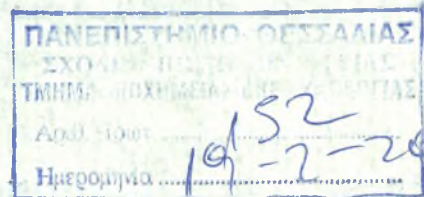




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**Μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του υποκινητή του  
ανθρώπινου γονιδίου TIN-ag (Tubulointerstitial nephritis  
antigen) σε κυτταρικές σειρές**

**ΜΠΑΣΑΜΑΚΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΑΘΗΝΑ 2010**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 8170/1

Ημερ. Εισ.: 20-04-2010

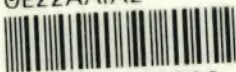
Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2010

ΜΠΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087096



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του υποκινητή του  
ανθρώπινου γονιδίου TIN-ag (Tubulointerstitial nephritis  
antigen) σε κυτταρικές σειρές**

**Υπεύθυνος καθηγητής:**

- ❖ Χαρόνης Αριστείδης, Ερευνητής Β, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών  
Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

**Μέλη τριμελούς επιτροπής:**

- ❖ Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Λάρισας
- ❖ Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος  
Ιατρικής Πατρών
- ❖ Χαρόνης Αριστείδης, Ερευνητής Β, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών  
Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

**Εκπόνηση: Εργαστήριο Ιστολογίας Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών  
Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)**

**ΜΠΑΣΑΜΑΚΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΑΘΗΝΑ 2010**



Κωνσταντίνος Σταθόπουλος  
Αναπληρωτής Καθηγητής  
Τηλ: 30-2610-997 932  
Fax: 30-2610-969 167  
E-mail: cstath@med.upatras.gr

Πάτρα 17-2-2010

Προς την  
Γραμματεία του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας  
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΘΕΜΑ: «Πτυχιακή εργασία του κου Ε. Μπασαμάκη»

Με την παρούσα επιστολή σας ενημερώνω ότι έχω λάβει γνώση σχετικά με την πρόοδο και την περάτωση της πτυχιακής εργασίας από τον κο Ε. Μπασαμάκη, η οποία εκπονήθηκε στο ΙΙΒΕΑΑ υπό την ουσιαστική επίβλεψη του κου Α. Χαρώνη και συναινών στην κατάθεσή της προς εξέταση και έγκρισή της από αρμόδια Τριμελή Επιτροπή όπως αυτή έχει ορισθεί από το Τμήμα σας.

Με εκτίμηση

Κ. Σταθόπουλος  
Αναπλ. Καθηγητής

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το διάστημα Μάρτιος 2007 – Μάιος 2008 στο Εργαστήριο Ιστολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών. Στην προσπάθεια αυτή είχα τη βοήθεια πολλών ανθρώπων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά. Συγκεκριμένα, ευχαριστώ την κ. Α. Χαράνη, Ερευνητή Β, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εργαστώ στο συγκεκριμένο εργαστήριο. Τον κ. Κ. Σταθόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας και τον κ. Κ. Μαθιόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας, ως μέλη της τριμελούς επιτροπής. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Π. Πολίτη, Ερευνητή Δ, που με βοήθησε και με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Όλους τους εργαζόμενους στο Εργαστήριο Ιστολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών για την πολύτιμη βοήθεια και την άψογη συνεργασία όλους αυτούς τους μήνες.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Θεωρητικό μέρος	3
Περίληψη	4
Περίληψη στα αγγλικά (Abstract)	5
Εισαγωγή	6
• Η δομή και η λειτουργία των νεφρών	6
• Που εντοπίζεται το TIN-ag?	8
• Η γλυκοπρωτεΐνη TIN-ag	9
• Ρόλος του TIN-ag στην διαφοροποίηση των νεφρών	11
• Χαρακτηριστικά των HNF1 μεταγραφικών παραγόντων και ο ρόλος του στους νεφρούς	13
• HNF1 και πολυκυστική ίνωση	15
Σκοπός	16
Πρακτικό μέρος	17
Υλικά και μέθοδοι	18
I.Υλικά	18
1. Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης	18
2. Στελέγη βακτηριακών κυττάρων E.Coli	22
3. Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές	22
4. Θρεπτικά υλικά	22
II.Μέθοδοι	24
1. Απομόνωση RNA από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές	24
2. Απομόνωση RNA από ιστούς ποντικού	24
3. Προετοιμασία βακτηριακών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση	25
4. Ηλεκτροδιάτρηση βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA	25
5. Καθαρισμό προϊόντος PCR	26
6. Σύνθεση cDNA χρησιμοποιώντας το ένζυμο SuperScript II RT	26
7. Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης	27
8. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%	27
9. Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης	28
10. Αποφωσφορυλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA με την αλκαλική φωσφατάση CIP	28
11. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με τη χρήση στήλης	29
12. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας με τη χρήση στήλης	29



13. Αντίδραση πέψης με περιοριστικά ένζυμα	30
14. Επεξεργασία δειγμάτων RNA με το ένζυμο RQ1 DNase	30
15. Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης DNA και RNA	30
16. Αλυσιδωτή αντίδραση πολύμερασης (PCR)	31
17. Καλλιέργεια ανθρώπινων κυτταρικών σειρών	31
18. Διαμόλυνση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών με πλασμιδιακό DNA	32
19. Προσδιορισμός ενεργότητας λουσιφεράσης σε κυτταρικά εκγυλίσματα	33
20. Προσδιορισμός ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης σε κυτταρικά εκγυλίσματα	33
21. Ποσοτικοποίηση ζωνών πηκτώματος αγαρόζης	34
22. Ταυτοποίηση αλληλουχίας νουκλεοτιδίων σε πλασμιδιακό DNA (sequencing)	34
<u>Αποτελέσματα</u>	<u>35</u>
✓ Βιοπληροφορική ανάλυση του υποκινητή του TIN-ag	35
✓ Μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του υποκινητή του TIN-Ag	37
➤ Κλωνοποίηση του υποκινητή του TIN-Ag	37
➤ Έλεγχος της ενεργότητας των μεταγραφικών παραγόντων HNF1	40
➤ Ο υποκινητής του TIN-Ag ενεργοποιείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF1	41
<u>Συζήτηση</u>	<u>45</u>
<u>Βιβλιογραφία</u>	<u>48</u>

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το TIN-ag είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας η οποία έχει μοριακό βάρος 58 kDa. Το γονίδιο αυτό παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην δημιουργία και την λειτουργία του νεφρικού ιστού για δύο κυρίους λόγους. Αρχικά μελέτες ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι το TIN-ag εκφράζεται στη βασική επιθηλιακή μεμβράνη του νεφρικού ιστού και συγκεκριμένα στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο. Επίσης το TIN-ag είναι μια αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη πρωτεΐνη η οποία αλληλεπιδρά με την λαμινίνη και το κολλαγόνο τύπου IV, και προάγει την κυτταρική προσκόλληση μια διεργασία πολύ κρίσιμη για την οργανογένεση κατά την εμβρυική ζωή.

Πρωταρχικός σκοπός της εργασίας ήταν η εύρεση πιθανών θέσεων δέσμησης μεταγραφικών παραγόντων πάνω στον υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου του TIN-ag. Πραγματοποιήσαμε βιοπληροφορική ανάλυση με το πρόγραμμα **ECR Browser** και μελετήσαμε τον υποκινητή του TIN-Ag. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μας έδειξαν ότι η μεταγραφική ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου ίσως να επηρεάζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF1 (HNF1-a και HNF1-β), διότι υπάρχουν πιθανές θέσεις πρόσδεσης στο σημείο έναρξης της μεταγραφής του υποκινητή.

Για να μπορέσουμε να μελετήσουμε τον τρόπο με τον οποίο οι μεταγραφικοί παράγοντες HNF1 επάγουν την μεταγραφή του υποκινητή του γονιδίου, πραγματοποιήσαμε κλωνοποίηση του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου του TIN-ag σε πλασμίδιο μπροστά από το γονίδιο της λουσιφεράσης και μελετήσαμε την ενεργότητα του σε *in vitro* κυτταρικά συστήματα. Πραγματοποιήσαμε διαμόλυνση κυττάρων HEK-293 και HK-2 με το πλασμίδιο που φέρει τον υποκινητή του γονιδίου TIN-Ag (pGL3-TINpro) και επώασαμε τα κύτταρα απουσία και παρουσία των μεταγραφικών παραγόντων HNF1.

Τελικά από τα πειράματα που πραγματοποιήσαμε διαπιστώσαμε ότι μια ισομορφή των μεταγραφικών παραγόντων HNF1, συγκεκριμένα η HNF-1β, είναι ικανή να επάγει την μεταγραφή του υποκινητή του γονιδίου του TIN-ag.

## ABSTRACT

Tubulointerstitial nephritis antigen (TIN-ag) is a glycoprotein of the extracellular matrix, which has a molecular weight of 58kDa. TIN-ag plays an important role in the function of the kidney. First, immunohistochemical studies showed that TIN-ag is expressed in the renal tubular membrane and particularly in the renal proximal tubule. Furthermore TIN-ag is a developmentally regulated protein which interacts in a specific manner with laminin and type IV collagen and promotes the cellular adhesion, a crucial process during the embryonic life.

Our primary purpose was to identify potential the binding sites for transcription factors on the promoter of human TIN-ag. Using the ECR Browser program we analyzed the promoter of human TIN-ag for putative binding sites in the conserved regions. The result of this analysis was that the transcriptional regulation of this promoter might be affected by the transcription factors of HNF1 family, since we manage to identify consensus binding sites for these transcription factors in close proximity to the transcription start site of TIN-ag promoter the promoter.

To further investigate this hypothesis, we cloned the human promoter in a plasmid with the luciferase gene (pGL3-TINpro). By this approach we were able to study the activity of this promoter in cellular systems in vitro. To this end, we transfected the HEK-293 and HK-2 cell lines with the cloned plasmid (pGL3-TINpro), then we incubate the cells the presence or absence of the HNF1 transcription factors.

The final conclusion from our experiments was that one isoform of the HNF1 transcription factors (HNF-1b) might be able to induce the transcriptional activity of TIN-ag promoter.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Η ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΝΕΦΡΩΝ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥΣ

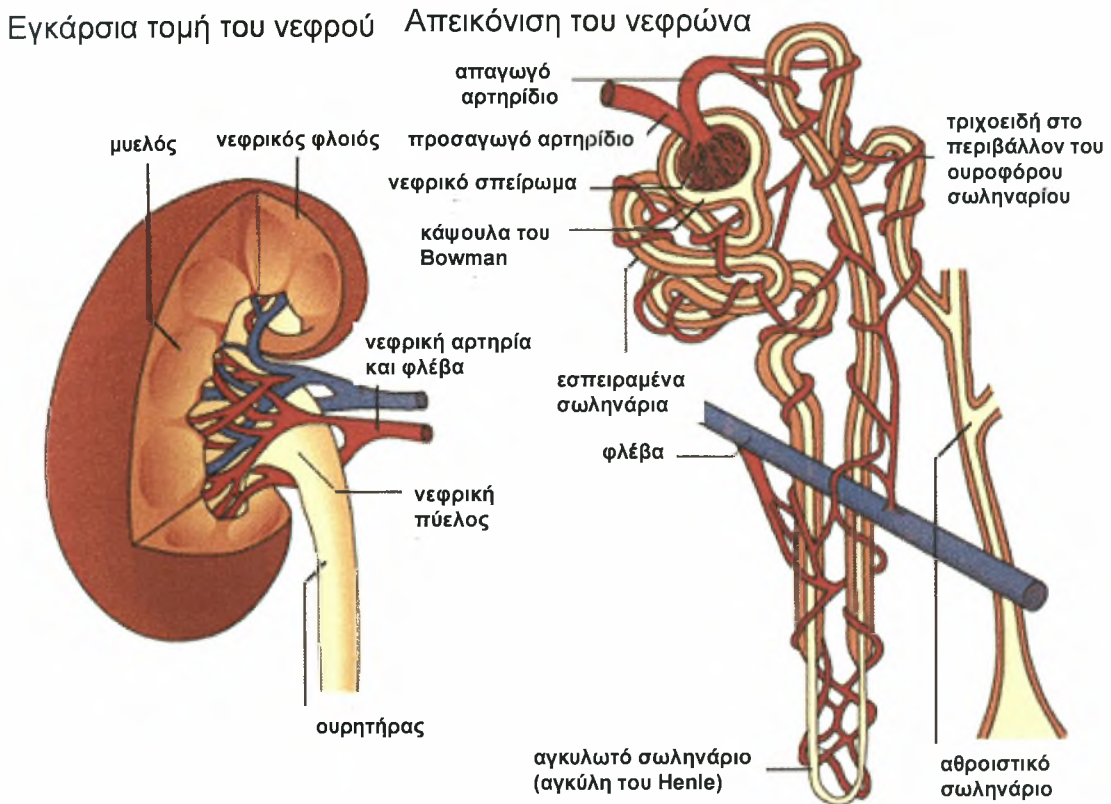
Οι νεφροί κατατάσσονται στα όργανα απέκκρισης ή αποβολής. Γενικά στην διατομή του νεφρού διακρίνονται δύο περιοχές : μια περιφερική, η φλοιώδης μοίρα και μια κεντρική, η μυελώδης μοίρα<sup>[1]</sup>. Οι δύο μοίρες του νεφρού παρουσιάζουν μορφολογικές, βιοχημικές και λειτουργικές διαφορές. Η μυελώδης μοίρα περικλείει την κοιλία ή τον κόλπο του νεφρού και τη νεφρική πύελο. Ο νεφρός αποτελείται κυρίως από τα ουροφόρα σωληνάρια, από λίγο διάμεσο συνδετικό ιστό και από αιμοφόρα αγγεία (άφθονα) και νεύρα. Κάθε ένα από τα ουροφόρα σωληνάρια ξεκινά από την φλοιώδη μοίρα με ένα διευρυμένο, τυφλό άκρο και απολήγει στην νεφρική θηλή ή στην νεφρική ακρολοφία. Το ουροφόρο σωληνάριο αποτελείται από το έλυτρο του σπειράματος ή του Bowman. Το έλυτρο αποτελείται από δύο πέταλα. Μεταξύ των δύο πετάλων (του εσωτερικού και του εξωτερικού) σχηματίζεται η ουροφόρος κοιλότητα. Η εγκόλπωση (κοιλότητα), που σχηματίζεται από το εσωτερικό πέταλο, καταλαμβάνεται από το αγγειώδες σπείραμα. Το αγγειώδες σπείραμα μαζί με το έλυτρο του Bowman αποτελούν το νεφρικό σωματίο<sup>[1]</sup>.

Από την μια πλευρά του νεφρικού σωματίου (αγγειώδης πόλος) γίνεται η είσοδος του προσαγωγού αρτηριδίου και η έξοδος απαγωγού αρτηριδίου και από την άλλη πλευρά (ουροφόρος πόλος) αρχίζει το έγγυς σπειροειδές σωληνάριο. Αυτό συνεχίζεται με το αγκυλωτό σωληνάριο (αγκύλη του Henle), που έχει δύο σκέλη, το κατιόν και το ανιόν σκέλος. Το ανιόν σκέλος συνεχίζεται με το άπω σπειροειδές σωληνάριο και αυτό, τελικά, με το αθροιστικό σωληνάριο. Τα αθροιστικά σωληνάρια ενώνονται και σχηματίζουν τους θηλαίους πόλους, που εκβάλλουν στις νεφρικές θηλές ή στην νεφρική ακρολοφία. Το νεφρικό σωματίο με το έγγυς σπειροειδές σωληνάριο, το αγκυλωτό σωληνάριο και το άπω σπειροειδές σωληνάριο ονομάζεται νεφρώνας και αποτελεί τη δομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού<sup>[1]</sup>.

Οι φυσιολογικές λειτουργίες των νεφρών είναι πολλές και βασικές:

1. Οι νεφροί απεκκρίνουν με το ούρο άχρηστα (μη πτητικά) προϊόντα του μεταβολισμού των θρεπτικών ουσιών (ουρία), καθώς και ξένες (δηλητήρια, φάρμακα)<sup>[1]</sup>.
2. Οι νεφροί παίζουν ρόλο στην ισορροπία του όγκου των υγρών του σώματος (με την μείωση ή αύξηση της απέκκρισης H<sub>2</sub>O με το ούρο) και στην διατήρηση του pH και της οσμωτικής πίεσης των υγρών αυτών σε φυσιολογικά όρια. Επίσης με τον σχηματισμό του ούρου οι νεφροί ελέγχουν την συγκέντρωση διαφόρων ηλεκτρολυτών όπως του νατρίου, καλίου, χλωρίου, ασβεστίου και μαγνησίου στα υγρά του σώματος<sup>[1]</sup>.
3. Οι νεφροί εξοικονομούν γλυκόζη (γλυκονογένεση), αμινοξέα, διάφορα ιόντα, ώστε να εξυπηρετούνται οι ανάγκες του οργανισμού και απεκκρίνουν την περίσσεια των ουσιών αυτών<sup>[1]</sup>.

4. Οι νεφροί εκκρίνουν ορμόνες όπως (ερυθροποιητίνη, ρεννίνη και βιταμίνη D)<sup>[1]</sup>.
5. Τέλος οι νεφροί παράγουν διάφορες ουσίες ουσιαστικής φυσιολογικής σημασίας για τον οργανισμό<sup>[1]</sup>.



*Εικόνα 1* :Στην αριστερή εικόνα βλέπουμε τα βασικά ανατομικά στοιχεία σε μια εγκάρσια τομή του νεφρού. Στην δεξιά εικόνα έχουμε την απεικόνιση του νεφρού και του αθροιστικού σωληναρίου.

## ΠΟΥ ΕΝΤΟΠΙΖΕΤΑΙ ΤΟ TIN-ag?

Οι ιστοί δεν αποτελούνται απλώς από κύτταρα. Όλα τα κύτταρα περιβάλλονται από εξωκυττάρια ουσία, η οποία είναι ένα σύνθετο δίκτυο πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα κύτταρα. Η εξωκυττάρια ουσία λειτουργεί ως ένα δομικό στοιχείο που στηρίζει τους ιστούς αλλά ταυτόχρονα επηρεάζει και τη



φυσιολογία τους. Συγκεκριμένα επηρεάζει την επιβίωση, την ανάπτυξη, τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και γενικότερα τη μορφή των κυττάρων. Οι παραλλαγές και τα σχετικά ποσά των διαφορετικών τύπων μακρομορίων της εξωκυττάριας ουσίας, καθώς επίσης και οι τρόποι με τους οποίους οργανώνονται προκαλούν μια καταπληκτική διαφοροποίηση των μορφών της εξωκυττάριας ουσίας. Μια από τις σημαντικότερες διαφοροποιήσεις της εξωκυττάριας ουσίας για την φυσιολογία και για παθολογικές καταστάσεις των ιστών είναι η βασική μεμβράνη. Η βασική μεμβράνη βρίσκεται είτε στη βάση κυττάρων που έχουν πολικότητα (στη επαφή μεταξύ ενός επιθηλίου και ενός συνδετικού ιστού) είτε περιβάλλουν ορισμένους τύπους κυττάρων ( μυϊκά κύτταρα, λιποκύτταρα, κύτταρα Schwann). Αν και η ακριβής σύνθεση κάθε βασικής μεμβράνης ποικίλλει από κύτταρο σε κύτταρο ακόμα και από περιοχή σε περιοχή του ίδιου κυττάρου, όλες (σχεδόν) οι βασικές μεμβράνες περιέχουν τυπικές κατηγορίες μακρομορίων όπως το κολλαγόνο τύπου IV, η λαμινίνη, η εντακτίνη/ νιδογόνο και η περλεκάνη. Σε αντίθεση με τα παραπάνω μόρια που βρίσκονται σε κάθε βασική μεμβράνη, σε ειδικές περιπτώσεις υπάρχουν μακρομόρια που εκφράζονται σε ειδικές μόνο περιοχές των βασικών μεμβρανών και σε εξειδικευμένους ιστούς. Αυτή η ιστοειδική έκφραση δείχνει ότι το συγκεκριμένο μακρομόριο επιτελεί εξειδικευμένη λειτουργία.

Ένα τέτοιο μόριο είναι και το αντιγόνο TIN, (TubuloInterstitial Nephritis antigen- **TIN-ag**) που είναι μία γλυκοπρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας μοριακού βάρους 58kD<sup>[2]</sup>. Το ανθρώπινο TIN χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 6p11.2-12. Το αντιγόνο TIN (TubuloInterstitial Nephritis Antigen) κυρίως εντοπίζεται στην επιθηλιακή βασική μεμβράνη του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου του νεφρού και στο έντερο. Συγκεκριμένα, μελέτες ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι το TIN-ag εκφράζεται αρχικά στη βασική μεμβράνη του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου, και κατά δεύτερο λόγω στην κάψα του Bowman, ελάχιστα στη βασική μεμβράνη κάτω από το επιθήλιο του άπω εσπειραμένου σωληναρίου και είναι εντελώς μη ανιχνεύσιμο στη σπειραματική βασική μεμβράνη και στο μεσάγγειο<sup>[3]</sup>. Στην περίπτωση του εντερικού ιστού, το αντιγόνο TIN ανιχνεύεται στη βασική μεμβράνη κάτω από το εντερικό επιθήλιο και σε καμία άλλη βασική μεμβράνη του ιστού. Ίχνη αντιγόνου TIN έχουν ανιχνευθεί στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας και του κερατοειδούς<sup>[3]</sup>. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το αντιγόνο TIN εκφράζεται κυρίως σε βασικές μεμβράνες που στηρίζουν επιθήλια με έντονη απορροφητική ικανότητα.

## **Η ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗ TIN-ag**

Το TIN-ag είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία βρέθηκε μέσα από την έρευνα για το αυτοαντιγόνο το οποίο είναι υπεύθυνο για την ασθένεια της διάμεσης σωληναριακής νεφρίτιδας. Η ασθένεια αυτή αποτελεί ένα αυτοάνοσο νόσημα και μπορεί να είναι

οξεία ή χρόνια. Η οξεία μορφή της ασθένειας χαρακτηρίζεται από ενδιάμεσο οίδημα, διείσδυση λευκοκυττάρων και τοπική νέκρωση ενώ η χρόνια μορφή της ασθένειας χαρακτηρίζεται από διείσδυση μονοπύρηνων, ευρεία σωληνοειδής νέκρωση και ατροφία. Η ασθένεια αυτή προκαλείται από το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα και χαρακτηρίζεται από γραμμική εναπόθεση ανοσοσφαιρίνης και συμπληρώματος γύρω από την βασική μεμβράνη του νεφρικού σωληναρίου. Αυτή η συσσώρευση οδηγεί στην μεταβολή της νεφρικής λειτουργίας και τελικά στο τελικό στάδιο της νεφρικής ασθένειας<sup>[4]</sup>.

Το TIN-ag είναι συστατικό της σωληναριακής βασικής μεμβράνης το οποίο αποτελεί το 9% της μάζας της. Ανακαλύφθηκαν δύο ισομορφές της ίδιας πρωτεΐνης. Μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 58 kDa και άλλη μια με μοριακό βάρος 50 kDa. Η κλωνοποίηση του ανθρώπινου TIN-ag μας έδειξε ενδιαφέροντα δομικά χαρακτηριστικά<sup>[5]</sup>. Δύο εναλλακτικές μορφές ματίσματος ταυτοποιήθηκαν, το TIN1 (476 αα) και το TIN2 (333 αα)<sup>[8]</sup>. Η ανάλυση της αμινοξικής του αλληλουχίας σε κουνέλι<sup>[6]</sup>, ποντίκι και άνθρωπο<sup>[7]</sup> αποκάλυψε περιοχές με ιδιαίτερη λειτουργική σημασία:

1. Ύπαρξη σηματοδοτικής αλληλουχίας που δείχνει ότι αυτή η πρωτεΐνη είναι πιθανότατα εκκρινόμενη
2. Ύπαρξη προπεπτιδίου που μπορεί να απομακρυνθεί με τη δράση φουρινών
3. Ύπαρξη θέσεων σύνδεσης με ATP/GTP
4. Ύπαρξη περιοχής με ομολογία ισομερασών (C-X-X-C)
5. Ύπαρξη περιοχής ή περιοχών με συγγένεια για ιόντα ασβεστίου
6. Ύπαρξη περιοχής με 30% ομολογία με καθεψίνες
7. Ύπαρξη μοτίβου ανάλογου με δομή επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
8. Ύπαρξη μεγάλου αριθμού κυστεϊνών συγκεντρωμένων σε δύο διαφορετικές περιοχές του μορίου

Εκτός από την παρουσία του σηματοδοτικού πεπτιδίου, την κωδικοποιημένη πρωτεΐνη, η οποία είναι ένα προπεπτιδίο 26 αμινοξέων, και την καρβοξυτελική ουρά, υπάρχει ακόμα ένα μοτίβο πέψης φουρίνης το οποίο υποδεικνύει ότι το μόριο υπόκειται σε περαιτέρω επεξεργασία πιθανώς στο σύμπλεγμά Golgi<sup>[9]</sup>. Επίσης υπάρχουν ακόμα δύο περιοχές<sup>[14]</sup> του μορίου που είναι πλούσιες σε κυστεΐνη. Μάλιστα η δεύτερη παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την καθεψίνη που ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών κυστεΐνης<sup>[10]</sup>, αν και η έλλειψη της συντηρητικότητας ενός καταλοίπου κυστεΐνης μπορεί να διατηρήσει ένα είδος ενεργότητας. Η έκφραση του TIN-ag με αυτόν τον συγκεκριμένο τρόπο μέσα στην βασική μεμβράνη του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου καθιστά το TIN-ag έναν υποψήφιο μάρτυρα για την αποτίμηση της κατάστασης του νεφρικού φλοιού σε κάποιες παθολογικές καταστάσεις και ειδικά στην οξεία νεφρική ανεπάρκεια που οδηγεί στην σωληνοειδή νέκρωση.

Η γλυκοπρωτεΐνη του TIN-ag αποτελείται από 4 δομικές περιοχές:

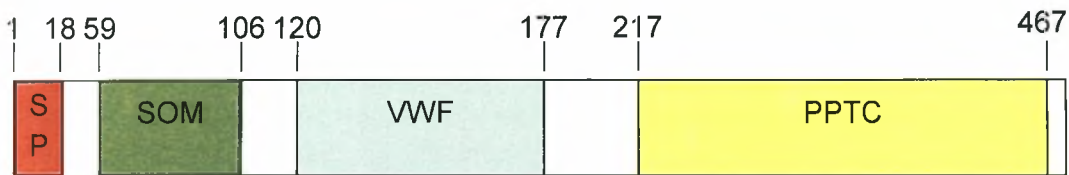
1. Περιοχή σηματοδοτικού πεπτιδίου (SP(signal peptide))
2. Περιοχή σωματομεδίνης-B (SOM)
3. Περιοχή vWF (von Willeband factor)<sup>[11]</sup>
4. Περιοχή πρωτεασών κυστεΐνης της οικογένειας των παπαϊνών (PPTC)

Περιοχή σηματοδοτικού πεπτιδίου: Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται από μία αλληλουχία υδροφοβικών αμινοξέων. Είναι συνήθως στο αμινοτελικό άκρο και η περιοχή αυτή απουσιάζει από την ώριμη πρωτεΐνη. Είναι μία αλληλουχία 20 περίπου αμινοξέων όπου αλληλεπιδρά με ένα σύμπλοκο αναγνώρισης σήματος και κατευθύνει το ριβόσωμα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα σηματοδοτικά πεπτίδια είναι υδρόφοβα με κάποια θετικά φορτισμένα κατάλοιπα. Η σηματοδοτική αλληλουχία συνήθως αφαιρείται από την παραγόμενη πεπτιδική αλυσίδα από μια σηματοδοτική πεπτιδάση.

Περιοχή σωματομεδίνης: Η σωματομεδίνη είναι ένα πεπτίδιο αποκομμένο πρωτεολυτικά από την βιτρονεκτίνη. Είναι ένας παράγοντας ορού που εξαρτάται από μια αυξητική ορμόνη και έχει δράση ανασταλτικής πρωτεάσης, και η λειτουργία της είναι άγνωστη. Πρόκειται για ένα πεπτίδιο πλούσιο σε κυστεΐνη προερχόμενο πρωτεολυτικά από το αμινοτελικό άκρο της βιτρονεκτίνης η οποία αποτελεί υπόστρωμα κυτταρικής προσκόλλησης. Η περιοχή SOM περιέχει 8 κατάλοιπα κυστεΐνης που ενώνονται με 4 δισουλφιδικούς δεσμούς.

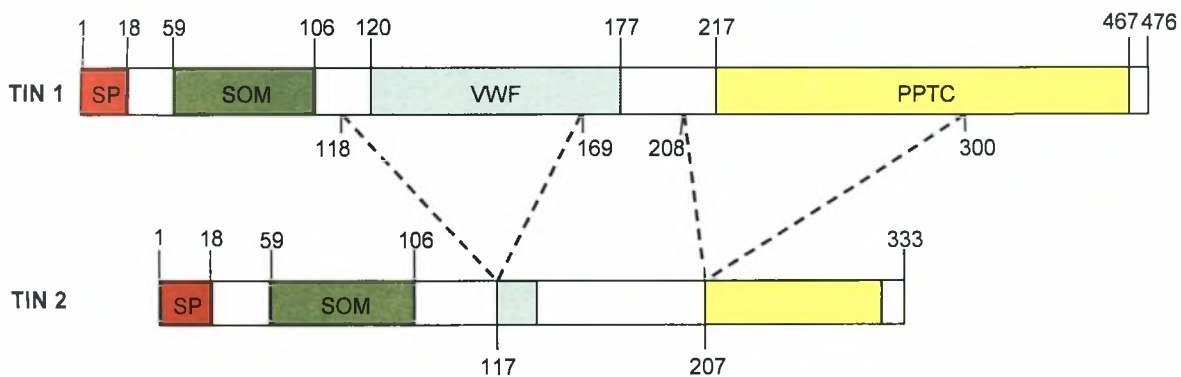
Περιοχή vWF: Ο παράγοντας αυτός έχει βρεθεί σε πάρα πολλές πρωτεΐνες πλάσματος<sup>[12]</sup>, σε παράγοντες συμπληρώματος B, C2, CR3, CR4, στις ιντεγκρίνες (I-domains), σε διάφορους τύπους κολλαγόνου<sup>[13]</sup> VI, VII, XII, XIV και σε άλλες εξωκυττάρειες πρωτεΐνες<sup>[12]</sup>. Παρόλο που η πλειοψηφία των πρωτεΐνων που έχουν τον vWF είναι εξωκυττάρειες, οι πρώτες εξελικτικά που εμφανίστηκαν στους ευκαρυώτες ήταν ενδοκυττάρειες και συμμετείχαν σε πάρα πολλές βιολογικές λειτουργίες όπως μεταγραφή, επιδιόρθωση DNA, κυτταρική και ριβοσωμική μεταφορά και λειτουργία πρωτεοσωματίου. Οι εξωκυττάρειες πρωτεΐνες που έχουν αυτήν την περιοχή συμμετέχουν σε λειτουργίες όπως κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση και μεταγωγή σήματος. Ακόμα αλληλεπιδρούν με μια μεγάλη ποικιλία προσδετών. Ένας μεγάλος αριθμός ανθρώπινων ασθενειών προέρχεται από μεταλλάξεις σ' αυτή την περιοχή. Η δευτεροταγής δομή της εμπεριέχει μια αλληλουχία από α-έλικες και β-πτυχωτά φύλλα.

Περιοχή πρωτεασών κυστεΐνης της οικογένειας των παπαϊνών: Οι πεπτιδάσες κυστεΐνης<sup>[14]</sup> έχουν χαρακτηριστικές τοπολογίες οι οποίες είναι ευδιάκριτες όχι μόνο στην τριτοταγή δομή αλλά και στην δευτεροταγή δομή. Η περιοχή αυτή της πεπτιδάσης είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών. Η οικογένεια των παπαϊνών περιλαμβάνει μια μεγάλη ποικιλία μορίων όπως ενδοπεπτιδάσες, αμινοπεπτιδάσες, διπεπτιδάσες και ένζυμα με δράση ενδοπεπτιδάσης και εξωπεπτιδάσης. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι κυρίως λυσοσωματικά ή εκκριτικά ένζυμα και η πρωτεολυτική πέψη του πεπτιδίου είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του ενζύμου. Οι πρωτεΐνάσες παπαΐνης και κυστεΐνης συντίθενται ως ανενεργά προένζυμα με μια αμινοτελική προπεπτιδική περιοχή. Η διαδικασία ενεργοποίησης των ενζύμων αυτών περιλαμβάνει την απομάκρυνση των προπεπτιδικών περιοχών. Τα καταλυτικά κατάλοιπα της παπαΐνης είναι η Cys-25, η His-159, η Gln-19 και το Asn-175 το οποίο προσανατολίζει τον δακτύλιο της ιμιδαζόλης της His-159<sup>[10]</sup>.



MWIGYALDLE SELLLEIYME KRYLSQREVD LEAYFTRNHT VLQGRFKRA IFQGQYCRNF GCCEDRD~~DE~~  
 VTEFYAANAL CYCDKPCDRE NSDCCPDYKS FCRE~~EE~~EWPP HTQPWYPEGC FKDGQHYEEG SVIKENCNSC  
 TCSGQQWKCS QHVCLVRSEL IEQVNKGDYG WTAQNYSQFW GMTLEDGFKF RLGTLPPSLM LLSMNEMTAS  
 LPATTDLPEF FVASYKWPGW THGPLDQKNC AASWAFSTAS VAADRIAIQS KGRYTANLSP QNLISCCAKN  
 RHGCNSGSID RAWWYLRKRK LVSHACYPLF KDQATNNGC AMASRSDGRG KRHATKPCPN NVEKSNRIYQ  
 CSPPYRVSSN ETEIMKEIMQ NGPVQAIMQV HEDFFHYKTG IYRHVTSTNK ESEKYRKLQT HAVKLTGWGT  
 LRGAQGQKEK FWIAANSWGK SWGENGYFRI LRGVNESDIE KLIIAAWGQL TSSDEP

Εικόνα 2 : Αμινοξική αλληλουχία της γλυκοπρωτεΐνης του TIN-ag.



Εικόνα 3 : Διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία της γλυκοπρωτεΐνης TIN-ag1 και της TIN-ag2.

## ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TIN-ag ΣΤΗΝ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΦΡΩΝ

Οι βασικές πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας εκφράζονται ευρύτατα στους ιστούς των θηλαστικών και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε κύριες βιολογικές διεργασίες όπως στην μορφογένεση αρκετών οργάνων κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης<sup>[15]</sup>. Η ανάπτυξη του εμβρυϊκού μετέμφρου αποτελείται από δύο διεργασίες: την δημιουργία των νεφρικών σωληναρίων και των νεφρικών



σπειραμάτων<sup>[16,17,18]</sup>. Σ' αυτές τις δύο διεργασίες παίρνουν μέρος βασικές πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, οι οποίες εκφράζονται στην βασική μεμβράνη των νεφρικών σωληναρίων και σπειραμάτων, και ο σχηματισμός της δομής τους πραγματοποιείται στο στάδιο του S-σχηματισμένου σώματος των νεφρών. Το S-σχηματισμένο σώμα έχει μια περιφερική και μια εγγύς συνέλιξη ή πόλο. Τα κύτταρα που βρίσκονται στον περιφερικό πόλο, κοντά στην άκρη της διακλαδισμένης ουρικής προεκβολής, πιστεύεται ότι αποτελούν την πρόδρομη μορφή των γραμμικών επιθηλιακών σωληναρίων, ενώ τα κύτταρα στην εγγύς συνέλιξη αναπτύσσονται σε νεφρικό σπείραμα.

Στο στάδιο του S-σχηματισμένου σώματος πάρα πολλές πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης εκφράζονται στην βασική μεμβράνη. Με την ωρίμανση του S-σχηματισμένου σώματος η έκφραση των βασικών πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας αυξάνεται και παραμένει υψηλή στις βασικές μεμβράνες των ώριμων νεφρικών σπειραμάτων και σωληναρίων. Το TIN-ag είναι μια αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη πρωτεΐνη η οποία αλληλεπιδρά με την λαμινίνη και το κολλαγόνο τύπου 4 και προάγει την κυτταρική προσκόλληση, μια διαδικασία πάρα πολύ κρίσιμη για την οργανογένεση στην εμβρυική ζωή<sup>[19,20]</sup>. Το TIN-ag επίσης, λειτουργεί ως πρόσδεμα για τις ιντεγκρίνες  $\alpha_3\beta_1$  και  $\alpha_3\beta_3$  με την τελευταία να φαίνεται ότι ρυθμίζει την νεφρογένεση<sup>[21]</sup>. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποδοχέα και προσδέματος όπως οι ιντεγκρίνες με τις βασικές πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας συγκρατούν τις επιθηλιακές-μεσενχυματικές αλληλεπιδράσεις, και έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην οργανογένεση των νεφρών<sup>[22]</sup>.

Η πρώτη ένδειξη ότι το TIN- ag παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και την λειτουργία του νεφρικού ιστού ήταν η παρατήρηση ότι η έκφραση του εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη αυτού του ιστού και συγκεκριμένα όπως αναλύσαμε παραπάνω στα νεφρικά σωληνάκια. Επίσης με πειράματα που έγιναν σε οργανοτυπική καλλιέργεια μετάνεφρων<sup>[23]</sup> από έμβρυα ποντικού έδειξαν ότι υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ του TIN-ag και της ανάπτυξης των μετάνεφρων<sup>[15]</sup>. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε αγωγή με αντινοσηματικό (antisense) κλώνο ολιγοδεοξυνουκλεοτιδίων (ODN) που στόχευαν την ειδική καταστολή της έκφρασης του TIN-ag σε αυτό το πειραματικό σύστημα. Έτσι αρχικά διαπιστώθηκε ότι η αγωγή αυτή οδήγησε στην ελάττωση του mRNA του TIN-ag και συνεπώς της de novo σύνθεσης της πρωτεΐνης του. Οι πιο σημαντικές παρατηρήσεις ήταν ότι αυτή η ελάττωση προκάλεσε δυσμορφογένεση των εμβρυικών μετάνεφρων, δυσπλασία του S-σχηματισμένου σώματος και μία ελάττωση στον πληθυσμό των νεφρικών σωληναρίων, ενώ το νεφρικό σπείραμα παρέμεινε ανεπηρέαστο. Μετά πραγματοποίησαν αγωγή με αντισώματα έναντι του TIN-ag και διαπίστωσαν ότι προκλήθηκαν ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα με αυτά που έγιναν από τα ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια (ODN). Οι πληροφορίες αυτές δείχνουν ότι το TIN-ag ίσως να ρυθμίζει επιλεκτικά την γένεση των νεφρικών σωληναρίων, ενώ δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του νεφρικού σπειράματος.

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ HNF1 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟΥΣ ΝΕΦΡΟΥΣ

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HNF-1 αποτελείται από δύο μέλη: HNF1α (TC1) και HNF1β (TC2), και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ιστοειδική ρύθμιση της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων<sup>[24]</sup>. Γενικά οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες λειτουργούν ως ενεργοποιητές, αλλά έχει παρατηρηθεί και καταστολή της μεταγραφής, η οποία μπορεί να οφείλεται στον υποκινητή του εκάστοτε γονιδίου και στο εναλλακτικό μάτισμα. Οι μεταγραφικοί παράγοντες HNF1α (TC1) και HNF1β (TC2) δένονται σαν διμερή πάνω στην ίδια αλληλουχία DNA: GTTAATNATTAAC<sup>[25]</sup>. Οι HNF-1 αποτελούνται από 3 λειτουργικές περιοχές: μία αμινοτελική περιοχή, μία περιοχή στην οποία δένεται το DNA και μια καρβοξυτελική περιοχή ενεργοποίησης<sup>[26]</sup>. Αυτοί οι δύο παράγοντες εμφανίζουν υψηλή ομολογία στις περιοχές όπου δένεται το DNA σε αντίθεση όμως με τις περιοχές ενεργοποίησης οι οποίες διαφέρουν η μία από την άλλη με αποτέλεσμα ο HNF-1α να είναι πιο δυνατός ενεργοποιητής από τον HNF-1β<sup>[27]</sup>. Στην αρχή υπήρχε η πεποίθηση ότι αυτές οι δύο πρωτεΐνες ήταν ειδικές μόνο για το ήπαρ, όμως τελικά φαίνεται ότι εκφράζονται και σε άλλα όργανα όπως στους νεφρούς, στο πεπτικό σύστημα, στο λεπτό και στο παχύ έντερο<sup>[24,26,28]</sup>. Στους νεφρούς η έκφραση του HNF-1α περιορίζεται στο εγγύς σωληνάριο ενώ ο HNF-1β παρατηρείται κατά μήκος των σωληνοειδών επιθηλιακών κυττάρων σε ολόκληρους τους νεφρούς<sup>[29,30]</sup>. Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF-1β εκφράζεται επίσης στον πνεύμονα και στις ωοθήκες.

Η έλλειψη του HNF-1α στα ποντίκια προκαλεί πολλά προβλήματα όπως στειρότητα, υπερτροφία στο ήπαρ, νεφρική δυσλειτουργία και μείωση της έκφρασης γονιδίων στο ήπαρ όπως η αλβουμίνη και η α<sub>1</sub>-αντιθριψίνη<sup>[24]</sup>. Ο HNF-1α σχετίζεται άμεσα με την ρύθμιση ηπατικών γονιδίων όπως η αλβουμίνη, η α<sub>1</sub>-αντιθριψίνη και η α- και β-φιμπρονεκτίνη<sup>[27]</sup>. Παίζει πάρα πολύ σημαντικό ρόλο στην έκφραση του συμμεταφορέα γλυκόζης 2 και του συμμεταφορέα φωσφορικού νατρίου, οι οποίοι εμπλέκονται στην επαναπορρόφηση της διηθημένης γλυκόζης και του φωσφορικού από τα ούρα<sup>[31]</sup>.

Επίσης ποντίκια με γενετική απαλοιφή του HNF-1β παρουσιάζουν αποδιοργανωμένο αγγειακό ενδόδερμα και πεθαίνουν την 7.5 εμβρυϊκή μέρα (E7.5) και συνεπώς ο ρόλος του HNF-1β στα ενήλικα άτομα παραμένει άγνωστος. Παρόλα αυτά, πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι ο HNF-1β είναι απαραίτητος για τον σχηματισμό του λειτουργικού συστήματος του χοληφόρου πόρου και συμμετέχει σε πολύ σημαντικές ηπατικές μεταβολικές διεργασίες<sup>[32]</sup>. Ακόμα ο HNF-1β συμβάλλει στην ρύθμιση του υποκινητή της Ksp-καδερίνης που είναι ειδική για τους νεφρούς. Εκτός από την ρύθμιση στην έκφραση γονιδίων στο ήπαρ, οι μεταγραφικοί παράγοντες HNF-1 είναι υπεύθυνοι για γονίδια που εκφράζονται μόνον στο λεπτό ή στο παχύ έντερο όπως το LPH, το SI και την γουανιδίνη. Αυτά τα δύο μέλη της οικογένειας του HNF-1 τα οποία είναι ικανά να σχηματίζουν ομοδιμερή τόσο όσο και

ετεροδιμερή, ενεργοποιούν εντελώς διαφορετικά και τους δύο υποκινητές των LPH και SI. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η σχετική αφθονία των ισομορφών των HNF-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση γονιδίων όπου δένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες HNF-1.

Εκτός από τα χαρακτηριστικά των μεταγραφικών παραγόντων HNF1, τα οποία αναφέραμε παραπάνω, τώρα θα αναφερθούμε στην σχέση που υπάρχει μεταξύ των παραγόντων αυτών και του νεφρού. Πειράματα <sup>133</sup>I που πραγματοποιήθηκαν στην κυτταρική σειρά HEK 293 (Human Embryonic Kidney cell line) μας έδειξαν ότι υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ των παραγόντων αυτών και του νεφρού. Στα αποτελέσματα των πειραμάτων βρέθηκε ένας μικρός αριθμός γονιδίων που σχετίζονται με τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF1α και HNF1β. Συγκεκριμένα 25 γονίδια ρυθμίζονται από τον HNF1β και 9 από τον HNF1α. Σύμφωνα με τον αριθμό των γονιδίων που επηρεάζονται από τους 2 μεταγραφικούς παράγοντες, φαίνεται ότι ο HNF1β είναι πιο δραστικός από τον HNF1α, γεγονός το οποίο δεν ισχύει επειδή ο HNF1β είναι σε γενικές γραμμές πιο αδύναμος από τον HNF1α. Τα γονίδια που ρυθμίζονται θετικά από τον HNF1α ρυθμίζονται το ίδιο θετικά και από τον HNF1β, εκτός από 2 γονίδια (PCBD , GLA) τα οποία ενεργοποιούνται μερικώς από τον HNF1β. Αυτό υποδηλώνει ότι ο HNF1α είναι λιγότερο ενεργός στην κυτταρική σειρά HEK 293 αλλά από την άλλη πλευρά έχει τους 'αγαπημένους' του γονιδιακούς στόχους.

Τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων μας δείχνουν την πολύ στενή σχέση που υπάρχει μεταξύ των νεφρών και τον HNF1. Ένα πάρα πολύ ενδιαφέρον γεγονός είναι ότι ο HNF1β ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου CD24 , μια μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία πρόσφατα ταυτοποιήθηκε ως δείκτης του προγενήτωρα του νεφρού μέσα στο μη επαγόμενο μετανεφρικό μεσένχυμα<sup>134</sup>. Η DPP4 (Dipeptidylpeptidase 4) εμπλέκεται στη ρύθμιση ορισμένων ορμονών και είναι ένα γονίδιο που ρυθμίζεται και από τους δυο μεταγραφικούς παράγοντες. Η απενεργοποίηση της DPP4 φαίνεται να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της γλυκόζης και από εδώ και πέρα μπορεί να αποτελεί ένα πιθανό στόχο για την θεραπεία του διαβήτη τύπου 2. Η οστεοποντίνη η οποία επίσης ρυθμίζεται θετικά από τον HNF1 είναι μια πρωτεΐνη που υπάρχει στα οστά αλλά έχει βρεθεί και στους νεφρούς και συγκεκριμένα στη αγκύλη του Henle<sup>135</sup>. Ακόμα η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί μια παρά πολύ σημαντική παράμετρο για τη μορφογένεση των νεφρών<sup>136</sup>. Φαίνεται να δρα μέσω των προσδετών των ιντεγκρινών που βρίσκονται στη κυτταρική επιφάνεια και συμμετέχει στη ανάπτυξη των νεφρών<sup>137</sup>. Τέλος το RBPM5 (RNA binding protein multiple splicing) είναι ένα γονίδιο που ευθύνεται για το σχηματισμό των νεφρών στο βάτραχο *Xenopus* και αποτελεί στόχο του HNF1β<sup>138,139</sup>. Γενικά φαίνεται ότι και τα δύο μέλη της οικογένειας των HNF1 μεταγραφικών παραγόντων παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση και τη σωστή λειτουργία των νεφρών, μέσω της ικανότητας τους να ρυθμίζουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων.

## ΗΝF1 ΚΑΙ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

Η δράση των ΗΝF1 μεταγραφικών παραγόντων έχει επίσης συσχετισθεί με παθολογικές καταστάσεις των νεφρών στον άνθρωπο, όπως είναι η πολυκυστική ίνωση. Άτομα με αυτοσωμικές επικρατείς μεταλλάξεις του ΗΝF-1β αναπτύσσουν διαβήτη τύπου 5 ‘MODY5’ (maturity-onset diabetes of the young type 5) και κυστικές ανωμαλίες του νεφρού<sup>[40]</sup>. Όλες αυτές οι ανωμαλίες περιλαμβάνουν πολυκυστικά νεφρά, κυστική δυσπλασία και μία ασθένεια που σχετίζεται με την εμφάνιση κύστης στα πειραματικά σωληνάρια του νεφρού. Αυτές οι διαταραχές έχουν την από κοινού ανάπτυξη κύστης στην σωληνοειδή μοίρα του νεφρού. Ακόμα μία ασθένεια που ονομάζεται ARPKD (autosomal recessive polycystic kidney disease) είναι μία κληρονομήσιμη ανωμαλία που σχετίζεται με την εμφάνιση κύστης και μπορεί να προάγει νεφρική ανεπάρκεια<sup>[41]</sup>. Η ασθένεια αυτή οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο Pkhd1. Ο υποκινητής αυτού του γονιδίου στο ποντίκι περιέχει μία εξελικτικά συντηρημένη αλληλουχία στην οποία προσδένεται ο ΗΝF1. Ο ΗΝF-1β και σε μικρότερο βαθμό ο ΗΝF-1α προσδένονται στον υποκινητή του γονιδίου και διεγείρουν την μεταγραφή του. Μεταλλάξεις στον ΗΝF-1β αναστέλλουν την ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου. Ο ΗΝF-1β ρυθμίζει αυστηρά την μεταγραφή του Pkhd1 και η αναστολή της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να συμβάλλει στον σχηματισμό κύστης στα νεφρά σε άτομα με την ασθένεια MODY5.



## ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει δύο αντικειμενικούς σκοπούς:

- A) Την εύρεση πιθανών θέσεων δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων πάνω στον υποκινητή του ανθρωπινού γονιδίου του TIN-ag. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες πιθανόν να επηρεάζουν την ιστοειδική έκφραση του γονιδίου.
- B) Να ελεγχθεί πως αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες μπορεί να επηρεάζουν την έκφραση του υποκινητή του γονιδίου του TIN-ag σε διάφορες κυτταρικές σειρές.

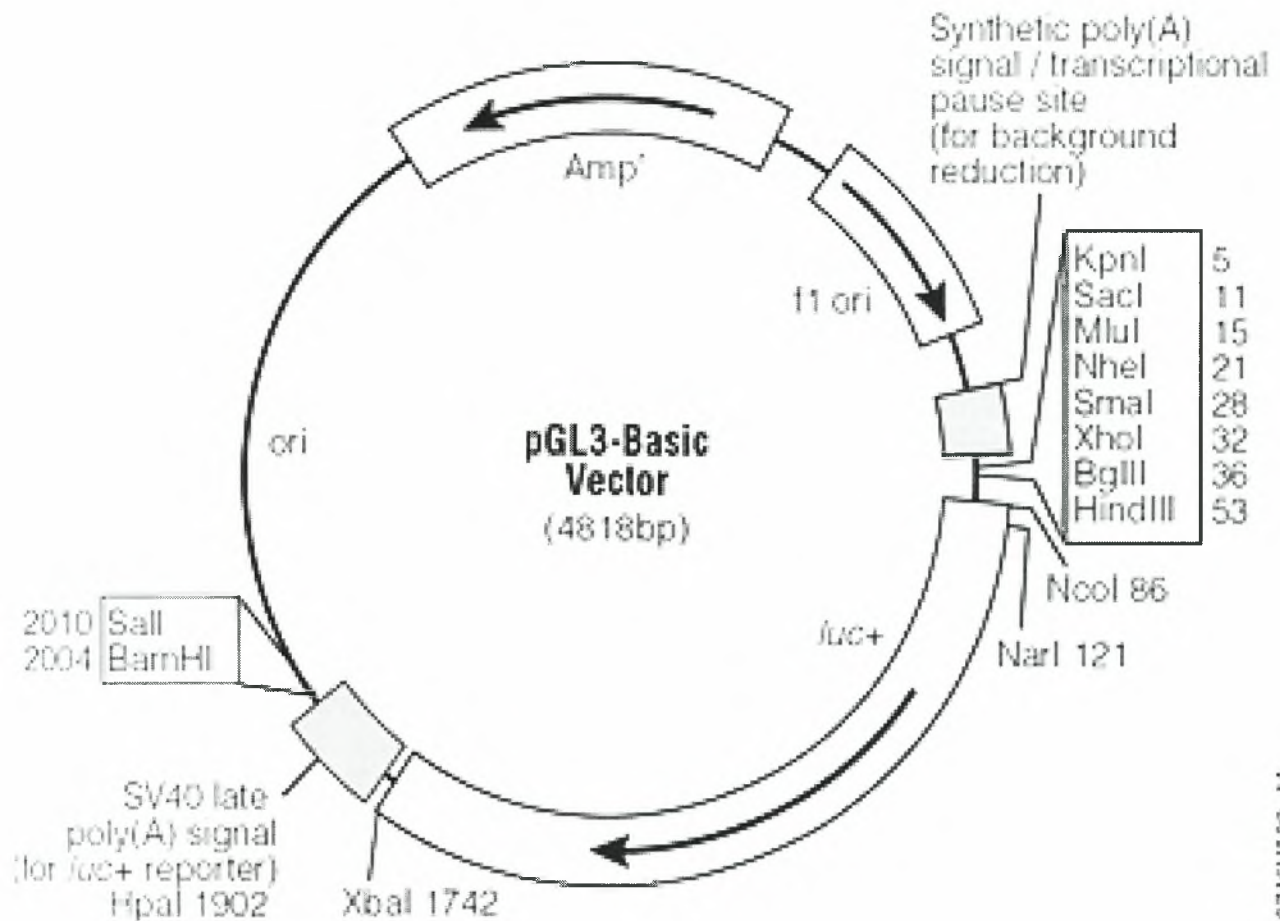
## ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## I. ΥΛΙΚΑ

### Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης

#### 1. pGL3-Basic Vector

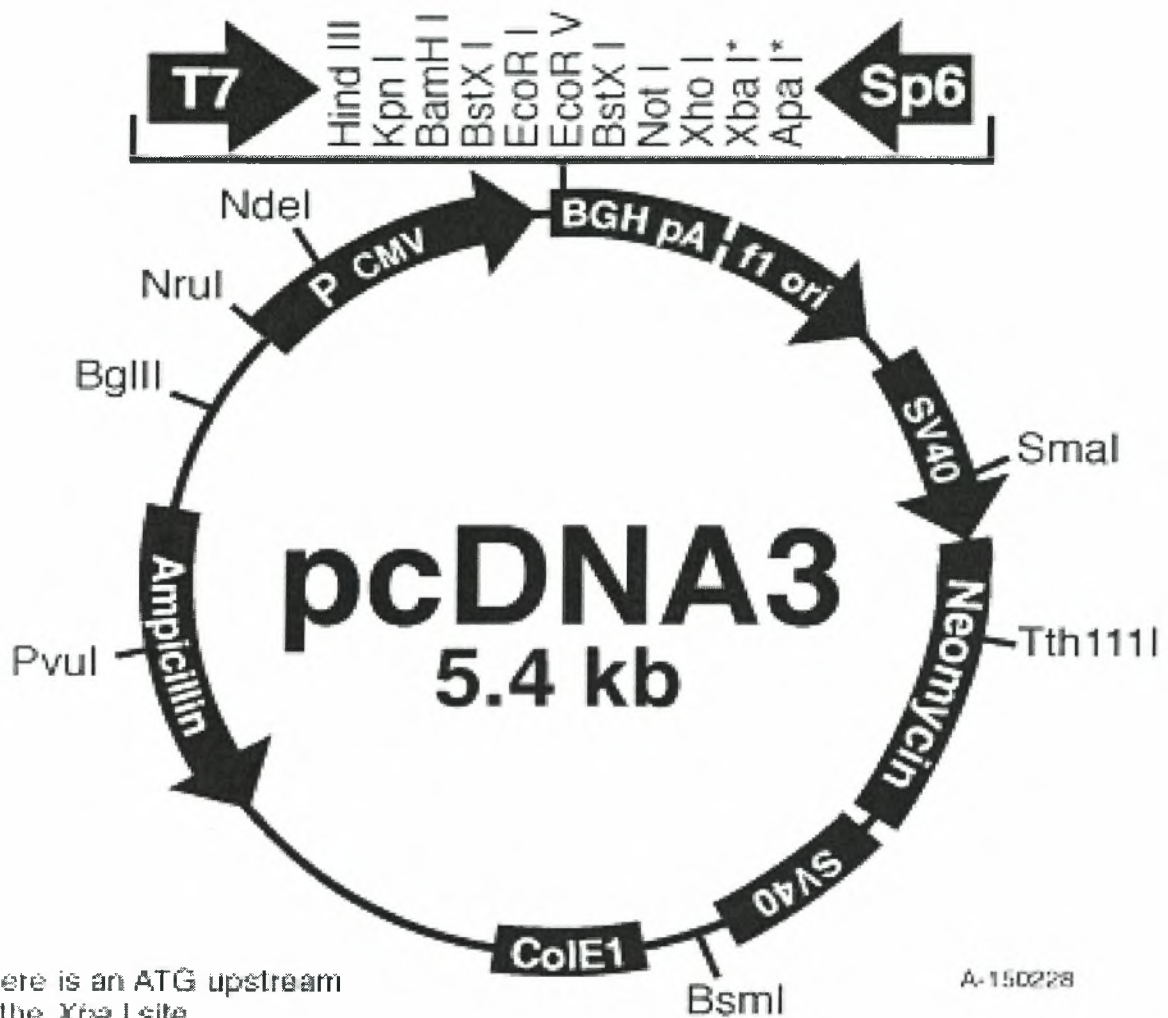


Εικόνα 4: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGL3-Basic Vector

**Amp<sup>r</sup>**: Γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμικιλίνη επιτρέποντας την επιλογή των βακτηριακών κυττάρων που το περιέχουν.

**luc+**: Γονίδιο αναφοράς, το οποίο εκφράζεται όταν έχουμε επαγωγή του υποκινητή.

## 2. pcDNA3



Εικόνα 5: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pcDNA3

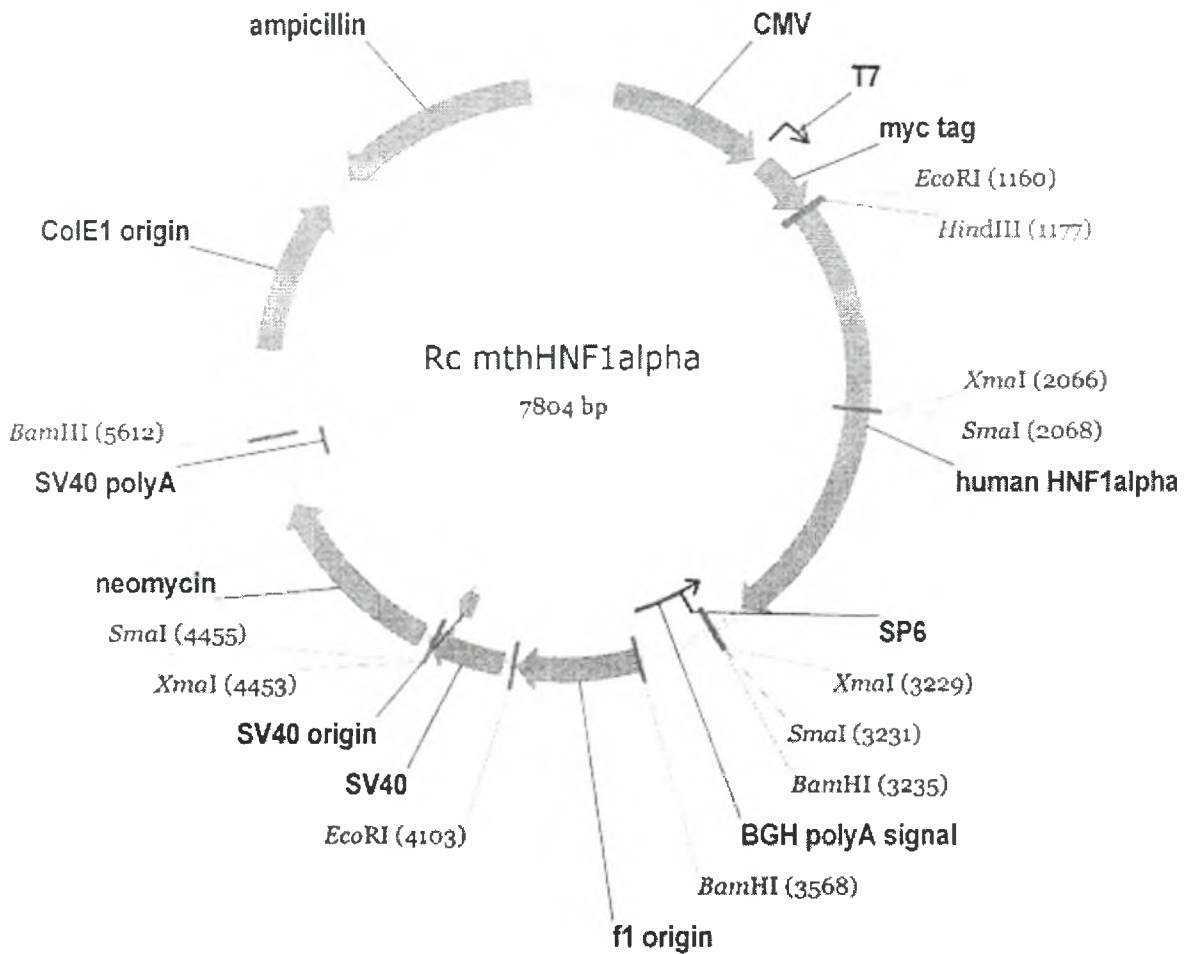
**Amp<sup>r</sup>**: Γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη επιτρέποντας την επιλογή των βακτηριακών κυττάρων που το περιέχουν.

**CMV**: Υποκινητής ανθρώπινου κυτταρομαγαλοϊού (πάρα πολύ ισχυρός υποκινητής).

**Neomycin**: Γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στα ευκαρυωτικά κύτταρα.



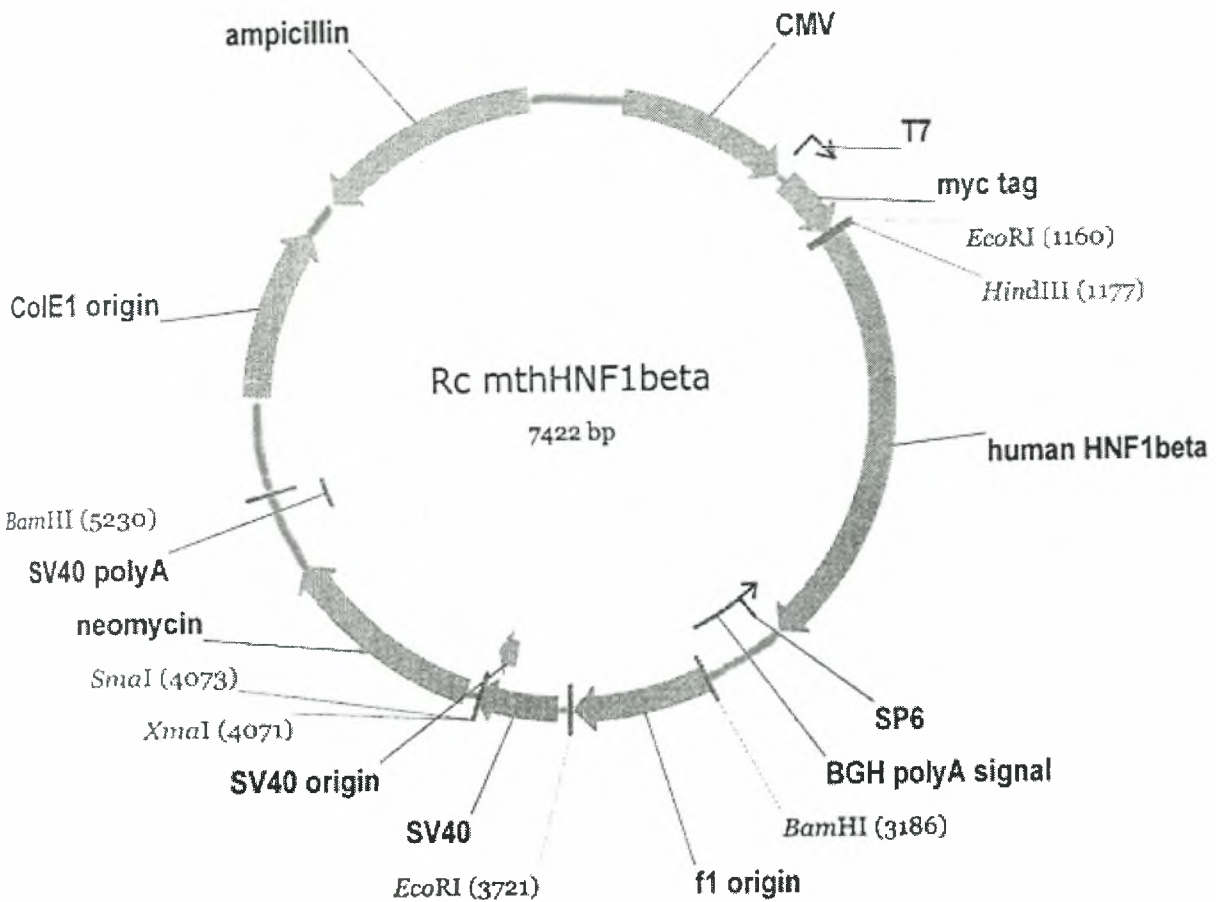
### 3. Rc mthHNF1alpha



Εικόνα 6: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα Rc mthHNF1alpha

Πλασμιδιακός φορέας που υπερεκφράζει τον HNF1-alpha. Ο πλασμιδιακός φορέας στάλθηκε από τον Prof. Gerhart U. Ryffel (Institute of cell Biology in Essen, <http://www.uni-essen.de/ifz/>).

#### 4. Rc mthHNF1beta



Εικόνα 7: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα Rc mthHNF1beta

Πλασμιδιακός φορέας ο οποίος υπερεκφράζει τον HNF1-beta. Ο πλασμιδιακός φορέας στάλθηκε από τον Prof. Gerhart U. Ryffel (Institute of cell Biology in Essen, <http://www.uni-essen.de/ifz/>).

## Στελέχη βακτηριακών κυττάρων *E. coli*:

- XL1-blue

## Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές:

- **HK-2** (ATCC number : CRL-2190): Είναι ανθρώπινη κυτταρική σειρά προερχόμενη από νεφρό ενήλικα. Τα κύτταρα αθανатоποιήθηκαν με μεταγωγή από τον ανθρώπινο ιό του παпилώματος (Human Papilloma Virus 16 HPV-16). Τα κύτταρα περιέχουν τις αλληλουχίες DNA του ιού.
- **HEK-293** (ATCC number : CRL-1573): Είναι ανθρώπινα νεφρικά εμβρυϊκά κύτταρα. Η κυτταρική αυτή σειρά είναι ιδανική για τιτλοδότηση ανθρώπινου αδενοϊού. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν τον ασυνήθιστο κυτταρικό υποδοχέα βιτρονεκτίνης. Ο υποδοχέας αυτός συντίθεται από την β-1 υπομονάδα της ιντεργκρίνης και την α-5 υπομονάδα του υποδοχέα της βιτρονεκτίνης.
- **HeLa** (ATCC number : CCL-2): Είναι ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από τον αυχένα. Η κυτταρική σειρά αυτή έχει αναφερθεί ότι περιέχει αλληλουχίες ενός ήπιου όγκου επιθηλιακού ιστού (Human Papilloma Virus 18 HPV-18).

Όλες οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές προέρχονται από την εταιρεία ATCC ( The Global Bioresource Center). Η ιστοσελίδα της εταιρείας είναι <http://www.Igepromochem-atcc.com>.

## Θρεπτικά υλικά

LB (για 1000 ml)

- 10 gr bacto tryptone
- 5 gr bacto yeast extract
- 10 gr NaCl
- για τρυβλία: 20 gr agar
- αποστείρωση σε αυτόκαυστο

DMEM : DULBECCO'S MEM (1x)

- 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>
- 4,5 g/l D-Glucose
- Na-Pyruvate
- **without** L-Glutamine

Το θρεπτικό υλικό είναι από την εταιρεία : The Cell Culture Company με ιστοσελίδα <http://www.paa.com/company.html>.

Το υλικό αυτό το χρησιμοποιούμε στα κύτταρα αφού προσθέσουμε τα εξής:

- L-Glutamine σε τελική συγκέντρωση 4mM
- FBS (Fetal Bovine Serum) 10%
- Penicillin/ Streptomycin σε τελική συγκέντρωση 1x

Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (1x)

- with L-glutamine
- 2400mg/L Sodium Bicarbonate
- HEPES
- Sodium Pyruvate
- Hypoxanthine
- Thymidine
- Trace elements
- Growth Factors
- 1,1 mg/L Phenol Red.

Αποθήκευση στους +4°C στο σκοτάδι. Το θρεπτικό αυτό υλικό χρησιμοποιήθηκε για την διαμόλυνση των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών.

Το προϊόν έχει κωδικό 31985-047 και είναι από την εταιρεία Invitrogen με ιστοσελίδα <http://www.invitrogen.com>

## II. ΜΕΘΟΔΟΙ

### **Απομόνωση RNA από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. (Total RNA purification from cultured cells with NucleoSpin RNA II protocol της MACHEREY-NAGEL).**

Χρησιμοποιείται για την απομόνωση RNA από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.

- Συλλέγουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 10 min.
- Επαναδιαλύουμε το δείγμα σε 350 μl διαλύματος λύσης (RA1) και 3,5 μl β-μερκαπτοαιθανόλης και μεταφέρουμε σε στήλη (Nucleospin Filter units) και φυγοκεντρούμε στις 9000 rpm για 1 min.
- Πετάμε την στήλη και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε μικροσωληνάκι φυγοκέντρησης. Προσθέτουμε 350 μl 70% αιθανόλης και ανακινούμε.
- Μεταφέρουμε το διάλυμα σε καινούργια στήλη και φυγοκεντρούμε στις 8500 rpm για 30 sec.
- Απορρίπτουμε το έκλουσμα και προσθέτουμε 350 μl MDB και φυγοκεντρούμε στις 9000 rpm για 1 min.
- Προετοιμάζουμε το διάλυμα επώασης για την DNase 1 το οποίο περιέχει 90 μl διαλύματος DNase 1 και 10 μl ενζύμου (DNase 1). Ανακινούμε το διάλυμα και προσθέτουμε 95 μl στην μεμβράνη της στήλης. Το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
- 1<sup>ο</sup> πλύσιμο: Προσθέτουμε 200 μl RA2 και φυγοκεντρούμε στις 8,500 rpm για 30 sec.
- 2<sup>ο</sup> πλύσιμο: Απορρίπτουμε το έκλουσμα και προσθέτουμε 600 μl RA3 και φυγοκεντρούμε στις 8,500 rpm για 30 sec.
- 3<sup>ο</sup> πλύσιμο: Απορρίπτουμε το έκλουσμα και προσθέτουμε 250 μl RA3 και φυγοκεντρούμε στις 9000 rpm για 2 min.
- Απορρίπτουμε το έκλουσμα και τοποθετούμε την στήλη σε καινούργιο μικροσωληνάκι φυγοκέντρησης. Προσθέτουμε 60 μl δις απεσταγμένο νερό και το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Μετά το πέρας του χρόνου φυγοκεντρούμε στις 9000 rpm για 1 min. Αυτή την διαδικασία την επαναλαμβάνουμε 2 φορές.
- Το έκλουσμα που παίρνουμε είναι 120 μl και αποτελεί το τελικό δείγμα με το RNA.

### **Απομόνωση RNA από ιστούς ποντικού. (Total RNA purification from tissue (mouse) with Nucleospin RNA II protocol της MACHEREY-NAGEL).**

Εκτελείται με τον ίδιο τρόπο όπως παραπάνω με την εξής τροποποίηση: Στο πρώτο βήμα αντί για κύτταρα έχουμε ιστούς ποντικού (εγκέφαλο, νεφρό και ήπαρ). Οι ιστοί πάρθηκαν από την χειρουργική μονάδα του κέντρου πειραματόζωων του I.I.B.E.A.A. και κρατήθηκαν στους -80°C για 3 μέρες και στην συνέχεια έγινε η κατεργασία για την απομόνωση του RNA.



- Αρχικά οι παγωμένοι ιστοί κονιορτοποιήθηκαν παρουσία υγρού αζώτου. Στην συνέχεια προσθέσαμε 350 μl διαλύματος λύσης (RA1) και 3,5 μl β-μερκαπτοαιθανόλης και τα μεταφέρουμε σε στήλη (Nucleospin Filter units) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 9000 rpm για 1 min.
- Στην συνέχεια η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια (βλέπε άνωθεν).

## **Προετοιμασία βακτηριακών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση (Preparing electrocompetent XL1 (blue) E.coli cells).**

- Παίρνουμε 10 ml από μία καλλιέργεια 24 ωρών και προσθέτουμε 500 ml LB.
- Αφήνουμε τα κύτταρα να μεγαλώσουν μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600 nm  $OD_{600} \approx 0,5 - 0,6$ . Τα κύτταρα επιάζονται στους 37°C στις 210 rpm στο Orbital Shaker της εταιρείας Thermo Forma.
- Τα βακτηριακά κύτταρα χωρίζονται σε δύο αποστειρωμένα δοχεία που είναι ειδικά για την κεφαλή JA10 rotor της φυγοκέντρου Multifuge 3 s-r της εταιρείας Heraeus. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 5000 rpm για 15 min στους 4°C.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το κυτταρικό ίζημα με 250 ml δις απεσταγμένο παγωμένο νερό (σε κάθε μπουκάλι).
- Φυγοκεντρούμε στις 5000 rpm για 15 min στους 4°C.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε τα κύτταρα με 125 ml δις απεσταγμένο παγωμένο νερό (σε κάθε μπουκάλι).
- Φυγοκεντρούμε στις 5000 rpm για 15 min στους 4°C.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε τα κύτταρα με 5 ml 10% v/v παγωμένη γλυκερόλη (σε κάθε μπουκάλι). Μεταφέρουμε το εναιώρημα των κυττάρων σε 2 αποστειρωμένα σωληνάκια φυγοκέντρωσης των 50 ml. Φυγοκεντρούμε 5000 rpm για 15 min στους 4°C.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο και μεταφέρουμε τα κύτταρα σε μικροσωληνάκια φυγοκέντρωσης των 1,5 ml με τελικό όγκο 500 μl 10% v/v γλυκερόλης (0,125% w/v yeast extract and 0,25% w/v tryptone). Μετά χωρίζουμε τα δείγματα μας (45 μl το καθένα) σε μικροσωληνάκια φυγοκέντρωσης των 1,5 ml.
- Στο τέλος τα αποθηκεύουμε στους -80°C.

## **Ηλεκτροδιάτρηση βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA (Electroporation).**

- Ξεπαγώνουμε τα βακτηριακά κύτταρα XL1-blue (45 μl δείγμα).
- Σε αυτό το δείγμα προσθέτουμε 2 μl από το μείγμα του ligation.
- Αναμειγνύουμε το DNA με τα βακτηριακά κύτταρα και τα προσθέτουμε στην κυβέτα με τα ηλεκτρόδια.
- Φτιάχνουμε ένα αρνητικό μάρτυρα (45 μl βακτηριακά κύτταρα και 1 μl νερό) και τον βάζουμε σε άλλη κυβέτα.

- Η ηλεκτροδιάτρηση γίνεται με τις εξής παραμέτρους:  
Voltage = 200V  
Resistance = 129 Ohms  
Capaticance = 50μF
- Μετά την ηλεκτροδιάτρηση προσθέτουμε 500 μl LB στην κυβέτα και αναδιαλύουμε τα κύτταρα. Στην συνέχεια τα μεταφέρουμε σε σωληνάκι φυγοκέντρησης των 15ml και στην συνέχεια προσθέτουμε ακόμα 500 μl LB στην κυβέτα για να πάρουμε και τα υπόλοιπα κύτταρα.
- Φυγοκέντρηση στις 210 rpm για 1 ώρα στους 37°C.
- Φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 1 ώρα στους 25°C.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο και κρατάμε 100 μl με τα οποία επαναδιαλύουμε τα κύτταρα.
- Στρώνουμε τα κύτταρα σε τρυβλίο Petri με κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη, ).
- Επώαση στο 37°C για 24 ώρες.

### **Καθαρισμός προϊόντος PCR. (PCR purification kit protocol της Qiagen).**

- Προσθέτουμε 5 όγκους διαλύματος PB σε 1 όγκο δείγματος PCR και ανακινούμε ελαφρά.
- Τοποθετούμε το δείγμα σε μια στήλη (QIAquick column) και εν συνεχεία την στήλη σε ένα μικροσωληνάκι φυγοκέντρησης 2 ml. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 1 min.
- Αποχύνουμε το έκλουσμα και προσθέτουμε 750 μl διαλύματος PE στην στήλη και φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 1 min.
- Αποχύνουμε το έκλουσμα και φυγοκεντρούμε πάλι στις 13000 rpm για 1 min.
- Τοποθετούμε την στήλη σε ένα καθαρό μικροσωληνάκι φυγοκέντρησης 1,5 ml.
- Τέλος για να πάρουμε το DNA προσθέτουμε 50 μl δις απεσταγμένο νερό στο κέντρο της μεμβράνης στη στήλη και φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 1 min.

### **Σύνθεση cDNA χρησιμοποιώντας το ένζυμο SuperScript II RT.( cDNA synthesis Using SuperScript II RT protocol της Invitrogen).**

Η αντίδραση έγινε για 2 μg RNA:

- Σε ένα μικροσωληνάκι φυγοκέντρησης 1,5ml προσθέσαμε τα εξής:  
-1 μl Random Primers  
-6,6 μl RNA (2μg)  
-1 μl dNTPs 10mM  
-4,4 μl δις απεσταγμένο νερό
- Επώαση στους 65 °C για 5 min.

- Μετά το πέρας του χρόνου κατευθείαν στον πάγο.
- Στην συνέχεια προσθέτουμε:
  - 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος ανάστροφης μεταγραφάσης (20x)
  - 2 μl 0,1M DTT
- Επώαση στους 25 °C για 5 min.
- Εν συνεχεία προσθέτουμε 1 μl ενζύμου ανάστροφης μεταγραφάσης (SyperScript II RT 200 U/μl)
- Επώαση στους 42 °C για 50 min.
- Στο τέλος για την απενεργοποίηση του ενζύμου κάνουμε επώαση στους 72°C για 15 min. Στο τέλος καταλήγουμε να έχουμε 20μl cDNA.

## Εισαγωγή τμήματος DNA σε πλασμιδιακό φορέα (αντίδραση σύνδεσης).

Χρησιμοποιείται η DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 η οποία καταλύει τη δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ γειτονικών 3'- υδροξυλικών και 5'- φωσφορικών άκρων.

- Για αντίδραση όγκου 20 μl χρησιμοποιούμε:
  - Πλασμιδιακό DNA και ξένο τμήμα DNA
  - 2 μl ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (10x)
  - 5 μl λιγάσης (1u/ μl)
  - dd H<sub>2</sub>O μέχρι τα 20 μl
- Επωάζουμε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου
- Μετασχηματίζουμε βακτηριακά κύτταρα E. coli με το προϊόν της αντίδρασης

## Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1%

Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση τμημάτων DNA από 500 bp ως 7 kb.

- Διαλύουμε αγαρόζη σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x ώστε η τελική συγκέντρωσή της στο διάλυμα να είναι 1% (0,5 gr αγαρόζης σε 50 ml TBE).
- Θερμαίνουμε το διάλυμα μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη.
- Προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ ml) ώστε η τελική συγκέντρωσή του στο διάλυμα να είναι 0.5 μg/ ml.
- Ρίχνουμε το διάλυμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που φέρει τις κατάλληλες εγκοπές και περιμένουμε να πήξει.
- Προσθέτουμε TBE 0,5x ώστε να καλυφθεί η πηκτική.
- Προσθέτουμε στο διάλυμα με το DNA **διάλυμα φόρτωσης**, το οποίο είναι 6x σε σχέση με τον συνολικό όγκο.
- Φορτώνουμε το διάλυμα στις εγκοπές της πηκτής.
- Συνδέουμε με ηλεκτρόδια τη συσκευή και ηλεκτροφορούμε στα 100 V για 20 min τουλάχιστον.

- Τοποθετούμε την πηκτή πάνω από λάμπα υπεριώδους φωτός και φωτογραφίζουμε.

**TBE:** 4 mM Tris- Boric Acid- 0,5 mM EDTA

**Διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer 6x):** 10mM Tris-HCL (ph 7,6), 0,03% bromophenol blue, 0,03% xylene cyanol FF, 60% glycerol and 60mM EDTA.

## **Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης. (Gel Extraction kit Protocol της QIAGEN).**

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA από 70 ως 10000 bp.

- Με αποστειρωμένο νυστέρι αφαιρούμε το κομμάτι της πηκτής που περιέχει το τμήμα που μας ενδιαφέρει.
- Ζυγίζουμε το κομμάτι και προσθέτουμε 3 όγκους διαλύματος QG σε έναν όγκο πηκτής. (100 mg = 100μl).
- Επωάζουμε για 10 min στους 50°C.
- Προσθέτουμε έναν όγκο ισοπροπανόλης σε έναν όγκο δείγματος.
- Μεταφέρουμε το δείγμα στην ειδική στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 min στις 13000 rpm.
- Αποχύνουμε το έκλουσμα και προσθέτουμε 750 μl PE Buffer. Φυγοκεντρούμε για 1 min στις 13000 rpm.
- Αποχύνουμε το έκλουσμα και φυγοκεντρούμε για 1 min στις 13000 rpm.
- Τοποθετούμε τη στήλη σε καθαρό σωληνάκι φυγοκέντρησης (1,5 ml ).
- Προσθέτουμε 30 μl δις απεσταγμένο νερό, περιμένουμε 1 min και φυγοκεντρούμε για 1 min στις 13000 rpm.

## **Αποφωσφορλίωση γραμμικού πλασμιδιακού DNA με την αλκαλική φωσφατάση CIP .(Calf Intestinal alkaline phosphatase).**

Χρησιμοποιείται για την αφαίρεση της 5' φωσφορικής ομάδας από μονόκλιωνα ή δίκλιωνα τμήματα DNA εμποδίζοντας την επανασύνδεση τους.

- Για αντίδραση όγκου 100 μl (10 μg πλασμιδιακού DNA)
- Προσθέτουμε 1 μl CIP (10 u/ μl).
- Αφήνουμε για 15 min στους 37°C.
- Αφήνουμε για 15 min στους 55°C.
- Προσθέτουμε 1 μl CIP.
- Αφήνουμε για 15 min στους 37°C.
- Προσθέτουμε EDTA ώστε η τελική συγκέντρωση του να είναι 5 mM.

- Αφήνουμε για 10 min στους 75.
- Καθαρίζουμε το πλασμιδιακό DNA με εκχυλίσαις με φαινόλη – χλωροφόρμιο.
- Κατακρημνίζουμε το DNA με αιθανόλη.

### **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με τη χρήση στήλης (Spin Miniprep Kit Protocol της QIAGEN).**

Χρησιμοποιείται για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από ολονύχτιες καλλιέργειες (1-5 ml) βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο LB στο οποίο έχει προστεθεί αμπικιλίνη (50μg/ml).

- Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 5 min στις 4000 rpm.
- Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 250 μl P1 buffer και μεταφέρουμε σε μικροσωληνάκι φυγοκέντρησης.
- Προσθέτουμε 250 μl P2 Buffer και ανακινούμε.
- Προσθέτουμε 350 μl N3 Buffer και ανακινούμε.
- Φυγοκεντρούμε για 10 min στις 14000 rpm.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 min στις 14000 rpm.
- Απορρίπτουμε το έκλουσμα και προσθέτουμε 500 μl PB Buffer.
- Φυγοκεντρούμε για 1 min στις 14000 rpm.
- Αποχύνουμε το έκλουσμα και προσθέτουμε 750 μl PE Buffer.
- Φυγοκεντρούμε για 1 min στις 14000 rpm, απορρίπτουμε το έκλουσμα και ξαναφυγοκεντρούμε για 1 min στις 14000 rpm.
- Προσθέτουμε 20 μl δις απεσταγμένο νερό, περιμένουμε 1 min και φυγοκεντρούμε για 1 min στις 14000 rpm.

### **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας με τη χρήση στήλης (Spin Maxiprep Kit Protocol της QIAGEN).**

Χρησιμοποιείται για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης ποσότητας από ολονύκτιες καλλιέργειες 100-500 ml σε θρεπτικό μέσο LB στο οποίο έχει προστεθεί αμπικιλίνη (50μg/ml). Σε αυτή την μέθοδο χρησιμοποιούνται κολώνες Maxiprep (tip-500) και η διαδικασία είναι ακριβώς ίδια (βλέπε άνωθεν), με την μόνη διαφορά ότι αλλάζουν οι όγκοι των διαλυμάτων που προσθέτουμε σύμφωνα πάντα με το πρωτόκολλο της QIAGEN (Spin Maxiprep Kit Protocol της QIAGEN).



## Αντίδραση πέψης με περιοριστικά ένζυμα (Digestion).

Χρησιμοποιείται έτσι ώστε ένας κυκλικός πλασμιδιακός φορέας να μπορέσει να δεχθεί ένα γραμμικό τμήμα DNA σε μία αντίδραση σύνδεσης.

Η αντίδραση όγκου είναι 30  $\mu$ l ( 1  $\mu$ g Plasmid DNA):

- Προσθέτουμε ποσότητα πλασμιδιακού DNA που αντιστοιχεί σε 1  $\mu$ g.
- 3  $\mu$ l ρυθμιστικό διάλυμα (10x).
- 1  $\mu$ l περιοριστικό ένζυμο ( 1 $\mu$ l/1 $\mu$ g DNA).
- Δις απεσταγμένο νερό μέχρι τα 30  $\mu$ l.
- Επώαση στους 37  $^{\circ}$ C για 3 ώρες.
- Στο τέλος για 15 min στους 65 $^{\circ}$ C για να επέλθει η μετουσίωση του ενζύμου.

## Επεξεργασία δειγμάτων RNA με το ένζυμο RQ1 DNase (RQ1 DNase treatment).

Η αντίδραση όγκου 50  $\mu$ l (20  $\mu$ g RNA) χρησιμοποιούμε:

- Προσθέτουμε ποσότητα RNA που αντιστοιχεί στα 20  $\mu$ g.
- 5  $\mu$ l ρυθμιστικό διάλυμα RQ1 DNase (10x).
- 20  $\mu$ l ενζύμου RQ1 DNase.
- Δις απεσταγμένο νερό μέχρι τα 50  $\mu$ l.
- Επώαση για 1 ώρα στους 37 $^{\circ}$ C.
- Στο τέλος για 15 min στους 65 $^{\circ}$ C για να επέλθει η μετουσίωση του ενζύμου.

## Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης DNA και RNA.

Αρχικά ρυθμίζουμε το φωτόμετρο στο πρόγραμμα που θέλουμε για να μετρήσουμε την συγκέντρωση. Οι φωτομετρήσεις έγιναν στην συσκευή Biomate 3 της εταιρείας Thermo Spectronic.

- Κάναμε αραιώση του δείγματος 1/25. Σε μια κυβέτα χαλαζία βάλαμε 1  $\mu$ l DNA ή RNA και προσθέσαμε 24  $\mu$ l δις απεσταγμένο νερό.
- Σε μια άλλη κυβέτα χαλαζία βάλαμε μόνο νερό, την οποία χρησιμοποιήσαμε για να μηδενίσουμε το φωτόμετρο (Biomate 3 – Thermo Spectronic).
- Αφού το μηδενίσαμε βάλαμε την κυβέτα με το DNA ή RNA και μετρήσαμε την απορρόφηση στα 260 nm.
- Η συγκέντρωση υπολογίζεται ως εξής: Πολλαπλασιάζουμε την τιμή της οπτικής πυκνότητας με την αραιώση που κάναμε και τον αριθμό 50 εάν πρόκειται για DNA ή τον αριθμό 40 εάν πρόκειται για RNA.  $C = O.D._{260\text{ nm}} \cdot \text{dilution} \cdot 50$  (DNA) ή  $40$  (RNA)  $\mu$ g/ml. (Βλέπε Maniatis Molecular Cloning (A laboratory manual, second edition) 3<sup>ος</sup> τόμος, παράρτημα 3 πίνακας C.2.

## Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA. Θα πρέπει να σημειώσουμε ότι για καθεμία αντίδραση οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται μια αντίδραση PCR καθώς και οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων ποικίλουν ανάλογα με την πολυμεράση που χρησιμοποιούμε. Συγκεκριμένα για μια αντίδραση όγκου 20 μl με την πολυμεράση (DyNAzyme EXT) της εταιρείας FINNZYMES χρησιμοποιούμε τα εξής:

- 2 μl ρυθμιστικό διάλυμα (Optimized DyNAzyme EXT Buffer 10x).
- X μl Primer A (0,5nM).
- X μl Primer B (0,5nM).
- 1 μl dNTPs (10mM).
- 1 μl δείγματος DNA.
- 0,5 μl πολυμεράσης (DyNAzyme EXT 200U (1 U/μl)).
- X μl δις απεσταγμένο νερό μέχρι τα 20 μl.

Όλες οι αντιδράσεις PCR έγιναν στην συσκευή DNA Engine DYAD™ της εταιρείας MJ Research.

## Καλλιέργεια ανθρώπινων κυτταρικών σειρών.

Η καλλιέργεια των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών έγινε με το θρεπτικό υλικό DMEM. Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού γινόταν κάθε δύο μέρες.

Η ανακαλλιέργεια των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της τρυψινοποίησης. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Στην αρχή πετάμε το θρεπτικό υλικό.
- Εν συνεχεία βάζουμε 2 ml trypsin-EDTA σε φλάσκα των 75 cm<sup>2</sup>. Απλώνουμε το διάλυμα και μετά το πετάμε.
- Μετά ξαναβάζουμε 2 ml trypsin-EDTA στην φλάσκα, το απλώνουμε και το αφήνουμε για 1 min- 2 min στους 37<sup>0</sup>C.
- Προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με ορό και μαζεύουμε τα κύτταρα.
- Κάνουμε φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 10 min.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το κυτταρικό ίζημα σε φρέσκο θρεπτικό υλικό.
- Στην συνέχεια μετράμε τον αριθμό των κυττάρων με την βοήθεια του αιματοκυττόμετρου. Σε κάθε περίπτωση μετρήθηκαν 4 διαφορετικά πεδία και βγάλαμε τον μέσο όρο. Με αυτό τον τρόπο υπολογίσαμε τον αριθμό των κυττάρων ανά ml θρεπτικού υλικού.
- Στο τέλος αφού μετρήσαμε τα κύτταρα, τα αραιώσαμε και τα βάλουμε σε νέες φλάσκες.

## Διαμόλυνση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών με πλασμιδιακό DNA (Transfection in human cell lines).

### A. Με την μέθοδο του Φωσφορικού ασβεστίου (Calcium Phosphate transfection).

- Αρχικά τα κύτταρα στην φλάσκα πρέπει να καλύπτουν το 70%-80% της επιφάνειας της.
- Αλλάζουμε το θρεπτικό υλικό δύο ώρες πριν την διαδικασία της διαμόλυνσης.
- Σε ένα μικροσωληνάκι φυγοκέντρησης 1,5 ml προσθέτουμε 5 μg πλασμιδιακού DNA και δις απεσταγμένο νερό μέχρι ο όγκος να γίνει 195 μl. Μετά προσθέτουμε 27,7 μl χλωριούχο ασβέστιο ( $\text{CaCl}_2$  2M).
- Στην συνέχεια προσθέτουμε 222,2 μl HBS 2x (50mM HEPES pH 7,1, 280 mM NaCl, 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) σε ένα άλλο μικροσωληνάκι φυγοκέντρησης 1,5 ml.
- Μετά προσθέτουμε σταγόνα-σταγόνα/δευτερόλεπτο το μείγμα του φωσφορικού ασβεστίου με το πλασμιδιακό DNA στο μικροσωληνάκι φυγοκέντρησης που περιέχει το HBS 2x. Καθώς προσθέτουμε ανακινούμε επίσης ελαφρά.
- Το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 40 min.
- Μετά το πέρας του χρόνου ανακινούμε και προσθέτουμε το μείγμα στο κύτταρα (προσθέτουμε σταγόνα-σταγόνα σε ολόκληρη την επιφάνεια της φλάσκας και την ανακινούμε ελαφρά).
- Επωάζουμε τα κύτταρα στο Steri-cycle  $\text{CO}_2$  Incubator της εταιρίας Thermo Forma για 24 ώρες στους  $37^\circ\text{C}$  με 5%  $\text{CO}_2$ .
- Την επόμενη μέρα πετάμε το θρεπτικό υλικό, πλένουμε τα κύτταρα δύο φορές με PBS και στο τέλος προσθέτουμε καινούριο θρεπτικό υλικό DMEM.

### B. Με την μέθοδο της Λιποφεκταμίνης (Lipofectamine Transfection).

- Πριν ξεκινήσουμε την διαδικασία διαμόλυνσης πρέπει να αλλάξουμε το θρεπτικό υλικό των κυττάρων.
- Αρχικά σε ένα μικροσωληνάκι φυγοκέντρησης 1,5 ml (1) προσθέτουμε 2 μg πλασμιδιακού DNA και 100 μl Opt-Mem και ανακινούμε ελαφρά.
- Μετά προσθέτουμε 6 μl Plus Reagent και ανακινούμε.
- Επωάζουμε για 15 min.
- Σε ένα άλλο μικροσωληνάκι φυγοκέντρησης 1,5 ml (2) προσθέτουμε 100 μl Opti-Mem και 8 μl λιποφεκταμίνης και ανακινούμε ελαφρά.
- Στην συνέχεια προσθέτουμε το μείγμα του πλασμιδιακού DNA (1) στο μικροσωληνάκι φυγοκέντρησης (2) και ανακινούμε ελαφρά.
- Επωάζουμε για 15 min.
- Κατά την διάρκεια της επώασης πλένουμε τα κύτταρα μας δύο φορές με Opt-Mem.
- Στην συνέχεια στο μικροσωληνάκι φυγοκέντρησης (2) προσθέτουμε 800 μl Opt-Mem και ανακινούμε.

- Στο τέλος προσθέτουμε το μείγμα στα κύτταρα σταγόνα-σταγόνα σε όλη την επιφάνεια της φλάσκας και την ανακινούμε ελαφρά.
- Επωάζουμε τα κύτταρα στο Steri-cycle CO<sub>2</sub> Incubator της εταιρίας Thermo Forma για 5 ώρες στους 37 °C με 5% CO<sub>2</sub>.
- Αφού περάσουν οι 5 ώρες πετάμε το μείγμα από τις φλάσκες και προσθέτουμε DMEM.

## **Προσδιορισμός ενεργότητας λουσιφεράσης σε κυτταρικά εκχυλίματα (Luciferase Assay System).**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε σε εκχυλίματα κυττάρων που είχαν υποστεί διαμόλυνση με φορείς έκφρασης για το γονίδιο της λουσιφεράσης (pGL3-Basic και pGL3-TINpro).

- Πλένουμε τα κύτταρα δύο φορές με PBS 1x.
- Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε μικροσωληνάκια φυγοκέντρησης 1,5 ml
- Φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm για 5 min.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 100 μl RLB 1x.
- Αναδεύουμε ισχυρά για 7 sec.
- Το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 7 min.
- Αναδεύουμε ισχυρά για 7 sec.
- Το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 7 min.
- Αναδεύουμε ισχυρά για 7 sec.
- Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 10 sec.
- Το αφήνουμε στους -4 °C μέχρι να μετρήσουμε την ενεργότητα της λουσιφεράσης.

Για να μετρήσουμε την ενεργότητα της λουσιφεράσης χρησιμοποιούμε την συσκευή Lumat LB 9507 της εταιρείας Berthold Technologies.

- Προσθέτουμε 20 μl κυτταρικού εκχυλίσματος στο σωληνάκι και μετά το τοποθετούμε μέσα στην συσκευή.
- Μετά προσθέτουμε 85 μl αντιδραστήριο λουσιφεράσης (υπόστρωμα για τη λουσιφεράση).
- Περιμένουμε 5 sec.
- Πατάμε το START στην συσκευή και παίρνουμε την τιμή.
- Μετά τοποθετούμε το επόμενο δείγμα στην συσκευή και το μετράμε.

## **Προσδιορισμός ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης σε κυτταρικά εκχυλίματα (β-galactosidase Assay System).**

Την ανάλυση της β-γαλακτοσιδάσης την χρησιμοποιούμε για να κανονικοποιήσουμε τις τιμές που πήραμε από τον προσδιορισμό ενεργότητας της λουσιφεράσης.

- Καταρχήν ξεπαγώνουμε τα συστατικά και τα ανακατεύουμε καλά πριν τα χρησιμοποιήσουμε. Τοποθετούμε το ρυθμιστικό διάλυμα 2x στον πάγο.
- Μπορεί να χρειαστεί να κάνουμε μία αραιώση των κυττάρων με το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Reporter Lysis Buffer 1x). Για να το αραιώσουμε(2:1) σε ένα μικροσωληνάκι φυγοκέντρωσης προσθέτουμε 100 μl κυττάρων και 50 μl ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Reporter Lysis Buffer 1x). Για αρνητικό control κάνουμε την ίδια αραιώση, όμως χρησιμοποιούμε κύτταρα, που δεν έχουμε διαμολύνει.
- Προσθέτουμε 150 μl ρυθμιστικού διαλύματος (Assay 2x Buffer) στο μικροσωληνάκι φυγοκέντρωσης.
- Αναδεύουμε ισχυρά τα δείγματά μας.
- Επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 30 min περίπου ή περιμένουμε μέχρι να σχηματιστεί ένα ασθενές κίτρινο χρώμα στο μικροσωληνάκι φυγοκέντρωσης. Η εμφάνιση του χρώματος μπορεί να πάρει μέχρι και 3 ώρες. Ακόμα αν η ενεργότητα του ενζύμου είναι χαμηλή η επώαση μπορεί να πάρει όλη την νύχτα.
- Αφού σχηματιστεί το χρώμα, προσθέτουμε 500 μl 1M Sodium Carbonate για να σταματήσουμε την αντίδραση.
- Μετά τοποθετούμε τα δείγματα μας μέσα σε κυβέτες και μετράμε την απορρόφηση στα 420 nm.

### **Ποσοτικοποίηση ζωνών πηκτώματος αγαρόζης.**

Η ποσοτικοποίηση των ζωνών έγινε με το πρόγραμμα Image J που βρίσκεται ελεύθερο στο Internet στην διεύθυνση [www.ansci.wisc.edu/equine/parrish/index.html](http://www.ansci.wisc.edu/equine/parrish/index.html)

### **Ταυτοποίηση αλληλουχίας νουκλεοτιδίων σε πλασμιδιακό DNA (sequencing).**

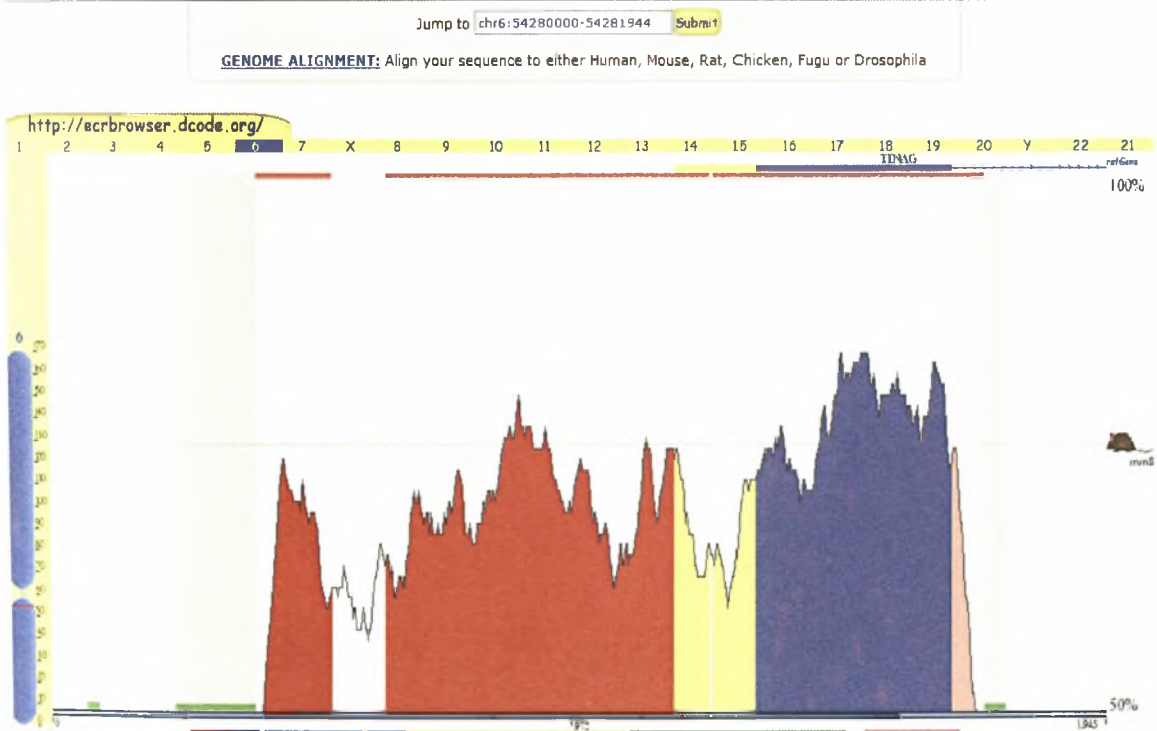
Η εύρεση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του πλασμιδιακού DNA έγινε με τη μέθοδο των διδέοξυ-αναλόγων κατά Sanger από την εταιρεία MACROGEN στην Κορέα (908 World Medical Center, Seoul).



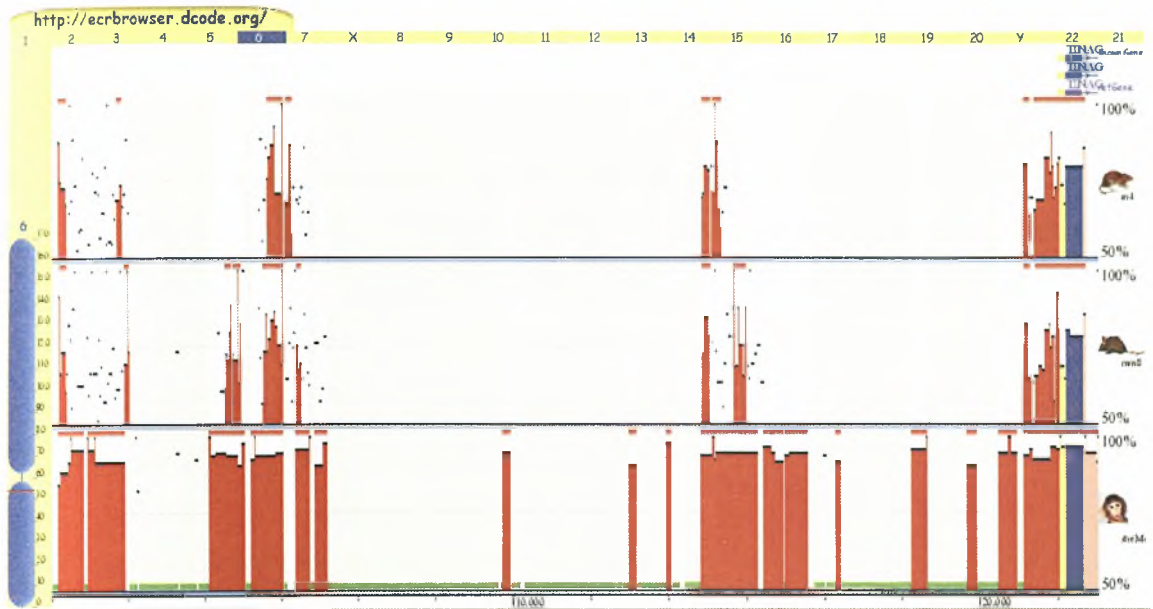
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1) ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ TIN-Ag

Σκοπός της βιοπληροφορικής ανάλυσης ήταν να εντοπίσουμε τις ρυθμιστικές αλληλουχίες οι οποίες μπορεί να ευθύνονται για την έκφραση του TIN-Ag στους νεφρικούς ιστούς. Χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα **ECR Browser** και μελετήσαμε τον υποκινητή του TIN-ag σε 4 διαφορετικούς οργανισμούς ( αρουραίος, ποντίκι, χιμπαντζής και άνθρωπος). Το συγκεκριμένο εργαλείο δίνει στον χρήστη την δυνατότητα να επιλέξει γονίδια του ενδιαφέροντός του από ένα φάσμα 18 διαθέσιμων γονιδιωμάτων σπονδυλωτών και ασπόνδυλων οργανισμών, και να εκτελέσει μια ποικιλία εργασιών στους υποκινητές των γονιδίων συμπεριλαμβανομένων της πολλαπλής στοίχισης αλληλουχιών υποκινητών ορθόλογων γονιδίων και του εντοπισμού θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στις αλληλουχίες αυτές. Πραγματοποιήσαμε στοίχιση του υποκινητή και είδαμε ότι υπάρχουν αρκετές συντηρημένες περιοχές (εικόνα 8). Συγκεκριμένα βρέθηκαν 5 περιοχές με μεγαλύτερη συντήρηση (homology islands) στην ίδια θέση σε όλες τις συγκρίσεις που πραγματοποιήσαμε.

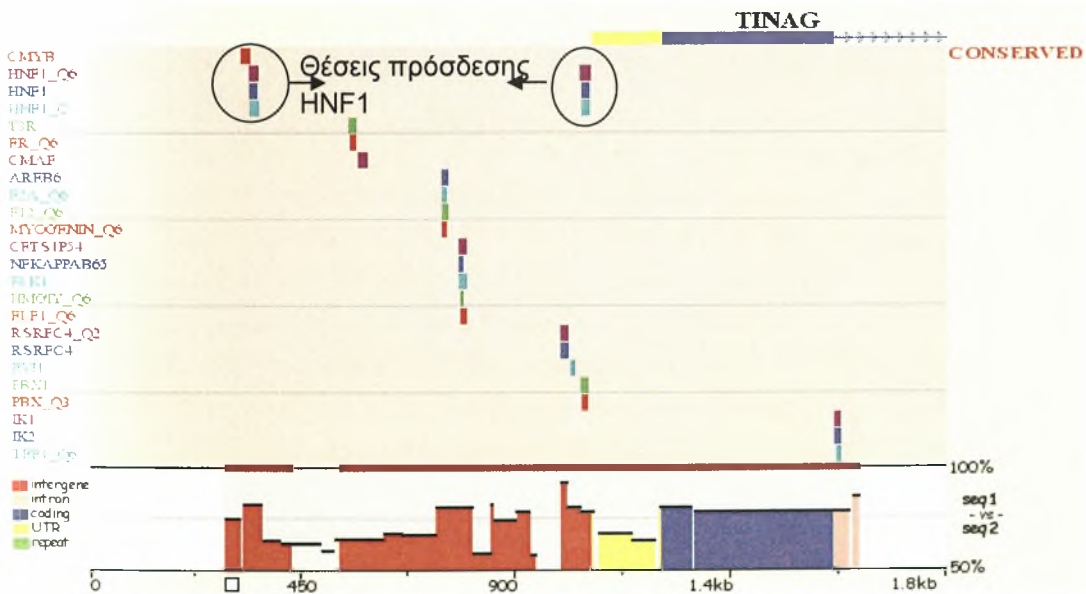


*Εικόνα 8:* Στην εικόνα αυτή παρατηρούμε την στοίχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος με το γονίδιο του ποντικού, του αρουραίου και του χιμπαντζή σε ένα τμήμα 20000 βάσεων πριν από το σημείο έναρξης της μεταγραφής (TSS) του TIN-ag, και διαπιστώνουμε την ύπαρξη 5 περιοχών με μεγαλύτερη συντήρηση.



**Εικόνα 9 :** Στην εικόνα αυτή παρατηρούμε την σύγκριση μεταξύ του γονιδιώματος του ανθρώπου και του ποντικού στην πρώτη περιοχή ομολογίας που βρίσκεται πριν από το σημείο έναρξης της μεταγραφής του υποκινητή του TIN-ag.

Η αναζήτηση θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στις στοιχισμένες περιοχές των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε από το πρόγραμμα για όλους τους δυνατούς παράγοντες και στη συνέχεια επικεντρώσαμε την ανάλυση στις θέσεις πρόσδεσης που βρέθηκαν για μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι εντοπίζονται σε απόσταση 1.9kb από το σημείο έναρξης της μεταγραφής του υποκινητή στην πρώτη περιοχή ομολογίας μεταξύ του γονιδιώματος του ανθρώπου και του ποντικού ( εικόνα 9).



**Εικόνα 10 :** Στην εικόνα αυτή βλέπουμε τις θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων. Παρατηρούμε ακόμα ότι εντοπίζονται δύο θέσεις πρόσδεσης των HNF1, και μάλιστα η μία θέση πρόσδεσης βρίσκεται ακριβώς στην έναρξη της μεταγραφής.

Συμπερασματικά, η βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε μας έδειξε ότι η μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου TIN-ag ίσως να επηρεάζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα HNF1. Όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή ο ρόλος του HNF1 στη ρύθμιση της ιστοειδικής έκφρασης διαφόρων γονιδίων στο νεφρικό ιστό, είναι σε συμφωνία με την βιοπληροφορική ανάλυση που μας δείχνει ότι ο HNF1 ίσως να προσδέεται ακριβώς στο σημείο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου TIN-ag.

## 2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ TIN-Ag

### 2.1 Κλωνοποίηση του υποκινητή του TIN-Ag

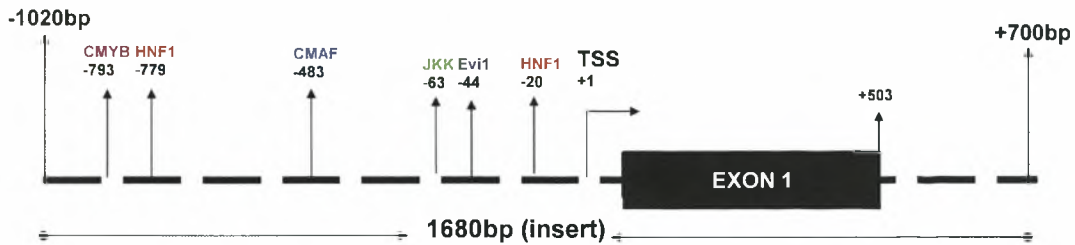
Για να μελετήσουμε το μηχανισμό με τον οποίο οι παράγοντες HNF1 επάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου του TIN-ag, πραγματοποιήσαμε κλωνοποίηση του υποκινητή του TIN-ag (από το ανθρώπινο γονίδιο) σε πλασμίδιο μπροστά από το γονίδιο της λουσιφεράσης και μελετήσαμε την ενεργότητά του σε ένα *in vitro* κυτταρικό σύστημα. Στην εικόνα 11 φαίνεται διαγραμματικά ο υποκινητής του ανθρώπινου γονιδίου του TIN-ag που κλωνοποιήσαμε, καθώς και οι μεταγραφικοί παράγοντες που δυνητικά προσδέονται στην αλληλουχία του όπως υποδεικνύεται από τη βιοπληροφορική ανάλυση.

Η διαδικασία με την οποία πραγματοποιήσαμε την κλωνοποίηση του υποκινητή του TIN-ag έχει περιγραφεί προηγουμένως αναλυτικά στην ενότητα «υλικά και μέθοδοι». Ξεκινώντας από ανθρώπινο γενετικό υλικό σαν εκμαγείο πραγματοποιήσαμε αντίδραση PCR με ειδικούς εκκινητές για τον υποκινητή του γονιδίου του TIN-Ag, πολλαπλασιάζοντας την αλληλουχία από -1020bp έως +700bp σε σχέση με την θέση έναρξης της μεταγραφής (TSS). Εν συνεχεία προχωρήσαμε στην πέψη του προϊόντος της PCR με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και κατόπιν αυτού στην κλωνοποίηση του υποκινητή στο πλασμίδιο pGL3-Basic μπροστά από το γονίδιο της λουσιφεράσης. Το προϊόν της PCR (insert) που ενσωματώσαμε στο πλασμίδιο είχε μέγεθος 1680bp. Κατόπιν πραγματοποιήσαμε επιμόλυνση του κλωνοποιημένου υποκινητή σε τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές και μετρήσαμε την ενεργότητα της λουσιφεράσης. Στα πειράματα αυτά κάναμε σύγκριση μεταξύ των δύο πλασμιδιακών φορέων, εκ των οποίων ο ένας είναι άδειος pGL3-Basic, ο οποίος χρησιμοποιείται και σαν πλασμιδιακός φορέας αναφοράς (control), ενώ ο δεύτερος περιέχει τον υποκινητή του γονιδίου TIN-Ag, pGL3-TINpro. Οι τρεις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήσαμε είναι οι εξής:

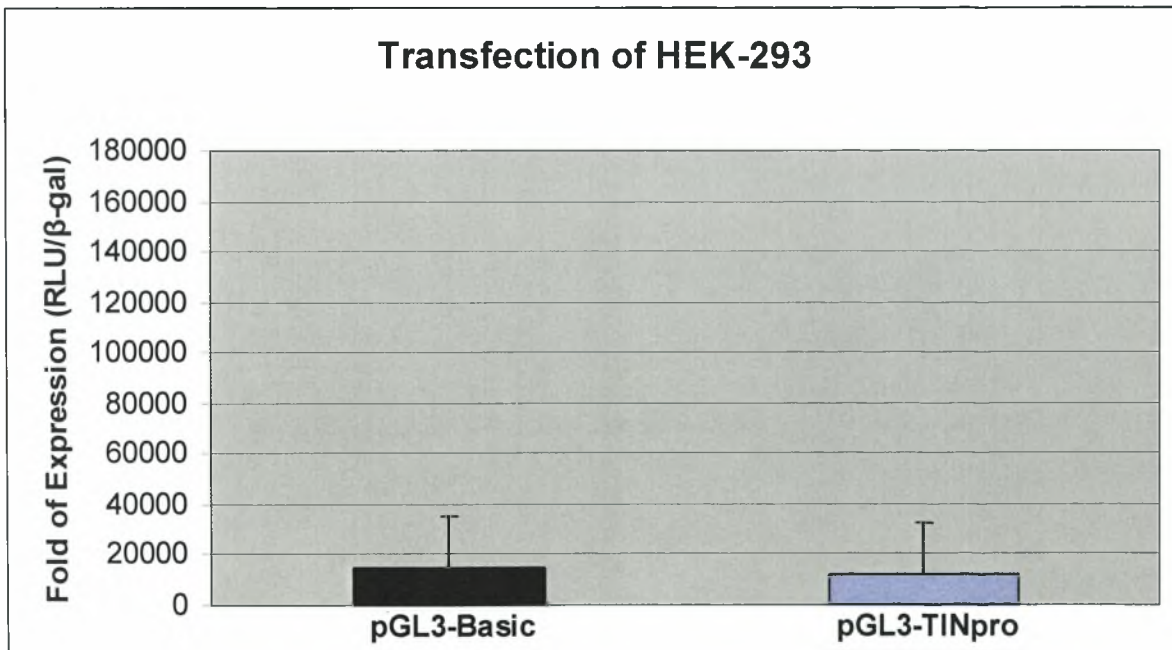
1. HEK-293 cell line
2. HK-2 cell line
3. Hela cell line

Η εικόνα 12 δείχνει πως η ενεργότητα της λουσιφεράσης που παρήχθη από το πλασμίδιο με τον κλωνοποιημένο υποκινητή (pGL3-TINpro) είναι ίδια με εκείνη

του άδειου πλασμιδίου (pGL3-Basic). Το γεγονός αυτό μας δείχνει ότι η κλωνοποιημένη αλληλουχία δεν περιέχει τα απαραίτητα ρυθμιστικά στοιχεία για την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της λουσιφεράσης και η έκφρασή της κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με αυτή του άδειου πλασμιδίου. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και στις άλλες δύο κυτταρικές σειρές HK-2 (εικόνα 13), και HeLa (εικόνα 14).

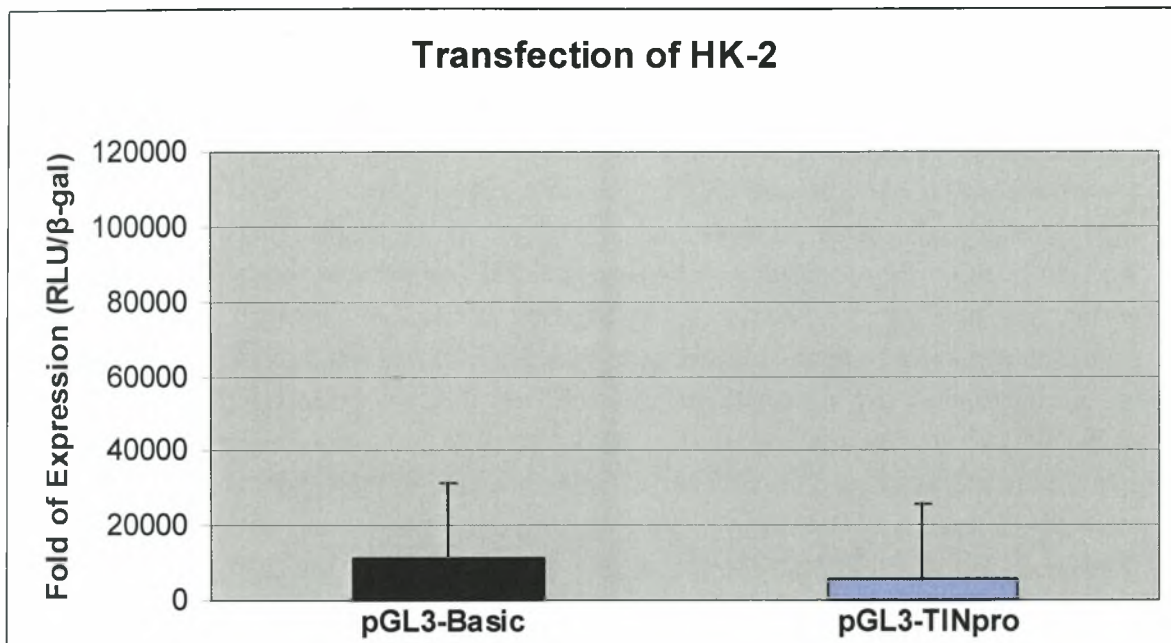


Εικόνα 11 : Διαγραμματική απεικόνιση του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου του TIN-ag. Σχηματικά φαίνονται οι θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων σύμφωνα με την βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήσαμε. Η θέση +1 υποδηλώνει την θέση έναρξης της μεταγραφής (TSS).

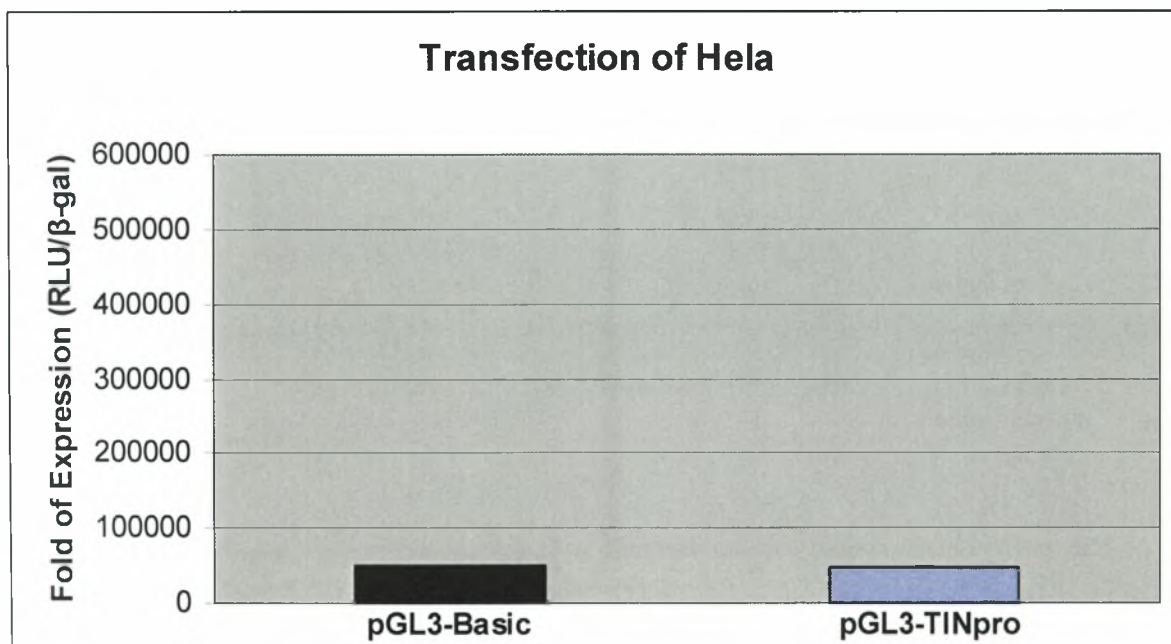


Εικόνα 12 : Έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του TIN-ag στην κυτταρική σειρά HEK-293. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης που παράγεται από το πλασμίδιο με τον κλωνοποιημένο υποκινητή (pGL3-TINpro) είναι περίπου ίδια με εκείνη του άδειου πλασμιδίου (pGL3-Basic).





*Εικόνα 13 :* Έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του TIN-ag στην κυτταρική σειρά HK-2. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης που παράγεται από το πλασμίδιο με τον κλωνοποιημένο υποκινητή (pGL3-TINpro) είναι περίπου ίδια με εκείνη του άδειου πλασμιδίου (pGL3-Basic).

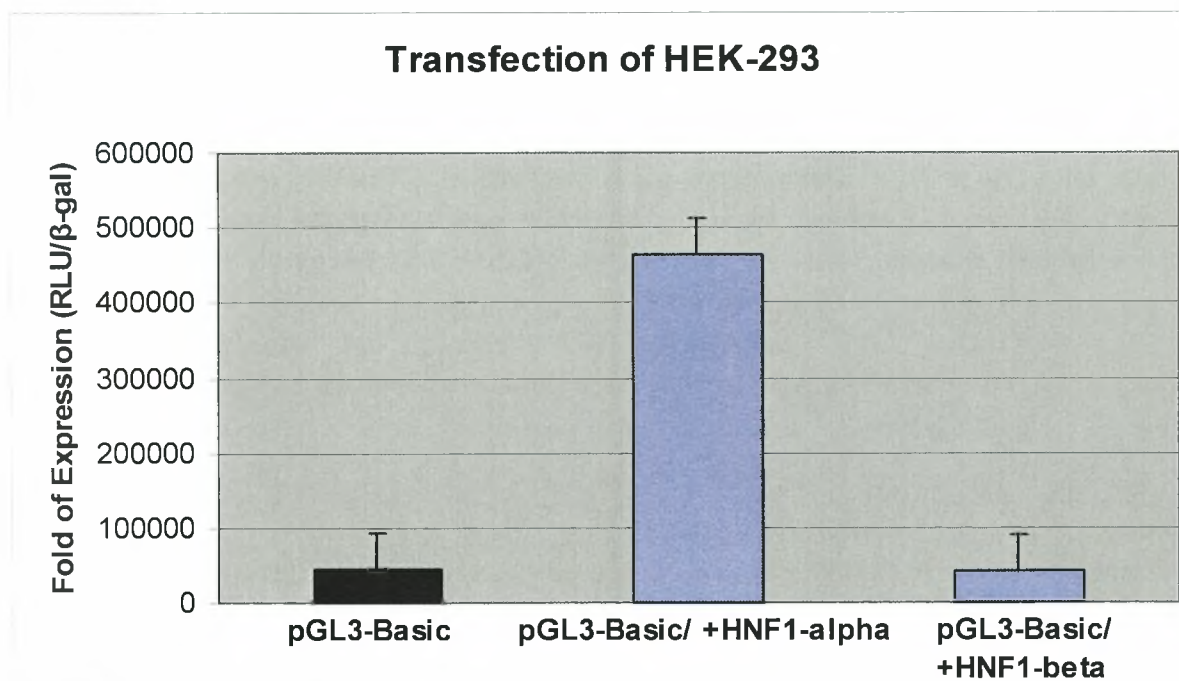


*Εικόνα 14 :* Έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του TIN-ag στην κυτταρική σειρά Hela. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης που παράγεται από το πλασμίδιο με τον κλωνοποιημένο υποκινητή (pGL3-TINpro) είναι περίπου ίδια με εκείνη του άδειου πλασμιδίου (pGL3-Basic).



## 2.2 Έλεγχος της ενεργότητας των μεταγραφικών παραγόντων HNF1

Ο σκοπός μας στην συνέχεια ήταν να ελέγξουμε την ικανότητα των μεταγραφικών παραγόντων HNF1-alpha και HNF1-beta να επάγουν τη μεταγραφή του pGL3-TINpro. Γνωρίζοντας από την βιβλιογραφία ότι ο μεταγραφικός παράγοντας HNF1-alpha είναι ισχυρός ενεργοποιητής προχωρήσαμε στο εξής πείραμα. Πραγματοποιήσαμε διαμόλυνση των κυττάρων HEK-293 με τον πλασμιδιακό φορέα αναφοράς pGL3-Basic, παρουσία των μεταγραφικών παραγόντων HNF1-alpha και HNF1-beta. Όπως φαίνεται στην εικόνα 15, η επίδραση του HNF1-alpha επάγει σχεδόν την δεκαπλάσια έκφραση της λουσιφεράσης σε σύγκριση με τα κύτταρα που επωάστηκαν με τον μεταγραφικό παράγοντα HNF1-beta και με αυτά που δεν επωάστηκαν καθόλου με παράγοντα. Έτσι λοιπόν καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι ο HNF1-alpha είναι πολύ ισχυρός ενεργοποιητής και είναι ικανός να επάγει την μεταγραφή της λουσιφεράσης στον άδειο φορέα έκφρασης pGL3-Basic, που χρησιμοποιούμε ως αρνητικό control.



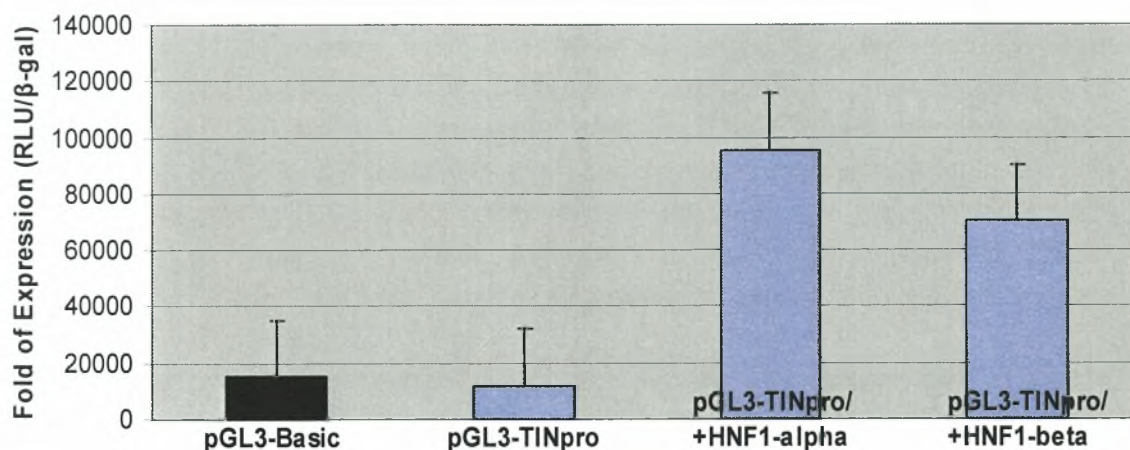
*Εικόνα 15* : Έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης στον πλασμιδιακό φορέα αναφοράς (pGL3-Basic) υπό την επίδραση των μεταγραφικών παραγόντων HNF1 στην κυτταρική σειρά HEK-293. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης που παράγεται από το άδειο πλασμίδιο με την επίδραση του HNF1-alpha είναι σχεδόν δεκαπλάσια σε σχέση με το άδειο πλασμίδιο. Το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και με τον pGL3-Basic υπό την επίδραση του HNF1-beta.

## 2.3 Ο υποκινητής του TIN-Ag ενεργοποιείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF1

Για τον έλεγχο της επίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων HNF1-alpha και HNF1-beta στην ενεργοποίηση του υποκινητή του TIN-ag θα χρησιμοποιήσουμε τις κυτταρικές σειρές HEK-293 και HK-2. Το γεγονός ότι η κυτταρική σειρά HEK-293 πολλαπλασιάζεται με πολύ γρήγορο ρυθμό και επιμολύνεται εύκολα με εξωγενές DNA, αποτελεί ένα ευνοϊκό σύστημα πειραμάτων διαμόλυνσης. Ακόμα η χρησιμοποίηση της κυτταρικής σειράς HK-2 έγινε βάσει του γεγονότος ότι τα κύτταρα της σειράς αυτής προέρχονται από νεφρά ανθρώπου και επίσης σε αυτά εντοπίζεται η έκφραση του TIN-ag.

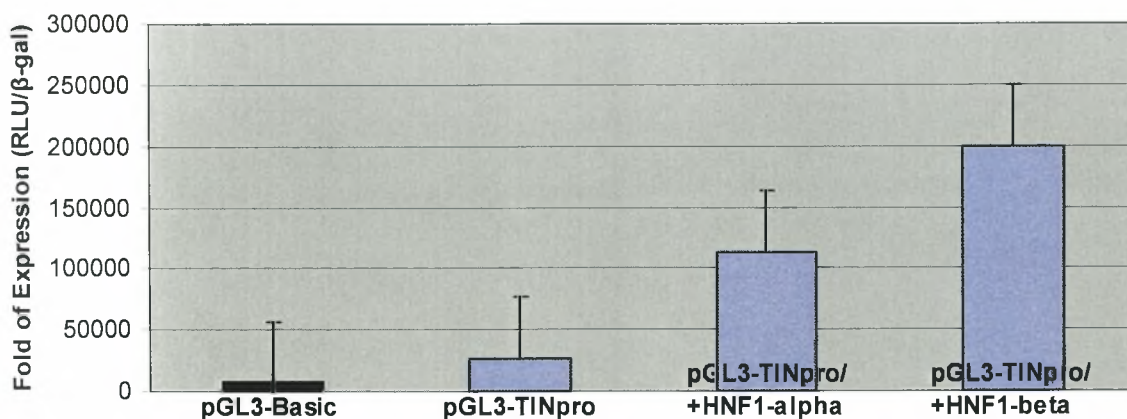
Αρχικά πραγματοποιήσαμε διαμόλυνση κυττάρων HEK-293 με το πλασμίδιο που φέρει τον υποκινητή του γονιδίου TIN-ag (pGL3-TINpro) και επώασαμε τα κύτταρα απουσία και παρουσία των μεταγραφικών παραγόντων HNF1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 16 η επίδραση του HNF1-alpha επάγει την δεκαπλάσια περίπου έκφραση της λουσιφεράσης σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν καθόλου με τον μεταγραφικό παράγοντα. Επίσης η επίδραση του HNF1-beta επάγει την τριπλάσια περίπου έκφραση της λουσιφεράσης σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν καθόλου. Παρατηρούμε ότι και στις δύο περιπτώσεις οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδέθηκαν και προκάλεσαν την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου. Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε διαμόλυνση με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως περιγράφηκε προηγουμένως στην κυτταρική σειρά HK-2. Στην εικόνα 17 παρατηρούμε ότι η επίδραση και των δύο μεταγραφικών παραγόντων προκαλεί την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου. Κατά συνέπεια, η επαγωγή του TIN-ag από τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF1 αντιστοιχεί στην ενεργοποίηση και επαγωγή του υποκινητή που θα οδηγήσει στην μεταγραφή του γονιδίου του.

### Transfection of HEK-293



*Εικόνα 16* : Ενεργότητα του υποκινητή του TIN-ag στην κυτταρική σειρά HEK-293 μετά από την επίδραση με τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF1. Η επώαση των κυττάρων με τον παράγοντα HNF1-alpha επάγει την δεκαπλάσια περίπου έκφραση της λουσιφεράσης από το πλασμίδιο με τον κλωνοποιημένο υποκινητή σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν με τον παράγοντα. Η επώαση των κυττάρων με τον HNF1-beta επάγει την τριπλάσια έκφραση της λουσιφεράσης από τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν με τον παράγοντα.

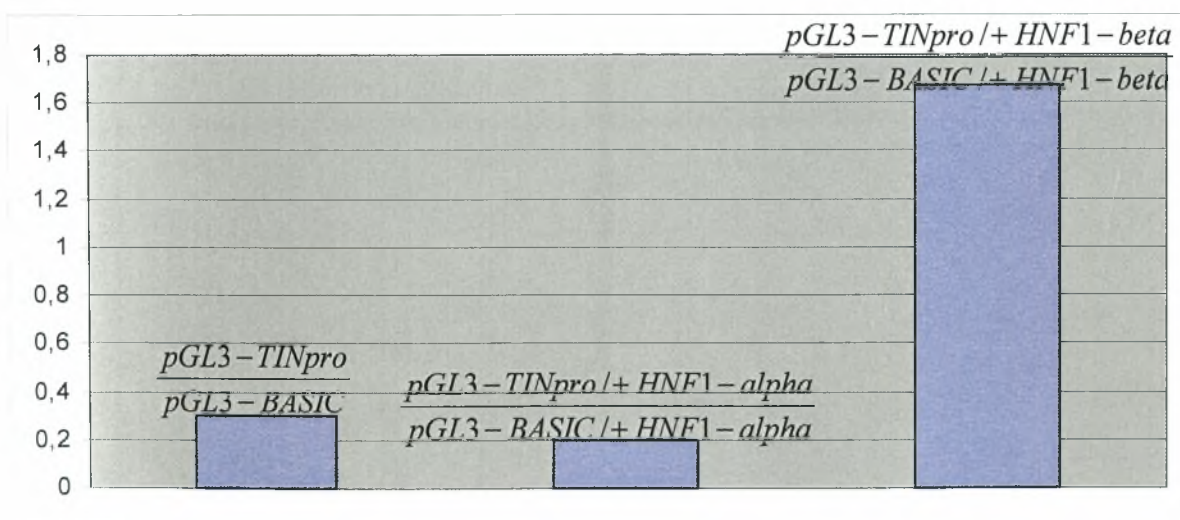
### Transfection of HK-2



*Εικόνα 17* : Ενεργότητα του υποκινητή του TIN-ag στην κυτταρική σειρά HK-2 μετά από την επίδραση με τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF1. Η επώαση των κυττάρων με τον HNF1-alpha επάγει την τετραπλάσια περίπου έκφραση της λουσιφεράσης από το πλασμίδιο με τον κλωνοποιημένο υποκινητή σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν με τον παράγοντα. Η επώαση των κυττάρων με τον HNF1-beta επάγει την οκταπλάσια έκφραση της λουσιφεράσης από τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν με τον παράγοντα.

Στα πειράματα που πραγματοποιήσαμε και στις δύο κυτταρικές σειρές παρατηρούμε ότι έχουμε ενεργοποίηση του υποκινητή και από τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες. Όμως και στις δύο περιπτώσεις παρατηρούμε διαφορετική ποσοστιαία επίδραση των μεταγραφικών παραγόντων στην ενεργοποίηση του υποκινητή. Στην κυτταρική σειρά HEK-293 ο παράγοντας HNF1-alpha προκαλεί μεγαλύτερη ενεργοποίηση σε σχέση με τον HNF1-beta. Αντίθετα στην κυτταρική σειρά HK-2 ο HNF1-beta προκαλεί μεγαλύτερη ενεργοποίηση σε σχέση με τον HNF1-alpha. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο HNF1-alpha είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής (βλέπε 2.2 και εικόνα 15), ικανός να επάγει την μεταγραφή ακόμα και στο άδειο φορέα (pGL3-Basic), μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ενεργοποίηση που προκαλεί στην κυτταρική σειρά HEK-293 είναι ψευδής ως προς το μέγεθος. Ο HNF1-alpha είναι δυνατόν να προκαλέσει την ενεργοποίηση του υποκινητή αλλά όχι τόσο μεγάλη σε σχέση με τον HNF1-beta.

Σαν τελικό συμπέρασμα ως προς την ακριβή ενεργοποίηση που μπορεί να προκαλέσει ο HNF1-alpha και ο HNF1-beta, σχεδιάσαμε μία γραφική παράσταση η οποία μας δείχνει τον λόγο της επίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων στο πλασμίδιο με τον υποκινητή του TIN-ag (pGL3-TINpro) ως προς το άδειο πλασμίδιο (pGL3-Basic). Στην εικόνα 18 βλέπουμε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας HNF1-alpha προκαλεί ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου μικρότερη από αυτή του HNF1-beta στην κυτταρική σειρά HEK-293. Άρα η ενεργοποίηση που προκαλείται από τον HNF1-alpha στο άδειο πλασμίδιο (εικόνα 15) είναι ψευδώς θετική. Η ψευδώς θετική ενεργοποίηση οφείλεται στο γεγονός ότι ο HNF1-alpha είναι πολύ ισχυρός ενεργοποιητής. Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF1-beta προκαλεί την μεγαλύτερη ενεργοποίηση του υποκινητή του TIN-ag και στις δύο κυτταρικές σειρές (HEK-293 και HK-2). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες επάγουν τον υποκινητή του γονιδίου TIN-ag με τον HNF1-beta να είναι ουσιαστικά πιο ισχυρός και πιο «ειδικός» για τον υποκινητή.



Εικόνα 18 : Ο λόγος των ενεργειών που προκαλούν οι μεταγραφικοί παράγοντες HNF1-alpha και HNF1-beta στο πλασμίδιο με τον υποκινητή του γονιδίου (pGL3-TINpro) ως προς το άδειο πλασμίδιο (pGL3-BASIC).

Από τα παραπάνω φαίνεται πως επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης σχετικά με την συμμετοχή συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων στην ρύθμιση του γονιδίου του TIN-ag. Ωστόσο, είναι σκόπιμο να πραγματοποιηθούν αντίστοιχα πειράματα για τον έλεγχο της μεταγραφικής ρύθμισης του TIN-Ag και από τους άλλους παράγοντες που έχουν δυνητικές θέσεις πρόσδεσης στον υποκινητή του.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 1. Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ TIN-Ag

Η μεταγραφική ρύθμιση του υποκινητή του TIN-ag πιθανόν να σχετίζεται με κάποιους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου. Για τον λόγο, αυτό πραγματοποιήσαμε βιοπληροφορική ανάλυση του υποκινητή του TIN-ag ελέγχοντας για την ύπαρξη θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Από την ανάλυση αυτή εντοπίσαμε στον υποκινητή του TIN-ag αρκετές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Οι παράγοντες που βρέθηκαν είναι οι CMYB, HNF1, T3R, ER, CMAF, AREB6, ELK1, HMGTY, ELF1, EVI1, PBX1, IK1, IK2 και TEF1. Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF1 φαίνεται να προσδέεται ακριβώς στο σημείο έναρξης της μεταγραφής και πιθανότατα να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε αυτήν.

Για να μελετήσουμε την μεταγραφική ρύθμιση του υποκινητή του TIN-ag και τον μηχανισμό επαγωγής του από τον παράγοντα HNF1 πραγματοποιήσαμε κλωνοποίηση του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου του TIN-ag σε πλασμίδιο μπροστά από το γονίδιο της λουσιφεράσης (γονίδιο αναφοράς). Μετά από επιμόλυνση του πλασμιδίου στις κυτταρικές σειρές HEK-293 (εικόνα 12), HK-2 (εικόνα 13) και HeLa (εικόνα 14) ο υποκινητής του TIN-Ag δεν ενεργοποίησε την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου ίσως να εξαρτάται και από άλλες αλληλουχίες DNA οι οποίες δεν εμπεριέχονται εντός του κλωνοποιημένου τμήματος.

Στην συνέχεια εξετάσαμε την επίδραση του παράγοντα HNF1-alpha και HNF1-beta στην ενεργότητα του κλωνοποιημένου υποκινητή στην κυτταρική σειρά HK-2 (εικόνα 17). Παρατηρήσαμε πως η έκφραση της λουσιφεράσης από το πλασμίδιο με τον κλωνοποιημένο υποκινητή ήταν τετραπλάσια στα κύτταρα που επώαστηκαν με τον παράγοντα HNF1-alpha σε σχέση με τα control κύτταρα που δεν επώαστηκαν καθόλου με τον παράγοντα. Ακόμα η επώαση των κυττάρων με τον παράγοντα HNF1-beta επάγει την οκταπλάσια έκφραση της λουσιφεράσης από τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν με τον παράγοντα. Συνεπώς φαίνεται πως η επαγωγή του TIN-ag από τους παράγοντες HNF1-alpha και HNF1-beta αντιστοιχεί σε ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της.

Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε διαμόλυνση στην κυτταρική σειρά HEK-293 με το κλωνοποιημένο πλασμίδιο και πλασμίδια έκφρασης για συγκεκριμένους παράγοντες (HNF1-alpha και HNF1-beta) με δυνητικές θέσεις πρόσδεσης στην αλληλουχία του υποκινητή και θελήσαμε να εξετάσουμε την ενεργότητα του υποκινητή του TIN-ag. Αρχικά διαμολώναμε τα κύτταρα HEK-293 με τον πλασμιδιακό φορέα αναφοράς pGL3-Basic, παρουσία των μεταγραφικών παραγόντων HNF1-alpha και HNF1-beta (εικόνα 15). Η επίδραση του HNF1-alpha επάγει σχεδόν την δεκαπλάσια έκφραση της λουσιφεράσης σε σύγκριση με τα

κύτταρα που επώαστηκαν με τον μεταγραφικό παράγοντα HNF1-beta και με αυτά που δεν επώαστηκαν καθόλου με παράγοντα. Έτσι λοιπόν καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι ο HNF1-alpha είναι πολύ ισχυρός ενεργοποιητής, γεγονός το οποίο επαληθεύεται από την βιβλιογραφία<sup>[27]</sup>.

Επιπλέον θελήσαμε να ελέγξουμε αν ο κλωνοποιημένος υποκινητής του TIN-ag ενεργοποιείται στην κυτταρική σειρά HEK-293 υπό την επίδραση των μεταγραφικών παραγόντων HNF1-alpha και HNF1-beta (εικόνα 16). Παρατηρήσαμε πως η επώαση του κλωνοποιημένου υποκινητή με τον παράγοντα HNF1-alpha επάγει την δεκαπλάσια περίπου έκφραση της λουσιφεράσης από τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν καθόλου με παράγοντα. Επίσης η επώαση του κλωνοποιημένου υποκινητή με τον παράγοντα HNF1-beta επάγει την τριπλάσια έκφραση της λουσιφεράσης από τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν καθόλου με παράγοντα. Στην κυτταρική σειρά HEK-293 παρατηρούμε ότι ο HNF1-alpha είναι πιο δραστικός σε σχέση με τον HNF1-beta.

Η ενεργότητα που παρουσιάζει ο HNF1-alpha στο άδειο πλασμίδιο ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας είναι πολύ ισχυρός. Για να διαπιστώσουμε τη ακριβή ποσοστιαία ενεργοποίηση που προκαλεί ο HNF1-alpha και ο HNF1-beta προσδιορίσαμε τον λόγο των ενεργοτήτων, δηλαδή την ενεργότητα που προκαλεί ο HNF1-alpha στο πλασμίδιο με τον κλωνοποιημένο υποκινητή προς τη ενεργότητα που προκαλεί ο ίδιος μεταγραφικός παράγοντας στο άδειο πλασμίδιο ( το ίδιο ακριβώς κάναμε και με τον μεταγραφικό παράγοντα HNF1-beta). Παρατηρήσαμε (εικόνα 18) ότι ο παράγοντας HNF1-beta προκαλεί μεγαλύτερη ειδική ενεργοποίηση σε σχέση με αυτή που προκαλεί ο HNF1-alpha, γεγονός το οποίο συμβαίνει και στην κυτταρική σειρά HK-2. Έτσι λοιπόν καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι και οι δύο παράγοντες επάγουν την έκφραση του γονιδίου του TIN-Ag με τον HNF1-beta να είναι πιο ειδικός για τον υποκινητή.

Τέλος θα θέλαμε να προτείνουμε ότι ίσως να υπάρχει ρυθμιστική και λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ του HNF1-beta και του TIN-ag. Συγκεκριμένα το TIN-ag είναι ένα γονίδιο που συμβάλει στην διαφοροποίηση των νεφρών και η έκφρασή του εντοπίζεται στην βασική μεμβράνη του νεφρικού ιστού και στα νεφρικά σωληνάκια<sup>[23]</sup>. Επίσης ο HNF1-beta παίζει και αυτός σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση και στην λειτουργία των νεφρών. Άτομα με αυτοσωμικές μεταλλάξεις του HNF1-beta αναπτύσσουν διάφορες ανωμαλίες συμπεριλαμβανομένων, πολυκυστικά νεφρά, κυστική δυσπλασία και εμφάνιση κύστης στα πειραματικά σωληνάκια του νεφρού<sup>[40]</sup>. Με τα πειράματα που πραγματοποιήσαμε σε αυτή την εργασία φαίνεται ότι ο HNF1-beta είναι ικανός να ενεργοποιήσει ειδικά τον υποκινητή του TIN-ag. Έτσι λοιπόν προτείνουμε ότι, το TIN-ag ίσως να είναι ένα γονίδιο στόχος για τον HNF1-beta μέσω του οποίου να επιτυγχάνει την σημαντική του λειτουργία στα νεφρά.

## 2. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ

Στόχος μελλοντικών σχεδίων αποτελεί η πραγματοποίηση αντίστοιχων πειραμάτων για τον έλεγχο της μεταγραφικής ρύθμισης του TIN-Ag και από τους άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν δυνητικές θέσεις πρόσδεσης στον υποκινητή του. Επίσης μελλοντικός στόχος μας είναι να δοκιμάσουμε εάν οι μεταγραφικοί παράγοντες HNF1 επηρεάζουν τη μεταγραφική ρύθμιση του ενδογενούς γονιδίου του TIN-Ag.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αθανασίου Σμοκοβίτη: Φυσιολογία (τέταρτη έκδοση 2004)
2. Todd R. Nelson, Youngki Kim, Alfred F. Michael, Ralph J. Butkowski, Aristidis S. Charonis, (1997), Tubulointerstitial Nephritis Antigen (TIN-ag) is Expressed in Distinct Segments of the Developing Human Nephron. *Connective Tissue Research*, Vol. 37(1-2).
3. Butkowski, R.J., Kleppel, M.M., Katz, A. and Michael, A.F. (1991). Distribution of tubulointerstitial nephritis antigen and evidence for multiple forms. *Kidney International*, 40:838-846.
4. Colvin, R.B., Fang, L.S.T. In Renal Pathology, Tisher and Brenner, Eb. Lippincot J.B. *Philadelphia* (1989), 728
5. Butkowski, R.J., Kleppel. M.M., Katz, A., Michael, A.F., Fish A.J., *Kidney Intern* (1991), 40, 838.
6. Nelson, T.R., Charonis, A.S., McIvor, R.S., Butkowski, R.J., *J. Biol. Chem.* (1995), 270, 16265.
7. Zhou, B. Nelson, T.R., Kashtan, C., Gleason, B., Michael, A.F., Vlassi, M., Charonis, A.S. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2000), 11, 658.
8. Bing Zhou, Todd R. Nelson, Clifford Kashtan, Bill Gleason, Alfred F. Michael, Metaxia Vlassi, Aristidis Charonis. Identification of two alternatively spliced forms of Human Tubulointerstitial Nephritis Antigen (TIN-ag). *J. Am. Soc. Nephrol* (2000) 658-668.
9. Wex, T., Lipyansky, A., Bromme. N.C., Wex, H., Guan. X.Q., Bromme, D. *Biochemistry* (2001), 40, 1350.
10. Wiederanders B., Bromme D., Kirschke H., Von Figura K., Schmidt B., Peters C. Phylogenetic conservation of cysteine proteinases. Cloning and expression of cDNA coding for human cathepsin. *S. J. Biol. Chem.* (1992), 13708-13713.
11. Borthron D.T., Handin R.I., Kaufman R.J., Wasley L.C., Orr E.C., Mitsock L.M., Ewenstein B.E., Loscalzo J., Ginburg D., Orkin S.H. Structure of pre-pro- von Willebrand factor and its expression in heterologous cells. *Nature* 324 (1986), 270-273.
12. Mayadas T.N., Wanger D.D. Vicinal cysteines in the prosequence play a role in von Willebrand factor multimer assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3531-3535, (1992).
13. Kalfa T.K., Thull J.D., Butkowski R.J., Charonis A.S. Tubulointerstitial nephritis antigen interacts with laminin and type IV collagen and promotes cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 269: 1654-1659, (1994).
14. Aumailley M., Nurcombe V., Edgar D., Paulsson M., Timpl R. The cellular interactions of laminin fragments: Cell adhesion correlates with two fragment-specific high affinity binding sites. *J. Biol. Chem* 262: 11532-11538, (1987).
15. Yashpal S. Kanwar, Anil Kumar, Yufeng Tian, Jun Wada, Naoki Kashihara, Elisabeth I. Wallner. Tubulointerstitial nephritis antigen: An extracellular

- matrix protein that selectively regulates tubulogenesis vs. glomerulogenesis during mammalian renal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11323-11328, (1999).
16. Saxen L. (1987) Organogenesis of the kidney (Cambridge Univ. Press, New York).
  17. Clapp W.L. & Abrahamson D.R. (1993) *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2, 419-429.
  18. Nigam S., Aperia A.C. & Brenner B.M. (1996) in the kidney eds. Brenner B.M., (Saunders, Philadelphia) 72-98.
  19. Kalfa T.A., Thull J.D., Butkowski R.J. & Charonis A.S., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:1654-1659.
  20. Kumar A., Ota K., Wada J., Wallner E.I., Charonis A.S. & Kanwar Y.S. (1997) *Kidney Int.* 52: 620-637.
  21. Wada J., Kumar A., Liu Z., Ruoslahti E., Reichart L., Marvaldi J. & Kanwar Y.S. (1996) *J. Cell Biol.* 132: 1161-1176.
  22. Hay E.D. ed (1991) in Cell Biology of Extracellular Matrix ( Plenum, New York): 419-462.
  23. Liu Z., Wada J., Kumar A., Ota K., Carone F.A. & Kanwar Y.S. (1996) *Dev. Biol.* 178: 133-148.
  24. Blumenfeld M., Maury M., Chouard T. & Condamine H. (1991) Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) shows a wide distribution than products of its known target genes in developing mouse. *Development* 113: 589-599.
  25. Mendel D.B. & Cradtree G.R. (1991) HNF-1 a member of a novel class of dimerizing homeodomain proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 677-680.
  26. Mendel D.B., Hansen L.P., Graves M.K., Conmley P.B. & Crabtree G.R. (1991) HNF-1alpha and HNF-1beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains and form heterodimers in vitro. *Genes Dev.* 5: 1042-1056.
  27. Rey-Campos J., Chouard T., Yaniv M. & Cereghini S. (1991) vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ)* 10: 1445-1457.
  28. Troche F. & Yaniv M. (1992) HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network. *Bioassays* 14: 579-587.
  29. Lazzaro D., Simone V., Magistris L., Lehtonen E. & Cortese R. (1992) LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development. *Development* 114: 469-479.
  30. Pontoglio M., Barra J., Hadchouel M., Diyen A., Kress C., Bach J.P., Badinet C. & Yaniv M. (1996) Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction phenylketonouria and renal Fanconi syndrome. *Cell* 84: 575-585.
  31. Pontoglio M. (2000) Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose homeostasis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 140-143.



32. Gresh L., Fischer E., Reimann A., Tanguy M., Garbay S., Shao X., Hiesberger T., Fiette L., Igarashi P., Yaniv M. & Pontoglio M. A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J.* (2004) 23: 1657-1668.
33. Sebina Senkel , Belen Lucas , Ludger Klein-Hitpass , Gerhart U. Ryffel Identification of target genes of the transcription factor HNF1 $\beta$  and HNF1 $\alpha$  in a human embryonic kidney cell line. *Biochemica et Biophysica Acta* 1731: 179-190 (2005).
34. Drewes T., Clairmount A., Klein-Hitpass L., Ryffel G.U. Estrogen-inducible derivatives of hepatocyte nuclear factor-4, hepatocyte nuclear factor-3 and liver factor B1 are differently affected by pure and partial antiestrogens. *Eur. J. Biochem.* 225: 441-448 (1994).
35. Xie Y., Sakatsume M., Nishi S., Narita I., Arakawa M., Gejyo F. Expression, roles receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney Int.* 60: 1645-1657 (2001).
36. Rogers S.A., Padanilam B.J., Hruska K.A., Giachelli C.M., Hammerman M.R. Metanephric osteopontin regulates nephrogenesis in vitro. *Am. J. Physiol.* 272: F469-F476 (1997).
37. Kreidberg J.A., Symons J.M. Integrins in kidney development, function, and disease. *Am. J. Physiol.: Renal Physiol.* 279: F233-F242 (2000).
38. Gerber W.V., Vokes S.A., Zearfoss N.R., Krieg P.A. A role for the RNA-binding protein, hermes, in the regulation of heart development. *Dev. Biol.* 247: 116-119 (2002).
39. Bohn S., Thomas H., TUran G., Ellard S., Bingham C., Hattersley A.T., Ryffel G.U. Distinct molecular and morphogenetic properties of mutations in the human HNF1beta gene that lead to defective kidney development. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: 2033-2041 (2003).
40. Bingham C. & al. (2001). Mutations in the hepatocyte nuclear factor -1 $\beta$  gene are associated with familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 219-224.
41. Hiesberger T., Bai Y., Shao X., McNally T.B., Sinclair M.A., Tian X., Somlo S. & Igarashi P. Mutation of hepatocyte nuclear factor -1 $\beta$  inhibits Pkhd1 gene expression and produces renal cysts in mice. *The Journal of Clinical Investigation.* Volume 13:N.6 (2004).