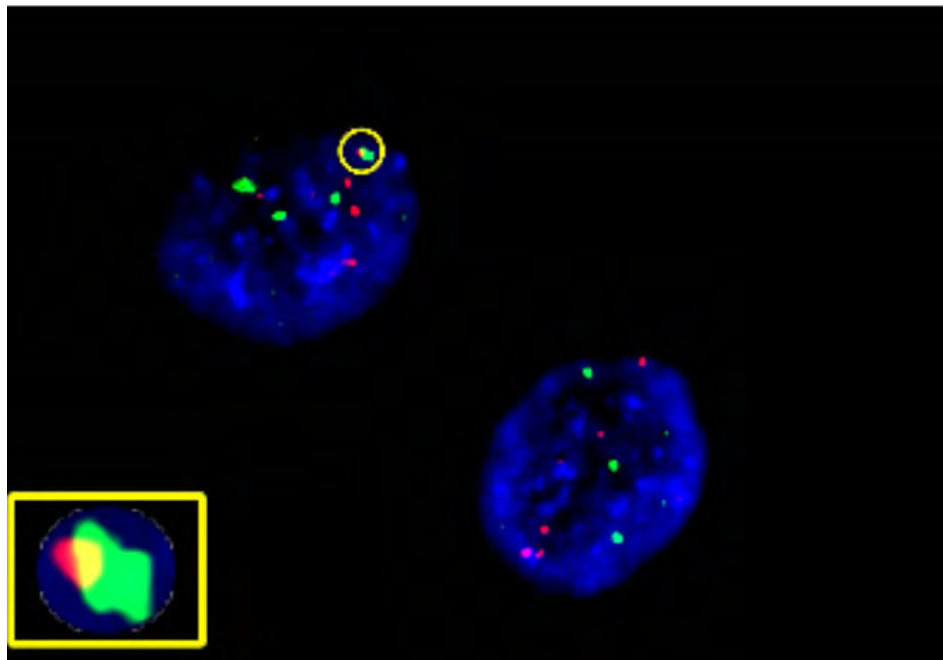


Διπλωματική εργασία με θέμα :

**Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΠΟΥ  
ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΕΙ ΤΙΣ ΣΤΟΧΑΣΤΙΚΕΣ  
ΔΙΑΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ**



*Φοιτήτρια: Κανελλίδη Αγγελική*

*Υπεύθυνος ερευνητής: Δημήτριος Θάνος  
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα πρόσωπα που συνέβαλλαν στην διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας. Αρχικά ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή μου και υπεύθυνο ερευνητή μου κ. Δημήτρη Θάνο για την τιμή που μου έκανε δίνοντας μου την ευκαιρία να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του. Οι γνώσεις και η εργαστηριακή εμπειρία που αποκόμισα κατά την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας είναι ανεκτίμητες και αυτό το οφείλω επίσης στην Χρύσα Νικοπούλου, διδακτορική φοιτήτρια του εργαστηρίου, η οποία στάθηκε δίπλα μου καθοδηγώντας με από την αρχή μέχρι το τέλος και στην οποία αξίζει να εκφράσω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου τα οποία δεν μου αρνήθηκαν ποτέ τη βοήθεια τους και πάντα μου έδιναν τις πολύτιμες συμβουλές. Επιθυμώ ακόμα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο και την κα. Άννα-Μαρία Ψαρρά που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή της διπλωματικής εργασίας μου. Τέλος ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στους γονείς μου που με στηρίζουν σε κάθε εγχείρημα.*

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ/ SUMMARY</b> .....	3
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ</b> .....	
Η ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ.....	10
ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ .....	12
ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΦΡΟΝΗ β (IFN-β).....	17
ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΤΟΥ ΕΝΙΣΧΥΤΗ ΤΗΣ IFN-β.....	19
ΣΤΟΧΑΣΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ .....	24
ΔΙΑΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ.....	26
ΜΟΝΟΑΛΛΗΛΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ IFN-β.....	28
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ GAGA ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (ThPOK).....	29
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ</b>	
Κυτταροκαλλιέργειες.....	33
Μόλυνση κυττάρων με ιό.....	34
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	34
Απομόνωση πυρηνικών εκχυλισμάτων για Western Blot.....	35
Απομόνωση RNA (RNA isolation).....	36
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	38
RT- PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής).....	39
Real time –PCR.....	40
Western Blot.....	41
DNA FISH (fluorescent in situ hybridization).....	47
Μικροσκόπια .....	52
Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP).....	53
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	59
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	70
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	75

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρώτη γραμμή αντι-ικής άμυνας βασίζεται στη παραγωγή και έκκριση ειδικών πρωτεϊνών που ονομάζονται *ιντερφερόνες τύπου I*, οι οποίες στη συνέχεια προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια τόσο υγείων όσο και μολυσμένων κυττάρων ενεργοποιώντας έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων με αντική δράση. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών (μεταγραφικοί παράγοντες, κυτταροκίνες κ.α.) δρουν προλαμβάνοντας την εισβολή αλλά και τον πολλαπλασιασμό των ιών μέσα στα κύτταρα. Στον άνθρωπο η ιική μόλυνση προκαλεί την άμεση μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της *ιντερφερόνης β (IFN-β)*. Αυτό επιτυγχάνεται με τη συντονισμένη ενεργοποίηση τριών μεταγραφικών παραγόντων (NF-κB, ATF-2/cJUN, IRFs), οι οποίοι μαζί με την αρχιτεκτονική πρωτεΐνη HMG1(Y) προσδένονται στον ενισχυτή του γονιδίου της IFN-β και δημιουργούν ένα αρχιτεκτονικά πολύπλοκο σύμπλοκο που είναι γνωστό ως *ενισχυόσωμα (enhanceosome)*. Το ενισχυόσωμα, αφού συγκροτηθεί στον ελεύθερο από νουκλεοσώματα ενισχυτή, καθοδηγεί τη στρατολόγηση μίας σειράς πρωτεϊνών που τροποποιούν τη χρωματίνη, συνεργοποιητών και βασικών μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή. Το πρόγραμμα στρατολόγησης ολοκληρώνονται με την ολίσθηση του νουκλεοσώματος που κάλυπτε τον υποκινητή, επιτρέποντας έτσι, την πρόσδεση της RNAπολυμεράσης II και την έναρξη της μεταγραφής. Η συνεργατικότητα (co-operativity) με την οποία προσδένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες στον ενισχυτή του γονιδίου, και η συνεργεία (synergy) που χαρακτηρίζει τον τρόπο στρατολόγησης των παραγόντων στο ενισχυόσωμα, υποδηλώνουν έναν εξαιρετικά πολύπλοκο και ακριβή μηχανισμό συνδυαστικού ελέγχου της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της IFN-β.

Ένα επιπρόσθετο ιδιαίτερο γνώρισμα της έκφρασης της IFN-β (Zawatzky et al., 1985), όπως και πολλών ακόμα κυττοκινών, είναι ότι ακόμη και υπό ιδανικές συνθήκες μόνο ένα περιορισμένο ποσοστό κυττάρων (~22% για την IFN-β) σε έναν πληθυσμό εκφράζει το γονίδιο της κυττοκίνης κάθε δεδομένη στιγμή. Αυτή η ετερογένεια χαρακτηρίζεται ως στοχαστικότητα ή πιθανοκρατία, και εμφανίζεται συνήθως σε βιολογικά συστήματα ή διεργασίες, που χαρακτηρίζονται από πολυπλοκότητα και χαμηλές συγκεντρώσεις των εμπλεκόμενων μορίων. Ένα ελκυστικό μοντέλο υποστηρίζει ότι η ίδια η μεταγραφική διαδικασία είναι υπεύθυνη για τη στοχαστική έκφραση κι αυτό, πιθανόν, να συνδέεται με την εγγενή πολυπλοκότητα της συγκρότησης του ενισχυοσώματος στον ενισχυτή/ υποκινητή της

IFN-β. Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και ο IRF-7 είναι αυτοί που διαδραματίζουν περιοριστικό ρόλο στην πιθανότητα έκφρασης του γονιδίου (Apostolou and Thanos 2009). Ο τρόπος που επιτυγχάνεται αυτό είναι μέσω διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων κατά τη διάρκεια των οποίων ο NF-κB προσδένεται σε τρεις γενωμικές περιοχές (NCRs- NF-κB reception centers) οι οποίες περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες Alu και στη συνέχεια μεταφέρεται στον ενισχυτή του γονιδίου της IFN-β (Apostolou and Thanos 2009). Ωστόσο η συγγένεια του NF-κB για τη θέση πρόσδεσης του στον ενισχυτή της IFN-β είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή του μεταγραφικού παράγοντα για τις θέσεις πρόσδεσης του στα NCRs γεγονός που υποδεικνύει ότι κάποιο άλλο γεγονός μεσολαβεί και αυξάνει τη συγγένεια του για τα τρία NCRs μετά την ιική μόλυνση. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας αποκάλυψαν μια περιοχή στα NCRs επαναλήψεις GAGA η οποία φαίνεται να διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στην πραγματοποίηση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων των NCRs με την IFN-β. Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι σε τέτοιου είδους επαναλήψεις προσδένεται ο Human GAGA Factor (ThPOK) ο οποίος είναι ομόλογος με τον GAGA Factor της *Drosophila*. Στόχος αυτή της διπλωματικής εργασίας είναι λοιπόν η μελέτη της πρωτεΐνης που διαμεσολαβεί τις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις που επάγουν την έκφρασή της IFN-β η οποία υποθέσαμε ότι είναι ο ThPOK. Θέλοντας να επαληθεύσουμε την υπόθεση μας αυτή χρησιμοποιήσαμε για την διεξαγωγή των πειραμάτων μια κυτταρική σειρά στην οποία είχε πραγματοποιηθεί αποσιώπηση του ThPOK μέσω sh-RNA σίγηση. Με αυτόν τον τρόπο μπορέσαμε να μελετήσουμε τις συνέπειες της απουσίας του ThPOK στην πραγματοποίηση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων. Αρχικά επαληθεύσαμε την αποτελεσματικότητα της σίγησης με την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης ThPOK στα κύτταρα με το Knock Down (ThPOK-KD) σε σύγκριση με κύτταρα Scramble καθώς και με έλεγχο των επιπέδων mRNA του ThPOK με Real Time PCR στα κύτταρα ThPOK-KD σε σύγκριση με τα κύτταρα control. Αφού το knock down ήταν αποτελεσματικό στη συνέχεια διερευνήσαμε την πιθανότητα ο ThPOK να επηρεάζει την έκφραση της IFN-β με τη πραγματοποίηση Real Time PCR για τα ThPOK-KD και τα κύτταρα control ύστερα από 6 ώρες ιικής μόλυνσης, όπου διαπιστώσαμε ότι ο ThPOK διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην έκφραση του γονιδίου IFN-β. Έπειτα μέσω FISH, στα κύτταρα ThPOK-KD και control πριν και μετά από 4 ώρες μόλυνσης, ελέγξαμε τις επιπτώσεις του knock down του ThPOK στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NCRs

οι οποίες μειώθηκαν σημαντικά υποδεικνύοντας τη συμμετοχή του ThPOK στην πραγματώση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων. Βασιζόμενοι στα παραπάνω υποθέσαμε ότι ο ThPOK πιθανόν ρυθμίζει την έκφραση της IFN-β μέσω των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των NRCs και του γονιδίου της IFN-β, οπότε διεξήγαμε ένα ακόμη FISH αυτή τη φορά για να εξετάσουμε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός από τα NCRs το NRC21 με την IFN-β στα κύτταρα ThPOK-KD, όπου παρατηρήσαμε ότι ο ThPOK έχει ένα πολύ κρίσιμο ρόλο στην πραγματοποίηση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του NRC21 και της IFN-β και με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζει την μονοαλληλική έκφραση της IFN-β. Τέλος με την πραγματοποίηση ενός ChIP στα ThPOK-KD και control κύτταρα πριν και μετά από μόλυνση με ιό για 2 ώρες και έτσι επιβεβαιώνουμε την ειδική πρόσδεση του ThPOK στο NRC21. Συνοψίζοντας επιβεβαιώσαμε την ειδική πρόσδεση του ThPOK στο NRC21 και με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η πρωτεΐνη αυτή επηρεάζει τις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ των τριών NRCs αλλά πολύ περισσότερο συμμετέχει στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του NRC21 και της IFN-β και με αυτό τον τρόπο ρυθμίζει την στοχαστική και μονοαλληλική έκφραση της IFN-β.

## **SUMMARY**

The primary line of antiviral response sits in the production and secretion of the interferon type “I” proteins, which subsequently bind to their specific receptors at the surface of both healthy and infected cells in order to activate a large number of antiviral genes. The product of those genes (transcription factors, cytokines etc) creates a function of inhibiting the penetration and/or replication of the virus inside the specific cells. The infection of human cells with different types of viruses induces the transcription of the interferon beta (IFN-β) gene, through the coordinate activation of three distinct groups of transcriptions factors (NF-κB, ATF-2/c-JUN, IRFs). The latter bind to the enhancer of the IFN-β gene in a cooperative and conjunctive manner and they create, in combination with the architectural protein HMGI(Y), a nucleoprotein (product) complex, known as enhanceosome. After its formation at the nucleosome-free enhancer, the enhanceosome instructs the ordered recruitment of several co-activators and basic transcription factors at the adjacent promoter. The recruitment program culminates with the sliding of the nucleosome masking the promoter, allowing the RNA polymerase II binding and the subsequent transcriptional

initiation. Both the cooperativity in the binding of transcription factors to the enhancer of the gene and the synergy in the recruitment of the co-activators at the enhanceosome, imply an extremely complex and accurate mechanism of combinatorial control of the transcriptional activation of the IFN- $\beta$  gene.

Another striking feature of the IFN- $\beta$  gene expression, as well as many other cytokine genes, is that even under optimal conditions, only a fraction of the cells in the population (~22% for the IFN- $\beta$ ) expresses the cytokine gene at any given moment. This heterogeneity is known as stochasticity and it is observed, usually, in biological systems or procedures, characterized by a high complexity and low concentrations of the implicated molecules. One attractive model option, proposes that the stochasticity is correlated with the transcription process itself and therefore is likely associated with the inherent complexity of enhanceosome assembly on the IFN- $\beta$  enhancer /promoter. The transcription factors NF-kB and IRF-7 are the ones that play a restraining role in the probability of gene expression (Apostolou and Thanos 2009). The way this is accomplished is through inter-chromosomal interactions during which the NF-kB binds itself to three genomic regions (NRCs) containing Alu repeat sequences and then those in turn are transferred to the amplifier of IFN- $\beta$  gene (Apostolou and Thanos 2009). However the affinity of NF-kB to the binding site of the amplifier of IFN- $\beta$  is larger than that of the transcription factor binding sites at NRCs indicating that another event has mediated and increases the affinity for these three NRCs after viral infection. Experiments performed in our laboratory have revealed a region of NRCs with GAGA repeats which appear to play a catalytic role in the formation of the inter-chromosomal interactions NRCs with IFN- $\beta$ . From the literature review in this paper it is apparent that in such repetition binds, the Human GAGA Factor (ThPOK) is homologous to the GAGA Drosophila Factor. The aim of this hypothesis is therefore the study of the protein that mediates the inter-chromosomal interactions that induce the expression of IFN- $\beta$  which is assumed to be the ThPOK. Wanting to verify our hypothesis, we have conducted our experiments in a cell line which took place in silencing the ThPOK using the method of sh-RNA silencing. By doing this we were able to study the effects of the absence of ThPOK in making inter-chromosomal interactions. Initially we verified the effectiveness of silencing by quantification of the protein ThPOK levels in cells via Knock Down (ThPOK-KD) in relation to the Scramble cells and controlling the mRNA levels of ThPOK with Real Time PCR in the cells ThPOK-KD compared to the control cells.

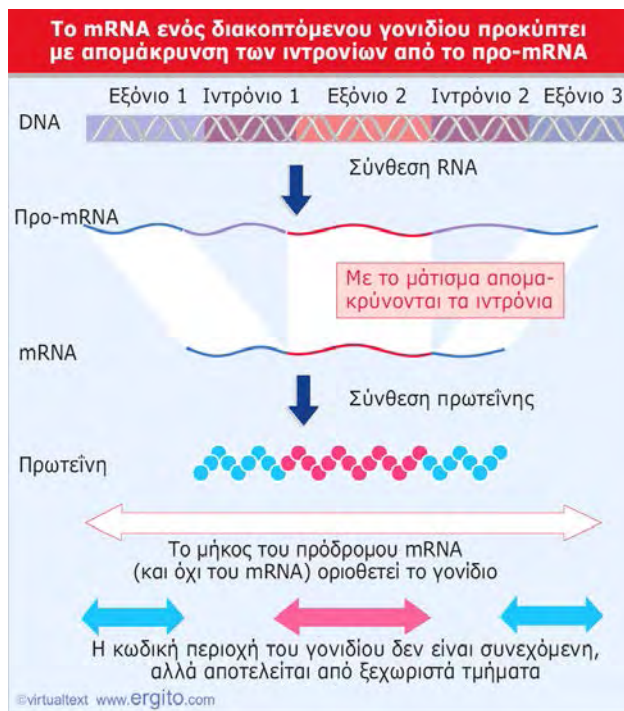
When we concluded the knock down was effective we then investigated the possibility that the ThPOK had the ability to affect the expression of IFN- $\beta$  through Real Time PCR for ThPOK-KD and the control cells in a period of 6 hours after a viral infection. We found that the ThPOK plays a role in the expression of IFN- $\beta$  gene. Then by FISH, the ThPOK-KD and control cells before and after four hours of infection, we tested the effects of knock down of ThPOK in inter-chromosomal interactions between NRCs which significantly decreased which indicates the involvement of ThPOK in the realisation of the inter-chromosomal interactions. Based on the above we assumed that ThPOK may regulate the expression of IFN- $\beta$  through inter-chromosomal interactions between NRCs and the IFN- $\beta$  gene, so we had an additional FISH, for this time to examine the interactions between one of the NRCs of NRC21 with IFN- $\beta$  at the ThPOK-KD cells, where we observed that the ThPOK has a very critical role in the realisation of the inter-chromosomal interactions between NRC21 and IFN-beta and in this way regulates monoallelic expressions of IFN- $\beta$ . Finally, with the embodiment of the ChIP in ThPOK-KD and control cells before and after infection with the same virus for 2 hours we looked to confirm the specific binding of the ThPOK NRC21. Summarising we confirmed the specific binding of ThPOK in NRC21. Based on these results we conclude that this protein affects inter-chromosomal interactions both among the three NRCs but also that they are much more involved in inter-chromosomal interactions between NRC21 and IFN- $\beta$  and in this manner it regulates reflectively the stochastic expression of IFN- $\beta$ .



## ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Παρ' όλο που το DNA εντοπίστηκε στον πυρήνα του κυττάρου σπέρματος ψαριών το 1869 από τον Friedrich Meischer, έως και το 1944 δεν ήταν γνωστό ότι αποτελεί το γενετικό υλικό των οργανισμών. Από τότε μέχρι και σήμερα το γενετικό υλικό πολλών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, έχει αποκωδικοποιηθεί με στόχο τη μελέτη του μηχανισμού, με βάση τον οποίο η πληροφορία που βρίσκεται στην αλληλουχία των βάσεων χρησιμοποιείται από τον οργανισμό για την οργάνωση του.

Προς το παρόν είναι γνωστό ότι μεγάλο μέρος της κωδικοποιημένης πληροφορίας χρησιμοποιείται για να καθορίσει την αλληλουχία των αμινοξέων. Η μεταφορά της πληροφορίας από το DNA στις πρωτεΐνες διεκπεραιώνεται μέσω δύο διαδικασιών εκ των οποίων η πρώτη είναι η μεταγραφή, που λαμβάνει χώρα στον πυρήνα, και η δεύτερη που είναι η μετάφραση που διαδραματίζεται στο κυτταρόπλασμα (**Εικόνα 1**). Επίσης καθορίζει τον τρόπο αναδίπλωσης και τρισδιάστατης διαμόρφωσης των πρωτεϊνών ώστε αυτές να αποτελέσουν μόρια με συγκεκριμένη δομή και χημική συμπεριφορά. Ακόμη παρέχει τις απαραίτητες πληροφορίες οι οποίες καθορίζουν σε ποιούς κυτταρικούς τύπους θα παράγεται η κάθε πρωτεΐνη αλλά και σε ποιο στάδιο ζωής του κυττάρου.

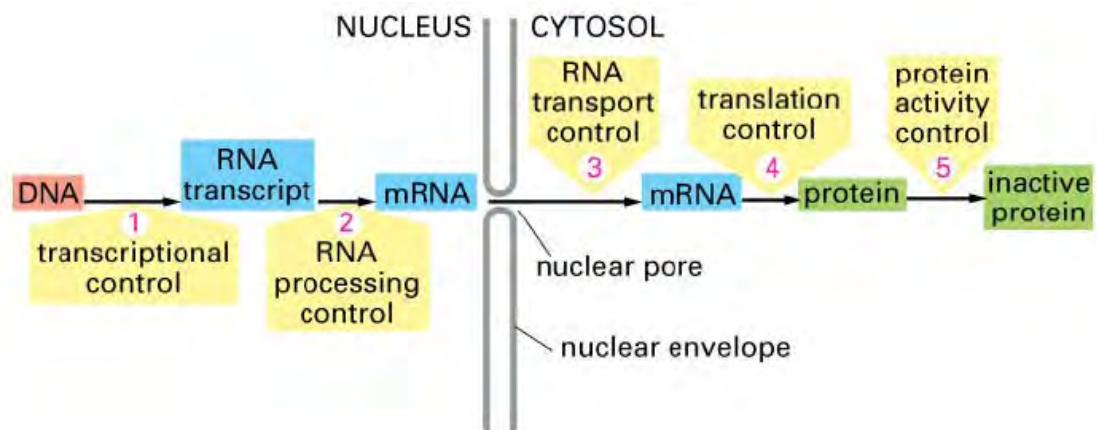


**Εικόνα 1: Το μονοπάτι από το DNA στις πρωτεΐνες.** Η ροή της γενετικής πληροφορίας από το DNA στο RNA (μεταγραφή) και από το RNA στις πρωτεΐνες εμφανίζεται σε όλα τα ζωντανά κύτταρα. **Πηγή:** *Genes VIII, Benjamin Lewin, εικόνα 2.1.*

Οι διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι σε ένα πολυκύτταρο οργανισμό ποικίλουν τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία τους. Εάν συγκρίνουμε ένα μυϊκό με ένα νευρικό κύτταρο οι διαφορές είναι τόσο δραματικές, που είναι δύσκολο να φανταστούμε ότι προέρχονται από τον ίδιο οργανισμό. Αυτή ήταν η αιτία που ώθησε τους βιολόγους να διατυπώσουν αρχικά την εσφαλμένη θεωρία, ότι κατά την κυτταρική διαφοροποίηση, σταδιακά και επιλεκτικά χάνονται κάποια γονίδια και παραμένουν ορισμένα μόνο, τα οποία εκφράζονται. Όπως γνωρίζουμε σήμερα κάτι τέτοιο δεν ισχύει καθώς όλα τα κύτταρα περιέχουν το ίδιο ποσοτικά και ποιοτικά DNA. Κατά συνέπεια η διαφορετική σύσταση των κυττάρων σε πρωτεΐνες οφείλεται στη διαφορετική έκφραση των γονιδίων του και όχι σε διαφορές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που περιέχουν. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης παίζει λοιπόν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση λειτουργικά διακριτών κυτταρικών τύπων, και μπορεί να γίνει σε διάφορα στάδια, με σημαντικότερο το στάδιο της μεταγραφής του DNA σε mRNA.

Όπως αναφέρθηκε, η έκφραση κάποιων γονιδίων με ένα κύτταρο- ή ιστοειδικό τρόπο είναι υπεύθυνη για την ταυτότητα των κυττάρων και τη μορφολογική ή λειτουργική εξειδίκευσή τους, ενώ τα γονίδια που είναι ενεργοποιημένα ιδιοσυστατικά σε όλους τους τύπους κυττάρων είναι υπεύθυνα για την ομοιοστασία των κυττάρων (housekeeping genes). Σε αντίθεση, μία πληθώρα των γονιδίων εκφράζεται ειδικά μόνο σε απόκριση προς εξωκυτταρικά σήματα όπως παράγοντες ανάπτυξης, κυτοκίνες, ορμόνες, θερμικό σοκ, και λοίμωξη από τον ιό. Δεδομένου ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης επιτυγχάνεται κυρίως με μεταβολές στο ρυθμό της σύνθεσης του mRNA, φαίνεται ότι τα ευκαρυωτικά γονίδια ως επί το πλείστον ρυθμίζονται σε μεταγραφικό επίπεδο. Κεντρικοί παίκτες σε αυτά τα μονοπάτια είναι οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται σε ειδικής αλληλουχίας DNA και οι οποίες αναγνωρίζουν μικρά cis-ρυθμιστικά μοτίβα που υπάρχουν στους υποκινητές και στους ενισχυτές όλων των ευκαρυωτικών γονιδίων.

Το πρώτο στάδιο ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης αφορά τη μεταγραφή του DNA σε RNA. Επίσης, στο επόμενο στάδιο, μπορεί να ρυθμιστεί το μάτισμα του mRNA και η ωρίμανση του. Ακόμη ρυθμίζεται η μεταφορά των ώριμων μορίων mRNA από το πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και η επιλογή εκείνων που θα μεταφραστούν. Τέλος ρυθμίζεται η αποδόμηση του mRNA καθώς και η ενεργοποίηση, απενεργοποίηση, αποδόμηση και συναρμολόγηση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων (**Εικόνα 2**).



**Εικόνα 2:** Έξι βήματα στα οποία γίνεται ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης στους ευκαριώτες. Πηγή: *Molecular Biology of the Cell, fourth edition, Alberts et al, εικόνα 7.5*

## Η ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Η μεταγραφή αποτελεί το πρώτο βήμα στη γονιδιακή έκφραση και το κυριότερο στάδιο ελέγχου της. Ένας αριθμός ρυθμιστικών πρωτεϊνών καθορίζει εάν ένα συγκεκριμένο γονίδιο είναι διαθέσιμο για μεταγραφή. Το αρχικό επίπεδο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης είναι η απόφαση για το εάν θα μεταγραφεί ένα γονίδιο ή όχι. Τα περισσότερα ρυθμιστικά γεγονότα συμβαίνουν κατά την έναρξη της μεταγραφής, ωστόσο όπως είδαμε και παραπάνω μερικές φορές μπορούν να ρυθμίζονται και τα επόμενα στάδια της μεταγραφής.

Ο μηχανισμός της μεταγραφής είναι ο ίδιος στους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η μεταγραφή καταλύεται από ένα ένζυμο, την RNA πολυμεράση (υπάρχουν τρία είδη RNA πολυμερασών). Στους ευκαριωτικούς οργανισμούς το ένζυμο που καταλύει τη μεταγραφή του DNA σε mRNA είναι η RNA πολυμεράση II. Η RNA πολυμεράση αναγνωρίζει και προσδένεται σε ειδικές περιοχές του DNA στην αρχή του γονιδίου, που ονομάζονται υποκινητές (promoters) διότι η αλληλουχία τους παρέχει το σήμα της αναγνώρισης. Οι υποκινητές χαρακτηρίζονται από την παρουσία βραχείων αλληλουχιών σε ειδικές θέσεις και συνήθως κάθε υποκινητής καλύπτει μια περιοχή 200bp γύρω από το σημείο έναρξης (InR) της μεταγραφής. Το σημείο έναρξης της μεταγραφής είναι επί το πλείστον μια πουρίνη και είναι σύνηθες να βρίσκεται στην κεντρική θέση της αλληλουχίας CAT χωρίς όμως να είναι αρκετά συντηρημένη. Ανοδικά του σημείου έναρξης, μια περιοχή 6bp είναι αναγνωρίσιμη σε όλους σχεδόν τους υποκινητές. Το κέντρο του εξαμερούς βρίσκεται ~10bp ανοδικά από το σημείο έναρξης και συχνά ονομάζεται

αλληλουχία -10, με πρότυπη αλληλουχία TATAAT (TATA box) και η οποία περιστοιχίζεται από άλλες αλληλουχίες πλούσιες σε βάσεις GC. Ένα άλλο συντηρημένο εξαμερές βρίσκεται ~35 bp ανοδικά της θέσης έναρξης και ονομάζεται αλληλουχία -35 και έχει ως πρότυπη αλληλουχία TTGACA. Η αναγνώριση του υποκινητή υποβοηθάτε από ειδικές πρωτεΐνες που ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες (transcription factors, TFs), αποτελούν ένα trans ρυθμιστικό στοιχείο. Σε κάποιες περιπτώσεις η δράση ενός υποκινητή αυξάνεται κατά πολύ από τη παρουσία ενός ενισχυτή (enhancer), ο οποίος αποτελείται από ένα άλλο σύνολο στοιχείων, τοποθετημένων όμως σε μεταβλητή απόσταση από τα στοιχεία του υποκινητή. Οι υποκινητές και οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν τα ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής του DNA και επιτρέπουν στην RNA πολυμεράση να αρχίσει σωστά τη μεταγραφή.

Κατά την έναρξη της μεταγραφής ενός γονιδίου η RNA πολυμεράση προσδένεται στον υποκινητή και προκαλεί τοπικό ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA. Στη συνέχεια, τοποθετεί τα ριβονουκλεοτίδια απέναντι από τα δεοξυριβονουκλεοτίδια μιας αλυσίδας του DNA σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων, όπως και στην αντιγραφή με τη διαφορά ότι εδώ απέναντι από την αδενίνη τοποθετείται ριβονουκλεοτίδιο που περιέχει ουρακίλη. Η RNA πολυμεράση συνδέει τα ριβονουκλεοτίδια, που προστίθενται το ένα μετά το άλλο, με 3' – 5' φωσφοδιεστερικό δεσμό. Η μεταγραφή έχει προσανατολισμό 5' → 3' όπως και η αντιγραφή. Η σύνθεση του RNA σταματά στο τέλος του γονιδίου όπου ειδικές αλληλουχίες, οι οποίες ονομάζονται αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής, επιτρέπουν την απελευθέρωση του. Το μόριο RNA που συντίθεται είναι συμπληρωματικό προς τη μια αλυσίδα της διπλής έλικας του DNA του γονιδίου. Η αλυσίδα αυτή είναι η μεταγραφόμενη και ονομάζεται μη-κωδική. Η συμπληρωματική αλυσίδα του DNA του γονιδίου ονομάζεται κωδική. Το RNA είναι το κινητό αντίγραφο της πληροφορίας ενός γονιδίου.

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς το mRNA αρχίζει να μεταφράζεται σε πρωτεΐνη πριν ακόμη ολοκληρωθεί η μεταγραφή του. Αυτό είναι δυνατό, επειδή δεν υπάρχει πυρηνική μεμβράνη. Αντίθετα, στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, το RNA που παράγεται κατά τη μεταγραφή ενός γονιδίου συνήθως δεν είναι έτοιμο να μεταφραστεί, αλλά υφίσταται μια πολύπλοκη διαδικασία ωρίμανσης. Η διαδικασία αυτή αποτελεί ένα από τα πιο ενδιαφέροντα ευρήματα της Μοριακής Βιολογίας γιατί οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα περισσότερα γονίδια των ευκαρυωτικών

οργανισμών (και των ιών που τους προσβάλλουν) είναι ασυνεχή ή διακεκομμένα. Δηλαδή η αλληλουχία που μεταφράζεται σε αμινοξέα διακόπτεται από ενδιάμεσες αλληλουχίες οι οποίες δεν μεταφράζονται σε αμινοξέα. Οι αλληλουχίες που μεταφράζονται σε αμινοξέα ονομάζονται εξώνια ενώ οι ενδιάμεσες αλληλουχίες ονομάζονται εσώνια. Όταν ένα γονίδιο που περιέχει εσώνια μεταγράφεται, δημιουργείται το πρόδρομο mRNA που περιέχει και εξώνια και εσώνια. Το πρόδρομο mRNA μετατρέπεται σε mRNA με τη διαδικασία της ωρίμανσης, κατά την οποία τα εσώνια κόβονται από μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια και απομακρύνονται. Τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια αποτελούνται από snRNA και από πρωτεΐνες και λειτουργούν ως ένζυμα: κόβουν τα εσώνια και συρράπτουν τα εξώνια μεταξύ τους. Έτσι σχηματίζεται το ώριμο mRNA. Αυτό, παρότι αποτελείται αποκλειστικά από εξώνια έχει δύο περιοχές που δεν μεταφράζονται σε αμινοξέα. Η μία βρίσκεται στο 5' άκρο και η άλλη στο 3' άκρο. Οι αλληλουχίες αυτές ονομάζονται 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές αντίστοιχα. Το mRNA μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και ειδικότερα στα ριβοσώματα όπου είναι η θέση της πρωτεϊνοσύνθεσης.

## **ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ**

Το πρώτο στάδιο της γονιδιακής ρύθμισης είναι η ρύθμιση της μεταγραφής μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από τη πολυπλοκότητα και τη δυναμική της, καθώς επιτυγχάνεται με τη συμβολή πολλών παραγόντων. Οι παράγοντα αυτοί δρουν ανεξάρτητα ή σε συνεργασία, με πολυάριθμους δυνατούς συνδυασμούς, προκειμένου να εξασφαλίσουν την εξειδικευμένη μεταγραφική ενεργοποίηση των κατάλληλων γονιδίων στο σωστό χρόνο και τόπο. Το μεγαλύτερο μέρος της ρύθμισης της μεταγραφής πραγματοποιείται κατά την έναρξη μέσω της πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή καθώς και τον ρυθμιστικών πρωτεϊνών.

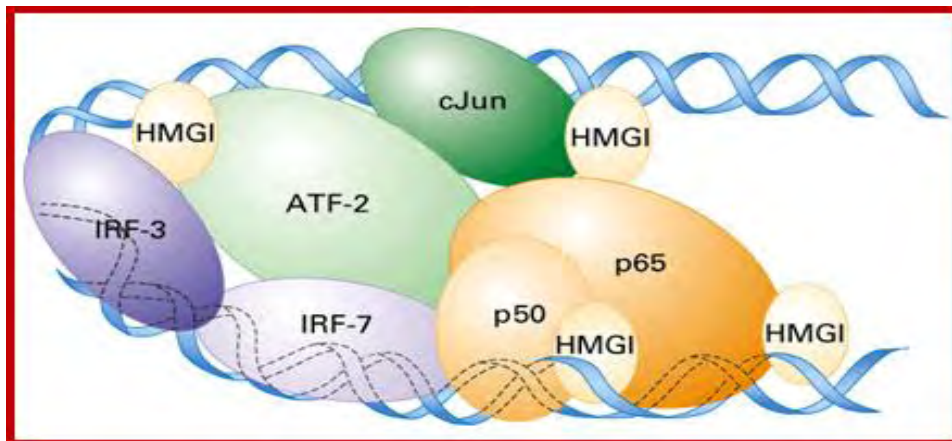
Η ρύθμιση της επαγομένης γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιείται από την αλληλουχία του ενισχυτή ο οποίος βρίσκεται κοντά ή σε απόσταση από τον υποκινητή του γονιδίου. Οι περιοχές αυτές του γενετικού υλικού δέχονται και επεξεργάζονται τα περιβαλλοντικά σήματα που φθάνουν στον πυρήνα με την μορφή ενεργοποιημένων πρωτεϊνών, που προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Η πρόσδεση αυτή μπορεί να ευνοεί ή να αποτρέπει τη μεταγραφή του γονιδίου που ελέγχεται από το συγκεκριμένο ενισχυτή και αυτό το χαρακτηρίζει ως επαγωγή ή καταστολέα. Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος του εξωτερικού ερεθίσματος

ενεργοποιεί ένα πλήθος μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι μετατοπίζονται στο πυρήνα και προσδένονται μεμονωμένα ή συνδυαστικά στις ειδικές θέσεις πρόσδεσης τους, που είναι παρούσες στους ενισχυτές ή στους υποκινητές των γονιδίων στόχων. Μόνο όταν ο απαραίτητος αριθμός μεταγραφικών προσδεθεί στους ενισχυτές και στους υποκινητές ενός γονιδίου στόχου η πολυμεράση μπορεί να στρατολογηθεί στο σημείο έναρξης και να αρχίσει η μεταγραφή.

Ο βασικός ρόλος του ενισχυτή φαίνεται να είναι η αύξηση της συγκέντρωσης των ενεργοποιητών κοντά στον υποκινητή. Οι πρωτεΐνες που προσδένονται σε έναν ενισχυτή, πολλά kb μακριά από έναν υποκινητή, αλληλεπιδρούν άμεσα με πρωτεΐνες που προσδένονται στην περιοχή του σημείου έναρξης, έτσι η οργάνωση του DNA πρέπει να είναι αρκετά ευέλικτη, ώστε να επιτρέπει τη γειτνίαση του ενισχυτή με τον υποκινητή. Αυτό απαιτεί την προεκβολή του ενδιάμεσου DNA με τη δημιουργία ενός μεγάλου βρόγχου. Εξαιρέση στον κανόνα που θέλει τους ενισχυτές να είναι *cis*-δραστικά στοιχεία στη φυσική τους κατάσταση είναι το φαινόμενο της διαλληλικής επίδρασης (*transvection*) το οποίο παρατηρήθηκε στη *Drosophila* (Lewis EB, 1954). Η σύναψη των σωματικών χρωμοσώματων επιτρέπει την ενεργοποίηση ενός υποκινητή που βρίσκεται σε ένα χρωμόσωμα από έναν ενισχυτή που βρίσκεται σε ένα άλλο χρωμόσωμα. Έτσι δύο διαφορετικά χρωμοσώματα συνεντοπίζονται ώστε να επιτελέσουν διάφορες λειτουργίες σημαντικές για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των εμπλεκόμενων γονιδίων (BrankoMR et al 2006, Fraser P. 2006).

Υπάρχουν δύο κύριες διαφορές μεταξύ των υποκινητών και των ενισχυτών. Αρχικά οι υποκινητές βρίσκονται πάντα κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής σε αντίθεση με τους ενισχυτές που μπορούν δρουν από απόσταση. Επίσης μια ακόμα διαφορά μεταξύ των δύο *cis* ρυθμιστικών στοιχείων είναι το γεγονός ότι οι ενισχυτές παρουσιάζουν μεγαλύτερο βαθμό συνεργείας κατά την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων. Το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο συνδέεται την στον ενισχυτή ο οποίος αποκρίνεται στο γονίδιο της IFN- $\beta$  συναρμολογείται με συνεργεία, σχηματίζοντας μια λειτουργική δομή που ονομάζεται ενισχυόσωμα (*enhanceosome*). Ο ενισχυτή της IFN- $\beta$  αποτελείται από 55bp και έχουν αποκαλυφθεί σε αυτόν και έχουν αναγνωριστεί σε αυτόν 4 διαφορετικά ρυθμιστικά στοιχεία. Η πρόσδεση της μη ιστονικής πρωτεΐνης HMGI(Y) κάμπει το DNA, ώστε να μπορούν στη συνέχεια να προσδεθούν οι μεταγραφικοί παράγοντες. Μετά τη συναρμολόγηση του ενισχυοσώματος στον ελεύθερο από νουκλεοσώματα ενισχυτή το ενισχυόσωμα οδηγεί στη συγχρονισμένη στρατολόγηση τροποποιητών της χρωματίνης και των

βασικών μεταγραφικών παραγόντων στον κοντινό υποκινητή (Agalioti et al., 2000). Η στρατολόγηση ολοκληρώνεται με την ολίσθηση του νουκλεοσώματος που καλύπτει τον βασικό υποκινητή και την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II για την έναρξη της μεταγραφής (Lomvardas and Thanos, 2001)( **Εικόνα3**).



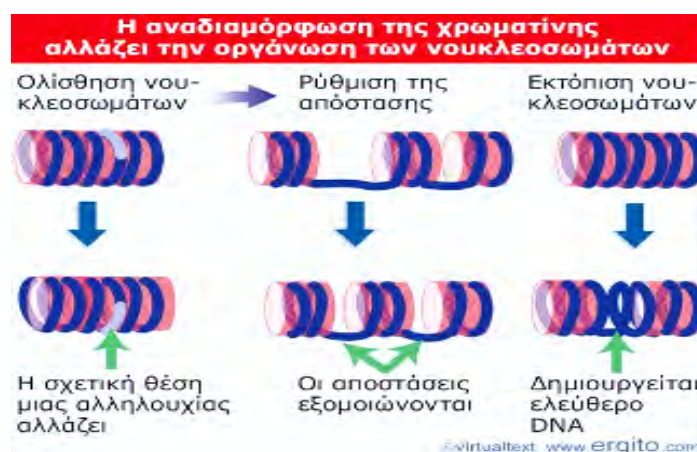
**Εικόνα 3:** Το μοντέλο του ενισχυσώματος που σχηματίζεται στον ενισχυτή της IFN-β. Στα τέσσερα ρυθμιστικά στοιχεία του ενισχυτή βλέπουμε τους μεταγραφικούς παράγοντες και την αρχιτεκτονική πρωτεΐνη HMGI(Y) που συνδέεται με τη μικρή έλικα του DNA. Πηγή: *Molecular Biology of the Cell, fourth edition, Alberts et al,εικόνα 10.5.*

Ένας ακόμη παράγοντας ο οποίος επηρεάζει τη μεταγραφή είναι η τοπική αρχιτεκτονική της χρωματίνης. Το κυτταρικό γονιδίωμα οργανώνεται σε νουκλεοσώματα, τα οποία αποτελούνται από 200 bp DNA και ένα οκταμερές ιστονών που αποτελείται από δύο αντίγραφα των H2A,H2B,H3 και H4. Στις περισσότερες περιοχές, τα ινίδια είναι συσκευασμένα πιο χαλαρά από ότι στο μιτωτικό χρωμόσωμα. Αυτό το υλικό ονομάζεται ευχρωματίνη, έχει την εμφάνιση σχετικά διάσπαρτου υλικού και καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του πυρήνα. Αντίθετα πολλές περιοχές της χρωματίνης είναι πολύ συμπυκνωμένες και μοιάζουν με το μιτωτικό πυρήνα. Αυτό το υλικό ονομάζεται ετεροχρωματίνη και μπορεί να είναι είτε ιδιοστατική χρωματίνη, η οποία βρίσκεται πάντα σε αυτή τη κατάσταση και δεν περιέχει κωδικές περιοχές, είτε μπορεί να είναι εναλλακτική χρωματίνη, στην οποία οι ευχρωματινικές περιοχές μεταπίπτουν στην ετεροχρωματινική κατάσταση. Όσο πιο κοντά είναι ένα γονίδιο στην ευχρωματίνη τόσο πιο πιθανό είναι να απενεργοποιηθεί. Η δομή της χρωματίνης είναι τέτοια ώστε οι περισσότερες αλληλουχίες DNA είναι δομικά απρόσιτες και λειτουργικά ανενεργές.

Η μεταγραφική συσκευή δεν μπορεί να προσδεθεί σε υποκινητές οι οποίοι βρίσκονται σε νουκλεοσώματα και το γεγονός αυτό διασφαλίζει ότι η μεταγραφή δεν

θα συμβεί σε ακατάλληλες περιοχές. Κατά αυτό τον τρόπο οι ιστόνες λειτουργούν σαν καταστολείς της μεταγραφής. Η ενεργοποίηση ενός γονιδίου προϋποθέτει αλλαγές στη δομή της χρωματίνης έτσι ώστε οι μεταγραφικοί παράγοντες να αποκτήσουν πρόσβαση στον DNA του υποκινητή. Το DNA αναδιπλώνεται προς τα πίσω και συνδέεται στην πολυμεράση σχηματίζοντας κλειστό βρόγχο. Καθώς η πολυμεράση προχωράει, δημιουργεί θετικές υπερελίκωση καθιστά πιο ασταθές το νουκλεόσωμα και διευκολύνει την εκτόπιση του οκταμερούς, το οποίο, ενώ διατηρεί επαφή με το DNA και με τη πολυμεράση, εναποτίθεται πίσω από την RNA πολυμεράση. Εάν οι μεταγραφικοί παράγοντες και η RNA πολυμεράση προσδεθούν πρώτοι στον υποκινητή και καθιερώσουν ένα σταθερό σύμπλοκο έναρξης, τότε η πρόσδεση των ιστονών δεν είναι δυνατή.

Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης είναι μια ενεργή διαδικασία στην οποία συμμετέχουν διάφορα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης, τα οποία χρησιμοποιούν την ενέργεια που παράγεται από την υδρόλυση του ATP και είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή του υποκινητή ενός γονιδίου που πρόκειται να μεταγραφεί. Έχουν χαρακτηριστεί αρκετοί τύποι αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, όπως η ολίσθηση των νουκλεοσωμάτων κατά μήκος του DNA, αλλάζοντας τη σχετική θέση πρωτεΐνης και νουκλεϊκού οξέος. Έτσι, μια συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία μπορεί να μετατοπιστεί πάνω στην επιφάνεια των νουκλεοσωμάτων. Ακόμη η απόσταση (spacing) ανάμεσα σε δύο διαδοχικά οκταμερή μπορεί να μεταβληθεί, με συνέπεια και πάλι την αλλαγή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε σχέση με το νουκλεόσωμα. Η πιο εκτεταμένη αλλαγή είναι η ολοκληρωτική εκτόπιση και απομάκρυνση ενός ή περισσότερων οκταμερών ιστονών από το DNA και η δημιουργία χάσματος στη συνεχή χρωματινική δομή, δηλαδή ο σχηματισμός μιας περιοχής όπου το νουκλεϊκό οξύ είναι ελεύθερο από νουκλεοσώματα (**Εικόνα 4**).



**Εικόνα 4: Τύποι αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης.** Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης προωθούν την ολίσθηση των νουκλεοσωμάτων κατά μήκος του DNA, να εκτοπίσουν ολοκληρωτικά τα νουκλεοσώματα από το DNA ή να αλλάξουν την απόσταση διαδοχικών νουκλεοσωμάτων. **Πηγή:** *Genes VIII, Benjamin Lewin, εικόνα 23.4.*



Η ιστόνη που φαίνεται να απομακρύνεται και να αλλάζει την αλληλεπίδραση της με το DNA είναι η H1, η οποία όταν είναι παρούσα στο DNA μειώνει τη μεταγραφική δραστηριότητα. Το πρώτο σύμολοκο αναδιαμόρφωσης χρωματίνης που αναγνωρίστηκε είναι το SWI/SNF το οποίο στη θέση στόχο μεταβάλλει τη ευαισθησία των νουκλεοσωμάτων στη δράση της DNAάσης I, ενώ επάγει αλλαγές σε επαφές μεταξύ πρωτεΐνης και DNA, οι οποίες εξακολουθούν να υπάρχουν και μετά την απελευθέρωση του συμπλόκου από τα νουκλεοσώματα. Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης στρατολογούνται στους υποκινητές από ενεργοποιητές που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του DNA.

Η συμμετοχή των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης στην ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης ανακαλύφθηκε όταν παρατηρήθηκε ότι ορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες χρειάζονται τα σύμπλοκα αυτά προκειμένου να επιδράσουν στους υποκινητές των γονιδίων στόχων τους. Ένα από τα πρώτα παραδείγματα αποτέλεσε ο παράγοντας GAGA, ο οποίος ενεργοποιεί *in vitro* τον υποκινητή *hsp70* της *Drosophila*. Η πρόσδεση του GAGA σε τέσσερις περιοχές του υποκινητή πλούσιες σε (CT)<sub>n</sub> οδηγεί σε αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων, δημιουργία μιας υπερευαίσθητης στην DNAάσης I θέσης και αναδιάταξη των παρακείμενων νουκλεοσωμάτων, ώστε να καταλαμβάνουν επιλεγμένες και όχι τυχαίες θέσεις. Η οργάνωση των παρακείμενων νουκλεοσωμάτων αλλάζει, έτσι ώστε αυτά να μην μπορούν να πλησιάσουν τον υποκινητή πέρα από κάποια καθορισμένα όρια. Στη διάρκεια αυτής της διαδικασίας ο GAGA προσδένεται στις θέσεις στόχους του πάνω στο DNA και η παρουσία του σταθεροποιεί τη χρωματίνη στην αναδιαμορφωμένη κατάσταση της.

Η έκφραση ενός γονιδίου εξαρτάται από τη δομή της χρωματίνης τόσο τοπικά (στον υποκινητή) όσο και την παρακείμενη περιοχή. Συγκεκριμένες πρωτεΐνες μπορούν να προσδένονται στη χρωματίνη και είτε άμεσα είτε έμμεσα να εμποδίζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες και την RNA πολυμεράση να ενεργοποιήσουν τους υποκινητές της περιοχής. Οι αλλαγές στη δομή της χρωματίνης απαιτούν τροποποίηση των N-τελικών ουρών των ιστονών, ειδικά των H3 και H4. Η ουρά των ιστονών περιλαμβάνει τα ~20 N-τελικά αμινοξέα και προεκβάλλει από τα νουκλεοσώματα, ανάμεσα από τις σπείρες του DNA. Οι ιστόνες λοιπόν μπορούν να τροποποιηθούν μέσω ακετυλίωσης, μεθυλίωσης και φωσφορυλίωσης με σημαντικές επιδράσεις στην δομή της χρωματίνης και κατά συνέπεια στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Οι τροποποιήσεις αυτές αλλάζουν το φορτίο της πολύπεπτικδικής

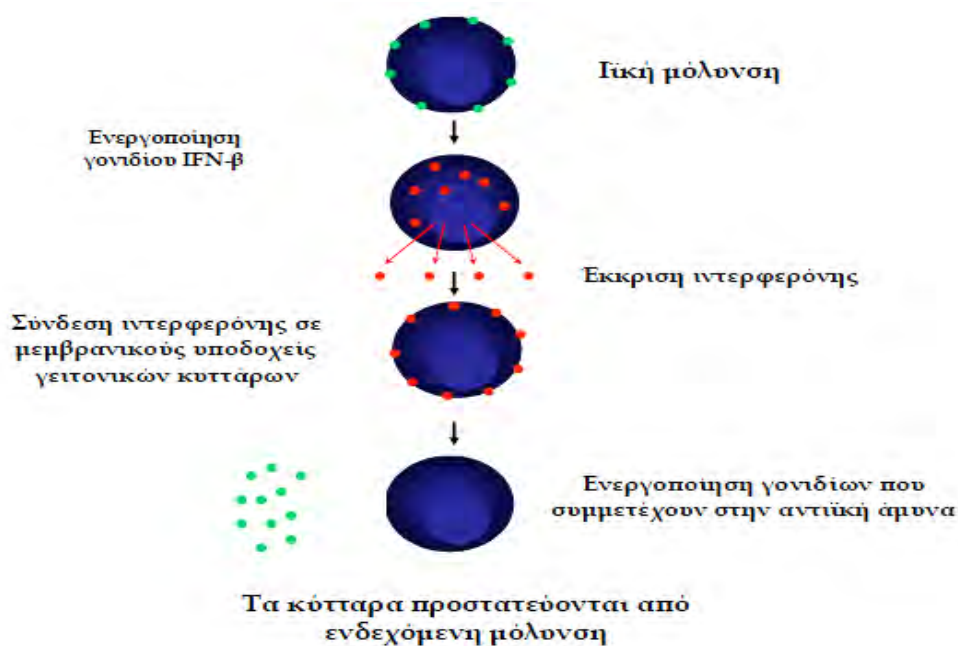
αλυσίδας και είναι δυνατόν να επηρεάσουν άμεσα τη δομή του νουκλεοσώματος ή να δημιουργήσουν θέσεις πρόσδεσης για την προσκόλληση μη ιστονικών πρωτεϊνών οι οποίες αλλάζουν τις ιδιότητες της χρωματίνης. Η ακετυλίωση των ιστονών σχετίζεται με την ενεργή χρωματίνη σε αντίθεση με τη μεθυλίωση που σχετίζεται με την ανενεργή χρωματίνη. Πειράματα έχουν δείξει ότι η ακετυλίωση της λυσίνης 16 της ιστόνης H4 αναστέλλει τη δημιουργία δομής πολύ συμπυκνωμένης χρωματίνης (Shogren-Knaak M. et al, 2006). Αυτή η πιο ανοιχτή διαμόρφωση αυξάνει τη πρόσβαση σε trans-δραστικούς παράγοντες οι οποίοι αναγνωρίζουν και προσδέουν αλληλουχίες του υποκείμενου DNA και μπορούν να επάγουν περαιτέρω αποσυμπίεση της χρωματίνης ή ακόμη και ανιχνεύσιμες περιοχές υπερευαίσθητες στη νουκλεάση. Οι περιοχές αυτές βρίσκονται στους υποκινητές ενεργών γονιδίων και σε ρυθμιστικά στοιχεία όπως μονωτές (Insulators), ενισχυτές και περιοχές ελέγχου(LCRs) και φαίνεται να επηρεάζουν την ιστοειδική μεταγραφή των γονιδίων και παίζουν ρόλο στη διατήρηση της ταυτότητας των κυττάρων( Fraser P.2006)

## **ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗ Β (IFN-β)**

Η ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής ανοσοαπόκρισης περιλαμβάνει λεμφοειδή κύτταρα, φλεγμονώδη κύτταρα και αιμοποιητικά κύτταρα. Οι πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των κυττάρων ρυθμίζονται από ένα σύνολο πρωτεϊνών που ονομάζονται κυτταροκίνες. Οι ιντερφερόνες είναι μια οικογένεια κυτταροκινών που ανακαλύφθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 50 και εκκρίνονται από μολυσμένα με ιό κύτταρα καθώς επίσης μπορούν δεσμεύονται σε γειτονικά κύτταρα και να επάγουν γενικευμένη αντι-ική δράση. Ονομάζονται έτσι γιατί παρεμβαίνουν (interfere) και εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ιών στα κύτταρα. Οι ιντερφερόνες εκτός από τη δράση τους στην άμυνα του ξενιστή – κυττάρου που είναι μολυσμένο από ιό παίζουν βασικό ρόλο και στη κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση καθώς και σε άλλες ανοσορρυθμιστικές βιολογικές λειτουργίες στους ανώτερους ευκαρυώτες (Sen GC et al 1992, Thanos D 1995). Οι ιντερφερόνες διακρίνονται σε τρεις διαφορετικούς τύπους ανάλογα με τη δομή τους, την λειτουργία τους και τον τρόπο σύνθεσης τους, που συμβολίζονται I, II, III. Οι τύπου I ιντερφερόνες περιλαμβάνουν τις ιντερφερόνες  $\alpha$ ,  $\beta$  (Taniguchi et al, 1980) καθώς και τις ιντερφερόνες  $\omega$ ,  $\kappa$ ,  $\epsilon$  (Pestka et al, 2004). Στον άνθρωπο υπάρχουν 13 ή 14 γονίδια για την IFN- $\alpha$ , η IFN- $\beta$  κωδικοποιείται μόνο από ένα γονίδιο, ωστόσο όλα τα

γονίδια των ιντερφερονών τύπου I εντοπίζονται ομαδοποιημένα σε μια γενωμική περιοχή του χρωμοσώματος 9. Οι ιντερφερόνες τύπου II περιλαμβάνουν μόνο ένα μέλος και αυτό είναι η ιντερφερόνη  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), η οποία κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο. Η IFN- $\gamma$  εκφράζεται μόνο σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, συγκεκριμένα στα T- λεμφοκύτταρα και στα φυσικά φονικά (NK- natural killer) κύτταρα ( Faffar and Schreiber,1993). Κάποια νέα μέλη έχουν κατηγοριοποιηθεί ως ιντερφερόνες τύπου III (Pestka et al, 2004), όπως οι IFN- $\lambda$ 1,- $\lambda$ 2 και  $\lambda$ 3. Οι ιντερφερόνες αυτές ενεργοποιούνται επίσης σε κύτταρα μολυσμένα με ιό. Οι ιντερφερόνες τύπου I επάγονται γρήγορα μετά από ιική μόλυνση σε κάθε κυτταρικό τύπο.

Το πρώτο βήμα στην αντι-ιική απόκριση απαιτεί μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων IFN τύπου I. Πριν από λοίμωξη από τον ιό, το επίπεδο του mRNA των IFN είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμο, αλλά μέσα σε λίγες ώρες μετά τη μόλυνση παράγονται περισσότερα από 4000 μετάγραφα ανά κύτταρο. Οι πρωτεΐνες IFN που συντίθενται και εκκρίνονται, προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας, ενεργοποιώντας έτσι την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες εναντίον των ιών (**Εικόνα 5**). Έτσι, η αντι-ιική απόκριση είναι μια οδός δύο σταδίων που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των IFNs και των γονιδίων που επάγονται από αυτές ( Darnell et al, 1994).



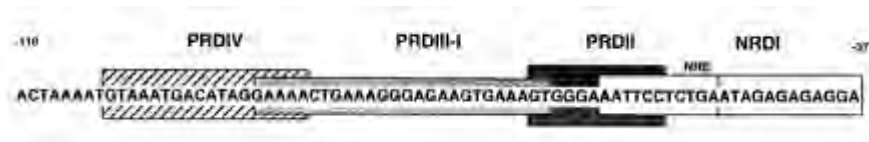
**Εικόνα 5:** Η ενεργοποίηση της οδού της IFN- $\beta$ . Μόλυνση των κυττάρων με ιό ή χειρισμός των κυττάρων με δίκλωνο RNA ενεργοποιεί το γονίδιο IFN- $\beta$ . Η εκκρινόμενη πρωτεΐνη IFN- $\beta$  συνδέεται με τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και έτσι ενεργοποιεί την έκφραση αντι-ιικών γονιδίων. **Πηγή:** *Mechanisms of Transcriptional Synergism of Eukaryotic Genes The Interferon- $\beta$  Paradigm* Thanos D. *Hypertension*.1996;27:1025-1019

Λοίμωξη από τον ιό οδηγεί σε παροδική ενεργοποίηση του γονιδίου IFN-β η οποία είναι όπως έχουμε ήδη αναφέρει μια μικρή κυτοκίνη που εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους και η δράση της είναι παρακρινής. Έχει υποθεθεί ότι ο επαγωγέας του γονιδίου IFN-β είναι το δίκλωνο RNA που παράγεται κατά τη διάρκεια της ιικής αντιγραφής και ότι η επαγωγή μπορεί να επαχθεί από το συνθετικό δίκλωνο poly RNA poly (I)-poly (C) (Sen et al). Τελικά τα κύτταρα, τα οποία επάγουν την έκφραση της IFN-β εξαιτίας των παραπάνω ερεθισμάτων, αποπίπτουν. Η πρόσδεση της, όμως, σε υποδοχείς των γειτονικών κυττάρων τα καθιστά ανθεκτικά στην ιική μόλυνση. Η τελευταία είναι και το μοναδικό ερέθισμα που μπορεί να την ενεργοποιήσει καθώς μόνο με αυτόν τον τρόπο μπορούν να ενεργοποιηθούν ταυτόχρονα όλοι οι παράγοντες που απαιτούνται για την επαγωγή του γονιδίου της IFN-β (Maniatis and Weintraub,1992). Η συσσώρευση του mRNA της IFN-β είναι παράλληλη με το ρυθμό μεταγραφής του γονιδίου της IFN-β. Η έκφραση της IFN-β ξεκινάει 6 ώρες μετά την ιική μόλυνση και σε περίπου 8 ώρες παρατηρείται το μεγαλύτερο επίπεδο έκφρασης της, στη συνέχεια μειώνεται σε χαμηλά επίπεδα ύστερα από 20 έως 24 ώρες. Πειράματα αναστολής της πρωτεϊνικής σύνθεσης έδειξαν ότι αυτή δεν απαιτείται για την ενεργοποίηση του γονιδίου, αλλά απαιτείται για την καταστολή της. Έτσι, η μεταγραφική ενεργοποίηση περιλαμβάνει πιθανώς την μετα-μεταφραστική τροποποίηση των προϋπάρχοντων παραγόντων μεταγραφής, ενώ η καταστολή της έκφρασης απαιτεί τη σύνθεση πρωτεϊνών καταστολέων (Maniatis T et al ).

## **ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΤΟΥ ΕΝΙΣΧΥΤΗ ΤΗΣ IFN-β**

Λεπτομερές μελέτες των αποτελεσμάτων των μεταλλάξεων του προαγωγέα που είναι υπεύθυνος για την επαγωγή του γονιδίου IFN-β από ιό οδήγησε στην ταυτοποίηση μιας ιδιαίτερα συμπαγούς και εξαιρετικά σύνθετης οργάνωσης των ρυθμιστικών αλληλουχιών. Οι αλληλουχίες DNA που απαιτούνται για τα μέγιστα επίπεδα της επαγωγής από ιό εντοπίζεται στα πρώτα 110 bp ανοδικά από τη θέση έναρξης της μεταγραφής εκ των οποίων τα 55 πιο απομακρυσμένα ζεύγη βάσεων αντιστοιχούν στον ενισχυτή. Η περιοχή αυτή περιέχει και θετικά και αρνητικά ρυθμιστικά στοιχεία (**Εικόνα 6**) και μπορεί να λειτουργήσει ως ενισχυτής επαγόμενος από ιό όταν βρίσκεται ανοδικά ή καθοδικά του ετερόλογου υποκινητή. Ο ενισχυτής του γονιδίου της ιντερφερόνης-β (IFN-β) παρέχει ένα από τα καλύτερα

κατανοημένα παραδείγματα για το πώς συνδυαστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων μπορούν να οδηγήσουν σε ένα πολύ συγκεκριμένο πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης.

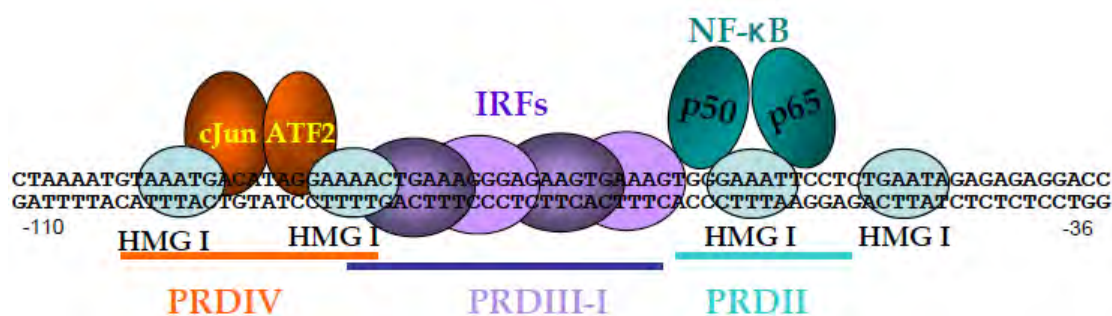


**Εικόνα 6 :**Οργάνωση των ρυθμιστικών αλληλουχιών της IFN-β. Η αλληλουχία του υποκινητή της IFN-β βρίσκεται μεταξύ των θέσεων -110 και -37. Κάθε κουτί αναφέρεται σε θετική ( PRD) ή αρνητική ρυθμιστική περιοχή (NRD). NRE υποδηλώνει αρνητικό ρυθμιστικό στοιχείο. **Πηγή:** *Mechanisms of Transcriptional Synergism of Eukaryotic Genes The Interferon-β Paradigm Thanos D. Hypertension.1996;27:1025-1019*

Ο ενισχυτής και ο κεντρικός υποκινητής στην 5' ρυθμιστική περιοχή είναι οι λόγοι που η επαγωγή της έκφρασης της IFN-β πραγματοποιείται μόνο μετά την ιική μόλυνση. Ο ενισχυτής περιλαμβάνει τα ρυθμιστικά στοιχεία (σε κατεύθυνση 5' → 3') PRDIV, PRDIII/I και PRDII στα οποία προσδένονται ισάριθμοι μεταγραφικοί παράγοντες και συγκεκριμένα το ετεροδιμερές ATF-2/c-Jun, μέλη της οικογένειας των παραγόντων IRF και ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB (ετεροδιμερές p50/p65 της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων Rel) αντιστοίχως. Ανοδικότερα όπως αναφέρθηκε υπάρχουν τα αρνητικά ρυθμιστικά στοιχεία, τα NRDI και NRDI αντιστοίχως. Αμέσως μετά ακολουθεί ο κεντρικός υποκινητής με ένα στοιχείο TATA τοποθετημένο σε απόσταση 20 ζευγών βάσεων από το σημείο έναρξης της μεταγραφής.

Το DNA στην περιοχή του ενισχυτή της IFN-β παρουσιάζει μια καμπυλότητα η οποία παρεμποδίζει τη πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων ATF-2/c-Jun και NF-κB. Το γεγονός αυτό αντιστρέφεται από την αρχιτεκτονική πυρηνική πρωτεΐνη HMGI(Y) (Falvo, Thanos et al.1995, Yie, Merika et al .1999) που προσδέεται σε πλούσιες σε κατάλοιπα A-T και μάλιστα από την πλευρά της μικρής αύλακας του DNA (Thanos and Maniatis 1992, Geierstanger, Volkman et al.1994). Με τη πρόσδεση της στα στοιχεία PRDIV και PRDII η καμπυλότητα αυτή άρτε και έτσι μπορεί να πραγματοποιηθεί η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων. Η HMGI(Y) επίσης αλληλεπιδρά με τους ενεργοποιητές που βρίσκονται στη μεγάλη αύλακα αλλά προάγει και τις διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις τους (Yie, Merika et al

.1999). Με αυτό τον τρόπο όλοι οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται στο DNA με συνεργατικότητα (cooperativity) και σχηματίζουν ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο ονομάστηκε ενισχυόσωμα (enhanceosome) (Thanos and Maniatis 1995) και το οποίο είναι απαραίτητο για την επαγωγή του γονιδίου της IFN-β (Εικόνα 7).



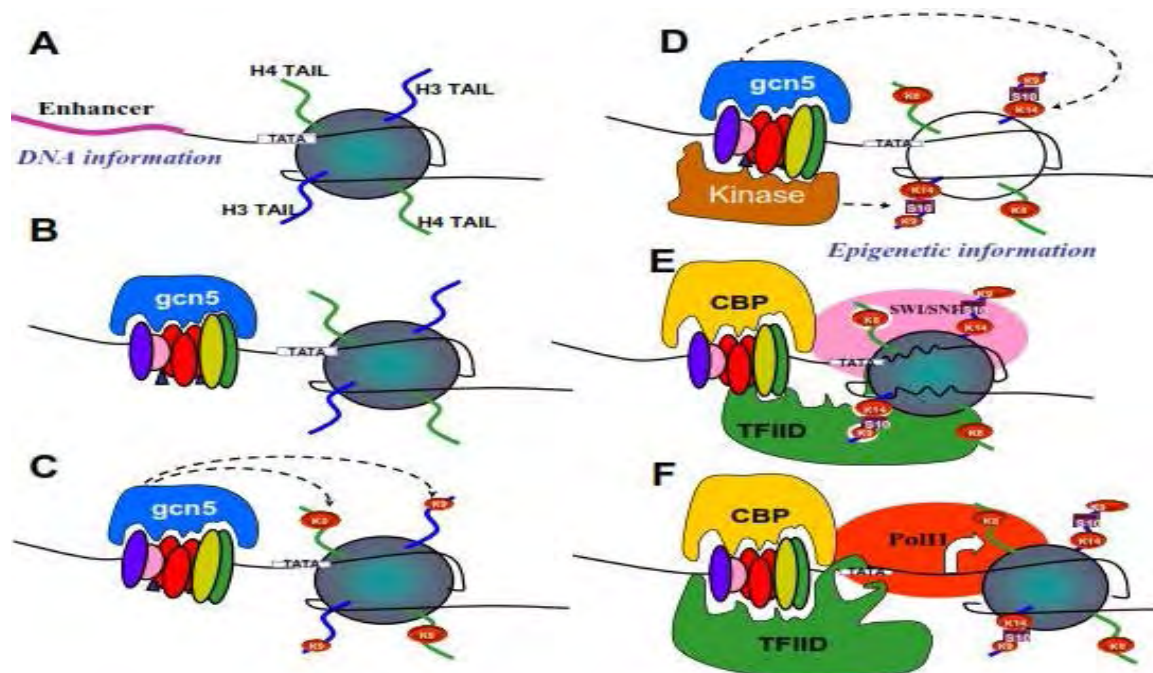
**Εικόνα 7:** Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του ενισχυτή, τα θετικά ρυθμιστικά στοιχεία και οι αντίστοιχοι μεταγραφικοί παράγοντες του γονιδίου της IFN-β. Πηγή :*In vivo study of transcriptional complexes* , Apostolou E, Thanos D 2009

Έκτος από την παρουσία των απαραίτητων μεταγραφικών παραγόντων απαραίτητη για την επαγωγή του γονιδίου της IFN -β είναι η ακριβής διάταξη των θέσεων πρόσδεσης η οποία επιβάλλει μια αντίστοιχη διάταξη των περιοχών μεταγραφικής ενεργοποίησης στο χώρο. Έτσι αποκαλύπτεται ένα δεύτερο επίπεδο συνεργατικότητας το οποίο ενυπάρχει στην κατασκευή του ενισχυοσώματος. Συγκεκριμένα η πρωτεϊνική επιφάνεια που σχηματίζουν οι τρεις περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης συν μια τέταρτη, ειδική περιοχή , που προσφέρεται από την υπομονάδα p65 του NF-κB (Merika , Williams et al.1998), πολύ επιλεκτικά αλληλεπιδρά με μια χαμηλής περιεκτικότητας μέσα στα κύτταρα, ειδική μορφή του ολοενζύμου, που είναι συνδεδεμένη με το μεταγραφικό συνενεργοποιητή CBP (Cho, Orphanides et al 1998, Yie, Senger et al.1999). Ο CBP είναι ένας μοριακός διαμεσολαβητής που χρησιμοποιείται για να στρατολογηθεί το ολοένζυμο με πολύ υψηλή αποτελεσματικότητα και να αρχίσει τη μεταγραφή. Η δημιουργία λοιπόν αυτής της ενεργοποιητικής επιφάνειας έχει ως αποτέλεσμα τη βέλτιστη ικανότητα αλληλεπίδρασης για την ταχύτητα της εξέλιξης του φαινομένου. Κατά αυτό τον τρόπο το ενισχυόσωμα δεν αυξάνει μόνο τη πιθανότητα σύνθεσης του σωστού μεταγράφου από μια αρχική μήτρα DNA αλλά και τη ταχύτητα σύνθεσης του, φαινόμενο που ονομάζεται συνεργεία (synergy).

Η ενεργοποίηση του γονιδίου της IFN-β στα ανθρώπινα κύτταρα οδηγεί σε υπερακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 στη περιοχή γύρω από τον υποκινητή (Parekh and Maniatis,1999). Αυτό συμβαίνει γιατί ενώ ο ενισχυτής της IFN-β είναι ελεύθερος από νουλεοσώματα, ωστόσο περιβάλλεται από δύο νουκλεοσώματα (Agalioti, Lamvardas et al. 2000) εκ των οποίων το ένα καλύπτει την ευρύτερη περιοχή γύρω από το σημείο έναρξης της αντιγραφής, ενώ το 5' άκρο του απέχει μόλις 5 ζεύγη βάσεων από το στοιχείο TATA. Έτσι η αναδόμηση του νουκλεοσώματος, που εξαρτάται από τη ακετυλίωση, είναι αναπόσπαστο κομμάτι της μεταγραφικής επαγωγής του γονιδίου (Agalioti, Lomvardas et al.2000, Agalioti, Chen et al.2002)

Η συναρμολόγηση του ενισχυοσώματος πραγματοποιείται με μια συγκεκριμένη χρονική ακολουθία, η οποία ξεκινάει με τη πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων και της HMG1 (Y) στον ενισχυτή ( Agalioti, Lomvardas et al.2000, Munshi, Agalioti et al.2000). Μέσω της συναρμολόγησης του ενισχυοσώματος στρατολογείται αρχικά ο συνενεργοποιητής GCN5 (Agalioti, Lomvardas et al.2000), ο οποίος ακετυλιώνει συγκεκριμένα κατάλοιπα λυσινών πρώτα στην ιστόνη H4 (λυσίνη K8) και έπειτα στην H3 (λυσίνη K9) του νουκλεοσώματος που καλύπτει τον υποκινητή (Agalioti, Chen et al.2002) καθώς επίσης ακετυλιώνει και την HMG1 (Y) στην λυσίνη 71, γεγονός που σταθεροποιεί τη δομή του ενισχυοσώματος (Munshi, Agalioti et al.2000). Μια ακόμη κίνηση φωσφορυλιώνει την H3 στη σερίνη 10 για να ακολουθήσει η ακετυλίωση ενός ακόμα καταλοίπου λυσίνης, της ίδια ιστόνης, στη θέση 14 (Agalioti, Chen et al.2002). Εντωμεταξύ, η σύσταση του ενισχυοσώματος αλλάζει, χωρίς να διακυβεύεται η σταθερότητα του και κατ'έπείτα η διεξαγωγή της μεταγραφικής ενεργοποίησης (Munshi, Agalioti et al.2000). Αρχικά στη θέση PRDIII/I του ενισχυτή προσδένεται ο IRF-1, στη συνέχεια αντικαθίσταται σταδιακά από άλλα μέλη της οικογένειας που γίνονται διαθέσιμα για πρόσδεση ή ενεργοποιούνται σε μετέπειτα στάδια της ιικής μόλυνσης (IRF-3 και IRF-7 αντιστοίχως). Αυτές οι αντικαταστάσεις συμπίπτουν χρονικά με την αντικατάσταση του συνενεργοποιητή GCN5 από έναν άλλο που έχει επίσης την δραστηριότητα ακετυλο-τρανσφεράσης, την πρωτεΐνη CBP( Agalioti, Lomvardas et al.2000, Munshi, Agalioti et al.2001). Στα όψιμα στάδια της ιικής μόλυνσης ο IRF-2 διεισδύει στο ενισχυοσώμα και πρακτικά αναστέλλει τη δράση του, καθώς απωθεί τη CBP με έναν ενεργητικό τρόπο (Senger, Merika et al.2000). Η CBP εμφανίζεται να δρα περισσότερο σαν ένας κλασσικός συνενεργοποιητής που

διαμεσολαβεί τις διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις παρά στοχεύοντας στις ιστόνες (Agalioti, Lomvardas et al.2000, Agalioti, Chen et al.2002). Ωστόσο όταν στατολογείται στον υποκινητή της IFN-β έχει ενζυμικό στόχο την HMGI(Y) και δρα αντίστροφα από την GCN5 αποσταθεροποιώντας το ενισχύσωμα μέσω ακετυλίωσης της K65 λυσίνης της HMGI(Y). Ωστόσο για να πραγματοποιηθεί αυτή η ακετυλίωση πρέπει πρώτα να έχει προηγηθεί από κάποια ακετυλάση η άρση της ακετυλίωσης στη λυσίνη K71 της HMGI(Y), οπότε μεσολαβεί ένα χρονικό διάστημα από τη στιγμή που φθάνει η CBP μέχρι να αποσταθεροποιηθεί το ενισχύσωμα (**Εικόνα 8**).



**Εικόνα 8:** Αναπαράσταση της διαδοχής των γεγονότων που οδηγούν στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της IFN-β μετά την ιική μόλυνση. Πηγή: *In vivo study of transcriptional complexes*, Apostolou E, Thanos D 2009

Η σύνδεση του CBP-ολοενζύμου με το ενισχύσωμα πρώτον στρατολογεί το ολοένζυμο στον υποκινητή παρόλο που ο βασικός μεταγραφικός παράγοντας TFIIID δεν μπορεί ακόμη να προσδεθεί στο στοιχείο TATA εξαιτίας της παρουσίας του νουκλεοσώματος (Agalioti, Lomvardas et al.2000). Δεύτερον στρατολογεί το σύμπλοκο SWI/SNF το οποίο σταθεροποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης της επικράτειας bromo στο εσωτερικό της καταλυτικής υπομονάδας με την ακετυλιωμένη από τη GCN5, λυσίνη K8 της H4 (Agalioti, Chen et al.2002) το οποίο αναδομεί το νουκλεόσωμα και καθιστά το στοιχείο TATA προσβάσιμο από τον TFIIID (Lomvardas and Thanos 2001). Η πληροφορία που είχε τυπωθεί από GCN5 αναγνωρίζεται πλήρως καθώς τα ακετυλιωμένα κατάλοιπα K9 και K14 της ιστόνης



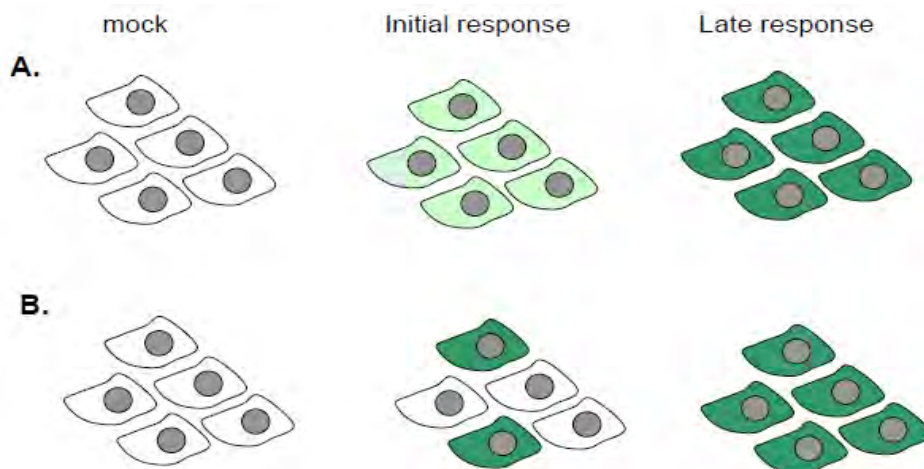
H3 αναγνωρίζονται από μια δεύτερη υπομονάδα του συμπλόκου TFIIID, που είναι μεγαλύτερη όλων των άλλων και ονομάζεται TAFII250. Έτσι η σταθερή πρόσδεση του TPB κάμπει το DNA και το νουκλεόσωμα εξωθείται σε μια ολίσθηση προς το εσωτερικό του γονιδίου, για μια απόσταση 36 ζεύγη βάσεων (Lomvardas and Thanos 2001). Η περιοχή του υποκινητή είναι τώρα ελεύθερη, το προεναρκτήριο σύμπλοκο ολοκληρώνεται και η μεταγραφή μπορεί να αρχίσει.

## **ΣΤΟΧΑΣΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ**

Η επικρατούσα άποψη των βιολόγων περιγράφει τις διάφορες βιολογικές διαδικασίες, όπως είναι η γονιδιακή έκφραση, κυτταρική διαφοροποίηση και ο κυτταρικός κύκλος ως μια αυστηρά προγραμματισμένη και σχεδιασμένη σειρά γεγονότων, τα οποία διεξάγονται κάτω από αυστηρό έλεγχο. Αυτές οι κλασσικές ιδέες αναφέρονται ως ντεντερμινισμός ή ως αιτιοκράτια τα οποία υποδεικνύουν ότι υπάρχει σχέδιο –πρόθεση και καθορισμός για να πραγματοποιηθεί μια βιολογική διαδικασία. Ωστόσο πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι, σε αντίθεση με τις ιδέες του ντεντερμινισμού, υπάρχουν κυτταρικές λειτουργίες οι οποίες συμβαίνουν πιθανολογικά με μη-γραμμικό τρόπο, γεγονός που υποδηλώνει μια έντονη πλαστικότητα του κυττάρου και έτσι κάθε βιολογικού συστήματος (Kurakin, 2005, Shahrezaei and Swain, 2008). Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται στοχαστικότητα ή πιθανοκρατία και υποστηρίζει πως ακόμα και σε ένα κύτταρο η οργάνισμός με όμοιο γενετικό υλικό, που εκτίθεται στο ίδιο περιβάλλον και με κοινό ιστορικό, εμφανίζουν ανεπαίσθητες έως δραματικές διαφορές στη δομή, τη λειτουργία και τη συμπεριφορά (Losick and Desplan, 2008)

Το φαινόμενο της στοχαστικότητας λοιπόν στη γονιδιακή έκφραση ερμηνεύεται με το ότι κάθε κύτταρο ενός ομογενούς πληθυσμού έχει μια δεδομένη και διακριτή πιθανότητα να εκφράσει το γονίδιο ανά χρονική περίοδο η οποία μπορεί να διαφέρει κατά πολύ ακόμη μεταξύ ισογενών πληθυσμών. Έτσι φαίνεται ότι η γονιδιακή έκφραση ακολουθεί ένα πρότυπο απόκρισης όλα η τίποτα, όπου ένα γονίδιο είτε εκφράζεται στο μέγιστο βαθμό είτε δεν εκφράζεται καθόλου σε ένα δεδομένο χρονικό διάστημα. Αν λοιπόν οι συνθήκες επαγωγής βελτιστοποιηθούν τότε περισσότερα κύτταρα θα αρχίσουν να εκφράζουν το γονίδιο -στόχο σε αντίθεση με το μοντέλο του ροοστάτη ή μοντέλο διαβάθμισης το οποίο θα υποδείκνυε ότι κάθε κύτταρο ενός

ομοιογενούς κυτταρικού πληθυσμού αυξάνει σταδιακά το ρυθμό μεταγραφής του γονιδίου –στόχου (**Εικόνα 9**)



**Εικόνα 9:** Διαφορετικά μοντέλα για την ερμηνεία της επαγόμενης έκφρασης σε ένα πληθυσμό. **A.** Ντετερμινιστικό, όλα τα κύτταρα αποκρίνονται στο σήμα, αλλά βαθμιαία αυξάνουν την παραγωγή του προϊόντος. **B.** Στοχαστικό μοντέλο, ένα ποσοστό των κυττάρων αποκρίνεται άμεσα στο ερέθισμα, αλλά στο μέγιστο βαθμό και σταδιακά αρχίζουν τα υπόλοιπα. **Πηγή :***In vivo study of transcriptional complexes*, Apostolou E, Thanos D 2009

Η στοχαστικότητα βασίζεται στη τυχαία ή αλλιώς στην πιθανολογική φύση των χημικών αντιδράσεων, που οργανώνουν και συντονίζουν την ζωή. Όταν όλα τα μόρια που εμπλέκονται σε μια βιολογική διαδικασία βρίσκονται σε αφθονία τότε οι χημικές αντιδράσεις γίνονται με προβλέψιμο τρόπο, ενώ αντίθετα όταν κάποιο συστατικό βρίσκεται σε περιορισμένα ποσά τότε παρατηρείται το φαινόμενο της στοχαστικής έκφρασης, εξαιτίας της δυναμικής κι απρόβλεπτης φύσης των θερμικών ταλαντώσεων. Με αυτό τον τρόπο οι πηγές της μεταβλητότητας που οδηγούν στην στοχαστική έκφραση μπορεί να είναι: η διαθεσιμότητα των εμπλεκόμενων μορίων σε μια διαδικασία, διαφορές την εσωτερική κατάσταση των κυττάρων (πχ στάδιο κυτταρικού κύκλου, κατανομή μιτοχονδρίων), ασθενείς περιβαλλοντικές διαφορές (διαβάθμιση ενός μορφοποιητικού παράγοντα) και γενετικές μεταλλάξεις. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι σύμφωνα με τη στοχαστική θεωρία της γονιδιακής έκφρασης, τα διάφορα μεταγραφικά ρυθμιστικά στοιχεία όπως είναι οι ενισχυτές και οι μεταγραφικοί παράγοντες, δεν επηρεάζουν το ρυθμό μεταγραφής ενός γονιδίου, αλλά δρουν αυξάνοντας την πιθανότητα να καταστεί ο υποκινητής ενεργός.

Η στοχαστική γονιδιακή έκφραση προσφέρει πλαστικότητα, ευελιξία και προσαρμοστικότητα στους κυτταρικούς πληθυσμούς και κατ'έκταση στους

οργανισμούς. Αυτό συμβαίνει γιατί μέσω της στοχαστικότητας υπάρχει η δυνατότητα έκφρασης διαφορετικών γονιδίων σε κάθε κύτταρο ενός ομογενούς πληθυσμού σε ένα χρονικό διάστημα γεγονός που καθιστά τα κύτταρα ικανά να ανταπεξέρχονται πιο αποτελεσματικά σε περιβαλλοντικές διακυμάνσεις καθώς και μια πληθώρα ερεθισμάτων. Έτσι τα στοχαστικά συστήματα παρουσιάζουν σημαντικό εξελικτικό πλεονέκτημα αφού ένας κυτταρικός πληθυσμός μπορεί να αποτελέσει ένα ανοιχτό πεδίο υποδοχής κάθε πιθανής μεταβολής και να αποκριθεί κατάλληλα σε αυτή χρησιμοποιώντας τον εκάστοτε πιο πετυχημένο φαινότυπο.

Πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας δείχνουν ότι και το γονίδιο της IFN- $\beta$  υπόκειται σε στοχαστική μεταγραφική ρύθμιση, όπου παρατηρείται ότι μετά από μόλυνση με ιό το ~22% του πληθυσμού εκφράζει την IFN- $\beta$ . Επίσης, βρέθηκε ότι η στοχαστική έκφραση του γονιδίου αυτού εξαρτάται κυρίως από τη διαθεσιμότητα των μεταγραφικών παραγόντων NF $\kappa$ B και IRF-7, καθώς οι παράγοντες αυτοί βρίσκονται σε μη ιδανικές συγκεντρώσεις. Ωστόσο περισσότερο ανασταλτικός παράγοντας για την στοχαστική έκφραση της IFN- $\beta$  είναι ο NF $\kappa$ B, ο οποίος βρίσκεται συνδεδεμένος με τον καταστολέα του στο κυτταρόπλασμα και με την ενεργοποίηση του αποδεσμεύεται και εισέρχεται στον πυρήνα όπου αποτελεί το πρώτο μεταγραφικό παράγοντα που προσδένεται στον ενισχυτή, καθώς εξωγενή αύξηση της συγκέντρωσης του οδηγεί σε αύξηση της στοχαστικής έκφρασης της IFN- $\beta$  στο ~70% του πληθυσμού, δηλαδή αυξάνεται η πιθανότητα έκφρασης της IFN- $\beta$  ανά κύτταρο. Σε αντίστοιχα πειράματα επιπρόσθετος IRF-7 αυξάνει την στοχαστική έκφραση της IFN- $\beta$  στο ~55% του πληθυσμού. Αντίθετα η επιπρόσθετη HMGI(Y) φαίνεται να μην επηρεάζει καθόλου την στοχαστική έκφραση του γονιδίου (Apostolou E, Thanos D 2009).

### **ΔΙΑΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ**

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF- $\kappa$ B έχει δειχθεί από έρευνες ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή αναλογία 50.000 με 100.000 μόρια ανά κύτταρο (Hottiger et al., 1998, Lipniacki et al., 2006), ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, καθώς τα λεμφοκύτταρα τείνουν να έχουν υψηλότερα επίπεδα NF- $\kappa$ B από τα επιθηλιακά. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο NF- $\kappa$ B, ως ετεροδιμερές αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά σε θέσεις με την εξής ακολουθία DNA: GGGRNYYCC (Lim et al,2007), όπου R: οποιαδήποτε πουρίνη (A,G), N: οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο και Y: οποιαδήποτε πυριμιδίνη (T,C).

Οι πιθανές θέσεις πρόσδεσης λοιπόν μετά από πειράματα του NF-κB φαίνεται να ξεπερνούν το 1.000.000. Τίθεται λοιπόν το ερώτημα που αφορά το μηχανισμό με τον οποίο ο NF-κB τοποθετείται στο γονίδιο της IFN-β και αποτελεί τον πυρήνα για τη συναρμολόγηση του ενισχυοσώματος στο συγκεκριμένο σημείο, πως δηλαδή ο NF-κB που βρίσκεται σε τόσο μικρή συγκέντρωση μπορεί και εντοπίζει την πληθώρα των ειδικών θέσεων στόχων.

Ένας πιθανός μηχανισμός είναι το μοντέλο της διαχρωμοσωμικής μεταφοράς (hit and run), σύμφωνα με το οποίο, ο κάθε παράγοντας συνδέεται κι αποσυνδέεται από διάφορες ενδιάμεσες θέσεις στο ίδιο (in cis) ή σε διαφορετικά χρωμοσώματα (in trans) μέχρι να καταλήξει στην ειδική θέση του στον υποκινητή/ ενισχυτή του γονιδίου-στόχου. Η σχετική πιθανότητα σύνδεσης ή αποσύνδεσης από μια θέση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως την χημική συγγένεια (affinity), την παρουσία άλλων πρωτεϊνών που μπορεί να διευκολύνουν ή να παρεμποδίζουν την πρόσδεση και τέλος, η τοπική αρχιτεκτονική της χρωματίνης, που καθορίζει πόσο προσιτή είναι η γενωμική περιοχή. Το μοντέλο «hit and run» θεωρείται το πιο ρεαλιστικό και ακριβές χάρη στην τρισδιάστατη υπόστασή του και τη δυναμική του φύση.

Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώθηκε με τη χρήση της τεχνικής 4C (circular chromosome conformation capture, Ling et al., 2006, Zhao et al., 2006) σε συνδυασμό με ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP) όπου αποκαλύφθηκαν αλληλεπιδράσεις της χρωμοσωμικής περιοχής που βρίσκεται το γονίδιο της IFN-β με τρεις χρωμοσωμικές περιοχές που δεν είχαν μέχρι τώρα γνωστό ρόλο στη ρύθμιση του γονιδίου και οι οποίες πραγματοποιούνται μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Έχει αποδειχθεί μάλιστα ότι μόνο το έναν αλληλόμορφο της ιντερφερόνης συμμετέχει στην αλληλεπίδραση και είναι αυτό το οποίο τελικά παράγει το mRNA της IFN-β. Οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα, μετά από ιική μόλυνση κατά τη διάρκεια της συγκρότησης του ενισχυοσώματος και πριν την ενεργοποίηση του γονιδίου της IFN-β, και η ταχεία και αποτελεσματική πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB είναι απαραίτητη για την επιτυχή επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου. Συγκεκριμένα, οι αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται αρχικά σε χαμηλές συχνότητες, 2 ώρες μετά την μόλυνση, κορυφώνονται στις 4 ώρες και σταδιακά σχεδόν εξαφανίζονται στις 6 και 8 ώρες. Σε κάθε αλληλεπιδρούσα χρωμοσωμική περιοχή υπάρχουν ειδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες Alu που χαρακτηρίζουν ευχρωματινικές περιοχές, γνωστές ως AluSX και AluY (Polak and

Domany 2006), οι οποίες περιλαμβάνουν τη θέση πρόσδεσης του NFκB, GGGTTTCACC. Οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις είναι ειδικές για ορισμένα μόνο γονίδια-στόχους του NF-κB και για ορισμένες μόνο Alu ακολουθίες (Apostolou E and Thanos D 2009). Οι περιοχές αυτές ονομάστηκαν κλώνοι #14, #9 και #21 (NRC14, NRC9, NRC21) και βρίσκονται στα χρωμοσώματα 9, 18 και 4 αντίστοιχα (η αλληλεπίδραση μεταξύ IFN-β και NRC14 είναι ενδοχρωμοσωμική αφού βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα) (**Εικόνα 10**).

<b>4C-ChIP clone number</b>	<b>Precise position</b>	<b>Nearby genes</b>	<b>Alu element</b>
<b>#21</b>	<b>4 p13</b>	19kb upstream of RHOH 20kb downstream of N4BP2	Alu Sx (GGGTTTCACC)
<b>#14</b>	<b>9q33</b>	10kb upstream of ABO, 15kb downstream of LCN1 (lipocalin 1)	Alu Y (GGGTTTCACC)
<b>#9</b>	<b>18q21</b>	12kb upstream of LOXHD1	Alu Sx (GGGTTTCACC)

**Εικόνα 10:** Γενικές πληροφορίες για τη χρωμοσωμική θέση και σύσταση των κλώνων σε γονίδια και επαναλαμβανόμενες ακολουθίες. Πηγή: *In vivo study of transcriptional complexes*, Apostolou E, Thanos D 2009

Οι χρωμοσωμικές περιοχές φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου της IFN-β και συγκεκριμένα ύστερα από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων HeLa με πλασμίδια που περιέχουν αυτές τις περιοχές φαίνεται πως η έκφραση της IFN-β αυξάνεται ύστερα από ιική μόλυνση στα κύτταρα αυτά, σε αντίθεση με κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με πλασμίδια αναφοράς (Apostolou and Thanos, 2008). Αυτό συμβαίνει γιατί η διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις με τους κλώνους και τον ενισχυτή της IFN-β αυξάνουν την πιθανότητα έκφρασης της ανά κύτταρο, καθώς ο NF-κB συνδέεται στους κλώνους και μεταφέρεται μέσω των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων στον ενισχυτή του γονιδίου. Η αύξηση του ενδοκυττάρου NF-κB μειώνει δραματικά τις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις γεγονός που δείχνει ότι αυτές είναι απαραίτητες για να υπερπηδήσουν το εμπόδιο της χαμηλής συγκέντρωσης του, ώστε να συνδεθεί στις θέσεις στόχους του στον ενισχυτή. Αντίθετα όταν η συγκέντρωση του είναι πολύ υψηλή μπορεί και συνδέεται

στον ενισχυτή της IFN-β χωρίς την διαμεσολάβηση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων (Apostolou and Thanos 2008).

Επιπρόσθετες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο μας αποκαλύπτουν ότι οι γενετικά απομακρυσμένες αυτές περιοχές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε στατιστικά σημαντικές συχνότητες ανεξάρτητα από το γονιδιακό τόπο της IFN-β. Η αλληλεπίδραση αυτή λαμβάνει χώρα ακόμη και στα άθικτα κύτταρα, χωρίς ιική μόλυνση. Πειράματα FISH έχουν δείξει ότι οι τρεις αυτοί κλώνοι αλληλεπιδρούν ανά δύο σε όλους τους συνδυασμούς, ενώ υπάρχουν και ορισμένα κύτταρα στα οποία υπάρχει τριπλός συνεντοπισμός (Apostolou E and Thanos 2009).

### **ΜΟΝΟΑΛΛΗΛΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ IFN-β**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η IFN-β εκφράζεται στο 19% από το 22% του κυτταρικού πληθυσμού μόνο από το ένα αλληλόμορφο, το 2% του πληθυσμού εκφράζει IFN-β από δύο αλληλόμορφα και το υπόλοιπο περισσότερο από δύο αλληλόμορφα (να θυμηθούμε ότι η κυτταρική σειρά HeLa είναι πολυαλληλική). Αρχικά οι κλώνοι που περιέχουν τα στοιχεία Alu προσδένουν και μεταφέρουν τον NF-κB στον ενισχυτή της IFN-β στο ένα από τα δύο αλληλόμορφα της το οποίο όπως είδαμε είναι και αυτό το οποίο θα εκφραστεί τελικά. Η μεταγραφή όμως του γονιδίου ενώ αρχικά ξεκινάει μονοαλληλικά μετατρέπεται σταδιακά σε πολυαλληλική και έτσι μετά από δέκα ώρες από την ιική μόλυνση όλα τα αλληλόμορφα είναι μεταγραφικά ενεργά καθώς επίσης και το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν IFN-β διπλασιάζεται. Η ακόλουθη πολυαλληλική έκφραση της IFN-β είναι ανεξάρτητη από τις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις και η μετάβαση από τη μονοαλληλική στην πολυαλληλική μεταγραφή συμβαίνει ως απόκριση στην μεταγωγή σήματος από την κυτταροκίνη IFN-β. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η IFN-β που παράγεται μετά την ιική μόλυνση μπορεί να συνδεθεί στους κυτταρικούς υποδοχείς της στη μεμβράνη του ίδιου ή και διαφορετικών κυττάρων και με αυτό τον τρόπο επάγει μονοπάτια μεταγωγής σήματος που καταλήγουν στην ενεργοποίηση αντιικών γονιδίων. Ένας στόχος της είναι και η ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα IRF-7 και έτσι έχουμε ένα μηχανισμό ανατροφοδότησης.

## **ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ GAGA ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (ThPOK)**

Εξαιτίας της συχνής επανάληψης των νουκλεοτιδίων GAGA στα στοιχεία AluSX, καθώς και πειραμάτων DNA FISH που δείχνουν ότι η περιοχή GAGA είναι απαραίτητη ώστε να πραγματοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις των κλώνων (NRCs) με την IFN $\beta$  υποτέθηκε ότι μπορεί η συγκεκριμένη περιοχή να αποτελεί θέση πρόσδεσης για μία πρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων. Μια τέτοια πρωτεΐνη θα μπορούσε να είναι η πρωτεΐνη ThPOK (T-helper inducing POZ/ Krüppel-like factor), ομόλογη της πολύ καλά χαρακτηρισμένης πρωτεΐνης GAF (GAGA factor) στη *Drosophila Melanogaster* (Matharu et al., 2010), η οποία προσδέεται σε αλληλουχίες GA(n) που βρίσκονται σε ευχρωματινικές περιοχές.

Ο παράγοντας GAF της *Drosophila* παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην μεταγραφική ενεργοποίηση, ενισχύοντας την επίδραση της «ποικιλομορφία θέσης» ή μεταβάλλοντας τη δομή της χρωματίνης στον υποκινητή του γονιδίου hsp70 (Tsukiyama et al 1994), καθώς και στην μεταγραφική καταστολή μέσω της αλληλεπίδρασης με μία ομάδα PRC1 και τη σύνδεση της με GAGAGA στοιχεία στο PRES στοιχεία ανταπόκρισης των γονιδίων HOX (Mishra et al 2001) ή με την ένωση με περιοχή ετεροχρωματίνης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Raff et al 1994). Ο παράγοντας GAF κωδικοποιείται από το Trihorax –like γονίδιο (Trl) το οποίο φαίνεται να παίζει ρόλο στη ρύθμιση αναπτυξιακών πρωτεϊνών στη *Drosophila* (Farkas et al 1994). Θέσεις δέσμευσης του GAF έχουν εντοπισθεί σε υποκινητές και ενισχυτές, καθώς και σε ευχρωματινικές περιοχές υποδεικνύοντας ένα ρόλο στη διατήρηση αυτών των περιοχών ως μεταγραφικά ενεργές.

Το γονίδιο Trl κωδικοποιεί 2 προϊόντα τα οποία είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος και διαφέρουν μόνο στο μήκος και στην αλληλουχία του καρβοξυτελικού άκρου που είναι πλούσιο σε γλουταμίνη. Ο GAF έχει μια αρχιτεκτονικά μοναδική δομή που αποτελείται από μια περιοχή δακτυλίου ψευδαργύρου (DBD), μια περιοχή PTB/POZ η οποία είναι γνωστή ως μοτίβο αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης- πρωτεΐνης και τέλος μια περιοχή πλούσια σε γλουταμίνη που ονομάζεται Q τομέας και χαρακτηρίζει μια υποομάδα μεταγραφικών ενεργοποιητών ενώ επίσης αλληλεπιδρά με τη μεταγραφική συσκευή. Ο GAF δεσμεύεται στο DNA, συνήθως σε περιοχές 200bp ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής, όπως αναφέραμε ήδη σε μοτίβα GAGA μέσω του πεδίο δακτύλου

ψευδαργύρου C2H2 αποτελούμενη από 82 αμινοξέα και κάθε αλληλεπίδραση σταθεροποιείται από το αμινοτελικό άκρο. Η N-τερματική PTB / POZ περιοχή αποτελείται από 122 αμινοξέα και έχει βρεθεί σε πληθώρα οργανισμών, κύριος ρόλος της είναι η δημιουργία ομοδιμερών αλλά και ετεροδιμερών τα οποία αυξάνουν τη δραστικότητα του GAF (Κατσάνη et al 1999). Τέλος η περιοχή Q είναι η λιγότερο κατανοημένη ωστόσο φαίνεται να παίζει ρόλο στην αναδιαμόρφωση του υποκινητή, στη πρόσδεση σε μονόκλωνη αλυσίδα και στον πολυμερισμό.

Ο ThPOK αρχικά χαρακτηρίστηκε ως μεταγραφικός ρυθμιστής του κολλαγόνου τύπου I γονίδια που εκφράζονται στο δέρμα, όπου προσδένεται κατά προτίμηση στον πυρήνα υποκινητή των γονιδίων κολλαγόνου αναγνωρίζοντας μια συναινετική αλληλουχία 5-GGGAGGG-3 (Galera 1994, Park, 1996, Widom et al 1997). Συγκεκριμένα σε ανθρώπινους ινοβλάστες, στρατολογεί την p65 υπομονάδα του παράγοντα μεταγραφής NF-κB, και στη συνέχεια ρυθμίζει αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση του κολλαγόνου τύπου I (Beauchef et al 2012).

Κατά την ανάπτυξη των ανώριμων T-κυττάρων (θυμοκύτταρα) οThPOK έχει αποδειχθεί ότι είναι ο κύριος ρυθμιστής της διαφοροποίησης των κυττάρων. Ο ThPOK εκφράζεται αποκλειστικά στα βοηθητικά CD4<sup>+</sup> κυττάρων και εκτοπική έκφραση του ThPOK σε ανώριμα T-κύτταρα που εκφράζουν τα ιστοσυμβατότητας I (MHC-I) μόρια και που η μοίρα τους είναι να γίνουν κυτταροτοξικά CD8<sup>+</sup> κύτταρα, τα ανακατευθύνει προς CD4<sup>+</sup> (He et al 2005). Σε κύτταρα CD4<sup>+</sup> ο ThPOK καταστέλλει τη πρωτεΐνη RUNX3, η οποία είναι κρίσιμος ρυθμιστής της ανάπτυξης CD8<sup>+</sup> T κυττάρων, ενώ σε CD8<sup>+</sup> κύτταρα οι RUNX1 και RUNX3 καταστέλλουν την έκφραση του γονιδίου του ThPOK και του CD4 (Egawa και Littman 2008, Luckey et al 2014). Η μεταγραφή του γονιδίου ThPOK σε θυμοκύτταρα ρυθμίζεται κυρίως από ένα απομακρυσμένο ρυθμιστικό στοιχείο (DRE), που είναι αναγκαίο και για την καταστολή στα κύτταρα CD8<sup>+</sup> και για την έκφραση στα κύτταρα CD4<sup>+</sup> (He et al 2008, Muroi et al 2008), ο GATA -3 μεταγραφικός παράγοντας και ο p-300 μεσολαβούν στην ακετυλίωση ορίζοντας έτσι μια λεπτή ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης ThPOK η οποία οδηγεί σε δέσμευση των CD4<sup>+</sup> (Wang et al 2008, Zhang et al 2010). Ένας πιθανός μοριακός μηχανισμός, ο οποίος δίνει εικόνα για το ρόλο της αλληλοαποκλειόμενης έκφρασης του ThPOK και των μεταγραφικών παραγόντων RUNX στα CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> κύτταρα, αντίστοιχα, περιγράφεται από τον Collins et al 2011, δείχνοντας πως η χρωμοσωμική τοποθέτηση και η πυρηνική οργάνωση ρυθμίζουν την έκφραση των CD4 και CD8. Εν συντομία CD4 και CD8 γενωμικοί



τόποι συνεργάζονται σε cis διάταξη μέσω της δέσμευσης CBFβ του εταίρου δέσμευσης πρωτεϊνών RUNX σε κύτταρα CD8<sup>+</sup>, και η ένωση αυτή διευκολύνει την έκφραση CD8, ενώ σε κύτταρα CD4<sup>+</sup> ο ThPOK εμποδίζει αυτή την αλληλεπίδραση, πιθανώς με την σύνδεση με ένα Cd4 εγγύς ενισχυτή. Ωστόσο, δεν μπορεί να εξηγηθεί αν η συσχέτιση αυτή είναι μια αιτία ή ένα αποτέλεσμα της μεταγραφής CD8, είναι η πρώτη απόδειξη ότι ThPOK ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση, παίζοντας ενεργό ρόλο στις χρωμοσωμικές σχέσεις .

Ο ThPOK έχει επίσης δείξει να συνδέεται σε μοτίβα GAGA του LASs κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου των ινοβλαστών ποντικού και παίζει ρόλο στην χρωματινική διαμερισματοποίηση στο πυρηνικό έλασμα και τη γονιδιακή καταστολή μέσω σύνδεσης με HDAC3 και Lap2β (Zullo et al 2012). Έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι αποσιώπηση του ThPOK σε μακροφάγα ποντικού διαταράσσει τη σύνδεση των αλληλομόρφων TNFα και εμποδίζει τη μετάβαση από τη μονοαλληλική έκφραση στη δυαλληλική έκφραση του TNFα (Stratigi et al 2015). Η συμμετοχή του ThPOK σε χρωμοσωμικές σχέσεις θυμίζει στη *Drosophila melanogaster* τον παράγοντα GAGA στο ρόλο του στα χρωμοσωμικά όρια και στο transvection (Bhat et al 1996, Laney και Biggin, 1992), γεγονός που υποδεικνύει ότι το στοιχείο GAGA έχει συντηρημένη λειτουργία μεταξύ των ειδών. Ωστόσο δεν έχει περιγραφεί ακόμη ένας καλά καθορισμένος μηχανισμός στον οποίο ο παράγοντας GAGA των σπονδυλωτών ολιγομερίζεται και μεσολαβεί στις ενδο- ή διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις .

## **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Όπως προαναφέρθηκε, η ανακάλυψη από το εργαστήριό μας, τριών γενωμικών περιοχών, οι οποίες περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, που αλληλεπιδρούν με αυτόν και τον μεταφέρουν στον ενισχυτή της IFN-β έπειτα από ιική μόλυνση. Με την αλληλεπίδραση των γενωμικών αυτών περιοχών, οι οποίες ονομάστηκαν κλώνοι #14, #9 και #21 (NRC14, NRC9, NRC21) και βρίσκονται στα χρωμοσώματα 9, 18 και 4 αντίστοιχα, με τον ενισχυτή της IFN-β καθώς και την πρόσδεση του NF-κB, που αποτελεί δεσμευτικό παράγοντα για την έκφραση του γονιδίου, ξεκινάει η συγκρότηση του ενισχυοσώματος η οποία επάγει την στρατολόγηση της μεταγραφικής συσκευής στον υποκινητή του γονιδίου.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα που είχαν ως στόχο τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την διαχρωμοσωμική αλληλεπίδραση μεταξύ της

περιοχής NRC21 και της IFN-β καθώς και την αποκάλυψη των πρωτεϊνών που διαμεσολαβούν ώστε να γίνει αυτή η αλληλεπίδραση με τόσο μεγάλη ειδικότητα. Αυτά υλοποιήθηκαν με τη κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών οι οποίες έχουν ενσωματωμένα πολλαπλά αντίγραφα από ελλείψεις και μεταλλάξεις της περιοχής NRC21 και τα οποία αποκάλυψαν την σημαντικότητα μιας περιοχής με επαναλήψεις GAGA στην πραγματοποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των NRCs με την IFN-β. Υποτέθηκε λοιπόν ότι μπορεί η συγκεκριμένη περιοχή να αποτελεί θέση πρόσδεσης για μία πρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων. Μια τέτοια πρωτεΐνη θα μπορούσε να είναι η πρωτεΐνη ThPOK, ομόλογη της πολύ καλά χαρακτηρισμένης πρωτεΐνης GAF (GAGA factor) στη *Drosophila Melanogaster*, η οποία προσδένεται σε αλληλουχίες GA(n) που βρίσκονται σε ευχρωματινικές περιοχές.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω στόχος της διπλωματικής αυτής εργασίας είναι η διευκρίνιση της παραπάνω θεωρίας μέσω της μελέτης της ειδικής πρόσδεσης του ThPOK στα NRCs μετά την μόλυνση με ιό, τη μελέτη του ρόλου του στην πραγματοποίηση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων τόσο μεταξύ των NRCs όσο και μεταξύ των NRCs και του ενισχυτή της IFN-β. Ενώ επίσης επιδιώκεται η συσχέτιση της έκφρασης του ThPOK με την έκφραση του γονιδίου της IFN-β. Για τη επίτευξη των παραπάνω πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε μια κυτταρική σειρά στην οποία έχει πραγματοποιηθεί αποσιώπηση (knock down) του ThPOK μέσω sh-RNA σίγησης καθώς και στη κυτταρικής σειράς HeLa.

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

### **Υλικά και μέθοδοι**

#### **Κυτταροκαλλιέργειες**

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε είναι της κυτταρικής σειράς HeLa CCL2 τα οποία συντηρούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό μέσο D<sub>10</sub> {DMEM (Dulbecos Modified Eagles Medium) +10%FBS (εμβρυϊκός ορός βοδιού) + 1%PEN STREP (διάλυμα αντιβιοτικών πενικιλίνης- στρεπτομικίνης)} και 1%GlutaMAX.. Τα κύτταρα αυτά είναι επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας, τα οποία διατηρούνται στους 37°C με 5% CO<sub>2</sub>.

### **Μόλυνση κυττάρων με ιό**

Ο Ιός που χρησιμοποιήσαμε για να μολύνουμε τα κύτταρα ώστε να επάγεται η έκφραση της IFN- $\beta$ , είναι Sendai Virus, mouse –specific RNA ιός. Τα κύτταρα μολύνονται με ιό σε συγκέντρωση 1:10 του θρεπτικού μέσου των κυττάρων.

### **Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης είναι η πρότυπη μέθοδος για τον διαχωρισμό μορίων DNA διαφορετικού μήκους. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, στο οποίο τα αρνητικά φορτισμένα μόρια μεταναστεύουν προς το θετικό ηλεκτρόδιο ενώ τα θετικά μόρια μεταναστεύουν προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο.

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος σχηματίζει πήκτη με πόρους, των οποίων η διάμετρος κυμαίνεται από 100nm έως 300nm. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στην πήκτη και κατά συνέπεια η παράμετρος αυτή καθορίζει το εύρος των κλασμάτων DNA που μπορεί να διαχωριστούν.

Μία πήκτη αγαρόζης παρασκευάζεται με ανάμειξη της κατάλληλης ποσότητας σκόνης αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE (για 4 λίτρα TBE 5x διαλύουμε σε κατάλληλο όγκο dH<sub>2</sub>O 216g Tris, 110g Boric Acid, 14.9g EDTA) και τη θερμαίνουμε μέχρι αυτή να λιώσει. Στο διάλυμα τοποθετούμε και 5% βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) το οποίο εισβάλλει στη διπλή έλικα έτσι ώστε σε UV να είναι ορατό το DNA. Ρίχνουμε το διάλυμα σε οριζόντια συσκευή ηλεκτοφόρησης και τοποθετούμε χτενάκια έτσι ώστε να σχηματιστούν πηγάδια (wells), στα οποία θα φορτώσουμε τα δείγματα DNA. Αφού σχηματιστεί η πήκτη, εμβαπτίζεται σε 1x TBE που επιτρέπει τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος διαμέσου αυτής όταν ασκηθεί διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού στα άκρα της. Για τη φόρτωση του δείγματος DNA χρησιμοποιούμε διάλυμα ρυθμιστικό με γλυκερόλη (έτσι ώστε το δείγμα να αποκτά μεγαλύτερη πυκνότητα και να κατακάθεται) και κάποια χρωστική για την οπτικοποίηση των δειγμάτων. Στη συνέχεια τα δείγματα DNA τοποθετούνται στα πηγάδια, κοντά στον αρνητικό πόλο ώστε μετά την εφαρμογή τάσης (όσο μεγαλύτερη είναι η τάση σε Volts τόσο πιο γρήγορα μετακινείτε το DNA μέσα από τους πόρους της πηκτής και το αντίστροφο) να κινηθούν προς τον θετικό πόλο εξαιτίας του αρνητικού τους φορτίου. Για την εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA καθώς και για την διάγνωση προβλημάτων κατά την

ηλεκτροφόρησης τρέχουμε έναν DNA δείκτη μοριακού βάρους (ladder), ο οποίος αποτελείται από τμήματα DNA καθορισμένου μεγέθους. Τέλος φωτογραφίζουμε το πηκτώμα με χρήση λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η ουσία που καθιστά ορατό το DNA είναι το βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο ενσωματώνεται στην έλικα του DNA και απορροφά τη χρωστική.

### Απομόνωση πυρηνικών εκγυλισμάτων για Western Blot

#### **A. Προετοιμασία διαλυμάτων**

<i>BUFFER A</i>	<i>BUFFER B</i>
10mM Hepes pH 7.5	20mM Hepes pH 7.5
10mM KCl	420mM NaCl
1.5mM MgCl <sub>2</sub>	1.5mM MgCl <sub>2</sub>
Glycerol 10%	Glycerol 25%
H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
Τελικός όγκος 10mL	Τελικός όγκος 10mL

#### **B. Πειραματική διαδικασία**

1. Ξέπλυμα με 10 mL PBS των κυττάρων ώστε να μπορούν να σηκωθούν από τα 10cm πιάτα (harvesting) και μεταφέρουμε τα κύτταρα σε 15 mL Falcon.
2. Φυγοκεντρούμε για 5 min στις 4.000 rpm.
3. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε σε 1mL διαλύματος Buffer A +1x PIC + 1/20 του όγκου 10% NP 40 ώστε να λυθούν τα κύτταρα, μεταφέρουμε σε νέο tube και κάνουμε Vortex.
4. Επώαση στον πάγο για 20 min.
5. Spin down στις 13.000 rpm για 1min.
6. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο το οποίο περιέχει το κυτταρόπλασμα, προσθέτουμε 1mL Buffer A και κάνουμε spin down στις 13.000 rpm για 1min .
7. Κρατάμε την πελέτα και προσθέτουμε 50μL διαλύματος Buffer B +1x PIC (μείγμα αναστολέων πρωτεασών-Roche), κάνουμε Vortex.
8. Ανακινούμε ήπια στο Rotator στους 4°C για 20min.
9. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 15min .
10. Κρατάμε το υπερκείμενο και πραγματοποιούμε Western Blot ή το αποθηκεύουμε στους -80°C.

### Απομόνωσή RNA (RNA isolation)

Γενικά οι μεθοδολογίες απομόνωσης RNA περιλαμβάνουν τρία βασικά βήματα με πρώτο την αδρανοποίηση ενδογενών ριβονουκλεασών (Rnase) οι οποίες δρουν καταστρέφοντας το RNA τόσο στα υλικά όσο και τα αντιδραστήρια εάν αυτά δεν είναι κατεργασμένα ειδικά για να είναι ελεύθερα από Rnάσες όσο και στο ίδιο το παρασκεύασμα αφού ελευθερώνονται από τα οργανίδια των κυττάρων που λύνονται. Δεύτερο βήμα είναι η απόσπαση του RNA από τις πρωτεΐνες στις οποίες είναι προσδεμένο. Τρίτο βήμα είναι ο φυσικός διαχωρισμός του από άλλα μόρια του διαλύματος.

Το πρωτόκολλο απομόνωσης RNA είναι το εξής :

1. Επαναιωρούμε το ίζημα κύτταρων που έχουν καλλιεργηθεί σε 6 well πιάτα σε 400  $\mu\text{L}$  Trizol (όξινη φαινόλη, έχει την ιδιότητα να απομακρύνει πρωτεΐνες και παράλληλα μεγάλη ποσότητα DNA προσμίξεων) καλά μέχρι να γίνει ένα ομογενές μείγμα και το αφήνουμε 10 min στον πάγο για να δράσει. Σε αυτό το βήμα μπορούμε να διακόψουμε το πρωτόκολλο και να αποθηκεύσουμε τα δείγματα στους  $-80^\circ\text{C}$ .
2. Προσθέτουμε 1/5 της ποσότητας Trizol (80  $\mu\text{L}$ ) χλωροφόρμιο σε κάθε tube για να απομακρυνθεί το Trizol και κάνουμε Vortex.
3. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 10 min στους  $4^\circ\text{C}$ .
4. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο tube, προσθέτουμε 250  $\mu\text{L}$  χλωροφόρμιο και κάνουμε πολύ καλό Vortex.
5. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 10 min στους  $4^\circ\text{C}$ .
6. Επανάληψη βημάτων 4 και 5.
7. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο ( $\text{H}_2\text{O} + \text{RNA}$ ) προσεκτικά σε νέο tube και προσθέτουμε 250  $\mu\text{L}$  ισοπροπανόλη και κάνουμε Vortex.
8. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 15 min στους  $4^\circ\text{C}$ .
9. Αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο και ξεπλένουμε την πελέτα με 300  $\mu\text{L}$  70% αιθανόλη. Εάν σηκωθεί η πελέτα φυγοκεντρούμε ξανά στις 13.000 rpm για 10 min στους  $4^\circ\text{C}$ . Αφαιρούμε την αιθανόλη και αφήνουμε την πελέτα να στεγνώσει πλήρως.
10. Επαναδιαλύουμε σε 30  $\mu\text{L}$  dd  $\text{H}_2\text{O}$  κάνουμε Vortex και Spin down
11. Φωτομετρούμε στο Nanodrop έτσι ώστε να μπορούμε να υπολογίσουμε τις ποσότητες που θα χρησιμοποιήσουμε για την αντίδραση της DNase που ακολουθεί.

12. Αντίδραση DNase:

Σε αυτό το βήμα στόχος είναι να κατακερματίσουμε το DNA που πιθανόν έχει απομείνει στα δείγματα μας. Κάθε αντίδραση λοιπόν περιέχει τα εξής:

- a. 4 γ RNA που υπολογίζουμε με βάση τις συγκεντρώσεις που πήραμε από τη φωτομέτρηση
- b. 4 μL DNase (Roshe)
- c. 1x DNase Buffer (6 μL)
- d. 1 μL HaeIII
- e. ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 60 μL

Επώαση για 1 ώρα στους 37 °C.

13. Προσθέτουμε dd H<sub>2</sub>O μέχρι τα 200 μL.

14. Προσθέτουμε 100 μL φαινόλη και 100 μL χλωροφόρμιο και κάνουμε Vortex

15. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 6 min στους 4 °C

16. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο tube, προσθέτουμε 200 μL χλωροφόρμιο και κάνουμε Vortex

17. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 6 min στους 4 °C

18. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 16 και 17

19. Κατακρήμνιση με αιθανόλη

- a. Προσθέτουμε 1/10 του όγκου CH<sub>3</sub>COONa (20 μL) και 3 φορές τον όγκο 100% αιθανόλη (600 μL )
- b. Επωάζουμε για 30 min στους -80 °C
- c. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 30 min στους 4 °C

20. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε με 100 μL 70% αιθανόλη. Εάν σηκωθεί η πελέτα φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm 10 min στους 4 °C.

21. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αφήνουμε την πελέτα να στεγνώσει πλήρως.

22. Επαναδιαλύουμε σε 30 μL ddH<sub>2</sub>O.

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της PCR επιτρέπει την ενίσχυση ενός κομματιού μονόκλωνου DNA και την ύστερη χρήση των αντιγράφων για πειράματα κλωνοποίησης, αλληλούχισης, ανάλυσης με ένζυμα περιορισμού κ.α. Η αντίδραση PCR ενέχει την σχεδίαση δύο μορίων εκκινητών, τα οποία περιστοιχίζουν την περιοχή DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε και έχουν μέγεθος γύρω στα 17-30 νουκλεοτίδια. Το ένα είναι συμπληρωματικό με τον έναν κλώνο του δίκλωνου DNA και το άλλο με το συμπληρωματικό του. Η αντίδραση χωρίζεται σε 3 στάδια που επαναλαμβάνονται για περίπου 20-30 φορές, το καθένα από τα οποία γίνεται σε διαφορετική θερμοκρασία. Το πρώτο στάδιο είναι η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA το οποίο γίνεται συνήθως στους 94°C. Το δεύτερο στάδιο είναι η πρόσδεση των εκκινητών και οι θερμοκρασίες κυμαίνονται μεταξύ 45-60°C. Το τρίτο στάδιο είναι η επιμήκυνση των εκκινητών, με συνέπεια την σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων. Στο στάδιο αυτό χρησιμοποιείται μια πολυμεράση θερμοσταθερή όπως η Taq, η οποία διατηρεί την ενεργότητα της ακόμα και εάν εκτεθεί στους 94°C, στο στάδιο της αποδιάταξης. Η θερμοκρασία στην οποία θα γίνει η αντιγραφή του DNA σε αυτό το στάδιο είναι 72°C. Η υψηλή αυτή διαδικασία αποδιατάσσει τους εκκινητές διότι είναι προσδεμένοι στο DNA με μεγάλη ειδικότητα.

Η PCR μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο δειγμάτων RNA ύστερα από τη διαδικασία απομόνωσης RNA για επιμόλυνση με DNA σε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιούμε εκκινητές που στοχεύουν γενώμικο DNA.

Το μείγμα που θα ετοιμάσουμε θα περιέχει τα εξής συστατικά :

- Taq Buffer 10x 5μL
- dNTPs 10mM 1μL
- FW primer (10pmol/μL) 1μL
- RV primer (10pmol/μL) 1μL
- Taq πολυμεράση 0.1 μL
- ddH<sub>2</sub>O 36.9 μL
- υπόστρωμα 5 μL

Σε αυτή τη περίπτωση είναι απαραίτητη η εισαγωγή μίας αντίδρασης θετικού ελέγχου η οποία θα περιέχει ως υπόστρωμα γενωμικό DNA έτσι ώστε εάν η αντίδραση αυτή δώσει προϊόν να έχουμε ένδειξη ότι οι αντιδράσεις ήταν ειδικές για γενωμικό DNA και ότι εάν δεν πάρουμε προϊόν στις αντιδράσεις με το RNA

ως υπόστρωμα το αποτέλεσμα αυτό θα είναι πραγματικό. Επίσης θα εισάγουμε και μία αντίδραση αρνητικού ελέγχου η οποία αντί για υπόστρωμα θα περιέχει ddH<sub>2</sub>O και αυτή θα μας παρέχει μια ένδειξη ότι κάποιο συστατικό του μείγματος της PCR είναι μολυσμένο σε περίπτωση που δώσει προϊόν. Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης θα είναι 50  $\mu$ L.

Το πρόγραμμα της PCR θα είναι το έξης:

1. 94°C για 3 min
2. 94°C για 30 sec
3. 66°C για 30 sec
4. 72°C για 1 min (για τα βήματα 2-4 40 κύκλοι)
5. 72°C για 5 min

### **RT- PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής)**

Ο συνδυασμός της αντίστροφης μεταγραφής με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιτρέπει την σύνθεση αντιγράφων cDNA. Το πρώτο βήμα είναι η ενζυμική μετατροπή του RNA (που έχει απομονωθεί παραδείγματος χάριν μετά από την διαδικασία απομόνωσης RNA) σε cDNA με την αντίστροφη μεταγραφάση, ενώ ακολουθεί ενίσχυση του DNA με Taq πολυμεράση με τον ίδιο τρόπο όπως σε μία κανονική PCR. Με αυτό τον τρόπο έχουμε τη δυνατότητα ενίσχυσης του ενδογενούς mRNA το οποίο μέσω της αντίστροφης αντιγραφής θα το έχουμε με τη μορφή cDNA.

Για την πραγματοποίηση της RT-PCR θα χρειαστεί να παρασκευάσουμε δύο μείγματα τα οποία θα περιέχουν τα έξης:

Μείγμα 1 ανά αντίδραση:

- oligodT (0.5  $\gamma$ /λ ) 1  $\mu$ L
- dNTPs ( 10 mM ) 1  $\mu$ L
- υπόστρωμα από το RNA 1  $\gamma$
- dd H<sub>2</sub>O μέχρι τα 12  $\mu$ L

Μείγμα 2 ανά αντίδραση:

- Buffer 5x για το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση 4  $\mu$ L
- 0.1 DDT 2  $\mu$ L



- Ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (200 Units) 1  $\mu$ L
- dd H<sub>2</sub>O μέχρι τα 20  $\mu$ L (υπολογίζω και την ποσότητα από το πρώτο μείγμα)

Το πρόγραμμα της PCR είναι το έξης :

1. 65 °C για 5 min
2. 4 °C για 5 min
3. 42 °C για 52 min
4. 70 °C για 15 min
5. 4 °C για  $\infty$

Αρχικά προσθέτουμε το υπόστρωμα σε κάθε PCR tube. Στη συνέχεια προσθέτουμε το μείγμα 1 σε κάθε αντίδραση και τοποθετούμε στη συσκευή για την PCR. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου βήματος προσθέτουμε το ένζυμο στο μείγμα 2 και στη συνέχεια το προσθέτουμε στις αντιδράσεις που βρίσκονται ήδη στη συσκευή.

Για να δούμε εάν τα αποτελέσματα της RT-PCR είναι αληθινά χρησιμοποιούμε για εσωτερικό θετικό έλεγχο ένα housekeeping γονίδιο (δηλαδή ένα γονίδιο που εκφράζεται ανέκαθεν στα κύτταρα που χρησιμοποιούμε) το GAPDH. Εάν δεν ενισχυθεί το cDNA από αυτό το γονίδιο τότε η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής δεν έχει πραγματοποιηθεί σωστά.

### **Real time –PCR**

Η PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί τη καλύτερη στρατηγική για την γρήγορη και ακριβή ποσοτικοποίηση RNA και DNA, καθώς επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων, και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου, σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης της PCR. Ύστερα από μία αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ χαμηλή ποσότητα, ακολουθεί μια εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε βήμα. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια στην αρχή, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να αρχίσει η εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις. Τα προϊόντα της PCR ανιχνεύονται με τη βοήθεια της χρωστικής

SYBR Green, μίας χρωστικής η οποία προσδένεται στο DNA χωρίς προτίμηση για συγκεκριμένες αλληλουχίες και εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα.

Για κάθε γονίδιο του οποίου την έκφραση θέλουμε να εξετάσουμε παρασκευάζουμε ένα μείγμα το οποίο περιέχει τα εξής:

- Υπόστρωμα 6  $\mu\text{L}$
- Μείγμα FW και RV εκκινητών ειδικούς για το γονίδιο που θέλουμε να εξετάσουμε (10 pmol/  $\mu\text{L}$  ο καθένας) 0.6  $\mu\text{L}$
- KAPA mix 10  $\mu\text{L}$
- ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 20  $\mu\text{L}$

Κάθε φορά πραγματοποιούμε και μία αντίδραση με εκκινητές ειδικούς για ένα housekeeping γονίδιο όπως είναι ο GAPDH , έτσι ώστε να έχουμε μια ένδειξη εάν η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σωστά καθώς επίσης να μπορούμε να κάνουμε την κανονικοποίηση μεταξύ των δειγμάτων. Μόνο με αυτόν τον τρόπο τα αποτελέσματα μας θα μπορούν να είναι συγκρίσιμα .

### **Western Blot**

Το στύπωμα western (μερικές φορές ονομάζεται πρωτεΐνη ανοσοστυπώματος) είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ειδικών πρωτεϊνών σε ένα δείγμα του ομογενοποιημένου ιστού ή εκχύλισμα. Χρησιμοποιεί ηλεκτροφόρηση πηκτής προς διαχωρισμό φυσικών πρωτεϊνών με δομή 3-D ή μετουσιωμένες πρωτεΐνες από το μήκος του πολυπεπτιδίου. Οι πρωτεΐνες στη συνέχεια μεταφέρονται σε μια μεμβράνη (τυπικά νιτροκυτταρίνης ή PVDF) μια διαδικασία η οποία βασίζεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, καθώς και σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μεμβράνης και της πρωτεΐνης (τριχοειδή φαινόμενα). Στη συνέχεια σημάνθηκαν με αντισώματα ειδικά για την πρωτεΐνη-στόχο και έπειτα ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο συνδέεται ειδικά με τη βαριά αλυσίδα του πρώτου αντισώματος και το οποίο είναι συχνά συνδεδεμένο με βιοτίνη ή με ένα ένζυμο ανταποκριτή όπως αλκαλική φωσφατάση.

## **A. Δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης**

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμίδης είναι η τυπική μέθοδος για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών ενός μείγματος. Ανάλογα με τη σύσταση της πηκτής και τις συνθήκες υπό τις οποίες εκτελείται η ηλεκτοφόρηση, διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βάση για τον διαχωρισμό τους. Η πιο διαδεδομένη τεχνική χρησιμοποιεί το απορρυπαντικό δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS), το οποίο μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και προσδίδει ένα αρνητικό φορτίο αδρά ισοδύναμο με το μήκος του ξεδιπλωμένου πολυπεπτιδίου. Υπό αυτές τις συνθήκες οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση τη μοριακή μάζα τους, έτσι οι μικρότερες πρωτεΐνες μετακινούνται ταχύτερα προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Εναλλακτικά, οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν μέσω ηλεκτρικής εστίασης σε μια πηκτή που περιέχει χημικές ουσίες οι οποίες δημιουργούν μια βαθμίδωση pH όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό φορτίο. Σε αυτό τον τύπο πηκτής, μια πρωτεΐνη μετακινείται προς το ησοηλεκτρικό σημείο της, δηλαδή τη θέση στη βαθμίδωση όπου το καθαρό φορτίο της είναι μηδέν.

1. Συναρμολογούμε τη θήκη με τα τζαμάκια με το απαραίτητο πάχος ανάλογα με το πείραμα ( 10cm) . Προσέχουμε να μην χάνει από πουθενά .
2. Παρασκευάζουμε το Separating Gel ( βρίσκεται στην κάτω πλευρά της πηκτής). Για 10% πηκτή ακρυλαμίδης σε 10 mL προσθέτουμε σε 15 mL falcon τα εξής:
  - a. ddH<sub>2</sub>O 4.13 mL
  - b. 30% Acrylamid 3.33 mL
  - c. 1.5M Tris pH 8.8 2.47 mL
  - d. 20% SDS 50 μL
  - e. 10% APS 40 μL
  - f. TEMD 20 μL

Από τη στιγμή που προσθέσουμε τα πολυμεριστικά (APS και TEMED) πρέπει να ρίξουμε γρήγορα το μείγμα στη θήκη πριν προλάβει να πήξει. Όσο ρίχνουμε το μείγμα έχουμε την πιπέτα στηριγμένη στην άκρη της θήκης και πλαγιασμένη, έτσι ώστε να πέφτει ομοιόμορφα. Μπορούμε επίσης πριν τελειώσει το μείγμα στην πιπέτα να ανεφοδιάζουμε για να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες στη πηκτή.

3. Αμέσως μόλις ρίξουμε 7,5 mL από το μείγμα προσθέτουμε 500 μL ισοπροπανόλη καθώς μετακινούμε την πιπέτα από τη μια άκρη ως την άλλη,

με αυτόν τον τρόπο η πηκτή που θα παρασκευαστεί θα είναι ομοιόμορφη στο τελείωμα της.

4. Περιμένουμε να πήξει και ελέγχουμε εάν αυτό έχει γίνει από το εάν έχει πήξει η ποσότητα που απέμεινε στο falcon. Ύστερα αφαιρούμε την ισοπροπανόλη και αφαιρούμε την υπόλοιπη που έχει απομείνει με Whatman και αφήνουμε να εξατμιστεί για μερικά λεπτά μέχρι να στεγνώσει εντελώς.
5. Παρασκευάζουμε το Stacking Gel (το οποίο βρίσκεται στην πάνω πλευρά της πηκτής). Για τη παρασκευή 3.75 mL μείγματος προσθέτουμε σε 15 mL falcon τα εξής:
  - a. dd H<sub>2</sub>O 2.62 mL
  - b. 30% Acrylamid 625.5 μL
  - c. 1.5M Tris pH 6.8 468 μL
  - d. 20% SDS 18.75μL
  - e. 10% APS 11.25 μL
  - f. TEMD 7.5 μL

Από τη στιγμή που προσθέσουμε τα πολυμεριστικά (APS και TEMED) πρέπει να ρίξουμε γρήγορα το μείγμα στη θήκη πριν προλάβει να πήξει. Ρίχνουμε το μείγμα με τον ίδιο τρόπο όπως στο Stacking Gel αυτή τη φορά μέχρι να ξεχειλίσει από τα τζαμάκια και στη συνέχεια τοποθετούμε τα χτενάκια τα οποία πρέπει να είναι ίδια cm (10cm) με τα τζαμάκια που έχουμε χρησιμοποιήσει, έτσι ώστε να εφαρμόζουν κατάλληλα και να δημιουργηθούν τα κατάλληλα πηγάδια.

6. Περιμένουμε να πήξει και η δεύτερη πηκτή και ελέγχουμε το πότε αυτό θα γίνει από το υπόλοιπό που έχει απομείνει στο falcon.
7. Παρασκευάζουμε το Running Buffer σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο των 1000 mL, προσθέτοντας 100 mL 10x EL , 2.5 mL 20% SDS και 898 mL d H<sub>2</sub>O.
8. Στήνουμε τη συσκευή στην οποία θα πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση, τοποθετούμε σε αυτή τη πηκτή με τα τζαμάκια και προσθέτουμε το Running Buffer. Αφού έχουμε προσθέσει το Running Buffer και η πηκτή είναι βυθισμένη ολόκληρη στο υγρό, τότε αφαιρούμε με προσοχή τα χτενάκια.
9. Με τη χρήση μιας σύριγγας αντλούμε μικρή ποσότητα από το Running Buffer και το ρίχνουμε σε κάθε πηγάδι ξεχωριστά έτσι ώστε να καθαριστούν τα πηγάδια από υπολείμματα ινιδίων από τη πηκτή.

10. Πραγματοποιούμε pre-running καθώς ρυθμίζουμε τη τροφοδοτική συσκευή στα 100V για 10 min, ώστε το Buffer να διαπεράσει όλους τους πόρους της πηκτής.
11. Προσθέτουμε στα δείγματα μας Loading Dye το οποίο αποτελείται από: 0.25M Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS (καταστρέφει όλες σχεδόν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις στην τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών και αποκτούν μεγάλο αρνητικό φορτίο), 30% Glycerol, 0.02% Bromophenol Blue, 0.3M DTT, έτσι υποβοηθείται η αποδιάταξη των πρωτεϊνών καθώς επίσης μπορούμε να διαχωρίζουμε τα δείγματα κατά τη διάρκεια του φορτώματος άλλα και καθ'όλη τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.
12. Τοποθετούμε τα δείγματα στο Heat Block στους 98°C για 5-10 min, μέχρι να βράσουν και να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη.
13. Φορτώνουμε ως 3μL μάρτυρα Prestained Marker για να μπορούμε να υπολογίσουμε το μέγεθος των πρωτεϊνών και στη συνέχεια φορτώνουμε 5 μL από κάθε δείγμα και τρέχουμε στα 100 V μέχρι να περάσουν τα δείγματα το Stacking Gel και στη συνέχεια ρυθμίζουμε στα 140V.

### **B. Μεταφορά πρωτεϊνών από τη πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

14. Παρασκευάζουμε το Transfer Buffer σε ένα ογκομετρικό κύλινδρο των 1000 mL προσθέτοντας τα εξής: 200 mL Methanol, 100 mL 10x Transfer Buffer A (για 4 λίτρα προσθέτουμε 121.1g Tris, 576g Glycine, dH<sub>2</sub>O μέχρι τα 4000 mL), dH<sub>2</sub>O 698,125 mL ,1.875 mL 20%SDS.
15. Σε ένα γυάλινο πιρέξ στο οποίο ρίχνουμε το μισό από το Transfer Buffer και εμποτίζουμε σε αυτό 4 Whatman , 2 σφουγγαράκια ειδικά για τη διαδικασία της μεταφοράς.
16. Στήνουμε τη συσκευή ώστε να πραγματοποιηθεί η μεταφορά, τοποθετώντας την βάση με την μαύρη πλευρά να βρίσκεται στην κάτω πλευρά στο πιρέξ από επάνω τοποθετούμε με τη σειρά ένα σφουγγαράκι, 2 Whatman, στη συνέχεια τοποθετούμε τη πηκτή από πάνω της με μεγάλη προσοχή τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης την οποία έχουμε εμποτίσει στο Transfer Buffer. Μόλις η μεμβράνη ακουμπήσει τη πηκτή προσέχουμε να μην κουνηθεί ξανά, τοποθετούμε από επάνω τα άλλα δυο Whatman και τέλος το δεύτερο σφουγγαράκι, προσέχοντας να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες, οι οποίες θα εμποδίσουν τη μεταφορά . Κλείνουμε τη βάση και τοποθετούμε στη θήκη για

τη μεταφορά με τέτοιο τρόπο ώστε η ροή του ρεύματος να μεταφέρει τις πρωτεΐνες από τη πηκτή στη μεμβράνη.

17. Προσθέτουμε το Transfer Buffer και ρυθμίζουμε τη τροφοδοτική συσκευή στα 300mA και στα 115 V για 45 min.

### **Γ. Δέσμευση μη ειδικών θέσεων για το αντίσωμα (Blocking)**

18. Ελέγχουμε εάν έχει πραγματοποιηθεί η μεταφορά από το εάν έχει μεταφερθεί ο μάρτυρας στη μεμβράνη.
19. Παρασκευάζουμε 5% γάλα {1.25g γάλα σε 25 mL 1x PBST (1x PBS +0.5%Tween+ dH<sub>2</sub>O)} το οποίο δεσμεύει τις μη ειδικές θέσεις στις οποίες μπορεί να δεσμευθεί το αντίσωμα και να δώσει background.
20. Τοποθετούμε την μεμβράνη με την πλευρά που ακουμπούσε στη πηκτή και στην οποία βρίσκονται οι πρωτεΐνες προς τα πάνω σε 25 mL 5% γάλα.
21. Επιάζουμε υπό ανάδευση για 1 ώρα
22. Ξεπλένουμε με 10mL 1x PBST

### **Δ. Επώαση με το πρώτο αντίσωμα**

23. Παρασκευάζουμε 1% άπαχο γάλα διαλυμένο σε 1x PBST και προσθέτουμε σε αυτό το πρώτο αντίσωμα που είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που μελετάμε. Χρησιμοποιούμε και ένα αντίσωμα για μια συντηρημένη πρωτεΐνη (H3) με σταθερή έκφραση ώστε να μπορούμε να πραγματοποιήσουμε την εξισορρόπηση τα αποτελέσματα να μπορούν να συγκριθούν.
24. Κόβουμε τη μεμβράνη στις περιοχές που περιμένουμε να βρίσκονται οι πρωτεΐνες που μελετάμε.
25. Επιάζουμε τη κάθε μεμβράνη με το αντίσωμα της υπό ανάδευση στους 4°C για ένα βράδυ.

### **Ε. Πλύσεις για την απομάκρυνση της περίσσειας του πρώτου αντισώματος**

26. Αφαιρούμε το πρώτο αντίσωμα και το αποθηκεύουμε στους -20 °C.
27. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη με 10 mL 1x PBST σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min υπό ανάδευση.
28. Ξεπλένουμε την μεμβράνη με 10 mL 1x PBST σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min υπό ανάδευση.
29. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 28 άλλες δύο φορές.

### **ΣΤ. Επώαση με το δεύτερο αντίσωμα**

30. Παρασκευάζουμε 1% γάλα στο οποίο προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα το οποίο προέρχεται από έναν διαφορετικό οργανισμό από αυτόν από τον οποίο έχουμε απομονώσει τις πρωτεΐνες και είναι ειδικό για τη βαρεία αλυσίδα του πρώτου αντισώματος.
31. Επωάζουμε τις μεμβράνες με το δεύτερο αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα υπό ανάδευση .

### **Ε. Πλύσεις για την απομάκρυνση της περίσσειας του δεύτερου αντισώματος**

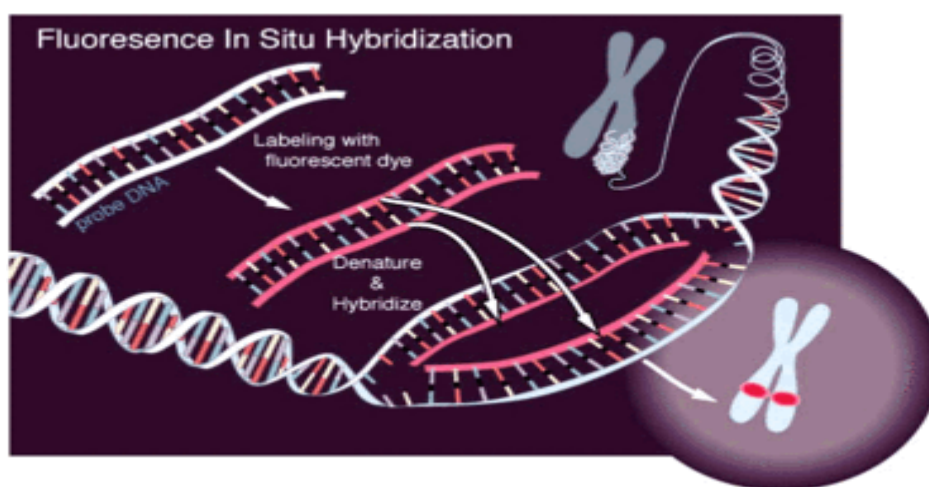
32. Αφαιρούμε το δεύτερο αντίσωμα χωρίς να το αποθηκεύσουμε.
33. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη με 10 mL 1x PBST σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min υπό ανάδευση.
34. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη 2 φορές με 10 mL 1x PBST σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min υπό ανάδευση.
35. Ξεπλένουμε τη μεμβράνη με 10 mL 1x PBS σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min υπό ανάδευση.

### **Ζ. Εμφάνιση του φιλμ**

36. Στραγγίζουμε τις μεμβράνες από την περίσσεια του 1x PBS.
37. Προσθέτουμε το μείγμα φθορισμού 1 mL ECL και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min σε σκοτάδι.
38. Στραγγίζουμε τις μεμβράνες από την περίσσεια του ECL.
39. Σκεπάζουμε με νάιλον μεμβράνη τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και τις τοποθετούμε στη θήκη εμφάνισης όπου προστατεύονται από το φως.
40. Σε δωμάτιο ειδικό για την εμφάνιση χωρίς καθόλου φως, για να μην καεί το φιλμ, το τοποθετούμε πάνω στη μεμβράνη και κρατάμε σταθερά για μερικά δευτερόλεπτα.
41. Τοποθετούμε το φιλμ στο μηχάνημα εμφάνισης.

## **DNA FISH (fluorescent in situ hybridization)**

Ο Φθορίζον in situ υβριδισμός είναι μια εκδοχή της ανάλυσης υβριδισμού, στην οποία ένα ακέραιο χρωμόσωμα εξετάζεται με την εφαρμογή ενός σημασμένου μορίου DNA που λειτουργεί ως ανιχνευτής. Σαν ανιχνευτές χρησιμοποιούνται μη ραδιενεργά, φθορίζοντα DNA σήματα που συνδυάζουν υψηλή ευαισθησία με υψηλή διαχωριστική ικανότητα, τα οποία μπορούν να είναι διαφορετικών χρωμάτων. Έτσι πολλοί διαφορετικοί ανιχνευτές μπορούν να υβριδιστούν στο ίδιο χρωμόσωμα αλλά και σε διαφορετικά χρωμοσώματα, έτσι ώστε να είναι δυνατή η μελέτη των σχετικών θέσεων των τμημάτων του DNA που βρίσκονται υπό μελέτη (**Εικόνα 11**).



**Εικόνα 11: Μηχανισμός DNA FISH**

### **A. Σήμανση ανιχνευτή (labeling)**

Τα μόρια που θα σημανθούν είναι DNA BAC κλώνων καθένα από τα οποία περιέχει ενσωματωμένη την περιοχή του DNA που υβριδίζεται με την περιοχή που εμείς μελετάμε. Στα πειράματα μου πραγματοποιήσαμε χρησιμοποιήσαμε ανιχνευτές για το γονίδιο της IFN-β, καθώς και για τους τρεις κλώνους που περιέχουν τις περιοχές Alu.

#### **Ανιχνευτής #21:**

1. Μεταφέρουμε τους BAC από τους  $-20^{\circ}\text{C}$  σε RT μέχρι να ξεπαγώσουν και στη συνέχεια στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 30 min.
2. Η αντίδραση για την σήμανση των BAC για τον κλώνο 21 με DIG (διγοξυγενίνη η οποία δεν είναι η ίδια φθοροφόρο αλλά ανιχνεύεται με ένα αντίσωμα που φέρει μόριο το οποίο παράγει φθορισμό στα 488nm, πράσινο χρώμα) Nick Translation Labeling Kit Roche περιέχει τα εξής:
  - a. 1  $\gamma$  BAC



- b. 4  $\mu\text{L}$  DIG Labeling mix
  - c. ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 20  $\mu\text{L}$
3. Ρυθμίζουμε τη συσκευή της PCR στους 15 °C για 135min

#### Ανιχνευτής #K9:

1. Μεταφέρουμε τους BAC από τους -20 °C σε RT μέχρι να ξεπαγώσουν και στη συνέχεια στους 37 °C για 30 min.
2. Η αντίδραση για την σήμανση των BAC για τον κλώνο K9 με Atto425 Nick Translation Labeling Kit Invitrogen (το χρωμοφόρο είναι ήδη ενσωματωμένο και παράγει φθορισμό στα 425 nm) περιέχει τα εξής:
  - a. 10 x NT Labeling Buffer 2  $\mu\text{L}$
  - b. Atto425 NT Labeling Mix 2  $\mu\text{L}$
  - c. 10x Enzyme Mix 2  $\mu\text{L}$
  - d. BAC 5.5  $\mu\text{L}$
  - e. ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 20  $\mu\text{L}$
3. Ρυθμίζουμε τη συσκευή της PCR στους 15 °C για 80 min

#### Ανιχνευτής #N14 και IFN- $\beta$ :

1. Μεταφέρουμε τους BAC από τους -20 °C σε RT μέχρι να ξεπαγώσουν και στη συνέχεια στους 37 °C για 30 min.
2. Η αντίδραση για την σήμανση των BAC για τον κλώνο N14 με BIO (βιοτίνη η οποία δεν είναι η ίδια φθοροφόρο αλλά ανιχνεύεται με ένα αντίσωμα που φέρει μόριο το οποίο παράγει φθορισμό στα 568nm) Nick Translation Labeling Kit Invitrogen περιέχει τα εξής:
  - a. 10  $\mu\text{L}$  BIO Nick Translation Mix( 5  $\mu\text{L}$  enzyme+ 5  $\mu\text{L}$  dNTPs
  - b. 6  $\mu\text{L}$  BAC
  - c. ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 50 ddH<sub>2</sub>O
3. Ρυθμίζουμε τη συσκευή της PCR στους 16 °C για 120min

Τρέχουμε μία μικρή ποσότητα από τον κάθε ανιχνευτή σε πήκτωμα αγαρόζης για να δούμε την ποσότητα της απόδοσής του (θα πρέπει να είναι 200-500bp)

Κατακρήμνιση με την εξής διαδικασία :

1. Σε ένα tube αναμειγνύουμε τα εξής:
  - a. Fish sperm (10 $\gamma$ /λ) 5 $\mu\text{L}$

- b. Yt-RNA (10mg/mL) 5μL
- c. Cot-1 (10mg/mL) 12.5μL
- d. CH<sub>3</sub>COONa 10μL
- e. dd H<sub>2</sub>O μέχρι τα 225μL
- f. Ισοπροπανόλη 125μL

Προσοχή η σειρά που προσθέτουμε τα υλικά πρέπει να είναι πάντοτε αυτή .

2. Κάνουμε πολύ καλό Vortex και φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 10 min.
3. Αφαιρούμε το υπερκείμενο, ξεπλένουμε με 300 μL 70% αιθανόλη και αφήνουμε την πελέτα να στεγνώσει πλήρως.
4. Προσθέτουμε 20 μL HybsolF1 και επαναδιαλύουμε κάνοντας Vortex. Προσοχή γιατί το HybsolF1 είναι ιδιαίτερα κολλώδες.
5. Αποθηκεύουμε στους -20 °C.

## **B. Ετοιμασία πλακιδίων (slides) για το FISH**

1. Χρησιμοποιούμε πιάτα τα οποία έχουν κορεστεί και τα ξεπλένουμε με 1x PBS δύο φορές .
2. Προσθέτουμε 10mL 1x PBS με το οποίο σηκώνουμε τα κύτταρα (harvesting) και τα συλλέγουμε σε 15 mL falcon.
3. Φυγοκεντρούμε στις 11.000 rpm για 10 min.
4. Αφαιρούμε το υπερκείμενο αφήνοντας έναν μικρό όγκο στον οποίο και επαναδιαλύουμε .
5. Προσθέτουμε 5-7 mL (εξαρτάται από το ίζημα) σταγόνα-σταγόνα από υποτονικό διάλυμα 0.075M KCl για να διογκωθούν οι πυρήνες.
6. Αναδεύουμε χρησιμοποιώντας μια γυάλινη πιπέτα paster και έναν pipetman .
7. Αφήνουμε για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου με μεγάλη προσοχή στο χρονικό διάστημα επώασης.
8. Προσθέτουμε σε σταγόνες 1 mL Acetic/Ethanol 3:1 και αναδεύουμε με paster πιπέτα ώστε να γίνουν διαπερατοί οι πυρήνες.
9. Φυγοκεντρούμε στις 1.200 rpm για 5 min
10. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο αφήνοντας μία μικρή ποσότητα στην οποία επαναδιαλύουμε .

11. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 9 και 10 άλλες τρεις φορές προσθέτοντας αυτή τη φορά 5 mL, 3 mL Acetic/Ethanol 3:1 αντίστοιχα.
12. Επαναλαμβάνουμε μία φορά προσθέτοντας τώρα 1.5 mL Acetic/Ethanol 3:1 και επαναδιαλύουμε πολύ καλά.

Επίστρωση κυττάρων (Plating):

13. Πλένουμε τα πλακάκια με προθερμασμένο νερό στους 37 °C .
14. Πλένουμε τα πλακάκια με fixing medium Acetic/Ethanol 3:1.
15. Με τη χρήση ενός πουάρ και μιας γυάλινης πιπέτας paster ρίχνουμε 5-7 σταγόνες από τους πυρήνες που έχουμε απομονώσει κρατώντας το πλακάκι υπό γωνία.
16. Τα στηρίζουμε κάθετα μέχρι να στεγνώσουν και τα κρατάμε σε θερμοκρασία δωματίου για όσο το δυνατόν περισσότερο (4 ώρες).
17. Αποθηκεύουμε στους 4 °C.

### **Γ. Προετοιμασία πλακιδίων για πρόσδεση ανιχνευτή**

1. Ξεπλένουμε τα πλακάκια με τους πυρήνες σε ένα βάζο με 50 mL 1x PBS.
2. Βάζουμε 25 $\mu$ l πεψίνη (100  $\mu$ L/ mL) σε προθερμασμένο στους 37 °C HCl (το διάλυμα αυτό καθιστά διαπερατούς τους πυρήνες)
3. Τοποθετούμε τα πλακάκια στο παραπάνω διάλυμα για 10 min .
4. Ξεπλένουμε τα πλακάκια σε ένα βάζο με 1x PBS για 3 min .
5. Τοποθετούμε τα πλακάκια ξαπλωμένα σε απορροφητικό χαρτί στον πάγκο, προσθέτουμε 200  $\mu$ L post fixation διάλυμα (1 mL 1x PBS, 1% Phormaldeid 30  $\mu$ L, 50mM MgCl<sub>2</sub> 1M 50  $\mu$ L) και καλύπτουμε με γυάλινη καλυπτρίδα για 10 min.
6. Κρατάμε κάθετα τα πλακάκια για να κυλίσει η καλυπτρίδα .
7. Ξεπλένουμε σε βάζο με 1x PBS για 5 min
8. Μεταφέρουμε τα πλακάκια σε βάζο το οποίο περιέχει προθερμασμένο στους 72 °C 2x SSC και επωάζουμε σε αυτή τη θερμοκρασία για 30 min (το SSC εξυπηρετεί να μην υπάρξει επαναδιάταξη των ανιχνευτών).
9. Μεταφέρουμε το βάζο με το 2x SSC και τα πλακάκια σε θερμοκρασία δωματίου για να κρυσώσουν και εν τω μεταξύ ετοιμάζουμε την αποδιάταξη των ανιχνευτών.

10. Μεταφέρουμε τα πλακάκια σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα 0.1x SSC για 1 min
11. Μεταφέρουμε τα πλακάκια σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα 0.07N NaOH για 1 min
12. Μεταφέρουμε τα πλακάκια σε διάλυμα 0.1x SSC που βρίσκεται ήδη στους 4 °C για 1 min
13. Μεταφέρουμε τα πλακάκια σε διάλυμα 2x SSC που βρίσκεται ήδη στους 4 °C για 1 min
14. Αφυδατώνουμε τα πλακάκια τοποθετώντας τα σε μια σειρά από κρύες (4 °C) αιθανόλες διαδοχικά 50%,70%,100% 1min στην κάθε μία.
15. Τα αφήνουμε να στεγνώσουν τοποθετώντας τα κάθετα.

#### **Δ. Αποδιάταξη ανιχνευτών**

1. Σε ένα tube προσθέτουμε 10  $\mu$ L από τους σημασμένους ανιχνευτές σε HYBS F1 (για κάθε πλακάκι).
2. Αποδιάταξη του ανιχνευτή στους 95 °C για 5 min.
3. Τοποθετούμε στον πάγο για (4 °C) για 10 min.
4. Μεταφέρουμε στους 37 °C για τουλάχιστον 15 min.
5. Προσθέτουμε 20ul ανιχνευτή/πλακάκι (100ng) και τα καλύπτουμε με parafilm .
6. Επωάζουμε σε υγρασία στους 37 °C για ένα βράδυ.

#### **Ε. Πλυσίματα- παρατήρηση πλακιδίων**

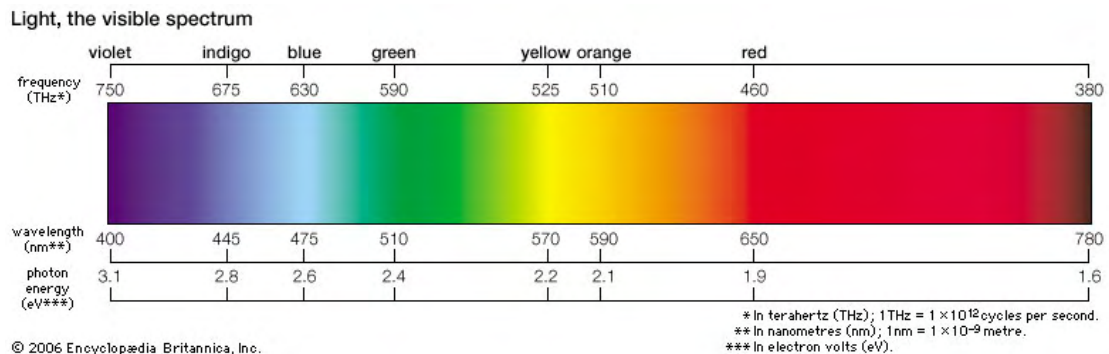
1. Ξεπλένουμε 3 φορές τα πλακάκια σε βάζο με Wash Solution I (pH 7, 2x SSC, 0.05% Tween και dd H<sub>2</sub>O μέχρι τα 150 mL) για 3 min κάθε φορά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αυτό ξεπλένει τους μη προσδεμένους ανιχνευτές) Προσοχή εάν οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούμε έχουν ήδη φθοροφόρο όλα τα βήματα πραγματοποιούνται στο σκοτάδι.
2. Τα μεταφέρουμε από το βάζο στον πάγκο και βάζουμε σε κάθε πλακάκι 100-200  $\mu$ L Block F1 (150mM NaCl, 100mM Tris pH 7.5-8.0, 0.05% Tween, Blocking reagent 0,05% ή 1x και d H<sub>2</sub>O) σε κάθε πλακάκι για 30 min. Το διάλυμα αυτό μπλοκάρει τις μη ειδικές θέσεις που θα μπορούσε να προσδεθεί το αντίσωμα.

3. Σε ένα tube προσθέτουμε 1:200 αντίσωμά διαλυμένο σε Block F1 για κάθε ανιχνευτή που χρησιμοποιούμε στο πείραμα και δεν έχει ήδη φθοροφόρο (Avidin-Alexa 568-κόκκινος φθορισμός για το κλώνο που έχει σημανθεί με βιοτίνη, Anti-Dig-Fluorescein 488- πράσινος φθορισμός για τον κλώνο που έχει σημανθεί με DIG)
4. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 10 min.
5. Από το υπερκείμενο βάζουμε 100-200  $\mu\text{L}$  σε κάθε πλακάκι και καλύπτουμε με parafilm για 30 min στο σκοτάδι.
6. Ξεπλένουμε 3 φορές με Wash Solution II ( 1x PBS, 0.1% Tween ) για 3 min κάθε φορά. Η διαδικασία γίνεται στο σκοτάδι και έχει ως σκοπό το ξέπλυμα του μη προσδεμένου αντισώματος.
7. Ξεπλένουμε 2 φορές σε 1x PBS και τα αφήνουμε κάθετα να στεγνώσουν.
8. Προσθέτουμε 2-3 σταγόνες mounting medium (Vectashield) με DAPI. Η DAPI είναι η χρωστική που θα βάψει τα κύτταρα μπλε και το mounting medium προστίθεται διότι έχει ίδιο συντελεστή διάθλασης με το γυαλί. Προσοχή εάν έχουμε μπλε φθοροφόρο όπως Atto τότε χρησιμοποιούμε mounting medium χωρίς DAPI.
9. Τοποθετούμε γυάλινη καλυπτρίδα και το αφήνουμε 20 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απλωθεί καλά το mounting medium.
10. Αποθηκεύουμε στους 4 °C.

### **Μικροσκόπια**

Μικροσκόπιο φθορισμού ZEISS: Άτομα ή μόρια διεγείρονται από ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, δηλαδή απορροφούν ενέργεια με αποτέλεσμα ηλεκτρόνια αυτών να μετακινούνται παροδικά σε υψηλότερη ενεργειακή στοιβάδα. Κατά την επαναφορά των ηλεκτρονίων αυτών στη βασική στοιβάδα εκπέμπεται ακτινοβολία (φθορισμού) μεγαλύτερου μήκους κύματος (μικρότερης ενέργειας,  $E = hc/\lambda$ ). Ο χρόνος μεταξύ απορρόφησης και εκπομπής κατά το φθορισμό είναι 10<sup>-9</sup>-10<sup>-12</sup> seconds. Μόρια τα οποία μπορούν να φθορίζουν ονομάζονται φθορίζοντα μόρια/ ουσίες/ χρωστικές (fluorescent molecules, fluorochromes, fluorescent dyes). Κάθε φθορίζουσα ουσία έχει χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης/ εκπομπής ακτινοβολίας τα οποία εξαρτώνται από τη δομή των ατόμων και των ηλεκτρονίων αυτής (**Εικόνα12**). Παρατηρείται διαφορά μεταξύ των μέγιστων μηκών κύματος απορρόφησης και

εκπομπής (Stokes shift). Για την απομόνωση ακτινοβολιών συγκεκριμένων μηκών κύματος χρησιμοποιούνται φίλτρα φθορισμού. Χρησιμοποιούνται φίλτρα για τις ακτινοβολίες εκπομπής αλλά και απορρόφησης.



**Εικόνα12 : Ορατό φάσμα ακτινοβολίας.**

Μικροσκόπιο Leica μικροσκόπιο (40X φακό): Τα μικροσκόπια της σειράς Leica DM είναι οπτικά όργανα για τη βελτίωση της οπτικοποίησης αντικειμένων με χρήση μεγέθυνσης και φωτισμού. Χρησιμοποιούνται για την παρατήρηση και την τεκμηρίωση.

### Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP)

Τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης μας επιτρέπουν να εξετάσουμε, σε ζωντανά κύτταρα, σε πιο βαθμό ένα cis-ρυθμιστικό στοιχείο του DNA καταλαμβάνεται από την ρυθμιστική πρωτεΐνη που το αναγνωρίζει. Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης ξεκινάει με επεξεργασία των κυττάρων με χαμηλή συγκέντρωση φορλαλδεϋδης, η οποία προκαλεί την διασύνδεση των πρωτεϊνών τόσο μεταξύ τους όσο και με το DNA. Μετά την διασύνδεση ακολουθεί κατάτμηση της χρωματίνης, ώστε να προκύψουν τμήματα DNA μήκους ~ 500 bp. Στη συνέχεια προστίθεται ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη η οποία προσδένεται στο DNA, για παράδειγμα ένα μεταγραφικό παράγοντα. Με φυγοκέντρηση του μείγματος διαχωρίζεται το σύμπλοκο αντισώματος-πρωτεΐνης (στο ίζημα) από τα άλλα τμήματα χρωματίνης (που παραμένουν στο υπερκείμενο). Το DNA που ανακτάται από το ίζημα μπορεί να αναλυθεί με PCR πραγματικού χρόνου, με αλληλούχιση ή με υβριδοποίηση με μικροσυστοιχίες. Αν ο στόχος του πειράματος είναι να επιβεβαιώσουμε ότι η πρωτεΐνη που μελετάμε αναγνωρίζει κάποιες γνωστές θέσεις του γονιδιώματος ή, γενικά, να διαπιστώσουμε αν αλληλεπιδρά με ένα μικρό σχετικά αριθμό αλληλουχιών, τότε χρησιμοποιούμε την PCR πραγματικού χρόνου προκειμένου να προσδιορίσουμε τα τμήματα του DNA στα οποία προσδένεται.

### **A. Διασύνδεση πρωτεϊνών (Cross linking)**

1. Αναπτύσσουμε σε 15cm πιάτα κύτταρα HeLa μέχρι να βρίσκονται σε 90% βαθμό κορεσμού και μολύνουμε τα κύτταρα με SV για 2 ώρες (σε αυτό το χρονικό σημείο παρατηρείται ο μεγαλύτερος βαθμός πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων).
2. Προσθέτουμε 1% φορμαλδεΐδη (540  $\mu$ L) στο θρεπτικό υλικό .
3. Επωάζουμε στους 4 °C υπό ανάδευση για 30 min.
4. Προσθέτουμε 1 mL 2.5M γλυκίνη σε κάθε πιάτο (τελική συγκέντρωση 0.125 M)
5. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 5 min.
6. Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και ξεπλένουμε 2 φορές με 10 mL 1x PBS και 1mM PMSF (αναστολέας πρωτεασών) όπου σε κάθε πλύση τα αφήνουμε για 1 min υπό ανάδευση.
7. Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 10 mL 1x PBS 1mM PMSF και 1x PIC (Proteinase inhibitors cocktail Roche) και μεταφέρουμε σε 15mL falcon.
8. Ξεπλένουμε τα πιάτα με 2 mL 1x PBS, έτσι ώστε να συλλέξουμε τα εναπομείναντα κύτταρα και μεταφέρουμε στο ίδιο falcon με το προηγούμενο βήμα..
9. Φυγοκεντρούμε στις 4.000 rpm για 5 min.

### **B. Προετοιμασία χρωματίνης για κατάτμηση (Sonication)**

10. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε την πελέτα των κυττάρων σε 4mL Lysis Buffer , 1x PIC και 1mM PMSF.
11. Επωάζουμε στον πάγο (4°C) για 20 min.
12. Φυγοκεντρούμε στις 4.000 rpm στους 4°C για 5 min.
13. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε σε 2 mL Wash Buffer, 1mM PMSF και 1x PIC.
14. Φυγοκεντρούμε στις 4.000 rpm στους 4°C για 5 min.
15. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 13 και 14 μία ακόμα φορά.
16. Αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο, έτσι ώστε να μη διαταραχθεί η πελέτα.
17. Προσθέτουμε προσεκτικά 1 mL Shearing Buffer και περιστρέφουμε το tube, έτσι ώστε να ξεπλυθεί όλο το Wash Buffer από τα τοιχώματα του tube χωρίς να διαταραχθεί η πελέτα.

18. Φυγοκεντρούμε στις 4.000 rpm στους 4°C για 5 min.
  19. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 17 και 18 μία ακόμα φορά.
  20. Επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 500 μL Shearing Buffer, 1mM PMSF και 1x PIC.
  21. Τοποθετούμε το 1,5 mL tube που περιέχει τη χρωματίνη σε ένα 50 mL falcon το οποίο είναι γεμάτο με πάγο το οποίο τοποθετούμε σε ένα δοχείο επίσης γεμάτο με πάγο, ώστε να εμποδίσει την υπερθέρμανση του δείγματος κατά την διάρκεια του sonication. Ανοίγουμε το παπάκι από το tube και βυθίζουμε μέσα στο υγρό το microtip εωσότου να είναι περίπου 5mm από το πάτο του tube. Ρυθμίζουμε το Sonicator ως εξής: 30% εύρος, παλμός για 1 sec και 1sec χωρίς παλμό για πλήρη χρονικό διάστημα υπό παλμό 3 min (ή συνολικά 6 min). Επαναλαμβάνουμε για 3 φορές.
  22. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm στους 4 °C για 2 min, έτσι ώστε να καθιζάνουν τα κυτταρικά υπολείμματα .
  23. Μεταφέρουμε 25μL από το υπερκείμενο το οποίο περιέχει τη χρωματίνη σε ένα 250μL PCR tube για την ανάλυση της αποτελεσματικότητας της κατάτμησης και ποσοτικοποίηση της χρωματίνης. Αυτό το δείγμα θα χρησιμοποιηθεί για να δημιουργήσει το Input DNA.
  24. Μοιράζουμε το υπόλοιπο από κάθε παρασκεύασμα χρωματίνης σε 1.5mL tubes. Προτείνουμε η ποσότητα που μοιράζεται να είναι όγκος 150 μL και αποθηκεύουμε στους -80 °C.
- Σημείωση: Το μέγεθος στο οποίο έχει κατατμηθεί η χρωματίνη πρέπει να ελεγχθεί πριν το βήμα της ανοσοκατακρήμνισης.

### **Γ. Προετοιμασία Input**

1. Σε κάθε 25 μL παρασκευάσματος χρωματίνης από το βήμα 23, προσθέτουμε 175 μL TE pH 8.0 και 1 μL RNaseA. Κλείνουμε τα καπάκια και κάνουμε Vortex για να αναμειχθούν τα υλικά.
2. Επώαση σε συσκευή PCR στους 37 °C για 30 min.
3. Προσθέτουμε 4 μL Proteinase K 10 mg/ mL σε κάθε tube, 4 μL SDS 10% και κάνουμε Vortex. Επωάζουμε στους 50 °C για 15 min.
4. Προσθέτουμε 6 μL NaCl 5M και επωάζουμε στους 65 °C για 16 ώρες.
5. Πραγματοποιούμε κατακρήμνιση με αιθανόλη:



- a. Προσθέτουμε 1/10 του όγκου CH<sub>3</sub>COONa (20 μL) και 3 φορές τον όγκο 100% αιθανόλη (600 μL)
- b. Επωάζουμε για 30 min στους -80 °C
- c. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 30 min στους 4 °C
- d. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε με 100 μL 70% αιθανόλη. Εάν σηκωθεί η πελέτα φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm 10 min στους 4 °C.
- e. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αφήνουμε την πελέτα να στεγνώσει πλήρως.
- f. Επαναδιαλύουμε σε 25 μL TE.

Μετράμε την ποσότητα του DNA στο Nanodrop και τρέχουμε σε 2.2% πήκτη αγαρόζης.

#### **Δ. Ανοσοκατακρήμνιση**

6. Προκαλούμε τήξη της χρωματίνης που έχει υποστεί sonication βάζοντας την στον πάγο. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm στους 4 °C για 2 min.
7. Προσθέτουμε Triton (10%) έτσι ώστε να είναι 10 φορές ο όγκος του SDS και NaCl 150 mM.
8. Ξεπλένουμε τα protein G magnetic beads με 500 μL IP buffer, 3 φορές. Χρησιμοποιούμε 15 μL από τα beats ανά 5μg αντισώματος. Μεταφέρουμε τη χρωματίνη στα beats και τα αφήνουμε να αναδεύονται στους 4 °C για 30 min.
9. Σε ένα 1.5 mL tube προετοιμάζουμε τα αντισώματα που θα χρησιμοποιηθούν στις αντιδράσεις του ChIP. Χρησιμοποιούμε ένα ξεχωριστό tube για κάθε αντίσωμα. Σε κάθε tube προσθέτουμε 10 μL ή 1mg/ mL Blocker (BSA 20mg/ mL) και 15μg αντίσωμα ChIP (20μL Abcam/50μg). Επωάζουμε το αντίσωμα με το μείγμα Blocker για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και μετά τα προσθέτουμε στις αντιδράσεις του ChIP.
10. Στήνουμε το ChIP σε 1.5 mL tube. Χρησιμοποιούμε 10-30μg χρωματίνης (1.5-4.5 εκατομμύρια κύτταρα) για κάθε αντίδραση, ωστόσο μπορούν να χρησιμοποιηθούν και λιγότερα εάν η διαθέσιμη χρωματίνη είναι περιορισμένη {3x 50μg (170 mL) ανά πείραμα}.

11. Προσέχουμε να μην αφήσουμε τα beads να ξεραθούν. Πλένουμε τα beads 2 φορές με IP Buffer και τα αφήνουμε να αναδεύονται σε IP Buffer στους 4 °C για όσο χρονικό διάστημα χρειαστεί.
12. Επωάζουμε τη χρωματίνη με το αντίσωμα στους 4 °C για όλο το βράδυ.

### **E. Ξεπλύματα**

13. Κάνουμε spin down τα beads και τα ξεπλένουμε μια φορά ακόμα με IP Buffer.
14. Προσθέτουμε IPs για να κάνουμε precleared τα beads στους 4 °C για 1 ώρα και 30 min.
15. Ξεπλένουμε με 500  $\mu$ L για 30 beats Low Salt Buffer (+5  $\mu$ L 10x PIC+ 1mM PMSF). Αλλάζουμε tube σε κάθε πλύση.
16. Ξεπλένουμε με ένα μείγμα από Low + Medium Salt Buffer (+ 5 $\mu$ L 10x PIC+ 1mM PMSF).
17. Ξεπλένουμε με Medium Salt Buffer (1/2 Low-1/2 High ), (+ 5 $\mu$ L 10x PIC+ 1 mM PMSF).
18. Ξεπλένουμε με LiCl Wash Buffer (+ 5  $\mu$ L 10x PIC+ 1mM PMSF).
19. Ξεπλένουμε με TE/10 Wash Buffer (+ 5  $\mu$ L 10x PIC+ 1mM PMSF).
20. Προσθέτουμε 45  $\mu$ L από το Buffer στο οποίο δρα η PK καθώς και 1  $\mu$ L RNase A στους 37 °C για 30 min.
21. Προσθέτουμε 1  $\mu$ L PK 20mg/ mL, κάνουμε ελαφρά Vortex και τοποθετούμε στους 50 °C για 15min.
22. Προσθέτουμε 3  $\mu$ L NaCl 5M, κάνουμε ελαφρά Vortex, spin down και επωάζουμε στους 65 °C για όλο το βράδυ, έτσι ώστε να σπάσουν οι δεσμοί που είχαν δημιουργηθεί κατά το cross linking.

### **ΣΤ. Καθαρισμός DNA με NucleoMag Beads**

23. Προσθέτουμε 50  $\mu$ L από πολύ καλά ανακατεμένο μείγμα NucleoMag Beads και 60  $\mu$ L 20% PEG 1.25M NaCl.
24. Αναμειγνύουμε αρκετές φορές με τη χρήση της πιπέτας.
25. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
26. Τοποθετούμε στο μαγνήτη για 5 min.
27. Αφαιρούμε το υπερκείμενο με μεγάλη προσοχή για να μην πάρουμε καθόλου Beads.

28. Κρατάμε τα δείγματα στον μαγνήτη και προσθέτουμε 900μL από 80% φρέσκια αιθανόλη.
29. Επωάζουμε για 30sec, έπειτα αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο.
30. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 28 και 29 .
31. Αφήνουμε τα Beads να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min.
32. Προσθέτουμε 45.5μL TE/10, αναδεύουμε με τη χρήση της πιπέτας αρκετές φορές μέχρι η πελέτα από τα Beads να διαλυθεί.
33. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2min.
34. Τοποθετούμε στο μαγνήτη για 5 min.
35. Μεταφέρουμε 44μL από το υπερκείμενο σε ένα tube.
36. Χρησιμοποιούμε 4μL από το DNA που έχει εκλουσθεί για QuantIT HS DNA Assay Kit Invitrogen, τρέχουμε 5μL από το Input DNA σε 2.2% πήκτη αγαρόζης, χρησιμοποιούμε 2.5μL DNA για PCR πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιούμε 10 ng για ChIP-seq βιβλιοθήκη.

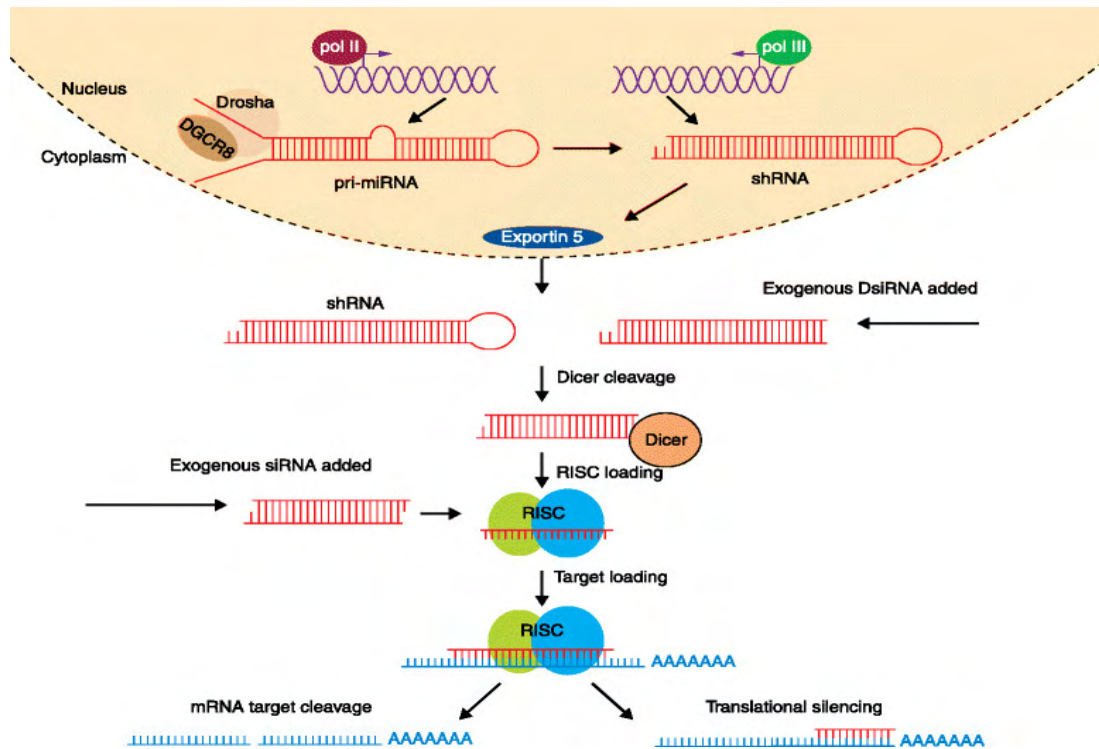
#### *Παρασκευή των Buffers*

- *Lysis Buffer*: 50mM Hepes pH 7.9, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 10% Glycerol, 0.5% NP-40, 0.25% TritonX-100
- *Wash Buffer*: 10mM Tris-Cl pH8.1, 200mM NaCl, 1mM EDTA pH 8, 0.5mM EGTA pH 8
- *Shearing Buffer*: 0.1%SDS, 1Mm EDTA, 10Mm Tris pH 8.1
- *IP Buffer* (το φτιάχνουμε φρέσκο): 0.1%SDS, 1Mm EDTA, 10Mm Tris pH 8.1, 1% ΤριτονX-100, 150mM NaCl
- *Low Salt Wash Buffer*: 0.1%SDS, 1Mm EDTA, 2mM EDTA, 20mM Hepes-KOH pH 7.9, 150mM NaCl
- *High Salt Wash Buffer*: 0.1%SDS, 1Mm EDTA, 2mM EDTA, 20mM Hepes-KOH pH 7.9, 500 mMNaCl
- *LiCl Wash Buffer*: 100mM Tris -HCl pH7.5, 0.5M LiCl, 1%NP-40, 1% Sodium Deoxycholate
- *Proteinase K Digestion Buffer*: 20mM Hepes pH 7.9, 1mM EDTA, 0.5%SDS
- *TE/10*: 10mM Tris-HCl pH8.0, 0.1mM EDTA

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για να μελετήσουμε τη πρωτεΐνη ThPOK και το ρόλο που διαδραματίζει στην πραγματοποίηση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των NRCs αλλά και μεταξύ αυτών και του ενισχυτή του γονιδίου της IFN-β, καθώς επίσης και τη επίδραση του στην επαγωγή της IFN-β κατασκευάστηκε μια κυτταρική σειρά στην οποία η έκφραση του ThPOK αποσιωπάτε μέσω sh-RNA σίγησης. Κατά την shRNA (small hairpin RNA) σίγηση ένα τεχνητό μόριο RNA με μια σφιχτή στροφή φουρκέτας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να φιμώσει την έκφραση του γονιδίου-στόχου μέσω παρεμβολής RNA (RNAi). Έκφραση του shRNA σε κύτταρα τυπικά επιτυγχάνεται με τη χρήση πλασμιδίων ή μέσω βακτηριακών ή ιικών φορέων. Το shRNA είναι ένας μεσολαβητής της RNAi που συμφέρει σε καθώς παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό αποδόμησης. Ωστόσο, απαιτεί τη χρήση ενός φορέα έκφρασης, κάτι που μπορεί να θέσει προβλήματα ασφάλειας. Η σωστή επιλογή υποκινητή είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί ισχυρή έκφραση του shRNA. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν υποκινητές της πολυμεράσης III όπως U6 και H1. Ωστόσο, δεν παρουσιάζουν δυνατότητα για χωρικό και χρονικό έλεγχο. Ως εκ τούτου, έχει υπάρξει μια στροφή προς τη χρήση υποκινητών της πολυμεράσης II για τη ρύθμιση της έκφρασης των shRNA.

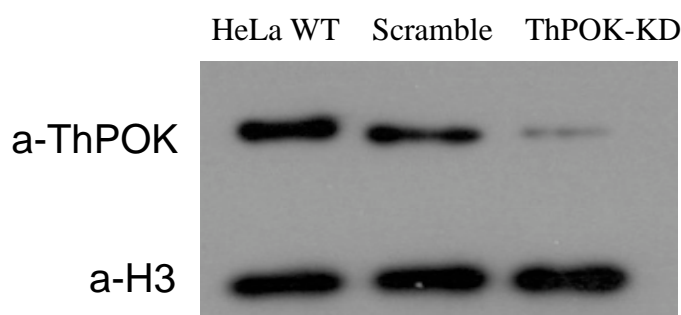
Αρχικά ενσωματώνεται ο φορέας στο γονιδίωμα του ξενιστή και το shRNA στη συνέχεια μεταγράφεται στον πυρήνα με πολυμεράση II ή πολυμεράση III ανάλογα με την επιλογή υποκινητή. Το προϊόν μιμείται το pri-microRNA (PRI-miRNA) και υποβάλλεται σε επεξεργασία από τη Drosha. Το προ-shRNA που προκύπτει εξάγεται από τον πυρήνα από την Exportin 5. Αυτό το προϊόν επεξεργάζεται από το σύμπλοκο DICER και μεταφέρεται στο σύμπλοκο RISC. Ο νοηματικός κλώνος αποικοδομείται και ο αντινοηματικός κλώνος κατευθύνει το RISC προς mRNA που έχει τη συμπληρωματική αλληλουχία. Στην περίπτωση της τέλει συμπληρωματικότητας, το RISC διασπά το mRNA και στη περίπτωση της ατελούς συμπληρωματικότητας, το RISC καταστέλλει την μετάφραση του mRNA. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις, το shRNA οδηγεί σε στοχευμένη γονιδιακή σίγηση (**Εικόνα 13**).



**Εικόνα 13: Μηχανισμός shRNA σίγησης**

Για να εξακριβώσουμε την αποτελεσματικότητα της αποσίωπησης του mRNA του ThPOK απαραίτητος ήταν ο έλεγχος της ποσότητας της πρωτεΐνης στο πυρήνα των κυττάρων, έτσι σκεφτήκαμε να πραγματοποιήσουμε Western Blot, που είναι μια μέθοδος ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών μέσω ανοσοαποτύπωσης. Για αυτό το λόγο καλλιεργήσαμε τα κύτταρα ThPOK-KD (κύτταρα στα οποία έχει πραγματοποιηθεί Knock Down του ThPOK) σε 10cm πιάτα με 10 mL από το θρεπτικό υλικό μέχρι να φτάσουν στο 90% του κορεσμού τους, κύτταρα Scramble τα οποία έχουν υποστεί την ίδια διαδικασία shRNA σίγησης αλλά με ένα μη ειδικό RNA και κύτταρα HeLaWT τα οποία εκφράζουν φυσιολογικά τον ThPOK, με τον ίδιο τρόπο. Στη συνέχεια απομονώνουμε από κάθε κυτταρική σειρά τις πρωτεΐνες του πυρήνα (βλέπε κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι) και αυτό γιατί ο ThPOK είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη. Έπειτα χρησιμοποιούμε αυτά τα πρωτεϊνικά δείγματα για να σε ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, για να μπορέσουν οι πρωτεΐνες να διαχωριστούν τόσο με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο όσο και με βάση το μοριακό τους βάρος, με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ο βέλτιστος διαχωρισμός τους. Για να πραγματοποιηθεί η ανοσοαποτύπωση πρέπει οι πρωτεΐνες που έχουν διαχωριστεί να μεταφερθούν σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, πραγματοποιείται το μπλοκάρισμα των μη ειδικών

θέσεων για την πιο ειδική πρόσδεση του πρώτου αντισώματος που είναι ειδικό για τον ThPOK ενώ ακολουθεί και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει τη βαριά αλυσίδα του πρώτου αντισώματος και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του σήματος. Παράλληλα χρησιμοποιούμε και αντίσωμα για τον H3, που αποτελεί έναν παράγοντα που συμμετέχει στη συναρμολόγηση της μεταγραφικής συσκευής και παρουσιάζει σταθερή έκφραση στον πυρήνα των κυττάρων, και με τη βοήθεια του θα μπορέσουμε να πραγματοποιήσουμε την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων μας ( **Εικόνα 14** )

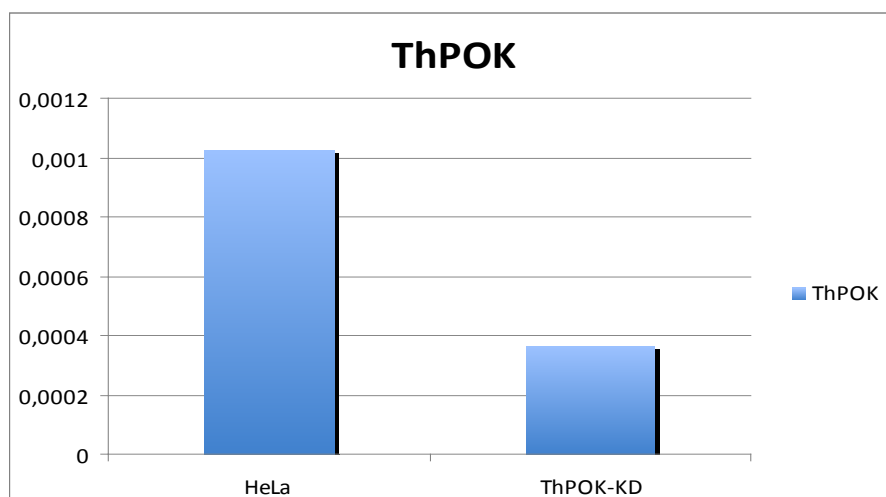


**Εικόνα 14:** Ανοσοαποτύπωση σε φιλμ με αντισώματα για τους H3 και ThPOK σε κύτταρα Scramble ThPOK-KD. Τα αποτελέσματα δείχνουν ~40% knock down του ThPOK στα ThPOK-KD.

Όπως μπορούμε να αντιληφθούμε και από την παρακάτω εικόνα που απεικονίζει τα αποτελέσματα του Western Blot η σίγηση του ThPOK στα ThPOK-KD κύτταρα έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία αφού παρατηρείται μειωμένη παραγωγή της πρωτεΐνης σε σχέση με τα κύτταρα HeLa στα οποία ο ThPOK εκφράζεται κανονικά . Φυσικά με την μέθοδο της shRNA σίγησης δεν μπορούμε να έχουμε ποτέ εκμηδενιστικά αποτελέσματα στην παραγωγή της πρωτεΐνης .

Θελήσαμε ωστόσο να επιβεβαιώσουμε το παραπάνω αποτέλεσμα και με ένα δεύτερο πείραμα με το οποίο εξετάσαμε αυτή τη φορά τη συγκέντρωση του mRNA του ThPOK στα ThPOK-KD κύτταρα σε σύγκριση με τα κύτταρα HeLa. Ο καλύτερος τρόπος για να το επιτύχουμε αυτό είναι με τη μέθοδο ποσοτικοποίησης πραγματικού χρόνου Real Time PCR (βλέπε κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι). Επομένως καλλιεργήσαμε ξανά της δύο κυτταρικές σειρές αυτή των ThPOK-KD κυττάρων καθώς και αυτή των HeLa κυττάρων σε 10cm πιάτα με 10mL θρεπτικού υλικού μέχρι να φτάσουν στο 90 % του κορεσμού τους. Στη συνέχεια απομονώσαμε το mRNA από κάθε κυτταρική σειρά (βλέπε κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι) έτσι ώστε στη συνέχεια να το χρησιμοποιήσουμε ως μήτρα για την κατασκευή των αντίστοιχων

cDNA. Τα cDNA τα οποία κατασκευάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για τους ειδικούς για τον ThPOK εκκινητές καθώς και εκκινητές για το housekeeping γονίδιο GAPDH, το οποίο χρησιμεύει για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με αυτόν τον τρόπο επιτεύχθηκε η ενίσχυση των αρχικών υποστωμάτων και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους. Τα αποτελέσματα που φαίνονται και παρακάτω παρουσιάζουν τα μειωμένα επίπεδα του mRNA του ThPOK στα ThPOK-KD κύτταρα σε σχέση με τα HeLa (**Εικόνα 15**).

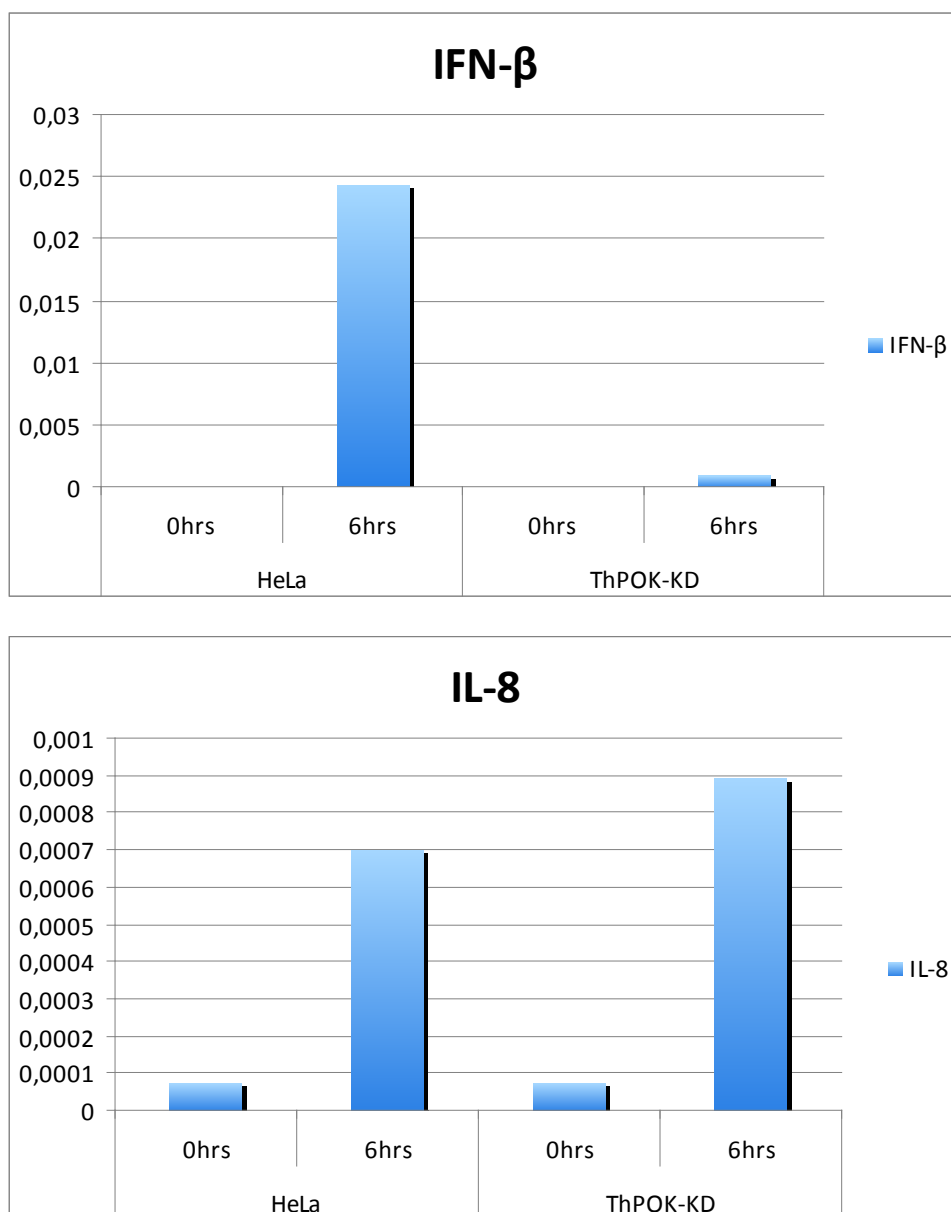


**Εικόνα 15:** Διαγραμματική απεικόνιση αποτελεσμάτων της Real Time PCR για τον ThPOK σε κύτταρα HeLa και ThPOK-KD. Το knock down έχει πραγματοποιηθεί αποτελεσματικά γιατί παρατηρείται μείωση της έκφρασης του.

Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων από τα δύο παραπάνω πειράματα αποδεικνύουν την αποτελεσματική αποσιώπηση του ThPOK στα ThPOK-KD κύτταρα όσον αφορά τα επίπεδα του mRNA του αλλά και της πρωτεΐνης. Έτσι καθίσταται δυνατή η συνέχιση των πειραμάτων για την μελέτη της επίδρασης της απουσίας του ThPOK στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις αλλά και στην έκφραση του γονιδίου της IFN-β.

Για να εξετάσουμε το εάν και με ποιον τρόπο η αποσιώπηση επηρεάζει την έκφραση της IFN-β, θελήσαμε να εξετάσουμε την ποσότητα του mRNA της IFN-β στα ThPOK-KD κύτταρα σε σύγκριση με τα κύτταρα HeLa ύστερα από ιική μόλυνση καθώς, όπως είδαμε από την βιβλιογραφία, μόνο τότε μπορεί να επαχθεί η έκφραση της IFN-β. Έτσι καλλιεργήσαμε ξανά της δύο κυτταρικές σειρές αυτή των ThPOK-KD κυττάρων καθώς και αυτή των HeLa κυττάρων σε 10cm πιάτα με 10mL θρεπτικού υλικού μέχρι να φτάσουν στο 90 % του κορεσμού τους και τότε μολύναμε

κάθε κυτταρική σειρά με Sendai Virus για 6 ώρες, ώστε να επαχθεί η έκφραση του επαγόμενου από ιό γονιδίου της IFN-β. Το χρονικό διάστημα για το οποίο πραγματοποιείται η ιική μόλυνση επιλέχθηκε διότι από την βιβλιογραφία υποστηρίζεται ότι ύστερα από 6 ώρες από την ιική μόλυνση παρατηρούνται τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης της IFN-β. Στη συνέχεια απομονώσαμε τα mRNA τις κάθε κυτταρικής σειράς από τις 0 ώρες και τις 6 ώρες και με αυτά κατασκευάσαμε τα αντίστοιχα cDNA τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σαν υπόστωμα για τους ειδικούς εκκινητές για την IFN-β και την IL8 στην Real Time –PCR(**Εικόνα 16**).

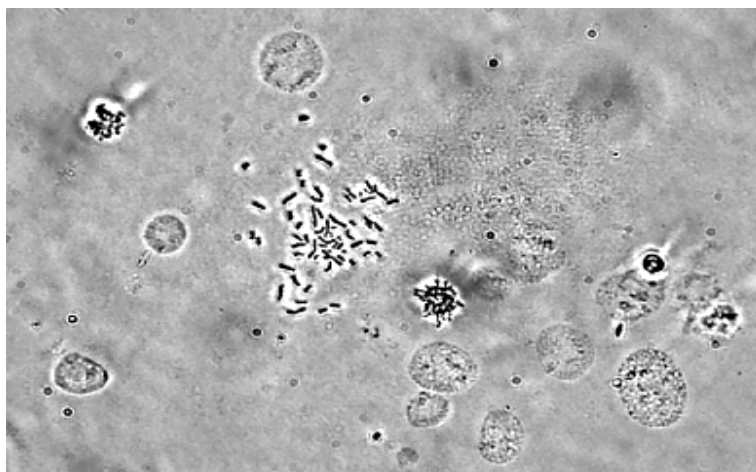


**Εικόνα 16:** Απεικόνιση αποτελεσμάτων Real Time PCR σε κύτταρα HeLa και ThPOK-KD με εκκινητές ειδικούς για την IL8 (control) και την IFN-β πριν και μετά από 6 ώρες μόλυνσης με Sendai ιό. Παρατηρείται μείωση των επιπέδων της IFN –β στα κύτταρα με το knock down του Th-POK.



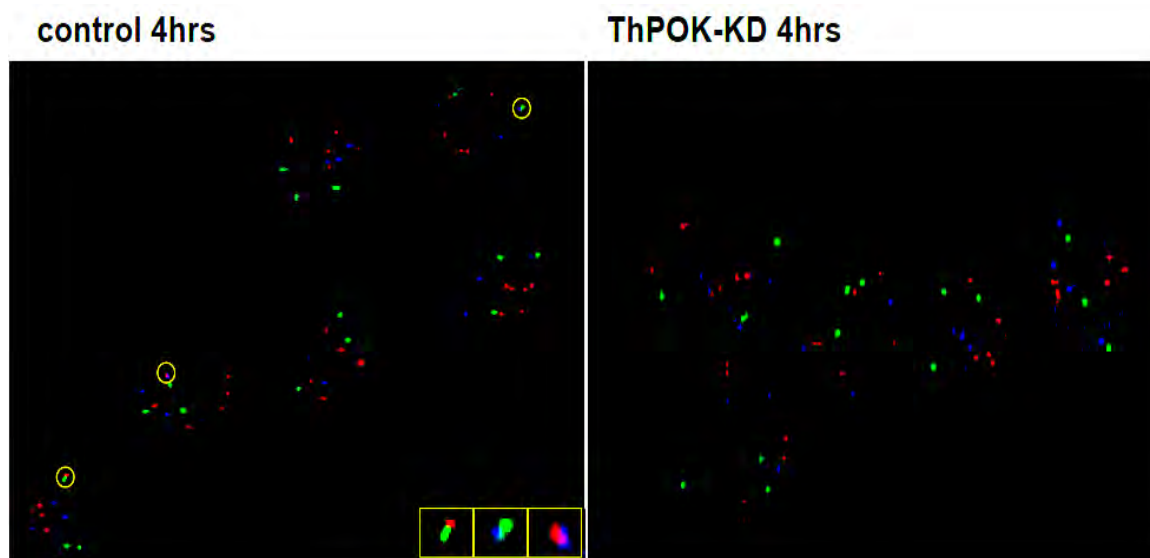
Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως το knock down του ThPOK έχει τεράστια επίπτωση στην έκφραση της IFN- $\beta$  που σημαίνει πως διαδραματίζει κάποιον ειδικό ρόλο στην επαγωγή του γονιδίου ύστερα από ιική μόλυνση ενώ στο control του πειράματος που είναι η IL8 ένα επίσης επαγόμενο από ιό γονίδιο φαίνεται ότι η απουσία του ThPOK δεν μειώνει την έκφραση της IFN- $\beta$  και κατά συνέπεια η έκφραση της είναι ανεξάρτητη από τον ThPOK.

Με τα προηγούμενα πειράματα δείχθηκε ότι το knock down του ThPOK επηρεάζει αρνητικά την έκφραση της IFN- $\beta$  καθώς τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου είναι φανερά μειωμένα σε σχέση με τα κύτταρα control. Έτσι θελήσαμε να εξετάσουμε σε πιο επίπεδο εμπλέκεται ο ThPOK έτσι ώστε η απουσία του να οδηγεί στα παραπάνω αποτελέσματα. Αρχικά αποφασίσαμε να διερευνήσουμε τις επιπτώσεις του knock down στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NRCs. Για να το καταφέρουμε αυτό σκεφτήκαμε ως ιδανική τεχνική το FISH (βλέπε κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι) με το οποίο, χρησιμοποιώντας κατάλληλους ανιχνευτές για τις γενωμικές περιοχές που θέλουμε να μελετήσουμε, μπορούμε να διακρίνουμε μέσω ανοσοφθορισμού τις θέσεις τους στο πυρήνα. Καλλιεργήσαμε ξανά της δύο κυτταρικές σειρές αυτή των ThPOK-KD κυττάρων καθώς και αυτή των HeLa κυττάρων σε 10cm πιάτα με 10mL θρεπτικού υλικού μέχρι να φτάσουν στο 90 % του κορεσμού τους και στη συνέχεια τα μολύναμε με Sendai Virus για 4 ώρες διότι σε αυτό το χρονικό σημείο η βιβλιογραφία υποδεικνύει πως λαμβάνει χώρα το μέγιστο ποσοστό των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων. Στη συνέχεια απομονώσαμε τους πυρήνες από κύτταρα HeLa και ThPOK-KD χωρίς ιό αλλά και μολυσμένα με ιό για 4 ώρες και τους στρώσαμε σε πλακάκια για να πραγματοποιήσουμε το FISH (**Εικόνα 17**)



**Εικόνα 17 :** Απεικόνιση πυρήνων με 40X φακό, Leica μικροσκόπιο.

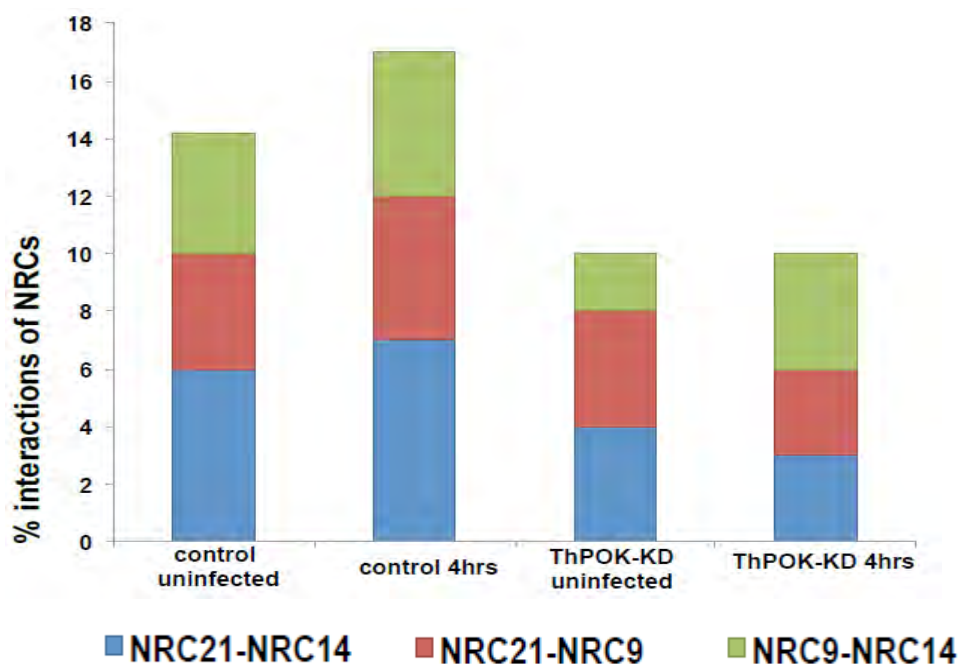
Έπειτα ιχνηθετήσαμε ανιχνευτές για κάθε ένα από τους NRCs με διαφορετικό χρώμα **NRC 14**, **NRC 9** και **NRC 21** και ακολουθήσαμε την πειραματική διαδικασία ώστε να αποκαλυφθούν οι περιοχές που είναι συμπληρωματικές με τους ανιχνευτές που κατασκευάσαμε και με αυτό το τρόπο να παρατηρήσουμε τις θέσεις στον πυρήνα των NRCs και των πιθανών αλληλεπιδράσεων δυο κυτταρικών σειρών χωρίς ιό στις 0 ώρες και μετά την μόλυνση με ιό για 4 ώρες την (βλέπε κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι) (**Εικόνα 18**).



**Εικόνα 18** :Απεικόνιση των αποτελεσμάτων του Triple- FISH στις 4 ώρες μετά την ιική μόλυνση για τους **NRC 14**, **NRC 9** και **NRC 21** με μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss και το πρόγραμμα ISIS. Στα κύτταρα control παρατηρούμε διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις ανά δύο NRCs σε αντίθεση με τα ThPOK-KD τα οποία φαίνεται ότι δεν παρουσιάζουν διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NRCs.

Τα αποτελέσματα από το FISH και για τα τρία NRCs δείχνουν μειωμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κλώνων δηλαδή μειωμένα επίπεδα συνεντοπισμού των NCRs, στα ThPOK-KD κύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου μετά από 4 ώρες ιικής μόλυνσης. Στο παραπάνω διάγραμμα γίνεται εμφανές πως στα κύτταρα που εκφράζουν φυσιολογικά τον ThPOK εμφανίζεται αύξηση των αλληλεπιδράσεων ανά δυο NRCs, με μια αναλογία σε κάθε είδος αλληλεπίδρασης, μεταξύ των μη μολυσμένων κυττάρων και αυτών έπειτα από 4 ώρες μόλυνσης με ιό. Αντίθετα στα ThPOK-KD κύτταρα δεν παρατηρείται η αναμενόμενη, επαγόμενη από ιό, αύξηση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μη μολυσμένων και μολυσμένων για 4 ώρες κυττάρων. Έτσι παρόλο που το γενικό ποσοστό των αλληλεπιδράσεων παραμένει ίδιο μεταξύ μολυσμένων και μη ThPOK-KD κυττάρων παρατηρείται ανακατανομή των ποσοστών των αλληλεπιδράσεων ανά δύο NRCs.

Συγκεκριμένα φαίνεται να αυξάνονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ NRC9 και NRC14 ενώ παρατηρείται μείωση των ποσοστών των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των NRC21 και NRC14 καθώς και μεταξύ των NRC21 και NRC9 (**Εικόνα 19**).

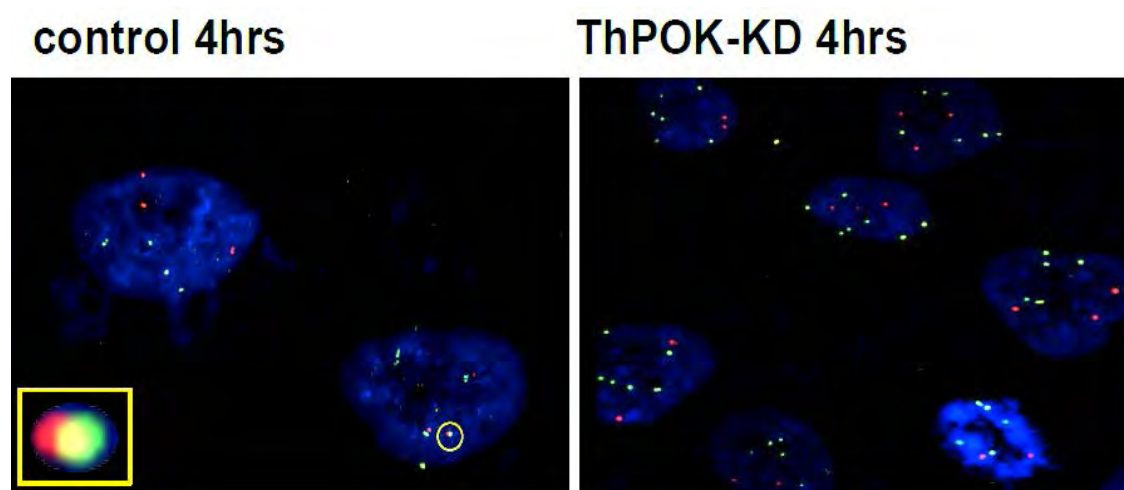


**Εικόνα 19:** Διαγραμματική απεικόνιση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων ανά δύο NRC σε control και ThPOK-KD κύτταρα πριν και μετά τη μόλυνση για 4 ώρες με Sendai ιό. Σε κύτταρα ThPOK-KD οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NRC μειώνονται σε σχέση με τα control κύτταρα έπειτα από την μόλυνση με ιό για 4 ώρες .

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι ο ThPOK συμμετέχει στη πραγματοποίηση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων έπειτα από την μόλυνση με ιό και ιδιαίτερα φαίνεται να διαμεσολαβεί με θετικό τρόπο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NRC21 και NRC14 καθώς και μεταξύ των NRC21 και NRC9 καθώς υπό την απουσία του αυτές μειώνονται σε αντίθεση με το ρόλο του στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ NRC9 και NRC14 οι οποίες αυξάνονται στην απουσία του. Ωστόσο το γενικό αποτέλεσμα δεν παύει να είναι πως στα ThPOK-KD η ιική μόλυνση δεν καταφέρνει να επάγει αύξηση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων.

Βασιζόμενοι στα ευρήματα τα οποία αρχικά υποστηρίζουν ότι ο ThPOK συμμετέχει με κάποιο τρόπο στην έκφραση της IFN-β, αφού απουσία του ύστερα από μόλυνση με ιό τα επίπεδα έκφρασης της είναι μειωμένα σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Επιπρόσθετα τα ευρήματα που υποδεικνύουν πως ο ThPOK διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των NRCs μας οδήγησαν στο να διερευνήσουμε τις συνέπειες του knock down του

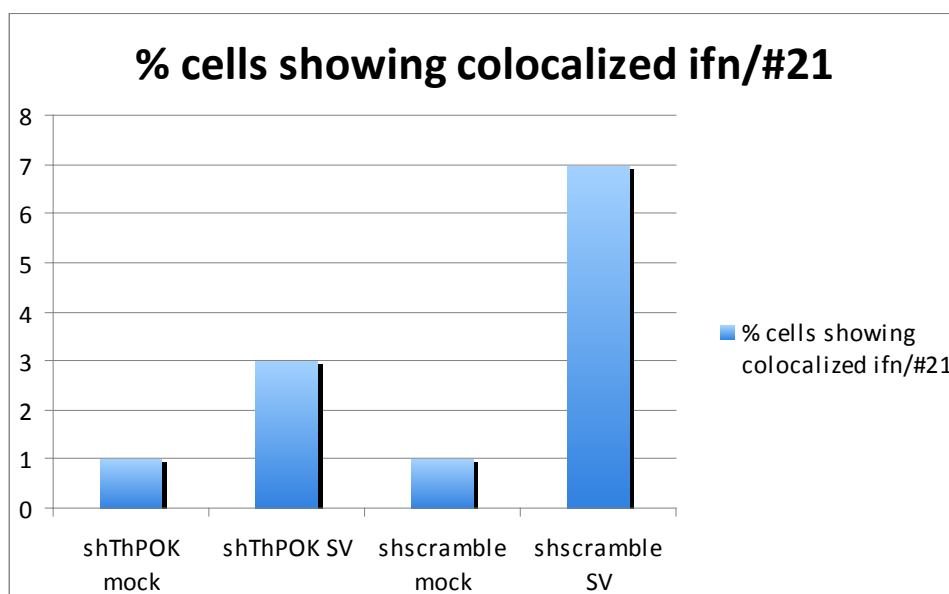
ThPOK στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις των κλώνων με το γονίδιο της IFN-β και έτσι μέσω αυτού του μηχανισμού συμβάλει στη ρύθμιση της έκφρασης. Για την εξακρίβωση αυτής της θεωρίας πραγματοποιήσαμε FISH αλλά αυτή τη φορά για τον ένα από τους τρεις NRCs, συγκεκριμένα για τον NRC21, και το γονίδιο της IFN-β σε κύτταρα control και ThPOK-KD πριν και μετά την ιική μόλυνση για 4 ώρες. Έτσι στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές για τον **NRC 21** και για το DNA της **IFN-β** ώστε να μελετηθούν οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις απουσία του ThPOK ύστερα από 4 ώρες ιικής μόλυνσης με Sendai Virus (**Εικόνα 20**). Τα αποτελέσματα που φαίνονται παρακάτω δείχνουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εξεταζόμενων περιοχών στα κύτταρα ελέγχου ύστερα από μόλυνση με ιό σε αντίθεση με τα κύτταρα ThPOK-KD στα οποία δεν παρουσιάζονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NRC21 και IFN-β.



**Εικόνα 20:** Απεικόνιση των αποτελεσμάτων του FISH στις 4 ώρες μετά την ιική μόλυνση για τους **NRC 21**, και **IFN-β** με μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss και το πρόγραμμα ISIS. Στα κύτταρα control παρατηρούμε διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του NRC21 και της IFN-β σε αντίθεση με τα ThPOK-KD τα οποία φαίνεται ότι δεν παρουσιάζουν διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εξεταζόμενων περιοχών.

Υστέρα από ποσοστοποίηση των αποτελεσμάτων προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα στο οποίο είναι εμφανές ότι υπάρχει δραματική πτώση των αλληλεπιδράσεων του NRC21 με το γονίδιο της IFN-β στα ThPOK-KD κύτταρα ύστερα από ιική μόλυνση για 4 ώρες σε σχέση με τα control κύτταρα, στα οποία οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις φαίνεται να διπλασιάζονται από τα μη μολυσμένα με ιό control κύτταρα στα μολυσμένα για 4 ώρες με ιό κύτταρα control (**Εικόνα 21**).

Γεγονός που υποδηλώνει ότι η αρχική μας υπόθεση ήταν αληθής και πως πράγματι ο ThPOK φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση της IFN-β μέσω της συμμετοχής τους τις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες όπως έχουμε ήδη αναφέρει είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της μεταγραφικής έκφρασης του ενός αλληλόμορφου της IFN-β, μέσω της μεταφοράς του NF-κB στον ενισχυτή του γονιδίου.

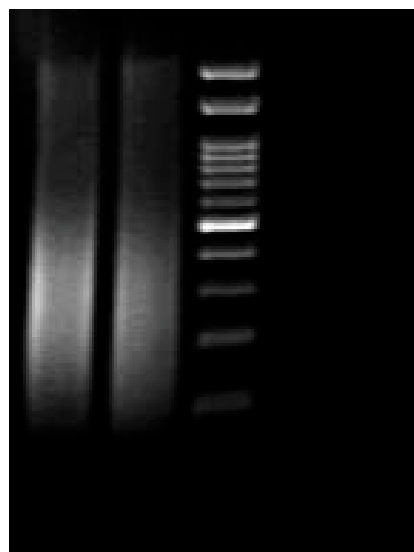


**Εικόνα 21:** Διαγραμματική απεικόνιση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των NRC21 και IFN-β σε (HeLa (control) και ThPOK-KD κύτταρα πριν και μετά τη μόλυνση για 4 ώρες με Sendai ιό. Σε κύτταρα ThPOK-KD οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του NRC21 και της IFN-β μειώνονται δραματικά σε σχέση με τα control κύτταρα έπειτα από την μόλυνση με ιό για 4 ώρες.

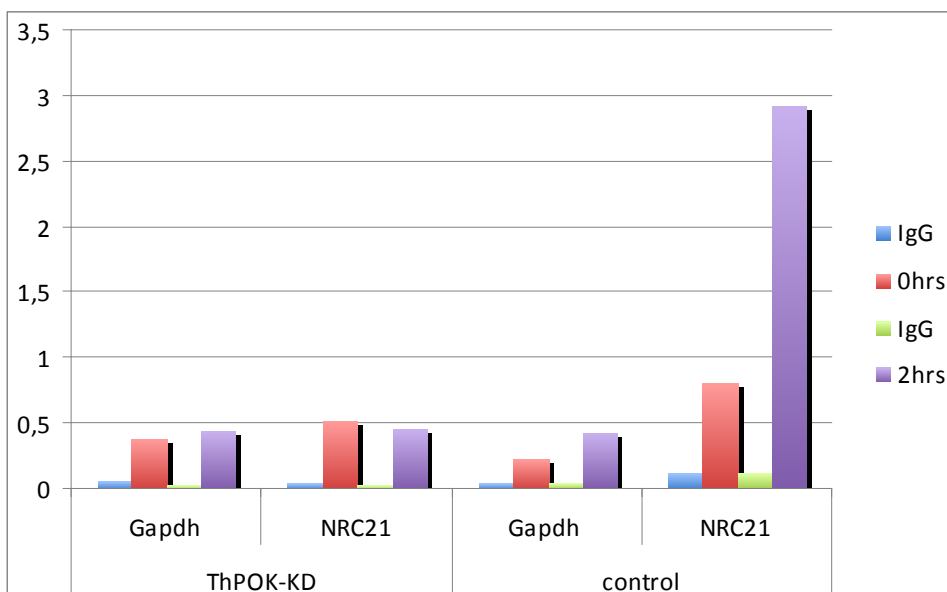
Τέλος καθώς όλα τα πειράματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο ThPOK διαμεσολαβεί με κάποιον τρόπο στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις κατά την επαγόμενη από ιό μεταγραφική έκφραση της IFN-β. Θελήσαμε να αποδείξουμε την ειδική πρόσδεση του ThPOK στις θέσεις πρόσδεσης τους στα NRCs, η εύρεση των οποίων μας καθοδήγησε αρχικά στην στόχευση του ThPOK ως παράγοντα που μεσολαβεί στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν κατά την επαγωγή του γονιδίου της IFN-β. Πραγματοποιήσαμε λοιπόν ένα πείραμα ανοσοκατακρύμνισης χρωματίνης σε κύτταρα ThPOK-KD και σε κύτταρα control πριν την μόλυνση με ιό (0 ώρες) και μετά από δύο ώρες από τη μόλυνση με ιό. Το χρονικό σημείο των δύο ωρών επιλέχθηκε με βάση τη βιβλιογραφία σύμφωνα με την

οποία τότε παρατηρείται το μέγιστο ποσοστό πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στις θέσεις πρόσδεσης τους.

Αρχικά λοιπόν καλλιεργήσαμε τις δύο κυτταρικές σειρές σε 20cm πιάτα με θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια μολύναμε με Sendai ιό και τις δύο κυτταρικές σειρές για δύο ώρες ενώ κρατήσαμε και μη μολυσμένα κύτταρα από κάθε κυτταρική σειρά. Έπειτα μονιμοποιήσαμε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και του DNA κατακερματίζουμε την χρωματίνη με τη χρήση Sonicator (Εικόνα 22) και προχωράμε στην ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα ειδικό για τον ThPOK (βλέπε κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι). Στη συνέχεια πραγματοποιούμε Real Time PCR ώστε να διαπιστώσουμε εάν το αντίσωμα για τον ThPOK μαζί με αυτόν «ψάρεψε» και γενωμική περιοχή του NCR21. Για αυτό στην Real Time PCR χρησιμοποιήσαμε εκκινητές ειδικούς για τον NCR21 καθώς επίσης και για το γονίδιο αναφοράς GAPDH που χρησιμεύει ως control (Εικόνα 23).



**Εικόνα 22:** Ηλεκτοφόρηση σε πηκτή αгарόζης της χρωματίνης των control και των ThPOK-KD κυττάρων έπειτα από Sonication .



**Εικόνα 23:** Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της Real Time με εκκινητές για τον NCR21 και τον GAPDH μετά από ChIP για τον ThPOK σε κύτταρα ThPOK-KD και HeLa πριν και μετά από δύο ώρες ιϊκής μόλυνσης.

Όπως βλέπουμε στο παραπάνω διάγραμμα ο ThPOK προσδένεται με μεγάλη ειδικότητα στο NRC21 στα control (HeLa) κύτταρα ύστερα από το πέρας 2 ωρών από την ιϊκή μόλυνση. Αντίθετα στα ThPOK-KD κύτταρα παρατηρείται τεράστια πτώση της ποσότητας του NRC21 ακόμη πιο χαμηλά και από τα επίπεδα NRC21 στα HeLa (control) κύτταρα στις 0 ώρες . Τα παραπάνω υποδεικνύουν τη ειδική πρόσδεση του ThPOK στον NRC21 μετά την μόλυνση με ιό.

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Για να φτάσουμε στο σημείο να κατανοήσουμε το νόημα των αλληλεπιδράσεων, που μελετήσαμε στην παραπάνω διπλωματική εργασία, στη ρύθμιση της μεταγραφής θα πρέπει να αναφέρουμε αρχικά κάποια γενικά στοιχεία για το πώς η γενική οργάνωση της χρωματίνης και οι χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις στον πυρήνα μπορούν να επηρεάζουν λειτουργίες όπως η γονιδιακή ρύθμιση, η αντιγραφή του DNA και η επιδιόρθωση του. Μελέτες δείχνουν ότι ο πυρήνας αρχιτεκτονικά χωρίζεται σε περιοχές χρωμοσωμάτων CTs (chromosome territories) και σε περιοχές ανάμεσα στη χρωματίνη ICs (interchromatine compartment), οι οποίες περιέχουν μακρομοριακά συμπλέγματα που χρησιμοποιούνται για την μεταγραφή, μετάφραση, μάτισμα και επιδιόρθωση του γενετικού υλικού (Cremer T 2001). Ένα χαρακτηριστικό στοιχείο των χρωμοσωμικών περιοχών (CTs) είναι ότι περιοχές με παρόμοιο γενετικό υλικό αλλά διαφορετική πυκνότητα γονιδίων καταλαμβάνουν διαφορετικές περιοχές πιο εξωτερικά ή πιο εσωτερικά μέσα στον πυρήνα (Boyle S 2001). Επίσης CTs με μικρά χρωμοσώματα τείνουν να οργανώνονται πιο εσωτερικά του πυρήνα (Sun H.B 2000). Υπάρχουν κάποια στοιχεία από πειράματα που δείχνουν ότι γονίδια που εκφράζονται συνεχώς ή επάγεται η έκφραση τους μετακινούνται, εκτός της χρωμοσωμικής περιοχής, στην οποία βρίσκονται σχηματίζοντας θηλιές (Wurtele H2006). Θεωρείται ότι αυτές οι θηλιές βοηθούν το μεταγραφόμενο γονίδιο να αλληλεπιδρά με άλλα χρωμοσώματα. Η άποψη αυτή στηρίζεται και από την παρατήρηση εκτεταμένης αλληλεπίδρασης περιοχών DNA ακριβώς στα όρια ή έξω από τα CTs (Branco M.R 2007). Άλλα πειράματα σχετικά με τη μεταγραφή του γονιδίου Hoxd κατά τη διαφοροποίηση έδειξαν ότι ο σχηματισμός θηλιών εκτός της χρωμοσωμικής περιοχής εξαρτάται από τον τρόπο τον οποίο το γονίδιο μεταγράφεται (Morey C 2007). Ακόμη όμως δεν είναι ξεκάθαρο εάν η μετακίνηση της χρωματίνης στις παραπάνω περιπτώσεις είναι απόρροια της μεταγραφής ή τη ρυθμίζει με κάποιο τρόπο.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για να αποσαφηνίσουν τη χωρική σχέση μεταξύ γονιδίων με πυρηνικές περιοχές που βρίσκεται συγκεντρωμένη η PolIII με τη μεταγραφική συσκευή ή με πυρηνικές περιοχές που βρίσκονται παράγοντες ματίσματος, έτσι ώστε να απαντηθεί το ερώτημα εάν αυτές οι περιοχές οργανώνονται απλά επειδή κάποια γονίδια τείνουν να μεταγράφονται ταυτόχρονα ή εάν διασφαλίζουν ώστε να γίνει η μεταγραφική ή μετα-μεταγραφική διαδικασία, αποκάλυψαν αλληλεπιδράσεις μεταξύ περιοχών ρυθμιστικών στοιχείων οι οποίες φαίνεται να συμβαίνουν εξ' αιτίας πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που βρίσκονται στις περιοχές αυτές και υποκινούν ή αναστέλλουν την δυνατότητα των γονιδίων να διαμορφώνουν ειδικά πυρηνικά περιβάλλοντα που είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση ή την αναστολή τους ή απλά τροποποιούν τη δομή της χρωματίνης των αλληλεπιδρώντων αλληλόμορφων. Μελέτη των αλληλεπιδράσεων του μητρικού αλληλόμορφου H19 ICR δείχνει ότι στις αλληλεπιδράσεις αυτές ενέχεται η πρωτεΐνη CTCF.

Ο CTCF είναι μια υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη επίσης γνωστή ως πρωτεΐνη δακτύλου 11-ψευδαργύρου ή παράγοντα CCCTC δέσμευσης είναι ένας παράγοντας μεταγραφής που στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το γονίδιο CTCF (Filippova GN et al 1996, Rubio ED et al 2008). Ο CTCF δεσμεύεται με την CCGCGNGGNGGCAG συναινετική αλληλουχία (IUPAC) (Kim TH et al 2007). Η αλληλουχία ορίζεται από 11 μοτίβα δακτύλου ψευδαργύρου στη δομή του. Η δέσμευση CTCF του εμποδίζεται από CpG μεθυλίωση του DNA που συνδέεται (Bell AC, Felsenfeld G 2000).

Ο CTCF εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως είναι η μεταγραφική ρύθμιση, έχει δραστηριότητα μονωτή, συμμετέχει στον V (D) J ανασυνδυασμό (Chaumeil J, Skok JA 2012) στη ρύθμιση της αρχιτεκτονικής της χρωματίνης (Phillips JE, Corces VG 2009), στη διατήρηση του εντυπώματος καθώς και προστασία από τη μεθυλίωση (Fedoriw et al 2004, Kurukuti et al 2006, Rand et al 2004, Schoenherr et al 2003, Szabo et al 2004) και στην απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X. Ο παράγοντας CCCTC-Binding ή CTCF αρχικά ανακαλύφθηκε ως αρνητικός ρυθμιστής του γονιδίου c-myc στην όρνιθα. Αυτή η πρωτεΐνη βρέθηκε να προσδένεται σε τρεις ρυθμιστικές επαναλήψεις της CCCTC αλληλουχία πυρήνα και έτσι ονομάστηκε παράγοντας δέσμευσης CCCTC (Lobanenkov VV, et al 1990).

Ο πρωταρχικός ρόλος της CTCF πιστεύεται ότι είναι στη ρύθμιση της 3D δομή της χρωματίνης (Phillips JE, Corces VG 2009). Ο CTCF συνενώνει σκέλη του



DNA, σχηματίζοντας έτσι βρόχους χρωματίνης, και άγκυρες DNA σε κυτταρικές δομές, όπως το πυρηνικό έλασμα (Guelen L et al 2008 ). Επίσης καθορίζει το όρια μεταξύ ενεργού και ετεροχρωματινικού DNA. Δεδομένου ότι η 3D δομή του DNA επηρεάζει την ρύθμιση των γονιδίων, η δραστηριότητα CTCF του επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων. Ο CTCF πιστεύεται ότι είναι ένα κύριο μέρος της δραστηριότητας των μονωτών, αλληλουχίες που μπλοκάρουν την αλληλεπίδραση μεταξύ ενισχυτών και υποκινητών. Η δέσμευση του CTCF φαίνεται να προωθεί αλλά και να καταστείλει την γονιδιακή έκφραση. Είναι άγνωστο αν CTCF επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση αποκλειστικά μέσω της δραστηριότητά του στο σχηματισμό θηλιών, ή αν έχει κάποια άλλη, άγνωστη, δραστηριότητα (Phillips JE, Corces VG 2009).

Η σύνδεση του CTCF έχει αποδειχθεί ότι έχει πολλά αποτελέσματα, τα οποία απαριθμούνται παρακάτω όμως σε κάθε περίπτωση, είναι άγνωστο αν ο CTCF προκαλεί άμεσα το αποτέλεσμα, ή αν το κάνει έμμεσα. Αρχικά συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση καθώς έχει βρεθεί ότι παίζει ένα βαρύ ρόλο στην καταστολή του γονιδίου της Igf2 (insulin-like growth factor 2), με τη σύνδεση του στη περιοχή ελέγχου εντυπώματος H-19(ICR), μαζί με τις περιοχές DMR1 (differentially-methylated region) και MAR3 (Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V 2001 and Dunn KL, Davie JR 2003). Επίσης λειτουργεί ως μονωτής όπου η δέσμευση του στις ειδικές θέσεις πρόσδεσης του μπορεί να εμποδίσει την αλληλεπίδραση μεταξύ ενισχυτών και υποκινητών, και με αυτό τον τρόπο περιορίζεται η δραστηριότητα των ενισχυτών σε ορισμένες λειτουργικές περιοχές. Εκτός από το ενεργεί ως μονωτής, μπλοκάροντας την δράση του ενισχυτή, ο CTCF μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως φραγμός της χρωματίνης (Cuddapah S et al 2009) με την πρόληψη της εξάπλωσης των δομών ετεροχρωματίνης. Επιπρόσθετα ρυθμίζει την αρχιτεκτονική της χρωματίνης καθώς ο CTCF σχηματίζει ομοδιμερή (Yusufzai TM, Tagami H, Nakatani Y, Felsenfeld G 2004), τα οποία προκαλούν το δεσμευμένο DNA να σχηματίσει βρόγχο (Hou C, Zhao H, Tanimoto K, Dean A 2008). Ο CTCF εμφανίζεται επίσης συχνά στα όρια των τμημάτων του DNA που συνδέεται με το πυρηνικό έλασμα. Η χρήση ChIP ακολουθούμενο από ChIP seq, διαπιστώθηκε ότι ο CTCF συνεντοπίζεται με την κοχεσίνη (πρωτεϊνικό σύμπλοκο που ρυθμίζει τον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων) και επηρεάζει του μηχανισμούς γονιδιακής ρύθμισης και τη δομή ανώτερης τάξης της χρωματίνης (Lee BK, Iyer VR 2012).

Τέλος έχει βρεθεί ότι η πρόσδεση σου στις ειδικές θέσεις που αναγνωρίζει επηρεάζει το εναλλακτικό μάτισμα (Shukla S et al 2011).

Στο σύνολό τους, αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η επίδραση του CTCF και άλλες αρχιτεκτονικές πρωτεΐνες στη γονιδιακή έκφραση είναι ένα αποτέλεσμα της ικανότητας τους να φέρνει σε στενή εγγύτητα αλληλουχίες που βρίσκονται πολύ μακριά στο γραμμικό γονιδίωμα. Υποθέτοντας ότι ο μηχανισμός αυτός αποτελεί τη βάση όλων των λειτουργιών CTCF, τα αποτελέσματα των μελετών μπορούν να υποδηλώνουν ότι οι επαφές CTCF μεσολαβούν στη ρύθμιση της λειτουργίας του γονιδιώματος με έναν τρόπο που εξαρτάται από. Το αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων οι οποίες εξαρτώνται από τη φύση των αλληλουχιών που γειτνιάζουν με θέσεις πρόσδεσης CTCF και ίσως και από τη παρουσία άλλων ειδικών πρωτεϊνών χρωματίνης.

Πρόσφατες μελέτες του τοπολογική οργάνωση του γονιδιώματος υποδηλώνουν ότι ο CTCF και η κοχεσίνη (cohesin) μπορεί να εμπλέκονται στην εγκατάσταση ή τη συντήρηση των τοπολογικών περιοχών στο γονιδίωμα των θηλαστικών, καθώς οι θέσεις σύνδεσης τους εμπλουτίζουν τα όρια αυτών των περιοχών (Dixon JR, et al. 2012). Κοχεσίνες βρέθηκαν να προσδέονται σε τόπους υπερευαισθησίας στην DNaseI και σε διατηρημένες μη κωδικεύουσες αλληλουχίες, και έτσι ανακαλύφθηκε ότι ο παράγοντας CCCTC δέσμησης πρωτεΐνης δέσμησης DNA (CTCF) συνεντοπίζεται με την κοχεσίνη στην πλειονότητα των θέσεων στο γονιδίωμα. Προτάθηκε λοιπόν ότι ο CTCF και η κοχεσίνη συνεργάζονται για να διευκολύνουν τις αλληλεπιδράσεις μεγάλου βεληνεκού στο γονιδίωμα (Phillips JE, Corces VG 2009). Η σχέση μεταξύ CTCF και κοχεσίνης είναι λειτουργική. Αυτά τα αποτελέσματα έχουν οδηγήσει σε ένα μοντέλο όπου ο CTCF κατευθύνεται σε θέσεις consensus αλληλουχίας (η οποία μπορεί να τροποποιηθεί με μεθυλίωση (Carriere L, et al 2012) και οι κοχεσίνες στρατολογούνται από τον CTCF μέσω μιας άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών (Oler AJ, et al 2010).

Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες επάγουν την επαγόμενη από ιό έκφραση της IFN-β. Οι διαχρωμοσωμικές αυτές αλληλεπιδράσεις πραγματοποιούνται μεταξύ τριών NCRs και του ενισχυτή της IFN-β έτσι ώστε να προσδεθεί σε αυτόν ο πρώτος μεταγραφικός παράγοντας του ενισχυσώματος NF-κB. Υστέρα από πειράματα βρέθηκαν στα τρία NCRs, τα οποία περιέχουν επαναλήψεις Alu, θέσεις πρόσδεσης του ανθρώπινου GAGA Factor (ThPOK) οι οποίες παίζουν μεγάλο ρόλο στην πραγματοποίηση των

διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των NRCs και της IFN-β. Για να διαλευκάνουμε το ρόλο της πρωτεΐνης αυτή στην πραγμάτωση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων και την επαγωγή του γονιδίου της IFN-β πραγματοποιήσαμε πειράματα με μια κυτταρική σειρά στην οποία είχε πραγματοποιηθεί knock down του ThPOK μέσω shRNA σίγησης. Μελετήσαμε την έκφρασή της IFN-β με Real Time PCR και είδαμε ότι μειώνεται με την απουσία του ThPOK γεγονός που υποδεικνύει έναν ρυθμιστικό ρόλο του ThPOK στην έκφραση της IFN-β. Επίσης πραγματοποιήσαμε πειράματα FISH στα ThPOK-KD κύτταρα τόσο για να εξετάσουμε τις επιπτώσεις στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τριών NRCs όσο και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενός από αυτά, NRC 21, με το γονίδιο της IFN-β. Παρατηρήθηκε και στις δύο περιπτώσεις μείωση των αλληλεπιδράσεων με πιο έντονη την μείωση μεταξύ του NRC21 και της IFN-β κάτι που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει την επαγωγή του γονιδίου της IFN-β μέσω διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων, που επιβεβαιώνεται και από ChIP που πραγματοποιήθηκε για τον ThPOK στην ίδια κυτταρική σειρά και βρέθηκε η ειδική πρόσδεση του στο NRC21. Με βάση όλα τα παραπάνω μπορούμε να προτείνουμε ένα μοντέλο ρύθμισης της μεταγραφής μέσω διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων που διαμεσολαβείται από τον συνεντοπισμό δυο ρυθμιστικών πρωτεϊνών των ThPOK και τον NF-κB το οποίο ρυθμίζει ειδικά την μονοαλληλική έκφραση του γονιδίου της IFN-β, παρόμοιο με το μηχανισμό δράσης του CTCF και της κοχεσίνης .

Μελλοντικός στόχος είναι η εύρεση ενός ολόκληρου δικτύου αντι-ιικών γονιδίων τα οποία ρυθμίζονται μέσω διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων στις οποίες μεσολαβεί ο ThPOK κάτι για το οποίο μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν πληροφορίες. Για να εντοπισθεί ένας αριθμός πιθανών γονιδίων στόχων του ThPOK θα πρέπει να πραγματοποιηθούν πειράματα ChIP-seq ώστε από την αλληλούχιση να εντοπισθούν οι χρωμοσωμικές περιοχές οι οποίες προσδένονται από τον ThPOK έπειτα από ική μόλυνση και κατά συνέπεια τα πιθανά γονίδια που υπόκεινται στην ρύθμιση του. Στη συνέχεια μπορεί να πραγματοποιηθούν FISH για τις χρωμοσωμικές περιοχές οι οποίες θα έχουν προκύψει από το ChIP-seq σε συνδυασμό με τα NRCs ώστε να δούμε ποιες από αυτές αλληλεπιδρούν ρυθμίζονται μέσω διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων με τα NRCs μέσω του ThPOK.

## **ΓΕΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. **Molecular Biology of the Cell**, 4<sup>th</sup> edition , Alberts B., Johnson A., Lewis G., Raff M., Roberts K., Walter P.
2. **Genes VIII**, Lewin
3. **Genomes 3**, T.A .Brown.
4. **In vivo study of transcriptional complexes** , Apostolou E, Thanos D 2009

## **ΕΙΔΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Lewis E.B. 1954 **The Theory and Application of a New Method of Detecting Chromosomal Rearrangements in Drosophila melanogaster** Am Nat 88 :637-645
2. Branko M.R., 2006, Fraser P., 2006 **Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations** PLUS Biol 4:138
3. Agalioti, T., S. Lomvardas, et al. 2000 **Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN- $\beta$  promoter** Cell 103(4): 667-78
4. Lomvardas, S., D. Thanos, 2001 **Nucleosome sliding via TBP DNA binding in vivo** Cell 106(6): 685-96
5. Shogren-Knaak M. et al, 2006 **Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions** Science 311: 844-847
6. Fraser P. 2006 **Transcriptional control thrown for a loop Current opinion in Genetics and development** 16: 490-495
7. Thanos, D., and T. Maniatis 1995 **Virus induction of human IFN $\beta$  gene expression requires the assembly of an enhanceosome** Cell 83(7): 1091-100
8. Sen GC. and P. Lengyel 1992 **The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry** J. Biol. Chem. 267: 5017-20
9. T. Taniguchi., Y. Fujii-Kuriyama., M. Muramatsu 1980 **Molecular cloning of human interferon cDNA** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77(7): 4003-6
10. Pestka, S., C.D. Krause., M.R. Walter 2004 **Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors** Immunol.Rev.202: 8-32
11. Faffar, M.A. and R.D. Schreiber 1993 **The Molecular Cell Biology of Interferon-gamma and its Receptor** Annual Review of Immunology 11: 571-611
12. Darnell, J.E., Jr., Kerr I.M., Stark G.R. 1994 **Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins** Science 264: 1415-1421

13. Maniatis T., Whittemore L.A., Du W., Fan C-M., Keller A., Palombella V.J., Thanos D. 1992 **Positive and Negative Control of Human Interferon- $\beta$  Gene Expression** In:McKnight S.L., Yamamoto K.R., eds. Transcriptional Regulation. Cold Spring Hrber, NY:Cold Spring Harbor Laboratory Press 2:1193-1220
14. Falvo, J.V., D. Thanos., T. Maniatis 1995 **Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN $\beta$  gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y)** Cell 83(7): 1101-11
15. Yie,j.,M.Merika,et al.1999 Therole Thanos, D., and T. Maniatis 1995 **The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF- $\kappa$ B-dependent virus induction of the human IFN- $\beta$  gene** Cell 71(5): 777-89
16. Geierstanger, H., B.F. Volkman, et al. 1994 **Short Peptide Fragments Derived from HMG-I/Y Proteins Bind Specifically to the Minor Groove of DNA** Biochemistry 33(17): 5347-55
17. Merika, M., A.J. Williams, et al. 1998 **Recruitment of CBP/p300 by the IFN $\beta$  Enhanceosome Is Required for Synergistic Activation of Transcription** Mol. Cell 1(2): 277-87
18. Cho. H., G. Orphanides, et al .1998 **A Human RNA Polymerase II Complex Containing Factors That Modify Chromatin Structure** Mol. Cell. Biol. 18(9):5355-63
19. Yie. J., Senger., D. Thanos 1999 **Mechanism by which the IFN- $\beta$  enhanceosome activates transcription** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96(23): 13108-of HMGI9y0 in the assembly and function of the IFN- $\beta$  enhanceosome EmboJ 18(11):3074-89 -13
20. Parekh. B.S., and T. Maniatis 1999 **Virus Infection Leads to Localized Hyperacetylation of Histones H3 and H4 at the IFN- $\beta$  Promoter** Mol. Cell 3(1): 125-9
21. Agalioti. T., G. Chen., D. Thanos 2002 **Deciphering the Transcriptional Histone Acetylation Code for a Human Gene** Cell 111(3): 381-92
22. Munshi. N., T. Agalioti, et al. 2000 **Coordination of a Transcriptional Switch by HMGI(Y) Acetylation** Science 293(5532): 1133-6
23. Senger, K., M. Merika, et al.2000 **Gene repression by coactivator repulsion** Mol. Cell 6(4): 931-7
24. Kurakin, A. 2005 **Stochastic cell** IUBMB Life 57(2): 59-63
25. Kurakin, A. 2005 **Stochastic cell** IUBMB Life 57(2): 59-63
26. Losick, R. and Desplan 2008 **Stochasticity and cell fate** Science 320(5872): 65-8
27. Ling J.Q. et al. 2006 **CTCF Mediates Interchromosomal Colocalization Between Igf2/H19 and Wsb1/Nf1** Science 312: 269-272

28. Zhao Z. et al. 2006 **Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions.** *Nature Genet.* 38:1341-1347
29. Polak, P. and E. Domany 2006 **Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental** *BMC Genomics* 7:133
30. Matharu, N.K., Hussain, T., Sankaranarayanan, R., and Mishra, R.K. (2010). **Vertebrate Homologue of Drosophila GAGA Factor.** *J. Mol. Biol.* 400, 434–447.
31. Tsukiyama, T., Becker, P.B., and Wu, C. (1994). **ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor.** *Nature* 367, 525–532.
32. Mishra, R.K., Mihaly, J., Barges, S., Spierer, A., Karch, F., Hagstrom, K., Schweinsberg, S.E., and Schedl, P. (2001). **The iab-7 polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity.** *Mol. Cell. Biol.* 21, 1311–1318.
33. Raff, J.W., Kellum, R., and Alberts, B. (1994). **The Drosophila GAGA transcription factor is associated with specific regions of heterochromatin throughout the cell cycle.** *EMBO J.* 13, 5977–5983.
34. Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuter, G., Gyurkovics, H., and Karch, F. (1994). **The Trithorax-like gene encodes the Drosophila GAGA factor.** *Nature* 371, 806–808.
35. Katsani, K.R., Hajibagheri, M.A., and Verrijzer, C.P. (1999). **Co-operative DNA binding by GAGA transcription factor requires the conserved BTB/POZ domain and reorganizes promoter topology.** *EMBO J.* 18, 698–708.
36. Galéra, P., Musso, M., Ducy, P., and Karsenty, G. (1994). **c-Krox, a transcriptional regulator of type I collagen gene expression, is preferentially expressed in skin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9372–9376.
37. Park, R.-W. (1996). **c-Krox Binds to Several Sites in the Promoter of Both Mouse Type I Collagen Genes. STRUCTURE/FUNCTION STUDY AND DEVELOPMENTAL EXPRESSION ANALYSIS.** *J. Biol. Chem.* 271, 21331–21339.
38. Widom, R.L., Culic, I., Lee, J.Y., and Korn, J.H. (1997). **Cloning and characterization of hcKrox, a transcriptional regulator of extracellular matrix gene expression.** *Gene* 198, 407–420.
39. Beauchef, G., Bigot, N., Kyriotou, M., Renard, E., Poree, B., Widom, R., Domp martin-Blanchere, A., Oddos, T., Maquart, F.-X., Demoor, M., et al. (2012). **The p65 Subunit of NF- B Inhibits COL1A1 Gene Transcription**

- in Human Dermal and Scleroderma Fibroblasts through Its Recruitment on Promoter by Protein Interaction with Transcriptional Activators (c-Krox, Sp1, and Sp3).** *J. Biol. Chem.* 287, 3462–3478.
40. He, X., He, X., Dave, V.P., Zhang, Y., Hua, X., Nicolas, E., Xu, W., Roe, B.A., and Kappes, D.J. (2005). **The zinc finger transcription factor ThPOK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment.** *Nature* 433, 826–833.
  41. Egawa, T., and Littman, D.R. (2008). **ThPOK acts late in specification of the helper T cell lineage and suppresses Runx-mediated commitment to the cytotoxic T cell lineage.** *Nat. Immunol.* 9, 1131–1139.
  42. Luckey, M.A., Kimura, M.Y., Waickman, A.T., Feigenbaum, L., Singer, A., and Park, J.-H. (2014). **The transcription factor ThPOK suppresses Runx3 and imposes CD4+ lineage fate by inducing the SOCS suppressors of cytokine signaling.** *Nat. Immunol.* 15, 638–645.
  43. Muroi, S., Naoe, Y., Miyamoto, C., Akiyama, K., Ikawa, T., Masuda, K., Kawamoto, H., and Taniuchi, I. (2008). **Cascading suppression of transcriptional silencers by ThPOK seals helper T cell fate.** *Nat. Immunol.* 9, 1113–1121.
  44. Wang, L., Wildt, K.F., Zhu, J., Zhang, X., Feigenbaum, L., Tessarollo, L., Paul, W.E., Fowlkes, B.J., and Bosselut, R. (2008). **Distinct functions for the transcription factors GATA-3 and ThPOK during intrathymic differentiation of CD4+ T cells.** *Nat. Immunol.* 9, 1122–1130.
  45. Zhang, M., Zhang, J., Rui, J., and Liu, X. (2010). **p300-Mediated Acetylation Stabilizes the Th-Inducing POK Factor.** *J. Immunol.* 185, 3960–3969.
  46. Collins, A., Hewitt, S.L., Chaumeil, J., Sellars, M., Micsinai, M., Allinne, J., Parisi, F., Nora, E.P., Bolland, D.J., Corcoran, A.E., et al. (2011). **RUNX Transcription Factor-Mediated Association of Cd4 and Cd8 Enables Coordinate Gene Regulation.** *Immunity* 34, 303–314.
  47. Zullo, J.M., Demarco, I.A., Piqué-Regi, R., Gaffney, D.J., Epstein, C.B., Spooner, C.J., Luperchio, T.R., Bernstein, B.E., Pritchard, J.K., Reddy, K.L., et al. (2012). **DNA Sequence-Dependent Compartmentalization and Silencing of Chromatin at the Nuclear Lamina.** *Cell* 149, 1474–1487.
  48. Stratigi, K., Kapsetaki, M., Aivaliotis, M., Town, T., Flavell, R.A., and Spilianakis, C.G. (2015). **Spatial proximity of homologous alleles and long noncoding RNAs regulate a switch in allelic gene expression.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E1577–E1586.
  49. Bhat, K.M., Farkas, G., Karch, F., Gyurkovics, H., Gausz, J., and Schedl, P. (1996). **The GAGA factor is required in the early Drosophila embryo not only for transcriptional regulation but also for nuclear division.** *Dev. Camb. Engl.* 122, 1113–1124.

50. Laney, J.D., and Biggin, M.D. (1992). **zeste, a nonessential gene, potently activates Ultrabithorax transcription in the Drosophila embryo.** *Genes Dev.* 6, 1531–1541.
51. Cremer T., Cremer C. 2001. **Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells.** *Nature Genetic Reviews* 2:292-301
52. Boyle S. et al. 2001. **The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells.** *Hum. Mol. Genet.* 10:211-219
53. Sum H.B., Shen J., Yotoka H. 2000. **Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei.** *Biophys. J.* 79:184-190
54. Wurtele H., Chartand P. 2006. **Genome-wide scanning of HoxB1-associated loci in mouse ES cells using an open-ended Chromosome Conformation Capture methodology.** *Chromosome Res.* 14:477-495
55. Morey C., Da Silva N.R., Perry P., Bickmore W.A. 2007. **Nuclear reorganization and chromatin decondensation are conserved, but distinct, mechanisms linked to Hox gene activation.** *Nature Genet.* 36:1065-1071
56. Dixon JR, et al. (2012) **Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions.** *Nature* 485(7398):376–380.
57. Phillips JE, Corces VG (2009) **CTCF: Master weaver of the genome.** *Cell* 137(7):1194–1211.
58. Filippova GN, Fagerlie S, Klenova EM, Myers C, Dehner Y, Goodwin G, Neiman PE, Collins SJ, Lobanenko VV (June 1996). **"An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes"**. *Mol. Cell. Biol.* 16 (6): 2802–13.
59. Rubio ED, Reiss DJ, Welch PL, Distchev CM, Filippova GN, Baliga NS, Aebersold R, Ranish JA, Krumm A (June 2008). **"CTCF physically links cohesin to chromatin"**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (24): 8309–14..
60. Chaumeil J, Skok JA (April 2012). **"The role of CTCF in regulating V(D)J recombination"**. *Curr. Opin. Immunol.* 24 (2): 153–9.
61. Phillips JE, Corces VG (June 2009). **"CTCF: master weaver of the genome"**. *Cell* 137 (7): 1194–211. d.
62. Lobanenko VV, Nicolas RH, Adler VV, Paterson H, Klenova EM, Polotskaja AV, Goodwin GH (December 1990). **"A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene"**. *Oncogene* 5 (12): 1743–53.



63. Guelen L, Pagie L, Brassat E, Meuleman W, Faza MB, Talhout W, Eussen BH, de Klein A, Wessels L, de Laat W, van Steensel B (June 2008). "**Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions**". *Nature* 453 (7197): 948–51.
64. Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V (2001). "**CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease**". *Trends Genet.* 17 (9): 520–7.
65. Dunn KL, Davie JR (2003). "**The many roles of the transcriptional regulator CTCF**". *Biochem. Cell Biol.* 81 (3): 161–7.
66. Cuddapah S, Jothi R, Schones DE, Roh TY, Cui K, Zhao K (2009). "**Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains**". *Genome Res.* 19 (1): 24–32.
67. Yusufzai TM, Tagami H, Nakatani Y, Felsenfeld G (January 2004). "**CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species**". *Mol. Cell* 13 (2):
68. Hou C, Zhao H, Tanimoto K, Dean A (December 2008). "**CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation**". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (51): 20398–403.
69. Lee BK, Iyer VR (September 2012). "**Genome-wide studies of CCCTC-binding factor (CTCF) and cohesin provide insight into chromatin structure and regulation**". *J. Biol. Chem.* 287 (37): 30906–13.
70. Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, Oberdoerffer P, Sandberg R, Oberdoerffer S (November 2011). "**CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing**". *Nature* 479 (7371): 74–9.
71. Carriere L, et al. "**Genomic binding of Pol III transcription machinery and relationship with TFIIIS transcription factor distribution in mouse embryonic stem cells**". *Nucleic Acids Res.* 2012;40:270–83.
72. Oler AJ, et al. "**Human RNA polymerase III transcriptomes and relationships to Pol II promoter chromatin and enhancer-binding factors**". *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17:620–8.

#### Πηγές διαδικτύου

- [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)
- [www.google.com](http://www.google.com)