδεση της Νευροϊνιδίνης με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης προϋποθέτει την φωσφορυλίωση της ειδικά από την PKCε. Ταυτόχρονα, η φωσφορυλίωση της Νευροϊνιδίνης από την PKCε είναι απαραίτητη ώστε να οδηγηθεί σε ειδικές μικροπεριοχές της μεμβράνης, lipid rafts, όπου δρα καλύτερα ως Ras-Gap.

1.4.6. Νευροϊνιδίνη μνήμη και μάθηση

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το 40-60% των παιδιών που πάσχουν από νευροϊνωμάτωση παρουσιάζουν μαθησιακές δυσκολίες [95, 96, 97], όμως ο μηχανισμός με τον οποίο η Νευροϊνιδίνη επηρεάζει την μνήμη και τη μάθηση παραμένει μέχρι σήμερα άγνωστος. Ερευνητές, χρησιμοποιώντας, ετερόζυγους μύες για το γονίδιο της Nf1 (Nf1 +/-) [98] έδειξαν ότι οι μύες αυτοί παρουσιάζουν μειωμένη χωρική μνήμη μετά από τη δοκιμασία Morris water Maze, γεγονός που δείχνει τη συμμετοχή της Νευροϊνιδίνης στη δημιουργία μνήμης μέσω του ιππόκαμπου [99]. Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν τα ίδια ποντίκια ξεπέρασαν τις μαθησιακές δυσκολίες με εκτεταμένη εκπαίδευση, μηχανισμός που δεν απαιτεί την συμμετοχή του ιππόκαμπου [100]. Στη συνέχεια, οι ερευνητές γνωρίζοντας ότι η Νευροϊνιδίνη εκφράζεται σε όλα τα μέρη του εγκεφάλου, θέλησαν να μελετήσουν τυχόν συμβολή της αμυγδαλής στη δημιουργία μνήμης, όμως αυτό δεν κατέστη δυνατό [99]. Σημαντικό επίσης είναι ότι η λειτουργία της Νευροϊνιδίνης στη μάθηση και ογκογένεση μπορούν να διαχωριστούν. Επίμυες με ομόζυγη απενεργοποίηση του εξωνίου 23α της Nf1 (Nf1 23a/-) που κωδικοποιεί ένα μέρος του Ras-GAP τμήματος της Νευροϊνιδίνης (GRDII) δεν δείχνει προδιάθεση για ανάπτυξη όγκων, αντίθετα παρουσιάζει μειωμένη χωρική μνήμη [101] υποδηλώνοντας ταυτόχρονα και την συμβολή της GAP ενεργότητας της Νευροϊνιδίνης στη δημιουργία μνήμης. Πειράματα σε Nf1+/- ποντίκια στα οποία έχει χορηγηθεί αναστολέας FTI, που εμποδίζει την σύνδεση του Ras με την μεμβράνη, παρεμποδίζοντας έτσι τη μεταγωγή σήματος μέσω αυτού, βοήθησε στην επαναφορά μνήμης. Στην συνέχεια, ερευνητές κατάφεραν να επαναφέρουν την μακροχρόνια ενίσχυση των συνάψεων (Long Term Potentiation, LTP) [102] σε Nf1+/- ποντίκια., χρησιμοποιώντας πικροτοξίνη, έναν ανταγωνιστή των GABA υποδοχέων (γ-αμινοβουτυρικό οξύ g-aminobutyric acid). Εν συνεχεία οι Cui et al (2008) [103] χρησιμοποιώντας κατά συνθήκη ελλειμματικούς στο γονίδιο της nf1

GABAεργικούς νευρώνες, διεγερτικούς νευρώνες και αστροκύτταρα διαπίστωσαν ελλειμματική χωρική μνήμη, και LTP στον ιππόκαμπο μόνο στους GABA νευρώνες .

Επίσης, έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για την συμμετοχή της Νευροϊνιδίνης στην δημιουργία μνήμης-μάθησης στη *Drosophila melanogaster*. Πειράματα από τους Ho et. al., (2007) [104] έδειξαν ότι το C-τελικό άκρο της Νευροϊνιδίνης είναι σημαντικό για τη δημιουργία άμεσης μνήμης, ενώ αντίθετα, η περιοχή Ras-GAP, δηλαδή η GAP ενεργότητα της πρωτεΐνης είναι απαραίτητη για την δημιουργία μακροχρόνιας μνήμης.

1.4.7. Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης σε άξονες και δενδρίτες.

Οι νεαροί νευρώνες, μετά από την εγκατάσταση στον τελικό προορισμό τους, οφείλουν να αποκτήσουν την χαρακτηριστική τους μορφολογία, μια διαδικασία που περιλαμβάνει την ανάπτυξη μακριών κυτταρικών προεκτάσεων, των αξόνων και των δενδριτών. Στο εσωτερικό κάθε αποφυάδας βρίσκεται ο κυτταροσκελετός της, υπεύθυνος για τη διατήρηση της δομής, του σχήματος, και της σταθερότητάς της. Τα σημαντικότερα συστατικά του είναι οι μικροσωληνίσκοι τα ενδιάμεσα ινίδια και τα νημάτια ακτίνης.

Όπως αναφέραμε ο κυτταροσκελετός των νευρικών κυττάρων αποτελείται από τρεις βασικές δομικές μονάδες. Κάθε μία από αυτές δημιουργείται από τρεις βασικές πρωτεΐνες. Οι μικροσωληνίσκοι αποτελούνται από υπομονάδες α και β τουμπουλίνης, τα νημάτια ακτίνης (F-ακτίνη) σχηματίζονται από τον πολυμερισμό υπομονάδων G-ακτίνης, ενώ τα ενδιάμεσα ινίδια αποτελούνται από τρεις κατηγορίες νευροϊνιδίων . Τα νημάτια της ακτίνης και οι μικροσωληνίσκοι συνδέονται με πλήθος άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες ρυθμίζουν τις φυσικές τους ιδιότητες και τις μοριακές τους συνδέσεις. Αν και τα βασικά κυτταροσκελετικά συστήματα βρίσκονται σε ολόκληρο το νευρώνα, οι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες που ανιχνεύονται στο σώμα και στους δενδρίτες διαφέρουν από αυτές που εντοπίζονται στον άξονα [105]. Κάθε πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού έχει συγκεκριμένο ρόλο.

Τα νευροϊνίδια που αποτελούνται από τρεις διαφορετικές πρωτεΐνες και ονομάζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε μικρά (NF-L 70kD), μεσαία (NF-M 150kDa) και μεγάλα (NF-H 200kDa) αποτελούν τα πιο σταθερά μόρια τα οποία προσδίδουν

σταθερότητα στους νευρώνες. [106]. Επίσης η πυκνότητα/ποσότητα των νευροϊνιδίων ρυθμίζει την διάμετρο και το μέγεθος του σώματος του νευρώνα. Σε πολλές αναπτυξιακές ασθένειες η μείωση των δενδριτικών διακλαδώσεων συχνά συνδέεται με μικρότερο νευρικό σώμα [107].

Το δίκτυο των ινιδίων της ακτίνης αποτελεί μια δυναμική συνιστώσα του κυτταροσκελετού που επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά ερεθίσματα. Η ισορροπία μεταξύ της μονομερή ακτίνης (G-ακτίνη) και πολυμερή (F-actin) είναι μια σύνθετη διαδικασία που ρυθμίζει το σχήμα των κυττάρων. Υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες που τροποποιούν την ισορροπία μεταξύ πολυμερισμού /αποπολυμερισμού της ακτίνης, μια εκ των οποίων είναι και η οικογένεια των Κοφιλίνων (cofilins). Η Κοφιλίνη όπως και πολλές άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται με τον κυτταροσκελετό ρυθμίζονται με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση, μέσω της κινάσης LIMK1.

Το επόμενο κυτταροσκελετικό σύστημα είναι αυτό των μικροσωληνίσκων που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και λειτουργία των δενδριτών. Οι μικροσωληνίσκοι ανιχνεύονται στους νευρώνες περισσότερο από ότι σε κάθε άλλο είδος κυττάρου. Οι μικροσωληνίσκοι είναι κυλινδρικά πολυμερή που σχηματίζονται από ετεροδιμερή της α και β τουμπουλίνης. Όπως και ο κυτταροσκελετός της ακτίνης έτσι και αυτός των μικροσωληνίσκων μπορεί να μεταβάλλεται σε μήκος και σταθερότητα μέσω πρωτεϊνών που δεσμεύονται σε αυτούς και ονομάζονται MAPs (Microtubule Associated Proteins). Οι μικροσωληνίσκοι δίνουν σταθερότητα τόσο στους άξονες όσο και στους δενδρίτες.

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των ασθενειών που παρουσιάζουν γνωστικές δυσλειτουργίες, όπως η νευροϊνωμάτωση, είναι οι ανωμαλίες στο σχήμα και την πυκνότητα των δενδριτικών ακάνθων. Οι δενδριτικές άκανθες είναι μικρές μεμβρανώδεις προεξοχές που περιέχουν τους γλουταμινικούς υποδοχείς, την μετασυναπτική πυκνότητα, το κυτταροσκελετό της ακτίνης και ένα πλήθος οργανιδίων συζευγμένων με τη μεμβράνη, όπως το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο μιτοχόνδρια και ενδοσώματα. Οι τυπικές άκανθες έχουν βολβώδες κεφάλι που συνδέεται με τον δενδριτικό άξονα (dendritic shaft) μέσω ενός στενού λαιμού. Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εντόπισαν ένα πλήθος τύπων ακάνθων βασισμένοι στο σχήμα και το μέγεθός τους. Υπάρχουν λεπτές, σε σχήμα μανιταριού,

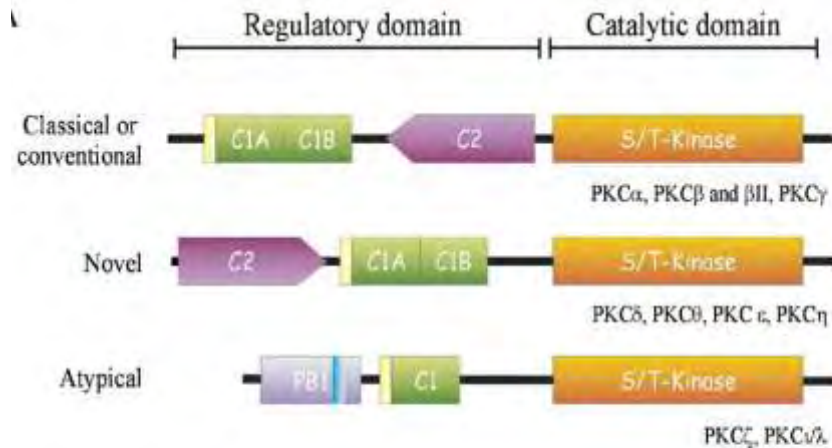
κοντές και σε σχήμα κυπέλλου. Οι άκανθες είναι εξαιρετικά δυναμικές, και μπορούν να μεταβάλουν το σχήμα και το μέγεθος τους σε δευτερόλεπτα ή σε μέρες. Το μέγεθος κάθε δενδριτικής άκανθας σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος της μετασυναπτικής πυκνότητας και της προσυναπτικής ενεργής ζώνης [108].

Οι ανωμαλίες στις άκανθες δημιουργούνται σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης τους ανάλογα με την πάθηση. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του συνδρόμου Down (DS), η μορφολογία τους το μήκος και οι διακλαδώσεις των δενδριτών φαίνεται φυσιολογική στη βρεφική ηλικία μέχρι έξι μηνών αλλά σταδιακά στη συνέχεια μειώνονται μέχρι τα δυο χρόνια [109, 110]. Στην περίπτωση του συνδρόμου εύθραυστου Χ (FXMR) έδειξαν ότι οι δενδρίτες είχαν μακριές άκανθες και σημαντικά μικρότερο αριθμό κοντών ακανθών [111]. Επίσης παρατηρήθηκε ότι οι άκανθες των ασθενών αυτών είχαν μικρό μη ώριμο σχήμα και παρουσίαζαν μεγαλύτερη πυκνότητα που αντικατοπτρίζει την αδυναμία δημιουργίας λειτουργικών συνάψεων στα άτομα αυτά.

1.5. Πρωτεϊνική κινάση C (PKC)

Η ανακάλυψη των PKCs έγινε από τον Nishizuka Yasutomi και τους συνεργάτες του το 1980, οι οποίοι κατά τη διάρκεια έρευνας πάνω σε μια διαφορετική κινάση, την PKG, παρατήρησαν ότι σε εγκεφάλους από ζωικά πρότυπα (αρουραίους) υπήρχε μια άλλη πολύ ενεργή κινάση, η λειτουργία της οποίας εξαρτιόταν τόσο από Ca^{2+} όσο και από DAG. Σήμερα οι PKCs αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων που αριθμεί τουλάχιστον 11 μέλη. Τα 11 αυτά μέλη κωδικοποιούνται από 9 γονίδια και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις υπό-οικογένειες: Η πρώτη περιλαμβάνει τις συμβατικές PKCs (conventional PKC-cPKC), μέλη της οποίας είναι η PKCα, βΙ, βΙΙ προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου PKCβ και γ. Η δεύτερη υποοικογένεια αποτελείται από τις νεοφανείς PKCs (novel-nPKCs) που αποτελούνται από την PKCδ, ε, η, θ, και ενεργοποιούνται από DAG χωρίς την παρουσία Ca^{2+} . Τέλος, υπάρχουν και οι άτυπες PKC (atypical PKCs) που περιλαμβάνουν τις PKC-ζ και ι/λ. οι ισομορφές αυτές δεν απαντούν στην παρουσία ιόντων ασβεστίου ή DAG, αλλά σε άλλα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Κάθε υπο-οικογένεια χαρακτηρίζεται από διακριτές ιδιότητες όπως είναι η δομή και ο τρόπος ενεργοποίησής τους. Η πρωτεϊνική

αλληλουχία των PKCs περιλαμβάνει μια υψηλά συντηρημένη καταλυτική περιοχή στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, που εμπεριέχει τα μοτίβα για την σύνδεση υποστρωμάτων, αλλά και μια ρυθμιστική περιοχή στο N-τελικό άκρο, που περιέχει την περιοχή του ψευδοϋποστρώματος καθώς και δυο διακριτές περιοχές C1 και C2 υπεύθυνες για την στόχευση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη.



Σχήμα 5 Σχηματική παρουσίαση της πρωτοταγούς δομής των μελών της οικογένειας των PKCs.

Οι cPKCs όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ενεργοποιούνται από τη διακυλογλυκερόλη (diacylglycerol, DAG) και από ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}). Η DAG αποτελεί ένα δεύτερο αγγελιοφόρο του κυττάρου που παράγεται από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C (phospholipase C PLCs). Οι PLCs αποτελούν ενζυμα –κλειδιά για τη μεταγωγή σήματος στο κύτταρο. Η ενεργοποίηση των ενζύμων αυτών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της λιποδιαλυτής DAG αλλά και της υδροδιαλυτής $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. Η $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και συνδέεται με τους υποδοχείς της (InsP_3R) που δρουν ως κανάλια ασβεστίου και βρίσκονται σε ενδοκυτταρικές αποθήκες, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η πρόσδεση της InsP_3 στους InsP_3R έχει ως αποτέλεσμα τη διάνοιξη τους και την απελευθέρωση του Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα. Παράλληλα, η DAG παραμένοντας στη μεμβράνη ενεργοποιεί με τη συνδρομή του Ca^{2+} την PKC η οποία με τη σειρά της μεταναστεύοντας στη μεμβράνη, φωσφορυλιώνει άλλες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες στόχους σε κατάλοιπα σερίνης θρεονίνης. Εκτός όμως από την DAG οι PKCs μπορούν να ενεργοποιηθούν και από λιπιδικής φύσης μόρια όπως η φωσφατιδυλοσερίνη Ptdser , (συμβατικές PKCs), τα

ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) (nPKCs, aPKCs) αλλά και οι PtdIns(3,4,5)P3/PtdIns(3,4)P2 (Divecha and Irvine 1995). Αυτό το χαρακτηριστικό δίνει στις PKCs έναν ρόλο οργάνωσης των σημάτων που προέρχονται από φωσφολιπάσες ή κινάσες που ενεργοποιούνται κατά την διέγερση των κυττάρων.

1.5.1. Δομή και λειτουργία της Πρωτεϊνικής Κινάσης C Ε (PKCε)

Η ισομορφή έψιλον της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKCε) εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας του καθοριστικού ρόλου της στην συναπτική πλαστικότητα, σε πολλούς τύπους μνήμης και μάθησης, αλλά και σε πολλές άλλες βιολογικές διεργασίες όπως η συναπτογένεση, η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός η απόπτωση αλλά και η ογκογένεση.

Η PKCε παρουσιάζει ευρεία κατανομή σε όλο το σώμα, ενώ οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έχουν ανιχνευτεί στον εγκέφαλο. Η έκφραση της PKCε ανιχνεύεται κυρίως στον ιππόκαμπο, τη μέλανα ουσία τον επικλινή πυρήνα, στο κέλυφος του κερκοφόρου πυρήνα στον έξω αμυγδαλοειδή πυρήνα, στο πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα, στην εξωτερική μοριώδη στοιβάδα του οσφρητικού λοβού αλλά και στο μετωπιαίο και βρεγματικό φλοιό [112, 113]. Βιοχημικές αναλύσεις απέδειξαν ότι μπορεί να εντοπιστεί τόσο στην πλασματική μεμβράνη όσο και στο κυτταρόπλασμα.

Μελέτες σε εγκεφαλικά ημισφαίρια εμβρύων όρνιθας [114] έδειξαν ότι η έκφραση της PKCε είναι αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη. Η έκφραση της ανιχνεύεται από τη τέταρτη εμβρυική μέρα και συνεχώς αυξάνει, ενώ τα επίπεδα έκφρασης των υπολοίπων ισομορφών PKCα και βΙ/ΙΙ μειώνονται. Η μέγιστη έκφραση της στην περιοχή του τελεγκέφαλου ανιχνεύτηκε την δέκατη εμβρυική ημέρα όπου το σύνολο των νευρώνων έχει διαφοροποιηθεί. Συνεπώς η PKCε ισομορφή αποτελεί την κύρια PKC ισομορφή σε διαφοροποιημένους νευρώνες.

Η δομή της πρωτεΐνης περιλαμβάνει στο C-τελικό άκρο της δυο καταλυτικές περιοχές με δραστηριότητα κινάσης. Ενώ στο N-τελικό άκρο της περιλαμβάνει την ρυθμιστική περιοχή η οποία περιέχει την C1 επικράτεια που χωρίζεται σε δύο υπομονάδες την C1a και C1b και αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης του ενεργοποιητή (activator binding domain) όπως διακυλογλυκερόλη και εστέρα φορβόλης χωρίς να εξαρτάται από τα ιόντα ασβεστίου [115]. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει επίσης και την C2 περιοχή η

οποία αλληλεπιδρά με φωσφολιπίδια. (Σχ. 5) Ακόμα η περιοχή αυτή περιέχει και την περιοχή του ψευδουποστρώματος, η οποία αλληλεπιδρά με την θέση σύνδεσης του υποστρώματος στην καταλυτική περιοχή χωρίς όμως να αποτελεί υπόστρωμα και είναι υπεύθυνη για την ενδομοριακή αναστολή της καταλυτικής δραστηριότητας πριν από τη σύνδεση του ενεργοποιητή.

Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό της PKCε είναι και τα έξι αμινοξέα μεταξύ των υπομονάδων C1α και C1b που αποτελεί μοτίβο δέσμευσης της ακτίνης [116]. Πειράματα σε κύτταρα νευροβλαστώματος, έδειξαν ότι η υπερέκφραση της PKCε, και όχι των άλλων ισομορφών PKCα, βII, ή δ έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της μορφολογίας τους και συγκεκριμένα την εμφάνιση αποφυάδων [117].

Το γεγονός ότι η αύξηση των επιπέδων της ενδογενούς PKC, ε είναι επαρκής για να προκαλέσει την διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος, θα μπορούσε να σημαίνει ότι η αύξηση των επιπέδων της ενδογενούς PKC ε μπορεί να είναι ένας μηχανισμός μέσω του οποίου γίνεται η επιμήκυνση των νευριτών των νευρικών κυττάρων κατά τη διαφοροποίησή τους. Συγκεκριμένα έχειδειχτεί ότι η εξαρτώμενη από νευριτικό αυξητικό παράγοντα (NGF) επιμήκυνση των νευριτών μπορεί να ανασταλθεί με ταυτόχρονη αναστολή της PKCε [118].

Η προσυναπτική παρουσία της PKCε είναι επίσης σημαντική για την ωρίμανση των συνάψεων. Μελέτες έδειξαν ότι η επαφή των νευρώνων με αστροκύτταρα ενδυναμώνει το διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό και επάγει διεγερτικές συνάψεις ενώ η συναπτογένεση διακόπτεται από αναστολές της PKC. Από όλες τις PKC ισομορφές που εντοπίστηκαν στους προσυναπτικούς νευρώνες, η PKCε ισομορφή συμμετέχει στη συναπτογένεση, καθώς παραγωγή αραχιδονικού οξέος από την φωσφολιπάση A2 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της PKCε και την συναπτογένεση.

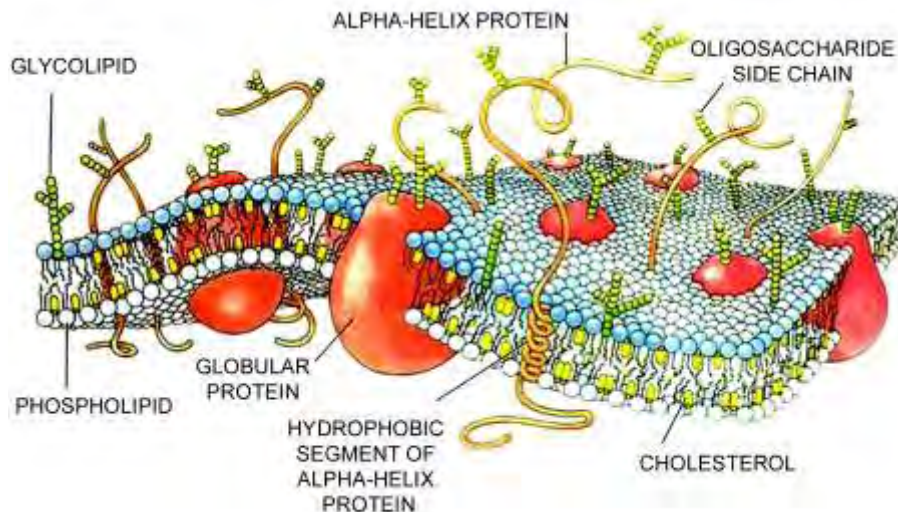
Η PKCε επίσης έχει συνδεθεί με την ευόδωση των γνωστικών λειτουργιών. Η ενεργοποίηση της μέσω βρυοστατίνης -1 έχειδειχτεί ότι μειώνει τα επίπεδα του διαλυτού Αβ αμυλοειδούς με ταυτόχρονη επαναφορά ή ανάσχεση των συνάψεων του ιπποκάμπου και ακόλουθη ανάστροφή της ελλειμματικής μνήμης.

1.6. Οργάνωση κυτταρικής μεμβράνης

1.6.1. Μοντέλο ρευστού μωσαϊκού

Η πλασματική μεμβράνη ορίζεται ως ένα ημιπερατό διάφραγμα μεταξύ, τόσο των πρωκαρυωτικών όσο και των ευκαρυωτικών κυττάρων, και του εξωτερικού τους περιβάλλοντος. Η πλασματική μεμβράνη έχει μια ιδιαίτερα σύνθετη χημική σύνθεση και δομή και λειτουργεί ως το όριο, εσωκλείοντας τις κυτταρικές δομές, και εμποδίζοντας διάφορες ουσίες του έξω-κυττάρου χώρου να εισέλθουν στο εσωτερικό. Η πλασματική μεμβράνη επιτρέπει την είσοδο μόνο σε ειδικά μόρια όπως θρεπτικές ουσίες να εισέλθουν στο κύτταρο ενώ ρυθμίζει την έξοδο των εκκριτικών προϊόντων του κυττάρου. Η μεταφορά μεγάλων μορίων όπως αμινοξέα και σάκχαρα υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο αλλά μικρά μόρια όπως οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα ή ακόμη και νερό μπορούν να διέρχονται ελεύθερα. Η μεμβράνη διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των κυττάρων, την μεταφορά μορίων και την μεταγωγή σήματος αφού αποτελεί την αρχικό σημείο ελέγχου της κυτταρικής σηματοδότησης και ομοιόστασης.

Η πλασματική μεμβράνη όπως και όλες οι άλλες μεμβράνες του κυττάρου αποτελούνται από διάφορα είδη μορίων όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και σάκχαρα. Τα λιπίδια, υδρόφοβα μόρια διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες, αποτελούν το κύριο συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών. Τα λιπίδια τα οποία διαθέτουν μια υδρόφιλη κεφαλή και μια υδρόφοβη ουρά διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να περιορίζεται όσο το δυνατόν η επαφή των υδρόφοβων περιοχών τους με νερό, δημιουργώντας έτσι μια ρευστή διπλοστοιβάδα. Η εσωτερική και εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης έχει διαφορετική λιπιδική σύσταση. Εδώ και αρκετές δεκαετίες δυο ερευνητές, οι Singer and Nicolson διατύπωσαν το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού για την οργάνωση της πλασματικής μεμβράνης [119]. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό η πλασματική μεμβράνη αποτελείται από μια διπλοστοιβάδα λιπιδίων κυρίως φωσφολιπιδίων, αλλά και διάφορα άλλα είδη μορίων όπως χοληστερόλη, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες που είναι σε συνεχή κίνηση όπως θα έκαναν οι ψηφίδες ενός μωσαϊκού που δεν είναι ενωμένες μεταξύ τους και επιπλέουν πάνω σε ένα ρευστό (Σχ. 6).



Σχήμα 6 Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης της πλασματικής μεμβράνης (Lodish et al 1995)

Όμως το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού αδυνατεί να εξηγήσει την διανομή ή τη λειτουργία των μεμβρανικών πρωτεϊνών καθώς επίσης και την διανομή και λειτουργία των μεμβρανικών λιπιδίων. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό οι πρωτεΐνες είναι ενσωματωμένες ή απλώς προσκολλημένες στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης. Επιπρόσθετα, ο υποκείμενος κυτταροσκελετός επηρεάζει μερικώς την τοποθέτηση των πρωτεϊνών αυτών κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης με το να τις συγκρατεί σε συγκεκριμένες θέσεις. Οι μεμβρανικές όμως πρωτεΐνες διαδραματίζουν συγκεκριμένους και διαφορετικούς ρόλους ενεργώντας ως ιοντικά κανάλια, μόρια μεταφοράς, υποδοχείς ή ενζυμα.

1.6.2. Κύρια λιπιδικά συστατικά της πλασματικής μεμβράνης: φωσφολιπίδια σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη.

Φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια είναι εστέρες του φωσφορικού οξέος, H_3PO_4 . Υπάρχουν δυο κύρια είδη φωσφολιπιδίων: τα φωσφογλυκερίδια και σφιγγολιπίδια.

Τα φωσφογλυκερίδια αφθονούν στους ζωικούς και φυτικούς ιστούς και αποτελούν το κύριο συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών (περίπου 40%). Τα φωσφογλυκερίδια περιέχουν ένα μόριο γλυκερόλης οστεοποιημένο με δυο μόρια λιπαρών οξέων και με

ένα μόριο φωσφορικού οξέος. Τα φωσφογλυκερίδια των κυτταρικών μεμβρανών είναι διευθετημένα σε μια λιπιδική διπλοστοιβάδα πάχους περίπου 50 Å. Τα υδρόφοβα άκρα κατευθύνονται στο κέντρο, εσωτερικό, της διπλοστοιβάδας ενώ τα πολικά άκρα προς το εξωτερικό. Τα φωσφολιπίδια είναι γνωστό ότι συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές διεργασίες όπως ο μεταβολισμός και η σηματοδότηση. Τα φωσφολιπίδια που περιέχουν χολίνη ή αιθανολαμίνη αποτελούν σημεία στα οποία μπορούν να προσδεθούν οι μεμβρανικές πρωτεΐνες.

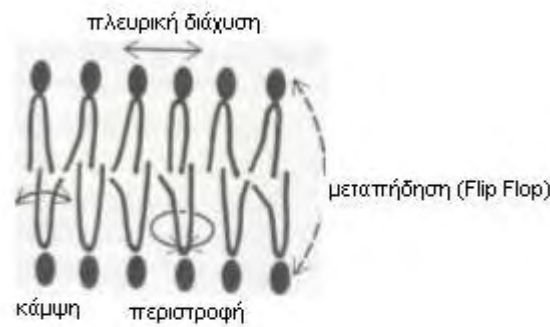
Σφιγγολιπίδια

Τα σφιγγολιπίδια, όπως αναφέρθηκε παραπάνω αποτελούν υποομάδα των φωσφολιπιδίων, βασικό συστατικό της δομής τους είναι η σφιγγοσίνη. Στη φωσφορική ομάδα των σφιγγολιπιδίων ενώνεται χολίνη, μονοσακχαρίτης ή πολυσακχαρίτης οπότε τα σφιγγολιπίδια ονομάζονται αντίστοιχα σφιγγομυελίνη, σερεβροζίδια και γαγγλιοζίδια. Σφιγγολιπίδια με υδατανθρακικές ομάδες αποτελούν τα πιο κοινά γλυκολιπίδια της πλασματικής μεμβράνης στα ζωικά και τα φυτικά κύτταρα. Στα κύτταρα θηλαστικών όλα σχεδόν τα γλυκολιπίδια είναι σφιγγολιπίδια και βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στην πλασματική μεμβράνη. Τα γαγγλιοζίδια είναι τα πιο σύνθετα γλυκολιπίδια από δομική άποψη, περιέχουν μια ή περισσότερες ομάδες σιαλικού οξέος και είναι αρνητικά φορτισμένα. Τα γαγγλιοζίδια αποτελούν μεγάλο τμήμα της πλασματικής μεμβράνης των νευρώνων. Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί υποδεικνύουν ότι τα γλυκολιπίδια συμβάλλουν σε πολλές κυτταρικές διεργασίες όπως στη ρύθμιση της λειτουργίας των μεμβρανικών πρωτεϊνών, της κυτταρικής ανάπτυξης και επιβίωσης (survival) [120, 121; 122].

Χοληστερόλη

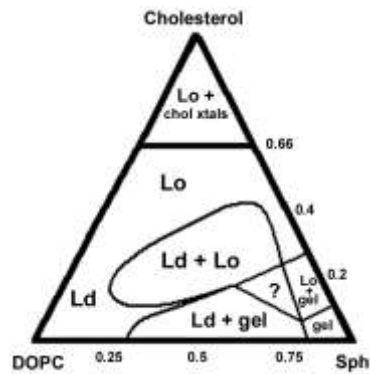
Η χοληστερόλη αποτελεί την κύρια στερόλη των μεμβρανών των ζωικών κυττάρων. Η πλασματική μεμβράνη των ζωικών κυττάρων περιέχει σημαντικά ποσά χοληστερόλης που σε μερικές περιπτώσεις φθάνουν και το 30% κατά βάρος, του συνόλου των μεμβρανικών λιπιδίων. Η πλασματική μεμβράνη περιέχει μεγαλύτερη αναλογία χοληστερόλης/φωσφολιπιδίων (0,3-1,2) σε σύγκριση με τις ενδοκυτταρικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων (0,03-0,09) και του ενδοπλασματικού δικτύου (0,03-0,08) [123]. Η χοληστερόλη είναι απαραίτητη για την ενδοκυτταρική μεταφορά και την μεταγωγή σήματος ιδιαίτερα στα νευρικά κύτταρα. Μια πολύ σημαντική ιδιότητα της

χοληστερόλης είναι ότι μπορεί να μεταπηδήσει από την μια στην άλλη πλευρά της μεμβράνης σε αντίθεση με τα φωσφολιπίδια, που αν και μπορούν να κινούνται ελεύθερα στη δική τους στοιβάδα με πλευρική διάχυση, να περιστραφεί γύρω από τον άξονα του ή και να καμφθεί είναι πολύ δύσκολο να περάσει από την μια στοιβάδα στην άλλη (Σχ. 7)



Σχήμα 7: Διάφοροι τύποι κίνησης που μπορούν να κάνουν τα λιπίδια μέσα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα

Εδώ και αρκετές δεκαετίες πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στη λιπιδική σύσταση των μεμβρανών (λιπιδική διπλοστοιβάδα) [124, 125]. Η παρουσία διαφορετικού είδους και αριθμού λιπιδίων καθώς και μεμβρανικών πρωτεϊνών στην σύνθεση της διπλοστοιβάδας δημιουργεί μια ρευστότητα και δυναμικότητα που μπορεί να μεταβληθεί από την επίδραση διαφόρων χημικών και φυσικών παραγόντων. Οι χημικοί παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ρευστότητα της είναι το μήκος της αλειφατικής αλυσίδας, ο αριθμός των διπλών δεσμών, το ποσό της χοληστερόλης που υπάρχει στη διπλοστοιβάδα ενώ οι φυσικοί παράγοντες είναι η θερμοκρασία, η πίεση, το pH, και το μεμβρανικό δυναμικό. Έτσι με βάση τους παραπάνω η λιπιδική διπλοστοιβάδα παρουσιάζει διαφορετικές μορφές/φάσεις. Μπορεί να υπάρχει σε ρευστή, (liquid lo), ημίρρευστη (gel-like phase) και στερεή (solid So) φάση [126] (Σχ. 8). Η ρευστή φάση μπορεί να χωριστεί περαιτέρω στην ‘ρευστή ακανόνιστη’ (liquid disorder phase Id) και στην πιο οργανωμένη ρευστή (Liquid order lo) φάση [127; 128; 129; 130].



Σχήμα 8 Διάγραμμα των φάσεων της λιπιδικής διπλοστοιβάδας

1.7. Λιπιδικές σχεδίες

Με βάση τα παραπάνω η λιπιδική διπλοστοιβάδα δεν παρουσιάζει ομοιογένεια όπως υποστηρίζει το μοντέλο των Singer and Nicolson, αλλά μια αυξημένη ετερογένεια και ασυμμετρία στη σύνθεση της [131; 132].

Η μελέτη των σφιγγολιπιδίων της χοληστερόλης, καθώς και η ενδοκυτταρική τους μεταφορά στα επιθηλιακά κύτταρα [133; 134, 135] οδήγησε στην παρατήρηση ότι διαφορές μικροπεριοχές (microdomains) της πλασματικής μεμβράνης είναι ιδιαίτερα πλούσιες στα δυο αυτά στοιχεία και παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Οι μικροπεριοχές αυτές ονομάζονται σήμερα λιπιδικές σχεδίες (lipid rafts). Πολλές μελέτες προτείνουν ότι οι εξειδικευμένες αυτές περιοχές της μεμβράνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένων των πολυάριθμων μονοπατιών μεταγωγής σήματος, της απόπτωσης, της προσκόλλησης και μετανάστευσης των κυττάρων, της συναπτικής διαβίβασης, της οργάνωσης του κυτταροσκελετού, και της ταξινόμησης των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της εξωκύτωσης και της ενδοκύτωσης [136, 137; 138]. Εκτός από τους ρόλους αυτούς σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, οι λιπιδικές σχεδίες έχουν προταθεί ως σημείο της κυτταρικής εισόδου ενός ευρέος φάσματος ιών, βακτηριδίων και τοξινών, καθώς επίσης και ως περιοχές όπου σχηματίζονται οι νέοι ιοί, τα prions και τα αμυλοειδή της νόσου Alzheimer [139; 140, 141; 142, 143; 144].

Το μέγεθος των lipid rafts δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί και μπορεί να εκτείνεται από 50 έως 700 nm [145; 146; 147]. Αρκετές έρευνες υποστηρίζουν ότι τα lipid rafts μπορεί να είναι μεμονωμένα/μικρά αλλά έχουν τη δυνατότητα να συνενώνονται

μεταξύ τους χάρη στη σύζευξη πρωτεϊνών ή λιπιδίων και να δημιουργούν μεγαλύτερες πλατφόρμες, διακριτές με τη βοήθεια μικροσκοπίου [143, 148].

Η πιο ευρέως χρησιμοποιημένη μέθοδος για την απομόνωση lipid rafts βασίζεται στην παρατήρηση ότι όταν η κυτταροπλασματική μεμβράνη κατεργάζεται με το μη ιονικό απορρυπαντικό Triton X-100 στους 4 °C, ένα μικρό υποσύνολο των συστατικών της μεμβράνης διαλυτοποιείται [130]. Νεότερες μελέτες όμως έχουν δείξει ότι η χρήση TX-100 αλλά και άλλων απορρυπαντικών που χρησιμοποιούνται όπως CHAPS [149, 150] και αλλά, μπορεί να αλλάξει τη σύσταση των πρωτεϊνών που συνδέονται με αυτά [151]. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα στα οποία δεν γίνεται χρήση απορρυπαντικών ώστε η σύσταση των lipid rafts να παραμένει όσο το δυνατόν ανέπαφη [152]. Σε αυτό συντέλεσε το γεγονός ότι παρά την αρχική παραδοχή ότι οι λιπιδικές σχεδίες είναι παρα προϊόντα κατεργασίας της μεμβράνης με απορρυπαντικά, πειράματα *in situ* απέδειξαν την ύπαρξη συγκεκριμένης κατανομής μορίων που βρίσκονται στις λιπιδικές αυτές σχεδίες [153]. Επίσης νέες μελέτες υποστηρίζουν το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν για την δημιουργία των λιπιδικών σχεδίων και οι πρωτεΐνες που συνδέονται με τις μεμβράνες. Μια από αυτές είναι και η ακτίνη του κυτταροσκελετού που δημιουργεί ένα σύνθετο δίκτυο νημαντιδίων υποκείμενου της πλασματικής μεμβράνης [154]. Δική μας πρωτογενής μελέτη αλλά και άλλες δείχνουν ότι οι λιπιδικές σχεδίες είναι εμπλουτισμένες με κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες όπως ακτίνη, τουμπουλίνη, μυοσίνη, ακτινίνη και σουπερβιλλίνη και αποδεικνύει την άμεση αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με τις λιπιδικές σχεδίες [155, 156, 157]. Η παρουσία του υποκείμενου κυτταροσκελετού έχει σημαντική λειτουργική σημασία. Πειράματα σε μοντέλα μεμβράνης με λιποφιλικές χρώσεις έδειξαν ότι οι πλούσιες σε ινίδια ακτίνης λιπιδικές σχεδίες, έχουν σταθερότητα και εμφανίζουν μεγαλύτερη συμύκνωση μορίων σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές της πλασματικής μεμβράνης.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως τα lipid rafts συμμετέχουν σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών. Η ικανότητα τους να ενώνονται, φέροντας έτσι τις πρωτεΐνες που συνδέονται με αυτά σε άμεση επαφή, δημιουργώντας ικριώματα πρωτεϊνών εξασφαλίζει ένα σημαντικό πλεονέκτημα για τη μεταγωγή και διεύρυνση της σηματοδότησης στο εσωτερικό των κυττάρων.

Οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να ανήκουν σε τρεις βασικές κατηγορίες: Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν πρωτεΐνες που βρίσκονται μέσα στα lipid rafts, στη δεύτερη σε

αυτές που βρίσκονται στην ρευστή ακανόνιστη φάση (ld) της πλασματικής μεμβράνης, και τέλος υπάρχουν και οι πρωτεΐνες εκείνες που μπορούν να εισέρχονται και να εξέρχονται από τα lipid rafts. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται μόνιμα μέσα στα lipid rafts έχουν ειδικές μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως οι GPI-anchored πρωτεΐνες, οι διπλά ακυλιομένες κινήσεις τυροσίνης της Src- οικογένειας πρωτεϊνών, καθώς και οι Gα υπομονάδες των G πρωτεϊνών. Επίσης στην κατηγορία αυτή μπορεί να υπάρξουν και παλμιτοϋλιωμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως η β-σεκρετάση. Επίσης είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι πολλοί υποδοχείς που βρίσκονται στην μεμβράνη μπορούν να εισέρθουν σε lipid rafts μόνο μετά την δέσμευση προσδέτη (ligand) που οδηγεί στην αλλαγή της διαμόρφωσης τους όπως ο EGFR [158, 159] ενώ για κάποιους άλλους υποδοχείς όπως ο FGFR, κάτι τέτοιο δεν είναι απαραίτητο [160]. Συνεπώς η είσοδος και η έξοδος πρωτεϊνών από τα lipid rafts υπόκειται σε έλεγχο.

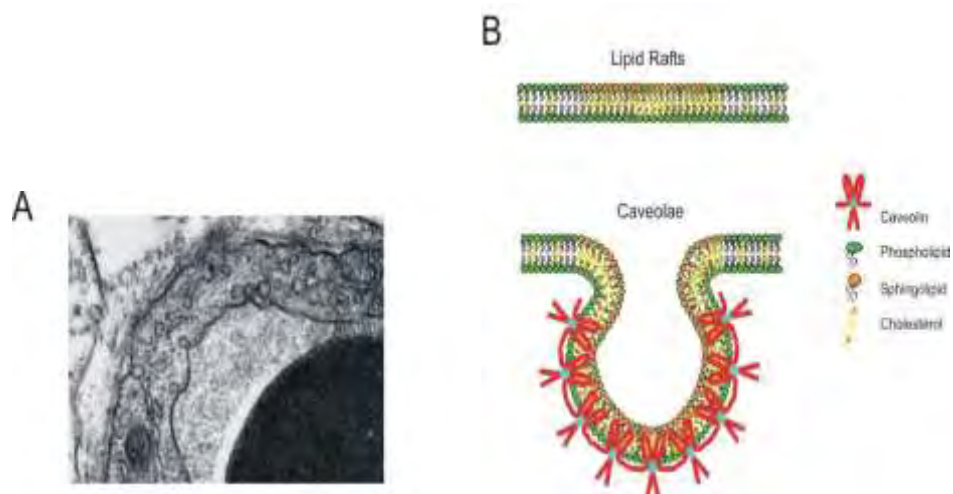
1.7.1. Καβεολίνες

Μια υποκατηγορία των lipid rafts αποτελούν τα καβεοσώματα. Τα καβεοσώματα αποτελούν εσοχές σε σχήμα φλάσκας της πλασματικής μεμβράνης. Οι σχηματισμοί αυτοί, σε αντίθεση με τα επίπεδα lipid rafts, είναι ευδιάκριτοι με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και η παρουσία τους στο κύτταρο είναι γνωστή εδώ και 50 χρόνια (Yamada et al., 1955). Επιπροσθέτως, στα καβεοσώματα εκτός από χοληστερόλη και σφιγγομυελίνη περιέχουν και πρωτεΐνες γνώστες και ως καβεολίνες. Η Καβεολίνη-1 (cav-1) είναι το πρώτο μέλος της οικογενείας των πρωτεϊνών αυτών που ανακαλύφθηκε, και είναι η πιο σημαντική για τη διατήρηση της δομής του καβεοσώματος. Υπάρχουν άλλες δυο πρωτεΐνες η Καβεολίνη-2 που συχνά συν-εκφράζεται με την Καβεολίνη-1 σε διάφορους τύπους κυττάρων, και η Καβεολίνη-3 που απαντάται μόνο σε μυϊκά κύτταρα [161, 162]. Η πρωτεϊνική δομή της Καβεολίνης-1 περιλαμβάνει ένα κυτταροπλασματικό N-τελικό άκρο, και ένα δεύτερο τμήμα (82-101αα) υπεύθυνο για αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Ταυτόχρονα το τμήμα αυτό επικαλύπτεται από ένα επιπλέον μοτίβο (61-101αα) το οποίο είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία συμπλεγμάτων με άλλες Καβεολίνες. Τέλος, υπάρχει ένα διαμεμβρανικό τμήμα (102-134αα) υπεύθυνο για την προσκόλληση της πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη. Σε πολλές πρωτεΐνες, όπως στην Νευροϊνιδίνη [56] αλλά και στις α απομόναχες των G πρωτεϊνών [163], έχουν αναγνωριστεί μοτίβα, αλληλουχίες αμινοξέων, μέσω των οποίων είναι δυνατόν να συνδεθούν με τις

Καβεολίνες. Η γενική αλληλουχία των μοτίβων αυτών είναι ΦΧΦΧΧΧΧΦ, ΦΧΧΧΧΦΧΧΦ ή ΦΧΦΧΧΧΧΦΧΧΦ, όπου Φ είναι ένα αμινοξύ με αρωματικό δακτύλιο όπως τρυπτοφάνη φαινυλαλανίνη ή τυροσίνη και Χ ένα οποιοδήποτε αμινοξύ.

Οι Καβεολίνες για να δημιουργήσουν τις χαρακτηριστικές εσοχές στην πλασματική μεμβράνη ενώνονται σε συστάδες δημιουργώντας μεγάλα πρωτεϊνικά ικρίωματα. Μια χαρακτηριστική δομή καβεοσώματος παρουσιάζεται στο σχ 9. Επιπλέον είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η Καβεολίνες μπορούν και δεσμεύουν άμεσα χοληστερόλη, για το λόγο αυτό οποιαδήποτε μείωση της χοληστερόλης μπορεί να αναστρέψει της χαρακτηριστικές αυτές εσοχές στην πλασματική μεμβράνη.

Τα καβεοσώματα υπάρχουν σε πολλά είδη κυττάρων, κυρίως σε ενδοθηλιακά και κύτταρα καθώς και σε ινοβλάστες, ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει το γεγονός ότι δεν υπάρχουν στην πλασματική μεμβράνη των λεμφοκυττάρων ή των νευρώνων [164]. Παρόλα αυτά πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ότι παρά την απουσία καβεοσωμάτων, σε ορισμένους πληθυσμούς νευρώνων υπάρχει έκφραση Καβεολινών [165, 166]. Η λειτουργία των Καβεολινών που δεν συμμετέχουν στη δημιουργία καβεοσωμάτων δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί, όμως υπάρχει η υπόθεση ότι μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών και έξω από τα καβεοσώματα [167]. Για παράδειγμα, έχει προταθεί ότι η Καβεολίνη-1 μπορεί να ρυθμίζει τη νευρωνική πλαστικότητα. Η υπερέκκριση της Καβεολίνη-1 σε νευρώνες ιππόκαμπου οδήγησε σε μείωση του μήκους των νευρικών ενώ παράλληλα αύξησε την πυκνότητα τους [165]. Επιπλέον, μια πρόσφατη έρευνα σε επίμυες με ομόζυγη απενεργοποίηση του γονιδίου της Καβεολίνης-1 έδειξαν ότι οι επίμυες αυτοί έχουν μειωμένο βάρος εγκεφάλου σε σχέση με του άγριου τύπου, χωρίς όμως να επηρεάζεται ο αριθμός των νευρώνων στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Ακόμα τα ποντίκια αυτά εμφάνισαν ελλειπείς κινητικές λειτουργίες και ήταν λιγότερο δραστήρια, υποδηλώνοντας ότι η Καβεολίνη-1 στους νευρώνες μπορεί να λειτουργεί ως ένας από τους ρυθμιστές κίνησης [168].



Σχήμα 9 (Α) εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο καβεόσωμάτων ενδοθηλιακών κυττάρων
(Β) Διάγραμμα της βιοχημικής σύνθεσης των λιπιδικών σχεδίων και καβεόσωμάτων
(Galbiati et al 2001)

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σταθερό εύρημα των μελετών που επικεντρώνονται στις ασθένειες με συμπτώματα νοητικής δυσλειτουργίας και μαθησιακές δυσκολίες είναι η ανωμαλία στον αριθμό, τη μορφολογία και τη δομή των δενδριτών και των ακανθών τους [228, 229]. Οι ανωμαλίες αυτές είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστικές και εμφανίζονται στη νηπιακή-παιδική ηλικία, δηλαδή στην ηλικία της συναπτογένεσης. Μια από τις ασθένειες αυτές είναι και η νευροϊνωμάτωση τύπου 1. Η Νευροϊνιδίνη, το παράγωγο του γονιδίου της NF1 μεταλλαγές του οποίου προκαλούν την ασθένεια, είναι μια αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη πρωτεΐνη. Η Νευροϊνιδίνη είναι μια μεγάλη κινητή RasGAP πρωτεΐνη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, κύρια λειτουργία της οποίας είναι η ρύθμιση της δραστηριότητας της Ras. Η δράση της πρωτεΐνης ως RasGAP οφείλεται σε μία κεντρική περιοχή 360 αμινοξέων, την περιοχή GRD, με πραγματική δράση RasGAP *in vivo* και *in vitro* που υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα, παράγοντας δυο μετάγραφα το GRDI και το GRDII.

Πρώτος στόχος της εργασίας αυτής ήταν η διαλεύκανση του ρόλου της ενδογενούς Νευροϊνιδίνης και των μεταγράφων της κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, και η συσχέτιση του με την πρωτεΐνη Ras. Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός της Νευροϊνιδίνης και ειδικότερα η παρουσία της στις λιπιδικές σχεδίες, όπου διερευνήθηκε ο μηχανισμός ενεργοποίησης της από την πρωτεϊνική κινάση E PKCε. Τέλος, η μελέτη της αλληλεπίδρασης των περιοχών GRDI και GRDII της Νευροϊνιδίνης με τα κυτταροσκελετικά συστήματα ακτίνης και τουμπουλίνης, και ο σαφής διακριτός ρόλος των δυο ισομορφών στη νευρική διαφοροποίηση, μας οδήγησαν να διερευνήσουμε την πιθανή αλληλεπίδραση της Νευροϊνιδίνης με πρωτεΐνες της μετασυναπτικής μεμβράνης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πλασμίδια και καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων

2.1.1. Πλασμίδια

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι pEGFP-GRDI, pEGFP-GRDII, pEGFP-SEC14, pEGFP-GRDI-SEC14, με ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη, και κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο της Δρ. Μάγκουρα. Τα πλασμίδια pHACE_PKCε-WT και PHACE_PKCε-CAT που εκφράζουν ολόκληρο το γονίδιο της PKCε και το καταλυτικό της τμήμα και μόνο ήταν προσφορά του Dr. Jae-Won Soh [169].

2.1.2. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με τη χρήση θερμικού σοκ

Ο μετασχηματισμός πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας δείγματα 100μL επιδεκτικών προς μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων. Στο δείγμα προστίθενται περίπου 100ng πλασμιδιακού DNA. Ύστερα από 30min επώασης στον πάγο, ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42°C, που διαρκεί 90sec-2min. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επιστρέφουν στον πάγο για επώαση 2min. Έπειτα, προστίθεται μέσο LB broth (900mL), επωάζεται στους 37°C για 1h και τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλίο. Το τρυβλίο τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο, όπου παραμένει για 16h στους 37°C.

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

Από το τρυβλίο των μετασχηματισμένων βακτηρίων επιλέγονται μία ή περισσότερες αποικίες, οι οποίες ενοφθαλμίζονται, υπό στείρες συνθήκες και παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού, σε 5mL LB broth. Οι μικρές καλλιέργειες αναπτύσσονται για 16h, στους 37°C, υπό ανάδευση. Για την ανάπτυξη καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας, 1mL από τη μικρή καλλιέργεια μεταφέρεται σε καλλιέργεια LB broth των 50-100mL, παρουσία αντιβιοτικού, και επωάζεται για 16h, στους 37°C, υπό ανάδευση.

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής και μεγάλης κλίμακας έγιναν με τα προϊόντα NucleoSpin και Nucleobond της εταιρείας MACHEREY-NAGEL.

2.1.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA

Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίζεται με βάση την οπτική πυκνότητα του διαλύματος, όπως αυτή υπολογίζεται από φασματοφωτόμετρο UV-VIS. Οι μετρήσεις του DNA πραγματοποιούνται σε κυψελίδες χαλαζία, το δείγμα αραιώνεται με dH₂O και μετριέται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 260nm και στα 280nm. Η τιμή της απορρόφησης OD₂₆₀ επιτρέπει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του DNA, ενώ, ο λόγος των οπτικών απορροφήσεων OD₂₆₀/OD₂₈₀ αποτελεί δείκτη της καθαρότητας του DNA.

2.1.5. Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Για την πέψη DNA μορίων με περιοριστικά ένζυμα ακολουθήθηκαν οι οδηγίες που αναγράφονται στα συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων και χρησιμοποιήθηκαν τα ειδικά διαλύματα που συνοδεύουν κάθε ένζυμο. Κατά κανόνα γίνεται πέψη 1μg DNA με 1 unit ενζύμου στα 20μl συνολικού όγκου αντίδρασης. Στην περίπτωση των GRD χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα NotI και HindIII. Ακολουθεί επώαση του μίγματος σε υδατόλουτρο 37°C για δύο ώρες και ανάλυση δείγματος από το διάλυμα της αντίδρασης με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης μετά από προσθήκη χρωστικής.

2.1.6. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Ο έλεγχος των προϊόντων των πέψεων πραγματοποιήθηκε με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v (CAMBREX). Αναλυτικά, 1g αγαρόζης διαλύονται σε 50ml TAE (2M Tris, 50mM EDTA). Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και να γίνει διαυγές. Όταν η θερμοκρασία της υγρής αγαρόζης φτάσει τους 50-60°C προστίθεται 50μl βρωμιούχου αιθιδίου, και το διάλυμα τοποθετείται στην ειδική υποδοχή της συσκευής ηλεκτροφόρησης, όπου έχει προηγουμένως τοποθετηθεί το ειδικό χτενάκι, ώστε κατά την πήξη της αγαρόζης να σχηματιστούν τα φρεάτια των δειγμάτων. Τα δείγματα προτού φορτωθούν αναμιγνύονται με ορισμένη ποσότητα διαλύματος φόρτωσης (loading buffer, Fermentas). Η γλυκερόλη, την οποία εμπεριέχει το διάλυμα φόρτωσης, επιτρέπει την ευκολότερη τοποθέτηση των δειγμάτων στα φρεάτια, ενώ, η χρωστική επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας του μετώπου της

ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 90V. Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται το TAE. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα παρατηρείται υπό υπεριώδη ακτινοβολία (Dolphin-Doc Pro system, Wealtec) όπου διακρίνονται φθορίζουσες ζώνες στις θέσεις όπου βρίσκονται τα μόρια DNA και φωτογραφίζεται.

2.2. Κυτταροκαλλιέργειες

2.2.1. Απομόνωση εγκεφαλικού ιστού νεοσσών

Εγκεφαλικά ημισφαίρια και οπτικοί λοβοί νεοσσών αφαιρέθηκαν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία πάνω σε πάγο. Ακολούθησε αφαίρεση των μηνίγγων και έκπλυση με παγωμένο διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Phosphate Buffer Saline, PBS) για τη απομάκρυνση των αιμοσφαιρίων. Εν συνεχεία, τα ημισφαίρια τοποθετήθηκαν σε ειδικό καλούπι γκιλοτίνα και με την βοήθεια λεπίδας κόπηκαν σε τομές του 1mm. Η διατήρηση και φύλαξή τους πραγματοποιείται στους -80°C

2.2.2. Απομόνωση και Καλλιέργεια Πρωτογενών Νευρώνων και Αστροκυττάρων

Η απομόνωση και διατήρηση *πρωτογενών καλλιιεργειών φλοιϊκών νευρώνων εμβρύου όρνιθας* έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε από τη Δρ. Μάγκουρα [170, 171, 172, 180]. Έμβρυα όρνιθας 7^{ης} εμβρυϊκής μέρας θυσιάστηκαν και τα εγκεφαλικά ημισφαίρια αφαιρέθηκαν κάτω από άσηπτες συνθήκες. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκαν οι μηνιγγες και τα ημισφαίρια διαχωρίστηκαν μηχανικά μετά από διέλευση μέσα από ειδική μεμβράνη (mesh) με πόρους διαμέτρου 78 μm. Ακολούθησε η επίστρωσή τους σε τρυβλία που είχαν επωαστεί για τουλάχιστον 4-5 ώρες με πολυλυσίνη (poly-L-lysine, 100 μg/ml) ως υπόστρωμα προσκόλλησης, ακολουθούμενη από πλύσεις με PBS και ddH₂O, ενώ στη συνέχεια προστέθηκε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's minimum essential medium) με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 4.5 g/L και 20% (v/v) ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) για τουλάχιστον τρεις ώρες. Η διαδικασία αυτή 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).

Για την απομόνωση αστροκυττάρων, έμβρυα όρνιθας 15^{ης} εμβρυικής ημέρας θυσιάστηκαν και τα εγκεφαλικά ημισφαίρια διαχωρίστηκαν μηχανικά μετά από διέλευση μέσα από ειδική μεμβράνη (mesh) με πόρους διαμέτρου 48 μ m. Ακολούθησε η επίστρωσή τους σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's minimum essential medium) με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1 g/L και 20% (v/v) ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS). Τα αστροκύτταρα δεν χρειάζονται υπόστρωμα προσκόλλησης.

2.2.3. Καλλιέργεια Ευκαριωτικών Κυττάρων

Η *SH-SY5Y* κυτταρική σειρά χρησιμοποιήθηκε σε αρκετά από τα πειράματά μας, καθώς αποτελεί παγκόσμια αποδεκτό μοντέλο μελέτης νευρωνικής λειτουργίας με ενδεδειγμένο χαρακτηρισμό. Πρόκειται για 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 [173]. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν και αναπτύχθηκαν σε μίξη θρεπτικού υλικού DMEM (45%) με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1 g/L και F12 (Ham, Nutrient mixture με L-γλουταμίνη) (45%), εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός.

Οι ινοβλάστες των νεφρών πιθήκου COS7 όπως και τα κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος IMR-32, καλλιεργήθηκαν σε DMEM με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1 g/L εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός.

Όλα τα θρεπτικά μέσα και υλικά προήλθαν από την εταιρεία Gibco, Life Technologies Inc, πλην των ορών βοός που προέρχονται από τη Biowest, και σε αυτά προστέθηκε 100 μ g/mL πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Biochrom AG).

2.2.4. Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τεχνολογία ηλεκτροδιάτρησης (AMAXA).

Για την παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τους φορείς έκφρασης που κατασκευάστηκαν, χρησιμοποιήθηκε τεχνική ηλεκτροδιάτρησης με τεχνολογία Amaxa. Για τα κύτταρα Cos7 χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα O-003 ενώ για τα

SHSY5Y αλλά και τους πρωτογενείς νευρώνες το πρόγραμμα A-023, τα οποία και επιλέχθηκαν μετά από προκαταρκτικά πειράματα. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα ανάλογα πλασμίδια χρησιμοποιώντας 4 µg/60 mm culture dish, ή με 4 µg πλασμιδίου μάρτυρα, σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή. Εν συντομία, στα νευρικά κύτταρα, μετά την απομόνωσή τους, έγινε έκπλυση με φυσιολογικό ορό, και φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στα 1000rpm. Το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύθηκε σε 100µl PBS, για κάθε συνθήκη, και κατόπιν αναμείχθηκε με το αντίστοιχο πλασμιδιακό DNA. Τα εκάστοτε εναιωρήματα που προέκυψαν (>100 µl το καθένα) τοποθετήθηκαν σε κυββέτες ηλεκτροδιάτρησης και ακολούθησε η ηλεκτροδιάτρηση. Στη συνέχεια, οι νευρώνες μεταφέρθηκαν σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 100 mm και επώαστηκαν στους 37°C σε 5% CO₂. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού μέσου και τα κύτταρα συλλέχθηκαν την επομένη, σε 48 ώρες. Για τις κυτταρικές σειρές, η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: τα κύτταρα από ένα τρυβλίο 100mm που είχαν φτάσει σε κατάσταση συμβολής επώαστηκαν με θρυψίνη/EDTA για 5 λεπτά στους 37°C. Στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα αναδιαλύθηκε σε 100µl PBS για κάθε συνθήκη. Η διαδικασία που ακολούθησε είναι όμοια με αυτήν που περιγράφηκε για τους νευρώνες.

Η απόδοση της διαδικασίας διαμόλυνσης των κυττάρων-στόχων (τυπικά ~70%) εκτιμήθηκε με GFP ανοσοφθορισμό και ανάλυση ανοσοαποτύπωσης (Western Blotting) με αντίστοιχα αντισώματα.

2.2.5. Χορήγηση αγωνιστών και αναστολέων

Ο ειδικός για την PKCε πεπτιδικός ενεργοποιητής ψεRACK [CYGRKKRRQRRR-NH₂ (TAT) \S-S/CHDAPIGYD –COOH] (1 µM) και ο PKCε ειδικός πεπτιδικός αναστολέας εV1-2 [CYGRKKRRQRRR-NH₂ (TAT) \S-S/ EAVSLKPT] (1 µM) [174] συντέθηκαν στο Biopolymer Facility του Πανεπιστημίου της Maryland. ο διαταράκτης των λιπιδικών σχεδίων MβCD (methyl-beta-cyclodextrin, 10 mM) και ο BrdU [2.5 µM] ήταν προϊόντα της Sigma, ο EGF (100 nM) και NGF [100ng/ml] προήλθε από την Alomone labs, το ρετινοϊκό οξύ (10µM) προήλθε από την sigma, το TPA (100nM) από την Alexis. FTI-277 αναστολέας [1.25 µM] από την Calbiochem και η dBcAMP [1mM] από την Applichem.

2.2.6. Απομόνωση ολικού RNA από ευκαριωτικά κύτταρα

RNA από ιστό και κυτταρικές σειρές απομονώθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol (Invitrogen), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Το TRIzol αποτελεί ένα ομογενές φαινολικό διάλυμα αποδιατακτών και αναστολέων RNAσών και χρησιμοποιείται σε διαδικασίες διαχωρισμού. Συγκεκριμένα, στα κύτταρα ή στον ιστό προστίθεται TRIzol και ακολουθεί διαλυτοποίηση τους και παραμονή για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 10 λεπτά στους 4°C, προστίθενται στο υπερκείμενο 0,2 ml χλωροφόρμιο για κάθε ml TRIzol που χρησιμοποιήθηκε, και, ακολουθεί νέα φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στους 4°C σε 12000 g. Στο σημείο αυτό το μείγμα έχει διαχωριστεί σε τρεις φάσεις. Η υδάτινη φάση, που εμπεριέχει το RNA, μεταφέρεται και κατακρημνίζεται από την υδάτινη φάση αφού αυτή μεταφερθεί σε νέο eppendorf με την προσθήκη 0,5 ml ισοπροπανόλης για κάθε ml TRIzol. Μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και μία τρίτη φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στους 4°C σε 12000 g, ακολουθεί έκπλυση του RNA με τουλάχιστον 1 ml αιθανόλης 75%, φυγοκέντρωση, και επανάληψη της διαδικασίας ξεπλύματος. Αφού αφαιρεθεί προσεκτικά όλη η ποσότητα αιθανόλης και το ίζημα στεγνώσει, επαναδιαλύεται σε 50 µl ελεύθερο ριβονουκλεάσης ddH₂O (double distilled H₂O). Ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός του RNA με φωτομέτρηση στα 260 nm και 280 nm και έλεγχος της καθαρότητας του RNA σε πηκτή αγαρόζης.

2.2.7. Αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR)

Για τη σύνθεση cDNA συμπληρωματικού του εξαχθέντος RNA χρησιμοποιήθηκε η αντίστροφη μεταγραφάση Superscript™ II RT (Invitrogen) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρείας παρασκευής. Συνοπτικά, 1000ng RNA από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε ειδικά DNA/RNA free eppendorfs. Στα δείγματα προστέθηκε 10ng/ml τυχαίων εκκινητών (random primers), 1 µM dNTP Mix και ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 12 µl, και ακολούθησε αποδιάταξη του RNA μίγματος στους 65°C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο και προστέθηκαν 4 µl ρυθμιστικού διαλύματος 5X First-Strand Buffer, και 2 µl 0,1 M DTT. Τα δείγματα αφέθηκαν στους 25°C για 2 λεπτά επανατοποθετήθηκαν σε πάγο και κατόπιν προστέθηκε 1 µL (200 units) της SuperScript™ II RT. Στη συνέχεια έγινε η τελική ανάδευση του μείγματος και επώαση στους 25°C για 10 λεπτά. Μετά το πέρας των 10 λεπτών, τα δείγματα επώαστηκαν για 50 λεπτά στους 42°C. Η τελική

φάση της σύνθεσης του cDNA πραγματοποιείται με επώαση για 15 λεπτά στους 70°C. Η φύλαξη των δειγμάτων RNA γίνεται στους -80°C.

2.2.8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αντίδραση της PCR για τον *in vivo* πολλαπλασιασμό ενός γνωστού μήκους τμήματος DNA και την επαγόμενη ανίχνευση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων με ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της Platinum Taq Πολυμεράσης (Invitrogen). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των μοτίβων της Νευροϊνιδίνης GTDI/II και NLS σχεδιάστηκαν ώστε να αναγνωρίζουν της περιοχές είτε στον άνθρωπο είτε στην όρνιθα. Οι εκκινητές που αναγνωρίζουν το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) σχεδιάστηκαν για να αναγνωρίζουν και τα δύο είδη. Οι ακολουθίες τους είναι οι ακόλουθες :

NLS

Για τον άνθρωπο

5'-ACAGCCTTCTCAGGCCAACAC-3' (Πρόσθιος Εκκινητής)

5'-GGGTGTTGTGATCCCTGATTCC-3' (Ανάστροφος Εκκινητής)

Για την όρνιθα

5'-GCAGCCTTCACAAGCGAACA-3' (Πρόσθιος Εκκινητής)

5'-GCAGCCTTCACAAGCGAACA-3' (Ανάστροφος Εκκινητής)

GRD

Για τον άνθρωπο

5'-ATTGTGATCACATCCTCTGATTGG-3' (Πρόσθιος Εκκινητής)

5'-CATGATTGGCAATACTCTGAA-3' (Ανάστροφος Εκκινητής)

Για την όρνιθα

5'-CTTCGGAATTCCCACCACAA-3' (Πρόσθιος Εκκινητής)

5'-CGAAGTCATTAAAAGGCCTG-3' (Ανάστροφος Εκκινητής)

GAPDH

5'-ATGGTGAAAG TCGGAGTCAA-3' (Πρόσθιος Εκκινητής)

5'-ATCACAAGTTTCCCGTTCTC-3' (Ανάστροφος Εκκινητής)

Οι συνθήκες της PCR για 20 µl αντίδρασης ήταν:

1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPS (κάθε ένα), 0,2 µM Primer Mix (κάθε ένας), 1x PCR Buffer, 1.0 unit Taq Πολυμεράση, εκμαγείο DNA (DNA template) 0,5 µg, και συμπλήρωμα στα 20 µl με ddH₂O.

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες:

Μετουσίωση για 5 min στους 94°C, στη συνέχεια μετουσίωση για 1 λεπτό στους 94°C, αναδιάταξη για 1 λεπτό στους 53°C για το **NLS**, και 52°C για το **GRD** και επιμήκυνση για 2 λεπτά στους 72°C, ακολουθούμενη από 30 κύκλους.

Για το γονίδιο της GAPDH οι αντιδράσεις PCR ήταν οι ακόλουθες:

Μετουσίωση για 4 min στους 94°C, στη συνέχεια μετουσίωση για 1 λεπτό στους 94°C, αναδιάταξη για 30 δευτερόλεπτα στους 51°C και επιμήκυνση για 1 λεπτό στους 72°C, ακολουθούμενη από 22 κύκλους. Μετά το πέρας των κύκλων κάθε αντίδρασης PCR ακολούθησε επιμήκυνση για 10 λεπτά στους 72°C. Τα προϊόντα του PCR ανιχνεύθηκαν σε 2% πηκτή αгарόζης με βρωμιούχο αιθίδιο.

2.4. Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών

2.4.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών

Τα κύτταρα υποβάλλονται στις επιθυμητές συνθήκες. Στη συνέχεια εκπλένονται με PBS, τρυψινοποιούνται, συλλέγονται σε σωληνάριο τύπου falcon, στο οποίο προστίθεται θρεπτικό μέσο για την εξουδετέρωση της τρυψίνης και φυγοκεντρούνται στις 1000rpm για 5min. Στη συνέχεια, το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε παγωμένο PBS και φυγοκεντρείται στα 270g για 5min, στους 4°C, η προαναφερόμενη διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές. Η εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών από τα κύτταρα πραγματοποιείται με παγωμένο διάλυμα RIPA (10mM Tris pH 7.5, 158mM NaCl, 2mM EDTA, 0.1%SDS, 1% Triton-X-100, 1% δεοξυχολικό νάτριο), το οποίο περιέχει αναστολείς φωσφατασών (οκαδαϊκό οξύ 1 nM, ορθοβαναδικό νάτριο 1 mM, β-γλυκεροφωσφορικό νάτριο 20 mM, φθοριούχο νάτριο 2 mM) και πρωτεασών (κοκτέιλ αναστολέων από Sigma). Τα κύτταρα αποκολλούνται από το τρυβλίο με τη χρήση scraper, συλλέγονται με σύριγγα ινσουλίνης 26-27G, μεταφέρονται σε eppendorf και ομογενοποιούνται είτε με υπερήχηση είτε με τη χρήση της σύριγγας.

Ακολουθεί υπό ανάδευση επώαση των δειγμάτων για 30min, στους 4°C, φυγοκέντρωση των δειγμάτων στα 13000rpm για 20min, στους 4°C και μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούρια erppendorf. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται στον πάγο.

2.4.2. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών

Η ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών είναι μια μέθοδος κατά την οποία, πρωτεϊνικά αντιγόνα προσδένονται σε αντισώματα δημιουργώντας σύμπλοκα τα οποία ανοσοκατακρημνίζονται προκειμένου να απομονωθεί το αντίγονο από το ανοσοσύμπλοκο και να γίνει ηλεκτροφορητική ανάλυση. Η όλη τεχνική στηρίζεται στην παρουσία πρωτεϊνών G που είναι δεσμευμένες σε σφαιρίδια αγαρόζης τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών τάξης G, και να σχηματίζουν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες. Στην τεχνική αυτή ακολουθείται σε πρώτη φάση η διαδικασία που μόλις περιγράφηκε για την εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα επωάζονται με 1 μg κατάλληλου αντισώματος για 200μg πρωτεΐνης στους 4°C για 16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση. Την επόμενη μέρα 20 μl σφαιριδίων αγαρόζης- πρωτεΐνης G (UBI) (50%) εξισορροπούνται σε PBS και ακολούθως φυγοκεντρούνται στις 13000 g για 1 λεπτό. Η διαδικασία αυτή έκπλυσης επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Στη συνέχεια το σύμπλοκο που έχει δημιουργηθεί, κυτταρικό εκχύλισμα-αντίσωμα, επωάζεται με τα σφαιρίδια της αγαρόζης με συνεχή περιστροφή με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα στους 4°C για 3 τουλάχιστον ώρες. Επομένως, το σύμπλοκο του αντιγόνου με το αντίσωμα κατακρημνίζεται με τη βοήθεια των σφαιριδίων-αγαρόζης. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 13000 g και το ίζημα ξεπλένεται με διάλυμα RIPA. Η διαδικασία έκπλυσης επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Στη συνέχεια το ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα κατεργασίας 2x Laemmli και ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά προκειμένου να εκλουσθούν οι δεσμευμένες στα σφαιρίδια πρωτεΐνες. Το δείγμα φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο φορτώνεται σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).

2.4.3. Υποκυτταρική κλασμάτωση - Απομόνωση πυρήνων

Για την απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνών η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: Τα κύτταρα υποβάλλονται στις επιθυμητές συνθήκες και στη συνέχεια ξεπλένονται με παγωμένο PBS, φυγοκεντρούνται και στο ίζημα προστίθεται το

παγωμένο διάλυμα HLB (10mM Tris pH 7.5, 10mM NaCl, 3mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.1% NP40) στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών, και επωάζονται στους 4°C για 5-10min, έως ότου τα κύτταρα φαίνονται φουσκωμένα (swollen) στο μικροσκόπιο. Ακολουθεί ομογενοποίηση του διαλύματος των κυττάρων σε ομογενοποιητή τύπου Dounce, φυγοκέντρωση των δειγμάτων στα 270g για 5min, στους 4°C. Το υπερκείμενο που προκύπτει αποτελείται από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες.

Το ίζημα που περιέχει το πυρηνικό κλάσμα σε διάλυμα RIPA με αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών αναδιαλύεται και ακολουθεί η διαδικασία για την απομόνωση των πρωτεϊνών όπως έχει περιγραφεί. 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.

2.4.4. Απομόνωση μικροσωμάτων

Για την απομόνωση μικροσωμάτων τουλάχιστον 10⁷ 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 εκπλύθηκε ακόμα δύο φορές με PBS. Το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύθηκε σε 3 ml διάλυμα HB (10 mM HEPES pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.25M σουκρόζης), που περιείχε αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών, και στη συνέχεια, το διάλυμα των κυττάρων ομογενοποιήθηκε σε ομογενοποιητή τύπου Dounce φυλάχθηκε μια μικρή ποσότητα (100 µl) ως ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (total cell lysate) και το υπόλοιπο φυγοκεντρήθηκε, στους 4°C και 1,000g, για 15min. Το υπερκείμενο στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε ειδικά σωληνάρια 1ml και υπερφυγοκεντρήθηκε για 2 ώρες στα 150,000g. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης το ίζημα που προέκυψε και αποτελεί τα μικροσώματα εκπλύθηκε με PBS και στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα ουρίας 2M

2.4.5. Απομόνωση αστροκυττάρων με φυγοκέντρωση πυκνότητας.

Τουλάχιστον 3 με 4 εγκεφαλικά ημισφαίρια εμβρύων όρνιθας χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των Νευρώνων και αστροκυττάρων. Αρχικά ο ιστός εκπλύθηκε με

διάλυμα PBS/γλυκόζης δύο φορές και στη συνέχεια επωάστηκε με τρυψίνη για 3 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια η θρυψίνη απομακρύνθηκε και ο ιστός εκπλύθηκε ξανά για 3 φορές με διάλυμα PBS/γλυκόζης. Το δείγμα ομογενοποιήθηκε με σύριγγα 16G και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για ένα λεπτό στα 150g στο 4°C. Στη συνέχεια το ίζημα αναδιαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα PBS/γλυκόζη και τοποθετήθηκε σε σωλήνα φυγοκέντρωσης. Στον οποίο είχε τοποθετηθεί στον πυθμένα διαβάθμιση Percoll/PBS 30-60%. Οι βαθμιδώσεις φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στα 150g στους 4°C. Το δείγμα των αστροκυττάρων επικάθεται στην κορυφή της βαθμίδωσης, ενώ των νευρώνων στην μεσόφαση μεταξύ 30 και 60% Percoll.

2.4.6. Απομόνωση λιπιδικών σχεδίων

Όλες οι διαδικασίες της μεθόδου για την απομόνωση των lipid rafts κλασμάτων πραγματοποιήθηκαν στους 4°C. Εγκεφαλικός ιστός από τέσσερα τουλάχιστον έμβρυα στην υποδεδειγμένη εμβρυϊκή ηλικία συγκεντρώθηκαν, και ομογενοποιήθηκαν, χρησιμοποιώντας Dounce glass/ glass ομογενοποιητή σε διάλυμα A (20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 250 mM σακχαρόζη) στο οποίο είχαν προστεθεί 1 mM CaCl_2 and 1 mM MgCl_2 . Στη συνέχεια το έκλουσμα φυγοκεντρήθηκε για δύο λεπτά στα 250g. Το ίζημα το οποίο δημιουργήθηκε επαναδιαλύθηκε σε 1 ml διαλύματος A στο οποίο είχαν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών. Τα κύτταρα λύθηκαν με διέλευση, από σύριγγα 21G είκοσι φορές. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στα 1,000g για δέκα λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ξεχωριστό σωλήνα ενώ το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1ml διαλύματος A. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε και το δεύτερο υπερκείμενο προστέθηκε στο πρώτο (2ml συνολικά). Ίσος όγκος διαλύματος A (2ml) στο οποίο είχε διαλυθεί 50% Opti-prep προστέθηκε στο υπερκείμενο (2ml) και τοποθετήθηκε στον πυθμένα σωλήνα φυγοκέντρωσης 12ml. Διαβάθμιση 8 ml από 0% σε 20% Opti-prep σε διάλυμα A τοποθετήθηκαν στη συνέχεια. Οι βαθμιδώσεις φυγοκεντρήθηκαν για ενενήντα λεπτά στα 52,000g (Sorval ultracentrifuge TH-641 rotor). Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης νεφελώματα παρατηρήθηκαν σε όλες τις περιοχές της βαθμίδωσης, ενώ μια διακριτή μπάντα ήταν εμφανής μεταξύ της βαθμίδωσης 20% με 25% Opti-prep. Κλάσματα 670μl συλλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

2.4.7. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

Ο προσδιορισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Dc Kit της εταιρείας Biorad χρησιμοποιώντας για την πρότυπη καμπύλη BSA. Αναλυτικότερα, η πρότυπη καμπύλη δημιουργείται με την προσθήκη σε υδατικό διάλυμα γνωστών συγκεντρώσεων BSA (0, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Παράλληλα 5 μl δείγματος προσθέτονται επίσης σε υδατικό διάλυμα. Αντιδραστήριο A (διάλυμα 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε 1% τρυγικό καλιονάτριο, Bio-Rad Laboratories) αναμειγνύεται με το Αντιδραστήριο S (διάλυμα 2% NaCO_3 σε 0,1M NaOH, Bio-Rad Laboratories) λίγο πριν τον πρωτεϊνικό προσδιορισμό και 25 μl αυτού προσθέτονται σε κάθε δείγμα προς εξέταση και στα δείγματα της πρότυπης καμπύλης. Στη συνέχεια προστίθεται και 200 μl από το αντιδραστήριο B (Folin Ciocalteu, περιέχει άλατα Mo, W και φωσφορικό οξύ, Bio-Rad Laboratories). Τα δείγματα μένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά ώστε να επιτελεστεί η αντίδραση και στη συνέχεια φωτομετρούνται σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (595 nm).

Ο προσδιορισμός γίνεται με την μέθοδο Lowry (1957), η οποία βασίζεται στη δημιουργία ενός έγχρωμου σύμπλοκου που απορροφά. Ιόντα χαλκού αλληλεπιδρούν με τους πολυπεπτιδικούς δεσμούς που έχουν οι πρωτεΐνες σε αλκαλικό περιβάλλον. Στη συνέχεια 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, αντίστοιχα.

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

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με κάθετη ηλεκτροφόρηση, παρουσία του ανιοντικού παράγοντα SDS, ο οποίος αποδιατάσσει και φορτίζει τις πρωτεΐνες αρνητικά, ώστε να διαχωρίζονται μόνο με βάση το μοριακό τους βάρος. Το πήκτωμα σχηματίζεται με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και bis-ακρυλαμίδης μετά την προσθήκη υπερθειικού αμμωνίου (APS) και TEMED. Ο πολυμερισμός γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Ανάλογα με το μοριακό βάρος της προς μελέτη πρωτεΐνης, καθορίζεται το μέγεθος των πόρων της πηκτής,

μεταβάλλοντας την συγκέντρωση ακρυλαμίδης/ bis-ακρυλαμίδης στο τελικό πήκτωμα.

Αναλυτικά, δύο γυάλινες πλάκες στερεώνονται σε κατάλληλη συσκευή στήριξης, μετά τον καθαρισμό τους με μεθανόλη. Ετοιμάζεται το διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού και τοποθετείται ανάμεσα στις πλάκες. Αμέσως μετά προστίθεται στιβάδα ισοβουτανόλης, ώστε να επιτευχθεί ομοιομορφία στην επιφάνεια της πηκτής. Το διάλυμα της πηκτής πολυμερίζεται σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα αφαιρείται η ισοβουτανόλη και πραγματοποιούνται μερικές πλύσεις με απιονισμένο νερό. Ακολουθεί η παρασκευή του διαλύματος της πηκτής επιστίβαξης, η οποία τοποθετείται πάνω από την πηκτή διαχωρισμού. Αμέσως μετά τοποθετείται στην πηκτή επιστίβαξη το ειδικό χτενάκι για το σχηματισμό των θέσεων φόρτωσης των δειγμάτων. Με την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της πηκτής επιστίβαξης, οι δύο γυάλινες πλάκες τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (page buffer: 125mM Tris, glycine 1M, SDS 0,5% w/v). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιούνται περιέχουν τις πρωτεΐνες, οι οποίες αραιώνονται με 5x διάλυμα Laemmli. Ακολουθεί βρασμός των δειγμάτων για 5min και φόρτωση στις διαδρομές που έχουν οριστεί από το χτενάκι. Σε μία από τις διαδρομές φορτώνεται το μίγμα των πρωτεϊνικών δεικτών γνωστού μοριακού βάρους. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με τροφοδοτικό και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 180 Volts.

2.4.9. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot)

Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται διαχωρισμένες στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η σύνδεση των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη επιτυγχάνεται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς, ενώ παράλληλα γίνεται εφικτή η ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υγρής (wet) μεταφοράς σε ειδική συσκευή.

Αναλυτικά, μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή διαχωρισμού, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Schleicher Schuell) και 4 φύλλα χαρτιού Whatman 3MM εξισορροπούνται σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer: 50mM Tris, 380mM Glycine, 0,1% SDS w/v). Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας την ειδική κασέτα της συσκευής, όπου θα γίνει η ηλεκτρομεταφορά, τοποθετήθηκαν με την εξής σειρά:

ειδικό σφουγγαράκι, 2 φύλλα χαρτιού Whatman, η πηκτή διαχωρισμού, η νιτροκυτταρίνη, 2 φύλλα χαρτιού Whatman και το δεύτερο σφουγγαράκι. Η κασέτα τοποθετείται στη ειδική συσκευή και η μεταφορά πραγματοποιείται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς (transfer buffer), με σταθερή ένταση ηλεκτρικού ρεύματος 400mA για 2h

Μετά τη μεταφορά ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με διάλυμα κορεσμού 5% BSA (Sigma) σε TBST (50mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20) για 1h. Με αυτό το τρόπο πραγματοποιείται η κάλυψη (blocking) των ελεύθερων θέσεων δέσμησης της μεμβράνης, ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμηση των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν. Έπειτα, η νιτροκυτταρίνη επωάζεται με διάλυμα BSA σε TBST που περιέχει το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει συγκεκριμένο επίτοπο της πρωτεΐνης-στόχο, για 1h σε θερμοκρασία δωματίου ή 16-18h στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, η νιτροκυτταρίνη πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα TBST και επώαση της μεμβράνης με διάλυμα TBST που περιέχει το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει συντηρημένη περιοχή του πρωτογενούς αντισώματος και παράλληλα φέρει μόριο ιχνηθέτη, καθιστώντας δυνατή την ανίχνευση της προς μελέτη πρωτεΐνης με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) ή με τη μέθοδο της αλκαλικής φωσφατάσης (Alkaline Phosphatase, AP). Ακολουθούν άλλες τρεις πλύσεις των 10min με TBST και στην περίπτωση που χρησιμοποιείται η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, η νιτροκυτταρίνη διαβρέχεται για 1min με το μίγμα των αντιδραστηρίων ECL (Santa-Cruz, Luminol Reagent), τοποθετείται σε ειδική κασέτα και εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ. Μετά την αποτύπωση του φθορισμού, το φιλμ εισάγεται σε ειδικό μηχάνημα εμφάνισης. Εάν χρησιμοποιείται η μέθοδος AP, το τελευταίο ξέπλυμα πραγματοποιείται σε διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης (pH 9.5 Tris 130mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 5mM) για 10 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με προσθήκη των κατάλληλων αντιδρώντων της αλκαλικής φωσφατάσης (0,5 g του υποστρώματος της αλκαλικής φωσφατάσης, 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλο-φωσφορικό (BCIP) σε 10 ml 100% διμεθυλφορμαμίδης, και 0,5 g της χρωστικής κυανό του νιτροτετραζολίου (NBT) σε 10 ml 70% διμεθυλφορμαμίδης) μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες. Η αντίδραση σταματάει με 50 mM EDTA.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εργασίας ανάλογα με την πρωτεΐνη που θέλαμε να ανιχνεύσουμε είναι τα εξής:

- Πολυκλωνικό αντίσωμα κατσίικας (pAbs) έναντι της Calnexin (Santa Cruz)
- Πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι των πρωτεϊνών Annexin 2, Νευροϊνιδίνης, GRP-D-067 και GRP-D -068, καβεολίνης-1 Neuroligin 3 και Flotilin-1 προερχόμενα από τη Santa Cruz (Santa Cruz, CA) της ERK1/2 και της Sos1 από την Upstate Biotechnology. Το αντίσωμα έναντι της TH είναι ευγενική χορηγία του Dr R.L. Perlman (University of Chicago).
- Μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού (mAbs) έναντι των, phosho-ERK1/2, H-Ras, και PKCε ήταν, από την εταιρία Santa Cruz της anti-tubulin III (Tuj1) της Covance και των actin και β-tubulin της Sigma.

2.5. Δοκιμασία Δραστικότητας Ras (RBD pull down assay)

Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζονται τα επίπεδα του ενεργού Ras σε κυτταρικά εκχυλίσματα. Η μέθοδος χρησιμοποιεί το ολιγοπεπτίδιο που αντιστοιχεί στην περιοχή δέσμευσης του Ras από την πρωτεΐνη Raf, (Ras Binding Domain, RBD) για κατακρήμνιση συγγένειας της ενεργής RasGTP. Η μέθοδος χωρίζεται σε τρία στάδια:

Στο πρώτο στάδιο γίνεται η προετοιμασία GST-fusion υποστρωμάτων.

DH5a/GST-RBD βακτήρια επωάζονται υπό ανάδευση στους 37°C σε 3 ml υγρό καλλιέργειας LB παρουσία αμπικιλίνης (100 µg/ml) για 16 ώρες. Την επόμενη ημέρα 2 ml (1%) από την καλλιέργεια μεταφέρονται σε 200ml φρέσκου LB με αμπικιλίνη. Και επωάζονται για 2-3 ώρες μέχρι η απορρόφηση OD600 να κυμαίνεται μεταξύ 0,5-0,8. Αφαιρείται 1ml για έλεγχο (non-induced control) και στην υπόλοιπη καλλιέργεια προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM. Ακολουθεί επώαση για 3-4 ώρες στους 37°C. Στην συνέχεια αφαιρείται 1ml (induced control), και μαζί με το προηγούμενο (non-induced control) φυγοκεντρώνονται και ακολουθεί η διαδικασία για προσδιορισμό της έκφρασης της GST-RBD με Western Blotting και αντίσωμα GST. Τα υπόλοιπα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 3500 rpm για 20 λεπτά στους 4 °C σε aliquots των 25 ml και το ίζημα φυλάσσεται στους -80°C, αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο και το ίζημα παγώσει απότομα με ξηρό πάγο/αιθανόλη.

Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η ένωση των GST υποστρωμάτων με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης.

Το ίζημα των GST-RBD πρωτεϊνών (στάδιο πρώτο) αναδιαλύεται σε 8,6 ml H₂O και προστίθενται 100 μl λυσοζύμης για διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Επώζονται στον πάγο για 10 λεπτά με συχνές αναδεύσεις κατά τη διάρκεια των οποίων προστίθενται 10 μg/ml leupeptin, 1 mM Na₃VO₄ και PMSF. Μετά προστίθενται 1 ml 10x PBS, 1 mM EDTA και 1 mM DTT.

Τα κύτταρα λύνονται μηχανικά με σύριγγα 21-G, το εκχύλισμα αναδεύεται για 1 ώρα στους 4 °C και προστίθεται 1 ml Triton X-100 σε PBS.

Ταυτόχρονα πραγματοποιείται έκπλυση των σφαιριδίων γλουταθειόνης και αναδιάλυσή τους σε PBS. Το υπερκείμενο του διαλυμένου σε Triton X-100 GST υποστρώματος προστίθεται σε 20 μl σφαιριδίων γλουταθειόνης και επώζεται στους 4 °C υπό συνεχή ανάδευση για 16 ώρες. Την επόμενη ημέρα τα προσδεμένα με GST-RBD σφαιρίδια γλουταθειόνης φυγοκεντρούνται, ξεπλένονται με PBS, και τελικά αναδιαλύονται σε PBS που περιέχει 10% γλυκερόλη και 0,1% TritonX-100.

Στο τρίτο στάδιο γίνεται η κατακρήμνιση συγγένειας του ενεργού Ras των κυττάρων που θέλουμε να μελετήσουμε με τα GST-RBD σφαιρίδια γλουταθειόνης.

Τα κύτταρα συλλέγονται από τα τρυβλία με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης MLB (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% NP-40, pH 7,5) και ακολουθεί η συνήθης διαδικασία απομόνωσης του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. 350-500μg επώζονται για 1 ώρα στους 4°C με 20 μl GST-RBD σφαιρίδια γλουταθειόνης. Στα σύμπλοκα που δημιουργούνται γίνονται εκπλύσεις τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης MLB, προστίθεται 2x Laemmli buffer και, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων και η μέθοδος Western για την ανίχνευση της ενεργής Ras.

2.6. In vitro δοκιμασία κινάσης

Με τη μέθοδο αυτή μπορούμε να ανιχνεύσουμε ενεργοποιημένες κινάσες σε πηκτική ακρυλαμίδης SDS-PAGE.

Τα στάδια που ακολουθούμε στη μέθοδο είναι τα εξής

Πηκτές ακρυλαμίδης διαχωρισμού SDS-PAGE φτιάχνονται με προσθήκη βασικής πρωτεΐνης μυελίνης (MBP) που λειτουργεί ως υπόστρωμα σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο

1,2ml MBP (1,25mg/ml)

4,75 ml H₂O

4,9 ml 30% ακρυλαμίδη

3,75ml Tris, pH 8.8

150μl APS

6μl TEMED

Στη συνέχεια, το διάλυμα της πηκτής τοποθετείται ανάμεσα στις πλάκες, πολυμερίζεται και στη συνέχεια παρασκευάζεται το διάλυμα πηκτής στίβαξης, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως. Η πηκτή πολυμερίζεται και φορτώνονται τα επιθυμητά δείγματα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή τάση στα 100mV για το χρόνο διέλευσης των δειγμάτων μέσω της πηκτής επιστίβαξης και στη συνέχεια στα 200mV για το χρόνο διέλευσης των δειγμάτων μέσω της στοιβάδας διαχωρισμού. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή επίσταξης αφαιρείται και η πηκτή διαχωρισμού επωάζεται για 2 ώρες με 200ml διαλύματος **A** (2 εκλύσεις) (40ml 5XHEPES pH 7.5, 40ml 2-προπανόλη, 140μl β-μερκαπτοαιθανόλη, 119,860ml H₂O) για την απομάκρυνση του SDS. Στη συνέχεια, η πηκτή επωάζεται για 1 ώρα με 250ml διαλύματος **B** (50ml 5XHEPES pH 7.5, 87,5 μl β-μερκαπτοαιθανόλης, 1998,125ml H₂O).

Η μετουσίωση των κινασών πραγματοποιείται με 2 εκλύσεις της πηκτής (2 x 100ml) διαλύματος **C** (70μl β-μερκαπτοαιθανόλη, 200ml Guanidine 6M).

Η επαναφορά της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών γίνεται με ακόλουθη επώαση της πηκτής για τουλάχιστον 16 ώρες σε 250ml διαλύματος **D** (100ml 5X HEPES, pH7.5, 200μl TWEEN 20, 172,5 μl β-μερκαπτοαιθανόλης, 400ml H₂O) στους 40°C και επιπλέον άλλες 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (2 εκλύσεις).

Στη συνέχεια, η πηκτή προεπωάζεται με 10ml διαλύματος **E** (κινάσης)(4ml 5xHEPES pH 7.5), 400μl 1M MgCl₂, 400μl 200 mM MnCl₂, 2mg NaVO₃, 15,2 ml H₂O) για 5 λεπτά, και ακολούθως επωάζεται ξανά με 10ml διαλύματος **E** στο οποίο έχει προστεθεί 3,5μl β-μερκαπτοαιθανόλης και 75μCi [³²P]-ATP στους 30°C για 1 ώρα.

Στη συνέχεια, το ραδιενεργό διάλυμα απομακρύνεται κατάλληλα και γίνονται 5 με 6 εκπλύσεις των 30 λεπτών στην πηκτή με 100ml διαλύματος **G** (50g TCA, 4,46g sodium pyrophosphate, 1L H₂O). Στο τελευταίο στάδιο η πηκτή επωάζεται με χρώση Coomassie Blue, αποχρωματίζεται με διάλυμα αποχρωματισμού (50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) Στη συνέχεια, η πηκτή αποξηράνθηκε και στη συνέχεια τοποθετήθηκε με φιλμ σε σκοτεινό θάλαμο για 48 ώρες.

2.7. Προσδιορισμός χοληστερόλης

Ο προσδιορισμός χοληστερόλης πραγματοποιήθηκε με την χρήση εμπορικού προϊόντος Data-Cal total kit (TR13303) από την εταιρία Thermo Scientific σύμφωνα με τις ενδείξεις του κατασκευαστή.

2.8. Μέθοδος χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας TLC

Ο διαχωρισμός ουσιών με τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης και στη διαφορά διαλυτότητας των συστατικών ενός μίγματος στην στατική και την κινητή φάση του συστήματος TLC. Πιο συγκεκριμένα ένα σύστημα TLC αποτελείται από δύο φάσεις, την στατική και την κινητή, μεταξύ των οποίων κατανέμονται οι προς διαχωρισμό ουσίες, καθώς και από τη φάση του δείγματος. Η στατική φάση είναι υλικό σε λεπτότατο διαμερισμό (Silica gel G60), το οποίο υπό τη μορφή εναιωρήματος σε νερό απλώνεται σαν λεπτό στρώμα, με ειδική συσκευή, πάνω σε γυάλινη πλάκα. Αυτή αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα και στη συνέχεια σε πυριαντήριο. Η κινητή φάση συνίσταται σε μίγμα διαλυτών κατάλληλης αναλογίας, ώστε να καταστεί δυνατός ο αποτελεσματικός διαχωρισμός του προς ανάλυση μίγματος. Το δείγμα τοποθετείται με τη βοήθεια πιπέτας κατά μήκος της βάσης της πλάκας. Το σημείο ένθεσης βρίσκεται συνήθως 1-2cm από το άκρο της. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη του δείγματος η πλάκα τίθεται στο θάλαμο ανάπτυξης, ο οποίος προηγουμένως έχει κορεσθεί με τους ατμούς του συστήματος ανάπτυξης (κινητή φάση). Ο κορεσμός επιτυγχάνεται δια διαβροχής με το μίγμα των διαλυτών διηθητικού χαρτιού, μεγέθους αναλόγου του θαλάμου, και ερμητικό κλείσιμο αυτού μέχρι να ετοιμαστεί η πλάκα. Το σημείο ένθεσης του

δείγματος πάνω στην πλάκα βρίσκεται στο κάτω μέρος του θαλάμου, ενώ το μίγμα των διαλυτών κινείται ανοδικά, χάρη σε τριχοειδή φαινόμενα. Στη διάρκεια του χρωματογραφήματος οι διαλύτες συμπαρασύρουν την κάθε ένωση του δείγματος σε διαφορετική απόσταση από το σημείο ένθεσης, η οποία εξαρτάται από την πολικότητα των εν λόγω ενώσεων.

Σε κωνική φιάλη των 250ml ζυγίζονται 60g silica gel G60 και προστίθενται 120ml απεσταγμένο H_2O . Η φιάλη ανακινείται έντονα για 2min. Κατόπιν το εναίωρημα χύνεται στην συσκευή επίστρωσης και στρώνονται 5-6 πλάκες με στρώμα πάχους 0.5mm. Οι πλάκες αφήνονται εκτεθειμένες στον αέρα προκειμένου να στεγνώσουν και εν συνεχεία ενεργοποιούνται με θέρμανση επί μία ώρα στους $130^{\circ}C$ εντός πυραντηρίου. Το προς ανάλυση δείγμα εξατμίζεται μέχρι σταθερού βάρους σε ρεύμα N_2 , αραιώνεται σε αναλογία 1:1 με διάλυμα $CHCl_3:CH_3OH$ (2:1) και κατόπιν τοποθετείται στην πλάκα. Μέρος από το συμπυκνωμένο δείγμα φυλάσσεται για προσδιορισμό φωσφόρου. Μετά το πέρας της ανάπτυξης του χρωματογραφήματος αυτό αφήνεται να στεγνώσει και κατόπιν τίθεται σε θάλαμο I_2 , ώστε να γίνει η εμφάνιση των κηλίδων. Το ιώδιο προστίθεται στο διπλό δεσμό των ακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία βρίσκονται εστερικά ενωμένα με τη γλυκερόλη και έτσι προσδίδει χαρακτηριστικό χρώμα στις κηλίδες.

Στην περίπτωση του χρωματογραφικού διαχωρισμού ουδετέρων-πολικών λιπιδίων χρησιμοποιείται σύστημα ανάπτυξης πετρελαϊκός αιθέρας-διαιθυλαιθέρας-οξικό οξύ (70:30:1), οπότε τα ουδέτερα λιπίδια οδεύουν στην κορυφή της πλάκας, ενώ τα πολικά παραμένουν στο σημείο ένθεσης. Η λωρίδα των πολικών λιπιδίων αποξύνεται, τοποθετείται σε γυάλινο φυγοκεντρικό σωλήνα και υφίσταται διεργασία όμοια με αυτή που αναπτύσσεται αμέσως πιο κάτω για τις περιοχές των επιμέρους τάξεων πολικών λιπιδίων. Κατά τον διαχωρισμό των PL κατά τάξεις χρησιμοποιείται σύστημα χλωροφόρμιο-μεθανόλη-οξικό οξύ-νερό (50:25:8:4), οπότε μετά την εμφάνιση του χρωματογραφήματος σε ατμούς I_2 οι περιοχές που αντιστοιχούν στις ενώσεις LPC, PAF, Sph, PC, PE αποξέονται και συλλέγονται σε γυάλινους φυγοκεντρικούς σωλήνες. Προστίθενται 10ml δια/τος $CHCl_3-CH_3OH-H_2O$ (1:2:0.8) στον καθένα και ακολουθεί ανάδευση στο Vortex. Κατόπιν υφίστανται φυγοκέντρωση για 10min στα 650xg, οπότε καταβυθίζεται η silica. Το υπερκείμενο διάλυμα κάθε φυγοκεντρικού σωλήνα αποχύνεται σε κωνική φιάλη. Προστίθενται εκ νέου 10ml διαλύματος C:M:H και η silica αναδιασπείρεται με έντονη ανάδευση στο Vortex. Ακολουθεί και νέα φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες. Τα νέα υπερκείμενα ενώνονται με τα αντίστοιχα

της προηγούμενης φυγοκέντρωσης. Τα προκύπτοντα διαλύματα καθίστανται διφασικά με προσθήκη 5.2ml CHCl_3 και H_2O . Για καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων αυτά παραμένουν σε ηρεμία για 12h στο ψυγείο. Μετά την πάροδο αυτού του διαστήματος οι χλωροφορμικές στοιβάδες παραλαμβάνονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα N_2 . Στη συνέχεια σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 1ml διαλύματος $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (2:1), αυτός πωματίζεται με αλουμινόχαρτο/parafilm και φυλάσσεται στο ψυγείο προκειμένου να καθαριστεί διεξοδικότερα με HPLC.

2.9. Δοκιμασία ανοσοκυτταροχημείας φθορισμού

Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία 12 ή 48 θέσεων, στα οποία έχουν ήδη τοποθετηθεί αποστειρωμένες καλυπτρίδες. Μετά από την υποβολή των κυττάρων στις επιθυμητές συνθήκες ακολουθεί η μονιμοποίηση τους και η δοκιμασία ανοσοφθορισμού. Για την μονιμοποίηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα, το πρωτόκολλο μονιμοποίησης με PFA και το πρωτόκολλο μονιμοποίησης για την ανίχνευση μικροσωληνίσκων και μικροϊνιδίων.

Στο πρωτόκολλο μονιμοποίησης με PFA, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο των κυττάρων και γίνεται μία έκπλυση με PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα μονιμοποίησης 4% PFA (paraformaldehyde, PFA) σε PBS και παραμένει για 15 min. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των 2 min με PBS, διαπερατοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης με διάλυμα 0.1% Triton-X σε PBS για 2 min και άλλες 3 εκπλύσεις με PBS. Ακολουθεί 30min επώαση των κυττάρων με διάλυμα 3% ορού σε PBS, για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης για το πρωτογενές αντίσωμα (blocking), 1h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου ή 16h επώαση στους 4°C ή στους 10°C με το πρωτογενές αντίσωμα σε διάλυμα 3% ορού σε PBS, 3 εκπλύσεις των 2min με PBS και 1h επώαση των κυττάρων με το δευτερογενές αντίσωμα και επαναλαμβάνονται οι πλύσεις με PBS. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και σφραγίζονται.

Στο πρωτόκολλο μονιμοποίησης για την ανίχνευση μικροσωληνίσκων και μικροϊνιδίων αντικαθίσταται το θρεπτικό μέσο με διάλυμα 1mM DSP (Pierce) σε HBSS για 10min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να γίνει το cross-linking των

πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, το διάλυμα 1mM DSP σε HBSS, αντικαθίσταται από διάλυμα 1mM DSP σε Tsb (0.5% Triton-X σε SB) για 10 min, στους 37°C. Ακολουθούν 2 εκπλύσεις 1min με Tsb. Η μονιμοποίηση γίνεται σε διάλυμα 4% PFA σε SB (1mM EGTA, 4% Polyethylene Glyco 8000, 0.0015% phenol red, 100mM PIPES, pH 6.9) για 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες επωάζονται με διάλυμα blocking, 3% ορού σε PHEM (60mM PIPES, 25mM HEPES, 10mM EGTA, 2mM MgCl₂, pH 6.9), για 30min και ακολουθούν η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα σε διάλυμα 3% ορού σε PHEM, για 16h στους 10°C, 3 εκπλύσεις των 5min σε PHEM, 1h επώαση των κυττάρων σε διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος σε PHEM και επανάληψη των εκπλύσεων με PHEM. Τέλος, πραγματοποιείται μία πλύση 5min με PBS και οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα και σφραγίζονται. Τα κύτταρα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axiovert 200M με φίλτρα FITC, ροδαμίνης και DAPI, χρησιμοποιώντας αντικειμενικούς φακούς 20x ή 40x Plan Zeis Aplanachromat NA 1.4, ενώ για τη λήψη και επεξεργασία φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκε Hamamatsu Orca-ER CCD κάμερα και το λογισμικό SlidebookTM 4.0.

2.10. Πυκνομετρική ανάλυση των ζωνών ηλεκτροφόρησης

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κάθε υπό μελέτη πρωτεΐνης ομαλοποιήθηκαν στα πρωτεϊνικά επίπεδα μιας άλλης πρωτεΐνης που αποτελεί το μάρτυρα και της οποίας τα επίπεδα δεν επηρεάζονται από τις ουσίες που χορηγούμε στα κύτταρα, όπως ακτίνης, τουμπουλίνης, p120GAP και αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης (GAPDH). Τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της Western blot ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το Image J πρόγραμμα ανάλυσης. Το Image J χρησιμοποιεί μια διαδικασία αποκαλούμενη ποσοτικός προσδιορισμός, για να συγκρίνει τη σχετική σκοτεινότητα των διαφορετικών ζωνών στην ανιχνευμένη εικόνα. Η μέθοδος ενσωμάτωσης όγκου χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αξιολογηθεί η σχετική πυκνότητα των ζωνών στις διαφορετικές λωρίδες. Η αριθμητική τιμή κάθε εικονοκυττάρου μέσα σε μια ορισμένη περιοχή προστίθεται μαζί. Το σύνολο αντιπροσωπεύει το ποσό του δείγματος που περιλαμβάνεται μέσα σε ορισμένη περιοχή. Ένα τμήμα από αυτό το σύνολο αποδίδεται στο υλικό του υποβάθρου και

πρέπει να αφαιρεθεί έτσι ώστε το πραγματικό ποσό του δείγματος να αντιπροσωπεύεται στην ανάλυση της σύγκρισης των ζωνών.

2.11. Φασματογραφία Μάζας

Η Φασματογραφία μάζας και η επεξεργασία των δειγμάτων για πρωτεομική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο κέντρο πρωτεομικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

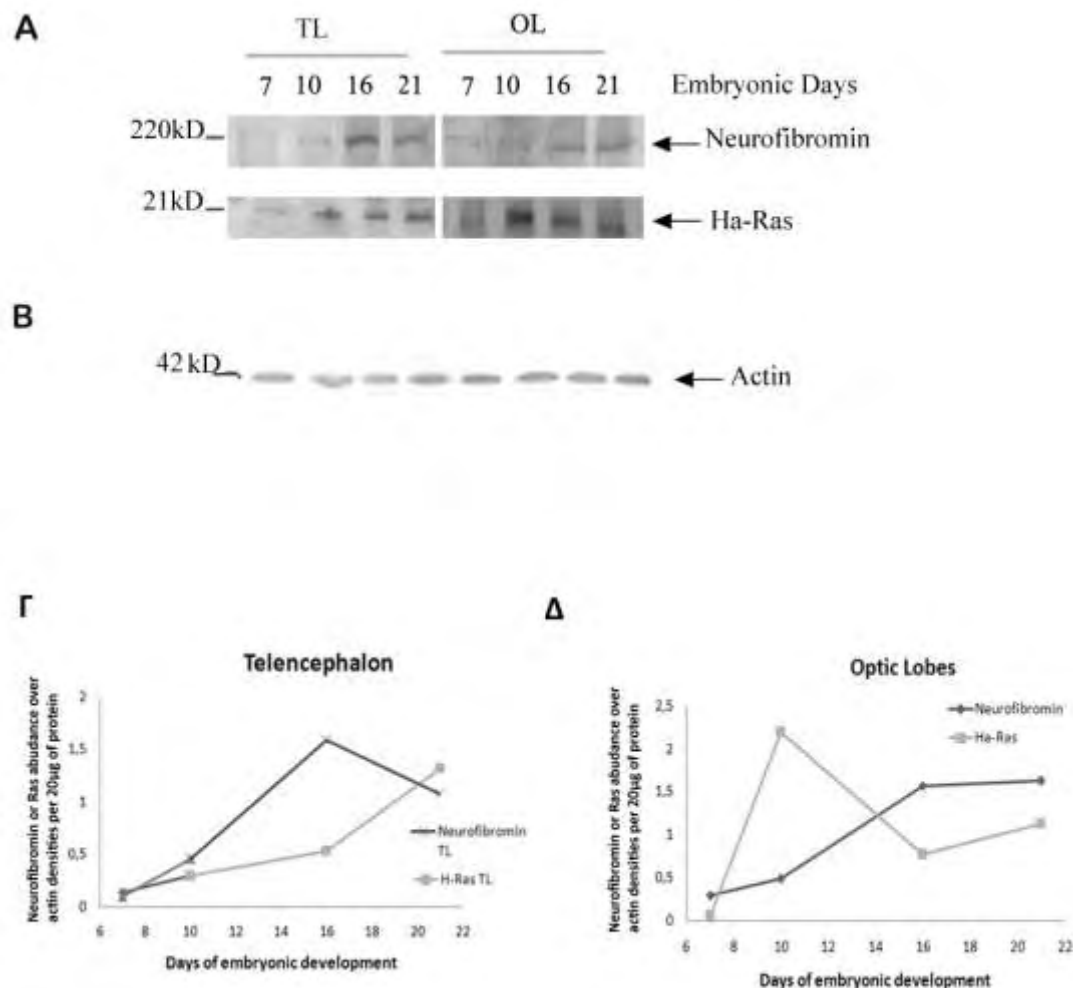
3.1. Ανάλυση της έκφρασης των επίπεδων της πρωτεΐνης Νευροϊνιδίνης και του γονιδίου της NF1 κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης

Στο μεγαλύτερο μέρος της διατριβής αυτής χρησιμοποιήθηκαν εγκεφαλικός ιστός και πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων προερχόμενες από τελεγκέφαλο εμβρύου όρνιθας [170, 171, 172, 180]. Μελέτες από ομάδες ερευνητών έχουν αποδείξει ότι η περίοδος κατά την οποία τα νευρικά κύτταρα σταματούν μόνιμα κύκλους πολλαπλασιασμού και ξεκινούν τη διαφοροποίηση τους, ορίζεται μεταξύ έκτης (E6) και ένατης ημέρας (E9) και συνεπώς οι μεταμιτωτικοί νευρώνες έβδομης ημέρας (E7) σε καλλιέργεια είναι κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της νευρωνικής διαφοροποίησης. Πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει, ότι η καλλιέργεια νευρώνων από τελεγκέφαλο κατ' αυτές τις μέρες εμβρυϊκής ανάπτυξης διατηρεί όλα τα χαρακτηριστικά διαφοροποίησης του *in vivo* προγράμματος και στη καλλιέργεια (*in culture*) όπως η έκφραση των κατάλληλων νευροδιαβιβαστών [114, 175, 176, 44, 160, 177].

3.1.1. Η έκφραση της πρωτεΐνης Νευροϊνιδίνης και της Ha-Ras κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης του κεντρικού νευρικού συστήματος

Η Νευροϊνιδίνη είναι μια RasGAP του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), κύρια λειτουργία της οποίας είναι η ρύθμιση της δραστικότητας της Ras πρωτεΐνης. Η μικρού μοριακού βάρους αυτή GTPase λειτουργεί ως μοριακός διακόπτης αλλάζοντας από την ενεργή GTP (Ras-GTP) στην ανενεργή Ras-GDP μορφή. Η Νευροϊνιδίνη εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο και παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στους νευρώνες και χαμηλότερα στα αστροκύτταρα και στα ολιγοδενδροκύτταρα [44, 36]. Συνεπώς παρακολουθήσαμε την πορεία της έκφρασής τους σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου κατά τη διάρκεια της καλά χαρακτηρισμένης αρχής της νευρωνικής διαφοροποίησης στο κεντρικό νευρικό σύστημα όρνιθας. Εγκεφαλικά ημισφαίρια τελεγκέφαλου (TL) ή οπτικών λοβών (OL) από τουλάχιστον 3 έμβρυα ομογενοποιήθηκαν τις υποδεικνυόμενες στην **Εικόνα 1Α**

εμβρυϊκές ηλικίες ξεκινώντας από την έβδομη εμβρυϊκή ημέρα (E7) μέχρι την εκκόλαψη των νεοσσών κατά την E21.



Εικόνα 1. Η έκφραση της Νευροϊνιδίνης και της H-Ras ρυθμίζονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης στα εγκεφαλικά ημισφαίρια εμβρύων όρνιθας.

(A) Εγκεφαλικά ημισφαίρια από τουλάχιστον 3-5 έμβρυα ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα RIPA κατά τις εμβρυϊκές ημέρες που αναγράφονται. Είκοσι μg κάθε δείγματος αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής 7% και ανοσοαποτύπωση με αντισώματα για την Νευροϊνιδίνη (sc-067) και την H-Ras. (B) Παρόμοια ανάλυση πραγματοποιήθηκε με αντίσωμα έναντι της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα από ανεξάρτητα πειράματα αναλύθηκαν με τη βοήθεια πυκνομετρίας και ομαλοποιήθηκαν με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης. Τόσο η έκφραση της Νευροϊνιδίνης όσο και της H-Ras αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του τελεγκέφαλου (Γ) και των οπτικών λοβών (Δ).

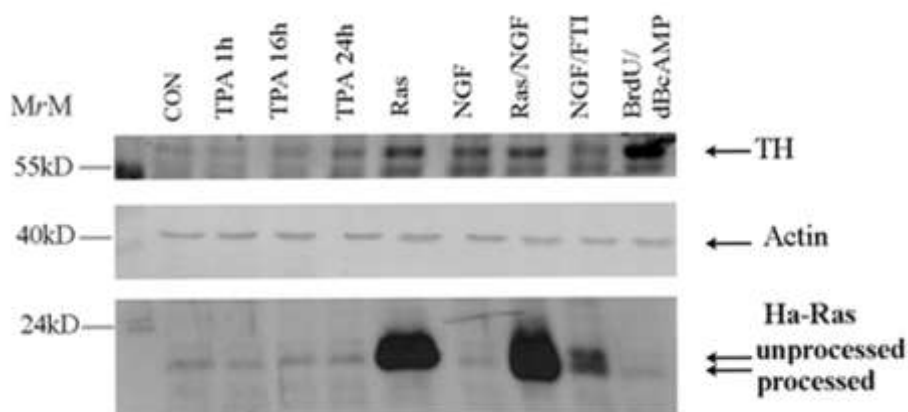
Διαπιστώσαμε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης αυξήθηκε παράλληλα με την εμβρυική ηλικία και στις δυο εξεταζόμενες περιοχές. Ειδικότερα, η έκφραση της Νευροϊνιδίνης ήταν αμυδρή κατά την έβδομη εμβρυική ημέρα E7 ενώ την E10 είχε αυξηθεί κατά 1,6 φορές στην περιοχή του τελεγκέφαλου και 2,3 φορές στην περιοχή των οπτικών λοβών, όπως φαίνεται στα γραφήματα (**Εικόνα 1Γ και Δ**). Στη συνέχεια η έκφρασή της παρουσίασε δραματική αύξηση μέχρι την δέκατη έκτη εμβρυϊκή ημέρα, σχεδόν κατά 6,6 φορές στην περιοχή των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Παρόμοιες αναλύσεις για την Ras έδειξαν μια διαφορετική εικόνα μεταξύ των δύο περιοχών του εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, στα εγκεφαλικά ημισφαίρια η έκφραση της Ha-Ras αυξήθηκε σταθερά από την E7, φτάνοντας την εικοστή πρώτη ημέρα σε τετραπλάσια επίπεδα. Στους οπτικούς λοβούς παρουσιάζει αρχικά μια θεαματική αύξηση μεταξύ της E7 και E10 αλλά τα επίπεδα έκφρασής της μειώνονται σταδιακά μέχρι την E16, οπότε και σταθεροποιούνται. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον πολλαπλασιασμό των άλλων κυττάρων, του ΚΝΣ, δηλαδή αστροκυττάρων και ολιγοδεδροκυττάρων, τα οποία αρχίζουν να αναπτύσσονται στα συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια.

Συμπερασματικά λοιπόν, η πρωτεϊνική έκφραση της RasGAP Νευροϊνιδίνης και της H-Ras ρυθμίζεται εξελικτικά κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, αλλά παρουσιάζονται διαφορές ως προς τα επίπεδα έκφρασής τους κατά την διάρκεια της ανάπτυξης.

3.1.2. Η έκφραση του ενζύμου Υδροξυλάση της Τυροσίνης που ρυθμίζει το βιοχημικό φαινότυπο των νευρώνων, αυξάνεται κατά τη διαδικασία διαφοροποίησης κυττάρων IMR-32 νευροβλαστώματος

Έχειδειχθεί ότι κατά τη διάρκεια της νευρωνικής διαφοροποίησης τόσο η απόκτηση βιοχημικού φαινότυπου, ανάλογα με τον τύπο νευροδιαβιβαστή που παράγουν οι νευρώνες, όσο και η περαιτέρω διατήρησή του ρυθμίζεται από σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας [187] έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Ras διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του ενζύμου υδροξυλάση της τυροσίνης (TH), βασικού ενζύμου (rate-limiting enzyme) που ευθύνεται για την κατάλυση της μετατροπής του αμινοξέος L-τυροσίνη προς L-3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη (L-DOPA). Η L-DOPA είναι πρόδρομος για ντοπαμίνη, η

οποία, με τη σειρά της, αποτελεί πρόδρομο των νευροδιαβιβαστών νορεπινεφρίνης (νοραδρεναλίνη) και επινεφρίνη (αδρεναλίνη).



Εικόνα 2. Η πρωτεΐνη Ras ρυθμίζει της έκφρασης της TH κατά τη διαφοροποίηση IMR-32 κυττάρων νευροβλαστώματος.

Κύτταρα νευροβλαστώματος IMR-32 ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα RIPA μετά από παροδική διαμόλυνση με άγριου τύπου H-Ras και επώαση σε συνδυασμό ή μη με τους ενεργοποιητές και αναστολείς που αναγράφονται. Είκοσι μg κάθε δείγματος αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι της TH της ακτίνης και της H-Ras. Η αύξηση της έκφρασης της TH ρυθμίζεται μέσω του H-Ras.

Συγκεκριμένα, κύτταρα νευροβλαστώματος IMR-32, επώαστηκαν με εστέρα φορβόλης TPA για μία, δεκαέξι και εικοσιτέσσερις ώρες. Επίσης, τα κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με άγριου τύπου Ha-Ras. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western μετά από επώαση με αντισώματα έναντι της TH, ακτίνης και Ras (**Εικόνα 2**) έδειξε ότι η έκφραση της TH αυξάνει σταδιακά και κορυφώνεται στις εικοσιτέσσερις ώρες. Παράλληλα, η έκφραση του ενζύμου αυτού σχεδόν τετραπλασιάζεται μετά από παροδική διαμόλυνση με Ha-Ras. Η επώαση των κυττάρων αυτών για 72 ώρες με τον νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF) προκάλεσε την αύξηση των επιπέδων έκφρασης της TH χωρίς όμως αυτό να μεταβάλλετε όταν τα ίδια κύτταρα επιμολυνθούν για το ίδιο χρονικό διάστημα με άγριου τύπου H-Ras. Η αύξηση της έκφρασης της TH μέσω της επίδρασης του NGF μειώθηκε μετά την επώαση των κυττάρων με FTI, ουσία που αναστέλλει τη φαρνεζυλίωση του Ras, δηλαδή το πρώτο βήμα που απαιτείται για την μεταφορά του Ras στην μεμβράνη και την ενεργοποίησή του. Ανάλυση της

ανοσοαποτύπωσης κατά Western έναντι της Ras πρωτεΐνης έδειξε ότι ο FTI στην συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για τα συγκεκριμένα πειράματα ήταν δυνατό να αναστείλει ένα μέρος τόσο των ενδογενών μορίων Ras όσο και αυτών που προήλθαν από την υπερέκφραση του, μειώνοντας έτσι δραστικά τα ενεργά μόρια του Ras. Η μέγιστη αύξηση της έκφρασης της TH προήλθε μετά την επίδραση του παράγοντα διαφοροποίησης BrdU/dbcAMP.

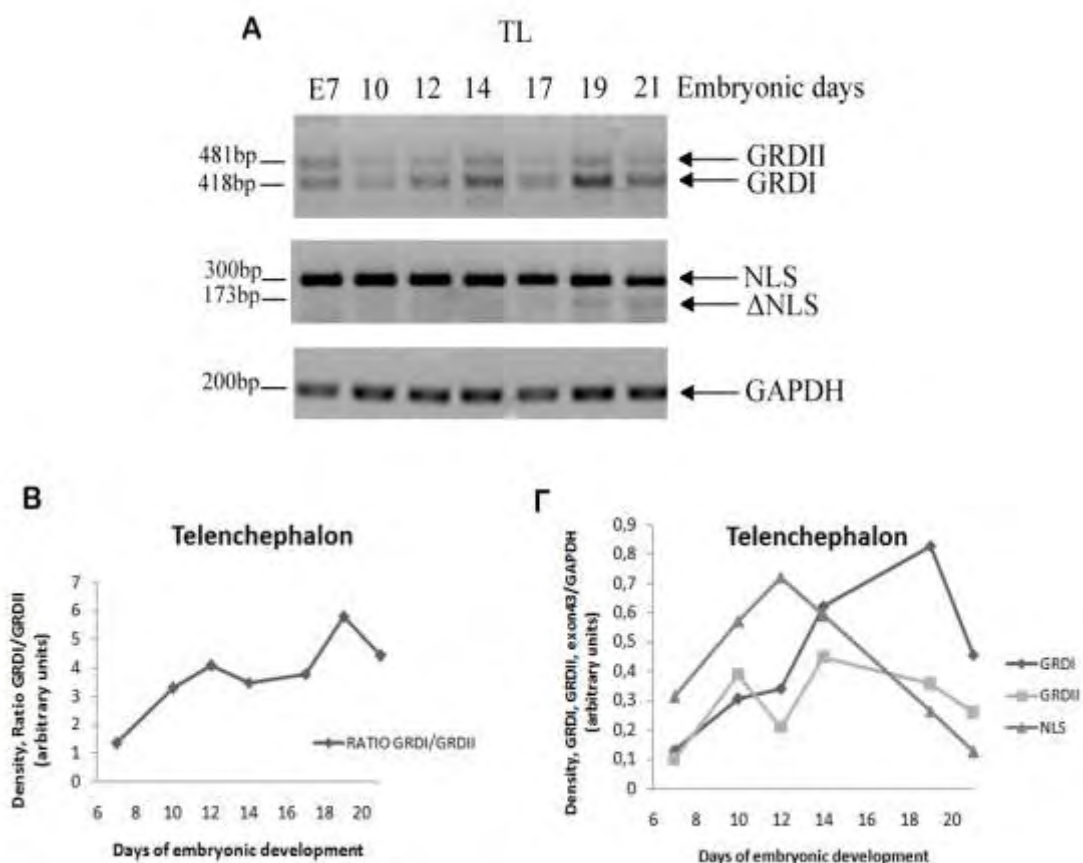
Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η πρωτεΐνη Ras, η οποία ρυθμίζεται κατά τα αναπτυξιακά στάδια από την Νευροϊνιδίνη, μπορεί να επηρεάσει την έκφραση του ενζύμου TH και κατ'επέκταση των βιοχημικό φαινότυπο ενός νευρώνα.

3.1.3. Η έκφραση των μεταγράφων NF1-GRD τύπου I και II καθώς και του NF1-NLS κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης

Για να εξετάσουμε βαθύτερα το μηχανισμό της έκφρασης της Νευροϊνιδίνης και της Ha-Ras κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, προχωρήσαμε στην ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων GRDI και GRDII της Νευροϊνιδίνης, τα οποία δύνανται να εμπεριέχουν το εξώνιο 43 που φέρει το NLS. Το τμήμα GRD, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι υπεύθυνο για την δραστικότητα της πρωτεΐνης, ως RasGAP. Αυτή η περιοχή GRD ρυθμίζει την δραστικότητα της Ras πρωτεΐνης *in vivo* και *in vitro* και μπορεί να εμφανιστεί σε δύο μορφές, την μορφή I και την μορφή II, που περιέχει ένα ακόμα εξώνιο το 23α μεγέθους 63bp. Οι δύο αυτές μορφές παρουσιάζουν διαφορετικές Ras-Gap δραστικότητες, δηλαδή το GRDII παρουσιάζει μειωμένη δραστικότητα έναντι του GRDI [40]. Επίσης, μετά από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας, και γνωρίζοντας ότι η Νευροϊνιδίνη μπορεί να μεταφερθεί στο πυρήνα με τη βοήθεια του μοτίβου της αλληλουχίας της NLS, μετάγραφο που εμφανίζεται μόνο σε κύτταρα ιστών που εμπλέκονται στην ασθένεια όπως νευρώνες, θελήσαμε για πρώτη φορά να

εξετάσουμε αν τα επίπεδα έκφρασης του μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης.

Ολικό RNA από εγκεφαλικά ημισφαίρια εμβρύων σε αντίστοιχες εμβρυικές ημέρες αναλύθηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας ειδικά σχεδιασμένους ανιχνευτές τόσο για το τμήμα GRD όσο και αυτό του εξωνίου 43, το οποίο εμπεριέχει το μοτίβο NLS για το γονίδιο της όρνιθας (**Εικόνα 3A**). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση των μεταγράφων GRDI, GRDII και NLS παρουσιάζουν αυξομειώσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (**Εικόνα 3B, Γ**). Συγκεκριμένα, στα πρώιμα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης (E7) παρουσιάζουν ίδια περίπου επίπεδα έκφρασης, αφού ο λόγος των GRDI:GRDII είναι σχεδόν 1:1. Αντίθετα, στα επόμενα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης τα επίπεδα έκφρασης του μετάγραφου GRDI αυξάνονται σημαντικά, με κορύφωση την δεκάτη ένατη εμβρυική ημέρα όπου ο λόγος γίνεται 5,7:1 δηλαδή σταδιακά το μετάγραφο GRDI υπερισχύει έναντι του GRDII. Επίσης είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι καθ' όλη την διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, από E7 μέχρι την εκκόλαψη των νεοσσών, το μετάγραφο GRDI αυξάνεται κατά 3,2 φορές, και το μετάγραφο GRDII κατά 2,4.



Εικόνα 3. Η έκφραση του μεταγράφου της NF1-GRD τύπου I και II αναστρέφεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, ενώ η έκφραση του μεταγράφου NLS μειώνεται με την νευρωνική διαφοροποίηση.

RNA από εγκεφαλικά ημισφαίρια εμβρύων όρνιθας απομονώθηκε σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, και παράχθηκε cDNA χρησιμοποιώντας 1μg ολικό RNA και το οποίο στη συνέχεια με τη χρήση και αντίδραση PCR επέτρεψε να ανιχνευτούν τα επίπεδα των μεταγράφων GRDI, GRDII και NLS της Νευροϊνιδίνης. Τα μεγέθη των μεταγράφων αναγράφονται σε bp. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανάλυση της RT-PCR έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων GRDI και GRDII και NLS μεταβάλλονται στον τελεγκέφαλο των εμβρύων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. (B) Πυκνομετρική ανάλυση του λόγου των μεταγράφων GRDI και GRDII. (Γ) Πυκνομετρική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης και των τριών μεταγραφών που ομαλοποιήθηκαν με την αντίστοιχη μέτρηση των επιπέδων του GAPDH.

Για να μελετήσουμε την έκφρασή του μεταγράφου NF1+ex43 (NLS) κατά την εμβρυική ανάπτυξη, σχεδιάσαμε ειδικούς ανιχνευτές, κατάλληλους για να εντοπίζουν την παρουσία ή απουσία του εξωνίου 43. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου NLS επίσης

παρουσιάζουν διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, η έκφραση του NLS που είναι το κυρίαρχο κατά την E7 αυξάνει σταδιακά και κορυφώνεται κατά την δωδέκατη εμβρυακή ημέρα, ενώ στη συνέχεια παρουσιάζει μια σταδιακή πτώση επιστρέφοντας στα επίπεδα της E7. Η πτώση στα επίπεδα του μεταγράφου αυτού συμπίπτει με την εμφάνιση των Δex43 (ΔNLS) μεταγράφων, τα οποία εμφανίζονται αμυδρά στην αρχή (E12) και εντονότερα αργότερα (E19, E21). Συμπίπτει δηλαδή χρονικά με την περαιτέρω νευρωνική διαφοροποίηση αλλά και την εμφάνιση των αστροκυττάρων στα εγκεφαλικά ημισφαίρια των εμβρύων.

Συγκρίνοντας τα επίπεδα πρωτεΐνης και mRNA προκύπτει ότι η έκφραση των επιπέδων πρωτεΐνης ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης του mRNA και τονίζει την σημασία της ρύθμισης της Νευροϊνιδίνης στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του εγκεφάλου.

3.2. Υποκυτταρικός εντοπισμός της Νευροϊνιδίνης

3.2.1. Η Νευροϊνιδίνη ανιχνεύεται σε πολλαπλά οργάνδια και εξειδικευμένες περιοχές των κυττάρων

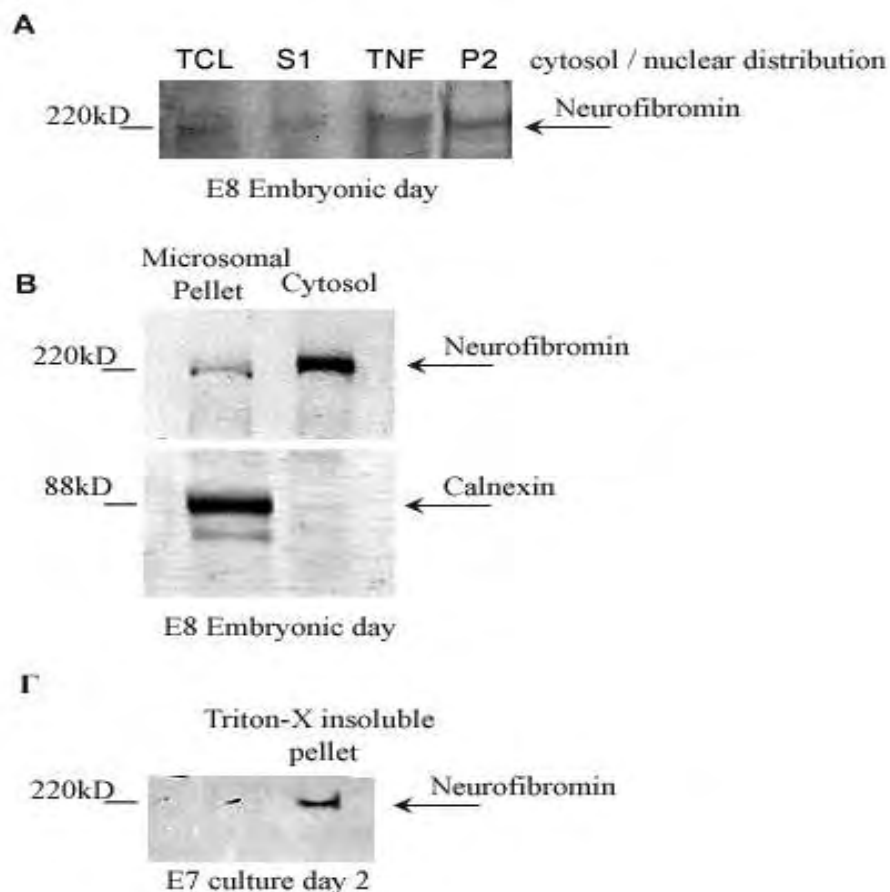
Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή η Νευροϊνιδίνη είναι μία αρκετά μεγάλη, κινητή πρωτεΐνη και εξαιτίας των μοτίβων που περιέχει στην πρωτεϊνική της αλληλουχία είναι δυνατό να δένεται στις πλασματικές μεμβράνες, να εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τον κυτταροσκελετό αλλά και τον πυρήνα [44, 66, 55]. Για να διαπιστωθεί ακριβέστερα, με βιοχημικό προσδιορισμό, ο υποκυτταρικός εντοπισμός της σε νευρώνες, χρησιμοποιήσαμε μια σειρά μεθόδων υποκυτταρικής κλασμάτωσης πρωτεϊνών.

Εγκεφαλικοί φλοιοί 4-6 εμβρύων όρνιθας όγδοης εμβρυϊκής ημέρας (E8) χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πυρηνικών κλασμάτων. Τα τελικά κυτταρικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ήταν τα εξής: ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (Total Cell Lysate, TCL), κυτταροπλασματικό εκχύλισμα (Supernatant 1, S1), ολικό πυρηνικό κλάσμα (Total Nuclear Fraction, TNF), και αδιάλυτο σε NaCl πυρηνικό ίζημα (Pellet 2, P2). Στη συνέχεια ακολουθήθηκε ανοσοδοκιμασία κατά Western με κατάλληλο αντίσωμα έναντι της Νευροϊνιδίνης (**Εικόνα 4Α**). Η πρωτεΐνη ανιχνεύτηκε στο

κυτταρόπλασμα (S1) και κυρίως στο ολικό πυρηνικό κλάσμα (TNF). Επίσης ανιχνεύτηκε στο πυρηνικό ίζημα P2, το οποίο σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου που ακολουθήθηκε αντιστοιχεί στην πυρηνική θεμέλια ουσία (nuclear matrix), η οποία αποτελείται κυρίως από τα ενδιάμεσα ινίδια λαμίνες.

Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε ανάλυση του κυτταροπλάσματος ώστε να διαπιστώσουμε εάν η Νευροϊνιδίνη είναι διαλυτή στο κυτταρόπλασμα ή εάν σχετίζεται με κυτταρικά οργανίδια. Ο ιστός, αφού ομογενοποιήθηκε σε διάλυμα σουκρόζης, φυγοκεντρήθηκε αρχικά για την απομάκρυνση των πυρήνων, και στη συνέχεια το εμπλουτισμένο σε λιπίδια υπερκείμενο κλάσμα υπέρ-φυγοκεντρήθηκε για 2 ώρες. Το ίζημα που δημιουργήθηκε αποτελείται κυρίως από μικροσώματα (microsomal pellet) που αντιστοιχούν σε κυστίδια του ενδοπλασματικού δικτύου. Επομένως, με ανοσοδοκιμασία κατά Western ανιχνεύσαμε την Νευροϊνιδίνη κυρίως στο κυτταροπλασματικό κλάσμα, αλλά και στο ίζημα μικροσωμάτων (**Εικόνα 4B**). Για να επιβεβαιώσουμε ότι επιτεύχθηκε ο σωστός διαχωρισμός κατά την υποκυτταρική κλασμάτωση, χρησιμοποιήσαμε επιπροσθέτως αντίσωμα έναντι της Καλνεξίνης, πρωτεΐνης που εκφράζεται αποκλειστικά στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Ακολούθως, προχωρήσαμε στην διερεύνηση της έκφρασης της Νευροϊνιδίνης στη μεμβράνη όπως έχουν υποδείξει προηγούμενες μελέτες [47], ειδικότερα σε μικροπεριοχές μεμβρανών εμπλουτισμένες σε φωσφολιπίδια και χοληστερόλη αδιάλυτες σε απορρυπαντικά, οι οποίες είναι γνωστές και σαν λιπιδικές σχεδίες [143]. Άρα, νευρώνες από εγκεφαλικά ημισφαίρια εβδόμης εμβρυϊκής ημέρας σε καλλιέργεια για δύο ημέρες (E7C2) ομογενοποιήθηκαν και στη συνέχεια ακολουθώντας μια σειρά φυγοκεντρήσεων, δημιουργήθηκε ίζημα αδιάλυτων σε απορρυπαντικό μεμβρανών στο οποίο μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε Νευροϊνιδίνη (**Εικόνα 4Γ**).



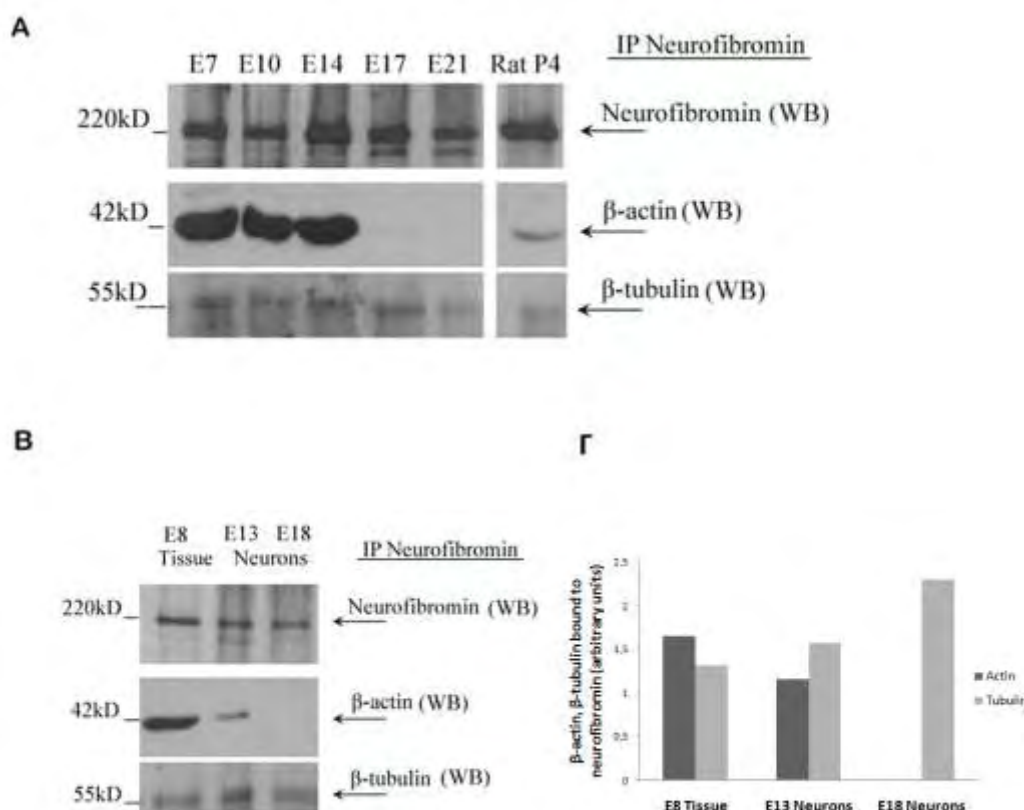
Εικόνα 4. Παρουσία της Νευροϊνιδίνης σε υποκυτταρικά κλάσματα.

Ανίχνευση επιπέδων Νευροϊνιδίνης σε ανοσοαποτύπωση κατά Western μετά από δοκιμασία υποκυτταρικής κλασμάτωσης σε ιστό εγκεφαλικών ημισφαιρίων όγδοης εμβρυϊκής ημέρας. **(Α)** Είκοσι μg πρωτεΐνης από κάθε κλάσμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής 7%. Στην ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα ειδικά προς την Νευροϊνιδίνη (sc-067). Η Νευροϊνιδίνη ανιχνεύεται στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (TCL) και το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα CS1, αλλά και σε ειδικά κλάσματα, δηλαδή το ολικό πυρηνικό κλάσμα, TNF, και το αδιάλυτο σε NaCl ίζημα P2. **(Β)** Είκοσι μg πρωτεΐνης από τα δύο κλάσματα αναλύθηκαν κατά Western χρησιμοποιώντας κατάλληλα αντισώματα για Νευροϊνιδίνη (220kDa) και Καλνεξίνη (88kDa). Τα κλάσματα αυτά που προήλθαν από υπερφυγοκέντρωση στα 150.000x g, που αντιστοιχούν σε κλάσμα μικροσωμάτων και κλάσμα κυτταροπλάσματος. **(Γ)** Τριάντα μg πρωτεΐνης από εγκεφαλικά ημισφαίρια εμβρύων δύο ημερών αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής 7% SDS-PAGE. Στην ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα ειδικά προς την Νευροϊνιδίνη (sc-067), η οποία ανιχνεύτηκε σε κλάσμα μεμβρανών αδιάλυτων σε TritonX-100.

3.2.2. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της Νευροϊνιδίνης με ακτίνη και τουμπουλίνη σε πρωτογενείς καλλιέργειες και εμβρυϊκό ιστό.

Η Νευροϊνιδίνη όπως έχει αναφερθεί συνεντοπίζεται με τον κυτταροσκελετό σε ανάλυση συνεστιακής μικροσκοπίας και ανοσοϊστοχημεία. Μάλιστα, συνεντοπίζεται με την ακτίνη και τους μικροσωληνίσκους αλλά όχι με τα ενδιάμεσα ινίδια [44]. Η ακτίνη και η τουμπουλίνη των μικροσωληνίσκων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη νευρωνική διαφοροποίηση, αφού αποτελούν τα βασικά δομικά συστατικά, στην δυναμική ρύθμιση των οποίων οφείλεται η ανάπτυξη των νευριτών. Για το λόγο αυτό θέλαμε να εξετάσουμε πιθανή ρύθμιση της σύνδεσης της Νευροϊνιδίνης με τις πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης εμβρύων όρνιθας. Επομένως, ιστός από εγκεφαλικά ημισφαίρια από τουλάχιστον 3-5 έμβρυα συγκεντρώθηκαν τις αναγραφόμενες εμβρυϊκές ηλικίες και υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης με αντισώματα έναντι της Νευροϊνιδίνης και μετά σε δοκιμασία ανοσοσύτωσης κατά Western με αντισώματα έναντι της ίδιας της Νευροϊνιδίνης, της β-ακτίνης και της β-τουμπουλίνης (**Εικόνα 5Α**).

Αποδείχθηκε ότι η Νευροϊνιδίνη προσδένεται στην ακτίνη κατά τα πρώτα στάδια της νευρωνικής διαφοροποίησης και συγκεκριμένα κατά τις εμβρυϊκές ημέρες E7, 10 και E14, ενώ στα όψιμα στάδια η πρόσδεση αυτή χάνεται σχεδόν πλήρως. Αντίθετα, η πρόσδεση της Νευροϊνιδίνης στην τουμπουλίνη είναι σταθερή σε κάθε στάδιο της ανάπτυξης που μελετήθηκε και μάλιστα μετά την εμβρυϊκή ημέρα E17. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε και ιστός από εγκεφαλικά ημισφαίρια νεογνού αρουραίου τεσσάρων ημερών (P4) ως μάρτυρας ειδικότητας του ευρήματος σε θηλαστικά, ο οποίος παρουσίασε αντίστοιχη εικόνα με εκείνη των δειγμάτων εμβρύων όρνιθας.



Εικόνα 5. Η πρόσδεση της Νευροϊνιδίνης στις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες ακτίνη και τουμπουλίνη εξαρτάται από το στάδιο της εμβρυϊκής ανάπτυξης και διαφοροποίησης καθώς και από τον τύπο μετάγραφου GRDI ή GRDII της πρωτεΐνης.

(Α) Εγκεφαλικός ιστός 4 εμβρύων ομογενοποιήθηκε σε διάλυμα RIPA και 600μg ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αναλύθηκαν με ανοσοκατακρήμνιση από τα ειδικά για τη Νευροϊνιδίνη αντισώματα sc-067 και sc-068 που αναγνωρίζουν αντίστοιχα τα C και N-τελικά άκρα της πρωτεΐνης. Ένα τρίτο του δείγματος αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση για την ανίχνευση της Νευροϊνιδίνης (220kDa) σε πηκτή 8%, το άλλο σε 12% για την ανίχνευση της β-ακτίνης (42kDa) και το τρίτο σε 10% για την ανίχνευση β-τουμπουλίνης (55kDa). Αντίστοιχες ποσότητες πρωτεΐνης ανοσοϊζήματος χρησιμοποιήθηκαν για παρόμοια ανάλυση από τον ιστό νεογνού αρουραίου τεσσάρων ημερών. (Β) Νευρώνες από εγκεφαλικά ημισφαίρια 8^{ης}, 13^{ης}, και 18^{ης} εμβρυϊκής ημέρας απομονώθηκαν με τη χρήση φυγοκέντρησης μέσα σε Percoll με διαβαθμισμένη πυκνότητα, όπως αναφέρεται στις Μεθόδους. Ίση ποσότητα από κάθε δείγμα ανοσοκατακρημνίστηκε με τα sc-067 και sc-068 αντισώματα για Νευροϊνιδίνη, και στη συνέχεια αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western για να ανιχνευθεί πιθανή αλληλεπίδραση της Νευροϊνιδίνης με την β-ακτίνη και β-τουμπουλίνη. (Γ) Πυκνομετρική ανάλυση της σύζευξης ακτίνης τουμπουλίνης στην Νευροϊνιδίνη αναδεικνύει ότι η σύζευξη είναι ρυθμιζόμενη κατά την ανάπτυξη.

Στη συνέχεια, για να εξετάσουμε αν η πρόσδεση αυτή της Νευροϊνιδίνης σε ακτίνη και τουμπουλίνη που διαπιστώσαμε στους ιστούς συμβαίνει ειδικά στους νευρώνες, αναλύσαμε με ανοσοκατακρήμνιση νευρώνες, οι οποίοι απομονώθηκαν άμεσα από ιστό με φυγοκέντρηση σε κλάσματα διαβάθμισης πυκνότητας Percoll. Όπως φαίνεται και στο γράφημα της **Εικόνας 5B**, η δέσμευση της ακτίνης είναι μεγαλύτερη την όγδοη εμβρυϊκή ημέρα σε σχέση με την ημέρα E13, όταν η δέσμευση της ακτίνης μειώνεται δραστικά και τελικά αποδεσμεύεται πλήρως κατά την E18. Αντίθετα, η πρόσδεση της Νευροϊνιδίνης σε μόρια τουμπουλίνης παρουσιάζεται αντίστροφη από εκείνη της ακτίνης και οδεύει σταδιακά αυξανόμενη.

Συμπερασματικά, η δέσμευση της Νευροϊνιδίνης σε μόρια ακτίνης και μικροσωληνίσκους ρυθμίζεται από το βαθμό διαφοροποίησης των νευρώνων και από την ισομορφία της. Σε νεαρούς νευρώνες η Νευροϊνιδίνη δεσμεύεται στην ακτίνη, ενώ κατά τη διάρκεια της συναπτογένεσης μεταπηδά στους μικροσωληνίσκους.

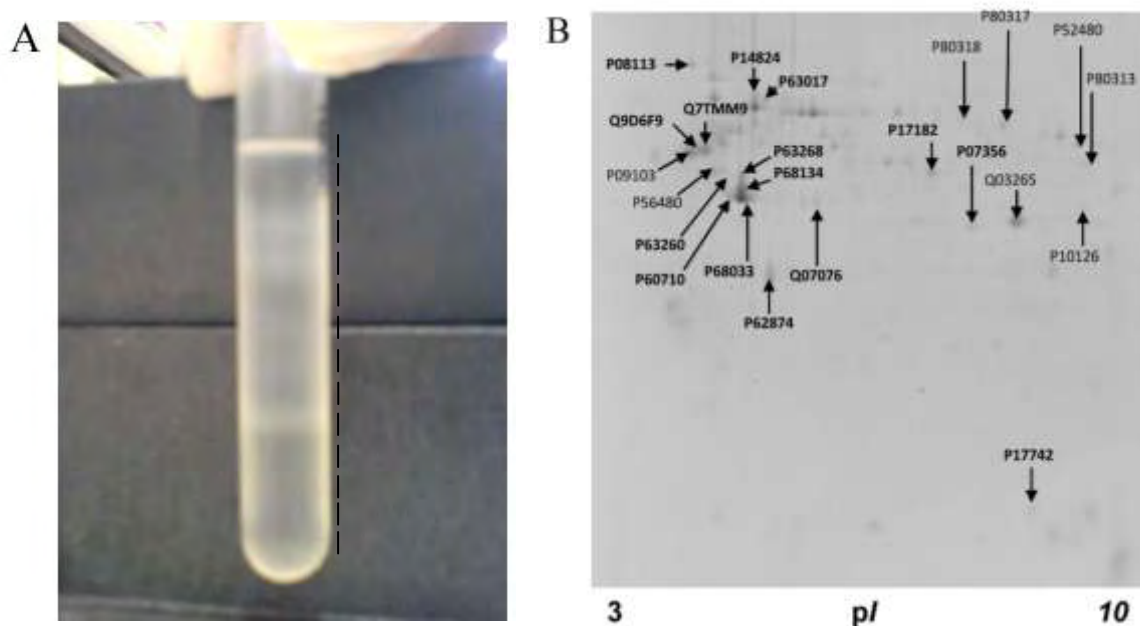
3.3. Λιπιδικές σχεδίες

3.3.1. Βιοχημικός χαρακτηρισμός λιπιδικών σχεδίων από εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού (ESCs)

Γνωρίζοντας ήδη ότι η Νευροϊνιδίνη ανιχνεύεται σε κλάσματα μεμβρανών αδιάλυτα σε Triton-X100 όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στην ενότητα 3.2.1, θέλαμε να εξετάσουμε αν η παρουσία της πρωτεΐνης στις λιπιδικές σχεδίες είναι καταλυτική για την λειτουργία της.

Οι λιπιδικές σχεδίες αποτελούν μικροπεριοχές της πλασματικής μεμβράνης στις οποίες εδρεύει ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος από τον εξωκυττάριο χώρο στο εσωτερικό του κυττάρου. Μετά από πιλοτικά πειράματα ακολουθήσαμε μέθοδο [152], στην οποία δεν γίνεται χρήση απορρυπαντικών και για αυτό διατηρείται όσο το δυνατόν ακέραιη η σύσταση των μεμβρανών. Επιλέξαμε να αρχίσουμε τις μελέτες μας με εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs) τα οποία αποτελούν έναν εξαιρετικά ομοιογενή πληθυσμό. Τα ευρήματά μας από τις μελέτες αυτές είναι ιδιαίτερα πλούσια. Τα εκχυλίσματα που λάβαμε μετά την ομογενοποίηση των κυττάρων και στη συνέχεια

υπερφυγοκεντρήσαμε σε κλασμάτωση διαβάθμισης, όπως αναφέρεται αναλυτικά στις μεθόδους, χωρίστηκαν σε 14 διακριτά ίσα κλάσματα (**Εικόνα 6Α**).



Εικόνα 6. A. Αντιπροσωπευτική εικόνα απομόνωσης λιπιδικών σχεδίων
B. 2D Gel με ανάλυση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών λιπιδικών σχεδίων

Προχωρήσαμε πρώτα με πρωτεομική ανάλυση των λιπιδικών σχεδίων αυτών μετά από ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και φασματογραφία μάζας. Η ανάλυση αυτή ανέδειξε αρκετές πρωτεΐνες μοναδικές στις λιπιδικές σχεδίες (**Εικόνα 6B και Πίνακας 1**). Η παρουσία πολλών ακτίνων (P60710, P63268, P68033, P62737, P63260) και υπομονάδων της T complex (P80318, P80313, P80317), γνωστών μοριακών συνοδών για την αναδίπλωση της ακτίνης και της τουμπουλίνης, αποδεικνύουν ότι έχουμε απομονώσει ταυτόχρονα το εξωτερικό και το εσωτερικό πέταλο των λιπιδικών σχεδίων, μαζί με τον υποκείμενο και στενά συνδεδεμένο κυτταροσκελετό της F-ακτίνης. Η απομόνωση των λιπιδικών σχεδίων με την ακτίνη ως μία λειτουργική μονάδα έγινε δυνατή επειδή δεν χρησιμοποιήσαμε απορρυπαντικά.

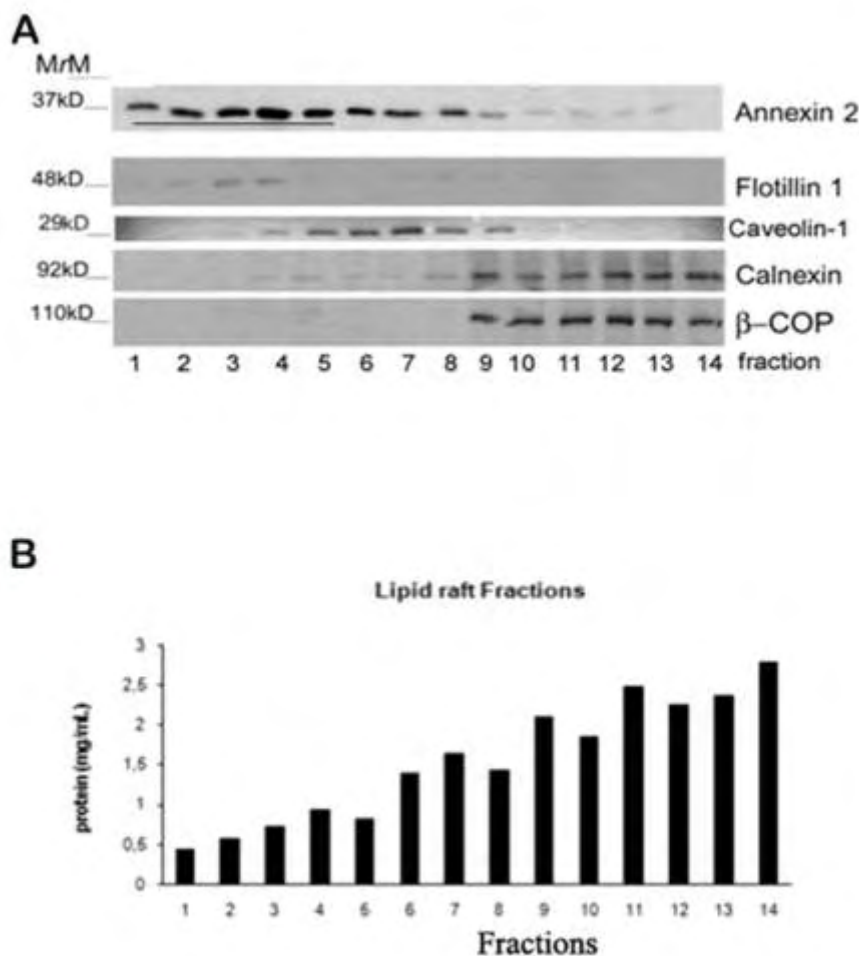
Προσδιορίστηκαν ως πρωτεΐνες των λιπιδικών σχεδίων οι Ανεξίνες A2 (P07356), A6 (P14824), και A7 (Q07076) (Πίνακας 2). Πιστεύουμε ότι αυτή είναι η πρώτη φορά που Ανεξίνες σε λιπιδικές σχεδίες προσεγγίζονται με πρωτεομική. Οι Ανεξίνες είναι διαλυτές, υδρόφιλες πρωτεΐνες που μπορούν να δεσμεύουν αρνητικά φορτισμένα

φωσφολιπίδια με ένα Ca^{2+} -εξαρτώμενο τρόπο και να προσδένονται στην ακτίνη [232]. Ειδικότερα η Ανεξίνη A2, , μπορεί να παρέχει έναν διαρθρωτικό δεσμό μεταξύ των λιπιδικών σχεδίων και του φλοιακού κυτταροσκελετού [178]. Η Ανεξίνη A6 έχει αποδειχθεί ότι οδώνει την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της μεμβράνης μέσω της ενεργοποίησης μιας πρωτεάσης της κυστεΐνης, διευκολύνοντας έτσι την ενδοκύττωση [179]. Η Ανεξίνη A7 εμπλέκεται στην εξωκύττωση και είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του εμβρύου. Δεν ανιχνεύσαμε την A5, μία Ανεξίνη που έχει προταθεί ως δείκτης διαφοροποίησης των εμβρυικών κυττάρων προς νευρώνες [144].

(P62737) Actin, aortic smooth cell	(P63017) Heat shock cognate 71kDa protein
(P60710) Actin, cytoplasmic 1	(P17742) Peptidyl-propyl cys-trans isomer
(P68033) Actin, α cardiac muscle	(P09103) Protein Disulfide-isomerase
(P63260) Actin, cytoplasmic 2	(P52480) Pyruvate kinase isozymes M1/M2
(P63268) Actin, γ enteric smooth	(Q7TMM9) Tubulin β -2A chain
(P68134) Actin, α skeletal	(Q9CWF2) Tubulin β -2B chain
(P07356) Ανεξίνη A2	(P68372) Tubulin β -2C chain
(P14824) Ανεξίνη A6	(Q9ERD7) Tubulin β -3 chain
(Q07076) Ανεξίνη A7	(Q9D6F9) Tubulin β -4 chain
(Q03265) ATP synthase subunit α	(Q3TFB6) Tubulin β -5 chain
(P56480) ATP synthase subunit β	(Q922FT) Tubulin β -6 chain
(P10126) Elongation Factor 1 α 1	(P80318) T-complex protein 1 subunit γ
(P08113) Endoplasmic precursor	(P80313) T-complex protein 1 subunit η
(P62874) Guanine nucleotide-binding protein	(P80317) T-complex protein 1 subunit ζ

Πίνακας 1. Πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν με τη μέθοδο φασματογραφίας μάζας στις λιπιδικές σχεδίες εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού

Πιο σημαντικά, κατά την ανάλυση Western αποκαλύψαμε εμπλουτισμό της Ανεξίνης 2 στις λιπιδικές σχεδίες, κλάσματα 1-5 (**Εικόνα 7Α**). Ομοίως, η Φλοτιλλίνη 1, ένας πρότυπος δείκτης λιπιδικών σχεδίων [152] ήταν συγκεντρωμένη στα ίδια κλάσματα επιβεβαιώνοντας την διαφορική κατανομή τους στα κλάσματα. Η Καλνεξίνη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί πρωτεΐνη δείκτη του ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ η πρωτεΐνη β -COP αποτελεί πρωτεΐνη δείκτη του οργανιδίου Golgi αφού



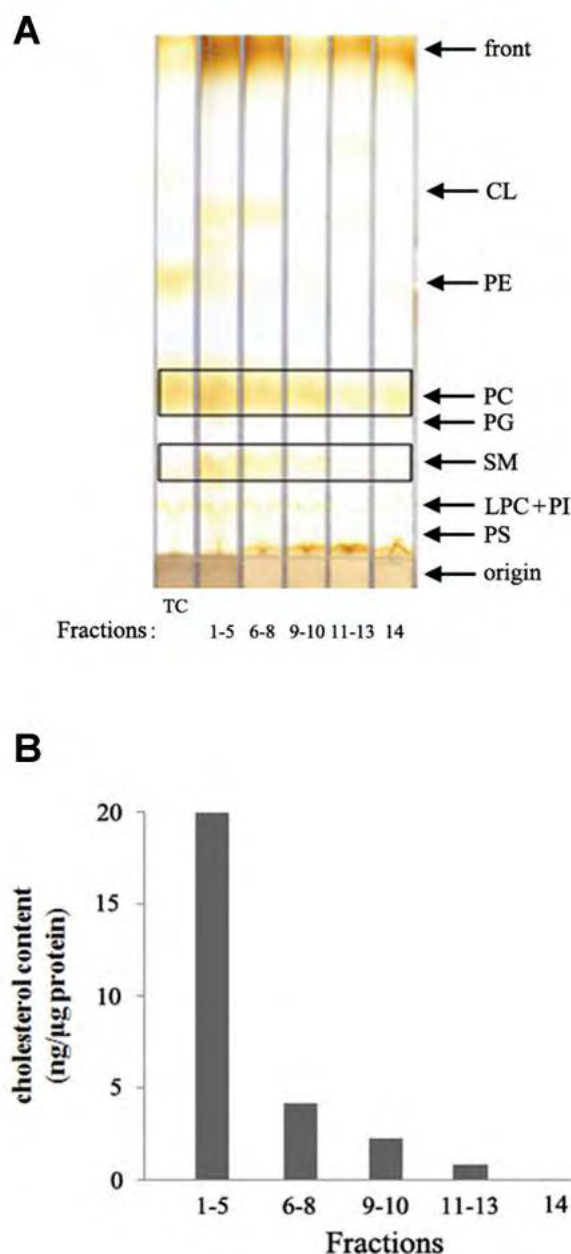
Εικόνα 7. Πρωτεϊνικός χαρακτηρισμός των λιπιδικών σχεδίων.

(A) Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοαποτύπωσης κατά Western μετά από απομόνωση λιπιδικών σχεδίων. Πενήντα μl από κάθε κλάσμα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής 8-12%. Με ειδικά αντισώματα Ανεξίνη 2 και Φλοτιλλίνη 1 ανιχνεύτηκαν στα κλάσματα 1-5 των λιπιδίων σχεδίων οι πρωτεΐνες Καλνεξίνη και β-COP I, στα κλάσματα 9-14 που αντιστοιχούν πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου και Golgi, ενώ στα κλάσματα 5-9 ανιχνεύεται η πρωτεΐνη Καβεολίνη-1, κύριο πρωτεϊνικό συστατικό των καβεοσωμάτων, που αποτελούν υποκατηγορία των λιπιδικών σχεδίων. (B) Πρωτεϊνικός προσδιορισμός κάθε κλάσματος χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Lowry. ρυθμίζει μέσω κυστιδίων τη μεταφορά πρωτεϊνών μεταξύ Golgi και ενδοπλασματικού δικτύου. Οι πρωτεΐνες αυτές ανιχνεύτηκαν στα πυκνότερα κλάσματα 10-14. Η πρωτεΐνη Καβεολίνη, που όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή αποτελεί κύριο συστατικό των καβεοσωμάτων,

υποκατηγορία των λιπιδικών σχεδίων, ανιχνεύτηκε στα κλάσματα 6-9 που αποτελούν και τα κλάσματα των καβεοσωμάτων (**Εικόνα 7Α**).

Στην συνέχεια αναλύσαμε την πρωτεϊνική σύσταση των κλασμάτων αυτών χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Lowry (**Εικόνα 7Β**), και το πρώτο ιδιαίτερα ενδιαφέρον στοιχείο που παρατηρήθηκε είναι ότι τα πέντε πρώτα κλάσματα που όπως αναφέρεται στην υπάρχουσα βιβλιογραφία αποτελούν τα κλάσματα των λιπιδικών σχεδίων περιέχουν μόνο το 10 με 12% της συνολικής ποσότητας πρωτεϊνών του δείγματος. Συνεπώς, η ανίχνευση των πρωτεϊνών αυτών σημαίνει αντίστοιχα και υψηλή συγκέντρωσή τους στα κλάσματα που εμπεριέχουν τις λιπιδικές σχεδίες. Από τα ευρήματά μας καθώς και την υπάρχουσα βιβλιογραφία [152, 181], είναι δυνατή η ένωση κλασμάτων ώστε να απλουστευθεί εν μέρει η ανάλυση χωρίς να διαταραχθεί η υποκλασμάτωση. Από τα 5 πρώτα δείγματα δημιουργήσαμε το δείγμα των λιπιδικών σχεδίων, από τα κλάσματα 6-9 το δεύτερο δείγμα (καβεοσώματα), τα κλάσματα 10-13 (κυρίως ER μεμβράνες) συγκεντρώθηκαν στο τρίτο δείγμα ενώ το κλάσμα 14 (πυρηνικές μεμβράνες) αποτέλεσε το πέμπτο δείγμα.

Ο διαχωρισμός των λιπιδικών σχεδίων επιπλέον πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας, TLC. Απαραίτητοι για τη διερεύνηση της λιπιδικής σύστασης των κλασμάτων, χρησιμοποιήθηκαν μάρτυρες η σφιγγομυελίνη SM, η φωσφατιδυλοσερίνη, PS, η φωσφατιδυλοινσιτόλη, PI, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, LPC, η φωσφατιδυλογλυκερόλη, PG, η φωσφατιδυλοχολίνη, PC, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PE, και η καρδιολιπίνη, CL. Ο μεγαλύτερος εμπλουτισμός των λιπιδίων αυτών παρουσιάστηκε στο δείγμα των κλασμάτων 1-5 που εμπεριέχουν τις λιπιδικές σχεδίες (**Εικόνα 8Α**). Τα φωσφολιπίδια αποτελούν βασικά δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Η PC και η SM βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά των μεμβρανών ενώ η PS και η PE καταλαμβάνουν την εσωτερική πλευρά. Η ασυμμετρία αυτή βοηθά τις πρωτεΐνες να στοχεύονται στα κατάλληλα υποκυτταρικά σημεία και ευοδώνουν την κυτταρική κυκλοφορία μέσω κυστιδίων, έτσι ώστε να υπάρχει καλύτερη ρύθμιση στη μεταγωγή του σήματος από την περιφέρεια στον πυρήνα του κυττάρου. Τελικά αποδείξαμε καταλυτικά την ύπαρξη λιπιδίων σχεδίων στα κλάσματα 1-5 με την ανάδειξη του υψηλού εμπλουτισμού τους με χοληστερόλη (**Εικόνα 8Β**).



Εικόνα 8. Οι λιπιδικές σχεδίες από εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs) είναι εμπλουτισμένες σε σφιγγομυελίνη, φωσφολιπίδια και χοληστερόλη.

(A) Ολικά λιπίδια (TC) ή κλάσματα κατά την απομόνωση λιπιδικών σχεδιών (1-5, 6-9, 10-13 και 14) από εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας την μέθοδο Bligh-Dyer. Ίση ποσότητα από κάθε κλάσμα εναποτέθηκε σε διαφορετικές λωρίδες σε πλάκες TLC που τοποθετήθηκαν σε σύστημα διαλυτών CHCl_3 : CH_3OH : H_2O : NH_4OH (120:75:6:2). Τα λιπίδια εμφανίστηκαν ως κίτρινες κηλίδες μετά από την έκθεση της πλάκας σε ατμούς ιωδίου. Τα βέλη υποδεικνύουν τη θέση των πρότυπων φωσφολιπιδίων που χρωματογραφήθηκαν παράλληλα σε ξεχωριστές λωρίδες. PS φωσφατιδυλοσερίνη, LPC,

λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, PI, φωσφατιδυλνινοσιτόλη, SM σφιγγομυελίνη, PG φωσφατιδυλογλυκερόλη, PC, φωσφατιδυλοχολίνη, PE, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, CL, καρδιολιπίνη. **(B)** Η χοληστερόλη μετρήθηκε χρησιμοποιώντας το Data-Cal total kit (Thermo Scientific) και αποδίδεται ως ng ανά mg πρωτεΐνης.

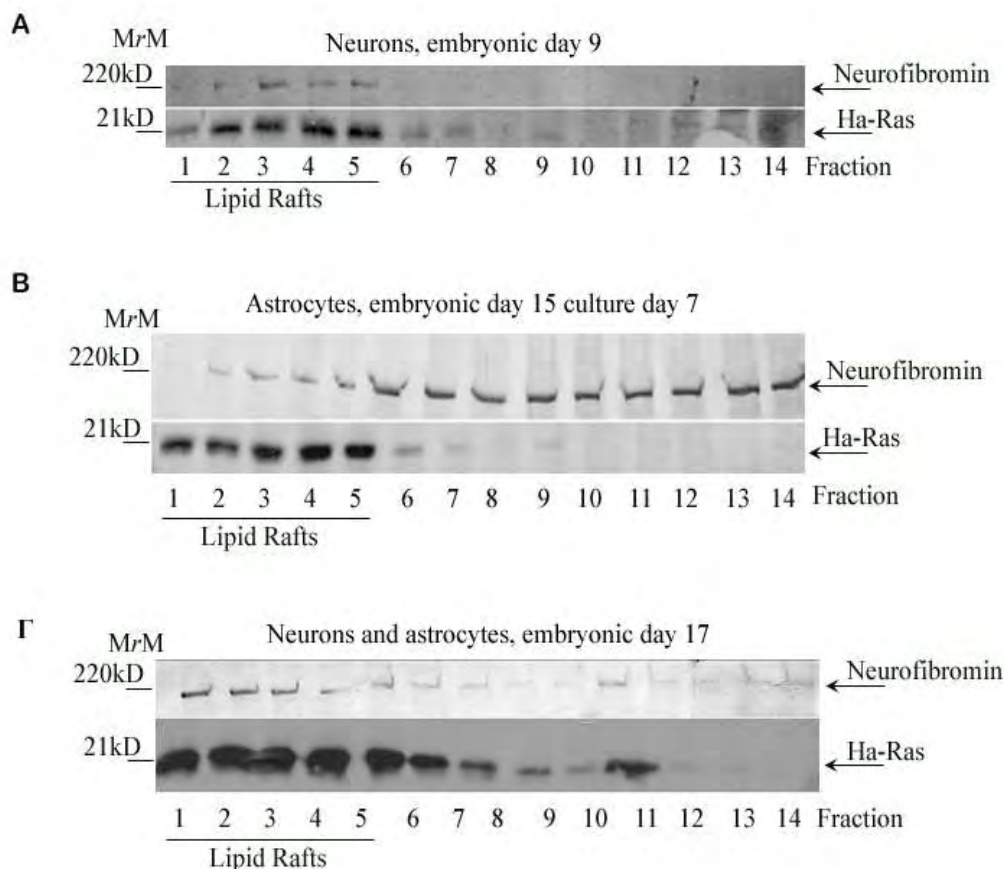
3.3.2. Η Νευροϊνιδίνη ανευρίσκεται στις λιπιδικές σχεδίες νευρώνων και αστροκυττάρων

Οι λιπιδικές σχεδίες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της σηματοδότησης των κυττάρων, αφού ένα πλήθος υποδοχέων και άλλων σηματοδοτικών μορίων όπως υποδοχείς, κινάσες, GTPases και πρωτεΐνες αγκυροβόλησης είναι συγκεντρωμένες σε αυτές. Συνεπώς, μία ενεργοποίηση των υποδοχέων της μεμβράνης μπορεί να οδηγήσει άμεσα στη δημιουργία συμπλοκών από πρωτεΐνες των λιπιδικών σχεδιών και μεταφορά της σηματοδότησης που θα οδηγήσει σε πιθανή διαφοροποίηση των κυττάρων. Ως εκ τούτου, στην προσπάθεια μας να κατανοήσουμε σε βάθος τη λειτουργία της Νευροϊνιδίνης στα νευρωνικά κύτταρα, ιστός από εγκεφαλικά ημισφαίρια ένατης εμβρυϊκής ημέρας, που αποτελούνται κατά 95% από νευρικά κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση λιπιδικών σχεδιών. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western έδειξε για πρώτη φορά ότι η Νευροϊνιδίνη βρίσκεται σχεδόν στο σύνολό της στα πρώτα πέντε κλάσματα, δηλαδή στις λιπιδικές σχεδίες (**Εικόνα 9A**). Επίσης, στις λιπιδικές σχεδίες ανιχνεύτηκε και η πρωτεΐνη Ha-Ras. Όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή, οι Ras πρωτεΐνες είναι μικρού μοριακού βάρους (21kDa) GTPases και λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες, επειδή αλλάζουν από την ενεργή GTP (Ras-GTP) στην ανενεργή GDP μορφή. Οι Ras πρωτεΐνες διαμεσολαβούν το σήμα από τους υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης προς ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης. Οι Ras πρωτεΐνες μπορούν να δεσμεύονται στην πλασματική μεμβράνη μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων με λιπίδια όπως η φαρνεζυλίωση.

Η επόμενη ερευνητική ερώτηση ήταν αν η στόχευση της Νευροϊνιδίνης στις μικροπεριοχές της μεμβράνης σχετίζεται με τον βαθμό της νευρωνικής διαφοροποίησης αλλά και το είδος των νευρωνικών κυττάρων. Πρώτα ελέγχθηκαν λιπιδικές σχεδίες σε αστροκύτταρα, από πρωτογενείς καλλιέργειες από εγκεφαλικά ημισφαίρια δέκατης πέμπτης εμβρυϊκής ημέρας (**Εικόνα 9B**). Στην περίπτωση αυτή, η κατανομή της Νευροϊνιδίνης στα κλάσματα που απομονώθηκαν ήταν διαφορετική.

Η πρωτεΐνη εντοπίστηκε κυρίως στα μεσαία και πυκνότερα κλάσματα στα οποία ανιχνεύονται πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου και Golgi.

Η διαφορική αυτή κατανομή επιβεβαιώθηκε με την απομόνωση λιπιδικών σχεδίων από εγκεφαλικά ημισφαίρια δέκατης έβδομης εμβρυϊκής ημέρας στα οποία υπάρχουν και οι δύο τύποι κυττάρων, νευρώνες και αστροκύτταρα (**Εικόνα 9 Γ**).



Εικόνα 9. Η κατανομή της Νευροϊνιδίνης στις λιπιδικές σχεδίες εξαρτάται από τον τύπο των νευρωνικών κυττάρων.

Για τη σύγκριση νευρώνων και αστροκυττάρων, απομονώθηκε εγκεφαλικός ιστός από τουλάχιστον 3 νεοσσούς την 9η ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης, ώστε να εμπεριέχει κυρίως νευρώνες (**A**), και (**B**) αστροκύτταρα από πρωτογενείς καλλιέργειες εγκεφαλικών ημισφαιρίων 15^{ης} εμβρυϊκής ημέρας (7 ημέρες στην καλλιέργεια). (**Γ**). Μετά από δοκιμασία κλασμάτωσης για τον διαχωρισμό λιπιδικών σχεδίων, 50μl από κάθε κλάσμα σε ομάδα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής 7% και 15%. Στην ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα ειδικά προς την Νευροϊνιδίνη (sc-067) και H-Ras. Τα μοριακά βάρη των δεικτών Μοριακού Βάρους σημειώνονται με παύλες.

Συγκεκριμένα, η ανοσοαποτύπωση της κλασμάτωσης αυτής με αντίσωμα έναντι της Νευροϊνιδίνης έδειξε ότι η πρωτεΐνη κατανέμεται σχεδόν σε όλα τα κλάσματα με τα μόρια της να συγκεντρώνονται κυρίως σε δυο περιοχές, στις λιπιδικές σχεδίες, που προφανώς αντιστοιχούν σε νευρώνες και στα πυκνότερα κλάσματα που αντιστοιχούν στα αστροκύτταρα. Η διαφορετική αυτή κατανομή της πρωτεΐνης μπορεί να οφείλεται πιθανώς στη διαφορετική έκφραση των μεταγράφων της πρωτεΐνης στους δύο αυτούς τύπους κυττάρων. Οι νευρώνες εκφράζουν και τις δύο ισομορφές με κυριότερη τη GRDI ενώ τα αστροκύτταρα μόνο την NF1- GRDII ισομορφή.

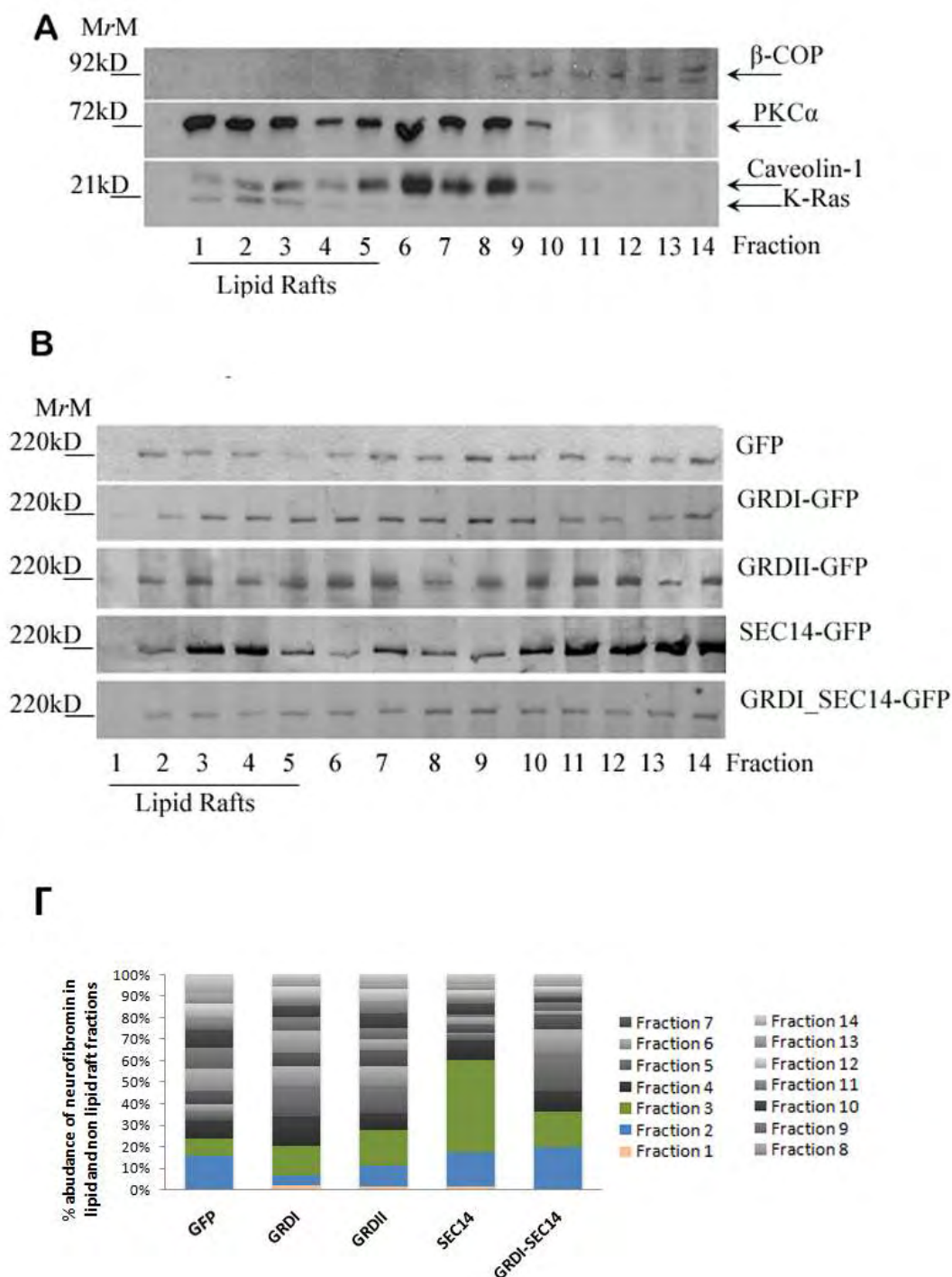
3.3.3. Η κατανομή της ενδογενούς Νευροϊνιδίνης σε λιπιδικές σχεδίες διαφοροποιείται μετά από υπερέκφραση των περιοχών της GRDI, GRDII, SEC14, GRDI+SEC14

Έχοντας ήδη διαπιστώσει ότι η κατανομή της Νευροϊνιδίνης φαίνεται να διαφέρει ανάμεσα σε νευρώνες και αστροκύτταρα, η επόμενη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε για να διαλευκανθεί η περιοχή σύνδεσης και στόχευσης που είναι υπεύθυνη για την κατανομή της πρωτεΐνης στις λιπιδικές σχεδίες. Γι' αυτό το λόγο κύτταρα COS7 διαμολύνθηκαν παροδικά χρησιμοποιώντας το σύστημα ηλεκτροδιάτρησης Amaxa με πλασμίδια που εκφράζουν EGFP-GRDI, EGFP-GRDII, EGFP-SEC14, EGFP-GRDI_SEC14 και EGFP ως μάρτυρας. Στα πειράματα αυτά συμπεριλάβαμε και την επικράτεια SEC14 της Νευροϊνιδίνης, αφού όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή, η περιοχή αυτή μπορεί να προσδένεται σε φωσφολιπίδια των πλασματικών μεμβρανών, στοχεύοντας έτσι την πρωτεΐνη στις μεμβράνες.

Στην **εικόνα 10Α** παρουσιάζεται μια τυπική εικόνα κατανομής πρωτεϊνών των COS7 κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της δοκιμασίας. Στα κλάσματα των λιπιδικών σχεδιών ανιχνεύθηκε K-Ras, στα μεσαία κλάσματα η Καβεολίνη ανιχνεύτηκε ενώ η β-COP ανευρέθηκε στα πυκνότερα κλάσματα πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου.

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western της ενδογενούς Νευροϊνιδίνης. (**Εικόνα 10Β**) ανέδειξε κατανομή της πρωτεΐνης σε όλα τα κλάσματα κυρίως όμως στις λιπιδικές σχεδίες και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η υπερέκφραση της GRDI οδήγησε σε λιγότερη έκφραση στις λιπιδικές σχεδίες, ενώ η GRDII την οδήγησε προς τα

καβεοσώματα. Η υπερέκφραση του SEC14 παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού εμφάνισε συγκέντρωση μορίων Νευροϊνιδίνης τόσο στις λιπιδικές σχεδίες αλλά και στα κλάσματα του ενδοπλασματικού δικτύου. Τέλος, η έκφραση της επικράτειας που περιέχει και GRDI και SEC14 άφησε σχεδόν ανέπαφη την κατανομή της ενδογενούς Νευροϊνιδίνης υποδεικνύοντας ότι μοιάζει με την ενδογενή ως προς τη συγγένεια με εξειδικευμένες κυτταρικές μεμβράνες.



Εικόνα 10. Η υπερέκφραση τμημάτων της Νευροϊνιδίνης, συγκεκριμένα των GRDI, GRDII, SEC14, GRDI-SEC14 μέσω παροδικής διαμόλυνσης με πλασμίδια σε κύτταρα COS7 προκαλούν μεταβολές στη στόχευση της ενδογενούς Νευροϊνιδίνης στις λιπιδικές σχεδίες.

Πενήντα μl από κάθε κλάσμα, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές 7% ή 15%. (Α) Στην ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα ειδικά για την πρωτεΐνη β-COP I (οργανίδια Golgi), την PKCα, την Ha-Ras και την Καβεολίνη ώστε να πιστοποιείται η

κλασμάτωση. **(B)** Ανοσοαποτύπωση της ενδογενούς Νευροϊνιδίνης COS7 κυττάρων μετά από παροδική διαμόλυνση τους με πλασμίδια που εκφράζουν EGFP, EGFP-GRDI, EGFP-GRDII, EGFP-SEC14, EGFP-GRDI_SEC14. **(Γ)** Πυκνομετρική ανάλυση της αφθονίας της ενδογενούς Νευροϊνιδίνης στα κλάσματα μεμβρανών.

Συμπερασματικά, η υπερέκφραση των περιοχών GRDI GRDII και SEC14 της Νευροϊνιδίνης οδήγησε σε διαφορετική κατανομή της ενδογενούς Νευροϊνιδίνης στις λιπιδικές σχεδίες με ισχυρή ένδειξη ότι προκύπτουν από χαρακτηριστικά της αλληλουχίας αμινοξέων. Ως εκ τούτου, η διαφορά στην κατανομή της πρωτεΐνης μεταξύ των νευρώνων και αστροκυττάρων που παρατηρήθηκε προηγουμένως πιθανώς να οφείλεται στη διαφορετική έκφραση των ισομορφών GRDI και GRDII, αλλά μπορεί επιπλέον να αντικατοπτρίζει και διαφορετικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης στις περιοχές αυτές, όπως η φωσφορυλίωσή της από ειδικές κινάσες όπως η πρωτεϊνική κινάση C έψιλον (PKCε).

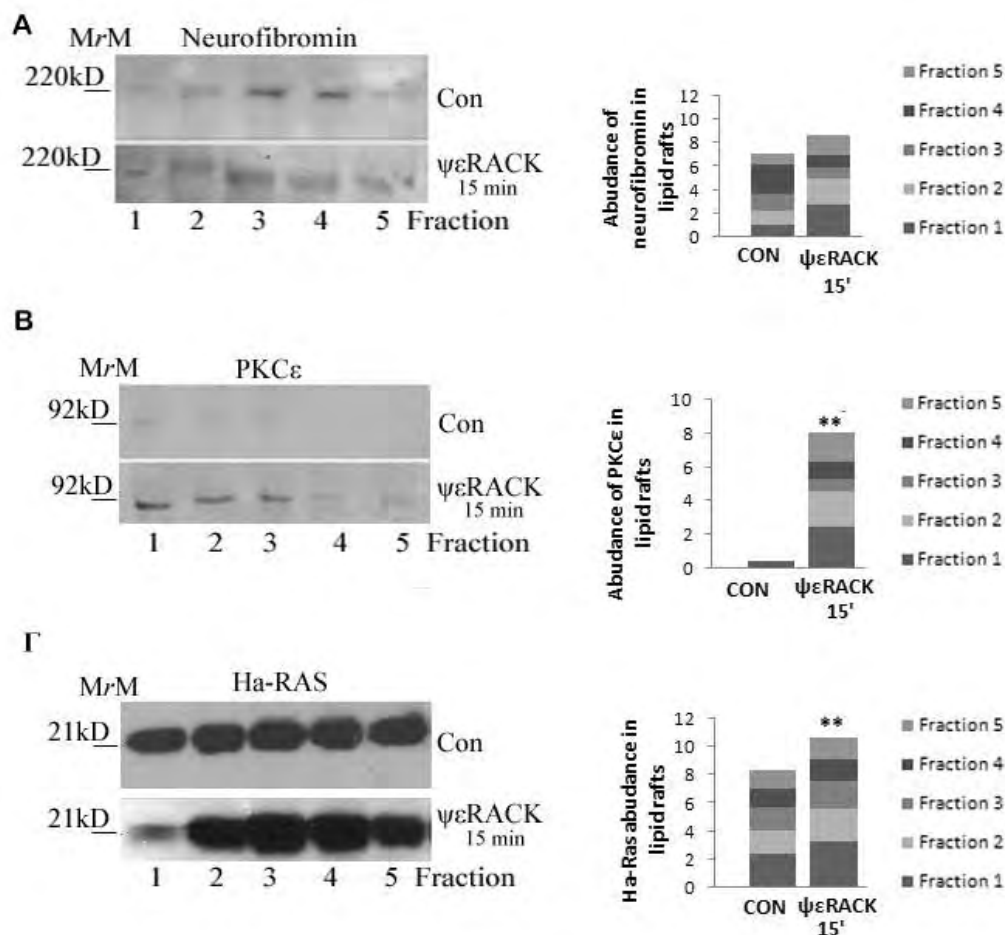
3.3.4. Φωσφορυλίωση της Νευροϊνιδίνης από την PKCε προκαλεί την επιστράτευσή της στις λιπιδικές σχεδίες

Έχοντας αποδείξει την παρουσία της Νευροϊνιδίνης και της Ras στις λιπιδικές σχεδίες, η μελέτη του μηχανισμού μέσω του οποίου η Νευροϊνιδίνη αναστέλλει τη δραστηριότητα της Ras σε σχέση με τις λιπιδικές σχεδίες αποτέλεσε το επόμενο βήμα στις έρευνες μας.

Προηγούμενες μελέτες που έχουν διεξαχθεί στο εργαστήριό μας έχουν αποδείξει ότι η φωσφορυλίωση της ενδογενούς Νευροϊνιδίνης πρώιμων νευρώνων από την PKCε αυξάνει τη RasGAP δραστηριότητά της [50]. Η φωσφορυλίωση μιας πρωτεΐνης από την PKC ακόμα και σε ένα μόνο σημείο της μπορεί να αλλάξει έντονα την τριτοταγή διαμόρφωσή της, οπότε και τις αλληλεπιδράσεις της με άλλες πρωτεΐνες ή ένζυμα (κινάσες, πρωτεάσες, φωσφατάσες), και επομένως τη λειτουργία της. Επίσης, γνωρίζοντας ότι η στόχευση της Νευροϊνιδίνης σε λιπιδικές σχεδίες της προσδίδει πλεονεκτική θέση λόγω εγγύτητας με την Ras πρωτεΐνη, ερευνήσαμε εάν η παρουσία της Νευροϊνιδίνης στις λιπιδικές σχεδίες οφείλεται στην φωσφορυλίωσή της από την PKCε. Για το λόγο αυτό εγκεφαλικά ημισφαίρια εμβρύων ένατης εμβρυϊκής ημέρας σε τομές των 100μM επωαστήκαν με το επιλεκτικό για την PKCε, πεπτίδιο ενεργοποιητή ψεRACK. Το πεπτίδιο αυτό συντέθηκε με κλασσική πεπτιδική σύνθεση

και συζεύχθηκε μέσω μιας επιπλέον N-τελικής Cys με δισουλφιδικό δεσμό με το δεκαπεπτίδιο Cys-TAT. Όπως έχουν δείξει προηγούμενες μελέτες, αυτή η μέθοδος σύζευξης αυξάνει την εισαγωγή του πεπτιδίου σε κύτταρα και ιστούς. Άμεση ενεργοποίηση της PKCε με ψεRACK προκάλεσε την ταχεία μετατόπιση μορίων της Νευροϊνιδίνης στα κλάσματα 1-3 (**Εικόνα 11Α**). Ταυτόχρονα, ανοσοαποτύπωση των κλασμάτων των λιπιδικών σχεδίων με αντισώματα έναντι της PKCε έδειξαν ότι, αν και σε φυσιολογικές συνθήκες η κινάση δεν εντοπίζεται στα κλάσματα των λιπιδικών σχεδίων, η επώαση με το επιλεκτικό για αυτήν πεπτίδιο ενεργοποίησης ψεRACK προκαλεί την ταχεία επιστράτευσή της στα κλάσματα αυτά (**Εικόνα 11Β**). Έπειτα, η H-Ras πρωτεΐνη ακολουθεί την πορεία της Νευροϊνιδίνης και συσσωρεύεται στις λιπιδικές σχεδίες (**Εικόνα 11Γ**) μετά από επίδραση ψεRACK. Αυτό μπορεί να οφείλετε στο γεγονός ότι η ενεργοποιημένη PKCε συμμετέχει και στην ενεργοποίηση του Ras με την παράλληλη ενεργοποίηση RasGEFs πρωτεϊνών όπως η Sos1.

Άρα, σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η ενεργοποίηση της PKCε και η άμεση μεταφορά της στις λιπιδικές σχεδίες έχει ως αποτέλεσμα, πιθανά μέσω δημιουργίας συμπλόκου, την φωσφορυλίωση της Νευροϊνιδίνης, όπου η Νευροϊνιδίνη μπορεί πιθανά να προσδένει το Ras.



Εικόνα 11. Η ενεργοποίηση της PKCε οδηγεί στη συγκέντρωση της Νευροϊνιδίνης και του Ras στις λιπιδικές σχεδίες.

Πενήντα μl από κάθε κλάσμα προερχόμενο από ιστό εγκεφαλικών ημισφαιρίων εμβρύων ένατης ημέρας (E9) επωάστηκε με ειδικό πεπτίδιο ενεργοποίησης της PKCε, ψεRACK. Τα κλάσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής 7% και 15%. Στην ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα ειδικά προς την Νευροϊνιδίνη (sc-067) (**A**), την PKCε (**B**) και H-RAS (**Γ**). Τα διαγράμματα δείχνουν την πυκνομετρική ανάλυση της αφθονίας της Νευροϊνιδίνης, PKCε και Ras στις λιπιδικές σχεδίες. Οι τιμές αποτελούν την μέση τιμή ανοσοαντίδρασης της Νευροϊνιδίνης, PKCε και Ha-Ras σε 3-5 δείγματα ομαλοποιημένες με βάση το περιεχόμενο της πρωτεΐνης. ** $P < 0.01$ στατιστικά σημαντική διάφορα έναντι του μάρτυρα (CON).

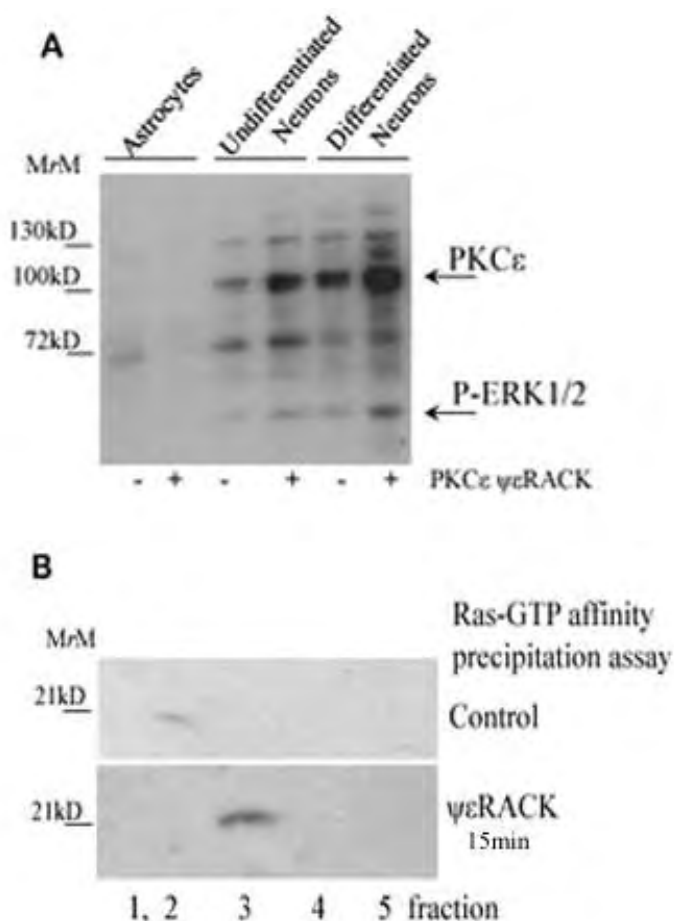
3.3.5. Οι ενεργοποιημένες PKCε και Ras ανευρίσκονται στις λιπιδικές σχεδίες

Στη σειρά αυτή πειραμάτων επιδιώξαμε να αποδείξουμε ότι οι ενεργοποιημένες PKCε και Ras βρίσκονται στις λιπιδικές σχεδίες. Μελετήσαμε αυτό το ερώτημα με δοκιμασία *in vitro* κινάσης, και με ανοσοκατακρήμνιση συγγένειας ενεργών μορίων Ras (RBD-affinity precipitation).

Με την *in vitro* δοκιμασία κινάσης [180] αναλύθηκαν κλάσματα λιπιδικών σχεδιών από νευρωνικά κύτταρα σε τρία διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης, δηλαδή α) αδιαφοροποίητοι νευρώνες (E5, undifferentiated neurons) β) ώριμοι διαφοροποιημένοι νευρώνες (differentiated neurons E7C4) και γ) αστροκύτταρα (astrocytes E15C10), τα οποία είχαν προ-επωαστεί στην παρουσία (+) ή μη (-) του επιλεκτικού πεπτιδίου ενεργοποίησης της PKCε ψεRACK. Η επανασύσταση των κινασών σε πηκτή που περιείχε βασική πρωτεΐνη Μυελίνης (MBP) και η επακόλουθη επώαση της πηκτής με σεσημασμένη ^{32}P -ATP κατέληξε σε *in situ* φωσφορυλίωση της MBP από τις κινάσες των δειγμάτων (**Εικόνα 12Α**). Η ραδιογραφία της πηκτής έδειξε έντονες ζώνες ακτινοβολίας στην περιοχή 90-100kDa που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της PKCε (92kDa). Η ζώνη εντοπίζεται στο δείγμα των διαφοροποιημένων ώριμων νευρώνων στην απουσία και πολύ περισσότερο στην παρουσία ψεRACK. Μικρότερα επίπεδα φωσφορυλίωσης ανιχνεύθηκαν στους αδιαφοροποίητους νευρώνες, ενώ εξαλείφεται στα αστροκύτταρα που δεν εκφράζουν PKCε [114]. Συνεπώς, στα δείγματα των διαφοροποιημένων μετασυναπτικών νευρώνων η ενεργοποίηση της PKCε είναι ιδιαίτερα αυξημένη. Επίσης, μια ακόμη ζώνη ακτινοβολίας που ακολουθεί το πρότυπο ενεργοποίησής της PKCε εμφανίζεται σε ύψος μοριακού βάρους 40kDa και πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύει την ενεργοποίηση της φωσφορυλιωμένης ERK, δείχνοντας έτσι και την ενεργοποίηση όλου του μονοπατιού PKC/Ras/ERK.

Στη συνέχεια αναλύθηκε η δραστικότητα του Ras σε κλάσματα λιπιδικών σχεδιών. Οι ανοσοαποτυπώσεις του Ras έδειξαν ότι επώαση με πεπτίδιο ψεRACK είχε ως αποτέλεσμα την έντονη ενεργοποίηση του Ras (RasGTP) σε κλάσματα (τρίτο κλάσμα) των λιπιδικών σχεδιών (**Εικόνα 12Β**). Το πείραμα υποδεικνύει ότι πιθανά το ενεργοποιημένο Ras ενδοκυττώνεται.

Συμπερασματικά, στις λιπιδικές σχεδίες ανευρίσκονται τα μόρια της ενεργοποιημένης PKCε του Ras προφανώς μετά την ενεργοποίηση RasGEF πρωτεϊνών από την PKC. Συνεπώς, η προσέλευση και των δύο πρωτεϊνών, Νευροϊνιδίνης και Ras, μέσω της PKCε διασφαλίζει τελικά την απενεργοποίηση του Ras και την ρύθμιση του μονοπατιού GEFs/PKC/Ras/Raf/ERK.



Εικόνα 12. Τα ενεργοποιημένα μόρια PKCε και Ras ανευρίσκονται στις λιπιδικές σχεδίες.

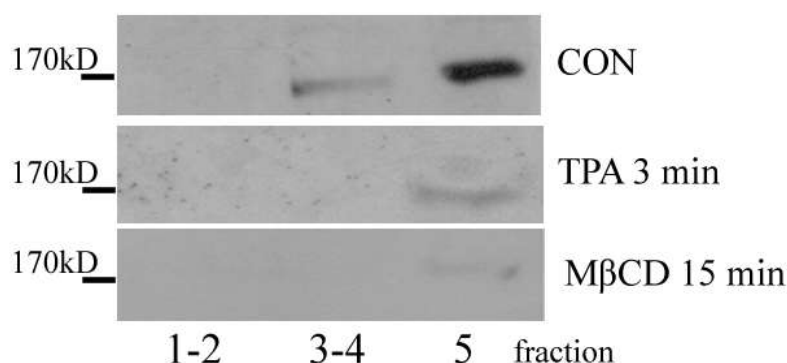
(A) Τριάντα μl από τα κλάσματα 3 και 4 των λιπιδικών σχεδιών προερχόμενα από α) αστροκύτταρα εγκεφαλικού ιστού E15 σε καλλιέργεια δέκα ημερών C10 (Culture day, C10) (E15C10 Astrocytes), β) εγκεφαλικά ημισφαίρια εμβρύων E5 (undifferentiated neurons) και γ) νευρώνες εγκεφαλικού ιστού E7 μετά από τέσσερις μέρες σε καλλιέργεια επώαστηκαν με ή χωρίς το ειδικό πεπτίδιο ενεργοποίησης της PKCε ψεRACK και υποβλήθηκαν σε in vitro δοκιμασία κινάσης. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής 12%, η οποία περιέχει 0.1mg/ml βασική πρωτεΐνη Μυελίνης (MBP). Μετά την επανασύσταση των κινασών οι κινάσες επωάζονται ως έχουν στην πηκτή, παρουσία [32-P]- ATP. Η φωσφορυλίωση της

MBP από κινάσες διαφόρων μοριακών βαρών διαπιστώνεται με αυτοραδιογραφία της πηκτής μετά από αποξήρανση. Τα βέλη δείχνουν έντονες ζώνες που αντιστοιχούν στο μοριακό βάρος της PKCε (92kDa) και της ERK, P-ERK1/2 (42/44kDa) αντίστοιχα. Η δοκιμασία αυτή έδειξε υψηλά επίπεδα ενεργοποίησης της PKCε σε διαφοροποιημένους νευρώνες. **(B)** Εκατό μl από κλάσματα λιπιδικών σχεδίων (κλάσματα 1 και 2, 3, 4, 5) εγκεφαλικού ιστού εμβρύων E9, μετά από επώαση 15 λεπτών με το ειδικό πεπτιδίο ψεRACK, εξετάστηκαν με δοκιμασία δραστηριότητας Ras, που αναφέρεται στις Μεθόδους. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοδοκιμασία κατά Western χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του Ha-Ras. Έντονη ζώνη εμφανίστηκε στα κλάσματα των λιπιδικών σχεδίων μετά από επώαση με ψεRACK.

3.3.6. Η ενεργοποίηση της PKCε προκαλεί την απομάκρυνση της RasGEF Sos1 από τις λιπιδικές σχεδίες.

Όπως δείχθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, η ενεργοποίηση της PKCε οδηγεί στη συγκέντρωση της Νευροϊνιδίνης και του Ras στις λιπιδικές σχεδίες. Για να διευκρινίσουμε αν η συγκέντρωση και ταυτόχρονα ενεργοποίηση του Ras γίνεται με την παράλληλη ενεργοποίηση RasGEF πρωτεϊνών από την PKCε, εγκεφαλικά ημισφαίρια όγδοης εμβρυακής ημέρας επώαστηκαν με εστέρα φορβόλης TPA. Ο εστέρας φορβόλης αποτελεί ισχυρό ενεργοποιητή της PKCε. Η ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα για την RasGEF πρωτεΐνη Sos1, έδειξε ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη στις βασικές συνθήκες συγκεντρώνεται στα τελευταία κλάσματα των λιπιδικών σχεδίων (κλάσμα 5). Μετά από επώαση με 100nM TPA η ανίχνευση της πρωτεΐνης στο κλάσμα αυτό ήταν περιορισμένη (**Εικόνα 13**). Η Sos1 απομακρύνεται από τις λιπιδικές σχεδίες, ενώ παράλληλα έχουμε συγκέντρωση ενεργών μορίων Ras. Η Sos1 μετακινείται στην μεμβράνη μετά από ενεργοποίηση. Η μετατόπιση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση της πρωτεΐνης RAS από το GDP και την πρόσδεση στο GTP. Εφόσον έχουμε ήδη διαπιστώσει ότι ενεργά μόρια Ras βρίσκονται στις λιπιδικές σχεδίες υποθέσαμε ότι η Sos1 έχει ήδη διατελέσει τον ρόλο της και έχει απομακρυνθεί από τις λιπιδικές σχεδίες. Επίσης στη σειρά αυτή πειραμάτων για να διαπιστώσουμε τη λειτουργική σημασία των παραπάνω παρατηρήσεων, προεπώασαμε τις τομές των εγκεφαλικών ημισφαιρίων για 15 λεπτά με 10mM μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (MβCD), η οποία δεσμεύει χοληστερόλη και αποδιατάσσει τις λιπιδικές σχεδίες. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της Sos1 έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης της Sos1 είναι μη ανιχνεύσιμα. Συνεπώς, η

ακεραιότητα των λιπιδικών σχεδίων είναι απαραίτητη για την ευόδωση του μονοπατιού RasGEF/PKC/Ras/ERK [182].



Εικόνα 13 Η ακεραιότητα των λιπιδικών σχεδίων είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της Ras.

Πενήντα μl από κάθε κλάσμα προερχόμενο από ιστό εγκεφαλικών ημισφαιρίων εμβρύων ένατης ημέρας (E9) επώαστηκε για 3 λεπτά με 100nM TPA και υποβλήθηκε σε δοκιμασία απομόνωσης λιπιδικών σχεδίων. Επίσης, αντίστοιχοι ιστοί επώαστηκαν με 10mM MβCD για 15 λεπτά. Όλα τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής 7% και ακολούθησε ανοσοδοκιμασία κατά Western με ειδικό αντίσωμα έναντι της Sos1.

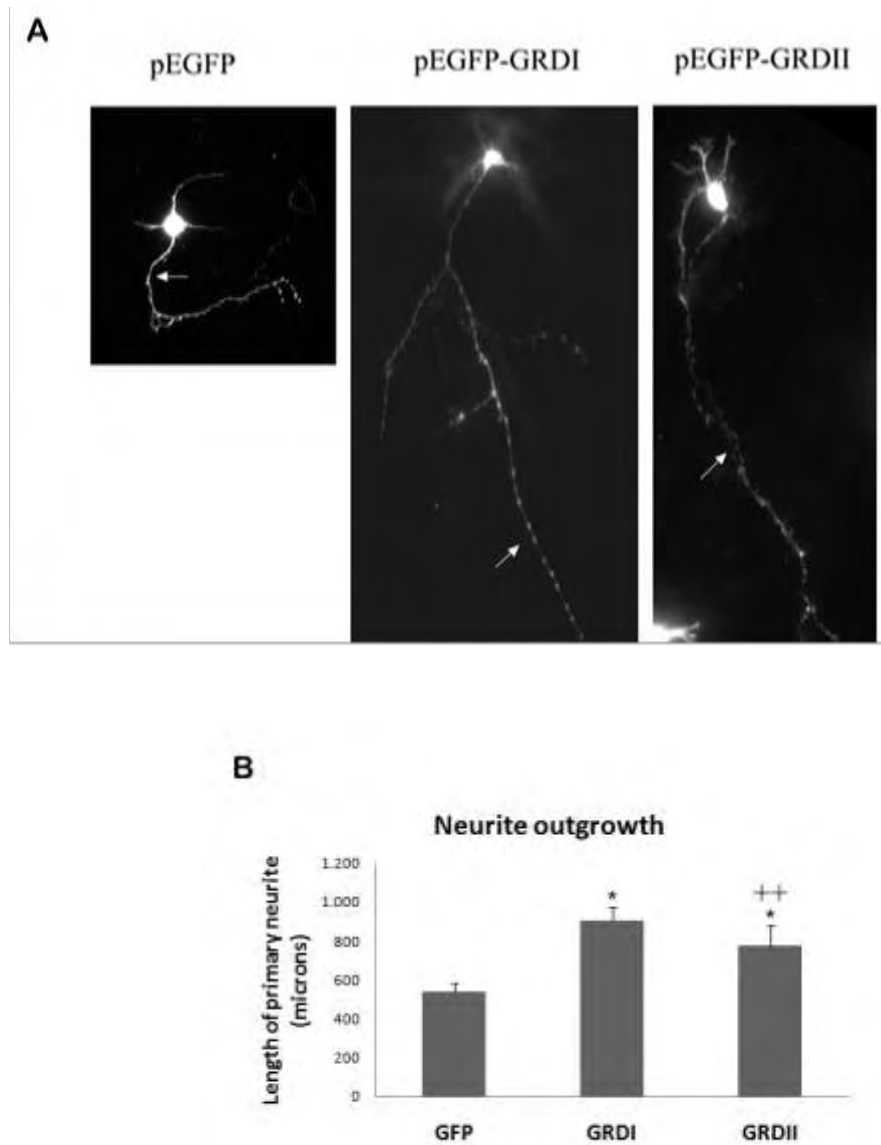
3.4. Ανάλυση του ρόλου των ισομορφών GRDI και GRDII της Νευροϊνιδίνης στη διαφοροποίηση των νευρώνων.

3.4.1. Φαινοτυπική ανάλυση της υπερέκφρασης των GRDI και GRDII σε πρωτογενείς νευρώνες.

Η περιοχή GRD της Νευροϊνιδίνης αποτελεί την πιο σημαντική και μελετημένη έως σήμερα λειτουργία της πρωτεΐνης, δηλαδή την αναστολή της δραστηριότητας του Ras. Όπως αποδείξαμε ήδη στην ενότητα 3.3. αυτό συμβαίνει σε πολύ συγκεκριμένες περιοχές της πλασματικής μεμβράνης δηλαδή τις λιπιδικές σχεδίες. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι δραστηριότητα του Ras μπορεί να έχει καταλυτικό ρόλο στη νευρική διαφοροποίηση. Η πειραματική μας διαπίστωση (Ενότητα 3.1) ότι κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων GRDI και GRDII της Νευροϊνιδίνης μεταβάλλονται με έντονα με τελική επικράτηση του GRDI μας

οδήγησε στην επόμενη σειρά πειραμάτων κατά την οποία εξετάσαμε τον πιθανά διαφορικό ρόλο των περιοχών GRD στη νευρωνική διαφοροποίηση (**Εικόνα 14A**).

Για το σκοπό αυτό πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων από τελεγκέφαλο εμβρύων οχτώ ημερών E8 διαμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδια που φέρουν είτε EGFP, ως μάρτυρα, ή EGFP- GRDI ή EGFP-GRDII και παρέμειναν στη καλλιέργεια για πέντε ημέρες. Οι νευρώνες κατά το στάδιο αυτό έχουν διαφοροποιηθεί πολύ και αναπτύξει το σύνολο των νευριτών τους. Στο πείραμα αυτό οι νευρώνες μονιμοποιήθηκαν με PFA όπως περιγράφεται στις Μεθόδους και στη συνέχεια με τη βοήθεια συνεστιακής μικροσκοπίας φωτογραφήθηκαν μέσω του φθορισμού τους για GFP. Στη συνέχεια, με το πρόγραμμα NIH Neuron J μετρήθηκαν οι κύριοι νευρίτες, των EGFP (n=62 με μέσο μήκος νευρίτη 539μm, +/- 33,9), EGFP-GRDI (n=56 με μέσο μήκος νευρίτη 906 μm, +/- 66,5) και EGFP-GRDII (n=58 με μέσο μήκος νευρίτη 770μm, +/-50,5) Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε ότι και οι δυο περιοχές αυξάνουν στατιστικά σημαντικά το μήκος των κύριων νευριτών σε σχέση με το μάρτυρα. Η ισομορφή GRDI αύξησε το μήκος του νευρίτη κατά 68% ενώ το GRDII κατά 44% (**Εικόνα 14B**).



Εικόνα 14. Η υπερέκφραση του GRD τμήματος της Νευροϊνιδίνης αυξάνει το μήκος των κύριων νευριτών.

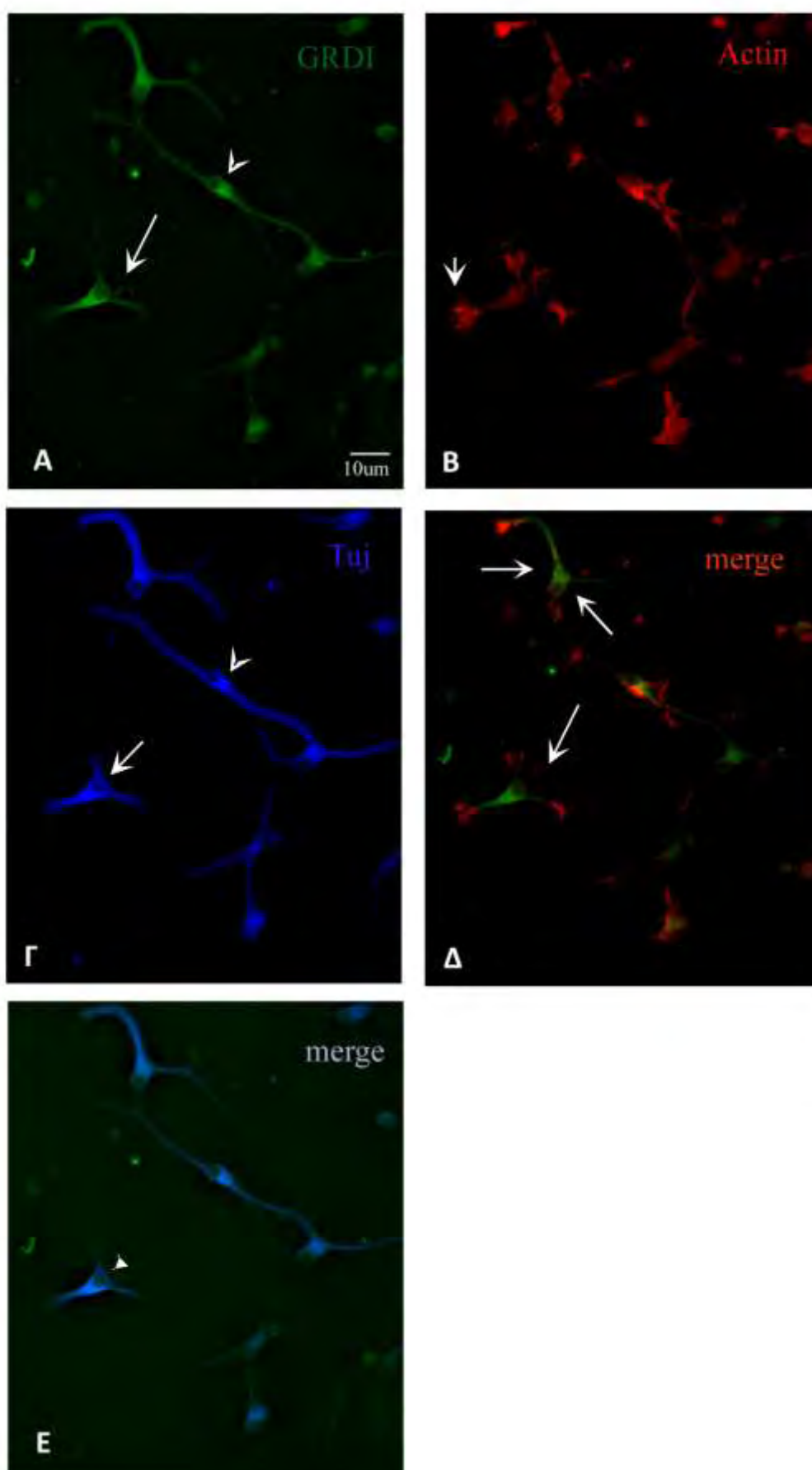
Υπερέκφραση του GRDI, κυρίως, αλλά και του GRDII οδήγησαν σε δραματική αύξηση του μήκους νευριτών. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες νευρώνων παροδικά διαμολυσμένων με πλασμίδια EGFP, EGFP-GRDI, EGFP-GRDII. (B) Μέτρηση μήκους πρωτογενούς νευρίτη σε μικρόμετρα. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το NIH neuron J software και οι μπάρες αντιστοιχούν στις μέσες τιμές \pm τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (s.e.) του αριθμού νευριτών που αναλύθηκαν κατά συνθήκη. * $P < 0.01$ στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι του μάρτυρα. ++ $P < 0.01$ στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ GRDI και GRDII.

Συμπερασματικά, οι περιοχές της Νευροϊνιδίνης GRDI και GRDII παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της νευρωνικής διαφοροποίησης αφού η υπερέκφραση τους

οδήγησε σε σημαντική αύξηση του μήκους των νευριτών, μια κύρια διαδικασία διαφοροποίησης και ωρίμανσης των νευρώνων από την οποία καθορίζεται η συναπτογένεση και η δημιουργία νευρωνικών κυκλωμάτων. Επίσης αναδεικνύεται ότι η περιοχή GRDI, που αντιστοιχεί στην ισομορφή της πρωτεΐνης που επικρατεί κατά την ανάπτυξη, ως σημαντικότερη για την νευρωνική διαφοροποίηση.

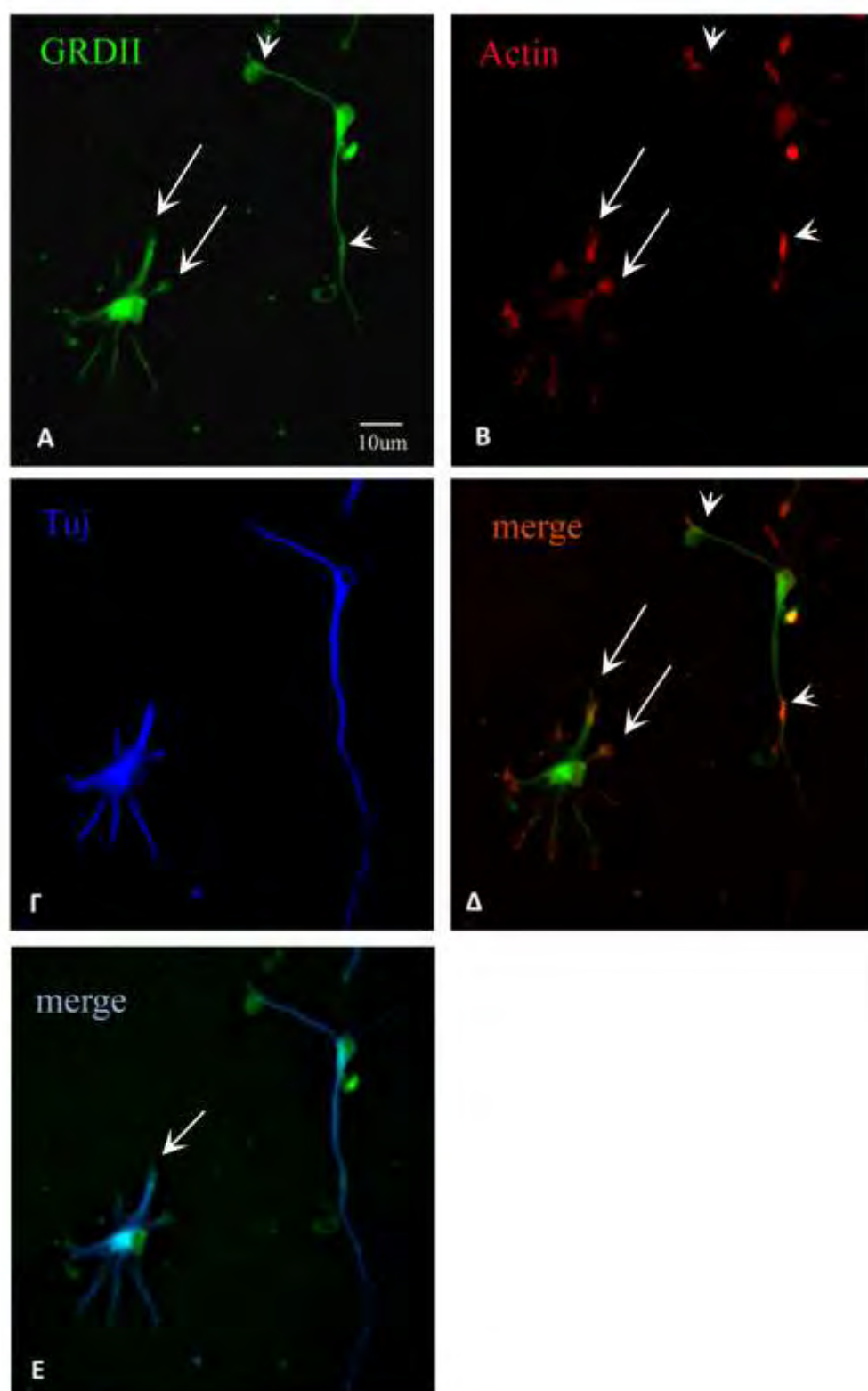
3.4.2. Η GRDI και GRDII περιοχή της Νευροϊνιδίνης συνεντοπίζεται με τους κυτταροσκελετούς ακτίνης και μικροσωληνίσκων.

Η σημαντική αυτή αύξηση του μήκους των νευριτών που αναφέρθηκε προηγουμένως μας οδήγησε στο να αναλύσουμε με δοκιμασία ανοσοφθορισμού την πιθανή συσχέτιση των περιοχών αυτών με τα κυτταροσκελετικά συστήματα της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων. Έτσι σε νευρώνες εγκεφαλικού ιστού έγινε παροδική διαμόλυνση με πλασμίδια EGFP-GRDI και EGFP-GRDII. Η διαδικασία της ανοσοιστοχημείας που ακολουθήθηκε μπορεί και διατηρεί ανέπαφο τον κυτταροσκελετό των κυττάρων. Ο ανοσοφθορισμός ακτίνης, τουμπουλίνης και των ισομορφών GRDI/II αναλύθηκε 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Από τις αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες (**Εικόνα 16 και 17**) μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η EGFP-GRDI ισομορφή εντοπίζεται κυρίως γύρω από τον πυρήνα στην περιοχή του ER και του MTOC (Κεφαλές βελών, **Εικόνα 16 Α, Γ**). αλλά και μέσα στον πυρήνα. Η έκφραση του EGFP-GRDI δεν συνεντοπίζεται με την ακτίνη στην περιοχή των αυξητικών κώνων (κοντά βέλη, **Εικόνα 16Β**), ενώ απαντάται κατά μήκος των νευριτών (βέλη, **Εικόνα 16Α και 16Δ**). Επίσης, σημαντικό είναι να αναφέρουμε ότι στους νεαρούς νευρίτες παρουσιάζεται πολύ μικρή συνεντόπιση EGFP-GRDI και τουμπουλίνης (**Εικόνα 16Ε**). Η ίδια ανάλυση EGFP-GRDII έδειξε διαφορετική εικόνα από εκείνη του EGFP-GRDI (**Εικόνα 17**). Η GRDII είναι περισσότερο στικτή (κοντά βέλη, **Εικόνα 17Α**) ενώ σε αντίθεση με το GRDI απαντάται σε μεγαλύτερο βαθμό στους αυξητικούς κώνους (μακριά βέλη, **Εικόνα 17Α, Β και Δ**). Επίσης, προσεκτική ανάλυση των εικόνων έδειξε ότι υπάρχουν αυξημένες συγκεντρώσεις ακτίνης καθώς και EGFP-GRDII σε περιοχές διακλάδωσης (κοντά βέλη, **Εικόνα 17 Δ**). Η υπερέκφραση του πλασμιδίου EGFP-GRDII δεν ακολουθεί πλήρως την κατανομή της τουμπουλίνης, όπως κάνει η ισομορφή GRDI, και μάλιστα συνεχίζει και μετά το τέλος των μικροσωληνίσκων προς την ακτίνη των αυξητικών κώνων (βέλος, **Εικόνα 17Ε**).



Εικόνα 16. Η επικράτεια GRDI της Νευροϊνιδίνης συνεντοπίζεται με τους μικροσωληνίσκους.

Νευρώνες όγδοης εμβρυικής ημέρας διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο EGFP-GRDI και έγινε ανοσοκυτταροχημική ανάλυση με χρήση πρωτοκόλλου DSP με αντίσωμα για β-τουμπουλίνης (μπλε φθορόχρωμα) και φαλλοϊδίνη (κόκκινο) για την ακτίνη. Οι εικόνες είναι προβολές 3 Z-τομών πάχους 0.4 μm , οι οποίες αποσυσχετίστηκαν (deconvolution) με τον αλγόριθμο του κοντινότερου γείτονα (nearest-neighbour algorithm). (A) EGFP-GRDI. Οι κεφαλές βελών δείχνουν τον εντοπισμό του στο ER και τον πυρήνα. (B) Ανίχνευση της ακτίνης, τα κοντά βέλη δείχνουν τους αυξητικούς κώνους. (Γ) Ανίχνευση τουμπουλίνης, το βέλος δείχνει την απουσία χρώσης με τουμπουλίνη νεαρού νευρίτη (Δ) Ανίχνευση EGFP-GRDI και ακτίνης, μακρύ βέλος, δείχνει την συνεντόπιση ακτίνης και EGFP-GRDI σε διακλάδωση νευρίτη, (Ε) ανίχνευση EGFP-GRDI και τουμπουλίνης.



Εικόνα 17. Η επικράτεια GRDII της Νευροϊνιδίνης συνεντοπίζεται και με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων.

Νευρώνες όγδοης εμβρυικής ημέρας διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο EGFP-GRDII. Και έγινε ανοσοκυτταροχημική ανάλυση με χρήση πρωτοκόλλου DSP με αντίσωμα για την β -τουμπουλίνη (μπλε φθορόχρωμα) και -φαλλοϊδίνη (κόκκινο) για την ακτίνη. Οι εικόνες είναι προβολές 3 Z-τομών πάχους 0.4 μm , οι οποίες αποσυσχετίστηκαν (deconvolution) με τον αλγόριθμο του κοντινότερου γείτονα (nearest-neighbour algorithm). (A) EGFP-GRDII. Τα μακριά βέλη δείχνουν το συνεντοπισμό EGFP-GRDII με ακτίνη. (B) Ανίχνευση της ακτίνης, τα μακριά βέλη δείχνουν τους αυξητικούς κώνους. (Γ) Ανίχνευση τουμπουλίνης, (Δ) Ανίχνευση EGFP-GRDII και ακτίνης, μακρύ βέλος δείχνει την συνεντόπιση ακτίνης και EGFP-GRDII σε νευρίτη, (E) ανίχνευση EGFP-GRDII και τουμπουλίνης, το βέλος δείχνει την έκφραση του EGFP-GRDII μετά την ανίχνευση των μικροσωληνίσκων.

3.5. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της Νευροϊνιδίνης και συμβολή τους στο μηχανισμό διαφοροποίησης.

3.5.1. Μελέτη της έκφρασης των μεταγράφων της Νευροϊνιδίνης κατά την διαδικασία της διαφοροποίησης των SHSY5Y κυττάρων νευροβλαστώματος.

Η μελέτη των μοριακών μηχανισμών σε πρωτογενείς νευρώνες επιφέρει ποικίλους περιορισμούς, όπως την ποσότητα και τον αριθμό κυττάρων για βιοχημική και μοριακή ανάλυση, την σχετική ποικιλομορφία σε υπότυπους νευρώνων, αλλά και τις έστω μικρές διαφορές βαθμού και μηχανισμού διαφοροποίησης. Συνεπώς όπως και για περισσότερους άλλους κυτταρικούς τύπους κάναμε χρήση κατάλληλης κυτταρικής σειράς που δεν θέτει περιορισμούς σε αριθμούς κυττάρων, δεν κάνει υπερβολική χρήση πειραματόζων, προσφέρει πιο ομοιογενείς πληθυσμούς και βέβαια επιτρέπει να ελέγξουμε αν οι προτεινόμενοι μηχανισμοί ισχύουν σε περισσότερα από ένα νευρωνικά κυτταρικά περιβάλλοντα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε ως μοντέλο, κύτταρα νευροβλαστώματος SHSY5Y, τα οποία αποτελούν ένα αποδεκτό μοντέλο μελέτης της νευρωνικής λειτουργίας, το οποίο έχει μελετηθεί και χαρακτηριστεί ενδελεχώς

Με βάση τα ευρήματά μας που δείχνουν ειδική αναπτυξιακή ρύθμιση των μεταγράφων GRDI και GRDII, αλλά και συνολικά της έκφρασης του NLS (Ενότητα 3.1.3), την διαφορετική συγγένειά τους για τις λιπιδικές σχεδίες (Ενότητα 3.3.3), την

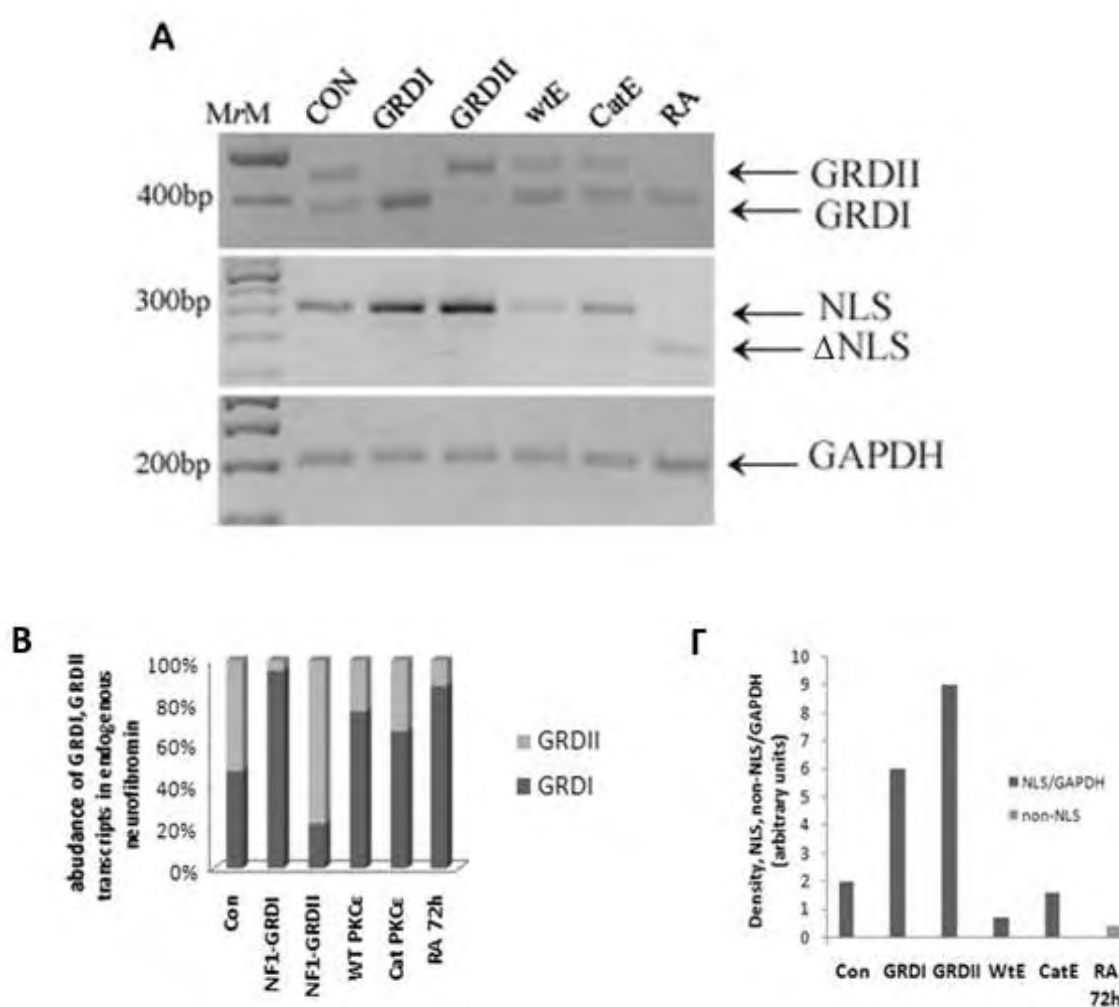
γνωστή διαφορά στην δραστικότητα τους σαν GTPασες του Ras [40], και βέβαια την διαφορική τους επίπτωση στην επιμήκυνση των νευριτικών αποφυάδων (Ενότητα 3.4.1), θέσαμε την υπόθεση ότι η ισομορφή GRDI της Νευροϊνιδίνης είναι απαραίτητη για την νευρωνική διαφοροποίηση. Συνεπώς εξετάσαμε την ρύθμιση των μεταγράφων αυτών σε άγριου τύπου SHSY5Y κύτταρα και σε SHSY5Y τα οποία είχαν οδωθεί προς διαφοροποίηση μετά από επώαση 72 ωρών με ρετινοϊκό οξύ (RA 10μM), ένα καλά χαρακτηρισμένο μοντέλο διαφοροποίησης αυτής της κυτταρικής σειράς [183]. Επιπλέον εξετάσαμε την έκφραση των μεταγράφων σε κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν, μετά από διαμόλυνση με σχετικά πλασμίδια, PKCε άγριου τύπου αλλά και την καταλυτική μόνο περιοχή της PKCε. Η μελέτη αυτή έγινε σε σύγκριση με κύτταρα που υπερέκφραζαν τα ίδια τα GRDI και GRDII. Όπως αναφάνεται στην **Εικόνα 18Α** τα SHSY5Y εκφράζουν και τα δύο μετάγραφα σε αναλογία GRDI:GRDII, δηλαδή υπερέχει το GRDII, όπως και στους πρώιμους νευρώνες (**Εικόνα 3**). Το πρώτο σημαντικό εύρημα σε αυτά τα πειράματα ήταν ότι η υπερέκφραση του GRDI δρα κυρίαρχα (dominant negative effect) έναντι του ενδογενούς μετάγραφου GRDII, ενώ η υπερέκφραση GRDII δεν απαλείφει την έκφραση του GRDI, προδιαγράφοντας πιθανό μηχανισμό για την αναστροφή που επίσης βρήκαμε να συμβαίνει με την νευρωνική διαφοροποίηση (**Εικόνα 3**).

Εξ ίσου σημαντική ήταν και η επίδραση της υπερέκφραση τόσο της PKCε άγριου τύπου (WtE), της διαρκώς ενεργού PKCε (CatE), αλλά και η διαφοροποίηση με ρετινοϊκό οξύ (RA), και οι τρεις διαφορετικοί μέθοδοι διαφοροποίησης, είχαν ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της έκφρασης του μετάγραφου GRDI (**Εικόνα 18Α και Β**)

Σχεδόν αντίστροφη ήταν η επίδραση των χειρισμών αυτών στην έκφραση του μετάγραφου που εμπεριέχει το NLS. Πράγματι όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18Α** και στο γράφημα **Εικόνα 18Γ** η έκφραση αυτού του μετάγραφου είναι αντίστροφα ανάλογη με το βαθμό διαφοροποίησης των SHSY5Y κυττάρων νευροβλαστώματος προς νευρώνες, φτάνοντας στην πλήρη απαλοιφή του μετάγραφου με διαφοροποίηση από ρετινοϊκό οξύ. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που είχαν επωαστεί για 72 ώρες με ρετινοϊκό οξύ δεν εξέφραζαν μετάγραφο NLS (η ζώνη στα 179 bp αντιστοιχεί στην έλλειψη του εξωνίου 43, ΔNLS). Αντίθετα η υπερέκφραση του GRDII αύξησε θεαματικά τα επίπεδα του μετάγραφου NLS. Επίσης, η υπερέκφραση τόσο του καταλυτικού τμήματος όσο και ολόκληρης της PKCε μειώνουν δραστικά τα επίπεδα

έκφρασης του μετάγραφου NLS. Πέραν της μηχανιστικής σημασίας του, το εύρημα είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την πορεία των μελλοντικών ερευνών μας αφού για πρώτη φορά έχουμε έναν τύπο κυττάρου το οποίο εκφράζει αποκλειστικά το μετάγραφο GRDI.

Συμπερασματικά, η ευόδωση της διαδικασίας της νευρωνικής διαφοροποίησης στα SHSY5Y κύτταρα είτε μέσω της υπερέκφρασης της PKCε είτε μέσω της παρατεταμένης έκθεσης (72 ώρες) σε ρετινοϊκό οξύ, οδηγεί αντίστοιχα σε μείωση και απαλοιφή των επιπέδων έκφρασης του GRDII και NLS.



Εικόνα 18. Η διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος SHSY5Y προκαλεί την αναστολή έκφρασης των μεταγράφων GRDII και NLS της Νευροϊνιδίνης.

Ολικό RNA απομονώθηκε από SHSY5Y κύτταρα 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση τους με τα πλασμίδια EGFP-GRDI, EGFP-GRDII, HA-WtE, HA-CatE που είχαν επωαστεί 72 ωρών με

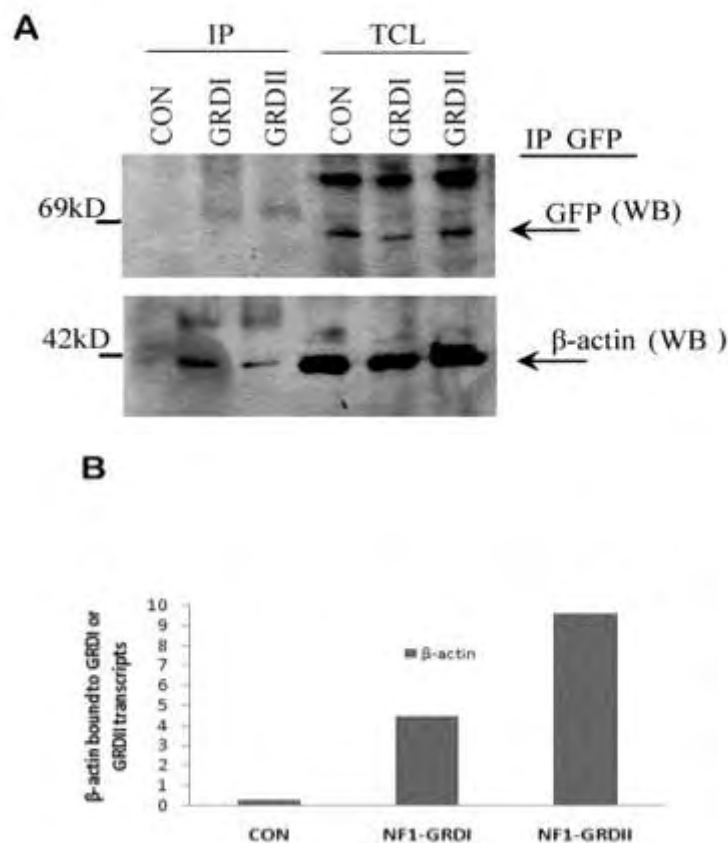
RA. cDNA παράχθηκε χρησιμοποιώντας 2μg RNA και με τη χρήση PCR και ειδικών ανιχνευτών, επέτρεψε να ανιχνεύσουμε για τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων GRDI, GRDII και NLS της Νευροϊνιδίνης. (Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανάλυση της RT-PCR (Β) Επί τοις εκατό αφθονία των μεταγράφων GRDI και GRDII. (Γ) Πυκνομετρική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων NLS/ΔNLS που ομαλοποιήθηκε με την αντίστοιχη μέτρηση των επιπέδων του GADPH. Μόνο μετά από επώαση με ρετινοϊκό οξύ έχουμε ανίχνευση ΔNLS μετάγραφου.

3.5.2. Οι περιοχές της Νευροϊνιδίνης GRDI και GRDII παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα σύζευξης με την ακτίνη.

Όπως έχει δείχθει (Ενότητα 3.4.1.) η υπερέκφραση της GRDI ισομορφής κυρίως, και σε μικρότερο βαθμό της GRDII προκαλούν αύξηση του μήκους των νευριτών σε νεαρούς νευρώνες. Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης και τουμπουλίνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή, αφού ο πολυμερισμός τους προσδίδει δομή, σχήμα αλλά και σταθερότητα στους νευρίτες. Η άμεση συσχέτιση λοιπόν των τμημάτων GRDI και GRDII με την ακτίνη είναι καθοριστικής σημασίας για την μελέτη του μηχανισμού διαφοροποίησης των νευρώνων.

Θέλοντας λοιπόν να διαπιστώσουμε τη συσχέτιση αυτή, και γνωρίζοντας ήδη ότι η σύνδεση της ενδογενούς Νευροϊνιδίνης με την ακτίνη και τους μικροσωλινίσκους ρυθμίζεται κατά την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των νευρώνων, SHSY5Y κύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμίδια EGFP-GRDI και EGFP-GRDII. (Εικόνα 19Α). Στη συνέχεια έγινε δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης και η ανάλυση του αποτελέσματος (Εικόνα 19Β) έδειξε ότι στατιστικά μεγαλύτερη δέσμευση μορίων ακτίνης γίνεται από την GRDII σε σύγκριση με την GRDI.

Συνεπώς, η διαφορετική εικόνα συνεντοπισμού των GRDI και GRDII (Εικόνα 15 και 16), η διαφορετική δράση τους στην στόχευση στις λιπιδικές σχεδίες (όπως προκύπτει από τα πειράματα της ενότητας 3.3.3) και όπως υποδεικνύει η διαφορετική τους έκφραση κατά την εμβρυική τους ανάπτυξη (Ενότητα 3.1.3) υποδηλώνουν ότι τα δύο μεταγγραφα έχουν διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες που οφείλονται στην διαφορετική πρωτογενή τους αλληλουχία.



Εικόνα 19. Η Νευροϊνιδίνη δεσμεύεται στην ακτίνη σε διαφορετικό βαθμό μέσω της GRDI ή της GRDII.

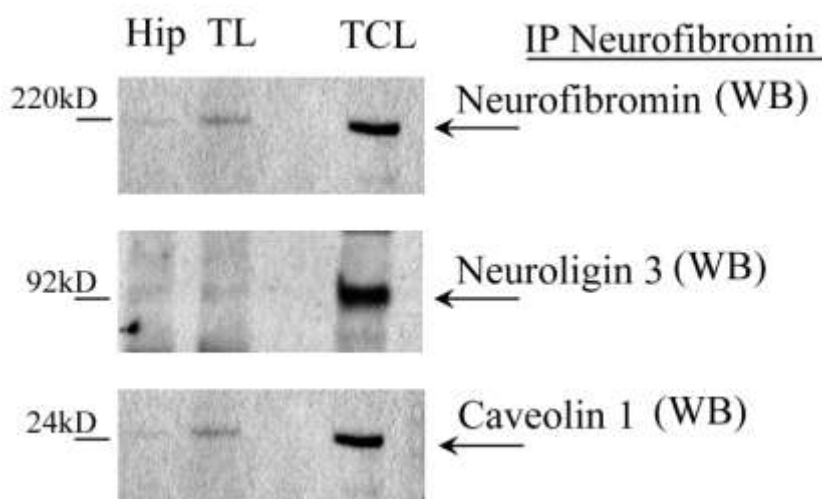
SHSY5Y κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδια που εκφράζουν EGFP-GRDI και EGFP-GRDII και δοκιμάστηκαν με ανοσοκατακρήμνιση συγγένειας χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι της GFP πρωτεΐνης. (A) Εικόνα των επιπέδων έκφρασης της κατακρημνισμένης GFP πρωτεΐνης και των επιπέδων έκφρασης GFP της ολικής πρωτεΐνης (άνω εικονίδιο). Ανοσοαποτύπωση των επιπέδων έκφρασης της συν κατακρημνισμένης β-ακτίνης και των επιπέδων έκφρασης β-ακτίνης της ολικής πρωτεΐνης (κάτω εικονίδιο). (B) Πυκνομετρική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της β-ακτίνης μετά από ομαλοποίηση με τα επίπεδα της έκφρασης της ανοσοκατακρημνισμένης GFP. Η περιοχή GRDII δεσμεύει υπερδιπλάσιο αριθμό μορίων ακτίνης από την GRDI ισομορφή.

3.5.3. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της Νευροϊνιδίνης στον ιππόκαμπο και εγκεφαλικό φλοιό αρουραίου.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η Νευροϊνιδίνη εκτός από της πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού μπορεί να συνδεθεί και με άλλες πρωτεΐνες όπως η Συνδεκάνη -2 [84] ή και Κινεσίνη [83]. Επίσης έχει αναφερθεί ότι η Νευροϊνιδίνη φέρει στην πρωτεϊνική της αλληλουχία μοτίβα ειδικά για την δέσμευση Καβεολίνης. [56]. Η παρουσία της Νευροϊνιδίνης στις λιπιδικές σχεδίες, η άμεση σύνδεση της με την ακτίνη, και η αύξηση της έκφρασης της κατά τη διάρκεια της συναπτογένεσης καθώς και η παρουσία της στις μετασυναπτικές πυκνότητες (PSD) όπως έχει επιβεβαιωθεί από αναλύσεις πρωτεομικής [184] μας ώθησαν να αναζητήσουμε πρωτεΐνες με τις οποίες μπορεί να αλληλεπιδρά. Σαν κριτήριο θέσαμε την έκφρασή τους στην PSD και την αποδεδειγμένη σχέση τους με μαθησιακές δυσκολίες όπως δηλαδή η ίδια η Νευροϊνιδίνη. Μια από τις πρωτεΐνες που επιλέξαμε είναι η πρωτεΐνη Neuroligin 3. Η Neuroligin 3 είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη της συναπτικής μεμβράνης και υπάρχει τόσο σε διεγερτικές όσο και ανασταλτικές συνάψεις ενώ μεταλλάξεις της έχουν σχετιστεί με τον αυτισμό.

Περιοχές ιππόκαμπου και εγκεφαλικών ημισφαιρίων απομονώθηκαν από αρουραίους τεσσάρων ημερών (P4) και τέθηκαν σε δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης με αντίσωμα έναντι της Νευροϊνιδίνης. Στη συνέχεια έγινε ανοσοδοκιμασία κατά Western με αντισώματα που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες Καβεολίνη -1 και Neuroligin 3. Τόσο στο δείγμα ιππόκαμπου όσο και στο δείγμα του εγκεφαλικού φλοιού μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε και τις δυο πρωτεΐνες.

Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει την παρουσία της Νευροϊνιδίνης σε ειδικές περιοχές της πλασματικής μεμβράνης και ειδικότερα σε συναπτικές περιοχές και βέβαια η συσχέτισή της Νευροϊνιδίνης με την Neuroligin 3 για πρώτη φορά στην βιβλιογραφία υποδεικνύει μηχανισμούς για την ανάπτυξη μαθησιακών δυσκολιών.



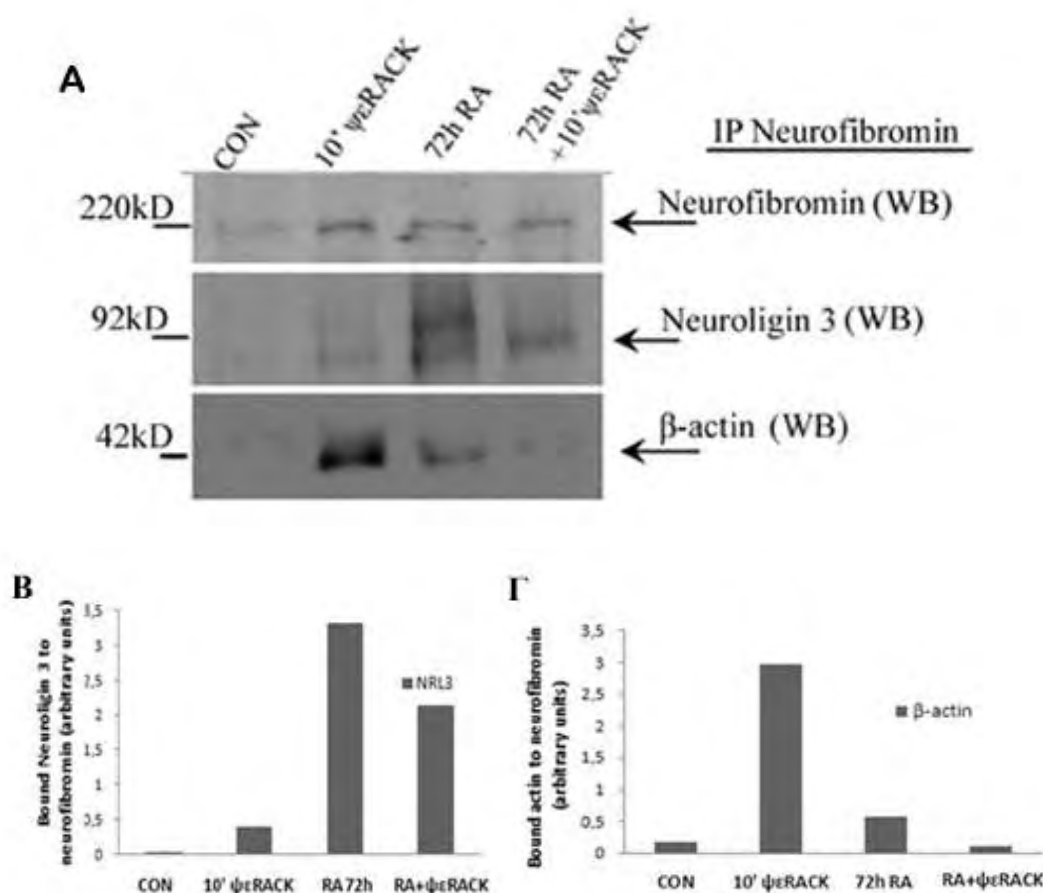
Εικόνα 20. Η Νευροϊνιδίνη δεσμεύει τις πρωτεΐνες Neuroligin 3 και Καβεολίνη 1.

Ιππόκαμποι (Hip) και εγκεφαλικά ημισφαίρια (TL) από αρουραίο τεσσάρων ημερών (P4) ομογενοποιήθηκαν και τέθηκαν σε δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης με αντίσωμα Νευροϊνιδίνης. Στη συνέχεια έγινε ανοσοδοκιμασία με αντισώματα έναντι της Νευροϊνιδίνης, της Neuroligin 3 και της Καβεολίνης. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών σημειώνονται με παύλες.

3.5.4. Η δέσμευση της Νευροϊνιδίνης σε πρωτεΐνες των μετασυναπτικών πυκνοτήτων της προσδίδουν καθοριστικό ρολό στη νευρική διαφοροποίηση και πιθανόν στην λειτουργία των συνάψεων

Η επόμενη επιστημονική ερώτηση που απευθύναμε είχε στόχο να διερευνήσει αν η σύνδεση Νευροϊνιδίνης Neuroligin 3 είναι ρυθμιζόμενη και εάν τα μετάγραφα με ή χωρίς NLS είχαν διαφορετική στόχευση στις PSD. Εκμεταλλευόμενοι ότι το ρετινοϊκό οξύ προκαλεί μεταγραφή του Nf1 με αποκλεισμό του εξωνίου 43 και συνεπώς του NLS, επώασαμε SHSY5Y κύτταρα για 72 ώρες με ρετινοϊκό οξύ και τα συγκρίναμε με άγριου τύπου SHSY5Y.. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με Νευροϊνιδίνη και στη συνέχεια ανοσοδοκιμασία Western με αντισώματα έναντι της Νευροϊνιδίνης, της β-ακτίνης και της Neuroligin 3. Η επώαση για 10 λεπτά με πεπτίδιο ψεRACK οδήγησε σε κατακόρυφη αύξηση του αριθμού των μορίων της ακτίνης που δεσμεύονται από την Νευροϊνιδίνη, ενώ ταυτόχρονα δέσμευσε και ένα πολύ μικρό πλήθος μορίων Neuroligin 3 στα κύτταρα άγριου τύπου. Στα

διαφοροποιημένα με ρετινοϊκό οξύ η εικόνα ήταν ανάστροφη. Στις βασικές συνθήκες η Νευροϊνιδίνη παρουσιάστηκε ήδη δεσμευμένη με ακτίνη και Neuroigin 3. Το ψεRACK είχε ως αποτέλεσμα να αποδεσμευτεί ένα μέρος των μορίων Neuroigin 3 από την Νευροϊνιδίνη, και σχεδόν ολοκληρωτικά η ακτίνη.



Εικόνα 21. Διαφορική δέσμευση της Neuroigin 3 από την Νευροϊνιδίνη τύπου GRDI ΔNLS.

(Α)Ανοσοαποτύπωση της κατακρήμνισης της Νευροϊνιδίνης και συν-κατακρήμνισης των πρωτεϊνών Neuroigin 3 και β-ακτίνης από κύτταρα SHSY5Y άγριου τύπου ή διαφοροποιημένα με ρετινοϊκό οξύ για 72 ώρες. (Β) Πυκνομετρική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της Neuroigin 3 και (Γ) της β-ακτίνης μετά από ομαλοποίηση με τα επίπεδα της έκφρασης της ανοσοκατακρημνισμένης Νευροϊνιδίνης.

Συνεπώς η ικανότητα της Νευροϊνιδίνης να δεσμεύει μόρια της Neuroigin 3 αποτελεί και την πιο ισχυρή ένδειξη ότι υπό συνθήκες νευρωνικής διαφοροποίησης η Νευροϊνιδίνη βρίσκεται στις νευρικές συνάψεις, και ειδικότερα στις περιοχές μετασυναπτικής πύκνωσης. Μάλιστα η παρουσία της αυτή προϋποθέτει

ταλληλεπίδραση αυτή είναι ενεργοποίηση της PKC. Η φυσική ιδιότητα αυτή δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την ύπαρξη GRDI ή NLS, αποδεικνύεται όμως ότι οι διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων είναι ικανές να επάγουν διαφορετική ρύθμιση των πρωτεο-πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της Νευροϊνιδίνης και μάλιστα ρύθμιση από σηματοδοτικές κινάσες. Τα πειράματα αυτά συνεπώς υποδεικνύουν τον μηχανισμό με τον οποίο μπορεί να δρα η Νευροϊνιδίνη σε αναπτυσσόμενους ή ανεπτυγμένους νευρώνες.

3.5.5. Επίδραση EGF σε SHSY5Y διαφοροποιημένα κύτταρα επάγει την ενεργοποίηση της ERK.

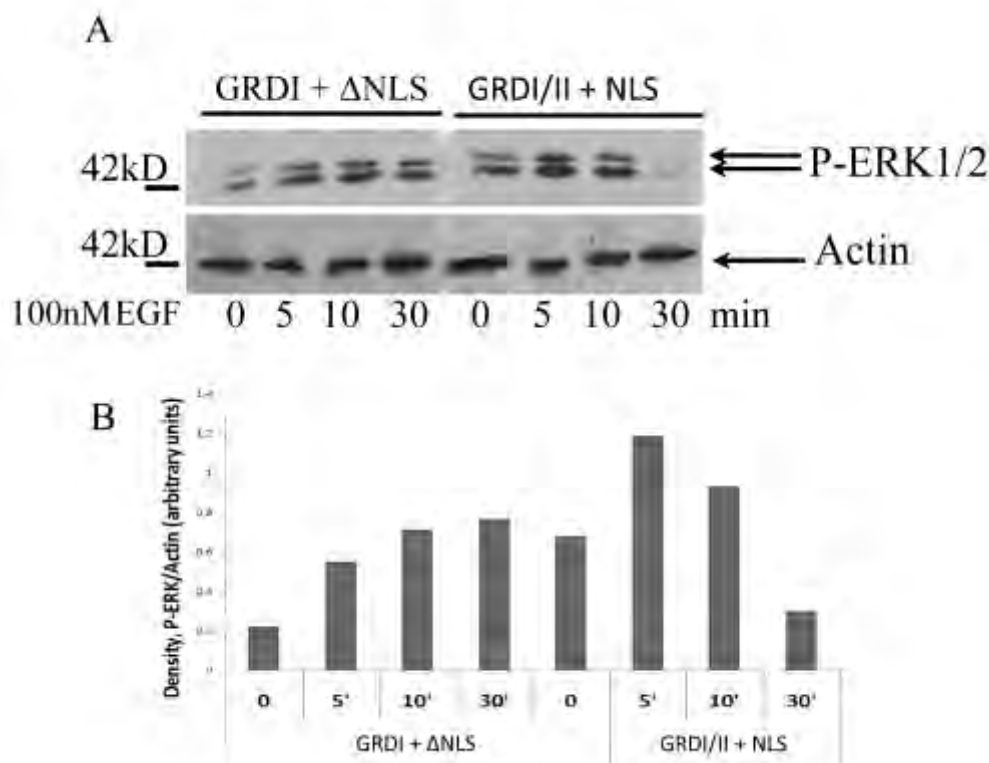
Η τελική σειρά πειραμάτων της διατριβής στόχευσε να συνδέσει τους μηχανισμούς δράσης των διαφορετικών ισομορφών της Νευροϊνιδίνης με τη ρύθμιση σήματος με συγκεκριμένο βιολογικό αποτέλεσμα.

Η πρόσδεση EGF στον υποδοχέα του EGFR έχει ως αποτέλεσμα την μεταφορά ενεργοποιημένης SOS1 στην κυτταρική μεμβράνη και ενεργοποίηση της Ras με επακόλουθη ενεργοποίηση του Ras/Raf/MEK/ERK μονοπατιού. Η Νευροϊνιδίνη αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα του μονοπατιού αυτού, αφού απενεργοποιεί το Ras και ρυθμίζει με τον τρόπο αυτό την ενεργοποίηση της ERK και την επακόλουθη μεταγραφή γονιδίων που οδηγούν το κύτταρο σε διαφοροποίηση ή σε πολλαπλασιασμό. Η επώαση με ρετινοϊκό οξύ επάγει την διαφοροποίηση των SHSY5Y κυττάρων ενώ παράλληλα πραγματοποιείται απαλειφή των ισομορφών GRDII και ισομορφών χωρίς NLS. Στο επόμενο πείραμα εξετάσαμε αν η μεταβολή αυτή στην έκφραση των ισομορφών της Νευροϊνιδίνης προκαλεί μεταβολή στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της ERK.

SHSY5Y κύτταρα επώαστηκαν με ή χωρίς ρετινοϊκό οξύ για 72 ώρες και στη συνέχεια με επιδερμικό αυξητικό παράγοντα EGF για πέντε, δέκα και τριάντα λεπτά. Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 22Α** τα διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσιάζουν μικρή ενεργοποίηση της ERK στα πέντε λεπτά η οποία στη συνέχεια αυξάνεται στα 10 λεπτά, και παραμένει σταθερή για 30 λεπτά. Αντίθετα τα άγριου τύπου SHSY5Y κύτταρα παρουσιάζουν ένα διαφορετικό πρότυπο ενεργοποίησης της ERK. Τα κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ενεργοποίησης της ERK σε φυσιολογικές συνθήκες, (0 λεπτά) ενώ παρατηρείται μέγιστη αύξηση στην ενεργοποίηση της ERK

στα πέντε λεπτά επώασης με EGF. Η ενεργοποίηση αυτή στην συνέχεια μειώνεται σταδιακά στα δέκα λεπτά και φτάνει τα βασικά επίπεδα στα 30 λεπτά.

Συνεπώς η αλλαγή της έκφρασης των ισομορφών της Νευροϊνιδίνης οδήγησε σε μεταβολή της σηματοδότησης της ERK.



Εικόνα 22. Η διαφοροποίηση SHSY5Y κυττάρων νευροβλαστώματος με ρετινοϊκό οξύ οδηγεί σε παρατεταμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης της ERK.

Διαφοροποιημένα και άγριου τύπου κύτταρα SHSY5Y νευροβλαστώματος επώαστηκαν με 100nM EGF για πέντε, δέκα και τριάντα λεπτά. (Α) Ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι της P-ERK1/2 και β-ακτίνης. (Β) Πυκνομετρική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της P-ERK1/2 μετά από ομαλοποίηση με τα επίπεδα της έκφρασης της β-ακτίνης.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η σκιαγράφηση των μηχανισμών ρύθμισης της νευρικής διαφοροποίησης στο κεντρικό νευρικό σύστημα από την Νευροϊνιδίνη, μεταλλάξεις της οποίας προκαλούν μορφολογικές ανωμαλίες στους νευρώνες και μαθησιακές δυσκολίες.

4.1. Μεταγραφική ρύθμιση της Νευροϊνιδίνης κατά την ανάπτυξη.

Η Νευροϊνιδίνη είναι μία μεγάλη κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, της οποίας το πλέον καλά χαρακτηρισμένο τμήμα, GRD, βρίσκεται στο μέσο της πρωτεΐνης, κύρια λειτουργία του οποίου είναι η ρύθμιση της δραστικότητας της Ras πρωτεΐνης. Η μικρού μοριακού βάρους αυτή GTPase λειτουργεί ως μοριακός διακόπτης αλλάζοντας από την ενεργή GTP (Ras-GTP) στην ανενεργή Ras-GDP μορφή. Αρχικά επομένως, μελετήσαμε ενδελεχώς την έκφραση της Νευροϊνιδίνης και την έκφραση της Ras κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του κεντρικού νευρικού συστήματος, χρησιμοποιώντας ως μοντέλο εγκεφαλικό ιστό εμβρύων όρνιθας [170, 171, 180] ώστε να διαπιστώσουμε αφ' ενός την πιθανή ρύθμισή τους από αναπτυξιακούς παράγοντες αλλά και αν ανήκουν στο ίδιο μεταγραφικό πρόγραμμα. Η έκφραση τόσο της Νευροϊνιδίνης όσο και της Ras αυξήθηκε εξελικτικά, το πρότυπο όμως έκφρασης των δυο πρωτεϊνών παρουσίασε διαφορές. (Εικόνα 1). Η έκφραση της Νευροϊνιδίνης στην περιοχή του τελεγκέφαλου και των οπτικών λοβών κορυφώνεται την δέκατη έβδομη εμβρυική ημέρα, συμπίπτει δηλαδή χρονικά με την ολοκλήρωση του πολλαπλασιασμού και την διαφοροποίηση των νευρώνων που οδηγεί στην αρχή της δημιουργίας συνάψεων και νευρωνικών κυκλωμάτων [185, 114, 186, 44]. Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων, όπου η αύξηση της έκφρασης της Νευροϊνιδίνης συμπίπτει με την αρχή της διαφοροποίησης των νευρώνων (E7) και την απαρχή της συναπτογένεσης (E17) [44, 50].

Η έκφραση της Ras, στην περιοχή των οπτικών λοβών, παρουσιάζει μια δραστική αύξηση μέχρι τη δέκατη ημέρα και αργότερα μειώνεται. Η ανάπτυξη των οπτικών

λοβών πραγματοποιείται αρκετά νωρίτερα [188] από ότι εκείνη των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, γεγονός που υποδηλώνει την απαραίτητη αύξηση του αριθμού των νευρωνικών κυττάρων, και συνεπώς τον πολλαπλασιασμό τους, διαδικασία κατά την οποία τα επίπεδα της Ras δραστηριότητας πρέπει να είναι αυξημένα ώστε να επάγουν την ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού [189, 190].

Η μείωση των επιπέδων έκφρασης της Ras γίνεται παράλληλα με την αύξηση των επιπέδων της έκφρασης της Νευροϊνιδίνης και στις δύο περιοχές του εγκεφάλου που μελετήσαμε, στον τελεγκέφαλο και στους οπτικούς λοβούς. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η Νευροϊνιδίνη στα αναπτυξιακά αυτά στάδια διαφοροποίησης, πιθανόν να ρυθμίζει όχι μόνο τη δραστηριότητα της Ras, αλλά μέσα από τις μεταβολές στην διάρκεια και ένταση που επιφέρει στην Ras-εξαρτώμενη σηματοδοτική ενεργοποίηση της ERK, και την μεταγραφή του.

Η GRD περιοχή της Νευροϊνιδίνης υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα και εκφράζει το μετάγραφο GRDI και το GRDII. Το GRDII μετάγραφο περιέχει ένα επιπλέον εξώνιο το 23α μεγέθους 63bp και η παραγόμενη πρωτεΐνη είναι μεγαλύτερη κατά 21 αμινοξέα (2839 αντί 2818 της I). Δεν υπάρχει τρόπος να απομονωθούν διακριτά οι δύο πρωτεΐνες, και οι μελέτες συνεπώς στηρίζονται στην υπερέκφραση της μίας ή της άλλης μορφής καθώς και η συγκριτική τους μελέτη. Η μεγαλύτερη λειτουργική διαφορά που έχει επισημανθεί μεταξύ των δύο, μέχρι στιγμής, αφορά τη δραστηριότητά τους έναντι της Ras, αφού έχει αποδειχθεί ότι η GRDI ισομορφή εμφανίζει μεγαλύτερη RasGAP δραστηριότητα έναντι της GRDII [82, 81, 191, 192]

Η ανάλυση της έκφρασης του αθροίσματος των δύο αυτών ισομορφών κατά τα ίδια αναπτυξιακά στάδια επαληθεύει την έκφραση της πρωτεΐνης, όμως η μεταξύ τους σχέση διαφέρει. Συγκεκριμένα, στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια, την έβδομη εμβρυϊκή ημέρα, όπου οι νευρώνες μόλις έχουν ολοκληρώσει μόνιμα τον κύκλο του πολλαπλασιασμού και αρχίζουν να διαφοροποιούνται, επικρατεί η ισομορφή GRDII. Στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, όπου τα νευρικά κύτταρα αρχίζουν να αποκτούν νευρίτες και χαρακτηριστικές μορφολογικές διαφορές [176] κυριαρχεί η ισομορφή GRDI, με κορύφωση τη δέκατη ένατη ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης, κατά την οποία η έκφρασή του είναι πέντε φορές μεγαλύτερη έναντι της GRDII. (Εικόνα 3)

Η ρύθμιση της δραστηριότητας της Ras από τις περιοχές της Νευροϊνιδίνης GRD I ή II έχει ως αποτέλεσμα την επακόλουθη διαφορική ρύθμιση του μονοπατιού της ERK. Η ρύθμιση του μονοπατιού αυτού είναι ιδιαίτερα σημαντική, αφού υψηλά επίπεδα ενεργοποίησης της ERK μπορεί να προκαλέσουν ανωμαλίες στη δημιουργία διεγερτικών συνάψεων αλλά και να εμποδίσουν την ανάπτυξη ώριμων δενδριτικών ακάνθων σε φλοιϊκούς νευρώνες [193]. Αντίθετα, χαμηλά επίπεδα έκφρασης της ERK, για παρατεταμένη διάρκεια ενεργοποίησης, οδηγούν σε διαφοροποίηση [194]. Επομένως, η επικράτηση του μετάγραφου GRDII τις πρώτες μέρες της εμβρυικής ανάπτυξης βοηθά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ενώ αργότερα η επικράτηση του μετάγραφου GRDI, με την παράλληλη χαμηλή έκφραση του GRDII, βοηθούν τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων, χωρίς όμως να διακόπτεται και ο πολλαπλασιασμός των μιτωτικών κυττάρων του ΚΝΣ που εν τω μεταξύ αρχίζουν να δημιουργούνται στον εγκεφαλικό ιστό, δηλαδή των αστροκυττάρων και ολιγοδενδοκυττάρων [195].

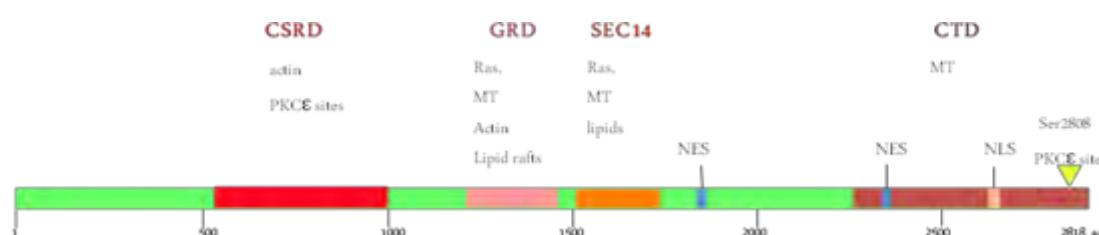
Η επικράτηση της έκφρασης του GRDI κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης επιβεβαιώθηκε και με την επώση SHSY5Y κυττάρων νευροβλαστώματος με ρετινοϊκό οξύ, ένα εκτενώς χαρακτηρισμένο φαρμακολογικό μοντέλο νευρωνικής διαφοροποίησης [196, 183]. Μάλιστα το GRDI μετάγραφο επικρατεί πλήρως (dominant negative effect) έναντι του GRDII, το οποίο δεν εμφανίζει ανάλογη δράση (Εικόνα 18). Ταυτόχρονα, ανάλογη αύξηση του GRDI ανιχνεύτηκε και με την επίδραση της PKCε. κινάσης που επίσης προάγει την διαφοροποίηση [114, 197, 198, 199, 200, 201].

Η επικράτηση του μεταγράφου GRDI που παρατηρήσαμε έχει διαπιστωθεί και για τον υποδοχέα σεροτονίνης τύπου 3 στα εμβρυονικά κύτταρα καρκινώματος P19 επίσης μετά από επίδραση ρετινοϊκού οξέος [202]. Είναι όμως η πρώτη φορά που ο μηχανισμός αυτός που υποδεικνύεται, δηλαδή η δράση της GRDI είτε μέσω ERK σηματοδότησης και γονιδιακής ρύθμισης στην περίπτωση του Ras, είτε από πρωτεο-πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις πάνω στο μηχανισμό εναλλακτικού ματίσματος □ [203, 204] στην περίπτωση της GRDII, προκύπτει από μελέτες σε πρωτογενείς νευρώνες και εγκεφαλικό ιστό.

4.2. Μηχανισμός και σημασία υποκυτταρικής στόχευσης της Νευροϊνιδίνης

Ένα πολύ σημαντικό στοιχείο για την λειτουργία της Νευροϊνιδίνης αποδεικνύεται να είναι ο υποκυτταρικός εντοπισμός της. Η Νευροϊνιδίνη ήταν γνωστή αρχικά με την κλωνοποίηση του γονιδίου της το 1990, ως κυτταροπλασματική πρωτεΐνη. Μελέτες όμως διαπιστώσαν τον εντοπισμό της στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στα οργανίδια Golgi, σε μιτοχόνδρια [48], σε μελανοσώματα, [49], καθώς και σε περιοχές της πλασματικής μεμβράνης [47, 205].

Επίσης, αποδείχθηκε ότι η Νευροϊνιδίνη προσδένεται στην ακτίνη [44]. κατά τα πρώτα στάδια της νευρωνικής διαφοροποίησης, ενώ στα όψιμα στάδια η πρόσδεση αυτή χάνεται σχεδόν πλήρως. Αντίθετα, η πρόσδεση της Νευροϊνιδίνης στην τουμπουλίνη είναι σταθερή σε κάθε στάδιο της ανάπτυξης (Εικόνα 5). Η πρόσδεση της Νευροϊνιδίνης στα συστήματα του κυτταροσκελετού, ακτίνης και μικροσωληνίσκων, ρυθμίζεται από την έκφραση των μεταγράφων της πρωτεΐνης. Η δέσμευση της ακτίνης είναι μεγαλύτερη στα αναπτυξιακά στάδια που υπερέχει η έκφραση του GRDII, όμως με την παράλληλη μείωση της έκφρασης του και την ταυτόχρονη άνοδο της έκφρασης της ισομορφής GRDI, η Νευροϊνιδίνη αποδεσμεύεται από την ακτίνη και συνεντοπίζεται με την τουμπουλίνη (Εικόνα 17).



Σχήμα 10 Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνικών μοτίβων της Νευροϊνιδίνης και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με αυτά

Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της πρωτοταγούς δομής της Νευροϊνιδίνης είναι ότι διαθέτει και ένα ειδικό μοτίβο NLS (Nuclear Localization Signal), το οποίο περιέχει το εξώνιο 43 και της επιτρέπει να εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου [44, 60]. Η

ανίχνευση της Νευροϊνιδίνης σε ολικό πυρηνικό κλάσμα (Εικόνα 3 Α) καθώς και η ανάλυση της έκφρασης του μετάγραφου NLS κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης έδειξε ότι αυξάνει, όμως με την ευόδωση της διαφοροποίησης πολλά μόρια της Νευροϊνιδίνης, κυρίως μετά την δέκατη έβδομη εμβρυική ημέρα, δεν φέρουν την συγκεκριμένη αλληλουχία (Dex43/ΔNLS), δημιουργώντας προφανώς δύο πληθυσμούς που έχουν ή δεν έχουν πρόσβαση στον πυρήνα. Η ισομορφή της πρωτεΐνης που περιέχει την αλληλουχία NLS δεν ανιχνεύεται σε ιστούς που δεν εμπλέκονται στην παθολογία της ασθένειας [66]. Για πρώτη φορά όμως χρησιμοποιώντας αμιγώς νευρώνες δείξαμε ότι εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα και επιπλέον ότι και αυτό ρυθμίζεται με την διαφοροποίηση των νευρώνων. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι ο πυρηνικός εντοπισμός της Νευροϊνιδίνης είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την ρύθμιση της λειτουργίας της (Εικόνα 3Γ).

Η διαπίστωση αυτή επαναλήφθηκε και σε SHSY5Y κύτταρα όταν η επώαση με τρεις παράγοντες διαφοροποίησης, δηλαδή ρετινοϊκό οξύ, άγριου τύπου PKCε και PKCε που εκφράζει μόνο το καταλυτικό της τμήμα, μείωσε δραματικά και στην περίπτωση του ρετινοϊκού οξέως εξάλειψε το μετάγραφο NLS (Εικόνα 18Γ) [206]. Συνεπώς αποδείξαμε ότι η Νευροϊνιδίνη προσαρμόζει την έκφραση των ισομορφών της ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης του κυττάρου. Η αύξηση της έκφρασης του GRDI και ταυτόχρονη μείωση του NLS που την μεταφέρει στον πυρήνα αποτελούν ενδείξεις διαφοροποίησης.

Η ανίχνευση της Νευροϊνιδίνης σε νευρικά κύτταρα ανέδειξε ότι εκτός από τον πυρήνα μπορεί να ανιχνευτεί και σε ειδικές μικροπεριοχές της πλασματικής μεμβράνης εμπλουτισμένες σε φωσφολιπίδια, σφιγγομυελίνη και χοληστερόλη, γνωστές και ως λιπιδικές σχεδίες (Εικόνα 6) [207, 208, 209]. Οι μικροπεριοχές αυτές αποτελούν κομβικά σημεία για την μεταγωγή του σήματος από τους υποδοχείς προς τους αντίστοιχους τελεστές στο εσωτερικό των κυττάρων [210].

Η στόχευση της Νευροϊνιδίνης στις λιπιδικές σχεδίες κατά τη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης έδειξε ότι η κατανομή της είναι και αυτή αποτέλεσμα της έκφρασης των δύο περιοχών της πρωτεΐνης GRDI και GRDII. Η Νευροϊνιδίνη στους νευρώνες εκφράζεται κυρίως ως GRDI και κατανέμεται κυρίως στις λιπιδικές σχεδίες, όμως η Νευροϊνιδίνη των αστροκυττάρων φέρει μόνο την περιοχή GRDII και κατανέμεται κυρίως σε κλάσματα πλούσια σε πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου και των

οργανιδίων Golgi (Εικόνα 9) [152, 211]. Η διαφορά στην κατανομή αυτή επιβεβαιώθηκε με υπερέκφραση των επικρατειών GRDI και GRDII καθώς και με τη SEC14 επικράτεια της Νευροϊνιδίνης, η οποία έχειδειχθεί ότι δεσμεύει λιπίδια [212, 58]. Η κατανομή της ενδογενούς πρωτεΐνης σε κύτταρα που υπερέκφραζαν GRDI έδειξε μεγαλύτερη συγγένεια με τις λιπιδικές σχεδίες σε σχέση με το GRDII, ενώ η υπερέκφραση του SEC14 οδήγησε την ενδογενή πρωτεΐνη προς τις ενδοκυτταρικές μεμβράνες (Εικόνα 9). Συνεπώς η GRDI έδειξε μεγαλύτερη συγγένεια από την II για τα πυκνότερα κλάσματα, ενώ η SEC14 έδειξε συγγένεια για τα πρώτα κλάσματα.

Η απομόνωση των λιπιδικών σχεδίων, η οποία έγινε χωρίς τη χρήση απορρυπαντικών, επιτρέπει την παράλληλη απομόνωση της ακτίνης ως μίας λειτουργικής ομάδας με τις λιπιδικές σχεδίες. Οι πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης μπορεί να βρίσκονται μόνιμα έξω από τις λιπιδικές σχεδίες, να εισέρχονται ή να εξέρχονται αλλά και να βρίσκονται μόνιμα πάνω σε αυτές. Πρωτεΐνες που αποτελούν δείκτες παρουσίας λιπιδικών σχεδίων είναι μεταξύ άλλων και η Φλοτιλλίνη-1 [213]. Αυτό μας επέτρεψε για πρώτη φορά την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών Ανεξίνη A2 A6 και A7 στις λιπιδικές σχεδίες με τη χρήση πρωτεομικής (Πίνακας 3). Έχειδειχθεί ότι η αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου και φωσφορυλίωση της Ανεξίνης 2 από την PKC [214] προκαλεί την μεταφορά της στις λιπιδικές σχεδίες. Η μετακίνηση αυτή αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την σύζευξη των λιπιδικών σχεδίων που οδηγούν στη ρύθμιση του μονοπατιού εξωκύττωσης κυστιδίων σε χρωμιόφιλα κύτταρα [215].

Οι πρωτεΐνες που μπορούν να συνδεθούν με τις λιπιδικές σχεδίες συχνά φέρουν στο μόριο τους κατάλληλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με λιπίδια όπως παλμιτοϋλίωση [216, 217, 218] πχ η διαμεμβρανική πρωτεΐνη β-σεκρετάση [219, 220] φαρνεξυλίωση πχ Ras [221], μυριστοϋλίωση πχ MARCKS [222] αλλά και μοτίβα δέσμευσης χοληστερόλης όπως ο σίγμα 1 υποδοχέας [223].

Πράγματι με *in silico* ανάλυση διαπιστώσαμε την ύπαρξη συγκεκριμένου μοτίβου δέσμευσης χοληστερόλης στην περιοχή του GRDI (1365-1379aa) [VCHCLYQVVSQR] αλλά όχι σε αυτήν του GRDII. Η θέση του μοτίβου αυτού βρίσκεται στο σημείο εναλλακτικού ματίσματος της GRDII. Η εισαγωγή των 21 πρόσθετων αμινοξέων διαταράσσει την αλληλουχία των αμινοξέων εκείνων του

μοτίβου και έτσι χάνεται η ικανότητα δέσμευσης χοληστερόλης από την επικράτεια GRDII.

Συνεπώς, η έκφραση των GRDI και GRDII μπορεί επιπλέον της διαφορετικής δραστηριότητας που εμφανίζουν έναντι της Ras να ορίζουν σε μεγάλο βαθμό και την κατανομή της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της νευρικής ανάπτυξης, και συνεπώς να επηρεάζουν διαφορετικά τα σχετικά με τη διαφοροποίηση σηματοδοτικά μονοπάτια που ξεκινούν από τις λιπιδικές σχεδίες. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η ακεραιότητα των λιπιδικών σχεδιών είναι απαραίτητη για τη σηματοδότηση που ρυθμίζει την δενδριτογένεση και την επιμήκυνση των αξόνων μέσω του νευρωνικού μορίου κυτταρικής προσκόλλησης (NCAM) [224] και την ταυτόχρονη φωσφορυλίωση της Fyn. Ακόμα η Ασιμάκη et al., απέδειξε ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα CB1R και η δημιουργία σύμπλοκων μεταξύ CB1R-Src-FGFR και η επακόλουθη ενεργοποίηση της ERK οδώνουν τη νευρική διαφοροποίηση [160].

Ειδικά για τη σηματοδότηση μέσω Ras, η παρουσία της Νευροϊνιδίνης στις λιπιδικές σχεδίες της προσδίδει ένα επιπλέον πλεονέκτημα. Είναι γνωστό από μελέτες που έχουν διεξαχθεί ότι η ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της Ras λαμβάνει χώρα στις λιπιδικές σχεδίες [225]. Άρα, το μικροπεριβάλλον αυτό της κυτταρικής μεμβράνης αποτελεί το χώρο στον οποίο η Νευροϊνιδίνη διατελεί την κύρια και πιο καλά μελετημένη λειτουργία της, την αναστολή δραστηριότητας της Ras. Επίσης, προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η Νευροϊνιδίνη φωσφορυλιώνεται από την PKCε και ενισχύει με τον τρόπο αυτό την RasGAP δραστηριότητά της [50]. Η παρουσία λοιπόν και των τριών αυτών μορίων σε συγκεκριμένο χώρο-χρόνο μέσα στο κύτταρο έχει ιδιαίτερη σημασία. Η ενεργοποίηση της PKCε μέσω του ειδικού πεπτιδίου ψεRACK προκάλεσε την άμεση μετατόπιση της πρωτεΐνης από το ενδοπλασματικό δίκτυο στις λιπιδικές σχεδίες όπου προκάλεσε την φωσφορυλίωση της Νευροϊνιδίνης αλλά και ταυτόχρονα την ενεργοποίηση της Ras (Εικόνα 10) μέσω φωσφορυλίωσης της Sos1 και άμεση απομάκρυνση της από τις λιπιδικές σχεδίες (Εικόνα 13) [226]. Βρήκαμε ότι η ενεργοποίηση της PKCε οδήγησε στη συγκέντρωση ενεργών μορίων, Sos1, Νευροϊνιδίνη, και Ras, στις λιπιδικές σχεδίες, στοιχείο που οδηγεί στη δημιουργία μεγαλύτερων σχηματισμών (σηματοσωμάτων) στην πλασματική μεμβράνη και ελεγχόμενη μεταγωγή σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου προς τον πυρήνα. Η μεταγωγή αυτή συνήθως πραγματοποιείται με τη

βοήθεια του υποκείμενου κυτταροσκελετού. Η PKCε είναι η μόνη ισόμορφη από την οικογένεια των PKC, η οποία διαθέτει μοτίβο δέσμευσης της ακτίνης [227]. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η αλληλεπίδραση της Νευροϊνιδίνης με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης ενισχύεται μετά τη φωσφορυλίωσή της από την PKCε [50]. Η φωσφορυλίωση της Sos από την PKCε είναι άμεση αφού έχει δείχθει ότι η PKC μπορεί να ενεργοποιήσει τις RasGEFs [182] χωρίς να απαιτείται η ενεργοποίηση του EGFR υποδοχέα και του Shc/Grb2/Sos μονοπατιού.

4.3. Νευροϊνιδίνη και νευρωνική διαφοροποίηση.

Όπως έχουμε αναφέρει στην Εισαγωγή (1.4.7) η νοητική δυσλειτουργία που εμφανίζεται στις μαθησιακές δυσκολίες και τη νοητική στέρηση, συμπτώματα που προκύπτουν από την ασθένεια της Νευροϊνωμάτωσης, είναι κατά κύριο λόγο ανωμαλία στον αριθμό, ή και τη δομή των δενδριτών και των ακανθών τους [228, 107, 229]. Για τη διερεύνηση λοιπόν αυτού του ρόλου της Νευροϊνιδίνης στραφήκαμε στους μηχανισμούς που ελέγχουν τις παραπάνω διαδικασίες.

Πρωταρχικό ρόλο στην επιμήκυνση των νευριτών και την εμφάνιση δενδριτών διαδραματίζει ο κυτταροσκελετός της ακτίνης και στη συνέχεια οι μικροσωληνίσκοι που στηρίζουν και δίνουν το τελικό σχήμα στους νευρίτες. Η Νευροϊνιδίνη ανοσοκατακρημνίστηκε από εγκεφαλικό ιστό σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και διαπιστώθηκε ότι η σύνδεση της με τα ινίδια της ακτίνης ανιχνεύεται μόνο σε νεαρούς νευρώνες, ενώ κατά την πορεία της ανάπτυξης και διαφοροποίησης δεσμεύεται με την τουμπουλίνη και συνεντοπίζεται στους μικροσωληνίσκους. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνει προηγούμενες έρευνες, με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας και σύμφωνα με τις οποίες η Νευροϊνιδίνη συνεντοπίζεται σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων με ινίδια ακτίνης και μικροσωληνίσκους αλλά όχι με ενδιάμεσα ινίδια [44]. Ακόμα, πρόσφατες έρευνες από το εργαστήριό μας απέδειξαν ότι η Νευροϊνιδίνη κατά τη διάρκεια της μίτωσης δεσμεύεται με τους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου (Κολιού υπο δημοσίευση). Ακόμα η ενδογενής Νευροϊνιδίνη, και ειδικότερα η επικράτεια SEC14 έχει ανιχνευτεί με την μορφή κυστιδίων στους μικροσωληνίσκους και της ενδοκυτταρικές μεμβράνες [65].

Έχοντας δείξει ότι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης υπάρχει ρύθμιση των ισομορφών GRDI και GRDII της Νευροϊνιδίνης, εξετάσαμε αν η μεταβολή αυτή σχετίζεται με την αλλαγή στον εντοπισμό της στα δύο διαφορετικά αυτά κυτταροσκελετικά συστήματα.

Ο συνεντοπισμός του GRDII με την ακτίνη ανιχνεύεται κυρίως στους αυξητικούς κώνους νεαρών νευρώνων, δηλαδή την περιοχή εκείνη που είναι υπεύθυνη για την αύξηση του μήκους των νευριτών σε ερεθίσματα του εξωτερικού περιβάλλοντος. Επίσης, ο μεγαλύτερος συνεντοπισμός του GRDII με την ακτίνη βρίσκεται στα σημεία προσκόλλησης στο υπόστρωμα που αποτελούν σημεία έναρξης διακλαδώσεων (Εικόνα 15). Και τα δυο αυτά σημεία στα οποία ανιχνεύτηκε η παρουσία του GRDII είναι ιδιαίτερα σημαντικά, αφού είναι πιθανό η Νευροϊνιδίνη με τη συμμετοχή και άλλων μορίων να προκαλέσει αλλαγές στη δυναμική ισορροπία πολυμερισμού της ακτίνης, συμμετέχοντας έτσι ενεργά στη διαφοροποίηση των νευρώνων.

Αντίθετα, η ισομορφή GRDI εμφάνισε διαφορετική κατανομή στο κυτταροσκελετικό σύστημα, αφού συνεντοπίστηκε κυρίως με τους μικροσωληνίσκους, ενώ δείχνει να συσσωρεύεται και γύρω από τον πυρήνα (Εικόνα 16). Ο συνεντοπισμός της Νευροϊνιδίνης με τον κυτταροσκελετό των μικροσωληνίσκων είναι επίσης ιδιαίτερα σημαντικός. Η ανάπτυξη των αποφυάδων που οδηγεί στην διαφοροποίηση απαιτεί την κίνηση δομικών λίθων, όπως οι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες και τα μεμβρανικά κυστίδια, από το κυτταρικό σώμα στον αυξητικό κώνο. Η κίνηση αυτή γίνεται με ενεργό μεταφορά, κατά την οποία οι μικροσωληνίσκοι, δρουν ως ράγες για να οδηγήσουν τα «φορτία» στον προορισμό τους. Το φορτίο μπορεί να είναι κάποια πρωτεΐνη, κυστίδια, οργανίδια, ακόμα και mRNA. Τα μόρια αυτά μετακινούνται με τη βοήθεια κινητήριων πρωτεϊνών, όπως είναι η Κινεσίνη και η Δυνεΐνη, κατά μήκος των μικροσωληνίσκων, και η Μυοσίνη, κατά μήκος των νηματίων ακτίνης. Ο συνεντοπισμός της Νευροϊνιδίνης στα κυτταροσκελετικά συστήματα και τον πυρήνα, καθώς και η διαπίστωση ότι μπορεί να συνδεθεί με μόρια Κινεσίνης [83], την καθιστούν πιθανή πρωτεΐνη που μπορεί να λειτουργεί ως μεταφορέας δομικών λίθων από τον πυρήνα στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων.

Στη συνέχεια, γνωρίζοντας ότι η ισομορφή GRDI της Νευροϊνιδίνης είναι κυρίαρχο κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης, εξετάστηκε η πιθανή επίδρασή του στο

φαινότυπο ώριμων νευρώνων (Εικόνα 14). Η υπερέκφραση και των δύο GRD ισομορφών οδήγησαν στην αύξηση του μήκους νευριτών πρώιμων νευρώνων. Η GRDI προκάλεσε 68% και 44% μεγαλύτερη αύξηση από το μάρτυρα και από την GRDII αντίστοιχα. Η γρήγορη και συνεχής απενεργοποίηση της Ras από RasGTP σε RasGDP που προκαλείται λόγω της έντονης παρουσίας της GRDI μπορεί να οδηγεί στην αύξηση του ρυθμού διαθεσιμότητας της ενεργής Ras και στην επακόλουθη ταχεία ενεργοποίηση του Ras/Raf/ERK μονοπατιού που οδηγεί στην αύξηση του μήκους των νευριτών [230].

Συνθέτοντας όλα τα παραπάνω μπορούμε να καταλήξουμε ότι η Νευροϊνιδίνη είναι μία μετα-μεταφραστικά κινητή πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια που οδώνουν τη νευρωνική διαφοροποίηση. Έχει την ικανότητα να συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους και τα ινίδια της ακτίνης αλλά και να μπορεί να διακινείται μεταξύ του πυρήνα και των λιπιδικών σχεδίων. Η ιδιότητά της αυτή εξαρτάται τουλάχιστον από τις επικράτειες GRDI και GRDII και τα πειράματά μας παρέχουν απόδειξη ότι τα δύο μετάγραφα έχουν διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες που οφείλονται στη διαφορετική πρωτογενή τους αλληλουχία.

Σε συνδυασμό με τα ευρήματά μας για παρουσία της Νευροϊνιδίνης στην άκρη των νευριτών και την ανίχνευσή της σε περιοχές μετασυναπτικής πυκνότητας (PSD) με τη χρήση πρωτεομικής [184], αποφασίσαμε να διερευνήσουμε πιθανή σύνδεση της Νευροϊνιδίνης με πρωτεΐνες της PSD. Διαλέξαμε να μελετήσουμε πρωτεΐνες της PSD, οι οποίες έχουν αποδεδειγμένη σχέση με μαθησιακές δυσκολίες όπως η Νευροϊνιδίνη και συγκεκριμένα τη Neuroligin 3, το γονίδιο της οποίας είναι το πρώτο που έχει συνδεθεί αιτιολογικά με τον αυτισμό [231].

Σε δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης Νευροϊνιδίνης από ιστό ιππόκαμπου αρουραίου ανιχνεύσαμε την Neuroligin 3. Αυτή είναι και η πρώτη φορά που συνδέονται οι δύο αυτές πρωτεΐνες (Εικόνα 20).

Η αλληλεπίδραση των δύο αυτών πρωτεϊνών ισχυροποιήθηκε όταν πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση της PKCε σε SHSY5Y κύτταρα νευροβλαστώματος (Εικόνα 21). Η ενεργοποίηση αυτή επιβεβαίωσε ταυτόχρονα και την ικανότητα της Νευροϊνιδίνης να δεσμεύει μόρια ακτίνης όταν φωσφορυλιώνεται [50]. Η περαιτέρω διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών με ρετινοϊκό οξύ αύξησε την

αλληλεπίδραση μεταξύ Νευροϊνιδίνης και Neuroligin 3 επισημαίνοντας ότι τα μόρια της Νευροϊνιδίνης που ανιχνεύονται στις μετασυναπτικές πυκνώσεις διαθέτουν GRDI αλλά όχι NLS.

Η τελευταία πειραματική παρατήρηση αφορά τη διαφορετική κινητική της ενεργοποίησης της ERK που ανιχνεύτηκε μετά από επώαση διαφοροποιημένων και μη κυττάρων SHSY5Y, μετά από την επίδραση EGF. Στα άγριου τύπου κύτταρα η φωσφορυλίωση της ERK ήταν άμεση (acute), ενώ στα διαφοροποιημένα με ρετινοϊκό οξύ κύτταρα, η φωσφορυλίωση της ERK είχε πολύ μεγαλύτερη διάρκεια (Εικόνα 22). Η διαφορετική ενεργοποίηση του Ras-ERK μονοπατιού έχει ως αποτέλεσμα και την διαφορετική ενεργοποίηση γονιδίων που μπορεί να ευνοούν είτε τον πολλαπλασιασμό είτε τη διαφοροποίηση [232, 55], όπως την αύξηση του μήκους των νευρώνων. Συνεπώς, η παρουσία μόνο του μετάγραφου GRDI επαληθεύει την ιδιότητά του να επάγει τη νευρική διαφοροποίηση.

Η συλλογή όλων αυτών των στοιχείων για την λειτουργία της Νευροϊνιδίνης και ειδικότερα για τις περιοχές GRDI και GRDII, όπως η ρύθμιση μεταγωγής σήματος, ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους αλλά και οι διαφορετικές βιολογικές τους δράσεις, τους προσδίδουν ένα σαφή διαφορετικό ρόλο στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων του ΚΝΣ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να σκιαγραφήσουμε τους μηχανισμούς ρύθμισης της νευρικής διαφοροποίησης στο ΚΝΣ από την πρωτεΐνη Νευροϊνιδίνη, μεταλλάξεις της οποίας προκαλούν μαθησιακές δυσκολίες. Η Νευροϊνιδίνη είναι μία RasGAP πρωτεΐνη, κύρια λειτουργία της οποίας είναι η ρύθμιση της δραστηριότητας της Ras. Αρχικά μελετήθηκε η έκφραση της Νευροϊνιδίνης και της Ras κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης του ΚΝΣ χρησιμοποιώντας πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων από τελεγκέφαλο εμβρύου όρνιθας. Οι δύο πρωτεΐνες ρυθμίζονται εξελικτικά με διαφορετικό όμως πρότυπο. Η Νευροϊνιδίνη ρυθμίζει τη δραστηριότητα της Ras και πιθανόν και τη μεταγραφή της, μέσα από τις μεταβολές στη διάρκεια και ένταση που επιφέρει στην Ras-εξαρτώμενη σηματοδοτική ενεργοποίηση της ERK. Η ανάλυση της έκφρασης των μεταγράφων GRDI και GRDII της Νευροϊνιδίνης ακολουθεί το πρότυπο της πρωτεΐνης, όμως η έκφραση του GRDI αυξάνει έναντι του GRDII κατά τη διαφοροποίηση. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε και με χρήση κυττάρων νευροβλαστώματος μετά την επίδραση παραγόντων διαφοροποίησης, όπως ρετινοϊκό οξύ και PKCε. Ταυτόχρονα μελετήθηκε και η έκφραση του μεταγράφου NLS υπεύθυνου για την μεταφορά της πρωτεΐνης στον πυρήνα. Το μετάγραφο αυτό είναι αναπτυξιακά ρυθμιζόμενο ενώ κατά τη διαφοροποίηση τείνει να εξαλείφεται. Επιπλέον προσδιορίστηκε η υποκυτταρική κατανομή της Νευροϊνιδίνης, η οποία εντοπίστηκε σε πολλαπλά μέρη του κυττάρου όπως στο κυτταροσκελετό ακτίνης και μικροσωληνίσκων και στις λιπιδικές σχεδίες. Ειδικότερα, η παρουσία της στις λιπιδικές σχεδίες παρουσίασε διαφορετική κατανομή κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Επίσης διαπιστώθηκε ότι η Νευροϊνιδίνη μεταφέρεται στις λιπιδικές σχεδίες μετά από φωσφορυλίωση από την PKCε, στις οποίες και αναστέλλει τη δραστηριότητα του Ras. Η δέσμευση των GRDI και GRDII, περιοχών της Νευροϊνιδίνης στα κυτταροσκελετικά συστήματα, παρουσίασε ακόμα μια διαφορά μεταξύ των δυο περιοχών, το GRDII μπορεί και δένεται με την ακτίνη, ενώ το GRDI σχεδόν αποκλειστικά με τους μικροσωληνίσκους. Γνωρίζοντας ότι η ισομορφή GRDI είναι κυρίαρχη κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, εξετάστηκε η πιθανή επίδρασή της στο φαινότυπο ώριμων νευρώνων, όπου και προκάλεσε σημαντική αύξηση του μήκους του κύριου νευρίτη. Οι σαφείς διαφορές που παρουσιάζουν οι δύο ισομορφές καθώς και ο εντοπισμός τους στις άκρες των νευριτών μας προέτρυναν να εξετάσουμε

την πιθανή αλληλεπίδραση της Νευροϊνιδίνης με πρωτεΐνες της PSD. Κατά την επίδραση παραγόντων διαφοροποίησης παρατηρήθηκε σύνδεση της με την πρωτεΐνη Neuroligin 3. Επομένως, ο μηχανισμός δράσης των ισομορφών της Νευροϊνιδίνης οδηγεί σε διαφορετική σηματοδότηση με συγκεκριμένο βιολογικό αποτέλεσμα

SUMMARY

In the present study we explored the role of neurofibromin, mutations of which cause learning difficulties. Neurofibromin is a GTPase Activating Protein (GAP) that has been shown to regulate the activity of Ras. Located primarily in the brain, neurofibromin expression levels are high in neurons and astrocytes and lower in oligodendrocytes. We initially studied the expression of neurofibromin and H-Ras during differentiation of the Central Nervous System to investigate whether these two proteins belong to the same transcription program and identify possible regulation by growth factors. We showed that both neurofibromin and H-Ras are developmentally regulated, but in a different manner. Neurofibromin regulates Ras activity and transcription by changing the duration and intensity of the Ras-dependent ERK activation. Next, we assessed the expression of GRDI and GRDII transcripts of neurofibromin that present differential RasGAP activity. We found that although the sum of the two transcripts change similarly to the protein, GRDI expression preferentially increased compared to GRDII expression, a finding that was further confirmed with the use of differentiating factors like PKC ϵ and retinoic acid on a neuroblastoma cell line. Furthermore, NLS transcript of neurofibromin that targets neurofibromin to the nucleus seems to be developmentally regulated. Namely, NLS transcript dramatically decreased and was almost abolished during differentiation. Moreover, we investigated the subcellular distribution of neurofibromin and found that neurofibromin located at different subcellular compartments like the endoplasmic reticulum, actin and microtubule cytoskeleton as well as the lipid rafts and the nucleus. More specifically, neurofibromin localization at the lipid rafts: a) was regulated by PKC ϵ phosphorylation, b) inhibited Ras activity and c) showed differential distribution during development possibly due to the differences observed in the primary sequence of GRDI and GRDII transcripts. Examining the ability of GRDI and GRDII transcripts to bind the cytoskeleton we showed that GRDII transcript preferentially binds actin, while GRDI transcript microtubules. Moreover, GRDI overexpression induced significant increases in neurite length. More importantly, we found that neurofibromin interacts with PSD proteins. Namely, using differentiating agents that eliminate GRDII and NLS transcripts, we showed that neurofibromin binds to neuroligin 3 a known

synaptic protein. Therefore, different neurofibromin transcripts induce differential signaling regulating the specific biological outcome.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Brosius S. A history of von Recklinghausen's NF1. *J Hist Neurosci.* 2010 Oct;19(4):333-48.
2. Hersh JH; American Academy of Pediatrics Committee on Genetics. Health supervision for children with neurofibromatosis. *Pediatrics.* 2008 Mar;121(3):633-42.
3. Riccardi VM. Cutaneous manifestation of neurofibromatosis: cellular interaction, pigmentation, and mast cells. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1981;17(2):129-45.
4. Von Recklinghausen FD. Ueber die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neurmen. Berlin Hirschwald, 1882
5. Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, et al. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell.* 1990 Aug 10;62(3):599-608.
6. Szudek J, Birch P, Friedman JM. Growth in North American white children with neurofibromatosis 1 (NF1). *J Med Genet.* 2000 Dec;37(12):933-8.
7. Fisher MJ, Loguidice M, Gutmann DH, Listernick R, Ferner RE, Ullrich NJ, Packer RJ, Tabori U, Hoffman RO, Arden-Holmes SL, Hummel TR, Hargrave DR, Bouffet E, Charrow J, Bilaniuk LT, Balcer LJ, Liu GT. Visual outcomes in children with neurofibromatosis type 1-associated optic pathway glioma following chemotherapy: a multicenter retrospective analysis. *Neuro Oncol.* 2012 Jun;14(6):790-7.
8. Yohay KH. The genetic and molecular pathogenesis of NF1 and NF2. *Semin Pediatr Neurol.* 2006 Mar;13(1):21-6.
9. Pulst SM, Riccardi VM, Fain P, Korenberg JR. Familial spinal neurofibromatosis: clinical and DNA linkage analysis. *Neurology.* 1991 Dec;41(12):1923-7.

10. Hyman SL, Shores A, North KN. The nature and frequency of cognitive deficits in children with neurofibromatosis type 1. *Neurology*. 2005 Oct 11;65(7):1037-44.
11. Rubin JB, Gutmann DH. Neurofibromatosis type 1 - a model for nervous system tumour formation? *Nat Rev Cancer*. 2005 Jul;5(7):557-64.
12. Upadhyaya M, Spurlock G, Thomas L, Thomas NS, Richards M, Mautner VF, Cooper DN, Guha A, Yan J. Microarray-based copy number analysis of neurofibromatosis type-1 (NF1)-associated malignant peripheral nerve sheath tumors reveals a role for Rho-GTPase pathway genes in NF1 tumorigenesis. *Hum Mutat*. 2012 Apr;33(4):763-76.
13. Staser K, Yang FC, Clapp DW. Plexiform neurofibroma genesis: questions of Nf1 gene dose and hyperactive mast cells. *Curr Opin Hematol*. 2010 Jul;17(4):287-93.
14. Mautner VF, Kluwe L, Friedrich RE, Roehl AC, Bammert S, Högel J, Spöri H, Cooper DN, Kehrer-Sawatzki H. Clinical characterisation of 29 neurofibromatosis type-1 patients with molecularly ascertained 1.4 Mb type-1 NF1 deletions. *J Med Genet*. 2010 Sep;47(9):623-30.
15. Dasgupta B, Gutmann DH. Neurofibromatosis 1: closing the GAP between mice and men. *Curr Opin Genet Dev*. 2003 Feb;13(1):20-7.
16. Lee MJ, Stephenson DA. Recent developments in neurofibromatosis type 1. *Curr Opin Neurol*. 2007 Apr;20(2):135-41.
17. Hegedus B, Yeh TH, Lee da Y, Emnett RJ, Li J, Gutmann DH. Neurofibromin regulates somatic growth through the hypothalamic-pituitary axis. *Hum Mol Genet*. 2008 Oct 1;17(19):2956-66.
18. Cutting LE, Koth CW, Denckla MB. How children with neurofibromatosis type 1 differ from "typical" learning disabled clinic attenders: nonverbal learning disabilities revisited. *Dev Neuropsychol*. 2000;17(1):29-47.
19. Barbier C, Chabernaude C, Barantin L, Bertrand P, Sembely C, Sirinelli D, Castelnau P, Cottier JP. Proton MR spectroscopic imaging of basal ganglia and

- thalamus in neurofibromatosis type 1: correlation with T2 hyperintensities. *Neuroradiology*. 2011 Feb;53(2):141-8.
20. Hyman SL, Gill DS, Shores EA, Steinberg A, Joy P, Gibikote SV, North KN. Natural history of cognitive deficits and their relationship to MRI T2-hyperintensities in NF1. *Neurology*. 2003 Apr 8;60(7):1139-45.
 21. 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):541-55.
 22. Cawthon RM, Weiss R, Xu GF, Viskochil D, Culver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O'Connell P, et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell*. 1990 Jul 13;62(1):193-201.
 23. Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell*. 1990 Jul 13;62(1):187-92.
 24. 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 Jul 13;249(4965):181-6. Erratum in: *Science* 1990 Dec 21;250(4988):1749.
 25. Li Y, O'Connell P, Breidenbach HH, Cawthon R, Stevens J, Xu G, Neil S, Robertson M, White R, Viskochil D. Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1). *Genomics*. 1995 Jan 1;25(1):9-18.
 26. Hajra A, Martin-Gallardo A, Tarlé SA, Freedman M, Wilson-Gunn S, Bernards A, Collins FS. DNA sequences in the promoter region of the NF1 gene are highly conserved between human and mouse. *Genomics*. 1994 Jun;21(3):649-52.
 27. 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 Dec;11(4):931-40.

28. Bernards A, Haase VH, Murthy AE, Menon A, Hannigan GE, Gusella JF. Complete human NF1 cDNA sequence: two alternatively spliced mRNAs and absence of expression in a neuroblastoma line. *DNA Cell Biol*. 1992 Dec;11(10):727-34.

29. Trovó-Marqui AB, Tajara EH. Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet*. 2006 Jul;70(1):1-13.

30. 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 EVI2 and mapping of other transcripts. *Genomics*. 1990 Aug;7(4):555-65.

31. 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 Mar;9(3):446-60.

32. 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 Feb;11(2):906-12.

33. Wang Q, Montmain G, Ruano E, Upadhyaya M, Dudley S, Liskay RM, Thibodeau SN, Puisieux A. Neurofibromatosis type 1 gene as a mutational target in a mismatch repair-deficient cell type. *Hum Genet*. 2003 Feb;112(2):117-23.

34. Kaufmann D, Gruener S, Braun F, Stark M, Griesser J, Hoffmeyer S, Bartelt B. EVI2B, a gene lying in an intron of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene, is as the NF1 gene involved in differentiation of melanocytes and keratinocytes and is overexpressed in cells derived from NF1 neurofibromas. *DNA Cell Biol*. 1999 May;18(5):345-56.

35. Skuse GR, Cappione AJ. RNA processing and clinical variability in neurofibromatosis type I (NF1). *Hum Mol Genet*. 1997;6(10):1707-12.

36. Gutmann DH, Zhang Y, Hirbe A. Developmental regulation of a neuron-specific neurofibromatosis 1 isoform. *Ann Neurol.* 1999 Nov;46(5):777-82.
37. Nishi T, Lee PS, 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 Sep;6(9):1555-9.
38. 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 GTPase activating protein-related domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Dec 31;181(3):955-61.
39. Baizer L, Ciment G, Hendrickson SK, Schafer GL. Regulated expression of the neurofibromin type I transcript in the developing chicken brain. *J Neurochem.* 1993 Dec;61(6):2054-60.
40. 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 Jan;13(1):487-95.
41. Suzuki H, Takahashi K, Yasumoto K, Fuse N, Shibahara S. Differential tissue-specific expression of neurofibromin isoform mRNAs in rat. *J Biochem.* 1996 Nov;120(5):1048-54.
42. Gutmann DH, Wood DL, Collins FS. Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Nov 1;88(21):9658-62.
43. 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 Nov 16;63(4):851-9.
44. 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 Oct 24;130(2):231-48.

45. Striedter GF, Keefer BP. Cell migration and aggregation in the developing telencephalon: pulse-labeling chick embryos with bromodeoxyuridine. *J Neurosci*. 2000 Nov 1;20(21):8021-30.
46. Tsai HM, Garber BB, Larramendi LM. 3H-thymidine autoradiographic analysis of telencephalic histogenesis in the chick embryo: II. Dynamics of neuronal migration, displacement, and aggregation. *J Comp Neurol*. 1981 May 10;198(2):293-306.
47. 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 Jun 1;21(11):3764-70.
48. Roudebush M, Slabe T, Sundaram V, Hoppel CL, Golubic M, Stacey DW. Neurofibromin colocalizes with mitochondria in cultured cells. *Exp Cell Res*. 1997 Oct 10;236(1):161-72.
49. 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 Mar;126(3):653-9.
50. 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 Feb 2;25(5):735-45.
51. Daston MM, Scrable 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 Mar;8(3):415-28.
52. Golubić M, Roudebush M, Dobrowolski S, Wolfman A, Stacey DW. Catalytic properties, tissue and intracellular distribution of neurofibromin. *Oncogene*. 1992 Nov;7(11):2151-9.

53. Koivunen J, Ylä-Outinen H, Korkiamäki T, Karvonen SL, Pöyhönen M, Laato M, Karvonen J, Peltonen S, Peltonen J. New function for NF1 tumor suppressor. *J Invest Dermatol.* 2000 Mar;114(3):473-9.
54. Vandenbroucke I, Van Oostveldt P, Coene E, De Paepe A, Messiaen L. Neurofibromin is actively transported to the nucleus. *FEBS Lett.* 2004 Feb 27;560(1-3):98-102.
55. Leondaritis G, Petrikos 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 Apr;109(2):573-83.
56. Boyanapalli M, Lahoud OB, Messiaen L, Kim B, Anderle de Sylor MS, Duckett SJ, Somara S, Mikol DD. Neurofibromin binds to caveolin-1 and regulates ras, FAK, and Akt. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Feb 24;340(4):1200-8.
57. Izawa I, Tamaki N, Saya H. Phosphorylation of neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) by cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 1996 Mar 11;382(1-2):53-9.
58. D'Angelo I, Welti S, Bonneau F, Scheffzek K. A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein. *EMBO Rep.* 2006 Feb;7(2):174-9.
59. 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 Mar 25;9(6):R195-7.
60. Vandenbroucke I, Callens T, De Paepe A, Messiaen L. Complex splicing pattern generates great diversity in human NF1 transcripts. *BMC Genomics.* 2002 May 24;3:13. Epub 2002 May 24.
61. Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C, Kücküceylan 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 Mar;66(3):790-818.

62. 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 Dec;42(4):278-87.
63. Bankaitis VA, Aitken JR, Cleves AE, Dowhan W. An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature.* 1990 Oct 11;347(6293):561-2.
64. Bollag G, McCormick F. Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature.* 1991 Jun 13;351(6327):576-9.
65. Leondaritis G and Mangoura D. The Sec14 domain of neurofibromin allosterically regulates the analog RasGAP activity of the adjacent GAP-related domain, 2012 υπό δημοσίευση.
66. Vandenbroucke I, Vandesompele J, De Paepe A, Messiaen L. Quantification of NF1 transcripts reveals novel highly expressed splice variants. *FEBS Lett.* 2002 Jul 3;522(1-3):71-6.
67. 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 Nov 16;63(4):843-9.
68. Hancock JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 May;4(5):373-84.
69. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature.* 1993 Dec 16;366(6456):643-54.
70. Downward J. The GRB2/Sem-5 adaptor protein. *FEBS Lett.* 1994 Jan 31;338(2):113-7.
71. Nag A, Monine M, Perelson AS, Goldstein B. Modeling and simulation of aggregation of membrane protein LAT with molecular variability in the number of binding sites for cytosolic Grb2-SOS1-Grb2. *PLoS One.* 2012;7(3):e28758.

72. Jaumot M, Yan J, Clyde-Smith J, Sluimer J, Hancock JF. The linker domain of the Ha-Ras hypervariable region regulates interactions with exchange factors, Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 2002 Jan 4;277(1):272-8.
73. Qian X, Esteban L, Vass WC, Upadhyaya C, Papageorge AG, Yienger K, Ward JM, Lowy DR, Santos E. The Sos1 and Sos2 Ras-specific exchange factors: differences in placental expression and signaling properties. *EMBO J.* 2000 Feb 15;19(4):642-54.
74. Brambilla R, Gnesutta N, Minichiello L, White G, Roylance AJ, Herron CE, Ramsey M, Wolfer DP, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Grant SG, Chapman PF, Lipp HP, Sturani E, Klein R. A role for the Ras signalling pathway in synaptic transmission and long-term memory. *Nature.* 1997 Nov 20;390(6657):281-6.
75. Guerrero C, Rojas JM, Chedid M, Esteban LM, Zimonjic DB, Popescu NC, Font de Mora J, Santos E. Expression of alternative forms of Ras exchange factors GRF and SOS1 in different human tissues and cell lines. *Oncogene.* 1996 Mar 7;12(5):1097-107.
76. Krapivinsky G, Krapivinsky L, Manasian Y, Ivanov A, Tyzio R, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Clapham DE, Medina I. The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron.* 2003 Nov 13;40(4):775-84.
77. Caloca MJ, Zugaza JL, Matallanas D, Crespo P, Bustelo XR. Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor Ras GRP1. *EMBO J.* 2003 Jul 1;22(13):3326-36.
78. Matallanas D, Arozarena I, Berciano MT, Aaronson DS, Pellicer A, Lafarga M, Crespo P. Differences on the inhibitory specificities of H-Ras, K-Ras, and N-Ras (N17) dominant negative mutants are related to their membrane microlocalization. *J Biol Chem.* 2003 Feb 14;278(7):4572-81.
79. Quilliam LA, Rebhun JF, Castro AF. A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2002;71:391-444.

80. Ohba Y, Mochizuki N, Yamashita S, Chan AM, Schrader JW, Hattori S, Nagashima K, Matsuda M. Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem.* 2000 Jun 30;275(26):20020-6.
81. Bollag G, McCormick F, Clark R. Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity. *EMBO J.* 1993 May;12(5):1923-7.
82. 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 May;19(3):265-74.
83. Hakimi MA, Speicher DW, Shiekhhattar R. The motor protein kinesin-1 links neurofibromin and merlin in a common cellular pathway of neurofibromatosis. *J Biol Chem.* 2002 Oct 4;277(40):36909-12.
84. Lin YL, Lei YT, Hong CJ, Hsueh YP. Syndecan-2 induces filopodia and dendritic spine formation via the neurofibromin-PKA-Ena/VASP pathway. *J Cell Biol.* 2007 Jun 4;177(5):829-41.
85. Wang HF, Shih YT, Chen CY, Chao HW, Lee MJ, Hsueh YP. Valosin-containing protein and neurofibromin interact to regulate dendritic spine density. *J Clin Invest.* 2011 Dec;121(12):4820-37.
86. Woodman PG. p97, a protein coping with multiple identities. *J Cell Sci.* 2003 Nov 1;116(Pt 21):4283-90.
87. Vij N. AAA ATPase p97/VCP: cellular functions, disease and therapeutic potential. *J Cell Mol Med.* 2008 Dec;12(6A):2511-8.
88. Tresse E, Salomons FA, Vesa J, Bott LC, Kimonis V, Yao TP, Dantuma NP, Taylor JP. VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD. *Autophagy.* 2010 Feb;6(2):217-27.
89. Kakizuka A. Roles of VCP in human neurodegenerative disorders. *Biochem Soc Trans.* 2008 Feb;36(Pt 1):105-8.

90. Beauvais DM, Burbach BJ, Rapraeger AC. The syndecan-1 ectodomain regulates alphavbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells. *J Cell Biol.* 2004 Oct 11;167(1):171-81.
91. Südhof TC. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature.* 2008 Oct 16;455(7215):903-11.
92. Etherton MR, Tabuchi K, Sharma M, Ko J, Südhof TC. An autism-associated point mutation in the neuroligin cytoplasmic tail selectively impairs AMPA receptor-mediated synaptic transmission in hippocampus. *EMBO J.* 2011 Jun 3;30(14):2908-19.
93. Gutmann DH, Tennekoon GI, Cole JL, Collins FS, Rutkowski JL. Modulation of the neurofibromatosis type 1 gene product, neurofibromin, during Schwann cell differentiation. *J Neurosci Res.* 1993 Oct 1;36(2):216-23.
94. 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 Jan 16;557(1-3):275-82.
95. North K, Hyman S, Barton B. Cognitive deficits in neurofibromatosis 1. *J Child Neurol.* 2002 Aug;17(8):605-12; discussion 627-9, 646-51.
96. Payne JM, Hyman SL, Shores EA, North KN. Assessment of executive function and attention in children with neurofibromatosis type 1: relationships between cognitive measures and real-world behavior. *Child Neuropsychol.* 2011;17(4):313-29.
97. Pride N, Payne JM, Webster R, Shores EA, Rae C, North KN. Corpus callosum morphology and its relationship to cognitive function in neurofibromatosis type 1. *J Child Neurol.* 2010 Jul;25(7):834-41.
98. Jacks T, Shih TS, Schmitt EM, Bronson RT, Bernard A, Weinberg RA. Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nat Genet.* 1994 Jul;7(3):353-61.

99. Silva AJ, Frankland PW, Marowitz Z, Friedman E, Laszlo GS, Cioffi D, Jacks T, Bourtschuladze R. A mouse model for the learning and memory deficits associated with neurofibromatosis type I. *Nat Genet.* 1997 Mar;15(3):281-4.
100. Pouzet B, Zhang WN, Feldon J, Rawlins JN. Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies. *Behav Brain Res.* 2002 Jul 18;133(2):279-91.
101. Costa RM, Yang T, Huynh DP, Pulst SM, Viskochil DH, Silva AJ, Brannan CI. Learning deficits, but normal development and tumor predisposition, in mice lacking exon 23a of Nf1. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):399-405.
102. Costa RM, Federov NB, Kogan JH, Murphy GG, Stern J, Ohno M, Kucherlapati R, Jacks T, Silva AJ. Mechanism for the learning deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Nature.* 2002 Jan 31;415(6871):526-30.
103. Cui Y, Costa RM, Murphy GG, Elgersma Y, Zhu Y, Gutmann DH, Parada LF, Mody I, Silva AJ. Neurofibromin regulation of ERK signaling modulates GABA release and learning. *Cell.* 2008 Oct 31;135(3):549-60.
104. Ho IS, Hannan F, Guo HF, Hakker I, Zhong Y. Distinct functional domains of neurofibromatosis type 1 regulate immediate versus long-term memory formation. *J Neurosci.* 2007 Jun 20;27(25):6852-7.
105. Mitchison T, Kirschner M. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron.* 1988 Nov;1(9):761-72.
106. Kunze D, Rüstow B. Pathobiochemical aspects of cytoskeleton components. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1993 Aug;31(8):477-89.
107. Kaufmann WE, Moser HW. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex.* 2000 Oct;10(10):981-91.
108. Bourne JN, Harris KM. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci.* 2008;31:47-67.
109. Becker LE, Armstrong DL, Chan F. Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Ann Neurol.* 1986 Oct;20(4):520-6.

110. Belichenko PV, Masliah E, Kleschevnikov AM, Villar AJ, Epstein CJ, Salehi A, Mobley WC. Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down Syndrome. *J Comp Neurol*. 2004 Dec 13;480(3):281-98.
111. Bilousova TV, Dansie L, Ngo M, Aye J, Charles JR, Ethell DW, Ethell IM. Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioural performance in the fragile X mouse model. *J Med Genet*. 2009 Feb;46(2):94-102.
112. Minami H, Owada Y, Suzuki R, Handa Y, Kondo H. Localization of mRNAs for novel, atypical as well as conventional protein kinase C (PKC) isoforms in the brain of developing and mature rats. *J Mol Neurosci*. 2000 Oct;15(2):121-35.
113. Saito N, Itouji A, Totani Y, Osawa I, Koide H, Fujisawa N, Ogita K, Tanaka C. Cellular and intracellular localization of epsilon-subspecies of protein kinase C in the rat brain; presynaptic localization of the epsilon-subspecies. *Brain Res*. 1993 Apr 2;607(1-2):241-8.
114. 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 Aug 1;35(5):488-98.
115. García-García J, Gómez-Fernández JC, Corbalán-García S. Structural characterization of the C2 domain of novel protein kinase Cepsilon. *Eur J Biochem*. 2001 Feb;268(4):1107-17.
116. Akita Y. Protein kinase C-epsilon (PKC-epsilon): its unique structure and function. *J Biochem*. 2002 Dec;132(6):847-52.
117. Zeidman R, Trollér U, Raghunath A, Pålman S, Larsson C. Protein kinase Cepsilon actin-binding site is important for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Mol Biol Cell*. 2002 Jan;13(1):12-24.
118. Kolkova K, Stensman H, Berezin V, Bock E, Larsson C. Distinct roles of PKC isoforms in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Neurochem*. 2005 Feb;92(4):886-94.
119. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972 Feb 18;175(4023):720-31.

120. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*. 1993 Apr;3(2):97-130.
121. Yang LJ, Zeller CB, Shaper NL, Kiso M, Hasegawa A, Shapiro RE, Schnaar RL. Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 23;93(2):814-8.
122. Kolter T, Magin TM, Sandhoff K. Biomolecule function: no reliable prediction from cell culture. *Traffic*. 2000 Oct;1(10):803-4.
123. Lange Y, Ye J, Steck TL. How cholesterol homeostasis is regulated by plasma membrane cholesterol in excess of phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 10;101(32):11664-7.
124. Dodge JT, Phillips GB. Composition of phospholipids and of phospholipid fatty acids and aldehydes in human red cells. *J Lipid Res*. 1967 Nov;8(6):667-75.
125. Luzzati V, Husson F. The structure of the liquid-crystalline phasis of lipid-water systems. *J Cell Biol*. 1962 Feb;12:207-19. PubMed PMID: 14467542;
126. Nielsen AT, Jonsson S. Trace determination of volatile sulfur compounds by solid-phase microextraction and GC-MS. *Analyst*. 2002 Aug;127(8):1045-9.
127. Ipsen JH, Mouritsen OG, Zuckermann MJ. Theory of thermal anomalies in the specific heat of lipid bilayers containing cholesterol. *Biophys J*. 1989 Oct;56(4):661-7.
128. Sankaram MB, Thompson TE. Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry*. 1990 Nov 27;29(47):10670-5.
129. Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998;14:111-36.
130. Edidin M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 May;4(5):414-8.

131. Thompson TE, Allietta M, Brown RE, Johnson ML, Tillack TW. Organization of ganglioside GM1 in phosphatidylcholine bilayers. *Biochim Biophys Acta*. 1985 Jul 25;817(2):229-37.
132. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997 Jun 5;387(6633):569-72.
133. Kusumi A, Suzuki K. Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Dec 30;1746(3):234-51.
134. van Meer G, Gumbiner B, Simons K. The tight junction does not allow lipid molecules to diffuse from one epithelial cell to the next. *Nature*. 1986 Aug 14-20;322(6080):639-41.
135. van Meer G, Stelzer EH, Wijnaendts-van-Resandt RW, Simons K. Sorting of sphingolipids in epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells. *J Cell Biol*. 1987 Oct;105(4):1623-35.
136. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Oct;1(1):31-9.
137. Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM Jr. Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci*. 2002 Aug;25(8):412-7.
138. Harris FM, Best KB, Bell JD. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Sep 20;1565(1):123-8.
139. Suomalainen M. Lipid rafts and assembly of enveloped viruses. *Traffic*. 2002 Oct;3(10):705-9.
140. Kovbasnjuk O, Edidin M, Donowitz M. Role of lipid rafts in Shiga toxin 1 interaction with the apical surface of Caco-2 cells. *J Cell Sci*. 2001 Nov;114(Pt 22):4025-31.
141. Naslavsky N, Weigert R, Donaldson JG. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol Biol Cell*. 2004 Aug;15(8):3542-52.

142. Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol.* 2003 Jan 6;160(1):113-23.
143. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science.* 2010 Jan 1;327(5961):46-50.
144. Simons K, Gerl MJ. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Oct;11(10):688-99.
145. Schütz GJ, Kada G, Pastushenko VP, Schindler H. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.* 2000 Mar 1;19(5):892-901.
146. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):31-9. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Mar;2(3):216.
147. de Almeida RF, Loura LM, Fedorov A, Prieto M. Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *J Mol Biol.* 2005 Mar 4;346(4):1109-20.
148. Owen DM, Williamson D, Magenau A, Gaus K. Optical techniques for imaging membrane domains in live cells (live-cell palm of protein clustering). *Methods Enzymol.* 2012;504:221-35.
149. Ilangumaran S, Arni S, van Echten-Deckert G, Borisch B, Hoessli DC. Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T lymphocyte plasma membranes. *Mol Biol Cell.* 1999 Apr;10(4):891-905.
150. Drevot P, Langlet C, Guo XJ, Bernard AM, Colard O, Chauvin JP, Lasserre R, He HT. TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J.* 2002 Apr 15;21(8):1899-908.
151. Pike LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res.* 2006 Jul;47(7):1597-8. Epub 2006 Apr 27.
152. Macdonald JL, Pike LJ. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res.* 2005 May;46(5):1061-7. Epub 2005 Feb 16.

153. Rodgers W, Smith K. Properties of glycolipid-enriched membrane rafts in antigen presentation. *Crit Rev Immunol.* 2005;25(1):19-30.
154. Forstner MB, Yee CK, Parikh AN, Groves JT. Lipid lateral mobility and membrane phase structure modulation by protein binding. *J Am Chem Soc.* 2006 Nov 29;128(47):15221-7.
155. Bini L, Pacini S, Liberatori S, Valensin S, Pellegrini M, Raggiaschi R, Pallini V, Baldari CT. Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering. *Biochem J.* 2003 Jan 15;369(Pt 2):301-9.
156. Yanagida M, Nakayama H, Yoshizaki F, Fujimura T, Takamori K, Ogawa H, Iwabuchi K. Proteomic analysis of plasma membrane lipid rafts of HL-60 cells. *Proteomics.* 2007 Jul;7(14):2398-409.
157. Yu MJ, Pisitkun T, Wang G, Aranda JF, Gonzales PA, Tchapyjnikov D, Shen RF, Alonso MA, Knepper MA. Large-scale quantitative LC-MS/MS analysis of detergent-resistant membrane proteins from rat renal collecting duct. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008 Sep;295(3):C661-78.
158. Filosto S, Khan EM, Tognon E, Becker C, Ashfaq M, Ravid T, Goldkorn T. EGF receptor exposed to oxidative stress acquires abnormal phosphorylation and aberrant activated conformation that impairs canonical dimerization. *PLoS One.* 2011;6(8):e23240.
159. Lambert S, Ameels H, Gniadecki R, Hérin M, Poumay Y. Internalization of EGF receptor following lipid rafts disruption in keratinocytes is delayed and dependent on p38 MAPK activation. *J Cell Physiol.* 2008 Dec;217(3):834-45.
160. 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 Mar;116(5):866-73.
161. Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M. Characterization of caveolin-rich membrane domains

- isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol.* 1994 Jul;126(1):111-26.
162. Quest AF, Leyton L, Párraga M. Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem Cell Biol.* 2004 Feb;82(1):129-44.
163. Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem.* 1997 Mar 7;272(10):6525-33.
164. Fernow I, Icking A, Tikkanen R. Reggie-1 and reggie-2 localize in non-caveolar rafts in epithelial cells: cellular localization is not dependent on the expression of caveolin proteins. *Eur J Cell Biol.* 2007 Jun;86(6):345-52.
165. Gaudreault SB, Blain JF, Gratton JP, Poirier J. A role for caveolin-1 in post-injury reactive neuronal plasticity. *J Neurochem.* 2005 Feb;92(4):831-9.
166. Masserini M, Palestini P, Pitto M. Glycolipid-enriched caveolae and caveolae-like domains in the nervous system. *J Neurochem.* 1999 Jul;73(1):1-11.
167. Head BP, Patel HH, Tsutsumi YM, Hu Y, Mejia T, Mora RC, Insel PA, Roth DM, Drummond JC, Patel PM. Caveolin-1 expression is essential for N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Src and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and protection of primary neurons from ischemic cell death. *FASEB J.* 2008 Mar;22(3):828-40.
168. Trushina E, Du Charme J, Parisi J, McMurray CT. Neurological abnormalities in caveolin-1 knock out mice. *Behav Brain Res.* 2006 Sep 15;172(1):24-32.
169. 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 Sep 5;278(36):34709-16. Epub 2003 Jun 6.
170. Sakellaridis N, Mangoura D, Vernadakis A. Effects of neuron-conditioned medium and fetal calf serum content on glial growth in dissociated cultures. *Brain Res.* 1986 Jun;392(1-2):31-41.

171. Mangoura D, Vernadakis A. GABAergic neurons in cultures derived from three-, six- or eight-day-old chick embryo: a biochemical and immunocytochemical study. *Brain Res.* 1988 May 1;468(1):25-35.
172. Mangoura D, Sakellaridis N, Vernadakis A. Cholinergic neurons in cultures derived from three-, six- or eight-day-old chick embryo: a biochemical and immunocytochemical study. *Brain Res.* 1988 May 1;468(1):37-46.
173. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 1973 Nov;33(11):2643-52.
174. Mochly-Rosen D, Wu G, Hahn H, Osinska H, Liron T, Lorenz JN, Yatani A, Robbins J, Dorn GW 2nd. Cardiotrophic effects of protein kinase C epsilon: analysis by in vivo modulation of PKCepsilon translocation. *Circ Res.* 2000 Jun 9;86(11):1173-9.
175. Mangoura D. mu-Opioids activate tyrosine kinase focal adhesion kinase and regulate cortical cytoskeleton proteins cortactin and vinculin in chick embryonic neurons. *J Neurosci Res.* 1997 Nov 1;50(3):391-401.
176. Cheng Y, Leung S, Mangoura D. Transient suppression of cortactin ectopically induces large telencephalic neurons towards a GABAergic phenotype. *J Cell Sci.* 2000 Sep;113 (Pt 18):3161-72.
177. Asimaki O, Mangoura D. Cannabinoid receptor 1 induces a biphasic ERK activation via multiprotein signaling complex formation of proximal kinases PKCε, Src, and Fyn in primary neurons. *Neurochem Int.* 2011 Feb;58(2):135-44.
178. Raynal P, Pollard HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Apr 5;1197(1):63-93.
179. Rollason R, Korolchuk V, Hamilton C, Jepson M, Banting G. A CD317/tetherin-RICH2 complex plays a critical role in the organization of the subapical actin cytoskeleton in polarized epithelial cells. *J Cell Biol.* 2009 Mar 9;184(5):721-36.

180. Mangoura D, Dawson G. Programmed cell death in cortical chick embryo astrocytes is associated with activation of protein kinase PK60 and ceramide formation. *J Neurochem.* 1998 Jan;70(1):130-8.
181. Karouzaki S, Leondaritis G, Asimaki O, Tsirimonaki E, Flarkis A, Vougas K, Papadopoulou A, Tsangaris G, Mangoura D (2012) Mouse embryonic stem cells possess distinct lipid rafts and elaborate lipid raft-associated cortical cytoskeleton machinery. Υπο δημοσίευση.
182. Rubio I, Rennert K, Wittig U, Beer K, Dürst 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 Sep 1;398(2):243-56.
183. Torres J, Prieto J, Durupt FC, Broad S, Watt FM. Efficient differentiation of embryonic stem cells into mesodermal precursors by BMP, retinoic acid and Notch signalling. *PLoS One.* 2012;7(4):e36405.
184. Li KW, Hornshaw MP, Van Der Schors RC, Watson R, Tate S, Casetta B, Jimenez CR, Gouwenberg Y, Gundelfinger ED, Smalla KH, Smit AB. Proteomics analysis of rat brain postsynaptic density. Implications of the diverse protein functional groups for the integration of synaptic physiology. *J Biol Chem.* 2004 Jan 9;279(2):987-1002.
185. Chada S, Lamoureux P, Buxbaum RE, Heidemann SR. Cytomechanics of neurite outgrowth from chick brain neurons. *J Cell Sci.* 1997 May;110 (Pt 10):1179-86.
186. Tokioka R, Matsuo A, Kiyosue K, Kasai M, Taguchi T. Synapse formation in dissociated cell cultures of embryonic chick cerebral neurons. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993 Jul 16;74(1):146-50.
187. Mangoura D, Theofilopoulos S, Karouzaki S, Tsirimonaki E. 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-dependent up-regulation of dopaminergic gene expression requires Ras and neurofibromin in human IMR-32 neuroblastoma. *J Neurochem.* 2006 Apr;97 Suppl 1:97-103.

188. Kim IJ, Zhang Y, Meister M, Sanes JR. Laminar restriction of retinal ganglion cell dendrites and axons: subtype-specific developmental patterns revealed with transgenic markers. *J Neurosci*. 2010 Jan 27;30(4):1452-62.
189. Fuentes-Calvo I, Blázquez-Medela AM, Eleno N, Santos E, López-Novoa JM, Martínez-Salgado C. H-Ras isoform modulates extracellular matrix synthesis, proliferation, and migration in fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012 Feb;302(4):C686-97.
190. Li Y, Li Y, McKay RM, Riethmacher D, Parada LF. Neurofibromin modulates adult hippocampal neurogenesis and behavioral effects of antidepressants. *J Neurosci*. 2012 Mar 7;32(10):3529-39.
191. 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 Sep 29;275(39):30740-5.
192. Kurella VB, Richard JM, Parke CL, Lecour LF Jr, Bellamy HD, Worthylake DK. Crystal structure of the GTPase-activating protein-related domain from IQGAP1. *J Biol Chem*. 2009 May 29;284(22):14857-65.
193. Yang K, Cao F, Sheikh AM, Malik M, Wen G, Wei H, Ted Brown W, Li X. Up-regulation of Ras/Raf/ERK1/2 signaling impairs cultured neuronal cell migration, neurogenesis, synapse formation, and dendritic spine development. *Brain Struct Funct*. 2012 May 5.
194. Traverse S, Seedorf K, Paterson H, Marshall CJ, Cohen P, Ullrich A. EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr Biol*. 1994 Aug 1;4(8):694-701.
195. Zhu Y, Harada T, Liu L, Lush ME, Guignard F, Harada C, Burns DK, Bajenaru ML, Gutmann DH, Parada LF. Inactivation of NF1 in CNS causes increased glial progenitor proliferation and optic glioma formation. *Development*. 2005 Dec;132(24):5577-88.
196. Nishi T, Lee PS, 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 Sep;6(9):1555-9.

197. Mangoura D, Sogos V, Pelletiere C, Dawson G. Differential regulation of phospholipases C and D by phorbol esters and the physiological activators carbachol and glutamate in astrocytes from chicken embryo cerebrum and cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res.* 1995 Jun 27;87(1):12-21.
198. 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 Jun 27;87(1):1-11.
199. Mangoura D, Pelletiere C, Leung S, Sakellaridis N, Wang DX. Prolactin concurrently activates src-PLD and JAK/Stat signaling pathways to induce proliferation while promoting differentiation in embryonic astrocytes. *Int J Dev Neurosci.* 2000 Nov;18(7):693-704.
200. Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, Wang OL, Rokosh G, Messing RO, Bolli R. Role of the protein kinase C-epsilon-Raf-1-MEK-1/2-p44/42 MAPK signaling cascade in the activation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 and induction of cyclooxygenase-2 after ischemic preconditioning. *Circulation.* 2005 Sep 27;112(13):1971-8.
201. 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 Apr 15;411(2):319-31.
202. Alam AH, Suzuki H, Tsukahara T. Retinoic acid treatment and cell aggregation independently regulate alternative splicing in P19 cells during neural differentiation. *Cell Biol Int.* 2010 May 4;34(6):631-43.
203. Miki T, Yoneda Y. Alternative splicing of Staufen2 creates the nuclear export signal for CRM1 (Exportin 1). *J Biol Chem.* 2004 Nov 12;279(46):47473-9.
204. Scotton P, Bleckmann D, Stebler M, Sciandra F, Brancaccio A, Meier T, Stetefeld J, Ruegg MA. Activation of muscle-specific receptor tyrosine kinase and binding to dystroglycan are regulated by alternative mRNA splicing of agrin. *J Biol Chem.* 2006 Dec 1;281(48):36835-45.

205. Nordlund M, Gu X, Shipley MT, Ratner N. Neurofibromin is enriched in the endoplasmic reticulum of CNS neurons. *J Neurosci.* 1993 Apr;13(4):1588-600.
206. Bolton JA, Wood SA, Kennedy D, Don RH, Mattick JS. Retinoic acid-dependent upregulation of mouse folate receptor-alpha expression in embryonic stem cells, and conservation of alternative splicing patterns. *Gene.* 1999 Apr 16;230(2):215-24.
207. Simons K, Sampaio JL. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Oct 1;3(10):a004697.
208. Chen X, Jayne Lawrence M, Barlow DJ, Morris RJ, Heenan RK, Quinn PJ. The structure of detergent-resistant membrane vesicles from rat brain cells. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Feb;1788(2):477-83.
209. Kiyokawa E, Baba T, Otsuka N, Makino A, Ohno S, Kobayashi T. Spatial and functional heterogeneity of sphingolipid-rich membrane domains. *J Biol Chem.* 2005 Jun 24;280(25):24072-84.
210. Bryant MR, Marta CB, Kim FS, Bansal R. Phosphorylation and lipid raft association of fibroblast growth factor receptor-2 in oligodendrocytes. *Glia.* 2009 Jul;57(9):935-46.
211. Chen X, Jen A, Warley A, Lawrence MJ, Quinn PJ, Morris RJ. Isolation at physiological temperature of detergent-resistant membranes with properties expected of lipid rafts: the influence of buffer composition. *Biochem J.* 2009 Jan 15;417(2):525-33.
212. Welte S, Fraterman S, D'Angelo I, Wilm M, Scheffzek K. The sec14 homology module of neurofibromin binds cellular glycerophospholipids: mass spectrometry and structure of a lipid complex. *J Mol Biol.* 2007 Feb 16;366(2):551-62.
213. Vassilieva EV, Ivanov AI, Nusrat A. Flotillin-1 stabilizes caveolin-1 in intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Feb 6;379(2):460-5. Epub 2008 Dec 31.

214. Chasserot-Golaz S, Vitale N, Sagot I, Delouche B, Dirrig S, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF. Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J Cell Biol.* 1996 Jun;133(6):1217-36.
215. Chasserot-Golaz S, Vitale N, Umbrecht-Jenck E, Knight D, Gerke V, Bader MF. Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell.* 2005 Mar;16(3):1108-19. Epub 2005 Jan 5.
216. Macdonald-Obermann JL, Pike LJ. Palmitoylation of the EGF receptor impairs signal transduction and abolishes high-affinity ligand binding. *Biochemistry.* 2009 Mar 24;48(11):2505-13.
217. Levental I, Lingwood D, Grzybek M, Coskun U, Simons K. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Dec 21;107(51):22050-4.
218. Levental I, Grzybek M, Simons K. Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry.* 2010 Aug 3;49(30):6305-16.
219. Riddell DR, Christie G, Hussain I, Dingwall C. Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr Biol.* 2001 Aug 21;11(16):1288-93.
220. Hattori C, Asai M, Onishi H, Sasagawa N, Hashimoto Y, Saido TC, Maruyama K, Mizutani S, Ishiura S. BACE1 interacts with lipid raft proteins. *J Neurosci Res.* 2006 Sep;84(4):912-7.
221. Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol.* 2003 Jan 20;160(2):165-70.
222. Yamaguchi H, Shiraishi M, Fukami K, Tanabe A, Ikeda-Matsuo Y, Naito Y, Sasaki Y. MARCKS regulates lamellipodia formation induced by IGF-I via association with PIP2 and beta-actin at membrane microdomains. *J Cell Physiol.* 2009 Sep;220(3):748-55.

223. Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptors at galactosylceramide-enriched lipid microdomains regulate oligodendrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 12;101(41):14949-54.
224. Niethammer P, Delling M, Sytnyk V, Dityatev A, Fukami K, Schachner M. Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J Cell Biol*. 2002 Apr 29;157(3):521-32.
225. Matallanas D, Sanz-Moreno V, Arozarena I, Calvo F, Agudo-Ibáñez L, Santos E, Berciano MT, Crespo P. Distinct utilization of effectors and biological outcomes resulting from site-specific Ras activation: Ras functions in lipid rafts and Golgi complex are dispensable for proliferation and transformation. *Mol Cell Biol*. 2006 Jan;26(1):100-16.
226. Guerrero C, Pesce L, Lecuona E, Ridge KM, Sznajder JJ. Dopamine activates ERKs in alveolar epithelial cells via Ras-PKC-dependent and Grb2/Sos-independent mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 May;282(5):L1099-107.
227. 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 Jan;132(1-2):77-90.
228. Huttenlocher PR. Dendritic and synaptic pathology in mental retardation. *Pediatr Neurol*. 1991 Mar-Apr;7(2):79-85.
229. Dierssen M, Ramakers GJ. Dendritic pathology in mental retardation: from molecular genetics to neurobiology. *Genes Brain Behav*. 2006;5 Suppl 2:48-60.
230. Inder K, Harding A, Plowman SJ, Philips MR, Parton RG, Hancock JF. Activation of the MAPK module from different spatial locations generates distinct system outputs. *Mol Biol Cell*. 2008 Nov;19(11):4776-84.
231. Soler-Llavina GJ, Fuccillo MV, Ko J, Südhof TC, Malenka RC. The neurexin ligands, neuroligins and leucine-rich repeat transmembrane proteins, perform convergent and divergent synaptic functions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 4;108(40):16502-9.

232. Klesse LJ, Meyers KA, Marshall CJ, Parada LF. Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells. *Oncogene*. 1999 Mar 25;18(12):2055-68.
233. Grieve AG, Moss SE, Hayes MJ. Annexin A2 at the interface of actin and membrane dynamics: a focus on its roles in endocytosis and cell polarization. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:852430.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Sophia Karouzaki		Graduate student	
EDUCATION/TRAINING			
INSTITUTION AND LOCATION	DEGREE	YEAR(S)	FIELD OF STUDY
Royal Holloway College, University of London	BSc	1998-2001	Molecular Biology& Genetics
Royal Holloway College, University of London	MSc	2001-2002	Neuroscience
<div><u>RESEARCH EXPERIENCE</u></div> <div>2001-2002 MSc in Neuroscience, Royal Holloway, University of London, UK, Mentor: P.W.Beesley,PhD MSc, Thesis topic: Defining the contact sites between the neuroplastins 65 molecules which mediate homophillic adhesion in the brain</div> <div>2002- 2004 Reasearch Technician, Department of Clinical Haematology, University College London, UK, Mentor: Amit Nathwani, MD, PhD</div> <div>2006 Graduate Student, Pharmacology Department University of Thessaly, and Neuroscience Division, Foundation for Biomedical Research, Athens, Greece. Mentor: Dr. D Mangoura</div> <div><u>AWARDS AND HONORS</u></div> <div>Distinction for high honors High School, Athens</div> <div>2001-2002 Departmental full Scholarship for the MSc awarded by The Biochemistry Department, Royal Holloway College</div> <div>2005- Graduate Student Training Fellowship PENED 03EΔ778 General Secretary for Research and Technology, Ministry of Development, Greece. “Role of PKC in learning and memory”</div>			

PUBLICATIONS

Articles

Mangoura D, Theofilopoulos S, Karouzaki S, Tsirimonaki E. “ 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-dependent up-regulation of dopaminergic gene expression requires Ras and neurofibromin in human IMR-32 neuroblastoma.” *J Neurochem.* 2006 Apr; 1:97-103.

Karouzaki S, Leondaritis G, Asimaki O, Tsirimonaki E, Flarkis A, Vougas K, Papadopoulou A, Tsangaris G, Mangoura D (2012) Mouse embryonic stem cells possess distinct lipid rafts and elaborate lipid raft-associated cortical cytoskeleton machinery. Submitted.

Karouzaki S, Tsirimonaki E, Sakellaridis N, and Mangoura D Neurofibromin transcripts differentially regulate interactions with actin and tubulin to induce neuritic outgrowth in cortical neurons in preparation.

Karouzaki S, Leondaritis G, Sakellaridis N, and Mangoura D Lipid raft targeting of activated PKC ϵ is required for activation of the GEF SOS and the RasGAP neurofibromin and regulation of Ras/ERK signalling , J. Neurochem submitted.

Abstracts

1. S. Karouzaki and P.W.Beesley. “Defining the contact sites between the neuroplastins 65 molecules which mediate homophilic adhesion in the brain” *The Department of Biological Science Annual Graduate meeting 2002*
2. S. Karouzaki, S. Theofilopoulos, G Leondaritis, E. Tsirimonaki and D. Mangoura. “A role for P21-Ras and Neurofibromin in neuronal differentiation during chick embryogenesis”. *3rd Meeting of the Hellenic Society for Biological Sciences, Nafplio, Greece, pp130-1, 2005.*
3. S. Theofilopoulos, S. Karouzaki, E. Tsirimonaki and D. Mangoura. “Dopaminergic gene expression by TPA-dependent upregulation requires Ras and Neurofibromin”. *19th Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience, Patras, Greece, pp260-1, 2005*
4. George Leondaritis, Sophia Karouzaki and Dimitra Mangoura "Membrane lipid and protein functional binding of the SEC14 domain and subcellular targeting of neurofibromin" *Proceedings of the children's tumor foundation international neurofibromatosis consortium June 4-6 2006, Aspen, CO, USA. P-81.*

5. Karouzaki, S., Theofilopoulos, S., Leondaritis, G., Tsirimonaki, E., and Mangoura, D. A role for P21-Ras and Neurofibromin in neuronal differentiation during chick embryogenesis. Trans. Hellenic Society for Biological Sciences, pp129-130, 2005.
6. Theofilopoulos, S., Karouzaki, S., Tsirimonaki, E., and Mangoura, D. Dopaminergic gene expression by TPA-dependent upregulation requires Ras and Neurofibromin. 19th Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience, pp259-260, 2005.
7. Leondaritis, G., Karouzaki, S. and Mangoura, D. Membrane lipid and protein functional binding of the SEC14 domain and subcellular targeting of neurofibromin. Proc. Children's Tumour Foundation International Neurofibromatosis Consortium, p.81, 2006.
8. Leondaritis, G., Karouzaki, S., Florakis, A., Tsirimonaki, E. and Mangoura, D. Expression of neurofibromin during neuronal differentiation of mouse neural stem cells. Soc. Neurosci. Abs. 784.22, 2006.
9. Leondaritis, G., Karouzaki, S., and Mangoura, D. Membrane lipid and protein functional binding of the SEC14 domain and subcellular targeting of neurofibromin. Trans., 58th Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, p138, 2006.
10. Leondaritis, G. Karouzaki, S. and Mangoura, D. The product of neurofibromatosis type 1 gene, the tumour suppressor RAS-GAP neurofibromin, localizes in the nucleus and interacts with the MAPK ERK2, Trans. 21st Meeting, Hellenic Society for Neuroscience, 21:140-1, 2007.
11. Karouzaki, S., Tsirimonaki, E., Sakellaridis, N. and Mangoura, D. PKC -dependent translocation of the Ras-GAP neurofibromin into lipid rafts. Trans., 59th Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, p138, 2007.
12. Karouzaki S., Leondaritis G., Tompa R., and Mangoura D. Src regulates EGF-dependent spatiotemporal activation of c-RAF, MEK1 and ERK , and cell differentiation. 22nd Meeting, Hellenic Society for Neuroscience, p93, 2008.
13. Mangoura, D., Leondaritis, G. and Karouzaki, S. Functional signaling and targeting properties of Neurofibromin. Proc. Children's Tumour Foundation International Neurofibromatosis Consortium, p61, 2008
14. Karouzaki, S., Leondaritis, G., and Mangoura, D. PKC – epsilon activation recruits the RasGAP Neurofibromin into lipid rafts Soc. Neurosci. Abs. *Session: Developmental Disorders*, 747.11, 2008.
15. Karouzaki, S., Andal,J., Leondaritis, G., and Mangoura, D. Crucial role of Src kinase in EGF-dependent activation of c-Raf, formation of MEKK1-MEK1-ERK signaling complex and cell differentiation. FEBS J 276 S1:237, 2009 **Travel Award recipient**

16. Karouzaki, S., Sakellaridis, N., Mangoura, D., PKC ϵ -Phosphorylation is required for the recruitment of the RAS-GAP neurofibromin to Lipid Rafts. J. Neurochem 110, Supp 2 p164, 2009 **Travel Award recipient**
17. Mangoura, D. Leondaritis, G. Tsirimonaki, E. Karouzaki, S. and Sakellaridis, N. Proteomics and lipid composition analysis of detergent –free lipid rafts fractions of mouse embryonic stem cells. J. Neurochem 110, Supp 2 p235, 2009
18. Karouzaki S., Sakellaridis N., Mangoura D. Activation of PKC ϵ regulates Raf activity in Lipid Rafts. 61st Meeting of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2010.
19. Karouzaki S., Theofilopoulos S. and Mangoura D. Differential properties of neurofibromin GRD I and II in developing neurons, J. Neurochem 118, Supp 1 p192, 2011
20. 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. Abs. 777.22/Y17, 2011.
21. Karouzaki S., Theofilopoulos S. and Mangoura D. Differential role of neuronal RASGAP neurofibromin Type I and Type II in developing neurons, and their association with the F-actin cytoskeleton. 25th Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience, 2011