



Διατμηματικό Πρόγραμμα  
Μεταπτυχιακών Σπουδών  
«Ιατρική Χημεία»



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ Ε3 ΛΙΓΑΣΗΣ TRIM32 ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

---

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Κατούνης Δημήτριος Α.Μ.: 243**

**Βιοχημικός- Βιοτεχνολόγος**

Υπεύθυνος Καθηγητής: Θεολόγος Μιχαηλίδης

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών &  
Τεχνολογιών

Ιωάννινα, 2021

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ Ε3 ΛΙΓΑΣΗΣ TRIM32 ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

## MASTER THESIS

THE ROLE OF E3 LIGASE TRIM32 IN NEURAL CELL BIOLOGY

### Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- **Δρ. Μιχαηλίδης Θεολόγος (Επιβλέπων Καθηγητής):** Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- **Δρ. Τράγκα Θεώνη:** Ομότιμη Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας & Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- **Δρ. Γεωργίου Ιωάννης:** Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

## Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε στο τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής και Νευροβιολογίας κατά την χρονική περίοδο 2019 - 2021. Την επίβλεψη της εργασίας είχε ο αναπληρωτής καθηγητής του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, κ. Θεολόγος Μιχαηλίδης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Θ. Μιχαηλίδη καθώς με εμπιστεύτηκε δίνοντας μου την ευκαιρία να είμαι στο εργαστήριό του. Οι συμβουλές του και η άμεση καθοδήγησή του ήταν καθοριστικές για την πορεία της διπλωματικής μου, δείχνοντας πάντα προθυμία και αμεσότητα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω επίσης την κ. Τράγκα Θεώνη και τον κ. Γεωργίου Ιωάννη για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Ιωάννη Τσίγκα για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του καθώς και για το δικαίωμα που μου έδωσε να εργαστώ πάνω στο project του. Η συνεισφορά του ήταν ιδιαίτερα σημαντική ώστε να καταφέρω να αυτονομηθώ, έχοντας πάντα τη στήριξη του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Κυριακή Παπαγεωργίου για τις πολύτιμες συμβουλές της και την αμεσότητα της κάθε φορά που χρειάστηκα το οτιδήποτε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, την Ιφιγένεια Χατζηναούμ, τη Μαρίνα Μαγουλά, τη Χριστίνα Γαβρούζου, την Αθηνά Γενοπούλου, την Ευτυχία Κοντίδου, την Μαρία Παπαγεωργίου, την Μαρία Παππά, τον Γεράσιμο Νάκα, τη Μαρούσα Δαρσινού, το Γιάννη Χρυσανθόπουλο, την Αιμιλία Ζησιάδη, τη Σοφία Λουκμακιά, την Ελένη Καρβέλα και την Έλενα Κεσικιάδου για τη βοήθεια και τη δημιουργία ενός πολύ ευχάριστου κλίματος.

Φυσικά το πιο ξεχωριστό ευχαριστώ το κρατάω για την οικογένειά μου, που με στήριξε και συνεχίζει να με στηρίζει, δίνοντας μου την ευκαιρία να κυνηγάω τα όνειρα και τους στόχους μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
<b>1. Γενικά στοιχεία.....</b>	<b>11</b>
1.1 Νευρικό σύστημα.....	11
1.1.1 Οργάνωση νευρικού συστήματος.....	11
1.1.2 Νευρογένεση.....	13
1.1.3 Νευροβλάστωμα.....	15
1.2 Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος.....	16
1.3 Το πρωτεάσωμα.....	19
1.4.Ε3 λιγάσες και νευρογένεση.....	20
<b>2. Η πρωτεΐνη TRIM32.....</b>	<b>22</b>
2.1 Η οικογένεια των πρωτεϊνών TRIM.....	22
2.2 Δομή και μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης TRIM32.....	23
2.3 TRIM32 και ασθένειες.....	26
<b>3. Σημαντικές βιολογικές διεργασίες και ρυθμιστικά μόρια που επηρεάζονται από την πρωτεΐνη TRIM32.....</b>	<b>28</b>
3.1 Τα πρωτο-ογκογονίδια c-myc και N-Myc.....	28
3.2 Κυτταρικός κύκλος.....	31
3.3 Απόπτωση.....	37
3.4 Αυτοφαγία.....	40
3.5 Βιολογία του μιτοχονδρίου.....	45
ΣΚΟΠΟΣ.....	47
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	48
1 Υλικά.....	48
1.1 Αναλώσιμα.....	48
1.2 Ένζυμα περιορισμού.....	49
1.3 Πλασμιδιακοί χάρτες.....	49

1.4 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα κυτταροκαλλιιεργειών.....	51
3.1.5 Κυτταρικές σειρές.....	51
1.6 Διαλύματα – Χημικά Αντιδραστήρια.....	52
1.6.1 Διαλύματα που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο.....	57
1.6.2 Διαλύματα μοριακής βιολογίας εμπορίου.....	57
1.6.3 Διαλύματα Κυτταρικής Βιολογίας.....	
2 Μέθοδοι.....	58
2.1 Μέθοδοι Κυτταροκαλλιιεργειών.....	58
2.1.1 Καλλιέργεια κυττάρων.....	58
2.1.2 Ανακαλλιέργεια Κυττάρων με την χρήση Θρυψίνης (Κυτταρικό Split).....	58
2.1.3 Μέτρηση κυττάρων σε πλάκα Neubauer.....	59
2.1.4 Απόψυξη κυττάρων.....	60
2.1.5 Αποθήκευση κυτταρικών σειρών.....	60
2.1.6 Νευρική διαφοροποίηση.....	61
2.1.7 Διαμόλυνση Ευκαρυωτικών Κυττάρων.....	62
2.2 Μέθοδοι Γενετική Μηχανικής.....	64
2.2.1 Ανάπτυξη βακτηρίων.....	64
2.2.2 Μετασχηματισμός βακτηρίων με θερμικό σοκ.....	65
2.2.3 Αποθήκευση μετασχηματισμένων βακτηρίων σε γλυκερόλη.....	65
2.2.4 Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας.....	65
2.2.5 Παρασκευή πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας.....	66
2.2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	66
2.2.7 Αντίδραση περιοριστικής πέψης.....	67
2.3 Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας.....	67
2.3.1 Απομόνωση RNA.....	67
2.3.2 Καθαρισμός RNA από DNA.....	68
2.3.3 Αντίστροφη μεταγραφή.....	69
2.3.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	70

2.4 Βιοχημικές μέθοδοι.....	72
2.4.1 Απομόνωση πρωτεϊνών.....	72
2.4.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη Μέθοδο Bradford.....	72
2.4.3 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting).....	72
2.5 Οπτικές Μέθοδοι.....	76
3.2.4.1 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός – Ανοσοκυτταροχημεία.....	76
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>78</b>
1. Εργαλεία και μέθοδοι που χρειάστηκε να εγκαθιδρύσουμε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής	78
2. Επίδραση της υπερέκφρασης του TRIM32 στα επίπεδα του c-myc και N-Myc.....	89
3. Μεταβολή των επιπέδων των γονιδίων Trim32, c-myc και N-Myc κατά τη νευρική διαφοροποίηση	92
4. Επίδραση της υπερέκφρασης του TRIM32 στον κυτταρικό κύκλο.....	95
5. Μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης TRIM32 στην αυτοφαγία.....	100
6. Ο ρόλος της πρωτεΐνης TRIM32 στη βιολογία του μιτοχονδρίου.....	103
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>107</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>110</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το TRIM32 είναι μια E3 λιγάση η οποία ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών TRIM (Tripartite motif-containing protein). Μέσω της επικράτειας RING συνδέει μόρια ουβικιτίνης σε πρωτεΐνες οδηγώντας τις σε πρωτεασωμική αποικοδόμηση. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *TRIM32*, έχουν συνδεθεί με μια σειρά ασθενειών, οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι το σύνδρομο Bardet-Biedl και η μυϊκή δυστροφία Limb-Girdl. Αυτές οι διαταραχές ενώ δεν παρουσιάζουν κοινά κλινικά χαρακτηριστικά, φαίνεται να έχουν ένα κοινό νευρολογικό «παρονομαστή». Στην παρούσα μελέτη εστιάσαμε στη μελέτη και τον χαρακτηρισμό της σημειακής μετάλλαξης P130S, η οποία εδράζεται στην επικράτεια B-box της πρωτεΐνης και σχετίζεται με την εμφάνιση του συνδρόμου Bardet-Biedl στον άνθρωπο. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε *in vitro* χρησιμοποιώντας ως κυτταρικό μοντέλο δύο σειρές νευρικής προέλευσης, τα νευροβλαστωματικά κύτταρα Neuro2A τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα έκφρασης του ογκογονιδίου N-Myc, και τα SK-N-BE(2)-C στα οποία η έκφρασή του είναι υψηλή εξαιτίας αυξημένου αριθμού αντιγράφων. Μέσω πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης, επιχειρήσαμε να συγκρίνουμε την επίδραση της φυσιολογικής πρωτεΐνης και της μεταλλαγμένης μορφής TRIM32(P130S) στον κυτταρικό κύκλο (*c-myc*, N-Myc, CDK1, p27) την απόπτωση (Bcl<sub>2</sub>, Bax, p53, caspase-3, Araf-1, XIAP), την αυτοφαγία (p62, Atg3, Atg12, LC3B) και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων (VDAC, Tim23). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης TRIM32, αλλά όχι της μεταλλαγμένης, αυξάνει τα επίπεδα mRNA των γονιδίων *c-myc* και *N-Myc*. Ωστόσο, πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western έδειξαν ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης C-MYC δεν επηρεάζονται, ενώ και οι δύο μορφές μειώνουν δραματικά τα επίπεδα της πρωτεΐνης N-MYC. Παρατηρήσαμε επίσης, ότι η αγρίου τύπου TRIM32 επηρεάζει τον αριθμό των κυττάρων που εισέρχονται στη φάση της μίτωσης, και ο φαινότυπος αυτός συνοδεύεται από μείωση της ενεργοποιητικής φωσφορυλίωσης της κινάσης CDK1 (cyclin-dependent kinase 1) στο κατάλοιπο Thr-161 (CDK1-Thr161), και μια αύξηση της ανασταλτικής φωσφορυλίωσης στο κατάλοιπο Tyr-15 (CDK1-Tyr-15). Παρόμοια ανασταλτική επίδραση στην μίτωση των κυττάρων έχει η μεταλλαγμένη μορφή P130S, ωστόσο στην περίπτωση αυτή διαπιστώσαμε αύξηση των επιπέδων του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p27. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι και οι δύο μορφές της πρωτεΐνης TRIM32 επηρεάζουν ανασταλτικά την πορεία του κυτταρικού κύκλου αλλά δρουν μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο μορφών στα επίπεδα των ρυθμιστικών μορίων της απόπτωσης που ελέγχθηκαν, με εξαίρεση την πρωτεΐνη XIAP, η οποία αξίζει να σημειωθεί ότι έχει και αυτή ενεργότητα E3 λιγάσης όπως και η πρωτεΐνη TRIM32. Συγκρίθηκε τέλος η επίδραση των δύο μορφών στη ρύθμιση της αυτοφαγίας και της

λειτουργίας των μιτοχονδρίων, και διαπιστώθηκε ότι σε αντίθεση με τη φυσιολογική πρωτεΐνη, η μετάλλαξη P130S στο γονίδιο *TRIM32* επηρεάζει επιλεκτικά τα επίπεδα μορίων-κλειδιών της αυτοφαγίας καθώς και πρωτεϊνών της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Αυτή η παρατήρηση ήταν εξαιρετικά ενδιαφέρουσα, και μελλοντικά πειράματα αναμένεται να δώσουν απάντηση στο ερώτημα, κατά πόσον η πιθανή απορρύθμιση του μηχανισμού της αυτοφαγίας και της μιτοχονδριακής λειτουργίας από την μετάλλαξη P130S μπορεί να συνδέονται με τον παθογενετικό μηχανισμό των νόσων Bardet-Biedl και Limb-Girdl.



## SUMMARY

TRIM32 is an E3 ligase that belongs to the TRIM (Tripartite motif-containing protein) family of proteins. Via its RING domain, it ubiquitinates protein substrates and marks them for proteosomal degradation. Mutations in the *TRIM32* gene have been associated with a number of diseases, the most important of which are the Bardet-Biedl syndrome and the Limb-Girdle muscular dystrophy. These disorders, while not having common clinical features, appear to have a common neurological "denominator". In the present study we focused on the characterization of the P130S point mutation, which is located in the B-box domain of the protein, and has been associated with the occurrence of the Bardet-Biedl syndrome in humans. The study was performed *in vitro* using as a model two cell lines of neuronal origin, namely the neuroblastoma cells Neuro2a, which are characterized by low expression of the *N-Myc* oncogene, and the SK-N-BE(2)-C in which the expression of this gene is relatively high due to increased number of copies. In transient transfection experiments, we attempted to compare the effects of normal protein and of the TRIM32(P130S) mutant on cell cycle (*c-myc*, *N-Myc*, CDK1, p27), apoptosis (Bcl2, Bax, p53, caspase-3, Apaf-1, XIAP), autophagy (p62, Atg3, Atg12, LC3B) and mitochondrial function (VDAC, Tim23). The results showed that overexpression of the wild-type TRIM32, but not of the mutant protein, increased the *c-myc* and *N-Myc* mRNA levels. However, Western immunoblotting experiments revealed that the protein levels of *c-MYC* remained unaffected, and also, that both forms are capable to dramatically reduce the *N-MYC* protein levels. We have also observed that wild-type TRIM32 reduces the number of cells entering mitosis, and this phenotype is accompanied by a decrease in the activating phosphorylation of CDK1 kinase (cyclin-dependent kinase 1) on threonine 161 (Thr161) and an increase in the inhibitory phosphorylation on tyrosine 15 (Tyr15). The mutant TRIM32(P130S) exerts a similar inhibitory effect on mitosis, however in this case we found a consistent increase in the levels of the cell cycle inhibitor p27. We therefore concluded that both forms of the TRIM32 protein can inhibit cell cycle progress, however by acting through different mechanisms. There was no influence of either form in the expression of the apoptosis regulators tested, with the exception of the XIAP protein, which it is worth-mentioning that has also E3 ligase activity (similar to TRIM32). Additionally, we compared the effect of the two forms on the regulation of autophagy and mitochondrial function, and we found that in contrast to the normal protein, the TRIM32(P130S) mutant selectively affects the levels of key molecules of autophagy as well as of inner and outer mitochondrial membrane proteins. This was particularly interesting, and future experiments are expected to address the emerging question of whether a potential deregulation of autophagy mechanisms and

mitochondrial function by the P130S mutation may be linked to the pathogenetic mechanisms of Bardet-Biedl and Limb-Girdl diseases.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. Γενικά στοιχεία

### 1.1 Νευρικό σύστημα

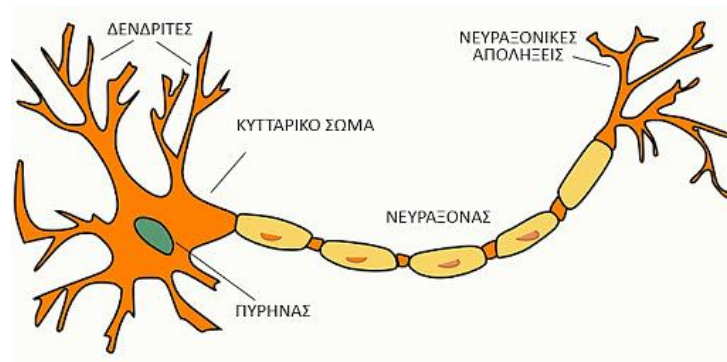
Το νευρικό σύστημα αποτελεί το πιο σύνθετο και εξαιρετικά οργανωμένο σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού για το συντονισμό της λειτουργίας όλων των υπολοίπων συστημάτων και οργάνων. Ουσιαστικά, δέχεται πληροφορίες από το εξωτερικό και εσωτερικό περιβάλλον, τις επεξεργάζεται και προκαλεί συγκεκριμένες αποκρίσεις ως απάντηση στα αρχικά ερεθίσματα (Kandel *et al.*, 2013).

#### 1.1.1 Οργάνωση νευρικού συστήματος

Το νευρικό σύστημα απαρτίζεται από δύο τμήματα: το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ). Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα αποτελείται από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό τα οποία είναι τα κύρια κέντρα επεξεργασίας και ελέγχου των πληροφοριών που δέχεται ο οργανισμός από το περιβάλλον. Το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα αποτελείται από τα νεύρα (συσσωμάτωμα νευρικών αξόνων) και τα γάγγλια (κυτταρικά σώματα νευρώνων) τα οποία μεταφέρουν πληροφορίες προς το ΚΝΣ από τα αισθητήρια όργανα (προσαγωγό σκέλος του ΠΝΣ) και από το ΚΝΣ στα εκτελεστικά όργανα (απαγωγό σκέλος του ΠΝΣ). Το ΠΝΣ χωρίζεται στο σωματικό και στο αυτόνομο νευρικό σύστημα. Το πρώτο είναι υπεύθυνο για τις εκούσιες λειτουργίες του ανθρώπινου σώματος και συνδέει το ΚΝΣ με τους σκελετικούς μύες. Το αυτόνομο χωρίζεται περαιτέρω στο συμπαθητικό, το παρασυμπαθητικό και το εντερικό νευρικό σύστημα. Το συμπαθητικό ρυθμίζει τις ακούσιες δραστηριότητες του σώματος, προετοιμάζει το σώμα για αυξημένες απαιτήσεις ετοιμότητας ενώ είναι υπεύθυνο και για τη διατήρηση της ομοιόστασής του. Το παρασυμπαθητικό έχει σκοπό την εξοικονόμηση και αποθήκευση ενέργειας για τις λειτουργίες του σώματος. Όσον αφορά το εντερικό σύστημα, ελέγχει την κινητικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα και την απορρόφηση ουσιών (Kandel *et al.*, 2013).

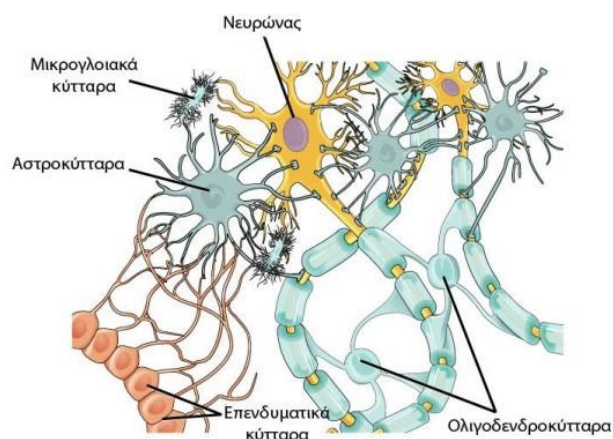
Οι κύριες μονάδες του νευρικού συστήματος είναι οι νευρώνες, ή αλλιώς νευρικά κύτταρα τα οποία είναι εξειδικευμένα κύτταρα τόσο μορφολογικά όσο και λειτουργικά. Συγκεκριμένα, δέχονται ερεθίσματα από το περιβάλλον, τα επεξεργάζονται και τα μεταφέρουν με τη βοήθεια ειδικών μορίων, των νευροδιαβιβαστών, στα εκτελεστικά όργανα, δηλαδή τους μύες και τους αδένες. Ένα τυπικό νευρικό κύτταρο (Εικόνα 1) αποτελείται από το σώμα, τους δενδρίτες, τον νευρικό άξονα και τις τερματικές απολήξεις. Το σώμα περιλαμβάνει τον πυρήνα με το γενετικό υλικό αλλά και το κυτταρόπλασμα όπου βρίσκονται μεμβρανώδη οργανίδια με τα ριβοσώματα και τα μιτοχόνδρια σε αφθονία, γεγονός που υποδεικνύει τις αυξημένες ανάγκες σε ενέργεια, πρωτεΐνες και ένζυμα για την επιβίωση και την ομαλή λειτουργία του κυττάρου. Από το σώμα προεκβάλλουν οι δενδρίτες, λεπτές μεμβρανικές προεκτάσεις με

τη μορφή διακλαδώσεων, που είναι υπεύθυνοι για τη λήψη σημάτων από άλλα νευρικά κύτταρα και τη μετάδοσή τους προς το σώμα. Στους δενδρίτες η παρουσία μεμβρανικών οργανιδίων σχετίζεται με τον υψηλό βαθμό πρωτεϊνοσύνθεσης που χρειάζεται για τη μετάδοση των σημάτων. Επίσης, από το σώμα και συγκεκριμένα από τον εκφυτικό κώνο (αχον hillock) εκτείνεται ένας μόνο άξονας με μήκος ποικίλου εύρους που είναι υπεύθυνος για τη μετάδοση των σημάτων προς τα άλλα νευρικά κύτταρα. Ορισμένοι νευρικοί άξονες καλύπτονται ανά διαστήματα από ένα στρώμα λιπιδιακής και πρωτεϊνικής φύσης, τη μυελίνη, συμβάλλοντας έτσι στην ταχύτερη και αποτελεσματικότερη μετάδοση των νευρικών σημάτων. Οι άξονες στο τέλος τους διακλαδίζονται και σχηματίζουν τις τερματικές απολήξεις από όπου θα γίνει η απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών, των χημικών μορίων μέσω των οποίων το σήμα θα μεταδοθεί σε επόμενα νευρικά κύτταρα (Albert *et al.*, 2002).



**Εικόνα 1. Η δομή ενός τυπικού νευρικού κυττάρου.** Παρουσιάζονται τα βασικά μέρη ενός νευρικού κυττάρου (<http://www.gsrt.gr/>).

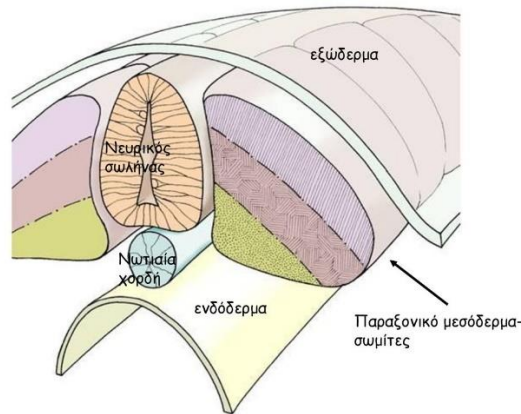
Ένας άλλος τύπος κυττάρων που απαρτίζουν το νευρικό σύστημα μαζί με τους νευρώνες είναι τα νευρογλοιακά κύτταρα ή νευρογλοία. Χαρακτηριστικά στον εγκέφαλο τα γλοιακά κύτταρα είναι τουλάχιστον 10 φορές περισσότερα από τα νευρικά. Η νευρογλοία διακρίνεται σε αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα (ή κύτταρα του Schwann στο ΠΝΣ), μικρογλοία και επενδυματικά κύτταρα (Εικόνα 2). Τα αστροκύτταρα παρέχουν ένα δομικό δίκτυο για τη μετανάστευση των αναπτυσσόμενων νευρικών κυττάρων αλλά και για τους μετέπειτα ώριμους νευρώνες, ενώ συγχρόνως ρυθμίζουν τη σύσταση του εξωκυττάρου χώρου. Τα ολιγοδενδροκύτταρα στο ΚΝΣ και τα κύτταρά του στο ΠΝΣ έχουν ως βασικό ρόλο τον σχηματισμό του ελύτρου μυελίνης γύρω από τους νευράξονες. Όσον αφορά τη μικρογλοία, αποτελείται από εξειδικευμένα ανοσοκύτταρα στο ΚΝΣ, με λειτουργία αντίστοιχη των μακροφάγων, ενώ τα επενδυματικά κύτταρα μέσω των κροσσών που φέρουν διευκολύνουν τη διακίνηση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού μέσα στις κοιλίες του εγκεφάλου (Jäkel and Dimou, 2017).



**Εικόνα 2. Οργάνωση των κυττάρων του νευρικού συστήματος.** Παρουσιάζεται τα κύτταρα του νευρικού συστήματος και πώς αλληλεπιδρούν δομικά (Προσαρμογή και τροποποίηση από Rye, et al., 2017).

### 1.1.2 Νευρογένεση

Η νευρογένεση αποτελεί μία δυναμική διεργασία, η οποία απαιτεί την ενορχήστρωση της γονιδιακής έκφρασης προκειμένου να ρυθμιστεί τόσο το κυτταρικό πεπρωμένο όσο και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (M. Zhang et al., 2020). Η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος ξεκινάει προγεννητικά σε ένα σχετικά όψιμο στάδιο και συνεχίζεται μεταγεννητικά μέχρι την ηλικία των 20 έως 30 ετών σε συγκεκριμένες περιοχές και κυκλώματα (Silbereis et al., 2016). Η προέλευσή του είναι από τα κύτταρα του εξωδέρματος, το οποίο μαζί με το εσώδερμα και το μεσόδερμα αποτελούν τις 3 βασικές κυτταρικές στοιβάδες από όπου θα προκύψουν όλα τα κύτταρα και τα συστήματα οργάνων. Ειδικότερα, τα νευρικά καθώς και τα γλοιακά κύτταρα προέρχονται από ένα στρώμα εξωδερμικών κυττάρων κατά μήκος της ραχιαίας μέσης γραμμής του εμβρύου στο στάδιο του γαστριδίου. Αφού σχηματιστεί η νευρική πλάκα από το στρώμα αυτό, ακολούθως στο στάδιο της νευριδίωσης με αναδίπλωση σχηματίζεται μια σωληνοειδής δομή που ονομάζεται νευρικός σωλήνας (Εικόνα 3). Από το ουραίο τμήμα του νευρικού σωλήνα θα προκύψει ο νωτιαίος μυελός, ενώ από το κεφαλικό τμήμα ο εγκέφαλος. Κατά τη διάρκεια αυτών των πρώιμων σταδίων, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων δεν είναι ομοιόμορφος κατά μήκος του νευρικού σωλήνα, με αποτέλεσμα διαφορετικές περιοχές να διευρύνονται με διαφορετικούς ρυθμούς και να προκύπτουν έτσι οι διαφορετικές περιοχές του ώριμου νευρικού συστήματος. Χαρακτηριστικά, στο κεφαλικό τμήμα σχηματίζονται αρχικά τρία διαφορετικά εγκεφαλικά κυστίδια, ο πρόσθιος εγκέφαλος, ο μεσεγκέφαλος και ο οπίσθιος εγκέφαλος, τα οποία στη συνέχεια μέσω κάμψεων και διαιρέσεων δημιουργούν μαζί με τον νωτιαίο μυελό έξι βασικές περιοχές του ώριμου κεντρικού νευρικού συστήματος. Όλα τα στάδια για τη δημιουργία του νευρικού συστήματος και τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων ελέγχονται μέσω της δράσης επαγωγικών σημάτων που εκκρίνονται από παρακρινή κύτταρα αλλά και ενδογενών παραγόντων (Alberts et al., 2002).



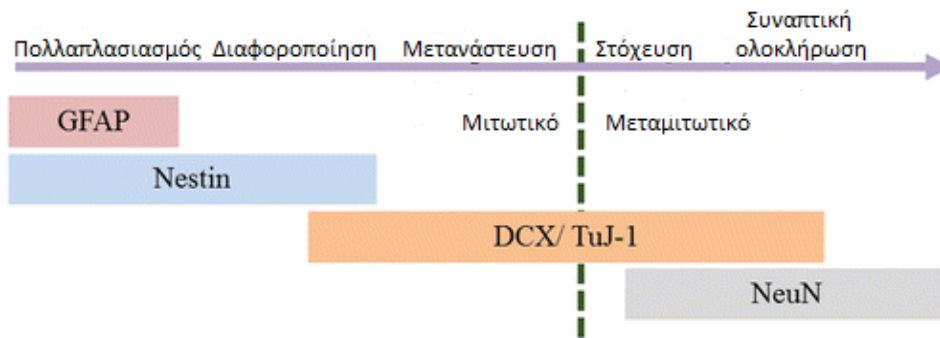
**Εικόνα 3. Παρουσιάζεται η θέση του νευρικού σωλήνα σε σχέση με τη νωτιαία χορδή και τους σωμίτες** (<https://slideplayer.gr/slide/13795762/>).

Ωστόσο, η νευρογένεση έχει παρατηρηθεί και σε περιοχές του ενήλικου εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο βασικές περιοχές του εγκεφάλου που παρατηρείται «ενήλικη νευρογένεση», η διαδικασία δηλαδή της γέννησης νέων λειτουργικών νευρώνων από ενήλικα πρόδρομα νευρικά κύτταρα στο ενήλικο νευρικό σύστημα : η υποκοκκιώδης ζώνη της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου και η υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών (Εικόνα 4) (Ming and Song, 2011)



**Εικόνα 4. Απεικόνιση των δύο νευρογενικών περιοχών του εγκεφάλου.** Σε εγκάρσια τομή του εγκεφάλου ενήλικου ποντικού, απεικονίζονται, όπως υποδεικνύουν τα βέλη, η υποκοκκιώδης ζώνη της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου και η υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών (Προσαρμογή και τροποποίηση από Ming and Song, 2011).

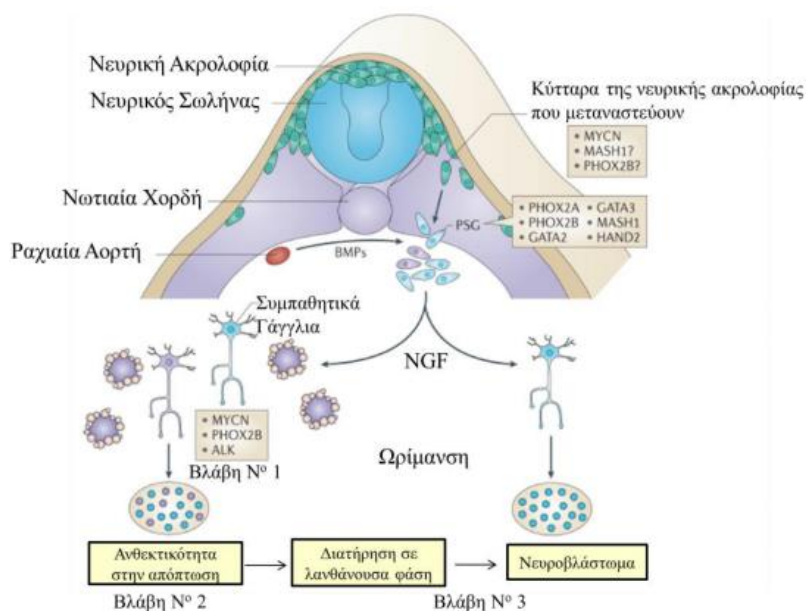
Τα βλαστικά κύτταρα στις δύο αυτές περιοχές αρχίζουν, υπό την επίδραση ενδογενών και εξωγενών παραγόντων, να διαφοροποιούνται από την αρχική κατάσταση στην οποία βρίσκονται ως κύτταρα ακτινωτής γλοίας σε ώριμους μεταμιτωτικούς νευρώνες. Τέτοιους παράγοντες αποτελούν μορφογόνα, αυξητικοί παράγοντες, νευροτροφίνες, κυτταροκίνες και ορμόνες. Επίσης, σημαντική επίδραση έχουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες μεταξύ των οποίων η άσκηση, το στρες αλλά και παθολογικές καταστάσεις. Τα κύτταρα καθώς διαφοροποιούνται εκφράζουν εξειδικευμένες πρωτεΐνες-μοριακοί δείκτες, που καθιστούν διακριτά τα διάφορα στάδια της ωρίμανσης (Εικόνα 5) (Suliman *et al.*, 2017).



**Εικόνα 5. Διαφορετικοί μοριακοί δείκτες καθώς προχωρά η ωρίμανση των βλαστικών κυττάρων στις περιοχές της ενήλικης νευρογένεσης (Προσαρμογή και τροποποίηση από Suliman et al., 2017).**

### 1.1.3 Νευροβλάστωμα

Το νευροβλάστωμα αποτελεί μια επιθετική και σπάνια μορφή καρκίνου που εμφανίζεται κατά την παιδική ηλικία. Η εμφάνιση του οφείλεται σε μετανάστευση κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας προς τη νωτοχορδή. Τα πρόδρομα συμπαθητικά νευρικά κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και αδυνατούν να διαφοροποιηθούν. Όταν το κύτταρο φτάσει στη νωτοχορδή είτε θα δεχθεί σήμα από τον NGF και θα επιβιώσει είτε όχι και θα οδηγηθεί σε απόπτωση. Κάποια όμως από τα κύτταρα που δεν θα δεχθούν σήμα από τον NGF είναι πιθανό να μην οδηγηθούν σε απόπτωση και να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται. Στη συνέχεια, αυτά τα ανθεκτικά στην απόπτωση κύτταρα μπαίνουν σε μία λανθάνουσα κατάσταση μέχρι και μετά τη γέννηση. Με τον τρόπο αυτό εμφανίζεται το νευροβλάστωμα μετά τη γέννηση και κυρίως κατά την παιδική ηλικία (Tsubota & Kadomatsu, 2017), (Marshall et al., 2014) (Pistoia et al., 2013).



**Εικόνα 6. Τα αρχικά στάδια της δημιουργίας του νευροβλαστώματος. (Προσαρμογή και τροποποίηση από Marshall et al., 2014)**

Το νευροβλάστωμα χαρακτηρίζεται από ετερογένεια, η οποία χρησιμοποιείται συστηματικά στην κλινική πρακτική για την κατηγοριοποίηση των σταδίων της νόσου καθώς οι ασθενείς συχνά παρουσιάζουν είτε εντοπισμένη είτε μεταστατική ασθένεια που είτε μπορεί να υποχωρήσει χωρίς παρέμβαση είτε μπορεί να γίνει ιδιαίτερα επιθετική ακόμα και μετά από χρόνια θεραπεία. Συγκεκριμένα, απαντώνται τουλάχιστον τρεις διαφορετικοί τύποι κυττάρων, οι οποίοι προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία. Ο πρώτος τύπος κυττάρων είναι ο νευροβλαστικός πληθυσμός ή αλλιώς τα κύτταρα τύπου N (Neuroblastic) τα οποία αποτελούν τον ογκογόνο πληθυσμό του νευροβλαστώματος καθώς έχουν την ικανότητα να δημιουργούν όγκους όταν ενεθούν σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Ο δεύτερος τύπος κυττάρων είναι ο γλοιοβλαστικός πληθυσμός ή αλλιώς τα κύτταρα τύπου S (Schwann-like) τα οποία θεωρούνται μη καρκινικά καθώς δε σχηματίζουν όγκους όταν ενεθούν σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Όσον αφορά, τον τρίτο τύπο κυττάρων του νευροβλαστώματος, αποτελείται από κύτταρα τύπου I (Intermediate) καθώς η μορφολογία που διαθέτουν είναι ενδιάμεση των N και S. Μάλιστα τα κύτταρα αυτά έχουν τη μεγαλύτερη ογκογόνο δράση (Acosta *et al.*, 2009).

## 1.2 Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος

Οι περισσότερες πρωτεΐνες αμέσως μετά τη σύνθεση τους υφίστανται μία σειρά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Posttranslational modifications-PTMs). Αυτές οι τροποποιήσεις επηρεάζουν τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των 20 αμινοξέων τροποποιώντας υπάρχουσες λειτουργικές ομάδες ή δημιουργώντας νέες μέσω διαφόρων τύπων επεξεργασίας των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων ή των καρβοξυλικών ή αμινοτελικών τους άκρων. Με τον τρόπο αυτό, επάγονται αλλαγές που επηρεάζουν το φορτίο και την υδροφοβικότητα των αμινοξέων επηρεάζοντας κατ'επέκταση τόσο τη λειτουργία όσο και τη δομή τους. Πιο συγκεκριμένα οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αποτελούν μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και επηρεάζουν τη σταθερότητα, τον υποκυτταρικό εντοπισμό, τη δομή, τη λειτουργία και την ενεργότητα μιας πρωτεΐνης, καθώς επίσης και για την ικανότητά της να αλληλοεπιδρά με άλλα μόρια. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτές είτε μη, πυροδοτούμενες από συγκεκριμένα αμινοξέα ή στοχαστικές, να υπόκεινται σε κυτταρικό έλεγχο ή να είναι τελείως ανεξάρτητες. Παίζουν έτσι καθοριστικό ρόλο σε διαδικασίες ρύθμισης του μεταβολισμού και των βιοχημικών μονοπατιών σηματοδότησης (Kokkinidis *et al.*, 2020).

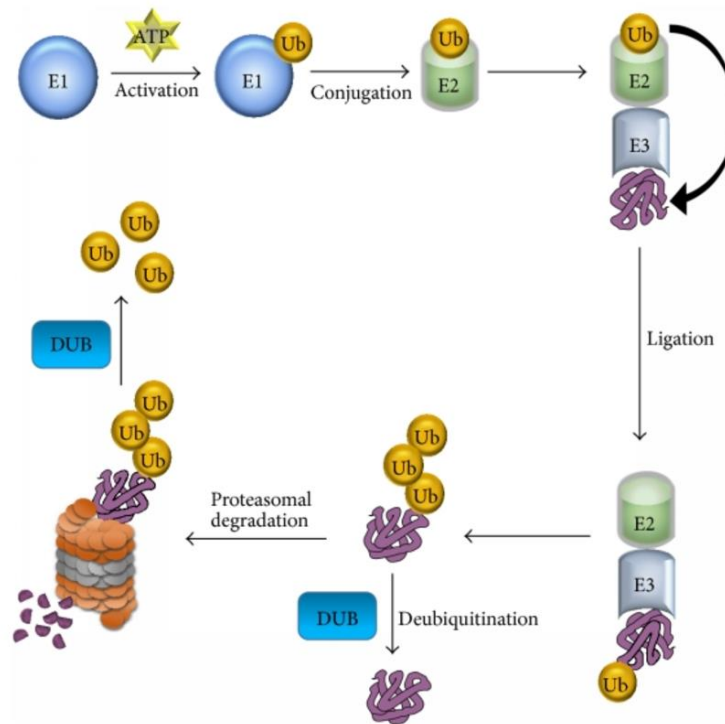
Ο ποιοτικός έλεγχος των πρωτεϊνών είναι απαραίτητος για την επιβίωση του κυττάρου, ειδικά όσον αφορά ιστούς που αποτελούνται από κύτταρα με μεγάλη διάρκεια ζωής. Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ιδιαίτερα αποδοτικούς μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών απόρροια των οποίων είναι να ζουν ένα ορισμένο χρονικό διάστημα και μετά να αποικοδομούνται με έναν έντονο ρυθμό. Η ανακύκλωση των πρωτεϊνών επιτρέπει στο κύτταρο να αντικαθιστά τις ελαττωματικές πρωτεΐνες και να τροποποιεί την πρωτεϊνική του σύσταση ανάλογα με τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες.

Το κύριο μονοπάτι επιλεκτικής αποικοδόμησης πρωτεϊνών στα ευκαρυωτικά κύτταρα βασίζεται στη στόχευση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών για γρήγορη πρωτεόλυση μέσω της



ομοιοπολικής προσθήκης σε αυτές **ουβικιτίνης**. Η ουβικιτίνη αποτελεί ένα θερμοανθεκτικό πεπτίδιο 8,5 kDa που αποτελείται από 76 αμινοξέα της οποίας η πρόσδεση σε πρωτεΐνες-στόχους συμβαίνει αντιστρεπτά και αντιστρέφεται από τις από-ουβικουτινάσες. Η ομοιοπολική σύνδεση της ουβικιτίνης σε πρωτεΐνες-υποστρώματα πραγματοποιείται μέσω ενός ισοπεπτιδικού δεσμού που σχηματίζεται ανάμεσα στην καρβοξυτελική γλυκίνη (G76) της ουβικιτίνης και μια ε-αμινομάδα λυσίνης από το μόριο-στόχο ή την ίδια την ουβικιτίνη. Η ουβικιτινίωση καταλύεται από ένα ενζυμικό σύμπλεγμα, που αποτελείται από ένα E1 ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικιτίνης, ένα E2 ένζυμο σύζευξης ουβικιτίνης και μία E3 λιγάση ουβικιτίνης η οποία μεταφέρει την ουβικιτίνη στην πρωτεΐνη-στόχο και είναι αυτή που παρέχει εξειδίκευση για την αποικοδόμηση του υποστρώματος. Στο ανθρώπινο πρωτέωμα υπάρχουν 2 E1s, περίπου 40 E2s και περισσότερες από 600 E3s οι οποίες αποτελούν και την πιο ετερογενή ομάδα ενζύμων του μονοπατιού της ουβικιτίνης. Οι E3s διακρίνονται σε 3 κατηγορίες ανάλογα με την ύπαρξη χαρακτηριστικών δομικών επικρατειών και το μηχανισμό μεταφοράς της ουβικιτίνης στην πρωτεΐνη-στόχο, τις HECT, RING και RBR. (Desheies *et al.*, 2009)

Αρχικά, η ουβικιτίνη, η οποία όταν δεν είναι άμεσα διαθέσιμη απελευθερώνεται πρωτεολυτικά από μια πρόδρομη πρωτεΐνη, ενεργοποιείται όταν η τελική καρβοξυλική ομάδα της συνδέεται σε μια σουλφυδρυλική ομάδα του E1 με θειοεστερικό δεσμό. Για τη δημιουργία του θειοεστερικού δεσμού απαιτείται πρώτα η υδρόλυση του ATP, αντίδραση που αποτελεί το «σήμα» για την ενεργοποίηση της διαδικασίας. Μια ομάδα αδενυλικού συνδέεται στην (C-τελική καρβοξυλική ομάδα της ουβικιτίνης με απομάκρυνση πυροφωσφορικού και η ουβικιτίνη μεταφέρεται σε μια σουλφυδρυλική ομάδα ενός βασικού καταλοίπου κυστεΐνης στο E1. Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη ουβικιτίνη μετατοπίζεται σε μια σουλφυδρυλική ομάδα του E2. Τέλος, το E3 καταλύει τη μεταφορά της ουβικιτίνης από το E2 σε μια ε-αμινική ομάδα στην πρωτεΐνη-στόχο. Η ουβικιτίνη περιέχει επτά συντηρημένα κατάλοιπα λυσίνης (K6, K11, K27, K29, K33, K48 και K63) οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό της ουβικιτινικής αλυσίδας. Αν και το συστατικό E3 εξασφαλίζει σε μεγάλο βαθμό την εξειδίκευση έναντι του υποστρώματος για την ουβικιτινίωση, οι πολλαπλοί συνδυασμοί του συμπλόκου E2-E3 επιτρέπουν τον πλέον εξαιρετικό συντονισμό της διάκρισης του υποστρώματος. (Pickart, 2001)



**Εικόνα 7: Το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος** α) Η ουβικιτίνη ενεργοποιείται για μεταφορά από το ένζυμο E1, β) μεταφέρεται στο E2-συνδετικό ένζυμο, γ) το σύμπλοκο E2-ουβικιτίνης αλληλεπιδρά με μια E3 λιγάση, δ) το υπόστρωμα οδηγείται σε πρωτεασωμική αποικοδόμηση (Suresh et al., 2016)

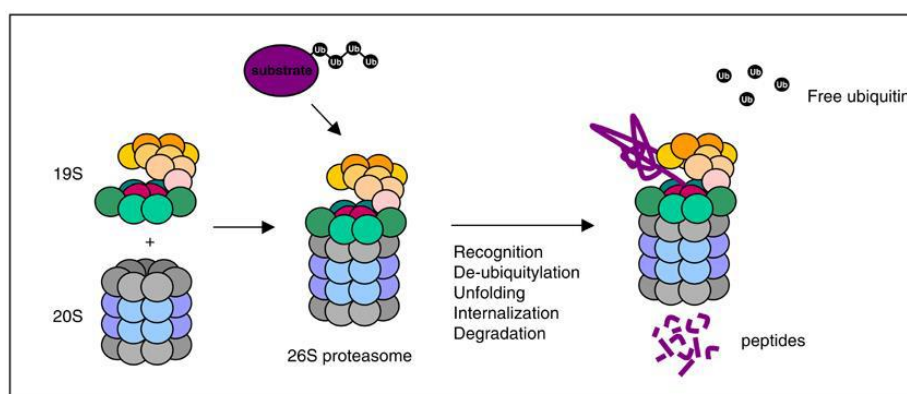
Επιπρόσθετα, το αμινοτελικό άκρο της ουβικιτίνης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο σχηματισμό γραμμικών πολύ-ουβικιτίνικών αλυσίδων. Αν η χρησιμοποιούμενη λυσίνη για τη σύνδεση με την ουβικιτίνη, βρίσκεται μόνο στο υπόστρωμα, τότε η τροποποίηση αναφέρεται ως μονο-ουβικιτινίωση (mono-ubiquitination), αν όμως η λυσίνη της αμινομάδας που χρησιμοποιείται για την σύνδεση με την ουβικιτίνη, εντοπίζεται μέσα σε ουβικιτίνη συνδεδεμένη με το υπόστρωμα, η τροποποίηση ονομάζεται πολύ-ουβικιτινίωση (poly-ubiquitination). Η στόχευση προς πρωτεασωμική αποικοδόμηση διαμεσολαβείται σχεδόν αποκλειστικά από την ουβικιτινίωση και ιστορικά έχει συνδεθεί με τις K48 πολυουβικιτίνικές αλυσίδες. (Hochstrasser, M 2009)

Πέρα από τη στόχευση πρωτεϊνών για αποικοδόμηση μέσω του 26S πρωτεασώματος, η ουβικιτινίωση μπορεί να εξυπηρετεί και άλλες λειτουργίες καθώς, για παράδειγμα, η προσθήκη ενός μορίου ουβικιτίνης ενέχεται στον έλεγχο κρίσιμων κυτταρικών διαδικασιών όπως η επιδιόρθωση του DNA, η μεταγραφή και η ενδοκυττάρωση. Στο ίδιο πλαίσιο, μπορεί μια πρωτεΐνη αντί να αποικοδομηθεί να αλλάξει υποκυτταρικό εντοπισμό ή να συμμετέχει στην προώθηση ή την καταστολή πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. (Chen et al., 2009)

Ειδικότερα, ορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες ουβικιτινιλιώνονται έπειτα από την αναγνώρισή τους από λιγάσες ουβικιτίνης και με αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση γονιδίων και έτσι η γονιδιακή έκφραση προσαρμόζεται στις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον, ορισμένες κυκλίνες που ελέγχουν τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου συντίθενται και αποικοδομούνται με έναν αυστηρά ρυθμιζόμενο τρόπο κατά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα σημαντική τη σωστή διαίρεση του κυττάρου. Επιπρόσθετα, βλάβες στο DNA προκαλούν την παύση του κυτταρικού κύκλου σε ορισμένα σημεία με αποτέλεσμα να δίνεται χρόνος στο κύτταρο να τις επιδιορθώσει και να αποφεύγεται η μεταφορά τους στα θυγατρικά κύτταρα. Έτσι, η φωσφατάση Cdc25 που είναι υπεύθυνη για τη μετάβαση στη φάση αντιγραφής του DNA ουβικιτινιλιώνεται και αποικοδομείται. (Schreiber A. *et al.*, 2013)

### 1.3 Το πρωτεάσωμα

Το 26S πρωτεάσωμα ( 2.5 MDa) είναι μία πρωτεάση αποτελούμενη από έναν 20S πρωτεολυτικό κορμό και το 19S ρυθμιστικό σωματίο. Το 26S πρωτεάσωμα βρίσκεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτοσόλιο, όπου αποικοδομεί άμεσα μικρού χρόνου ημιζωής πρωτεΐνες. Ο 20S πρωτεολυτικός κορμός αποτελείται από τέσσερις ετερο-επταμερικούς δακτυλίους που σχηματίζουν ένα κεντρικό κανάλι. Κάθε δακτύλιος περιέχει επτά διαφορετικές, αλλά ομόλογες α-τύπου ή β-τύπου υπομονάδες, που σχηματίζουν έναν α- ή β- δακτύλιο αντίστοιχα. Τα καταλυτικά κατάλοιπα εντοπίζονται στο κεντρικό κανάλι του 20S κορμού. Στους ευκαρυώτες, το κανάλι φράσσεται από το 19S ρυθμιστικό σωματίο σε κάθε άκρο (doubled-capped) ή μόνο στο ένα άκρο (single-capped). Το 19S σωματίο ρυθμίζει το άνοιγμα του καναλιού, είναι το πρώιμο σημείο αναγνώρισης του υποστρώματος, επάγει την από- ουβικιτινίωση, το ξεδίπλωμα και την μεταφορά των ουβικιτινιλιωμένων υποστρωμάτων. (Desheies *et al.*, 2009)



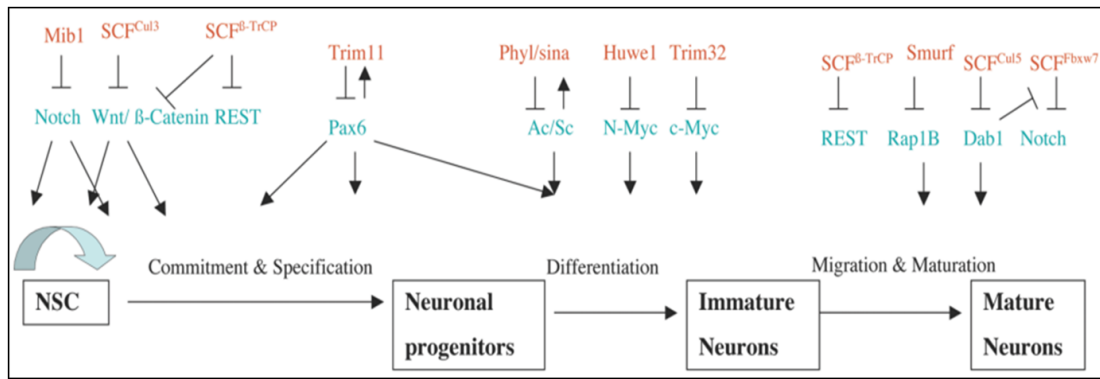
**Εικόνα 8: Το 26S πρωτεάσωμα.** Είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση ουβικιτινιλιωμένων πρωτεϊνών, που πέπτονται σε μικρά ανενεργά πεπτίδια. Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από τις υπομονάδες 20S και 19S. Η 20S υπομονάδα χαρακτηρίζεται από καταλυτικές ιδιότητες, ενώ η 19S ξεδιπλώνει τα ουβικιτινιλιωμένα υποστρώματα και αφαιρεί την ουβικιτινική αλυσίδα μετά την αποικοδόμηση.

#### 1.4 E3 λιγάσες και νευρογένεση

Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά της νευρογένεσης στον ενήλικο εγκέφαλο είναι ότι οι μηχανισμοί που την ελέγχουν, λαμβάνουν χώρα σε ένα εντελώς διαφορετικό περιβάλλον σε σχέση με αυτό του εμβρυικού εγκεφάλου. Όπως προαναφέρθηκε, τα νευρικά βλαστικά κύτταρα δίνουν γένεση σε νευρώνες σε δύο περιοχές στον ενήλικο εγκέφαλο: στην υποκοκκιδώδη ζώνη της οδοντωτής έλικας του υπόκαμπου και στην υποκοιλιακή ζώνη των πλάγιων κοιλιών. Η νευρογένεση σε αυτές τις δύο περιοχές ελέγχεται από μία σειρά σημάτων, τα οποία μεταφράζονται σε μία σειρά από προγράμματα γονιδιακής έκφρασης ειδικών σταδίων τα οποία ελέγχουν την ανάπτυξη των νευρικών βλαστικών κυττάρων σε ώριμους νευρώνες. (Stoykova et al., 2010)

Στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα, η αποικοδόμηση πρωτεϊνών μέσω του πρωτεασώματος αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή του πολλαπλασιασμού των πρόδρομων νευρικών κυττάρων, της νευρικής διαφοροποίησης των νευρικών βλαστικών κυττάρων τα οποία μέσω μιας σειράς διαδοχικών βημάτων οδηγούν στη δημιουργία νευρικών και γλοιακών κυττάρων, της ωρίμανσής τους σε ώριμους νευρώνες και της μετανάστευσης των αναπτυσσόμενων νευρικών κυττάρων προς τη νωτοχορδή. και σε αυτό το πλαίσιο, το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος αποτελεί σημαντικό μηχανισμό ελέγχου απαραίτητο για τη νευρική διαφοροποίηση. (Schwartz AL et al., 2009)

Σε αυτό το πλαίσιο λοιπόν, αναδεικνύεται ο κρίσιμος ρόλος των E3 λιγασών. Για παράδειγμα, η E3 λιγάση Mib1 αποικοδομεί τους προσδέτες του μονοπατιού Notch με αποτέλεσμα το μονοπάτι Notch να είναι ανενεργό, να μην καταστέλλεται η έκφραση προ-νευρικών γονιδίων και να επάγεται η μετατροπή του νευρικού βλαστικού κυττάρου σε πρόδρομο νευρικό. Επιπλέον, οι E3 λιγάσες SCF<sup>Cul3</sup> και SCF<sup>B-TrcP</sup> αποικοδομούν μόρια απαραίτητα για την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που διατηρούν τα νευρικά βλαστικά κύτταρα σε μία αδιαφοροποίητη κατάσταση. Ιδιαίτερη βαρύτητα δίνεται στην E3 λιγάση TRIM32 η οποία μειώνει τον πολλαπλασιασμό κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, κατανέμεται ασύμμετρα στα θυγατρικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της νευρογένεσης (E14.5) επάγοντας την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο, ευνοώντας τη νευρική διαφοροποίηση και μειώνει τα επίπεδα του ογκογονιδίου *c-myc* όταν υπερεκφράζεται. Το γεγονός ότι με βάση τα παραπάνω, επάγεται η νευρική διαφοροποίηση αποδεικνύεται και από την αναστολή της μεταγραφής του microRNA *Let-7a* από το *c-myc* με αποτέλεσμα το *Let-7a* να μην μπορεί να επάγει τη νευρική διαφοροποίηση. (Yoon KJ et al., 2008) (Ballas N et al., 2005) (Schwamborn JC et al., 2009)



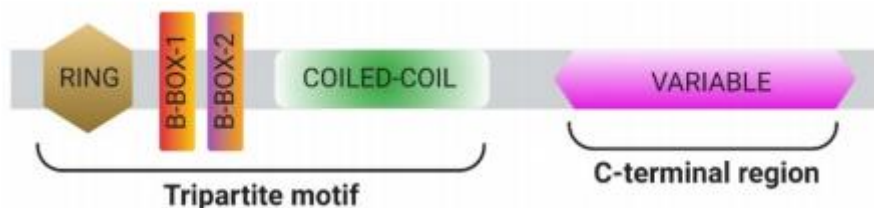
**Εικόνα 9:** Οι κυριότερες E3 λιγάσες που λαμβάνουν μέρος στη νευρογένεση, με κόκκινο χρώμα, και με μπλε χρώμα τα υποστρώματά τους. (Stoykova et al., 2010)

Η αποικοδόμηση του c-myc από την πρωτεΐνη TRIM32 αποδείχθηκε σε ένα κυτταρικό μοντέλο πρόδρομων νευρικών κυττάρων ποντικού. Δεδομένου ότι για τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης των νευρικών βλαστικών κυττάρων απαιτείται η ανταγωνιστική δράση μεταξύ μίας E3 λιγάσης και μίας από-ουβικουτινάσης, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η E3 λιγάση TRIM32 ανταγωνίζεται με την USP7 από-ουβικουτινάση προκειμένου η τελευταία να αποτρέψει τη νευρική διαφοροποίηση και να σταθεροποιηθούν τα επίπεδα έκφρασης του c-myc. (Schwamborn JC et al., 2009)

## 2. Η πρωτεΐνη TRIM32

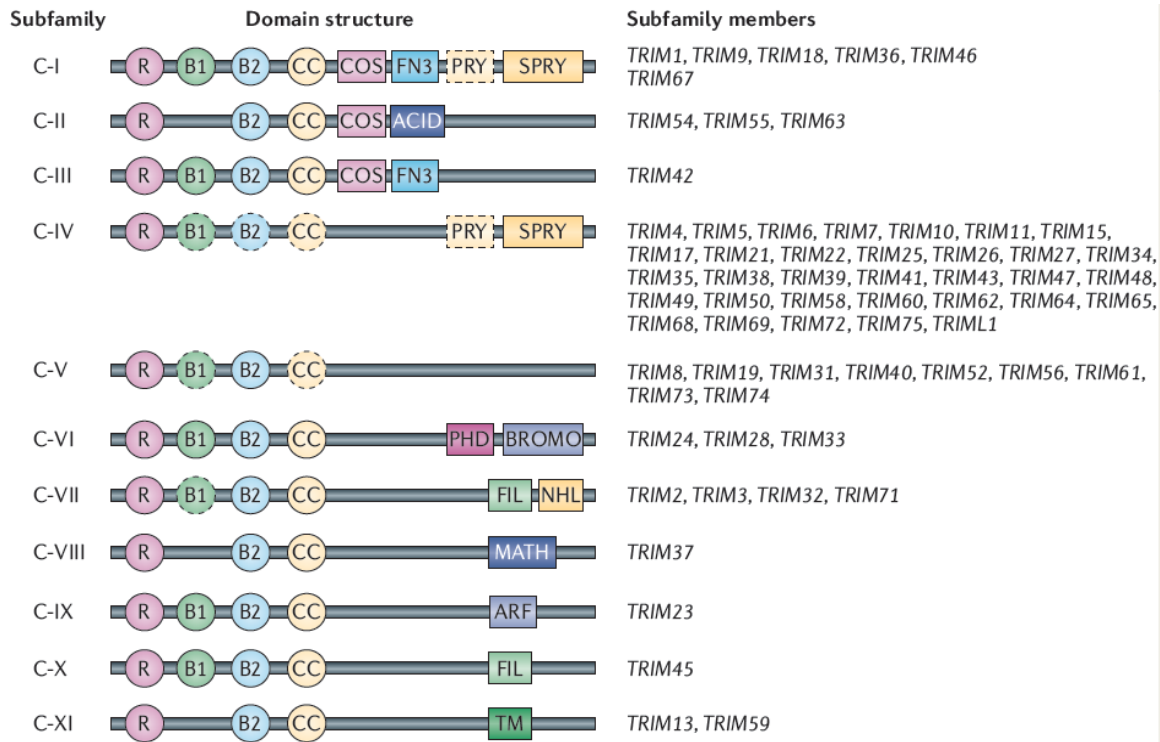
### 2.1 Η οικογένεια των πρωτεϊνών TRIM

Οι πρωτεΐνες TRIM (Tripartite Motif) χαρακτηρίζονται από τις επικράτειες: δακτύλιος RING, B-box, coiled-coil που είναι σταθερές και NHL που είναι μεταβλητή και αποτελούν μία ευρεία πρωτεϊνική οικογένεια 70 περίπου μελών τα οποία συμμετέχουν σε ποικίλες βιολογικές διαδικασίες, όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, η απόπτωση, η γήρανση, η μεταγραφή και η ογκογένεση. (Tochini et al., 2015)



**Εικόνα 10:** Οι βασικές δομικές επικράτειες των πρωτεϊνών TRIM (Geisbrecht et al., 2021)

Κάθε επικράτεια έχει ανεξάρτητη δράση και η ποικιλία ως προς την οργάνωση του C-τελικού άκρου καθορίζει τα δομικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης.



**Εικόνα 11:** Η TRIM πρωτεϊνική οικογένεια (Geisbrecht et al., 2021)

Οι TRIM πρωτεΐνες μεταφέρουν ουβικιτίνη σε συγκεκριμένα υποστρώματα, αλλά εμπλέκονται ακόμη σε τροποποιήσεις όπως η SUMOυλίωση. Τα θηλαστικά έχουν 70 γονίδια TRIM που κατηγοριοποιούνται σε δύο εξελικτικές κατηγορίες: i) σε μεγάλο βαθμό διατηρημένα γονίδια που συντηρούνται και στα ασπόνδυλα ii) νεότερα εξελικτικά και γρήγορα εξελισσόμενα που υπάρχουν μόνο στα θηλαστικά και δύσκολα έχουν συντηρηθεί ακόμη και ανάμεσα σε ίδιες φυλογενετικές τάξεις.

## 2.2 Δομή και μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης TRIM32

Η TRIM32 πρωτεΐνη ανακαλύφθηκε το 1995 και φαίνεται να συμμετέχει σε έναν αριθμό διαφορετικών βιολογικών μονοπατιών. Ανήκει στην TRIM πρωτεϊνική οικογένεια και αποτελείται από τέσσερις βασικές δομικές περιοχές. (Wulczyn et al., 2010)

Η βασική λειτουργική περιοχή της είναι η RING που αποτελείται από τέσσερα ζεύγη καταλοίπων Zn, ένα συντηρημένο μοτίβο 7 καταλοίπων κυστεΐνης και ενός καταλοίπου ιστιδίνης και προσδίδει ενεργότητα E3 λιγάσης στο μόριο, αν και αρχικά είχε βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες που περιείχαν την RING δεσμευόταν μόνο στο DNA. Λειτουργικά αποτελεί την “γέφυρα” που συνδέει το υπόστρωμα με τις E2, όντας ειδική για το υπόστρωμα και είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της βιολογικής δραστηριότητας. Προκειμένου η πρωτεΐνη να μπορέσει να εκδηλώσει τη δραστηριότητα E3 λιγάσης, απαιτείται η ύπαρξη ενός καταλοίπου προλίνης έπειτα από κυστεΐνη στην έβδομη θέση. (Koliopoulos et al, 2016)

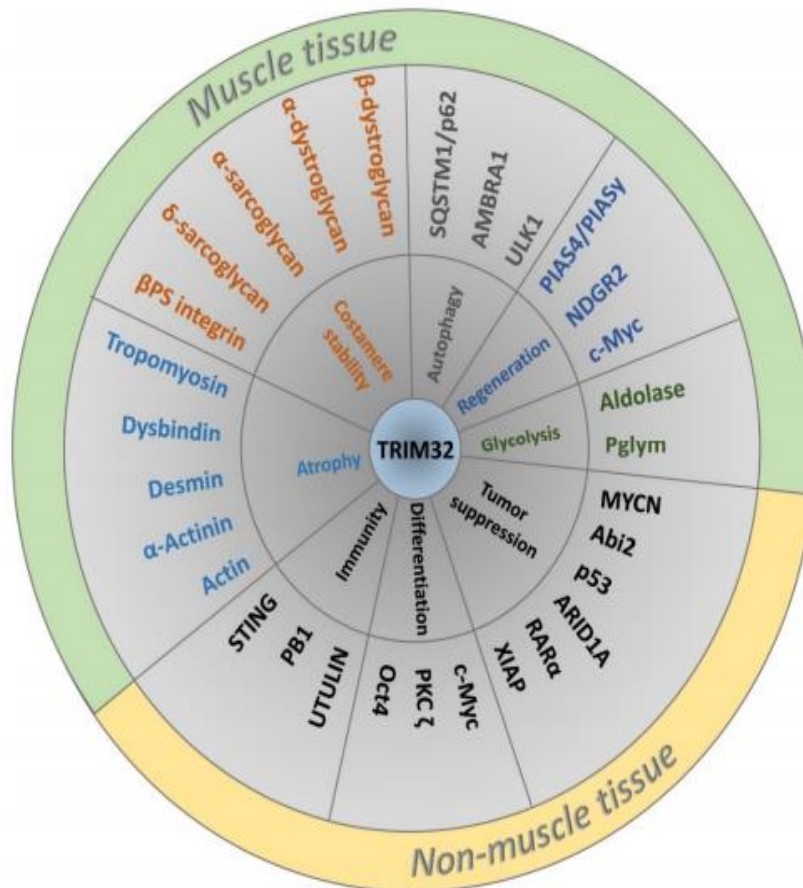
Οι άλλες δύο περιοχές σε γειτνίαση με την RING, B-Box και Coiled-Coil, είναι υπεύθυνες για αλληλεπίδραση με διάφορα υποστρώματα. Η B-Box περιοχή είναι υπεύθυνη για τη συναρμολόγηση των αλυσίδων ουβικιτίνης και συμβάλει στον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης ενώ η CC συμβάλει στον δι-πολυμερισμό του μορίου σε αντιπαράλληλη διεύθυνση (με την συμμετοχή της RING) κάτι που καθιστά το TRIM32 μια E3 λιγάση υψηλής συγγένειας. (Nisole et al., 2009)

Η NHL περιοχή (αρχικά από NCL1, HT2A, LIN41) δομείται από πέντε περιοχές σε στενή γειτνίαση σχηματίζοντας μια δομή προπέλα και οι οποίες αναδιπλώνονται σε ένα μοτίβο τεσσάρων αντιπαράλληλων β-πτυχωτών φύλλων που είναι οργανωμένο τορο-ειδικά γύρω από έναν κεντρικό άξονα. Η περιοχή αυτή ενισχύει τη δέσμευση του υποστρώματος ή/και μπορεί να λειτουργεί ως γέφυρα για να προσελκύσει υποστρώματα που βρίσκονται γειτονικά αυτής στο κύτταρο. (Bawa S et al., 2020) Έχει υποτεθεί ότι αλληλεπιδρά με ορισμένα miRNAs αλλά και με πληθώρα υποστρωμάτων όπως η Argonaute-1, στόχος της οποίας είναι το Let-7a που είναι απαραίτητο για τη νευρική διαφοροποίηση. Έτσι, η TRIM32 πυροδοτεί τουλάχιστον δύο γεγονότα που προάγουν την νευρογένεση: ενεργοποιεί miRNAs και οδηγεί το c-Myc σε πρωτεασωματική αποικοδόμηση .

Η πρωτεΐνη εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο νευρικό και το μυϊκό σύστημα ενώ σε επίπεδο κυττάρου απαντάται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, αλλά μπορεί να βρεθεί και στον πυρήνα, όπου αλληλεπιδρά με την επικράτεια ενεργοποίησης της HIV Tat πρωτεΐνης. (Fatima M, 2016) Ο εντοπισμός της σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα υποδηλώνει και διαφορετική λειτουργία. Στην περίπτωση που αυτή μπαίνει στον πυρήνα έχει αποδειχθεί ότι δρα ως μεταγραφικός παράγοντας μεταβάλλοντας την έκφραση ορισμένων γονιδίων όπως η  $\alpha$ -synuclein (Pavlou MA et al., 2016) Στην περίπτωση που ο εντοπισμός όμως είναι κυτταροπλασματικός, εξάγεται το συμπέρασμα ότι έχει δράση E3 λιγάσης.

Πολλά υποστρώματα της πρωτεΐνης TRIM32 έχουν αναγνωρισθεί και στα οποία μεταξύ άλλων περιλαμβάνονται πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μυϊκή λειτουργία όπως η ακτίνη, η  $\alpha$ -ακτινίνη, η δεσμίνη, η τροπομυοσίνη και η dysbindin, πρωτεΐνες-ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου όπως τα

ογκογονίδια c-myc και N-Myc και οι πρωτεΐνες p53 και Abi2, παράγοντες απαραίτητους για τον επαναπρογραμματισμό όπως ο Oct4, καθώς και πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την αυτοφαγία και την αναγέννηση των ιστών. ( Locke M et al., 2009) (Cohen S, et al., 2012) (Kudryashova E, et al., 2005) (Kano S, et al., 2008) (Liu J, et al., 2014) (Izumi H, 2014) (Schwamborn JC et al., 2009)



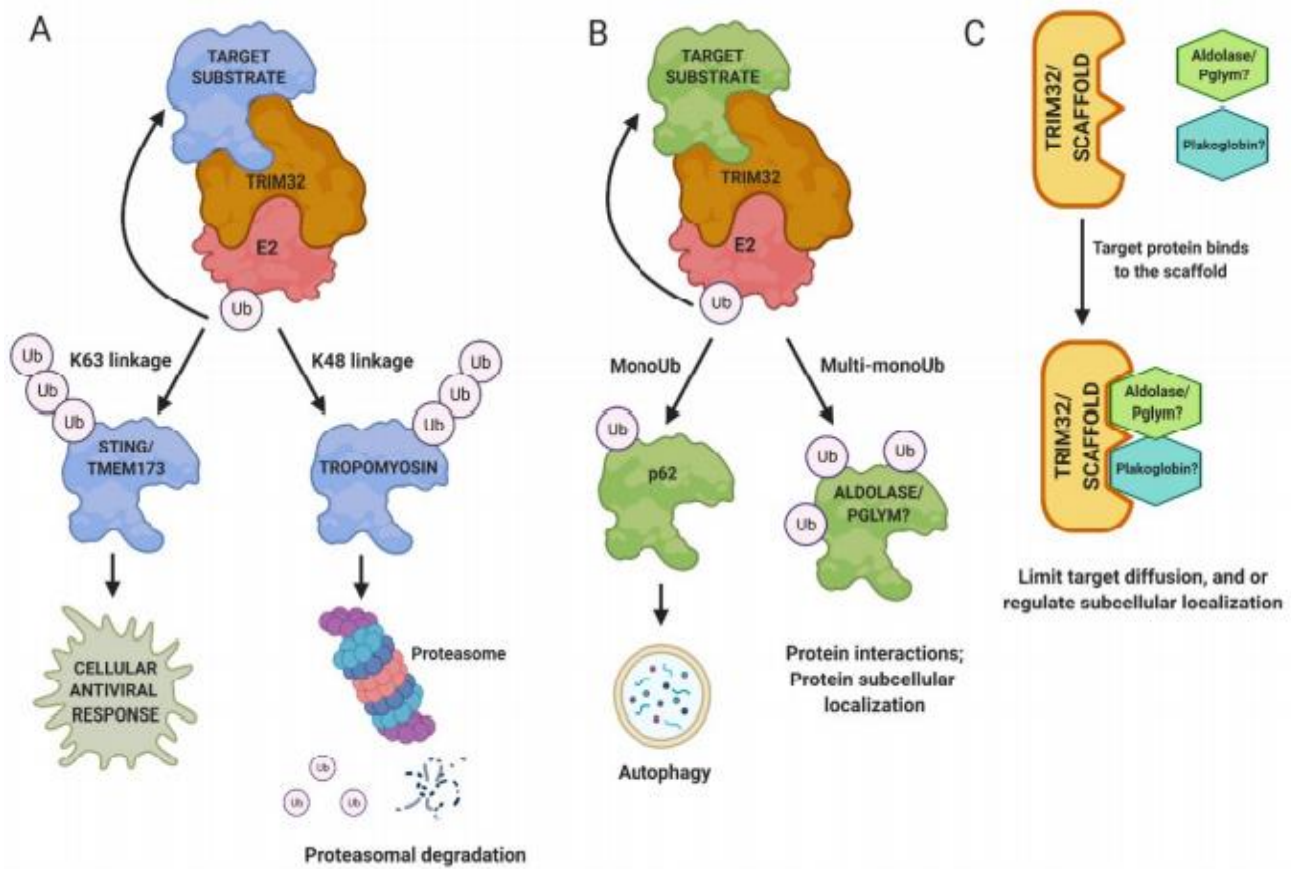
Εικόνα 12: Οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά το TRIM32 (Geisbrecht et al., 2021)

Δρα μέσω 3 μηχανισμών:

- Την προσθήκη αλυσίδων πολυουβικιτίνης με αποτέλεσμα την πρωτεασωμική αποικοδόμηση πρωτεϊνών-στόχων.
- Την μονο-ουβικουτίνωση σε ένα σημείο όπως στην πρωτεΐνη-ρυθμιστή της αυτοφαγίας p62 ή σε πολλά διαφορετικά σημεία επηρεάζοντας την αυτοφαγία, την κατανομή των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο ή τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες.



- Μπορεί να δρα ως πλατφόρμα προσέλευσης άλλων πρωτεϊνών περιορίζοντας την κατανομή τους μέσα στο κύτταρο ή ρυθμίζοντας την υποκυτταρική τους εντόπιση.



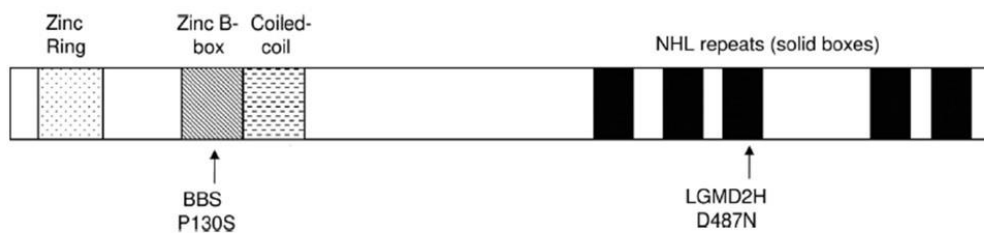
Εικόνα 13: Οι βασικοί μηχανισμοί δράσης της πρωτεΐνης TRIM32 (Geisbrecht et al., 2021)

## 2.3 TRIM32 και ασθένειες

Η πρωτεΐνη TRIM32 έχει συσχετιστεί με δύο διαφορετικές ασθένειες που εμφανίζονται στον άνθρωπο: τη μυϊκή δυστροφία Limb-Girdl και το σύνδρομο Bardet-Biedl. Αυτές οι δύο ασθένειες έχουν διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αλλά προκαλούνται από παρανοηματικές μεταλλάξεις σε διαφορετικά domains της πρωτεΐνης. Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα εστιάσουμε στο σύνδρομο Bardet-Biedl.

Μυϊκή δυστροφία Limb-Girdl 2H: Η μυοπάθεια αυτή ανήκει σε μια ευρύτερη ομάδα μυοπαθειών των οποίων η κληρονομισιμότητα πραγματοποιείται με αυτοσωμικό επικρατή και υπολειπόμενο τρόπο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο τύπος 2H είναι αυτοσωμικός υπολειπόμενος. Η ασθένεια αυτή μπορεί να είναι από ασυμπτωματική μπορεί όμως και να οδηγήσει σε μυϊκή αδυναμία, δυσκολία κατά την αναπνοή ακόμα και σε απώλεια της ικανότητας βόδισης. Έχει βρεθεί ότι μια μετάλλαξη στο κατάλοιπο 487 της NHL περιοχής του TRIM32 μπορεί να οδηγήσει στη μυϊκή δυστροφία Limb-Girdl (LGMD2H). Συγκεκριμένα μια παρανοηματική μεταλλαγή του ασπαρτικού οξέος σε ασπαραγίνη μειώνει την ικανότητα αλληλεπίδρασης του TRIM32 με την Piasy οδηγώντας, λόγω αυτού, σε πιθανή εμπλοκή του NF-κB μέσω αναστολής του στην ανάπτυξη της LGMD2H. (Frosk P , et al., 2002) (Albor et al., 2006)

Σύνδρομο Bardet-Biedl: Είναι ένα σύνδρομο που παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια στον άνθρωπο. Πρόκειται για μια πλειοτροπική γενετική διαταραχή η οποία οφείλεται σε μεταλλάξεις τουλάχιστον 15 διαφορετικών γονιδίων, κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και επηρεάζει τον ανθρώπινο οργανισμό σε πολλά επίπεδα επιφέροντας μεταξύ άλλων παχυσαρκία, αμφιβληστροειδοπάθεια, πνευματική καθυστέρηση, υπογοναδισμό και νεφρική δυσλειτουργία. Αποτελεί μια ciliopathy, καθώς οφείλεται σε δυσλειτουργία ενός οργανιδίου του κυττάρου που ονομάζεται cilium. Μια παρανοηματική μεταλλαγή στο κατάλοιπο 130 που οδηγεί σε αλλαγή της προλίνης σε σερίνη στη B-box περιοχή της πρωτεΐνης, αλλάζει τη λειτουργία της. Σημαντικό είναι επίσης ότι δυσλειτουργία των BBS πρωτεϊνών μία από τις οποίες είναι και το TRIM32 (BBS11) μπορεί να οδηγήσει σε αναπτυξιακές ανωμαλίες του αριστερού-δεξιού μοτίβου ανάπτυξης στο zebrafish αναδεικνύοντας τη σημαντικότητα του μορίου αυτού σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. (Blacque et al., 2006) (Sheffield VC, 2004) (Chiang et al., 2006) (Loktev et al., 2008)



Εικόνα 14: Οι περιοχές του TRIM32 και οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με τις δύο ασθένειες

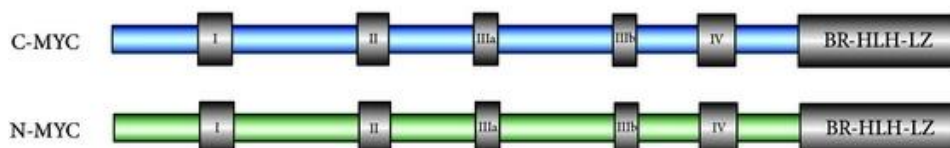
### 3. Σημαντικές βιολογικές διεργασίες και ρυθμιστικά μόρια που επηρεάζονται από την πρωτεΐνη TRIM32

#### 3.1 Τα πρωτο-ογκογονίδια c-myc και N-Myc

Στην παρούσα εργασία δίνεται έμφαση στα δύο αυτά πρώτο-ογκογονίδια που αποδεδειγμένα αποτελούν άμεσους στόχους του TRIM32 και η μεταβολή τους επηρεάζει καθολικά την μοίρα ενός κυττάρου. Για το λόγο αυτό θα αναφερθούν πρώτα γενικά δομικά και λειτουργικά στοιχεία και στη συνέχεια θα εμβαθύνουμε στην αλληλεπίδρασή τους με το TRIM32 και στις επιπτώσεις που έχει στην κυτταρική λειτουργία.

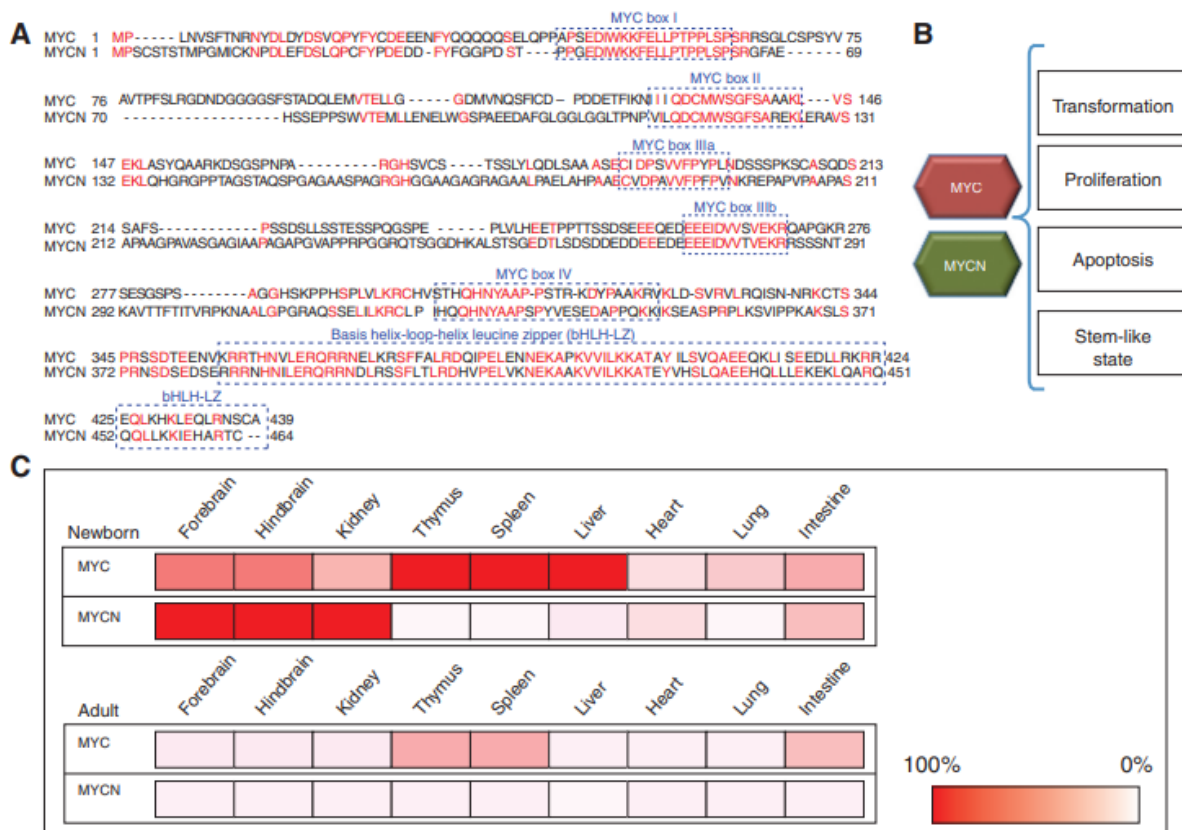
##### 3.1.1 Δομικά και λειτουργικά στοιχεία N-MYC και c-MYC

Η οικογένεια των γονιδίων Myc πρωτοανακαλύφθηκε σε ασθενείς που έπασχαν από λέμφωμα Burkitt. Αποτελείται κυρίως από τα N-Myc, c-Myc και L-Myc τα οποία είναι πυρηνικές φωσφοπρωτεΐνες και δρουν κυρίως ως μεταγραφικοί παράγοντες. Οι σημαντικότερες λειτουργικές περιοχές τους είναι: η bHLH (basic helix-loop-helix) όπου πραγματοποιείται δέσμευση του DNA και η LZ (leucine zipper) στην οποία δεσμεύεται η MAX. (Gearhart J et al., 2007) (Cotterman et al., 2008)



Εικόνα 15: Οι δομικές περιοχές των ογκογονιδίων c-myc και N-Myc

Οι κωδικές περιοχές του MYC και του MYCN έχουν υψηλή ομολογία με τις 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές και τα γονιδιακά προϊόντα να έχουν παρόμοια μεγέθη. Επιπλέον, οι περιοχές για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ DNA-πρωτεϊνών καθώς και για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις είναι συντηρημένες. Η έκφραση των MYC και MYCN χαρακτηρίζεται από ιστοειδικότητα αλλά η δράση τους είναι παρόμοια όσον αφορά τις μοριακές λειτουργίες. Ειδικότερα, το MYCN εκφράζεται σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια και είναι αυξημένο στον πρόσθιο εγκέφαλο, τους νεφρούς και τον οπίσθιο εγκέφαλο νεογνών ενώ το MYC ανιχνεύεται σε ένα ευρύ φάσμα νεογέννητων και ενήλικων ιστών. (Ruiz et al., 2017) (Stanton et al., 1986) (Huang et al., 2021)



Εικόνα 16: α) Η ομολογία των ογκογονιδίων *c-myc* και *N-Myc*, οι παρόμοιες λειτουργίες τους (β) και η ιστοειδική τους έκφραση(γ)

Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν κυρίως ως μεταγραφικοί παράγοντες επηρεάζοντας ένα πολύ μεγάλο αριθμό γονιδίων (εικάζεται περί του 15%) Η λειτουργικότητά τους έχει ταυτιστεί με την ενεργοποίηση ακετυλοτρανσφερασών ιστονών (HATs), αφού προηγουμένως έχουν δεσμευθεί σε συγκεκριμένες γονιδιακές αλληλουχίες τα E-boxes. Η ιδιότητα αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι *Myc*, εκτός από μεταγραφικοί παράγοντες είναι και ρυθμιστές χρωματινικών δομών. Η σημαντικότητα των πρωτεϊνών αυτών γίνεται εμφανής από το ότι παίρνουν μέρος σε κύρια κυτταρικά μονοπάτια όπως *Wnt*, *Shh* και *MAPK/ERK*. Η ενεργοποίηση των *Myc* και η ρύθμιση κομβικών γονιδίων έχουν ως αποτέλεσμα την εμπλοκή τους σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως: η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός, η αυτο-ανανέωση και η διαφοροποίηση.

### **3.1.2 Η συμμετοχή των N-MYC και c-Myc στον πολλαπλασιασμό των νευροβλαστωματικών κυττάρων.**

Εμβαθύνοντας περισσότερο, θα αναφερθεί αναλυτικότερα η συνεισφορά τους στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω της αλληλεπίδρασης με μία μεγάλη ποικιλία μορίων. Τα περισσότερα βιβλιογραφικά στοιχεία δείχνουν ότι η αλληλεπίδραση του N-MYC με συγκεκριμένα μόρια αφορά το επίπεδο της μεταγραφής τονίζοντας τη δράση του μορίου ως μεταγραφικού ενεργοποιητή. Μία πρώτη δράση είναι η επαγωγή μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης του E2F2 και η ακόλουθη αύξηση του πολλαπλασιασμού. (Sears et al., 1997) Ομοίως με τις κυκλίνες D1 και D2, ο E2F2 αποτελεί καθοδικό στόχο του N-MYC κατά το μονοπάτι Sonic-Hedgehog. Το N-MYC επίσης οδηγεί σε αύξηση του πολλαπλασιασμού μέσω ενεργοποίησης της πρωτεΐνης HMGA1 που είναι υπεύθυνη για την κυτταρική ανάπτυξη. (Giannini et al., 2005). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι σε νευροβλαστωματικά κύτταρα που εκφράζουν N-MYC, παράγεται σε υψηλά επίπεδα ένα μεταβολικό ένζυμο, η 2-υδροξυμεθυλοτρανσφεράση της σερίνης (SHMT2) η οποία είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση μιας σερίνης σε γλυκίνη και ένα ανθρακικό προϊόν. (Ye J et al., 2014) Τα υψηλά ποσοστά γλυκίνης είναι ένδειξη βιοσύνθεσης σε μεγάλο βαθμό, έμμεσα, υψηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού. Σημαντική είναι επίσης η συμβολή του N-MYC στο μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR. Συγκεκριμένα, έχει συσχετιστεί η ενεργοποίηση της AKT μέσω φωσφορυλίωσης στην Thr308 με τα υψηλά ποσοστά του N-MYC στα νευροβλαστώματα. (Opel D et al., 2007) Τέλος, η σημαντικότερη πληροφορία που μας δίνεται βιβλιογραφικά είναι η αλληλεπίδραση του N-MYC με το p53 και η ακόλουθη αύξηση της έκφρασής του. Ωστόσο, το στοιχείο που προκαλεί περιέργεια είναι ο ρόλος του πρωτο-ογκογονιδίου Mdm2 το οποίο αποτελεί μεταγραφικό στόχο του N-MYC ενώ παράλληλα αλληλεπιδρά με το p53 μειώνοντας τα επίπεδα του οδηγώντας σε ένα αποτέλεσμα αντίθετο του προαναφερόμενου. (Chen et al., 2010)

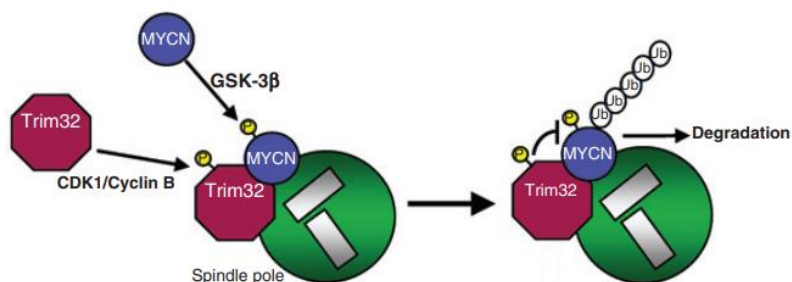
Ομοίως με το N-MYC, το C-MYC είναι μεταγραφικός ρυθμιστής πολλών γονιδίων που άμεσα ή έμμεσα επηρεάζουν την πορεία του πολλαπλασιασμού. Πιο συγκεκριμένα, ένα μόριο που η υπερέκφραση του C-MYC επηρεάζει μεταγραφικά, είναι ένας αναστολέας του κυτταρικού κύκλου, το p21. Παρατηρήθηκε ότι με υπερέκφραση του C-MYC το κύτταρο ξεπερνά την παύση του κυτταρικού κύκλου που έχει προκληθεί από τη δράση του TGF-β. Επίσης, η ανασταλτική δράση του C-MYC στο p21 οδηγεί στην αναστολή της δράσης του p53 ως απάντηση σε βλάβη του DNA. (Classen et al., 2010) (Seoane et al., 2002) Εξίσου ενδιαφέρουσα είναι και η δράση του c-myc ως ρυθμιστή miRNAs. Συγκεκριμένα, ως ρυθμιστής του μεταβολισμού το c-myc αναστέλλει μεταγραφικά τα miR-23a και miR-23β, οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση ενός ενζύμου του μεταβολισμού της γλουταμίνης, της μιτοχονδριακής γλουταμινάσης. Με αυτόν τον τρόπο, αυξάνονται τα επίπεδα καταβολισμού της γλουταμίνης και η σύνθεση του ακέτυλο-coA υποδεικνύοντας έναν πιθανό μηχανισμό εμπλοκής του c-myc στο μεταβολισμό. (Yuneva et al., 2007) (Morrish et al., 2010) (Kim JB et al., 2008)

### 3.1.3 Οι επιπτώσεις της αλληλεπίδρασης του TRIM32 με τα ογκογονίδια c-myc και N-Myc στην κυτταρική λειτουργία.

Αφού αναλύθηκε μερικώς ο μοριακός και κυτταρικός ρόλος που επιτελούν τα c-myc και N-Myc, θα εστιάσουμε στην αλληλεπίδραση που αυτά έχουν με το μόριο που αποτελεί αντικείμενο αυτής της εργασίας, το TRIM32. Σε φυσιολογικές συνθήκες και οι δύο πρωτεΐνες διατηρούν το κύτταρο σε μία φυσιολογική φάση πολλαπλασιασμού και αυτοανανέωσης. Η απορρύθμιση όμως αυτών έχει συσχετιστεί με καρκίνο, ενεργοποίηση μονοπατιών απόπτωσης και αύξηση της διαφοροποίησης.

Έχει αποδειχθεί ότι υψηλά επίπεδα c-myc είναι απαραίτητα για την αυτοανανέωση των νευρικών βλαστικών κυττάρων και για τον αναπρογραμματισμό τους σε ES. Λόγω αυτού, η απόδειξη ότι το TRIM32 ουβικιτινιλιώνει το c-myc οδήγησε στην ύπαρξη αποτελεσμάτων που καταδεικνύουν ότι το TRIM32 σταματά τον κυτταρικό κύκλο άρα και τον πολλαπλασιασμό οδηγώντας το κύτταρο σε διαφοροποίηση. (Schwamborn JC et al., 2009)

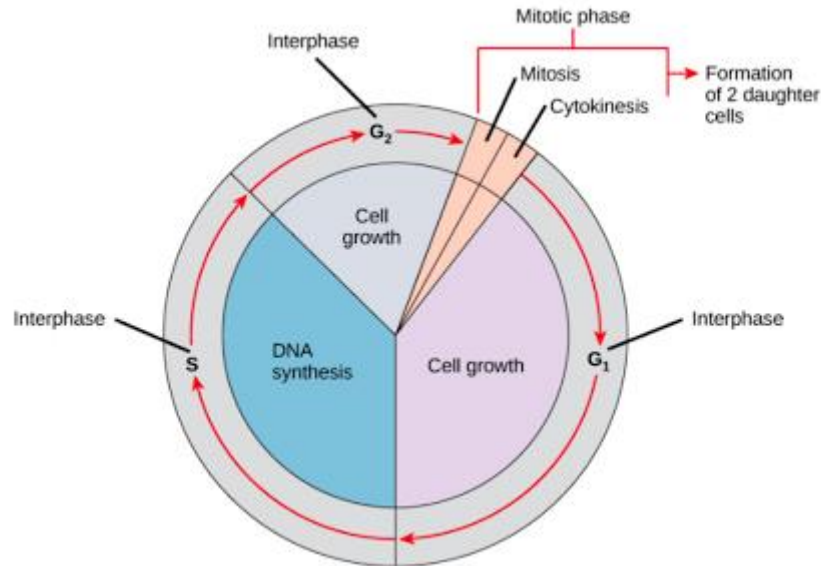
Μία επιπλέον πληροφορία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή για τη μελέτη λειτουργικότητας του TRIM32, αφορούσε την αλληλεπίδρασή του με το N-Myc στους πόλους της ατράκτου. Αποδείχθηκε ότι κατά την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση υπάρχει συσσώρευση των δύο μορίων στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του N-Myc. Αυτό πραγματοποιείται με φωσφορυλιώσεις αμφότερων των δύο παραπάνω μορίων, του TRIM32 στα κατάλοιπα σερίνης 328,335 και 339 από το σύμπλοκο Cdk1/cyclin B και του N-Myc από την GSK-3β στην θρεονίνη 58. (Izumi et al., 2014)



Εικόνα 17: α) Η πρωτεασωμική αποικοδόμηση του N-Myc από το TRIM32 στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου.

### 3.2 Κυτταρικός κύκλος

Είναι μια ακολουθία γεγονότων που οδηγούν στον διπλασιασμό του DNA και στην διαίρεση του κυττάρου σε δύο θυγατρικά και διακρίνεται σε δύο κύριες περιόδους. Την **μεσόφαση** και την **μίτωση**.



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και των σημείων ελέγχου του.

Κατά την μεσόφαση, λαμβάνει χώρα η αποσυμπύκνωση των χρωμοσωμάτων με αποτέλεσμα αυτά να καταλαμβάνουν ολόκληρο τον πυρήνα ενώ η κυτταρική αύξηση και η αντιγραφή του DNA συμβαίνουν συντονισμένα προκειμένου να προετοιμαστεί κατάλληλα το κύτταρο για την επικείμενη διαίρεσή του. Στη φάση αυτή απορροφάται το μεγαλύτερο μέρος των θρεπτικών που είναι απαραίτητα στο κύτταρο για διαίρεση.

Η **μεσόφαση** διακρίνεται στις εξής φάσεις:

- **Φάση G1:** Είναι η φάση που ξεκινά μετά την προηγούμενη μίτωση και τελειώνει πριν την έναρξη σύνθεσης DNA. Ονομάζεται και φάση ανάπτυξης διότι αυξάνεται η ποσότητα πρωτεϊνών και οργανιδίων και παράλληλα το κύτταρο διογκώνεται και είναι μεταβολικά ενεργό.
- **Φάση S:** Σε αυτή τη φάση διεξάγεται η αντιγραφή του DNA. Τα επίπεδα παραγωγής πρωτεϊνών και μεταγραφής του RNA είναι χαμηλά, εκτός από τις ιστόνες.
- **Φάση G2:** Εδώ συνεχίζεται η κυτταρική αύξηση και σύνθεση πρωτεϊνών και το κύτταρο προετοιμάζεται για τη μίτωση.

Η **μίτωση** αφορά το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων των δύο κυττάρων ώστε κάθε θυγατρικό πλέον κύτταρο να έχει διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων. Τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται, ο πυρηνικός φάκελος αποσυναρμολογείται, και ο κυτταροσκελετός αναδιοργανώνεται για να σχηματιστεί η μιτωτική άτρακτος. Χωρίζεται σε πέντε στάδια:

**Πρόφαση:** Είναι η φάση κατά την οποία η χρωματίνη συμπυκνώνεται σχηματίζοντας τα χρωμοσώματα. Τα κεντροσώματα αυξάνουν την ενεργότητα των μικροσωληνίσκων τους και προετοιμάζονται για δέσμευση στον κυτταροσκελετό. Ο κυτταροσκελετός αρχίζει να αναδιαμορφώνεται με βασική ενέργεια την κίνηση των κεντριολίων προς τους πόλους του κυττάρου.

**Μετάφαση:** Το βασικό γεγονός της φάσης αυτής είναι η μεταφορά των χρωμοσωμάτων στο κέντρο του κυττάρου σχηματίζοντας την Μιτωτική Πλάκα. Αφού το κεντρομερές των χρωμοσωμάτων δεσμευτεί στην  $\gamma$ -Τουμπουλίνη των μικροϊνιδίων του κυτταροσκελετού, πρωτεΐνες κίνησης μεταφέρουν τα χρωμοσώματα στην Μιτωτική Πλάκα. Πρωτεϊνικές δομές των χρωμοσωμάτων βοηθάνε στην ευθυγράμμιση τους και τα κρατούν χωριστά ονομάζονται κινητοχώροι.

**Ανάφαση:** Είναι το σημείο κατά το οποίο τα χρωμοσώματα διαχωρίζονται και μετακινούνται προς αντίθετους πόλους. Τα χρωμοσώματα στην φάση αυτή έχουν την μέγιστη πυκνότητα έτσι ώστε να μπορέσει να επανασηματιστεί ο πυρήνας.

**Τελόφαση:** Αποτελεί το τελικό στάδιο της Μίτωσης. Τα γεγονότα είναι τα αντίθετα από αυτά της πρόφασης και της μετάφασης, με αποτέλεσμα την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης. Κύριο σημείο είναι η δημιουργία πυρηνικού φακέλου από συστατικά του μητρικού φακέλου.

**Κυτταροκίνηση:** Είναι το στάδιο της κυτταρικής διαίρεσης κατά το οποίο το κυτταρόπλασμα χωρίζεται στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Η προετοιμασία ξεκινά από το τέλος της ανάφασης και συνεχίζεται στην τελόφαση. Κατά την ανάφαση ενεργοποιείται μια ΑΤΡαση η RHOA, η οποία προάγει τον σχηματισμό ενός συστατικού δακτυλίου ακτίνης-μυοσύνης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας αύλακας. Στη συνέχεια σχηματίζεται μια δομή μικροσωληνίσκων οι οποίοι "πλέκονται" σε ένα συγκεκριμένο σημείο το midbody. Οι μικροσωληνίσκοι του σημείου αυτού έχουν υψηλά επίπεδα ακετυλίωσης. Τελικό στάδιο είναι το "σπάσιμο" της γέφυρας στα δύο, κάτι που συμβαίνει στο μέσο του midbody.

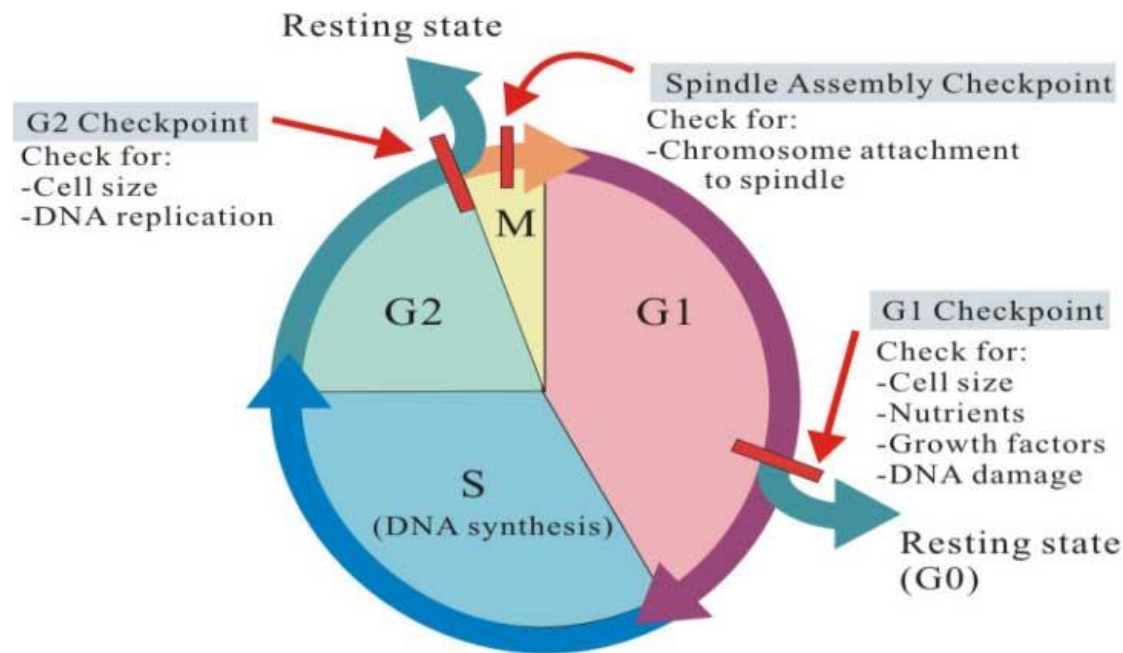
### **3.2.1 Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου**

Υπάρχουν μηχανισμοί που ελέγχουν την πρόοδο του κύκλου έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ο σωστός κυτταρικός διαχωρισμός. Ο έλεγχος αυτός συμβαίνει σε καλά μελετημένα, από το κύτταρο, σημεία των



φάσεων του κύκλου. Με σκοπό να πληρούνται οι κατάλληλες προϋποθέσεις σε κάθε σημείο ελέγχου, για το ασφαλές πέρασμα από την μια φάση στην άλλη.

Συναντώνται τρία κομβικά σημεία ελέγχου που συσχετίζονται με τις φάσεις του κύκλου, αυτά είναι το G1 (κεντρικό σημείο ελέγχου), το G2/M και αυτό στη Μετάφαση γνωστό και ως spindle checkpoint.



Εικόνα 19: Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

### Σημείο ελέγχου στη G1

Λίγο πριν φτάσει στο σημείο ελέγχου, το κύτταρο έχει τρεις επιλογές: να αποφασίσει να προχωρήσει στη φάση S, να σταματήσει στην G1 ή να βγει από αυτόν και να μπει σε μια κατάσταση ηρεμίας που χαρακτηρίζεται φάση G0. Στις δύο πρώτες περιπτώσεις, το κύτταρο ελέγχει βλάβες στο DNA και αποφασίζει αν πρέπει να προχωρήσει. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιεί κομβικά μόρια που παίρνουν μέρος σε συγκεκριμένους μηχανισμούς.

Αρχικά το σύμπλοκο μεταξύ κυκλίνης D και CDK4-CDK6 καταστέλλει την αναστολή του E2F1-3 ( που έχει συμβεί από μεταγραφικούς αναστολείς του Rb). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μεταγραφική ενεργοποίηση στόχων οι οποίοι προωθούν τον κύκλο από την G1-> S. Ένας από αυτούς είναι η κυκλίνη E που σχηματίζει σύμπλοκο με την CDK2. Το σύμπλοκο αυτό οδηγεί σε μια απόκριση <<όλα ή τίποτα>>, ορίζοντας έτσι το σημείο χωρίς γυρισμό. Όταν αναγνωριστεί βλάβη στο DNA ο κύκλος σταματά στην G1. Δύο μηχανισμοί οδηγούν σε αυτό το αποτέλεσμα. Ο πρώτος οδηγεί στην απενεργοποίηση το συμπλόκου κυκλίνης E-CDK2

Κατά τον δεύτερο μηχανισμό το αποτέλεσμα είναι το ίδιο δηλαδή απενεργοποιείται το σύμπλοκο κυκλίνης E-CDK2, τα ενδιάμεσα μόρια όμως διαφέρουν. Οι κινάσες Chk2 ή Chk1 σταθεροποιούν το p53 φωσφορυλιώνοντάς το. Αποτέλεσμα η E3 λιγάση που το αποικοδομεί (MDM2), να μην μπορεί να το δεσμεύσει. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση του p21 το οποίο αποτελεί αναστολέα του συμπλόκου κυκλίνης E-CDK2. (Bertoli et al., 2014)

### Σημείο ελέγχου στη G2

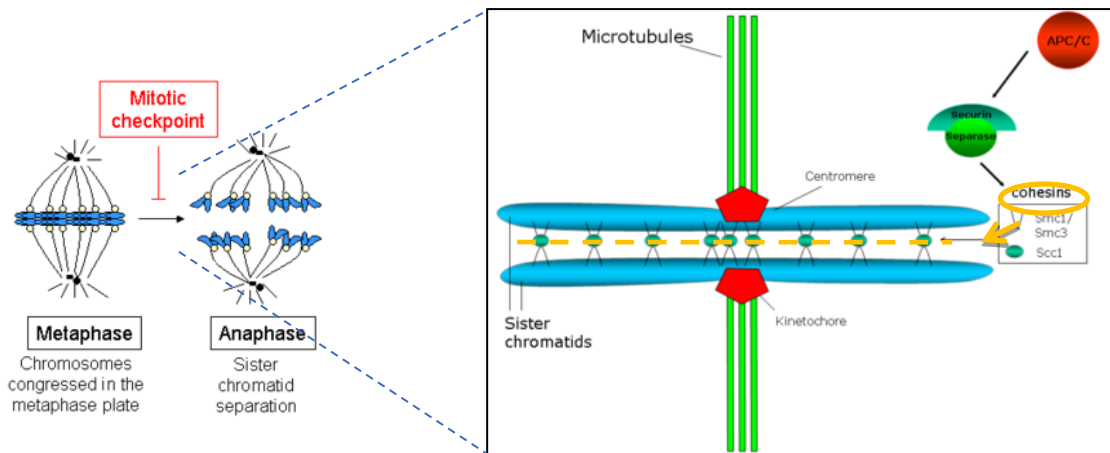
Κατά την G2 το κύτταρο αυξάνει σε μέγεθος και παράγονται πρωτεΐνες της Μίτωσης, με αποτέλεσμα την προετοιμασία του για να εισέλθει σε αυτήν. Στο σημείο ελέγχου το κύτταρο ελέγχει το μέγεθος και την αντιγραφική πιστότητα. Λίγο πριν φτάσει στο σημείο ελέγχου το κύτταρο έχει δύο επιλογές: να αποφασίσει να προχωρήσει στη φάση M ή να σταματήσει στην G2. Για τον σκοπό αυτό επιστρατεύει πολλούς μηχανισμούς παρόμοιους με το σημείο ελέγχου G1/S. Η κυκλίνη B, που αποτελεί και το κομβικό μόριο του ελέγχου, συμπλοκοποιείται με την Cdk1 οδηγώντας στην πρόοδο του κύκλου.

Αρχικά, σε πρώιμα στάδια της G2, το σύμπλοκο κυκλίνης A-Cdk2 ενεργοποιεί την cdc25, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί το σύμπλοκο κυκλίνης B-Cdk, με αποτέλεσμα να αυξάνονται προοδευτικά τα επίπεδα της κυκλίνης B. Λίγο πριν το σημείο ελέγχου τρία βασικά μόρια ενεργοποιούνται η Plk-1, το cdc2 και cdc25. Η επικείμενη συμπλοκοποίησή τους οδηγεί, μέσω θετικής ανατροφοδότησης, στην αύξηση των επιπέδων της cdc2. Η τελευταία συμπλοκοποιείται στη συνέχεια με την κυκλίνη B, προωθώντας την είσοδο στη Μίτωση. Σημαντικό είναι επίσης και το στοιχείο ότι έχει θεσπιστεί ένα ελάχιστο πλατώ συγκέντρωσης της κυκλίνης B, για την προώθηση στη φάση M. Στην περίπτωση σφάλματος στην αντιγραφή του DNA η ελάχιστη συγκέντρωση αυξάνεται, απαγορεύοντας στο κύτταρο να προχωρήσει χωρίς επιδιόρθωση. Οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται στην περίπτωση που ο κύκλος θα σταματήσει λόγω θραύσης του DNA, είναι παρόμοιοι με αυτούς του G1/S. Εδώ όμως μέρος λαμβάνουν και κάποιες πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος οι 14-3-3, οι οποίες έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρούν με ιδιαίτερο τρόπο και με το TRIM32. (Lobrich et al., 2007) (Harper et al., 2007)

### Σημείο ελέγχου στην M

Στο σημείο αυτό, γνωστό και ως σημείο ελέγχου της ατράκτου (SAC), ελέγχεται κατά πόσο οι αδερφές χρωματίδες είναι σωστά δεσμευμένες στην άτρακτο, όπως επίσης και αν έχουν τον κατάλληλο προσανατολισμό. Ο κύριος μηχανισμός της προώθησης του κύκλου είναι η ενεργοποίηση του συμπλόκου

προώθησης της ανάφασης (APC/C). Ο οποίος, περιληπτικά, οδηγεί στην ενεργοποίηση της σεπαράσης η οποία με τη σειρά της διασπά τις κοχεσίνες που κρατάνε δεσμευμένους τους κινητοχώρους στην άτρακτο. Αποτέλεσμα η τάση που έχει δημιουργηθεί να οδηγεί τα χρωμοσώματα στους δύο πόλους (



**Εικόνα 20:** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού προώθησης της μίτωσης μετά το σημείο ελέγχου

Στην περίπτωση που αναγνωριστεί κάποιο σφάλμα, ενεργοποιείται το SAC με αποτέλεσμα ο κύκλος να σταματά στην ανάφαση. Ο μηχανισμός οδηγεί στην αναστολή του APC από το σύμπλοκο του σημείου ελέγχου Μίτωσης (MCC) και περιλαμβάνει διάφορα μόρια που παίρνουν μέρος σε μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διεργασία. (Mussachio et al., 2007)

### 3.2.2 Ο ρόλος του TRIM32 στον πολλαπλασιασμό

Στη συγκεκριμένη υποενότητα θα αναφερθούμε στο κατά πόσο το TRIM32 μπορεί να επηρεάσει τη σημαντικότερη κυτταρική λειτουργία, τον πολλαπλασιασμό. Οποιαδήποτε αλλαγή της φυσιολογικής λειτουργίας του πολλαπλασιασμού θεωρείται μεταβολή, κάτι το οποίο μπορεί να έχει ποικίλες επιπτώσεις στην κυτταρική λειτουργία.

Για τον λόγο αυτό θα εξετασθούν κομβικά μόρια του Κυτταρικού Κύκλου, η μεταβολή των οποίων επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και έχει επιβεβαιωθεί *in vitro* η αλληλεπίδρασή τους με το TRIM32. Βέβαια η ιδιότητα αυτή αφορά συγκεκριμένα κυτταρικά μοντέλα για κάθε μόριο, αλλά παραμένει να είναι η σημαντικότερη πληροφορία για την προσπάθεια περάτωσης της παρούσας εργασίας.

### Αλληλεπίδραση TRIM32 και ABI2

Το ABI2 είναι ένα μόριο που παίρνει μέρος στην απενεργοποίηση της Cdc2 κινάσης. Η Cdc2 συμπλοκοποιείται με την κυκλίνη B, προωθώντας τον κύκλο στη φάση M. Άρα το ABI2 φαίνεται να αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη. Το σημαντικό στοιχείο που έρχεται να προστεθεί είναι ότι το TRIM32 αλληλεπιδρά με το ABI2 σημαίνοντάς το για αποικοδόμηση. Με αυτόν τον έμμεσο τρόπο το TRIM32 δρα ως ένα ογκογονίδιο, αφού με υπερέκφραση του TRIM32 τα επίπεδα του ABI2 μειώνονται, με αποτέλεσμα να επιταχύνεται η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου και κατ'επέκταση η είσοδος στη μίτωση. Όσον αφορά την ογκογένεση που μπορεί να προκαλείται από το TRIM32, βρέθηκε ότι περισσότερο δρα ως συνενεργοποιητής παρά ως το βασικό αιτιατό μόριο. (Kano S et al., 2008)

### Αλληλεπίδραση TRIM32 και p53

Το p53 είναι ένας ρυθμιστής κλειδί της απόκρισης του κυττάρου σε συνθήκες stress. Εν προκειμένω εμβαθύνουμε στην σημαντικότερη ρυθμιστική του ιδιότητά ως ογκοκαταστολέας. Το p53 φυσιολογικά αναστέλλει τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό, ως απάντηση σε μια στρεσογόνο κατάσταση. Έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίηση του p53 οδηγεί σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Το TRIM32 αλληλεπιδρά άμεσα με το p53 οδηγώντας το προς αποδόμηση. Συνδυαστικά με τα παραπάνω έχει αποδειχθεί ότι κατά τη μείωση της ποσότητας της πρωτεΐνης TRIM32, παρατηρείται μια αύξηση των κυττάρων που έχουν σταματήσει στην φάση G1, κάτι που έχει συσχετιστεί με τον τρόπο που δρα το p53. Ως αποτέλεσμα αυτών η υπερέκφραση του TRIM32 έχει συσχετιστεί με υπερπολλαπλασιασμό-ογκογένεση και έχει χαρακτηρίσει πολλά είδη καρκίνων όπως: κεφαλής-αυχένα, δέρματος, πνευμόνων, ορθικό και ηπατοκυτταρικό. (Liu J et al., 2014)

## **3.3 Απόπτωση**

### **3.3.1 Γενικά στοιχεία**

Οι κύριοι τελεστές της διαδικασίας της απόπτωσης είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζονται κασπάσες και φέρουν στο ενεργό τους κέντρο κυστεΐνες, πέπτοντας τα υποστρώματά τους στον πεπτιδικό δεσμό στην καρβοξυτελική πλευρά καταλοίπων ασπαρτικού. Οι κασπάσες διακρίνονται είτε σε εναρκτήριες (initiator) , τις 2,8,9 και 10 οι οποίες ενεργοποιούνται ως απόκριση σε μια ποικιλία αποπτωτικών σημάτων είτε σε εκτελεστικές (effector), τις 3,6 και 7 και συντίθενται ως ανενεργά πρόδρομα μόρια που ενεργοποιούνται στην ενεργή τους μορφή με πρωτεόλυση από τις εναρκτήριες και με τη σειρά τους πέπτουν πρωτεΐνες-στόχους που σχετίζονται με την απόπτωση. (Geske, F. J., & Gerschenson., 2001) (Elmore S., 2007), (Hengartner,2000).

Η απόπτωση πυροδοτείται μέσω δύο μονοπατιών, κοινό σημείο των οποίων είναι η ενεργοποίηση της κασπάσης 3, του εξωγενούς που διαμεσολαβείται από διαμεμβρανικούς υποδοχείς κυτταρικού θανάτου και του ενδογενούς, το οποίο περιλαμβάνει την εσωτερική ενεργοποίηση από περιβαλλοντικούς παράγοντες (πχ ακτινοβολία) μέσω μιτοχονδριακής διέγερσης. (Cohen, 1997);(Geske, F. J., & Gerschenson., 2001)

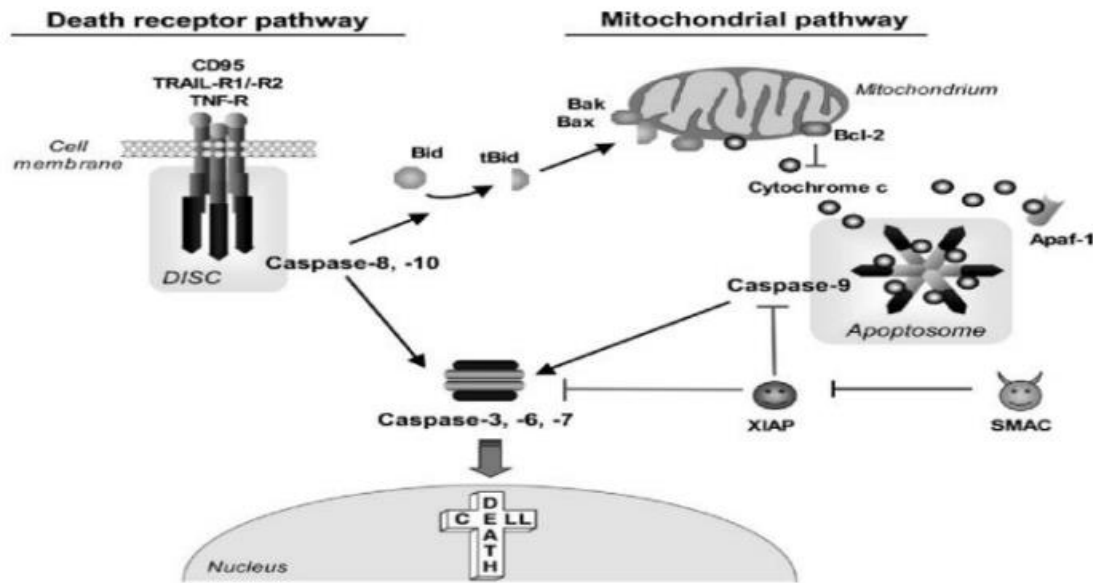
### **3.3.2 Εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι**

Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς κυτταρικού θανάτου, της υπεροικογένειας του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF) ενεργοποιούνται όταν λάβουν τα κατάλληλα ερεθίσματα και συγκεκριμένα από τη σύνδεση του προσδέτη τους. Έπειτα από την αλληλεπίδραση υποδοχέα-προσδέτη, επάγεται μια αλλαγή διαμόρφωσης του υποδοχέα η οποία οδηγεί στην έκθεση της κυτταροπλασματικής «επικράτειας θανάτου» που διαθέτει, τον επακόλουθο διμερισμό της και τελικά την αλληλεπίδραση με τις εναρκτήριες κασπάσες 8 και 10 έπειτα από το σχηματισμό του συμπλέγματος σηματοδότησης επαγωγής θανάτου (DISC- Death Inducing Signaling Complex). Οι εναρκτήριες κασπάσες 8 και 10 ενεργοποιούνται μέσω πρωτεόλυσης και πέπτουν και ενεργοποιούν τις κασπάσες 3,6 και 7. Οι κυριότεροι υποδοχείς θανάτου με τους αντίστοιχους προσδέτες τους είναι οι FasR/FasL και TNF-R1/TNF- $\alpha$ . (Mousavi S. H., 2008) (Mita M. M., 2006).

### **3.3.3 Ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι**

Η ενδογενής αποπτωτική οδός διεξάγεται στα μιτοχόνδρια και λαμβάνει χώρα ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα όπως η υπεριώδης ή ιονίζουσα ακτινοβολία, το οξειδωτικό stress, η υποξία και η έλλειψη θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων. Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται και καταστέλλεται από τα μέλη της οικογένειας Bcl2 η οποία περιλαμβάνει προαποπτωτικές πρωτεΐνες (Bak, Bax, Bim, Puma, Noxa, Bid, Bad) και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες (Bcl2, Bcl-XL). Η ισορροπία μεταξύ προαποπτωτικών και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών καθορίζει την κυτταρική επιβίωση ή την απόπτωση. (Mita M. M., 2006).

Όταν ενεργοποιηθούν οι πρωτεΐνες Bax και Bak προκαλούν το άνοιγμα του καναλιού ανιόντος που εξαρτάται από την τάση (VDAC- Voltage Dependent Anion Channel) και το σχηματισμό ολιγομερών στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων μιτοχονδριακών προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών λόγω αύξησης της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα οδηγεί στην αλληλεπίδρασή του με την Araf1 με αποτέλεσμα το σχηματισμό του αποπτωσώματος και τελικά την ενεργοποίηση της κασπάσης 9. Η ενεργοποιημένη πλέον κασπάση 9 ενεργοποιεί μέσω πρωτεόλυσης τις εκτελεστικές κασπάσες 3,6 και 7. (Fulda S, 2006)



Εικόνα 22: Σύνοψη των δύο κύριων αποπτωτικών οδών (Mousavi S. H., 2008)..

### 3.3.4 TRIM32 και απόπτωση

Υπάρχουν δύο κατευθύνσεις για το πώς το TRIM32 μπορεί να επηρεάσει την απόπτωση ενός κυττάρου. Και οι δύο βασίζονται στην ιδιότητα του TRIM32 να ουβικιτινιλιώνει τα υποστρώματά του δρώντας ως E3 λιγάση.

#### A. Αλληλεπίδραση TRIM32 και p53 και αναστολή της απόπτωσης.

Ο μεταγραφικός παράγοντας p53 εμπλέκεται στο κύριο μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες του DNA, το οποίο προκαλεί στάση του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, η ενεργοποίηση του p53 από βλάβες του DNA μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση. Το p53 επάγει απόπτωση μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες PUMA και Noxa. Ειδικότερα, η PUMA επάγει την έκφραση της Bax, αλλαγή της διαμόρφωσής της και μετατόπιση στην μιτοχονδριακή μεμβράνη με επακόλουθο την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και την ενεργοποίηση της κασπάσης 9.

Το TRIM32 αλληλεπιδρά με το p53 ουβικιτινιλιώνοντάς το. Η αλληλεπίδραση αυτή συμβαίνει με την περιοχή RING, κυρίως, αλλά βοηθητικό ρόλο έχει και η NHL. Αναλυτικότερα, έχει βρεθεί ένας ανατροφοδοτικός μηχανισμός κατά τον οποίο το p53 δεσμεύεται στον υποκινητή του TRIM32 και προάγει την υπερέκφρασή του. Το TRIM32 με τη σειρά του εκτός από την αυτοανατροφοδότηση που επιτελεί

δεσμεύει και αποδομεί το p53. Κατά αυτόν τον τρόπο, το TRIM32 δρα εμμέσως ως ογκογονίδιο αφού αποτρέπεται η απόπτωση και προάγεται ο υπέρμετρος πολλαπλασιασμός. (Liu J et al., 2014)

### B. Αλληλεπίδραση TRIM32 και XIAP και επαγωγή της απόπτωσης.

Στη δεύτερη περίπτωση, αντίθετα με την πρώτη, έχουμε μια επαγωγή της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού TNF- $\alpha$ . Το TRIM32 παίρνει μέρος στη διαδικασία αυτή αποδομώντας έναν κομβικό παράγοντα του μονοπατιού, το XIAP. Το XIAP φυσιολογικά αναστέλλει την απόπτωση αλληλεπιδρώντας με τις κασπάσες 3,9 και 7 μέσω της επικράτειάς του BIR2. Ένα άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του XIAP είναι η δράση του ως E3 λιγάση. Η ενζυμική αυτή δράση το οδηγεί στην έμμεση αλληλεπίδραση με ένα μόριο που έχει κομβικό ρόλο για την πορεία του κυτταρικού κύκλου, την κυκλίνη D, μεταβάλλοντας τις τροποποιήσεις της Arp1 με αποτέλεσμα τη γρήγορη μετάβαση από το σημείο ελέγχου G1/S. Αποτέλεσμα αυτών είναι ότι το TRIM32 αλληλεπιδρά με το XIAP μέσω της RING περιοχής του πρώτου, με τη βοήθεια των coiled-coil και NHL αναστέλλοντας ένα αντι-αποπτωτικό μονοπάτι. (Ryu YS et al., 2011)

## **3.4 Αυτοφαγία**

### **3.4.1 Γενικά στοιχεία**

Η αυτοφαγία αποτελεί μια συντηρημένη οδό ποιοτικού ελέγχου των ευκαρυωτικών κυττάρων μέσω της οποίας πρωτεΐνες και υποκυτταρικά οργανίδια μεταφέρονται στα λυσοσώματα τα οποία περιέχουν μια σειρά από πεπτικά ένζυμα. Η διαδικασία περιλαμβάνει το σχηματισμό κυστιδίων, των αυτοφαγοσωμάτων, τα οποία σχηματίζονται από εγκολλώσεις της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και εισάγουν στο εσωτερικό τους συστατικά του κυτταροπλάσματος. Αυτά τα κυστίδια στη συνέχεια συντήκονται με λυσοσώματα, τα υδρολυτικά ένζυμα των οποίων πέπτουν το περιεχόμενό τους. (He & Klionsky, 2009). (Yang & Klionsky, 2010).

Η αυτοφαγία είναι μια ελεγχόμενη διαδικασία που ελέγχεται αναπτυξιακά αλλά και ανάλογα με τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών. Γενικά, ενεργοποιείται σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών, αλλά και από το οξειδωτικό stress, το μεταβολικό stress, το stress του ενδοπλασματικού δικτύου και την υποξία. Έχει διττό ρόλο καθώς σε κανονικές συνθήκες διεξάγεται σε ένα βασικό ρυθμό για να απομακρύνει μακρόβιες ή/και ελαττωματικές πρωτεΐνες ενώ σε στρεσογόνες συνθήκες προάγεται ως κυτταροπροστατευτικός μηχανισμός απαραίτητος για την ομοιοστάση του κυττάρου. (Cuervo, 2004).

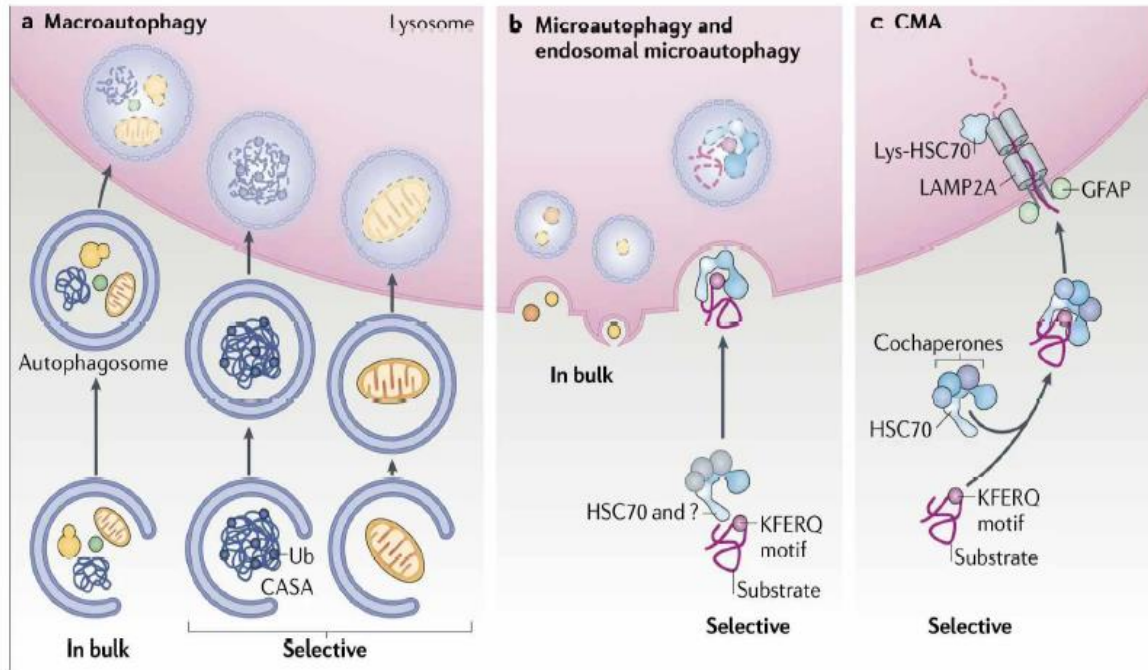
### 3.4.2 Τύποι αυτοφαγίας

Στα κύτταρα των θηλαστικών έχουν παρατηρηθεί τρεις τύποι αυτοφαγίας.

1. Μικροαυτοφαγία: περιλαμβάνει την είσοδο μέρους του κυτταροπλάσματος στα λυσοσώματα μέσω μιας διαδικασίας εγκόλπωσης της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η εγκόλπωση μπορεί να γίνει είτε μαζικά είτε επιλεκτικά μέσω αναγνώρισης του υποστρώματος από την πρωτεΐνη HSC70/HSPA8 ή άλλες μοριακούς συνοδούς. (Marzella et al., 1981).
2. Μακροαυτοφαγία: αποτελεί την πιο εξελικτικά συντηρημένη και καλά μελετημένη οδό διαμέσου της οποίας μπορούν να αποικοδομηθούν και οργανίδια. Χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ειδικών κυστιδίων διπλής μεμβράνης, τα αυτοφαγοσώματα τα οποία εγκολπώνουν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και οργανίδια και τα οδηγούν προς αποικοδόμηση στα λυσοσώματα. Στα διάφορα στάδια της μακροαυτοφαγίας συμμετέχουν κάποιες πρωτεΐνες που ονομάζονται ATG (Autophagy-Related) των οποίων τα γονίδια που τις κωδικοποιούν είναι πολύ καλά μελετημένα και σε μοντέλα ζύμης. Η διαδικασία της μακροαυτοφαγίας πιθανόν εμφανίζει εξειδίκευση και εκλεκτικότητα όσον αφορά το φορτίο που θα αποικοδομηθεί στα λυσοσώματα. Για παράδειγμα μπορούν να αποικοδομηθούν ενδοκυτταρικά λιποσταγονίδια (λιποφαγία), ριβοσώματα (ριβοφαγία) και μιτοχόνδρια (μιτοφαγία) (Yang & Klionsky, 2009).
3. Αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από μοριακούς συνοδούς: αυτός ο τύπος αυτοφαγίας αφορά αποκλειστικά αποικοδόμηση πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος προκαλώντας τη μετακίνησή τους κατά μήκος της μεμβράνης των λυσοσωμάτων και όχι μέσω εγκόλπωσής τους. Οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν το μοτίβο KFERQ και αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη μοριακή-συνοδό HSC70/HSPA8, η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση της υπό αποικοδόμηση πρωτεΐνης στον λυσοσωμικό υποδοχέα LAMP2A. Στο τέλος, ο υποδοχέας πολυμερίζεται και η πρωτεΐνη μετατοπίζεται στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων για να αποικοδομηθεί. (Dice, 1990; Massey et al., 2006)

Η λειτουργία των τριών παραπάνω αυτοφαγικών μηχανισμών δεν είναι ανεξάρτητη αλλά υπακούει στις ανάγκες του κυττάρου. Για παράδειγμα, υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών, αρχικά ενεργοποιείται η μακροαυτοφαγία και έπειτα αν η έλλειψη διαρκεί περισσότερο ενεργοποιείται η αυτοφαγία που εξαρτάται από μοριακούς-συνοδούς.





*Εικόνα 23: Σύνοψη των τριών κύριων τύπων αυτοφαγίας α)μακροαυτοφαγία, β)μικροαυτοφαγία, γ)αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από μοριακούς συνοδούς.*

### 3.4.3 Σηματοδοτικά μονοπάτια αυτοφαγίας

Η αυτοφαγία μπορεί να χωριστεί στη φάση έναρξης, επιμήκυνσης, ωρίμανσης του αυτοφαγοσώματος, σύντηξης με το λυσόσωμα και τελικά αποικοδόμηση του περιεχομένου του αυτοφαγολυσσοσωμάτων.

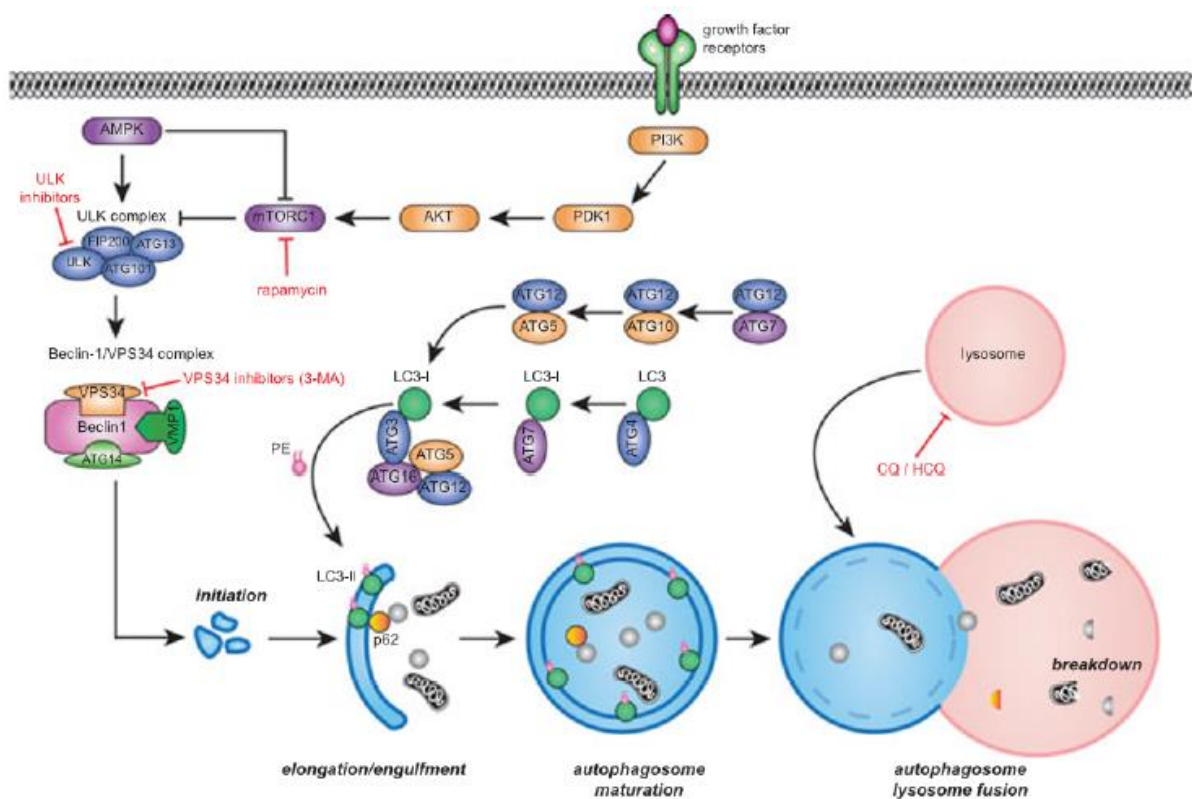
Η δημιουργία του αυτοφαγοσώματος ξεκινά από τα ωμεγασώματα που αποτελούν υποπεριοχές του ενδοπλασματικού δικτύου με λιπιδική μεμβράνη πλούσια σε 3-φωσφορική φωσφατιδυλοινσιτόλη. Από τα ωμεγασώματα προκύπτει το φαγοφόρο, μια δομή διπλής μεμβράνης που αποτελεί την αρχική μορφή του αυτοφαγοσώματος. Απαραίτητο για την έναρξη της αυτοφαγίας είναι το σύμπλοκο 1 του μηχανικού στόχου της ραπαμυκίνης (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1), να κατασταλεί, το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες καταστέλλει την αυτοφαγία λόγω καταστολής της κινάσης ULK1. Με τη δράση στρεσογόνων ερεθισμάτων, το mTORC1 απενεργοποιείται και αίρεται η καταστολή της ULK1. Η ULK1 με τη σειρά της σχηματίζει σύμπλοκα με τις ATG13/FIP200 και ATG101 και αυτά τα σύμπλοκα όταν εντοπιστούν στο φαγοφόρο επάγουν τη δημιουργία του αυτοφαγοσώματος. Έπειτα προσελκύεται το σύμπλοκο BECLIN1-ATG14L-VPS34 το οποίο ενεργοποιείται και προσελκύεται στη μεμβράνη του φαγοφόρου έπειτα από φωσφορυλίωση της BECLIN1 από την ULK1. (Axe et al., 2008; Hayashi-Nishino et al., 2009; Ylä-Anttila et al., 2009)

Το σύμπλοκο BECLIN1-ULK1 δρα ως κινάση της 3 φωσφατιδυλοινσιτόλης (PI3K) οδηγώντας στην παραγωγή PIP<sub>3</sub>. Μετά την παραγωγή PIP<sub>3</sub> στη μεμβράνη του φαγοφόρου προσελκύονται οι πρωτεΐνες

WIP1 οι οποίες δημιουργούν σύμπλοκο με την ATG12. Το σύμπλοκο αυτό είναι σημαντικό καθώς είναι απαραίτητο για τη μεταφορά λιπιδίων στη μεμβράνη του φαγοφόρου συμβάλλοντας στην επιμήκυνσή του. (Itakura & Mizushima, 2010).

Κατά την ωρίμανση του φαγοφόρου προς αυτοφαγόσωμα εμπλέκονται δύο συστήματα πρωτεϊνών με δράση ανάλογη της ουβικιτίνης. Το πρώτο σύστημα αφορά τις ομοιοπολικά συνδεδεμένες ATG12/ATG5 και η σύνδεση αυτή επιτυγχάνεται από την ATG7 που δρα ως E1 ένζυμο ενεργοποίησης και την ATG10 που δρα ως E2 ένζυμο σύζευξης. Στο σύμπλοκο ATG12/ATG5 συνδέεται αργότερα η ATG16L η οποία είναι απαραίτητη για τη σωστή τοποθέτηση των άλλων δύο, ώστε να πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός του αυτοφαγοςώματος. Το δεύτερο σύστημα με δράση ανάλογη της ουβικιτίνης αφορά τη λιπιδίωση της πρωτεΐνης LC3. Το LC3 πρωτεολύεται από την πρωτεΐνη ATG4 και μετατρέπεται σε LC3-I που αποτελεί μια κυτταροπλασματική μορφή. Η LC3-I μετατρέπεται από τις ATG3 και ATG7 σε LC3-II και για αυτή τη μετατροπή πρέπει να συζευχθεί με το λιπίδιο φωσφατιδυλοεθανολαμίνη (PE). Αυτή η διαδικασία ενισχύεται από το σύμπλοκο ATG5-ATG12-ATG16. Η LC3-II ενσωματώνεται στη μεμβράνη του αυτοφαγοςώματος και έπειτα προσελκύονται πρωτεΐνες όπως η p62/SQSTM1 η οποία αλληλεπιδρά μέσω του μοτίβου LIR με την LC3-II. Η p62 είναι υπεύθυνη για την απομόνωση πρωτεϊνών και οργανιδίων τα οποία θα αποικοδομηθούν μαζί με την p62. (Lamark et al., 2017).

Τέλος, το ώριμο αυτοφαγόσωμα συντήκεται με το λυσόσωμα για να σχηματιστεί το αυτοφαγολυσόσωμα. Υπεύθυνες για αυτή τη διαδικασία είναι η GTPάση Rab7 και οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με το λυσόσωμα LAMP-1 και LAMP-2. (Parzych & Klionsky, 2014)



*Εικόνα 24: Σύνοψη της διαδικασίας της αυτοφαγίας και των κυριότερων ρυθμιστικών μορίων που λαμβάνουν μέρος σε αυτή.*

### **3.4.4 TRIM32 και αυτοφαγία**

Δύο μελέτες δείχνουν έναν νέο αναδυόμενο ρόλο του TRIM32 στην αυτοφαγία μέσω της αλληλεπίδρασής του με βασικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες του μονοπατιού, την ULK1 και την p62.

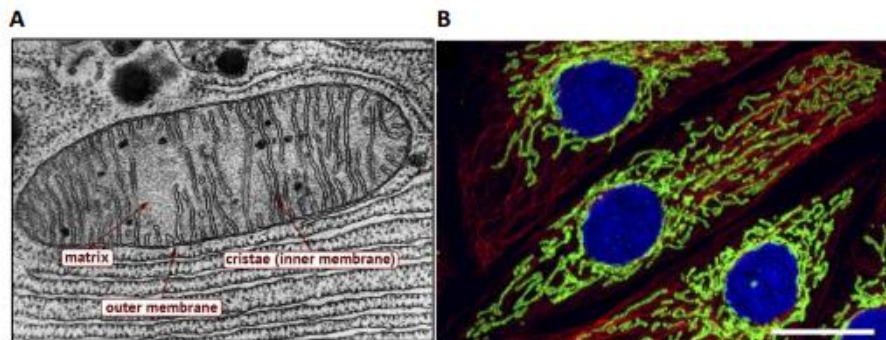
Η πρώτη μελέτη έδειξε ότι η πρωτεΐνη TRIM32 επάγει την αυτοφαγία ως προστατευτικό μηχανισμό των μυικών κυττάρων έπειτα από μυική ατροφία. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν ότι αλληλεπιδρά με τις AMBRA1/ULK1 στις οποίες προσδένεται μέσω της επικράτειας RING και ενεργοποιεί την ULK1 με την προσθήκη ουβικιτίνης. Η ULK1 με τη σειρά της διεγείρει τη δημιουργία του αυτοφαγοσώματος φωσφορυλιώνοντας συστατικά του συμπλόκου BECN1-BECLIN1-PIK3C3-VPS34. (Di Rienzo et al., 2019)

Η δεύτερη μελέτη έδειξε ότι η πρωτεΐνη TRIM32 αποτελεί υπόστρωμα της πρωτεΐνης p62 αλλά και ότι προσδένεται στην p62 μονο-ουβικιτινιλιώνοντάς τη. Ωστόσο, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη D487N που είναι υπεύθυνη για τη μυική δυστροφία Limb-Girdl ενώ προσδένεται στην p62 δεν την ουβικιτινιλιώνει. Αυτό μας οδηγεί σε ένα πιθανό μηχανισμό που σχετίζεται με χαρακτηριστικά της μυικής δυστροφίας Limb-Girdl, λόγω απορρύθμισης της διαδικασίας της αυτοφαγίας με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η αποικοδόμηση των κυτταρικών πρωτεϊνών. (Overa et al., 2019)

### **3.5 Ο ρόλος της πρωτεΐνης TRIM32 στη βιολογία του μιτοχονδρίου**

Τα μιτοχόνδρια είναι μητρικώς κληρονομούμενα κυτταρικά οργανίδια τα οποία κατανέμονται σε όλη την έκταση του κυτταροπλάσματος των εμπύρηνων κυττάρων και οριοθετούνται από δύο μεμβράνες, την εσωτερική μεμβράνη που σχηματίζει πολυάριθμες αναδιπλώσεις οι οποίες ονομάζονται cristae και εκτείνονται στο εσωτερικό ή στρώμα (μήτρα) του οργανιδίου, και την εξωτερική. (Kuznetsov et al., 2009) Θεωρούνται τα κέντρα παραγωγής ενέργειας του κυττάρου την οποία παράγουν με τη μορφή 5'-τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην αναπνευστική αλυσίδα ενώ ταυτόχρονα χρησιμοποιούν τα παράγωγα του κύκλου του κιτρικού οξέος NADH και FADH ως δότες ηλεκτρονίων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ATP. Βασικό συστατικό για την ομαλή λειτουργία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι η αναπνευστική αλυσίδα η οποία βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και απαρτίζεται από τέσσερα σύμπλοκα πρωτεϊνών (I, II, III και IV). Η λειτουργία της έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ηλεκτροχημικής διαβάθμισης φορτίου στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου, η οποία οδηγεί στην παραγωγή μορίων ATP από την ATP συνθάση. Επιπλέον, στα μιτοχόνδρια εκτελούνται σημαντικές μεταβολικές διεργασίες όπως η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, η βιοσύνθεση της αίμης ενώ είναι υπεύθυνα και για την επαγωγή του οξειδωτικού stress. Τέλος, το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό το οποίο διαθέτουν αφορά το δικό τους γενετικό υλικό και ριβοσώματα προς

την παραγωγή πρωτεϊνών. Έτσι, αυτά τα οργανίδια καθίστανται απαραίτητα για τη δράση διάφορων σημάτων με σκοπό τη ρύθμιση μεταβολικών και αναπτυξιακών διεργασιών. (Yellen, 2018)



*Εικόνα 25: α) Ηλεκτρονική μικρογραφία μιτοχονδρίου, β) ενδεικτική εικόνα ανοσοφθορισμού που απεικονίζει το μιτοχονδριακό δίκτυο.*

Όσον αφορά το ρόλο της πρωτεΐνης TRIM32 στη βιολογία του μιτοχονδρίου, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι κατά την διάρκεια οξειδωτικού stress, η TRIM32 μετακινείται στα μιτοχόνδρια προτείνοντας αφενός έναν διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό σε σχέση με τους ήδη γνωστούς από τη βιβλιογραφία και αφετέρου ρυθμίζει τον επαγόμενο από οξειδωτικό stress κυτταρικό θάνατο δεδομένου ότι τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). Ειδικότερα, ο Prajapati και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι υπό συνθήκες οξειδωτικού stress με παράγοντες όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και ροτενόνη, η υπερέκφραση του TRIM32 προκαλεί κυτταρικό θάνατο εξαρτώμενο από κασπάσες ενώ επιπρόσθετα αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη XIAP για τη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου μέσω του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Για αυτή της τη δράση, απαραίτητη είναι η ενεργότητά της ως E3 λιγάση μέσω της επικράτειας RING που διαθέτει, καθώς η παραπάνω βιολογική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων δεν παρατηρήθηκε έπειτα από υπερέκφραση μιας  $\Delta$ RING μορφής και συνδυασμό με τον παράγοντα αναστολής του πρωτεασώματος MG132. Κατά τη διάρκεια οξειδωτικού stress, το TRIM32 μετακινείται στα μιτοχόνδρια ρυθμίζοντας τη δράση του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας, που αποτελεί την κύρια είσοδο ηλεκτρονίων, εξασθενώντας τη λειτουργία του και αυξάνοντας την αύξηση μιτοχονδριακών ενεργών ριζών οξυγόνου. Το γεγονός αυτό το επιτυγχάνει προκαλώντας απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και με την αλληλεπίδρασή του με πρωτεΐνες που ελέγχουν την επεξεργασία του μιτοχονδριακού RNA και ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα παραπάνω συνολικά υποδηλώνουν το σημαντικό ρόλο που επιτελεί η πρωτεΐνη TRIM32 στη μιτοχονδριακή λειτουργία δεδομένου ότι προβλήματα στην ομαλή δραστηριότητα της συνδέονται με την εμφάνιση καρκίνου και νευροεκφυλιστικών διαταραχών. (Prajapati et al., 2020)

## ΣΚΟΠΟΣ

Κύριο στόχο της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η συγκριτική μελέτη της επίδρασης της φυσιολογικής πρωτεΐνης TRIM32 καθώς και της μεταλλαγμένης μορφής P130S σε βασικές βιολογικές ιδιότητες των νευρικών κυττάρων. Θελήσαμε να ελέγξουμε αν η υπερέκφραση της αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης αυτής επηρεάζει διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση ο κυτταρικός κύκλος, η αυτοφαγία και η λειτουργία των μιτοχονδρίων βασιζόμενοι στη βιβλιογραφία, αρχικά για να δούμε αν μπορούμε να αναπαράγουμε αυτούς τους φαινοτύπους και κατά δεύτερον αν υπάρχουν διαφορές στη λειτουργικότητα των δύο μορφών της πρωτεΐνης και μέσω της αλληλεπίδρασης με ποια μόρια εντοπίζονται αυτές οι διαφορές. Επίσης, εκμεταλλευόμενοι την ικανότητα των κυτταρικών μοντέλων που χρησιμοποιήσαμε να διαφοροποιούνται παρουσία ρετινοϊκού οξέος προς ώριμους νευρώνες θελήσαμε να δούμε κατά πόσο αυτοί οι δείκτες μεταβάλλονται στη διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, θέσαμε τους εξής πειραματικούς στόχους:

- Τι προκαλεί η υπερέκφραση της αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης TRIM32 στο turnover των γονιδίων της οικογένειας MYC
- Έλεγχος για μεταβολές των επιδράσεων του TRIM32, κατά τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την αυτοφαγία και τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων
- Μελέτη της επίδρασης του TRIM32 στη βιολογία του μιτοχονδρίου

# ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

## 1. ΥΛΙΚΑ

### 1.1 Αναλώσιμα

- Σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου falcon 50ml και 15ml (Sarstedt)
- Σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου erpendorf 1.5ml(Sarstedt)
- Σωληνάρια κατάψυξης κυττάρων 2ml (Cryo tube vials, Kisker)
- Κρυσταλλοειδή για πάγωμα κυττάρων στους -196°C (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)
- Ορολογικές πιπέτες 10ml, 5ml και 2ml, αποστειρωμένες για χρήση σε κυτταροκαλλιέργειες (Sarstedt)
- Πιπέτες Pasteur πλαστικές, μη αποστειρωμένες (Sarstedt)
- Πιπέτες Pasteur γυάλινες
- Μικροπιπέτες 0.2-1μl, 2-20μl, 20-200μl, 200-1000μl (Gilson)
- Πλαστικά ρύγχη για μικροπιπέτες (tips) 0.2-1μl (Greiner bio one)
- Πλαστικά ρύγχη για μικροπιπέτες (tips) 2-20μl, 20-200μl, 200-1000μl (Sarstedt)
- Αιμοκυτταρόμετρο Newbauer (HBG)
- Γυάλινες καλυπτρίδες στρόγγυλες διαμέτρου 11mm (Thermo Scientific, Cat. No: 12688116)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες 26x76mm (Deltalab)
- Cell Scraper για τη συγκομιδή των κυττάρων από τα πιάτα κυτταροκαλλιέργειας.

### 1.2 Ένζυμα Περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού καθώς και τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Takara και Minotech.

**Πίνακας 1. Αναγράφονται τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τις διαγνωστικές πέψεις, τα ρυθμιστικά διαλύματα και οι αντίστοιχες εταιρείες.**

Ένζυμο	Ρυθμιστικό διάλυμα	Εταιρεία
EcoRI	EcoRI buffer	Minotech
XbaI	T buffer	Takara
BamHI	K buffer	Minotech
HindIII	K buffer	Minotech
ScaI	ScaI buffer	Minotech
PstI	H buffer	Takara

### 1.3 Αντισώματα

#### ➤ Ανοσοαποτύπωση κατά Western

##### Πρωτογενή αντισώματα

**Πίνακας 2: Αναγράφονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, ο οργανισμός που έχουν παραχθεί, η αραιώση στην οποία χρησιμοποιούνται και η αντίστοιχη εταιρεία.**

Αντίσωμα	Οργανισμός	Αραιώση	Εταιρεία
Tuj1	ποντίκι	1:2500	Millipore #MAB1637
TRIM32	ποντίκι	1:500	Santa Cruz (8H8) sc-135588
TRIM32	κουνέλι	1:500	Sigma AV-38966
TRIM32	κουνέλι	1:500	Sigma T-1704
TRIM32 (7f10/zf1/5g7/1e10)	αρουραίος	1:10	Αντι-ορός
FLAG	ποντίκι	1:3000	Sigma F3165
Bcl <sub>2</sub>	ποντίκι	1:500	Santa Cruz sc-7382
Bax	κουνέλι	1:2000	GeneTex GTX 635715
Caspase 3	κουνέλι	1:1000	GeneTex GTXX110543
Total p53	ποντίκι	1:500	Santa Cruz sc-263
XIAP	κουνέλι	1:1000	Cell Signalling Technology #2042
Apa1	ποντίκι	1:500	Santa Cruz sc-135836
p-CDK1 (Tyr15)	κουνέλι	1:1000	Cell Signalling Technology #9111
p-CDK1 (Thr161)	κουνέλι	1:500	Cell Signalling Technology #9114
p27 Kip1	κουνέλι	1:2000	GeneTex GTX100446
N-Myc	ποντίκι	1:500	Santa Cruz sc-142

c-myc	ποντίκι	1:1000	αντι-ορός
Atg3	ποντίκι	1:500	Santa Cruz sc-393660
Atg12	ποντίκι	1:500	Santa Cruz sc-271688
p62	κουνέλι	1:1000	Abcam Ab91526
LC3B	κουνέλι	1:2000	GeneTex GTX127375
GRP78 Bip1	κουνέλι	1:1000	Abcam ab21685
VDAC	ποντίκι	1:200	Santa Cruz sc-390996
Tim23	ποντίκι	1:2000	BD Biosciences #611222
SOD	κουνέλι	1:2000	Abcam A16831
TFAM	ποντίκι	1:1000	Abnova H00007019-B01P
Parkin	κουνέλι	1:500	Cell Signalling Technology #2132
GFP	κουνέλι	1:1000	αντι-ορός
β- actin	ποντίκι	1:10000	Millipore #MAB1501

### Δευτερογενή αντισώματα

- Αντίσωμα αιγός έναντι IgG (H+L) κουνελιού, συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανακίου HRP (goat anti-rabbit, Thermo Scientific, #31460), αραιώση 1:2500 – 1:5000.
- Αντίσωμα αιγός έναντι IgG (H+L) ποντικιού, συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανακίου HRP (goat anti-mouse, Jackson immunoresearch, #115-035-146), αραιώση 1:5000.
- Αντίσωμα αιγός έναντι IgG (H+L) αρουραίου, συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανακίου HRP (goat anti-mouse, Jackson immunoresearch, #112-035-003), αραιώση 1:5000.

### ➤ Ανοσοκυτταροχημεία

#### Πρωτογενή αντισώματα

*Πίνακας 3. Αναγράφονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, ο οργανισμός που έχουν παραχθεί, η αραιώση στην οποία χρησιμοποιούνται και η αντίστοιχη εταιρεία.*

Αντίσωμα	Οργανισμός	Αραιώση	Εταιρεία
pH3 (Ser10)	κουνέλι	1:500	Upstate 06-570
FLAG	ποντίκι	1:1000	Sigma F1804
TRIM32 (7f10/zf1/5g7/1e10)	αρουραίος	1:10	Αντι-ορός
AcTub	ποντίκι	1:2000	Abcam #ab6046



## Δευτερογενή αντισώματα

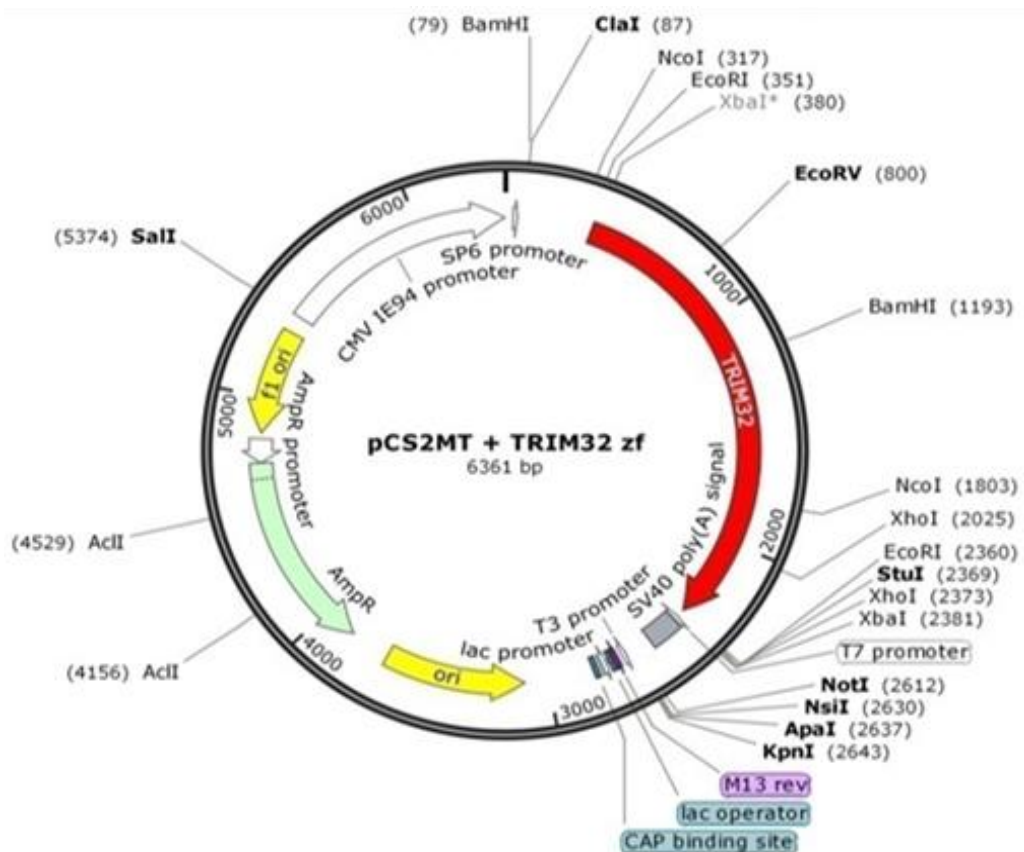
- Αντίσωμα αιγός έναντι IgG (H+L) κουνελιού συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική CF που εκπέμπει στα 555nm, δίνοντας κόκκινο χρώμα (CF555 goat anti-rabbit, Biotium, 20033), αραίωση 1:1000.
- Αντίσωμα αιγός έναντι IgG (H+L) ποντικού συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική CF που εκπέμπει στα 555nm, δίνοντας κόκκινο χρώμα (CF555 goat anti-mouse, Biotium, 20033), αραίωση 1:1000.

### 1.4 Εκκινητές

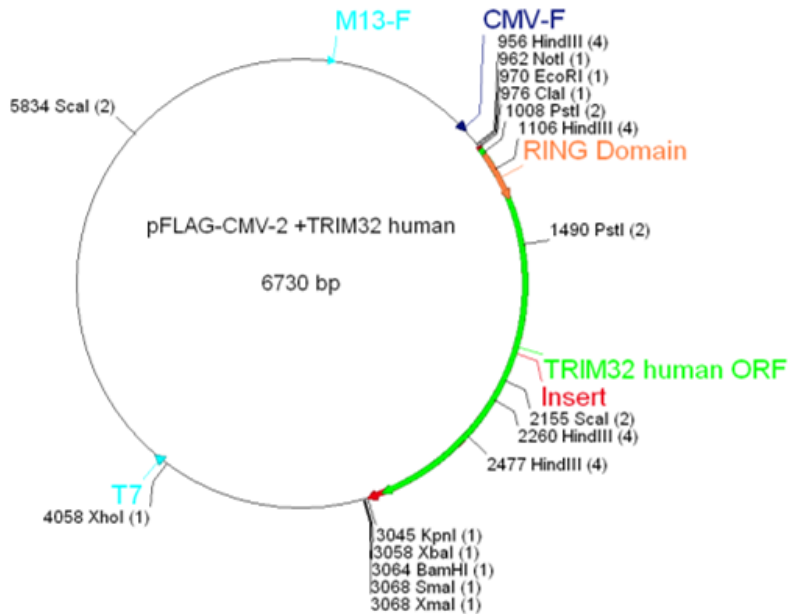
Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')	Μέγεθος Απλικονίου σε bp
Tyrosine Kinase Receptor B of BDNF/NT3	TrkB-s	AGC CCT GGT ACC AGC TGT CAA A	184
	TrkB-a	GCC TTG GCC AAG TTC TGA AGG A	
Tyrosine kinase receptor type 1	TrkA-s	GCA GAT GTG AAC GAT AGC TC	133
	TrkA-a	CGT GGA CGT AGT CGT TGC	
MYCN	MYCN-s	AATGG TGC TTA AGT TCC AGC A	154
	MYCN-a	GAA CTT CCA GTC TAA TAC TGG C	
c-myc	c-myc - s	TTG GGC GAG CTG CTG TCG TT	179
	c-myc - a	GAG AAG CTG GCC TCC TAC CA	
Tripartite motif 32	Trim32-s	TGG CAT GTG TGT GGA TGC TC	187
	Trim32- a	CAA CAG TCC AAG ACC AGC AGC	
Signal Recognition Particle 14 (Srp14)	Srp14-s	CAG TGC TGA TCT TCT TCT TCC C	200
	Srp14 -a	GAT GGT GTT GTT GGA GAG CGA G	

### 1.3 Πλασμιδιακοί χάρτες

Ως φορείς κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν οι pCS2MT και pFLAG-CMV2. Σε αυτούς εντέθηκαν: η αγρίου τύπου μορφή wtTrim32 από zebrafish και άνθρωπο, και η μεταλλαγμένη μορφή mtTrim32P130S από άνθρωπο.



Πλασμιδιακός χάρτης ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pCS2MT με ένθεση zfTRIM32. Στην εικόνα φαίνεται το γονίδιο zTRIM32, στοιχεία του πλασμιδίου όπως επίσης και βασικές θέσεις δράσης περιοριστικών ενζύμων.



Πλασμιδιακός χάρτης ανασυνδυασμένου πλασμιδίου Pflag-cmv-2 με ένθεση hTRIM32. Στην εικόνα φαίνεται το γονίδιο hTRIM32, στοιχεία του πλασμιδίου όπως επίσης και βασικές θέσεις δράσης περιοριστικών ενζύμων.

#### 1.4 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα κυτταροκαλλιέργειών

- Donkey Serum (Biosera #AS-228/500)
- Fetal Bovine Serum - FBS (Biosera #FB-1001/500 B11636, ThermoFisher Scientific #10270106)
- Antibiotic-Antimycotic 100x (ThermoFisher Scientific #15240062)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (ThermoFisher Scientific #41966029)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12 – DMEM / F12 (Biosera #LM-D1223/500)
- Trypsin 0.05%, 0.53mM EDTA σε PBS (Biosera #LMT1706/500)
- Phosphate Buffered Saline – PBS για κυτταροκαλλιέργεια (Biosera #LMS2041/500)
- Distilled Water sterile (ThermoFisher Scientific, #15230- 089)
- Acutase (ThermoFisher Scientific, #A1110501)
- Collagen (rat) (Roche #11179179001)
- Ρετινοϊκό οξύ (All Trans- Retinoic Acid – RA) (Sigma – Aldric #R2625)

## 1.5 Κυτταρικές σειρές

### Neuro2A (ATCC CCL-131)

Η κυτταρική σειρά Neuro2a αποτελείται από νευροβλαστωματικά κύτταρα προερχόμενα από την νευρική ακρολοφία ποντικού σε πρώιμο στάδιο. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά παρουσιάζει νευρική μορφολογία και τα κύτταρα αυτά διατηρούν το δυναμικό διαφοροποίησης τους αποκρινόμενα σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι για παράδειγμα το ρετινοϊκό οξύ (RA). Τα διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσιάζουν αρκετές ιδιότητες των νευρώνων και χρησιμοποιούνται σε μελέτες νευριτικής αύξησης, νευροτοξικότητας, ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης αλλά και στην νόσο του Alzheimer.

### SK-N-BE (2)-C (ATCC CRL #2268)

Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά αποτελεί υποκλώνο της πατρικής νευροβλαστωματικής σειράς SK-N-Be(2) και προέρχεται από κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας ανθρώπου. Διατηρεί δυναμικό διαφοροποίησης ως απόκριση σε εξωγενείς παράγοντες καθώς διαφοροποιείται παρουσία all-trans ρετινοϊκού οξέος (ATRA), ενώ παρουσία ρετινοϊκού οξέος διαφοροποιείται προς ώριμους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Επίσης, τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα ενεργότητας των ενζύμων τυροσινική υδροξυλάση και ντοπαμινική-b-υδροξυλάση.

### NIH-3T3

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά NIH-3T3. Πρόκειται για κύτταρα εμβρυονικών ινοβλαστών ποντικού τα οποία ξεκίνησαν από μια κυτταρική γραμμή που απομονώθηκε το 1962 στο Τμήμα Παθολογίας του Πανεπιστημίου της Νέας Υόρκης. Το 3T3 αναφέρεται στο πρωτόκολλο μεταφοράς και εμβολιασμού κυττάρων της γραμμής και σημαίνει «μεταφορά σε 3 μέρες, εμβολιασμός 3x10<sup>5</sup>κυττάρων». Χρησιμοποιώντας αυτό το πρωτόκολλο, η αθάνατοποιημένη κυτταρική σειρά αρχίζει να αναπτύσσεται και να σταθεροποιείται στην καλλιέργεια μετά από περίπου 20-30 γενεές ανάπτυξης in vitro. Οι επιστήμονες που καλλιέργησαν αρχικά αυτή την σειρά ήταν οι George Todaro και Howard

Green και έλαβαν τα κύτταρα από ινοβλάστες εμβρυϊκού ελβετικού αλφικού ποντικού. Η κυτταρική γραμμή έχει έκτοτε γίνει μια τυποποιημένη κυτταρική σειρά ινοβλαστών

## 1.6 Διαλύματα – Χημικά Αντιδραστήρια

### 1.6.1 Διαλύματα Μοριακής Βιολογίας που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο

- Διάλυμα Phosphate Buffered Saline (PBS) 20x

Για την παρασκευή 1L διαλύματος συμπύκνωσης 20x, χρειάζονται:

- 160gr NaCl
- 4gr KCl
- 28,8gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 4,8gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Όλα τα συστατικά αναμειγνύονται σε 800 ml H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με την προσθήκη NaOH και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1L με δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Τέλος το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121 °C και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα παρα- φορμαλδεΐδης (PFA) 4%

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

- Προσθήκη 2gr PFA σε 100 ml PBS 1x
  - Ανάδευση με μαγνητάκι σε θερμοκρασία ανεκτή στο χέρι
  - Ρύθμιση του pH στο 7,4 με τη βοήθεια NaOH
  - Συντήρηση στους 4°C και αποθήκευση στους -20°C
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών TGS 10x

Για την παρασκευή 1L διαλύματος 10x απαιτούνται:

- 30gr Tris (Sigma-Aldrich, T1503)
- 144gr γλυκίνης

- 10gr SDS

Τα συστατικά διαλύονται σε 800ml δις απεσταγμένο νερό και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1L με H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.3 με HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα συλλέγεται μετά τη χρήση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλη μία φορά.

- Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών 4x (Laemmli)

Για την παρασκευή 12ml διαλύματος, που χρησιμοποιείται για φόρτωση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης, αναμειγνύονται :

- 2,2ml Tris 1M, pH: 6,8
- 4,4ml γλυκερόλη 100%
- 4,4ml SDS 10%
- 0,5ml τη χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης
- 0,5ml β-μερκαπτοαιθανόλη

- Διάλυμα υγρής μεταφοράς πρωτεϊνών 10x (Transfer Buffer)

Για την παρασκευή 1L ρυθμιστικού διαλύματος για την ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών χρειάζονται :

- 111,66 gr γλυκίνης
- 29,32 gr Tris

Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε 1L δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Για να χρησιμοποιηθεί, αραιώνεται σε 1X με καθαρή μεθανόλη και νερό. Για την παρασκευή 1L ρυθμιστικού διαλύματος 1X απαιτούνται 100 ml από το Transfer Buffer 10X, 200 ml μεθανόλη και 700 ml H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία (~ 4° C).

### Διάλυμα Tris Buffered Saline (TBS) 20x

Είναι ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στο Western Blot και στον ανοσοφθορισμό. Για την παρασκευή 1L διαλύματος συμπύκνωσης 20X, αναμειγνύονται:

- 160gr NaCl
- 4gr KCl
- 60gr Tris base

Όλα τα συστατικά αναμειγνύονται σε 800 ml H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με την προσθήκη HCl και ο όγκος του συμπληρώνεται μέχρι το 1L με δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Τέλος το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121°C και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

• Διάλυμα TBS – Tween-20 0,1%

Με σκοπό την παρασκευή 500 ml διαλύματος πλύσης των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης χρειάζονται :

- 5ml Tween-20 10%
- 495ml TBS 1x

Το διάλυμα αναδεύεται για περίπου 5 λεπτά πριν χρησιμοποιηθεί και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

• Διάλυμα αποκλεισμού (Blocking Buffer)

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος αποκλεισμού απαιτούνται :

- 5 gr γάλα σκόνη
- 95 ml TBS 1X
- 1 ml Tween 20x 10%

Πριν την χρήση το διάλυμα αναδεύεται για περίπου 15 λεπτά και στην συνέχεια μπορεί να διατηρηθεί στους 4°C για περίπου 3-4 ημέρες.

• Διάλυμα γάλακτος (5%) για την επαναιώρηση των δευτερογενών αντισωμάτων

Για την παρασκευή 500 ml διαλύματος, 25gr σκόνης γάλακτος διαλύονται σε 480ml TBS – Tween-20 0,1%, (1x).

• Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS) 10%

Για την Παρασκευή 10ml διαλύματος, 1gr APS (Sigma-Aldrich, A3678) διαλύεται σε 10ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα για την επαναιώρηση των πρωτογενών αντισωμάτων

Τα πρωτογενή αντισώματα για την ανοσοαποτύπωση αραιώνονται σε διάλυμα που περιέχει

- 5% BSA
- 0,1% TWEEN (10%)
- TBS 1x

Επομένως για 2ml διαλύματος επαναιώρησης αναμειγνύονται 0,1 gr BSA (Sigma- Aldrich, A9647) 20μl TWEEN και 1980μl TBS 1x. Στη συνέχεια ανάλογα με την επιθυμητή αραιώση προστίθεται και η κατάλληλη ποσότητα αντισώματος. Το διάλυμα με το αντίσωμα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί εφόσον φυλλάσσεται στους -20°C

- Διάλυμα SDS 10%

Για την Παρασκευή 100ml διαλύματος, 10gr SDS διαλύονται σε 80ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100ml με H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου

- Διάλυμα Tris-HCl 1.5M, pH 8.8

Για την παρασκευή 500ml διαλύματος 20.85gr Tris διαλύονται σε 450ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500ml. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με HCl Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15 λεπτά και φυλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα Tris-HCl 1M, pH 6.8

Για την παρασκευή 500ml διαλύματος 60.56gr Tris διαλύονται σε 450ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500ml. Το pH ρυθμίζεται στο 6.8 με HCl Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15 λεπτά και φυλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH για αραιώση κολλαγόνου



Για την παρασκευή 50ml διαλύματος CH<sub>3</sub>COOH 57ml πυκνού CH<sub>3</sub>COOH(1M) διαλύονται σε 50ml H<sub>2</sub>O.

- Διάλυμα φόρτωσης νουκλεϊκών οξέων 5x

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

Η συγκέντρωσή του κατά την χρήση πρέπει να είναι 1X.

- 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
- 100 ml 0.5M EDTA (pH 8)

Γίνεται αραιώση σε 1L δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και πριν την χρήση αραιώνεται σε 1X.

### 1.6.2 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*)
- Διάλυμα Acrylamide/Bis-Acrylamide 30 % (29:1) (*Carl Roth # 3029.1*)
- Διάλυμα RIPA 10x (*Cell signaling # 9806*)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) (*Sigma – Aldrich, E1510*)
- GelRed (*Biotium*)
- SYBR Green (*Lonza*)
- 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*)
- Προπανόλη-2 (*Merck # 109634*)
- Υπόστρωμα ECL για την εμφάνιση κατά την ανοσοαποτύπωση (Lumilight western blotting Substrate, *Roche # 1201520001*)

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για μεταφορά πρωτεϊνών (*GE Healthcare # 10600002*)
- Χλωροφόρμιο - CHCl<sub>3</sub> (*Fluka # C/4960/17*)
- Φαινόλη (*ROTH #0038*)
- H<sub>2</sub>O για PCR (*Calbiochem, # 9601*)
- DNA πολυμεράση (kit) (*KAPA Biosystems # KK1510*)
- Oligo(dT)18 primer – εκκινητής ολιγο-dT (*Thermo Scientific # SO131*)
- RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase - Αντίστροφη μεταγραφή (*Thermo Scientific # EP0733*)
- RiboLock RNase Inhibitor – αναστολέας των ριβονουκλεασών (*Thermo Scientific # EO0381*)

### 1.6.3 Διαλύματα Κυτταρικής Βιολογίας

- Διάλυμα ανοσοφθορισμού

Για την Παρασκευή 50ml διαλύματος ανοσοφθορισμού απαιτούνται:

- 500μl Donkey serum
- 500μl Triton X-100 10% [αραιωμένο 10 φορές από stock 100% (*Carl Roth, 3051*) σε υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O.

Τα συστατικά προστίθενται σε 49ml TBS 1x. Ακολουθεί ανάδευση και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C

- Μέσο στερέωσης καλυπτρίδων στην αντικειμενοφόρο πλάκα:

Aqua-Poly/Mount Coverslipping Medium (*Polysciences, 18606-20*)

## 2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Μέθοδοι Κυτταροκαλλιιεργειών

#### 2.1.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Ο χειρισμός όλων των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής (Telstar, BioIIAdvance) σε ειδικό δωμάτιο κυτταροκαλλιιεργειών. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε κλίβανο κυττάρων (FORMASCIENTIFIC), με σταθερή θερμοκρασία 37°C και 5% περιεκτικότητα CO<sub>2</sub>.

Τα νευροβλαστωματικά κύτταρα Neuro2A αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει τα ακόλουθα:

- DMEM (4500mg/L glucose)
- 10% FBS \*
- 1% A/A (Antibiotic/Antimycotic)

\*(Πριν τη χρήση του ορού (FBS) πρέπει να θερμανθεί στους 56°C για 30 λεπτά, με σκοπό την αποφυγή τυχόν ανοσολογικών αποκρίσεων από τα κύτταρα λόγω των πρωτεϊνών του συμπληρώματος του ορού)

Τα νευροβλαστωματικά κύτταρα Be2C αναπτύσσονται με τον ίδιο τρόπο με τις παραπάνω νευροβλαστωματικές σειρές με τη διαφορά ότι το θρεπτικό μέσο περιέχει DMEM-F12 αντί για DMEM.

#### 2.1.2 Ανακαλλιέργεια Κυττάρων με την χρήση Θρυψίνης (Κυτταρικό Split)

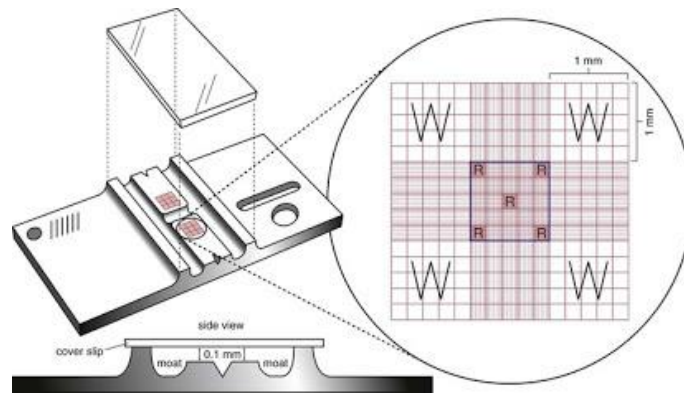
Η διατήρηση της καλλιέργεια των κυττάρων, προϋποθέτει ότι όταν το ποσοστό των κυττάρων έχει καλύψει το 70-80% της συνολικής επιφάνειας του πιάτου, θα πρέπει πραγματοποιηθεί ανακαλλιέργεια των κυττάρων σε καινούριο πιάτο με τη χρήση θρυψίνης. Η θρυψίνη είναι μία

πρωτεύαση η οποία καταστρέφει τις πρωτεΐνες προσκόλλησης των κυττάρων στην επιφάνεια του πιάτου. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας για πιάτο διαμέτρου 100 mm περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από το πιάτο καλλιέργειας
2. Έκπλυση για απομάκρυνση του εναπομείναντος θρεπτικού υλικού με 5 mL διαλύματος PBS 1x
3. Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 820 μl θρυψίνης
4. Επώαση στους 37°C για 5 λεπτά, με ελαφρά χτυπήματα κατά διαστήματα ώστε να διευκολυνθεί η αποκόλληση των κυττάρων
5. Προσθήκη 4.8 mL νέου θρεπτικού για αδρανοποίηση της θρυψίνης και επαναιώρηση με χρήση πιπέτας μιας χρήσεως ώστε τα κύτταρα να γίνουν κατά βάση μονήρη
6. Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer
7. Μεταφορά του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε νέο πιάτο, στο οποίο έχει ήδη προστεθεί θρεπτικό υλικό
8. Επώαση των κυττάρων στους 37°C. Στο διάστημα των επόμενων 4-5 ωρών τα κύτταρα προσκολλώνται ξανά στο υπόστρωμα του πιάτου.

### 2.1.3 Μέτρηση κυττάρων σε πλάκα Neubauer

Η χρήση της πλάκας Neubauer αποτελεί μια μέθοδο προσδιορισμού προσεγγιστικά του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα. Η πλάκα αποτελείται από τέσσερα μεγάλα τετράγωνα που βρίσκονται στις γωνίες της πλάκας και υποδιαιρούνται σε άλλα μικρότερα (Εικόνα 20). Αφού προστεθούν περίπου 10 μl του κυτταρικού εναιωρήματος στην πλάκα, καλύπτεται με καλυπτρίδα και ακολουθεί παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Γίνεται μέτρηση των κυττάρων σε καθένα από τα τέσσερα τετράγωνα και υπολογίζεται ο μέσος όρος. Ο αριθμός που προκύπτει πολλαπλασιάζεται επί  $10^4$  και αποτελεί τον αριθμό των κυττάρων ανά ml καλλιέργειας.



**Εικόνα 26. Πλάκα Neubauer.** Εμφανίζονται σημειωμένα τα τετράγωνα στις γωνίες όπου γίνεται μέτρηση των κυττάρων. Μετά υπολογίζεται ο μέσος όρος και ο αριθμός πολλαπλασιαζόμενος με  $10^4$  αντιστοιχεί στον αριθμό κυττάρων ανά mL καλλιέργειας.

#### 2.1.4 Απόψυξη κυττάρων

Αρχικά, γίνεται προσθήκη 10 ml θρεπτικού μέσου σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας (100 mm) και 8,2 ml σε falcon των 50 ml. Στη συνέχεια, το κρυοφιαλίδιο με τα κύτταρα μεταφέρεται από το υγρό άζωτο στον επωαστικό θάλαμο (37°C), αφού καθαριστεί με αιθανόλη 70%, ανοίγοντας ελαφρώς το καπάκι για να εκτονωθεί η πίεση. Μόλις σχηματιστεί μια μπάλα πάγου στο κέντρο του φιαλιδίου, γίνεται μεταφορά του περιεχομένου στο falcon ώστε το ξεπάγωμα να ολοκληρωθεί εκεί. Ακολουθούν, φυγοκέντρηση (900 rpm, 5 λεπτά), απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5 ml θρεπτικού, τα οποία λαμβάνονται από το πιάτο. Τέλος γίνεται μεταφορά κυττάρων στο πιάτο και επώαση στους 37°C μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια.

#### 2.1.5 Αποθήκευση κυτταρικών σειρών

Οι κυτταρικές μπορούν να διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε ειδικά κρυοφιαλίδια τοποθετημένα σε υγρό άζωτο (-196°C). Για κάθε κρυοφιαλίδιο (χωρητικότητα 2 mL) απαιτούνται 900 μL κυτταρικού εναιωρήματος και 900 μL διαλύματος παγώματος (νευροβλάστωμα: 50% FBS, 20% DMSO, 30% DMEM, ενώ για τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα: 80% θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, 20% DMSO). Αρχικά πραγματοποιείται θρυψινοποίηση των κυττάρων και φυγοκέντρηση τους (900 rpm, 5 λεπτά). Ακολουθεί απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 900 μL θρεπτικού μέσου. Το εναιώρημα μεταφέρεται στο κρυοφιαλίδιο μαζί με 900 μL

διαλύματος παγώματος και στη συνέχεια το κρυοφιαλίδιο τοποθετείται σε δοχείο με διάλυμα ισοπροπανόλης για αργό πάγωμα στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Μετά από 16-24 ώρες μπορεί να γίνει αποθήκευση του κρυοφιαλιδίου στο υγρό άζωτο.

### **2.1.6 Νευρική Διαφοροποίηση των Νευροβλαστωματικών Κυττάρων Be2C**

Τα νευροβλαστωματικά κύτταρα Be2C απαιτούν κάποιο ειδικό υπόστρωμα για να μπορέσουν να προσκολληθούν στα τρυβλία καλλιέργειας. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα προσκόλλησης κολλαγόνο τύπου I (collagen). Το κολλαγόνο είναι η βασική δομική πρωτεΐνη του εξωκυττάρου χώρου των συνδετικών ιστών του σώματος και χρησιμοποιείται στις κυτταροκαλλιέργειες ως υπόστρωμα προσκόλλησης.

Η διαφοροποίηση των κυττάρων νευροβλαστώματος, 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. Επιπλέον το RA επάγει τη διαδικασία της διαφοροποίησης, ενεργοποιώντας μόρια, όπως είναι οι p21Cip1 και p27Kip1 τα οποία αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο στις φάσεις G0/G1. Η διαφοροποίηση ολοκληρώνεται μέσα σε 7-8 ημέρες.

Το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης περιλαμβάνει:

- 10  $\mu\text{M}$  ρετινοϊκό οξύ (RA)
- 1% FBS
- DMEM
- 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. 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 κα ανάλυση.

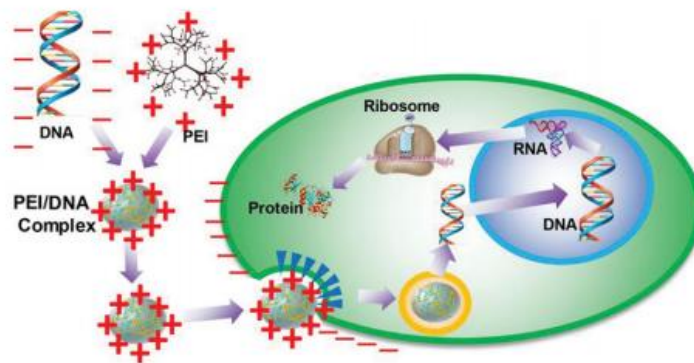
#### 2.1.7 Διαμόλυνση Ευκαρυωτικών Κυττάρων

Η είσοδος εξωγενούς γενετικού υλικού στα ευκαρυωτικά κύτταρα (διαμόλυνση) αποτελεί μια μέθοδο για τη μελέτη της λειτουργίας και της ρύθμισης γονιδίων αλλά και το ρόλο που διαδραματίζουν διάφορες πρωτεΐνες στην κυτταρική λειτουργία. Το εξωγενές γενετικό υλικό μπορεί να διατηρείται σταθερά στο κύτταρο δέκτη εφόσον ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ή να παραμείνει για ένα μικρό χρονικό διάστημα χωρίς να ενσωματωθεί, ανάλογο με τον σκοπό του πειράματος. Η διαμόλυνση μπορεί πραγματοποιηθεί είτε με χημικούς τρόπους όπως με χρήση  $\text{CaCl}_2$ , λιποσωμάτων ή κατιονικών πολυμερών, είτε με μη χημικές μεθόδους όπως με ηλεκτροδιάτρηση, εφαρμόζοντας υψηλή πίεση ή με χρήση νανοσωματιδίων. Εναλλακτικό τρόπο μεταφοράς DNA αποτελεί η χρήση ιών. Η επιλογή της μεθόδου γίνεται με βάση κυτταρικό τύπο και το μέγεθος του γονιδίου/φορέα, επιδιώκοντας όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, επαναληψιμότητα και χαμηλή τοξικότητα για τα κύτταρα (Kim and Eberwine, 2010).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, η διαμόλυνση έγινε με χρήση χημικών μεθόδων και συγκεκριμένα μέσω κατιονικών πολυμερών (PEI), όπου το ποσοστό αποτελεσματικότητας της διαμόλυνσης είναι 40% - 50%.

- Διαμόλυνση με πολυαιθυλεναμίνη (PEI)

Η πολυαιθυλεναμίνη είναι ένα θετικά φορτισμένο πολυμερές που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω της χαμηλής τοξικότητας, της χαμηλής ανοσογονικότητας και του χαμηλού κόστους της. Αρχικά, σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το αρνητικά φορτισμένο DNA το οποίο όντας στο εσωτερικό του συμπλόκου μπορεί να προστατεύεται από την αποικοδόμηση. Στη, συνέχεια το θετικά φορτισμένο σύμπλοκο αλληλεπιδρά με την ανιονική διπλοστοιβάδα πεπτιδογλυκάνων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και έτσι εισάγεται στα κύτταρα με ενδοκυτάρωση, απελευθερώνοντας το DNA (Εικόνα 21) (Yang *et al.*, 2017).



**Εικόνα 27. Σχηματική απεικόνιση διαμόλυνσης ευκαρυωτικού κυττάρου με χρήση PEI.** Αρχικά σχηματίζεται ένα σύμπλοκο μεταξύ PEI-DNA και στη συνέχεια αυτό αλληλεπιδρά με την κυτταρική μεμβράνη επιτρέποντας την είσοδο του γενετικού υλικού στο εσωτερικό των κυττάρων (Yang *et al.*, 2017).

Η διαδικασία που εφαρμόζεται για διαμόλυνση σε πιάτο 24 βοθρίων περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Αλλαγή θρεπτικού μέσου στο βοθρίο αφήνοντας 250  $\mu\text{L}$  (πάντα τη μισή ποσότητα θρεπτικού από τη μέγιστη που χωράει το εκάστοτε πιάτο ή βοθρίο)
2. Προσθήκη 18  $\mu\text{L}$  PEI 25% σε 1 mL  $\text{H}_2\text{O}$  ειδικό για κυτταροκαλλιέργειες και ανάδευση σε αναδευτήρα vortex για 10 δευτερόλεπτα, ώστε το διάλυμα εργασίας του PEI να είναι 0.45%



3. Σε σωλήνα τύπου errendorf (P), ανάμειξη για κάθε βοθρίο 0.75  $\mu\text{L}$  δ/τος εργασίας PEI και 25  $\mu\text{L}$  DMEM και ανάδευση μέσω vortex για 10 δευτερόλεπτα
4. Σε σωλήνα τύπου errendorf (D), ανάμειξη για κάθε βοθρίο 1  $\mu\text{g}$  DNA και 12.5  $\mu\text{L}$  DMEM και ανάδευση μέσω vortex για 10 δευτερόλεπτα
5. Μεταφορά του περιεχομένου από το errendorf P στο D και ανάδευση μέσω vortex για 10 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά
6. Προσθήκη του διαλύματος στάγδην στα κύτταρα και επώαση για 4 ώρες
7. Αφαίρεση θρεπτικού και προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  νέου θρεπτικού (πάντα τον μέγιστο όγκο που χωράει το εκάστοτε βοθρίο ή πιάτο)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι ποσότητες των PEI, DNA και DMEM για διάφορα πιάτα/βοθρία

**Πίνακας 5. Συγκεντρωτικός πίνακας για τις αναλογίες των υλικών για διαμόλυνση με PEI σε διάφορα πιάτα κυτταροκαλλιιεργειών.**

	Πιάτο 12 βοθρίων		Πιάτο 6 βοθρίων		Πιάτο διαμέτρου 60 mm		Πιάτο διαμέτρου 100 mm	
	P	D	P	D	P	D	P	D
PEI	0.75 $\mu\text{L}$	-	3 $\mu\text{L}$	-	3 $\mu\text{L}$	-	4.5 $\mu\text{L}$	-
DNA	-	1 $\mu\text{g}$	-	4 $\mu\text{g}$	-	4 $\mu\text{g}$	-	10 $\mu\text{g}$
DMEM	25 $\mu\text{L}$	12.5 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$

## 2.2 Μέθοδοι Γενετικής Μηχανικής

### 2.2.1 Ανάπτυξη Βακτηρίων

Η ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους DH5a – E.Coli γίνεται στους 37°C. Το υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (LB), αποτελείται από:

- 1% τρυπτόνη
- 0,5% NaCl
- 1% εκχύλισμα ζύμης

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, στο παραπάνω προστίθεται 1.5%

Άγαρ. Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15 λεπτά. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται στους 4°C. Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 30 µg/ml.

### 2.2.2 Μετασχηματισμός Βακτηρίων με Θερμικό Σοκ

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

- 100µl βακτηριακών κυττάρων, επιλεκτικών 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.
- Στην συνέχεια προστίθενται 900µl υγρού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας.
- Μετά από επώαση για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση (125rpm), πραγματοποιείται επίστρωση σε τρυβλία στερεού θρεπτικού μέσου με το κατάλληλο αντιβιοτικό.
- Τα τρυβλία επωάζονται ολονύκτια στους 37°C (175-250 rpm).

### 2.2.3 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 συγκεκριμένα, 440µl υγρής βακτηριακής καλλιέργειας, αναμιγνύονται με 880µl αποστειρωμένης γλυκερόλης 86% (αναλογία 1:2) και μεταφέρονται σε κρυοφιαλίδια των 2ml. Ακολουθεί μεταφορά και αποθήκευση στους -80 °C.

### 2.2.4 Παρασκευή Πλασμιδιακού DNA σε Μικρή Κλίμακα (mini prep)

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων. 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 λύονται

τα κύτταρα, σπάει, ενώ το μικρού μεγέθους πλασμιδιακό DNA παραμένει ανέπαφο.

- 1 ml βακτηριακής καλλιέργειας τοποθετείται σε φιαλίδιο του 1.5ml 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 300μl του αλκαλικού διαλύματος λύσης, το οποίο περιέχει NaOH και SDS, ήπια ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά.
- Στη συνέχεια προστίθενται 300μl 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 490μl ισοπροπανόλης (*2-Propanol*). Τα διαλύματα αναμιγνύονται και φυγοκεντρώνονται 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 H<sub>2</sub>O ή διάλυμα TE.
- Το πλασμιδιακό DNA φυλάσσεται στους -20°C

### **2.2.5 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.

### **2.2.6 Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Αγαρόζης**

Για την ηλεκτροφόρηση με σκοπό τον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων, χρησιμοποιούνται τα πηκτώματα αγαρόζης η πυκνότητα των οποίων εξαρτάται από το μέγεθος του υπό εξέταση νουκλεϊκού οξέος. Μικρά τμήματα νουκλεϊκών οξέων κινούνται πιο εύκολα και άρα πιο γρήγορα, με αποτέλεσμα να απαιτούν μεγάλη πυκνότητα πηκτώματος, ενώ για τα μεγάλα τμήματα ισχύει το αντίθετο. Για μεγάλα τμήματα απαιτείται πηκτώμα περιεκτικότητας ~ 0,8% σε αγαρόζη, για τα μεσαίου μεγέθους τμήματα απαιτείται περιεκτικότητα ~1-1,2% σε αγαρόζη, ενώ για τα μικρά τμήματα όπως είναι για παράδειγμα τα προϊόντα της PCR που είναι περίπου 300 bp, παρασκευάζεται πηκτή με περιεκτικότητα >1,5% σε αγαρόζη.

Τα νουκλεϊκά οξέα γίνονται ορατά μέσα στο πήκτωμα, μέσω χρώσης με ειδικές χρωστικές, οι οποίες προσδένονται σε αυτά. Έτσι, εκθέτοντας το πήκτωμα σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) αποκαλύπτονται φωτεινές ζώνες που αντιστοιχούν σε νουκλεϊκά οξέα διαφορετικού μεγέθους. Με σκοπό τον προσδιορισμό του μεγέθους των άγνωστων ζωνών, χρησιμοποιούνται δείγματα με τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους, τα οποία συγκρίνονται με τις άγνωστες ζώνες του πηκτώματος.

Η πιο συνηθισμένη χρωστική που χρησιμοποιείται είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), το οποίο όμως είναι εξαιρετικά καρκινογόνο. Άλλες πιο ασφαλείς αλλά και πιο ευαίσθητες χρωστικές είναι το GelRed και το SYBR Green.

- Για την παρασκευή 1% πηκτής αγαρόζης, 1gr αγαρόζης 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 εμφάφτιση της πηκτής στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X.

### **2.2.7 Αντίδραση Περιοριστικής Πέψης**

Η αντίδραση της περιοριστικής 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.

## **2.3 Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας**

### **2.3.1 Απομόνωση Ολικού Ριβονουκλεϊκού Οξέος (RNA) από Ευκαρυωτικά Κύτταρα**

Η απομόνωση RNA είναι μία διαδικασία που πρέπει να γίνεται πολύ προσεκτικά, καθώς πρέπει να αποφευχθεί η επιμόλυνση του RNA με αποδιατακτικά ένζυμα, τα οποία ονομάζονται ριβονουκλεάσες (RNases). Για αυτόν το λόγο, κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται filter

tips και αποστειρωμένος πλαστικός εξοπλισμός απαλλαγμένος από RNases. Στην παρούσα εργασία η απομόνωση RNA έγινε με την βοήθεια του διαλύματος Trizol. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- 1ml διαλύματος Trizol προστίθεται στα κύτταρα του πιάτου κυτταροκαλλιέργειας (αφού έχει απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό) ή στο ίζημα των κυττάρων (αφού έχει προηγηθεί φυγοκέντρηση).
- Τα κύτταρα με το Trizol συλλέγονται σε φιαλίδιο τύπου erpendorf και σε αυτό το στάδιο μπορούν να φυλαχθούν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ειδικά, ακολουθεί θραύση των κυτταρικών μεμβρανών μέσω έντονης ανάδευσης (15 φορές) με τη χρήση σύριγγας ινσουλίνης.
- Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προστίθενται 200μl χλωροφορμίου και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με το χέρι για 15 δευτερόλεπτα.
- Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στα  $12000\text{g}/15\text{λεπτά}/4^{\circ}\text{C}$ . 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.
- Η πάνω φάση, που περιέχει το RNA, μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο, προστίθενται 200μl ισοπροπανόλης και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με το χέρι για 15 δευτερόλεπτα.
- Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτό το στάδιο το RNA κατακρημνίζεται λόγω βαρύτητας και αδιαλυτότητας στην ισοπροπανόλη .
- Τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στα  $12000\text{g}/ 10 \text{λεπτά}/ 4^{\circ}\text{C}$
- Ακολουθεί πλύση του ιζήματος με 1ml διαλύματος 75% υπερκάθαρης αιθανόλης. Το ίζημα σε αυτό το στάδιο παραμένει ορατό καθώς δεν διαλυτοποιείται παρουσία αιθανόλης
- Το RNA φυγοκεντρείται στα  $7500\text{g}/ 5 \text{λεπτά}/ 4^{\circ}\text{C}$  .
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ακολουθεί ακόμα μια φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων αιθανόλης.
- Τα φιαλίδια με το RNA αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου με ανοικτά τα καπάκια για 5 – 10 λεπτά. 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 10 λεπτών καθώς υπάρχει κίνδυνος να ξεραθεί το RNA και να μην επαναδιαλύεται.
- Τέλος, το RNA επαναδιαλύεται σε 30μl  $\text{H}_2\text{O}$  και φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για σύντομο χρονικό διάστημα ή στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα

### **2.3.2 Καθαρισμός του Απομονωμένου RNA από το DNA**

Μία πολύ σημαντική διαδικασία είναι η κατεργασία του απομονωμένου RNA με μία δεοξυρεβονουκλεάση (DNase), η οποία καταστρέφει τυχόν υπολείμματα γενωμικού DNA, διασπώντας τους φωσφωδιεστερικούς δεσμούς. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζουμε την

καθαρότητα του απομονωμένου RNA. Χρησιμοποιήθηκε το RQ1 RNase-Free DNase kit της εταιρίας Promega και η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Ποσότητα ανά αντίδραση</b>
RNA	1 µg
Buffer 10X	1 µl
DNase	1 µl
H <sub>2</sub> O	0-7 µl
<b>Τελικός Όγκος</b>	<b>10 µl</b>

1. Αφού γίνει η μίξη των παραπάνω συστατικών, ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 37 °C.
2. Στην συνέχεια προστίθεται 1µl από το αντιδραστήριο STOP, το οποίο σταματά την δράση της DNase.
3. Τέλος, γίνεται επώαση για 10 λεπτά στους 65°C.

### **2.3.3 Αντίστροφη Μεταγραφή**

Κατά την αντίστροφη μεταγραφή, ένα μονόκλωνο μόριο RNA μετατρέπεται στο συμπληρωματικό του μονόκλωνο DNA με την βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Το ένζυμο είναι μία πολυμεράση, που έχει την ικανότητα χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο μία αλυσίδα RNA, να συνθέτη την συμπληρωματική της αλυσίδα cDNA. Χρησιμοποιούνται ειδικοί εκκινητές με αλληλουχία oligo-dT, οι οποίοι σχηματίζουν ζεύγη βάσεων με την poly-A ουρά που υπάρχει μόνο σε όλα τα ευκαρυωτικά mRNA. Με αυτόν τον τρόπο η συγκεκριμένη αντίδραση είναι ειδική μόνο στα mRNA. Χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρείας Thermo Fisher.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

<b>RNA</b>	<b>4,5 µl</b>
<b>Oligo-Dt</b>	<b>0,5 µl</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>1 µl</b>

1. Ανάμιξη των παραπάνω συστατικών της αντίδρασης και επώαση για 5 λεπτά στους 65°C.

Παρασκευή Master Mix με την αντίστροφη μεταγραφάση, που περιέχει τα εξής συστατικά:

<b>Reaction Buffer 5X</b>	<b>2 μl</b>
<b>dNTPs</b>	<b>1 μl</b>
<b>Ribolock αναστολείς ριβονουκλεασών</b>	<b>0,5 μl</b>
<b>Αντίστροφη μεταγραφάση RT</b>	<b>0.5 μl</b>

1. Προσθήκη 4 μl του Master Mix σε κάθε αντίδραση.
2. Επώαση για 1 ώρα στους 42°C.
3. Επώαση για 5 λεπτά στους 70 °C για να τερματιστεί η αντίδραση.
4. Αραίωση του κάθε δείγματος με H<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 30 μl.
5. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C.

### 2.3.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την ενίσχυση μιας αλληλουχίας DNA μέσω ενζυμικής αντίδρασης in vitro.

Η PCR βασίζεται στην λειτουργία του θερμικού κυκλοποιητή. Η συγκεκριμένη συσκευή εκθέτει τα αντιδραστήρια σε διαφορετικές θερμοκρασίες με συνεχή θέρμανση και ψύξη, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η πραγματοποίηση διαδοχικών αντιδράσεων που απαιτούν διαφορετικές θερμοκρασίες. Αποτελείται από 3 διακριτά στάδια-αντιδράσεις. Στο πρώτο, αποδιατάσσεται η δίκλωνη έλικα του DNA, στο δεύτερο στάδιο οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μόριο-στόχο, ενώ στο τρίτο η DNA πολυμεράση συνθέτει μία καινούρια μονόκλωνη αλυσίδα από κάθε εκκινητή.

Σε αυτή την διαδικασία χρησιμοποιούνται ειδικές θερμοανθεκτικές πολυμεράσες, οι οποίες πραγματοποιούν τον πολυμερισμό σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες χωρίς να καταστρέφονται. Η πιο συνηθισμένη πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι η Taq. Ο πολυμερισμός γίνεται με κατεύθυνση 5' → 3' και οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες λειτουργούν ως εκμαγείο για τους επόμενους κύκλους. Το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει το DNA εκμαγείο, τους εκκινητές, dNTPs, DNA πολυμεράση, MgCl<sub>2</sub> και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου.

Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών θα πρέπει να βεβαιωθεί ότι το ζεύγος των εκκινητών είναι ειδικό μόνο για την περιοχή που θέλουμε να ενισχύσουμε και δεν παράγονται παραπροϊόντα. Αν η υπό έλεγχο περιοχή αφορά ένα γονίδιο, τότε οι εκκινητές θα πρέπει να βρίσκονται εντός της κωδικής περιοχής του γονιδίου και να περιλαμβάνουν ένα ιντρόνιο. Οι εκκινητές sense

έχουν την ίδια αλληλουχία με την νοηματική αλυσίδα και είναι συμπληρωματικοί με την αντινοηματική αλυσίδα, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τους antisense εκκινητές.

**Πίνακας 7 : Αντιδραστήρια και ποσότητες που χρησιμοποιούνται σε μία αντίδραση PCR**

Reaction Buffer 10X	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 $\mu$ l
dNTPs	0.4 $\mu$ l
Primer – sense	1 $\mu$ l
Primer – antisense	1 $\mu$ l
Taq polymerase (5 u/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
DNA template	1 – 2 $\mu$ l ανάλογα με την συγκέντρωση
Nuclease – free H <sub>2</sub> O	Μέχρι τελικού όγκου 50 $\mu$ l

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή είναι το εξής:

20 – 35 Cycles	}	<b>Preheating</b>	<b>94 °C</b>	<b>2 λεπτά</b>
		<b>Denaturation</b>	<b>94 °C</b>	<b>45 δευτερόλεπτα</b>
		<b>Annealing</b>	<b>45 – 68 °C **</b>	<b>45 δευτερόλεπτα</b>
		<b>Extension</b>	<b>72 °C</b>	<b>30 δευτερόλεπτα</b>
		<b>Elongation</b>	<b>72 °C</b>	<b>10 λεπτά</b>

\*\* Η θερμοκρασία του Annealing εξαρτάται από τα σημεία τήξης των εκκινητών και συνήθως είναι 1 έως 5 βαθμούς χαμηλότερη από αυτά.



## 2.4 Βιοχημικές Μέθοδοι

### 2.4.1 Απομόνωση Ολικού Πρωτεϊνικού Εκχυλίσματος από Νευρικά Κύτταρα

Η απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το διάλυμα λύσης RIPA. 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 5 λεπτά.
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 παύση και ένταση 30%.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14000g/ 10 λεπτά/ 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.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Πραγματοποιείται μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα 595nm συναρτήσεως 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 επαναλωρείται 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.
- Επώαση 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 την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες πολυπεπτιδικές τους υπομονάδες, αλλά και τον μη σχηματισμό συσσωματωμάτων. Οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται με θέρμανση για 5 λεπτά στους 95 °C με την χρήση κατάλληλων αποδιατακτικών αναγωγικών παραγόντων όπως είναι το SDS και η β-μερκαπτοαιθανόλη, που περιέχονται στο Laemli buffer.

Η β-μερκαπτοαιθανόλη, ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και το SDS καταστρέφει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και δεσμεύεται στις πρωτεΐνες, προσδίδοντάς τους μεγάλο αρνητικό φορτίο. Υπό αυτές τις συνθήκες, καταστρέφεται η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να έχουν όμοιες αναλογίες φορτίου/μεγέθους. 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).

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αποτελείται από 2 διακριτά μέρη:

- **Stacking gel 5%:** σκοπός του είναι να στοιβάξει τις πρωτεΐνες, ώστε να ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση από το ίδιο σημείο
- **Separation gel 10-15%:** σκοπός του είναι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών

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.
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 επιστοίβαξης με συγκέντρωση ακρυλαμίδης 4%.
6. Απομακρύνεται η ισοπροπανόλη από το πήκτωμα διαχωρισμού, ξεπλένεται το πήκτωμα με H<sub>2</sub>O και προστίθεται το διάλυμα του πηκτώματος επιστοίβαξης.
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.

**Πίνακας 4: συστατικά και ποσότητες για κάθε τύπο πηκτώματος**

Πηκτή διαχωρισμού (separating)	8%	10%	12%	15%	Πηκτή επιστοίβαξης (stacking) 5%
Acryl:bis (29:1)	2,7 ml	3,3 ml	4 ml	5 ml	0,67 ml
1.5M Tris pH 8.8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
1M Tris pH 6.8	-	-	-	-	0,5 ml
H <sub>2</sub> O (υπερκάθαρο)	4,6 ml	4 ml	3,3 ml	2,3 ml	2,7 ml
10 % SDS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	40 μl
10 % APS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	40 μl
TEMED	6 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl
<b>Τελικός όγκος</b>	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	4 ml

#### **2.4.3.2 Μεταφορά των Πρωτεϊνών σε Μembrάνη Νιτροκυτταρίνης**

Μόλις η χρωστική φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής, η ηλεκτροφόρηση σταματά και αρχίζει η διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, οφείλεται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις καθώς και σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και της μεμβράνης.

Τα βήματα που ακολουθούνται κατά την υγρή ηλεκτρομεταφορά είναι τα εξής:

1. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κόβεται στο μέγεθος της πηκτής διαχωρισμού και διαβρέχεται με υπερκάθαρο (nanopure) H<sub>2</sub>O.
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<sup>1/2</sup> – 4<sup>1/2</sup> ώρες, ανάλογα με το μοριακό βάρος των προς μεταφορά πρωτεϊνών.

#### **2.4.3.3 Επώαση της Μembrάνης με Ειδικά Αντισώματα και Ανίχνευση των Πρωτεϊνών**

Για την ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται συνολικά 2 αντισώματα. Τα πρωτογενή αντισώματα είναι ειδικά για την υπό εξέταση πρωτεΐνη, ενώ τα δευτερογενή αντισώματα είναι ειδικά και αναγνωρίζουν τα πρωτογενή. Επιπλέον τα δευτερογενή αντισώματα είναι συζευγμένα με το ένζυμο HRP (horseradish peroxide). Εκμεταλλευόμενοι μία τεχνική χημειοφωταύγειας (ECL), το ένζυμο HRP αντιδρά με το υπόστρωμα και παράγεται φως. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εντοπιστούν ακόμα και πολύ μικρές ποσότητες πρωτεϊνών. Για την απεικόνιση χρησιμοποιούνται φωτογραφικά φιλμ, τα οποία καίγονται από το παραγόμενο φως και απεικονίζεται σε αυτά η ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, μεμβράνη πριν επωαστεί με τα αντισώματα, επwάζεται με διάλυμα γάλακτος για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (blocking). Αυτό γίνεται γιατί η καζεΐνη του γάλακτος μπλοκάρει τις μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων, αφήνοντας εκτεθειμένες μόνο τις θέσεις που βρίσκονται οι πρωτεΐνες.

Η διαδικασία της επώασης με τα αντισώματα έχει ως εξής:

1. Επώαση της μεμβράνης με διάλυμα γάλακτος για 1h σε θερμοκρασία δωματίου (Blocking).
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 1h υπό συνεχή ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου ή O/N στους 4°C (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 1h 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: Clarity Western ECL Substrate της εταιρίας BioRad. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Επώαση της μεμβράνης με 800μl 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 0.5-15 min.
4. Επώαση του φιλμ για 1-3 min σε υγρό developer
5. Πλύση του φιλμ με H<sub>2</sub>O και επώασή του σε υγρό fixer για 1-2 min
6. Μετά το πέρας της διαδικασίας η μεμβράνη στεγνώνεται και διατηρείται στους -20°C.

## 2.5 Οπτικές Μέθοδοι

### 2.5.1 Έμμεσος Ανοσοφθορισμός - Ανοσοκυτταροχημεία

Ο ανοσοφθορισμός είναι μία μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθοριοχρώματα για τον εντοπισμό των αντιγόνων στα κύτταρα (ανοσοκυτταροχημεία, ICC) ή στους ιστούς (ανοσοϊστοχημεία, IHC). Τα φθοριοχρώματα εκπέμπουν φως όταν διεγερθούν με ακτινοβολία μεγαλύτερης ενέργειας. Οι χρωστικές αυτές είναι προσδεμένες στην περιοχή Fc των αντισωμάτων με σκοπό 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.

## Μονιμοποίηση Κυττάρων

Η μονιμοποίηση των κυττάρων γίνεται με την χρήση της παραφορμαλδεΐδης, η οποία αποτρέπει την αποσύνθεση των κυττάρων και διατηρεί τα κύτταρα στο ίδιο σημείο. Αυτό το πετυχαίνει δημιουργώντας ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των κυτταρικών πρωτεϊνών.

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι το εξής:

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% (παραφορμαλδεΐδης) 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.

## Ανοσοκυτταροχημεία

1. Οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα μεταφέρονται σε μια κατασκευή που τους παρέχει υγρασία και περιέχει τα εξής: ένα πιάτο κυτταροκαλλιεργειών 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.
2. 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.
3. 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.
4. Ακολουθούν δυο πλύσεις με 100μl διαλύματος ανοσοφθορισμού, από 5min η καθεμία και μια ακόμη που διαρκεί 30min.
5. 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.
6. Ακολουθούν τέσσερις πλύσεις με 100μl PBS, από 5min η καθεμία.
7. Στη συνέχεια προστίθεται στα κύτταρα η χρωστική DAPI, αραιωμένη σε PBS (50μl) για 2min.

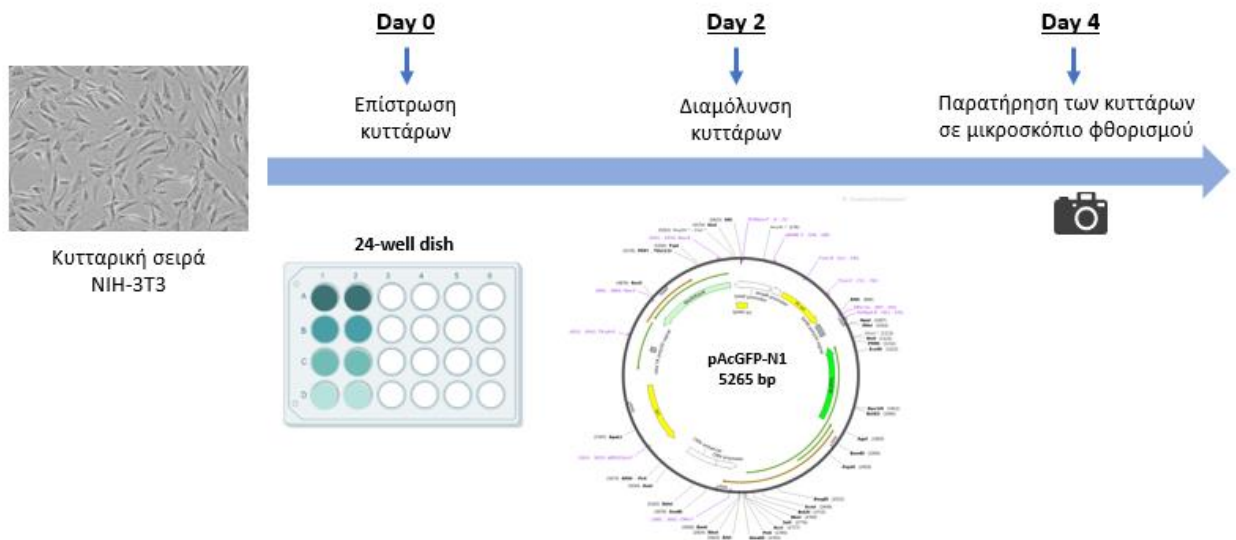
8. Πραγματοποιούνται τέσσερις πλύσεις με 100μl PBS, από 5min η καθεμία.
9. Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται με την επιφάνεια των κυττάρων προς τα κάτω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στο σημείο ακριβώς όπου πριν έχει τοποθετηθεί μικρή ποσότητα (6-7μl) του μέσου στερέωσης των καλυπτρίδων (mounting medium).
10. 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.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Εργαλεία και μέθοδοι που χρειάστηκε να εγκαθιδρύσουμε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής.

### 1.1 Βελτιστοποίηση των συνθηκών διαμόλυνσης των κυττάρων με το αντιδραστήριο PEI σε συνθήκες confluency.

Στην προσπάθειά μας να βελτιώσουμε το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για τη διαμόλυνση των κυττάρων με το αντιδραστήριο PEI (πολυεθυλαμίνη) θεωρήθηκε καταλληλότερο να δοκιμαστούν διάφοροι όγκοι του αντιδραστηρίου καθώς και διαφορετικές συγκεντρώσεις (σε µg) του DNA που χρησιμοποιείται κάθε φορά προκειμένου να ελέγξουμε πού υπάρχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (ενδεικτικά για την κυτταρική σειρά NIH-3T3, και η ίδια πορεία εφαρμόστηκε και στην κυτταρική σειρά Neuro2A)

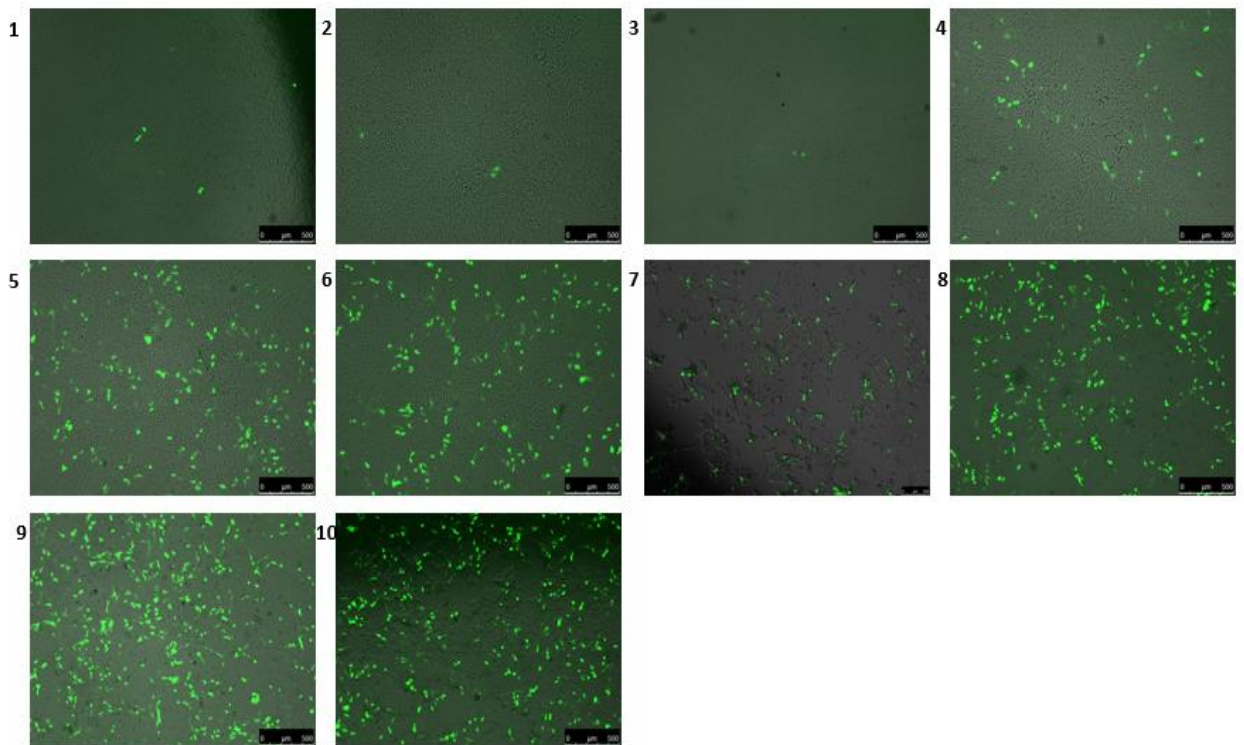


*Εικόνα 28. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη διαμόλυνση κυττάρων με χρήση PEI.*

Οι συνθήκες που ελέγχθηκαν ήταν οι εξής:

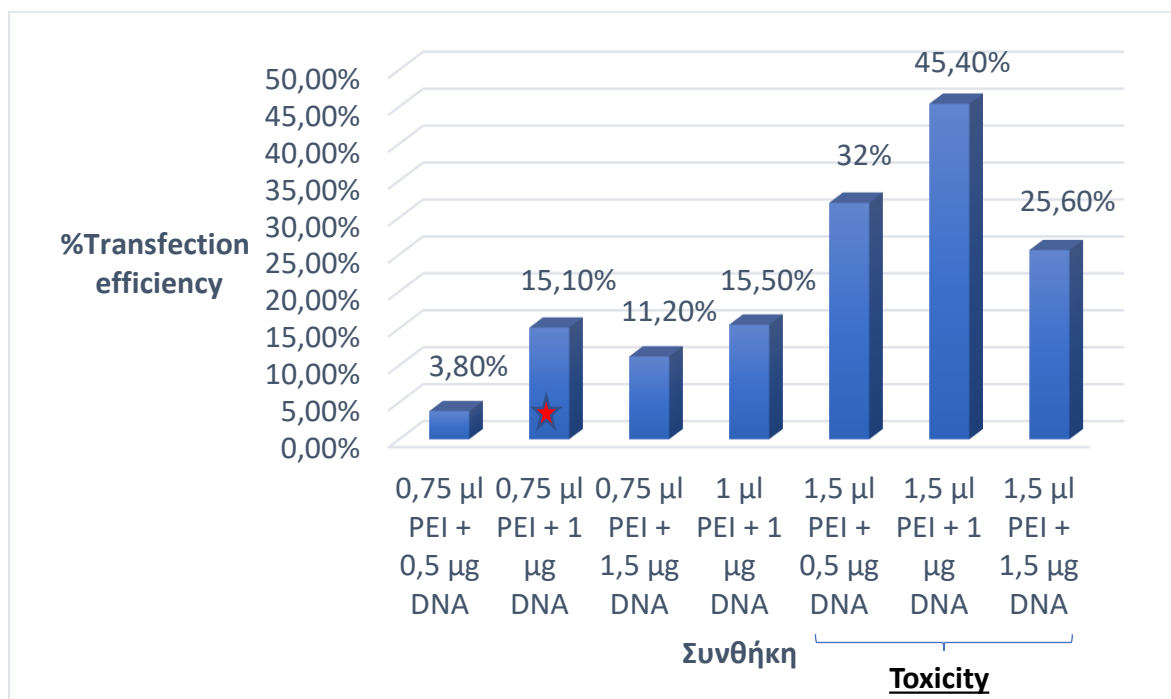
- |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1. 0,36 µl PEI + 0,5 µg DNA | 6. 0,75 µl PEI + 1,5 µg DNA |
| 2. 0,36 µl PEI + 1 µg DNA   | 7. 1 µl PEI + 1 µg DNA      |
| 3. 0,36 µl PEI + 1,5 µg DNA | 8. 1,5 µl PEI + 0,5 µg DNA  |
| 4. 0,75 µl PEI + 0,5 µg DNA | 9. 1,5 µl PEI + 1 µg DNA    |
| 5. 0,75 µl PEI + 1 µg DNA   | 10. 1,5 µl PEI + 1,5 µg DNA |





**Εικόνα 29.** Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού έπειτα από διαμόλυνση κυττάρων NIH-3T3 με χρήση PEI κάτω από διαφορετικές συνθήκες.

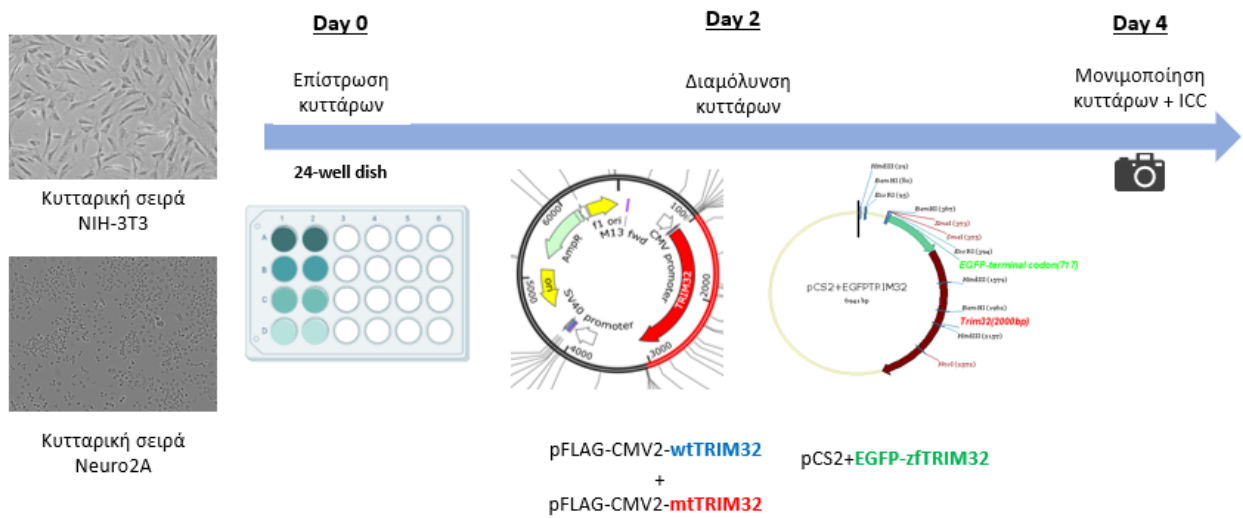
Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η ποσοτικοποίηση των παραπάνω αποτελεσμάτων.



Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η συνθήκη διαμόλυνσης που είναι περισσότερο αποτελεσματική είναι αυτή με 0,75 μl PEI + 1 μg DNA. Οι συνθήκες με την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ως προς την επιτυχία της διαμόλυνσης απορρίφθηκαν λόγω εμφάνισης τοξικότητας στα κύτταρα.

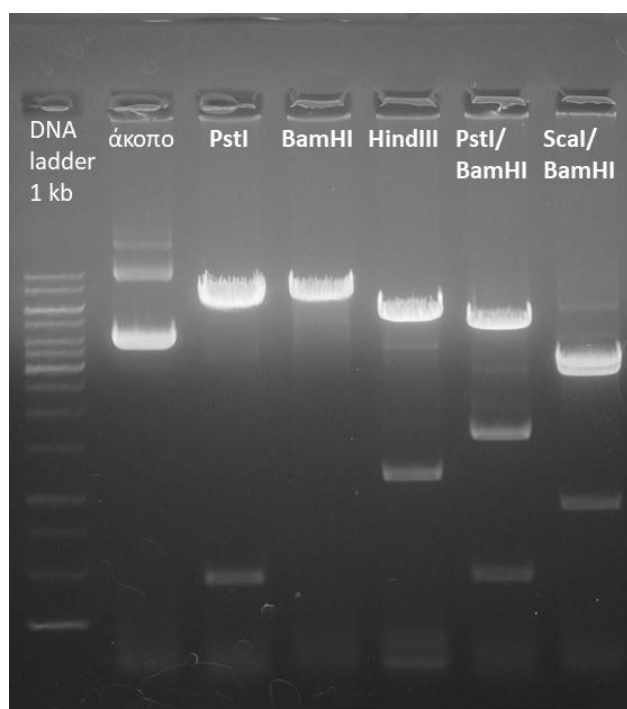
### 1.2 Αντισώματα για την ανίχνευση της πρωτεΐνης TRIM32

Θέλοντας να εντοπίσουμε κατά πόσο και σε ποια σημεία του κυττάρου εντοπίζεται η πρωτεΐνη TRIM32, χρησιμοποιήσαμε 3 εμπορικά πολυκλωνικά αντισώματα, τα Sigma AV-38966, Sigma T-1704 και anti-TRIM32 (8H8- Santa Cruz) και 4 μονοκλωνικά αντισώματα αρουραίου, τα 7f10, zf1, 5g7 και 1e10, για την παρασκευή των οποίων χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα συνθετικά πεπτίδια με βάση την αλληλουχία του TRIM32 από zebrafish. Οι πειραματικές πορείες που ακολουθήθηκαν αφορούν τόσο την ανίχνευση της εξωγενούς πρωτεΐνης TRIM32 όσο και τα ενδογενή επίπεδα και αφορούσαν καλλιέργεια νευρικών και μη νευρικών κυττάρων και διερεύνηση της λειτουργίας των παραπάνω αντισωμάτων με ανοσοκυτταροχημεία και παρατήρηση των κυττάρων με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας.



**Εικόνα 30.** Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη διαμόλυνση κυττάρων και την ανάλυσή τους με συνεστιακή μικροσκοπία για τον έλεγχο των αντισωμάτων.

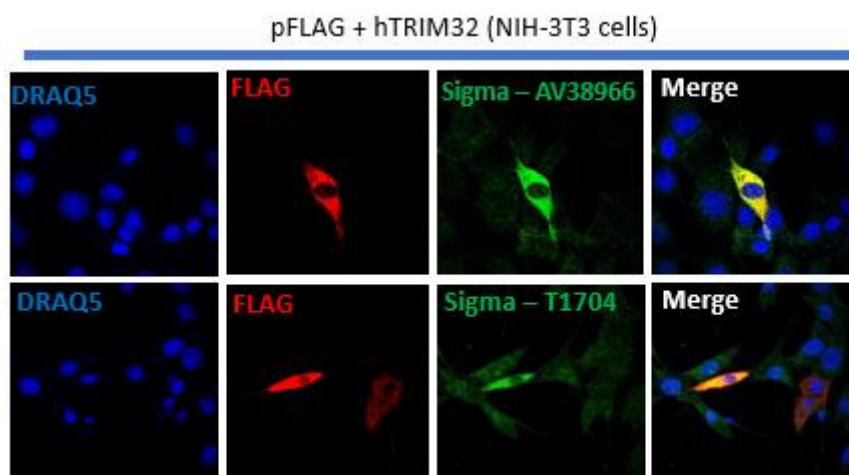
Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις του πλασμιδιακού φορέα pFLAG-CMV2 + hTRIM32 προτού διαμολύνουμε τα κύτταρα για να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη της επιθυμητής ένθεσης.



**Εικόνα 31.** Διαγνωστικές πέψεις του πλασμιδιακού φορέα pFLAG+hTRIM32 και ηλεκτροφόρησή τους σε gel αγαρόζης 1% (5% EtBr)

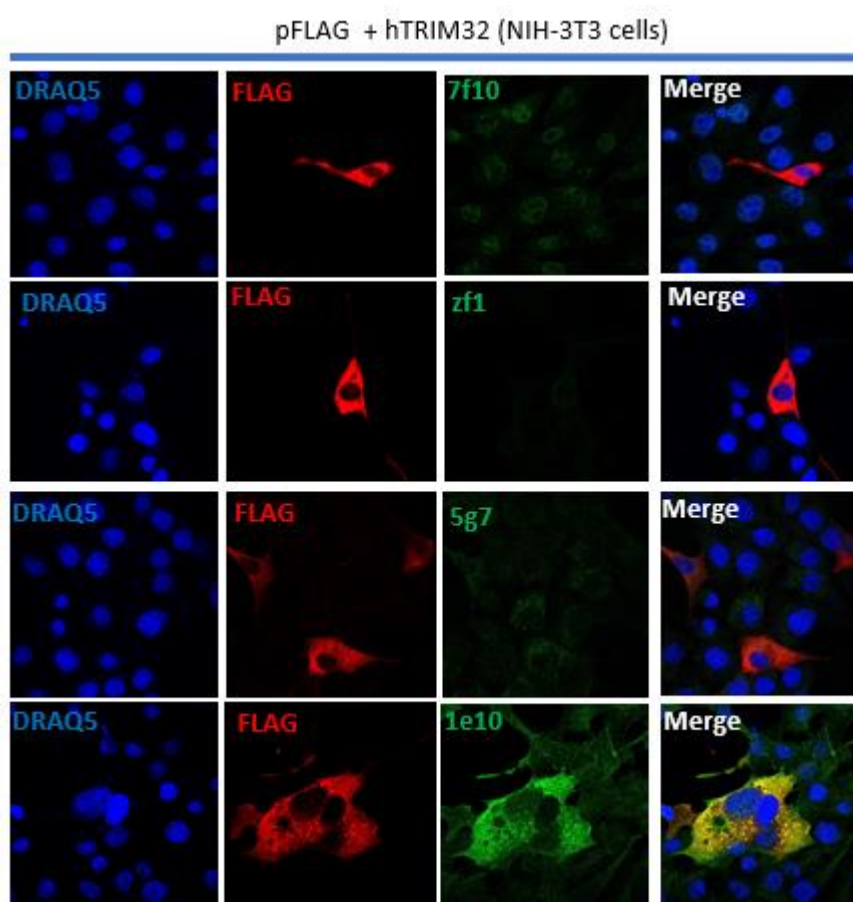
Περιοριστικό Ένζυμο	Αναμενόμενα μοριακά βάρη ζωνών
PstI	6248 bp, 482 bp
BamHI	6730 bp
HindIII	217 bp, 1154 bp, 150 bp, 5209 bp
PstI/BamHI	1574 bp, 482 bp, 4674 bp
Scal/BamHI	909 bp, 2770 bp, 3051 bp

Αφού επιβεβαιώσαμε ότι η ένθεση στον πλασμιδιακό φορέα είναι η επιθυμητή, προχωρήσαμε στο 1<sup>ο</sup> πείραμα που αφορούσε την ανίχνευση της εξωγενούς πρωτεΐνης σε μη νευρικά κύτταρα NIH-3T3 με χρήση τόσο των εμπορικών όσο και των μονοκλωνικών αντισωμάτων καθώς και με αντίσωμα ειδικό για τον επίτοπο FLAG δεδομένου ότι το TRIM32 έχει κλωνοποιηθεί στο φορέα pFLAG-CMV2. Παρατηρήσαμε λοιπόν αρχικά ότι το πλασμίδιο που διαθέτουμε είναι λειτουργικό δεδομένου ότι αναγνωρίζεται από το αντίσωμα για το FLAG και ότι η διαμόλυνση θεωρείται επιτυχής. Επίσης παρατηρήσαμε ότι τα εμπορικά αντισώματα της Sigma (AV38966 και T1704) είναι αποτελεσματικά στην αναγνώριση της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης.



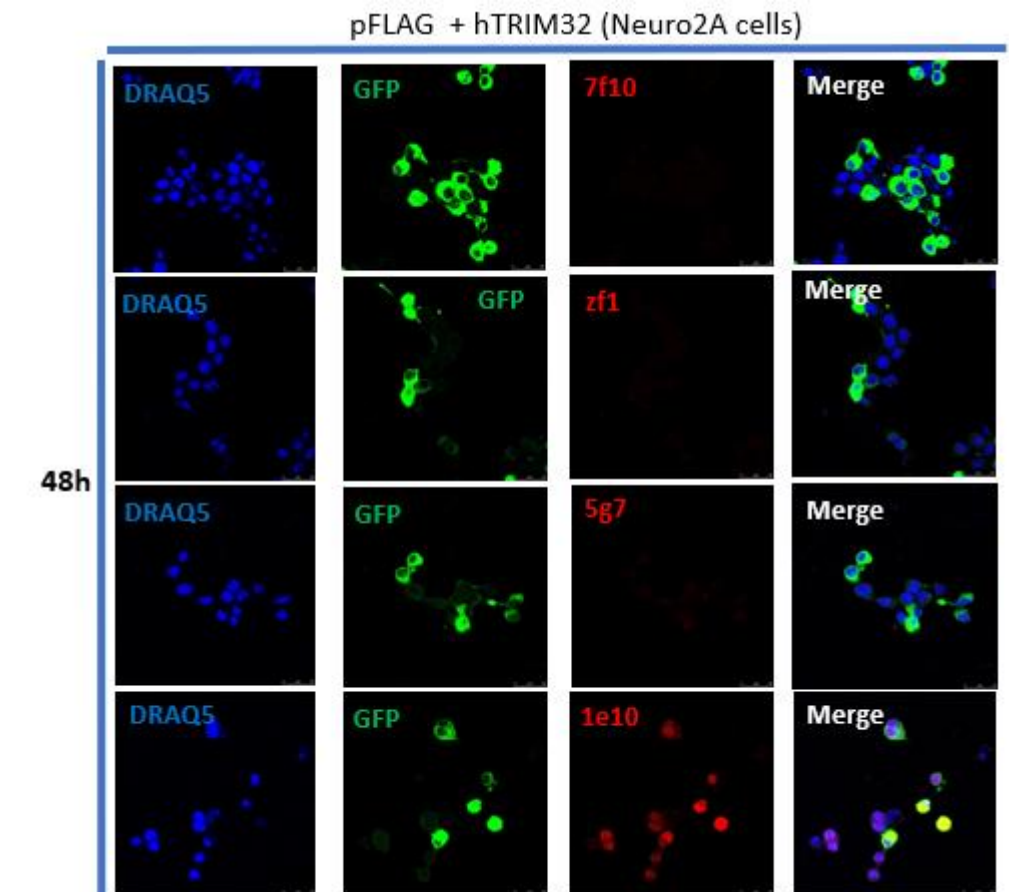
*Εικόνα 32. Διαμόλυση κυττάρων NIH-3T3 με τον πλασμιδιακό φορέα pFLAG+hTRIM32 και έλεγχος λειτουργικότητας των εμπορικών πολυκλωνικών αντισωμάτων.*

Στη συνέχεια, θελήσαμε να απαντήσουμε το ίδιο ερώτημα όσον αφορά την αποτελεσματικότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων αρουραίου να ανιχνεύουν την εξωγενή πρωτεΐνη TRIM32. Το συμπέρασμα που εξήχθη ήταν ότι μόνο το μονοκλωνικό αντίσωμα 1e10 ανιχνεύει επιτυχώς την πρωτεΐνη ενώ η διαμόλυση θεωρείται επιτυχής λόγω θετικού σήματος για τον επίτοπο FLAG.



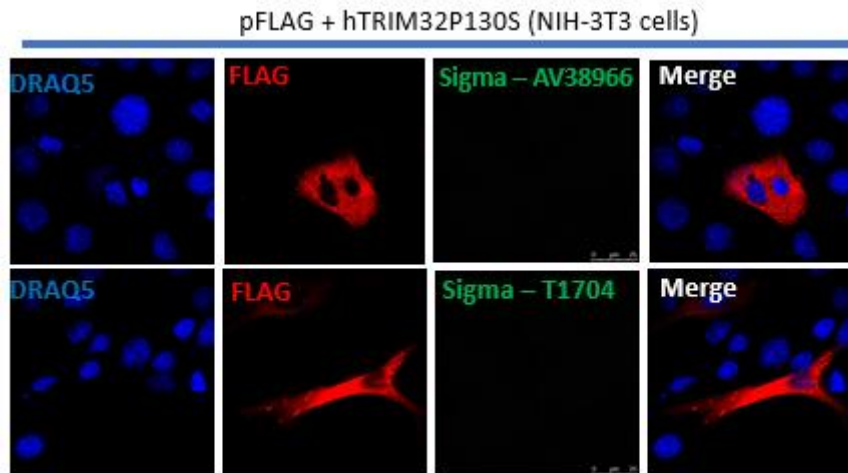
**Εικόνα 32.** Διαμόλυνση κυττάρων NIH-3T3 με τον πλασμιδιακό φορέα **pFLAG+hTRIM32** και έλεγχος λειτουργικότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων αρουραίου.

Για να διαπιστωθεί αν το παραπάνω αποτέλεσμα οφείλεται στο μη νευρικό περιβάλλον της κυτταρικής σειράς NIH-3T3, το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε στη νευρική κυτταρική σειρά Neuro2A, και παρατηρήσαμε και πάλι ότι το μονοκλωνικό αντίσωμα 1e10 ανιχνεύει επιτυχώς την υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής του TRIM32.



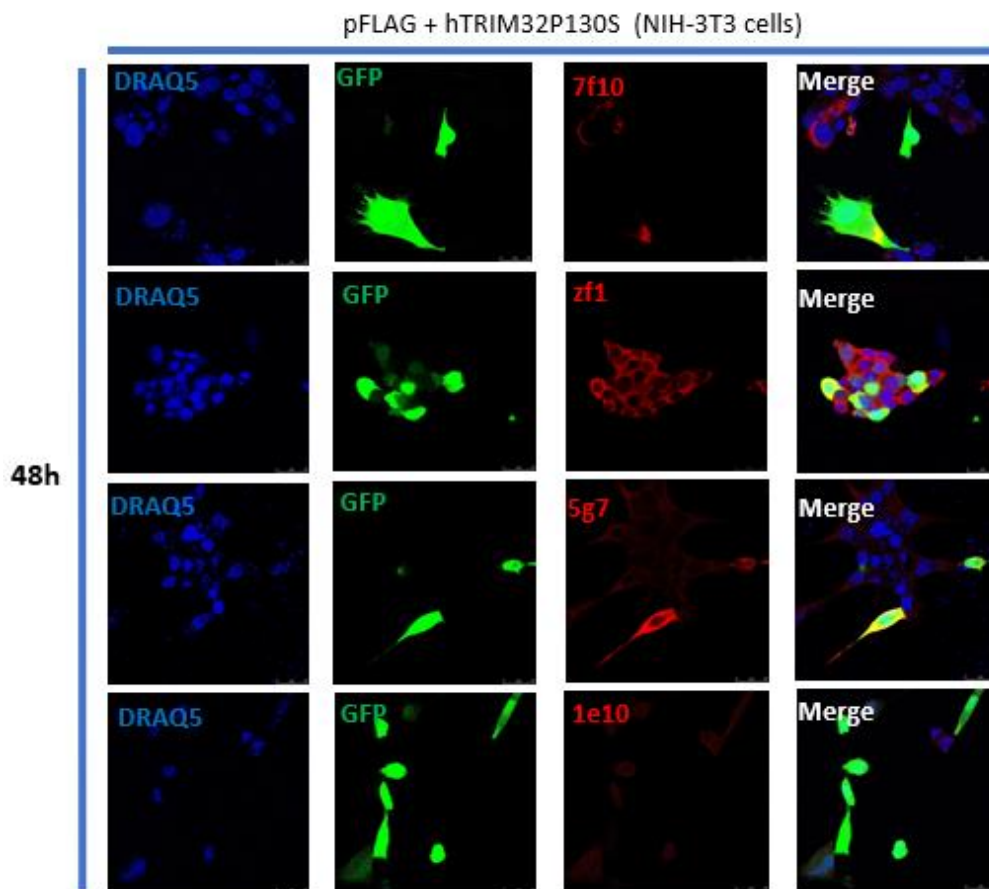
**Εικόνα 32.** Διαμόλυνση κυττάρων Neuro2A με τον πλασμιδιακό φορέα **pFLAG+hTRIM32** και έλεγχος λειτουργικότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων αρουραίου.

Όσον αφορά την ικανότητα των αντισωμάτων να ανιχνεύουν την μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης, διαμολύναμε κύτταρα NIH-3T3 με hTRIM32-P130S και έπειτα από 48hr τα μονιμοποιήσαμε και ελέγξαμε αρχικά τη λειτουργία των εμπορικών πολυκλωνικών αντισωμάτων.



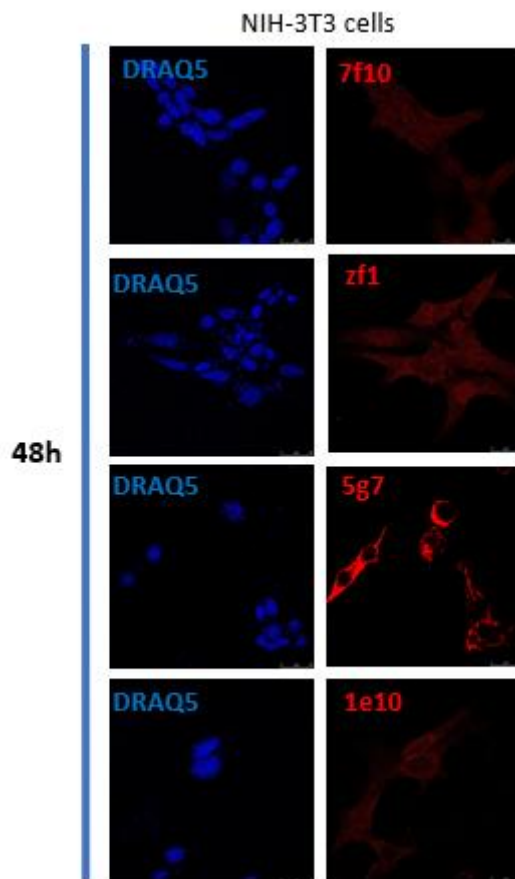
**Εικόνα 33.** Διαμόλυση κυττάρων NIH-3T3 με τον πλασμιδιακό φορέα **pFLAG+hTRIM32P130S** και έλεγχος λειτουργικότητας των εμπορικών πολυκλωνικών αντισωμάτων.

Ενώ λοιπόν η διαμόλυση θεωρείται επιτυχής λόγω ανίχνευσης του επιτόπου FLAG από το αντίσωμα, τα δύο εμπορικά πολυκλωνικά αντισώματα δεν ανίχνευαν τη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης TRIM32. Με χρήση των τεσσάρων μονοκλωνικών αντισωμάτων αρουραίου όμως, παρατηρήσαμε ότι το αντίσωμα 5g7 ανιχνεύει επιτυχώς την P130S μορφή του TRIM32.



**Εικόνα 34.** Διαμόλυνση κυττάρων NIH-3T3 με τον πλασμιδιακό φορέα **pFLAG+hTRIM32P130S** και έλεγχος λειτουργικότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων.

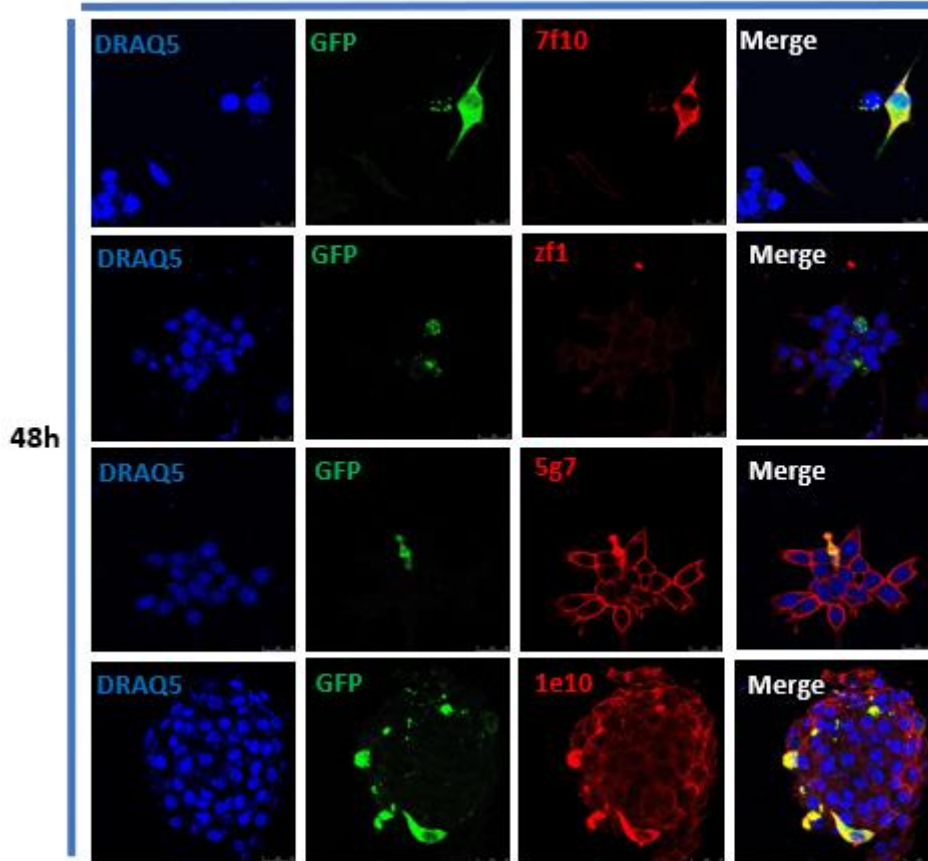
Αναφορικά με την ικανότητα των αντισωμάτων να ανιχνεύουν τα ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης, το πείραμα πραγματοποιήθηκε και πάλι στα NIH-3T3 κύτταρα και είδαμε ότι το μονοκλωνικό αντίσωμα αρουραίου 5g7 είναι το πιο αποτελεσματικό.



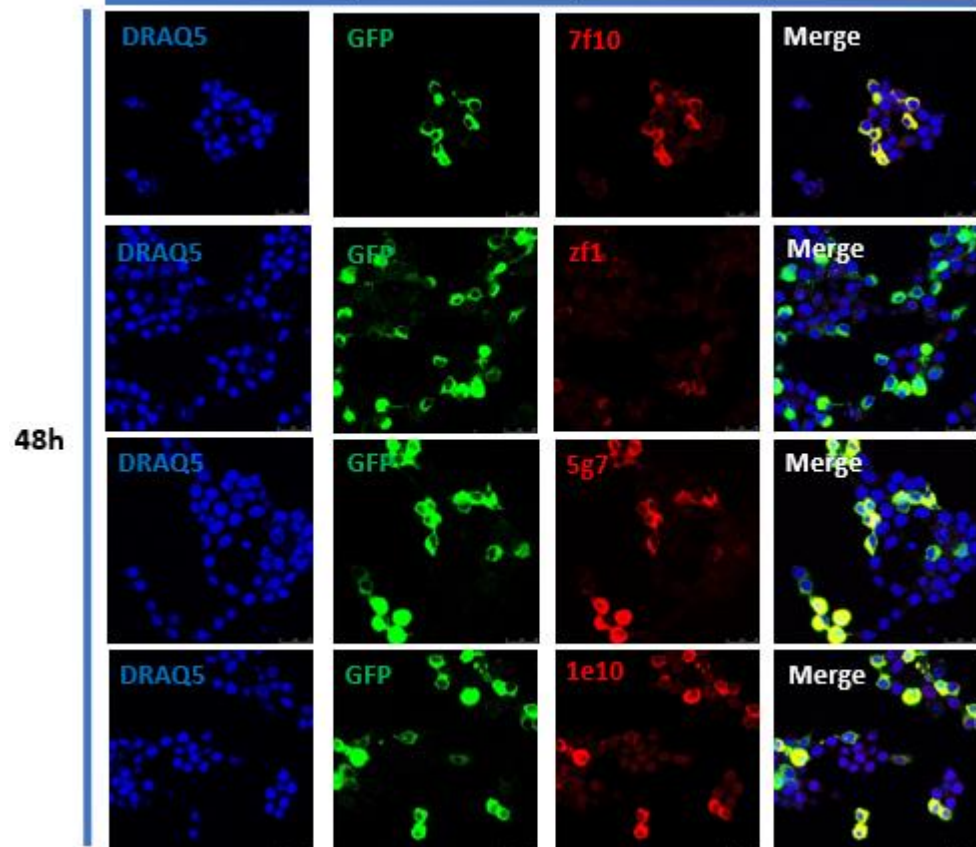
**Εικόνα 35.** Έλεγχος λειτουργικότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης TRIM32 στα κύτταρα NIH-3T3.

Τέλος, επειδή τα μονοκλωνικά αντισώματα φτιάχτηκαν με βάση την αμινοξική αλληλουχία του zfTRIM32 (zebrafish-TRIM32) θελήσαμε να ελέγξουμε την ειδικότητά τους έναντι αυτής της μορφής. Για το λόγο αυτό διαμολύναμε τόσο μη νευρικά κύτταρα NIH-3T3 όσο και νευρικά κύτταρα Neuro2A με zfTRIM32 σε σχημαρική μορφή με την πρωτεΐνη GFP. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα 7f10, 5g7 και 1e10 είναι τα πιο αποτελεσματικά αντισώματα.

pEGFP-zfTRIM32 (NIH-3T3 cells)



pEGFP-zfTRIM32 (Neuro2A cells)

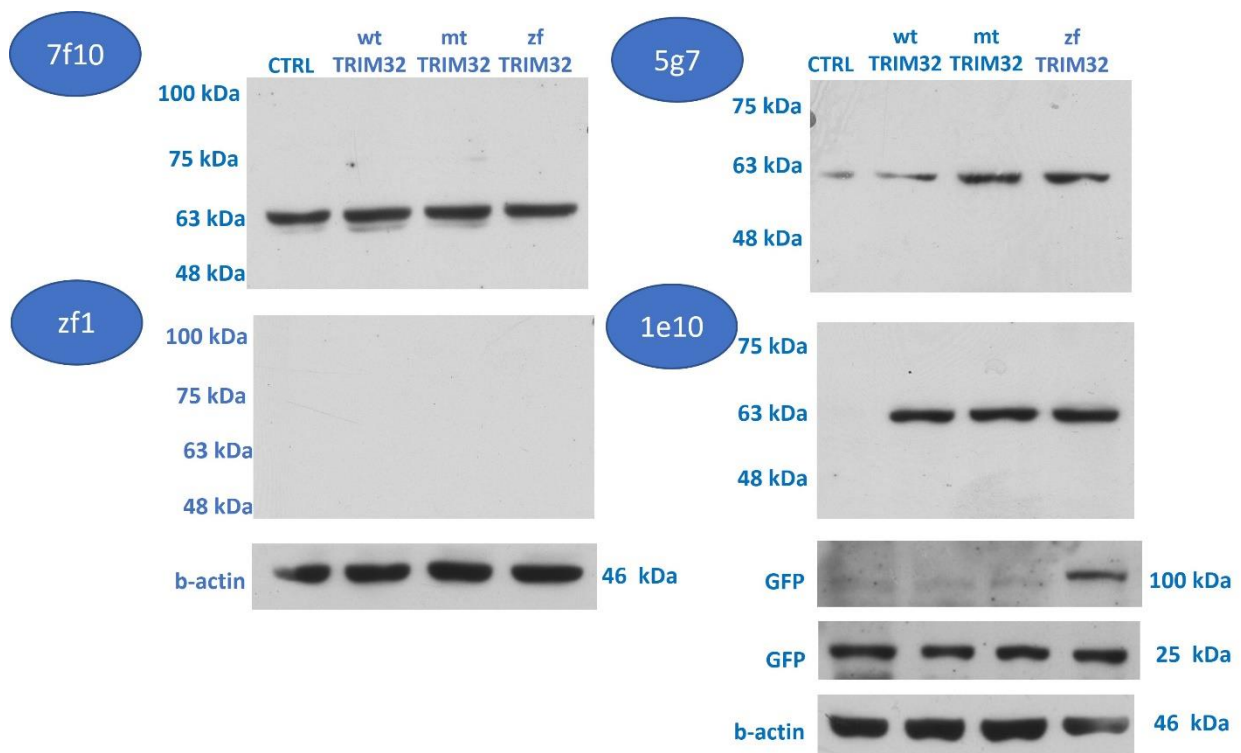




**Εικόνα 36:** Διαμόλυνση κυττάρων NIH-3T3 και Neuro2A με τον πλασμιδιακό φορέα **pEGFP+zfTRIM32** και έλεγχος λειτουργικότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων αρουραίου.

Συμπερασματικά λοιπόν, οι παραπάνω πειραματικές πορείες έδειξαν ότι τα εμπορικά πολυκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν την εξωγενή αγρίου τύπου αλλά όχι τη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης hTRIM32- P130S. Επιπλέον, το μονοκλωνικό αντίσωμα 1e10 αναγνωρίζει την αγρίου πρωτεΐνη hTRIM32 σε νευρικό και μη νευρικό περιβάλλον ενώ τα ενδογενή επίπεδα του TRIM32 αναγνωρίζονται μόνο από το μονοκλωνικό αντίσωμα 5g7. Τα γεγονότα αυτά υποδηλώνουν ότι η διαμόρφωση της πρωτεΐνης TRIM32 και η αναγνώρισή της από τα αντισώματα που χρησιμοποιούμε μπορεί να επηρεάζεται από παράγοντες όπως η μετάλλαξη P130S ή το είδος του οργανισμού από το οποίο προέρχεται.

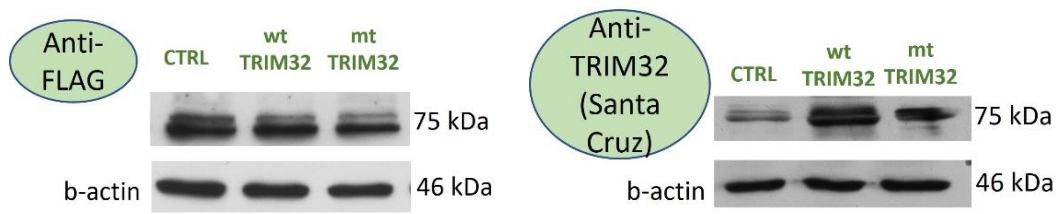
Σε βιοχημικό επίπεδο, ελέγξαμε τα παραπάνω αντισώματα και σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από νευρικά κύτταρα Neuro2A τα οποία έχουν διαμολυνθεί με αγρίου τύπου, μεταλλαγμένη μορφή και zebrafish μορφή του TRIM32 και η ανάλυση έγινε με ανοσοαποτύπωση κατά Western.



**Εικόνα 37:** Διαμόλυνση κυττάρων Neuro2A με τους πλασμιδιακούς φορείς **pFLAG+hTRIM32**, **pFLAG+hTRIM32P130S** και **pEGFP+zfTRIM32** και έλεγχος λειτουργικότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων αρουραίου με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western δείχνουν ότι όλα τα μονοκλωνικά αντισώματα αρουραίου είτε δεν αναγνωρίζουν καθόλου, είτε αναγνωρίζουν πρωτεΐνες διαφορετικού μοριακού βάρους από αυτό του TRIM32 (75 kDa), τόσο ως προς τα ενδογενή όσο και ως προς τα εξωγενή επίπεδα. Για να βεβαιωθούμε ότι πέτυχε η διαμόλυνση των κυττάρων επώασαμε τις μεμβράνες της ανοσοαποτύπωσης με anti-GFP αντίσωμα δεδομένου ότι έγινε συν-διαμόλυνση με GFP πλασμιδιακό φορέα ως control και είδαμε τόσο τις ζώνες που αντιστοιχούν στα 25 kDa όσο και στα 100 kDa που αντιστοιχούν στην χιμαιρική μορφή του zfTRIM32.

Επιπροσθέτα, προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε την υπερέκφραση της πρωτεΐνης TRIM32 σε βιοχημικό επίπεδο με χρήση ενός anti-FLAG αντισώματος δεδομένου ότι τόσο το γονίδιο αγρίου τύπου όσο και αυτό που κωδικοποιεί για τη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης έχουν κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pFLAG-CMV2. Είδαμε λοιπόν ότι δεν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το συγκεκριμένο αντίσωμα για να απαντήσουμε περαιτέρω βιολογικά ερωτήματα καθώς δίνει ζώνη και στο control που αφορά μη διαμολυσμένα κύτταρα. Όμως, το anti-TRIM32 αντίσωμα της Santa Cruz ήταν πολύ αποτελεσματικό καθώς υπάρχει διαφορά στην ένταση των ζωνών μεταξύ control και υπερέκφρασμένης μορφής.



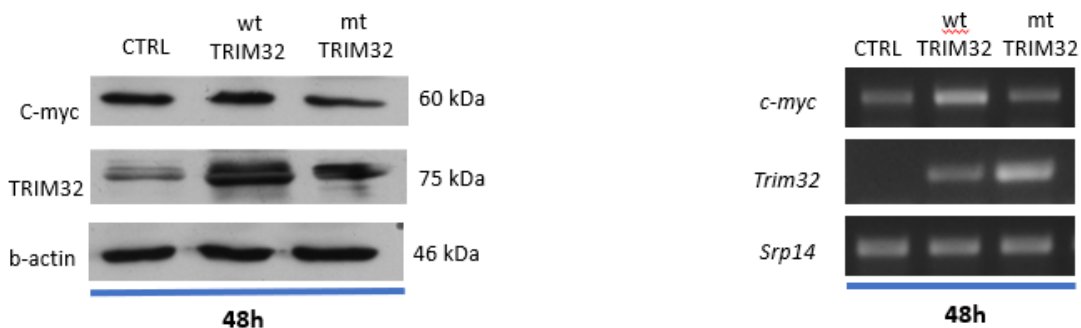
**Εικόνα 37:** Διαμόλυνση κυττάρων Neuro2A με τους πλασμιδιακούς φορείς **pFLAG+hTRIM32** και **pFLAG+hTRIM32P130S** και έλεγχος λειτουργικότητας των αντισωμάτων anti-FLAG και anti-TRIM32 (Santa Cruz) με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

**2. Επίδραση της υπερέκφρασης της αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης TRIM32 στα επίπεδα του c-Myc και N-Myc.**

Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη TRIM32 αλληλεπιδρά με μόρια που σχετίζονται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και κατ'επέκταση του πολλαπλασιασμού. Στην ενότητα αυτή εξετάστηκαν δύο μόρια που σχετίζονται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και κατ'επέκταση του πολλαπλασιασμού, τα οποία αποδεδειγμένα η Trim32 πρωτεΐνη τα ουβικιτινιλιώνει στέλνοντας τα για αποικοδόμηση. Αυτά είναι το c-Myc και n-Myc.

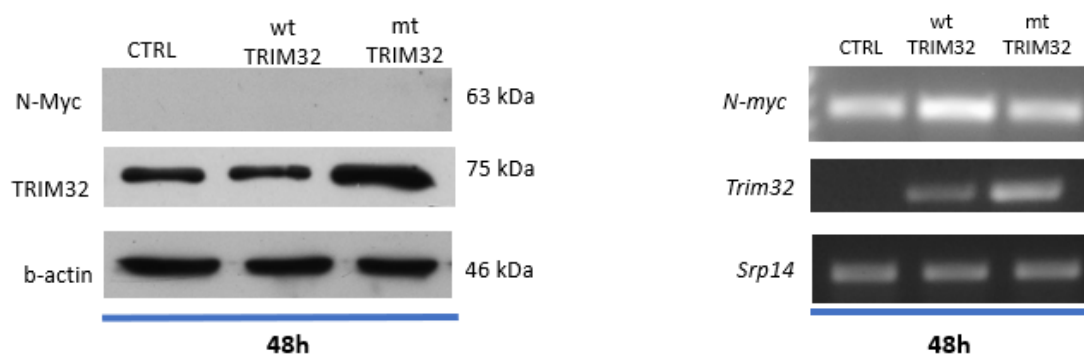
Αρχικά θελήσαμε να ελέγξουμε στο σύστημά μας αν υπάρχουν μεταβολές στα επίπεδα των c-myc και n-myc λόγω της υπερέκφρασης του Trim32 και κατά δεύτερον να εντοπίσουμε τυχόν διαφορές μεταξύ αγρίου τύπου και μεταλλαγμένης μορφής. Για το σκοπό αυτό καλλιεργήθηκαν Neuro2a τα οποία διαμολύνθηκαν με τα hTRIM32 και hTRIM32-P130S. Απομονώθηκαν πρωτεΐνες οι οποίες αναλύθηκαν με Western Blot και RNA, από το οποίο συντέθηκε cDNA και έλεγχος των επιπέδων mRNA, των γονιδίων c-myc και n-myc.

Όσον αφορά το c-myc παρατηρήσαμε ότι σε πρωτεϊνικό επίπεδο η υπερέκφραση της αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένης μορφής του TRIM32 δεν επηρεάζει τα επίπεδα του c-myc, όμως σε επίπεδο mRNA η αγρίου τύπου αυξάνει τα επίπεδα του mRNA του c-myc στην κυτταρική σειρά Neuro2A. Η διαμόλυνση των κυττάρων και στις δύο περιπτώσεις θεωρείται επιτυχής.



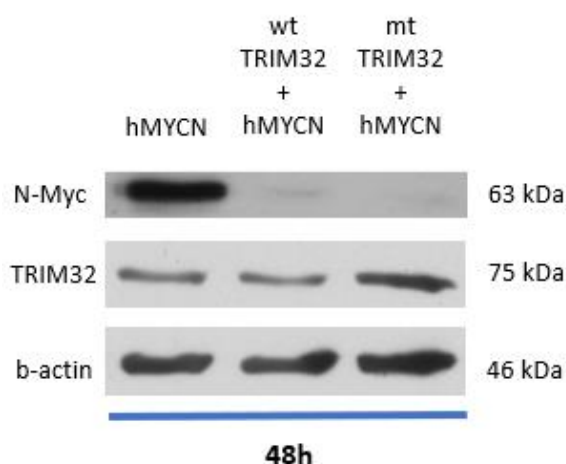
**Εικόνα 38:** Διαμόλυνση κυττάρων Neuro2A με τους πλασμιδιακούς φορείς **pFLAG+hTRIM32** και **pFLAG+hTRIM32P130S** για να ανιχνευτούν Α: ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης c-myc με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Β. ενδογενή επίπεδα του mRNA του c-myc με PCR. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε το housekeeping γονίδιο Srp14.

Όσον αφορά το N-Myc, σε πρωτεϊνικό επίπεδο δεν καταφέραμε να ανιχνεύσουμε το μόριο και τυχόν μεταβολές στα ενδογενή επίπεδά του έπειτα από υπερέκφραση των δύο μορφών του TRIM32, πιθανόν γιατί το αντίσωμα που χρησιμοποιήσαμε δεν είναι κατάλληλο για τη mouse μορφή του N-Myc. Σε επίπεδο mRNA παρατηρήθηκε μία παρόμοια επίδραση με το c-myc δηλαδή αύξηση των επιπέδων έπειτα από υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής του TRIM32.



**Εικόνα 39:** Διαμόλυση κυττάρων *Neuro2A* με τους πλασμιδιακούς φορείς **pFLAG+hTRIM32** και **pFLAG+hTRIM32P130S** για να ανιχνευτούν Α: ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης *N-myc* με ανοσοαποτύπωση κατά *Western*. Ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Β. ενδογενή επίπεδα του mRNA του *N-myc* με *PCR*. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε το housekeeping γονίδιο *Srp14*.

Για να μπορέσουμε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για το τι συμβαίνει σε επίπεδο πρωτεΐνης, συνδιαμόλυση των κυττάρων με hTrim32 & n-myc και n-myc & GFP (control) και ακολούθησε απομόνωση πρωτεϊνών για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων του εξωγενούς n-myc μετά από υπερέκφραση των 2 μορφών του hTrim32. Παρατηρήσαμε λοιπόν ότι και οι 2 μορφές του εξωγενούς TRIM32 είναι ικανές να αποικοδομήσουν το N-MYC.



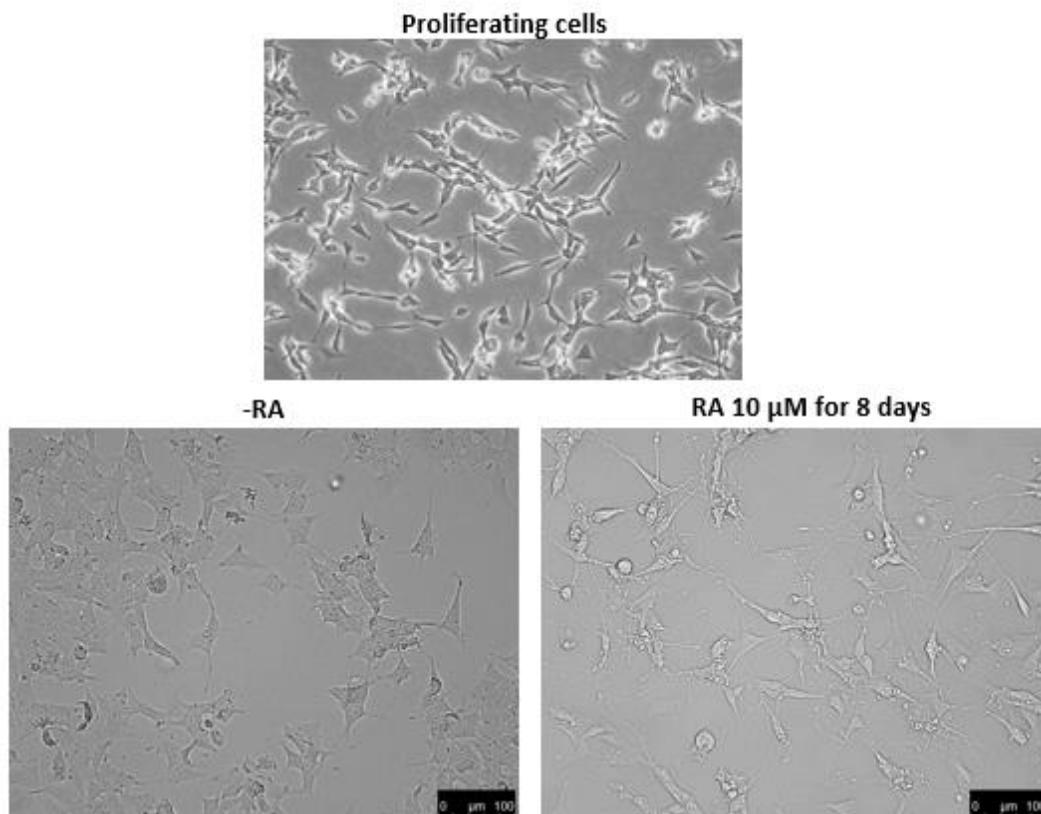
**Εικόνα 39:** Διαμόλυση κυττάρων *Neuro2A* με τους πλασμιδιακούς φορείς, **pcDNA3-hMYCN**, **pFLAG+hTRIM32** και **pFLAG+hTRIM32P130S** για να ανιχνευτούν τα εξωγενή επίπεδα της πρωτεΐνης *N-myc* με ανοσοαποτύπωση κατά *Western*. Ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

### 3. Έλεγχος της μεταβολής της έκφρασης των γονιδίων *Trim32*, *N-Myc* και *c-myc* κατά τη νευρική διαφοροποίηση

Γνωρίζουμε ότι η κυτταρική σειρά Be2C ανήκει σε πιο εξελιγμένο στάδιο καρκίνου (στάδιο 4s) σε σχέση με τα Neuro2A (στάδιο 4), άρα εμφανίζει και υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του *n-myc*.

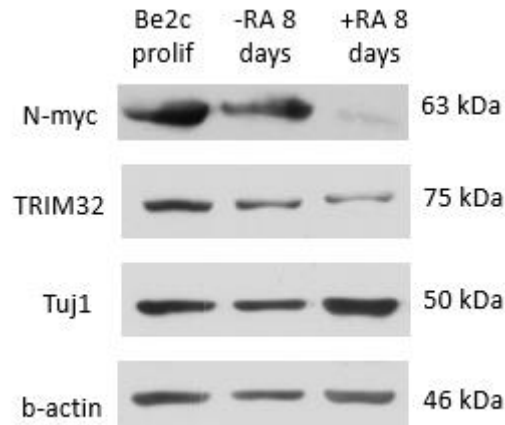
Επομένως θελήσαμε να εξετάσουμε την έκφραση του *N-myc*, του *c-myc* και του *Trim32* σε αυτήν την κυτταρική σειρά. Για το σκοπό αυτό καλλιεργήθηκαν Be2C σε συνθήκες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης με ρετινοϊκό οξύ για 8 ημέρες και αρχικά απομονώθηκαν πρωτεΐνες που αναλύθηκαν με Western Blot. Για να αξιολογηθεί η πορεία της διαφοροποίησης χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης Tuj1 (Class III  $\beta$ -tubulin), ο οποίος εκφράζεται σε τρεις περιπτώσεις: σε νεοσχηματισμένους ανώριμους μεταμιτωτικούς νευρώνες, ως δείκτης νευρωνικής διαφοροποίησης και σε μιτωτικά ενεργά πρόδρομα κύτταρα.

Επιπλέον, έγινε παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο για να επιβεβαιωθεί η πορεία της διαφοροποίησης.



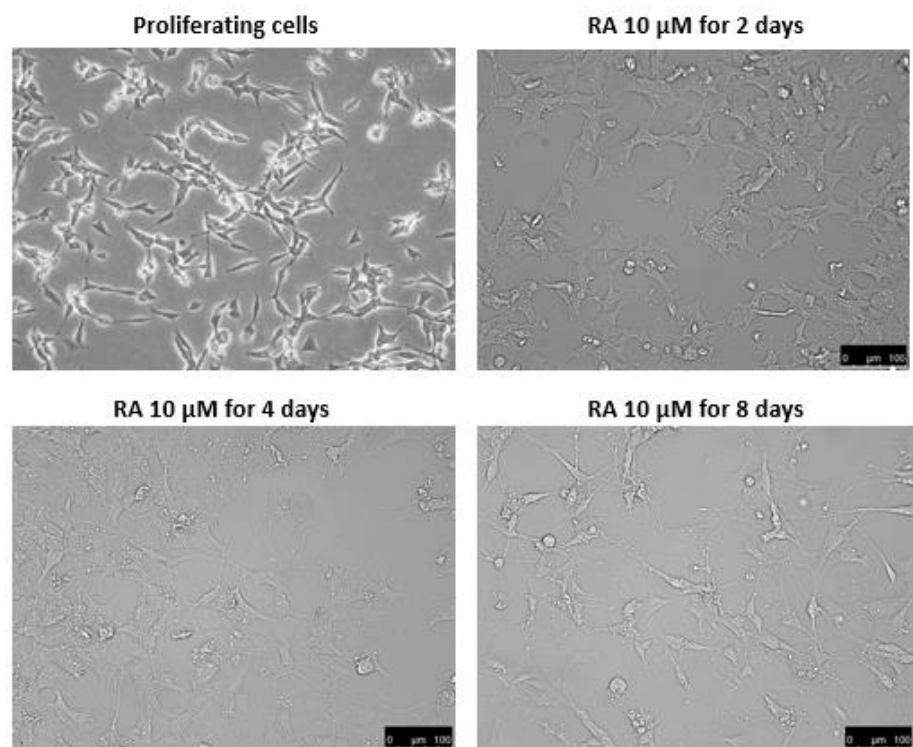
**Εικόνα 40:** Παρατήρηση των κυττάρων Be2C για να επιβεβαιωθεί η πορεία της διαφοροποίησης. Τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν σε μικροσκόπιο ολική εσωτερικής ανάκλασης TIRF.

Έπειτα από 8 ημέρες διαφοροποίησης φαίνεται χαρακτηριστικά ο σχηματισμός νευριτών ενώ η ανοσοαποτύπωση κατά Western έδειξε αφενός ότι η διαφοροποίηση πέτυχε λόγω αύξησης των επιπέδων του Tuj1 και αφετέρου ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών TRIM32 και N-Myc μειώνονται έπειτα από 8 ημέρες διαφοροποίησης.



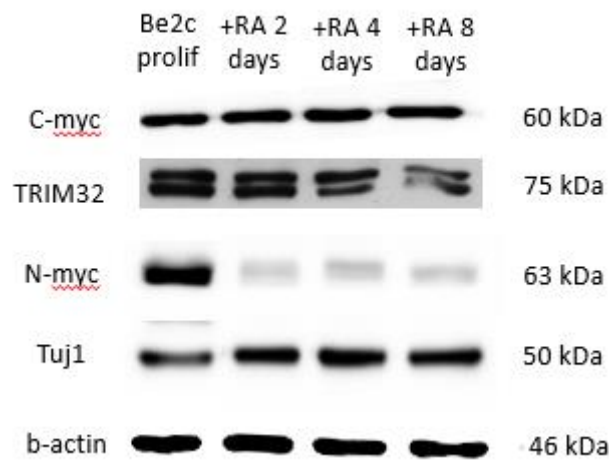
**Εικόνα 41:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western για ανίχνευση των ενδογενών επιπέδων των πρωτεϊνών TRIM32 και N-Myc σε αδιαφοροποίητα και διαφοροποιημένα κύτταρα Be2C για 8 ημέρες. Ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

Για να μπορέσουμε να διερευνήσουμε περαιτέρω πότε αρχίζει χρονικά αυτή η μεταβολή των επιπέδων καλλιεργήθηκαν κύτταρα Be2C σε συνθήκες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης για 2,4 και 8 ημέρες με ρετινικό οξύ.



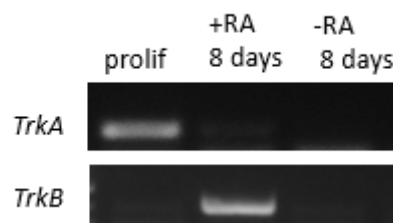
**Εικόνα 42:** Παρατήρηση των κυττάρων Be2C για να επιβεβαιωθεί η πορεία της διαφοροποίησης. Τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν σε μικροσκόπιο ολική εσωτερικής ανάκλασης TIRF.

Έπειτα από 2,4 και 8 ημέρες διαφοροποίησης η ανοσοαποτύπωση κατά Western έδειξε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης TRIM32 αρχίζει να μειώνεται από την 4<sup>η</sup> μέρα διαφοροποίησης με ρετινικό οξύ ενώ η πρωτεΐνη N-Myc μειώνονται έπειτα από τη 2<sup>η</sup> κιάλας ημέρα διαφοροποίησης.



**Εικόνα 41:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western για ανίχνευση των ενδογενών επιπέδων των πρωτεϊνών TRIM32, c-myc και N-Myc σε αδιαφοροποίητα και διαφοροποιημένα κύτταρα Be2C για 2,4 και 8 ημέρες. Ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

Όσον αφορά τα επίπεδα mRNA, εστίασαμε μόνο στις 8 ημέρες διαφοροποίησης ώστε να διαπιστώσουμε τυχόν μεταβολές. Πριν ελέγξουμε τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου, θελήσαμε να ελέγξουμε την έκφραση ορισμένων γονιδίων – δεικτών, ώστε να διαπιστώσουμε αν η διαφοροποίηση των κυττάρων με ρετινικό οξύ (RA) έχει επιτευχθεί. Τα γονίδια που ελέγχθηκαν ήταν το trkB, που αποτελεί τον υποδοχέα του νευροτροφικού παράγοντα BDNF και το trkA, ο οποίος είναι ένας υποδοχέας κινάσης τυροσίνης τύπου I.



**Εικόνα 42:** RT-PCR για ενίσχυση των γονιδίων *TrkA* και *TrkB* σε αδιαφοροποίητα και διαφοροποιημένα κύτταρα *Be2C* για 8 ημέρες για να αξιολογηθεί η πορεία της διαφοροποίησης. Ως δείκτης ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το *housekeeping* γονίδιο *Srp14*

Κατά την διαδικασία της διαφοροποίησης φυσιολογικά αυξάνεται η έκφραση του γονιδίου *trkB*, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η έκφραση του γονιδίου *trkA*. Αυτό οφείλεται στην προσθήκη του ρετινοϊκού οξέος, το οποίο σταματά τον πολλαπλασιασμό ενώ ταυτόχρονα προκαλεί την έναρξη της διαφοροποίησης των κυττάρων. Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε πως το *TrkB* αυξάνεται στο δείγμα RA σε σχέση με τα αδιαφοροποίητα κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η έκφραση του *TrkA*. Επομένως, με βάση αυτά τα δεδομένα θεωρούμε πως η διαφοροποίηση των κυττάρων έχει πετύχει.

Έχοντας διαπιστώσει ότι έχουμε μία επιτυχή διαφοροποίηση, ακολούθησε η ενίσχυση των cDNA με εκκινητές για το *Trim32*, *N-Myc* και *c-myc* σε συνθήκες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης για 8 ημέρες. Παρατηρήσαμε λοιπόν ότι τα επίπεδα των mRNA *Trim32*, *N-Myc* και *c-myc* μειώνονται συντονισμένα έπειτα από 8 ημέρες διαφοροποίησης των κυττάρων *Be2C* με RA.

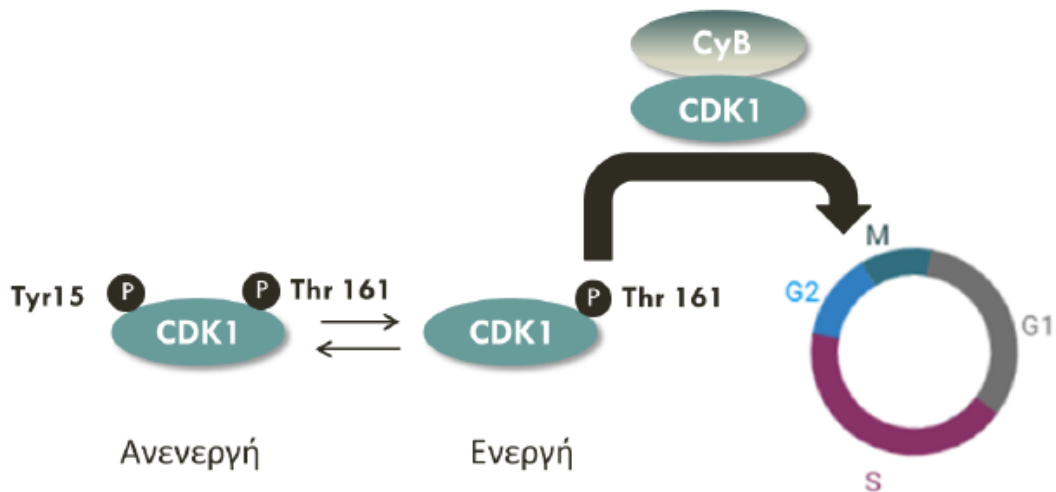
#### 4. Επίδραση της υπερέκφρασης της αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης TRIM32 στον κυτταρικό κύκλο των νευρικών κυττάρων

Βιβλιογραφικά γνωρίζουμε ότι ο *ABI2* είναι ένα μόριο που παίρνει μέρος στην απενεργοποίηση της *CDK1* κινάσης η οποία συμπλοκοποιείται με την κυκλίνη *B*, προωθώντας τον κύκλο στη φάση *M*. Άρα το *ABI2* φαίνεται να αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη. Το σημαντικό στοιχείο που έρχεται να προστεθεί είναι ότι το *TRIM32* αλληλεπιδρά με το *ABI2* σημαίνοντάς το για αποικοδόμηση. Με αυτόν τον έμμεσο τρόπο το *TRIM32* δρα ως ένα ογκογονίδιο, αφού με υπερέκφραση του *TRIM32* τα επίπεδα του *ABI2* μειώνονται, με αποτέλεσμα να επιταχύνεται η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου και κατ'επέκταση η είσοδος στη μίτωση.

Για να ελεγχθεί η επίδραση των δύο μορφών του *TRIM32* στην πορεία του κυτταρικού κύκλου καλλιεργήθηκαν *Neuro2a* τα οποία διαμολύνθηκαν με τα *hTRIM32* και *hTRIM32-P130S*, απομονώθηκαν πρωτεΐνες οι οποίες αναλύθηκαν με *Western Blot*.

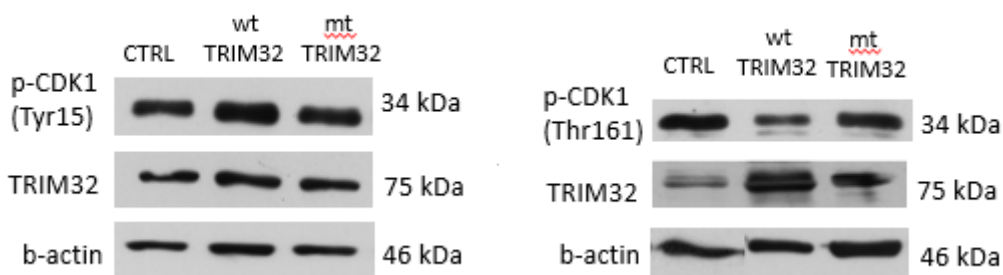
Προκειμένου να κατανοήσουμε καλύτερα το μηχανισμό μέσω του οποίου οι δύο μορφές του *TRIM32* πιθανόν επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο (και συγκεκριμένα τη διαδικασία της μίτωσης) ελέγξαμε με πειράματα ανοσοαποτύπωσης το βαθμό ενεργοποίησης μιας πολύ σημαντικής κινάσης για την πορεία της μίτωσης, της *CDK1*. Όταν η *CDK1* ενεργοποιηθεί και προσελκύσει μόρια κυκλίνης *B* (*CyB*), το σύμπλοκο *CDK1-CyB* φωσφορυλιώνει το μόριο *Borealin* με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση άλλων δύο μορίων των *INCENP* και των *Survivin*. Το σύμπλοκο των τριών πρωτεϊνών είναι υπεύθυνο για τη φωσφορυλίωση της *Aurora* που οδηγεί σε ενεργοποίηση της Ιστόνης 3 και είσοδο των κυττάρων στη μίτωση. Η *CDK1* στην ανενεργή της κατάσταση είναι φωσφορυλιωμένη στα κατάλοιπα *Thr161* και *Tyr15*, όταν αποφωσφορυλιωθεί στη θέση *Tyr15* ενεργοποιείται, προσελκύει μόρια κυκλίνης *B* και ωθεί τα κύτταρα στη φάση της μίτωσης.





**Εικόνα 43:** Η ανενεργή και ενεργή CDK1 και ο ρόλος τους στην πορεία της μίτωσης.

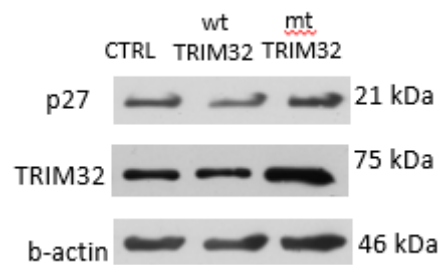
Αφού υπερεκφράσαμε τις δύο μορφές και το control πλασμίδιο σε κύτταρα Neuro2A απομονώσαμε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μετά από 48 ώρες. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot) και χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα τόσο για την ενεργή CDK1 (pCDK1-Thr 161) όσο και για την ανενεργή CDK1 (pCDK1-Tyr15). Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης έδειξαν πως η ενεργή μορφή της CDK1 μειώνεται έπειτα από υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης TRIM32 ενώ αντίθετα, η έκφραση της ανενεργής CDK1 αυξήθηκε από την αγρίου τύπου μορφή. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης ως προς την επίδραση της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης TRIM32 δεν έδειξαν κάποια αλλαγή.



**Εικόνα 44:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέρχονται από κύτταρα Neuro2A μετά από διαμόλυση και έλεγχος των αντισωμάτων για την ενεργή CDK1 (pCDK1-Thr 161) και για την ανενεργή CDK1 (pCDK1-Tyr15).

Τα γεγονότα αυτά δείχνουν ότι η αγρίου τύπου μορφή του TRIM32 παρεμποδίζει την είσοδο των κυττάρων στη μίτωση.

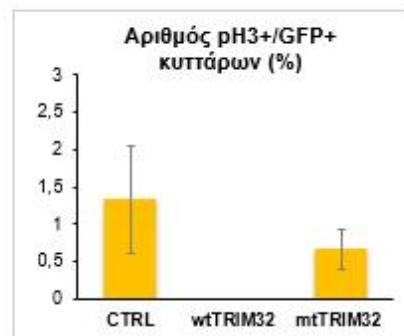
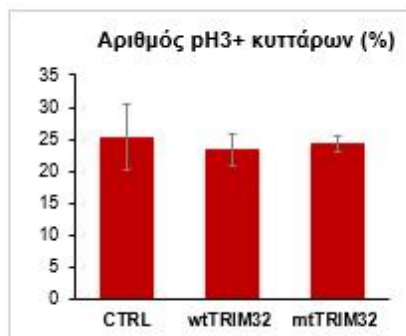
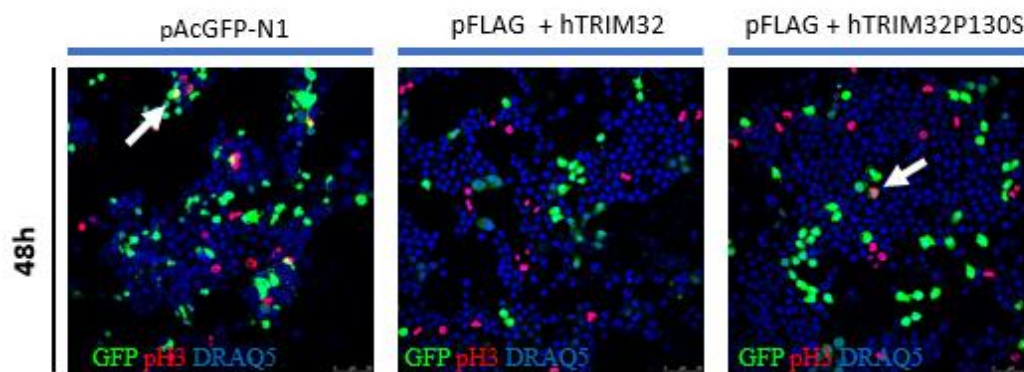
Στη συνέχεια, ελέγξαμε και αν η υπερέκφραση των δύο μορφών του TRIM32 επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης p27. Η πρωτεΐνη p27 ανήκει στην οικογένεια των Cip/Kip αναστολέων του κυτταρικού κύκλου, αναστέλλει τη μετάβαση στη φάση G1 και αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του πολλαπλασιασμού. Ακόμα, έχει βρεθεί ότι η έκφρασή του επάγεται στη φάση αδράνειας G0 και είναι απαραίτητη για τη διατήρηση αυτής της φάσης. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης έδειξαν ότι η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μορφής P130S της πρωτεΐνης TRIM32 αυξάνει τα επίπεδα της p27 υποδηλώνοντας συνολικά ότι οι 2 μορφές του TRIM32 επηρεάζουν ανασταλτικά τον κυτταρικό κύκλο αλλά μέσω διαφορετικών μηχανισμών.



**Εικόνα 45:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέρχονται από κύτταρα Neuro2A μετά από διαμόλυνση και έλεγχο των αντισωμάτων για πρωτεΐνη p27

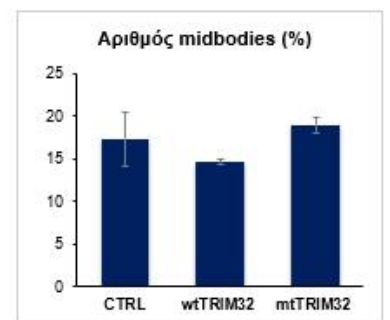
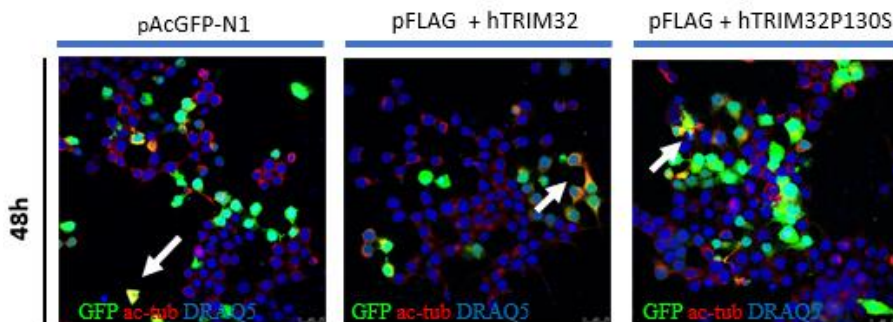
Σαν δείκτης πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε επίσης αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης Ιστονής 3 (pH3). Η Ιστονή 3 κατέχει μία ιδιαίτερη θέση για τα κύτταρα όσον αφορά στην πορεία του κυτταρικού κύκλου (Kruitwagen et al., 2015). Όταν η Ιστονή 3 φωσφορυλιωθεί στη σερίνη 10 από την Aurora B τότε οδηγεί σε συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, με αποτέλεσμα την είσοδο των κυττάρων στη μίτωση. Αρχικά ελέγξαμε τι συμβαίνει στα κύτταρα Neuro2A διαμολύνοντας τα κύτταρα αυτά με τις δύο πλασμιδιακές μας κατασκευές και το πλασμίδιο control και ελέγξαμε τι συμβαίνει μετά από 48 ώρες.

Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού έρχονται σε συμφωνία με τα ευρήματα ως προς τα επίπεδα της p-CDK1 και της p27. Ειδικότερα, ο αριθμός των διπλών θετικών κυττάρων δηλαδή θετικών για τη φάση της μίτωσης αλλά και διαμολυσμένων με τις 2 πλασμιδιακές κατασκευές μειώνεται σημαντικά ειδικά έπειτα από υπερέκφραση της αργίου τύπου μορφής του TRIM32.



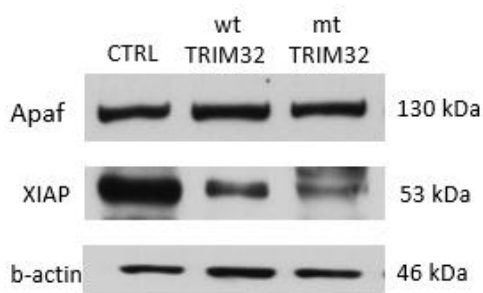
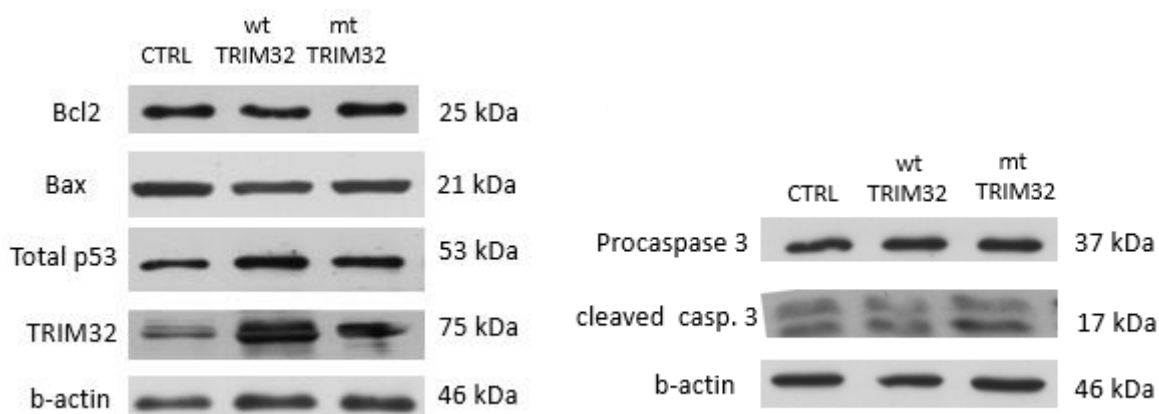
**Εικόνα 46: Α.** Διαμόλυνση κυττάρων Neuro2A με τις πλασμιδιακές κατασκευές wtTRIM32 και mtTRIM32 και ανίχνευση των κυττάρων που βρίσκονται στην μίτωση με αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης Ιστονης 3 (pH3). Χρώση πυρήνων με DRAQ5. **Β.** Ποσοτικοποίηση των κυττάρων που βρίσκονται στην μίτωση και άρα πολλαπλασιάζονται (pH3) και αυτών που βρίσκονται στην μίτωση και εκφράζουν ταυτόχρονα μία από τις μορφές του TRIM32 (pH3/ Transfected cells). Φακός: 43X.

Ως control βλέπουμε ότι η υπερέκφραση των 2 μορφών του TRIM32 δεν επηρεάζει σημαντικά τη θετικότητα σε άλλες πρωτεΐνες όπως η πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού ακετυλιωμένη τουμπουλίνη, η οποία φυσιολογικά δείχνει τις γέφυρες μικροσωληνίσκων μεταξύ θυγατρικών κυττάρων και προσδιορίζει αν και κατά πόσο ένας πληθυσμός κυττάρων βρίσκεται σε κατάσταση πολλαπλασιασμού.



**Εικόνα 47: Α.** Διαμόλυνση κυττάρων *Neuro2A* με τις πλασμιδιακές κατασκευές *wtTRIM32* και *mtTRIM32* και ανίχνευση των κυττάρων των ενδιάμεσων σωμάτων με αντίσωμα έναντι της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης. Χρώση πυρήνων με *DRAQ5*. **Β.** Ποσοτικοποίηση των κυττάρων Φακός: 43X.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι παραπάνω επιδράσεις των 2 μορφών του TRIM32 ως προς τον πολλαπλασιασμό των νευρικών κυττάρων συνοδεύονται από ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών, ακολούθησαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης για τον έλεγχο των επιπέδων μορίων-κλειδιών της απόπτωσης. Υπάρχουν δύο κατευθύνσεις για το πώς το TRIM32 μπορεί να επηρεάσει την απόπτωση ενός κυττάρου και δύο βασίζονται στην ιδιότητα να ουβικιτινιλιώνει τα υποστρώματά του δρώντας ως E3 λιγάση. Το πρώτο μονοπάτι είναι το *Apaf/Casp.9* και ο ανασταλτικός ρόλος που διαδραματίζει το TRIM32 στο μονοπάτι αυτό αφορά την ουβικιτινίωση του *p53*, ενός εναρκτήριου μορίου του μονοπατιού που απαντά σε στρεσογόνες συνθήκες. Το δεύτερο μονοπάτι είναι του *TNF-α* όπου εδώ το TRIM32 δρα εμμέσως ενεργοποιητικά αποικοδομώντας ένα κομβικό μόριο του μονοπατιού, το *XIAP*. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ελέγχθηκαν τα επίπεδα της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης *Bax*, της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης *Bcl<sub>2</sub>*, της κασπάσης 3, της πρωτεΐνης *Apaf* καθώς και των γνωστών υποστρωμάτων του TRIM32, της E3 λιγάσης *XIAP* και του *p53*.



**Εικόνα 48:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέρχονται από κύτταρα *Neuro2A* μετά από διαμόλυνση και έλεγχο των αντισωμάτων έναντι βασικών αποπτωτικών μορίων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση των δύο μορφών του TRIM32 δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα των παραπάνω βασικών ρυθμιστικών μορίων της απόπτωσης με εξαίρεση τα επίπεδα της πρωτεΐνης XIAP η οποία αξίζει να σημειωθεί ότι έχει και αυτή ενεργότητα E3 λιγάσης όπως και η πρωτεΐνη TRIM32.

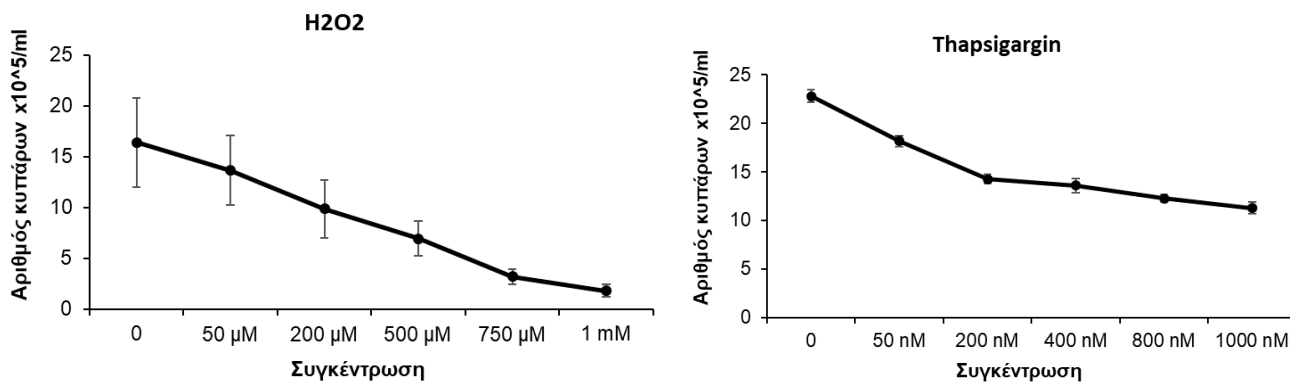
## 5. Ο ρόλος της πρωτεΐνης TRIM32 στην αυτοφαγία.

Δύο μελέτες δείχνουν έναν νέο αναδυόμενο ρόλο της πρωτεΐνης TRIM32 στην αυτοφαγία. Η πρώτη αφορά την αλληλεπίδραση του TRIM32 με την πρωτεΐνη ULK1 που είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του φαγοφόρου, ενός ενδιάμεσου στη δημιουργία του αυτοφαγοσώματος. Η δεύτερη δείχνει ότι αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη p62 που είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση ουβικιτινιωμένων ή μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μέσω του μονοπατιού της αυτοφαγίας.

Για να ελέγξουμε το ρόλο της πρωτεΐνης TRIM32 στην αυτοφαγία εφαρμόσαμε μια διπλή προσέγγιση. Αρχικά, επιχειρήσαμε να επάγουμε αυτοφαγία *in vitro* γνωρίζοντας βιβλιογραφικά ότι μπορεί να προέλθει από οξειδωτικό stress και από stress του ενδοπλασματικού δικτύου. Για την επαγωγή οξειδωτικού stress χρησιμοποιήθηκε το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ενώ για την επαγωγή του stress του ενδοπλασματικού δικτύου χρησιμοποιήθηκε το φάρμακο thapsigargin.

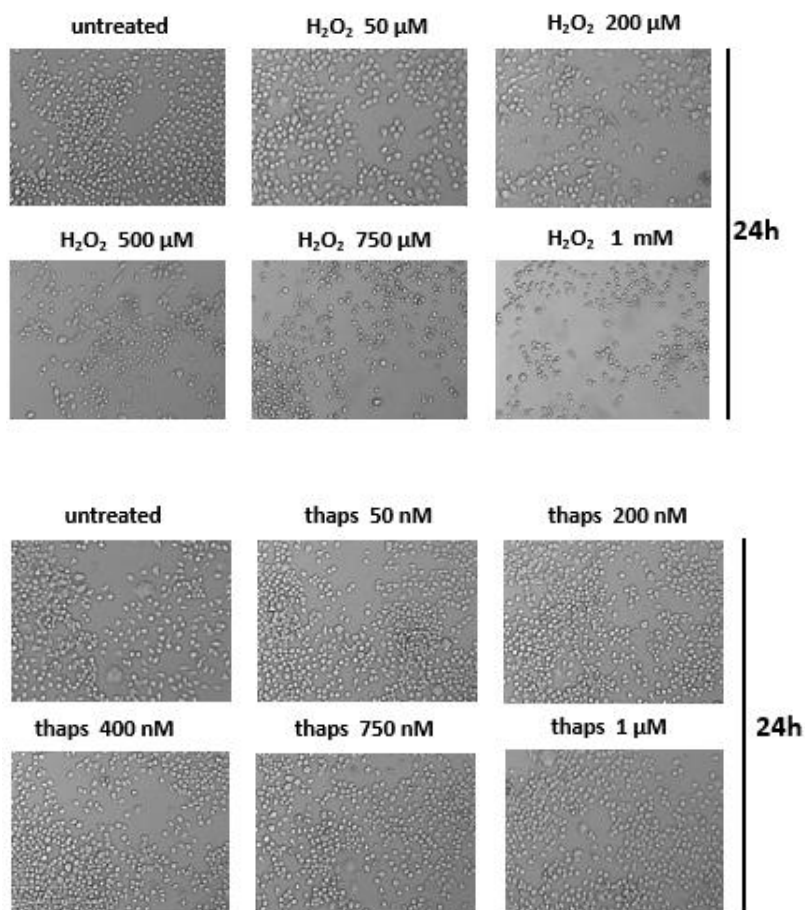
- Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι ένα δραστικό μόριο, που οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών, όπως η ρίζα του (·OH) η οποία προκαλεί σοβαρή οξειδωτική βλάβη στα κυτταρικά συστατικά αντιδρώντας με τα βιολογικά μακρομόρια. Η Ένας μεγάλος αριθμός τοξικών παραπροϊόντων σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με τις ελεύθερες ρίζες, που οδηγεί σε μία εξαιρετικά βλαβερή αλυσίδα αντιδράσεων λιπιδικής υπεροξειδωσης με αποτέλεσμα να αλλάζει η ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών, να αυξάνεται η διαπερατότητα της μεμβράνης συνεπώς να προκύπτει απώλεια ενδοκυτταρικών υγρών, να μειώνεται η μεταφορά ηλεκτρονίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο και να επάγονται αλλαγές στη μιτοχονδριακή λειτουργία. Η συσσώρευση των ROS έχει επίσης σαν αποτέλεσμα την οξείδωση των πρωτεϊνών. Σαν συνέπεια της οξείδωσης, οι πρωτεΐνες μπορεί να χάσουν αμινοξέα ή να κατακερματιστούν και αυτό να έχει σαν αποτέλεσμα απώλεια στην ενζυμική λειτουργία και αλλαγή στην κυτταρική λειτουργία. Επιπλέον, προκαλεί βλάβες όπως τροποποίηση βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, αλλαγή στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA.
- Το thapsigargin είναι ένα αλκαλοειδές σεσκι-τερπένιο το οποίο αποτελεί εκλεκτικό και ισχυρό αναστολέα της αντλίας Ca<sup>2+</sup> του ενδοπλασματικού/σαρκοπλασματικού δικτύου SERCA. Μέσω της αναστολής της SERCA, παρεμποδίζεται η είσοδος Ca<sup>2+</sup> στο ενδοπλασματικό δίκτυο και αυξάνεται η συγκέντρωσή του στο κυτταρόπλασμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μη λειτουργούν σωστά Ca<sup>2+</sup>-εξαρτώμενες μοριακές συνοδοί που είναι υπεύθυνες για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών και να προκύπτουν μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες οι οποίες θα πρέπει να αποικοδομηθούν δεδομένου ότι δεν είναι λειτουργικές.

Το εύρος των συγκεντρώσεων των φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν καθορίστηκε από τη βιβλιογραφία με σκοπό να επιλεχθούν τέτοιες συγκεντρώσεις ώστε να προκαλείται αναστολή στον πολλαπλασιασμό χωρίς να επάγεται κυτταρικός θάνατος. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στα φάρμακα αυτά για 24hr.



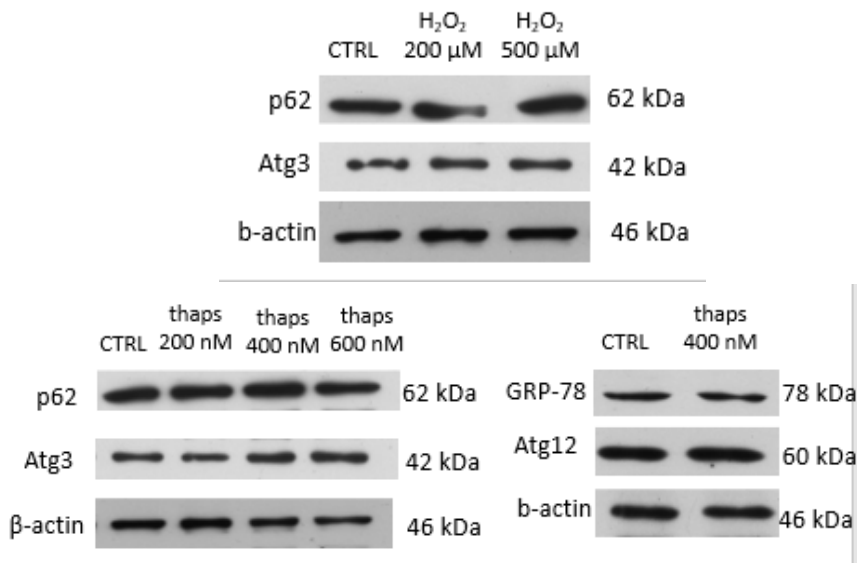
**Εικόνα 49:** Απεικόνιση του αριθμού των κυττάρων Neuro2A παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και thapsigargin για 24 ώρες. Έχουν πραγματοποιηθεί τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα.

Επιπλέον, έγινε παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο προκειμένου να διαπιστωθεί από ποια συγκέντρωση και πάνω τα φάρμακα αρχίζουν να επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων.



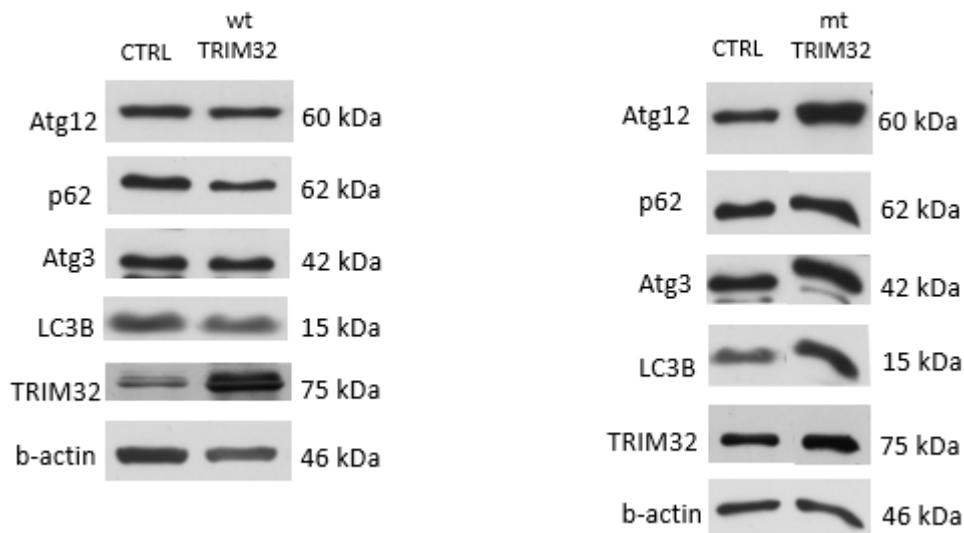
**Εικόνα 50:** Μορφολογική απεικόνιση των κυττάρων Neuro2A παρουσία ή απουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και thapsigargin για 24 ώρες. Έχουν πραγματοποιηθεί τρία ανεξάρτητα βιολογικά πειράματα.

Όσον αφορά το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είδαμε ότι όσο αυξάνονται οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται τόσο μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων ενώ ο κυτταρικός πληθυσμός παραμένει αμετάβλητος έπειτα από έκθεση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του thapsigargin. Αναφορικά με το αν αυτά τα δύο φάρμακα επηρεάζουν τα επίπεδα βασικών μορίων της αυτοφαγίας δεν παρατηρήθηκαν διαφορές παρουσία και απουσία των φαρμάκων. Ελέγχθηκαν οι αυτοφαγικές πρωτεΐνες Atg3, Atg12 και p62 με ανοσοαποτύπωση κατά Western ενώ ειδικά για την περίπτωση του επαγόμενου από thapsigargin stress χρησιμοποιήθηκε και αντισωμα έναντι της μοριακής συνοδού GRP78 που αποτελεί δείκτη αποτελεσματικότητας του φαρμάκου.



**Εικόνα 51:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέρχονται από κύτταρα Neuro2A παρουσία και απουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και thapsigargin και έλεγχος των αντισωμάτων έναντι βασικών αυτοφαγικών μορίων.

Έτσι λοιπόν, έπειτα από την μη επιτυχή επαγωγή της αυτοφαγίας in vitro, προχωρήσαμε στο 2<sup>ο</sup> μέρος της προσέγγισής μας που αφορούσε την σύγκριση της επίδρασης των δύο μορφών του TRIM32 στη ρύθμιση της αυτοφαγίας. Για το σκοπό αυτό καλλιεργήθηκαν Neuro2a τα οποία διαμολύνθηκαν με τα hTRIM32 και hTRIM32-P130S και απομονώθηκαν πρωτεΐνες οι οποίες αναλύθηκαν με Western Blot.

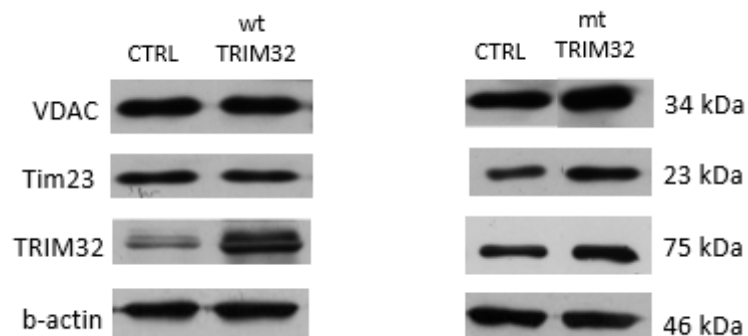


**Εικόνα 52:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέρχονται από κύτταρα Neuro2A μετά από διαμόλυνση με wtTRIM32 και mtTRIM32 και έλεγχος των αντισωμάτων έναντι βασικών αυτοφαγικών μορίων.

Διαπιστώθηκε ότι σε αντίθεση με τη φυσιολογική πρωτεΐνη, η μετάλλαξη P130S στην πρωτεΐνη TRIM32 επηρεάζει επιλεκτικά τα επίπεδα μορίων-κλειδιών της αυτοφαγίας όπως του Atg12, Atg3, p62 και LC3B. Αυτό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς πιθανή απορρύθμιση του μηχανισμού της αυτοφαγίας πιθανόν εμπλέκεται στην παθογένεση της νόσου Bardet Biedl.

## 6. Μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης TRIM32 στη βιολογία του μιτοχονδρίου.

Βλέποντας ότι η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης TRIM32 επηρεάζει μόρια-κλειδιά της αυτοφαγίας και γνωρίζοντας ότι η αυτοφαγία σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια, διερευνήσαμε περαιτέρω τι συμβαίνει σε επίπεδο μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Για το λόγο αυτό, καλλιεργήθηκαν Neuro2a τα οποία διαμολύνθηκαν με τα hTRIM32 και hTRIM32-P130S και απομονώθηκαν πρωτεΐνες οι οποίες αναλύθηκαν με Western Blot. Ελέγχθηκαν τα επίπεδα μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που βρίσκονται στην εσωτερική και εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όπως η VDAC1 και το Tim23.



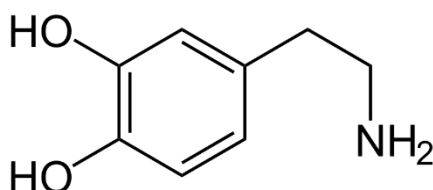


**Εικόνα 53:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέρχονται από κύτταρα Neuro2A μετά από διαμόλυνση με wtTRIM32 και mtTRIM32 και έλεγχος των αντισωμάτων έναντι βασικών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών

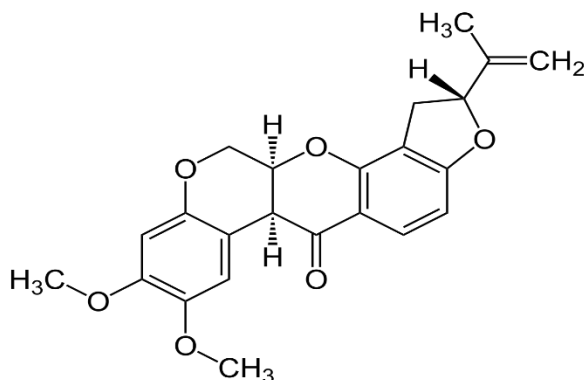
Διαπιστώθηκε ότι σε αντίθεση με τη φυσιολογική πρωτεΐνη, η μετάλλαξη P130S στην πρωτεΐνη TRIM32 επηρεάζει τα επίπεδα των πρωτεϊνών της εσωτερικής και εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Όσον αφορά τα επίπεδα της πρωτεΐνης TRIM32 σε συνθήκες μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, χρησιμοποιήθηκαν οι παράγοντες 6-OHDA και rotenone. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στην 6-OHDA για 24 hr σε συγκέντρωση 50  $\mu\text{M}$  ενώ στη rotenone για 6 hr σε συγκέντρωση 500 nM.

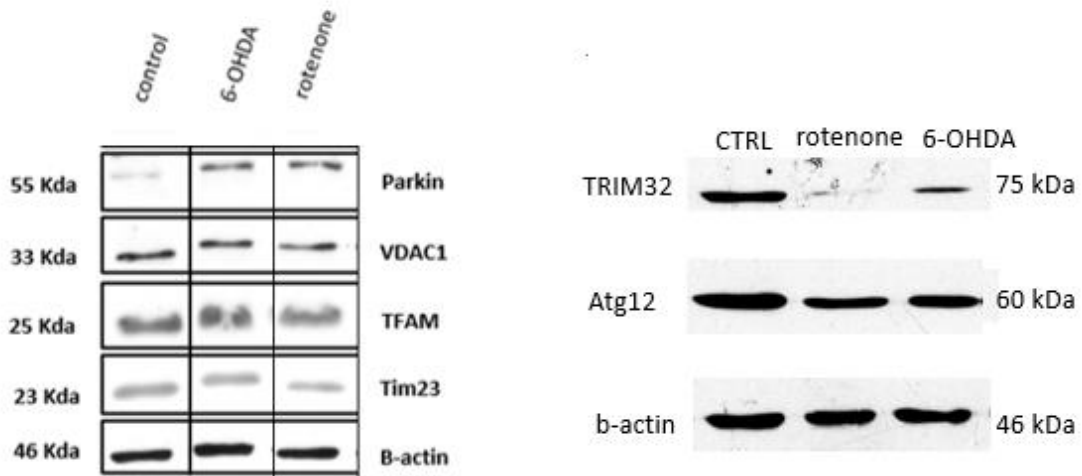
- 6-Hydroxydopamine (6-OHDA). Είναι ένα υδροξυλιωμένο παράγωγο της ντοπαμίνης που έχει υψηλή συγγένεια για μεμβρανικούς μεταφορείς νευροδιαβιβαστών, όπως ο DAT (dopamine transporter), γεγονός που της επιτρέπει να εισέρχεται ελεύθερα στο εσωτερικό των ντοπαμινεργικών και νοραδρενεργικών κυττάρων. Η τοξίνη 6-OHDA προκαλεί βλάβες λόγω παραγωγής ελεύθερων ριζών (ROS) και υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω της αμινικής οξειδάσης τύπου B και κινονών. Οι κινόνες αδρανοποιούν βιολογικά μακρομόρια αντιδρώντας με τις πυρηνόφιλες ομάδες τους. Τα μεταβολικά τοξικά προϊόντα της νευροτοξίνης έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μηχανισμών που οδηγούν στην αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (MOMP), την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων προ-αποπτωτικών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που με τη σειρά τους ενεργοποιούν άλλες πρωτεΐνες-τελεστές όπως η κασπάση 3.



- Η Ροτενόνη είναι ένα φυσικά παραγόμενο οργανικό μόριο που αποτελεί αναστολέα του complex I της αναπνευστικής μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας που μπορεί να περάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και τις βιολογικές μεμβράνες ανεξάρτητα από υποδοχείς και μεταφορείς. Η αναστολή του complex I από την ροτενόνη έχει καταστροφικές επιδράσεις στο κύτταρο και παραγωγή ROS με αποτέλεσμα το οξειδωτικό στρες.

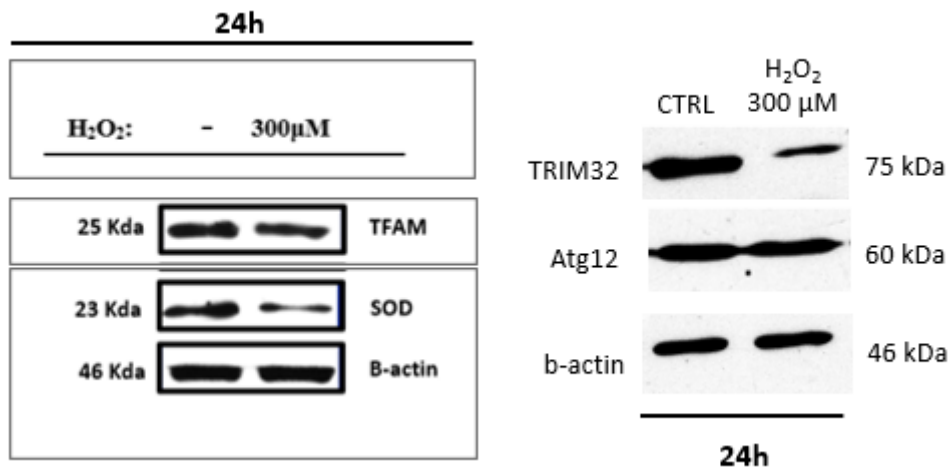


Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης έδειξαν ότι τα ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης TRIM32 μειώνονται σημαντικά έπειτα από stress μιτοχονδριακής λειτουργίας ενώ η αποτελεσματικότητα της δράσης αυτών των δύο φαρμάκων αξιολογήθηκε με βάση την αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης Parkin.



**Εικόνα 53:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέρχονται από κύτταρα Neuro2A για μελέτη των ενδογενών επιπέδων των πρωτεϊνών TRIM32 και Atg12 έπειτα από έκθεση σε 6-OHDA ( 50  $\mu$ M / 24 hr) και rotenone ( 500 nM / 6 hr)

Αναφορικά με την μεταβολή των ενδογενών επιπέδων της πρωτεΐνης TRIM32 έπειτα από έκθεση σε  $H_2O_2$  300  $\mu$ M για 24 hr, παρατηρήθηκε και εκεί μείωση, ενώ η αποτελεσματικότητα της δράσης του  $H_2O_2$  αξιολογήθηκε με βάση την αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης SOD.



**Εικόνα 54:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέρχονται από κύτταρα Neuro2A για μελέτη των ενδογενών επιπέδων των πρωτεϊνών TRIM32 και Atg12 έπειτα από έκθεση σε  $H_2O_2$  ( 300  $\mu$ M / 24 hr)

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο πλαίσιο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας έγινε μια πρώτη προσπάθεια χαρακτηρισμού της μεταλλαγμένης μορφής P130S της πρωτεΐνης TRIM32, που είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση του συνδρόμου Bardet-Biedl σε σχέση με την αγρίου τύπου μορφή.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης των δύο μορφών του TRIM32 στο turnover των ογκογονιδίων της οικογένειας MYC, N-Myc και c-myc, τα οποία αποδεδειγμένα αποτελούν στόχους του TRIM32 στέλνοντάς τα για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Τα δύο αυτά ογκογονίδια έχουν υψηλή ομολογία, εκτελούν παρόμοιες μοριακές λειτουργίες αλλά η έκφρασή τους χαρακτηρίζεται από ιστοειδικότητα. Έτσι θελήσαμε να ελέγξουμε αν μπορούμε να αναπαράγουμε αυτούς τους φαινοτύπους στις νευροβλαστωματικές κυτταρικές σειρές που μελετάμε και κατά δεύτερον να παρατηρήσουμε τυχόν διαφορές μεταξύ αγρίου τύπου και μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης TRIM32. Έγινε υπερέκφραση των hTRIM32 και hTRIM32-P130S στην κυτταρική σειρά Neuro2A και ελέγχθηκαν τα επίπεδα mRNA και πρωτεϊνών N-Myc και c-myc. Παρατηρήθηκε μία αύξηση των mRNA των N-Myc και c-myc έπειτα από υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής αλλά όχι της μεταλλαγμένης ενώ σε επίπεδο πρωτεΐνης όσον αφορά το c-myc δεν παρατηρήθηκαν διαφορές. Επειδή το αντίσωμα που χρησιμοποιήσαμε δεν αναγνωρίζει το ενδογενές N-Myc του ποντικού έγινε συν-διαμόλυνση του hTRIM32 και του N-MYC στα κύτταρα Neuro2A. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του εξωγενούς N-Myc μειώνονται έπειτα από την υπερέκφραση των δύο μορφών του TRIM32. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι τα γονίδια μπορεί να ελέγχονται και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο ενώ το γεγονός ότι η μετάλλαξη P130S δεν επηρεάζει τα επίπεδα mRNA θα μπορούσε να συνδέεται με χαρακτηριστικά της νόσου Bardet-Biedl.

Στη συνέχεια, θέλαμε να δούμε αν υπάρχει συσχέτιση της έκφρασης των N-Myc, c-myc και Trim32 κατά τη νευρική διαφοροποίηση. Για το λόγο αυτό, επειδή μας ενδιέφεραν τα ενδογενή επίπεδα αυτή τη φορά, καλλιεργήσαμε κύτταρα Be2C τα οποία χαρακτηρίζονται από αυξημένο αριθμό αντιγράφων του γονιδίου N-Myc και τα διαφοροποιήσαμε για οκτώ ημέρες παρουσία ρετινοϊκού οξέος. Αρχικά εστιάσαμε σε επίπεδο πρωτεΐνης και αφού επιβεβαιώσαμε μια επιτυχή διαφοροποίηση λόγω αύξησης των επιπέδων του νευρωνικού δείκτη Tuj1, είδαμε ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών TRIM32 και N-MYC μειώνονται έπειτα από οκτώ ημέρες διαφοροποίησης. Για να διαλευκάνουμε πότε αρχίζουν να παρατηρούνται αυτές οι αλλαγές, καλλιεργήσαμε ξανά κύτταρα Be2C αλλά τα διαφοροποιήσαμε για δύο, τέσσερις και οκτώ ημέρες με ρετινοϊκό οξύ. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης c-myc παρέμειναν αμετάβλητα ενώ η πρωτεΐνη N-MYC άρχισε να μειώνεται σημαντικά από την 2<sup>η</sup> ημέρα διαφοροποίησης και η TRIM32 από την 4<sup>η</sup>. Σε επίπεδο mRNA εστιάσαμε μόνο στις οκτώ ημέρες διαφοροποίησης και είδαμε ότι η έκφραση των γονιδίων N-Myc και Trim32 μειώνεται συντονισμένα κατά τη νευρική διαφοροποίηση.

Έπειτα αναρωτηθήκαμε αν η υπερέκφραση της αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένης μορφής P130S της πρωτεΐνης επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο των νευρικών κυττάρων. Βιβλιογραφικά, γνωρίζουμε ότι το TRIM32 λόγω της δράσης του ως E3 λιγάση ουβικιτινιλιώνει και αποικοδομεί την πρωτεΐνη Abi2, η οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες αναστέλλει τη δράση της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης 1 (CDK1). Η μείωση των επιπέδων του Abi2 από το TRIM32 προάγει τον πολλαπλασιασμό. Εμείς διαμολύναμε κύτταρα Neuro2A με hTRIM32 και hTRIM32-P130S και ελέγξαμε αν μεταβάλλονται τα επίπεδα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης 1, ενός βασικού μορίου για την πορεία του κυτταρικού κύκλου που ελέγχεται από τις κυκλίνες A και B και η φωσφορλίωση του οποίου στο κατάλοιπο Tyr15 αυξάνει την ενεργότητα της και αντίστοιχα στην Thr161 τη μειώνει. Παρατηρήσαμε ότι η υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης TRIM32

αύξησε τα επίπεδα της ανενεργούς και μείωσε τα επίπεδα της ενεργούς CDK1, με αποτέλεσμα να εισέρχονται λιγότερα κύτταρα στη φάση M του κυτταρικού κύκλου. Έπειτα ελέγξαμε πώς επηρεάζει η υπερέκφραση των δύο μορφών του TRIM32 τα επίπεδα της πρωτεΐνης p27, που «ανάβει» όταν τα κύτταρα βρίσκονται στη φάση G0 και είδαμε ότι αυξάνονται έπειτα από υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μορφής P130S. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι οι δύο μορφές του TRIM32 αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο αλλά με διαφορετικούς μηχανισμούς. Στη συνέχεια ελέγξαμε τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής στο κατάλοιπο Ser10 της ιστόνης 3 η οποία συμμετέχει στη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και αντανακλά τον αριθμό των μιτωτικών κυττάρων. Είδαμε ότι κανένα από τα κύτταρα που υπερεκφράζουν wtTRIM32 δεν βρίσκεται στη φάση της μίτωσης ενώ με υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μορφής είδαμε κάποια μιτωτικά κύτταρα αλλά πολύ λιγότερα σε σχέση με το control.

Για να διαπιστώσουμε αν η αναστολή του κυτταρικού κύκλου που επιτελείται από τις δύο μορφές του TRIM32 οφείλεται στην ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών ελέγξαμε τα επίπεδα βασικών ρυθμιστικών μορίων της απόπτωσης όπως Bcl2, Bax, p53, caspase 3, Araf, XIAP έπειτα από υπερέκφραση των δύο μορφών του TRIM32. Δεν παρατηρήσαμε σημαντικές διαφορές μεταξύ αγρίου τύπου και μεταλλαγμένης μορφής με εξαίρεση τη μείωση των επιπέδων του XIAP. Το γεγονός πιθανόν να έχει ιδιαίτερο βιολογικό ρόλο δεδομένου ότι το XIAP είναι και αυτό μια E3 λιγάση.

Δύο μελέτες δείχνουν έναν νέο αναδυόμενο ρόλο της πρωτεΐνης TRIM32 στην αυτοφαγία. Η πρώτη αφορά την αλληλεπίδραση του TRIM32 με την πρωτεΐνη ULK1 που είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του φαγοφόρου, ενός ενδιάμεσου στη δημιουργία του αυτοφαγοσώματος. Η δεύτερη δείχνει ότι αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη p62 που είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση ουβικιτινιλιωμένων ή μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μέσω του μονοπατιού της αυτοφαγίας. Για να ελέγξουμε το ρόλο της πρωτεΐνης TRIM32 στην αυτοφαγία εφαρμόσαμε μια διπλή προσέγγιση. Αρχικά, επιχειρήσαμε να επάγουμε αυτοφαγία in vitro γνωρίζοντας βιβλιογραφικά ότι μπορεί να προέλθει από οξειδωτικό stress και από stress του ενδοπλασματικού δικτύου. Χρησιμοποιήσαμε δύο παράγοντες που προκαλούν τέτοιου είδους stress σε κατάλληλες συγκεντρώσεις, το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και το thapsigargin αλλά δεν είδαμε να επηρεάζονται τα επίπεδα βασικών ρυθμιστικών μορίων της αυτοφαγίας όπως το p62 και το Atg3. Έτσι προχωρήσαμε στο δεύτερο σκέλος της προσέγγισής μας και είδαμε ότι η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μορφής P130S της πρωτεΐνης TRIM32 αυξάνει τα επίπεδα μορίων-κλειδιών της αυτοφαγίας όπως του Atg3, Atg12, p62 και LC3B, αντίθετα με την υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η απορρύθμιση του μηχανισμού της αυτοφαγίας από την μεταλλαγμένη μορφή P130S μπορεί να αποτελεί πιθανό μηχανισμό που σχετίζεται με την παθολογία της νόσου Bardet-Biedl.

Τέλος, βλέποντας ότι το TRIM32 επηρεάζει μόρια της αυτοφαγίας και γνωρίζοντας ότι η αυτοφαγία σχετίζεται με τα μιτοχόνδρια θελήσαμε να διερευνήσουμε περαιτέρω τι συμβαίνει σε επίπεδο μιτοχονδριακής λειτουργίας. Αρχικά είδαμε ότι η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μορφής P130S της πρωτεΐνης TRIM32 αυξάνει τα επίπεδα των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών VDAC και Tim23 αντίθετα με την υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής και στη συνέχεια παρατηρήσαμε ότι σε συνθήκες μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας έπειτα από χρήση των φαρμάκων rotenone, 6-OHDA και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μειώνονται τα ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης TRIM32.

Συμπερασματικά, στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής προέκυψαν διαφορές μεταξύ αγρίου τύπου και μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης TRIM32 ως προς τον κυτταρικό κύκλο, την αυτοφαγία και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων των νευρικών κυττάρων. Στο μέλλον αξίζει να μελετηθούν τα επίπεδα των ογκογονιδίων c-myc και N-Myc καθώς και ο πολλαπλασιασμός κυτταρικών

νευροβλαστωματικών σειρών έπειτα από σίγηση του Trim32. Επιπλέον, χρειάζεται να μελετηθούν οι επιπτώσεις της μεταλλαγής P130S στον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση και την αυτοφαγία σε TRIM32-null περιβάλλον και τέλος καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική η διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου η πρωτεΐνη TRIM32 ελέγχει την ακεραιότητα των μιτοχονδρίων.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acosta S, C. Lavarino, R. Paris, I. Garcia, C. de Torres, E. Rodríguez, H. Beleta, and J. Mora, (2009), "Comprehensive characterization of neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells," *BMC Dev. Biol.*, 9, no. 1, p. 12.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, (1999) *General Development of the Nervous System, Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition.

Alexander V. Loktev, et. al A BBSome Subunit Links Ciliogenesis, Microtubule Stability, and Acetylation DOI 10.1016/j.devcel.2008.11.001

Amador Albor et al. The Interaction of Piasy with Trim32, an E3-Ubiquitin Ligase Mutated in Limb-girdle Muscular Dystrophy Type 2H, Promotes Piasy Degradation and Regulates UVB-induced Keratinocyte Apoptosis through NFκB the journal of biological chemistry vol. 281, NO. 35, pp. 25850–25866, September 1, 2006

Annie P. Chiang et al. (2006) Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet–Biedl syndrome gene (BBS11)

Ballas N, Grunseich C, Lu DD, Speh JC, Mandel G. REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell* 2005; 121:645-57.

O. E. Blacque, M. R. Leroux Bardet-Biedl syndrome: an emerging pathomechanism of intracellular transport *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006) 2145–2161

Bawa, S.; Brooks, D.S.; Neville, K.E.; Tipping, M.; Sagar, M.A.; Kollhoff, J.A.; Chawla, G.; Geisbrecht, B.V.; Tennesen, J.M.; Eliceiri, K.W.; et al. TRIM32 cooperates with glycolytic enzymes to promote cell growth. *Elife* 2020, 9

Bertoli C., De Bruin R. A. M. "Turning cell cycle entry on its head". *CELL DIVISION* 1 July 2014. *elifesciences.org*.

Chen Z, Sun L, (2009) Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling, *Molecular Cell* 33, no3, p.275-286

Chen, L.; Iraci, N.; Gherardi, S.; Gamble, L.D.; Wood, K.M.; Perini, G.; Lunec, J.; Tweddle, D.A. P53 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2010, 70, 1377–1388.

Cohen, S.; Zhai, B.; Gygi, S.P.; Goldberg, A.L. Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *J. Cell Biol.* 2012, 198, 575–589

Cohen GM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326 ( Pt 1):1-16.

Cotterman R, Jin VX, Krig SR, Lemen JM, Wey A, Farnham PJ, Knoepfler PS (December 2008). "N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor". *Cancer Research*

Deshaies R.J., Joazeiro A.P.: RING Domain Ubiquitin Ligases, *Annual Rev Biochem* 2009 78:399-434

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.

Fatima M C Tripartite containing motif 32 modulates proliferation of human neural precursor cells in HIV-1 neurodegeneration. *ell Death Differ.* 2016 May;23(5):776-86. doi: 10.1038/cdd.2015.138.

Fulda, S., & Debatin, K.-M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798–4811.

Gearhart J, Pashos EE, Prasad MK (October 2007). "Pluripotency redux--advances in stem-cell research". *The New England Journal of Medicine*

Geske, F. J., & Gerschenson, L. E. (2001). The biology of apoptosis. *Human Pathology*, 32(10), 1029–1038.

Giannini, G et al. High mobility group A1 is a molecular target for MYCN in human neuroblastoma. *Cancer Res.* 2005, 65, 8308–8316.

Gisela F. Claassen and Stephen R. Hann (2000) A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor b-induced cell-cycle arrest

Izumi, H.; Kaneko, Y. Trim32 facilitates degradation of MYCN on spindle poles and induces asymmetric cell division in human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 2014, 74, 5620–5630

Harper J., Wade E., Stephen J. "The DNA Damage Response: Ten Years After". *Molecular Cell* 28 (5) December 2007: 739–745.

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770–776

Huang Miller & Weiss William, Neuroblastoma and MYCN (2021) Departments of Neurology, Pediatrics, and Neurosurgery, University of California, San Francisco,

Hochstrasser, M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 2009, 458, 422-429, doi:10.1038/nature07958.

Jäkel, S., & Dimou, L. (2017). Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11

Kandel Eric, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Steven A. Siegelbaum, A.J. Hudspeth, (2013), Principles of Neural Science, Fifth Edition, McGraw-Hill, New York

Kano, S.; Miyajima, N.; Fukuda, S.; Hatakeyama, S. Tripartite motif protein 32 facilitates cell growth and migration via degradation of Abl-interactor 2. *Cancer Res.* 2008, 68, 5572–5580

Kokkinidis, M., Glykos, N. M., & Fadouloglou, V. E. (2020). Catalytic activity regulation through post-translational modification: the expanding universe of protein diversity. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 122, 97–125.

Kudryashova, E.; Kudryashov, D.; Kramerova, I.; Spencer, M.J. Trim32 is a ubiquitin ligase mutated in limb girdle muscular dystrophy type 2H that binds to skeletal muscle myosin and ubiquitinates actin. *J. Mol. Biol.* 2005, 354, 413–424

Marios G Koliopoulos , Diego Esposito , Evangelos Christodoulou , Ian A Taylor & Katrin Rittinger, Functional role of TRIM E3 ligase oligomerization and regulation of catalytic activity 10.15252/embj.201593741

Kuznetsov AV, Hermann M, Saks V, Hengster P, Margreiter R, The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Oct;41 (10):1928-39.

Löbrich M.,Jeggo P.A. "The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction". *Nature Reviews Cancer* 7, November 2007 (11): 861–869.



Liu, J.; Zhang, C.; Wang, X.L.; Ly, P.; Belyi, V.; Xu-Monette, Z.Y.; Young, K.H.; Hu, W.; Feng, Z. E3 ubiquitin ligase TRIM32 negatively regulates tumor suppressor p53 to promote tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2014, 21, 1792–1804

Locke, M.; Tinsley, C.L.; Benson, M.A.; Blake, D.J. TRIM32 is an E3 ubiquitin ligase for dysbindin. *Hum. Mol. Genet.* 2009, 18, 2344–2358

Marshall, G. M., Carter, D. R., Cheung, B. B., Liu, T., Mateos, M. K., Meyerowitz, J. G., & Weiss, W. A. (2014). The prenatal origins of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 14(4), 277–289.

Ming, G. L., & Song, H., (2011) " Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions," *Neuron*, vol. 70, no. 4, pp. 687-702.

Mita, M. M., Mita, A. C., & Tolcher, A. W. (2006). Apoptosis: mechanisms and implications for cancer therapeutics. *Targeted Oncology*, 1(4), 197–214.

Morrish F, Noonan J, Perez-Olsen C, Gafken PR, Fitzgibbon M, Kelleher J, et al. Myc-dependent mitochondrial generation of acetyl-CoA contributes to fatty acid biosynthesis and histone acetylation during cell cycle entry. *J Biol Chem.* 2010; 285:36267–36274

Musacchio, Andrea; Edward D. Salmon (May 2007). "The spindle-assembly checkpoint in space and time". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8 (5): 379–393. doi:10.1038/nrm2163

Sebastien Nisole, Jonathan P. Stoye and Ali Savb TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence *Nature Reviews Microbiology* | AOP, published online 9 September 2005; doi:10.1038/nrmicro1248

Opel, D.; Poremba, C.; Simon, T.; Debatin, K.M.; Fulda, S. Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2007, 67, 735–745.

Patrick Frosk, Am. J. Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2H Associated with Mutation in TRIM32, a Putative E3-Ubiquitin–Ligase Gene *Hum. Genet.* 70:663–672, 2002

Pavlou MA Expression of the Parkinson's Disease-Associated Gene Alpha-Synuclein is Regulated by the Neuronal Cell Fate Determinant TRIM32 , *Mol Neurobiol.* 2016, Jun 23

- Pickart, C.M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001, 70, 503-533, doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.503.
- Pistoia, F. Morandi, G. Bianchi, A. Pezzolo, I. Prigione, and L. Raffaghello, (2013) "Immunosuppressive microenvironment in neuroblastoma.," *Front. Oncol.*, vol. 3, no. June, p. 167.
- Prajapati P, Gohel D, Shinde A, Roy M, Singth K, Singth R, TRIM32 regulates mitochondrial mediated ROS levels and sensitizes the oxidative stress induced cell death, *Cellular Signaling* 76 (2020)109777
- Rye C., Wise R., Jurukovsky V., DeSaix J., Choi J., Avissar Y. (2017) Biology. Rice University.
- Ryu, Y.S.; Lee, Y.; Lee, K.W.; Hwang, C.Y.; Maeng, J.S.; Kim, J.H.; Seo, Y.S.; You, K.H.; Song, B.; Kwon, K.S. TRIM32 protein sensitizes cells to tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ )-induced apoptosis via its RING domain-dependent E3 ligase activity against X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP). *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 25729–25738.
- Ruiz-Pérez MV, Henley AB, Arsenian-Henriksson M. The MYCN protein in health and disease. *Genes (Basel)*. 2017;8(4):1-27. doi:10.3390/genes8040113
- Schwamborn, J.C.; Berezikov, E.; Knoblich, J.A. The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell* 2009, 136, 913–925.
- Schwartz AL, Ciechanover A. Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009; 49:73-96.
- Sears, R.; Ohtani, K.; Nevins, J.R. Identification of positively and negatively acting elements regulating expression of the E2F2 gene in response to cell growth signals. *Mol. Cell. Biol.* 1997, 17, 5227–5235.
- Seoane, J., Le, H. V. & Massague, J. Myc suppression of the p21Cip1 Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419, 729–734 (2002).
- Sheffield VC. Use of isolated populations in the study of a human obesity syndrome, the Bardet-Biedl syndrome. *Pediatr Res.* 2004;55:908–911

Stanton LW, Schwab M, Bishop JM. Nucleotide sequence of the human N-myc gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(6):1772-1776. doi:10.1073/pnas.83.6.1772

Stoykova A., Tuoc T.C (2010) Role of the ubiquitin-proteasome system in neurogenesis, *Cell cycle* 9:16, 3194-3200

Suliman, N. A., Taib, C. N. M., Moklas, M. A. M., & Basir, R. (2017). Delta-9-Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) Induce Neurogenesis and Improve Cognitive Performances of Male Sprague Dawley Rats. *Neurotoxicity Research*, 33(2), 402

Tochini C, Ciosk R, TRIM-NHL proteins in development and disease, *Semin Cell Dev. Biol.* 2015 47-48, 52-59

Tsubota, S., & Kadomatsu, K. (2017). Origin and mechanism of neuroblastoma. *Oncoscience*, 4(7–8), 70–72.

F. Gregory Wulczyn, et. al 2010 miRNAs need a TRIM Regulation of miRNA Activity by Trim-NHL Proteins Landes Bioscience and Springer Science+Business Media

Ye, J.; Fan, J.; Venneti, S.; Wan, Y.W.; Pawel, B.R.; Zhang, J.; Finley, L.W.; Lu, C.; Lindsten, T.; Cross, J.R.; et al. Serine catabolism regulates mitochondrial redox control during hypoxia. *Cancer Discov.* 2014, 4, 1406–1417

Yellen G, Fueling thought: Management of glycolysis and oxidative phosphorylation in neuronal metabolism. *J Cell Biol.* 2018 Jul 2;217(7):2235-2246.

Yuneva M, Zamboni N, Oefner P, Sachidanandam R, Lazebnik Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol.* 2007;

Yoon KJ, Koo BK, Im SK, Jeong HW, Ghim J, Kwon MC, et al. Mind bomb 1-expressing intermediate progenitors generate notch signaling to maintain radial glial cells. *Neuron* 2008; 58:519-31.

Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Arauzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Scholer HR. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature.* 2008; 454:646–650.

Zhang, M., Zhao, J., Lv, Y., Wang, W., Feng, C., Zou, W., Su, L., & Jiao, J. (2020). Histone Variants and Histone Modifications in Neurogenesis. *Trends in Cell Biology*, 0(0), 1–12.

Di Rienzo, M.; Antonioli, M.; Fusco, C.; Liu, Y.; Mari, M.; Orhon, I.; Refolo, G.; Germani, F.; Corazzari, M.; Romagnoli, A.; et al. Autophagy induction in atrophic muscle cells requires ULK1 activation by TRIM32 through unanchored K63-linked polyubiquitin chains. *Sci. Adv.* 2019, 5, eaau8857

Overa K.S, Garcia J.G, Bhujabal Z, Jain A, Overvatn A, Larsen K.B, Deretic V, Johansen T, Lamark T, Sjøttem E (2019) TRIM32 acts both as a substrate and a positive regulator of p62 /SQSTM1 impaired in a muscular dystrophy disease, *Journal of Cell Science*

Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., & Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3- phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, 182(4), 685–701.

Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: Many paths to the same end. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263(1), 55– 72

Dice, J. F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(8), 305–309.

Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., & Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature Cell Biology*, 11(12), 1433– 1437

He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43, 67–93.

Lamark, T., Svenning, S., & Johansen, T. (2017). Regulation of selective autophagy: The p62/SQSTM1 paradigm. *Essays in Biochemistry*, 61(6), 609–624.

Marzella, L., Ahlberg, J., & Glaumann, H. (1981). Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 36(2–3), 219–234.

Massey, A. C., Zhang, C., & Cuervo, A. M. (2006). Chaperone-Mediated Autophagy in Aging and Disease. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 73, pp. 205–235). Elsevier.

Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 460–473

Yang, Zhifen, & Klionsky, D. J. (2009). An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 335, 1–32.

Yang, Zhifen, & Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 124–131.

Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., & Eskelinen, E.-L. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*, 5(8), 1180–1185.