



SANITURA

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (MIS 5002514)

Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων
Χρηματοδότηση από το
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία»

Ανάδοχος: Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών
ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Υλοποίηση με ένα υποέργο (εκτέλεση με ίδια μέσα)

Έναρξη: 1/11/2017

Λήξη: 30/4/2021



Co-financed by Greece and the European Union

SANITURA (ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ): έργο ΕΣΠΑ (MIS 5002514) για την ενίσχυση των ερευνητικών δραστηριοτήτων του ΙΒΕ - ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΟΤΕΩΝ

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ 4.5.2

Συντήρηση και ανάπτυξη αποικιών πειραματοζώων

ΕΚΤΡΟΦΕΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ



ΕΚΤΡΟΦΕΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ ΙΒΕ



Εγκατάσταση Εκτροφής :

EL 25 BIO 019

Εγκατάσταση Προμήθειας :

EL 25 BIO 020

Εγκατάσταση Χρήσης :

EL 25 BIO 039



Ζωϊκά Πρότυπα Εκτροφείου Πειραματοζώων ΙΒΕ

Ζωϊκά πρότυπα:

1. ΜΥΕΣ SWISS WEBSTER (CFW) ALBINO
2. ΜΥΕΣ NOD SCID ALBINO (ανοσοκατεσταλμένοι μύες)
3. ΜΥΕΣ SKH1 (άτριχοι μύες)
4. ΜΥΕΣ C57Bl/6j και παράλληλες αποικίες γενετικά τροποποιημένων μυών AD 5xFAD & TgMMP-9
5. ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR ALBINO
6. ΚΟΥΝΕΛΙΑ NEW ZEALAND ALBINO (αναπαραγωγή και συντήρηση)
7. ΜΟΝΑΔΑ ΓΗΡΑΣΜΕΝΩΝ ΖΩΪΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑνεΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION



2014-2020
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη
Partnership Agreement
2014 - 2020

Co-financed by Greece and the European Union

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά και συνέδρια αποτελεσμάτων που έχουν προκύψει από μελέτες συναφείς με αυτές που εκτελούνται στο πλαίσιο της παροχής εξειδικευμένων επιστημονικών υπηρεσιών. Ενδεικτικά αναφέρονται οι παρακάτω (32):

- Papadopoulou A. and Kletsas D. «Human lung fibroblasts prematurely senescent after exposure to ionizing radiation enhance the growth of malignant lung epithelial cells in vitro and in vivo» *Int J Oncol.* (2011): 39(4):989-99.
- Georgoutsou-Spyridonos M, Ricklin D, Pratsinis H, Perivolioti E, Pirmettis I, Garcia BL, Geisbrecht BV, Foukas PG, Lambris JD, Mastellos DC, Sfyroera G. «Attenuation of Staphylococcus aureus-Induced Bacteremia by Human Mini-Antibodies Targeting the Complement Inhibitory Protein» *J Immunol.* (2015) 195(8):3946-58.
- Zikos C., A. Evangelou, C.-E. Karachaliou, G. Gourma, P. Blouchos, G. Moschopoulou, C. Yialouris, J. Griffiths, G. Johnson, P. Petrou, S. Kakabakos, S. Kintzios, E. Livaniou. «Commercially Available Chemicals as Immunizing Haptens for the Development of a Polyclonal Antibody Recognizing Carbendazim and Other Benzimidazole-Type Fungicides» *Chemosphere*, 119, S16-S20 (2015).
- Fragkouli A., Papatheodoropoulos C., Georgopoulos S., Stamatakis A., Stylianopoulou F., Tsilibary E.C. and Tzinia A.K. J. *Neurochem.* «Enhanced neuronal plasticity and elevated endogenous sAPP α levels in mice over-expressing MMP9» *J Neurochem.* (2012): 121(2):239-51
- Gkogkas C.G., Khoutorsky A., Lacaille J.-C., Sonenberg N. «Pharmacogenetic Inhibition of eIF4E-Dependent Mmp9 mRNA Translation Reverses Fragile X Syndrome-like Phenotypes» *Cell Reports* 9 December 11, 2014
- Fragkouli A., Tsilibary E.C., Tzinia A.K. «Neuroprotective role of MMP-9 overexpression in the brain of Alzheimer's 5xFAD mice» *Neurobiol. Dis* 70 2017
- Kaminari A., Giannakas N., Tzinia A.K. & Tsilibary E.C. «Overexpression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) rescues insulin-mediated impairment in the 5XFAD model of Alzheimer's disease» *Scientific Reports* 6 April 2017
- Liolios C.C., Fragogeorgi E.A., Zikos C., Loudos G., Xanthopoulos S., Bouziotis P., Paravatou-Petsotas M., Livaniou E., Varvarigou A.D., Sivolapenko G.B. «Structural modifications of 99mTc-labelled bombesin-like peptides for optimizing pharmacokinetics in prostate tumor targeting», *Int. J. Pharmac.* 430 (2012), pp 1-17.
- Psimadas D., Fani M., Gourni E., Loudos G., Xanthopoulos S., Zikos C., Bouziotis P., Varvarigou A.D., «Synthesis and comparative assessment of a labelled RGD peptide bearing two different 99mTc-tricarbonyl chelators for potential use as targeted radiopharmaceutical», *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 20(8) (2012), pp 2549-2557.
- Tsiapa I., Loudos G., Varvarigou A.D., Fragogeorgi I., Psimadas D., Tsoதாகos T., Xanthopoulos S., Mihailidis D., Bouziotis P., Nikiforidis G.C., Kagadis G.C., «Biological Evaluation of an ornithine-modified 99mTc-labeled RGD peptide as an angiogenesis imaging agent», *Nuclear Medicine and Biology* 40(2) (2013), pp 262-272.
- Bouziotis P., Gourni E., Patsis G., Psimadas D., Zikos C., Fani M., Xanthopoulos S., Loudos G., Paravatou-Petsotas M., Livaniou E., Varvarigou A.D., Pirmettis I., Papadopoulou M., «Radiochemical and Radiobiological Assessment of a Pyridyl-S-Cysteine Functionalized Bombesin Derivative Labeled with the 99mTc(CO) $_3$ Core», *Bioorganic Medicinal Chemistry* 21(2013):pp 6699-6707.
- Fragogeorgi E., Savina I., Tsoதாகos T., Efthimiadou E., Xanthopoulos S., Palamaris L., Psimadas D., Bouziotis P., Kordas G., Mikhailovsky S., Alavijeh M., Loudos G., «Comparative In vitro Stability and Scintigraphic Imaging for Trafficking and Tumour Targeting of a Directly and a Novel 99mTc(I)(CO) $_3$ Labeled Liposome, *International Journal of Pharmaceutics* 465 (1-2) (2014): pp 333-346.
- Tsiapa I., Loudos G., Fragogeorgi E.A., Bouziotis P., Psimadas D., Xanthopoulos S., Paravatou-Petsotas M., Palamaris L., Varvarigou A.D., Karnabatidis D., Kagadis G.C., «Evaluation of $\alpha\beta_3$ -mediated tumor expression with a 99mTc-labeled ornithine-modified RGD derivative during glioblastoma growth in vivo», *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceutics*, 29(10) (2014): pp 444-450.
- Gazouli, M, Bouziotis P., Lyberopoulou A., Ikonomopoulos J., Papalois A., Anagnou N.P., Efstathopoulos E.P., «Quantum dots-bevacizumab complexes for in vivo imaging of tumors», *In Vivo* 28(6) (2014): pp 1091-1096.
- Radchenko V., Bouziotis P., Tsoதாகos T., Paravatou-Petsotas M., de la Fuente A., Loudos G., Harris A.L., Xanthopoulos S., Filosofov D., Hauser H., Eisenhut M., Ponsard B., Roesch F., «Labeling and preliminary in vivo assessment of niobium-labeled radioactive species: A proof-of-concept study», *Nucl Med Biol* 43(5) (2016): pp 280-287.
- Bouziotis P., Stellas D., Thomas E., Truillet C., Tsoukalas C., Lux F., Tsoதாகos T., Xanthopoulos S., Paravatou-Petsotas M., Gaitanis A., Mouloupoulos L.A., Koutoulidis V., Anagnostopoulos C.D., Tillement O., « ^{68}Ga -radiolabeled AguIX nanoparticles as dual-modality imaging agents for PET/MRI-guided radiation therapy», *Nanomedicine: Future Medicine* 2017 (in press)
- Nikolaki E., V. Vassilakopoulou, C.-E. Karachaliou, Z. Tsialla, P.S. Petrou, S.E. Kakabakos, C. Zikos, E. Livaniou. In-House Development and Cross-Reactivity Evaluation of a Polyclonal «Antibody for the Immunoanalysis of the Pollutant 2,4,6-Trichlorophenol. In: *Proceedings of the 14th International Conference on Environmental Science and Technology* (CEST2015_00355), Rhodes, Greece, September 2-5, 2015.

- Nrf2-Mediated Fibroblast Reprogramming Drives Cellular Senescence by Targeting the Matrisome. Hiebert P, Wietcha MS, Cangkrama M, Haertel E, Mavrogonatou E, Stumpe M, Steenbock H, Grossi S, Beer HD, Angel P, Brinckmann J, Kletsas D, Dengjel J, Werner S. Dev Cell. 2018 Jul 16;46(2):145-161
- Human lung fibroblasts prematurely senescent after exposure to ionizing radiation enhance the growth of malignant lung epithelial cells in vitro and in vivo. Papadopoulos A, Kletsas D. Int J Oncol. 2011 Oct;39(4):989-99.
- Serglycin activates pro-tumorigenic signaling and controls glioblastoma cell stemness, differentiation and invasive potential. Manou, D., Bouris, P, Kletsas, D, Götte, M, Greve, B, Moustakas, A, Karamanos, N.K, Theocharis, A.D. Matrix Biology Plus Volume 6-7, May 2020, Article number 100033
- Expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) in Wistar rat's intervertebral disc after experimentally induced scoliotic deformity. Grivas T., Vasiliadis E., Kaspiris A., Khaldi L., Kletsas D. Scoliosis 2011 May 9;6(1):9.
- Katifelis, H., Mukha, I., Bouziotis, P., Vityuk, N., Tsoukalas, C., Lazaris, A.C., Lyberopoulou, A., Theodoropoulos, G.E., Efstathopoulos, E.P., Gazouli, M. «Ag/Au bimetallic nanoparticles inhibit tumor growth and prevent metastasis in a mouse model”. International Journal of Nanomedicine, 2020; 15: 6019 – 6032.
- Synthesis, characterization and evaluation of 68Ga labelled monomeric and dimeric quinazoline derivatives of the HBED-CC chelator targeting the epidermal growth factor receptor, ChristosLiolios, AntonioSheganic, IoannaRoupa, ChristosKiritsis, AtaMakarem, MariaParavatou-Petsotas, MariaPelecanou, PenelopeBouziotis, MinasPapadopoulos, Klaus Kopka, IoannisPirmettis, Bioorganic Chemistry 2020
- Photodynamic therapy of 4T1 tumors in NOD-SCID mice, Georgios Kareliotis, Stavros Xanthopoulos, Eleni Drakaki, Maria Papachristou, Ioannis Datsaris, Penelope Bouziotis, Mersini Makropoulou, arXiv:2008.03537 [physics.med-ph] (2020)
- A Proof-of-Concept Study on the Therapeutic Potential of Au Nanoparticles Radiolabeled with the Alpha-Emitter Actinium-225, Evangelia-Alexandra Salvanou, Dimitris Stellas, Charalampos Tsoukalas, Barbara Mavroidi, Maria Paravatou-Petsotas, Nikolaos Kalogeropoulos, Stavros Xanthopoulos, Franck Denat, Gautier Laurent, Rana Bazzi, Stephane Roux and Penelope Bouziotis, Pharmaceutics 2020, 12(2), 188
- Trastuzumab Conjugated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Labeled with 225Ac as a Perspective Tool for Combined α -Radioimmunotherapy and Magnetic Hyperthermia of HER2-Positive Breast Cancer by Edyta Cędrowska, Marek Pruszyński, Weronika Gawęda, Michał Żuk, Paweł Krysiński, Frank Bruchertseifer, Alfred Morgenstern, Maria-Argyro Karageorgou, Penelope Bouziotis and Aleksander Bilewicz, Molecules 2020, 25(5)
- Rapid detection of mozzarella and feta cheese adulteration with cow milk through a silicon photonic immunosensor, Michailia Angelopoulou, Panagiota S. Petrou, Ioannis Raptis, Konstantinos Misiakos, Evangelia Livaniou, Eleni Makarona and Sotirios Kakabakos, Analyst 2020
- A White Light Reflectance Spectroscopy label-free biosensor for the determination of fungicide carbendazim, Georgios Koukouvinos, Chrysoula-Evangelia Karachaliou, Sotirios Kakabakos, Evangelia Livaniou, MDPI in The 1st International Electronic Conference on Biosensors session, 2020
- Kanellopoulos P, Kaloudi A, Rouchota M, Loudos G, de Jong M, Krenning EP, Nock BA, Maina T. One Step Closer to Clinical Translation: Enhanced Tumor Targeting of [99mTc]Tc-DB4 and [111In]In-SG4 in Mice Treated with Entresto. Pharmaceutics. 2020;12(12):E1145. doi: 10.3390/pharmaceutics12121145.
- Kanellopoulos P, Nock BA, Krenning EP, Maina T. Optimizing the Profile of [99mTc]Tc-NT(7-13) Tracers in Pancreatic Cancer Models by Means of Protease Inhibitors. Int J Mol Sci. 2020;21(21):7926. doi: 10.3390/ijms21217926.
- Kanellopoulos P, Lymperis E, Kaloudi A, de Jong M, Krenning EP, Nock BA, Maina T. [99mTc]Tc-DB1 Mimics with Different-Length PEG Spacers: Preclinical Comparison in GRPR-Positive Models. Molecules. 2020;25(15):3418. doi: 10.3390/molecules25153418.
- Kaloudi A, Kanellopoulos P, Radolf T, Chepurny OG, Rouchota M, Loudos G, Andreae F, Holz GG, Nock BA, Maina T. [99mTc]Tc-DGA1, a Promising CCK2R-Antagonist-Based Tracer for Tumor Diagnosis with Single-Photon Emission Computed Tomography. Mol Pharm. 2020;17(8):3116-3128. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00605.
- Kanellopoulos P, Kaloudi A, Jong M, Krenning EP, Nock BA, Maina T. Key-Protease Inhibition Regimens Promote Tumor Targeting of Neurotensin Radioligands. Pharmaceutics. 2020;12(6):528. doi: 10.3390/pharmaceutics12060528.



Γιάννης Ζαφειρόπουλος **Γιώργος Δουλγερίδης**



Co-financed by Greece and the European Union

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

Παρουσιάσεις Παραδοτέων Προγράμματος SANITURA

2.1 Κατανόηση μηχανισμών κυτταρικής γήρανσης και του ρόλου της σε ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις

Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑνηΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION



Co-financed by Greece and the European Union

2.1 Κατανόηση μηχανισμών κυτταρικής γήρανσης και του ρόλου της σε ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις

- A.** *in vitro* μελέτη υπεργκυκαιμικών και φλεγμονωδών παραγόντων στην απόκριση των ινοβλαστών του περιοδοντικού συνδέσμου (ΠΔΣ) σε μηχανικές δυνάμεις

- B.** Μελέτη της σχέσης μορφής λειτουργίας στα γηρασμένα κύτταρα

Κυτταρικά μοντέλα

- A.** Ανθρώπινοι ινοβλάστες περιοδοντικού συνδέσμου

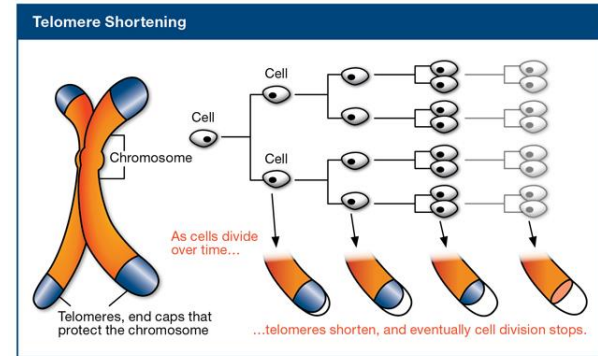
- B.** Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ

• Τα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα έχουν ένα πεπερασμένο εύρος ζωής, μπορούν δηλαδή να επιτελέσουν έναν συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, μετά από τις οποίες παραμένουν μεταβολικά ενεργά αλλά αδυνατούν πλέον να πολλαπλασιασθούν. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται **αναπαραγωγική γήρανση**.

Η κυτταρική γήρανση είναι αποτέλεσμα :

❖ Της προοδευτικής μείωσης του μήκους των τελομερών λόγω των συνεχών αναδιπλασιασμών (**Αναπαραγωγική Γήρανση, Replicative Senescence**)

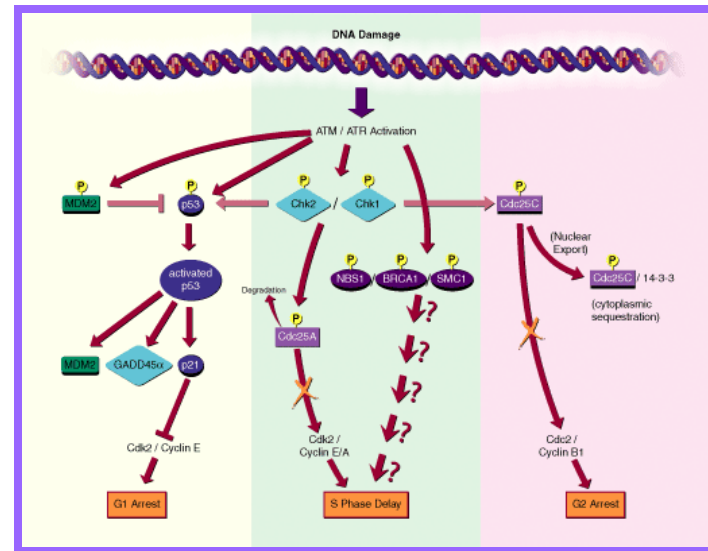


❖ Της επαναλαμβανόμενης επίδρασης μη κυτταροτοξικών στρες όπως:

Οξειδωτικό στρες (φλεγμονώδεις κυτοκίνες, υπεργλυκαιμικές συνθήκες)

υπερέκφραση ογκογονιδίων

γ- και UV ακτινοβολία

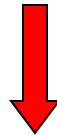


Αυτός ο τύπος γήρανσης ονομάζεται **Πρόωρη Κυτταρική Γήρανση που επάγεται από Στρες (Stress-induced premature senescence-SIPS)**

Φαινότυπος των γηρασμένων ινοβλαστών

Οι **γηρασμένοι ινοβλάστες** αποκτούν έναν ιδιαίτερο προ-φλεγμονώδη φαινότυπο (Senescence-associated Secretory Phenotype):

- Έκφραση μορίων που ενέχονται στη διαδικασία της φλεγμονής (προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, π.χ IL6, IL8, φλεγμονώδη μόρια, π.χ ICAM1)
- Αυξημένη έκφραση καταβολικών/πρωτεολυτικών ενζύμων (ένζυμα που αποικοδομούν την ECM, π.χ μεταλλοπρωτεάσες, MMP1, MMP9)



Επηρεάζουν την ομοιοστασία των ιστών στους οποίους βρίσκονται και συμβάλλουν στην ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων σχετιζόμενων με την ηλικία.

Περιοδοντικός Σύνδεσμος (ΠΔΣ, Periodontal Ligament-PDL)

✓ Ο συνδετικός ιστός που βρίσκεται μεταξύ της ρίζας του δοντιού και του φατνιακού οστού.

Αποτελείται από:

Κύτταρα και εξωκυττάρια μήτρα

Ινοβλάστες περιοδοντικού συνδέσμου (Periodontal ligament fibroblasts- PDLF)

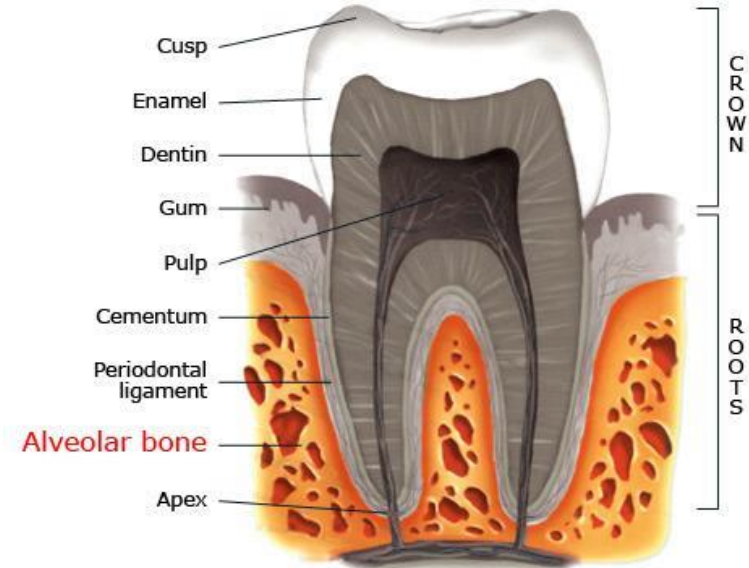
- χαρακτηρίζονται από την έκφραση οστεοειδικών γονιδίων, π.χ αλκαλική φωσφατάση (**ALP**), οστεοποντίνη (**OPN**), οστεοκαλσίνη (**OCN**), κολλαγόνο τύπου I (**Col1A**)
- υπό την επίδραση μηχανικών δυνάμεων διαφοροποιούνται σε προ-οστεοβλάστες
- ικανότητα να σχηματίζουν μεταλλοποιημένους όζους (**mineralized nodules**)



Οστεοβλαστική διαφοροποίηση

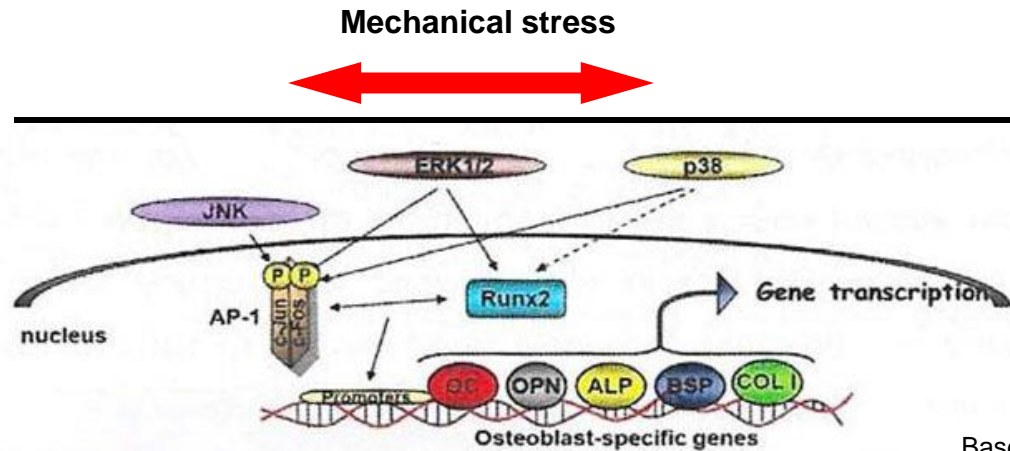


Συνεπώς συμβάλλουν σημαντικά στην οστική αναδιαμόρφωση, στη διατήρηση της ακεραιότητας καθώς και στην αναδόμηση του περιοδοντικού ιστού.

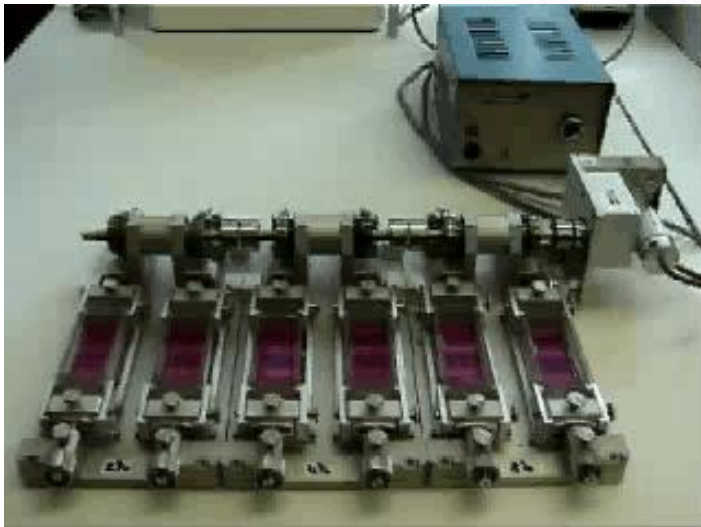


Η επίδραση του μηχανικού στρες στην διαφοροποίηση των ινοβλαστών του περιοδοντικού συνδέσμου

- Λόγω της θέσης του ο περιοδοντικός σύνδεσμος υπόκειται διαρκώς σε **μηχανική φόρτιση** (π.χ μάσηση αλλά και κατά τη διάρκεια της ορθοδοντικής θεραπείας)
- Οι **ινοβλάστες του περιοδοντικού συνδέσμου** παίζουν το ρόλο των αισθητήρων του ιστού στα μηχανικά ερεθίσματα



Basdra, J Orofac Orthop. 1997



Η συσκευή του κυκλικού (περιοδικού) μηχανικού στρες

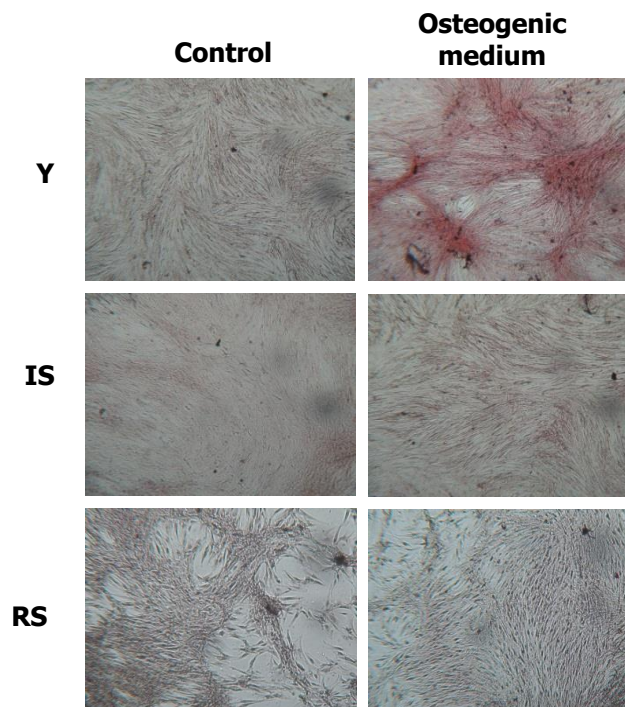
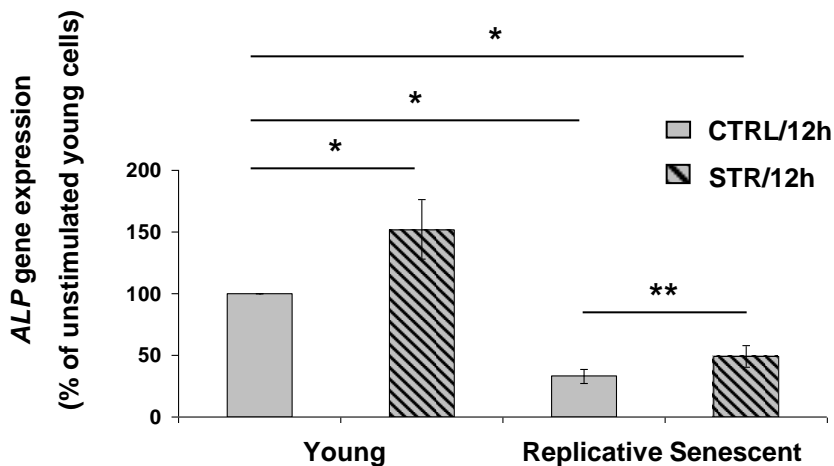
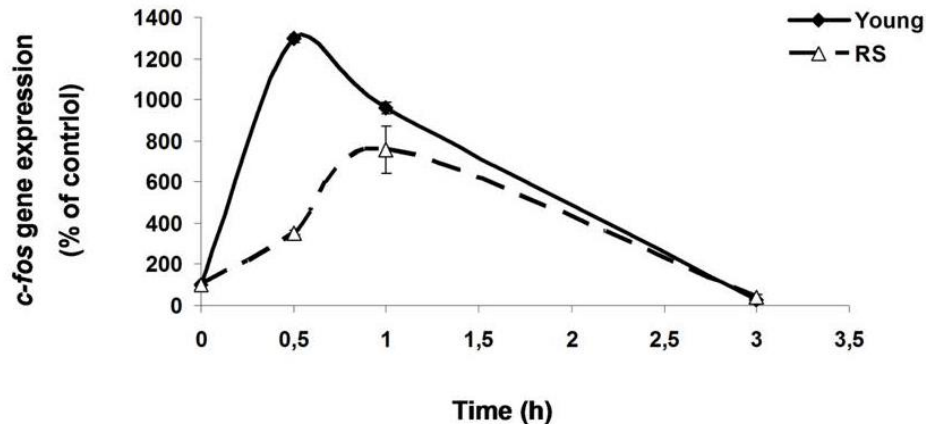
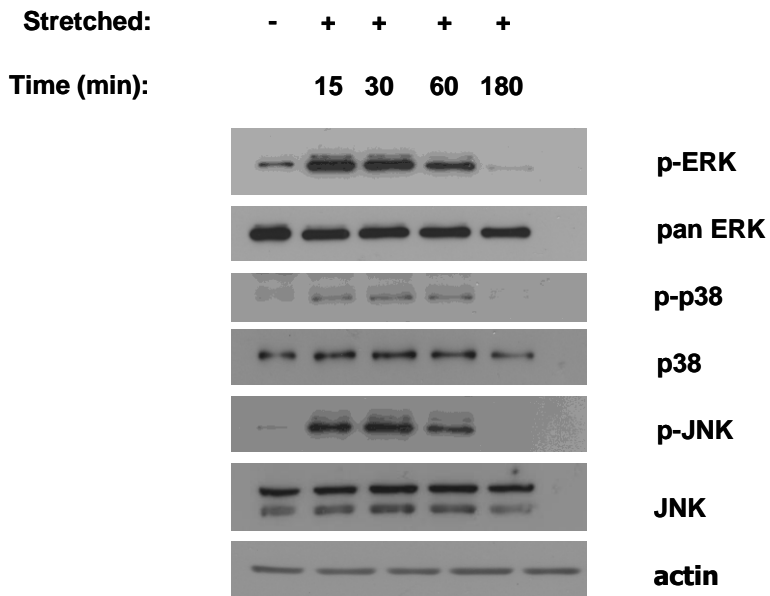
(Δυνάμεις που προσομοιάζουν με αυτές που δέχονται τα δόντια κατά τη διάρκεια της μάσησης και της επίδρασης ορθοδοντικών δυνάμεων)

ΣΥΝΘΗΚΕΣ:

- Τρυβλία σιλικόνης επιστρωμένα με φιμπρονεκτίνη (2ng/ml – επώαση x72h)
- Έκταση των κυττάρων 8% ,1Hz

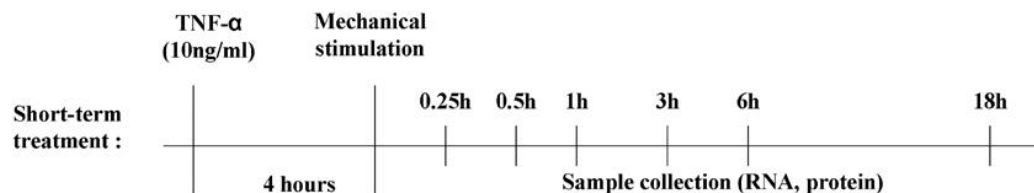
Η επίδραση του μηχανικού στρες στην διαφοροποίηση των ινοβλαστών του περιοδοντικού συνδέσμου

Ο ρόλος της κυτταρικής γήρανσης



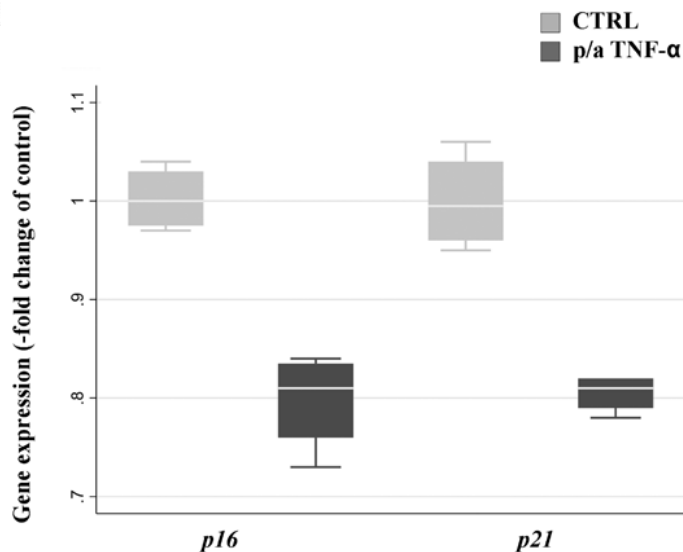
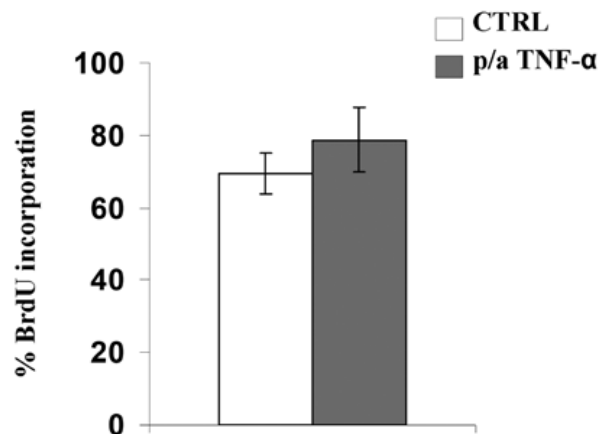
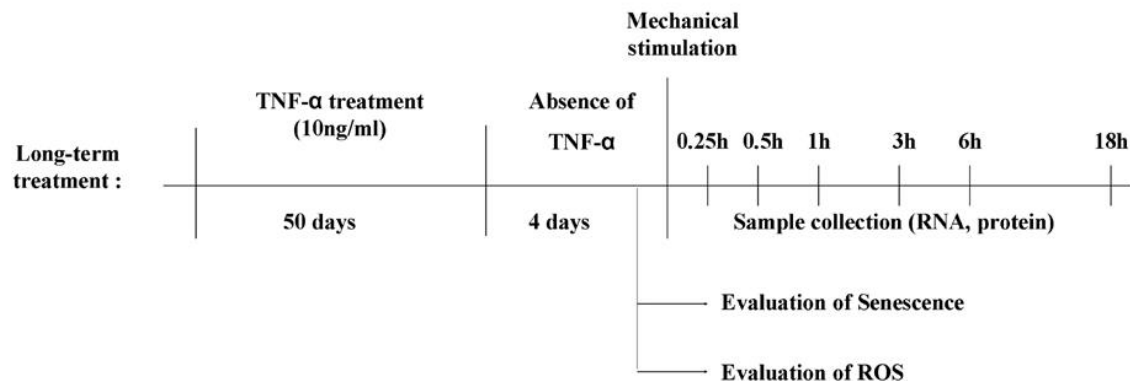
A.

▶ Επίδραση υπεργλυκαιμικών και φλεγμονωδών συνθηκών στην επαγωγή πρόωρης κυτταρικής γήρανσης των ινοβλαστών ΠΔΣ



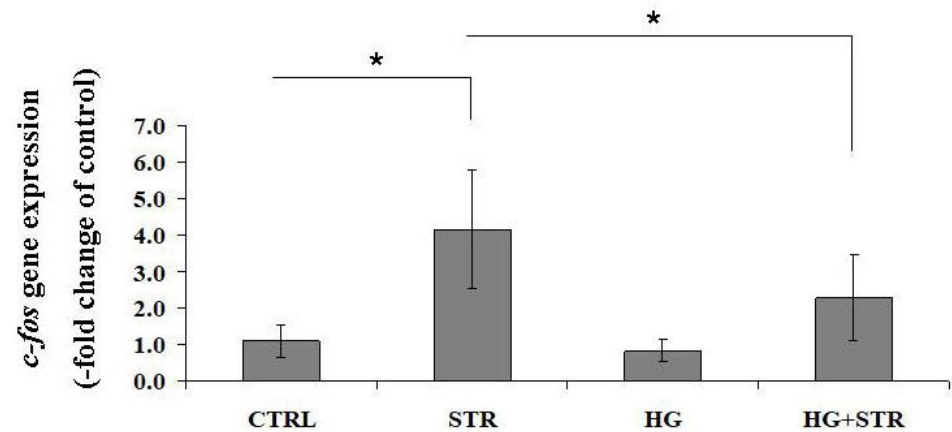
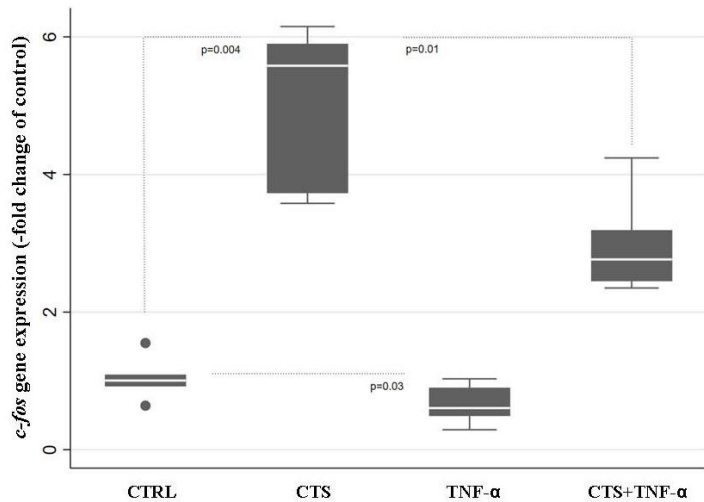
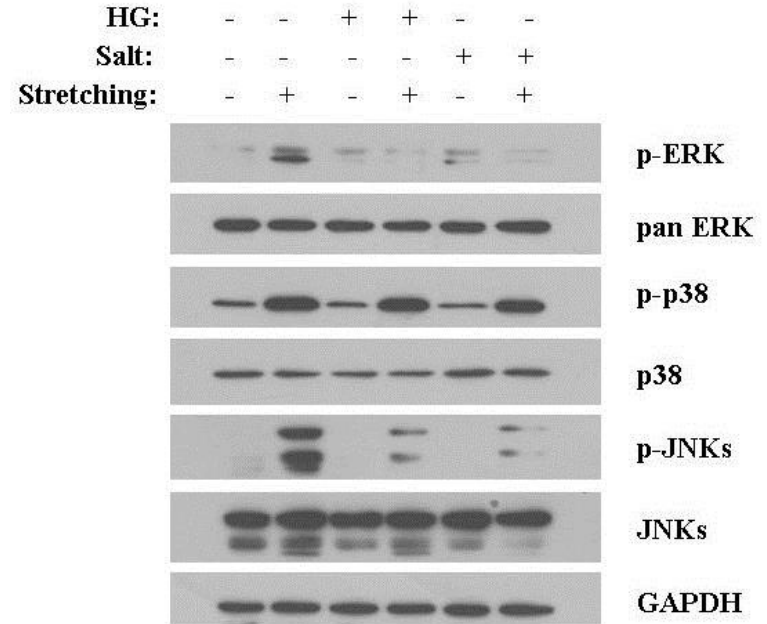
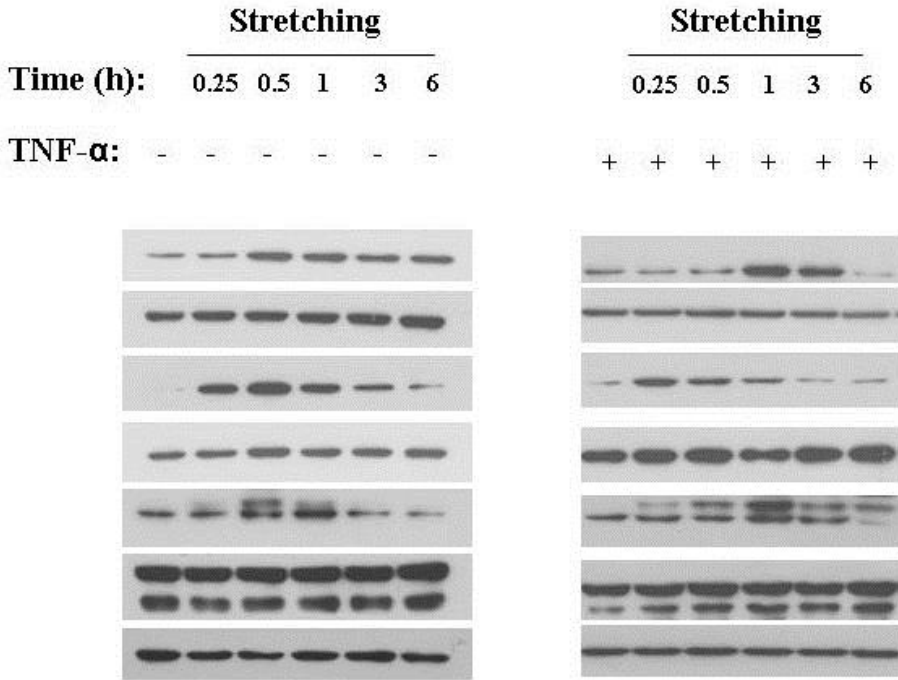
DMEM 10% (v/v) FBS / 5.5mM D-γλυκόζη
(Φυσιολογικές συνθήκες)

DMEM 10% (v/v) FBS / 30mM D-γλυκόζη
(Συνθήκες υπεργλυκαιμίας)



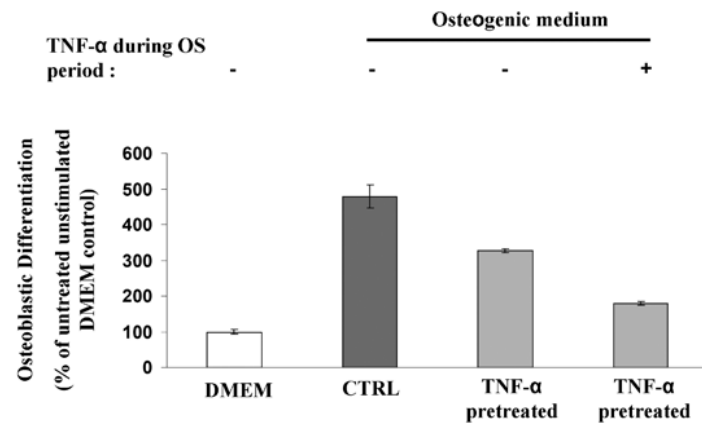
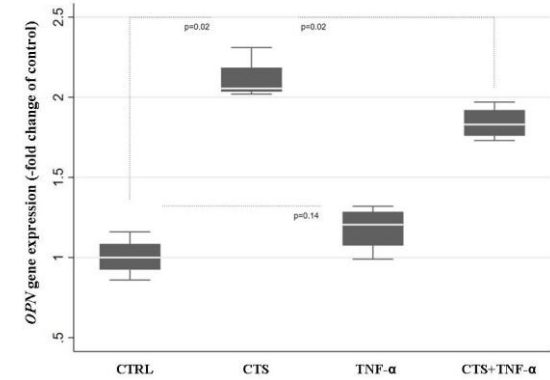
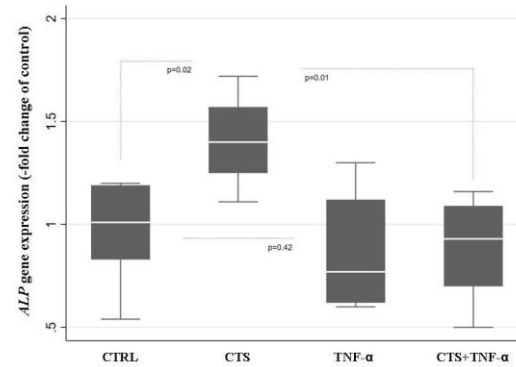
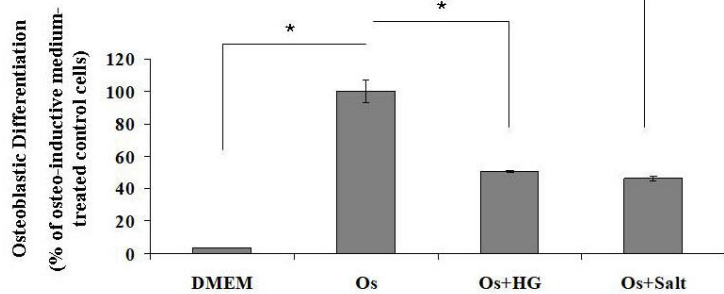
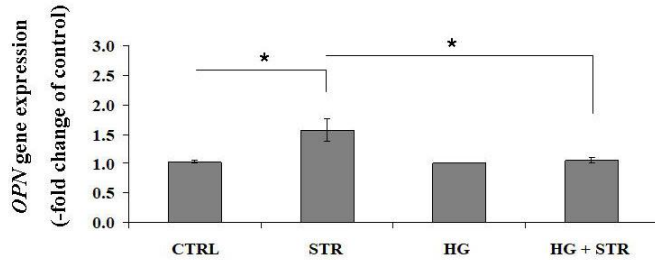
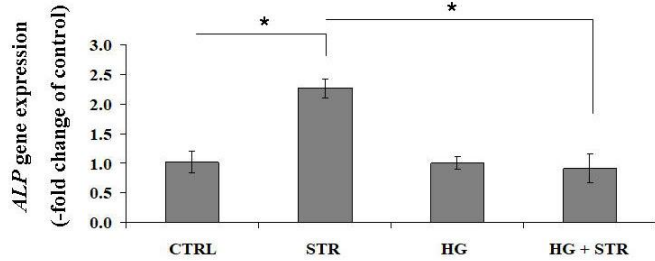
A.

▶ Επίδραση υπεργλυκαιμικών και φλεγμονωδών συνθηκών στην απόκριση των ινοβλαστών ΠΔΣ στο κυκλικό μηχανικό στρες



A.

► Επίδραση υπεργλυκαιμικών και φλεγμονωδών συνθηκών στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση των ινοβλαστών ΠΔΣ



Συμπεράσματα (Μέρος Α)

- Η κυτταρική γήρανση αναστέλλει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση των ινοβλαστών του ΠΔΣ
- Η έκθεση των ινοβλαστών του ΠΔΣ σε υπεργλυκαιμικές και φλεγμονώδεις συνθήκες επηρεάζει την ικανότητα απόκρισης τους στο κυκλικό μηχανικό στρες
- Η έκθεση των ινοβλαστών του ΠΔΣ σε υπεργλυκαιμικές και φλεγμονώδεις συνθήκες περιορίζει την ικανότητα τους για οστεοβλαστική διαφοροποίηση



European Journal of Orthodontics, 2019, 1–8
doi:10.1093/ejo/cjz051
Original article

OXFORD

Original article

Effect of hyperglycaemic conditions on the response of human periodontal ligament fibroblasts to mechanical stretching

Adamantia Papadopoulou^{1,*}, Alexia Todaro^{2,*}, Theodore Eliades^{2,®} and Dimitris Kletsas¹

¹Laboratory of Cell Proliferation & Ageing, Institute of Biosciences & Applications, National Centre for Scientific Research 'Demokritos', 15310 Athens, Greece, ²Clinic of Orthodontics and Paediatric Dentistry, University of Zurich, 8032 Zurich, Switzerland

Correspondence to: Dimitris Kletsas, Laboratory of Cell Proliferation & Ageing, Institute of Biosciences & Applications, National Centre for Scientific Research 'Demokritos', P. Grigoriou Str, Ag. Paraskevi, 15310 Athens, Greece. E-mail: dkletsas@bio.demokritos.gr

*The first two authors contributed equally to this paper.



European Journal of Orthodontics, 2020, 1–11
doi:10.1093/ejo/cjaa042
Original article

OXFORD

Original article

Short- and long-term treatment with TNF- α inhibits the induction of osteoblastic differentiation in cyclic tensile-stretched periodontal ligament fibroblasts

Adamantia Papadopoulou^{1,*}, Aurelie Cantele^{2,*}, Despina Koletsis², Theodore Eliades² and Dimitris Kletsas¹

¹Laboratory of Cell Proliferation and Ageing, Institute of Biosciences and Applications, National Centre for Scientific Research 'Demokritos', P. Grigoriou Str, Ag. Paraskevi, 153 10 Athens, Greece

²Clinic of Orthodontics and Paediatric Dentistry, University of Zurich, 11 Plattenstrasse Str, 8032, Switzerland

*These authors contributed equally to this work.

B.

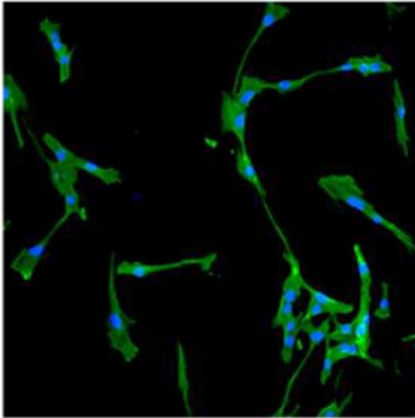
Μελέτη της σχέσης μορφής-λειτουργίας στους γηρασμένους ινοβλάστες

Μορφολογικές αλλαγές των γηρασμένων ινοβλαστών

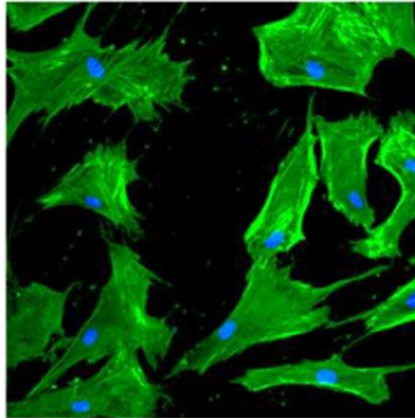
- Απώλεια ατρακτοειδούς σχήματος
- Ακανόνιστο, αυξημένο και πεπλατυσμένο σχήμα

In vitro

Young fibroblasts



Senescent fibroblasts



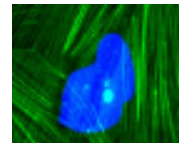
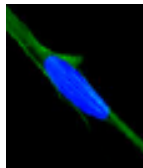
Γηρασμένοι ινοβλάστες *in vivo*

Liakou E., et.al. (2016). Aging

Πυρήνας

- Απώλεια στρογγυλού ή ωοειδούς σχήματος
- Αύξηση μεγέθους, ακανόνιστο σχήμα, εμφάνιση λοβών
- Ακανόνιστο σχήμα πυρηνικού φακέλου
- Αλλαγές χρωματίνης λόγω έλλειψης λαμίνης B1

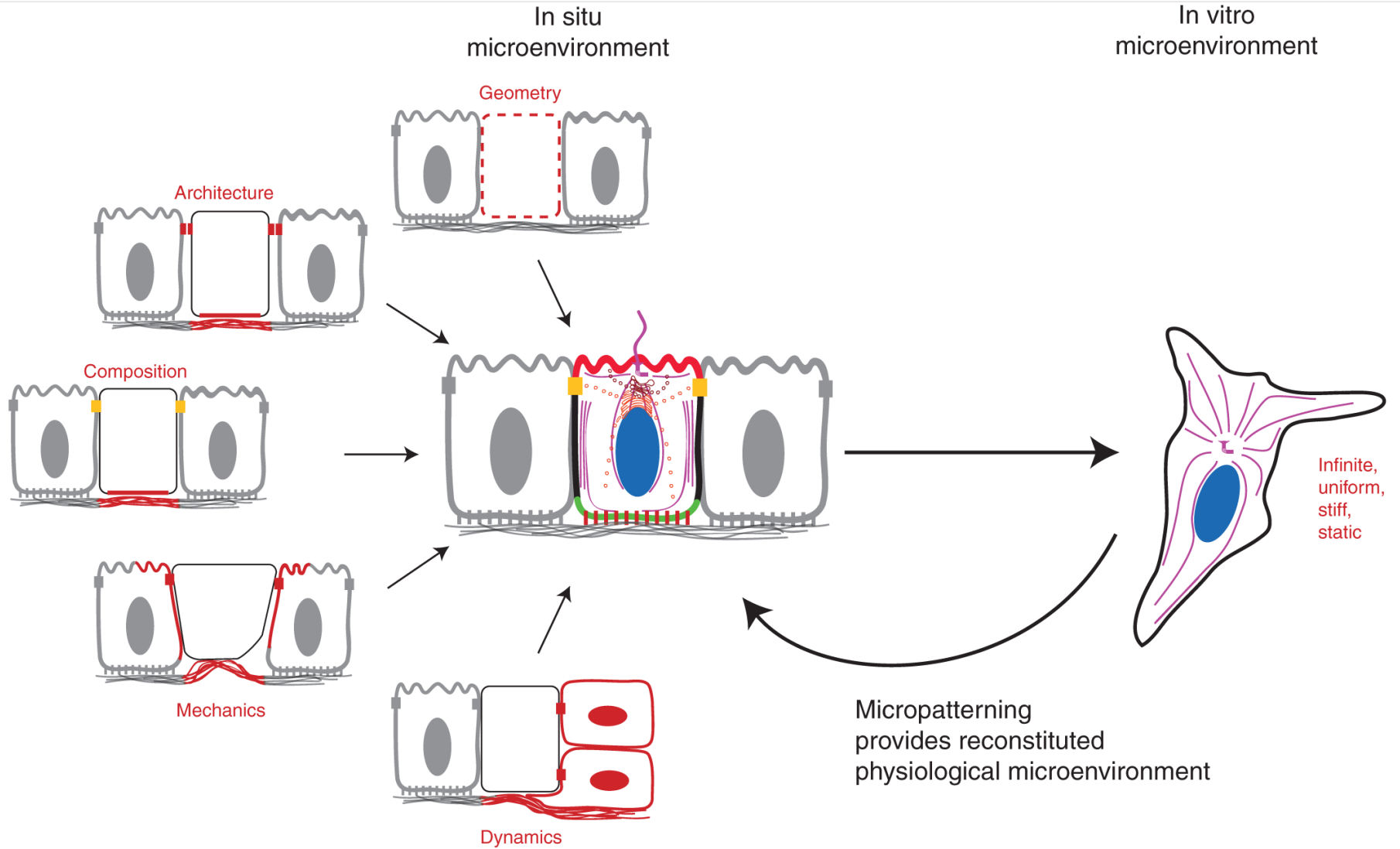
Νεαρός ινοβλάστης



Γηρασμένος ινοβλάστης

B.

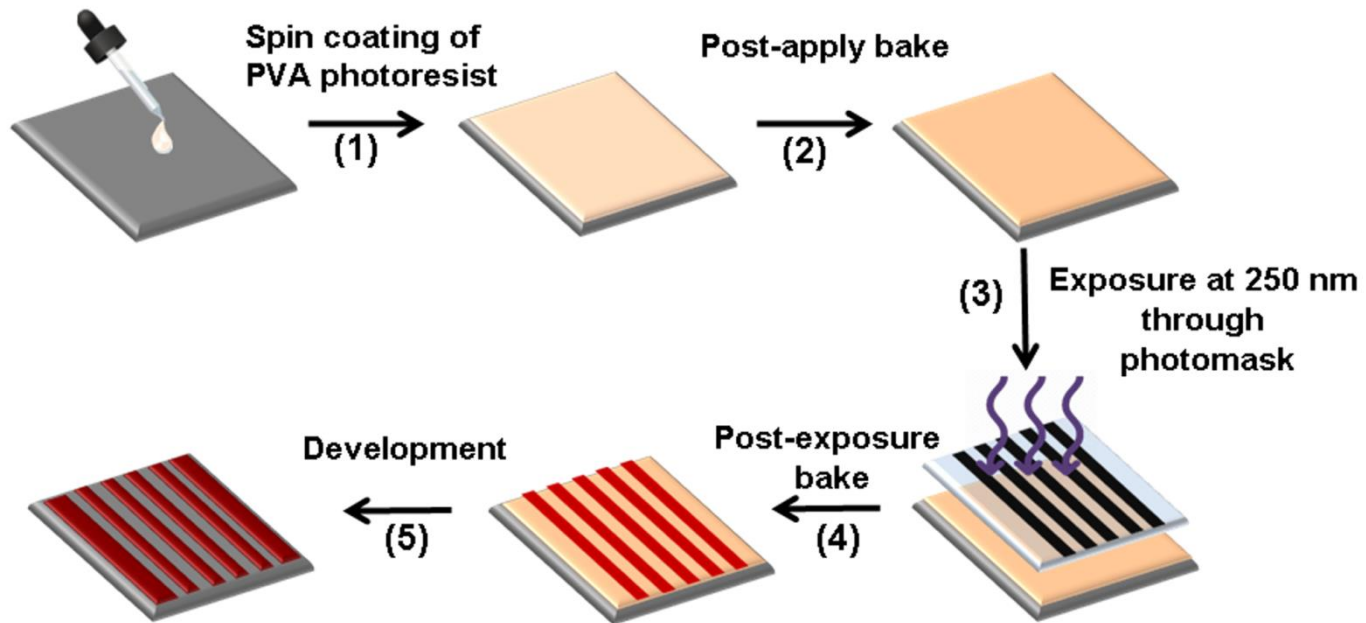
Μελέτη της σχέσης μορφής-λειτουργίας στους γηρασμένους ινοβλάστες



ΣΚΟΠΟΣ

Έχοντας υπόψη τη σχέση μεταξύ του σχήματος του κυττάρου και της λειτουργίας του, θελήσαμε να μελετήσουμε εάν η αλλαγή της μορφολογίας των γηρασμένων ινοβλαστών είναι υπεύθυνη για τις λειτουργικές τους αλλαγές

Κατασκευή μικροσηματοποιημένων επιφανειών με εναλλασσόμενες γραμμές πυριτίου/πολυβινυλικής αλκοόλης (Si/PVA επιφάνειες ή Li-επιφάνειες) πλάτους 22.5 μm με τη μέθοδο της φωτολιθογραφίας



Li-επιφάνεια

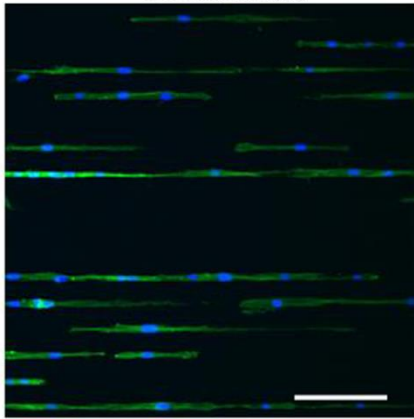
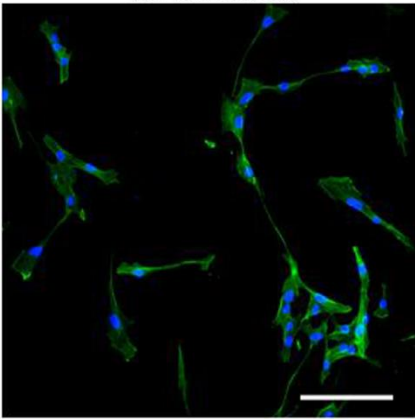
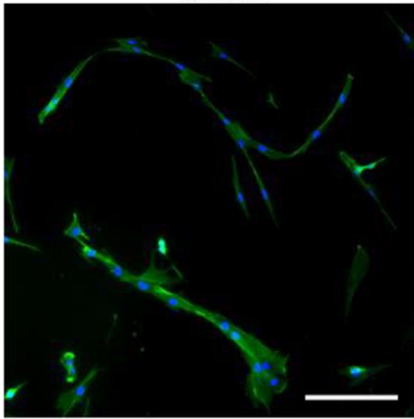
B.

Glass

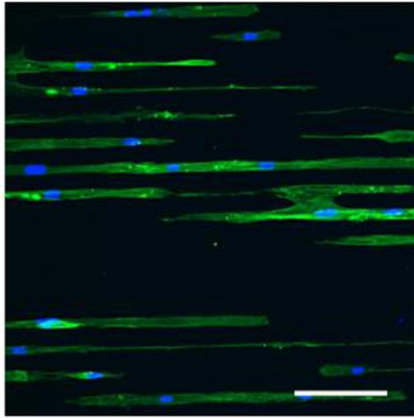
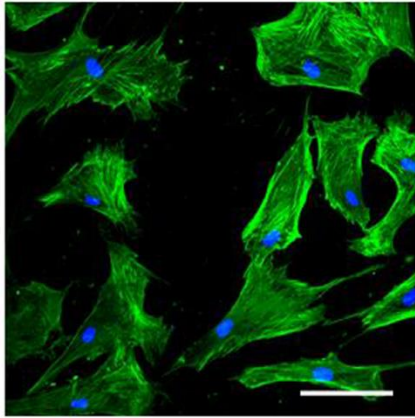
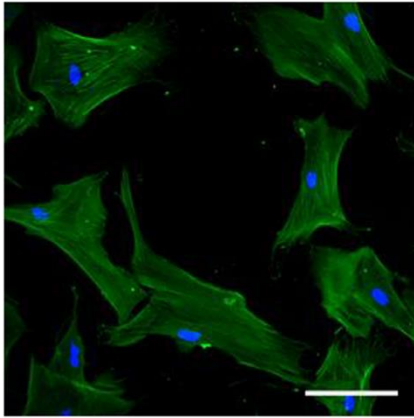
Si surface

Li surface

Young



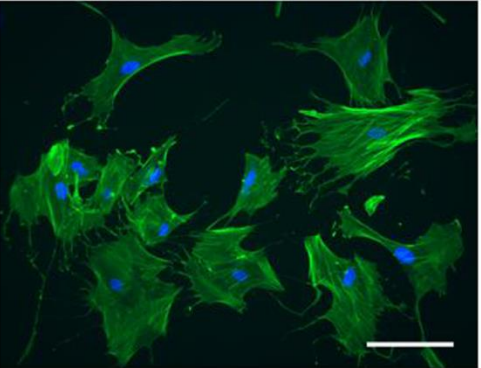
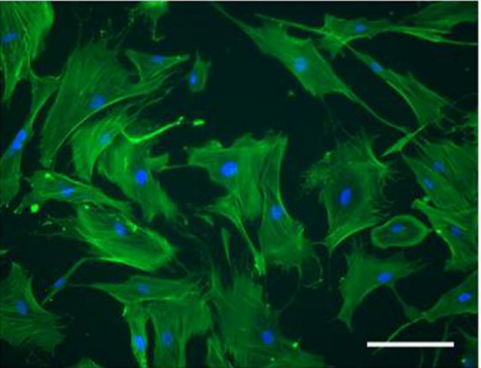
Senescent



Η ανάπτυξη των γηρασμένων ινοβλαστών επάνω στις Li-επιφάνειες επάγει την ευθυγράμμιση των κυττάρων και την αποκατάσταση της νεαρής μορφολογίας

Senescent cells on Glass

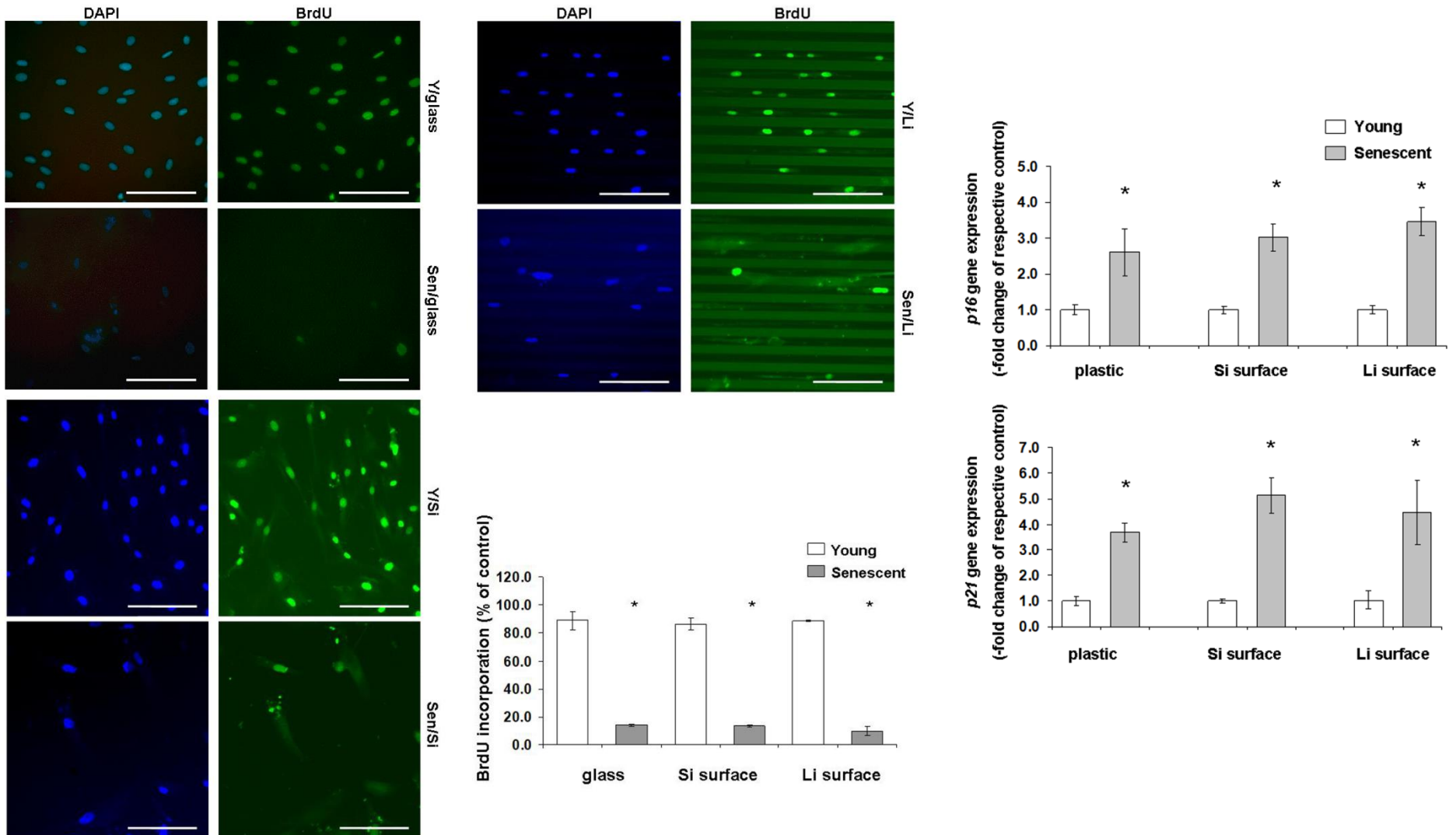
Li surface-grown Senescent cells replated on Glass



Η αποκατάσταση της νεαρής μορφολογίας στους γηρασμένους ινοβλάστες που αναπτύχθηκαν στις Li-επιφάνειες δεν είναι μόνιμη

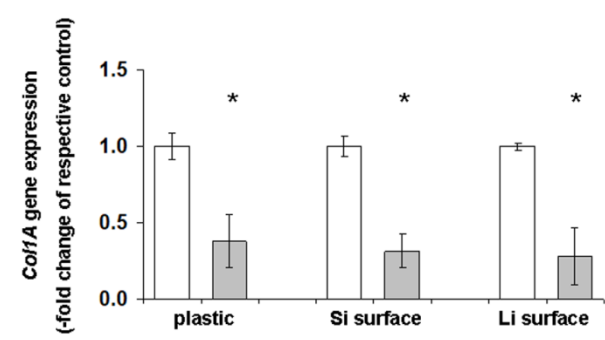
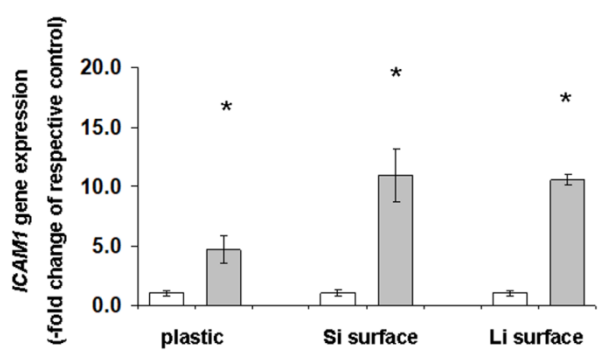
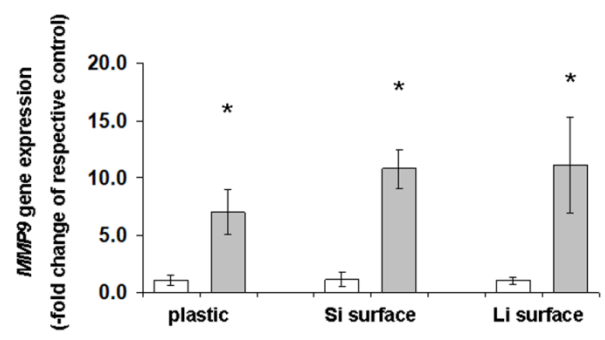
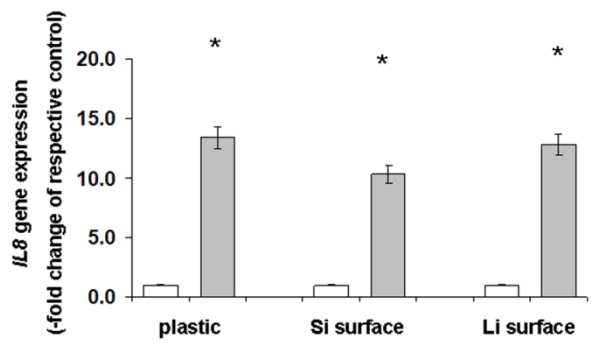
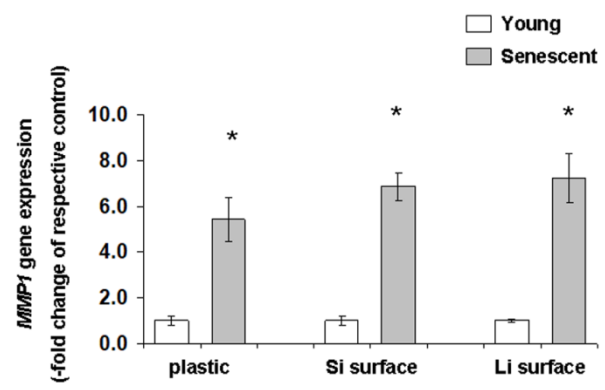
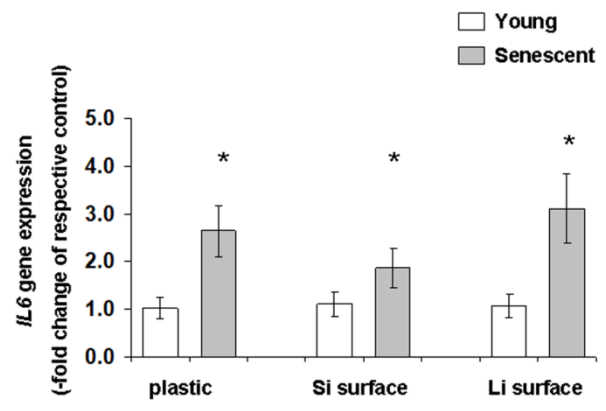
B.

Οι γηρασμένοι ινοβλάστες που αναπτύσσονται επάνω στις Li-επιφάνειες διατηρούν το μειωμένο πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό



B.

Η ανάπτυξη των γηρασμένων ινοβλαστών επάνω στις Li-επιφάνειες δεν αναιρεί τον προφλεγμονώδη/καταβολικό τους φαινότυπο



Συμπέρασμα (Μέρος Β)


Ο φλεγμονώδης/καταβολικός φαινότυπος των γηρασμένων ινοβλαστών δεν οφείλεται στην αλλαγή της μορφής τους

Biogerontology (2020) 21:695–708
<https://doi.org/10.1007/s10522-020-09886-8>



RESEARCH ARTICLE

Reacquisition of a spindle cell shape does not lead to the restoration of a youthful state in senescent human skin fibroblasts

Adamantia Papadopoulou · Anastasia Kanioura · Panagiota S. Petrou ·
Panagiotis Argitis · Sotirios E. Kakabakos · Dimitris Kletsas 

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (SANITURA)» (MIS 5002514) που εντάσσεται στη Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



Co-financed by Greece and the European Union



Co-financed by Greece and the European Union

SANITURA (ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ): έργο ΕΣΠΑ (MIS 5002514) για την ενίσχυση των ερευνητικών δραστηριοτήτων του ΙΒΕ - ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΑΡΑΔΟΤΕΩΝ

- ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ 2.1** Κατανόηση μηχανισμών κυτταρικής γήρανσης και του ρόλου της σε ηλικιοεξαρτώμενες παθήσεις
- ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ 2.8** Κατανόηση μοριακών μηχανισμών δράσης αυξητικών παραγόντων

Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης

The role of the stroma in cancer development

- **Cancer** is one of the major causes of morbidity and mortality worldwide
- **Breast cancer** is generally regarded as the most common malignancy and the second leading cause of cancer-related deaths in women around the world
- For many years **carcinogenesis and tumor expansion** were **solely** attributed to the genetic and molecular alterations obtained by **neoplastic cells**
- The **stroma** constitutes a high fraction of the solid tumor's volume

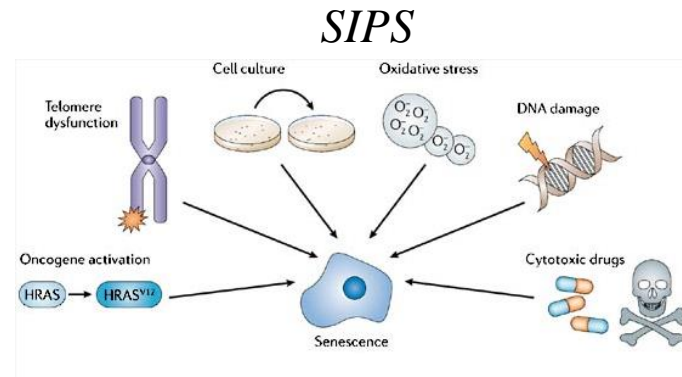
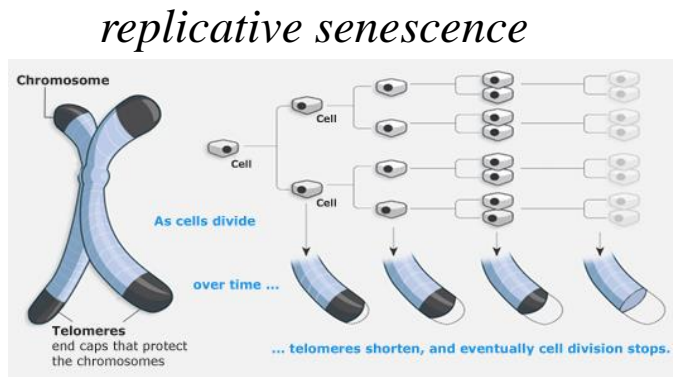
[ECM
	stromal cells
- **Fibroblasts** represent the most important stromal cell type

[ECM components
	ECM-degrading enzymes
	growth factors/chemokines
- **Ionizing radiation**, which is commonly used to treat breast cancer, **inevitably affects stromal cells** located within or around tumors and it can render them **senescent**



Cellular senescence

- **Cellular senescence** is a state of an **irreversible cell cycle arrest**
- There are **two kinds of cellular senescence** {
 - replicative senescence**
 - stress-induced premature senescence (SIPS)**

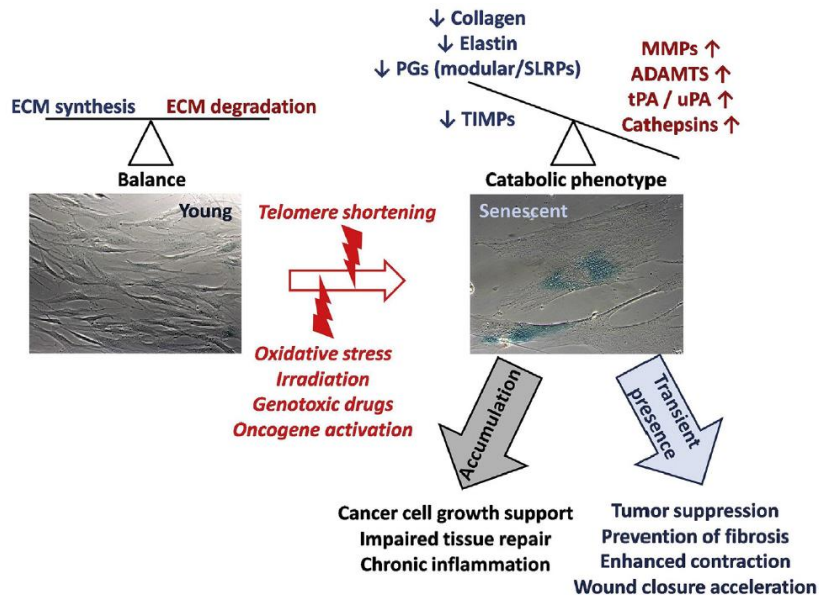


Collado and Serrano, Nat Rev Cancer. 2006 Jun;6(6):472-6

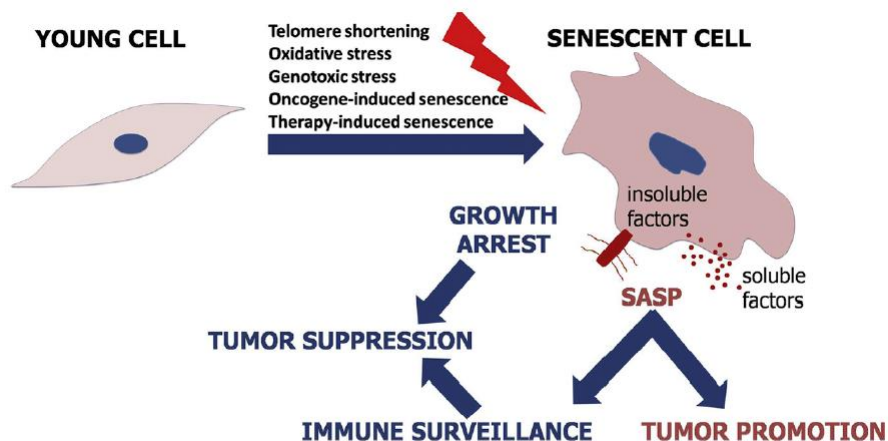
- DNA damage response (DDR) is a central motif in replicative senescence and SIPS
- Cellular senescence represents a powerful anticancer mechanism
- All senescent cells are characterized by {
 - inability to proliferate**
 - distinct morphological traits**
 - a catabolic/pro-inflammatory phenotype (SASP)**

The role of cellular senescence in tissue remodeling and in the development of age-related diseases and especially cancer

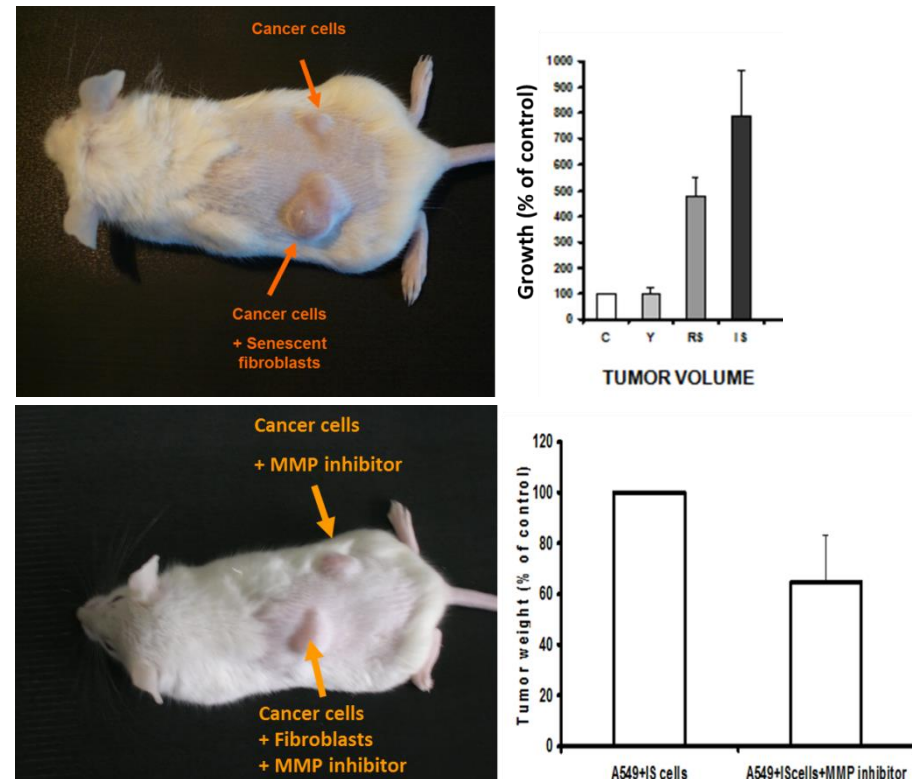
- The tumor microenvironment has emerged as a key participant in cancer progression *via* the modified synthesis and deposition of several ECM constituents and *via* its complex interactions with malignant cells



Mavrogonatou et al., *Matrix Biol.* 2019 Jan;75-76:27-42



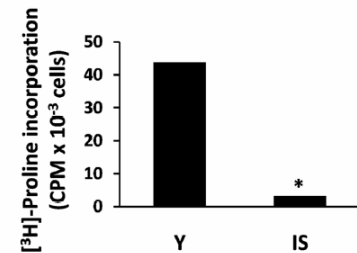
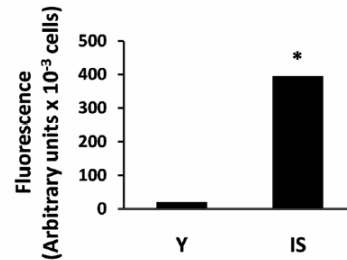
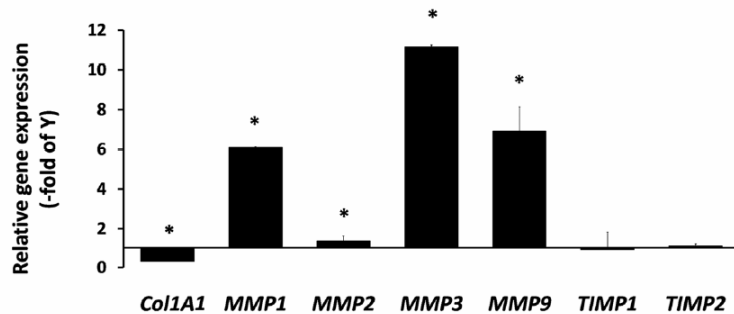
Mavrogonatou et al., *Semin Cancer Biol.* 2020 May;62:182-191



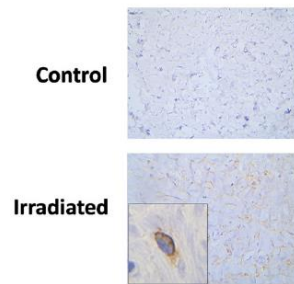
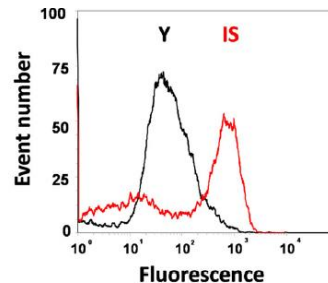
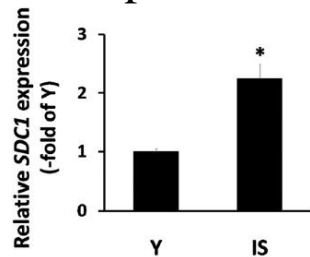
Papadopoulou and Kletras, *Int J Oncol.* 2011 Oct;39(4):989-99

Ionizing radiation-induced senescence of breast stromal fibroblasts contributes to the creation of a tumor-promoting microenvironment

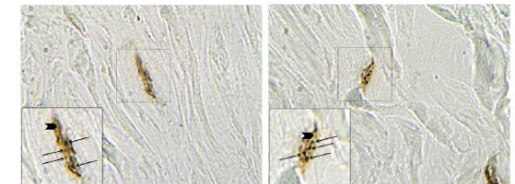
- **Ionizing radiation** results in the accumulation of **prematurely senescent breast stromal fibroblasts** both *in vitro* and *in vivo*
- Ionizing radiation-induced senescent breast stromal fibroblasts are characterized by an **enhanced expression and enzymatic activity of MMPs** in parallel to the **down-regulation** and decreased biosynthesis of **type I collagen**



- This catabolic phenotype is complemented by the **overexpression** of the cell surface heparan sulfate proteoglycan **syndecan-1**, a poor prognostic factor for breast cancer development

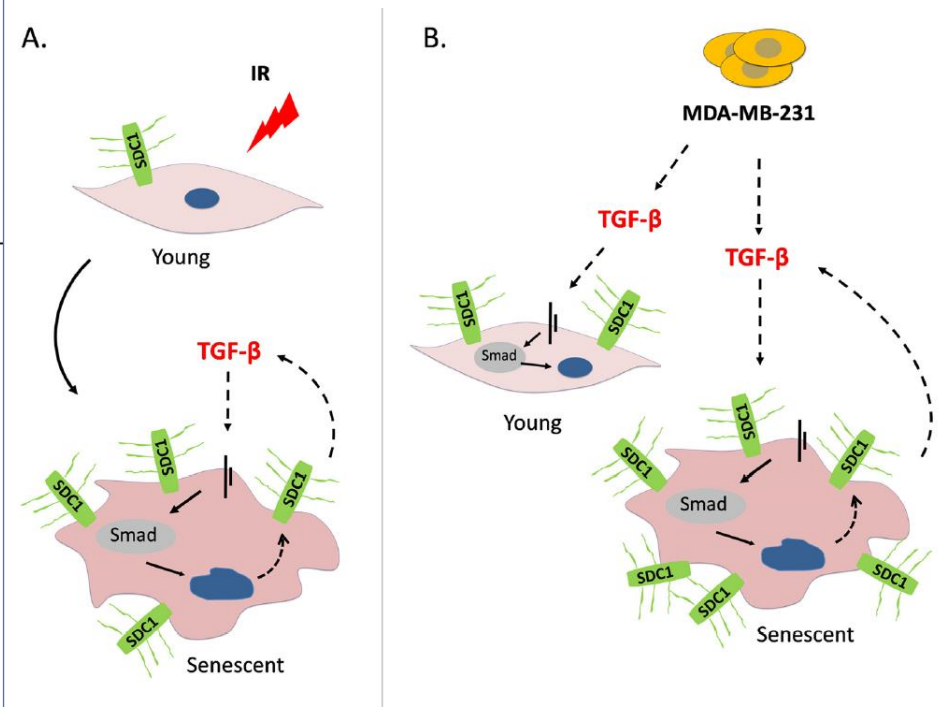
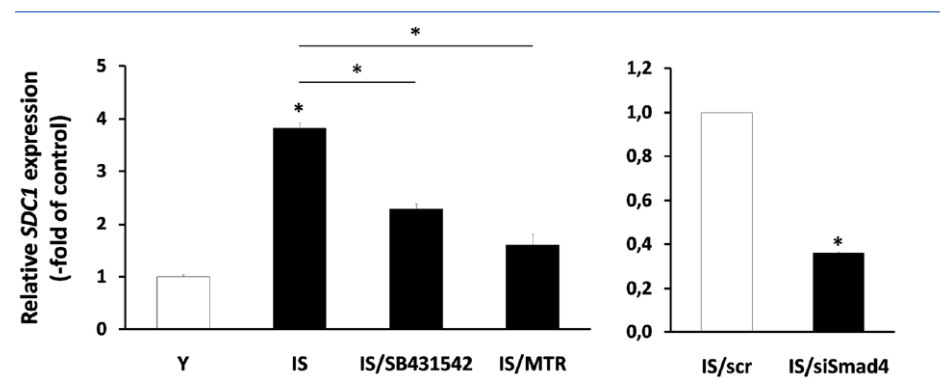
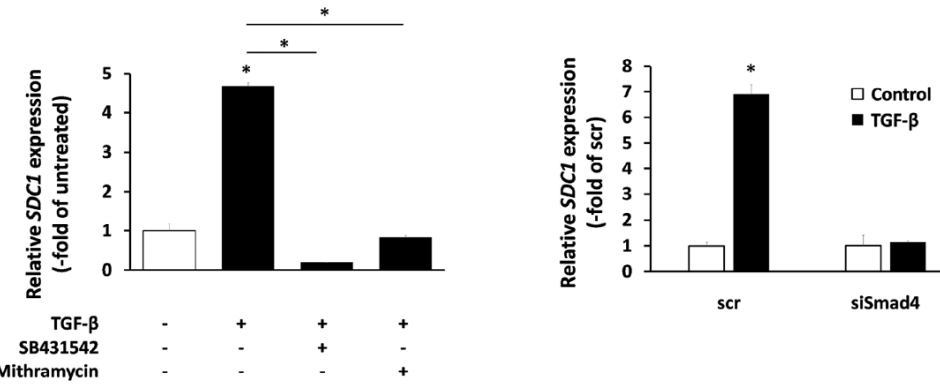
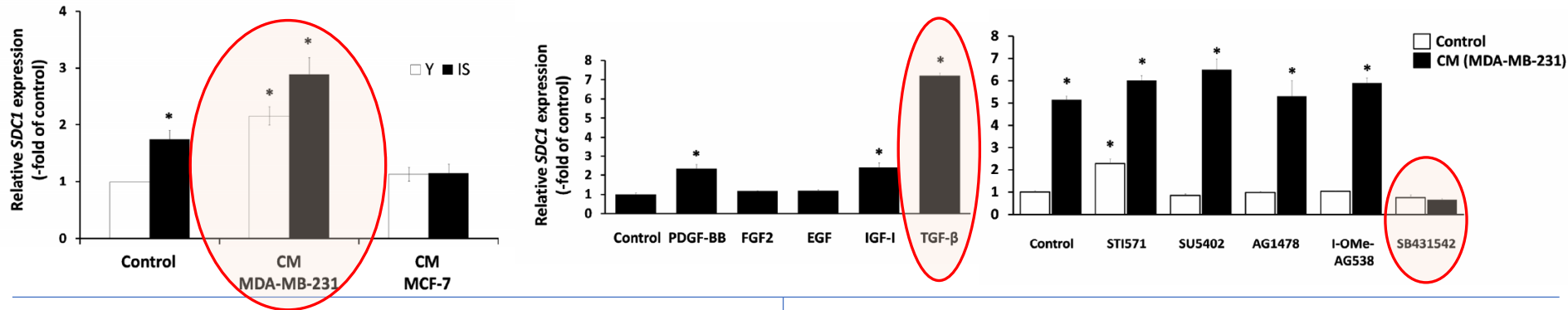


SDC1



SDC1/SBB

Overexpression of syndecan-1 is regulated by TGF- β through the Smad pathway and the transcription factor Sp1



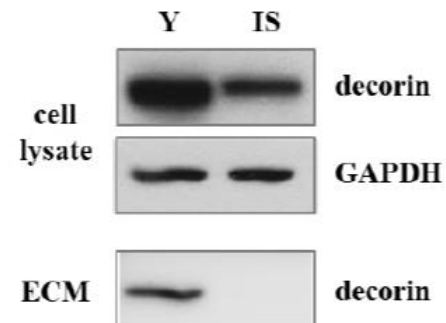
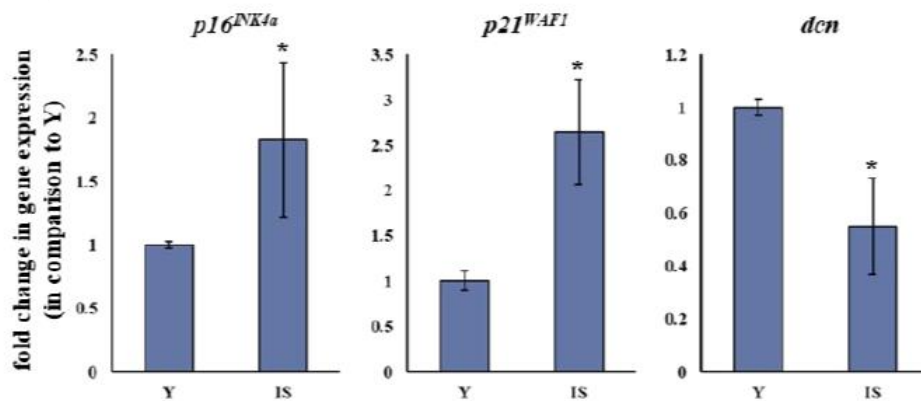
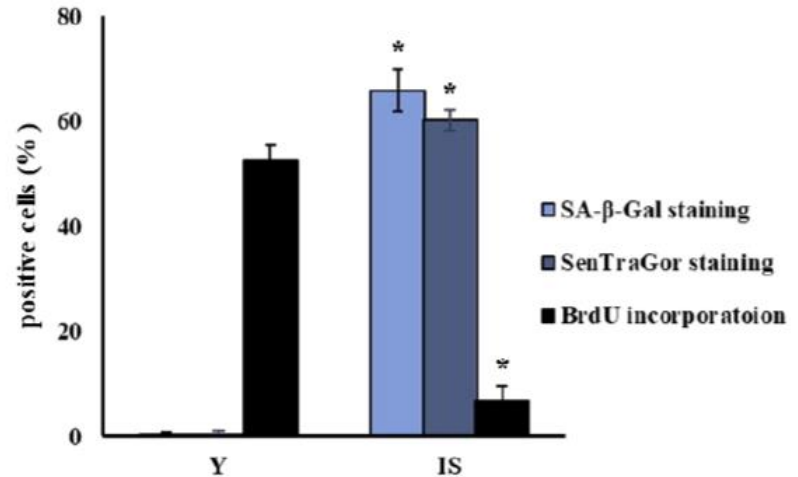
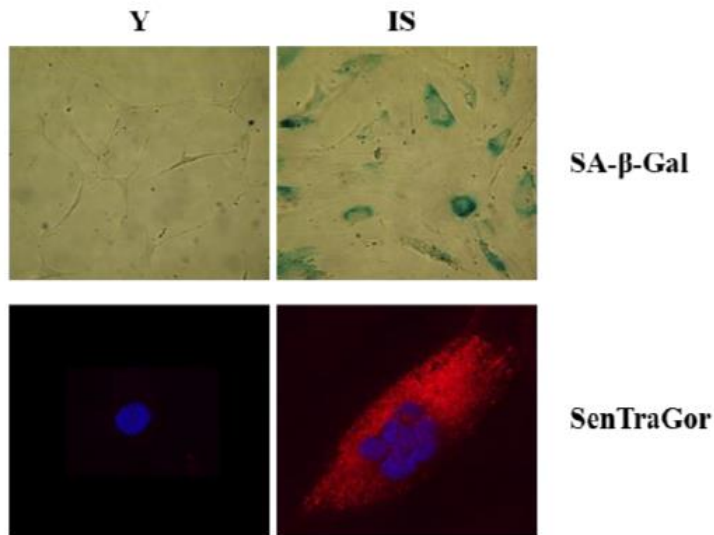
The small leucine-rich proteoglycan (SLRP) decorin has an antitumorigenic effect when overexpressed in the stroma

- **Decorin** is the archetypical and most extensively studied representative of the 18-member SLRP family
- Decorin is a stromal proteoglycan primarily synthesized by fibroblasts, vascular endothelial cells and smooth muscle cells and has **numerous binding partners**, including **ECM components** (i.e. collagens) and **growth factors** (i.e. VEGF, TGF- β , PDGF, FGF, IGF, CTGF and HGF)
- Decorin directly engages and **down-regulates** multiple **receptor tyrosine kinases** often overexpressed in cancer cells
- Decorin initiates **endothelial cell autophagy** and induces **tumor cell mitophagy**
- Overall, **decorin constitutes a potent antitumorigenic signal** by suppressing tumor cell proliferation, migration, invasion, metastasis and angiogenesis

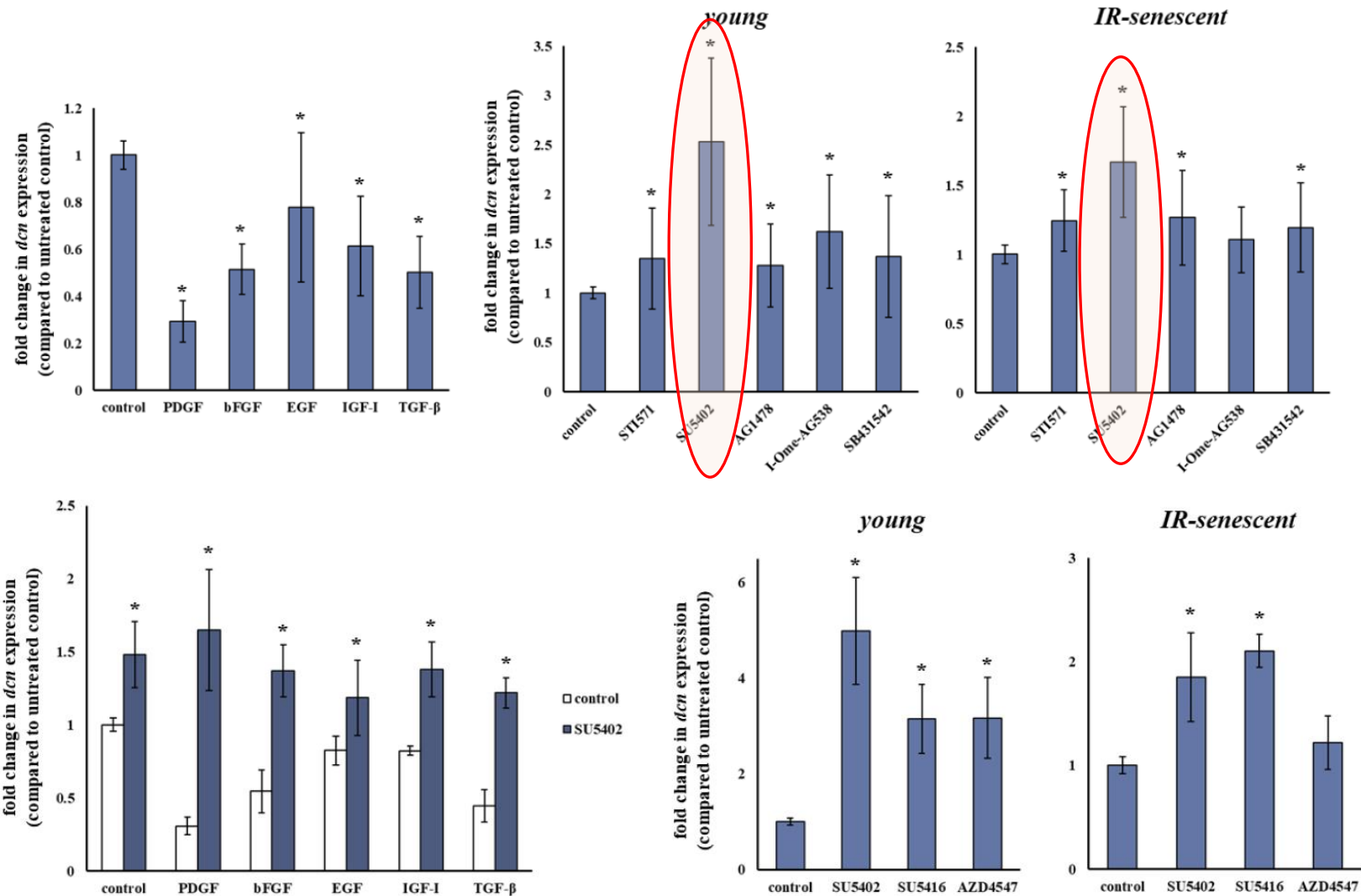


high stromal decorin expression is a significant predictive marker of **higher survival rates** and the **good prognosis** in patients with breast cancer

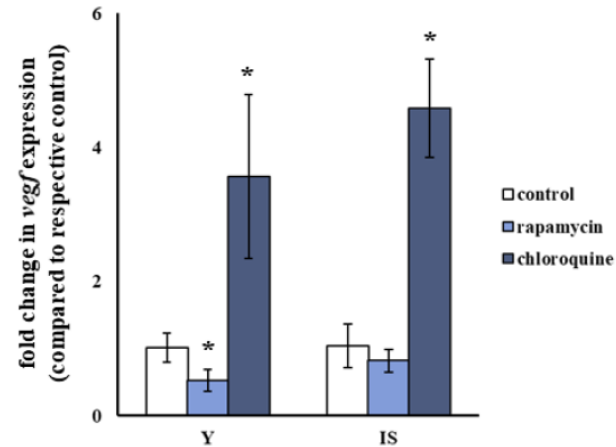
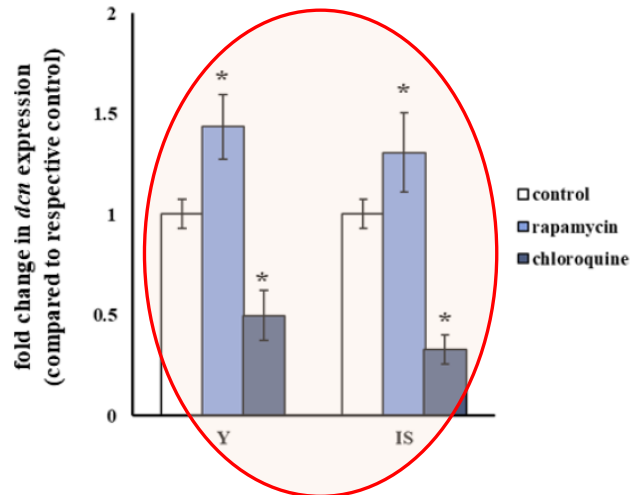
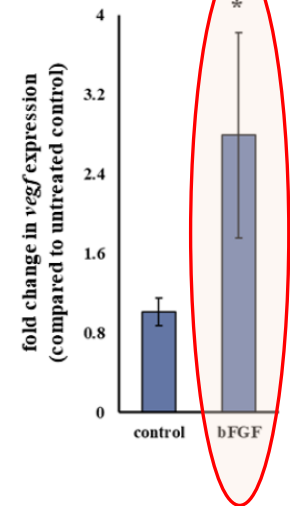
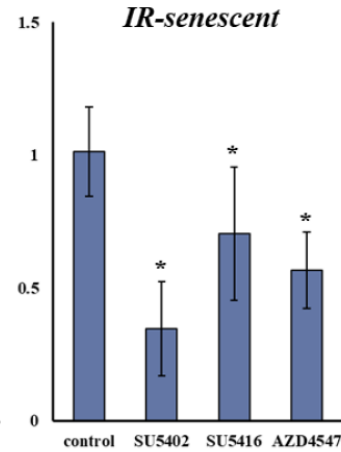
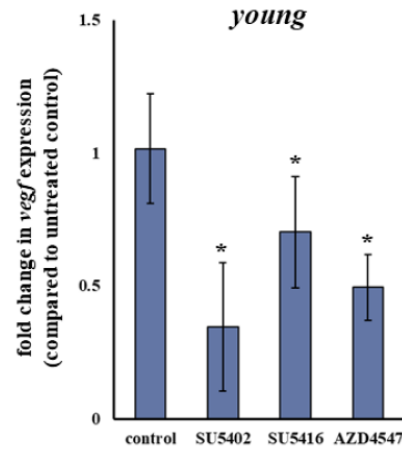
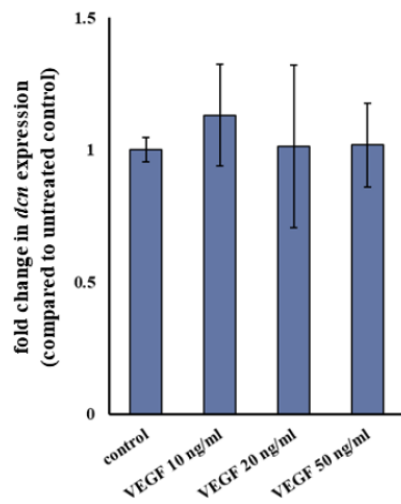
Ionizing radiation leads to the premature senescence of human breast stromal fibroblasts, characterized by the down-regulation of decorin



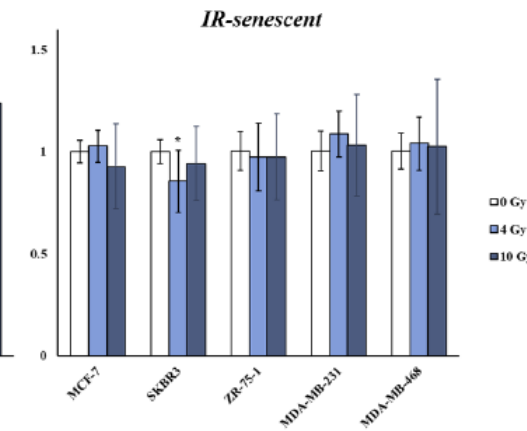
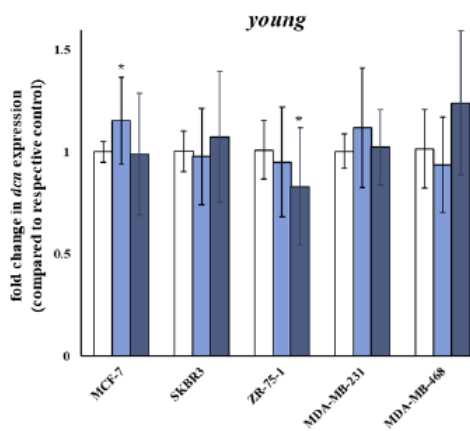
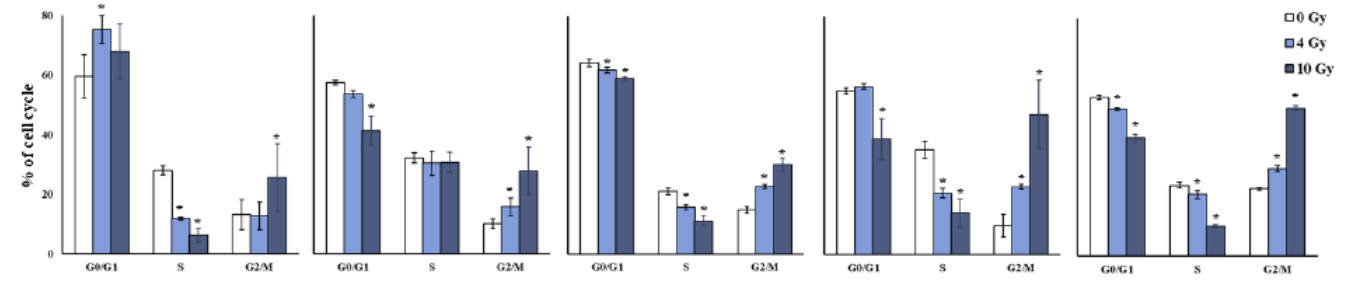
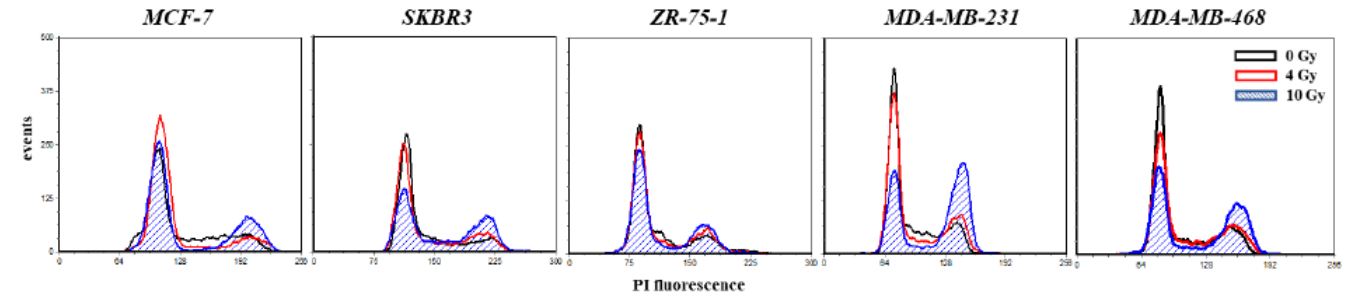
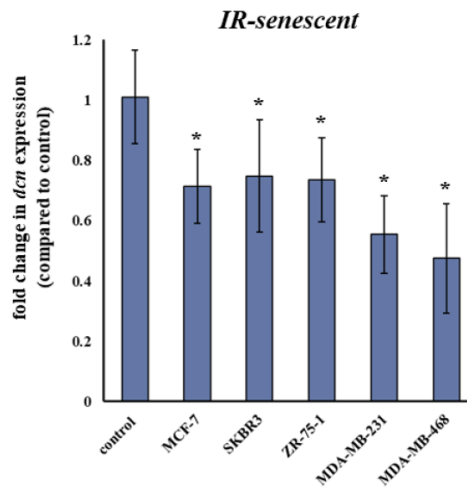
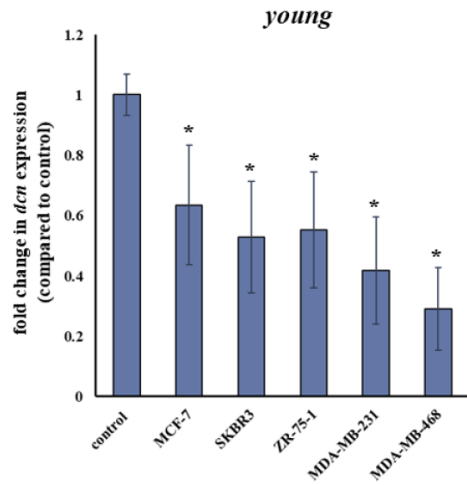
Decorin expression is decreased in human breast stromal fibroblasts as a response to exogenous growth factors, mainly bFGF and VEGF



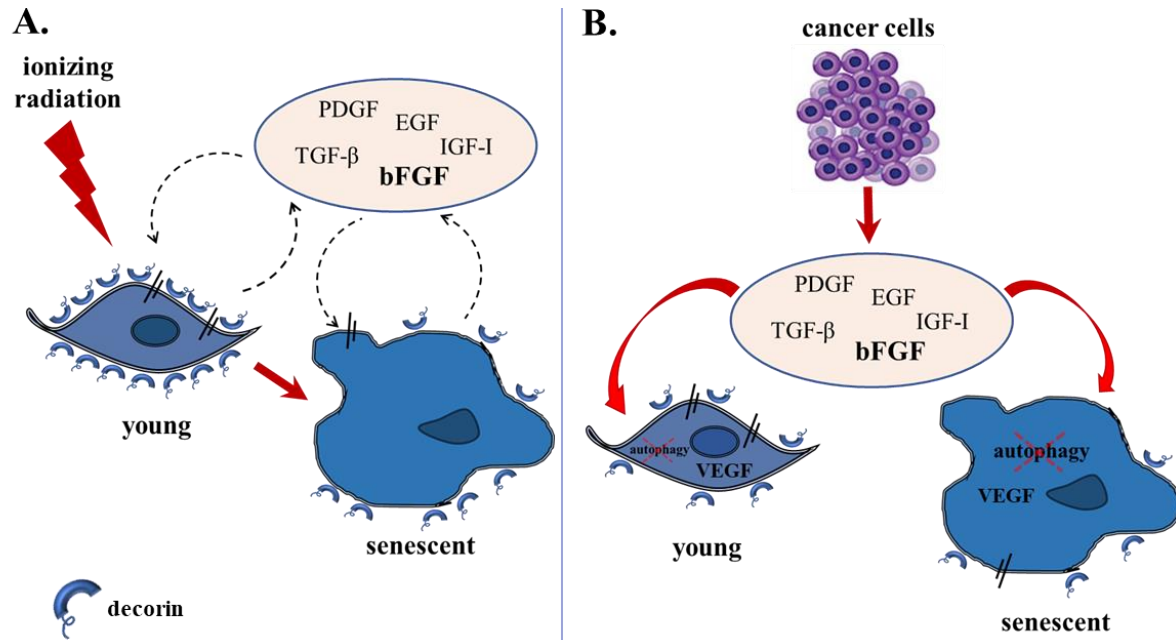
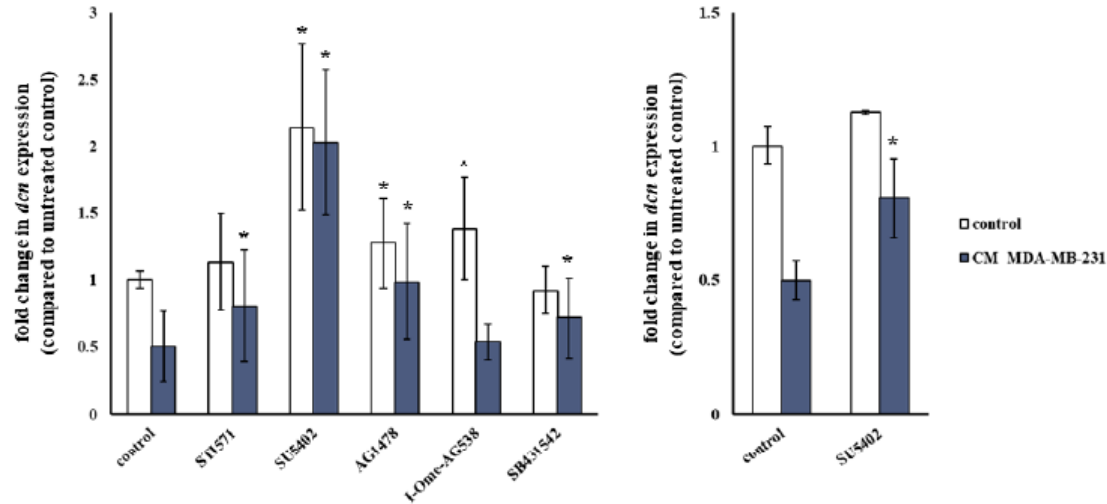
Decorin expression in human breast stromal fibroblasts is regulated by VEGF in an intracrine manner and is autophagy-induced



Human breast cancer cells decrease decorin expression in human stromal fibroblasts *via* a paracrine effect



bFGF and VEGF inhibition abrogates decorin down-regulation mediated in human breast stromal fibroblasts by the paracrine action of MDA-MB-231 cells





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cancer Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcancer

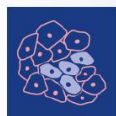


Review

The role of senescence in cancer development

Eleni Mavrogonatou, Harris Pratsinis, Dimitris Kletsas*

Laboratory of Cell Proliferation and Ageing, Institute of Biosciences and Applications, National Centre for Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece



cancers

an Open Access Journal by MDPI

Down-Regulation of the Proteoglycan Decorin Fills in the Tumor-Promoting Phenotype of Ionizing Radiation-Induced Senescent Human Breast Stromal Fibroblasts

Eleni Mavrogonatou; Adamantia Papadopoulou; Asimina Fotopoulou; Stathis Tsimelis; Heba Bassiony; Andreas M. Yiacooumettis; Petros N. Panagiotou; Harris Pratsinis; Dimitris Kletsas

Cancers 2021, Volume 13, Issue 8, 1987



We acknowledge support by the project "Target Identification and Development of Novel Approaches for Health and Environmental Applications" (MIS 5002514) which is implemented under the Action for the Strategic Development on the Research and Technological Sectors, funded by the Operational Programme "Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation" (NSRF 2014-2020) and co-financed by Greece and the European Union (European Regional Development Fund)



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

EPANEK 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη
Partnership Agreement
2014 - 2020

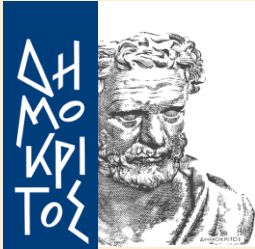
Co-financed by Greece and the European Union

SANITURA (TARGET IDENTIFICATION AND DEVELOPMENT OF NOVEL APPROACHES FOR HEALTH AND ENVIRONMENTAL APPLICATIONS)



Co-financed by Greece and the European Union

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ/ΠΑΘΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΧΩΡΟΥ



ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΗΣ»

Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών

Ο ρόλος των λιποπρωτεϊνών στη δυσλιπιδαιμία, αθηροσκλήρωση και νόσο Alzheimer

Αγγελική Χρόνη
Διευθύντρια Ερευνών

Παρουσιάσεις Παραδοτέων της Πράξης

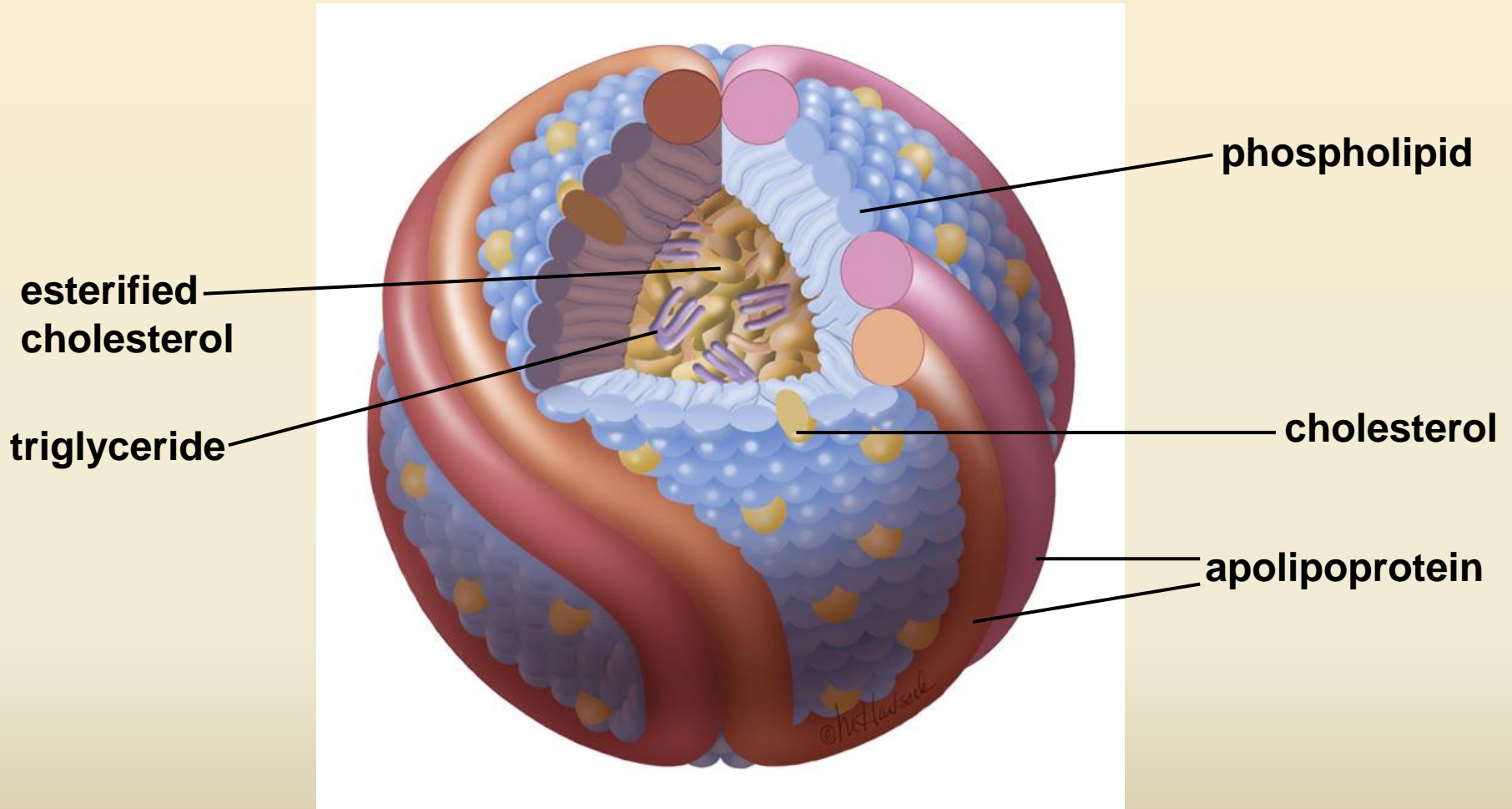
«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (SANITURA)» (MIS 5002514)



Co-financed by Greece and the European Union

LIPOPROTEINS

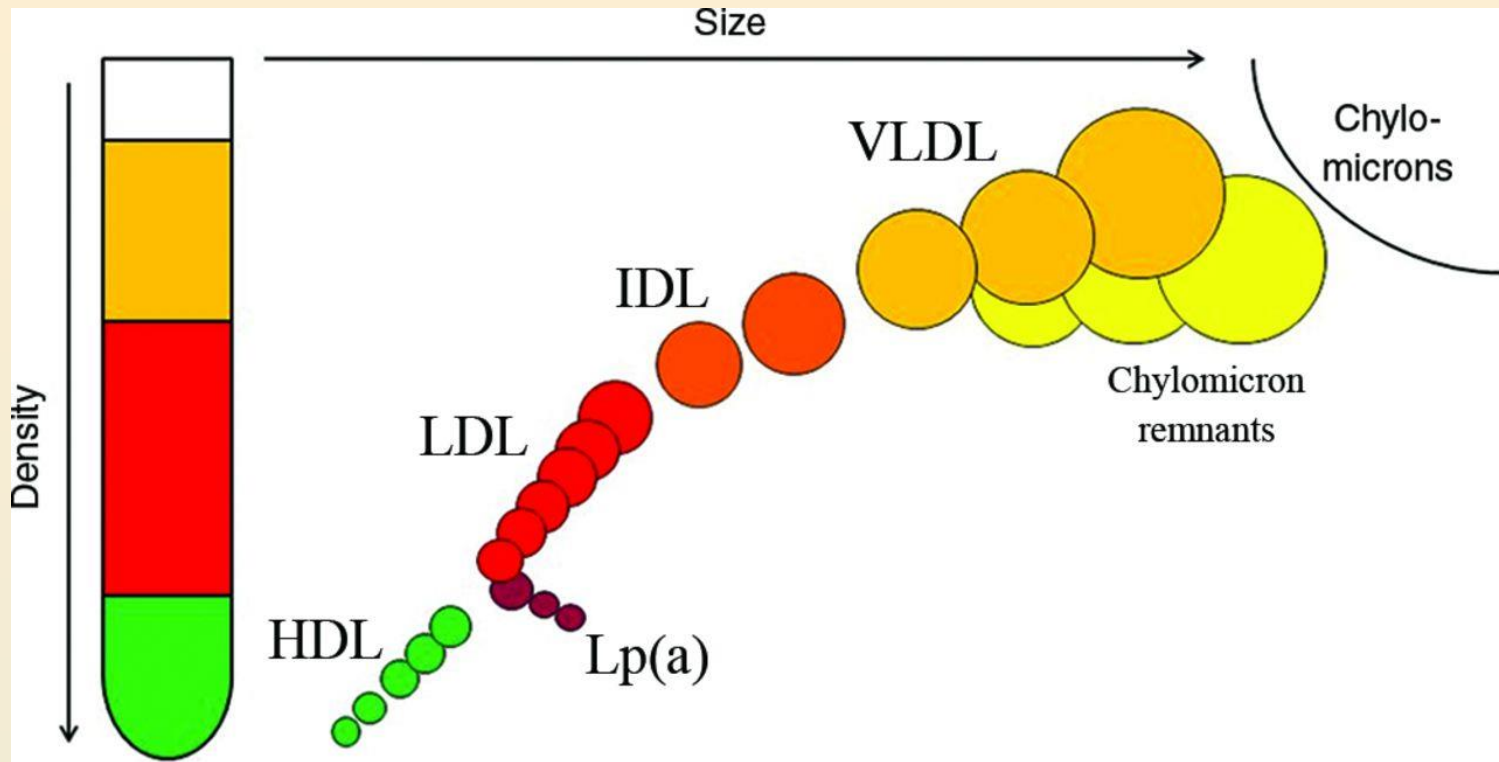
Lipoproteins are complexes of amphipathic proteins with lipids. Their role is to carry lipids through the bloodstream.



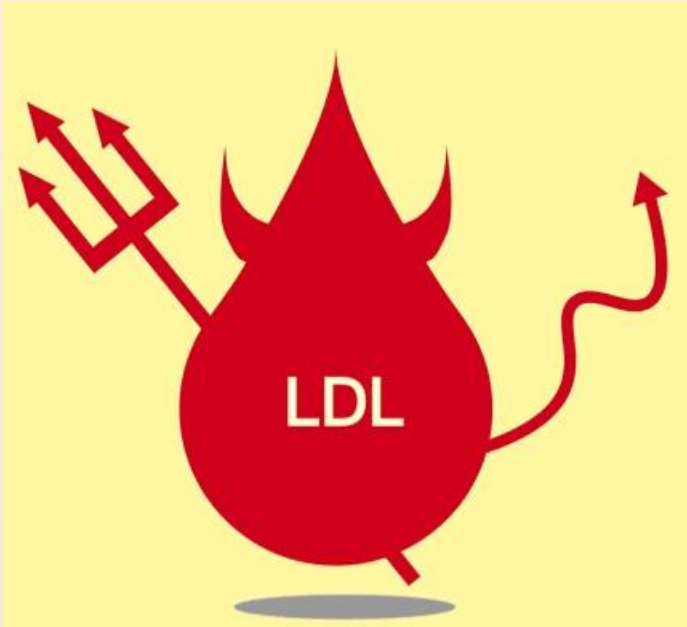
Dyslipidemia, Atherosclerosis, Cardiovascular disease

- Lipids are carried in the bloodstream by lipoproteins
- **Dyslipidemia (high cholesterol, high triglycerides)** is a major risk factor for the development of atherosclerosis
- **Atherosclerosis**: the clogging of the arteries by “plaques” consisting mainly of cholesterol derived from macrophages (foam cells)
- Atherosclerosis is the underlying cause of **cardiovascular disease** (heart attacks, stroke and peripheral vascular disease) is the leading cause of death in men and women after age 50 and 55, respectively, worldwide.

LIPOPROTEIN CLASSES



DOI: 10.1373/clinchem.2018.287037

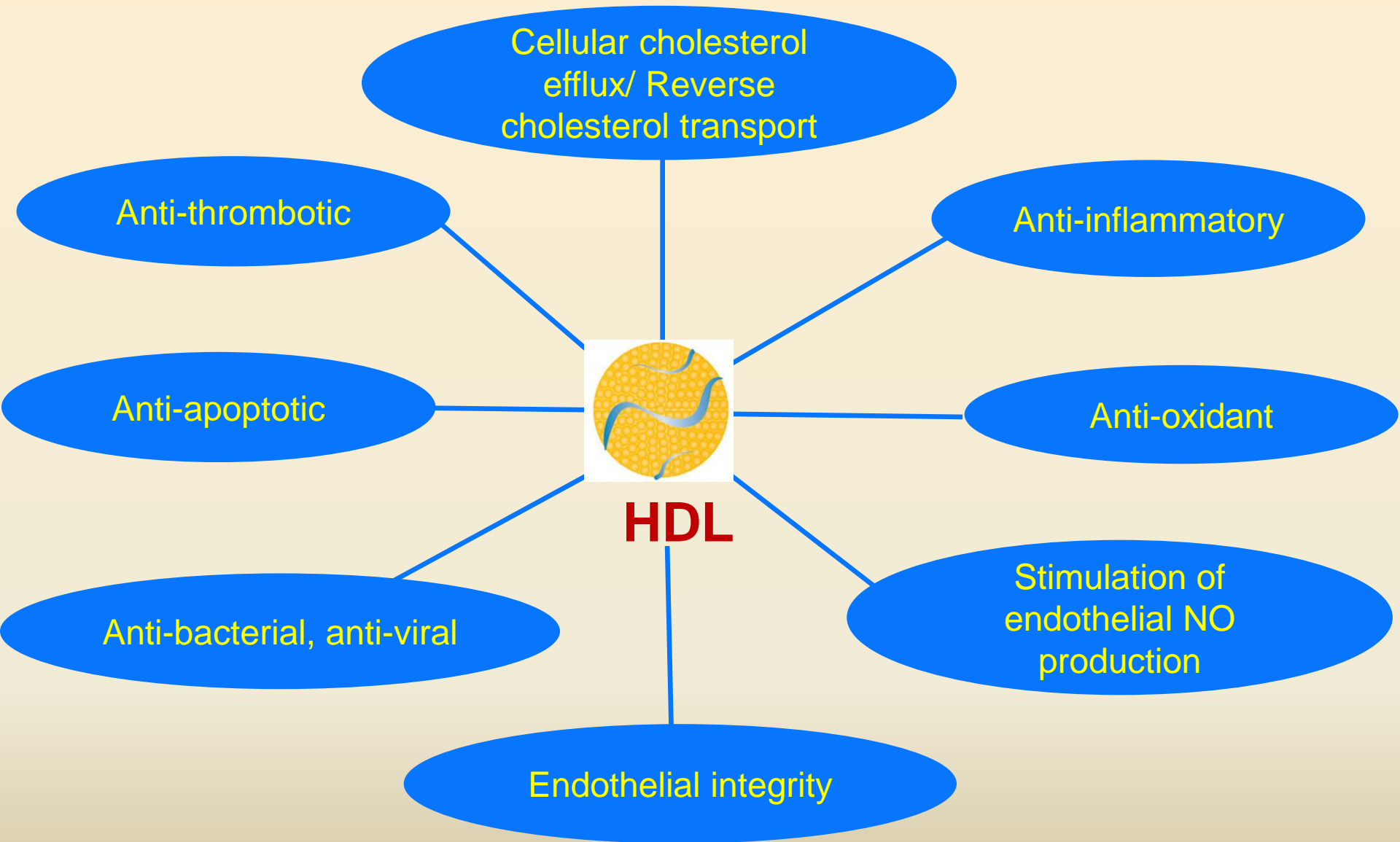


Potentially proatherogenic



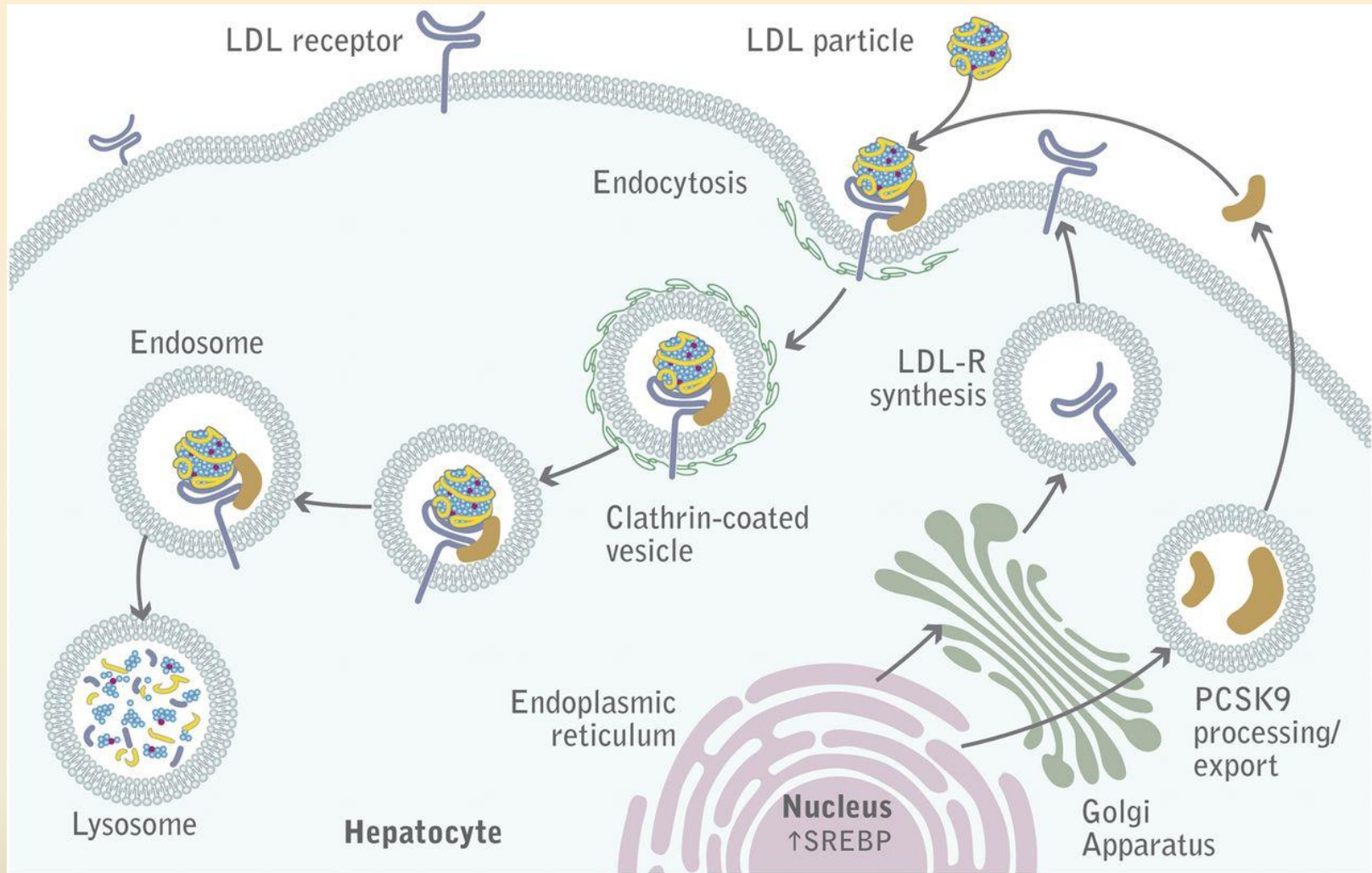
Potentially anti-atherogenic

Pleiotropic functions of HDL



**Π2.2α: Κατανόηση των μοριακών
μηχανισμών που οδηγούν σε διαταραχές
του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών**

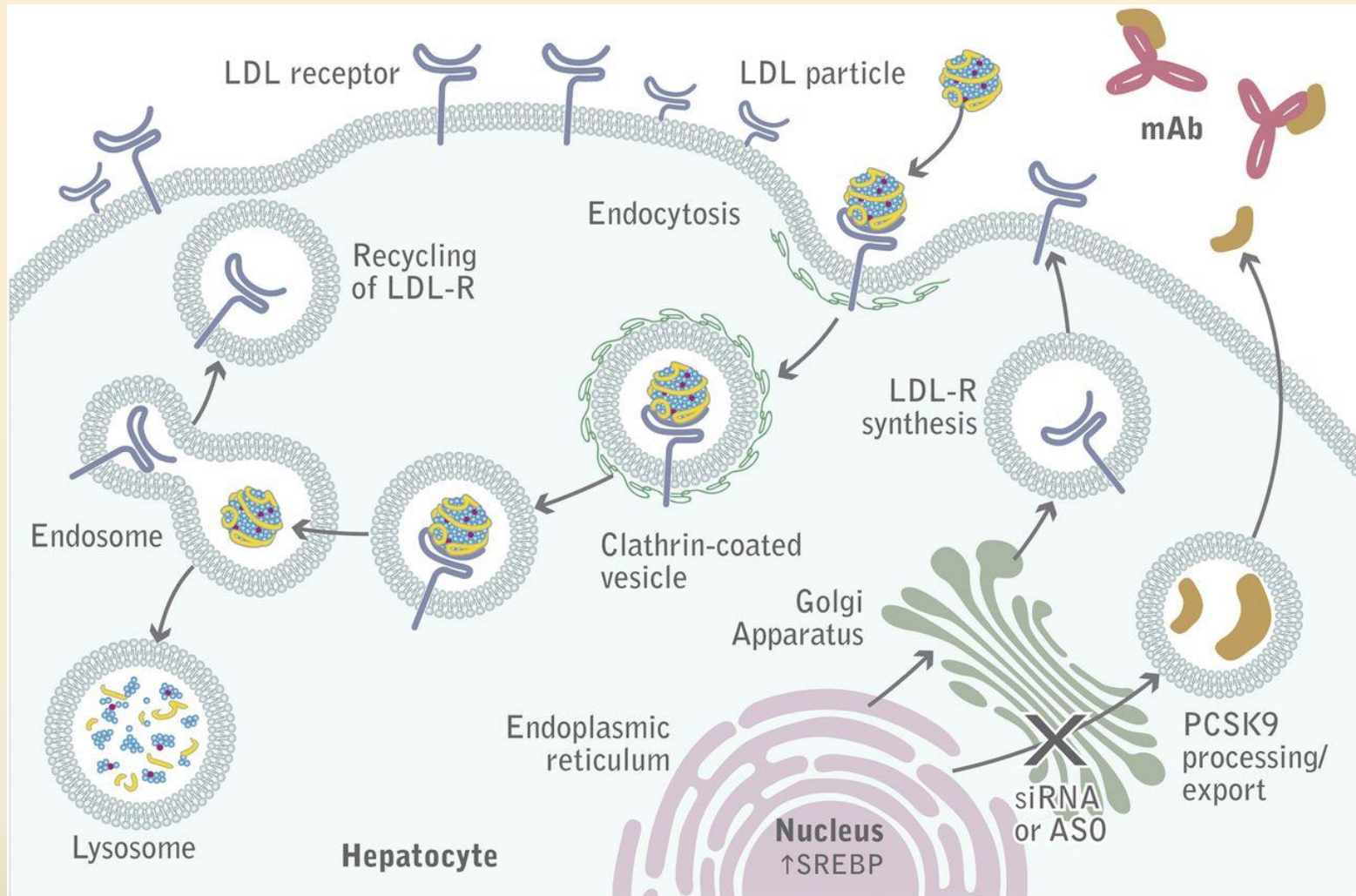
Regulation of LDL levels: LDL receptor, PCSK9



Lambert G et al. The PCSK9 decade. *J. Lipid Res.* 2012;53:2515-2524

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9: PCSK9

PCSK9 inhibitors



Lambert G et al. The PCSK9 decade. *J. Lipid Res.* 2012;53:2515-2524

Διερευνήσαμε τη σύνδεση της PCSK9 πλάσματος με σωματίδια HDL

Η σύνδεση της PCSK9 με τις HDL εξετάστηκε με μη-μετουσιωτική PAGE, δισδιάστατη μη-μετουσιωτική χρωματογραφία αγαρόζης και PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των apoA-I και PCSK9.

- ✓ **Εντοπίσαμε την PCSK9 σε υποπληθυσμούς των HDL που περιέχουν apoA-I**

**Π4.4: Αναφορά στην αξιολόγηση της
χρήσης συστατικών ή δράσεων της HDL
ως βιοδείκτες για τη διάγνωση του
καρδιαγγειακού κινδύνου**

Dysfunctional HDL has been found in conditions:

- **Cardiovascular disease**
- metabolic syndrome
- chronic kidney disease
- obstructive sleep apnea
- surgery
- infections
- **chronic inflammatory disorders, such as RA, SLE, AS**

HDL quality is more important than HDL quantity for atheroprotection

Detailed characterization of changes in HDL composition and function in various pathogenetic conditions, as well as elucidation of the molecular basis for these changes →

successful clinical exploitation of HDL and

identification of new biomarkers for diagnosis, prognosis and therapy monitoring of cardiovascular disease

Η εκροή κυτταρικής χοληστερόλης από την HDL έχει μελετηθεί ως προγνωστικός δείκτης καρδιαγγειακού κινδύνου.

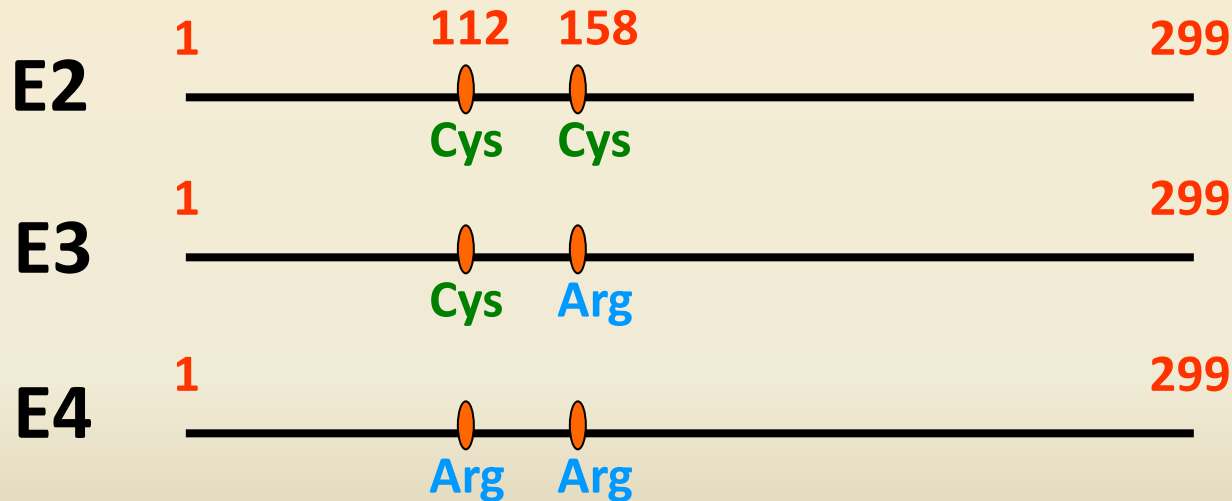
Μελετήσαμε την ικανότητα εκροής χοληστερόλης της HDL ασθενών με οξύ ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και διερευνήσαμε τη συσχέτιση με την βαρύτητα και την πρόγνωση του εγκεφαλικού.

- ✓ Βρήκαμε συσχέτιση της ικανότητας εκροής χοληστερόλης της HDL με τη βαρύτητα του εγκεφαλικού και τον βαθμό λειτουργικής εξάρτησης του ασθενούς στο τέλος της νοσηλείας

Π2.2γ.1: Κατανόηση του ρόλου της αποΕ4 και της ομοιόστασης χοληστερόλης στη νόσο Alzheimer

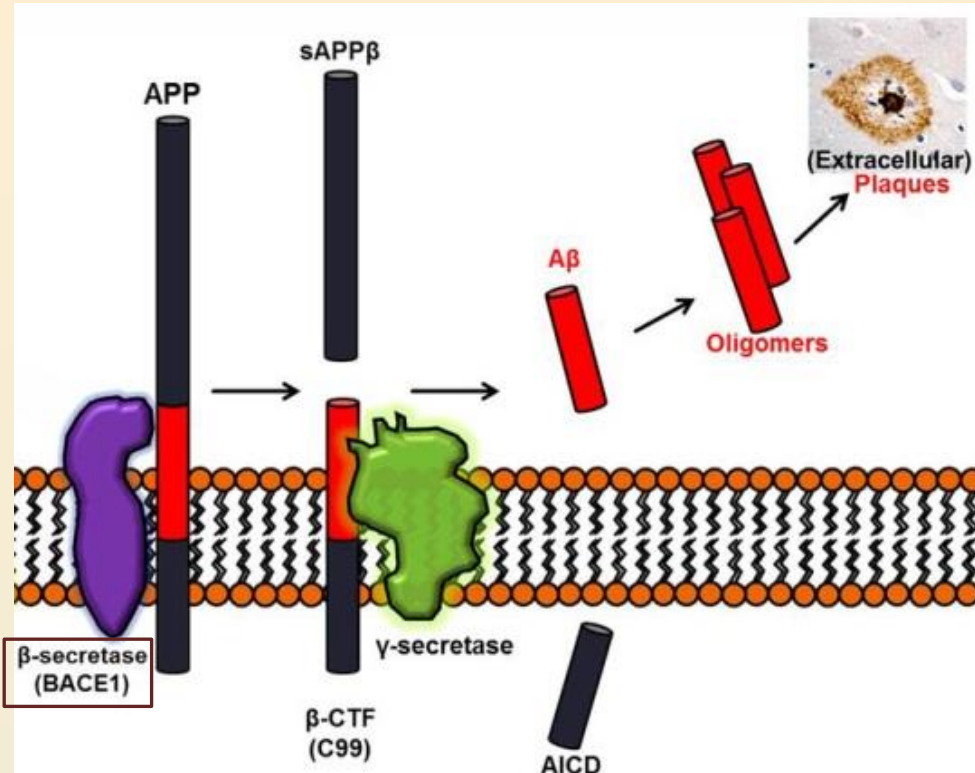
Apolipoprotein E (apoE)

- ApoE is a major protein of the lipoprotein transport system that plays critical roles in atherosclerosis, dyslipidemia and Alzheimer's disease (AD)
- ApoE's expression is highest in the liver, followed by the brain
- ApoE has three common isoforms (apoE2, apoE3, apoE4) in humans, each differing in the amino acid positions 112 and 158



- ApoE4 is a major risk factor for Alzheimer's disease

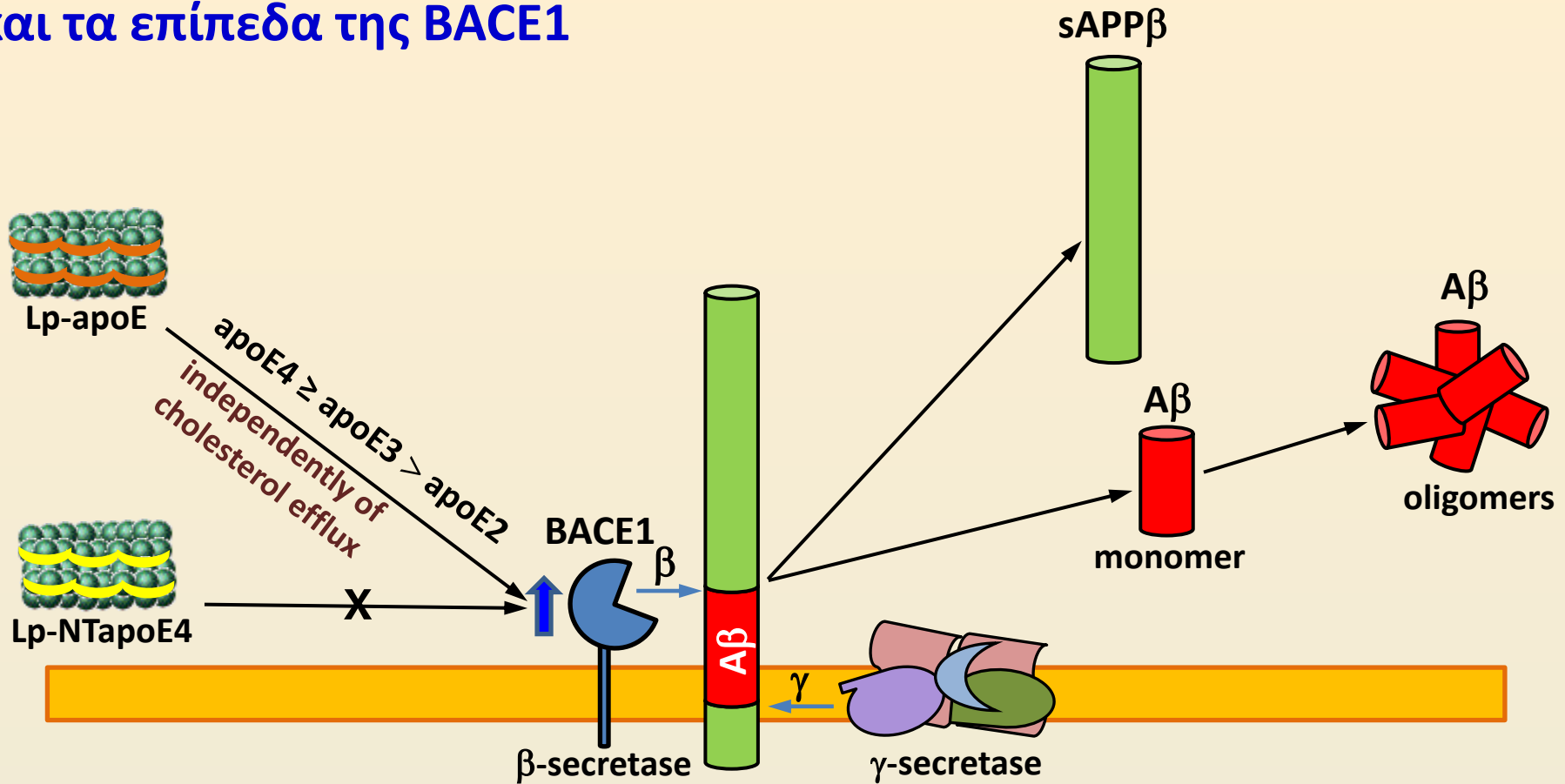
Amyloid peptide β ($A\beta$) generation



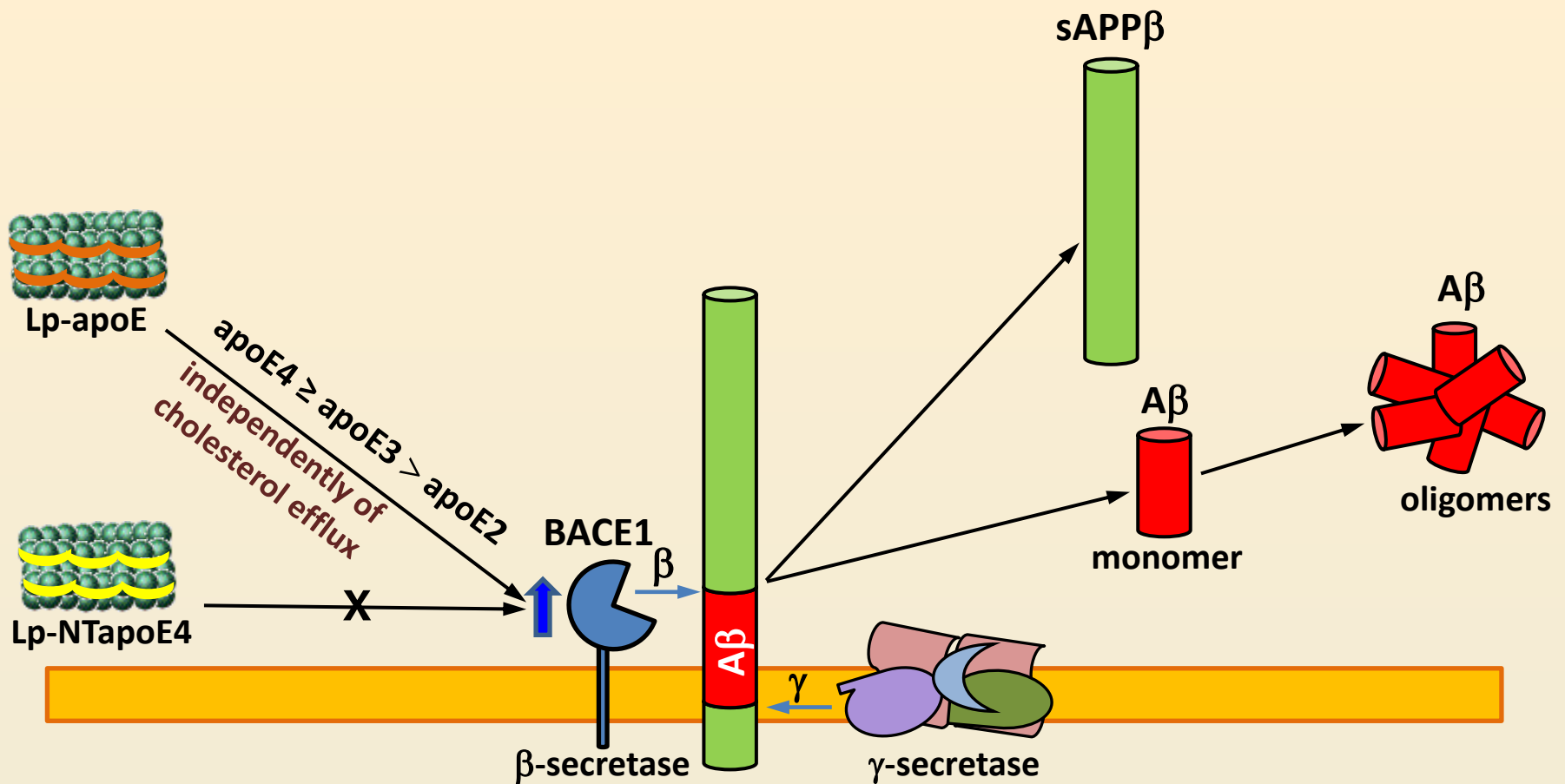
Toh et al, Biochem J. 2016
doi: 10.1042/BCJ20160147

- $A\beta$ is a ~4 kDa peptide fragment, generated by sequential proteolytic cleavage of the transmembrane APP
- The rate-limiting enzyme in the production of $A\beta$ is the aspartic protease **BACE1**
- Changes in **cholesterol** homeostasis have been suggested to affect $A\beta$ production and oligomerization

Διερεύνηση της επίδρασης της apoE στην παραγωγή Aβ και τα επίπεδα της BACE1



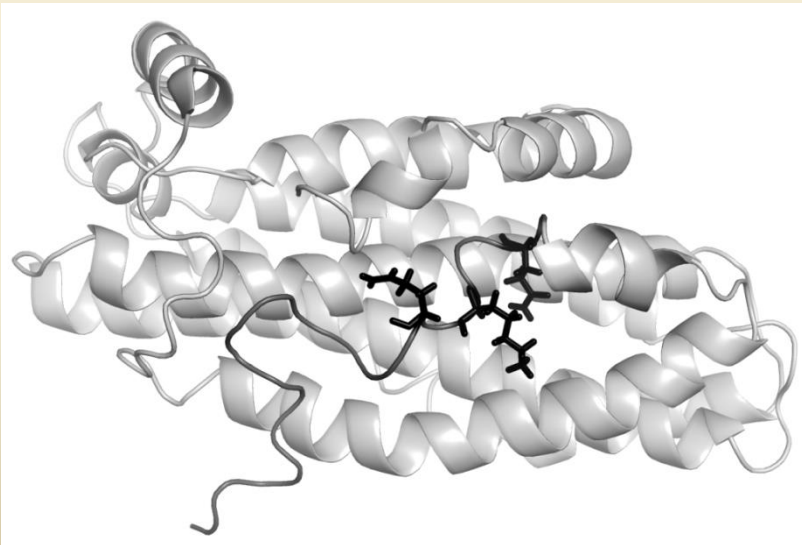
- ✓ Λιποπρωτεϊνικά σωματίδια που περιέχουν apoE αυξάνουν την παραγωγή και τον ολιγομερισμό του Aβ καθώς και τα επίπεδα του ενζύμου BACE1, με σειρά ισχύος apoE4 ≥ apoE3 > apoE2.
- ✓ Η καρβοξυ-τελική περιοχή της apoE είναι σημαντική για τις παραπάνω δράσεις, αφού αποκοπή της καρβοξυ-τελικής περιοχής της apoE4 μέχρι το κατάλοιπο 166 εμπόδισε την apoE4 από το να αυξάνει την BACE1 και τα επίπεδα του Aβ σε νευρικά κύτταρα.
- ✓ Τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια που περιέχουν apoE συνεισφέρουν σε πορείες παθογένεσης της νόσου Alzheimer ανεξάρτητα από την ικανότητα τους να προάγουν εκροή χοληστερόλης



Dafnis I., Raftopoulou C., Mountaki C., Megalou E. Zannis V. I. and Chroni A. ApoE isoforms and carboxyl-terminal truncated apoE4 forms affect neuronal BACE1 levels and Aβ production independently of their cholesterol efflux capacity. *Biochem J.* 475, 1839-1859 (2018).

Ολιγομερισμός και Νευροτοξικότητα της apoE4

- Μετά την επώαση της apoE4 με Aβ42, η apoE4 εμφανίζει αυξημένα ολιγομερή (σταθερά στο SDS), που πιθανώς αποτελούν συσσωματωμένες μορφές.
- Επιπλέον, η εξωκυτταρική apoE4 είναι κυτταροτοξική για τα ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος SK-N-SH, ενώ το Aβ42 ενισχύει την κυτταροτοξικότητα της apoE4.
- Τα καρβοξυ-τελικά κατάλοιπα L279, K282 και Q284 φαίνεται ότι εμπλέκονται στη διαμόρφωση της apoE4 και τον ολιγομερισμό της και καθορίζουν την νευροτοξική της δράση.



Dafnis I., Argyri L., and Chroni A. Amyloid-peptide β 42 enhances the oligomerization and neurotoxicity of apoE4: the C-terminal residues Leu279, Lys282 and Gln284 modulate the structural and functional properties of apoE4. *Neuroscience* 394, 144-155 (2018).

✓ Άρθρο ανασκόπησης με στόχο την παρουσίαση των πρόσφατων εξελίξεων στον τομέα των μιμητικών της αποΕ και των δυνατοτήτων τους για τη θεραπεία της καρδιαγγειακής νόσου

Valanti E.K., Chroni A. and Sanoudou D. The future of apolipoprotein E mimetic peptides in the prevention of cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 30, 326-341 (2019).

Οι μελέτες υλοποιήθηκαν στο πλαίσιο της Πράξης «ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (SANITURA)» (MIS 5002514) που εντάσσεται στη Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑ^ηΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION



Co-financed by Greece and the European Union

Σας ευχαριστώ



Μελέτη μηχανισμών προστασίας και επιβίωσης κυττάρων σε παθολογικές καταστάσεις όπως η νευροεκφυλιστική νόσος Alzheimer και ο Διαβήτης τύπου II: Ο ρόλος του ενζύμου MMP-9.

Εργαστήριο Παθολογίας Κυττάρου & Εξωκυττάρου Χώρου

- ❖ Δρ. Αθηνά Τζίνια
- ❖ Δρ. Αρχοντία Καμινάρη
- ❖ Νικόλας Γιαννάκας
- ❖ Δρ. Φωτεινή Τσιλιμπάρη



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΠΕ 2 : ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Στόχος: Κατανόηση των κοινών μηχανισμών ανάπτυξης διαβήτη τύπου 2 και νόσου Alzheimer για την αποτελεσματικότερη θεραπευτική αντιμετώπιση των νοσημάτων αυτών.

2.2.γ.2. Ο ρόλος της μεταλλοπρωτεάσης MMP-9 στην προστασία και επιβίωση κυττάρων στη νόσο Alzheimer και το διαβήτη τύπου 2

- ▶ **Παραδοτέο 2.2.γ.2:** Μελέτη έκφρασης και ενεργοποίησης πρωτεϊνών στο μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης, σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρικών κυττάρων ιππόκαμπου

- Ανάπτυξη πρωτογενών καλλιεργειών από τον ιππόκαμπο διαγονιδιακών μυών.
- Μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης.
- Μελέτη της ενεργοποίησης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης.

ΠΕ 4 : ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Στόχος: Κατανόηση του ρόλου της MMP-9 στην αναστολή της διαταραχής του μονοπατιού σηματοδότησης της ινσουλίνης στη νόσο Alzheimer in vivo.

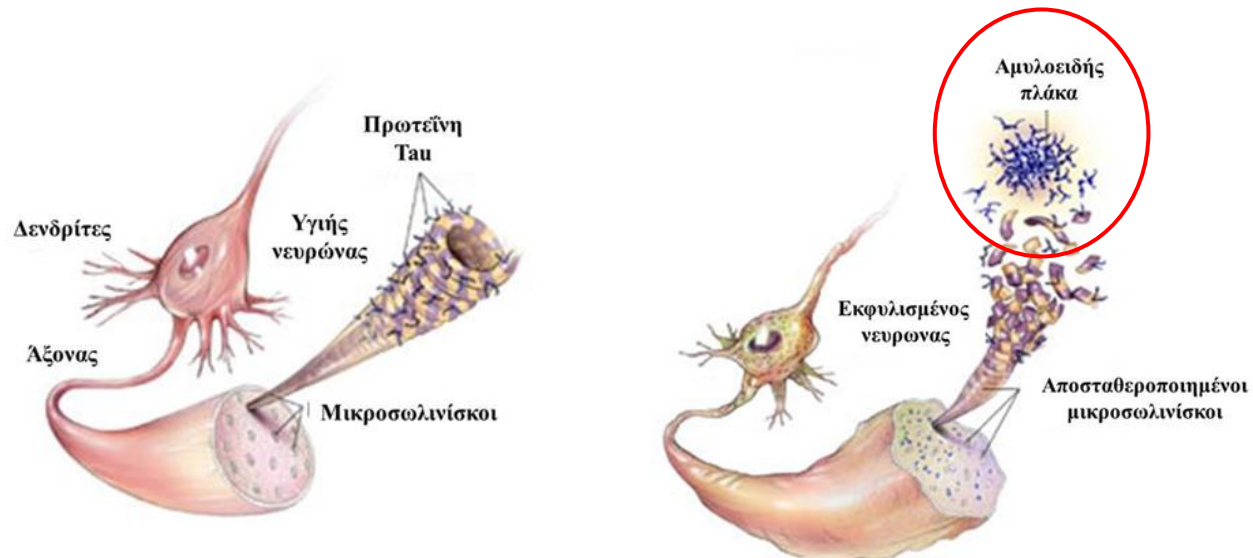
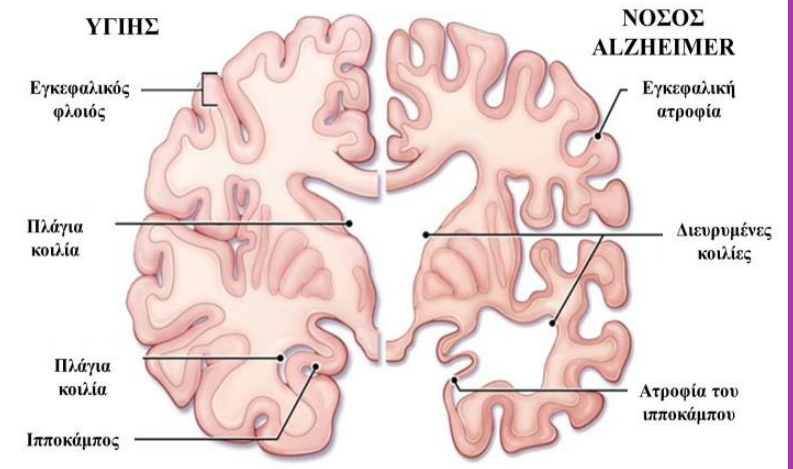
4.3.1: Μελέτη κοινών παθογενετικών μηχανισμών της νόσου Alzheimer και του Διαβήτη τύπου 2 σε ζωικά μοντέλα για την ανάδειξη νέων θεραπευτικών στόχων

- ▶ **Παραδοτέο Π4.3.1.α:** Μελέτη έκφρασης και ενεργοποίησης πρωτεϊνών στο μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης σε ιστούς ενήλικων διαγονιδιακών μυών στα διάφορα στάδια ανάπτυξης

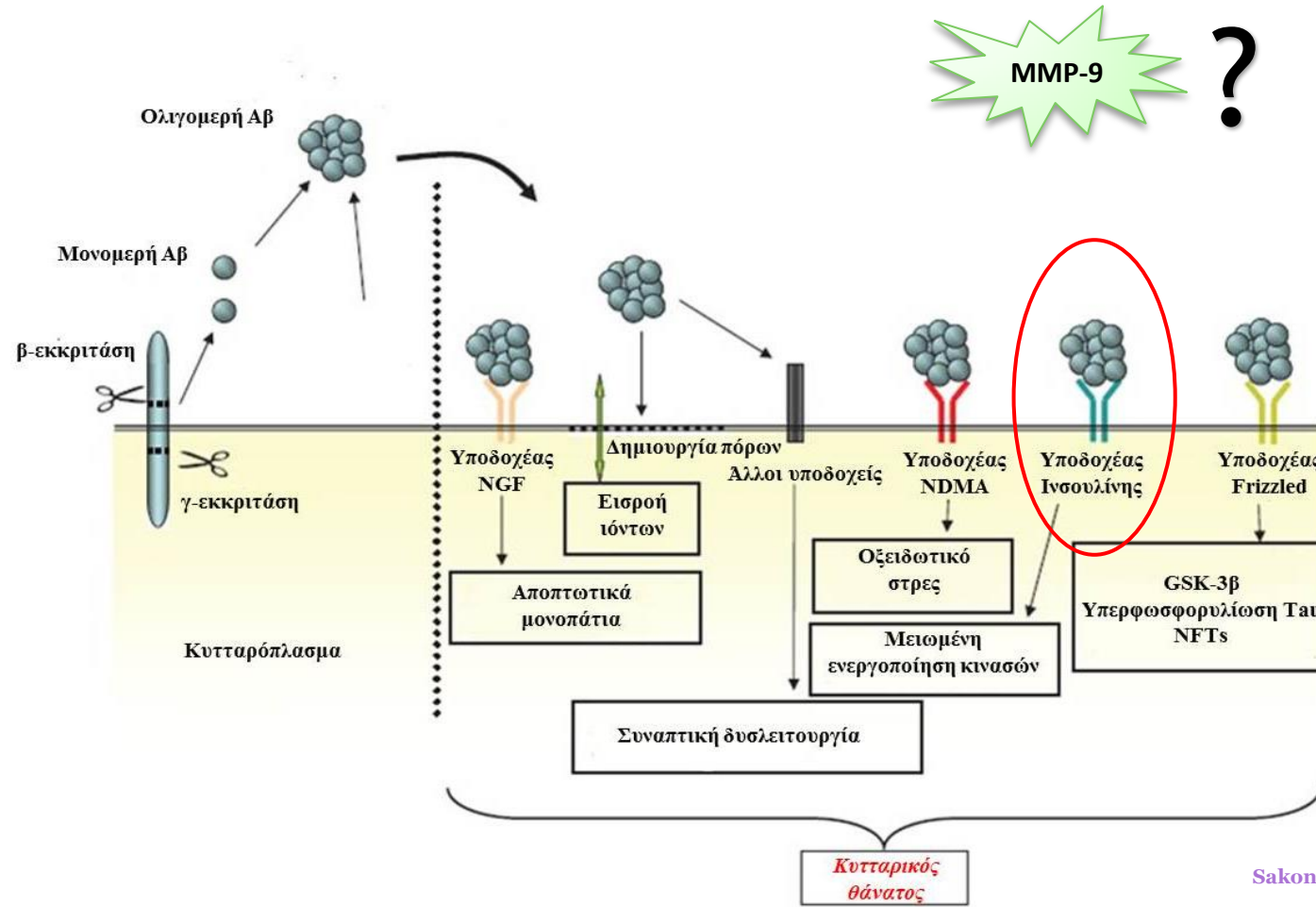
- Διατήρηση διαγονιδιακών μυών και απομόνωση ιστών από ενήλικα ζώα στα διάφορα στάδια ανάπτυξης.
- Μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης.
- Μελέτη της ενεργοποίησης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης.

Νόσος Alzheimer (NA)

- ▶ Νευροεκφυλιστική νόσος
- ▶ Συχνότερη μορφή άνοιας ~ 80%
- ▶ Συχνότητα που αναμένεται να τετραπλασιαστεί μέχρι το 2050
- ▶ ~ 90-95% Σποραδική (sporadic AD)
- ▶ ~5-10% Γενετική (familial AD)

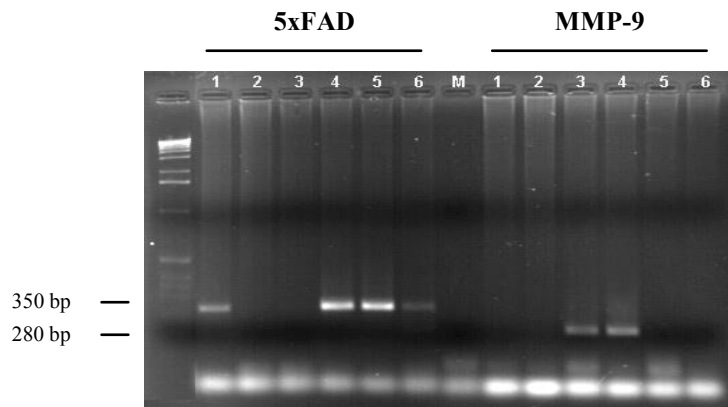


Νευροτοξικότητα Αβ ολιγομερών

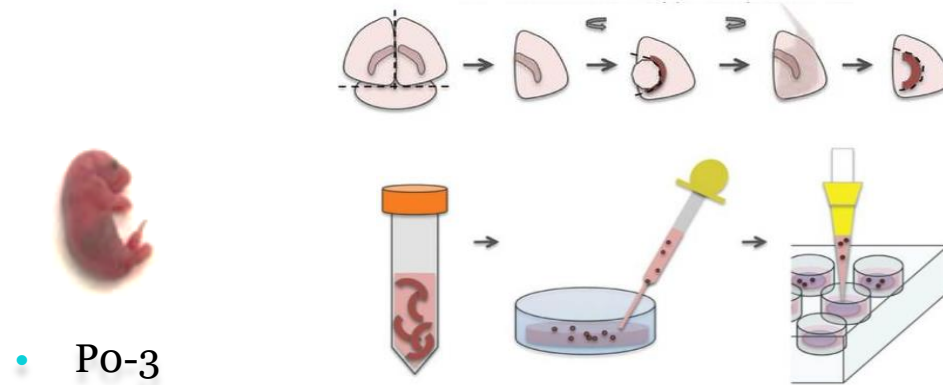


Μεθοδολογία

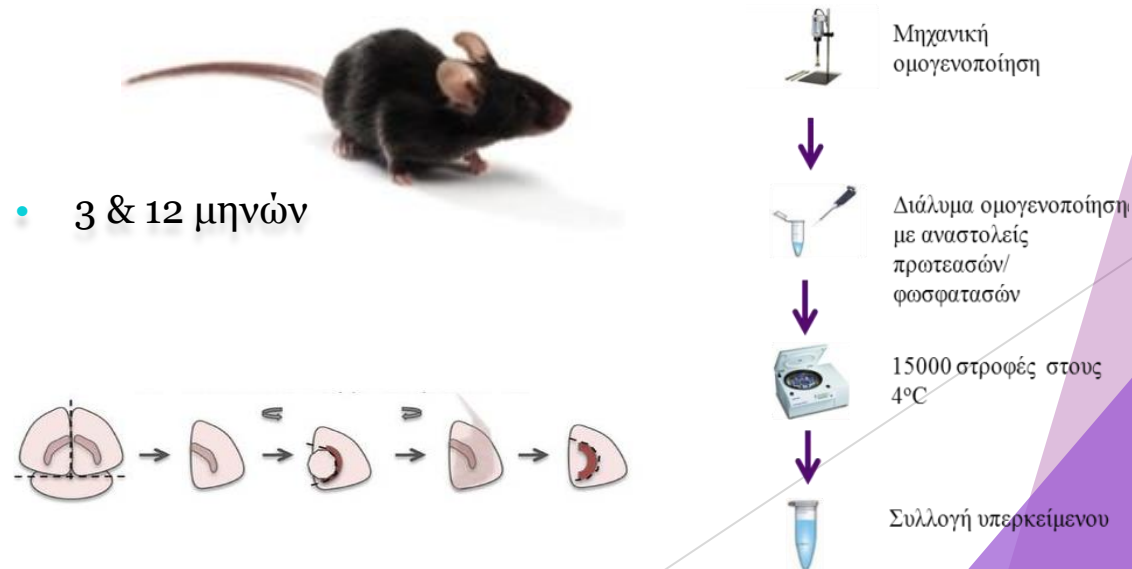
- **Genotyping**



- **Hippocampal Isolation**

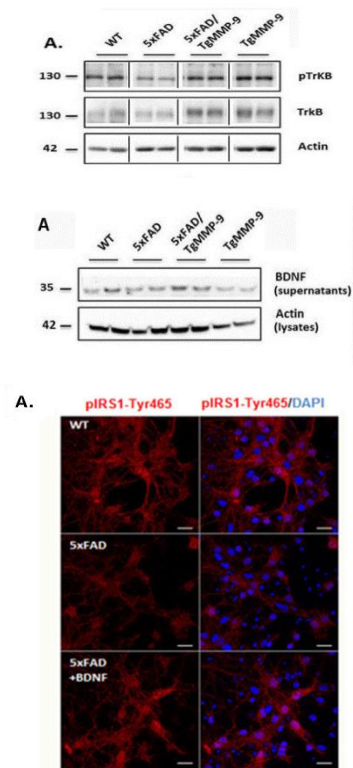
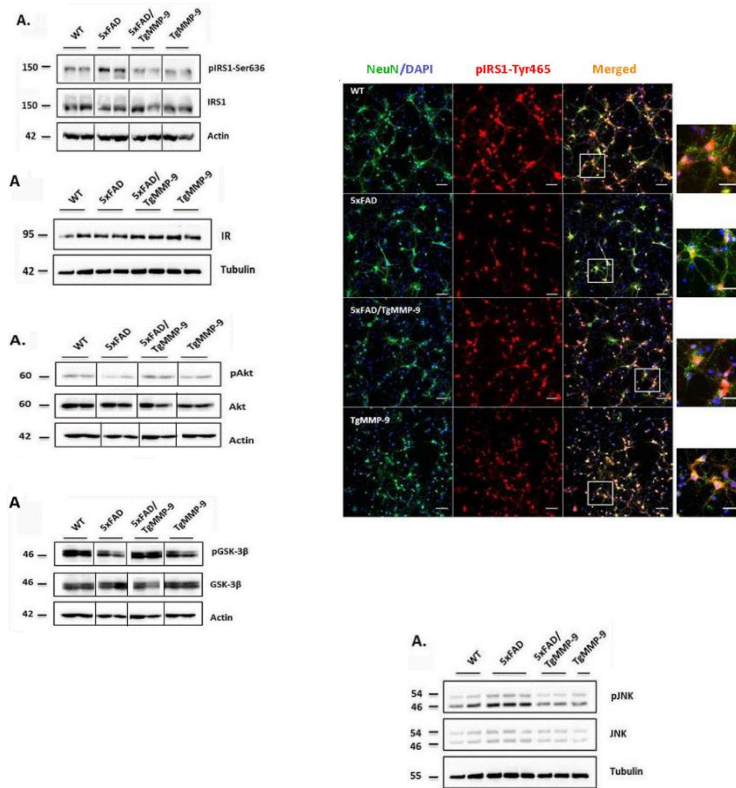


- 3 & 12 μηνών

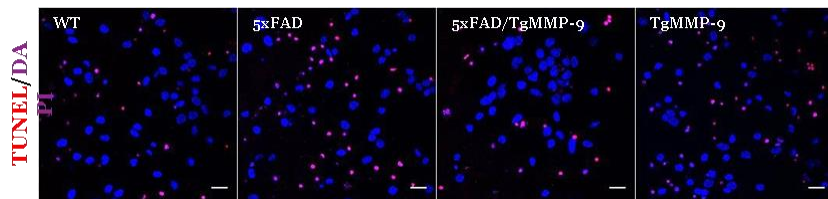
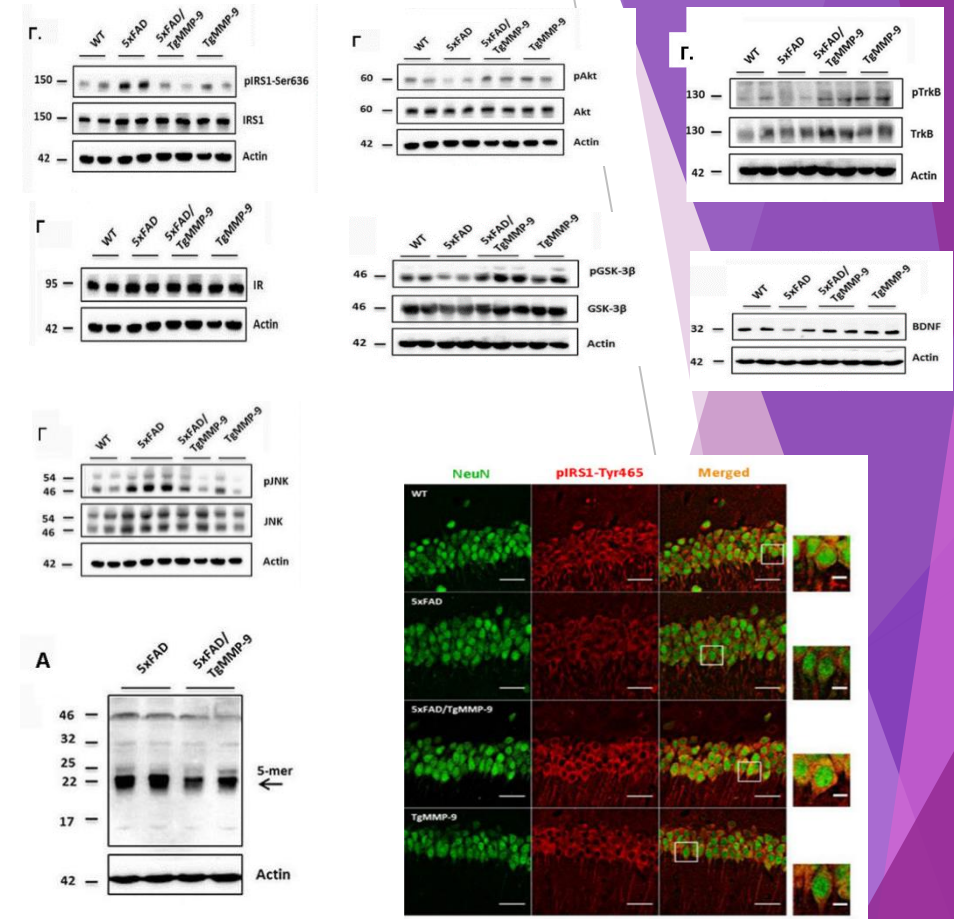


Αποτελέσματα

- in vitro*



- in vivo*



Kaminari A, Giannakas N, Tzinia A, Tsilibary EC. Overexpression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) rescues insulin-mediated impairment in the 5XFAD model of Alzheimer's disease. Scientific reports. 2017 Apr 6;7(1):1-2.

Συνοπτικά αποτελέσματα (*in vitro* & *in vivo*)

Πίνακας 1: % Διαφοροποίηση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος σε σχέση με τον Μάρτυρα

Proteins	Primary Hippo Cells			3month old			12 month old		
	Wild type	5XFAD	5XFAD-TgMMP-9	Wild type	5XFAD	5XFAD-TgMMP-9	Wild type	5XFAD	5XFAD-TgMMP-9
pSerIRS1	100	183	107	100	207	153	100	126	89
pTyrIRS1	100	47	86.3	100	20	136	ND	ND	ND
IRS1	100	NC	NC	100	NC	NC	100	NC	NC
IRS2	100	NC	NC	100	NC	NC	100	NC	NC
IR	100	NC	NC	100	NC	NC	100	125	112
pAkt	100	72	103	100	57	81	100	68	114
pGSK3b	100	78	96	100	80	105	100	67	88
pJNK	100	133	89	100	147	106	ND	ND	ND
pTrkB	100	60	96	100	42	108	-	-	-
BDNF	100	58	94	100	71	89	-	-	-

NC: Καμία αλλαγή, ND: Δεν ανιχνεύτηκε

Table 1: Beneficial effects of MMP-9 in Alzheimer's disease (AD) and Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM)

Alzheimer's Disease (AD)		
System	Observation	Ref
U373 cells,	NO-mediated MMP-9 activity results in A β fibrillar degradation in vitro	(41)
APPswDI/NOS2 ^{-/-} mice	Decreased MMP-9 activity results in increased amyloid deposition in an AD mouse model lacking nitric oxide (NO)	(41)
APP/PS1 mice, in vitro	MMP-9 degrades A β fibrils in vitro and compact amyloid plaques in situ.	(43)
In situ plaques of AD patients	MMP-9 synthesized in neurons of the human hippocampus is capable of degrading the A β (1-40)	(42)
PC12 cells,	MMP-9 induces sA β PP α production via NGF in vitro,	(44-45)
HEK/APP695 cells	Overexpression of MMP-9 results in sA β PP α production in vitro	
TgMMP-9 mice	Overexpression of MMP-9 results in enhanced neuronal plasticity and increased sA β PP α levels in mice	(39)
5xFAD mice	Overexpression of MMP-9 results in increased sA β PP α levels and decreased A β oligomers in an AD mouse model	(40)
5xFAD mice	Overexpression of MMP-9 rescues insulin-mediated impairment in an AD mouse model	(61)
APP/PS1 mice	MMP-9 expressed by astrocytes mediates extracellular A β catabolism	(68)
Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM)		
Primary β -cells and islets of hIAPP mice	Overexpression of MMP-9 in amyloid-prone islets reduces amyloid deposition and β -cell apoptosis	(94)
hIAPP mice, T2DM human islets	Matrix metalloproteinase-9 reduces islet amyloid formation by degrading islet amyloid polypeptide.	(95)
HTC-IR cells	Neu1 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) cross talk is essential for insulin-induced IR activation.	(99)
Transplanted pancreatic islets of mice	MMP-9 is required for islet revascularization and functional integration after transplantation for diabetes treatment.	(85-86)
Pancreatic islets of mice of MMP-9 ^{-/-} mice	MMP-9 loss of function on pancreatic islets results deteriorated beta cell function	(87)

Συμπέρασμα

❖ Η MMP-9 στο ΚΝΣ δρα βελτιώνοντας το ινσουλινοεξαρτώμενο μονοπατι στη νόσο Alzheimer κατά ανάλογο τρόπο με τη δράση της στον διαβήτη τύπου II.

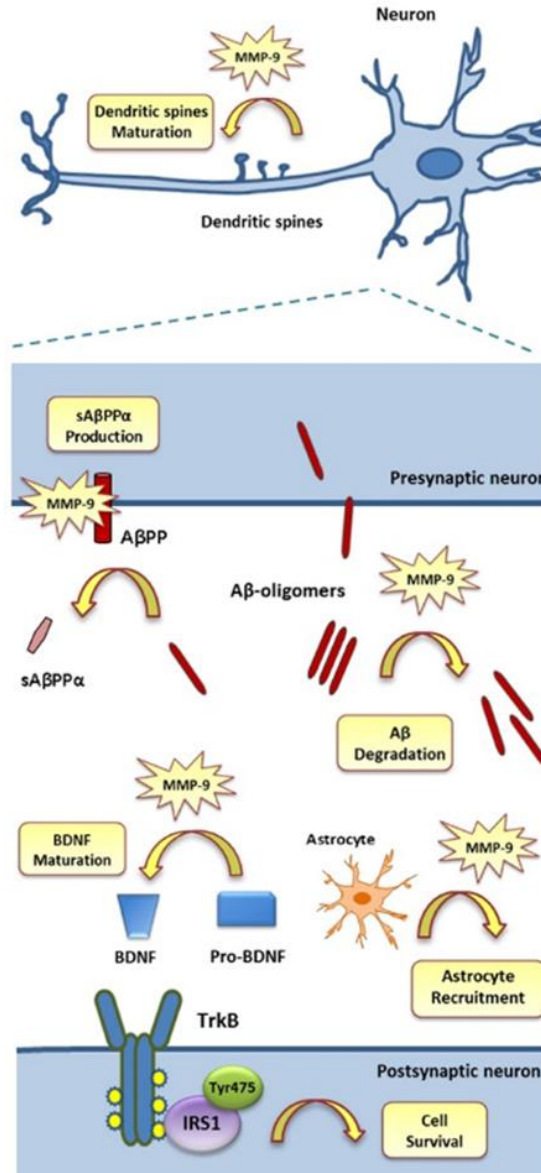
➤ Η MMP-9 στη νόσο Alzheimer:

- ✓ Μειώνει τη δημιουργία των τοξικών Αβ ολιγομερών
- ✓ Επάγει τη σηματοδότηση του BDNF μέσω του υποδοχέα του TrkB, επάγωντας τη σηματοδότηση του ινσουλινοεξαρτώμενου μονοπατιού.

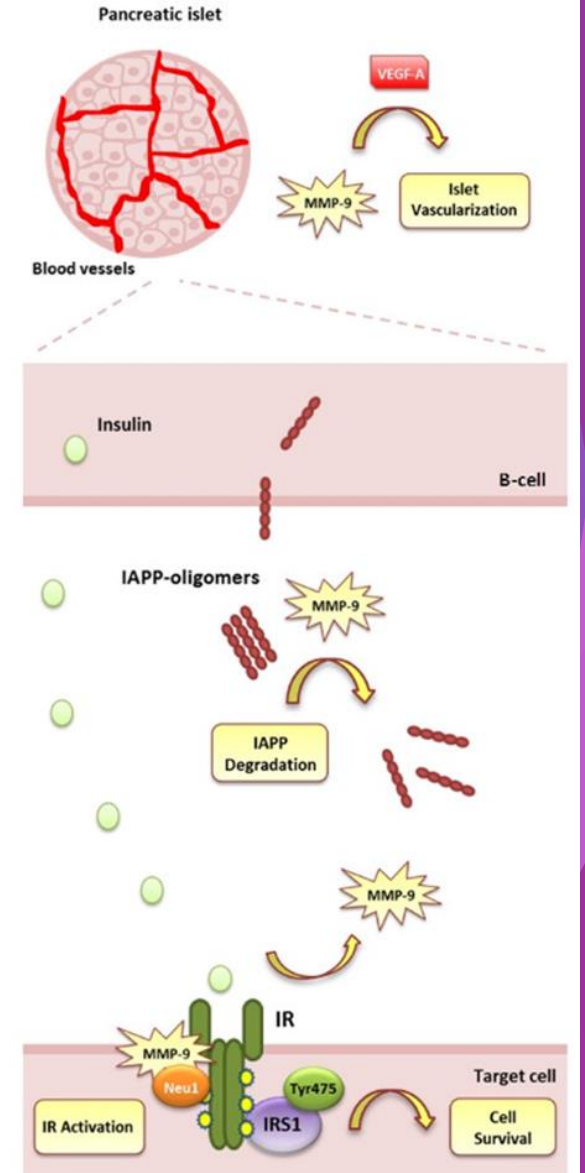
❑ Η MMP-9 είναι ένας υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος τόσο για τη ΝΑ όσο και για τον ΔΤ2.

Kaminari A, Tsilibary EC, Tzinia A. A new perspective in utilizing MMP-9 as a therapeutic target for Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018 Jan 1;64(1):1-6.

Alzheimer's Disease



Type 2 Diabetes Mellitus





ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ

Εργαστήριο Παθοβιολογίας Κυττάρων & Εξωκυττάριου Χώρου

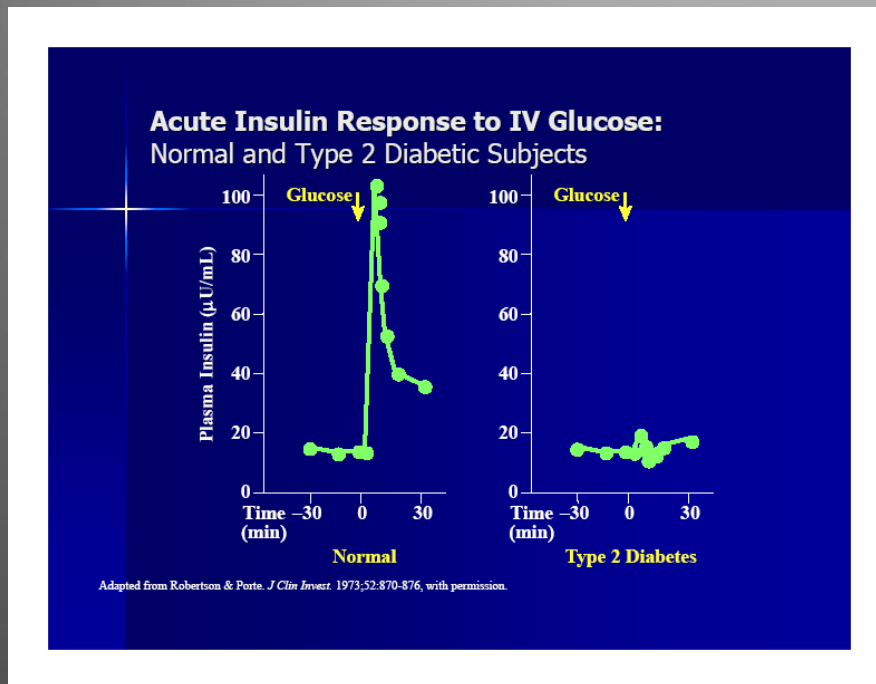
Παραδοτέο 2.2.β1

Μελέτη του μοριακού μηχανισμού δράσης της λιραγλουτίδης στην πρόληψη ή/και αναστολή της απόπτωσης των παγκρεατικών β-κυττάρων στο διαβήτη τύπου 2

Παρασκευή Κίτσιου, Ph.D.

Ο Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι ένα μεταβολικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα λόγω έλλειψης ινσουλίνης



Διαβήτης τύπου 1 (5%)

Αυτοάνοσο νόσημα

Διαβήτης τύπου 2 (95%)

(Διαβήτης της μέσης ηλικίας)

Μία εντυπωσιακή και ανησυχητική πληροφορία ωστόσο είναι πως περίπου το 25-30% των ανθρώπων με διαβήτη τύπου 2 αγνοούν την κατάστασή τους και παραμένουν χωρίς θεραπεία.

Ο Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Σήμερα, όταν αναφέρονται στο διαβήτη μιλούν πλέον για πανδημία. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα στοιχεία της Διεθνούς Ομοσπονδίας Διαβήτη (I.D.F.), ενώ το 2000 τα άτομα με διαβήτη έφταναν τα 151 εκατομμύρια, σήμερα φθάνουν τα 425 εκατομμύρια και ο αριθμός αναμένεται να αυξηθεί στα 629 εκατομμύρια μέχρι το 2045.

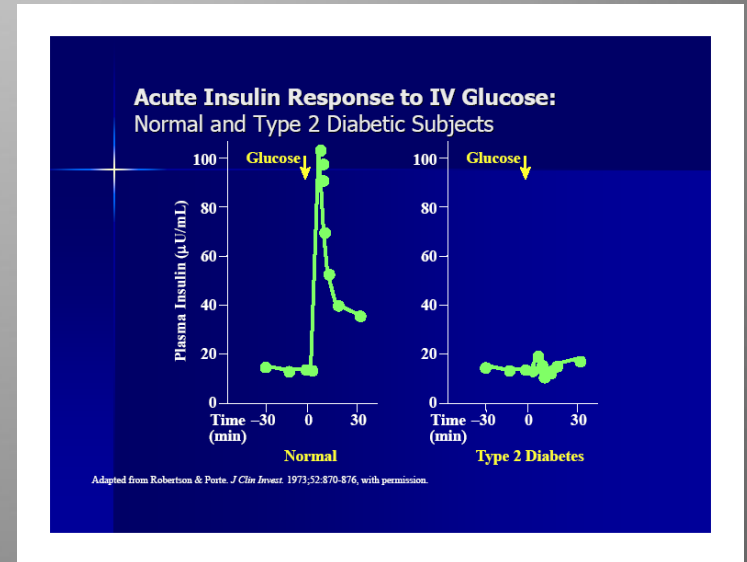
Στην Ελλάδα πάσχει το 10-12% του γενικού πληθυσμού (περίπου 1.200.000)

Ιδιαίτερα ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2), που χαρακτηρίζεται από τους ειδικούς ως «ύπουλος», καθώς τα πρώτα χρόνια μπορεί να δρα κρυφά, χωρίς να εκδηλώνει συμπτώματα, αποτελεί τη βασική αιτία θανάτου για περίπου 7.000.000 άτομα ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο και συνδέεται με επιπλοκές που προκαλούν τεράστιο ανθρώπινο πόνο, με τη μορφή τύφλωσης, νεφρικής ανεπάρκειας, ακρωτηριασμών, αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου και εγκεφαλικού επεισοδίου. Ο Π.Ο.Υ προβλέπει ότι ο Σακχαρώδης διαβήτης θα είναι η 7^η κύρια αιτία θανάτου το 2030

Ο Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Στάδια της νόσου:

- *Ινσουλινοαντίσταση*
- *Υπερινσουλιναίμια / Φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης*
- *Υπερινσουλιναίμια / Υπεργλυκαιμία*
- *Υπεργλυκαιμία*

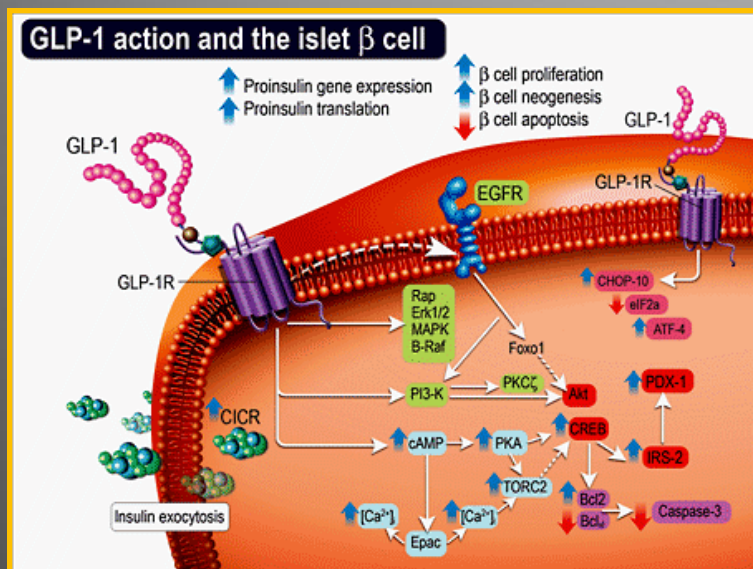


- *Ινσουλινοαντίσταση*
- *Δυσλειτουργία των β-κυττάρων*
- **Απόπτωση β-κυττάρων**

Νέα Φάρμακα-Το σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα GLP-1R στα β-κύτταρα

Στο πεδίο του Διαβήτη τύπου 2 υπάρχουν εξελίξεις που χαρίζουν καλύτερη ποιότητα ζωής στους ασθενείς. Τα ανάλογα του GLP-1, του γλυκαγονόμορφου πεπτιδίου 1 που βρέθηκε ότι ρυθμίζει τα μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, αποδείχθηκε ότι μειώνουν την ανάγκη για ινσουλίνη στους διαβητικούς τύπου 2 – διότι και το 30% των διαβητικών τύπου 2 είναι ινσουλινοθεραπευόμενοι.

Η διεγερτική δράση του GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) ασκείται μέσω της δέσμησης στο υποδοχέα του στα β-κύτταρα.

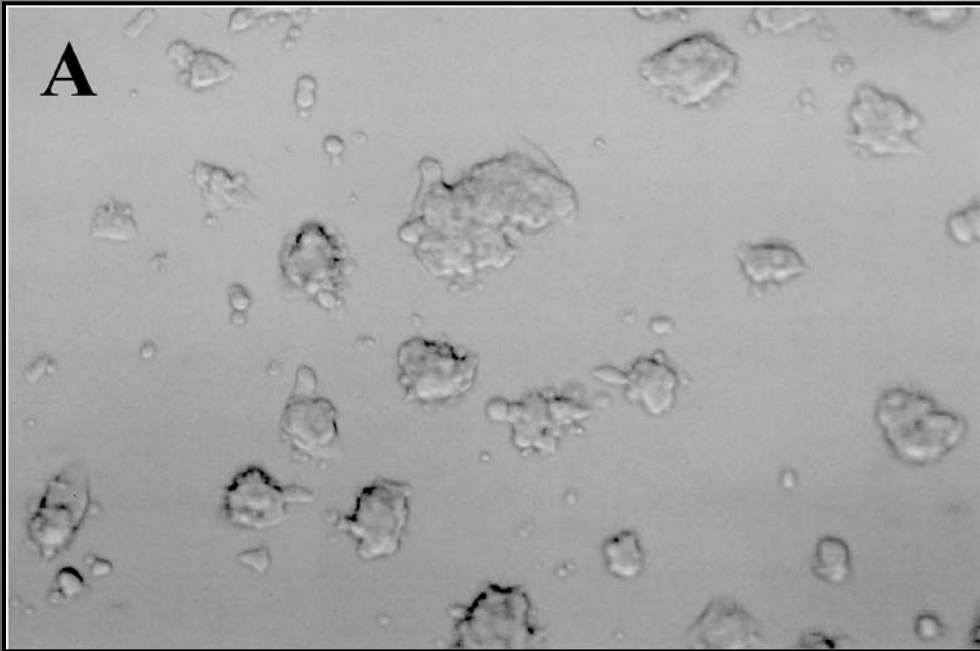


Η δράση GLP-1 στο β-κύτταρο οδηγεί σε:

- Σε αύξηση της μεταγραφής, βιοσύνθεσης, και έκκρισης ινσουλίνης από τα β-κύτταρα
- Διαφοροποίηση
- Πολλαπλασιασμός
- Επιβίωση των β-κυττάρων

Η Λιραγλουτίδη (**Liraglutide**) είναι ένα μακράς διάρκειας ανάλογο (αγωνιστής) του ανθρώπινου GLP-1 που χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2. Έχει αποδειχθεί ότι η λιραγλουτίδη διατηρεί τη μάζα β-κυττάρων μέσω του πολλαπλασιασμού και της νεογέννησης..

Πειραματικό μοντέλο



Τα β-TC6 κύτταρα:

α) εκφράζουν το λειτουργικό σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt

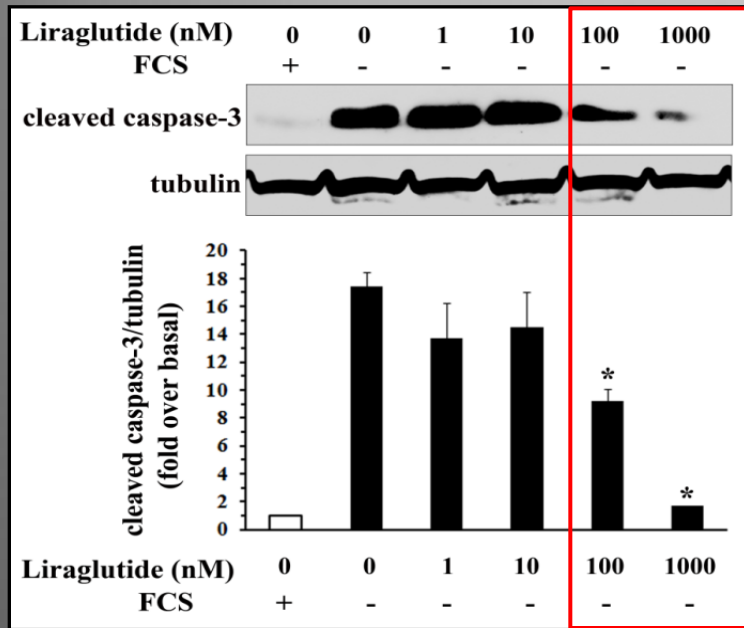
β) Η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης αναστέλει την σηματοδοτική οδό της Akt και επάγει την απόπτωση των β-κυττάρων.

Ινσουλινο-παραγωγός κυτταρική σειρά παγκρεατικών β-κυττάρων ποντικού (TSV-40 αθανатоποιημένα βTC-6 κύτταρα).

Τα κύτταρα σχηματίζουν *in vitro*, ομάδες οι οποίες μοιάζουν με νησίδια (ψευδονησίδια).

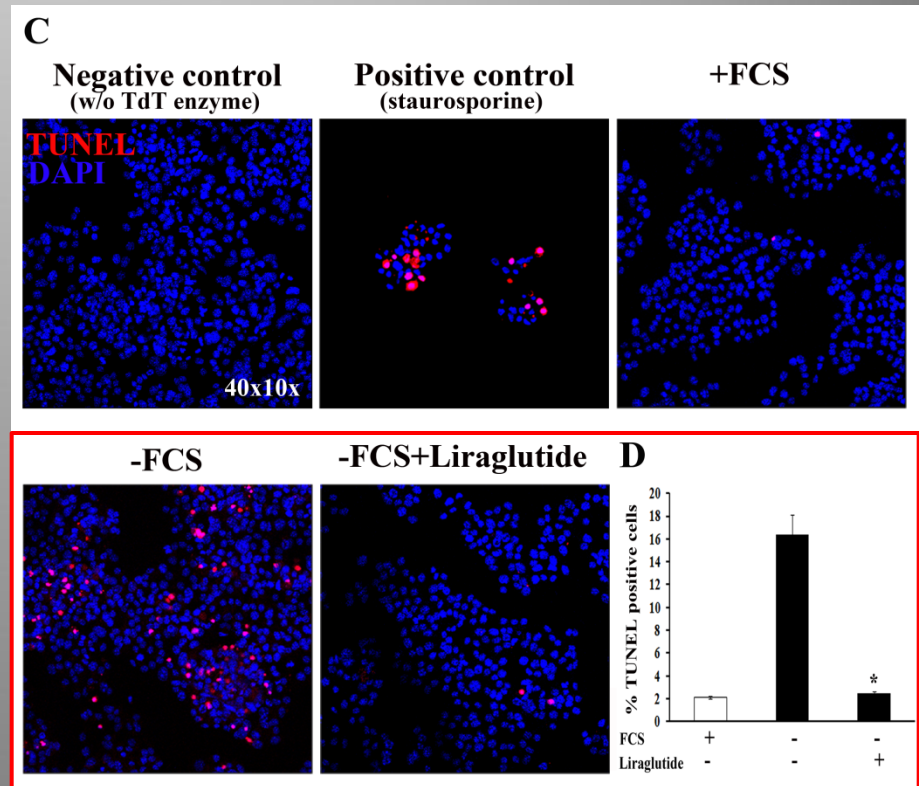
Η Λιραγλουτίδη (Victoza) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ευγενική χορηγία της Novo Nordisk Hellas (Agia Paraskevi, Attiki, Greece)

Η λιραγλουτίδη προστατεύει τα καλλιεργημένα βTC-6 κύτταρα από την επαγόμενη από κυτταρικό-stress απόπτωση



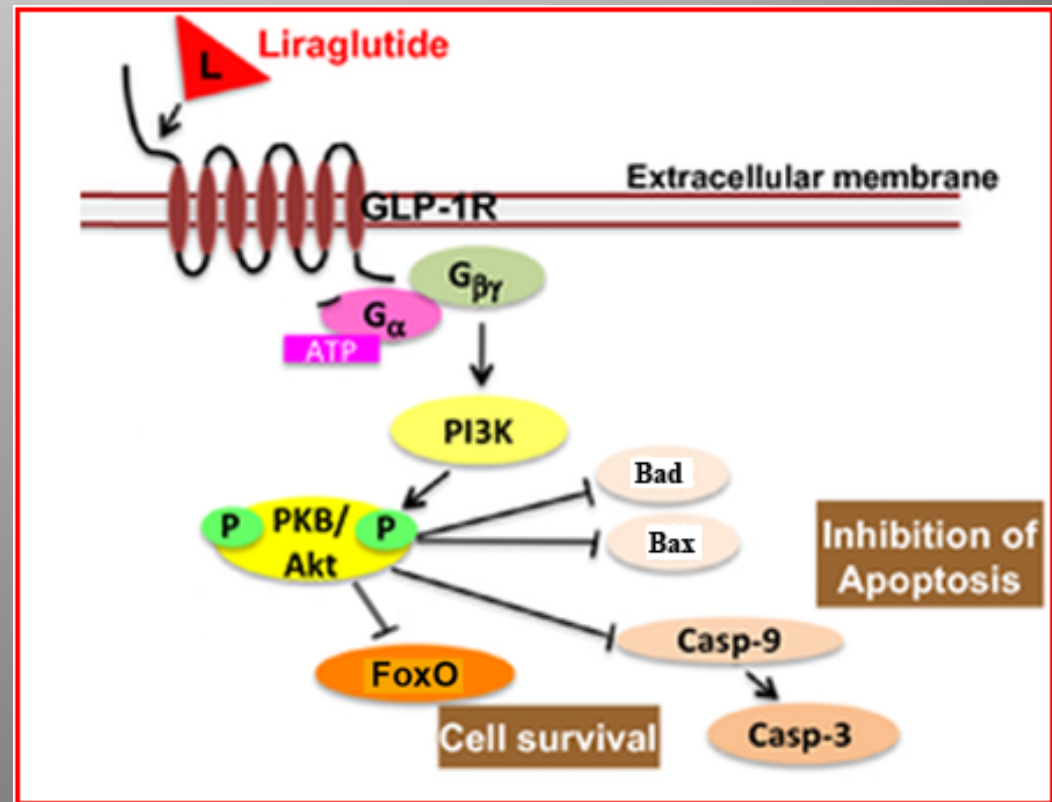
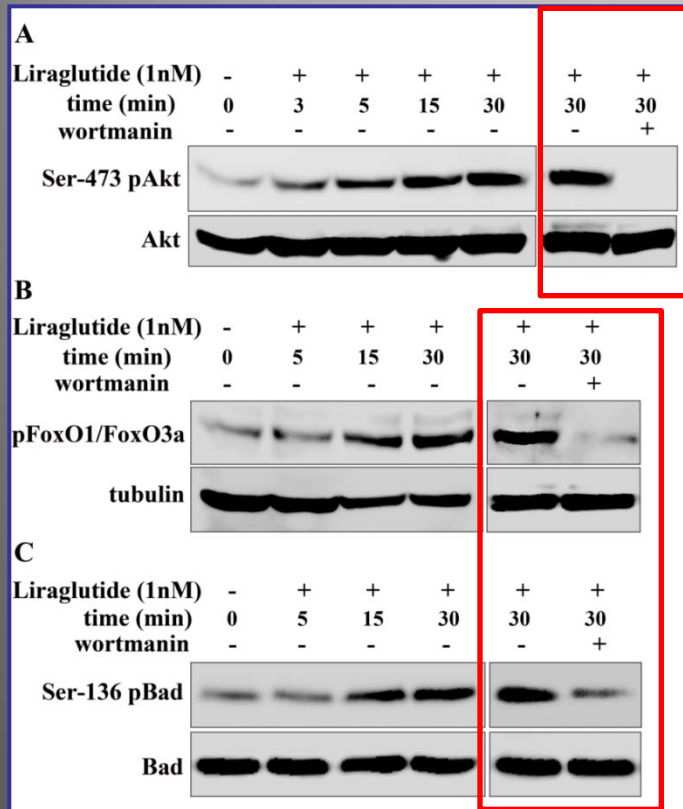
➤ Τα βTC-6 κύτταρα απουσία ορού εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ενεργοποιημένης κασπάσης-3 έναντι των κυττάρων που αναπτύσσονται παρουσία ορού.

➤ Εντούτοις, 1000 nM/l λιραγλουτίδης εμπόδισαν την ενεργοποίηση της κασπάσης-3.



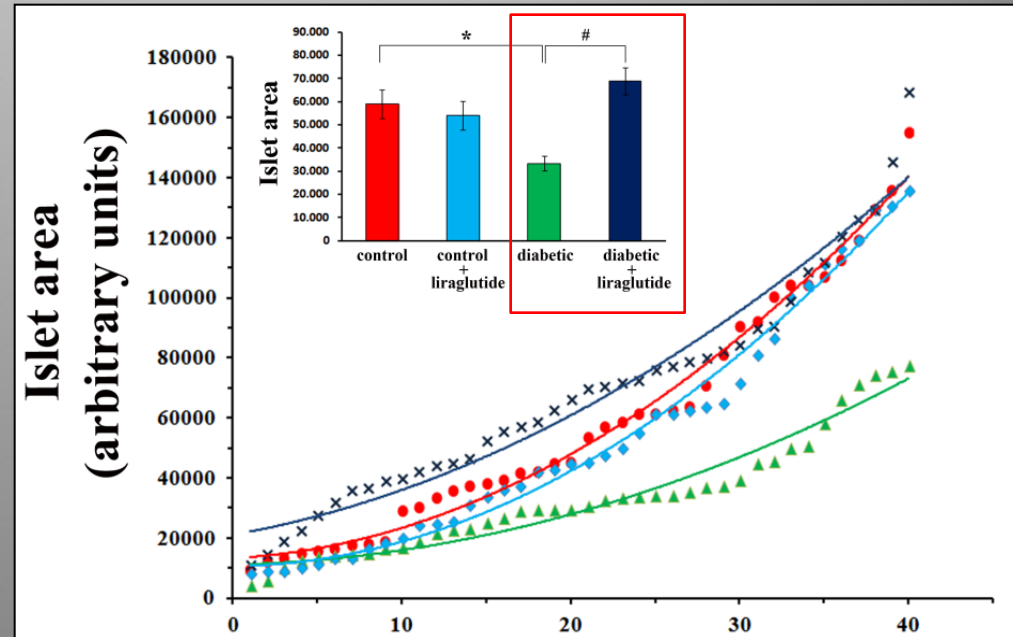
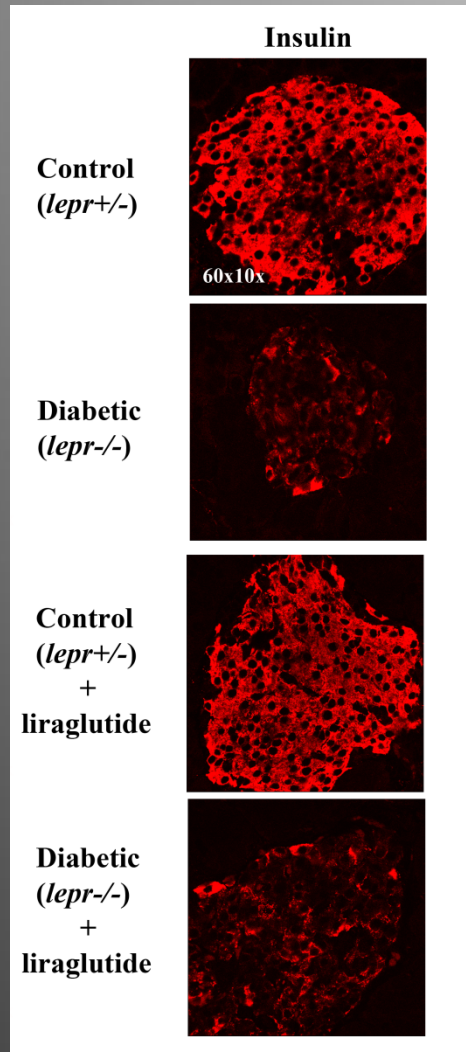
Η ανάλυση βTC-6 κυττάρων για τον κατακερματισμό του DNA (TUNEL-θετικά κύτταρα) αποκάλυψε ότι η έλλειψη ορού οκταπλασίασε τον αριθμό TUNEL-θετικών κυττάρων, έναντι των κυττάρων που καλλιεργούνται παρουσία ορού. Εντούτοις, η απόπτωση των κυττάρων εμποδίστηκε αποτελεσματικά από 1000 nM/l λιραγλουτίδης

Η λιραγλουτίδη προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση ενισχύοντας την επιβίωση των β-κυττάρων



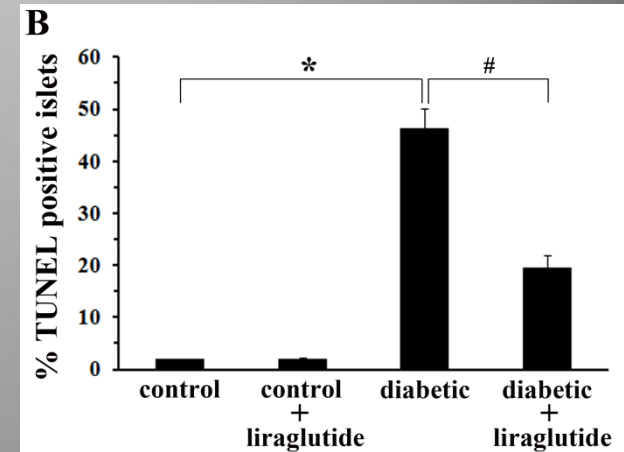
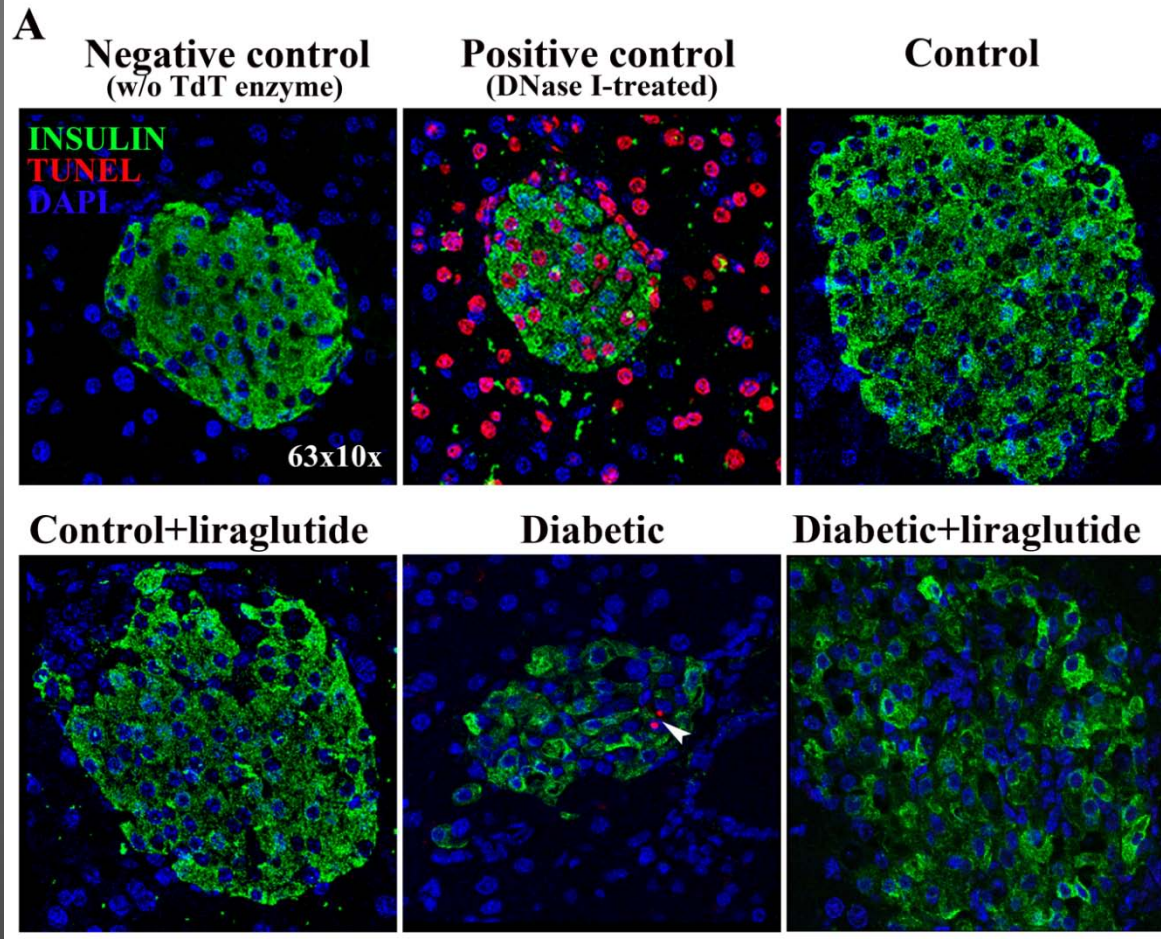
Η Λιραγλουτίδη επάγει την εξαρτώμενη από την PI3K ενεργοποίηση της Akt κινάσης η οποία αναστέλει τη δράση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών BAD και FoxO προάγοντας την κυτταρική επιβίωση και προστατεύοντας τα κύτταρα από την επαγόμενη από κυτταρικό-stress απόπτωση

Επίδραση της λιραγλουτίδης στο μέγεθος των νησιδίων στα διαβητικά ποντίκια (db/db *lepr*^{-/-})



Μελέτες ανοσοφθορισμού σε τομές παγκρέατος αποκάλυψαν ότι η λιραγλουτίδη αποκατέστησε το μέγεθος των νησιδίων των διαβητικών ποντικών.

Επίδραση της λιραγλουτίδης στην επιβίωση των β -κυττάρων των νησιδίων στα διαβητικά ποντίκια (db/db *lepr*^{-/-})



Μελέτες διπλού ανοσοφορισμού σε τομές παγκρέατος αποκάλυψαν αυξημένη β -κυτταρική απόπτωση στα νησίδια διαβητικών ποντικών. Αντίθετα, η κυτταρική απόπτωση ήταν ελάχιστη στα νησίδια φυσιολογικών και διαβητικών ποντικών στους οποίους είχε χορηγηθεί λιραγλουτίδη.

Η χορήγηση λιραγλουτίδης οδήγησε στην αναστολή της απόπτωσης των β -κυττάρων και αποκατάσταση του μεγέθους των νησιδίων στα διαβητικά ποντίκια.

Νέα φάρμακα ανάλογα του GLP-1

Η πλειοτροπική δράση της λιραγλουτίδης αναδεικνύεται μέσα από μελέτες σύμφωνα με τις οποίες μπορεί να πιάνει «με έναν σμπάρο πολλά τρυγόνια» χτυπώντας, εκτός από τον διαβήτη, την παχυσαρκία, ακόμη και τις επιπτώσεις της νόσου Αλτσχάιμερ! Πέραν της λιραγλουτίδης έχουν εμφανιστεί πλέον και αντιδιαβητικά φάρμακα εβδομαδιαίας δράσης (σεμαγλουτίδη) που βοηθούν πολύ στην καθημερινότητα των ασθενών.

Το σημαντικότερο όλων ώστε να βγούμε νικητές απέναντι στον διαβήτη είναι η πρόωμη διάγνωση αλλά και η σωστή, συνεχής παρακολούθηση των ασθενών ώστε να αποφευχθούν επιπλοκές όπως η αμφιβληστροειδοπάθεια που οδηγεί σε τύφλωση, η νεφρική νόσος αλλά και οι ακρωτηριασμοί.

Αν υιοθετηθεί ένας πιο υγιεινός τρόπος ζωής που θα περιλαμβάνει σωστή διατροφή, άσκηση (ακόμη και ήπια, μια απλή καθημερινή βόλτα), αποφυγή του αλκοόλ και του καπνίσματος μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου κατά 35%-40%. Σε τι αντιστοιχεί αυτό το ποσοστό; Σε πρόληψη 150 εκατομμυρίων νέων περιπτώσεων διαβήτη έως το 2035.

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (SANITURA)» (MIS 5002514) που εντάσσεται στη Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑΝΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη
Partnership Agreement
2014 - 2020

Co-financed by Greece and the European Union



Ινστιτούτο
Βιοεπιστημών
και Εφαρμογών

ΕΚΕΦΕ
“Δημόκριτος”



Εργαστήριο
Παθοβιολογίας
Κυττάρου και
Εξωκυττάρου
χώρου

SANITURA
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ
ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ
ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ
ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ
(MIS 5002514)

**Ενότητα εργασίας 2.2.β2: Κατανόηση μοριακών μηχανισμών
διαβητικής νεφροπάθειας και υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης.**

Ενότητα εργασίας 4.3.2: Μελέτη πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης NSCs

Γαρυφαλιά Δροσοπούλου



Ειδικά για τους νεφρούς

Βασικό όργανο για την ομοιοστασία του οργανισμού

Οι λειτουργίες τους είναι:

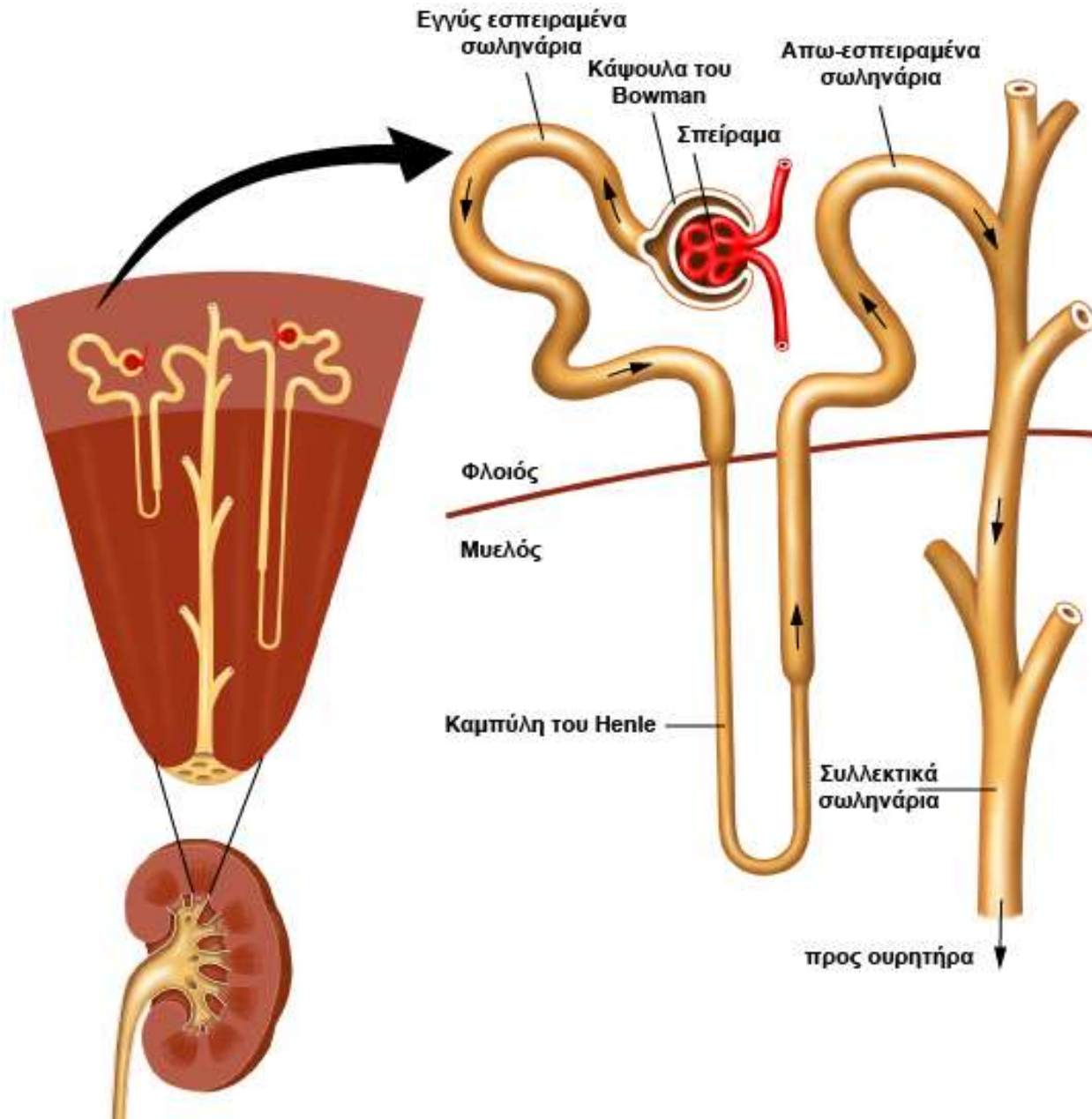
Μεταβολικές: απέκκριση-επαναρρόφηση-διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας
1700 lt αίματος/24ωρο παράγουν 1 lt ούρα
δέχονται το 25% της καρδιακής παροχής αίματος

Ρυθμιστικές: Ρύθμιση της ενδοαγγειακής πίεσης (ρενίνη, αγγειοτενσίνη)

Ενδοκρινικές: Παραγωγή ορμονών όπως ρενίνη, ερυθροποιητίνη
Στόχος ορμονών όπως αλδοστερόνη, αντιδιουρητική ορμόνη,
νατριοδιουρητικό πεπτιδίο

Μείωση των λειτουργιών επιφέρει σημαντικές επιπτώσεις

+ ΝΕΦΡΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΤΟΥ ΔΟΜΕΣ

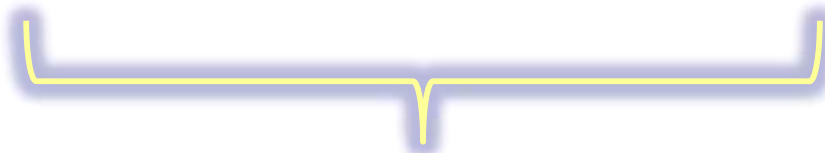


+ Νεφρικό σωμάτιο: Σπείραμα και κάψα του Bowman



Το νεφρικό σωμάτιο περιλαμβάνει:

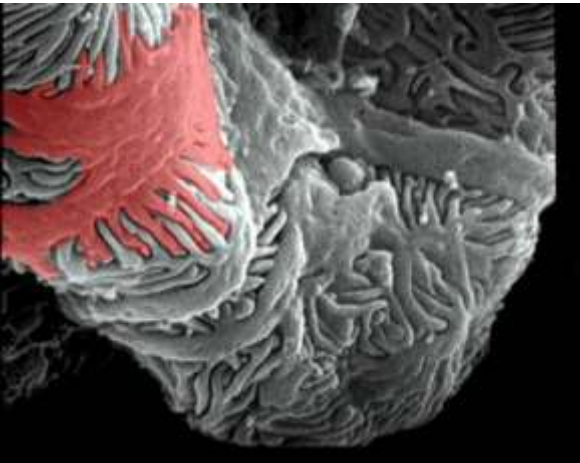
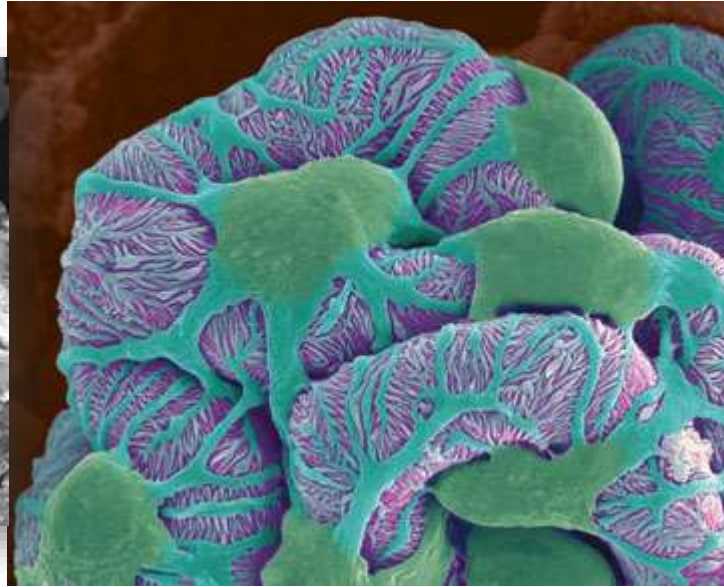
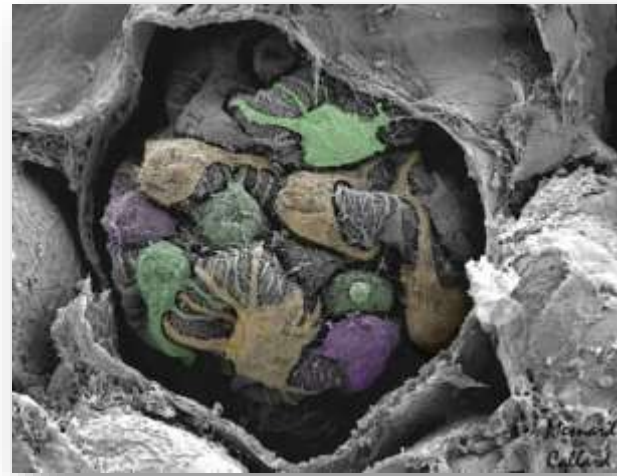
- i) σπείραμα → σύνολο τριχοειδών αγγείων
- ii) κάψα του Bowman → περιβάλλει το σπείραμα



Πρώτο βήμα στη διήθηση του πλάσματος του αίματος



+ ΣΠΕΙΡΑΜΑ ΚΑΙ ΠΟΔΟΚΥΤΤΑΡΑ



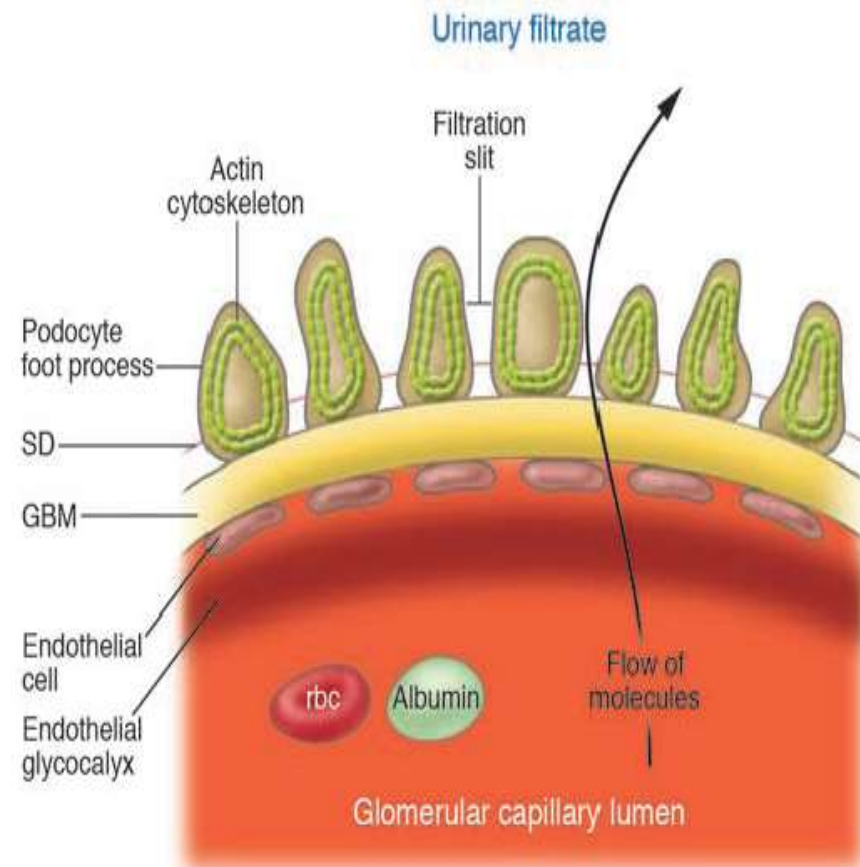
- Επιθηλιακά κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης χωρίς ικανότητα πολλαπλασιασμού.
- Εμφανίζουν επιθηλιακά και περιορισμένα μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά.

- Ογκώδες σφαιρικό κυτταρικό σώμα
- Πρωτογενείς ποδοειδείς προεκβολές εκτείνονται προς τα τριχοειδή αγγεία στα οποία προσφύονται με δευτερογενείς προεκβολές (ποδίσκοι)
- Οι ποδοειδείς προεκβολές διαπλέκονται αφήνοντας ανοιχτές τις σχισμές διήθησης που γεφυρώνονται από μια εξωκυτταρική δομή, τον ηθμό διήθησης

+ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΦΡΑΓΜΟΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ

Στοιχεία του φραγμού
διήθησης:

- Ποδοειδείς προεκβολές ποδοκυττάρων
- Σπειραματική βασική μεμβράνη
- Θυριδωτό ενδοθήλιο

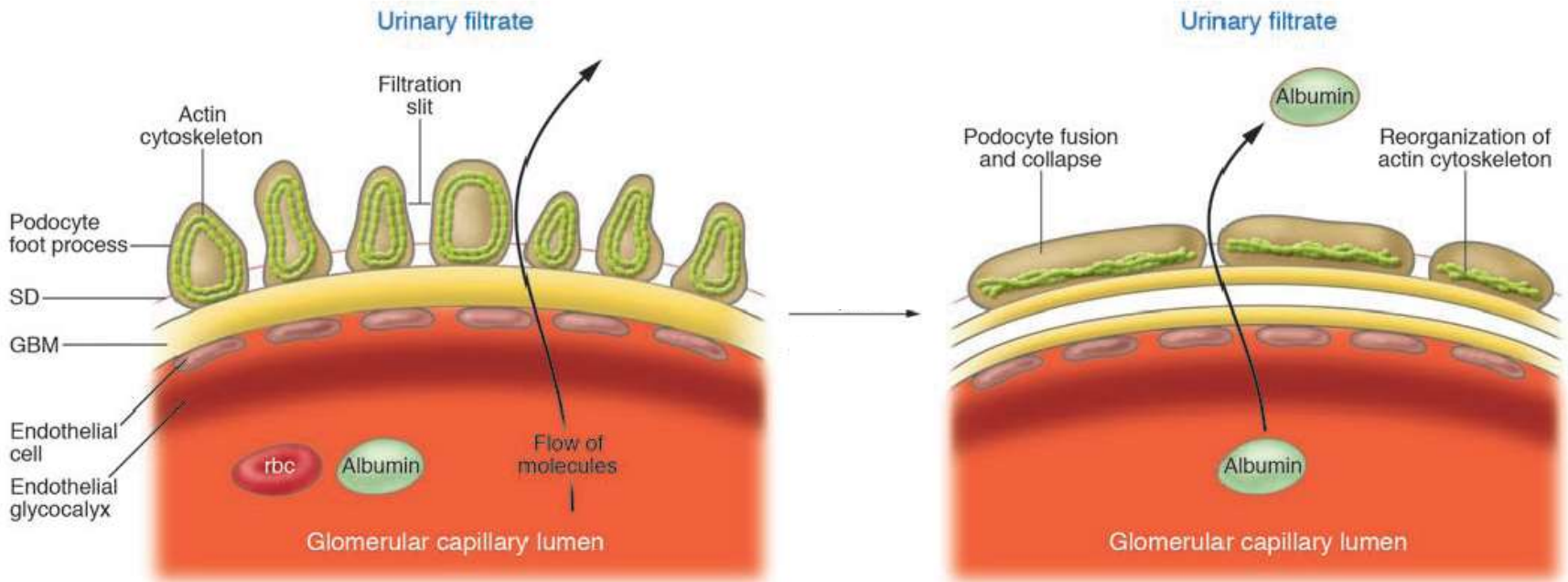


από Ronco, P., *J. Clin. Invest.*, 117 (2007)



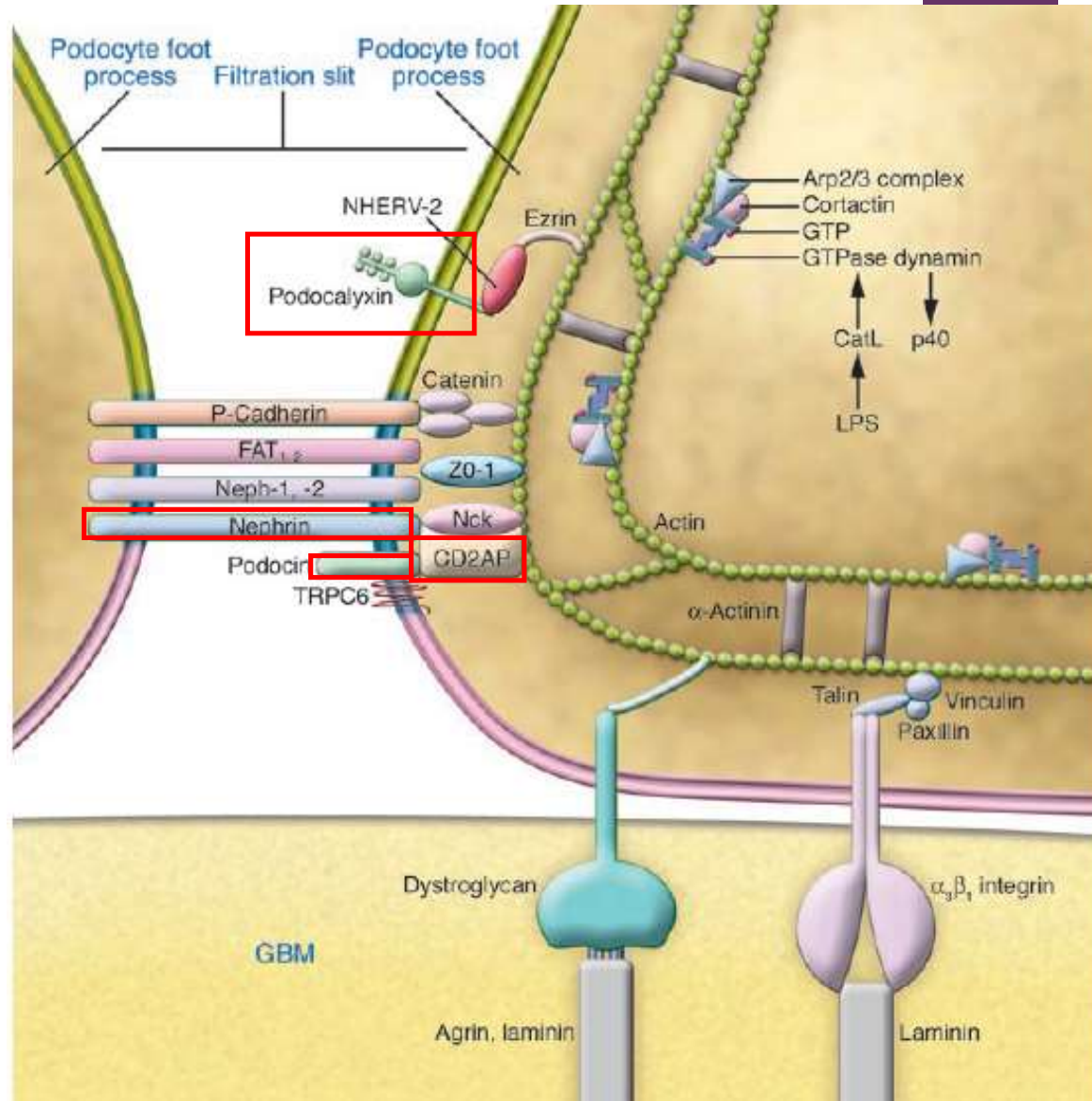
ΠΛΑΤΥΝΣΗ ΤΩΝ ΠΟΔΟΕΙΔΩΝ ΠΡΟΕΚΒΟΛΩΝ

Η πλάτυνση των ποδοειδών προεκβολών σχετίζεται με διάφορες σπειραματικές πρωτεϊνουρικές παθήσεις, όπως η οικογενής νεφροπάθεια φινλανδικού τύπου, η εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση και η διαβητική νεφροπάθεια



από Ronco, P., *J. Clin. Invest.*, 117 (2007)

+ Δομή των σχισμών διήθησης



+ Νεφροσκλήρυνση & Υπέρταση

ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ (ΧΝΝ):

- Αποτέλεσμα των περισσότερων νεφρικών νοσημάτων αλλά και διαδεδομένων συστημικών παθήσεων, όπως υπέρταση και διαβήτης
- Η γήρανση του πληθυσμού καθώς και η αυξανόμενη συχνότητα υπέρτασης και διαβήτη τείνουν να αυξήσουν το ποσοστό της ΧΝΝ.
- Από τους πάσχοντες από ΧΝΝ υπολογίζεται ότι το 1% θα οδηγηθεί σε στάδιο 5, γνωστό και σαν Νεφρική Νόσος Τελικού Σταδίου (NNTΣ), όπου η μοναδική θεραπεία είναι η υποκατάσταση (διάλυση ή μεταμόσχευση).
- Η υπερτασική νεφροσκλήρυνση είναι το δεύτερο πιο συχνό αίτιο NNTΣ.



Μελέτη των αλλοιώσεων που υφίστανται τα ποδοκύτταρα κατά την ανάπτυξη της παθολογίας στην υπερτασική νεφροσκλήρυνση.

- Έκφραση κομβικών μορίων: CD2AP, Nephrin, PODXL, DDR1 σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης της νεφροσκλήρυνσης**
- Απόπτωση ποδοκυττάρων: Μελέτη προ-αποπτωτικών όπως η κατακερματισμένη PARP.**

+ Σύντομη περιγραφή εργασιών

Ζωϊκό μοντέλο αυτόματα υπερτασικών αρουραίων:

Υπερτασικοί αρουραίοι - Spontaneous Hypertensive Rats (SHR)

Ηλικίες = 6, 13 και 20 εβδομάδων.

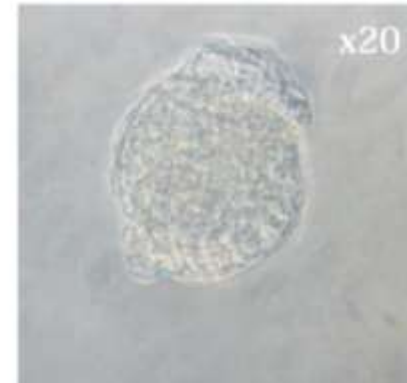
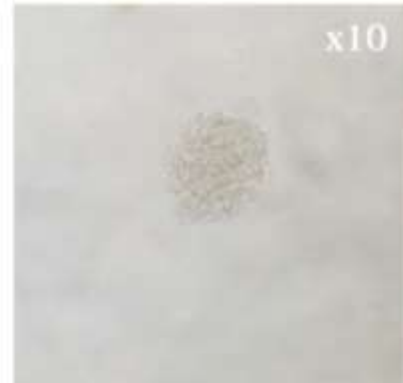
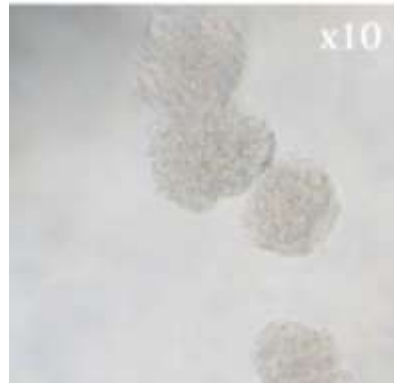
Αρουραίοι μάρτυρες – Wistar Rats (WKY)

Ηλικίες = 6, 13 και 20 εβδομάδων.

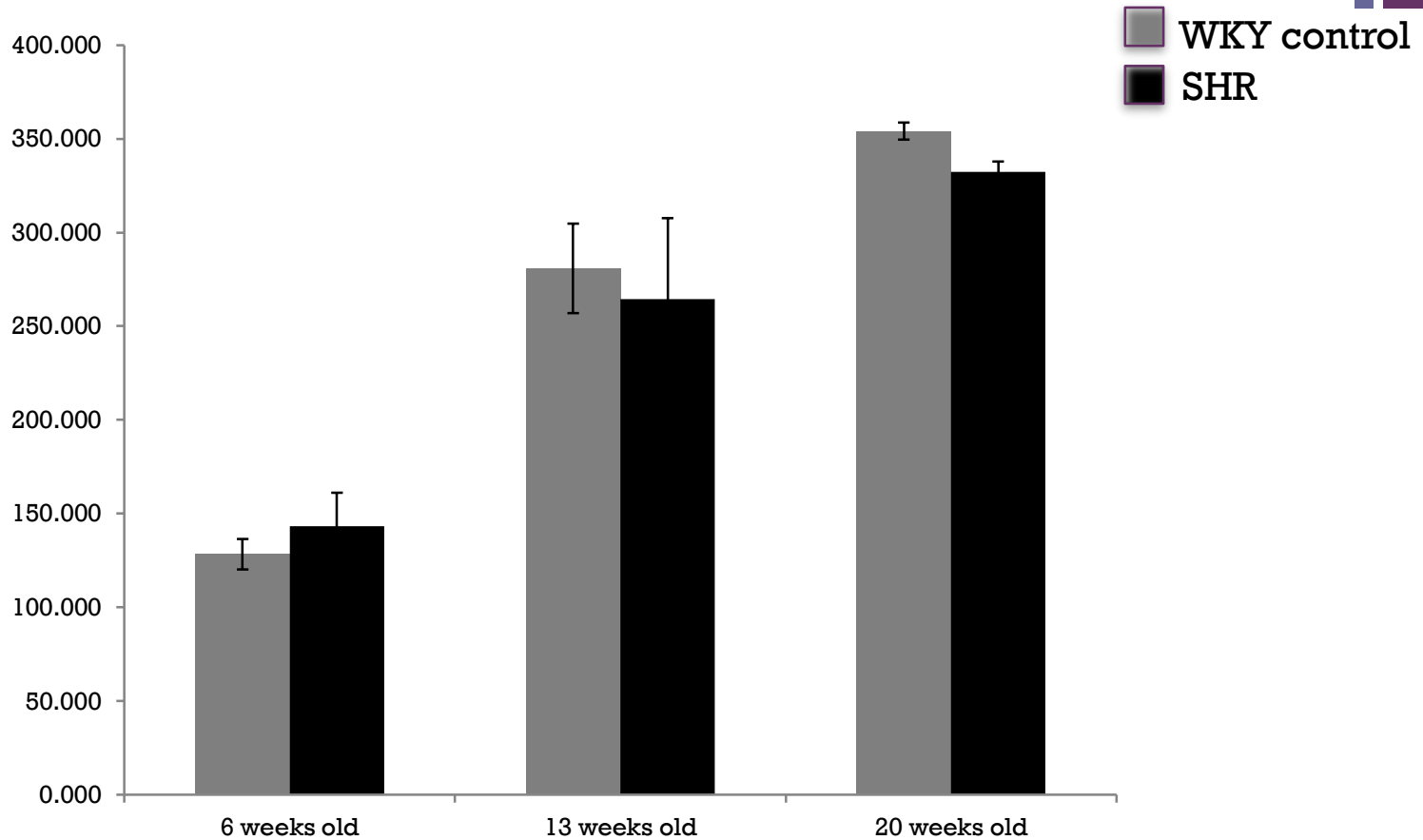
Απομόνωση σπειραμάτων από WKY και SHR



Wistar & SHR Rat

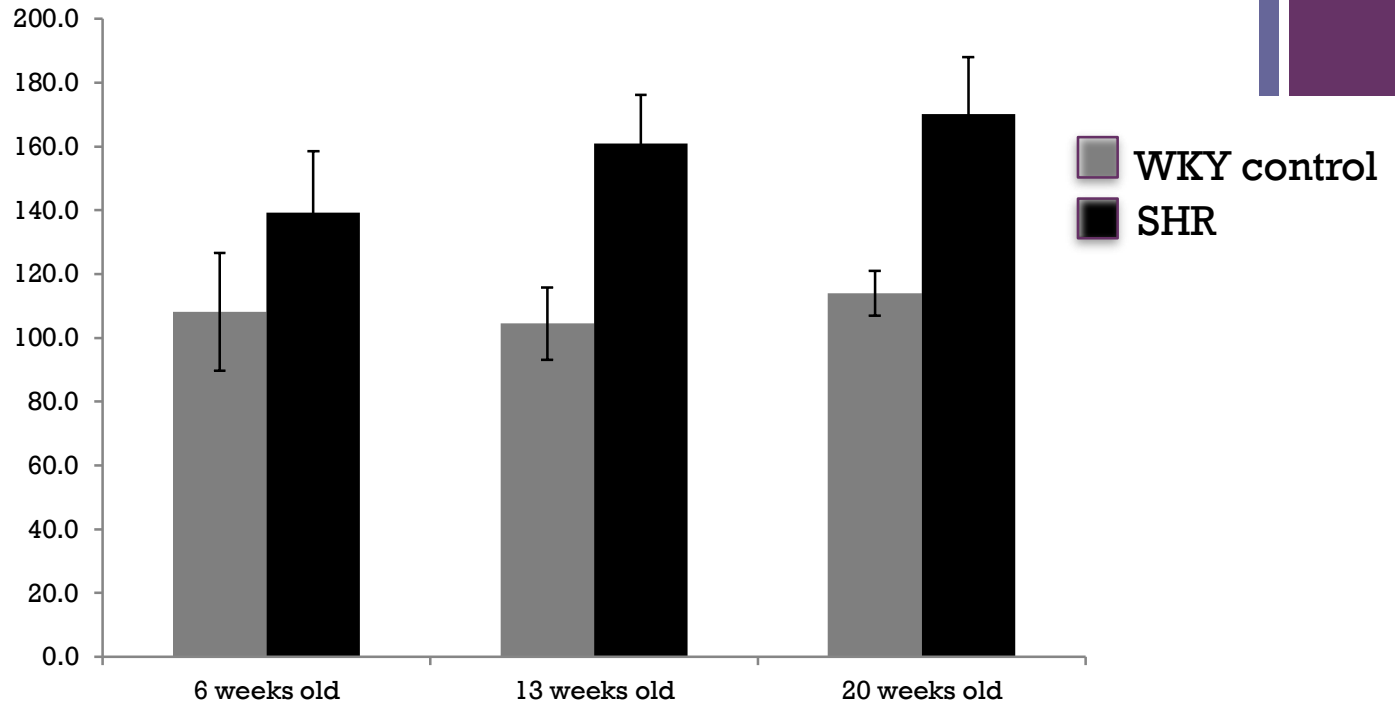


+ Γράφημα μέσου βάρους στα WKY και στα SHR



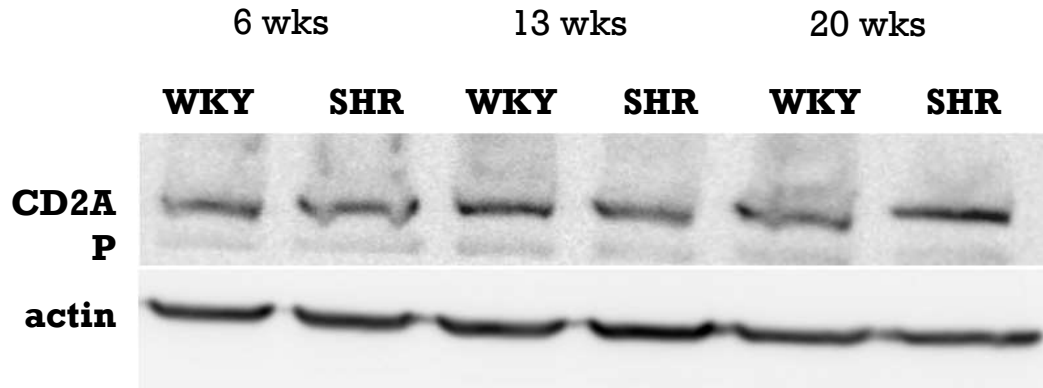
- Δεν εντοπίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές

+ Γράφημα μέσης αρτηριακής πίεσης στα WKY και στα SHR

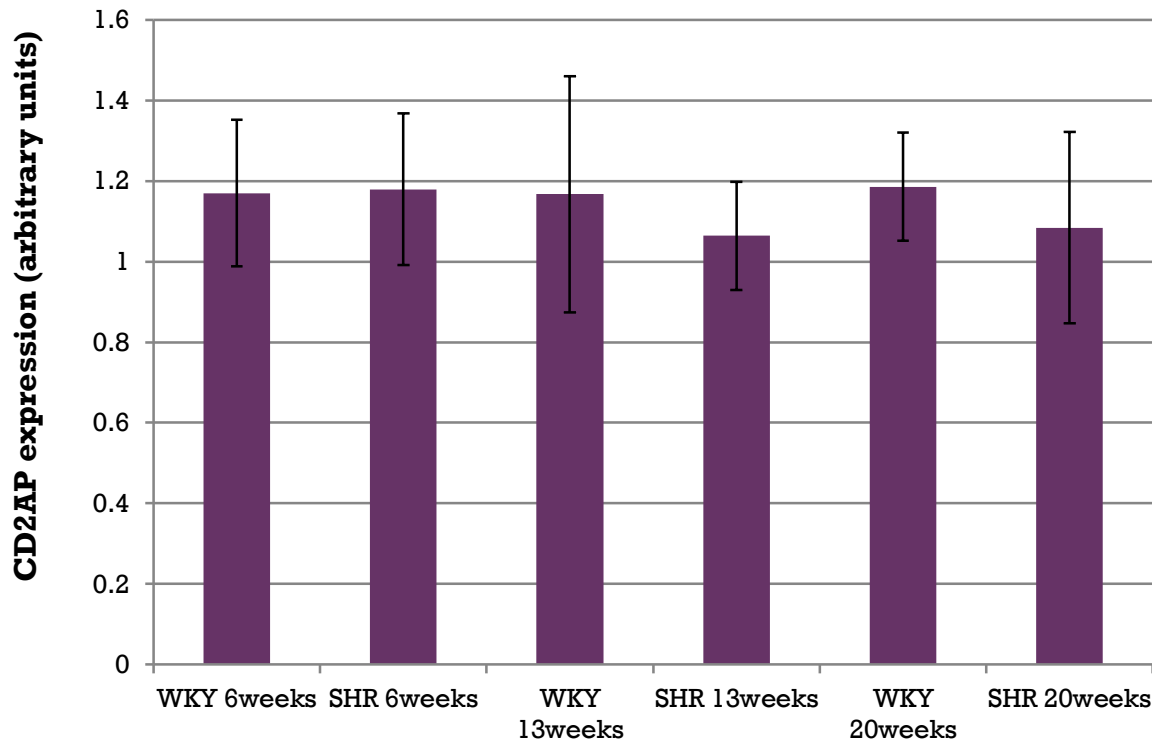


- Εντονότερη η διαφορά στις 13 εβδομάδες
- Η αύξηση της μέσης αρτηριακής πίεσης στα υπερτασικά ζώα (SHR) των 6 εβδομάδων είναι **28,58%**
- Η αντίστοιχη αύξηση στα υπερτασικά ζώα (SHR) των 13 εβδομάδων είναι **54,04%**
- Η αύξηση της μέσης αρτηριακής πίεσης στα υπερτασικά ζώα (SHR) των 20 εβδομάδων είναι **49,2%**

CD2AP/actin

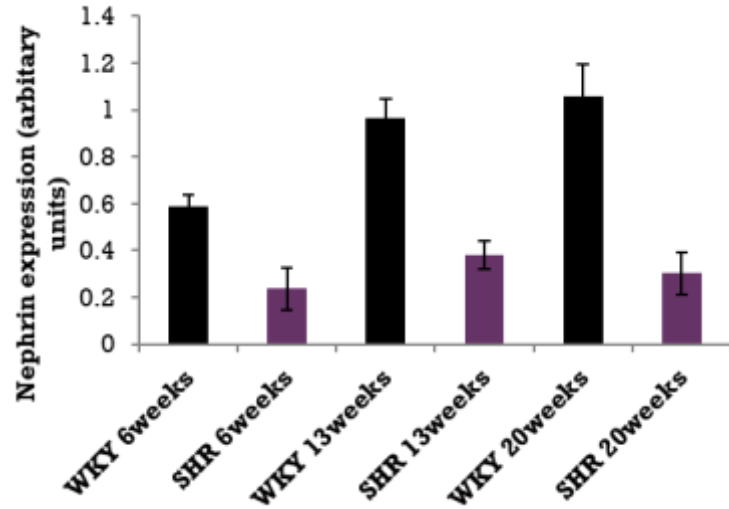


- Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή των επιπέδων της CD2AP στα SHR ζώα σε σχέση με τα WKY, σε καμία χρονική περίοδο.

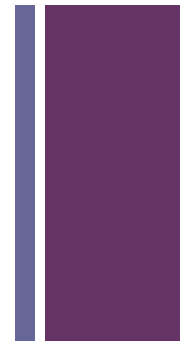
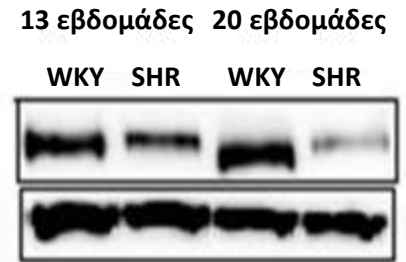
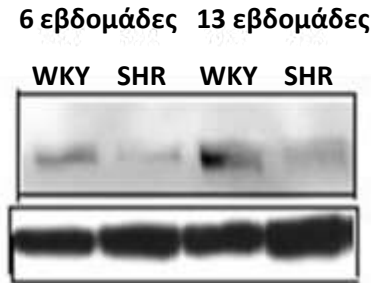


+

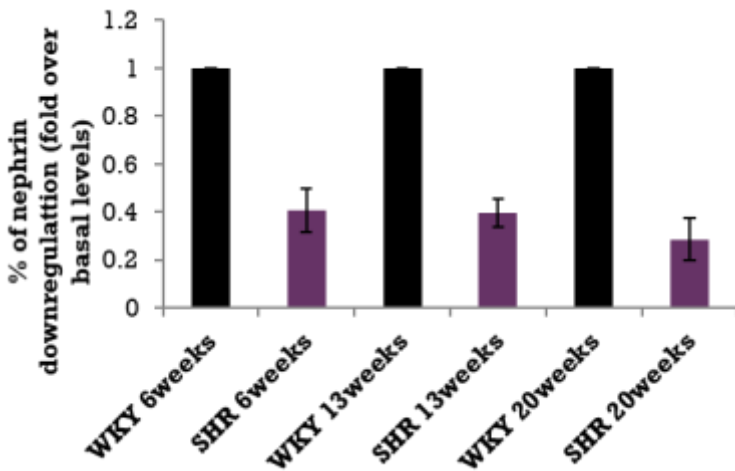
NEPHRIN/actin



Nephtrin
Actin

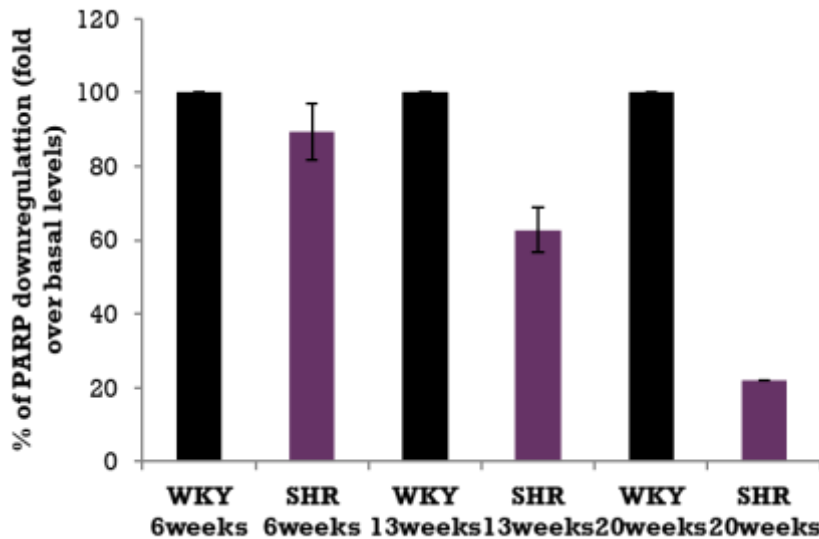
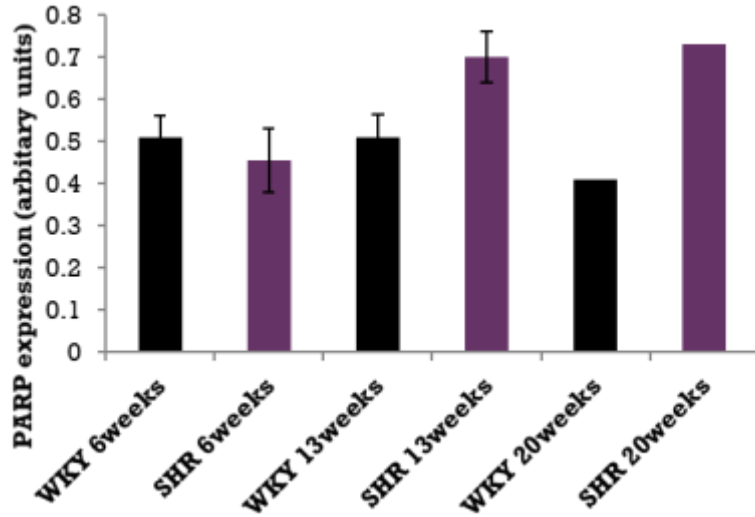


- Στα WKY ζώα παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της Nephtrin με την πάροδο του χρόνου
- Στα SHR ζώα η Nephtrin μειώνεται σε σύγκριση με τα WKY ζώα από τις 6 έως και τις 20 εβδομάδες
- Η μεγαλύτερη % μείωση των επιπέδων Nephtrin στα SHR ζώα σε σύγκριση με τα WKY ζώα αναφοράς παρατηρήθηκε στις 20 εβδομάδες και ήταν 71%



+

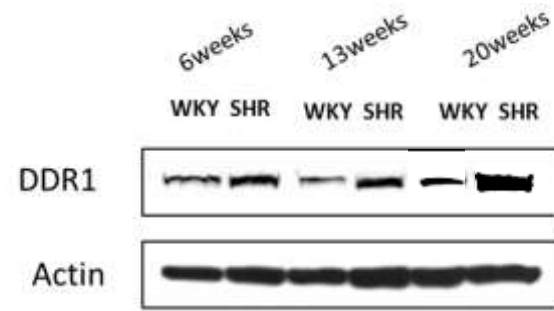
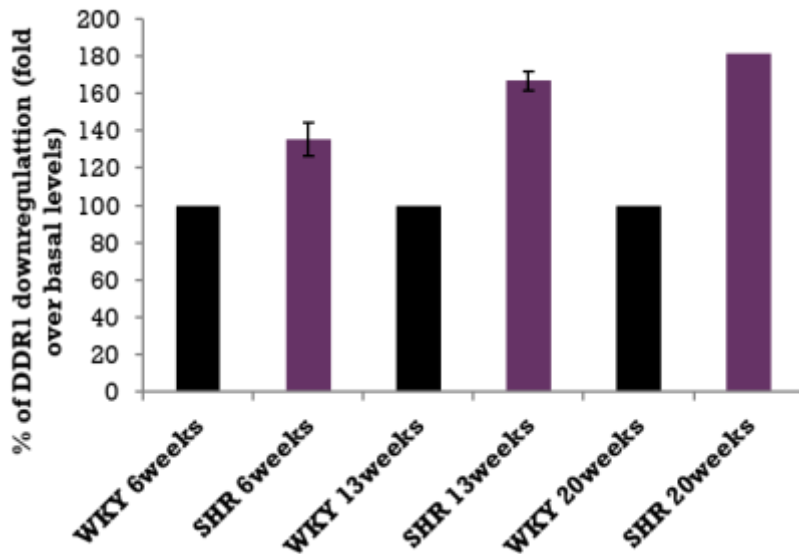
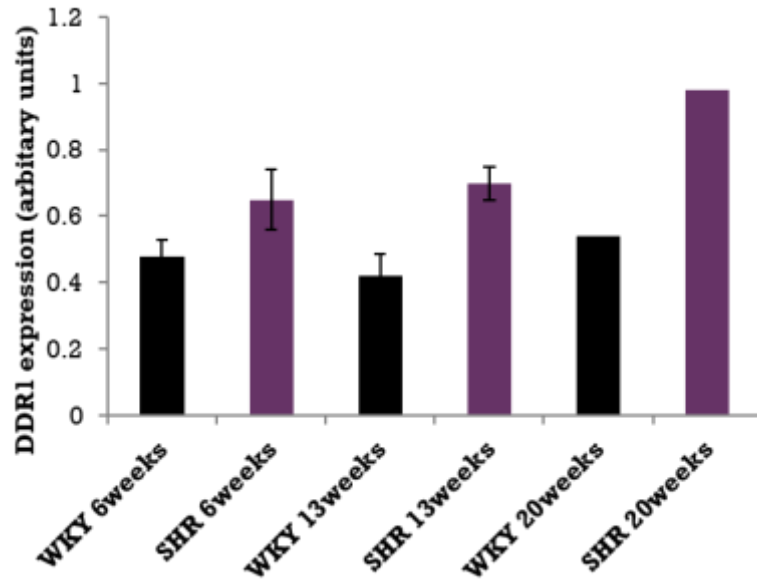
CLEAVED PARP/actin



- Στις 6 εβδομάδες δεν παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WKY-SHR ζώων
- Στις 13 εβδομάδες ο λόγος cleaved Parp/actin SHR ζώα αυξάνει σε σύγκριση με τα WKY
- Στις 13 εβδομάδες παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική αύξηση 38% του λόγου cleaved Parp/actin στα SHR ζώα σε σύγκριση με τα WKY ζώα
- Στις 20 εβδομάδες παρατηρήσαμε αύξηση του λόγου cleaved Parp/actin στα SHR ζώα σε σύγκριση με τα WKY ζώα



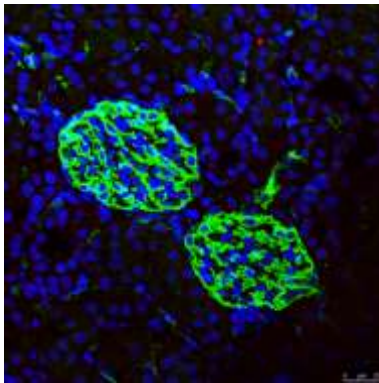
DDR1/actin



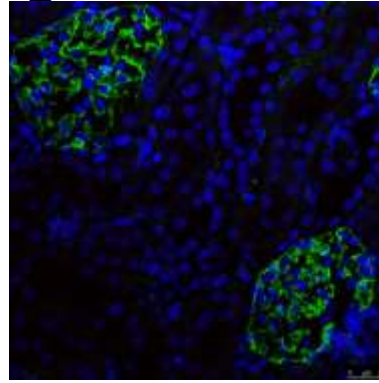
- Δεν παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του DDR1 στα WKY ζώα, με την πάροδο του χρόνου.
- Τα επίπεδα έκφρασης του DDR1 στα SHR ζώα είναι αυξημένα σε σύγκριση με τα WKY ζώα.
- Στις 6 εβδομάδες παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική άυξηση 35% της έκφρασης του DDR1 στα SHR ζώα σε σύγκριση με τα WKY ζώα.
- Στις 13 εβδομάδες παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική άυξηση 66% της έκφρασης του DDR1 στα SHR ζώα σε σύγκριση με τα WKY ζώα.
- Στις 20 εβδομάδες παρατηρήσαμε άυξηση περίπου 80% της έκφρασης του DDR1 στα SHR ζώα σε σύγκριση με τα WKY ζώα.

PODXL

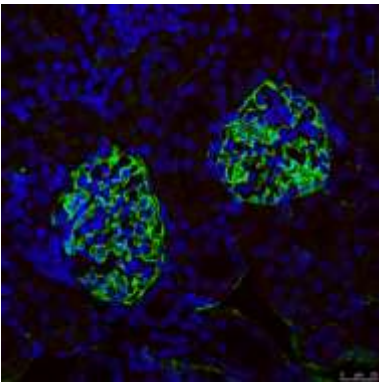
WKY_6w_PCLP



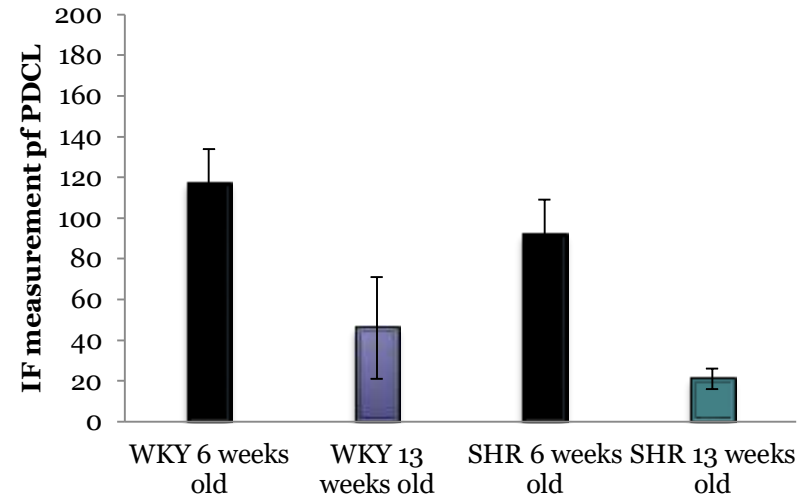
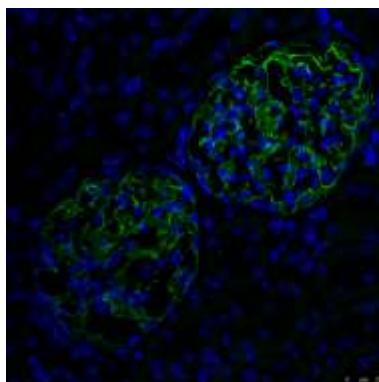
WKY_13w_PCL



SHR_6w_PCLP



SHR_13w_PCLP



- Στα **SHR** ζώα η ποδοκαλυκίνη μειώνεται σε σύγκριση με τα **WKY** ζώα τόσο στις 6 εβδομάδες όσο και στις 13 εβδομάδες, κατα **50%**



Συμπεράσματα



- Η μείωση της έκφρασης της **Nephrin** στους **SHR** αρουραίους, καθώς και η αύξηση της έκφρασης του αποπτωτικού δείκτη **PARP**, επιβεβαιώνουν τη διαταραχή του σπειραματικού φραγμού διήθησης.
- Η αύξηση της έκφρασης του **DDR1** στους **SHR** αρουραίους επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα άλλων ζωικών μοντέλων (π.χ ρενίνης-αγγειοτενσίνης)
- Η μείωση της έκφρασης της **PODXL** στους **SHR** αρουραίους είναι ένδειξη ότι η υπέρταση έχει αρνητικό αντίκτυπο στους νεφρούς σε πρώιμα στάδια



Ινστιτούτο
Βιοεπιστημών
και Εφαρμογών

ΕΚΕΦΕ
“Δημόκριτος”



Εργαστήριο
Παθοβιολογίας
Κυττάρου και
Εξωκυττάρου
χώρου

SANITURA
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ
ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ
ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ
ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ
(MIS 5002514)

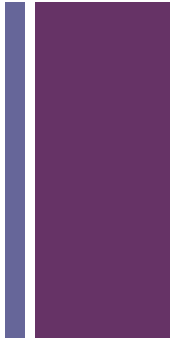
Ενότητα εργασίας 2.2.β2: Κατανόηση μοριακών μηχανισμών διαβητικής νεφροπάθειας και υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης.

Ενότητα εργασίας 4.3.2: Μελέτη πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης
NSCs
Γαρυφαλιά Δροσοπούλου





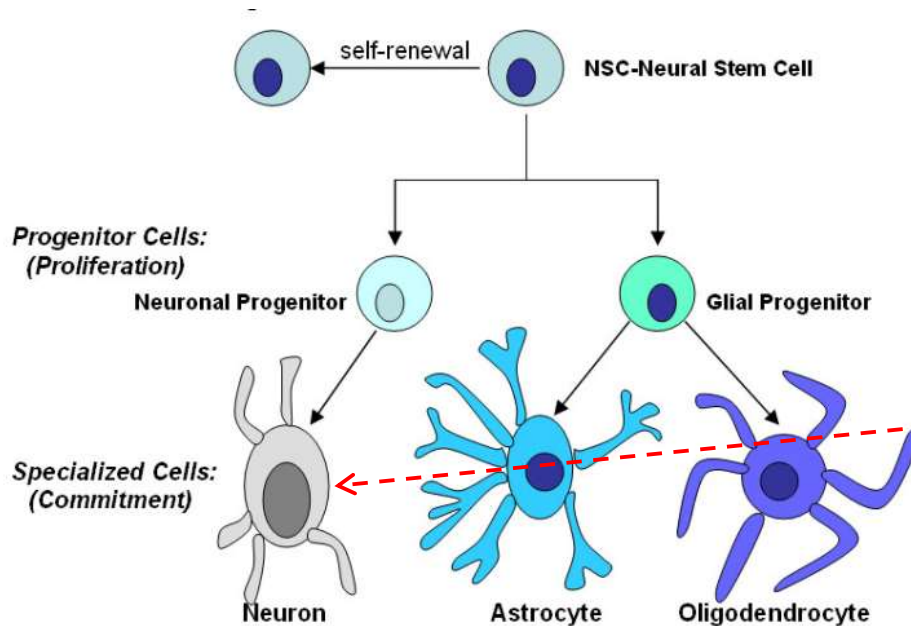
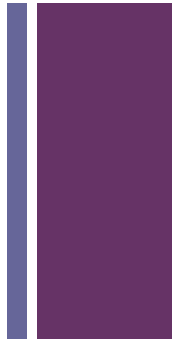
Olfactory ensheathing cells (OECs)



- ✓ Ο κυτταρικός πληθυσμός του οσφρητικού βλεννογόνου [olfactory ensheathing cells (OECs)] αποτελεί εξαιρετική πηγή πολυδύναμων προγονικών νευρικών κυττάρων.
- ✓ Η απομόνωση του οσφρητικού βλεννογόνου είναι σχετικά απλή, χωρίς ηθικούς περιορισμούς.
- ✓ Η μεταμόσχευση των κυττάρων του οσφρητικού βλεννογόνου δεν έχει σχετισθεί με την εμφάνιση παρενεργειών όπως δημιουργία όγκων.
- ✓ Τα ανωτέρω στοιχεία καθιστούν τον πληθυσμό αυτό εξαιρετικά χρήσιμο στην κλινική εφαρμογή κυτταρικής θεραπείας νευροεκφυλιστικών παθήσεων, καθώς και παθήσεων που σχετίζονται με τραυματισμούς της σπονδυλικής στήλης.



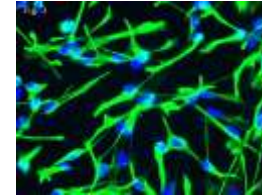
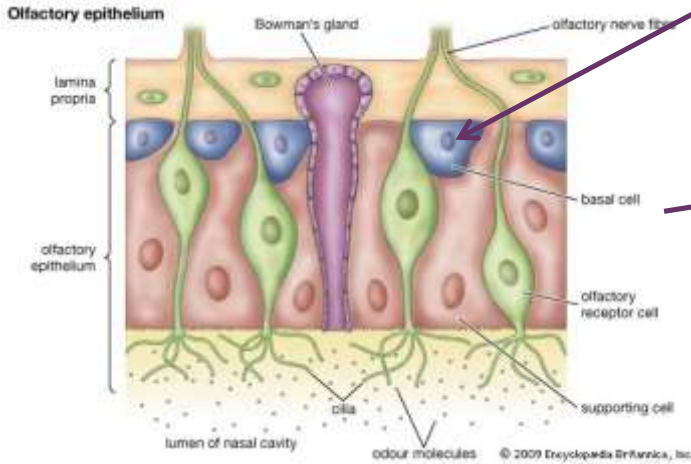
Neuronal stem cells for cell therapy in diseases of the nervous system



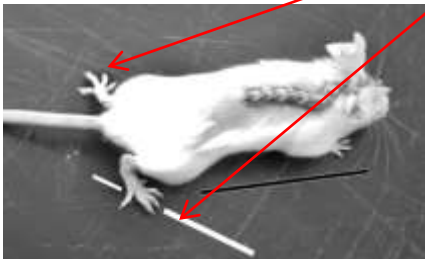
This line of research includes the use of specific neuroblasts to restore spinal damage which leads to paraplegia/quadraplegia



1. Autologous neuroblasts from a specialized tissue: olfactory mucosa will be obtained with minor surgical excision and will be cultured to obtain large cell numbers...

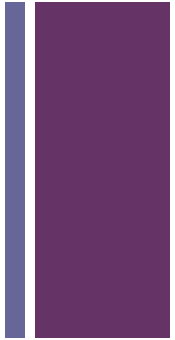


2....and transplant the cells in the spinal cord of mice with induced spinal damage (paraplegic, not moving hind legs)

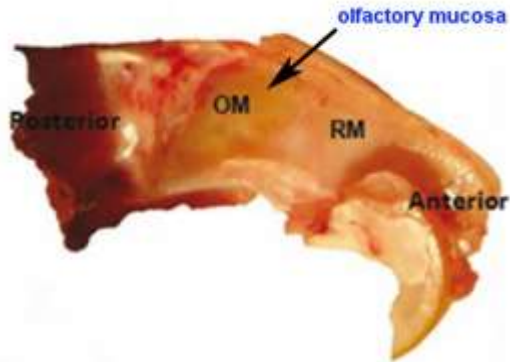


3....These mice following neuroblast transplantation eventually show restored hind leg movement

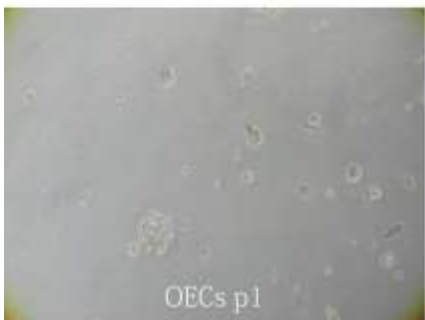
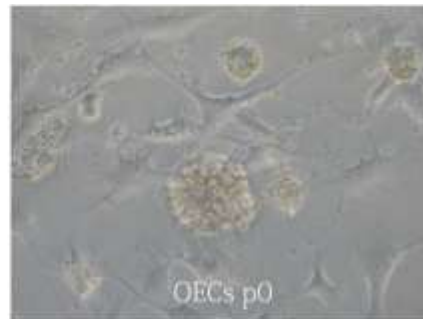
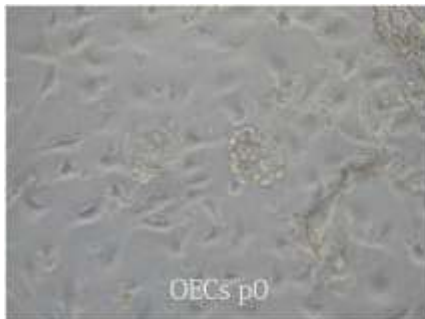




1. Απομόνωση οσφρητικού βλεννογόνου από πειραματόζωα

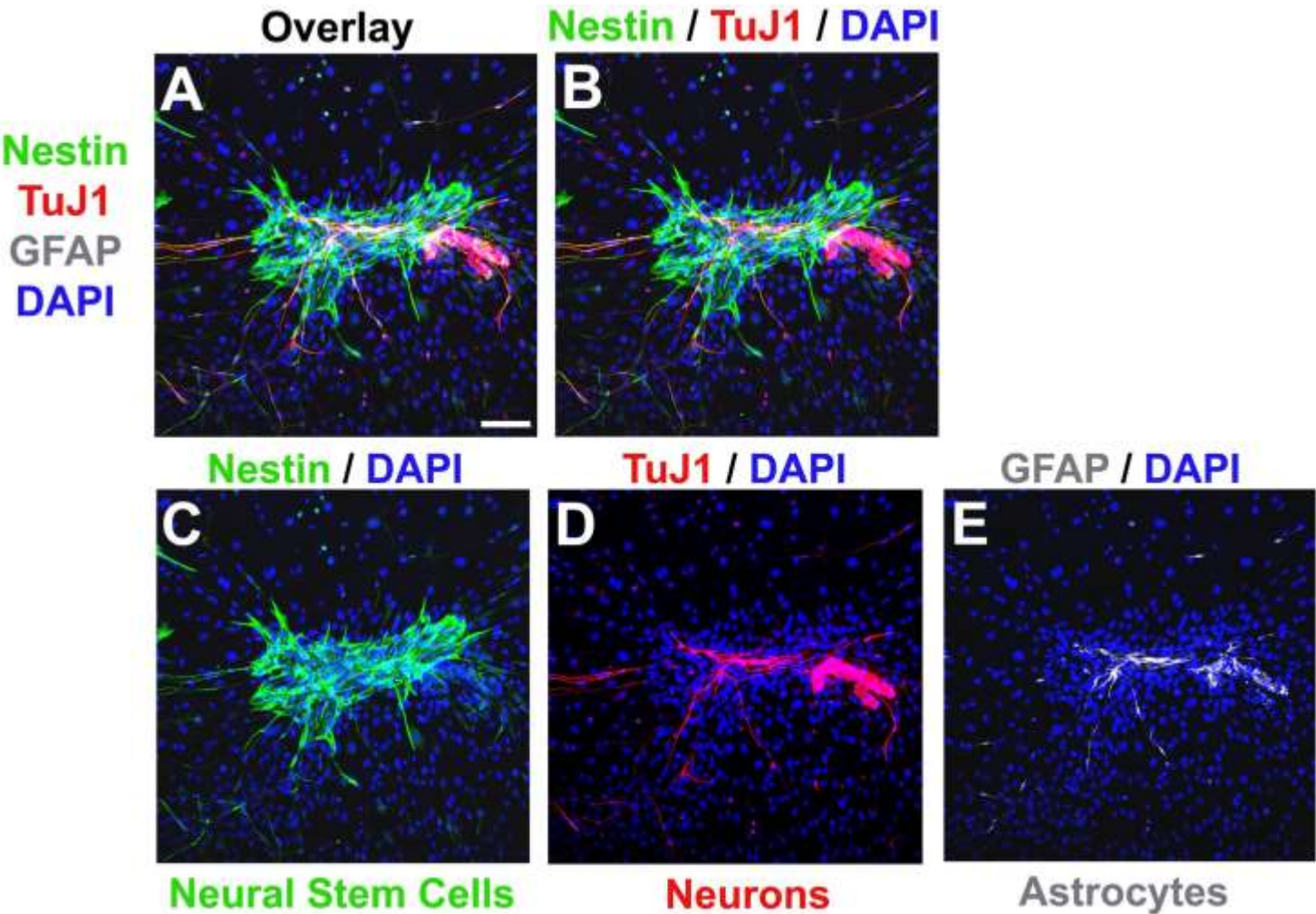
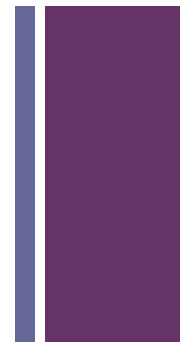


2. Καλλιέργεια απομονωμένων κυττάρων οσφρητικού βλεννογόνου.

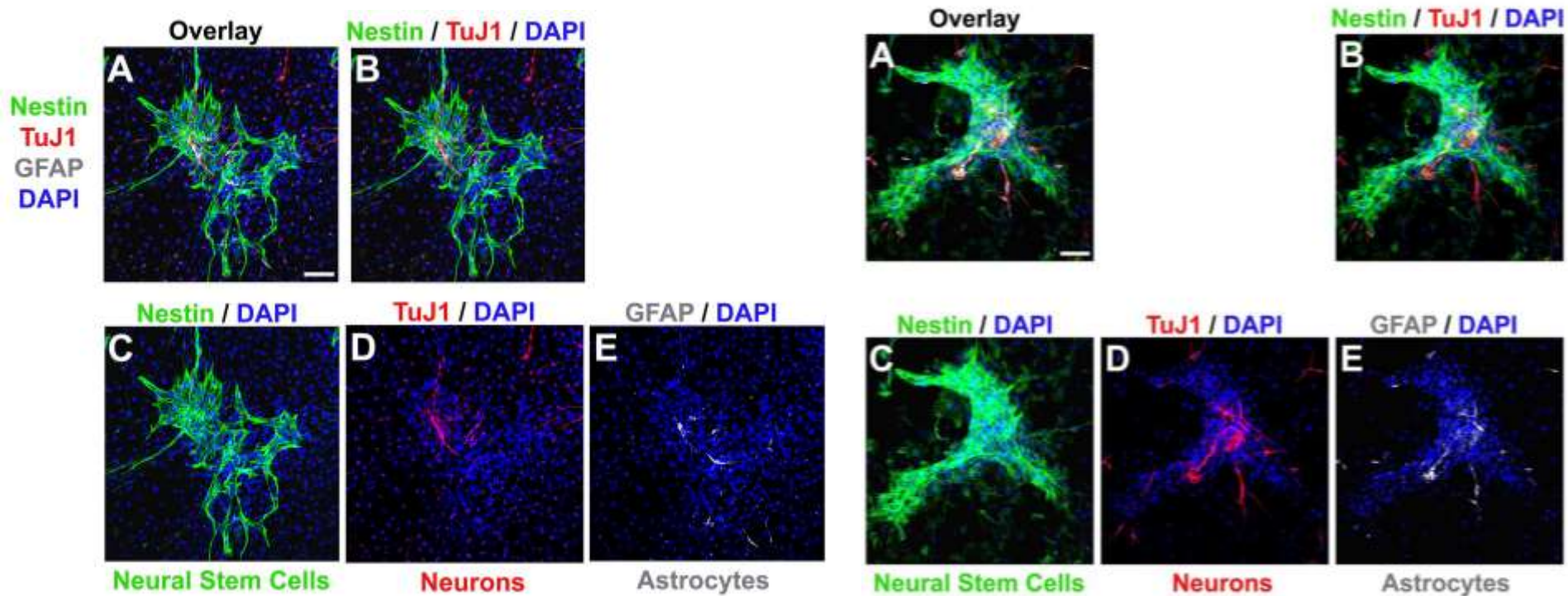
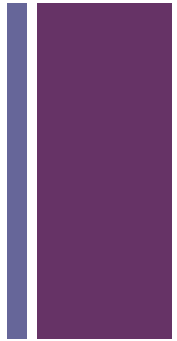


Η καλλιέργεια των OECs οδηγεί στη δημιουργία νευροσφαιρών (**neurospheres**) οι οποίες διατηρούνται μετά από διαδοχικές ανακαλλιέργειες.

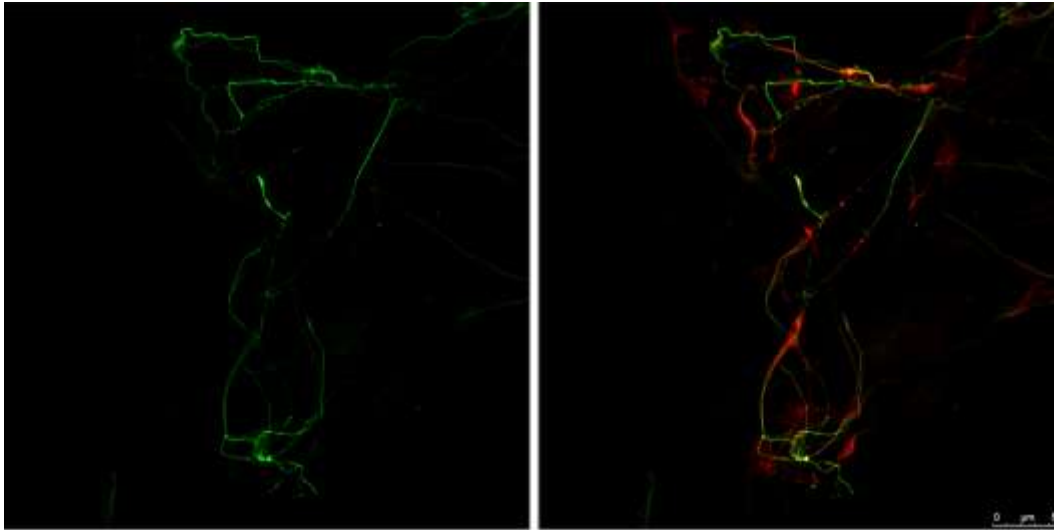
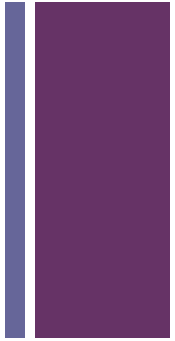
- + Χρήση κατάλληλων μορίων δεικτών για τον εντοπισμό πληθυσμού νευρικών βλαστικών κυττάρων (neural stem cells (NSC))



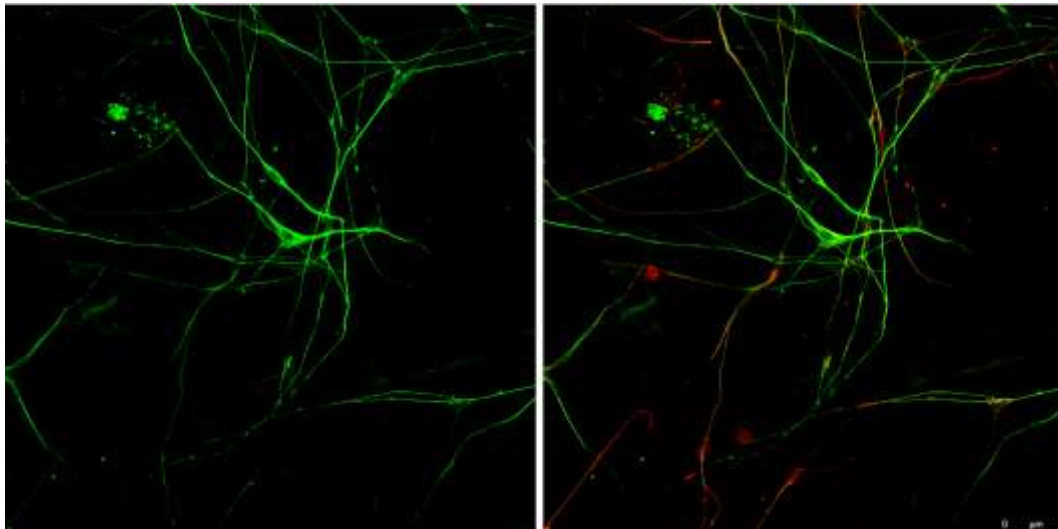
+ Η ανακαλλιέργεια των OECs μπορεί να οδηγήσει στην απόκτηση ενός εμπλουτισμένου πληθυσμού νευρικών βλαστικών κυττάρων



+ Απομόνωση OECs από ασθενείς με σοβαρές βλάβες στη σπονδυλική στήλη



P0: Nestin/TuJ1



P1: Nestin/TuJ1

Βασικό στόχο αποτελεί ο επαναπρογραμματισμός των OECs με σκοπό την απόκτηση αμιγούς πληθυσμού νευρικών βλαστικών κυττάρων [neural stem cells (NSC)], τα οποία θα διατηρούν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και αυτό-ανανέωσης.



Εργαστήριο Παθολογίας Κυττάρου και
Εξωκυττάρου Χώρου

Γαρυφαλιά Δροσοπούλου, PhD

Ουρανία Τροχάτου, PhD

Κέντρο Πειραματικής Χειρουργικής και
Μεταφραστικής Έρευνας, ΙΙΒΕΑΑ

Παναγιώτης Πολίτης, PhD



Co-financed by Greece and the European Union

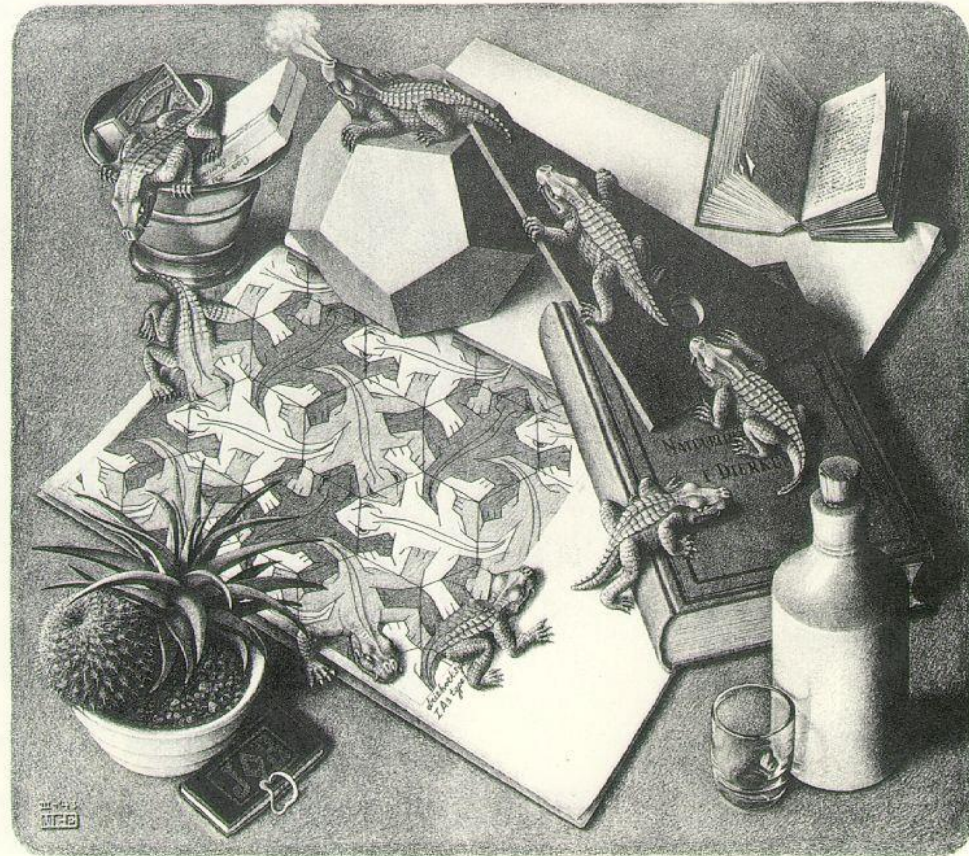


Co-financed by Greece and the European Union

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ

Οι αποκλίσεις από τον «2^ο νόμο ισοτιμίας του Chargaff» ως εργαλείο εντοπισμού μεταλλακτικών ρυθμών που εξαρτώνται από ‘πρώτους γείτονες’, καθώς και άλλων γονιδιωματικών χαρακτηριστικών

Κωστας Αποστόλου
Χριστόφορος
Νικολάου
Γιάννης Αλμυράντης



Παρατηρώντας αλληλουχίες από βάσεις δεδομένων, συχνά μας διαφεύγει η λεπτομέρεια της σχεδόν πανταχού παρούσας σχεδόν-ισότητας A~T, G~C :

```

• ID EU196537; SV 1; linear; mRNA; STD; INV; 1562 BP.
• XX
• AC EU196537;
• XX
• DE Capitella sp. I ECS-2004 labial hox protein mRNA, complete cds.
• XX
• OS Capitella sp. I Grassle & Grassle, 1976
• OC Eukaryota; Metazoa; Annelida; Polychaeta; Scolecida; Capitellida;
• OC Capitellidae; Capitella.
• XX
• .....
• XX
• SQ Sequence 1562 BP; 421 A; 370 C; 350 G; 421 T; 0 other;
• gagagcggct tcatttcagc agtgcacttc gatggctggg gaatacacgc tttgtaattt 60
• ggacaatcat acgtacactt caccgtacaa cggcacggag ggtgcaaact acaatggcta 120
• cactggagcg gagtatggtg ttcaccacgg cgcaggtcca gggccgctg gggcatcact 180
• ggaactgcat agccccgcg ggctcggcta cggtgagcgg ggcggcatgt gcgatgggga 240
• .....
• .....
• =====

```

... Η οποία γίνεται πιο έντονη σε μακρότερες αλληλουχίες:

• ID U01317; SV 1; linear; genomic DNA; STD; HUM; 73308 BP.

• XX

•

• 08 (Rel. 97, Last updated, Version 36)

• XX

• DE **Human beta globin region on chromosome 11.**

• XX

•

• XX

• OS Homo sapiens (human)

• OC Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia;

• OC Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae;

• OC Homo.

•

• XX

• SQ Sequence **73308 BP; 22068 A; 14146 C; 14785 G; 22309 T**; 0 other;
gaattctaatt ctcctctca accctacagt caccatttg gtatattaaa gatgtgtgtg 60
ctactgtcta gtatcctca agtagtgta ggaattagc atttaaatag tctgcaagcc 120
aggagtgtg gctcatgtct gtaattccag cactggagag gtagaagtgg gaggactgct 180
tgagctcaag agtttgatat tatcctggac aacatagcaa gacctcgtct ctacttaaaa 240

•

•

• =====

• ID CH940649; SV 1; linear; genomic DNA; ANN; INV; 20206255 BP.

• XX

•

• XX

• DE **Drosophila virilis strain TSC#15010-1051.87 scaffold_12963** genomic

• DE scaffold, whole genome shotgun sequence.

•

• XX

• OS Drosophila virilis

• OC Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera;

• OC Endopterygota; Diptera; Brachycera; Muscomorpha; Ephydroidea;

• OC Drosophilidae; Drosophila.

• XX

•

• XX

• SQ Sequence **20206255 BP; 5956259 A; 3990075 C; 3984193 G; 5957336 T**; 318392 other;
gttgtgattt tagtagtctt cgtagttgaa attggagttg tccttgtagt tgacacagaa 60
gtaggcactg tggttattgg gattggtgtt ggtggtgtca ctgtggtgtg agtcggtatt 120
gtgctacaaa ttggtaaatt gggagacggt gtacaaaggt tacttggttc tctagttgtc 180

•

•

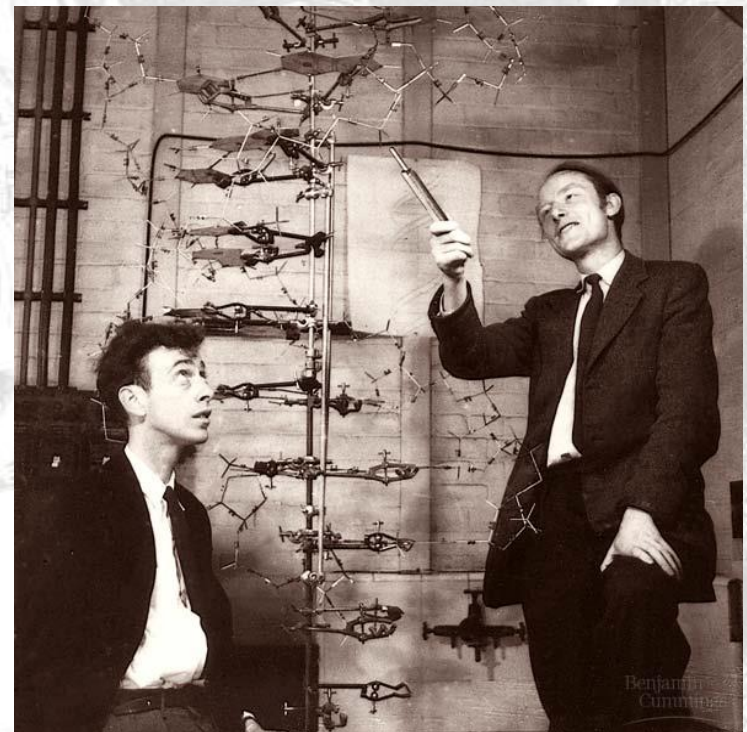
LIST OF NUCLEOTIDE CONTENT OF RANDOMLY CHOSEN MICROBIAL GENOMES

ORGANISM NAME	A	T	G	C	Total
<i>Acinetobacter</i>	1072579	1071135	730970	723937	3598621
<i>Agrobacterium</i>	581214	573172	835436	851758	2841580
<i>Bacillus anthrac.Am.</i>	1685374	1692668	919244	930007	5227293
<i>Bacillus subtilis</i>	1187714	1192801	914988	919127	4214630
<i>Borrelia burgdorferi</i>	323079	327196	129646	130760	910681
<i>Brucella melitensis</i>	452846	454173	607001	603116	2117136
<i>Buchnera aphidicola</i>	228624	231258	78130	77968	615980
<i>Campylobacter jejuni</i>	571694	568338	249577	251872	1641481
.					
.					
.					
.					
.					
<i>Thermosyn/cus elong.</i>	598906	596397	699842	698712	2593857
<i>Thermotoga maritima</i>	501834	498348	436953	423590	1860725
<i>Vibrio cholerae</i>	769234	779567	708931	703384	2961116
<i>Xanthomonas campest.</i>	889264	883916	1652127	1650865	5076172
<i>Yersinia pestis</i>	1219520	1217353	1114185	1102670	4653728

Source: <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/Oriloc/>

Οι γνωστές σχέσεις $A=T$, $G=C$.
interstrand basepairing rule
(*BPR*)...

... ισχύουν στοιχειομετρικά σε κυτταρικό DNA, και συνέτειναν στην ανακάλυψη από τους Watson & Crick της δίκλωνης δομής του μορίου βάσει της συμπληρωματικότητας των βάσεων.



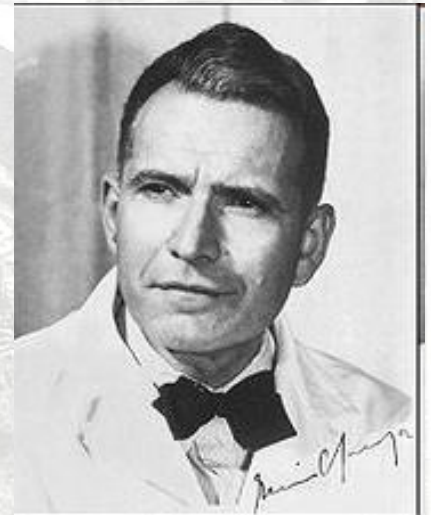
Benjamin Cummings

...και ο «δεύτερος νόμος ισοτιμίας» του Chargaff, “Chargaff’s 2nd Parity Rule” (PR2), που προτάθηκε το 1968.

Ο PR2 προβλέπει ότι: A~T, G~C σε μονόκλωνο DNA. Επί μακρόν η αιτιολόγησή του αποτέλεσε ένα ανοικτό πρόβλημα για την γρήγορα εξελισσόμενη επιστήμη της μοριακής βιολογίας

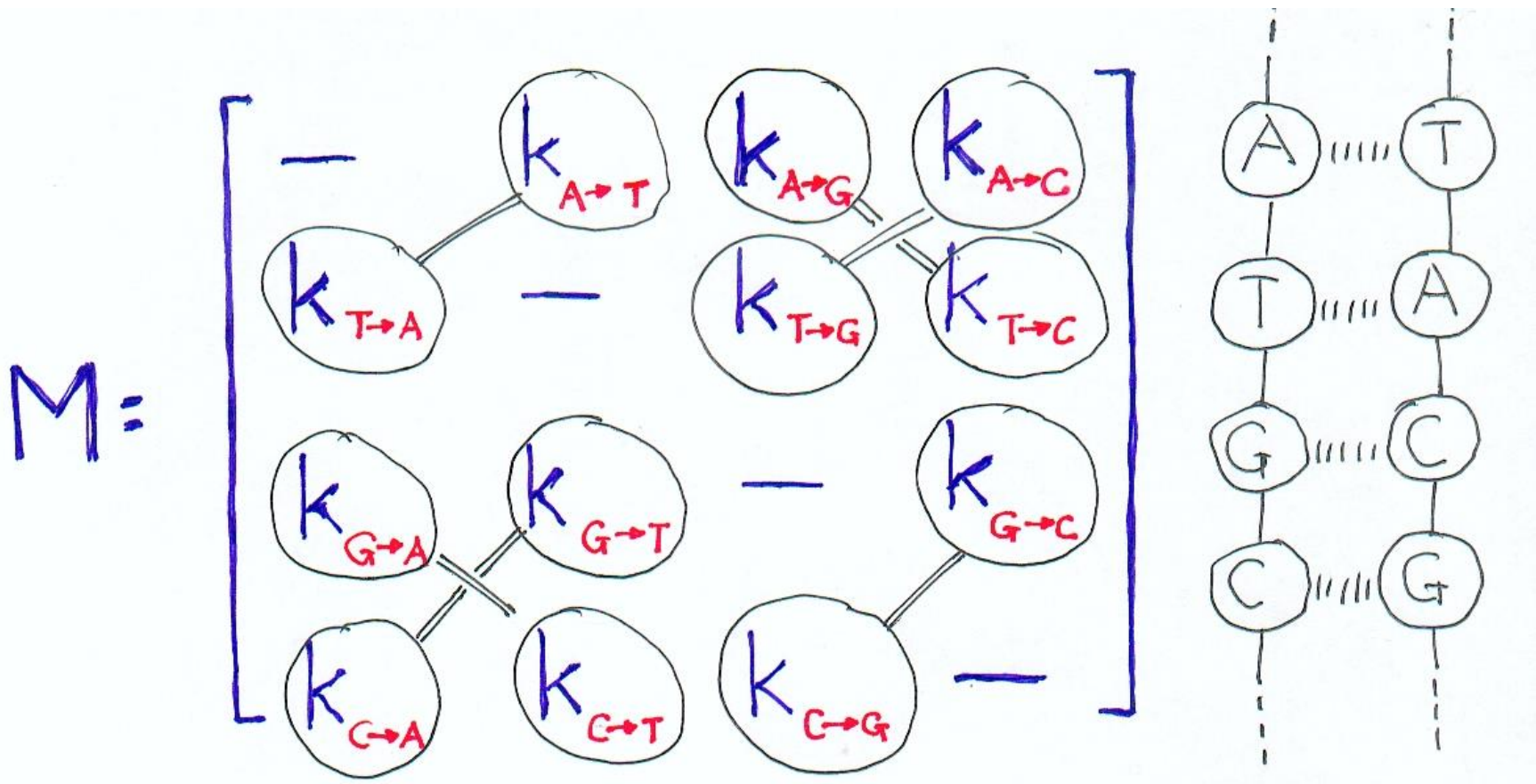
Σήμερα ο PR2 αποδίδεται με βεβαιότητα στον «πρώτο νόμο ισοτιμίας» του Chargaff, “Chargaff’s 1st Parity Rule” (PR1) που, από την ισοδυναμία μεταξύ συμπληρωματικών κλώνων όσον αφορά «μεταλακτικές» και «επιλεκτικές» τάσεις που με τη σειρά της οφείλεται στην λειτουργική τους ισοδυναμία, συνάγει την ελάττωση των μεταλλακτικών ρυθμών από 12 σε 6, βάσει του παρακάτω σχήματος: [\[see next slide\]](#)

Προσομοιώνοντας αριθμητικά την μεταλλακτική δυναμική του DNA για μακρό χρόνο, από οποιαδήποτε αρχική σύσταση, τελικά θα οδηγηθούμε στην ισχύ του PR2: **A~T & G~C**



Erwin Chargaff (1905-2002)

Πίνακας ρυθμών μεταλλάξεων σε δίκλωνο DNA. Η υπόθεση συμμετρίας μεταξύ των κλώνων, δηλ. ισότητας των μεταλλακτικών ρυθμών που επικρατούν (**πρώτος νόμος ισοτιμίας του Chargaff**) οδηγεί στις ισότητες που δείχνει το παρακάτω σχήμα, άρα στην μείωση των σταθερών από δώδεκα σε έξι



Οι σχέσεις μεταξύ μεταλλακτικών ρυθμών στους δύο συμπληρωματικούς κλώνους που σε συνθήκες διακλωνικής συμμετρίας όσον αφορά την λειτουργία και την έκθεση σε εξωτερικούς παράγοντες οδηγούν στη μείωση των ανεξάρτητων παραμέτρων από δώδεκα σε έξι.

Sueoka, N. (1995) Intra-strand parity rules of DNA base composition and usage biases of synonymous codons. *J. Mol. Evol.*, **40**, 318–325.

ISOTYPE SUBSTITUTIONS

A → T (r_1) or T → A (r_2)	G → C (r_{11}) or C → G (r_{12})
<p>$r_1 = r_2'$ $r_2 = r_1'$ (BPR)</p> <p>If no-strand-bias, Therefore, $r_1 = r_1'$.</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> $r_1 = r_2$ $r_1' = r_2'$ </div> (PR1)	<p>$r_{11} = r_{12}'$ $r_{12} = r_{11}'$ (BPR)</p> <p>If no-strand-bias, Therefore, $r_{11} = r_{11}'$.</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> $r_{11} = r_{12}$ $r_{11}' = r_{12}'$ </div> (PR1)

ALLOYE SUBSTITUTIONS

A → G (r_4) or T → C (r_{10})	A → C (r_6) or T → G (r_8)
<p>$r_4 = r_{10}'$ $r_{10} = r_4'$ (BPR)</p> <p>If no-strand-bias, Therefore, $r_4 = r_4'$.</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> $r_4 = r_{10}$ $r_4' = r_{10}'$ </div> (PR1)	<p>$r_6 = r_8'$ $r_8 = r_6'$ (BPR)</p> <p>If no-strand-bias, Therefore, $r_6 = r_6'$.</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> $r_6 = r_8$ $r_6' = r_8'$ </div> (PR1)
G → A (r_3) or C → T (r_9)	G → T (r_7) or C → A (r_5)
<p>$r_3 = r_9'$ $r_9 = r_3'$ (BPR)</p> <p>If no-strand-bias, Therefore, $r_3 = r_3'$.</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> $r_3 = r_9$ $r_3' = r_9'$ </div> (PR1)	<p>$r_7 = r_5'$ $r_5 = r_7'$ (BPR)</p> <p>If no-strand-bias, Therefore, $r_7 = r_7'$.</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> $r_6 = r_7$ $r_5' = r_7'$ </div> (PR1)

Από την εργασία του N.Sueoka που αναφέραμε: Οι κινητικές εξισώσεις για τα μοριακά κλάσματα των A, T, G, C που όπως όπως δείχνεται από αριθμητική του προσομοίωση, οδηγούν ασυμπτωτικά στις σχέσεις $A = T$ & $G = C$

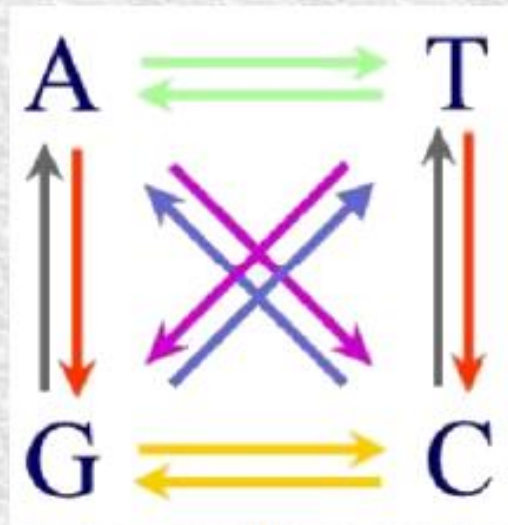
Appendix 2: Equations for the Calculation of A, T, G, and C at Equilibrium

$$\begin{aligned}dA/dt &= (-r_1-r_4-r_6)A+r_2T+r_3G+r_5(1-A-T-G)=0 \\dT/dt &= r_1A+(-r_2-r_8-r_{10})T+r_7(1-A-T-C)+r_9C=0 \\dG/dt &= r_4A+r_8(1-A-G-C)+(-r_3-r_7-r_{11})G+r_{12}C=0 \\dC/dt &= r_6(1-T-G-C)+r_{10}T+r_{11}G+(-r_5-r_9-r_{12})C=0,\end{aligned}$$

Να σημειωθεί ότι μία διαδικασία που χωρεί «παράλληλα» με τις μεταλλάξεις, δηλαδή η συνεχής γονιδιωματική ανάμιξη (*inter- & intra-chromosomal shuffling*) τελικά οδηγεί στο ίδιο αποτέλεσμα. Όμως, η τήρηση του PR2 και σε εξελικτικά επί μακρόν «παγωμένες» αλληλουχίες (π.χ. μακρές κωδικοποιούσες αλληλουχίες) κάνει γενικότερης εμβέλειας την εξήγηση τη βασισμένη σε σταθερές κινητικής μεταλλάξεων. Επίσης, υπέρ την ερμηνείας του PR2 βάσει του PR1 είναι και η ύπαρξη συγκεκριμένων μοτίβων κατανομής των αποκλίσεων από τον PR2 που σχετίζονται με αποκλίσεις από την ισοδυναμία των κλώνων, όπως το *V-motif* στα βακτήρια, το *factory-roof motif* στο ευκαρυωτικό DNA κ.α.

Συμμετρική εξέλιξη των κλώνων του DNA

PR1



ορισμός ποσοτήτων

$$S^{A-T} = \frac{[A] - [T]}{[A] + [T]}$$

$$S^{G-C} = \frac{[G] - [C]}{[G] + [C]}$$

για αρκούντως μεγάλα μονόκλιωνα τμήματα DNA

PR2

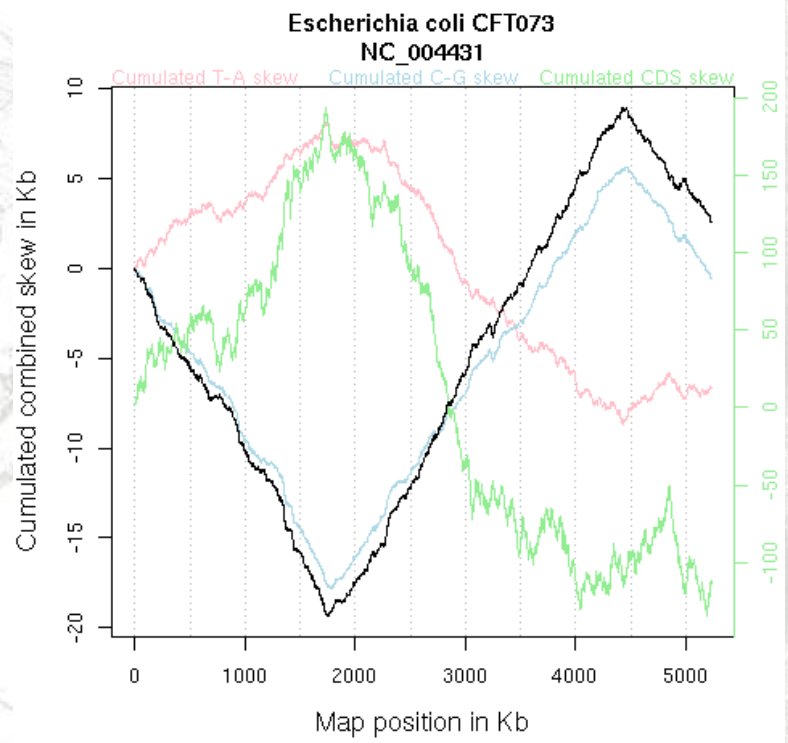
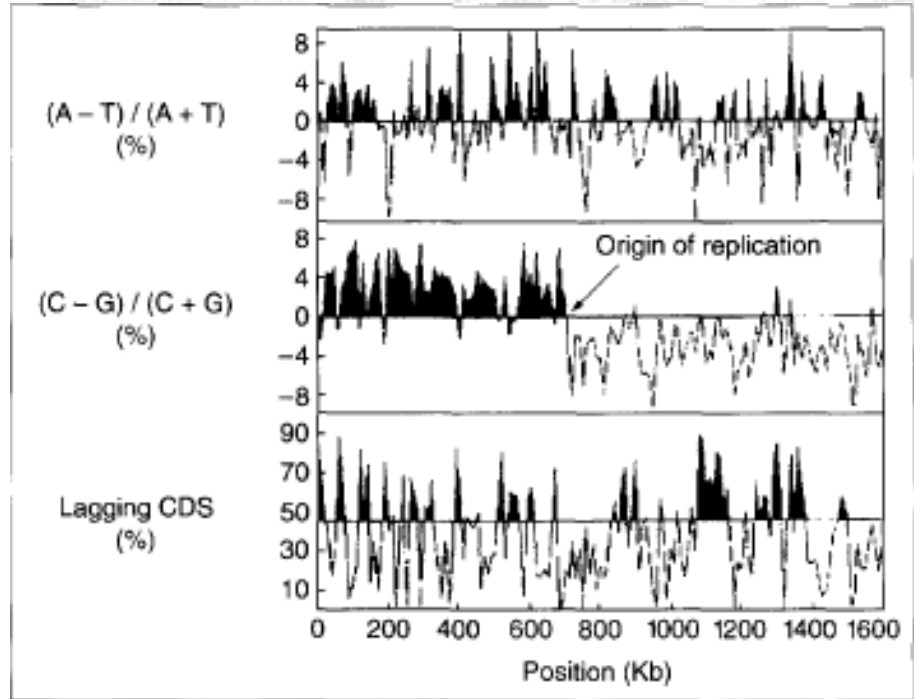
$$S^{A-T} \rightarrow 0 \quad \text{και} \quad S^{G-C} \rightarrow 0$$

Μετά την καταρχήν κατανόηση της προέλευσης του PR2 παρέμεινε, και συνεχίζει να παραμένει έντονο, το ενδιαφέρον για τη μελέτη των αποκλίσεων (skews) που παρατηρούνται, και για τη χρήση των skews ως εργαλείου για τον εντοπισμό πλευρών της γονιδιωματικής δυναμικής.

Η κάτω αριστερά εικόνα (Lobry JR, 1996, *Mol.Biol.Evol.* **13**, 660) δείχνει την ποσοτική έκφραση των skews σε περιοχή του γονιδιώματος του *E. coli*. Η τρίτη εμφανιζόμενη skew αφορά «περίσσεια» CDS στον ένα κλώνο.

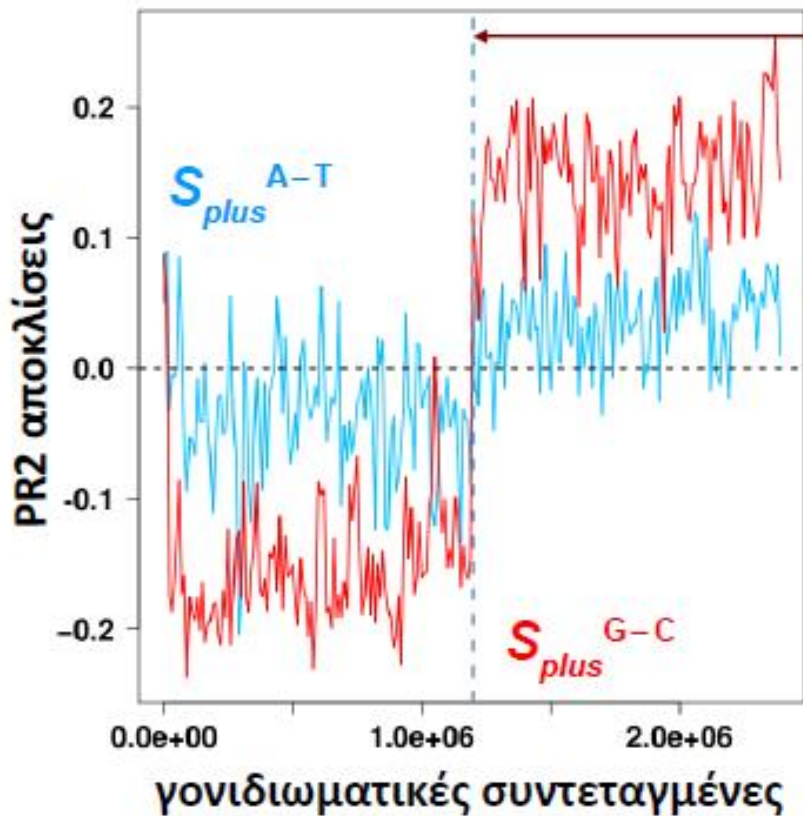
Αντί αυτής της περιγραφής των skews συχνότερα προτιμάται η ολοκληρωτική (αθροιστική, cumulated) καμπύλη που παράγεται από την προηγούμενη (ανοδική όταν είναι >0 και καθοδική για <0).

Η κάτω δεξιά εικόνα αναπαριστά αθροιστικά τις τρεις παραπάνω skews για ολόκληρο το γονίδωμα του *E. coli* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/Oriloc/>).

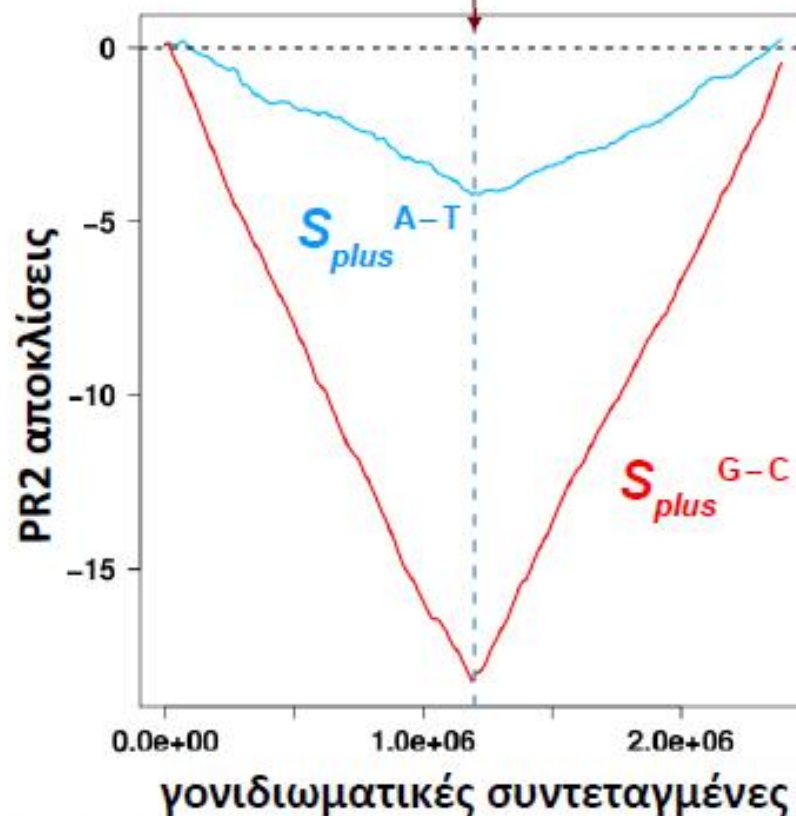


(Η μαύρη γραμμή αποτελεί συνδυασμό AT/GC-skews που εξάγεται υπολογιστικά)

Ο 2^{ος} κανόνας της ισοδυναμίας σε βακτηριακά γονιδιώματα



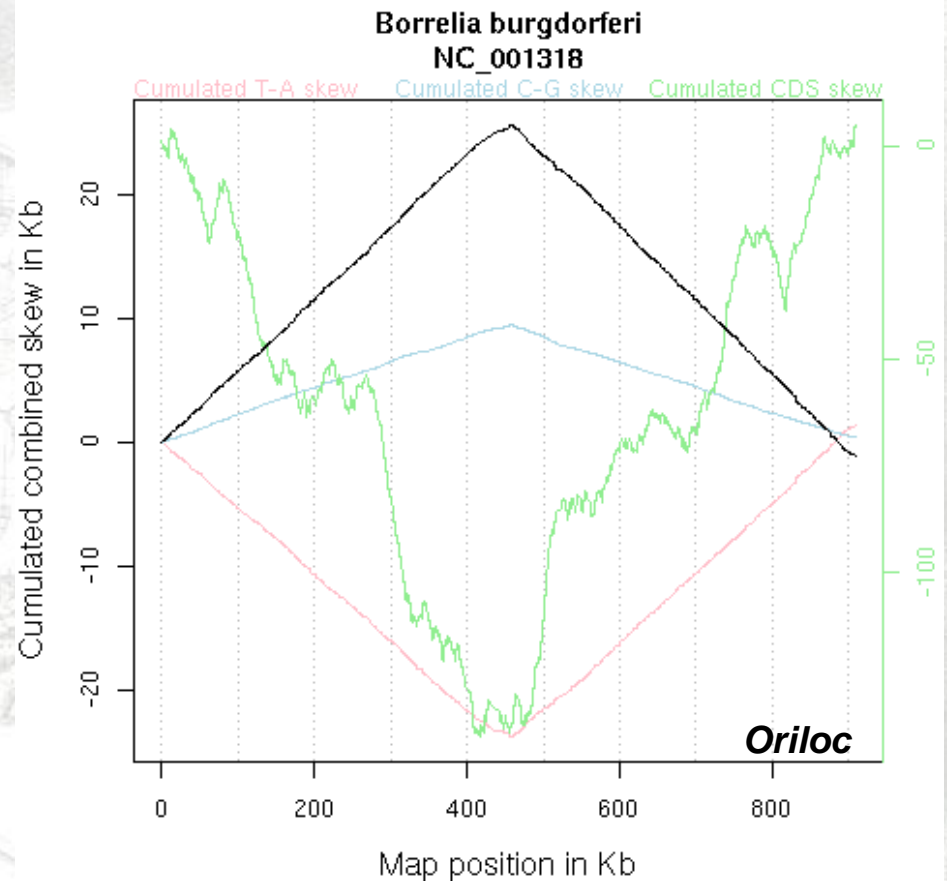
σημείο έναρξης αντιγραφής *ori*



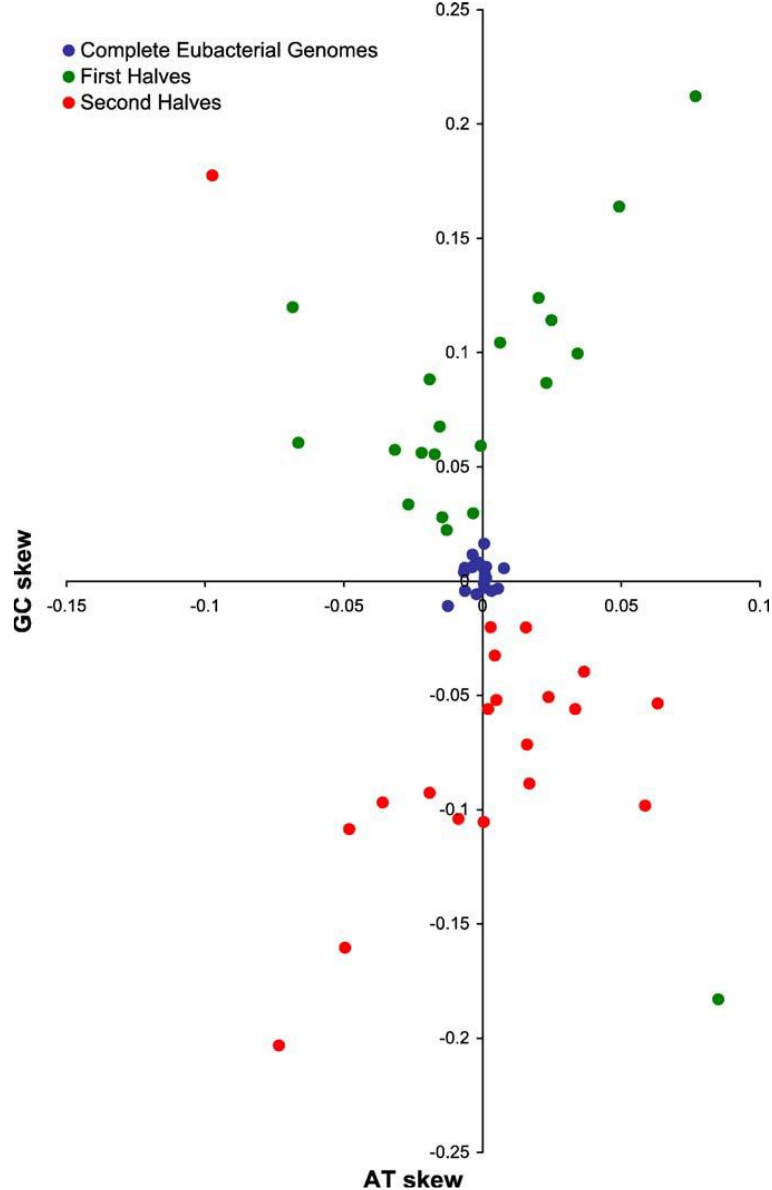
Το προηγούμενο και το εδώ εικονιζόμενο διάγραμμα *skews* ολόκληρου μικροβιακού γονιδιώματος είναι τυπικά των ευβακτηρίων με λίγες εξαιρέσεις. Ο εντοπισμός ακρότατων στα σημεία έναρξης και λήξης του αναδιπλασιασμού (*ori*, *ter*) συσχετίστηκε με ασυμμετρίες μεταξύ των κλώνων και συνεπώς με αναστολή της βασικής προϋπόθεσης που παράγει τον PR2.

Στόχο των εργασιών της ομάδας μας που συνοψίζουμε εδώ, καθώς και άλλων μελετών, αποτελεί η αναζήτηση των αιτίων των εμφανιζόμενων *skews* και πιο συγκεκριμένα, ποια φαινόμενα είναι σημαντικότερα για την εμφάνισή τους, καθώς και συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν από αυτή τη διερεύνηση.

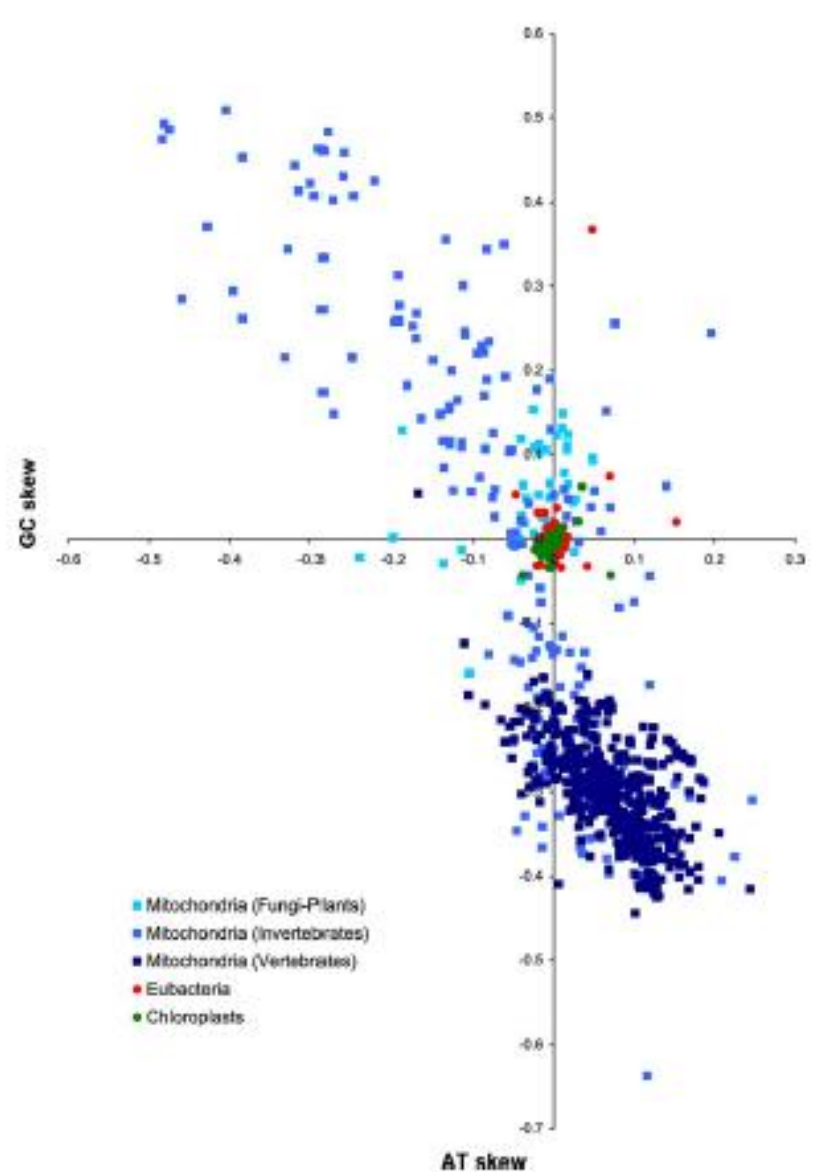
Βλ: K.Apostolou-Karampelis, C.Nikolaou & Y.Almirantis. A novel skew analysis reveals substitution asymmetries linked to genetic code GC-biases and PolIII a-subunit isoforms. *DNA Research* (2016) **23**. DOI 10.1093/dnares/dsw021



(Η μαύρη γραμμή αποτελεί συνδυασμό AT/GC-skews που εξάγεται υπολογιστικά)



AT and GC parity violations for 20 eubacterial genomes as compared to the corresponding values for each genome's half-sequences when divided at the sites of replication origin and terminus. Half-genomes deviate from the second parity rule, in contrast to the complete genomes.



AT and GC parity violations for 236 eubacterial, 804 mitochondrial and 42 chloroplast genomes. The mitochondrial genomes may be divided into three groups according to their nucleotide composition as reflected in the scatter diagram.

C.Nikolaou & Y.Almirantis. Deviations from Chargaff's second parity rule in organellar DNA - Insights into the evolution of organellar genomes. *Gene* (2006) **381**, 34-41.

*to factory-roof motif
στο ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΟ
DNA*

Marie Touchon et al (2005)
Replication-associated strand
asymmetries in mammalian
genomes: Toward detection of
replication origins.
PNAS, **102**, 9836-9841

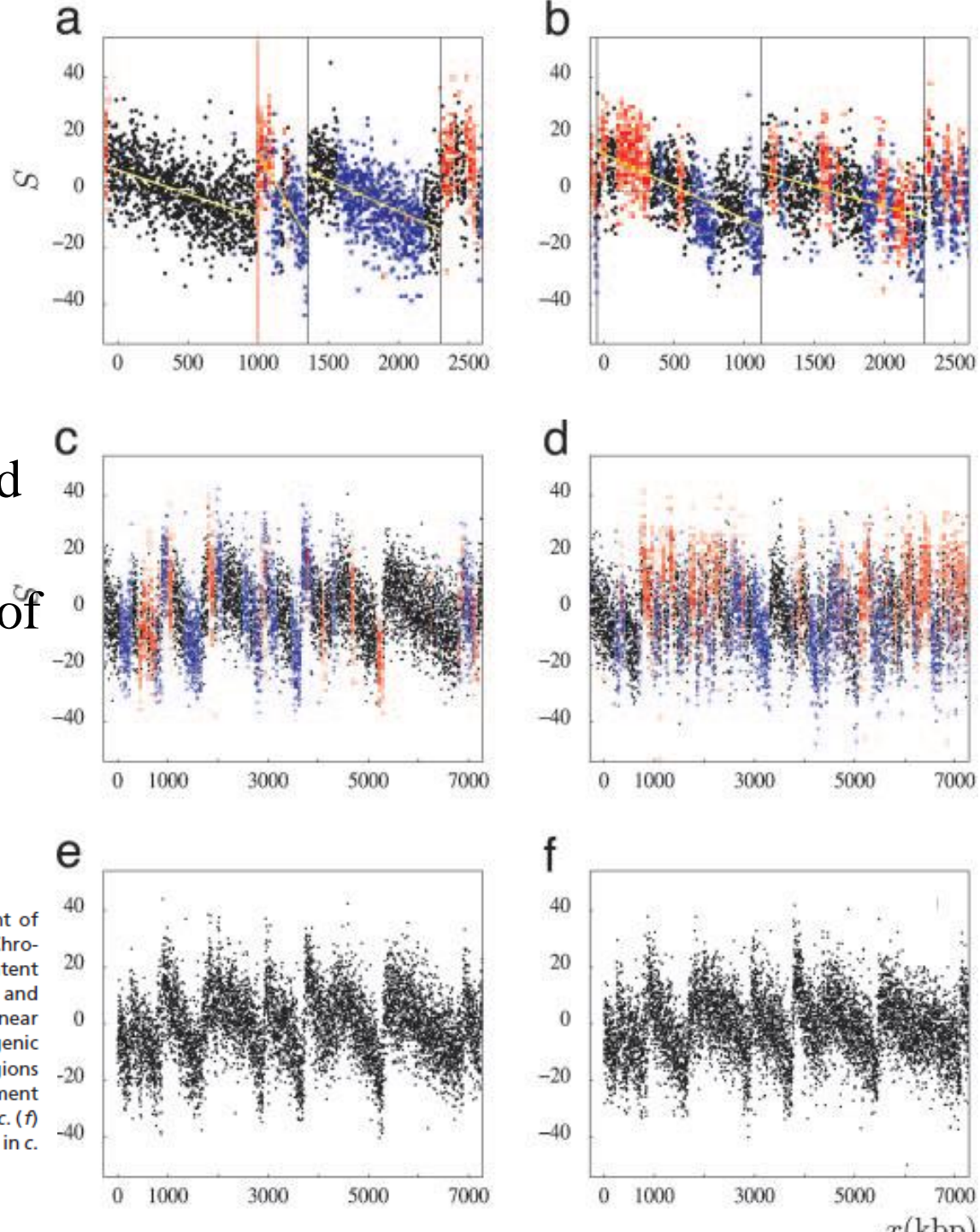


Fig. 5. S profiles along mammalian genome fragments. (a) Fragment of chromosome 20 including the *TOP1* origin (red vertical line). (b and c) Chromosome 4 and chromosome 9 fragments, respectively, with low G+C content (36%). (d) Chromosome 22 fragment with larger G+C content (48%). In a and b, vertical lines correspond to selected putative origins; yellow lines are linear fits of the S values between successive putative origins. Black, intergenic regions; red, (+) genes; blue, (-) genes. Note the fully intergenic regions upstream of *TOP1* in a and from positions 5,290–6,850 kbp in c. (e) Fragment of mouse chromosome 4 homologous to the human fragment shown in c. (f) Fragment of dog chromosome 5 syntenic to the human fragment shown in c. In e and f, genes are not represented.

Ο 2^{ος} κανόνας της ισοδυναμίας για δινουκλεοτίδια

για αρκούντως μεγάλα μονόκλιωνα τμήματα DNA

$$[\mathbf{A}_p\mathbf{A}] \approx [\mathbf{T}_p\mathbf{T}]$$

$$[\mathbf{G}_p\mathbf{G}] \approx [\mathbf{C}_p\mathbf{C}]$$

$$[\mathbf{A}_p\mathbf{G}] \approx [\mathbf{C}_p\mathbf{T}]$$

$$[\mathbf{A}_p\mathbf{C}] \approx [\mathbf{G}_p\mathbf{T}]$$

$$[\mathbf{G}_p\mathbf{A}] \approx [\mathbf{T}_p\mathbf{C}]$$

$$[\mathbf{C}_p\mathbf{A}] \approx [\mathbf{T}_p\mathbf{G}]$$

Prabhu, V.V. 1993, Symmetry observations in long nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.*, 21, 2797–800.

Baisnée, P.-F., Hampson, S., and Baldi, P. 2002, Why are complementary DNA strands symmetric? *Bioinformatics*, 18, 1021–33.

Ο 2^{ος} κανόνας της ισοδυναμίας για δινουκλεοτίδια

για αρκούντως μεγάλα μονόκλιωνα τμήματα DNA

$$[A_pA] \approx [T_pT]$$

$$[G_pG] \approx [C_pC]$$

$$[A_pG] \approx [C_pT]$$

$$[A_pC] \approx [G_pT]$$

$$[G_pA] \approx [T_pC]$$

$$[C_pA] \approx [T_pG]$$

ορισμός ποσοτήτων

$$S^{A_pA-T_pT} = \frac{[A_pA] - [T_pT]}{[A_pA] + [T_pT]}$$

$$S^{G_pG-C_pC} = \frac{[G_pG] - [C_pC]}{[G_pG] + [C_pC]}$$

$$S^{A_pG-C_pT} = \frac{[A_pG] - [C_pT]}{[A_pG] + [C_pT]}$$

$$S^{A_pC-G_pT} = \frac{[A_pC] - [G_pT]}{[A_pC] + [G_pT]}$$

$$S^{G_pA-T_pC} = \frac{[G_pA] - [T_pC]}{[G_pA] + [T_pC]}$$

$$S^{C_pA-T_pG} = \frac{[C_pA] - [T_pG]}{[C_pA] + [T_pG]}$$

Ο 2^{ος} κανόνας της ισοδυναμίας για δινουκλεοτίδια

για αρκούντως μεγάλα **μονόκλιωνα** τμήματα DNA

$$[A_pA] \approx [T_pT] \quad S^{A_pA-T_pT}$$

$$[G_pG] \approx [C_pC] \quad S^{G_pG-C_pC}$$

$$[A_pG] \approx [C_pT] \quad S^{A_pG-C_pT}$$

$$[A_pC] \approx [G_pT] \quad S^{A_pC-G_pT}$$

$$[G_pA] \approx [T_pC] \quad S^{G_pA-T_pC}$$

$$[C_pA] \approx [T_pG] \quad S^{C_pA-T_pG}$$

→ 0

ορισμός ποσοτήτων

$$S^{A_pA-T_pT} = \frac{[A_pA] - [T_pT]}{[A_pA] + [T_pT]}$$

$$S^{G_pG-C_pC} = \frac{[G_pG] - [C_pC]}{[G_pG] + [C_pC]}$$

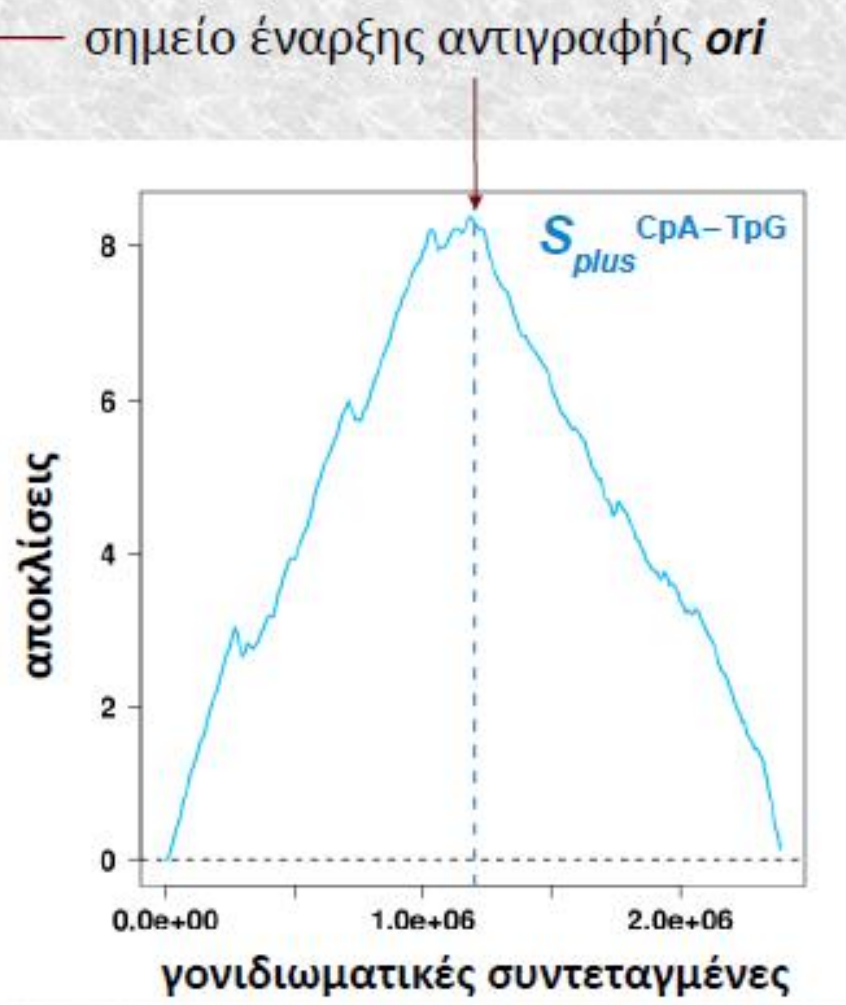
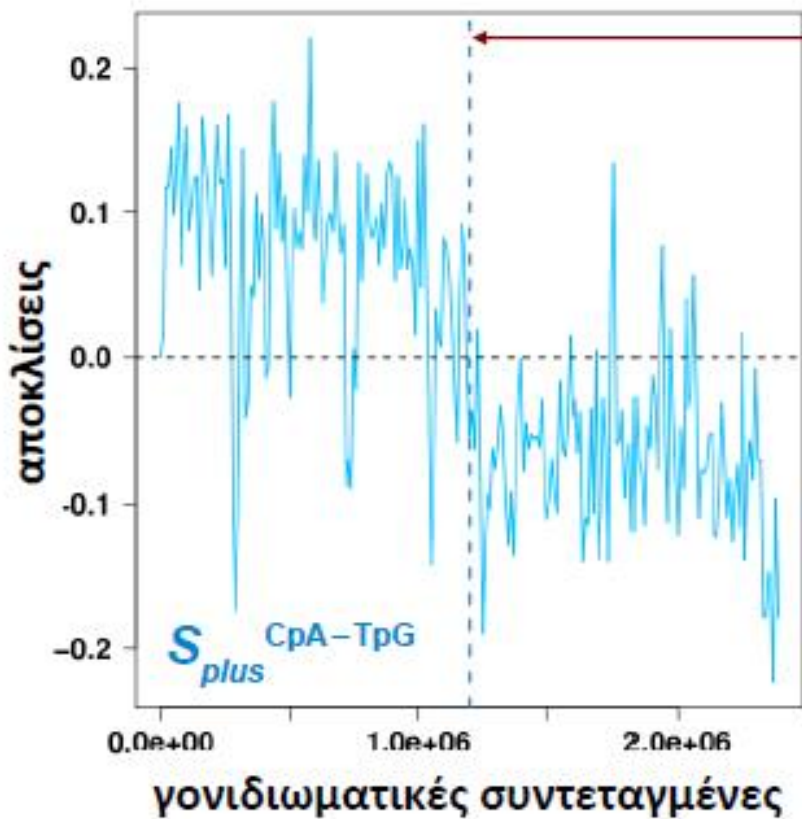
$$S^{A_pG-C_pT} = \frac{[A_pG] - [C_pT]}{[A_pG] + [C_pT]}$$

$$S^{A_pC-G_pT} = \frac{[A_pC] - [G_pT]}{[A_pC] + [G_pT]}$$

$$S^{G_pA-T_pC} = \frac{[G_pA] - [T_pC]}{[G_pA] + [T_pC]}$$

$$S^{C_pA-T_pG} = \frac{[C_pA] - [T_pG]}{[C_pA] + [T_pG]}$$

Ο 2^{ος} κανόνας της ισοδυναμίας σε βακτηριακά γονιδιώματα



Ο 2^{ος} κανόνας της ισοδυναμίας για δινουκλεοτίδια

ορισμός ποσοτήτων

σταθμισμένες συχνότητες δινουκλεοτιδίων

$$\rho^{X_p Y} = \frac{[X_p Y]}{[X] \cdot [Y]}$$

όπου $X, Y \in (A, C, G, T)$

Nussinov, R. 1981, *Nearest neighbor nucleotide patterns. Structural and biological implications*. J. Biol. Chem., 256, 8458–62.

Nussinov, R. 1984, *Strong doublet preferences in nucleotide sequences and DNA geometry*. J. Mol. Evol., 20, 111–9.

Ο 2^{ος} κανόνας της ισοδυναμίας για δινουκλεοτίδια

για αρκούντως μεγάλα μονόκλωνα τμήματα DNA

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

$$\rho^{A_pA} \approx \rho^{T_pT}$$

$$\rho^{G_pG} \approx \rho^{C_pC}$$

$$\rho^{A_pG} \approx \rho^{C_pT}$$

$$\rho^{A_pC} \approx \rho^{G_pT}$$

$$\rho^{G_pA} \approx \rho^{T_pC}$$

$$\rho^{C_pA} \approx \rho^{T_pG}$$

$$\rho^{X_pY}$$

ορισμός ποσοτήτων

$$P^{A_pA-T_pT} = \rho^{A_pA} - \rho^{T_pT}$$

$$P^{G_pG-C_pC} = \rho^{G_pG} - \rho^{C_pC}$$

$$P^{A_pG-C_pT} = \rho^{A_pG} - \rho^{C_pT}$$

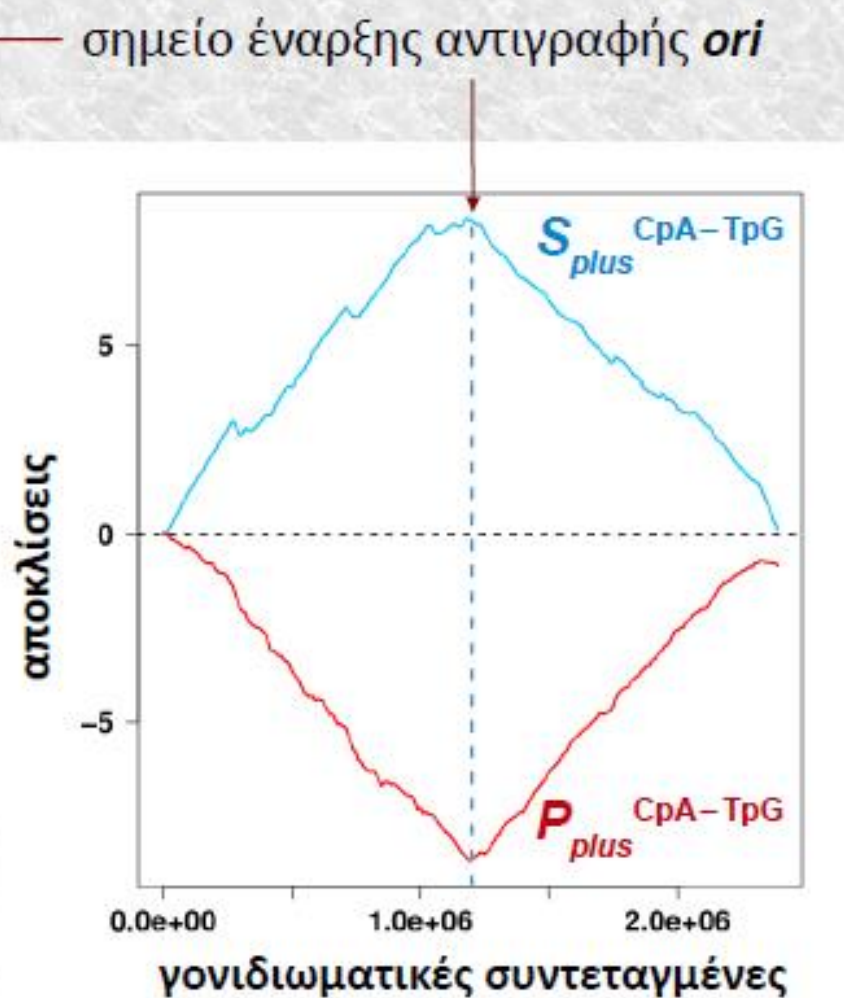
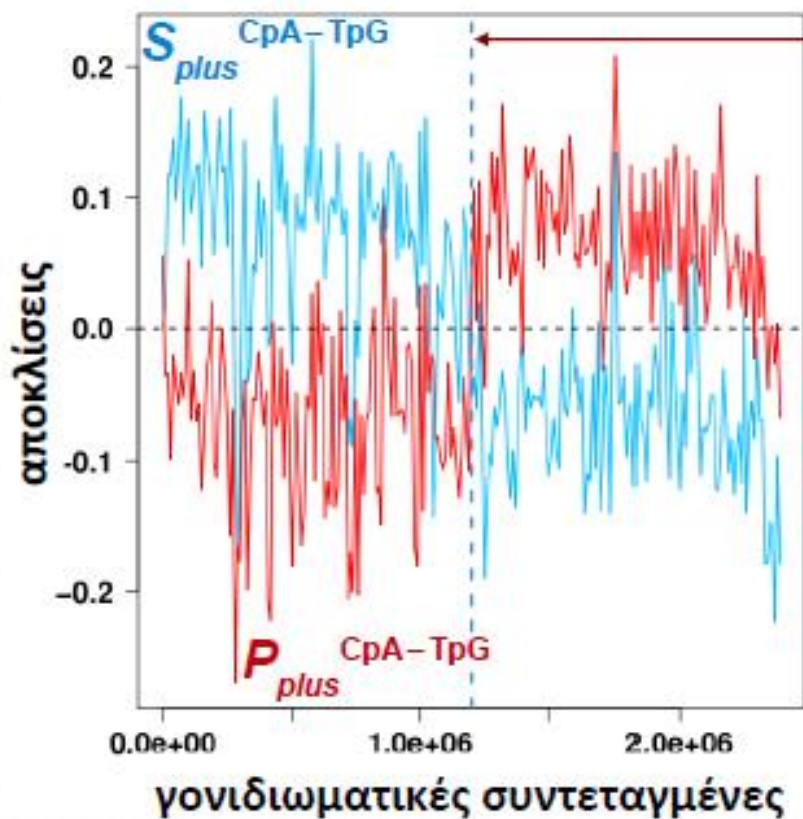
$$P^{A_pC-G_pT} = \rho^{A_pC} - \rho^{G_pT}$$

$$P^{G_pA-T_pC} = \rho^{G_pA} - \rho^{T_pC}$$

$$P^{C_pA-T_pG} = \rho^{C_pA} - \rho^{T_pG}$$

ισοδυναμία των σταθμισμένων συχνοτήτων
των αντιστρόφως συμπληρωματικών δινουκλεοτιδίων

Ο 2^{ος} κανόνας της ισοδυναμίας σε βακτηριακά γονιδιώματα

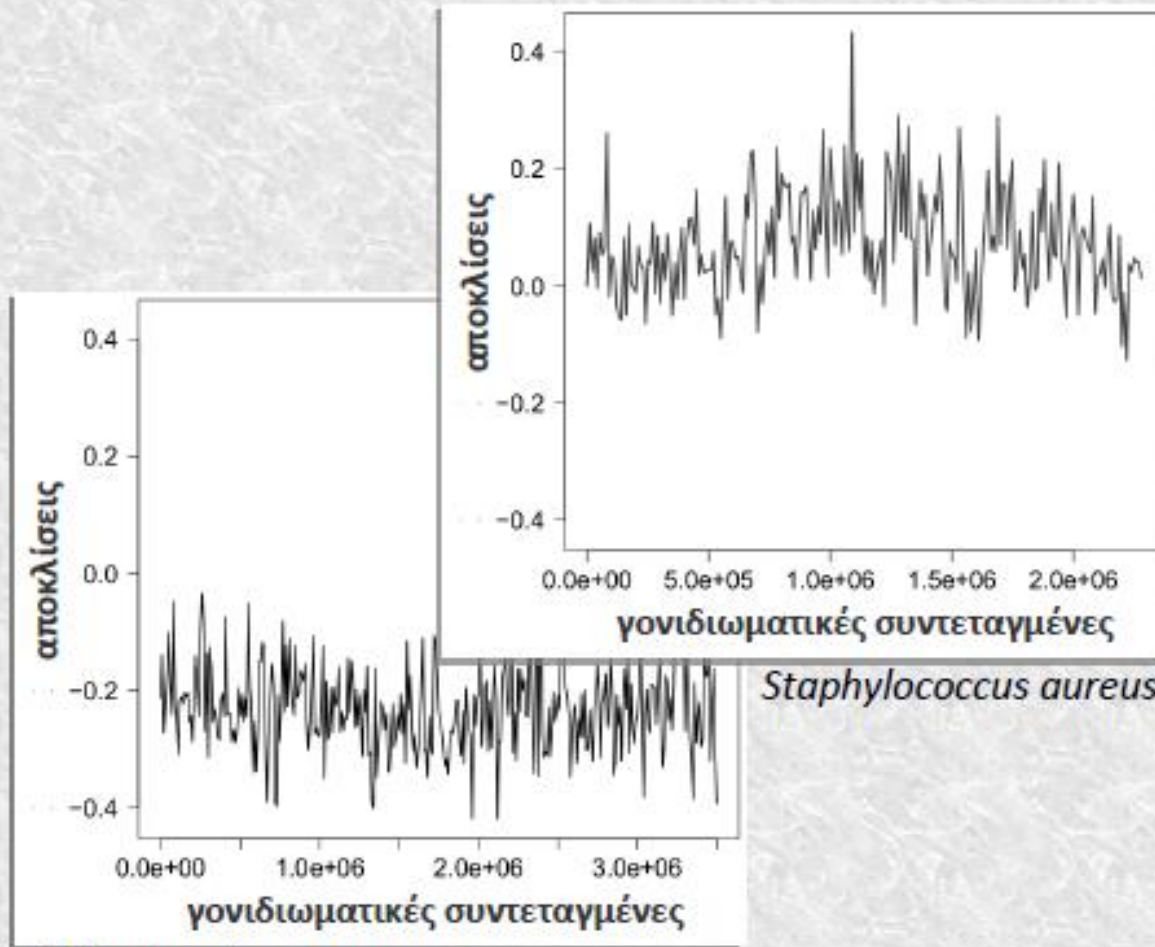


Στην παρούσα εργασία εισάγουμε για πρώτη φορά και μελετάμε την ύπαρξη ισοτήτων του τύπου του PR2 για δινουκλεοτίδια μέσω ποσοτικοποίησης των προτιμήσεων γειτόνων. Τούτο είναι δυνατό με την εισαγωγή των ποσοτήτων: $\rho^{XY-X'Y'} = \rho^{XY} - \rho^{XY}$. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται δυνατή (με διάφορες μεθοδολογίες) η εξέταση της επίδρασης των γειτονικών βάσεων στους μεταλλακτικούς ρυθμούς του γονιδιώματος. Ενδεικτικά παρουσιάζουμε εδώ μία μόνον από τις μεθοδολογίες που έχουμε εισάγει:

Κατασκευάστηκε μια συλλογή 340 βακτηριακών χρωμοσωμάτων, λήφθηκε η CDS-συρραφή εκάστου, κατατμήθηκε σε τμήματα 10 knt και συγκρίθηκαν κατά ζεύγη οι κατανομές του συνόλου των αποκλίσεων των ρ (δινουκλ.). Για τις συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκε η συμμετρική Kullback–Leibler (KL) απόκλιση (Kullback & Leibler 1951). Βάσει των συμμετρικών KL-αποκλίσεων, κατασκευάστηκαν κλαδογράμματα για κάθε φύλο ή κλάση που αντιπροσωπεύονται στη συλλογή μας (κλαδογράμματα αποκλίσεων, βλ. Εικόνα). Ακολούθως, συγκρίθηκαν τα κλαδογράμματα αποκλίσεων των σταθμισμένων συχνοτήτων με τα αντίστοιχα ταξινομικά δέντρα και λήφθηκαν τα επί τοις εκατό ποσοστά τοπολογικής ομοιότητας των δέντρων (“τοπολογική βαθμολογία”). Για λόγους σύγκρισης με ένα ήδη εν χρήσει μέτρο, περιλήφθηκε και η τοπολογική βαθμολογία που αντιστοιχεί στα κλαδογράμματα των γονιδιωματικών υπογραφών. Επίσης για λόγους σύγκρισης και αξιολόγησης του ρόλου των ‘πρώτων γειτόνων’, για κάθε φύλο ή κλάση που αντιπροσωπεύονται στη συλλογή, κατασκευάστηκαν κλαδογράμματα βάσει της κατανομής των μονονουκλεοτιδικών αποκλίσεων και των αποκλίσεων των δινουκλεοτιδίων κατά μήκος των CDS-συρραφών και προσδιορίστηκε η τοπολογική τους βαθμολογία.

Συσχέτιση των ειδικών ανά κλώνο ασυμμετριών με την φυλογένεση των βακτηρίων

σήμα πληροφορίας



Staphylococcus aureus

Bdellovibrio bacteriovorus

διαφορά πληροφοριακού περιεχομένου

απόκλιση Kullback-Leibler
KL divergence

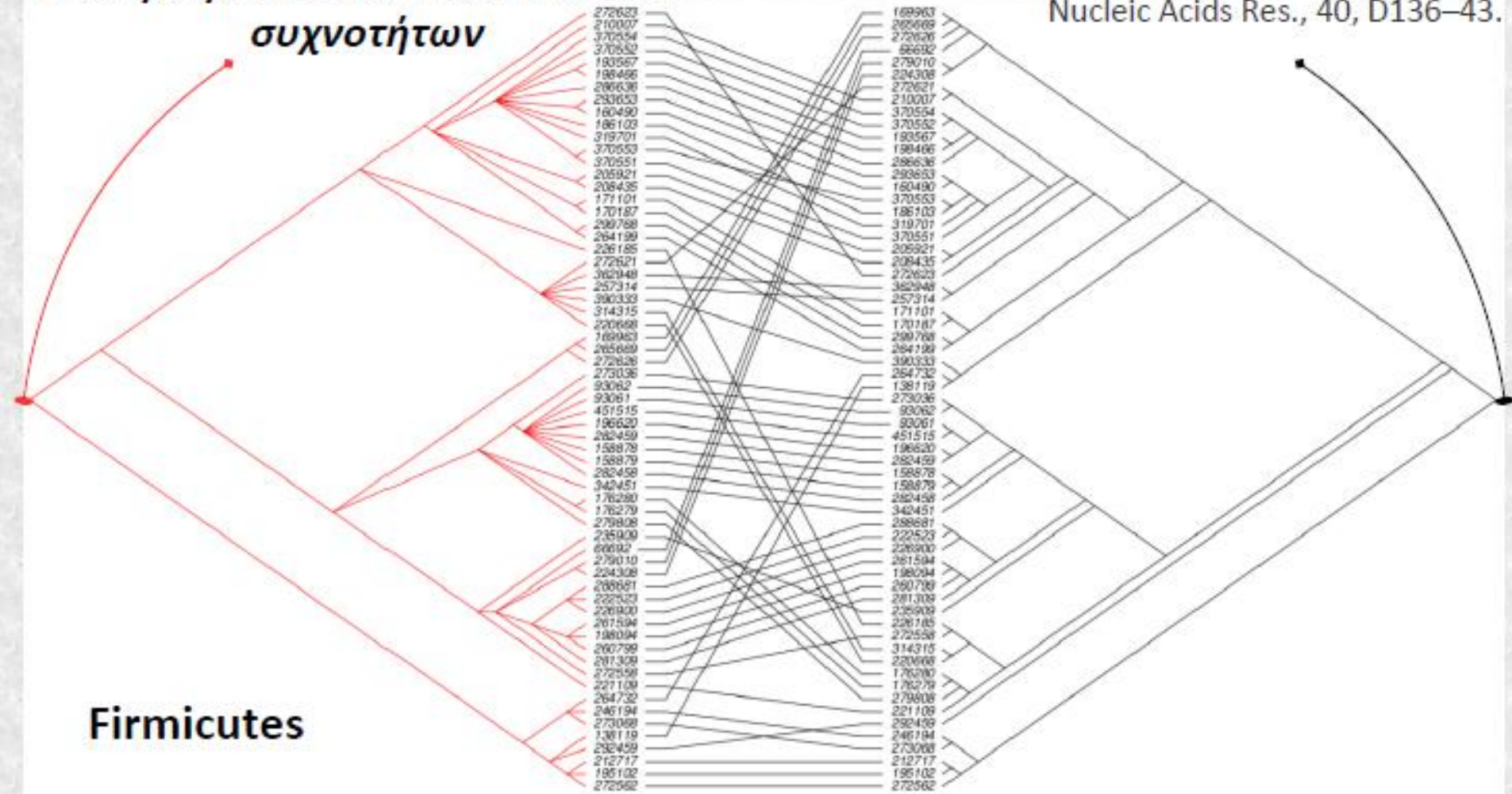
ιεραρχική συσταδοποίηση
πλήρους σύνδεσης
complete-linkage hierarchical
clustering

Συσχέτιση των ειδικών ανά κλώνο ασυμμετριών με την φυλογένεση των βακτηρίων

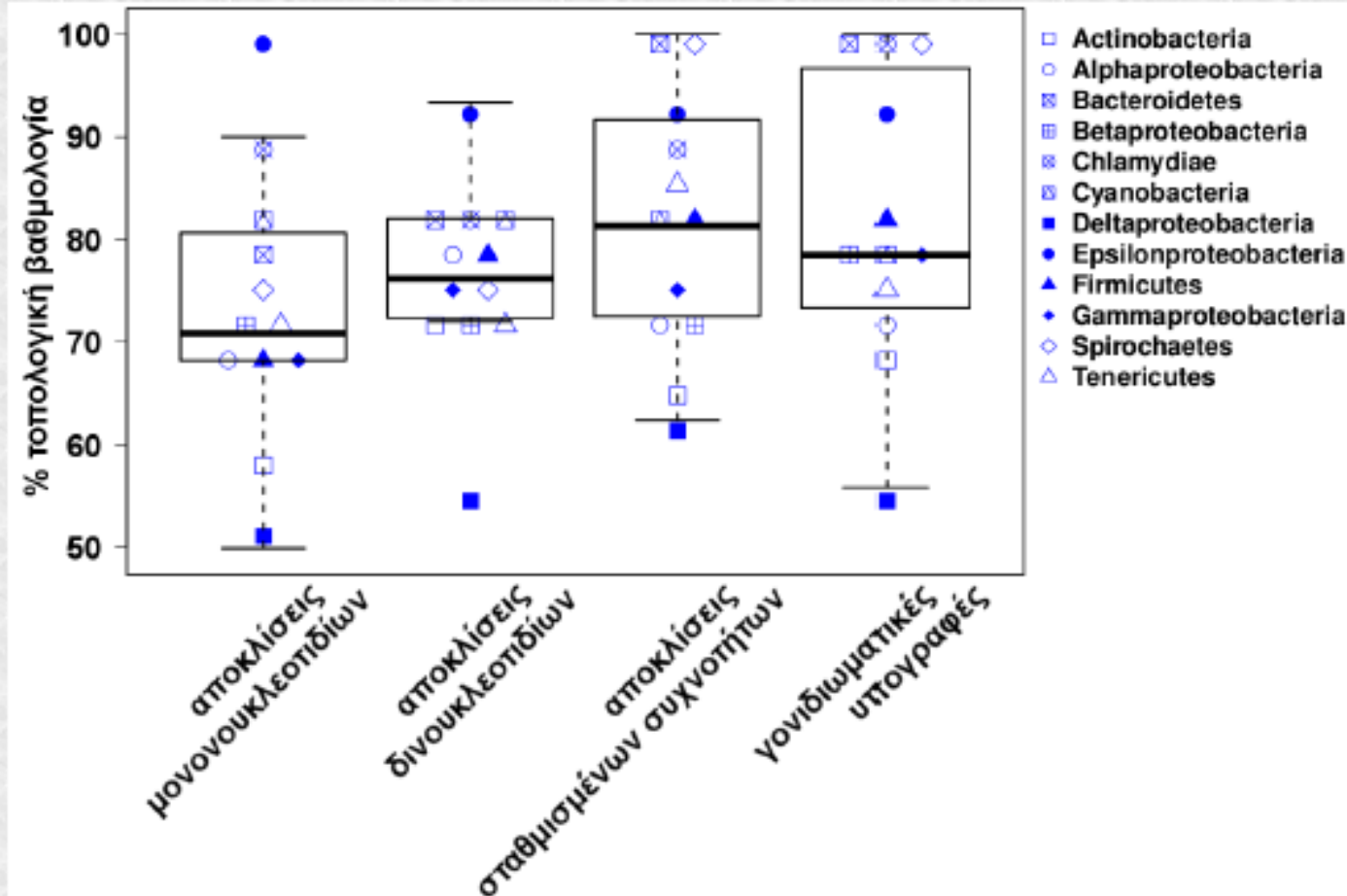
κλαδόγραμμα αποκλίσεων
σταθμισμένων δινουκλεοτιδικών
συχνοτήτων

ταξινομικά δέντρα
Federhen, S. 2012, The NCBI Taxonomy database.
Nucleic Acids Res., 40, D136–43.

Firmicutes



Συσχέτιση των ειδικών ανά κλώνο ασυμμετριών με την φυλογένεση των βακτηρίων



διάμεσος τοπολογικής βαθμολογίας

μονονουκλεοτιδικές αποκλίσεις

70.8 %

δινουκλεοτιδικές αποκλίσεις

76.2 %

αποκλίσεις σταθμισμένων συχνοτήτων

81.3 %

γονιδιωματικές υπογραφές

78.5 %

μέτρο σύγκρισης →

K.Apostolou-Karampelis, D.Polychronopoulos & Y.Almirantis. Introduction of ‘Generalized Genomic Signatures’ for the quantification of neighbour preferences leads to taxonomy- and functionality-based distinction among sequences. *Scientific Reports* (2019). DOI:10.1038/s41598-018-38157-3.

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (SANITURA)» (MIS 5002514) που εντάσσονται στη Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).

We acknowledge support of this work by the project “Target Identification and Development of Novel Approaches for Health and Environmental Applications” (MIS 5002514) which is implemented under the Action for the Strategic Development on the Research and Technological Sectors, funded by the Operational Programme "Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation" (NSRF 2014-2020) and co-financed by Greece and the European Union (European Regional Development Fund).



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑ^ηΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION

 ΕΣΠΑ
2014-2020
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη
Partnership Agreement
2014 - 2020

Co-financed by Greece and the European Union



Co-financed by Greece and the European Union

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΠΑΝΙΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ



Γεράσιμος Βουσινάς
Εργ. Μοριακής Καρκινογένεσης και Γενετικής Σπανίων Παθήσεων
Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών
ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Sanitura: Παραδοτέο 2.4



fineartposterpub.com

(c) Erik Johansson

ΙΒΕ
Δευτέρα 26 Απριλίου 2021
14.00-16.00



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑΝΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION



ΕΣΠΑ
2014-2020
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη
Partnership Agreement
2014 - 2020

Co-financed by Greece and the European Union

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (SANITURA)» (MIS 5002514) που εντάσσεται στη Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).

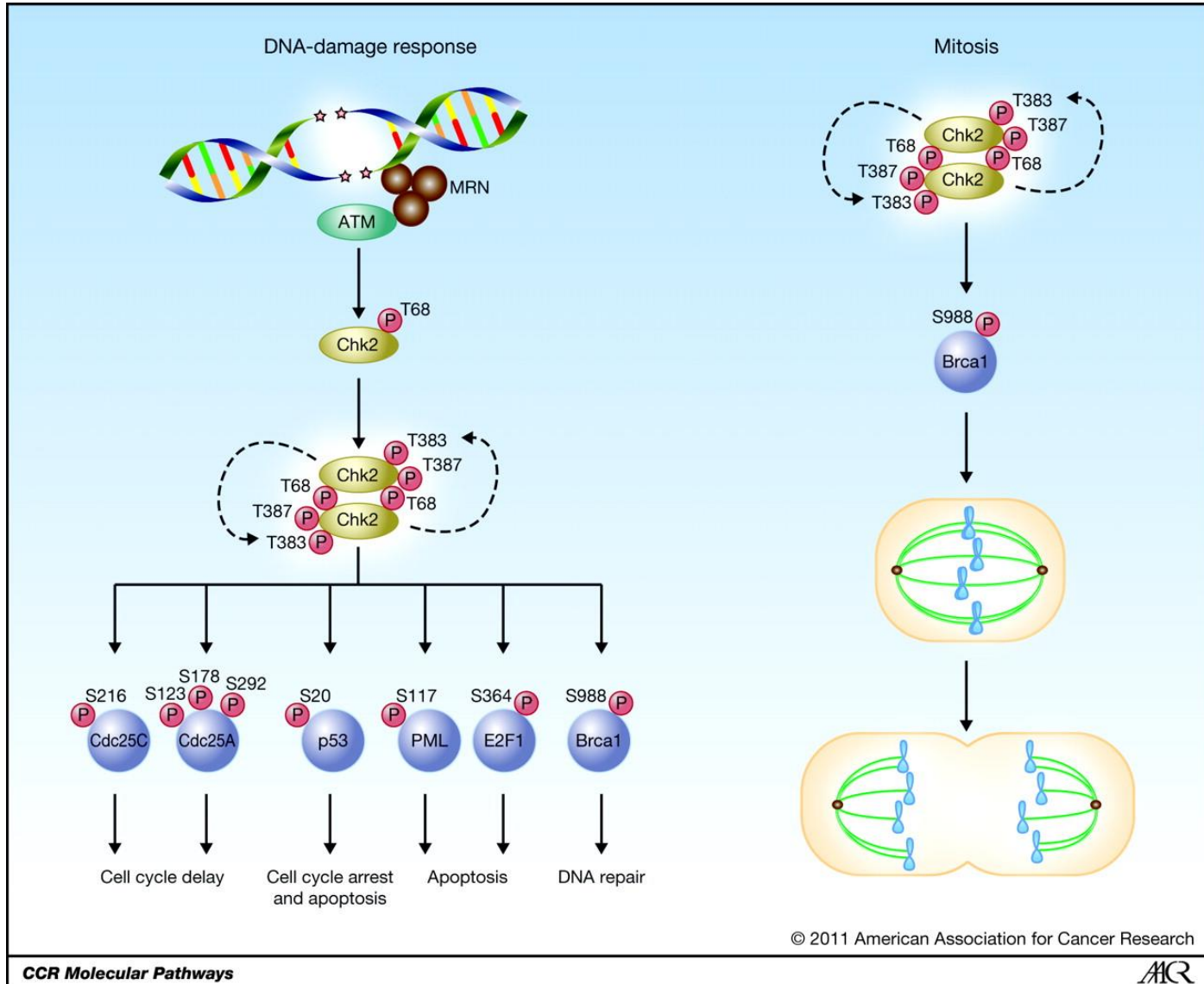
Παραδοτέο 2.4

1. Λειτουργική δοκιμασία στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* για ανάλυση παθογονικότητας παραλλαγών του γονιδίου CHEK2 στον καρκίνο του μαστού
2. Βάση δεδομένων κλινικών και γενετικών χαρακτηριστικών 30 Ελλήνων ασθενών με Οζώδη Σκλήρυνση (ΟΣ)

Παραδοτέο 2.4

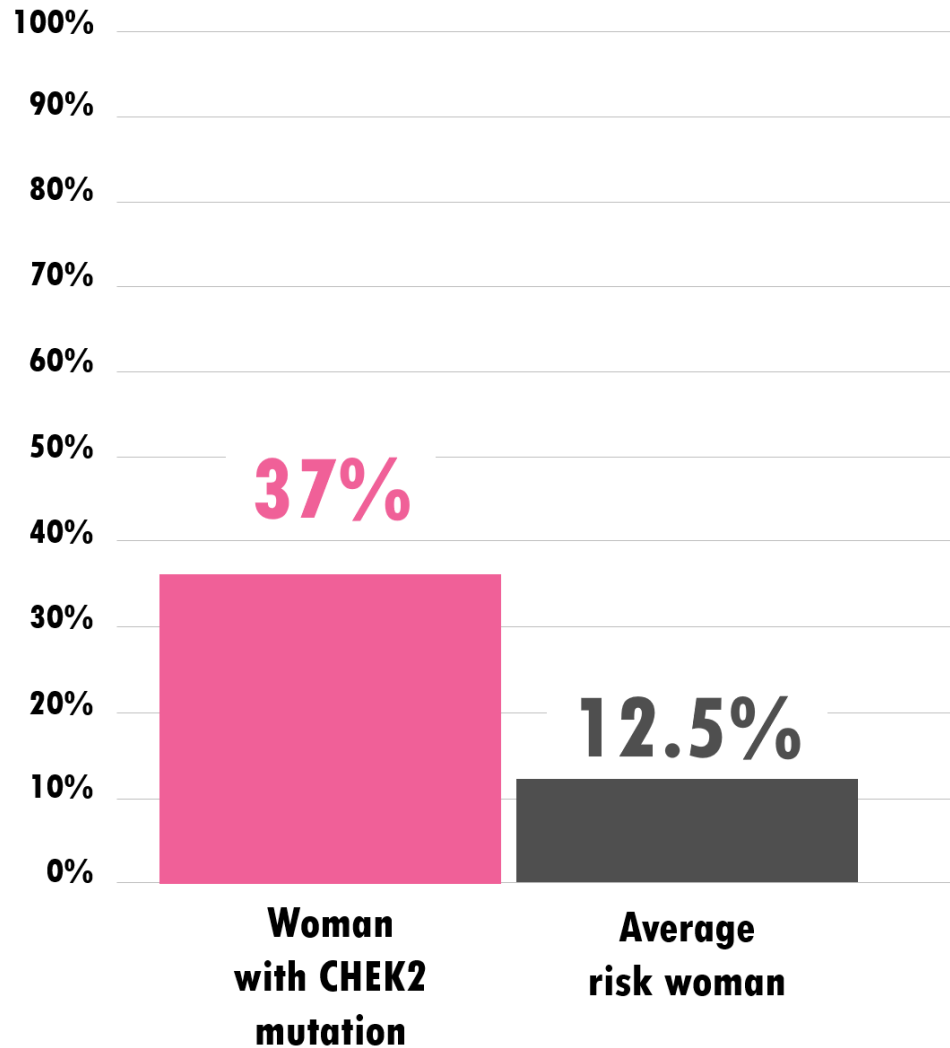
- 1. Λειτουργική δοκιμασία στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* για ανάλυση παθογονικότητας παραλλαγών του γονιδίου CHEK2 στον καρκίνο του μαστού**
2. Βάση δεδομένων κλινικών και γενετικών χαρακτηριστικών 30 Ελλήνων ασθενών με Οζώδη Σκλήρυνση (ΟΣ)

CHEK2



- **Breast cancer**
- **Ovarian cancer**
- **Prostate cancer**
- **Colon cancer**
- **Kidney cancer**
- **Thyroid cancer**
- **Brain tumors**
- **Osteosarcoma**
- **Li-Fraumeni syndrome**

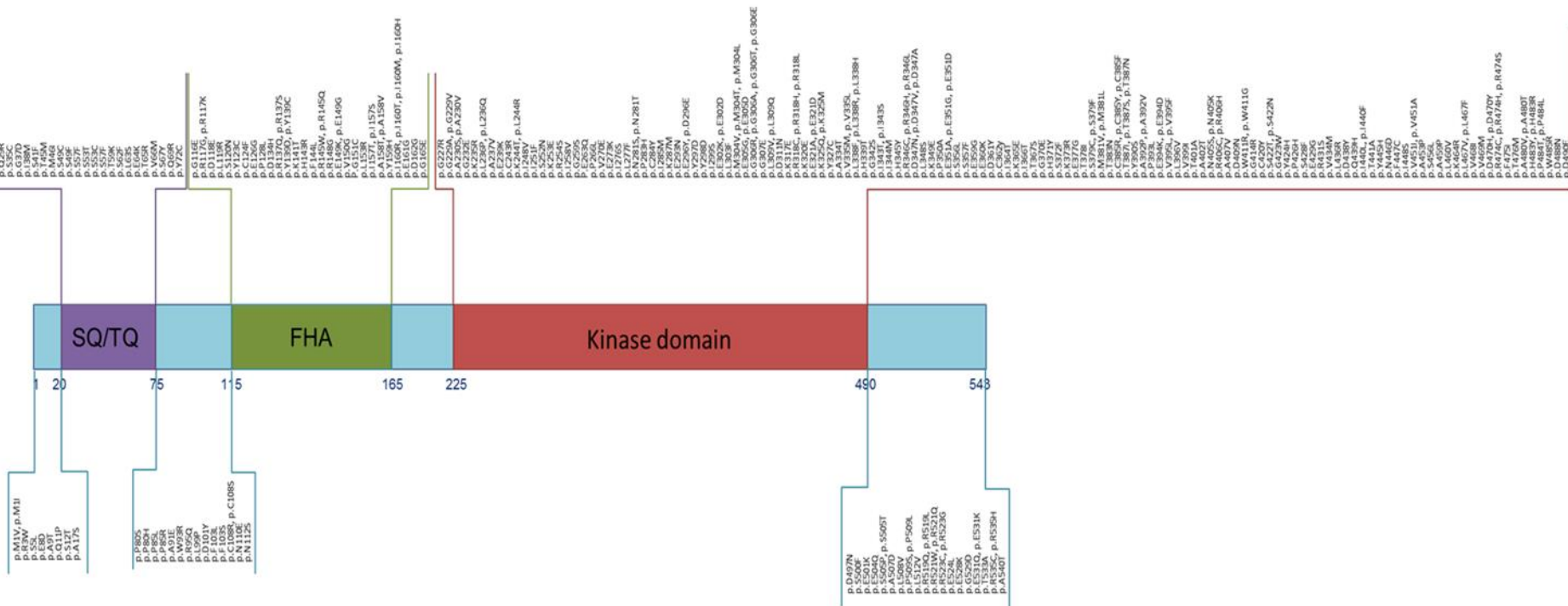
Lifetime breast cancer risk (%)



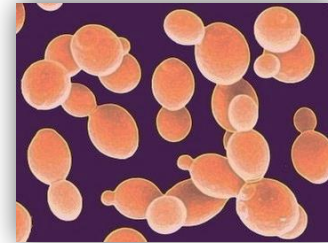
©2021 FORCE-Facing Our Risk of Cancer Empowered, Inc.



Παρανοηματικές παραλλαγές CHEK2 στην ClinVar 744 το 2018, 2.347 το 2021



Βιολογικό σύστημα

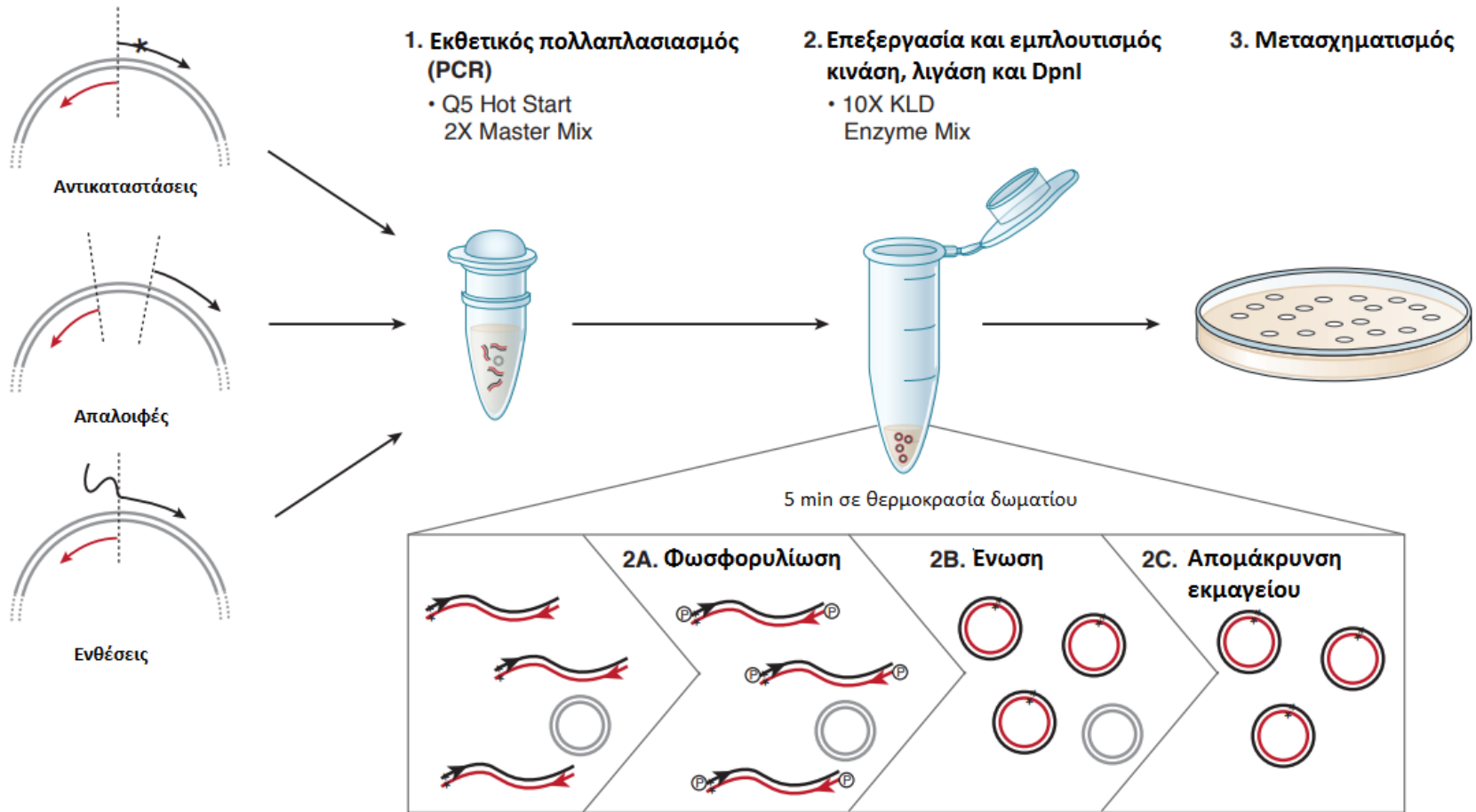


Saccharomyces cerevisiae

W2105 -17b (απουσία του *RAD53*)

(ευγενική δωρεά του Dr. Rodney Rothstein)

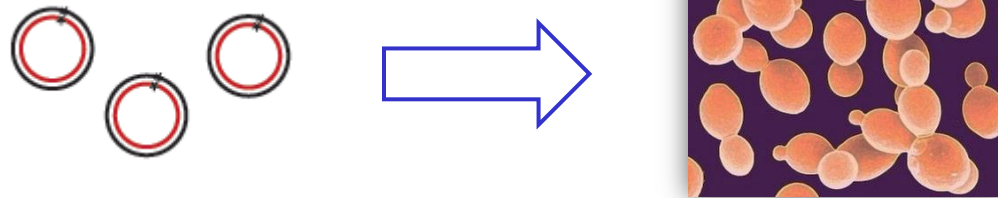
Λειτουργική δοκιμασία στη ζύμη 1



pmh267 (pBAD101, 2μ LEU2 GAL-CHEK2)
(ευγενική δωρεά του Dr. Steven Elledge)



Λειτουργική δοκιμασία στη ζύμη 2



- **Εφαρμογή MMS** (μεθυλ-μεθανοσουλφονικό οξύ)
 - **Μέτρηση ανάπτυξης της ζύμης** (0h, 12h, 17h και 22h)
 - **Σύγκριση της ανάπτυξης** (θετικός και αρνητικός μάρτυρας)
 - **Στατιστική ανάλυση**
-
- ✓ **Θετικός μάρτυρας: pmh267** (pBAD101, 2μ LEU2 GAL-CHEK2)
 - ✓ **Αρνητικός μάρτυρας: c.1100delC**

Επιλογή παραλλαγών

120 παρανοηματικές παραλλαγές του *CHEK2*

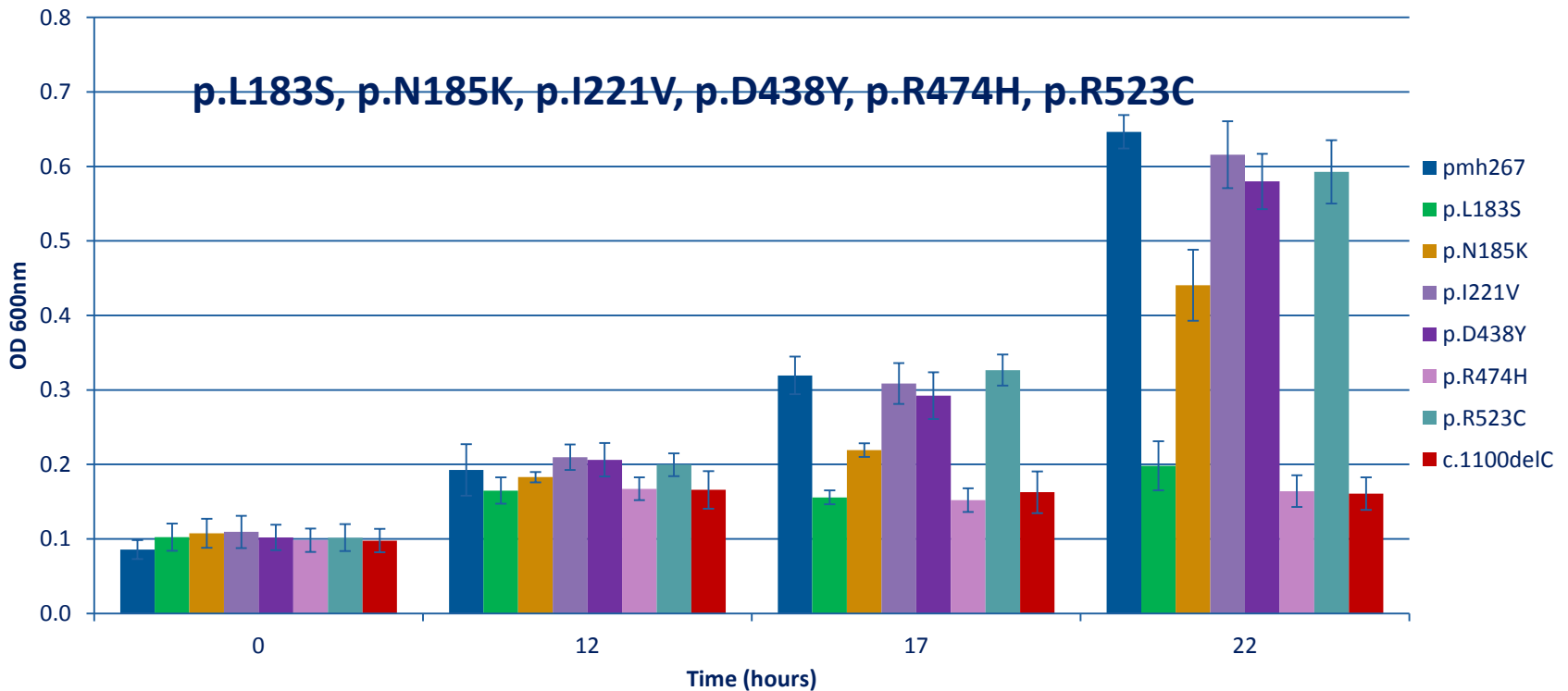
+ 2 μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις

(~6kb απαλοιφή των εξονίων 2&3, ~7,5kb απαλοιφή του εξονίου 6)

- Εντοπίστηκαν σε γενετικό έλεγχο Ελλήνων ασθενών με καρκίνο μαστού
- Προτάθηκαν από μέλη του ENIGMA consortium
(Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles)
- Επιλέχθηκαν από τη βάση δεδομένων ClinVar

Κατηγοριοποίηση παραλλαγών

- **Μη-επιβλαβείς:** παρόμοια ανάπτυξη με το θετικό μάρτυρα
- **Παθογόνοι:** παρόμοια ανάπτυξη με τον αρνητικό μάρτυρα
- **Ενδιάμεσης λειτουργικότητας:** ανάπτυξη μεταξύ των δύο παραπάνω

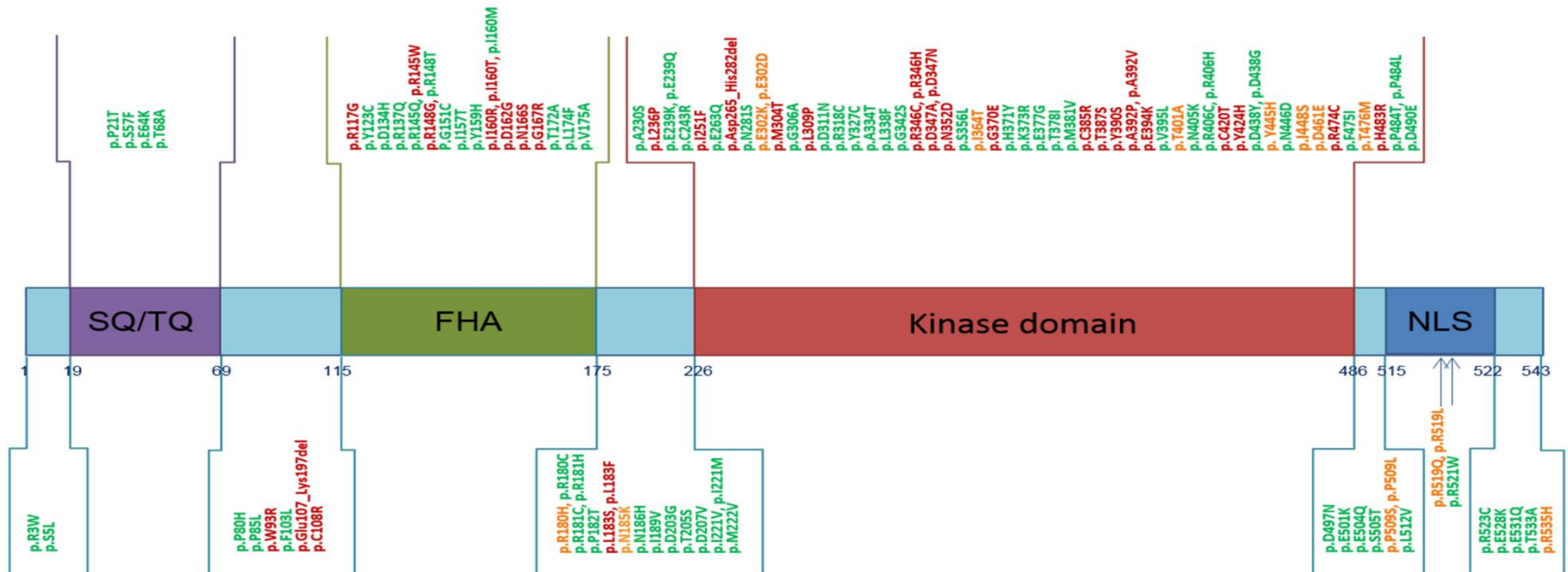


Τα αποτελέσματα προέκυψαν από 3 ανεξάρτητα πειράματα με 4-6 επαναλήψεις της κάθε παραλλαγής στο καθένα

Αποτελέσματα

Συνολικά,

- 73 παραλλαγές χαρακτηρίστηκαν ως **μη-επιβλαβείς**
- 34 ως **παθολόγοι**
- 15 ως **ενδιάμεσης λειτουργικότητας**



Σύγκριση με υπολογιστικά εργαλεία

❖ *In silico* εργαλεία:

- SIFT/PROVEAN
- Align GVGD
- PolyPhen-2
- MutationTaster
- PhastCons
- PhyloP
- GERP
- Grantham

❑ 19 παθογόνοι παραλλαγές σε πλήρη συμφωνία με το χαρακτηρισμό από τα *in silico* εργαλεία

❖ Πρόγραμμα **Human Splicing Finder** (version 3.1)

❖ Λογισμικό **PyMOL**

❑ 14 παθογόνοι παραλλαγές με επίπτωση στο μάτισμα

❖ Εύρεση του **MAF** (Minor allele frequency)





Συμπεράσματα

- ❑ ~**27%** των παρανοηματικών παραλλαγών, καθώς και οι 2 γονιδιακές αναδιατάξεις χαρακτηρίστηκαν ως **παθογόνοι**.
- ❑ Η πλειονότητα αυτών εντοπίζεται στην περιοχή του ενεργού κέντρου της **κινάσης** και την περιοχή **διμερισμού** της **CHEK2**.

Η **λειτουργική δοκιμασία στη ζύμη** είναι μια **γρήγορη, εύκολη, χαμηλού κόστους**, αλλά κυρίως μια ***in vivo*** μέθοδος, που μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στην κατηγοριοποίηση παρανοηματικών παραλλαγών και ενθέσεων/απαλοιφών του **CHEK2**

RESEARCH ARTICLE

Functional characterization of *CHEK2* variants in a *Saccharomyces cerevisiae* system

Angeliki Delimitsou^{1,2}  | Florentia Fostira¹  | Despoina Kalfakakou¹  |
Paraskevi Apostolou¹  | Irene Konstantopoulou¹ | Christos Kroupis³ |
Athanasios G. Papavassiliou⁴ | Zdenek Kleibl⁵ | Efstratios Stratikos⁶ |
Gerassimos E. Voutsinas^{2*} | Drakoulis Yannoukakos^{1*}

¹Molecular Diagnostics Laboratory, INRaSTES, National Center for Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece

²Laboratory of Environmental Mutagenesis and Carcinogenesis, Institute of Biosciences and Applications, National Centre for Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece

³Department of Clinical Biochemistry, "Attikon" University General Hospital, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

⁴Department of Biological Chemistry, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

⁵Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

⁶Protein Chemistry Laboratory, INRaSTES, National Center for Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece

Correspondence

Drakoulis Yannoukakos, Molecular Diagnostics Laboratory, INRaSTES, National Center for Scientific Research "Demokritos", Patriarchou Gregoriou E' & Neapoleos Street, Aghia Paraskevi, 153 10 Athens, Greece.
Email: yannouka@rrp.demokritos.gr

Funding information

A.G. Leventis Foundation; IKY_Greek State Scholarships Foundation; research program ARISTEIA, Grant/Award Numbers: P, BROCA, ARISTEIA 39; European Union (European Social Fund, ESF); Greek national funds through the Operational Program; Targeted Identification and Development of Novel Approaches for Health and Environmental Applications, Grant/Award Number: MIS 5002514; Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation, Grant/Award Number: NSRF 2014-2020; Greece and the European Union (European Regional Development Fund)

Abstract

Genetic testing for cancer predisposition leads to the identification of a number of variants with uncertain significance. To some extent, variants of *BRCA1/2* have been classified, in contrast to variants of other genes. *CHEK2* is a typical example, in which a large number of variants of unknown clinical significance were identified and still remained unclassified. Herein, the *CHEK2* variant assessment was performed through an in vivo, yeast-based, functional assay. In total, 120 germline *CHEK2* missense variants, distributed along the protein sequence, and two large in-frame deletions were tested, originating from genetic test results in breast cancer families, or selected from the ClinVar database. Of these, 32 missense and two in-frame deletions behaved as non-functional, 73 as functional, and 15 as semi-functional, after comparing growth rates of each strain with positive and negative controls. The majority of non-functional variants were localized in the *CHK2* kinase and forkhead-associated domains. In vivo results from the non-functional variants were in agreement with in silico predictions, and, where available, with strong breast cancer family history, to a great extent. The results of the largest, to date, yeast-based assay, evaluating *CHEK2* variants, can complement and assist in the classification of rare *CHEK2* variants with unclear clinical significance.

KEYWORDS

breast cancer, *CHEK2* variants, functional assay, yeast

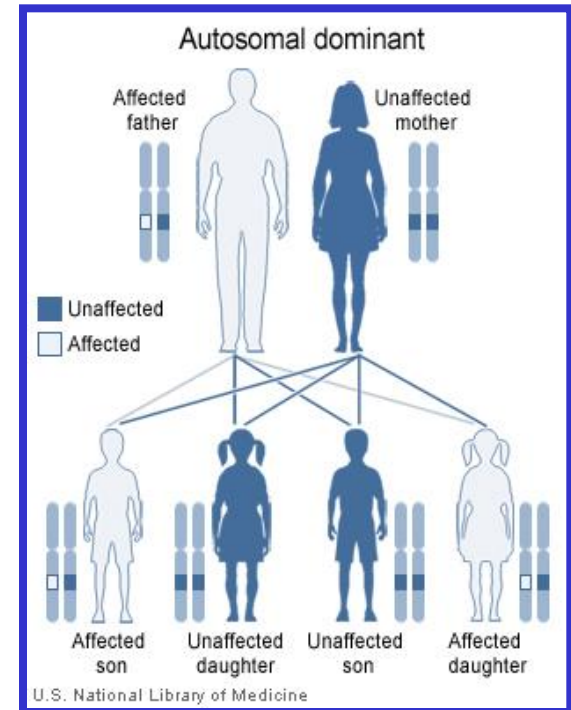


Παραδοτέο 2.4

1. Λειτουργική δοκιμασία στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* για ανάλυση παθογονικότητας παραλλαγών του γονιδίου CHEK2 στον καρκίνο του μαστού
2. Βάση δεδομένων κλινικών και γενετικών χαρακτηριστικών 30 Ελλήνων ασθενών με Οζώδη Σκλήρυνση (ΟΣ)

Οζώδης Σκλήρυνση (Tuberous Sclerosis - TSC)

- Σπάνια πάθηση (επίπτωση 1:6.000 επιπολασμός 1:11.300-1:25.000)
- Γενετική -> αυτοσωμική επικρατής
- Πολυσυστημική -> καλοήθεις όγκοι στον εγκέφαλο, τα νεφρά, την καρδιά, τους οφθαλμούς, τους πνεύμονες, το δέρμα
- Κλινική διάγνωση
- Συμπτωματική θεραπεία, και από το ~2007, αναστολείς του mTORC1



Κλινική διάγνωση

Κλινικά χαρακτηριστικά

Μείζονα

1. αγγειοϊνώματα προσώπου
2. ίνωμα στα νύχια
3. υπομελανωτικές κηλίδες
4. σαγρέ κηλίδες στο δέρμα
5. όζοι στον αμφιβληστροειδή
6. όζοι στον εγκεφαλικό φλοιό
7. αστροκύτωμα
8. καρδιακό ραβδομύωμα
9. λεμφαγγειομυωμάτωση
10. νεφρικό αγγειομυολίπωμα

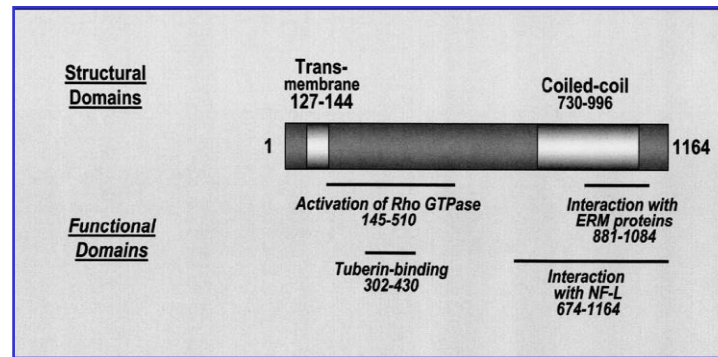
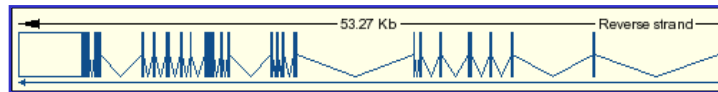
Ελάσσονα

1. πολλαπλές κοιλότητες στο σμάλτο των δοντιών
2. πολύποδας του ορθού
3. κύστεις στα οστά
4. ινώματα στα ούλα
5. άχρωμες κηλίδες του αμφιβληστροειδούς
6. «κονφετί» δερματικές αλλοιώσεις
7. πολλαπλές νεφρικές κύστεις
8. μη νεφρικοί όζοι

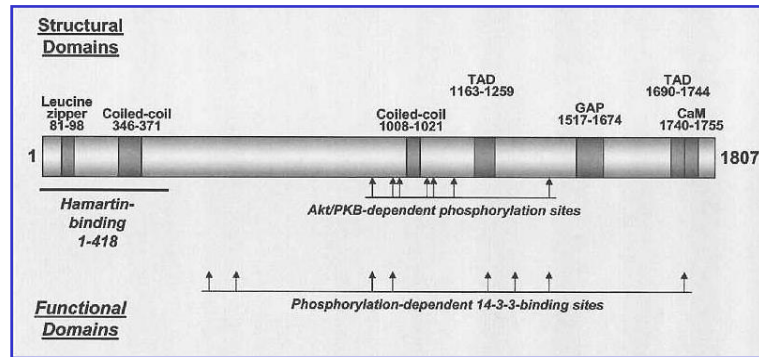
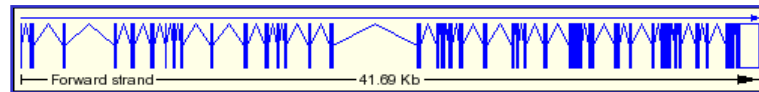
Δύο μείζονα ή ένα μείζον και δύο ελάσσονα

Τα γονίδια της ΟΣ

TSC1



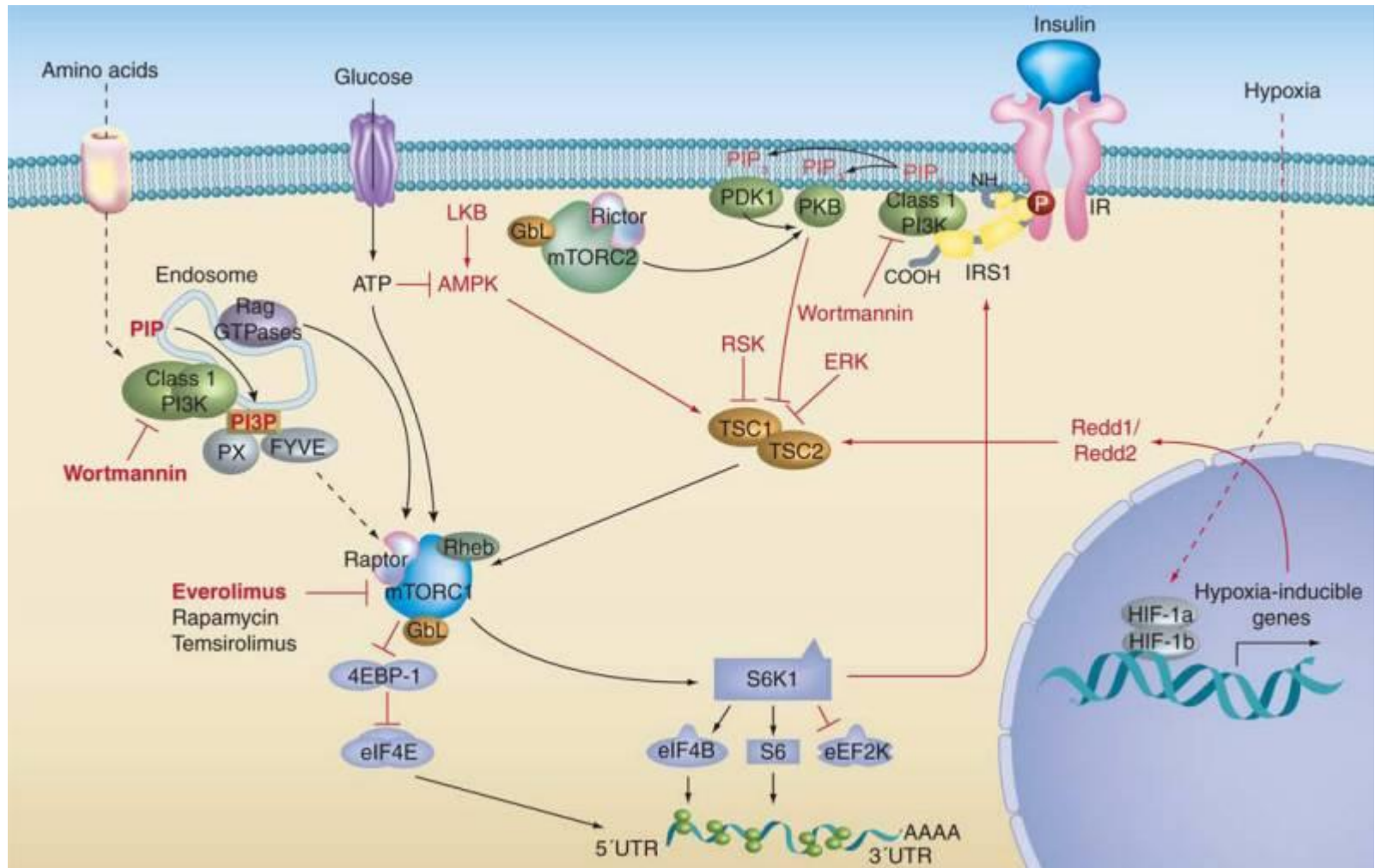
TSC2



- 9q34.3 - 53,27 kb (1997)
- 23 εξόνια (21 κωδικοποιούντα)
- Μήκος μεταγράφου: 8.604 bp
- Μήκος πρωτεΐνης: 1.164 aa (130 kD)

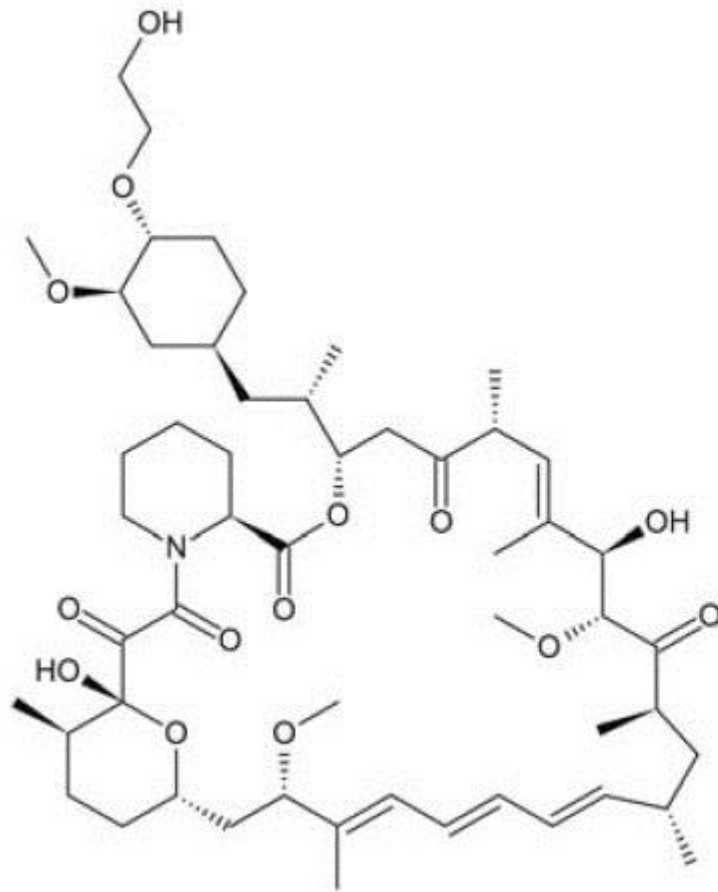
- 16p13.3 - 41,69 kb (1993)
- 42 εξόνια (41 κωδικοποιούντα)
- Μήκος μεταγράφου: 6.598 bp
- Μήκος πρωτεΐνης: 1.807 aa (198 kD)

Μονοπάτι mTOR

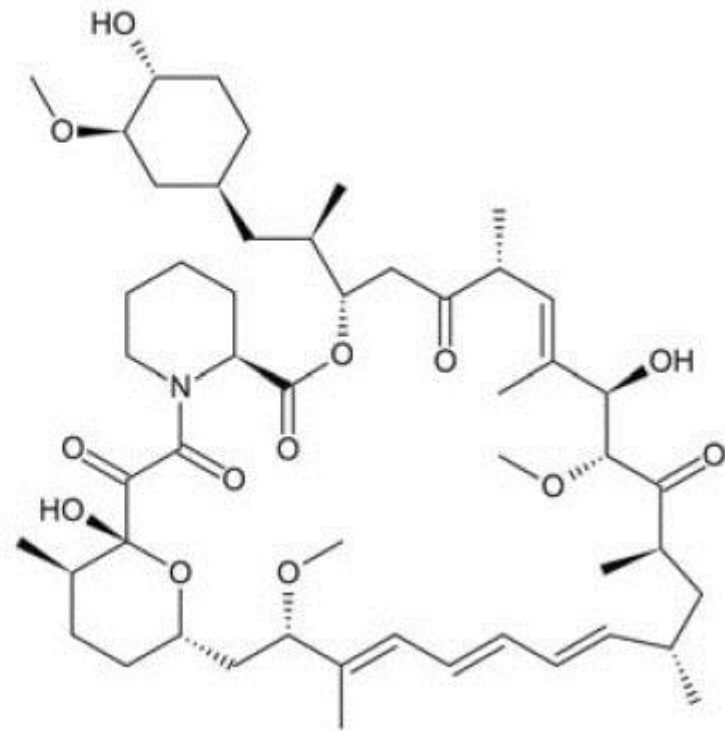


Curatolo and Moavero (2012) *Curr Neuropharmacol*. 10(4): 404-415

Αναστολείς mTORC1

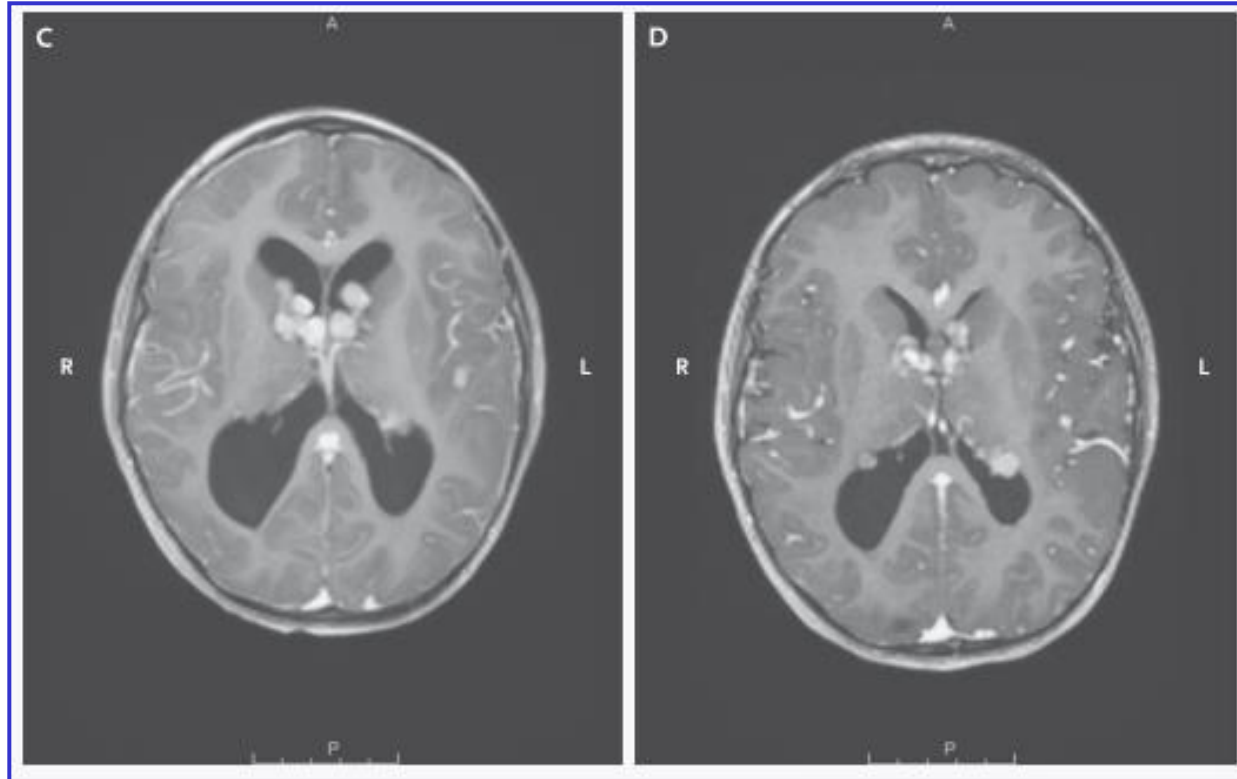


everolimus



sirolimus

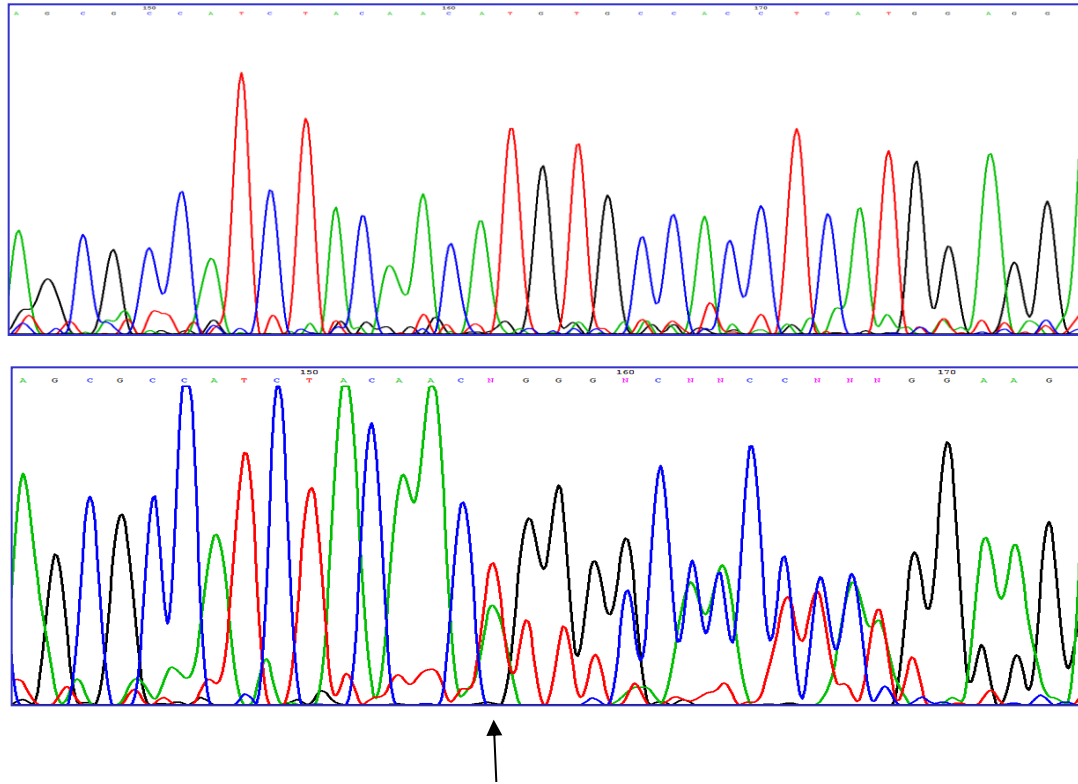
Θεραπεία με αναστολείς mTORC1



Krueger et al (2010) N Eng J Med 363, 19

- Πολλαπλά αμφοτερόπλευρα SEGAs - 3 mo everolimus

Γενετική ανάλυση TSC



Γονίδιο

TSC2 (16p13)

Παραλλαγή

Εξόνιο 8 (7ο μεταφραζόμενο)

Χαρακτηριστικά παραλλαγής

cDNA: c.826delA

Πρωτεΐνη: p.Met276Cysfs*17

Διεισδυτικότητα και εκφραστικότητα

- Υψηλή διεισδυτικότητα (100%)
 - => Όσοι φέρουν μια μετάλλαξη στα γονίδια *TSC1* ή *TSC2* νοσούν
- Ποικίλη εκφραστικότητα
 - => η βαρύτητα των συμπτωμάτων είναι διαφορετική ακόμα και σε πάσχοντες μέσα στην ίδια οικογένεια

Συμπληρωματικά στοιχεία για το πρόγραμμα

- Έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του ΕΚΕΦΕΔ
- Ελληνική Εταιρεία Οζώδους Σκλήρυνσης
- Ελληνική Παιδονευρολογική Εταιρεία
- Ελληνική Νευρολογική Εταιρεία
- Ελληνική Νεφρολογική Εταιρεία
- Ελληνική Εθνική Ένωση κατά της Επιληψίας
- Παιδονευρολόγοι και Νευρολόγοι από νοσοκομεία όλης της Ελλάδας
- Ενημερωτική συνεδρία σχετικά με τις δυνατότητες και τους περιορισμούς της μοριακής διάγνωσης
- Πρωτόκολλο της μοριακής ανάλυσης
- Δήλωση συγκατάθεσης
- Συγχρηματοδότηση από το Sanitura, τους ασθενείς (προς το Εργαστήριο Μοριακής Διάγνωσης Γενετικών Παθήσεων) και την Novartis Hellas

Γενετικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΟΣ

Patient code	Patient	Result	TSC diagnostic status	Cortical displasias	Subependymal giant cell astrocytomas	Subependymal nodules	Seizures/ Infantile spasms	Renal angiomyolipomas	Multiple renal cysts
N1			Definite	+		+	IS		+
N2			Definite			+			
N3			Definite					+	
N4			Definite				IS	+	
N5			Definite	+		+		+	
N6			Possible						
N7			Possible	???					
N8			Definite	+		+	+		+
N9			Possible	???			IS		
N10			Possible		+		IS		
N11			Definite	+			+		
N12			Definite		+	+	IS		
N13			Definite	+		+	IS	+	+
N14			Possible				+		
N15			Definite	+					
N16			Definite	+		+	IS/+	+	
N17			Definite	+		+	IS/+	+	+
N18			Definite	+	+	+	IS/+	+	+
N19			Definite			+	IS		
N20			Possible			+	IS		+
N21			Definite	+		+	IS		
N22			Definite	+	+	+	IS/+	?	
N23			Definite	+		+			?
N24			Definite	+		+	+	+	
N25			Possible					+	
N26			Definite	+		+	IS/+	+	
N27			Definite	?				+	
N28			Possible				IS		
N29			Possible				IS		
N30			Definite					AML	
N31			Possible				+		
N32			Definite	+	+	+	IS	AML	
N33			Definite			+	+		
N34			Definite	MRI findings			IS		
N35			Definite			+			



Γενετικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΟΣ

Patient code	Lymphangi leiomyomatosis	Cardiac rhabdomyomas	Multiple retinal hamartomas	Retinal achromic patch	Angiofibroma	Shagreen patch	Hypomelanotic macules	Café au lait macules	Confetti skin lesions	Ungual fibromas	Intraoral fibromas	Dental enamel pits	Learning disabilities	Mental retardation	Autism spectrum disorder	Attention Deficit Hyperactivity Disorder
N1							+									
N2							+									
N3					+		+									
N4					+		+									
N5	+															
N6							+									
N7					+											
N8																
N9							+									
N10										+						
N11					+								+			
N12			+				+									
N13			+				+						+			
N14	+															
N15							+									
N16				+	+					+				+	+	
N17			+											+		+
N18		+	+		+	+					+			+		+
N19		+					+									
N20																
N21		+	+				+									
N22		+					+						+			
N23					+		+			+						
N24		+			+	+	+		+	+			+	+	+	
N25	? Look at symptoms?						1 (1-2cm) -									
N26					+		+	+					+			
N27					+											
N28							+	+								
N29																
N30					+											
N31							?									
N32							+	+					+			
N33							+									
N34							+									
N35		+														



Γενετικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΟΣ

Patient	Gene	Exon	Variant	Codon change	Mutation type	Inheritance	LOVD ID	ClinVar ID
N2	<i>TSC1</i>	15			Nonsense	De novo	-	280309
N8		17			Deletion	De novo	TSC1_000303	48894
N11		4			Nonsense	Familial	-	-
N15		16			Splice-site	De novo	-	-
N28		7			Splice-site	Familial	-	-
N33		11			Duplication	Familial	-	-
N3	<i>TSC2</i>	2			Deletion	Familial	-	-
N4		34			Splice-site	One parent missing	-	373118
N12		11			Missense	Familial	-	49967
N13		15			Nonsense	De novo	-	-
N16		20			Nonsense	De novo	-	-
N17		34			Nonsense	De novo	-	65003
N18		20			Duplication	De novo	-	-
N19		41			Deletion	De novo	TSC2_000149	12402
N20		10			Splice-site	De novo	-	-
N21		17			Missense	De novo	TSC2_000105	12397
N24		27			Deletion	Familial	-	-
N26		37			Nonsense	Familial	-	50097
N32		10			Deletion	De novo	-	-
N34		17			Splice-site	De novo	-	546435
N35		36			Nonsense	De novo	-	49326

Αποτελέσματα

- Αριθμός οικογενειών: 32
- Οριστική/πιθανή ΟΣ: 25/7
- Συνολικό ποσοστό ανιχνευμένων μεταλλάξεων: 21 (66%)
- Αριθμός νέων μεταλλάξεων: 11
- Οικογενείς/de novo μεταλλάξεις: 7/13 (1 ασαφής)
- Μεταλλάξεις σε ασθενείς με οριστική κλινική διάγνωση: 19 (76%)
- Μεταλλάξεις σε ασθενείς με πιθανή κλινική διάγνωση: 2 (29%)
- Μεταλλάξεις TSC1/TSC2: 6/15
- Μη νοηματικές (nonsense): 7
- Παρανοηματικές (missense): 2
- Θέσεις συρραφής (splice-site): 5
- Ενθέσεις/ελλείμματα (indels): 5
- Διπλασιασμοί (duplications): 2
- Κλινικά συμπεράσματα: Μεταλλάξεις του *TSC2* βρέθηκε ότι προκαλούν πιο σοβαρό φαινότυπο από εκείνες του *TSC1*, με περισσότερα υποεπενδυματικά γιγαντοκυτταρικά αστροκυττώματα και αγγειομυολιπώματα, υψηλότερη συχνότητα φαρμακοανθεκτικών επιληπτικών κρίσεων, και σοβαρότερες νευροψυχιατρικές διαταραχές



Ευχαριστώ για την προσοχή σας!





Co-financed by Greece and the European Union

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΡΟΝΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Προσδιορισμός στόχων και Ανάπτυξη Καινοτόμων
Προσεγγίσεων για Εφαρμογές στην υγεία και το
Περιβάλλον (SANITURA)**

**Α. Προμονά
Εργαστήριο Χρονοβιολογίας
Π2.5, Π3.3 - 26.4.2021**

Π2.5: Προσδιορισμός του ρόλου της ογκοπρωτεΐνης c-MYC στη ρύθμιση γονιδίων κεντρικών στοιχείων του ημερήσιου βιολογικού ρολογιού σε καρκινικές καταστάσεις.

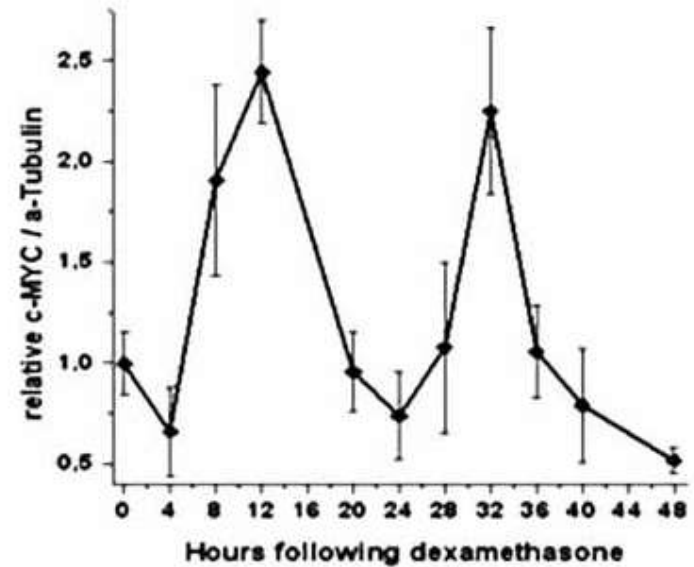
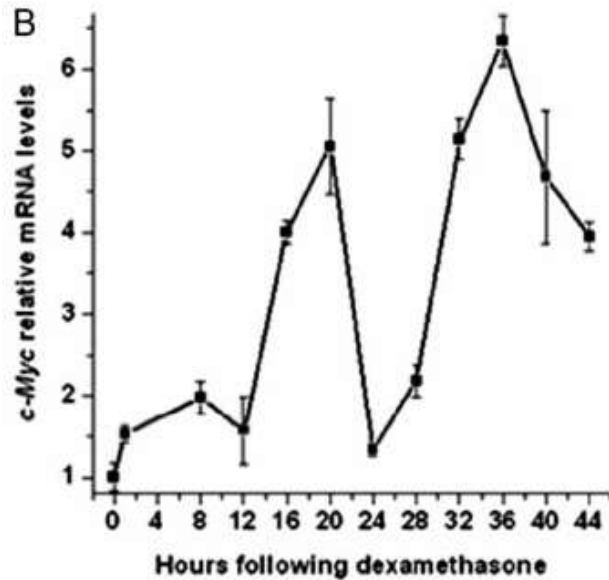
- **Στόχος: η διερεύνηση του ρόλου της ογκοπρωτεΐνης c-MYC στην έκφραση γονιδίων του ημερήσιου βιολογικού ρολογιού**

Συνεργάτης: Δρ. Αγγελική Γαλέου

Πώς συνδέεται το c-MYC με το Βιολογικό Ρολόι

- Το c-MYC είναι μεταγραφικός παράγοντας που απαιτείται για την είσοδο του κυττάρου στον κυτταρικό κύκλο
- Χαρακτηρίζεται ως ογκοπρωτεΐνη λόγω της υπερέκφρασης σε καρκινικές καταστάσεις
- Το 2002 διαπιστώθηκε ότι σε καρκινικά κύτταρα εκφράζεται ρυθμικά (**The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo** Fu et al., Cell)

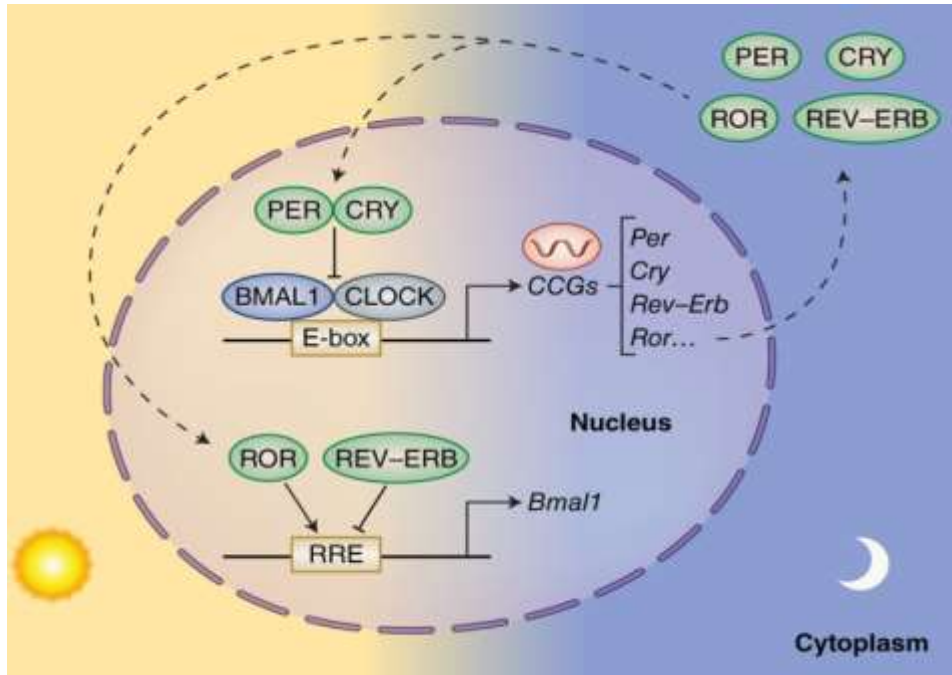
- Ρυθμική έκφραση του c-MYC σε συγχρονισμένα N2A κύτταρα



Πώς συνδέεται το c-MYC με το Βιολογικό Ρολόι

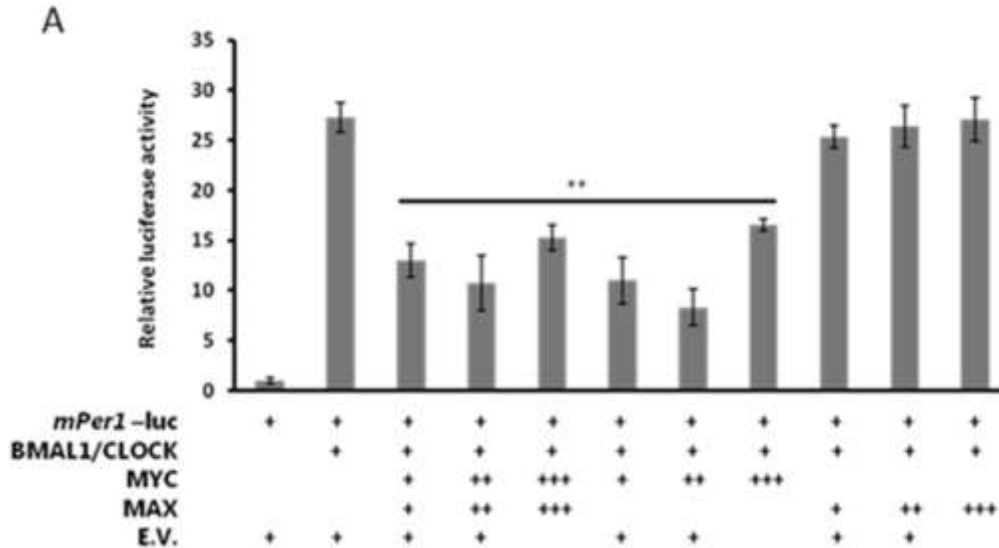
In the [human genome](#), *C-myc* is located on [chromosome 8](#) and is believed to regulate expression of 15% of all genes through **binding on enhancer box sequences (E-boxes)**.

Ο μοριακός κεντρικός ταλαντωτής στα θηλαστικά

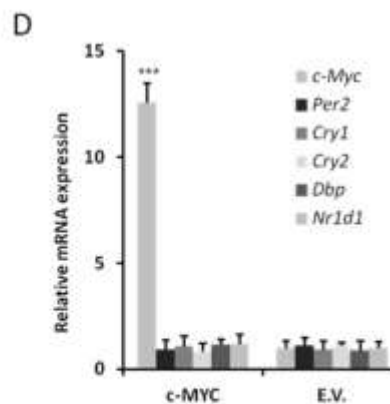
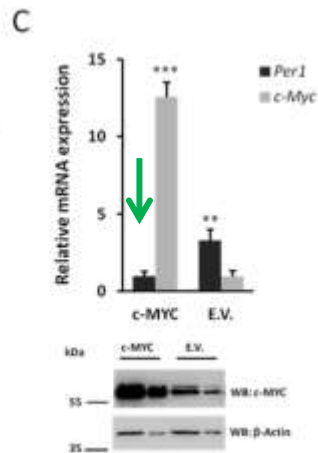
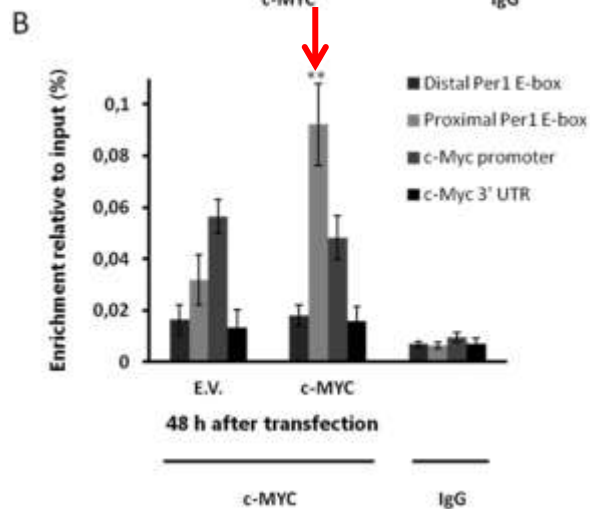
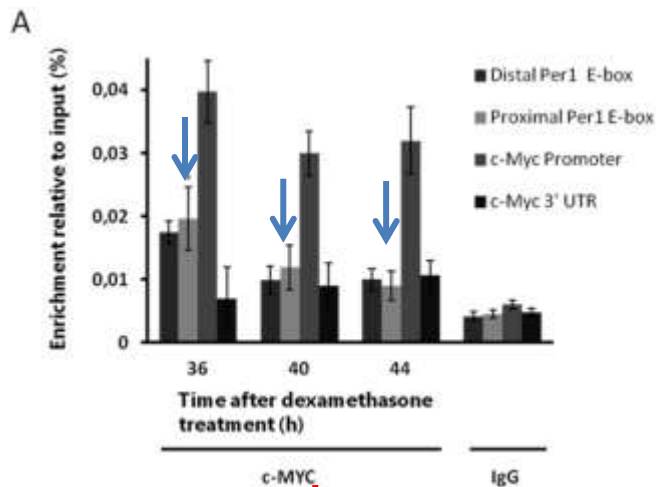


Αμφίδρομη σχέση?

Πώς ελέγχει το c-MYC το Βιολογικό Ρολόι ?



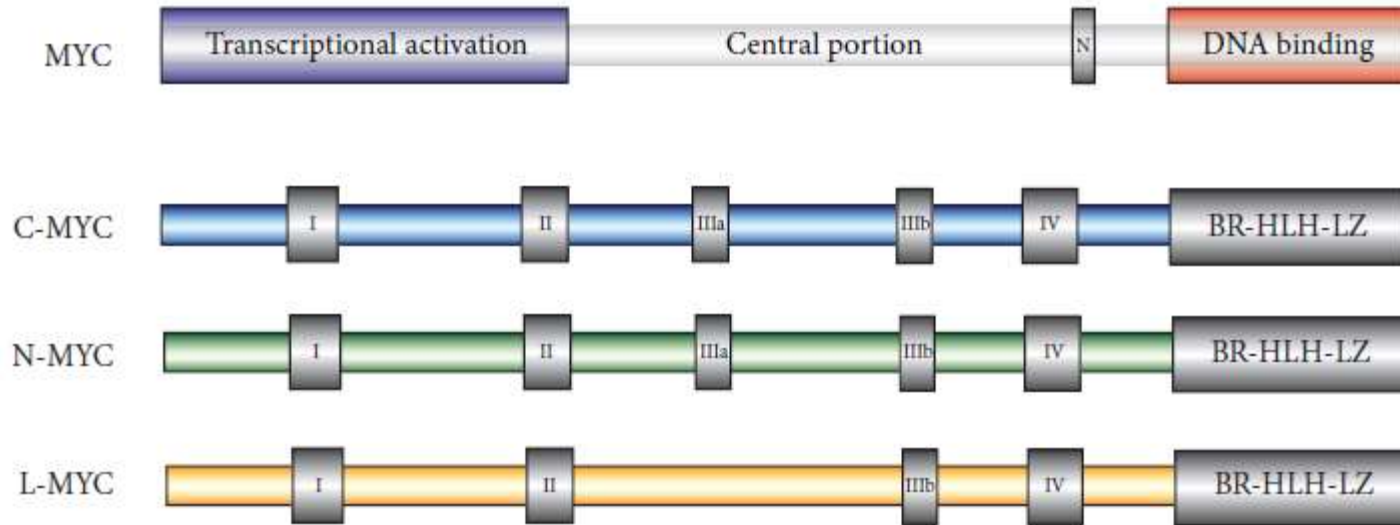
Το c-Myc καταστέλλει στον *Per1* υποκινητή τη δράση του συμπλόκου BMAL1/CLOCK υποκινητή, ανεξαρτήτως της πρωτεΐνης MAX



- Το c-Myc προσδένεται στον *Per1* υποκινητή (↓)
- Υπερέκφραση του c-MYC παρουσιάζει υψηλή πρόσδεση στον *Per1* υποκινητή (↓)
- Το υπερέκφρασμένο c-MYC καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου *Per1* (↓)

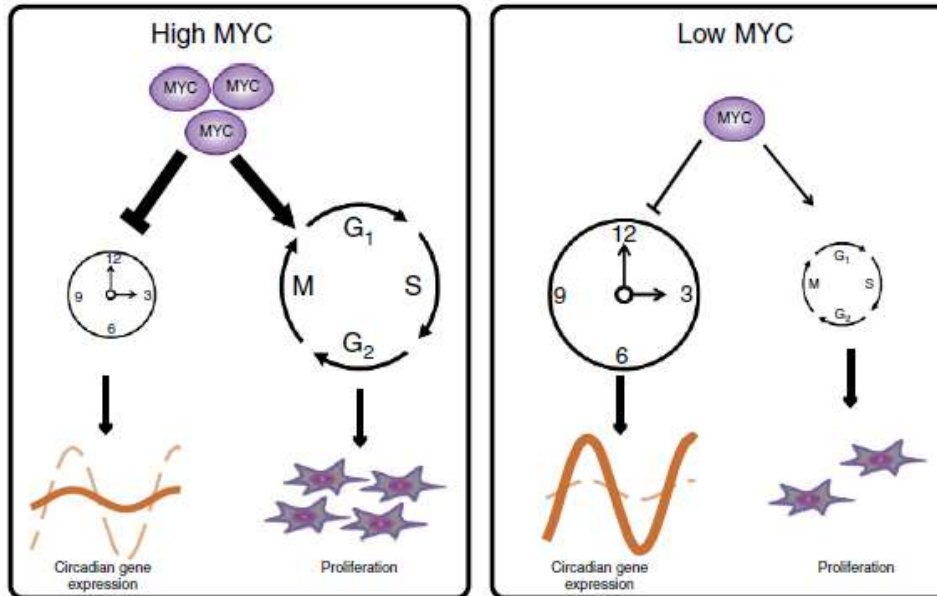
Η c-MYC πρωτεΐνη

Συντηρημένες περιοχές στα MYC (MYCN, MYCL, c-MYC)



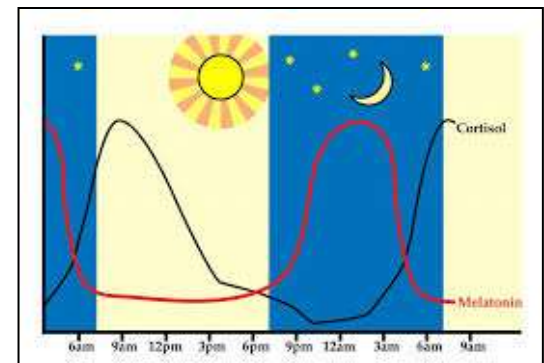
→ Μεταλλαγμένη σε διαφορετικές περιοχές της c-MYC πρωτεΐνης και μελέτη του ρόλου τους στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων του κεντρικού ταλαντωτή σε καρκινικές σειρές.

MYC, ρολόι και καρκινογένεση



Τι είναι το ημερήσιο βιολογικό ρολόι

- **Ενδογενής μηχανισμός** των οργανισμών (κυανοβακτήρια - άνθρωπο) που παράγει ρυθμούς με περίοδο ~24 ωρών (διακυμάνσεις στη φυσιολογία και τη δραστηριότητα)
- **Γενετική βάση:** διατήρηση των ρυθμών και σε σταθερές συνθήκες (συνεχές φως ή σκοτάδι) - περιημερήσιοι ή κιρκάδιοι
“circa” = περίπου, “dies” = ημέρα
- **Συγχρονισμός** των φυσιολογικών λειτουργιών με τη φωτοπερίοδο του περιβάλλοντος
 - **anticipation-πρόβλεψη** προετοιμασία των διεργασιών του οργανισμού για τη μέρα ή τη νύχτα που επέρχεται
 - **επανασυγχρονισμός** (jet lag, αλλαγή της διάρκειας της ημέρας)



Π3.3: Διερεύνηση της απόκρισης παραγόντων του HBP σε συνθήκες αβιοτικού στρες και ταυτοποίηση ρυθμιστικών περιοχών των υποκινητών γονιδίων του ημερήσιου βιολογικού ρολογιού.

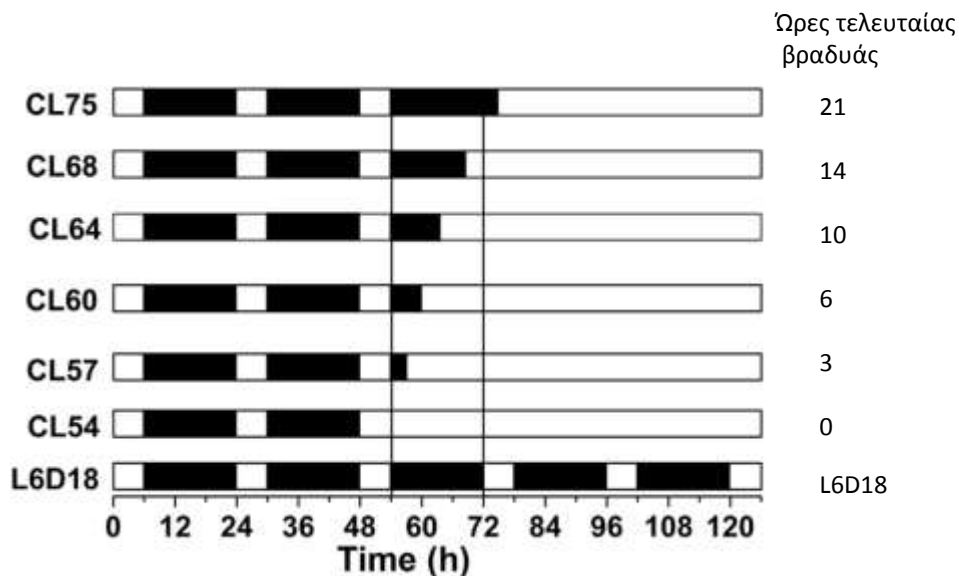
- **Στόχος:** η διερεύνηση της απόκρισης γονιδίων του ρολογιού σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού
- Μελέτη των κινήσεων των φύλλων ως 'λειτουργία αναφοράς' του ρολογιού
- **Πειραματική προσέγγιση:** Σε φυτά συγχρονισμένα σε φωτοπερίοδο μικρής νύχτας εφαρμόστηκε συνεχής φωτισμός σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της νύχτας και μελετήθηκαν συγχρόνως η ρυθμική γονιδιακή έκφραση (PvLHY, PvTOC1) και οι ρυθμικές κινήσεις των φύλλων.

Συνεργάτης: Δρ. Αγγελική Γαλέου

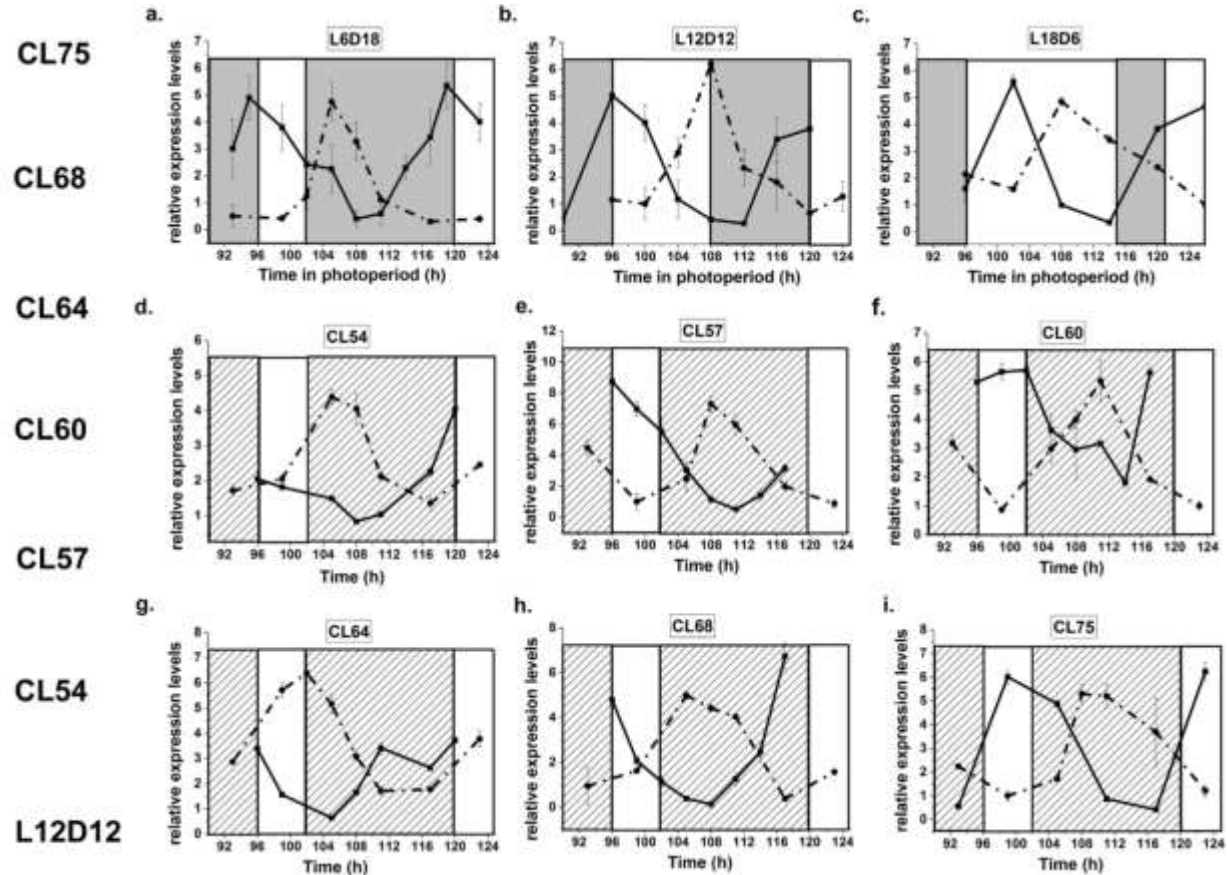
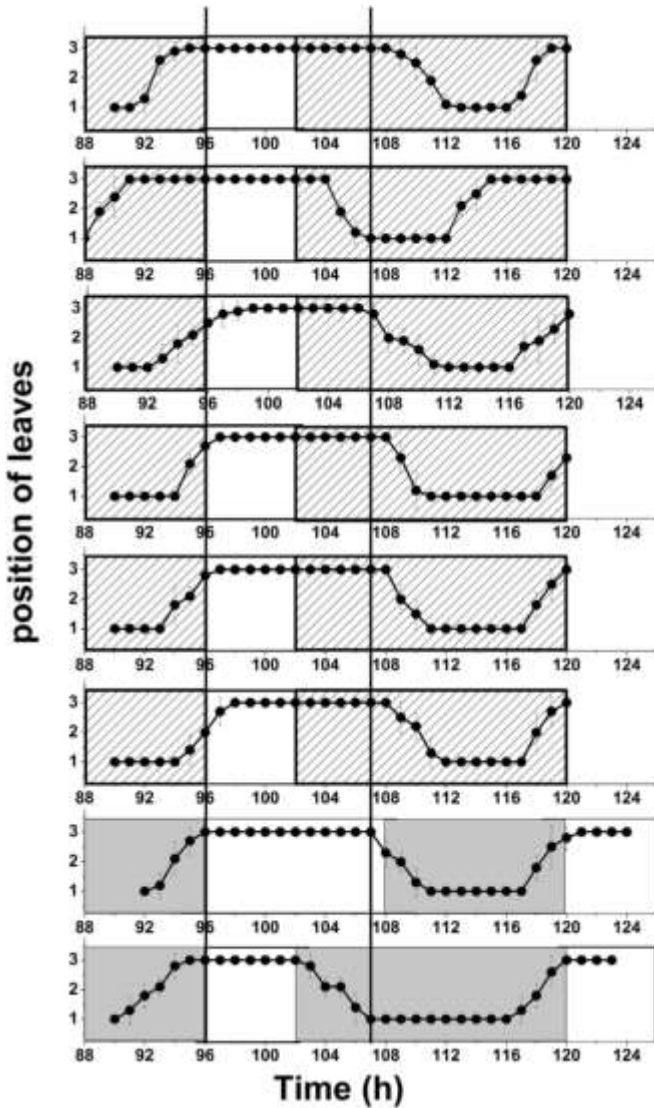
- Κινήσεις φύλλων στα ψυχανθή ρυθμικές, αλλά δεν γνωρίζουμε πώς συνδέονται με το ρολόι (νυκτιναστία)
- Έκθεση σε συνεχή φωτισμό προκαλεί προσωρινή διαταραχή με στόχο τον επανασυγχρονισμό
- Δειγματοληψία: χρονικό διάστημα 92-120 ώρες (σταθεροποιημένοι ρυθμοί)



Πειραματικός Σχεδιασμός για μελέτη επανασυγχρονισμού σε συνεχές φως



Αποτελέσματα

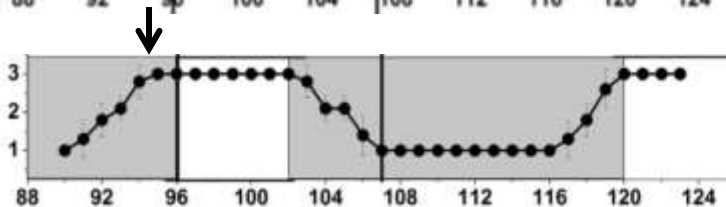
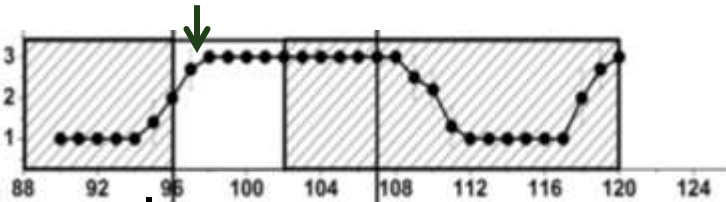
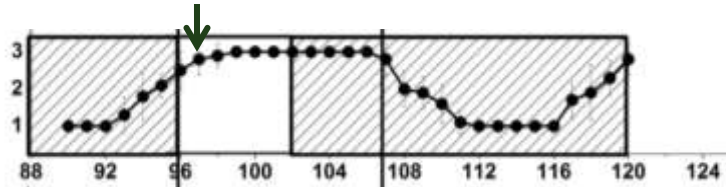
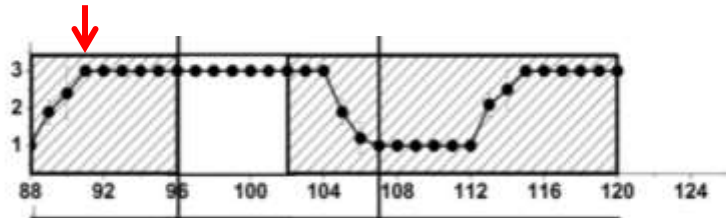


Daily rhythmic leaf movements and expression of circadian clock genes are differentially synchronized by light in *Phaseolus vulgaris*

Angeliki Galani, Anastasia Prokhorova
 Plant Gene database: <http://www.plantgene.org/>

© 2010 The Authors. Journal compilation © 2010 Blackwell Publishing Ltd, *Journal of Experimental Botany*, 51, 1–10

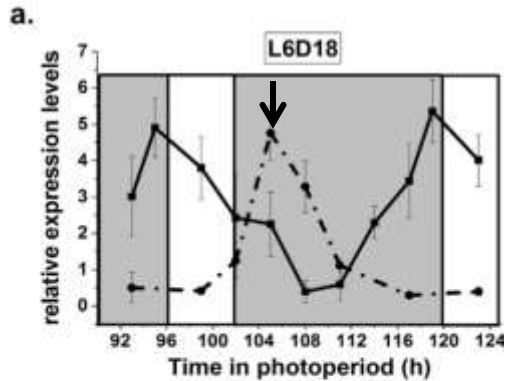
Μεταβολή Ρυθμού στις κινήσεις φύλλων



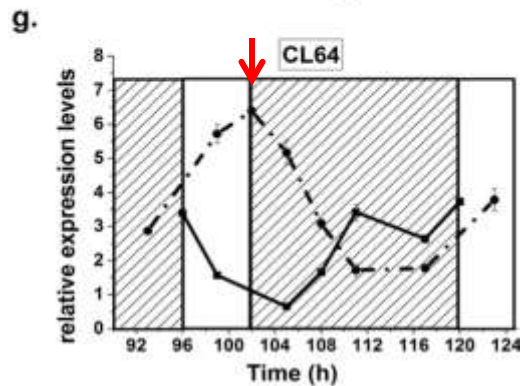
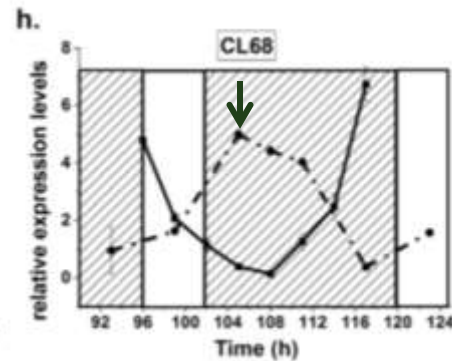
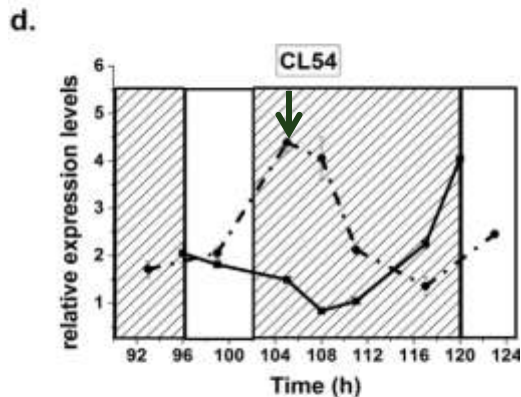
Time (h)

- Στο **CL54 CL64** παρατηρούμε καθυστέρηση
- Στο **CL68** παρατηρούμε **προπόρευση** του ρυθμού

Μεταβολή Ρυθμού στα γονίδια του ρολογιού



- Στο **CL54** **CL68** δεν παρατηρούμε αλλαγή
- Στο **CL64** παρατηρούμε **προπόρευση** του ρυθμού



Οι 24ωροι ρυθμοί σε φύλλα και γονίδια μεταβάλλονται διαφορετικά. Αυτό υποδεικνύει ότι οι ρυθμοί των φύλλων υπόκεινται και σε μηχανισμούς ανεξάρτητους από τον κεντρικό ταλαντωτή.

Η εργασία αυτές υλοποιήθηκαν στο πλαίσιο της Πράξης «ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (SANITURA)» (MIS 5002514) που εντάσσεται στη Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων και χρηματοδοτήθηκε από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑνηΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION

**ΕΣΠΑ**
2014-2020
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη
Partnership Agreement
2014 - 2020

Co-financed by Greece and the European Union



Σας ευχαριστώ!



Co-financed by Greece and the European Union

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗΣ

Παρουσιάσεις Παραδοτέων Sanitura

2.6 *In silico* Μοντέλα Τρισδιάστατης Δομής και Δυναμικής Πρωτεϊνικών Μορίων που Εμπλέκονται σε Ασθένειες



ΝΑΣΤΑΖΙΑ ΛΕΣΓΙΔΟΥ, ΜΕΤΑΞΙΑ ΒΛΑΣΗ*

Εργαστήριο Δομής Πρωτεϊνών και Μοριακής Μοντελοποίησης,
Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”

* corresponding: Email: meta@bio.demokritos.gr



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



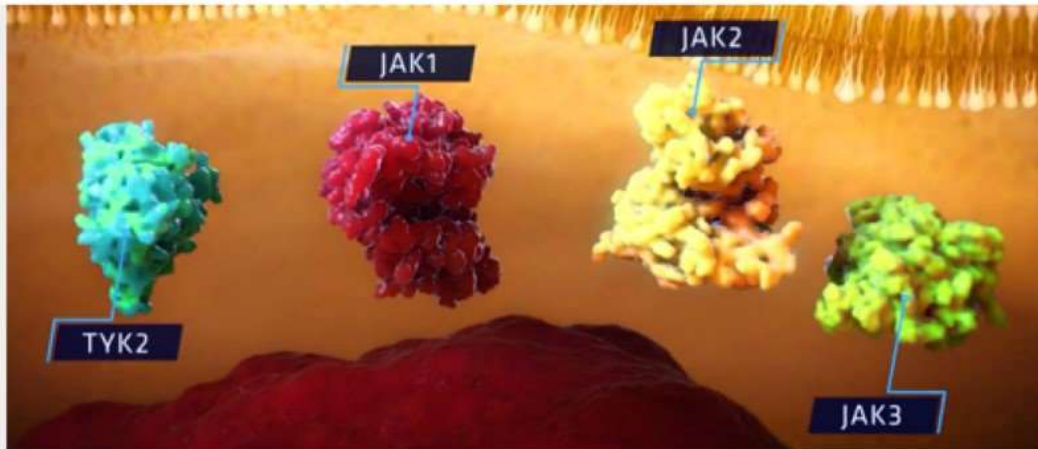
HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑ^ηΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION

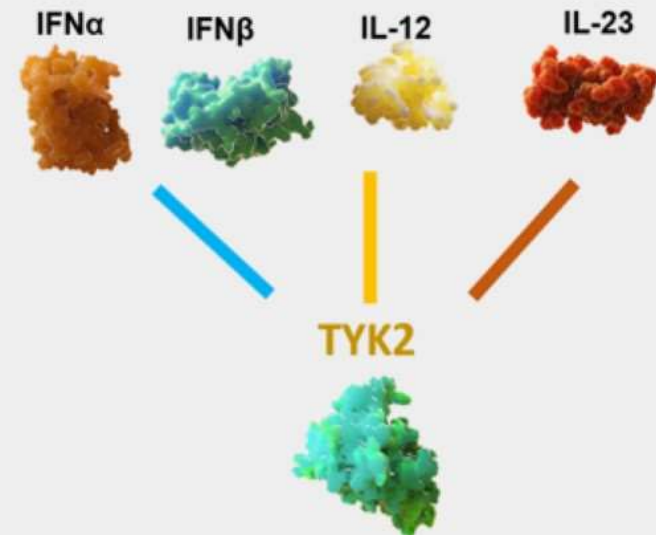


Co-financed by Greece and the European Union

Παρουσιάσεις Παραδοτέων Sanitura



Εισαγωγή στην TYK2



Κυτταροπλασματική κινάση τυροσίνης

Janus Kinases (JAKs)

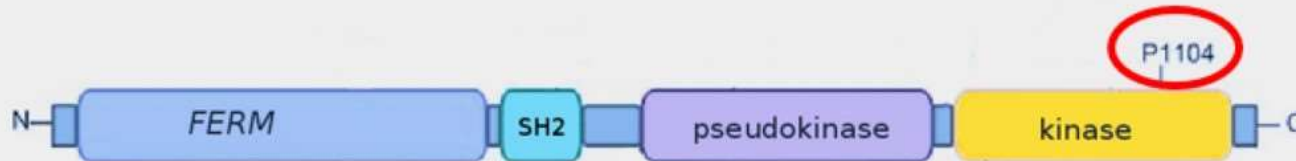
Εμπλέκεται στην ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος παρουσία διαφόρων κυτκινών συμπεραλαμβανομένων της ιντερφερόνης τύπου I (IFN) όπως και προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών

Συμμετέχει στο μονοπάτι ενεργοποίησης των STAT3/6

Εμπλέκεται στην παθογένεια διαφόρων αυτοάνοσων και φλεγμονωδών ασθενειών

Παρουσιάσεις Παραδοτέων Sanitura

Εισαγωγή στην ΤΥΚ2



Πολυμορφισμός
του *Tyk2* γονιδίου
rs34536443

→ Pro σε Ala στην θέση 1104

Έχει συνδεθεί με προστασία απέναντι σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως:

ψωριασική αρθρίτιδα (*Myrthianou et al., 2017*)

Ερυθηματώδης λύκος (*Diogo et al., 2015*)

Ρευματοειδής αρθρίτιδα (*Diogo et al., 2015*)

Σκλήρυνση κατά πλάκας (*Dyment et al., 2012*)

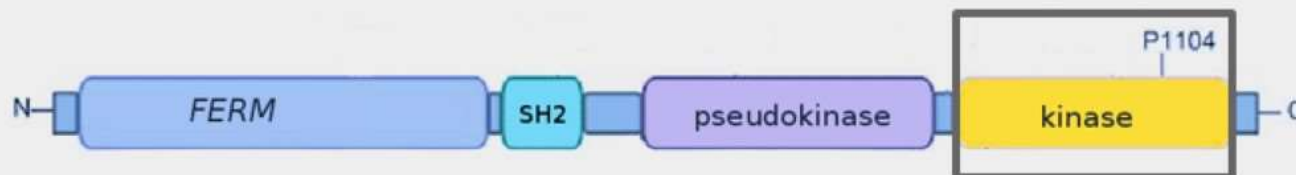
Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (*Diogo et al., 2015*)

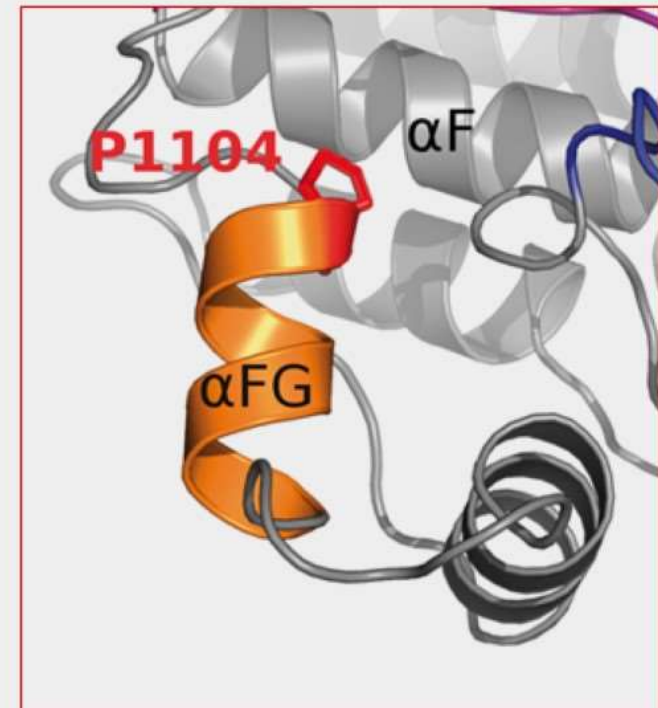
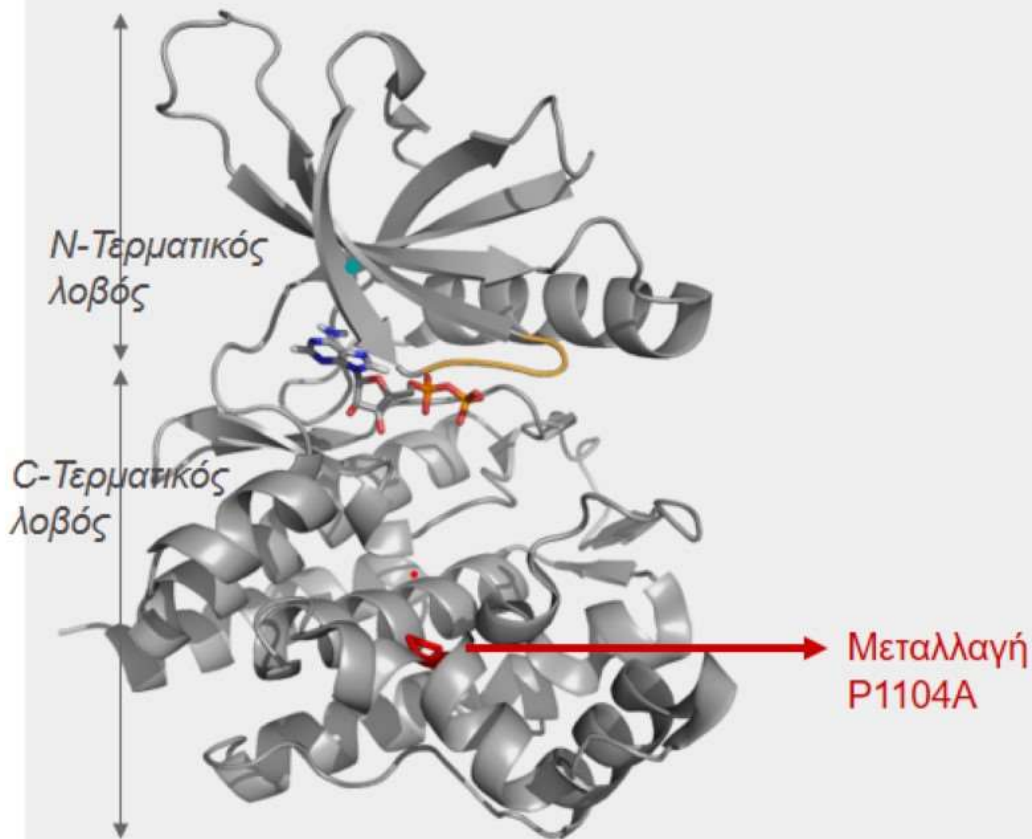
Ενδομητρίωση (*Peluso et al., 2013*)

Οι ατομικές λεπτομέρειες του μηχανισμού προστασίας, δεν είναι γνωστές

Η δομική προσέγγιση του μηχανισμού προστασίας έναντι των αυτοάνοσων νοσημάτων, που προκαλεί η μεταλλαγή P1104A

In Silico μελέτες : Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής





3D-κρυσταλλική δομή της περιοχής της κινάσης της TYK2, PDB entry code: 4GVJ (Liang et al., 2013, Eur J Med Chem 67: 175)

Molecular dynamics Simulations

APO TYK2



In Explicit water

GROMACS software

wild type

hundreds of ns
time-scales

P1104A

MD1 100ns

MD2 100ns

MD3 100ns

MD1 100ns

MD2 100ns

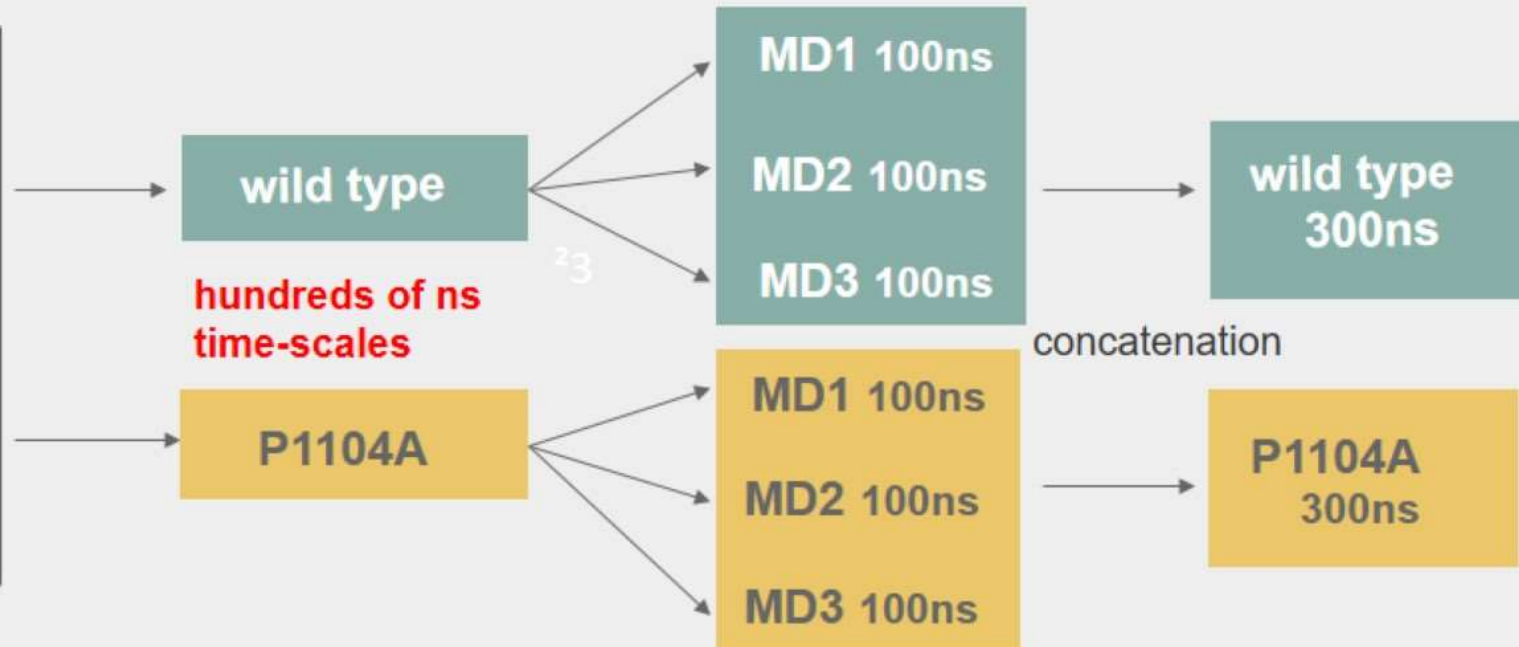
MD3 100ns

wild type
300ns

P1104A
300ns

concatenation

23

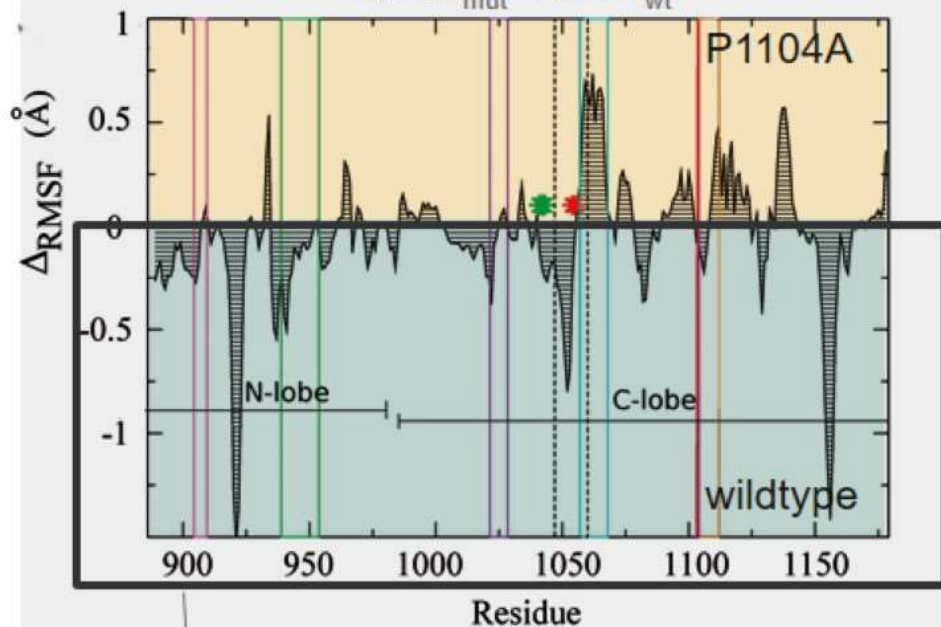


Διερεύνηση: Δομική Ευκίνησία

Αναλύσεις ΜΔ

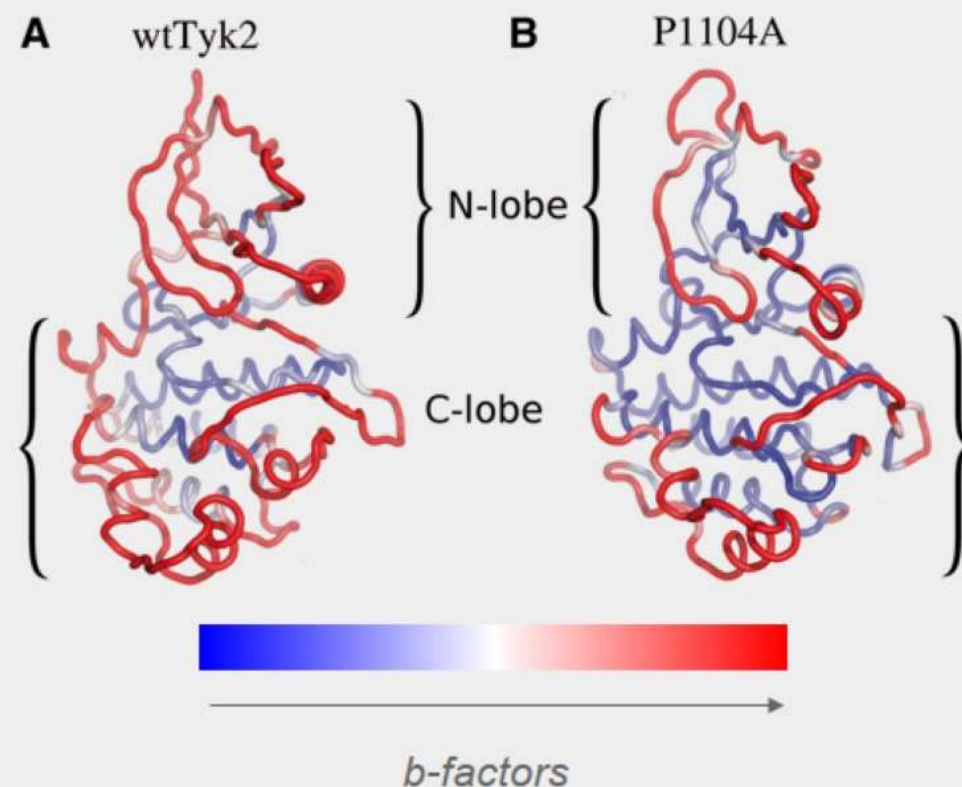
RMSF analysis

Ca άτομα πρωτεΐνης
 $RMSF_{mut} - RMSF_{wt}$



Η **P1104A** φαίνεται λιγότερο ευκίνητη σε σχέση με την **wildtype Tyk2**

B-factors



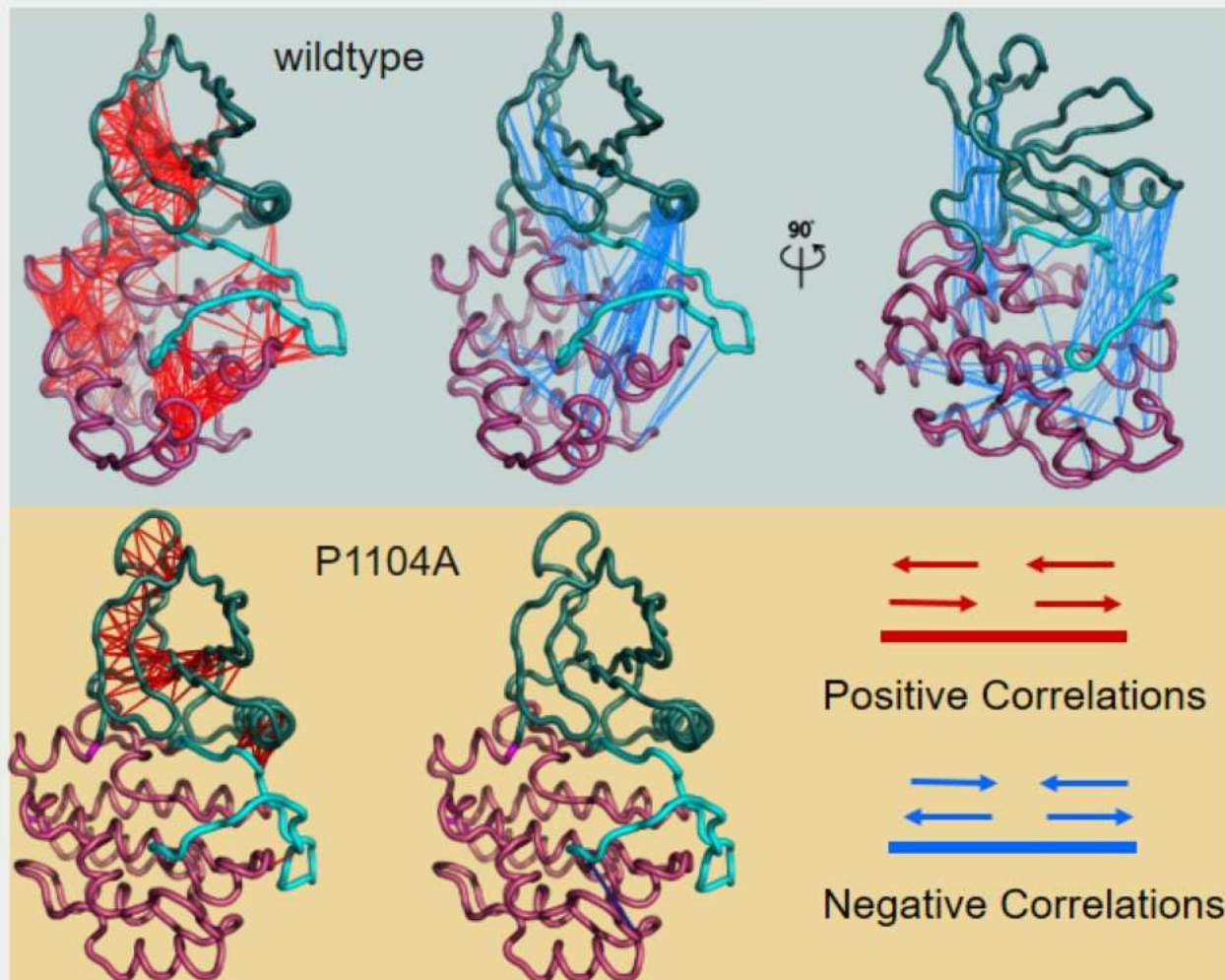
Διερεύνηση: Συντονισμός ατομικών κινήσεων

Αναλύσεις ΜΔ

cross-Correlation analysis

Στην wildtype *Tyk2* υπάρχει επικοινωνία μεταξύ των διαφορετικών περιοχών της κινάσης (αρνητικός και θετικός συσχετισμός κινήσεων)

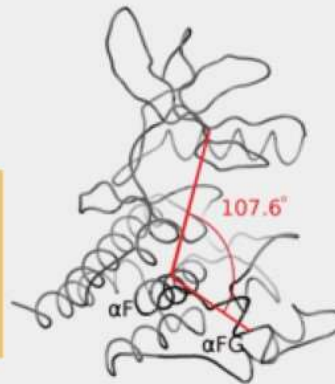
Στην P1104A διαταράσσεται η επικοινωνία μεταξύ των περιοχών της κινάσης (απώλεια συσχετισμού κινήσεων)



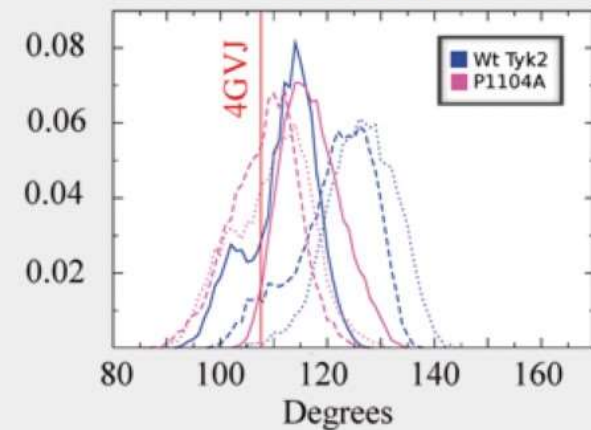
Γωνία N-C λοβών

Η P1104A φαίνεται να υιοθετεί συνολικά πιο «κλειστές» διαμορφώσεις σε σχέση με το wildtype

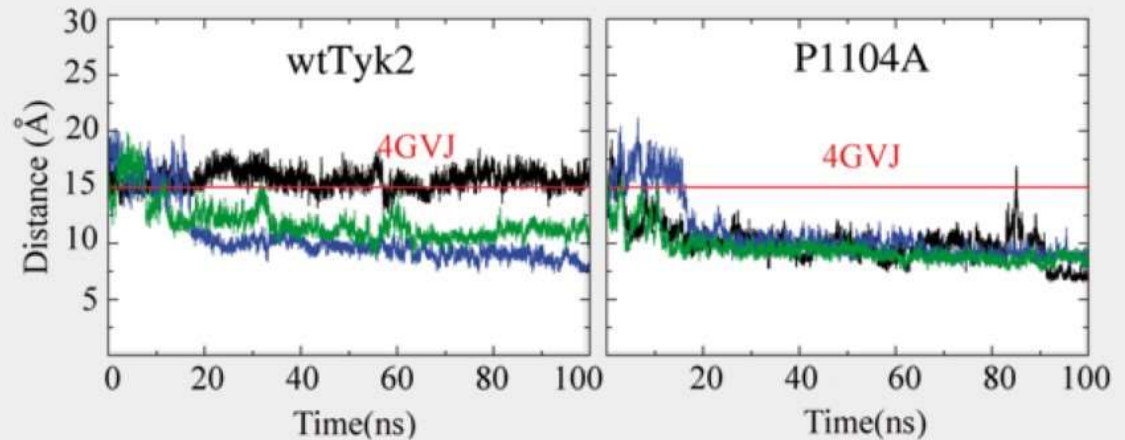
A



Κατανομή



B



Παρουσιάσεις Παραδοτέων Sanitura

Μεθοδολογία

Molecular dynamics
Simulations

APO TYK2



Explicit water

GROMACS software

wild type

**μs time-
scales**

P1104A

MD1 1μs

MD2 1μs

MD3 1μs

MD1 1μs

MD2 1μs

MD3 1μs

wild type
3μs

P1104A
3μs

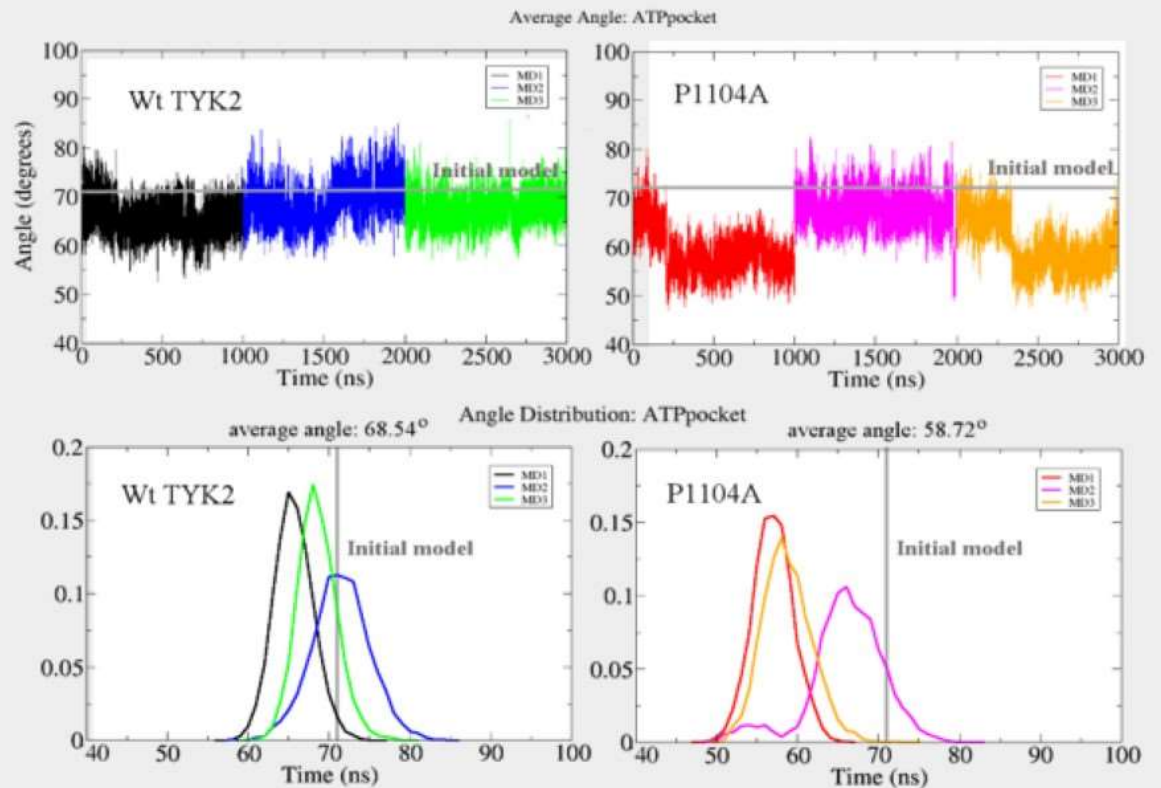
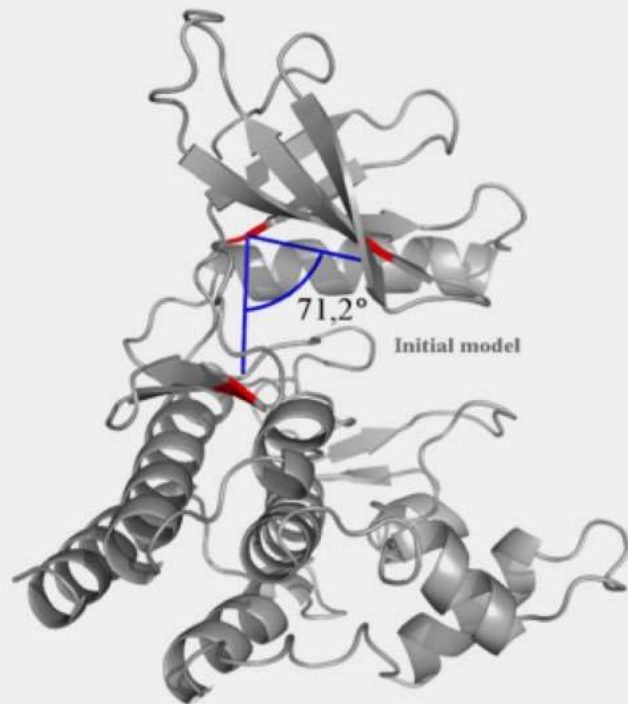
concatenation

Εθνική Υποδομή

ARIS@GRNET

project ID: pr006032

Γωνία περιοχής πρόσδεσης ATP

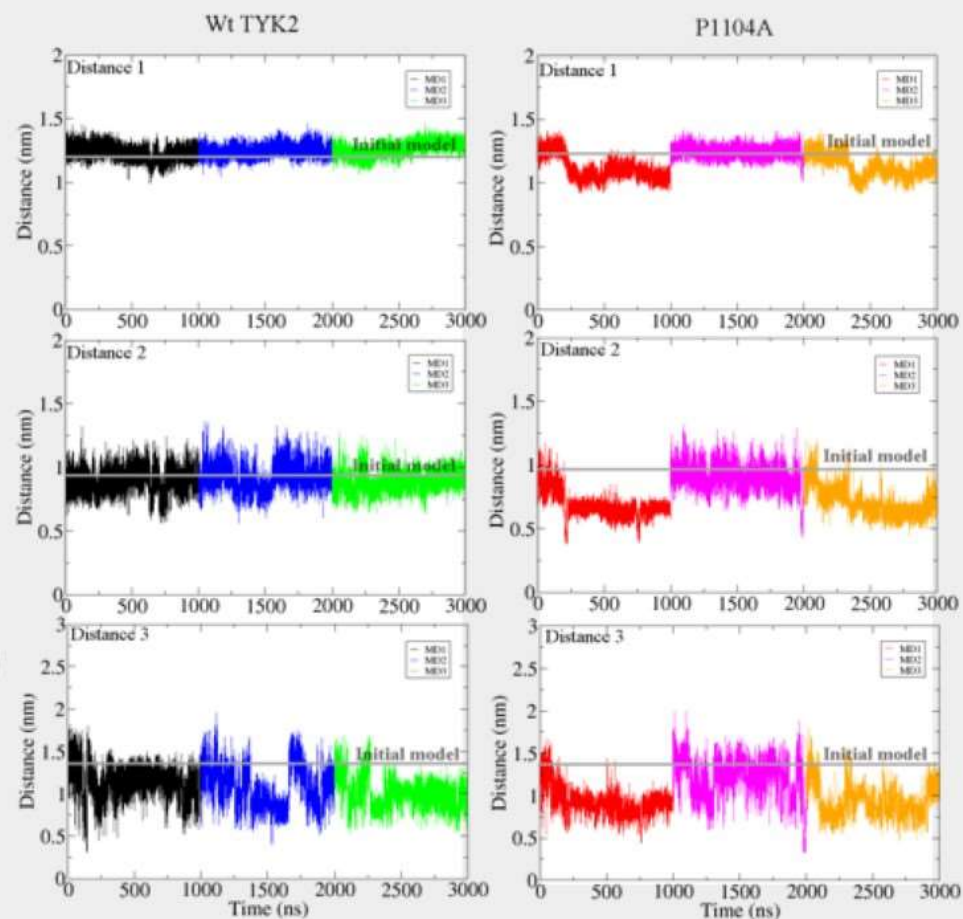
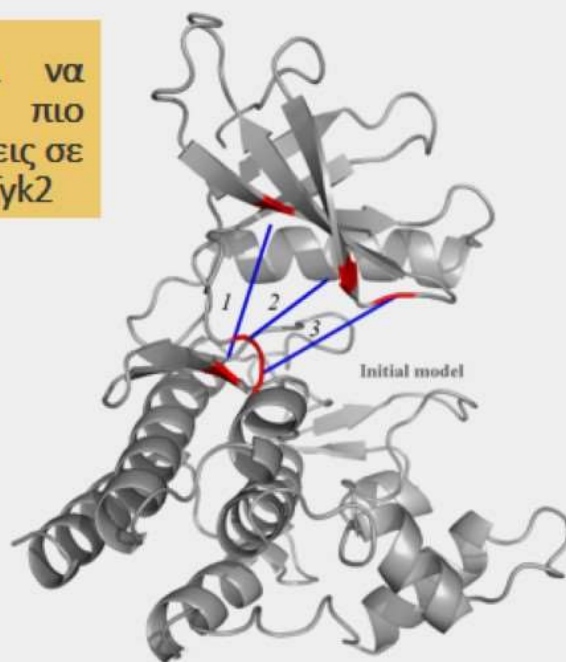


Διερεύνηση: Περιοχή πρόσδεσης ATP

Αναλύσεις

Αποστάσεις σε περιοχή πρόσδεσης ATP

Η P1104A φαίνεται να υιοθετεί συνολικά πιο «κλειστές» διαμορφώσεις σε σχέση με την wildtype *Tyk2*



Παρουσιάσεις Παραδοτέων *Sanitura*

Μεθοδολογία

Molecular dynamics
Simulations

binary-complexes

μ s time-scales

3 μ s wild type

3 μ s P1104A

tertiary-complexes

μ s time-scales

4 μ s wild type

4 μ s P1104A

GROMACS software

MD simulations

Analysis

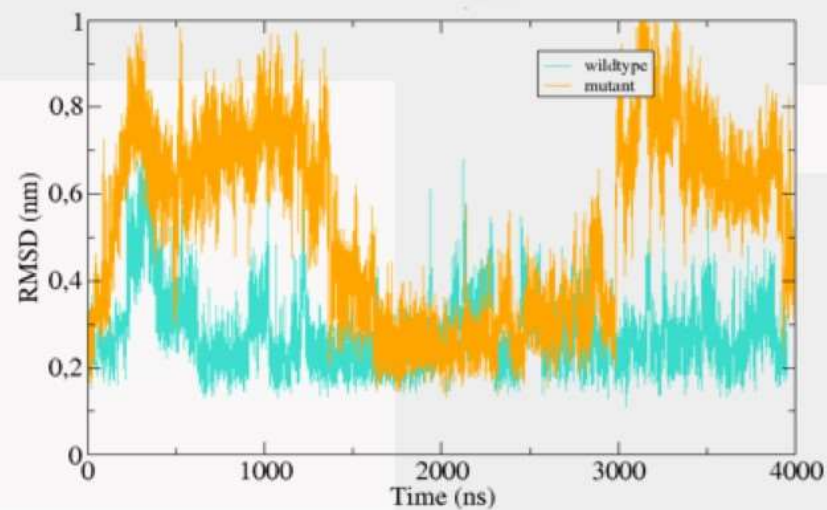
Explicit water

Εθνική Υποδομή

ARIS@GRNET

project ID: pr008030

RMSD analysis



Στην περίπτωση του P1104A, πεπτιδιο-υπόστρωμα φαίνεται να έχει μεγάλη απόκλιση από την αρχική του δομή κατά την διάρκεια της προσομοίωσης σε σχέση με το αντίστοιχο του wildtype

Η αλλαγή P1104 σε Ala φαίνεται να:



Μειώνει την ευκινησία της Tyk2

Παρεμποδίζει την επικοινωνία ανάμεσα στις διαφορετικές λειτουργικές περιοχές της καταλυτικής περιοχής της κινάσης

Σταθεροποιεί διαμορφώσεις της κινάσης οι οποίες εμποδίζουν την λειτουργία της

Προτείνουμε ότι ο μηχανισμός προστασίας ενάντια σε αυτοάνοσα νοσήματα που παρέχεται από την αλλαγή Pro 1104 σε Ala, σχετίζεται με την μειωμένη ενζυμική δράση της TYK2 μέσω σταθεροποίησης ανενεργών διαμορφώσεών της

Δημοσιεύσεις / ανακοινώσεις σε συνέδρια

Δημοσίευση peer-reviewed

Lesgidou N, Eliopoulos E, Goulielmos GN and Vlassi M (2018) Insights on the alteration of functionality of a tyrosine kinase 2 variant: a molecular dynamics study. *Bioinformatics* **34(17)**:i781-i786. doi: 10.1093/bioinformatics/bty556. PMID: 30423093.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty556>

Συνέδρια

N. Lesgidou, E. Eliopoulos, G. N Goulielmos, and Vlassi *; Insights on the alteration of functionality of a tyrosine kinase 2 variant: a molecular dynamics study, **17th European Conference on Computational Biology, –ECCB 2018, 8-12 Sept 2018, Athens, Greece** (oral presentation: M.V)

N. Lesgidou and Vlassi M. Investigating the structural consequences of a protective *TYK2* gene polymorphism linked to autoimmune diseases using molecular dynamics simulations. **Hellenic Bioinformatics 11, November 15-18, 2018 Thessaloniki, Macedonia, Greece**. Poster published on F1000Research 2019, 8:364 <https://doi.org/10.7490/f1000research.1116510.1>

Nastazia Lesgidou, Metaxia Vlassi. Microsecond-scale molecular dynamics simulations of *TYK2* kinase shed light on the structural consequences of a protective *TYK2* gene polymorphism against autoimmune diseases. Poster P118, **70th Annual Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology**, 29 Nov-1 Dec 2019, Athens, Greece. Book of abstracts 222.

The μ s-scale molecular dynamics simulations were supported by computational time granted from the National Infrastructures for Research & Technology S.A. (GRNET) in the National HPC facility – ARIS – under project IDs: pr006032, pr008030

Παρουσιάσεις Παραδοτέων Sanitura

Ευχαριστίες

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (SANITURA)» (MIS 5002514) που εντάσσεται στη Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑνηΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION



Co-financed by Greece and the European Union

Ευχαριστώ πολύ



Co-financed by Greece and the European Union

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑνηΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
**COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION**



Co-financed by Greece and the European Union

2.7 Προσδιορισμός αλλαγών υποτύπων και επιγενετικών τροποποιήσεων ιστονών σε παθολογικές καταστάσεις

Δρ. Θ. Σουρλίγκα
Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών
Εργαστήριο:
Πυρηνικές Πρωτεΐνες
και Λειτουργία της Χρωματίνης
ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»
26-04-2021

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

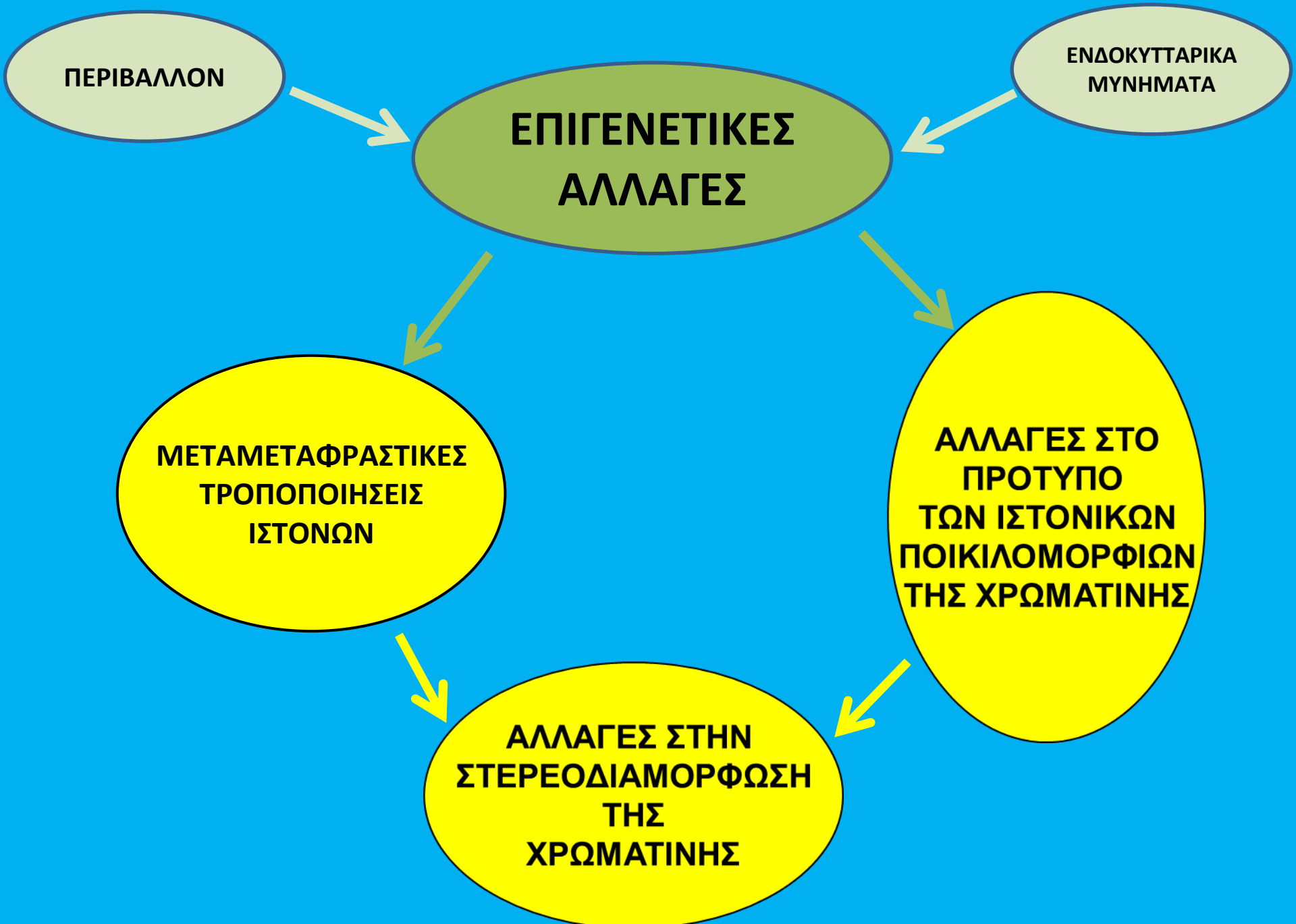
ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ
ΜΥΝΗΜΑΤΑ

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ
ΑΛΛΑΓΕΣ

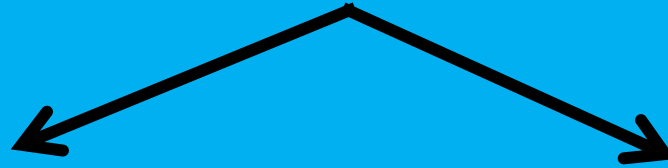
ΜΕΤΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ
ΙΣΤΟΝΩΝ

ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ
ΠΡΟΤΥΠΟ
ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΙΚΩΝ
ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΩΝ
ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΗΝ
ΣΤΕΡΕΟΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ
ΤΗΣ
ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ



ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗΝ ΣΤΕΡΕΟΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ



ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΗΝ
ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ
ΕΚΦΡΑΣΗ

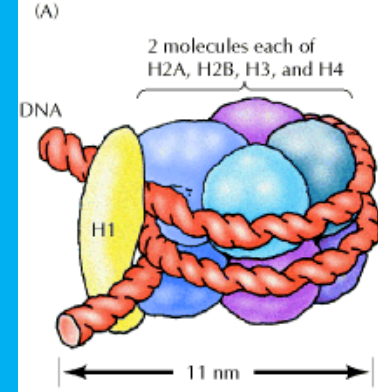
ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ
ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ
ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ



ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ
ΓΗΡΑΝΣΗ
ΑΠΟΠΤΩΣΗ

ΑΠΟΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΑΓΩΝ ΣΤΗΝ
ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΕΠΙΦΕΡΕΙ
ΣΟΒΑΡΕΣ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΣΕ ΑΥΤΕΣ ΤΙΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΟΔΗΓΟΥΝ
ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Κύρια χαρακτηριστικά των H1 υποτύπων του συνδέτου DNA



ΥΠΟΤΥΠΟΣ	ΜΗΚΟΣ C-ΑΚΡΟΥ	ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΠΑΡΑΜΟΝΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ	ΡΟΛΟΣ-ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ
H1.0	μικρό	ενδιάμεση	ενδιάμεσος	ευ-/ετερο-χρωματίνη	ρύθμιση, διαφοροποίηση, ανάπτυξη, απόπτωση, γήρανση
H1.3	μέτριο	ενδιάμεση	ενδιάμεσος	ευ-/ετερο-χρωματίνη	ρύθμιση
H1.1/H1.2	μικρό	χαμηλή	μικρός	ευχρωματίνη	ενεργοποίηση γονιδίων
H1.4/H1.5	μεγάλο	υψηλή	μεγάλος	ετεροχρωματίνη	απενεργοποίηση γονιδίων, αποσιωπποίηση, συμπύκνωση χρωματίνης

Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών

❖ Ακετυλίωση

❖ Μεθυλίωση

❖ Φωσφορυλίωση

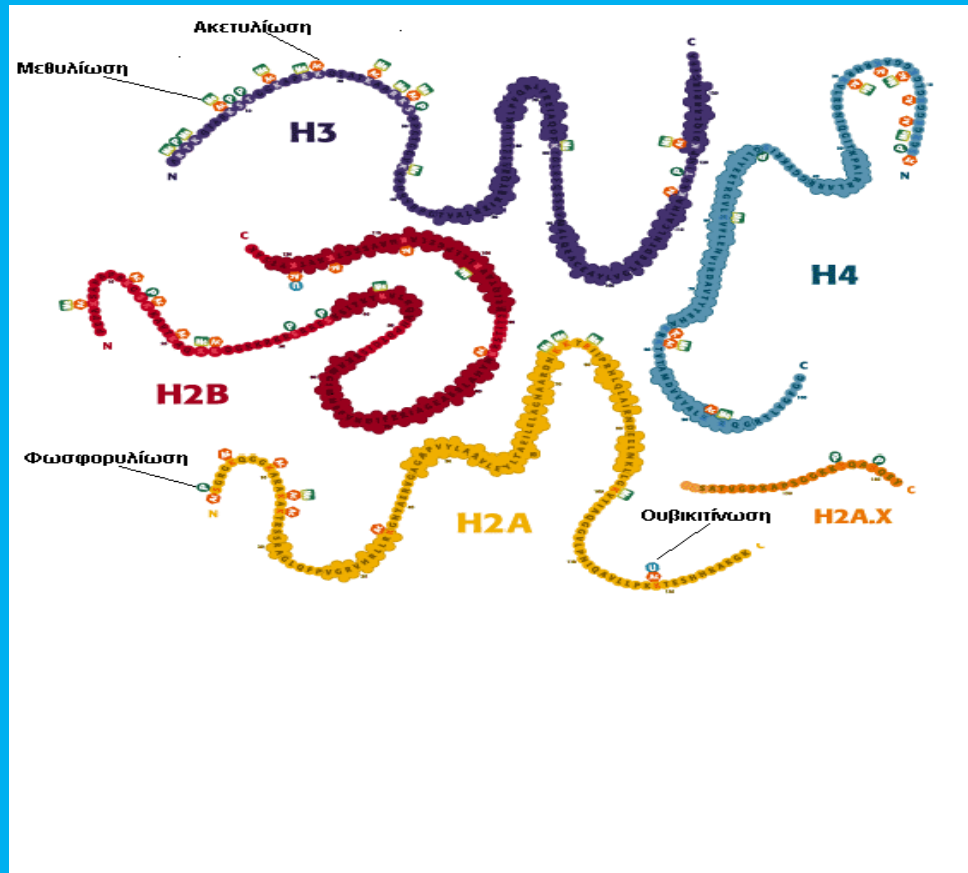
❖ Φορμυλίωση

❖ Ουβικιτίνωση

❖ Πολυ(ADP-ριβοζυλ)ίωση

❖ Σουμοϋλίωση

❖ Κροτονυλίωση



Αντιστρεπτές ομοιοπολικές προσδέσεις σε συγκεκριμένα κατάλοιπα του αμινο-τελικού ή του καρβοξυλικού άκρου.

Σκοπός

- ❖ Διερεύνηση της επίδρασης αναστολέων των αποακετυλασών των ιστονών (HDACI) στα επίπεδα H1 υποτύπων και σε επιγενετικές τροποποιήσεις των ιστονών σε λευχαιμικά κύτταρα συγκριτικά με φυσιολογικά λεμφοκύτταρα ανθρώπου
- ❖ Η μελέτη αυτή θα αποτελέσει την βάση στην κατεύθυνση ταυτοποίησης αλλαγών των ιστονών ως δεικτών της στοχευμένης απόδοσης των HDACIs ως αντικαρκινικά μέσα και σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά σχήματα



Co-financed by Greece and the European Union

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΕΝΤΟΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (SANITURA)» (MIS 5002514)

Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία»

στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020
με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης
(Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης)

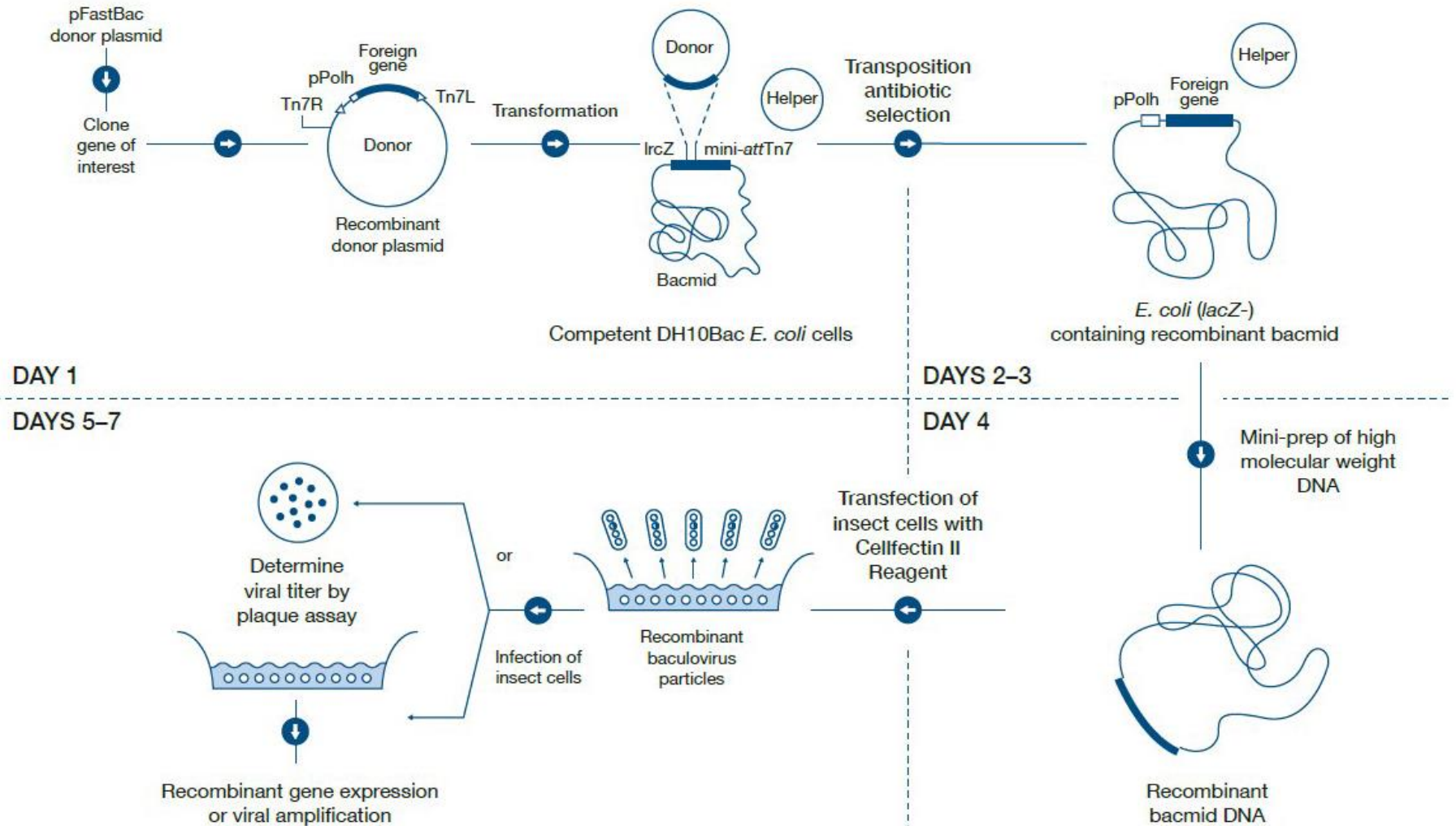


We acknowledge support of this work by the project “Target Identification and Development of Novel Approaches for Health and Environmental Applications” (MIS 5002514) which is implemented under the Action for the Strategic Development on the Research and Technological Sectors, funded by the Operational Programme "Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation" (NSRF 2014-2020) and co-financed by Greece and the European Union (European Regional Development Fund).

Insect Molecular Genetics and Biotechnology

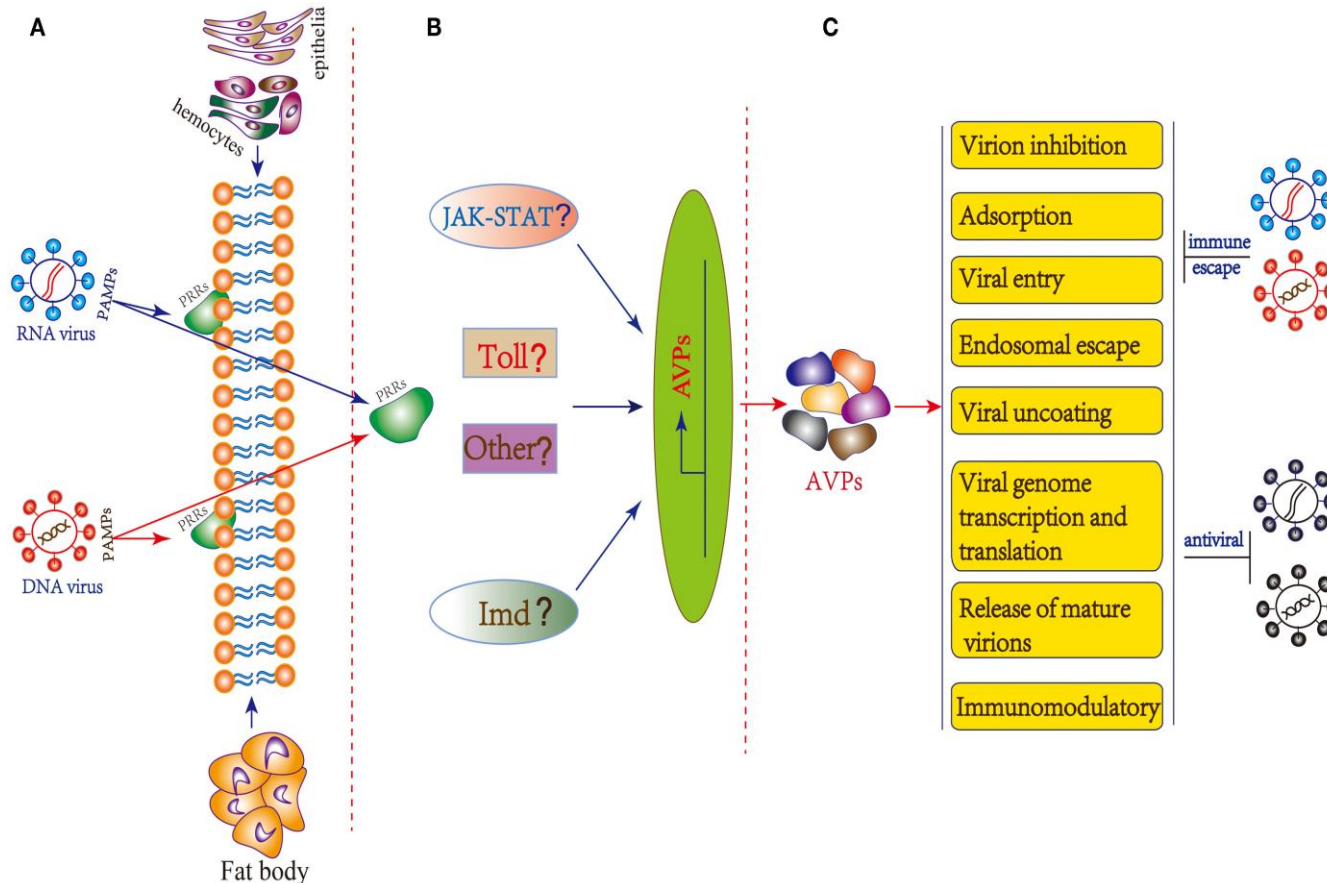
3.1.2α. Παραγωγή και καθαρισμός αντιμικροβιακών πεπτιδίων με το σύστημα έκφρασης βακτροϊών

3.1.2β. Δοκιμές αντιμικροβιακής και αντι-ιικής δραστηριότητας των αντιμικροβιακών πεπτιδίων που εκφράζονται από ανασυνδυασμένους βακτροϊού



Antimicrobial peptides

1. Expression by baculovirus expression system
2. Potential as antiviral compounds



Review article

Antimicrobial Peptides as Potential Antiviral Factors in Insect Antiviral Immune Response

Feng, M., Fei, S., Xia, J., Labropoulou, V., Swevers, L., and Sun, J. (2020).

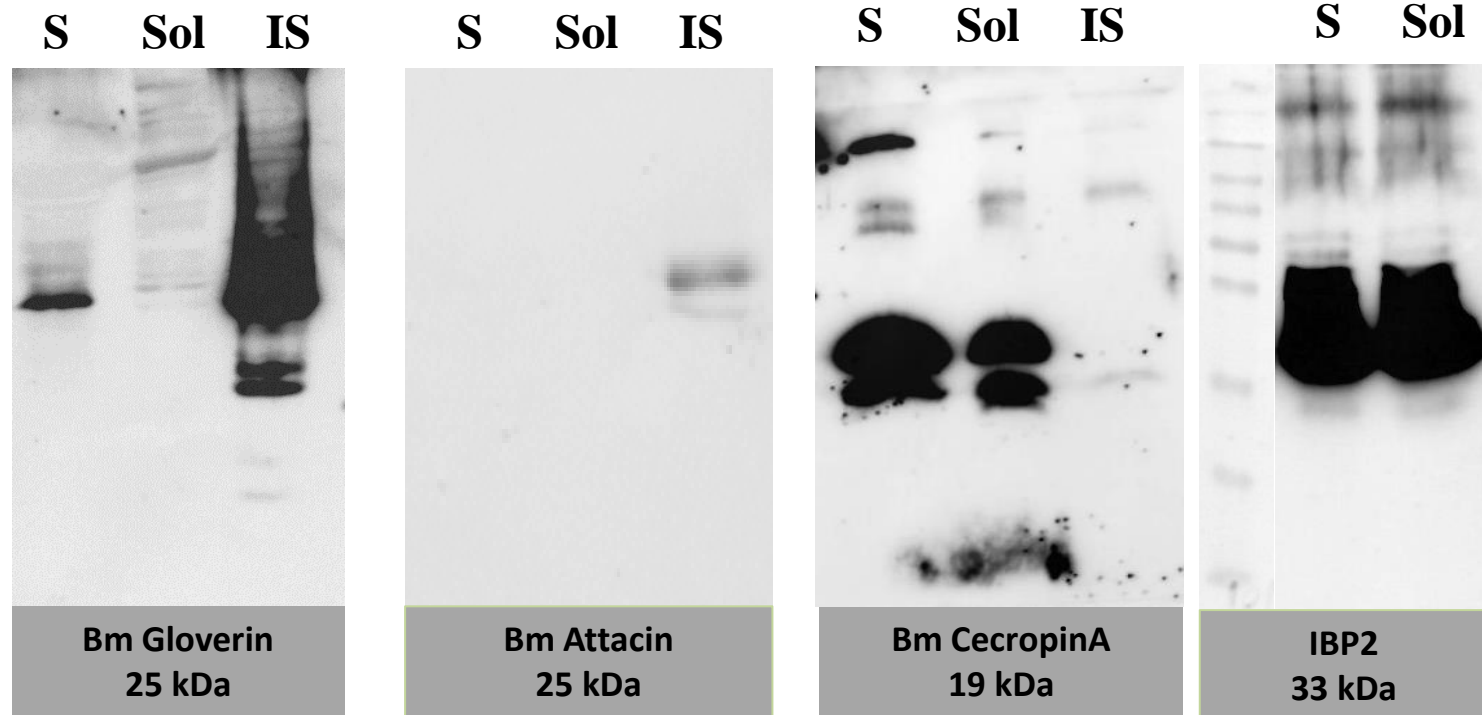
Antimicrobial peptides as potential antiviral factors in insect antiviral immune response.

Front. Immunol. 11, 2020.

Antimicrobial peptides

Baculovirus expression (AcMNPV) of *Bombyx mori* AMPs

S = secreted
Sol = soluble cellular extract
IS = insoluble cellular extract

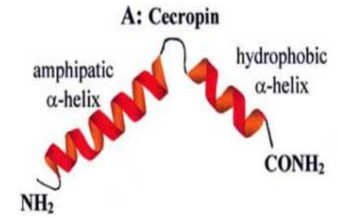
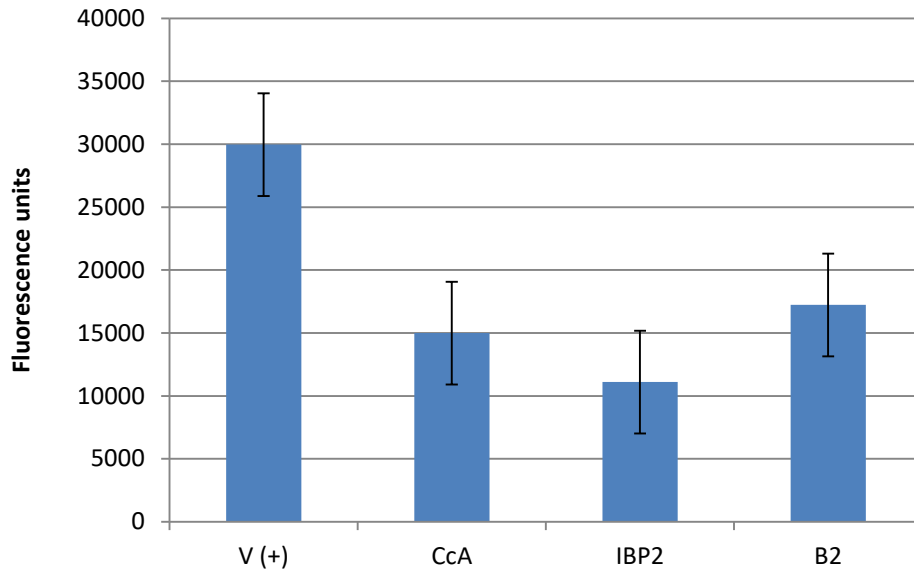


Western blot

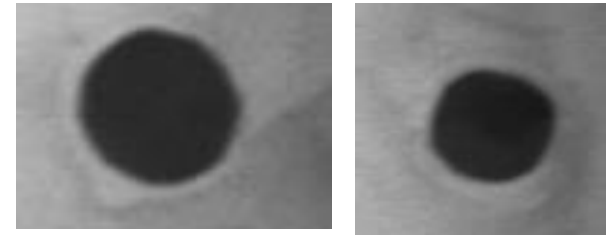
**Insect Molecular Genetics and
Biotechnology**

Antimicrobial peptides

Virus inhibition (Ac-YFP) by AMPs



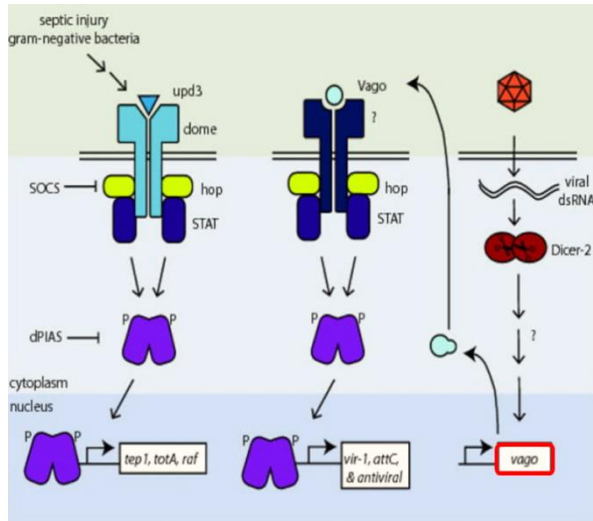
Antimicrobial activity of
Bm Cecropin A



Inhibition of *E.coli* growth

Innate immunity

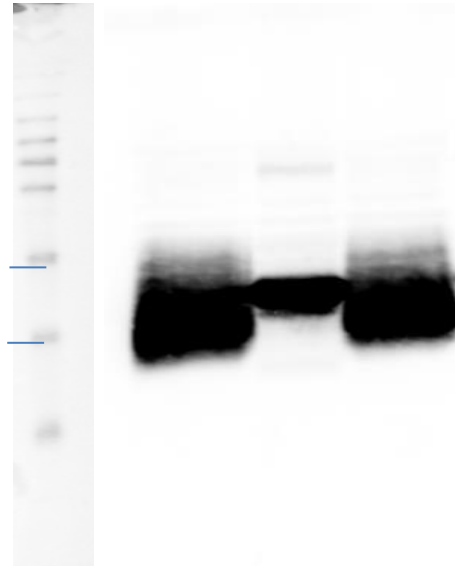
Vago (SVWC)



Kingsolver B, Huang Z, Hurdy W. Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. 2013. J Mol Biol. 425, 4921-36.

Baculovirus expression

SVWC
-1 -2 -3



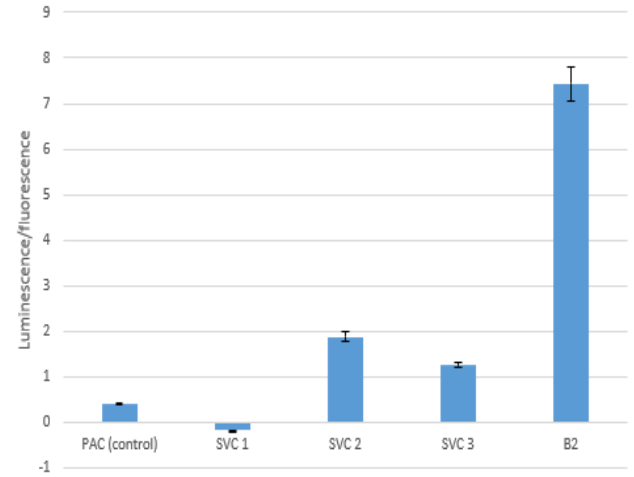
Bombyx mori

SVWC-1

SVWC-2

SVWC-3

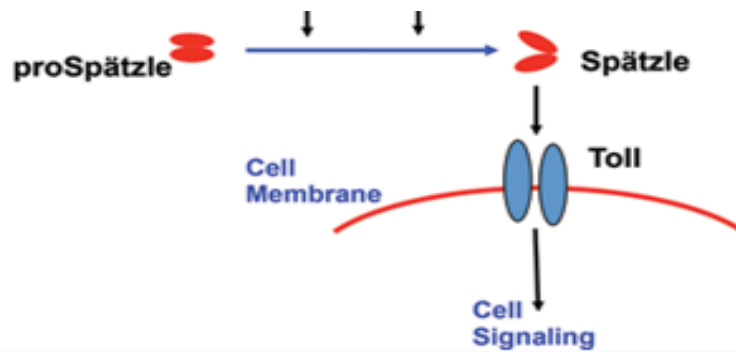
Effect of Vago(s) expression on AMPs transcriptional activity



Bm Relish (-d2)

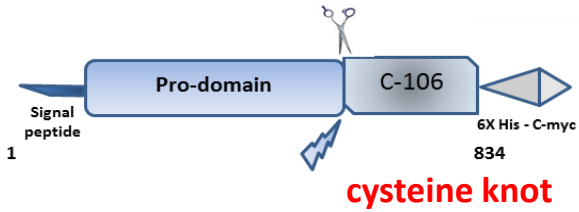
Bm CecB promoter

Innate immunity

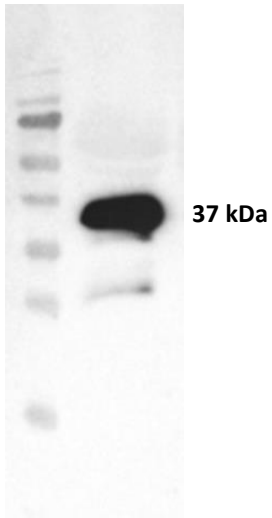


NF-κB transcription

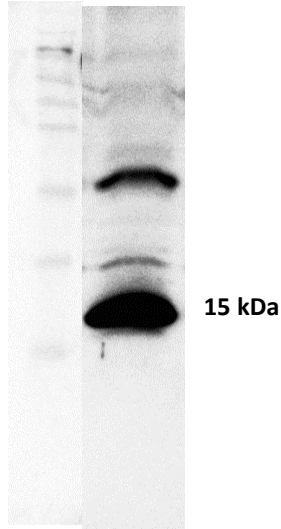
Bm Spätzle



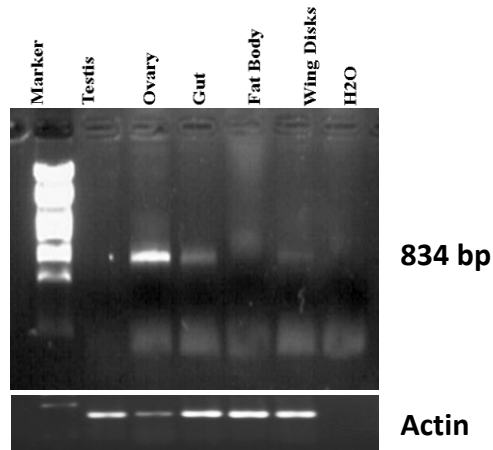
cysteine knot



proSpätzle



Spätzle



RT - PCR

Virus processing of SPZ1

V(-)

V(+)



Toll activation ?
AMP induction ?

Π3.1.1α: Παραγωγή μελέτη ενζυμικών ιδιοτήτων καρβοξυλεστερασών και γλυκοζυλοτρανσφερασών στην ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα

Π3.1.1β: Σάρωση βιβλιοθηκών χημικών ουσιών/φυτικών εκχυλισμάτων για αναστολείς ενζύμων

Outline

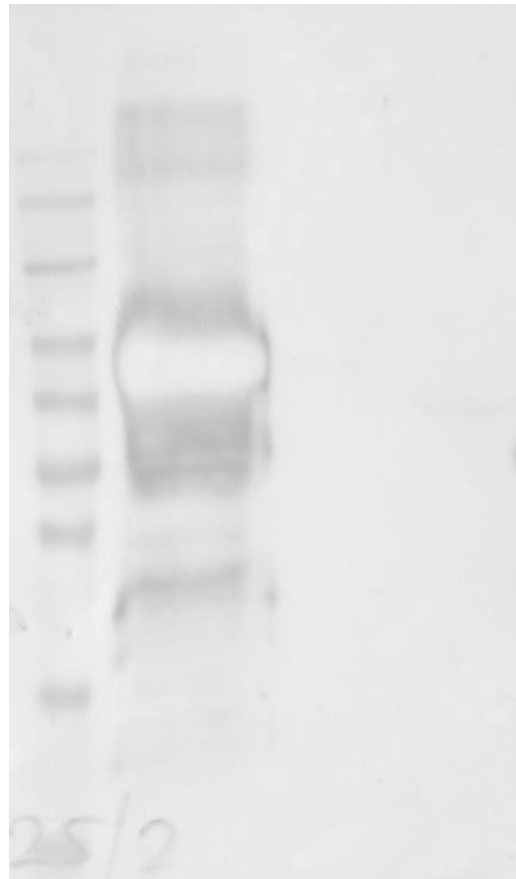
συνεργασία με τον Δρ. Ι. Βόντα
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

1. Identification of gene of insecticide resistance
2. Amplification of ORF by RT-PCR from (susceptible and resistant) insects
3. Molecular cloning in plasmid (pBluescript)
4. Transfer to pFastBac vector (Bac-to-Bac system; Thermo Scientific)
pFastBac1: control of polyhedrin promoter
engineering with MycHis-tag for antibody detection (Myc)
and purification by affinity chromatography (His)
5. Generation of recombinant "bacmid" genomes (Bac-to-Bac system; Thermo Scientific)
transposition of expression cassette of the pFastBac1 vector
6. Transfection of recombinant "bacmid" DNA to lepidopteran insect cell lines
Sf21 and Hi5
generation of recombinant baculovirus that expresses gene of interest
7. Analysis of gene expression (Western blot)
Purification (affinity chromatography)
Functional analysis (insecticide metabolism)

**Insect Molecular Genetics and
Biotechnology**

Carboxylesterase: CoE1 of *Bemisia tabaci* (whitefly)
(organophosphate resistance)

IS Sol Sup



IS = insoluble (cellular extract)
Sol = soluble (cellular extract)
Sup = supernatant (extracellular medium)

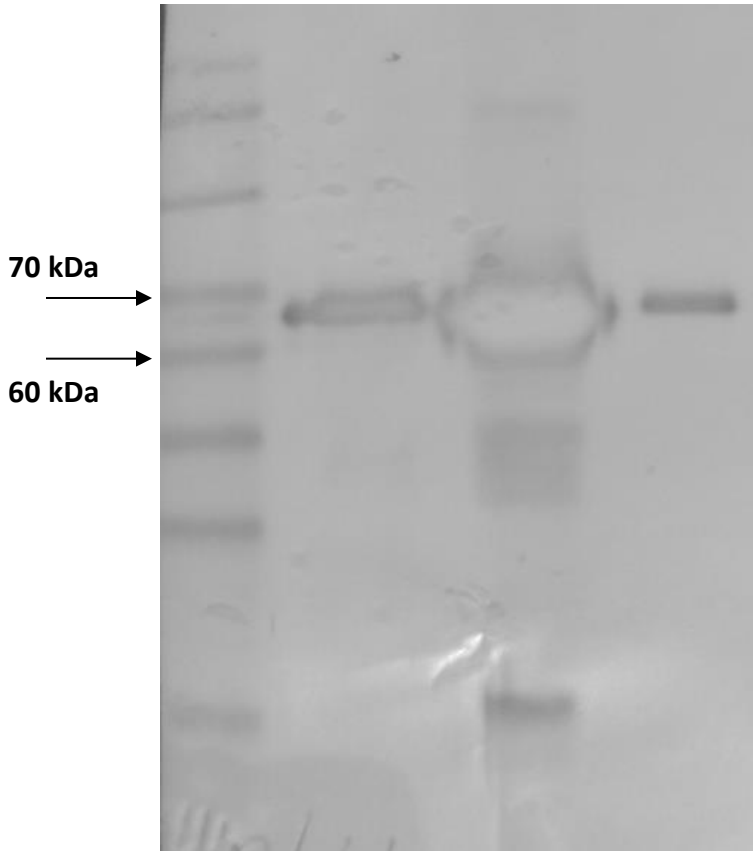
high expression
but insoluble protein

no esterase activity above background
(1-naphthylacetate as substrate)

Carboxylesterase: CCEAE3 of *Aedes aegypti*
and *Aedes albopictus* (mosquitoes)
(temephos (organophosphate) resistance)

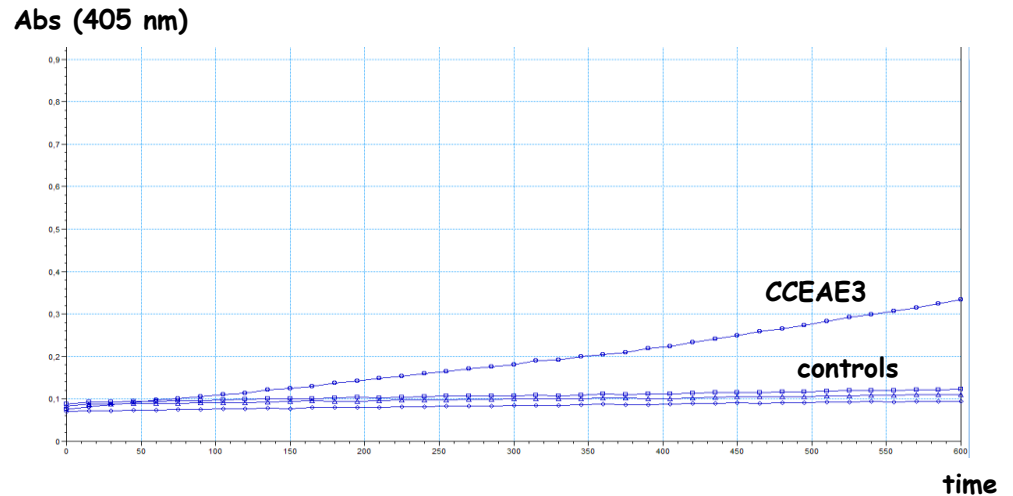
IS = insoluble (cellular extract)
Sol = soluble (cellular extract)
Sup = supernatant (extracellular medium)

IS Sol Sup

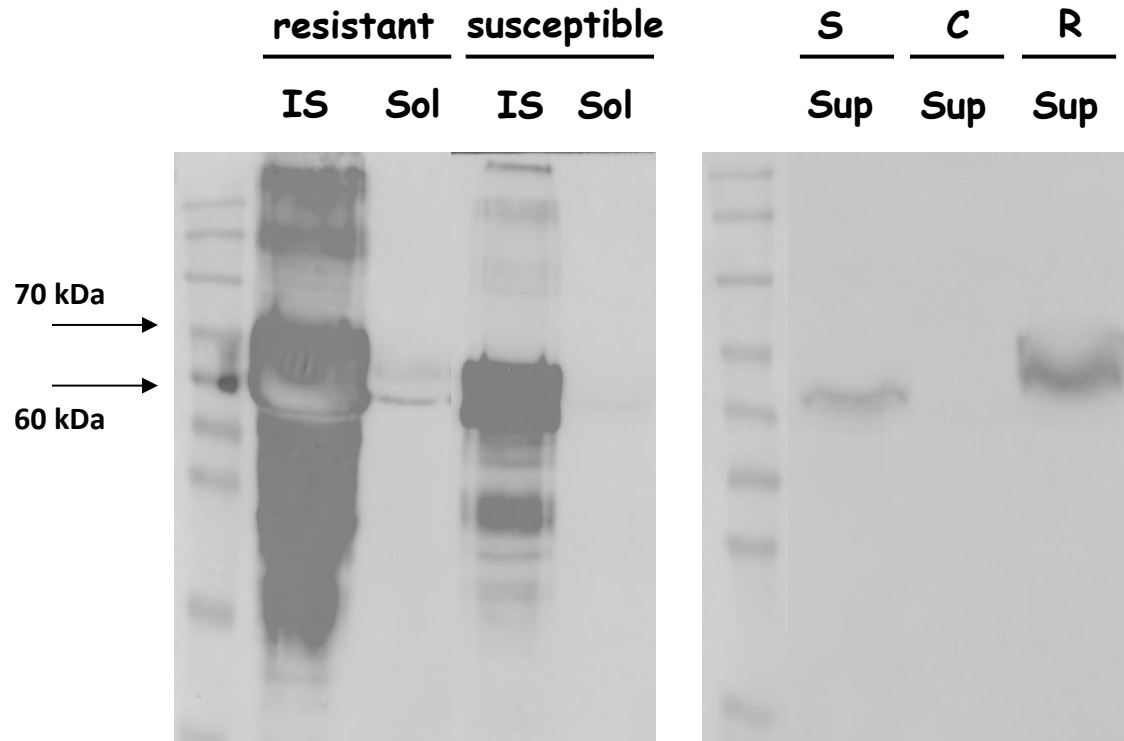


high expression in soluble extracts

specific esterase activity
(p-nitrophenyl acetate as substrate)



Carboxylesterase: CCE04 of *Tetranychus urticae* (mite)
and CCE 493 of *Panonychus citri* (mite)
 (spirodiclofen (acaricide) resistance)

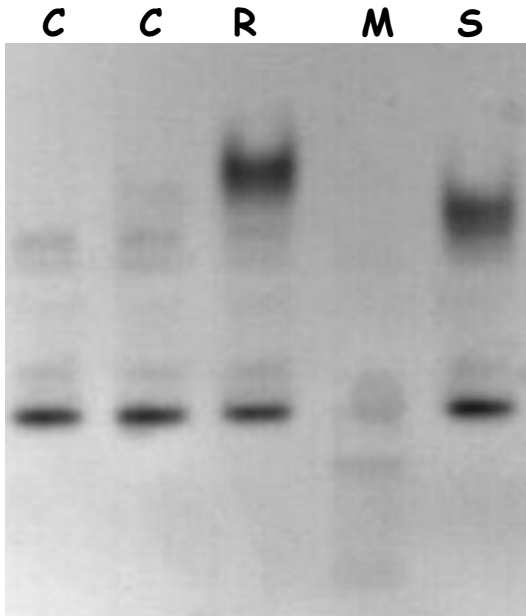


IS = insoluble (cellular extract)
 Sol = soluble (cellular extract)
 Sup = supernatant (extracellular medium)

S = susceptible strain
 R = resistant strain
 C = control

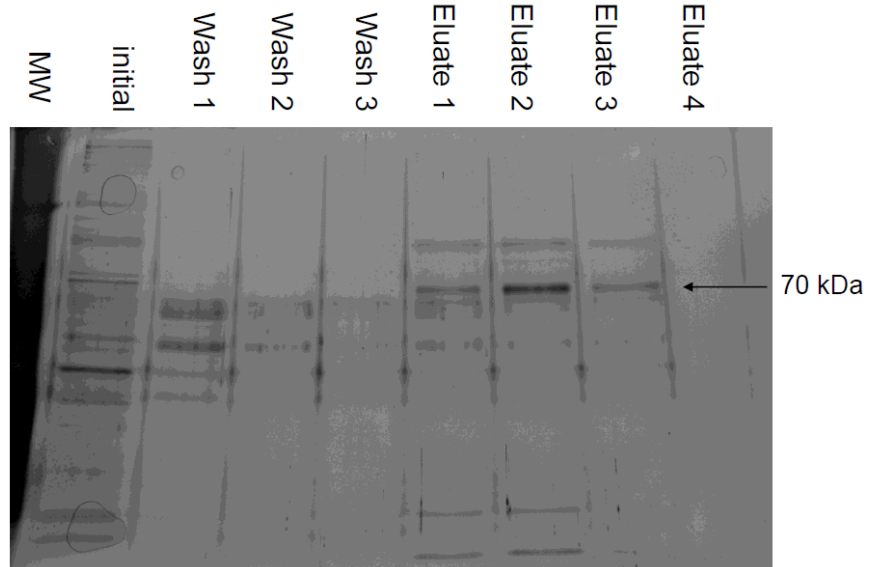
high expression
 protein is secreted
 (contains signal peptide)

**esterase activity in supernatants
(native polyacrylamide staining)**

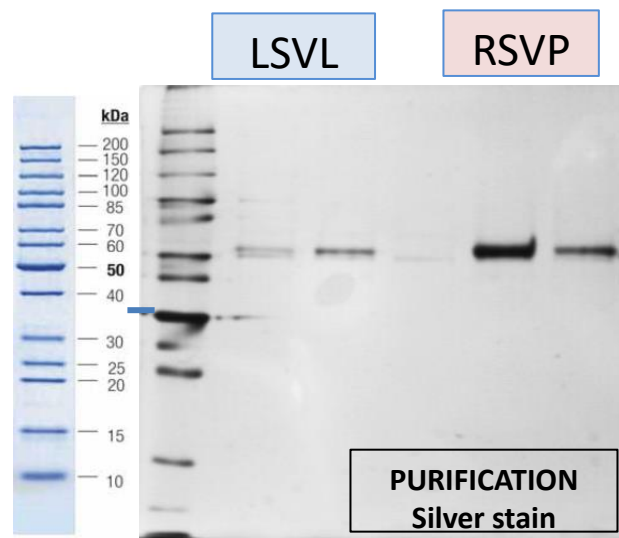
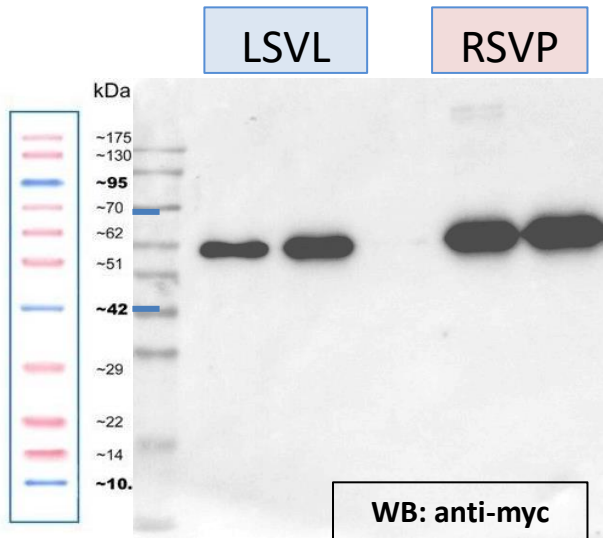


S = susceptible strain
R = resistant strain
C = control
M = molecular weight

**protein purification from supernatants
(nickel affinity chromatography)**



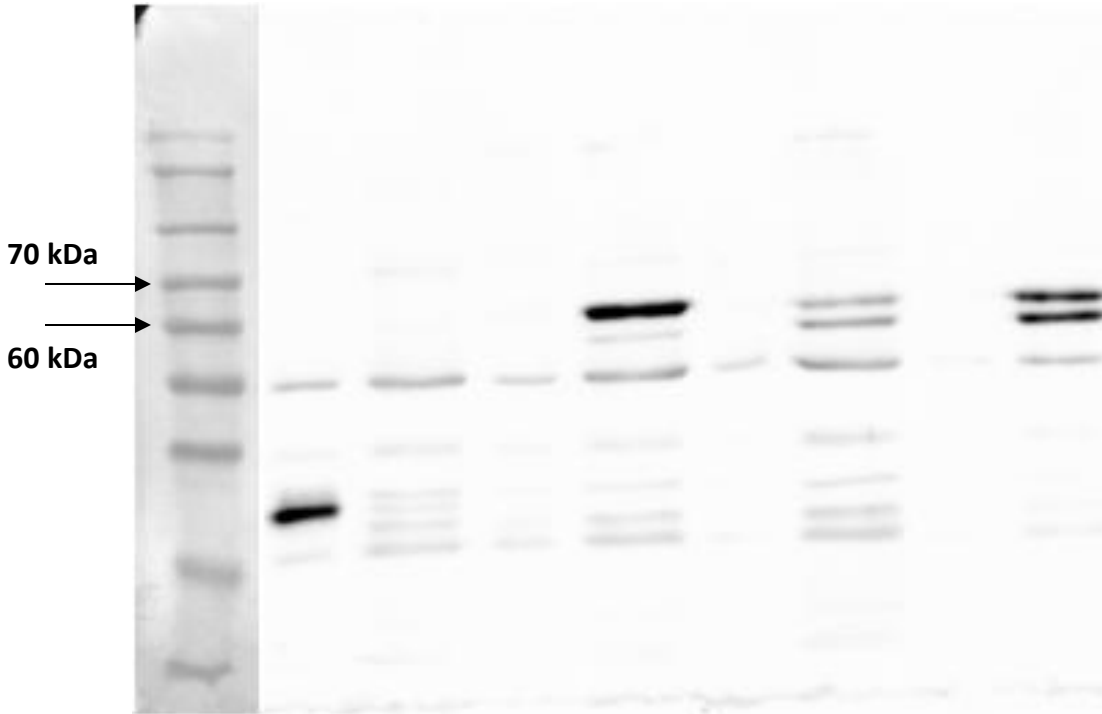
silver-stained gel



UDP-glucosyltransferase:

Ae_alboUGT1 and Ae_alboUGT2 of *Aedes albopictus* (mosquito)
and Ag_UGT of *Anopheles gambiae* (mosquito)
(pyrethroid resistance)

<u>GFP</u>		<u>Ag_UGT</u>		<u>Ae_UGT1</u>		<u>Ae_UGT2</u>	
C	M	C	M	C	M	C	M



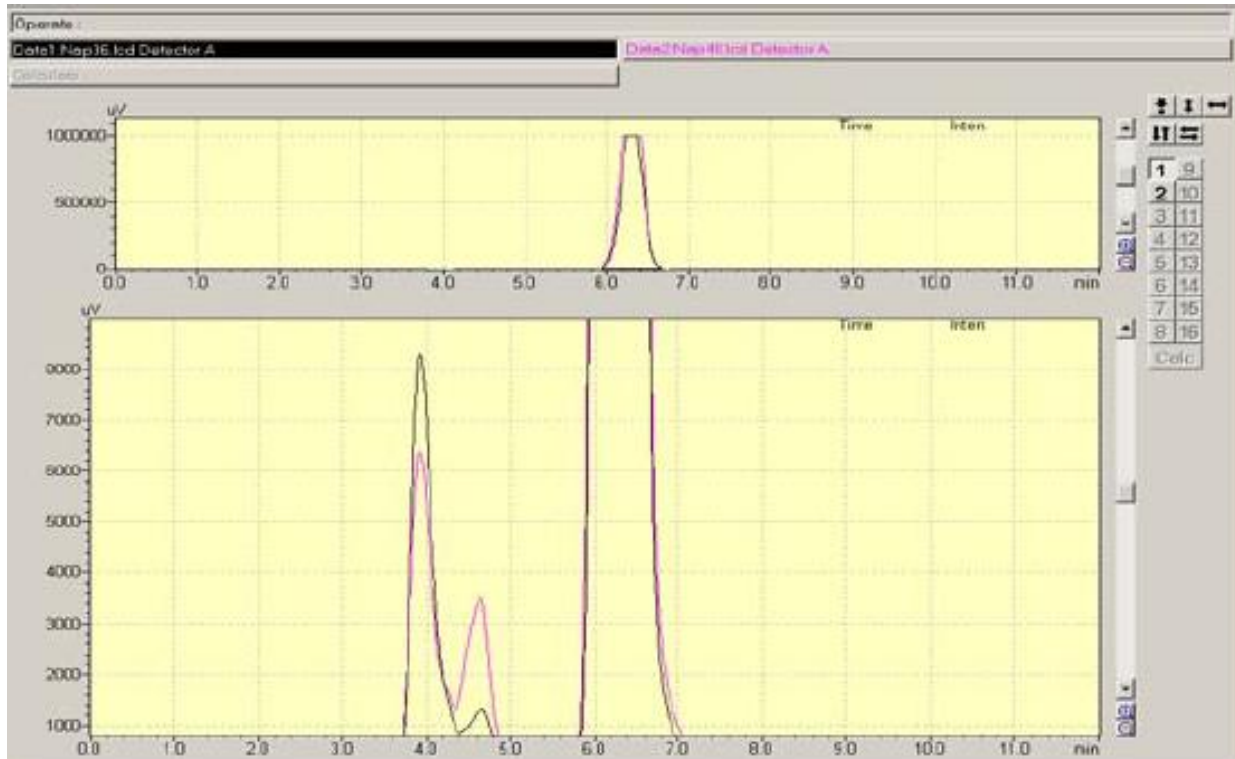
cellular extracts

detection in microsomes
(100,000 g pellet)

C = cytosol
M = microsomes

C = cytosol M = microsomes

Functional assay: UDP-glucose (donor) and α -naphthol (substrate)
HPLC analysis



An_UGT (pink) versus GFP (black)

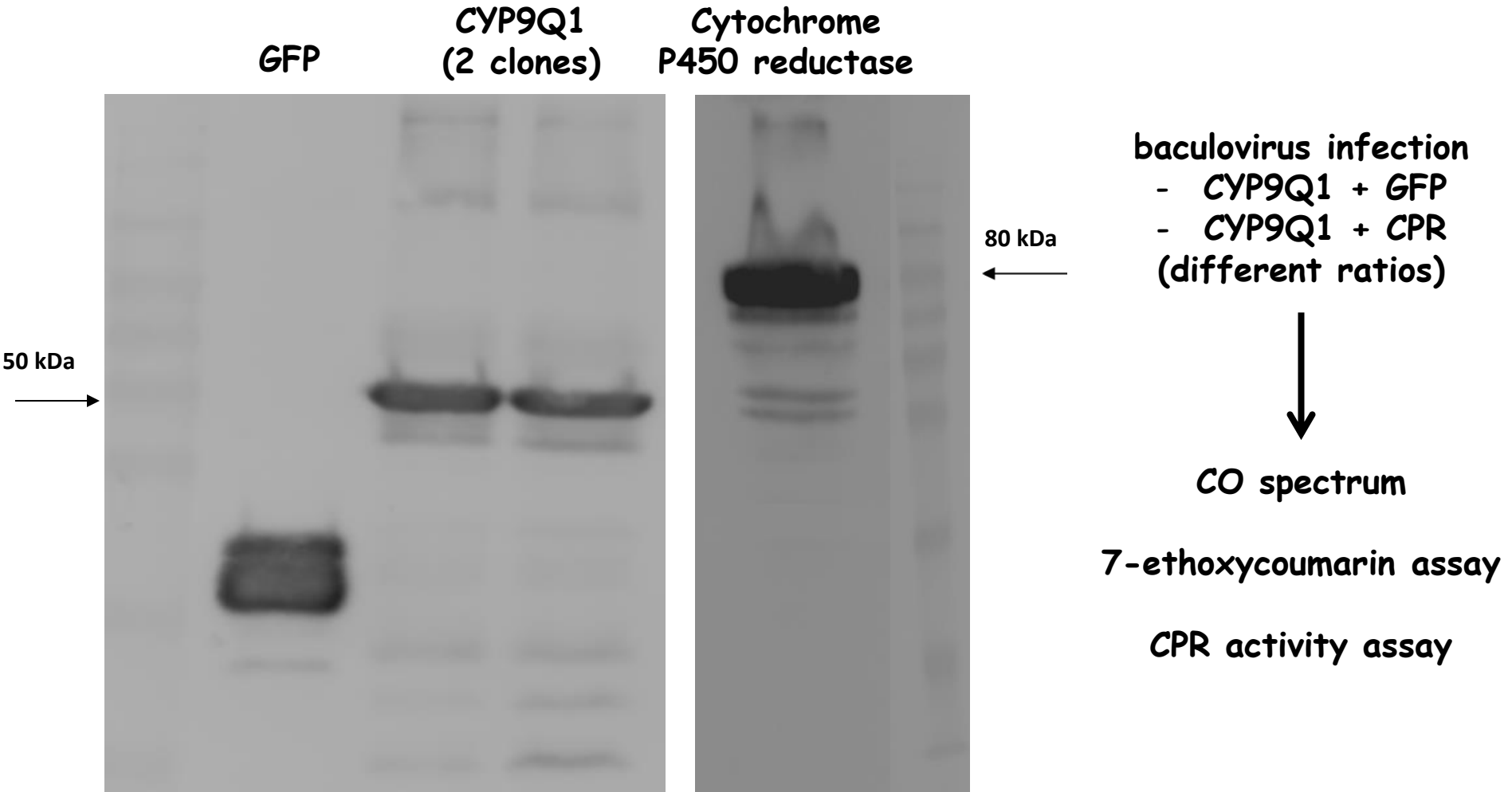
Dimitra Pipini
(M.Sc. student)

Dr. John Vontas
(Agricultural University
of Athens)

Cytochrome P450:

CYP9Q1, CYP9Q2, CYP9Q3 of *Apis mellifera* (honey bee)

(tau-fluvalinate (aciricide) and coumaphos (organophosphate) resistance)



Chemosensory protein:

sensory appendage protein 2 (SAP2) of *Anopheles gambiae* (mosquito)

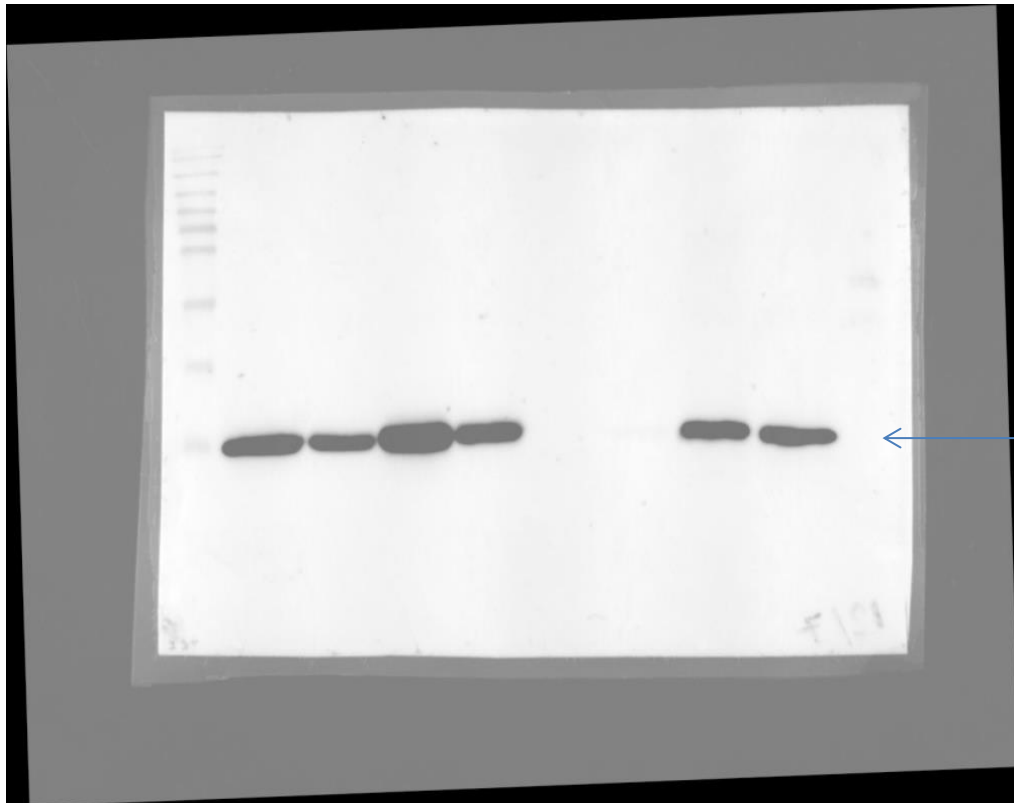
(pyrethroid resistance)

accumulation in supernatants of infected cells
(secreted protein)

bioassay

displacement of the ligands from SAP2
by the fluorescent probe

N-phenyl-1-naphthylamine (1-NPN)



~15kDa

Lanes:

1. marker
2. Hi5 Serum Free - HisSAP2 (clone1) cell supernatant,
3. Hi5 Serum Free HisSAP2 (clone 2) cell supernatant,
4. SF9 Serum Free HisSAP2 (clone1) cell supernatant
5. SF9 Serum Free HisSAP2 (clone2) cell supernatant
6. SF9 SerumFree HisSAP2 (clone3 Crete)
7. SF9 Serum Free HisSAP2 (clone4 Crete)
8. Hi5 SF HisSAP2 (clone1) cells extracts
9. Hi5 SF HisSAP2 (clone 2) cell extracts
10. control

Π3.1.1γ: Σίγηση έκφρασης μέσω RNAi ενζύμων στην ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα και ποσοστά τοξικότητας σε ακάρεα και έντομα

Π5.2α: Σκευάσματα dsRNA που στοχεύουν γονίδια επιβίωσης κουνουπιού και ποσοστά θνησιμότητας

RNAi

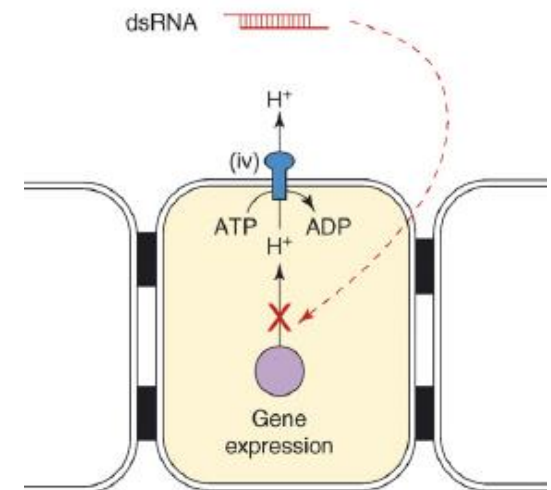
RNAi technology

is one of the most recent trends in the field of pesticides and approaches the “ideal” of the perfect pesticide

- target only the intended pest
- minimal impact on non-target organisms (pollinators, parasitoids, predators, vertebrates)
- biodegradable
- low toxicity to human health and the environment

opportunity:

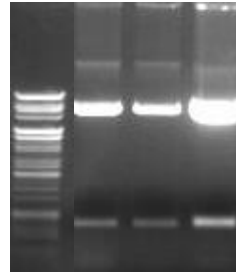
pesticide regulations are expected to get tighter which will encourage the development of biological pesticides



Aedes albopictus and *Anopheles gambiae* (mosquitoes)

RT-PCR: amplification of fragments of UDP-glucosyltransferase (UGT) genes
amplification of fragments of essential genes
(Rab-11, vesicle transport; IAP, inhibitor of apoptosis; HR3, hormone signaling)

Cloning in pLitmus 28i or 38i vectors



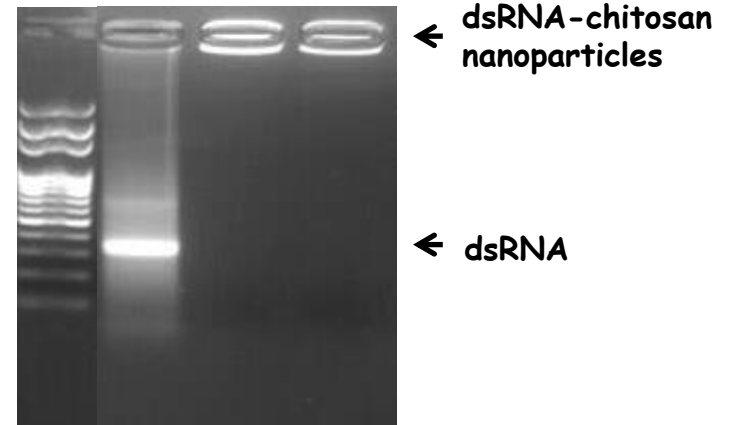
Dimitra Pipini
(M.Sc. student)

Dr. John Vontas
(Agricultural University
of Athens)

Production of dsRNA by T7 RNA polymerase
(*in vitro* transcription)

Encapsulation of dsRNA fragments by chitosan

Feeding experiments
(food pellets)



Publications Sanitura

RNA viruses as delivery agents for dsRNA (RNAi): efficiency and safety issues

- **Review: immune response in *Drosophila***

Swevers, L., Liu, J., and Smaghe, G. (2018). Defense mechanisms against viral infection in *Drosophila*: RNAi and non-RNAi. *Viruses* 10, 230.

- **Review: production platform for RNA viruses**

Zhao, Y., Sun, J., Labropoulou, V., and Swevers, L. (2018). Beyond baculoviruses: additional biotechnological platforms based on insect RNA viruses. *Adv. Insect Physiol.* 55, 123-162.

- **Research: kinetics of infection of a broad-spectrum RNA virus in lepidopteran cells**

Wang, L., Cappelle, K., Santos, D., Vanden Broeck, J., Smaghe, G., and Swevers, L. (2019). Short-term persistence precedes pathogenic infection: Infection kinetics of cricket paralysis virus in silkworm-derived Bm5 cells. *J. Insect Physiol.* 115, 1-11.

- **Research: viral-like particles as non-GMO delivery agents of dsRNA: transcriptional response of immune-related genes**

Zhao, Y., Koliopoulou, A., Ren, F., Lu, Q., Labropoulou, V., Swevers, L., and Sun, J. (2019). Transcriptional response of immune-related genes after endogenous expression of VP1 and exogenous exposure to VP1-based VLPs and CPV virions in lepidopteran cell lines. *Mol. Genet. Genomics* 294, 887-899.

- **Review: immune response against dsRNA viruses in lepidopteran insects**

Swevers, L., Feng, M., Ren, F., and Sun, J. (2020). Antiviral defense against Cypovirus 1 (*Reoviridae*) infection in the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 103, e21616.



ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»



Προσδιορισμός Στόχων και Ανάπτυξη Καινοτόμων Προσεγγίσεων για Εφαρμογές στην Υγεία και το Περιβάλλον (SANITURA)

Δρ. Άννα Κολλιοπούλου

26 Απριλίου 2021

Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

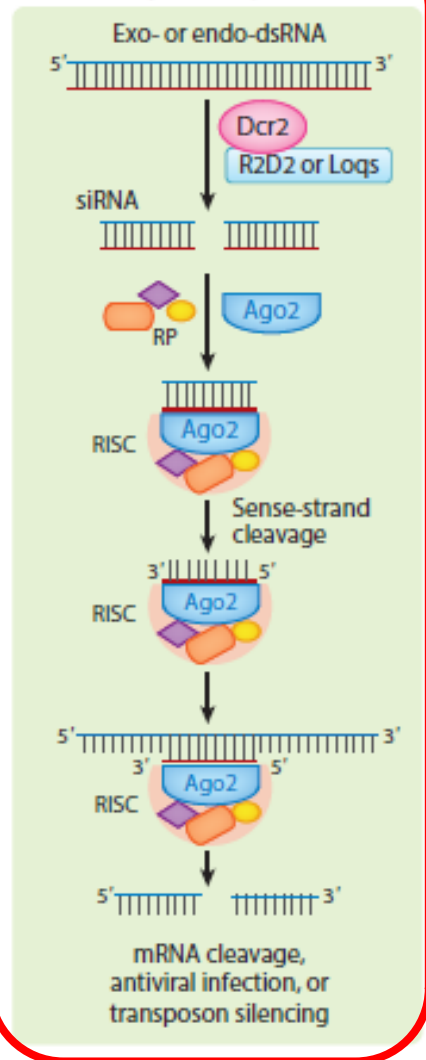
ΕΡΑνηΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION



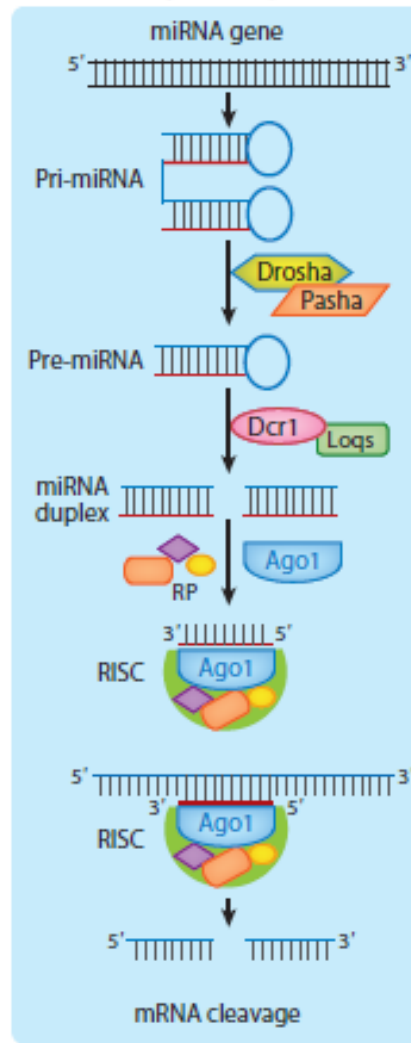
Co-financed by Greece and the European Union

Τα κύρια μονοπάτια του RNAi στα έντομα

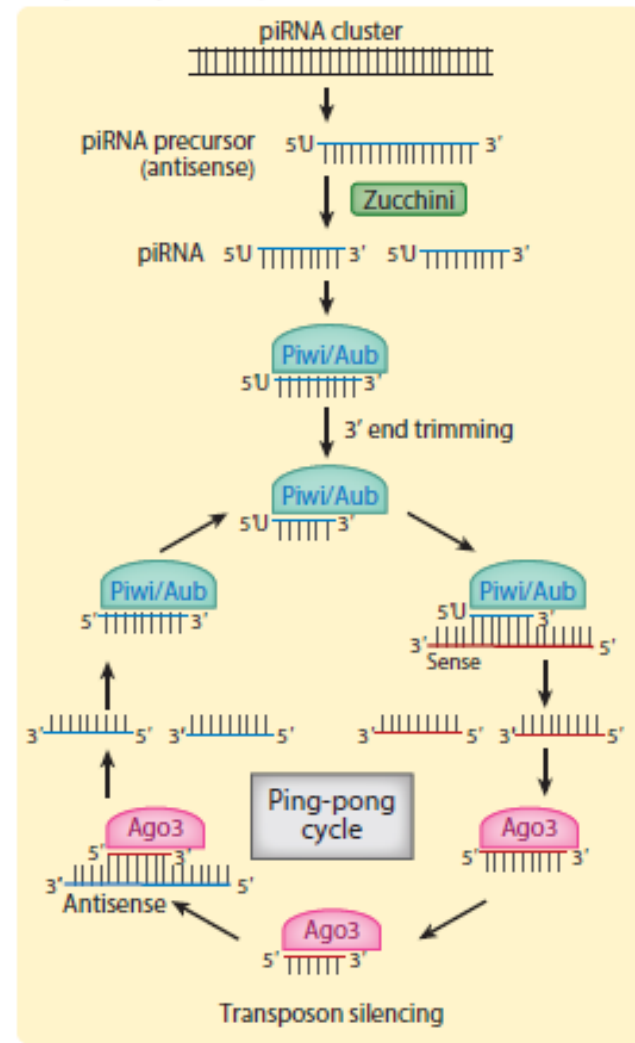
a siRNA pathway



b miRNA pathway



c piRNA pathway



Η χρήση συστήματος ανάστροφης γενετικής για την παράδοση σημάτων RNAi έναντι λεπιδοπτέρων εντόμων

- ❖ Η RNA παρεμβολή (RNA interference, RNAi) είναι ένας μηχανισμός γονιδιακής αποσιώπησης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πολύτιμο εργαλείο για τον έλεγχο επιβλαβών εντόμων στη γεωργία.
- ❖ Συνθετικά νανοσωματίδια;
- ❖ Η **χρήση ιών** αποκτά αυξανόμενο ενδιαφέρον σχέση με την αξιοποίησή της ως μεθόδου παράδοσης μορίων dsRNA => **Σύστημα ανάστροφης γενετικής** (reverse genetics) το οποίο βασίζεται σε πλασμίδια για την παραγωγή των ιών.
- ❖ Ιϊκά γονιδιώματα μπορούν να ανασυνδυάζονται ώστε να εκφράζουν και να παράγουν μόρια dsRNA ή hpRNA, ειδικά σχεδιασμένα έναντι γονιδίων εντόμων, με πιθανή χρήση στον έλεγχο των πληθυσμών επιβλαβών εντόμων.
- ❖ RNA ιοί: προσφέρονται καθώς το dsRNA αποτελεί φυσικό ενδιάμεσο μόριο που παράγεται κατά τη διάρκεια της αντιγραφής τους. Η παρουσία ιϊκών καταστολέων του RNAi (VSRs) θα μπορούσε να παίξει ανασταλτικό ρόλο στην παράδοση των dsRNA.

Π5.2β: Ανασυνδυασμένοι βακτροϊοί και RNA ιοί που εκφράζουν στοχευμένα dsRNA και ποσοστά θνησιμότητας

Κατασκευή ανασυνδυασμένων φορέων του ιού Flock house (Flock house virus, FHV) που θα εκφράζουν dsRNA έναντι κυτταρικών γονιδίων κατά τη διάρκεια του κύκλου μόλυνσης του ιού.

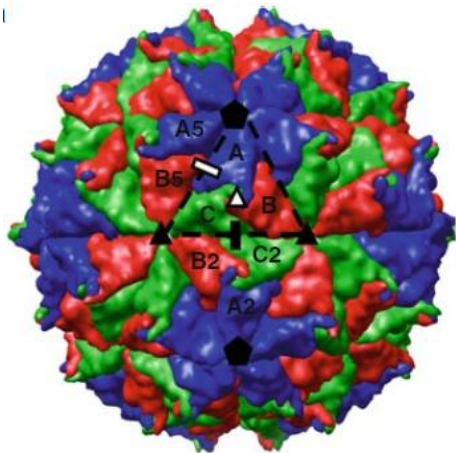


Παραγωγή φορέων FHV που στοχεύουν βασικά γονίδια σε παράσιτα λεπιδοπτέρων εντόμων (*Sprodoptera frugiperda*) στα πλαίσια συνεργασίας με το εργαστήριο του Δρ G. Smagghe (Ghent University, Βέλγιο).

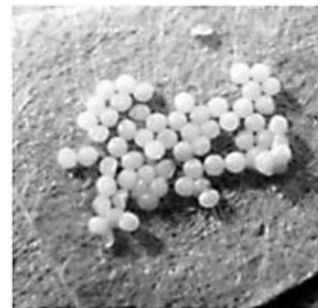
Χρήση του ιού Flock House Virus ως μεθόδου παράδοσης σημάτων RNAi έναντι λεπιδοπτέρων εντόμων

Υπόθεση

Έντομα επιβλαβή για σημαντικές γεωργικές καλλιέργειες σε παγκόσμια κλίμακα μπορούν να αντιμετωπιστούν μέσω γονιδιακής αποσιώπησης αξιοποιώντας το μηχανισμό RNAi, με τον σχεδιασμό και τη χρήση νέων βιοτεχνολογικών εργαλείων, τα οποία θα προέρχονται από ιούς και / ή ιϊκά σωματίδια.



Ιϊκό σωματίδιο FHV



Egg
5 days

Larva
16 days

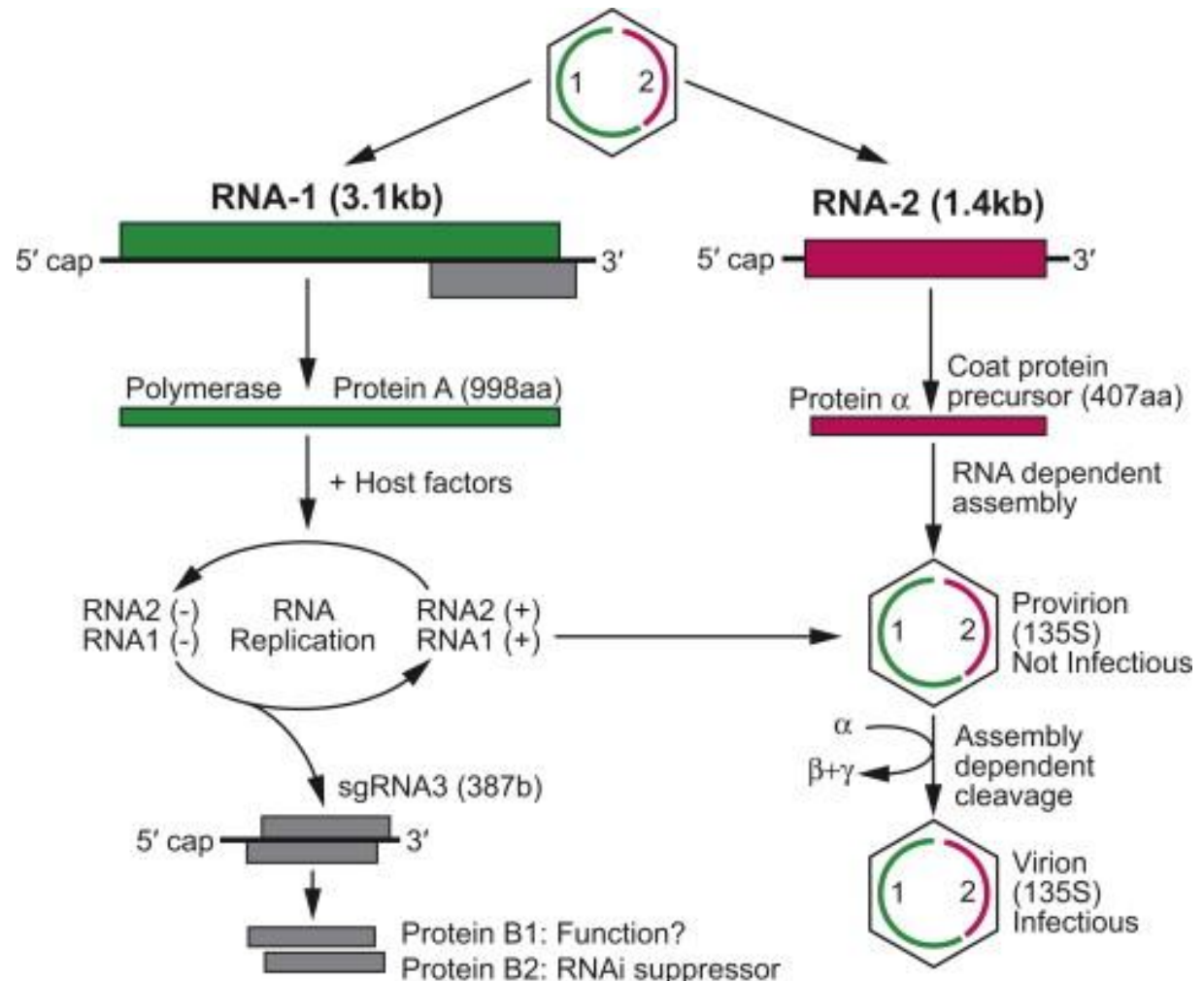
Pupa
5 days

Adult
5 days

Κύκλος ζωής *Spodoptera frugiperda*

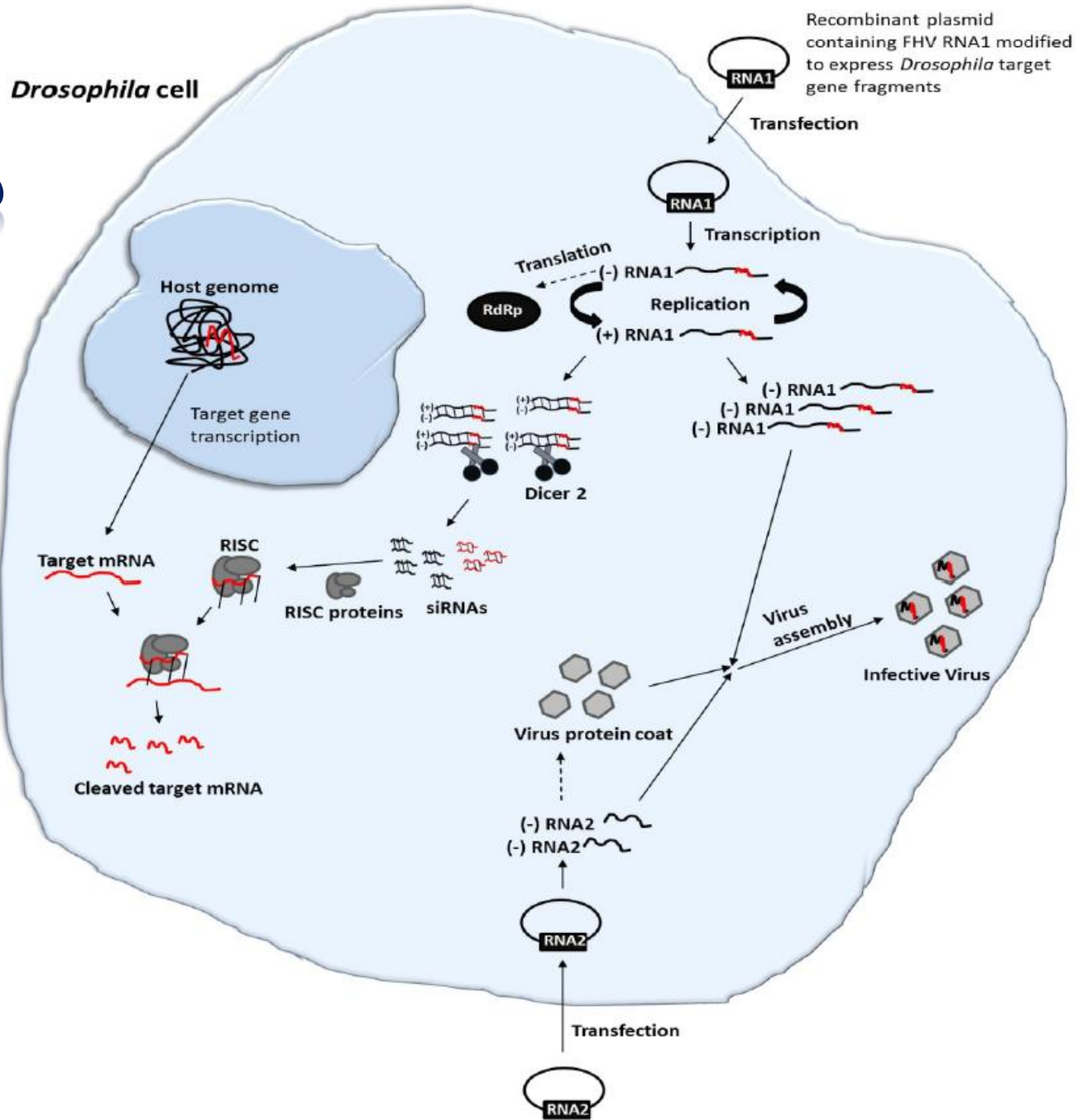
Η οργάνωση του γονιδιώματος του ιού Flock House virus (Alphanodavirus)

Nodaviridae
+ssRNA ιός



Όχημα για την παράδοση dsRNA στα Λεπιδόπτερα, καθώς είναι γνωστό ότι αναπαράγεται σε αυτή την τάξη εντόμων

Στρατηγική για την παράδοση RNAi σημάτων μέσω του ιού FHV σε κύτταρα εντόμων



Taning, Christiaens *et al.* (2018), *Front. Physiol.*

Recombinant plasmid containing FHV RNA2

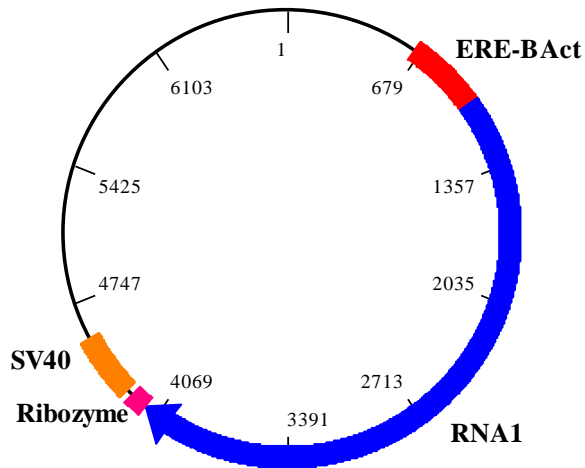
Πειραματική διαδικασία

Τα ORFs (RNA1, RNA2, RNA3) του FHV κλωνοποιήθηκαν σε φορείς έκφρασης.

Οι φορείς περιείχαν την κασέτα του Στοιχείου Απόκρισης στην Εκδυσόνη (Ecdysone Response Element, ERE) από τον υποκινητή *hsp27* της *Drosophila*, που κατόπιν επαγωγής με την ορμόνη 20-υδροξυεκδυσόνη (20Ε) μπορεί να προάγει ισχυρά τα επίπεδα έκφρασης των κλωνοποιημένων ORF.

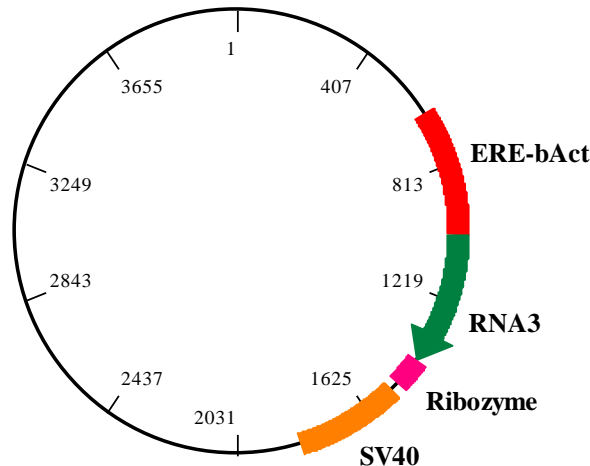
pERE-bAct-RNA1-Ribo-SV40

6781 bp



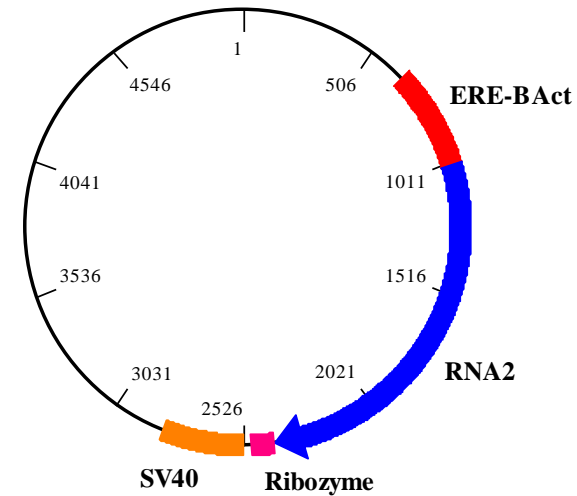
pERE-bAct-RNA3-Ribo-SV40

4062 bp



pERE-bAct-RNA2-Ribo-SV40

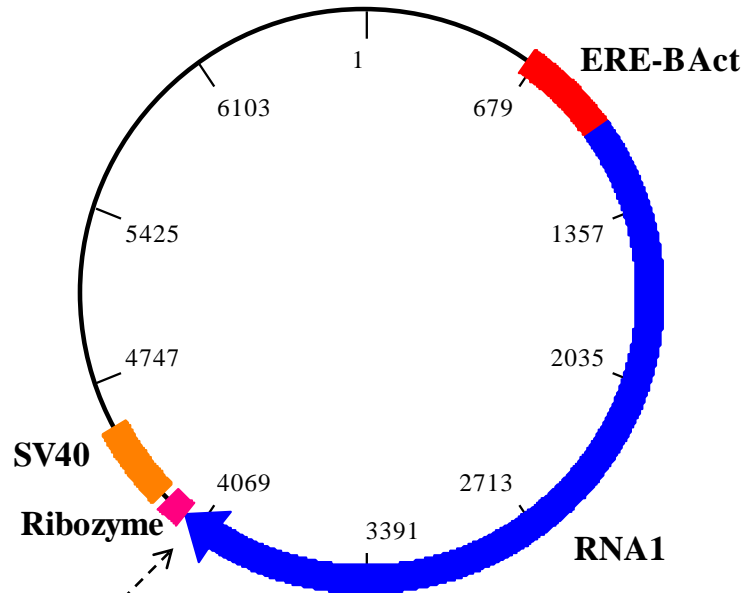
5056 bp



Ο ανασυνδυασμένος ιός FHV

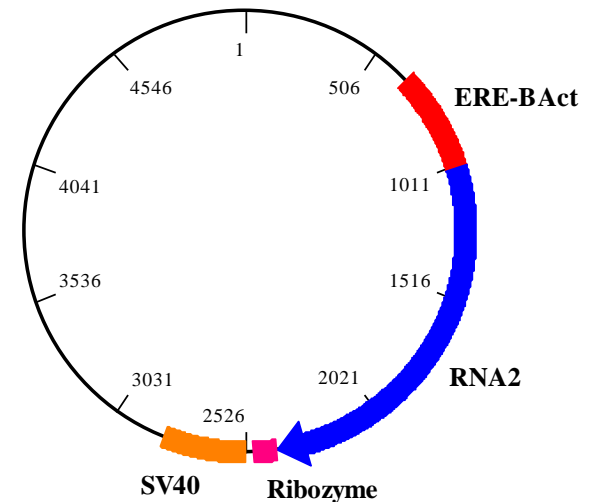
pERE-bAct-RNA1-Ribo-SV40

6781 bp



pERE-bAct-RNA2-Ribo-SV40

5056 bp



+ eGFP (+polylinker)

+ αλληλουχία-στόχος *S. frugiperda*



FHV-GFP/dsRNA

Στοιχεία εισαγωγής στο φορέα RNA1:

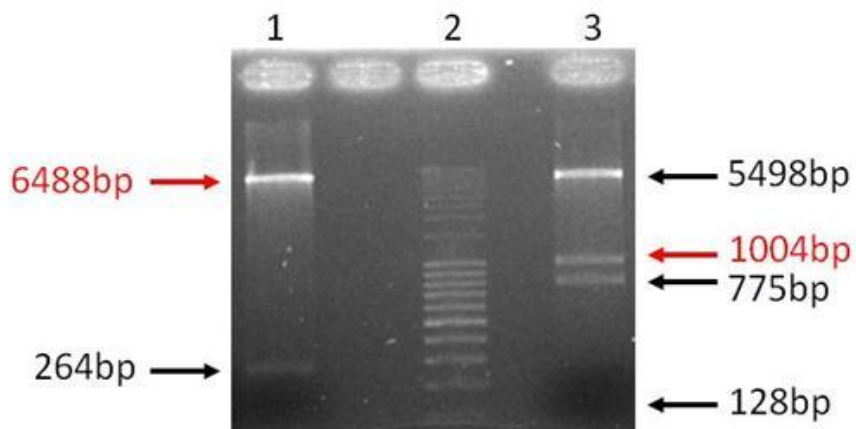
1. eGFP ORF
2. Polylinker (NsiI, AsiSI, BsrGI)
3. Αλληλουχία-στόχος έναντι κάποιου γονιδίου λεπιδοπτέρου (*S. frugiperda*)

Διαδικασία κλωνοποίησης

Φορέας pERE που περιέχει το ORF FHV-RNA1

+

egfp + polylinker για τη μετέπειτα ένθεση των αλληλουχιών-στόχων

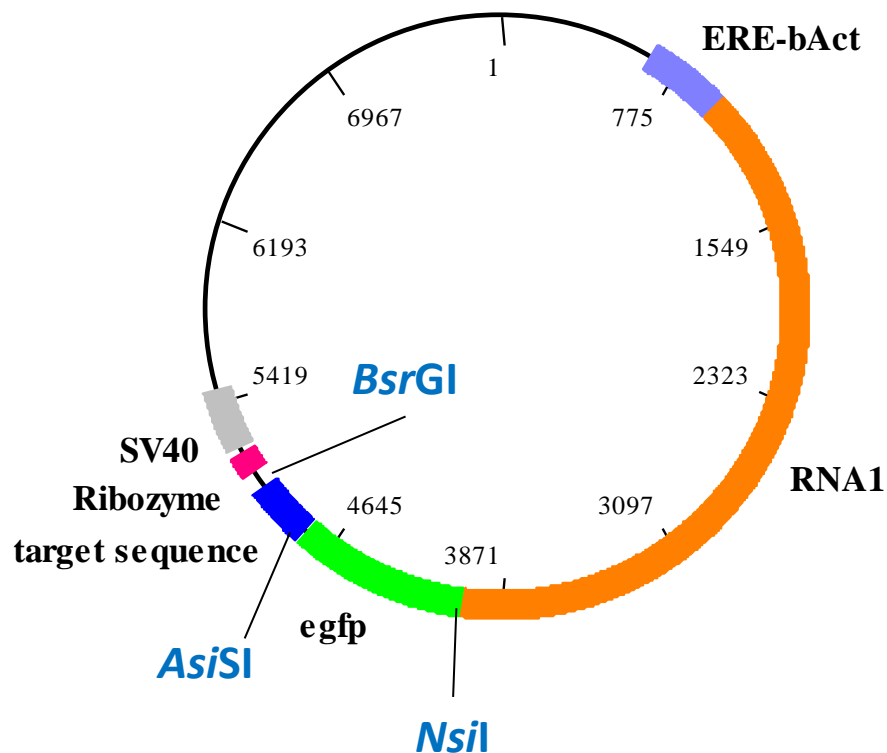


1: pERE.bA.RNA1.Ribo.SV40

2: MassRuler DNA Ladder

3: pMT.RNA1.egfp.Ribo

pERE.bA.RNA1.egfp.Ribo.TS.SV40
7743 bp



Διαδικασία κλωνοποίησης

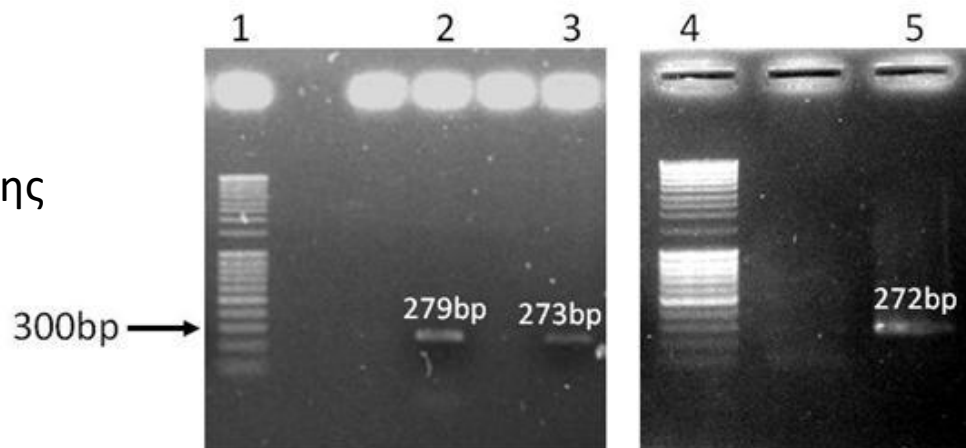
Ειδικά σχεδιασμένες αλληλουχίες-στόχοι που προέρχονται από το μεταγράψωμα του *Spodoptera frugiperda* (Tre, UBQL3)
+
Αλληλουχία-μάρτυρας (NLuc)

Trehalase (DQ447188.1):

- υδρολύει την τρεχαλόζη σε γλυκόζη
- σημαντικό ρόλο στη σύνθεση της χιτίνης

Ubiquitin Ligase 3 (XM_022959167.1):

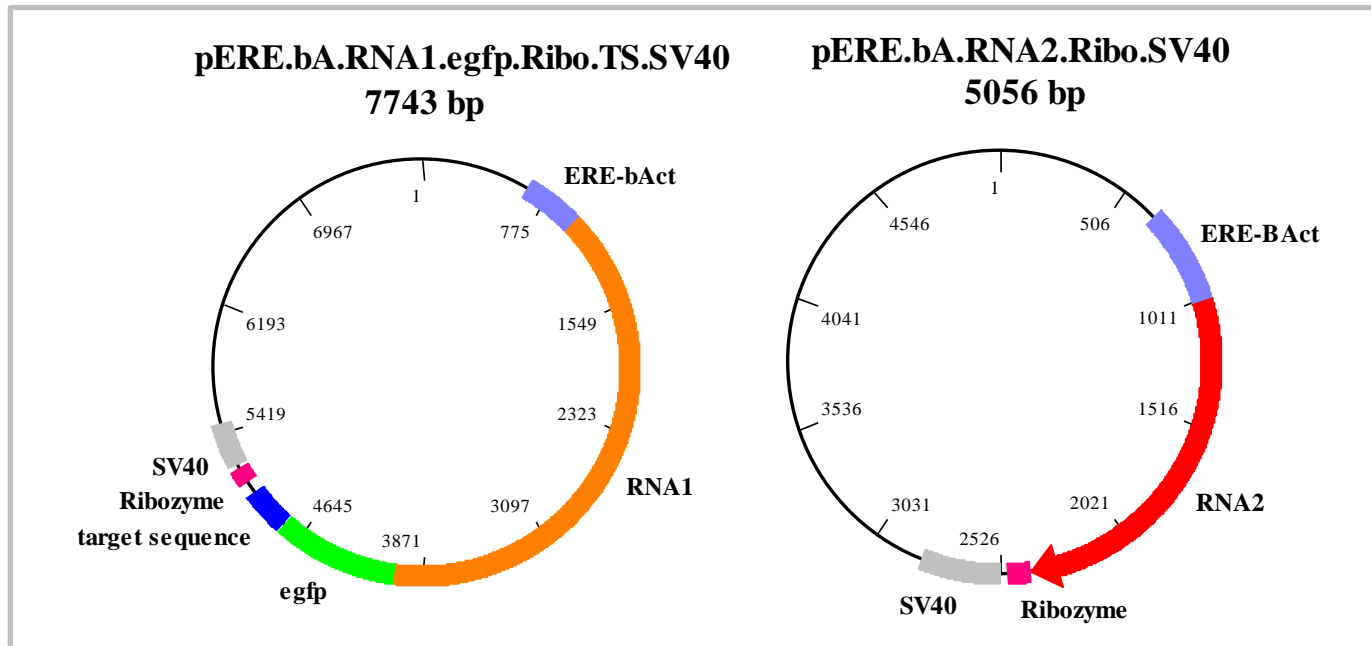
- καταλύει/υποβοηθά τη μεταφορά της ουβικιτίνης από το E2 ένζυμο στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα



- 1: MassRuler DNA Ladder
- 2: Ubiquitin Ligase 3 target sequence
- 3: Trehalase target sequence
- 4: MassRuler DNA Ladder
- 5: Nanoluciferase target sequence

Ανίχνευση του ανασυνδυασμένου ιού FHV

Διαμόλυνση κυττάρων SF9 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια του FHV



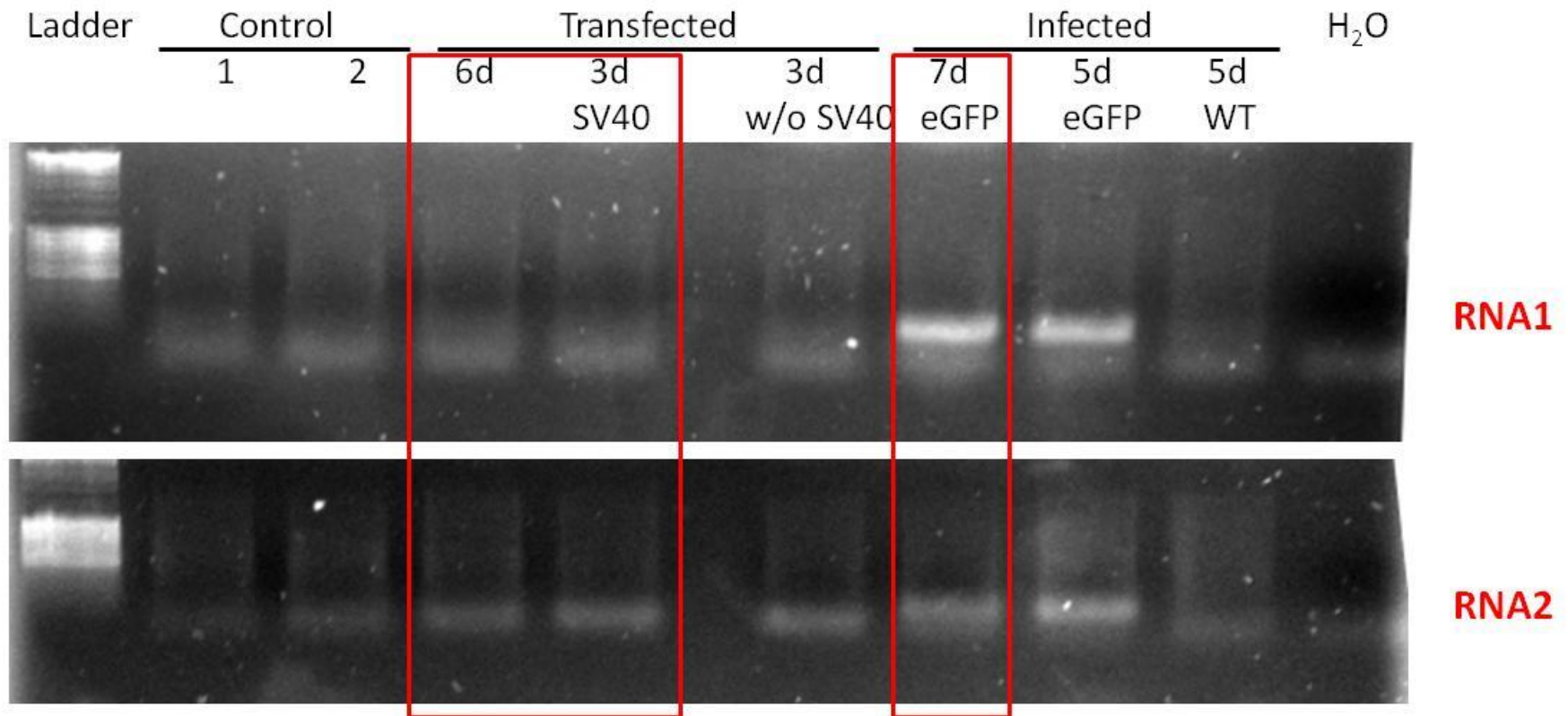
Μόλυνση κυττάρων SF9 με τον ανασυνδυασμένο FHV που συλλέχθηκε από τα διαμολυσμένα κύτταρα



Ανίχνευση μέσω PCR και *in situ* υβριδισμού

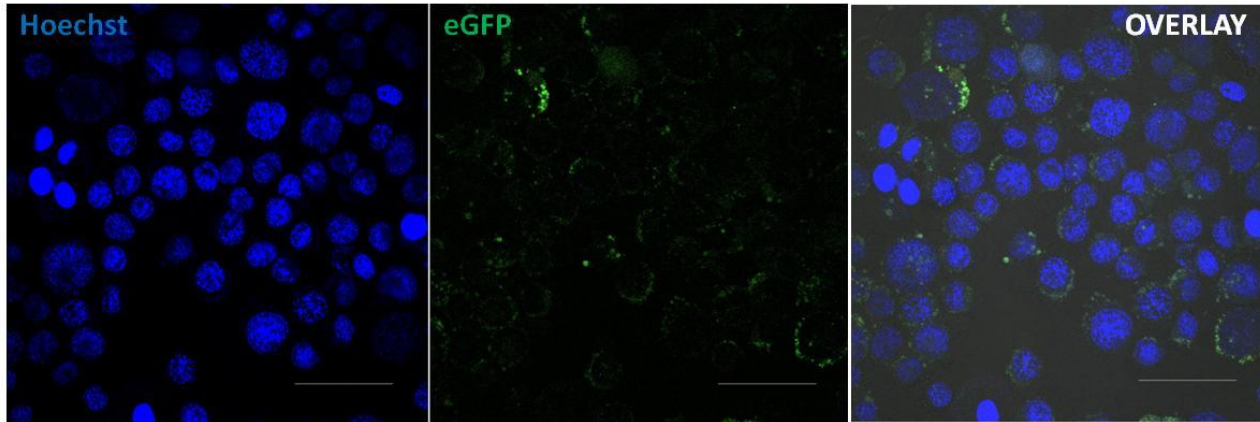
Ανίχνευση του ανασυνδυασμένου ιού FHV μέσω PCR

PCR για τα τμήματα του RNA1 και RNA2

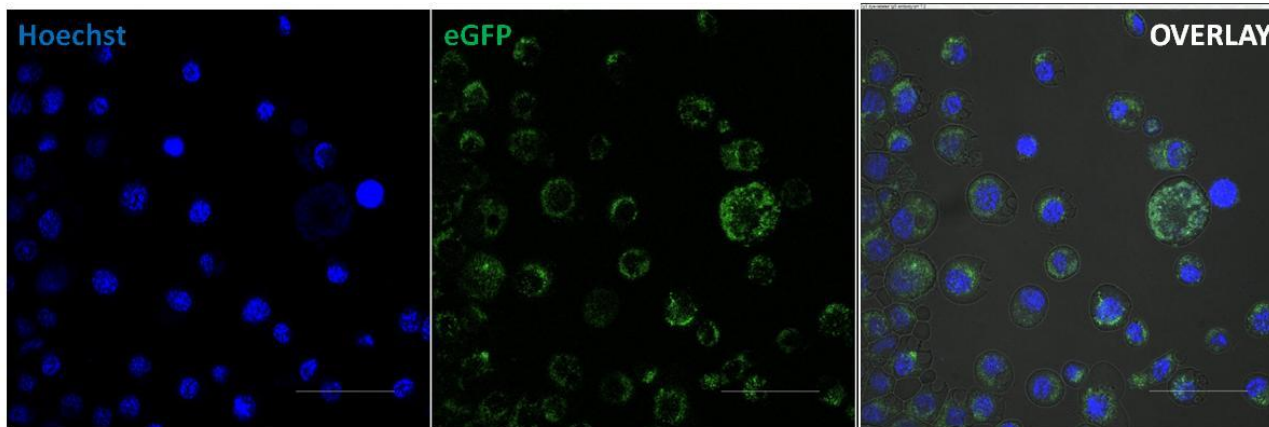


Ανίχνευση του ανασυνδυασμένου ιού FHV μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας

Infected 2.5d



Infected 5d

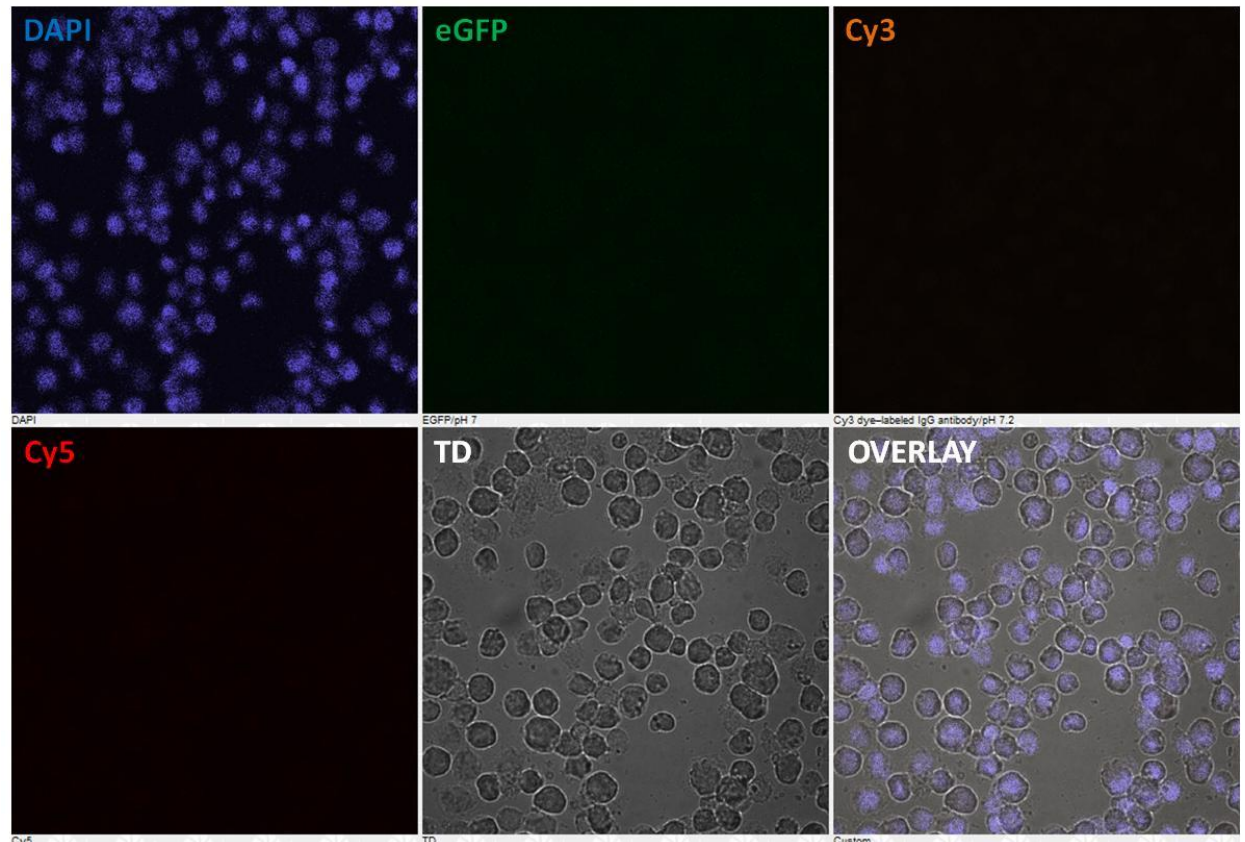


Ανίχνευση του ανασυνδυασμένου ιού FHV μέσω PCR σε κύτταρα Sf9 με χρήση FISH και συνεστιακής μικροσκοπίας

Ειδικά σχεδιασμένοι ανιχνευτές

- FHV-RNA1 probes
5'-Cy3-RNA1-206as
5'-Cy3-RNA1-3004as
- FHV-RNA2 probes
5'-Cy5-RNA2-238as
5'-Cy5-RNA2-1127as

Control
(Probes:
Cy3-RNA1-206as,
Cy5-RNA2-238as)

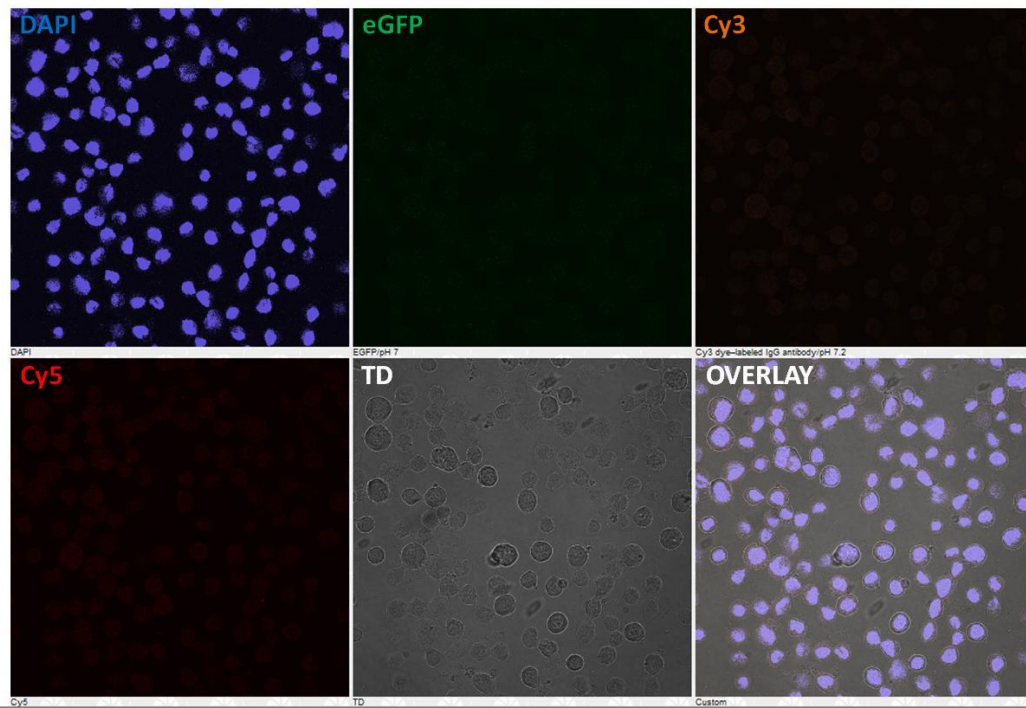


Transfected 3d with WT FHV plasm.

(Probes:

Cy3-RNA1-206as,

Cy5-RNA2-238as)

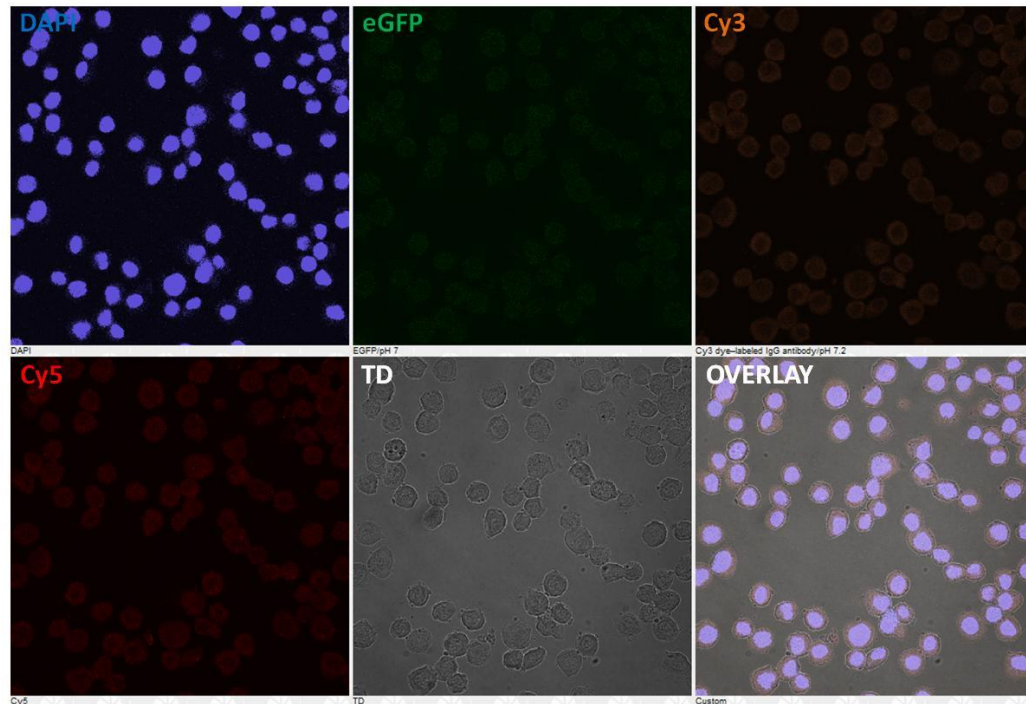


Infected 7d with FHV-eGFP

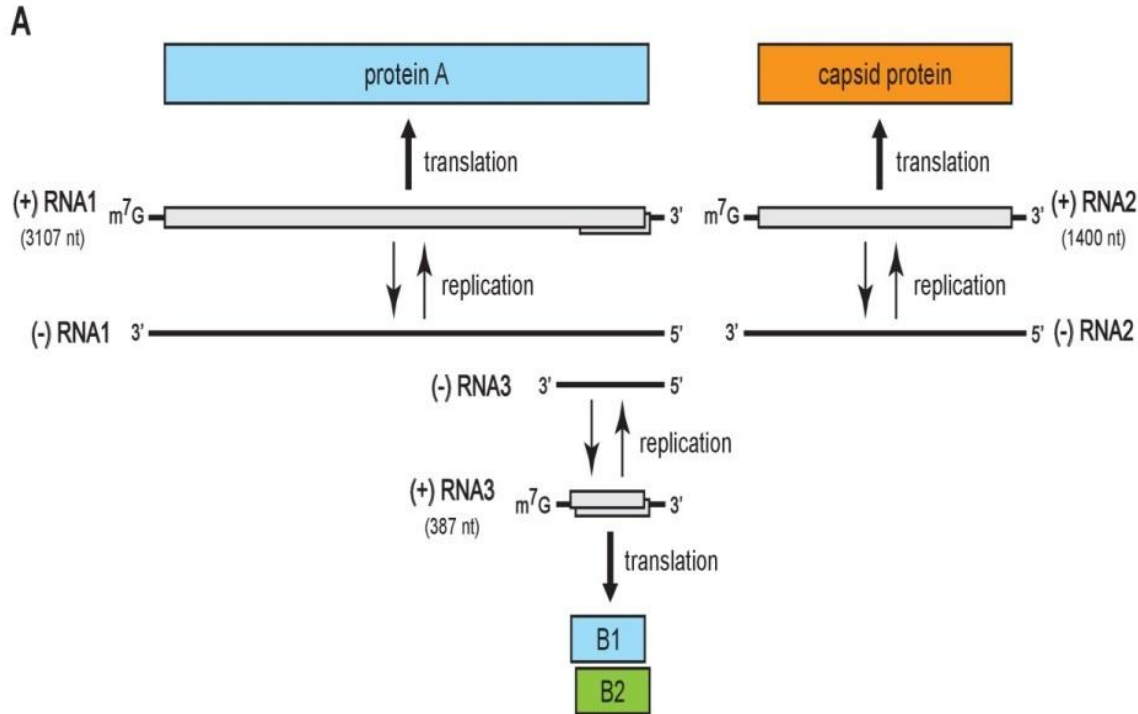
(Probes:

Cy3-RNA1-206as,

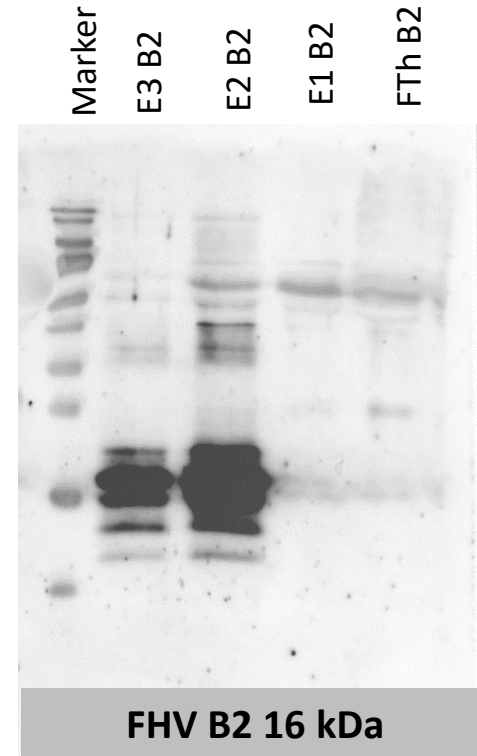
Cy5-RNA2-238as)



Έκφραση της πρωτεΐνης B2 του ιού FHV μέσω μπακουλοϊού



AcMNPV-B2m.h



- Η πρωτεΐνη B2 δεσμεύει μόρια δίκλωνου RNA (dsRNA) με υψηλή συγγένεια.
- Καταστέλλει την αντιϊκή απόκριση που επιτυγχάνεται μέσω RNA αποσιώπησης από τον ξενιστή, παρεμποδίζοντας τη διάσπαση του dsRNA μέσω της Dicer-2 *in vitro*.

Π5.2α: Σκευάσματα dsRNA που στοχεύουν γονίδια επιβίωσης κουνουπιού και ποσοστά θνησιμότητας

ADVANCED REVIEW



WILEY

PIWI pathway against viruses in insects

Anna Kolliopoulou¹ | Dulce Santos² | Clauvis Nji Tizi Taning³ | Niels Wynant² | Jozef Vanden Broeck² | Guy Smagghe³ | Luc Swevers¹

frontiers
in Physiology

REVIEW
published: 11 July 2019
doi: 10.3389/fphys.2019.00890



Arboviruses and the Challenge to Establish Systemic and Persistent Infections in Competent Mosquito Vectors: The Interaction With the RNAi Mechanism

OPEN ACCESS

Ji Sheng Liu^{1*}, Luc Swevers^{2*,†}, Anna Kolliopoulou² and Guy Smagghe³

Edited by:
Xanthe Vafoiopolou,
York University, Canada

¹ School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou, China, ² Institute of Biosciences and Applications, National Centre of Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece, ³ Department of Plants and Crops, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge support of this work by the project "Target Identification and Development of Novel Approaches for Health and Environmental Applications" (MIS 5002514) which is implemented under the Action for the Strategic Development on the Research and Technological Sectors, funded by the Operational Programme "Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation" (NSRF 2014–2020) and co-financed by Greece and the European Union (European Regional Development Fund).

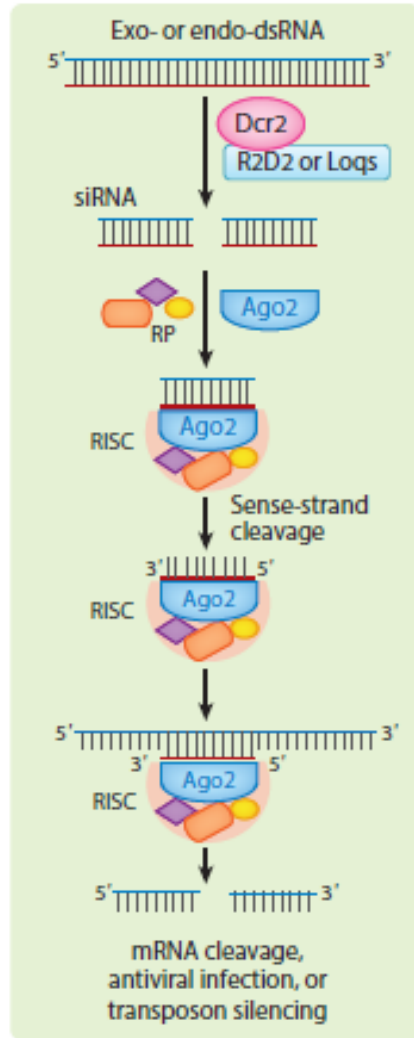
Μελέτη του πιθανού αντιϊκού ρόλου του μονοπατιού PIWI στα έντομα

Βασικοί άξονες ανασκόπησης

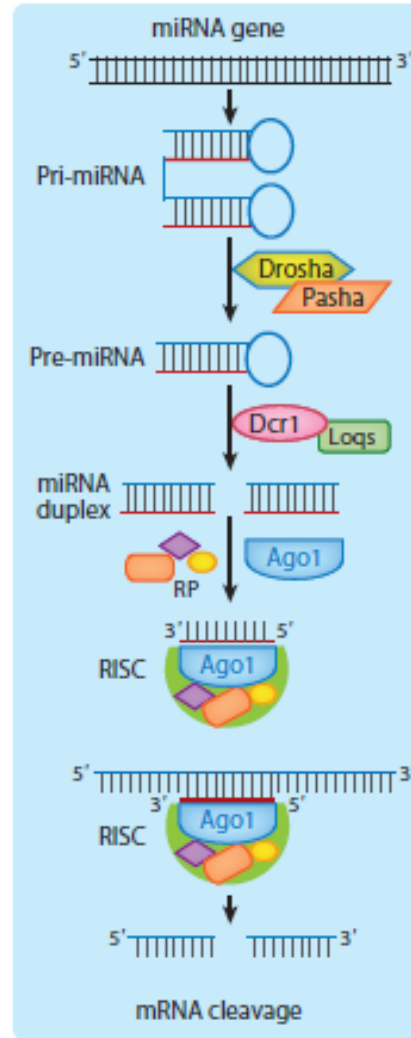
- Η **βιογένεση** των μορίων piRNA σε διαφορετικά έντομα
- Διερεύνηση του **πιθανού αντιϊκού ρόλου του piRNA μονοπατιού σε διαφορετικά έντομα** (*Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, κουνούπια *Aedes* sp., *Anopheles* sp., *Culex* sp.) μέσω της παραγωγής μορίων viral-piRNA (**vpiRNA**)
- Συσχέτιση με τον τύπο του **ϊικού γονιδιώματος**
- Ανάδειξη εμπλεκόμενων **PIWI παραγόντων** στο αντιϊκό μονοπάτι
- Ενδεχόμενη συσχέτιση με το μονοπάτι **siRNA**

Τα κύρια μονοπάτια του RNAi στα έντομα

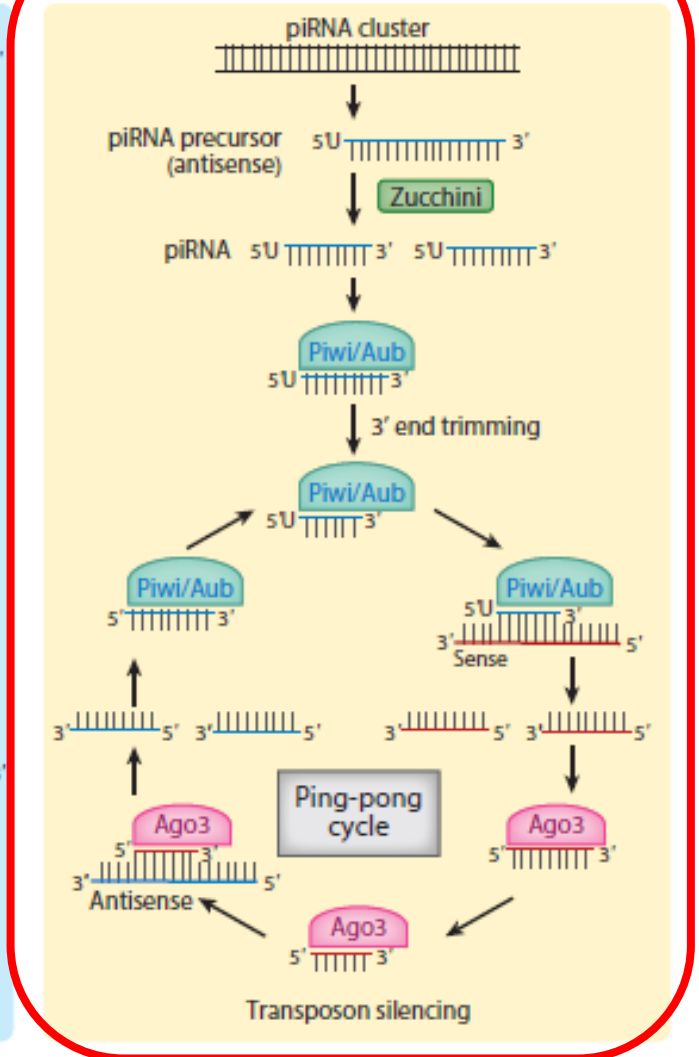
a siRNA pathway



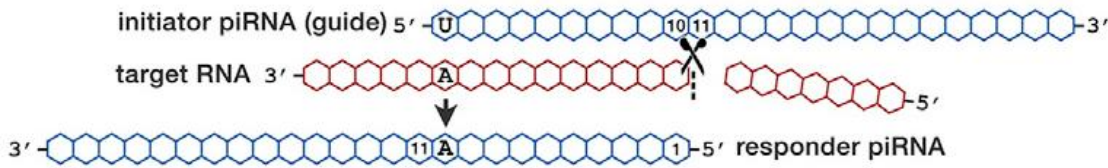
b miRNA pathway



c piRNA pathway



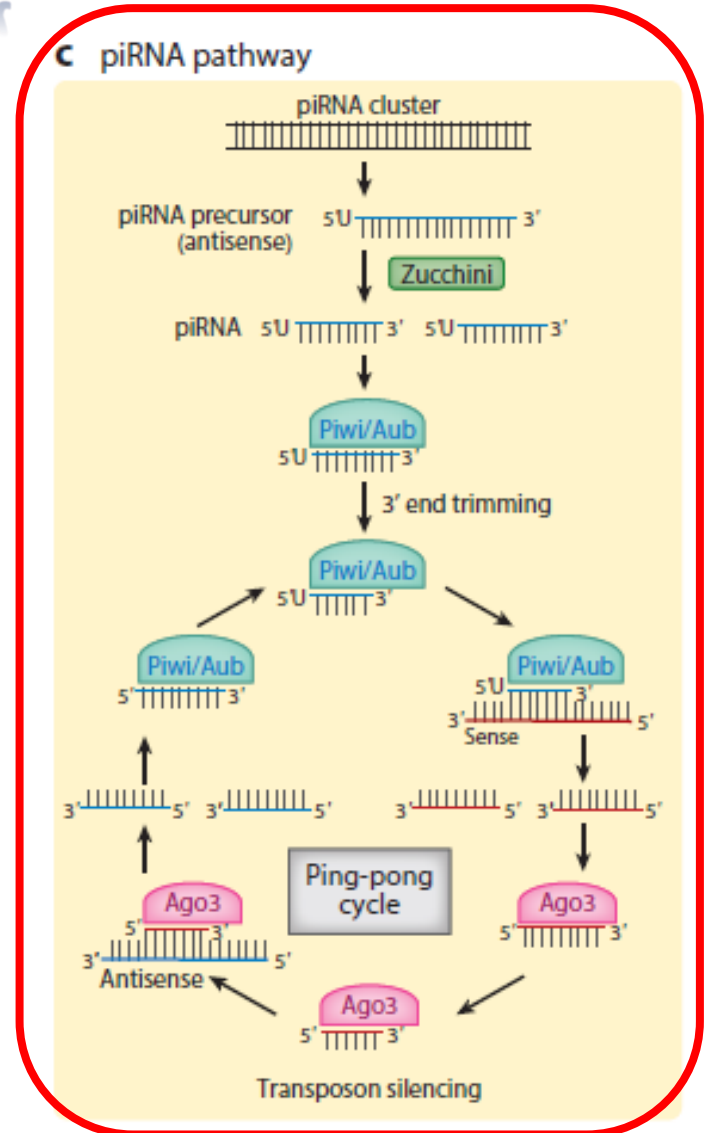
Βασικά χαρακτηριστικά του μονοπατιού piRNA στα έντομα



Ophinni et al. (2019), *Trends Immunol*

Aub-bound piRNAs 1U-rich, antisense

Ago3-bound piRNAs 10A-rich, sense

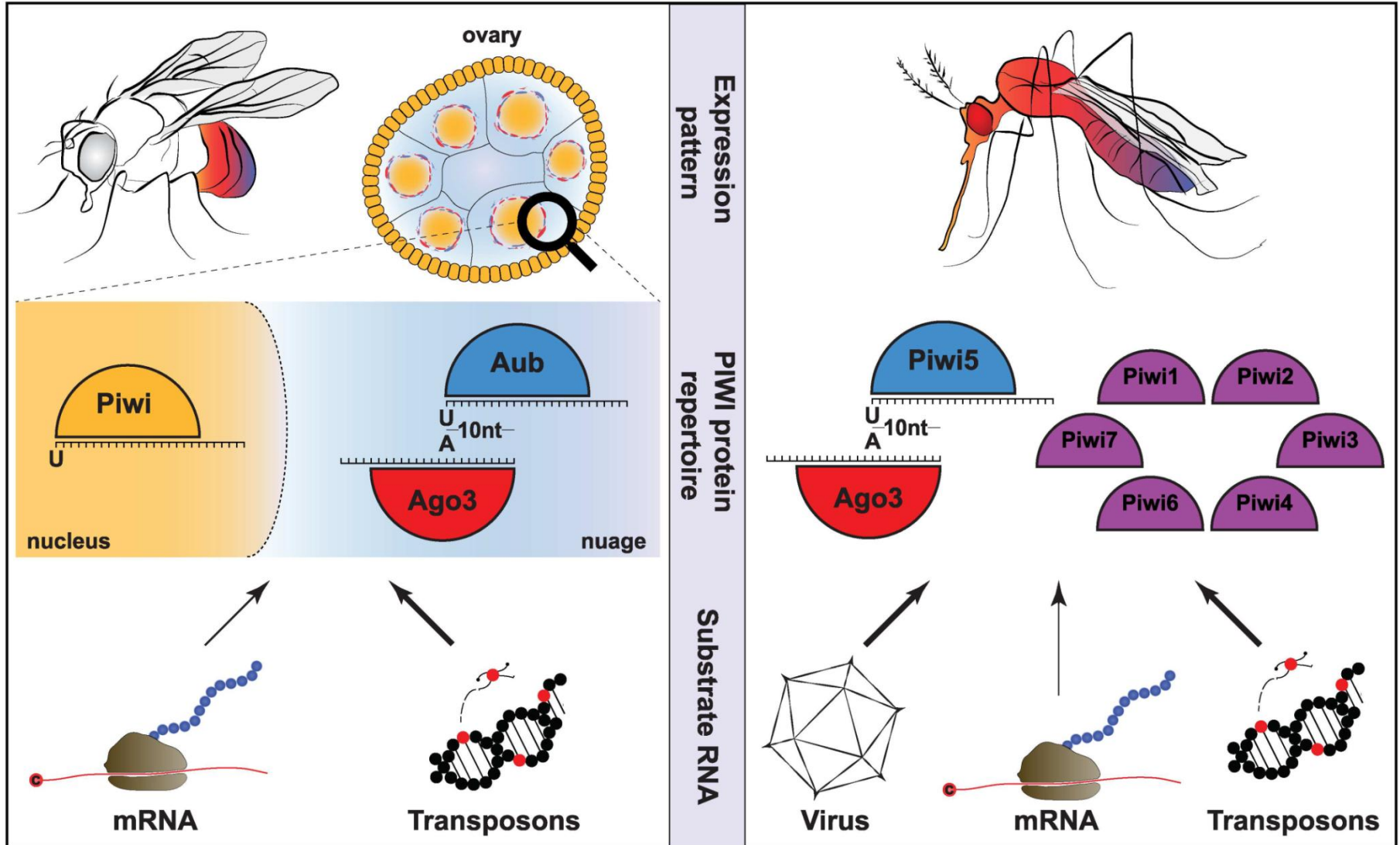


Zhu & Palli (2019), *Annu Rev Entomol*

Διαφοροποίηση των μονοπατιών piRNA μεταξύ ειδών εντόμων

Drosophila sp.

Aedes sp. mosquito



Μελέτη της απόκρισης του μονοπατιού piRNA σε ιικές μολύνσεις σε διάφορα πρότυπα έντομα

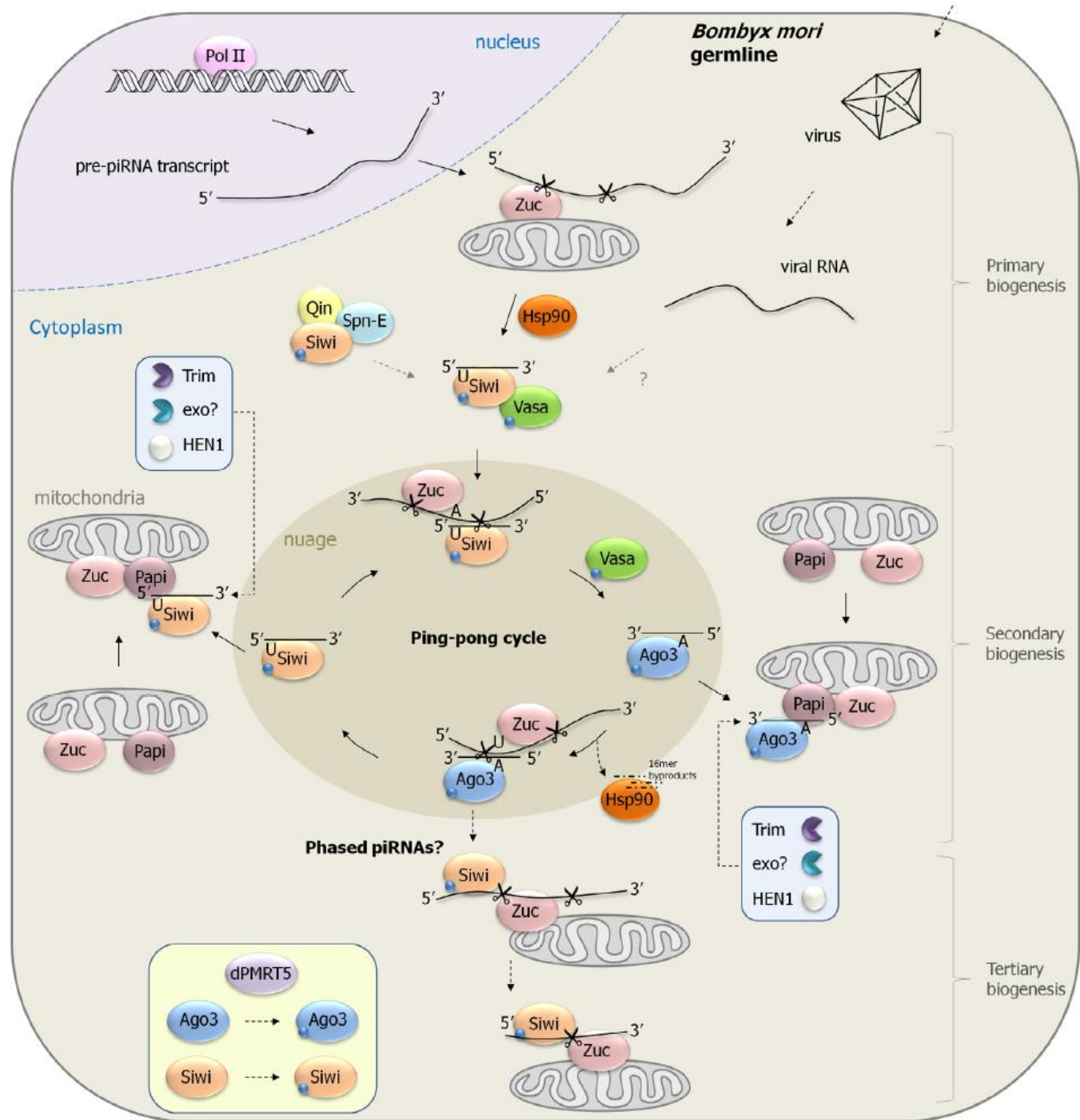
Order	Family	Genus	Name	Genome type	Host/cells	vpiRNA-sized reads	Ping-Pong signature	Strand orientation bias	Reference
Picomavirales	Dicistroviridae	Cripavirus	Cricket Paralysis Virus (CrPV)	(+) ssRNA	Bm5 cells	No	N/A	N/A	(L. Wang et al., 2019)
			Drosophila C Virus (DCV)	(+) ssRNA	Drosophila adults	(Yes)	No	Sense bias	(Petit et al., 2016)
	Unclassified	Nora Virus (NoraV)	(+) ssRNA	OSS cells	Yes	1U-sense	Sense bias	(Wu et al., 2010)	
			(+) ssRNA	Drosophila adults	(Yes)	No	Sense bias	(Petit et al., 2016)	
			(+) ssRNA	OSS cells	(Yes)	1U-sense	No	(Wu et al., 2010)	
Mononegavirales	Rhabdoviridae	Merida Virus	Merida Virus (MERDV)	(-) ssRNA	Hsu cells	Yes	1U-antisense, 10A-sense	Antisense bias	(Ruckert et al., 2019)
		Sigmavirus	<i>D. melanogaster</i> sigma virus (DMelSV)	(-) ssRNA	Drosophila adults	(Yes)	No	Sense bias	(Petit et al., 2016)
Tymovirales	Tymoviridae	Maculavirus	<i>B. mori</i> Macula-like Virus (BmMLV)	(+) ssRNA	BmN4 cells	Yes	1U-sense Siwi-bound, 10A-antisense Siwi- & Ago3-bound	Sense bias	(Katsuma et al., 2018)
					Bm5 cells	No	N/A	N/A	(L. Wang et al., 2019)
					VF-MLV cells	Yes	N/A	Antisense bias	(Katsuma et al., 2018)
Unassigned	Bimaviridae		<i>Drosophila</i> birnavirus (DBV)	dsRNA	OSS cells	(Yes)	1U-sense	No	(Wu et al., 2010)

Ανασκόπηση των παραγόντων βιογένεσης μορίων νριRNA που εμπλέκονται σε εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις εντόμου-ξενιστή

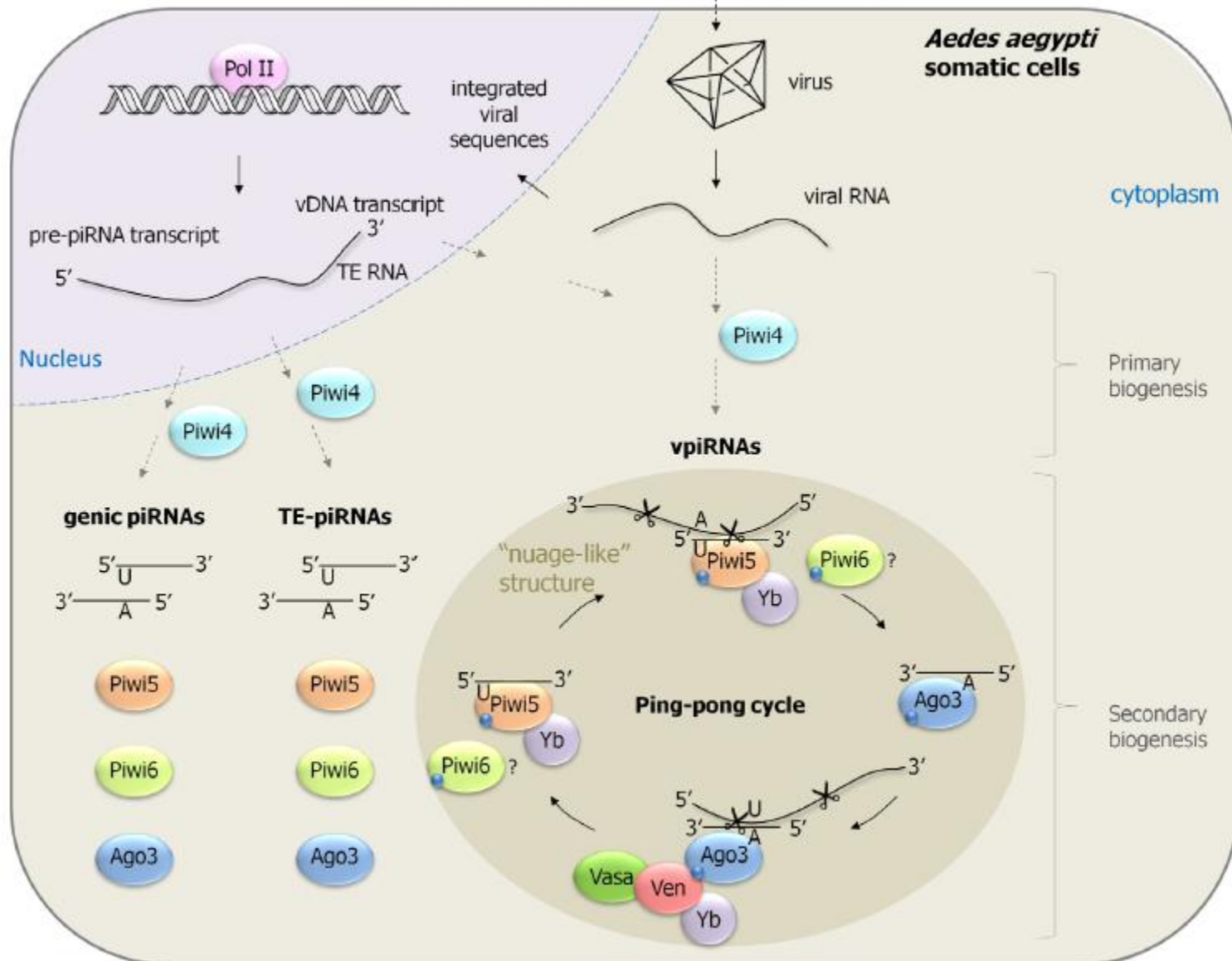
Viral genus	Virus	Host insect	Ago3	Piwi4	Piwi5	Piwi6	Siwi	Spn-E	Vasa	Ven	Yb
Alphavirus	CHIKV	<i>Ae. aegypti</i>	✓	✓	✓	✓					
	ONNV	<i>A. gambiae</i>	✓								
	SFV	<i>Ae. aegypti</i>	✓	✓	✓	✓		✓			
Cripavirus	SINV	<i>Ae. aegypti</i>	✓		✓	✓			✓	✓	✓
	CrPV	<i>B. mori</i>	×				✓				
Flavivirus	DENV2	<i>Ae. aegypti</i>	✓		✓	✓					
	ZIKV	<i>Ae. aegypti</i>	✓	✓		✓					
Maculavirus	BmMLV	<i>B. mori</i>	✓				✓				
Orthobunyavirus	BUNV	<i>Ae. aegypti</i>	✓	✓		✓					
	CVV	<i>Ae. aegypti</i>		✓							
	SATV	<i>Ae. aegypti</i>		×							
	SBV	<i>Ae. aegypti</i>		×	✓						
Phlebovirus	RVFV	<i>Ae. aegypti</i>	✓	✓							
Flavivirus / Reovirus / Rhabdovirus	NIRVS	<i>Ae. aegypti</i>		✓	✓	✓					

Note: The factors of the piRNA pathway that have been confirmed to be involved in the antiviral response of a specific insect host against a particular virus are presented. Data regarding piRNA factors involved in NIRVS are also presented. Factors that have been confirmed to be or not to be involved in the specific insect-virus interaction are marked with a ✓ or a ×, respectively.

Προτεινόμενο μοντέλο για τη λειτουργία του μονοπατιού PIWI στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*



Προτεινόμενο μοντέλο για τη λειτουργία του μονοπατιού PIWI στο κουνούπι *Ae. aegypti*



Αρμποιοί: Αλληλεπίδραση με τον RNAi μηχανισμό και πιθανή χρήση τους σε συστήματα VIGS

Βασικοί άξονες ανασκόπησης

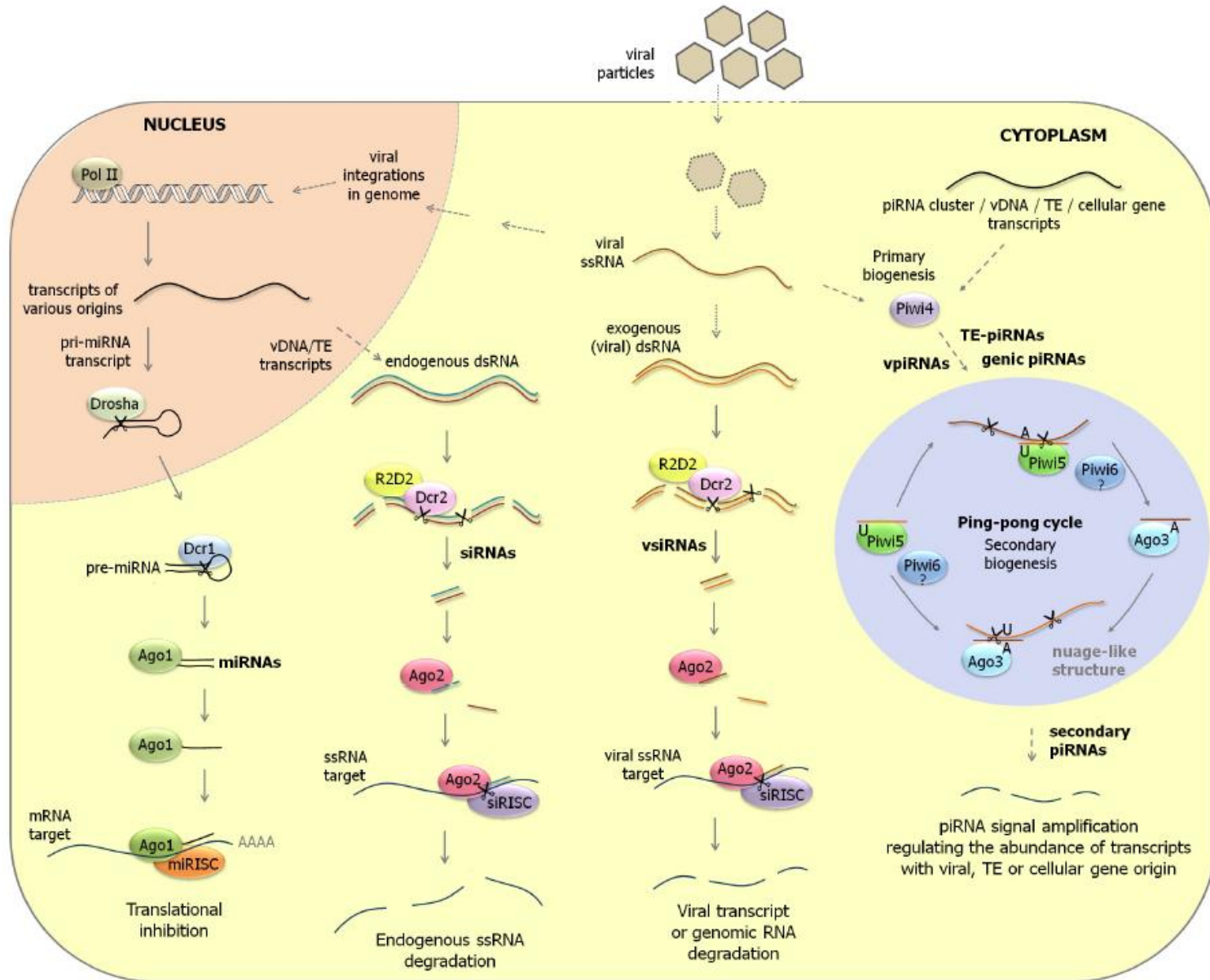
- Διερεύνηση του **RNAi μηχανισμού** ως **αντιϊκής απόκρισης** κατά τη διάρκεια μολύνσεων από αρμποϊούς.
- Αν και σε ποιο βαθμό μπορούν οι αρμποϊοί (υπό εμμένουσα μόλυνση) να λειτουργήσουν ως **φορείς μεταγωγής σημάτων RNAi στα κουνούπια**.
- **Ανασυνδυασμένοι αρμποϊοί** ως **ϊικοί φορείς** για την πρόκληση αποσιώπησης.

Αρμποϊοί

- Οι **αρμποϊοί (Arboviruses, arthropod-borne viruses)** αποτελούν μια μη ταξινομική ομάδα ιών, οι οποίοι μεταδίδονται στον άνθρωπο και τα ζώα μέσω αρθρόποδων-φορέων, που συνήθως είναι έντομα (κουνούπια, σκνίπες, κ.ά. Δίπτερα) και κρότωνες (Acari, Arachnida).
- Συνηθέστερα RNA ιοί.
- *Togaviridae* (SINV, SFV, CHIKV, ONNV)
Flaviviridae (DENV, WNV, ZIKV)
Bunyavirales (RVFV, LACV, SBV, BUNV)
- Μπορούν να προκαλούν **μακράς διάρκειας εμμένουσες (persistent) μολύνσεις** στα κουνούπια, οι οποίες **δεν επηρεάζουν τη φυσιολογία των εντόμων-φορέων.**



Τα μονοπάτια του RNAi μηχανισμού στα κουνούπια



Συμπεράσματα - Προτάσεις

- Για την εγκαθίδρυση μιας **εμμένουσας μόλυνσης**, είναι απαραίτητο να υπάρχει μια **λεπτή ισορροπία μεταξύ του ιού και του ανοσοποιητικού συστήματος του κουνουπιού**, προκειμένου να ρυθμίζεται η αντιγραφή και η διατήρηση του ιού χωρίς όμως να προκαλούνται σοβαρές επιπτώσεις που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη μετάδοση σε νέο ξενιστή.
- **Ανασυνδυασμένοι αρμποϊοί ή σχετικοί εξειδικευμένοι για τα κουνούπια ιοί** (π.χ. Nienokoue virus, Eilat virus) θα μπορούσαν να αναπτυχθούν ως αποτελεσματικοί φορείς VIGS στα κουνούπια, στα πλαίσια της **ανάλυσης γονιδιακών λειτουργιών ή ως νέου τύπου εντομοκτόνα**.
- **Προσεκτικός σχεδιασμός των αλληλουχιών-στόχων** για αποφυγή δράσης εκτός στόχου (off-target effect) - **VSRs**

Ευχαριστίες...



**Insect Molecular Genetics
& Biotechnology Lab,
NCSR Demokritos**

L. Swevers *PhD*
B. Labropoulou *PhD*
D. Kontogiannatos *PhD*
D. Stefanou



**Dept. of Crop Protection,
Faculty of Bioscience Engineering,
Gent, Belgium**

Prof. G. Smagghe
C.N.T. Taning *PhD*



**School of Life Sciences,
Guangzhou University,
Guangzhou, China**

J. Liu *PhD*



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑνεΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη
Partnership Agreement
2014 - 2020

Co-financed by Greece and the European Union



Co-financed by Greece and the European Union

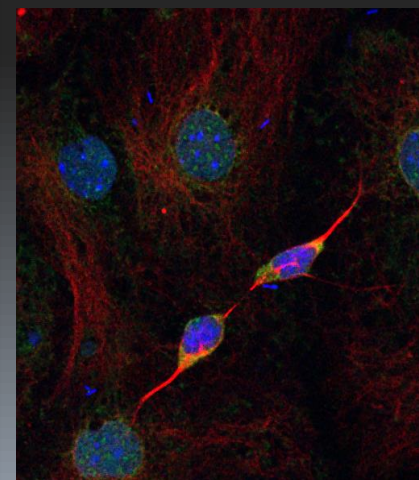
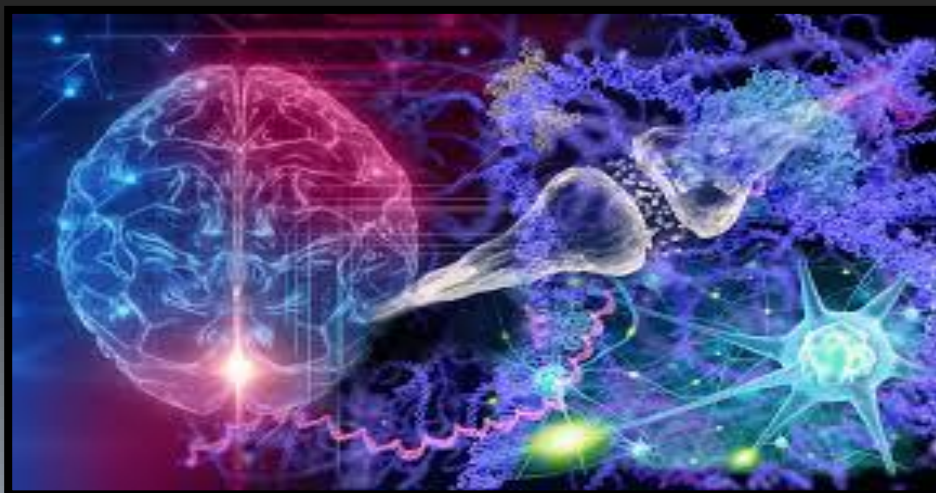
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ



ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ



ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΩΝ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ: ΣΤΟΧΕΥΟΝΤΑΣ ΣΕ ΝΕΑ
ΟΠΙΟΕΙΔΗ

Π. Παλλάκη, Χ. Καρουσιώτης, Α. Συμεώνωφ και Η.Γεωργούση



Παρουσίαση Παραδοτέων Προγράμματος "SANITURA", 26 Απριλίου 2021



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ
ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ «SANITURA» (MIS 5002514)**



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



**HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS**

ΕΡΑ_ηΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION

ΕΣΠΑ
2014-2020
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη
Partnership Agreement
2014 - 2020

Co-financed by Greece and the European Union

Οπιοειδείς Υποδοχείς στην υγεία, την ασθένεια και την παραγωγή νέων φαρμάκων



Μηχανισμοί
λειτουργίας των
υποδοχέων που
συζεύγνυνται με G
πρωτεΐνες:
Οπιοειδείς Υποδοχείς

Προσδιορισμός
νέων
σηματοδοτικών
μονοπατιών &
φαρμακολογικών
στόχων

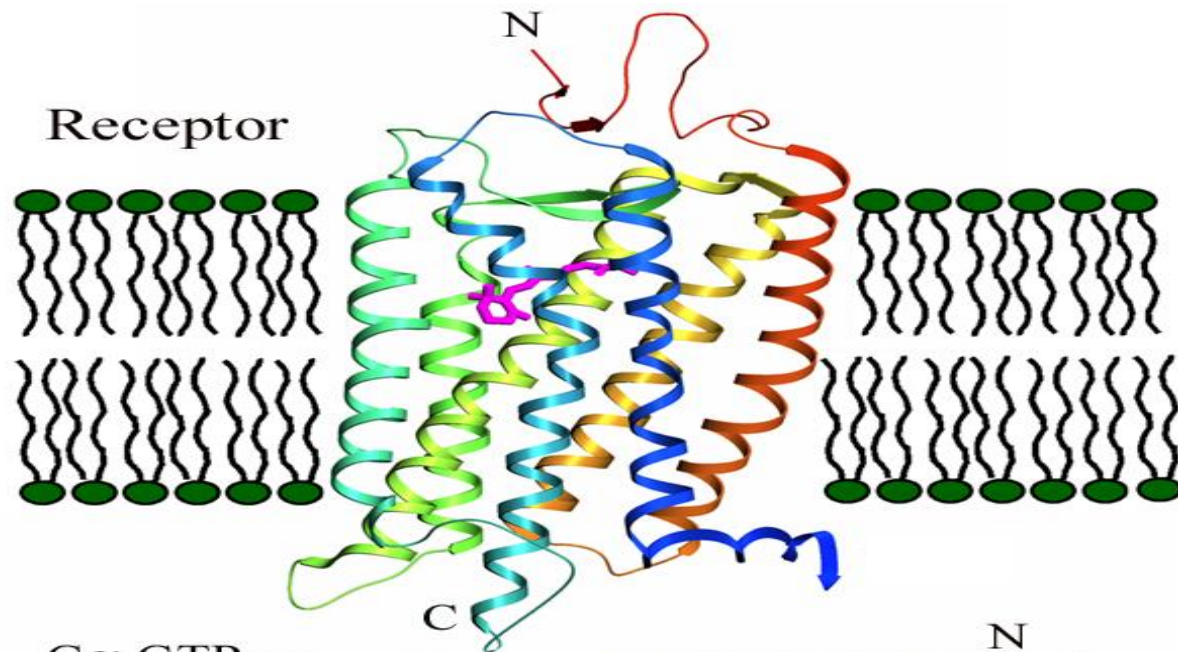
Νέα φάρμακα ..

Προσδιορισμός
νέων βιοενεργών
μορίων με
αναλγητική δράση

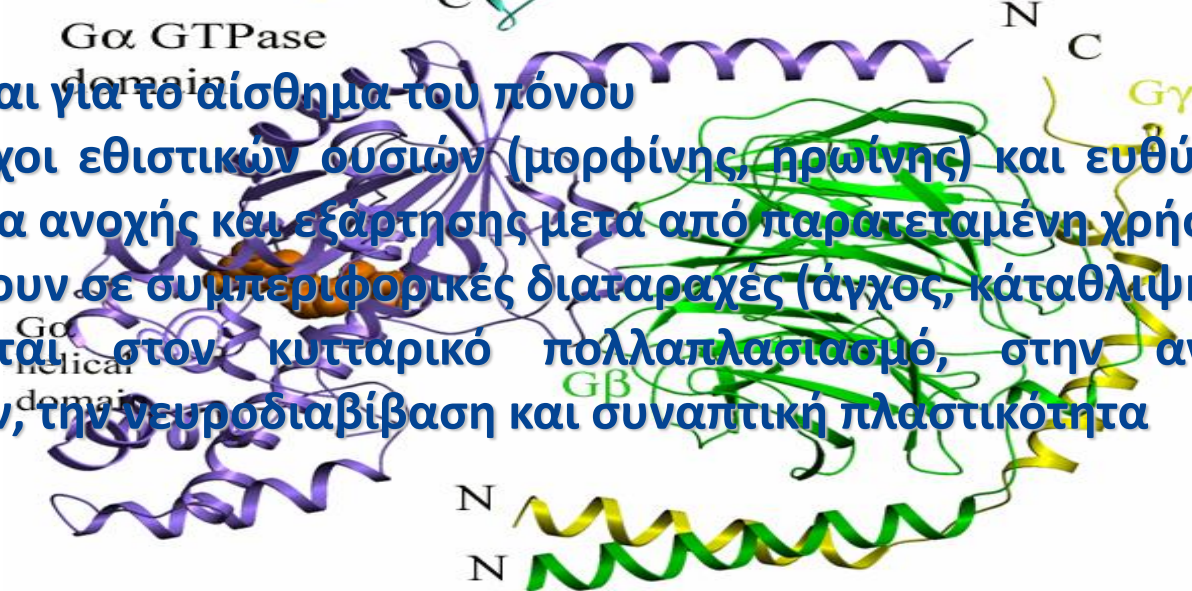


ΟΠΙΟΕΙΔΕΙΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

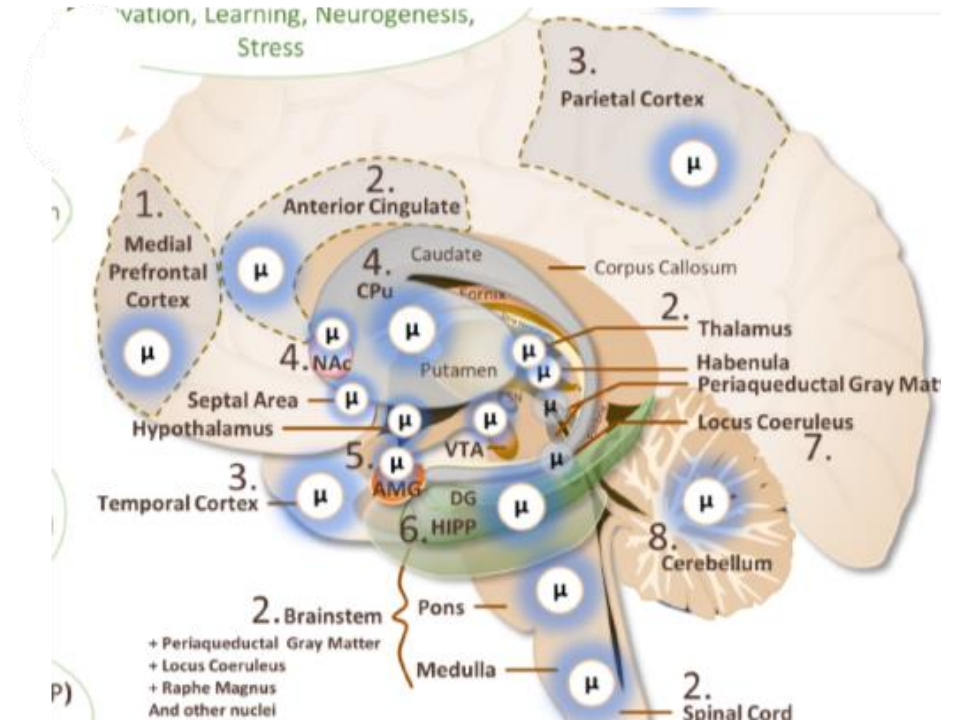
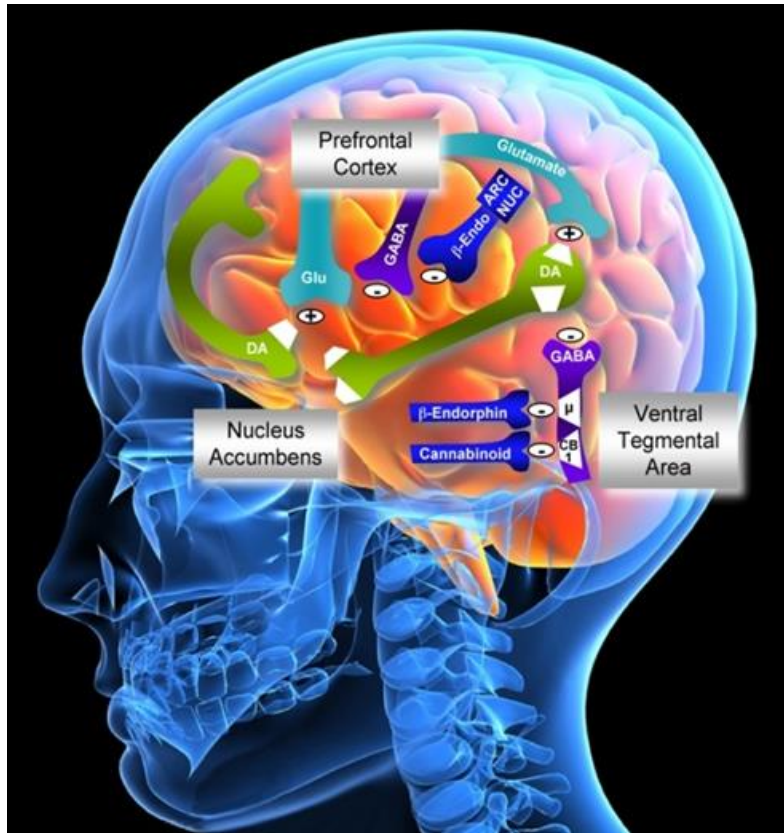
μ-(β-ενδορφίνη) δ-(εγκεφαλίνη) κ-(δυνορφίνη)



- ❖ Ευθύνονται για το αίσθημα του πόνου
- ❖ Είναι στόχοι εθιστικών ουσιών (μορφίνης, ηρωίνης) και ευθύνονται για τα φαινόμενα ανοχής και εξάρτησης μετά από παρατεταμένη χρήση
- ❖ Συμμετέχουν σε συμπεριφορικές διαταραχές (άγχος, κατάθλιψη, στρες)
- ❖ Εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην ανάπτυξη των νευρώνων, την νευροδιαβίβαση και συναπτική πλαστικότητα



Κατανομή των μ, δ and κ-οπιοειδών υποδοχέων στον εγκέφαλο



Φλοιό, Υποθάλαμο
Επικλινή πυρήνα (VTA, Nac, LC)
Αμυγδαλή, Ραβδωτό, Ιππόκαμπο
Ροης, Νωτιαίο μυελό, Γάγγλια ραχιαίας ρίζας
παρεγκεφαλίδα

OPIOID ACTIONS THROUGHOUT THE BODY

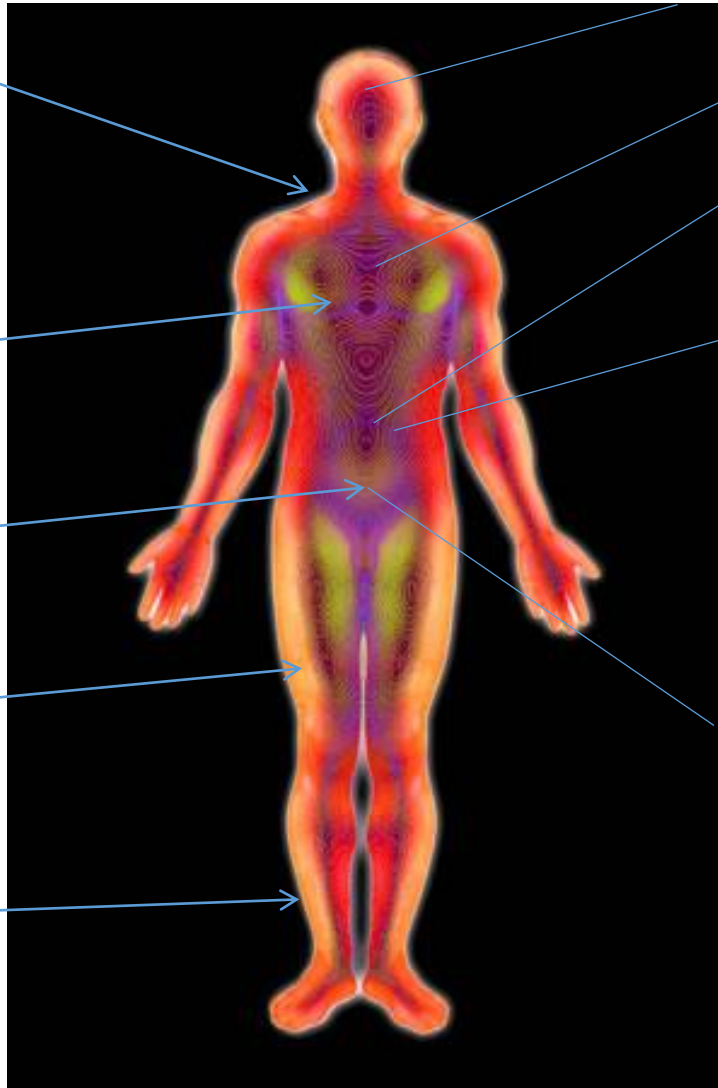
Spinal cord & Dorsal Root Ganglia
Pain and sensory perception

Heart (δ -OR, κ -OR)
Cardioprotection, heart rate

Small intestine, Enteric system - *Constipation*

Skeletal muscle (δ -OR, κ -OR)

Skin - *Epidermis, Fibroblasts, Hair follicles*
Slow wound healing



Brain Microglia- *Neuroinflammation*

Lung - *Cancer*

Pancreas - *weight gain*

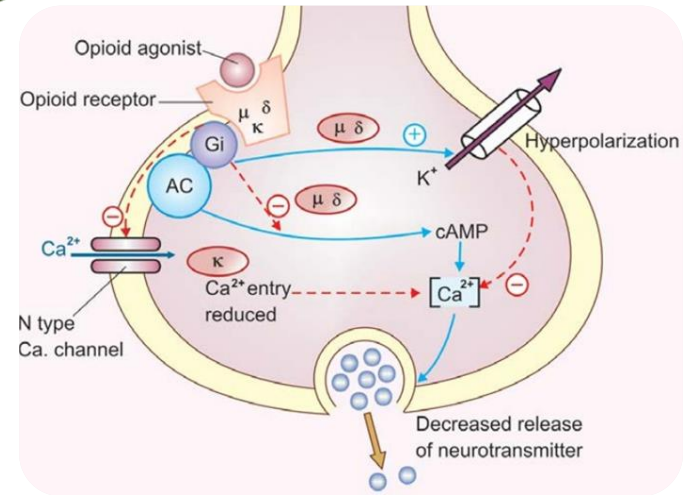
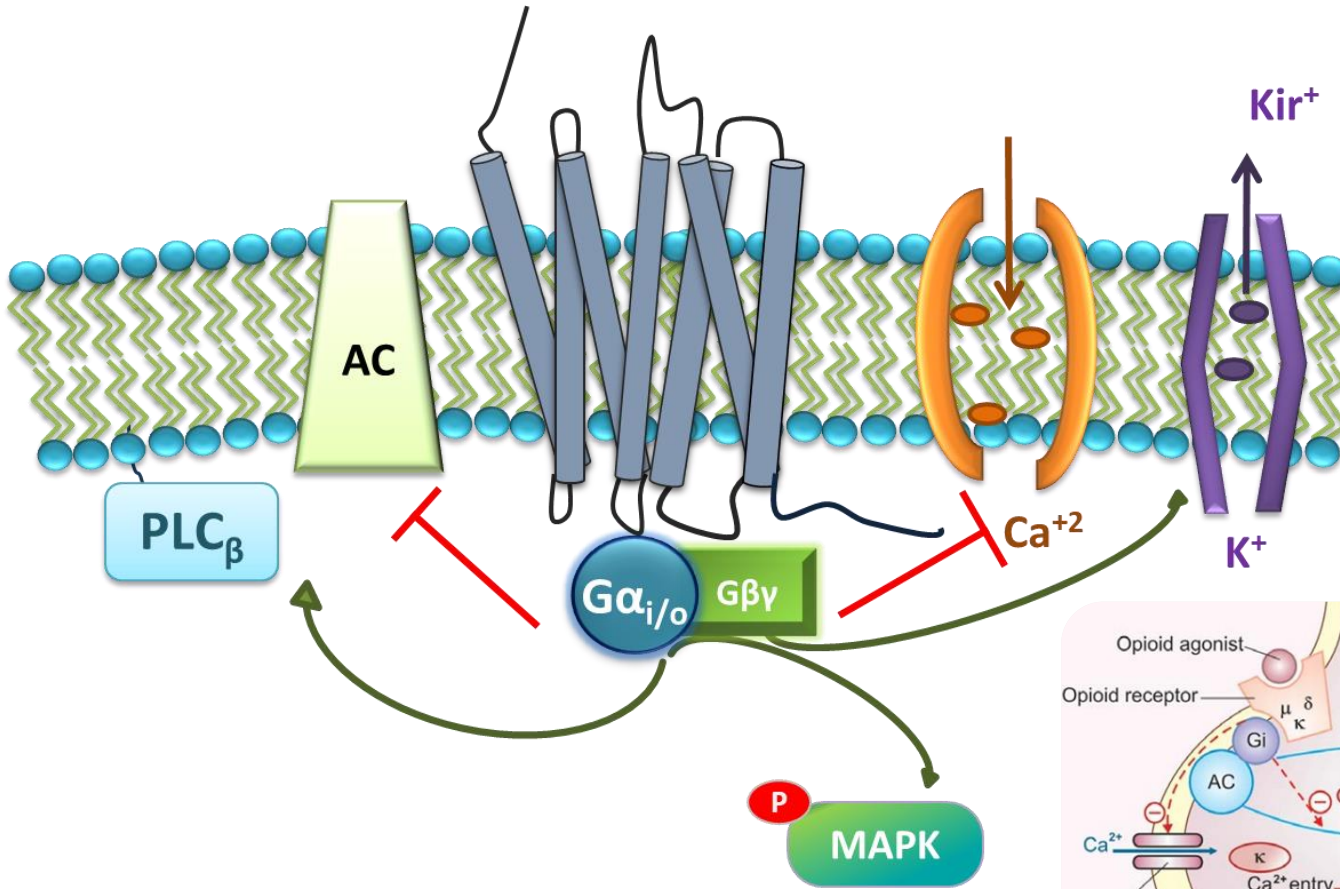
Adrenal gland
Reduce cortisol, Affect immune and stress responses

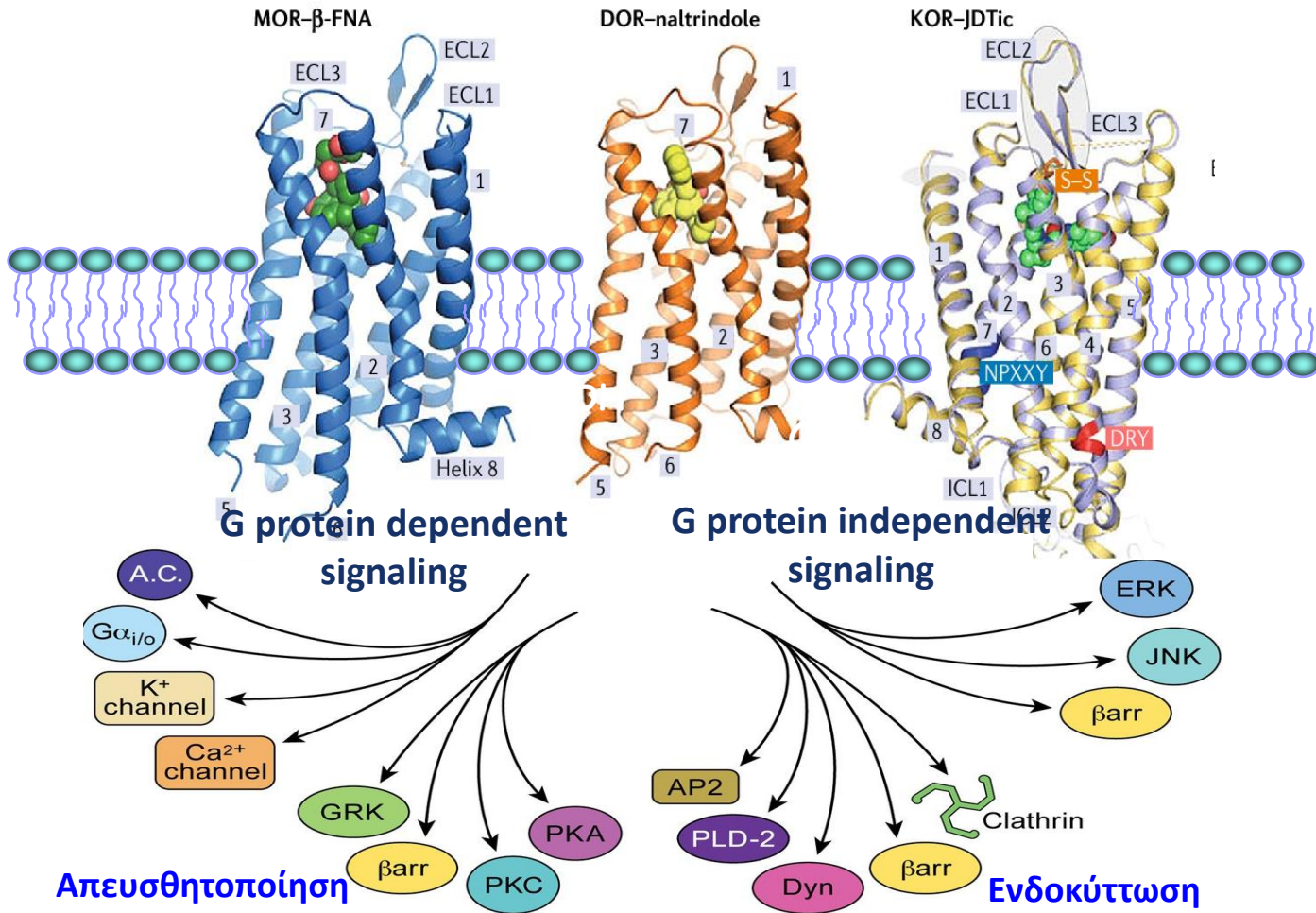
Kidney (δ -OR, κ -OR)
Renal failure, Urinary Retention

Immune system -*lymphocytes, monocytes, macrophages*
Granulocytes- Immunosuppression



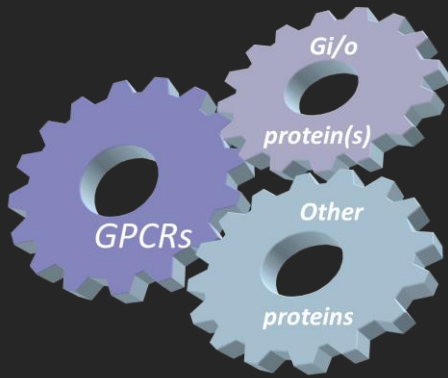
Κλασικό σηματοδοτικό μονοπάτι των οπιοειδών υποδοχέων





Οι GPCRs σχηματίζουν δυναμικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα που περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποδοχέα-υποδοχέα και υποδοχέα-νέων αλληλεπιδρώσεων πρωτεϊνών

Οι αλληλεπιδράσεις αυτές συμβάλλουν στην εναρμόνιση της κυτταρικής σηματοδότησης, στη κυκλοφορία, στον εντοπισμό των υποδοχέων στη μεμβράνη και στη τροποποίηση των φαρμακολογικών ιδιοτήτων τους

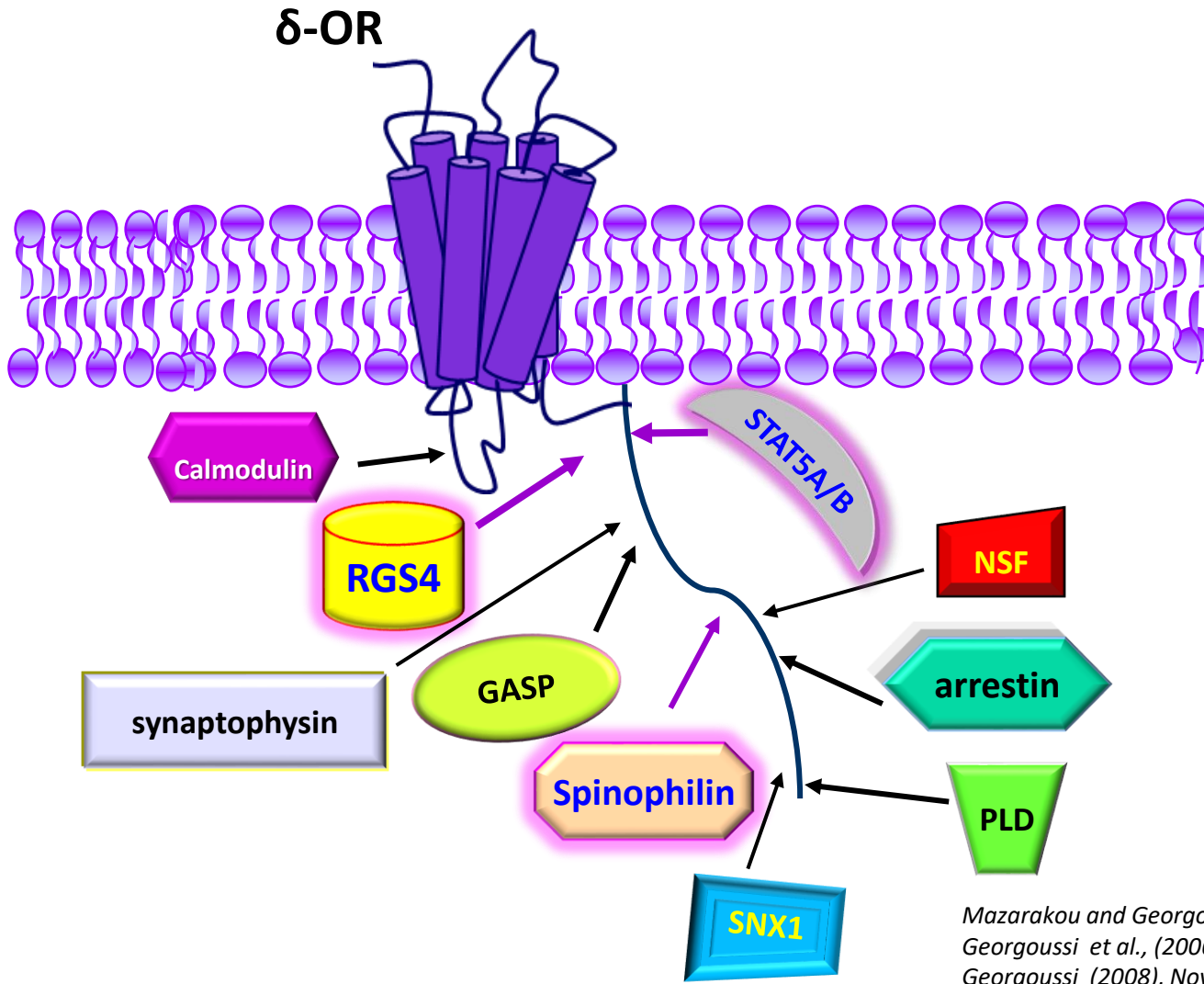


ΘΕΜΕΛΙΩΔΗ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ



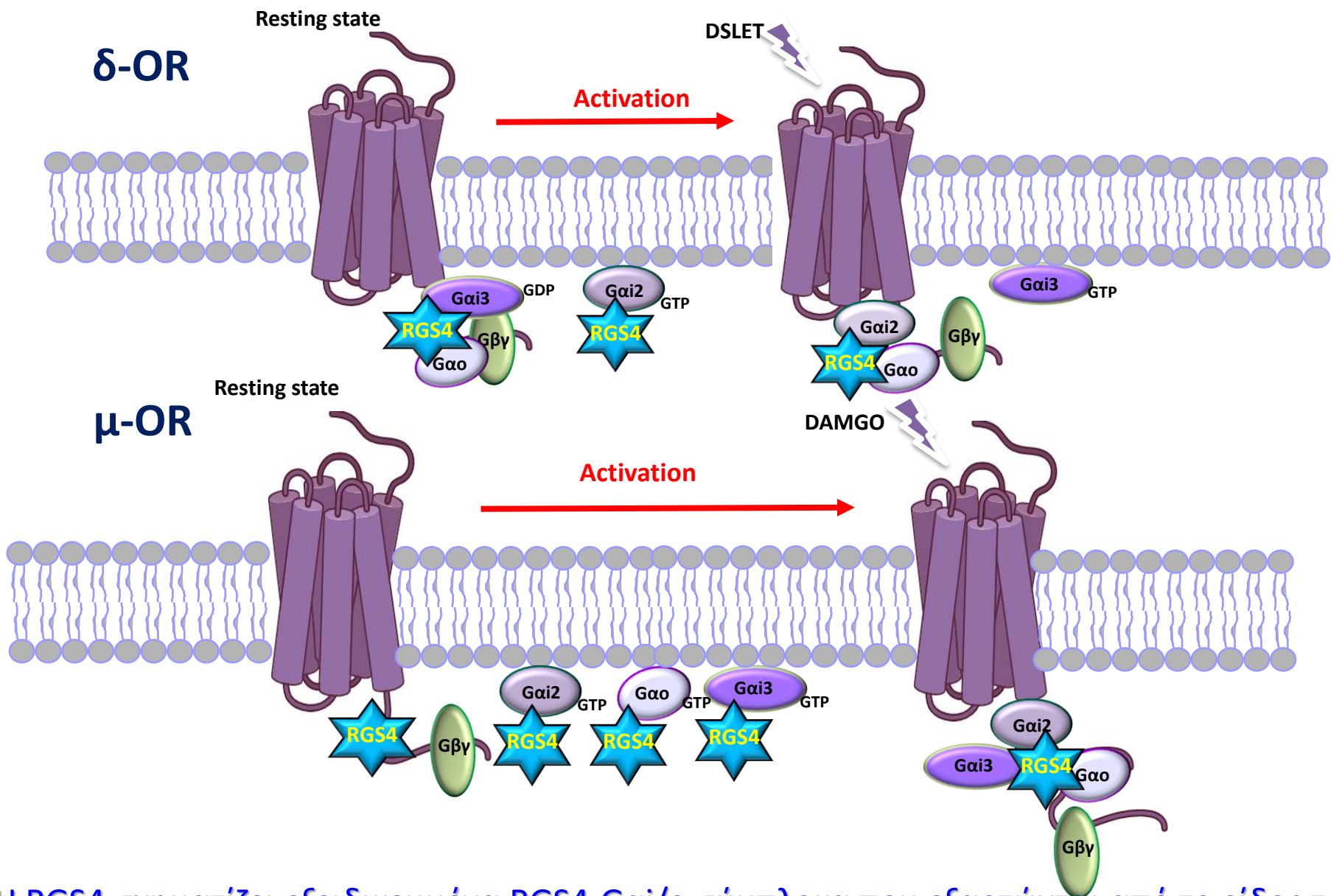
- ✓ Με ποιες πρωτεΐνες πέραν των G πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν οι οπιοειδείς υποδοχείς ?
- ✓ Εξαρτώνται τα σχηματιζόμενα πρωτεϊνικά σύμπλοκα από το είδος του οπιοειδούς προσδέτη ?
- ✓ Ποιος είναι ρόλος και η σημασία των αλληλεπιδράσεων αυτών στη φυσιολογία και ομοίωση του οργανισμού ?

✓ Με ποιες πρωτεΐνες πέραν των G πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν οι οπιοειδείς υποδοχείς ?



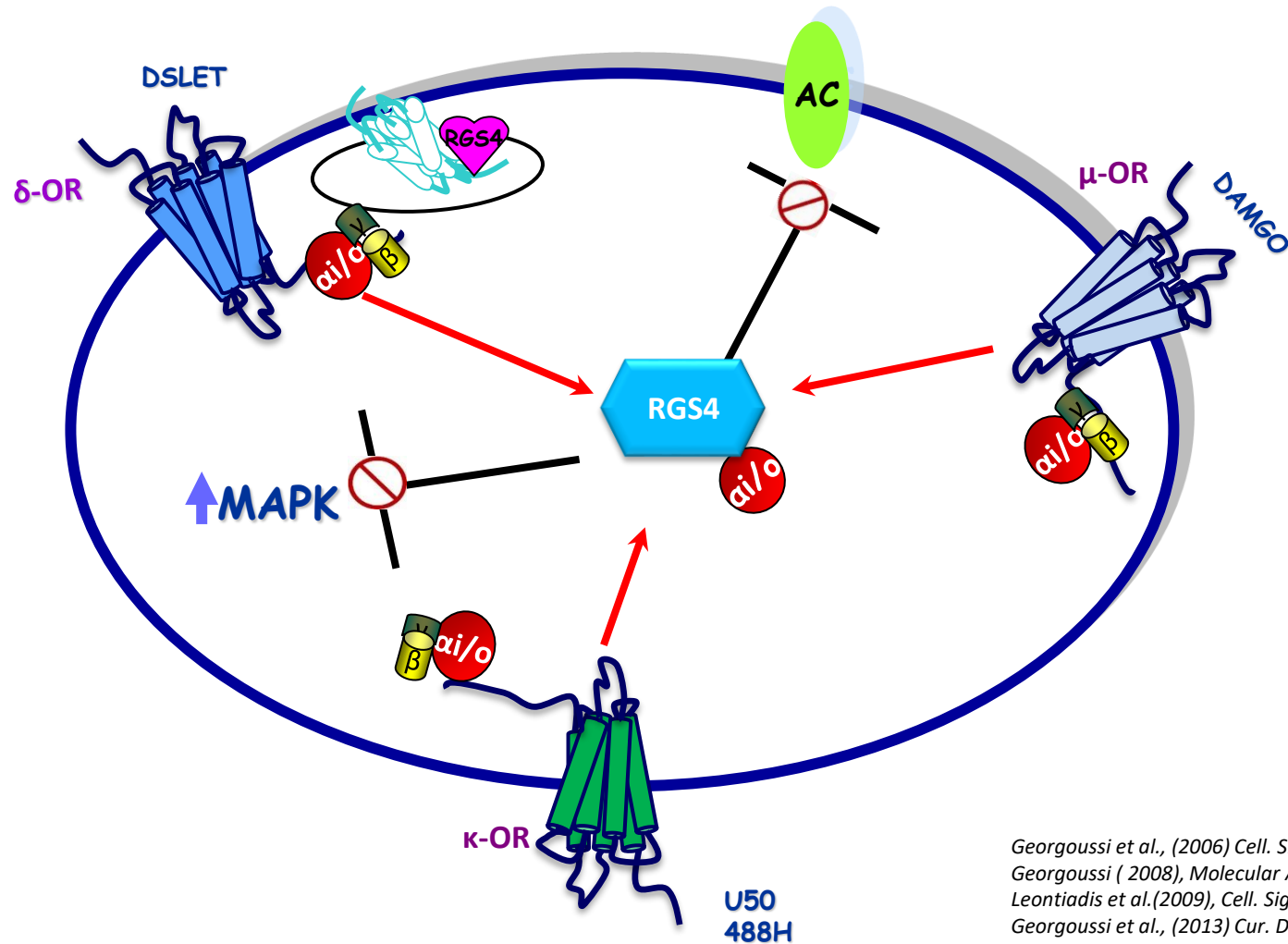
Mazarakou and Georgoussi (2005) Mol. Pharmacol.
Georgoussi et al., (2006) Cell. Signal. 18, 771-81
Georgoussi (2008), Nova Sci. Publ. Inc. 169-206
Leontiadis (2009) Cell.Signal. 21, 218-
Georgoussi et al.,(2012) Curr.Drug Targets,13, 80-102
Foula et al., (2012) Cell. Signal. 4, 2315-28
Papakonstantinou.et al., (2015) Cell. Signal. 27, 104-14

Ποιος είναι ο ρόλος της RGS4 στη σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων ?



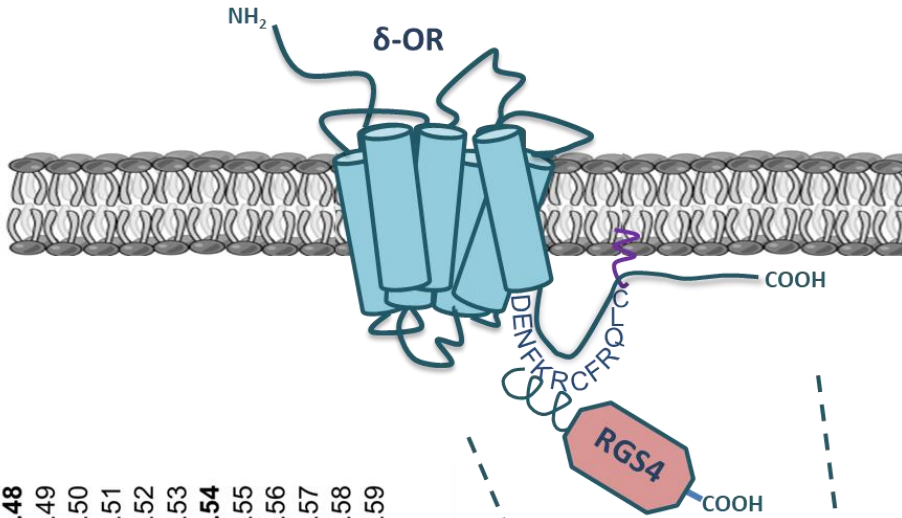
Η RGS4 σχηματίζει εξειδικευμένα RGS4-Gai/o σύμπλοκα που εξαρτώνται από το είδος του υποδοχέα και τον εκάστοτε προσδέτη

Η RGS4 είναι αρνητικός ρυθμιστής της κυτταρικής σηματοδότησης των οπιοειδών υποδοχέων

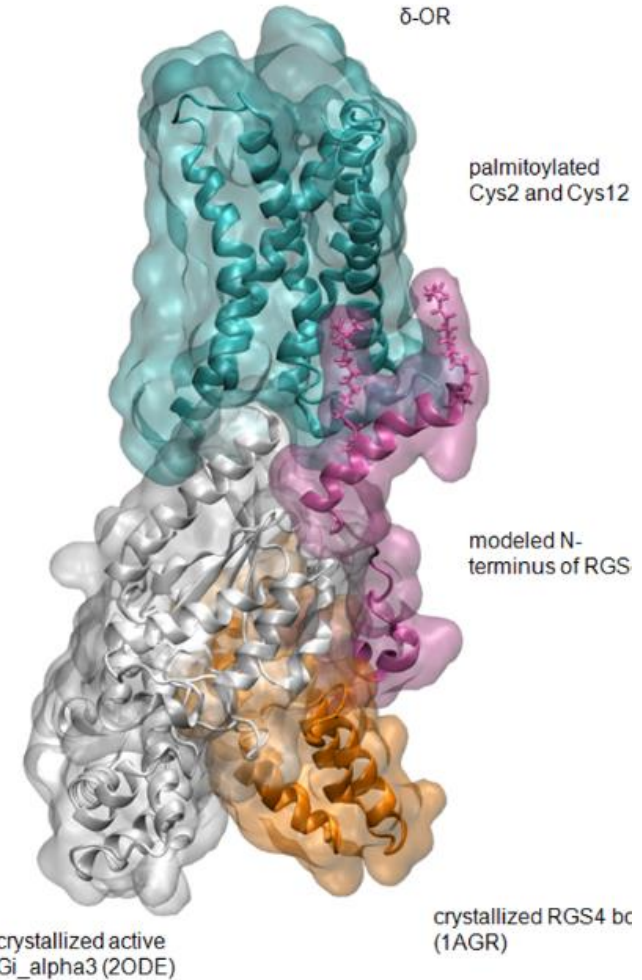
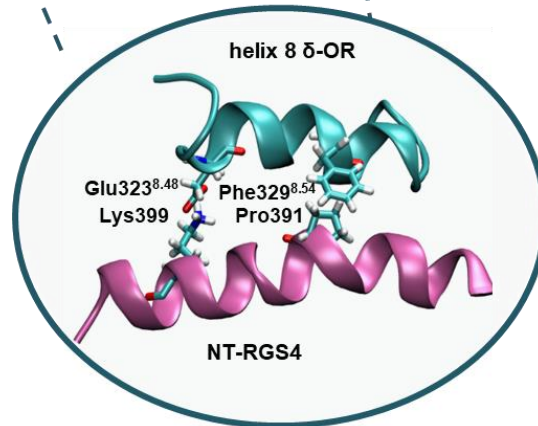


Georgoussi et al., (2006) *Cell. Signal.* 18, 771
Georgoussi (2008), *Molecular Aspects of GPCRs*, 6, 169
Leontiadis et al. (2009), *Cell. Signal.* 21, 1218
Georgoussi et al., (2013) *Cur. Drug. Targets* 13, 80
Papakonstantinou et al., (2015) *Cell.Signal.* 27, 104

Χαρτογράφηση των θέσεων επαφής του συμπλόκου μεταξύ του δ-οπιοειδούς υποδοχέα με τις RGS4 και Για πρωτεΐνες



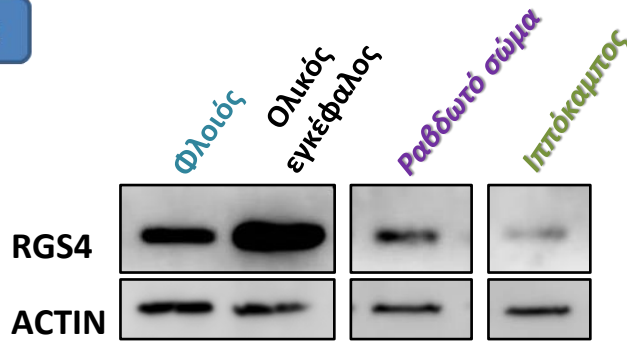
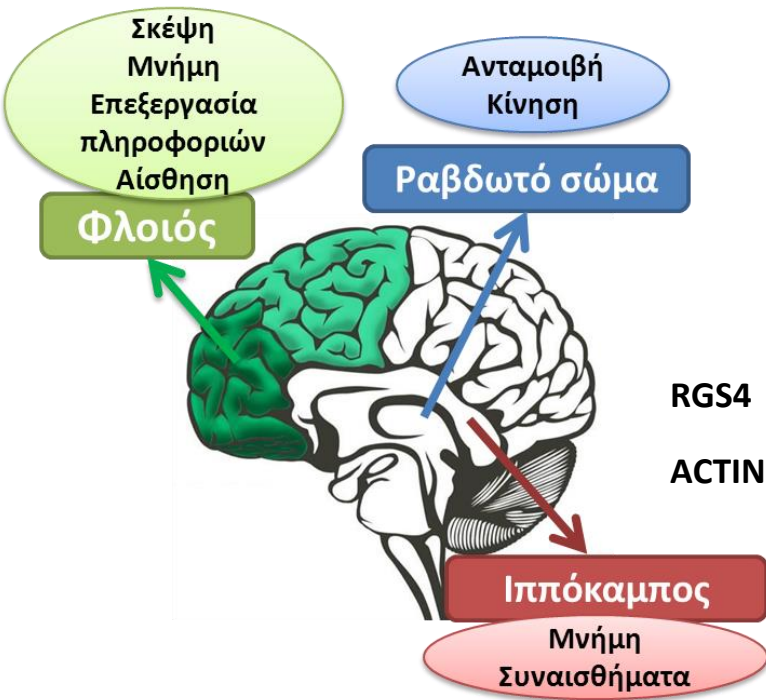
	8:47	8:48	8:49	8:50	8:51	8:52	8:53	8:54	8:55	8:56	8:57	8:58	8:59
δ-OR	D	E	N	F	K	R	C	F	R	Q	L	C	R
κ-OR	D	E	N	F	K	R	C	F	R	D	F	C	F
μ-OR	D	E	N	F	K	R	C	F	R	E	F	C	I



Συνεργασία Παν/μιο Pompeu Fabra, Βαρκελώνη, Ισπανία

Η αλληλεπίδραση της RGS4 με τον δ-οπιοειδή υποδοχέα (δ-OR) γίνεται μεταξύ των αμινοξέων F329, E323 της έλικας 8 του δ-OR και των αμινοξέων P9, K17 στο NH2-άκρο της RGS4

RGS4



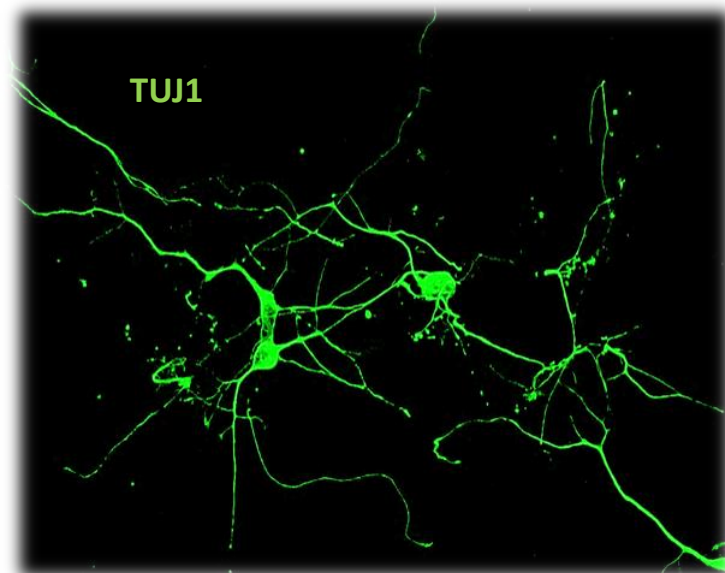
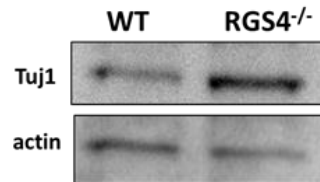
Νευροεκφυλιστικές ασθένειες

- Σχιζοφρένεια
- Parkinson
- Alzheimer

- ✓ Πόνος
- ✓ Άγχος
- ✓ Εξάρτηση



WT RGS4^{-/-}



Αυξημένη νευρωνική ανάπτυξη

- Αισθητικό-κινητικά προβλήματα
- Μεγαλύτερη ανοχή στον πόνο

Προσδιορισμός
νέων
σηματοδοτικών
μονοπατιών &
φαρμακολογικών
στόχων



2.3. Παραδοτέο:
Προσδιορισμός νέων
φαρμακολογικών
στόχων που
συμμετέχουν στη
νευριτική ανάπτυξη και
διαφοροποίηση μετά
από έκθεση
σε οπιοειδή

Π.2.3α. Ρόλος
της RGS4 στη
κυτταρική
επιβίωση και
διαφοροποίηση

Π.2.3β Μελέτη
του
μηχανισμού
της
αυτοφαγίας
από οπιοειδή
ανάλογα

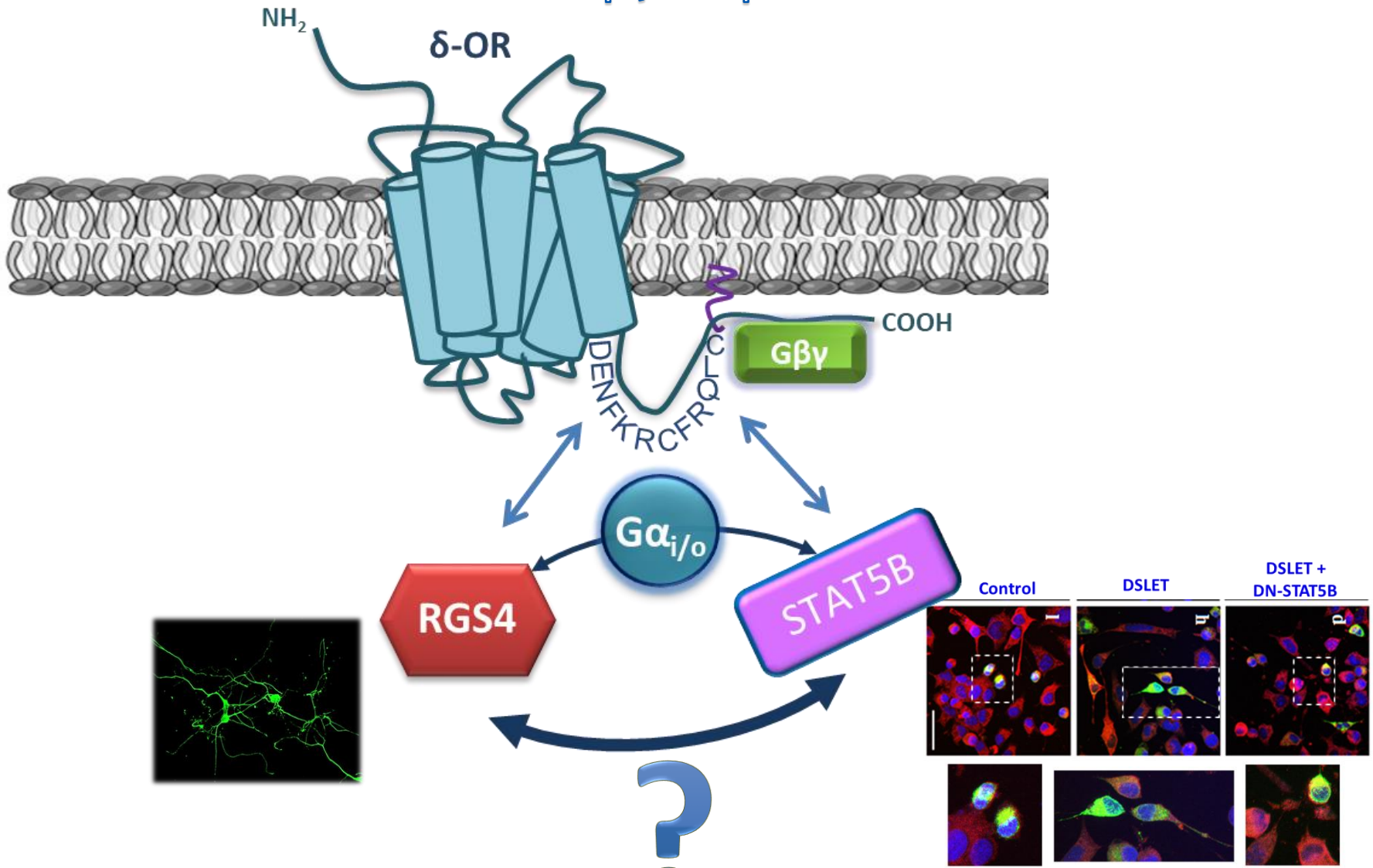


Co-financed by Greece and the European Union

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

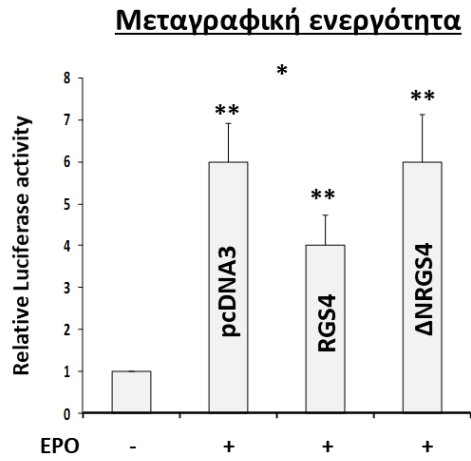
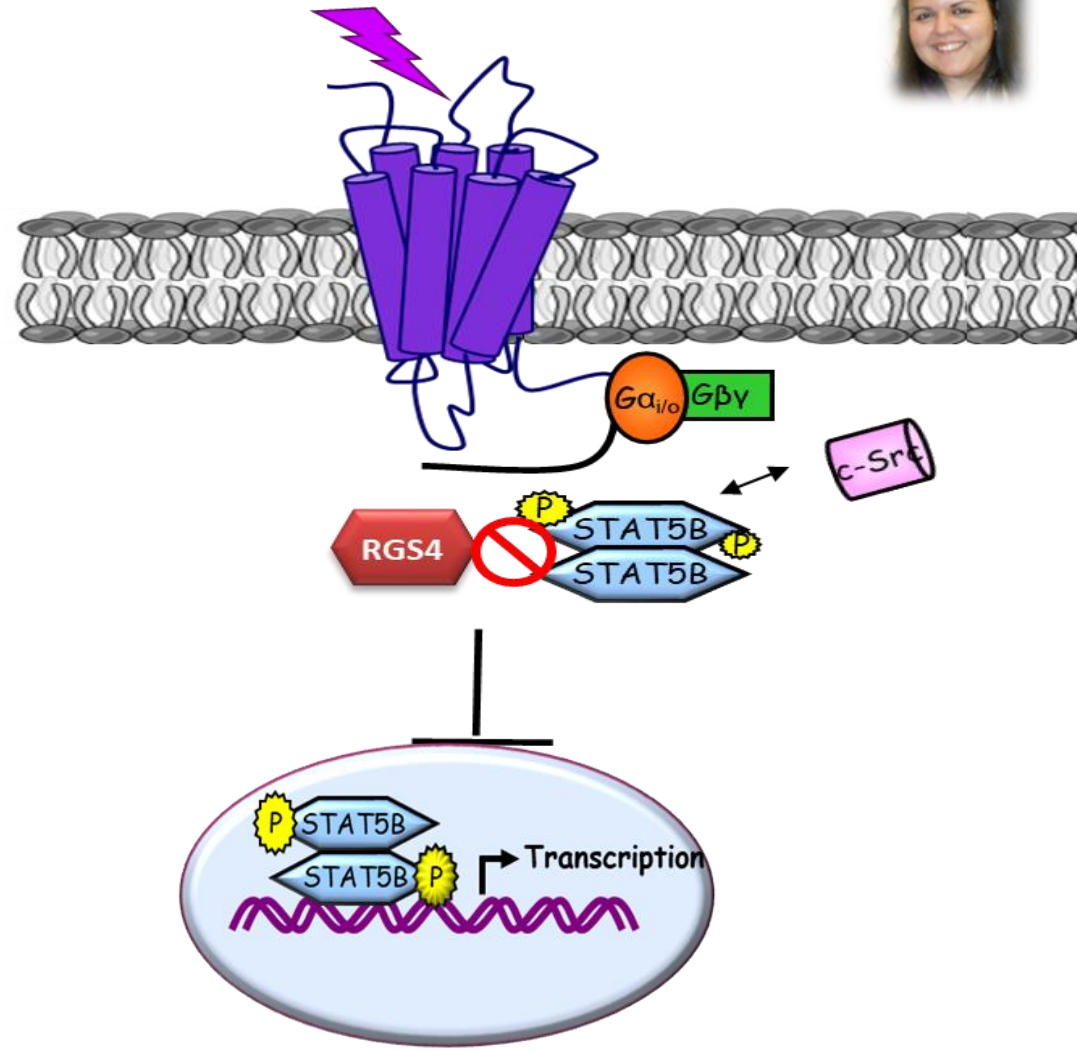
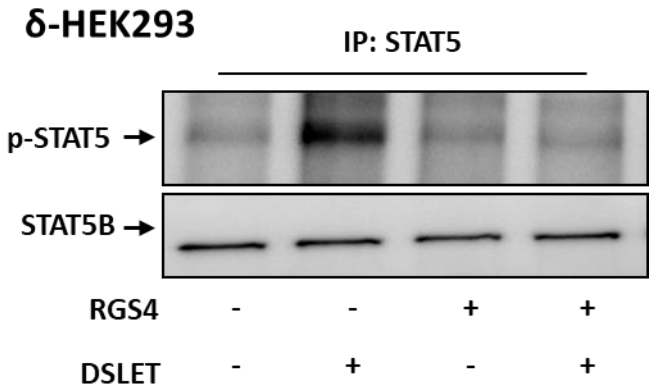
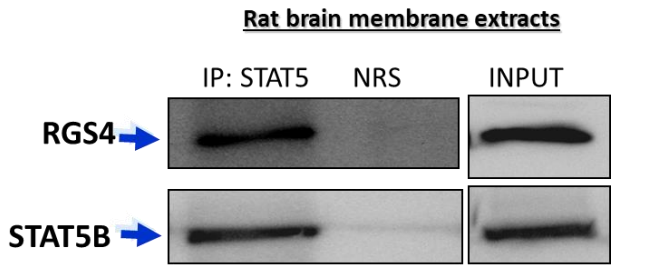
Παραδοτέα- Προγράμματος "SANITURA" 23,26, 27 Απριλίου 2021

Συμμετέχει η RGS4 στην νευριτική ανάπτυξη από οπιοειδή ανάλογα και αν ναι με ποιο μηχανισμό?



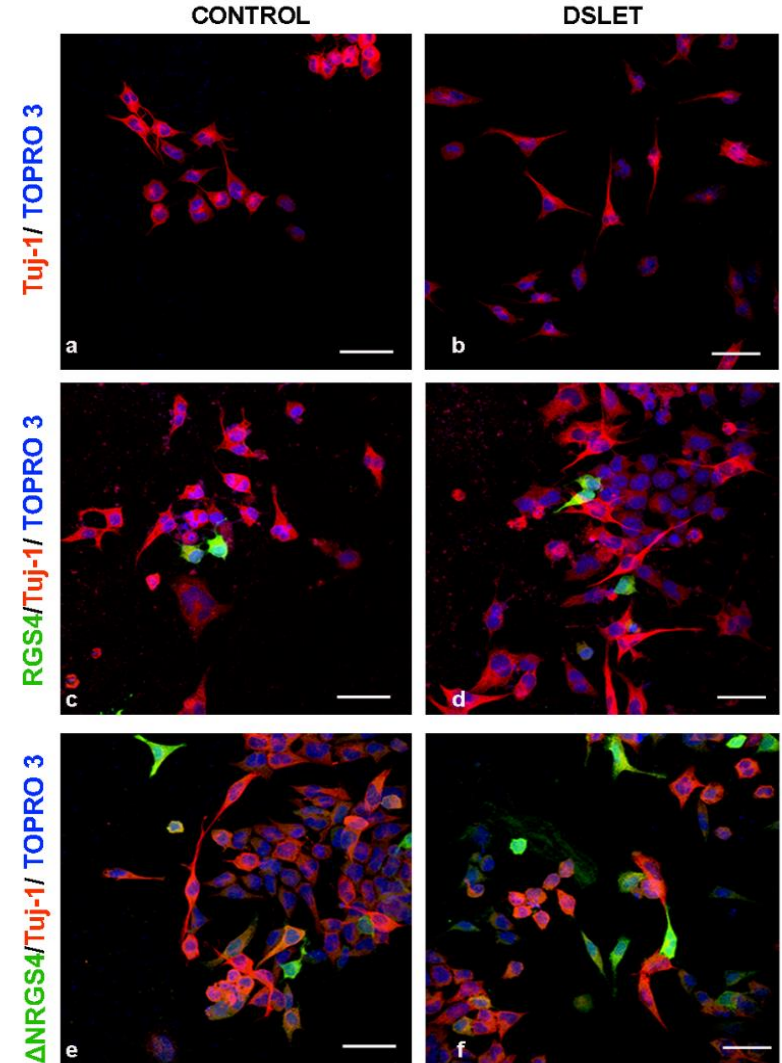
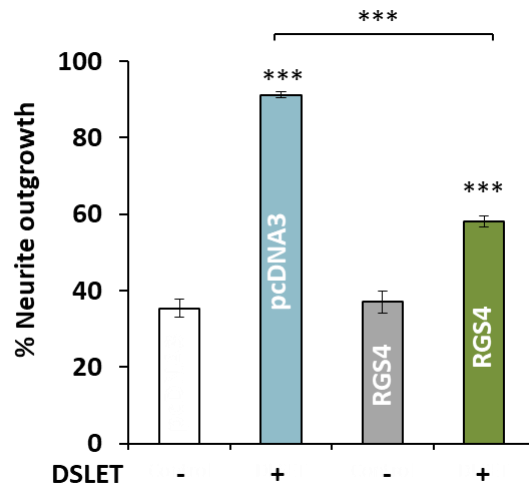
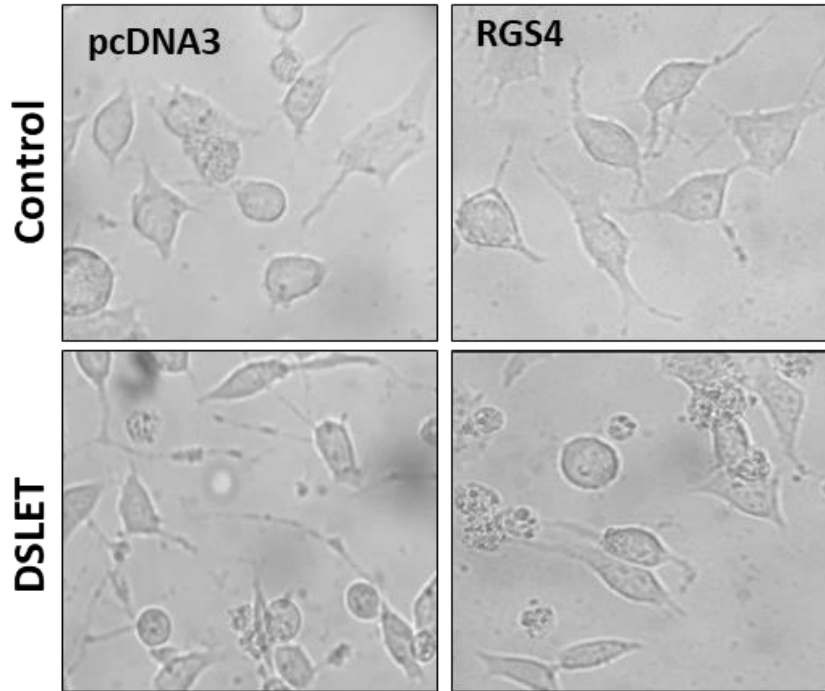
Georganta et al.(2010), *Neuropharmacology* 59, 139-148
 Georganta et al.(2013) *J. Neurochem.* 127, 329-341

Αλληλεπιδρά η RGS4 με τον μεταγραφικό παράγοντα STAT5B ?



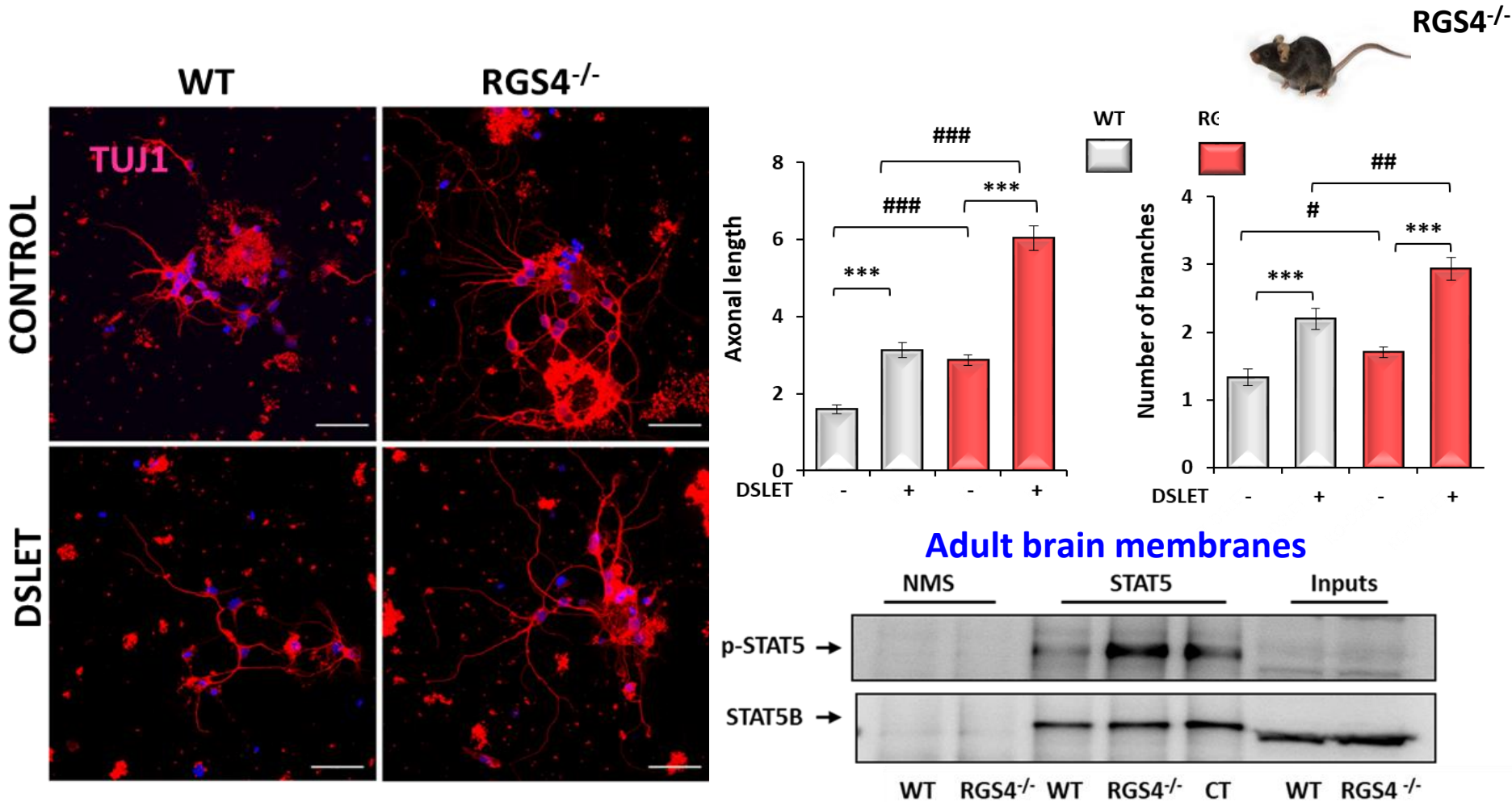
Η RGS4 αλληλεπιδρά με τον STAT5B και παρεμποδίζει την μεταγραφική ενεργότητα του

Συμμετέχει η RGS4 σε αλλαγές της νευριτικής ανάπτυξης από οπιοειδή ?



Η RGS4 αναστέλλει την νευριτική ανάπτυξη μετά από ενεργοποίηση του δ-OR

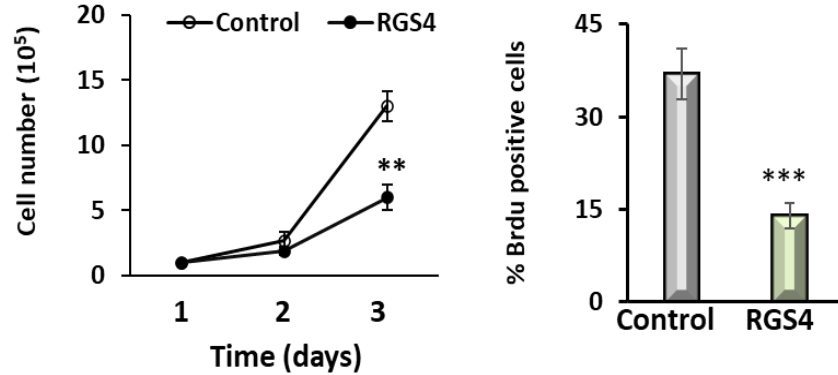
Συμμετέχει η RGS4 σε αλλαγές της νευριτικής ανάπτυξης από οπιοειδή ?



Η RGS4 ρυθμίζει την ανάπτυξη των νευραξόνων και τον αριθμό των νευρικών διακλαδώσεων μέσω ενός μηχανισμού που συμμετέχει η φωσφορυλίωση του STAT5B μεταγραφικού παράγοντα

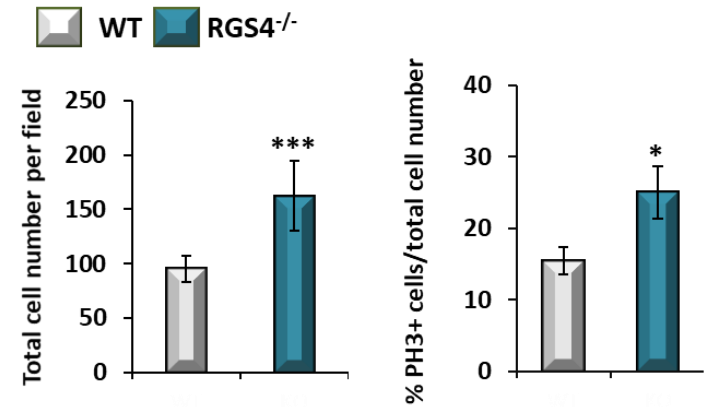
Η RGS4 συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό νευρικών κυττάρων

Neuro-2A

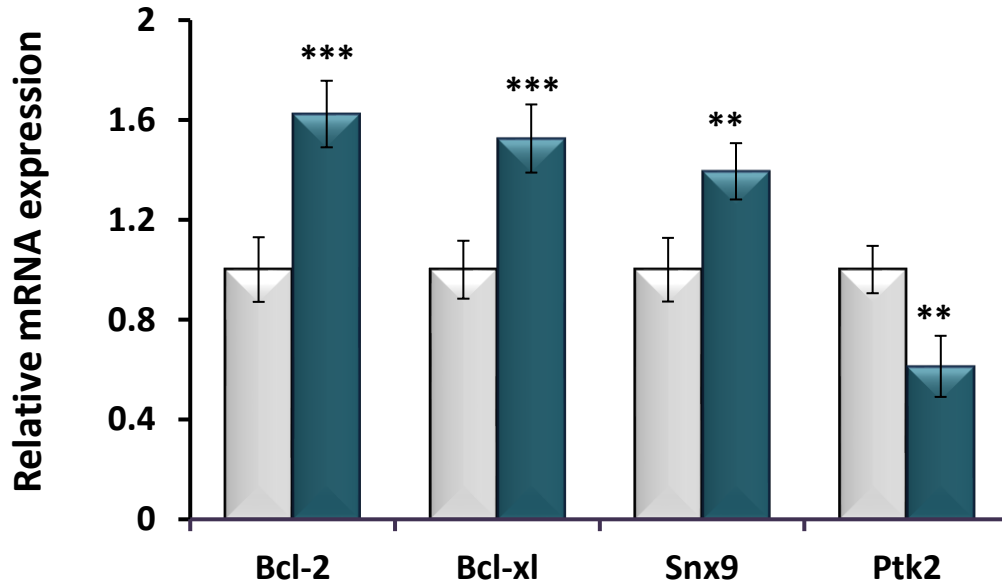


Έκφραση της RGS4 μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού Neuro-2A κυττάρων

Ενήλικα νευροβλαστικά κύτταρα (NSCs)

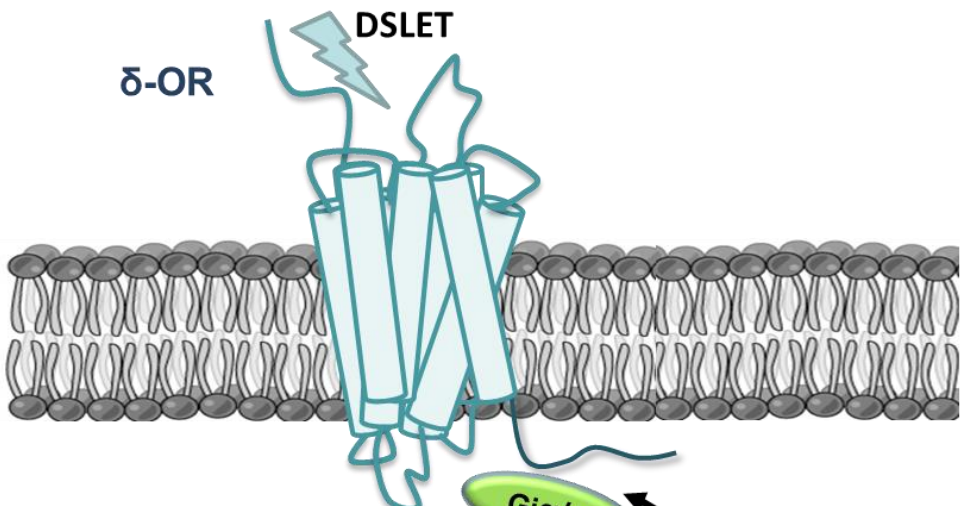


Απαλοιφή της RGS4 αυξάνει τον πολλαπλασιασμό σε απομονωμένα νευρικά βλαστοκύτταρα



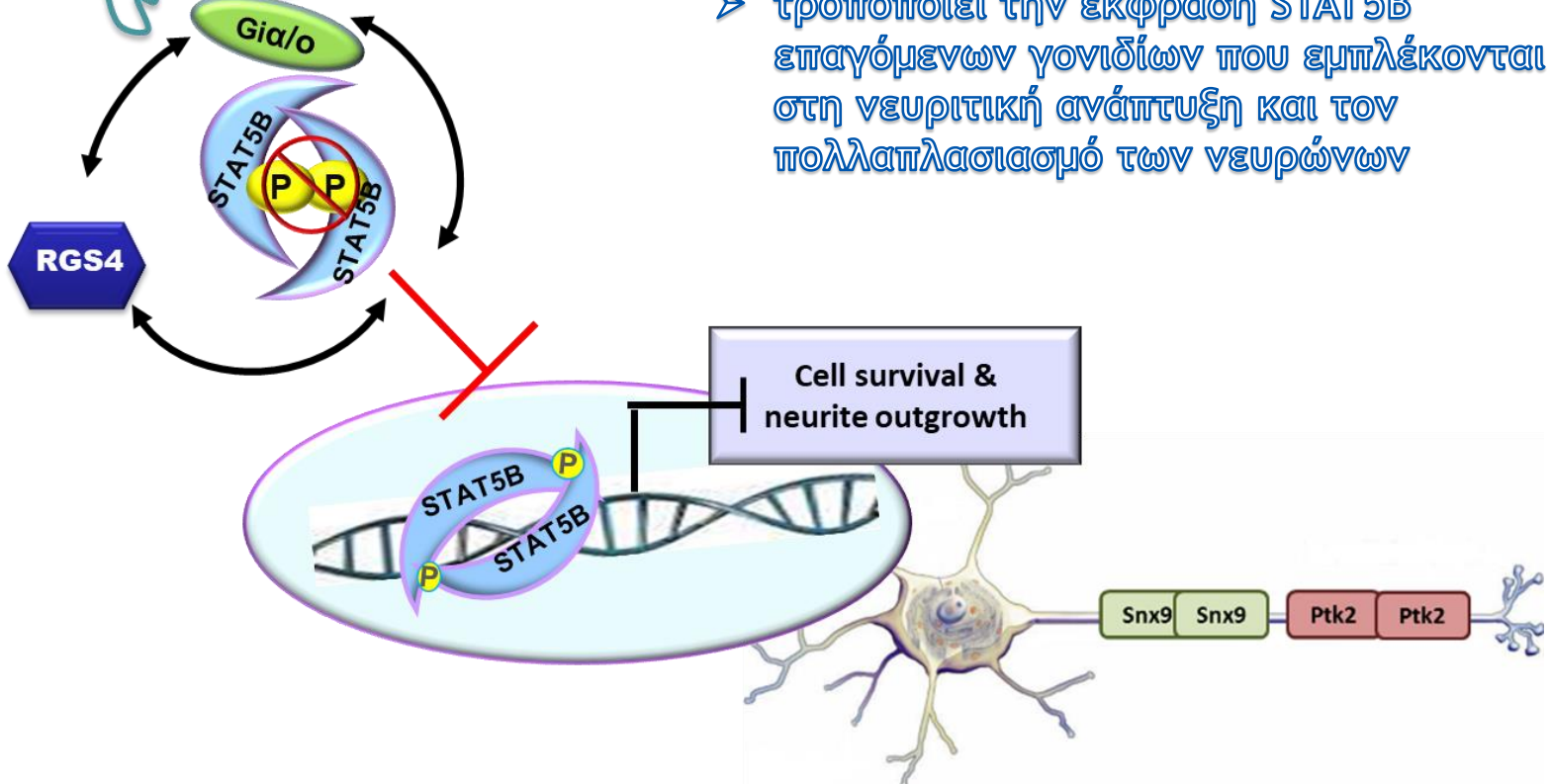
Η RGS4 ρυθμίζει την μεταγραφή STAT5-επαγόμενων αντιαποπτωτικών γονιδίων και γονιδίων που συμμετέχουν στην αξονογένεση σε νευρικά βλαστοκύτταρα

Μοντέλο ενός νέου σηματοδοτικού μονοπατιού του δ-οπιοειδούς υποδοχέα

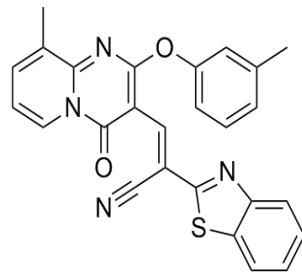
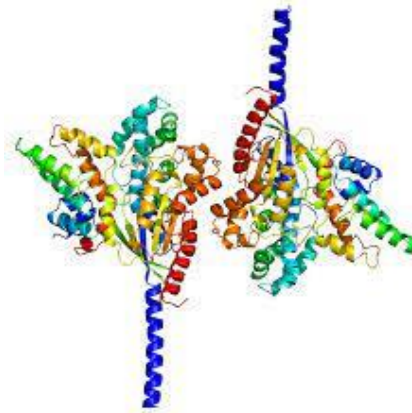


Η RGS4 αλληλεπιδρά με την STAT5B

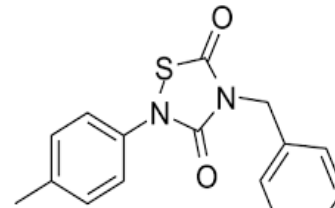
- μειώνει την μεταγραφική ενεργότητα της STAT5B και
- τροποποιεί την έκφραση STAT5B επαγόμενων γονιδίων που εμπλέκονται στη νευριτική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των νευρώνων



RGS4 είναι ένας νέος φαρμακολογικός στόχος



CCG-63802



CCG-50014F

Μικρά μόρια παρεμποδιστές της RGS4 χρησιμοποιούνται σε προκλινικές μελέτες

και ενδυναμώνουν την δράση των ενδογενών οπιοειδών επιτρέποντας έτσι την χορήγηση μικρότερων δόσεων συνθετικών αναλγητικών με αποτέλεσμα να μειώνεται η ανοχή στα οπιοειδή

Προσδιορισμός
νέων βιοενεργών
μορίων με
αναλγητική δράση



4.2.1 Παραδοτέο:
Φαρμακολογικός
χαρακτηρισμός
αγωνιστών &
ανταγωνιστών
υποδοχέων που
συζεύγγονται με
G πρωτεΐνες

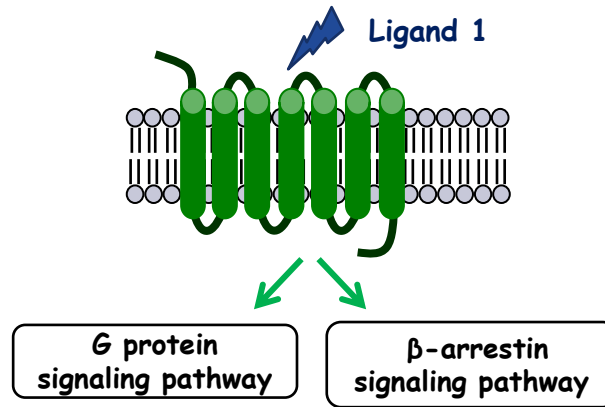
Νέα αναλγητικά
?



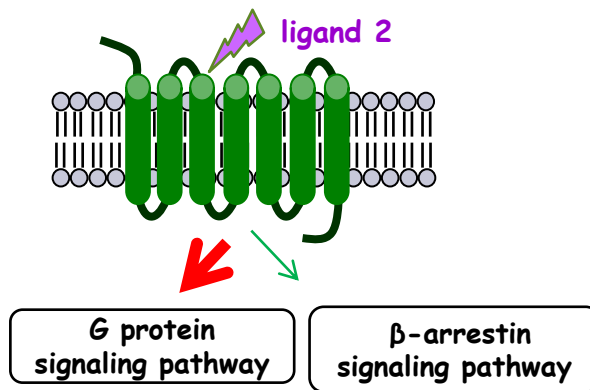
Το σηματοδοτικό μονοπάτι των GPCRs εξαρτάται από το είδος του προσδέτη

(Biased agonism- functional selectivity-λειτουργική επιλεκτικότητα)

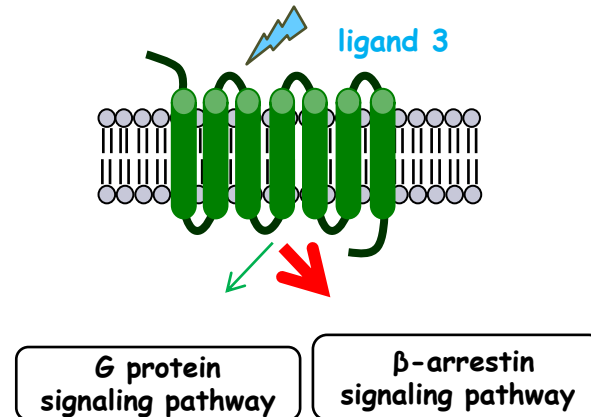
Balanced Signal



G protein Biased ligand



β-arrestin Biased ligand



Novel *N*-Substituted Benzomorphan-Based Compounds: From MOR-Agonist/DOR-Antagonist to Biased/Unbiased MOR Agonists

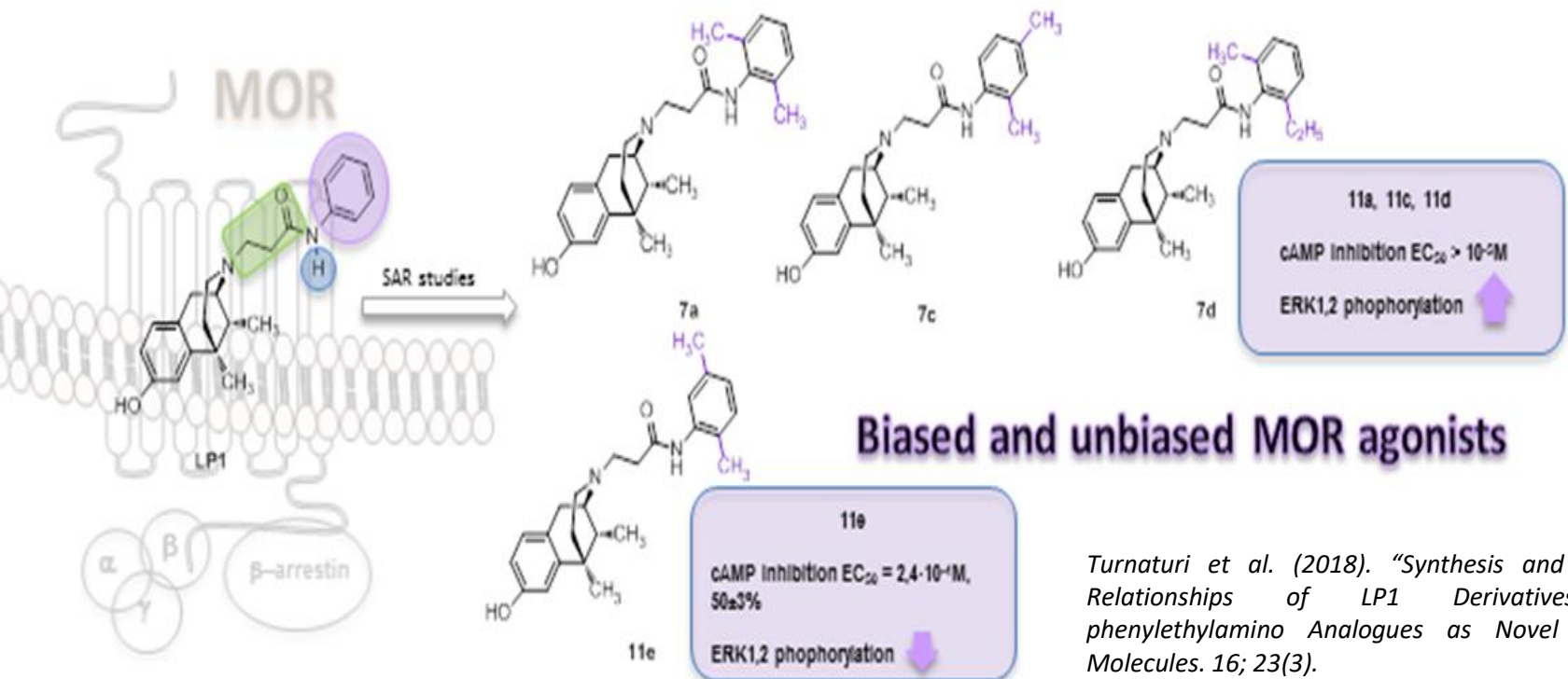
Lorella Pasquinucci, Carmela Parenti,* M. Carmen Ruiz-Cantero, Zafiroula Georgoussi, Paschalina Pallaki, Enrique J. Cobos, Emanuele Amata, Agostino Marrazzo, Orazio Prezzavento, Emanuela Arena, Maria Dichiarà, Loredana Salerno, and Rita Turnaturi*



Cite This: *ACS Med. Chem. Lett.* 2020, 11, 678–685



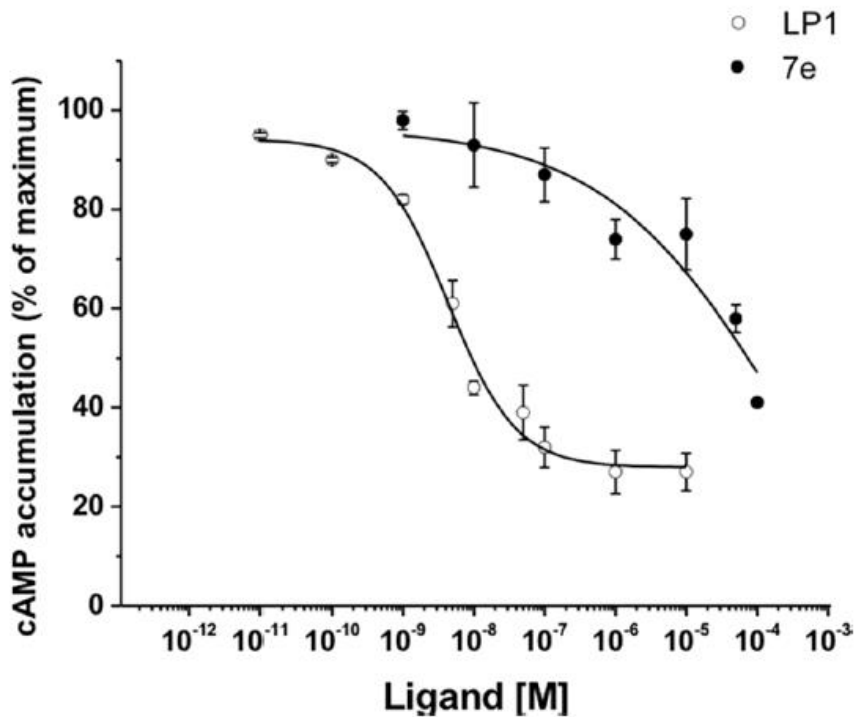
Read Online



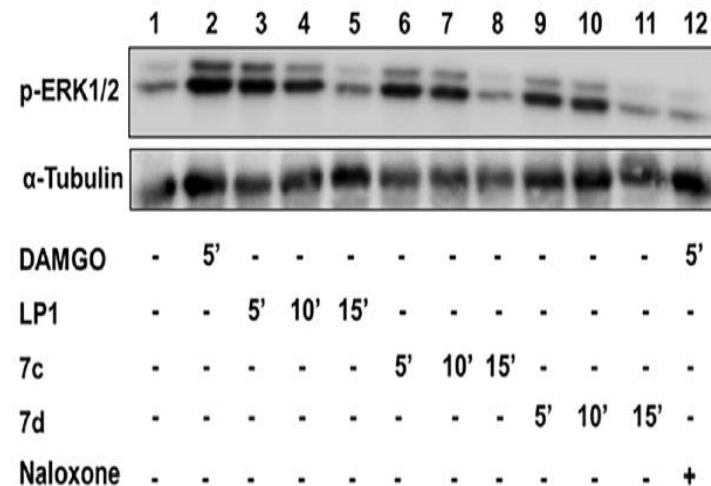
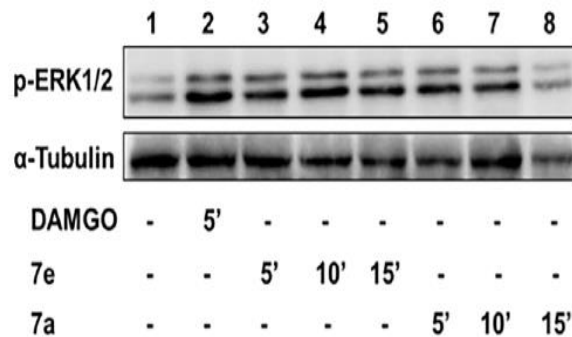
Turnaturi et al. (2018). "Synthesis and Structure-Activity Relationships of LP1 Derivatives: *N*-Methyl-*N*-phenylethylamino Analogues as Novel MOR Agonists", *Molecules*. 16; 23(3).

Pasquinucci et al. (2018) "Synthesis and structure-activity relationships of (-)-*cis*-*N*-normetazocine-based LP1 derivatives", *Pharmaceuticals* 11(2), 40

Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός νέων οπιοειδών αναλόγων με αναλγητική δράση



Προσδιορισμός νέων οπιοειδών με αναλγητική δράση που εμφανίζουν λειτουργική επιλεκτικότητα (functional selectivity) για συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι



Άλλες δημοσιεύσεις

- ❖ P. Pallaki, I. Serafimidis, D. Thomaidou, M. Gaitanou, Z. Georgoussi (2018) *“A novel regulatory role of RGS4 in neuronal cell proliferation and sprouting mediated via STAT5B transcriptional responses”* FEBS OPEN BIO, 8, 380-380
- ❖ P. Pallaki, I. Serafimidis, E. Papadimitriou, M. P. Papakonstantinou, D. Thomaidou, M. Gaitanou, Z. Georgoussi (2018) *“RGS4 Regulates Neurite Outgrowth and Cell Proliferation Mediated by STAT5B Transcriptional Responses”* The FASEB Journal 32 (1-supplement), 805.17-805.17

Παρουσιάσεις σε συνέδρια

- Z. Georgoussi, P. Pallaki, I. Serafimidis, D. Thomaidou, M. Gaitanou, (2018) *“RGS4 regulates neurite outgrowth and cell proliferation mediated by STAT5B transcriptional responses. Experimental Biology 2018, San Diego, 21-25 Απριλίου, USA (αναρτημένη εργασία)*
- P. Pallaki, I. Serafimidis, D. Thomaidou, M. Gaitanou and Z. Georgoussi (2018). *“A novel regulatory role of RGS4 in neuronal cell proliferation and sprouting mediated via STAT5B transcriptional responses”*. 43^ο FEBS Congress, 7-12 Ιουλίου, Πράγα, Τσεχία (Αναρτημένη παρουσίαση)
- P. Pallaki, I. Serafimidis, A. Symeonof, D. Thomaidou, M. Gaitanou and Z. Georgoussi (2018). *“A novel regulatory role of RGS4 in neuronal cell proliferation and sprouting mediated by opioids through STAT5B transcriptional responses”*. Cell Signaling Workshop, November 12-17, Ιερουσαλήμ, Ισραήλ (Αναρτημένη παρουσίαση)
- P. Pallaki, C. Karoussiotis, A. Polissidis, I. Serafimidis, Z. Georgoussi (2019). *“The role of Regulator of G protein signalling 4 in neuronal cell death and differentiation”*. Forum Νέων επιστημών του 70^{ου} Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας 29 Νοεμβρίου-1 Δεκεμβρίου 2019, Αθήνα (Προφορική παρουσίαση)
- P. Pallaki, C. Karoussiotis, A. Polissidis, I. Serafimidis, Z. Georgoussi (2019). *“The role of Regulator of G protein signalling 4 in neuronal cell death and differentiation”*. 70^ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας 29 Νοεμβρίου-1 Δεκεμβρίου 2019, Αθήνα (Αναρτημένη παρουσίαση)
- P. Pallaki, C. Karoussiotis, A. Polissidis, I. Serafimidis, Z. Georgoussi (2019) *“RGS4 exerts a regulatory role in neuronal homeostasis through autophagy”*. 1st ERNEST meeting, Cost Action 18133, Belfast, Ηνωμένο Βασίλειο (ποστερ).

Προσδιορισμός
νέων
σηματοδοτικών
μονοπατιών &
φαρμακολογικών
στόχων

2.3.ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ:
Προσδιορισμός νέων
φαρμακολογικών
στόχων που
συμμετέχουν στη
νευριτική ανάπτυξη και
διαφοροποίηση μετά
από έκθεση
σε οπιοειδή

Π2.3β. Μελέτη
του μηχανισμού
της αυτοφαγίας
από οπιοειδή
ανάλογα

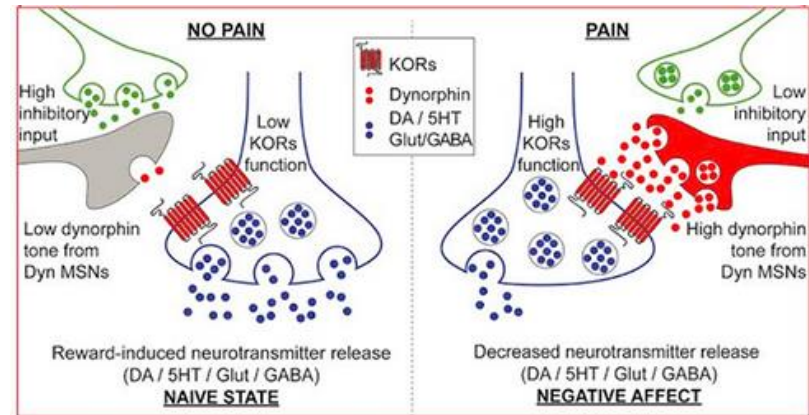


ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

FUNCTION OF κ -OR IN THE NERVOUS SYSTEM

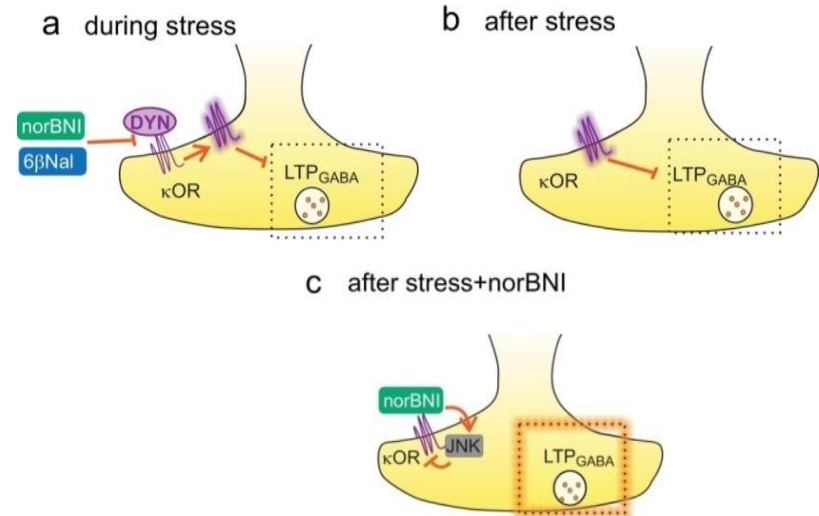
κ -OR and neuronal plasticity

- κ -OR is localized pre- and post-synaptically and **inhibits** neurotransmission via **regulation** of GABA or dopamine release.
- Sustained κ -OR activation decreases neuronal arborization.



After acute or chronic stress

- Dynorphin release and κ -OR expression are increased in hippocampus, striatum and hypothalamus.
- Animal models of PDYN $^{-/-}$ or KOR $^{-/-}$ show decreased anxiety-like behaviors.



Pharmacological significance

- κ -OR antagonists are considered as important pharmacological targets for depressive disorders and anxiety-like behaviors after alcohol withdrawal (Aticaprant, Janssen Pharmaceuticals).



Trends in Cell Biology

CellPress
REVIEWS

Review

Regulation and Roles of Autophagy at Synapses

Vassiliki Nikolettou¹ and Nektarios Tavernarakis^{1,2,*}

Published in final edited form as:

Neuron. 2012 April 26; 74(2): 277–284. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.020.

Regulation of presynaptic neurotransmission by macroautophagy

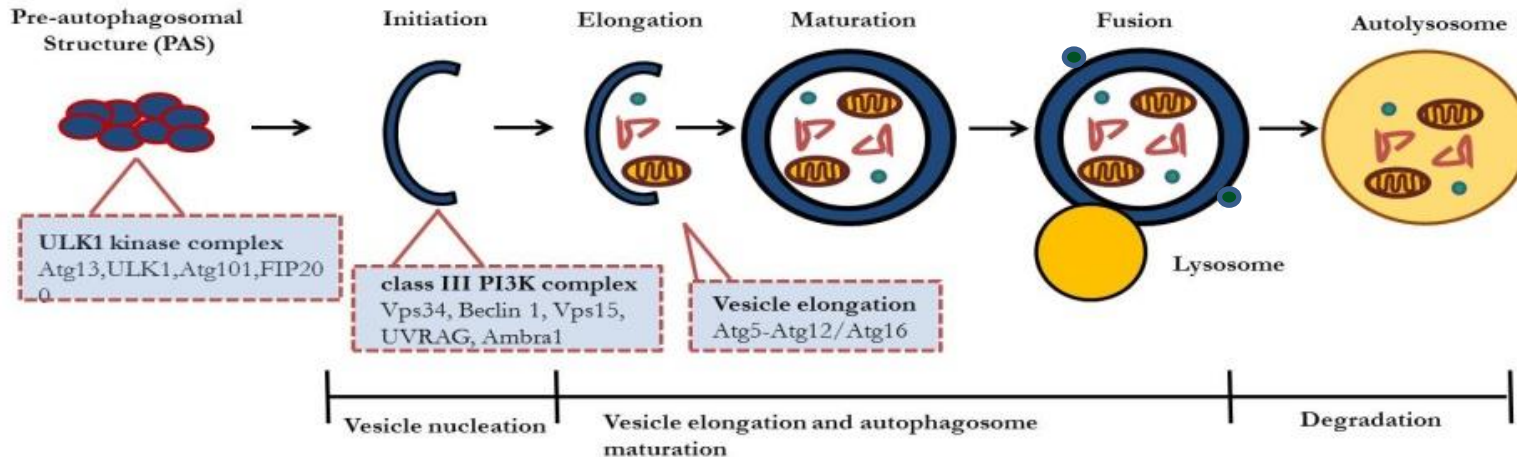
Daniela Hernandez^{1,*}, Ciara A. Torres^{2,*}, Wanda Setlik³, Carolina Cebrián⁴, Eugene V. Mosharov⁴, Guomei Tang⁴, Hsiao-Chun Cheng⁴, Nikolai Kholodilov⁴, Olga Yarygina⁴, Robert E. Burke⁴, Michael Gershon³, and David Sulzer^{4,5}

Macroautophagy can press a brake on presynaptic neurotransmission

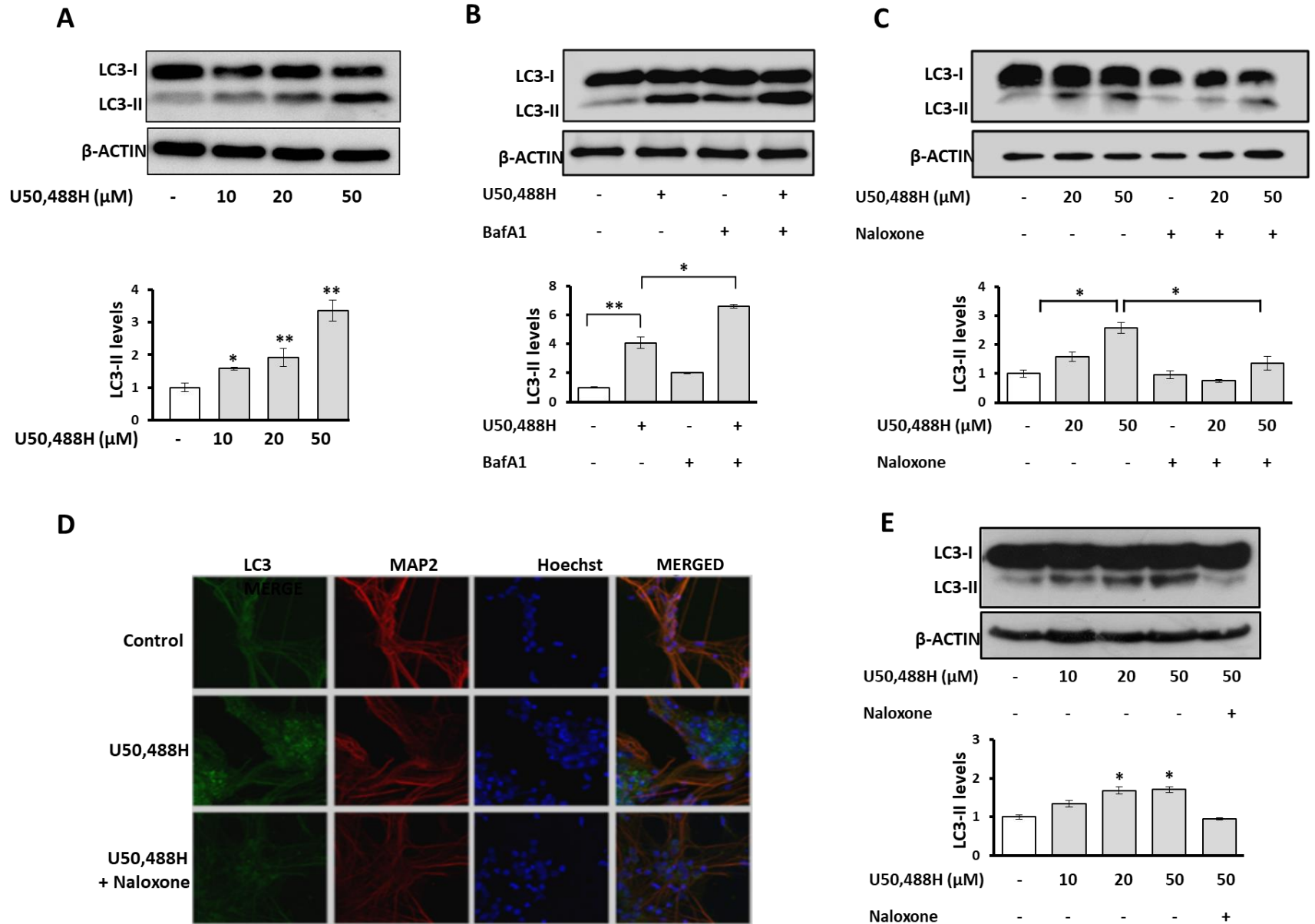
Ciara A. Torres^{1,2} and David Sulzer^{2,*}

¹Integrated Program in Cellular, Molecular and Biomedical Studies; Columbia University Medical Center; New York, NY USA; ²Departments of Psychiatry, Neurology & Pharmacology; Columbia University Medical Center; New York, NY USA

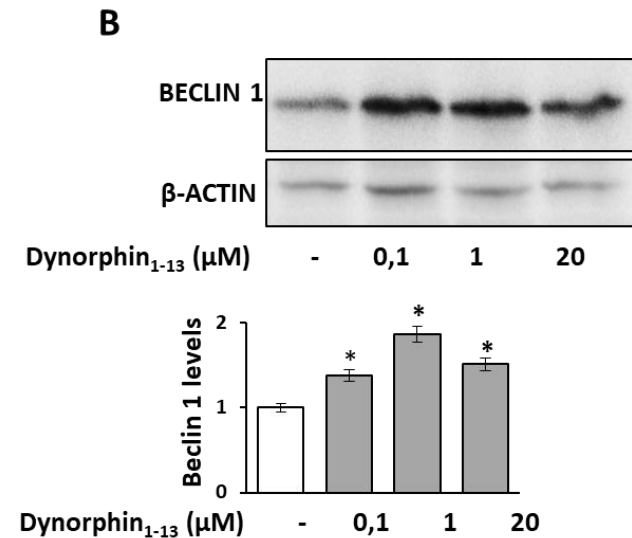
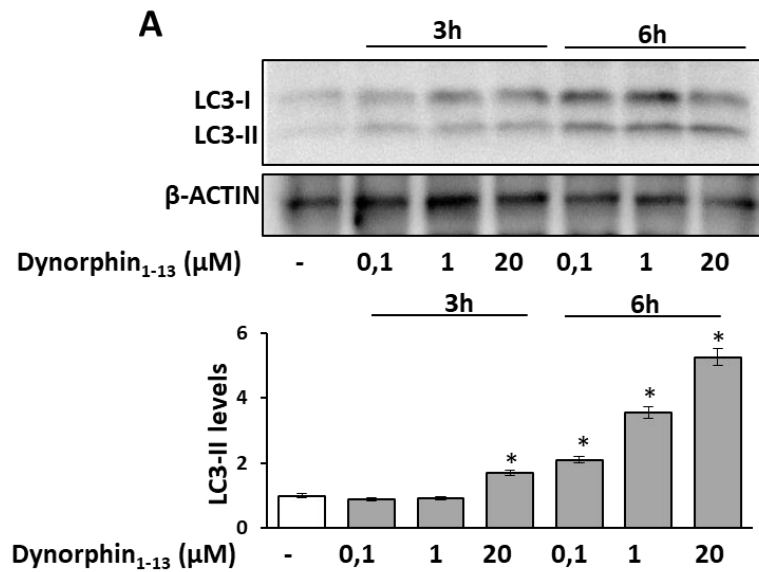
Aim: Study the effects of opioid analogs in the regulation of autophagy



DOES U50,488H-κ-OR ACTIVATION INDUCE AUTOPHAGY?

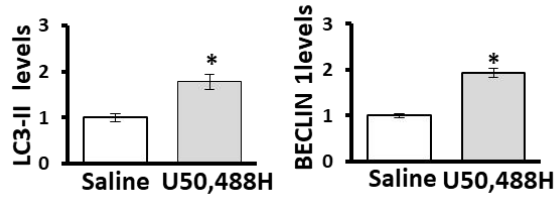
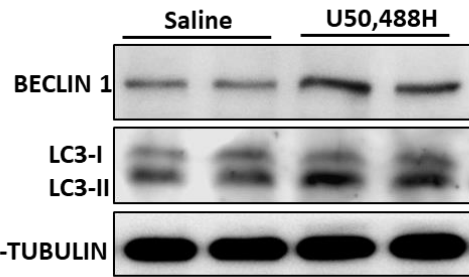


DOES DYNORPHIN AN ENDOGENOUS κ -OR NEUROPEPTIDE INDUCE AUTOPHAGY ?

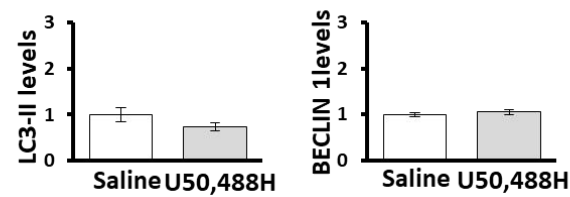
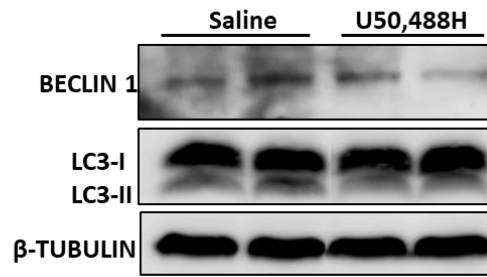


WHICH BRAIN REGIONS ARE RESPONSIBLE FOR κ -OR MEDIATED AUTOPHAGY?

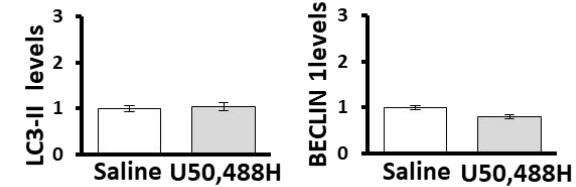
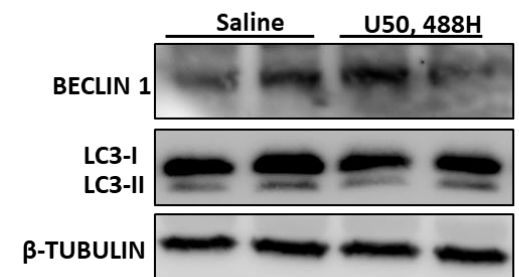
A Hippocampus



B Cortex



C Striatum



D

CONCLUSIONS

- Endogenous and exogenous κ -OR peptides induce the autophagic machinery *in vitro* and *in vivo*.
- U50,488H administration induces autophagy in mice hippocampus

Άλλες δημοσιεύσεις

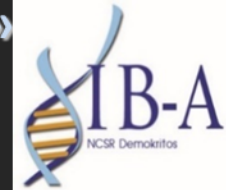
- Zafiroula Georgoussi, Christos Karoussiotis, Aggeliki Sotiriou, Danae Papavranoussi-Daponte, Alexia-Victoria Polissidis, Vassiliki Nikolettou. *“The role of κ-opioid receptor-induced autophagy in synaptic alterations”* The FASEB Journal 34 (supplement) Μάρτιος 2020

Παρουσιάσεις σε συνέδρια

- Christos Karoussiotis, Aggeliki Sotiriou, Danae Papavranoussi-Daponte, Alexia-Victoria Polissidis, Vassiliki Nikolettou and Zafiroula Georgoussi, *“The role of κ-opioid receptor-induced autophagy in synaptic alterations”* 7ο Συνέδριο της Ελληνικής εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα Νοέμβριος 2019 (Προφορική παρουσίαση)
- Christos Karoussiotis, Aggeliki Sotiriou, Danae Papavranoussi-Daponte, Alexia-Victoria Polissidis, Vassiliki Nikolettou and Zafiroula Georgoussi, *“The role of κ-opioid receptor-induced autophagy in synaptic alterations”* 7ο Πανελλήνιο Forum Νέων Επιστημόνων της Ελληνικής εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα Νοέμβριος 2019 (ποστερ)
- Zafiroula Georgoussi, Christos Karoussiotis, Aggeliki Sotiriou, Danae Papavranoussi-Daponte, Alexia-Victoria Polissidis, Vassiliki Nikolettou. *“The role of κ-opioid receptor-induced autophagy in synaptic alterations”* Experimental Biology, San Diego, CA, Απρίλιος 2020. (ποστερ).



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (SANITURA)» (MIS 5002514) που εντάσσεται στη Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑ_ηΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
**COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION**

ΕΣΠΑ
2014-2020
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη
Partnership Agreement
2014 - 2020

Co-financed by Greece and the European Union



Co-financed by Greece and the European Union

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Εργαστήριο Χημικής Οικολογίας & Φυσικών Προϊόντων

Δρ. Μαρία Κωνσταντοπούλου

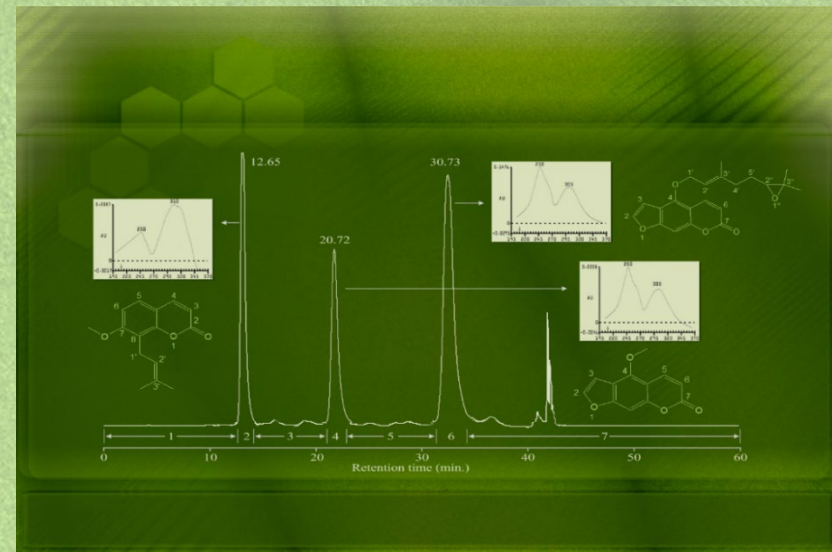
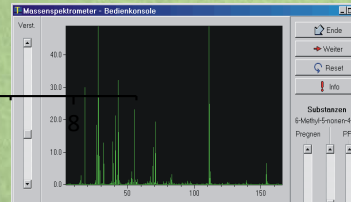
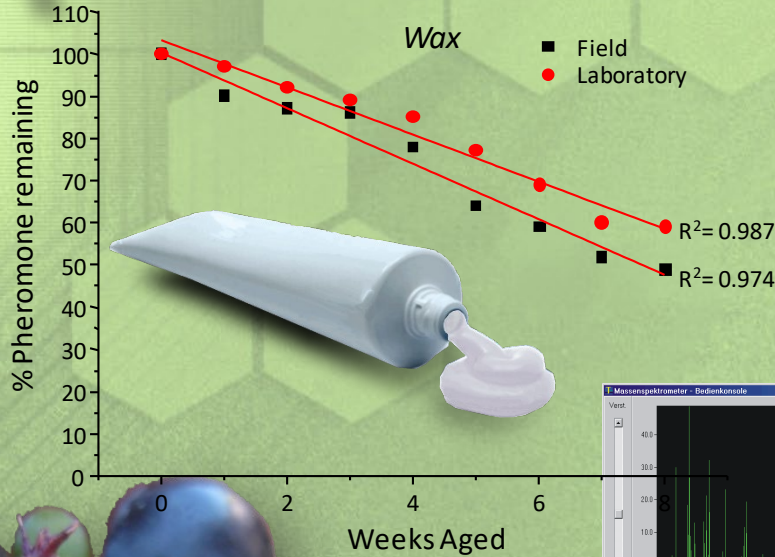
Δρ. Ελένη Κουτσουμπέλη

Δρ. Αναστασία Φύτρου

Χριστίνα-Πέτρη Μπέτση MSc.

Ιωάννα Δασενάκη MSc.

Νεοκλής Μανίκας



Εργαστήριο Χημικής Οικολογίας & Φυσικών Προϊόντων

Πακέτο Εργασίας 3

Π3.1.3.: Φυσικής προέλευσης μεταβολίτες με βιοενεργότητα σε εντομολογικούς στόχους

Πακέτο Εργασίας 5:

Π5.1.α: Ανάπτυξη τεχνολογίας βραδείας και ελεγχόμενης απελευθέρωσης βιοενεργών ουσιών.

Π5.1.β: Εφαρμογή «έξυπνων» εντομοκτόνων σε πρόγραμμα ολοκληρωμένης διαχείρισης πληθυσμών εντόμων.


18^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο – Οκτώβριος 2019

Επίδραση δευτερογενών μεταβολιτών του σχίνου *Pistacia lentiscus* και του στελέχους SMU-21 του μύκητα *Mucor hiemalis* στη βιωσιμότητα του *Lobesia botrana*

Α. Φύτρου, Ε. Κουτσουμπέλη και Μ.Α. Κωνσταντοπούλου
Εργαστήριο Χημικής Οικολογίας & Φυτικών Προϊόντων, Ινστιτούτο Βιοεπιτημιών και Εφαρμογών, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Αγ. Παρασκευή Αττικής


Η συνεχής προσπάθεια για απομόνωση φυσικών, εξειδικευμένων και βιο-αποικοδομημένων εντομοκτόνων υπηρετεί τη σύγχρονη ανάγκη για τη μείωση ή την αντικατάσταση των συνθετικών εντομοκτόνων. Οι στόχοι της συγκεκριμένης μελέτης εστιάζονται στον προσδιορισμό αμιοχημικών (πιοχημικών) και άλλων βιογενεργών μεταβολικών φυτικών προέλευσης (φυτικής ή μικροβιακής), για τον έλεγχο του πληθυσμού εντόμων μεγάλης οικονομικής σημασίας.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση εκχυλισμάτων καρπών, φύλλων και βλαστών του σχίνου, *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) και του στελέχους SMU-21 του μύκητα *Mucor hiemalis* (Zygomycota: Mucorales), που απομονώθηκε¹ από προνύμφες φυσικού πληθυσμού του λεπιδόπτερου *Sesamia nonagrioides*, στη βιωσιμότητα ενήλικων και προνυμφών του *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae).



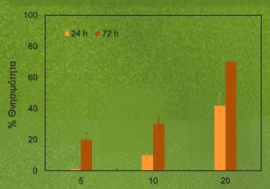
Pistacia lentiscus

- > Φύλλα, καρποί, βλαστοί
- > Εκχύλιση 80% μεθανόλη
- > Διαδοχική κλασμάτωση σε: πετρελαϊκό αέθρα – εξάνη - διχλωρομεθάνιο – νερό



Μελέτη βιοδραστικότητας των κλασμάτων σε ενήλικα έντομα *L. botrana* με βιοδοκίμες επαφής

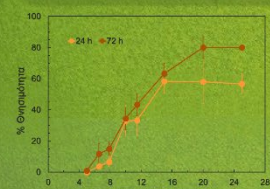
- > Υψηλή θνησιμότητα στα μη-τοξικά κλάσματα των καρπών (πετρελαϊκό αέθρα), (Εικ. 1).



Εικόνα 1: Θνησιμότητα ακμαίων *L. botrana* μετά από έκθεση (βιοδοκίμες τριβλίου, 3 h) σε εκχυλίματα καρπών *P. lentiscus* σε πετρελαϊκό αέθρα (LSO (89%CL): 24h-21.45 (18.13-25.1), 72h-14.50 (10.07-18.3))

Μελέτη επίδρασης του εκχυλίσματος των καρπών σε προνύμφες 5^{ης} σταδίου του *L. botrana* με βιοδοκίμες επαφής

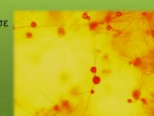
- > Δοσο-εξαρτώμενη θνησιμότητα (Εικ. 2)
- > Καθυστερήση νυμφώσεως και μειωμένη εξόδοσ



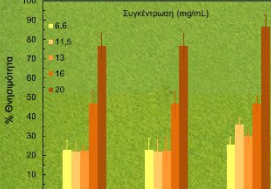
Εικόνα 2: Θνησιμότητα προνυμφών *L. botrana* μετά από έκθεση (βιοδοκίμες τριβλίου, 3 h) σε εκχυλίματα καρπών *P. lentiscus* σε πετρελαϊκό αέθρα (LSO (89%CL): 24h-17.49 (15.4-26.5), 72h-14.22 (13.1-15.6))

Mucor hiemalis

- > Εκχύλιμα υγρής καλλιέργειας του στελέχους SMU-21 σε Richard's medium
- > Καθαρσιμός μέσω διαδοχικής κλασμάτωσης (χλωροφόρμιο, μεθανόλη, βουτανόλη)²
- > Μελέτη βιοδραστικότητας του τελικού κλάσματος σε ενήλικα έντομα *L. botrana* με βιοδοκίμες επαφής
- > Δοσο-εξαρτώμενη θνησιμότητα (Εικ. 3)



Μελέτη βιοδραστικότητας του τελικού κλάσματος σε ενήλικα έντομα *L. botrana* με βιοδοκίμες επαφής




Εικόνα 3: Θνησιμότητα ακμαίων *L. botrana* μετά από έκθεση (βιοδοκίμες τριβλίου, 3 h) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του τελικού κλάσματος από το εκχύλιμα του *Mucor hiemalis* (SMU-21) (LSO(95%CL): 3h-16.58(14.2-19.1), 24h-14.37(12.5-17.6), 48h-14.27(12.1-17.6))

Οι βιοδοκίμες βρίσκονται σε εξέλιξη όπως επίσης και η χημική ανάλυση των φυτικών κλασμάτων με αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) για τον προσδιορισμό των βιογενεργών ουσιών που προσδίδουν την παρατηρούμενη δραστικότητα.

1) Κωνσταντοπούλου, Μ. and Mazonmeza, B. (2005). Evaluation of *Besnoitia bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis carpata*. *BioControl*, 50(2), pp.293-305.
2) Κωνσταντοπούλου, Μ., Mionas, P. and Mazonmeza, B. (2006). Partial purification and insecticidal activity of toxic metabolites secreted by a *Mucor hiemalis* strain (SMU-21) against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis carpata* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, 99(5), pp.1657-1664.

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «ΠΡΟΔΕΔΟΥΣΜΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΤΙΤΗΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΕΣ. ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ» (ΦΑΡΜΑΚΟΝ) MIS 50025-40, που εντάσσεται στη δράση Συστηματική Διευκρίνιση Ερευνητικών και Τεχνολογικών Όψεων και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Κατανομιανότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



Mentha spicata (δυόσμος)

Αιθέρια έλαια από φυτά ανεπτυγμένα σε

- βιολογική/συμβατική καλλιέργεια
- συνθήκες έλλειψης/κανονικής άρδρευσης

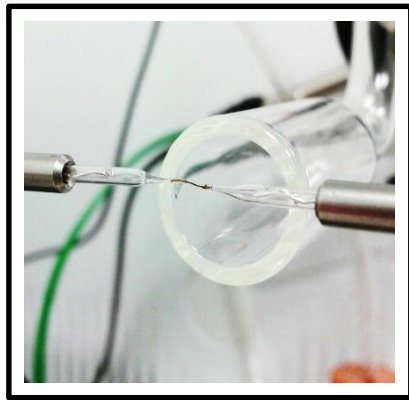
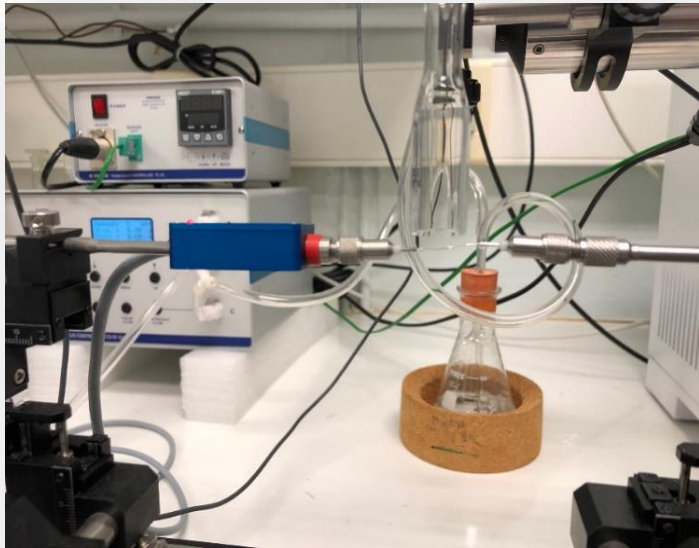


Μελέτη βιο-δραστικότητας των αιθέριων ελαίων σε προνύμφες 5^{ου} σταδίου *L. botrana* με βιοδοκιμές επαφής (**topical application**)

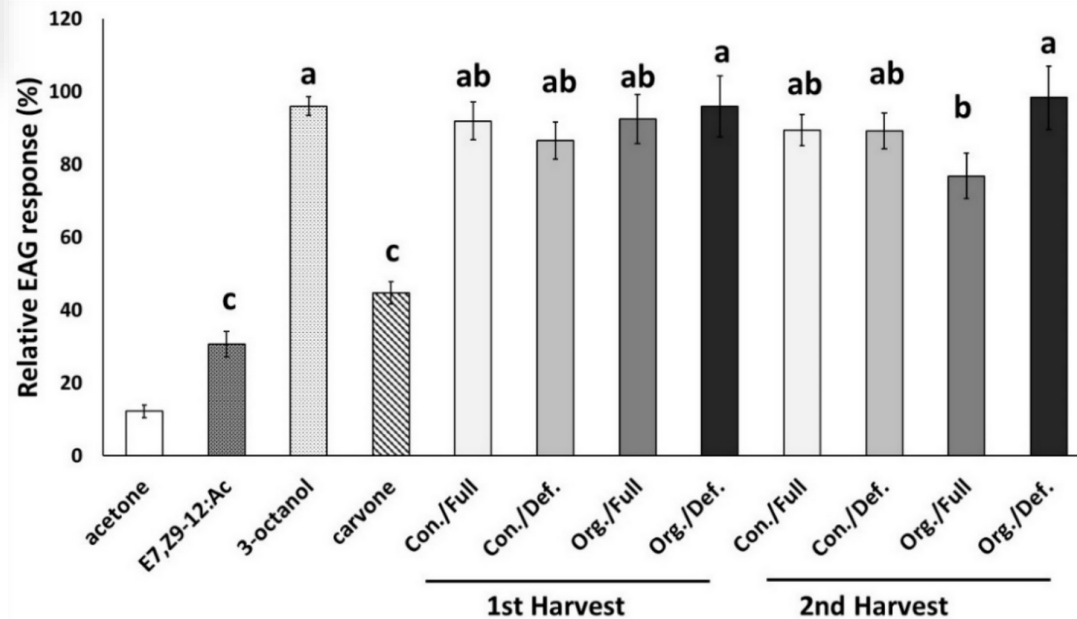
Essential Oil		LD ₅₀	CL 95%	Slope ± SE	Intercept ± SE	x ²	p
1st harvest							
Conventional/Full	CI	52.11	41.23–61.75	0.03 ± 0.001	−1.45 ± 0.09	147.20	0.000
Conventional/Deficit	CD	53.29	44.76–61.90	0.03 ± 0.001	−1.70 ± 0.83	159.16	0.000
Organic/Full	OI	50.84	42.45–59.02	0.03 ± 0.001	−1.67 ± 0.08	151.53	0.000
Organic/Deficit	OD	57.72	52.96–62.40	0.03 ± 0.001	−1.73 ± 0.08	53.78	0.000
2nd harvest							
Conventional/Full	CI	51.26	39.73–61.61	0.03 ± 0.001	−1.44 ± 0.08	225.08	0.000
Conventional/Deficit	CD	47.03	33.49–53.59	0.03 ± 0.001	−1.35 ± 0.08	244.57	0.000
Organic/Full	OI	51.96	42.00–61.86	0.04 ± 0.001	−1.86 ± 0.09	235.51	0.000
Organic/Deficit	OD	51.43	44.99–57.36	0.03 ± 0.001	−1.46 ± 0.08	79.50	0.000

Υψηλή θνησιμότητα (LD₅₀; µg), μη διακριτές διαφορές μεταξύ δειγμάτων

Ηλεκτροαντενογραφία - *L. botrana*



➤ Υψηλή απόκριση στα αιθέρια έλαια του *M. spicata*



1st Harvest

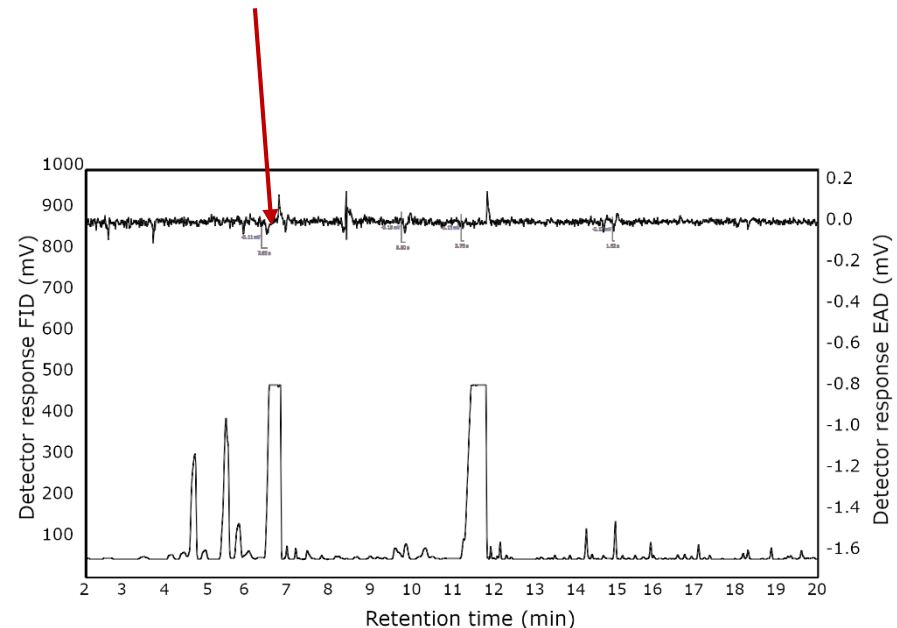
2nd Harvest

We acknowledge support of this work by the project "Target Identification and Development of Novel Approaches for Health and Environmental Applications" (MIS 5002514) which is implemented under the Action for the Strategic Development on the Research and Technological Sectors, funded by the Operational Programme "Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation" (NSRF 2014-2020) and co-financed by Greece and the European Union (European Regional Development Fund).

Ηλεκτροαντενογραφία με αέρια χρωματογραφία (GC-EAD)



- *L. botrana* vs *Mentha spicata*
- Καρβόνη: Κύριο συστατικό, υψηλή ηλεκτροφυσιολογική απόκριση



agronomy



Article

Organic Cultivation and Deficit Irrigation Practices to Improve Chemical and Biological Activity of *Mentha spicata* Plants

Antonios Chrysargyris ¹, Eleni Koutsoumpeli ², Panayiota Xylia ¹, Anastasia Fytrou ², Maria Konstantopoulou ^{2,*} and Nikolaos Tzortzakos ^{1,*}



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑΝΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION

ΕΣΠΑ
2014-2020
Ευρωπαϊκό - εθνικό - αλληλεγγύη
Partnership Agreement
2014 - 2020

We acknowledge support of this work by the project "Target Identification and Development of Novel Approaches for Health and Environmental Applications" (MIS 5002514) which is implemented under the Action for the Strategic Development on the Research and Technological Sectors, funded by the Operational Programme "Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation" (NSRF 2014-2020) and co-financed by Greece and the European Union (European Regional Development Fund).

Υλικά μορφοτυποποίησης σημειοχημικών και έλεγχος αποδέσμευσης



Application of semiochemical carrying flowable polymer on plant

Samples aged naturally are collected, placed in sealed vials and kept at -20 °C until further analysis



Determination of residual semiochemical content by SPME

Ανάπτυξη εφαρμογής «έξυπνων» εντομοκτόνων

Smart farming applications alternative to drone-aided spraying



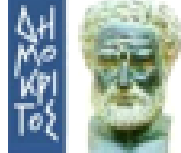
Remotely controlled, semi-auto caulking gun, mountable on drone for precision dollop dropping.

Prototype



Co-financed by Greece and the European Union

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ



SANITURA

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (MIS 5002514)

Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων
Χρηματοδότηση από το
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία»

Παραδοτέο	Περιγραφή
3.2.1α	Μεταβολικό μονοπάτι καταβολισμού του AZC
3.2.1β	Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων <i>ngn2</i> και <i>azhA</i> και της εμπλοκής τους στην αποτοξικοποίηση του AZC





ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»



ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ

Μελέτη των υπεύθυνων γονιδίων για την αποτοξικοποίηση του azetidine (AZC)

και του καταβολισμού του στον *Aspergillus nidulans*

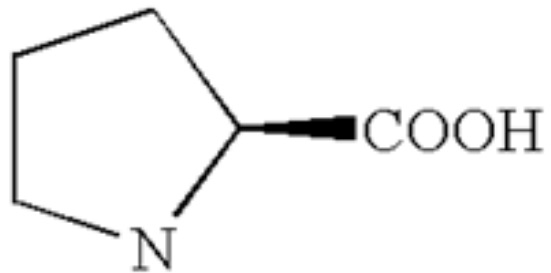
Παρουσίαση: ΑΝΤΑ ΜΠΙΡΑΤΣΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

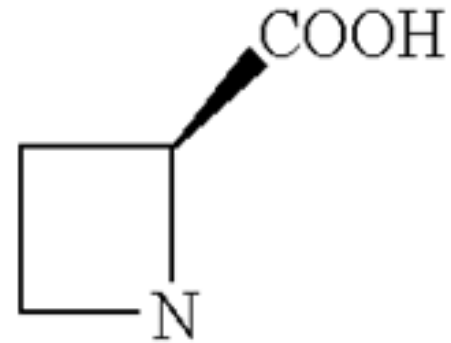
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ



Το **azetidine** (AZC) αποτελεί ένα φυσικά παραγόμενο τοξικό ανάλογο της προλίνης

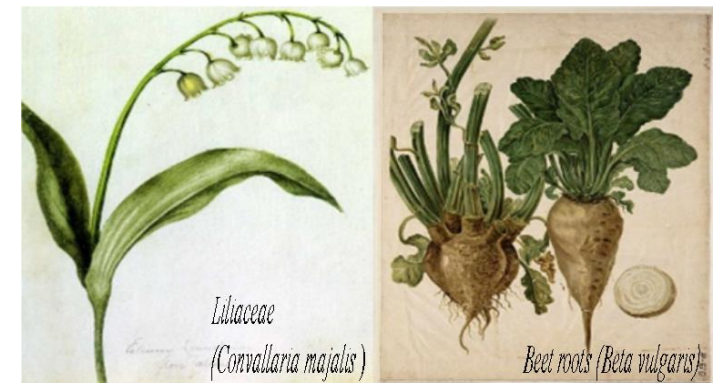


L-Proline

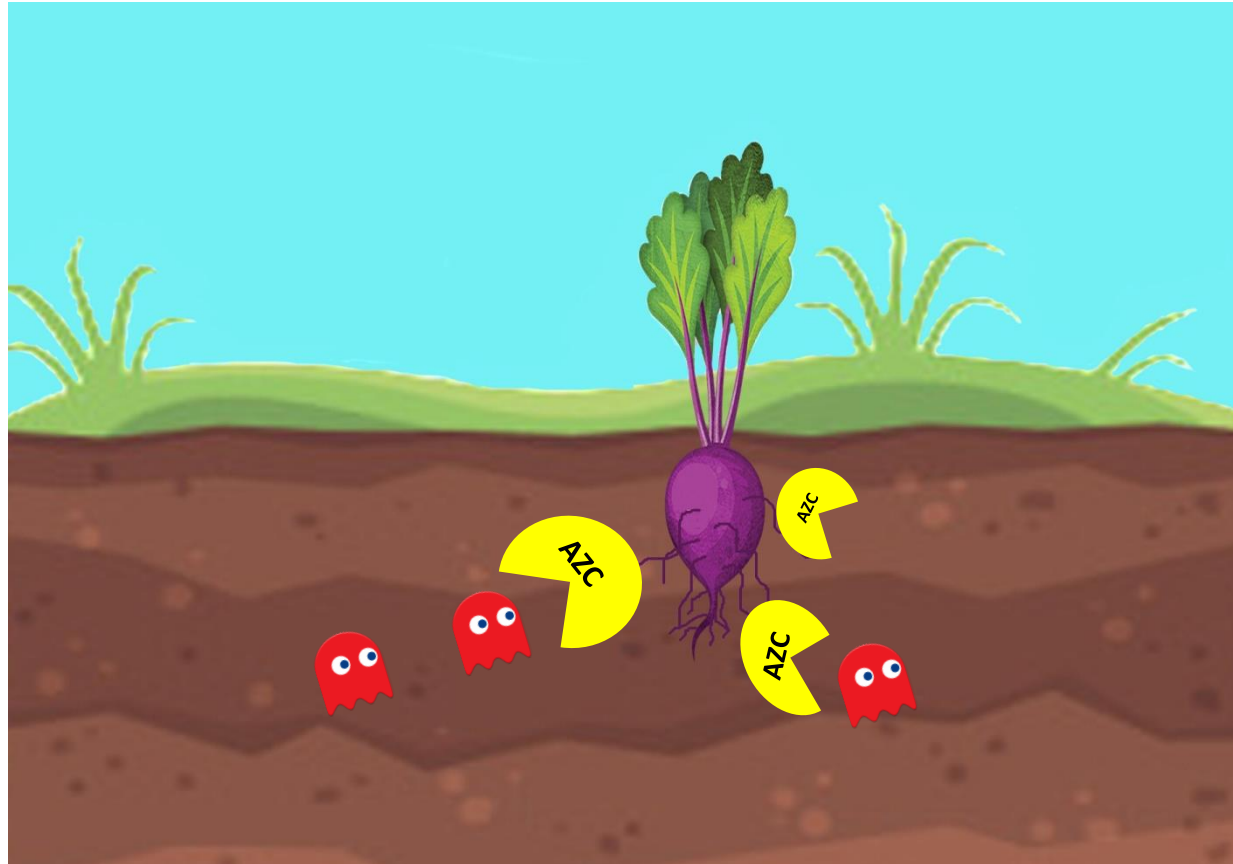


Azetidine-2-carboxylic acid

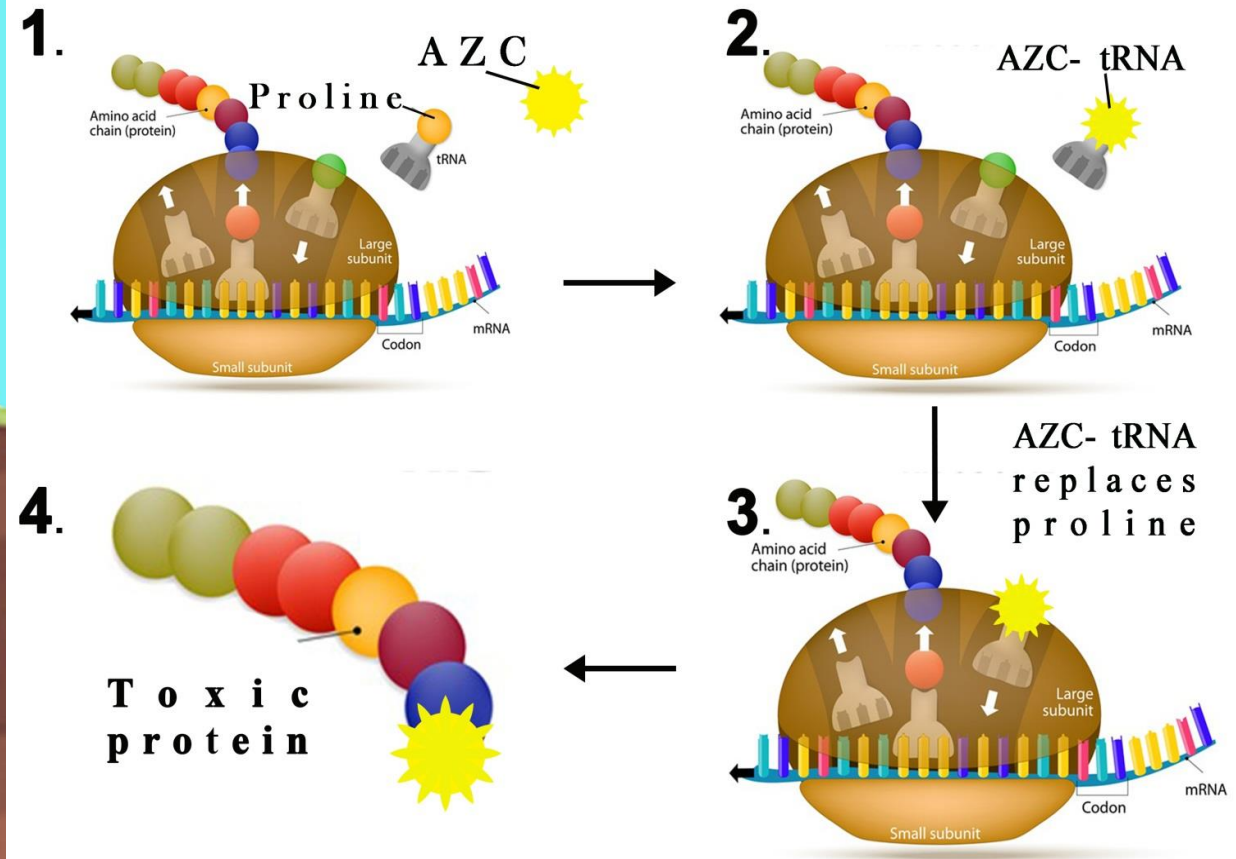
Παράγεται από φυτά της οικογένειας των Λειριοειδών (*Liliaceae*), των ψυχανθών (*Fabaceae*) και από διάφορες ποικιλίες τεύτλων (*Beta vulgaris*), όπως τα ζαχαρότευτλα και τα παντζάρια



Ο ρόλος του AZC στη φύση

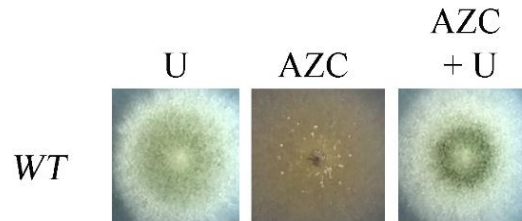


Με ποιο τρόπο το AZC προστατεύει τα φυτά που το παράγουν?

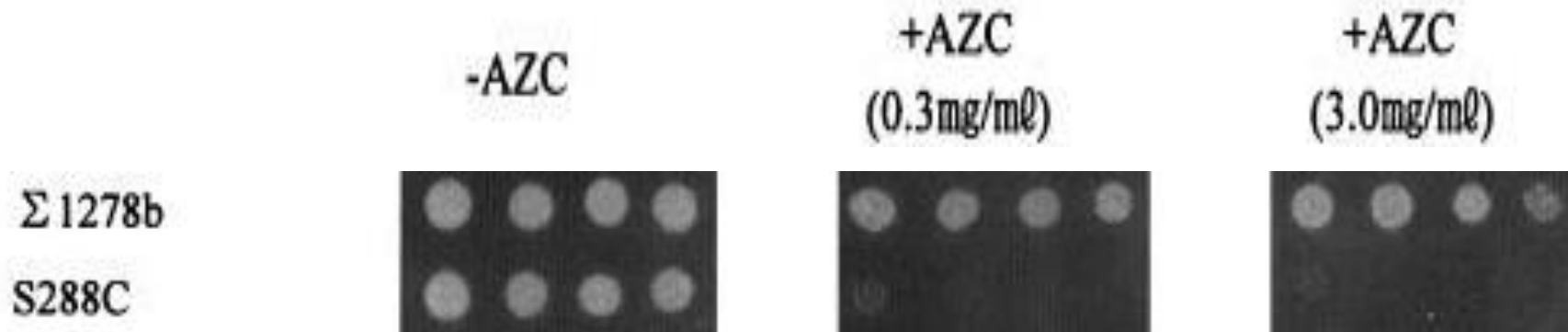


Το AZC στους μικροοργανισμούς...

1. Το AZC χρησιμοποιείται από τον *Aspergillus nidulans* ως φτωχή πηγή αζώτου (Gournas *et al.*, 2018)



2. Ο *Saccharomyces cerevisiae* αποτοξικοποιεί το AZC μέσω της ακετυλοτρανφσεράσης MPR1



3. Το AZC καταβολίζεται από στέλεχος *Pseudomonas* μέσω της AC υδρολάσης

Ταυτοποίηση των γονιδίων αποτοξικοποίησης και
καταβολισμού του AZC στον *A. nidulans*

Πειραματικές Προσεγγίσεις

1

In silico αναγνώριση των ομόλογων πρωτεϊνών των Mpr1p και AC-hydrolase στον *A.nidulans*

2

Απαλοιφή των ομόλογων γονιδίων
(Mpr1p -> *ngnA* και AC-hydrolase -> *azhA*)

3

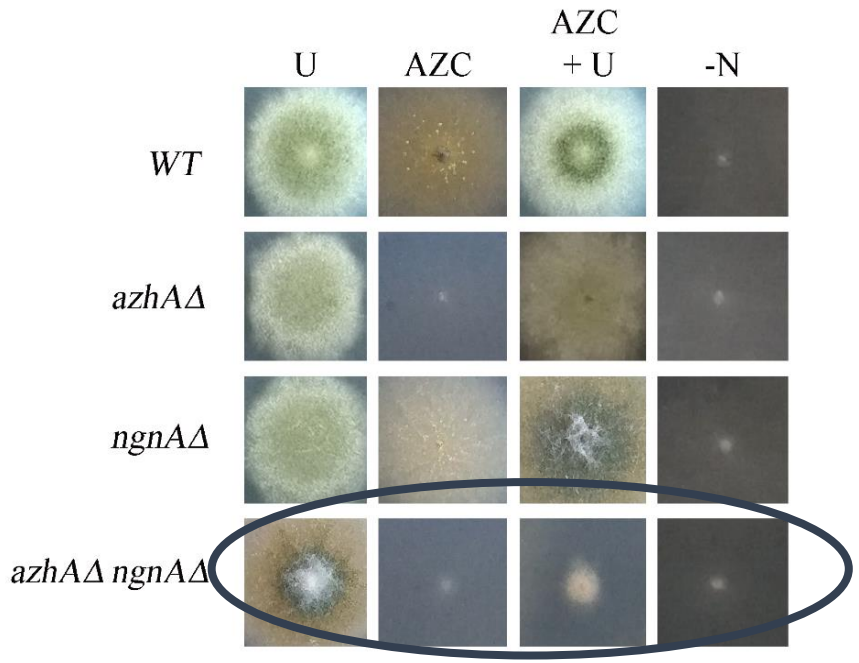
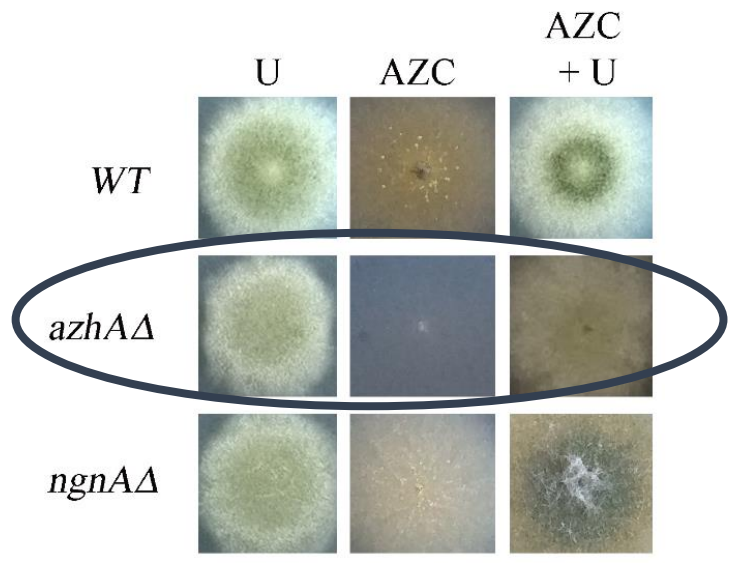
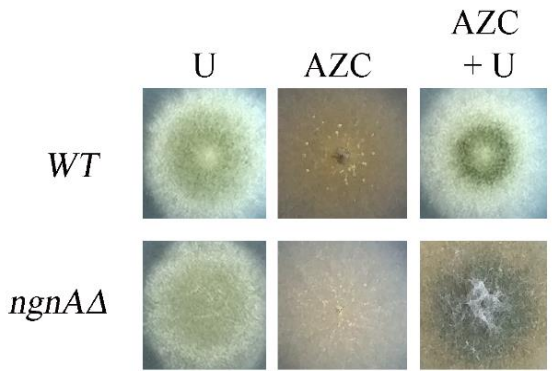
Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός μεταλλαγμένων στελεχών

Παραδοτέο	Περιγραφή
3.2.1α	Μεταβολικό μονοπάτι καταβολισμού του AZC
3.2.1β	Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων <i>ngn2</i> και <i>azhA</i> και της εμπλοκής τους στην αποτοξικοποίηση του AZC

Το AZC δεν είναι τοξικό για το στέλεχος *ngnAΔ* του *A. nidulans*

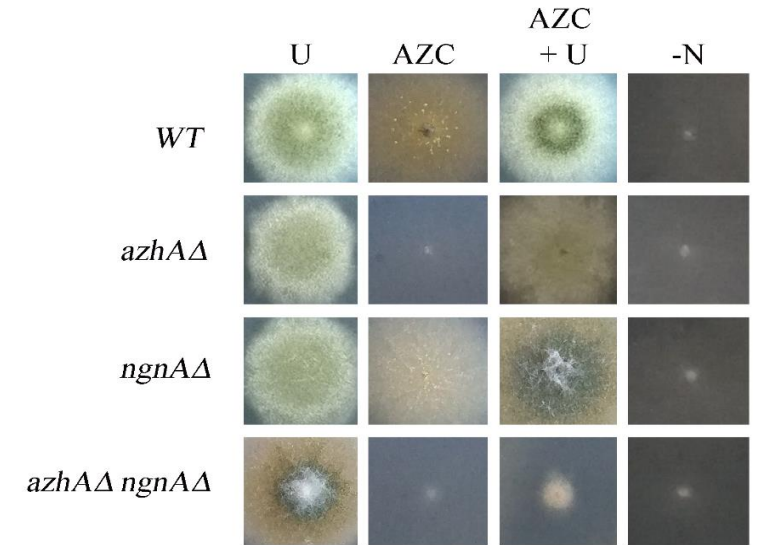
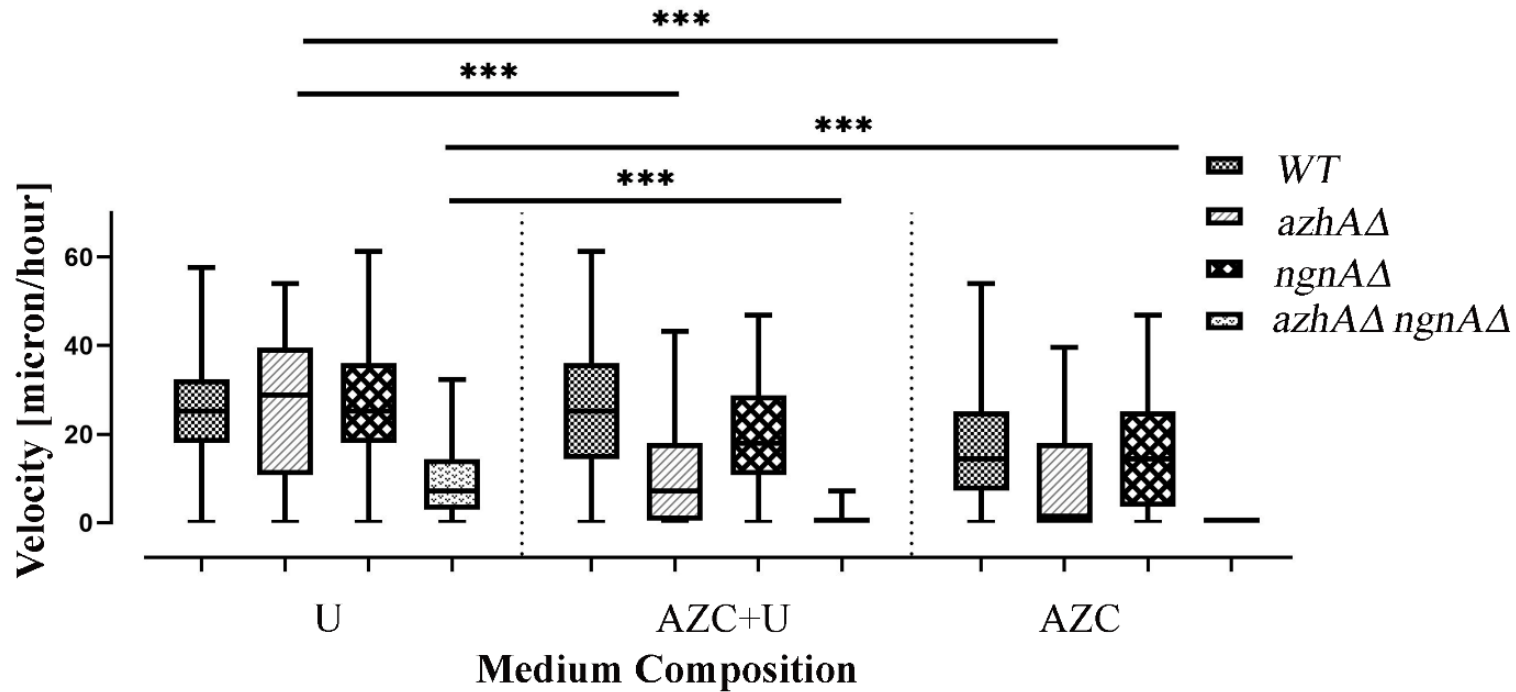
Το AZC δεν καταβολίζεται στο στέλεχος *azhAΔ* του *A. nidulans*

Το AZC είναι τοξικό για το διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος, *azhAΔ ngn2Δ*



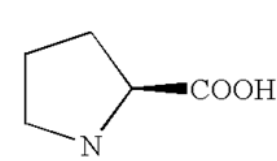
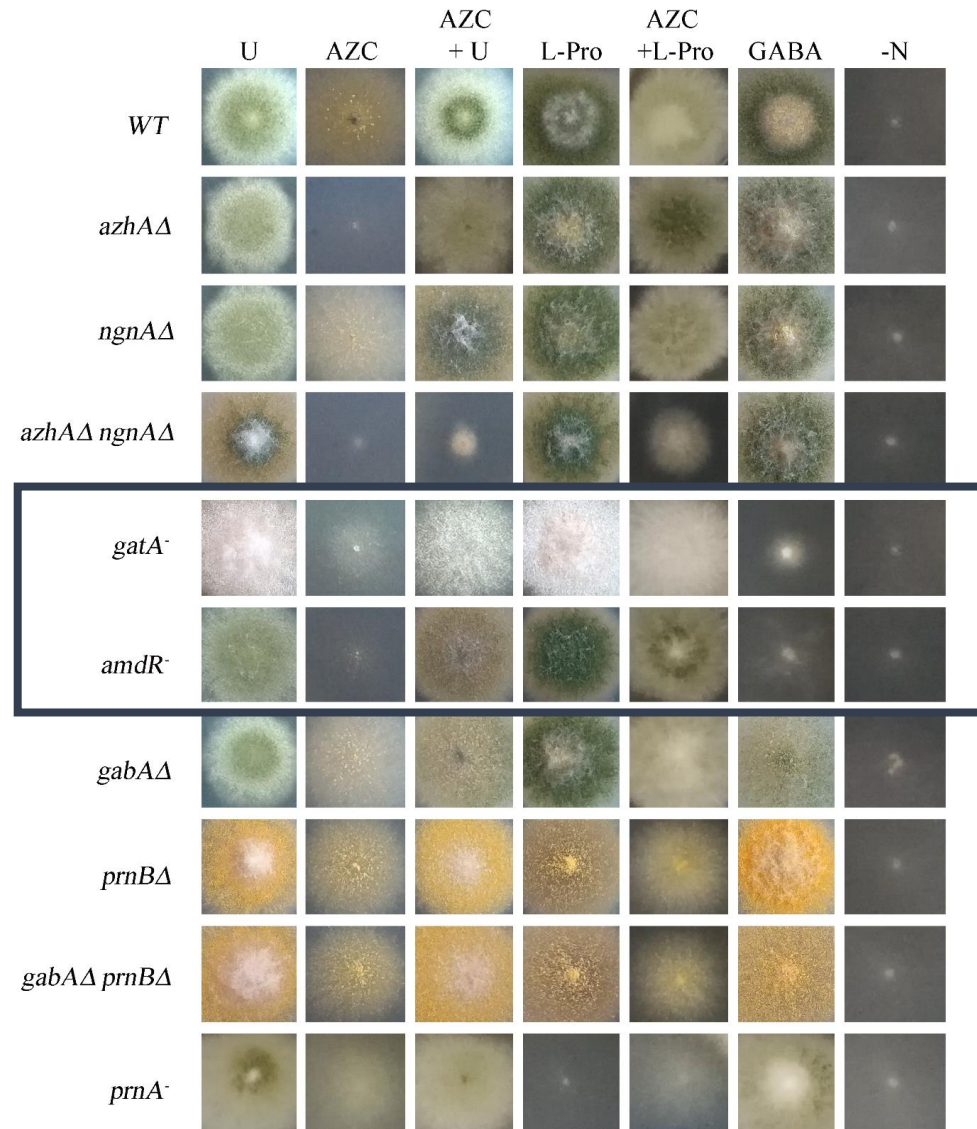
Biratsi et al., 2021

Καταβολισμός του AZC στον *A. nidulans*

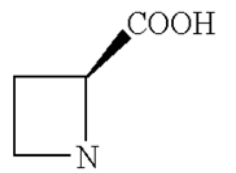


Biratsi *et al.*, 2021

Καταβολισμός του AZC μέσω του GABA μεταβολικού μονοπατιού στον *A. nidulans*?



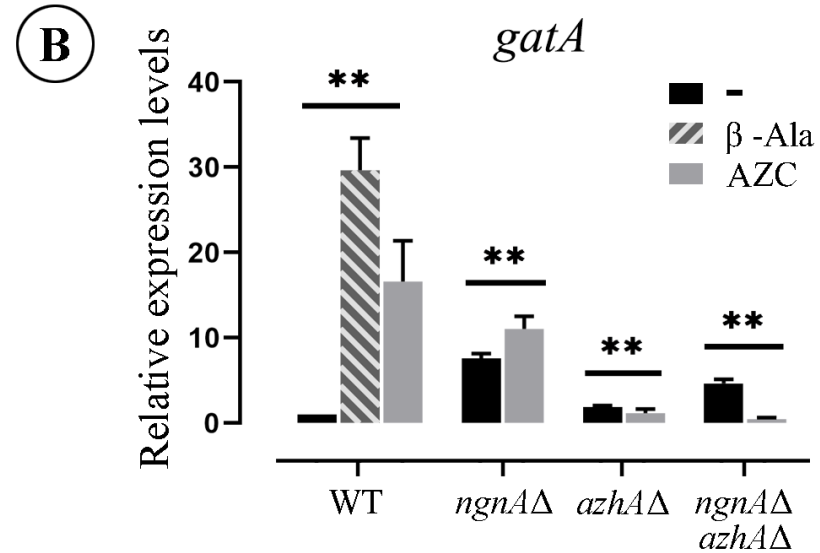
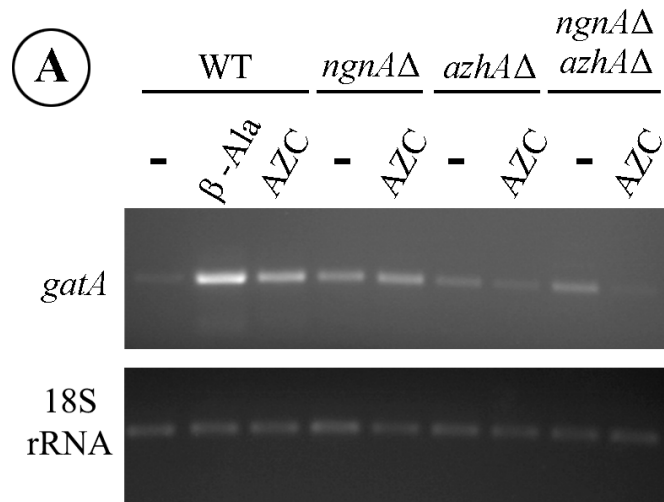
L-Proline



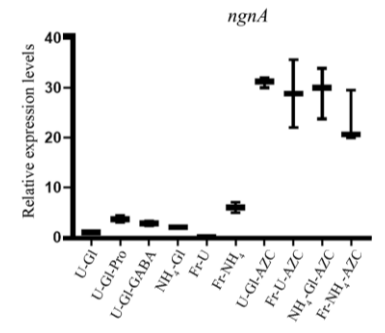
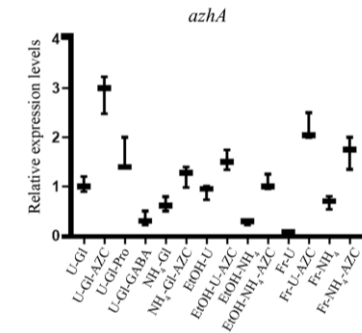
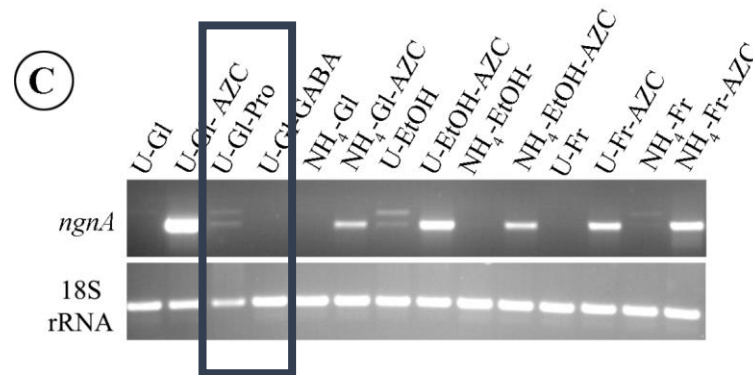
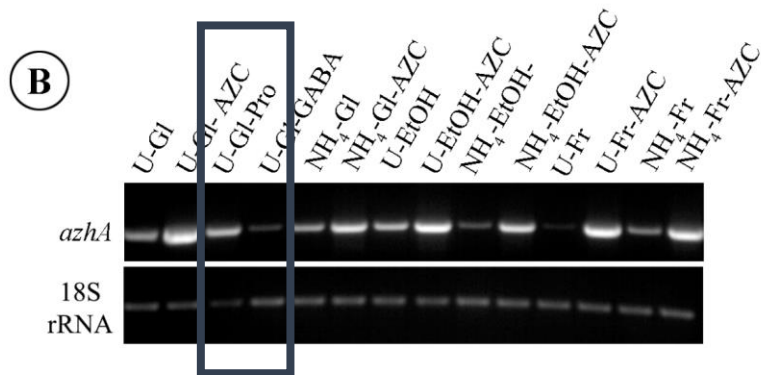
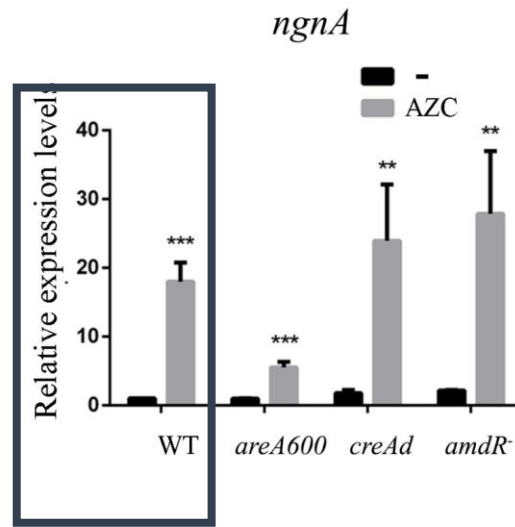
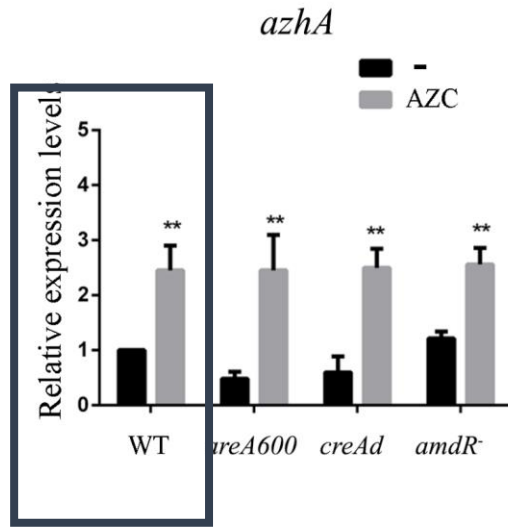
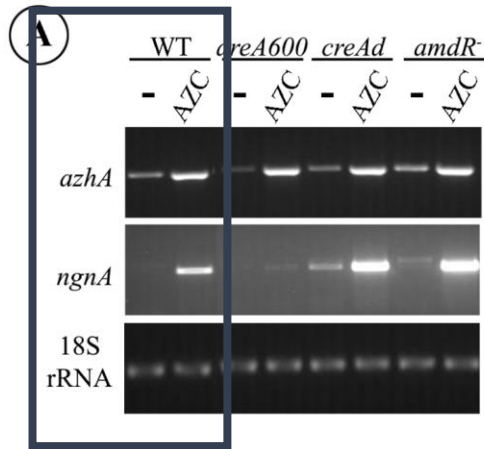
Azetidine-2-carboxylic acid

Παραδοτέο	Περιγραφή
3.2.1α	Μεταβολικό μονοπάτι καταβολισμού του AZC
3.2.1β	Μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων <i>ngn2</i> και <i>azhA</i> και της εμπλοκής τους στην αποτοξικοποίηση του AZC

Το AZC μετατρέπεται σε GABA στον *A. nidulans*

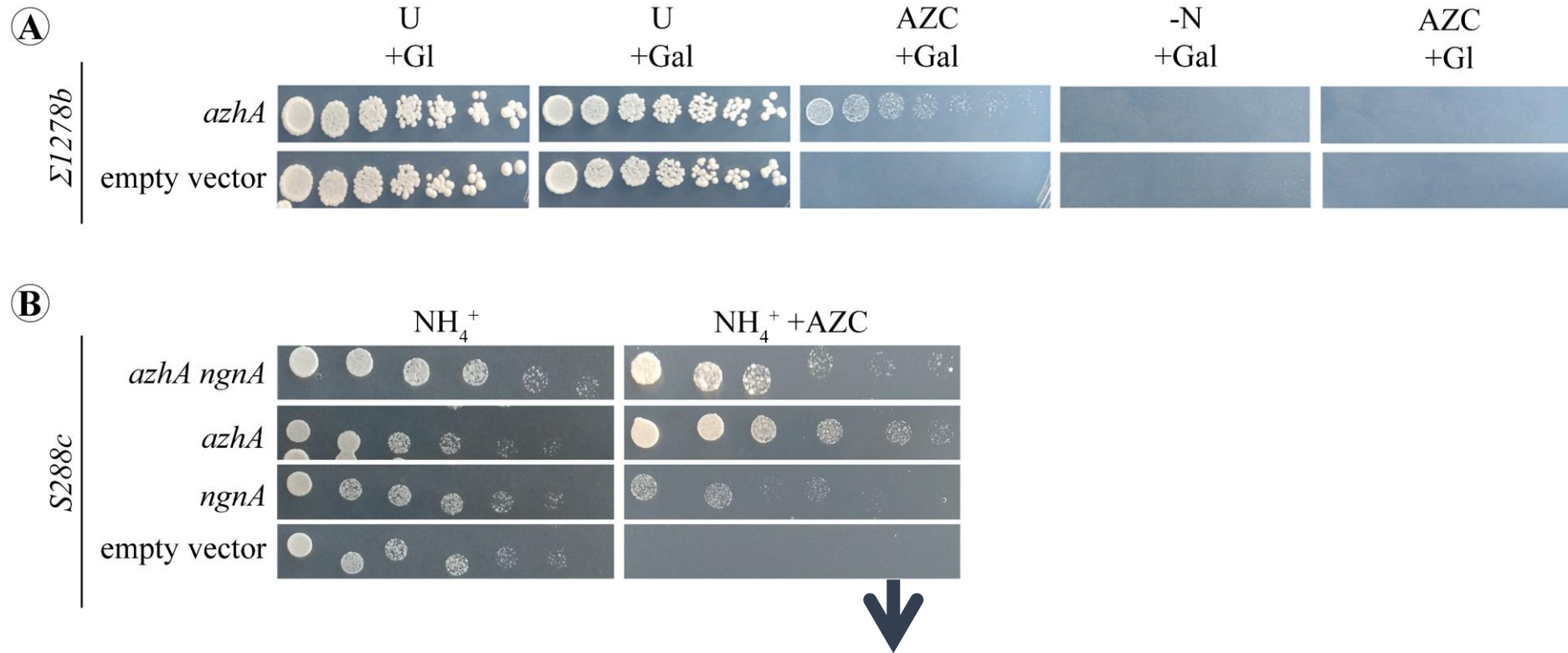


Το AZC επάγει την έκφραση των γονιδίων *azhA* και *ngnA*



Biratsi et al., 2021

Ετερόλογη έκφραση του γονιδίου *azhA* του *A. nidulans* στο *S. cerevisiae* προσδίδει ικανότητα χρησιμοποίησης του AZC ως πηγή αζώτου από τον ζυμομύκητα



Το γονίδιο *azhA* είναι ορθόλογο του γονιδίου της AC υδρολάσης της ψευδομονάδας.

Πιθανές εφαρμογές

1

Σχεδιασμός νέων και εξειδικευμένων αντιμυκητιακών ουσιών με συγκεκριμένη στόχευση

2

Κατασκευή νέων βιοσυνθετικών μονοπατιών με οικολογικές και περιβαλλοντο-προστατευτικές εφαρμογές

Παραδοτέα του προγράμματος

Πίνακας εργασιών που δημοσιεύθηκαν κατά τη διάρκεια του προγράμματος SANITURA

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά	Ανακοινώσεις σε διεθνή και ελληνικά συνέδρια
<p>Biratsi, A., Athanasopoulos, A., Kouvelis, V., Gournas, Ch. And Sophianopoulou, V. (2021). 'A highly conserved mechanism for the detoxification and assimilation of the toxic phytoproduct L-azetidine-2-carboxylic acid in <i>Aspergillus nidulans</i>', <i>Scientific Reports</i>, 11(1), p. 7391. doi: 10.1038/s41598-021-86622-</p>	<p>Biratsi A., Gournas Ch., Sophianopoulou V., (2015). A toxic analogue of proline, L-Azetidine-2-carboxylic acid, is detoxified and catabolized by the filamentous fungus <i>Aspergillus nidulans</i>. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Μικροβιόκοσμος με θέμα Μικροβιόκοσμος: Νέοι Ορίζοντες στον Μικρόκοσμο. Conference proceedings. EIE 3-5 Απριλίου, Αθήνα.</p> <p>Biratsi A, Gournas C, Sophianopoulou V. (2016) <i>Aspergillus nidulans</i> is able to detoxify and to utilize L-Azetidine-2-carboxylic acid as poor nitrogen source. Abstract book, 34th SMYTE (Small Meeting on Yeast Transport and Energetics) Chania, Crete, Greece.</p> <p>A. Biratsi, Ch. Gournas and V. Sophianopoulou (2017). Παρουσίαση Poster με τίτλο "A toxic analogue of proline, L-Azetidine-2-carboxylic acid, is detoxified and catabolized by the filamentous fungus <i>Aspergillus nidulans</i>". 68^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Θεματική περιοχή Biotechnology of plants and microorganisms, Ίδρυμα Ευγενίδου, Αθήνα. Περίληψη εργασίας σελ. 31, P43, http://eebmb2017.gr/wp-content/uploads/2017/11/FINAL-PROGRAM-.pdf.</p>
<p>Gournas, C., Athanasopoulos, A. and Sophianopoulou, V. (2018) 'On the Evolution of Specificity in Members of the Yeast Amino Acid Transporter Family as Parts of Specific Metabolic Pathways.', <i>International journal of molecular sciences</i>, 19(5). doi: 10.3390/ijms19051398.</p>	<p>Biratsi, A., Gournas, C., Athanasopoulos, A., and Sophianopoulou V. (2018). Efficient enzymatic degradation and assimilation by soil fungi of a plant-protectant natural amino acid analogue. European Biotechnology Congress 2018, April 26-28, Athens, Greece. Journal of Biotechnology, Volume 280, Supplement, 30 August 2018, Pages s49-s50.</p> <p>Biratsi, A., Gournas, C., Athanasopoulos, A., and Sophianopoulou V. (2018). Characterization of two distinct pathways for the detoxification and utilization of L-Azetidine-2-carboxylic acid in <i>Aspergillus nidulans</i>. Abstract of the 43rd FEBS Congress "Biochemistry forever" P.07-075, July 7-12, Prague, Czech Republic.</p>



Co-financed by Greece and the European Union

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

3.2.2

Διερεύνηση πιθανού τρόπου αύξησης της συσσώρευσης της σακχαρόζης στα κύτταρα του *Synechococcus* sp. PCC 7942 σε συνθήκες αβιοτικού στρές

Εργαστήριο Βιοφυσικής και Βιοτεχνολογίας Μεμβρανών
Επ. Υπεύθυνος: Δρ. Κων/νος Σταματάκης
Υπότροφος: Δημήτρης Βαγενός

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (SANITURA)» (MIS 5002514) που εντάσσεται στη Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Ταμείο
Περιφερειακής Ανάπτυξης



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ
ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΕΠΙΧ. & Τ.Ε.
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΙΧ.

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ΕΣΠΑ
2014-2020
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Ηλιακή ενέργεια

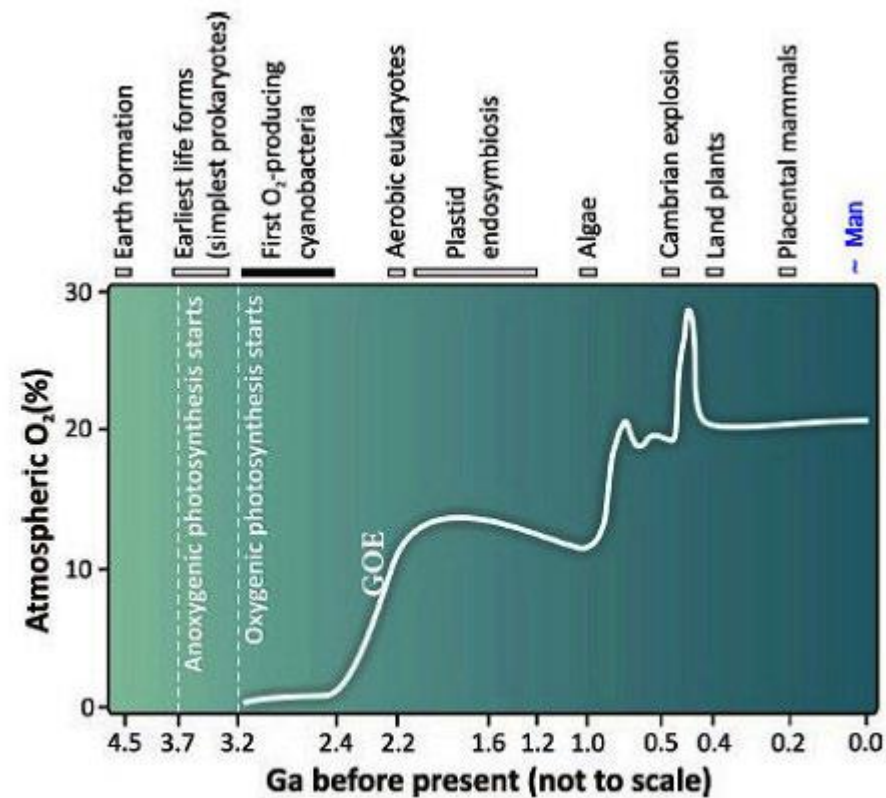
1. Ο ήλιος είναι μια απεριόριστη πηγή ενέργειας για τη Γη και θα είναι έτσι για τα επόμενα 5-6 δισεκατομμύρια χρόνια. Το περιστατικό ηλιακής ενέργειας ετησίως είναι περίπου 3.850.000 εκαjoules (EJ). (ημερήσιο ενεργειακό ισοδύναμο 20 χιλιοτόνων TNT ανά 1,5 τετραγωνικό μίλι)
2. Μπορούμε να βρούμε έναν τρόπο να μετατρέψουμε το ηλιακό φως σε ένα τέτοιο είδος ενέργειας;
3. Η φύση ανακάλυψε πριν από 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια μια πολύ χρήσιμη διαδικασία για τη **σύλληψη αυτής της φωτεινής ενέργειας** και τη **σταθερή αποθήκευση** της, δηλαδή τη **φωτοσύνθεση**.

Μελετάμε: Φωτοσύνθεση **κυανοβακτηρίων** η διαδικασία που άλλαξε την "ιστορία" της γής".

Κυανοβακτήρια

- Φωτοσύνθεση: όπως τα ανώτερα φυτά, αλλά με το **πλεονέκτημα** ότι δεν χρειάζονται καλλιεργήσιμη γη.
- «πρόγονος» χλωροπλάστη
- Gram negative Βακτήρια
- Επιβιώνουν σε εξαιρετικά αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασίας και χημικής σύστασης)
- Επιβιώνουν 3.5 δισ. εκατ. Χρόνια

Συμβολή της φωτοσύνθεσης των κυανοβακτηρίων στη ποσότητα του Οξυγόνου της Ατμόσφαιρας



After Govindjee & Shevela D (2011)

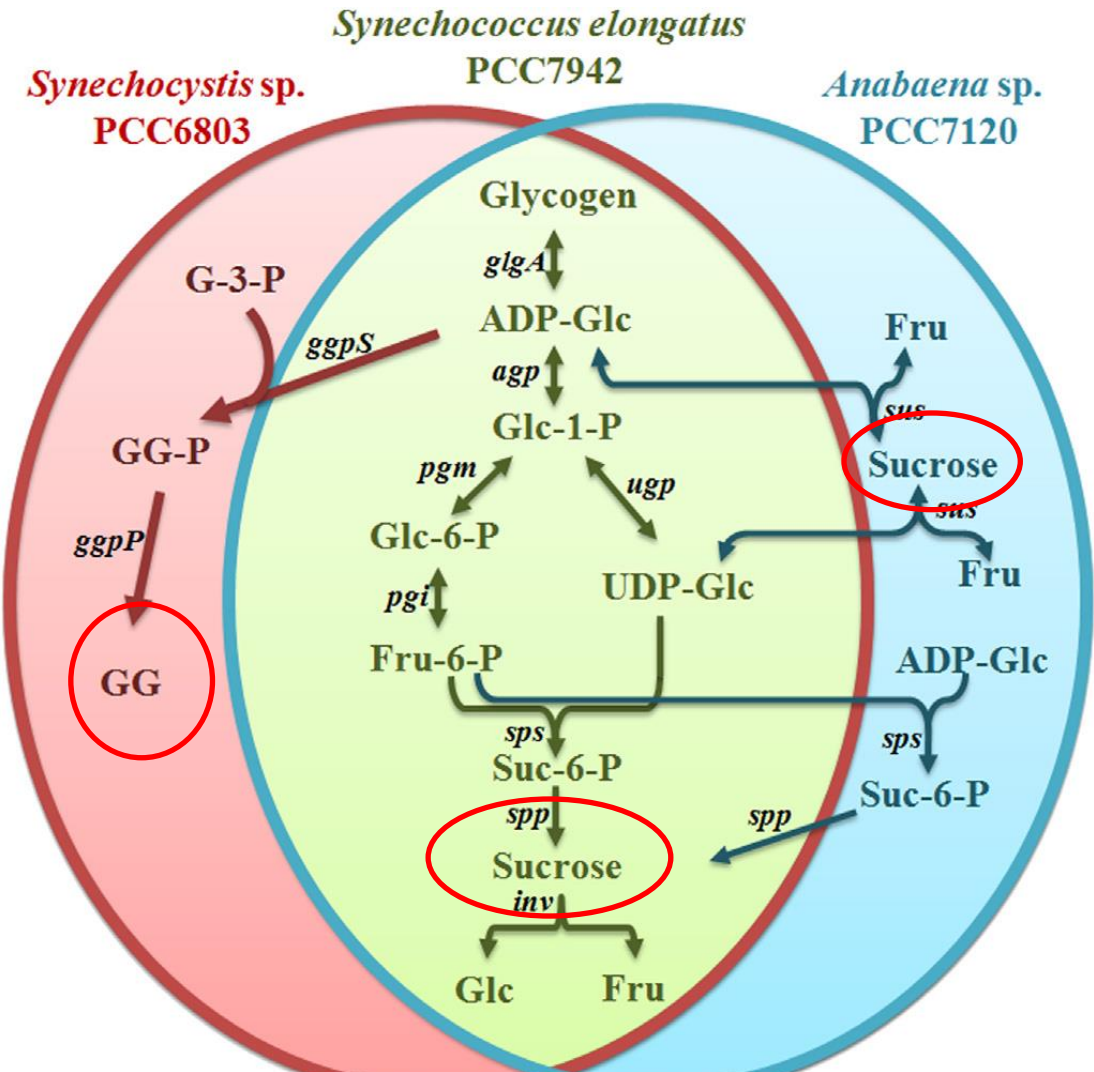
Synechococcus elongatus PCC7942

Υπό ειδικές συνθήκες (αυξημένης αλατότητας), στο κυανοβακτήριο *Synechococcus* sp PCC 7942 είναι δυνατόν να εκτραπούν οι βιοσυνθετικές οδοί προς τη συσσώρευση περίσσειας σακχαρόζης στο κυτταρόπλασμα.

Το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος του *Synechococcus elongatus* PCC7942 (PAMCOD) αυξάνει την ανθεκτικότητα στο στρες αλατότητας του *Synechococcus elongatus* PCC7942

PAMCOD (Deshnium et al. Στο Plant Mol Biol 29: 897-902, 1995) περιέχει το γονίδιο *codA* που κωδικοποιεί την οξειδάση της χολίνης, το ένζυμο που μετατρέπει τη χολίνη σε βεταΐνη της γλυκίνης. Η βεταΐνη της γλυκίνης είναι ένας συμβατός οσμόλυτης που αυξάνει το αλατοανθεκτικότητα του *Synechococcus elongatus* PCC7942.

Σακχαρόζη ένας συμβατός οσμολύτης στα κυανοβακτήρια δρά ως: α) Πηγή ενέργειας και β) ωσμοπροστατευτικός παράγοντας



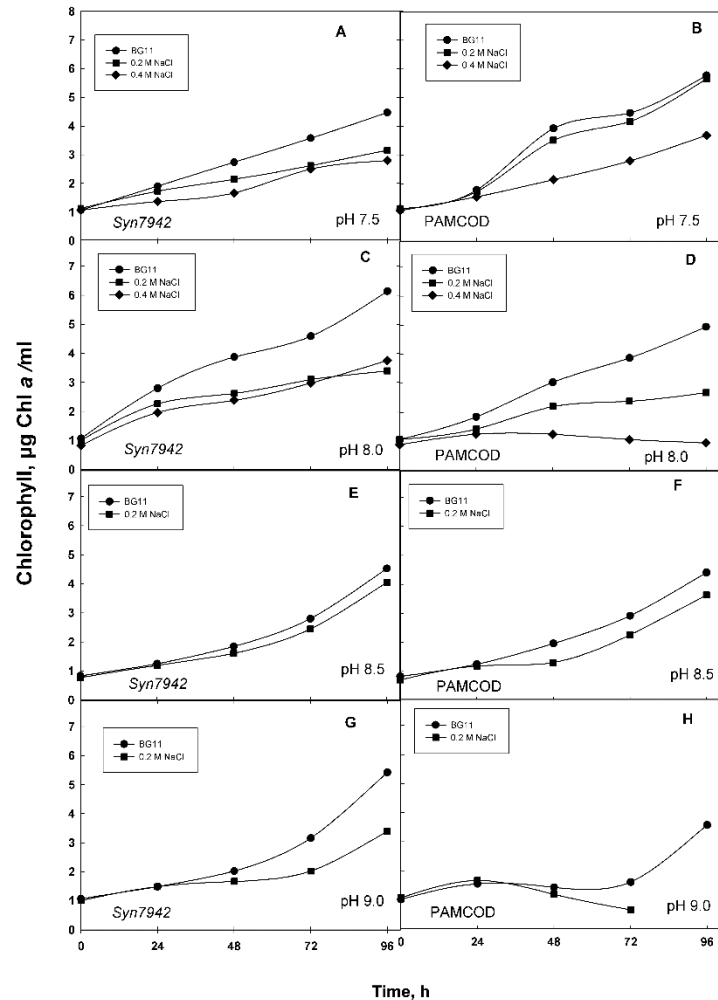
Μελέτη των στελεχών σε συνθήκες περιβαλλοντικού στρες:

- Αλατότητα
- pH
- Διοξείδιο του Άνθρακα

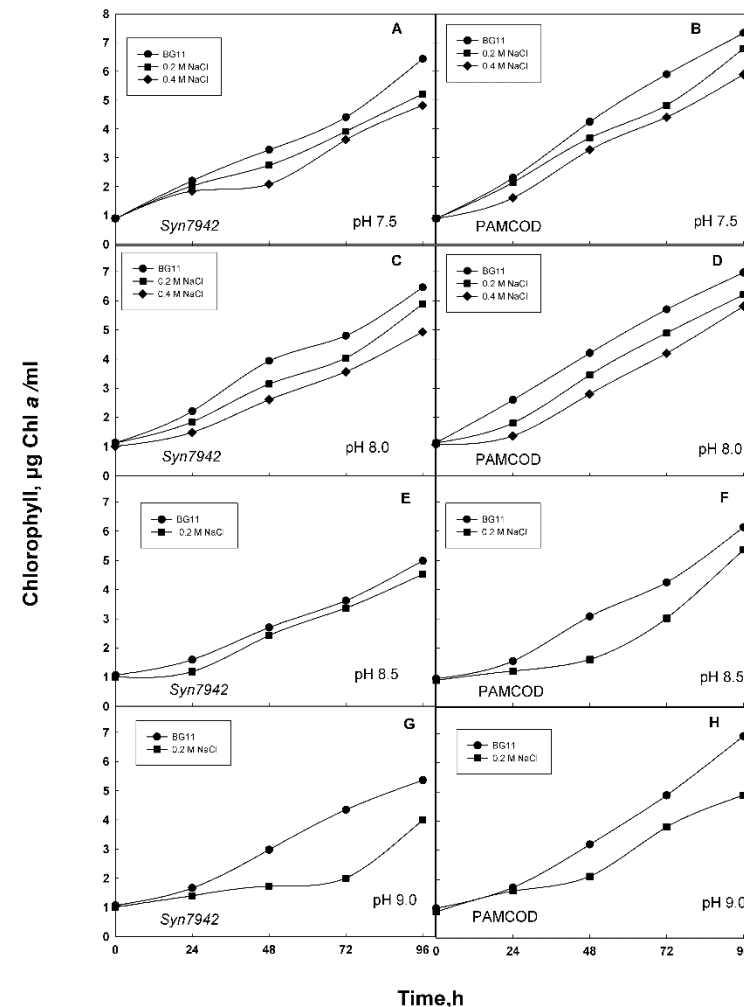
Με τελικό στόχο την παραγωγή Σακχαρόζης

1^ο βήμα: Πολλαπλασιασμός κυττάρων σε συνθήκες στρες.

A. Ατμοσφαιρικό CO₂ (0.04 %, v/v)



B. 5 % CO₂ (v/v) in air

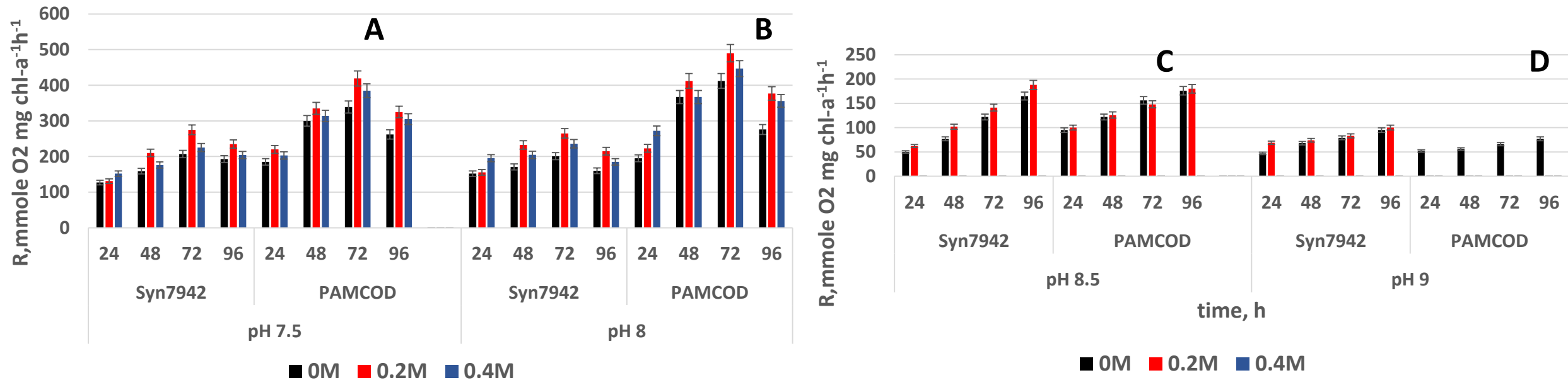


1^ο Συμπέρασμα

- Οι Πίνακες 1 και 2 υποδεικνύουν ότι: 1) και οι δύο τύποι κυττάρων (*Syn7942* και *PAMCOD*) αναπτύσσονται αποδοτικότερα σε συνθήκες εμπλουτισμένου CO_2 (Πίνακας 2) σε σχέση με το ατμοσφαιρικό CO_2 (Πίνακας 1). Τα *PAMCOD* κύτταρα «υπερισχύουν» στην ικανότητα πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα *Syn7942*, στο εύρος 7.5 - 8.5 pH και έως 0.2 M NaCl. Το βέλτιστο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και για τους δύο τύπους κυττάρων παρατηρείται σε pH 7.5 και απουσία NaCl. Τέλος στο ανώτερο όριο επιβίωσης (0.4 M NaCl) και σε αλκαλικά pHs (8.5 and 9.0) και οι δύο τύποι κυττάρων δεν είναι ικανοί να πολλαπλασιασθούν.

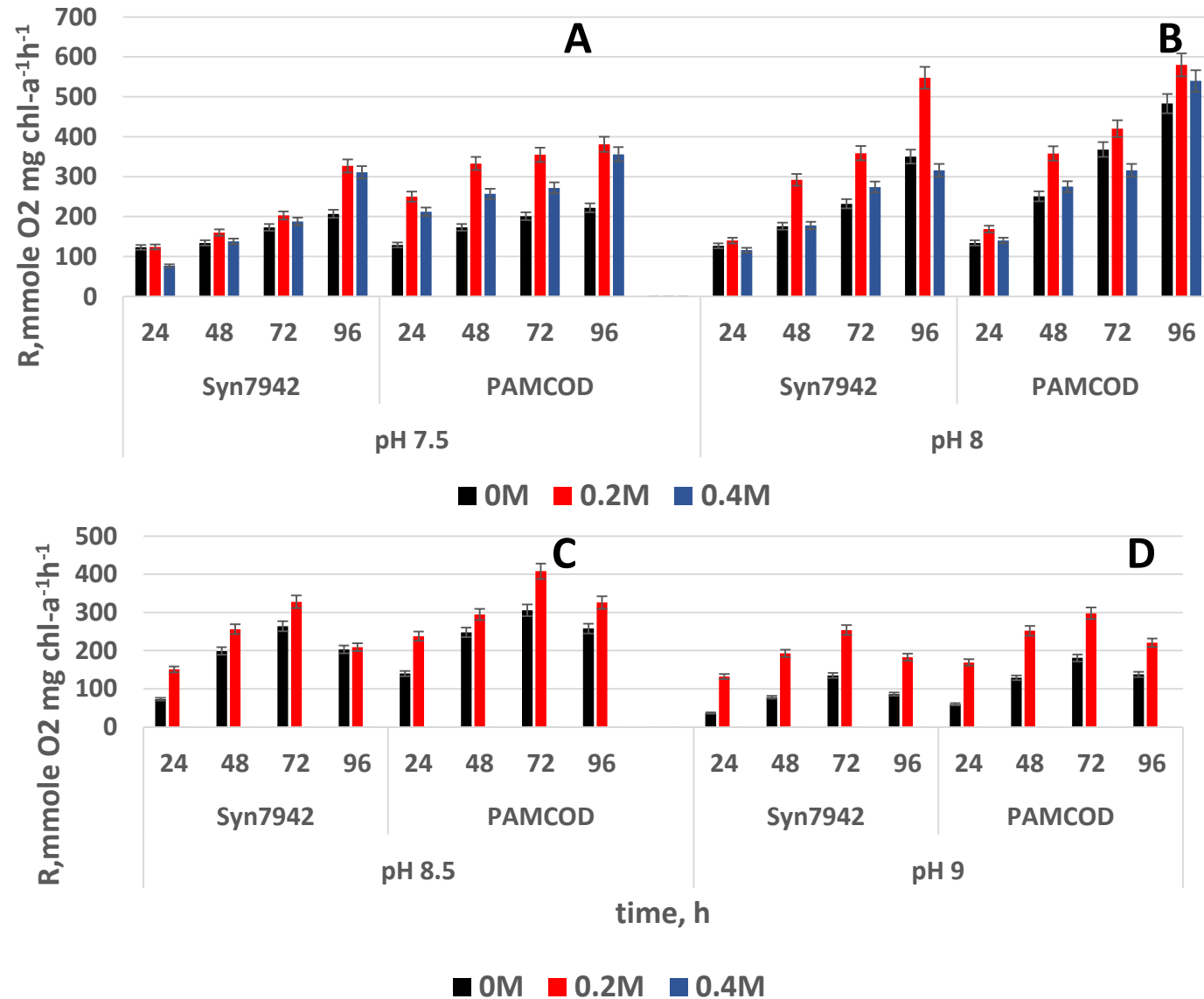
2^ο βήμα: Μελέτη της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας σε συνθήκες στρες

2.1.α. Μελέτη της συνολικής ροής ηλεκτρονίων κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των κυττάρων σε CO₂ περιβάλλοντος



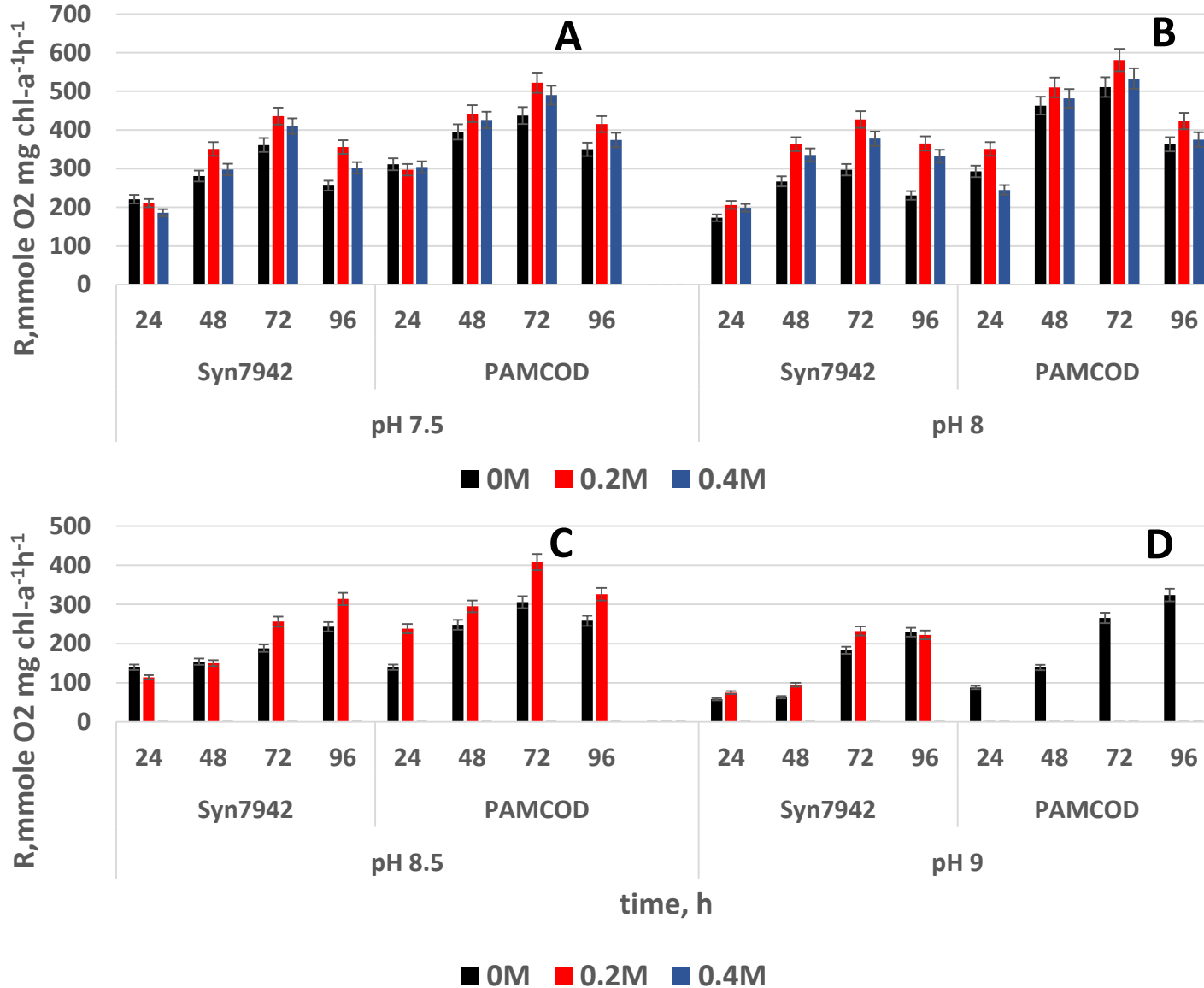
Σχ. 1. Συνολική φωτοσυνθετική δραστηριότητα, μετρούμενη σε όρους έκλυσης O₂ (H₂O → CO₂), κατά τη διάρκεια 96 ωρών ανάπτυξης της καλλιέργειας (πολλάπλασιασμού των κυττάρων) συνεχής έκθεση σε λευκό φως, σε pH 7.5, 8.0, 8.5 ή 9.0 (A, B, C, D), των κυττάρων Syn7942 και των κυττάρων PAMCOD σε CO₂ περιβάλλοντος

2.1.β. Μελέτη της συνολικής ροής ηλεκτρονίων κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των κυττάρων σε συνθήκες αυξημένου CO₂ (5% v/v αέρα)



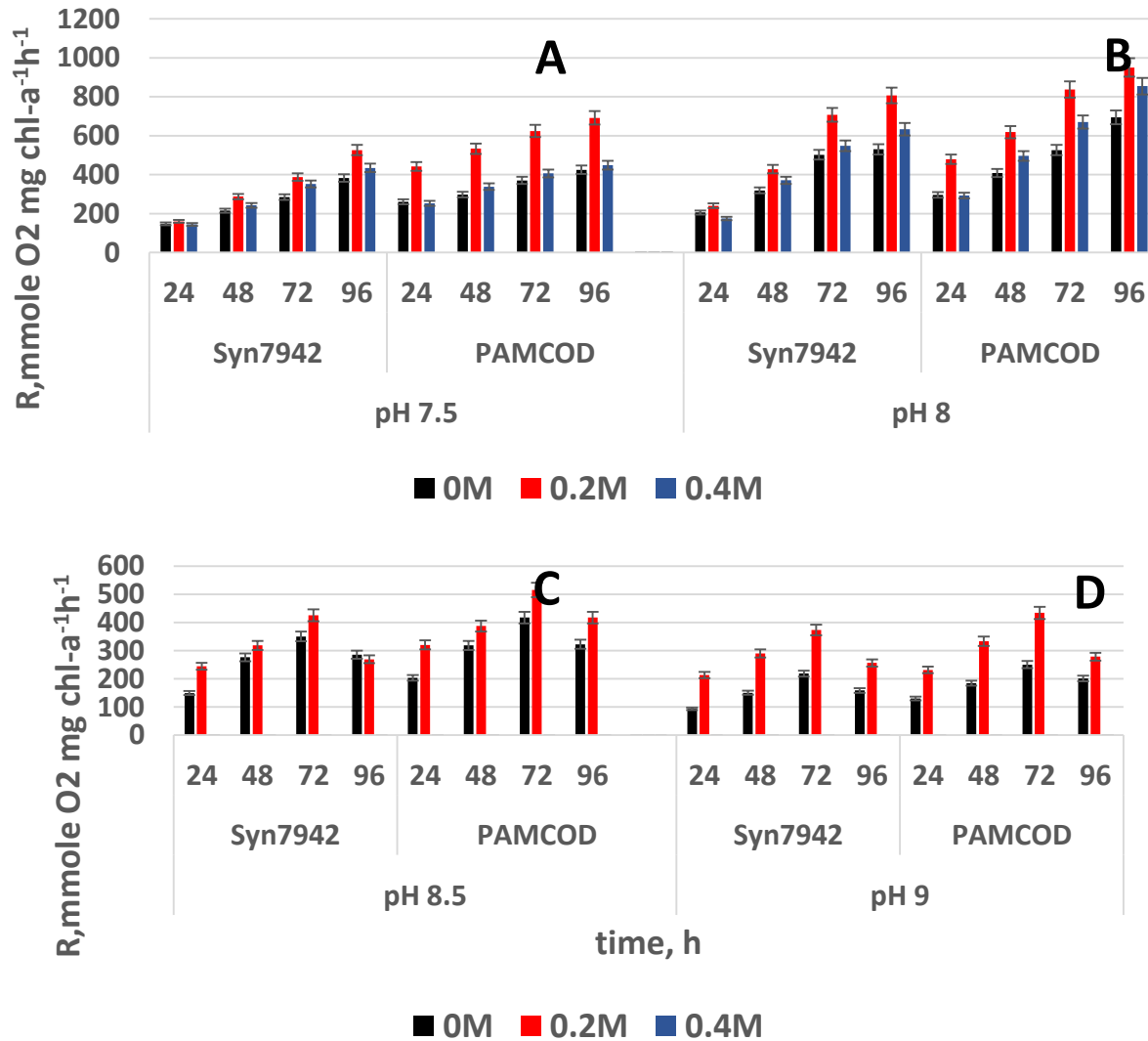
Σχ. 2. Συνολική φωτοσυνθετική δραστηριότητα, μετρούμενη σε όρους έκλυσης O₂ (H₂O → CO₂), κατά τη διάρκεια 96 ωρών ανάπτυξης της καλλιέργειας (πολλαπλασιασμού των κυττάρων) συνεχής έκθεση σε λευκό φως, σε pH 7.5, 8.0, 8.5 ή 9.0 (A, B, C, D), των κυττάρων Syn7942 και των κυττάρων PAMCOD σε συνθήκες 5% CO₂ (v/v)

2.2.α. Μελέτη της δραστηριότητας του Φωτοσυστήματος II κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των κυττάρων σε CO₂ περιβάλλοντος



Σχ. 3. Φωτοσυνθετική δραστηριότητα του Φωτοσυστήματος II, μετρούμενη σε όρους έκλυσης O₂ (H₂O → PBQ), κατά τη διάρκεια 96 ωρών ανάπτυξης της καλλιέργειας (πολλάπλασιασμού των κυττάρων) συνεχής έκθεση σε λευκό φως, σε pH 7.5, 8.0, 8.5 ή 9.0 (A, B, C, D), των κυττάρων Syn7942 και των κυττάρων PAMCOD σε CO₂ περιβάλλοντος

2.2.β. Μελέτη της δραστηριότητας του Φωτοσυστήματος II κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των κυττάρων σε CO₂ περιβάλλοντος



Σχ. 4. Φωτοσυνθετική δραστηριότητα του Φωτοσυστήματος II, μετρούμενη σε όρους έκλυσης O₂ (H₂O → PBQ), κατά τη διάρκεια 96 ωρών ανάπτυξης της καλλιέργειας (πολλάπλασιασμού των κυττάρων) συνεχής έκθεση σε λευκό φως, σε pH 7.5, 8.0, 8.5 ή 9.0 (A, B, C, D), των κυττάρων Syn7942 και των κυττάρων PAMCOD σε συνθήκες 5% CO₂ (v/v).

2^ο Συμπέρασμα

Τα αποτελέσματα της μελέτης της συνολικής φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και της δραστηριότητας του Φωτοσυστήματος ΙΙ δείχνουν ότι και οι δύο τύποι κυττάρων (Syn7942 και PAMCOD) αυξάνουν τη φωτοσυνθετική τους δραστηριότητα σε 0,2 Μ NaCl κύτταρα με σκοπό:

α) την παραγωγή σακχαρόζης

β) την ενεργό αποβολή των ιόντων Na^+ , σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν υπέστησαν την καταπόνηση αλατότητας.

Ωστόσο, σε 0,4 Μ NaCl, το κατώφλι αλατότητας για επιβίωση, η δραστηριότητα είναι περιορισμένη.

Επιπλέον, σε συνθήκες αυξημένου CO_2 και οι δύο τύποι κυττάρων (Syn7942 και PAMCOD) αυξάνουν τη φωτοσυνθετική τους δραστηριότητα σε όλες τις συνθήκες αλατότητας.

Για την παραγωγή Σακχαρόζης...

A. Ατμοσφαιρικό CO₂ (0.04 %, v/v)

Κυτοπλασματική σακχαρόζη (μετρημένη ως sucrose/Chl
a molar ratio).

----- --	NaCl, M	pH 7.5	pH 8.0	pH 8.5	pH 9.0
Syn 7942	0	0.1±0.05	0.1±0.05	0.0	0.0
PAMCOD		0.4±0.05	0.2±0.05	0.0	0.0
Syn 7942	0.2	3.4±0.1	1.1±0.1	1.4±0.1	0.8±0.1
PAMCOD		4.0±0.1	1.6±0.1	1.8±0.2	0.5±0.1
Syn 7942	0.4	5.1±0.2	4.2±0.1	0.0	--
PAMCOD		10.0±0.5	9.4±0.4	0.0	--

B. 5 % CO₂ (v/v)

Κυτοπλασματική σακχαρόζη (μετρημένη ως sucrose/Chl
a molar ratio).

----- --	NaCl, M	pH 7.5	pH 8.0	pH 8.5	pH 9.0
Syn 7942	0	0.0	0.0	0.0	0.0
PAMCOD		0.0	0.0	0.0	0.0
Syn 7942	0.2	3.7±0.2	2.7±0.2	2.0±0.1	1.3±0.1
PAMCOD		6.6±0.2	4.9±0.2	6.3±0.4	1.6±0.1
Syn 7942	0.4	6.5±0.3	6.1±0.3	--	--
PAMCOD		13.5±0.4	10.9±0.3	--	--

2^ο Συμπέρασμα

Η συγκέντρωση σακχαρόζης είναι αυξημένη στα *PAMCOD* κύτταρα σε σχέση με τα *Syn7942* σε όλες τις συνθήκες.

Βέλτιστες συνθήκες είναι:

α) pH 7.5

β) παρουσία 0.4 M NaCl, και

γ) παρουσία εμπλουτισμένου CO₂ (5% v/v).

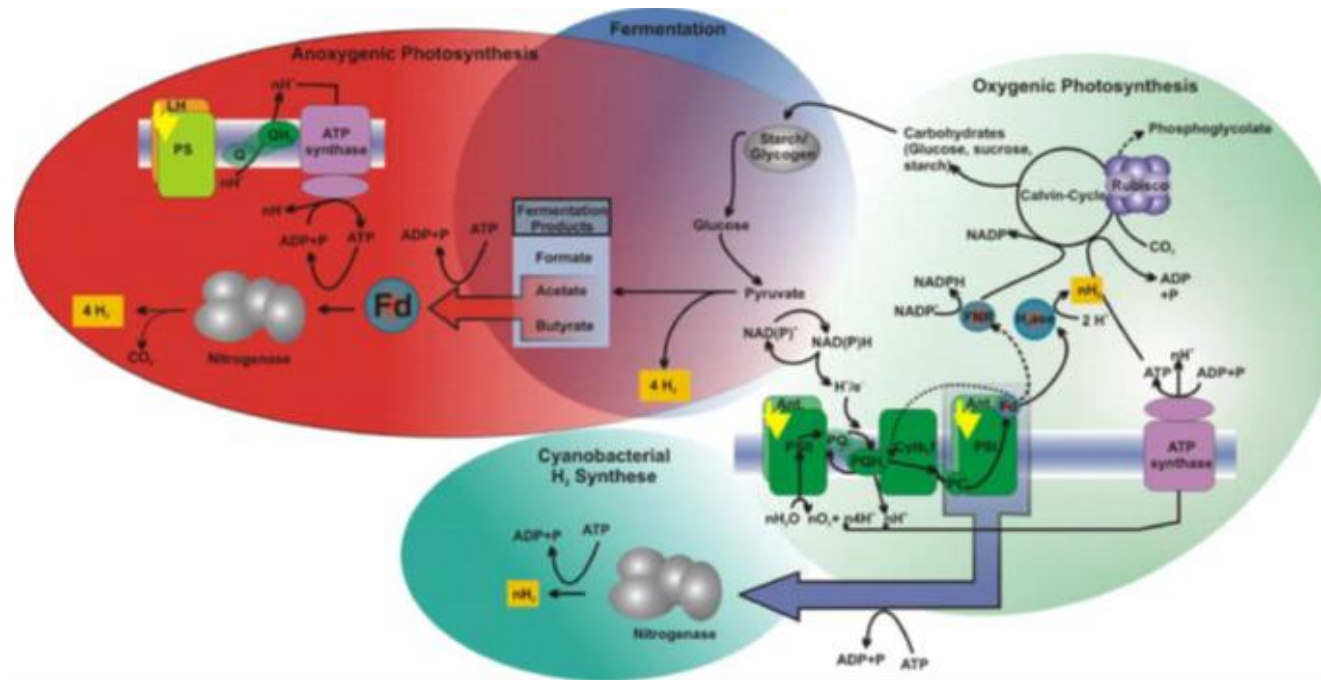
Η συλλογή της σουκρόζης απαιτεί λύση των κυττάρων και περαιτέρω επεξεργασία γεγονός που αυξάνει το κόστος αλλά και απαιτεί συνεχώς νέα κύτταρα.

2^ο Βήμα: Είναι ικανά τα κύτταρα να μετατρέψουν την συσσωρευθείσα σακχαρόζη σε αέριο υδρογόνο;

Για την μετατροπή αυτή απαιτείται:

- (i) ενδογενής υδρόλυση της σακχαρόζης σε εξόζες (γλυκόζη και φρουκτόζη) από ενδοκυτταρική ινβερτάση (παρούσα και στο *Syn7942*),
- (ii) Σχηματισμός NADH μέσω της γλυκόλυσης των εξοζών,
- (iii) Αναγωγή των H⁺ σε μοριακό H₂ μέσω του NADH στις [Ni, Fe]-Υδρογενάσες των κυανοβακτηρίων (παρούσα και στο *Syn7942*).

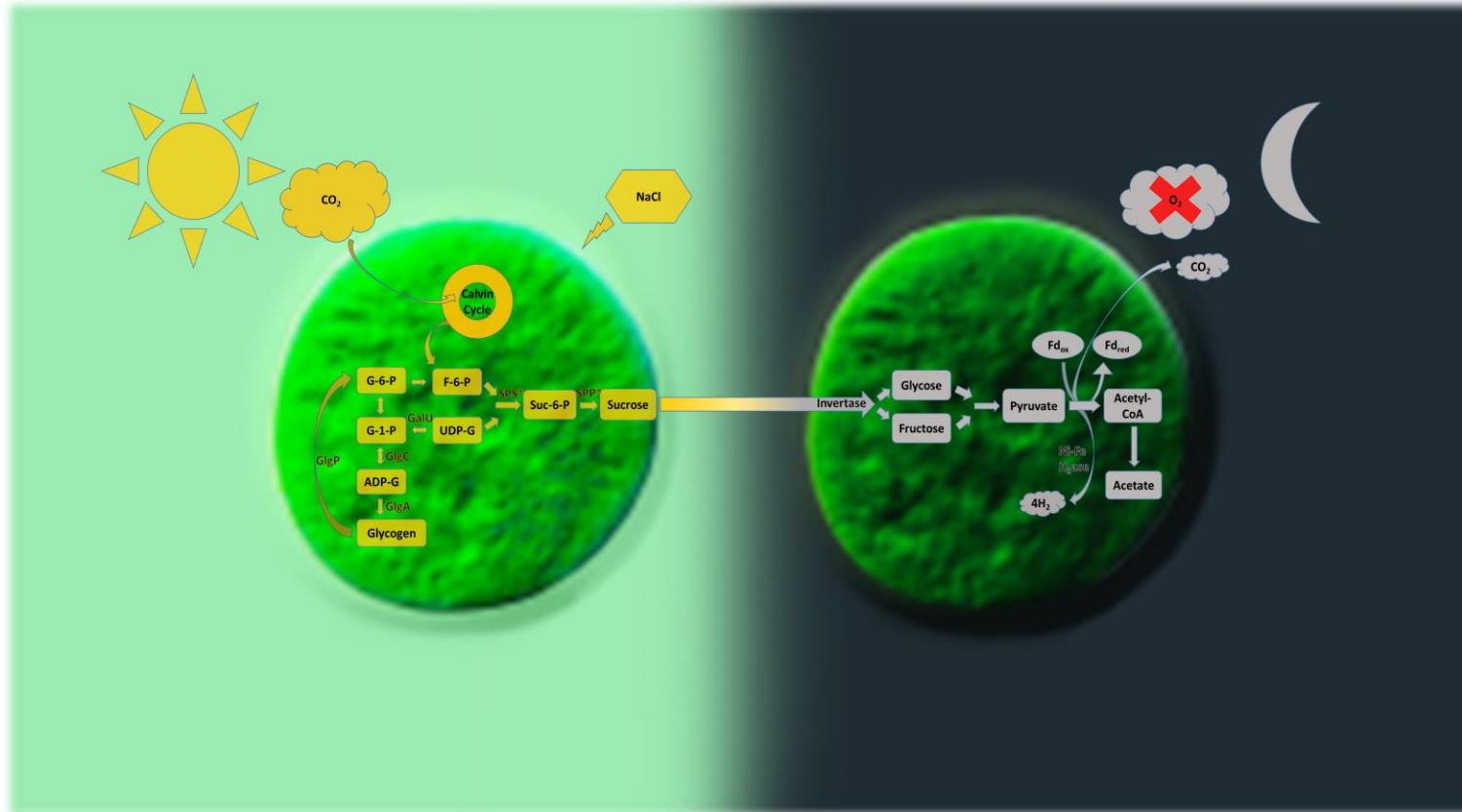
Η διαδικασία ονομάζεται «σκοτεινή» αναερόβια ζύμωση παράγει μοριακό H₂ και δεν απαιτεί λύση των κυττάρων, απαιτεί ενεργά κύτταρα.



Παραγωγή H₂ μέσω «σκοτεινής» ζύμωσης της ενδοκυτταρικής σακχαρόζης στο μονοκύτταρο *Syn7942* and *PAMCOD*.

Συνθήκες καλλιέργειας	Συνθήκες αναερόβιας ζύμωσης	<i>Syn7942</i>	<i>PAMCOD</i>
Φώς, NaCl 0.4M, pH 7.5	Φώς	H ₂ not detected	H ₂ not detected
Φώς, No NaCl, pH 7.5	Σκοτάδι	H ₂ not detected	H ₂ not detected
Φώς, NaCl 0.4M, pH 7.5	Σκοτάδι	0.76±0.01 nmol H ₂ × mgChl α ⁻¹ × h ⁻¹	2±0.01 nmol H ₂ × mgChl α ⁻¹ × h ⁻¹

Μοντέλο παραγωγής H₂ από κυανοβακτήρια και η επιλογή του *Synechococcus elongatus* PCC7942



- Η διαδρομή φωτο-H₂: Φωτοσύνθεση από H₂O μέσω των δύο φωτοσυστημάτων (PS) που αποδίδουν H⁺ (lumen) και NADPH (cytosol).
- Η διεργασία ζυμώσεως-H₂: Ζύμωση στο σκοτάδι των αναγωγικών παραγώγων άνθρακα που παράγεται με φωτοσύνθεση (τυπικά γλυκογόνο).

Μέγιστη απόδοση 4H₂ / γλυκόζη, με CO₂ ως παραπροϊόν

Πιστεύω ότι το νερό θα χρησιμοποιηθεί μια μέρα ως καύσιμο, επειδή το υδρογόνο και το οξυγόνο που το συνθέτουν, χρησιμοποιούμενα ξεχωριστά ή μαζί, θα παράσχουν μια ανεξάντλητη πηγή θερμότητας και φωτός. Πιστεύω λοιπόν ότι, όταν οι ορυκτές ποσότητες άνθρακα οξειδωθούν, θα ζεσταθούμε με νερό. Το νερό είναι ο άνθρακας του μέλλοντος."

Ιούλιος Βέρν 1875

Παραδοτέα:

Δημοσίευση σε περιοδικά με κριτές:

Vayenos D., Romanos Em. G., Papageorgiou G. C., Stamatakis K. (2020) The freshwater cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 under salt stress: A cell factory for sucrose and hydrogen production. *Photosynth. Research* 146: 235-245

Παρουσίαση σε διεθνές συνέδριο:

D. Vayenos, G. C. Papageorgiou, G. Em. Romanos, K. Stamatakis (2019) *Synechococcus* sp. PCC7942: A cyanobacterium cell factory for producing useful chemicals and fuels under abiotic stress conditions. 10th International Conference "Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability - 2019", 23 - 28 June 2019, Saint Petersburg, Russia

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (SANITURA)» (MIS 5002514) που εντάσσεται στη Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



5.3α

Αναφορά για την εφαρμογή της μεθόδου στην αξιολόγηση της πιθανής αντιμικροβιακής δράσης φυσικών ή συνθετικών ουσιών και επιφανειών

5.3β

Εφαρμογή μεθόδου αξιολόγησης πιθανής αντιμικροβιακής δράσης φυσικών ή συνθετικών

Δι-Ινστιτουτική συνεργασία

Εργ. Βιοφυσικής και Βιοτεχνολογίας Μεμβρανών (IB-E)- Εργαστήριο Μεμβρανών και Μικροπορώδων Υλικών για Περιβαλλοντικούς Διαχωρισμούς (INN)- Εργαστήριο Λειτουργικών Νανοϋλικών Οργανωμένης Δομής (INN)- Εργαστήριο Νανοτεχνολογίας Πλάσματος και Εφαρμογών (INN)

Ανάπτυξη Μεθόδου ελέγχου αντιμικροβιακής δράσης υλικών

Χαρακτηριστικά γνωστών αντιμικροβιακών test (AST)

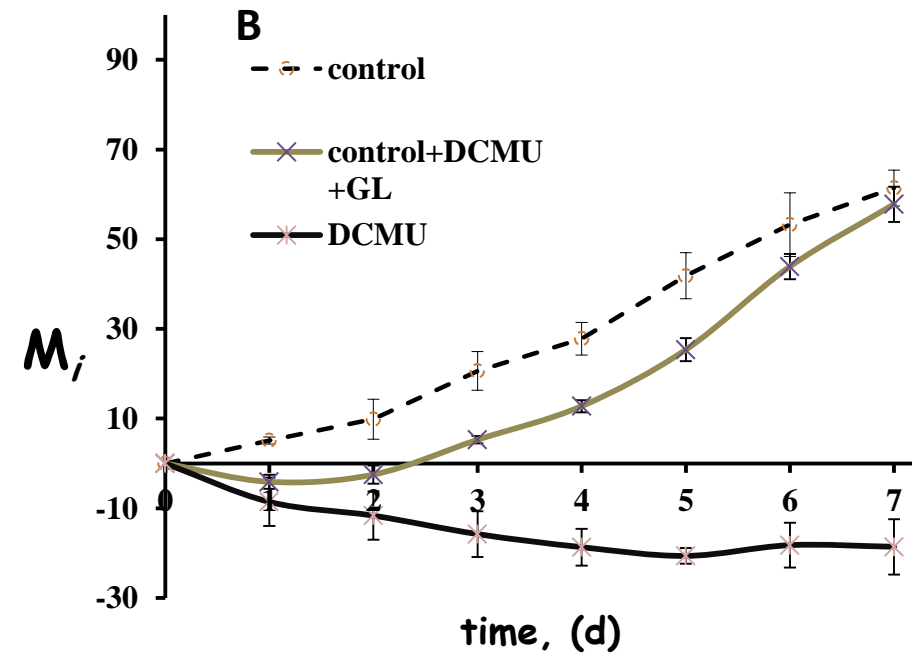
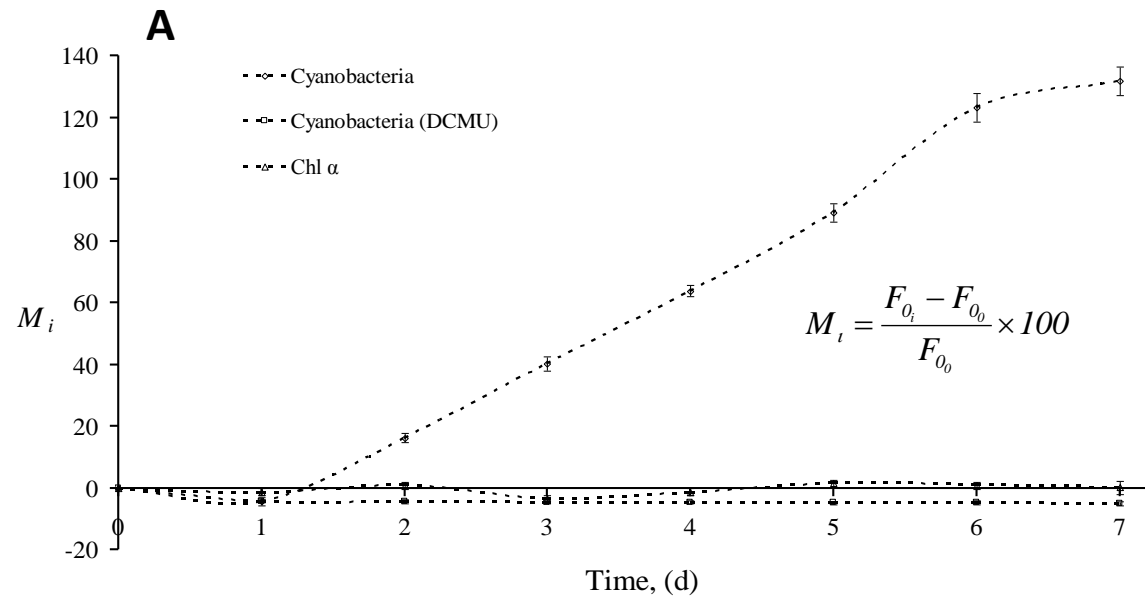
1. Έμμεσα
2. Υποκειμενικός τρόπος μέτρησης αποικιών των μικροοργανισμών μετά την αποκόλληση τους από την προς εξέταση επιφάνεια και την αναπτυξή τους σε νέο μέσο.

Μέθοδος του φθορισμού της χλωροφύλλης των κυανοβακτηρίων (CFM)

Θεωρία-Βασικά στοιχεία της Μεθόδου.

Τα κυανοβακτήρια είναι gram negative βακτήρια. Επικολλώνται και αναπτύσσονται σε οποιαδήποτε επιφάνεια σχηματίζοντας biofilm. Όταν φωτίζονται ο φθορισμός της ενδογενούς τους χλωροφύλλης λαμβάνει μέγιστη τιμή σε sec. Η πρώτη μετρήσιμη τιμή του (μs) είναι σταθερή και ονομάζεται F_0 .

Δείξαμε ότι το F_0 ακολουθεί τον πολλαπλασιασμό των κυανοβακτηρίων

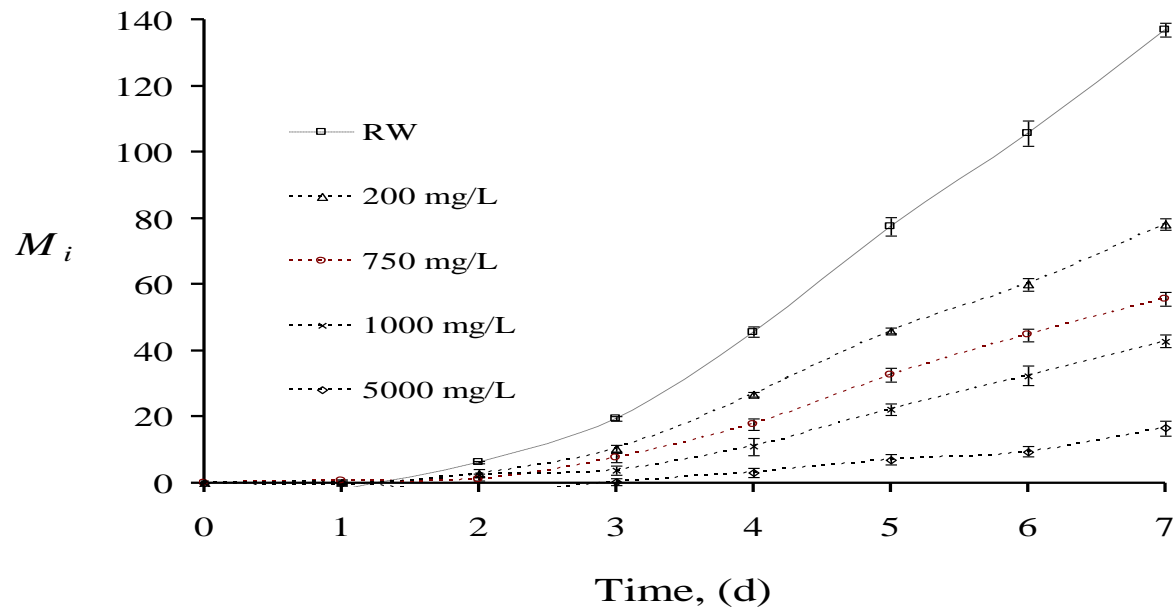


Εικ.1. Καμπύλες ανάπτυξης του M_i των κυανοβακτηρίων παρουσία αναστολέα της φωτοσύνθεσης (DCMU) καθαρής χλωροφύλλης (Chl a) σε υλικό προς εξέταση. F_{0_0} φθορισμός της Chl a των κυανοβακτηρίων σε 0 χρόνο. fluorescence of cyanobacterium at zero time. F_{0_i} φθορισμός της Chl a των κυανοβακτηρίων κατά την διάρκεια των 1,2,...,i ημερών. **A. Αυτότροφο; *Synechococcus* sp PCC 7942. **B.** Ετερότροφο; *Synechosystis* sp PCC 6714. (20 μM DCMU/5 mM Γλυκόζη)**

Αξιολόγηση και έλεγχος της μεθόδου

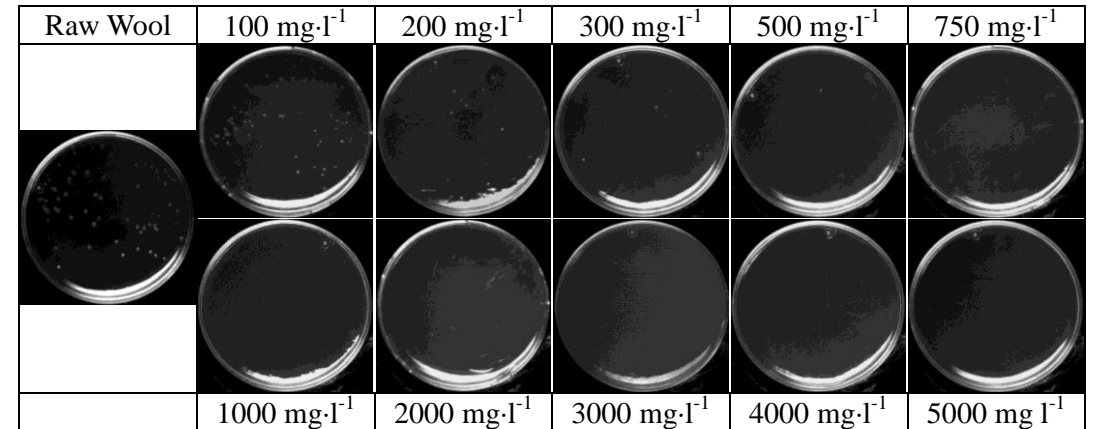
Η ΑΑΤCС 100-2004 μέθοδος χρησιμοποιήθηκε ως standard μέθοδος για τον έλεγχο και αξιολόγηση των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων σε μάλλινο ύφασμα και μάλλινο ύφασμα παρουσία ιόντων Cu^{++} .

CFM μέθοδος



Εικ. 2. Καμπύλες ανάπτυξης σε μάλλινο ύφασμα και σε μάλλινο ύφασμα εμπλουτισμένο με ιόντα ^{++}Cu .

ΑΑΤCС 100-2004 standard μέθοδος



Εικ. 3 Ανιβακτηριακή δράση των ιόντων ^{++}Cu σε μάλλινο ύφασμα με τη χρήση της ΑΑΤCС 100-2004 standard μεθόδου

Εξετασθέντα Υλικά:

Textile (Wool), Viscose, Polymethyl methacrylate (PMMA), PMMA with Cu^{++} , plasma nanotextured superhydrophobic surfaces, Water-Soluble Multi-Walled Carbon Nanotubes

Συμπέρασμα

- 1. Τα αποτελέσματα της μεθόδου είναι ποσοτικά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση διαφόρων επιφανειών σε συνθήκες πραγματικού χρόνου.
- 2. Η μέθοδος εφαρμόζεται στα υλικά και μπορούν να ελεγχθούν σε πραγματικές συνθήκες του υλικού.
- 3. Έχει μεγάλη ευαισθησία και εφαρμόζεται ταυτόχρονα σε πολλές υλικά καθιστώντας την και οικονομικά αποδεκτη.
- 4. Η χρήση οργάνου καθιστά τη μέθοδο ακριβή και η συλλογή αποτελεσμάτων κάθε 10 s επιτρέπουν γρήγορη και ταυτόχρονη συλλογή τους.

Δημοσιεύσεις

- 1. Heliopoulos, N.S., Papageorgiou, S.K., Galeou, A., Favvas, E.P., Katsaros, F.K., Stamatakis, K. (2013) Effect of copper and copper alginate treatment on wool fabric. Study of textile and antibacterial properties. *Surface and Coatings Technology* 235: 24-31.
- 2. Heliopoulos, N.S., Galeou, A., Papageorgiou, S.K., Favvas, E.P., Katsaros, F.K., Stamatakis, K. (2015) An in situ antimicrobial susceptibility testing method based on in vivo measurements of chlorophyll a fluorescence. *Journal of Microbiological Methods*, 112: 49-54
- 3. Heliopoulos, N.S., Galeou, A., Papageorgiou, S.K., Favvas, E.P., Katsaros, F.K., Stamatakis, K. (2016) Modified in situ antimicrobial susceptibility testing method based on cyanobacteria chlorophyll a fluorescence. *Journal of Microbiological Methods*, 121: 1-4
- 4. Ellinas, K., Kefallinou, D., Stamatakis, K., Gogolides, E., Tserepi, A. (2017) Is there a threshold in the antibacterial action of superhydrophobic surfaces? *ACS Applied Materials & Interfaces* 9: 39781-39789
- 5. Kefallinou, D., Ellinas, K., Speliotis Th., Stamatakis, K., Gogolides, E., Tserepi, A. (2019) Optimization of Antibacterial Properties of "Hybrid" Metal-Sputtered Superhydrophobic Coatings, 10, 25; doi:10.3390/coatings10010025Surfaces
- 6. Heliopoulos S. N., Kouzilos N. G., Papageorgiou S. K., Stamatakis K., Katsaros F. K. (2020) Viscose fabric functionalized with Copper and Copper Alginate treatment toward Antibacterial and UV blocking Properties. *Fibers and Polymers* 21: 1238-1250
- 7. Heliopoulos S. N., Kythreoti G., Lyra K.M., Panagiotaki N.K., Papavasiliou A., Sakellis E., Papageorgiou S., Kouloumpis A, Gournis D., Katsaros K.F., Stamatakis K., Sideratou Z. (2020) Cytotoxicity Effects of Water-Soluble Multi-Walled Carbon Nanotubes Decorated with Quaternized Hyperbranched Poly(ethyleneimine) Derivatives on Autotrophic and Heterotrophic Gram-Negative Bacteria. *Pharmaceuticals* 2020, 13: 293

Δημοσιεύσεις σε πρακτικά διεθνών συνεδρίων

- 1. N. S. Heliopoulos, A. Galeou, S. K. Papageorgiou, E. P. Favvas, F. K. Katsaros, E. Gogolides, A. Tserepi, K. Ellinas, D. Kefallinou, K. Stamatakis An in situ antimicrobial susceptibility testing method based on cyanobacteria chlorophyll a fluorescence 12th Workshop on Cyanobacteria Arizona State University Campus, Tempe, Arizona, May 19-22, 2016
- 2. Z. Sideratou, F. Katsaros, N. Heliopoulos, K. Stamatakis, S. Papageorgiou, Th. Tsoufis, Novel Dendritic Polymer-Functionalized Nanostructured Carbon-Based Materials with Antibacterial Properties, American Advanced Materials Congress 2016, 4-9 December 2016, Miami, USA



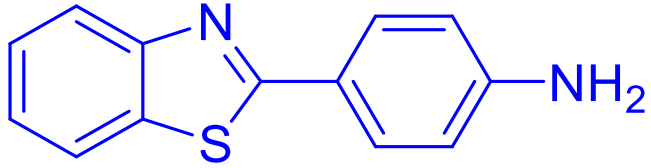
Co-financed by Greece and the European Union

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΠΥΡΗΝΙΚΟ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟ (NMR)

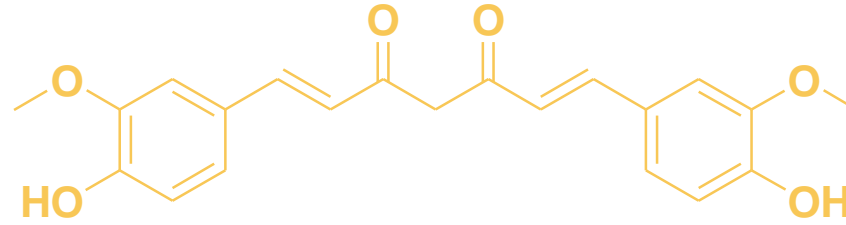
ΣΑΝΙΤΥΡΑ (ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ): έργο ΕΣΠΑ (MIS 5002514) για την ενίσχυση των ερευνητικών δραστηριοτήτων του ΙΒΕ

4.1	Σχεδιασμός σύνθεσης και αξιολόγηση στοχευμένων κυτταροτοξικών ενώσεων
4.3.1β	Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση καινοτόμων ενώσεων με πολυδύμανη δράση

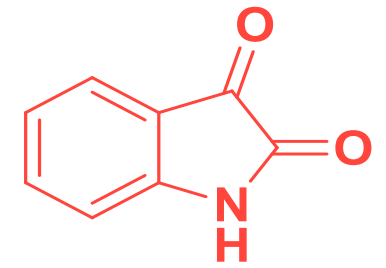
Μ. Πελεκάνου (Διευθύντρια Ερευνών)
Μ. Σαγνού
Α. Παναγιωτοπούλου
Β. Μαυροειδή
Δ. Ματιάδης (Χρηματοδότηση από ΚΡΗΠΙΣ II)
Ε. Χαλέβας



4-Αμινοφαινυλο-
βενζοθειαζόλιο (Bz)



Κουρκουμίνη (Cur)



Ισατίνη (Isa)

- Εκλεκτική κυτταροτοξική δράση σε κύτταρα καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών.
- Ικανότητα πρόσδεσης στις αμυλοειδείς πλάκες της νόσου του Alzheimer
- Φθορίζει



ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ Ή/ΚΑΙ
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

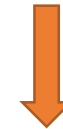
- Φυσικό προϊόν με θεραπευτικές ιδιότητες γνωστές από τις Κινέζικες και Αγίουβερδικές παραδοσιακές πρακτικές
- Πολυδύναμο μόριο με αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντι-Alzheimer, νευροπροστατευτική, επουλωτική, αντικαταθλιπτική, αντιβακτηριακή

- Φθορίζει



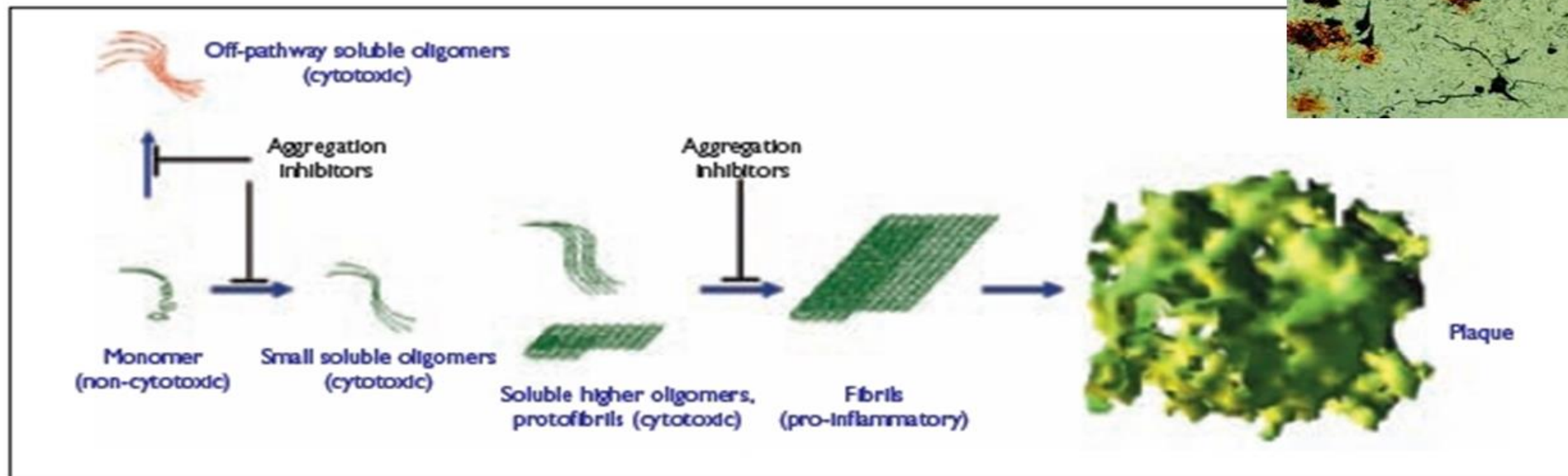
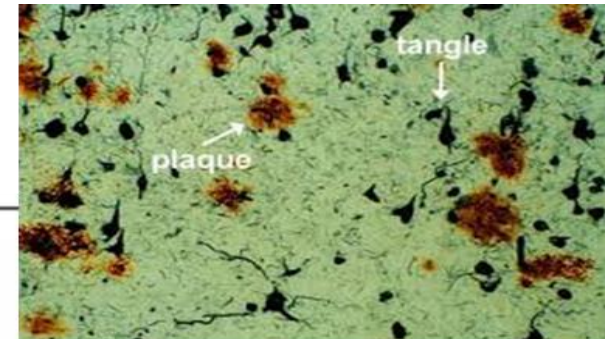
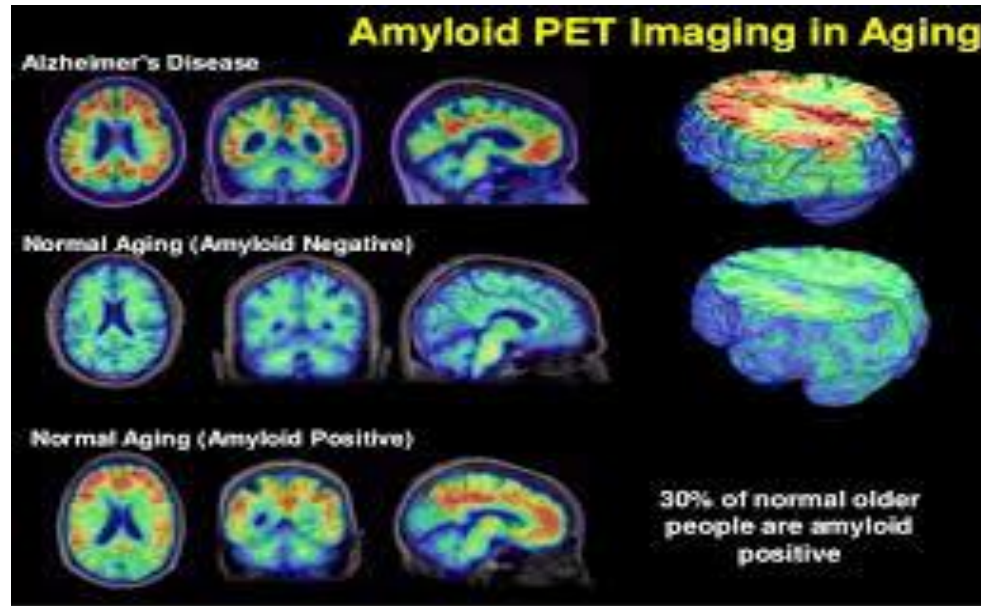
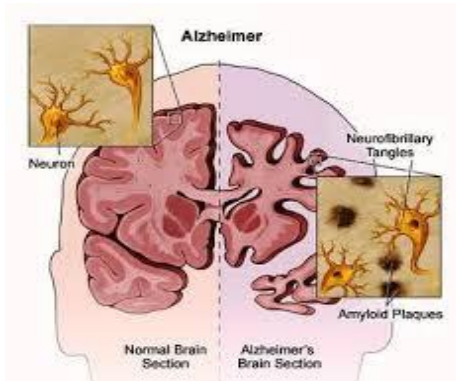
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ Ή/ΚΑΙ
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

- Φυσικό προϊόν που αποτελεί τη δομική μονάδα πολλών φαρμακευτικών ουσιών με αντι-ιικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριακές και αντισπασμωδικές ιδιότητες



ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ Ή/ΚΑΙ
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Διάγνωση/Θεραπεία της νόσου ALZHEIMER

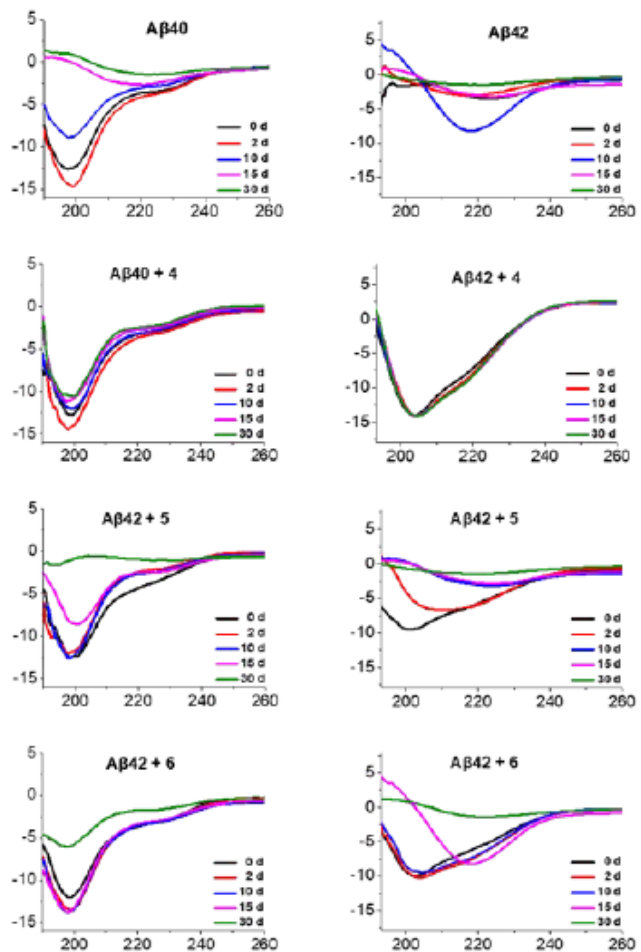
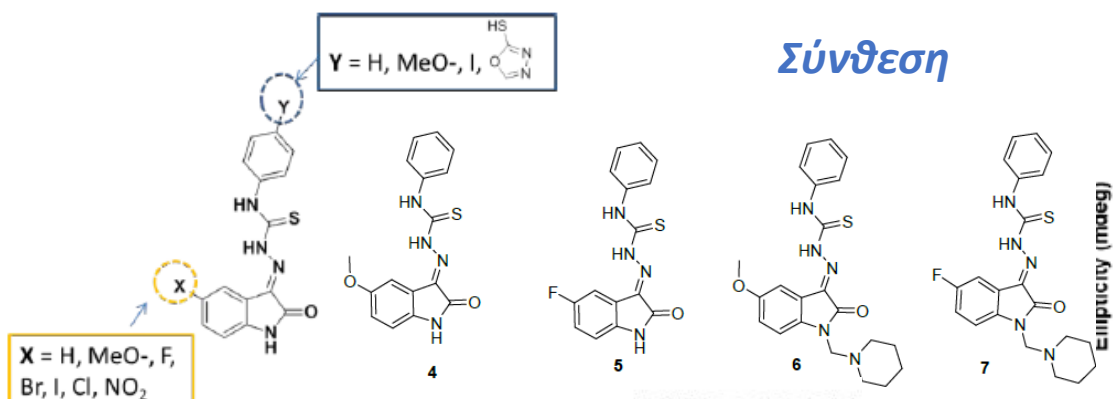


Novel isatin thiosemicarbazone derivatives as potent inhibitors of β -amyloid peptide (β) aggregation and toxicity

Marina Sagnou, Barbara Mavroidi, Archontia Kaminari, Nikos Boukos, and Maria Pelecanou

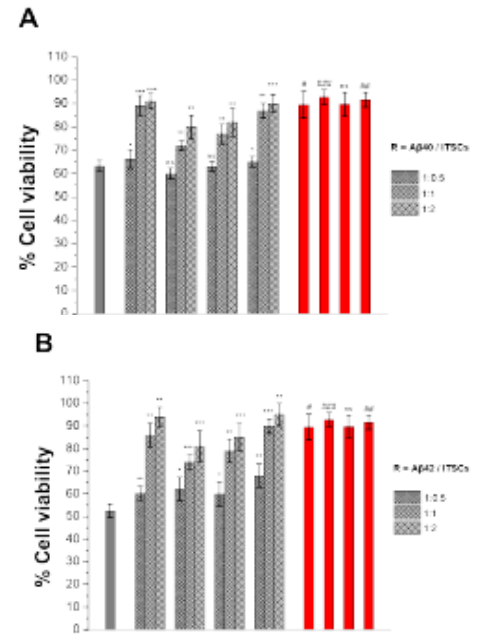
ACS Chem. Neurosci., Just Accepted Manuscript • DOI: 10.1021/acchemneuro.0c00208 • Publication Date (Web): 29 Jun 2020

Downloaded from pubs.acs.org on July 1, 2020

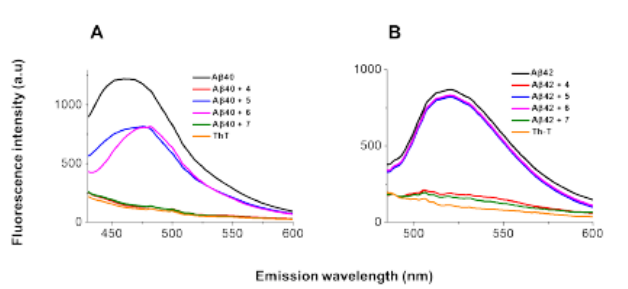
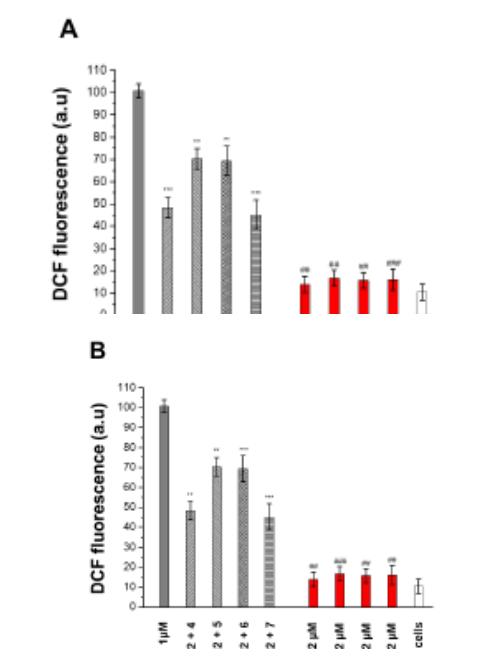


Κυκλικός διχρωσμός για τη μελέτη αναστολής πολυμερισμού του αμυλοειδούς πεπτιδίου Αβ

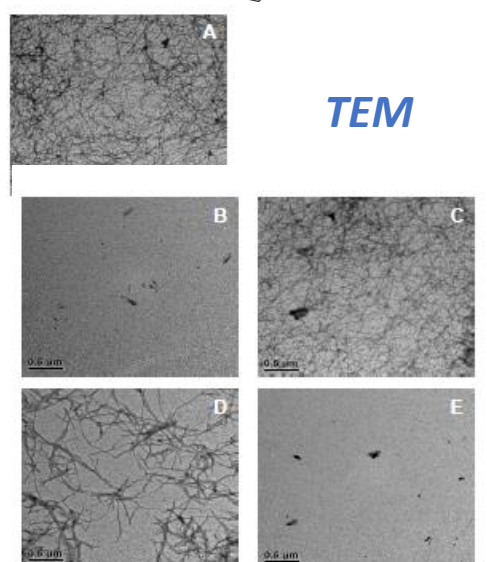
Αναστολή κυτταροτοξικότητας που προκαλεί το Αβ (MTT)



Μείωση επιπέδων ROS που προκαλεί το Αβ (MTT)

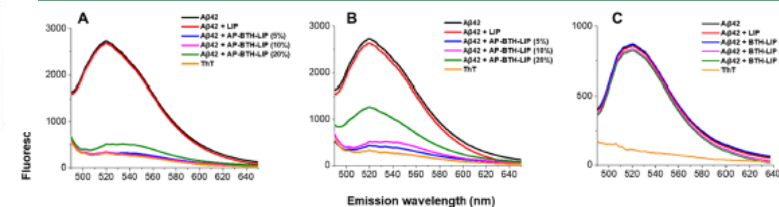
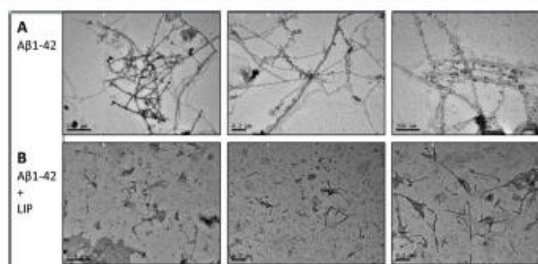
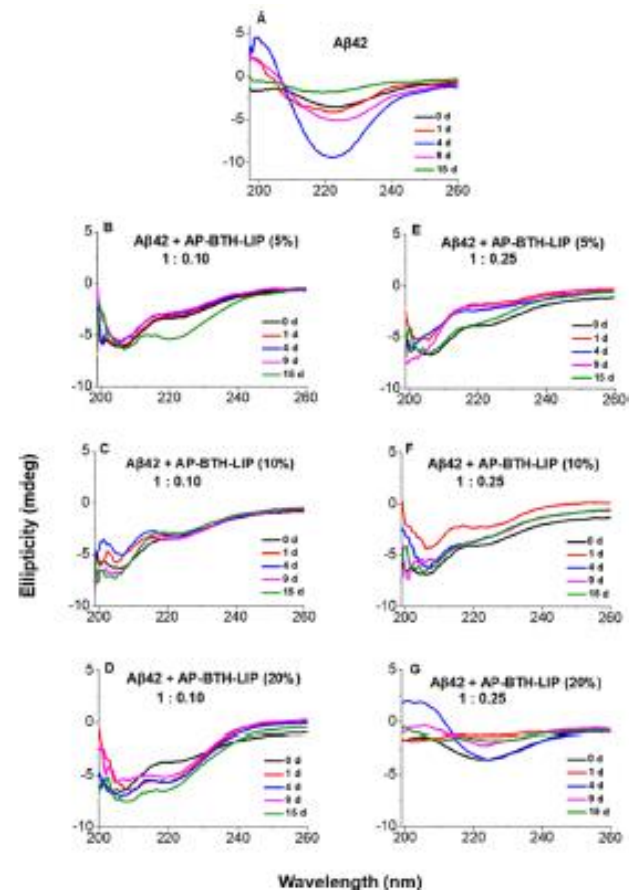
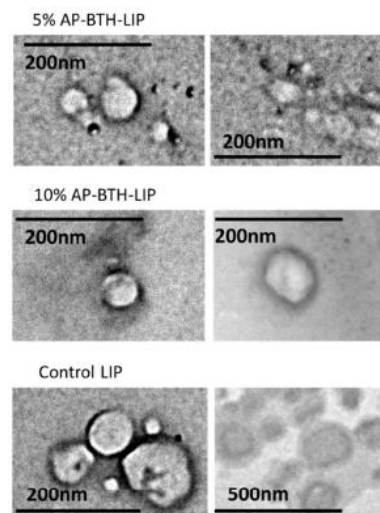
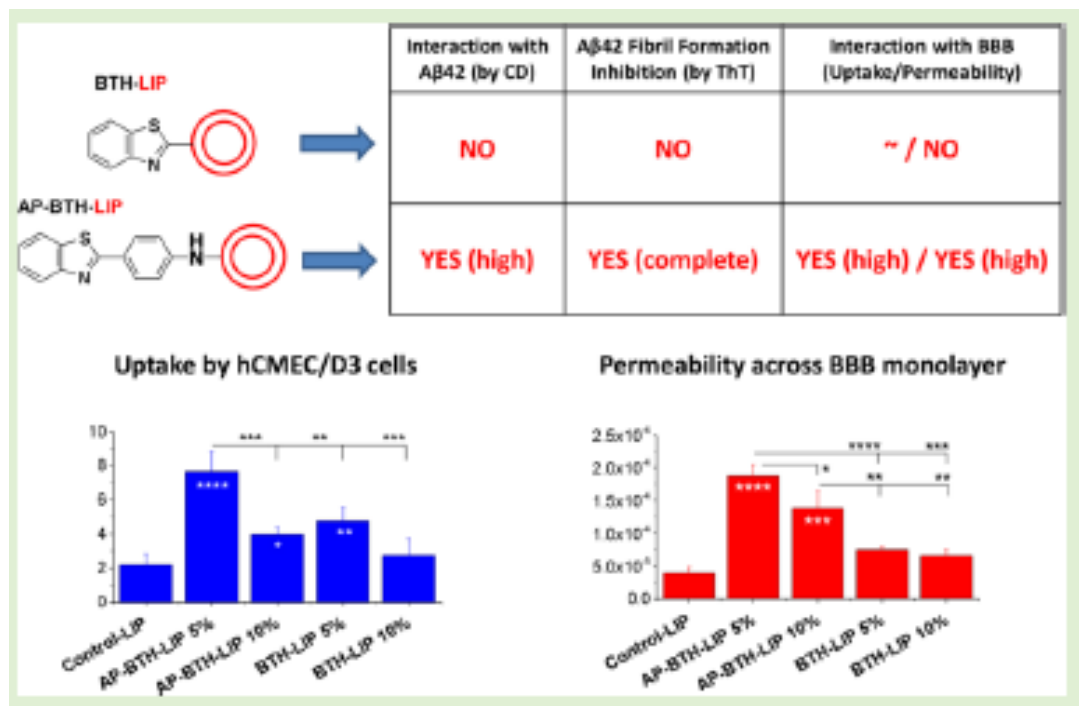


Τεστ πρόσδεσης Θειοφλαβίνη T

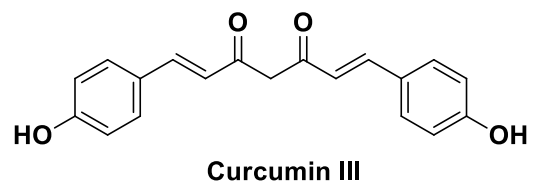
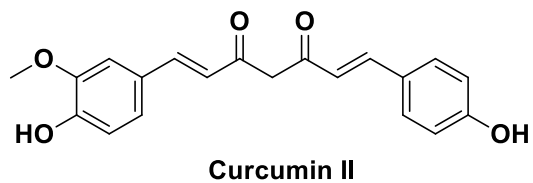
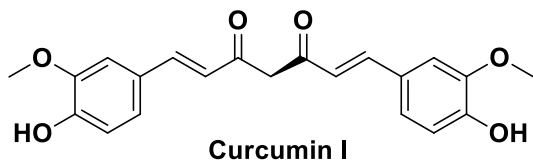


Liposomes Decorated with 2-(4'-Aminophenyl)benzothiazole Effectively Inhibit $A\beta_{1-42}$ Fibril Formation and Exhibit in Vitro Brain-Targeting Potential

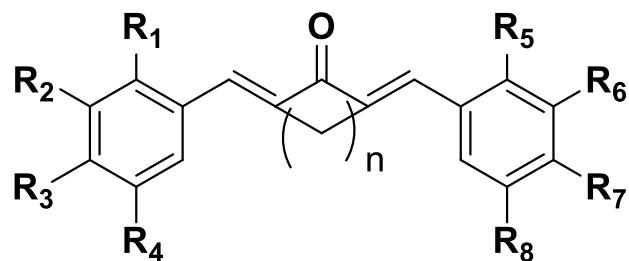
Spyridon Mourtas,* Barbara Mavroidi, Antonia Marazioti, Maria Kannavou, Marina Sagnou, Maria Pelecanou, and Sophia G. Antimisiaris



Curcumin and derivatives



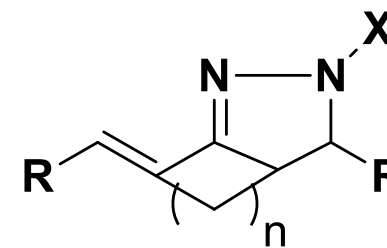
monocarbonyl derivatives



$n = 0 - 3$

$R_1 - R_8 =$ same or different

pyrazoline derivatives



- anti-bacterial
- anti-fungal
- anti-viral
- anti-parasitic
- anti-tubercular
- anti-inflammatory
- anti-cancer
- anesthetic
- analgesic
- insecticidal

- The yellow-colored bioactive constituent of *Curcuma longa*
- Wide range of pharmacological properties including antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, neuroprotective and anti-diabetic activities



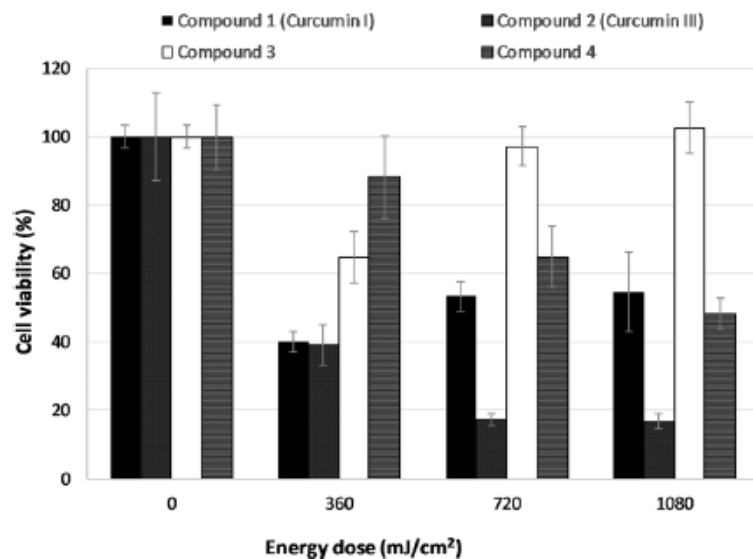
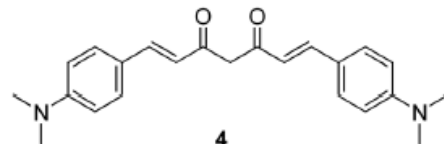
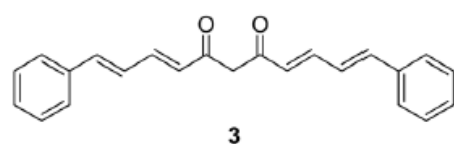
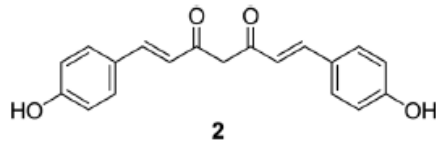
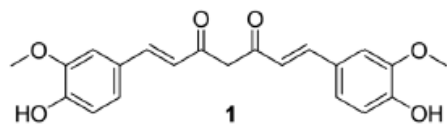
- Curcumins exhibit low bioavailability, solubility and stability limiting their clinical application
- Monocarbonyl Analogues of Curcumin (MACs) show improved properties



Cite this: *Photochem. Photobiol. Sci.*,
2020, **19**, 193

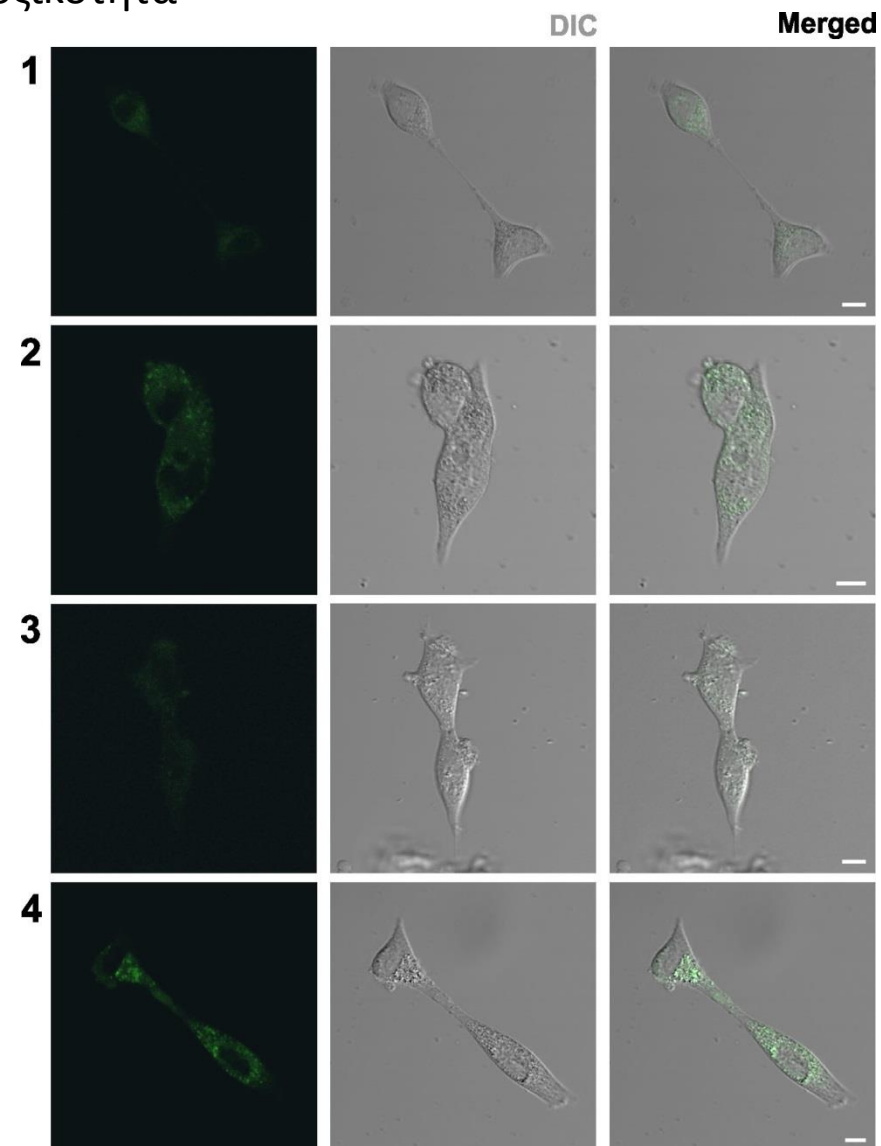
Curcumin derivatives as photosensitizers in photodynamic therapy: photophysical properties and *in vitro* studies with prostate cancer cells

K. T. Kazantzis,^a K. Koutsonikoli,^a B. Mavroidi,^{id} M. Zachariadis,^c P. Alexiou,^b
M. Pelecanou,^{id} K. Politopoulos,^a E. Alexandratou,^{id}*^a and M. Sagnou*^b



Φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου

- Φωτοευαισθητοποιητές με διέγερση σε υψηλό μήκος κύματος και εκλεκτική κυτταρική πρόσληψη
- Η διέγερση με φως οδηγεί στο σχηματισμό ROS
- Κυτταροτοξικότητα



Communication

(E)-1-(4-Ethoxycarbonylphenyl)-5-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxystyryl)-2-pyrazoline: Synthesis, Characterization, DNA-Interaction, and Evaluation of Activity Against Drug-Resistant Cell Lines

Dimitris Matiadis ¹, Barbara Mavroidi ¹, Angeliki Panagiotopoulou ¹, Constantinos Methenitis ², Maria Pelecanou ¹ and Marina Sagnou ^{1,*}

Received: 15 January 2020; Accepted: 27 January 2020; Published: 30 January 2020

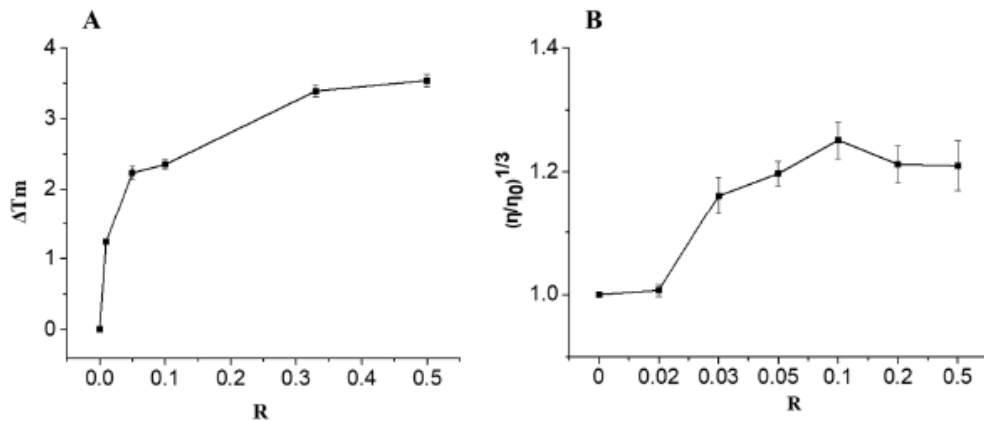
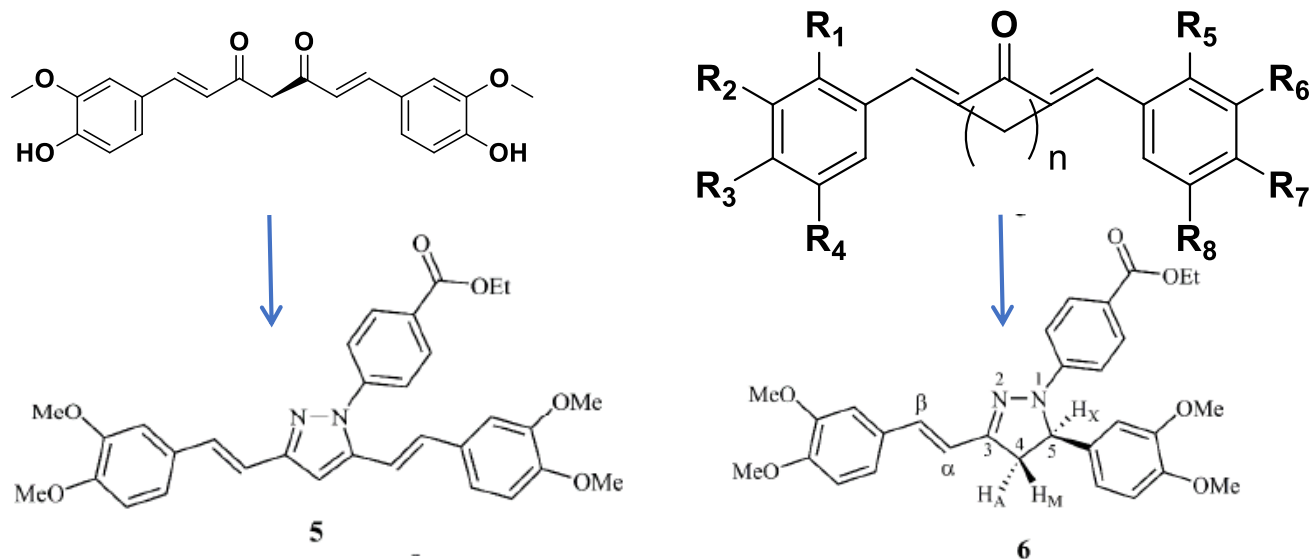


Table 1. Effect of curcuminoid pyrazoline 6 on DOX sensitivity in MCF-7 and MCF-7/DOX^R.

Compound	IC ₅₀ (μM)	
	MCF-7	MCF-7-DOX ^R
6	53.09 ± 3.58	85.11 ± 4.68
DOX	5.22 ± 1.33	70.90 ± 8.75
DOX (pre-incubated with 6)	7.71 ± 1.59	72.55 ± 4.99

Article

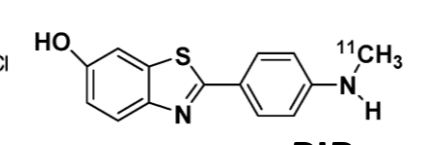
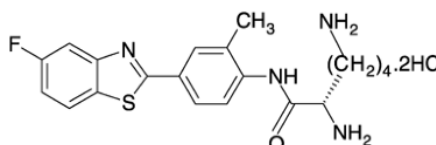
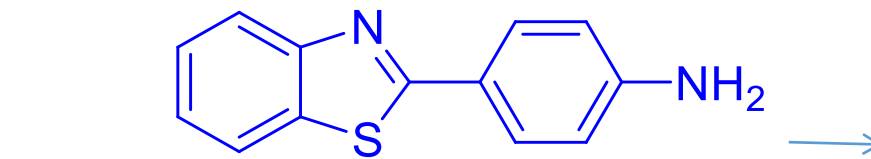
Remarkable brain penetration of cyclopentadienyl M(CO)₃ (M = Tc, Re) derivatives of benzothiazole and benzimidazole paves the way for their application as diagnostic, with Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT), and therapeutic agents for Alzheimer's disease

Marina Sagnou, Barbara Mavroidi, Antonio Shegani, Maria Paravatou-Petsotas, Catherine P Raptopoulou, Vassilis Psycharis, Ioannis Pirmettis, Minas S. Papadopoulos, and Maria Pelecanou

J. Med. Chem., **Just Accepted Manuscript** • DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01949 • Publication Date (Web): 15 Feb 2019

Downloaded from <http://pubs.acs.org> on February 17, 2019

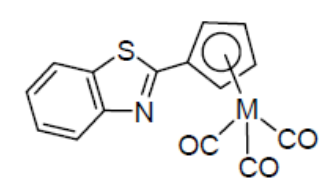




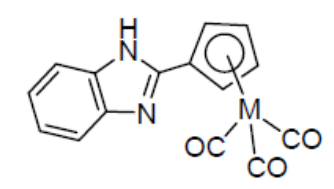
Phortress

PIB

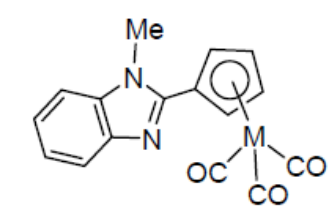
M = ^{99m}Tc



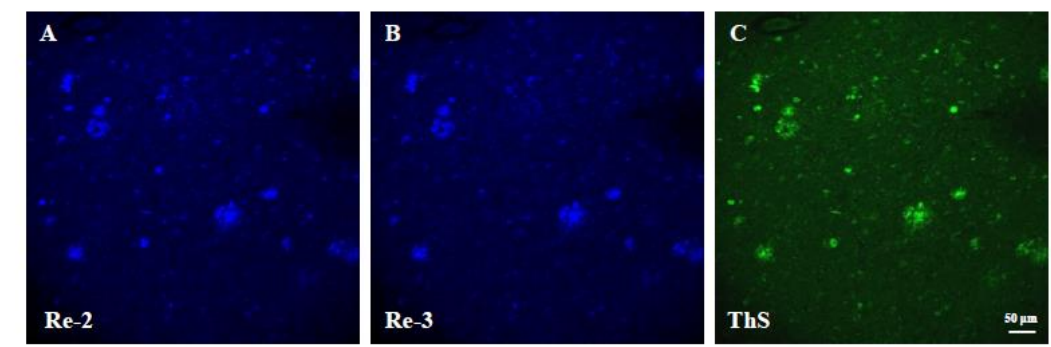
^{99m}Tc-1 M = ^{99m}Tc
Re-1 M = Re



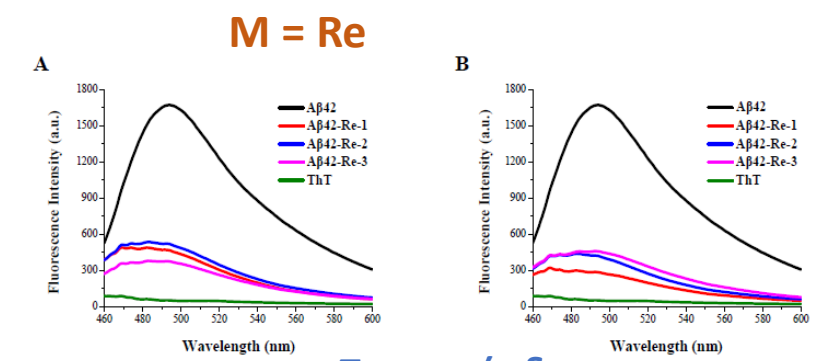
^{99m}Tc-2 M = ^{99m}Tc
Re-2 M = Re



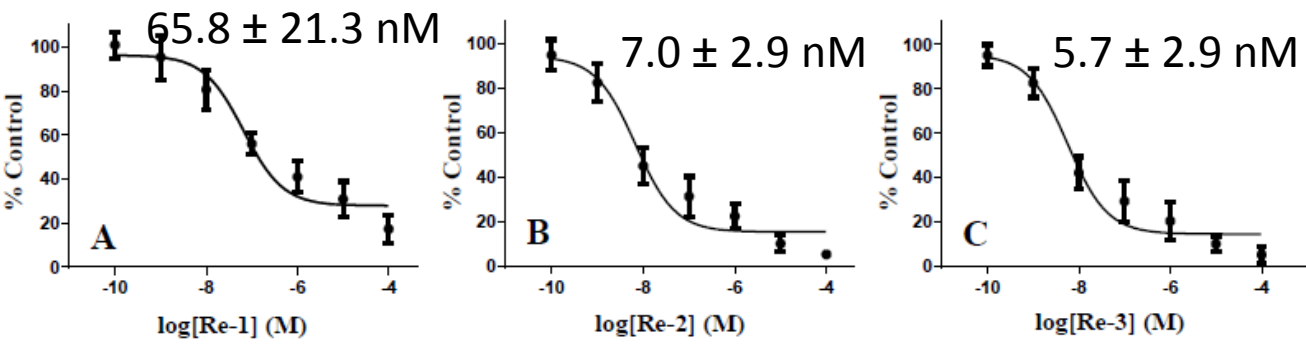
^{99m}Tc-3 M = ^{99m}Tc
Re-3 M = Re



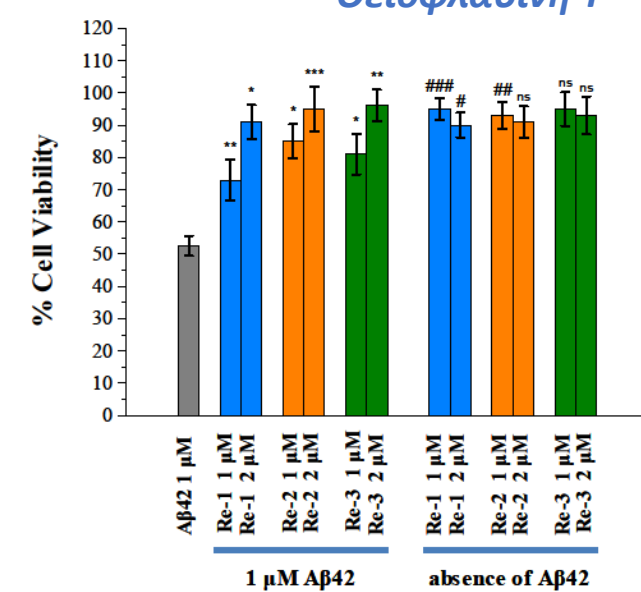
Απεικόνιση πλακών σε τομές εγκεφάλου AD



**Τεστ πρόσδεσης
Θειοφλαβίνη T**



Πολύ υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με το Aβ



**Αντιστροφή της
κυτταροτοξικότητας
που προκαλεί η Aβ**

Table 2. Biodistribution of Radioactivity (% ID/g) after Injection of Complexes

^{99m}Tc -1, ^{99m}Tc -2, and ^{99m}Tc -3 in Healthy Swiss Albino Mice (n = 4)^a

organ	^{99m}Tc -1			^{99m}Tc -2			^{99m}Tc -3		
	2 min	15 min	90 min	2 min	15 min	90 min	2 min	15 min	90 min
blood	2.90 ± 0.73	1.59 ± 0.23	0.47 ± 0.01	3.38 ± 0.67	1.86 ± 0.13	0.48 ± 0.12	1.82 ± 0.74	0.41 ± 0.08	0.14 ± 0.01
liver	11.30 ± 1.79	28.22 ± 1.82	17.11 ± 1.25	13.97 ± 2.13	30.66 ± 3.96	18.08 ± 1.34	4.46 ± 0.43	10.68 ± 1.69	5.30 ± 0.58
heart	23.81 ± 5.39	4.93 ± 0.34	0.69 ± 0.13	7.53 ± 1.28	1.95 ± 0.26	0.22 ± 0.05	9.43 ± 2.28	1.73 ± 0.07	0.25 ± 0.06
kidneys	15.54 ± 4.30	13.61 ± 1.96	13.91 ± 1.34	9.70 ± 0.92	5.04 ± 0.53	1.57 ± 0.20	8.42 ± 1.48	8.99 ± 2.55	7.42 ± 1.09
stomach	2.87 ± 1.22	7.83 ± 2.57	15.26 ± 3.88	1.63 ± 0.44	3.17 ± 0.43	4.63 ± 0.56	1.29 ± 0.31	3.57 ± 0.98	3.18 ± 1.70
intestines	2.81 ± 0.95	15.70 ± 0.95	15.42 ± 2.41	3.06 ± 0.08	14.80 ± 0.25	23.94 ± 4.27	2.01 ± 0.55	11.89 ± 0.16	22.16 ± 1.53
spleen	2.95 ± 0.89	3.32 ± 0.30	0.67 ± 0.08	2.63 ± 0.40	1.01 ± 0.09	0.17 ± 0.03	1.69 ± 0.45	0.64 ± 0.04	0.16 ± 0.05
muscle	4.12 ± 0.34	2.76 ± 0.12	0.83 ± 0.34	5.23 ± 0.79	1.50 ± 0.19	0.15 ± 0.03	4.10 ± 0.39	1.34 ± 0.28	0.32 ± 0.06
lungs	22.61 ± 5.47	17.07 ± 3.06	8.48 ± 1.18	7.09 ± 0.38	2.44 ± 0.39	0.45 ± 0.13	9.10 ± 1.93	3.77 ± 1.48	1.23 ± 0.30
pancreas	6.99 ± 0.97	4.24 ± 0.35	0.73 ± 0.19	5.99 ± 0.62	1.96 ± 0.25	0.21 ± 0.02	5.35 ± 1.21	1.17 ± 0.12	0.38 ± 0.09
brain	7.94 ± 1.46	3.70 ± 0.40	0.20 ± 0.03	3.99 ± 0.60	0.75 ± 0.11	0.04 ± 0.01	5.36 ± 0.65	0.85 ± 0.05	0.09 ± 0.02

^aData expressed as the % of the injected dose per gram of wet tissue (% ID/g) ± the standard deviation of the mean.

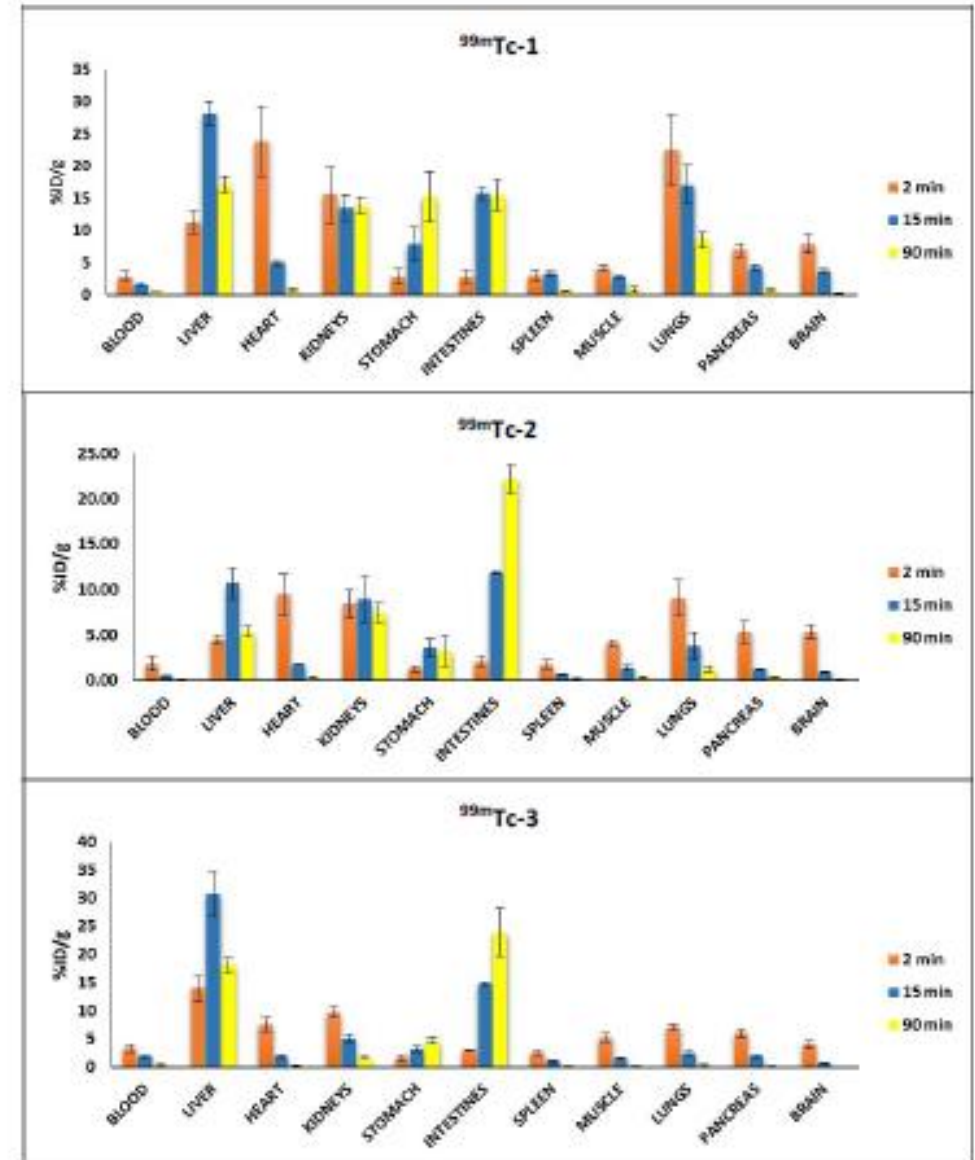
7.94%

3.99%

5.36%

18F-florbetapir (7.33% ID/g at 2 min)

18F-florbetaben (4.77% ID/g at 2 min)



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization

International Bureau

(43) International Publication Date
26 September 2019 (26.09.2019)



(10) International Publication Number

WO 2019/180200 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 51/04 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *A61K 103/10* (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2019/057235

(22) International Filing Date:

22 March 2019 (22.03.2019)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

20180100128 22 March 2018 (22.03.2018) GR

(71) Applicant: NATIONAL CENTRE FOR SCIENTIFIC RESEARCH "DEMOKRITOS" [GR/GR]; Patr. Gregoriou E & 27 Neapoleos Str., 15341 Agia Paraskevi (GR).

(72) Inventors; and

(71) Applicants: PELECANOU ZAMPARA, Maria [GR/GR]; 19C Paschalias Str., 15452 Palaio Psychico, Athens (GR). SAGNOU, Marina [GR/GR]; 7 Marathonos Str., 15235 Vrilissia, Athens (GR). PAPAPOULOS, Minas [GR/GR]; 8 Mavili Str., 15351 Pallini, Attiki (GR). PIRMETTIS, Ioannis [GR/GR]; 14 Komnion Str., 16452 Argypoli, Athens (GR).

(72) Inventors: MAVROIDI, Barbara; 124 Thessalonikis Str., 18345 Moschato (GR). SHEGANI, Antonio; 35 Mesogeion Str., 20002 Krines - Velo (GR).

(74) Agent: ROUKOUNAS, Dimitrios; Dietlindenstr. 18, 80802 Munich (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,

Patent Application Record

✓ GR 20180100128 A 20180322

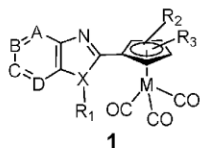
✓ **WO 2019180200 A1 20190926**

✓ EP 2019057235 W 20190322

✓ CN 201980020996 A 20190322

✓ US 201917040117 A 20190322

(54) Title: TRICARBONYL COMPLEXES OF TRANSITION METALS WITH BENZO-HETEROCYCLIC DERIVATIVES OF THE CYCLOPENTADIENYL ANION



(57) Abstract: Complex compounds of transition metals according to formula

(1) wherein the $M(CO)_3^+$ tricyclopentadienyl-metal core forms a complex with the cyclopentadienyl anion linked to heterocyclic moieties of the benzothiazole, benzimidazole and benzoxazole families. The compounds exhibit high blood-brain barrier permeability and can be used in the diagnosis and/or treatment of diseases of the Central Nervous System.



Co-financed by Greece and the European Union

ΤΡΑΠΕΖΑ ΙΣΤΙΚΩΝ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ

**Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ**

**ΤΡΑΠΕΖΑ ΙΣΤΙΚΩΝ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ
(Human Tissue Bank)**

**Έργο: «Προσδιορισμός στόχων και Ανάπτυξη Καινοτόμων Προσεγγίσεων
για Εφαρμογές στην υγεία και το Περιβάλλον (SANITURA)» (Ε-12177).**

Επιστημονική Υπεύθυνος:

Βαβουράκη Ελένη, Ph.D

Συνεργάτες:

Νινιός Ιωάννης, Ph.D



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



Co-financed by Greece and the European Union



Έργο: «Προσδιορισμός στόχων και Ανάπτυξη Καινοτόμων Προσεγγίσεων για Εφαρμογές στην υγεία και το Περιβάλλον (SANITURA)» (Ε-12177).

Ενέργεια 4.5.1

Τράπεζα Ιστικών Μοσχευμάτων

Παραδοτέα

Π4.5.1.α: Παραγωγή νέων προϊόντων – νέων κωδικών (επιστημονικό, κοινωνικό και οικονομικό όφελος ,συμμετοχή σε συνέδρια, ανακοινώσεις, δημοσιεύσεις)

Π4.5.1.β: Μελέτη δράσης προϊόντων σε διάφορες ιατρικές και οδοντιατρικές εφαρμογές (επιστημονικό, κοινωνικό όφελος, συμμετοχή σε συνέδρια, ανακοινώσεις, δημοσιεύσεις)

Π4.5.1.γ: Βελτιστοποίηση της διαδικασίας παραγωγής με αποτέλεσμα την ενίσχυση της ανταγωνιστικότητας και αύξηση του αριθμού των παραγομένων προϊόντων (οικονομικό όφελος)



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



Co-financed by Greece and the European Union



ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ- Ορισμοί

- **Μόσχευμα** είναι ένα όργανο (σύνολο ιστών) ή ιστικό τμήμα (σύνολο κυττάρων) που τοποθετείται από έναν «δότη», στον οργανισμό άλλου ατόμου, τον «λήπτη» ή «δέκτη».
- **Τύποι μοσχευμάτων**
 - Αυτομόσχευμα
 - Αλλομόσχευμα
 - Ξενομόσχευμα

Π4.5.1.α: Παραγωγή νέων προϊόντων – νέων κωδικών (επιστημονικό, κοινωνικό και οικονομικό όφελος ,συμμετοχή σε συνέδρια, ανακοινώσεις, δημοσιεύσεις)

Στο παραπάνω διάστημα παρασκευάστηκαν οστικά μοσχεύματα ανθρώπινης προέλευσης από ζώντες δότες. Η παραλαβή των ιστικών τμημάτων από διάφορα νοσοκομεία της χώρας ,η αποθήκευσή τους και η επεξεργασία τους, ακολούθησε τις προδιαγραφές των σχετικών Ευρωπαϊκών Οδηγιών και του συστήματος ποιότητας ISO9001/2015, που ακολουθεί η Τράπεζα.

Με την διαδικασία παραγωγής που εφαρμόζεται στην Τράπεζα και εξελίσσεται συνεχώς, διασφαλίζεται στο μέγιστο βαθμό η ασφάλεια των προϊόντων καθώς και η διατήρηση των εμβιομηχανικών, οστεοεπαγωγικών και οστεοαγώγιμων ιδιοτήτων του οστού.



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑνηΕΚ 2014–2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION

 **ΕΣΠΑ**
2014-2020
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη
Partnership Agreement
2014 - 2020

Co-financed by Greece and the European Union

ISO 9001/2015



Θεσμός Πιστοποίησης & Ελέγχου

CERTIFICATE

The certification & inspection Body
EQA HELLAS S.A.
certifies that

NATIONAL CENTRE OF SCIENTIFIC RESEARCH DEMOCRITOS HUMAN TISSUES BANK

PATR. GRIGORIOU E' & 27, NEAPOLEOS Str., GR 153 10 AG. PARASKEVI

has established and applies a Quality Management System which is in conformance with

ELOT EN ISO 9001:2015
(Quality Management System)
with scope

TISSUE BANKING

Certificate Number: **QMS 3176/18**
Date of Issue: **19 October 2018**
Valid Until: **18 October 2021**

Initial certification date: 23 October 2012

FOR THE COMPANY
CHARALAMPOS GALATSANOS

This Certificate of Conformity, is valid only when annual surveillance audits
within 12 months, from the issue date, are performed – and it is subject
to the regulations of EQA HELLAS S.A.



EQA HELLAS S.A.
30 KALAMIA P. Str., 152 33 CHALANDRI
Tel: (+30) 210 6834012, Fax: (+30) 210 6850985
url: www.eqa.gr, e-mail: eqa@eqa.gr, info@eqa.gr

www.eqa.gr

*Παρακαλούμε ενημερωθείτε για να αναυθίσετε παράδοση σχετικό με τον συγκεκριμένο πιστοποιητικό ISO 9001

ISO 9001/2015

Σύστημα διαχείρισης ποιότητας

Διαδικασίες / αρχεία καταγραφής όλων των δραστηριοτήτων της Τράπεζας :

- Χειρουργεία
- Παραγόμενα μοσχεύματα
- Διατιθέμενα μοσχεύματα
- Νέες συσκευές και μηχανήματα
- Συντήρηση και έλεγχος υπάρχοντος εξοπλισμού
- Εκπαίδευση και δια βίου μάθηση εργαζομένων
- Στόχοι που επιτεύχθηκαν – νέοι στόχοι σε ετήσια βάση

Πλήρης ιχνηλασιμότητα από τον δότη έως τον δέκτη

Π4.5.1.α: Παραγωγή νέων προϊόντων – νέων κωδικών (επιστημονικό, κοινωνικό και οικονομικό όφελος ,συμμετοχή σε συνέδρια, ανακοινώσεις, δημοσιεύσεις)

Επεξεργάσθηκαν 100 κεφαλές μηριαίου οστού και αναπτύχθηκαν και μελετήθηκαν εκτός άλλων , οι εξής νέοι κωδικοί προϊόντων προκειμένου να καλυφθούν ειδικές ανάγκες στην γναθοχειρουργική και περιοδοντολογική κλινική πράξη.

ΟΜ 4013 Οστικό σπογγοφλοιώδες 1*1,

ΟΣ 4013, Τρίμματα σπογγοφλοιώδους (<1mm), 0.5cc

ΟΣ 4014, Τρίμματα σπογγοφλοιώδους (<1mm), 1cc



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



HELLENIC REPUBLIC
MINISTRY OF
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS

ΕΡΑΝΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION



Co-financed by Greece and the European Union

ΟΜ 4013 Οστικό σπογγοφλοιιώδες 1*1 Ειδικής διαμόρφωσης μοσχεύματα (customized)

«Ανάπτυξη νέου φλοιοσπογγώδους αλλομοσχεύματος για χρήση στην Χειρουργική Σχιστιών Παίδων- Πρώιμα αποτελέσματα»,
11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής εταιρείας Βιοϋλικών



A. Νέο οστικό σπογγοφλοιιώδες μόσχευμα διαστάσεων 1X1X0,2 cm .



B. Προεγχειρητική ετερόπλευρη σχιστία παιδιού.



Γ. Χειρουργική αντιμετώπιση με τοποθέτηση του νέου customized μοσχεύματος.



Δ. Μετεγχειρητική ορθοδοντική αποκατάσταση (2 μήνες-μετακίνηση του δοντιού στη θέση τοποθέτησης του αλλομοσχεύματος.

Τα πρώιμα αποτελέσματα είναι άκρως ικανοποιητικά (αυξημένη ταχύτητα επούλωσης, γρήγορη οστεοποίηση). Η μελέτη της εφαρμογής του αλλομοσχεύματος στις σχιστίες παιδιά εξελίσσεται παράλληλα με τη διαδικασία ανάπτυξης του βρέφους/παιδιού. (Μελέτη σε 10 παιδιά ηλικιακού εύρους από 6 μηνών έως 10 ετών ,έχει παρατηρηθεί μέχρι και ανατολή του πρώτου κυνόδοντα).



ΟΣ 4013, Τρίμματα σπογγοφλοιώδους (<1mm), 0.5cc
ΟΣ 4014, Τρίμματα σπογγοφλοιώδους (<1mm), 1cc

Προϊόν ειδικής επεξεργασίας που απαιτείται για την παραγωγή σπογγοφλοιωδών μοσχευμάτων.

1. Δεν έχει αντιγονικότητα, επάγει οστεογένεση.
2. Αποτελεσματικότερη αποκατάσταση οστικού ελλείμματος.
3. Ταχύτερη επούλωση, μείωση χειρουργικού χρόνου.



Π4.5.1.β: Μελέτη δράσης προϊόντων σε διάφορες ιατρικές και οδοντιατρικές εφαρμογές (επιστημονικό, κοινωνικό όφελος, συμμετοχή σε συνέδρια, ανακοινώσεις, δημοσιεύσεις)

Τα παραγόμενα προϊόντα, χρησιμοποιούνται και μελετώνται σε επεμβάσεις επανορθωτικής χειρουργικής/αναγεννητικής Ιατρικής , στους ακόλουθους κλάδους:

- Γναθοπροσωπικής χειρουργικής
- Εμφυτευματολογίας
- Περιοδοντολογίας
- Στοματολογίας
- Χειρουργικής
- Ορθοπαιδικής
- Νευροχειρουργικής



EUROPEAN UNION
European Regional Development Fund



ΕΡΑνηΕΚ 2014-2020
OPERATIONAL PROGRAMME
COMPETITIVENESS
ENTREPRENEURSHIP
INNOVATION



Co-financed by Greece and the European Union

Π4.5.1.β: Μελέτη δράσης προϊόντων σε διάφορες ιατρικές και οδοντιατρικές εφαρμογές (επιστημονικό, κοινωνικό όφελος, συμμετοχή σε συνέδρια, ανακοινώσεις, δημοσιεύσεις)

1) Βαβουράκη Ελένη : *Τράπεζα Ιστικών Μοσχευμάτων - Νέοι Ορίζοντες* , Διάλεξη

Session: “Novel Concepts in Biomaterials” , 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, Αθήνα 23-25 /11/2018

2) Ανάπτυξη νέου φλοιοσπογγώδους αλλομοσχεύματος για χρήση στην Χειρουργική Σχιστιών Παίδων - Πρώιμα αποτελέσματα.

Σ.Α.Λαζάρου², Ι.Π.Νινιός¹, Ε.Ν.Βαβουράκη¹

¹Τράπεζα Ιστικών Μοσχευμάτων, ΙΒΕ, ΕΚΕΦΕ “ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ”

²Διευθυντής Πλαστικής Κρανιογναθοπροσωπικής Χειρουργικής, Νοσοκομείο “ΙΑΣΩ ΠΑΙΔΩΝ”

11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 23-25 Νοεμβρίου, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», Αθήνα.

3) ΗΑΟΜΣ 2019, ΤΡΙΤΟ ΣΥΜΠΟΣΙΟ ΕΜΦΥΤΕΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΣΤΟΜΑΤΟΣ, 24 – 26 ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΥ 2019, ΑΘΗΝΑ (ΠΟΛΕΜΙΚΟ ΜΟΥΣΕΙΟ).

4) 39° ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, 24 – 26 ΟΚΤΩΒΡΙΟΥ 2019, ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ.





Ανάπτυξη νέου φλοιοσπογγώδους αλλομοσχεύματος για χρήση στην Χειρουργική Σχιστιών Παιδών- Πρώιμα αποτελέσματα

Σ.Α.Λαζάρου², Ι.Π.Νινιός¹, Ε.Ν.Βαβουράκη¹

¹Τράπεζα Ιστικών Μοσχευμάτων,ΙΒΕ,ΕΚΕΦΕ “ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ”

² Διευθυντής Πλαστικής Κρανιογναθοπροσωπικής Χειρουργικής,Νοσοκομείο “ΙΑΣΩ ΠΑΙΔΩΝ”

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία 25 χρόνια έχουν προταθεί διάφορες τεχνικές και υλικά για την ανακατασκευή οστικών ελλειμμάτων, μεταξύ των οποίων και τα αυτόλογα, και αλλογενή οστικά μοσχεύματα. Παρά την εξέλιξη στο πεδίο των αλλομοσχευμάτων και άλλων υλικών, αλλά και στις τεχνικές της κατευθυνόμενης οστικής αναγέννησης, και παρά την εντατική έρευνα και τις σχετικές δημοσιεύσεις στον τομέα αυτό, παραμένει περιορισμένη η κλινική εφαρμογή τους. Ειδικότερα, στη χειρουργική σχιστιών απαιτείται η χρήση αλλομοσχευμάτων ειδικών διαστάσεων ,προσαρμοσμένων στην ηλικία του βρέφους /παιδιού και στην εξελκτική διαδικασία ανάπτυξης. Στην εργασία αυτή δίδονται η παρασκευή φλοιοσπογγώδους αλλομοσχεύματος συγκεκριμένων διαστάσεων (Εικ.1) και τα πρώτα αποτελέσματα εφαρμογής του σε μεμονωμένα περιστατικά σχιστιών.



Εικ.1 Φλοιοσπογγώδες αλλομοσχεύμα

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

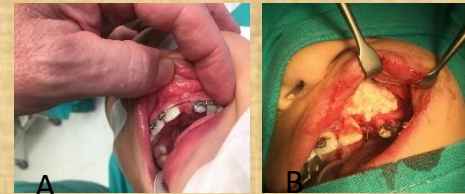
Στην Τράπεζα Ιστικών Μοσχευμάτων(TIM) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», συλλέγονται με πιστοποιημένες διαδικασίες κεφαλές μηριαίου(Εικ.2) οι οποίες υφίστανται επεξεργασία προς παραγωγή των οστικών αλλομοσχευμάτων στις διαστάσεις που απαιτούνται. Η διαδικασία παραγωγής περιλαμβάνει μετά τον χειρουργικό τραυματισμό, φυσικοχημική επεξεργασία, και λυοφίληση προς αφυδάτωση. Τα παραγόμενα αλλομοσχεύματα αποστειρώθηκαν με ακτινοβολία γ , και μετά τον απαραίτητο μικροβιολογικό έλεγχο στειρότητας, διατέθηκαν για εφαρμογή. Το μόσχευμα τοποθετείται κάτω από τους βλεννογονοπερίστεους κρημούς στην περιοχή της σχιστίας της άνω γνάθου. Για καλύτερη πρόσφυση και στήριξη συνοδεύεται από CaSO₄ και PRP(1),(Εικ.2)



Εικ.2 Κεφαλή μηριαίου οστού

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα οστικά μοσχεύματα που παρήχθησαν για την παραπάνω εφαρμογή είχαν διαστάσεις 1x1x0,2 cm, και σαφώς διακεκριμένη κυρίως την φλοιώδη και σπογγώδη μοίρα. Τα πρώιμα αποτελέσματα σε 8 παιδιά ηλικίας 6 μηνών έως 10 χρόνων είναι ενθαρρυντικά.(Εικ.3) Τα τραύματα έχουν επούλωθει χωρίς πρόβλημα και αναμένουμε τόσο τα μεταγενέστερα αποτελέσματα (π.χ εκκρεμούν ακτινογραφίες ενδεικτικές του βαθμού οστεοποίησης) όσο και την ανατολή είτε του πρώτου είτε του δεύτερου κυνόδοντα.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το customized αλλομοσχευμα που παράγεται στην TIM χρησιμοποιήθηκε,εκτός άλλων, στη χειρουργική αποκατάσταση σχιστιών παιδιών. Τα πρώιμα αποτελέσματα είναι άκρως ικανοποιητικά (αυξημένη ταχύτητα επούλωσης, γρήγορη οστεοποίηση). Η μελέτη της εφαρμογής του αλλομοσχεύματος στις σχιστιές παιδιά εξελίσσεται παράλληλα με τη διαδικασία ανάπτυξης του βρέφους/παιδιού.

Εικ.3 Α.Προεγχειρητική ετερόπλευρη σχιστία παιδιού, Β. Χειρουργική αντιμετώπιση με customized αλλομοσχευμα, Γ. Μετεγχειρητική ορθοδοντική αποκατάσταση(2 μήνες-μετακίνηση του δοντιού στη θέση τοποθέτησης του αλλομοσχεύματος).

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΟΧΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΣ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ (SANITURA)» (MIS 5002514) που εντάσσεται στη Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



ΤΡΑΠΕΖΑ ΙΣΤΙΚΩΝ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ

50 χρόνια εμπειρίας στον χώρο των Ιστικών Μοσχευμάτων

Το πρώτο & μοναδικό εργαστήριο στην Ελλάδα
με τεχνολογία επεξεργασίας
συντηρημένων ανθρώπινων μοσχευμάτων

ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ ΑΠΟ ΖΩΝΤΕΣ ΔΟΤΕΣ



ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

- Παραγωγή μοσχευμάτων - νέα προϊόντα προσαρμοσμένα στις ανάγκες της αναγεννητικής ιατρικής
- Ανάπτυξη νέων μεθόδων και τεχνικών επεξεργασίας ιστών
 - Εφαρμοσμένη έρευνα
- Εκπαίδευση (Ιατρών, Συνεργατών, Τεχνικού Προσωπικού)

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ
ΤΡΑΠΕΖΑ ΙΣΤΙΚΩΝ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ
Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. "ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ"

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: ΔΡ. ΒΑΒΟΥΡΑΚΗ ΕΛΕΝΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: ΠΑΤΡΙΑΡΧΟΥ ΓΡΗΓΟΡΙΟΥ ΚΑΙ ΝΕΑΠΟΛΕΩΣ 27
ΑΓ. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ, Τ.Κ. 13541
ΤΗΛ. ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ: 210-6503777, 210-6540856
EMAIL: helvav@bio.demokritos.gr, yinikos@bio.demokritos.gr



Π4.5.1.γ: Βελτιστοποίηση της διαδικασίας παραγωγής με αποτέλεσμα την ενίσχυση της ανταγωνιστικότητας και αύξηση του αριθμού των παραγομένων προϊόντων (οικονομικό όφελος)

Με την διαδικασία παραγωγής που εφαρμόζεται στην Τράπεζα και εξελίσσεται συνεχώς, διασφαλίζεται στο μέγιστο βαθμό η ασφάλεια των προϊόντων καθώς και η διατήρηση των εμβιομηχανικών, οστεοεπαγωγικών και οστεοαγώγιμων ιδιοτήτων του οστού.



Λοιπές Δραστηριότητες Τ.Ι.Μ

- Παραγωγή και διάθεση μοσχευμάτων από ποικίλα ιστικά τμήματα - Συλλογή ιστών, κριτήρια επιλογής δοτών, επεξεργασία ανά είδος ιστού
- Ανάπτυξη νέων μεθόδων και τεχνικών επεξεργασίας ιστών
- Ανάπτυξη σχετικής εφαρμοσμένης έρευνας – θεραπευτικά πρωτόκολλα
- Εκπαίδευση (ιατρών, συνεργατών, τεχνικού προσωπικού)
- Ρυθμιστικό πλαίσιο - Προετοιμασία Άδειας Λειτουργίας Διαδικασίες ποιότητας ISO
- Συνεργασίες με Δημόσιους και Ιδιωτικούς φορείς.

We acknowledge support by the project “Target Identification and Development of Novel Approaches for Health and Environmental Applications” (MIS 5002514) which is implemented under the Action for the Strategic Development on the Research and Technological Sectors, funded by the Operational Programme “Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation” (NSRF 2014-2020) and co-financed by Greece and the European Union (European Regional Development Fund)



Co-financed by Greece and the European Union

SANITURA (TARGET IDENTIFICATION AND DEVELOPMENT OF NOVEL APPROACHES FOR HEALTH AND ENVIRONMENTAL APPLICATIONS)