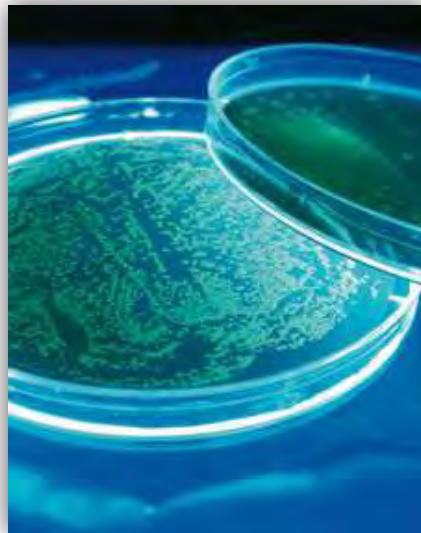


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου TLE4 του
ποντικού*



ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΓΚΟΥΝΤΑΚΟΣ

*Επιβλέπων Καθηγητής: Γ. Σκάβδης,
Επίκουρος Καθηγητής,
Τμήμα Μοριακής Βιολογίας
και Γενετικής, ΔΠΘ*

ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου TLE4 του
ποντικού*

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΓΚΟΥΝΤΑΚΟΣ

*Επιβλέπων Καθηγητής : Γ. Σκάβδης,
Επίκουρος Καθηγητής,
Τμήμα Μοριακής Βιολογίας
και Γενετικής, ΔΠΘ*

ΛΑΡΙΣΑ 2012

Στους γονείς μου...

Ευχαριστίες:

Κάποιοι λένε πως όλα τα ωραία στη ζωή κάποτε τελειώνουν και εγώ δεν μπορώ παρά να συμφωνήσω μαζί τους. Τα χρόνια που ήμουν φοιτητής αλλά και το διάστημα κατά το οποίο δούλενα στο εργαστήριο για να πραγματοποιήσω αυτή την πτυχιακή, είναι δύο πολύ σημαντικά κεφάλαια στη ζωή μου, τα οποία θα τα θυμάμαι έντονα και θα μείνουν για πάντα μέσα στο μυαλό μου.

Στην ομαλή διεκπεραίωση αυτής της πτυχιακής εργασίας συνετέλεσαν κάποια άτομα, στα οποία θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Πρώτα απ' όλα θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου. Τον πατέρα μου Γιάννη και την μητέρα μου Μάρθα, οι οποίοι από πολύ νέοι μέχρι και σήμερα δουλεύουν σκληρά για να μην λείπει τίποτα σε μένα και στον αδερφό μου. Τους ευχαριστώ που στηρίζουν και σέβονται κάθε επιλογή μου από μικρό παιδί και που μου έδωσαν την ευκαιρία να σπουδάσω αυτό που αγαπάω πραγματικά.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω θερμά τους επιβλέποντες καθηγητές μου. Τον κ. Σκάβδη Γιώργο, επίκουρο καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και την κ. Γρηγορίου Μαριρένα, επίκουρη καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας γιατί με δέχτηκαν στο εργαστήριο τους, με εμπιστεύτηκαν και με έκαναν να νιώσω αμέσως μέλος της ομάδας τους. Τους εύχομαι να είναι πάντα καλά και ευτυχισμένοι.

Χρυστάω ένα ευχαριστώ στους καθηγητές του τμήματος μου για τις γνώσεις που μου έχουν μεταδώσει και τους εύχομαι να είναι πάντα καλά. Θέλω να πω ένα ευχαριστώ παραπάνω στον κ.Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο, αναπληρωτή καθηγητή Μοριακής Βιολογίας, ο οποίος δέχτηκε να είναι μέλος στην τριμελή επιτροπή της διπλωματικής εργασίας μου.

Θέλω να ευχαριστήσω επίσης την υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Ελντέμ Σαδίκογλου για τη βοήθεια που μου προσέφερε από τη πρώτη ημέρα που μπήκα στο εργαστήριο μέχρι και την τελευταία. Γνωρίζοντας άριστα αυτά που μου μετέδιδε, είμαι σίγουρος πως αυτά που έχω μάθει από την Ελντέμ, είναι βασισμένα πάνω σε απόλυτα σωστές βάσεις.

Ακόμη θέλω να ευχαριστήσω την Ηλέκτρα Στυλιανοπούλου, επίσης υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής για όλες τις εργαστηριακές συμβουλές της και για την ευχάριστη παρέα της όλο αυτό τον καιρό. Πλέον την θεωρώ καλή μου φίλη.

Θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα παιδιά του εργαστηρίου. Επειδή ήμουν καινούργιος όχι μόνο στο εργαστήριο αλλά και στο χώρο της σχολής, τους ευχαριστώ πολύ γιατί από τις πρώτες μέρες με αγκάλιασαν και με έκαναν να αισθανθώ μέλος της παρέας τους. Με βοήθησαν κάθε φορά που τους χρειάστηκα και αυτό πραγματικά το εκτιμώ πολύ. Τους εύχομαι να έχουν πάντα υγεία, να είναι ευτυχισμένοι και καλή τύχη στις επιλογές τους.

Φυσικά δεν πρόκειται να ξεχάσω να ευχαριστήσω τους φίλους μου στη Λάρισα. Αυτά τα περίπου 4 χρόνια που πέρασα ως φοιτητής εκεί ήταν γεμάτα με ευχάριστες αναμνήσεις και πολύ καλή παρέα. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον φίλο μου αλλά και το καλύτερο παιδί που έχω γνωρίσει μέχρι τώρα, τον Ηλία όπως επίσης και τον φίλο αλλά και σειρά, Φώτη, με τους οποίους δέθηκα περισσότερο αυτά τα χρόνια.

Γκουντάκος Αναστάσιος

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1 Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης	4
1.2 Υποκινητές και ενισχυτές.....	5
1.3 Οι μεταγραφικοί παράγοντες και ο τρόπος δράσης τους.....	6
1.4 Καταστολή της μεταγραφής	8
1.5 Καταστολείς και συγκαταστολείς	10
1.6 Μηχανισμοί καταστολής	12
1.7 Η οικογένεια συγκαταστολέων Groucho/ TLEs	18
1.8 Μηχανισμοί δράσης Groucho/TLEs	19
1.9 Οι πρωτεΐνες Groucho/TLEs και σηματοδοτικά μονοπάτια.....	21
1.9.1 Οι πρωτεΐνες Groucho/TLEs και το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt	21
1.9.2 Η οικογένεια Groucho/TLEs, πλευρική αναστολή και το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch στη <i>Drosophila</i>	22
1.10 Η δομή των πρωτεϊνών της οικογένειας Groucho/TLEs.....	23
1.11 Μοτίβα αλληλεπίδρασης με τις επικράτειες των Gro/TLEs.....	25
1.12 Gro/TLEs και καρκίνος	26
1.13 Το γονίδιο Transducin-Like Enhancer of split 4 (TLE4) της οικογένειας Gro/TLEs	27
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
2.1 Υλικά.....	31
2.2 Μέθοδοι.....	32
2.2.1 Θρεπτικά υλικά βακτηρίων.....	32
2.2.2 Βακτηριακά στελέχη	33
2.2.3 Πλασμίδια.....	33
2.2.4 Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων για μετασχηματισμό με χρήση της μεθόδου RbCl..	33
2.2.5 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων (Transformation)	34
2.2.6 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων	34
2.2.6.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με τη μέθοδο του βρασμού (boiling miniprep)	34
2.2.6.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (midiprep)	35
2.2.7 Πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού	36
2.2.8 Αντίδραση Klenow.....	37
2.2.9 Σύνδεση γραμμικών τμημάτων DNA με αντίδραση λιγάσης	37
2.2.10 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v	38
2.2.11 Απομόνωση μορίων DNA από παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης με τη μέθοδο της ηλεκτροέκλυσης.....	38

2.2.12 Μοριακή διήθηση με Sephadex G-50.....	39
2.2.13 Καθαρισμός DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο	39
2.2.14 Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη.....	39
2.2.15 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων και παρασκευή κυτταρικών εκχυλισμάτων	40
2.2.16 Δοκιμασία Λουσιφεράσης	41
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
3.1 Απομόνωση ενός τμήματος 2.1 kb του υποκινητή του γονιδίου TLE4 από γενωμικό DNA ποντικού με τη χρήση της PCR.....	44
3.2 Κλωνοποίηση του υποκινητή TLE4 στις θέσεις MluI-XhoI του πλασμιδιακού φορέα pGL3-Basic.	44
3.3 Πέψη του πλασμιδίου <i>pGL3-Basic TLE4 2.1 kb</i> με ενδονουκλεάσες περιορισμού για την απομάκρυνση τμήματος 1 kb από τον υποκινητή του TLE4 και τη δημιουργία του πλασμιδίου <i>pGL3-Basic TLE4 1.1 kb</i> .45	
3.4 Κατασκευή του πλασμιδίου <i>pGL3-Basic TLE4 0.5 kb</i> από το πλασμίδιο <i>pGL3-Basic TLE4 1.1 kb</i>	48
3.5 Κατασκευή του πλασμιδίου <i>pGL3-Basic TLE4 0.4 kb</i> και του πλασμιδίου <i>pGL3-Basic TLE4 0.3 kb</i>	51
3.6 Κατασκευή των πλασμιδίων <i>pGL3-Basic TLE4 0.2 kb</i> και <i>pGL3-Basic TLE4 0.07 kb</i>	53
3.7 Δημιουργία του πλασμιδίου <i>pGL3-Basic TLE4 0.25 kb</i>	57
3.8 Κατασκευή του πλασμιδίου <i>pGL3-Basic TLE4 0.22 kb</i>	58
3.9 Δημιουργία του πλασμιδίου <i>pGL3-Basic TLE4 (DSacII.NheI;PmlI)</i>	61
3.10 Διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς HEK293 με πλασμιδιακά DNA και μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης	62
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	64
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Περίληψη

Το γονίδιο *tle4* αποτελεί μέλος της οικογένειας των συγκαταστολέων μεταγραφικών παραγόντων Groucho/TLE και έχει αποδειχθεί πως παίρνει μέρος σε πλήθος διεργασιών και σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω των οποίων ρυθμίζεται η ανάπτυξη στα ζώα. Η αλληλεπίδραση του με το DNA δεν είναι άμεση αλλά στρατολογείται σε *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων-στόχων από καταστολείς με τους οποίους αλληλεπιδρά μέσω αντίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η αρνητική του δράση επιτελείται είτε ως ομοτετραμερές είτε ως ετεροτετραμερές και είναι σε θέση να προκαλέσει μεγάλου εύρους καταστολή. Στην προσπάθεια να αποσαφηνιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης του *tle4*, χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ένας φορέας λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν πως η περιοχή του υποκινητή καθοδικά από το -400 bp είναι σημαντική για την έκφραση του *tle4* γονιδίου.

Abstract

TLE4 is a member of the Groucho/TLE family of transcriptional corepressors. Groucho/TLE family proteins are involved in several signaling pathways that regulate numerous developmental decisions in animals, while more recently they have been also implicated in various types of cancer. Groucho/TLE family proteins do not bind DNA directly but are recruited to target gene promoters by a diverse profile of DNA-binding proteins and appear to mediate long-range repression. However, the mechanism by which they exert their negative regulatory function in gene expression is not yet fully understood but it has become apparent that Gro/TLE proteins must repress transcription by various molecular mechanisms in vivo and they may depend on the specific biological context.

Because Groucho/TLE proteins are broadly expressed, they were traditionally regarded as constitutive factors whose repressive activity is mainly regulated by the availability of their partner transcriptional repressors. Nevertheless, it becomes increasingly evident, that their expression is under tight spatial and temporal control. In order to elucidating the molecular mechanisms of *tle4* regulation we have conducted several transient transfection experiments. Using a luciferase reporter we have characterized that a promoter region downstream of -400bp is critical for *tle4* expression.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

Όλα τα σωματικά κύτταρα ενός πολυκύτταρου οργανισμού περιέχουν την ίδια ποσότητα γενετικού υλικού. Στο DNA κάθε κυττάρου περιλαμβάνονται οι πληροφορίες για τη σύνθεση όλων των μακρομορίων που μπορεί να παράγει. Υπάρχουν πολλά γονίδια των οποίων τα προϊόντα απαιτούνται συνεχώς σε όλους τους ιστούς, όπως είναι, για παράδειγμα, τα προϊόντα των γονιδίων που εμπλέκονται στο σχηματισμό της βασικής κυτταρικής δομής, στην πρωτεϊνοσύνθεση ή στο μεταβολισμό. Τα γονίδια αυτά ονομάζονται γονίδια κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes). Καθώς προχωρά η ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών, τα κύτταρα σταδιακά δεσμεύονται για το σχηματισμό συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων. Οι διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι που απαντώνται σε έναν οργανισμό και οι φαινοτυπικές διαφορές που παρουσιάζουν μεταξύ τους, οφείλονται σε μεγάλο βαθμό, στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, δηλαδή εκείνων που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II. Κατά συνέπεια, πρέπει να υπάρχει κάποιος μηχανισμός, με τον οποίο, κάθε φορά ρυθμίζεται η μεταγραφή του επιθυμητού γονιδίου. Η εύρυθμη ανάπτυξη και λειτουργία του οργανισμού επιτυγχάνεται κυρίως μέσω ρυθμιστικών μηχανισμών, οι οποίοι ελέγχουν τη ροή των πληροφοριών από το DNA προς τις πρωτεΐνες.

Είναι φανερό πως η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης παίζει καίριο ρόλο στην ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών καθώς οι πρώιμες κυτταρικές διαιρέσεις του νέου οργανισμού δημιουργούν αδιαφοροποίητες και μορφολογικά απλές κυτταρικές δομές. Ωστόσο μέσω της δράσης σηματοδοτικών μονοπατιών και γενικότερα με την ενεργοποίηση της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, αυτές οι πρώιμες κυτταρικές στιβάδες θα οδηγήσουν στον σχηματισμό πολύπλοκων δομών και τελικά στην δημιουργία του πολυκύτταρου οργανισμού (Slack, 2006).

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης ασκείται σε αρκετά επίπεδα: στο επίπεδο της μεταγραφής, της μετάφρασης αλλά και στα στάδια των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Για τα περισσότερα γονίδια ωστόσο, το σημαντικότερο σημείο ρύθμισης της έκφρασης τους αποτελεί η έναρξη της μεταγραφής.

Ο έλεγχος της έναρξης της μεταγραφής επιτελείται μέσω της δράσης διαφόρων πρωτεϊνών που διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

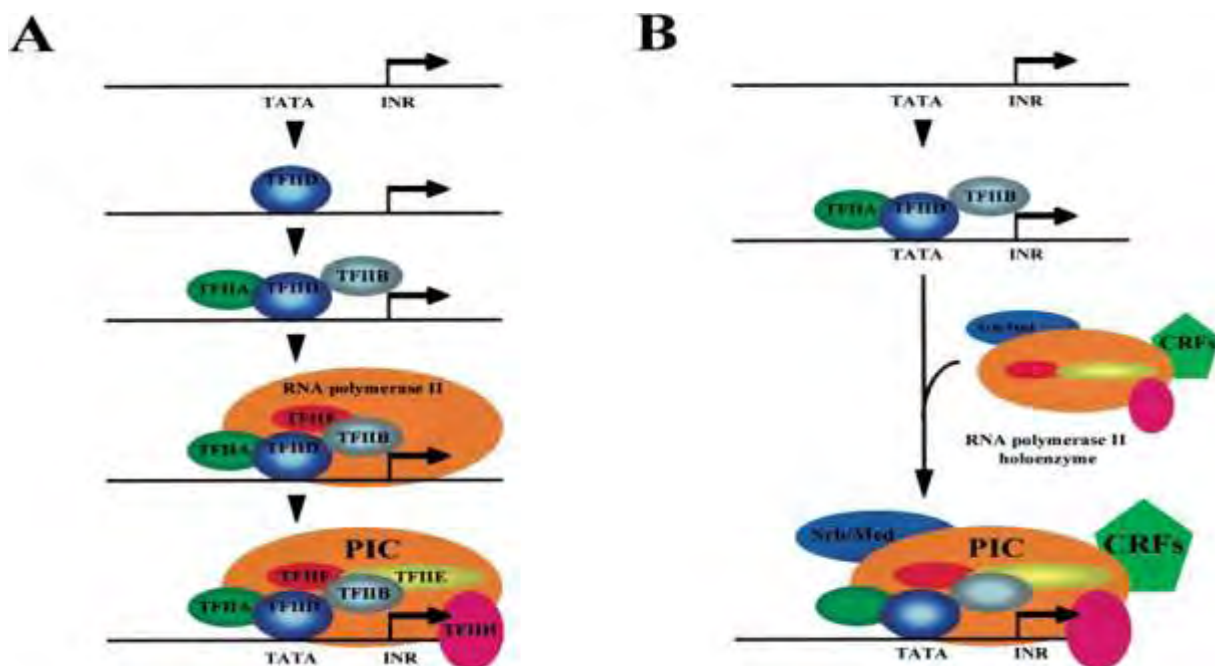
1. Οι **βασικοί παράγοντες** ή **γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες** (basal factors) προσδένονται μαζί με την RNA πολυμεράση στο σημείο έναρξης της μεταγραφής και στο πλαίσιο TATA.
2. Οι **μεταγραφικοί παράγοντες** που αναγνωρίζουν με ειδικότητα σύντομες αλληλουχίες, οι οποίες εντοπίζονται σε ειδικά *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία και προσδένονται σε αυτές. Πολλοί δρουν ιδιοστατικά, ενώ άλλοι έχουν ρυθμιστικό ρόλο και συντίθενται ή ενεργοποιούνται σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές ή σε συγκεκριμένους ιστούς. Επομένως, αυτοί οι παράγοντες ευθύνονται για τις μεταβολές του προτύπου της μεταγραφής ανάλογα με τη θέση, δηλαδή τον κυτταρικό τύπο ή τον ιστό ενός πολυκύτταρου οργανισμού. Οι μεταγραφικοί **ενεργοποιητές** προάγουν τη μεταγραφή ενώ οι **καταστολείς** μειώνουν τα επίπεδα έκφρασης.

3. Μια άλλη ομάδα παραγόντων, οι **συνενεργοποιητές** και οι **συγκαταστολείς**, περιλαμβάνει μόρια, τα οποία δεν συνδέονται άμεσα με το DNA αλλά είναι αναγκαία για τη ρύθμιση της μεταγραφής. Πρόκειται για μόρια που δρουν μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και συμμετέχουν στην ενεργοποίηση (ή καταστολή) της μεταγραφής γεφυρώνοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες με τη βασική μεταγραφική συσκευή.

4. Τέλος, σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της μεταγραφής έχουν και **πρωτεΐνες** που ασκούν τη δράση τους προκαλώντας αλλαγές στη δομή της χρωματίνης.

1.2 Υποκινητές και ενισχυτές

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, σημαντικό ρόλο στο μεταγραφικό έλεγχο έχουν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών που εντοπίζονται στο DNA και πρωτεϊνών που τις αναγνωρίζουν και προσδέονται σε αυτές. Τα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία απαντούν κυρίως στις περιοχές των υποκινητών και ενισχυτών. Ως υποκινητής ενός γονιδίου χαρακτηρίζεται η περιοχή που εντοπίζεται τις περισσότερες φορές ακριβώς ανοδικά από τη θέση έναρξης της μεταγραφής του και περιέχει τη θέση στην οποία προσδέεται η RNA πολυμεράση. Η πληροφορία για τη λειτουργία του υποκινητή περιέχεται στην αλληλουχία του (Slack J.M.W, 2006). Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν τρεις διαφορετικές RNA πολυμεράσες, οι οποίες μεταγράφουν γονίδια των τεσσάρων κατηγοριών RNA. Η ευκαρυωτική RNA πολυμεράση II αποτελείται από περισσότερες από 10 υπομονάδες, από τις οποίες, κάποιες είναι μερικώς ομόλογες με τις υπομονάδες α, β και β' της RNA πολυμεράσης του *E.coli*. Η ευκαρυωτική πολυμεράση II δεν έχει την δυνατότητα να επάγει μόνη της την μεταγραφική διαδικασία, αλλά τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς τους παράγοντες είναι οι TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF και TFIIH. Αυτοί οι γενικοί παράγοντες συνδέονται με την RNA πολυμεράση II με συγκεκριμένη σειρά σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που περιβάλλει και καθορίζει το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Αυτό το σύμπλοκο ονομάζεται προ-εναρκτήριο σύμπλοκο (PIC=pre-initiation complex) (Εικόνα 1). Με την άφιξη και την κατάλληλη πρόσδεση στο σημείο και κάποιων άλλων πρωτεϊνικών παραγόντων, σχηματίζεται η βασική μεταγραφική συσκευή, ικανή να επάγει τη διαδικασία της μεταγραφής. (Pedersen A.G et.al, 1999).



Εικόνα 1: Σχηματισμός του προεναρκτήριου συμπλόκου (PIC=pre-initiation complex) και ενεργοποίηση της μεταγραφής. *A)* Οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες (GTFs) προσδένονται στο DNA με συγκεκριμένη σειρά για το σχηματισμό του PIC. Το σημείο έναρξης της μεταγραφής υποδεικνύεται από το βέλος. *B)* Στο σχηματισμό του PIC ίσως εμπλέκεται και το ένζυμο της RNA pol II. Το ολόενζυμο περιλαμβάνει την RNA pol, GTFs, τις Srb/ Mediator πρωτεΐνες και παράγοντες που αναδιαμορφώνουν τη χρωματίνη (CRFs=Chromatin remodeling factors) (Gaston and Jayaraman, 2002).

Η έτερη κατηγορία *cis*-ρυθμιστικών περιοχών καλούνται ενισχυτές. Οι ενισχυτές φέρουν αλληλουχίες, οι οποίες επηρεάζουν τη μεταγραφή ωστόσο, βρίσκονται σε αρκετά μεγάλη απόσταση από το σημείο έναρξης της διαδικασίας. Οι ενισχυτές μπορούν να ασκήσουν τη δράση τους είτε βρίσκονται ανοδικά είτε καθοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής. Συνήθως όμως βρίσκονται ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου που ελέγχουν, κάποιες φορές, μάλιστα χιλιάδες ζεύγη βάσεων μακριά από αυτόν. Οι πρωτεΐνες που προσδένονται σε στοιχεία του ενισχυτή αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που είναι προσδεμένες σε στοιχεία του υποκινητή. Με άλλα λόγια, οι ενισχυτές έχουν την δυνατότητα να ρυθμίζουν τη μεταγραφή από απόσταση. Περιλαμβάνουν, επίσης, μια ποικιλία από μικρού μεγέθους ρυθμιστικές αλληλουχίες, μερικές από τις οποίες είναι ίδιες με αυτές που συναντώνται στους υποκινητές και αποτελούν θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Russell J.P, 2009).

1.3 Οι μεταγραφικοί παράγοντες και ο τρόπος δράσης τους

Εκτός από τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες που απαιτούνται για τη συγκρότηση του μεταγραφικού συμπλόκου, υπάρχουν πολυάριθμοι ειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες αλληλουχίες που εντοπίζονται σε ρυθμιστικές περιοχές. Αξίζει να αναφερθεί πως τα γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ρύθμιση της μεταγραφής αποτελούν ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό του γονιδιώματος των σπονδυλωτών.

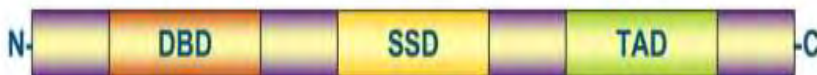
Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες, οι οποίες απαντούν σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων, προσδένονται σε αυτές μέσω μιας

επικράτειας πρόσδεσης στο DNA και ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τη μεταγραφή μέσω συγκεκριμένων επικρατειών. Οι μεταγραφικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με το βασικό σύμπλοκο της μεταγραφής μέσω αλληλεπιδράσεων «πρωτεΐνης- πρωτεΐνης», είτε άμεσα είτε με την βοήθεια πρωτεϊνών αγκυροβόλησης. Οι περισσότεροι μεταγραφικοί παράγοντες είναι πυρηνικές πρωτεΐνες, παρόλο που ορισμένες απαντώνται πριν από την ενεργοποίηση τους στο κυτταρόπλασμα.

Κάθε γονίδιο περιέχει αρκετά *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία, που αποτελούν σημείο στόχευσης για ένα πλήθος διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων. Η αλληλεπίδραση ενός μεταγραφικού παράγοντα με το ρυθμιστικό στοιχείο εξαρτάται από την αλληλουχία πρόσδεσης αλλά και από τους υπόλοιπους παράγοντες οι οποίοι βρίσκονται στο κυτταρικό περιβάλλον τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Ωστόσο, κάθε γονίδιο διαθέτει το δικό του πρότυπο, «χάρτη» ρυθμιστικών στοιχείων, εξασφαλίζοντας με αυτό τον τρόπο πως θα εκφραστεί με το σωστό χωροχρονικό πρότυπο. Επίσης, η ενεργοποίηση ενός μεταγραφικού παράγοντα ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης ενός ή περισσότερων σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία με την σειρά τους μπορεί να επάγονται από εξωκυτταρικά ερεθίσματα όπως η αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα ή μία μόλυνση από ιό (Pedersen A.G et.al, 1999). Η τυπική δομή των μεταγραφικών παραγόντων περιλαμβάνει τις παρακάτω επιμέρους επικράτειες:

1. **Επικράτεια πρόσδεσης στο DNA** (DNA-binding domain, DBD): Η επικράτεια αυτή αλληλεπιδρά με συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται ορισμένες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων που παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη.
2. **Επικράτεια ενεργοποίησης *in trans*** (Trans-activating domain, TAD): Η επικράτεια αυτή παρέχει θέσεις αλληλεπίδρασης για άλλες πρωτεΐνες όπως μεταγραφικοί συνενεργοποιητές.
3. Σε ορισμένες περιπτώσεις επίσης, απαντά μια **επικράτεια-αισθητήρας σήματος** (signal sensing domain, SSD), η οποία δρα ως αισθητήρας που ανιχνεύει εξωτερικά σήματα επηρεάζοντας τη μεταγραφή με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Εναλλακτικά, η επικράτεια πρόσδεσης στο DNA και η επικράτεια-αισθητήρας σήματος μπορεί να βρίσκονται σε διαφορετικές πρωτεΐνες, οι οποίες όταν βρίσκονται κοντά στο μεταγραφικό σύμπλοκο, συνδέονται προκειμένου να ρυθμίσουν τη γονιδιακή έκφραση (Lewin, 2004).

Η συνηθισμένη μορφή ρύθμισης της μεταγραφής στους ευκαρυώτες είναι θετική: ένας μεταγραφικός παράγοντας εκφράζεται σε συγκεκριμένο ιστό όπου προκαλεί την ενεργοποίηση ενός ή περισσότερων υποκινητών που φέρουν την αλληλουχία-στόχο του. Η ρύθμιση με ειδική καταστολή του υποκινητή στόχου είναι πιο σπάνια.



Εικόνα 2: Σχηματικό διάγραμμα της δομής ενός πρότυπου μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος φέρει (1) επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (DBD), (2) επικράτεια-αισθητήρα σήματος (SSD) και *trans* επικράτεια ενεργοποίησης (TAD).

Παρόλο που συνήθως οι μεταγραφικοί παράγοντες χαρακτηρίζονται ως ενεργοποιητές ή καταστολείς, η δράση τους εξαρτάται και από το περιβάλλον του κυττάρου, καθώς η παρουσία άλλων πρωτεϊνών είναι δυνατόν να επηρεάσει την ενεργότητα τους, με αποτέλεσμα ένας μεταγραφικός παράγοντας που τις περισσότερες φορές λειτουργεί ως ενεργοποιητής να συμπεριφέρεται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ως καταστολέας (Slack J.M.W, 2006).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες κατατάσσονται με βάση τη δομή της επικράτειας πρόσδεσης στο DNA, σε αρκετές κατηγορίες (Πίνακας 1):

<i>Κύριες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων</i>
<i>Οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων με επικράτεια πρόσδεσης στο DNA</i>
<i>Μεταγραφικοί παράγοντες που φέρουν ομοιοεπικράτεια (homeodomain)</i>
<i>Μεταγραφικοί παράγοντες Pax</i>
<i>Μεταγραφικοί παράγοντες με δακτύλους ψευδαργύρου (Zinc finger)</i>
<i>Υπεροικογένεια πυρηνικών υποδοχέων (nuclear receptor superfamily)</i>
<i>Μεταγραφικοί παράγοντες με βασικά φορτισμένη περιοχή και το μοτίβο έλικα-βρόχος-έλικα (basic Helix-Loop-Helix, bHLH)</i>
<i>Μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας φτερωτής έλικας (winged helix)</i>
<i>Μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας T</i>
<i>Μεταγραφικοί παράγοντες με βασικά φορτισμένη περιοχή και φερμουάρ λευκίνης (basic leucine zipper, bZIP)</i>

Πίνακας 1: Κατηγορίες μεταγραφικών παραγόντων.

1.4 Καταστολή της μεταγραφής

Η καταστολή της μεταγραφής γονιδίων αποτελεί σημαντικό παράγοντα στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, καθώς η ενεργοποίηση της πλειονότητας των γονιδίων ρυθμίζεται από το συνδυασμό θετικών και αρνητικών ρυθμιστικών μηχανισμών. Οι συνδυασμοί αυτοί έχουν ως αποτέλεσμα τα ειδικά χωροχρονικά πρότυπα έκφρασης των γονιδίων. Μελέτες σε πολλά ευκαρυωτικά συστήματα, έχουν δείξει ότι πως οι καταστολείς έχουν την ικανότητα να παρεμβαίνουν σε πολλά, ακόμα και σε όλα τα βήματα που απαιτούνται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής (Renkawitz, 1990).

Η σπουδαιότητα της καταστολής αποκαλύπτεται κατά την ανάπτυξη, διότι προκειμένου να επιτευχθεί χωρικός έλεγχος της ενεργοποίησης των γονιδίων, τα όρια της γονιδιακής έκφρασης συχνά καθορίζονται από τον περιορισμένο τοπικό εντοπισμό ή ενεργοποίηση των μεταγραφικών καταστολέων (Mannervik et. al 1999). Επιπλέον, κατά την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιούνται αλληλεπιδράσεις μεταξύ καταστολέων και τελεστών μονοπατιών εξωκυτταρικών σημάτων. Συγκεκριμένα οι καταστολείς διατηρούν τα γονίδια σε μία ανενεργή κατάσταση παρεμποδίζοντας την έκφραση τους, έως ότου δράσουν κατάλληλα εξωκυττάρια σήματα αίροντας έτσι την καταστολή και επιτρέποντας την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων (Roose and Clevers, 1999).

Υπάρχουν κάποιοι λόγοι που εξηγούν γιατί τα συστήματα, τα οποία βασίζονται σε θετικούς μεταγραφικούς παράγοντες, χρειάζονται επιπλέον μηχανισμούς, οι οποίοι εμποδίζουν τη διαδικασία της μεταγραφής:

1. Κάποια αρνητικά ρυθμιστικά στοιχεία είναι υπεύθυνα για την αποτελεσματική γονιδιακή καταστολή σε ιστούς, όπου κάποια γονίδια πρέπει να είναι ανενεργά σε συγκεκριμένα στάδια ή τύπους.
2. Σε ιστούς, όπου η έκφραση ενός γονιδίου επάγεται από κάποιο σήμα, είναι σημαντικό να καταστέλλεται άμεσα η συνέχιση της μεταγραφής του μόλις το επαγωγικό σήμα αφαιρείται.
3. Σχετικά με την εξέλιξη, η παρουσία αρνητικών ρυθμιστικών στοιχείων σε θετικές ρυθμιστικές περιοχές επιτρέπει στα γονίδια να προσαρμόσουν την ενεργότητα τους σε νέες περιβαλλοντικές συνθήκες, αφού η αποτελεσματικότητα της μεταγραφής είναι αποτέλεσμα των συνδυασμών όλων των ρυθμιστικών στοιχείων (Renkawitz, 1990).

Γενικά, η καταστολή της μεταγραφής μπορεί να χωριστεί σε δύο κύριες κατηγορίες: τη γενική ή καθολική καταστολή και την γονιδιο-ειδική καταστολή (K. Gaston and P. S. Jayaraman, 2003).

Η **γενική ή καθολική καταστολή** συμβαίνει όταν μια πρωτεΐνη καταστολέας ή ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών καταστολής είτε απομονώνει είτε τροποποιεί ένα σημαντικό στοιχείο του προεναρκτήριου συμπλόκου (PIC) ή της RNA πολυμεράσης II, με αποτέλεσμα η μεταγραφή να καθίσταται πλέον αδύνατη. Η καθολική καταστολή επηρεάζει αρνητικά την έκφραση όλων των γονιδίων που μεταγράφονται από αυτή τη RNA πολυμεράση. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση μιας υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II από τις κινάσες ICP22 και UL13 του HSV-1, προκαλεί το σχηματισμό μιας μη λειτουργικής μορφής της πολυμεράσης με αποτέλεσμα τη γενική καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων. Τα νουκλεοσώματα επίσης εμποδίζουν την ενεργότητα του υποκινητή απομονώνοντας την αλληλουχία του υποκινητή μέσα στη χρωματίνη. Αντίθετα, η **γονιδιο-ειδική καταστολή** αφορά τη μεταγραφή ενός συγκεκριμένου γονιδίου ή μιας ομάδας γονιδίων που ελέγχεται από την ενεργότητα ενός γονιδιο-ειδικού καταστολέα ή συγκαταστολέα. Οι καταστολείς μπορούν να προκαλέσουν γονιδιο-ειδική καταστολή μέσω της μείωσης των επιπέδων συγκέντρωσης κάποιου λειτουργικού ενεργοποιητή ή συνενεργοποιητή στην περιοχή του υποκινητή ή μέσω αντίδρασης στις διεγερτικές επιδράσεις αυτών των πρωτεϊνών πάνω στη διαδικασία της μεταγραφής. Επιπρόσθετα, κάποιοι καταστολείς εμποδίζουν τη μεταγραφή επηρεάζοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποκινητών και στοιχείων του PIC ή με την στρατολόγηση πρωτεϊνών που αναδιαμορφώνουν τη χρωματίνη (K. Gaston and P. S. Jayaraman, 2003).

Οι καταστολείς, κατηγοριοποιούνται σε δύο τάξεις ανάλογα με το αν προκαλούν μεγάλο ή μικρό εύρους καταστολή (Gray and Levine, 1996). Στην πρώτη περίπτωση, η καταστολή, η οποία επάγεται από πολύ απομακρυσμένους καταστολείς συνήθως ονομάζεται ως **μεγάλου εύρους καταστολή** και αυτές οι πρωτεΐνες είναι γνωστές ως μεγάλου εύρους καταστολείς. Αυτού του είδους οι καταστολείς προκαλούν αναστολή της μεταγραφής μέσω της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης στο σημείο του υποκινητή ή κοντά σε αυτό. Εναλλακτικά, ίσως να έρχονται σε επαφή με ενεργοποιητές της μεταγραφής και/ή στοιχεία του PIC με τη βοήθεια μιας λούπας, η οποία θα παρακάμπτει το ενδιάμεσο κομμάτι DNA. Στη δεύτερη περίπτωση, η **μικρού εύρους καταστολή**

πραγματοποιείται όταν μια πρωτεΐνη καταστολέας ασκεί τη δράση της τοπικά. Με αυτό τον τρόπο ο καταστολέας εμποδίζει τη δράση παρακείμενων ενεργοποιητών ή στοιχείων του PIC χωρίς ωστόσο να επηρεάζει με οποιοδήποτε τρόπο απομακρυσμένους ενεργοποιητές. Οι πρωτεΐνες που επιφέρουν αυτή τη μικρού εύρους καταστολή ονομάζονται αρκετές φορές και καταστολείς μικρού εύρους. Παρόλα αυτά, αυτοί οι δύο τύποι καταστολής δεν είναι αποκομμένοι μεταξύ τους καθώς ένας καταστολέας δύναται να προκαλέσει μικρού αλλά και μεγάλου εύρους καταστολή ανάλογα με τις ιδιότητες της θέσης πρόσδεσης αλλά και ανάλογα με τον ακριβή τρόπο δράσης του. Για παράδειγμα, ο καταστολέας Hairy, μπορεί να επιφέρει μικρού αλλά και μεγάλου εύρους καταστολή (Paroush Z. et al., 1994 ; Poortinga G. et al., 1998).

1.5 Καταστολείς και συγκαταστολείς

Όπως και η ενεργοποίηση έτσι και η καταστολή διεκπεραιώνεται από δύο κατηγορίες μορίων, τους μεταγραφικούς καταστολείς και τους συγκαταστολείς.

Οι καταστολείς είναι μόρια που ανταγωνίζονται τη δράση των ενεργοποιητών, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η μεταγραφή και κατά συνέπεια η έκφραση των γονιδίων. Όπως οι ενεργοποιητές, έτσι και οι καταστολείς διαθέτουν δύο επικράτειες: μία επικράτεια πρόσδεσης στο DNA και μια επικράτεια καταστολής.

Οι καταστολείς της μεταγραφής στα βακτήρια συνήθως προσδένονται σε αλληλουχίες DNA που επικαλύπτονται μερικώς με τον υποκινητή, με αποτέλεσμα να αποτρέπουν απευθείας την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης ή την έναρξη της μεταγραφής. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός καταστολής δεν εμφανίζεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αντίθετα, οι ευκαρυωτικοί καταστολείς δρουν με πολλούς άλλους τρόπους. Γενικά, μια πρωτεΐνη-καταστολέας μπορεί να προσδεθεί σε μια θέση κοντά στη θέση πρόσδεσης μιας πρωτεΐνης-ενεργοποιητή και μέσω της αλληλεπίδρασης των επικρατειών καταστολής και ενεργοποίησης, αντίστοιχα, να παρεμποδιστεί η δράση του ενεργοποιητή. Εναλλακτικά, η θέση πρόσδεσης του ενεργοποιητή και η θέση πρόσδεσης του καταστολέα μπορεί να αλληλεπικαλύπτονται και η πρόσδεση του καταστολέα να αποκλείει την πρόσδεση του ενεργοποιητή. Τέλος, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης μπορεί να παρεμποδίσει τη μεταγραφή όταν ένας καταστολέας προσδεθεί στο DNA και στρατολογήσει ένα σύμπλοκο απακετυλασών των ιστονών, που προκαλεί τη συμπύκνωση της χρωματίνης (Russell J.P, 2009).

Οι γονίδιο-ειδικές πρωτεΐνες-καταστολείς είναι μία μεγάλη ομάδα που περιλαμβάνει ποικίλες πρωτεΐνες, οι οποίες ρυθμίζουν αρνητικά την μεταγραφή αλλά είναι δύσκολο να κατηγοριοποιηθούν. Οι πρωτεΐνες-καταστολείς έχουν ταξινομηθεί σε κατηγορίες συναρτήσεων διάφορων παραγόντων. Έχουν χωριστεί σε πρωτεΐνες που προκαλούν μικρού εύρους και μεγάλου εύρους καταστολή. Επίσης, έχουν χωριστεί σε ομάδες, οι οποίες μπορούν ή αδυνατούν να στρατολογήσουν απακετυλάσες ιστονών στις περιοχές των υποκινητών. Επιπλέον, έχουν κατηγοριοποιηθεί είτε σαν DNA προσδετοεξαρτώμενοι καταστολείς είτε σαν μη DNA προσδετοεξαρτώμενοι συγκαταστολείς. Παρόλα αυτά υπάρχουν πολλά παραδείγματα καταστολέων, τα οποία δεν μπορούν να συμπεριληφθούν σε καμία από τις πιο πάνω κατηγορίες. Αξίζει να σημειωθεί, πως παρουσιάζεται μια ραγδαία αύξηση σε περιβαλλοντο-εξαρτώμενους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι προσδένονται στο DNA και είναι ικανοί να ρυθμίσουν είτε θετικά είτε αρνητικά τη διαδικασία της μεταγραφής ανάλογα πάντα με το περιβάλλον των θέσεων πρόσδεσης, τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Μια αρκετά καλά τεκμηριωμένη προσπάθεια κατηγοριοποίησης των καταστολέων παρουσιάζεται παρακάτω και προτείνει 3 κύριες τάξεις. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, κάποιοι καταστολείς δύναται να προκαλούν καταστολή με περισσότερους από έναν μηχανισμούς και να ανήκουν σε περισσότερες από μία κατηγορίες.

Οι καταστολείς της τάξης I προσδένονται στο DNA και ρυθμίζουν αρνητικά τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Αυτές οι πρωτεΐνες-καταστολείς χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες:

1. Σε αυτές που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες (τάξη IA).
2. Σε αυτές που προσδένονται σε περιοχές μεθυλιωμένου DNA (τάξη IB).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι περιοχές πρόσδεσης των καταστολέων απαντούν μέσα σε περιοχές που υπάρχουν και θέσεις πρόσδεσης για ενεργοποιητές, δημιουργώντας έτσι ένα *cis*-ρυθμιστικό στοιχείο με πολλές πιθανές ενεργότητες. Τα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία των ευκαρυωτικών κυττάρων σπάνια έχουν μόνο μια θέση πρόσδεσης. Αντίθετα, σε γενικές γραμμές περιλαμβάνουν μικρά τμήματα DNA, στα οποία συνδέεται ένας αριθμός πρωτεϊνών με αλληλουχο-εξαρτώμενο τρόπο.

Οι περιοχές καταστολής πιθανόν να βρίσκονται κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής, γεγονός το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση που οι καταστολείς ανταγωνίζονται τους παράγοντες της βασικής μεταγραφικής συσκευής όσον αφορά τη πρόσδεση στο DNA. Επίσης, οι περιοχές αυτές μπορεί να εντοπιστούν και αρκετές χιλιάδες βάσεις μακριά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής και η πιθανότερη λειτουργία τους είναι να παρεμποδίζουν τη δράση γειτονικών ενεργοποιητών (D.N. Arnosti, 2004). Εξαιτίας της μεγάλης ποικιλίας τους, οι περιοχές καταστολής δεν έχουν ταξινομηθεί επιτυχώς αναφορικά με τη συνολική αμινοξική σύστασή τους, ωστόσο εντοπίστηκαν ορισμένοι καταστολείς, οι οποίοι περιέχουν τμήματα πλούσια σε κατάλοιπα αλανίνης (Hanna-Rose and Hansen, 1996). Πολλές φορές, οι περιοχές καταστολής περιέχουν δομικά μοτίβα που αλληλεπιδρούν με διακριτές ομάδες συγκαταστολέων. Αυτά τα μοτίβα μπορεί να είναι μικρά και εκφυλισμένα, αλλά πολύ συχνά διατηρούνται ανάμεσα στα ομόλογα γονίδια, επιτρέποντας έτσι την εύκολη ταυτοποίησή τους. Κάθε μοτίβο αντιπροσωπεύει μια μοναδική επιφάνεια αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένους στόχους μέσα στη βασική ή ρυθμιστική μεταγραφική συσκευή, με αποτέλεσμα την καταστολή της διαδικασίας.

Σε αντίθεση με την πρώτη τάξη καταστολέων, η τάξη II αποτελείται από πρωτεΐνες-καταστολείς που δεν συνδέονται απευθείας με το DNA. Αντίθετα, προσελκύουν τους υποκινητές διάφορων γονιδίων μέσω άλλων πρωτεϊνών. Και οι καταστολείς αυτής της τάξης ταξινομούνται σε δύο υποκατηγορίες:

1. Σε καταστολείς, οι οποίοι αντιδρούν με άλλους καταστολείς, δίνοντας μας έτσι τη δυνατότητα να τους μελετάμε ως συγκαταστολείς (τάξη IIA).
2. Σε αντιδιαστολή με την τάξη IIA, οι καταστολείς της δεύτερης υποκατηγορίας έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με καταστολείς που ανήκουν στην τάξη I αλλά ακόμα και με περιβαλλοντό-εξαρτώμενους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι υπό άλλες συνθήκες επάγουν τη διαδικασία της μεταγραφής (τάξη IIB).

Η τρίτη και τελευταία κύρια τάξη περιέχει πρωτεϊνικούς καταστολείς, οι οποίοι δεν είναι απαραίτητο να συνδέονται είτε άμεσα είτε έμμεσα με το DNA. Αυτού του είδους οι καταστολείς στοχεύουν ενεργοποιητές, συνενεργοποιητές ή στοιχεία της βασικής μεταγραφικής συσκευής και συνήθως προκαλούν μείωση στα επίπεδα συγκέντρωσης των λειτουργικών πρωτεϊνών, οι οποίες ρυθμίζουν τη διαδικασία της μεταγραφής:

1. Οι καταστολείς της τάξης IIIA απομονώνουν αυτές τις πρωτεΐνες σε ανενεργά σύμπλοκα ή μεταβάλλουν τη σταθερότητα τους ή επηρεάζουν τον πυρηνικό εντοπισμό τους, πριν τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση τους.
2. Οι καταστολείς της τάξης IIIB τροποποιούν τους στόχους τους (ενεργοποιητές, συνενεργοποιητές και βασική μεταγραφική συσκευή) μετά-μεταφραστικά (K. Gaston, P. S. Jayaraman, 2003).

Οι αλληλεπιδράσεις των καταστολέων με κάθε μία ομάδα πιθανών μοριακών στόχων τους έχουν μελετηθεί επαρκώς και έχει προταθεί πως έχουν άμεση συμβολή στη επαγωγή της καταστολής (Hanna-Rose and Hansen, 1996).

Ο όρος συγκαταστολέας αναφέρεται είτε σε μονομερείς πρωτεΐνες είτε σε πρωτεΐνες ικρίωματος που προωθούν το σχηματισμό ενός συμπλέγματος αποτελούμενο από πολλές υπομονάδες (καταστολείς ή/και συγκαταστολείς), το οποίο στρατολογείται πάνω στα γονίδια από τους μεταγραφικούς παράγοντες (Burke and Baniahmad, 2000).

1.6 Μηχανισμοί καταστολής

Υπάρχουν τρεις κύριες οδοί μέσω των οποίων οι πρωτεΐνες-καταστολείς εμποδίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων:

1. *Παρεμπόδιση της βασικής μεταγραφικής συσκευής*
2. *Πρόκληση απώλειας της λειτουργίας του ενεργοποιητή*
3. *Αναδιαμόρφωση της χρωματίνης*

✓ Καταστολή μέσω παρεμπόδισης της βασικής μεταγραφικής συσκευής:

Ενώ από τη στόχευση της βασικής μεταγραφικής συσκευής αναμενόταν ως αποτέλεσμα η καθολική αδυναμία της μεταγραφικής διαδικασίας, εντούτοις υπάρχει ένας αριθμός πρωτεϊνών-καταστολέων, οι οποίοι δρουν σε γονίδιο-ειδικό περιβάλλον αλληλεπιδρώντας με έναν ή περισσότερους από τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες ή υπομονάδες συμπλόκων ενεργοποίησης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μεταγραφής σε συγκεκριμένους υποκινητές και είναι γνωστή ως "ενεργή" ή "άμεση" καταστολή (K. Gaston, P. S. Jayaraman, 2003).

✓ Τροποποίηση της μεγάλης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II:

Η καρβοξυτελική περιοχή της μεγάλης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II αποτελεί στόχο για άμεση καταστολή. Η περιοχή αυτή είναι γλυκοσυλιωμένη και αποφωσφορυλιωμένη κατά την έναρξη της μεταγραφής, ενώ κατά την επιμήκυνση είναι απογλυκοσυλιωμένη και φωσφορυλιωμένη. Μεταβάλλοντας την έκταση ή τη διάρκεια αυτών των τροποποιήσεων πάνω

στην καρβοξυτελική περιοχή, επέρχεται η καταστολή της μεταγραφής (K. Gaston, P. S. Jayaraman, 2003).

✓ Παρεμπόδιση της σύνδεσης της πρωτεΐνης που προσδένεται στο πλαίσιο TATA (TBP):

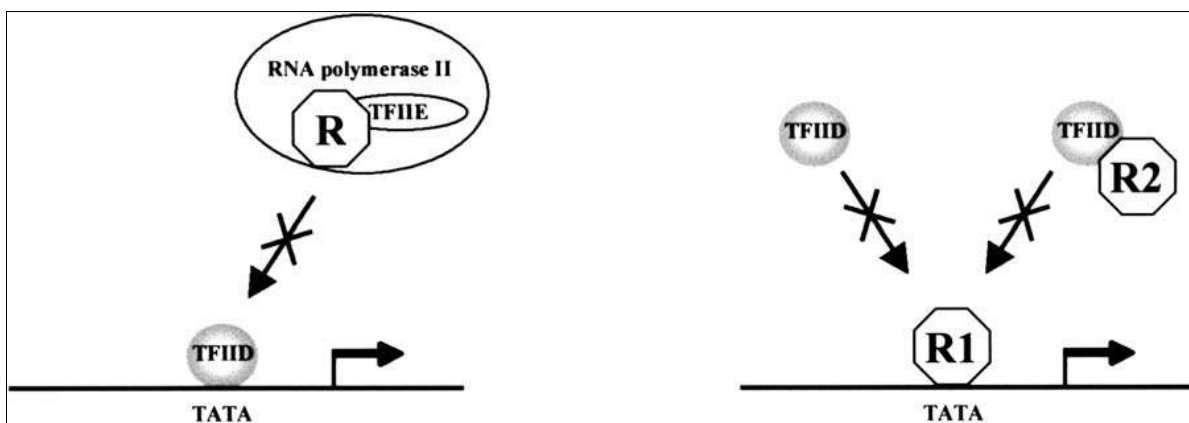
Ένας σημαντικός μηχανισμός γονίδιο-ειδικής καταστολής είναι η παρεμπόδιση της σύνδεσης της TBP και ως εκ τούτου του TFIID στο πλαίσιο TATA. Αυτός ο μηχανισμός επηρεάζει αποκλειστικά μόνο ένα γονίδιο κάθε φορά για τρεις λόγους.

Πρώτον, οι καταστολείς που ασκούν τη δράση τους με αυτό τον τρόπο μπορούν να στοχεύσουν σε υποκινητές είτε μέσω άμεσης είτε έμμεσης σύνδεσης σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA.

Δεύτερον, πολλά γονίδια που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II, δεν περιέχουν TATA box αλληλουχία και αυτό πιθανώς τα καθιστά λιγότερο ευαίσθητα σ' αυτού του είδους την καταστολή. Τρίτον, τουλάχιστον κάποια από τα γονίδια που μεταγράφει η RNA πολυμεράση II, ρυθμίζονται από ένα PIC, το οποίο δεν περιέχει TBP (K. Gaston, P. S. Jayaraman, 2003).

Η παρεμπόδιση της σύνδεσης της TBP με το DNA δεν είναι απαραίτητο να περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεταξύ του καταστολέα και της TBP. Αρκετές πρωτεΐνες-καταστολείς προσδένονται σε αλληλουχίες TATA και εξαιτίας της στερεοδιάταξης που δημιουργείται, εμποδίζεται η πρόσδεση της TBP (K. Gaston, P. S. Jayaraman, 2003).

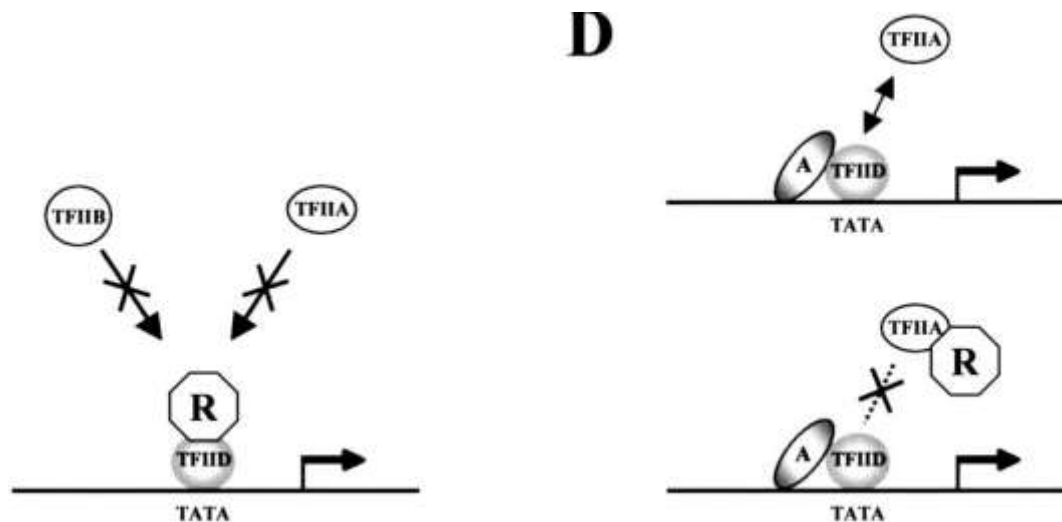
Ένας αριθμός καταστολέων δρα μέσω αποκλεισμού των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των γενικών μεταγραφικών παραγόντων. Παράδειγμα τέτοιου καταστολέα είναι η πρωτεΐνη Krüppel που ανήκει στην πρώτη τάξη καταστολέων και ο υποδοχέας της θυρεοειδούς ορμόνης (TR). Αυτές οι δύο πρωτεΐνες καταστέλλουν τη διαδικασία της μεταγραφής τροποποιώντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γενικών μεταγραφικών παραγόντων (GTFs). Ενώ η μονομερής Krüppel δρα ως ενεργοποιητής και προσδένεται στον TFIIB, η διμερής μορφή της πρωτεΐνης προσδένεται στην υπομονάδα TFIIE_β και προκαλεί αναστολή του σχηματισμού του PIC (K. Gaston, P. S. Jayaraman, 2003).



Εικόνα 3: A) Οι καταστολείς προσδένονται και/ ή τροποποιούν την RNA πολυμεράση ή τους GTFs και εμποδίζουν την πρόσδεση τους στον υποκινητή. B) Οι καταστολείς αποτρέπουν την πρόσδεση του TFIID στο πλαίσιο TATA είτε ανταγωνιζόμενοι με τον TFIID για τη θέση αυτή είτε στοχεύοντας και παρεμπόδιζοντας τον TFIID.

- ✓ Αναστολή αλληλεπιδράσεων μεταξύ γενικών μεταγραφικών παραγόντων (GTFs):

Ομοίως, παρουσία προσδέτη, ο υποδοχέας της θυρεοειδούς ορμόνης είναι ένας ενεργοποιητής που αλληλεπιδρά με τον TFIIIB. Ωστόσο, απουσία προσδέτη, ο TR μπορεί να αντιδράσει με την TBP και να εμποδίσει το σχηματισμό ενός λειτουργικού PIC. Μελέτες in vitro έχουν δείξει πως ο TR προσδένεται απευθείας στην TBP και παρεμβαίνει στη δημιουργία των συμπλόκων TBP-TFIIA και TBP-TFIIA-TFIIIB (K. Gaston, P. S. Jayaraman, 2003).



Εικόνα 4: A) Οι καταστολείς δεν επιτρέπουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των GTFs. B) Οι καταστολείς εμποδίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των GTFs, οι οποίες προκαλούνται από τον ενεργοποιητή (Activator).

- ✓ **Καταστολή μέσω της απώλειας λειτουργίας του ενεργοποιητή:**

Πολλοί πρωτεϊνικοί καταστολείς της μεταγραφής ρυθμίζουν την ενεργότητα και τον εντοπισμό των ενεργοποιητών και συνενεργοποιητών αυτής της διαδικασίας. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί α) με τη ρύθμιση της ανακύκλωσης (turnover) και κατά συνέπεια των επιπέδων συγκέντρωσης ενός ενεργοποιητή, β) επηρεάζοντας τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό του, γ) εμποδίζοντας τη πρόσδεση στο DNA ή δ) εμποδίζοντας αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, τις οποίες ο ενεργοποιητής πραγματοποιεί με τη βασική μεταγραφική συσκευή.

- ✓ Ρύθμιση ανακύκλωσης ενεργοποιητή/συνενεργοποιητή:

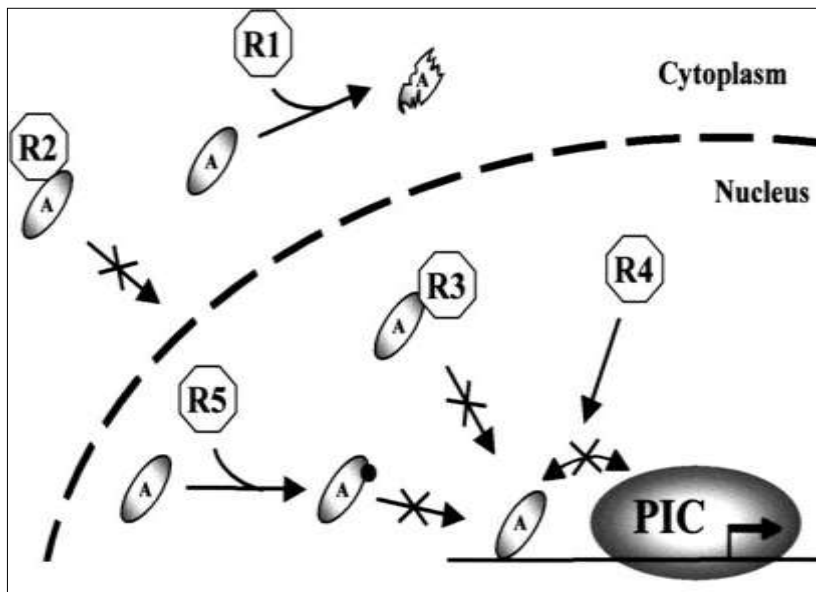
Οι πρωτεΐνες, οι οποίες ρυθμίζουν τη σταθερότητα και την ανακύκλωση ενός ενεργοποιητή, ρυθμίζουν έμμεσα και τη διαδικασία της μεταγραφής.

Η ογκοπρωτεΐνη MDM2 είναι ένα παράδειγμα καταστολέα, ο οποίος ουβικουτιώνει τον ενεργοποιητή και εν συνεχεία προωθεί την αποικοδόμηση του από το πρωτεάσωμα. Η ουβικουτινίωση της πρωτεΐνης p53 από την MDM2 πυροδοτεί την έξοδο από τον πυρήνα της p53 και έπειτα την αποικοδόμηση της. Η αποικοδόμηση ενός ενεργοποιητή που προωθείται από έναν καταστολέα, συνήθως διεκπεραιώνεται από το πρωτεάσωμα, ωστόσο υπάρχει τουλάχιστον μια περίπτωση, όπου ο καταστολέας καταστρέφει ο ίδιος τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγραφή. Αυτή η περίπτωση αφορά την πρωτεΐνη AEBP1 που ανήκει στην πρώτη τάξη

καταστολέων, η οποία έχει ενεργότητα πεπτιδάσης. Εντούτοις, ακόμα παραμένει αδιευκρίνιστο αν είναι ενεργοποιητές ή στοιχεία του PIC αυτά που αποικοδομούνται από την πρωτεΐνη.

Ο καταβολισμός των συνενεργοποιητών επίσης μπορεί να προκαλέσει αναστολή της μεταγραφικής διαδικασίας (K. Gaston, P. S. Jayaraman, 2003).

- ✓ Ρύθμιση του ενδοκυτταρικού εντοπισμού του ενεργοποιητή:



Εικόνα 5: Καταστολή μέσω απόλειας λειτουργίας του ενεργοποιητή. Οι καταστολείς συχνά στοχεύουν ενεργοποιητές και συνενεργοποιητές προς αποικοδόμηση (R1) ή διατηρούν τους ενεργοποιητές σε μη λειτουργικά σύμπλοκα (R2 και R3). Κάποιοι καταστολείς εμποδίζουν τις επαφές μεταξύ ενεργοποιητή και PIC (R4). Άλλοι καταστολείς τροποποιούν τους ενεργοποιητές μετα-μεταφραστικά (R5).

Ένας γνωστός

μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος εμποδίζει τον ενεργοποιητή να μετατοπιστεί από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, είναι ο καταστολέας IκB. Ο IκB αποτρέπει την είσοδο του NFκB στον πυρήνα. Ο τελευταίος είναι ένα ετεροδιμερές, το οποίο αποτελείται από την p50 και την p65, δύο μέλη της οικογένειας ενεργοποιητών Rel. Ο καταστολέας IκB αποκρύπτει τη σηματοδοτική αλληλουχία που οδηγεί τον NFκB στον πυρήνα και ως εκ τούτου ο ενεργοποιητής μένει εκτός πυρηνικού χώρου και αυτό έχει ως συνέπεια την παρεμπόδιση ενεργοποίησης των γονιδίων που ενεργοποιούνται από αυτόν τον παράγοντα.

- ✓ Παρεμπόδιση αντιδράσεων ενεργοποιητή-DNA:

Ένας από τους πρώτους μηχανισμούς καταστολής που μελετήθηκαν ενδελεχώς αφορά τον ανταγωνισμό δύο διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων για το ίδιο ρυθμιστικό στοιχείο. Αυτό το είδος καταστολής είναι αντίστοιχο με αυτό που παρατηρείται όταν οι πρωτεΐνες ανταγωνίζονται με την TBP για την πρόσδεση στο πλαίσιο TATA. Για παράδειγμα, ο Engrailed συναγωνίζεται τον ενεργοποιητή Fushi-taratzu (Ftz) για την ίδια θέση πρόσδεσης, με αποτέλεσμα να καταστέλλει τη μεταγραφή (K. Gaston, P. S. Jayaraman, 2003). Η μετα-μεταφραστική τροποποίηση των ενεργοποιητών δύναται να τους στερήσει την ικανότητα να προσδένονται στο DNA. Για παράδειγμα, κατά τη διαδικασία της μίτωσης, η φωσφορυλίωση της ομοιοεπικράτειας της Oct-1 από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) καταργεί την ικανότητα της Oct-1 να προσδένεται στο DNA και ως εκ τούτου καταστέλλεται και η ενεργοποίηση των γονιδίων που ρυθμίζονται θετικά από την Oct-1 (K. Gaston, P. S. Jayaraman, 2003). Επίσης, πρέπει να αναφερθεί πως αρκετοί καταστολείς

ρυθμίζουν τη μεταγραφή εμποδίζοντας τους ενεργοποιητές να προσδεθούν στο DNA, ωστόσο αυτό δεν γίνεται με μετα-μεταφραστική τροποποίηση του ενεργοποιητή. Αυτός ο τύπος καταστολής περιλαμβάνει συνήθως αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ανάμεσα στον καταστολέα και τον ενεργοποιητή.

✓ Παρεμπόδιση αλληλεπίδρασης ενεργοποιητή-στόχου:

Μεγάλο ποσοστό των καταστολέων της τάξης II προσδένονται στους ενεργοποιητές και δεν τους επιτρέπουν να αλληλεπιδράσουν με τους στόχους τους. Όταν ο καταστολέας προσδέεται στην περιοχή ενεργοποίησης, τότε αυτός ο τύπος καταστολής συχνά αναφέρεται και ως απόκρυψη (masking). Η απόκρυψη αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά στη ζύμη και συγκεκριμένα στην πρωτεΐνη-καταστολέα GAL80, η οποία στοχεύει και προσδέεται απευθείας στον ενεργοποιητή GAL4 (K. Gaston, P. S. Jayaraman, 2003). Η απόκρυψη στην περιοχή ενεργοποίησης ως μηχανισμός καταστολής έχει προταθεί τουλάχιστον για άλλες 3 πρωτεΐνες-καταστολείς της δεύτερης τάξης. Η πρωτεΐνη Rb αλληλεπιδρά με τον ενεργοποιητή E2F και αποκρύπτει την περιοχή ενεργοποίησης του. Ομοίως δρα η MDM2 στην περιοχή ενεργοποίησης της p53 και τρίτον, η πρωτεΐνη-καταστολέας PHO80 της ζύμης πιθανολογείται πως δρα με τον ίδιο τρόπο στην περιοχή ενεργοποίησης της PHO4 (K. Gaston, P. S. Jayaraman, 2003). Όταν οι καταστολείς της πρώτης τάξης παρεμποδίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός ενεργοποιητή που προσδέεται στο DNA και ενός ή περισσοτέρων στοιχείων του PIC, τότε αυτό το φαινόμενο συχνά ονομάζεται ως «απομόνωση» (quenching).

✓ Μετά-μεταφραστική τροποποίηση του ενεργοποιητή ή του συνενεργοποιητή:

Είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίο η φωσφορυλίωση και η ακετυλίωση ρυθμίζουν την ικανότητα ενός ενεργοποιητή να προσδέεται στο DNA. Εντούτοις, σε αρκετές περιπτώσεις, οι καταστολείς τροποποιούν τους ενεργοποιητές μετά-μεταφραστικά και εξαιτίας αυτού του γεγονότος, παρεμποδίζονται αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Αυτές οι μεταβολές λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες, οι οποίοι μπορούν πολύ γρήγορα να ρυθμίσουν την μεταγραφή μιας ομάδας γονιδίων. Η γλυκοσυλίωση και η αποακετυλάσες μεταγραφικών παραγόντων επίσης μπορούν να εμποδίσουν την ενεργοποίηση. Μετά-μεταφραστική τροποποίηση ενός συνενεργοποιητή, μπορεί επίσης να δράσει ως μοριακός διακόπτης, ο οποίος ρυθμίζει μια συγκεκριμένη ομάδα γονιδίων (K. Gaston and P. S. Jayaraman, 2003).

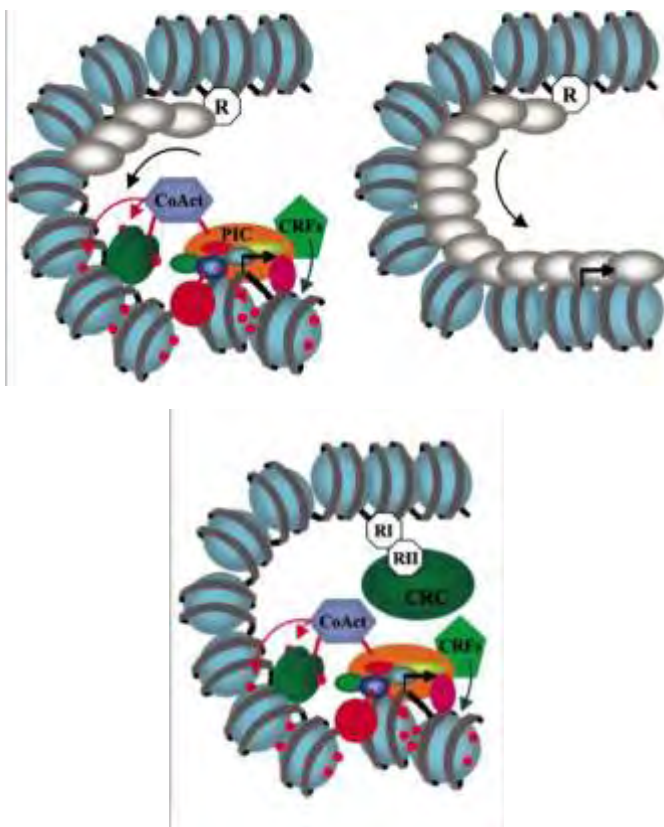
✓ Καταστολή μέσω στρατολόγησης παραγόντων που αναδιαμορφώνουν τη χρωματίνη:

Το ευκαρυωτικό γονιδίωμα είναι διαμορφωμένο σε ένα σύμπλεγμα, το οποίο ονομάζεται χρωματίνη και αποτελείται από DNA και πρωτεΐνες. Αρχικά, το DNA περιτυλίγεται γύρω από κάποιες συγκεκριμένες πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται ιστόνες και είναι οι H2A, H2B, H3 και H4 προς σχηματισμό νουκλεοσωμάτων. Η χρωματίνη φαίνεται να διαχωρίζεται σε δύο τύπους: την ευχρωματίνη και την ετεροχρωματίνη. Η ευχρωματίνη περιέχει τα περισσότερα γονίδια που εκφράζονται στο κύτταρο ενώ αντίθετα η ετεροχρωματίνη αποτελείται από ιδιαίτερα συσπειρωμένες περιοχές χρωματίνης, στις οποίες βρίσκεται πολύ μικρός αριθμός ενεργών γονιδίων.

Η αλλαγή της δομής της χρωματίνης προς μία κατασταλτική μορφή μπορεί να οφείλεται σε μεταβολές στην κατάσταση των ιστονών. Υπάρχουν αρκετά διαφορετικά είδη ενζύμων, τα οποία τροποποιούν τις ιστόνες όπως για παράδειγμα οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (HATs), οι απακετυλάσες των ιστονών (HDACs), οι μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών (HMTs), οι κινάσες των ιστονών όπως επίσης και ένζυμα που ουβικουτιώνουν τις ιστόνες. Γενικά, η ενεργοποίηση της μεταγραφικής διαδικασίας συνδέεται με την ακετυλίωση των ιστονών, όταν το αντίθετο γεγονός, δηλαδή η καταστολή της μεταγραφής σχετίζεται στενά με την απακετυλίωσή τους.

. Οι τροποποιήσεις των ιστονών όπως για παράδειγμα η ακετυλίωσή τους, πιθανότατα αλλάζουν άμεσα τη δομή της χρωματίνης μέσω της μεταβολής του μεγέθους του φορτίου στα αμινοτελικά άκρα των ιστονών. Επιπλέον, οι μεταβολές που παρατηρούνται στη δομή της χρωματίνης μετά από τροποποιήσεις των ιστονών δύναται να οφείλονται σε μια ειδική κατηγορία πρωτεϊνών, η οποία προσδένεται πάνω στη χρωματίνη. Αλλαγές στη δομή της χρωματίνης μπορούν επίσης να επιφέρουν κάποιες πρωτεΐνες, οι οποίες επηρεάζουν τις επαφές μεταξύ νουκλεοσώματος και DNA αλλά και ανάμεσα στα νουκλεοσώματα χωρίς ωστόσο να μεταβάλλουν τις ιστόνες.

Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η πυριμιδίνη κυτοσίνη μέσα στο δινουκλεοτίδιο CpG είναι πολύ συχνά μεθυλιωμένη και αυτό το γεγονός παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης και στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Είναι γνωστό πως η ετεροχρωματίνη είναι μεθυλιωμένη σε πολύ μεγάλο βαθμό σχεδόν σε όλη την έκταση της, ενώ στην ευχρωματίνη εναλλάσσονται οι μεθυλιωμένες και οι μη μεθυλιωμένες περιοχές.



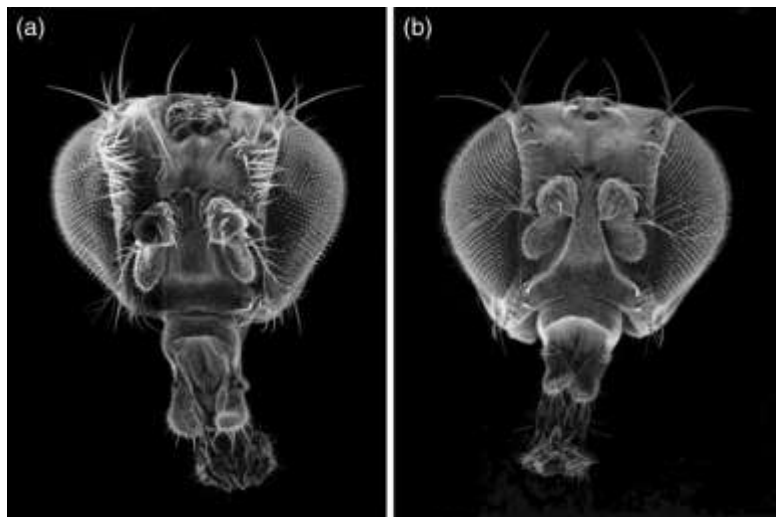
Εικόνα 6: Καταστολή μέσω της στρατολόγησης παραγόντων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Α) Ένα μοντέλο, το οποίο παρουσιάζει με ποιο τρόπο οι καταστολείς πιθανότατα στρατολογούν πρωτεΐνες που προσδένονται στη χρωματίνη (γκρι οβάλ), οι οποίες και ολιγομερίζονται και εκτείνονται κατά μήκος της χρωματίνης. Β) Ένα μοντέλο, το οποίο δείχνει πως οι καταστολείς της τάξης I (R I) μπορούν να στρατολογήσουν καταστολείς της τάξης II (R II), οι οποίοι είναι στοιχεία των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (CRCs). Τα CRCs επιφέρουν απακετυλίωση και μεθυλίωση των ιστονών (μπλε τελείες) με τη βοήθεια HDAC και HMT αντίστοιχα.

Η διαδικασία της μεθυλίωσης του DNA πραγματοποιείται από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DMTs) και συμβαίνει στις κυτοσίνες των δινουκλεοτιδίων CpG και των δύο

αλυσίδων του γενετικού υλικού. Πολλές μελέτες συνδέουν τη μεθυλίωση του DNA και την τροποποίηση των ιστονών με την καταστολή της μεταγραφικής διαδικασίας. Η μεθυλίωση των CpG μπορεί άμεσα να εμποδίσει την πρόσδεση των ενεργοποιητών και επομένως να επιφέρει την καταστολή. Επιπλέον, η μεθυλίωση αυτή μπορεί να προκαλέσει αλλαγή στη διαμόρφωση της χρωματίνης και να προσελκύσει πρωτεΐνες που προσδένονται πάνω στα CpG εμποδίζοντας έτσι έμμεσα την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων. Έχουν περιγραφεί αρκετές τέτοιες πρωτεΐνες, οι οποίες ανταγωνίζονται τους μεταγραφικούς παράγοντες ως προς τη πρόσδεση τους πάνω στις CpG μεθυλιωμένες περιοχές (K. Gaston and P. S. Jayaraman, 2003).

1.7 Η οικογένεια συγκαταστολέων Groucho/ TLEs

Το γονίδιο *groucho* (*gro*) της *Drosophila melanogaster* ταυτοποιήθηκε το 1968 και έχει καταγραφεί ως το πρωτότυπο μέλος της οικογένειας συγκαταστολέων Groucho/ TLE (Lindsley and Grell, 1968). Τα μεταλλάγματα *groucho*, τα οποία επηρεάζουν την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος της *Drosophila*, φέρουν πάνω από τα μάτια πυκνές αισθητήριες τρίχες και λόγω του παραλληλισμού του φαινοτύπου αυτού με τα πυκνά φρύδια του κωμικού ηθοποιού Marx Groucho, το εν λόγω γονίδιο ονομάστηκε *groucho* (Fisher and Caudy, 1998), Εικόνα 7 (Parkhurst, 1998) και Εικόνα 8 (www.ucl.ac.uk/cancer/rescancerbiol/transcripregulation).



Εικόνα 7: Ο φαινότυπος *groucho*. (a) Ομόζυγες μεταλλαγμένες μύγες για το *groucho*. (b) Μύγες αγρίου τύπου (Parkhurst, 1998).



Εικόνα 8: (αριστερά) *Drosophila melanogaster* αγρίου τύπου, (δεξιά) *Drosophila* με μετάλλαξη *groucho* (www.ucl.ac.uk/cancer/rescancerbiol/transcripregulation)

Ένας ιδιαίτερα μεγάλος αριθμός ομόλογων πρωτεϊνών του *groucho* έχει εντοπιστεί στα περισσότερα μετάζωα. Αξίζει να σημειωθεί δε, ότι δεν υπάρχουν ομόλογα του *groucho* σε φυτά, μύκητες ή πρωτόζωα (Chen and Courey, 2000). Τα ομόλογα του *groucho* στα θηλαστικά

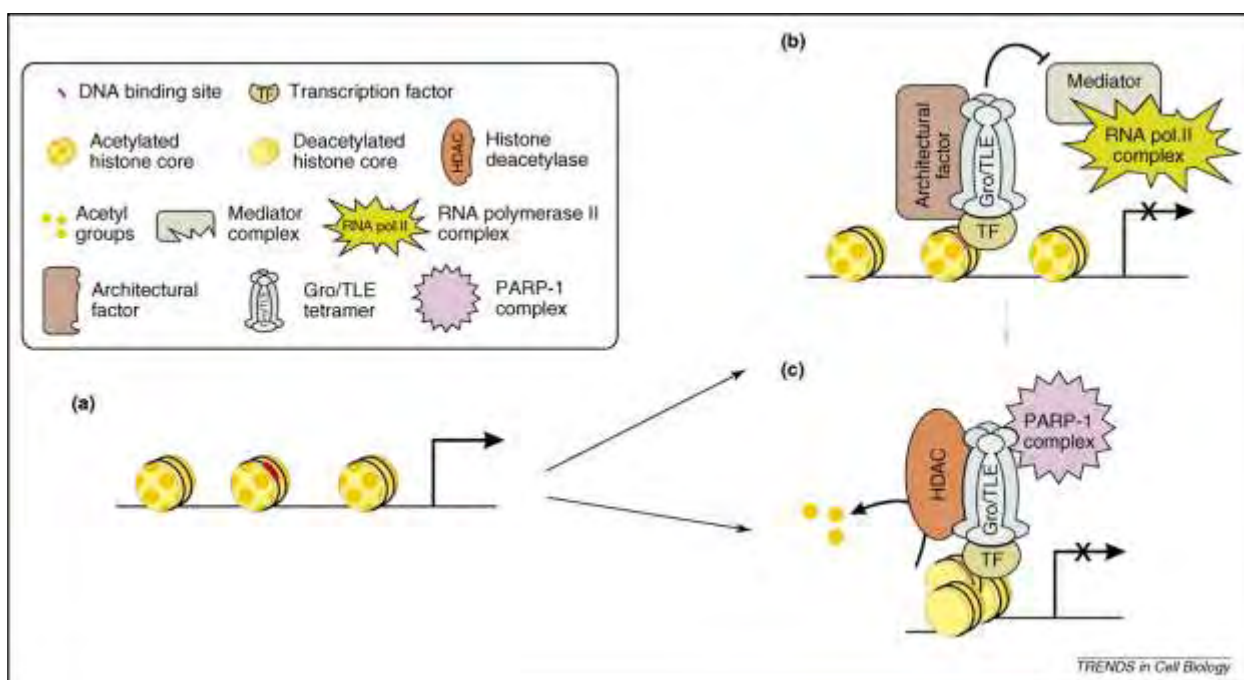
ονομάστηκαν TLEs (Transducin-Like Enhancer of split) και εντοπίστηκαν το 1992 (Buscarlet and Stifani, 2007) αν και όταν απομονώθηκαν από τον ποντικό είχαν ονομαστεί Grg (Gro-related gene) (Mallo et. al, 1993). Στον *C.elegans* το ομόλογο πρωτεϊνικό προϊόν του *groucho*, ονομάζεται unc-37 (Pflugrad et. al, 1997). Η ονομασία TLE (Transducin-Like Enhancer of split) προέκυψε λόγω της δομικής ομοιότητας των πρωτεϊνών της οικογένειας (Buscarlet and Stifani, 2007) με την υπομονάδα β μιας ετεροτριμερούς πρωτεΐνης G της τρανσδουσίνης σε συνδυασμό με τη συμμετοχή των Groucho/TLE στο σύμπλεγμα E(spl) (Enhancer of split complex) (Stifani et. al, 1992; Hartley et. al, 1988). Ενδεικτικά, αναφέρεται πως η *Drosophila* και ο *C. elegans* φέρουν από ένα μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Groucho/TLE, η *Ciona* δύο μέλη, τα πτηνά, ο ποντικός και ο άνθρωπος από τέσσερα μέλη ενώ οι τελεόστεοι ιχθύες έξι μέλη (Bajoghli, 2007).

Η οικογένεια συγκαταστολέων Groucho/TLE λαμβάνει μέρος σε ένα μεγάλο αριθμό αναπτυξιακών διαδικασιών όπως είναι για παράδειγμα ο καθορισμός του φύλου, η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, η πλευρική αναστολή, ο καθορισμός του εμπροσθοπίσθιου άξονα, η ανάπτυξη του οφθαλμού και η δημιουργία ασυμμετρίας μεταξύ δεξιάς και αριστερής πλευράς (Chen and Courey, 2000). Η συμμετοχή αυτών των συγκαταστολέων σε τόσες πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες πιθανότατα σημαίνει και συμμετοχή σε πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών με κυριότερα αυτών τα Notch, Wingless/Wnt και Dpp/BMP/TGF- β . Υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις πως απουσία ελέγχου της έκφρασης των μελών της οικογένειας Groucho/TLE στον άνθρωπο, είναι πιθανό να προκληθούν νεοπλασματικές παθήσεις και καρκινογένεση (Buscarlet and Stifani, 2007).

1.8 Μηχανισμοί δράσης Groucho/TLEs

Έχει πλέον αποδειχθεί πως οι πρωτεΐνες της Gro/TLE οικογένειας ασκούν τη δράση τους ως συγκαταστολείς. Αυτό σημαίνει πως δεν έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν και να συνδέονται με το DNA άμεσα αλλά στρατολογούνται από διαφορετικές οικογένειες καταστολέων που διαθέτουν επικράτεια πρόσδεσης στο DNA και αυτοί τους κατευθύνουν στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων στόχων. Επειδή, αυτοί οι συγκαταστολείς εκφράζονται ευρέως, υπήρχε η άποψη πως η καταστολή που σχετίζεται με αυτή την οικογένεια ρυθμιζόταν μόνο από τη χωρική και χρονική κατανομή των συνοδών καταστολέων. Πρόσφατα διαπιστώθηκε, ότι η καταστολή που επάγεται από αυτούς τους συγκαταστολείς είναι αυτορυθμιζόμενη και εξαρτάται από τις εκάστοτε συνθήκες που επικρατούν στο χώρο (Cinnamon and Paroush, 2008).

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα δράσης με τα οποία οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας επιφέρουν καταστολή της μεταγραφής. Αυτά τα μοντέλα, τα οποία πιθανότατα πολλές φορές συνεργάζονται, περιλαμβάνουν άμεση ή έμμεση τροποποίηση της χρωματίνης ή αλληλεπιδράσεις με τη βασική μεταγραφική συσκευή (Εικόνα 9),(Buscarlet and Stifani, 2007). Ένας ενεργός υποκινητής μπορεί να κατασταλεί από τους συγκαταστολείς Gro/TLEs με δύο μηχανισμούς, οι οποίοι πιθανότατα συνεργάζονται (Εικ.9α). Στη μια περίπτωση (b) οι Gro/TLEs, αλληλεπιδρούν με κάποιο μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος συνδέεται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία πάνω στο γενετικό υλικό και στη συνέχεια κατευθύνονται και προσδένονται στον υποκινητή, όπου αλληλεπιδρούν με τον παράγοντα TFIIIE, ο οποίος αποτελεί τμήμα της βασικής μεταγραφικής συσκευής και με σύμπλοκο του mediator, το οποίο είναι μια πολυπρωτεϊνική δομή που συνδέεται με την καρβοξυτελική περιοχή της μεγαλύτερης υπομονάδας της RNA pol II. Αυτές οι συνδέσεις



Εικόνα 9: Μηχανισμοί δράσης των συγκαταστολέων Gro/TLEs.

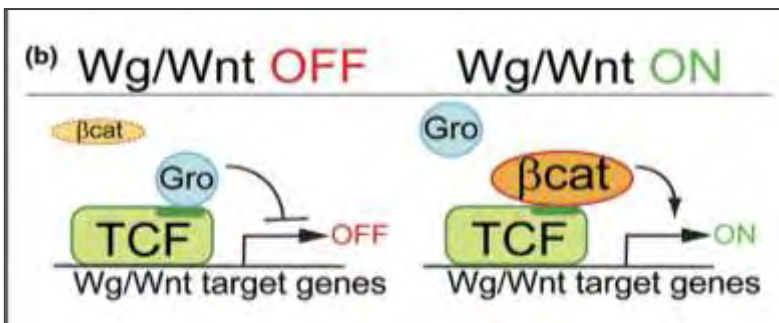
μπορεί να σταθεροποιούνται από άλλους παράγοντες και ίσως παρεμβάλλονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενεργοποιητών της μεταγραφής και του συμπλόκου mediator, επιφέροντας με αυτό τον τρόπο την καταστολή της μεταγραφής. Εναλλακτικά οι συγκαταστολείς Gro/TLEs συνδέονται στο DNA ως τμήματα ενός μεγάλου συμπλέγματος. Ανάλογα με την ταυτότητα των γονιδίων στόχων, αυτά τα σύμπλοκα καταστολέων μπορεί να περιλαμβάνουν αποακετυλάσες (HDACs) και πιθανότατα άλλους παράγοντες που προσδένονται σε αυτές. Αυτοί οι συγκαταστολείς πιθανότατα να αλληλεπιδρούν και με άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης και τη ρύθμιση της μεταγραφής. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι η τοποισομεράση IIβ, νουκλεολίνη, νουκλεοφοσμίνη και η poly (ADP-ribose) πολυμεράση-1 (PARP-1). Υπάρχουν ενδείξεις πως αυτά τα μεγάλα σύμπλοκα καταστέλλουν τη μεταγραφή είτε μέσω τροποποιήσεων της κατάστασης ακετυλίωσης των ιστονών είτε μέσω μηχανισμών αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (Buscarlet and Stefani, 2007).

1.9 Οι πρωτεΐνες Groucho/TLEs και σηματοδοτικά μονοπάτια

1.9.1 Οι πρωτεΐνες Groucho/TLEs και το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt

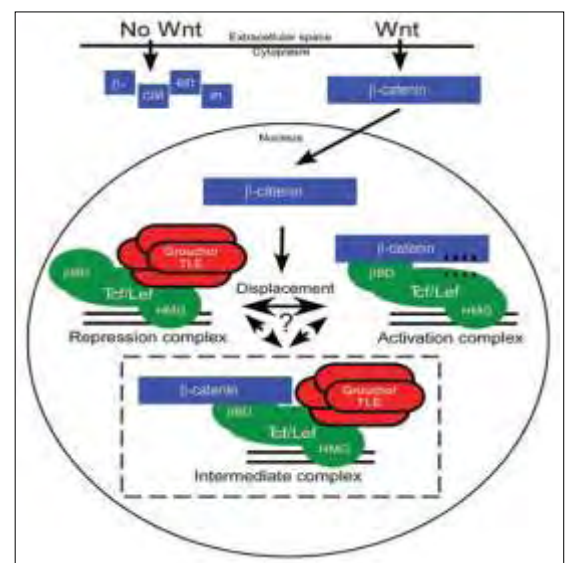
Οι αναπτυξιακοί παράγοντες του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt μεσολαβούν για τον καθορισμό της ταυτότητας των κυττάρων κατά την εμβρυογένεση και έχουν συμβολή και στην ανανέωση των ιστών στα ενήλικα άτομα. Στο κανονικό μονοπάτι Wnt, η ενεργοποίηση οδηγεί στη σταθεροποίηση των επιπέδων συγκέντρωσης του συνενεργοποιητή β-κατενίνη, ο οποίος μετατοπίζεται στον πυρήνα και σχηματίζει σύμπλοκα με τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας Tcf/Lef. Απουσία β-κατενίνης, οι Tcf/Lefs λειτουργούν ως καταστολείς της μεταγραφής και προσδένονται στις Gro/TLEs πρωτεΐνες (Daniels and Weis, 2005).

Πιο αναλυτικά, αν το μονοπάτι Wnt είναι απενεργοποιημένο, τότε η β-κατενίνη φωσφορυλιώνεται και αποικοδομείται. Κατά τη σηματοδότηση μέσω του κανονικού μονοπατιού Wnt, η φωσφορυλίωση της β-κατενίνης παρεμποδίζεται, αυτή σταθεροποιείται στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια εισέρχεται στον πυρήνα όπου σχηματίζει σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες Tcf/Lef, οι οποίες προσδένονται στο DNA με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού. Οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει πως η ενεργοποίηση της μεταγραφής από το σύμπλοκο β-κατενίνη/Tcf, μπορεί να εμποδιστεί από την προσθήκη κατάλληλης συγκέντρωσης Gro/TLE. Τα πειράματα απέδειξαν πως η β-κατενίνη και ο TLE ανταγωνίζονται για την πρόσδεση στο Lef-1 σε μια θέση στην καρβοξυτελική περιοχή του (Daniels and Weis, 2005).



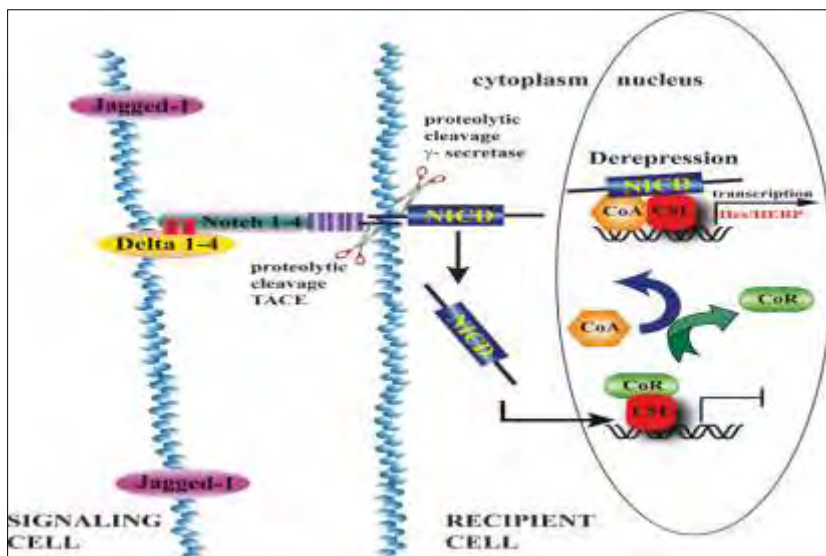
Εικόνα 10: Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt και οι Gro/TLEs (Cinnamon and Paroush, 2008).

Εικόνα 11: Ενεργοποίηση της μεταγραφής από τη β-κατενίνη (Daniels and Weis, 2005).



1.9.2 Η οικογένεια Groucho/TLEs, πλευρική αναστολή και το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch στη *Drosophila*

Η σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων Notch αποτελεί έναν εξελικτικά παλιό μηχανισμό διακυτταρικής επικοινωνίας, ο οποίος παίζει θεμελιώδη ρόλο στις αναπτυξιακές διαδικασίες των πολυκύτταρων οργανισμών. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών κυττάρων μέσω των υποδοχέων Notch ενισχύουν και κατευθύνουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών, ώστε τελικά να κατευθύνουν και το πεπρωμένο τους. Εκτός από την κυτταρική διαφοροποίηση, η δράση του Notch επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, παρέχοντας στον οργανισμό ένα κύριο αναπτυξιακό «εργαλείο» για το σχηματισμό των οργάνων και τη μορφοποίηση του.

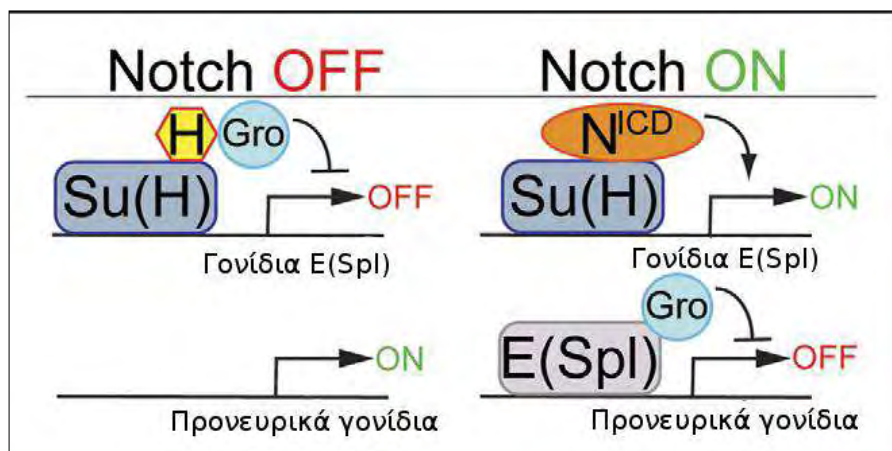


Εικόνα 12: Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch (Ang and Tergaonkar, 2007).

Ο υποδοχέας Notch είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 300 kDa, η οποία διαπερνά μόνο μια φορά την κυτταρική μεμβράνη. Ένας σχετικά μικρός αριθμός ουσιών αποτελεί τον «πυρήνα» των μορίων που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις της σηματοδότησης του Notch. Οι προσδέτες (μόρια ενεργοποιητές) του υποδοχέα Notch ανήκουν στην ομάδα DSL Ligand (Delta-Serrate-LAG). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι επίσης διαμεμβρανικές ενώ διαπερνούν και αυτές μόνο μια φορά την κυτταρική μεμβράνη. Μετά την αλληλεπίδραση τους, το ενδοκυτταρικό τμήμα του Notch, NICD (NotchIntraCellularDomain), αποκόπτεται από μια πρωτεάση και μετατοπίζεται στον πυρήνα. Οι κύριοι τελεστές (effector) του μονοπατιού Notch είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες που ανήκουν στην οικογένεια CSL (CBF-Su(H)-Lag). Ο κύριος στόχος αυτών των μεταγραφικών παραγόντων είναι τα γονίδια [E (spl)] (Enhancer of split), υπεύθυνα για την παραγωγή πρωτεϊνών Hes, οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν αρνητικά τη δράση προνευρικών γονιδίων, με αποτέλεσμα την αναστολή της νευρικής μοίρας του αδιαφοροποίητου κυττάρου (Zifa A., 2008).

Η διαδικασία κατά την οποία η σηματοδότηση Notch διατηρεί την ισορροπία μεταξύ του αριθμού των νεοσχηματιζόμενων νευρώνων και του αριθμού των εναπομεινάντων πρόδρομων κυττάρων είναι γνωστή ως 'πλευρική αναστολή' (lateral inhibition) (Beatus and Lendahl, 1998). Οι νεοσχηματιζόμενες E(spl)/HES πρωτεΐνες στρατολογούν τους συγκαταστατολείς Gro/TLEs και μαζί εμποδίζουν το προνευρικό δυναμικό του αδιαφοροποίητου κυττάρου μέσω καταστολής της έκφρασης των προνευρικών γονιδίων. Κατά συνέπεια, το ενεργό σηματοδοτικό μονοπάτι Notch εν συνεχεία, κατευθύνει τους υποψήφιους νευρώνες προς μια επιδερμική μοίρα. Απουσία όμως, είτε

των Groucho/TLEs είτε των E(spl)/HES καταστολέων, η σηματοδότηση μέσω Notch δεν είναι αποτελεσματική και ως εκ τούτου σχηματίζονται υπεράριθμοι νευροβλάστες (Bray S., 1998 ; Lewis J, 1998 ; Simpson P., 1990). Απουσία ενεργοποιημένης Notch στη *Drosophila*, η πρωτεΐνη Groucho σχηματίζει ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο περιλαμβάνει την πρωτεΐνη Su (H), την πρωτεΐνη προσαρμογέα Hairless (H) και τον συγκαταστολέα CtBP. Το εν λόγω σύμπλοκο καταστέλλει την έκφραση των καταστολέων E(spl)/HES (Nagel et. al, 2005 and Barolo et. al, 2002). Στην περίπτωση όμως κατά την οποία ο Notch υποδοχέας είναι ενεργός, το τμήμα NICD αλληλεπιδρά με το Su(H), αντικαθιστώντας στο προαναφερθέν σύμπλοκο τις πρωτεΐνες Hairless-Groucho-CtBP. Έπειτα από αυτή την αντικατάσταση, το σύμπλοκο NICD-Su(H) επάγει την έκφραση των γονιδίων E(spl)/HES. Ακολούθως, οι καταστολείς E(spl)/HES προσδένουν τους Gro/TLEs συγκαταστολείς καταστέλλοντας την έκφραση των προνευρικών γονιδίων.

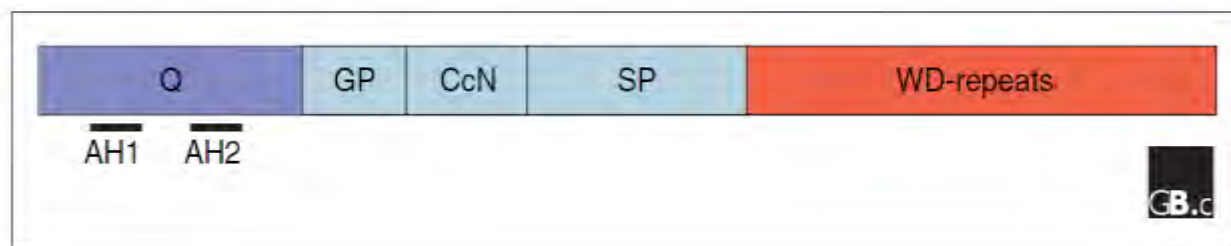


Εικόνα 12: Notch σηματοδοτικό μονοπάτι και Gro/TLEs (τροποποιημένη, Cinnamon and Paroush, 2008).

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, η Groucho απαιτείται τόσο για την ενεργή όσο και για την ανενεργή κατάσταση του μονοπατιού Notch. Αυτό το επιτυγχάνει δρώντας σε συνδυασμό με διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Cinnamon and Paroush, 2008).

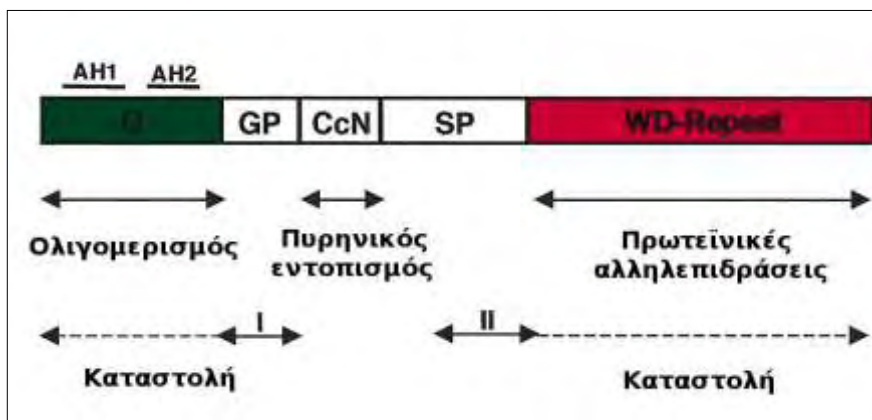
1.10 Η δομή των πρωτεϊνών της οικογένειας Groucho/TLEs

Η βασική δομή της οικογένειας συγκαταστολέων Gro/TLEs περιλαμβάνει πέντε εξελικτικά συντηρημένες περιοχές, οι οποίες κατά σειρά από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο είναι οι εξής: Q, GP, CcN, SP και WD. Από αυτές τις επικράτειες, οι πιο υψηλά συντηρημένες και οι πιο εκτενώς χαρακτηρισμένες είναι η αμινοτελική περιοχή Q και η καρβοξυτελική περιοχή WD (Εικόνες 13, 14, 15), (Jennings and Horowicz, 2008).

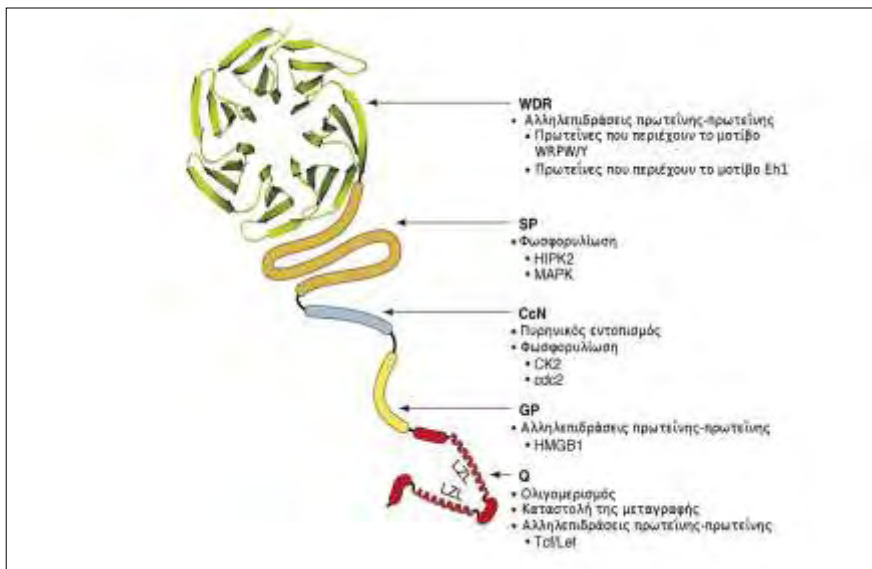


Εικόνα 13: Οι δομικές επικράτειες των Gro/TLEs συγκαταστολέων (Jennings and Horowicz, 2008).

Η επικράτεια Q, η οποία είναι πλούσια σε κατάλοιπα γλυκίνης, είναι υπεύθυνη για τον όμο ή έτερο τετραμερισμό των Gro/TLEs. Η επικράτεια Q φέρει δύο μοτίβα φερμουάρ λευκίνης (LZL motifs), σχηματίζοντας δομές σπειρωμένων σπειραμάτων (coiled-coil). Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί πως τα μοτίβα LZL σχηματίζουν σε κάθε επικράτεια Q δύο αμφιπαθείς α-έλικες (AH1 και AH2), οι οποίες είναι διευκολύνουν τον τετραμερισμό των Gro/TLEs και την πρόσδεση τους σε διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες όπως είναι ο Lef1/Tcf, FoxA και C-Myc (Orlan A. et al. 2007 ; Daniels DL. et al. 2005 ; Sekiya T. et al. 2007). Η επικράτεια GP, η οποία είναι πλούσια σε κατάλοιπα γλυκίνης και προλίνης αλλά είναι και από τις λιγότερο συντηρημένες περιοχές, έχει προταθεί πως έχει ικανότητα καταστολής της μεταγραφής και αυτό το επιτυγχάνει στρατολογώντας απακετυλάσες των ιστονών (Chen et al. 1999). Η κεντρική επικράτεια CcN (CcN domain) περιέχει σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) αλλά και θέσεις φωσφορυλίωσης με πιθανό ρυθμιστικό ρόλο, οι οποίες αναγνωρίζονται από τις κινάσες CK2 και cdc2. Από τα αρχικά δε, των CK2, cdc2 και NLS, ονομάστηκε επικράτεια CcN (Stifani S. et al. 1992). Η επικράτεια SP (Serine-Proline rich domain) πιθανότατα συμμετέχει στη ρύθμιση της κατασταλτικής ικανότητας των Gro/TLEs. Περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης, οι οποίες δρουν αρνητικά στην κατασταλτική ικανότητα αυτών των συγκαταστολέων (Chen and Courey, 2000). Η επικράτεια WD (WD-Trp-Asp repeat domain) είναι η πιο συντηρημένη περιοχή των Gro/TLEs. Περιλαμβάνει επτά επαναλαμβανόμενες μονάδες επαναλήψεων WD, όπου κάθε μια αποτελείται από τέσσερις αντιπαράλληλους β-κόνους. Η δομή της επικράτειας μοιάζει με κώνο και ονομάζεται β-προπέλα. Η επικράτεια WD μέσω της δομής της β-προπέλας δίνει τη δυνατότητα στους Gro/TLEs να αλληλεπιδρούν με έναν μεγάλο αριθμό μεταγραφικών παραγόντων, κατά βάση καταστολέων.



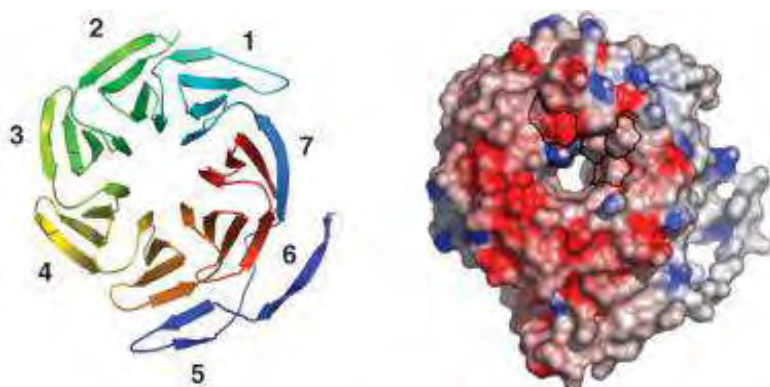
Εικόνα 14: Οι ιδιότητες των επικρατειών των συγκαταστολέων Gro/TLEs (τροποποιημένη, Chen and Courey, 2000).



Εικόνα 15: Δομή και λειτουργία των Gro/TLEs (τροποποιημένη, Buscarlet and Stefani, 2007).

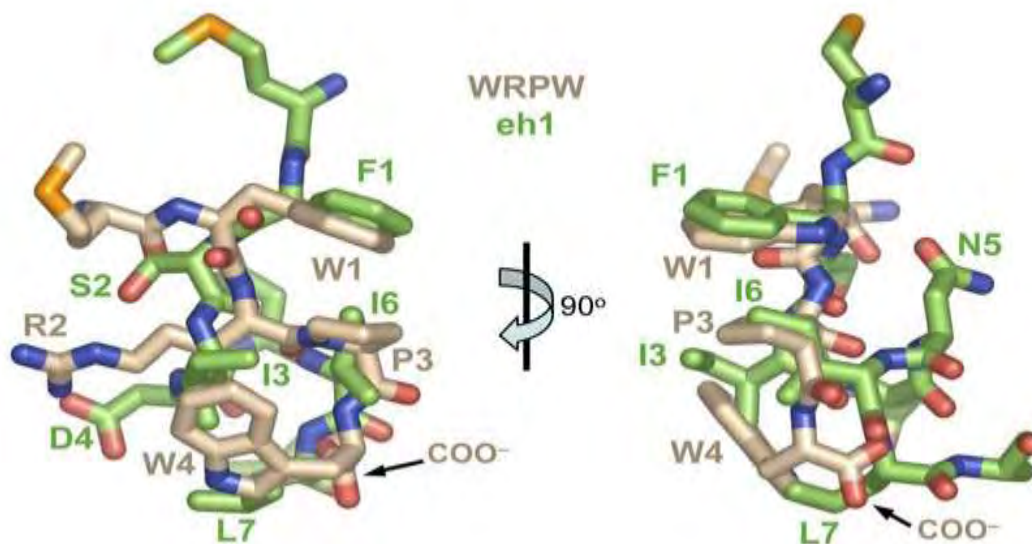
1.11 Μοτίβα αλληλεπίδρασης με τις επικράτειες των Gro/TLEs

Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών, οι οποίες στρατολογούν τους Gro/TLEs συγκαταστολείς και φέρουν επικράτεια πρόσδεσης στο DNA, αλληλεπιδρούν με την επικράτεια WD (Εικ. 16).



Εικόνα 16: Η επικράτεια WD (τροποποιημένη, Buscarlet and Stefani, 2007).

Οι περισσότερες από αυτές κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες ανάλογα με την αλληλουχία πρόσδεσης τους στους Gro/TLEs. Η πρώτη ομάδα αλληλεπιδρά με τους συγκαταστολείς μέσω μιας τετραπεπτιδικής αλληλουχίας WRPW (Trp-Arg-Pro-Trp) ή παραλλαγών αυτής. Οι πρωτεΐνες της δεύτερης ομάδας χρησιμοποιούν το μοτίβο Eh-1 (Engrailed homology-1). Τα πεπτίδια WRPW και Eh-1 (Εικ. 17, FxIxIL, όπου x= οποιοδήποτε αμινοξύ) έχουν διαφορετική δομή και προσδέονται στην επικράτεια WD των Gro/TLEs σε διακριτές αλλά αλληλεπικαλυπτόμενες θέσεις κατά μήκος του κεντρικού πόρου της β-προπέλας (Jennings, et al. 2006).



Εικόνα 17: WRPW και eh-1 μοτίβα (Jennings, et al. 2006).

Η πρόσδεση του WRPW στην επικράτεια WD των Groucho/TLEs δίνει πιο σταθερή δομή συγκριτικά με την πρόσδεση του Eh-1. Και τα τέσσερα αμινοξικά κατάλοιπα του πεπτιδίου WRPW

αλληλεπιδρούν με κατάλοιπα της επικράτειας WD των Groucho/TLEs. Επίσης, το πεπτίδιο WRPW όταν συνδεθεί στην επικράτεια WD των Gro/TLEs, παίρνει διαμόρφωση β-κλώνου. Το πεπτίδιο Eh-1 (FxIxxIL, όπου x= οποιοδήποτε αμινοξύ) είναι μεγαλύτερο από το πεπτίδιο WRPW και είναι δυσκολότερο να εντοπιστεί, καθώς περισσότερα από τα μισά του αμινοξέα δεν έχουν καθοριστεί. Επιπλέον, το Eh-1 όταν προσδεθεί στην επικράτεια WD σχηματίζει αμφιπαθή α-έλικα (Jennings, et al. 2006). Το μοτίβο WRPW αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στον καταστολέα Hairy της *Drosophila* και στα μέλη της οικογένειας E (spl) των θηλαστικών (Paroush, et al.1994). Το Eh-1 ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στις πρωτεΐνες που φέρουν ομοιοεπικράτεια, Engrailed (En) και Goosecoid (Gsc) (Smith and Jaynes, 1996).

1.12 Gro/TLEs και καρκίνος

Από τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι και σήμερα πάνω στην έκφραση των συγκαταστολέων Gro/TLE του ανθρώπου, έχει παρατηρηθεί πως σε αρκετές κακοήθειες, μεταξύ αυτών του τραχήλου της μήτρας αλλά και του καρκίνου του παχέος εντέρου, τα επίπεδα συγκέντρωσης αυτών των πρωτεϊνών είναι αυξημένα. Αυτές οι αλλαγές συσχετίζονται με τη ρύθμιση κάποιων άλλων στοιχείων του μονοπατιού του Notch και πιθανόν αυτή η απορύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του Notch συμβάλλει σημαντικά στη δημιουργία των νεοπλασιών (Zagouras P et.al, 1995 ; Liu Y et.al, 1996). Αυτή η υπόθεση έρχεται να συμφωνήσει με την αποδεδειγμένη σχέση του μονοπατιού Notch με συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, όπως η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία των T-κυττάρων στον άνθρωπο, ο καρκίνος του μαστικού αδένου και των σιελογόνων αδένων στον ποντικό (Bray S.J, 2006 ; Sundaram M.V, 2005). Πρέπει να δοθεί έμφαση στο γεγονός πως η σηματοδότηση μέσω Notch εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και λειτουργεί ως ογκοκαταστολέας στο δέρμα, αποδεικνύοντας έτσι ότι οι συνέπειες αυτού του μονοπατιού εξαρτώνται από τις συνθήκες του χώρου δράσης του. Αξίζει να σημειωθεί πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Notch και Ras σηματοδοτικών μονοπατιών ίσως να παίζουν καθοριστικό ρόλο για το αν οι μετατροπές που υπόκεινται αυτοί οι μηχανισμοί αποκτούν ογκογόνο χαρακτήρα. Οι συγκαταστολείς Gro/TLEs ενδέχεται να βρίσκονται στο σημείο σύνδεσης αυτών των δύο μονοπατιών κατά τη διάρκεια αναπτυξιακών διαδικασιών, γεγονός που υποδηλώνει πως είναι πολύ σημαντικό να διασαφηνιστούν οι σχέσεις μεταξύ της έκφρασης και ενεργότητας των Gro/TLEs, Notch και Ras σηματοδοτικών μονοπατιών στους ανθρώπινους όγκους.

Το αστροκυττάρωμα τύπου 1 αποτελεί το πιο κοινό τύπου καρκίνου του εγκεφάλου. Σε αυτή τη παθολογική κατάσταση παρατηρείται υπερέκφραση του συγκαταστολέα Gro/TLE2 όπως και του ASCL1 (Achaete scute complex-like 1). Η έκφραση του ASCL1 διακόπτεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch μέσω συμπλόκων Hes:Gro/TLEs. Αυτό πιθανότατα σημαίνει πως τα επίπεδα του ASCL1 μπορούν να μειωθούν αν αυξηθεί η έκφραση των Gro/TLEs (Ju B.G, et. al, 2004).

Τα μηνιγγειώματα συγκαταλέγονται στους πιο συχνούς όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος (Hartmann et. al, 2006). Στη συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρούνται ανωμαλίες στη ρύθμιση του TLE2 και TLE3. Επίσης υπάρχουν και άλλοι παράγοντες του Notch μονοπατιού σε

υψηλότερες από το φυσιολογικό συγκεντρώσεις όπως είναι ο Notch 1, Notch 2 και Hes 1. Έχει παρατηρηθεί δε, ότι όσο πιο αυξημένη είναι η έκφραση των Gro/TLEs τόσο πιο επιζήμιος είναι ο φαινότυπος. Τα παραπάνω στοιχεία προδίδουν πως τα προβλήματα στη φυσιολογική έκφραση κάποιων στοιχείων του Notch αποτελούν καθοριστικό παράγοντα στην παθογένεση του μηνιγγειώματος (Cuevas et. al, 2005).

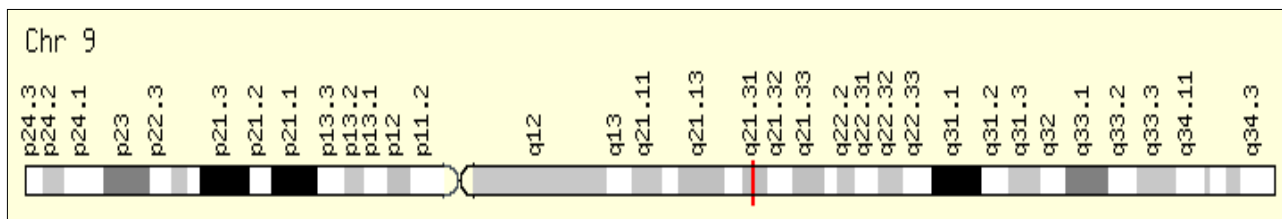
Στο αδένωμα της υπόφυσης τώρα ανιχνεύονται υψηλές συγκεντρώσεις των TLE2 και TLE4 συγκαταστολέων, απορύθμιση του μονοπατιού Notch καθώς και μειωμένα επίπεδα του ASCL1 (Moreno et. al, 2005 and Ruebel et. al, 2006).

Το αδenoκαρκίνωμα του πνεύμονα είναι μια ιδιαίτερα σοβαρή μορφή καρκίνου και από τις μέχρι τώρα έρευνες, εκτός των άλλων, έχει αποδειχθεί πως η υπερέκφραση του Gro/TLE1 στα ενήλικα ποντίκια επάγει αυτού του είδους την κακοήθεια. Στην παραπάνω παρατήρηση, έρχεται να συμφωνήσει το γεγονός πως στον άνθρωπο, ο Gro/TLE1 παρουσιάζει μια αύξηση στην έκφραση του της τάξεως των 20% σε περιπτώσεις αδenoκαρκινώματος του πνεύμονα (Allen et. al, 2006). Η ανάπτυξη όγκων του πνεύμονα στα διαγονιδιακά ποντίκια εκτός από υπερέκφραση του TLE1, συνοδεύεται και από αύξηση των επιπέδων συγκέντρωσης των Erb1 και Erb2, οι οποίοι ανήκουν στους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης. Την εγκυρότητα των παραπάνω παρατηρήσεων έρχεται να επιβεβαιώσει μια άλλη μέτρηση, η οποία αναφέρει πως και στα αδenoκαρκινώματα του πνεύμονα στον άνθρωπο εντοπίζεται αύξηση της συγκέντρωσης του Erb2 κατά 35% (Allen et. al, 2006).

Οι παραπάνω περιπτώσεις παρουσιάζουν τον ενεργό ρόλο των Gro/TLEs σε διάφορους τύπους καρκίνου, ωστόσο, ακόμα δεν έχει εξακριβωθεί αν οι ανωμαλίες που παρατηρούνται στη ρύθμιση των συγκεντρώσεων αυτής της οικογένειας συγκαταστολέων είναι η αιτία δημιουργίας και εμφάνισης της κακοήθειας ή είναι αποτέλεσμα αυτής. Τέλος, οι συγκαταστολείς αυτής της οικογένειας θα μπορούσαν να αποτελέσουν δείκτες και να χρησιμοποιηθούν ως ένα νέο διαγνωστικό εργαλείο για τον εντοπισμό νεοπλασματικών παθήσεων (Buscarlet and Stifani, 2007).

1.13 Το γονίδιο Transducin-Like Enhancer of split 4 (TLE4) της οικογένειας Gro/TLEs

Το γονίδιο *TLE4* απαντά συντηρημένο στον άνθρωπο, στον ποντικό, στον αρουραίο, στο χιμπατζή, στο σκύλο, στην αγελάδα, στην όρνιθα, στο βάτραχο και στο κουνούπι. Εκφράζεται σε μεγάλο αριθμό ιστών αλλά περισσότερο στον εγκέφαλο και στους σκελετικούς μυς (www.uniprot.org/uniprot/Q04727). Το *TLE4* μπορεί να το συναντήσουμε και με διαφορετικές ονομασίες όπως για παράδειγμα Bce1, Esg4, Grg4, Enhancer of split groucho 4.



Εικόνα 19: Η ακριβής θέση του *TLE4* (9q21.31) πάνω στο χρωμόσωμα 9 (www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TLE4).

Στον άνθρωπο, το *TLE4* εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 9 και η ακριβής του θέση είναι η 9q21.31.

Το μήκος του γονιδίου είναι 154.779 ζεύγη βάσεων. Ο αριθμός καταχώρησης του στην Genebank είναι 7091 και στην HGNC 11840. Το πρόδρομο mRNA του γονιδίου περιέχει 20 εξόνια και 19 ιντρόνια. Μετά το μάτισμα, το ώριμο mRNA έχει μήκος 4749 ζεύγη βάσεων. Η περιοχή 829-3150 του mRNA αποτελεί την κωδική αλληλουχία (CDS). Αφού πραγματοποιηθεί η διαδικασία της μετάφρασης, η πρωτεΐνη που προκύπτει έχει μήκος 773 αμινοξικά κατάλοιπα και έχει MB 83755 Da. Ο κωδικός της πρωτεΐνης στην UniProt είναι Q04727.

Σχετικά με τα δομικά στοιχεία αυτής της πρωτεΐνης, αξίζει να σημειωθεί πως φέρει και τις πέντε δομικές επικράτειες των Gro/TLEs. Πιο συγκεκριμένα, περιέχει την επικράτεια Q (Gln-rich domain) στις θέσεις 1-137, την επικράτεια GP (Gly-Pro rich domain) στις θέσεις 138-205, την επικράτεια CcN (CcN domain) στις θέσεις 207-274, τις επτά επαναλήψεις WD (WD-repeats domain) στις θέσεις 485-773 και τέλος σχετικά με την επικράτεια SP (Ser/Pro-rich domain) αυτή βρίσκεται ανάμεσα στις δύο προηγούμενες επικράτειες. Ένα στοιχείο που πρέπει να παρουσιαστεί είναι πως η πρωτεΐνη υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε μεγάλο αριθμό καταλοίπων της. Αναλυτικά, φωσφορυλιώνονται τα κατάλοιπα S206, S208, Y243, S245, S250, S265, S292, S305 και ακετυλιώνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα K237, K281 (www.uniprot.org/uniprot/Q04727).

Στον ποντικό τώρα, το γονίδιο *TLE4* εδράζεται στο χρωμόσωμα 19. Έχει μήκος 149.912 ζεύγη βάσεων και ο αριθμός καταχώρησης του στην Genebank είναι 21888. Το γονίδιο μεταγράφεται σε πρόδρομο mRNA, το οποίο αποτελείται από 20 εξόνια και 19 ιντρόνια. Το ώριμο mRNA έχει μήκος 4555 ζεύγη βάσεων και η περιοχή μεταξύ 572 έως και 2893 αποτελεί την κωδική αλληλουχία (CDS). Η πρωτεΐνη δε, που προκύπτει μετά τη διαδικασία της μετάφρασης έχει μήκος 773 αμινοξέα και ο κωδικός της στην UniProt είναι Q62441. Αξίζει να σημειωθεί πως όπως και στον άνθρωπο έτσι και στον ποντικό, η εν λόγω πρωτεΐνη φέρει τις πέντε δομικές επικράτειες που είναι χαρακτηριστικές για τους Gro/TLEs συγκαταστολείς. Ειδικότερα, περιέχει την επικράτεια Q (Gln-rich domain) στις θέσεις 1-137, την επικράτεια GP (Gly-Pro rich domain) στις θέσεις 138-205, την επικράτεια CcN (CcN domain) στις θέσεις 207-274, τις επτά επαναλήψεις WD (WD-repeats domain) στις θέσεις 485-773 και τέλος σχετικά με την επικράτεια SP (Ser/Pro-rich domain) αυτή βρίσκεται ανάμεσα στις δύο προηγούμενες επικράτειες.

Η ολική στοίχιση των πεπτιδικών αλληλουχιών *TLE4* του ανθρώπου και του ποντικού, η οποία πραγματοποιήθηκε με κατάλληλα προγράμματα ανέδειξε την ομοιότητα τους καθώς αυτές οι δύο αλληλουχίες ταυτίζονται κατά 99,6% (770/773 α/α) και έχουν αμινοξική ομοιότητα κατά 99,9% (772/773 α/α). Η πρωτεΐνη *TLE4* του ποντικού λόγω της μεγάλης ομοιότητας της με αυτήν του ανθρώπου, εικάζεται πως υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε διάφορα αμινοξικά κατάλοιπα, πχ. φωσφορυλιώσεις και ακετυλιώσεις (www.uniprot.org/uniprot/Q62441). Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί πως η πρωτεΐνη *TLE4* σαν συγκαταστολέας που είναι, αλληλεπιδρά μέσω αντιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με ένα πλήθος μεταγραφικών παραγόντων όπως είναι οι πρωτεΐνες MSX1, OTX1, PAX5, TCF7, LEF1, CUX1, HDAC1 και OTX2, γεγονός που δικαιολογεί τη συμμετοχή της σε τόσο μεγάλο αριθμό αναπτυξιακών διαδικασιών (www.anvita.info/wiki/Transducin_Like_Enhancer_Protein_4).

Μια σειρά πειραμάτων υβριδοποίησης *in situ* πάνω στο χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *tle4* κατά την εμβρυογένεση του ποντικού, απέδειξε πως το mRNA του γονιδίου ανιχνεύεται για πρώτη φορά στο στάδιο E12.5 και παραμένει ανιχνεύσιμο έως και λίγο πριν τη γέννηση (E18.5). Το *tle4* εκφράζεται με ένα ιδιαίτερα ειδικό χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης κατά κύριο λόγο στο νευρικό σύστημα και δη στον εγκέφαλο (τελεγκέφαλος, διεγκέφαλος, μεσεγκέφαλος, οπίσθιος εγκέφαλος), στο νωτιαίο μυελό, στο τρίδυμο γάγγλιο καθώς και στα νότια γάγγλια (Χαράλαμπος Χυτούδης-Περούδης, 2011).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός του υποκινητή του γονιδίου *Ple4* καθώς και η ταυτοποίηση ρυθμιστικών στοιχείων που ελέγχουν την έκφρασή του.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια και τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας όπως επίσης και οι εταιρείες από τις οποίες έχουν αγοραστεί.

Υλικά	Εταιρείες
Αγαρόζη	Invitrogen
Αιθανόλη	Carlo Erba
Αμπικιλίνη	Applichem
Βορικό οξύ	Research Organics
Βρωμιούχο Αιθίδιο	Sigma Aldrich
CaCl ₂	Research Organics
Γλουταμικό κάλιο (KGB)	AppliChem
Γλυκερόλη	Sigma Aldrich
dATP	H.T Biotechnology L.T.D
dCTP	H.T Biotechnology L.T.D
dGTP	H.T Biotechnology L.T.D
dTTP	H.T Biotechnology L.T.D
EDTA	Sigma Aldrich
Ισοβουτανόλη	Fluka
Ισοπροπανόλη	Sigma
LB- Agar	Sigma
LB- Broth	Sigma
LiCl	Fluka
MgCl ₂	Applichem
MgSO ₄	Applichem
Μεθανόλη	Applichem
NaCl	Scharlau
NaOH	Scharlau
Na ₂ HPO ₄	Scharlau
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	Research Organics
SDS	Research Organics
Sephadex G-50	Sigma
Sodium Acetate	Sigma
Sodium Citrate	Research Organics
Tris	Applichem
Tris Base	Sigma
Triton X-100	Applichem
Φαινόλη	Fluka
Χλωροφόρμιο	Pancreac
Χρωστική Gel-green	Biotium
Χρωστική Gel-red	Biotium
T4 DNA ligase Buffer	Takara

Ένζυμο	Εταιρεία
BamHI	Takara
BglII	Takara
DraI	Takara
EcoRI	Takara
HincII	Takara
HindIII	Takara
KpnI	Takara
NheI	Takara
PmlI	NEB
PstI	Takara
SacI	Takara
SacII	Takara
Sall	Takara
ScaI	Takara
SmaI	Takara
XbaI	Takara
XhoI	Takara
Klenow fragment	Takara
Λυσοζύμη	Sigma
RNase A	Sigma
T4 DNA Ligase	Takara

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Θρεπτικά υλικά βακτηρίων

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων *E.coli* χρησιμοποιήθηκε το υγρό θρεπτικό μέσο Luria Broth (LB), το οποίο έχει την παρακάτω σύσταση:

Luria Broth (LB)- 1L	
Τρυπτόνη	10 gr
Εκχύλισμα ζύμης	5 gr
NaCl	10 gr

Για τις στερεές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε Luria Agar (LA). Το LA παρασκευάζεται από LB στο οποίο προστίθεται άγαρ σε συγκέντρωση 1,5% w/v.

Ανάλογα με το πλασμίδιο το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί για το μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων προστίθεται στο LB και το αντίστοιχο αντιβιοτικό επιλογής. Στην παρούσα εργασία το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αμικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml.

Τα στελέχη δύνανται να διατηρηθούν για μικρά χρονικά διαστήματα σε τρυβλία LA σε θερμοκρασία 4°C. Τα θρεπτικά υλικά LB και LA αποστειρώνονται. Η αποστείρωση των υλικών γίνεται σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκαυστο) σε συνθήκες θερμοκρασίας 121 °C και πίεση 1,1 bar για 20 λεπτά. Στην περίπτωση του LA μετά την αποστείρωση το μίγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ψυχθεί σε θερμοκρασία περίπου 50 °C και ακολουθεί προσθήκη του αντιβιοτικού και απόχυση του μίγματος σε άδεια τρυβλία. Τα τρυβλία με το στερεό θρεπτικό υλικό παραμένουν ολονυκτίως σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να στερεοποιηθεί το μίγμα και να απομακρυνθεί η υγρασία. Στη συνέχεια τοποθετούνται και διατηρούνται στο ψυγείο. Πριν τη

χρήση τους τα τρυβλία παραμένουν για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Sambrook, Fritsch, and Maniatis, 1989).

2.2.2 Βακτηριακά στελέχη

Οι κλωνοποιήσεις της παρούσας πτυχιικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν με το παρακάτω στέλεχος DH5a του βακτηρίου *E.coli* με γονότυπο:

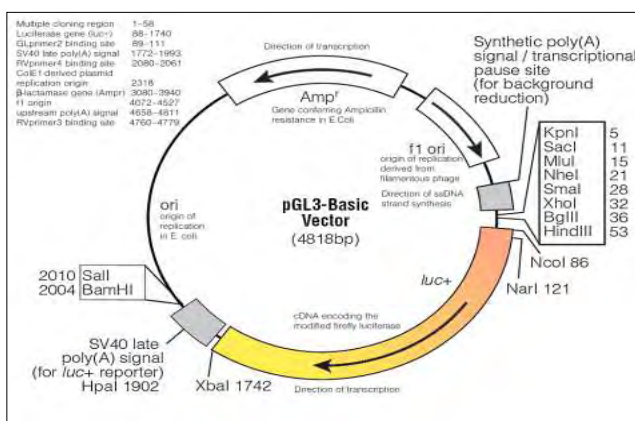
F- endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, nupG, Φ80dlacZΔM15 Δ(*lacZYAargF*) U169, hsdR17(rK- mK +), λ- (http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes).

2.2.3 Πλασμίδια

Στην παρούσα πτυχιική εργασία χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο *pGL3-Basic* της εταιρείας Promega (Εικόνα 2.1).

Το πλασμίδιο αυτό φέρει τις κάτωθι αλληλουχίες:

- **Πολυσυνδέτη (Multiple Cloning Site)**, όπου κλωνοποιούνται τμήματα DNA, προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα τους να επάγουν την μεταγραφή της λουσιφεράσης.
- **Γονίδιο Λουσιφεράσης (*luc+*)**, ως γονίδιο αναφοράς.
- **Περιοχή έναρξης της αντιγραφής (Origin of Replication)**.
- **Γονίδιο της β-λακταμάσης**, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, ως γονίδιο επιλογής.



Εικόνα 2.1. Το πλασμίδιο *pGL3-Basic*.

2.2.4 Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων για μετασχηματισμό με χρήση της μεθόδου RbCl

Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων πραγματοποιείται σε στείρο περιβάλλον. Αρχικά μια μονή αποικία *E.coli* μεταφέρεται από φρέσκο τρυβλίο με LA σε κωνική φιάλη που περιέχει 200 ml θρεπτικού υλικού LB. Ακολουθεί επώαση με ισχυρή ανάδευση σε θερμοκρασία 37 °C για 14-16 ώρες. Την επόμενη μέρα 1,0 ml από την αρχική καλλιέργεια μεταφέρεται σε 100 ml νέου LB (δηλαδή πραγματοποιείται αραιώση της καλλιέργειας 1:100) και η νέα καλλιέργεια επωάζεται με ανάδευση στους 37 °C μέχρι η τιμή της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 600 nm (OD600) να φθάσει στο 0,5 οπότε τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξής τους. Εν συνεχεία, η καλλιέργεια τοποθετείται σε πάγο για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων σε θερμοκρασία 4 °C, στις 2.500-3.000 rpm για 10-15 λεπτά, απομάκρυνση του

υπερκειμένον και επαναδιάλυση του ιζήματος στο διάλυμα BI (30 ml BI σε 100 ml αρχικής καλλιέργειας). Ακολούθως το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται σε πάγο για 20 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία 4 °C, στις 3.000 rpm για 10-15 λεπτά. Τέλος, γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5 ml διαλύματος BII και το εναιώρημα διανέμεται σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου errendorf τα οποία αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -80 °C.

Διάλυμα BI (pH=5,8)	
KAC	300 mM
MgCl ₂	50 mM
RbCl	100 mM
CaCl ₂	10 mM
Γλυκερόλη	15% v/v
Διάλυμα BII (pH=6,6)	
NaMOPS pH 7,0	10 mM
CaCl ₂	75 mM
RbCl	10 mM
Γλυκερόλη	15% v/v

2.2.5 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων (Transformation)

Ποσότητα 100 μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, τα οποία έχουν παρασκευαστεί όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.2.4, αναμιγνύονται με DNA περίπου 1 μl (συνήθως χρησιμοποιείται ως δείγμα ελέγχου DNA γνωστής συγκέντρωσης, για τον υπολογισμό της αποτελεσματικότητας του μετασχηματισμού) και τοποθετούνται σε πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί επώαση των βακτηρίων σε θερμοκρασία 42 °C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα και αμέσως μετά στον πάγο για 2-5 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 900 μl θρεπτικού υλικού LB και επωάζονται σε θερμοκρασία 37 °C για 1 ώρα. Έπεται φυγοκέντρηση των δειγμάτων και επίστρωσή τους σε τρυβλία LA με αμικικίνη (σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml). Η διαδικασία επίστρωσης πραγματοποιείται ως εξής: Γυάλινη πιπέτα Pasteur διαμορφώνεται με τη βοήθεια φλόγας έτσι ώστε να λυγίσει και να κλείσει η οπή στην άκρη της (διανομέας). Ακολούθως η πιπέτα τοποθετείται σε αιθανόλη 100% v/v. Σε ένα τρυβλίο προστίθενται 100 μl από το δείγμα τα οποία απλώνονται με τη βοήθεια του διανομέα μέχρι να απορροφηθούν από το LA. Το υπόλοιπο δείγμα (900 μl) φυγοκεντρείται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε περίπου 100 μl θρεπτικού υλικού LB, τα οποία επιστρώνονται με τον τρόπο που προαναφέρθηκε σε ένα νέο τρυβλίο. Μετά την επίστρωση τα τρυβλία επωάζονται για λίγο σε θερμοκρασία δωματίου, και τέλος τοποθετούνται σε θερμοκρασία 37 °C για 14-16 ώρες. Την επόμενη μέρα υπολογίζεται από το δείγμα ελέγχου η αποτελεσματικότητα (efficiency) του μετασχηματισμού (δηλ. αριθμός αποικιών ανά 1 μg DNA).

2.2.6 Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

2.2.6.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με τη μέθοδο του βρασμού (boiling miniprep)

Μονές βακτηριακές αποικίες από στερεή καλλιέργεια αναπτύσσονται για 14-16 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 37 °C με ανάδευση σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα που

περιέχει 1,5-2 ml θρεπτικού υλικού LB μαζί με το αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Έπειτα, 1,5 ml από κάθε καλλιέργεια διανέμεται σε σωληνάρια τύπου erpendorf και φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 250 µl διαλύματος STET. Ακολουθεί προσθήκη 25 µl διαλύματος λυσοζύμης (10 mg/ml) και το δείγμα αναδεύεται πολύ έντονα στο vortex μέχρι να διαλυθεί το ίζημα. Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο 100 °C για 1 λεπτό ακριβώς, και ακολούθως φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το ίζημα απομακρύνεται με μια οδοντογλυφίδα. Στο εναπομείναν υπερκείμενο προστίθενται 2 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100% v/v, ακολουθεί ελαφρά ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα παραμένει, σε θερμοκρασία δωματίου για λίγη ώρα ώστε να στεγνώσει. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100 µl H₂O (WFI).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, για την ταυτοποίηση των κλώνων πραγματοποιείται πέψη 2 µl πλασμιδιακού DNA με 1 Unit κατάλληλου περιοριστικού ενζύμου, στην ενδεδειγμένη θερμοκρασία, τυπικά για 2 ώρες. Το υπόλοιπο δείγμα αποθηκεύεται στην κατάψυξη. Στο τέλος της πέψης στο δείγμα προστίθεται 1 µl διαλύματος RNAσης (10 mg/ml) και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης.

Διάλυμα STET	
NaCl	0,1 M
Triton X- 100	2% v/v
EDTA pH=8	10 mM
Tris-HCl pH=8	10 mM

2.2.6.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (midiprep)

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα πραγματοποιείται με το σύστημα αντιδραστηρίων (kit) της εταιρείας Macherey- Nagel (MACHEREY-NAGEL, GmbH & Co, KG, Germany). Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα κάτωθι:

Αρχικά, 1,5-2 ml υγρής καλλιέργειας προστίθενται σε 150 ml θρεπτικού υλικού LB με αμπικιλίνη και αναπτύσσονται για 14-16 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C με ανάδευση σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, η καλλιέργεια χωρίζεται ισόποσα σε αποστειρωμένα falcons, τα οποία φυγοκεντρούνται για 20 λεπτά στις 3.000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 6 ml διαλύματος S1 το οποίο περιέχει και RNAση A. Στη συνέχεια, στο δείγμα προστίθενται 6 ml από το διάλυμα S2, γίνεται αργή ανάδευση (6-8 φορές) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) για 2-5 λεπτά. Έπειτα, στο δείγμα προστίθενται 6 ml παγωμένου (4 °C) διαλύματος S3 και ακολουθεί αργή ανάδευση (6-8 φορές) έως ότου να δημιουργηθεί ένα λευκό ομογενές εναιώρημα (λυμένα βακτήρια). Το δείγμα τοποθετείται σε πάγο για 5 λεπτά, ενώ ταυτόχρονα η στήλη ιοντοανταλλαγής εξισορροπείται με 2,5 ml διαλύματος N2 και το φίλτρο εμποτίζεται με μικρή ποσότητα διαλύματος N2 ή αποστειρωμένου H₂O. Το δείγμα διηθείται από φίλτρο και προστίθεται στην στήλη. Αφού περάσει το διάλυμα από την στήλη, αυτή εκπλύνεται με 10 ml διαλύματος N3. Στη συνέχεια,

προστίθενται 5 ml διαλύματος N5, οπότε το δεσμευμένο DNA εκλύεται. Μετά την έκλυση προστίθενται στο δείγμα 3,5 ml ισοπροπανόλης, η οποία βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται 2 ml αιθανόλης 70% v/v. Έπεται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για λίγη ώρα ώστε να στεγνώσει. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 300 µl αποστειρωμένο H₂O και επωάζεται για 30 λεπτά στους 37 °C. Μετά την επαναδιάλυση το καθαρό DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 °C.

Διάλυμα S1 (pH=8)	
Tris-HCl	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml
Διάλυμα S2	
NaOH	200 mM
SDS	1%
Διάλυμα S3 (pH=5,1)	
KAc	2,8 M
Διάλυμα N2 (pH=6,3 µε H₃PO₄)	
Tris	100 mM
Αιθανόλη	15% v/v
KCl	900 mM
Triton X-100	0,15% v/v
Διάλυμα N3 (pH=6,3 µε H₃PO₄)	
Tris	100 mM
Αιθανόλη	15% v/v
KCl	1,15 M
Διάλυμα N5 (pH=8,5 µε H₃PO₄)	
Tris	100 mM
Αιθανόλη	15% v/v
KCl	1 M

2.2.7 Πέψη μορίων DNA με ένζυμο περιορισμού

Όλες οι πέψεις με ένζυμο περιορισμού πραγματοποιήθηκαν βάσει των οδηγιών της προμηθεύτριας εταιρείας (Takara). Για την αντίδραση της πέψης με ένζυμο περιορισμού απαιτούνται τα έξης αντιδραστήρια: το ένζυμο με το οποίο θα γίνει η επιθυμητή πέψη, το ρυθμιστικό διάλυμα δράσης του ενζύμου, αποστειρωμένο H₂O και το DNA. Προκειμένου να αποφευχθεί το φαινόμενο της μη ειδικής πέψης «star activity» επειδή στο διάλυμα φύλαξης του ενζύμου περιέχεται και 50% v/v γλυκερόλη, ο όγκος που προστίθεται, πρέπει να είναι μικρότερος από το 1/10 του συνολικού όγκου της αντίδρασης ώστε η τελική συγκέντρωση της γλυκερόλης να

είναι <5% v/v. Το δείγμα επωάζεται για 2-3 ώρες σε κατάλληλη θερμοκρασία. Τα προϊόντα της πέψης διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης ή αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -20 °C. Για τις πέψεις υπερελικωμένων πλασμιδίων χρησιμοποιείται περίσσεια ενζυμικών μονάδων ενεργότητας 2-5X. Στις πέψεις απαιτείται η ύπαρξη ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης προκειμένου να ικανοποιούνται οι συνθήκες δράσεις των ενζύμων. Το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία και στο οποίο πραγματοποιούνται οι πέψεις είναι το KGB. Το KGB αποτελεί ένα διάλυμα αντίδρασης στο οποίο σχεδόν όλα τα περιοριστικά ένζυμα εμφανίζουν φυσιολογικά επίπεδα ενεργότητας. Παρασκευάζεται συγκεντρωμένο κατά 10 φορές (10X). Τα περισσότερα από τα ένζυμα περιορισμού παρουσιάζουν βέλτιστη ενεργότητα σε συγκέντρωση KGB 1X, υπάρχουν όμως και άλλα τα οποία δρουν καλύτερα σε συγκεντρώσεις 0,5X, 1,5X ή 2X. Το διάλυμα αντίδρασης KGB είναι κατάλληλο για διπλές πέψεις καθώς μέσα σ' αυτό μπορούν να δράσουν περισσότερα του ενός ένζυμα περιορισμού.

Διάλυμα KGB 10X	
Γλουταμικό κάλιο	1 M
Tris-οξικό (pH=7,6)	50 mM
BSA	500 µg/ml
β-μερκαπτοαιθανόλη	5 mM

2.2.8 Αντίδραση Klenow

Η αντίδραση δημιουργίας λείων άκρων έγινε με το τμήμα Klenow της DNA πολυμεράσης I. Το τμήμα αυτό περιλαμβάνει το τμήμα της DNA πολυμεράσης I που φέρει την ενεργότητα πολυμεράσης και 3'-5' εξωνουκλεάσης. Στις αντιδράσεις Klenow χρησιμοποιήθηκαν 50 ng DNA, 3,5 Units ενζύμου, dNTPs σε συγκέντρωση 100µM σε KGB 1X και τελικό όγκο 20 µl. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση (heat inactivation) σε θερμοκρασία 75 °C για 10 λεπτά, επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και μοριακή διήθηση σε στήλη G-50 Sephadex προκειμένου να απομακρυνθούν τα νουκλεοτίδια που δεν έχουν ενσωματωθεί.

2.2.9 Σύνδεση γραμμικών τμημάτων DNA με αντίδραση λιγάσης

Η DNA λιγάση T4 είναι το προϊόν του γονιδίου 30 του φάγου T4. Η DNA λιγάση T4 καταλύει, με δαπάνη μορίων ATP, την επιδιόρθωση των εγκοπών στη μία αλυσίδα του DNA αλλά και την σύνδεση τμημάτων DNA που έχουν συμπληρωματικά ή λεία άκρα. Η DNA λιγάση T4 είναι το μόνο ένζυμο που μπορεί να καταλύσει αποτελεσματικά τη σύνδεση λείων άκρων. Για την αντίδραση λιγάσης χρησιμοποιείται το ένζυμο DNA λιγάση T4, το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα δράσης της εταιρείας Takara, H₂O και κατάλληλες ποσότητες των τμημάτων DNA που θέλουμε να ενώσουμε. Συνήθως, χρησιμοποιούνται 5 ng φορέα κλωνοποίησης ανά kb φορέα και το υπό ένθεση τμήμα DNA (insert) σε κατάλληλη ποσότητα ώστε ο αριθμός των μορίων του να είναι πενταπλάσιος έως δεκαπλάσιος του αριθμού των μορίων του φορέα κλωνοποίησης. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας ο φορέας με λιγάση (χωρίς το υπό ένθεση τμήμα DNA). Η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 4 ώρες.

Διάλυμα λιγάσης T4 (350 Units/μl)	
Tris-HCl (pH=7,5)	10 mM
KCl	50 mM
β-μερκαπτοαιθανόλη	10 mM
EDTA	0,1 mM
Γλυκερόλη	50% v/v

Ρυθμιστικό διάλυμα δράσης της λιγάσης T4 (10X)	
Tris-HCl (pH=7,6)	660 mM
MgCl ₂	66 mM
DTT	100 mM
ATP	1 mM

2.2.10 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v

Σε 100 ml διαλύματος 1X TBE προστίθεται 1 gr αγαρόζη. Το εναιώρημα θερμαίνεται στο φούρνο μικροκυμάτων και αναδεύεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα έως ότου διαλυθεί τελείως η αγαρόζη και γίνει το διάλυμα εντελώς διαυγές. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος φθάσει σε θερμοκρασία 50 °C περίπου, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml (αρχική συγκέντρωση 10 mg/ml), και το διάλυμα αναδεύεται ήπια. Στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρεται σε κατάλληλη φόρμα η οποία φέρει ειδικό χτενάκι, και στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την απομάκρυνση του χτενιού, το πήκτωμα χρησιμοποιείται άμεσα ή αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 °C. Με ανάλογο τρόπο παρασκευάζονται και πηκτώματα αγαρόζης με διαφορετική περιεκτικότητα όταν αυτό απαιτείται.

10 X TBE (1lt)	
Tris Base	108 gr
Βορικό οξύ	55 gr
EDTA 0,5 M	40 ml

2.2.11 Απομόνωση μορίων DNA από παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης με τη μέθοδο της ηλεκτροέκλυσης

Στα πειράματα που περιγράφονται σε αυτή τη διπλωματική εργασία χρειάστηκε να πραγματοποιηθεί απομόνωση τμημάτων DNA από παρασκευαστικά πηκτώματα αγαρόζης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροέκλυσης.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, αρχικά το DNA ηλεκτροφορείται σε παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης. Για την παρασκευή του πηκτώματος αυτού χρησιμοποιείται ειδικό χτενάκι που επιτρέπει το σχηματισμό ενός ενιαίου πηγαδιού. Αξίζει να σημειωθεί ότι στα παρασκευαστικά πηκτώματα αγαρόζης αντί για βρωμιούχο αιθίδιο, η χρώση του DNA πραγματοποιείται με την χρωστική GEL

GREEN. Η εν λόγω χρωστική είναι μη τοξική ουσία, η οποία χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια για τη χρώση νουκλεϊκών οξέων. Πιο συγκεκριμένα, η χρωστική GELGREEN προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που απορροφά μπλε φως ($\lambda_{\max} = 488 \text{ nm}$) και εκπέμπει πράσινο φως ($\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$). Ο βασικός λόγος για τον οποίο προτιμάται η χρωστική GELGREEN έναντι του βρωμιούχου αιθιδίου είναι γιατί το τελευταίο κατά τη σύνδεσή του στο DNA και την επακόλουθη έκθεση σε ακτινοβολία UV, προκαλεί εγκοπές στη διπλή έλικα περιορίζοντας τη δυνατότητά του DNA να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για περαιτέρω πειράματα (N F Cariello *et al*, 1988). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εκτίθεται σε UV και η ζώνη στην οποία εντοπίζεται το επιθυμητό τμήμα DNA αποκόπτεται και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis) κατάλληλου μήκους. Ακολούθως στη μεμβράνη που περιέχει το τμήμα του πηκτώματος προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Τα άκρα της μεμβράνης ασφαλιζονται με δύο κλιπ κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μην εγκλωβιστεί αέρας μέσα σε αυτή. Έπειτα το δείγμα ηλεκτροφορείται έως ότου να εξέλθει το μόριο DNA από τη ζώνη της αгарόζης και να βρεθεί στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης, εγκλωβισμένο μέσα στη μεμβράνη. Έπεται απομάκρυνση του τμήματος του πηκτώματος και μεταφορά του διαλύματος σε σωληνάριο τύπου erpendorf. Στη συνέχεια στο διάλυμα στο οποίο περιέχεται το DNA, προστίθεται ίσος όγκος ισοβουτανόλης προκειμένου αυτό να συμπυκνωθεί. Το δείγμα ανακινείται ισχυρά ώστε να αναμιχθούν οι δύο φάσεις και φυγοκεντρείται για 1 min στις 13.000 rpm. Απομακρύνεται η υπερκείμενη φάση της ισοβουτανόλης και η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου ο όγκος της υδατικής φάσης να περιοριστεί στα 100-200 μl . Τέλος, ακολουθεί καθαρισμός του κομματιού DNA που απομονώθηκε.

2.2.12 Μοριακή διήθηση με Sephadex G-50

Η μοριακή διήθηση σε στήλη G-50 χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση μικρών μορίων (π.χ. αλάτων, νουκλεοτιδίων κλπ) από διαλύματα νουκλεϊκών οξέων. Αρχικά, το υλικό της στήλης πακετάρεται γεμίζοντας πλήρως μια σύριγγα του 1 ml με Sephadex G-50. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 2.000 rpm. Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται στην κορυφή της στήλης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2500rpm για 5 λεπτά.

2.2.13 Καθαρισμός DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Σε σωληνάριο τύπου erpendorf αναμιγνύονται ίσοι όγκοι υδατικού διαλύματος DNA και φαινόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη φυγοκέντρηση σχηματίζονται τρεις φάσεις. Η επάνω υδατική φάση περιέχει το DNA, η κάτω οργανική φάση περιέχει τη φαινόλη ενώ η ενδιάμεση (μεσόφαση) περιέχει αποδιαταγμένες πρωτεΐνες-ένζυμα. Η υδατική φάση απομακρύνεται, τοποθετείται σε νέο σωληνάριο και αναμιγνύεται με ίσο όγκο χλωροφορμίου με έντονο Vortex (αν το δείγμα περιέχει αρκετές προσμίξεις η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου να μην υπάρχει ορατή μεσόφαση). Έπεται φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη φυγοκέντρηση σχηματίζονται δύο φάσεις, από τις οποίες συλλέγεται η επάνω, η υδατική η οποία περιέχει το DNA.

2.2.14 Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη

Το DNA βρίσκεται διαλυμένο σε κάποιον όγκο νερού. Στο εν λόγω δείγμα, προστίθενται 2,5 όγκοι αιθανόλης 100 % v/v και 1/10 του όγκου, 3M οξικού νατρίου (CH_3COONa). Το δείγμα

αναμειγνύεται και τοποθετείται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τουλάχιστον 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθεται αιθανόλη 70 % v/v σε όγκο ίσο προς το συνολικό όγκο του δείγματος. Το δείγμα φυγοκεντρείται ξανά για 5 λεπτά στις 13.000 rpm στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για λίγη ώρα ώστε να στεγνώσει. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου νερού και το δείγμα αποθηκεύεται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.15 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων και παρασκευή κυτταρικών εκχυλισμάτων

Τα βήματα που ακολουθούνται για την διεκπεραίωση αυτών των διαδικασιών περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

1. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία 24 θέσεων (24 well plates) σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο σε ειδικό θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ και 5 % CO_2 έως ότου καλυφθεί η επιφάνεια του τρυβλίου κατά 70-80 %.
2. Σε κάθε μία από τις 24 θέσεις χρησιμοποιείται για τη διαμόλυνση συνολική ποσότητα 200 ng DNA : 50 ng DNA του πλασμιδίου pCMVlacZ (το συγκεκριμένο πλασμίδιο είναι απαραίτητο για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων) και 150 ng του DNA που μελετάται. Για κάθε δείγμα DNA πραγματοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα δύο διαμολύνσεις.
3. Έστω ότι έχουμε X αριθμό δειγμάτων DNA. Ετοιμάζουμε $2X+2$ σωληνάρια τύπου erpendorf. Σε κάθε σωληνάριο προστίθενται το υπό μελέτη DNA και το pCMVlacZ. Ο όγκος σε κάθε σωληνάριο συμπληρώνεται με dH_2O μέχρι τα 12 μl .
4. Σε ένα σωληνάριο τύπου erpendorf αναμειγνύονται $2X+2$ μl αντιδραστηρίου FUGENE με $9 \times (2X+2)$ μl DMEM ελεύθερο ορού.
5. Σε καθένα από τα σωληνάρια με το DNA προστίθενται 10 μl από το mix DMEM-Fugene.
6. Ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Στο τέλος της επώασης το περιεχόμενο των σωληναρίων προστίθεται στο τρυβλίο.
8. Μετά από 24 ώρες πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις με $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - free-PBS.
9. Στη συνέχεια, προστίθεται στα κύτταρα διάλυμα λύσης και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (200 μl / θέση του τρυβλίου).

Διάλυμα λύσης	Τελική συγκέντρωση
Tris buffer, pH=7,8	25,0 mM
EDTA	2,0 mM
Triton X-100	1,0 %
Glycerol	10,0 %
Dithiothreitol (DTT)	2,0 mM
Φύλαξη σε μερίδες των 1,8 ml στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	

10. Μετά την επώαση τα κυτταρικά εκχυλίσματα μεταφέρονται σε σωληνάρια τύπου erpendorf. Τα επόμενα βήματα πραγματοποιούνται στον πάγο.
11. Φυγοκέντρηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων στις 12.500 rpm, για 3 λεπτά, στους 4 °C.
12. Μεταφορά του υπερκείμενου σε πλάκα 96 βοθρίων. Αποθήκευση και φύλαξη στους -80 °C.

2.2.16 Δοκιμασία Λουσιφεράσης

Πρόκειται για μια ευαίσθητη και γρήγορη τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης. Συνοπτικά, η υπό έλεγχο αλληλουχία DNA τοποθετείται ανοδικά του γονιδίου λουσιφεράσης. Το πλασμίδιο εισάγεται στα κύτταρα και ακολουθεί προσδιορισμός της παραγόμενης ποσότητας λουσιφεράσης. Η λουσιφεράση αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα μοριακού βάρους 60,7 kDa και καταλύει την ATP-εξαρτώμενη οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση της λουσιφερίνης. Αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η παραγωγή οξειδωμένης λουσιφερίνης και φωτός:



Η εκπομπή φωτός διαρκεί μέχρι 20 δευτερόλεπτα και μετράται σε λουμινόμετρο. Προκειμένου τα αποτελέσματα της λουσιφεράσης να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους στο κάθε πείραμα, χρησιμοποιείται ένας τρόπος κανονικοποίησης τους. Κατά τη διαμόλυνση προστίθεται στα δείγματα ποσότητα του πλασμιδίου pCMVlacZ, το οποίο κωδικοποιεί την β-γαλακτοσιδάση υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV. Υπολογίζοντας την δραστικότητα της β-γαλακτοσιδάσης του κάθε δείγματος και συγκρίνοντας την με τις υπόλοιπες, προκύπτει ένας συντελεστής για κάθε δείγμα με τον οποίο η τιμή της λουσιφεράσης ομαλοποιείται και τα αποτελέσματα είναι πλέον συγκρίσιμα ανάμεσα στα δείγματα. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι η β-γαλακτοσιδάση, παρουσία ιόντων καλίου ή μαγνησίου, υδρολύει το υπόστρωμα ONPG (Ortho-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside) σε γαλακτόζη και όρθο-νιτροφαινόλη. Το τελευταίο έχει υποκίτρινο χρώμα και η απορρόφηση του μετράται φωτομετρικά στα 480 nm.

Αρχικά, παρασκευάζονται τα διαλύματα MIX-B & MIX-C. Τα υποστρώματα (CPRG και luciferin) αυτών των διαλυμάτων προστίθενται στο τέλος πριν την ανάμιξη με τα κυτταρικά εκχυλίσματα. Με μια πολυκάναλη πιπέτα μεταφέρονται 20 μl από κάθε εκχύλισμα σε διαφανή πλάκα 96 βοθρίων. Εν συνεχεία, ξανά με την χρήση πολυκάναλης πιπέτας μεταφέρονται 20 μl από κάθε εκχύλισμα σε λευκή πλάκα 96 βοθρίων. Η χωρητικότητα του κάθε βοθρίου ανέρχεται στα 100 μl. Αρχικά, προστίθεται στα βοθρία της λευκής πλάκας το MIX-C (80 μl) και ακολουθεί ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα. Ακολούθως πραγματοποιείται η μέτρηση της χημειοφωταύγειας στο λουμινόμετρο τη χρονική στιγμή $t_0 = 0 \text{ min}$ για 2 δευτερόλεπτα και η μέτρηση επαναλαμβάνεται στο $t_1 = 3 \text{ min}$. Έπειτα, προστίθεται στα βοθρία της διαφανούς πλάκας το MIX-B (80 μl). Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης υπολογίζεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 480 nm, ορίζοντας $t_0 = 0 \text{ min}$ την αρχή της διαδικασίας μέτρησης και λαμβάνοντας κατόπιν μετρήσεις στους χρόνους $t_1 = 20 \text{ min}$, $t_2 = 40 \text{ min}$, $t_3 = 60 \text{ min}$. Οι τελικές τιμές τόσο για τη λουσιφεράση όσο και για τη γαλακτοσιδάση, υπολογίζονται από το μέσο όρο των τιμών που λαμβάνονται στις διάφορες μετρήσεις.

Διάλυμα MIX-B	
β-Gal Assay Buffer 2X	50 μl
CPRG 10X	10 μl
H ₂ O	20 μl
Κυτταρικό εκχύλισμα	20 μl

Διάλυμα β-γαλακτοσιδάσης (2X)	Τελική συγκέντρωση
KCl	20,0 mM
MgCl ₂	10,0 mM
Dithiothreitol	145,5 mM

Διάλυμα MIX-C	
Luciferase Assay Buffer 2x	50 μl
Luciferin 20X	5 μl
H ₂ O	25 μl
Κυτταρικό εκχύλισμα	20 μl

Διάλυμα Λουσιφεράσης (2X)	Τελική συγκέντρωση
Tricine, pH=7,8	40,00 mM
(MgCO ₃) ₄ · Mg(OH) ₂ · 5H ₂ O	2,14 mM
1X PBS pH=7,5	66,60 ml
ATP (mM)	1,06 mM
MgSO ₄ (mM)	5,34 mM
EDTA (mM)	0,20 mM
Coenzyme A	540,00 μM

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση ενός τμήματος 2.1 kb του υποκινητή του γονιδίου TLE4 από γενωμικό DNA ποντικού με τη χρήση της PCR.

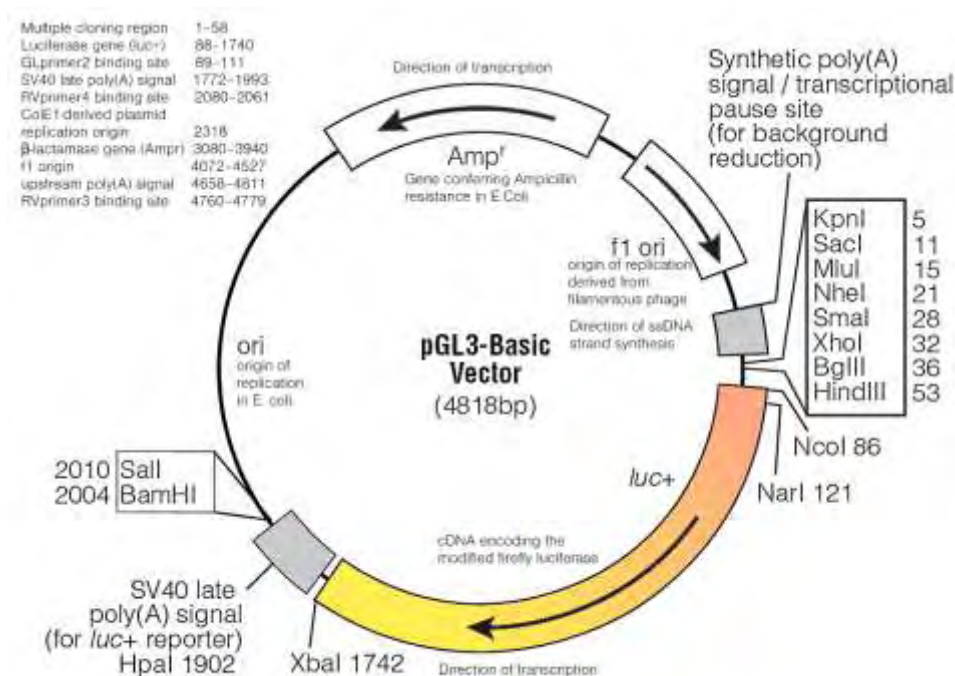
Η παρούσα πτυχιακή εργασία, όπως έχει προαναφερθεί, έχει ως σκοπό τη μελέτη του υποκινητή του γονιδίου TLE4 και τον εντοπισμό των σημαντικότερων ρυθμιστικών στοιχείων πάνω σ' αυτόν. Για να επιτευχθούν οι παραπάνω στόχοι χρησιμοποιήθηκαν αρκετές τεχνικές της μοριακής βιολογίας, όπως η τεχνική PCR, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, η κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς και στο τελικό στάδιο η διαμόλυνση (transfection) DNA σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Η πρώτη ενέργεια που έπρεπε να πραγματοποιηθεί ήταν η απομόνωση της αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου TLE4. Έτσι, από γενωμικό DNA του ποντικού με τη βοήθεια των ακόλουθων εκκινητών:

- TLE4-LUCF: tttagcgtGACTGCATGGATCCTAATGACACA
- TLE4-LUCR: atactcgagTCCCGGGAGATGTAGTCCTCGc

και με την τεχνική PCR, απομονώθηκε η επιθυμητή αλληλουχία συνολικού μήκους 2.1 kb στα άκρα της οποίας είχαν προστεθεί οι περιοριστικές θέσεις MluI-XhoI.

3.2 Κλωνοποίηση του υποκινητή TLE4 στις θέσεις MluI-XhoI του πλασμιδιακού φορέα pGL3-Basic.

Για τη συνέχιση των πειραμάτων, η αλληλουχία του υποκινητή του TLE4 έπρεπε να κλωνοποιηθεί σε έναν πλασμιδιακό φορέα. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία είναι ο pGL3-Basic της εταιρείας Promega (Εικόνα 3.1). Η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των θέσεων MluI-XhoI.



Εικόνα 3.1: Το πλασμίδιο pGL3-Basic.

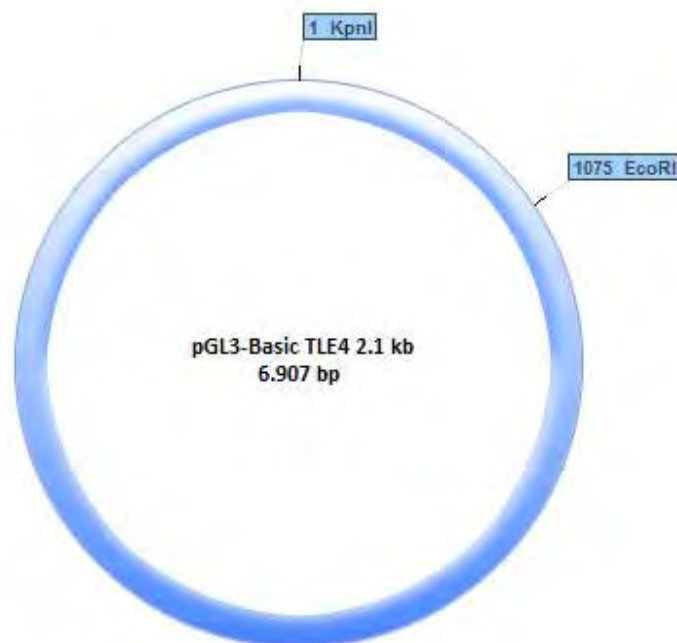
Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω (Ενότητα 2.2.3) ο φορέας αυτός είναι προϊόν της εταιρείας Promega και διαθέτει τις εξής αλληλουχίες:

- **Πολυσυνδέτη** (Multiple Cloning Site), όπου κλωνοποιούνται τμήματα DNA, προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα τους να επάγουν την μεταγραφή της λουσιφεράσης.
- **Γονίδιο Λουσιφεράσης** (luc+), ως γονίδιο αναφοράς.
- **Περιοχή έναρξης της αντιγραφής** (Origin of Replication).
- **Γονίδιο της β-λακταμάσης** που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, ως γονίδιο επιλογής.

3.3 Πέψη του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 2.1 kb* με ενδονουκλεάσες περιορισμού για την απομάκρυνση τμήματος 1 kb από τον υποκινητή του TLE4 και τη δημιουργία του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 1.1 kb*.

Από τη στιγμή που εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα η προς μελέτη αλληλουχία του υποκινητή του TLE4, μπορεί να ξεκινήσει η διαδοχική απομάκρυνση τμημάτων του από το 5' άκρο με σκοπό τον προσδιορισμό των σημαντικότερων περιοχών για τη μεταγραφή του γονιδίου.

Η επόμενη κατασκευή δημιουργήθηκε μετά την απομάκρυνση τμήματος μήκους 1 kb περίπου (1074 bp) από την αλληλουχία του υποκινητή του TLE4 ώστε να προκύψει το πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 1.1 kb*. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η αποκοπή χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και KpnI, τα οποία είχαν μόνο μία θέση αναγνώρισης πάνω στο πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 2.1 kb* (Εικόνα 3.2).



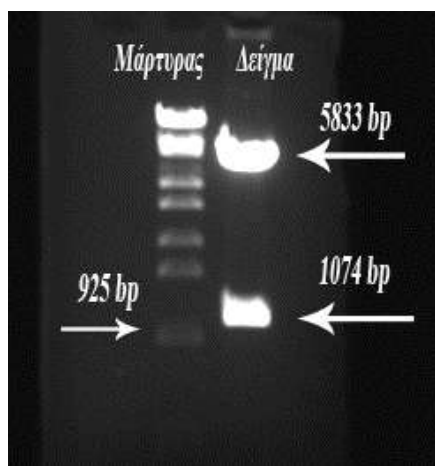
Εικόνα 3.2: Οι θέσεις αναγνώρισης από τα ένζυμα KpnI και EcoRI στο πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 2.1 kb*.

Οι συνθήκες της αντίδρασης πέψης που πραγματοποιήθηκε παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1):

Πέψη του <i>pGL3-Basic TLE4 2.1 kb</i> με <i>EcoRI-KpnI</i>	
DNA	5μg
KGB	0,5X
EcoRI	22 units
KpnI	20 units
Επώαση για 2 ώρες στους 37°C	

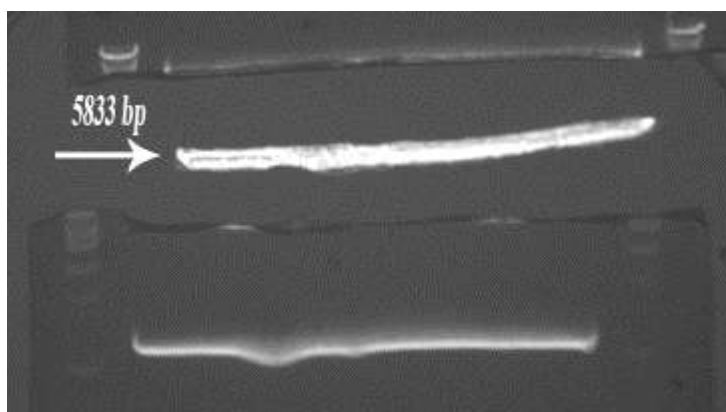
Πίνακας 3.1: Συνθήκες πέψης του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 2.1 kb* με *EcoRI-KpnI*.

Από την παραπάνω διπλή πέψη, ηλεκτροφορείται μια μικρή ποσότητα DNA και οι αναμενόμενες ζώνες είναι 5.833 bp και 1.074 bp (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Έλεγχος διπλής πέψης. Λήψη αναμενόμενων ζωνών. Ο μάρτυρας και το δείγμα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αραρόζης 1% w/v.

Μετά από τον έλεγχο που πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί ότι η διαδικασία της πέψης κύλησε ομαλά και το DNA κόπηκε στις σωστές θέσεις, ακολουθεί η διαδικασία του καθαρισμού του επιθυμητού τμήματος, δηλαδή της ζώνης των 5.833 bp (Εικόνα 3.4) με τη διαδικασία της ηλεκτροέκλουσης (Ενότητα 2.2.11).

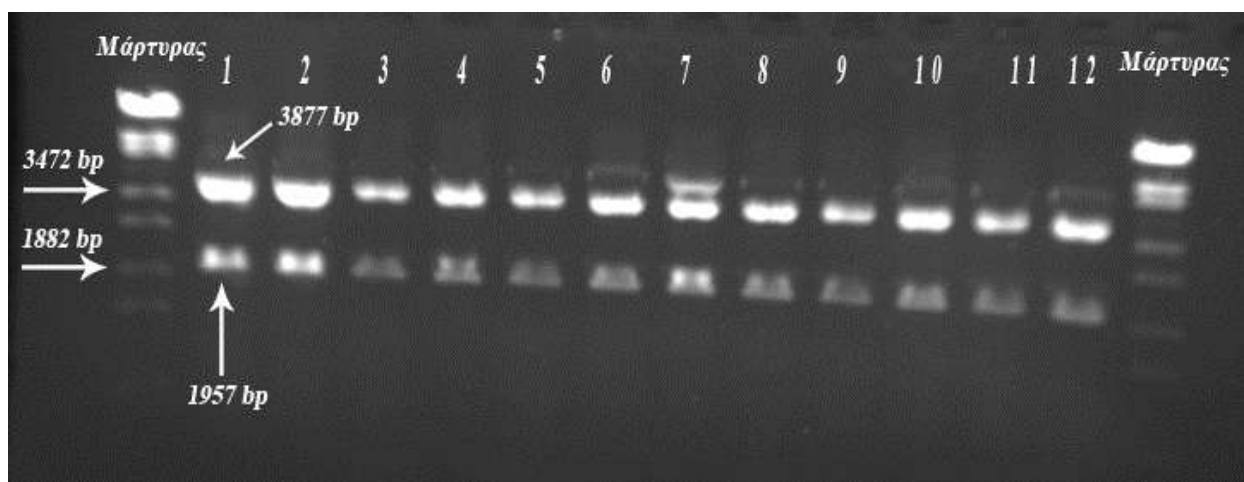


Εικόνα 3.4: Καθαρισμός του επιθυμητού τμήματος με τη διαδικασία της ηλεκτροέκλουσης.

Ύστερα από την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου της ηλεκτροέκλυσης, ακολούθησε μια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 1% w/v με σκοπό την ποσοτικοποίηση του DNA που καθαρίστηκε και απομονώθηκε. Η συγκέντρωση του DNA εκτιμήθηκε στα 30 ng/μl. Μετά την απομάκρυνση του τμήματος των 1.074 bp, το πλασμιδίο έπρεπε να ξανακλείσει αλλά εξαιτίας της διπλής πέψης που προηγήθηκε, δημιουργήθηκαν ασύμβατα άκρα με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατό να επανενωθούν. Για να λυθεί αυτό το πρόβλημα, εφαρμόστηκε η αντίδραση Klenow για τη δημιουργία λείων άκρων (Ενότητα 2.2.8).

Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία επανένωσης των άκρων του πλασμιδίου, τα οποία ήταν πλέον λεία. Για την αντίδραση της λιγάσης, χρησιμοποιήθηκαν 125 ng γραμμοποιημένου πλασμιδίου και 1 μl T4 λιγάση (360 units/μl) σε τελικό όγκο 25 μl. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας επανένωσης του πλασμιδίου, ακολούθησε μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα του στελέχους DH5a του βακτηρίου *E.coli*, επίστρωση σε στερεό θρεπτικό μέσο LB άγαρ και επώαση στους 37 °C. Την επόμενη ημέρα επιλέχθηκαν δώδεκα αποικίες ώστε να γίνει ενοφθαλμισμός τους σε ξεχωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες με υγρό θρεπτικό μέσο LB.

Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37 °C και στη συνέχεια απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA κάθε καλλιέργειας με τη μέθοδο του βρασμού (boiling miniprep). Η ταυτοποίηση των αποικιών που έφεραν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμιδίο έγινε με κατάλληλες πέψεις με ενδονουκλεάσες περιορισμού. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η HindIII και η SalI. Οι αναμενόμενες ζώνες μετά τη διπλή πέψη είναι 3.877 bp και 1.957 bp (Εικόνα 3.5).

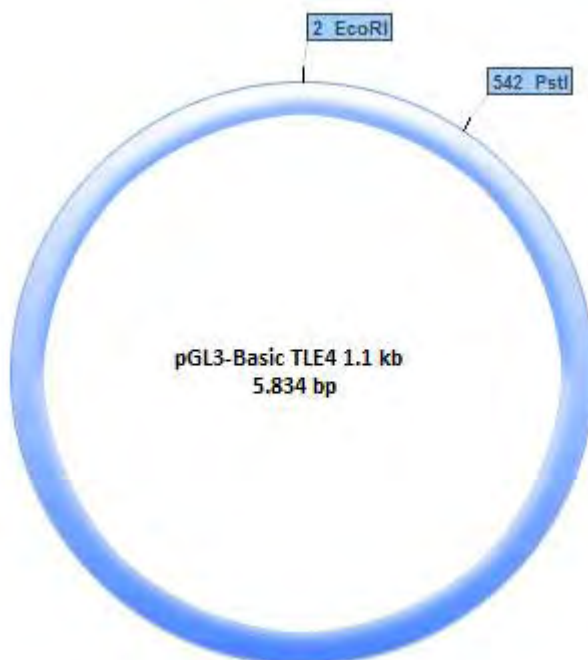


Εικόνα 3.5: Διπλή πέψη για την εύρεση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 1.1 kb*. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 1% w/v.

Όπως φαίνεται και από την παραπάνω εικόνα, όλοι οι κλώνοι εμφανίζουν τις αναμενόμενες ζώνες άρα όλοι οι κλώνοι είναι θετικοί. Έτσι επιλέχθηκε ο κλώνος από τη θέση 1 και ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα με το σύστημα αντιδραστηρίων της εταιρείας Macherey Nagel.

3.4 Κατασκευή του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 0.5 kb* από το πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 1.1 kb*.

Η επόμενη κατασκευή της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της προηγούμενης, με την απομάκρυνση ενός τμήματος EcoRI-PstI μεγέθους περίπου 0,5 kb από το 5' άκρο του υποκινητή του TLE4 (Εικόνα 3.6).



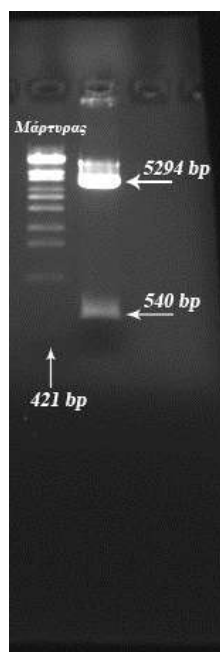
Εικόνα 3.6: Θέσεις κοπής των ενζύμων EcoRI-PstI πάνω στο πλασμίδιο.

Το πρώτο βήμα ήταν η διπλή πέψη του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 1.1 kb* με τα ένζυμα EcoRI και PstI. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι συνθήκες της αντίδρασης (Πίνακας 3.2).

Πέψη του πλασμιδίου <i>pGL3-Basic TLE4 1.1 kb</i> με EcoRI-PstI	
DNA	2 μ g
KGB	1X
EcoRI	7 units
PstI	7 units
Ολονύκτια επώαση στους 37 °C	

Πίνακας 3.2: Αντίδραση πέψης του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 1.1 kb* με EcoRI και PstI.

Έπειτα από την πέψη και αφού ελέγχθηκε πως η διαδικασία ήταν επιτυχής (Εικόνα 3.7) η ποσότητα του DNA φορτώθηκε και ηλεκτροφορήθηκε σε ένα παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v για να καθαριστεί με τη διαδικασία της ηλεκτροέκλουσης.



Εικόνα 3.7: Ηλεκτροφόρηση ελέγχου της πέψης του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 1.1 kb* με *EcoRI* και *PstI*.

Αφού απομονώθηκε η επιθυμητή ζώνη από το πήκτωμα, ακολούθησε η απομάκρυνση των ενζύμων με φαινόλη-χλωροφόρμιο (Ενότητα 2.2.13) και στη συνέχεια καθαρισμός του δείγματος DNA με μοριακή διήθηση σε στήλη G-50 (Ενότητα 2.2.12) για να απομακρυνθούν τα άλατα του ρυθμιστικού διαλύματος της πέψης που προηγήθηκε. Για να επανασυνδεθούν τα άκρα του γραμμοποιημένου πλασμιδίου, εφαρμόστηκε η αντίδραση Kleenow, η οποία μετατρέπει τα ασύμβατα άκρα σε λεία.

Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία επανένωσης των άκρων του πλασμιδίου, τα οποία ήταν πλέον λεία. Έτσι, κατά την αντίδραση της λιγάσης, χρησιμοποιήθηκαν 12,5 ng DNA και 1 μl T4 λιγάση (360 units/μl) σε τελικό όγκο 20 μl.

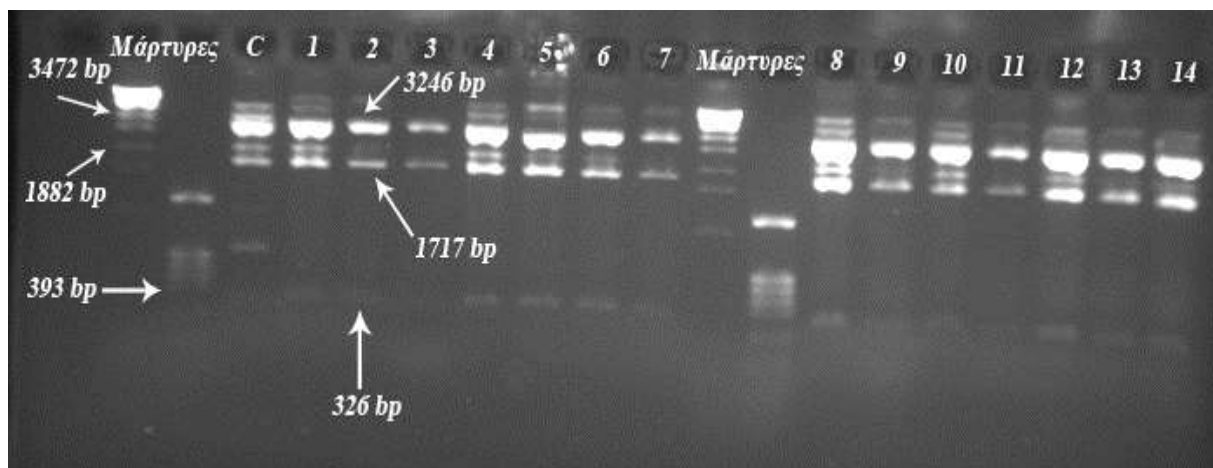
Το επόμενο βήμα ήταν μετασχηματισμός της νέας κατασκευής σε δεκτικά κύτταρα του στελέχους DH5a του βακτηρίου *E.coli* και η επίστρωση σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ. Την επόμενη ημέρα και μετά από επώαση στους 37°C, τα τρυβλία παρουσίαζαν πολύ ικανοποιητική εικόνα και γι' αυτό επιλέχθηκαν 14 μονές αποικίες, οι οποίες επώαστηκαν σε ξεχωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες για 14-16 ώρες.

Η απομόνωση του DNA από κάθε αποικία πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της μεθόδου του βρασμού. Ο έλεγχος των κλώνων που επιλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε με μια διπλή πέψη (Πίνακας 3.3).

Ποσότητες αντιδραστηρίων για πέψη ενός κλώνου	
DNA	0,5 μg
KGB	1X
SmaI	3 units
XbaI	3 units
Ολονύκτια επώαση στους 37°C	

Πίνακας 3.3: Διπλή πέψη για 14 πιθανούς κλώνους του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 0.5 kb*.

Οι ζώνες που αναμένονται από την παραπάνω πέψη είναι η 3.246 bp, η 1.717 bp και η 326 bp. Η πέψη των 14 κλώνων παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 3.8).



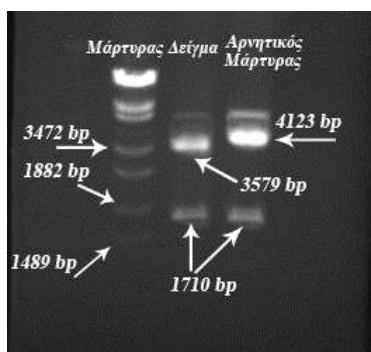
Εικόνα 3.8: Διπλή πέψη των 14 κλώνων για τον εντοπισμό ανασυνδυασμένου κλώνου.

Στο σύνολο τους οι κλώνοι είναι θετικοί. Επιλέχθηκε ο κλώνος από τη θέση 2 και πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα με το σύστημα αντιδραστηρίων της εταιρείας Macherey Nagel.

Το απομονωμένο DNA ελέγχθηκε με διπλή πέψη και συγκεκριμένα με τα ένζυμα XbaI και XhoI. Οι αναμενόμενες ζώνες για τον θετικό κλώνο είναι 3.579 bp και 1.710 bp (Εικόνα 3.9). Κόπηκε επίσης και η πατρική κατασκευή (*pGL3-Basic TLE4 1.1 kb*) ως αρνητικός μάρτυρας, του οποίου οι αναμενόμενες ζώνες είναι 4.123 bp και 1.710 bp. Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται οι ποσότητες του DNA και των ενζύμων περιορισμού (Πίνακας 3.4).

Πέψη των <i>pGL3-Basic TLE4 0.5 kb</i> και <i>pGL3-Basic TLE4 1.1 kb</i>
DNA 0,3 μg
KGB 1X
XbaI 5 units
XhoI 5 units
Επώαση για 2 ώρες στους 37°C

Πίνακας 3.4: Διαγνωστική πέψη για επιβεβαίωση της κατασκευής *pGL3-Basic TLE4 0.5 kb*.



Εικόνα 3.9: Ανάλυση πέψης πλασμιδιακού DNA μετά από απομόνωση προς επαλήθευση του κλώνου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αραρόζης 1% w/v.

3.5 Κατασκευή του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 0.4 kb* και του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 0.3 kb*.

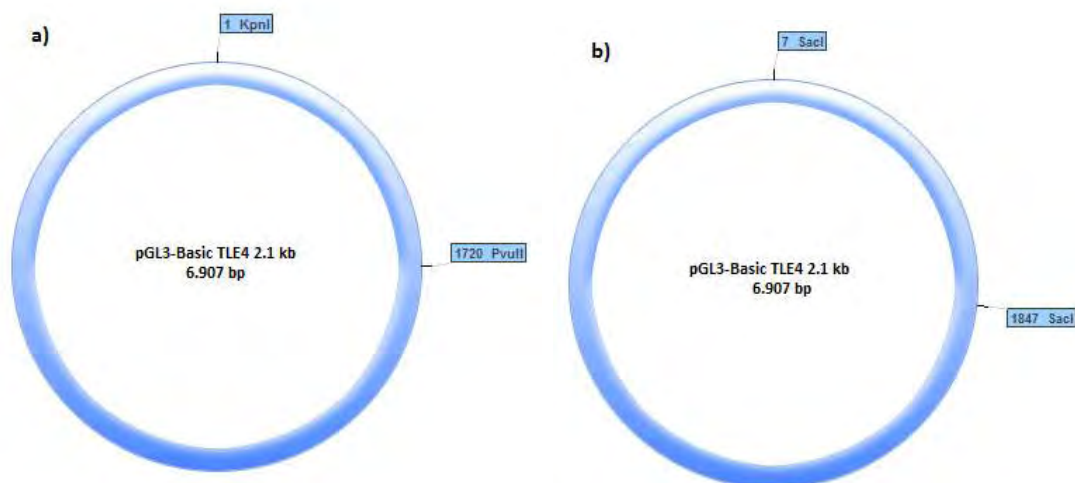
Το *pGL3-Basic TLE4 2.1 kb* αποτέλεσε τη πατρική κατασκευή για τη δημιουργία των δύο νέων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Το πρώτο βήμα για την κατασκευή τους ήταν οι πέψεις, οι οποίες παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 3.5 και Πίνακας 3.6). Επίσης τα 5' τμήματα του υποκινητή του TLE4 που θα αφαιρεθούν σε κάθε μια από τις δύο νέες κατασκευές παρατίθενται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 3.10).

<i>pGL3-Basic TLE4 0.4 kb</i>	
DNA (<i>pGL3Basic-TLE4 2.1 kb</i>)	5 μ g
KGB	0,5X
PvuII	15 units
KpnI	15 units
Ολονύκτια επώαση στους 37°C	

Πίνακας 3.5: Συνθήκες αντίδρασης πέψης για την κατασκευή του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 0.4 kb*.

<i>pGL3-Basic TLE4 0.3 kb</i>	
DNA (<i>pGL3Basic-TLE4 2.1 kb</i>)	1 μ g
KGB	1X
SacI	30 units
Επώαση για 2 ώρες στους 37°C	

Πίνακας 3.6: Συνθήκες αντίδρασης πέψης για την κατασκευή του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 0.3 kb*.



Εικόνα 3.10: α) Η απομάκρυνση των 1.720 bp θα δημιουργήσει το πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 0.4 kb* και β) Η απομάκρυνση των 1.840 bp θα δημιουργήσει το πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 0.3 kb*.

Μετά την ηλεκτροφόρηση ελέγχου, η οποία απέδειξε πως τα ένζυμα έκοψαν το DNA στις σωστές θέσεις και δημιούργησαν τις αναμενόμενες ζώνες, ακολούθησε απομάκρυνση των ενζύμων με φαινόλη-χλωροφόρμιο και καθαρισμός των αλάτων του ρυθμιστικού διαλύματος πέψης μέσω μοριακής διήθησης σε στήλη G-50. Για να επανασυνδεθούν τα άκρα του κομμένου πλασμιδίου με τα ένζυμα PvuII και KpnI εφαρμόστηκε η αντίδραση Klenow, η οποία μετατρέπει τα ασύμβατα άκρα σε λεία.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση λιγάσης για να ξανακολλήσουν τα άκρα των πλασμιδίων και ύστερα από 5 ώρες επώασης της αντίδρασης, το επόμενο βήμα ήταν ο μετασχηματισμός αυτών των νέων πλασμιδίων σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα του στελέχους DH5a του *E.coli* και επίστρωση τους σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ.

Την επόμενη ημέρα ετοιμάστηκαν 3 αποικίες για καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό μέσο από την πρώτη κατασκευή και άλλες 3 αποικίες από τη δεύτερη κατασκευή. Η επώαση τους πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 14-16 ώρες.

Μετά από αυτό το διάστημα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από αυτές τις καλλιέργειες με τη μέθοδο του βρασμού και η διαδικασία συνεχίστηκε με μια πέψη ελέγχου, η οποία εντόπισε τους θετικούς κλώνους. Ένας θετικός κλώνος και από τις δύο νέες κατασκευές, τοποθετήθηκε για υγρή καλλιέργεια για 14-16 ώρες στους 37° C και την επόμενη απομονώθηκαν τα πλασμιδιακά DNA σε μεσαία κλίμακα μέσω αλκαλικής λύσης.

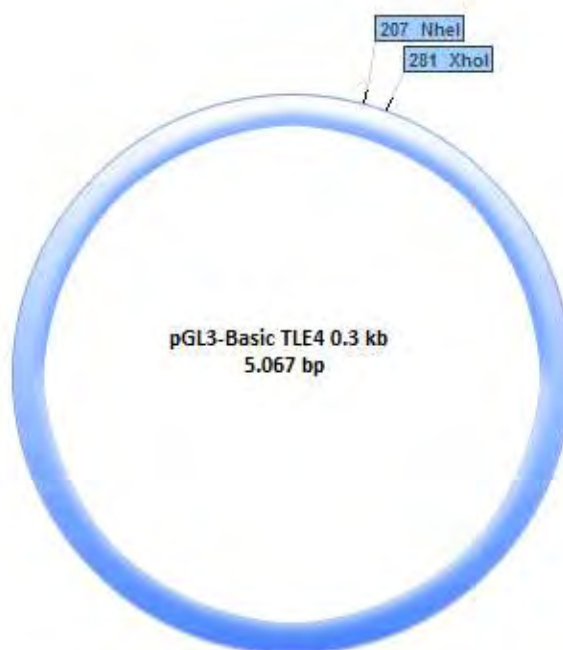
3.6 Κατασκευή των πλασμιδίων pGL3-Basic TLE4 0.2 kb και pGL3-Basic TLE4 0.07 kb.

Προκειμένου να κατασκευαστεί το νέο πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 0.2 kb*, χρησιμοποιήθηκε ως πατρικό το πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 0.3 kb* που αναφέρθηκε παραπάνω. Με μια κατάλληλη διαδικασία πέψης, η οποία παρουσιάζεται στη συνέχεια (Πίνακας 3.7), αποκόπτεται ένα τμήμα 74 bp από το 3' άκρο του υποκινητή του γονιδίου TLE4. Με αυτό τον τρόπο, το μέγεθος του υποκινητή έπεσε περίπου στις 200 bp, γεγονός το οποίο μπορεί να επηρεάζει την ικανότητα του να επάγει τη μεταγραφή.

<i>pGL3-Basic TLE4 0.2 kb</i>	
DNA (<i>pGL3-Basic TLE4 0.3 kb</i>)	2 μg
KGB	1X
NheI	20 units
XhoI	30 units
Επώαση για 5 ώρες στους 37°C	

Πίνακας 3.7: Αντίδραση πέψης του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 0.3 kb* προς κατασκευή του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 0.2 kb*.

Οι θέσεις κοπής από τα ένζυμα περιορισμού καθώς και το τμήμα του DNA που αποκόπτεται παρουσιάζονται την εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 3.11).



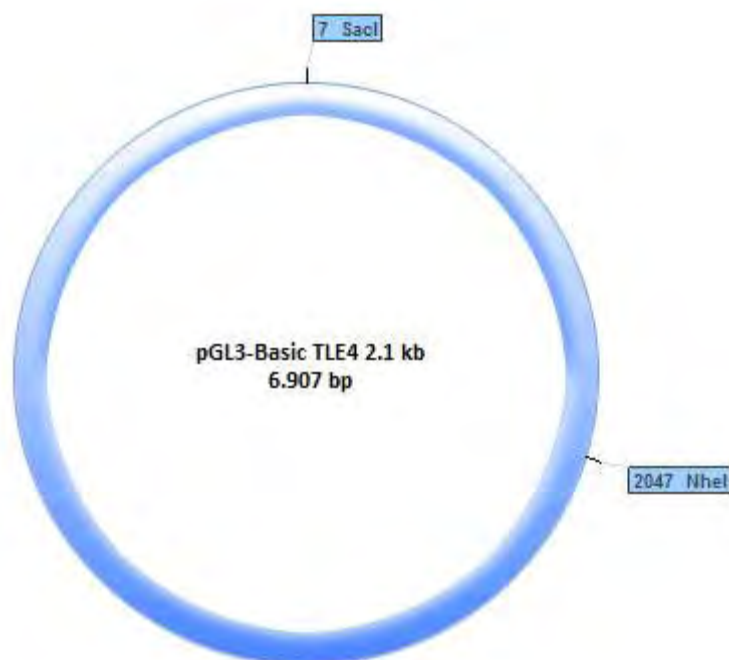
Εικόνα 3.11: Θέσεις κοπής από τα ένζυμα περιορισμού *NheI-XhoI* και απομάκρυνση τμήματος 74 bp από το πατρικό πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 0.3 kb*.

Το πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 0.07 kb* κατασκευάστηκε μετά από πέψη του *pGL3-Basic TLE4 2.1 kb* με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NheI* και *SacI*. Η ακριβής αντίδραση της πέψης φαίνεται παρακάτω (Πίνακας 3.8).

pGL3-Basic TLE4 0.07 kb	
DNA (pGL3-Basic TLE4 2.1 kb)	2 μg
KGB	1X
NheI	20 units
SacI	24 units
Επώαση για 5 ώρες στους 37°C	

Πίνακας 3.8: Πέψη του πλασμιδίου pGL3-Basic TLE4 2.1 kb προς κατασκευή του πλασμιδίου pGL3-Basic TLE4 0.07 kb.

Με αυτή την πέψη απομακρύνονται από τον υποκινητή του γονιδίου 2.040 bp (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12: Οι θέσεις αναγνώρισης από την NheI και τη SacI στο πλασμίδιο pGL3-Basic TLE4 2.1 kb και απομάκρυνση τμήματος 2.040 bp.

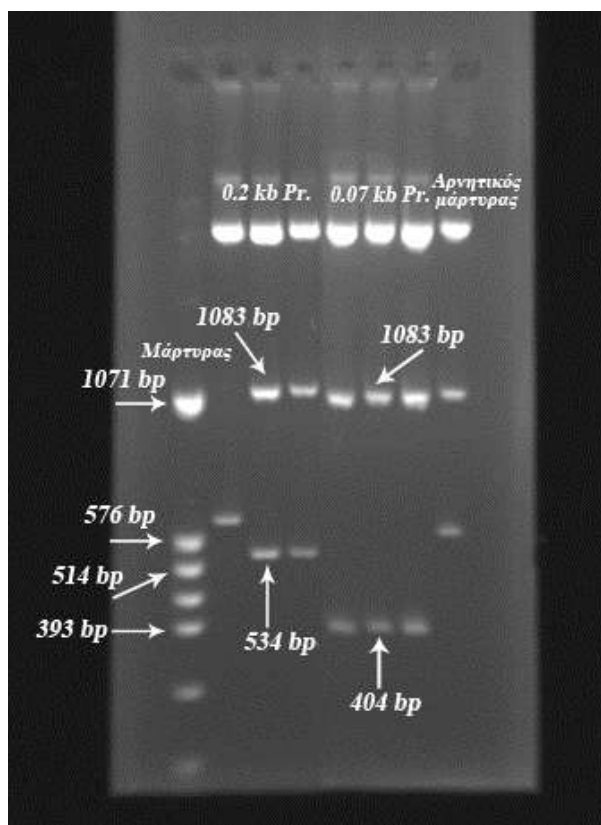
Μετά από την απαιτούμενη επώαση, ηλεκτροφορήθηκε μικρή ποσότητα DNA και από τις δύο παραπάνω αντιδράσεις πέψης και διαπιστώθηκε πως τα ένζυμα έκοψαν στις σωστές θέσεις. Ακολούθησε απομάκρυνση των ενζύμων με φαινόλη-χλωροφόρμιο (Ενότητα 2.2.13) και στη συνέχεια καθαρισμός του δείγματος DNA με μοριακή διήθηση σε στήλη G-50 (Ενότητα 2.2.12) για να απομακρυνθούν τα άλατα του ρυθμιστικού διαλύματος της πέψης που προηγήθηκε.

Έπειτα από τον καθαρισμό, 8 μl από το κάθε DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v για να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή του. Η κατασκευή της πρώτης πέψης παρουσίαζε συγκέντρωση περίπου 15 ng/μl ενώ το πλασμίδιο της δεύτερης πέψης περίπου 12,5 ng/μl.

Τα άκρα αυτών των δύο κομμένων πλασμιδίων ήταν ασύμβατα οπότε εφαρμόστηκε η αντίδραση Kleenow. Μετά τη δημιουργία λείων άκρων, συνεχίστηκε η διαδικασία με την αντίδραση της λιγάσης ώστε να ενωθούν τα άκρα των πλασμιδίων και στη συνέχεια ακολούθησε μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα του στελέχους DH5a του βακτηρίου *E.coli*.

Την επόμενη ημέρα τοποθετήθηκαν από τρεις μονές αποικίες βακτηρίων για καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό και από τις δύο νέες κατασκευές, προκειμένου να πραγματοποιηθεί έλεγχος για το αν τα βακτήρια δέχτηκαν τα νέα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Η επώαση των καλλιεργειών αυτών πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 14-16 ώρες.

Η απομόνωση του DNA από κάθε αποικία μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της μεθόδου του βρασμού. Στη συνέχεια και αφού απομονώθηκαν επιτυχώς τα πλασμιδιακά DNA, ακολούθησε πέψη με το ένζυμο *ScaI* για να διαπιστωθεί αν τα βακτήρια είχαν μετασχηματιστεί επιτυχώς με τα νέα υπό κατασκευή πλασμίδια. Οι ζώνες που αποδείκνυαν πως οι κατασκευές είναι σωστές είναι η 1.083 bp και η 534 bp στο πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 0.2 kb* και η 1.083 bp και η 404 bp στο πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 0.07 kb* (Εικόνα 3.13).



Εικόνα 3.13: Πέψη των αποικιών με το ένζυμο *ScaI* για έλεγχο θετικού κλώνου. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v.

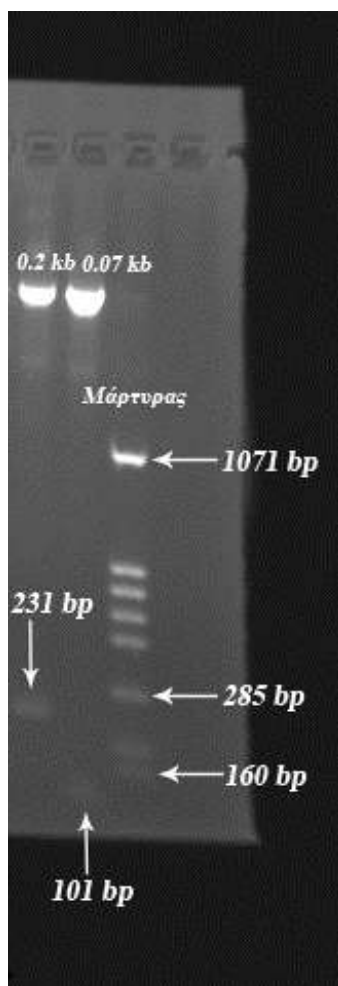
Από την παραπάνω φωτογραφία, διαπιστώθηκε πως οι κλώνοι 2 και 3 του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 0.2 kb* είναι θετικοί, δηλαδή έχουν προσλάβει το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Επιλέχθηκε ο κλώνος 2 και πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα μέσω αλκαλικής λύσης. Από το πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 0.07 kb*, θετικοί ήταν και οι 3 κλώνοι και επιλέχθηκε ο κλώνος 1 για απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

Μετά τις απομονώσεις αυτών των δύο νέων κατασκευών, πραγματοποιήθηκε μια ακόμα διαγνωστική πέψη για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων (Πίνακας 3.9).

DNA	0.5 µg
KGB	0.5 X
KpnI	2 units
HindIII	3 units
Επώαση για 2 ώρες στους 37°C	

Πίνακας 3.9: Διαγνωστική πέψη για την επαλήθευση των κατασκευών *pGL3-Basic TLE4 0.2 kb* και *pGL3-Basic TLE4 0.07 kb*.

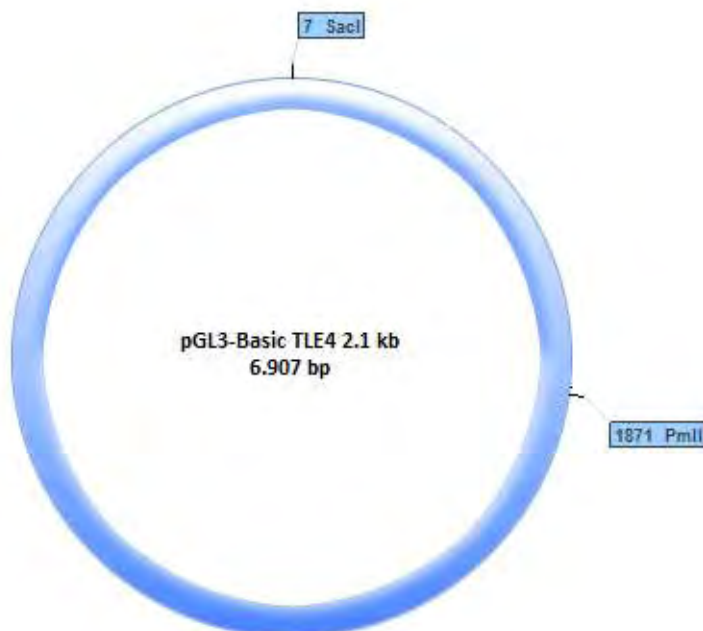
Τα δύο δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v (Εικόνα 3.14). Οι ζώνες που επιβεβαίωναν την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων ήταν η 231 bp και η 101 bp για το πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 0.2 kb* και για το πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 0.07 kb* αντίστοιχα.



Εικόνα 3.14: Διαγνωστική πέψη για την επαλήθευση των κατασκευών *pGL3-Basic TLE4 0.2 kb* και *pGL3-Basic TLE4 0.07 kb*.

3.7 Δημιουργία του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 0.25 kb*.

Το πλασμίδιο αυτό δημιουργήθηκε μετά από πέψη του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 2.1 kb* με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *PmlI* και *SacI*. Με αυτό τον τρόπο απομακρύνεται ένα κομμάτι μεγέθους 1850 bp από το 5' άκρο του υποκινητή. (Εικόνα 3.15).

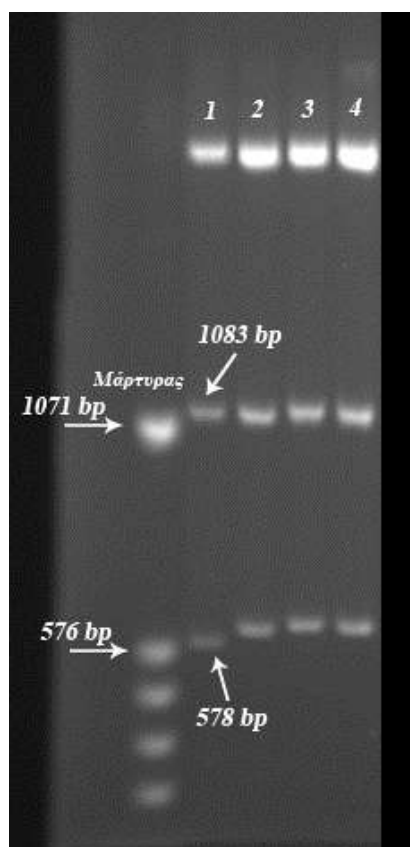


Εικόνα 3.15: Θέσεις κοπής των ενζύμων *PmlI* και *SacI* πάνω στο πατρικό πλασμίδιο *pGL3-Basic TLE4 2.1 kb*.

Μετά την διπλή πέψη, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση των ενζύμων περιορισμού με φαινόλη-χλωροφόρμιο και αμέσως μετά καθαρισμός από τα άλατα του διαλύματος της πέψης μέσω μοριακής διήθησης από στήλη G-50 Sephadex.

Το επόμενο βήμα ήταν να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA, η οποία εκτιμήθηκε περίπου στα 15 ng/μl. Εξαιτίας των διαφορετικών άκρων που δημιουργούνται μετά την δράση των ενζύμων περιορισμού, έπρεπε να εφαρμοστεί η αντίδραση Klenow για να μετατραπούν τα ασύμβατα άκρα σε λεία και να είναι δυνατή η επανασύνδεση τους. Στην αντίδραση λιγάσης χρησιμοποιήθηκαν περίπου 5 ng DNA και 1 μl (360 units) από το ένζυμο T4 Ligase. Η επώαση της αντίδρασης λιγάσης ήταν 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας αυτού του χρόνου ακολούθησε μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα του στελέχους DH5a του βακτηρίου *E.coli*. Την επόμενη ημέρα τοποθετήθηκαν 4 αποικίες σε ξεχωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες με υγρό θρεπτικό μέσο και ακολούθησε επώαση για 14-16 ώρες.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από αυτές τις 4 αποικίες με τη μέθοδο του βρασμού. Ο έλεγχος για κλώνους, οι οποίοι ίσως προσέλαβαν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια πέψης με το ένζυμο *ScaI* (Εικόνα 3.16). Οι διαγνωστικές ζώνες είναι η 578 bp και η 1.083 bp και όπως φαίνεται στην εικόνα, το πλασμιδιακό DNA στη θέση 1 είναι σωστό.



Εικόνα 3.16: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 1,5% w/v τεσσάρων πλασμιδιακών DNA για την ανεύρεση του επιθυμητού ανασυνδυασμένου κλώνου.

Ο κλώνος από τη θέση 1 καλλιεργήθηκε προς απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα.

3.8 Κατασκευή του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 0.22 kb*.

Η νέα αυτή κατασκευή ξεκίνησε με την πέψη του πλασμιδίου *pGL3-Basic TLE4 0.25 kb*. Αυτό το πλασμίδιο γραμμοποιήθηκε δύο φορές καθώς υπέστη δύο πέψεις με διαφορετικά ένζυμα (Πίνακες 3.10 και 3.11).

DNA	5 μg
KGB	1X
BglII	30 units
Ολονύκτια επώαση στους 37 °C	

Πίνακας 3.10: Πέψη με *BglI*.

DNA	5 μg
KGB	1X
KpnI	25 units
Ολονύκτια επώαση στους 37 °C	

Πίνακας 3.11: Πέψη με *KpnI*.

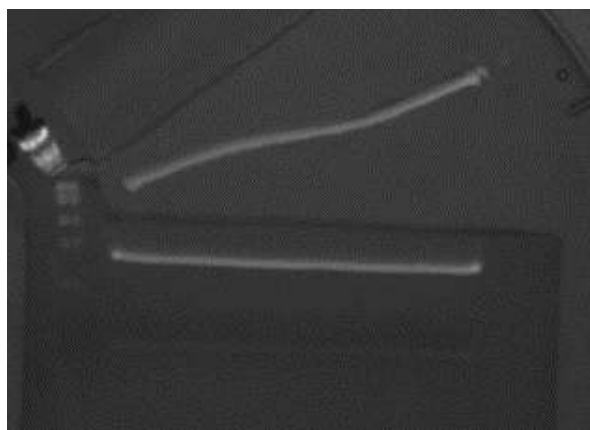
Την επόμενη ημέρα, τα διαλύματα των πέψεων τοποθετούνται στους 80° C για να πραγματοποιηθεί η απενεργοποίηση των ενζύμων περιορισμού εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας. Μετά από την απενεργοποίηση, ακολούθησε η αντίδραση Klenow για να μετατραπούν τα ασύμβατα άκρα σε λεία. Το επόμενο βήμα ήταν η απομάκρυνση των ενζύμων με φαινόλη-χλωροφόρμιο (CHCl₃) και στήλη G-50 για απομάκρυνση των αλάτων πέψης.

Η διαδικασία συνεχίστηκε με κοινή πέψη των δύο πλασμιδίων (ίδιο DNA, γραμμοποιημένο με διαφορετικά ένζυμα) με 35 units του ενζύμου BamHI. Μετά από αυτό, μικρή ποσότητα των δειγμάτων ηλεκτροφορήθηκε για να διαπιστωθεί πως τα ένζυμα έκοψαν στις σωστές θέσεις (Εικόνα 3.17).



Εικόνα 3.17: Στη θέση 1 είναι το πλασμίδιο κομμένο σωστά με BglI-BamHI και στη θέση 2 το πλασμίδιο κομμένο σωστά με KpnI-BamHI.

Μετά την παραπάνω ηλεκτροφόρηση και αφού τα DNA ήταν σωστά κομμένα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός των επιθυμητών τμημάτων τους με τη μέθοδο της ηλεκτροέκλουσης. Συγκεκριμένα, απομονώθηκε η ζώνη 2.190 bp στο κομμένο DNA με BglI-BamHI και η ζώνη 2.811 bp στο κομμένο DNA με KpnI-BamHI (Εικόνες 3.18 και 3.19).



Εικόνα 3.18: DNA κομμένο με BglI-BamHI.

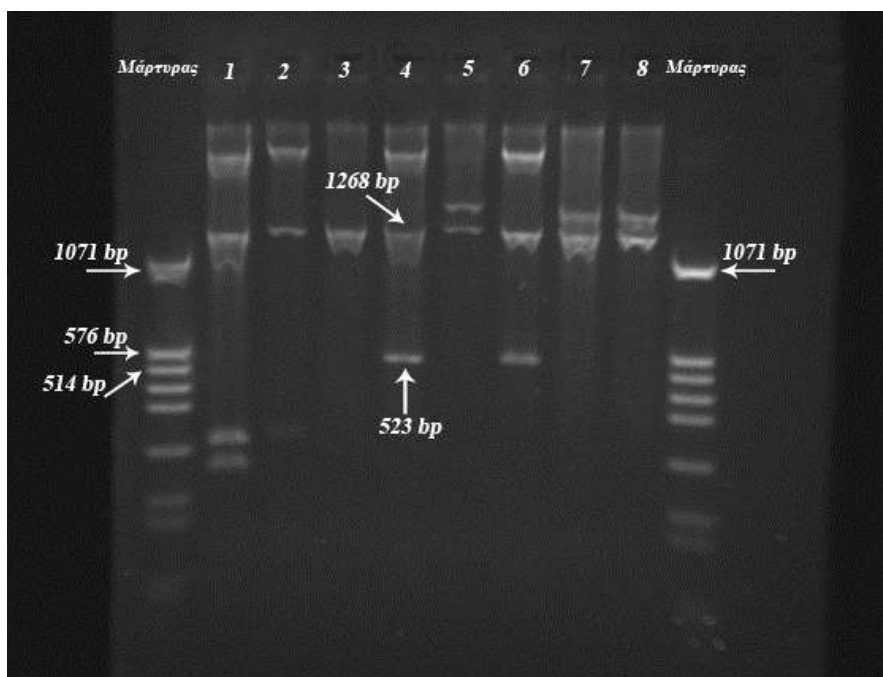


Εικόνα 3.19: DNA κομμένο με *KpnI-BamHI*.

Στη συνέχεια και με απομονωμένα πλέον τα επιθυμητά τμήματα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης, η οποία επώαστηκε για 4 ώρες και αμέσως μετά έγινε μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα του στελέχους DH5a του βακτηρίου *E.coli*. Την επόμενη ημέρα επιλέχθηκαν 8 αποικίες για καλλιέργεια σε ξεχωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες με υγρό θρεπτικό LB.

Μετά από 16 ώρες καλλιέργειας, τα πλασμιδιακά DNA των 8 αποικιών απομονώθηκαν με τη μέθοδο του βρασμού και υπέστησαν πέψη με τα ένζυμα *HindIII* και *BglII* για τον εντοπισμό της νέας επιθυμητής κατασκευής. Η διαδικασία της πέψης διήρκησε 2 ώρες στους 37° C.

Μετά το πέρας αυτού του χρόνου, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v. Οι αναμενόμενες ζώνες για τους θετικούς κλώνους είναι 3.214 bp, 1.268 bp και 523 bp (Εικόνα 3.20).



Εικόνα 3.20: Ηλεκτροφόρηση 8 δειγμάτων. Θετική εικόνα παρουσιάζουν τα πλασμιδιακά DNA στις θέσεις 4 και 6.

Το πλασμιδιακό DNA από τη θέση 4 τοποθετήθηκε για καλλιέργεια και την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του σε μεσαία κλίμακα μέσω αλκαλικής λύσης.

3.9 Δημιουργία του πλασμιδίου pGL3-Basic TLE4 (DSacII.NheI;PmlI).

Αυτή η νέα κατασκευή ξεκίνησε με διπλή πέψη του πλασμιδίου pGL3-Basic TLE4 0.25 kb με τα εξής ένζυμα περιορισμού: SacII και NheI (Πίνακας 3.12).

DNA	1,5 µg
KGB	0,5 X
SacII	25 units
NheI	25 units
Επώαση για 2 ώρες στους 37°C	

Πίνακας 3.12: Αντίδραση διπλής πέψης του πλασμιδίου pGL3-Basic TLE4 0.25 kb.

Αφού ολοκληρώθηκε η πέψη, το διάλυμα πέψης τοποθετήθηκε στους 80° C για 30 λεπτά για να απενεργοποιηθούν τα ένζυμα κοπής. Μετά, η διαδικασία προχώρησε με καθαρισμό με φαινόλη-χλωροφόρμιο και τελικά με καθαρισμό των αλάτων μέσω στήλης Sephadex G-50.

Τα ένζυμα περιορισμού αναγνωρίζουν διαφορετικές αλληλουχίες ως θέσεις κοπής και δημιουργούν διαφορετικά άκρα. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση Klepov για να γίνουν τα άκρα λεία. Ακολούθησε και πάλι καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο και με στήλη G-50.

Υστερα, η διαδικασία έφτασε στο σημείο της αντίδρασης λιγάσης, ώστε να επανασυνδεθούν τα λεία άκρα και να κλείσει το πλασμίδιο. Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 15 ng DNA και 500 units ενζύμου T4 Ligase. Μετά την επώαση αυτής της αντίδρασης, η οποία κράτησε περίπου 3 ώρες, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα του στελέχους DH5a του βακτηρίου *E.coli*.

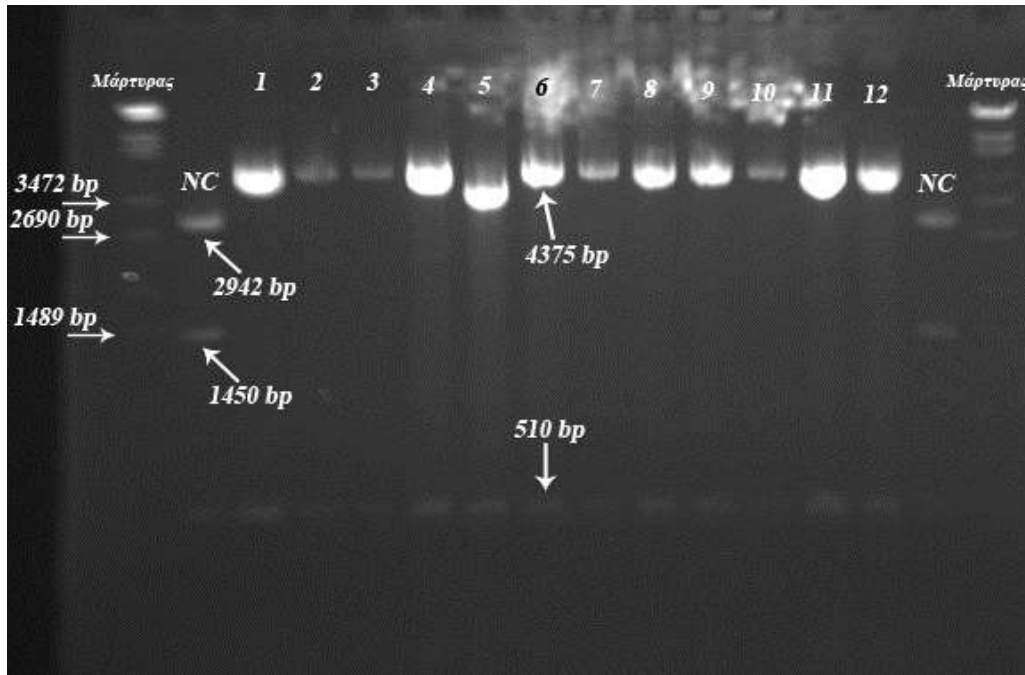
Την επόμενη ημέρα, τοποθετήθηκαν 12 αποικίες σε υγρή καλλιέργεια με επώαση στους 37°C για 14-16 ώρες, με σκοπό την ανεύρεση θετικών κλώνων, δηλαδή βακτηρίων που θα έχουν προσλάβει την επιθυμητή νέα κατασκευή. Επίσης, τοποθετήθηκαν και δύο αποικίες, οι οποίες περιείχαν το πατρικό πλασμίδιο και χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες.

Μετά το πέρας της καλλιέργειας, απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA από αυτές τις 14 αποικίες με τη μέθοδο του βρασμού. Για να διαπιστωθεί αν υπάρχει η επιθυμητή κατασκευή μέσα σ' αυτούς τους κλώνους, έγινε μια διπλή διαγνωστική πέψη, οι λεπτομέρειες της οποίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.13).

DNA	0.4 µg
KGB	0.5X
HincII	3 units
SacII	3 units
Επώαση για 2 ώρες στους 37°C	

Πίνακας 3.13: Στοιχεία διπλής διαγνωστικής πέψης για ένα πλασμιδιακό DNA.

Αφού τελείωσε η παραπάνω διαδικασία, όλα τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. Οι αναμενόμενες ζώνες για τους θετικούς κλώνους είναι οι εξής: 4.375 bp και 510 bp (Εικόνα 3.21).



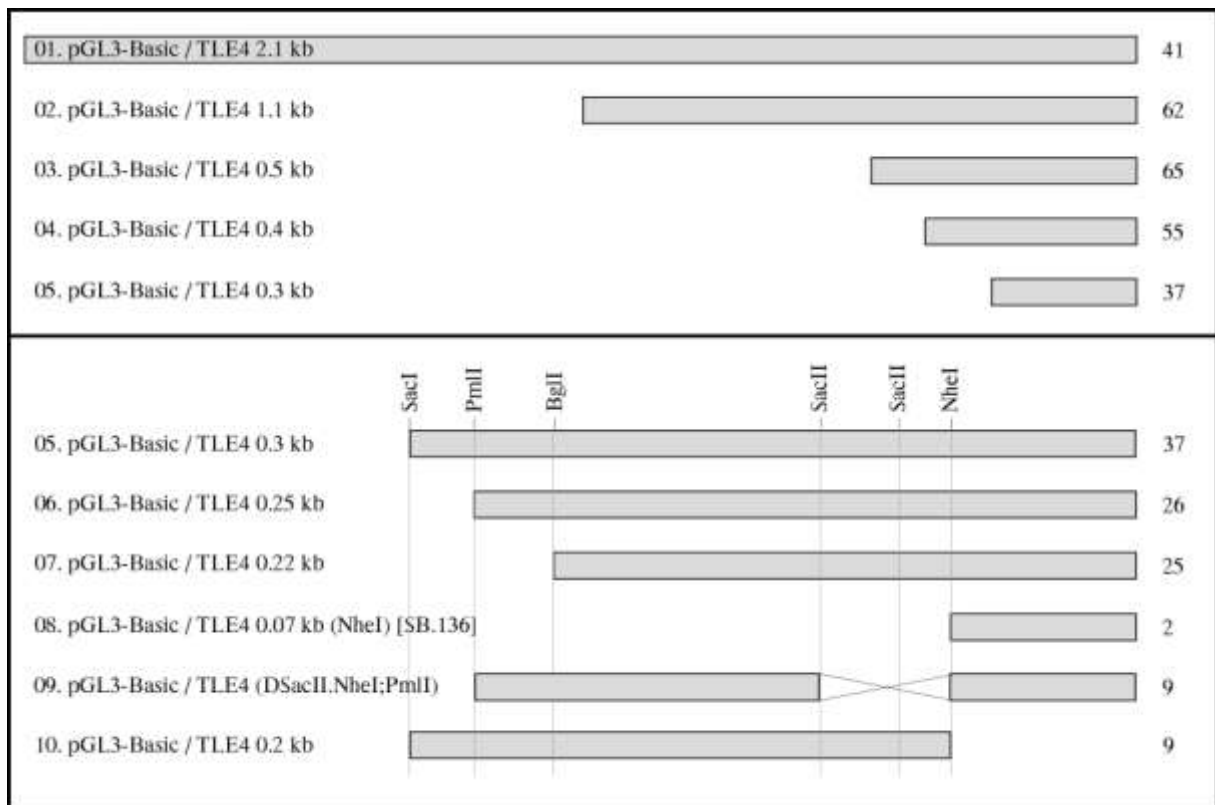
Εικόνα 3.21: Ηλεκτροφόρηση 14 δειγμάτων (12 πιθανοί θετικοί κλώνοι και 2 αρνητικοί μάρτυρες) για τον εντοπισμό θετικών κλώνων του πλασμιδίου pGL3-Basic TLE4 (DSacII.NheI;PmlI).

Από την παραπάνω φωτογραφία βγήκε το συμπέρασμα πως και οι 12 αποικίες είναι θετικές, δηλαδή έχουν προσλάβει το επιθυμητό νέο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Η αποικία που αντιστοιχεί στη θέση 6 τοποθετήθηκε για υγρή καλλιέργεια στους 37° C για 14-16 ώρες για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα.

3.10 Διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς HEK293 με πλασμιδιακά DNA και μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης.

Το πρώτο σκέλος αυτής της πτυχιακής εργασίας ολοκληρώθηκε επιτυχώς, καθώς κατασκευάστηκαν όλα τα επιθυμητά πλασμίδια έκφρασης της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο τμημάτων του υποκινητή του γονιδίου TLE4. Το επόμενο βήμα ήταν η διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς HEK293, με το σύνολο των πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν παραπάνω. Ύστερα η διαδικασία συνεχίστηκε με την απομόνωση των κυτταρικών εκχυλισμάτων και τη μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης. Η διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών έγινε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στις ενότητες 2.2.15 και 2.2.16. Τα αποτελέσματα της διαμόλυνσης παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 3.22).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.22, το τμήμα του υποκινητή που εκτείνεται περίπου 2.1 kb - 04 kb ανοδικά από την περιοχή της έναρξης της μεταγραφής δεν περιέχει σημαντικά στοιχεία που να ρυθμίζουν θετικά τη μεταγραφή του γονιδίου. Το τμήμα μάλιστα που εκτείνεται περίπου 2.1 kb - 1.1 kb ανοδικά από την περιοχή της έναρξης της μεταγραφής ενδεχομένως περιέχει στοιχεία τα οποία επηρεάζουν αρνητικά τη μεταγραφή του γονιδίου. Στοιχεία με θετικό ρόλο στη μεταγραφή φαίνεται να υπάρχουν στα τμήματα που εκτείνονται περίπου 0,4 kb ανοδικά από την περιοχή της έναρξης της μεταγραφής μέχρι αυτή και ιδιαίτερα στα τελευταία περίπου 0.2 kb, ολική η μερική απώλεια των οποίων ρίχνει σχεδόν σε μηδενικά επίπεδα την έκφραση της λουσιφεράσης.



Εικόνα 3.22: Αποτελέσματα της διαμόλυνσης 10 διαφορετικών πλασμιδίων στην κυτταρική σειρά HEK293. Ως σημείο 0 θεωρούμε τη βάση 39 του mRNA, σύμφωνα με το EST (expressed sequence tag) GenBank: CX238105.1 που εκτείνεται ανοδικά του κωδικονίου έναρξης ATG περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο γνωστό cDNA. Δεξιά από κάθε κατασκευή δίνονται τα επίπεδα έκφρασης της λουσιφεράσης σε αυθαίρετες μονάδες.

Τα παραπάνω αποτελέσματα της διαμόλυνσης θα παρουσιαστούν και θα σχολιαστούν εκτενέστερα στην επόμενη ενότητα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σωστή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία κάθε οργανισμού. Η γονιδιακή έκφραση έγκειται στη διαφορική έκφραση γονιδίων που στην περίπτωση των προκαρυωτικών οργανισμών, επιφέρει αλλαγές που είναι επιβεβλημένες για την επιβίωση τους στο συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον τους. Για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η γονιδιακή ρύθμιση είναι επιπλέον υπεύθυνη για τη δημιουργία και τη φυσιολογική λειτουργία διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Ένα από τα στάδια και ίσως το πιο κρίσιμο από όλα, στα οποία επιτελείται η γονιδιακή ρύθμιση, είναι αυτό της μεταγραφής που ελέγχεται κυρίως από μια κατηγορία πρωτεϊνών που ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες.

Το γονίδιο *tle4* είναι μέλος της οικογένειας συγκαταστολέων μεταγραφικών παραγόντων Groucho/TLE και μετέχει σε πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία ρυθμίζουν την ανάπτυξη των ζώων. Ο συγκεκριμένος παράγοντας στερείται επικράτειας πρόσδεσης στο DNA και για αυτό το λόγο στρατολογείται σε *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία μέσω των καταστολέων με τους οποίους αλληλεπιδρά. Το γονίδιο *tle4* έχει αποδειχθεί πως εκφράζεται σε μεγάλο αριθμό ιστών αλλά περισσότερο στον εγκέφαλο και τους σκελετικούς μύες.

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε ο υποκινητής του γονιδίου *tle4*. Αρχικά, ένα τμήμα μήκους περίπου 2.1 kb του υποκινητή του γονιδίου *tle4*, το οποίο σύμφωνα με το EST (expressed sequence tag) GenBank: CX238105.1, που εκτείνεται ανοδικά του κωδικονίου έναρξης ATG περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο γνωστό cDNA, περιλαμβάνει τη θέση έναρξης της μεταγραφής και τις πρώτες 39 βάσεις της 5' αμετάφραστης περιοχής του mRNA, εισήχθη με τεχνικές μοριακής βιολογίας σε ένα κατάλληλο πλασμίδιο που έφερε ως γονίδιο αναφοράς αυτό της λουσιφεράσης. Ακολούθησαν στοχευμένες απομακρύνσεις τμημάτων αυτού του υποκινητή. Σε όλα τα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν, το γονίδιο της λουσιφεράσης τέθηκε υπό τον έλεγχο τμημάτων του υποκινητή του γονιδίου *tle4*. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν μετά από την διαδικασία διαμόλυνσης των πλασμιδίων στην κυτταρική σειρά HEK293 και τα οποία παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα, αποδεικνύουν πως το τμήμα αυτό του υποκινητή του γονιδίου περιέχει εξαιρετικά σημαντικές ρυθμιστικές αλληλουχίες, απολύτως απαραίτητες για την επαγωγή της μεταγραφής.

Αναλυτικά, δεν παρατηρήθηκε κάποια ιδιαίτερη πτώση στα επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου εφόσον διατηρούνταν ανέπαφα τα περίπου 400 ζεύγη βάσεων ανοδικά της περιοχής έναρξης της μεταγραφής. Η σταδιακή περαιτέρω απομάκρυνση τμημάτων του υποκινητή οδήγησε σε βαθμιαία πτώση των επιπέδων λουσιφεράσης (με εξαίρεση την απομάκρυνση ενός μικρού τμήματος περίπου 30 ζευγών βάσεων μεταξύ των περιοριστικών θέσεων PmlI-BglII το οποίο δεν φαίνεται να συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης του *tle4* – βλ. Εικόνα 3.22) τα οποία πρακτικά μηδενίζονται στην κατασκευή pGL3-Basic TLE4 0.07 kb η οποία περιέχει ένα τμήμα του *tle4* μεγέθους περίπου 70 ζευγών βάσεων περιλαμβανομένων των πρώτων 39 βάσεων της 5' αμετάφραστης περιοχής του mRNA του. Η μείωση αυτή των επιπέδων της λουσιφεράσης, προφανώς οφείλεται σε ρυθμιστικά στοιχεία απαραίτητα για τη φυσιολογική μεταγραφή του *tle4*. Τα πιο κρίσιμα ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής φαίνεται πως περιέχονται στα τελευταία περίπου 200 bp του υποκινητή του γονιδίου *tle4* καθώς πλήρης ή μερική απομάκρυνση τους, ρίχνει σχεδόν σε μηδενικά επίπεδα την έκφραση της λουσιφεράσης.

Συμπερασματικά, οι παραπάνω πειραματικές παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα πως στην περιοχή που εκτείνεται περίπου 0,4 kb ανοδικά από την θέση της έναρξης της μεταγραφής και μέχρι αυτή, υπάρχουν πολλά ρυθμιστικά στοιχεία, τα οποία επηρεάζουν την απόδοση της μεταγραφικής διαδικασίας. Μπορεί να ειπωθεί πως στο τμήμα 2.1 kb έως 0.5 kb δεν βρίσκεται κάποια κρίσιμη αλληλουχία, απαραίτητη για τη φυσιολογική μεταγραφή. Ωστόσο, στο τμήμα των επόμενων περίπου 500 bp και ιδιαίτερα στα τελευταία περίπου 200 bp του υποκινητή, όπως μαρτυρούν τα πειραματικά αποτελέσματα, περιέχονται απολύτως απαραίτητα ρυθμιστικά στοιχεία για την έναρξη της διαδικασίας της μεταγραφής.

Τα επόμενα βήματα για την πρόοδο αυτής της έρευνας είναι η δημιουργία νέων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, τα οποία θα περιέχουν τμήματα αλλά και συνδυασμούς τμημάτων του αρχικού τμήματος του υποκινητή του γονιδίου *tle4* που δεν μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία, με την ελπίδα πως θα προσεγγιστούν όσο το δυνατόν καλύτερα και έγκυρα οι πιο κρίσιμες αλληλουχίες του για τη διαδικασία της μεταγραφής. Ερευνητική πρόκληση αποτελεί επίσης και ο εντοπισμός του υπεύθυνου ή υπεύθυνων μορίων για την ενεργοποίηση του *tle4*, γεγονός το οποίο θα συνέβαλε ουσιαστικά στην καλύτερη γνώση και κατανόηση της γονιδιακής ρύθμισης αυτού του παράγοντα όπως επίσης θα εμπλούτιζε και τις γνώσεις πάνω στο ρόλο που κατέχει στη δημιουργία των οργανισμών.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία:

- [1] J.M.W. SLACK, *Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης*, Δεύτερη Έκδοση, 2006.
- [2] Anders Gorm Pedersen, Pierre Baldi, Yves Chauvin, Soren Brunak, The biology of eukaryotic promoter prediction-a review, *Computers & Chemistry*, 1999, **23**, 191-207.
- [3] K. Gaston and P.S. Jayaraman, Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms-review, *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003, **60**, 721-741.
- [4] Peter J. Russell, *iGenetics-Μια Μεντελική Προσέγγιση*, Τόμος Δεύτερος, 2009.
- [5] www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/learning-center/pathway-slides-and/modular-structure.html
- [6] Benjamin Lewin, *Genes VIII*, Δεύτερος Τόμος, 2004.
- [7] Rainer Renkawitz, Transcriptional repression in eukaryotes, *Trends in Genetics*, 1990, **6**, 192-196.
- [8] Mattias Mannervik and Michael Levine, The Rpd3 histone deacetylase is required for segmentation of the *Drosophila* embryo, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, **96**, 6797-6801.
- [9] Roose J., Clevers H., TCF transcription factors: Molecular switches in carcinogenesis, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1999, **1424**, M23-M37.
- [10] Susan Gray and Michael Levine, Transcriptional repression in development, *Cell Biology*, 1996, **8**, 358-364.
- [11] D.N. Arnosti, Multiple Mechanisms of Transcriptional Repression in Eukaryotes, *Transcription Factor*, 2004, **166**, 33-67.
- [12] Wendy Hanna-Rose and Ulla Hansen, Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors, *Trends in Genetics*, 1996, **12**, 229-234.
- [13] Les J. Burke and Aria Baniahmad, Co-repressors 2000, *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 2000, **14**, 1876-1888.
- [14] Lindsley E.B. and Grell E.H., Genetic Variation of *Drosophila melanogaster*, Publ. No **627**, Carnegie Institute, 1968, Washington DC.
- [15] Alfred L. Fisher and Michael Caudy, Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates, *Genes Dev.*, 1998, **12**, 1931-1940.
- [16] Susan M. Parkhurst, Groucho: making its Marx as a transcriptional co-repressor, *Trends in Genetics*, 1998, **14**, 130-132.
- [17] Guoqing Chen and Albert J. Courey, Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression, *GENE*, 2000, **249**, 1-16.

- [18] Manuel Buscarlet and Stefano Stifani, The 'Marx' of Groucho on development and disease, *TRENDS in Cell Biology*, 2007, **17(7)**, 353-361.
- [19] Mallo M., Franco del Amo F., Gridley T., Cloning and developmental expression of Grg, a mouse gene related to the groucho transcript of the Drosophila Enhancer of split complex, *Mechanisms of Development*, 1993, **42**, 67-76.
- [20] Pflugrad A., Meir J.Y., Barnes T.M., Miller D.M., The Groucho-like transcription factor UNC-37 functions with the neural specificity gene unc-4 to govern motor neuron identity in *C. elegans*, *Development*, 1997, **124**, 1699-1709.
- [21] Stifani S., Blaumueller CM., Redhead NJ., Hill RE., Artavanis-Tsakonas S: Human homologs of a Drosophila Enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins, *Nat Genet*, 1992, **2**, 119-127.
- [22] Hartley DA., Preiss A., Artavanis-Tsakonas S., A deduced gene product from the Drosophila neurogenic locus, enhancer of split, shows homology to mammalian G-protein beta subunit, *Cell*, 1998, **55**, 785-795.
- [23] Bajoghli B., Evolution of the Groucho/Tle gene family: gene organization and duplication events, *Dev Genes Evol*, 2007, **217**, 613-618.
- [24] Cinnamon Einat and Paroush Ze'ev, Context-dependent regulation of Groucho/TLE-mediated repression, *Genetics & Development*, 2008, **18**, 435-440.
- [25] Daniels Danette L & Weis William I, β -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation, *Nature structural & molecular biology*, 2005, **12**, 364-371.
- [26] Zifa A., *Διακυτταρική Επικοινωνία-Μεταγωγή Σήματος*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2008.
- [27] Ang Hwee-Luan and Tergaonkar Vinay, Notch and NF κ B signaling pathways: do they collaborate in normal vertebrate brain development and function?, *BioEssays*, 2007, **29**, 1039-1047.
- [28] Beatus P. and Lendahl U., Notch and neurogenesis, *J Neuroscience Res*, 1998, **54**, 125-136.
- [29] Bray S., Notch signaling in Drosophila: three ways to use a pathway, *Semin Cell Dev Biol*, 1998, **9**, 591-597.
- [30] Lewis J., Notch signaling and the control of cell fate choices in vertebrates, *Semin Cell Dev Biol*, 1998, **9**, 583-589.
- [31] Simpson P., Notch and the choice of cell fate in Drosophila neuroepithelium, *Trends Genet.*, 1990, **6**, 343-345.
- [32] Nagel AC., Krejci A., Tenin G., Bravo-Patino A., Bray S., Maier D., Preiss A, Hairless-mediated repression of Notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors, *Mol Cell Biol.*, 2005, **25**, 10433-10441.

- [33] Barolo S., Stone T., Bang AG., Posakony JW., Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless, *Genes Dev.*, 2002, **16**, 1964-1976.
- [34] Jennings Barbara H. and Ish-Horowicz David, The Groucho/TLE/Grg family of transcriptional co-repressors, *Genome Biology*, 2008, **9**, 205.
- [35] Orian A., Delrow JJ., Rosales Nieves AE., Abed M., Metzger D., Paroush Z., Eisenman RN., Parkhurst SM., A Myc-Groucho complex integrates EGF and Notch signaling to regulate neural development, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**, 15771-15776.
- [36] Sekiya T., Zaret KS., Repression by Groucho/TLE/Grg proteins: genomic site recruitment generates compacted chromatin in vitro and impairs activator binding in vivo, *Mol Cell*, 2007, **28**, 291-303.
- [37] Chen G., Fernandez J., Mische S., Courey AJ., A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the co-repressor groucho in Drosophila development, *Genes Dev.*, 1999, **13**, 2218-2230.
- [38] Jennings Barbara H., Pickles Laura M., Wainwright S. Mark, Roe S. Mark, Pearl H. Laurence and Ish-Horowicz David, Molecular Recognition of Transcriptional Repressor Motifs by the WD Domain of the Groucho/TLE Corepressor, *Molecular Cell*, 2006, **22**, 645-655.
- [39] Paroush Z., Finley R.L., Kidd T., Wainwright S.M., Ingham P.W., Brent R., Ish-Horowicz D., Groucho is required for Drosophila neurogenesis, segmentation and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins, *Cell*, 1994, **79**, 805-815.
- [40] Smith S.T., Jaynes J.B., A conserved region of engrailed, shared among all en-, gsc-, Nk1-, Nk2- and msh- class homoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo, *Development*, 1996, **122**, 3141-3150.
- [41] Zagouras P., et al., Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1995, **92**, 6414-6418.
- [42] Liu Y., et al., Epithelial expression and chromosomal location of human TLE genes: implications for Notch signaling and neoplasia, *Genomics*, 1996, **31**, 58-64.
- [43] Bray S.J., Notch signaling: a simple pathway becomes complex, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2006, **7**, 678-689.
- [44] Sundaram M.V., The love-hate relationship between Ras and Notch, *Genes Dev.*, 2005, **19**, 1825-1839.
- [45] Ju B.G., et al., Activating the PARP-1 sensor component of the Groucho/TLE1 corepressor complex mediates a CaM Kinase II delta-dependent neurogenic gene activation pathway, *Cell*, 2004, **119**, 815-829.
- [46] Hartmann C., et al., Diagnostic and molecular pathology of meningiomas, *Expert Rev. Neurother.*, 2006, **6**, 1671-1683.

- [47] Cuevas I.C., et al., Meningioma transcript profiles reveal deregulated Notch signaling pathway, *Cancer Res.*, 2005, **65**, 5070-5075.
- [48] Moreno C.S., et al., Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses, *Cancer Res.*, 2005, **65**, 10214-10222.
- [49] Ruebel K.H., Patterns of gene expression in pituitary carcinomas and adenomas analyzed by high-density oligonucleotide arrays, reverse transcriptase-quantitative PCR and protein expression, *Endocrine*, 2006, **29**, 435-444.
- [50] Allen T., et al., Grg1 acts as a lung-specific oncogene in a transgenic mouse model, *Cancer Res.*, 2006, **66**, 1294-1301.
- [51] Poortinga G., Watanabe M. and Parkhurst S. M., *Drosophila* CtBP: a hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression, *EMBO J.*, 1998, **17**: 2067–2078.
- [52] Χαράλαμπος-Χρυσοβαλάντης Περούδης-Χυτούδης, *Ανάλυση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου tle4 κατά την εμβρυογένεση του ποντικού*, Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη 2011.
- [53] www.uniprot.org/uniprot/Q04727.
- [54] www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TLE4.
- [55] www.uniprot.org/uniprot/Q62441.
- [56] www.anvita.info/wiki/Transducin_Like_Enhancer_Protein_4.