



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

**Διερεύνηση της Ρύθμισης της Έκφρασης του bHLH
Μεταγραφικού Παράγοντα Neurogenin2
και της Μεθυλοτρανσφεράσης της Αργινίνης PRMT8
στο Νευρικό Περιβάλλον**

ΜΑΡΟΥΣΑ ΔΑΡΣΙΝΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2018

Ορισμός έναρξης εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής της Βιολόγου Μαρούσας Δαρσινού από τη Γ.Σ.Ε.Σ του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογικών της συνεδρίασης της αριθμ. 152/12-03-2010

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ της αριθμ. 158/22-06-2010

Επιτροπή αποτελούμενη από τους :

1. **Μιχαηλίδη Θεολόγο**, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Παν/μιου Ιωαννίνων, Επιβλέποντα
2. **Δελιδάκη Χρήστο**, Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας Παν/μιου Κρήτης, Μέλος
3. **Ταλιανίδη Ιωάννη**, Ερευνητή Α', Διευ/ντη Ερευνών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας Κρήτης, Μέλος

Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ της συνεδρίασης της αριθμ. 254/11-06-2018

Επιτροπή αποτελούμενη από τους:

1. **Μιχαλίδη Θεολόγο**, Αναπληρωτή Καθηγητή με γνωστικό αντικείμενο «Μοριακή Γενετική» του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Παν/μιου Ιωαννίνων, Επιβλέπων
2. **Δελιδάκη Χρήστο**, Καθηγητή με γνωστικό αντικείμενο «Μοριακή Γενετική» του Τμήματος Βιολογίας, Παν/μιου Κρήτης, Μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
3. **Ταλιανίδη Ιωάννη**, Ερευνητή Α' και Διευ/ντη Ερευνών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας Κρήτης, Μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
4. **Αντωνίου Αικατερίνη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια με γνωστικό αντικείμενο «Φαρμακολογία» του Τμήματος Ιατρικής, Παν/μιου Ιωαννίνων
5. **Γρηγορίου Μαρία**, Καθηγήτρια με γνωστικό αντικείμενο «Μοριακή Βιολογία-Αναπτυξιακή Βιολογία» του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής Παν/μιου Θράκης
6. **Κόλλια Παναγούλα**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια με γνωστικό αντικείμενο «Μοριακή Γενετική του Ανθρώπου» του Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ
7. **Σύρρου Μαρίκα**, Καθηγήτρια με γνωστικό αντικείμενο «Γενική Βιολογία- Γενετική Ιατρική», Τμήματος Ιατρικής, Παν/μιου Ιωαννίνων

Στη γλυκιά μου μανούλα

&

στους δύο Σταύρους

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αγάπη, ενθουσιασμός, έμπνευση, αφοσίωση και αισιοδοξία τροφοδοτούσαν όλα αυτά τα χρόνια την παρούσα διδακτορική διατριβή, η οποία εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοϊατρικής Έρευνας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB), του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας Κρήτης κατά τη χρονική περίοδο 2010- 2018. Την επίβλεψη της εργασίας είχε ο Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Μοριακής Γενετικής κ. Θεολόγος Μιχαηλίδης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το επιβλέποντά μου κ.Θ.Μιχαηλίδη για όλα αυτά τα δέκα ζοηρά και έντονα έτη εκπαίδευσης και συνεργασίας, που ξεκίνησαν με την πτυχιική μου εργασία. Είχα την ευκαιρία να μάθω πολλά όντας μαθήτρια του. Με υπομονή και μεράκι προσπάθησε να καθοδηγήσει τα βήματα των ονείρων μου στο μονοπάτι της εύρευνας. Με απέραντη ευγνωμοσύνη και εκτίμηση τον ευχαριστώ για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε, τη γνώση που μου μεταλαμπάδεψε και την έμπνευση που μου εμφύσησε.

Κατόπιν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα δύο ακόμη μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, κ.Ι.Ταλιανίδη, Διευθυντή Ερευνών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας και κ.Χ.Δελιδάκη, Καθηγητής Μοριακής Γενετικής. Το κύρος και η επιστημονική υπόσταση των σπουδαίων αυτών ερευνητών αποτέλεσε κινητήριο δύναμη συνεχούς προσπάθειας και σκληρής δουλειάς. Απήλαινα την αλληλεπίδραση μαζί τους, η οποία μάλιστα με ενέπνευσε πολλαπλασιάζοντας τον ενθουσιασμό μου αλλά και τις δυνάμεις μου. Ιδιαίτερα δε, θα ήθελα να ευχαριστήσω, με βαθύτατη ευγνωμοσύνη, τον κ.Ταλιανίδη που χάρη στη συνεργασία μας είχα την ευκαιρία και ιδιαίτερη χαρά να μπω στον κόσμο της χρωματίνης και σε τεχνικές ανάλυσης αλληλούχισης του RNA. Ευχαριστώ επίσης και το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» και τα μέλη αυτού που βοήθησαν στην ανάλυση και επεξεργασία αυτών των αποτελεσμάτων.

Βεβαίως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τις αγαπητές κυριές Αικ. Αντωνίου, Μ. Γρηγορίου, Π. Κόλλια και Μ. Σύρρου. Είχα την τύχη να συνεργαστώ με όλες και να αποκομήσω γνώσεις αλλά και εμπειρίες μέσα από τη δουλειά και τις συζητήσεις μας.

Δε θα μπορούσα φυσικά να παραλείψω τον Prof. C. D Lie, ο οποίος με φιλοξένησε σχεδόν ένα χρόνο στο εργαστήριο του, στο HelmholtzZentrum του Μονάχου, και μου έδωσε την ευκαιρία να εκπαιδευτώ σε *in vivo* πειράματα με στόχο τη μελέτη της ενήλικης νευρογένεσης. Τον ευχαριστώ για τη μοναδική εμπειρία και τεχνογνωσία που απέκτησα αλλά και για τους υπέροχους ανθρώπους που είχα την τύχη να γνωρίσω.

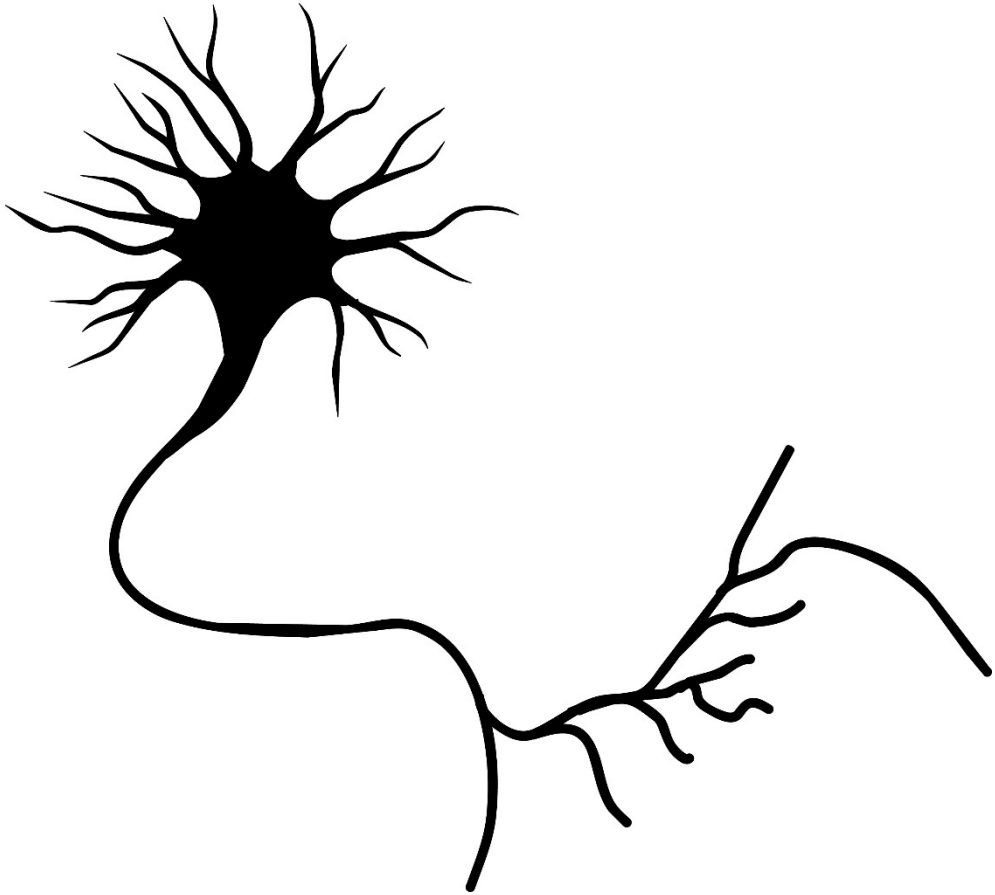
Ένα μεγάλο ευχαριστώ αισθάνομαι την ανάγκη να πω στην εργαστηριακή μου οικογένεια, τα κύρια μέλη του εργαστηρίου, για τις αμέτρητες ώρες που μοιραστήκαμε παρέα, περισσότερο εντός αλλά και εκτός εργαστηρίου. Πολλές αναμνήσεις, εμπειρίες, αγώνες με την Ευτυχία Βασίλη, τη Νατάσα Ξαγαρά, την Κική Παπαγεωργίου και τον Γιάννη Τσίγκα, θα με συντροφεύουν σ' όλη μου τη ζωή. Θα ήθελα να ευχαριστήσω, ιδιαίτερος και τις εξαιρετικές συναδέλφους Μαριάντζελα Βλάικου και Βάσω Γκουβά για την άψογη συνεργασία μας την οποία ευχαριστήθηκα στο έπακρο. Δύο υπέροχους ανθρώπους από τους οποίους έμαθα πολλά, διασκεδάζοντας ταυτόχρονα, είναι η Esra Caraca και ο Tobias Schwarz. Τους ευχαριστώ πάρα πολύ για όσα μου μετέδωσαν αλλά και γιατί αποτελούν τους *“my Turkish sister”* και *“my Bavarian brother”*, όπως συνηθίζω να τους αποκαλώ.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου στους κυρίους Αλέξανδρο Δραΐνα, Νίκο Σιδηρόπουλο και Joachim Weischenfeldt για την πολύτιμη βοήθεια τους και το χρόνο που διέθεσαν για την ανάλυση των δεδομένων του ChIP-seq καθώς και για τις ιδιαίτερα χρήσιμες συμβουλές τους.

Ευχαριστώ θερμά και την Ι.Μ.Υδρας και ιδιαίτερος τον μητροπολίτη κ.κ Εφραίμ για τη μέριμνα προς τους φοιτητές και την οικονομική ενίσχυση η οποία ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση των σπουδών μου.

Τέλος, αλλά πάνω απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που στέκονται πάντα δίπλα μου. Αυτοί δεν είναι άλλοι από την καλή μου φίλη Νατάσα Καραμπά, τον αγαπημένο μου, Πάρη Τσανταρλιώτη, και την οικογένεια μου. Με την αγάπη τους, την κατανόηση τους, την πάσης φύσεως βοήθεια τους, την υπομονή και την πίστη τους σε εμένα, με βοήθησαν να ξεπεράσω πολλά εμπόδια ώστε σήμερα να ολοκληρωθεί αυτή η προσπάθεια.

Μαρούσα Δαρσινού



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	15
ABSTRACT	21
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΣΗ	27
1.1 Ενήλικη Νευρογένεση	27
1.1.1 Ενήλικη Νευρογένεση στην Οδοντωτή Έλικα του Ιππόκαμπου	30
1.1.2 Ενήλικη Νευρογένεση στην Υποκοιλιακή ζώνη των Πλάγιων Κοιλιών	33
1.2 Σηματοδοτικά Μονοπάτια που Συμμετέχουν στην Ενήλικη Νευρογένεση	35
1.2.1 Σηματοδοτικό Μονοπάτι Notch	35
1.2.2 Σηματοδότηση Hedgehog	37
1.2.3 Σηματοδοτικό Μονοπάτι BMP.....	37
1.2.4 Σηματοδότηση Wnt.....	37
1.3 Ενδογενή Μόρια –Μεταγραφικοί Παράγοντες με Κομβικό Ρόλο στην Πορεία της Νευρικής Διαφοροποίησης.....	38
1.3.1 Οι Μεταγραφικοί Παράγοντες της Οικογένειας bHLH	39
1.3.1.1 Η υπο- οικογένεια των Νευρογενινών	41
1. Ο Ρόλος και η Σημασία του bHLH Μεταγραφικού Παράγοντα Neurogenin2 (Ngn2)	42
2. Η Ρύθμιση της Ενεργότητας της Πρωτεΐνης Ngn2	43
1.3.2 Οι Μεταγραφικοί Παράγοντες Sox	50
1.3.3 Οι Μεταγραφικοί Παράγοντες NFI.....	53
1.4 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες που Επηρεάζουν την Ενήλικη Νευρογένεση	56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	59
2.1 Επιγενετική Ρύθμιση.....	59
2.1.1 Μεθυλίωση του DNA	60
2.1.2 Τροποποιήσεις των Ιστονών.....	63
2.1.2.1 Ακετυλίωση των Ιστονών.....	65
2.1.2.2 Μεθυλίωση των Ιστονών.....	67
1. Μεθυλίωση της Λυσίνης των Ιστονών	67
2. Μεθυλίωση της Αργινίνης των Ιστονών	68
i. PRMT8: Μια Εξειδικευμένη Μεθυλοτρανσφεράση της Αργινίνης για το Νευρικό Σύστημα.....	72
2.2 Ρύθμιση της Γονιδιακής Έκφρασης στο Επίπεδο Μετά τη Μεταγραφή.....	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο ΑΠΟΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	81
3.1 Νευροεκφύλιση.....	81
3.2 Ο Επαναπρογραμματισμός των Σωματικών Κυττάρων ως Μια Νέα Θεραπευτική Προσέγγιση.....	84
3.3 Καρκινογένεση	85
II. ΣΚΟΠΟΣ	89
III: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	95
1. ΥΛΙΚΑ.....	97
1.1. Αναλώσιμα.....	97
1.2 Διαλύματα – Χημικά αντιδραστήρια – Θρεπτικά υλικά – Πλασμιδιακοί Χάρτες-Εκκινητές.....	98
1.2.1 Διαλύματα Μοριακής Βιολογίας που Παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο	98
1.2.2 Διαλύματα Μοριακής Βιολογίας του Εμπορίου.....	102
1.2.3 Ένζυμα Περιορισμού.....	103
1.2.4 Ένζυμα για Κλωνοποίηση	103

1.2.5	Διαλύματα Κυτταρικής Βιολογίας που Παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο	103
1.2.6	Διαλύματα Κυτταρικής Βιολογίας του Εμπορίου	104
1.2.7	Θρεπτικά Υλικά, Διαλύματα Κυτταροκαλλιιεργειών και Κυτταρικές Σειρές.	104
1.2.8	Χημικοί Αναστολείς – Επαγωγείς, Αυξητικοί Παράγοντες.....	105
1.2.9	Αντιδραστήρια Διαμόλυνσης Ευκαρυωτικών Κυττάρων	105
1.2.10	Αντισώματα.....	105
1.2.11	Χρώση Πυρήνα- Χρώση Νουκλεϊκών Οξέων	107
1.2.12	Πλαδιακές Κατασκευές & Χάρτες.....	107
1.2.13	Εκκινητές.....	113
1.2.13.1	Εκκινητές για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (ημιποσοτική και ποσοτική) από αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT- PCR).....	113
1.2.13.2	Εκκινητές του Γονιδίου Ngn2 που Χρησιμοποιήθηκαν για το Πείραμα Μεθυλίωσης.....	116
1.2.13.3	Ολιγονουκλεοτίδια για την Παρασκευή των miRNAs	117
1.3	Λογισμικό.....	117
1.4	Εξοπλισμός.....	117
2.	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	119
2.1	Μέθοδοι Κυτταροκαλλιιεργειών	119
2.1.1	Καλλιέργεια Νευροβλαστωματικών Κυττάρων.....	119
2.1.1.1	Ανακαλλιέργεια των Νευροβλαστωματικών Κυττάρων με τη Χρήση Θρυψίνης.....	119
2.1.2	Καλλιέργεια Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων (Νευροσφαίρες, Μονοστοιβάδα Κυττάρων).....	120
2.1.2.1	Ανακαλλιέργεια Πρόδρομων Νευρικών Κυττάρων με τη Χρήση Acutase / Θρυψίνης.....	121
1.	Ανακαλλιέργεια Νευροσφαιρών	121

2. Ανακαλλιέργεια των Πρόδρομων Νευρικών Κυττάρων που Αναπτύσσονται ως Μονοστοιβάδα Κυττάρων	122
2.1.3 Μέτρηση του Αριθμού των Κυττάρων με Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.....	122
2.1.4 Αποθήκευση Κυτταρικών Σειρών	122
2.1.5 Απόψυξη των Κυττάρων	123
2.1.6 Νευρική Διαφοροποίηση των Νευροβλαστωματικών Κυττάρων SH-SY5Y, Be(2)-C.....	123
2.1.7 Νευρική Διαφοροποίηση Πρόδρομων Νευρικών Κυττάρων	125
2.1.8 Επίστρωση Καλλιεργητικών Πιάτων με τα Υποστρώματα Πολυ- L- Ορνιθίνης (PORN), Πολυ- D – Λυσίνης (PDL) και Λαμνίνης (Lam).....	125
2.1.8.1 Επίστρωση με PDL- Lam.....	125
2.1.8.2 Επίστρωση με PORN- Lam.....	125
2.1.8.3 Επίστρωση με Lam.....	126
2.1.8.4 Προετοιμασία Καλυπτρίδων	126
2.1.9 Διαμόλυνση των Ευκαρυωτικών Κυττάρων (Transfection).....	126
2.2 Μεθοδοι Γενετικής Μηχανικής	127
2.2.1 Παρασκευή βακτηριακών Κυττάρων Επιδεκτικών σε Μετασχηματισμό	127
2.2.2 Ανάπτυξη Βακτηρίων	128
2.2.3 Μετασχηματισμός Βακτηρίων με Θερμικό Σοκ.....	129
2.2.4 Αποθήκευση Μετασχηματισμένων Βακτηρίων σε Γλυκερόλη.....	129
2.2.5 Παρασκευή Πλασμιδιακού DNA σε Μικρή Κλίμακα (mini prep)	129
2.2.6 Παρασκευή Πλασμιδιακού DNA σε Μεγάλη Κλίμακα	130
2.2.7 Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Αγαρόζης.....	131
2.2.8 Απομόνωση Τμημάτων DNA από Πηκτή Αγαρόζης.....	131
2.2.9 Αντίδραση Klenow	132
2.2.10 Αντίδραση Αποφωσφορυλίωσης.....	132

2.2.11 Αντίδραση Ένθεσης	132
2.2.12 Αντίδραση Περιοριστικής Πέψης	133
2.2.13 Δημιουργία Πλασμιδιακών Κατασκευών	133
2.2.13.1 Παρασκευή miRNAs.....	133
2.3 Μέθοδοι Μοριακοί Βιολογίας.....	136
2.3.1 Απομόνωση Γενωμικού Δεοξυριβονουκλεϊνικού Οξέος, (DNA).....	136
2.3.2 Καθαρισμός του DNA με τους Οργανικούς Διαλύτες Φαινόλη και Χλωροφόρμιο.....	137
2.3.3 Απομόνωση Ολικού Ριβονουκλεϊκού Οξέος (RNA) από Ευκαρυωτικά Κύτταρα	138
2.3.4 Καθαρισμός του Απομονωμένου RNA από το DNA.....	139
2.3.5 Προετοιμασία Δειγμάτων για Αλληλούχιση RNA (RNA sequencing)	140
2.3.6 Αντίστροφη Μεταγραφή	140
2.3.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)...	142
2.3.7.1 Σχεδιασμός Εκκινητών.....	143
2.3.7.2 Σύσταση Μίγματος Αντίδρασης και Πρόγραμμα στο Θερμοκυκλοποιητή για τα Διάφορα Ζεύγη Εκκινητών	143
2.3.7.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Q-PCR)..	144
2.3.7.4 Η Τιμή Ct (threshold cycle – το κατώφλι του κύκλου).....	145
1. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην Q-PCR	146
2. Σύσταση μίγματος και συνθήκες της αντίδρασης Q-PCR	146
2.3.8 Ανάλυση του Προτύπου Μεθυλίωσης	147
2.3.9 Ανοσοκατακρήμνιση Πρωτεϊνών (Immunoprecipitation, IP).....	148
2.3.10 Ανοσοκατακρήμνιση Χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP).....	150
2.3.10.1 Αλληλούχιση Μεταγραφικών Στόχων σε Κλίμακα Γονιδιώματος.....	153
2.3.10.2 Αλληλούχιση RNA.....	153

2.3.11 Ταυτοποίηση των 5' άκρων του mRNA.....	153
2.3.11.1 Μέθοδος cRACE (Rapid Amplification of cDNA ends)	153
2.3.11.2 Μέθοδος RLM-RACE (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA ends).....	155
2.4 Βιοχημικές Μέθοδοι	156
2.4.1 Απομόνωση Πρωτεϊνικού Εκχυλίσματος από Νευρικά Κύτταρα.....	156
2.4.2 Προσδιορισμός Συγκέντρωσης των Πρωτεϊνών με τη Μέθοδο Bradford	156
2.4.3 Ανοσοαποτύπωση (Western Blot)	157
2.4.3.1 Ηλεκτροφόρηση των Δειγμάτων σε Πηκτή SDS – Πολυακρυλαμιδίου .	157
2.4.3.2 Μεταφορά των Πρωτεϊνών σε Μembrάνη Νιτροκυτταρίνης.....	160
2.4.3.3 Επώση της Μembrάνης με Ειδικά Αντισώματα και Ανίχνευση των Πρωτεϊνών.....	161
2.4.4 Διαδικασία Διαχωρισμού Πρωτεϊνών που Προσδένονται στη Χρωματίνη (Chromatin Binding Assay, CBA)	162
2.4.5 Αντίδραση Λουσιφεράσης.....	163
2.5 Οπτικές Μέθοδοι	165
2.5.1 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός.....	165
2.5.1.1 Ανοσοκυτταροχημεία	165
2.5.1.2 Ανοσοϊστοχημεία.....	166
2.5.2 Χρώση Πυρήνα.....	167
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	169
1. Εγκαθίδρυση Συνθηκών Καλλιέργειας και Διαφοροποίησης Πειραματικών Μοντέλων	171
1.1 In Vitro Μοντέλα Νευρικής Διαφοροποίησης.....	171
1.1.1 Νευροβλαστωματικά Κύτταρα SK-N-Be-(2)-C	172
1.1.1.1 Εμπλουτισμός της Καλλιέργειας των Be(2)- C Κυττάρων με τον Κυτταρικό Υποπληθυσμό Τύπου I.....	176

1.1.2	Νευροβλαστωματικά Κύτταρα SK-N-SH-SY5Y.....	178
1.1.3	Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα	179
2.	Έλεγχος του Πιθανή Ρόλου και της Σημασίας των Μεταγραφικών Παραγόντων NFIA και NFIB Κατά την Ενήλικη Νευρογένεση	183
2.1	Μελέτη της Έκφρασης και του Ρόλου των NFIA και B Μεταγραφικών Παραγόντων στην Ενήλικη Νευρογένεση	183
2.1.1	Το Πρότυπο Έκφρασης των NFIA και B στην Οδοντωτή Έλικα του Ενήλικου Ιπποκάμπου και στην Υποκοιλιακή Ζώνη των Πλάγιων Κοιλιών	183
2.1.2	Μελέτη των Μεταγραφικών Επιπέδων του NFIA και NFIB Κατά τη Νευρική Διαφοροποίηση των Πρόδρομων Νευρικών Κυττάρων, <i>in vitro</i>	187
2.1.3	Κατασκευή Ιικών Φορέων για την Καταστολή της Έκφρασης μέσω miRNAs για την Καταστολή της Έκφρασης των Μορίων NFIA και NFIB, <i>in vivo</i>	188
3.	Διερεύνηση του Ρόλου και της Ρύθμισης της Γονιδιακής Έκφρασης της Μεθυλοτρανσφεράσης της Αργινίνης PRMT8 στην Ενήλικη Νευρογένεση	191
3.1	Ανάλυση του Προτύπου Έκφρασης της Μεθυλοτρανσφεράσης της Αργινίνης PRMT8 στην Οδοντωτή Έλικα του Ιπποκάμπου.....	191
3.2	Κατασκευή Πλασμιδιακών Κατασκευών για την Υπερέκφραση και την Καταστολή της Έκφρασης, μέσω miRNAs, της Πρωτεΐνης PRMT8.....	193
3.3	Χαρακτηρισμός του 5' Άκρου του Γονιδίου <i>Prmt8</i> με Σκοπό την Κλωνοποίηση του Μεταγράφου που Αντιστοιχεί στην Πυρηνική Ισομορφή της Πρωτεΐνης.....	196
3.3.1	Προσπάθεια Ταυτοποίησης του 5' Άκρου του Γονιδίου <i>prmt8</i> με τη Μέθοδο cRACE: Η Ανακάλυψη Ενός Νέου Εξονίου Πιθανόν Οδηγεί σε μία Νέα Ισομορφή της Πρωτεΐνης.....	198
3.3.2	Προσπάθεια Ταυτοποίησης του 5' Άκρου του Γονιδίου <i>prmt8</i> με τη Μέθοδο 5'RLM RACE.....	205
4.	Διερεύνηση των Επιπέδων Ρύθμισης της Έκφρασης του Μεταγραφικού Παράγοντα Neurogenin2 (Ngn2) κατά τη Νευρική Διαφοροποίηση.....	207
4.1	Έλεγχος της Έκφρασης του Γονιδίου <i>Ngn2</i> στο Επίπεδο της Μεταγραφής.....	208

4.2 Διερεύνηση των Επιπέδων Ρύθμισης της Έκφρασης του Μεταγραφικού Παράγοντα Ngn2 κατά τη Νευρική Διαφοροποίηση.....	211
4.3 Η Συνεχής Παρουσία του RA είναι Απαραίτητη για την Ελεγχόμενη Αύξηση των Επιπέδων mRNA του Γονιδίου Ngn2 κατά τη Διάρκεια της Διαφοροποίησης.....	212
4.4 Μελέτη των Έπιγενετικών Χαρακτηριστικών του 5' Άκρου του Γονιδίου <i>Ngn2</i> στα SH-SY5Y Κύτταρα	213
4.4.1 Ανάλυση του Προτύπου Μεθυλίωσης της Περιοχής του Υποκινητή του Γονιδίου <i>Ngn2</i>	213
4.4.2 Κλωνοποίηση Περιοχών του Υποκινητή του Γονιδίου <i>Ngn2</i> και Ανάλυση της Ενεργότητας με Δοκιμασίες Λουσιφεράσης σε Πειράματα Παροδικής Διαμόλυνσης	216
4.5 Η Έκφρασης του Γονιδίου <i>Ngn2</i> Ελέγχεται στο Επίπεδο της Μετάφρασης.....	219
4.5.1 Αποκάλυψη μιας Αρνητικής Συσχέτισης μεταξύ του Μεταγραφικού Παράγοντα Ngn2 και της HuD, μιας Πρωτεΐνης Πρόσδεσης στο RNA (RNA Binding Protein).....	220
4.5.2 Η 5' Μη Μεταφραζόμενη Περιοχή του mRNA που Παράγεται από το Γονίδιο Ngn2 Διαδραματίζει Σημαντικό Ρόλο στη Ρύθμιση της Μετάφρασής του, καθώς και στην Αλληλεπίδραση της Πρωτεΐνης Ngn2 με την HuD.....	224
4.5.3 Η 5' μη Μεταφραζόμενη Περιοχή του Γονιδίου Ngn2 Κατέχει Καθοριστικό Ρόλο στη Μεταφρασσιμότητα του	228
4.6 Μελέτη της Μεταγραφικής Ενεργότητας του Μεταγραφικού Παράγοντα Ngn2. 231	
4.6.1 Ο Μεταγραφικός Παράγοντας Sox11 Ελέγχει την Επαγωγή της Έκφρασης της HuD από την Ngn2 και Ενδεχομένως και Άλλων Γονιδίων-Στόχων Αυτής της Πρωτεΐνης	231
4.6.2 Προκαταρτική Ανάλυση των Μεταγραφικών Στόχων της Πρωτεΐνης Ngn2 σε Επίπεδο Γονιδιώματος	232
4.7 Ανάλυση Αλληλούχισης του RNA στα Κύτταρα SH-SY5Y	235
5. Μεταβολές στο Πρότυπο της Έκφρασης Μεταγραφικών Παραγόντων των Οικογενειών bHLH και SoxC, καθώς και των PRMTs σε Συνθήκες Απορρύθμισης της Φυσιολογικής	

Λειτουργίας των Νευρικών Κυττάρων Εξαιτίας της Χρήσης Κανναβινοειδών και του Στρες.....	243
5.1 Έλεγχος στον Ιππόκαμπο Επίμυνων που τους Έχει Χορηγηθεί Δ9-Τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC) κατά την Περίοδο της Εφηβείας.	243
5.2 Έλεγχος της Επίδρασης Στρεσογόνων Παραγόντων στην Έκφραση Γονιδίων που Εμπλέκονται στη Νευρογένεση	245
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	247
Συντομογραφίες.....	259
Ευρετήριο Εικόνων	265
Ευρετήριο Πινάκων.....	279
Παράρτημα Αλληλουχιών.....	281
Παράρτημα Πινάκων.....	283
Βιβλιογραφία.....	305

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ενήλικη νευρογένεση ελέγχεται μέσω εξωγενών σημάτων τα οποία εκκρίνονται από το μικροπεριβάλλον και ρυθμίζουν με αυστηρά καθορισμένο χωροχρονικό τρόπο την έκφραση ενδογενών μορίων που χαρακτηρίζουν τα επιμέρους στάδια αυτής της πορείας. Όλα τα περιβαλλοντικά σήματα που ελέγχουν τη νευρογένεση, θα μεταφραστούν τελικά σε μια ιεραρχημένη ακολουθία προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης εξειδικευμένων για κάθε στάδιο, που με τη σειρά τους θα ενορχηστρώσουν την ομαλή ανάπτυξη του βλαστικού κυττάρου σε ώριμο νευρώνα. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των επιγενετικών, μεταγραφικών και μετα-μεταγραφικών μηχανισμών, που αποτελούν τη βάση αυτών των γενετικών προγραμμάτων, δεν είναι πλήρως κατανοητή και αποτελεί ένα δυναμικό πεδίο έρευνας. Στόχος αυτής της διατριβής ήταν η κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης επιγενετικών ρυθμιστών και μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στην πορεία της νευρογένεσης και συγκεκριμένα της μεθυλοτρανσφεράσης της αργινίνης PRMT8, καθώς και της πρωτεΐνης Ngn2.

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί συμβάλλουν στη ρύθμιση της έκφρασης μορίων που καθορίζουν την ομοιότητα των πρόδρομων νευρικών κυττάρων και εναρμονίζουν την αλληλεπίδραση των εξωγενών περιβαλλοντικών ερεθισμάτων με το ενδογενές γενετικό πρόγραμμα. Η μεθυλίωση των ιστονών σε κατάλοιπα αργινίνης αποτελεί έναν νέο μηχανισμό δυναμικής ρύθμισης της δομής της χρωματίνης, και επιτελείται από μια κατηγορία ενζύμων που ονομάζονται PRMTs (*Protein Arginine Methyl Transferases*), ορισμένα από τα οποία δρουν ως επιγενετικοί ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων που ελέγχουν τις ιδιότητες της πολυδυναμίας στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα. Η πρωτεΐνη PRMT8 παρουσιάζει ενδιαφέρον επειδή, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μέλη, εκφράζεται αποκλειστικά στο νευρικό σύστημα. Μεθυλιώνει κατάλοιπα αργινίνης της ιστόνης H4, μια ιδιότητα που σε συνδυασμό με την άφθονη έκφρασή της στον ενήλικο εγκέφαλο οδήγησε στην υπόθεση ότι μπορεί να συμμετέχει στον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων σημαντικών για την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης. Δεν είναι όμως ακόμη γνωστά τα βιολογικά σημαντικά υποστρώματά της ούτε και ο ρόλος της στη διαδικασία της ενήλικης νευρογένεσης. Θεμελιώδη ρόλο στη νευρογένεση, τη διατήρηση του δυναμικού των νευρικών βλαστικών κυττάρων και τον καθορισμό της κυτταρικής μοίρας παίζουν επίσης

και οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*). Ένα από τα προνευρικά γονίδια αυτής της οικογένειας που αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της νευρογένεσης και ελέγχεται από το μονοπάτι Notch είναι το *Ngn2*. Ελέγχει την έκφραση γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη σωστή πορεία και ολοκλήρωση της νευρικής διαφοροποίησης, και συμβάλλει καθοριστικά στον σχηματισμό της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου, ενώ η απορρύθμισή του έχει συσχετισθεί με νευρολογικές δυσλειτουργίες. Η έκφραση και η ενεργότητα της πρωτεΐνης *Ngn2* υπόκεινται σε αυστηρό έλεγχο ο οποίος είναι απαραίτητος, προκειμένου ένα πρόδρομο νευρικό κύτταρο να ξεκινήσει τη διαφοροποίησή του και να ωριμάσει τελικά ως ένας λειτουργικός νευρώνας. Ωστόσο ο τρόπος ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου δεν είναι ακόμη κατανοητός.

Μελετήσαμε, αρχικά, το πρότυπο έκφρασης της *PRMT8*, καθώς και δύο μεταγραφικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με την *Ngn2*, των επιγενετικών ρυθμιστών *NFIA* και *NFIB* στον ιππόκαμπο ενήλικου ποντικού, χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα έναντι αυτών των πρωτεϊνών, σε συνδυασμό με τον δείκτη βλαστικότητας *Sox2*, τον γλοιακό δείκτη *GFAP*, καθώς και τους δείκτες νευρικής διαφοροποίησης *DCX* και *NeuN*. Παρατηρήσαμε ότι τόσο ο *NFIA* όσο και ο *NFIB* εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό και στις δύο νευρογενικές περιοχές, και μάλιστα στην υποκοκκιώδη ζώνη της οδοντωτής έλικας συνεκφράζονται τόσο με τον δείκτη *Sox2* όσο και με τον πρώιμο νευρικό δείκτη *DCX*, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της πορείας της ενήλικης νευρογένεσης. Δείξαμε επίσης για πρώτη φορά, ότι η *PRMT8* συνεκφράζεται με την πρωτεΐνη *NeuN* η οποία εντοπίζεται στον πυρήνα των ώριμων νευρικών κυττάρων στην κοκκιώδη στοιβάδα της οδοντωτής έλικας, ενώ δεν συνεντοπίζεται με τον δείκτη *DCX*. Παρατηρήσαμε ότι η υποκυτταρική κατανομή της *PRMT8* σε αυτή την περιοχή είναι πυρηνική και όχι μεμβρανική, ένα εύρημα που προσδίδει νέο ενδιαφέρον για το ρόλο αυτού του ενζύμου στα ώριμα νευρικά κύτταρα. Προκειμένου να διερευνήσουμε τον ρόλο της *PRMT8* *in vivo*, κατασκευάσαμε πλασμιδιακούς φορείς με στόχο την παρασκευή ρετροϊών για την υπερέκφραση ή την καταστολή της πρωτεΐνης. Για τα πειράματα υπερέκφρασης, υποκλωνοποιήθηκε η κωδική περιοχή του γονιδίου στον ιικό φορέα *pCAG-IRES-GFP*, ενώ για την καταστολή σχεδιάστηκαν και κλωνοποιήθηκαν στον ίδιο φορέα τεχνητά *miRNAs*, η αποτελεσματικότητα των οποίων ελέγχθηκε σε πειράματα *in vitro*. Απώτερος στόχος ήταν η διαμόλυνση της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου ενήλικου ποντικού, για να εξετάσουμε κατά πόσο η τροποποίηση της έκφρασης της

PRMT8 επηρεάζει την πορεία της νευρογένεσης. Κατά τη διάρκεια του ελέγχου της λειτουργικότητας των miRNAs για την καταστολή της PRMT8 σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης, διαπιστώσαμε ότι το cDNA που είχαμε χρησιμοποιήσει και το οποίο αντιστοιχούσε στο mRNA που ήταν καταχωρημένο στη βάση δεδομένων, παρήγαγε μόνο τη μεμβρανική μορφή. Το γεγονός ότι δεν εντοπίσαμε κανένα κύτταρο στο οποίο η PRMT8 να κατανέμεται στον πυρήνα, μας έκανε να υποθέσουμε ότι ίσως η κωδική περιοχή που έχουμε κλωνοποιήσει δεν είναι εκείνη που παράγει την πυρηνική ισομορφή της πρωτεΐνης, οπότε μελετήσαμε αναλυτικότερα το 5' άκρο του γονιδίου προκειμένου να διερευνήσουμε αν υπάρχει κάποιο άλλο μετάγραφο που θα μπορούσε να ευθύνεται για αυτή τη μορφή. Ακολουθώντας μεθόδους όπως την cRACE, ή την 5' RLM-RACE, σε συνδυασμό με διάφορους εκκινητές, διαπιστώσαμε ότι το γονίδιο αυτό χαρακτηρίζεται από ένα σύνθετο 5' άκρο, και χαρακτηρίσαμε αρκετά νέα εναλλακτικά μετάγραφα. Ένα από αυτά διαφέρει από το γνωστό mRNA μόνο στο πρώτο εξώνιο, το οποίο περιέχει ένα κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης που ανοίγει ένα αναγνωστικό πλαίσιο 18 αμινοξέων το οποίο συνεχίζεται κανονικά στο εξώνιο 2. Μπορεί έτσι να παραχθεί μια νέα ισομορφή της πρωτεΐνης, η οποία διαφέρει από την μέχρι τώρα γνωστή μόνο σε αυτή τη μικρή περιοχή, και είναι αρκετά συντηρημένη μεταξύ ανθρώπου και ποντικού. Από τη νέα αυτή αλληλουχία απουσιάζει η γλυκίνη στη θέση 2, η οποία στην χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη ευθύνεται για τη μεμβρανική κατανομή της PRMT8. Κατά συνέπεια, θεωρούμε ότι η νέα ισομορφή που ταυτοποιήσαμε αποτελεί την πυρηνική μορφή. Η επιβεβαίωση και περαιτέρω μελέτη αυτής της ισομορφής, σε συνδυασμό με τα εργαλεία που έχουμε κατασκευάσει για την τροποποίηση της έκφρασης της PRMT8, θα συμβάλλει σημαντικά στη διερεύνηση των ερωτημάτων που σχετίζονται με την συμμετοχή αυτής της πρωτεΐνης στη νευρική διαφοροποίηση.

Παράλληλα, διερευνήσαμε τα επίπεδα ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου *Ngn2* κατά τη νευρική διαφοροποίηση *in vitro*, χρησιμοποιώντας ως κύρια μοντέλα πρόδρομα νευρικά κύτταρα απομονωμένα από ιππόκαμπο ενήλικου ποντικού καθώς και την ανθρώπινη νευροβλαστωματική σειρά SH-SY5Y, και διαπιστώσαμε ότι η ρύθμιση αυτή είναι πολύ πιο σύνθετη από ότι πιστευόταν. Στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα το γονίδιο εκφράζεται μέσα στις τρεις πρώτες ώρες της διαφοροποίησης, ενώ στη συνέχεια η έκφρασή του μειώνεται δραματικά. Στα νευροβλαστωματικά κύτταρα το mRNA αυξάνεται με προοδευτικό τρόπο κατά τη διαφοροποίηση και η έκφραση του διατηρείται σε σχετικά

σταθερά και χαμηλά επίπεδα. Προς έκπληξη μας, είδαμε ότι στις αντίστοιχες συνθήκες αλλά απουσία του RA που επάγει τη νευρική διαφοροποίηση, τα επίπεδα mRNA του γονιδίου είναι πολύ αυξημένα, επομένως η συνεχής παρουσία του RA είναι απαραίτητη για την ελεγχόμενη (συγκρατημένη) αύξηση του mRNA. Δείξαμε επίσης ότι οι 5' ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου, παρουσιάζουν ένα δυναμικό πρότυπο μεθυλίωσης το οποίο εξαρτάται από το περιβάλλον και την κατάσταση των κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι η έκφραση του *Ngn2* μπορεί να υπόκειται σε επιγενετικό έλεγχο κατά τη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης. Μελετώντας τις μεταβολές στο επίπεδο της πρωτεΐνης αντιληφθήκαμε μια αναντιστοιχία με τα αντίστοιχα επίπεδα του mRNA, η περαιτέρω διερεύνηση της οποίας μας έδειξε ότι εκτός από το επίπεδο της μεταγραφής, υπάρχει ένας ακόμη σημαντικός έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *Ngn2* και στο επίπεδο της μετάφρασης. Μέσω αυτών των πειραμάτων, αποκαλύφθηκε επίσης η παρουσία ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης μεταξύ των επιπέδων της *Ngn2* και της HuD, μιας πρωτεΐνης με ιδιότητες πρόσδεσης στο RNA, η οποία έχει την ικανότητα να ενισχύει ή να καταστέλλει τη μετάφραση των mRNA-στόχων, και κατ' αυτόν τον τρόπο να ρυθμίζει προγράμματα γονιδιακής έκφρασης- απαραίτητα για την αποτελεσματική απόκριση των κυττάρων στις προκλήσεις του εξωτερικού περιβάλλοντος. Στον μηχανισμό αυτό, σημαντικό ρόλο φαίνεται ότι έχει η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του *Ngn2* mRNA τόσο για τη ρύθμιση της μετάφρασης όσο και για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης *Ngn2* με την HuD. Παρατηρήσαμε επίσης ότι στα νευροβλαστωματικά αλλά και στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα η εξωγενής *Ngn2* αυξάνει την έκφραση της HuD στον ευρύτερο κυτταρικό πληθυσμό, τόσο στην κατάσταση πολλαπλασιασμού όσο και της διαφοροποίησης, φανερώνοντας ότι ένας μικρός αριθμός κυττάρων που εκφράζουν *Ngn2* μπορεί να επηρεάζει την έκφραση της HuD σε περισσότερα κύτταρα. Δείξαμε ότι η παρουσία του Sox11, ενός άλλου σημαντικού ρυθμιστή της νευρογένεσης, εξειδικεύει την δράση της *Ngn2*, περιορίζοντας την έκφραση της HuD αποκλειστικά στα *Ngn2*⁺ κύτταρα, ένα εύρημα που υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων *Ngn2* και Sox11 μπορεί να συντονίζει τη ρύθμιση της έκφρασης και άλλων γονιδίων-στόχων τους. Γνωρίζοντας ότι η πρωτεΐνη *Ngn2* συνεργάζεται με τον Sox11 για τον επαναπρογραμματισμό φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων προς τη νευρική γενεαλογία, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η συγχρονισμένη έκφραση αυτών των δύο μορίων σε ένα κύτταρο είναι ικανή να κατευθύνει τη μοίρα του, και ενδεχομένως και του

γειτονικού του, συντονίζοντας ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες μέσω μηχανισμών στους οποίους εμπλέκονται πρωτεΐνες με ιδιότητες πρόσδεσης στο RNA, όπως η HuD. Παράλληλα, εγκαθιδρύσαμε αξιόπιστες συνθήκες ανοσοκατακρήμνισης της Ngn2 και ξεκινήσαμε πειράματα για τη μελέτη των μεταγραφικών της στόχων σε επίπεδο γονιδιώματος (ChIP-Seq). Επιχειρήσαμε επίσης να αναλύσουμε το σύνολο των γονιδίων που μεταγράφονται (RNAseq), σε διακριτά στάδια της νευρικής διαφοροποίησης στα οποία το πρότυπο έκφρασης της Ngn2 μεταβάλλεται με καθορισμένο τρόπο, καθώς και σε συνθήκες στις οποίες η Ngn2 εκφράζεται αλλά τα κύτταρα δεν διαφοροποιούνται. Οι γονδιακές ομάδες χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά με τη χρήση της βάσης δεδομένων GO. Η ανάλυση έδειξε ότι αρκετές κύριες κατηγορίες GO ήταν σημαντικά εμπλουτισμένες σε κάθε επιμέρους στάδιο, αποκαλύπτοντας μια συντονισμένη ρύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων στην πορεία της διαφοροποίησης. Τα γονίδια που ταυτοποιήθηκαν με αυτή την πειραματική προσέγγιση παρέχουν μια πηγή για μελλοντικές μελέτες των μηχανισμών μέσω των οποίων επιτυγχάνεται αυτός ο συντονισμός, καθώς και για την καλύτερη κατανόηση του δικτύου στο οποίο συμμετέχουν βασικοί ρυθμιστές της νευρογένεσης ή έκφραση των οποίων ρυθμίζεται εκλεπτυσμένα σε πολλαπλά επίπεδα, όπως είναι η Ngn2.

Τέλος, μελετώντας την απορύθμιση της ομοιόστασης και της φυσιολογικής λειτουργίας των νευρικών κυττάρων η οποία προκαλείται κάτω από καταστάσεις φαρμακολογικού ή αναπτυξιακού στρες σε δύο παραδείγματα *in vivo*, διαπιστώσαμε ότι οι συνθήκες αυτές μπορούν να τροποποιήσουν τα πρότυπα έκφρασης γονιδίων όπως τα *Ngn2*, και *Prmt8*, υπογραμμίζοντας το ρόλο των επιγενετικών μηχανισμών και του περιβάλλοντος στην αρμονική έκφραση αυτών των γονιδίων και κατά την ενήλικη ζωή.

ABSTRACT

Adult hippocampal neurogenesis is controlled by environment-derived signals, which are translated into a sequence of stage-specific gene expression programs that characterize the individual stages of this process and orchestrate the progressive development of a stem cell into a mature neuron. The coordinated interactions between the epigenetic, transcriptional and post-transcriptional mechanisms that control these genetic programs are not fully understood and comprise a dynamic research field. The main goal of this thesis was to investigate the regulatory mechanisms that govern the expression and function of transcription factors and epigenetic modulators which are involved in neurogenesis focusing on the arginine methyltransferase PRMT8, and the bHLH protein Neurogenin 2 (Ngn2).

The epigenetic mechanisms contribute to the expression of genes that determine neural progenitor cell homeostasis and harmonize the exogenous environmental signals with the endogenous genetic programs. Histone methylation on arginine residues has recently emerged as a new mechanism implicated in the dynamic regulation of chromatin structure and epigenetic memory. It is carried out by specialized enzymes called PRMTs (*Protein αRginine Methyl Transferases*), some of which are acting as epigenetic regulators of genes that control the pluripotency properties of embryonic stem cells. The PRMT8 protein is particularly interesting, because in contrast to the other members of the family, it is expressed exclusively in the nervous system. It methylates arginine residues on histone H4, a property which together with its abundant expression in the adult brain, has led to the hypothesis that it may participate in the regulation of the expression of genes with critical roles in neuronal differentiation. Nevertheless, neither its biological substrates nor its putative role in the nervous system and the process of adult neurogenesis are yet known. A fundamental role in neurogenesis as well as in neural stem cell maintenance and cell fate determination is played by the bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) family of transcription factors. One of the proneural genes of this family which is a crucial regulator of neurogenesis, and is regulated by the Notch signaling pathway is *Ngn2*. *Ngn2* controls the expression of genes which are important for neuronal differentiation and plays a crucial role in the development of the dentate gyrus of the hippocampus, while its dysregulation

has been linked to neurological disorders. Both the expression and the activity of Ngn2 are under strict control which is essential for the initiation of the differentiation process of a neural progenitor cell. However, the regulation of Ngn2 gene expression is still not fully understood.

Initially, we analysed the expression profile of PRMT8 and two transcription factors which interact with Ngn2, the epigenetic regulators NFIA and NFIB, in adult mouse hippocampus, using specific antibodies in combination with the multipotency marker Sox2 and the glia marker GFAP, as well as with the neuronal markers DCX and NeuN. We observed that NFIA and NFIB are abundantly expressed in both neurogenic regions. In the subgranular zone of the dentate gyrus they are co-expressed with Sox2 and the early differentiation marker DCX, implying that both transcription factors might be involved in the early stages of adult neurogenesis. We also showed for the first time, that PRMT8 is localized solely in the mature NeuN⁺ neurons in the granular zone of the dentate gyrus, and it is never expressed together with DCX. We found that the subcellular distribution of PRMT8 in these cells is exclusively nuclear, as it was not observed in the plasma membrane, a finding that provides new insights for the functions of this enzyme in the mature neurons. To investigate the role of PRMT8 *in vivo*, we generated retroviral vectors in order to overexpress or downregulate the protein in the neurogenic regions of the adult mouse brain. For the overexpression experiments we subcloned the coding region of *PRMT8* in the viral vector pCAG-IRES-GFP, and for the suppression we designed and cloned in the same vector artificial miRNAs, the efficiency of which was initially tested *in vitro*, in transient transfection experiments. During these *in vitro* experiments we realized that the cDNA we had used, and corresponded to the sequence that was annotated in the NCBI database, produced only the membrane-bound form. Since we could not identify any cell in which the exogenous PRMT8 was localized in the nucleus, we reasoned that the coding sequences we had cloned were not sufficient to produce the nuclear isoform. For this reason, we decided to analyze more extensively the 5' end of the gene, in order to find out if there is another transcript encoding the nuclear protein. By employing methods such as cRACE or 5' RLM-RACE, in combination with various primers, we discovered that this gene is characterized by a complex 5' end, and identified several alternative transcripts not previously known. One of them differs from the established *PRMT8* mRNA only in the first exon. The new exon contains a unique translation initiation codon that opens a reading

frame of 18 amino acids which is continuing without interruption in exon 2, thereby producing a protein that differs from the already known only in this small region which is highly conserved between human and mouse. This region lacks the glycine residue at position 2 which is responsible for the anchorage of the PRMT8 protein to the plasma membrane, suggesting that the new isoform may represent the nuclear isoform. The validation and further analysis of this isoform, exploiting also the tools we have generated in order to modify the expression of PRMT8, is expected to contribute significantly to uncover the role of this protein in neuronal differentiation.

In parallel, we investigated the regulation of *Ngn2* gene expression during neuronal differentiation *in vitro*, using as models neural progenitor cells (NPCs) from adult mouse hippocampus as well as the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, and showed that it is more complex than previously thought. In the NPCs, the *Ngn2* mRNA levels increase fast within the first three hours of differentiation, and then decrease rapidly to undetectable levels. In the neuroblastoma cells the *Ngn2* mRNA increases gradually at the early stages of differentiation and then it remains at constantly low levels for the rest of the program. To our surprise, we realized that in the absence of RA which is essential for the neuronal differentiation in low serum conditions, the mRNA levels of *Ngn2* rise dramatically and remain high, indicating that the continuous presence of RA is important for the control of the steady state levels of the *Ngn2* mRNA. We showed that the 5' regulatory sequences of the gene exhibit a dynamic methylation profile which is influenced by the microenvironment and the cell state, and matches the changes in the mRNA levels, suggesting that the expression of *Ngn2* might be subject to epigenetic control during neuronal differentiation. Interestingly, by studying the changes in the protein levels of Ngn2, we noticed a disparity with the corresponding mRNA levels. Further analysis revealed that in addition to the regulation at the level of transcription and mRNA stability, *Ngn2* expression is also regulated at the level of translation. These experiments also uncovered the presence of a negative feedback mechanism between Ngn2 and HuD, an RNA binding protein (RBP) which has the ability to enhance or suppress the translation of its mRNA targets, thereby adjusting gene expression programs that are essential for the efficient response of the cells to external environmental challenges. The 5' untranslated region of the *Ngn2* mRNA seems to play a fundamental role in this mechanism, influencing not only the regulation of translation but also the interplay between Ngn2 and

HuD. We also observed that the exogenous Ngn2 increased the expression of HuD in many untransfected cells in the culture, both in the SH-SY5Y and the NPCs, indicating that a small number of cells expressing Ngn2 is capable to influence the expression of endogenous HuD in the total cell population. Importantly, co-expression of Sox11, another important regulator of neurogenesis, normalized the activity of Ngn2, as it limited the expression of HuD exclusively in the Ngn2⁺ cells. This may indicate that the interaction between the transcription factors Ngn2 and Sox11 can also coordinate the expression of other target genes. Considering that the Ngn2 protein synergizes with Sox11 for reprogramming normal and cancer cells towards the neuronal lineage, we propose that the synchronized and fine-tuned expression of these two transcription factors in a cell can direct its fate, and possibly the fate of its neighboring cell, by coordinating intrinsic and extrinsic signals via mechanisms involving RBP proteins, such as the HuD. In parallel, we established reliable immunoprecipitation conditions for Ngn2, and initiated experiments in order to investigate its downstream targets at the genome-wide level (ChIP-Seq). We also attempted to analyze the transcriptome profile (RNAseq) at distinct stages of neuronal differentiation in which the expression pattern of Ngn2 changes in a defined manner, as well as in conditions in which Ngn2 is expressed but the cells are not differentiated. The gene groups were functionally characterized using the GO database. The analysis showed that several major GO categories were selectively enriched in each individual stage, revealing a coordinated regulation of the expression of specific groups of genes in the course of neuronal differentiation. The genes identified by this experimental approach may provide a source for future studies in order to understand the mechanisms by which this coordination is achieved, as well as the network of delicate key regulators of neurogenesis whose expression is adjusted at multiple levels, such as the bHLH transcription factor Ngn2.

Finally, by studying the deregulation of homeostasis and normal neuronal function which are caused by pharmacological or developmental stress in two different *in vivo* paradigms, we ascertained that these conditions can modify the expression pattern of genes like the *Ngn2* or the *Prmt8*, underscoring the role of the epigenetic mechanisms and the environment in the regulated expression of these genes during adult life.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΣΗ

1.1 *Ενήλικη Νευρογένεση*

Πριν από 60 και πλέον χρόνια, περίπου τη δεκαετία του 1950, ανοίχθηκε ένα νέο επιστημονικό πεδίο, αυτό των ενήλικων βλαστικών κυττάρων. Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα που διαθέτουν την ιδιότητα της αυτοανανέωσης τους όσο καθώς και ένα ισχυρό δυναμικό διαφοροποίησης προς ένα ή περισσότερα ή και όλα τα κυτταρικά πεπρωμένα. Οι επιστήμονες έχουν ανακαλύψει την παρουσία ενήλικων βλαστικών κυττάρων σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς. Το 1950, βρέθηκε για πρώτη φορά ότι ο μυελός των οστών διαθέτει τουλάχιστον δύο τύπους βλαστικών κυττάρων, τα αιμοποιητικά και τα μεσεγχυματικά. Σήμερα γνωρίζουμε ότι βλαστικά κύτταρα βρίσκονται σε πολλά όργανα του ενήλικου σώματος όπως στο περιφερικό αίμα, τα αγγεία του αίματος, τους σκελετικούς μύες, το δέρμα, τα δόντια, την καρδιά, το έντερο, το συκώτι, τις ωοθήκες, το επιθήλιο, τους όρχεις αλλά και τον εγκέφαλο.

Η πολυπλοκότητα της λειτουργίας του εγκεφάλου και των νευρωνικών δικτύων απέτρεπε τους επιστήμονες από το να σκεφτούν την πιθανότητα εμφάνισης ενός νέου, ώριμου νευρικού κυττάρου κατά την ενήλικη ζωή. Ήταν ωστόσο γνωστό ότι άλλα κύτταρα του νευρικού συστήματος, όπως η μικρογλοία, τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα, σε περίπτωση τραυματισμού μπορούσαν να διαιρεθούν και να αντιμετωπίσουν τη προκληθείσα βλάβη [1]. Για τα νευρικά κύτταρα όμως, με τις πολλές δενδριτικές διακλαδώσεις, τους πολυσυναπτικούς άξονες, που συνεχώς λαμβάνουν και μεταβιβάζουν σήματα μέσω των νευρωνικών δικτύων που σχηματίζουν, η ιδέα της δυνατότητας κυτταρικής διαίρεσης ήταν σαφώς ανύπαρκτη. Το 1962, ο Joseph Altman, ένας Ούγγρος επιστήμονας ο οποίος ξεκίνησε να μελετά την ανθρώπινη συμπεριφορά και τη δομή του εγκεφάλου αρχικά ως βιβλιοθηκάριος και αργότερα ως νευροεπιστήμονας, με πειράματα αυτοραδιογραφίας ήταν ο πρώτος που παρατήρησε πολλαπλασιαζόμενους νευρώνες και νευροβλάστες στον εγκέφαλο ενήλικων επίμων [2]. Τα ευρήματά του αντιμετωπίστηκαν με σκεπτικισμό από τους συναδέλφους τους, όμως τρία χρόνια αργότερα, δημοσίευσε μια σειρά από ισχυρά στοιχεία που αποδείκνυαν την παρουσία αδιαφοροποίητων κυττάρων, τα ποία μετά τη γέννηση μεταναστεύουν, από τις κοιλίες του πρόσθιου

εγκεφάλου στον ιππόκαμπο, όπου και διαφοροποιούνται [3]. Και τότε ήταν που άρχισε να χρησιμοποιείται να ακούγεται για πρώτη φορά ο όρος «Ενήλικη Νευρογένεση», η διαδικασία δηλαδή της γέννησης νέων λειτουργικών νευρώνων από ενήλικα πρόδρομα νευρικά κύτταρα στο ενήλικο νευρικό σύστημα [4]. Μερικά χρόνια αργότερα, το 1983, οι Steven Goldman και Fernando Nottebohm [5], μελετώντας τον τρόπο με τον οποίον τα καναρίνια, κάθε άνοιξη μαθαίνουν νέα κελαϊδίσματα, έτσι ώστε να προσελκύσουν τα θηλυκά με σκοπό να ζευγαρώσουν, βρέθηκαν μπροστά σε μία μεγάλη ανακάλυψη: τα καναρίνια κατά το τέλος της καλοκαιρινής περιόδου και με την έναρξη του φθινοπώρου, έχαναν τις δεξιότητες που είχαν αποκτήσει στο κελαϊδίσμα, και συμπεριφέρονταν σαν να ξεκινούσαν να μαθαίνουν από την αρχή. Παρατήρησαν ότι η συμπεριφορά αυτή σχετίζεται τόσο με την έκκριση ορμονών στο αίμα των πτηνών (τεστοστερόνη, οιστρογόνα) όσο και με τον κυτταρικό θάνατο νευρώνων του ανώτερου ακουστικού κέντρου [6]. Επιπλέον, ανακάλυψαν βλαστικά κύτταρα στην κοιλιακή ζώνη του εγκεφάλου, τα οποία ύστερα από ορισμένες μιτωτικές διαιρέσεις μεταναστεύουν προς την περιοχή του αρχιραβδωτού σώματος (*archistriatum*), μια περιοχή σημαντική για την παραγωγή του τραγουδιού, και διαφοροποιούνται σε νέους ώριμους νευρώνες. Οι νέοι αυτοί νευρώνες αντικαθιστούν τους προηγούμενους και συμμετέχουν απόλυτα φυσιολογικά στα νευρωνικά δίκτυα, χωρίς την παραμικρή δυσλειτουργία [6]. Η διαδικασία της ενήλικης νευρογένεσης στον εγκέφαλο των καναρινιών επαναλαμβάνεται καθ' όλη τη ζωή τους κατά την εναλλαγή των εποχών.

Οι επιστήμονες λοιπόν έκτοτε, δικαίως αναρωτιόνταν εάν η διαδικασία της νευρογένεσης λαμβάνει χώρα και στον ενήλικο εγκέφαλο άλλων οργανισμών, όπως των θηλαστικών. Οι συζητήσεις για την παρουσία βλαστικών κυττάρων στον ενήλικο εγκέφαλο είχαν ξεκινήσει ήδη από το 1962 αλλά η νευρογένεση ως ενεργή και φυσιολογική διαδικασία κατά την ενήλικη ζωή, δεν είχε ακόμη αποδειχθεί. Το 1996, ο Georg Kuhn και άλλοι συνεργάτες της ερευνητικής ομάδας του Fred Gage, απέδειξαν ότι τα νευρικά βλαστικά κύτταρα του ενήλικου επίμυος βρίσκονται στην υποκοκκιώδη ζώνη του ιππόκαμπου, την λεπτή αυτή ζώνη που χωρίζει την πολύμορφη στιβάδα της οδοντωτής έλικας (*hilus*) από την κοκκιώδη κυτταρική στοιβάδα (*granule cell layer*), και έχουν σημαντικό δυναμικό αυτοανανέωσης καθώς μπορούν και διαιρούνται μιτωτικά. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να μεταναστεύουν προς την κοκκιώδη στοιβάδα, όπου σταματούν να διαιρούνται και διαφοροποιούνται σε ώριμους νευρώνες [7]. Το 1998, ο Peter S. Eriksson και άλλοι οι

συνεργάτες πάλι από την ομάδα του Fred Gage, απέδειξαν ότι η ενήλικη νευρογένεση συμβαίνει και στον άνθρωπο με χαρακτηριστικά αντίστοιχα με αυτά που παρατηρούνται στους επίμυες [8].

Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η διαδικασία της νευρογένεσης σχετίζεται με την ηλικία [7]. Με το πέρασ των χρόνων μάλιστα, μειώνεται σημαντικά, κάτι που μπορεί να συνδέεται με τις δυσκολίες που εμφανίζονται στη μνήμη και τη μάθηση στις προχωρημένες ηλικίες [9]. Γενικότερα, η ενήλικη νευρογένεση μπορεί να επηρεαστεί θετικά ή αρνητικά από διάφορους παράγοντες, όπως τη φυσική άσκηση, τη μάθηση, το πλούσιο σε ερεθίσματα περιβάλλον, το στρες, κ.α., οι οποίοι επηρεάζουν τον ρυθμό πολλαπλασιασμού και επιβίωσης των νευρικών βλαστικών κυττάρων [9].

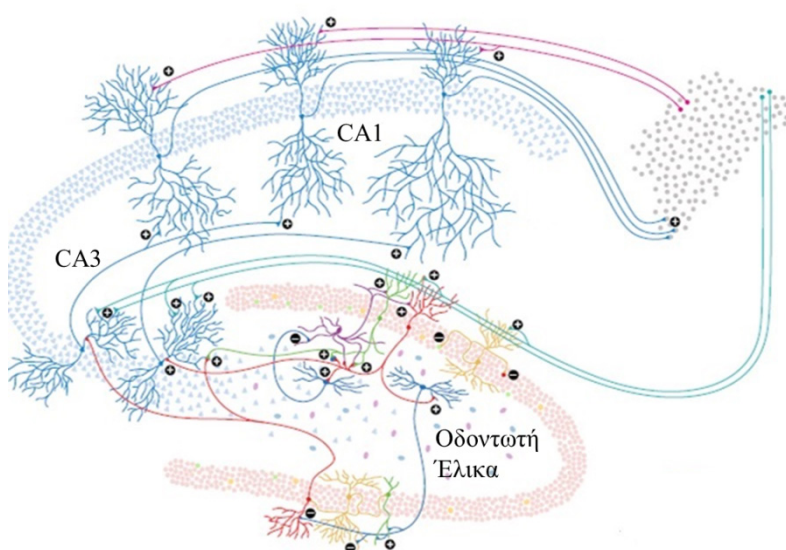
Έτσι λοιπόν, σήμερα γνωρίζουμε ότι υπάρχουν δύο νευρογενικές περιοχές στον εγκέφαλο των ενήλικων θηλαστικών: η υποκοκκιά της ζώνης της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου και η υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών (**Εικόνα 1**). Ωστόσο αν και νωρίζουμε ήδη αρκετά για τη διαδικασία αυτή, οι μηχανισμοί που ελέγχουν την ενεργοποίηση και την πορεία της νευρογένεσης παραμένουν άγνωστοι. Πότε ένα νευρικό βλαστικό κύτταρο «αποφασίζει» να διαφοροποιηθεί σε ένα νέο νευρώνα και γιατί; Μπορεί ένα τέτοιο κύτταρο να αντικαταστήσει ένα άλλο που πεθαίνει χωρίς καμία λειτουργική συνέπεια στο νευρωνικό δίκτυο; Η κατανόηση αυτών των ερωτημάτων αναμένεται να συμβάλλει καταλυτικά στην ανάπτυξη στρατηγικών για τη θεραπεία πολλών νευρολογικών διαταραχών και την επιδιόρθωση διαφόρων βλαβών του νευρικού συστήματος.



Εικόνα 1: Απεικόνιση των δύο νευρογενικών περιοχών του εγκεφάλου. Σε εγκάρσια τομή του εγκεφάλου ενήλικου ποντικού, ακεικονίζονται, όπως υποδεικνύουν τα βέλη, οι δύο περιοχές νευρογένεσης. Η οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου και η υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών (ΠΚ) είναι πλούσιες σε νευρικά βλαστικά κύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμους νευρώνες του ιπποκάμπου, καθώς και του οσφρητικού βολβού, μετά τη μετανάστευση τους εκεί διαμέσου του πρόσθιου μεταναστευτικού ρεύματος (ΠΜΡ). (Προσαρμογή και τροποποίηση από Ming and Song, 2011 [4])

1.1.1 Ενήλικη Νευρογένεση στην Οδοντωτή Έλικα του Ιππόκαμπου

Ο ιππόκαμπος, μέρος του μεταχιακού συστήματος του εγκεφάλου, αποτελεί το κέντρο μνήμης και μάθησης. Ανατομικά, το σχήμα του μοιάζει με αυτό του θαλάσσιου ζώου ιππόκαμπου, απ' το οποίο πήρε και το όνομα του (**Εικόνα 2**). Αποτελείται από τέσσερις *Cornu Ammonis*¹ περιοχές (CA1- CA4) και την οδοντωτή έλικα [10]. Η οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου αποτελεί το ένα από τα δύο νευρογενικά μικροπεριβάλλοντα του εγκεφάλου, όπου διαβιούν, αυτοανανεώνονται και διαφοροποιούνται τα νευρικά βλαστικά κύτταρα. Ωστόσο, αναπτυξιακά, η προέλευση αυτών των βλαστικών κυττάρων δεν είναι ακόμη γνωστή.



Εικόνα 2: Η οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου. Η οδοντωτή έλικα χαρακτηρίζεται από ένα πολύπλοκο τοπικό νευρωνικό δίκτυο διεγερτικών και ανασταλτικών σημάτων. Οι νευρώνες εκτείνουν τους δενδρίτες του προς τη περιοχή CA1 και τους άξονες τους προς την περιοχή CA3 του ιπποκάμπου. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Aimone et al*, 2014 [10]).

Η διαδικασία της ενήλικης νευρογένεσης στην οδοντωτή έλικα οδηγεί στη διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων σε ώριμα νευρικά κοκκιώδη κύτταρα (**Εικόνα 3**). Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα που βρίσκονται στην υποκοκκιώδη στοιβάδα της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου, έχουν τη μορφή κυττάρων ακτινωτής γλοίας, είναι γνωστά ως **πρόδρομα κύτταρα τύπου 1** (*radial glial-like type 1 progenitor cells*), και βρίσκονται σε ένα στάδιο ηρεμίας με χαμηλό ρυθμό αυτοανανέωσης [11], [4]. Τα κύτταρα αυτά, χωρίς να γνωρίζουμε τα ακριβή αίτια, αυξάνουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους και μετατρέπονται σε **πρόδρομα κύτταρα τύπου 2** (*type 2 progenitor cells*) [11], [4]. Στη συνέχεια, αυτά τα παροδικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα μετατρέπονται σε **κύτταρα**

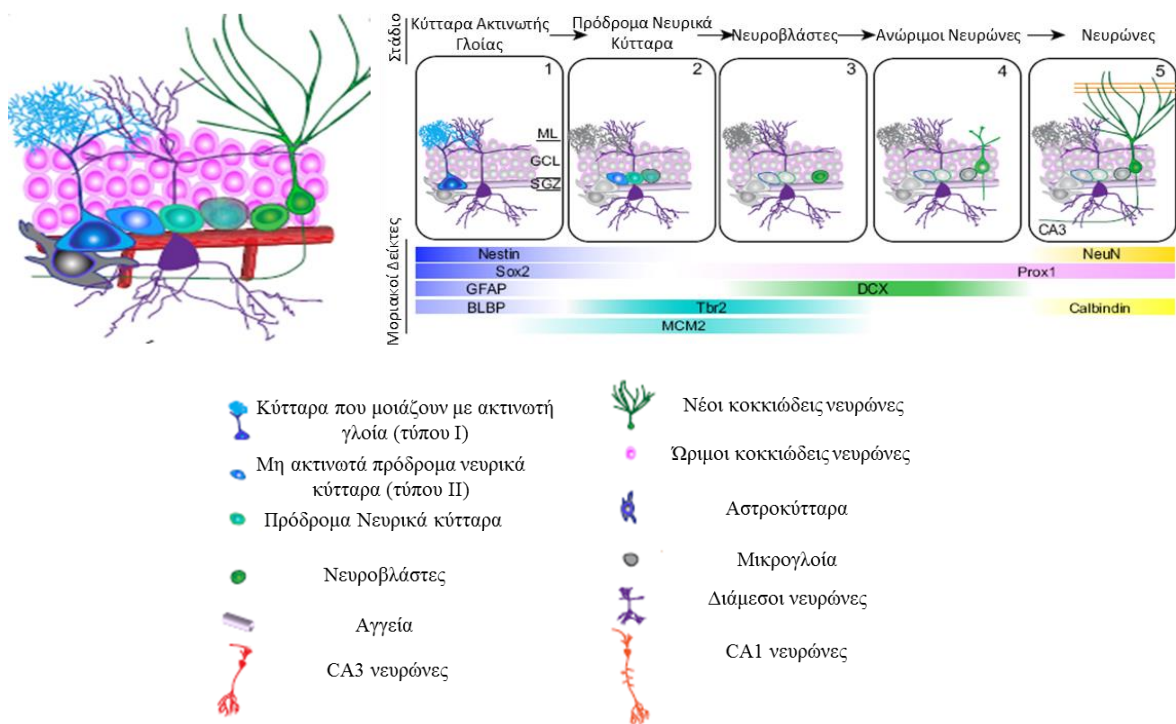
¹ Cornu Ammonis: το κέρασ του Amun, ενός θεού της Αιγύπτου. Πήρε την ονομασία αυτή λόγω του σχήματός του.

τύπου 3 ή νευροβλάστες (*type 3 neuroblasts*), τα οποία θα διαφοροποιηθούν πρώτα σε **ανώριμους νευρώνες ή κύτταρα τύπου 4** (*type 4, immature neurons*), και ύστερα σε **ώριμους νευρώνες** της κοκκιώδους στοιβάδας της οδοντωτής έλικας (*mature granule neurons*) [11], [4]. Κάθε διαφορετικό στάδιο στην πορεία της νευρικής διαφοροποίησης κατά τη νευρογένεση, χαρακτηρίζεται από την έκφραση εξειδικευμένων πρωτεϊνών-μοριακών δεικτών. Για παράδειγμα, τα κύτταρα τύπου 1 συνεκφράζουν τους μοριακούς δείκτες GFAP, Sox2 και Nestin ενώ τα ενδιάμεσα πρόδρομα νευρικά κύτταρα (τύπου 2) εκφράζουν μεταγραφικούς παράγοντες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στον προσδιορισμό του κυτταρικού πεπρωμένου των βλαστικών κυττάρων, όπως είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας basic Helix-Loop-Helix (bHLH), *Mash1* και *Neurogenin2* (*Ngn2*) [12]. Καθώς η πορεία της νευρογένεσης εξελίσσεται, η μετάβαση από το στάδιο των νευροβλαστών (τύπου 3) στο στάδιο των ανώριμων νευρώνων (τύπου 4) συνάδει με την έκφραση των μοριακών δεικτών DCX και PSA-NCAM [11], καθώς και του bHLH μεταγραφικού παράγοντα NeuroD1 [11], [12]. Όταν πια οι νέοι νευρώνες ωριμάσουν σε λειτουργικά νευρικά κύτταρα της κοκκιώδους στοιβάδας της οδοντωτής έλικας, εκφράζουν τους μοριακούς δείκτες όπως οι NeuN, calretinin και calbindin [4]. Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι υπάρχει ένα αυστηρό πρότυπο έκφρασης γονιδίων τα οποία είναι απαραίτητα για την προοδευτική ωρίμανση των κυττάρων και χαρακτηρίζουν τα επιμέρους στάδια της νευρογένεσης.

Κομβικό ρόλο στην πορεία της νευρογένεσης παίζουν και οι επιγενετικοί ρυθμιστές, οι οποίοι, μέσω των τροποποιήσεων του DNA ή της χρωματίνης, ελέγχουν τη μεταγραφή γονιδίων, υπεύθυνων για την άρτια ολοκλήρωση της διαδικασίας, όπως είναι τα γονίδια της οικογένειας bHLH.

Εκτός από τα ενδογενή μόρια που καθορίζουν τα στάδια της νευρικής διαφοροποίησης κατά τη νευρογένεση στον ιππόκαμπο, υπάρχουν και εξωγενείς παράγοντες στους οποίους περιλαμβάνονται θεμελιώδη σηματοδοτικά μονοπάτια και εκκρινόμενοι νευροδιαβιβαστές, που κατ' αντιστοιχία χαρακτηρίζουν και ρυθμίζουν τα επιμέρους στάδια. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια Notch, BMP, Shh και Wnt3A, στα οποία θα αναφερθούμε εκτενέστερα παρακάτω, φαίνεται πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ενεργοποίησης και της πορείας της νευρογένεσης [11]. Παράλληλα οι νευροδιαβιβαστές γ-αμινοβουτυρικό οξύ (*GABA*), η ντοπαμίνη (*DA*), η σεροτονίνη (*5HT*), η νορεπινεφρίνη (*NE*), η ακετυλοχολίνη (*Ach*), το γλουταμικό οξύ (*Glutamate*), καθώς και η νευροτροφίνη

BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) είναι εξίσου καθοριστικοί παράγοντες για τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων κυττάρων, τη μετανάστευση, την ωρίμανση, την ενσωμάτωση στο νευρωνικό δίκτυο, τη δενδριτική ανάπτυξη, και την επιβίωση των νευρώνων [4], [10]. Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι νέοι νευρώνες ενσωματώνονται λειτουργικά στο νευρωνικό δίκτυο είναι παρόμοιοι με αυτούς που χρησιμοποιούνται κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Οι διάμεσοι νευρώνες της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου εκκρίνουν GABA στο μικροπεριβάλλον τους, ενεργοποιώντας κατ' αυτόν τον τρόπο τους νέους νευρώνες ώστε να γίνουν διεγερτικοί γλουταματεργικοί νευρώνες [4].



Εικόνα 3: Η ενήλικη νευρογένεση στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου. Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε ώριμους νευρώνες περνώντας διαδοχικά από το στάδιο του πρόδρομου νευρικού κυττάρου, του νευροβλάστη, και του ανώριμου νευρώνα, εκφράζοντας χαρακτηριστικούς μοριακούς δείκτες σε κάθε ένα από αυτά. (Προσαρμογή και τροποποίηση από Ming and Song, 2011 [4]).

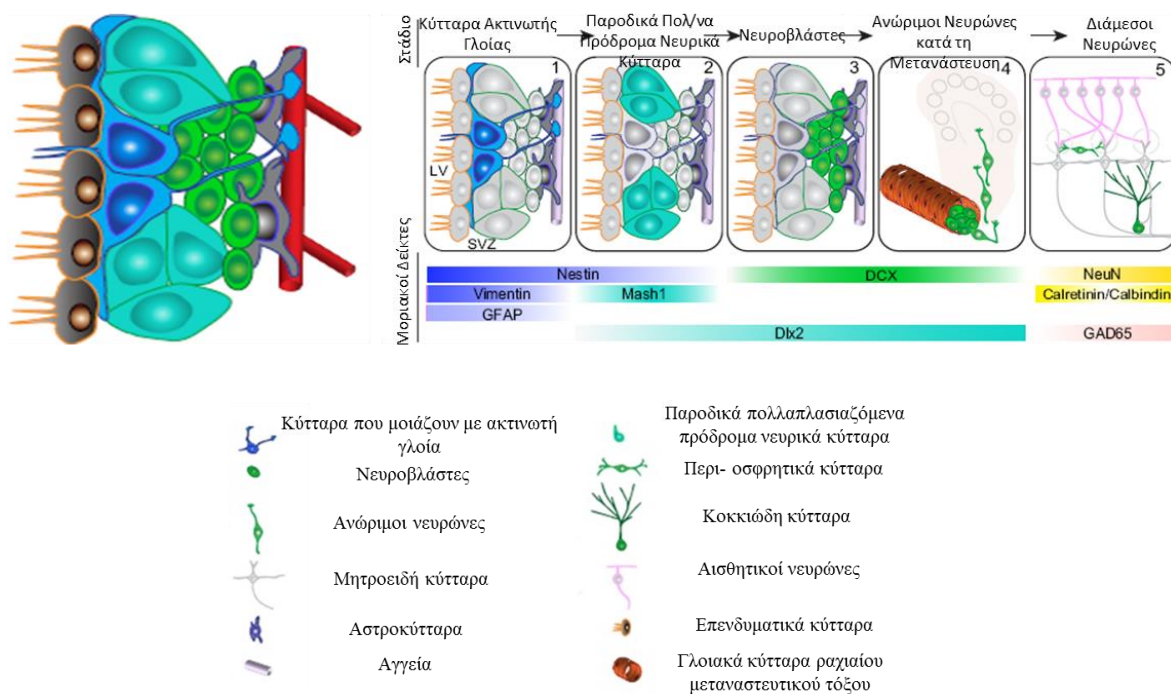
Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το νευρογενικό μικροπεριβάλλον της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου δεν αποτελείται μόνο από νευρικά βλαστικά κύτταρα, νευροβλάστες και ώριμους κοκκιώδεις νευρώνες. Σε αυτό συνυπάρχουν αστροκύτταρα, κύτταρα της μικρογλοίας, αγγεία και ενδοθηλιακά κύτταρα [4], [10] (**Εικόνα 3**). Ο ρόλος των αστροκυττάρων είναι πολύ κομβικός για την πορεία της νευρογένεσης μέσω πολλών μορίων (GFAP, vimentin, ephrin-B2, Il-1β, Il-6), αυξητικών παραγόντων (IGF, VEGF,

FGF-2, BDNF) αλλά και σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούν (Notch, Wnt3A) [10]. Η μικρογλοία, δηλαδή μακροφάγα κύτταρα και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του εγκεφάλου, εμπλέκεται στη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης παρέχοντας νευροπροστασία [10]. Απομακρύνει τόσο αποπίπτοντα κοκκιώδη κύτταρα όσο και νέα νευρικά κύτταρα που δεν καταφέρνουν να επιβιώσουν κατά την πορεία της νευρογένεσης [10]. Εκφράζουν κυρίως κυτταροκίνες και χυμοκίνες και ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια όπως είναι το Toll-4, ανάλογα με την εκάστοτε κατάσταση του μικροπεριβάλλοντος και με τον τρόπο αυτό είτε επάγουν είτε καταστέλλουν τη νευρογένεση, δρώντας πάντοτε νευροπροστατευτικά [10]. Ιδιαίτερης σημασίας είναι και η παρουσία των αγγείων και των ενδοθηλιακών κυττάρων στο νευρογενικό μικροπεριβάλλον [4]. Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα βρίσκονται κοντά σε αιμοφόρα αγγεία υποδηλώνοντας τη σημασία τους στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού, της νευρικής διαφοροποίησης αλλά και της επιβίωσης των νευρικών κυττάρων, μέσω των εξωκρινών παραγόντων – σημάτων που απελευθερώνονται από αυτά [4]. Διαπιστώνουμε, επομένως, ότι η ενήλικη νευρογένεση δεν είναι μια αυτόνομη, ανεξάρτητη και αυτορυθμιζόμενη διαδικασία. Αντιθέτως είναι απόλυτα συντονισμένη, εξαρτώμενη και καθοριζόμενη από το μικροπεριβάλλον στο οποίο διαβιούν τα νευρικά βλαστικά κύτταρα.

1.1.2 Ενήλικη Νευρογένεση στην Υποκοιλιακή ζώνη των Πλάγιων Κοιλιών

Η νευρογένεση στην υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών του εγκεφάλου διαφέρει σε ελάχιστα σημεία από την αντίστοιχη της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου (**Εικόνα 4**). Όπως και στον ιππόκαμπο, κύτταρα ακτινωτής γλοίας μετατρέπονται αρχικά σε μια κατηγορία πρόδρομων κυττάρων (*intermediate precursors*) τα οποία διαιρούνται γρήγορα, γνωστά και ως παροδικά πολλαπλασιαζόμενα πρόδρομα νευρικά κύτταρα (*transit amplifying progenitor cells*), τα οποία στη συνέχεια γίνονται νευροβλάστες, εκφράζοντας χαρακτηριστικούς δείκτες στα διάφορα στάδια. Οι νευροβλάστες, μεταναστεύουν στον οσφρητικό βολβό (*olfactory bulb, OB*) διαμέσου του πρόσθιου μεταναστευτικού ρεύματος (*rostral migratory stream, RMS*), ενός αυλού δομημένου από αστροκύτταρα [4]. Μόλις τα ανώριμα νευρικά κύτταρα φτάνουν στον οσφρητικό βολβό, αποκολλούνται από το RMS και καθώς κατευθύνονται ακτινωτά προς τα οσφρητικά σπειράματα (*glomeruli*), διαφοροποιούνται σε διάμεσους νευρώνες [4]. Η πλειοψηφία των κυττάρων διαφοροποιείται σε GABAεργικά κοκκιώδη κύτταρα, τα οποία επικοινωνούν με τα μητροειδή (*mitral*) και τα

θυσανωτά (tafted) κύτταρα μέσω δενδρο- δενδριτικών συνάψεων. Ένας μικρός αριθμός κυττάρων διαφοροποιούνται σε GABAεργικά σπειραματικά (periglomerular) κύτταρα, εκ των οποίων ένα μικρό ποσοστό είναι και ντοπαμινεργικά [4].



Εικόνα 4: Η ενήλικη νευρογένεση στην υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών. Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα, με μορφολογία ακτινωτής γλοίας, περνούν μέσα από διακριτά στάδια (παροδικά πολλαπλασιαζόμενα πρόδρομα νευρικά κύτταρα, νευροβλάστες, ανώριμοι νευρώνες) μέχρι να διαφοροποιηθούν σε διάμεσους νευρώνες του οσφρητικού βολβού. Κάθε στάδιο χαρακτηρίζεται και εδώ από την εξειδικευμένη έκφραση γονιδίων – μοριακών δεικτών (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Ming and Song, 2011* [4]).

Το νευρογενικό μικροπεριβάλλον της υποκοιλιακής ζώνης των πλάγιων κοιλιών έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με το αντίστοιχο της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου (**Εικόνα 4**). Ωστόσο, σε αυτό το μικροπεριβάλλον η εξειδικευμένη παρουσία των επενδυματικών κυττάρων που περιβάλλουν το κοιλιακό τείχος, έχει εξέχουσα σημασία. Τα επενδυματικά κύτταρα βρίσκονται σε στενή επαφή με τα νευρικά βλαστικά κύτταρα προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο ολόκληρο το μικροπεριβάλλον. Συγχρόνως, έχουν το δυναμικό να επιδράσουν στο κυτταρικό πεπρωμένο των νευρικών βλαστικών κυττάρων και μέσω των βλεφαρίδων που εκφύονται (cilia) μπορούν να ελέγχουν τη μετανάστευση των νευροβλαστών προς τον οσφρητικό βολβό.

1.2 Σηματοδοτικά Μονοπάτια που Συμμετέχουν στην Ενήλικη Νευρογένεση

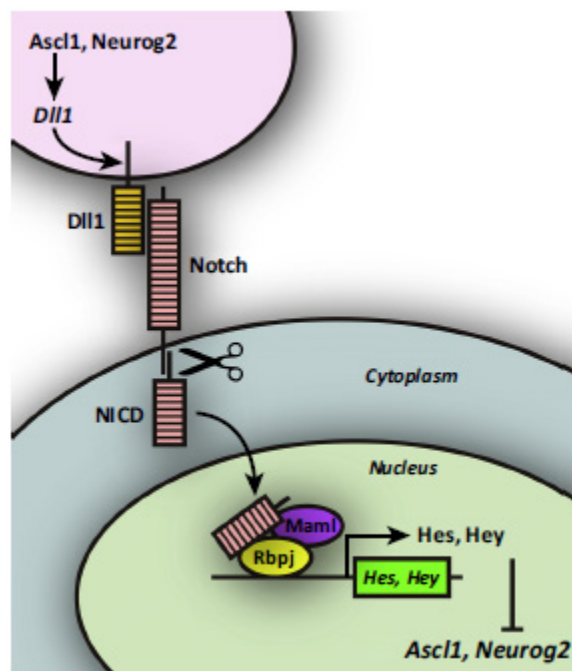
Όπως ήδη αναφέρθηκε, το νευρογενικό μικροπεριβάλλον διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη νευρογένεση. Οι εξωγενείς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται στο περιβάλλον των νευρικών βλαστικών κυττάρων, ελέγχουν τα διακριτά στάδια της πορείας της νευρογένεσης. Η σηματοδότηση των Notch, Sonic Hedgehog (Shh), Bone Morphogenetic Protein (BMP) και Wnt είναι θεμελιώδους σημασίας για τη διατήρηση και αυτοανανέωση των νευρικών βλαστικών κυττάρων και την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης.

1.2.1 Σηματοδοτικό Μονοπάτι Notch

Το μονοπάτι Notch, ένα από τα αρχέγονα αναπτυξιακά μονοπάτια, ιδιαίτερα συντηρημένο από τη *Drosophila* έως τον άνθρωπο, παίζει κομβικό ρόλο στη διατήρηση και αυτοανανέωση των νευρικών βλαστικών κυττάρων, τον καθορισμό του κυτταρικού τους πεπρωμένου και την απόπτωση τόσο κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος όσο και κατά την ενήλικη νευρογένεση. Η δραστηριότητα αυτής της σηματοδότησης είναι ιδιαίτερα αυξημένη στα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας, κάτι που εξυπηρετεί στη διατήρηση της δεξαμενής των βλαστικών κυττάρων τόσο στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου όσο και στην υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών [13]. Η ενεργή σηματοδότηση Notch απαιτεί διακυτταρική επαφή μέσω του προσδέτη Delta και του υποδοχέα Notch. Η επαφή αυτή, οδηγεί στο ένα κύτταρο (*signal-receiving cell*), στην πρωτεολυτική πέψη του Notch από την γ -σεκρετάση (γ -secretase), την απελευθέρωση του ενδοκυττάριου τμήματος του Notch NICD (*Notch Intracellular Domain*) στο κυτταρόπλασμα, και την είσοδό του στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα και κεντρικό διαμεσολαβητή της σηματοδότησης Notch Rbpj-k (*recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J*), ο οποίος είναι προσδεδεμένος στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων αυτού του μονοπατιού. Η πρόσδεση του NICD στον Rbpj-k οδηγεί στην απομάκρυνση κατασταλικών συμπλόκων όπως NCoR ή SMRT και αποακετυλασών των ιστονών (HDAC), και την αντικατάστασή τους από συν-ενεργοποιητές όπως η πρωτεΐνη Mam1 (*Mastermind-like protein1*) και ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών όπως η πρωτεΐνη p300 με

αποτέλεσμα τη χαλάρωση της χρωματίνης. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στην προσέλκυση της RNA πολυμεράσης II και την έναρξη της μεταγραφής γονιδίων-στόχων του Notch όπως οι πρωτεΐνες Hes (Hairy-enhancer of split), μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας bHLH που προσδένονται στο DNA και καταστέλλουν την έκφραση προ-νευρικών γονιδίων όπως τα *Mash1* και *Ngn2* τα οποία είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση της νευρογένεσης [14]. Αντίθετα, στο κύτταρο στο οποίο εκφράζεται ο προσδέτης του Notch (*signaling cell*), η μεταγραφή των προ-νευρικών bHLH γονιδίων ενεργοποιείται, καθώς τα γονίδια *Hes1* και *Hes5* παύουν να εκφράζονται, κατευθύνοντας το κύτταρο αυτό προς τη νευρική διαφοροποίηση.

Η σηματοδότηση του Notch δεν επηρεάζει μόνο τα πολλαπλασιαζόμενα νευρικά βλαστικά κύτταρα αλλά και τη δενδριτική μορφογένεση κατά τα στάδια ωρίμανσης των νευρώνων. Για παράδειγμα, απουσία Notch1 οι δενδριτικές διακλαδώσεις είναι λιγότερες κάτι που μελλοντικά, κατά των σχηματισμό των συνάψεων, μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία του νευρωνικού κυκλώματος [11], [13], [14].



Εικόνα 5: Η σηματοδότηση Notch. Το μονοπάτι Notch ενεργοποιείται όταν ο προσδέτης Dll1 δεσμεύεται στον υποδοχέα του Notch. Μετά από πρωτεολυτική πέψη, το ενδοκυττάριο τμήμα του Notch (NICD) εισέρχεται στον πυρήνα και καθώς αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Rbpj-k προσελκύεται ο συνενεργοποιητής Maml1, οπότε ενεργοποιείται η μεταγραφή γονιδίων στόχων του Notch, όπως τα *Hes1* και *Hes5*, που με τη σειρά τους καταστέλλουν την έκφραση προνευρικών γονιδίων όπως τα *Mash1* (*Ascl1*) και *Ngn2* (*Neurog2*). (Προσαρμογή και τροποποίηση από Imayoshi et al, 2014 [15])

1.2.2 Σηματοδότηση Hedgehog

Το μονοπάτι Shh κατέχει εξίσου σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων. Οι υποδοχείς του Shh, patched (*Ptc*) και smoothened (*Smo*) εκφράζονται στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου, συμπεριλαμβανομένης και της υποκοιλιακής στοιβάδας. Η ενεργή σηματοδότηση εξασφαλίζει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων της κοκκιώδους στοιβάδας [11]. Συγχρόνως, συμβάλλει στη διατήρηση του πληθυσμού των πρόδρομων νευρικών κυττάρων, καθώς απουσία της σηματοδότησης Shh το ποσοστό αυτών των κυττάρων μειώνεται δραματικά. Ιδιαίτερη σχέση με τη σηματοδότηση Shh φαίνεται να έχει ο σχηματισμός των βλεφαρίδων στην επιφάνεια των κυττάρων (*cilia*). Απουσία των βλεφαρίδων, εκλεπτυσμένων δομών που λειτουργούν ως «κεραίες» για τα κύτταρα, η δραστηριότητα του Shh είναι σημαντικά ελαττωμένη με εμφανή αποτελέσματα στον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων νευρικών κυττάρων [11].

1.2.3 Σηματοδοτικό Μονοπάτι BMP

Η σηματοδότηση BMP στον ιππόκαμπο είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της ομοιόστασης μεταξύ των βλαστικών κυττάρων με μορφολογία ακτινωτής γλοίας και των πρόδρομων νευρικών κυττάρων. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας BMP εκκρίνονται από τα κοκκιώδη κύτταρα του νευρογενικού μικροπεριβάλλοντος και εκτός από το ρόλο τους στην διατήρηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων, ελέγχουν και τον ρυθμό ωρίμανσης των κυττάρων της κοκκιώδους στοιβάδας της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου, κάτι που οφείλεται στη έκφραση διαφορετικών υποδοχέων του BMP στις μεμβράνες των διαφορετικού τύπου κυττάρων [11].

1.2.4 Σηματοδότηση Wnt

Η «κανονική» σηματοδότηση του μονοπατιού Wnt κατέχει σημαντικό ρόλο στη νευρογένεση, τόσο στην αυτοανανέωση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων όσο και στην επαγωγή της νευρικής διαφοροποίησης. Για παράδειγμα, το Wnt3A, που παράγεται από τα αστροκύτταρα του τοπικού νευρικού μικροπεριβάλλοντος ενεργοποιεί τη σηματοδότηση Wnt/ β -catenin, ωθώντας τα κύτταρα να ακολουθήσουν ένα νευρικό πεπρωμένο [16], ενώ η αδρανοποίηση του γονιδίου στο ποντίκι οδηγεί σε ολοκληρωτική απουσία του ιπποκάμπου

από τον εγκέφαλο [17]. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα νευρικά γονίδια *Prox1* και *Neurod1*, η έκφραση των οποίων παίζει σημαντικό ρόλο στην πορεία της νευρικής διαφοροποίησης, είναι άμεσοι στόχοι αυτής της σηματοδότησης. Είναι ενδιαφέρον ότι το ίδιο μονοπάτι έχει ενοχοποιηθεί και για την ακριβώς αντίθετη λειτουργία, δηλαδή την καταστολή της έκφρασης γονιδίων όπως το *Neurod1* στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα [11]. Οι λόγοι για τους οποίους η σηματοδότηση Wnt μπορεί να ελέγχει με διττό τρόπο την πορεία της νευρογένεσης, είτε ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων νευρικών κυττάρων είτε επάγοντας τη νευρική διαφοροποίηση, δεν έχουν ακόμη διασαφηνιστεί.

Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι με την αύξηση της ηλικίας αυξάνονται τα επίπεδα του Dickkopf-1, ενός ανταγωνιστή του μονοπατιού Wnt στον υπόκαμπο [11] και έχει υποτεθεί ότι η μειωμένη δραστηριότητα αυτής της σηματοδότησης θα μπορούσε να συνδέεται με τη μειωμένη νευρογένεση που παρατηρείται στις γηραιότερες ηλικίες.

Εκτός από την «κανονική» Wnt/ β -catenin σηματοδότηση ένα από τα «μη κανονικά» (ανεξάρτητα από την β -catenin) μονοπάτια Wnt, το PCP², διαδραματίζει επίσης κομβικό ρόλο, αλλά σε περισσότερο προχωρημένα στάδια της νευρογένεσης [11]. Η δραστηριότητά του έχει συσχετιστεί με τη δημιουργία των δενδριτών, την ακτινωτή μετανάστευση καθώς και με την δενδριτική διάταξη.

1.3 Ενδογενή Μόρια –Μεταγραφικοί Παράγοντες με Κομβικό Ρόλο στην Πορεία της Νευρικής Διαφοροποίησης

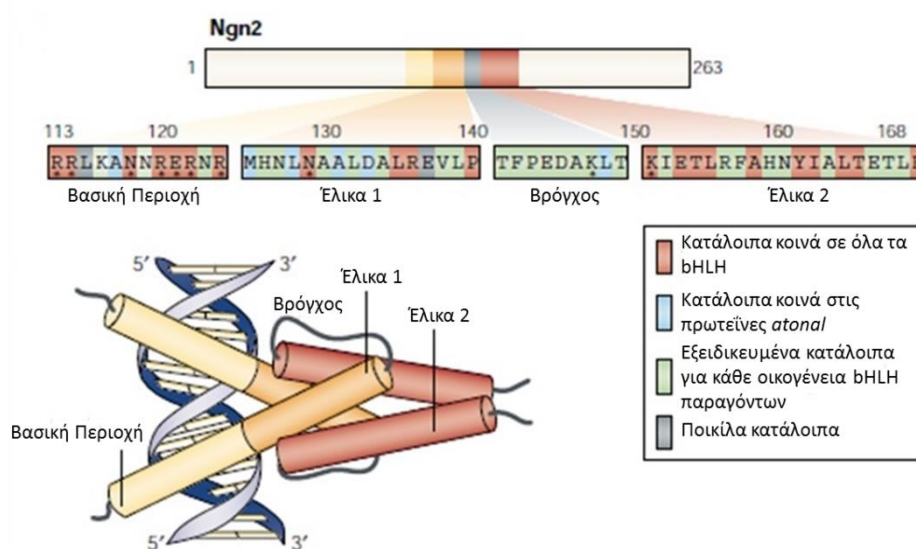
Η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, του πολυπλοκότερου οργάνου των σπονδυλωτών, απαιτεί την δημιουργία του κατάλληλου αριθμού τόσο νευρικών όσο και γλοιακών κυττάρων, τα οποία θα καταλάβουν τις κατάλληλες θέσεις, δημιουργώντας έτσι τις λειτουργικές συνάψεις που είναι απαραίτητες για την άρτια λειτουργία του. Οι αποφάσεις που θα πάρει ένα πολυδύναμο βλαστικό κύτταρο για το πεπρωμένο του, ελέγχονται και καθορίζονται από την έκφραση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων. Συχνά, οι ίδιοι μεταγραφικοί παράγοντες φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο και κατά την ενήλικη νευρογένεση, αν και δεν έχουν μελετηθεί τόσο καλά όσο κατά τα στάδια της ανάπτυξης.

²PCP: (non canonical) Planar Cell Polarity. Το «μη κανονικό» μονοπάτι Wnt PCP, στο οποίο δεν συμμετέχει η β -catenin

Τρεις κατηγορίες μεταγραφικών παραγόντων, που ο ρόλος τους είναι ιδιαίτερα σημαντικός στη διαφοροποίηση των κυττάρων του νευρικού συστήματος, είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας bHLH, οι παράγοντες Sox (Sry-related HMG box), και οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας NFI (Nuclear Factor I).

1.3.1 Οι Μεταγραφικοί Παράγοντες της Οικογένειας bHLH

Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας bHLH έχουν δομή έλικας–βρόγχου–έλικας, και αποτελούνται από δύο έλικες και μία βασική περιοχή. Η βασική περιοχή με την έλικα 1 σχηματίζουν μια α-έλικα, η οποία συνδέεται με την έλικα 2 μέσω ενός βρόγχου. Ως μεταγραφικοί παράγοντες δεσμεύονται απευθείας στο DNA (**Εικόνα 6**). Αναγνωρίζουν ένα μοτίβο 6 νουκλεοτιδίων, CANNTG, που ονομάζεται κουτί E (E -box), στους υποκινητές των γονιδίων που στοχεύουν [18]. Δρουν είτε ως ομοδιμερή είτε ως ετεροδιμερή με τις bHLH πρωτεΐνες «Ε» [19]. Πιο συγκεκριμένα, η βασική περιοχή προσδένεται άμεσα στη μεγάλη αύλακα του DNA μέσω επτά καταλοίπων, από τα δέκα συνολικά που είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση στο DNA [18]. Τα υπόλοιπα τρία βρίσκονται διασκορπισμένα στην HLH περιοχή. Τα δύο κεντρικά νουκλεοτίδια του μοτίβου αναγνώρισης E-box είναι αυτά που εξειδικεύουν το γονίδιο-στόχο, σε συνδυασμό με τον συμπαράγοντα με τον οποίο σχηματίζουν ετεροδιμερή [18].



Εικόνα 6: Η δομή των bHLH πρωτεϊνών. Ένα χαρακτηριστικό bHLH γονίδιο είναι το *Ngn2*, με ιδιαίτερο ρόλο στην πορεία της νευρογένεσης. Στο κέντρο της επικράτειας της πρωτεΐνης *Ngn2* βρίσκεται η περιοχή bHLH, η οποία ευθύνεται για την πρόσδεση στο DNA. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Bertrand et. al, 2002* [18])

Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί, ο μηχανισμός με τον οποίον ένας bHLH μεταγραφικός παράγοντας επιλέγει, τη μία φορά να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή ενός γονιδίου-στόχου, και μια άλλη φορά ενός άλλου, δεν έχει ακόμη αποκρυπτογραφηθεί. Τα προ-νευρικά γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες με δομή έλικας-βρόγχου- έλικας, κατέχουν θεμελιώδη ρόλο στην ενεργοποίηση της νευρογένεσης, τη διατήρηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων αλλά και τον καθορισμό της κυτταρικής τους μοίρας [20], τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και κατά την ενήλικη ζωή. Πιο συγκεκριμένα, μέλη των οικογενειών *asc* και *ato* της κλάσης II των bHLH μεταγραφικών παραγόντων [19], τα οποία παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες μεταξύ τους, ως προ-νευρικές πρωτεΐνες, είναι απαραίτητα αλλά και ικανά να επάγουν την γένεση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων του εξωδέρματος [18]. Ωστόσο, πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα που βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις στο αναπτυσσόμενο έμβρυο, διαφοροποιούνται σε διαφορετικούς κυτταρικούς υπότυπους [18]. Τα πρόδρομα κύτταρα του κοιλιακού νευρικού σωλήνα διαφοροποιούνται σε κινητικούς νευρώνες και μετέπειτα σε ολιγοδενδροκύτταρα, ενώ τα αντίστοιχα της ραχιαίας πλευράς οδηγούν στην παραγωγή διάμεσων νευρώνων και αστροκυττάρων [18]. Η υποκοκκιώδης ζώνη του ιπποκάμπου καθώς και η υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών, οι οποίες προέρχονται από τη ραχιαία περιοχή του τελεγκέφαλου και τη γαγγλιονική προεξοχή αντίστοιχα, συνεχίζουν να αναγενούν και στην ενήλικη ζωή, ίδιου κυτταρικού τύπου νευρώνες, αντίστοιχους με αυτούς που σχηματίζονται κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος [21]. Ο καθορισμός λοιπόν, τόσο του κυτταρικού πεπρωμένου όσο και του εξειδικευμένου κυτταρικού τύπου στον οποίο θα διαφοροποιηθεί ένα πολυδύναμο ή πρόδρομο νευρικό κύτταρο, εξαρτώνται τόσο από τα αναπτυξιακά μονοπάτια που είναι ενεργά και σηματοδοτούν στην συγκεκριμένη περιοχή όπου βρίσκονται τα αδιαφοροποίητα κύτταρα, όσο και από τους ενδογενείς μεταγραφικούς παράγοντες που εκφράζει το ίδιο. Τα προνευρικά γονίδια της οικογένειας bHLH παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην όλη διαδικασία. Στα σπονδυλωτά, τα γονίδια αυτά χωρίζονται σε δύο οικογένειες, την οικογένεια *atonal* (*ato*) και την οικογένεια *achaete-scute-complex* (*asc*) [18], [19]. Η οικογένεια *ato* διακρίνεται σε τρεις υπο-οικογένειες, στα γονίδια των νευρογενινών (*neurogenin genes*), στα γονίδια νευρογενικής διαφοροποίησης (*neurogenic differentiation genes*), και στα γονίδια *Olig* [19]. Στην υπο-οικογένεια των νευρογενινών ανήκουν τα γονίδια *Neurog1*, *Neurog2* και *Neurog3* [19]. Στην υπο-οικογένεια των γονιδίων

νευρογενικής διαφοροποίησης ανήκουν τα γονίδια *NeuroD1*, *NeuroD2*, *Neurod4/Math3/Atoh3*, *Neurod6/Math2/Atoh2*, *Atoh1/Math1*, *Atoh7/Math5* ενώ στην υπο-οικογένεια *Olig* ανήκουν τα γονίδια *Olig1*, *Olig2*, *Olig3* [19]. Η οικογένεια του συμπλόκου *achaete-scute* είναι λιγότερο σύνθετη. Αποτελείται από δύο μόνο γονίδια, το *Ascl1/Mash1* που εκφράζεται στο νευρικό σύστημα, και το *Ascl2/Mash2* που παρουσιάζει ευρύτερη κατανομή [19]. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (**Εικόνα 5**), η σηματοδότηση Notch μέσω του ελέγχου της έκφρασης των προνευρικών μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας bHLH, επιτρέπει στο κύτταρο είτε να αυτοανανεώνεται, διατηρώντας συγχρόνως τις ιδιότητες του νευρικού βλαστικού κυττάρου είτε να κατευθύνεται προς τη νευρική διαφοροποίηση.

1.3.1.1 Η υπο- οικογένεια των Νευρογενινών

Οι μεταγραφικοί παράγοντες αυτής της οικογένειας είναι ικανοί να ενεργοποιήσουν το πρόγραμμα της νευρικής διαφοροποίησης και να εξειδικεύσουν τον κυτταρικό φαινότυπο. Αν και έχουν μελετηθεί εκτενέστερα κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, η σημασία και ο ρόλος τους κατά την ενήλικη νευρογένεση είναι αδιαμφισβήτητος. Τα γονίδια *ngn* είναι ιδιαίτερα συντηρημένα στην επικράτεια bHLH. Στο ποντίκι και τον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τρία γονίδια (*Ngn1*, *Ngn2*, *Ngn3*), δύο στην όρνιθα (*Ngn1*, *Ngn2*) και το ψάρι ζέβρα (*zebrafish*) ενώ στη *Drosophila* εκφράζεται μόνο μία νευρογενίνη [22]. Η έκφραση αυτών των μορίων σε περιοχές πλούσιες σε πρόδρομα βλαστικά κύτταρα ρυθμίζεται αυστηρά τόσο χρονικά όσο και χωρικά [22]. Όσον αφορά στο λειτουργικό τους ρόλο, οι νευρογενίνες πολλές φορές παρουσιάζουν αλληλοεπικαλυπτόμενες δράσεις. Το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης *Ngn1* συμπίπτει με το αντίστοιχο της *Ngn2*, αν και τα δύο μόρια διαφέρουν σε πολλά σημεία. Η *Ngn3* εκφράζεται σε διαφορετικές περιοχές του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου, υποδεικνύοντας έναν περισσότερο διαφοροποιημένο ρόλο σε σχέση με τα άλλα δύο μέλη της υπο-οικογένειας [22].

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, η *Ngn1* ανιχνεύεται σε πολλές περιοχές, όπως στους πυραμιδικούς και κοκκιώδεις νευρώνες του ιππόκαμπου, τους διάμεσους νευρώνες του οσφρητικού βολβού, τα πυραμιδικά κύτταρα του φλοιού, καθώς και σε ένα μεγάλο τμήμα του θαλάμου. Είναι γνωστό ότι επάγει τη γένεση κρανιακών αισθητικών νευρώνων και είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη όλων των κρανιακών γαγγλίων. Ιδιαίτερη δε είναι η

σημασία της για τη νευρογένεση στο ακουστικό αισθητικό επιθήλιο, αφού η απουσία της έκφρασής της συμπίπτει με την απουσία νευρώνων του έσω ώτος [23]. Η Ngn2 επάγει τη διαφοροποίηση των κοκκιωδών νευρώνων του ιπποκάμπου, καθώς και των μεσεγκεφαλικών ντοπαμινεργικών νευρώνων, ενώ συμμετέχει και στον σχηματισμό του αμφιβληστροειδούς [24], [25], [26], σε συνεργασία με την Ngn3. Η Ngn3 εκφράζεται επίσης και στα πυραμιδικά κύτταρα και την οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου [22]. Η παρουσία αυτών των μορίων σε περιοχές που αποτελούν δεξαμενές βλαστικών κυττάρων και στην ενήλικη ζωή, υποδηλώνει το σπουδαίο ρόλο που ενδεχομένως διαδραματίζουν και κατά την ενήλικη νευρογένεση.

Οι νευρογενίνες δρουν συνεργιστικά ενεργοποιώντας διάφορους μηχανισμούς που αφορούν στον προσδιορισμό τους κυτταρικού υπότυπου. Όταν η Ngn1 συνεργάζεται με την Ngn2 τότε εξειδικεύουν τη γένεση γλουταματεργικών νευρών στον οσφρητικό βολβό. Επίσης η παρόμοια δράση των Ngn2 και Ngn3 στην αξονική και δενδριτική αύξηση αντίστοιχα στον ιππόκαμπο, η οποία συμβαίνει παράλληλα, υποδηλώνει ότι αυτοί οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες συνεργάζονται συντονισμένα για την παραγωγή λειτουργικών νευρώνων [13].

Αξίζει τέλος να σημειωθεί ότι δύο μόρια αυτής της οικογένειας, η Ngn1 και η Ngn3 συμμετέχουν επίσης, και μάλιστα με αντίστροφο τρόπο και στη γλοιογένεση. Πιο συγκεκριμένα, η Ngn1 την αναστέλλει μέσω άμεσης πρόσδεσης στους υποκινητές γλοιακών γονιδίων, ενώ η Ngn3 την επάγει [13].

1. Ο Ρόλος και η Σημασία του bHLH Μεταγραφικού Παράγοντα Neurogenin2 (Ngn2)

Το προνευρικό γονίδιο Ngn2 ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα μέλη της υπο-οικογένειας των νευρογενινών γιατί έχει ένα ιδιαίτερο ρόλο στην πορεία της νευρογένεσης. Ενώ η πρωτεΐνη Ngn1 εκφράζεται στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο από την εμβρυική ημέρα 11.5 έως την 15.5 (E10-E15.5), η πρωτεΐνη Ngn2 ξεκινά να εκφράζεται νωρίτερα, από τη δέκατη κιόλας εμβρυική ημέρα, και η έκφραση της διατηρείται και μετά τη γέννηση [19]. Το γεγονός ότι η έκφραση της συνεχίζεται και κατά την ενήλικη ζωή, και μάλιστα αποκλειστικά στις νευρογενικές περιοχές του εγκεφάλου υποδηλώνει έναν εξέχουσας σημασίας ρόλο στην ενήλικη νευρογένεση.

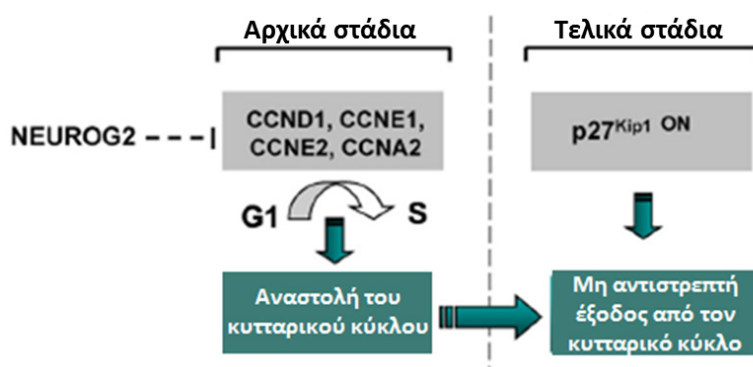
Ως κύριος ρυθμιστής της νευρογένεσης, η Ngn2 έχει το δυναμικό να κατευθύνει τη νευρική διαφοροποίηση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων προς διαφορετικούς τύπους νευρώνων, ανάλογα με το σημείο όπου εκφράζεται [19]. Στον ραχιαίο τελεγκέφαλο επάγει τη διαφοροποίηση γλουταματεργικών πυραμιδικών νευρώνων οι οποίοι αποικίζουν διάφορες περιοχές του εγκεφάλου όπως τον νεοφλοιό, τον ιππόκαμπο, τον απιοειδή φλοιό και τον οσφρητικό βολβό [19]. Στον κοιλιακό μεσεγκέφαλο, η έκφρασή της είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση ορισμένων ντοπαμινεργικών νευρώνων ενώ στη κοιλιακή νωτιαία χορδή επάγει τη διαφοροποίηση των χολινεργικών κινητικών και των κοιλιακών διάμεσων νευρώνων.

Η Ngn2 συμβάλλει καθοριστικά στον σχηματισμό της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου [27] κατά τα εμβρυική και μετεμβρυική ανάπτυξη, αφού η απουσία της οδηγεί σε σημαντικά μικρότερο - σε μέγεθος - ιππόκαμπο και σχεδόν παντελή απουσία της οδοντωτής έλικας [25]. Αυτό συμβαίνει, διότι τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα της οδοντωτής έλικας, το ποσοστό των οποίων είναι αισθητά μειωμένο, αδυνατούν να διαφοροποιηθούν. Στον ενήλικο εγκέφαλο η έκφραση της Ngn2 είναι ιδιαίτερα άφθονη στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου [28] καθώς και στην υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών [29]. Εντοπίζεται στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα και ο ρόλος της είναι να τα διατηρεί σε μία αδιαφοροποίητη κατάσταση επιτρέποντας τους να πολλαπλασιαστούν, προτού διαφοροποιηθούν και ωριμάσουν σε κοκκιώδεις νευρώνες [25] ενώ όταν χρειαστεί, μπορεί να επάγει τη διαφοροποίησή τους μέσω εξειδικευμένων γονιδίων που μεταγράφει. Είναι ενδιαφέρον ότι ένα μεγάλο ποσοστό των κυττάρων του οπίσθιου ραχιαίου μεταναστευτικού τόξου εκφράζει Ngn2, κάτι που δε συμβαίνει στο πρόσθιο μέρος [29], όπου τα κύτταρα έχουν μεταβεί σε ένα πιο ώριμο στάδιο.

2. Η Ρύθμιση της Ενεργότητας της Πρωτεΐνης Ngn2

Η ικανότητα του μεταγραφικού παράγοντα Ngn2 να ελέγχει το ισοζύγιο μεταξύ των πρόδρομων νευρικών κυττάρων και εκείνων που ξεκινούν να διαφοροποιούνται οφείλεται στην αλληλεπίδραση με ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, η Ngn2 καταστέλλει τα επίπεδα μιας ομάδας κυκλινών που δρουν στις φάσεις G1 και S προκαλώντας μια γρήγορη αναστολή στην φάση G1. Έτσι αποτρέπεται η είσοδος στην φάση S και ευνοείται η έξοδος από τον κυτταρικό κύκλο [30]. Η επιμήκυνση

της φάσης G1 παρέχει στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα τον απαιτούμενο χρόνο να αποκριθούν στους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που θα ενεργοποιήσουν τη διαδικασία της διαφοροποίησής τους. Η Ngn2 καταστέλλει έμμεσα την έκφραση των κυκλινών CcnD1, CcnE1/2 και CcnA2, αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι η ρύθμιση των μεταγραφικών επιπέδων της CcnE2 μπορεί να επιτελείται και άμεσα [30] (Εικόνα 7). Η μείωση των επιπέδων αυτών των κυκλινών ενδεχομένως να συμβάλει και στη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης Ngn2. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ευνοείται η μεταγραφική της δραστηριότητα και να ενεργοποιείται το πρόγραμμα της νευρικής διαφοροποίησης μέσω της επαγωγής της έκφρασης νευρικών γονιδίων, όπως είναι το NeuroD1. Έχει δειχθεί ότι οι Cdks, και συγκεκριμένα οι Cdk1 και Cdk2, αναστέλλουν την ικανότητα της Ngn2 να μεταγράφει τα γονίδια στόχους της, μέσω της φωσφορυλίωσης που προκαλούν σε πολλαπλές θέσεις (σερίνης-προλίνης ή θρεονίνης-προλίνης) της πρωτεΐνης [31]. Η Ngn2 επηρεάζεται επίσης και από αναστολές κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών που ευθύνονται για την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο. Για παράδειγμα, ο αναστολέας p27^{Kip1} σταθεροποιεί την Ngn2 και μέσω αυτής της ρύθμισης επάγει τη νευρική διαφοροποίηση στον εγκεφαλικό φλοιό [32] (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Η ενεργότητα της πρωτεΐνης Ngn2 επηρεάζεται και επηρεάζει από κυκλίνες, κινάσες και αναστολές κινασών του κυτταρικού κύκλου. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Lacomme et. al, 2011* [30])

Οι παραπάνω μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αποτρέπουν την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ενεργοποίηση και έναρξη της μεταγραφής. Επειδή οι φωσφορυλιώσεις αυτές επάνω στο μόριο μπορεί να κυμαίνονται από λίγες έως πολλές μπορούν να ρυθμίζουν την ενεργότητα της Ngn2 όπως

The diagram illustrates the Notch signaling pathway in the context of cell fate determination, showing the transition from a stem cell state to a differentiated state.

Left Panel (Stem Cell State):

- Notch Signaling:** The Notch receptor (green oval) is active, leading to the activation of the **ΔE** (purple oval) and **Notch** (green oval) components.
- Transcription Factors:** The **Notch** component inhibits the **ΔE** component, which in turn inhibits the **Notch** component, forming a negative feedback loop.
- Transcription Factors:** The **Notch** component inhibits the **ΔE** component, which in turn inhibits the **Notch** component, forming a negative feedback loop.
- Transcription Factors:** The **Notch** component inhibits the **ΔE** component, which in turn inhibits the **Notch** component, forming a negative feedback loop.

Right Panel (Differentiated State):

- Notch Signaling:** The Notch receptor (green oval) is inactive, leading to the activation of the **ΔE** (purple oval) and **Notch** (green oval) components.
- Transcription Factors:** The **Notch** component inhibits the **ΔE** component, which in turn inhibits the **Notch** component, forming a negative feedback loop.
- Transcription Factors:** The **Notch** component inhibits the **ΔE** component, which in turn inhibits the **Notch** component, forming a negative feedback loop.
- Transcription Factors:** The **Notch** component inhibits the **ΔE** component, which in turn inhibits the **Notch** component, forming a negative feedback loop.

Πρόσφατα αποκαλύφθηκε ένας γενικός μηχανισμός ενεργοποίησης των bHLH μεταγραφικών παραγόντων Asc και Ato, κατά τον οποίοι μία και μόνο φωσφορύλιωση ενός καταλοίπου σερίνης και ενός καταλοίπου θρεονίνης αντίστοιχα, τα οποία είναι

συντηρημένα από τη *Drosophila* ως τον άνθρωπο, λειτουργεί ως διακόπτης για την ενεργοποίηση του προγράμματος της νευρικής διαφοροποίησης [35]. Όταν τα κατάλοιπα αυτά είναι φωσφορυλιωμένα, τότε οι bHLH μεταγραφικοί παράγοντες δεν μπορούν να προσδεθούν στο DNA εξαιτίας ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με το DNA που αυξάνουν την απαιτούμενη ενέργεια για την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα στα E-boxes. Δεν είναι όμως μόνο ο τύπος της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης που έχει σημασία είναι και το κατάλοιπο αυτό καθ' αυτό, αφού αντικατάστασή του από άλλο που επίσης μπορεί να φωσφορυλιωθεί, δεν οδηγεί στο ίδιο λειτουργικό αποτέλεσμα [35].

Εκτός από τις CDKs υπάρχουν κι άλλες κινάσες που είναι γνωστό ότι φωσφορυλιώνουν την Ngn2. Η GSK3 φωσφορυλιώνει το καρβοξυ-τελικό άκρο του μορίου, και συγκεκριμένα τα κατάλοιπα σερίνης στις θέσεις 231 και 234 [36]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται η ικανότητα της Ngn2 να αλληλεπιδράσει με τις ομοιοτικές πρωτεΐνες LIM-HD, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η μεταγραφή γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τον προσδιορισμό της «ταυτότητας» των κινητικών νευρώνων [36]. Στον νεοφλοιό η GSK3, μέσω της φωσφορυλίωσης της Ngn2, επάγει τη δημιουργία ετεροδιμερών με τον συμπαράγοντα E47, μειώνοντας έτσι την ικανότητα μεταγραφής των γονιδίων-στόχων [37]. Η φωσφορυλίωση αυτή ουσιαστικά αποτρέπει τη δημιουργία ομοδιμερών Ngn2 τα οποία έχουν αυξημένη ικανότητα μεταγραφής των νευρογενικών γονιδίων. Βλέπουμε λοιπόν ότι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση σε ένα κομβικό ρυθμιστή της νευρογένεσης δεν ενεργοποιεί μόνο το πρόγραμμα της νευρικής διαφοροποίησης αλλά συμβάλλει και στον προσδιορισμό του κυτταρικού υπότυπου στον οποίον θα διαφοροποιηθεί ένα κύτταρο.

Ένα ακόμη σημαντικό στοιχείο είναι ότι η Ngn2, μέσω των πολλαπλών φωσφορυλιώσεων που μπορεί να υποστεί, μιας και το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης αποτελείται από περιοχές που δεν έχουν σταθερή δευτεροταγή και τριτοταγή διαμόρφωση (*Intrinsically Disordered Domains, IDD*s), μπορεί να αποκτά δομή [38]. Ο μηχανισμός αυτός συμβάλλει στην εξειδίκευση του στόχου της, επηρεάζοντας είτε αυτή καθ' αυτή η ικανότητα πρόσδεσής της στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων, είτε την αλληλεπίδρασή της με διάφορα συνοδά μόρια που είναι προαπαιτούμενη για την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων.

Η εξειδίκευση της δράσης της Ngn2 εξαρτάται και από την παρουσία άλλων μορίων με τα οποία αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα. Όπως ήδη αναφέρθηκε, χαρακτηριστικό στοιχείο

των νευρογενινών και γενικότερα των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας bHLH είναι ότι δρουν είτε ως ετεροδιμερή είτε ως ομοδιμερή. Η Ngn2 έχει δύο κύριους bHLH συμπαράγοντες, τον E12 και τον E47, ενώ αλληλεπιδρά ασθενώς και με τον bHLH μεταγραφικό παράγοντα Olig2 [18]. Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Ngn2 και Olig2 είναι ανταγωνιστική, καθώς συναγωνίζονται για κοινές E-box περιοχές πρόσδεσης στους ίδιους υποκινητές. Από την αλληλεπίδραση αυτή καθορίζεται η μεταγραφή γονιδίων που επάγουν τη διαφοροποίηση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων του κοιλιακού νευρικού σωλήνα προς κινητικούς νευρώνες [39]. Για την διαφοροποίηση των κινητικών νευρώνων εκτός από τον παράγοντα Olig2, η Ngn2 συνεργάζεται επίσης και με τον πυρηνικό υποδοχέα RAR (*retinoic acid receptor*). Το ρετινοϊκό οξύ (*retinoic acid, RA*), ένα βιοδραστικό παράγωγο της βιταμίνης A, που παράγεται από μία αντίδραση αφυδρογόνωσης μέσω του ενζύμου αφυδρογονάση της ρετιναλδεΰδης (*Retinaldehyde dehydrogenase 2, Raldh2*), είναι άφθονο από τα πολύ πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, και κατέχει θεμελιώδη ρόλο στη διαφοροποίηση των κινητικών νευρώνων. Πιο συγκεκριμένα, ο υποδοχέας του ρετινοϊκού οξέος RAR αλληλεπιδρά άμεσα με την Ngn2, προσελκύοντας τους συνενεργοποιητές CBP και p300, με τους οποίους έρχεται επίσης σε επαφή, επάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων τα οποία είναι απαραίτητα για την πορεία αυτής της διαφοροποίησης [40]. Ένα γονίδιο ιδιαίτερα σημαντικό για τη διαφοροποίηση των πρόδρομων κυττάρων του νευρικού σωλήνα, είναι το *Dll3*, το οποίο σε αντίθεση με το *Dll1* δεν διεγείρει τη σηματοδότηση του Notch [41]. Οι δύο κύριοι ρυθμιστές της νευρογένεσης Mash1 και Ngn2 σχηματίζουν ετεροδιμερή, προσδένονται στις περιοχές πρόσδεσης E-box του υποκινητή του *Dll3* και επάγουν την έκφρασή του [41]. Συνεργατικό αποτέλεσμα έχει και η αλληλεπίδραση της Ngn2 με την *LIM-only* πρωτεΐνη, LMO4 [42]. Η LMO4, μαζί με τον συμπαράγοντα LIM (NLI/LDB1/CLIM2), σχηματίζει σύμπλοκο με την Ngn2. Το σύμπλοκο αυτό αγκυροβολεί στις αναγνωριστικές αλληλουχίες E-box των ενισχυτών των γονιδίων-στόχων της, προωθώντας την ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού [42].

Η ενεργότητα της Ngn2 μπορεί επίσης να καθορίζεται και από τη συνέργεια με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες χωρίς να απαιτείται αλληλεπίδραση εξ επαφής. Για παράδειγμα, κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος η Ngn2 συνεργάζεται με τον μεταγραφικό παράγοντα Mash1 για τη διαφοροποίηση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων προς συγκεκριμένους τύπους νευρώνων. Ο Mash1 έχει το δυναμικό να

καθορίζει το κυτταρικό πεπρωμένο αλλά η Ngn2 συντονίζει αυτή τη διενέργεια μέσω της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων στον ραχιαίο τελεγκέφαλο και κοιλιακό νωτιαίο μυελό [43]. Παράλληλα, στον κοιλιακό νωτιαίο μυελό, τα δύο μόρια συνεργάζονται για την διαφοροποίηση των διάμεσων νευρώνων. Η πρωτεΐνη Mash1 κατευθύνει περισσότερο τη δημιουργία συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών ενώ η Ngn2 συντονίζει τον αριθμό των νευρώνων κάθε πληθυσμού, κάτω από την επιστατική δράση της Mash1 [44]. Αυτοί οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες συνεργάζονται επίσης και για τον προσδιορισμό της φλοιοθαλαμικής και υποεγκεφαλικής μοίρας των πρόδρομων κυττάρων του νεοφλοιού [45]. Ένα ακόμη σημαντικό στοιχείο για την σχέση της Ngn2 με την Mash1 είναι ότι αλληλεπιδρούν με κοινούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι E2f1, Tef, Egr1, Hes1, καθώς και μέλη της οικογένειας POU [46]. Ωστόσο άλλοι παράγοντες όπως οι Sox9, Creb, Tcf4, Lef1, Mef2a και Yy1 αλληλεπιδρούν εξειδικευμένα με την Ngn2 και όχι με την Mash1 [46]. Αυτή η διάδραση με άλλα μόρια είναι και ένα χαρακτηριστικό της Ngn2, η οποία συνεργάζεται επίσης και με άλλους bHLH μεταγραφικούς παράγοντες εκτός του Mash1, όπως είναι οι Ngn1 και NeuroD. Με τον Ngn1 συνεργάζεται για την ανάπτυξη του οσφρητικού συστήματος [47] ενώ με τον NeuroD, που είναι παράλληλα και μεταγραφικός της στόχος, σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου κατά τη νευρογένεση [48].

Τα γονίδια-στόχοι, στη μεταγραφή των οποίων συμβάλλει η Ngn2, είναι πολλά και το καθένα κατέχει διακριτό ρόλο. Ο ρόλος τους συνδέεται με την επιτυχή πορεία της νευρικής διαφοροποίησης των πρόδρομων κυττάρων και τον καθορισμό του κυτταρικού τους πεπρωμένου, καθώς και με τη μετανάστευση και την ωρίμανση των νευρώνων. Από τους πιο σημαντικούς μεταγραφικούς της στόχους είναι το *Dll1*, προσδέτης του Notch και τα *bhlh* γονίδια *Neurod1* και *Nex/Math2* [27], απαραίτητα τόσο για τη νευρική διαφοροποίηση όσο και για την επιβίωση των κυττάρων. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η Ngn2 αλληλεπιδρά με πληθώρα συνρρυθμιστικών μορίων, με τα οποία σε συνδυασμό και με τις διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίσταται ενεργοποιεί πολλά και διαφορετικά γονίδια, ανάλογα με την περιοχή, το χρονικό διάστημα και τη διάρκεια που εκφράζεται. Επί παραδείγματι, στον ραχιαίο τελεγκέφαλο ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων *Nhlh1*, *Mfng* και *Hud*, ενώ στη κοιλιακή ζώνη τα γονίδια *Rbph4* και *Zfb238* [46]. Μεταξύ των γονιδίων-στόχων με ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκαταλέγονται το *NFIB*, ένας μεταγραφικός παράγοντας με θεμελιώδη ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και ιδιαίτερα του υποκάμπο [49], το *Sox4*, ένα μέλος της οικογένειας των SoxC

μεταγραφικών παραγόντων που διαδραματίζει ενεργό ρόλο κατά την ενήλικη νευρογένεση [50], καθώς επίσης και των γονιδίων *DCX*, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού των νευρώνων [51] και *Rnd2*, που κωδικοποιεί τη μικρή GTP-άση *Rnd2* [52], μόρια και τα δύο με ρόλο κλειδί στη Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό γνώρισμα των γονιδίων-στόχων της *Ngn2* είναι ότι δεν ελέγχονται αποκλειστικά από αυτήν, διότι η μεταγραφή τους εξαρτάται και από άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Ένα τυπικό παράδειγμα είναι η περίπτωση του γονιδίου *Rnd2*. Η *Ngn2* ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου αυτού μέσω της άμεσης πρόσδεσής της σε έναν ενισχυτή ο οποίος εδράζεται στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου. Μάλιστα, η πρόσδεση αυτή δεν επηρεάζεται από την φωσφορυλίωση της *Ngn2*. Η *Rnd2* όμως είναι μια πρωτεΐνη που εκφράζεται και σε μετα-μιτωτικά κύτταρα, ενώ η έκφραση της *Ngn2* είναι γνωστό πως απουσιάζει από αυτά τα στάδια. Τον ρόλο λοιπόν της *Ngn2* όταν εκείνη σταματήσει να εκφράζεται, αναλαμβάνουν οι μεταγραφικοί παράγοντες *NeuroD1* και *Tbr2*, επίσης μεταγραφικοί της στόχοι, κι έτσι η μικρή GTP-άση *Rnd2* συνεχίζει να παράγεται στα όψιμα στάδια της νευρικής διαφοροποίησης [52].

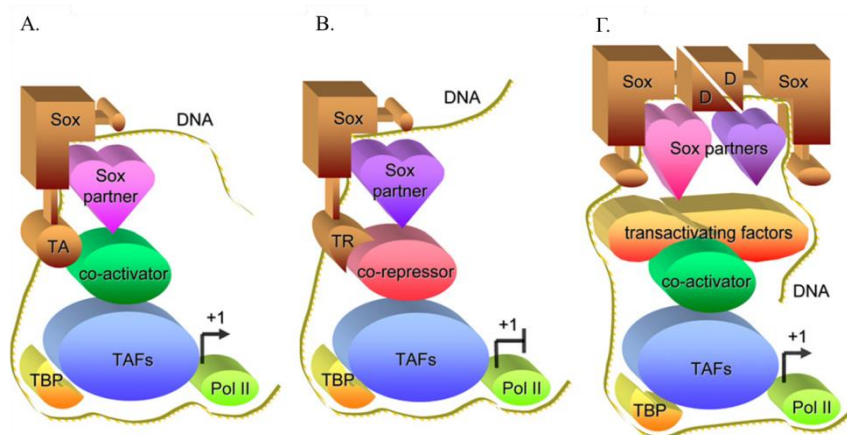
Ένα τόσο ενδιαφέρον μόριο λοιπόν, με πολύπλοκη δράση, και πολύτιμο για τη διατήρηση της «δεξαμενής» των νευρικών βλαστικών κυττάρων, την ενεργοποίηση του προγράμματος νευρογένεσης και τον καθορισμό του πεπρωμένου τους, δεν θα μπορούσε παρά να έχει αυστηρό και απόλυτα συντονισμένο έλεγχο των επιπέδων του στο κύτταρο. Λίγα στοιχεία ωστόσο, είναι γνωστά για τον τρόπο που ρυθμίζεται η έκφραση αυτού του γονιδίου. Τα *cis*- ρυθμιστικά στοιχεία που είναι ικανά να επάγουν τη μεταγραφή του, κατανέμονται σε μια περιοχή που εκτείνεται από 4.4 kb ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής (+1) μέχρι και 1 kb καθοδικά του 3' άκρου του γονιδίου [53]. Δύο από τους βασικούς ρυθμιστές της έκφρασης του *Ngn2* είναι οι ομοιοτικοί μεταγραφικοί παράγοντες *Pax6* και *Pax3*. Ο *Pax6* προσδένεται στον ενισχυτή που βρίσκεται στο 5' άκρο του γονιδίου [54], ενώ ο *Pax3* προσδένεται στον ενισχυτή που βρίσκεται στο 3' άκρο του [55]. Δύο άλλα μόρια με ιδιαίτερη σημασία, ο bHLH μεταγραφικός παράγοντας *Ptfla* με τον συμπάροντα «E» και τον *Rpbj-k*, βασικό διαμεσολαβητή της σηματοδότησης *Notch*, προσδένονται επίσης στον ενισχυτή του 3' άκρου ως σύμπλοκο, και δρουν θετικά στην έκφραση του γονιδίου [56].

Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίον συντονίζεται η ρύθμιση της έκφρασης τέτοιων καθοριστικών μεταγραφικών παραγόντων όπως είναι η *Ngn2*, οι οποίοι κατευθύνουν τα

πρώιμα στάδια της νευρογένεσης, από τη δημιουργία και την αρχική διαφοροποίηση των πρόδρομων κυττάρων μέχρι και τα τελικά στάδια διαφοροποίησης των νευρώνων, μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην αποκρυπτογράφηση των μοριακών μηχανισμών της νευρογένεσης, καθώς και στην ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση νευρολογικών διαταραχών.

1.3.2 Οι Μεταγραφικοί Παράγοντες Sox

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων Sox ανήκει σε μια υπεροικογένεια πρωτεϊνών οι οποίες χαρακτηρίζονται από μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA 80 περίπου αμινοξέων που ονομάζεται HMG-box (*Histone Mobility Group, HMG*). Τα γονίδια της οικογένειας Sox (*Sry-related HMG box*) ονομάστηκαν έτσι επειδή περιέχουν στην αλληλουχία τους την περιοχή HMG-box του γονιδίου *Sry* (*Sex-determining region Y*) που βρίσκεται στο χρωμόσωμα Y, και εμπλέκεται στον καθορισμό του φύλου. Οι μεταγραφικοί παράγοντες Sox προσδένονται απευθείας στο DNA, αναγνωρίζοντας την περιοχή (A/T)(A/T) CAA (A/T) G στην μικρή αύλακα. Έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν την αρχιτεκτονική δομή του DNA, επιτρέποντας σε πρωτεΐνες που είναι προσδεδεμένες σε σχετικά απομακρυσμένα σημεία των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων-στόχων να πλησιάζουν κοντά και να αλληλεπιδρούν ώστε να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή [57], [58]. Οι πρωτεΐνες Sox, είκοσι στο σύνολο τους στον άνθρωπο και το ποντίκι, κατανέμονται σε οχτώ υπο-οικογένειες, από A έως H, με βάση την ομολογία τους σε αλληλουχίες εκτός της περιοχής πρόσδεσης στο DNA [57], [58]. Χαρακτηριστικό αυτών των μεταγραφικών παραγόντων είναι ότι δρουν σχηματίζοντας ετεροδιμερή ή αλληλεπιδρώντας με άλλους παράγοντες και μεταγραφικούς ρυθμιστές, κάτι που συναντήσαμε και στον τρόπο δράσης των bHLH μεταγραφικών παραγόντων [59]. Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων ενεργούν είτε ενεργοποιητικά είτε κατασταλτικά στη μεταγραφή ενός γονιδίου (**Εικόνα 9**). Εμπλέκονται σε πολλά αναπτυξιακά γεγονότα, μεταξύ των οποίων είναι η ανάπτυξη των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας, η γλοιογένεση, και η νευρογένεση τόσο στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια όσο και κατά την ενήλικη ζωή [57].

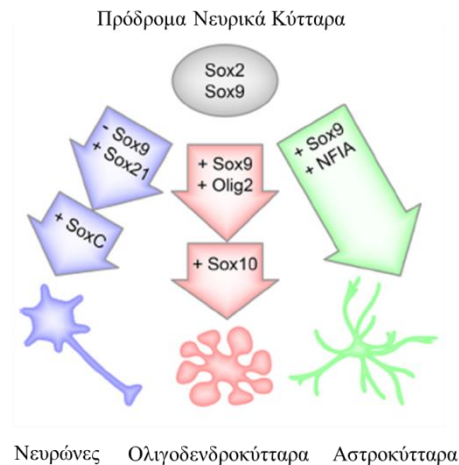


Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου που μπορεί να διαδραματίζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες Sox στη μεταγραφή. Οι πρωτεΐνες Sox ως Α) ενεργοποιητές, Β) καταστολείς και Γ) οργανωτές του ενισχυοσώματος χωρίς να αλληλεπιδρούν άμεσα με ενεργοποιητές η καταστολείς της μεταγραφής. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Lefevre et. al, 2007 [59]*)

Η έκφραση των γονιδίων Sox1, Sox2 και Sox3, της υπο-οικογένειας SoxB1, συμβάλλει στη διατήρηση των πρόδρομων βλαστικών κυττάρων αποτρέποντας τα από το να διαφοροποιηθούν. Από πειράματα συν-υπερέκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων Sox3 και Ngn2 βρέθηκε ότι ο Sox3 μπορεί να καταστέλλει τη δράση της Ngn2, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η έναρξη της διαφοροποίησης [57]. Επιπλέον, ο παράγοντας Sox21 της υπο-οικογένειας SoxB2, που φυσιολογικά καταστέλλει τη δράση των μορίων της υπο-οικογένειας SoxB1, ίσως δρα καθοδικά της Ngn2, καθώς η καταστολή της έκφρασής του σε κύτταρα που εκφράζουν Ngn2 οδηγεί σε αναστολή της νευρικής διαφοροποίησης [57]. Αντίθετη δράση ωστόσο, φαίνεται να έχουν τα μέλη της υπο-οικογένειας SoxC, η οποία περιλαμβάνει τα γονίδια Sox4, Sox11 και Sox12. Οι Sox4 και Sox11 ελέγχουν την έκφραση των παν-νευρικών γονιδίων *Tuj1* και *Map2* κατά την ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού της όρνιθας [60], ευνοώντας έτσι τη νευρική διαφοροποίηση. Οι παράγοντες SoxC παίζουν επίσης καθοριστικό ρόλο και κατά την ενήλικη νευρογένεση. Ο Sox11 εκφράζεται σε αφθονία στις νευρογενικές περιοχές του ενήλικα ιπποκάμπου στο ποντίκι, και συγκεκριμένα στα πολλαπλασιαζόμενα πρόδρομα νευρικά κύτταρα και στους ανώριμους νευρώνες [61]. Το δυναμικό αυτού του μορίου να επάγει τη νευρική διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων σε ανώριμους νευρώνες, υποδηλώνει ένα θεμελιώδη ρυθμιστικό ρόλο στον έλεγχο και την πορεία της νευρογένεσης [61]. Έχει διαπιστωθεί μια ιδιαίτερη αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών

SoxC με τις πρωτεΐνες της οικογένειας bHLH. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ανάπτυξη του φλοιού ο Sox11 εκφράζεται στους νεογέννητους νευρώνες και αλληλεπιδρώντας με την Ngn1 οδηγεί στη μεταγραφή του νευρικού γονιδίου *NeuroD1* [62]. Αντίστοιχα, ο μεταγραφικός παράγοντας Sox4, που εκφράζεται στα παροδικά πολλαπλασιαζόμενα πρόδρομα νευρικά κύτταρα, αλληλεπιδρά με την Ngn2 συμβάλλοντας στη μεταγραφή του γονιδίου-στόχου της Ngn2, *Tbr2* [62]. Ο Sox11, εκτός από την Ngn1, αλληλεπιδρά και με την Ngn2, και είναι ενδιαφέρον ότι μέσω της αλληλεπίδρασης αυτών των δύο μεταγραφικών παραγόντων, κύτταρα γλοιώματος μπορούν να διαφοροποιηθούν σε νευρώνες, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [63]. Διαπιστώνουμε, λοιπόν, ότι η αλληλεπίδραση των παραγόντων SoxC με τους bHLH οδηγεί σε καθοριστικές αποφάσεις για το πεπρωμένο του κυττάρου.

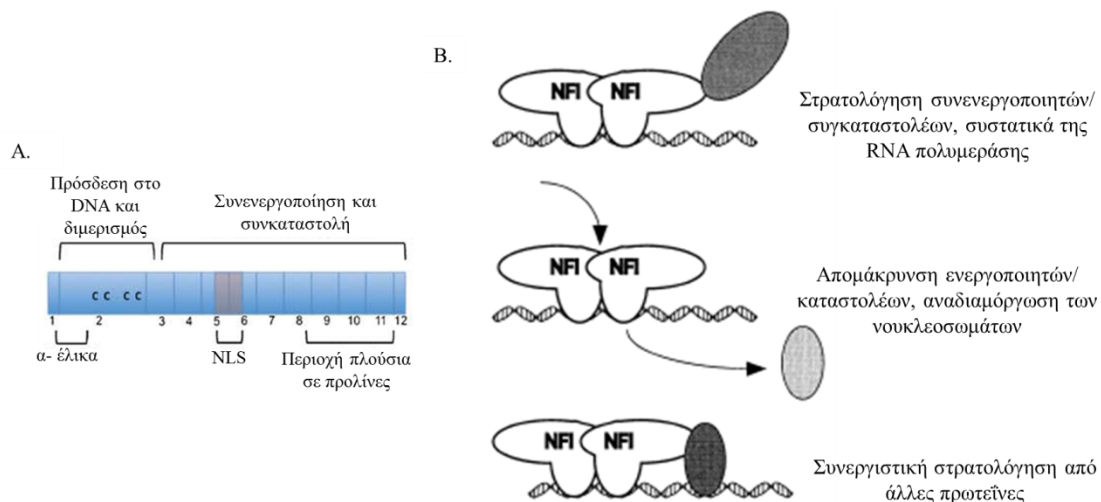
Οι μεταγραφικοί παράγοντες Sox δεν συμμετέχουν ενεργά μόνο στη νευρογένεση, αλλά και στην πορεία της γλοιογένεσης (**Εικόνα 10**). Ο Sox9 της υπο-οικογένειας SoxE, επάγει μέσω της άμεσης πρόσδεσης στην περιοχή του υποκινητή, τη μεταγραφή του παράγοντα NFIA, ενός μεταγραφικού παράγοντα καθοριστικού για την αστρογλοιογένεση [58]. Στη συνέχεια, ο NFIA αλληλεπιδρά με τον με τον επαγωγέα του, δηλαδή τον παράγοντα Sox9, ενεργοποιώντας την έκφραση γλοιακών γονιδίων-στόχων και κατ' επέκταση τη διαφοροποίηση των κυττάρων προς τη γλοιακή μοίρα. Ο Sox9 επάγει επίσης αλλά και διατηρεί τον πληθυσμό των νευρικών βλαστικών κυττάρων, τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και κατά την ενήλικη ζωή [64] αποκαλύπτοντας έναν διττό ρόλο. Η παρουσία του Sox9 είναι επίσης απαραίτητη και για τη διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων. Απουσία αυτού του μορίου ο αριθμός των ολιγοδενδροκυττάρων είναι αισθητά μειωμένος στον μυελό των οστών κατά την ανάπτυξη, ενώ παρατηρείται αυξημένος αριθμός κινητικών νευρώνων [58]. Παράλληλα, ο bHLH μεταγραφικός παράγοντας Olig2, που εκτός από το ότι ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων προς κινητικούς νευρώνες, συντονίζει και την ολιγοδενδρογένεση σε πιο όψιμα αναπτυξιακά στάδια, επάγει τη μεταγραφή του Sox10, κι αυτός με τη σειρά του ως μεταγραφικός παράγοντας συμβάλει στη διατήρηση της έκφρασης του Olig2 [58].



Εικόνα 10: Η αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων Sox με άλλους παράγοντες (Sox, bHLH, NFI) επηρεάζει το πεπρωμένο των πρόδρομων κυττάρων του νευροεπιθηλίου. Με – συμβολίζεται η μείωση της έκφρασης ενώ με + η αύξηση της έκφρασης. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Reiprich et. al, 2014, [58]*)

1.3.3 Οι Μεταγραφικοί Παράγοντες NFI

Πρόκειται για μια οικογένεια πρωτεϊνών με ιδιαίτερη σημασία για το νευρικό σύστημα. Αποτελείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες NFIA, NFIB, NFIC και NFIX, οι οποίοι προσδένονται απευθείας στο DNA ως διμερή, αναγνωρίζοντας την αλληλουχία TTGGC(N5)GCCAA, και μπορούν να ρυθμίζουν τη διαμόρφωση και την προσβασιμότητα της χρωματίνης [65]. Μπορούν επίσης να προσδένονται και σε αλληλουχίες με το μισό από το παραπάνω μοτίβο, αλλά με χαμηλότερη συγγένεια. Έχουν αναγνωριστεί θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων NFI σε περιοχές υποκινητών, ενισχυτών, και αποσιωπητών της έκφρασης περισσότερων από εκατό γονιδίων [65]. Οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν με σημαντικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες μέσω του καρβοξυτελικού τους άκρου το οποίο είναι πλούσιο σε κατάλοιπα προλίνης (**Εικόνα 11Α**). Για παράδειγμα, συνεργάζονται με τον γενικό μεταγραφικό παράγοντα TFIIIB του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής καθώς και με πλειάδα άλλων συν-ρυθμιστών, όπως οι πρωτεΐνες TAFII55, Sp1, YY1, και HIV-Tat, αλλά και με μόρια – τροποποιητές της χρωματινικής δομής όπως είναι ο CBP και ο συμπαράγοντας p300 [65] (**Εικόνα 11Β**), συμβάλλοντας είτε θετικά είτε αρνητικά στη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Μπορούν επίσης να έρθουν και άμεσα σε επαφή με τις ιστόνες, συγκεκριμένα με τις H1 και H3, προκαλώντας μετατόπιση των νουκλεοσωμάτων, επηρεάζοντας έτσι και μέσω ενός τέτοιου μηχανισμού τη μεταγραφή.



Εικόνα 11: Η δομή και ο τρόπος δράσης των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας NFI. Α) Οι μεταγραφικοί παράγοντες NFI αποτελούνται από μία επικράτεια στην οποία εντοπίζονται η περιοχή πρόσδεσης στο DNA και διμερισμού με δομή α-έλικας, και μία περιοχή αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες στην οποία εδράζεται και ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης. Β) Οι μεταγραφικοί παράγοντες NFI επηρεάζουν με διάφορους τρόπους τη μεταγραφή: αλληλεπιδρούν με συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς, απομακρύνουν άλλους μεταγραφικούς παράγοντες από ρυθμιστικές περιοχές ενώ οι ίδιοι μπορούν να προσελκύονται από άλλους. (Προσαρμογή και τροποποίηση από Mason *et al*, 2009 [66] και Gronostajski *et al*, 2000 [65]).

Από την οικογένεια αυτή, εξέχοντα ρόλο για το νευρικό σύστημα έχουν οι παράγοντες NFIA και NFIB. Εκφράζονται νωρίς κατά την ανάπτυξη του ιπποκάμπου (E13) ενώ όταν πια η οδοντωτή έλικα είναι ορατή (E17), η έκφραση τους είναι ιδιαίτερα αυξημένη [66]. Η απουσία τους κατά την ανάπτυξη, προκαλεί αγενεσία του μέσου λοβού, διογκωμένες πλάγιες κοιλίες και αδυναμία πλήρους σχηματισμού του ιπποκάμπου [66], [67]. Αξίζει να σημειωθεί ότι απουσία NFIB παρατηρούνται λιγότερα μιτωτικά κύτταρα στο μεταναστευτικό ρεύμα των κυττάρων της οδοντωτής έλικας (*dentate migratory stream*), αφού τα πρόδρομα κύτταρα (*radial progenitor cells*) αδυνατούν να διαφοροποιηθούν και παραμένουν σε αυτό το στάδιο, καθώς επίσης και αδυναμία μετανάστευσης των νευρώνων που κατευθύνονται προς τους στόχους τους [66], [67].

Επίσης, οι NFIA και B εκφράζονται τόσο σε νευρικά όσο και αστρογλοιακά κύτταρα, αλλά έχουν κυρίως συνδεθεί με την επαγωγή και ενεργοποίηση της γλοιογένεσης. Ο NFIA επάγει τη γλοιογένεση μέσω της ενεργοποίησης του *Hes5*, δρώντας ως μόριο ελεγχόμενο κι αυτό το ίδιο από τη σηματοδότηση Notch [68], ενώ ταυτόχρονα μειώνει το δυναμικό αυτοανανέωσης των πρόδρομων νευρικών κυττάρων μέσω καταστολής της έκφρασης του

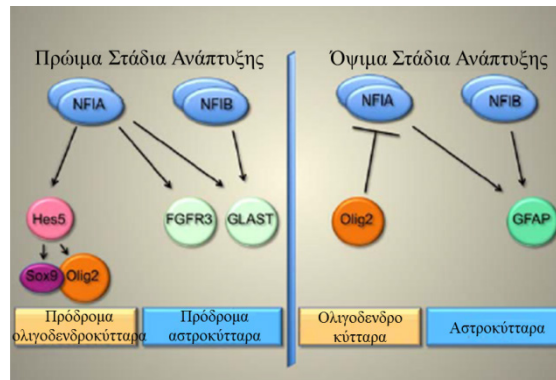
Hes1 [69]. Οι παράγοντες NFI ελέγχουν την έκφραση διαφόρων γλοιακών γονιδίων όπως είναι τα *Gfap*, *S100β*, *Aquaporin4*, *Clusterin*, κ.α. [70]. Μάλιστα ο NFIA προσδένεται απευθείας στον υποκινητή του γονιδίου *Gfap* με αποτέλεσμα να μην επιτρέπει στη μεθυλοτρανσφεράση του DNA, DNMT1 να προσδεθεί στη συγκεκριμένη περιοχή και να προκαλέσει τη μεθυλίωση της. Έτσι ο απομεθυλιωμένος υποκινητής του γονιδίου *gfap* είναι προσβάσιμος στον μεταγραφικό παράγοντα STAT3 της σηματοδότησης JAK-STAT, ο οποίος τελικά ενεργοποιεί τη μεταγραφή του αστρογλοιακού γονιδίου [70] (Εικόνα 12). Τη δράση του συναγωνίζεται ο bHLH μεταγραφικός παράγοντας Olig2, ο οποίος επάγει την ολιγοδενδρογλοιακή μοίρα των κυττάρων, καθώς αλληλεπιδρά μαζί του και εμποδίζει την πρόσδεσή του στον υποκινητή του *Gfap* [68]. Το αν θα υπερισχύσει η αστρογλοιακή ή η ολιγοδενδρογλοιακή μοίρα εξαρτάται από τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα των δύο μεταγραφικών παραγόντων. Εκείνος που θα εκφράζεται περισσότερο θα καθορίσει το πεπρωμένο του κυττάρου [68]. Κατασταλτική δράση στην πορεία της αστρογένεσης που διαμεσολαβείται από τον NFIA έχει και ο ομοιοτικός μεταγραφικός παράγοντας LIM-HD, Lhx2, ο οποίος αλλάζει το πεπρωμένο των πρόδρομων νευρικών κυττάρων από την γλοιακή προς τη νευρική μοίρα [71].

Ο παράγοντας Olig2 δεν είναι ο μόνος bHLH μεταγραφικός παράγοντας με τον οποίον σχετίζονται οι NFIs. Η απουσία της *Ngn2* κατά την ανάπτυξη του νεοφλοιού οδηγεί σε μείωση των επιπέδων του NFIB [49], ενώ έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα του γονιδίου *Ngn2* είναι αυξημένα σε ποντίκια στα οποία το γονίδιο του NFIA έχει αδρανοποιηθεί (knockout) [69].

Οι μεταγραφικοί παράγοντες Sox αλληλεπιδρούν κι αυτοί, όπως ήδη αναφέρθηκε με τους NFIs. Αξίζει να σημειωθεί ότι απουσία έκφρασης του NFIA παρατηρείται αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του *Sox11* (καθώς και του *Sox4*), τη δέκατη έκτη ημέρα ζωής νεογνών ποντικών [72]. Μάλιστα, στον υποκινητή του *Sox11* έχουν εντοπισθεί δύο πιθανές θέσεις πρόσδεσης των NFI, υποδηλώνοντας ότι το *Sox11* ίσως να καταστέλλεται άμεσα από τον NFIA [72].

Όπως αποδεικνύεται, οι NFIA και NFIB μεταγραφικοί παράγοντες δεν ελέγχουν μόνο την αστρογένεση αλλά φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στη νευρογένεση, κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος [66]. Η σχέση και η αλληλεπίδραση τους με αναπτυξιακά μονοπάτια όπως το Notch, το Shh και το Wnt [73], καθώς και με μεταγραφικούς παράγοντες που κατέχουν θεμελιώδη ρόλο στον έλεγχο της πορείας της

νευρογένεσης και τον καθορισμό του κυτταρικού πεπρωμένου όπως είναι οι παράγοντες bHLH και Sox, υποδεικνύει την ιδιαίτερη σημασία της διερεύνησής τους για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της νευρικής διαφοροποίησης, καθώς και της ενήλικης νευρογένεσης.



Εικόνα 12: Ο ρόλος των NFIA και NFIB στη γλαιογένεση στον νωτιαίο μυελό. Παρατηρούμε πως οι NFIA και B μεταγραφικοί παράγοντες επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων ρυθμίζοντας, έτσι, τη γλαιογένεση τόσο σε πρώιμα (E5- E7) όσο και σε όψιμα αναπτυξιακά στάδια. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Mason et al, 2009 [66]*).

1.4 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες που Επηρεάζουν την Ενήλικη Νευρογένεση

Όπως περιγράψαμε και παραπάνω, η διαδικασία της νευρογένεσης κατά την ενήλικη ζωή δεν είναι αυτόνομη και ανεξάρτητη αλλά επηρεάζεται και ελέγχεται από το μικροπεριβάλλον των πρόδρομων βλαστικών κυττάρων. Πρόκειται για μια δυναμική διαδικασία που ενεργοποιείται όταν αυτό απαιτείται, σε απόκριση στα ερεθίσματα που λαμβάνονται από το περιβάλλον, τόσο το μικροπεριβάλλον όσο και το μακροπεριβάλλον. Ανάμεσα στους εξωγενείς παράγοντες του ευρύτερου περιβάλλοντος στο οποίο ζει ένας ενήλικος οργανισμός και επηρεάζουν τη νευρογένεση μπορεί να είναι φαρμακολογικοί αλλά και στρεσογόνοι παράγοντες.

Η χρήση ψυχοτρόπων ουσιών, αντικαταθλιπτικών, αντιψυχωτικών φαρμάκων και εξαρτησιογόνων ουσιών επηρεάζει με διάφορους τρόπους τη νευρογένεση. Τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα είναι γνωστό ότι δρουν θετικά στη νευρογένεση ενώ τα αντιψυχωτικά μπορούν να δρουν είτε θετικά είτε αρνητικά [74]. Οι εξαρτησιογόνες

ουσίες όπως τα οπιοειδή, η αιθανόλη, η νικοτίνη αναστέλλουν τη νευρογένεση. Η επίδραση των κανναβινοειδών, ωστόσο, δεν έχει ακόμη διασαφηνιστεί πλήρως [74]. Είναι γνωστό, ότι τα κύτταρα του ιπποκάμπου εκφράζουν τον υποδοχέα των ενδοκανναβινοειδών CB1R, στον οποίον μπορούν, εκτός από τα ενδοκανναβινοειδή, να προσδεθούν και μιμητικές ουσίες όπως είναι τα κανναβινοειδή [75] [76]. Έχει υπονοηθεί, από πειράματα καταστολής της έκφρασης του CB1R υποδοχέα, ότι η έκφραση του δρα θετικά στη νευρογένεση. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με το γεγονός ότι η πρόσδεση του ενδοκανναβινοειδούς ανανδαμίδης στον CB1R οδηγεί σε μείωση της νευρογένεσης στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου.

Το στρες είναι ένας παράγοντας που μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στη νευρογένεση. Οφείλεται στο περιβάλλον διαβίωσης και τα ερεθίσματα που λαμβάνει το άτομο [74]. Σε στρεσογόνες καταστάσεις ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων HPA (*Hypothalamic-Pituitary-Adrenal*) ενεργοποιείται προκαλώντας την αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης. Η κορτιζόλη επηρεάζει αρνητικά τη νευρογένεση καθώς ο ιππόκαμπος είναι πλούσιος με υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο ιππόκαμπος ρυθμίζει τα επίπεδα κορτιζόλης, ενώ αντίθετα σε στρεσογόνες καταστάσεις αυτή η ρύθμιση δυσχεραίνεται. Ένα πλούσιο σε ερεθίσματα περιβάλλον και μη στρεσογόνο ευνοεί τη νευρογένεση και κατ' επέκταση και τη νευρική πλαστικότητα [77]. Η σωστή λειτουργία του εγκεφάλου εξαρτάται από την ικανότητα των νευρώνων να προσαρμόζονται στα διάφορα ερέθισματα. Άλλωστε ο τρόπος με τον οποίον τα κύτταρα αποφασίζουν να διατηρήσουν μία μνήμη ή να την διαγράψουν στηρίζεται ακριβώς σε αυτή τη δυναμική των ώριμων νευρώνων. Παράγοντες όπως το στρες εκτός από τη διαδικασία της νευρογένεσης αυτής καθ' αυτής, επηρεάζουν και τη γενικότερη πλαστικότητα του νευρικού συστήματος.

Η φυσική άσκηση είναι ένας ακόμα παράγοντας που επάγει τη νευρογένεση [13] [74]. Πολλές φορές συνοδεύεται από περισσότερα ερεθίσματα και προκλήσεις από το περιβάλλον όσο και από την αύξηση του καρδιακού ρυθμού και κατ' επέκταση της αιμάτωσης στον εγκέφαλο, η οποία είναι γνωστό ότι συμβάλλει, μέσω σειράς σηματοδοτικών μορίων στην επαγωγή της νευρογένεσης, αφού άλλωστε τα αγγεία αποτελούν μέρος του νευρογενικού περιβάλλοντος.

Το εξωγενές περιβάλλον, λοιπόν, είτε μέσω φαρμακολογικών είτε μέσω στρεσογόνων και μη παραγόντων, συνδέεται με τη διαδικασία της νευρογένεσης και της νευρικής

πλαστικότητα. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων οι εξωγενείς παράγοντες επιδρούν στην πορεία της νευρογένεσης αναμένεται να συμβάλλει στην αντιμετώπιση ψυχικών και νευρολογικών παθήσεων όπως είναι οι αγχώδεις διαταραχές και η κατάθλιψη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

2.1 *Επιγενετική Ρύθμιση*

Ως επιγενετικοί μηχανισμοί μπορούν να χαρακτηριστούν οι κληρονομήσιμες αλλαγές της γονιδιακής δραστηριότητας και έκφρασης καθώς και οι σταθερές και μακροπρόθεσμες μεταβολές του δυναμικού της μεταγραφής γονιδίων, οι οποίες δεν είναι απαραίτητα κληρονομήσιμες. Πρόκειται για αλλαγές όχι στην αλληλουχία του DNA αλλά στην επεξεργασία που αυτό υπόκειται καθώς και στη δομή χρωματίνης. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί, στους οποίους περιλαμβάνονται οι τροποποιήσεις του DNA (μεθυλίωση) και των ιστονών (μεθυλίωση, ακετυλίωση, σουμοϋλίωση, ουβικιτινίλωση, φωσφορυλίωση) καθώς και η δράση των μη κωδικών RNAs, κατέχουν εξέχοντα ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Μέσω της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που προκαλούν, ελέγχουν αλλά και διατηρούν την έκφραση ειδικών για κάθε κυτταρικό τύπο γονιδίων κατά την ανάπτυξη, και αποτελούν τον συνδετικό κρίκο μεταξύ των εξωγενών ρυθμιστικών παραγόντων και του ενδογενούς γενετικού προγράμματος [78].

Η σημασία των επιγενετικών μηχανισμών είναι θεμελιώδης για την άρτια λειτουργία του εγκεφάλου. Διαδραματίζουν καθοριστικό ρυθμιστικό ρόλο στη νευρική πλαστικότητα, τη μνήμη και τη μάθηση, τον κερκάρδιο κύκλο, τον εθισμό από εξαρτησιογόνες ουσίες αλλά και την ενήλικη νευρογένεση [79], από το στάδιο των νευρικών βλαστικών κυττάρων έως το στάδιο των ώριμων νευρώνων. Είναι γνωστό, άλλωστε, ότι κάποιοι από τους bHLH μεταγραφικούς παράγοντες, που διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην ενεργοποίηση και στην πορεία της νευρογένεσης, ρυθμίζουν τη μεταγραφή των νευρικών γονιδίων μέσω της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που προκαλούν. Οι κύριοι ρυθμιστές της νευρογένεσης Mash1 και Ngn2, στους οποίους αναφερθήκαμε εκτενώς παραπάνω, συνεργάζονται με τη χρωματίνη και μόρια που αναδιαμορφώνουν τη δομή της, ώστε να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Το Mash1 μάλιστα, το οποίο δεσμεύεται στο DNA τόσο σε ενεργές όσο και ανενεργές χρωματινικές περιοχές, προάγει την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, ώστε αυτή να γίνει περισσότερο προσβάσιμη, με στόχο την ενεργοποίηση της

μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων [80]. Συγχρόνως, η Ngn2 συμβάλλει στον σχηματισμό ενεργής χρωματίνης για τη μεταγραφή γονιδίων που ελέγχουν την διαφοροποίηση κινητικών νευρώνων. Πιο συγκεκριμένα, ο υποδοχέας του ρετινοϊκού οξέος RAR αλληλεπιδρά άμεσα με την Ngn2, η οποία βρίσκεται προσδεδεμένη στους υποκινητές των γονιδίων στόχων. Παρουσία RA, προσελκύει τους συνενεργοποιητές CBP και p300, με τους οποίους επίσης αλληλεπιδρά άμεσα, επάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων που καθορίζουν την ανάπτυξη των κινητικών νευρώνων [40]. Είναι ακόμα γνωστό ότι το μεταγραφικό δυναμικό δύο ακόμη bHLH μεταγραφικών παραγόντων των Ngn1 και NeuroD, εξαρτάται από την ενεργή δράση της καταλυτικής υπομονάδας του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF, Brg1 [81].

Οι επιγενετικοί ρυθμιστές, δηλαδή τα ένζυμα που μπορούν να επιβάλλουν, να διαγράψουν ή να αναγνωρίσουν αλλαγές στο DNA και τις ιστόνες, καθώς και οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν, συνήθως, τους διαμεσολαβητές των ενδογενών σημάτων [82]. Παράλληλα, η έκκριση και απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων, ορμονών και νευροτροφινών στο εξωκυττάριο περιβάλλον υπόκειται σε έναν εξίσου αυστηρό και συντονισμένο επιγενετικό έλεγχο [82]. Κάπως έτσι, λοιπόν, οι επιγενετικοί μηχανισμοί ενορχηστρώνουν τη νευρογένεση, καθώς αποκρίνονται αυστηρά στα εξωγενή αλλά και τα ενδογενή σήματα, ελέγχοντας την έκφραση ρυθμιστικών μορίων που είναι υπεύθυνα τόσο για τη διατήρηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων όσο και για τη διαφοροποίησή τους [82].

Όταν οι επιγενετικοί «διακόπτες», που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση ή την καταστολή της έκφρασης των γονιδίων, δυσλειτουργούν τότε τα κύτταρα μπορεί να οδηγηθούν σε πολλαπλές παθολογικές καταστάσεις. Η απορύθμισή τους μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη καρκίνου, ή να οδηγήσει σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες και νευροψυχιατρικές διαταραχές.

2.1.1 Μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί ένα καίριας σημασίας επιγενετικό παράγοντα, που εμπλέκεται στην πορεία της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των κυττάρων καθώς και σε πολλαπλές ασθένειες. Αναφέρθηκε πρώτα από τον Rollin Hotchkiss, το 1948, τέσσερα χρόνια μετά το περίφημο πείραμα των Avery, MacLeod και McCarty, που αποκάλυψε ότι το DNA είναι το γενετικό υλικό όλων των οργανισμών [83], [84], και εδραιώθηκε στη

συνέχεια από τον R. G. Wyatt το 1951 [85], [86]. Ο Hotchkiss, βοηθός τότε του Avery, ανακάλυψε, με χρωματογραφία χάρτου, ότι η αζωτούχος βάση κυτοσίνη υφίσταται παράλληλα και σε μεθυλιωμένη μορφή [84]. Οι επιστήμονες από τότε πιθανολογούσαν πως η τροποποίηση αυτή σχετίζεται με τη γονιδιακή έκφραση, ωστόσο χρειάστηκαν τριάντα χρόνια περίπου μέχρις ότου το αποδείξουν.

Η μεθυλίωση του DNA είναι μια ενζυμική αντίδραση, που καταλύεται από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες ή μεθυλάσες (DNMTs). Πρόκειται, ουσιαστικά, για τη μεταφορά μίας μεθυλομάδας από τον δότη S- αδενοσυλομεθειονίνη στον πέμπτο άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης [84], [87]. Η αντίδραση της μεθυλίωσης είναι αντιστρεπτή και καταλύεται από τα αντίστοιχα ένζυμα, τα οποία ονομάζονται DNA απομεθυλάσες. Οι κυτοσίνες του DNA που μεθυλιώνονται, βρίσκονται, ως επί το πλείστον, σε περιοχές πλούσιες σε δινουκλεοτίδια κυτοσίνης- γουανίνης, που ονομάζονται «CpG νησίδες» [84]. Πρόκειται για περιοχές όχι μικρότερες των 500 ζευγών βάσεων, που εντοπίζονται συνήθως κοντά στο 5' άκρο των υποκινητών των γονιδίων. Η μεθυλίωση του DNA είναι περισσότερο μελετημένη σε τέτοιες ρυθμιστικές περιοχές και είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την γονιδιακή αποσιώπηση [87]. Ωστόσο, είναι γνωστό, πως περιοχές πλούσιες σε κατάλοιπα κυτοσίνης- γουανίνης δεν εντοπίζονται μόνο στους υποκινητές αλλά και στο σώμα των γονιδίων και μπορούν εξίσου να μεθυλιώνονται. Αντίθετα όμως, η μεθυλίωση του DNA σε αυτή την περιοχή των γονιδίων επιδρά θετικά στη μεταγραφή [88] αναδεικνύοντας έτσι τον πολυσχιδή ρόλο που κατέχει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Αν και στα περισσότερα σωματικά κύτταρα η μεθυλίωση του DNA λαμβάνει χώρα σε μεγαλύτερο ποσοστό στις «CpG νησίδες», στα νευρικά κύτταρα προτιμούνται περιοχές χαμηλής περιεκτικότητας στα δινουκλεοτίδια CG [82], [79]. Μάλιστα, τα περισσότερα γονίδια που βρέθηκαν μεθυλιωμένα σε αυτές τις περιοχές, είναι νευρικά γονίδια και σχετίζονται με τη νευρική πλαστικότητα [89].

Ένα τέτοιο γονίδιο είναι αυτό που κωδικοποιεί για τη νευροτροφίνη BDNF και διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη μνήμη και τη μάθηση. Το γονίδιο αυτό έχει πολλαπλά εναλλακτικά μετάγραφα εξαιτίας των πολλών διαφορετικών σημείων έναρξης της μεταγραφής. Έχειδειχθεί ότι η αίσθηση του φόβου προκαλεί μείωση του βαθμού μεθυλίωσης των εξονίων I και IV ενώ αυξάνει τη μεθυλίωση στο εξόνιο VI, στην περιοχή CA1 του ιππόκαμπου [90]. Οι αλλαγές στη μεθυλίωση ως αντίδραση σε ένα εξωγενές

ερέθισμα, επηρεάζουν τη μεταγραφή του γονιδίου επιδρώντας κατ' επέκταση στη διαδικασία παγίωσης της μνήμης [87]. Εκτός από το ρόλο του στη διαδικασία της μνήμης, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ο BDNF συμμετέχει ενεργά και στην ενήλικη νευρογένεση. Ένας ακόμη αυξητικός παράγοντας του νευρογενικού μικροπεριβάλλοντος, η έκφραση του οποίου είναι κομβικής σημασίας για την ενήλικη νευρογένεση, είναι ο *Fgf1*. Η μεθυλίωση- απομεθυλίωση του γονιδίου ρυθμίζει την έκφραση του μορίου αυτού, υποδεικνύοντας και τη σημασία της στη διατήρηση και αυτοανανέωση των νευρικών βλαστικών κυττάρων [88].

Εκτός από την παραδοσιακή μεθυλίωση που λαμβάνει χώρα στις CpG περιοχές, έχει παρατηρηθεί μεθυλίωση και στις λεγόμενες CpH περιοχές, με το H να συμβολίζει την αδερίνη ή τη θυμίνη ή την κυτοσίνη [91]. Μάλιστα, η μεθυλίωση στις περιοχές αυτές παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ διαφόρων νευρικών κυτταρικών τύπων και είναι ιδιαίτερα συνιφασμένη με την καταστολή της μεταγραφής [82]. Θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μία πιο δυναμική και ευέλικτη μεθυλίωση που όμως δεν γνωρίζουμε πολλά για τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της [82].

Για τη διασφάλιση της μεθυλίωσης του DNA απαιτείται η έκφραση και σωστή λειτουργία των εξειδικευμένων ενζύμων που καταλύουν αυτή την αντίδραση, των DNMTs. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα η DNMT1 εκφράζεται σε όλους τους νευρώνες, ακόμη και στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα, και είναι υπεύθυνη για την διατήρηση του πρωτύπου μεθυλίωσης κατά την αντιγραφή του DNA [82]. Η απουσία της έκφρασής της από τα κύτταρα αυτά οδηγεί στην επαγωγή της γλοιογένεσης, εξαιτίας της υπομεθυλίωσης και καταστολής των νευρικών γονιδίων σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση γλοιακών γονιδίων όπως είναι το *Gfap* [82]. Μάλιστα, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, η ενέργεια αυτή μεσολαβείται από τον NFIA, ο οποίος απομακρύνει την DNMT1 [70] από τον υποκινητή του *Gfap* και κατά συνέπεια και το σύμπλοκο Sin3A- MeCP2, επιτρέποντας την προσέλκιση μορίων που αναδιαμορφώνουν τη χρωματίνη και την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου [92]. Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την *de novo* μεθυλίωση στα νευρικά κύτταρα είναι οι DNMT3A και DNMT3B [88]. Η DNMT3A εκφράζεται κατά την εμβρυογένεση αλλά και στους ώριμους νευρώνες ενώ η έκφραση της DNMT3B περιορίζεται αποκλειστικά στα εμβρυικά στάδια [82]. Η απουσία της DNMT3A οδηγεί σε προβληματική μετεμβρυική νευρογένεση, στοιχείο που επιβεβαιώνει το διακριτό ρόλο που κατέχει στην πορεία της νευρικής διαφοροποίησης. Γενικότερα, η βιωσιμότητα ποντικών

τα οποία δεν εκφράζουν τα γονίδια *Dntms* είναι πολύ περιορισμένη κι αυτό αποδεικνύει τη σημασία της μεθυλίωσης του DNA όχι μόνο στη νευρογένεση αλλά και σε κάθε ζωτική λειτουργία του οργανισμού.

Εξίσου σημαντικό ρόλο με τα μόρια που καταλύουν την αντίδραση της μεθυλίωσης κατέχουν και τα αντίστοιχα μόρια που αφαιρούν τις μεθυλομάδες από τις κυτοσίνες ή αυτά που «διαβάζουν» την τροποποίηση αυτή και την ερμηνεύουν, μέσω μίας σειράς μοριακών αλληλεπιδράσεων, σε μία βιολογική δραστηριότητα, όπως είναι η γονιδιακή έκφραση ή καταστολή. Οι πρωτεΐνες TET, ως υδροξυλάσες, επάγουν έμμεσα την απομεθυλίωση μέσω της υδροξυλίωσης της μεθυλιωμένης κυτοσίνης που προκαλούν, όπως συμβαίνει χαρακτηριστικά στην περίπτωση του γονιδίου *Nanog* [88], [93]. Κάτι που αξίζει να σημειωθεί είναι πως η έκφραση του γονιδίου *Tet3* είναι απαραίτητη για τη έκφραση μορίων με καθοριστικό ρόλο στην νευρογένεση όπως είναι η *Ngn2*, γεγονός που αποκαλύπτει τον μοναδικό και κρίσιμο ρόλο των επιγενετικών μηχανισμών [94]. Από την άλλη πλευρά, η MeCP2, κύριος ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης στον νευρικό σύστημα, αναγνωρίζει το μεθυλιωμένο DNA και προσδένεται στις αντίστοιχες CpG περιοχές [95], [96]. Μάλιστα είναι γνωστό ότι προσδένεται στις μεθυλιωμένες περιοχές του υποκινητή του γονιδίου *Gfap*, στο οποίο αναφερθήκαμε παραπάνω, οδηγώντας έτσι στην καταστολή της έκφρασής του.

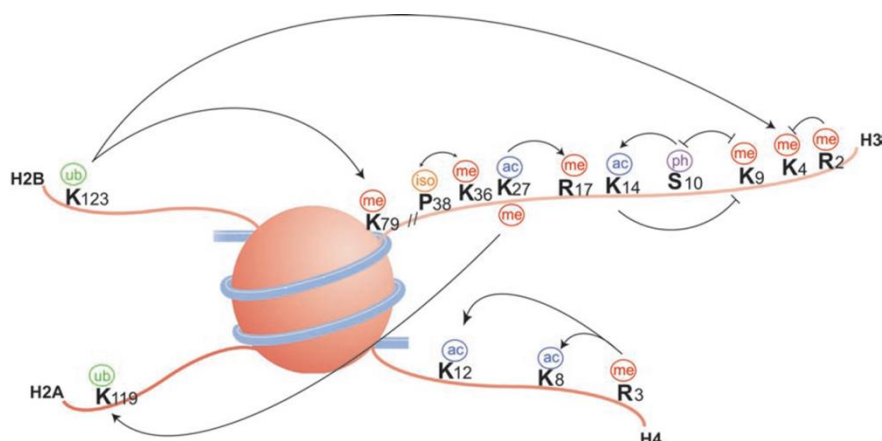
2.1.2 Τροποποιήσεις των Ιστονών

Ο Albrecht Kossel, βραβευμένος με το Nobel το 1910 για την σπουδαία ανακάλυψη του περί της σύστασης των νουκλεϊκών οξέων, είχε νωρίτερα, το 1884, ανακαλύψει τις ιστόνες [97]. Αν και πρόκειται για πυρηνικές πρωτεΐνες των ευκαρυωτικών οργανισμών, έχουν ανιχνευθεί και σε ορισμένα *Αρχαία*. Χάρη στο οκταμερές που σχηματίζουν, συμβάλλουν στην οργάνωση και το πακετάρισμα του DNA στη δομή της χρωματίνης, καθώς αποτελούν βασικά δομικά συστατικά των νουκλεοσωμάτων. Στις αρχές 1960, με την πρωτοποριακή μελέτη του Vincent Allfrey ανακαλύφθηκε ότι οι ιστόνες τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά, μέσω ομοιοπολικών δεσμών με διάφορες χημικές ομάδες [98]. Περίπου 20 χρόνια αργότερα, ο Timothy Richmond και οι συνεργάτες του, χαρακτήρισαν με τη βοήθεια υψηλής ανάλυσης ακτίνων X τη δομή των νουκλεοσωμάτων [99], τα οποία είχαν αναφερθεί για πρώτη φορά το 1974 [100], και διαπίστωσαν ότι τα αμινοτελικά άκρα

των ιστονών προεξέχουν επιτρέποντας την επικοινωνία μεταξύ των νουκλεοσωμάτων, μέσω των τροποποιήσεων στις οποίες υπόκεινται. Οι ιστονικές ουρές μπορούν να ακετυλιώνονται, να μεθυλιώνονται, να φωσφορυλιώνονται, να ουβικιτινιλιώνονται, να σουμοϋλιώνονται και να ριβοζυλιώνονται σε διάφορες θέσεις και περιοχές του DNA [101]. Η δυναμική των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων τροποποιήσεων των ιστονών με τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες του DNA και τα μη κωδικά RNA καθορίζει με ακρίβεια το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων, καθώς ρυθμίζει τη διαμόρφωση μιας χαλαρής, ανοιχτής και ενεργής χρωματίνης (ευχρωματίνη) ή μιας συμπαγούς, κλειστής και ανενεργής χρωματίνης (ετεροχρωματίνη) [102], μέσω μορίων που αναδιαμορφώνουν τη δομή της.

Η τροποποιήσεις των ιστονών λαμβάνουν χώρα σε πολλά κατάλοιπα που βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις των ιστονικών ουρών. Σήμερα είναι γνωστό ότι μπορούν να τροποποιηθούν μετα-μεταφραστικά περισσότερα από 60 κατάλοιπα [103]. Η φωσφορυλίωση και η ουβικιτινιλίωση είναι περιορισμένες σε λίγες θέσεις, σε αντίθεση με την ακετυλίωση και τη μεθυλίωση που τις συναντούμε σε πολλαπλά σημεία. Κάποιες από τις τροποποιήσεις αυτές λειτουργούν ως ενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως επί παραδείγματι η ακετυλίωση της λυσίνης 9 και 14, η δι- ή τριμεθυλίωση της λυσίνης 4 ή η φωσφορυλίωση της σερίνης 10 της ιστόνης H3 ενώ άλλες λειτουργούν ως αναστολείς της γονιδιακής έκφρασης, όπως είναι η δι- ή τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 και 27 της ιστόνης H3 [101]. Ορισμένες φορές στον ίδιο υποκινητή συνυπάρχουν τροποποιήσεις που επιφέρουν αντίθετα αποτελέσματα, όπως π.χ. η H3K27me3 με την H3K4me3, γεγονός που επιτρέπει στο κύτταρο να αποκρίνεται πολύ γρήγορα ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας την γονιδιακή έκφραση [102]. Πολλοί υποκινητές γονιδίων, που κατέχουν σημαντικό ρόλο κατά τη νευρογένεση και τη νευρική διαφοροποίηση, ανήκουν σε αυτή την κατηγορία των «δισθενών υποκινητών» (*bivalent promoters*). Οι μεταγραφικοί παράγοντες Ngn2, NeuroD1, Sox4 και Sox11, μάλιστα, αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα [102]. Έτσι λοιπόν, αυτά τα γονίδια βρίσκονται σε ετοιμότητα ώστε να μπορέσουν να αποκριθούν πολύ γρήγορα στα ερεθίσματα που προέρχονται από τους εξωγενείς παράγοντες. Με τον τρόπο αυτό ένα πρόδρομο νευρικό κύτταρο εξασφαλίζει την άμεση και ταχεία στρατολόγηση μεταγραφικών παραγόντων, ενεργοποιητών ή καταστολέων ώστε να διασφαλίσει είτε την διατήρηση του στο ισχύον στάδιο είτε να ενεργοποιήσει καθοριστικές κυτταρικές «αποφάσεις» για το πεπρωμένο του. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ικανότητα των

bHLH γονιδίων *Ngn2* και *Neurod1* να βρίσκονται σε «μεταγραφική ετοιμότητα» οφείλεται στον μεταγραφικό παράγοντα και δείκτη πολυδυναμίας Sox2, μέσω της δέσμευσης του στις ρυθμιστικές περιοχές των αντίστοιχων υποκινητών, η οποία αποτρέπει τη συσσώρευση της τριμεθυλίωσης της λυσίνης 27 της ιστόνης H3, και περιορίζει τη δράση της μεθυλοτρανσφεράσης των ιστονών PRC2 (*Polycomb Repression Complex 2*) [104] (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τροποποιήσεων των ιστονών. ub= ουβικιτινίλωση, ac= ακετυλίωση, me=μεθυλίωση, ph= φωσφορυλίωση. (Τροποποίηση και προσαρμογή από *Bannister and Kouzarides, 2011 [98]*)

Τα ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για τις τροποποιήσεις των ιστονών αλληλεπιδρούν άμεσα με σύμπλοκα παραγόντων που προσδένονται απευθείας στο DNA, καθώς και με άλλες πρωτεΐνες που προσελκύονται σε συγκεκριμένες χρωματινικές περιοχές [105]. Τέτοια ένζυμα είναι οι ακετυλάσες (HATs) και απακετυλάσες (HDACs) των ιστονών, οι μεθυλοτρανσφεράσες (HMTs) και απομεθυλάσες (HdMTs) των ιστονών και άλλα.

2.1.2.1 Ακετυλίωση των Ιστονών

Η ακετυλίωση των ιστονών οδηγεί στην ενεργοποίηση της μεταγραφής, καθώς συνοδεύεται με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης σε μία χαλαρή δομή, προσβάσιμη πια, στους μεταγραφικούς παράγοντες και ενισχυτές. Το πρώτο μόριο αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, με ενεργότητα HAT³, που ανακαλύφθηκε ήταν το σύμπλοκο SWI/SNF

³ HAT: Histone Acetyltransferase: ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών. Δρουν ενεργοποιητικά στη μεταγραφή καθώς «χαλαρώνουν» τη χρωματινική δομή

[106]. Αποτελείται από 7-13 υπομονάδες και είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με άλλα μόρια με ενεργότητα HAT ή HDACs προκειμένου να ενεργοποιήσει ή να καταστείλει τη μεταγραφή [81]. Μάλιστα μία από τις υπομονάδες του, η Brg1, φαίνεται πως είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη νευρική διαφοροποίηση [81]. Ήδη αναφέρθηκε η σχέση του με τους μεταγραφικούς παράγοντες Ngn1 και NeuroD. Η πρωτεΐνη p300 και το κοντινό ομόλογό της CBP, που όπως και το σύμπλοκο SWI/SNF εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα και τους ιστούς, ενεργούν θετικά στη μεταγραφή, καθώς αλληλεπιδρούν με μόρια της μεταγραφικής μηχανής και άλλες ενεργότητες HAT [105]. Είναι ενδιαφέρον ότι κατά την ανάπτυξη, οι p300 και CBP εκφράζονται σε μεγάλη αφθονία στον νευρικό σωλήνα, ενώ στα τελικά αναπτυξιακά στάδια η έκφραση τους περιορίζεται αρκετά [107]. Στο ενήλικο νευρικό σύστημα η παρουσία των p300 και CBP είναι αισθητά αυξημένη στα κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού και στους κινητικούς νευρώνες [107], η διαφοροποίηση των οποίων συντονίζεται από την Ngn2. Κομβικό ρόλο στη νευρογένεση της υποκοιλιακής ζώνης των πλάγιων κοιλιών φαίνεται πως παρουσιάζει η ακετυλάση KAT6B, μιας και η απουσία της οδηγεί σε μείωση των νευροβλαστών που μεταναστεύουν διαμέσου του *RMS*, προς τον οσφρητικό βολβό. Παράλληλα, οι απομεθυλάσες HDACs, που κι αυτές με τη σειρά τους παίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη νευρογένεση, έχουν πιο εξειδικευμένη δράση. Οι HDACs 3 και 5 εκφράζονται σε αφθονία στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα και η έκφραση τους είναι καθοριστική για τον πολλαπλασιασμό, τη διατήρηση και τη διαφοροποίηση τους, ενώ οι HDACs 2, 4, 5, 7 και 9 παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση κατά τη διαφοροποίηση [82], [101].

Διαπιστώνοντας από τα παραπάνω ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί αποτελούν τον ενδιάμεσο κρίκο μεταξύ των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων και της γονιδιακής έκφρασης στο νευρικό σύστημα, αξίζει να σημειωθεί ότι οι νευροτροφίνες, οι πρωταγωνιστές της νευρικής πλαστικότητας, επιφέρουν επιγενετικής φύσης αλλαγές μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης CBP από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια [105]. Μάλιστα, ο BDNF μέσω της S-νιτροζυλίωσης της HDAC2, την απομακρύνει από τους υποκινητές των γονιδίων στόχων του, επάγοντας συγχρόνως την ακετυλίωση των ιστονών και κατ' επέκταση τη μεταγραφή τους [105].

2.1.2.2 Μεθυλίωση των Ιστονών

Μια άλλη κατηγορία ενζύμων που τροποποιούν ομοιοπολικά τις ιστόνες και είναι εξίσου καλά μελετημένη με τις ακετυλάσες είναι οι μεθυλοτρανσφεράσες και οι απομεθυλάσες των ιστονών (HMTs), όπως αναφέραμε και νωρίτερα. Η μεθυλίωση στις ιστόνες λαμβάνει χώρα σε δύο κατάλοιπα, τη λυσίνη και την αργινίνη.

1. Μεθυλίωση της Λυσίνης των Ιστονών

Η μεθυλίωση της λυσίνης απασχολεί εδώ και χρόνια την επιστημονική κοινότητα και έχει συμβάλλει καθοριστικά στην κατανόηση των μηχανισμών της γονιδιακής ρύθμισης. Ορισμένες από τις τροποποιήσεις αυτές είναι αποκλειστικά ενεργοποιητικές (H3K4 και H3K79) ή κατασταλτικές (H3K27 και H3K9), ενώ κάποιες άλλες μπορεί είτε να ενεργοποιούν τη γονιδιακή έκφραση είτε να την καταστέλνουν (H3K36) [108]. Στον ιππόκαμπο, οι KMT6B και 6A, υπεύθυνες για την H3K27me₃, εκφράζονται άφθονα στους ανώριμους νευρώνες, με την KMT6B να κυριαρχεί και στους ώριμους νευρώνες. Κατά τον καθορισμό της αστροκυτταρικής μοίρας, η H3K27me₃ αυξάνεται στον υποκινητή των γονιδίων της οικογένειας *ngn* [109], κάτι που αναδεικνύει το ρόλο της όχι μόνο στη διατήρηση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων αλλά και στη διαφοροποίησή τους.

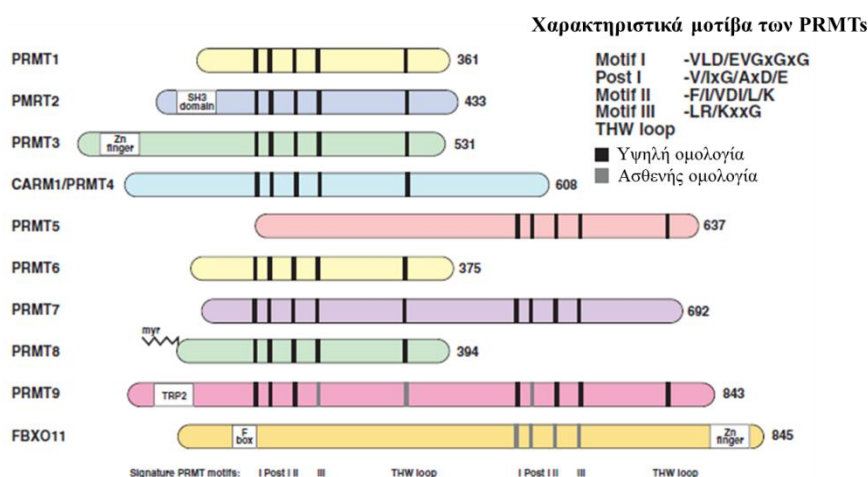
Ένα από τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την αστρογένεση, το *Gfap*, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσον αφορά στην κατάσταση της χρωματίνης στον υποκινητή του [110]. Κατά τον καθορισμό της αστροκυτταρικής μοίρας, τα επίπεδα της H3K9me₂ μειώνονται ενώ αυξάνονται τα επίπεδα της H3K4me₃, παράλληλα με την ακετυλίωση των H3K9 και H3K14, οδηγώντας, κατ' αυτόν τον τρόπο στην προσέλκυση της μεταγραφικής μηχανής και την ενεργοποίηση της μεταγραφής [92], [110], [111]. Η μεθυλίωση H3K9 (H3K9me_{2/3}) παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαφοροποίηση των κυττάρων [112], [113]. Η απομεθυλάση KDM3A που απομακρύνει τις μεθυλομάδες από την H3K9 έχει εξειδικευμένη δράση στην πορεία της νευρικής διαφοροποίησης [114]. Όπως αποδείχθηκε πρόσφατα αλληλεπιδρά άμεσα με την Ngn2 μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου, και ρυθμίζει τη στρατολόγησή της στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων *Neurod1* και *Tubb2b*, κατά την εμβρυική νευρογένεση, στον βάτραχο [114]. Η Ngn2 με την σειρά της, επηρεάζει την στρατολόγηση της KDM3A στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων της, *Neurod1*, *Myt1* και *Tubb2b* [114]. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό στον μηχανισμό αυτό ότι η

σχέση της Ngn2 με την απομεθυλάση KDM3A είναι εξειδικευμένη και όχι γενικευμένη και για άλλους bHLH μεταγραφικούς παράγοντες [114]. Αυτή είναι ακόμη μία απόδειξη του διαφορετικού ρόλου που διαδραματίζουν αυτά τα δύο τόσο σημαντικά μόρια στη νευρογένεση.

Το Bmi1, παράγοντας του συμπλόκου PRC1 (*Polycomb Repressive Complex 1*) με δράση μεθυλοτρανσφεράσης, είναι γνωστό ότι επηρεάζει τον πληθυσμό των πρόδρομων νευρικών κυττάρων της υποκοιλιακής ζώνης των πλάγιων κοιλιών διασφαλίζοντας, τρόπον τινά, την ομοιοστάσή του [115]. Απαραίτητη για τον καθορισμό της νευρικής μοίρας είναι και η έκφραση της απομεθυλάσης των λυσινών Jmjd3 (*Jumonji D3*). Η Jmjd3 αναγνωρίζει την κατασταλτική τριμεθυλίωση της λυσίνης 27 της ιστόνης H3 και απομακρύνει τις μεθυλομάδες από τις ιστόνες στους υποκινητές γονιδίων που ρυθμίζουν τη νευρογένεση [116], συμβάλλοντας έτσι θετικά στη μεταγραφή τους.

2. Μεθυλίωση της Αργινίνης των Ιστονών

Ενώ η μεθυλίωση της λυσίνης των ιστονών έχει μελετηθεί διεξοδικά, οι γνώσεις μας για τη μεθυλίωση των καταλοίπων της αργινίνης, ενός σχετικά νέου μηχανισμού δυναμικής ρύθμισης της δομής της χρωματίνης και επιγενετικής μνήμης, είναι περιορισμένες. Η τροποποίηση αυτή καταλύεται από τα ένζυμα της οικογένειας των μεθυλοτρανφερασών της αργινίνης (*Protein Arginine (R) Methyl Transferases*) ή PRMTs, η οποία αποτελείται από 11 μέλη στον άνθρωπο, τα περισσότερα από τα οποία είναι πρωτεΐνες κυτταρικής οικονομίας [117] (Εικόνα 14).

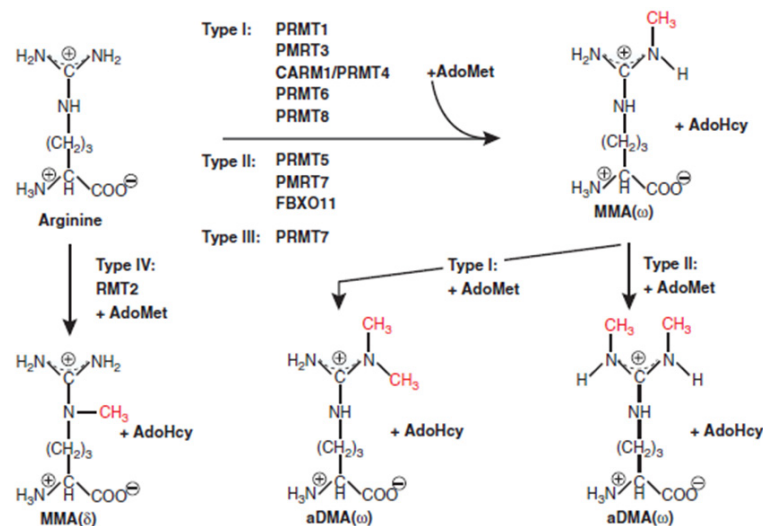


Εικόνα 14: Η οικογένεια των PRMT πρωτεϊνών.

Τα μέλη αυτής της οικογένειας παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία ως προς τα χαρακτηριστικά μοτίβα που φαίνονται με σκούρο χρώμα. (Προσαρμογή και τροποποίηση από Bedford, 2007 [118])

Η ενζυμική τους ενεργότητα εξειδικεύεται στην μεταφορά μιας ή δύο μεθυλομάδων από την S- αδενοσύλ-μεθειονίνη (AdoMet) στα άτομα αζώτου που βρίσκονται στη γουανιδική ομάδα της αργινίνης, καταλήγοντας είτε σε ω -N^G-μονομεθυλ-αργινίνη είτε σε ω -N^G,N^G-ασύμμετρη ή ω -N^G,N^G-συμμετρική διμεθυλ-αργινίνη και αδενοσύλ-ομοκυστεΐνη [119] (**Εικόνα 15**). Με βάση το τελικό προϊόν που παράγεται, οι PRMTs κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις ομάδες, δύο βασικές, και δύο δευτερεύουσες και όχι τόσο γνωστές και χρησιμοποιούμενες. Οι ομάδες τύπου I και II αρχικά καταλύουν το σχηματισμό μονομεθυλιωμένης αργινίνης (ω -MMA) ως ενδιάμεσο προϊόν [118], [120]. Οι τύπου I μεθυλοτρανσφεράσες οδηγούν στο σχηματισμό ασύμμετρης διμεθυλ-αργινίνης (ω -aDMA) ενώ οι τύπου II στο σχηματισμό συμμετρικής διμεθυλιωμένης αργινίνης (ω -sDMA) [118], [120]. Οι τύπου III σχηματίζουν μονάχα μονομεθυλιωμένα κατάλοιπα αργινίνης (ω -MMA) ενώ οι τύπου IV, σχηματίζουν επίσης μονομεθυλιωμένες αργινίνες με τη διαφορά ότι η μεθυλομάδα προστίθεται στο άζωτο (N) του δ-άνθρακα (C) του αμινοξέος (δ -MMA) και όχι στο ω -C όπως στους υπόλοιπους τρεις τύπους [117]. Στις ομάδες τύπου I περιλαμβάνονται τα ένζυμα PRMT1, PRMT3, PRMT4/CARM1, PRMT6 και PRMT8, και στις τύπου II τα ένζυμα PRMT5 και PRMT7 (το PRMT7 κατατάσσεται και στην τύπου III ομάδα των μεθυλοτρανσφερασών) [119]. Για το PRMT2 δεν έχει βρεθεί ενζυμική δραστηριότητα και για το PRMT9 δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής στοιχεία [118]. Έχουν βρεθεί επίσης κι αλλά δύο ένζυμα, τα PRMT10 και PRMT11, που συμμετέχουν σε διαδικασίες διαφοροποίησης στα φυτά όπως η άνθιση.

Όλα τα μέλη της οικογένειας των PRMTs διαθέτουν μια κοινή καταλυτική περιοχή [117], η οποία αποτελείται από τέσσερα υψηλά συντηρημένα μοτίβα, 310 περίπου αμινοξέων και μία περιοχή γνωστή ως βρόγχος THW (Thr-His-Trp) [118]. Μεταξύ τους διαφέρουν κυρίως ως προς το μήκος της N-τελικής περιοχής, καθώς και ως προς την παρουσία κάποιων ξεχωριστών μοτίβων που διαθέτουν και τα οποία προσδίδουν συγκεκριμένες ιδιότητες.



Εικόνα 15: Η αντίδραση μεθυλίωση της αργινίνης που καταλύεται από τις PRMT πρωτεΐνες. (Προσαρμογή και τροποποίηση από Bedford, 2007 [118])

Τα ένζυμα αυτά μεθυλιώνουν περιοχές πλούσιες σε κατάλοιπα γλυκίνης-αργινίνης (*Glycine- Arginine Rich domains* ή *GAR domains*). Κυριαρχούν τα μοτίβα αργινίνης-γλυκίνης-γλυκίνης (RGG), αργινίνης-Xaa- αργινίνης (RXR), και αργινίνης-γλυκίνης (RG) [118]. Οι μεθυλοτρανσφεράσες τύπου I, PRMT1, PRMT3 και PRMT6 μεθυλιώνουν τέτοιου είδους κατάλοιπα ενώ η CARM1 μεθυλιώνει πιο εξειδικευμένα μοτίβα όπως προλίνη-γλυκίνη-μεθειονίνη (PGM) σε πρωτεΐνες που προσδένονται στο RNA (*RNA-binding proteins, RBP*) [118]. Οι μεθυλοτρανσφεράσες τύπου II, PRMT5 και PRMT7 αναγνωρίζουν απομονωμένες αργινίνες αλλά και αργινίνες των μοτίβων GAR.

Οι PRMTs τροποποιούν ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι το μάτισμα του RNA, η μεταφορά του από και προς τον πυρήνα, η μετάφραση του mRNA, η επιδιόρθωση του DNA, η μεταγωγή σημάτων, η κυτταρική διαφοροποίηση, η αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών, η σταθερότητα των πρωτεϊνών, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και η ρύθμιση της [119], [121].

Η μεθυλίωση των καταλοίπων αργινίνης, όπως άλλωστε και των καταλοίπων λυσίνης των ιστονών, διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η μεθυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων μπορεί να έχει ενεργοποιητικό ή κατασταλτικό ρόλο στη μεταγραφή. Θετική επίδραση έχουν οι τροποποιήσεις H4R3me2a από PRMT1 [119], [122], η H3R2me2s από την PRMT5 [123], [124] από την PRMT7 [125], και οι H3R17me2a, H3R26me2a και H3R42me2s από την PRMT4/CARM1 [126], [127].

Αντίθετα, αρνητική επίδραση στη μεταγραφή επιφέρουν η H3R2me2a και η H2AR29me2a από την PRMT6 [127], [128], η H3R8me2a από την PRMT2 [127], [129], η H3R8me2s από την PRMT5 και η H4R3me2s από τις PRMT5 και PRMT7 [127]. Είναι επίσης γνωστό ότι η PRMT5 μεθυλιώνει την αργινίνη 3 της ιστόνης H2A (H2AR3me2), μια τροποποίηση που δρα συνδυαστικά με τη μεθυλίωση της αργινίνης 3 της ιστόνης H4 [130]. Η ιστόνη H2A αποτελεί επίσης υπόστρωμα και της PRMT1, χωρίς να είναι γνωστός ακόμη ο λειτουργικός ρόλος της τροποποίησης αυτής [130].

Η PRMT1 και η PRMT4/CARM1 έχουν έναν ιδιαίτερο ρόλο στην ενεργοποίηση της μεταγραφής. Δρουν συνεργιστικά, μέσω μίας διαδοχικής ακολουθίας τροποποιήσεων που διαμεσολαβούνται αρχικά από την PRMT1 η οποία διμεθυλιώνει ασύμμετρα την αργινίνη 3 της ιστόνης H4, στη συνέχεια από τον συνενεργοποιητή, CBP/p300, που προκαλεί την ακετυλίωση των λυσινών 18 και 23 στην ιστόνη H3, οι οποίες τέλος με την σειρά τους, προσελκύουν την PRMT4 για να διμεθυλιώσει την αργινίνη 17 της ιστόνης H3, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής [127], [130].

Η μεθυλίωση της αργινίνης, όπως άλλωστε και της λυσίνης, είναι μία αντιστρεπτή αντίδραση. Ωστόσο δεν έχουν ανακαλυφθεί, ως τώρα, ένζυμα εξειδικευμένα που να απομακρύνουν αποκλειστικά τις μεθυλομάδες μόνο από τα κατάλοιπα αργινίνης. Πολλές όμως από τις οξυγενάσες Jumonji (JmjC) που αποτελούν τις απομεθυλάσες των λυσινών, έχουν δυναμικό απομεθυλίωσης και καταλοίπων λυσίνης. Αν και αρχικά ήταν γνωστό ότι μόνο η απομεθυλάση JmjD6 [127], [130] διαθέτει αυτή την ενεργότητα, αργότερα αποδείχθηκε ότι και άλλα JmjC μόρια όπως οι KDM3A, KDM4E, KDM5C και KDM6B έχουν τη δυνατότητα να καταλύουν την αντιστρεπτή αντίδραση της μεθυλίωσης της αργινίνης [131].

Ως ένζυμα κυτταρικής οικονομίας, οι PRMTs είναι απαραίτητες για τη σωστή λειτουργία πολλών –αν όχι όλων– των ιστών. Μια σειρά από μελέτες αναδεικνύουν μάλιστα, έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στο μυϊκό, το ανοσοποιητικό, το αναπαραγωγικό και το νευρικό σύστημα [127]. Εστιάζοντας το ενδιαφέρον μας στο νευρικό σύστημα, αξίζει να αναφερθεί ότι η PRMT1 έχει συσχετιστεί με τη μυελίνωση των νευρώνων [127], η PRMT3 με τη λειτουργία των κινητικών νευρώνων [127], [132], PRMT5 με την αυτοανανέωση και επιβίωση των νευρικών βλαστικών κυττάρων [127], [133] και η PRMT6 με την γονιδιακή έκφραση κατά τη χρόνια έκθεση σε κοκκαΐνη [127], [134]. Τέλος, η PRMT7 πιθανόν εμπλέκεται στη νευρική διαφοροποίηση [127], [135]. Η πρωτεΐνη PRMT8 αποτελεί ίσως

την πιο ενδιαφέρουσα μεθυλοτρανσφεράση της αργινίνης για το νευρικό σύστημα, επειδή εκφράζεται αποκλειστικά και εξειδικευμένα στο κεντρικό νευρικό σύστημα, χωρίς όμως να είναι ακόμη γνωστός ο ρόλος και η ενζυμική της δράση [136], [137].

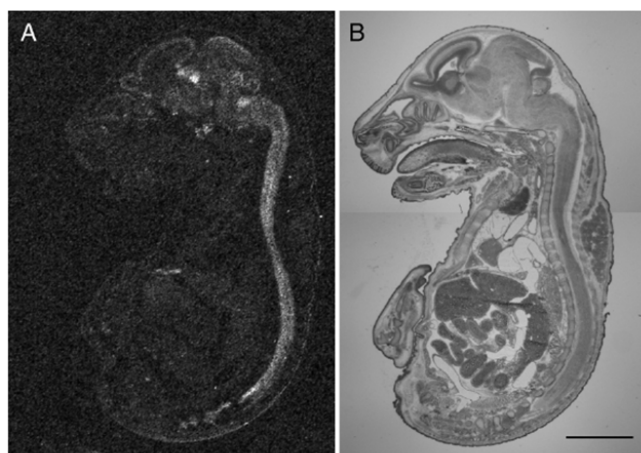
i. PRMT8: Μια Εξειδικευμένη Μεθυλοτρανσφεράση της Αργινίνης για το Νευρικό Σύστημα

Η PRMT8 ταυτοποιήθηκε το 2003 από ανάλυση μικροσυστοιχιών του κυτταρικού υποπληθυσμού που εκφράζει τον μεταγραφικό παράγοντα Sox1 την 10.5 ημέρα της εμβρυικής ανάπτυξης του ποντικού, μαζί με τους Sox4 και Sox11 [138]. Χαρακτηριζόταν αρχικά ως μία ετερογενής πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη (hnRNP) με το όνομα *Hrmt114* ή *Hrmt113* (*hnRNP methyltransferase-like*) [139]. Το γονίδιο της πρωτεΐνης εδράζεται σε μια υποτελομερική περιοχή στο χρωμόσωμα 12 στον άνθρωπο και στο χρωμόσωμα 6 στο ποντίκι. Παρουσιάζει 83% ομολογία με την PRMT1 (τα 325 από τα 347 αμινοξέα), με την οποία μάλιστα σχηματίζει ετεροδιμερή [139], [140]. Οι πρώτες μελέτες έδειξαν ότι πρόκειται για ένα νέο μέλος της οικογένειας των PRMTs με ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της υποκυτταρικής κατανομής του αλλά και της ιστοειδικότητας που παρουσιάζει [139].

Η PRMT8 αγκυροβολεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων στα οποία εκφράζεται, μέσω ενός μηχανισμού μυριστοϋλίωσης της στο αμινοτελικό της άκρο. Πιο αναλυτικά, διαθέτει ένα μοτίβο μυριστοϋλίωσης, το MGXXX(S/T), το οποίο ξεκινά από το πρώτο ATG της κωδικής περιοχής και είναι συντηρημένο στον άνθρωπο, το ποντίκι και το *zebrafish* [139]. Η μυριστοϋλίωση του N-τελικού άκρου οφείλεται στην προσθήκη του μυριστικού οξέος $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$ στο κατάλοιπο γλυκίνης που βρίσκεται αμέσως μετά την εναρκτήρια μεθειονίνη (Gly-2) [139]. Η παρουσία βασικών αμινοξέων κοντά σ' αυτό το μοτίβο διευκολύνει ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με τα λιπίδια των μεμβρανών, και κατά συνέπεια την αγκυροβόληση της μυριστοϋλιωμένης πρωτεΐνης [139].

Το N-τελικό άκρο του μορίου, έχει επίσης ρυθμιστικό ρόλο και στη δραστηριότητα του ενζύμου. Η πρωτεολυτική απομάκρυνση της N-τελικής περιοχής αυξάνει την ενζυμική ενεργότητα της PRMT8, προσδίδοντάς της ενδεχομένως, νέο βιολογικό ρόλο [140]. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό που αφορά το αμινοτελικό άκρο της PRMT8, είναι ότι αποτελεί περιοχή αυτομεθυλίωσης της πρωτεΐνης (μονομεθυλίωσης και ασύμμετρης διμεθυλίωσης), καθώς επίσης και αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, χάρη στα κατάλοιπα προλίνης (*Proline Rich domains*, *PR domains*) που διαθέτει [140].

Το πιο ελκυστικό, ίσως, χαρακτηριστικό της PRMT8 είναι ότι είναι η μοναδική από τις μεθυλοτρανσφεράσες της αργινίνης που παρουσιάζει εξειδικευμένη έκφραση στον νευρικό σύστημα [139]. Ο *Tenada et al.* απέδειξαν, με πειράματα υβριδοποίησης *in situ* σε ποντίκια, ότι το γονίδιο *prmt8* εκφράζεται εξειδικευμένα και άφθονα στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό [137] (Εικόνα 16). Η ίδια ερευνητική ομάδα, με πειράματα ανοσοϊστοχημείας αποκάλυψε ότι η πρωτεΐνη PRMT8 εκφράζεται σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου, πλην της κοκκιώδους στοιβάδας της παρεγκεφαλίδας. Υπονοήθηκε μάλιστα ότι η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται και στον υποκάμπο [136].



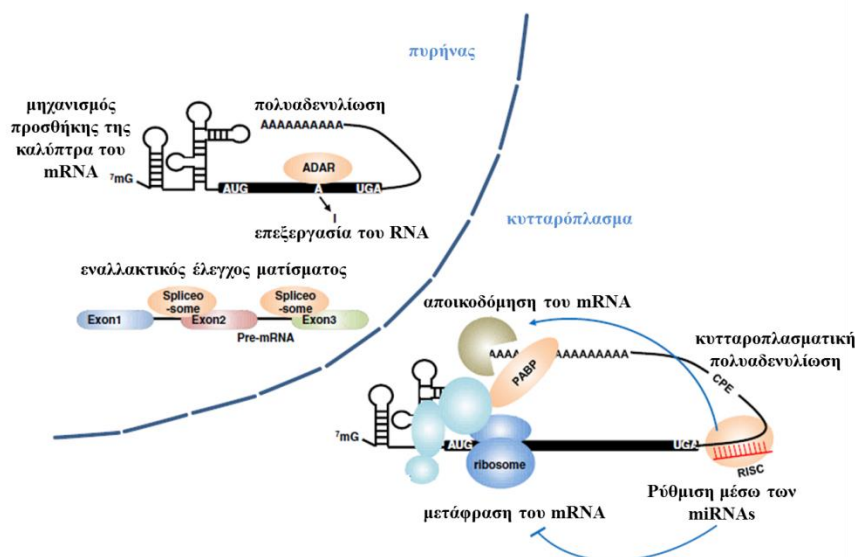
Εικόνα 16: Η έκφραση του mRNA του γονιδίου *prmt8* σε έμβryo ποντικού. Εγκάρσια τομή εμβρύου ποντικού την ημέρα E16.5 και υβριδοποίηση *in situ* αποδεικνύει την άφθονη κατανομή του mRNA του γονιδίου *prmt8* στο κεντρικό νευρικό σύστημα. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Tenada et al.* 2007 [137]).

Η πρωτεΐνη PRMT8 είναι σημαντική για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος στο *zerabfish*, καθώς η πλήρης απουσία της οδηγεί σε εκτεταμένη γαστριδίωση και πολλές αναπτυξιακές ανωμαλίες [141]. Η έκφραση της, έχειδειχθεί, ότι επάγεται από το ρετινοϊκό οξύ κι ότι λειτουργεί ως συνενεργοποιητής της σηματοδότησης του ίδιου του μορφογόνου [142]. Αλληλεπιδρά επίσης με την PRMT1, ρυθμίζοντας τη νευρική διαφοροποίηση προς έναν συγκεκριμένο κυτταρικό υπότυπο [142]. Η δράση αυτού του ενζύμου έχει συσχετιστεί με την διατήρηση της πολυδυναμίας των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων και το μονοπάτι της PI3K/AKT [143]. Ωστόσο ο ρόλος και η σημασία της PRMT8 για την ανάπτυξη ή τη λειτουργία του νευρικού συστήματος δεν είναι ακόμη σαφής.

2.2 Ρύθμιση της Γονιδιακής Έκφρασης στο Επίπεδο Μετά τη Μεταγραφή

Η ροή της γενετικής πληροφορίας ελέγχεται σε πολλαπλά σημεία. Το κύτταρο δεν ξοδεύει αλλόγιστα ενέργεια ούτε θέτει σε κίνδυνο την ομοιόστασή του. Γι αυτόν τον λόγο ελέγχει με πολλούς τρόπους την πορεία της γονιδιακής έκφρασης.

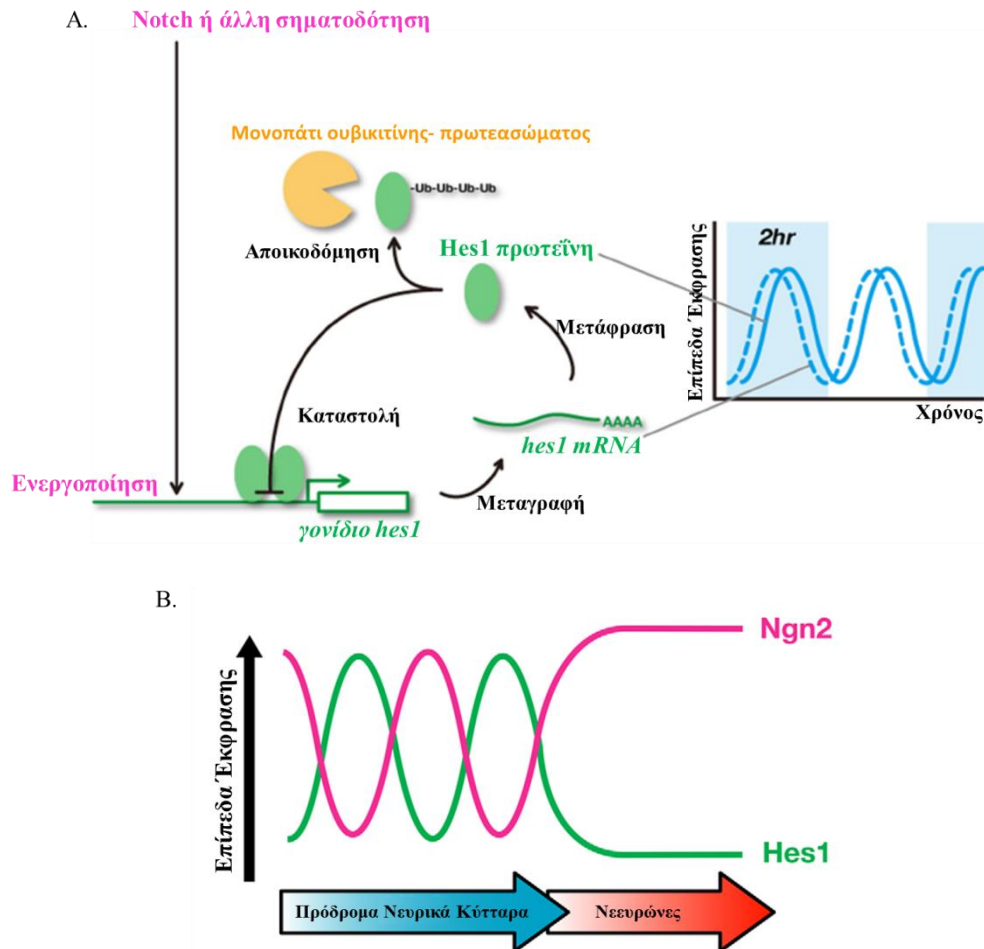
Όταν ένα γονίδιο μεταγράφεται, το mRNA που παράγεται, ελέγχεται αυστηρά για να προχωρήσει στο επόμενο στάδιο, αυτό της μετάφρασης. Το πέρασμα από το στάδιο της μεταγραφής στη μετάφραση εξαρτάται από τη σταθερότητα του mRNA αλλά και από μηχανισμούς που ελέγχουν την έναρξη της μεταφραστικής διαδικασίας. Είναι εντυπωσιακό πόσους πολλούς τρόπους χρησιμοποιεί ένα κύτταρο για να ελέγξει τη σταθερότητα του μηνύματος. Ο μηχανισμός προσθήκης της καλύπτρας (7 μεθυλογουανοσίνη- m⁷G cap) στο 5' άκρο των μηνυμάτων, της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης στο 3' άκρο καθώς και του εναλλακτικού ματίσματος ελέγχουν πολύ επιλεκτικά την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα [144] (Εικόνα 17). Επιπλέον επίπεδα επεξεργασίας, όπως η μεθυλίωση και η απαμίνωση της αδεΐνης, αποτελούν έναν επιπρόσθετο μηχανισμό ελέγχου της σταθερότητας του mRNA επηρεάζοντας ακόμα και τη δευτεροταγή δομή του [144], [145]. Η αλληλεπίδραση του mRNA με πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν εξειδικευμένα τα σωστά επεξεργασμένα μηνύματα σηματοδοτεί την έξοδο του από τον πυρήνα [146].



Εικόνα 17: Σχηματικό μοντέλο των μετα- μεταγραφικών ρυθμιστικών μηχανισμών της γονιδιακής έκφρασης. Η ρύθμιση επιτελείται τόσο μέσα στον πυρήνα (προσθήκη καλύπτρας στο 5' άκρο, πολυαδενυλίωση, εναλλακτικό μάτισμα) όσο και στο κυτταρόπλασμα (αποικοδόμηση του mRNA, πολυαδενυλίωση, miRNAs, αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες των οικογενειών RBPs (*RNA-binding proteins*) και PABPs (*poly(A)-binding proteins*). (Προσαρμογή και τροποποίηση από Kim et. al, 2016 [144])

Η έκφραση του γονιδίου *Ngn2* ρυθμίζεται και σε αυτό το επίπεδο, με τρόπους που μόλις πρόσφατα έχουν αρχίσει να γίνονται αντιληπτοί. Τα *bHLH* γονίδια που βρίσκονται υπό τον έλεγχο της σηματοδότησης Notch, όπως το *Ngn2*, παρουσιάζουν μια αξιοσημείωτη περιοδική έκφραση (*oscillation*) (**Εικόνα 18**), διάρκειας 2-3 ωρών, η οποία παρατηρείται τόσο στο επίπεδο της πρωτεΐνης όσο και του mRNA [147], [148] (**Εικόνα 18A**). Οι ακριβείς μηχανισμοί της ρυθμικής έκφρασης δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί αλλά χάρη σε αυτούς η σηματοδότηση Notch παραμένει ενεργή, εξασφαλίζοντας συγχρόνως τη διατήρηση της «δεξαμενής» των πρόδρομων νευρικών κυττάρων. Όταν η περιοδικότητα αυτή σταματά και η έκφραση των προνευρικών γονιδίων σταθεροποιείται, τότε το κύτταρο διαφοροποιείται ακολουθώντας την προκαθορισμένη νευρική του μοίρα [149], [150], [151] (**Εικόνα 18B**).

Ο σύντομος χρόνος ημιζωής του mRNA του γονιδίου *Ngn2* που αντιστοιχεί περίπου σε μισή ώρα, υποδεικνύει ότι η ρύθμιση της έκφρασης του επιτελείται και σε μεταγραφικό επίπεδο [152]. Ένα μόριο που σχετίζεται με τη σταθερότητα του mRNA του γονιδίου *Ngn2* στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα, χωρίς όμως να συνδέεται με τη ρυθμική έκφραση του, κατά την πλευρική αναστολή του Notch, είναι η Droscha, μια ριβοκουκλεάση που ανήκει στην οικογένεια ενζύμων RNase III [153]. Συγκεκριμένα η Droscha αποσταθεροποιεί το mRNA του *Ngn2*, με έναν τρόπο που δεν συνδέεται με τον μηχανισμό των miRNAs. Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με τον μεταγραφικό παράγοντα NFIB. Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Droscha με άλλες πρωτεΐνες που προσδένονται στο RNA (RBPs) έχει ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του mRNA του γονιδίου *Nfib*, το οποίο επάγει φυσιολογικά τη γλοιογένεση στον ιππόκαμπο [154].



Εικόνα 18: Περιοδική έκφραση του γονιδίου *hes1* λόγω της πλευρικής αναστολής του Notch. Α) Το γονίδιο *Hes1* όπως και τα άλλα bHLH γονίδια της σηματοδότησης του Notch εκφράζονται περιοδικά. Η ρυθμική έκφραση ελέγχεται τόσο στο επίπεδο της μεταγραφής, όσο και στο επίπεδο μετά τη μεταγραφή αλλά και μετά τη μετάφραση. Β) Για να μπορέσουν τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα να διαφοροποιηθούν θα πρέπει η έκφραση των bHLH γονιδίων να σταθεροποιηθεί. (Προσαρμογή και τροποποίηση από Kageyama *et al.* 2015 [149], Kageyama *et al.* 2009 [151])

Στους μηχανισμούς της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης καθοριστικό ρόλο διαδραματίζουν και *trans*-δρώντες παράγοντες, όπως πρωτεΐνες που δεσμεύονται άμεσα στο RNA, η δράση των microRNAs, καθώς και το ακριβές σημείο που θα βρεθεί το κάθε μετάγραφο στο κύτταρο [144], [155]. Τα νευρικά γονίδια των οποίων η έκφραση ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό μετά τη μεταγραφή είναι πολύ περισσότερα από όσα γενικά πιστεύαμε [144]. Το κύτταρο αναστέλλει τη μετάφραση μέσω της δράσης των miRNAs, τα οποία καταστρέφουν τα mRNAs που στοχοποιούν. Η έξοδος ενός μορίου mRNA από τον πυρήνα δεν σημαίνει πως αυτό θα μεταφραστεί. Το κύτταρο αναστέλλει τη μετάφραση

μέσω της δράσης των miRNAs, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στη διατήρηση και αυτοανανέωση των νευρικών βλαστικών κυττάρων αλλά και τη διαφοροποίησή τους. Η έκφραση των γονιδίων *miR9* και *miR124*, που εξαρτάται από τον παράγοντα REST⁴, αυξάνεται κατά τη νευρική διαφοροποίηση καταστέλλοντας, συγχρόνως, την έκφραση γονιδίων που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων νευρικών κυττάρων [144]. Αντίθετα το *miR134* δρα ανασταλτικά στη νευρική διαφοροποίηση [144]. Το *miR137* επάγει κι αυτό τη νευρική διαφοροποίηση, καθώς συμβάλλει στην ωρίμανση των νευρικών κυττάρων [144]. Εκτός από τα miRNA υπάρχουν και τα μεγάλα μη κωδικά RNAs (*long non coding RNAs*) τα οποία επίσης κατέχουν ρυθμιστικό ρόλο κατά τη γονιδιακή έκφραση. Μάλιστα το γονίδιο *Ngn1* ρυθμίζεται θετικά μέσω ενός τέτοιου μορίου [156].

Καθώς λοιπόν το mRNA περνά τα επιμέρους επίπεδα ελέγχου είναι σχεδόν έτοιμο να μεταφραστεί. Τον τελευταίο λόγο έχουν πια πρωτεΐνες που προσδένονται απευθείας στο RNA (*RNA Binding Proteins*), γνωστές ως RBPs. Οι πρωτεΐνες αυτές προσδένονται σε περιοχές πλούσιες σε AU (*AREs – AU Rich Elements*), οι οποίες συναντώνται ως επί το πλείστον στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή των mRNAs [144]. Η πρόσδεση αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να επηρεάσει θετικά ή αρνητικά τη μετάφραση. Έχουν το δυναμικό να σταθεροποιούν ή να αποσταθεροποιούν τα μηνύματα και να μεταβάλλουν τη δομή του RNA επηρεάζοντας την αλληλεπίδρασή του με άλλες πρωτεΐνες έτσι ώστε να ενισχύεται ή να αποτρέπεται η έναρξη της διαδικασίας της μετάφρασης [157], [158], [159]. Επηρεάζουν επίσης και λειτουργίες όπως το εναλλακτικό μάτισμα, η μεταφορά, καθώς και ο υποκυτταρικός εντοπισμός του mRNA, διαδικασίες δηλαδή που διεκπεραιώνονται μέσα ή έξω απ' τον πυρήνα των κυττάρων [157], [158]. Μία οικογένεια τέτοιων RBP με ιδιαίτερη σημασία για το νευρικό σύστημα είναι οι ELAV ή Hu [160]. Η ονομασία ELAV έχει προέλθει από το πρωτότυπο γονίδιο που εντοπίστηκε αρχικά στη *Drosophila (embryonic lethal abnormal vision, ELAV)*. Τα ανθρώπινα ορθόλογα ταυτοποιήθηκαν λίγο αργότερα ως στόχοι μιας αυτοάνοσης διαταραχής του νευρικού συστήματος, γνωστής ως σύνδρομο Hu (*Hu-syndrome*) από τα αρχικά του ασθενούς στον οποίο βρέθηκαν τα αυτοαντισώματα [161]. Σε αυτή την ασθένεια τα αντιγόνα Hu εκτίθενται στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων και ενεργοποιούν μηχανισμούς αυτοανοσίας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολλαπλών νευρολογικών βλαβών [162].

⁴ REST: *RE1 Silencing Transcription Factor* ή NRSF (*Neuron-Restrictive Silencer Factor*). Μεταγραφικός κατάστολέας, υπεύθυνος για την καταστολή της έκφρασης νευρικών γονιδίων σε μη νευρικά κύτταρα.

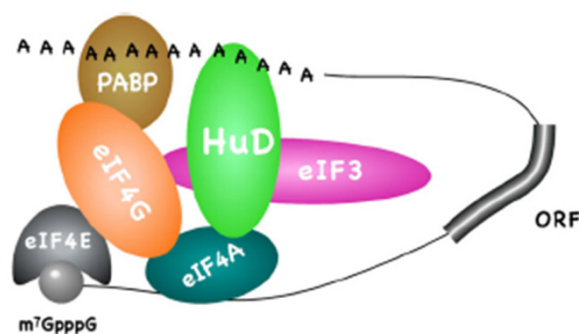
Δύο από τα τέσσερα μέλη της οικογένειας, τα HuC και HuD εκφράζονται εξειδικευμένα στο νευρικό σύστημα. Η πρωτεΐνη HuB είναι επίσης άφθονη στο νευρικό σύστημα αλλά εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα και στους όρχεις, ενώ το τέταρτο μέλος της οικογένειας, η πρωτεΐνη HuR/ HuA εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και ιστούς [162]. Η έκφραση των HuB, C, D αυξάνεται κατά τη νευρική διαφοροποίηση. Μάλιστα, κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος καθένα από τα γονίδια αυτά εκφράζεται σε συγκεκριμένη περιοχή και εξειδικευμένους τύπους νευρώνων υποδηλώνοντας και το ξεχωριστό τους ρόλο [144].

Η πρωτεΐνη HuD παίζει έναν ιδιαίτερο ρόλο στα νευρικά κύτταρα καθώς η λειτουργία της συνδέεται με την έκφραση πολλών σημαντικών μορίων για τα νευρικά κύτταρα [144]. Μάλιστα έχει χαρακτηριστεί ως ρυθμιστής της νευρικής διαφοροποίησης, της διατήρησης του νευρωνικού φαινοτύπου και της πλαστικότητας του νευρικού συστήματος [163]. Αν και κατά κύριο λόγο δεσμεύεται σε *cis*- ρυθμιστικές αλληλουχίες του 3'-UTR, υπάρχουν ενδείξεις ότι δεσμεύεται και στο 5' UTR των μεταγράφων [164]. Ρυθμίζει την έκφραση πολλών σημαντικών μορίων για τη βιολογία του νευρικού κυττάρου όπως της πρωτεΐνης του κυτταρικού σκελετού Tau [164], [165], των νευροτροφινών *Bdnf* [166] και *Ngf* [167], του *Musashi* και του *Gap-43* [164].

Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι το γονίδιο *Hud* αποτελεί μεταγραφικό στόχο της *Ngn2*. Με τη σειρά της, η πρωτεΐνη HuD ελέγχει έμμεσα την έκφραση ενός άλλου *bHLH* γονιδίου, που επίσης έχει επίσης χαρακτηριστεί ως μεταγραφικός στόχος της *Ngn2*, του *NeuroD1*. Ο έλεγχος αυτός επιτελείται μέσω της σταθεροποίησης του mRNA ενός άλλου μεταγραφικού παράγοντα που επάγει την έκφραση του *NeuroD1*, του SATB1. Και φυσικά, δεν ελέγχει μόνο τα γονίδια νευρικής πλαστικότητας ή εκείνα που εμπλέκονται στη νευρογένεση. Ρυθμίζει και την έκφραση πολλών άλλων πρωτεϊνών που προσδένονται στο RNA (*AUF1*, *Musashi2*, *Staufen 2*, *HuB*, *HuD*, *HuR*), δημιουργώντας έτσι ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό δίκτυο στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο [164].

Οι RBPs επηρεάζουν τη διαδικασία της μετάφρασης και με τρόπο ανεξάρτητο από αυτόν της σταθεροποίησης των μηνυμάτων, αφού αλληλεπιδρούν και με τους παράγοντες της μεταφραστικής μηχανής [144]. Συγκεκριμένα το HuD μπορεί και αλληλεπιδρά άμεσα με τον παράγοντα eIF4A του πρωτεϊνικού συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης eIF4F, συμβάλλοντας θετικά στην έναρξη της διαδικασίας της μετάφρασης [168] (Εικόνα 19). Καθώς το HuD είναι άμεσα ή έμμεσα συνδεδεμένο στα AREs της 3' μη μεταφραζόμενης

περιοχής και αλληλεπιδρά και με άλλες πρωτεΐνες εκεί (*Poly-A Binding Proteins, PABPs*), έχει την ικανότητα να φέρνει κοντά το 3' με το 5' άκρο, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων που είναι προσδεδεμένοι σε αυτά, και ενεργοποιώντας την έναρξη της μεταφραστικής πορείας [169]. Έτσι, ο παράγοντας eIF4A ξετυλίγει τη δευτεροταγή δομή του RNA στο 5' άκρο προσκαλώντας τις ριβοσωμικές υπομονάδες να αναλάβουν δράση [168], [170].



Εικόνα 19: Αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης HuD με τις περιοχές 5' και 3' -UTR. Η πρωτεΐνη HuD αλληλεπιδρά τόσο με τα cis- ρυθμιστικά στοιχεία της polyA ουρά όσο και με πρωτεΐνες της έναρξης της μετάφρασης στο 5' άκρο, επάγοντας έτσι την κάμψη του mRNA ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάφρασης. (Προσαρμογή και τροποποίηση από Fukao et al. 2009 [169]).

Η επιτυχής έναρξη της μετάφρασης είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα, αλλά αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα ότι η διαδικασία θα συνεχισθεί και θα ολοκληρωθεί. Η πορεία της μετάφρασης ελέγχεται σε επιπλέον στάδια. Για παράδειγμα, υπάρχουν κωδικόνια που προτιμώνται περισσότερο σε σχέση με άλλα για την προσθήκη του ίδιου αμινοξέος στην παραγόμενη πρωτεΐνη, φαινόμενο που ονομάζεται «μεροληπτική χρήση κωδικονίου» (*codon usage bias*) [171]. Αυτό σχετίζεται με την αφθονία του εκάστοτε tRNA και την ταχύτητα επιμήκυνσης της πρωτεΐνης που συντίθεται. Όσο πιο γρήγορα ολοκληρώνεται η πρωτεϊνοσύνθεση τόσο σταθερότερο είναι το mRNA απ' το οποίο παράγεται και επομένως τόσο περισσότεροι κύκλοι θα επακολουθήσουν [171]. Η ταχύτητα της πρωτεϊνοσύνθεσης εξαρτάται και από την τροποποίηση των ίδιων των μεταφορικών μορίων RNA (tRNA), π.χ. η μεθυλίωση της αδεΐνης, μπορεί να επηρεάσει τόσο τη βιωσιμότητα του tRNA όσο και την απόδοση της πορείας της μετάφρασης [172], [173].

Οι μηχανισμοί του μετα-μεταγραφικού ελέγχου επιτρέπουν στο κύτταρο να αποκρίνεται ταχύτατα στα ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Κύτταρα όπως τα νευρικά, που κάθε σημείο (αυξητικοί κώνοι, άξονες, δενδρίτες) αποτελεί κι ένα διαφορετικό τοπικό μικροπεριβάλλον, που πρέπει να αποκριθεί με απόλυτα ακριβή και συντονισμένο τρόπο, πρέπει να διαθέτουν ευελιξία ώστε να προσαρμόζονται άμεσα στις διάφορες αλλαγές.

Οι επιγενετικοί και μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης αποτελούν ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της πλαστικότητας των νευρώνων. Τα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία σε συνδυασμό με τους *trans* παράγοντες, που τα αναγνωρίζουν και δεσμεύονται σε αυτά, συντελούν στην διατήρηση της ομοιόστασης της λειτουργίας όλων των κυττάρων εξασφαλίζοντας έναν συντονισμένο έλεγχο των αποφάσεων (μόνιμων ή μη) για την έκφραση ενός γονιδίου [162].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΑΠΟΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η άρτια λειτουργία των νευρώνων οφείλεται στην αυστηρά συντονισμένη απόκριση στα ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα καθώς και στην ικανότητα επικοινωνίας με τα γειτονικά τους κύτταρα. Ωστόσο η συσσώρευση μεταλλάξεων και οι επιβλαβείς εξωγενείς-περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν στην απορύθμιση των νευρικών κυττάρων και κατ' επέκταση σε παθολογικές καταστάσεις. Ο καρκίνος του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος (γλοιοβλάστωμα και νευροβλάστωμα) καθώς και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες αποτελούν τις δύο κύριες περιπτώσεις τέτοιων διαταραχών.

Τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων, στην στοχευμένη δηλαδή απορύθμιση μέσω της αποδιαφοροποίησης τους, και στην κατευθυνόμενη ρύθμιση τους προς ένα καθορισμένο κυτταρικό πεπρωμένο. Η προσπάθεια αυτή αναμένεται να δώσει φως στη μοριακή βάση ασθενειών όπως η νευροεκφύλιση και ο καρκίνος, παρέχοντας συγχρόνως νέες θεραπευτικές μεθόδους.

3.1 Νευροεκφύλιση

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την πορεία της νευρογένεσης. Αν και εξαρτώνται από την ηλικία, μιας και τα συμπτώματα σπανιότερα παρουσιάζονται σε νεαρής ηλικίας άτομα, η ικανότητα γένεσης νέων νευρώνων είναι εκείνη που τελικά τους επιτρέπει να εκδηλωθούν [174]. Το δυναμικό της νευρογένεσης και ο κυτταρικός θάνατος είναι τα στοιχεία που καθορίζουν τόσο την έναρξη όσο και την επιδείνωση μιας νευροεκφυλιστικής νόσου. Σε έναν φυσιολογικό εγκέφαλο, κατά τη νευρογένεση, δε καταφέρνουν όλα τα κύτταρα να διαφοροποιηθούν και να ενσωματωθούν στο νευρωνικό δίκτυο, ως πλήρως διαφοροποιημένοι ώριμοι νευρώνες, με αποτέλεσμα να αποπίπτουν. Η απόπτωση είναι μια φυσιολογική διαδικασία γι αυτό και η ισορροπία του νευρογενικού περιβάλλοντος προλαμβάνει και αποτρέπει τυχόν προβλήματα μέσα από την ίδια την πορεία της νευρογένεσης. Η ισορροπία αυτή

εξασφαλίζει την νευρική πλαστικότητα και επομένως τη σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος [174]. Ωστόσο ποιοτικές και ποσοτικές αλλοιώσεις στους άξονες, τους δενδρίτες και τις συνάψεις, εξαιτίας χρόνιων και συσσωρευμένων βλαβών, γενετικών ή περιβαλλοντικών, μπορεί να επιτρέψει την εκδήλωση μίας νευροεκφυλιστικής νόσου. Η μη δυνατή αντικατάσταση των νοσούντων κυττάρων με νέα και υγιή αποτελεί το κυριότερο πρόβλημα καθώς συνοδεύεται με δραματικές επιπτώσεις για τον οργανισμό. Το γεγονός ότι το δυναμικό της νευρογένεσης μειώνεται με την πάροδο των ετών δικαιολογεί μερικώς το χρόνο εκδήλωσης των συμπτωμάτων αυτών των νοσημάτων [174].

Η νόσος του Parkinson (PD), η νόσος του Alzheimer (AD), η χορεία του Huntington (HD) και η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) είναι οι πιο διαδεδομένες νευροεκφυλιστικές ασθένειες και σχετίζονται με τη λειτουργία των γονιδίων *α-synuclein*, *presenilin-1*, *tau*, *huntingtin*, *TDP-43* και *FUS*. Οι περιοχές νευρογένεσης φαίνεται να είναι οι πρώτες που δυσλειτουργούν κατά την εκδήλωση των πρώτων συμπτωμάτων, τα οποία σχετίζονται με τη λειτουργία που αυτές επιτελούν [174].

Η νόσος του Alzheimer, η οποία συνήθως εκδηλώνεται μετά το 65^ο έτος της ηλικίας του ασθενούς ατόμου, χαρακτηρίζεται από τη δυσλειτουργία και απώλεια των νευρώνων σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου όπως ο ιππόκαμπος [175]. Η νόσος οδηγεί στην προοδευτική απώλεια της μνήμης και τη μείωση των νοητικών ικανοτήτων. Γονίδια όπως τα *presenilin-1*, *tau* και *β-amyloid* έχουν συνδεθεί με την παθογένεια αυτής της ασθένειας. Τα αποτελέσματα αρκετών μελετών δείχνουν ότι η διατήρηση του δυναμικού της νευρογένεσης θα μπορούσε να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο για την αντιμετώπιση της νόσου. Για παράδειγμα, η στοχευμένη έκφραση του bHLH μεταγραφικού παράγοντα NeuroD1 στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα ιπποκάμπου ποντικού που εκδηλώνει την ασθένεια αυτή, αποτρέπει την εκφύλιση των νευρώνων και διατηρεί τη νευρική πλαστικότητα προστατεύοντας ουσιαστικά τον οργανισμό από τις αρνητικές επιπτώσεις [176]. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η αυξημένη έκφραση του αμυλοειδογόνου πεπτιδίου Aβ₄₂ το οποίο έχει μεγάλη τάση να συναθροίζεται και να δημιουργεί τοξικά συσσωματώματα έναντι του λιγότερο τοξικού πεπτιδίου Aβ₄₀, συνδέεται με μείωση των επιπέδων έκφρασης της Ngn2, μια παρατήρηση που υπονοεί έναν πιθανό μηχανισμό με τον οποίο μπορεί να επηρεάζεται το δυναμικό της νευρογένεσης κατά την εκδήλωση αυτής της νευροεκφυλιστικής ασθένειας [177]. Η υπερέκφραση της Ngn2 σε συνδυασμό με δύο

άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, τον Mash1 και Brn2 στον υπόκαμπο ποντικού, οδηγεί σε μείωση της απώλειας της μνήμης και της αδυναμίας στη μάθηση [175]. Μάλιστα, η δράση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων φαίνεται να σχετίζεται με την αναστολή της φλεγμονώδους αντίδρασης και τον νευροπροστατευτικό τους ρόλο, αποκαλύπτοντας τη σημασία του νευρογενικού μικροπεριβάλλοντος για την προοδευτική εξέλιξη της νόσου Alzheimer [175].

Παράλληλα, γίνονται προσπάθειες και για την κατανόηση της πιθανού ρόλου της πρωτεΐνης Ngn2 και σε άλλες νευροεκφυλιστικές παθήσεις όπως της νόσου Parkinson και της ALS. Η νόσος του Parkinson είναι μία προοδευτική νευροεκφυλιστική ασθένεια που οδηγεί στην απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην περιοχή της μέλαινας ουσίας. Αν και δεν έχουν βρεθεί ενοχοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *Ngn2* [178], η έκφρασή της φαίνεται να συνδέεται με την παθογένεια της νόσου [179]. Μάλιστα, πολύ πρόσφατα βρέθηκε ότι η συνέκφραση της με το μόριο Nurr1 παρέχει νευροπροστασία σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα της νόσου του Parkinson, μέσω ενός μηχανισμού αναστολής του οξειδωτικού στρες και της απόπτωσης των νευρικών κυττάρων [180]. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι η συνεργιστική δράση αυτών των δύο μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να ελέγχει και τη διαφοροποίηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων [181].

Η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση είναι μία προοδευτική νόσος των κινητικών νευρώνων. Η πρωτεΐνη FUS (*fused in sarcoma / translocated in liposarcoma*) έχει συνδεθεί με τη συγκεκριμένη νευροεκφυλιστική ασθένεια, καθώς μεταλλάξεις του γονιδίου μπορούν να οδηγήσουν στην εκδήλωση διαφόρων μορφών ALS [182]. Μάλιστα οι πρωτεΐνες PRMT1 και PRMT8 βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη FUS και την μεθυλιώνουν, επηρεάζοντας τη μεταφορά της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου σχηματίζονται τα χαρακτηριστικά έγκλειστα τα οποία σχετίζονται με την εκδήλωση της ασθένειας [182]. Στα έγκλειστα αυτά συνεντοπίζονται και οι PRMT1 και 8 και πιστεύεται ότι αυτές οι δύο μεθυλοτρανφεράσες της αργινίνης παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια αυτής της νόσου [182].

3.2 *Ο Επαναπρογραμματισμός των Σωματικών Κυττάρων ως Μια Νέα Θεραπευτική Προσέγγιση.*

Πολλές προσπάθειες γίνονται με στόχο τη θεραπεία των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Τα τελευταία χρόνια, μάλιστα, το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην εγκαθίδρυση αποτελεσματικών μεθόδων επαναπρογραμματισμού των κυττάρων για την αντιμετώπιση τους.

Η ικανότητα των μεταγραφικών παραγόντων πολυδυναμίας Oct3/4, Sox2, c-Myc, KLF4 να αποδιαφοροποιούν τα ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα, άνοιξε ένα νέο κόσμο που θα βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση βασικών κυτταρικών μηχανισμών [183]. Ο bHLH μεταγραφικός παράγοντας Ngn2, ως ένα μόριο που καθορίζει το πεπρωμένο των πρόδρομων νευρικών κυττάρων, έχει κι αυτός το δυναμικό να επαναπρογραμματίζει διαφοροποιημένα κύτταρα και να τα μετατρέπει σε νευρικά, σε συνεργασία με άλλα μόρια [184] [185]. Η υπερέκφραση της Ngn2, με την παράλληλη παρουσία μικρών μορίων όπως η φορσκολίνη (Fsk) και η δορσομορφίνη (Dm) τα οποία επηρεάζουν σημαντικά κυτταρικά μονοπάτια, μπορεί να επαναπρογραμματίσει εμβρυικούς ινοβλάστες σε χολινεργικούς νευρώνες. Σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Sox11 η Ngn2 μπορεί να μετατρέψει ακόμη και ενήλικους ινοβλάστες σε ίδιου τύπου νευρώνες [186], [187]. Μάλιστα, η συνεργασία της Ngn2 με τον Sox11 μπορεί να οδηγήσει στη διαφοροποίηση ακόμη και καρκινικών γλοιοματικών κυττάρων σε νευρικά [186]. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες NFIA και NFIB, οι οποίοι έχουν καθοριστικό ρόλο όπως είδαμε στην αστρογλιογένεση, συνεργάζονται με μια πρωτεΐνη της ίδιας οικογένειας, την Sox9, επαναπρογραμματίζοντας αντίστοιχα ινοβλάστες σε αστρογλοιακά κύτταρα [188]. Η Ngn2 συνεργάζεται επίσης και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως το Brn3, Mash1 και το NeuroD1, μετατρέποντας διάφορους τύπους κυττάρων σε νευρώνες [189], [190], [191].

Η αξιοποίηση του δυναμικού της Ngn2 και άλλων παραγόντων που έχουν την ικανότητα να επανακαθορίζουν το πεπρωμένο των κυττάρων, ακόμη και μη νευρικών, σε συνεργασία με άλλα μόρια και μεταγραφικούς παράγοντες, αποτελεί ένα ιδιαίτερα ελκυστικό πεδίο για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση νευρολογικών παθήσεων [192], [193], [194]. Μπορούμε να φανταστούμε πόσο ωφέλιμο θα ήταν για μια θεραπευτική παρέμβαση αν το ίδιο το γενετικό πρόγραμμα των εκφυλιζόμενων νευρικών κυττάρων μπορούσε να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση.

3.3 Καρκινογένεση

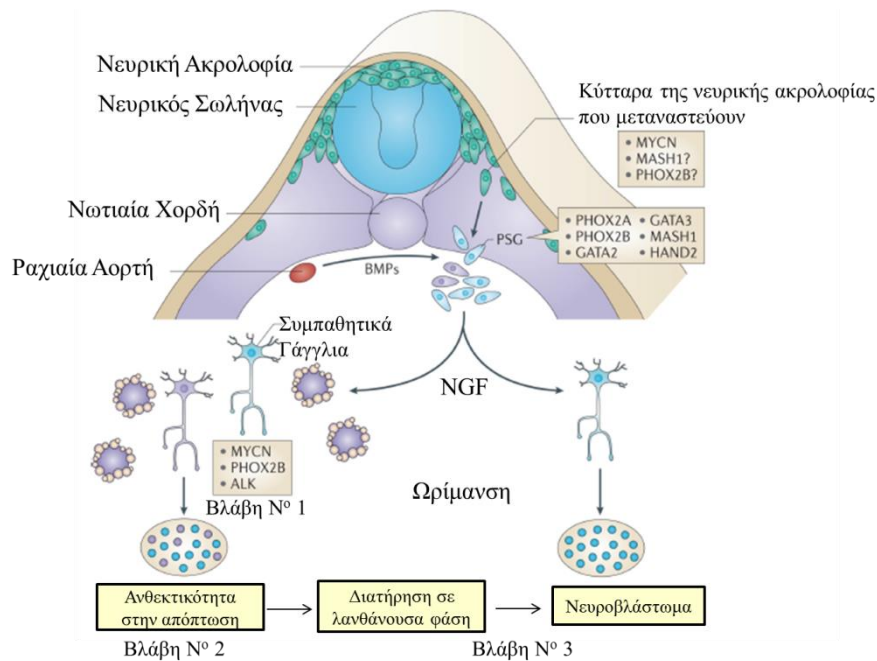
Η απορύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας ενός βλαστικού, πρόδρομου ή και διαφοροποιημένου κυττάρου, λόγω της συσσώρευσης μεταλλάξεων ή αλλαγών στα σήματα του μικροπεριβάλλοντος, μπορεί να οδηγήσει σε διατάραξη του ισοζυγίου μεταξύ των πολλαπλασιαζόμενων και διαφοροποιούμενων κυττάρων και κατά συνέπεια στην καρκινογένεση [195].

Το νευροβλάστωμα είναι ένας εμβρυικής προέλευσης καρκίνος του περιφερικού νευρικού συστήματος. Η δημιουργία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων ξεκινά πολύ νωρίς κατά την ανάπτυξη, όταν τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, ενός πολυδύναμου μεταναστευτικού πληθυσμού που αναδύεται από τον ραχιαίο νευρικό σωλήνα, ξεκινούν να μεταναστεύουν, κατά μήκους διαφόρων οδών προς την περιφέρεια [196], [197]. Λαμβάνοντας εξωγενή σήματα από τους σωμίτες, τον κοιλιακό νευρικό σωλήνα και τη ραχιαία αορτή, τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται φυσιολογικά προς πολλούς τύπους κυττάρων όπως συμπαθητικούς και παρασυμπαθητικούς νευρώνες, αισθητικούς νευρώνες, εντερικούς νευρώνες, λεία μυϊκά κύτταρα, κύτταρα γλοίας καθώς και μελανοκύτταρα [197]. Στα αρχικά στάδια της μετανάστευσης η έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου *MYCN* είναι υψηλή και στη συνέχεια μειώνεται [197]. Η διατήρηση της υψηλής έκφρασης του γονιδίου αυτού επάγει τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων και αποτρέπει τα κύτταρα να οδηγηθούν σε κυτταρικό θάνατο [197]. Η απορύθμιση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων λόγω της αυξημένης έκφρασης του *MYCN* δεν τους επιτρέπει να αποκριθούν φυσιολογικά στις οδηγίες παραγόντων όπως ο NGF (*Nerve Growth Factor*) που ελέγχει τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων με αποτέλεσμα να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα [197]. Η ασθένεια διατηρείται σε μία λανθάνουσα φάση και εκδηλώνεται κυρίως κατά την παιδική ηλικία.

Το νευροβλάστωμα χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια [198], [199]. Στις καλλιέργειες νευροβλαστωματικών κυττάρων αλλά και τους πρωτογενείς όγκους, διακρίνονται τρεις χαρακτηριστικοί κυτταρικοί τύποι (α) κύτταρα τύπου N (*Neuroblastic*), τα οποία έχουν στρογγυλό σχήμα με μικρούς νευρίτες και μικρή συνάφεια με το υπόστρωμα [198] [200], (β) κύτταρα τύπου S (*Schwann-like*), τα οποία είναι μεγαλύτερα πεπλατυσμένα, γλοιακού χαρακτήρα, και με μεγάλη συνάφεια προς το υπόστρωμα [198],

[200] και (γ) κύτταρα τύπου I, ενδιάμεσης μορφολογίας μεταξύ N και S, τα οποία εκφράζουν μοριακούς δείκτες που χαρακτηρίζουν και τους δύο προηγούμενους τύπους [198]. Τα κύτταρα τύπου I, θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα και μπορούν να αλληλομετατρέπονται είτε σε N είτε σε S, ενώ συγχρόνως διατηρούν τις βλαστικές τους ιδιότητες [198]. Τα τύπου I κύτταρα έχουν τη μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού όγκων, ενώ τα τύπου S θεωρούνται μη κακοήγη και επομένως μη επιθετικά [200]. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό των νευροβλαστωμάτων είναι η ενίσχυση του αριθμού των αντιγράφων και της έκφρασης του *MYCN*, η οποία όμως είναι ανεξάρτητη από το δυναμικό κακοήθειας [198], [200]. Υπάρχουν νευροβλαστωματικές σειρές με ενισχυμένη έκφραση, και άλλες, με μη ενισχυμένη έκφραση αυτού του γονιδίου. Τα νευροβλαστωματικά κύτταρα Be(2)-C χαρακτηρίζονται από μεγάλο ποσοστό κυττάρων τύπου I και ενισχυμένη έκφραση *MYCN*, ενώ τα SH-SY5Y έχουν μικρότερο ποσοστό κυττάρων τύπου I και ένα ζεύγος αλληλομόρφων του γονιδίου *MYCN*.

Τα νευροβλαστωματικά κύτταρα επομένως, διατηρούν ένα δυναμικό πολυδυναμίας, και παρουσία ρετινοϊκού οξέος μπορούν να διαφοροποιούνται προς τη νευρική γενεαλογία, ένα χαρακτηριστικό το οποίο αποτελεί και θεραπευτική μέθοδο σε αυτές τις περιπτώσεις καρκίνου [201]. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο κατά πόσον η ετερογένεια των κυττάρων που προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία, και κατ' επέκταση και του νευροβλαστώματος, εξαρτάται από πολύ πρώιμα και αυστηρά καθορισμένα γεγονότα, τα οποία συνοδεύονται από την έκφραση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων ή αν οι αποφάσεις αυτές λαμβάνονται αργότερα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, με έναν περισσότερο στοχαστικό τρόπο [202]. Σε κάθε περίπτωση όμως, οι bHLH μεταγραφικοί παράγοντες παίζουν κομβικό ρόλο στον καθορισμό της μοίρας των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας. Η παρουσία της πρωτεΐνης Ngn2 είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση προς την κατεύθυνση των αισθητικών νευρώνων ενώ η έκφραση της δε χρειάζεται για την διαφοροποίηση των νευρώνων του αυτόνομου νευρικού συστήματος, ούτε για τα κύτταρα Schwann [202], ενώ στην περίπτωση του νευροβλαστώματος δεν έχει μελετηθεί η έκφρασή της και ο ρόλος της.



Εικόνα 20: Τα αρχικά στάδια της δημιουργίας του νευροβλαστώματος. Καθώς τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας μεταναστεύουν κατά μήκος διαφόρων οδών προς την περιφέρεια, το πεπρωμένο τους επηρεάζεται από την έκφραση πολλών bHLH γονιδίων (*MYCN*, *Mash1*, *Hand2* κ.α.) και σηματοδοτικών μορίων όπως το BMP. Η ικανότητα απόκρισης των διαφοροποιούμενων κυττάρων στον NGF καθορίζει τη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων και την μελλοντική ανάπτυξη του νευροβλαστώματος. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Marshall et al, 2014 [197]*)

II. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός

Η πρωτεΐνη Ngn2, όπως ήδη αναφέραμε, εξειδικεύει το πεπρωμένο των πρόδρομων νευρικών κυττάρων προς τη νευρική μοίρα και η έκφραση της είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του προγράμματος της νευρικής διαφοροποίησης, τόσο κατά την ανάπτυξη - για εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους- όσο και κατά την ενήλικη ζωή, κάτι που υποδηλώνει τον θεμελιώδη της ρόλο. Αν και διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες, σηματοδοτικά μονοπάτια και ρυθμιστικά μόρια έχουν ενοχοποιηθεί για την επαγωγή της έκφρασής της, οι ακριβείς μηχανισμοί στους οποίους υπακούει το γονίδιο *Ngn2*, ώστε να ξεκινήσει ή να σταματήσει να εκφράζεται δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί.

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί, συμβάλλουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μορίων που καθορίζουν τη διατήρηση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων και το κυτταρικό τους πεπρωμένο και επιτρέπουν την αλληλεπίδραση των εξωγενών περιβαλλοντικών ερεθισμάτων με το ενδογενές γενετικό πρόγραμμα. Εξασφαλίζουν ουσιαστικά την κυτταρική μνήμη και ελέγχουν τη νευρική πλαστικότητα. Μία όχι καλά μελετημένη τροποποίηση που επηρεάζει τη χρωματινική δομή και κατ' επέκταση τη μεταγραφή είναι η μεθυλίωση της αργινίνης των ιστονών. Την τροποποίηση αυτή επιτελούν οι μεθυλοτρανσφεράσες της αργινίνης (PRMTs). Η PRMT8 προσελκύει το ενδιαφέρον καθώς εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ωστόσο ο ρόλος και η λειτουργία της παραμένουν άγνωστοι.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης μορίων που παρουσιάζουν αυστηρή έκφραση κατά την ενήλικη νευρογένεση και την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης, όπως ο bHLH μεταγραφικός παράγοντας Ngn2 και η μεθυλοτρανσφεράση της αργινίνης PRMT8. Παράλληλα θέλαμε να μελετήσουμε τις επιπτώσεις που προκαλεί η απορρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας των νευρικών κυττάρων, λόγω στρεσογόνων παραγόντων (κανναβινοειδή, αναπτυξιακή δυσλεξία) στην έκφραση αυτών των γονιδίων.

Χρησιμοποιήσαμε δύο *in vitro* μοντέλα νευρικής διαφοροποίησης, με χαρακτηριστικά πολυδυναμίας ώστε να απαντήσουμε τα ερωτήματά μας: πρόδρομα νευρικά κύτταρα από ιππόκαμπο επίμυος και κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Και τα δύο μοντέλα διαθέτουν το δυναμικό διαφοροποίησης προς τη νευρική γενεαλογία παρουσία ενός βασικού παράγοντα, του ρετινοϊκού οξέος (RA). Τα ρετινοειδή αποτελούν απαραίτητα

μόρια για την ανάπτυξη του ΚΝΣ των σπονδυλωτών και ρυθμίζουν πολλές λειτουργίες κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Το RA και οι υποδοχείς του, οι οποίοι δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, αποτελούν σημαντικούς συντελεστές της συναπτικής πλαστικότητας του ενήλικου εγκεφάλου και η δράση τους έχει συνδεθεί με την πορεία της νευρογένεσης. Μάλιστα, το RA συμβάλλει καταλυτικά στα πρώιμα στάδια της νευρικής διαφοροποίησης και την επιβίωση των νεογέννητων κυττάρων στον ενήλικο ιππόκαμπο. Για τα *in vivo* πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δύο μοντέλα, μύες και επίμυες.

Κατά τη διάρκεια αυτής της διατριβής, παράλληλες μελέτες με στόχο την κατανόηση κυρίως της δραστηριότητας και του δυναμικού της Ngn2 πρωτεΐνης, μας βοήθησαν στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων αλλά και στην επανατοποθέτηση των ερωτημάτων μας. Οι επιμέρους στόχοι που θέσαμε ήταν να μελετήσουμε τις μεταβολές στο πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Ngn2*, στα νευροβλαστωματικά, καθώς και στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης (επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης). Επιλέξαμε τη συγκεκριμένη νευροβλαστωματική σειρά εξαιτίας του δυναμικού των κυττάρων να διαφοροποιούνται σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες, για τη διαφοροποίηση των οποίων είναι απαραίτητη η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Ngn2. Τις μεταβολές αυτές, είχαμε ως στόχο να τις συσχετίσουμε με το πρότυπο μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου, αλλά και με το χρωματινικό περιβάλλον. Παράλληλα προσπαθήσαμε να χαρτογραφίσουμε τις *cis*-ρυθμιστικές αλληλουχίες, μέσω των οποίων ελέγχεται η έκφραση του γονιδίου. Γνωρίζοντας τις δυνατότητες επαναπρογραμματισμού σωματικών κυττάρων που έχει η συνεργασία της πρωτεΐνης Ngn2 με τον μεταγραφικό παράγοντα Sox11, θελήσαμε να ελέγξουμε τις συνέπειες της συνεργασίας αυτής στα υπό μελέτη συστήματα. Μέσω της αλληλούχισης των μεταγραφικών στόχων της Ngn2 σε κλίμακα γονιδιώματος καθώς και της αλληλούχισης σε επίπεδο RNA, όλων, δηλαδή, των γονιδίων που εκφράζονται στη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης, είχαμε ως απώτερο στόχο να προσεγγίσουμε εις βάθος τον τρόπο δράσης της, καθώς και πως αυτή σχετίζεται με διάφορα στάδια στην πορεία της νευρικής διαφοροποίησης που είναι καθοριστικά για το πεπρωμένο των κυττάρων.

Παράλληλα, επιχειρήσαμε να μελετήσουμε το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης PRMT8 στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου, τη μια από τις δυο νευρογενικές περιοχές του εγκεφάλου, και να κατασκευάσουμε εργαλεία για την τροποποίηση της έκφρασης του γονιδίου *in vivo*, δηλαδή την καταστολή του με miRNAs και την υπερέκφρασή του, ώστε

να κατανοήσουμε τον πιθανό του ρόλο στην πορεία της νευρογένεσης. Ένας άλλος στόχος μας ήταν να προσεγγίσουμε τους μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασής του.

Δύο ακόμη μεταγραφικοί παράγοντες, που εκφράζονται στο νευρικό σύστημα και μπορούν να επηρεάζουν τη χρωματινική δομή, και οι οποίοι μας απασχόλησαν στο διάστημα αυτό ήταν οι NFIA και NFIB. Αν και οι παράγοντες αυτοί γνωρίζουμε ότι συνδέονται με τη γλοιογένεση, εμείς προσπαθήσαμε να τους συσχετίσουμε με την πορεία της ενήλικης νευρογένεσης, καθώς σε προκαταρκτικά πειράματα ο NFIA απομονώθηκε ως συμπαράγοντας του κεντρικού διαμεσολαβητή της σηματοδότησης Notch Rbpj-k.

Τέλος, στην προσπάθεια μας να κατανοήσουμε τον πολυδύναμο χαρακτήρα και το δυναμικό διαφοροποίησης των νευροβλαστωματικών κυττάρων, στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΘΑΛΗΣ, με τίτλο «Λειτουργικά δίκτυα μικρο-RNA και μεταγραφικών ρυθμιστών στη φυσιολογική ανάπτυξη, γήρανση και ογκογένεση», στόχος μας ήταν να απομονώσουμε miRNAs που διαδραματίζουν κομβικό ρόλο κατά την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης, και να διερευνήσουμε τον πιθανό ρόλο εξειδικευμένων miRNAs στην ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων όπως το *Ngn2*.

III: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΑ

1.1. Αναλώσιμα

- Σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου eppendorf 1,5ml (Sarstedt)
- Σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου falcon 50ml και 15ml (Sarstedt)
- Σωληνάρια κατάψυξης κυττάρων 2ml (Cryo tube vials, Kisker)
- Τρυβλία 100mm επίπεδου πυθμένα, επεξεργασμένα για κυτταροκαλλιέργειες (Greiner Bio one)
- Τρυβλία 60mm επίπεδου πυθμένα, επεξεργασμένα για κυτταροκαλλιέργειες (Greiner Bio one)
- Τρυβλία 6 φρεατίων επίπεδου πυθμένα, επεξεργασμένα για κυτταροκαλλιέργειες (Greiner Bio one)
- Τρυβλία 24 φρεατίων επίπεδου πυθμένα, επεξεργασμένα για κυτταροκαλλιέργειες (Greiner Bio one)
- Κρυοφιαλίδια για πάγωμα κυττάρων στους -196°C (Kisker)
- Πιπέτες 25 ml, 10ml, 5ml και 2ml αποστειρωμένες, για χρήση σε κυτταροκαλλιέργειες (Sarstedt)
- Πιπέτες Pasteur 3ml, πλαστικές, μη αποστειρωμένες (Sarstedt)
- Μικροπιπέτες 0,2 – 1μl, 2 – 20μl, 20 – 200μl, 200 – 1000μl (Gilson)
- Πλαστικά tips για μικροπιπέτες 0,2 – 1μl (Greiner Bio one)
- Πλαστικά tips για μικροπιπέτες 2 – 20μl, 20 – 200μl, 200 – 1000μl (Sarstedt)
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (HBG)
- Cell Scraper για τη συγκομιδή των κυττάρων από τα πιάτα κυτταροκαλλιέργειας
- Γυάλινες καλυπτρίδες στρόγγυλες Ø 11mm (Thermo Scientific, Cat. No.: 12688116)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες 26 x 76mm (Deltalab)
- Φίλτρα 0,45μm (Sarstedt)

1.2 Διαλύματα – Χημικά αντιδραστήρια – Θρεπτικά υλικά – Πλασμιδιακοί Χάρτες- Εκκινητές

Όλα τα διαλύματα, τα χημικά αντιδραστήρια και τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη προέρχονται από τις εταιρίες: Sigma-Aldrich, Applichem, Panreac, Merck, Riedel-de Haen, Carl Roth, Regilait, HT-Biotechnology, Fluka, Biorad, MRC, Cell signaling, Nippon Genetics, Polysciences, Calbiochem, Roche, GE Healthcare, KAPA Biosystems, ThermoFisher Scientific, Kisker, Promega, Biosera, Axon Medchem, Cayman, Santa cruz, Selleckchem.com.

1.2.1 Διαλύματα Μοριακής Βιολογίας που Παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο

- Διάλυμα γάλακτος (5%) για την επαναιώρηση των δευτερογενών αντισωμάτων
Για την παρασκευή 500ml διαλύματος, 25gr σκόνης γάλακτος (*Regilait*) διαλύονται σε 480ml TBS – Tween-20 0,1%, (1x).
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών SDS - PAGE (10x)
Για την παρασκευή 1lt διαλύματος 10x, 30gr Tris (*Sigma – Adrich, #T1503*), 144gr γλυκίνης (*Applichem, A1067*) και 10gr SDS (*Applichem, #A1502*) διαλύονται σε 800ml δις απεσταγμένο H₂O και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1lt με H₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8,3 με HCl (*Sigma -Aldrich, #258148*). Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα συλλέγεται μετά τη χρήση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλη μια φορά.
- Διάλυμα υγρής μεταφοράς πρωτεϊνών 10x
Για την παρασκευή 1lt διαλύματος 10x, 24,32gr Tris (*Sigma – Adrich, #T1503*) και 111,66gr γλυκίνης (*Applichem, #A1067*) διαλύονται σε 800ml δις απεσταγμένο H₂O και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1lt με H₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Στο 1lt διαλύματος 1x προστίθενται 200ml MeOH (*Merck, #M/4056/17*) λίγο πριν τη χρήση. Το διάλυμα συλλέγεται μετά τη χρήση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλες δυο φορές.
- Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (Ammonium Persulfate - APS) 10%
Για την παρασκευή 10ml διαλύματος, 1gr APS (*Sigma-Aldrich, #A3678*) διαλύεται σε 10ml δις απεσταγμένο H₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών 4x (Laemmli)
Για την παρασκευή 12ml διαλύματος, 2,2ml Tris 1M, pH: 6,8 αναμειγνύονται με 4,4ml γλυκερόλης 100%, 4,4ml SDS 10%, 0,5ml της χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης και 0,5ml β-μερκαπτοαιθανόλης. Ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex και το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα BSA (5%) για την επαναιώρηση των πρωτογενών αντισωμάτων
Για την παρασκευή 10ml διαλύματος, 1gr BSA (*Sigma – Aldrich*, #A9647) διαλύεται σε 10ml TBS – Tween-20 0,1%, (1x).
- Διάλυμα Phosphate Buffered Saline (PBS) 20x
Για την παρασκευή 1lt διαλύματος συμπύκνωσης 20x, 160gr NaCl (*Applichem*, #A2942), 4gr KCl (*Sigma-Aldrich*, #P9541), 28,8gr Na₂HPO₄ (*Panreac*, #141679.124) και 4,8gr KH₂PO₄ (*Merck*, #1.04873) διαλύονται σε 800ml H₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με NaOH (*Riedel-de Haen*, #30620) και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1lt με δις απεσταγμένο H₂O. Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15min και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα SDS 10%
Για την παρασκευή 100ml διαλύματος, 10gr SDS (*Applichem*, #A1502) διαλύονται σε 80ml δις απεσταγμένο H₂O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100ml με H₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα Tris Buffered Saline (TBS) 20x
Για την παρασκευή 1lt διαλύματος συμπύκνωσης 20x, 160gr NaCl (*Applichem*, #A2942), 4gr KCl (*Sigma-Aldrich*, #P9541) και 60gr Tris base (*Sigma – Aldrich*, #T1503) διαλύονται σε 800ml H₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με HCl (*Sigma – Aldrich*, #258148) και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1lt με δις απεσταγμένο H₂O. Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15min και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα Tris – HCl 1,5M, pH: 8,8
Για την παρασκευή 500ml διαλύματος, 20,85gr Tris (*Sigma – Aldrich*, #T1503) διαλύονται σε 450ml δις απεσταγμένο H₂O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500ml με H₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8,8 με HCl (*Sigma – Aldrich*, #258148).

Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15min και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα Tris – HCl 1M, pH: 6,8

Για την παρασκευή 500ml διαλύματος, 60,56gr Tris (*Sigma – Adrich, #T1503*) διαλύονται σε 450ml δις απεσταγμένο H₂O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500ml με H₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 6,8 με HCl (*Sigma -Aldrich, #258148*). Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15min και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα TBS – Tween-20 0,1%

Για την παρασκευή 500ml διαλύματος TBS – Tween-20 0,1%, 5ml Tween-20 10% (αραιωμένο 10 φορές από stock 100% (*Sigma-Aldrich, #P2287*) σε υπερκάρθρο H₂O) προστίθενται σε 495ml TBS 1x. Ακολουθεί ανάδευση και το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα TAE 50x

Για την ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιούμε το διάλυμα TAE. Η σύσταση του είναι η ακόλουθη:

- 242 gr Tris base
- 57,1 ml glacial acetic acid (*Merk*)
- 100 ml 0.5M EDTA (pH 8)

- Διάλυμα φόρτωσης νουκλεϊκών οξέων 6x

Το διάλυμα φόρτωσης του DNA και του RNA παρασκευάζεται ως εξής:

- 80% glycerol
- 20mM EDTA pH:8.0
- Λίγους κόκκους Orange G (*Sigma*) ώστε το χρώμα να γίνει πορτοκαλί

- Διάλυμα παρα- φορμαλδεΰδης (PFA) 4%

Για την παρασκευή παρα- φορμαλδεΰδης 4% ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. Προσθήκη 2 gr PFA (*Merk*) σε 100 ml PBS 1x
2. Ανάδευση με μαγνητάκι σε θερμοκρασία ανεκτή στο χέρι
3. Ρύθμιση του pH στο 7,4 με τη βοήθεια NaOH και HCl
4. Συντήρηση στους 4° C και αποθήκευση στους -20°C

- Μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)

Για την παρασκευή 100μl μείγματος δεοξυριβονουκλεοτιδίων 25mM, αναμειγνύουμε 25μl από το καθένα dNTP συγκέντρωσης 100mM (dATP, dTTP, dGTP και dCTP - *HT Biotechnology # SB23*). Το μείγμα φυλάσσεται και αποθηκεύεται στους -20°C.

- Διαλύματα Ανοσοκατακρύμνισης Χρωματίνης

Hepes Solution

50 mM Hepes pH 7.9, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA

B buffer

0.25% triton-x100, 10mM EDTA, 0.5mM EGTA, 20 mM HEPES, +aprotinin/PMSF

C buffer

0.15M NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 20 mM HEPES, +aprotinin/PMSF

Sonication Buffer

50 mM Hepes pH 7.9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Na-deoxycholate, 0.5% Sarkosyl, 0.5 mM PMSF, Protease inhibitor cocktail (Roche)

Dilution Buffer

50 mM Hepes pH 7.9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 0.5 mM PMSF, Protease inhibitor cocktail (Roche)

Wash Buffer S

50 mM Hepes pH 7.9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5 mM PMSF, 2 μg/ml aprotinin

Wash Buffer A

Wash buffer S + 500 mM NaCl

Wash Buffer B

20 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0.5 % NP-40, 0.5 % Na-deoxycholate, 0.5 mM PMSF, 2 μg/ml aprotinin.

Elution Buffer

50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 % SDS, 50 mM NaHCO₃

1.2.2 Διαλύματα Μοριακής Βιολογίας του Εμπορίου

- Αιθανόλη (EtOH) υπερκάθαρη (*Fluka E/0650DF/17*)
- Αντιδραστήριο Bradford 5x (*Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate # 5000006*)
- Αντιδραστήριο TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine - *Carl Roth # 2367*)
- Αντιδραστήριο Trizol (*MRC # RT-111*)
- Διάλυμα Acrylamide/Bis-Acrylamide 30 % (29:1) (*Carl Roth # 3029.1*)
- Διάλυμα RIPA 10x (*Cell signaling # 9806*)
- Μάρτυρας μοριακών βαρών για ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων (*HT Biotechnology # MK05b*)
- Μάρτυρας μοριακών βαρών για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (*Nippon Genetic # MWP04*)
- Μείγμα αναστολέων των πρωτεασών (protease inhibitor cocktail, *Sigma – Aldrich # P8340*)
- H₂O για PCR (*Calbioche, # 9601*)
- Προπανόλη-2 (*Merck # 109634*)
- Υπόστρωμα ECL για την εμφάνιση κατά την ανοσοαποτύπωση (Lumilight western blotting Substrate, *Roche # 1201520001*)
- Χλωροφόρμιο - CHCl₃ (*Fluka # C/4960/17*)
- Φαινόλη (*ROTH #0038*)
- DNase
- RNase
- Proteinase K
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για μεταφορά πρωτεϊνών (*GE Healthcare # 10600002*)
- Dimethyl Sulfoxide – DMSO (*Sigma – Aldrich # D8418*)
- DNA πολυμεράση (kit) (*KAPA Biosystems # KK1510*)
- KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (*KAPA Biosystems # KK4601*)
- Oligo(dT)18 primer – εκκινητής ολιγο-dT (*Thermo Scientific # SO131*)
- PCR-Plate 96-well (*Kisker # GK96LOW*)

- RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase - Αντίστροφη μεταγραφάση (*Thermo Scientific* # EP0733)
- RiboLock RNase Inhibitor – αναστολέας των ριβονουκλεασών (*Thermo Scientific* # EO0381)
- RQ1 RNase-Free DNase kit (*Promega* # M6101)
- PEG Poly (ethylene glycol) (*Sigma – Aldrich* # 86101)
- Αμπικικιλίνη (*Sigma-Aldrich*, #A9393)
- Καναμυκίνη (*Sigma-Aldrich*, # K4000)

1.2.3 Ένζυμα Περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν, προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Takara, New England Biolabs και Minotech

1.2.4 Ένζυμα για Κλωνοποίηση

- T4 DNA ligase (*NEB* # M0202S)
- T4 RNA ligase (*NEB* #0437M)
- DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (*NEB* #M0210S)
- Antarctic Phosphatase (*NEB* # M289S)
- T4 Polynucleotide Kinase (PNK, *NEB* # M201S)

1.2.5 Διαλύματα Κυτταρικής Βιολογίας που Παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο

- Διάλυμα ανοσοφθορισμού

Για την παρασκευή 50ml διαλύματος ανοσοφθορισμού, 500μl ορού όνου (Donkey Serum 1%) και 500μl Triton X-100 10% (0.1%) (αραιωμένο 10 φορές από stock 100% (Carl Roth, 3051 σε υπερκάθαρο H₂O) προστίθενται σε 49ml TBS 1x. Ακολουθεί ανάδευση και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C. Το αντίστοιχο διάλυμα στους ανοσοφθορισμούς ιστών εμπεριέχει 3% Donkey Serum και 0.25% TritonX.

1.2.6 Διαλύματα Κυτταρικής Βιολογίας του Εμπορίου

- Μέσο στερέωσης των καλυπτρίδων στην αντικειμενοφόρο πλάκα: Aqua-Poly/Mount Coverslipping Medium (*Polysciences* # 18606 - 20)

1.2.7 Θρεπτικά Υλικά, Διαλύματα Κυτταροκαλλιιεργειών και Κυτταρικές Σειρές

- Donkey Serum (*Biosera* # AS-228/500)
- Fetal Bovine Serum - FBS (*Biosera* # FB-1001/500 (B11636) και *ThermoFisher Scientific* # 10270106)
- Antibiotic-Antimycotic 100x (*ThermoFisher Scientific* # 15240062)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (*ThermoFisher Scientific* # 41966029)
- F12
- Dulbecco's Modified Eagle Medium + F12 + Glutamax - DMEM -F12 +Glutamax (*ThermoFisher Scientific* # 31331-093)
- Opti-MEM (*ThermoFisher Scientific* # 31985062)
- Trypsin 0.05% EDTA (*ThermoFisher Scientific* # 25300-054)
- Διάλυμα θρυψίνης 0,05% με 0,53mM EDTA σε PBS (*Biosera* # LM-T1706/500)
- Acutase (*ThermoFisher Scientific* # A1110501)
- Phosphate Buffered Saline – PBS για κυτταροκαλλιέργεια (*Biosera* # LM-S2041/500)
- B27 Supplement 50x, serum free (*ThermoFisher Scientific* # 17504-044)
- Poly –L Ornithine hydrobromide -PORN (*Sigma*, # P3655)
- Poly –D Lysine hydrobromide -PDL (*Sigma*, # P7886)
- Cultrex Mouse Laminin I (*R&D Systems*, #3400-010-01)
- Distilled Water sterile (*ThermoFisher Scientific*, #15230- 089)
- Hepes (*ThermoFisher Scientific*, #15630-080)
- Κυτταρική Σειρά Be(2) –C (ATCC CRL #2268)
- Κυτταρική Σειρά SH-SY5Y (ATCC CRL #2266)
- Κυτταρική Σειρά Neuro2A (ATCC CCL-131)

1.2.8 Χημικοί Αναστολείς – Επαγωγείς, Αυξητικοί Παράγοντες

- Ρετινοϊκό οξύ (All *Trans*- Retinoic Acid – RA) (*Sigma – Aldric* # R2625)
- Φορσκολίνη (Forskolin –Fsk) (*Cayman* # 66575-29-9)
- Human EGF (*Peptotec* # AF-100-15)
- Human FGF basic (*Peptotech* # 100-18C)
- Actinomycin D (*Sigma – Aldrich* # A1410)

1.2.9 Αντιδραστήρια Διαμόλυνσης Ευκαρυωτικών Κυττάρων

- Polyethylinemine PEI (*Sigma* # 408727)
- Lipofectamine 2000 (*ThermoFisher Scientific* # 11668030)
- Xfect (*Clontech* # 631318)
- Prime JetPRIME (*Polyplus* # 114-007)

1.2.10 Αντισώματα

➤ Αντισώματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western Πρωτογενή αντισώματα

Πίνακας 1: Πίνακας των πρωτογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά το Western Blot.

Αντίσωμα	Εταιρία -Κωδικός	Αραίωση
Ngn2	(D2R3D) Cell Signaling #13144	1:300
PRMT8	Sigma #HPA39747	1:2000
β- actin	Millipore #MAB1501	1:10000
β-tubulin	Abcam #ab6046	1:10000
TujI	Millipore # MAB1637	1:500
GFP	αντι-ορός	1:1000

Δευτερογενή αντισώματα

- Αντίσωμα αιγός έναντι IgG (H+L) κονίκλου, συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανακίου HRP (goat anti-rabbit, *Thermo Scientific*, #31460), αραίωση 1:2500 – 1:5000.

- Αντίσωμα αιγός έναντι IgG (H+L) μύος, συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανακίου HRP (goat anti-mouse, *Jackson immunoresearch*, #115-035-146), αραιώση 1:5000.



Ανοσοφθορισμός

Πρωτογενή αντισώματα

Πίνακας 2: Πίνακας πρωτογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στον ανοσοφθορισμό

Αντίσωμα	Εταιρία -Κωδικός	Αραιώση
Ngn2	(D2R3D) Cell signaling # 13144	1:200
PRMT8	Sigma # HPA39747	1:2000
TujI	Millipore # MAB1637	1:500
NF160	Invitrogen # 34-1000	1:200
PSA-NCAM	Millipore #MAB5324	1:400
HuC/D	Molecular Probes, #21271	1:250
HuD	Santa Cruz # 28299	1:500
Ki67	Abcam # ab15580	1:1000
Sox2	Millipore # AB5603	1:500
GFAP	Sigma # G3893	1:1000
Nestin	Sigma # N5413	1:200
NeuN	Chemicon # MAB377	1:50
DCX	Santa Cruz # sc-8066	1:250
NFIA	Active Motif	1:1000
NFIB	Active Motif	1:1000

Δευτερογενή αντισώματα

- Αντίσωμα αιγός έναντι IgG (H+L) κόνικλου συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική CF που εκπέμπει στα 555nm, δίνοντας κόκκινο χρώμα (CF555 goat anti-rabbit, Biotium, 20033), αραιώση 1:1000.
- Αντίσωμα αιγός έναντι IgG (H+L) κόνικλου συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική Cyanine-5 (Cy5 goat anti- rabbit, Biotium, 20087)

- Αντίσωμα αιγός έναντι IgG (H+L) κονίκλου συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική CF που εκπέμπει στα 488nm δίνοντας πράσινο χρώμα (CF 488 goat anti-rabbit, Biotium 200-12)
- Αντίσωμα αιγός έναντι IgG (H+L) μυός συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική Alexa fluor που εκπέμπει στα 488nm, δίνοντας πράσινο χρώμα (Alexa fluor 488 goat anti-mouse, *Invitrogen*, A-11001), αραίωση 1:1000.
- Αντίσωμα αιγός έναντι IgG (H+L) μυός συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική CF που εκπέμπει στα 555nm, δίνοντας κόκκινο χρώμα (CF 555 goat anti- mouse, Biotium, 20030-1)

1.2.11 Χρώση Πυρήνα- Χρώση Νουκλεϊκών Οξέων

Πίνακας 3: Πίνακας χρωστικών για το DNA

Χρωστική	Εταιρία -Κωδικός	Αραίωση
DAPI	<i>Sigma-Aldrich, D9542</i>	1:2000
DRAQ5	<i>eBioscience, #65-0880-92</i>	1:2000
Propidium Iodide	<i>Sigma-Aldrich, #P4864</i>	1:1000
Ethidium Bromide	<i>Sigma –Aldrich, #E1510</i>	1:20
Gel Red	<i>Biotium, #41001 - 41003-T</i>	1:25

1.2.12 Πλαδιακές Κατασκευές & Χάρτες

1. **pCAG-miR-IRES-GFP:** Πλασμιδιακές κατασκευές των miRNAs για την καταστολή της έκφρασης των NFIA, NFIB, PRMT8. Χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια που είναι καταγεγραμμένα παρακάτω και η πειραματική πορεία της ενότητας των Μεθόδων 2.2.13.1.
2. **pCAG-PRMT8-IRES-GFP:** Η κωδική περιοχή του ανθρώπινου γονιδίου PRMT8, υποκλωνοποιήθηκε από τον φορέα pEGFP-N1 με περιοριστικές πένψεις με τα ένζυμα EcoRI και SalI, στον φορέα CAG-IRES-GFP.

3. Πλασμιδιακή κατασκευή υπερέκφρασης του *Ngn2* γονιδίου (**pNgn2-AcGFP-N1**).

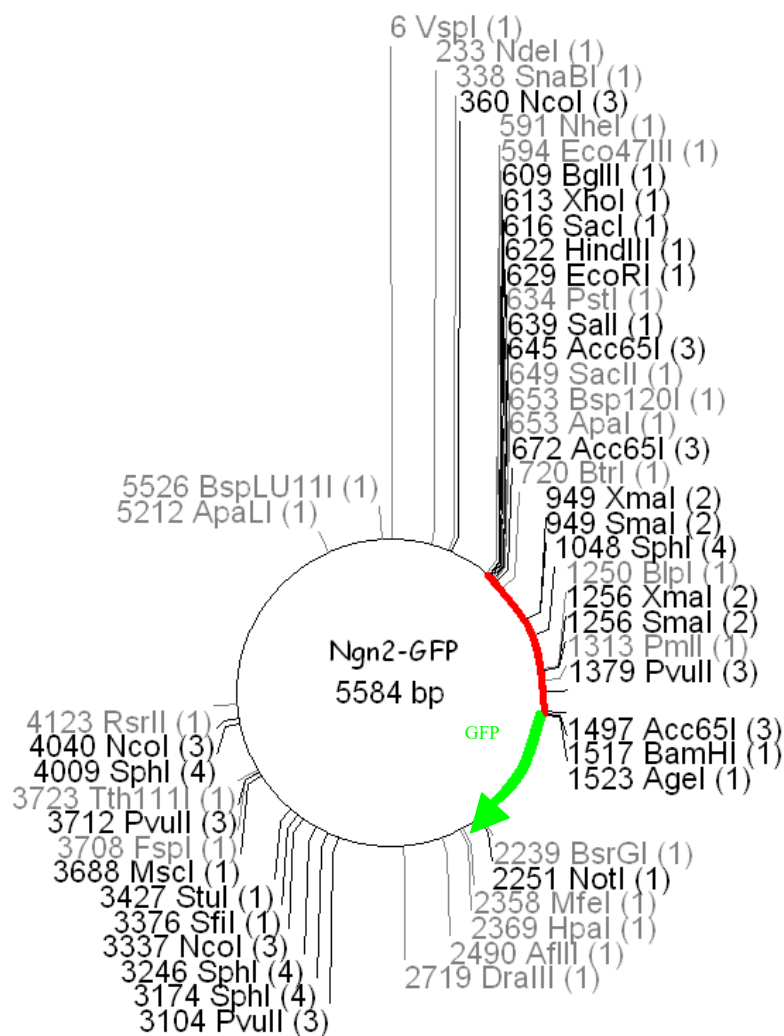
Κωδική Περιοχή -Ένθεση (659- 1515): human *Ngn2* (NM_024019.3,GI:384551666)

Φορέας: pAcGFP

Εκκινητές για ενίσχυση, με PCR, της ένθεσης:

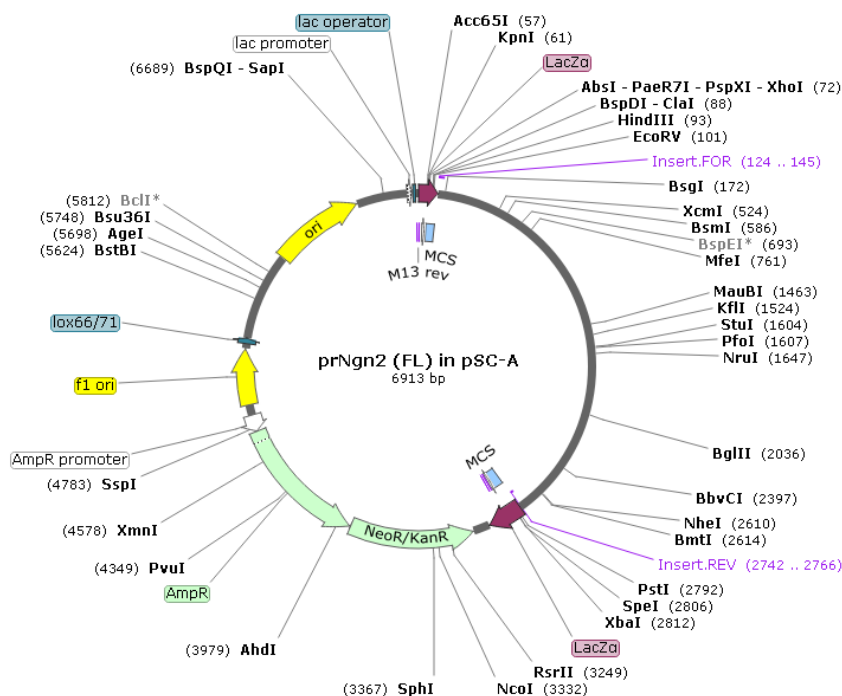
Forward: 5'-**CAG GTA CC** ATG TTC GTC AAA TCC GAG -3'

Reverse 1: 5'-**CA GGT ACC AAG** ATA CAA TCC CTG GCT -3' (**Acc65I** adaptors, μεταλλαγμένο κωδικόνιο λήξης)



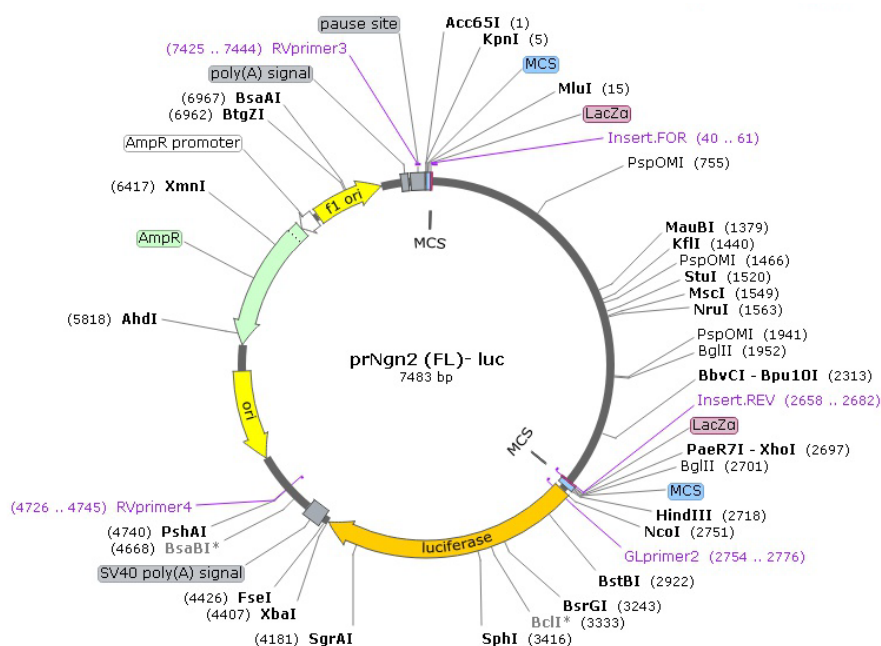
4. Πλασμιδιακές κατασκευές τμημάτων του 5' άκρου του γονιδίου *Ngn2* στον φορέα pBasic-luc (*Promega*)

pNgn2[-1972/+671]-SC-A



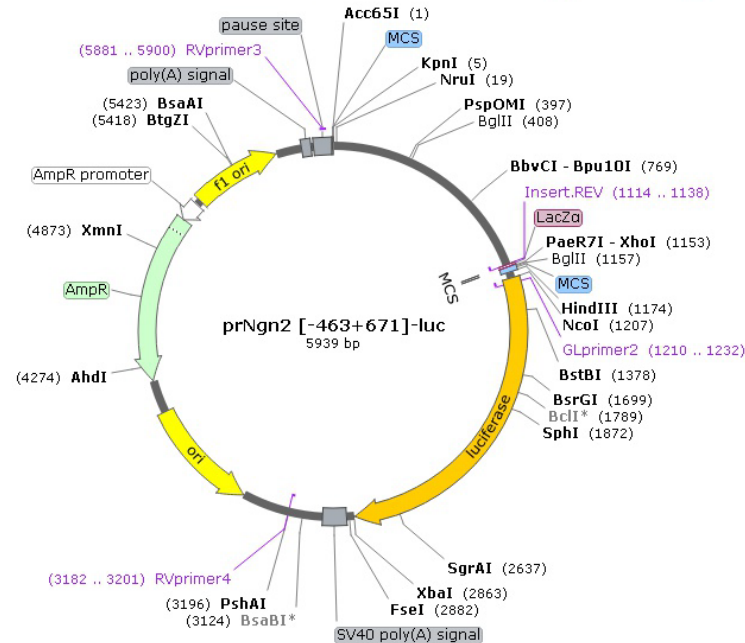
pNgn2[-1972/+671]-luc

Η ένθεση του υποκινητή του *ngn2* γονιδίου του pSC-A φορέα, ησήχθη στον PGL3basic-luc φορέα με περιοριστικές πέψεις με το ένζυμο SmaI.



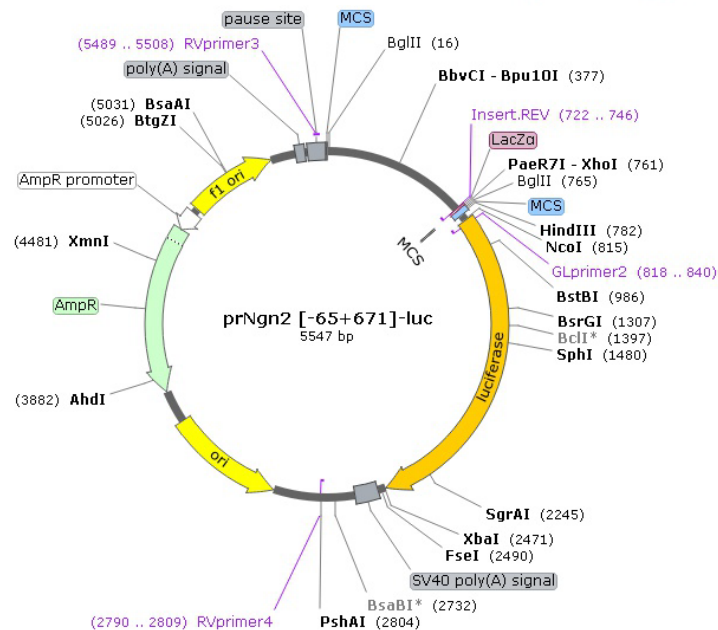
pNgn2[-463/+671]-luc

Διαγραφή από pNgn2[-1972/+671]-luc του τμήματος ύστερα από περιοριστική πέψη με τα ένζυμα Acc65I και MscI.



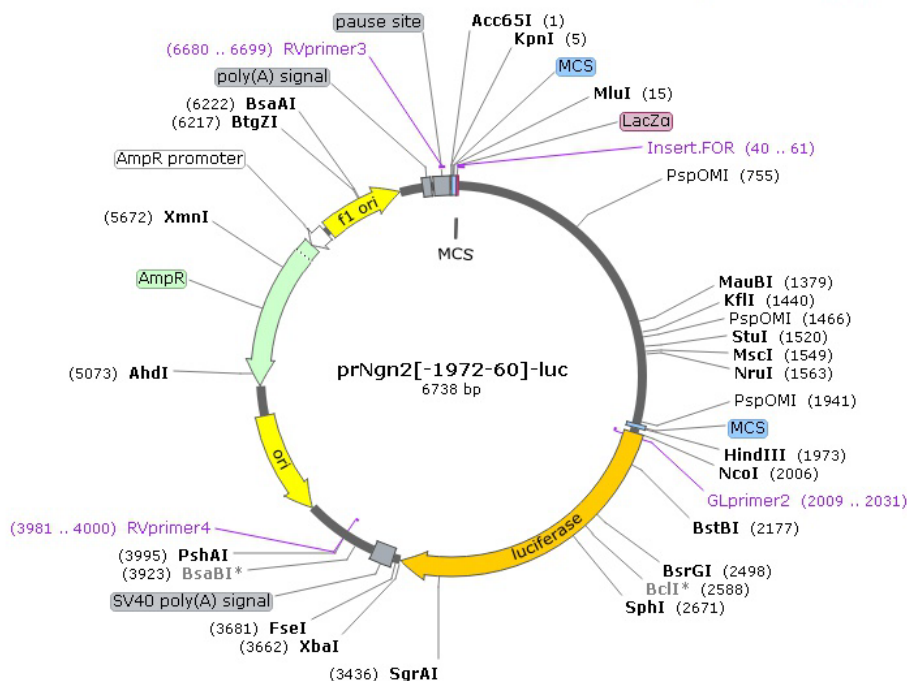
pNgn2[-65/+671]-luc

Διαγραφή από pNgn2[-1972/+671]-luc του τμήματος ύστερα από περιοριστική πέψη με τα ένζυμα Acc65I και PspOMI.



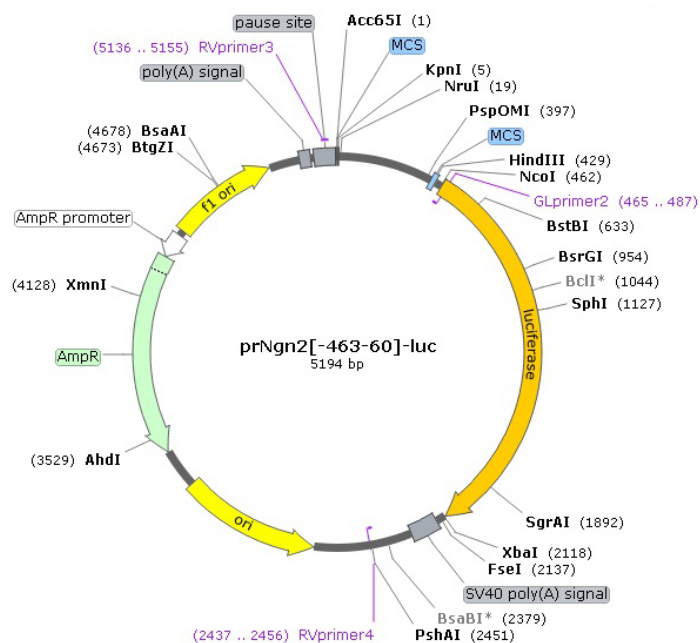
pNgn2[-1972/60]-luc

Διαγραφή από pNgn2[-1972/+671]-luc του τμήματος ύστερα από περιοριστική πέψη με το ένζυμο BglII.

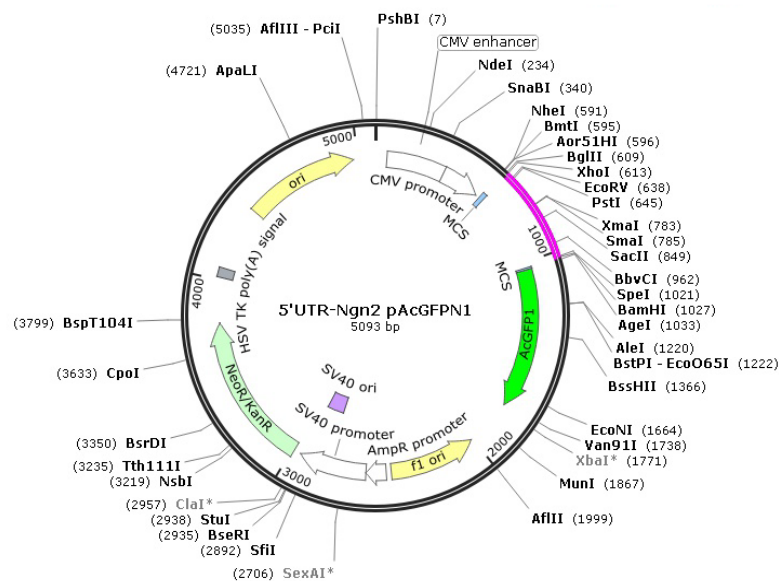


pNgn2[-463/60]-luc

Διαγραφή από pNgn2[-/+671]-luc του τμήματος ύστερα από περιοριστική πέψη με το ένζυμο BglII.



5. pNgn2 5'UTR-AcGFP-N1



6. pNgn2 5'UTR-luc

Η περιοχή του 5'UTR του γονιδίου *Ngn2* υποκλωνοποιήθηκε από τον φορέα TOPO-TA, στον φορέα basic-luc ύστερα από περιοριστική πέψη με τα ένζυμα BamHI/ XhoI.

1.2.13 Εκκινητές

1.2.13.1 Εκκινητές για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (ημιποσοτική και ποσοτική) από αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT- PCR)

Πίνακας 4: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για PCR

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')	Μέγεθος Αμπλικονίου σε bp
Neurogenin1	Ngn1- s	CCTTTGTGACTGGCTCAGAAC	152
	Ngn1- a	GGCTCCAAACCGAATTTTCAT	
Neurogenin2	Ngn2- s	ATG CAA CTG GTC CCT GTG AT	182
	Ngn2-a	ACA GGT GAA ATT CCC ACA GC	
NeuroD1	NeuroD1-s	CAGTGACTGTCGTGTTTACA	143
	NeuroD1-a	CATAAGGTGAACAGGAACCTTG	
NeuroD6	NeuroD6-s	TTGTCCTTCGAGGAAAGAGCAT	175
	NeuroD6-a	GCT TCC TGT CTC CTG AAC TTG A	
Mammalian Achaete-scute complex	Mash1-s	CCC AAC TAC TCC AAC GAC TTG A	170
	Mash1-a	CCT GCT TCC AAA GTC CAT TC	
SRY- related HMG Box 11	Sox11-s	GGTCGGAGAAGTTCGCCTC	138
	Sox11-a	GCTGTCAGATTACTTGAAGAC	
SRY- related HMG Box 4	Sox4-s	CGCAAGATCATGGAGCAGTC	151
	Sox4-a	CAAGCTAGTCAGCCATGTGC	
Protein Arginine Methyltransferase 1	PRMT1-s	GAT GGC CTC ATC TTC CCA GAC	600
	PRMT1-a	CAT CCG GTA GTC GGT GGA ACA	
Protein Arginine Methyltransferase 4	PRMT4-s	GTA ACC TGC TGG ATC TAA AGA AC	355
	PRMT4-a	ACT GGT TGT TGA CTG CAT AGT GG	
Protein Arginine Methyltransferase 8	PRMT8-s	CCA AAG CAA GTG GTG ACC AAT G	332
	PRMT8-a	TCT ACT GTG AAA TCG AGG TCT CG	
Human Antigen D	HuD-s	ATGCTGAACCCACTAAGTGCAT	
	HuD-a	TGCAGCCTTGGTATTCGTTATC	

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')	Μέγεθος Αμπλικονίου σε bp
cMyc	c-Myc-s	TTG GGC GAG CTG CTG TCG TT	197
	c-Myc-a	GAG AAG CTG GCC TCC TAC CA	
Hairy and enhancer of split 1	Hes1-s	GTGAAGCACCTCCGGAACCT	199
	Hes1-a	TGATCTGGGTCATGCAGTTGG	
Hairy and enhancer of split 5	Hes5-s	AGCCCAACTCCAAGCTGGAGA	119
	Hes5-a	TTCGCTGTAGTCCTGGTGC	
Neuron specific beta III tubulin	TujI-s	GGACATCTCTTCACGCCTGACA	147
	TujI-a	CAGGCAGTCGCAGTTTTACAC	
Doublecortin	DCX-s	ACCCCCAAGTCTAAGCAGTCTC	136
	DCX-a	CTCCCCTCCTTTACATGGAATC	
Drosha	Drosha-s	AGAATAGGCTGTGGGAAAGGAC	200
	Drosha-a	TTCTGATGGGCCATCTGGGGAA	
DNA methyltransferase 1	Dnmt1-s	GAGTGGGACGGCTTCTTCAG	169
	Dnmt1-a	GGTGCCTGTCCAGGATGTTG	
DNA methyltransferase 3A	Dnmt3A-s	CTTCTGGGGTAACCTTCC	123
	Dnmt3A-a	GTAATGGTCCTCACTTTGCTG	
Delta- like 1	Dll1-s	ACACCAAGTACCAGTCGGTGT	189
	Dll1-a	GTTTCTCAGCAGCAGTCC	
Rho familyEGTPase 2	Rnd2-s	ATGGAAGACATCCCTGACACTG	125
	Rnd2-a	CCAAGCAGAGACTTATCCCTGT	
T- Box Binding Protein 2 ή EOMES	Tbr-s	ACGTCTACCTGTGCAACC	117
	Tbr2-a	GTCCGTTTATGTTGAAGCTC	
Propsero homeobox protein 1	Prox1-s	GAAGGGTTGACATTGGAGTGA	121
	Prox1-a	GAATACTCAACATCCTGCTC	
Receptor Tyrosine Kinase of GDNF	RET-s	CAGCAAAGACCTGGAGAAGATG	175
	RET-a	GTTTTCAATCCATGTGGAAGGG	
Tyrosine Kinase Receptor B of BDNF/ NT3	TrkB-s	AGCCCTGGTACCAGCTGTCAAA	184
	TrkB-a	GCCTTGGCCAAGTTCTGAAGGA	184

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')	Μέγεθος Αμπλικονίου σε bp
Microtubule Associated Protein 2	MAP2-s	TGTAGGTGAAGGCCAAGACTCT	148
	MAP2-a	AACCTCGGAATCCCAGCATACA	
Nuclear Factor One A	NFIA-s	TGGCATACTTTGTACATGCAGC	128
	NFIA-a	ACCTGATGTGACAAAGCTGTCC	
Nuclear Factor One B	NFIB-s	AGCTGCTGGAAGTCGAACAT	118
	NFIB-a	TCTTGGGGAAGAATCCTGTG	
Microtubule Associated Protein tau	Tau5-s	GCTGGATCTTAGCAAACGTCCAG	200
	Tau5-a	GAGCCACACTTGGAGGTCAC	
Glutamate A Spartate Transporter	GLAST1-s	GACATCACGCTCATCATCGC	155
	GLAST1-a	TCAATCACCGAGTTACCCATT	
Ras homolog gen family member A	RhoA-s	CGGAATGACGAGCACACGAG	122
	RhoA-a	AGATGAGGCACCCAGACTTTTTC	
Glycoprotein 130 (GP130 ή IL6ST)	GP130-s	TGGTACACAGTGGCTACAGACA	141
	GP130-a	GCAAAATACCATCACCGCCATCT	
Single Recognition Particle 14	Srp14-s	GATGGTGTGTGTTGGAGAGCGAG	209
	Srp14-a	CAGTGCTGATCTTCTTCTTCCC	
β και γ actin	β/γ actin-s	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	141
	β/γ actin- a	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH-s	GTG GTC TCC TCT GAC TTC AAC A	134
	GAPDH-a	ACC ACC CTG TTG CTG TAG CC	
18S Ribosomal RNA	18S RNA-s	GCTGCTGGACCAGACTT	110
	18S RNA-a	CGGCTACCACATCCAAGG	

1.2.13.2 Εκκινητές του Γονιδίου *Ngn2* που Χρησιμοποιήθηκαν για το Πείραμα Μεθυλίωσης

Πίνακας 5: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *Ngn2*

Περιοχή στο 5' άκρο	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')		Θέση στον γονιδιακό τόπο (σημείο έναρξης του εκκινητή)	Μέγεθος Αμπλικονίου σε ζεύγη βάσεων (ζ. β./ bp)
Περιοχή Υποκινητή 1 (PR1)	Sense	cgtctttggaatacagcttg	-1573	403
	antiense	gctgacatttctgtgacctct	-1170	
Περιοχή Υποκινητή 2 (PR2)	sense	agaggtcacagaaatgtcagcg	-1192	434
	antiense	aagcctcttaggggttgta	-755	
Περιοχή Υποκινητή 3 (PR3)	sense	caacccttaagaggctttgc	-779	559
	antiense	atccatctctctctccac	-220	
Περιοχή Υποκινητή 4 (PR4)	sense	gtgggaggaggaggatggat	-240	560
	antiense	ggctctaactgtgcctcagc	+320	
Περιοχή Ιντρονίου (IR1)	sense	gctgaggcacagttagagcc	+300	461
	antiense	tcttctctacacctcactgcc	+761	

1.2.13.3 Ολιγονουκλεοτίδια για την Παρασκευή των miRNAs

Πίνακας 6: Ολιγονουκλεοτίδια για τη κατασκευή τεχνητών miRNAs για την καταστολή της έκφρασης του PRMT8

Όνομα ολιγονουκλεοτιδίου	#	Αλληλουχία 5'-3'
miRNA1_bottom	Mmi545368	CCT GTA ATC TCT CGA TCA TCT CCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GGA GAT GAC ATC GAG AGA TTA C
miRNA1_top	Mmi545368	TGC TGT AAT CTC TCG ATG TCA TCT CCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GGA GAT GAT CGA GAG ATT A
miRNA2_bottom	Mmi545369	CCT GTT CAA TCC CAA ACC TTC TTG TCA GTC AGT GGC CAA AAC AAG AAG GTG TTT GGG ATT GAA C
miRNA2_top	Mmi545369	TGC TGT TCA ATC CCA AAC ACC TTC TTG TTT TGG CCA CTG ACT GAC AAG AAG GTT TGG GAT TGA A
miRNA3_bottom	Mmi545370	CCT GAT TGC TAC CAC ACA AAG CTG TCA GTC AGT GGC CAA AAC AGC TTT GTA CGT GGT AGC AAT C
miRNA3_top	Mmi545370	TGC TGA TTG CTA CCA CGT ACA AAG CTG TTT TGG CCA CTG ACT GAC AGC TTT GTG TGG TAG CAA T

1.3 Λογισμικό

Για την ανάλυση των πειραμάτων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω λογισμικά:

- Excel, όπου η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Paired t-TEST.
- Bio-Rad CFX Manager και Step One Real- Time PCR, Applied Biosystems για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της QPCR.
- LAS AF Lite, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων του ανοσοφθορισμού.
- SnapGene για τη δημιουργία των πλασμιδιακών χαρτών

1.4 Εξοπλισμός

- Αναδευτήρας για ανάδευση των μεμβρανών (Kisker, mini Rocker, MR-1)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος για eppendorfs (KUBOTA 3300)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος για σωληνάρια τύπου falcon (Heraeus, Megafuge 1R)
- Θάλαμος νηματικής ροής (Telstar, Bio II Advance)
- Θερμοκυκλοποιητής για συμβατική PCR (Applied Biosystems, PCR system 8700, Biorad)
- Θερμοκυκλοποιητής για QPCR (Biorad, CFX96 system)

- Κλίβανος κυττάρων (FORMA SCIENTIFIC)
- Μαγνητικός αναδευτήρας (LABINCO L34)
- Μηχάνημα εμφάνισης φιλμ (Amersham Hyperprocessor)
- Μικροσκόπιο TIRF (Leica)
- Μικροσκόπιο Συνεστιακής Μικροσκοπίας Leica SP5
- Οπτικό μικροσκόπιο (ZEISS, Axiovert25)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών μικρής κλίμακας (Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell, BIORAD)
- Συσκευή μέτρησης του pH (ORION 410A)
- Συσκευή υπερήχων (BRANSON 250-D)
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους/ορατού (Hitachi, U-2001).
- Nano Drop (Qwawell)
- Μικροτόμος (Leica Microsystems Wetzlar Germany)
- Λουμινόμετρο (junior EG&G Berthold)

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μέθοδοι Κυτταροκαλλιέργειών

2.1.1 Καλλιέργεια Νευροβλαστωματικών Κυττάρων

Όλες οι διαδικασίες που σχετίζονται με την καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιούνται στο δωμάτιο κυτταροκαλλιέργειών σε θάλαμο νηματικής ροής, υπό ασηπτικές συνθήκες.

Τα νευροβλαστωματικά κύτταρα Neuro2A, SH-SY5Y και Be(2)-C αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιλαμβάνει:

- DMEM (4500 mg/L glucose) για τα Neuro2A και SH-SY5Y, DMEM-F12 για τα Be(2)-C
- 10% FBS
- 1% αντιβιοτικό (Antibiotic – Antimycotic).

Απαραίτητη προϋπόθεση πριν τη χρήση του ορού (FBS) είναι η θέρμανσή του στους 56°C για 30min με σκοπό την αδρανοποίηση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος του ορού. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες ενεργοποιούν την ανοσολογική απόκριση και η αδρανοποίησή τους θεωρείται απαραίτητη για την αποφυγή τυχόν λανθασμένων ανοσολογικών αποκρίσεων από το κύτταρο. Ακόμη, η θέρμανση του ορού έχει συνδεθεί με την αδρανοποίηση μικροοργανισμών όπως το μυκόπλασμα (BIOCHROM AG, 2005).

Η καλλιέργεια γίνεται σε ειδικούς επωαστήρες στις ακόλουθες συνθήκες:

- Θερμοκρασία: 37°C
 - Περιεκτικότητα σε CO₂: 5%
- (www.abcam.com)

2.1.1.1 Ανακαλλιέργεια των Νευροβλαστωματικών Κυττάρων με τη Χρήση Θρυψίνης

Για να διατηρηθεί η κυτταροκαλλιέργεια των νευροβλαστωματικών SH-SY5Y κυττάρων, όταν τα κύτταρα καταλάβουν το 80% - 90% της επιφάνειας του τρυβλίου, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια (ή passage) σε καινούριο τρυβλίο με τη χρήση

διαλύματος θρυψίνης. Η θρυψίνη είναι μια πρωτεάση η οποία προκαλεί διάσπαση των αμινοξικών δεσμών μεταξύ των κυττάρων και την αποκόλληση τους από την επιφάνεια του τρυβλίου. Συνήθως, πραγματοποιούνται έως 25 ανακαλλιέργειες περίπου, καθώς από το σημείο αυτό κι έπειτα αρχίζει να φθίνει ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και να αυξάνεται ο κυτταρικός θάνατος. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από το τρυβλίο.
2. Απομάκρυνση του εναπομείναντος θρεπτικού υλικού μέσω πλύσης με διάλυμα PBS.
3. Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 800μl θρυψίνης (για πιάτο διαμέτρου 100mm), επώαση στους 37°C για 3 min, ικανό διάστημα για την αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα του πιάτου με ελαφρά χτυπήματα.
4. Προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού και ανάδευση των κυττάρων, με πιπέτα μιας χρήσεως, ώστε να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα μεταξύ τους.
5. Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.
6. Μεταφορά του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε νέο τρυβλίο, στο οποίο έχει ήδη προστεθεί θρεπτικό υλικό.
7. Επώαση των κυττάρων στους 37°C. Στο διάστημα των επόμενων 4-5 ωρών τα κύτταρα προσκολλώνται ξανά στο υπόστρωμα του τρυβλίου.

2.1.2 Καλλιέργεια Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων (Νευροσφαίρες, Μονοστοιβάδα Κυττάρων)

Τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα, προερχόμενα από τον ιπόκαμπο επίμυος, αναπτύσσονται *in vitro* ως νευροσφαίρες σε καλλιεργητικές φλάσκες απουσία υποστρώματος, ενώ παρουσία υποστρώματος πολυ-ορνιθίνη με ή χωρίς λαμινίνη (PORN, Lam) αναπτύσσονται ως μονοστοιβάδα κυττάρων. Τα συγκεκριμένα κύτταρα προμυθευτήκαμε από το εργαστήριο του Dr. Fred Gage [203].

Επιλέχθηκαν οι εξής συνθήκες καλλιέργειας των πρόδρομων βλαστικών κυττάρων, ύστερα από έλεγχο και βελτιστοποίηση διαφόρων συνθηκών:

- Υπόστρωμα: πολυ-ορνιθίνη (PORN, μόνο για την καλλιέργεια μονοστοιβάδας)
- Θρεπτικό Μέσο Ανάπτυξης:

-DMEM-F12 +GlutaMAXTM

-1x B27

-8mM Hepes

-1% Antibiotic- Antimycotic

-20ng/ml bFGF

Η ανανέωση του μισού θρεπτικού μέσου γίνεται ανά 4 ημέρες. Ο αυξητικός παράγοντας προστίθεται εκ νέου κάθε 2 ημέρες.

2.1.2.1 Ανακαλλιέργεια Πρόδρομων Νευρικών Κυττάρων με τη Χρήση Acutase / Θρυψίνης

1. Ανακαλλιέργεια Νευροσφαιρών

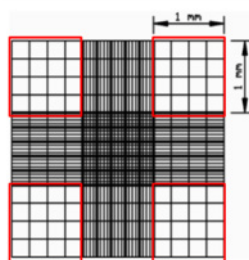
1. Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου, όπου εμπεριέχονται οι νευροσφαίρες, από τη φλάσκα.
2. Φυγοκέντρωση 900g/ 3min
3. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού (το οποίο φυλλάσσεται και μέρος αυτού χρησιμοποιείται στη νέα καλλιέργεια) και πλύσης με διάλυμα PBS.
4. Φυγοκέντρωση 900g/ 3min
5. Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 1,2ml acutase (για φλάσκα 75mm), επώαση στους 37°C για 7 min.
6. Προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού και ανάδευση των κυττάρων, με πιπέτα μιας χρήσεως των 5ml και τη βοήθεια tip 2-20μl, ώστε τα κύτταρα να γίνουν μονήρη (trituration).
7. Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.
8. Μεταφορά του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε νέο τρυβλίο, στο οποίο έχει ήδη προστεθεί θρεπτικό υλικό (συνήθης αραίωση για τη διατήρηση της καλλιέργειας 1:10-1:20)
9. Επώαση των κυττάρων στους 37°C.

2. Ανακαλλιέργεια των Πρόδρομων Νευρικών Κυττάρων που Αναπτύσσονται ως Μονοστοιβάδα Κυττάρων

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με την αντίστοιχη στα νευροβλαστωματικά κύτταρα

2.1.3 Μέτρηση του Αριθμού των Κυττάρων με Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Ο αριθμός των κυττάρων που απαιτείται σε κάθε περίπτωση υπολογίζεται με το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer ή πλάκα Neubauer. Προστίθενται 10μl κυτταρικού εναιωρήματος στην πλάκα και μετράται ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται εντός των τεσσάρων μεγάλων τετραγώνων της πλάκας. Τα τετράγωνα αυτά βρίσκονται στις τέσσερις γωνίες της πλάκας και αποτελούνται από 16 μικρότερα τετράγωνα (**Εικόνα 21**). Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων προκύπτει από το άθροισμα του αριθμού των κυττάρων που περιλαμβάνονται σε καθένα από τα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα και διαιρείται δια του 4. Ο αριθμός που προκύπτει πολλαπλασιάζεται $\times 10^4$ και αποτελεί τον αριθμό των κυττάρων της καλλιέργειας ανά ml (www.celeromics.com).



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση των σημείων μέτρησης κυττάρων στην πλάκα Neubauer.

2.1.4 Αποθήκευση Κυτταρικών Σειρών

Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε ειδικά κρυοφιαλίδια για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε βαθεία ψύξη (-196°C) με την παρακάτω διαδικασία:

1. Θρυψινοποίηση των κυττάρων του τρυβλίου.
2. Φυγοκέντρηση του κυτταρικού εναιωρήματος σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 min/ 900rpm.
3. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 900μl θρεπτικού μέσου (900μl κυτταρικού εναιωρήματος αντιστοιχούν σε ένα κρυοφιαλίδιο)
4. Προσθήκη 900μl διαλύματος ψύξης (freezing mix)

5. Μεταφορά του συνολικού όγκου, 1.8 ml αυτού του διαλύματος που περιλαμβάνει τα κύτταρα, σε ένα κρυοφιαλίδιο.
6. Τοποθέτηση σε ειδικό δοχείο με ισοπροπανόλη (για αργό και σταδιακό πάγωμα) στους -80°C . Το διάλυμα αποθήκευσης είναι τοξικό για τα κύτταρα, γι αυτό τα κρυοφιαλίδια πρέπει να ψύχονται κατευθείαν μετά την προσθήκη του στο κυτταρικό εναιώρημα.
7. Μετά από 12-24 ώρες, το κρυοφιαλίδιο φυλάσσεται στο υγρό άζωτο (-196°C).

Πίνακας 7: Διάλυμα βαθείας ψύξης των ευκαρυωτικών κυττάρων

Συστατικά	Πρόδρομα Νευρικά Κύτταρα	Κυτταρικές Σειρές
Θρεπτικό Μέσο Ανάπτυξης	80%	30%
DMSO	20%	20%
FBS	-	50%

2.1.5 Απόψυξη των Κυττάρων

Η απόψυξη των κυττάρων περιλαμβάνει:

1. Άμεση μεταφορά του κρυοφιαλιδίου από το υγρό άζωτο στους 37°C . Η τήρηση άσηπτων συνθηκών με τη χρήση αιθανόλης 70% κρίνεται απαραίτητη.
2. Μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε ένα σωλήνα φυγοκέντρησης τύπου falcon που περιέχει 8.2ml πλήρους θρεπτικού μέσου και φυγοκέντρωση στα 900rpm/ 5min.
3. Απομάκρυνση του υπερκειμένου, επαναιώρηση των κυττάρων σε νέο θρεπτικό μέσο και ανάδευση με πιπέτα μιας χρήσεως.
4. Μεταφορά των κυττάρων στο αντίστοιχο πιάτο/φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας και τοποθέτηση στους 37°C μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια.

2.1.6 Νευρική Διαφοροποίηση των Νευροβλαστωματικών Κυττάρων SH-SY5Y, Be(2)-C

Η διαφοροποίηση των κυττάρων νευροβλαστώματος SH-SY5Y, πραγματοποιείται με τη χρήση ρετινοϊκού οξέος (Retinoic Acid, RA). Το ρετινοϊκό οξύ επάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων καθώς εμπλέκεται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που καταστέλλουν την

έκφραση της ογκοπρωτεΐνης N-Myc, η οποία είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό των νευροβλαστωματικών κυττάρων και παρεμποδίζουν τη δημιουργία του συμπλόκου N-Myc/Max [204]. Επιπλέον το RA επάγει τη διαδικασία της διαφοροποίησης, ενεργοποιώντας μόρια, όπως είναι οι p21^{Cip1} και p27^{Kip1} τα οποία αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο στις φάσεις G0/G1 [205].

Η διαφοροποίηση ολοκληρώνεται μέσα σε 7-8 ημέρες.

Το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης περιλαμβάνει:

- 10μM RA
- DMEM
- 1% FBS
- 1% Antibiotic – Antimycotic

Η διαδικασία διαφοροποίησης των κυττάρων έχει ως εξής:

1. Αφού έχει προηγηθεί θρυψινοποίηση, μεταφέρεται ο κατάλληλος αριθμός των κυττάρων σε νέο τρυβλίο (π.χ. 35000 κύτταρα σε πιάτο 6-well). Είναι πολύ σημαντικό να πραγματοποιηθεί καλή ανάδευση των κυττάρων, πριν τη μεταφορά στο νέο τρυβλίο, γιατί να κύτταρα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μονήρη.
2. Την επόμενη ημέρα, η πυκνότητα των κυττάρων πρέπει να είναι περίπου 60%-70%, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο, εκπλένονται τα κύτταρα με PBS αντικαθίσταται το θρεπτικό μέσο με το αντίστοιχο χαμηλού ορού και προστίθεται το RA.
3. Το RA ανανεώνεται ανά δυο ημέρες αφαιρώντας τη μισή ποσότητα του θρεπτικού μέσου και προσθέτοντας άλλη τόση που περιέχει όμως τη διπλάσια ποσότητα RA.
4. Τα κύτταρα συλλέγονται τις επιθυμητές ημέρες προς μοριακή, βιοχημική και ανάλυση.

Οι συνθήκες διαφοροποίησης των Be(2)-C κυττάρων, καθώς δεν είναι πολύ καλά εγαθιδρυμένες, ελέγχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής και περιγράφονται στην παράγραφο 1.1.1 των αποτελεσμάτων.

2.1.7 Νευρική Διαφοροποίηση Πρόδρομων Νευρικών Κυττάρων

Τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε υπόστρωμα πολυ- ορνιθίνης – λαμινίνης (PORN/Lam) στο ίδιο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, απουσία bFGF και παρουσία 1μM RA και 5μM Fsk.

Κατά την αλλαγή του θρεπτικού μέσου ώστε να ξεκινήσει η διαφοροποίηση είναι απαραίτητη η έκπλυση με PBS.

2.1.8 Επίστρωση Καλλιεργητικών Πιάτων με τα Υποστρώματα Πολυ- L- Ορνιθίνης (PORN), Πολυ- D – Λυσίνης (PDL) και Λαμινίνης (Lam)

2.1.8.1 Επίστρωση με PDL- Lam

Ημέρα 1^η

- PDL stock: 1mg/ml, τελική συγκέντρωση 50μg/ml (αραίωση 1:20 σε H₂O)
- Ολονύκτια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου

Ημέρα 2^η

- πλύσεις (x3) με H₂O και ολιγόλεπτη ξήρανση
- Lam stock= 1mg/ml, τελική συγκέντρωση 5μg/ml (1:200 σε DPBS)
- Ολονύκτια επώαση στους 37°C

Ημέρα 3^η

Αποθήκευση στους -20°C

2.1.8.2 Επίστρωση με PORN- Lam

3.1.8.2 Ημέρα 1^η

- PORN stock= 10mg/ml, τελική συγκέντρωση 50 μg/ml (αραίωση 1:200 σε H₂O)
- Ολονύκτια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου

Ημέρα 2^η

- πλύσεις (x3) με H₂O και ολογόλεπτη ξήρανση
- Lam stock= 1mg/ml, τελική συγκέντρωση 5μg/ml (1:200 σε DPBS)
- Ολονύκτια επώαση στους 37°C

Ημέρα 3^η

Αποθήκευση στους -20°C

2.1.8.3 Επίστρωση με Lam

Ημέρα 1^η

- Lam stock= 1mg/ml, τελική συγκέντρωση 20μg/ml (1:50 σε DPBS)
- Ολονύκτια επώαση στους 37°C

Ημέρα 2^η

- πλύσεις (x4) με H₂O και ξήρανση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Αποθήκευση στους 4°C

2.1.8.4 Προετοιμασία Καλυπτρίδων

Ημέρα 1^η

- Τοποθέτηση 100 καλυπτρίδων σε σωληνάριο falcon των 50ml
- Προσθήκη 45ml ακετόνης για 20 λεπτά
- Απομάκρυνση της ακετόνης και προσθήκη αιθανόλης 100% για 20 λεπτά
- Απομάκρυνση της αιθανόλης και προσθήκη 45ml H₂O (MilliQ) που θα περιέχει 4.5ml HCl (32%)⁵ για 1 ώρα
- Απομάκρυνση του διαλύματος οξέος και προσθήκη 45ml H₂O (MilliQ) και ολονύκτια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου

Ημέρα 2^η

- Πλύσεις των καλυπτρίδων με H₂O (MilliQ) (x10, διάρκεια πλύσης 3-5 λεπτά)
- Απόχυση του H₂O και αντικατάσταση του με αιθανόλη 100%
- Τοποθέτηση των καλυπτρίδων στα πηγάδια του 24- well dish πιάτου και ολιγόλεπτη ξήρανση
- Αποστείρωση με UV ακτινοβολία για 30 λεπτά

2.1.9 Διαμόλυνση των Ευκαρυωτικών Κυττάρων (Transfection)

Η είσοδος εξωγενούς DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα (διαμόλυνση) μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με χημικούς τρόπους (όπως CaCl₂, λιποσώματα, κατιονικά πολυμερή), είτε με μη χημικές μεθόδους (όπως ηλεκτροδιάτρηση, υψηλή πίεση,

⁵ Προστίθεται πρώτα το H₂O και ύστερα το HCl

νανοσωματίδια) καθώς και με τη βοήθεια ιόν. Από τις χημικές μεθόδους, ακολουθήθηκε η διαμόλυνση με τη μέθοδο των λιποσωμάτων (lipofectamine) και των κατιονικών πολυμερών (PEI, JetPEI, JetPRIME Polyplus, Xfect), όπου το ποσοστό επιτυχίας αγγίζει το 40% - 50%.

Η πολυαιθυλεναμίνη (PEI) είναι ένα θετικά φορτισμένο πολυμερές που έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με την ανιονική διπλοστοιβάδα πεπτιδογλυκάνων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και να εισάγεται στα κύτταρα με ενδοκύτωση. Λειτουργεί σα «σφουγγάρι» πρωτονίων, γι αυτό άλλωστε και προσροφά το DNA [206]. Στο εσωτερικό του μπορεί να αυτορυθμίζει, το pH προστατεύοντας έτσι το DNA από την αποικοδόμηση. Με αντίστοιχο τρόπο λειτουργούν και τα κατιονικά λιποσώματα. Η λιποφεκταμίνη έχει την ικανότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα επιτρέποντας τους να ξεπερνούν το φραγμό της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και να εισέρχονται εντός του κυττάρου, όπου και απελευθερώνονται [206].

Τα Neuro2A και Hek293 διαμολύνονται με CaCl_2 και PEI ενώ τα πρόδρομα νευρικά, τα SH-SY5Y και τα Be-(2)C κύτταρα με τα υπόλοιπα μέσα διαμόλυνσης.

2.2 Μεθοδοι Γενετικής Μηχανικής

2.2.1 Παρασκευή βακτηριακών Κυττάρων Επιδεκτικών σε Μετασχηματισμό

Για την παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων σε μετασχηματισμό με πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *DH5a* του βακτηρίου *E.Coli*. Η μέθοδος παρασκευής χημικών επιδεκτικών κυττάρων κατά *Inoue* [207], βασίζεται στην επεξεργασία βακτηριακών κυττάρων με διάλυμα αλάτων τα οποία ευνοούν την πρόσδεση του πλασμιδιακού DNA, στις μεμβράνες των κυττάρων. Ακολούθως με θέρμανση, πραγματοποιείται άνοιγμα των πόρων των βακτηριακών κυττάρων, με επακόλουθη είσοδο του πλασμιδιακού DNA. Όλα τα στάδια της διαδικασίας πραγματοποιούνται κάτω από άσηπτες συνθήκες με τη βοήθεια λυχνίας Bunsen.

- Τα βακτήρια ανασύρονται από βακτηριακό μητρικό απόθεμα διαλύματος γλυκερόλης (*glycerol stock*) και γίνεται επίστρωση σε τρυβλίο στερεού άγαρ χωρίς αντιβιοτικό. Το τρυβλίο επωάζεται στους 37 °C ολονύκτια (12-16 ώρες).

- Την επόμενη ημέρα εμβολιάζεται μια αποικία σε 25 ml υγρού βακτηριακού θρεπτικού μέσου και επωάζεται για 6-8 ώρες στους 37 °C υπο ανάδευση στις 250-300 στροφές/ λεπτό.
- Στη συνέχεια 2,4 και 6ml προκαλλιέργειας, εμβολιάζονται σε 250ml υγρού θρεπτικού μέσου και αφήνονται να αναπτυχθούν ολονύκτια στους 18 °C, υπο ανάδευση στις 200 στροφές/ λεπτό.
- Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται μέτρηση οπτικής πυκνότητας. Για την παρασκευή των επιδεκτικών κυττάρων, επιλέγεται η καλλιέργεια με την καταλληλότερη οπτική πυκνότητα ($OD_{600}=0.55$), και τοποθετείται στον πάγο για 10 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4 °C / 2500 στροφές/λεπτό και απόρριψη του υπερκειμένου.
- Τα κύτταρα επαναδιαλύονται με αργές και προσεκτικές κινήσεις σε 80 ml, παγωμένου διαλύματος μετασχηματισμού. Η ανάμιξη γίνεται στροβιλίζοντας, χωρίς τη χρήση πιπέτας ή ηλεκτρικού αναδευτήρα.
- Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση, 60 απόρριψη του υπερκειμένου και επαναιώρηση σε 18.6 διαλύματος μετασχηματισμού με 1.4 ml DMSO. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται, επωάζονται για 10 λεπτά στον πάγο και διαμοιράζονται σε επιμέρους όγκους των 50μl σε φιαλίδια του 1.5 ml.
- Τέλος ακολουθεί άμεση κατάψυξη σε υγρό άζωτο και φύλαξη στους -80 °C.

2.2.2 Ανάπτυξη Βακτηρίων

Η ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους DH5a – E.Coli γίνεται στους 37 °C. Για τις υγρές βακτηριακές καλλιέργειες, χρησιμοποιείται τροχιακός επωαστήρας (*Heidolph, Unimax-1010*). Το υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (*LuriaBroth, LB*) αποτελείται από

- 1% τρυπτόνη (*Applichem, #A1553*),
- 0.5% NaCl2 (*Applichem, #A2942*) και
- 1% εκχύλισμα ζύμης (*Applichem, #403687.1210*).

Για την Παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, στο παραπάνω προστίθεται 1.5% Άγαρ (*Applichem, A0949,0500*). Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121

°C για 15 λεπτά. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται στους 4 °C. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100 µg/ml (*Sigma-Aldrich*, #A9393) και καναμυκίνη σε συγκέντρωση 30 µg/ml (*Sigma-Aldrich*, # K4000).

2.2.3 Μετασχηματισμός Βακτηρίων με Θερμικό Σοκ

Για το μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος του θερμικού σοκ.

- 50µl-100µl βακτηριακών κυττάρων, επιδεκτικών σε μετασχηματισμό αφήνονται να αποψυχθούν σε πάγο.
- Ακολουθεί προσθήκη πλασμιδιακού DNA και επώαση στον πάγο για 20 λεπτά.
- Το διάλυμα κυττάρων-DNA, μεταφέρεται στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα
- αφήνεται για 2 λεπτά στον πάγο και στη συνέχεια
- προστίθενται 900 µl υγρού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας.
- Μετά από επώαση για 1 ώρα στους 37 °C υπο ανάδευση (125 rpm), πραγματοποιείται επίστρωση σε τρυβλία στερεού θρεπτικού μέσου με το κατάλληλο αντιβιοτικό.
- Τα τρυβλία επωάζονται ολονύκτια στους 37 °C (175-250 rpm).

2.2.4 Αποθήκευση Μετασχηματισμένων Βακτηρίων σε Γλυκερόλη

Με σκοπό την αποθήκευση για μεγάλα χρονικά διαστήματα, τα μετασχηματισμένα βακτήρια με το εκάστοτε πλασμιδιακό γενετικό υλικό, αναμιγνύονται κάτω από ασηπτικές συνθήκες με γλυκερόλη. Πιο αναλυτικά 440 µl υγρής βακτηριακής καλλιέργειας, αναμιγνύονται με 880 µl αποστειρωμένης γλυκερόλης 86% (αναλογία 1:2) και μεταφέρονται σε κρυοφιαλίδια των 2 ml. Ακολουθεί μεταφορά και αποθήκευση στους -80 °C.

2.2.5 Παρασκευή Πλασμιδιακού DNA σε Μικρή Κλίμακα (mini prep)

Για την απομόνωση DNA σε μικρή κλίμακα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων [106]. Βασική αρχή της μεθόδου αποτελεί η χρήση αλκαλικού διαλύματος το οποίο λύει τα κύτταρα, ενώ το υψηλό pH προκαλεί αποικοδόμηση του

RNA. Επίσης, οι αλκαλικές συνθήκες επιδρούν και στη δομή του DNA, αποδιατάσσοντάς το. Επειδή το χρωμοσωμικό DNA είναι πολύ μεγάλο σε μέγεθος, όταν λύνονται τα κύτταρα, σπάει, ενώ το μικρού μεγέθους πλασμιδιακό DNA παραμένει ανέπαφο.

- Μετασχηματισμένες βακτηριακές αποικίες, μεταφέρονται σε αποστειρωμένα σωληνάρια που περιέχουν 3 ml υγρού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση στους 37°C.
- Την επόμενη ημέρα 1 ml βακτηριακής καλλιέργειας τοποθετείται σε φιαλίδιο του 1.5 ml και φυγοκεντρείται στα 14.000 rpm για 30 δευτερόλεπτα.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 300 μl διαλύματος επαναιώρησης, όπου περιέχεται RNase, ώστε να καταστραφεί το RNA, με τη βοήθεια ηλεκτρικού αναδευτήρα (vortex).
- Ακολουθεί προσθήκη 300 μl του αλκαλικού διαλύματος λύσης, το οποίο περιέχει NaOH και SDS, ήπια ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται
- 300 μl διαλύματος εξουδετέρωσης το οποίο περιέχει οξικό κάλιο, για την επαναφορά του pH στο ουδέτερο και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο, ώστε να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες.
- Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση 14.000 rpm για 20 λεπτά στους 4 °C.
- Μετά τη φυγοκέντρηση, 700μl του υπερκειμένου μεταφέρονται σε νέο φιαλίδιο και προστίθενται 490 μl ισοπροπανόλης (*2-Propanol*). Τα διαλύματα αναμιγνύονται και φυγοκεντρούνται στις 14.000 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τελικώς, το ίζημα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA εκπλένεται σε 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε 30- 50 μl H₂O ή διάλυμα TE.
- Το πλασμιδιακό DNA φυλάσσεται στους -20 °C.

2.2.6 Παρασκευή Πλασμιδιακού DNA σε Μεγάλη Κλίμακα

Για την παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoBond Xtra Midi (*Macherey- Nagel*, #740410) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πρωτόκολλο στηρίζεται στην μέθοδο της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων.

2.2.7 Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, αποτελεί μια πολύτιμη αναλυτική μέθοδο κατά την οποία καθίσταται εφικτός ο διαχωρισμός τμημάτων DNA, με βάση το μέγεθός τους. Η πηκτή αγαρόζης, αποτελείται από ένα πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών οι αλυσίδες των οποίων, κατά το σχηματισμό της πηκτής, σχηματίζουν πόρους. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η μεγάλη συγκέντρωση αγαρόζης, επιτρέπει την ευκολότερη ροή μικρών νουκλεϊκών οξέων, και το αντίθετο. Για την ανάλυση του DNA είναι απαραίτητη η εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης. Το DNA σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα είναι φορτισμένο αρνητικά λόγω των φωσφορικών ομάδων. Έτσι καθίσταται δυνατή η μετακίνησή του προς την άνοδο. Επειδή το πήκτωμα, εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μεγέθους, διαχωρίζονται σε ζώνες και γίνονται ορατά με βρωμιούχο αιθίδιο κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

- Για την παρασκευή 1% πηκτής αγαρόζης, 1gr αγαρόζης (*Thermo Fisher Scientific*, #16500500) διαλύεται σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x.
- Ακολουθεί βρασμός στους 100 °C, μέχρι τη δημιουργία ομοιογενούς διαλύματος. Στο διάλυμα προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο συγκέντρωσης 1 µg/ml και αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για να πήξει.
- Για να είναι εφικτή η ηλεκτροφόρηση των εκάστοτε δειγμάτων είναι απαραίτητη η ανάμιξη τους με διάλυμα φόρτωσης 4X, καθώς και η εμφύσηση της πηκτής στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X.

2.2.8 Απομόνωση Τμημάτων DNA από Πηκτή Αγαρόζης

Για την απομόνωση τμημάτων DNA, το ως προς διαχωρισμό δείγμα ηλεκτοφορείται σε πηκτή αγαρόζης συνοδευόμενο από μάρτυρα τμημάτων DNA γνωστού μοριακού βάρους (*Nippon Genetics*, #MWD100). Κάτω από το υπεριώδες φως, με τη βοήθεια νυστεριού αποκόπτεται το τμήμα της πηκτής που περιέχει το DNA που μας ενδιαφέρει. Για τον καθαρισμό των τμημάτων DNA, χρησιμοποιήθηκε το πακέτο PCR Clean-up / Gel extraction (*Macherey Nagel*, #740609) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.9 Αντίδραση Klenow

Απο τις περισσότερες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, προκύπτουν κολλώδη άκρα. Τα άκρα αυτά, πολλές φορές δεν είναι συμβατά για τη δημιουργία αντιδράσεων σύνδεσης διαφόρων τμημάτων DNA. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται η μεγάλη υπομονάδα του συμπλόκου της DNA πολυμεράσης I [107], Klenow. Η πρωτεΐνη Klenow, διατηρεί την 5'-3' πολυμεριστική της ενεργότητα, καθώς και την 3'-5' ενεργότητα εξωνουκλεάσης. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων της είναι ικανή να δημιουργεί τυφλά άκρα σε τμήματα DNA (*blunt ends*).

Για την αντίδραση Klenow (*NEB, # M0210S*), χρησιμοποιήθηκε 1 unit ενζύμου για κάθε μg DNA και 10nM dNTPs. Η αντίδραση επωάζεται στους 25 °C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια το ένζυμο αδρανοποιείται προσθέτοντας 10mM EDTA και επωάζοντας στους 72 °C για 20 λεπτά.

2.2.10 Αντίδραση Αποφωσφορυλίωσης

Η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης των άκρων των διαφόρων τμημάτων DNA πραγματοποιείται από το ένζυμο ανταρκτική φωσφατάση. Η χρήση της κρίνεται απαραίτητη κατά τις διαδικασίες δημιουργίας υβριδικών πλασμιδίων. Το ένζυμο χρησιμοποιείται για να αφαιρέσει τις 5' φωσφορικές ομάδες από τους επεξεργασμένους με περιοριστικές ενδονουκλεάσες πλασμιδιακούς φορείς. Με τη διαδικασία αυτή, περιορίζεται η επανασύνδεση των φορέων που δεν έχουν λάβει το ένθεμα, στις αντιδράσεις σύνδεσης.

Για την αντίδραση αποφωσφορυλίωσης των άκρων (*NEB, #M289S*), χρησιμοποιήθηκε 1 unit ενζύμου για κάθε μg DNA σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολούθησε επώαση της αντίδρασης στους 37 °C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια το ένζυμο αδρανοποιήθηκε επωάζοντας στους 80 °C για 2 λεπτά.

2.2.11 Αντίδραση Ένθεσης

Η αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA πραγματοποιείται με το ένζυμο T4 DNA λιγάση. Η T4 DNA λιγάση χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ATP, καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού, μεταξύ της 3' υδροξυλικής ομάδας ενός άκρου DNA και της 5' φωσφορικής ομάδας ενός άλλου.

Για την αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε 1μl T4 DNA λιγάσης (NEB, #M0202S). Η αντίδραση ένθεσης γίνεται σε τελικό όγκο 10μl και τελική συγκέντρωση DNA 10ng/μl. Η αναλογία μαζών φορέα- ενθέματος υπολογίζεται βάσει της ακόλουθης εξίσωσης:

$$\text{Μάζα ένθεσης (}\mu\text{g)} = 5 \times \text{μάζα φορέα} \times \text{μέγεθος ένθεσης (}\zeta.\beta\text{)} / \text{μέγεθος φορέα (}\zeta.\beta\text{.)}$$

Για τις αντιδράσεις σύνδεσης με τυφλά άκρα πραγματοποιήθηκε επώαση της αντίδρασης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια για 12-16 ώρες στους 16 °C ενώ για τις αντιδράσεις με κολλώδη άκρα, η αντίδραση επώαστηκε στους 16 °C για 2- 16 ώρες.

2.2.12 Αντίδραση Περιοριστικής Πέψης

Η αντίδραση της περιοριστική πέψης γίνεται μέσω των ενζύμων περιορισμού. 4-5 Units ενζύμου είναι ικανά να πέψουν ~1μg DNA σε χρονικό διάστημα μίας ώρας. Η τελική συγκέντρωση του DNA της περιοριστικής αντίδρασης θα πρέπει να είναι 100-200 ng/ μl.

2.2.13 Δημιουργία Πλασμιδιακών Κατασκευών

2.2.13.1 Παρασκευή *miRNAs*

Οι αλληλουχίες των *miRNAs* σχεδιάστηκαν μέσω του Block-iT™ *miR RNAi Select* (Thermo Fisher Scientific). Η διαδικασία της κατασκευής των πλασμιδιακών φορέων που θα μπορούν να εκφράσουν τα σύνθετα *miRNAs* είναι η ακόλουθη:

- Επεξεργασία της ένθεσης
 1. Υβριδοποίηση των ολογονουκλεοτιδίων

Η υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων γίνεται με 60 pmol κωδικού ολογονουκλεοτιδίου και 60pmol από το αντικωδικό, σε τελικό όγκο 50 μl για κάθε *miRNA* ξεχωριστά, με τη βοήθεια ενός διαλύματος υβριδοποίησης στις ακόλουθες συνθήκες.

Διάλυμα υβριδοποίησης (annealing buffer)

100mM K-Acetate

30mM Hepes pH 7,4 with KOH

2mM Mg-Acetate

Συνθήκες αντίδρασης PCR

95°C, 5min

70°C, 10min

70°C to 4°C: 0,1°C/min decrease

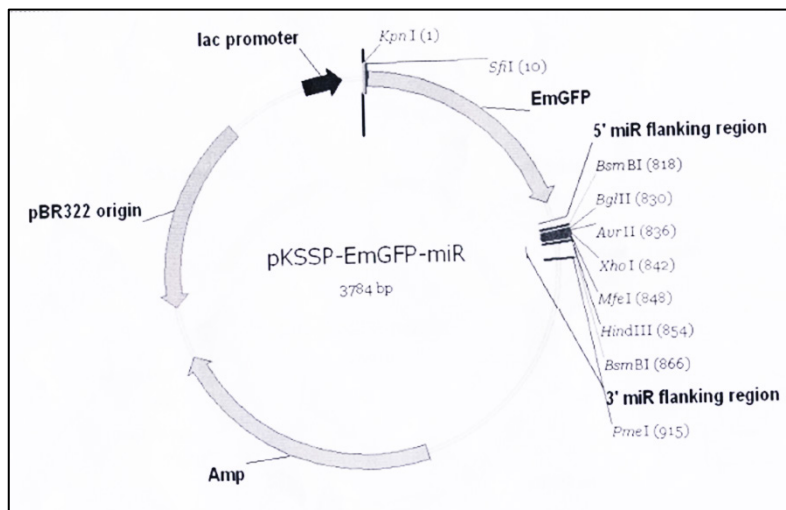
(storage: -20°C, defreeze at RT)

2. Φωσφορυλίωση των άκρων

Τα άκρα των miRNAs φωσφορυλιώνονται μέσω της αντίδρασης με το ένζυμο T4 πρωτεϊνικής κινάσης (T4 PNK, NEB), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

- Επεξεργασία του φορέα

1. Ενζυμική πέψη του φορέα με pKSSP-EmGFP-miR (**Εικόνα 22**) με το ένζυμο BsmBI. 3-5μg του πλασμιδίου πέπτονται με 20 Units ενζύμου σε τελικό όγκο 50μl και επωάζονται για 2-3ώρες στους 55°C.
2. Αποφωσφορυλίωση των άκρων με το ένζυμο ανταρκτική φωσφατάση (Antarctic Phosphatase, NEB), προσθέτοντας στην αντίδραση της περιοριστικής πέψης 1μl ενζύμου και 5,5μl ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου, επωάζοντας 15-30 λεπτά στους 37°C.
3. Η αντίδραση αδρανοποιείται στους 65°C για 5 λεπτά.



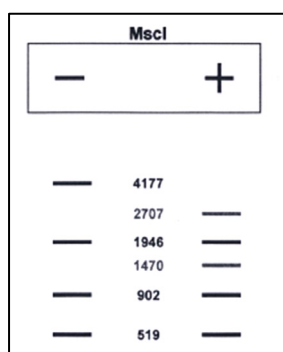
Εικόνα 22: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pKSSP-EmGFP-miR

4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και απομόνωση και καθαρισμός της ζώνης του φορέα.
- Αντίδραση ένθεσης

Υπολογίζουμε την ποσότητα της ένθεσης βάσει της εξίσωσης που ήδη περιγράψαμε, χρησιμοποιώντας 50ng φορέα (3736 ζ.β), 3.95ng (59 ζ.β.) ένθεσης, 1μl λιγάσης και 1μl διαλύματος του ενζύμου, σε τελικό όγκο 10μl.

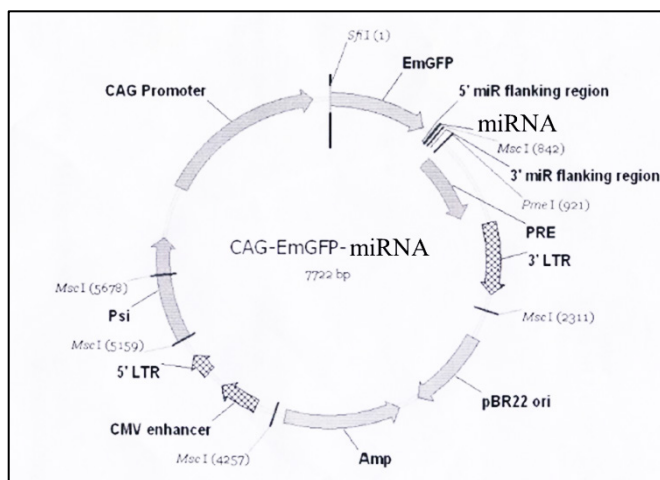
Η αντίδραση επώζεται για 1h σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια αφήνεται στους 4°C μέχρι την επόμενη ημέρα.

- Χημικός Μετασχηματισμός με τη μέθοδο που περιγράφηκε.
- Περιοριστικές πέψεις με το ένζυμο MscI. Δεδομένου ότι το μέγεθος των miRNAs είναι σχεδόν πάντα ίδιο, στη μέθοδο που ακολουθούμε, περιμένουμε τα αντίστοιχα πρότυπα ζωνών, ύστερα από ηλεκτροφόρηση των περιοριστικών πέψεων (**Εικόνα 23**).



Εικόνα 23: Πρότυπο ζωνών θετικών και αρνητικών κλώνων ύστερα από πέψη με το ένζυμο MscI.

- Υποκλωνοποίηση στο πλασμιδιακό και ιικό φορέα CAG-IRES-GFP
1. Περιοριστικές πέψεις του φορέα pKSSP-EmGFP-miRNA και του CAG-IRES-GFP με τα ένζυμα PmeI και SfiI (**Εικόνα 24**). Η ένθεση απομονώνεται με καθαρισμό από πηκτική αгарόζης ώστε να συνδεθεί στον δεύτερο φορέα.
 2. Αντίδραση ένθεσης βάσει της εξίσωσης που περιγράφηκε παραπάνω (2.2.11).



Εικόνα 24: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα CAG-EmGFP- miRNA

2.3 Μέθοδοι Μοριακοί Βιολογίας

2.3.1 Απομόνωση Γενωμικού Δεοξυριβονουκλεϊνικού Οξέος, (DNA)

1. Αρχικά τα κύτταρα εκπλένονται με ισοτονικό διάλυμα (PBS) και προστίθεται 350 μ l διαλύματος λύσης (10 mM Tris pH 7.5, 0.1M EDTA pH8, 0.5% SDS, 0.2 mg/ml RNase A) για κάθε 10^7 κύτταρα. Με τη βοήθεια κομμένου μπλε τιπ, τα κύτταρα συλλέγονται και επωάζονται για μία ώρα στους 37 °C.
2. Ακολουθεί προσθήκη πρωτεϊνάσης K (15 mg/ml) και επώαση για μία ώρα στους 55 °C.
3. Στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης, το σωληνάριο ανακινείται με ρυθμό 1/8 για 30 sec και φυγοκεντρείται για 3 min στο μέγιστο των στροφών.
4. Η πάνω φάση συλλέγεται, προσεκτικά, προστίθεται σ' αυτή ίσος όγκος χλωροφορμίου, ανακινείται με ρυθμό 1/8 και φυγοκεντρείται.
5. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης, η πάνω φάση συλλέγεται και προστίθεται 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M και 2 όγκοι 100% αιθανόλη. Στο σημείο αυτό είναι δυνατή η παρατήρηση του γενωμικού DNA, με γυμνό μάτι.
6. Το σωληνάριο τοποθετείται για 1 ώρα στους -80 °C.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 min στο μέγιστο των στροφών και απόχυση του υπερκειμένου.
8. Το ίζημα, που περιέχει το γενωμικό DNA, εκπλένεται με 70% αιθανόλη
9. Φυγοκεντρηση για 3 λεπτά
10. Αφύγρανση της πελέττα για 7-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
11. Επαναδιαλυτοποίηση σε διάλυμα Tris-EDTA (TE). Αρχικά προθέτουμε 30 μ l TE και ανά 5-10 λεπτά συνεχίζουμε να προσθέτουμε επιπλέον TE ώστε το DNA να ενυδατωθεί κατά το δυνατόν καλύτερα. Ο συνολικός όγκος TE που προστίθεται εξαρτάται κάθε φορά από την ποσότητα του DNA και πρέπει να είναι τέτοιος ώστε το DNA να πιπετάρεται, κάτι που σημαίνει ότι έχει και επαδιαλυτοποιηθεί. Για την καλύτερη επαναδιαλυτοποίηση το DNA αφήνεται ολονύκτια στους 4°C.
12. Το καθαρό απομονωμένο γενωμικό DNA, ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αгарόζης 0.8% στα 50V, ποσοτικοποιείται και φυλάσσεται στους -20 °C.

2.3.2 Καθαρισμός του DNA με τους Οργανικούς Διαλύτες Φαινόλη και Χλωροφόρμιο

Το πρωτόκολλο καθαρισμού του γενωμικού DNA με τους οργανικούς διαλύτες φαινόλη - χλωροφόρμιο περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Αρχικά προστίθεται ίσος όγκος με το ομογενοποίημα φαινόλης και αναμιγνύονται με αργό ρυθμό έως ότου δημιουργηθούν τρεις φάσεις. Η πάνω φάση είναι υδάτινη (πολική) και περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα, η ενδιάμεση περιέχει τις πρωτεΐνες και η κάτω φάση η οργανική περιέχει τα λιπίδια. Οι πρωτεΐνες βρίσκονται στην ενδιάμεση φάση καθώς αποτελούνται και από υδρόφοβες και από υδρόφιλες περιοχές.
2. Φυγοκέντρηση στο μέγιστο των στροφών για 3min.
3. Αφαιρείται η υδατική φάση. Προστίθεται σε αυτή ίση ποσότητα χλωροφορμίου και αναμιγνύονται με αργό ρυθμό. Το χλωροφόρμιο (χλωροφόρμιο / ισοαμυλική αλκοόλη 24:1) απομακρύνει επιπλέον τα λιπίδια και τη φαινόλη από την υδάτινη φάση και μετουσιώνει τις πρωτεΐνες.
4. Φυγοκέντρηση στο μέγιστο των στροφών για 2min.
5. Απομακρύνεται η πάνω φάση και προστίθενται 1/10 του όγκου CH_3COONa και δύο όγκοι του συνολικού απόλυτη αιθανόλη. Ακολουθεί ήπια ανάδευση.
6. Το δείγμα μεταφέρεται στο -80°C / 1hr ή εναλλακτικά -20°C / overnight.
7. Φυγοκέντρηση στο μέγιστο των στροφών για 10min.
8. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται ίσος όγκος αιθανόλης 70%.
9. Φυγοκέντρηση στο μέγιστο των στροφών για 3min.
10. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση για μερικά sec. Με τη βοήθεια ενός tip απομακρύνεται εναπομείνασα αιθανόλη.
11. Στέγνωμα ιζήματος στον πάγκο για 7min.
12. Διαλυτοποίηση σε κατάλληλο όγκο H_2O ή TE (10mM Tris $-\text{Cl}$ pH 8.0, 1mM EDTA)

2.3.3 Απομόνωση Ολικού Ριβονουκλεϊκού Οξέος (RNA) από Ευκαρυωτικά Κύτταρα

Η απομόνωση του ολικού RNA από τα ευκαρυωτικά κύτταρα μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους. Κοινό χαρακτηριστικό για όλες τις μεθόδους είναι η ιδιαίτερη προσοχή που θα πρέπει να διατηρηθεί προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση του RNA με αποδιατακτικά ένζυμα, όπως είναι οι ριβονουκλεάσες (RNases) τόσο κατά τη διάρκεια της απομόνωσης αλλά και μετά το πέρας αυτής. Γι' αυτό το λόγο όλη η διαδικασία θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε περιβάλλον όπου ακολουθούνται όλες οι μικροβιολογικές ασηπτικές τεχνικές και χρησιμοποιείται ειδικός πλαστικός εξοπλισμός που είναι απαλλαγμένος από RNases. Η απομόνωση του RNA στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο εκχύλισης μέσω του συνδυασμού: θειοκυανικό γουανιδίνιο – φαινόλη – χλωροφόρμιο. Το θειοκυανικό γουανιδίνιο και η φαινόλη περιέχονται στο διάλυμα Trizol. Το πρωτόκολλο απομόνωσης RNA με τη μέθοδο Trizol, από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε πιάτο 10cm, είναι το ακόλουθο (<https://tools.thermofisher.com>):

1. 1ml διαλύματος Trizol προστίθεται στα κύτταρα του πιάτου κυτταροκαλλιέργειας (αφού έχει απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό) ή στο ίζημα των κυττάρων (αφού έχει προηγηθεί φυγοκέντρηση).
2. Τα κύτταρα με το Trizol συλλέγονται σε φιαλίδιο τύπου erpendorf και σε αυτό το στάδιο μπορούν να φυλαχθούν στους -80°C . Ειδάλλως, ακολουθεί θραύση των κυτταρικών μεμβρανών μέσω έντονης ανάδευσης (15 φορές) με τη χρήση σύριγγας ινσουλίνης (1ml).
3. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προστίθενται 200μl χλωροφορμίου και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με το χέρι για 15sec.
5. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στα 12000g/ 15min/ 4°C . Μετά τη φυγοκέντρηση προκύπτει ένα μείγμα τριών φάσεων: η πάνω φάση (υδατική) περιλαμβάνει τα νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA), η μεσόφαση περικλείει κυρίως πρωτεΐνες και η κάτω φάση (οργανική) περιέχει μεμβρανικά θραύσματα, λιπίδια, πολυσακχαρίτες και θραύσματα οργανιδίων.

7. Η πάνω φάση, που περιέχει το RNA, μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο, προστίθενται 200μl ισοπροπανόλης και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με το χέρι για 15sec.
8. Ακολουθεί επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτό το στάδιο το RNA κατακρημνίζεται λόγω βαρύτητας και αδιαλυτότητας στην ισοπροπανόλη.
9. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στα 12000g/ 10min/ 4°C.
10. Ακολουθεί πλύση του ιζήματος με 1ml διαλύματος 75% υπερκάθαρης αιθανόλης. Το ίζημα σε αυτό το στάδιο παραμένει ορατό καθώς δεν διαλυτοποιείται παρουσία αιθανόλης.
11. Το RNA φυγοκεντρείται στα 7500g/ 5min/ 4°C.
12. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ακολουθεί ακόμα μια φυγοκέντρωση για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων αιθανόλης.
13. Τα φιαλίδια με το RNA αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου με ανοικτά τα καπάκια για 5 - 10min. Σε αυτό το στάδιο απαιτείται προσοχή καθώς πρώτον, το RNA θα πρέπει να παραμείνει σε περιβάλλον καθαρό από RNases και δεύτερον, δεν θα πρέπει να ξεπεραστεί το διάστημα των 10min καθώς υπάρχει κίνδυνος να ξεραθεί το RNA και να μην επαναδιαλύεται στη συνέχεια.
14. Τέλος, το RNA επαναδιαλύεται σε 30μl H₂O και φυλάσσεται στους -20°C για σύντομο χρονικό διάστημα ή στους -80°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι για τα πιάτα διαφορετικής διαμέτρου οι ποσότητες των αντιδραστηρίων προσαρμόζονται ανάλογα.

2.3.4 Καθαρισμός του Απομονωμένου RNA από το DNA

Μια διαδικασία η οποία είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση της καθαρότητας του απομονωμένου RNA είναι η απομάκρυνση τυχόν επιμολύνσεων με γενωμικό DNA. Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει την κατεργασία του RNA με δεοξυριβονουκλεάση (DNase), ένα ένζυμο το οποίο αποικοδομεί το DNA καθώς καταλύει τη διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το RQ1 RNase-Free DNase kit της εταιρίας Promega και η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

1. Αναμειγνύονται τα συστατικά της αντίδρασης:

Αντιδραστήριο	Όγκος
RNA	1-8μl (1,5μg)
Ρυθμιστικό διάλυμα της DNase, 10x(απαλλαγμένο από RNases)	1μl
DNase (απαλλαγμένη από RNases)	1μl
H ₂ O (απαλλαγμένο από RNases)	0-7μl
Τελικός όγκος	10μl

2. Ακολουθεί επώαση του μείγματος στους 37 °C για 30min, όπου δρα η DNase.
3. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 1μl διαλύματος STOP, το οποίο απενεργοποιεί τη δράση της DNase.
4. Επώαση του μείγματος στους 65 °C για 10min, όπου δρα το διάλυμα STOP και αποθήκευση του RNA προσωρινά στους -20 °C ή απευθείας μετατροπή σε cDNA

2.3.5 Προετοιμασία Δειγμάτων για Αλληλούχιση RNA (RNA sequencing)

10-12 μg ολικού RNA κατακριμνίστηκαν με 1/10 του όγκου CH₃COONa και 2.5x όγκους (του συνολικού) απόλυτης αιθανόλης και στάλθηκαν προς αλληλούχιση.

Τα RNAs αλληλουχίστηκαν και η ανάλυση έγινε όπως περιγράφεται από τους *Moulos P. and Hantzis P.* [208].

2.3.6 Αντίστροφη Μεταγραφή

Κατά την αντίδραση της Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription), ένα μονόκλωνο RNA μετατρέπεται στο συμπληρωματικό του μονόκλωνο DNA (complementary DNA - cDNA), με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase). Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μια RNA κατευθυνόμενη DNA πολυμεράση η οποία χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο μια αλυσίδα RNA συνθέτει τη συμπληρωματική της αλυσίδα cDNA. Παρουσία ενός εκκινητή που περιέχει την αλληλουχία ολιγο-dT, η αντίστροφη μεταγραφάση μπορεί να συνθέσει ειδικό cDNA, από mRNA, καθώς ο εκκινητής αυτός σχηματίζει ζεύγη βάσεων με την αλληλουχία

πολύ-A που βρίσκεται στο 3' άκρο των ευκαρυωτικών μορίων mRNA. Το 3' άκρο που σχηματίστηκε δημιουργεί μια δομή φουρκέτας και εκκινεί τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA [207]. Στη συγκεκριμένη μελέτη η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια της εταιρίας Thermo Scientific. Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι η ακόλουθη:

1. Προσθήκη των τριών πρώτων συστατικών για κάθε δείγμα (Τελικός όγκος 13μl).

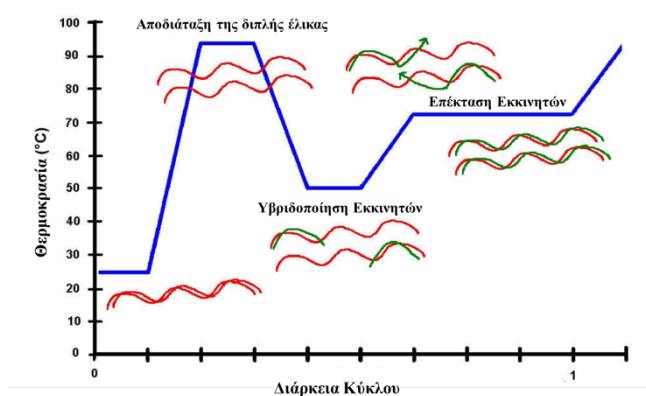
dH ₂ O (απαλλαγμένο από νουκλεάσες)	0-8μl
Εκκινητής (primer) OligodT (5μM)	1μl
RNA (0.75 μg/αντίδραση)	1-12μl
2. Ανάδευση (8-10 φορές) και μεταφορά σε πάγο.
3. Επώαση των αντιδράσεων για 5min στους 65°C και 2min στον πάγο.
4. Προετοιμασία του Master Mix της αντίδρασης στον πάγο (Τελικός όγκος 7μl/αντίδραση).

dH ₂ O (απαλλαγμένο από νουκλεάσες)	1μl
Μείγμα dNTPs (10mM το καθένα)	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα 5x (Reaction Buffer buffer)	4μl
Αναστολέας των RNases (RiboLock RNase Inhibitor - 20U)	0.5μl
Αντίστροφη μεταγραφάση (RevertAid RT - 100U)	0.5μl
5. Ανάδευση 12-15 φορές.
6. Από το Master Mix μεταφέρονται 7μl σε κάθε αντίδραση.
7. Επώαση των αντιδράσεων στους 50 °C για 30min.
8. Απενεργοποίηση των ενζύμων με επώαση στους 85 °C για 5min και άμεση μεταφορά σε πάγο.
9. Φύλαξη στους -20 °C.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αντιδράσεις μετατροπής του RNA σε cDNA έγιναν εις διπλούν για το κάθε δείγμα. Η μια ήταν η κανονική και η άλλη που ονομάζεται no RT ή –RT περιελάμβανε όλα τα συστατικά της αντίδρασης (μαζί με το RNA), χωρίς όμως την αντίστροφη μεταγραφάση. Αυτό το δείγμα αποτελεί το αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control) της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής καθώς εάν υπάρχει χρωμοσωμικό DNA στο RNA θα φανεί και εκεί προϊόν μετά την αντίδραση PCR.

2.3.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis και τους συνεργάτες του στα μέσα του 1980, για την οποία ο Kary Mullis βραβεύτηκε το 1993 με το βραβείο Nobel στη Χημεία [209]. Με την απλή PCR, μια συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενισχύεται με συγκεκριμένα πριμοδοτικά μόρια και με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης. Η PCR αποτελείται από διάφορα θερμικά στάδια. Στο πρώτο στάδιο το προς ενίσχυση DNA μετουσιώνεται, στο δεύτερο στάδιο τα πριμοδοτικά μόρια (εκκινητές) ενώνονται με τις μονόκλωνες συμπληρωματικές τους αλυσίδες DNA (την νοηματική και την αντινοηματική αλυσίδα) και στο τρίτο στάδιο η DNA πολυμεράση συνθέτει μια καινούργια μονόκλωνη αλυσίδα από κάθε εκκινητή χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την προς ενίσχυση αλυσίδα (**Εικόνα 25**).



Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση ενός κύκλου PCR. (Προσαρμογή και Τροποποίηση από <https://biosistemika.com/blog/qpcr-technology-basics/>).

Η σύνθεση γίνεται προς την κατεύθυνση 5'→3' και οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες χρησιμεύουν ως εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο. Θεωρητικά, το DNA ενισχύεται μέσω PCR 2ⁿ φορές μετά από n κύκλους [210]. Το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει το DNA εκμαγείο, τους εκκινητές, dNTPs, DNA πολυμεράση, MgCl₂ και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου.

2.3.7.1 Σχεδιασμός Εκκινητών

Τα κριτήρια βάσει των οποίων σχεδιάζονται οι εκκινητές είναι τα ακόλουθα:

- Αριθμός νουκλεοτιδίων >16 και < 22 (ιδανικό 20-22 νουκλεοτίδια).
- Περιεκτικότητα σε βάσεις GC : 40-60%
- Να μην υπάρχει συμπληρωματικότητα μεταξύ των εκκινητών
- Να μην υπάρχουν διαδοχικά νουκλεοτίδια G ή C (ποτέ πάνω από 4), καθώς δημιουργούνται ισχυροί δεσμοί υδρογόνου.
- Προτιμάται, στο 3' άκρο των εκκινητών να υπάρχουν GC για να μην «αναπνέουν» τα άκρα.
- Οι δύο εκκινητές πρέπει να έχουν παραπλήσιες θερμοκρασίες τήξης (T_m) η οποία υπολογίζεται βάσει του ακόλουθου τύπου:

$$T_m = 81,5 + 16,6(\log 0,053) + 0,41 (GC\%) - 500/n$$

όπου n ο αριθμός νουκλεοτιδίων και GC % το ποσοστό της περιεκτικότητας της αλληλουχίας σε γουανίνη-κυτοσίνη.

Η θερμοκρασία τήξης των δύο εκκινητών καθορίζει τη θερμοκρασία υβριδοποίησης (annealing) της αντίδρασης.

-Μέγεθος ενισχυόμενου τμήματος: 200- 400 ζ.β. Για PCR πραγματικού χρόνου το μέγεθος του αμπλικονίου δε θα πρέπει να υπερβαίνει τα 200 ζ.β.

-Οι εκκινητές προτιμάται να σχεδιάζονται σε διαφορετικά εξόνια (τουλάχιστον ένα ιντρόνιο διαφορά)

2.3.7.2 Σύσταση Μίγματος Αντίδρασης και Πρόγραμμα στο Θερμοκυκλοποιητή για τα Διάφορα Ζεύγη Εκκινητών

Το χρησιμοποιούμενο πρόγραμμα στον θερμοκυκλοποιητή αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

1. Αρχική μετουσίωση του DNA στους 95 °C για 3min.
2. 30 -35 κύκλους αποτελούμενους από τρία βήματα ο καθένας:
 - i. μετουσίωση -αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA στους 95 °C/ 30sec
 - ii. υβριδοποίηση των εκκινητών στους $T_m -5$ °C/ 30sec
 - iii. επιμήκυνση- επέκταση των εκκινητών στους 72 °C/ 30sec-2min
3. Τελική επιμήκυνση στους 72 °C/ 10min.

Η σύσταση του μίγματος της αντίδρασης PCR περιγράφεται παρακάτω.

Σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR

Αντιδραστήριο	Όγκος
Υπερκάθαρο H ₂ O	33,4μl
5x buffer με MgCl ₂ (1x)	13μl
dNTPs (0,2 mM)	0,4μl
Εκκινητής Sense (s) (0,4μM)	1μl
Εκκινητής Antisense (a) (0,4μM)	1μl
Εκμαγείο DNA	1μl *
Taq DNA Polymerase (1U)	0,2μl
Τελικός όγκος	50μl

* Οι χρησιμοποιούμενοι όγκοι αντιστοιχούν σε ποσότητα 37,5ng.

2.3.7.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Q-PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου, μπορεί να ονομαστεί και ποσοτική PCR (Q-PCR/qPCR/qrt-PCR). Οι περιορισμοί που έθετε η απλή PCR κάμφθηκαν το 1992 με την ανάπτυξη της Q-PCR από τον Higuchi και τους συνεργάτες του. Από την ανακάλυψή της μέχρι και σήμερα, η PCR έχει γνωρίσει μεγάλη άνθιση αλλά και βελτίωση με την Q-PCR.

Στην απλή PCR μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ακολουθεί η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στην Q-PCR όμως, η ποσότητα του προϊόντος που σχηματίζεται ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια της πορείας της αντίδρασης. Πρόκειται δηλαδή για μια τεχνική στην οποία γίνεται συλλογή πληροφοριών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της PCR, και έτσι συνδυάζει τον πολλαπλασιασμό και την ανίχνευση σε ένα στάδιο. Οι πραγματικού χρόνου αντιδράσεις εκτελούνται σε θερμοκυκλοποιητή ο οποίος επιτρέπει τη μέτρηση των επιπέδων φθορισμού ενός μορίου-ανιχνευτή. Αυτό επιτυγχάνεται με την αξιοποίηση ειδικών χημικών αντιδραστηρίων τα οποία φθορίζουν ανάλογα με τη συγκέντρωση του PCR προϊόντος. Επειδή οι επιθυμητές αλληλουχίες ανιχνεύονται καθώς πολλαπλασιάζονται δεν χρειάζεται να αφαιρεθούν ποσότητες του προϊόντος κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

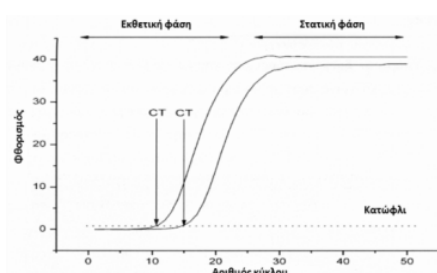
Αντί για αυτό, το μηχάνημα απεικονίζει το ρυθμό της συσσώρευσης του πολλαπλασιαζόμενου DNA καθώς η αντίδραση εξελίσσεται. Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική συγκέντρωση των προς πολλαπλασιασμό αλληλουχιών στο μίγμα της αντίδρασης τόσο λιγότεροι είναι οι κύκλοι που απαιτούνται για να επιτευχθεί μια συγκεκριμένη παραγωγή του πολλαπλασιαζόμενου προϊόντος [206]. Για την κατανόηση της τεχνικής Q-PCR πρέπει να γίνει αναφορά στην τιμή Ct και στις φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται.

2.3.7.4 Η Τιμή Ct (threshold cycle – το κατώφλι του κύκλου)

Η βασική πορεία σε μια PCR μπορεί να διακριθεί σε τρεις φάσεις:

- Εκθετική φάση: Συμβαίνει ο διπλασιασμός του προϊόντος σε κάθε κύκλο (υποθέτουμε 100% απόδοση σε κάθε προϊόν). Η αντίδραση είναι πολύ ειδική και ακριβής.
- Γραμμική φάση (Υψηλή Μεταβλητότητα): Τα αντιδρώντα συστατικά αρχίζουν να καταναλώνονται, η αντίδραση επιβραδύνεται, πλησιάζοντας στη φάση κορεσμού και δεν λαμβάνονται πλέον τα επιθυμητά προϊόντα.
- Στατική φάση (Τελικό-Σημείο): Χρήση της πηκτής αγαρόζης για παραδοσιακές μεθόδους: Η αντίδραση έχει παύσει και δεν παράγονται άλλα προϊόντα.

Στα αρχικά στάδια των κύκλων το σήμα είναι ασθενές και δεν μπορεί να καταγραφεί (είναι μικρότερο του υποβάθρου, δηλαδή του ορίου ανίχνευσης).



Εικόνα 26: Γραφικές παραστάσεις στις οποίες εικονίζεται το κατώφλι του κύκλου στην αρχή της εκθετικής φάσης.

Καθώς η ποσότητα του προϊόντος αυξάνεται, η ανίχνευση του σήματος εξελίσσεται εκθετικά. Σταδιακά όμως, παύει να αυξάνεται άλλο και έτσι έχουμε κορεσμό (**Εικόνα 26**).

Σε ένα τυπικό πείραμα Q-PCR όλες οι καμπύλες φτάνουν σε κορεσμό στο ίδιο επίπεδο. Έτσι, οι μετρήσεις στο τελικό σημείο (στατική φάση) δεν μας πληροφορούν για τις αρχικές ποσότητες των

μορίων cDNA που θέλουμε να ενισχύσουμε και τα οποία αντιστοιχούν στα επίπεδα RNA που περιέχονται στα δείγματα. Το μόνο που διαχωρίζουν είναι το αρνητικό από το θετικό δείγμα. Ωστόσο, οι καμπύλες των αντιστοίχων δειγμάτων

διαχωρίζονται στη φάση ανάπτυξης της αντίδρασης, γεγονός που αντανακλά τις διαφορετικές αρχικές ποσότητες [209]. Το σημείο του χρόνου ή ο κύκλος όπου ανιχνεύεται για πρώτη φορά το τμήμα που ενισχύεται, ονομάζεται τιμή Ct (threshold cycle). Είναι ο χρόνος στον οποίο η ένταση του φθορισμού είναι μεγαλύτερη από το φθορισμό του υποβάθρου. Συνεπώς, όσο περισσότερη είναι η ποσότητα του DNA-στόχου στο αρχικό υλικό, τόσο γρηγορότερα θα εμφανιστεί μια σημαντική αύξηση του σήματος φθορισμού, που σημαίνει ένα χαμηλό Ct [211].

1. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην Q-PCR

Οι μεταβολές στην συγκέντρωση του DNA ανιχνεύονται με τη χρήση ειδικών μορίων που αλληλεπιδρούν με αυτό και έχουν ιδιότητες φθορισμού. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν φθορίζουσες χρωστικές που εισχωρούν στη διπλή έλικα του DNA. Αυτές οι χρωστικές φθορίζουν λίγο όταν βρίσκονται ελεύθερες στο διάλυμα του δείγματος (μη δεσμευμένες), ενώ αρχίζουν να φθορίζουν έντονα όταν συνδέονται σε διπλή έλικα DNA και εκτίθενται σε ένα κατάλληλο μήκος κύματος φωτός. Έτσι, όσο ο αριθμός των αντιγράφων του DNA αυξάνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, τόσο αυξάνεται και ο φθορισμός [209], [211].

Υπάρχουν διάφορες φθορίζουσες ουσίες όπως BEBO, BOXTO, Eva Green® με πιο γνωστή τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I, η οποία χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια των πειραμάτων μας.

2. Σύσταση μίγματος και συνθήκες της αντίδρασης Q-PCR

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται στην Q-PCR έχουν τελικό όγκο 10 μl και περιέχουν: το προς πολλαπλασιασμό DNA, τους εκκινητές και ποσότητα έτοιμου μίγματος του εμπορίου (KAPA SYBR® FAST qPCR Kit) που περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την τέλεση της αντίδρασης (KAPA SYBR® DNA Polymerase, χρωστική SYBR® Green I, MgCl₂ και dNTPs). Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με υπερκάθαρο H₂O. Η σύσταση του μίγματος και οι συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή αναφέρονται παρακάτω.

Σύσταση μίγματος Q-PCR και πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή:

Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή

95°C για 3min

95°C για 10sec (αποδιάταξη του DNA)

60°C για 1min (υβριδισμός των εκκινητών στο DNA)

Ανάγνωση της πλακέτας

Επανάληψη των σταδίων 2 έως 4 για 40 κύκλους

Δημιουργία καμπύλης τήξης από 50°C έως 90 °C με ανάγνωση 0,5 °C κάθε 5sec

Για την παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ειδικός θερμοκυκλοποιητής για QPCR.

Σύσταση μίγματος αντίδρασης

1 – 4,8μl DNA (<10 ng)

0,1 μl απ' τον εκκινητή Sense (200 nM)

0,1 μl απ' τον εκκινητή Antisense (200 nM)

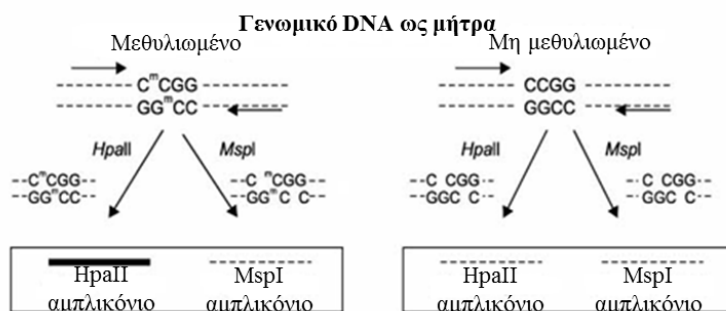
5 μl του έτοιμου μίγματος αντιδραστηρίων που περιέχουν και τη χρωστική SYBR Green I

0 – 3,8μl ddH₂O

Τελικός όγκος: 10 μl

2.3.8 Ανάλυση του Προτύπου Μεθυλίωσης

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην διαφορετική ευαισθησία, ως προς τη μεθυλίωση, δύο ενζύμων που αναγνωρίζουν και πέπτουν την ίδια αλληλουχία στο DNA (CCGG): το μεν ένζυμο HpaII είναι ευαίσθητο στη μεθυλίωση, το δε MspI δεν είναι. Όταν η/οι κυτοσίνη/ες των συγκεκριμένων αλληλουχιών αναγνώρισης είναι μεθυλιωμένη/ες, τότε το HpaII ένζυμο αδυνατεί να πέψει το DNA, ενώ το MspI πέπτει αναξάρτητα από το αν είναι μεθυλιωμένο ή όχι. Έτσι εάν ακολουθήσει PCR για την/τις περιοχή/ες εντός της/των οποίας/ων εντοπίζονται τέτοιες περιοριστικές θέσεις, η ενίσχυση προϊόντος αποδुकνεύει ότι η συγκεκριμένη περιοχή είναι μεθυλιωμένη, ενώ αντίθετα αν δεν ενισχυθεί προϊόν τότε το DNA δεν είναι μεθυλιωμένο (**Εικόνα 27**).



Εικόνα 27: Αρχή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των προτύπων μεθυλίωσης (Προσαρμογή και τροποποίηση από Kwon M. H. et.al [212]).

Για την ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης, γενωμικό DNA απομονώνεται με τη μέθοδο φαινόλης/ χλωροφορμίου, από κύτταρα. 1μg γενωμικού DNA πέπτεται με τα ένζυμα HpaII και MspI σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή EpiJET DNA Methylation Analysis Kit (*Thermo Scientific #1441*). Ακολουθείται καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο και επαναδιάλυση του DNA σε 10μl TE. Τέλος, με PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές των περιοχών ενδιαφέροντος (Υλικά, παράγραφος 1.2.13.2) και 1μl του DNA, αναλύεται το πρότυπο μεθυλίωσης.

2.3.9 Ανοσοκατακρήμνιση Πρωτεϊνών (Immunoprecipitation, IP)

Η ανοσοκατακρήμνιση αποτελεί μία μορφή χρωματογραφίας συγγένειας. Σε αυτήν, ως στερεή φάση χρησιμοποιούνται σφαιρίδια από αгарόζη ή κάποιο ανάλογο υλικό. Πάνω στα σφαιρίδια βρίσκεται ομοιοπολικά δεσμευμένη πρωτεΐνη A και πρωτεΐνη G. Είναι πρωτεΐνες βακτηριακής προέλευσης που δεσμεύουν με μεγάλη συγγένεια την Fc περιοχή ορισμένων τύπων IgG ανοσοσφαιρινών. Με τη χρήση της δημιουργείται ένα σύμπλοκο σφαιριδίων-πρωτεϊνών A και G-αντισωμάτων στο οποίο δεσμεύεται επιλεκτικά το αντιγόνο που θέλουμε να κατακρημνίσουμε. Το σύμπλοκο αυτό είναι δυνατό να συλλεχθεί μετά από φυγοκέντρηση και οι πρωτεΐνες που υπάρχουν σε αυτό να αποδεσμευτούν με τη χρήση αποδιατακτικών παραγόντων.

Σύζευξη αντισώματος - Antibody conjugation

1. Για την παρακάτω διαδικασία χρησιμοποιούνται σφαιρίδια αгарόζης καλυμμένα με πρωτεΐνη G - beads. Το σύνολο των beads που θα χρειαστούν μεταφέρονται σε ένα eppendorf, ακολουθούν 3 πλύσεις, με τη βοήθεια του μαγνήτη, με 200μl PBS (η αφαίρεση του PBS γίνεται επίσης με τη χρήση του μαγνήτη).
2. Τα beads επαναδυσκλύνονται στον όγκο PBS που χρειάζεται για το σύνολο των αντιδράσεων και μοιράζονται από 25μl σε κάθε eppendorf όπου προορίζεται να γίνει η σύζευξη με το αντίσωμα, (π.χ σε 75 μl PBS αν πρόκειται για 3 αντιδράσεις και μεταφέρω από 25μl σε κάθε νέο eppendorf).
3. Τα beads μεταφέρονται στον πάγο (25μl ανά αντίσωμα) και προστίθενται:
2.5μg αντίσωμα
5% Glycerol (for molecular biology, 99% clean)
Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι 200μl με PBS.

4. Ολονύκτια επώαση στον ψυχρό θάλαμο σε περιστροφική κίνηση.

Σημειώσεις:

1. Για δύο IP αντιδράσεις η σύζευξη γίνεται σε 200μl, για παραπάνω αντιδράσεις οι όγκου διαμορφώνονται αναλογικά.
2. ο PBS buffer βρίσκεται ήδη στον πάγο.
3. Στην περίπτωση αντισωμάτων που ήδη περιέχουν γλυκερόλη αν ο όγκος του αντισώματος που απαιτείται για την IP αντίδραση είναι μεγάλος και κοντά σε αυτόν της glycerol που συμπληρώνουμε τότε δεν είναι απαραίτητο να προσθέσουμε επιπλέον γλυκερόλη ή ίσως χρειάζεται να συμπληρώσουμε λιγότερο όγκο (φυσικά ελέγχουμε τη ροή του δείγματος)

Επώαση beads με το εκχύλισμα πρωτεΐνης.

- Απομακρύνεται το υπερκείμενο που περιέχει το αντίσωμα (φυλάσσεται για ανοσοαποτύπωση κατά western λαμβάνεται υπόψη η συνολική αραίωση) (Supernatant - S).
- Τα beads μεταφέρονται στον πάγο, ακολουθούν 2 πλύσεις με 200μl PBS Buffer και μια με τελευταία πλύση με 200μl RIPA buffer (1x).
- Μετά τις πλύσεις επαναδιαλύονται σε 110μl RIPA Buffer στον πάγο (προορίζεται για δύο αντιδράσεις), αντίστοιχα αν προορίζονται για μία αντίδραση σε 55μl RIPA Buffer.
- Προετοιμάζεται ένα νέο eppendorf tube το οποίο θα περιλαμβάνει:
 - ✓ 50μl beads
 - ✓ 200μg εκχύλισμα πρωτεϊνών
 - ✓ 20μl protease inhibitor
 - ✓ 150mM τελική συγκέντρωση NaCl (ελέγχεται πρώτα πόσο περιέχεται στο buffer και συμπληρώνεται ανάλογα)
 - ✓ 5% Glycerol (από working stock 50%) σε 200μl συνολικού όγκου RIPA. Ο όγκος της αντίδρασης δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 250μl.
- Ολονύκτια επώαση στον ψυχρό θάλαμο σε περιστροφική κίνηση (η αντίδραση είναι έτοιμη μετά από 3-4 ώρες παραμονής στον ψυχρό θάλαμο)

Έλεγχος της ανοσοκατακρήμνισης.

- Τοποθετείται η αντίδραση στο μαγνήτη και συλλέγεται το υπερκείμενο (Supernatant - S).

- 3 πλύσεις με 200μl RIPA Buffer και συλλέγονται οι αντίστοιχες πλύσεις δηλαδή: Wash1, Wash2, Wash3 (W1, W2 και W3 αντίστοιχα) (ενδιάμεσα από κάθε πλύση αναδεύω για περίπου 3min).
- Τα beads επαναδυναμώνονται σε 40μl Laemmli Buffer.
- Τα προϊόντα της ανοσοκατακρήμνισης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση με τη μέθοδο SDS-PAGE.
- Τα δείγματα που ελέγχονται από κάθε αντίδραση είναι:
L: Load, 20μg από το αρχικό εκχύλισμα πρωτεϊνών (αναλογικά αντιστοιχεί σε όγκο 20μl), **B:** Beads, 20μl από τα 40μl Laemmli στα οποία έχουν επαναδυναμωθεί τα beads, **S:** Supernatant, 20μl, **W1:** Wash 1, 20μl.

2.3.10 Ανοσοκατακρήμνιση Χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)

Η μέθοδος ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης χρησιμοποιείται ευρέως για το προσδιορισμό αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών με το DNA. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να προσδιοριστούν νέοι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες υποκινητών γονιδίων ή εναλλακτικά, οι θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών στο γονιδίωμα. Βασική αρχή της μεθόδου αποτελεί η χρήση ειδικών αντισωμάτων για την προς μελέτη πρωτεΐνη τα οποία συζευγνύονται με ειδικά σφαιρίδια αгарόζης/σεφαρόζης. Το σύμπλοκο αυτό στη συνέχεια αναμειγνύεται με τη συνολική χρωματίνη των κυττάρων, με αποτέλεσμα να προσδένεται ειδικά στην ως προς μελέτη πρωτεΐνη, η οποία είναι προσδεδεμένη στη χρωματίνη. Τέλος το σύμπλοκο κατακρημνίζεται και οι περιοχές πρόσδεσης της πρωτεΐνης στη χρωματίνη, προσδιορίζονται με PCR.

1. Το θρεπτικό μέσο αντικαθίσταται με 27 ml θρεπτικού μέσου (πλήρους ή ελαχίστου ανάλογα με το αν πρόκειται για διαφοροποιημένα ή όχι κύτταρα).
2. Προστίθενται 3 ml φορμαλδεΰδης (formaldehyde, 10% stock), αναδεύοντας αμέσως και επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προστίθενται 3 ml γλυκίνης (glycine, 1.375 M stock), αναδεύοντας αμέσως και επωάζονται για 5 λεπτά.

4. Το πιάτο τοποθετείται στον πάγο και τα μονιμοποιημένα κύτταρα εκπλένονται 3 φορές με παγωμένο PBS / 0.5 mM PMSF.
5. Ακολουθεί απόξυση των κυττάρων με 20 ml παγωμένο PBS/ 0.5mM PMSF.
6. Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 2000 rpm για 5 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο
7. Η πελέττα επαναδιαλύεται με 10 ml διαλύματος **B** και το εναιώρημα αναδεύεται περιστροφικά για 10 λεπτά στους 4°C. Ύστερα ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 2500 rpm για 5 λεπτά.
8. Η πελέττα επαναδιαλύεται σε 10 ml διαλύματος **C** και το εναιώρημα αναδεύεται περιστροφικά για 10 λεπτά στους 4°C. Ύστερα ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 2500 rpm για 5 λεπτά.
9. Η πελέττα (πυρήνες) επαναδιαλύεται σε 9 όγκους του εκτιμώμενου όγκου της πελέττας διαλύματος **Sonication Buffer**.
10. Τα δείγματα ψύχονται άμεσα σε υγρό άζωτο και ύστερα φυλάσσονται στους -80 °C μέχρι να συνεχιστεί το πείραμα.
11. Τα δείγματα μεταφέρονται στον πάγο όπου και περιμένουν έως ότου επανέλθουν σε υγρή κατάσταση. Ύστερα δέχονται εκπεμπόμενους υπερήχους σε Bioruptor για 12 επαναλήψεις των 30 δευτερολέπτων.
12. Προστίθενται 0.5 ml **Dilution Buffer** για κάθε 1 ml του επεξεργασμένου με υπερήχους εκχυλίσματος. Ύστερα από ανάμειξη μεταφέρονται σε φιαλίδια Eppendorf 1.5ml φυγοκεντρούνται στις 14000 rpm για 15 λεπτά.
13. (αν επιθυμείται) Αφαιρείται το υπερκείμενο, το οποίο φυλάσσεται και επαναφυγοκεντρούνται τα δείγματα στις ίδιες συνθήκες.
14. Το υπερκείμενο, το οποίο εμπεριέχει τη διαλυτή χρωματίνη, μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο. Από αυτό κρατάται το 1/20 του όγκου ως input.

Ανοσοκατακρήμνιση

Σύζευξη των σφαιριδίων που φέρουν την πρωτεΐνη G (dynabeads) με το αντίσωμα.

- 100 μl σφαιριδίων που φέρουν την πρωτεΐνη G μεταφέρονται σε φιαλίδιο 1.5ml (για κάθε IP).
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται 1 ml 0.5% BSA σε PBS.
- Τα σφαιρίδια συλλέγονται και εκπλένονται 2 φορές με 0.5% BSA/PBS.

- Τα σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε 250 μ l 0.5% BSA/PBS και προστίθενται 2-15 μ g αντισώματος.
 - Ακολουθεί επώαση για 4-5 ώρες στους 4°C σε περιστροφική πλατφόρμα.
 - Μετά την επώαση τα σφαιρίδια εκπλένονται 3 φορές με 0.5% BSA/PBS.
15. Αναμιγνύονται τα χρωματινικά εκχυλίσματα με τα συζευγμένα σφαιρίδια και επωάζονται για 12-16 ώρες στους 4°C σε περιστροφική πλατφόρμα.
 16. Με τη βοήθεια του μαγνήτη συλλέγονται τα σφαιρίδια
 17. Τα σφαιρίδια, που πλέον είναι συζευγμένα με το αντίσωμα και τη χρωματίνη, εκπλένονται για 10 λεπτά στους 4°C σε περιστροφική πλατφόρμα, 2 φορές με το διάλυμα **Wash Buffer S**
 18. Ακολούθως εκπλένονται μία φορά με το διάλυμα **Wash buffer A** και
 19. Μία φορά με το **Wash buffer B**.
 20. Μία επιπλέον έκλυση με 1 ml διαλύματος **TE** buffer.
 21. Προστίθενται 150 μ l **Elution buffer** στα σφαιρίδια και επωάζονται στους 65 °C για 10 λεπτά. Ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex. Τα σφαιρίδια συλλέγονται μέσω του μαγνήτη και το υπερκείμενο μεταφέρεται (140 μ l) σε νέο φυαλίδιο. Στη συνέχεια εκλούονται ξανά προσθέτοντας 150 μ l elution buffer. Ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex και επώαση 65 °C για 10 λεπτά. Αφαιρούνται 150 μ l από το υπερκείμενο και συνδυάζονται με το πρώτο υπερκείμενο (290 μ l τελικός όγκος). Σε αυτά προστίθενται 110 μ l H₂O.
 22. Προστίθενται 21 μ l NaCl (4 M stock).
Συγχρόνως αποψύχονται τα δείγματα input (50 μ l) όπου συμπληρώνονται 240 μ l elution buffer + 110 μ l H₂O. Προστίθενται επιπλέον 21 μ l NaCl (4M stock).
 23. Όλα τα δείγματα επωάζονται στους 65 °C για τουλάχιστον 5 ώρες. Στο στάδιο αυτό γίνεται η αντίστροφη μονιμοποίηση και μπορεί εναλλακτικά να γίνει και ολονύκτια επώαση.
 24. Προστίθεται RNase A (10 mg/ml stock, DNase-free stock) και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 1 ώρα.
 25. Προστίθενται 4 μ l EDTA (0.5 M stock) and 2 μ l Proteinase K (10 mg/ml stock).
 26. Τα δείγματα επωάζονται στους 42 °C για 2 ώρες και προστίθενται 100 μ l H₂O.

27. Στη συνέχεια τα δείγματα εκχυλίζονται με φαινόλη/χλωροφόρμιο/ ισοαμυλική αλκοόλη.
28. Προστίθενται 1μl GlycoBlue (20 mg/ml stock), 40 μl οξικό νάτριο (Na-acetate, 3M stock) και 1 ml αιθανόλης (EtOH).
29. Τα δείγματα αναμιγνύονται με vortex και κατακρημνίζονται στους -20°C για ένα βράδυ.
30. Αφού φυγοκεντρηθούν στις 14000 rpm για 30 λεπτά, εκλένονται μία φορά με αιθανόλη 80% και αφυδατώνονται πλήρως στο speedvac.
Τόσο τα δείγματα του IP όσο και τα input επαναδιαλύονται σε 30-100 μl 10 mM Tris (pH 7.5).

2.3.10.1 Αλληλούχιση Μεταγραφικών Στόχων σε Κλίμακα Γονιδιώματος

Η αλληλούχιση έγινε σε συνεργασία με το *Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ"*.

2.3.10.2 Αλληλούχιση RNA

Η αλληλούχιση του RNA καθώς και η ανάλυση των δεδομένων έγινε στο *Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ"*.

2.3.11 Ταυτοποίηση των 5' άκρων του mRNA

2.3.11.1 Μέθοδος cRACE (Rapid Amplification of cDNA ends)

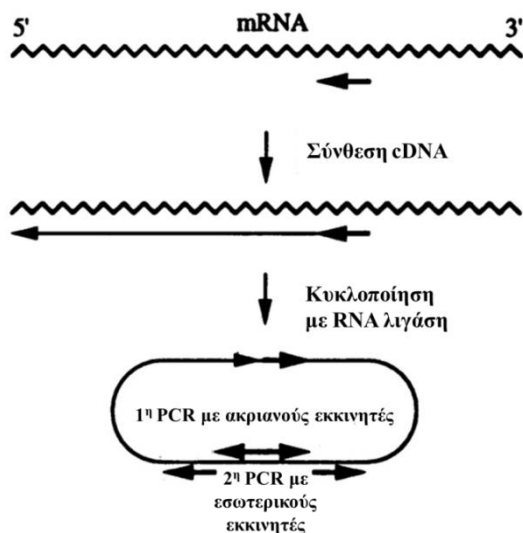
Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι η απομόνωση και ταυτοποίηση του 5' άκρου του προς μελέτη γονιδίου. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται από τον *Mariyama I.N et al., 1995 [213] (Εικόνα 28)*.

Η διαδικασία είναι η ακόλουθη:

1. Σύνθεση εξειδικευμένου cDNA (0.5μg), χρησιμοποιώντας, αντί oligo-dT ή random hexamers, εκκινητή σχεδιασμένο στο γονίδιο του οποίου το 5' άκρο επιθυμούμε να μελετήσουμε. Ο εκκινητής προτιμάται να είναι σχεδιασμένο κοντά στο 5' άκρο ώστε η αντίστροφη μεταγραφάση να μπορέσει να συνθέσει όσο

μεγαλύτερη περιοχή γίνεται. Η αντίστροφη μεταγραφάση που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο μας έχει την ικανότητα σύνθεσης περίπου 2000 ζ.β.

2. Φωσφορυλίωση των άκρων με τη βοήθεια της T4 PNK, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή
3. Υδρόλυση του RNA
Η αντίδραση της υδρόλυσης επιτυγχάνεται με την προσθήκη 0.5N NaOH στην αντίδραση της φωσφορυλίωσης και επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.
4. Κατακρήμνιση με αιθανόλη
Όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο καθαρισμού DNA στάδιο 5-12.
5. Κυκλοποίηση του cDNA με RNA λιγάση.
Η αντίδραση κυκλοποίησης γίνεται με την προσθήκη 25% PEG (MW8000), 1mM hexamine cobalt chloride, 0.01mM ATP, 10mM Tris-HCl pH8, 10mM MgCl₂, 1μg/ml BSA και 10 Units T4 RNA ligase. Η αντίδραση επώάζεται στους 22°C για 16 ώρες.
6. PCR με αντικριστούς, πλέον, εκκινητές στο κυκλοποιημένο cDNA και re-PCR με εσωτερικούς εκκινητές για την ενίσχυση της υπο μελέτη -άγνωστη περιοχής του 5' άκρου του mRNA.



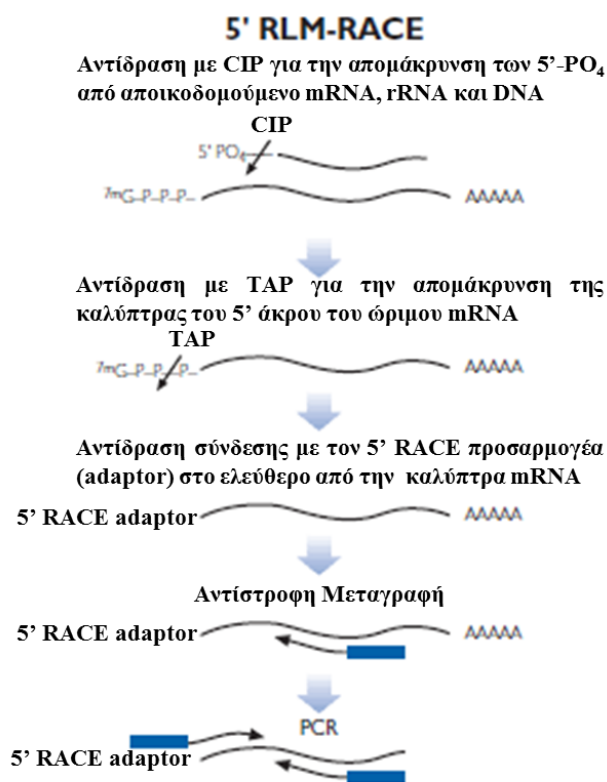
Εικόνα 28: Σχηματική αποϊκόνιση της μεθόδου cRACE (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Maruyama I.N et al., 1995, [213]*)

2.3.11.2 Μέθοδος RLM-RACE (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA ends)

Η μέθοδος 5' RLM RACE είναι μία εναλλακτική τεχνική ταυτοποίησης του ή των 5' άκρων του mRNA ενός γονιδίου. Πρόκειται για μία παρόμοια με την παραπάνω τεχνική που όμως προσπαθεί να μειώσει το θόρυβο του πειράματος και να αυξήσει το ποσοστό επιτυχίας και αξιοπιστίας. Το κύριο πρόβλημα της τεχνικής cRACE είναι η μη ειδική απομόνωση περιοχών που προέρχονται είτε από μη ματισμένο mRNA, είτε από άλλα μόρια RNA (tRNA, rRNA). Η μέθοδος αυτή σχεδιάστηκε αξιοποιώντας τα χαρακτηριστικά του ώριμου mRNA και εκμεταλλευόμενη τις ιδιότητες ορισμένων ενζύμων. Συγκεκριμένα βασίζεται στην παρουσία της καλύπτρας στο 5' άκρο των mRNA, η οποία

προστίθεται εξειδικευμένα μόνο στα ώριμα μηνύματα έναντι των ελεύθερων φωσφορικών ομάδων που συναντώνται στα υπόλοιπα μόρια RNA. Με τη χρήση του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση, προερχόμενη από έντερο μόσχου (calf intestine alkaline phosphatase, CIP) επιτυγχάνεται η αποφωσφορυλίωση σχεδόν όλων των νουκλεϊκών οξέων (rRNA, tRNA και DNA) πλην του αγγελιοφόρου RNA (mRNA), ενώ με το ένζυμο όξινη πυροφωσφατάση του καπνού (tobacco acid pyrophosphatase, TAP) απομακρύνεται η καλύπτρα από το 5' άκρο των mRNA, ύστερα από την αντίδραση της υδρόλυσης φωφορικού εστέρα που καταλύει, αφήνοντας ελεύθερα φωσφορικά άκρα.

Στόχος είναι η προσθήκη ενός προσαρμογέα στο 5' άκρο των mRNA (5' RACE adaptor), με τη βοήθεια της RNA λιγάσης, ο οποίος έχει γνωστή αλληλουχία. Έτσι, χρησιμοποιώντας εκκινητές σχεδιασμένους στην περιοχή του προσαρμογέα και στο γονίδιο το 5' άκρο του οποίου επιθυμούμε να μελετήσουμε, να καταφέρουμε να



Εικόνα 29: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου 5' RLM-RACE (Προσαρμογή και τροποποίηση από https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manual/s/cms_056070.pdf).

ενισχύσουμε την περιοχή που μας ενδιαφέρει. Η χρήση των ενζύμων CIP και TAP εξασφαλίζει ότι ο προσαρμογέας δε θα συνδεθεί και σε άλλα νουκλεϊκά οξέα που συνυπάρχουν, εφόσον εκείνα δεν διαθέτουν φωσφορικές ομάδες στα άκρα τους.

Η πειραματική πορεία εκτελέστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (*Thermo Fisher Scientific FirstChoice® RLM- RACE Kit # AM1700*) (**Εικόνα 29**).

2.4 Βιοχημικές Μέθοδοι

2.4.1 Απομόνωση Πρωτεϊνικού Εκχυλίσματος από Νευρικά Κύτταρα

Η απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το διάλυμα λύσης RIPA Buffer (Cell Signaling). Η συγκεκριμένη διαδικασία συνίσταται απ' τα ακόλουθα στάδια:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων στο πιάτο κυτταροκαλλιέργειας μια φορά με PBS.
2. Προσθήκη 400μl διαλύματος RIPA 1x (για πιάτο 10cm) στο οποίο έχει προστεθεί μείγμα αναστολέων των πρωτεασών (1:100).
3. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5min.
4. Τα κύτταρα συλλέγονται με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας (cell scraper) σε φιαλίδιο τύπου erpendorf.
5. Πραγματοποιείται λύση των κυτταρικών μεμβρανών και θραύση των νουκλεϊκών οξέων με την εφαρμογή υπερήχων για 4sec, με εναλλάξ 0,5sec θραύση και 0,5sec παγόλουτρο και ένταση 30%.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14000g/ 10min/ 4°C.
7. Συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο περιλαμβάνει το πρωτεϊνικό εκχύλισμα και αποθηκεύεται στους -20°C.

2.4.2 Προσδιορισμός Συγκέντρωσης των Πρωτεϊνών με τη Μέθοδο Bradford

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα

595nm. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (διάλυμα Bradford) που περιέχει την παραπάνω χρωστική και με το οποίο ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. Πραγματοποιείται μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα 595nm συναρτήσει της συγκέντρωσης του προτύπου διαλύματος BSA (1mg/ml) σε 2.5ml διαλύματος Bradford αραιωμένο 1:5 (0-25μg πρωτεΐνης). Το μίγμα παραμένει για 60sec και ακολουθεί φωτομέτρηση.
2. Ποσότητα έως 40μl δείγματος επαναιωρείται σε 2.5ml αραιωμένου διαλύματος Bradford, παραμένει για 60sec και φωτομετρείται στα 595nm.

2.4.3 Ανοσοαποτύπωση (Western Blot)

Η ανοσοαποτύπωση (ή αλλιώς Western blot) είναι μια μέθοδος ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών ενός σύνθετου μίγματος, που συνδυάζει την υψηλή αναλυτική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης, την ειδικότητα των αντισωμάτων και την ευαισθησία των ενζυμικών μεθόδων. Η μέθοδος αυτή αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμιδίου.
- Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.
- Επώση της μεμβράνης με αντισώματα.
- Ανίχνευση των πρωτεϊνών.

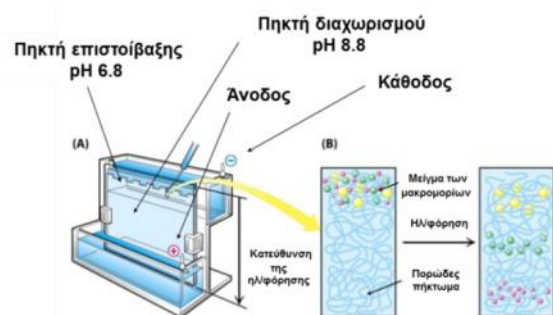
2.4.3.1 Ηλεκτροφόρηση των Δειγμάτων σε Πηκτή SDS – Πολυακρυλαμιδίου

Σχεδόν όλες οι αναλυτικές ηλεκτροφορήσεις των πρωτεϊνών πραγματοποιούνται σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες οι οποίες διασφαλίζουν αφενός μεν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες πολυπεπτιδικές τους υπομονάδες, αφετέρου δε τον μη σχηματισμό συσσωματωμάτων. Συνήθως, χρησιμοποιείται το ισχυρά ιονικό απορρυπαντικό SDS σε συνδυασμό με έναν αναγωγικό παράγοντα και την υψηλή θερμοκρασία για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών πριν τη φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή. Επιπλέον, η προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης στα δείγματα διασφαλίζει τον μη-σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Τα μετουσιωμένα πολυπεπτίδια προσδένονται με το SDS και έτσι φορτίζονται

αρνητικά. Επειδή η πρόσδεση με το SDS είναι σχεδόν πάντα ανάλογη με το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και είναι ανεξάρτητη με την αλληλουχία του, τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου σύμφωνα με το μέγεθος του πολυπεπτιδίου. Έτσι, χρησιμοποιώντας ειδικούς μάρτυρες γνωστών μοριακών βαρών μπορούμε να εκτιμήσουμε το μοριακό βάρος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Μετατροπές όμως του πολυπεπτιδικού σκελετού, όπως Π.χ. N- ή O-

γλυκοζυλιώσεις έχουν μια σημαντική επίδραση στο μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και πιθανόν το μοριακό βάρος που υπολογίζεται να μην ανταποκρίνεται στην πραγματική μάζα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας [206].

Στις περισσότερες των περιπτώσεων, η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) πραγματοποιείται σε ένα διακοπτόμενο



Εικόνα 30: Βασικά χαρακτηριστικά της ηλεκτροφόρησης SDS – PAGE. (Προσαρμογή και τροποποίηση από www.slideshare.net).

σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο, το ρυθμιστικό διάλυμα στη δεξιαμενή έχει διαφορετικό pH και ιονική ισχύ από αυτό που χρησιμοποιείται για να παρασκευαστεί η πηκτή. Τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται προς τον θετικό πόλο της κατακόρυφης συσκευής όταν περάσει συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα από τα ηλεκτρόδια. Όταν περάσουν πια μέσω της πηκτής επιστοίβαξης (stacking) η οποία είναι αρκετά πορώδης, τα συμπλέγματα κατακάθονται σε μια πολύ λεπτή ζώνη στην επιφάνεια της πηκτής διαχωρισμού (separating).

Τα ιόντα χλωρίου στο ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος και στην πηκτή επιστοίβαξης σχηματίζουν ένα προπορευμένο άκρο του κινούμενου οροθετικού δείκτη ενώ το ρυμουλκούμενο άκρο αποτελείται από μόρια γλυκίνης. Μεταξύ του προπορευόμενου και του ρυμουλκούμενου άκρου του κινούμενου οροθετικού δείκτη υπάρχει μια ζώνη χαμηλότερης αγωγιμότητας η οποία εναποθέτει τελικά τα πολυπεπτίδια στην επιφάνεια της πηκτής διαχωρισμού. Εκεί το υψηλότερο pH της πηκτής ευνοεί τον ιονισμό της γλυκίνης και τα ιόντα γλυκίνης που προκύπτουν μεταναστεύουν στην πηκτή διαχωρισμού ακριβώς πίσω από τα ιόντα χλωρίου. Ελεύθερα από τον κινούμενο οροθετικό δείκτη, τα

συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίων μετακινούνται στην πηκτή διαχωρισμού και διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθος τους.

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου συνθέτονται από αλυσίδες πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου οι οποίες είναι συνδεδεμένες με bis-ακρυλαμίδιο. Με την προσθήκη TEMED (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine) κατά την παρασκευή των πηκτών επιταχύνεται ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου και του bis-ακρυλαμιδίου καταλύοντας τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών οι οποίες παρέχονται από το APS (Υπερθειϊκό αμμώνιο), Η διαχωριστική ικανότητα αυτών των πηκτών εξαρτάται από την συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου στην πηκτή.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο SDS-PAGE είναι η ακόλουθη:

1. Συναρμολογείται κατάλληλα η συσκευή γυάλινων πλακών που θα χρησιμοποιηθεί έτσι ώστε να μην υπάρχει διαρροή.
2. Κατασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού στην κατάλληλη πυκνότητα (Πίνακας 3.4).
3. Το μείγμα τοποθετείται πολύ γρήγορα στο σύστημα των γυάλινων πλακών, στην επιφάνεια του προστίθεται ισοπροπανόλη για να ευθυγραμμιστεί η στάθμη και να αποφευχθεί τυχόν εξάτμιση του υγρού.
4. Το πήκτωμα αφήνεται σε ηρεμία ~20min προκειμένου να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός.
5. Κατασκευάζεται το πήκτωμα επιστοιβάξης με συγκέντρωση ακρυλαμίδης 4%.
6. Απομακρύνεται η ισοπροπανόλη από το πήκτωμα διαχωρισμού, ξεπλένεται το πήκτωμα με H₂O και προστίθεται το διάλυμα του πηκτώματος επιστοιβάξης.
7. Τοποθετείται το ειδικό χτενάκι για τη δημιουργία των πηγαδιών, αφήνεται σε ηρεμία για ~15min να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός. Στο στάδιο αυτό, το πήκτωμα μπορεί να αποθηκευθεί στους 4°C ή να χρησιμοποιηθεί την ίδια ημέρα μετά το πέρας τουλάχιστον 45min.
8. Η συσκευή με το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδική δεξαμενή.
9. Η δεξαμενή γεμίζεται με 1lt περίπου 1x SDS-PAGE ρυθμιστικό διάλυμα, προσέχοντας η στάθμη του να βρίσκεται 1-2cm πάνω από την επιφάνεια των πηκτών.

10. Προετοιμασία των δειγμάτων με επαναιώρησή τους σε διάλυμα 1x ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (Laemmli).
11. Αφαιρείται το χτενάκι από το πήκτωμα επιστοίβαξης και φορτώνονται τα δείγματα στην πηκτή, με τελικό όγκο 24μl.
12. Φορτώνεται επίσης και μίγμα με πρότυπες πρωτεΐνες για SDS-PAGE (μάρτυρας μοριακών βαρών), έτσι ώστε να μπορεί να υπολογιστεί το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θα διαχωριστούν.
13. Η δεξαμενή καλύπτεται και η όλη διάταξη λειτουργεί περίπου στα 120 - 150Volt μέχρι η ζώνη της χρωστικής διατρέξει κατά μήκος την πηκτή.

Οι όγκοι των αντιδραστηρίων για τις πηκτές διαχωρισμού και επιστοίβαξης περιγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 8: Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

Πηκτή διαχωρισμού (separating)	8%	10%	12%	15%	Πηκτή επιστοίβαξης (stacking) 5%
Acryl:bis (29:1)	2.7ml	3.3ml	4ml	5ml	0.67ml
1.5M Tris pH 8.8	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	-
1M Tris pH 6.8	-	-	-	-	0,5ml
H ₂ O (υπερκάθαρο)	4.6ml	4ml	3.3ml	2.3ml	2.7ml
10 % SDS	100μl	100μl	100μl	100μl	40 μl
10 % APS	100μl	100μl	100μl	100μl	40 μl
TEMED	6μl	4μl	4μl	4μl	4 μl
Τελικός όγκος	10ml	10ml	10ml	10ml	4ml

2.4.3.2 Μεταφορά των Πρωτεϊνών σε Μembrάνη Νιτροκυτταρίνης

Μόλις η χρωστική φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής σταματά η ηλεκτροφόρηση και αρχίζει η διαδικασία της υγρής μεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη οφείλεται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις καθώς και σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μεμβράνης και των πρωτεϊνών. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κόβεται στο μέγεθος της πηκτής διαχωρισμού και διαβρέχεται με υπερκάθαρο (nanopure) H₂O.
2. 2 ειδικά «σφουγγαράκια» και 4 διηθητικά χαρτιά Whatman διαβρέχονται με το διάλυμα υγρής μεταφοράς.
3. Τοποθετούνται στη συσκευή υγρής μεταφοράς από κάτω προς τα πάνω τα εξής: 1 «σφουγγαράκι», 2 χαρτιά Whatman, η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, αλλά 2 χαρτιά Whatman και τέλος ακόμη 1 «σφουγγαράκι».
4. Η συσκευή συναρμολογείται, μεταφέρεται στη δεξαμενή όπου πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών και η δεξαμενή γεμίζεται με 1lt περίπου διαλύματος υγρής μεταφοράς.
5. Ξεκινά η μεταφορά των πρωτεϊνών, σε χαμηλή θερμοκρασία, στα 200mA για 1^{1/2} – 4^{1/2} hrs, ανάλογα με το μοριακό βάρος των προς μεταφορά πρωτεϊνών.

2.4.3.3 Επώαση της Μεμβράνης με Ειδικά Αντισώματα και Ανίχνευση των Πρωτεϊνών

Μετά το πέρας της μεταφοράς η μεμβράνη επωάζεται με εκείνα τα αντισώματα που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες του ενδιαφέροντος. Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Επώαση της μεμβράνης με διάλυμα γάλακτος για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου (Blocking). Η καζεΐνη του γάλακτος δεσμεύει όλες τις μη ειδικές θέσεις δέσμευσης του αντισώματος στη μεμβράνη αφήνοντας εκτεθειμένες μόνο αυτές στις οποίες βρίσκονται οι πρωτεΐνες.
2. Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης, των 5min με διάλυμα TBS-T (Washing).
3. Επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο έχει επαναδιαλυθεί σε διάλυμα TBS-T + BSA, για 1 h υπό συνεχή ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου ή O/N στους 4⁰C (Binding).
4. Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης των 5min με διάλυμα TBS-T (Washing).
5. Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο έχει επαναδιαλυθεί σε διάλυμα γάλακτος, για 1 h υπό συνεχή ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (Binding).
6. Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης των 5min με διάλυμα TBS-T (Washing).

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας, χρησιμοποιώντας το kit: Lumilight western blotting Substrate, της εταιρίας Roche. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

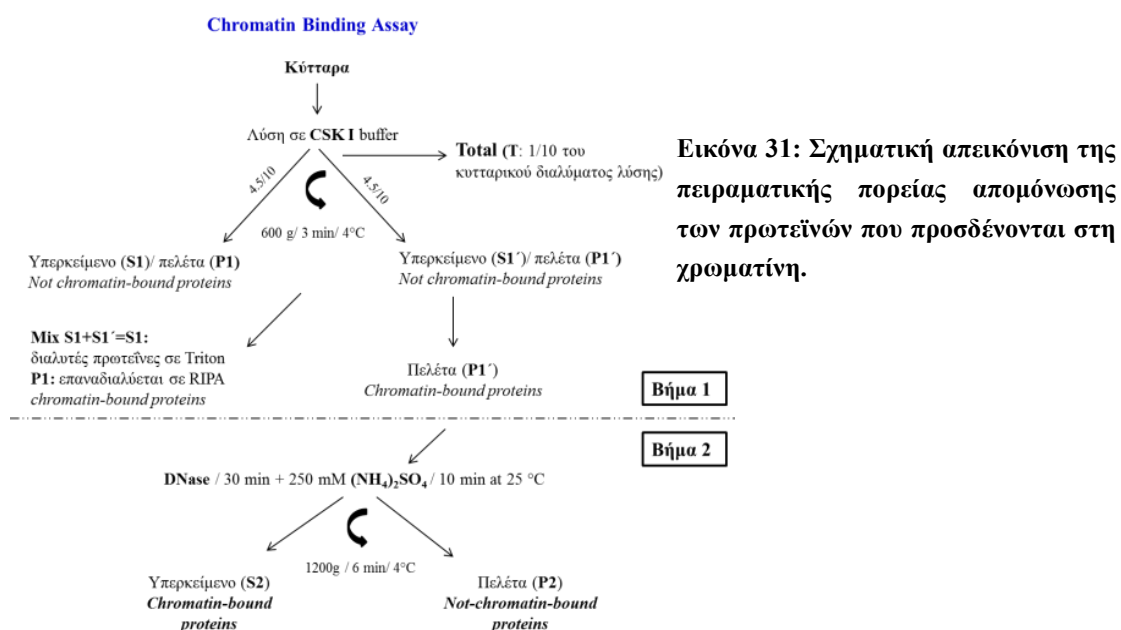
1. Επώαση της μεμβράνης με 700μl από το κάθε διάλυμα εμφάνισης του kit για 5min, μακριά απ' το πολύ φως.
2. Τοποθέτηση της μεμβράνης μέσα στην κασέτα εμφάνισης.
3. Μετάβαση στο σκοτεινό θάλαμο και τοποθέτηση ενός φωτογραφικού φιλμ πάνω στην μεμβράνη για 1-15 min.
4. Εμφάνιση του φιλμ σε ειδικό μηχάνημα.
5. Μετά το πέρας της διαδικασίας η μεμβράνη στεγνώνεται και διατηρείται στους -20°C.

2.4.4 Διαδικασία Διαχωρισμού Πρωτεϊνών που Προσδένονται στη Χρωματίνη (Chromatin Binding Assay, CBA)

Το πρωτόκολλο διαχωρισμού των πρωτεϊνών που προσδένονται στη χρωματίνη περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

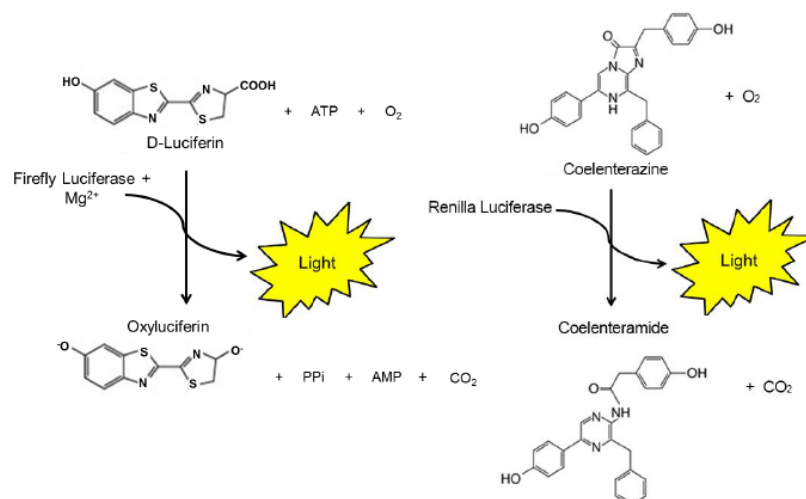
1. Πλύση των κυττάρων με 5ml PBS. Διάρρηξη και λύση των κυττάρων για 15min/ 4°C στο buffer CSK I (cytoskeleton buffer I): 10 mM Pipes (pH 6.8), 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, συμπληρώνεται με 1 mM DTT, 1 mM PMSF, protease inhibitor και 0.5% (vol/vol) Triton X-100. Επώαση για 3/ 4°C.
2. Αποθηκεύεται το 1/10 του εκχύλισματος, αποτελεί το συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων (total fraction, T).
3. Το υπόλοιπό εκχύλισμα διαχωρίζεται ισόποσα σε δύο eppendorfs. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 600g/ 3min/ 4°C. Με τη φυγοκέντρηση κατακρημνίζονται οι πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και το πυρηνικό εκχύλισμα, και παραμένουν στο εναίωρημα οι διαλυτές πρωτεΐνες. Το εναίωρημα ονομάζεται (S1 – supernatant 1), δηλαδή πρωτεΐνες διαλυτές από Triton ή πρωτεΐνες που δεν προσδένονται στη χρωματίνη.
4. Ακολουθώς η μία από τις δύο πελέτες, η οποία περιέχει τις πρωτεΐνες που προσδένονται στη χρωματίνη, πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας και αδιάλυτες πρωτεΐνες, επαναιωρείται σε RIPA buffer (εκχύλισμα P1).

5. Η δεύτερη πελέτα επαναδιαλύεται σε CSK II buffer (10 mM Pipes (pH 6.8), 50 mM NaCl, 300 mM sucrose, 6 mM MgCl₂, 1 mM DTT), επώαση με DNase/ 30 min και προσθήκη 250 mM (NH₄)₂SO₄/ 10min/ 25 °C.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 1200g/ 6min/ 4°C. απομόνωση υπερκείμενου εκχύλισμα S2, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες που απελευθερώθηκαν από τη χρωματίνη μετά την επώαση με DNase και η πελέτα P2 η οποία περιέχει τις αδιάλυτες, κυτταροσκελετικές και πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας. Η πελέτα P2 επαναδιαλύεται σε RIPA buffer [214], σχηματική απεικόνιση (Εικόνα 31).



2.4.5 Αντίδραση Λουσιφεράσης

Η αντίδραση λουσιφεράσης είναι μια βιοχημική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως, για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο μεταγραφής. Η λουσιφεράση είναι ένα οξειδωτικό ένζυμο, το οποίο φυσιολογικά απαντάται σε αρκετούς βιολογικούς οργανισμούς. Το πιο ευρέως διαδεδομένο είναι η λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας. Οι πυγολαμπίδες, είναι ικανές να εκπέμπουν φώς, μέσω μιας χημικής αντίδρασης, κατά την οποία η λουσιφερίνη μετατρέπεται σε όξυ-λουσιφερίνη με το ένζυμο της λουσιφεράσης. Κάποια από την ενέργεια που απελευθερώνεται από αυτή την αντίδραση, βρίσκεται σε μορφή φωτός (Εικόνα 32). Το φώς που εκπέμπεται ανιχνεύεται από ειδική διάταξη που ονομάζεται λουμινόμετρο δίνοντας ποσοτικά αποτελέσματα.



Εικόνα 32: Χημική αντίδραση λουσιφεράσης. (Προσαρμογή και τροποποίηση από <http://bpsbioscience.com/dual-luciferase-firefly-renilla-luciferase-assay-system-60683>)

Στα πειράματα λουσιφεράσης για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης ο υποκινητής του προς μελέτη γονιδίου βρίσκεται κλωνοποιημένος σε ειδικό φορέα, ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης. Με τον τρόπο αυτό, όσο πιο ενεργός είναι ένας υποκινητής, τόσο μεγαλύτερο θα είναι το ποσοστό του φωτός που εκπέμπεται. Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το πακέτο *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega, #E1910). Με το συγκεκριμένο πακέτο εκτός τη λουσιφεράση της πυγολαμπίδας, ανιχνεύεται και το φώς από τη *Renilla* λουσιφεράση, το οποίο προέρχεται από τη συν-διαμόλυνση των κυττάρων με ένα φορέα υπερέκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου (*pRL-Renilla*). Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή η κανονικοποίηση των δειγμάτων.

Για τη μέτρηση της λουσιφεράσης, κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με τον προς μελέτη υποκινητή και το γονίδιο της *Renilla*, εκπλένονται με PBS. Σ αυτά προστίθενται 100 μl διαλύματος λύσης (*Passive Lysis Buffer*, PLB) και επωάζονται υπο ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό απελευθερώνεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα, το οποίο στη συνέχεια συλλέγεται και φυγοκεντρείται. 1/5 του υπερκειμένου τοποθετείται σε ειδικά σωληνάρια του λουμινομέτρου. Ακολουθεί προσθήκη 50μl διαλύματος LARII (*Luciferase Assay Buffer II*) και μέτρηση λουσιφεράσης. Στη συνέχεια στο ίδιο σωληνάριο προστίθενται 50 μl διαλύματος STOP and Glo και γίνεται η μέτρηση της *Renilla*. Τα τελικά αποτελέσματα της μέτρησης προκύπτουν από την παρακάτω μαθηματική εξίσωση: κανονικοποιημένη λουσιφεράση = (μικρότερη *Renilla* / *Renilla* δείγματος) X λουσιφεράση δείγματος.

2.5 Οπτικές Μέθοδοι

2.5.1 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός

2.5.1.1 Ανοσοκυτταροχημεία

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθοριοχρώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Τα φθοριοχρώματα, ή φθορίζουσες χρωστικές, εκπέμπουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος όταν διεγερθούν από φως υψηλότερης ενέργειας. Οι φθορίζουσες χρωστικές είναι συνδεδεμένες με την περιοχή Fc των αντισωμάτων, ώστε να μην επηρεάζουν την ειδικότητά τους. Μερικές από τις πιο γνωστές φθορίζουσες χρωστικές είναι η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) που εκπέμπει πράσινο χρώμα, η ισοθειοκυανική τετραμεθυλοραδαμίνη (TMRITC) που εκπέμπει κόκκινο χρώμα και η φυκοερυθρίνη (RE) που εκπέμπει πορτοκαλί χρώμα. Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό το πρώτο αντίσωμα είναι μη σημασμένο και ανιχνεύεται με ένα δεύτερο αντι-ισοτυπικό αντίσωμα συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική.

Το πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού που ακολουθείται στο εργαστήριο μας είναι το ακόλουθο:

1. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πιάτο 24-well στο οποίο έχει προηγηθεί η επίστρωση με γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 11mm.
2. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα και πραγματοποιείται μια πλύση των κυττάρων με 500μl PBS.
3. Τα κύτταρα επί των καλυπτρίδων μονιμοποιούνται σε 200μl διαλύματος PFA 4% (παραφολμαδεΰδης) για 10min, σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Ακολουθούν τρεις πλύσεις με 500μl PBS, από 5min η καθεμία. Στο στάδιο αυτό, τα κύτταρα μπορούν να φυλαχτούν στους 4°C.
5. Οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα μεταφέρονται σε μια κατασκευή που τους παρέχει υγρασία και περιέχει τα εξής: ένα πιάτο κυτταροκαλλιιεργειών μεγάλης διαμέτρου με 3 χαρτιά whatman στο μέγεθος του πιάτου, τα οποία διαβρέχονται με νερό και πάνω τους τοποθετείται πλαστική μεμβράνη τύπου parafilm. Οι καλυπτρίδες μεταφέρονται πάνω στην μεμβράνη με την πλευρά των κυττάρων προς τα πάνω.

6. Τα κύτταρα επωάζονται με 100μl διαλύματος ανοσοφθορισμού για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό την αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων και τη διευκόλυνση της εισόδου των αντισωμάτων.
7. Στη συνέχεια αφαιρείται το διάλυμα ανοσοφθορισμού και προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση. Τα κύτταρα επωάζονται με το πρωτογενές αντίσωμα ολονύκτια στους 4°C.
8. Ακολουθούν δυο πλύσεις με 100μl διαλύματος ανοσοφθορισμού, από 5min η καθεμία και μια ακόμη που διαρκεί 30min.
9. Αφαιρείται το διάλυμα ανοσοφθορισμού και προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα, στην κατάλληλη αραιώση, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η αραιώση καθώς και η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα γίνονται σε σκοτεινό μέρος.
10. Ακολουθούν τέσσερις πλύσεις με 100μl PBS, από 5min η καθεμία.
11. Στη συνέχεια προστίθεται στα κύτταρα η χρωστική DAPI, αραιωμένη σε PBS (50μl) για 2min.
12. Πραγματοποιούνται τέσσερις πλύσεις με 100μl PBS, από 5min η καθεμία.
13. Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται με την επιφάνεια των κυττάρων προς τα κάτω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στο σημείο ακριβώς όπου πριν έχει τοποθετηθεί μικρή ποσότητα (6-7μl) του μέσου στερέωσης των καλυπτρίδων (mounting medium).
14. Οι καλυπτρίδες αφήνονται να στεγνώσουν ολονύκτια σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος και στη συνέχεια φυλάσσονται στους 4°C (σε σκοτεινό μέρος) μέχρι την παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο.

Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού ανιχνεύτηκαν μέσω μικροσκοπίας TIRF ή συνεστιακής μικροσκοπίας.

Σημείωση: Οι αραιώσεις του πρωτογενούς και του δευτερογενούς αντισώματος γίνονται σε 100μl διαλύματος ανοσοφθορισμού.

2.5.1.2 Ανοσοϊστοχημεία

Προετοιμασία Τομών Εγκέφαλου

Ο μονιμοποιημένος εγκέφαλος ενήλικου μυός τέμνεται σε μικροτόμο, σε διαμήκεις και εγκάρσιες τομές πάχους 40μm. Οι τομές φυλάσσονται σε κρυοκροστατευτικό διάλυμα εντός καλλιεργητικού πιάτου 96 πηγαδιών (96-well dish), στους -20°C.

Η πειραματική πορεία της ανοσοϊστοχημείας είναι παρόμοια με αυτήν της ανοσοκυτταροχημείας. Πιο αναλυτικά:

1. Έκπλυση των τομών με TBS 1x, 3 x15min, σε ανακινούμενη πλατφόρμα
2. Επώαση με διάλυμα εμπλοκής (3% Donkey Serum, 0.25% TritonX σε TBS) για μία ώρα
3. Ολονύκτια επώαση με πρωτογενές αντισώματα στους 4°C, σε περιστροφική κίνηση. (Οι τομές τοποθετούνται σε Eppendorf tubes 1.5ml όπου και επωάζονται)
4. Έκπλυση των τομών με TBS 1x, 3 x15min, σε ανακινούμενη πλατφόρμα
5. Επώαση με διάλυμα εμπλοκής (3% Donkey Serum, 0.25% TritonX σε TBS) για 30 λεπτά
6. Επώαση με δευτερογενές αντισώματα σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες
7. Έκπλυση των τομών με TBS 1x, 1 x15min, σε ανακινούμενη πλατφόρμα
8. Χρώση πυρήνα για 10 λεπτά
9. Έκπλυση των τομών με TBS 1x, 2 x15min, σε ανακινούμενη πλατφόρμα
10. Οι τομές μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες όπου με τη βοήθεια του μέσου στερέωσης Aqua/polymount και των καλυπτρίδων προστατεύονται και φυλάσσονται σε σκοτεινό μέρος, στους 4°C.

2.5.2 Χρώση Πυρήνα

Για τη χρώση του πυρήνα χρησιμοποιούνται χρωστικές που δεσμεύονται στο DNA, όπως είναι οι DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), PI (propidium iodide) και DRAQ5, οι οποίες εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος. Το φως που εκπέμπεται από τις φθορίζουσες χρωστικές μπορεί να γίνει ορατό με απλό μικροσκόπιο το οποίο είναι εξοπλισμένο με λάμπα φθορισμού ή με συνεστιακό μικροσκόπιο.

Οι χρωστικές αυτές διαλύονται σε PBS 1x. Το DAPI και το DRAQ5 διαλύονται σε αραιώση 1:2000 και επωάζονται με τα κύτταρα για 2 και 5 λεπτά, αντίστοιχα.

Το PI διαλύεται σε αραιώση 1:1000 για 2 λεπτά. Πριν την επώαση του με τα κύτταρα απαιτείται να προηγηθεί μία αντίδραση με RNase (τελική συγκέντρωση 1mg/ml / 45λεπτά στους 37°C)

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Εγκαθίδρυση Συνθηκών Καλλιέργειας και Διαφοροποίησης Πειραματικών Μοντέλων

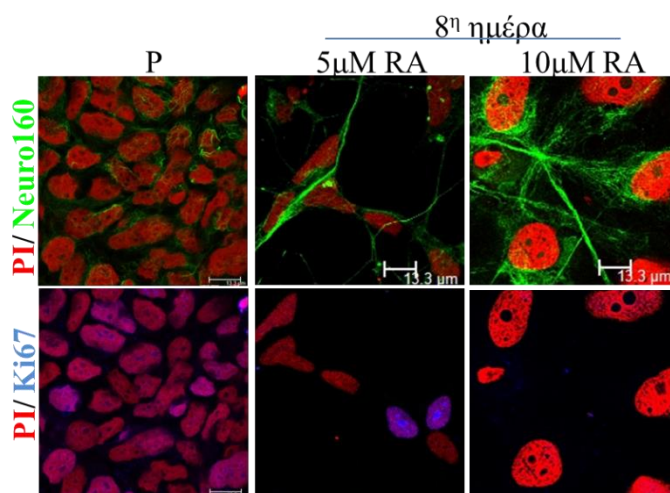
1.1 In Vitro Μοντέλα Νευρικής Διαφοροποίησης

Τα κυτταρικά μοντέλα που χρησιμοποιήσαμε ήταν νευροβλαστωματικές κυτταρικές σειρές που διατηρούν το δυναμικό διαφοροποίησης προς την συμπαθητικο-αδρενεργική μοίρα. Τα νευροβλαστώματα χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια, μιας και τα κύτταρα αυτά προέρχονται από την νευρική ακρολοφία η οποία επάγει τη γένεση πολλών διαφορετικών κυτταρικών τύπων στην περιφέρεια. Οι όγκοι του ΠΝΣ μπορούν να αναπτυχθούν οπουδήποτε θα μπορούσαν φυσιολογικά να υπάρξουν κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας [215]. Η ετερογένεια αυτή εξαρτάται από τον ιστό αρχικής προέλευσης του όγκου, από το σημείο μετάστασης, καθώς και από το ακριβές στάδιο της ασθένειας, γεγονός που αντανακλάται και στον μεγάλο αριθμό (113) νευροβλαστωματικών κυτταρικών σειρών που έχουν απομονωθεί έως σήμερα [199]. Ορισμένες από αυτές τις σειρές έχουν χαρακτηριστεί πολύ καλά [200] ως προς ορισμένα βασικά μορφολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά. Όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή, στα νευροβλαστωματικά κύτταρα διακρίνονται 3 χαρακτηριστικοί κυτταρικοί υπότυποι, τα κύτταρα τύπου N, τα κύτταρα τύπου S και τα κύτταρα τύπου I [216]. Οι μοριακοί και ιστολογικοί δείκτες που εκφράζονται στα διάφορα νευροβλαστώματα ποικίλουν.

Τα νευροβλαστωματικά κύτταρα Be(2)-C απομονώθηκαν από όγκο του μυελού των οστών κατά την μετάσταση καρκινικών κυττάρων του εγκεφάλου άρρενος δύο ετών, και χαρακτηρίζονται από αυξημένο αριθμό αντιγράφων του *MYCN* καθώς και σχετικά μεγάλο ποσοστό κυττάρων τύπου I [200]. Τα κύτταρα SH-SY5Y προέρχονται από νευροβλάστωμα του μυελού των οστών θήλεος τεσσάρων ετών, δεν παρουσιάζουν ενισχυμένη έκφραση του *MYCN* [200] και το ποσοστό των κυττάρων τύπου I είναι μικρότερο από των Be(2)-C. Η νευρική διαφοροποίηση τέτοιων νευροβλαστωματικών κυττάρων επάγεται από παράγοντες όπως ο BDNF, η νορεπινεφρίνη και το RA [217]. Το ρετινοϊκό οξύ χρησιμοποιείται ευρύτατα για την επαγωγή της νευρικής διαφοροποίησης. Μέσω της ενεργοποίησης των πυρηνικών υποδοχέων του ρετινοϊκού οξέος (RAR α , RAR γ , RAR β) και των ρετινοειδών (RXR) οι οποίοι εκφράζονται στα νευροβλαστωματικά κύτταρα [199], επάγει την έκφραση των κατάλληλων γονιδίων στόχων και ενεργοποιεί τη νευρική διαφοροποίηση [218]. Τα γονίδια αυτά είναι υπεύθυνα για τη νευριτική αύξηση αλλά και για τη μετάβαση των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στο μεταμιτωτικό στάδιο [219], [220].

1.1.1 Νευροβλαστωματικά Κύτταρα SK-N-Be-(2)-C

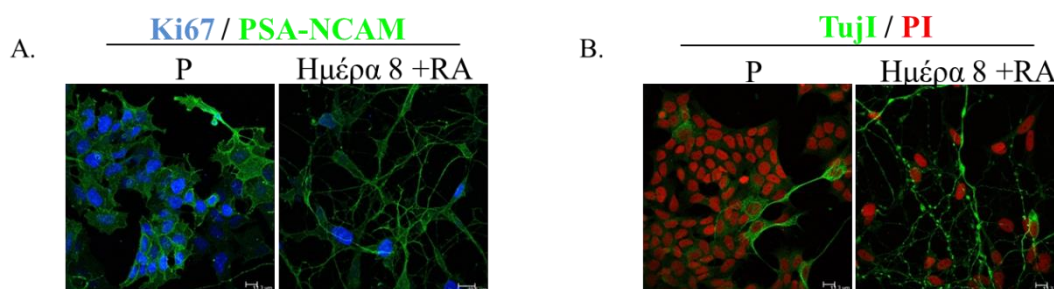
Τα κύτταρα Be(2)-C αναπτύσσονται σε DMEM-F12, παρουσία 10% ορού (FBS) και 1% antimycotic- antibiotic. Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών διαφοροποίησης ελέγχθηκαν διάφορες παράμετροι, όπως η παρουσία ορού, η συγκέντρωση του RA, καθώς επίσης και η ανάπτυξη των κυττάρων σε διάφορα υποστρώματα, και σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Επιλέξαμε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις RA (5, 10 και 15μM) σε θρεπτικό μέσο DMEM-F12 απουσία ορού, και παρακολουθήσαμε την πορεία διαφοροποίησης σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση RA (15μM) σε συνδυασμό με την πλήρη απουσία ορού από το θρεπτικό μέσο, ήταν τοξική για τα κύτταρα από τις πρώτες κιόλας ημέρες της διαφοροποίησης. Διαπιστώσαμε ότι μετά από οκτώ ημέρες καλλιέργειας τα κύτταρα αποκρίνονται ικανοποιητικά στα 5μM RA, ωστόσο στα 10μM η έκφραση του νευρικού φαινοτύπου ήταν εντονότερη (μεγαλύτερη νευριτική αύξηση, σημαντική αύξηση των επιπέδων του νευρικού δείκτη *Neurofilament 160* (*Neuro160*), και κατακόρυφη μείωση του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67) (Εικόνα 33).



Εικόνα 33: Η παρουσία του RA στα κύτταρα Be(2)-C οδηγεί σε μείωση του πολλαπλασιασμού και αύξηση των επιπέδων του νευρικού δείκτη *Neuro160*. Τα κύτταρα Be(2)-C διαφοροποιήθηκαν σε DMEM-F12 απουσία ορού (0% FBS), και παρουσία RA 5μM (iii, iv) και 10μM (v, vi). Αντιπροσωπευτική εικόνα από πειράματα ανοσοκυτταροχημείας και συνεστιακή μικροσκοπία (φακός 100x) με αντισώματα για τους δείκτες *Neuro160* και Ki67. Παρατηρούμε ότι ο νευρικός δείκτης *Neuro160* αυξάνεται σημαντικά στα 5μM, συγκριτικά με τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε συνθήκες πολλαπλασιασμού (prolif, i, ii), και ότι η αύξηση αυτή είναι μεγαλύτερη στα 10μM RA. Ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki67 μειώνεται τόσο τα 5μM όσο και στα 10μM RA. Η χρώση του πυρήνα έγινε με *Propidium Iodide* (PI).

Έτσι λοιπόν διαπιστώσαμε πως τα Be(2)-C κύτταρα διατηρούν το δυναμικό διαφοροποίησης προς τη νευρική μοίρα, παρουσία ρετινοϊκού οξέος.

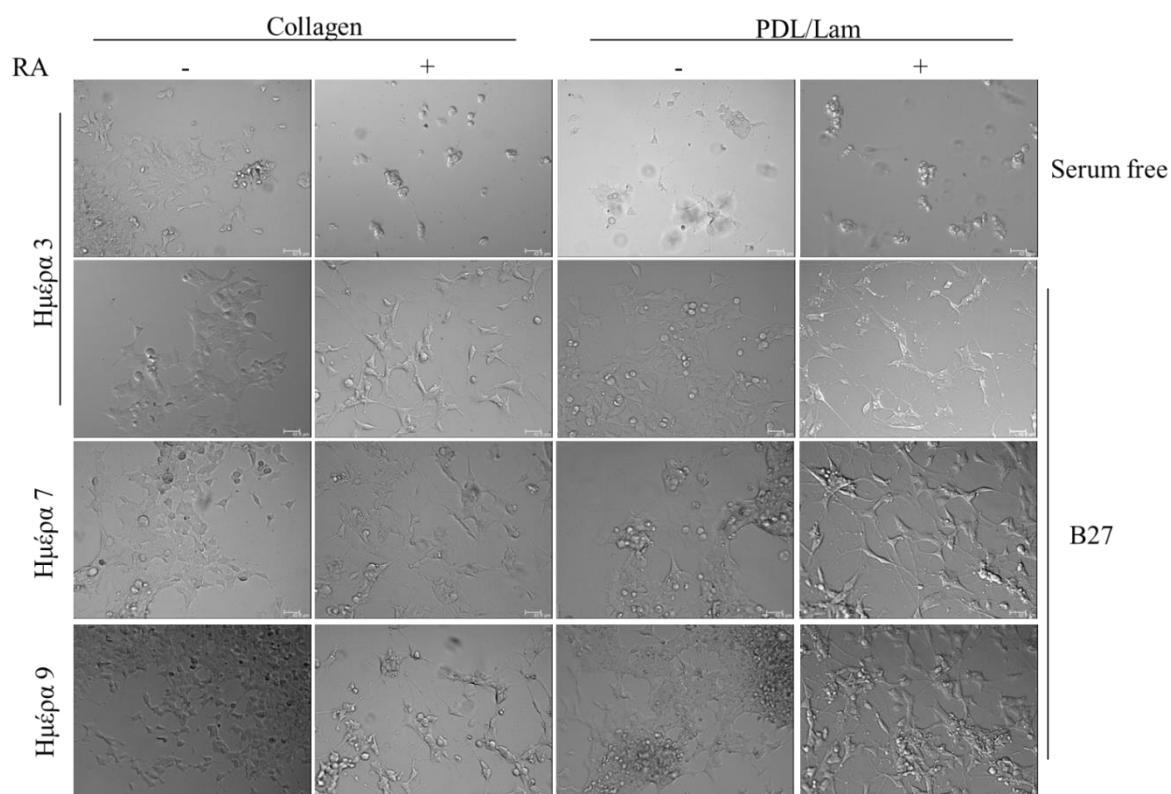
Στη συνέχεια, επιλέγοντας τη συγκέντρωση των 10μM για τη διαφοροποίηση των Be(2)-C στις παραπάνω συνθήκες, ελέγξαμε και άλλους νευρικούς δείκτες, όπως τον PSA-NCAM και τον TujiI (Εικόνα 34 Α και Β). Διαφοροποιώντας τα κύτταρα για οκτώ ημέρες παρουσία RA, παρατηρήσαμε ότι η έκφραση των δεικτών αυτών αυξάνεται, η υποκυτταρική κατανομή τους αλλάζει και η νευριτική αύξηση είναι μεγαλύτερη, υποδηλώνοντας την επιτυχή διαφοροποίηση των κυττάρων.



Εικόνα 34: Η διαφοροποίηση των κυττάρων Be(2)-C συνοδεύεται από αύξηση και άλλων νευρικών δεικτών. Μετά από οκτώ ημέρες καλλιέργειας σε DMEM-F12 απουσία ορού και παρουσία 10 μM RA αυξάνονται σημαντικά οι νευρικοί δείκτες PSA-NCAM (Α) και TujiI (Β). Η χρώση του πυρήνα έγινε με *Propidium Iodide* (PI).

Ελέγξαμε επίσης κατά πόσο η ανάπτυξη των κυττάρων σε διαφορετικά υποστρώματα και θρεπτικά μέσα, θα μπορούσε να επηρεάσει την ποιότητα της διαφοροποίησης. Δοκιμάσαμε δύο διαφορετικά υποστρώματα, τον συνδυασμό PDL (Poly-D-Lysine) και laminin (Lam), και το κολλαγόνο (Collagen), καθώς και τον εμπλουτισμό με το συμπλήρωμα B27 το οποίο είναι πλούσιο σε συστατικά που βοηθούν την ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων απουσία ορού. Παρατηρήσαμε ότι το υπόστρωμα PDL/Lam σε θρεπτικό μέσο DMEM-F12+ B27 οδηγεί σε καλύτερη νευρική διαφοροποίηση με μεγαλύτερη νευριτική αύξηση συγκριτικά με το κολλαγόνο (Εικόνα 35).

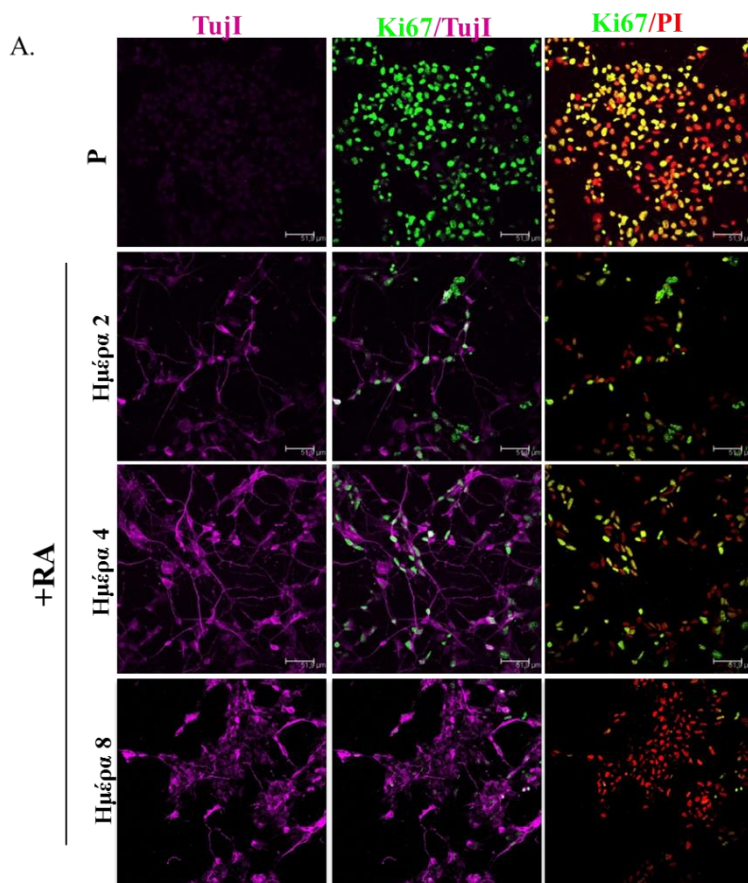
Ωστόσο, επειδή η επίστρωση των καλλιεργητικών πιάτων με PDL/Lam είναι ιδιαίτερα ακριβή και τα κύτταρα καθώς διαφοροποιούνται αποκολλώνται πιο εύκολα από τις καλυπτρίδες, επιλέξαμε για τα περαιτέρω πειράματα να χρησιμοποιούμε ως υπόστρωμα κολλαγόνο, σε θρεπτικό μέσο DMEM-F12+B27 και παρουσία 15μM RA, συγκέντρωση η οποία δεν είναι τοξική για τα κύτταρα σε αυτό το θρεπτικό μέσο.

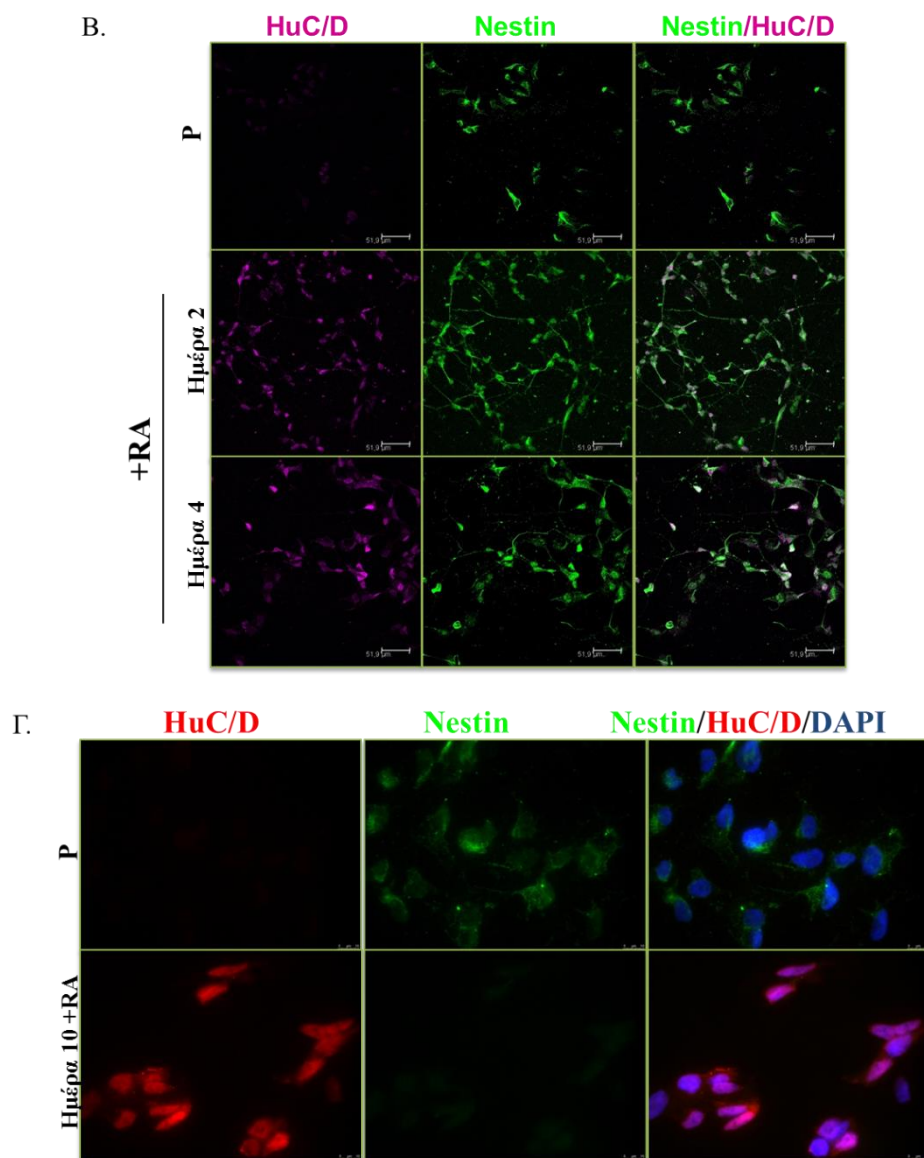


Εικόνα 35: Μορφολογία των κυττάρων BE(2)-C κατά τη διαφοροποίηση σε διαφορετικά υποστρώματα και θρεπτικά μέσα. Η μορφολογία των είναι καλύτερη στο θρεπτικό μέσο DMEM-F12+B27 με 15μM RA, σε σύγκριση με το DMEM-F12, απουσία ορού και 10μM RA. Επιπλέον, τα κύτταρα παρουσιάζουν καλύτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά νευρικού κυττάρου όταν διαφοροποιούνται σε υπόστρωμα PDL/lam συγκριτικά με το κολλαγόνο. Μικροσκόπιο TIRF, φακός 20x.

Εφόσον καταλήξαμε στις συνθήκες διαφοροποίησης των Be(2)-C κυττάρων (DMEM-F12 + B27, 15μM RA), με πειράματα ανοσοκυτταροχημείας και αντισώματα έναντι του μοριακού δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 και του νευρικού δείκτη TujI, διαπιστώσαμε ότι σε θρεπτικό μέσο πλούσιο σε ορό, το 98% των κυττάρων εκφράζει Ki67, ενώ κατά την όγδοη ημέρα διαφοροποίησης παρουσία ρετινοϊκού οξέος μόλις το 2.5% των κυττάρων εκφράζει το συγκεκριμένο δείκτη πολλαπλασιασμού. Επιβεβαιώσαμε στη συνέχεια τις παραπάνω συνθήκες διαφοροποίησης για τα κύτταρα Be(2)-C (DMEM-F12 + B27, 15μM RA, και υπόστρωμα κολλαγόνο) με πειράματα ανοσοκυτταροχημείας και αντισώματα έναντι του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 και του νευρικού δείκτη TujI. Διαπιστώσαμε ότι ενώ στις συνθήκες πολλαπλασιασμού το 98% των κυττάρων εκφράζει Ki67, κατά την όγδοη ημέρα της διαφοροποίησης μόλις το 2.5% των κυττάρων είναι Ki67⁺. Αυτό υποδηλώνει ότι τα κύτταρα εξέρχονται

σταδιακά από τον κυτταρικό κύκλο, και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι στο τέλος του προγράμματος διαφοροποίησης σχεδόν το σύνολο του πληθυσμού εκφράζει TujI (Εικόνα 36 Α) ο νευρικός δείκτης HuC/D (Εικόνα 36 Β) αυξάνεται σημαντικά ενώ μειώνεται ο δείκτης πρόδρομων νευρικών κυττάρων Nestin (Εικόνα 36 Γ) συμπεραίνεται ότι στις συνθήκες αυτές, τα κύτταρα διαφοροποιούνται αποτελεσματικά προς τη νευρική γενεαλογία.





Εικόνα 36: Τελικές συνθήκες νευρικής διαφοροποίησης των κυττάρων BE(2)-C. Σε θρεπτικό μέσο DMEM-F12+B27, παρουσία 15μM RA, και υπόστρωμα κολλαγόνο, οι νευρικοί δείκτες TuJ1 (Α) και HuC/D (Β) αυξάνονται δραματικά, ενώ παράλληλα ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki67 (Α) και ο δείκτης πρόδρομων νευρικών κυττάρων Nestin (Γ) μειώνονται.

(Α, Β): Συνεστιακή μικροσκοπία, Φακός 40x, Χρώση του πυρήνα με *Propidium Iodide* (PI).

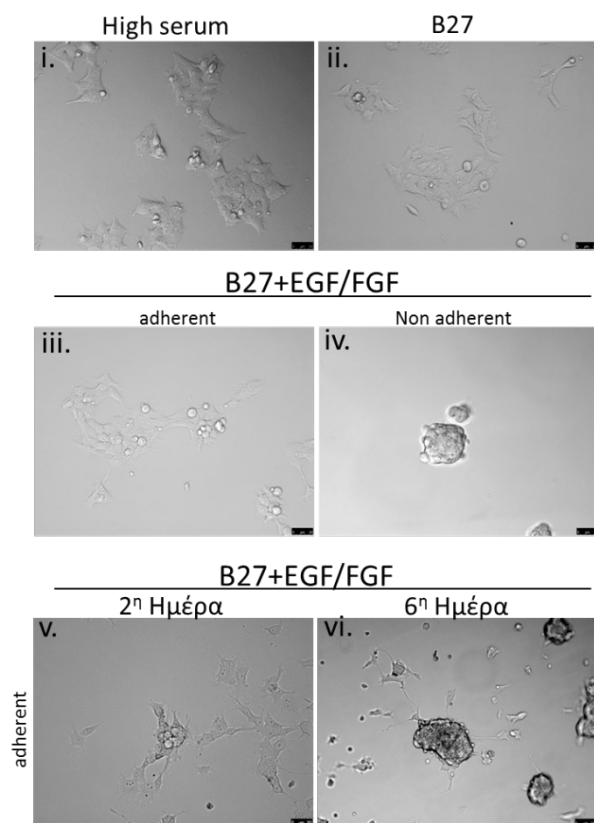
(Γ): Μικροσκοπία TIRF, Φακός 100x, Χρώση του πυρήνα με *DAPI*.

1.1.1.1 Εμπλουτισμός της Καλλιέργειας των Be(2)- C Κυττάρων με τον Κυτταρικό Υποπληθυσμό Τύπου I

Γνωρίζοντας ότι τα Be(2)-C κύτταρα διαθέτουν σε αρκετά μεγάλο ποσοστό, συγκριτικά με άλλα νευροβλαστώματα, τον υποπληθυσμό κυττάρων τύπου I, στα πλαίσια του προγράμματος ΘΑΛΗΣ, με τίτλο «Λειτουργικά δίκτυα μικρο-RNA και μεταγραφικών

ρυθμιστών στη φυσιολογική ανάπτυξη, γήρανση και ογκογένεση», επιχειρήσαμε να εμπλουτίσουμε τον πληθυσμό με αυτά τα κύτταρα, ώστε να αναλυθούν τα πρότυπα έκφραση miRNAs. Η προσπάθεια αυτή έγινε καλλιεργώντας τα Be(2)-C κύτταρα σε καλλιεργητικά πιάτα για κύτταρα που προσκολλώνται στο υπόστρωμα και σε βακτηριακά πιάτα, παρουσία αυξητικών παραγόντων EGF και FGF (20ng/ml) (Εικόνα 37). Και στις δύο περιπτώσεις, τα κύτταρα σχημάτιζαν σφαίρες (Εικόνα 37 iv και vi). Οι σφαίρες απομονώνονταν μηχανικά και αφού γίνονταν μονήρη κύτταρα (με τη βοήθεια της Acutase) επανεπιστρώνονταν στα αντίστοιχα καλλιεργητικά πιάτα. Η διαδικασία αυτή ακολουθούταν για τρία διαδοχικά περάσματα ώστε να καταφέρουμε να δημιουργήσουμε μια καλλιέργεια με εμπλουτισμένο πληθυσμό κυττάρων τύπου I, ο οποίος αποτελεί τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα.

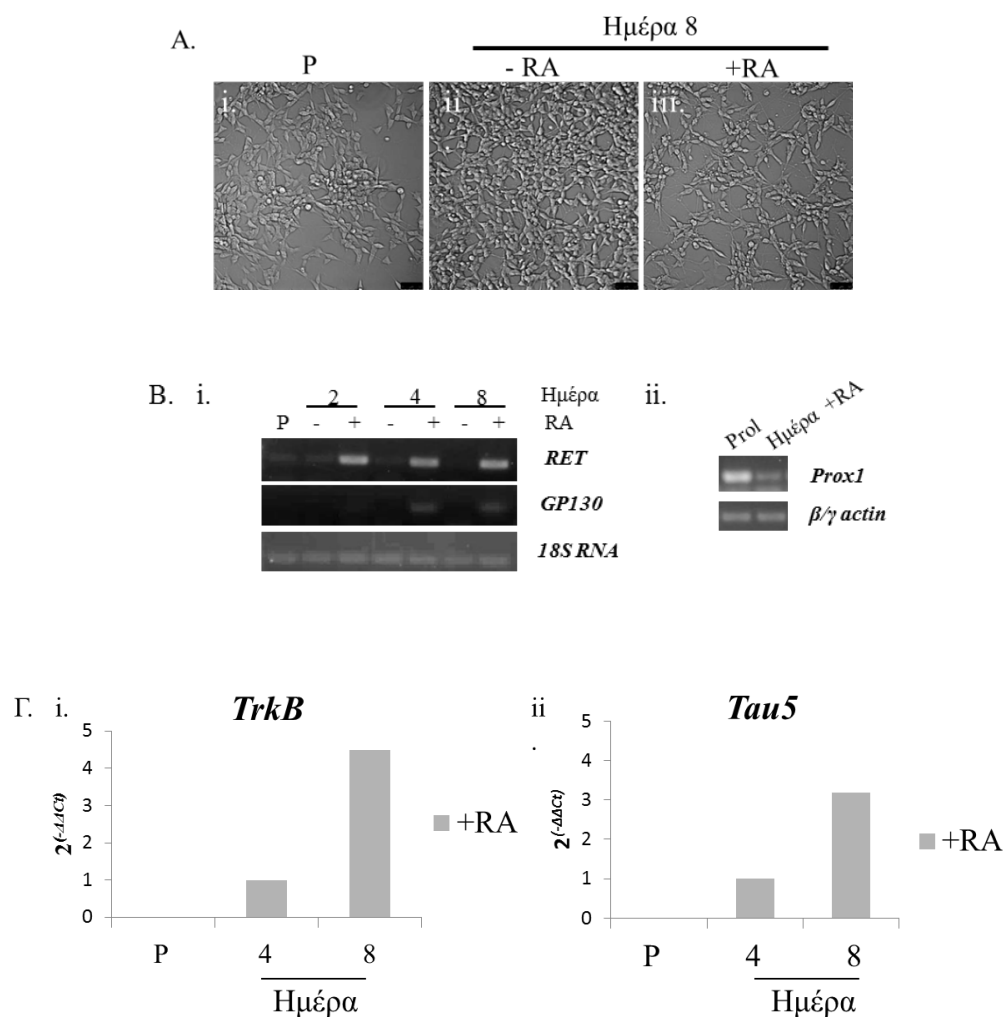
Απομονώθηκε τόσο RNA όσο και πρωτεΐνες για μελλοντική μελέτη και επιβεβαίωση του εμπλουτισμού του πληθυσμού με τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Ένας πρώτος έλεγχος των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου *prominin1* (CD133), μοριακό δείκτη των κυττάρων τύπου I, δεν υπέδειξε κάποια αύξηση γεγονός που πιθανά να σημαίνει ότι δεν καταφέραμε να εμπλουτίσουμε τον πληθυσμό μας με κύτταρα αυτού του τύπου. Ωστόσο περαιτέρω μελέτη με περισσότερους μοριακούς δείκτες, ενδεικτικούς για τον συγκεκριμένο πληθυσμό, είναι απαραίτητη.

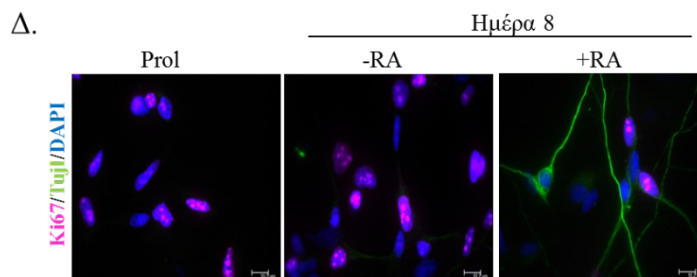


Εικόνα 37: Η μορφολογία των Be(2)-C κυττάρων είναι διαφορετική όταν αυτά καλλιεργούνται σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα ή καλλιεργητικά πιάτα. Παρουσία αυξητικών παραγόντων (EGF, FGF) τα Be(2)-C κύτταρα σχηματίζουν ογκοσφαίρες, όταν καλλιεργούνται σε βακτηριακά πιάτα (iv) και συσσωματώματα κυττάρων προσκολλημένα στο υπόστρωμα, σε καλλιεργητικά πιάτα για κύτταρα που προσκολλώνται στο υπόστρωμα (v: 2^η ημέρα, vi: 6^η ημέρα παρουσία αυξητικών παραγόντων). Τα κύτταρα σε πλούσιο θρεπτικό μέσο (10% ορό και B27) αναπτύσσονται ως μονοστοιβάδα κυττάρων. i= πλούσιος ορός στην καλλιέργεια, ii= καλλιέργεια κυττάρων παρουσία B27 αντί ορού, iii= προσκολλητικό πιάτο και θρεπτικό μέσο με B27 και αυξητικούς παράγοντες, iv= μη προσκολλητικό πιάτο με B27 και αυξητικούς παράγοντες

1.1.2 Νευροβλαστωματικά Κύτταρα SK-N-SH-SY5Y

Η δεύτερη νευροβλαστωματική σειρά που μελετήσαμε, ήταν τα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία καλλιεργούνται σε DMEM με 10% FBS και 1% antibiotic-antimycotic. Κάνοντας αντίστοιχα πειράματα όπως και στα Be(2)-C, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι τα κύτταρα SH-SY5Y διαφοροποιούνται άριστα μορφολογικά (Εικόνα 38 Α) σε θρεπτικό μέσο DMEM με 1% FBS και 10μM RA. Κατά την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης κάτω από αυτές τις συνθήκες, αυξάνονται τα επίπεδα mRNA των νευρικών δεικτών *RET*, *GP130*, *TrkB* και *Tau5* [221], ενώ συγχρόνως μειώνεται η έκφραση του *Prox1* (Εικόνα 38 Β και Γ). Η επιτυχία της διαφοροποίησης των κυττάρων SH-SY5Y προς τη νευρική μοίρα επιβεβαιώνεται και από την αύξηση της έκφρασης του TujI και τη μείωση του Ki67 (Εικόνα 38 Δ).



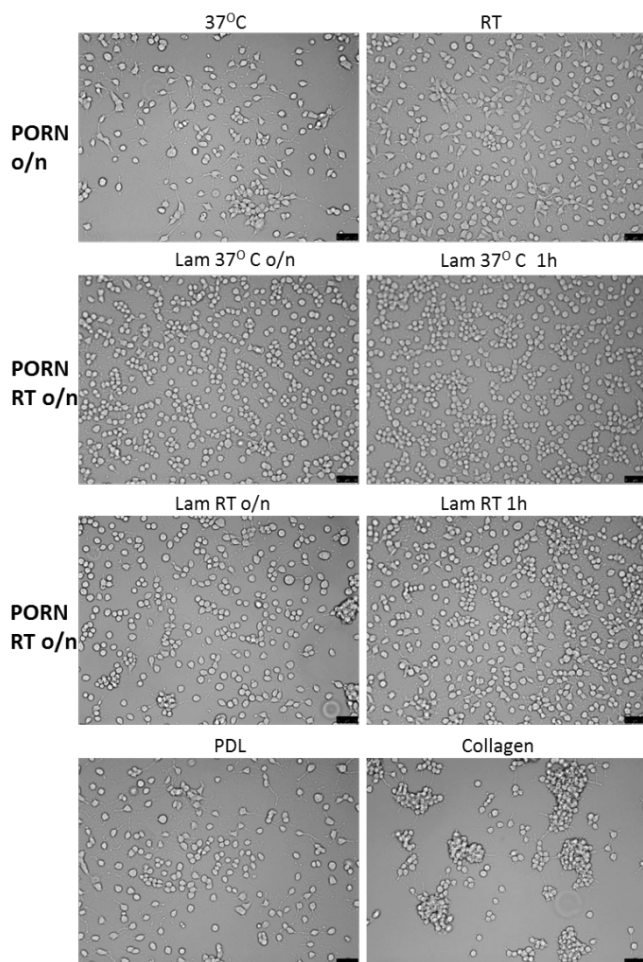


Εικόνα 38: Συνθήκες διαφοροποίησης των κυττάρων SH-SY5Y προς τη νευρική μοίρα. (Α) Σε θρεπτικό μέσο DMEM και 1% ορού, η παρουσία 10μM RA, οδηγεί σε σημαντική αύξηση του αριθμού και του μήκους των νευριτών. (i) Συνθήκες υψηλού ορού (*proliferating*), (ii) Συνθήκες χαμηλού ορού χωρίς RA (-RA), (iii) Συνθήκες χαμηλού ορού με RA (+RA). (Β) Κατά την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης το mRNA των νευρικών δεικτών *RET* και *GPI30* αυξάνεται από τη δεύτερη κιόλας ημέρα (i), ενώ παράλληλα μειώνονται τα μεταγραφικά επίπεδα του *Prox1* (ii). Η ανίχνευση των επιπέδων mRNA έγινε με αντίστροφη μεταγραφή (RT) σε συνδυασμό με ημιποσοτική PCR (RT-semiQPCR). (Γ) Παρατηρείται προοδευτική αύξηση στα επίπεδα mRNA των νευρικών δεικτών *TrkB* (i) και *Tau5* (ii). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με *18SRNA* στο (Β, i), β/γ *actin* στο (Β, ii) και *spr14* στα (Γ, i και ii). Η ανίχνευση των επιπέδων mRNA έγινε με RT-qPCR. (Δ) Πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε κύτταρα SH-SY5Y τα οποία έχουν καλλιιεργηθεί σε συνθήκες υψηλού ορού (*Prol*) και χαμηλού ορού απουσία (-RA) ή παρουσία (+RA) για 8 ημέρες. Παρατηρούμε ότι σε συνθήκες χαμηλού ορού ο αριθμός των Ki67⁺ κυττάρων μειώνεται είτε απουσία είτε παρουσία RA. Ωστόσο, ο δείκτης νευρικής διαφοροποίησης Tuj1 επάγεται μόνο παρουσία του RA. Μικροσκοπία TIRF, Φακός 100x, Χρώση του πυρήνα με DAPI.

1.1.3 Νευρικά Βλαστικά Κύτταρα

Παράλληλα, χαρακτηρίσαμε τις συνθήκες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των νευρικών βλαστικών κυττάρων από τον ενήλικο ιππόκαμπο. Δοκιμάσαμε διαφορετικά υποστρώματα τα οποία επιστρώθηκαν στα καλλιιεργητικά πιάτα σε διαφορετικές συνθήκες επώασης (θερμοκρασία και χρόνος). Μελετήθηκαν τέσσερα διαφορετικά υποστρώματα (PORN, Lam, κολλαγόνο, PDL), μόνα τους και σε συνδυασμούς. Διαπιστώσαμε ότι τα νευρικά βλαστικά κύτταρα διατηρούνται στην καλλιέργεια και πολλαπλασιάζονται καλά παρουσία bFGF (20ng/ml), σε υπόστρωμα πολυορνιθίνης (PORN) το οποίο έχει παραμείνει στο καλλιιεργητικό πιάτο 12-16 ώρες (o/n), σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Για τη διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων *in vitro*, είναι απαραίτητη και η παρουσία της λαμινίνης στο προσκολλητικό υπόστρωμα (PORN/Lam). Η λαμινίνη, όπως και το κολλαγόνο συμβάλλουν στην επέκταση των αυξητικών κώνων και τη νευριτική αύξηση. Αν και μορφολογικά τα κύτταρα παρουσιάζουν ικανοποιητική εικόνα σε υπόστρωμα

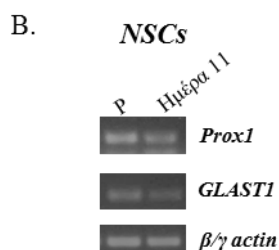
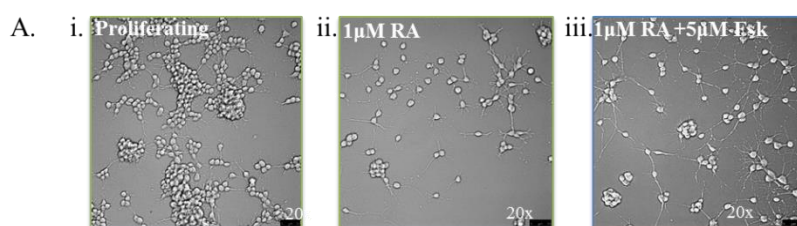
PORN/Lam, τόσο για 1 ώρα όσο και για 12-16 ώρες επώασης στους 37°C, επιλέξαμε να τα διαφοροποιούμε σε υπόστρωμα όπου η λαμινίνη έχει παραμείνει για 12-16 ώρες στους 37°C (**Εικόνα 39**).

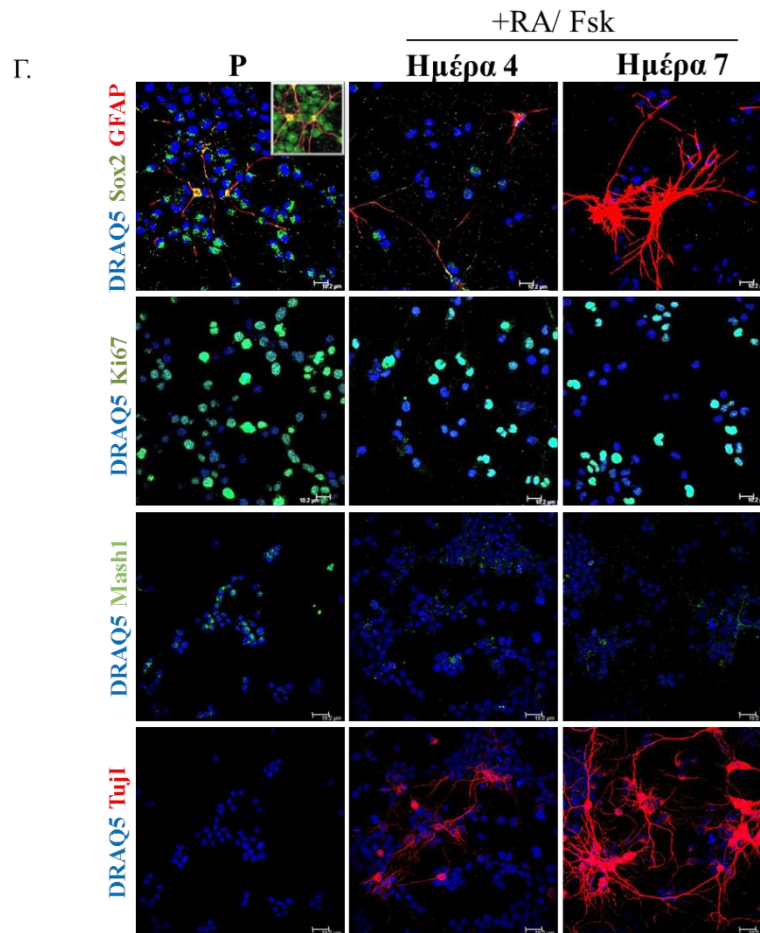


Εικόνα 39: Μορφολογία των νευρικών βλαστικών κυττάρων σε διαφορετικά υποστρώματα. Το υπόστρωμα PORN που παραμένει στο καλλιεργητικό πιάτο για 12-16 ώρες (o/n), σε θερμοκρασία δωματίου (RT), είναι ιδανικό για την καλλιέργεια και τον πολλαπλασιασμό αυτών των κυττάρων, ενώ το υπόστρωμα PORN/lam (PORN σε RT και Lam στους 37°C) είναι ιδανικό για τη διαφοροποίησή τους. Μικροσκόπιο TIRF, φακός 10x

Στη συνέχεια ελέγξαμε το δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών προς τη νευρική μοίρα. Δοκιμάσαμε να τα διαφοροποιήσουμε σε υπόστρωμα PORN/Lam είτε παρουσία RA (1μM) μόνο, είτε παρουσία RA (1μM) και φορσκολίνης (Fsk) (5μM). Την τέταρτη μέρα της διαφοροποίησης, παρατηρήσαμε ότι στη συνθήκη RA+Fsk τα κύτταρα εκτείνουν πολύ μεγαλύτερου μήκους νευρίτες από ότι στη συνθήκη RA (**Εικόνα 40A**). Διαπιστώσαμε επίσης ότι παρουσία RA+Fsk, τα επίπεδα mRNA των γονιδίων *Prox1* και *GLAST1* μειώνονται την ενδέκατη ημέρα διαφοροποίησης, ένδειξη ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων έχει διαφοροποιηθεί (**Εικόνα 40 B**). Ελέγξαμε επίσης με ανοσοκυτταροχημεία την έκφραση του δείκτη βλαστικότητας Sox2,

του Ki67, του ρυθμιστή της νευρογένεσης Mash1, του νευρικού δείκτη TuJ1 και του γλοιακού δείκτη GFAP. Διαπιστώσαμε ότι τα κύτταρα HCN διατηρούν το δυναμικό βλαστικότητα τους, αφού σε συνθήκες πολλαπλασιασμού το Sox2 εκφράζεται στο σύνολο του πληθυσμού, ενώ περιλαμβάνονται και κύτταρα που συνεκφράζουν Sox2 και GFAP (**Εικόνα 40 Γ**). Τα κύτταρα αυτά αντιπροσωπεύουν τα πολυδύναμα κύτταρα RGL (radial glia-like cells), βλαστικά κύτταρα που συναντώνται στην υποκοκκιώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου. Ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki67 ανιχνεύεται αρχικά στο 84% του συνολικού πληθυσμού, την τέταρτη ημέρα της διαφοροποίησης το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 80%, και την έβδομη ημέρα στο 37,6%. Εμφανής είναι και η μείωση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Mash1. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με τη δραματική άύξηση του νευρικού δείκτη TuJ1 επιβεβαιώνουν την επιτυχή πορεία της διαφοροποίησης προς τη νευρική μοίρα (**Εικόνα 40 Γ**).





Εικόνα 40: Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (HCN), διατηρούν το δυναμικό βλαστικότητας, καθώς και το δυναμικό διαφοροποίησής τους προς τη νευρική μοίρα. Η πορεία της διαφοροποίησης είναι πολύ πιο αποτελεσματική σε συνθήκες RA+Fsk συγκριτικά με το RA μόνο. (Α) Μορφολογία των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο. (Β) Κατά την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης παρατηρείται μείωση των επιπέδων mRNA των γονιδίων *Prox1* και *Glast1* (δείκτες πρόδρομων νευρικών κυττάρων), όπως φαίνεται με τη μέθοδο RT-semiQPCR (κανονικοποίηση με β/γ -actin). (Γ) Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα εκφράζουν σε μεγάλο ποσοστό τον δείκτη βλαστικότητας Sox2 ενώ ένα μικρό ποσοστό Sox2⁺ κυττάρων εκφράζουν και τον γλοιϊκό δείκτη GFAP, χαρακτηριστικό των κυττάρων ακτινωτής γλοίας. Το Sox2, το Ki67 και το Mash1 μειώνονται σταδιακά κατά τη νευρική διαφοροποίηση, ενώ ο δείκτης ανώριμων νευρικών κυττάρων Tuji, αυξάνεται. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας, Φακός 63x. Χρώση του πυρήνα με DRAQ5.

2. Έλεγχος του Πιθανή Ρόλου και της Σημασίας των Μεταγραφικών Παραγόντων NFIA και NFIB Κατά την Ενήλικη Νευρογένεση

2.1 Μελέτη της Έκφρασης και του Ρόλου των NFIA και B Μεταγραφικών Παραγόντων στην Ενήλικη Νευρογένεση

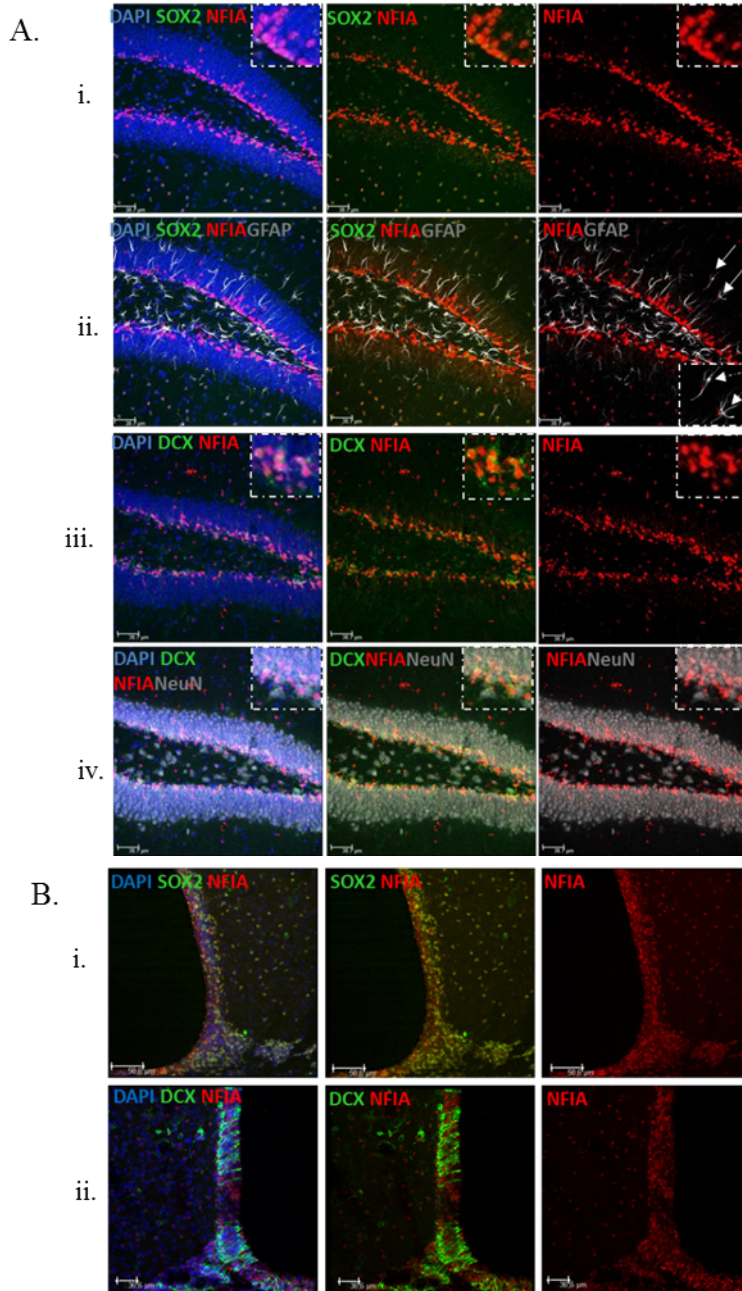
Όπως αναφέραμε ήδη στην εισαγωγή, οι NFIA και B μεταγραφικοί παράγοντες είναι απαραίτητοι για την άρτια ολοκλήρωση της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος και είναι υπεύθυνοι κυρίως για την επαγωγή της γλοιογένεσης. Προκαταρκτικά πειράματα στο εργαστήριο Ενήλικης Νευρογένεσης του HelmholtzZentrum του Μονάχου έδειξαν ότι ο NFIA συνεκφράζεται και συνεντοπίζεται με τον Rpbj-k, βασικό παράγοντα του μεταγραφικού συμπλόκου της σηματοδότησης Notch (**Εικόνα 5**), στα ενήλικα νευρικά βλαστικά κύτταρα. Έτσι, θέλοντας να ελέγξουμε αν οι μεταγραφικοί παράγοντες NFIA και B συμμετέχουν στη διαδικασία της ενήλικης νευρογένεσης αναλύσαμε το πρότυπο έκφρασης τους στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου και στην υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών.

2.1.1 Το Πρότυπο Έκφρασης των NFIA και B στην Οδοντωτή Έλικα του Ενήλικου Ιπποκάμπου και στην Υποκοιλιακή Ζώνη των Πλάγιων Κοιλιών

Προσπαθώντας να αναλύσουμε το πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών NFIA και NFIB, διαπιστώσαμε ότι εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό και στις δύο νευρογενικές περιοχές ενήλικου επίμυος ηλικίας 8 εβδομάδων. (**Εικόνα 41** και **Εικόνα 42**). Με πειράματα ανοσοϊστοχημείας, χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των NFIA, NFIB σε συνδυασμό με τον δείκτη νευρικών βλαστικών κυττάρων Sox2, τον γλοιακό δείκτη GFAP, καθώς και τους δείκτες νευρικής διαφοροποίησης DCX και NeuN, επιχειρήσαμε να χαρακτηρίσουμε με μεγαλύτερη λεπτομέρεια το πρότυπο έκφρασης των NFIA και NFIB σ' αυτές τις περιοχές.

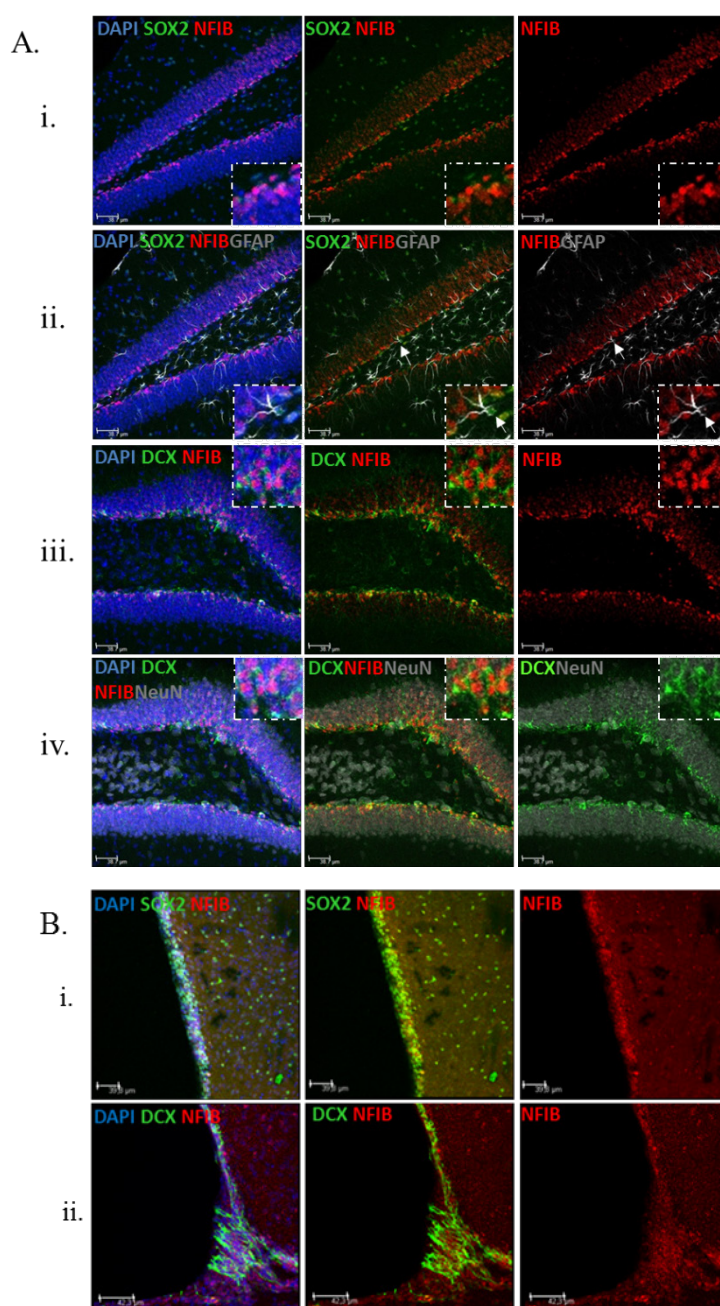
Παρατηρήσαμε ότι στην περιοχή της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου, τα κύτταρα που εκφράζουν NFIA εκφράζουν τόσο Sox2 όσο και DCX σε ποσοστό 93.3% (**Εικόνα 41 A, i** και **iii**), ενώ τα κύτταρα που εκφράζουν NFIB συνεκφράζουν Sox2 σε ποσοστό 94% και

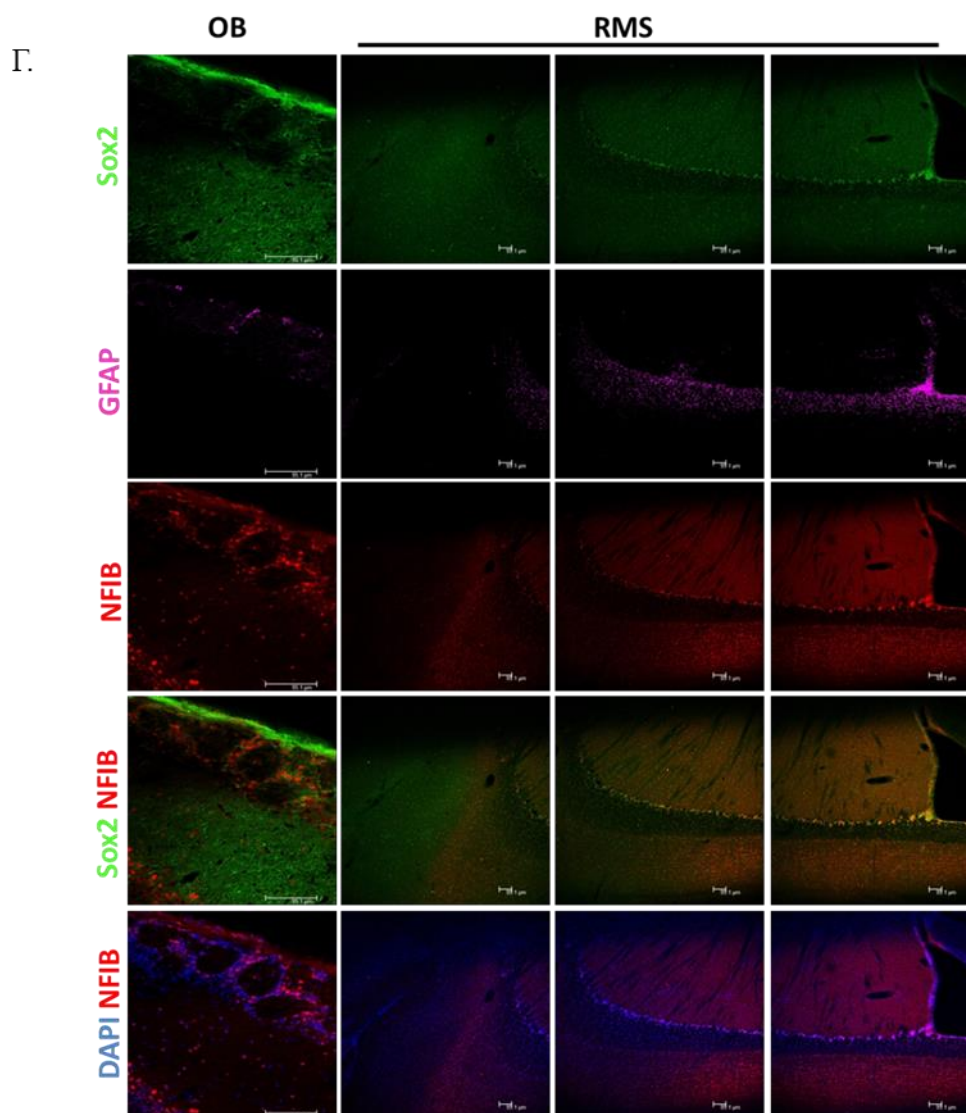
DCX σε ποσοστό 100% (Εικόνα 42 A, i και iii). Η έκφραση των NFIA και B είναι εξίσου άφθονη και στην υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών. Συνεκφράζονται τόσο με το Sox2 όσο και με το DCX (Εικόνα 41 B, i και ii, Εικόνα 42 B, i και ii). Παράλληλα ο NFIA φαίνεται πως εκφράζεται και στη μοριακή στοιβάδα του ιπποκάμπου και συνεντοπίζεται και με τον γλοιακό δείκτη GFAP (Εικόνα 42 A, ii). Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με το γεγονός ότι οι NFIA και B επάγουν τη γλοιογένεση. Ωστόσο δεν παρατηρείται αντίστοιχη έκφραση του NFIB στη συγκεκριμένη περιοχή (Εικόνα 42 A, ii), ένα εύρημα που ενδεχομένως να διαφοροποιεί τη λειτουργία των δύο μορίων στον ιππόκαμπο.



Εικόνα 41: Πρότυπο έκφρασης του NFIA στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου και την υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών. Σε εγκάρσιες τομές ενήλικου εγκεφάλου, παρατηρούμε ότι η έκφραση του NFIA είναι άφθονη τόσο στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου (A) όσο και στην υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών (B). Συνεντοπίζεται δε τόσο με τον δείκτη βλαστικότητας Sox2 (i) όσο και με τον πρώιμο νευρικό δείκτη DCX (iii), σε ποσοστό 93.3%. Το ποσοστό αυτό προέκυψε μετρώντας 100 κύτταρα/τομή από τρία διαφορετικά ζώα. Συνέκφραση παρατηρείται και με τον γλοιακό δείκτη GFAP στη μοριακή στοιβάδα (ii), καθώς και με τον δείκτη ώριμων νευρώνων NeuN στα κύτταρα της κοκκιώδους στοιβάδας (iv). Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI (450nm, μπλε χρώμα). Sox2= 488nm, DCX = 488nm, NFIA= 555nm. Κλίμακα: (A-i) 41.9μm (A-ii) 39.8 μm (B-i) 58.6μm (B-ii) 36.6μm. Πάχος τομών: 40μm. Φακός 40x.

Παρατηρούμε επίσης ότι υπάρχουν ορισμένα κύτταρα που εκφράζουν NFIA και NFIB, τα οποία βρίσκονται στην κοκκιώδη στοιβάδα της οδοντωτής έλικας και όπως φαίνεται στις εικόνες **41 A (iv)** και **42 A (iv)** συνεκφράζουν τον μοριακό δείκτη ώριμων νευρώνων NeuN. Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο είναι ότι τα κύτταρα που εκφράζουν NFIA και NFIB δεν συνεκφράζουν ταυτόχρονα Sox2 και GFAP, κάτι που θα υποδήλωνε ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες αυτοί εκφράζονται και στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα (**Εικόνα 42 A, ii μεγεθυμένο πλαίσιο**).

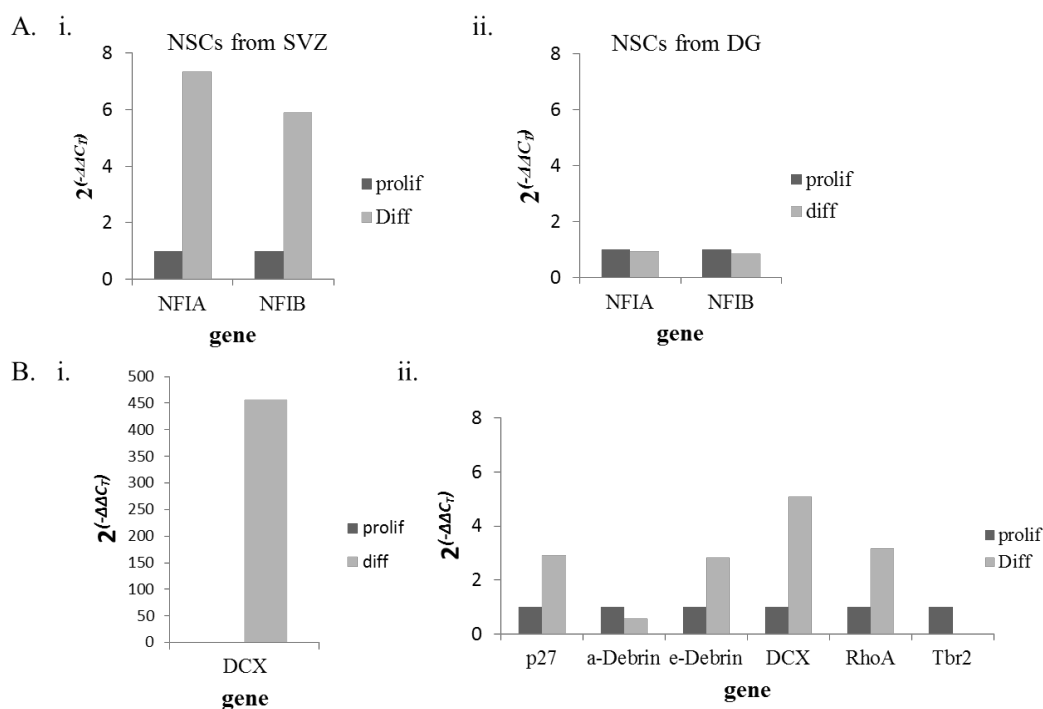




Εικόνα 42: Πρότυπο έκφρασης του NFIB στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου και την υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών. Σε εγκάρσιες τομές ενήλικου εγκεφάλου ποντικού, παρατηρούμε ότι η έκφραση του NFIB είναι άφθονη στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου (A) αλλά και στην υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών (B). Συνεντοπίζεται με (i) τον δείκτη πολυδυναμίας Sox2 σε ποσοστό 94% και (ii) με τον πρώιμο νευρικό δείκτη DCX σε ποσοστό 100%. Τα ποσοστά προκύψαν μετρώντας 100 κύτταρα/τομή από τρία διαφορετικά ζώα. Ο γλοιακός δείκτης GFAP δεν συνεκφράζεται με τον NFIB (iii). Επιπλέον τα Sox2⁺/GFAP⁺ κύτταρα δεν εκφράζουν NFIB (iii, *μεγέθυνση*). Σε διαμήκη τομή (Γ) παρατηρήσαμε ότι ο NFIB εκφράζεται καθ' όλο το μεταναστευτικό ρεύμα και συνεκφράζεται με το Sox2 στο μεγαλύτερο μέρος του Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα οσφρητικά σπειράματα του οσφρητικού βολβού (OB). Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI (450nm, μπλε χρώμα). Sox2= 488nm, DCX = 488nm, NFIB= 555nm, GFAP= 603nm. Κλίμακα: (A-i) 34.4μm (A-ii) 26.3 μm (B-i) 39.8μm (B-ii) 42.3μm. (Γ) 95.1μm Πάχος τομών 40μm.Φακός 40x σε (A), (B), (Γ) OB και 10x σε (Γ) RMS.

2.1.2 Μελέτη των Μεταγραφικών Επιπέδων του NFIA και NFIB Κατά τη Νευρική Διαφοροποίηση των Πρόδρομων Νευρικών Κυττάρων, *in vitro*.

Παράλληλα, μελετήσαμε και τις μεταβολές στα μεταγραφικά επίπεδα των NFIA και NFIB, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης νευρικών βλαστικών κυττάρων, απομονωμένων από την υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών ενήλικου ποντικού. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργούνται αρχικά σε πιάτα χωρίς υπόστρωμα, παρουσία αυξητικών παραγόντων (bFGF, EGF, 20 ng/ml) όπου σχηματίζουν νευροσφαίρες. Σε καλλιεργητικά πιάτα επιστρωμένα με poly-D lysine και laminin, τα κύτταρα αναπτύσσονται ως μονοστοιβάδα και απουσία αυξητικών παραγόντων μπορούν να διαφοροποιηθούν σε νευρώνες σε χρονικό διάστημα 4 ημερών. Χρησιμοποιώντας αυτό το μοντέλο, παρατηρήσαμε πως τα επίπεδα mRNA τόσο του NFIA όσο και του NFIB αυξάνονται σημαντικά κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης προς τη νευρική γενεαλογία (**Εικόνα 43 A, i**). Αντίθετα, κατά τη διαφοροποίηση πρόδρομων νευρικών κυττάρων προερχόμενων από την υποκοκιάδη ζώνη της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου, τα επίπεδα mRNA των NFIA και NFIB δεν παρουσιάζουν μεταβολή (**Εικόνα 43 A, ii**). Η επιτυχής διαφοροποίηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων επιβεβαιώθηκε μέσω της αύξησης της έκφρασης νευρικών δεικτών, όπως DCX, RhoA, drebrin A, drebrin E και Tbr2 (**Εικόνα 43 B**).



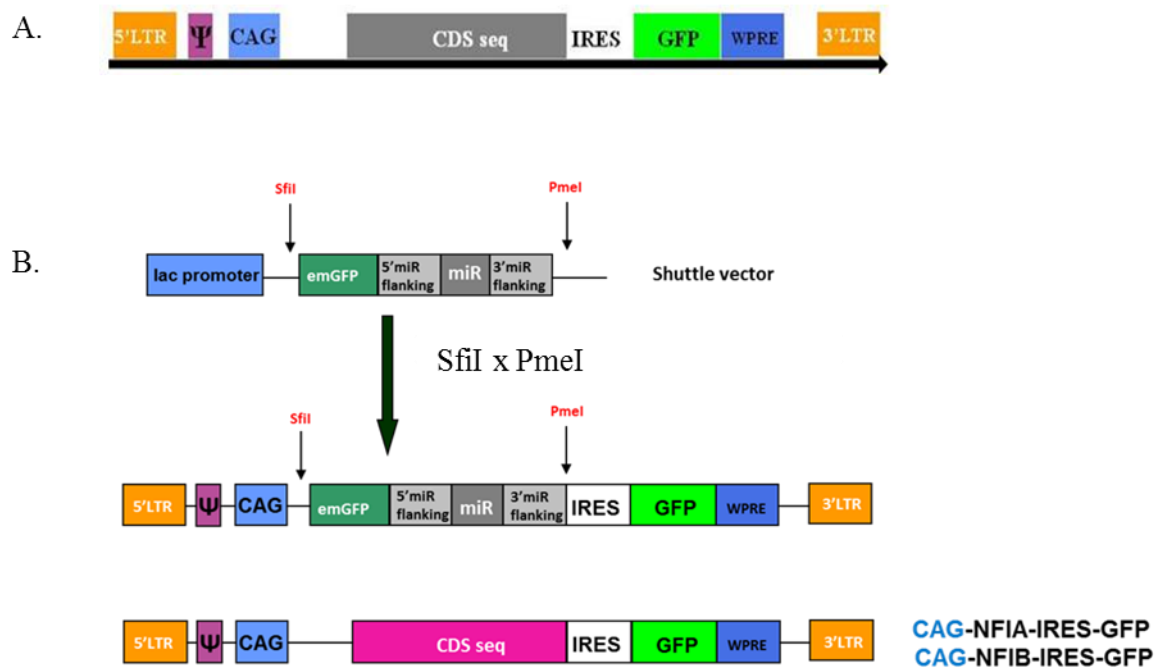
Εικόνα 43: Μεταβολές στα επίπεδα mRNA των γονιδίων NFIA και NFIB κατά τη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης. (Α) Τα επίπεδα mRNA των NFIA και NFIB αυξάνονται κατά τη διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων απομονωμένων από την υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών (i), ενώ όταν τα κύτταρα προέρχονται από την υποκοιλιακή ζώνη της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου τα επίπεδα των μεταγράφων παραμένουν σταθερά (ii). (Β) Έλεγχος των επιπέδων mRNA χαρακτηριστικών νευρικών δεικτών κατά τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων από την υποκοιλιακή (i) και την υποκοιλιακή (ii) ζώνη. Η αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *DCX*, *RhoA*, *drebrin A*, και *drebrin E* επιβεβαιώνει την διαφοροποίηση προς τη νευρική γενεαλογία, ενώ η αύξηση του *p27* επιβεβαιώνει ότι τα κύτταρα. Τα επίπεδα των mRNA των παραπάνω γονιδίων ελέγχθηκαν με τη μέθοδο RT-qPCR (Reverse Transcription-quantitative PCR).

Τα αποτελέσματα μας αποκαλύπτουν ένα νέο πιθανή ρόλο των πρωτεϊνών NFIA και NFIB στην πορεία της ενήλικης νευρογένεσης.

2.1.3 Κατασκευή Ιικών Φορέων για την Καταστολή της Έκφρασης μέσω miRNAs για την Καταστολή της Έκφρασης των Μορίων NFIA και NFIB, *in vivo*.

Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα αποτελούν ενδείξεις ότι οι NFIA και NFIB ενδεχομένως να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της νευρογένεσης. Για να απαντήσουμε αυτό το ερώτημα σχεδιάσαμε πλασμιδιακές κατασκευές ώστε, μέσω της παρασκευής ρετροϊικών φορέων, να μπορούμε να υπερεκφράσουμε ή να καταστείλουμε επιλεκτικά την έκφραση αυτών των μορίων. Χρησιμοποιώντας κατάλληλες πλασμιδιακές κατασκευές από το εργαστήριο του Dr. Kinichi Nakashima, υποκλωνοποιήθηκαν οι κωδικές περιοχές των NFIA και NFIB, σε ιικό φορέα, ο οποίος φέρει τον ισχυρό υποκινητή CAG, με στόχο την υπερέκφραση των μορίων (Εικόνα 44 Α).

Για την καταστολή της έκφρασης των NFIA και NFIB, συντέθηκαν 4 διαφορετικά miRNAs (Ambion) για κάθε μόριο, υβριδοποιήθηκαν και κλωνοποιήθηκαν αρχικά σε έναν ενδιάμεσο φορέα, και στη συνέχεια στον ιικό φορέα CAG-IRES-GFP (Εικόνα 44 Β) όπως περιγράφεται αναλυτικά στις μεθόδους (Μέθοδοι, παράγραφος 2.2.13.1). Ο απώτερος σκοπός ήταν η διαμόλυνση της υποκοιλιακής ζώνης της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου με τους ρετροϊούς, ώστε να κατανοήσουμε τη σημασία και το ρόλο των NFIA και NFIB στην ενήλικη νευρογένεση.



Εικόνα 44: Πλασμιδιακές κατασκευές για την υπερέκφραση (A) και την καταστολή μέσω miRNAs (B), των μεταγραφικών παραγόντων NFIA και B. Τα miRs, αφού υβριδοποιήθηκαν, κλωνοποιήθηκαν σε έναν ενδιάμεσο, ειδικά σχεδιασμένο φορέα ώστε μετά από περιοριστικές πέψεις με τα ένζυμα *SfiI* και *PmeI*, να εντεθούν στον φορέα pCAG-IRES-GFP, για την παρασκευή των ρετροϊών.

3. Διερεύνηση του Ρόλου και της Ρύθμισης της Γονιδιακής Έκφρασης της Μεθυλοτρανσφεράσης της Αργινίνης PRMT8 στην Ενήλικη Νευρογένεση

Όπως αναφέραμε λεπτομερώς στο κεφάλαιο 2 της εισαγωγής (*PRMT8: Μια Εξειδικευμένη Μεθυλοτρανσφεράση της Αργινίνης για το Νευρικό Σύστημα*), η πρωτεΐνη PRMT8 εκφράζεται εξειδικευμένα στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ωστόσο ο ρόλος και η ενεργότητα της δεν έχουν χαρακτηριστεί με σαφήνεια.

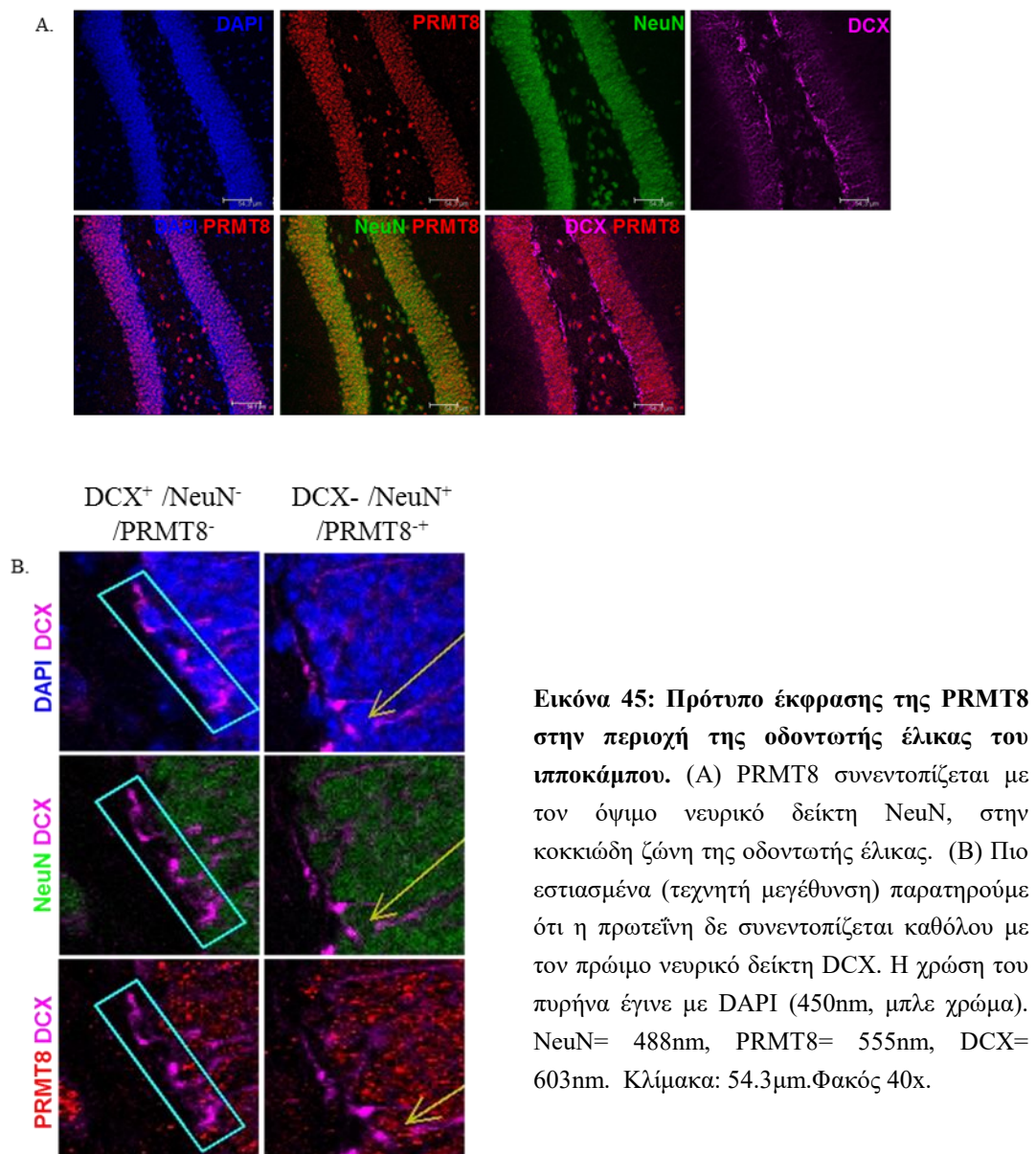
Θέλοντας να κατανοήσουμε αν η PRMT8 πρωτεΐνη συμμετέχει ενεργά στην πορεία της ενήλικης νευρογένεσης, χαρακτηρίσαμε το πρότυπο έκφρασης της στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου και δημιουργήσαμε πλασμιδιακές κατασκευές με στόχο την καταστολή αλλά και την υπερέκφραση της στην περιοχή της οδοντωτής έλικας. Συγχρόνως, προσπαθήσαμε να μελετήσουμε τη ρύθμιση της έκφρασης της κάτι που μας οδήγησε στη μελέτη του 5' άκρου του γονιδίου, το οποίο διαπιστώσαμε ότι χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη πολυπλοκότητα.

3.1 Ανάλυση του Προτύπου Έκφρασης της Μεθυλοτρανσφεράσης της Αργινίνης PRMT8 στην Οδοντωτή Έλικα του Ιπποκάμπου

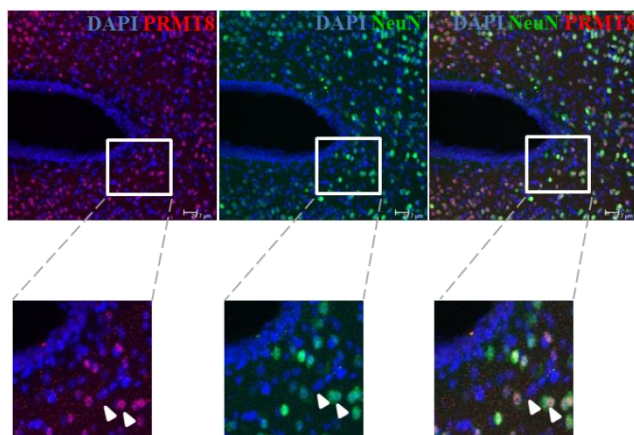
Επιχειρήσαμε να χαρακτηρίσουμε το πρότυπο έκφρασης της, στις νευρογενικές περιοχές του εγκεφάλου, εστιάζοντας αρχικά στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου.

Με πειράματα ανοσοϊστοχημείας, σε εγκάρσιες τομές εγκεφάλου ενήλικου ποντικού, διαπιστώσαμε ότι η PRMT8 συνεκφράζεται με την πρωτεΐνη NeuN η οποία εντοπίζεται στον πυρήνα των ώριμων νευρικών κυττάρων, στην κοκκιώδη στοιβάδα της οδοντωτής έλικας, ενώ δεν συνεντοπίζεται καθόλου με την πρωτεΐνη DCX, έναν δείκτη πρόιμης νευρικής διαφοροποίησης, που εκφράζεται στην υποκοκκιώδη ζώνη του ιπποκάμπου (**Εικόνα 45 Α και Β**).

Αξίζει να σημειωθεί πως η υποκυτταρική κατανομή της PRMT8 είναι πυρηνική και καθόλου μεμβρανική, μια παρατήρηση που προσδίδει νέο και ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε αυτό το ένζυμο για τον λειτουργικό του ρόλο εντός του πυρήνα των ώριμων νευρικών κυττάρων και πιθανόν την επίδραση του στη δομή της χρωματίνης.



Ελέγχοντας την έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε μία διαφορετική περιοχή του εγκεφάλου, στον φλοιό, παρατηρήσαμε ότι αυτή εκφράζεται μόνον στα κύτταρα που συγχρόνως εκφράζουν NeuN (**Εικόνα 46**). Αυτό ίσως σημαίνει ότι η έκφραση της PRMT8 περιορίζεται μόνο σε συγκεκριμένους τύπους νευρώνων, χαρακτηριστικό ιδιαίτερα σημαντικό για την κατανόηση του ρόλου και της λειτουργίας αυτού του μορίου.



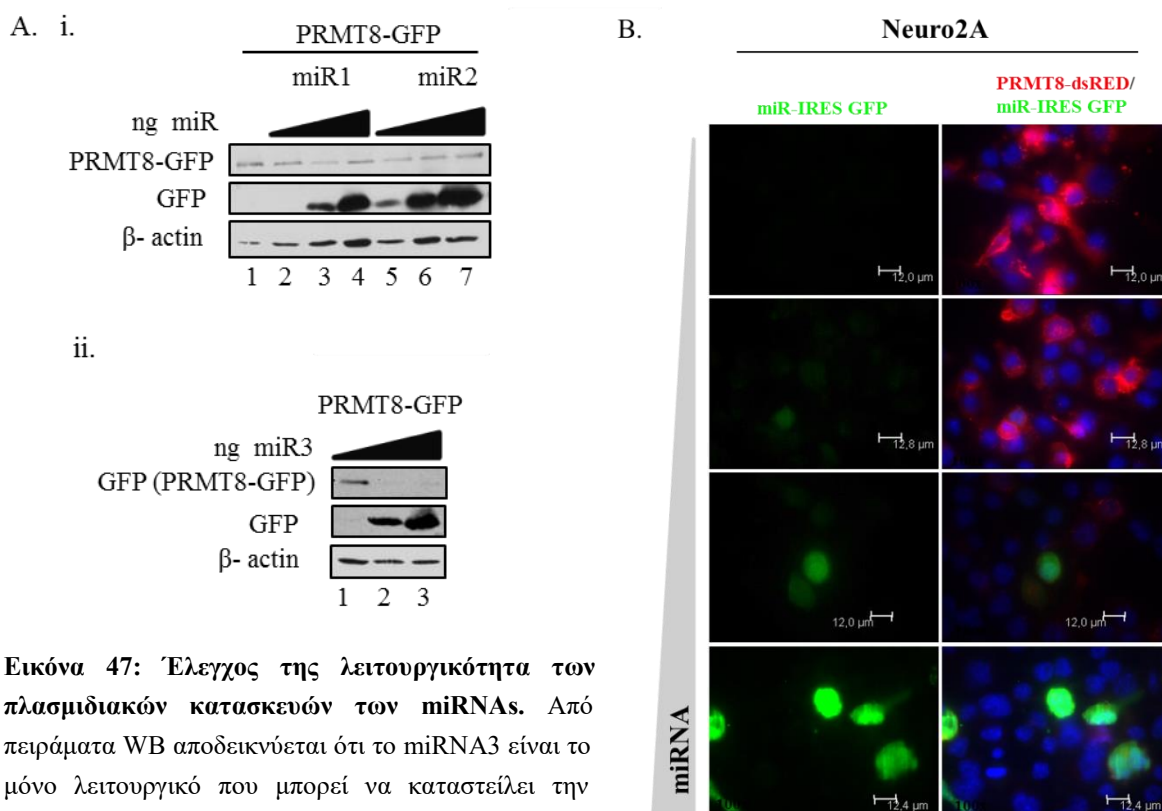
Εικόνα 46: Πρότυπο έκφρασης της PRMT8 πρωτεΐνης στην περιοχή του φλοιού. Η PRMT8 εκφράζεται μόνο στα κύτταρα που συνεκφράζουν NeuN και όχι σε όλο τον κυτταρικό πληθυσμό. NeuN=488nm, PRMT8=555nm, Πυρινηκή χρώση με DAPI. Κλίμακα: 24.7 μm . Φακός 40x.

Η έντονη παρουσία της PRMT8 πρωτεΐνης στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου, που για πρώτη φορά παρατηρήσαμε, ίσως υπονοεί ότι το μόριο αυτό συμμετέχει στην πορεία της ενήλικης νευρογένεσης. Η πυρινηκή της έκφραση ίσως σχετίζεται με τη μεθυλίωση της αργινίνης των ιστονών, η οποία δεν είναι καλά μελετημένη. Αυτό θα βοηθούσε ιδιαίτερα στην κατανόηση των μηχανισμών της αυστηρής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, που αποτελεί ένα συναρπαστικό γεγονός όχι μόνο για την κατανόηση της νευρογένεσης αλλά και για όλη την αναπτυξιακή και μοριακή βιολογία.

3.2 Κατασκευή Πλασμιδιακών Κατασκευών για την Υπερέκφραση και την Καταστολή της Έκφρασης, μέσω miRNAs, της Πρωτεΐνης PRMT8.

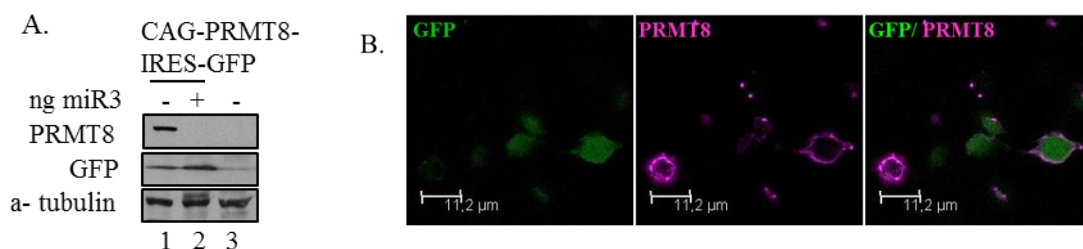
Όπως και με τους μεταγραφικούς παράγοντες NFIA και B, έτσι και με την PRMT8, ο επόμενος στόχος μας ήταν να διαπιστώσουμε αν διαδραματίζει κομβικό ρόλο κατά την πορεία της νευρογένεσης. Για τον σκοπό αυτό σχεδιάσαμε και δημιουργήσαμε πλασμιδιακές κατασκευές με στόχο την παρασκευή ρετροϊών. Υποκλωνοποιήθηκε έτσι η κωδική περιοχή του γονιδίου *prmt8*, από πλασμιδιακές κατασκευές ιχνηλάτες της PRMT8 (πλασμιδιακοί φορείς pEGFP-N1 και pdsRED-N1) στον ιικό φορέα CAG- IRES-GFP, για την υπερέκφραση του μορίου. Παράλληλα συντέθηκαν και κλωνοποιήθηκαν 3 miRNAs (Υλικά, παράγραφος 0), κατά τρόπο αντίστοιχο με αυτόν των miR για τους NFIA και B, για την καταστολή της έκφρασης του της PRMT8 πρωτεΐνης. Απώτερος στόχος και εδώ ήταν η φαινοτυπική ανάλυση των κυττάρων απ' όπου απουσιάζει ή υπερεκφράζεται η PRMT8, ώστε να κατανοήσουμε το πιθανή ρόλο στην διαδικασία της νευρογένεσης.

Για να διαπιστώσουμε εάν οι πλασμιδιακές κατασκευές με τα miRNAs έχουν την ικανότητα να καταστείλουν την έκφραση της PRMT8, έπρεπε πρώτα να ελέγξουμε τη λειτουργικότητά τους. Ελέγχοντας τη λειτουργικότητα και την απόδοση των τριών πλασμιδιακών κατασκευών των miRNAs, διαπιστώσαμε πως παρότι όλα είναι λειτουργικά, ως μοριακές κατασκευές, μόνον το miR3 μπορεί να καταστείλει την έκφραση της PRMT8. Αυτό επιβεβαιώθηκε με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western (**Εικόνα 47 A i, ii**) και ανοσοκυτταροχημείας (**Εικόνα 47 B**), μέσω της υπερέκφρασης της εξωγενούς σημασμένης, με GFP και dsRED, PRMT8 (PRMT8-GFP, PRMT8-dsRED) και των miRNAs, σε κύτταρα Neuro2A, καθώς καμιά από τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούμε δεν εκφράζει ενδογενώς PRMT8.



Εικόνα 47: Έλεγχος της λειτουργικότητας των πλασμιδιακών κατασκευών των miRNAs. Από πειράματα WB αποδεικνύεται ότι το miRNA3 είναι το μόνο λειτουργικό που μπορεί να καταστείλει την υπερέκφρασμένη PRMT8, με CMV-PRMT8-GFP ενώ τα miR1 και 2 δεν μπορούν να μειώσουν την έκφραση της και επομένως δεν είναι λειτουργικά. Πιο αναλυτικά, Neuro2A κύτταρα διαμολύνθηκαν με A. (i) 200ng CMV-PRMT8-GFP και 40, 400 και 1600ng miR3 και (ii) με 200ng CAG-PRMT8-IRES-GFP και 400ng miR3. Και στις 2 περιπτώσεις τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PRMT8 μειώνονται παρουσία 400ng miR3 και πάνω. Το ίδιο προκύπτει και από αντίστοιχα πειράματα ανοσοφθορισμού (B) όπου το miR3 (250 και 500ng) καταστέλλει την υπερέκφρασμένη με CMV-PRMT8-dsRED (100ng), πρωτεΐνη. Κλίμακα 12μm, 12.8μm, 12μm και 12.4μm με φορά από επάνω προς τα κάτω. Φακός 100x

Παράλληλα ελέγχθηκε η λειτουργικότητα της πλασμιδιακής κατασκευής για την υπερέκφραση της PRMT8 (CAG-PRMT8-IRES-GFP). Από πειράματα διαμόλυνσης σε Neuro2A κύτταρα, διαπιστώσαμε ότι αυτή είναι λειτουργική ενώ ταυτόχρονα το miR3 μπορεί να καταστείλει την έκφραση του μορίου (**Εικόνα 48 A**). Από πειράματα υπερέκφρασης του ιικού φορέα CAG-PRMT8-IRES-GFP σε Be(2)- C κύτταρα και πειράματα ανοσοϊστοχημείας, παρατηρήσαμε, από την έκφραση του GFP ότι αυτό κατανέμεται σε όλη την έκταση του κυττάρου όπως άλλωστε αναμένεται, ενώ με τη παράλληλη χρήση αντισώματος έναντι της PRMT8, διαπιστώσαμε πως η PRMT8 κατανέμεται αποκλειστικά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων (**Εικόνα 48 B**). Γνωρίζουμε ότι η PRMT8 πρωτοχαρακτηρίστηκε ως μία προσδεδεμένη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη πρωτεΐνη [222]. Το γεγονός ότι δεν εντοπίσαμε κανένα κύτταρο όπου η PRMT8 να κατανέμεται στον πυρήνα, αποτελεί πρόβλημα για την περαιτέρω μελέτη μας, μιας και επιθυμούμε να μελετήσουμε το δυναμικό της πυρηνικής PRMT8, εφόσον τα ευρήματά μας δείχνουν πως η PRMT8 κατανέμεται στον πυρήνα των κυττάρων της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου. Υποθέτουμε επομένως πως ίσως υπάρχει κάποια εναλλακτική ισομορφή της πρωτεΐνης παραγόμενη από διαφορετική κωδική περιοχή που να κατευθύνει την πρωτεΐνη στον πυρήνα των κυττάρων.



Εικόνα 48: Η πλασμιδιακή κατασκευή υπερέκφρασης είναι λειτουργική. (A) Πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, από την υπερέκφραση της πλασμιδιακής κατασκευής σε κύτταρα Neuro2A, επιβεβαιώνουν τη λειτουργικότητα της ενώ παράλληλα φαίνεται πως το miR3 είναι ικανό να καταστείλει την έκφραση της PRMT8. (B) Η λειτουργικότητα επιβεβαιώνεται και με πειράματα ανοσοκυτταροχημείας. Με χρήση αντισώματος έναντι της PRMT8 παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη κατανέμεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των Be(2)-C κυττάρων. Κλίμακα 11.2μm

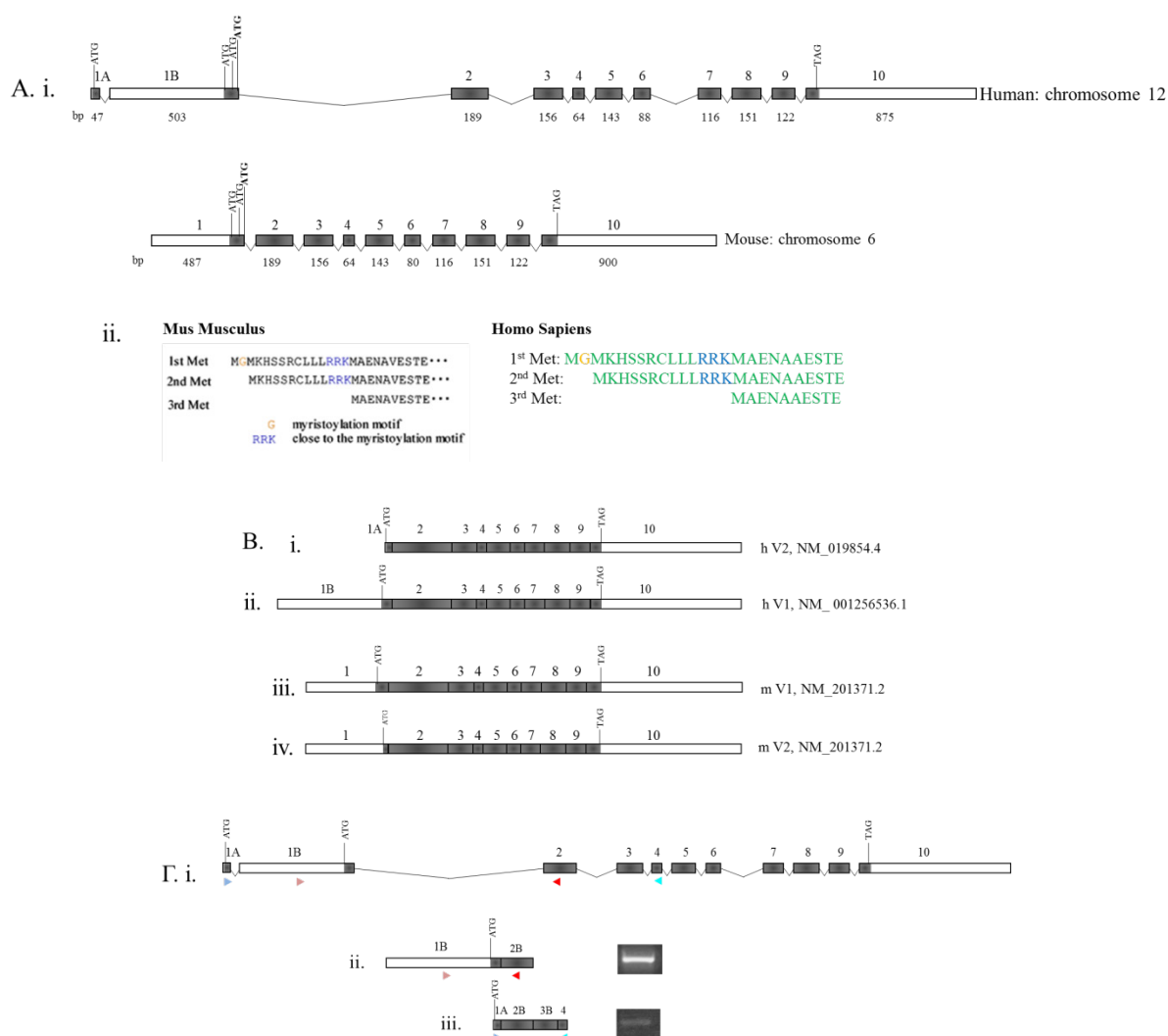
3.3 Χαρακτηρισμός του 5' Ακρου του Γονιδίου *Prmt8* με Σκοπό την Κλωνοποίηση του Μεταγράφου που Αντιστοιχεί στην Πυρηνική Ισομορφή της Πρωτεΐνης

Έχοντας διαπιστώσει ότι οι κατασκευές που φτιάξαμε για την υπερέκφραση της PRMT8 παρήγαγαν μόνο την μεμβρανική μορφή, επιχειρήσαμε να απομονώσουμε την πυρηνική ισομορφή της πρωτεΐνης, προκειμένου να μπορέσουμε να μελετήσουμε τον ρόλο της κατά τη νευρική διαφοροποίηση. Η PRMT8 έχει χαρακτηριστεί κυρίως ως μία πρωτεΐνη που αγκυροβολεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων [139]. Η κατανομή αυτή οφείλεται στην μυριστοϋλίωση της γλυκίνης που βρίσκεται αμέσως μετά την εναρκτήρια μεθειονίνη (Gly-2). Από πειράματα υπερέκφρασης με το γονίδιο του ποντικού, βρέθηκε ότι όταν ως σημείο έναρξης της μετάφρασης χρησιμοποιείται το δεύτερο ή το τρίτο κατά σειρά κατάλοιπο μεθειονίνης τότε η PRMT8 λαμβάνει πυρηνική κατανομή (**Εικόνα 49 A i και ii**). Ωστόσο η έκφραση των αντίστοιχων ενδογενών ισομορφών δεν επιβεβαιώθηκε ποτέ πειραματικά.

Στον άνθρωπο φαίνεται ότι υπάρχει διαφορετική οργάνωση στη δομή του γονιδίου (**Εικόνα 49 A, i**), γεγονός που έθεσε υπό αμφισβήτηση τα συμπεράσματα που είχαν βγει για το γονίδιο του ποντικού (παρότι οι αμινοξικές αλληλουχίες που κατά τους Kousaka *et al.*, προσδίδουν τόσο την μυριστοϋλιωμένη όσο και την πυρηνική μορφή της πρωτεΐνης είναι υψηλά συντηρημένες στο ποντίκι και στον άνθρωπο (**Εικόνα 49 A, ii**).

Μελετώντας τον γονιδιακό τόπο του *Prmt8* στον άνθρωπο, παρατηρήσαμε ότι υπάρχει ένα θεωρητικά προβλεπόμενο μετάγραφο, που ονομάζεται hV2 (NCBI_Ref_Seq:NM_001256536.1) το οποίο διαφέρει από το πειραματικά επιβεβαιωμένο hV1 (NCBI_Ref_Seq:NM_019854.4) μόνο στα πρώτα αμινοξέα του N-τελικού άκρου. Το προϊόν της ισομορφής hV2 στερείται του καταλοίπου Gly-2, και θα μπορούσε να αποτελεί την πυρηνική μορφή της πρωτεΐνης. Το θεωρητικό εξώνιο 1 του εναλλακτικού μεταγράφου hV2 το ονομάσαμε 1A, για να το ξεχωρίζουμε από το εξώνιο 1 του γνωστού μεταγράφου hV1 το οποίο ονομάσαμε 1B (είναι αυτό που οδηγεί στη μυριστοϋλίωση της πρωτεΐνης). Το εξώνιο 1A εδράζεται σε πολύ μεγάλη απόσταση, 109.801 bp ανοδικά του εξονίου 1B (**Εικόνα 49 A, i**). Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη του μεταγράφου αυτού χρησιμοποιήσαμε ως υλικό, ολικό RNA από ανθρώπινο εμβρυικό εγκέφαλο (λόγω της απουσίας έκφρασης του

γονιδίου στα βιολογικά μας μοντέλα). Χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για τα εξώνια 1A και 1B σε συνδυασμό με έναν εκκινητή από το υποθετικά κοινό εξώνιο 2 (Εικόνα 49 B i και ii) διαπιστώσαμε με RT-PCR ότι εκφράζονται και οι δύο μορφές (Εικόνα 49 Γ) σε αυτόν τον ιστό.

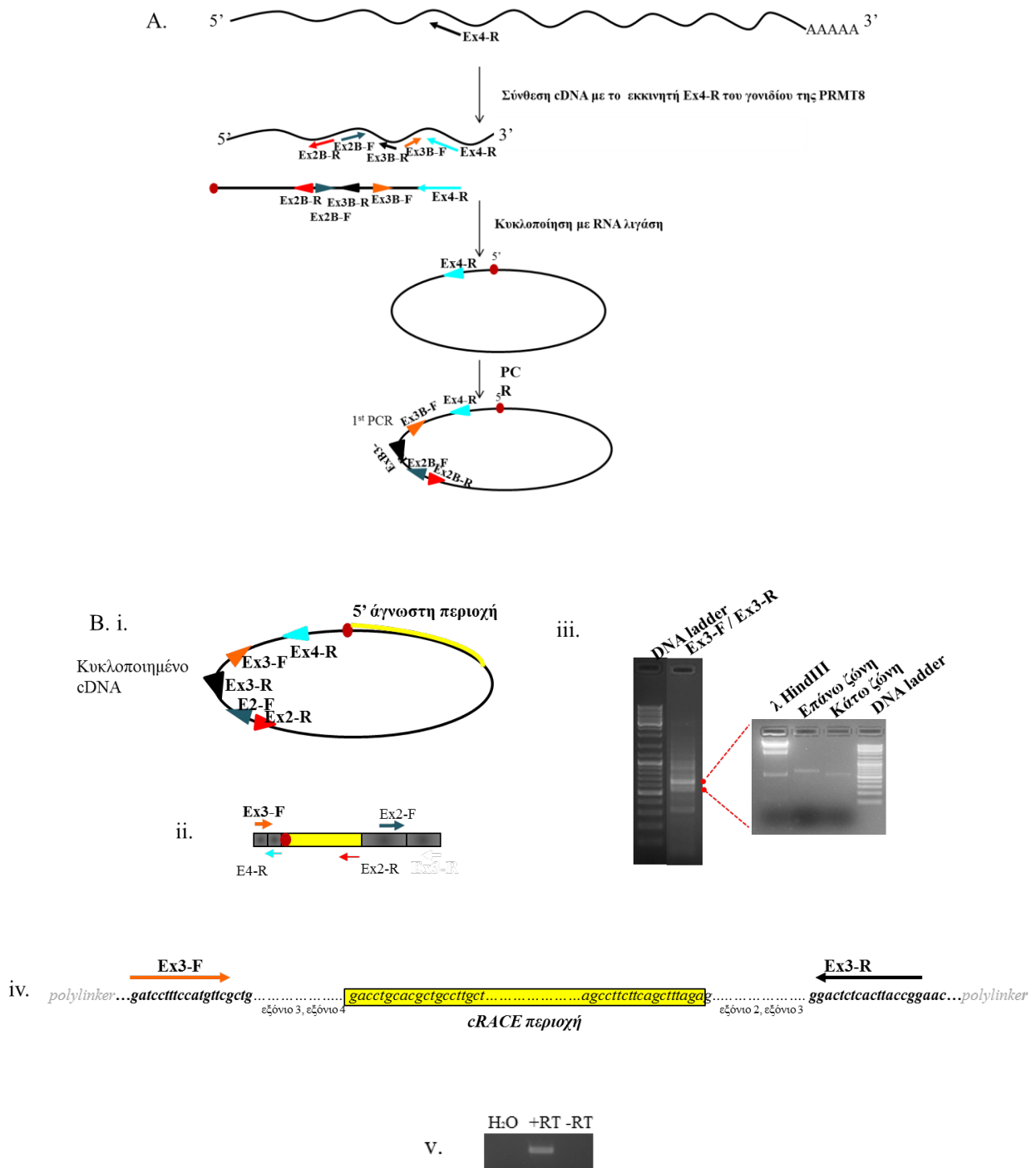


Εικόνα 49: Οργάνωση της δομής του γονιδίου Prmt8 στον άνθρωπο και τον ποντίκι. (A) Σχηματική απεικόνιση του γονιδιακού τύπου στον άνθρωπο (επάνω) και στο ποντίκι (κάτω) (i). Η αμινοξική αλληλουχία (με τα τρία εναλλακτικά εναρκτήρια κωδικόνια) που έχει υποτεθεί ότι ευθύνεται τόσο για την μυριστοϋλιωμένη όσο και για την πυρηνική μορφή της πρωτεΐνης, είναι υψηλά συντηρημένη στο ποντίκι και στον άνθρωπο (ii). (B) Σχηματική απεικόνιση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου Prmt8. Το hV1 είναι πειραματικά επιβεβαιωμένο, ενώ το hV2 έχει προβλεφθεί θεωρητικά. Στον ποντικό οι δύο ισομορφές της πρωτεΐνης (mV1 και mV2) πιστεύεται ότι προκύπτουν από ένα μοναδικό μετάγραφο με εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης. Οι κωδικοί που αναγράφονται αντιστοιχούν στους κωδικούς πρόσβασης της NCBI. (Γ) Ανίχνευση των εναλλακτικών μεταγράφων που περιλαμβάνουν είτε το εξώνιο 1A είτε το 1B, σε ανθρώπινο εμβρυικό εγκέφαλο.

3.3.1 Προσπάθεια Ταυτοποίησης του 5' Ακρου του Γονιδίου *prmt8* με τη Μέθοδο cRACE: Η Ανακάλυψη Ενός Νέου Εξωνίου Πιθανόν Οδηγεί σε μία Νέα Ισομορφή της Πρωτεΐνης

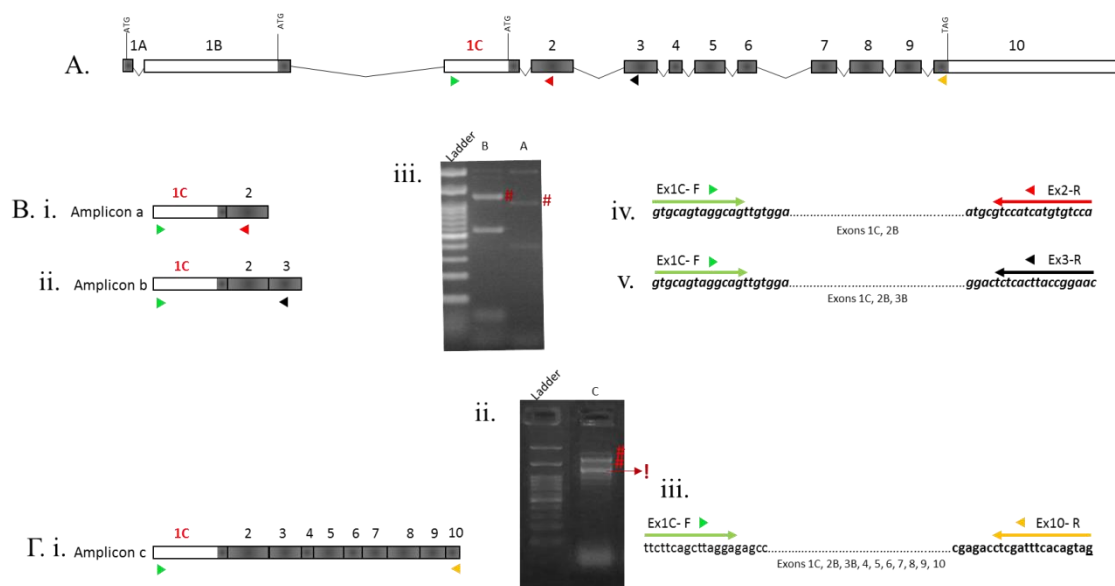
Το γεγονός ότι το μετάγραφο με το εξώνιο 1A δεν είχε αναφερθεί από άλλους πειραματικά μέχρι εκείνη την περίοδο σε συνδυασμό με την παρουσία ενός πυρηνικού σιγιάλου (nuclear localization signal, NLS) στην πειραματικά επιβεβαιωμένη ισομορφή hV1, και την απουσία ενός τυπικού NLS από την ισομορφή hV2, μας έκαναν να προβληματιστούμε για το ποιά είναι τελικά η πυρηνική ισομορφή της πρωτεΐνης. Έτσι, αποφασίσαμε να μελετήσουμε αναλυτικότερα το 5' άκρο του γονιδίου προκειμένου να εντοπίσουμε όλα τα πιθανά εναλλακτικά μετάγραφα τα οποία θα μπορούσαν να μας οδηγήσουν στην ταυτοποίηση της πυρηνικής ισομορφής. Ακολουθώντας τη μέθοδο cRACE (circular first-strand cDNA-mediated RACE) [213] και ένα συνδυασμό από διάφορους εκκινητές (**Εικόνα 50 A**) συνθέσαμε cDNA ειδικό για το Prmt8 (με τον εκκινητή Ex4-R), και στη συνέχεια προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε όλα τα πιθανά 5' άκρα των mRNAs που παράγονται από το γονίδιο Prmt8.

Χρησιμοποιώντας ως μήτρα το κυκλοποιημένο cDNA (**Εικόνα 50 A**) και αντίδραση PCR με τους εκκινητές Ex3-F και Ex3-R για την ενίσχυση του τμήματος που θεωρητικά περιλαμβάνει την άγνωστη 5' περιοχή του γονιδίου, προέκυψε ένα πρότυπο ζωνών. Επιλέξαμε τις δύο πιο έντονες (**Εικόνα 50 B, iii**) για κλωνοποίηση στον φορέα pSC-A-amp/kan (*Stratagene*), με σκοπό να αλληλουχηθούν. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης αποκάλυψαν μία περιοχή εντός του ιντρονίου που παρεμβάλλεται μεταξύ των εξωνίων 1B και 2 (βλ. **Παράρτημα Αλληλουχιών, Αλληλουχία 1** και **Εικόνα 50 A**), η οποία οριοθετείται από τα χαρακτηριστικά στοιχεία ματίσματος-συρραφής (*splice junctions*), και επομένως είναι πιθανό να αντιπροσωπεύει ένα νέο εξώνιο. Συνθέτοντας εκκινητές για την συγκεκριμένη περιοχή, διαπιστώσαμε ότι πράγματι εκφράζεται στον εμβρυικό εγκέφαλο (**Εικόνα 50 B, iv**).



Εικόνα 50: Προσδιορισμός εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *Prmt8* με τη μέθοδο cRACE. (A) Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας cRACE, για την ταυτοποίηση του 5' άκρου του *PRMT8* mRNA. (B) Χρησιμοποιώντας ως μήτρα το κυκλοποιημένο cDNA και εκκινητές τους Ex3-F και Ex3-R που απεικονίζονται σχηματικά στα (i) και (ii) πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR από την οποία προέκυψε ένα πρότυπο ζωνών (iii). Επιλέχθηκαν οι δύο πιο έντονες και κλωνοποιήθηκαν. Η αλληλούχιση με τον εκκινητή M13 (iv) οδήγησε στην ταυτοποίηση ενός πιθανού νέου εξωνίου, για το οποίο συνθέσαμε εκκινητές και επιβεβαιώσαμε την έκφρασή του με RT-PCR σε RNA από ανθρώπινο εμβρυικό εγκέφαλο (v).

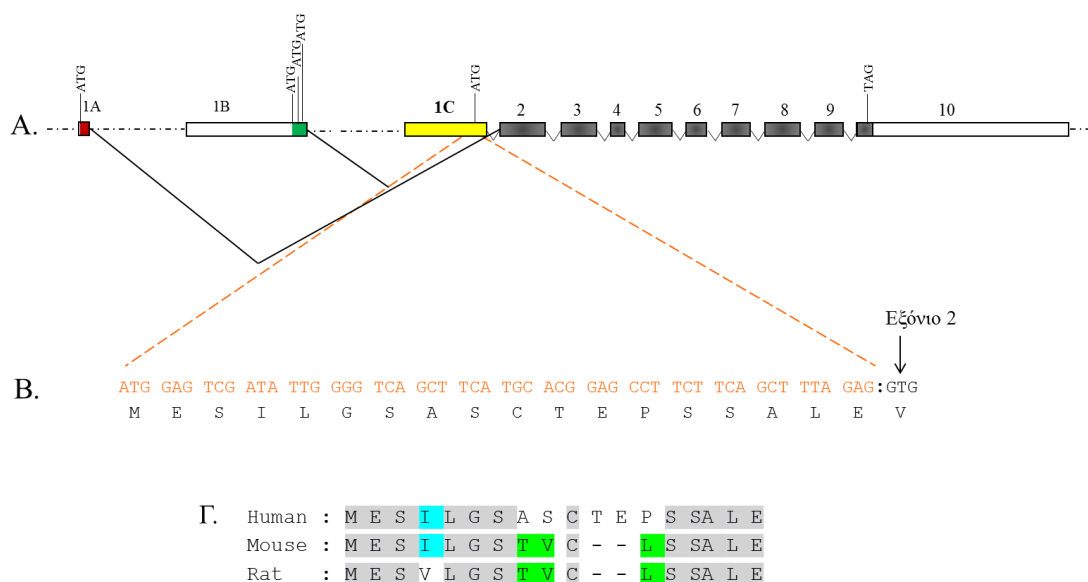
Μάλιστα φαίνεται να λειτουργεί ως πρώτο εξόνιο, καθώς δεν συνδυάζεται με τα ανοδικά εξόνια 1A ή 1B, και το ονομάσαμε 1C (**Εικόνα 51 A**). Χρησιμοποιώντας εκκινητές από το εξόνιο 1C (Ex1C-F) και τα εξόνια 2 (Ex2-R) και 3 (Ex3-R) πήραμε προϊόντα αναμενόμενου μεγέθους (**Εικόνα 51 B**). Μετά από νουκλεοτιδική ανάλυση διαπιστώσαμε ότι πράγματι αυτό το νέο εξόνιο συνδυάζεται με αυτά, αφού απομακρύνονται ορθά τα ενδιάμεσα ιντρόνια. Δείξαμε επίσης ότι αποτελεί τμήμα ενός μεταγράφου το οποίο ξεκινά από αυτό και συρράφεται με όλα τα κάτωθεν εξόνια μέχρι και το εξόνιο 10 (**Παράρτημα Αλληλουχιών, Αλληλουχία 2 και Εικόνα 51 Γ**). Σημειώνεται ότι κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν και άλλα προϊόντα από αυτήν την προσπάθεια τα οποία αντιπροσώπευαν και πλήρως, αλλά και μερικώς ματισμένες περιοχές, που επιβεβαίωσαν τα παραπάνω συμπεράσματα.



Εικόνα 51: Η ανάλυση cRACE οδήγησε στην ταυτοποίηση ενός νέου εξωνίου. (A) Ο γονιδιακός τόπος του *Prmt8* στον οποίο φαίνεται η θέση του νέου εξωνίου. Σημειώνονται επίσης οι θέσεις των υπόλοιπων εξωνίων, των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των διαφόρων περιοχών, καθώς και των κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης. (B) Ενισχύθηκαν με RT-PCR οι δύο περιοχές που φαίνονται στην εικόνα (i και ii), και από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων προέκυψαν τρεις ζώνες. Κλωνοποιήθηκαν στον pSC-A-amp/kan και αλληλουχήθηκαν με τον εκκινητή *M13 Forward* (-20). Η χαμηλότερου μοριακού βάρους (MB) ζώνη αντιπροσωπεύει την αλληλουχία που αντιστοιχεί στο ώριμο mRNA, ενώ οι μεγαλύτερου MB αποτελούν αντιστοιχούν σε μη ματισμένο mRNA. (Γ) Η αντίδραση RT-PCR με τον έναν εκκινητή στην αρχή του εξωνίου 1C και τον άλλον στο τελευταίο εξόνιο του γονιδίου (το οποίο είναι συντηρημένο μεταξύ των μεταγράφων), οδήγησε σε ένα πρότυπο τριών ζωνών (ii). Η κλωνοποίηση και αλληλούχηση αυτών των προϊόντων έδειξε ότι η επιδεικνυόμενη ζώνη (!) αντιπροσωπεύει την αλληλουχία που αντιστοιχεί στο ώριμο mRNA του *Prmt8* (iii) το οποίο ξεκινά από το νέο εξόνιο έως και το εξόνιο 10. Η δίοση (#) αντιπροσωπεύει προϊόντα, τα οποία προέρχονται από μη ώριμο mRNA.

Η περιοχή λοιπόν που ταυτοποιήσαμε φαίνεται πως αποτελεί το πρώτο εξώνιο ενός νέου μεταγράφου. Περιλαμβάνει ένα κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης που ανοίγει ένα αναγνωστικό πλαίσιο 18 αμινοξέων το οποίο συνεχίζεται κανονικά στο εξώνιο 2 (**Εικόνα 52 Α και Β**). Η αλληλουχία αυτή παρουσιάζει αρκετά υψηλή συντήρηση μεταξύ ανθρώπου, ποντικού και αρουραίου (**Εικόνα 52 Γ**), γεγονός που ενδυναμώνει τις υποψίες μας ότι πρόκειται για μία νέα ισομορφή της πρωτεΐνης. Μάλιστα, στα πρώτα 7 αμινοξέα παρουσιάζει 71% ομολογία με την αντίστοιχη αλληλουχία του εξωνίου 1Α.

Αυτά τα ευρήματα ίσως ανοίγουν νέες προοπτικές για την κατανόηση της οργάνωσης του γονιδίου *Prmt8*, και καταλήγουν στο να μη μας παραξενεύουν τόσο, αφού το κατά 83% ομόλογο γονίδιο *Prmt1*, παρουσιάζει μια εξίσου σύνθετη οργάνωση στο 5' άκρο του [223]. Τα διαφορετικά εναλλακτικά μετάγραφα μπορεί να έχουν ιδιαίτερη σημασία όσον αφορά στις δράσεις και τον ρόλο αυτού του μορίου στο νευρικό σύστημα.



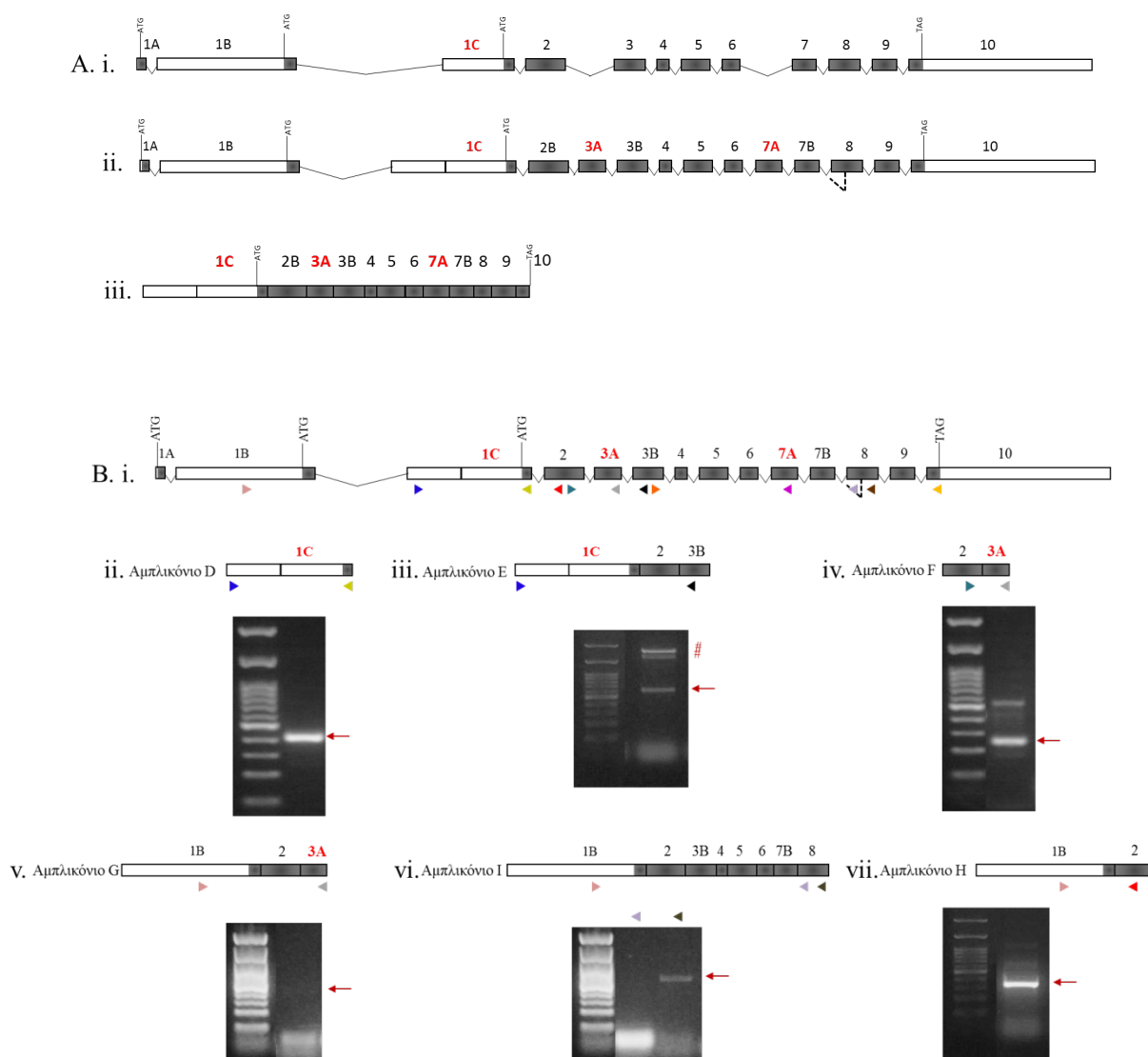
Εικόνα 52: Το νέο εξώνιο περιέχει ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο που συνεχίζεται στο εξώνιο 2 και πιθανόν οδηγεί σε μια νέα ισομορφή της PRMT8. (Α) Σχηματική απεικόνιση του γονιδιακού τόπου της *Prmt8*. Το κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύει την κωδική περιοχή του εξωνίου 1Α (η θεωρητικά προβλεπόμενη 5'-UTR είναι πολύ μικρή), το πράσινο χρώμα την κωδική περιοχή του εξωνίου 1Β, και το κίτρινο την κωδική περιοχή του νέου εξωνίου, 1C. (Β) Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (πορτοκαλί) οδηγεί στη αμινοξική ακολουθία που αναγράφεται αμέσως από κάτω. (Γ) Η σύγκριση των αμινοξικών ακολουθιών μεταξύ ανθρώπου, ποντικού και αρουραίου επιδεικνύει υψηλό βαθμό συντήρησης.

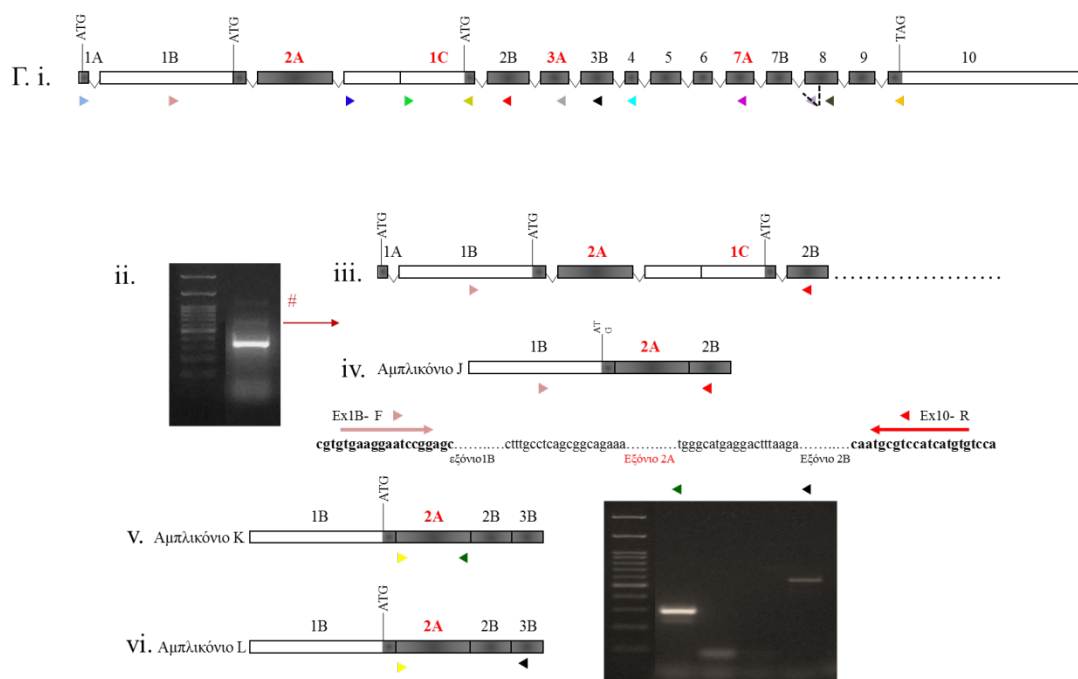
Αναζητώντας στη βάση δεδομένων NCBI αν το εξώνιο αυτό έχει χαρακτηριστεί σε κάποιο άλλο σύστημα, διαπιστώσαμε ότι έχει περιγραφεί ένα μετάγραφο με αριθμό πρόσβασης *AK026786.1*, το οποίο απομονώθηκε από ανθρώπινο πνεύμονα και περιλαμβάνει το εξώνιο 1C που ανιχνεύσαμε εμείς, ως πρώτο εξώνιο (**Εικόνα 53 A, iii**). Ωστόσο στο μετάγραφο αυτό υπάρχει μία μεγαλύτερη 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή, δύο επιπλέον εξώνια (3A και 7A) και το δεύτερο μισό του όγδοου εξωνίου (**Εικόνα 53 A, ii, iii**).

Για να επιβεβαιώσουμε αν η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του εξωνίου 1C, και τα εξώνια 3A και 7A αποτελούν τμήμα ενός ακέραιου μεταγράφου και στο δικό μας βιολογικό σύστημα, σχεδιάσαμε εκκινητές σε όλες αυτές τις περιοχές και με συμβατική PCR ελέγξαμε την έκφραση τους σε RNA από ανθρώπινο εγκέφαλο μετά από αντίστροφη μεταγραφή με έναν ολίγο(dT) εκκινητή (**Εικόνα 53 B, i**). Διαπιστώσαμε ότι η 5'μη μεταφραζόμενη περιοχή του εξωνίου 1C ανιχνεύεται (**Εικόνα 53 B, ii**) ως τμήμα μιας συνεχούς αλληλουχίας μέχρι το εξώνιο 3B (**Εικόνα 53 B, iii**) στην οποία δεν συμπεριλαμβάνεται το εξώνιο 3A, όπως στο μετάγραφο του πνεύμονα. Ωστόσο το εξώνιο 3A ανιχνεύεται (**Εικόνα 53 B, iv**) αλλά με εκκινητές που εδράζονται στα εξώνια 2 και 3A. Το εξώνιο 3A φαίνεται επίσης να συνδυάζεται και με το εξώνιο 1B, αφού ανιχνεύεται μια χαμηλής έντασης ζώνη ύστερα από RT-PCR με τους αντίστοιχους εκκινητές (**Εικόνα 53 B, v**). Όσον αφορά στο μισό όγδοο εξώνιο, από το αμπλικόνιο I φαίνεται ότι αυτό συνδυάζεται 1 με το εξώνιο 1B (**Εικόνα 53 B, vi**).

Προκειμένου να εξετάσουμε αν το νέο εξώνιο 1C αποτελεί το πρώτο εξώνιο ενός νέου μεταγράφου, ενισχύσαμε την περιοχή από το εξώνιο 1B έως το 2, μεταξύ των οποίων βρίσκεται το εξώνιο 1C. Διαπιστώσαμε έτσι ότι εκτός από την αναμενόμενη μεγαλύτερης έντασης ζώνη (**Εικόνα 53 B, vii**), ενισχύονται και δύο ακόμη μεγαλύτερου μοριακού βάρους ζώνες. Τις κλωνοποιήσαμε στον φορέα pTOPO-TA, τις αλληλουχίσαμε, και προς έκπληξη μας διαπιστώσαμε την ύπαρξη ενός ακόμη εξωνίου το οποίο οριοθετείται από τις συντηρημένες αλληλουχίες ματίσματος και το ονομάσαμε 2A (βλ. **Παράρτημα Αλληλουχιών, Αλληλουχία 3** και **Εικόνα 53 Γ, i, iv**). Το εξώνιο αυτό βρίσκεται ανοδικά του 1C (**Εικόνα 53 Γ, ii**). Σχεδιάζοντας εκκινητές για το νέο εξώνιο 2A, επιβεβαιώσαμε ότι μεταγράφεται (**Εικόνα 53 Γ, v, vi**), και με κατάλληλους εκκινητές διαπιστώσαμε ότι αποτελεί τμήμα μιας συνεχούς mRNA

αλληλουχίας μέχρι το εξώνιο 3B (**Εικόνα 53 Γ, vi, vii**). Αναλύοντας τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του εξωνίου 2A, διαπιστώσαμε ότι κανένα εναλλακτικό κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης δεν μπορεί να οδηγήσει σε ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο και κατά συνέπεια σε κάποια νέα ισομορφή της πρωτεΐνης. Η ύπαρξη εναλλακτικών μεταγράφων που δεν οδηγούν σε παραγόμενη πρωτεΐνη έχει ξεχωριστή σημασία καθώς τέτοια μόρια μπορεί να επηρεάζουν τη ροή της γενετικής πληροφορίας αλλά και το εναλλακτικό μάτισμα.



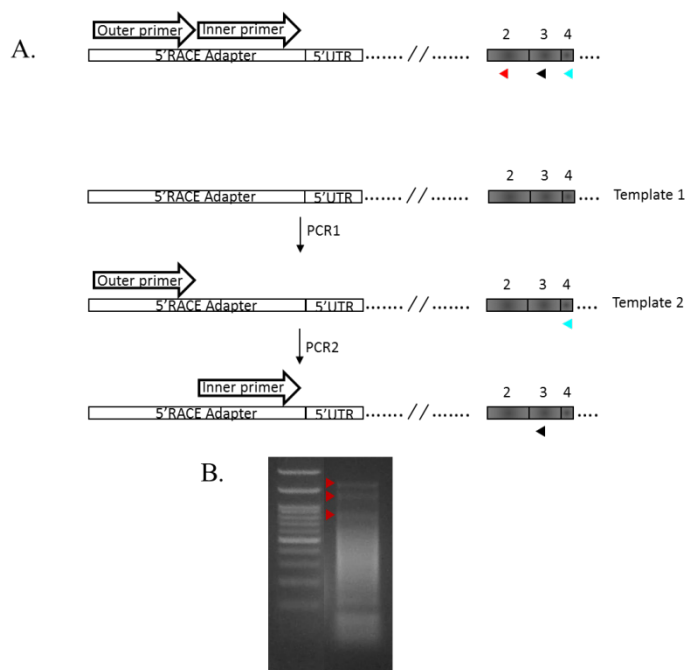


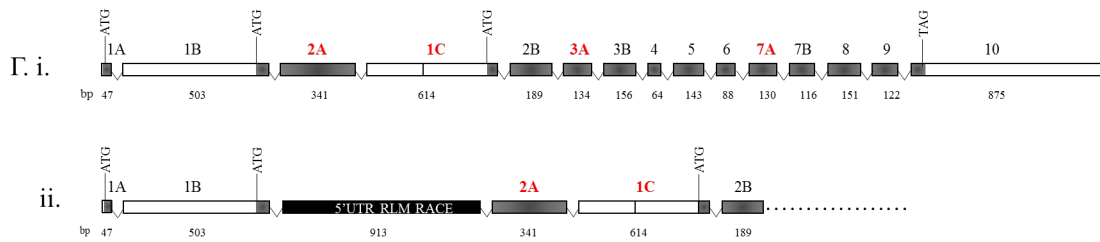
Εικόνα 53: Νέα μετάγραφα του γονιδίου Prmt8 αποκαλύπτονται από τη μελέτη του 5' άκρου του. (A) Απεικόνιση της δομής του γονιδίου Prmt8 όπως διαμορφώθηκε από τα νέα πειραματικά μας δεδομένα (i), και εμπλουτίστηκε με βάση τα νέα στοιχεία που προέκυψαν από τις αλληλουχίες που βρέθηκαν στην NCBI (ii). Απεικόνιση της δομής του μεταγράφου (iii) που ταυτοποιήθηκε στον πνεύμονα (AK026786.1). (B) Με βέλη διαφορετικού χρώματος σημειώνονται οι θέσεις των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των διάφορων περιοχών (i). Ακολουθούν τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης με τους εκκινητές που απεικονίζονται στα οποία φαίνονται τα αμπλικόνια D, E, F, G, I και H (ii, iii, iv, v, vi, και vii, αντίστοιχα). Το κόκκινο βέλος υποδεικνύει την σωστή (αναμενόμενου μοριακού βάρους) ζώνη. Η δίσωση (#) αντιπροσωπεύει προϊόντα, τα οποία προέρχονται από μη ώριμο mRNA. (I) Ένα νέο εξόνιο ανιχνεύθηκε από την υποδεικνυόμενη με το κόκκινο βέλος ζώνη, το οποίο εδράζεται μεταξύ των εξονίων 1B και 1C (i). Διαγραμματική απεικόνιση της αλληλουχίας του προϊόντος αμπλικονίου, στην οποία φαίνεται ότι το νέο εξόνιο λειτουργεί ως δεύτερο εξόνιο (ii) RT-PCR με εκκινητές για το εξόνιο 2A επιβεβαιώνουν την ύπαρξή του ως τμήμα ενός ακέραιου μεταγράφου (iii).

Αναλύοντας τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του εξωνίου 2A, διαπιστώσαμε ότι κανένα εναλλακτικό κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης δεν μπορεί να οδηγήσει σε ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο και κατά συνέπεια σε νέα ισομορφή της πρωτεΐνης. Η ύπαρξη βέβαια τέτοιων εναλλακτικών μεταγράφων που δεν οδηγούν σε παραγόμενη πρωτεΐνη έχει ξεχωριστή σημασία καθώς τέτοια μόρια μπορεί να επηρεάζουν τη ροή της γενετικής πληροφορίας αλλά το εναλλακτικό μάτισμα [224].

3.3.2 Προσπάθεια Ταυτοποίησης του 5' Ακρου του Γονιδίου *prmt8* με τη Μέθοδο 5'RLM RACE

Η πολυπλοκότητα της οργάνωσης του γονιδίου στο 5' άκρο, και επομένως η δυσκολία να εντοπίσουμε την περιοχή που εδράζεται ο υποκινητής (ή οι υποκινητές) του γονιδίου, μας υποχρέωσε να αναζητήσουμε εναλλακτικές μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχιών κοντά στο 5' άκρο των mRNAs, όπως η μέθοδος 5' RLM-RACE (*RNA Ligase Mediated-Rapid Amplification of cDNA Ends*) η οποία περιγράφεται στην **Εικόνα 54 Α**. Μετά από τρεις διαδοχικές αντιδράσεις PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα, αρχικά το cDNA που προέκυψε από τη διαδικασία του 5' RLM-RACE και στη συνέχεια τα διαδοχικά προϊόντα των αντιδράσεων PCR που περιγράφονται στην **Εικόνα 54 Β**, προέκυψαν τρεις ζώνες οι οποίες απομονώθηκαν, κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν (**Εικόνα 54 Γ**). Οι δύο υψηλότερου μοριακού βάρους ζώνες δεν αντιστοιχούσαν σε αλληλουχίες του γονιδίου *Prmt8*, η χαμηλότερη όμως υποδεικνύει μία ακόμη μεταγραφόμενη περιοχή εντός του γενετικού τόπου του *Prmt8*, μεταξύ των εξωνίων 1B και 2A (**Εικόνα 54 Δ, ii**). Ο σχεδιασμός εκκινητών σε αυτό το νέο, υποθετικό 5' άκρο και κατάλληλες αντιδράσεις PCRs θα μας βοηθήσουν να κατανοήσουμε εάν όντως πρόκειται για τμήμα ενός λειτουργικού μεταγράφου.





Εικόνα 54: Προσπάθεια χαρακτηρισμού του 5' άκρου και πιθανών νέων εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου Prmt8 με τη μέθοδο 5' RLM-RACE. (Α) Σχηματική περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας 5' RLM- RACE. (Β) Διαγραμματική απεικόνιση των διαδοχικών αντιδράσεων PCR που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να ενισχύσουμε τις επιθυμητές περιοχές και να κατανοήσουμε την οργάνωση του γονιδίου Prmt8 στο 5' άκρο. (Γ) Από τις παραπάνω αντιδράσεις PCR προέκυψαν τρεις ζώνες σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους. Αυτές κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pTOPO-TA και αλληλούχησηκαν. (Δ) Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης αποκάλυψαν μία νέα περιοχή μεταξύ των εξονίων 1B και 2A.

Χρειάζονται επιπλέον εφαρμογές της συγκεκριμένης μεθόδου σε καλής ποιότητας RNA για να χαρακτηρίσουμε την οργάνωση του γονιδίου στο 5' άκρο και να καταφέρουμε να εντοπίσουμε τους πιθανούς υποκινητές. Παρόλα αυτά, από τις προσπάθειές μας αποκαλύπτεται ένα αρκετά σύνθετο 5' άκρο το οποίο θέτει νέες βάσεις για την κατανόηση της λειτουργίας και τη ρύθμισης της έκφρασης του *Prmt8*. Η πολυπλοκότητά του αντανakλά και τις πολλαπλές του δράσεις, οι οποίες είναι πολύ πιθανόν να συνδέονται με την άρτια λειτουργία των νευρώνων. Μια πρωτεΐνη που μπορεί να κατανέμεται είτε στην κυτταροπλασματική μεμβράνη είτε στον πυρήνα των κυττάρων, με πιθανό ρόλο στην ρύθμιση της κατάστασης της χρωματίνης και η οποία εκφράζεται αυστηρά και εξειδικευμένα σε ώριμα νευρικά κύτταρα ενώ, όπως αποκαλύπτει το 5' άκρο του γονιδίου της, υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση, σίγουρα θα αποκαλύψει πολλά στο μέλλον.

4. Διερεύνηση των Επιπέδων Ρύθμισης της Έκφρασης του Μεταγραφικού Παράγοντα *Neurogenin2 (Ngn2)* κατά τη Νευρική Διαφοροποίηση

Θεμελιώδη ρόλο στην ενεργοποίηση της νευρογένεσης, τη διατήρηση των νευρικών βλαστικών κυττάρων αλλά και τον καθορισμό της κυτταρικής τους μοίρας, τόσο κατά την ανάπτυξη όσο και κατά την ενήλικη ζωή, κατέχουν τα προ-νευρικά γονίδια *bhlh*. Όπως ήδη αναφέραμε στην εισαγωγή (Παράγραφος 1.3.1), η *Neurogenin 2 (Ngn2)* πρωτεΐνη συμβάλλει καθοριστικά στον σχηματισμό της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου [27] κατά τα εμβρυική και μετεμβρυική ανάπτυξη και στην παραγωγή των νευροβλαστών της οδοντωτής έλικας νεογνού ποντικού [29]. Μαζί με τον παράγοντα *Mash1* (της οικογένειας των *asc*), αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές της νευρογένεσης και έχουν το δυναμικό να κατευθύνουν τη νευρική διαφοροποίηση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων προς διαφορετικούς τύπους νευρώνων. Η πρωτεΐνη *Mash1* δρα περισσότερο καθοδηγώντας το κύτταρο να αποκτήσει μια συγκεκριμένη νευρική μοίρα ενώ η *Ngn2* αναλαμβάνει, σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες, την πορεία της διαδικασίας της διαφοροποίησης ώστε να ακολουθηθεί ένα προκαθορισμένο νευρικό πεπρωμένο [43].

Όντας εντυπωσιασμένοι από το διττό ρόλο του γονιδίου *Ngn2*, που από τη μία διατηρεί το ισοζύγιο μεταξύ των αδιαφοροποίητων και διαφοροποιούμενων κυττάρων, λόγω της πλευρικής αναστολής του *Notch*, και από την άλλη ενεργοποιεί όλο το πρόγραμμα της νευρικής διαφοροποίησης, αποφασίσαμε να το μελετήσουμε.

Χρησιμοποιώντας ως πειραματικά μοντέλα τα πρόδρομα νευρικά και νευροβλαστωματικά κύτταρα, με χαρακτηριστικά πολυδυναμίας, έχοντας ως στόχο την μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου *Ngn2* κατά την νευρική διαφοροποίηση, αναλύσαμε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου στο επίπεδο της μεταγραφής και προσπαθήσαμε να το συσχετίσουμε με το πρότυπο μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου αλλά και με τη σημασία της χρωματινικής δομής. Συγχρόνως, μελετήσαμε την έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου στο επίπεδο της μετάφρασης, προσπαθώντας να συνδέσουμε τις παρατηρήσεις μας με τις *cis*-ρυθμιστικές περιοχές που συμμετέχουν στη μεταφραστική πορεία. Τέλος γνωρίζοντας το πλούσιο ρεπερτόριο γονιδίων στόχων του μεταγραφικού παράγοντα *Ngn2* αλλά και τη δυναμική, την οποία διαπιστώσαμε και εμείς από τα δικά μας πειράματα, του να αλληλεπιδρά με διάφορα μόρια και να μεταγράφει κάθε φορά διαφορετικά γονίδια, αναλύσαμε τους μεταγραφικούς της στόχους σε επίπεδο γονιδιώματος.

4.1 Έλεγχος της Έκφρασης του Γονιδίου *Ngn2* στο Επίπεδο της Μεταγραφής

Πρώτος στόχος ήταν να μελετήσουμε τις μεταβολές των επιπέδων του mRNA του γονιδίου *Ngn2* κατά την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης των πρόδρομων νευρικών κυττάρων αλλά και των νευροβλαστωματικών Be(2)-C και SH-SY5Y.

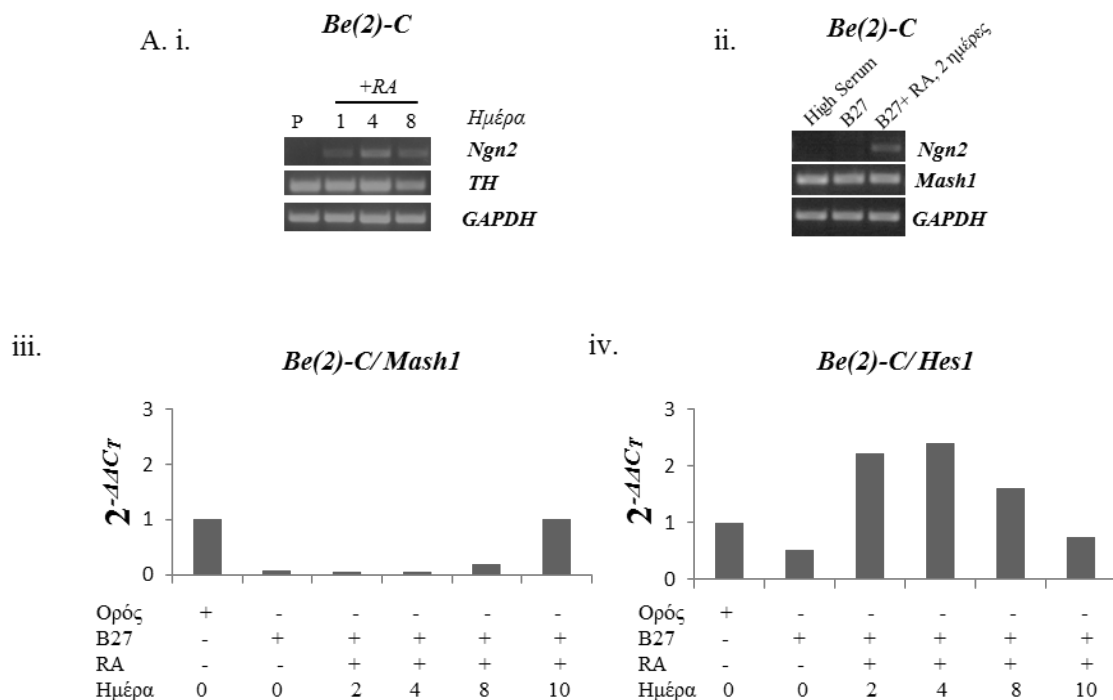
Παράλληλα με την έκφραση του γονιδίου *Ngn2* ελέγξαμε και τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *Hes1*, *Hes5* και *Mash1* που μαζί με το *Ngn2*, αποτελούν τα κυριότερα μόρια που εκφράζονται κατά την πλευρική αναστολή του Notch.

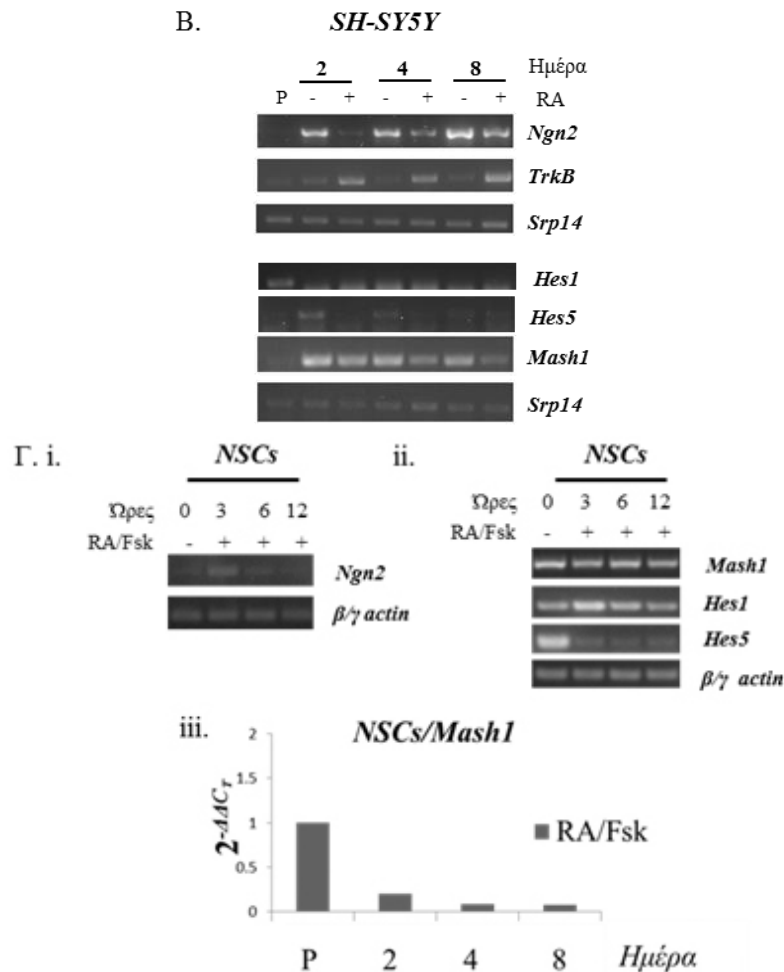
Διαφοροποιώντας τα Be(2)-C κύτταρα με RA τόσο απουσία ορού όσο και παρουσία B27 στο θρεπτικό μέσο, διαπιστώσαμε ότι τα μεταγραφικά επίπεδα του *Ngn2* αυξάνονται κατά τη διαφοροποίηση (**Εικόνα 55 A**). Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, μέχρι και την τέταρτη ημέρα, τα μεταγραφικά επίπεδα του *Mash1* μειώνονται (**Εικόνα 55 A, ii και iii**) ενώ, αντίθετα, του *Hes1* αυξάνονται (**Εικόνα 55 A, iv**). Αύξηση και μείωση για τα *Mash1* και *Hes1*, αντίστοιχα, παρατηρείται κατά την όγδοη και δέκατη ημέρα της διαφοροποίησης. Η αντίστροφη αυτή σχέση στην έκφραση των γονιδίων, υποδηλώνει ότι η σηματοδότηση του Notch είναι ενεργή. Παρότι, λοιπόν, τα κύτταρα διαφοροποιούνται προς τη νευρική μοίρα, συνεχίζουν να διατηρούν ενεργή τη σηματοδότηση. Εάν και αναμέναμε πως κατά τη νευρική διαφοροποίηση το μονοπάτι Notch δε θα ήταν πια ενεργό, η καρκινικότητα των Be(2)-C κύτταρων θα μπορούσε να αποτελεί μία εξήγηση.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το πρότυπο έκφρασης του *Ngn2* στα SH-SY5Y νευροβλαστωματικά κύτταρα. Ελέγχοντας τρία διαφορετικά χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, δηλαδή, τη 2^η, 4^η και 8^η ημέρα της διαφοροποίησης, απουσία και παρουσία RA, σε συνθήκες χαμηλού ορού παρατηρούμε ότι τα μεταγραφικά επίπεδα του *Ngn2* αυξάνονται προοδευτικά κατά τη νευρική διαφοροποίηση, ενώ του *Mash1* μειώνονται. Η νευρική διαφοροποίηση ελέγχεται κάθε φορά με την αύξηση της έκφρασης μοριακών δεικτών όπως το *TrkB*. Απουσία RA και ενώ τα κύτταρα δε διαφοροποιούνται, καθώς δεν εκφράζεται *TrkB*, η αύξηση του mRNA του *Ngn2* είναι εντυπωσιακά μεγαλύτερη. Κάτι αντίστοιχο παρατηρείται και με το *Mash1*, αλλά σε χαμηλότερο βαθμό. Συμπεραίνουμε επομένως πως παρουσία RA, η έκφραση της *Ngn2* επάγεται αλλά διατηρείται σε σχετικά χαμηλά και σταθερά επίπεδα. Θα μπορούσαμε, επίσης, να πούμε ότι ο RA δρα κατασταλτικά στη συνεχώς αυξανόμενη έκφραση της απουσία μιτογόνων. Συγχρόνως, παρατηρούμε ότι η έκφραση του *Hes1* εξαφανίζεται από

τη δεύτερη κιόλας ημέρα της διαφοροποίησης ενώ το *Hes5* εκφράζεται έντονα μόνο τη δεύτερη ημέρα, απουσία RA, ενώ παρουσία RA δε φαίνεται να εκφράζεται. Επομένως, είναι πιθανόν η σηματοδότηση Notch να μην είναι ενεργή στα SH-SY5Y κύτταρα καθώς αυτά μπαίνουν στο πρόγραμμα της νευρικής διαφοροποίησης. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι δύο νευροβλαστωματικές σειρές έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες.

Αντίθετα με τα κύτταρα SH-SY5Y, στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε mRNA του *Ngn2*, παρότι το *Mash1* εκφράζεται και μειώνεται κατά την πορεία της διαφοροποίησης. Γνωρίζοντας όμως το γρήγορο βαθμό ανακύκλωσης του γονιδίου θεωρήσαμε ότι τα γεγονότα που συμπίπτουν με την έκφραση του συμβαίνουν πολύ νωρίς κατά την έναρξη της διαφοροποίησης. Πράγματι, ελέγχοντας τις 3, 6 και 12 πρώτες διαφοροποίησης διαπιστώσαμε ότι το mRNA του *Ngn2* αυξάνεται μέσα στις 3 πρώτες ώρες ενώ στη συνέχεια μειώνεται. Η έκφραση του γονιδίου *Mash1* δε μεταβάλλεται ενώ τα γονίδια *Hes1* και *Hes5* παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα συμπεριφορά. Το μεν πρώτο αυξάνεται κατά πολύ μέσα στις 3 ώρες και στη συνέχεια μειώνεται, διατηρώντας όμως υψηλή την έκφραση του, το δε *Hes5* εξαφανίζεται αμέσως.

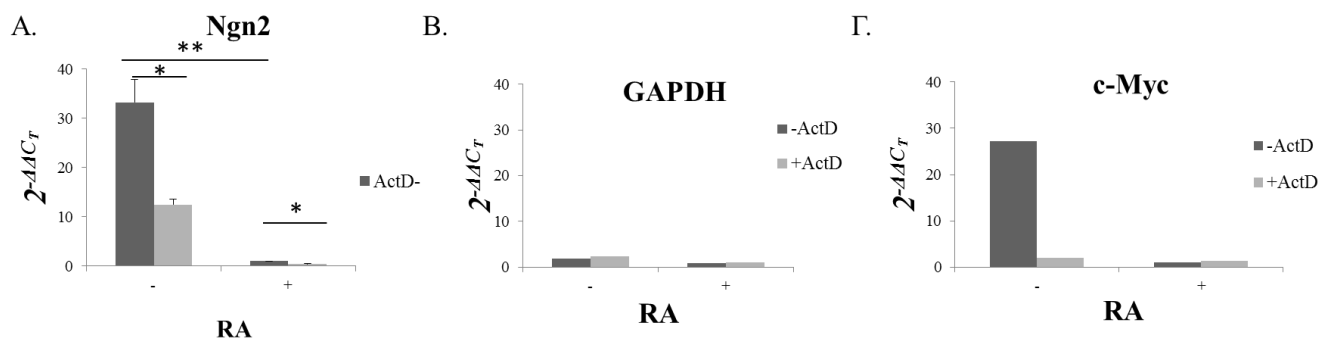




Εικόνα 55: Μεταβολές στο πρότυπο έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας bHLH κατά τη πορεία διαφοροποίησης των τριών κυτταρικών μοντέλων προς τη νευρική μοίρα. (A). Τα αποτελέσματα από RT-semiQPCR (i, ii) και RT-QPCR από RNA το οποίο απομονώθηκε από κύτταρα Be(2)-C σε διαφορετικές ημέρες του προγράμματος διαφοροποίησης. Η έκφραση του γονιδίου *Ngn2* αυξάνεται από την πρώτη κιόλας ημέρα διαφοροποίησης, ενώ ο νευρικός δείκτης TH εκφράζεται σταθερά, χωρίς να μεταβάλλονται τα επίπεδα του (i). Παρατηρείται μια αντίστροφη σχέση στο πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Mash1* (ii) και *Hes1* (iii). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *GAPDH*. (B). Αποτελέσματα RT-semiQPCR (i) και RT-QPCR (ii) από RNA το οποίο απομονώθηκε από κύτταρα SH-SY5Y σε διαφορετικές ημέρες της διαφοροποίησης. Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *Ngn2* αυξάνονται τόσο παρουσία όσο και απουσία RA. Απουσία RA (δηλαδή σε συνθήκες χαμηλού ορού μόνο), η έκφραση του γονιδίου είναι πολύ μεγαλύτερη. Το γονίδιο *Mash1* αρχικά αυξάνεται και στη συνέχεια μειώνεται τόσο απουσία όσο και παρουσία RA, ενώ τα γονίδια *Hes1* σταματά να εκφράζεται με την έναρξη της διαφοροποίησης. Το γονίδιο *Hes5* συμπεριφέρεται παρόμοια με το *Mash1* αλλά μόνο σε συνθήκες χαμηλού ορού. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *Srp14*. (B) Αποτελέσματα RT-semiQPCR (i, ii) και RT-QPCR (iii) από RNA το οποίο απομονώθηκε από νευρικά βλαστικά κύτταρα σε διαστήματα ωρών (i, ii) ή ημερών (iii) μετά την έναρξη της διαφοροποίησης. Η έκφραση του *ngn2* αυξάνεται πολύ γρήγορα, μέσα στις 3 πρώτες ώρες, στις 6 ώρες έχει ήδη μειωθεί αρκετά, ενώ μετά τις 12 ώρες δεν ανιχνεύεται (i). Το *mash1* έχει ρυθμική έκφραση το πρώτο δωδεκάωρο (ii) αλλά μειώνεται σταθερά στα επόμενα στάδια της διαφοροποίησης (iii). Το *hes5* μειώνεται πολύ γρήγορα μετά την έναρξη της διαφοροποίησης (ii), σε αντίθεση με το *ngn2* που όπως είδαμε στο (i) αυξάνεται, ενώ το *hes1* παρουσιάζει ρυθμική έκφραση το πρώτο δωδεκάωρο (ii). Ως γονίδιο εσωτερικού ελέγχου για την κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το *β/γ actin*.

4.2 Διερεύνηση των Επιπέδων Ρύθμισης της Έκφρασης του Μεταγραφικού Παράγοντα Ngn2 κατά τη Νευρική Διαφοροποίηση

Η αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *Ngn2* κατά την διαφοροποίηση των κυττάρων SH-SY5Y, και ιδιαίτερα η πολύ έντονη συσσώρευση των μεταγράφων του απουσία RA μας ενέπνευσαν να μελετήσουμε με μεγαλύτερη λεπτομέρεια τον τρόπο με τον οποίο ελέγχεται η έκφραση του. Γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία ότι ο χρόνος ημιζωής του mRNA αυτού του γονιδίου σε άλλα κυτταρικά περιβάλλοντα είναι περίπου 30min [152], [225], [38], [226] υποθέσαμε ότι οι παραπάνω μεταβολές μπορεί να οφείλονται σε αλλαγές στη μεταγραφή του. Για να το επιβεβαιώσουμε αυτό, ελέγξαμε την επίδραση του φαρμακολογικού αναστολέα της μεταγραφής ακτινομυκίνη D (*Actinomycin D*, *ActD*), στα μετάγραφα του γονιδίου στα κύτταρα SH-SY5Y. Η ακτινομυκίνη D, ένα αντιβιοτικό με αντικαρκινικές ιδιότητες απομονωμένο από βακτήρια του εδάφους του γένους *Streptomyces* και με μακρά χρήση στην ιατρική και την έρευνα, αναστέλλει τη μεταγραφή εξαιτίας της πρόσδεσής του σε μια ιδιαίτερη διαμόρφωση του DNA (*premelting DNA conformation*) που συναντάται στο σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής, αποτρέποντας έτσι την επιμήκυνση του RNA από την πολυμεράση. Ο έλεγχος έγινε στις συνθήκες που παρατηρείται η μέγιστη έκφραση του γονιδίου *Ngn2*, δηλαδή σε κύτταρα SH-SY5Y τα οποία έχουν καλλιεργηθεί για οκτώ ημέρες σε χαμηλό ορό, παρουσία ή απουσία RA. Η ActD προστέθηκε σε συγκέντρωση (0.5μg/ml) για 2 ώρες πριν τη λύση των κυττάρων και την επακόλουθη απομόνωση του RNA. Όπως βλέπουμε στην **Εικόνα 56A**, η επώαση με την ActD προκαλεί σημαντική μείωση των επιπέδων του *Ngn2* mRNA. Επομένως, η μεγάλη αύξηση που παρατηρείται στα μετάγραφα του γονιδίου απουσία RA, οφείλεται και στην αποτελεσματικότερη μεταγραφή από την RNA πολυμεράση II. Ως γονίδια ελέγχου για την επίδραση του αναστολέα χρησιμοποιήθηκαν το *c-Myc* (**Εικόνα 56B**) το mRNA του οποίου είναι ασταθές, και το *GAPDH* (**Εικόνα 56Γ**), τα μετάγραφα του οποίου είναι αρκετά σταθερά και δεν επηρεάζονται από την παρουσία της ActD στο θεραπευτικό καλλιεργητικό μέσο κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες.

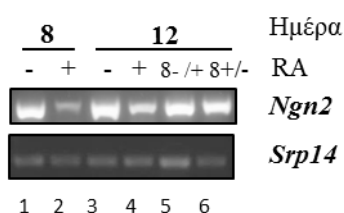


Εικόνα 56: Ανάλυση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *Ngn2* σε κύτταρα SHSY-5Y μετά την αναστολή της μεταγραφής από την Ακτινομυκίνη D. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για οκτώ ημέρες σε 1% ορό απουσία ή παρουσία RA (10 μ M), και στο τέλος της διαφοροποίησης εκτέθηκαν σε ActD (0.5 μ g/ml) για 2 ώρες. Απομονώθηκε ολικό RNA και ακολούθησε ανάλυση RT-qPCR. Τόσο παρουσία RA όσο και απουσία αυτού του παράγοντα όπου η έκφραση του γονιδίου *ngn2* είναι πολύ μεγαλύτερη ($p < 0.01$) τα επίπεδα του mRNA μειώνονται σημαντικά ($p < 0.05$) από την ActD (A). Όπως αναμενόταν, τα σχετικά σταθερά μετάργραφα του γονιδίου *GAPDH* δεν επηρεάζονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες (B), ενώ τα ασταθή μετάργραφα του γονιδίου *c-Myc* μειώνονται δραματικά μετά την επίδραση της ActD. Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το *Srp14* σε όλες τις περιπτώσεις.

4.3 Η Συνεχής Παρουσία του RA είναι Απαραίτητη για την Ελεγχόμενη Αύξηση των Επιπέδων mRNA του Γονιδίου *Ngn2* κατά τη Διάρκεια της Διαφοροποίησης

Η αυξομείωση των επιπέδων του παράγοντα *Ngn2* είναι πολύ σημαντική για την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης. Τα νευροβλαστωματικά κύτταρα, ακόμη και απουσία μιτογόνων, δηλαδή σε θρεπτικό μέσο χαμηλής συγκέντρωσης ορού, αδυνατούν να διαφοροποιηθούν αν δεν υπάρχει RA. Για να ελέγξουμε εάν τα χαμηλά, και σχετικά ελεγχόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Ngn2*, παρουσία RA, είναι απόρροια της παρουσίας αυτού του παράγοντα, ή του προγράμματος της νευρικής διαφοροποίησης που επάγει, αφαιρέσαμε το RA μετά τις 8 ημέρες της διαφοροποίησης και καλλιεργήσαμε τα κύτταρα για τέσσερις επιπλέον ημέρες μόνο με χαμηλό ορό. Παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα του *Ngn2* mRNA αυξάνονται (Εικόνα 57, διαδρομή 6), φτάνοντας τα επίπεδα που παρατηρούνται στα κύτταρα όταν αυτά καλλιεργούνται απουσία RA από την αρχή, είτε για 8 (διαδρομή 1) είτε για 12 ημέρες (διαδρομή 3). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η παρουσία του RA είναι απαραίτητη για την ελεγχόμενη αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, και ότι η αύξηση αυτή δεν οφείλεται σε μόνιμες αλλαγές στους μηχανισμούς που ελέγχουν την έκφρασή του.

Κάνοντας το αντίστροφο πείραμα, όταν δηλαδή προσθέσαμε RA για τέσσερις ημέρες σε κύτταρα που είχαν ήδη καλλιεργηθεί για οκτώ ημέρες απουσία αυτού του παράγοντα, όπου όπως έχουμε δει, τα μεταγράφα του *Ngn2* είναι σε πολύ υψηλά επίπεδα (διαδρομή 1), διαπιστώσαμε ότι παραμένουν υψηλά και δεν μειώνονται (διαδρομή 5). Η παρατήρηση αυτή ενθαρρύνει την υπόθεσή μας, ότι το RA δεν ελέγχει άμεσα τη μεταγραφή του γονιδίου *Ngn2*, αντίθετα, η έκφρασή του ρυθμίζεται από άλλους μηχανισμούς, σε συντονισμό με την πορεία του προγράμματος της νευρικής διαφοροποίησης.



Εικόνα 57: Τα ελεγχόμενα επίπεδα mRNA του γονιδίου *Ngn2* είναι συνέπεια του προγράμματος της νευρικής διαφοροποίησης και όχι της άμεσης επίδρασης του RA. Κύτταρα SH-SY5Y, καλλιεργήθηκαν για οκτώ ημέρες σε 1% ορό απουσία (διαδρομές 1, 3 και 5) ή παρουσία 10μM RA (διαδρομές 2, 4 και 6). Στη συνέχεια, τα κύτταρα είτε λύθηκαν για την απομόνωση ολικού RNA (διαδρομές 1 και 2) είτε καλλιεργήθηκαν για τέσσερις επιπλέον ημέρες απουσία RA (διαδρομές 3 και 6) ή παρουσία RA (διαδρομές 4 και 5). Κατόπιν, απομονώθηκε ολικό RNA και ακολούθησε RT-semiQPCR για όλα τα δείγματα. Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το *Srp14*.

4.4 Μελέτη των Έπιγενετικών Χαρακτηριστικών του 5' Άκρου του Γονιδίου *Ngn2* στα SH-SY5Y Κύτταρα

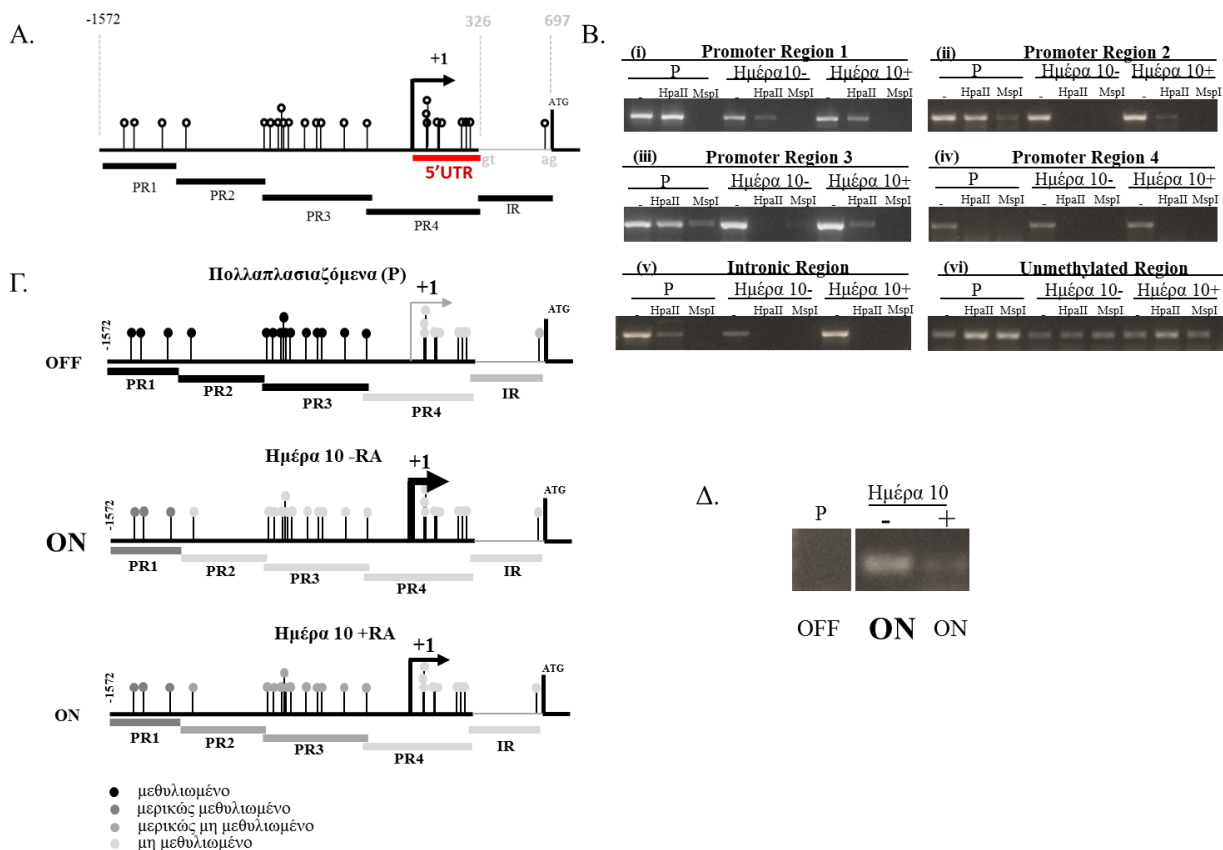
4.4.1 Ανάλυση του Προτύπου Μεθυλίωσης της Περιοχής του Υποκινητή του Γονιδίου *Ngn2*

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί μια πολύ σημαντική μορφή επιγενετικού ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Είναι αντιστρεπτή, και μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφή αποτρέποντας την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων και μεταβάλλοντας την δομή της χρωματίνης. Το γεγονός ότι, όπως είδαμε παραπάνω, η μεταγραφή του γονιδίου *Ngn2* φαίνεται να ελέγχεται από μηχανισμούς που είναι συντονισμένοι με την πορεία του προγράμματος της νευρικής διαφοροποίησης, σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι το γονίδιο είναι βυθισμένο μέσα σε μια «θάλασσα» από νησίδες CpG, μας ενθάρρυνε να μελετήσουμε τις πιθανές μεταβολές στο πρότυπο της μεθυλίωσης του υποκινητή του και να δούμε αν συσχετίζονται με τις διαφορές που παρατηρούνται στα επίπεδα του mRNA στις διάφορες συνθήκες.

Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν περιοριστικές πέψεις γενωμικού DNA το οποίο απομονώθηκε από κύτταρα SH-SY5Y που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες πολλαπλασιασμού (prolif), διαφοροποίησης με RA (+), καθώς και σε συνθήκες χαμηλού ορού απουσία RA (-) στις οποίες τα επίπεδα του Ngn2 mRNA είναι πολύ υψηλά. Οι περιοριστικές πέψεις έγιναν με τα ένζυμα με τα ένζυμα HpaII και MspI, όπως περιγράφεται αναλυτικά στις μεθόδους (**Παράγραφος 2.3.8, Εικόνα 27**).

Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, αναλύσαμε το πρότυπο μεθυλίωσης τεσσάρων διαφορετικών περιοχών του ευρύτερου υποκινητή, πλούσιων σε δινοκλεοτίδια CG (PR1, PR2, PR3 και PR4), καθώς και μιας ιντρονιακής περιοχής κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου (IR) (**Εικόνα 58 A**). Ένα τμήμα της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής (3'-UTR) το οποίο δεν διαθέτει αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα (*unmethylated region*), χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ενεργότητας και της εξειδικευμένης δράσης των ενζύμων, καθώς και ως δείγμα ισοφόρτωσης (**Εικόνα 58 B, vi**).

Παρατηρούμε ότι ο υποκινητής του γονιδίου είναι μεθυλιωμένος σε μεγάλη έκταση σε συνθήκες πολλαπλασιασμού (**Εικόνα 58 B και Γ, πολλαπλασιαζόμενα, P**), σε συμφωνία με το γεγονός ότι στις συνθήκες αυτές τα επίπεδα mRNA είναι πάρα πολύ χαμηλά (**Εικόνα 58 Δ, P**). Σε συνθήκες διαφοροποίησης στις οποίες επάγεται η έκφραση του γονιδίου (**Εικόνα 58 Δ, +**), απομεθυλώνονται σε πολύ μεγάλο βαθμό οι περιοχές PR2 και PR3 καθώς και η περιοχή IR, και εν μέρει η περιοχή PR1 (**Εικόνα 58 B και Γ, Ημέρα 10+**). Σε συνθήκες χαμηλού ορού και απουσία RA, όπου τα επίπεδα του γονιδίου είναι πολύ υψηλά (**Εικόνα 58 Δ, -**), οι παραπάνω περιοχές (με εξαίρεση την PR1), απομεθυλώνονται πλήρως (**Εικόνα 58 B και Γ, Ημέρα 10-**). Η περιοχή PR4 στην οποία βρίσκεται η 5'-UTR του γονιδίου δεν είναι μεθυλιωμένη σε καμία από τις τρεις περιπτώσεις (**Εικόνα 58 B, iv**). Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι οι 5' ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου, παρουσιάζουν ένα δυναμικό πρότυπο μεθυλίωσης το οποίο εξαρτάται από το περιβάλλον και την κατάσταση των κυττάρων και είναι σε συμφωνία με τις μεταβολές των επιπέδων mRNA που παρατηρούνται στις διάφορες συνθήκες. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι η έκφραση του γονιδίου *Ngn2* μπορεί να υπόκειται σε επιγενετικό έλεγχο κατά τη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης μέσω μεθυλίωσης των ρυθμιστικών του περιοχών.



Εικόνα 58: Ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *Ngn2* σε συνθήκες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. (A) Σχηματική απεικόνιση του 5' άκρου του γονιδίου *Ngn2* στην οποία περιλαμβάνεται η ευρύτερη περιοχή του υποκινητή η οποία είναι πλούσια σε δινουκλεοτίδια CG (μικροί κύκλοι), καθώς και η 5'-UTR μέχρι το ATG στην οποία παρεμβάλλεται και ένα μικρό ιντρόνιο (-1572 έως +697). Χρησιμοποιήθηκαν πέντε ζεύγη εκκινητών που παράγουν τα αμπλικόνια PR1, PR2, PR3, PR4 και IR ώστε να ελεγχθεί όλη η περιοχή (*methylation walk*). (B) Απομονώθηκε γενωμικό DNA από κύτταρα SHSY-5Y τα οποία είχαν καλλιεργηθεί σε συνθήκες πολλαπλασιασμού (*prolif*), διαφοροποίησης (*Ημέρα 10+RA*), καθώς και απουσίας RA (*Ημέρα 10-RA*). Ακολούθησε πέψη 1μg DNA με τα περιοριστικά ένζυμα *HpaII* και *MspI* για 1h στους 37°C (ως control χρησιμοποιήθηκε η ίδια αντίδραση σε κάθε περίπτωση, χωρίς όμως την προσθήκη ενζύμου). Μετά την εκχύλιση του DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη τα προϊόντα των πέψεων χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα (*template*) για τις αντιδράσεις PCR. Τα προϊόντα αναλύθηκαν σε 1.5% πήκτωμα αгарόζης και ακολούθησε ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε ζώνης. Ως αρνητικό *control* για τη μεθυλίωση χρησιμοποιήθηκε η περιοχή της 3' UTR στην οποία δεν υπάρχουν νησίδες CpG. (Γ) Σχηματική αναπαράσταση των αλλαγών στο πρότυπο μεθυλίωσης του υποκινητή στις τρεις συνθήκες: PR1-4= promoter region 1-4, IR= intronic region. Η ένταση του χρώματος αντανακλά το ποσοστό μεθυλίωσης. (Δ) Τα επίπεδα του *Ngn2* mRNA στις παραπάνω συνθήκες προσδιορίστηκαν με RT-semiQPCR με γονίδιο αναφοράς το *Srp14* (δεν δείχνεται εδώ).

4.4.2 Κλωνοποίηση Περιοχών του Υποκινητή του Γονιδίου Ngn2 και Ανάλυση της Ενεργότητας με Δοκιμασίες Λουσιφεράσης σε Πειράματα Παροδικής Διαμόλυνσης

Αναλύοντας την αλληλουχία 2000 bp ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου *ngn2*, διαπιστώσαμε ότι βρίθκει στοιχείων πρόσδεσης πολλών μεταγραφικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων πρωτεΐνες της οικογένειας bHLH (E-box), καθώς και ομοιοτικές πρωτεΐνες (homeodomain proteins, HD) (Εικόνα 59 Α). Επιχειρήσαμε έτσι να χαρτογραφήσουμε επιμέρους περιοχές με απώτερο στόχο να διαπιστώσουμε ποια και με ποιο τρόπο συμβάλλει περισσότερο στον έλεγχο της μεταγραφής, καθώς και ποιοί πιθανοί παράγοντες ενδέχεται να την επηρεάζουν.

Αρχικά κλωνοποιήσαμε μια περιοχή που περιλαμβάνει τις αλληλουχίες 1972 bp ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής (+1) έως και 671 bp καθοδικά αυτού του σημείου, στον πλασμιδιακό φορέα pGL3-Basic (Promega) (βλ. Υλικά, παράγραφος 0, κατασκευή pNgn2[-1972/+671]-luc). Η περιοχή από το +1 έως το +326 bp αντιπροσωπεύει την 5'-UTR, ενώ αμέσως μετά (+327 bp έως +698 bp) ακολουθεί το ένα και μοναδικό ιντρόνιο του γονιδίου. Από αυτή την κατασκευή δημιουργήθηκαν δύο ακόμη με τη χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων, από τις οποίες αφαιρέθηκαν οι περιοχές [-1972 έως -462] και [-1972 έως -64], (pNgn2[-463/+671]-luc και pNgn2[-65/+671]-luc), αντίστοιχα (Εικόνα 59 Β, i).

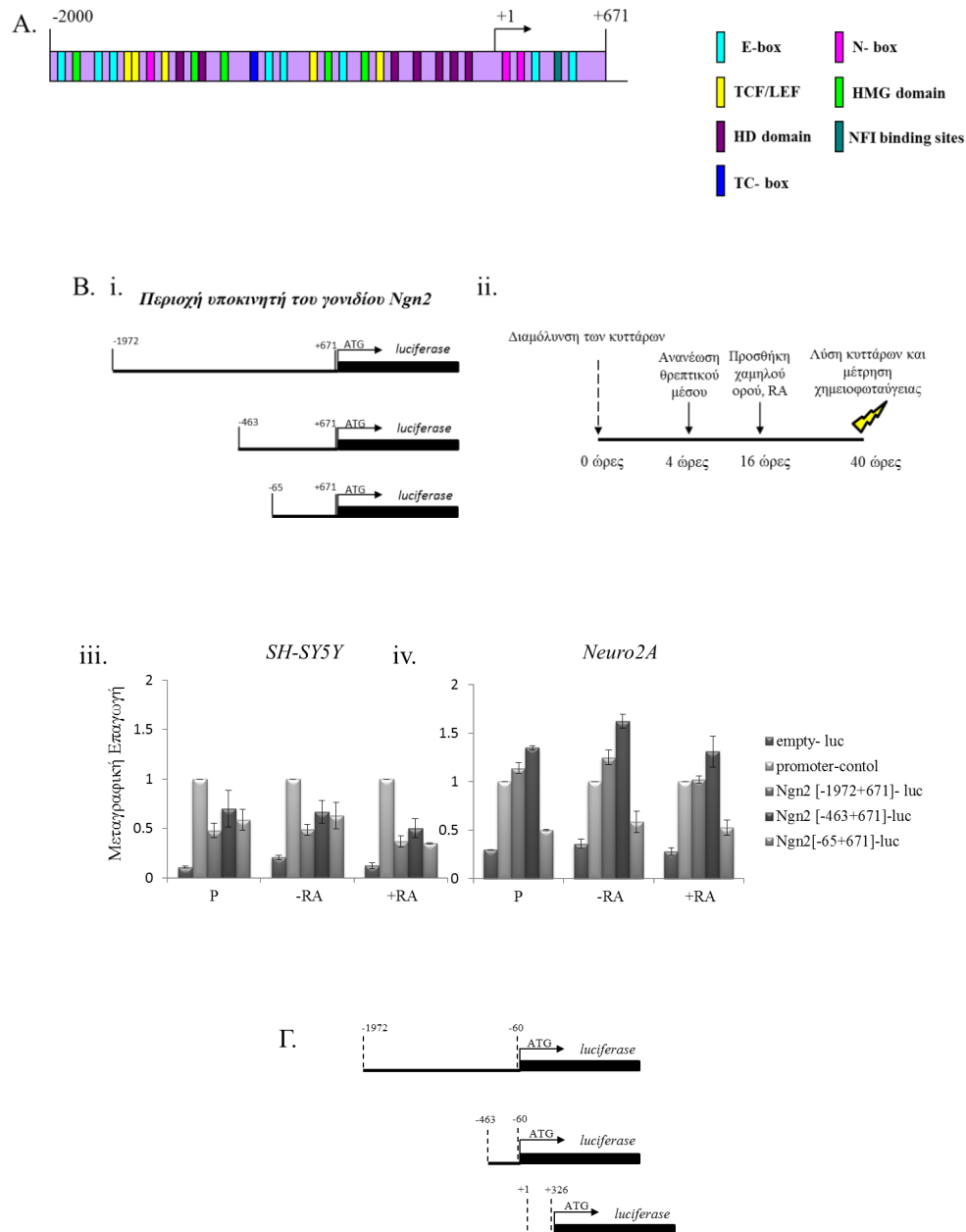
Για να επιβεβαιώσουμε τη λειτουργικότητα των πλασμιδιακών κατασκευών και να προσδιορίσουμε την μεταγραφικά πιο ενεργή περιοχή του υποκινητή, πραγματοποιήσαμε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης (*transient transfection assays*) σε νευροβλαστωματικά κύτταρα Neuro2A και SH-SY5Y. Η σειρά Neuro2A προέρχεται από νευροβλάστωμα ποντικού και επιλέχθηκε επειδή στα κύτταρα αυτά, σε αντίθεση με τα SH-SY5Y, το ενδογενές γονίδιο Ngn2 είναι μεταγραφικά σιωπηλό. Χρησιμοποιήθηκε δηλαδή ως ένα «ετερόλογο» σύστημα στο οποίο θα μπορούσαμε να ελέγξουμε αν οι εξωγενείς συνθήκες (η παρουσία του ορού ή του RA), αυτές καθ' αυτές είναι ικανές να ενεργοποιήσουν τον υποκινητή του Ngn2, ανεξάρτητα από το περιβάλλον της χρωματίνης στο οποίο βρίσκονται οι ενδογενείς ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου.

Διαμολύναμε λοιπόν κύτταρα Neuro2A και SH-SY5Y, με τις παραπάνω κατασκευές, χρησιμοποιώντας ως controls τον «άδειο» φορέα (pGL3basic-luc), καθώς κι έναν φορέα ο

ο οποίος φέρει έναν υποκινητή με στοιχειώδη (βασική) μεταγραφική ενεργότητα (pGL3promoter-luc). Από τις δοκιμασίες λουσιφεράσης, διαπιστώσαμε ότι στα κύτταρα SH-SY5Y, η μεταγραφική ενεργότητα και των τριών περιοχών του υποκινητή είναι χαμηλή (χαμηλότερη από τον pGL3promoter-luc), και δεν μεταβάλλεται ούτε παρουσία RA, αλλά ούτε και σε συνθήκες χαμηλού ορού (**Εικόνα 59 B, iii, iv**). Επειδή όπως έχουμε περιγράψει παραπάνω το γονίδιο Ngn2, μεταγράφεται ταχύτατα αμέσως μετά την αφαίρεση του ορού από το θρεπτικό μέσο, αναμέναμε να ανιχνεύσουμε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας στις συνθήκες αυτές. Μια απλή εξήγηση για αυτό το αποτέλεσμα θα μπορούσε να είναι ότι από τις κλωνοποιημένες περιοχές απουσιάζει μια περιοχή πρόσδεσης ενός παράγοντα ο οποίος είναι απαραίτητος για την ενεργότητα του υποκινητή στα κύτταρα SH-SY5Y. Μία άλλη ερμηνεία είναι ότι η αύξηση της έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου είναι συνάρτηση της κατάστασης της χρωματίνης όπως αυτή είναι διαμορφωμένη στο περιβάλλον του χρωμοσώματος στο οποίο εδράζεται το γονίδιο. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να υπάρχει ένας καταστολέας ο οποίος αδυνατεί να προσδεθεί (και άρα να επιτρέπεται η πρόσβαση στη μεταγραφική μηχανή), μονάχα όταν η κατάσταση της χρωματίνης π.χ. μια αλλαγή στη μεθυλίωση του DNA ή στον κώδικα των ιστονών (σε απόκριση σε παράγοντες όπως το RA ή η απουσία του ορού), αποτρέπει την πρόσδεσή του. Ένας τέτοιος καταστολέας θα μπορούσε να προσδένεται στη νουκλεοπρωτεϊνική δομή που σχηματίζει το πλασμιδιακό DNA στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης και να μην μπορεί να απομακρυνθεί μέσω ενός τέτοιου μηχανισμού, καθιστώντας έτσι τις περιοχές που ελέγξαμε μεταγραφικά ανενεργές.

Στα κύτταρα Neuro2A, το μεταγραφικό δυναμικό των δύο μεγαλύτερων τμημάτων του υποκινητή της Ngn2 είναι μεγαλύτερο (στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με τον άδειο φορέα), και πάλι όμως καμία από τις κατασκευές δεν ξεπερνάει την ενεργότητα του στοιχειώδους υποκινητή, σε καμία συνθήκη (**Εικόνα 59 B, iii**).

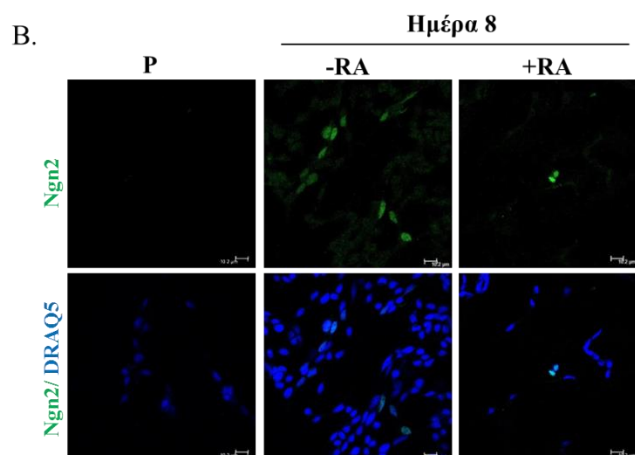
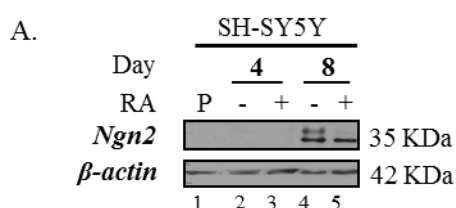
Επειδή, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στο 5'-UTR παρεμβάλλεται ένα ιντρόνιο το οποίο ίσως επηρεάζει αρνητικά την μεταγραφή, αποφασίσαμε να το αφαιρέσουμε (**Εικόνα 59 Γ**) και να ελέγξουμε σε επόμενα πειράματα αν επηρεάζεται η μεταγραφική ενεργότητα των περιοχών αυτών.



Εικόνα 59: Η 5' περιοχή του γονιδίου *Ngn2* είναι πλούσια σε *cis* ρυθμιστικά στοιχεία για την έλεγχο της μεταγραφής. (A) Διαγραμματική απεικόνιση των περιοχών πρόσδεσης πιθανών μεταγραφικών παραγόντων. Κάθε χρώμα αντιπροσωπεύει διαφορετική οικογένεια πρωτεϊνών. (B) Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδιακών κατασκευών που περιλαμβάνουν τις τρεις περιοχές του υποκινητή ανοδικά της λουσιφεράσης στον πλασμιδιακό φορέα pGL3-Basic (i). Στα κύτταρα SH-SY5Y, η μεταγραφική ενεργότητα και των τριών περιοχών του υποκινητή είναι χαμηλότερη από τον pGL3-Promoter, και δεν μεταβάλλεται σε καμία από τις συνθήκες που ελέγχθηκαν (ii). Από τη διαμόλυνση των κυττάρων Neuro2A προκύπτει ότι οι κατασκευές είναι λειτουργικές και παρουσιάζουν στατιστικές σημαντικές διαφορές με την ενεργότητα του άδειου φορέα (*empty-luc*) (iii). Οι τιμές της λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την ενεργότητα που παράγεται από το πλασμίδιο pRenilla-Luc. Η μεταγραφική ενεργότητα εκφράζεται με βάση την ενεργότητα του pGL3promoter-luc. Έγιναν τρία ανεξάρτητα πειράματα στα Neuro2A (n=3) και τέσσερα στα SH-SY5Y (n=4).

4.5 Η Έκφραση του Γονιδίου *Ngn2* Ελέγχεται στο Επίπεδο της Μετάφρασης

Έχοντας διαπιστώσει ότι η συνεχής παρουσία του RA είναι απαραίτητη για την ελεγχόμενη αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *Ngn2* κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, θελήσαμε να εξετάσουμε κατά πόσο οι αλλαγές που παρατηρούνται στο επίπεδο του RNA αντανakλώνται και στο επίπεδο της πρωτεΐνης. Ο έλεγχος έγινε με τη χρήση αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης *Ngn2* σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης (Western blot) και ανοσοκυτταροχημείας. Παρατηρήσαμε ότι κατά την όγδοη ημέρα της καλλιέργειας των κυττάρων SH-SY5Y ανιχνεύονται σημαντικά επίπεδα πρωτεΐνης τόσο απουσία όσο και παρουσία RA (**Εικόνα 60 A**, διαδρομές 4 και 5). Μάλιστα, απουσία RA εμφανίζεται και μία μεγαλύτερου μοριακού βάρους ζώνη, που ίσως υποδηλώνει κάποια μετα-μεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης. Αυτό που μας προκάλεσε το ενδιαφέρον ήταν ότι οι μεταβολές στα επίπεδα του mRNA δεν συνοδεύονται από αντίστοιχες μεταβολές στα επίπεδα της πρωτεΐνης (**Εικόνα 55 B**). Για παράδειγμα, κατά την τέταρτη ημέρα δεν ανιχνεύεται πρωτεΐνη (**Εικόνα 60 A**, διαδρομές 2 και 3), ενώ το mRNA είναι σχετικά άφθονο (**Εικόνα 55 B**). Με πειράματα ανοσοκυτταροχημείας σε συνδυασμό με συνεστιακή μικροσκοπία επιβεβαιώσαμε αυτό το εύρημα και παρατηρήσαμε ότι η *Ngn2* εκφράζεται σε μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων απουσία RA απ' ό τι παρουσία αυτού την όγδοη ημέρα της καλλιέργειας σε συνθήκες χαμηλού ορού (**Εικόνα 60 B**). Συμπεράναμε ότι είτε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της *Ngn2* κατά την τέταρτη ημέρα είναι τόσο χαμηλά που δεν ανιχνεύονται, είτε ότι υπάρχει ένας δεύτερος μηχανισμός ελέγχου της έκφρασης του μορίου στο επίπεδο της πρωτεΐνης.



4.5.1 Αποκάλυψη μιας Αρνητικής Συσχέτισης μεταξύ του Μεταγραφικού Παράγοντα Ngn2 και της HuD, μιας Πρωτεΐνης Πρόσδεσης στο RNA (RNA Binding Protein)

[illegible]

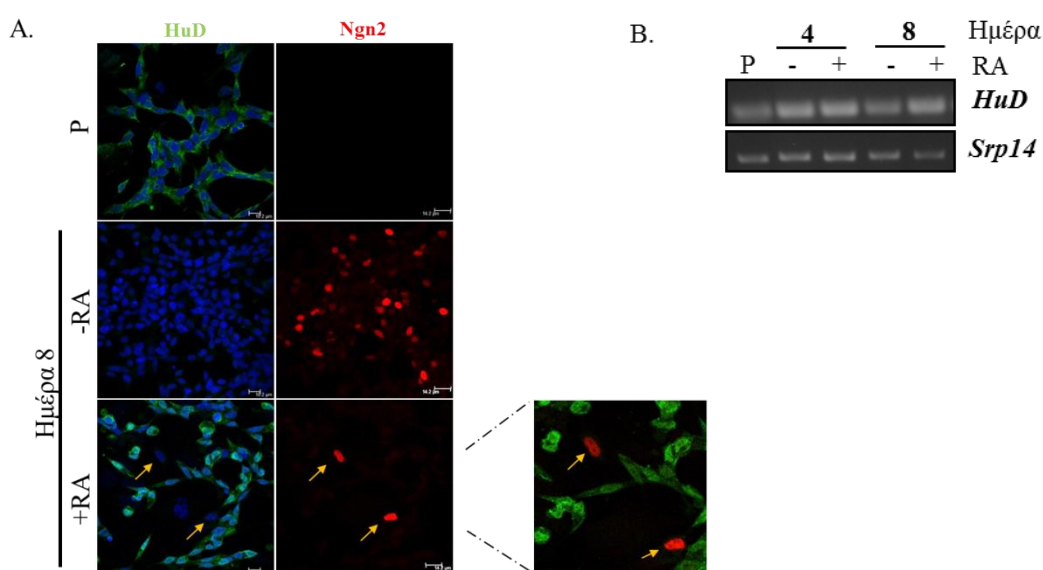
Αναλύοντας την 5'-UTR αλλά και την 3'-UTR του γονιδίου με τα υπολογιστικά προγράμματα:

- RBP map (*RNA binding proteins*) [<http://rbpmap.technion.ac.il/index.html>],
- AURA (Atlas of UTR Regulatory activity) [<http://aura.science.unitn.it>] και
- ARE site (AU-rich elements) [<http://nibiru.tbi.univie.ac.at/AREsite2/welcome>]

διαπιστώσαμε ότι οι περιοχές αυτές διαθέτουν πολλά ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία έχουν συνδεθεί με τον έλεγχο της μετάφρασης. Ανάμεσα στους πιθανούς *trans-acting* παράγοντες που μπορεί να συμβάλλουν στον έλεγχο αυτό είναι και οι πρωτεΐνες που προσδένονται στο RNA, γνωστές ως RBPs (*RNA Binding Proteins*). Οι πρωτεΐνες αυτές, αλληλεπιδρώντας άμεσα ή έμμεσα με το 5' ή το 3' άκρο, μπορούν είτε να ενισχύουν είτε να καταστέλλουν τη μετάφραση των mRNA-στόχων, και κατ' αυτόν τον τρόπο να ρυθμίζουν (στο κυτταρόπλασμα) προγράμματα γονιδιακής έκφρασης, τα οποία απαιτούνται προκειμένου τα κύτταρα να ανταποκρίνονται αποτελεσματικά σε αλλαγές στο εξωτερικό περιβάλλον. Μια τέτοια οικογένεια είναι οι πρωτεΐνες Hu στις οποίες αναφερθήκαμε στην παράγραφο 2.2 της εισαγωγής και αποτελούν ομόλογα της πρωτεΐνης ELAV (*embryonic lethal abnormal vision*) της *Drosophila*. Στα σπονδυλωτά υπάρχουν τέσσερις τέτοιες πρωτεΐνες, από τις οποίες οι τρεις (HuB, HuC και HuD) εκφράζονται αποκλειστικά στα νευρικά κύτταρα και είναι σημαντικές για τη νευρική διαφοροποίηση. Μια από αυτές, που χρησιμοποιείται συχνά και ως δείκτης νευρικής διαφοροποίησης, είναι η HuD [195]. Η πρωτεΐνη αυτή αφθονεί στους νευρώνες κατά την πρόιμη εμβρυική νευρογένεση, ενώ η υπερέκφρασή της έχει βρεθεί ότι επιταχύνει τη νευριτική αύξηση τόσο σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρικών κυττάρων όσο και σε κυτταρικές σειρές. Είναι γνωστό ότι ρυθμίζει την έκφραση πολλών σημαντικών μορίων για τη βιολογία του νευρικού κυττάρου, όπως της πρωτεΐνης του κυτταρικού σκελετού Tau, της νευροτροφίνης BDNF και του νευροδιαβιβαστή του γλουταμικού [227], [228], [229], ενώ έχει δειχθεί ότι αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο της Ngn2 [164].

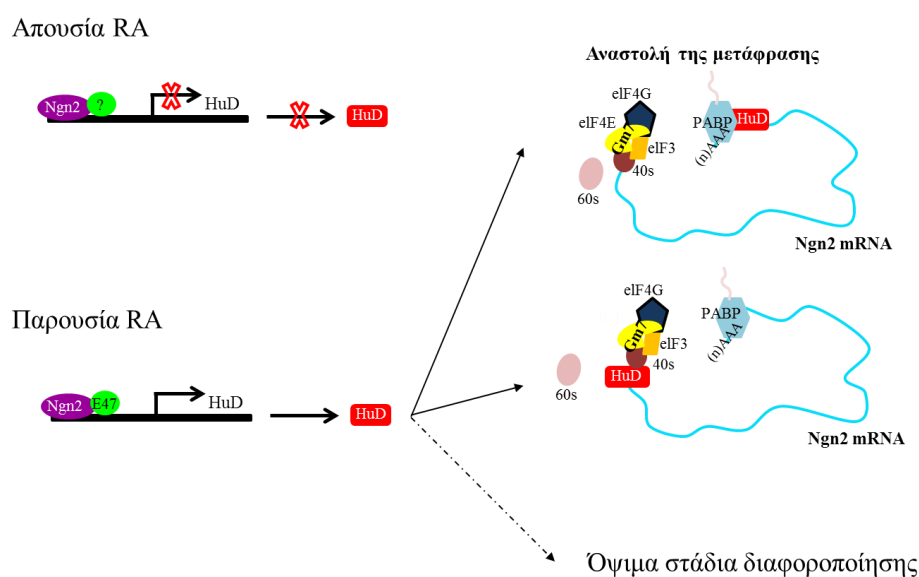
Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω δεδομένα, σχεδιάσαμε πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού με αντισώματα έναντι των Ngn2 και HuD, ώστε να δούμε αν υπάρχει κάποια θετική ή αρνητική συσχέτιση της έκφρασης αυτών των δύο πρωτεϊνών, στις συνθήκες που μελετάμε. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 62 Α**, μετά από οχτώ ημέρες καλλιέργειας σε συνθήκες χαμηλού ορού αλλά απουσία RA, όπου τα κύτταρα επιβιώνουν αλλά δεν διαφοροποιούνται (-RA), τα επίπεδα της HuD είναι σημαντικά μειωμένα συγκριτικά με τις συνθήκες πολλαπλασιασμού (P), ενώ εκείνα της Ngn2 είναι αυξημένα. Στις συνθήκες που οδηγούν στη νευρική διαφοροποίηση (+RA), η HuD εκφράζεται στο σύνολο σχεδόν του πληθυσμού, εκτός όμως από τα κύτταρα που εκφράζουν Ngn2 (βλ. μεγέθυνση, **Εικόνα 62 Α**). Παρατηρούμε λοιπόν ότι υπάρχει μία αντίθετη σχέση μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων των Ngn2 και HuD στο σύστημά μας. Επιπλέον, απουσία RA,

παρότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης Ngn2 είναι υψηλά, δεν παρατηρείται επαγωγή της έκφρασης του *HuD* ούτε στο επίπεδο του mRNA (Εικόνα 62 Β). Οι παρατηρήσεις αυτές μας οδήγησαν στην υπόθεση ότι απουσία RA η Ngn2 εκφράζεται, αλλά δεν έχει το δυναμικό να επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου *HuD* (και ενδεχομένως άλλων γονιδίων-στόχων, σημαντικών για την πορεία της διαφοροποίησης) είτε επειδή δεν τροποποιείται κατάλληλα μετα-μεταφραστικά είτε επειδή δεν εκφράζεται κάποιος υποθετικός παράγοντας με τον οποίο χρειάζεται να αλληλεπιδράσει προκειμένου να επάγει τα γονίδια στόχους της, και ο οποίος επάγεται μόνο όταν τα κύτταρα βρίσκονται στην πορεία της νευρικής διαφοροποίησης (δηλαδή παρουσία RA).



Εικόνα 62: Τα επίπεδα των πρωτεϊνών Ngn2 και HuD μεταβάλλονται με αντίθετο τρόπο στις συνθήκες καλλιέργειας των νευροβλαστωματικών κυττάρων. Κύτταρα SH-SY5Y καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM με 1% ορό παρουσία ή απουσία 10μM RA για 4 ή 8 ημέρες όπως αναγράφεται στις εικόνες. (Α) Πειράματα ανοσοκυτταροχημείας με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών Ngn2 και HuD έδειξαν ότι η πρωτεΐνη HuD αυξάνεται μόνο σε συνθήκες διαφοροποίησης (+RA). Στην περίπτωση της Ngn2, ενώ η μείωση του ορού για 8 ημέρες οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης στον κυτταρικό πληθυσμό (-RA), στις συνθήκες διαφοροποίησης (+RA) η αύξηση αυτή παρατηρείται πάντοτε σε περιορισμένο αριθμό κυττάρων. Από αυτό τον Ngn2+ πληθυσμό φαίνεται να απουσιάζει εντελώς η HuD, στο 100% των κυττάρων που ελέγχθηκαν σε πολλά ανεξάρτητα πειράματα, υποδηλώνοντας την πιθανή παρουσία ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης. Φακός 100x. Η χρώση του πυρήνα έγινε με DRAQ5 (μπλε). (Β) Ανάλυση RT-semiQPCR στην οποία φαίνεται ότι δεν μεταβάλλονται σημαντικά τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *HuD* στις υποδεικνυόμενες συνθήκες. Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *Srp14*.

Έτσι λοιπόν προτείνουμε το παρακάτω μοντέλο (**Εικόνα 63**). Απουσία RA η Ngn2 δε μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων όπως το *HuD*, είτε γιατί δε έχει του κατάλληλους συμπαραγόντες είτε γιατί το ίδιο το περιβάλλον δεν είναι ευνοϊκό. Παρουσία RA όμως, που τα κύτταρα βρίσκονται στο πρόγραμμα διαφοροποίησης, η Ngn2 μεταγράφει, μεταξύ άλλων και το γονίδιο *HuD*. Το HuD με τη σειρά του, εφόσον εκφράζεται, αναστέλλει τη μετάφραση του mRNA του γονιδίου Ngn2 είτε άμεσα είτε έμμεσα, καθώς τα κύτταρα μεταβαίνουν σε πιο όψιμα στάδια διαφοροποίησης.



Εικόνα 63: Υποθετικό μοντέλο που εξηγεί τη σχέση της πρωτεΐνης Ngn2 με την HuD.

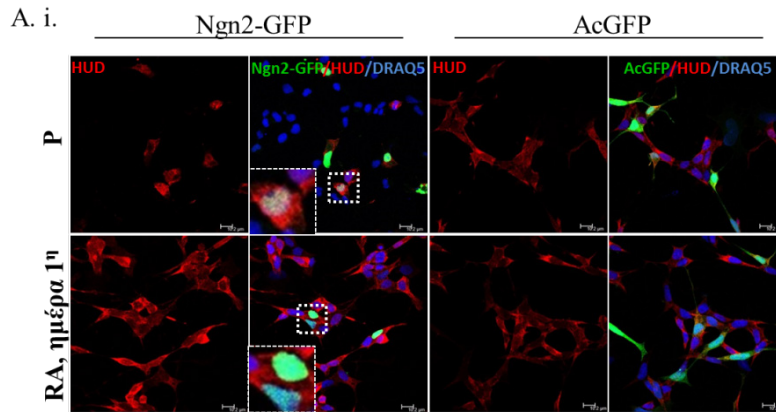
4.5.2 Η 5' Μη Μεταφραζόμενη Περιοχή του mRNA που Παράγεται από το Γονίδιο *Ngn2* Διαδραματίζει Σημαντικό Ρόλο στη Ρύθμιση της Μετάφρασής του, καθώς και στην Αλληλεπίδραση της Πρωτεΐνης *Ngn2* με την *HuD*

Αν και πολλές από τις περιοχές ενός μορίου mRNA μπορούν να συμβάλλουν στη ρύθμιση της μετάφρασής του, τα περισσότερα *cis* στοιχεία εδράζονται συχνά μέσα στις μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες. Προκειμένου να κατανοήσουμε το ρόλο αυτών των αλληλουχιών στη μετάφραση του *Ngn2* mRNA, κλωνοποιήσαμε μόνο την κωδική του περιοχή ανοδικά του γονιδίου *AcGFP* στον φορέα *pAcGFP-N1*, έχοντας μεταλλάξει το κωδικόνιο λήξης ώστε το αναγνωστικό πλαίσιο της *Ngn2* να ακολουθείται από εκείνο της *GFP*, δημιουργώντας έτσι μια χιμαιρική πρωτεΐνη *Ngn2-AcGFP*. Στη συνέχεια διαμολύναμε κύτταρα SH-SY5Y με τους φορείς *pNgn2-AcGFP* και *pAcGFP-N1* (δηλαδή τον άδειο φορέα) και παρατηρήσαμε τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων σε συνθήκες πολλαπλασιασμού αλλά και πρώιμης διαφοροποίησης, μετά από την επίδραση του RA για μία ημέρα. Διαπιστώσαμε ότι αυτή η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της *Ngn2* και της *HuD* που περιγράφηκε παραπάνω δεν υφίσταται μετά την απομάκρυνση των μη μεταφραζόμενων περιοχών από την *Ngn2*, αφού ένας σημαντικός αριθμός *Ngn2-AcGFP*⁺ κυττάρων εκφράζουν και *HuD* (Εικόνα 64 Α, i). Ο πίνακας στην Εικόνα 64 Α (ii) δείχνει ότι το ποσοστό των *Ngn2-AcGFP*⁺ κυττάρων που εκφράζουν *HuD* από 48.8% στην κατάσταση πολλαπλασιασμού σχεδόν διπλασιάζεται (87.5%), όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν σε συνθήκες διαφοροποίησης για μία ημέρα. Μια δεύτερη παρατήρηση ήταν ότι η εξωγενής *Ngn2* αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων που εκφράζουν *HuD* στον ευρύτερο πληθυσμό σε συνθήκες πολλαπλασιασμού (*P*), κάτι που δεν παρατηρείται στο control πείραμα (δηλαδή σε κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με τον φορέα *pAcGFP-N1*). Μάλιστα, η αναμενόμενη αύξηση του αριθμού των *HuD*⁺ κυττάρων από την κατάσταση του πολλαπλασιασμού (*P*) σε εκείνη της διαφοροποίησης (+RA, ημέρα 1^η) είναι πολύ μεγαλύτερη στα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με τον φορέα *pNgn2-AcGFP* συγκριτικά με τα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με τον φορέα *pAcGFP-N1* (Εικόνα 64 Α, i).

Στη συνέχεια εφαρμόσαμε αντίστοιχα πειράματα σε πρόδρομα νευρικά κύτταρα από υπόκαμπο ενήλικου αρουραίου, στα οποία είχαμε παρατηρήσει μια πολύ γρήγορη διακύμανση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *Ngn2*. Διαπιστώσαμε ότι και σε αυτά τα

κύτταρα η εξωγενής Ngn2 αυξάνει την έκφραση της HuD στον ευρύτερο κυτταρικό πληθυσμό, και μάλιστα σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τα SH-SY5Y, τόσο στην κατάσταση πολλαπλασιασμού όσο και της διαφοροποίησης (**Εικόνα 64 Β**).

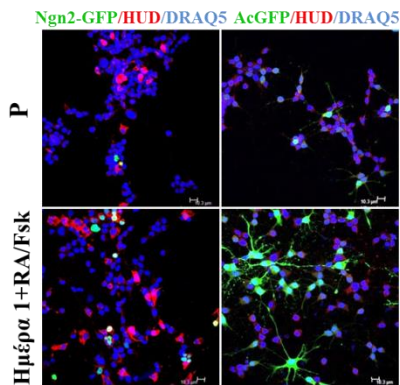
Έτσι λοιπόν, εκτός από τα συμπεράσματα αναφορικά με ρύθμιση της Ngn2 στο επίπεδο της πρωτεΐνης, από τα παραπάνω πειράματα αποκαλύπτεται επίσης ότι και στα δύο συστήματα ένας μικρός αριθμός κυττάρων που εκφράζουν Ngn2 μπορεί να επηρεάζει την έκφραση της HuD σε πολύ περισσότερα κύτταρα του πληθυσμού. Αυτό ήταν πολύ ενδιαφέρον διότι η HuD είναι μια πρωτεΐνη πρόσδεσης στο RNA, η οποία μπορεί με τη σειρά της να ρυθμίσει την έκφραση πολλών άλλων πρωτεϊνών και κατά συνέπεια το πρόγραμμα της νευρικής διαφοροποίησης. Σε μία έρευνα που δημοσιεύθηκε παράλληλα με τη δική μας εργασία δείχθηκε ότι πρόδρομα νευρικά κύτταρα, τροποποιημένα έτσι ώστε να υπερεκφράζουν Ngn2, χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκκριση στο θρεπτικό μέσο διαφόρων νευροτροφικών παραγόντων, όπως NGF, BDNF, NT3, CNTF κ.α [230]. Προκειμένου να ελέγξουμε αν και στο σύστημά μας υπάρχει κάποιος εξωκρινής παράγοντας, επαγόμενος από την Ngn2, που να μπορεί να προκαλέσει αύξηση της έκφρασης του HuD στον κυτταρικό πληθυσμό, προσθέσαμε διάφορες ποσότητες από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των διαμολυσμένων με Ngn2-AcGFP (*conditioned medium*, CM), σε πρόδρομα νευρικά κύτταρα τα οποία βρίσκονταν είτε σε συνθήκες πολλαπλασιασμού είτε σε πορεία διαφοροποίησης με RA και Fsk. Ωστόσο δεν παρατηρήσαμε καμία διαφορά στην έκφραση του HuD. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει ότι η δράση του υποθετικού παράγοντα που επάγεται από την πρωτεΐνη Ngn2 και ενεργοποιεί την έκφραση του HuD, εξαρτάται από τη διακυτταρική επαφή, όπως συμβαίνει επί παραδείγματι, στη σηματοδότηση του Notch. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι η έκφραση του HuD είναι δυνατόν να ενεργοποιηθεί από το Notch3 σε κύτταρα θύμου [231], ενώ έχει επίσηςδειχθεί ότι η συγγενική πρωτεΐνη HuR μπορεί να σταθεροποιήσει τα επίπεδα του προσδέτη Dll1 (Delta-like 1) mRNA σε νευροεπιθηλιακά κύτταρα [232], παρατηρήσεις που ενδυναμώνουν τις υποψίες μας για την ενδεχόμενη αλληλεπίδραση μεταξύ του μονοπατιού Notch και της RBP πρωτεΐνης HuD στη βιολογική δράση του μεταγραφικού παράγοντα Ngn2 στους νευρικούς πληθυσμούς.



ii.

	Ngn2-AcGFP	
	P	Day 1 +RA
HuD ⁺	48.8%	87.5%
HuD ⁻	40.2%	12.5%

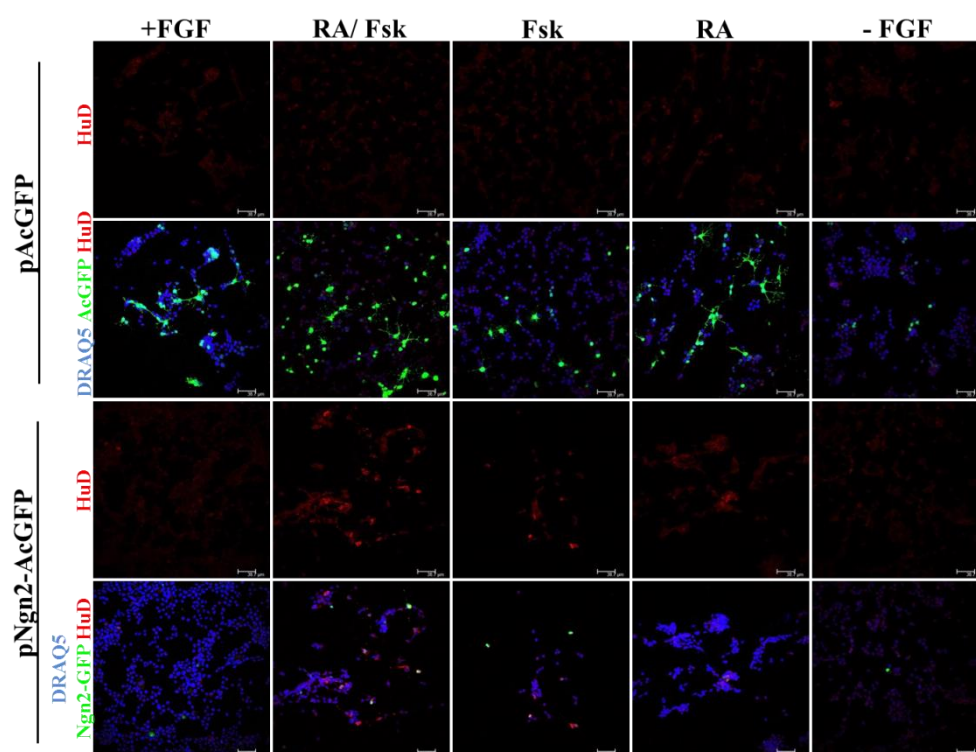
B. Πρόδρομα Νευρικά Κύτταρα



Εικόνα 64: Η αρνητική σχέση μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων της Ngn2 και της HuD χάνεται όταν απομακρυνθούν οι μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες από την κωδική περιοχή της Ngn2. (A) Κύτταρα SH-SY5Y διαμολύνθηκαν με 500 ng είτε του πλασμιδίου pNgn2-AcGFP (Ngn2-AcGFP) είτε του pAcGFP-N1(AcGFP). Την επόμενη ημέρα ανανεώθηκε το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ακόμη ώρες είτε σε συνθήκες πολλαπλασιασμού (P) είτε σε συνθήκες διαφοροποίησης (RA, ημέρα 1^η). Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων και

ανοσοκυτταροχημεία με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών Ngn2, AcGFP1 και HuD (i). Η παρουσία της πρωτεΐνης Ngn2-AcGFP (πράσινο) αυξάνει τον αριθμό των HuD⁺ (κόκκινο) κυττάρων συγκριτικά με την AcGFP (πράσινο), και στις συνθήκες διαφοροποίησης η αύξηση αυτή είναι εντονότερη. Φακός 100x. Η χρώση του πυρήνα έγινε με DRAQ5 (μπλε). Στον πίνακα (ii) φαίνεται το ποσοστό των Ngn2-AcGFP⁺ κυττάρων που εκφράζουν HuD σε συνθήκες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. (B) Πρόδρομα νευρικά κύτταρα από υπόκαμπο ενήλικου αρουραίου (HCN) διαμολύνθηκαν όπως και τα SH-SY5Y. Η διαφοροποίηση έγινε απουσία bFGF και παρουσία FSK και RA για την ίδια χρονική περίοδο. Η επεξεργασία και η παρατήρηση των κυττάρων έγινε όπως και στα SH-SY5Y. Βλέπουμε ότι και σε αυτή την περίπτωση η παρουσία της εξωγενούς Ngn2 αυξάνει τον αριθμό των HuD⁺ κυττάρων στον ευρύτερο κυτταρικό πληθυσμό, και μάλιστα σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από αυτόν που παρατηρείται στα νευροβλαστωματικά κύτταρα. Φακός 63x. Χρώση του πυρήνα με DRAQ5 (μπλε).

Μία τρίτη παρατήρηση, που κάναμε από τα πειράματα υπερέκφρασης της Ngn2 στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα, ήταν ότι τα επίπεδα της εξωγενούς πρωτεΐνης είναι μεγαλύτερα παρουσία RA και Fsk συγκριτικά με την κατάσταση πολλαπλασιασμού (**Εικόνα 65**), υποδηλώνοντας ότι οι συνθήκες διαφοροποίησης ίσως να ευνοούν την έκφρασή της, πιθανόν μέσω ενός μηχανισμού σταθεροποίησης της πρωτεΐνης. Για να κατανοήσουμε τι είναι εκείνο που προκαλεί την αύξηση του φθορισμού της Ngn2, επαναλάβαμε το πείραμα, διαμολύνοντας τα κύτταρα με το πλασμίδιο Ngn2-AcGFP, και ελέγχοντας στη συνέχεια τα επίπεδα φθορισμού του υπερεκφρασμένου μορίου παρουσία ή απουσία του αυξητικού παράγοντα bFGF, καθώς επίσης και παρουσία μόνο του RA ή μόνο της Fsk, ή και των δύο. Όπως βλέπουμε στην **Εικόνα 65**, η Fsk από μόνη της είναι ικανή να αυξήσει τα επίπεδα της Ngn2 αλλά όχι τόσο όσο η ταυτόχρονη παρουσία Fsk και RA, ενώ το RA από μόνο του, δεν δύναται να προκαλέσει καμία επαγωγή. Παράλληλα παρατηρούμε ότι σε όλες τις συνθήκες υπερέκφρασης της υβριδικής πρωτεΐνης Ngn2-AcGFP, η έκφραση του HuD είναι σημαντικά αυξημένη συγκριτικά με τις αντίστοιχες συνθήκες της πρωτεΐνης AcGFP, όπως είδαμε και παραπάνω (**Εικόνα 65**).

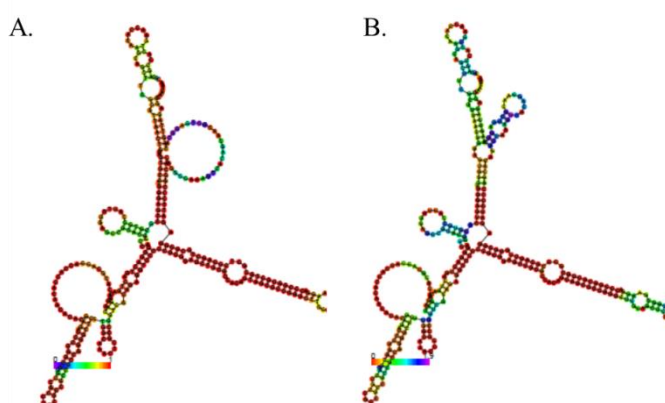


Εικόνα 65: Οι συνθήκες διαφοροποίησης ευνοούν την έκφραση της Ngn2, πιθανόν και μέσω ενός μηχανισμού σταθεροποίησης της πρωτεΐνης. Πρόδρομα νευρικά κύτταρα HCN διαμολύνθηκαν με 500 ng είτε του πλασμιδίου pAcGFP-N1 (επάνω μέρος) είτε του pNgn2-AcGFP (κάτω μέρος). Το θρεπτικό μέσο ανανεώθηκε στις 4 ώρες, και 12-16 ώρες μετά τη διαμόλυνση έγινε μια ακόμη αλλαγή, και τα κύτταρα

καλλιιεργήθηκαν για 24 επιπλέον ώρες είτε σε μέσο με bFGF (πρώτη στήλη) ή σε μέσο χωρίς bFGF παρουσία RA και Fsk (δεύτερη στήλη), μόνο Fsk (τρίτη στήλη), μόνο RA (τέταρτη στήλη), ή χωρίς κανέναν από αυτούς τους παράγοντες (πέμπτη στήλη). Παρατηρούμε (τελευταία σειρά κάτω) την αύξηση του φθορισμού της υπερεκφραζόμενης Ngn2 παρουσία RA και Fsk, αλλά και παρουσία μόνο της Fsk, ενώ το RA από μόνο του δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του μορίου. Στο πείραμα ελέγχου (επάνω), δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της AcGFP σε καμία από τις συνθήκες. Βλέπουμε επίσης ότι σε όλες τις συνθήκες υπερέκφρασης της Ngn2-AcGFP, η έκφραση του HuD (κόκκινο) είναι σημαντικά αυξημένη συγκριτικά με την υπερέκφραση της AcGFP. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας, φακός 40x. Η χρώση του πυρήνα έγινε με DRAQ5 (μπλε).

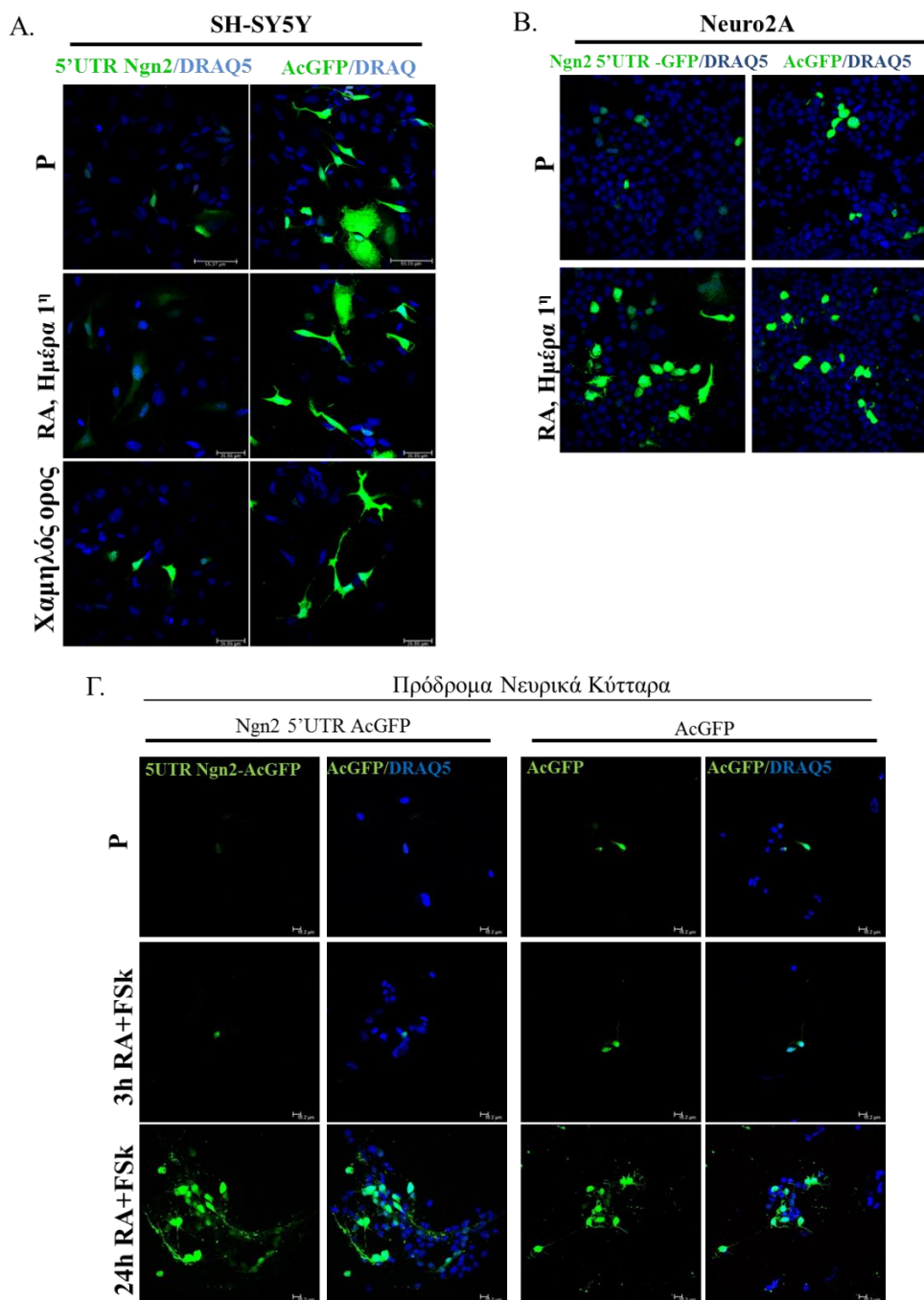
4.5.3 Η 5' μη Μεταφραζόμενη Περιοχή του Γονιδίου Ngn2 Κατέχει Καθοριστικό Ρόλο στη Μεταφρασιμότητα του

Οι 5' μη μεταφραζόμενες περιοχές (5' UTRs), οι οποίες αποτελούν το σημείο εισόδου για το ριβόσωμα, μπορούν να υιοθετούν σύνθετες δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές οι οποίες μπορεί να συμμετέχουν στη ρύθμιση της έναρξης της μετάφρασης. Εφόσον διαπιστώσαμε ότι οι μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες του *Ngn2* mRNA παίζουν σημαντικό ρόλο, τόσο στα επίπεδα της πρωτεΐνης όσο και στην αλληλεπίδρασή της με την HuD, εστιαστήκαμε περισσότερο στο 5' UTR, το οποίο είναι σχετικά μεγάλο και περιλαμβάνει το ένα και μοναδικό ιντρόνιο του γονιδίου. Εξετάζοντας αρχικά την αλληλουχία του 5' UTR του *Ngn2* με το υπολογιστικό πρόγραμμα RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at>), παρατηρήσαμε ότι μπορεί και λαμβάνει πολλαπλές δευτεροταγείς διαμορφώσεις (Εικόνα 66).



Εικόνα 66: Πρόβλεψη δευτεροταγών δομών του 5'UTR του *Ngn2* mRNA. Απεικονίζονται ενδεικτικά δύο πιθανές θερμοδυναμικά σταθερές δευτεροταγείς δομές (A και B), με τη χρήση του προγράμματος RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at>).

Προκειμένου να ελέγξουμε κατά πόσο η περιοχή αυτή μπορεί να επηρεάζει τη μετάφραση ενός άλλου αναγνωστικού πλαισίου, την κλωνοποιήσαμε στον φορέα pAcGFP-N1 ανοδικά του γονιδίου AcGFP (pNgn2-5'UTR-AcGFP). Στη συνέχεια υπερεκφράσαμε την πλασμιδιακή κατασκευή pNgn2-5'UTR-AcGFP καθώς και τον άδειο φορέα pAcGFP-N1 σε νευροβλαστωματικά κύτταρα SH-SY5Y και Neuro2A (τα οποία δεν εκφράζουν ενδογενώς την πρωτεΐνη Ngn2), και παρατηρήσαμε την ένταση του φθορισμού σε συνθήκες πολλαπλασιασμού καθώς και πρόιμης διαφοροποίησης υπό την επίδραση του RA για μία ημέρα. Διαπιστώσαμε ότι η ένθεση του *Ngn2* 5'-UTR ανοδικά του αναγνωστικού πλαισίου της AcGFP μειώνει τη μετάφραση της πρωτεΐνης τόσο στην κατάσταση του πολλαπλασιασμού όσο και της διαφοροποίησης (**Εικόνα 67 A και B**). Είναι ενδιαφέρον ότι απουσία RA, μια συνθήκη στην οποία όπως έχουμε αναφέρει παραπάνω η πρωτεΐνη Ngn2 εκφράζεται πιο έντονα, η ένταση του φθορισμού που προέρχεται από το *Ngn2* 5'UTR-AcGFP mRNA είναι μεγαλύτερη (**Εικόνα 67 A, κάτω αριστερά**), πλησιάζοντας την ένταση που παράγεται από το AcGFP mRNA (**Εικόνα 67 A, κάτω δεξιά**). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η περιοχή 5' UTR του *Ngn2* ενδέχεται να έχει έναν λειτουργικό, ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση του μορίου. Θέτοντας το ίδιο ερώτημα και στο περιβάλλον των πρόδρομων νευρικών κυττάρων, και μάλιστα σε παράλληλα πειράματα χρησιμοποιώντας το ίδιο μείγμα διαμόλυνσης (DNA transfection master mix) παρατηρήσαμε ότι σε συνθήκες πολλαπλασιασμού, το *Ngn2* 5'-UTR δρα ανασταλτικά στη μετάφραση του AcGFP, ενώ παρουσία RA και Fsk η αναστολή αυτή αίρεται και η μετάφραση ενεργοποιείται (**Εικόνα 67 Γ**). Μάλιστα, η πρωτεΐνη AcGFP που παράγεται από τη μετάφραση του *Ngn2* 5'UTR-AcGFP mRNA έχει ήδη αρχίζει να εμφανίζεται από τις τρεις κιόλας πρώτες ώρες της διαφοροποίησης, επιβεβαιώνοντας το συμπέρασμα ότι το 5' UTR του γονιδίου *Ngn2* μπορεί να ασκεί ενεργό ρυθμιστικό ρόλο στον έλεγχο της μετάφρασης με έναν τρόπο που εξαρτάται από το περιβάλλον των κυττάρων.



Εικόνα 67: Η περιοχή 5' UTR του γονιδίου *Ngn2* φαίνεται να έχει ρυθμιστικό ρόλο στον έλεγχο της μετάφρασης επηρεάζοντας τη μετάφραση του AcGFP mRNA με έναν τρόπο που εξαρτάται από το κυτταρικό περιβάλλον. Στο επάνω μέρος κάθε εικόνας απεικονίζονται σχηματικά οι φορείς pNgn2-5'UTR-AcGFP και pAcGFP-N1. Νευροβλαστωματικά κύτταρα SH-SY5Y (A) και Neuro2A (B), καθώς και πρόδρομα νευρικά κύτταρα HCN (Γ) διαμολύνθηκαν με 500 ng του φορέα pNgn2-5'UTR-AcGFP ή του φορέα pAcGFP-N1. Την επόμενη ημέρα ανανεώθηκε το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν είτε σε συνθήκες πολλαπλασιασμού (P) είτε σε συνθήκες διαφοροποίησης, όπως αναγράφεται στις εικόνες. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων και έλεγχος της έντασης του φθορισμού της AcGFP. Παρατηρούμε ότι το 5' UTR του *Ngn2* περιορίζει τη μετάφραση της AcGFP με έναν τρόπο που εξαρτάται από τον τύπου του κυττάρου και τις συνθήκες καλλιέργειας. Συνεστιακή μικροσκοπία, φακός 63x. Η χρώση του πυρήνα έγινε με DRAQ5 (μπλε).

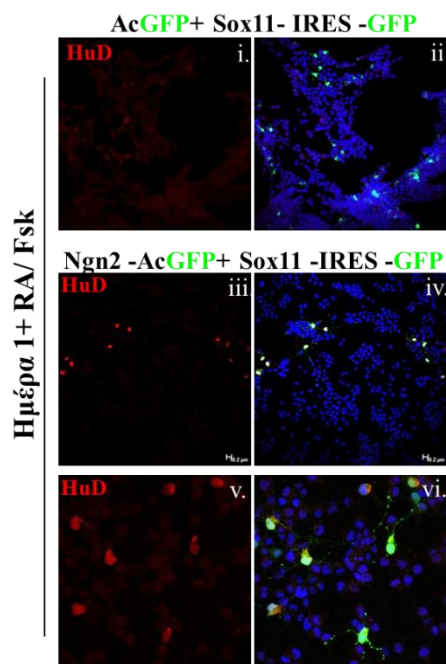
4.6 Μελέτη της Μεταγραφικής Ενεργότητας του Μεταγραφικού Παράγοντα Ngn2

4.6.1 Ο Μεταγραφικός Παράγοντας Sox11 Ελέγχει την Επαγωγή της Έκφρασης της HuD από την Ngn2 και Ενδεχομένως και Άλλων Γονιδίων-Στόχων Αυτής της Πρωτεΐνης

Η παρατήρηση ότι τα κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη Ngn2 δεν είναι όλα HuD^+ (βλ. **Εικόνα 63**) σε συνδυασμό με την ικανότητα της εξωγενούς Ngn2 να αυξάνει τα επίπεδα της HuD σε κύτταρα που δεν είναι $Ngn2^+$, ιδιαίτερα στις καλλιέργειες των πρόδρομων νευρικών κυττάρων (βλ. **Εικόνα 64 B**) τα οποία αποτελούν έναν αρκετά ετερογενή πληθυσμό, μας έκανε να αναρωτηθούμε μήπως το φαινόμενο αυτό αντανακλά την απουσία από τους $Ngn2^+/HuD^-$ πληθυσμούς, κάποιου παράγοντα ο οποίος χρειάζεται για την ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου *HuD*. Γνωρίζοντας ότι η πρωτεΐνη Ngn2 συνεργάζεται με μέλη των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας SoxC, όπως ο Sox11 για τον επαναπρογραμματισμό φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων προς τη νευρική μοίρα [186], [187] επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσον η ταυτόχρονη παρουσία αυτών των δύο μορίων μπορεί να επηρεάσει το παραπάνω φαινόμενο στα πειράματα υπερέκφρασης.

Διαμολύναμε λοιπόν πρόδρομα νευρικά κύτταρα με τους φορείς pNgn2-AcGFP ή pAcGFP-N1 μαζί με το πλασμίδιο pSox11-IRES-GFP (στο οποίο ο παράγοντας Sox11 μεταφράζεται ανεξάρτητα από την GFP) και αφήσαμε τα κύτταρα να διαφοροποιηθούν παρουσία Fsk και RA για 24 ώρες. Στη συνέχεια μονιμοποιήσαμε τα κύτταρα και ελέγξαμε την κατανομή της πρωτεΐνης HuD στον κυτταρικό πληθυσμό με ανοσοκυτταροχημεία (**Εικόνα 68**). Παρατηρήσαμε ότι παρουσία του παράγοντα Sox11, η εξωγενής Ngn2 επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης HuD μόνο στα $Ngn2^+$ κύτταρα (δεν ανιχνεύσαμε ούτε ένα HuD^+ κύτταρο το οποίο να μην ήταν και $Ngn2^+$) (**Εικόνα 68, κάτω**). Στο πείραμα ελέγχου, ο παράγοντας Sox11 μόνος του, χωρίς την ταυτόχρονη παρουσία της Ngn2, δεν μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση HuD^+ κυττάρων (**Εικόνα 68, πάνω**). Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι η πιθανή αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων Ngn2 και Sox11 εξειδικεύει την δράση της Ngn2 (έμμεσα ή και άμεσα), αφού περιορίζει την έκφραση της HuD (και ενδεχομένως και άλλων γονιδίων-στόχων της Ngn2), μόνο στα $Ngn2^+$ κύτταρα. Θα μπορούσε κανείς να ισχυριστεί ότι η ταυτόχρονη έκφραση αυτών των δύο μορίων σε ένα

κύτταρο είναι ικανή να κατευθύνει με τρόπο «αντίστοιχο» του επαναπρογραμματισμού, τη μοίρα του συγκεκριμένου κυττάρου, ενδεχομένως και του γειτονικού του, συντονίζοντας ενδογενείς και εξωγενείς μηχανισμούς. Θα μπορούσε, για παράδειγμα, η παρουσία του Sox11 να αποτρέπει την επαγωγή από την Ngn2 των υποτιθέμενων παραγόντων που συζητήθηκαν παραπάνω, αλλά με έναν αναπτυξιακά/φυσιολογικά ελεγχόμενο τρόπο. Θα ήταν ενδιαφέρον σε μελλοντικά πειράματα να διερευνηθεί η βιολογική σημασία της σχέσης Ngn2-Sox11-HuD για τον καθορισμό της κυτταρικής μοίρας *in vivo*.



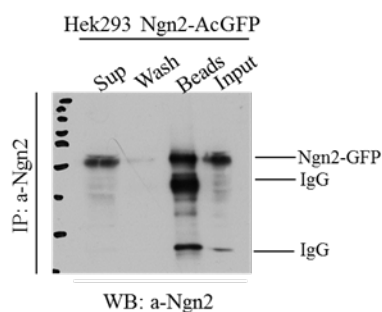
Εικόνα 68: Η παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα Sox11 εξειδικεύει την δράση της Ngn2, περιορίζοντας την έκφραση της HuD αποκλειστικά στα Ngn2⁺ κύτταρα. Πρόδρομα νευρικά κύτταρα διαμολύνθηκαν με 250 ng του φορέα pAcGFP-N1 (επάνω) ή pNgn2-AcGFP (κάτω), μαζί με 250 ng του φορέα pSox11-IRES-GFP. Την επόμενη ημέρα ανανεώθηκε το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες διαφοροποίησης παρουσία Fsk και RA για μία ημέρα. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων και ανοσοκυτταροχημεία με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών AcGFP (πράσινο) και HuD (κόκκινο). Παρατηρούμε ότι όλα τα κύτταρα που εκφράζουν Ngn2 και Sox11 είναι HuD⁺ (κάτω), ενώ το Sox11 από μόνο του δεν έχει το δυναμικό να το προκαλέσει την εμφάνιση HuD⁺ κυττάρων (επάνω). Συνεστιακή μικροσκοπία, φακός 40x. Η χρώση του πυρήνα έγινε με DRAQ5 (μπλε).

4.6.2 Προκαταρτική Ανάλυση των Μεταγραφικών Στόχων της Πρωτεΐνης Ngn2 σε Επίπεδο Γονιδιώματος

Είδαμε παραπάνω ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Sox11 ελέγχει την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου HuD από την Ngn2, και μπορεί ενδεχομένως να επηρεάζει το ρεπερτόριο και άλλων γονιδίων-στόχων της. Παρατηρήσαμε επίσης ότι η μεταγραφική ενεργότητα της Ngn2 και κατά συνέπεια το προφίλ των μεταγραφικών της στόχων, εξαρτάται και από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα που εκφράζεται. Θεωρήσαμε λοιπόν ότι για την φυσιολογικά ορθή λειτουργία αυτής της πρωτεΐνης χρειάζεται η συντονισμένη αλληλεπίδρασή της με άλλους παράγοντες κατά τη διάρκεια του προγράμματος της νευρικής διαφοροποίησης. Ορμώμενοι από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της έκφρασης του γονιδίου όπως αυτά περιγράφηκαν

παραπάνω ξεκινήσαμε προκαταρκτικά πειράματα για την ανάλυση των μεταγραφικών στόχων της Ngn2 σε επίπεδο γονιδιώματος με τη μεθοδολογία ChIP-Seq (chromatin immunoprecipitation sequencing).

Επειδή, όπως διαπιστώσαμε, δεν αρκεί η έκφραση αυτού του μορίου από μόνη της για να διαφοροποιηθούν τα κύτταρα, αλλά απαιτείται και η παρουσία άλλων παραγόντων, η μεταγραφή των οποίων είναι συνάρτηση της πορείας διαφοροποίησης, σκεφτήκαμε να αναλύσουμε τους στόχους της Ngn2 τόσο σε συνθήκες στις οποίες η έκφρασή της συνοδεύεται από νευρική διαφοροποίηση (+RA), όσο και σε συνθήκες στις οποίες η πρωτεΐνη εκφράζεται αλλά τα κύτταρα δεν διαφοροποιούνται (-RA). Επιβεβαιώσαμε αρχικά ότι το αντίσωμα μας είναι λειτουργικό πραγματοποιώντας πειράματα ανοσοκατακρήμνισης (immunoprecipitation, IP) (Εικόνα 69). Χρησιμοποιήσαμε την κατασκευή pNgn2-AcGFP και διαμολύναμε κύτταρα HEK293, επειδή η διαδικασία αυτή στα συγκεκριμένα κύτταρα είναι πολύ αποτελεσματική. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι της Ngn2 και ανοσοαποτύπωση Western με το ίδιο αντίσωμα. Παρατηρήσαμε ότι ένα σημαντικό μέρος της πρωτεΐνης κατακρημνίζεται, ενθαρρύνοντας τη χρήση του συγκεκριμένου αντισώματος για τα πειράματα ChIPseq.



Εικόνα 69: Ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης Ngn2 μετά από υπερέκφραση σε κύτταρα HEK293. Κύτταρα HEK293 (*human embryonic kidney cells 293*) διαμολύνθηκαν με τον φορέα pNgn2-AcGFP. Μετά από 28 ώρες απομονώθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα με τη μέθοδο RIPA, και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι της Ngn2, συζευγμένο σε σφαιρίδια αгарόζης καλυμμένα με πρωτεΐνη G. Χρησιμοποιήσαμε το ίδιο αντίσωμα για το WB, και διαπιστώσαμε ότι το συγκεκριμένο αντίσωμα είναι λειτουργικό στις συνθήκες μας. Η υβριδική πρωτεΐνη Ngn2-AcGFP μετακινείται πάνω από την βαριά και την ελαφριά αλυσίδα (IgG).

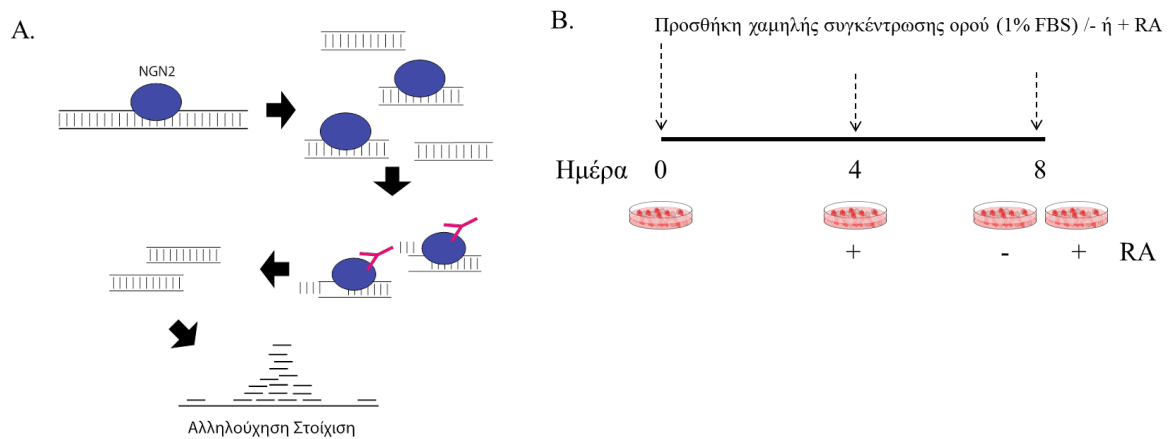
Στο προκαταρκτικό μας πείραμα ελέγξαμε κύτταρα SH-SY5Y

(A) σε συνθήκες πολλαπλασιασμού,

(B) μετά από διαφοροποίηση παρουσία RA για 4 ημέρες (στις οποίες δεν ανιχνεύεται η πρωτεΐνη Ngn2),

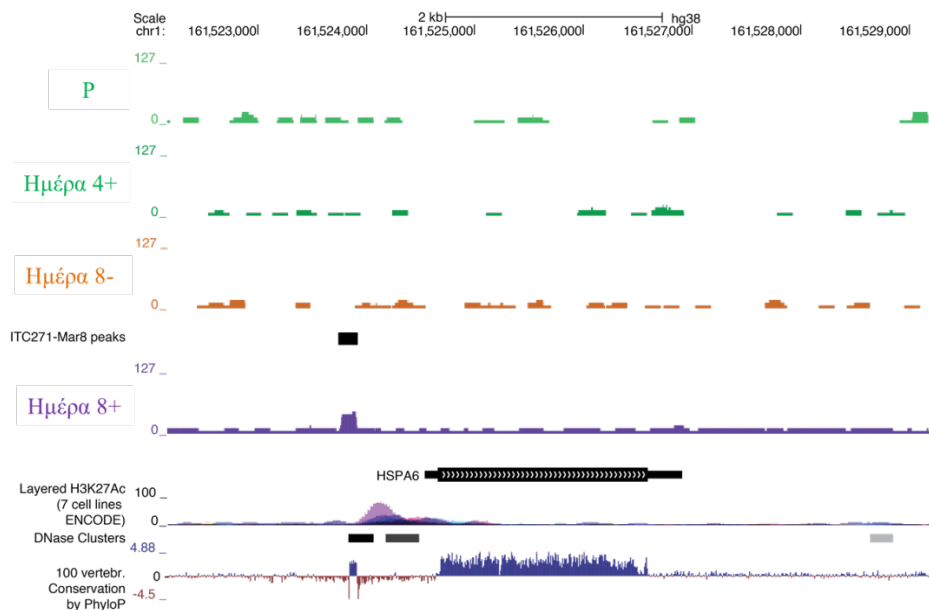
(Γ), μετά από διαφοροποίηση παρουσία RA για 8 ημέρες, καθώς και (Δ) μετά από 8 ημέρες καλλιέργειας σε συνθήκες χαμηλού ορού αλλά απουσία RA όπου τα κύτταρα επιβιώνουν αλλά δεν διαφοροποιούνται (-RA). (Εικόνα 70 Β)

Μετά την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Ngn2 (Εικόνα 70 Α) προχωρήσαμε στην πρώτη ανάλυση των μεταγραφικών στόχων (Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ"). Αν και το πείραμα χρήζει βελτιστοποίησης και επανάληψης, διότι η απόδοση του αντισώματος είναι σχετικά χαμηλή, και επιπλέον, στο συγκεκριμένο πείραμα δεν χρησιμοποιήθηκαν όλα τα απαιτούμενα δείγματα ελέγχου (αναλύθηκε το *input* μόνο από το δείγμα της ημέρας 8), εντοπίσαμε δύο πιθανούς μεταγραφικούς στόχους του Ngn2: το γονίδιο *HSP6A* (*Heat shock protein 67B1*) και το γονίδιο *GSTA4* (*Glutathione S-transferase A4*) (Εικόνα 70 Γ).



Γ. i.

HSPA6

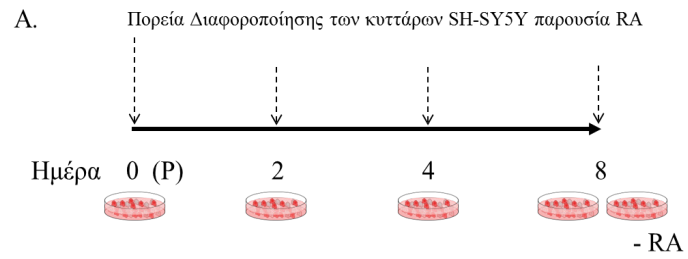




Εικόνα 70: Ανάλυση των μεταγραφικών στόχων του παράγοντα Ngn2 σε κλίμακα γονιδιώματος. Α) Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας. Β) Σχηματική απεικόνιση των συνθηκών του πειράματος Γ) Οι δύο πιθανοί μεταγραφικοί στόχοι στο Ngn2, το γονίδιο HSPA6 (i) και GST4 (ii).

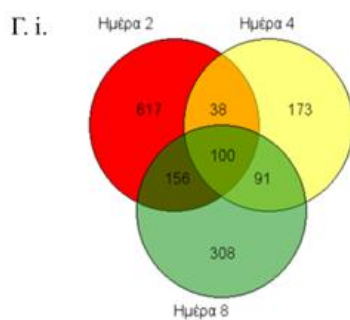
4.7 Ανάλυση Αλληλούχησης του RNA στα Κύτταρα SH-SY5Y

Κατά τη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης, τα κύτταρα περνούν από διακριτά στάδια στα οποία εκφράζονται διαφορετικές ομάδες γονιδίων (synexpression groups). Η ομαλή μετάβαση από το ένα στάδιο στο άλλο χαρακτηρίζεται από ένα σημαντικό ποσοστό αλληλοεπικάλυψης των γονιδιακών ομάδων που ρυθμίζονται. Ένας τρόπος φιλτραρίσματος (filtering strategy) που βοηθά να προσδιορίσουμε τέτοιες ομάδες γονιδίων και να κατανοήσουμε τα μεταγραφικά δίκτυα που ρυθμίζουν την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης είναι να συγκρίνουμε τις μεταγραφικές αλλαγές σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Αυτή τη στρατηγική εφαρμόσαμε εδώ αξιοποιώντας τη μεθοδολογία RNA-Seq (RNA Sequencing) και τα αποτελέσματα της ανάλυσης συνοψίζονται στην **Εικόνα 74**.



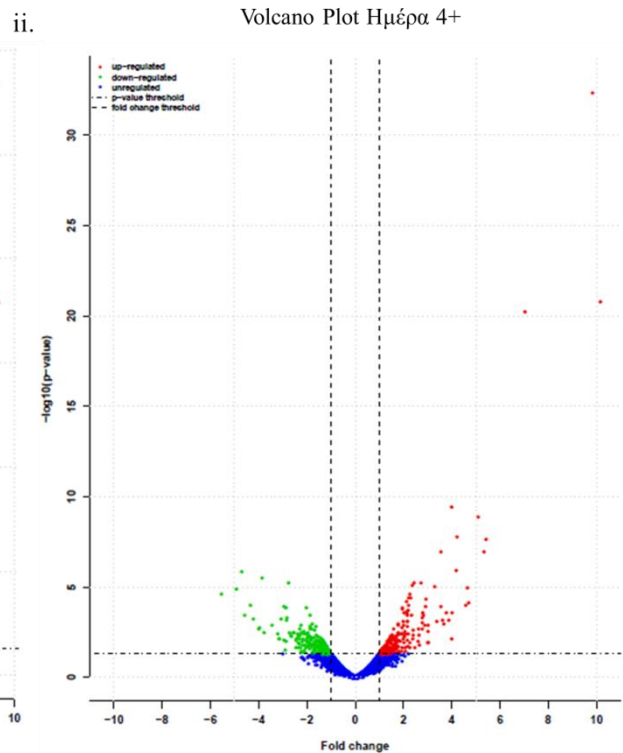
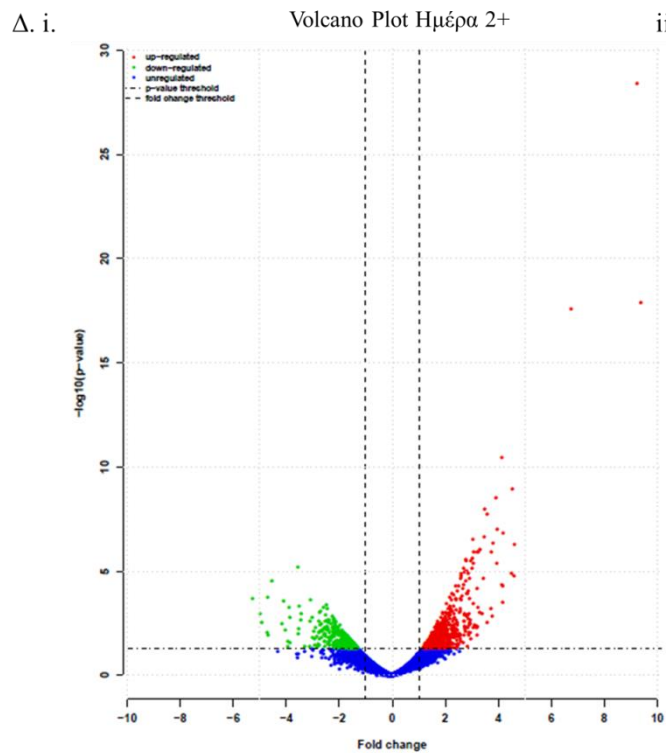
B.

Ημέρα x/P	Σύνολο	Αύξηση	Μείωση
Ημέρα 2+*	911	543	368
Ημέρα 4+*	402	203	199
Ημέρα 8+*	655	428	227
Ημέρα 8-*	571	254	361

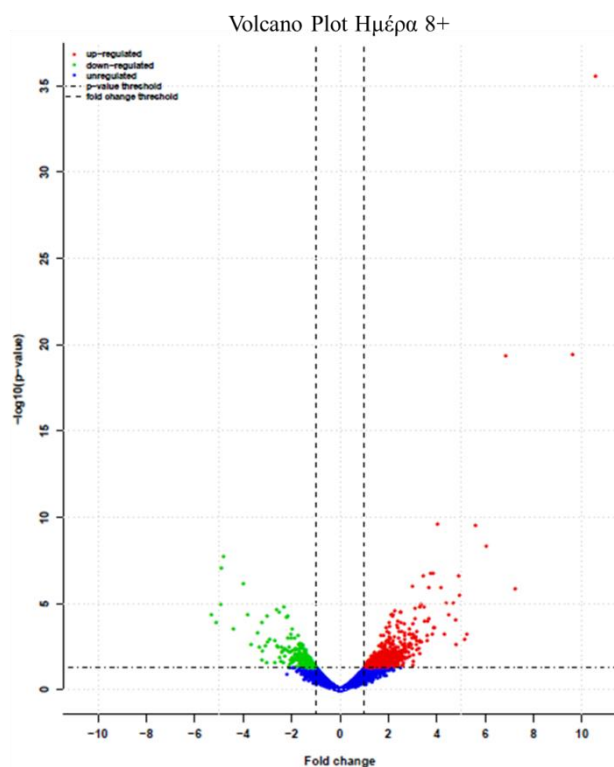


ii.

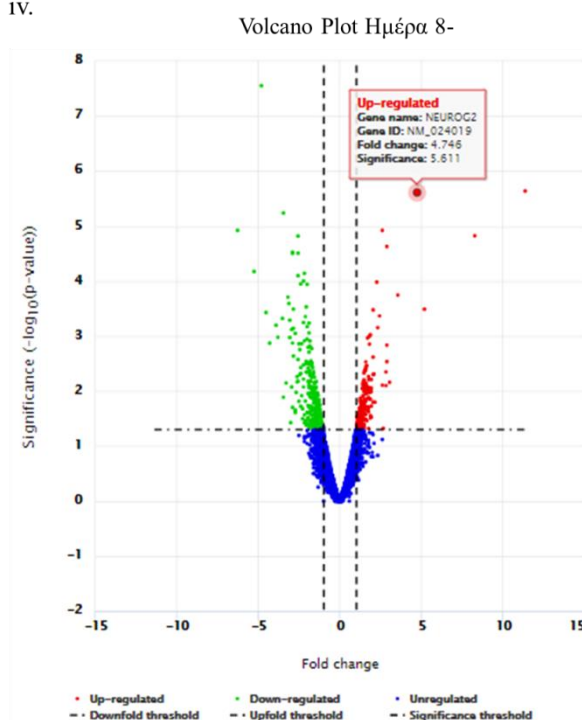
Ημέρες/P	Αριθμός διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων	Αύξηση	Μείωση
Ημέρες 2&4*	38	21	17
Ημέρες 4&8*	91	46	45
Ημέρες 2&4&8*	100	64	36



iii.



iv.



Εικόνα 71: Μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης νευροβλαστωματικών κυττάρων προς τη νευρική γενεαλογία. (Α) Σχηματικό διάγραμμα της πειραματικής στρατηγικής που ακολουθήσαμε για να ταυτοποιήσουμε τις γονιδιακές ομάδες (*synexpression groups*) των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται κατά την πορεία της διαφοροποίησης. Κύτταρα SH-SY5Y διαφοροποιήθηκαν για οκτώ ημέρες παρουσία RA, και το μεταγράφομα προσδιορίστηκε τις ημέρες 2, 4 και 8 με τη μεθοδολογία RNA-Seq. Η σύγκριση έγινε με σημείο αναφοράς τα αδιαφοροποίητα κύτταρα (P). (Β) Πίνακας που δείχνει τον αριθμό των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων σε κάθε χρονική περίοδο. (Γ) Διάγραμμα Venn (i) και πίνακας (ii) που δείχνουν τον αριθμό των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων και στις τρεις συνθήκες. (* FDR<5%). Ως σημαντικό κατώφλι (*cut-off*) για την επιλογή των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε ο $\log_2FC > 1$ (δηλαδή μεταβολή 2-φορές). (Δ) Διάγραμμα Volcano για κάθε μία από τις συνθήκες που μελετήσαμε (i-iii= day2-8 +RA, iv= day8- RA) που αναπαριστά το σύνολο των γονιδίων που εκφράζονται. Τα γονίδια η έκφραση των οποίων αυξάνεται αναπαρίστανται με κόκκινο χρώμα ενώ αυτών που μειώνεται με πράσινο. Τα γονίδια που η έκφραση τους διατηρείται σε σταθερά επίπεδα αναπαρίστανται με το μπλε χρώμα.

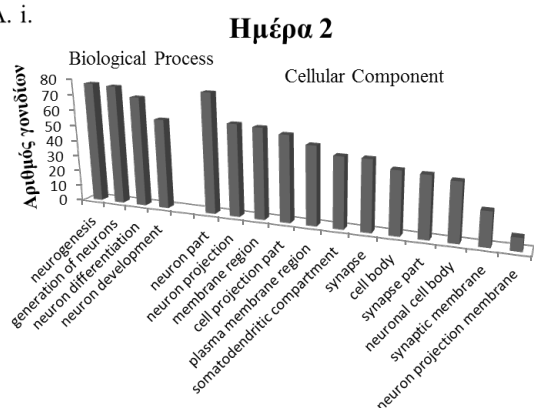
Συνολικά, βρέθηκαν 911 γονίδια τα οποία έδειξαν σημαντική μεταβολή στην έκφρασή τους σε σχέση με τα αδιαφοροποίητα κύτταρα την Day2, 402 γονίδια την Day4, και 655 γονίδια την Day8 (σε όλες τις περιπτώσεις επιλέχθηκαν γονίδια με FDR<5%, και κατώφλι μεταβολής 2-φορές). Από αυτά, 100 γονίδια ήταν κοινά και στις τρεις συνθήκες, 38 ήταν κοινά μόνο στις συνθήκες Day2 και Day4, και 91 στις συνθήκες Day4 και Day8. Όπως ήταν αναμενόμενο η έκφραση ενός σημαντικού αριθμού γονιδίων μεταβλήθηκε επιλεκτικά σε κάθε ένα από τα χρονικά στάδια της πορείας διαφοροποίησης που ελέγχθηκαν.

Οι γονιδιακές ομάδες χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά με τη χρήση της βάσης δεδομένων GO (*Gene Ontology*) προκειμένου να ταυτοποιηθούν σημαντικά υπερ-αντιπροσωπευόμενες κατηγορίες. Η ανάλυση αυτή, έδειξε ότι αρκετές κύριες κατηγορίες GO ήταν σημαντικά εμπλουτισμένες σε κάθε στάδιο της διαφοροποίησης. Την Day2 αυξάνεται η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη δημιουργία νέων νευρώνων, τη νευριτική αύξηση και τον σχηματισμό συνάψεων (π.χ. «*neuron projection*», «*synapsis*», κ.α.) (**Εικόνα 72 A, i**), **Παράρτημα-Πίνακας 1**) και μειώνεται η αντιπροσώπευση κατηγοριών που σχετίζονται με το μεταβολισμό του RNA, το σχηματισμό των ριβοσωμάτων και τη μετάφραση, καθώς και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων (**Παράρτημα-Πίνακας 2**).

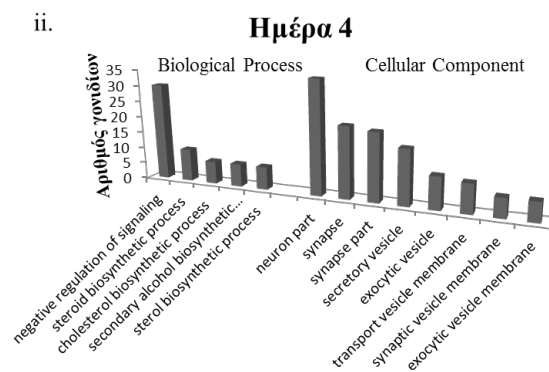
Στο επόμενο στάδιο, δηλαδή την Day4, μειώνονται κατηγορίες GO που σχετίζονται με τη νευρική διαφοροποίηση (**Παράρτημα-Πίνακας 3**), και αυξάνεται η αντιπροσώπευση κατηγοριών GO που ελέγχουν τη σύσταση των μεμβρανών και τον σχηματισμό κυστιδίων («*cholesterol biosynthetic process*», «*synaptic vesicle membrane*», κ.α.) (**Εικόνα 72 A, ii**, **Παράρτημα-Πίνακας 4**) – μάλιστα, η κατηγορία «*cellular component*» περιορίζεται μόνο σε γονίδια που σχετίζονται με τα συναπτικά κυστίδια (**Εικόνα 72 A, ii**).

Στο πιο όψιμο στάδιο, την Day8, εμφανίζονται κατηγορίες γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική προσκόλληση, τη μετανάστευση και την πολικότητα των κυττάρων, καθώς και με τη συναπτική λειτουργία (**Εικόνα 72 A, iii**, **Παράρτημα-Πίνακας 5**), ενώ στην κατηγορία «*cellular component*» κυριαρχούν ομάδες γονιδίων οι οποίες δρουν σε επιμέρους περιοχές των νευρικών κυττάρων και τις συνάψεις («*synaptic membrane*», «*synapse neuron projection*», «*synapse part*» κ.α.), ένα στοιχείο που φανερώνει το βαθμό ωριμότητας των διαφοροποιημένων νευρικών κυττάρων στο σύστημά μας (**Εικόνα 72 A, iii**, **Παράρτημα-Πίνακας 5**). Μειώνεται επίσης η αντιπροσώπευση κατηγοριών που σχετίζονται με τη μετάφραση, γεγονός που δείχνει ότι σε προχωρημένα στάδια της διαφοροποίησης η ρύθμιση της μετάφρασης είναι πιο αυστηρή (**Παράρτημα-Πίνακας 5**). Είναι ενδιαφέρον ότι σε αυτό και μόνο το στάδιο, η κατηγορία “*transcription factor binding site*” περιλαμβάνει αρκετές υποκατηγορίες (π.χ. θέσεις πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες όπως LEF1, Nkx2-5, Pitx2, κ.α.), γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει ότι η χρωματίνη είναι πιο προσβάσιμη και/ή ότι η έκφραση εξειδικευμένων μεταγραφικών παραγόντων έχει αυξηθεί (**Εικόνα 72 B**, **Παράρτημα-Πίνακας 5**).

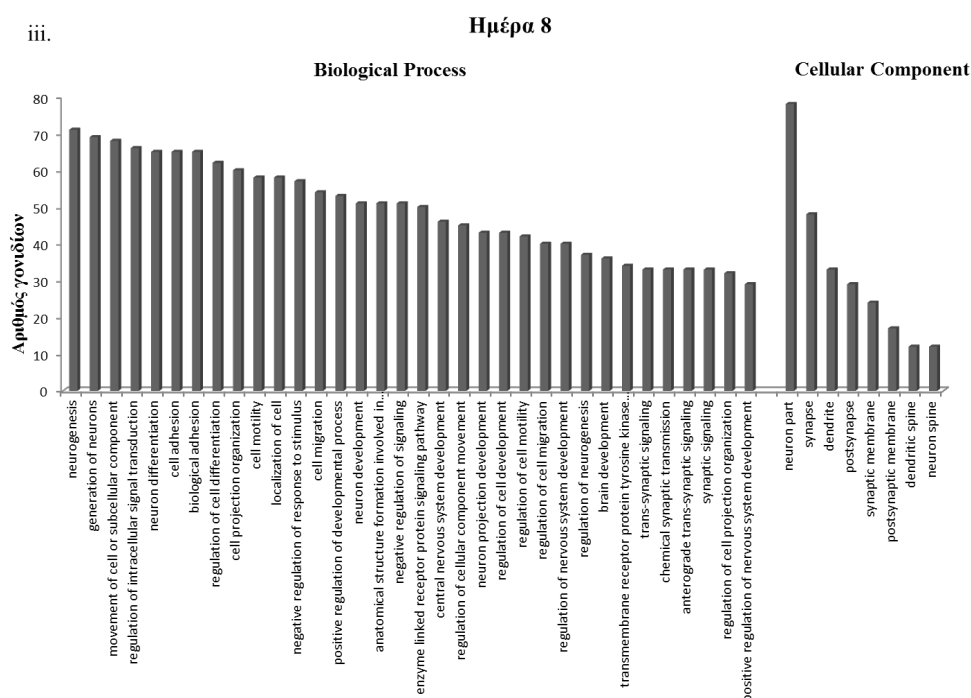
A. i.



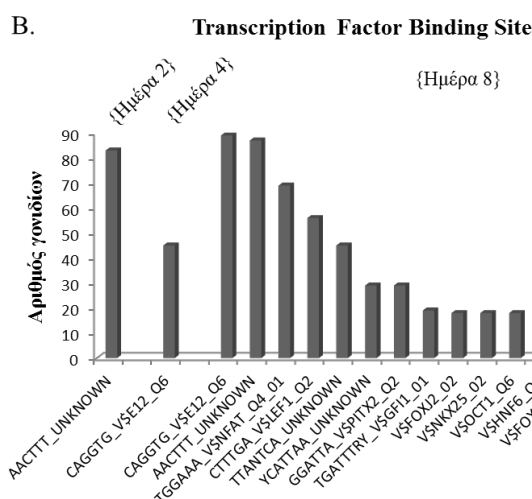
ii.



iii.

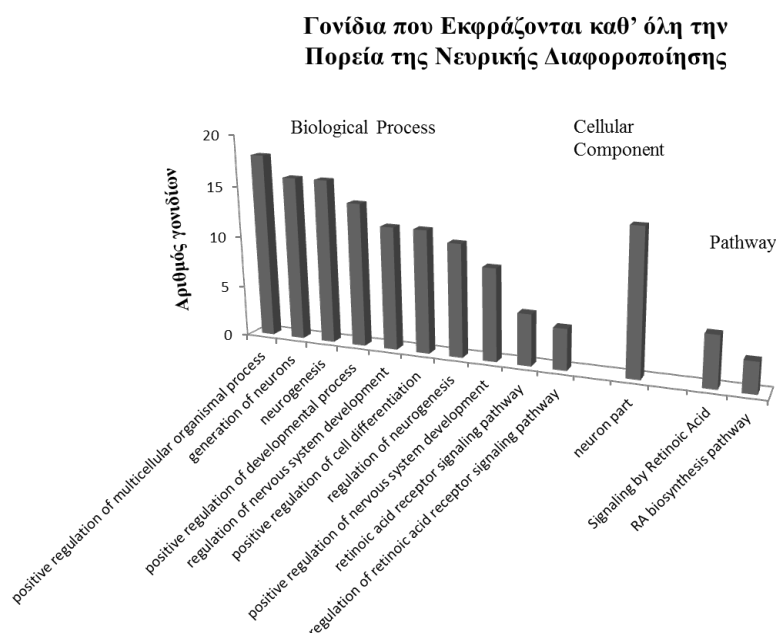


B.



Εικόνα 72: Οντολογία των γονιδίων που επάγονται στα διαφορετικά στάδια του προγράμματος νευρικής διαφοροποίησης των νευροβλαστωματικών κυττάρων. Τα γονίδια με αυξημένη έκφραση ταξινομήθηκαν στις διαφορετικές κατηγορίες βιολογικών διεργασιών που περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων GO, με κυριότερες τις «biological process» και «cellular component», και «transcription factor binding site».

Μεταξύ των διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων των Day2/P και Day4/P βρέθηκαν 38 γονίδια, τα οποία όμως δεν σχημάτισαν λειτουργικές κατηγορίες (*functional categories*) στη βάση δεδομένων GO, γεγονός που δείχνει ότι αυτά τα δύο στάδια είναι πολύ διαφορετικά. Αντίθετα, η ομάδα των γονιδίων που ήταν κοινά μεταξύ των Day4/P και Day8/P (**Day4-Day8 synexpression group**) ήταν εμπλουτισμένη σε λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τα συναπτικά κυστίδια, όπως «*secretory vesicle*» και «*exocytic vesicle*», υποδηλώνοντας ότι μετά την Day4 τα κύτταρα έχουν αποκτήσει τα βασικά χαρακτηριστικά της νευροδιαβιβαστικής λειτουργίας. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν ότι τα γονίδια που ήταν κοινά μεταξύ των τριών συγκρίσεων (Day2/P, Day4/P και Day8/P), και τα οποία μπορεί να θεωρηθεί ότι αντιπροσωπεύουν γονίδια που μεταβάλλονται νωρίς (Day2) αλλά κρατούν το πρότυπο της μεταβολής τους καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος της διαφοροποίησης, σχημάτισαν αρκετές λειτουργικές κατηγορίες GO (**Εικόνα 73, Παράρτημα-Πίνακας 6**). Μεταξύ αυτών είναι ομάδες γονιδίων σχετίζονται με τη δράση του RA, που είναι ο παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε για τη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι στην κατηγορία «*cellular component*», υπεραντιπροσωπεύεται μόνο η υποκατηγορία «*neuron part*» γεγονός που ενδεχομένως αντανakλά τις εξειδικευμένες διεργασίες που γίνονται στα νευρικά κύτταρα.



Εικόνα 73: Οντολογία των γονιδίων που επάγονται και στα τρία διαφορετικά στάδια του προγράμματος νευρικής διαφοροποίησης. Τα γονίδια με αυξημένη έκφραση ταξινομήθηκαν στην κατηγορία «*biological process*» της βάσης δεδομένων GO.

Συμπερασματικά, η λειτουργική ανάλυση GO έδειξε ότι κατηγορίες που σχετίζονται με την απόπτωση ή τον γενικό μεταβολισμό απουσιάζουν από τις ομάδες των γονιδίων, δείχνοντας ότι οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν ισορροπημένες, επιτρέποντας στα κύτταρα να επιβιώνουν σε ένα άρτιο μεταβολικό περιβάλλον. Διαπιστώσαμε επίσης την υπερ-αντιπροσώπευση ενός επιλεκτικού συνδυασμού βιολογικών διεργασιών οι οποίες φαίνεται ότι εξασφαλίζουν την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης, από τη νευριτική αύξηση ως την συναπτική λειτουργία. Αποκαλύπτεται έτσι μια συντονισμένη ρύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων μέσω της οποίας επιτυγχάνεται αυτή η σύνθετη διαδικασία. Τα γονίδια που ταυτοποιήθηκαν με αυτή την πειραματική προσέγγιση παρέχουν μια πηγή για μελλοντικές λειτουργικές μελέτες των μηχανισμών μέσω των οποίων επιτυγχάνεται αυτός ο συντονισμός, καθώς και για την καλύτερη κατανόηση του δικτύου στο οποίο συμμετέχουν βασικοί ρυθμιστές της νευρογένεσης η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται εκλεπτυσμένα σε πολλαπλά επίπεδα, όπως είναι η Ngn2.

A. i.

Ημέρα 2

Entered	Human Symbol	Gene ID
CYP26A1	CYP26A1 (cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1)	1592
CYP26B1	CYP26B1 (cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1)	56603
RARB	RARB (retinoic acid receptor beta)	5915
NTRK2	NTRK2 (neurotrophic receptor tyrosine kinase 2)	4915
GABARAPL1	GABARAPL1 (GABA type A receptor associated protein like 1)	23710
RET	RET (ret proto-oncogene)	5979
NCAM2	NCAM2 (neural cell adhesion molecule 2)	4685
RELN	RELN (reelin)	5649
SEMA3E	SEMA3E (semaphorin 3E)	9723
NAV3	NAV3 (neuron navigator 3)	89795
DISC1	DISC1 (DISC1 scaffold protein)	27185
BRINP1	BRINP1 (BMPretinoic acid inducible neural specific 1)	1620
DKK2	DKK2 (dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2)	27123

ii.

Ημέρα 4

Entered	Human Symbol	Gene ID
CYP26A1	CYP26A1 (cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1)	1592
CYP26B1	CYP26B1 (cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1)	56603
RARB	RARB (retinoic acid receptor beta)	5915
NTRK2	NTRK2 (neurotrophic receptor tyrosine kinase 2)	4915
GABARAPL2	GABARAPL2 (GABA type A receptor associated protein like 2)	11345
RET	RET (ret proto-oncogene)	5979
NCAM2	NCAM2 (neural cell adhesion molecule 2)	4685
DRD5	DRD5 (dopamine receptor D5)	1816
DKK2	DKK2 (dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2)	27123
DKK3	DKK3 (dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3)	27122
SLC6A17	SLC6A17 (solute carrier family 6 member 17)	388662
ADD3-AS1	ADD3-AS1 (ADD3 antisense RNA 1)	100505933
CLSTN2	CLSTN2 (calsynenin 2)	64084
TUSC1	TUSC1 (tumor suppressor candidate 1)	286319

iii.

Ημέρα 8

Entered	Human Symbol	Gene ID
CYP26B1	CYP26B1 (cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1)	56603
CYP26A1	CYP26A1 (cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1)	1592
RARB	RARB (retinoic acid receptor beta)	5915
NTRK2	NTRK2 (neurotrophic receptor tyrosine kinase 2)	4915
GABARAPL2	GABARAPL2 (GABA type A receptor associated protein like 2)	11345
RET	RET (ret proto-oncogene)	5979
NCAM2	NCAM2 (neural cell adhesion molecule 2)	4685
DRD5	DRD5 (dopamine receptor D5)	1816
DKK2	DKK2 (dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2)	27123
SEMA3A	SEMA3A (semaphorin 3A)	10371
SEMA3D	SEMA3D (semaphorin 3D)	223117
RELN	RELN (reelin)	5649
CTTNBP2	CTTNBP2 (cortactin binding protein 2)	83992
SLC8A1	SLC8A1 (solute carrier family 8 member A1)	6546
SOX9	SOX9 (SRY-box 9)	6662
HES1	HES1 (hes family bHLH transcription factor 1)	3280

Εικόνα 74: Γενική και αντιπροσωπευτική απεικόνιση των γονιδίων που ανιχνεύτηκαν μέσω του RNA seq. Επιλεκτική απεικόνιση ορισμένων γονιδίων που εκφράζονται στα διάφορα στάδια της νευρικής διαφοροποίησης.

5. Μεταβολές στο Πρότυπο της Έκφρασης Μεταγραφικών Παραγόντων των Οικογενειών *bHLH* και *SoxC*, καθώς και των *PRMTs* σε Συνθήκες Απορρύθμισης της Φυσιολογικής Λειτουργίας των Νευρικών Κυττάρων Εξαιτίας της Χρήσης Κανναβινοειδών και του Στρες.

Σε μια προσπάθεια να μελετήσουμε τις πιθανές αλλαγές στα επίπεδα mRNA γονιδίων όπως τα *Ngn2*, *Prmt8*, και *Sox4/11* *in vivo*, κάτω από καταστάσεις φαρμακολογικού ή αναπτυξιακού στρες στον εγκέφαλο συνεργαστήκαμε με δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Με τη μία ομάδα, η πρόκληση ήταν η επίδραση Δ9-Τετραϋδροκανναβινόλης (Δ9-THC) κατά την περίοδο της εφηβείας σε πειραματόζωα, και με την άλλη η επίδραση του στρες που συνδέεται με την αναπτυξιακή δυσλεξία κατά την παιδική ηλικία στον άνθρωπο.

5.1 Έλεγχος στον Ιππόκαμπο Επίμυων που τους Έχει Χορηγηθεί Δ9-Τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC) κατά την Περίοδο της Εφηβείας.

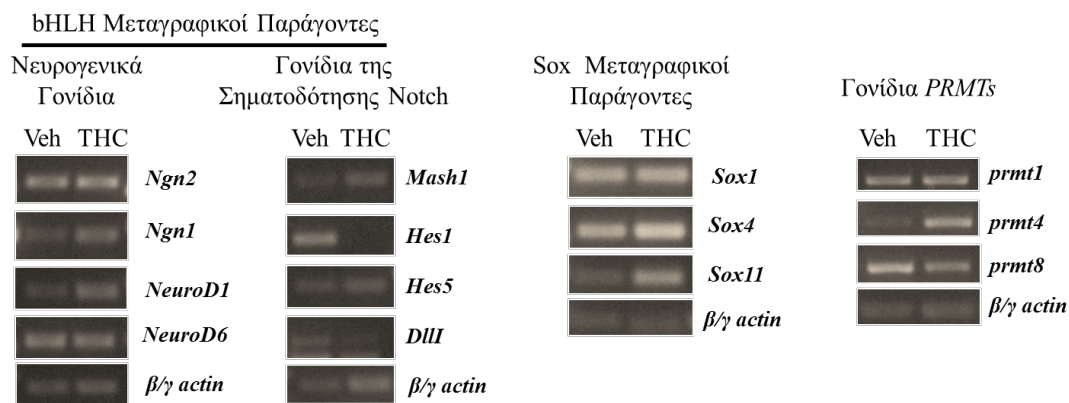
Στα πλαίσια της διερεύνησης της επίδρασης της Δ9-Τετραϋδροκανναβινόλης στη νευρογένεση, μελετήσαμε τις μεταβολές στην έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων των οικογενειών *bHLH*, *SoxC*, και *PRMT*, ως ένα *in vivo* σύστημα στο οποίο έχει διαταραχθεί η φυσιολογική λειτουργία των νευρικών κυττάρων. Σε έφηβους επίμυες χορηγήθηκε Δ9-τετραυδροκανναβινόλη, δύο φορές την ημέρα, σε σταδιακά αυξανόμενες αλλά χαμηλές δόσεις, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί. Μετά την ενηλικίωση των ζώων πραγματοποιήθηκαν συμπεριφορικά τεστ (*Water Maze* και *Object Location Task*), τα οποία έδειξαν δυσλειτουργία στη χωρική μνήμη καθώς και αυξημένη κινητικότητα. Κατόπιν, τα ζώα θυσιάστηκαν και απομονώθηκε ο ιππόκαμπος στον οποίο εμείς μελετήσαμε την έκφραση των παραπάνω γονιδίων στο επίπεδο του RNA. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, ο υποδοχέας των κανναβινοειδών CB1R εκφράζεται στην υποκοκκιώδη ζώνη της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου και η ενεργοποίηση του θεωρείται ότι επηρεάζει τη νευρογένεση, αλλά οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί είναι ακόμη άγνωστοι.

Πίνακας 9: Πρόγραμμα χορήγηση Δ9- Τετραϋδροκανναβινόλης

Δόση	0,3mg/ml	1 mg/ml	3 mg/ml	0	Συμπεριφορικά Τεστ	Απομόνωση Ιστού
Ηλικία	35-37	38-41	42-45	46-75	75	>75

Παρουσιάζεται το πειραματικό πρόγραμμα δοσολογιών του κανναβιβοειδούς Δ9- Τετραϋδροκανναβινόλη (THC) σε έφηβους επίμυες.

Με πειράματα RT-semiQPCR, στα δείγματα του ιπποκάμπου παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα mRNA των bHLH μεταγραφικών παραγόντων Ngn2, NeuroD1, Mash1 και Hes5 αυξάνονται στους επίμυες που τους έχει χορηγηθεί το κανναβινοειδές (**Εικόνα 75**). Εντυπωσιακό είναι ότι το Hes1, ένας μεταγραφικός στόχος της σηματοδότησης Notch, μειώνεται δραματικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενεργότητα αυτού του μονοπατιού μπορεί να επηρεάζεται ως συνέπεια της χορήγησης του THC. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι μεταβολές των επιπέδων mRNA των γονιδίων Sox4, Sox11, PRMT4 και PRMT8 (**Εικόνα 75**), με τα τρία πρώτα να αυξάνονται και το τέταρτο να μειώνεται. Τα αποτελέσματα αυτά, μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η πορεία της νευρογένεσης φαίνεται να επηρεάζεται αρνητικά. Είναι πιθανόν η χρήση του THC να επάγει, την πρόιμη νευρογένεση διαταράσσοντας το ισοζύγιο μεταξύ των πρόδρομων νευρικών κυττάρων και αυτών που διαφοροποιούνται, εξαντλώντας έτσι τη δεξαμενή των πρόδρομων νευρικών κυττάρων. Πειράματα ανοσοϊστοχημείας με πρώιμους (π.χ. GFAP, Sox2) και όψιμους (π.χ. DCX, NeuN) νευρικούς δείκτες διαφοροποίησης στην περιοχή της οδοντωτής έλικας θα συνέβαλαν σημαντικά στην επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης για την επίδραση του THC στην πορεία της νευρογένεσης.

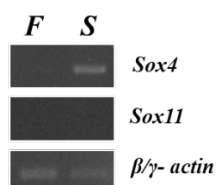


Εικόνα 75: Μεταβολές στα επίπεδα mRNA μεταγραφικών παραγόντων των οικογενειών bHLH, SoxC, και PRMT στον ιππόκαμπο επίμυων που τους έχει χορηγηθεί Δ9-Τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC) κατά την περίοδο της εφηβείας. Απομονώθηκε ολικό RNA από την περιοχή του ιπποκάμπου και ακολούθησε ανάλυση RT-semiQPCR. Είναι φανερό ότι η χορήγηση της ουσίας Δ9-THC επηρεάζει την έκφραση των bHLH νευρογενικών γονιδίων και στόχων της σηματοδότησης του Notch. Σημαντικές μεταβολές παρατηρούνται και στα επίπεδα του mRNA των γονιδίων και των άλλων δύο οικογενειών, δηλαδή των SoxC (κυρίως του Sox11), και των PRMT (κυρίως του Prmt4). Τα νευρογενικά γονίδια ελέγχθηκαν σε τέσσερα διαφορετικά σέτ επίμυων, ενώ εκείνα των SoxC και PRMT γονίδια σε δύο. Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το β/γ actin σε όλες τις περιπτώσεις.

5.2 Έλεγχος της Επίδρασης Στρεσογόνων Παραγόντων στην Έκφραση Γονιδίων που Εμπλέκονται στη Νευρογένεση

Το στρες είναι ένας περιβαλλοντικός παράγοντας που μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στη νευρογένεση. Μελετήσαμε την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Sox4 και Sox11, οι οποίοι σχετίζονται με τη νευρωνική πλαστικότητα, σε περιφερικό αίμα ενός 56χρονου δεξιόχειρα ασθενούς με αναπτυξιακή δυσλεξία, μια δυσλειτουργία η οποία μπορεί να αποτελέσει έναν ιδιαίτερα σημαντικό στρεσογόνο παράγοντα, κυρίως κατά την παιδική ηλικία. Το άτομο αυτό, φέρει χαρακτηριστικό ιστορικό με τυπικές δυσκολίες στη γραφή και την ανάγνωση. Κατά τα λοιπά είναι υγιές και δε φέρει κάποια άλλη νευρολογική, ψυχιατρική ή χρόνια πάθηση. Κατάφερε επίσης, παρακάμπτοντας το πρόβλημα της δυσλεξίας να αποκτήσει διδακτορικό δίπλωμα και να είναι επιτυχημένος επιστήμονας. Συγκρίναμε την έκφραση των παραπάνω γονιδίων χρησιμοποιώντας RNA από περιφερικό αίμα από τον πατέρα και γιό ο οποίος δεν πάσχει από τη νόσο, προκειμένου να διαπιστώσουμε κατά πόσο το περιβάλλον μπορεί να επηρεάσει βασικούς

μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται τόσο στη νευρωνική πλαστικότητα όσο και στο στρες. Διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα του Sox4 είναι σημαντικά μειωμένα (μη ανιχνεύσιμα) στον πατέρα (**Εικόνα 76**). Η μελέτη αυτή είναι σε εξέλιξη με την διερεύνηση δειγμάτων και άλλων μελών από την συγκεκριμένη οικογένεια, καθώς και επιπλέον ασθενών.



Εικόνα 76: Μειωμένα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα Sox4 σε περιφερικό αίμα ασθενούς με αναπτυξιακή δυσλεξία. Μετά από απομόνωση RNA από περιφερικό αίμα, ακολούθησε RT-semiQPCR και διαπιστώθηκε ότι το mRNA του γονιδίου Sox4 εκφράζεται κανονικά στον γιό (S) ενώ είναι μη ανιχνεύσιμο στον πατέρα (F). Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το το β/γ actin.

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συζήτηση

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής προσπαθήσαμε να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης επιγενετικών ρυθμιστών και μεταγραφικών παραγόντων, που εμπλέκονται στην πορεία της νευρογένεσης.

Αρχικά εστιαστήκαμε στη διερεύνηση του ρόλου και της σημασίας δύο μορίων με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, κατά την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης: των μεταγραφικών παραγόντων αλλά και επιγενετικών ρυθμιστών NFIA και NFIB, που επάγουν τη γλοιογένεση κατά την εμβρυική ανάπτυξη και του εν δυνάμει επιγενετικού ρυθμιστή PRMT8, ο οποίος εκφράζεται εξειδικευμένα στον ΚΝΣ. Θέλοντας να χαρακτηρίσουμε το προτύπο έκφρασης των μορίων αυτών στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου, αξιοποιήσαμε το *in vivo* σύστημα ενήλικου ποντικού και διερευνήσαμε τόσο την υποκυτταρική κατανομή αυτών των πρωτεϊνών όσο και το στάδιο στο οποίο εκφράζονται κατά την πορεία της νευρογένεσης. Διαπιστώσαμε ότι οι NFIA και B εκφράζονται άφθονα στην υποκοκκιώδη ζώνη της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου και συνεκφράζονται τόσο με τον μοριακό δείκτη πολυδυναμίας Sox2 όσο και με τον πρώιμο νευρικό δείκτη DCX, κάτι που ενισχύει τις υποψίες μας για τον ενεργό ρόλο των πρωτεϊνών αυτών στην πορεία της ενήλικης νευρογένεσης. Κάτι που μας προκάλεσε ιδιαίτερο ενθουσιασμό ήταν η παρατήρηση μας ότι η PRMT8 πρωτεΐνη εντοπίζεται στον πυρήνα των ώριμων νευρικών κυττάρων της κοκκιώδους στοιβάδας της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου. Για να μπορέσουμε να κατανοήσουμε τη σημασία της έκφρασης των PRMT8, NFIA και NFIB στην διαδικασία της γέννησης νέων νευρώνων κατά την ενήλικη ζωή, σχεδιάσαμε τεχνητά miRNAs με στόχο την τοπική καταστολή της έκφρασης τους στην περιοχή της οδοντωτής έλικας. Η αναστολή της μετάφρασης των γονιδίων και επομένως η απουσία των πρωτεϊνών αυτών, σε συνδυασμό με την υπερέκφραση τους, θα βοηθούσε στην κατανόηση του ρόλου τους. Είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται πως οι παράγοντες NFIA, NFIB και η μεθυλοτρανσφεράση της αργινίνης PRMT8 ίσως συμμετέχουν στη διαδικασία της ενήλικης νευρογένεσης. Οι NFIA και NFIB, ως μόρια που επάγουν την αστρογλοιογένεση, θα μπορούσαν να εκφράζονται στις νευρογενικές περιοχές για να ελέγχουν την συγκεκριμένη πορεία. Τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα έχουν το δυναμικό να διαφοροποιούνται όχι μόνο σε νευρώνες αλλά και σε γλοιακά κύτταρα και οι NFI παράγοντες εκφράζονται χωρίς κατά

την αστρογλοιογένεση. Λαμβάνοντας, επίσης, υπόψιν ότι ο παράγοντας NFIA εντοπίζεται στο μεταγραφικό σύμπλοκο της σηματοδότησης του Notch, μαζί με τον Rpbj-k (μη δημοσιευμένα δεδομένα *Schwarz TJ, Darsinou M. et al*), θα μπορούσε να συμμετέχει στον έλεγχο της νευρογένεσης μέσω του συγκεκριμένου μονοπατιού. Η κατανομή της PRMT8 πρωτεΐνης στα κύτταρα της κοκκιώδους στοιβάδας υποδεικνύει ένα άγνωστο μέχρι σήμερα ρόλο αυτής στον πυρήνα. Το συγκεκριμένο ένζυμο, μέσω των μετα- μεταφραστικών τροποποιήσεων που μπορεί να προκαλέσει σε άλλες πρωτεΐνες, θα μπορούσε να συμμετέχει στον έλεγχο των όψιμων σταδίων της νευρογένεσης, όταν τα νευρικά κύτταρα, δηλαδή, προσπαθούν να ενσωματωθούν στο νευρωνικό δίκτυο δημιουργώντας λειτουργικές συνάψεις. Αν οι ιστόνες αποτελούν, πράγματι, υπόστρωμα της πρωτεΐνης PRMT8 τότε το συγκεκριμένο μόριο θα μπορούσε να συμμετέχει και στον έλεγχο της γονιδιακής ρύθμισης μορίων με εξέχοντα ρόλο στη νευρογένεση. Οι αντιφατικές ωστόσο πληροφορίες στη βιβλιογραφία που αφορούν στην κατανομή αυτού του ενζύμου, σε σύγκριση με τις δικές μας παρατηρήσεις (μεμβρανική έναντι πυρηνικής κατανομής), καθώς και η μη έκφραση της σε κάποιο κυτταρικό μοντέλο, συνέβαλαν ανασταλτικά στην προσπάθεια κατανόησης του ρόλου και της ρύθμισης του γονιδίου αυτού. Παρόλα αυτά, στην προσπάθεια μας να χαρακτηρίσουμε το 5' άκρο του γονιδίου με τη μέθοδο cRACE ώστε να απομονώσουμε την πυρηνική ισομορφή της πρωτεΐνης, τη ρύθμιση της οποίας επιθυμούμε να μελετήσουμε, ταυτοποιήσαμε πολλαπλά εναλλακτικά μετάγραφα, και πιθανές εναλλακτικές ισομορφές της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, που μέχρι σήμερα ήταν εντελώς άγνωστες. Σε συμφωνία με τα ευρήματά μας, η μεθυλοτρανσφεράση της αργινίνης PRMT1 η οποία παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομολογία με την PRMT8 [222] διαθέτει κι αυτή ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο 5' άκρο με πολλαπλά εναλλακτικά μετάγραφα τα οποία επηρεάζουν την εξειδίκευση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα [223]. Ο έλεγχος της ενεργότητας των εναλλακτικών ισομορφών είναι κάτι που θα αποκαλύψει το ρόλο της πρωτεΐνης, η οποία, μέσω αυτών, πιθανόν να συμμετέχει σε πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένου και του μεταγραφικού ελέγχου. Η ανίχνευση μεταγράφων που όμως δεν βρίσκονται σε ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο και στα οποία εντοπίζονται πολλαπλά κωδικόνια λήξης, μπορεί επίσης να έχει ιδιαίτερη σημασία για τη ρύθμιση και τη λειτουργία του συγκεκριμένου μορίου.

Όντας εντυπωσιασμένοι από την αυστηρή χωροχρονική έκφραση, κατά την ενήλικη νευρογένεση, πληθώρας γονιδίων, εστίασαμε το ενδιαφέρον μας σε έναν ακόμα μεταγραφικό παράγοντα, τον *Ngn2*, η έκφραση του οποίου περιορίζεται σε ένα βραχύ χρονικό πλαίσιο και είναι ικανή να καθορίσει το πεπρωμένο των πρόδρομων νευρικών κυττάρων προς τη νευρική γένεση. Αν και το πρότυπο έκφρασης της *Ngn2* πρωτεΐνης στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου ήταν ήδη γνωστό, σε αντίθεση με τους NFIA, NFIB και PRMT8, οι μηχανισμοί που διέπουν τη ρύθμιση της έκφρασης αυτού του γονιδίου δεν είναι ακόμη σαφείς. Επιδιώκοντας έτσι να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς ρύθμισης του *Ngn2* γονιδίου, ελέγξαμε τα μεταγραφικά επίπεδα αυτού και διαπιστώσαμε ότι στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα το γονίδιο εκφράζεται μέσα στις τρεις πρώτες ώρες της διαφοροποίησης, ενώ στη συνέχεια η έκφραση του μειώνεται. Στο σύστημα των νευροβλαστωματικών κυττάρων SH-SY5Y όμως, το mRNA του γονιδίου αυξάνεται προοδευτικά κατά τη νευρική διαφοροποίηση και η έκφραση του διατηρείται σε σχετικά σταθερά και χαμηλά επίπεδα. Επιλέξαμε ως σύστημα περαιτέρω μελέτης τα συγκεκριμένα κύτταρα λόγω του δυναμικού πολυδυναμίας το οποίο διατηρούν αλλά και της ικανότητας τους να διαφοροποιούνται σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες [217], για τη διαφοροποίηση των οποίων, κατά την ανάπτυξη, είναι απαραίτητη η παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα *Ngn2* [233] [234]. Διαπιστώσαμε συγχρόνως ότι στις αντίστοιχες συνθήκες (χαμηλού ορού), απουσία του παράγοντα που επάγει τη νευρική διαφοροποίηση (RA), η έκφραση του γονιδίου είναι εντυπωσιακά αυξημένη. Ενώ τα κύτταρα, λοιπόν, δε διαφοροποιούνται ο κύριος ρυθμιστής της νευρογένεσης, *Ngn2*, εκφράζεται πολύ έντονα. Αυτό υποδηλώνει ότι η χαμηλή περιεκτικότητα σε μιτογόνα, από μόνη της είναι ικανή να ενεργοποιεί τη μεταγραφή του συγκεκριμένου γονιδίου. Η έκφραση του *Ngn2* γνωρίζουμε ότι επηρεάζεται θετικά από τη σηματοδότηση PI3K και TOR [235]. Θα μπορούσε επομένως η τόσο έντονη αύξηση να οφείλεται και στην επίδραση των μονοπατιών αυτών τα οποία, εφόσον τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται (έστω και σε χαμηλό βαθμό), είναι ακόμη ενεργά. Ωστόσο, σε συνθήκες πολλαπλασιασμού (υψηλού ορού), που το PI3K και TOR είναι επίσης ενεργά, πιθανόν να εκφράζονται κι άλλοι παράγοντες ή να είναι ενεργά επιπλέον μονοπάτια που να μην επιτρέπουν την έκφραση του *Ngn2*. Μια επιπλέον εξήγηση είναι ότι τα κύτταρα σε φτωχό θρεπτικό μέσο θα πρέπει να αποφασίσουν είτε να διαφοροποιηθούν είτε να αποπέσουν. Στην προσπάθειά τους να επιβιώσουν προσπαθούν να διαφοροποιηθούν κι

έτσι ενεργοποιούν την έκφραση του γονιδίου *Ngn2* το οποίο, με τη σειρά του, θα ενεργοποιήσει το πρόγραμμα της διαφοροποίησης. Εξαιτίας όμως της απουσίας επιπλέον παραγόντων που επάγουν ή/και ρυθμίζουν τη νευρική διαφοροποίηση, όπως το ρετινοϊκό οξύ ή άλλων ρυθμιστικών μορίων, χάνεται ο έλεγχος της έκφρασης του κι έτσι, καθώς εκφράζεται σε υπερβολικά αυξημένα επίπεδα, δεν μπορεί να επιτελέσει το φυσιολογικό του ρόλο και να ενεργοποιήσει τη νευρική διαφοροποίηση. Εναλλακτικά, το mRNA του *Ngn2* θα μπορούσε να είναι πιο σταθερό στις συγκεκριμένες συνθήκες και να μην παράγεται περισσότερη πρωτεΐνη αλλά να μην είναι ενεργή, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να μεταγράψει τα κατάλληλα γονίδια-στόχους. Η ενεργότητα της θα μπορούσε να ελέγχεται από κάποια μετα- μεταφραστική τροποποίηση όπως η φωσφορύλιωση, που γνωρίζουμε ότι έχει μεγάλη σημασία για τη λειτουργία αυτού του μεταγραφικού παράγοντα [33].

Έχοντας ως στόχο να μελετήσουμε τους επιγενετικούς μηχανισμούς που επηρεάζουν την έκφραση του *Ngn2*, ελέγξαμε πρώτα το βαθμό μεθυλίωσης της ευρύτερης περιοχής του υποκινητή του γονιδίου, σε συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων όπου τα επίπεδα έκφρασης του είναι υψηλά ώστε να μπορούμε να τα μελετήσουμε. Παρατηρήσαμε ότι παρουσιάζεται ένα δυναμικό πρότυπο μεθυλίωσης, το οποίο σε συνδυασμό με το περιβάλλον της χρωματίνης, συμβάλλει στον έλεγχο της μεταγραφής του. Μάλιστα, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, ότι και η περιοχή του (μοναδικού) ιντρονίου, αν και η περιεκτικότητα σε GC εκεί είναι χαμηλή, επηρεάζεται από τη μεθυλίωση. Η μεθυλίωση σε ιντρονιακές περιοχές, αν και δεν είναι πολύ καλά μελετημένη, είναι εξίσου σημαντική με τη μεθυλίωση στις περιοχές των εξονίων. Μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των γονιδίων οδηγώντας π.χ ακόμη και στην γονιδιακή αποσιώπιση όπως συμβαίνει στην περίπτωση του γονιδίου *PMP24* [236] ή στην ενίσχυση της μεταγραφής όπως στην περίπτωση του *EGR2* [237]. Η μεθυλίωση στην περιοχή των ιντρονίων μπορεί να επηρεάσει επίσης και τη χρωματινική δομή συμβάλλοντας έτσι στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [238].

Συγχρόνως, παρατηρήσαμε μια αναντιστοιχία των μεταβολών στα επίπεδα του mRNA σε σύγκριση με εκείνα της πρωτεΐνης, η οποία μας ενέπνευσε να υποθέσουμε ότι μπορεί η έκφραση του γονιδίου να ρυθμίζεται και σε μετα- μεταγραφικό επίπεδο. Ελέγχοντας αν, πρωτεΐνες που προσδένονται άμεσα στο RNA (*RNA binding proteins, RBPs*) θα μπορούσαν να συμμετέχουν στον έλεγχο αυτής της ρύθμισης, ανακαλύψαμε ότι η

πρωτεΐνη HuD, η οποία ελέγχει την έκφραση πολλών νευρικών γονιδίων, παρουσιάζει μία αρνητική συσχέτιση με τον μεταγραφικό παράγοντα Ngn2. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα που εκφράζουν Ngn2 δεν συνεκφράζουν HuD, παρ' ότι η μεταγραφή του γονιδίου *HuD* ελέγχεται από τον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα. Οι 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές του γονιδίου *Ngn2* φαίνεται πώς είναι απαραίτητες για αυτή την αλληλεπίδραση, αφού κατά την υπερέκφραση της κωδικής περιοχής μόνον, αυτή η αρνητική σχέση δεν υπάρχει. Καθώς τα κύτταρα βρίσκονται στο πρόγραμμα της νευρικής διαφοροποίησης το γονίδιο *HuD* εκφράζεται, πιθανόν μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Ngn2. Μετά την έκφραση του, η πρωτεΐνη HuD ελέγχει (δηλαδή καταστέλλει) μέσω της δράσης της, άμεσα ή έμμεσα (βλ. μοντέλο εικόνας 63), στις 5' ή/και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές, την έκφραση του γονιδίου *Ngn2*. Ο έλεγχος της άμεσης πρόσδεσης της πρωτεΐνης HuD στο mRNA του *Ngn2* με τη μεθοδολογία CLIP, σε συνδυασμό με την υπερέκφραση και καταστολή της έκφρασης του HuD γονιδίου θα αποκάλυπτε την ακριβή σχέση των δύο μορίων και έναν νέο μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου *Ngn2*. Βέβαια, αυτό που έχει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον δεν είναι η σχέση των πρωτεϊνών Ngn2 και HuD, αλλά η αποκάλυψη ενός νέου ρυθμιστικού μηχανισμού ελέγχου της έκφρασης του γονιδίου *Ngn2*. Σε αυτόν το έλεγχο θα μπορούσαν να συμβάλλουν και επιπλέον μόρια, δηλαδή και άλλες Hu πρωτεΐνες ή RBPs. Άλλωστε η σταθεροποίηση του mRNA του *Dll1* από τη συγγενική πρωτεΐνη HuR στα νευροεπιθηλιακά κύτταρα ενδυναμώνει τις υποψίες μας για την πιθανότητα ρύθμισης του γονιδίου *Ngn2* από τις RBPs [232]. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένας μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης της πρωτεΐνης HuD μέσω της δράσης εξειδικευμένων miRNAs που αποκαλύφθηκε πρόσφατα στη *Drosophila* [239], θα μπορούσε να συμβάλλει και στη σχέση αρνητικής ανατροφοδότησης που παρατηρήσαμε με την Ngn2, σχηματίζοντας ένα ακόμη πιο σύνθετο δίκτυο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης.

Αποδείξαμε ότι η περιοχή του 5'-UTR του γονιδίου κατέχει ρυθμιστικό ρόλο στη μεταφρασιμότητα του mRNA, και ότι οι συνθήκες καλλιέργειας επηρεάζουν τη ρύθμιση αυτή. Είναι γνωστό ότι η δομή του 5' άκρου των μεταγράφων μπορεί και λαμβάνει επιπλέον δευτεροταγείς διαμορφώσεις επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μετάφραση. Για το γονίδιο *Ngn2* είναι η πρώτη φορά που μαθαίνουμε ότι η συγκεκριμένη περιοχή κατέχει ρυθμιστικό ρόλο στη μετάφραση του. Επιπλέον, η θέση του ενός και μοναδικού ιντρονίου το γονιδίου εντός της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής έχει ξεχωριστό

ενδιαφέρον καθώς ιντρόνια που εντοπίζονται σε αυτές τις περιοχές χαρακτηρίζουν γονίδια με ρυθμιστικό ρόλο και εκπλεετυσμένη ρύθμιση έκφρασης [240]. Άλλωστε η ίδια η μεταφραστική διαδικασία μπορεί να επηρεαστεί από τα ιντρόνια των 5'UTR [241], [242]. Επομένως όλο το 5' άκρο του γονιδίου, δηλαδή η μη μεταφραζόμενη περιοχή με το ιντρόνιο, πιθανόν διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στον έλεγχο της μεταφρασιμότητας του μορίου, κάτι που φαίνεται και από τα πειράματα μέτρησης της ενεργότητας του υποκινητή του *Ngn2*.

Διαπιστώσαμε ότι η υπερέκφραση της *Ngn2* απουσία των δύο πλευρικών μη μεταφραζόμενων περιοχών, στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα είναι ικανή να επάγει την έκφραση του *HuD* στον ευρύτερο κυτταρικό πληθυσμό, και όχι μεμονωμένα στα κύτταρα που την υπερεκφράζουν, ενώ η ταυτόχρονη παρουσία του *Sox11* είναι ικανή να εξειδικεύσει την έκφραση του *HuD* αποκλειστικά στα διαμολυσμένα κύτταρα. Η μεταγραφική ενεργότητα της *Ngn2* παρουσιάζει μία ευελιξία καθώς αλλάζει η εξειδικεύει τους στόχους της αξιοποιώντας κάθε φορά το περιβάλλον. Στην προκειμένη περίπτωση φαίνεται ότι το *Sox11* επηρεάζει το ρεπερτόριο των μεταγραφικών στόχων της *Ngn2* και κατ' αυτόν το τρόπο παρεμποδίζει την έκφραση των παραγόντων που ευθύνονται για την έκφραση του *HuD* στα μη διαμολυσμένα κύτταρα. Η παρατήρηση αυτή εξηγεί, εν μέρει, και ότι οι δυνατότητες επαναπρογραμματισμού των σωματικών κυττάρων από την πρωτεΐνη *Ngn2* επηρεάζονται από την παρουσία του *Sox11* [186], [187]. Δεν είναι απαραίτητο οι δύο αυτοί παράγοντες να αλληλεπιδρούν άμεσα ώστε να επιφέρουν τα συγκεκριμένα αποτελέσματα. Η αλληλεπίδραση τους μπορεί να είναι έμμεση και το σύνολο των γεγονότων που προκαλούν να έχει καθοριστικό ρόλο για το κυτταρικό πεπρωμένο. Θα ήταν ενδιαφέρον να ελεγχθεί και η σχέση του παράγοντα *Sox4* με την πρωτεΐνη *Ngn2*, καθώς και η μελέτη του μεταγραφικού τους δυναμικού, μιας και ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας διαδραματίζει εξίσου κομβικό ρόλο στην πορεία της νευρογένεσης, και ο ρόλο του δεν είναι σαφώς διακεκριμένος από τον ρόλο του *Sox11*.

Γνωρίζοντας το πλούσιο ρεπερτόριο των γονιδίων που ελέγχονται από την *Ngn2*, επιδιώξαμε να αναλύσουμε τους μεταγραφικούς της στόχους σε επίπεδο γονιδιώματος (*ChIP sequencing*), αλλά και το σύνολο των γονιδίων που μεταγράφονται στις συνθήκες που το γονίδιο *Ngn2* εκφράζεται έντονα, και παρουσιάζει την ασυμφωνία μεταξύ επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης που περιγράψαμε στα κύτταρα SH-SY5Y. Αν και η βελτιστοποίηση

και επανάληψη της πορείας ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης είναι απαραίτητη, οι ενδείξεις για 2 πιθανούς μεταγραφικούς στόχους είναι αρκετά ενδιαφέρουσες. Από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης RNA είδαμε ότι υπάρχει μια συντονισμένη ρύθμιση της έκφρασης συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων κατά την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης, που σε συνδυασμό με τις μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Ngn2*, δίνουν σημαντικές πληροφορίες για περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών ρύθμισης και δράσης αυτού του μεταγραφικού παράγοντα.

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι ένας άλλος bHLH μεταγραφικός παράγοντας, ο ASCL1 ή Mash1 εκφράζεται άφθονα σε μία άλλη μορφή καρκίνου του νευρικού συστήματος, το γλοιοβλάστωμα, και έχει την ικανότητα να αναδιαμορφώνει τη χρωματινική δομή επάγοντας τη νευρογένεση και καταστέλλοντας την ογκογονικότητα [243], μπορούμε να υποθέσουμε ότι και ο *Ngn2*, εφόσον εκφράζεται στα νευροβλαστωματικά κύτταρα, ίσως έχει παρόμοια συμπεριφορά. Η βελτιστοποίηση και επανάληψη της ανάλυσης ChIPseq, σε συνδυασμό με την αλληλούχιση του RNA, στις ίδιες, αλλά και σε ορισμένες επιπλέον συνθήκες, όπου η έκφραση του *Ngn2* επάγεται ή καταστέλλεται, θα αποκαλύψει με μεγαλύτερη λεπτομέρεια το μεταγραφικό δυναμικό της *Ngn2* στα κύτταρα αυτά, και μπορεί να δώσει ιδέες για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του νευροβλαστώματος.

Θέλοντας να αναλύσουμε σε μεγαλύτερο βάθος τους γενικούς μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (καθώς στο επίπεδο αυτό εκτός από τις RBPs σημαντικό ρόλο παίζουν και τα miRNAs) κατά τη νευρική διαφοροποίηση, προσπαθήσαμε να ελέγξουμε το πρότυπο έκφρασης των miRNAs σε διάφορα στάδια της διαφοροποίησης των νευροβλαστωματικών κυττάρων. Για τον λόγο αυτό εγκαθιδρύσαμε αξιόπιστες συνθήκες διαφοροποίησης στα Be(2)-C νευροβλαστωματικά κύτταρα ώστε να αναλύσουμε την έκφραση των miRNAs και να τις συσχετίσουμε με την έκφραση του της *Ngn2*, που όπως διαπιστώσαμε εκφράζεται και εκεί, ακολουθώντας ένα παρόμοιο πρότυπο όπως και στα κύτταρα SH-SY5Y. Γι αυτή τη μελέτη επιλέχθηκε η συγκεκριμένη νευροβλαστωματική σειρά, επειδή διατηρεί υψηλότερο ποσοστό του κυτταρικού υποπληθυσμού τύπου I, που αντιπροσωπεύει τα καρκινικά νευρικά βλαστικά κύτταρα. Η μελλοντική αξιοποίηση των προκαταρκτικών πειραμάτων που έγιναν αναμένεται να συμβάλλει στην κατανόηση του πιθανού ρόλου των miRNAs στην έκφραση της *Ngn2*, και την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης. Παράλληλα, μελέτησαμε και την επίδραση που

μπορεί να έχουν οι στρεσογόνοι παράγοντες στην έκφραση γονιδίων που διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στη νευρογένεση. Ελέγχθηκαν δύο καταστάσεις στρες: αυτή που προκαλείται από τη χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών όπως τα κανναβινοειδή, και εκείνη που συνδέεται με μαθησιακές δυσκολίες, και συγκεκριμένα με την αναπτυξιακή δυσλεξία κατά την παιδική ηλικία στον άνθρωπο. Ελέγξαμε τις μεταβολές στα μεταγραφικά επίπεδα γονιδίων που εμπλέκονται στη νευρογένεση (*Ngn2*, *Ngn1*, *Hes1*, *Mash1*, *Neurod1*, *Sox4*, *Sox11*, *Prmt8*) κατά τη χρήση χαμηλών και σταδιακά αυξανόμενων δόσεων κανναβινοειδών, σε έφηβους επίμυες. Διαπιστώσαμε ότι η πορεία της νευρογένεσης είναι σθεναρά επηρεασμένη και μάλιστα παρατηρείται πρόωρη νευρογένεση στους ενηλικιωμένους επίμυες, γεγονός που ανοίγει νέους ορίζοντες για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών δράσης των κανναβινοειδών. Η γνώση αυτή θα μπορούσε να συμβάλλει και στην αποφυγή των παρενεργειών που προκαλούν οι συγκεκριμένες ουσίες κατά τη χρήση τους σε θεραπευτικές μεθόδους. Στο δεύτερο σύστημα, παρατηρήσαμε σημαντικές μεταβολές στην έκφραση γονιδίων με σημαντικό ρόλο στη νευρογένεση και το στρες, χρησιμοποιώντας RNA από περιφερικό αίμα δυσλεξικών ατόμων και συγγενών τους. Ο εμπλουτισμός αυτής της προσπάθειας με περισσότερους ασθενείς και υγιείς συγγενείς μπορεί να δώσει σπουδαία στοιχεία για την κατανόηση αυτής της σύνθετης διαταραχής.

Στη συγκεκριμένη εργασία ασχοληθήκαμε με έξι διαφορετικούς παραγόντες και το ρόλο αυτών στη νευρική διαφοροποίηση: τους NFIA και NFIB της οικογένειας των NFI, την πρωτεΐνη PRMT8 της οικογένειας των PRMTs, τον bHLH μεταγραφικό παράγοντα *Ngn2*, τον μεταγραφικό παράγοντα *Sox11* της οικογένειας των πρωτεϊνών Sox, και την HuD της οικογένειας των RBPs. Μπορεί να φαίνεται πως οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες διαδραματίζουν ανεξάρτητους ρόλους, αλλά αυτό που διαπιστώσαμε είναι ότι στην πραγματικότητα η μεταξύ τους σχέση δεν είναι τόσο ασύνδετη. Ο NFIB έχει υπονοηθεί, χωρίς να έχει αποδειχθεί, ότι επάγει την έκφραση του γονιδίου *Ngn2* [49] ενώ ο NFIA αλλά και ο NFIB, μπορούν να συνεργάζονται με τους παράγοντες Sox με τρόπο αντίστοιχο όπως η *Ngn2* [58], [186] Επίσης, η πρωτεΐνη PRMT4 (*Carm1*), μια άλλη μεθυλοτρανφεράση της αργινίνης, μεθυλιώνει την πρωτεΐνη HuD, ρυθμίζοντας μέσω αυτής της τροποποίησης τη μετάφραση του γονιδίου *p21^{cip1/waf1}* [244]. Μήπως η PRMT8 και μάλιστα μια εξειδικευμένη ισομορφή της, έχει τη δυνατότητα να ελέγχει κατά αντίστοιχο τρόπο την έκφραση του προνευρικού γονιδίου *Ngn2*, επάγοντας τα κατάλληλα

ερεθίσματα για την ολοκλήρωση των τελικών σταδίων της νευρικής διαφοροποίησης; Μέσα από όλη αυτή την προσπάθεια θεωρούμε ότι μπορούν να διατυπωθούν νέα ενδιαφέροντα ερωτήματα όπως αυτό, και ότι ανοίχθηκαν νέοι δρόμοι για την κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης γονιδίων που ελέγχουν τη διαδικασία γένεσης νέων νευρώνων. Πιστεύουμε δε, ότι η περαιτέρω έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση θα συμβάλλει στην αντιμετώπιση και τη θεραπεία πολλαπλών νευρολογικών δυσλειτουργιών.

Συντομογραφίες

A

ActD	Actinomycin D
ALS	amyotrophic lateral sclerosis
APS	Ammonium Pesulfate
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
Aβ	Amyloid beta peptide

B

bdnf	brain derived neurotrophic factor
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bhlh	basic helix-loop-helix
Bmi	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Brn3	Brain-specific homeobox/POU domain protein 3

C

CB1R	Cannabinoid receptor type 1
CBP	CREB- binding protein
CCND1	Cyclin D1
cdk	cyclin-dependent kinase 1
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
c-Myc	avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
Creb	cAMP response element binding

D

DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCX	Doublecortin
Dll1	Delta -like 1
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNMT	DNA methyltransferase
DRAQ5	1,5-bis {[2-(di-methylamino) ethyl]amino}-4, 8-dihydroxyanthracene-9,10-dione
DTT	Dithiothreitol

E

E2f	eukaryotic transcription factor 2
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic acid
Egr1	Early Growth Response 1
EGTA	Ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EtBr	Ethidium bromide
EtOH	Ethanol

F

FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fsk	Forskolin
FUS	Fused in Sarcoma

G

gap-43	Growth Associated Protein 43
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GAR	Glycine /Arginine- Rich
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GP130	Glycoprotein 130 (CNTF receptor)
gsk3	glycogen-synthase kinase-3 β

H

HAT	Histone Acetyltransferase
HDAC	Histone deacetylase
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
Hes 1	Hairy and Enhancer of Split 1
HMG	Histone Mobility Group
HMT	Histone Methyltransferase
HPA axis	Hypothalamic- pituitary -adrenal axis
Hrmt	hnRNP methyltransferase –like
HuD	Human Antigen D

I

IP Immunoprecipitation

J

K

KDM3A Lysine Demethylase 3A

KLF4 Kruppel like factor 4

L

Lam Laminin

Lhx LIM -homeobox 1

LIM (Lin11- Isl-1-Mec3) domain

LMO4 LIM only-4

M

MAP2 Microtubule Associated Protein 2

Mash1 Mammalian Achaete scute homolog 1

MeCP2 Methyl- CpG binding protein 2

N

NeuN Neuronal Nuclei

NeuroD1 Neurogenic Defferentiation 1

NF160 Neurofilament 160

NFIA Nuclear Factor 1

Ngn2 Neurogenin 2

NICD Notch Intacellular Domain

Nurr1 Nuclear receptor related 1 protein

O

Oct3/4 Octamer binding transcription factor 3/4

P

PABP Poly-A Binding Protein

Pax3 Paired Box Gene 3

PBS	Phosphate Buffer Saline
PCP	Planar Cell Polarity
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDL	Poly- D –Lysine
PGM	Phosphoglucomutase
PI	Propidium Iodide
PORN	Poly-L-ornithine
PRC1	Polycomb Repression Complex 1
PRMT8	Protein Arginine (R) Methyl transferase 8
Prox1	Prospero homeobox protein 1
PSA-NCAM	polysialylated -Neural cell adhesion molecule
Ptfla	Pancreas Specific Transcription Factor, 1a

Q

R

RA	all-trans retinoic acid
RBP	RNA Binding Protein
REST	RE1-Silencing Transcription factor
RET	Receptor Tyrosine Kinase of GDNF
RGG	Arginine (R) - Glycine (G)- Glycine (G)
RIPA	Radiomunoprecipitation Assay Buffer
RMS	Rostral Migratory Stream
Rnd2	Rho Family GTPase -2
Rpbj-k	Recombining binding protein suppressor of hairless

S

SATB1	special AT-rich sequence-binding protein-1
SDS	sodium dodecyl-sulphate
Shh	Sonic Hedgehog
Sox	SRY-related HMG-box
Srp14	Single Recognition Particle 14
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable

T

Tau	microtubule-associated protein tau
Tbr2	T-box brain protein 2
TBS	Tris- Buffer Saline
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
Tef	Thyrotroph embryonic factor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TET	Ten-eleven Translocation
TrkB	Tyrosine Kinase Receptor B of BDNF/ NT3
tubb2b	Tubulin Beta 2A Class IIa
TujI	Neuron-specific class III beta-tubulin

U

UTR	Untranslated Region

V

W

WB	Western blot

X, Y, Z

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Απεικόνιση των δύο νευρογενικών περιοχών του εγκεφάλου. Σε εγκάρσια τομή του εγκεφάλου ενήλικου ποντικού, ακεικονίζονται, όπως υποδεικνύουν τα βέλη, οι δύο περιοχές νευρογένεσης. Η οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου και η υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών (ΠΚ) είναι πλούσιες σε νευρικά βλαστικά κύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμους νευρώνες του ιπποκάμπου, καθώς και του οσφρητικού βολβού, μετά τη μετανάστευση τους εκεί διαμέσου του πρόσθιου μεταναστευτικού ρεύματος (PMP). (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Ming and Song, 2011* [4]) 29

Εικόνα 2: Η οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου. Η οδοντωτή έλικα χαρακτηρίζεται από ένα πολύπλοκο τοπικό νευρωνικό δίκτυο διεγερτικών και ανασταλτικών σημάτων. Οι νευρώνες εκτείνουν τους δενδρίτες του προς τη περιοχή CA1 και τους άξονες τους προς την περιοχή CA3 του ιπποκάμπου. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Aimone et al, 2014* [10]). 30

Εικόνα 3: Η ενήλικη νευρογένεση στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου. Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε ώριμους νευρώνες περνώντας διαδοχικά από το στάδιο του πρόδρομου νευρικού κυττάρου, του νευροβλάστη, και του ανώριμου νευρώνα, εκφράζοντας χαρακτηριστικούς μοριακούς δείκτες σε κάθε ένα από αυτά. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Ming and Song, 2011* [4]). 32

Εικόνα 4: Η ενήλικη νευρογένεση στην υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών. Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα, με μορφολογία ακτινωτής γλοίας, περνούν μέσα από διακριτά στάδια (παροδικά πολλαπλασιαζόμενα πρόδρομα νευρικά κύτταρα, νευροβλάστες, ανώριμοι νευρώνες) μέχρι να διαφοροποιηθούν σε διάμεσους νευρώνες του οσφρητικού βολβού. Κάθε στάδιο χαρακτηρίζεται και εδώ από την εξειδικευμένη έκφραση γονιδίων – μοριακών δεικτών (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Ming and Song, 2011* [4]). 34

Εικόνα 5: Η σηματοδότηση Notch. Το μονοπάτι Notch ενεργοποιείται όταν ο προσδέτης Dll1 δεσμεύεται στον υποδοχέα του Notch. Μετά από πρωτεολυτική πέψη, το ενδοκυττάριο τμήμα του Notch (NICD) εισέρχεται στον πυρήνα και καθώς αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Rb/j-k προσελκύεται ο συνενεργοποιητής Maml, οπότε ενεργοποιείται η μεταγραφή γονιδίων στόχων του Notch, όπως τα *Hes1* και *Hes5*, που με τη σειρά τους καταστέλλουν την έκφραση προνευρικών γονιδίων όπως τα *Mash1* (*Ascl1*) και *Ngn2* (*Neurog2*). (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Imayoshi et al, 2014* [15]) 36

Εικόνα 6: Η δομή των bHLH πρωτεϊνών. Ένα χαρακτηριστικό bHLH γονίδιο είναι το *Ngn2*, με ιδιαίτερο ρόλο στην πορεία της νευρογένεσης. Στο κέντρο της επικράτειας της πρωτεΐνης *Ngn2* βρίσκεται η περιοχή bHLH, η οποία ευθύνεται για την πρόσδεση στο DNA. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Bertrand et. al, 2002* [18]) 39

Εικόνα 7: Η ενεργότητα της πρωτεΐνης *Ngn2* επηρεάζεται και επηρεάζεται από κυκλίνες, κινάσες και αναστολείς κινασών του κυτταρικού κύκλου. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Lacomme et. al, 2011* [30]) 44

Εικόνα 8: Η σχέση μεταξύ του προτύπου φωσφορυλίωσης και της ενεργότητας της πρωτεΐνης *Ngn2*. Η φωσφορυλίωση της *Ngn2* σε πολλαπλά σημεία διατηρεί ενεργή τη σηματοδότηση του Notch. Αντίθετα

- η φωσφορυλίωση σε μία θέση προάγει τη νευρική διαφοροποίηση μέσω της μεταγραφής νευρικών γονιδίων όπως το *NeuroD*. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Hindley et. al, 2012* [33]) 45
- Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου που μπορεί να διαδραματίζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες Sox στη μεταγραφή. Οι πρωτεΐνες Sox ως A) ενεργοποιητές, B) καταστολείς και Γ) οργανωτές του ενισχυοσώματος χωρίς να αλληλεπιδρούν άμεσα με ενεργοποιητές ή καταστολείς της μεταγραφής. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Lefevre et. al, 2007* [59]) 51
- Εικόνα 10: Η αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων Sox με άλλους παράγοντες (Sox, bHLH, NFI) επηρεάζει το πεπρωμένο των πρόδρομων κυττάρων του νευροεπιθηλίου. Με – συμβολίζεται η μείωση της έκφρασης ενώ με + η αύξηση της έκφρασης. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Reiprich et. al, 2014*, [58]) 53
- Εικόνα 11: Η δομή και ο τρόπος δράσης των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας NFI. Α) Οι μεταγραφικοί παράγοντες NFI αποτελούνται από μία επικράτεια στην οποία εντοπίζονται η περιοχή πρόσδεσης στο DNA και διμερισμού με δομή α-έλικας, και μία περιοχή αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες στην οποία εδράζεται και ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης. Β) Οι μεταγραφικοί παράγοντες NFI επηρεάζουν με διάφορους τρόπους τη μεταγραφή: αλληλεπιδρούν με συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς, απομακρύνουν άλλους μεταγραφικούς παράγοντες από ρυθμιστικές περιοχές ενώ οι ίδιοι μπορούν να προσελκύονται από άλλους. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Mason et al, 2009* [66] και *Gronostajski et al, 2000* [65]). 54
- Εικόνα 12: Ο ρόλος των NFIA και NFIB στη γλοιογένεση στον νωτιαίο μυελό. Παρατηρούμε πως οι NFIA και B μεταγραφικοί παράγοντες επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων ρυθμίζοντας, έτσι, τη γλοιογένεση τόσο σε πρώιμα (E5- E7) όσο και σε όψιμα αναπτυξιακά στάδια. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Mason et al, 2009* [66]). 56
- Εικόνα 13: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τροποποιήσεων των ιστονών. ub= ουβικιτινίωση, ac= ακετυλίωση, me=μεθυλίωση, rh= φωσφορυλίωση. (Τροποποίηση και προσαρμογή από *Bannister and Kouzarides, 2011* [98]) 65
- Εικόνα 14: Η οικογένεια των PRMT πρωτεϊνών. Τα μέλη αυτής της οικογένειας παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία ως προς τα χαρακτηριστικά μοτίβα που φαίνονται με σκούρο χρώμα. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Bedford, 2007* [118]) 68
- Εικόνα 15: Η αντίδραση μεθυλίωση της αργινίνης που καταλύεται από τις PRMT πρωτεΐνες. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Bedford, 2007* [118]) 70
- Εικόνα 16: Η έκφραση του mRNA του γονιδίου *prmt8* σε έμβρυο ποντικού. Εγκάρσια τομή εμβρύου ποντικού την ημέρα E16.5 και υβριδοποίηση *in situ* αποδεικνύει την άφθονη κατανομή του mRNA του γονιδίου *prmt8* στο κεντρικό νευρικό σύστημα. (Προσαρμογή και τροποποίηση από *Tenada et al. 2007* [137]). 73
- Εικόνα 17: Σχηματικό μοντέλο των μετα- μεταγραφικών ρυθμιστικών μηχανισμών της γονιδιακής έκφρασης. Η ρύθμιση επιτελείται τόσο μέσα στον πυρήνα (προσθήκη καλύπτρας στο 5' άκρο, πολυαδενυλίωση, εναλλακτικό μάτισμα) όσο και στο κυτταρόπλασμα (αποικοδόμηση του mRNA, πολυαδενυλίωση,

miRNAs, αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες των οικογενειών RBPs (*RNA-binding proteins*) και PABPs (*poly(A)-binding proteins*). (Προσαρμογή και τροποποίηση από Kim *et. al*, 2016 [144]) 74

Εικόνα 18: Περιοδική έκφραση του γονιδίου *hes1* λόγω της πλευρικής αναστολής του Notch. Α) Το γονίδιο *Hes1* όπως και τα άλλα bHLH γονίδια της σηματοδότησης του Notch εκφράζονται περιοδικά. Η ρυθμική έκφραση ελέγχεται τόσο στο επίπεδο της μεταγραφής, όσο και στο επίπεδο μετά τη μεταγραφή αλλά και μετά τη μετάφραση. Β) Για να μπορέσουν τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα να διαφοροποιηθούν θα πρέπει η έκφραση των bHLH γονιδίων να σταθεροποιηθεί. (Προσαρμογή και τροποποίηση από Kageyama *et al*. 2015 [149], Kageyama *et al*. 2009 [151]) 76

Εικόνα 19: Αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης HuD με τις περιοχές 5' και 3' -UTR. Η πρωτεΐνη HuD αλληλεπιδρά τόσο με τα cis- ρυθμιστικά στοιχεία της polyA ουρά όσο και με πρωτεΐνες της έναρξης της μετάφρασης στο 5' άκρο, επάγοντας έτσι την κάμψη του mRNA ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάφρασης. (Προσαρμογή και τροποποίηση από Fukao *et al*. 2009 [169]). 79

Εικόνα 20: Τα αρχικά στάδια της δημιουργίας του νευροβλαστώματος. Καθώς τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας μεταναστεύουν κατά μήκος διαφόρων οδών προς την περιφέρεια, το πεπρωμένο τους επηρεάζεται από την έκφραση πολλών bHLH γονιδίων (*MYCN*, *Mash1*, *Hand2* κ.α.) και σηματοδοτικών μορίων όπως το BMP. Η ικανότητα απόκρισης των διαφοροποιούμενων κυττάρων στον NGF καθορίζει τη διατήρηση της ομοιότητας των κυττάρων και την μελλοντική ανάπτυξη του νευροβλαστώματος. (Προσαρμογή και τροποποίηση από Marshall *et al*, 2014 [197]) 87

Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση των σημείων μέτρησης κυττάρων στην πλάκα Neubauer. 122

Εικόνα 22: Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pKSSP-EmGFP-miR 134

Εικόνα 23: Πρότυπο ζωνών θετικών και αρνητικών κλώνων ύστερα από πέψη με το ένζυμο MscI. 135

Εικόνα 24: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα CAG-EmGFP- miRNA 135

Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση ενός κύκλου PCR. (Προσαρμογή και Τροποποίηση από <https://biosistemika.com/blog/qpcr-technology-basics/>). 142

Εικόνα 26: Γραφικές παραστάσεις στις οποίες εικονίζεται το κατώφλι του κύκλου στην αρχή της εκθετικής φάσης. 145

Εικόνα 27: Αρχή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των προτύπων μεθυλίωσης (Προσαρμογή και τροποποίηση από Kwon M. H. *et.al* [212]). 147

Εικόνα 28: Σχηματική αποκόνιση της μεθόδου cRACE (Προσαρμογή και τροποποίηση από Maruyama I.N *et al.*, 1995, [213]) 154

Εικόνα 29: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου 5' RLM-RACE (Προσαρμογή και τροποποίηση από https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manual/s/cms_056070.pdf). 155

Εικόνα 30: Βασικά χαρακτηριστικά της ηλεκτροφόρησης SDS – PAGE. (Προσαρμογή και τροποποίηση από www.slideshare.net). 158

Εικόνα 31: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας απομόνωσης των πρωτεϊνών που προσδένονται στη χρωματίνη. 163

Εικόνα 32: Χημική αντίδραση λουσιφεράσης. (Προσαρμογή και τροποποίηση από <http://bpsbioscience.com/dual-luciferase-firefly-renilla-luciferase-assay-system-60683>) 164

Εικόνα 33: Η παρουσία του RA στα κύτταρα Be(2)-C οδηγεί σε μείωση του πολλαπλασιασμού και αύξηση των επιπέδων του νευρικού δείκτη Neuro160. Τα κύτταρα Be(2)-C διαφοροποιήθηκαν σε DMEM-F12 απουσία ορού (0% FBS), και παρουσία RA 5μM (*iii*, *iv*) και 10μM (*v*, *vi*). Αντιπροσωπευτική εικόνα από πειράματα ανοσοκυτταροχημείας και συνεστιακή μικροσκοπία (φακός 100x) με αντισώματα για τους δείκτες Neuro160 και Ki67. Παρατηρούμε ότι ο νευρικός δείκτης Neuro160 αυξάνεται σημαντικά στα 5μM, συγκριτικά με τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε συνθήκες πολλαπλασιασμού (*prolif*, *i*, *ii*), και ότι η αύξηση αυτή είναι μεγαλύτερη στα 10μM RA. Ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki67 μειώνεται τόσο τα 5μM όσο και στα 10μM RA. Η χρώση του πυρήνα έγινε με *Propidium Iodide* (PI). 172

Εικόνα 34: Η διαφοροποίηση των κυττάρων Be(2)-C συνοδεύεται από αύξηση και άλλων νευρικών δεικτών. Μετά από οκτώ ημέρες καλλιέργειας σε DMEM-F12 απουσία ορού και παρουσία 10 μM RA αυξάνονται σημαντικά οι νευρικοί δείκτες PSA-NCAM (*A*) και TujI (*B*). Η χρώση του πυρήνα έγινε με *Propidium Iodide* (PI). 173

Εικόνα 35: Μορφολογία των κυττάρων BE(2)-C κατά τη διαφοροποίηση σε διαφορετικά υποστρώματα και θρεπτικά μέσα. Η μορφολογία των είναι καλύτερη στο θρεπτικό μέσο DMEM-F12+B27 με 15μM RA, σε σύγκριση με το DMEM-F12, απουσία ορού και 10μM RA. Επιπλέον, τα κύτταρα παρουσιάζουν καλύτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά νευρικού κυττάρου όταν διαφοροποιούνται σε υπόστρωμα PDL/lam συγκριτικά με το κολλαγόνο. Μικροσκόπιο TIRF, φακός 20x. 174

Εικόνα 36: Τελικές συνθήκες νευρικής διαφοροποίησης των κυττάρων BE(2)-C. Σε θρεπτικό μέσο DMEM-F12+B27, παρουσία 15μM RA, και υπόστρωμα κολλαγόνο, οι νευρικοί δείκτες TujI (*A*) και HuC/D (*B*) αυξάνονται δραματικά, ενώ παράλληλα ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki67 (*A*) και ο δείκτης πρόδρομων νευρικών κυττάρων Nestin (*I*) μειώνονται. 176

Εικόνα 37: Η μορφολογία των Be(2)-C κυττάρων είναι διαφορετική όταν αυτά καλλιεργούνται σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα ή καλλιεργητικά πιάτα. Παρουσία αυξητικών παραγόντων (EGF, FGF) τα Be(2)-C κύτταρα σχηματίζουν ογκοσφαίρες, όταν καλλιεργούνται σε βακτηριακά πιάτα (*iv*) και συσσωματώματα κυττάρων προσκολλημένα στο υπόστρωμα, σε καλλιεργητικά πιάτα για κύτταρα που προσκολλώνται στο υπόστρωμα (*v*: 2^η ημέρα, *vi*: 6^η ημέρα παρουσία αυξητικών παραγόντων). Τα κύτταρα σε πλούσιο θρεπτικό μέσο (10% ορό και B27) αναπτύσσονται ως μονοστοιβάδα κυττάρων. *i*= πλούσιος ορός στην καλλιέργεια, *ii*= καλλιέργεια κυττάρων παρουσία B27 αντί ορού, *iii*= προσκολλητικό πιάτο και θρεπτικό μέσο με B27 και αυξητικούς παράγοντες, *iv*= μη προσκολλητικό πιάτο με B27 και αυξητικούς παράγοντες, 177

Εικόνα 38: Συνθήκες διαφοροποίησης των κυττάρων SH-SY5Y προς τη νευρική μοίρα. (*A*) Σε θρεπτικό μέσο DMEM και 1% ορού, η παρουσία 10μM RA, οδηγεί σε σημαντική αύξηση του αριθμού και του μήκους των νευριτών. (*i*) Συνθήκες υψηλού ορού (*proliferating*), (*ii*) Συνθήκες χαμηλού ορού χωρίς RA (*-RA*), (*iii*) Συνθήκες χαμηλού ορού με RA (*+RA*). (*B*) Κατά την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης το mRNA των νευρικών δεικτών *RET* και *GP130* αυξάνεται από τη δεύτερη κιόλας ημέρα (*i*), ενώ παράλληλα μειώνονται τα μεταγραφικά επίπεδα του *Prox1* (*ii*). Η ανίχνευση των επιπέδων mRNA έγινε με αντίστροφη μεταγραφή (RT) σε συνδυασμό με ημιποσοτική PCR (RT-semiQPCR). (*I*) Παρατηρείται προοδευτική αύξηση στα επίπεδα mRNA των νευρικών δεικτών *TrkB*

(i) και *Tau5* (ii). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με *18SRNA* στο (B, i), *β/γ actin* στο (B, ii) και *spr14* στα (Γ, i και ii). Η ανίχνευση των επιπέδων mRNA έγινε με RT-qPCR. (Δ) Πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε κύτταρα SH-SY5Y τα οποία έχουν καλλιιεργηθεί σε συνθήκες υψηλού ορού (*Prol*) και χαμηλού ορού απουσία (-RA) ή παρουσία (+RA) για 8 ημέρες. Παρατηρούμε ότι σε συνθήκες χαμηλού ορού ο αριθμός των Ki67⁺ κυττάρων μειώνεται είτε απουσία είτε παρουσία RA. Ωστόσο, ο δείκτης νευρικής διαφοροποίησης *Tuj1* επάγεται μόνο παρουσία του RA. Μικροσκοπία TIRF, Φακός 100x, Χρώση του πυρήνα με *DAPI*. 179

Εικόνα 39: Μορφολογία των νευρικών βλαστικών κυττάρων σε διαφορετικά υποστρώματα. Το υπόστρωμα PORN που παραμένει στο καλλιιεργητικό πιάτο για 12-16 ώρες (o/n), σε θερμοκρασία δωματίου (RT), είναι ιδανικό για την καλλιέργεια και τον πολλαπλασιασμό αυτών των κυττάρων, ενώ το υπόστρωμα PORN/lam (PORN σε RT και Lam στους 37°C) είναι ιδανικό για τη διαφοροποίησή τους. Μικροσκόπιο TIRF, φακός 10x 180

Εικόνα 40: Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (HCN), διατηρούν το δυναμικό βλαστικότητας, καθώς και το δυναμικό διαφοροποίησής τους προς τη νευρική μοίρα. Η πορεία της διαφοροποίησης είναι πολύ πιο αποτελεσματική σε συνθήκες RA+Fsk συγκριτικά με το RA μόνο. (Α) Μορφολογία των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο. (Β) Κατά την πορεία της νευρικής διαφοροποίησης παρατηρείται μείωση των επιπέδων mRNA των γονιδίων *Prox1* και *Glast1* (δείκτες πρόδρομων νευρικών κυττάρων), όπως φαίνεται με τη μέθοδο RT-semiQPCR (κανονικοποίηση με *β/γ-actin*). (Γ) Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα εκφράζουν σε μεγάλο ποσοστό τον δείκτη βλαστικότητας Sox2 ενώ ένα μικρό ποσοστό Sox2⁺ κυττάρων εκφράζουν και τον γλοιακό δείκτη GFAP, χαρακτηριστικό των κυττάρων ακτινωτής γλοίας. Το Sox2, το Ki67 και το Mash1 μειώνονται σταδιακά κατά τη νευρική διαφοροποίηση, ενώ ο δείκτης ανώριμων νευρικών κυττάρων *Tuj1*, αυξάνεται. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας, Φακός 63x. Χρώση του πυρήνα με *DRAQ5*. 182

Εικόνα 41: Πρότυπο έκφρασης του NFIA στην οδοντωτή έλικα του υποκάμπου και την υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών. Σε εγκάρσιες τομές ενήλικου εγκεφάλου, παρατηρούμε ότι η έκφραση του NFIA είναι άφθονη τόσο στην οδοντωτή έλικα του υποκάμπου (Α) όσο και στην υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών (Β). Συνεντοπίζεται δε τόσο με τον δείκτη βλαστικότητας Sox2 (i) όσο και με τον πρώιμο νευρικό δείκτη DCX (iii), σε ποσοστό 93.3%. Το ποσοστό αυτό προέκυψε μετρώντας 100 κύτταρα/τομή από τρία διαφορετικά ζώα. Συνέκφραση παρατηρείται και με τον γλοιακό δείκτη GFAP στη μοριακή στοιβάδα (ii), καθώς και με τον δείκτη ώριμων νευρώνων NeuN στα κύτταρα της κοκκιδώδους στοιβάδας (iv). Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI (450nm, μπλε χρώμα). Sox2= 488nm, DCX = 488nm, NFIA= 555nm. Κλίμακα: (Α-i) 41.9μm (Α-ii) 39.8 μm (Β-i) 58.6μm (Β-ii) 36.6μm. Πάχος τομών: 40μm. Φακός 40x. 184

Εικόνα 42: Πρότυπο έκφρασης του NFIB στην οδοντωτή έλικα του υποκάμπου και την υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών. Σε εγκάρσιες τομές ενήλικου εγκεφάλου ποντικού, παρατηρούμε ότι η έκφραση του NFIB είναι άφθονη στην οδοντωτή έλικα του υποκάμπου (Α) αλλά και στην υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών (Β). Συνεντοπίζεται με (i) τον δείκτη πολυδυναμίας Sox2 σε ποσοστό 94% και (ii) με τον πρώιμο νευρικό δείκτη DCX σε ποσοστό 100%. Τα ποσοστά προκύψαν μετρώντας 100

κύτταρα/ τομή από τρία διαφορετικά ζώα. Ο γλοιακός δείκτης GFAP δεν συνεκφράζεται με τον NFIB (iii). Επιπλέον τα Sox2⁺/GFAP⁺ κύτταρα δεν εκφράζουν NFIB (iii, *μεγέθυνση*). Σε διαμήκη τομή (I) παρατηρήσαμε ότι ο NFIB εκφράζεται καθ' όλο το μεταναστευτικό ρεύμα και συνεκφράζεται με το Sox2 στο μεγαλύτερο μέρος του Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα οσφρητικά σπειράματα του οσφρητικού βολβού (OB). Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI (450nm, μπλε χρώμα). Sox2= 488nm, DCX = 488nm, NFIB= 555nm, GFAP= 603nm. Κλίμακα: (A-i) 34.4μm (A-ii) 26.3 μm (B-i) 39.8μm (B-ii) 42.3μm. (I) 95.1μm Πάχος τομών 40μm. Φακός 40x σε (A), (B), (I) OB και 10x σε (I) RMS. 186

Εικόνα 43: Μεταβολές στα επίπεδα mRNA των γονιδίων *NFIA* και *NFIB* κατά τη διάρκεια της νευρικής διαφοροποίησης. (A) Τα επίπεδα mRNA των *NFIA* και *NFIB* αυξάνονται κατά τη διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων απομονωμένων από την υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών (i), ενώ όταν τα κύτταρα προέρχονται από την υποκοιλιακή ζώνη της οδοντωτής έλικας του υποκάμπου τα επίπεδα των μεταγραφών παραμένουν σταθερά (ii). (B) Έλεγχος των επιπέδων mRNA χαρακτηριστικών νευρικών δεικτών κατά τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων από την υποκοιλιακή (i) και την υποκοιλιακή (ii) ζώνη. Η αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *DCX*, *RhoA*, *drebrin A*, και *drebrin E* επιβεβαιώνει την διαφοροποίηση προς τη νευρική γενεαλογία, ενώ η αύξηση του *p27* επιβεβαιώνει ότι τα κύτταρα. Τα επίπεδα των mRNA των παραπάνω γονιδίων ελέγχθηκαν με τη μέθοδο RT-qPCR (Reverse Transcription-quantitative PCR). 188

Εικόνα 44: Πλασμιδιακές κατασκευές για την υπερέκφραση (A) και την καταστολή μέσω miRNAs (B), των μεταγραφικών παραγόντων NFIA και B. Τα miRs, αφού υβριδοποιήθηκαν, κλωνοποιήθηκαν σε έναν ενδιάμεσο, ειδικά σχεδιασμένο φορέα ώστε μετά από περιοριστικές πέψεις με τα ένζυμα *SfiI* και *PmeI*, να εντεθούν στον φορέα pCAG-IRES-GFP, για την παρασκευή των ρετροϊών. 189

Εικόνα 45: Πρότυπο έκφρασης της PRMT8 στην περιοχή της οδοντωτής έλικας του υποκάμπου. (A) PRMT8 συνεντοπίζεται με τον όψιμο νευρικό δείκτη NeuN, στην κοκκιώδη ζώνη της οδοντωτής έλικας. (B) Πιο εστιασμένα (τεχνητή μεγέθυνση) παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη δε συνεντοπίζεται καθόλου με τον πρώιμο νευρικό δείκτη DCX. Η χρώση του πυρήνα έγινε με DAPI (450nm, μπλε χρώμα). NeuN= 488nm, PRMT8= 555nm, DCX= 603nm. Κλίμακα: 54.3μm. Φακός 40x. 192

Εικόνα 46: Πρότυπο έκφρασης της PRMT8 πρωτεΐνης στην περιοχή του φλοιού. Η PRMT8 εκφράζεται μόνο στα κύτταρα που συνεκφράζουν NeuN και όχι σε όλο τον κυτταρικό πληθυσμό. NeuN= 488nm, PRMT8=555nm, Πυρινηκή χρώση με DAPI. Κλίμακα: 24.7 μm. Φακός 40x. 193

Εικόνα 47: Έλεγχος της λειτουργικότητας των πλασμιδιακών κατασκευών των miRNAs. Από πειράματα WB αποδεικνύεται ότι το miRNA3 είναι το μόνο λειτουργικό που μπορεί να καταστείλει την υπερεκφρασμένη PRMT8, με CMV-PRMT8-GFP ενώ τα miR1 και 2 δεν μπορούν να μειώσουν την έκφραση της και επομένως δεν είναι λειτουργικά. Πιο αναλυτικά, Neuro2A κύτταρα διαμολύνθηκαν με A. (i) 200ng CMV-PRMT8-GFP και 40, 400 και 1600ng miR3 και (ii) με 200ng CAG-PRMT8-IRES-GFP και 400ng miR3. Και στις 2 περιπτώσεις τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PRMT8 μειώνονται παρουσία 400ng miR3 και πάνω. Το ίδιο προκύπτει και από αντίστοιχα πειράματα ανοσοφθορισμού (B) όπου το miR3 (250 και 500ng) καταστέλλει την υπερεκφρασμένη με CMV-PRMT8-dsRED

(100ng), πρωτεΐνη. Κλίμακα 12μm, 12.8μm, 12μm και 12.4μm με φορά από επάνω προς τα κάτω. Φακός 100x 194

Εικόνα 48: Η πλασμιδιακή κατασκευή υπερέκφρασης είναι λειτουργική. (Α) Πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, από την υπερέκφραση της πλασμιδιακής κατασκευής σε κύτταρα Neuro2A, επιβεβαιώνουν τη λειτουργικότητα της ενώ παράλληλα φαίνεται πως το miR3 είναι ικανό να καταστείλει την έκφραση της PRMT8. (Β) Η λειτουργικότητα επιβεβαιώνεται και με πειράματα ανοσοκυτταροχημείας. Με χρήση αντισώματος έναντι της PRMT8 παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη κατανέμεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των Be(2)-C κυττάρων. Κλίμακα 11.2μm 195

Εικόνα 49: Οργάνωση της δομής του γονιδίου *Prmt8* στον άνθρωπο και τον ποντικό. (Α) Σχηματική απεικόνιση του γονιδιακού τόπου στον άνθρωπο (επάνω) και στο ποντίκι (κάτω) (i). Η αμινοξική αλληλουχία (με τα τρία εναλλακτικά εναρκτήρια κωδικόνια) που έχει υποτεθεί ότι ευθύνεται τόσο για την μυριστοϋλιωμένη όσο και για την πυρηνική μορφή της πρωτεΐνης, είναι υψηλά συντηρημένη στο ποντίκι και στον άνθρωπο (ii). (Β) Σχηματική απεικόνιση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *Prmt8*. Το hV1 είναι πειραματικά επιβεβαιωμένο, ενώ το hV2 έχει προβλεφθεί θεωρητικά. Στον ποντικό οι δύο ισομορφές της πρωτεΐνης (mV1 και mV2) πιστεύεται ότι προκύπτουν από ένα μοναδικό μετάγραφο με εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης. Οι κωδικοί που αναγράφονται αντιστοιχούν στους κωδικούς πρόσβασης της NCBI. (Γ) Ανίχνευση των εναλλακτικών μεταγράφων που περιλαμβάνουν είτε το εξώνιο 1A είτε το 1B, σε ανθρώπινο εμβρυικό εγκέφαλο. 197

Εικόνα 50: Προσδιορισμός εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *Prmt8* με τη μέθοδο cRACE. (Α) Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας cRACE, για την ταυτοποίηση του 5' άκρου του *PRMT8* mRNA. (Β) Χρησιμοποιώντας ως μήτρα το κυκλοποιημένο cDNA και εκκινητές τους Ex3-F και Ex3-R που απεικονίζονται σχηματικά στα (i) και (ii) πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR από την οποία προέκυψε ένα πρότυπο ζωνών (iii). Επιλέχθηκαν οι δύο πιο έντονες και κλωνοποιήθηκαν. Η αλληλούχηση με τον εκκινητή M13 (iv) οδήγησε στην ταυτοποίηση ενός πιθανού νέου εξωνίου, για το οποίο συνθέσαμε εκκινητές και επιβεβαιώσαμε την έκφρασή του με RT-PCR σε RNA από ανθρώπινο εμβρυικό εγκέφαλο (v). 199

Εικόνα 51: Η ανάλυση cRACE οδήγησε στην ταυτοποίηση ενός νέου εξωνίου. (Α) Ο γονιδιακός τόπος του *Prmt8* στον οποίο φαίνεται η θέση του νέου εξωνίου. Σημειώνονται επίσης οι θέσεις των υπόλοιπων εξωνίων, των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των διαφόρων περιοχών, καθώς και των κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης. (Β) Ενισχύθηκαν με RT-PCR οι δύο περιοχές που φαίνονται στην εικόνα (i και ii), και από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων προέκυψαν τρεις ζώνες. Κλωνοποιήθηκαν στον pSC-A-amp/kan και αλληλουχήθηκαν με τον εκκινητή *M13 Forward* (-20). Η χαμηλότερου μοριακού βάρους (MB) ζώνη αντιπροσωπεύει την αλληλουχία που αντιστοιχεί στο ώριμο mRNA, ενώ οι μεγαλύτερου MB αποτελούν αντιστοιχούν σε μη ματισμένο mRNA. (Γ) Η αντίδραση RT-PCR με τον έναν εκκινητή στην αρχή του εξωνίου 1C και τον άλλον στο τελευταίο εξώνιο του γονιδίου (το οποίο είναι συντηρημένο μεταξύ των μεταγράφων), οδήγησε σε ένα πρότυπο τριών ζωνών (ii). Η κλωνοποίηση και αλληλούχηση αυτών των προϊόντων έδειξε ότι η επιδεικνυόμενη ζώνη (I) αντιπροσωπεύει την αλληλουχία που αντιστοιχεί στο ώριμο mRNA του *Prmt8* (iii) το οποίο

ξεκινά από το νέο εξώνιο έως και το εξώνιο 10. Η δίεση (#) αντιπροσωπεύει προϊόντα, τα οποία προέρχονται από μη ώριμο mRNA. 200

Εικόνα 52: Το νέο εξώνιο περιέχει ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο που συνεχίζεται στο εξώνιο 2 και πιθανόν οδηγεί σε μια νέα ισομορφή της PRMT8. (Α) Σχηματική απεικόνιση του γονιδιακού τόπου της *Prmt8*. Το κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύει την κωδική περιοχή του εξωνίου 1Α (η θεωρητικά προβλεπόμενη 5'-UTR είναι πολύ μικρή), το πράσινο χρώμα την κωδική περιοχή του εξωνίου 1Β, και το κίτρινο την κωδική περιοχή του νέου εξωνίου, 1C. (Β) Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (πορτοκαλί) οδηγεί στη αμινοξική ακολουθία που αναγράφεται αμέσως από κάτω. (Γ) Η σύγκριση των αμινοξικών ακολουθιών μεταξύ ανθρώπου, ποντικού και αρουραίου επιδεικνύει υψηλό βαθμό συντήρησης. 201

Εικόνα 53: Νέα μετάγραφα του γονιδίου *Prmt8* αποκαλύπτονται από τη μελέτη του 5' άκρου του. (Α) Απεικόνιση της δομής του γονιδίου *Prmt8* όπως διαμορφώθηκε από τα νέα πειραματικά μας δεδομένα (i), και εμπλουτίστηκε με βάση τα νέα στοιχεία που προέκυψαν από τις αλληλουχίες που βρέθηκαν στην NCBI (ii). Απεικόνιση της δομής του μεταγράφου (iii) που ταυτοποιήθηκε στον πνεύμονα (AK026786.1). (Β) Με βέλη διαφορετικού χρώματος σημειώνονται οι θέσεις των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των διάφορων περιοχών (i). Ακολουθούν τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης με τους εκκινητές που απεικονίζονται στα οποία φαίνονται τα αμπλικόνια D, E, F, G, I και H (ii, iii, iv, v, vi, και vii, αντίστοιχα). Το κόκκινο βέλος υποδεικνύει την σωστή (αναμενόμενου μοριακού βάρους) ζώνη. Η δίεση (#) αντιπροσωπεύει προϊόντα, τα οποία προέρχονται από μη ώριμο mRNA. (Γ) Ένα νέο εξώνιο ανιχνεύθηκε από την υποδεικνυόμενη με το κόκκινο βέλος ζώνη, το οποίο εδράζεται μεταξύ των εξονίων 1Β και 1C (i). Διαγραμματική απεικόνιση της αλληλουχίας του προϊόντος αμπλικονίου, στην οποία φαίνεται ότι το νέο εξώνιο λειτουργεί ως δεύτερο εξώνιο (ii) RT-PCR με εκκινητές για το εξώνιο 2Α επιβεβαιώνουν την ύπαρξή του ως τμήμα ενός ακέραιου μεταγράφου (iii). 204

Εικόνα 54: Προσπάθεια χαρακτηρισμού του 5' άκρου και πιθανών νέων εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *Prmt8* με τη μέθοδο 5' RLM-RACE. (Α) Σχηματική περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας 5' RLM-RACE. (Β) Διαγραμματική απεικόνιση των διαδοχικών αντιδράσεων PCR που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να ενισχύσουμε τις επιθυμητές περιοχές και να κατανοήσουμε την οργάνωση του γονιδίου *Prmt8* στο 5' άκρο. (Γ) Από τις παραπάνω αντιδράσεις PCR προέκυψαν τρεις ζώνες σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους. Αυτές κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pTOPO-TA και αλληλουχήθηκαν. (Δ) Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης αποκάλυψαν μία νέα περιοχή μεταξύ των εξονίων 1Β και 2Α. 206

Εικόνα 55: Μεταβολές στο πρότυπο έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας bHLH κατά τη πορεία διαφοροποίησης των τριών κυτταρικών μοντέλων προς τη νευρική μοίρα. (Α). Τα αποτελέσματα από RT-semiQPCR (i, ii) και RT-QPCR από RNA το οποίο απομονώθηκε από κύτταρα Be(2)-C σε διαφορετικές ημέρες του προγράμματος διαφοροποίησης. Η έκφραση του γονιδίου *Ngn2* αυξάνεται από την πρώτη κιόλας ημέρα διαφοροποίησης, ενώ ο νευρικός δείκτης TH εκφράζεται σταθερά, χωρίς να μεταβάλλονται τα επίπεδα του (i). Παρατηρείται μια αντίστροφη σχέση

στο πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *Mash1* (ii) και *Hes1* (iii). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *GAPDH*. (B). Αποτελέσματα RT-semiQPCR (i) και RT-QPCR (ii) από RNA το οποίο απομονώθηκε από κύτταρα SH-SY5Y σε διαφορετικές ημέρες της διαφοροποίησης. Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *Ngn2* αυξάνονται τόσο παρουσία όσο και απουσία RA. Απουσία RA (δηλαδή σε συνθήκες χαμηλού ορού μόνο), η έκφραση του γονιδίου είναι πολύ μεγαλύτερη. Το γονίδιο *Mash1* αρχικά αυξάνεται και στη συνέχεια μειώνεται τόσο απουσία όσο και παρουσία RA, ενώ τα γονίδια *Hes1* σταματά να εκφράζεται με την έναρξη της διαφοροποίησης. Το γονίδιο *Hes5* συμπεριφέρεται παρόμοια με το *Mash1* αλλά μόνο σε συνθήκες χαμηλού ορού. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *Srp14*. (B) Αποτελέσματα RT-semiQPCR (i, ii) και RT-QPCR (iii) από RNA το οποίο απομονώθηκε από νευρικά βλαστικά κύτταρα σε διαστήματα ωρών (i, ii) ή ημερών (iii) μετά την έναρξη της διαφοροποίησης. Η έκφραση του *ngn2* αυξάνεται πολύ γρήγορα, μέσα στις 3 πρώτες ώρες, στις 6 ώρες έχει ήδη μειωθεί αρκετά, ενώ μετά τις 12 ώρες δεν ανιχνεύεται (i). Το *mash1* έχει ρυθμική έκφραση το πρώτο δωδεκάωρο (ii) αλλά μειώνεται σταθερά στα επόμενα στάδια της διαφοροποίησης (iii). Το *hes5* μειώνεται πολύ γρήγορα μετά την έναρξη της διαφοροποίησης (ii), σε αντίθεση με το *ngn2* που όπως είδαμε στο (i) αυξάνεται, ενώ το *hes1* παρουσιάζει ρυθμική έκφραση το πρώτο δωδεκάωρο (ii). Ως γονίδιο εσωτερικού ελέγχου για την κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το β/γ *actin*.

210

Εικόνα 56: Ανάλυση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *Ngn2* σε κύτταρα SHSY-5Y μετά την αναστολή της μεταγραφής από την Ακτινομυκίνη D. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για οκτώ ημέρες σε 1% ορό απουσία ή παρουσία RA (10 μ M), και στο τέλος της διαφοροποίησης εκτέθηκαν σε ActD (0.5 μ g/ml) για 2 ώρες. Απομονώθηκε ολικό RNA και ακολούθησε ανάλυση RT-qPCR. Τόσο παρουσία RA όσο και απουσία αυτού του παράγοντα όπου η έκφραση του γονιδίου *ngn2* είναι πολύ μεγαλύτερη ($p < 0.01$) τα επίπεδα του mRNA μειώνονται σημαντικά ($p < 0.05$) από την ActD (A). Όπως αναμενόταν, τα σχετικά σταθερά μετάγραφα του γονιδίου *GAPDH* δεν επηρεάζονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες (B), ενώ τα ασταθή μετάγραφα του γονιδίου *c-Myc* μειώνονται δραματικά μετά την επίδραση της ActD. Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το *Srp14* σε όλες τις περιπτώσεις. 212

Εικόνα 57: Τα ελεγχόμενα επίπεδα mRNA του γονιδίου *Ngn2* είναι συνέπεια του προγράμματος της νευρικής διαφοροποίησης και όχι της άμεσης επίδρασης του RA. Κύτταρα SH-SY5Y, καλλιεργήθηκαν για οκτώ ημέρες σε 1% ορό απουσία (διαδρομές 1, 3 και 5) ή παρουσία 10 μ M RA (διαδρομές 2, 4 και 6). Στη συνέχεια, τα κύτταρα είτε λύθηκαν για την απομόνωση ολικού RNA (διαδρομές 1 και 2) είτε καλλιεργήθηκαν για τέσσερις επιπλέον ημέρες απουσία RA (διαδρομές 3 και 6) ή παρουσία RA (διαδρομές 4 και 5). Κατόπιν, απομονώθηκε ολικό RNA και ακολούθησε RT-semiQPCR για όλα τα δείγματα. Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το *Srp14*.

213

Εικόνα 58: Ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *Ngn2* σε συνθήκες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. (A) Σχηματική απεικόνιση του 5' άκρου του γονιδίου *Ngn2* στην οποία περιλαμβάνεται η ευρύτερη περιοχή του υποκινητή η οποία είναι πλούσια σε

δινουκλεοτίδια CG (μικροί κύκλοι), καθώς και η 5'-UTR μέχρι το ATG στην οποία παρεμβάλλεται και ένα μικρό ιντρόνιο (-1572 έως +697). Χρησιμοποιήθηκαν πέντε ζεύγη εκκινητών που παράγουν τα αμπλικόνια PR1, PR2, PR3, PR4 και IR ώστε να ελεγχθεί όλη η περιοχή (*methylation walk*). (B) Απομονώθηκε γενωμικό DNA από κύτταρα SHSY-5Y τα οποία είχαν καλλιεργηθεί σε συνθήκες πολλαπλασιασμού (*prolif*), διαφοροποίησης (*Ημέρα 10+RA*), καθώς και απουσίας RA (*Ημέρα 10-RA*). Ακολούθησε πέψη 1μg DNA με τα περιοριστικά ένζυμα *HpaII* και *MspI* για 1h στους 37°C (ως control χρησιμοποιήθηκε η ίδια αντίδραση σε κάθε περίπτωση, χωρίς όμως την προσθήκη ενζύμου). Μετά την εκχύλιση του DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη τα προϊόντα των πέψεων χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα (*template*) για τις αντιδράσεις PCR. Τα προϊόντα αναλύθηκαν σε 1.5% πήκτωμα αγαρόζης και ακολούθησε ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε ζώνης. Ως αρνητικό *control* για τη μεθυλίωση χρησιμοποιήθηκε η περιοχή της 3' UTR στην οποία δεν υπάρχουν νησίδες CpG. (Γ) Σχηματική αναπαράσταση των αλλαγών στο πρότυπο μεθυλίωσης του υποκινητή στις τρεις συνθήκες: PR1-4= promoter region 1-4, IR= intronic region. Η ένταση του χρώματος αντανακλά το ποσοστό μεθυλίωσης. (Δ) Τα επίπεδα του *Ngn2* mRNA στις παραπάνω συνθήκες προσδιορίστηκαν με RT-semiQPCR με γονίδιο αναφοράς το *Srp14* (δεν δείχνεται εδώ). 215

Εικόνα 59: Η 5' περιοχή του γονιδίου *Ngn2* είναι πλούσια σε *cis* ρυθμιστικά στοιχεία για την έλεγχο της μεταγραφής. (A) Διαγραμματική απεικόνιση των περιοχών πρόσδεσης πιθανών μεταγραφικών παραγόντων. Κάθε χρώμα αντιπροσωπεύει διαφορετική οικογένεια πρωτεϊνών. (B) Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδιακών κατασκευών που περιλαμβάνουν τις τρεις περιοχές του υποκινητή ανοδικά της λουσιφεράσης στον πλασμιδιακό φορέα pGL3-Basic (i). Στα κύτταρα SH-SY5Y, η μεταγραφική ενεργότητα και των τριών περιοχών του υποκινητή είναι χαμηλότερη από τον pGL3-Promoter, και δεν μεταβάλλεται σε καμία από τις συνθήκες που ελέγχθηκαν (ii). Από τη διαμόλυνση των κυττάρων Neuro2A προκύπτει ότι οι κατασκευές είναι λειτουργικές και παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με την ενεργότητα του άδειου φορέα (*empty-luc*) (iii). Οι τιμές της λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την ενεργότητα που παράγεται από το πλασμίδιο pRenilla-Luc. Η μεταγραφική ενεργότητα εκφράζεται με βάση την ενεργότητα του pGL3promoter-luc. Έγιναν τρία ανεξάρτητα πειράματα στα Neuro2A (n=3) και τέσσερα στα SH-SY5Y (n=4). 218

Εικόνα 60: Το mRNA του γονιδίου *Ngn2* επάγεται νωρίς, ωστόσο η πρωτεΐνη εμφανίζεται σε ποιο όψιμα στάδια της καλλιέργειας σε χαμηλό ορό. Κύτταρα SH-SY5Y καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM με 1% ορό παρουσία ή απουσία 10μM RA για 4 ή 8 ημέρες. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από πειράματα Western blot (A) και ανοσοκυτταροχημείας (B). (A) Παρατηρούμε ότι η *Ngn2* ανιχνεύεται την όγδοη ημέρα τόσο απουσία όσο και παρουσία RA (διαδρομές 4 και 5), ενώ το mRNA του γονιδίου εμφανίζεται από την τέταρτη ημέρα. (B) Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας (φακός 100x) που δείχνουν ότι η πρωτεΐνη *Ngn2* εντοπίζεται στο πυρήνα των κυττάρων SH-SY5Y, και εκφράζεται σε περισσότερα κύτταρα. Η χρώση του πυρήνα έγινε με DRAQ5 (χρώμα μπλε). Ως δείκτης ισοφόρτωσης για το WB χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη β -actin. 220

Εικόνα 61: Απεικόνιση της μεταγραφόμενης αλληλουχίας του γονιδίου *Ngn2*. Με πορτοκαλί χρώμα αντιπροσωπεύονται οι 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές και με γκρι το ένα και μοναδικό ιντρόνιο

του γονιδίου. Με πράσινο χρώμα υπογραμμίζονται τα κωδικόνια έναρξης και λήξης της μετάφρασης.
220

Εικόνα 62: Τα επίπεδα των πρωτεϊνών Ngn2 και HuD μεταβάλλονται με αντίθετο τρόπο στις συνθήκες καλλιέργειας των νευροβλαστωματικών κυττάρων. Κύτταρα SH-SY5Y καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM με 1% ορό παρουσία ή απουσία 10μM RA για 4 ή 8 ημέρες όπως αναγράφεται στις εικόνες. (Α) Πειράματα ανοσοκυτταροχημείας με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών Ngn2 και HuD έδειξαν ότι η πρωτεΐνη HuD αυξάνεται μόνο σε συνθήκες διαφοροποίησης (+RA). Στην περίπτωση της Ngn2, ενώ η μείωση του ορού για 8 ημέρες οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης στον κυτταρικό πληθυσμό (-RA), στις συνθήκες διαφοροποίησης (+RA) η αύξηση αυτή παρατηρείται πάντοτε σε περιορισμένο αριθμό κυττάρων. Από αυτό τον Ngn2+ πληθυσμό φαίνεται να απουσιάζει εντελώς η HuD, στο 100% των κυττάρων που ελέγχθηκαν σε πολλά ανεξάρτητα πειράματα, υποδηλώνοντας την πιθανή παρουσία ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης. Φακός 100x. Η χρώση του πυρήνα έγινε με DRAQ5 (μπλε). (Β) Ανάλυση RT-semiQPCR στην οποία φαίνεται ότι δεν μεταβάλλονται σημαντικά τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *HuD* στις υποδεικνυόμενες συνθήκες. Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *Srp14*. 222

Εικόνα 63: Υποθετικό μοντέλο που εξηγεί τη σχέση της πρωτεΐνης Ngn2 με την HuD. 223

Εικόνα 64: Η αρνητική σχέση μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων της Ngn2 και της HuD χάνεται όταν απομακρυνθούν οι μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες από την κωδική περιοχή της Ngn2. (Α) Κύτταρα SH-SY5Y διαμολύνθηκαν με 500 ng είτε του πλασμιδίου pNgn2-AcGFP (*Ngn2-AcGFP*) είτε του pAcGFP-N1(*AcGFP*). Την επόμενη ημέρα ανανεώθηκε το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ακόμη ώρες είτε σε συνθήκες πολλαπλασιασμού (P) είτε σε συνθήκες διαφοροποίησης (RA, ημέρα 1^η). Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων και ανοσοκυτταροχημεία με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών Ngn2, AcGFP1 και HuD (i). Η παρουσία της πρωτεΐνης Ngn2-AcGFP (πράσινο) αυξάνει τον αριθμό των HuD⁺ (κόκκινο) κυττάρων συγκριτικά με την AcGFP (πράσινο), και στις συνθήκες διαφοροποίησης η αύξηση αυτή είναι εντονότερη. Φακός 100x. Η χρώση του πυρήνα έγινε με DRAQ5 (μπλε). Στον πίνακα (ii) φαίνεται το ποσοστό των Ngn2-AcGFP⁺ κυττάρων που εκφράζουν HuD σε συνθήκες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. (Β) Πρόδρομα νευρικά κύτταρα από υπόκαμπο ενήλικου αρουραίου (HCN) διαμολύνθηκαν όπως και τα SH-SY5Y. Η διαφοροποίηση έγινε απουσία bFGF και παρουσία FSK και RA για την ίδια χρονική περίοδο. Η επεξεργασία και η παρατήρηση των κυττάρων έγινε όπως και στα SH-SY5Y. Βλέπουμε ότι και σε αυτή την περίπτωση η παρουσία της εξωγενούς Ngn2 αυξάνει τον αριθμό των HuD⁺ κυττάρων στον ευρύτερο κυτταρικό πληθυσμό, και μάλιστα σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από αυτόν που παρατηρείται στα νευροβλαστωματικά κύτταρα. Φακός 63x. Χρώση του πυρήνα με DRAQ5 (μπλε). 226

Εικόνα 65: Οι συνθήκες διαφοροποίησης ευνοούν την έκφραση της Ngn2, πιθανόν και μέσω ενός μηχανισμού σταθεροποίησης της πρωτεΐνης. Πρόδρομα νευρικά κύτταρα HCN διαμολύνθηκαν με 500 ng είτε του πλασμιδίου pAcGFP-N1 (επάνω μέρος) είτε του pNgn2-AcGFP (κάτω μέρος). Το θρεπτικό μέσο ανανεώθηκε στις 4 ώρες, και 12-16 ώρες μετά τη διαμόλυνση έγινε μια ακόμη αλλαγή, και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 επιπλέον ώρες είτε σε μέσο με bFGF (πρώτη στήλη) ή σε μέσο χωρίς

bFGF παρουσία RA και Fsk (δεύτερη στήλη), μόνο Fsk (τρίτη στήλη), μόνο RA (τέταρτη στήλη), ή χωρίς κανέναν από αυτούς τους παράγοντες (πέμπτη στήλη). Παρατηρούμε (τελευταία σειρά κάτω) την αύξηση του φθορισμού της υπερέκφραζόμενης *Ngn2* παρουσία RA και Fsk, αλλά και παρουσία μόνο της Fsk, ενώ το RA από μόνο του δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του μορίου. Στο πείραμα ελέγχου (επάνω), δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της AcGFP σε καμία από τις συνθήκες. Βλέπουμε επίσης ότι σε όλες τις συνθήκες υπερέκφρασης της *Ngn2*-AcGFP, η έκφραση του HuD (κόκκινο) είναι σημαντικά αυξημένη συγκριτικά με την υπερέκφραση της AcGFP. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας, φακός 40x. Η χρώση του πυρήνα έγινε με DRAQ5 (μπλε). 227

Εικόνα 66: Πρόβλεψη δευτεροταγών δομών του 5'UTR του *Ngn2* mRNA. Απεικονίζονται ενδεικτικά δύο πιθανές θερμοδυναμικά σταθερές δευτεροταγείς δομές (A και B), με τη χρήση του προγράμματος RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at>). 228

Εικόνα 67: Η περιοχή 5' UTR του γονιδίου *Ngn2* φαίνεται να έχει ρυθμιστικό ρόλο στον έλεγχο της μετάφρασης επηρεάζοντας τη μετάφραση του AcGFP mRNA με έναν τρόπο που εξαρτάται από το κυτταρικό περιβάλλον. Στο επάνω μέρος κάθε εικόνας απεικονίζονται σχηματικά οι φορείς pNgn2-5'UTR-AcGFP και pAcGFP-N1. Νευροβλαστωματικά κύτταρα SH-SY5Y (A) και Neuro2A (B), καθώς και πρόδρομα νευρικά κύτταρα HCN (Γ) διαμολύνθηκαν με 500 ng του φορέα pNgn2-5'UTR-AcGFP ή του φορέα pAcGFP-N1. Την επόμενη ημέρα ανανεώθηκε το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε σε συνθήκες πολλαπλασιασμού (P) είτε σε συνθήκες διαφοροποίησης, όπως αναγράφεται στις εικόνες. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων και έλεγχος της έντασης του φθορισμού της AcGFP. Παρατηρούμε ότι το 5' UTR του *Ngn2* περιορίζει τη μετάφραση της AcGFP με έναν τρόπο που εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου και τις συνθήκες καλλιέργειας. Συνεστιακή μικροσκοπία, φακός 63x. Η χρώση του πυρήνα έγινε με DRAQ5 (μπλε). 230

Εικόνα 68: Η παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα Sox11 εξειδικεύει την δράση της *Ngn2*, περιορίζοντας την έκφραση της HuD αποκλειστικά στα *Ngn2*⁺ κύτταρα. Πρόδρομα νευρικά κύτταρα διαμολύνθηκαν με 250 ng του φορέα pAcGFP-N1 (επάνω) ή pNgn2-AcGFP (κάτω), μαζί με 250 ng του φορέα pSox11-IRES-GFP. Την επόμενη ημέρα ανανεώθηκε το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες διαφοροποίησης παρουσία Fsk και RA για μία ημέρα. Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων και ανοσοκυτταροχημεία με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών AcGFP (πράσινο) και HuD (κόκκινο). Παρατηρούμε ότι όλα τα κύτταρα που εκφράζουν *Ngn2* και Sox11 είναι HuD⁺ (κάτω), ενώ το Sox11 από μόνο του δεν έχει το δυναμικό να το προκαλέσει την εμφάνιση HuD⁺ κυττάρων (επάνω). Συνεστιακή μικροσκοπία, φακός 40x. Η χρώση του πυρήνα έγινε με DRAQ5 (μπλε). 232

Εικόνα 69: Ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης *Ngn2* μετά από υπερέκφραση σε κύτταρα HEK293. Κύτταρα HEK293 (*human embryonic kidney cells* 293) διαμολύνθηκαν με τον φορέα pNgn2-AcGFP. Μετά από 28 ώρες απομονώθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα με τη μέθοδο RIPA, και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι της *Ngn2*, συζευγμένο σε σφαιρίδια αгарόζης καλυμμένα με πρωτεΐνη G. Χρησιμοποιήσαμε το ίδιο αντίσωμα για το WB, και διαπιστώσαμε ότι το συγκεκριμένο

αντίσωμα είναι λειτουργικό στις συνθήκες μας. Η υβριδική πρωτεΐνη Ngn2-AcGFP μετακινείται πάνω από την βαριά και την ελαφριά αλυσίδα (IgG). 233

Εικόνα 70: Ανάλυση των μεταγραφικών στόχων του παράγοντα Ngn2 σε κλίμακα γονιδιώματος. Α) Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας. Β) Σχηματική απεικόνιση των συνθηκών του πειράματος Γ) Οι δύο πιθανοί μεταγραφικοί στόχοι στον Ngn2, το γονίδιο HSPA6 (i) και GST4 (ii). 235

Εικόνα 71: Μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης νευροβλαστωματικών κυττάρων προς τη νευρική γενεαλογία. (Α) Σχηματικό διάγραμμα της πειραματικής στρατηγικής που ακολουθήσαμε για να ταυτοποιήσουμε τις γονιδιακές ομάδες (*synexpression groups*) των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται κατά την πορεία της διαφοροποίησης. Κύτταρα SH-SY5Y διαφοροποιήθηκαν για οκτώ ημέρες παρουσία RA, και το μεταγράψωμα προσδιορίστηκε τις ημέρες 2, 4 και 8 με τη μεθοδολογία RNA-Seq. Η σύγκριση έγινε με σημείο αναφοράς τα αδιαφοροποίητα κύτταρα (P). (Β) Πίνακας που δείχνει τον αριθμό των διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων σε κάθε χρονική περίοδο. (Γ) Διάγραμμα Venn (i) και πίνακας (ii) που δείχνουν τον αριθμό των διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων και στις τρεις συνθήκες. (* FDR<5%). Ως σημαντικό κατώφλι (*cut-off*) για την επιλογή των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε ο $\log_2FC > 1$ (δηλαδή μεταβολή 2-φορές). (Δ) Διάγραμμα Volcano για κάθε μία από τις συνθήκες που μελετήσαμε (i-iii= day2-8 +RA, iv= day8- RA) που αναπαριστά το σύνολο των γονιδίων που εκφράζονται. Τα γονίδια η έκφραση των οποίων αυξάνεται αναπαρίσταται με κόκκινο χρώμα ενώ αυτών που μειώνεται με πράσινο. Τα γονίδια που η έκφραση τους διατηρείται σε σταθερά επίπεδα αναπαρίστανται με το μπλε χρώμα. 237

Εικόνα 72: Οντολογία των γονιδίων που επάγονται στα διαφορετικά στάδια του προγράμματος νευρικής διαφοροποίησης των νευροβλαστωματικών κυττάρων. Τα γονίδια με αυξημένη έκφραση ταξινομήθηκαν στις διαφορετικές κατηγορίες βιολογικών διεργασιών που περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων GO, με κυριότερες τις «*biological process*» και «*cellular component*», και «*transcription factor binding site*». 239

Εικόνα 73: Οντολογία των γονιδίων που επάγονται και στα τρία διαφορετικά στάδια του προγράμματος νευρικής διαφοροποίησης. Τα γονίδια με αυξημένη έκφραση ταξινομήθηκαν στην κατηγορία «*biological process*» της βάσης δεδομένων GO. 240

Εικόνα 74: Γενική και αντιπροσωπευτική απεικόνιση των γονιδίων που ανιχνεύτηκαν μέσω του RNA seq. Επιλεκτική απεικόνιση ορισμένων γονιδίων που εκφράζονται στα διάφορα στάδια της νευρικής διαφοροποίησης. 242

Εικόνα 75: Μεταβολές στα επίπεδα mRNA μεταγραφικών παραγόντων των οικογενειών bHLH, SoxC, και PRMT στον ιππόκαμπο επίμυων που τους έχει χορηγηθεί Δ9-Τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC) κατά την περίοδο της εφηβείας. Απομονώθηκε ολικό RNA από την περιοχή του ιπποκάμπου και ακολούθησε ανάλυση RT-semiQPCR. Είναι φανερό ότι η χορήγηση της ουσίας Δ9-THC επηρεάζει την έκφραση των bHLH νευρογενικών γονιδίων και στόχων της σηματοδότησης του Notch. Σημαντικές μεταβολές παρατηρούνται και στα επίπεδα του mRNA των γονιδίων και των άλλων δύο

οικογενειών, δηλαδή των SoxC (κυρίως του Sox11), και των PRMT (κυρίως του Prmt4). Τα νευρογενικά γονίδια ελέγχθηκαν σε τέσσερα διαφορετικά σετ επίμυων, ενώ εκείνα των SoxC και PRMT γονίδια σε δύο. Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το β/γ actin σε όλες τις περιπτώσεις. 245

Εικόνα 76: Μειωμένα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα Sox4 σε περιφερικό αίμα ασθενούς με αναπτυξιακή δυσλεξία. Μετά από απομόνωση RNA από περιφερικό αίμα, ακολούθησε RT-semiQPCR και διαπιστώθηκε ότι το mRNA του γονιδίου Sox4 εκφράζεται κανονικά στον γιό (S) ενώ είναι μη ανιχνεύσιμο στον πατέρα (F). Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το β/γ actin. 246

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Πίνακας των πρωτογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά το Western Blot. 105

Πίνακας 2: Πίνακας πρωτογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στον ανοσοφθορισμό 106

Πίνακας 3: Πίνακας χρωστικών για το DNA 107

Πίνακας 4: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για PCR 113

Πίνακας 5: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου Ngn2 116

Πίνακας 6: Ολιγονουκλεοτίδια για τη κατασκευή τεχνητών miRNAs για την καταστολή της έκφρασης του PRMT8 117

Πίνακας 7: Διάλυμα βαθείας ψύξης των ευκαρυωτικών κυττάρων 123

Πίνακας 8: Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμίδιου για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. 160

Πίνακας 9: Πρόγραμμα χορήγηση Δ9- Τετραϋδροκανναβινόλης 244

Παράρτημα Αλληλουχιών

Αλληλουχία 1

```

1 gcatactcta tagggcgatt ggagctcccc cggtgcgggc gctctagaac tagtggatcc
61 cccgggctgc agcccaatgt ggaattcgcc          ex3-F      exon3
                                cttgatcctt tccatgttcg ctgccaaaggc
121 agggggccaag aaggtgtttg gg          ex4-R      exon4
                                atcgaatg ctccagtatt tctgactact cagagaagat
181 cattaaggcc aaccacttgg acaaca
                                gacc tgcacgctgc cttgctgttg gagatctgtg
241 cagtaggcag ttgtggaatt aaaagcaaca ccccatgtcg ctgaatgttc agggatcaca
301 ggccactgcc gtttcccacc cactcccagc ctccggggag tcttagcctg tggagtccca
361 ggaagcacat ggaaaagaga gccttggaac cagagtggag tgacagctaa ggggtgctgg
421 aggccctgtg gaccttgacc atgcacaatg cccagaccag ctccgacttt ttcctctcct
481 tcacatattt aaatgagtc gatattgggg tcagcttcat gcacggagcc ttcttcagct
541 ttagag          exon2
                                gtga acagccccc cctccagccc cccagcccg tcgtccctgc taagcccgtg
601 caatgcgtcc atcatgtgtc cactcaacc agctgcccag gacggggcaa gatgtccaag
661 ctgctgaacc cagaggagat gacctcgaga gattattact tcgactccta tgcccacttt
721 gggatccacg ag          exon3      Ex3-R
                                gaaatgct gaaggatgag gtgcggactc tcacttaccg gaad aagggc
781 gaattccaca gtggatatca agcttatcga taccgtcgac ctcgagggg gggcccggta
841 cccagctttt gttcccttta gtgagggtta attgcgcgt tggcgtaatc atggtcatag
901 ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaatttcca cacaacatac gagcccggga
961 gcataaagtg taaagcctgg ggtgccta at gagtgagcta actcacatta ttgcgttgcg
1021 ctactgctc gctttcagtc ggaactgtc gtgccagctg catatgatca cacgcgcggg
1081 agaagccgat tgcgtatggg gcgctctcgc tctcgctca ctgactcgt gcaatcggtc
1141 gctcggcttg cggcgagtgg atcaggteac tcagcgtata cggtatccag attcagggta

```

Αλληλουχία 2

Reverse and Complement

```

1 atcgtccctt gagtccccag agcacattga atggacctgg aaccaagagt gatgacagct
61 aaaggtgctg aggcgttgaa cttagcaatg gcacaatgcc cagagccagt tccgagcctt
121 ttcctctctc ttcacatagt aaattgaggt cgatattgag tccagctcat gcaaggagcc
181 ttcttcagct taggaggtga acaggccccc cctcccagcc ccccacagcc gtctgctctg
241 ctaagcccggt gcaatgcggt ccacatgtgt ttcactcaa cccagctgcc caggacgggg
301 caagatgtcc aagctgctga acccagagga gatgacctcg agagattatt acttcagctc
361 ctatgcccac ttggggatcc acgaggaaat gctgaaggat gaggtgcgga ctctcactta
421 cgggaactcc atgtaccaca acaagcacgt gttcaaggac aaagtggtag tggatgtggg
481 gagtggtaact gggatccctt ccattgttcg tgccaaggca ggggccaaga aggtgttttg
541 gatcgaaatgc tccagtattt ctgactactc agagaagatc attaaggcca accacttgga
601 caacatcact accatattta agggtaaaat ggaagagggt gagctgcctg tggagaaggt
661 ggacatcact atcagcgagt ggaatgggta ctgtctgttc tatgagttca tgcctaacac
721 ggtgatcttt gccagggaca agtggctgaa acctggaggg cttatgtttc cagaccgggc
781 agctttgtac gtggttagcga ttgaagacag acagtacaaag gacttcaaaa tccactgggtg
841 ggagaatgtc tatggctttg acatgacctg catccgggac gtggccatga aggagcctct
901 agtggacatc gtggatccaa agcaagtggg gaccaatgcc tgtttgataa aggaggtgga
961 catttacaca gtgaagacgg aagagctatc gttcacatct gcattctgcc tgcagatata
1021 gcgcaacgac tacgtccacg ccttggtcac ctattttaat attgaattta ccaagtgcac
1081 caagaaaaat ggggttttcc cagccccctg tgcctccctac acccaactgga agcagaccgt
1141 cttctacttg gaagattacc tcactgtccg gaggggggag gaaatctacg ggaccatata
                                ← Ex10-R
Exon10 1201 catgaagcaa aatgccaaaa atgtgcgaga cctcgatttc acagtatgaa gggcgaattc
1261 cagcacactg cgggccgtta ctagtggatc cgagctcggt accaagcttg atgcatagct
1321 tgagtattct ataggtcacc caaaatggac cc

```

C Race yellow region. With many mismatches

polyfiter

Αλληλουχία 3

polylinker	1	gggtggcatt	tagggtgacc	tatagaatac	tcaagctatg	catcaagctt	ggtaccgagc	Myr-s2		
	61	tccggtccac	tagtaacggc	cgcacgtgtg	ctggaattcg	cccttgggtg	gaagggaatc			
	121	ggagccagatg	agaagggagg	aaaataaaaag	aaagtggaga	ctgcagaaca	gactccgctg		Myr Exon 1	
	181	tggctgactg	tgccggccga	cgtccagct	gaggggctgg	gttggatttt	ttttttctcc			
	241	catcctctcg	ctctctcttt	taaagcgaca	ccagctctct	ctctctctct	actatctcgg			
	301	tatcaccaaa	cccttgccgg	ctcttatggg	catgaaacac	tcctcccgct	gcctgctcct			
	361	gaggaggaaa	atggcgggga	acgcggccga	gagcaccgag	ctttgctcca	gcggcagaaa			
	421	tcagagtttt	cagaggtctt	caggtccacc	tccacctcgg	gagtgcactc	caagtaatcc			
	481	agtcaaggca	gcagggacct	atcctgagcc	ccaaggagta	gctgcctcaa	ctttccttac			New exon detection
	541	acattcactc	cagttcctcg	ggcctccagc	tgataccaaag	taacatagaa	aaagtcaaga			
601	atcaagagcc	agaacccgtg	atcctgaccc	tgctgcagag	agttacacat	ctgaaaaagt				
661	gatgaaatga	tcccatctta	tctcagctg	taggcttacc	ccttaataaa	atggagacaa				
721	tgggcacgag	gactttaaga	gttgaacaga	ccccctcccc	agccccccca	gccccgtcgt				
E2R										
polylinker	781	cctgctaaga	cctgtccaatg	cgtccatcat	gtgtccagg	ggcgaattct	gcagatatcc	Exon2		
	841	atcacactgg	cggccgctcg	agcatgcata	tagagggccc	aattcgccct	atagtgaatc			
	901	gtattacaat	tcactggccg	tcgtttttaca	acgtcgtgat	tgggaaaaac	ctggcggttac			
	961	ccaaacttaat	cgccttgccg	cacatccccc	tttcgccagc	tggcgtaata	gcgagaggcc			
	1021	cgcaccgac	gcccctccca	acagttgcgc	agcctgaatg	gcgaatggac	gcgccttgta			
	1081	cggcccgcat	agccgcggcg	gtggtgggtga	ttacgcgcag	cgtgacgct	acactggcag			
	1141	cgcctaacgc	cgggtcctt	cgttttctcc	cttcgttcgc	ccagttcgcg	cttcccgta			
	1201	gcctaatcga	gggtccctag	gttcgattag	tgttttacgg	acctcgacca	aaccttgata			
	1261	gggttaggtt	cactaggggc	actaccgcac	gcac					

Παράρτημα Πινάκων

Πίνακας 1: Day2 upregulated genes

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Biological Process	GO:0048699	generation of neurons		1.28E-07	6.25E-04	6.25E-04	5.67E-03	76
GO: Biological Process	GO:0030182	neuron differentiation		3.37E-07	1.65E-03	8.26E-04	7.49E-03	70
GO: Biological Process	GO:0022008	neurogenesis		7.72E-07	3.79E-03	1.26E-03	1.15E-02	77
GO: Biological Process	GO:0048666	neuron development		2.42E-06	1.19E-02	2.97E-03	2.69E-02	57
GO: Cellular Component	GO:0097458	neuron part		1.29E-07	7.73E-05	7.73E-05	5.39E-04	76
GO: Cellular Component	GO:0043005	neuron projection		6.90E-06	4.13E-03	1.45E-03	1.01E-02	58
GO: Cellular Component	GO:0044297	cell body		9.26E-06	5.55E-03	1.45E-03	1.01E-02	39
GO: Cellular Component	GO:0043025	neuronal cell body		9.70E-06	5.81E-03	1.45E-03	1.01E-02	36
GO: Cellular Component	GO:0044463	cell projection part		2.86E-05	1.71E-02	2.77E-03	1.93E-02	54
GO: Cellular Component	GO:0036477	somatodendritic compartment		3.41E-05	2.04E-02	2.77E-03	1.93E-02	44
GO: Cellular Component	GO:0044456	synapse part		3.65E-05	2.18E-02	2.77E-03	1.93E-02	38
GO: Cellular Component	GO:0045202	synapse		3.70E-05	2.22E-02	2.77E-03	1.93E-02	44
GO: Cellular Component	GO:0032589	neuron projection membrane		4.15E-05	2.49E-02	2.77E-03	1.93E-02	8
GO: Cellular Component	GO:0097060	synaptic membrane		5.40E-05	3.23E-02	3.23E-03	2.26E-02	21
GO: Cellular Component	GO:0098589	membrane region		7.28E-05	4.36E-02	3.97E-03	2.77E-02	57
GO: Cellular Component	GO:0098590	plasma membrane region		8.15E-05	4.88E-02	4.07E-03	2.84E-02	49
Domain	IPR013032	EGF-like CS	InterPro	8.55E-06	2.14E-02	5.35E-03	4.50E-02	21
Domain	IPR000742	EGF-like_dom	InterPro	1.44E-05	3.60E-02	6.20E-03	5.21E-02	20
Domain	IPR033237	BRINP	InterPro	1.97E-05	4.92E-02	7.03E-03	5.91E-02	3
Domain	PS00022	EGF_1	PROSITE	4.47E-07	1.12E-03	5.60E-04	4.70E-03	23
Domain	PS01186	EGF_2	PROSITE	8.76E-07	2.19E-03	7.31E-04	6.14E-03	23
Domain	PS00010	ASX_HYDROXYL	PROSITE	1.49E-05	3.72E-02	6.20E-03	5.21E-02	12
Domain	SM00181	EGF	SMART	4.24E-07	1.06E-03	5.60E-04	4.70E-03	22
Transcription Factor Binding Site	AACTTT UNKNOWN	AACTTT UNKNOWN		3.97E-07	2.35E-04	2.35E-04	1.63E-03	83

Πίνακας 2: Day2, downregulated genes

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Molecular Function	GO:0003735	structural constituent of ribosome		5.68E-10	5.28E-07	5.28E-07	3.91E-06	21
GO: Molecular Function	GO:0003723	RNA binding		4.67E-09	4.34E-06	2.17E-06	1.61E-05	64
GO: Biological Process	GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis		9.73E-12	3.98E-08	3.98E-08	3.54E-07	34
GO: Biological Process	GO:0042254	ribosome biogenesis		5.97E-11	2.44E-07	1.22E-07	1.09E-06	27
GO: Biological Process	GO:0043604	amide biosynthetic process		1.34E-10	5.48E-07	1.57E-07	1.40E-06	43
GO: Biological Process	GO:0043043	peptide biosynthetic process		1.84E-10	7.53E-07	1.57E-07	1.40E-06	40
GO: Biological Process	GO:0006412	Translation		1.92E-10	7.86E-07	1.57E-07	1.40E-06	39
GO: Biological Process	GO:0034660	ncRNA metabolic process		3.48E-10	1.42E-06	2.37E-07	2.11E-06	35
GO: Biological Process	GO:0006364	rRNA processing		5.76E-10	2.35E-06	3.36E-07	2.99E-06	23
GO: Biological Process	GO:0016072	rRNA metabolic process		9.70E-10	3.96E-06	4.95E-07	4.41E-06	23
GO: Biological Process	GO:0034470	ncRNA processing		1.56E-09	6.39E-06	6.93E-07	6.16E-06	28
GO: Biological Process	GO:0006518	peptide metabolic process		1.70E-09	6.93E-06	6.93E-07	6.16E-06	43
GO: Biological Process	GO:0043603	cellular amide metabolic process		2.32E-09	9.47E-06	8.61E-07	7.66E-06	48
GO: Biological Process	GO:0070125	mitochondrial translational elongation		5.01E-09	2.05E-05	1.65E-06	1.47E-05	13
GO: Biological Process	GO:0006396	RNA processing		5.25E-09	2.14E-05	1.65E-06	1.47E-05	44
GO: Biological Process	GO:0000956	nuclear-transcribed mRNA catabolic process		3.97E-08	1.62E-04	1.16E-05	1.03E-04	18
GO: Biological Process	GO:0032543	mitochondrial translation		4.57E-08	1.87E-04	1.24E-05	1.11E-04	14
GO: Biological Process	GO:0070126	mitochondrial translational termination		5.67E-08	2.32E-04	1.45E-05	1.29E-04	12
GO: Biological Process	GO:0016071	mRNA metabolic process		7.99E-08	3.26E-04	1.82E-05	1.62E-04	34
GO: Biological Process	GO:1901566	organonitrogen compound biosynthetic process		8.03E-08	3.28E-04	1.82E-05	1.62E-04	56
GO: Biological Process	GO:0006402	mRNA catabolic process		1.27E-07	5.19E-04	2.73E-05	2.43E-04	18

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Biological Process	GO:0006414	translational elongation		1.85E-07	7.55E-04	3.78E-05	3.36E-04	14
GO: Biological Process	GO:0006415	translational termination		2.77E-07	1.13E-03	5.38E-05	4.79E-04	12
GO: Biological Process	GO:0006401	RNA catabolic process		8.10E-07	3.31E-03	1.50E-04	1.34E-03	18
GO: Biological Process	GO:0007005	mitochondrion organization		2.18E-06	8.89E-03	3.87E-04	3.44E-03	34
GO: Biological Process	GO:0042770	signal transduction in response to DNA damage		2.66E-06	1.09E-02	4.53E-04	4.03E-03	12
GO: Biological Process	GO:0034655	nucleobase-containing compound catabolic process		3.35E-06	1.37E-02	5.47E-04	4.87E-03	23
GO: Biological Process	GO:0030330	DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator		4.95E-06	2.02E-02	7.77E-04	6.91E-03	11
GO: Biological Process	GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly		7.64E-06	3.12E-02	1.16E-03	1.03E-02	15
GO: Biological Process	GO:0042255	ribosome assembly		9.19E-06	3.75E-02	1.34E-03	1.19E-02	8
GO: Biological Process	GO:0000278	mitotic cell cycle		1.18E-05	4.82E-02	1.63E-03	1.45E-02	39
GO: Biological Process	GO:0042273	ribosomal large subunit biogenesis		1.19E-05	4.88E-02	1.63E-03	1.45E-02	8
GO: Cellular Component	GO:0044391	ribosomal subunit		1.70E-13	8.49E-11	8.49E-11	5.76E-10	23
GO: Cellular Component	GO:0005840	ribosome		1.89E-12	9.43E-10	4.71E-10	3.20E-09	25
GO: Cellular Component	GO:1990904	ribonucleoprotein complex		1.26E-10	6.31E-08	1.58E-08	1.07E-07	42
GO: Cellular Component	GO:0030529	intracellular ribonucleoprotein complex		1.26E-10	6.31E-08	1.58E-08	1.07E-07	42
GO: Cellular Component	GO:0015934	large ribosomal subunit		9.11E-10	4.54E-07	9.09E-08	6.17E-07	15
GO: Cellular Component	GO:0005730	nucleolus		2.81E-09	1.40E-06	2.34E-07	1.59E-06	44
GO: Cellular Component	GO:0044429	mitochondrial part		5.76E-08	2.87E-05	4.10E-06	2.79E-05	44
GO: Cellular Component	GO:0022626	cytosolic ribosome		3.13E-07	1.56E-04	1.95E-05	1.32E-04	13
GO: Cellular Component	GO:0005739	mitochondrion		6.03E-07	3.01E-04	3.34E-05	2.27E-04	62
GO: Cellular Component	GO:0031966	mitochondrial membrane		7.24E-07	3.62E-04	3.62E-05	2.46E-04	33
GO: Cellular Component	GO:0005740	mitochondrial envelope		9.38E-07	4.68E-04	4.18E-05	2.84E-04	34

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Cellular Component	GO:0031967	organelle envelope		1.01E-06	5.02E-04	4.18E-05	2.84E-04	46
GO: Cellular Component	GO:0031975	envelope		1.13E-06	5.64E-04	4.34E-05	2.95E-04	46
GO: Cellular Component	GO:0005759	mitochondrial matrix		1.37E-06	6.85E-04	4.89E-05	3.32E-04	24
GO: Cellular Component	GO:0000313	organelle ribosome		1.89E-06	9.42E-04	5.89E-05	4.00E-04	10
GO: Cellular Component	GO:0005761	mitochondrial ribosome		1.89E-06	9.42E-04	5.89E-05	4.00E-04	10
GO: Cellular Component	GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit		3.76E-06	1.87E-03	1.10E-04	7.49E-04	9
GO: Cellular Component	GO:0044445	cytosolic part		8.23E-06	4.10E-03	2.28E-04	1.55E-03	16
GO: Cellular Component	GO:0005743	mitochondrial inner membrane		9.09E-06	4.53E-03	2.39E-04	1.62E-03	25
GO: Cellular Component	GO:0019866	organelle inner membrane		1.94E-05	9.70E-03	4.85E-04	3.29E-03	26
GO: Cellular Component	GO:0015935	small ribosomal subunit		5.34E-05	2.67E-02	1.18E-03	8.03E-03	8
GO: Cellular Component	GO:0005762	mitochondrial large ribosomal subunit		5.45E-05	2.72E-02	1.18E-03	8.03E-03	6
GO: Cellular Component	GO:0000315	organelle large ribosomal subunit		5.45E-05	2.72E-02	1.18E-03	8.03E-03	6
Mouse Phenotype	MP:0008942	abnormal induced cell death		5.59E-06	1.67E-02	1.67E-02	1.44E-01	17
Domain	IPR026768	FAM72	InterPro	2.44E-05	4.66E-02	2.33E-02	1.89E-01	3
Domain	PF14976	FAM72	Pfam	2.44E-05	4.66E-02	2.33E-02	1.89E-01	3
Pathway	83036	Ribosome	BioSystems: KEGG	4.56E-11	6.73E-08	4.93E-08	3.88E-07	19
Pathway	1059538	Central carbon metabolism in cancer	BioSystems: KEGG	2.23E-05	3.29E-02	1.22E-03	9.58E-03	8
Pathway	169351	Validated targets of C-MYC transcriptional activation	BioSystems: Pathway Interaction Database	2.02E-06	2.98E-03	3.03E-04	2.38E-03	10
Pathway	1269649	Gene Expression	BioSystems: REACTOME	6.69E-11	9.86E-08	4.93E-08	3.88E-07	72
Pathway	1268844	Mitochondrial translation elongation	BioSystems: REACTOME	7.22E-09	1.07E-05	3.55E-06	2.79E-05	13
Pathway	1268842	Mitochondrial translation	BioSystems: REACTOME	1.63E-08	2.40E-05	6.00E-06	4.72E-05	13
Pathway	1268843	Mitochondrial translation initiation	BioSystems: REACTOME	6.11E-08	9.02E-05	1.50E-05	1.18E-04	12
Pathway	1268845	Mitochondrial translation termination	BioSystems: REACTOME	6.11E-08	9.02E-05	1.50E-05	1.18E-04	12
Pathway	1268689	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	BioSystems: REACTOME	1.31E-06	1.93E-03	2.75E-04	2.17E-03	12

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
Pathway	1269717	Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)	BioSystems: REACTOME	2.05E-06	3.03E-03	3.03E-04	2.38E-03	12
Pathway	1269716	Nonsense-Mediated Decay (NMD)	BioSystems: REACTOME	2.05E-06	3.03E-03	3.03E-04	2.38E-03	12
Pathway	1427846	rRNA processing in the nucleus and cytosol	BioSystems: REACTOME	2.45E-06	3.62E-03	3.29E-04	2.59E-03	15
Pathway	1383085	rRNA processing	BioSystems: REACTOME	4.58E-06	6.76E-03	5.63E-04	4.44E-03	15
Pathway	1383086	Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol	BioSystems: REACTOME	5.66E-06	8.34E-03	6.42E-04	5.05E-03	14
Pathway	1269120	Viral mRNA Translation	BioSystems: REACTOME	7.17E-06	1.06E-02	7.05E-04	5.55E-03	10
Pathway	1268691	Peptide chain elongation	BioSystems: REACTOME	7.17E-06	1.06E-02	7.05E-04	5.55E-03	10
Pathway	1339156	Selenocysteine synthesis	BioSystems: REACTOME	9.55E-06	1.41E-02	8.03E-04	6.32E-03	10
Pathway	1268678	Translation	BioSystems: REACTOME	1.01E-05	1.48E-02	8.03E-04	6.32E-03	13
Pathway	1268692	Eukaryotic Translation Termination	BioSystems: REACTOME	1.05E-05	1.55E-02	8.03E-04	6.32E-03	10
Pathway	1268686	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	BioSystems: REACTOME	1.09E-05	1.61E-02	8.03E-04	6.32E-03	11
Pathway	1268688	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	BioSystems: REACTOME	1.09E-05	1.61E-02	8.03E-04	6.32E-03	11
Pathway	1268690	Eukaryotic Translation Elongation	BioSystems: REACTOME	1.15E-05	1.69E-02	8.07E-04	6.35E-03	10
Pathway	1270158	Metabolism of amino acids and derivatives	BioSystems: REACTOME	1.27E-05	1.88E-02	8.53E-04	6.72E-03	20
Pathway	1269718	Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC)	BioSystems: REACTOME	1.38E-05	2.03E-02	8.82E-04	6.94E-03	10
Pathway	1339149	Selenoamino acid metabolism	BioSystems: REACTOME	1.49E-05	2.20E-02	9.17E-04	7.22E-03	11
Pathway	1268679	Eukaryotic Translation Initiation	BioSystems: REACTOME	2.02E-05	2.98E-02	1.15E-03	9.03E-03	11
Pathway	1268680	Cap-dependent Translation Initiation	BioSystems: REACTOME	2.02E-05	2.98E-02	1.15E-03	9.03E-03	11
Pathway	1268681	Formation of a pool of free 40S subunits	BioSystems: REACTOME	2.50E-05	3.68E-02	1.32E-03	1.04E-02	10
Transcription Factor Binding Site	CACGTG V\$MYC_Q2	CACGTG V\$MYC_Q2		1.16E-06	6.57E-04	6.57E-04	4.55E-03	37
Transcription Factor Binding Site	V\$MYCMAX_01	V\$MYCMAX_01		2.14E-05	1.21E-02	6.07E-03	4.20E-02	15

Πίνακας 3: Day4, downregulated genes

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Molecular Function	GO:0000982	transcription factor activity, RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding		7.08E-07	5.10E-04	4.95E-04	3.54E-03	16
GO: Molecular Function	GO:0008134	transcription factor binding		1.38E-06	9.90E-04	4.95E-04	3.54E-03	20
GO: Molecular Function	GO:0001078	transcriptional repressor activity, RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding		1.73E-05	1.25E-02	4.16E-03	2.98E-02	8
GO: Molecular Function	GO:0000981	RNA polymerase II transcription factor activity, sequence-specific DNA binding		4.03E-05	2.90E-02	4.70E-03	3.36E-02	19
GO: Molecular Function	GO:0044212	transcription regulatory region DNA binding		4.12E-05	2.97E-02	4.70E-03	3.36E-02	22
GO: Molecular Function	GO:0000987	proximal promoter sequence-specific DNA binding		4.24E-05	3.05E-02	4.70E-03	3.36E-02	14
GO: Molecular Function	GO:0001067	regulatory region nucleic acid binding		4.57E-05	3.29E-02	4.70E-03	3.36E-02	22
GO: Molecular Function	GO:0000977	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding		5.36E-05	3.86E-02	4.82E-03	3.45E-02	18
GO: Molecular Function	GO:0001012	RNA polymerase II regulatory region DNA binding		6.05E-05	4.35E-02	4.84E-03	3.46E-02	18
GO: Biological Process	GO:0045595	regulation of cell differentiation		3.26E-09	1.24E-05	1.24E-05	1.09E-04	44
GO: Biological Process	GO:0022008	neurogenesis		9.14E-09	3.47E-05	1.74E-05	1.53E-04	42
GO: Biological Process	GO:0009719	response to endogenous stimulus		2.06E-08	7.83E-05	2.11E-05	1.86E-04	43
GO: Biological Process	GO:0016477	cell migration		2.23E-08	8.45E-05	2.11E-05	1.86E-04	36
GO: Biological Process	GO:0048699	generation of neurons		4.68E-08	1.78E-04	2.91E-05	2.57E-04	39
GO: Biological Process	GO:0014070	response to organic cyclic compound		5.39E-08	2.05E-04	2.91E-05	2.57E-04	31
GO: Biological Process	GO:0040011	locomotion		5.64E-08	2.14E-04	2.91E-05	2.57E-04	42
GO: Biological Process	GO:0045444	fat cell differentiation		6.64E-08	2.52E-04	2.91E-05	2.57E-04	14
GO: Biological Process	GO:0006928	movement of cell or subcellular component		6.89E-08	2.62E-04	2.91E-05	2.57E-04	44

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Biological Process	GO:0051960	regulation of nervous system development		2.29E-07	8.70E-04	7.36E-05	6.49E-04	27
GO: Biological Process	GO:0048870	cell motility		2.32E-07	8.83E-04	7.36E-05	6.49E-04	36
GO: Biological Process	GO:0051674	localization of cell		2.32E-07	8.83E-04	7.36E-05	6.49E-04	36
GO: Biological Process	GO:0009790	embryo development		3.36E-07	1.28E-03	9.80E-05	8.65E-04	31
GO: Biological Process	GO:0030182	neuron differentiation		4.16E-07	1.58E-03	1.08E-04	9.53E-04	35
GO: Biological Process	GO:0045598	regulation of fat cell differentiation		4.27E-07	1.62E-03	1.08E-04	9.53E-04	10
GO: Biological Process	GO:0051093	negative regulation of developmental process		4.72E-07	1.79E-03	1.12E-04	9.89E-04	27
GO: Biological Process	GO:1901700	response to oxygen-containing compound		5.64E-07	2.14E-03	1.26E-04	1.11E-03	38
GO: Biological Process	GO:2000026	regulation of multicellular organismal development		6.14E-07	2.33E-03	1.30E-04	1.14E-03	42
GO: Biological Process	GO:0050767	regulation of neurogenesis		1.17E-06	4.46E-03	2.35E-04	2.07E-03	24
GO: Biological Process	GO:0045596	negative regulation of cell differentiation		1.93E-06	7.33E-03	3.67E-04	3.23E-03	22
GO: Biological Process	GO:0048666	neuron development		2.22E-06	8.43E-03	3.97E-04	3.51E-03	29
GO: Biological Process	GO:0072359	circulatory system development		2.48E-06	9.41E-03	3.97E-04	3.51E-03	28
GO: Biological Process	GO:0072358	cardiovascular system development		2.48E-06	9.41E-03	3.97E-04	3.51E-03	28
GO: Biological Process	GO:0009887	animal organ morphogenesis		2.51E-06	9.54E-03	3.97E-04	3.51E-03	29
GO: Biological Process	GO:0000904	cell morphogenesis involved in differentiation		3.87E-06	1.47E-02	5.71E-04	5.04E-03	24
GO: Biological Process	GO:0033993	response to lipid		4.03E-06	1.53E-02	5.71E-04	5.04E-03	27
GO: Biological Process	GO:0071495	cellular response to endogenous stimulus		4.09E-06	1.55E-02	5.71E-04	5.04E-03	31
GO: Biological Process	GO:0045667	regulation of osteoblast differentiation		4.21E-06	1.60E-02	5.71E-04	5.04E-03	9
GO: Biological Process	GO:0045668	negative regulation of osteoblast differentiation		4.86E-06	1.85E-02	6.37E-04	5.62E-03	6

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Biological Process	GO:0060284	regulation of cell development		6.19E-06	2.35E-02	7.83E-04	6.91E-03	26
GO: Biological Process	GO:0042127	regulation of cell proliferation		8.45E-06	3.21E-02	1.04E-03	9.13E-03	36
GO: Biological Process	GO:0001568	blood vessel development		9.26E-06	3.52E-02	1.10E-03	9.69E-03	20
GO: Biological Process	GO:0045664	regulation of neuron differentiation		1.01E-05	3.85E-02	1.17E-03	1.03E-02	20
GO: Biological Process	GO:0031175	neuron projection development		1.06E-05	4.01E-02	1.18E-03	1.04E-02	25
GO: Cellular Component	GO:0005667	transcription factor complex		3.69E-06	1.35E-03	1.35E-03	8.78E-03	15
Domain	IPR001791	Laminin_G	InterPro	1.85E-06	2.40E-03	2.40E-03	1.86E-02	7
Domain	PS50025	LAM_G_DOMAIN	PROSITE	3.80E-05	4.93E-02	2.46E-02	1.91E-01	5
Pathway	1269916	Amino acid transport across the plasma membrane	BioSystems: REACTOME	1.75E-05	1.88E-02	1.88E-02	1.42E-01	5
Transcription Factor Binding Site	AACTTT_UNKNOWN	AACTTT_UNKNOWN		2.37E-07	1.33E-04	1.33E-04	9.19E-04	41
Transcription Factor Binding Site	V\$PAX4_04	V\$PAX4_04		4.17E-05	2.34E-02	1.17E-02	8.08E-02	10

Πίνακας 4: Day4, upregulated genes

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Biological Process	GO:0006695	cholesterol biosynthetic process		6.82E-07	2.28E-03	1.14E-03	9.91E-03	7
GO: Biological Process	GO:1902653	secondary alcohol biosynthetic process		6.82E-07	2.28E-03	1.14E-03	9.91E-03	7
GO: Biological Process	GO:0016126	sterol biosynthetic process		1.31E-06	4.38E-03	1.46E-03	1.27E-02	7
GO: Biological Process	GO:0006694	steroid biosynthetic process		8.31E-06	2.78E-02	6.95E-03	6.04E-02	10
GO: Biological Process	GO:0023057	negative regulation of signaling		1.49E-05	4.99E-02	9.99E-03	8.68E-02	30
GO: Cellular Component	GO:0097458	neuron part		3.15E-06	1.04E-03	9.51E-04	6.06E-03	35
GO: Cellular Component	GO:0044456	synapse part		7.76E-06	2.56E-03	9.51E-04	6.06E-03	21
GO: Cellular Component	GO:0070382	exocytic vesicle		8.64E-06	2.85E-03	9.51E-04	6.06E-03	10
GO: Cellular Component	GO:0099503	secretory vesicle		2.52E-05	8.32E-03	1.46E-03	9.32E-03	17
GO: Cellular Component	GO:0030658	transport vesicle membrane		2.89E-05	9.53E-03	1.46E-03	9.32E-03	9
GO: Cellular Component	GO:0030672	synaptic vesicle membrane		3.10E-05	1.02E-02	1.46E-03	9.32E-03	6
GO: Cellular Component	GO:0099501	exocytic vesicle membrane		3.10E-05	1.02E-02	1.46E-03	9.32E-03	6
GO: Cellular Component	GO:0045202	synapse		5.39E-05	1.78E-02	2.22E-03	1.42E-02	22
Mouse Phenotype	MP:0010980	ectopic ureteric bud		1.32E-05	4.33E-02	4.33E-02	3.76E-01	4
Pathway	142269	superpathway of cholesterol biosynthesis	BioSystems: BIOCYC	3.34E-06	3.22E-03	7.30E-04	5.43E-03	5
Pathway	142266	cholesterol biosynthesis II (via 24,25-dihydrolanosterol)	BioSystems: BIOCYC	5.31E-06	5.11E-03	7.30E-04	5.43E-03	4
Pathway	142267	cholesterol biosynthesis I	BioSystems: BIOCYC	5.31E-06	5.11E-03	7.30E-04	5.43E-03	4
Pathway	142268	cholesterol biosynthesis III (via desmosterol)	BioSystems: BIOCYC	5.31E-06	5.11E-03	7.30E-04	5.43E-03	4
Pathway	545317	zymosterol biosynthesis	BioSystems: BIOCYC	1.67E-05	1.60E-02	2.01E-03	1.49E-02	3
Pathway	413390	Cholesterol biosynthesis, squalene 2,3-epoxide => cholesterol	BioSystems: KEGG	2.49E-06	2.39E-03	7.30E-04	5.43E-03	4
Pathway	82937	Steroid biosynthesis	BioSystems: KEGG	3.42E-05	3.29E-02	3.29E-03	2.45E-02	4
Pathway	1492886	Apelin signaling pathway	BioSystems: KEGG	5.19E-05	4.99E-02	4.23E-03	3.15E-02	8
Pathway	1270037	Cholesterol biosynthesis	BioSystems: REACTOME	2.70E-06	2.59E-03	7.30E-04	5.43E-03	5
Pathway	1269342	Prostacyclin signalling through prostacyclin receptor	BioSystems: REACTOME	2.75E-05	2.65E-02	2.94E-03	2.19E-02	4

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
Pathway Transcription Factor Binding Site	SMP00023	Steroid Biosynthesis	SMPDB	1.32E-06	1.27E-03	7.30E-04	5.43E-03	5
	CAGGTG V\$E12 Q6	CAGGTG V\$E12 Q6		8.18E-06	4.45E-03	4.45E-03	3.06E-02	45

Πίνακας 5: Day8, upregulated genes

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Molecular Function	GO:0005102	signaling receptor binding		8.09E-07	7.56E-04	7.30E-04	5.41E-03	62
GO: Molecular Function	GO:0005509	calcium ion binding		1.56E-06	1.46E-03	7.30E-04	5.41E-03	35
GO: Molecular Function	GO:0004653	polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase activity		3.25E-05	3.04E-02	1.01E-02	7.52E-02	5
GO: Molecular Function	GO:0005539	glycosaminoglycan binding		4.95E-05	4.62E-02	1.16E-02	8.57E-02	15
GO: Biological Process	GO:0051240	positive regulation of multicellular organismal process		1.20E-11	5.83E-08	5.83E-08	5.29E-07	75
GO: Biological Process	GO:0048699	generation of neurons		3.68E-10	1.79E-06	6.51E-07	5.90E-06	69
GO: Biological Process	GO:0030182	neuron differentiation		4.01E-10	1.95E-06	6.51E-07	5.90E-06	65
GO: Biological Process	GO:0022008	Neurogenesis		8.85E-10	4.31E-06	1.08E-06	9.76E-06	71
GO: Biological Process	GO:2000026	regulation of multicellular organismal development		3.49E-09	1.70E-05	3.40E-06	3.08E-05	77
GO: Biological Process	GO:0051270	regulation of cellular component movement		8.81E-09	4.29E-05	6.34E-06	5.75E-05	45
GO: Biological Process	GO:0007167	enzyme linked receptor protein signaling pathway		9.12E-09	4.44E-05	6.34E-06	5.75E-05	50
GO: Biological Process	GO:0007155	cell adhesion		1.46E-08	7.10E-05	8.87E-06	8.04E-05	65
GO: Biological Process	GO:0022610	biological adhesion		1.97E-08	9.58E-05	9.96E-06	9.03E-05	65
GO: Biological Process	GO:2000145	regulation of cell motility		2.05E-08	9.96E-05	9.96E-06	9.03E-05	42
GO: Biological Process	GO:0030334	regulation of cell migration		2.82E-08	1.37E-04	1.25E-05	1.13E-04	40
GO: Biological Process	GO:0072359	circulatory system development		3.34E-08	1.63E-04	1.25E-05	1.13E-04	50
GO: Biological Process	GO:0072358	cardiovascular system development		3.34E-08	1.63E-04	1.25E-05	1.13E-04	50
GO: Biological Process	GO:0048666	neuron development		6.60E-08	3.21E-04	2.29E-05	2.08E-04	51
GO: Biological Process	GO:0030030	cell projection organization		7.54E-08	3.67E-04	2.45E-05	2.22E-04	60
GO: Biological Process	GO:0040012	regulation of locomotion		8.61E-08	4.19E-04	2.62E-05	2.37E-04	43
GO: Biological Process	GO:0007417	central nervous system development		2.88E-07	1.40E-03	8.25E-05	7.48E-04	46
GO: Biological Process	GO:0048870	cell motility		4.48E-07	2.18E-03	1.15E-04	1.04E-03	58
GO: Biological Process	GO:0051674	localization of cell		4.48E-07	2.18E-03	1.15E-04	1.04E-03	58

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Biological Process	GO:0016477	cell migration		5.94E-07	2.89E-03	1.45E-04	1.31E-03	54
GO: Biological Process	GO:0031175	neuron projection development		1.15E-06	5.59E-03	2.66E-04	2.42E-03	43
GO: Biological Process	GO:1902531	regulation of intracellular signal transduction		1.69E-06	8.22E-03	3.74E-04	3.39E-03	66
GO: Biological Process	GO:0051962	positive regulation of nervous system development		1.93E-06	9.40E-03	4.09E-04	3.70E-03	29
GO: Biological Process	GO:0051094	positive regulation of developmental process		2.27E-06	1.10E-02	4.53E-04	4.11E-03	53
GO: Biological Process	GO:0051960	regulation of nervous system development		2.40E-06	1.17E-02	4.53E-04	4.11E-03	40
GO: Biological Process	GO:0050767	regulation of neurogenesis		2.42E-06	1.18E-02	4.53E-04	4.11E-03	37
GO: Biological Process	GO:0007420	brain development		2.64E-06	1.29E-02	4.64E-04	4.21E-03	36
GO: Biological Process	GO:0060284	regulation of cell development		2.70E-06	1.31E-02	4.64E-04	4.21E-03	43
GO: Biological Process	GO:0006928	movement of cell or subcellular component		2.76E-06	1.35E-02	4.64E-04	4.21E-03	68
GO: Biological Process	GO:0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway		3.40E-06	1.66E-02	5.52E-04	5.01E-03	34
GO: Biological Process	GO:0099537	trans-synaptic signaling		4.57E-06	2.22E-02	6.73E-04	6.11E-03	33
GO: Biological Process	GO:0007268	chemical synaptic transmission		4.57E-06	2.22E-02	6.73E-04	6.11E-03	33
GO: Biological Process	GO:0098916	anterograde trans-synaptic signaling		4.57E-06	2.22E-02	6.73E-04	6.11E-03	33
GO: Biological Process	GO:0040011	locomotion		5.88E-06	2.86E-02	8.13E-04	7.37E-03	63
GO: Biological Process	GO:0099536	synaptic signaling		6.02E-06	2.93E-02	8.13E-04	7.37E-03	33
GO: Biological Process	GO:0045595	regulation of cell differentiation		6.04E-06	2.94E-02	8.13E-04	7.37E-03	62
GO: Biological Process	GO:0031344	regulation of cell projection organization		6.31E-06	3.07E-02	8.13E-04	7.37E-03	32
GO: Biological Process	GO:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis		6.34E-06	3.09E-02	8.13E-04	7.37E-03	51
GO: Biological Process	GO:0048585	negative regulation of response to stimulus		6.55E-06	3.19E-02	8.18E-04	7.42E-03	57
GO: Biological Process	GO:0023057	negative regulation of signaling		8.18E-06	3.98E-02	9.96E-04	9.03E-03	51
GO: Biological Process	GO:0070848	response to growth factor		9.68E-06	4.71E-02	1.15E-03	1.04E-02	32
GO: Biological Process	GO:0060322	head development		1.01E-05	4.92E-02	1.17E-03	1.06E-02	36

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Cellular Component	GO:0097458	neuron part		3.55E-14	1.56E-11	1.56E-11	1.04E-10	78
GO: Cellular Component	GO:0045202	Synapse		3.13E-10	1.38E-07	6.88E-08	4.58E-07	48
GO: Cellular Component	GO:0043005	neuron projection		5.14E-10	2.26E-07	7.54E-08	5.03E-07	58
GO: Cellular Component	GO:0044456	synapse part		1.70E-09	7.48E-07	1.87E-07	1.25E-06	41
GO: Cellular Component	GO:0097060	synaptic membrane		1.11E-08	4.87E-06	9.73E-07	6.49E-06	24
GO: Cellular Component	GO:0098794	Postsynapse		4.60E-08	2.03E-05	3.38E-06	2.25E-05	29
GO: Cellular Component	GO:0036477	somatodendritic compartment		6.29E-08	2.77E-05	3.96E-06	2.64E-05	43
GO: Cellular Component	GO:0005615	extracellular space		9.25E-08	4.07E-05	5.09E-06	3.39E-05	60
GO: Cellular Component	GO:0030425	Dendrite		1.62E-07	7.12E-05	7.91E-06	5.27E-05	33
GO: Cellular Component	GO:0098590	plasma membrane region		5.96E-07	2.62E-04	2.62E-05	1.75E-04	46
GO: Cellular Component	GO:0098589	membrane region		9.77E-07	4.30E-04	3.91E-05	2.61E-04	52
GO: Cellular Component	GO:0044463	cell projection part		1.28E-06	5.65E-04	4.70E-05	3.14E-04	48
GO: Cellular Component	GO:0030054	cell junction		2.40E-06	1.06E-03	8.12E-05	5.41E-04	49
GO: Cellular Component	GO:0045211	postsynaptic membrane		3.75E-06	1.65E-03	1.18E-04	7.85E-04	17
GO: Cellular Component	GO:0031226	intrinsic component of plasma membrane		1.08E-05	4.74E-03	3.16E-04	2.11E-03	61
GO: Cellular Component	GO:0005887	integral component of plasma membrane		1.36E-05	5.98E-03	3.74E-04	2.49E-03	59
GO: Cellular Component	GO:0043025	neuronal cell body		2.58E-05	1.13E-02	6.67E-04	4.45E-03	29
GO: Cellular Component	GO:0044297	cell body		3.41E-05	1.50E-02	8.33E-04	5.55E-03	31
GO: Cellular Component	GO:0031012	extracellular matrix		4.25E-05	1.87E-02	9.83E-04	6.56E-03	23
GO: Cellular Component	GO:0043197	dendritic spine		6.15E-05	2.71E-02	1.33E-03	8.88E-03	12
GO: Cellular Component	GO:0090665	glycoprotein complex		6.66E-05	2.93E-02	1.33E-03	8.88E-03	5
GO: Cellular Component	GO:0016010	dystrophin-associated glycoprotein complex		6.66E-05	2.93E-02	1.33E-03	8.88E-03	5
GO: Cellular Component	GO:0044309	neuron spine		6.99E-05	3.07E-02	1.34E-03	8.91E-03	12
GO: Cellular Component	GO:0005578	proteinaceous extracellular matrix		1.04E-04	4.58E-02	1.91E-03	1.27E-02	20
Domain	2.60.40.10	-	Gene3D	8.33E-06	1.70E-02	1.51E-03	1.24E-02	32
Domain	2.60.40.60	-	Gene3D	2.43E-05	4.97E-02	2.86E-03	2.35E-02	11

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
Domain	IPR009030	Growth_fac_rept_	InterPro	8.68E-07	1.77E-03	4.86E-04	3.98E-03	15
Domain	IPR000742	EGF-like_dom	InterPro	1.19E-06	2.43E-03	4.86E-04	3.98E-03	19
Domain	IPR000152	EGF-type_Asp/Asn_hydroxyl_site	InterPro	1.95E-06	3.99E-03	6.10E-04	5.00E-03	12
Domain	IPR013032	EGF-like_CS	InterPro	2.39E-06	4.88E-03	6.10E-04	5.00E-03	19
Domain	IPR018097	EGF_Ca-bd_CS	InterPro	5.14E-06	1.05E-02	1.17E-03	9.57E-03	11
Domain	PS00022	EGF_1	PROSITE	9.02E-08	1.84E-04	1.76E-04	1.44E-03	21
Domain	PS01186	EGF_2	PROSITE	1.73E-07	3.52E-04	1.76E-04	1.44E-03	21
Domain	PS00010	ASX_HYDROXYL	PROSITE	1.04E-06	2.13E-03	4.86E-04	3.98E-03	12
Domain	PS01187	EGF_CA	PROSITE	6.28E-06	1.28E-02	1.28E-03	1.05E-02	11
Domain	PS50026	EGF_3	PROSITE	8.86E-06	1.81E-02	1.51E-03	1.24E-02	17
Domain	PS50268	CADHERIN_2	PROSITE	2.43E-05	4.97E-02	2.86E-03	2.35E-02	11
Domain	PF00008	EGF	Pfam	1.19E-05	2.44E-02	1.88E-03	1.54E-02	12
Domain	PF00028	Cadherin	Pfam	2.24E-05	4.57E-02	2.86E-03	2.35E-02	11
Domain	SM00181	EGF	SMART	2.16E-06	4.41E-03	6.10E-04	5.00E-03	18
Pathway	M5884	Ensemble of genes encoding core extracellular matrix including ECM glycoproteins, collagens and proteoglycans	MSigDB C2 BIOcARTA (v6.0)	1.25E-09	1.75E-06	1.03E-06	8.02E-06	25
		Genes encoding structural ECM glycoproteins	MSigDB C2 BIOcARTA (v6.0)	1.47E-09	2.05E-06	1.03E-06	8.02E-06	21
Pathway	M5889	Ensemble of genes encoding extracellular matrix-associated proteins	MSigDB C2 BIOcARTA (v6.0)	4.90E-09	6.85E-06	2.28E-06	1.78E-05	52
Transcription Factor Binding Site	AAC1TT_UNKNOWN	AAC1TT_UNKNOWN		2.03E-12	1.18E-09	1.18E-09	8.20E-09	87
Transcription Factor Binding Site	CTTTGA_V\$LEF1_Q2	CTTTGA_V\$LEF1_Q2		4.89E-08	2.85E-05	1.42E-05	9.89E-05	56
Transcription Factor Binding Site	CAGGTG_V\$E12_Q6	CAGGTG_V\$E12_Q6		1.29E-07	7.49E-05	2.50E-05	1.73E-04	89
Transcription Factor Binding Site	TTANTCA_UNKNOWN	TTANTCA_UNKNOWN		4.78E-07	2.79E-04	6.96E-05	4.84E-04	45
Transcription Factor Binding Site	TGGA AAA_V\$NFAT_Q4_Q1	TGGA AAA_V\$NFAT_Q4_Q1		3.91E-06	2.28E-03	3.93E-04	2.73E-03	69

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
Transcription Factor Binding Site	V\$FOXJ2_02	V\$FOXJ2_02		4.05E-06	2.36E-03	3.93E-04	2.73E-03	18
Transcription Factor Binding Site	V\$NKKX25_02	V\$NKKX25_02		1.25E-05	7.31E-03	1.04E-03	7.25E-03	18
Transcription Factor Binding Site	V\$OCT1_Q6	V\$OCT1_Q6		1.86E-05	1.08E-02	1.35E-03	9.40E-03	18
Transcription Factor Binding Site	YCATTAA_UNKNOWN	YCATTAA_UNKNOWN		2.21E-05	1.29E-02	1.43E-03	9.94E-03	29
Transcription Factor Binding Site	V\$HNF6_Q6	V\$HNF6_Q6		2.75E-05	1.60E-02	1.60E-03	1.11E-02	17
Transcription Factor Binding Site	V\$OCT1_02	V\$OCT1_02		3.56E-05	2.07E-02	1.78E-03	1.23E-02	16
Transcription Factor Binding Site	TGATTTRY_V\$GFII_01	TGATTTRY_V\$GFII_01		3.66E-05	2.13E-02	1.78E-03	1.23E-02	19
Transcription Factor Binding Site	V\$FOXMI_01	V\$FOXMI_01		5.16E-05	3.01E-02	2.16E-03	1.50E-02	17
Transcription Factor Binding Site	GGATTA_V\$PTX2_Q2	GGATTA_V\$PTX2_Q2		5.18E-05	3.02E-02	2.16E-03	1.50E-02	29

Πίνακας 6: Day8, downregulated genes

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Molecular Function	GO:0019843	rRNA binding		1.08E-05	8.13E-03	8.13E-03	5.85E-02	7
GO: Biological Process	GO:0030182	neuron differentiation		1.92E-09	7.63E-06	5.76E-06	5.10E-05	43
GO: Biological Process	GO:0048699	generation of neurons		2.90E-09	1.15E-05	5.76E-06	5.10E-05	45
GO: Biological Process	GO:0022008	Neurogenesis		6.81E-09	2.71E-05	9.02E-06	7.99E-05	46
GO: Biological Process	GO:0031175	neuron projection development		1.21E-08	4.79E-05	1.14E-05	1.01E-04	33
GO: Biological Process	GO:0048666	neuron development		1.44E-08	5.70E-05	1.14E-05	1.01E-04	36
GO: Biological Process	GO:0000904	cell morphogenesis involved in differentiation		3.05E-08	1.21E-04	2.02E-05	1.79E-04	30
GO: Biological Process	GO:0048667	cell morphogenesis involved in neuron differentiation		7.78E-08	3.09E-04	4.12E-05	3.65E-04	24
GO: Biological Process	GO:0043604	amide biosynthetic process		8.30E-08	3.30E-04	4.12E-05	3.65E-04	28
GO: Biological Process	GO:0061564	axon development		1.17E-07	4.66E-04	4.96E-05	4.40E-04	22
GO: Biological Process	GO:0007409	Axonogenesis		1.35E-07	5.36E-04	4.96E-05	4.40E-04	21
GO: Biological Process	GO:1901566	organonitrogen compound biosynthetic process		1.38E-07	5.46E-04	4.96E-05	4.40E-04	40
GO: Biological Process	GO:0045595	regulation of cell differentiation		1.95E-07	7.75E-04	6.46E-05	5.72E-04	44
GO: Biological Process	GO:0048812	neuron projection morphogenesis		2.60E-07	1.03E-03	7.93E-05	7.03E-04	24
GO: Biological Process	GO:0045664	regulation of neuron differentiation		5.24E-07	2.08E-03	1.49E-04	1.32E-03	24
GO: Biological Process	GO:0051960	regulation of nervous system development		9.74E-07	3.87E-03	2.58E-04	2.29E-03	28
GO: Biological Process	GO:0050767	regulation of neurogenesis		1.13E-06	4.47E-03	2.79E-04	2.48E-03	26
GO: Biological Process	GO:0045667	regulation of osteoblast differentiation		1.51E-06	6.00E-03	3.38E-04	2.99E-03	10
GO: Biological Process	GO:0043043	peptide biosynthetic process		1.53E-06	6.08E-03	3.38E-04	2.99E-03	24
GO: Biological Process	GO:0006412	Translation		2.57E-06	1.02E-02	5.37E-04	4.76E-03	23
GO: Biological Process	GO:0060284	regulation of cell development		2.82E-06	1.12E-02	5.60E-04	4.97E-03	29

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Biological Process	GO:0021700	developmental maturation		3.60E-06	1.43E-02	6.81E-04	6.04E-03	14
GO: Biological Process	GO:1902531	regulation of intracellular signal transduction		4.47E-06	1.78E-02	8.08E-04	7.16E-03	42
GO: Biological Process	GO:0030030	cell projection organization		5.26E-06	2.09E-02	9.09E-04	8.06E-03	36
GO: Biological Process	GO:0043603	cellular amide metabolic process		5.88E-06	2.34E-02	9.74E-04	8.63E-03	29
GO: Biological Process		nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay						
GO: Biological Process	GO:0000184	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane		1.06E-05	4.20E-02	1.68E-03	1.49E-02	9
GO: Biological Process	GO:0006614			1.23E-05	4.89E-02	1.88E-03	1.67E-02	8
GO: Cellular Component	GO:0022626	cytosolic ribosome		6.17E-05	2.51E-02	1.47E-02	9.66E-02	8
GO: Cellular Component	GO:0005840	Ribosome		7.66E-05	3.12E-02	1.47E-02	9.66E-02	11
GO: Cellular Component	GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit		1.08E-04	4.40E-02	1.47E-02	9.66E-02	6
Pathway	83036	Ribosome	BioSystems: KEGG	2.09E-05	2.42E-02	1.89E-03	1.45E-02	10
Pathway	1268690	Eukaryotic Translation Elongation	BioSystems: REACTOME	3.30E-06	3.83E-03	1.46E-03	1.12E-02	9
Pathway	1268679	Eukaryotic Translation Initiation	BioSystems: REACTOME	3.79E-06	4.39E-03	1.46E-03	1.12E-02	10
Pathway	1268680	Cap-dependent Translation Initiation	BioSystems: REACTOME	3.79E-06	4.39E-03	1.46E-03	1.12E-02	10
Pathway	1268678	Translation	BioSystems: REACTOME	6.23E-06	7.21E-03	1.59E-03	1.21E-02	11
Pathway	1268681	Formation of a pool of free 40S subunits	BioSystems: REACTOME	6.85E-06	7.93E-03	1.59E-03	1.21E-02	9
Pathway	1270158	Metabolism of amino acids and derivatives	BioSystems: REACTOME	1.23E-05	1.43E-02	1.89E-03	1.45E-02	16
Pathway	1269710	Cytosolic tRNA aminoacylation	BioSystems: REACTOME	1.45E-05	1.68E-02	1.89E-03	1.45E-02	5
Pathway	1268686	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	BioSystems: REACTOME	1.63E-05	1.89E-02	1.89E-03	1.45E-02	9
Pathway	1268688	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	BioSystems: REACTOME	1.63E-05				
Pathway	1269120	Viral mRNA Translation	BioSystems: REACTOME	1.91E-05	1.89E-02	1.89E-03	1.45E-02	8
Pathway	1268691	Peptide chain elongation	BioSystems: REACTOME	1.91E-05	2.21E-02	1.89E-03	1.45E-02	8

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
Pathway	1339149	Selenoamino acid metabolism	BioSystems: REACTOME	2.13E-05	2.46E-02	1.89E-03	1.45E-02	9
Pathway	1339156	Selenocysteine synthesis	BioSystems: REACTOME	2.41E-05	2.79E-02	2.00E-03	1.52E-02	8
Pathway	1268692	Eukaryotic Translation Termination	BioSystems: REACTOME	2.60E-05	3.01E-02	2.01E-03	1.53E-02	8
Pathway	1269718	Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC)	BioSystems: REACTOME	3.25E-05	3.76E-02	2.35E-03	1.79E-02	8
Pathway	1269916	Amino acid transport across the plasma membrane	BioSystems: REACTOME	3.56E-05	4.12E-02	2.42E-03	1.85E-02	5

Πίνακας 7: common expressed genes during differentiation

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Molecular Function	GO:0001972	retinoic acid binding		6.50E-06	1.43E-03	4.58E-05	2.73E-04	3
GO: Molecular Function	GO:0034928	1-hydroxypyrene 6,7-monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0043823	spheroidene monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034858	2-hydroxybenzothiazole monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034816	anthracene 9,10-dioxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0018586	mono-butyltin dioxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034874	thioacetamide S-oxide S-oxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0018600	alpha-pinene dehydrogenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034786	9-fluorenone-3,4-dioxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0018596	dimethylsilanediol hydroxylase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0018594	tert-butanol 2-monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0018589	di-n-butyltin dioxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034893	N-nitrodimethylamine hydroxylase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034897	4-(1-ethyl-1,4-dimethyl-pentyl)phenol monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034927	pyrene 1,2-monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0018590	methylsilanetriol hydroxylase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034950	phenylboronic acid monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0018592	4-nitrocatechol 4-monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0018588	tri-n-butyltin dioxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034873	thioacetamide S-oxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034857	2-(methylthio)benzothiazole monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Molecular Function	GO:0018598	hydroxymethylsulfanetriol oxidase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0018591	methyl tertiary butyl ether 3-monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0018593	4-chlorophenoxyacetate monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034559	bisphenol A hydroxylase B activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034562	2,2-bis(4-hydroxyphenyl)-1-propanol hydroxylase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0018595	alpha-pinene monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034903	endosulfan ether monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034862	2,6-dihydroxybenzothiazole monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0018597	ammonia monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034925	pyrene 4,5-monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034929	1-hydroxypyrene 7,8-monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034870	pinacolone 5-monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034859	benzothiazole monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0018599	2-hydroxyisobutyrate 3-monoxygenase activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0034888	endosulfan monoxygenase I activity		7.49E-06	1.65E-03	4.58E-05	2.73E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0018585	fluorene oxygenase activity		1.50E-05	3.29E-03	8.66E-05	5.17E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0008401	retinoic acid 4-hydroxylase activity		1.50E-05	3.29E-03	8.66E-05	5.17E-04	2
GO: Molecular Function	GO:0005501	retinoid binding		3.05E-05	6.70E-03	1.72E-04	1.03E-03	3
GO: Molecular Function	GO:0019840	isoprenoid binding		3.84E-05	8.44E-03	2.11E-04	1.26E-03	3
GO: Biological Process	GO:0048384	retinoic acid receptor signaling pathway		1.88E-08	2.25E-05	2.25E-05	1.73E-04	5
GO: Biological Process	GO:0048385	regulation of retinoic acid receptor signaling pathway		3.11E-07	3.72E-04	1.86E-04	1.43E-03	4
GO: Biological Process	GO:0030522	intracellular receptor signaling pathway		6.99E-06	8.37E-03	2.25E-03	1.72E-02	6

Category	ID	Name	Source	p-value	q-value Bonferroni	q-value FDR B&H	q-value FDR B&Y	Hit Count in Query List
GO: Biological Process	GO:0042573	retinoic acid metabolic process		8.47E-06	1.01E-02	2.25E-03	1.72E-02	3
GO: Biological Process	GO:0048387	negative regulation of retinoic acid receptor signaling pathway		1.34E-05	1.60E-02	2.25E-03	1.72E-02	3
GO: Biological Process	GO:0001523	retinoid metabolic process		1.45E-05	1.73E-02	2.25E-03	1.72E-02	4
GO: Biological Process	GO:0034653	retinoic acid catabolic process		1.50E-05	1.80E-02	2.25E-03	1.72E-02	2
GO: Biological Process	GO:0016103	diterpenoid catabolic process		1.50E-05	1.80E-02	2.25E-03	1.72E-02	2
GO: Biological Process	GO:0016101	diterpenoid metabolic process		1.93E-05	2.31E-02	2.56E-03	1.96E-02	4
GO: Biological Process	GO:0051240	positive regulation of multicellular organismal process		2.27E-05	2.71E-02	2.71E-03	2.08E-02	11
GO: Biological Process	GO:0006721	terpenoid metabolic process		2.91E-05	3.48E-02	3.16E-03	2.43E-02	4
GO: Biological Process	GO:0016115	terpenoid catabolic process		3.75E-05	4.49E-02	3.52E-03	2.70E-02	2
GO: Biological Process	GO:0034754	cellular hormone metabolic process		3.82E-05	4.57E-02	3.52E-03	2.70E-02	4
Domain	IPR030480	Natr_peptide_CS	InterPro	6.93E-06	1.90E-03	3.80E-04	2.35E-03	2
Domain	IPR000663	Natr_peptide	InterPro	6.93E-06	1.90E-03	3.80E-04	2.35E-03	2
Domain	IPR002403	Cyt_P450_E_grp-IV	InterPro	1.03E-04	2.83E-02	4.72E-03	2.92E-02	2
Domain	PS00263	NATRIURETIC PEPTIDE	PROSITE	6.93E-06	1.90E-03	3.80E-04	2.35E-03	2
Domain	PF00212	ANP	Pfam	6.93E-06	1.90E-03	3.80E-04	2.35E-03	2
Domain	SM00183	NAT_PEP	SMART	6.93E-06	1.90E-03	3.80E-04	2.35E-03	2
Pathway	83020	Retinol metabolism	BioSystems: KEGG	2.54E-04	3.41E-02	8.52E-03	4.67E-02	3
Pathway	1269630	Signaling by Retinoic Acid	BioSystems: REACTOME	1.57E-08	2.10E-06	2.10E-06	1.15E-05	5
Pathway	1269631	RA biosynthesis pathway	BioSystems: REACTOME	1.09E-05	1.46E-03	7.28E-04	3.99E-03	3
Pathway	1270199	Vitamins	BioSystems: REACTOME	5.32E-05	7.13E-03	2.38E-03	1.30E-02	2

Βιβλιογραφία

- [1] Gage, F. H., "Neurogenesis in the adult brain," *Journal of Neuroscience*, vol. 22, no. 3, pp. 612-613, 2002.
- [2] Altman, J., "Are new neurons formed in the brains of adult mammals," *Science*, vol. 135, no. 3509, pp. 1127-1128, 1962.
- [3] Altman, J., & Das, G. D., "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 124, no. 3, pp. 319-335, 1965.
- [4] Ming, G. L., & Song, H., "Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions," *Neuron*, vol. 70, no. 4, pp. 687-702, 2011.
- [5] Goldman, S. A., & Nottebohm, F., "Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 80, no. 8, pp. 2390-2394, 1983.
- [6] Nottebohm, F., «From bird song to neurogenesis,» *Scientific American*, τόμ. 260, αρ. 2, pp. 74-79, 1989.
- [7] Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., & Gage, F. H., "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation," *Journal of Neuroscience*, vol. 16, no. 6, pp. 2027-2033, 1996.
- [8] Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H., "Neurogenesis in the adult human hippocampus," *Nature medicine*, vol. 4, no. 11, pp. 1313-1317, 1998.
- [9] Schwarz, T. J., Ebert, B., & Lie, D. C., "Stem cell maintenance in the adult mammalian hippocampus: a matter of signal integration?," *Developmental neurobiology*, vol. 72, no. 7, pp. 1006-1015, 2012.
- [10] Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., Clemenson, G. D., Deng, W., & Gage, F. H., "Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition.," *Physiological reviews*, vol. 94, no. 4, pp. 991-1026, 2014.
- [11] Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., & Gage, F. H., "Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior," *Cell*, vol. 167, no. 4, pp. 897-914, 2016.
- [12] Diana, X. Y., Marchetto, M. C., & Gage, "How to make a hippocampal dentate gyrus granule neuron," *Development*, vol. 144, no. 12, pp. 2366-2375, 2014.
- [13] Zhang, X., & Jin, G., "Neurogenesis in Adult Hippocampus," *In Neural Stem Cells and Therapy, InTech*, 2012.
- [14] Zhang, R., Engler, A., & Taylor, V., "Notch: an interactive player in neurogenesis and disease," *Cell and Tissue Research*, pp. 1-17, 2017.
- [15] Imayoshi, I., & Kageyama, R., "Oscillatory control of bHLH factors in neural progenitors.," *Trends in neurosciences*, vol. 37, no. 10, pp. 531-538, 2014.
- [16] Lie, D. C., Colamarino, S. A., Song, H. J., Désiré, L., Mira, H., Consiglio, A., ... & Gage, F. H., "Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis," *Nature*, vol. 437, no. 7063, pp. 1370-1375, 2005.
- [17] Lee, S. M., Tole, S., Grove, E., & McMahon, A. P., "A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus," *Development*, vol. 127, no. 3, pp. 457-467, 2000.
- [18] Bertrand, N., Castro, D. S., & Guillemot, F., "Proneural genes and the specification of neural cell types," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 3(7), pp. 517-530, 2002.
- [19] Huang, C., Chan, J. A., & Schuurmans, C., "Proneural bHLH genes in development and disease," *Current topics in developmental biology*, vol. 110, pp. 75-127, 2014.
- [20] Kageyama, R., Shimojo, H., & Imayoshi, I., "Dynamic expression and roles of Hes factors in neural development," *Cell and tissue research*, vol. 359(1), pp. 125-133, 2015.
- [21] Suh, H., Deng, W., & Gage, F. H., "Signaling in adult neurogenesis. Annual Review of Cell and

- Developmental," *Annual Review of Cell and Developmental*, vol. 25, pp. 253-275, 2009.
- [22] Yuan, L., & Hassan, B. A., "Neurogenins in brain development and disease: an overview," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 558, pp. 10-13, 2014.
 - [23] Kim, E. J., Hori, K., Wyckoff, A., Dickel, L. K., Koundakjian, E. J., Goodrich, L. V., & Johnson, J. E., "Spatiotemporal fate map of neurogenin1 (Neurog1) lineages in the mouse central nervous system.," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 519, no. 7, pp. 1355-1370, 2011.
 - [24] hompson, L. H., Andersson, E., Jensen, J. B., Barraud, P., Guillemot, F., Parmar, M., & Björklund, A., "Neurogenin2 identifies a transplantable dopamine neuron precursor in the developing ventral mesencephalon.," *Experimental neurology*, vol. 198, no. 1, pp. 183-198, 2006.
 - [25] Roybon, L., Hjalt, T., Stott, S., Guillemot, F., Li, J. Y., & Brundin, P., "Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis," *PloS one*, vol. 4, no. 3, p. e4779, 2009.
 - [26] Ma, W., & Wang, S. Z., "The final fates of neurogenin2-expressing cells include all major neuron types in the mouse retina," *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 31, no. 3, pp. 463-469, 2006.
 - [27] Galichet, C., Guillemot, F., & Parras, C. M., "Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus," *Development*, vol. 135(11), pp. 2031-2041, 2008.
 - [28] Ozen, I., Galichet, C., Watts, C., Parras, C., Guillemot, F., & Raineteau, O., "Proliferating neuronal progenitors in the postnatal hippocampus transiently express the proneural gene Ngn2.," *European Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 9, pp. 2591-2603, 2007.
 - [29] Roybon, L., Deierborg, T., Brundin, P., & Li, J. Y., "Involvement of Ngn2, Tbr and NeuroD proteins during postnatal olfactory bulb neurogenesis.," *European Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 2, pp. 232-243, 2009.
 - [30] Lacomme, M., Liaubet, L., Pituello, F., & Bel-Vialar, S., "NEUROG2 drives cell cycle exit of neuronal precursors by specifically repressing a subset of cyclins acting at the G1 and S phases of the cell cycle," *Molecular and cellular biology*, vol. 32, no. 13, pp. 2596-2607, 2012.
 - [31] Ali, F., Hindley, C., McDowell, G., Deibler, R., Jones, A., Kirschner, M., ... & Philpott, A., "Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis," *Development*, vol. 138, no. 19, pp. 4267-4277, 2011.
 - [32] Nguyen, L., Besson, A., Heng, J. I. T., Schuurmans, C., Teboul, L., Parras, C., ... & Guillemot, F., "p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex.," *Genes & development*, vol. 20, no. 11, pp. 1511-1524, 2006.
 - [33] Hindley, C., Ali, F., McDowell, G., Cheng, K., Jones, A., Guillemot, F., & Philpott, A., "Post-translational modification of Ngn2 differentially affects transcription of distinct targets to regulate the balance between progenitor maintenance and differentiation.," *Development*, vol. 139, no. 10, pp. 1718-1723, 2012.
 - [34] Philpott, A., "Multi-site phospho-regulation of proneural transcription factors controls proliferation versus differentiation in development and reprogramming," *Neurogenesis*, vol. 2, no. 1, p. e1049733, 2015.
 - [35] Quan, X. J., Yuan, L., Tiberi, L., Claeys, A., De Geest, N., Yan, J., ... & Rousseau, F., "Post-translational control of the temporal dynamics of transcription factor activity regulates neurogenesis.," *Cell*, vol. 164, no. 3, pp. 460-475, 2016.
 - [36] Ma, Y. C., Song, M. R., Park, J. P., Ho, H. Y. H., Hu, L., Kurtev, M. V., ... & Greenberg, M. E., "Regulation of motor neuron specification by phosphorylation of neurogenin 2," *Neuron*, vol. 58, no. 1, pp. 65-77, 2008.
 - [37] Li, S., Mattar, P., Zinyk, D., Singh, K., Chaturvedi, C. P., Kovach, C., ... & Wallace, V., "GSK3 temporally regulates neurogenin 2 proneural activity in the neocortex," *Journal of Neuroscience*, vol. 32, no. 23, pp. 7791-7805, 2012.
 - [38] McDowell, G. S., Hindley, C. J., Lippens, G., Landrieu, I., & Philpott, A., "Phosphorylation in intrinsically disordered regions regulates the activity of Neurogenin2.," *BMC biochemistry*, vol. 15, no. 1, p. 24, 2014.
 - [39] Lee, S. K., Lee, B., Ruiz, E. C., & Pfaff, S. L., "Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells.," *Genes & development*, vol. 19, no. 2, pp. 282-294,

- 2005.
- [40] Lee, S., Lee, B., Lee, J. W., & Lee, S. K., "Retinoid signaling and neurogenin2 function are coupled for the specification of spinal motor neurons through a chromatin modifier CBP.," *Neuron*, vol. 62, no. 5, pp. 641-654, 2009.
 - [41] Henke, R. M., Meredith, D. M., Borromeo, M. D., Savage, T. K., & Johnson, J. E., "Ascl1 and Neurog2 form novel complexes and regulate Delta-like3 (Dll3) expression in the neural tube.," *Developmental biology*, vol. 328, no. 2, pp. 529-540, 2009.
 - [42] Asprer, J. S., Lee, B., Wu, C. S., Vadakkan, T., Dickinson, M. E., Lu, H. C., & Lee, S. K., "LMO4 functions as a co-activator of neurogenin 2 in the developing cortex.," *Development*, vol. 138, no. 13, pp. 2823-2832, 2011.
 - [43] Parras, C. M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D. J., & Guillemot, F., "Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity.," *Genes & development*, vol. 16, no. 3, pp. 324-338, 2002.
 - [44] Helms, A. W., Battiste, J., Henke, R. M., Nakada, Y., Simplicio, N., Guillemot, F., & Johnson, J. E., "Sequential roles for Mash1 and Ngn2 in the generation of dorsal spinal cord interneurons.," *Development*, vol. 132, no. 12, pp. 2709-2719, 2005.
 - [45] Dennis, D. J., Wilkinson, G., Li, S., Dixit, R., Adnani, L., Balakrishnan, A., ... & Dyck, R. H., "Neurog2 and Ascl1 together regulate a postmitotic derepression circuit to govern laminar fate specification in the murine neocortex.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 201701495, 2017.
 - [46] Gohlke, J. M., Armant, O., Parham, F. M., Smith, M. V., Zimmer, C., Castro, D. S., ... & Guillemot, F., "Characterization of the proneural gene regulatory network during mouse telencephalon development.," *BMC biology*, vol. 6, no. 1, p. 15, 2008.
 - [47] Shaker, T., Dennis, D., Kurrasch, D. M., & Schuurmans, C., "Neurog1 and Neurog2 coordinately regulate development of the olfactory system.," *Neural development*, vol. 7, no. 1, p. 28, 2012.
 - [48] "Neurogenin and NeuroD direct transcriptional targets and their regulatory enhancers.," *The EMBO journal*, vol. 26, no. 24, pp. 5093-5108, 2007.
 - [49] Mattar, P., Britz, O., Johannes, C., Nieto, M., Ma, L., Rebeyka, A., ... & Schuurmans, C., "A screen for downstream effectors of Neurogenin2 in the embryonic neocortex," *Developmental biology*, vol. 273, no. 2, pp. 373-389, 2004.
 - [50] Smith, D. K., Yang, J., Liu, M. L., & Zhang, C. L., "Small Molecules Modulate Chromatin Accessibility to Promote NEUROG2-Mediated Fibroblast-to-Neuron Reprogramming," *Stem cell reports*, vol. 7, no. 5, pp. 955-969, 2016.
 - [51] Ge, W., He, F., Kim, K. J., Bianchi, B., Coskun, V., Nguyen, L., ... & Tao, J., "Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 5, pp. 1319-1324, 2006.
 - [52] Heng, J. I. T., Nguyen, L., Castro, D. S., Zimmer, C., Wildner, H., Armant, O., ... & Guillemot, F., "Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2.," *Nature*, vol. 455, no. 7209, pp. 114-118, 2008.
 - [53] Simmons, A. D., Horton, S., Abney, A. L., & Johnson, J. E., "Neurogenin2 expression in ventral and dorsal spinal neural tube progenitor cells is regulated by distinct enhancers.," *Developmental biology*, vol. 229, no. 2, pp. 327-339, 2001.
 - [54] Scardigli, R., Bäumer, N., Gruss, P., Guillemot, F., & Le Roux, I., "Direct and concentration-dependent regulation of the proneural gene Neurogenin2 by Pax6.," *Development*, vol. 130, no. 14, pp. 3269-3281, 2003.
 - [55] Nakazaki, H., Reddy, A. C., Mania-Farnell, B. L., Shen, Y. W., Ichi, S., McCabe, C., ... & Mayanil, C. S. K., "Key basic helix-loop-helix transcription factor genes Hes1 and Ngn2 are regulated by Pax3 during mouse embryonic development.," *Developmental biology*, vol. 316, pp. 510-523, 2005.
 - [56] Henke, R. M., Savage, T. K., Meredith, D. M., Glasgow, S. M., Hori, K., Dumas, J., ... & Johnson, J. E., "Neurog2 is a direct downstream target of the Ptf1a-Rbpj transcription complex in dorsal spinal cord," *Development*, vol. 136, no. 17, pp. 2945-2954, 2009.
 - [57] Kiefer, J. C., "Back to basics: Sox genes.," *Developmental Dynamics*, vol. 236, no. 8, pp. 2356-2366,

2007.

- [58] Reiprich, S., & Wegner, M., "From CNS stem cells to neurons and glia: Sox for everyone.," *Cell and tissue research*, vol. 359, no. 1, pp. 111-124, 2015.
- [59] Lefebvre, V., Dumitriu, B., Penzo-Méndez, A., Han, Y., & Pallavi, B., "Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors," *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 39, no. 12, pp. 2195-2214, 2007.
- [60] Bergsland, M., Werme, M., Malewicz, M., Perlmann, T., & Muhr, J., "The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11," *Genes & Development*, vol. 20, no. 24, pp. 3475-3486, 2006.
- [61] Haslinger, A., Schwarz, T. J., Covic, M., & Chichung Lie, D., "Expression of Sox11 in adult neurogenic niches suggests a stage-specific role in adult neurogenesis," *European Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 11, pp. 2103-2114, 2009.
- [62] Chen, C., Lee, G. A., Pourmorady, A., Sock, E., & Donoghue, M. J., "Orchestration of neuronal differentiation and progenitor pool expansion in the developing cortex by SoxC genes," *Journal of Neuroscience*, vol. 35, no. 29, pp. 10629-10642, 2015.
- [63] Liu, M. L., Zang, T., Zou, Y., Chang, J. C., Gibson, J. R., Huber, K. M., & Zhang, C. L., "Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons," *Nature communications*, vol. 4, p. 2183, 2013.
- [64] Scott, C. E., Wynn, S. L., Sesay, A., Cruz, C., Cheung, M., Gavira, M. V. G., ... & Briscoe, J., "SOX9 induces and maintains neural stem cells," *Nature neuroscience*, vol. 13, no. 10, pp. 1181-1189, 2010.
- [65] Gronostajski, R. M., "Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development," *Gene*, vol. 249, no. 1, pp. 31-45, 2000.
- [66] Sharon Mason, Michael Piper, Richard M. Gronostajski, Linda J. Richards, "Nuclear Factor One Transcription Factors in CNS Development," *Mol Neurobiol*, vol. 39, pp. 10-23, 2009.
- [67] Barry, G., Piper, M., Lindwall, C., Moldrich, R., Mason, S., Little, E., ... & Richards, L. J., "Specific glial populations regulate hippocampal morphogenesis," *Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 47, pp. 12328-12340, 2008.
- [68] Deneen, B., Ho, R., Lukaszewicz, A., Hochstim, C. J., Gronostajski, R. M., & Anderson, D. J., "The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord.," *Neuron*, vol. 52, no. 6, pp. 953-968, 2006.
- [69] Piper, M., Barry, G., Hawkins, J., Mason, S., Lindwall, C., Little, E., ... & Tole, S., "NFIA controls telencephalic progenitor cell differentiation through repression of the Notch effector Hes1," *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 27, pp. 9127-9139, 2010.
- [70] Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Sanosaka, T., Deneen, B., Taga, T., & Nakashima, K., "Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells," *Developmental cell*, vol. 16, no. 2, pp. 245-255, 2009.
- [71] Subramanian, L., Sarkar, A., Shetty, A. S., Muralidharan, B., Padmanabhan, H., Piper, M., ... & Tole, S., "Transcription factor Lhx2 is necessary and sufficient to suppress astrogliogenesis and promote neurogenesis in the developing hippocampus," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 27, pp. E265-E274, 2011.
- [72] Wong, Y. W., Schulze, C., Streichert, T., Gronostajski, R. M., Schachner, M., & Tilling, T., "Gene expression analysis of nuclear factor IA deficient mice indicates delayed brain maturation," *Genome biology*, vol. 8, no. 5, p. R72, 2007.
- [73] Hasenpusch-Theil, K., Magnani, D., Amaniti, E. M., Han, L., Armstrong, D., & Theil, T., "Transcriptional analysis of Gli3 mutants identifies Wnt target genes in the developing hippocampus," *Cerebral Cortex*, p. bhr365, 2012.
- [74] Maekowiak, M., Chocyk, A., Markowicz-Kula, K., & Wędzony, K., "Neurogenesis in the adult brain," *Pol J Pharmacol*, vol. 56, no. 6, pp. 673-687, 2004.
- [75] Jin, K., Xie, L., Kim, S. H., Parmentier-Batteur, S., Sun, Y., Mao, X. O., ... & Greenberg, D. A., "Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice," *Molecular pharmacology*, vol. 66, no. 2, pp. 204-208, 2004.
- [76] Wolf, S. A., Bick-Sander, A., Fabel, K., Leal-Galicia, P., Tauber, S., Ramirez-Rodriguez, G., ... &

- Kempermann, G., "Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis," *Cell Communication and Signaling*, vol. 8, no. 1, p. 12, 2010.
- [77] Sailor, K. A., Schinder, A. F., & Lledo, P. M., "Adult neurogenesis beyond the niche: its potential for driving brain plasticity," *Current opinion in neurobiology*, vol. 42, pp. 111-117, 2017.
- [78] Sun, J., Sun, J., Ming, G. L., & Song, H., "Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult mammalian brain," *European Journal of Neuroscience*, vol. 33, no. 6, pp. 1087-1093, 2011.
- [79] Guo, J. U., Ma, D. K., Mo, H., Ball, M. P., Jang, M. H., Bonaguidi, M. A., ... & Zhang, K., "Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain.," *Nature neuroscience*, vol. 14, no. 10, pp. 1345-1351, 2011.
- [80] Raposo, A. A., Vasconcelos, F. F., Drechsel, D., Marie, C., Johnston, C., Dolle, D., ... & Flicek, P., «Ascl1 coordinately regulates gene expression and the chromatin landscape during neurogenesis.», *Cell reports*, τόμ. 10, αρ. 9, pp. 1544-1556, 2015.
- [81] Seo, S., Richardson, G. A., & Kroll, K. L., "The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD.," *Development*, vol. 132, no. 1, pp. 105-115, 2005.
- [82] Yao, B., Christian, K. M., He, C., Jin, P., Ming, G. L., & Song, H., "Epigenetic mechanisms in neurogenesis.," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 17, no. 9, pp. 537-549, 2016.
- [83] Avery, O. T., MacLeod, C. M., & McCarty, M., "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 79, no. 2, pp. 137-158, 1944.
- [84] Moore, L. D., Le, T., & Fan, G., "DNA methylation and its basic function," *Neuropsychopharmacology*, vol. 38, no. 1, pp. 23-38, 2013.
- [85] Wyatt, G. R., "Recognition and estimation of 5-methylcytosine in nucleic acids," *Biochemical Journal*, vol. 48, no. 8, p. 581, 1951.
- [86] Wyatt, G. R., "The purine and pyrimidine composition of deoxypentose nucleic acids," *Biochemical Journal*, vol. 48, no. 5, p. 584, 1951.
- [87] Jarome, T. J., Thomas, J. S., & Lubin, F. D., "The epigenetic basis of memory formation and storage.," *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*, vol. 128, pp. 1-27, 2014.
- [88] Chen, Z. X., & Riggs, A. D., "DNA methylation and demethylation in mammals.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 21, pp. 18347-18353, 2011.
- [89] Guo, J. U., Ma, D. K., Mo, H., Ball, M. P., Jang, M. H., Bonaguidi, M. A., ... & Zhang, K., «Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain.», *Nature neuroscience*, τόμ. 14, αρ. 10, pp. 1345-1351, 2011.
- [90] Lubin, F. D., Roth, T. L., & Sweatt, J. D., "Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory.," *Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 42, pp. 10576-10586, 2008.
- [91] Mo, A., Mukamel, E. A., Davis, F. P., Luo, C., Henry, G. L., Picard, S., ... & Eddy, S. R., "Epigenomic signatures of neuronal diversity in the mammalian brain," *Neuron*, vol. 86, no. 6, pp. 1369-1384, 2015.
- [92] Cheng, P. Y., Lin, Y. P., Chen, Y. L., Lee, Y. C., Tai, C. C., Wang, Y. T., ... & Yu, J., "Interplay between SIN3A and STAT3 mediates chromatin conformational changes and GFAP expression during cellular differentiation," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, p. e22018, 2011.
- [93] Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L., & Song, H., "Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain.," *Cell*, vol. 145, no. 3, pp. 423-434, 2011.
- [94] Xu, Y., Xu, C., Kato, A., Tempel, W., Abreu, J. G., Bian, C., ... & Diao, J., "Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for Xenopus eye and neural development.," *Cell*, vol. 151, no. 6, pp. 1200-1213, 2012.
- [95] Sun, J., Sun, J., Ming, G. L., & Song, H., "Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult mammalian brain.," *European Journal of Neuroscience*, vol. 33, no. 6, pp. 1087-1093, 2011.
- [96] Nelson, E. D., Kavalali, E. T., & Monteggia, L. M., "Activity-dependent suppression of miniature neurotransmission through the regulation of DNA methylation.," *Journal of Neuroscience*, vol. 28,

no. 2, pp. 395-406, 2008.

- [97] M. E. JONES, "ALBRECHT KOSSEL, A BIOGRAPHICAL SKETCH," *Yale Journal of Biology and Medicine*, pp. 80-97, 1953.
- [98] Bannister, A. J., & Kouzarides, T., "Regulation of chromatin by histone modifications.," *Cell research*, vol. 21, no. 3, pp. 381-395, 2011.
- [99] Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D., & Klug, A., "Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution," *Nature*, vol. 313, no. 5986, p. 532, 1984.
- [100] Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., ... & Walter, P., Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας, Αθήνα: Εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδης ΕΠΕ, 2006.
- [101] Hsieh, J., & Zhao, X., "Genetics and epigenetics in adult neurogenesis," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 8, no. 6, p. a018911, 2016.
- [102] Covic, M. A. R. C. E. L. A., Karaca, E., & Lie, D. C., "Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult hippocampus," *Heredity*, vol. 105, no. 1, pp. 122-134, 2010.
- [103] Kouzarides, T., "Chromatin Modifications and Their Function," *Cell*, vol. 128, pp. 693-705, 2007.
- [104] Amador-Arjona, A., Cimadamore, F., Huang, C. T., Wright, R., Lewis, S., Gage, F. H., & Terskikh, A. V., "SOX2 primes the epigenetic landscape in neural precursors enabling proper gene activation during hippocampal neurogenesis.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 15, pp. E1936-E1945, 2015.
- [105] Riccio, A., "Dynamic epigenetic regulation in neurons: enzymes, stimuli and signaling pathways.," *Nature neuroscience*, vol. 13, no. 11, p. 1330, 2010.
- [106] Kadonaga, J. T., "Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines," *Cell*, vol. 92, no. 3, pp. 307-313, 1998.
- [107] Partanen, A., Motoyama, J., & Hui, C. C., "Developmentally regulated expression of the transcriptional cofactors/histone acetyltransferases CBP and p300 during mouse embryogenesis.," *The International journal of developmental biology*, vol. 43, no. 6, p. 487, 1999.
- [108] Roidl, D., & Hacker, C., "Histone methylation during neural development.," *Cell and tissue research*, vol. 356, no. 3, pp. 539-552, 2014.
- [109] Hirabayashi, Y., Suzuki, N., Tsuboi, M., Endo, T. A., Toyoda, T., Shinga, J., ... & Gotoh, Y., "Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition," *Neuron*, vol. 63, no. 5, pp. 600-613, 2009.
- [110] Song, M. R., & Ghosh, A., "FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation," *Nature neuroscience*, vol. 7, no. 3, p. 229, 2004.
- [111] MuhChyi, C., Juliandi, B., Matsuda, T., & Nakashima, K., "Epigenetic regulation of neural stem cell fate during corticogenesis," *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 31, no. 6, pp. 424-433, 2013.
- [112] Soshnev, A. A., Josefowicz, S. Z., & Allis, C. D., "Greater than the sum of parts: complexity of the dynamic epigenome," *Molecular cell*, vol. 62, no. 5, pp. 681-694, 2016.
- [113] Black, J. C., Van Rechem, C., & Whetstone, J. R., "Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact.," *Molecular cell*, vol. 48, no. 4, pp. 491-507, 2012.
- [114] Lin, H., Zhu, X., Chen, G., Song, L., Gao, L., Khand, A. A., ... & Tao, Q., "KDM3A-mediated demethylation of histone H3 lysine 9 facilitates the chromatin binding of Neurog2 during neurogenesis.," *Development*, vol. 144, no. 20, pp. 3674-3685, 2017.
- [115] Fasano, C. A., Dimos, J. T., Ivanova, N. B., Lowry, N., Lemischka, I. R., & Temple, S., "shRNA knockdown of Bmi-1 reveals a critical role for p21-Rb pathway in NSC self-renewal during development.," *Cell stem cell*, vol. 1, no. 1, pp. 87-99, 2007.
- [116] Burgold, T., Spreafico, F., De Santa, F., Totaro, M. G., Prosperini, E., Natoli, G., & Testa, G., "The histone H3 lysine 27-specific demethylase Jmjd3 is required for neural commitment.," *PLoS one*, vol. 3, no. 8, p. e3034, 2008.
- [117] Wolf, S. S., "The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans.," *Cellular and molecular life sciences*, vol. 66, no. 13, pp. 2109-2121, 2009.

- [118] Bedford, M. T., "Arginine methylation at a glance.," *Journal of cell science*, vol. 120, no. 24, pp. 4243-4246, 2007.
- [119] Bedford, M. T., & Clarke, S. G., "Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why.," *Molecular cell*, vol. 33, no. 1, pp. 1-13, 2009.
- [120] Bedford, M. T., & Richard, S., "Arginine methylation: an emerging regulator of protein function.," *Molecular cell*, vol. 18, no. 3, pp. 263-272, 2005.
- [121] Yang, Y., & Bedford, M. T., "Protein arginine methyltransferases and cancer.," *Nature Reviews Cancer*, vol. 13, no. 1, p. 37, 2013.
- [122] Strahl, B. D., Briggs, S. D., Brame, C. J., Caldwell, J. A., Koh, S. S., Ma, H., ... & Allis, C. D., "Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1," *Current Biology*, vol. 11, no. 12, pp. 996-1000, 2001.
- [123] Pal, S., Baiocchi, R. A., Byrd, J. C., Grever, M. R., Jacob, S. T., & Sif, S., "Low levels of miR-92b/96 induce PRMT5 translation and H3R8/H4R3 methylation in mantle cell lymphoma.," *The EMBO journal*, vol. 26, no. 15, pp. 3558-3569, 2007.
- [124] Lacroix, M., El Messaoudi, S., Rodier, G., Le Cam, A., Sardet, C., & Fabbrizio, E., "The histone-binding protein COPR5 is required for nuclear functions of the protein arginine methyltransferase PRMT5.," *EMBO reports*, vol. 9, no. 5, pp. 452-458, 2008.
- [125] Migliori, V., Müller, J., Phalke, S., Low, D., Bezzi, M., Mok, W. C., ... & Cecatiello, V., «Symmetric dimethylation of H3R2 is a newly identified histone mark that supports euchromatin maintenance.», *Nature Structural and Molecular Biology*, τόμ. 19, αρ. 2, p. 136, 2012.
- [126] Schurter, B. T., Koh, S. S., Chen, D., Bunick, G. J., Harp, J. M., Hanson, B. L., ... & Aswad, D. W., "Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1," *Biochemistry*, vol. 40, no. 19, pp. 5747-5756, 2001.
- [127] Blanc, R. S., & Richard, S., «Arginine methylation: the coming of age.», *Molecular cell*, τόμ. 65, αρ. 1, pp. 8-24, 2017.
- [128] Neault, M., Mallette, F. A., Vogel, G., Michaud-Levesque, J., & Richard, S., "Ablation of PRMT6 reveals a role as a negative transcriptional regulator of the p53 tumor suppressor.," *Nucleic acids research*, vol. 40, no. 19, pp. 9513-9521, 2012.
- [129] Blythe, S. A., Cha, S. W., Tadjuidje, E., Heasman, J., & Klein, P. S., "β-Catenin primes organizer gene expression by recruiting a histone H3 arginine 8 methyltransferase, Prmt2," *Developmental cell*, vol. 19, no. 2, pp. 220-231, 2010.
- [130] Kuhn, P., & Xu, W., "Protein arginine methyltransferases: nuclear receptor coregulators and beyond.," *Progress in molecular biology and translational science*, vol. 87, pp. 299-342, 2009.
- [131] Walport, L. J., Hopkinson, R. J., Chowdhury, R., Schiller, R., Ge, W., Kawamura, A., & Schofield, C. J., «Arginine demethylation is catalysed by a subset of JmjC histone lysine demethylases.», *Nature communications*, τόμ. 7, p. 11974, 2016.
- [132] Ikenaka, K., Miyata, S., Mori, Y., Koyama, Y., Taneda, T., Okuda, H., ... & Tohyama, M., "Immunohistochemical and western analyses of protein arginine N-methyltransferase 3 in the mouse brain.," *Neuroscience*, vol. 141, no. 4, pp. 1971-1982, 2006.
- [133] Chittka, A., Nitarska, J., Grazini, U., & Richardson, W. D., "Transcription factor positive regulatory domain 4 (PRDM4) recruits protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) to mediate histone arginine methylation and control neural stem cell proliferation and differentiation.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 51, pp. 42995-43006, 2012.
- [134] Damez-Werno, D. M., Sun, H., Scobie, K. N., Shao, N., Rabkin, J., Dias, C., ... & Cahill, M. E., "Histone arginine methylation in cocaine action in the," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, no. 34, pp. 9623-9628, 2016.
- [135] Dhar, S. S., Lee, S. H., Kan, P. Y., Voigt, P., Ma, L., Shi, X., ... & Lee, M. G., "Trans-tail regulation of MLL4-catalyzed H3K4 methylation by H4R3 symmetric dimethylation is mediated by a tandem PHD of MLL4.," *Genes & development*, vol. 26, no. 24, pp. 2749-2762, 2012.
- [136] Kousaka, A., Mori, Y., Koyama, Y., Taneda, T., Miyata, S., & Tohyama, M., "THE DISTRIBUTION AND CHARACTERIZATION OF ENDOGENOUS," *Neuroscience*, vol. 163, no. 4, pp. 1146-1157, 2009.

- [137] Taneda, T., Miyata, S., Kousaka, A., Inoue, K., Koyama, Y., Mori, Y., & Tohyama, M., "Specific regional distribution of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) in the mouse brain.," *Brain research*, vol. 1155, pp. 1-9, 2007.
- [138] Aubert, J., Stavridis, M. P., Tweedie, S., O'Reilly, M., Vierlinger, K., Li, M., ... & Smith, A., "Screening for mammalian neural genes via fluorescence-activated cell sorter purification of neural precursors from Sox1-gfp knock-in mice.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, no. suppl 1, pp. 11836-11841, 2003.
- [139] Lee, J., Sayegh, J., Daniel, J., Clarke, S., & Bedford, M. T., "PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 38, pp. 32890-32896, 2005.
- [140] Sayegh, J., Webb, K., Cheng, D., Bedford, M. T., & Clarke, S. G., " Regulation of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) activity by its N-terminal domain.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 50, pp. 36444-36453, 2007.
- [141] Lin, Y. L., Tsai, Y. J., Liu, Y. F., Cheng, Y. C., Hung, C. M., Lee, Y. J., ... & Li, C., "The critical role of protein arginine methyltransferase prmt8 in zebrafish embryonic and neural development is non-redundant with its paralogue prmt1.," *PloS one*, vol. 8, no. 3, p. e55221, 2013.
- [142] Simandi, Z., Czipa, E., Horvath, A., Koszeghy, A., Bordas, C., Póliska, S., ... & Barta, E., " PRMT1 and PRMT8 Regulate Retinoic Acid-Dependent Neuronal Differentiation with Implications to Neuropathology.," *Stem cells*, vol. 33, no. 3, pp. 726-741, 2015.
- [143] Jeong, H. C., Park, S. J., Choi, J. J., Go, Y. H., Hong, S. K., Kwon, O. S., ... & Shin, H. D., "PRMT8 Controls the Pluripotency and Mesodermal Fate of Human Embryonic Stem Cells by Enhancing the PI3K/AKT/SOX2 axis.," *STEM CELLS*, 2017.
- [144] Kim, D. Y., "Post-transcriptional regulation of gene expression in neural stem cells," *Cell biochemistry and function*, vol. 34, no. 4, pp. 197-208, 2016.
- [145] Zhao, B. S., Roundtree, I. A., & He, C., "Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 18, no. 1, p. 31, 2017.
- [146] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P., Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδης, 2006.
- [147] Kobayashi, T., & Kageyama, R., "Expression dynamics and functions of Hes factors in development and diseases," *In Current topics in developmental biology*, Academic Press, vol. 110, pp. 263-283, 2014.
- [148] Shimojo, H., Ohtsuka, T., & Kageyama, R., "Dynamic expression of notch signaling genes in neural stem/progenitor cells," *Frontiers in neuroscience*, vol. 78, p. 5, 2011.
- [149] Kageyama R., Shimojo, H., & Imayoshi, I., "Dynamic expression and roles of Hes factors in neural development," *Cell and tissue research*, vol. 359, no. 1, pp. 125-133, 2015.
- [150] Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H., & Imayoshi, I., " Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition.," *Nature neuroscience*, vol. 11, no. 11, p. 1247, 2008.
- [151] Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H., & Imayoshi, I., "Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells.," *Current opinion in cell biology*, vol. 21, no. 6, pp. 733-740, 2009.
- [152] Shimojo, H., Ohtsuka, T., & Kageyama, R., "Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors," *Neuron*, vol. 58(1), pp. 52-64, 2008.
- [153] Knuckles, P., Vogt, M. A., Lugert, S., Milo, M., Chong, M. M., Hautbergue, G. M., ... & Taylor, V., "Drosha regulates neurogenesis by controlling neurogenin 2 expression independent of microRNAs," *Nature neuroscience*, vol. 15, no. 7, p. 962, 2012.
- [154] Rolando, C., Erni, A., Grison, A., Beattie, R., Engler, A., Gokhale, P. J., ... & Taylor, V., " Multipotency of adult hippocampal NSCs in vivo is restricted by Drosha/NFIB.," *Cell stem cell*, vol. 19, no. 5, pp. 653-662, 2016.
- [155] Kejiou, N. S., & Palazzo, A. F., "mRNA localization as a rheostat to regulate subcellular gene expression," *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, vol. 8, no. 4, 2017.
- [156] Onoguchi, M., Hirabayashi, Y., Koseki, H., & Gotoh, Y., " A noncoding RNA regulates the neurogenin1 gene locus during mouse neocortical development," *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences*, vol. 109, no. 42, pp. 16939-16944, 2012.
- [157] Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J., & Dreyfuss, G., "RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation," *FEBS letters*, vol. 582, no. 14, pp. 1977-1986, 2008.
 - [158] Bryant, C. D., & Yazdani, N., "RNA-binding proteins, neural development and the addictions," *Genes, Brain and Behavior*, vol. 15, no. 1, pp. 169-186, 2016.
 - [159] Gardiner, A. S., Twiss, J. L., & Perrone-Bizzozero, N. I., "Competing interactions of RNA-binding proteins, microRNAs, and their targets control neuronal development and function," *Biomolecules*, vol. 5, no. 4, pp. 2903-2918, 2015.
 - [160] Pascale, A., Amadio, M., & Quattrone, A., "Defining a neuron: neuronal ELAV proteins," *Cellular and molecular life sciences*, vol. 65, no. 1, p. 128, 2008.
 - [161] Szabo, A., Dalmau, J., Manley, G., Rosenfeld, M., Wong, E., Henson, J., ... & Furneaux, H. M., "HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal," *Cell*, vol. 62, no. 2, pp. 325-333, 1991.
 - [162] Colombrita, C., Silani, V., & Ratti, A., "ELAV proteins along evolution: back to the nucleus?," *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 56, pp. 447-455, 2013.
 - [163] Deschênes-Furry, J., Perrone-Bizzozero, N., & Jasmin, B. J., "The RNA-binding protein HuD: a regulator of neuronal differentiation, maintenance and plasticity," *Bioessays*, vol. 28, no. 8, pp. 822-833, 2006.
 - [164] Bronicki, L. M., & Jasmin, B. J., «Emerging complexity of the HuD/ELAV14 gene; implications for neuronal development, function, and dysfunction,» *Rna*, τόμ. 19, αρ. 8, pp. 1019-1037, 2013.
 - [165] Aranda-Abreu, G. E., Behar, L., Chung, S., Furneaux, H., & Ginzburg, I., "Embryonic lethal abnormal vision-like RNA-binding proteins regulate neurite outgrowth and tau expression in PC12 cells," *Journal of Neuroscience*, vol. 19, no. 16, pp. 6907-6917, 1999.
 - [166] Allen, M., Bird, C., Feng, W., Liu, G., Li, W., Perrone-Bizzozero, N. I., & Feng, Y., "HuD promotes BDNF expression in brain neurons via selective stabilization of the BDNF long 3' UTR mRNA," *PloS one*, vol. 8, no. 1, p. e55718, 2013.
 - [167] Lim, C. S., & Alkon, D. L., "Protein kinase C stimulates HuD-mediated mRNA stability and protein expression of neurotrophic factors and enhances dendritic maturation of hippocampal neurons in culture," *Hippocampus*, vol. 22, no. 12, pp. 2303-2319, 2012.
 - [168] Chen, C. Y. A., & Shyu, A. B., "HuD stimulates translation via eIF4A," *Molecular cell*, vol. 36, no. 6, pp. 920-921, 2009.
 - [169] Fukao, A., Sasano, Y., Imataka, H., Inoue, K., Sakamoto, H., Sonenberg, N., ... & Fujiwara, T., "The ELAV protein HuD stimulates cap-dependent translation in a Poly (A)- and eIF4A-dependent manner," *Molecular cell*, vol. 36, no. 6, pp. 1007-1017, 2009.
 - [170] Bryant, C. D., & Yazdani, N., «RNA-binding proteins, neural development and the addictions,» *Genes, Brain and Behavior*, τόμ. 15, αρ. 1, pp. 169-186, 2016.
 - [171] Bicknell, A. A., & Ricci, E. P., "When mRNA translation meets decay," *Biochemical Society Transactions*, vol. 45, no. 2, pp. 339-351, 2017.
 - [172] Frye, M., & Blanco, S., "Post-transcriptional modifications in development and stem cells," *Development*, vol. 143, no. 21, pp. 3871-3881, 2016.
 - [173] Flores, J. V., Cordero-Espinoza, L., Oeztuerk-Winder, F., Andersson-Rolf, A., Selmi, T., Blanco, S., ... & Frye, M., "Cytosine-5 RNA methylation regulates neural stem cell differentiation and motility," *Stem cell reports*, vol. 8, no. 1, pp. 112-124, 2017.
 - [174] Winner, B., Kohl, Z., & Gage, F. H., "Neurodegenerative disease and adult neurogenesis," *European Journal of Neuroscience*, vol. 33, no. 6, pp. 1139-1151, 2011.
 - [175] Chen, P., Yan, Q., Wang, S., Wang, C., & Zhao, P., "Transfer of three transcription factors via a lentiviral vector ameliorates spatial learning and memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease," *Gene*, vol. 587, no. 1, pp. 59-63, 2016.
 - [176] Richetin, K., Leclerc, C., Toni, N., Gallopin, T., Pech, S., Roybon, L., & Rampon, C., "Genetic manipulation of adult-born hippocampal neurons rescues memory in a mouse model of Alzheimer's disease," *Brain*, vol. 138, no. 2, pp. 440-455, 2014.
 - [177] Uhrig, M., Ittrich, C., Wiedmann, V., Knyazev, Y., Weninger, A., Riemenschneider, M., &

- Hartmann, T., "New Alzheimer amyloid β responsive genes identified in human neuroblastoma cells by hierarchical clustering," *PloS one*, vol. 4, no. 8, p. e6779, 2009.
- [178] Deng, S., Deng, H., Le, W., Xu, H., Yang, H., Deng, X., ... & Jankovic, J., "Genetic analysis of the NEUROG2 gene in patients with Parkinson's disease.," *Neuroscience letters*, vol. 468, no. 3, pp. 195-197, 2010.
- [179] El-Sadik, A., "Potential sources of stem cells as a regenerative therapy for Parkinson's disease.," *Stem cells and cloning: advances and applications*, vol. 3, p. 183, 2010.
- [180] Liu, Q., Qin, Q., Sun, H., Zhong, D., An, R., Tian, Y., ... & Li, G., "Neuroprotective effect of olfactory ensheathing cells co-transfected with Nurr1 and Ngn2 in both in vitro and in vivo models of Parkinson's disease.," *Life sciences*, 2017.
- [181] Park, C. H., Kang, J. S., Yoon, E. H., Shim, J. W., Suh-Kim, H., & Lee, S. H., " Proneural bHLH neurogenin 2 differentially regulates Nurr1-induced dopamine neuron differentiation in rat and mouse neural precursor cells in vitro.," *FEBS letters*, vol. 582, no. 5, pp. 537-542, 2008.
- [182] Scaramuzzino, C., Monaghan, J., Milioto, C., Lanson Jr, N. A., Maltare, A., Aggarwal, T., ... & Pandey, U. B., "Protein arginine methyltransferase 1 and 8 interact with FUS to modify its sub-cellular distribution and toxicity in vitro and in vivo.," *PloS one*, vol. 8, no. 4, p. e61576, 2013.
- [183] Takahashi, K., & Yamanaka, S., "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors," *cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663-676, 2006.
- [184] Thoma, E. C., Wischmeyer, E., Offen, N., Maurus, K., Sirén, A. L., Scharl, M., & Wagner, T. U., "Ectopic expression of neurogenin 2 alone is sufficient to induce differentiation of embryonic stem cells into mature neurons," *PloS one*, vol. 7, no. 6, p. e38651, 2012.
- [185] Grande, A., Sumiyoshi, K., López-Juárez, A., Howard, J., Sakthivel, B., Aronow, B., ... & Nakafuku, M., "Environmental impact on direct neuronal reprogramming in vivo in the adult brain.," *Nature communications*, vol. 4, p. 2373, 2013.
- [186] Su, Z., Zang, T., Liu, M. L., Wang, L. L., Niu, W., & Zhang, C. L., "Reprogramming the fate of human glioma cells to impede brain tumor development," *Cell death & disease*, vol. 10, no. 5, p. e1463, 2014.
- [187] Liu, M. L., Zang, T., Zou, Y., Chang, J. C., Gibson, J. R., Huber, K. M., & Zhang, C. L., "Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons," *Nature communications*, vol. 5, no. 2183, 2013.
- [188] Caiazzo, M., Giannelli, S., Valente, P., Lignani, G., Carissimo, A., Sessa, A., ... & Settembre, C., "Direct conversion of fibroblasts into functional astrocytes by defined transcription factors," *Stem cell reports*, vol. 4, no. 1, pp. 25-36, 2015.
- [189] Ladewig, J., Mertens, J., Kesavan, J., Doerr, J., Poppe, D., Glaue, F., ... & Koch, P., "Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts," *Nature methods*, vol. 9, no. 6, p. 575, 2012.
- [190] Blanchard, J. W., Eade, K. T., Szűcs, A., Sardo, V. L., Tsunemoto, R. K., Williams, D., ... & Baldwin, K. K., "Selective conversion of fibroblasts into peripheral sensory neurons," *Nature neuroscience*, vol. 18, no. 1, p. 25, 2015.
- [191] Zhang, L., Yin, J. C., Yeh, H., Ma, N. X., Lee, G., Chen, X. A., ... & Wu, G. Y., " Small molecules efficiently reprogram human astroglial cells into functional neurons.," *Cell stem cell*, vol. 17, no. 6, pp. 735-74, 2015.
- [192] Liu, M. L., Zang, T., & Zhang, C. L., " Direct lineage reprogramming reveals disease-specific phenotypes of motor neurons from human ALS patients," *Cell reports*, vol. 14, no. 1, pp. 115-128, 2016.
- [193] Liu, X., Li, F., Stubblefield, E. A., Blanchard, B., Richards, T. L., Larson, G. A., ... & Benke, T. A., "Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells.," *Cell research*, vol. 22, no. 2, p. 321, 2012.
- [194] Hester, M. E., Murtha, M. J., Song, S., Rao, M., Miranda, C. J., Meyer, K., ... & Pfaff, S. L., "Rapid and efficient generation of functional motor neurons from human pluripotent stem cells using gene delivered transcription factor codes," *Molecular therapy*, vol. 19, no. 10, pp. 1905-1912, 2011.
- [195] Ross, R. A., & Spengler, B. A., "Human neuroblastoma stem cells.," *In Seminars in cancer biology*,

- vol. 17, no. 3, pp. 241-247, 2007.
- [196] E. R. Kandel, J. H. Schwartz, & T. M. Jessell, Βασικές Αρχές Νευροεπιστημών, New York: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2006.
 - [197] Marshall, G. M., Carter, D. R., Cheung, B. B., Liu, T., Mateos, M. K., Meyerowitz, J. G., & Weiss, W. A., "The prenatal origins of cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 14, no. 4, p. 277, 2014.
 - [198] Ross, R. A., & Spengler, B. A., "Human neuroblastoma stem cells," *Seminars in cancer biology*, vol. 17, no. 3, pp. 241-247, 2007.
 - [199] Thiele C.J, "Neuroblastoma Cell Lines," in *Human Cell Culture*, Lancaster, UK, Kluwer Academic Publishers, 1998, pp. 21-53.
 - [200] Walton, J. D., Kattan, D. R., Thomas, S. K., Spengler, B. A., Guo, H. F., Biedler, J. L., ... & Ross, R. A., "Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors," *Neoplasia*, vol. 6, no. 6, pp. 838-845, 2004.
 - [201] Rohwedel, J., Guan, K., & Wobus, A. M., "Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro.," *Cells Tissues Organs*, vol. 165, no. 3-4, pp. 190-202, 1999.
 - [202] Zirlinger, M., Lo, L., McMahon, J., McMahon, A. P., & Anderson, D. J., "Transient expression of the bHLH factor neurogenin-2 marks a subpopulation of neural crest cells biased for a sensory but not a neuronal fate.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 99, no. 12, pp. 8084-8089, 2002.
 - [203] Gage, F. H., Coates, P. W., Palmer, T. D., Kuhn, H. G., Fisher, L. J., Suhonen, J. O., ... & Ray, J., «Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain.», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, τόμ. 95, αρ. 25, pp. 11879-11883, 1995.
 - [204] Cetinkaya, C., Hultquist, A., Su, Y., Wu, S., Bahram, F., Pahlman, S., ... & Larsson, L. G., "Combined IFN- γ and retinoic acid treatment targets the N-Myc/Max/Mad1 network resulting in repression of N-Myc target genes in MYCN-amplified neuroblastoma cells," *Molecular cancer therapeutics*, vol. 6, no. 10, pp. 2634-2641, 2007.
 - [205] Dimberg, A., Karlberg, I., Nilsson, K., & Öberg, F., "Ser727/Tyr701-phosphorylated Stat1 is required for the regulation of c-Myc, cyclins, and p27Kip1 associated with ATRA-induced G0/G1 arrest of U-937 cells," *Blood*, vol. 102, no. 1, pp. 254-261, 2003.
 - [206] Sambrook, J. russell DW, *Molecular cloning: a laboratory manual*, NY: Cold Spring Harb Lab Press Cold Spring Harb, 2001.
 - [207] Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J., *Molecular cloning: a laboratory manual*, NY: Cold Spring harbor laboratory: Cold Spring Harbor, 1982.
 - [208] Moulos P. and Hatzis P., "Systematic integration of RNA-Seq statistical," *Nucleic Acid Research*, vol. 43, no. 4, p. e25, 2015.
 - [209] Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... & Ståhlberg, A., "The real-time polymerase chain reaction.," *Molecular aspects of medicine*, vol. 27, no. 2-3, pp. 95-125, 2006.
 - [210] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... & Erlich, H. A., "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase," *Science*, vol. 239, no. 4839, pp. 487-491, 1988.
 - [211] Wong, M. L., & Medrano, J. F., "Real-time PCR for mRNA quantitation," *Biotechniques*, vol. 39, no. 1, pp. 75-88, 2005.
 - [212] Kwon, M. H., Lee, G. E., Kwon, S. J., Choi, E., Na, M. J., Cho, H. M., ... & Son, J. W., "dentification of DNA methylation markers for NSCLC using HpaII-MspI methylation microarray," *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, vol. 65, no. 6, pp. 495-503, 2008.
 - [213] Maruyama, I. N., Rakow, T. L., & Maruyama, H. I., "cRACE: a simple method for identification of the 5' end of mRNAs," *Nucleic Acids Research*, vol. 23, no. 18, pp. 3796-3797, 1995.
 - [214] Llano, M., Vanegas, M., Hutchins, N., Thompson, D., Delgado, S., & Poeschla, E. M., " Identification and characterization of the chromatin-binding domains of the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75.," *Journal of molecular biology*, vol. 360, no. 4, pp. 760-773, 2006.
 - [215] Dundr, P., & Ehrmann, J., "Neural crest cell-derived tumors: an overview.," *In Stem Cells and Cancer Stem Cells*, vol. 1, pp. 29-40, 2012.

- [216] Acosta, S., Lavarino, C., Paris, R., Garcia, I., de Torres, C., Rodríguez, E., ... & Mora, J., "Comprehensive characterization of neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells.," *BMC developmental biology*, vol. 9, no. 1, p. 12, 2009.
- [217] Constantinescu, R., Constantinescu, A. T., Reichmann, H., & Janetzky, B. (, "Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y," in *Neuropsychiatric disorders an integrative approach*, Austria, Springer- Verlag, 2007, pp. 17-28.
- [218] Lopes, F. M., Schröder, R., da Frota Júnior, M. L. C., Zanotto-Filho, A., Müller, C. B., Pires, A. S., ... & Moreira, J. C. F., "Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies," *Brain research*, vol. 1337, pp. 85-94, 2010.
- [219] Pålman, S., Ruusala, A. I., Abrahamsson, L., Mattsson, M. E., & Esscher, T., "Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation," *Cell differentiation*, vol. 14, no. 2, pp. 135-144, 1984.
- [220] López-Carballo, G., Moreno, L., Masiá, S., Pérez, P., & Baretino, D., "Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 28, pp. 25297-25304, 2002.
- [221] Carol J. Thiele, «Neuroblastoma Cell Lines,» σε *Human Cell Culture*, Lancaster, UK, Kluwer Academic Publishers, 1998, pp. 21-53.
- [222] Lee, J., Sayegh, J., Daniel, J., Clarke, S., & Bedford, M. T., "PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 38, pp. 32890-32896, 2005.
- [223] Goulet, I., Gauvin, G., Boisvenue, S., & Côté, J., "Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase 1 isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 45, pp. 33009-33021, 2007.
- [224] Hart, R. P., & Goff, L. A., " Long noncoding RNAs: central to nervous system development," *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 55, pp. 109-116, 216.
- [225] McDowell, G. S., Kucerova, R., & Philpott, A., "Non-canonical ubiquitylation of the proneural protein Ngn2 occurs in both *Xenopus* embryos and mammalian cells," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 400, no. 4, pp. 655-660, 2010.
- [226] McDowell, G. S., Hardwick, L. J., & Philpott, A., "Complex domain interactions regulate stability and activity of closely related proneural transcription factors," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 450, no. 4, pp. 1283-1290, 2014.
- [227] Aronov, S., Aranda, G., Behar, L., & Ginzburg, I., "Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules," *Journal of Cell Science*, vol. 115, no. 19, pp. 3817-3827, 2002.
- [228] Ince-Dunn, G., Okano, H. J., Jensen, K. B., Park, W. Y., Zhong, R., Ule, J., ... & Yoo, J., " Neuronal Elav-like (Hu) proteins regulate RNA splicing and abundance to control glutamate levels and neuronal excitability.," *1067-1080*, vol. 75, no. 6, pp. 1067-1080, 1012.
- [229] Aranda-Abreu, G. E., Behar, L., Chung, S., Furneaux, H., & Ginzburg, I., "Embryonic Lethal Abnormal Vision-Like RNA- Binding Protein Regulate Neurite Outgrowth and Tau Expression in PC12 Cells," *Journal of Neuroscience*, vol. 19, no. 16, pp. 6907-6917, 1999.
- [230] Lee, I. S., Koo, K. Y., Jung, K., Kim, M., Kim, I. S., Hwang, K., ... & Park, K. I., " Neurogenin-2-transduced human neural progenitor cells attenuate neonatal hypoxic-ischemic brain injury," *Translational Research*, vol. 183, pp. 121-136, 2017.
- [231] Bellavia, D., Mecarozzi, M., Campese, A. F., Grazioli, P., Talora, C., Frati, L., ... & Screpanti, I., "Notch3 and the Notch3-upregulated RNA-binding protein HuD regulate Ikaros alternative splicing.," *The EMBO journal*, vol. 26, no. 6, pp. 1670-1680, 2007.
- [232] García-Domínguez D.J., Morello, D., Cisneros, E., Kontoyiannis, D.L., & Frade J.M., "Stabilization of Dll1 mRNA by Elavl1/HuR in neuroepithelial cells undergoing mitosis.," *García-Domínguez D.J., Morello, D., Cisneros, E., Kontoyiannis, D.L., & Frade J.M. "Stabilization of D Mol Biol Cell*, vol. 22, no. 8, pp. 1227-39, García-Domínguez D.J., Morello, D., Cisneros, E., Kontoyiannis, D.L., & Frade J.M. "Stabilization o2011.
- [233] Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A. L., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., & Ang, S. L., «Neurogenin 2

- is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons,» *Development*, τόμ. 133, αρ. 3, pp. 495-505, 2006.
- [234] Andersson, E. K., Irvin, D. K., Ahlsjö, J., & Parmar, M., «Ngn2 and Nurr1 act in synergy to induce midbrain dopaminergic neurons from expanded neural stem and progenitor cells,» *Experimental cell research*, τόμ. 313, αρ. 6, pp. 1172-1180, 2007.
 - [235] Fishwick, K. J., Li, R. A., Halley, P., Deng, P., & Storey, K. G., "Initiation of neuronal differentiation requires PI3-kinase/TOR signalling in the vertebrate neural tube,," *Developmental biology*, vol. 338, no. 2, pp. 215-225, 2010.
 - [236] Zhang, X., Wu, M., Xiao, H., Lee, M. T., Levin, L., Leung, Y. K., & Ho, S. M., "Methylation of a single intronic CpG mediates expression silencing of the PMP24 gene in prostate cancer," *The Prostate*, vol. 70, no. 7, pp. 765-776, 2010.
 - [237] Unoki, M., & Nakamura, Y., "Methylation at CpG islands in intron 1 of EGR2 confers enhancer-like activity,," *FEBS letters*, vol. 554, no. 1-2, pp. 67-72, 3.
 - [238] Rigal, M., Kevei, Z., Pelissier, T., & Mathieu, O., "DNA methylation in an intron of the IBM1 histone demethylase gene stabilizes chromatin modification patterns," *The EMBO journal*, vol. 31, no. 13, pp. 2981-2993, 2012.
 - [239] Piero Sanfilippo, Peter Smibert, Hong Duan and Eric Lai, "Neural specificity of RNA- binding protein Elav is achieved by post- transcriptional repression in non neural tissues," *The Company of Biologists*, vol. 143, pp. 4474-4485, 2016.
 - [240] Shaul, O., "How introns enhance gene expression," *he international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 91, pp. 145-155, 2017.
 - [241] Cenik, C., Derti, A., Mellor, J. C., Berriz, G. F., & Roth, F. P., " Genome-wide functional analysis of human 5'untranslated region introns," *Genome biology*, vol. 11, no. 3, p. R29, 2010.
 - [242] Akua, T., & Shaul, O., "The Arabidopsis thaliana MHX gene includes an intronic element that boosts translation when localized in a 5' UTR intron," *Journal of experimental botany*, vol. 64, no. 14, pp. 4255-4270, 2013.
 - [243] Nicole I.Park, Paul Guilhamon, Mathieu Lupien, Peter B.Dirks, "ASCL1 Reorganizes Chromatin to Direct neuronal Fate and Suppress Tumorigenicity of Glioblastoma Stem Cells," *Cell Stem Cell*, vol. 21, pp. 1-16, 2017.
 - [244] Hubers, L., Valderrama-Carvajal, H., Laframboise, J., Timbers, J., Sanchez, G., & Co  t  , J., "HuD interacts with survival motor neuron protein and can rescue spinal muscular atrophy-like neuronal defects," *Human molecular genetics*, vol. 20, no. 3, pp. 553-579, 2010.
 - [245] Shimojo, H., Ohtsuka, T., & Kageyama, R., "Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors," *Neuron*, vol. 58, no. 1, pp. 52-64, 2008.