



**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΝΓΚ
Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών

ΣΥΝΕΡΓΑΤΕΣ ΤΟΥ SOX2 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΓΑΣΤΡΙΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Επιβλέπουσα Ερευνήτρια Γ΄ :

Ευμορφια Ρεμπουτσικα, PhD

Εργαστήριο βιολογίας βλαστικών Κυττάρων
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας Και Γενετικής
Ε.ΚΕ.Β.Ε Αλ.Φλέμινγκ Stem cell biology

Συν-επιβλέποντες καθηγητές:

Νικόλαος Μπαλατσός, PhD

Λέκτορας Βιοχημείας

Αικατερίνη Μούτου, PhD

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών

Όνοματεπώνυμο: *Εμμανουήλ Μετζακοπιάν*
ΑΦΜ:1800059

Σεπτέμβριος 2006

Λάρισα



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

Αριθ. Εισ.: 5010/1
Ημερ. Εισ.: 13/11/2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΜΕΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087761

Περιεγόμενα:

<u>1 Εισαγωγή</u>	<u>4</u>
<u>1.1 Πώς ένα μοναδικό κύτταρο—το γονιμοποιημένο ωάριο— δίνει γένεση σε έναν περίπλοκο, πολυκύτταρο οργανισμό</u>	<u>5</u>
<u>1.2 Ολοδύναμα, πλειοδύναμα και πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα:</u>	<u>8</u>
<u>1.3 Πειραματικά συστήματα που χρησιμοποιούνται για την μελέτη της εμβρυογένεσης:</u>	<u>12</u>
<u>1.4 Σηματοδότηση στα Εμβρυονικά Βλαστικά Κύτταρα</u>	<u>14</u>
<u>1.5 Ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και βλαστικά κύτταρα</u>	<u>16</u>
<u>1.7 Sox B1 & B2 πρωτεΐνες :</u>	<u>18</u>
<u>1.8 Οι γνώσεις μας για το Sox2 σε διαφορετικά μοντέλα ζώων:</u>	<u>19</u>
<u>1.9 Πως κάθε SOX B πρωτεΐνη αναγνωρίζει το κατάλληλο γονίδιο στόχο της:</u>	<u>25</u>
<u>1.11 Συνεργάτες του Sox2 :</u>	<u>27</u>
<u>2 Πειραματική προσέγγιση:</u>	
<u>2.1 Έλεγχος δύο υβριδίων της cDNA βιβλιοθήκη σε μαγιά:</u>	<u>29</u>
<u>2.1 Έλεγχος δύο υβριδίων της cDNA βιβλιοθήκη σε μαγιά:</u>	<u>31</u>
<u>2.3 Διαδικασία υποκλωνοποίησης</u>	<u>32</u>
<u>2.4 Κατασκευές Sox2</u>	<u>42</u>
<u>2.5 Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην σουμοϋλίωση</u>	<u>44</u>
<u>2.6 Καλλιέργεια κυττάρων Cos1:</u>	<u>45</u>
<u>2.7 Μετασηματισμός των Cos1 κυττάρων:</u>	<u>45</u>
<u>2.8 Ποσοτική ανάλυση λουσιφεράσης:</u>	<u>47</u>
<u>2.9 Πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης (IP) και ανάλυση Western:</u>	<u>48</u>
<u>2.10 Υπολογιστική προσέγγιση της σουμοϋλίωσης σε SOXB πρωτεΐνες</u>	<u>51</u>
<u>Αναφορές</u>	<u>52</u>

Περίληψη:

Τα γονίδια Sox (Sry-type HMG box) κωδικοποιούν μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στην λήψη αποφάσεων που σχετίζονται με την κυτταρική εξειδίκευση και κατέχουν μια HMG (high mobility group) περιοχή μέσω της οποίας προσδένονται στο DNA. Απαντώνται σε όλα τα μετώπα και εκφράζονται σε κρίσιμες φάσεις της εμβρυϊκής ανάπτυξης και ομοιόστασης. Το *Sox2* είναι μέλος της ομάδας SoxB1 και εκφράζεται στο στάδιο του μωριδίου, της βλαστοκύστης, του επιβλάστη και αργότερα στους νευρικούς ιστούς και τα αισθητικά επιθήλια. Είναι γνωστό ότι ο *Sox2* δρα συνεργιακά με τον παράγοντα Oct4 στην μεταγραφική ρύθμιση πολλών γονιδίων, όπως το *Nanog*, *Bmi1*, και *Pax6*. Εντούτοις, παραμένουν ακόμα άγνωστες οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον Sox2 κατά την γαστριδιοποίηση. Στην παρούσα εργασία, έχουμε πραγματοποιήσει ανάλυση δύο υβριδίων, ώστε να ταυτοποιήσουμε τις πρωτεΐνες «συνεργάτες» του Sox2 κατά την γαστριδιοποίηση.

1 Εισαγωγή:

Τα βλαστικά κύτταρα είναι ένα ξεχωριστός τύπος κυττάρων που έχουν μια μοναδική ικανότητα να αυτό-ανανεώνονται και να δίνουν γένεση σε εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους. Αν και τα περισσότερα κύτταρα του σώματος, όπως τα καρδιακά ή τα κύτταρα του δέρματος, είναι διαφοροποιημένα ώστε να διεξάγουν μια εξειδικευμένη λειτουργία, το βλαστικό κύτταρο είναι και παραμένει αδιαφοροποίητο, έως ότου λάβει ένα «μήνυμα» να αναπτυχθεί σε εξειδικευμένο κύτταρο. Η ικανότητα πολλαπλασιασμού συνδυασμένη με την δυνατότητα τους να εξειδικευτούν κάνει τα βλαστικά κύτταρα μοναδικά. Ερευνητές που ασχολούνται με την αναπτυξιακή βιολογία του ανθρώπου έχουν μελετήσει την αναπτυξιακή βιολογία των ζώων για πολλά χρόνια.

Αυτή η έρευνα απέφερε μια πρώτη γνωριμία με μια τάξη βλαστικών κυττάρων τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο του σώματος. Αυτή η τάξη των βλαστικών κυττάρων καλείται πλειοδύναμη, εννοώντας ότι αυτά τα κύτταρα έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν σε σχεδόν όλους από τους >200 διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Αυτά τα βλαστικά κύτταρα είναι στην πραγματικότητα, ικανά να διαφοροποιηθούν σε σχεδόν όλα τα εξειδικευμένα κύτταρα του σώματος και συνεπώς, υπάρχει η πιθανότητα να αναγεννηθούν κύτταρα για ένα ευρύ φάσμα ιστών και οργάνων, όπως η καρδιά, το πάγκρεας και το νευρικό σύστημα. Συμπερασματικά, αυτή η τάξη των ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων προσφέρει την δυνατότητα της διόρθωσης ή αντικατάστασης κυττάρων ή ιστών, οι οποίοι είναι τραυματισμένοι ή κατεστραμμένοι. Σήμερα, οι θεραπείες για τραυματισμούς στον εγκέφαλο ή την σπονδυλική στήλη αποσκοπούν εκ των πλείστων στην εξασθένηση των συμπτωμάτων και στον περιορισμό περαιτέρω βλάβης. Όμως πρόσφατες έρευνες των μηχανισμών αναγέννησης του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), συμπεριλαμβανομένης της ανακάλυψης βλαστικών κυττάρων σε εγκέφαλο ενηλίκων τα οποία μπορούν να δώσουν γένεση σε νέους νευρώνες και νευρικά βοηθητικά κύτταρα, έχουν δώσει ελπίδες ότι οι ερευνητές μπορούν να βρουν τρόπους να επισκευάσουν βλάβες του ΚΝΣ. Η έρευνα βλαστικών κυττάρων σε ασθένειες του ΚΝΣ είναι ένας από τους λίγους κλάδους όπου υπάρχουν στοιχεία ότι η θεραπεία μέσω κυτταρικής αντικατάστασης μπορεί να επαναφέρει την χαμένη λειτουργία.

1.1 Πώς ένα μοναδικό κύτταρο—το γονιμοποιημένο ωάριο—δίνει γένεση σε έναν περίπλοκο, πολυκύτταρο οργανισμό;

Η ερώτηση αντικατοπτρίζει ένα από τα μεγαλύτερα μυστήρια της ζωής και αναπαριστά μια θεμελιώδη πρόκληση στην αναπτυξιακή βιολογία. Μέχρι στιγμής, η γνώση μας για την διαδικασία με την οποία το γονιμοποιημένο ωάριο διαιρείται (αυλάκωση), σχηματίζει μία σφαίρα από κύτταρα (μορίδιο), αναπτύσσει μια κοιλότητα (στάδιο βλαστοκύστης), σχηματίζει τα τρία αρχικά στρώματα κυττάρων, τα οποία τελικά θα δώσουν γένεση σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του σώματος (στάδιο γαστριδίου) και τελικά δημιουργεί όλους τους εξειδικευμένους ιστούς και τα όργανα ενός πλήρους ανεπτυγμένου οργανισμού, είναι πολύ περιορισμένη. Λιγοστά είναι τα στοιχεία που υπάρχουν για τα γονίδια που ρυθμίζουν αυτά τα πρώιμα στάδια ή το πώς οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων ή το πώς οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις με άλλους παράγοντες στο τρισδιάστατο περιβάλλον ενός εμβρύου επηρεάζουν την ανάπτυξη. Η διαδικασία κατά την οποία το γονιμοποιημένο ωάριο γίνεται έμβρυο, η οποία καλείται εμβρυογένεση, περιλαμβάνει συγχρονισμένες κυτταρικές διαιρέσεις, κυτταρική διαφοροποίηση, κυτταρική μετανάστευση και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Gilbert, S.F. 2000).

Είναι γενικά δύσκολο να προσδιορίσουμε τα γονίδια και τους παράγοντες που επηρεάζουν *in vivo* τα πρώιμα στάδια στην ανάπτυξη των θηλαστικών: διατηρούν την αδιαφοροποίητη, πολλαπλασιαστική φάση της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (EKM, inner cell mass) ή των κυττάρων του επιβλάστη, ρυθμίζουν την εμφύτευση και κατευθύνουν την διαφοροποίηση των κυττάρων μέσω ειδικών αναπτυξιακών μονοπατιών, ή κυτταρικών σειρών. Το έμβρυο από μόνο του είναι πολύ μικρό και *in vivo* είναι σχεδόν απλησίαστο για μελέτη. Επομένως, πολλές από τις γενετικές και μοριακές επιρροές που είναι αυτή την στιγμή γνωστές στο να ρυθμίζουν την πρώιμη εμβρυογένεση *in vivo* προσδιορίστηκαν μελετώντας εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού *in vitro*. Για παράδειγμα, ο Oct4 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος έχει ταυτοποιηθεί ως γενετικός δείκτης αδιαφοροποίητων κυττάρων. Είναι απαραίτητος για την διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (EKM) και του επιβλάστη. Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν τον Oct4 έχουν διεξαχθεί σε έμβρυα ποντικού και εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Ο Oct4 εκφράζεται στο ωοκύτταρο ποντικού, εξαφανίζεται κατά την διάρκεια της πρώτης αυλάκωσης του ζυγωτού και επανεμφανίζεται στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων του εμβρύου όπου το γένωμα του

Undifferentiated state marker	Mouse	Human
<i>Cell-surface and nuclear antigens</i>		
SSEA1	+	-
SSEA3/4	-	+
TRA1-60/81	-	+
TRA2-54	-	+
GCTM-2	-	+
TG343§	?	+
TG30	?	+
CD9	+	+
CD133/prominin	+	+
OCT4	+	+
NANOG	+	+
SOX2	+	+
<i>Enzymatic activities</i>		
AP	+	+
Telomerase	+	+
<i>In vitro culture requirements</i>		
Feeder-cell dependent	+	+
LIF dependent	+	-
FGF4	+	-
<i>Growth characteristics</i>		
Ability to form trophoblast	-	+
Teratoma formation <i>in vivo</i>	+	+
Growth characteristics <i>in vitro</i>	Form tight, rounded, multi-layer clumps; can form EBs	Form flat, loose aggregates; can form EBs
Ability to form germ cells <i>in vitro</i>	+	NR

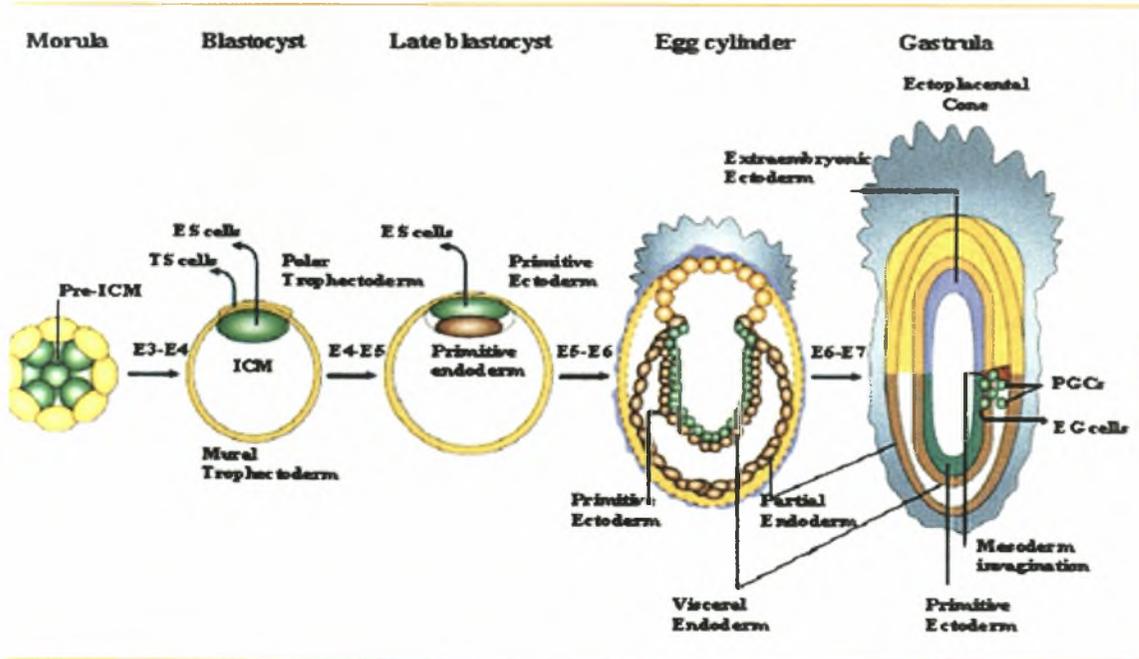
Πίνακας 1: Γενετικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Michele Boiani et al. *Nature Reviews Mol. Cell Biol* 2005)

ζυγωτού αρχίζει να ρυθμίζει την ανάπτυξη του εμβρύου. Η έκφραση του Oct4 παραμένει σταθερή στην ΕΚΜ της βλαστοκύστης, αλλά δεν λαμβάνει χώρα στα διαφοροποιημένα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος ούτε σε άλλους διαφοροποιημένους κυτταρικούς τύπους που εμφανίζονται μετά την γαστριδιοποίηση στον ποντικό.

Το γονίδιο για τον Oct4, το *Pou5f1*, εκφράζεται σε αρχέγονα γαμετικά κύτταρα, είναι μέλος της τάξης 5 της POU οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων (από Pit, Oct και Unc), οι οποίοι δεσμεύονται σε αλληλουχίες εκκινητών ή ενισχυτών στο DNA. Αυτές οι πρωτεΐνες ρυθμίζουν την μεταγραφή γονιδίων. Ο μεταγραφικός παράγοντας Oct4 μπορεί να ενεργοποιήσει ή να καταστείλει την γονιδιακή έκφραση: δεσμεύεται στο DNA σε κάποια απόσταση από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Για αυτό το λόγο, ανάλογα με το γονίδιο στόχο, μπορεί να απαιτείται η παρουσία πρωτεϊνών συν-ενεργοποιητών, όπως ο *Sox2* μεταγραφικός παράγοντας. Ένας στόχος

του Oct4 κατά την εμβρυογένεση του ποντικού είναι το γονίδιο *Fgf4*. το οποίο κωδικοποιεί τον ινοβλαστικό αυξητικό παράγοντα 4 (FGF-4), μια αυξητική πρωτεΐνη που συνεκφράζεται με τον Oct4 στην ΕΚΜ και τον επιβλάστη. Ο FGF-4 είναι παρακρινής παράγοντας, εννοώντας ότι απελευθερώνεται από έναν τύπο κυττάρου και δρα σε έναν άλλο. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, ο FGF-4 απελευθερώνεται από την πολλαπλασιαζόμενη ΕΚΜ και δρα στο περιβάλλοντα τροφοεξώδερμα. Ο FGF-4 μπορεί επίσης να δράσει ως αυτοκρινές σήμα, εννοώντας ότι μπορεί να επηρεάσει τον ίδιο τύπο κυττάρων από τον οποίο παράγεται. Σειρά πρόσφατων πειραμάτων υποδεικνύει ότι τα επίπεδα της έκφρασης του Oct4 καθορίζουν την διαφοροποίηση και την πορεία ανάπτυξης των βλαστικών κυττάρων.

Figure1: Προέλευση των βλαστικών κυττάρων στο αναπτυσσόμενο έμβryo θηλαστικού.
(*Michele Boiani et al. Nature Reviews Mol. Cell Biol 2005*)



Πίνακας 2: Ιδιότητες των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων.

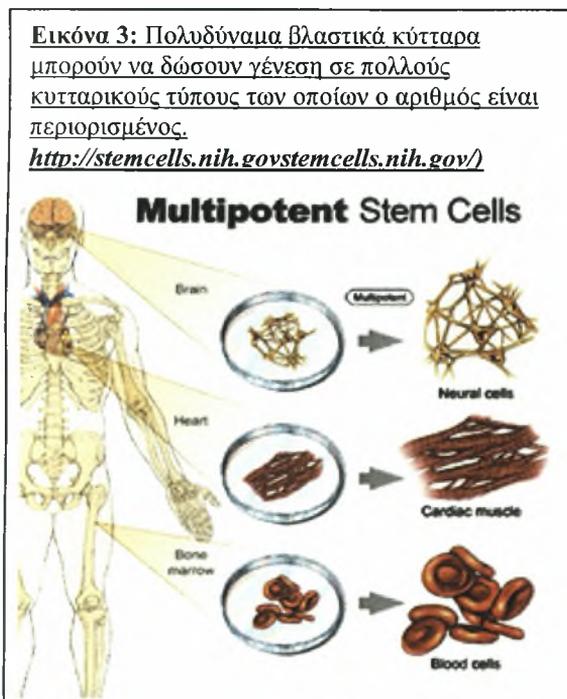
Derived from the inner cell mass/epiblast of the blastocyst.
Capable of undergoing an unlimited number of symmetrical divisions without differentiating (long term self-renewal).
Exhibit and maintain a stable, full (diploid), normal complement of chromosomes (karyotype).
Pluripotent ES cells can give rise to differentiated cell types that are derived from all three primary germ layers of the embryo (endoderm, mesoderm, and ectoderm).
Capable of integrating into all fetal tissues during development. (Mouse ES cells maintained in culture for long periods can still generate any tissue when they are reintroduced into an embryo to generate a chimeric animal.)
Capable of colonizing the germ line and giving rise to egg or sperm cells.
Clonogenic, that is a single ES cell can give rise to a colony of genetically identical cells, or clones, which have the same properties as the original cell.
Expresses the transcription factor Oct-4, which then activates or inhibits a host of target genes and maintains ES cells in a proliferative, nondifferentiating state.
Can be induced to continue proliferating or to differentiate.
Lacks the G1 checkpoint in the cell cycle. ES cells spend most of their time in the S phase of the cell cycle, during which they synthesize DNA. Unlike differentiated somatic cells, ES cells do not require any external stimulus to initiate DNA replication.
Do not show X inactivation. In every somatic cell of a female mammal, one of the two X chromosomes becomes permanently inactivated. X inactivation does not occur in undifferentiated ES cells.

1.2 Ολοδύναμα, πλειοδύναμα και πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα:

Κατά την στιγμή της γονιμοποίησης, όταν το σπέρμα και το ωάριο ενώνονται, το κύτταρο που παράγεται είναι ικανό να σχηματίσει έναν ολόκληρο οργανισμό. Αυτά τα κύτταρα κατηγοριοποιούνται ως ολοδύναμα, που σημαίνει ότι η δυναμικότητα του κυττάρου είναι απεριόριστη. Για ένα μικρό χρονικό διάστημα, κάθε κυτταρική διαίρεση δημιουργεί ταυτόσημα ολοδύναμα κύτταρα. Κάθε ένα από τα κύτταρα που σχηματίζεται κατά την διάρκεια των πρώτων ωρών μετά την γονιμοποίηση μπορεί να τοποθετηθεί στην μήτρα του θηλυκού και να αναπτυχθεί σε έμβryo. Κατά την τέταρτη ημέρα, τα ολοδύναμα κύτταρα αρχίζουν να εξειδικεύονται, σχηματίζοντας μια βλαστοκύστη ή μια δέσμη κυττάρων. Το εξωτερικό στρώμα των κυττάρων

σχηματίζει τον πλακούντα και άλλους ιστούς στην μήτρα που απαιτούνται για την ανάπτυξη του εμβρύου. Αν και τα κύτταρα της ΕΚΜ της βλαστοκύστης θα σχηματίσουν ουσιαστικά κάθε τύπο ιστού στο σώμα, δεν μπορούν να δώσουν γένεση στον πλακούντα ή άλλους υποστηρικτικούς ιστούς της μήτρας. Συνεπώς, είναι ανέκδοτα να σχηματίσουν από μόνα τους έναν οργανισμό αν τοποθετηθούν στην μήτρα του θηλυκού και για αυτό αναφέρονται ως πλειοδύναμα. Όσο τα πλειοδύναμα κύτταρα συνεχίζουν να διαφοροποιούνται, γίνονται κύτταρα που μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη συγκεκριμένων ιστών. Μερικά θα οδηγήσουν σε μυελό των οστών, ενώ άλλα σε αίμα ή δέρμα. Τα βλαστικά κύτταρα που κατέχουν αυτήν τη επιπλέον εξειδίκευση καλούνται πολυδύναμα. Είναι πλήρως κατανοητό ότι τα πολυδύναμα κύτταρα διαθέτουν ένα ζωτικό ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου, παρόλα αυτά, πολυδύναμα κύτταρα μπορούν να ανιχνευθούν καθ' όλη την πορεία της ενήλικης ζωής (εικόνα 3). Αν και συνήθως βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες, τα βλαστικά κύτταρα ενηλίκων κατέχουν κρίσιμο ρόλο στην διατήρηση της ζωής. Για παράδειγμα, τα ερυθρά κύτταρα συνεχώς αντικαθίστανται και η παράγωγή νέων ερυθροκυττάρων αρχίζει από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Ουσιαστικά κάθε λειτουργία του σώματος που απαιτεί αύξηση περιλαμβάνει την συμμετοχή βλαστικών κυττάρων.

Αναφέρθηκε μια λειτουργική σύγκριση ανάμεσα σε μοριακά καθορισμένους και κλωνικά συσχετισμένους πληθυσμούς νευρικών βλαστικών κυττάρων (NBK) και εμβρυικών βλαστικών κυττάρων (EBK), χρησιμοποιώντας τον εκκινητή του *Sox2* για απομόνωση «καθαρών» πληθυσμών. Αποκάλυψε αυτή η σύγκριση ενδιαφέροντες διαφορές στο προφίλ έκφρασης ανάμεσα στα EBK και στα NBK (Πίνακας 3).

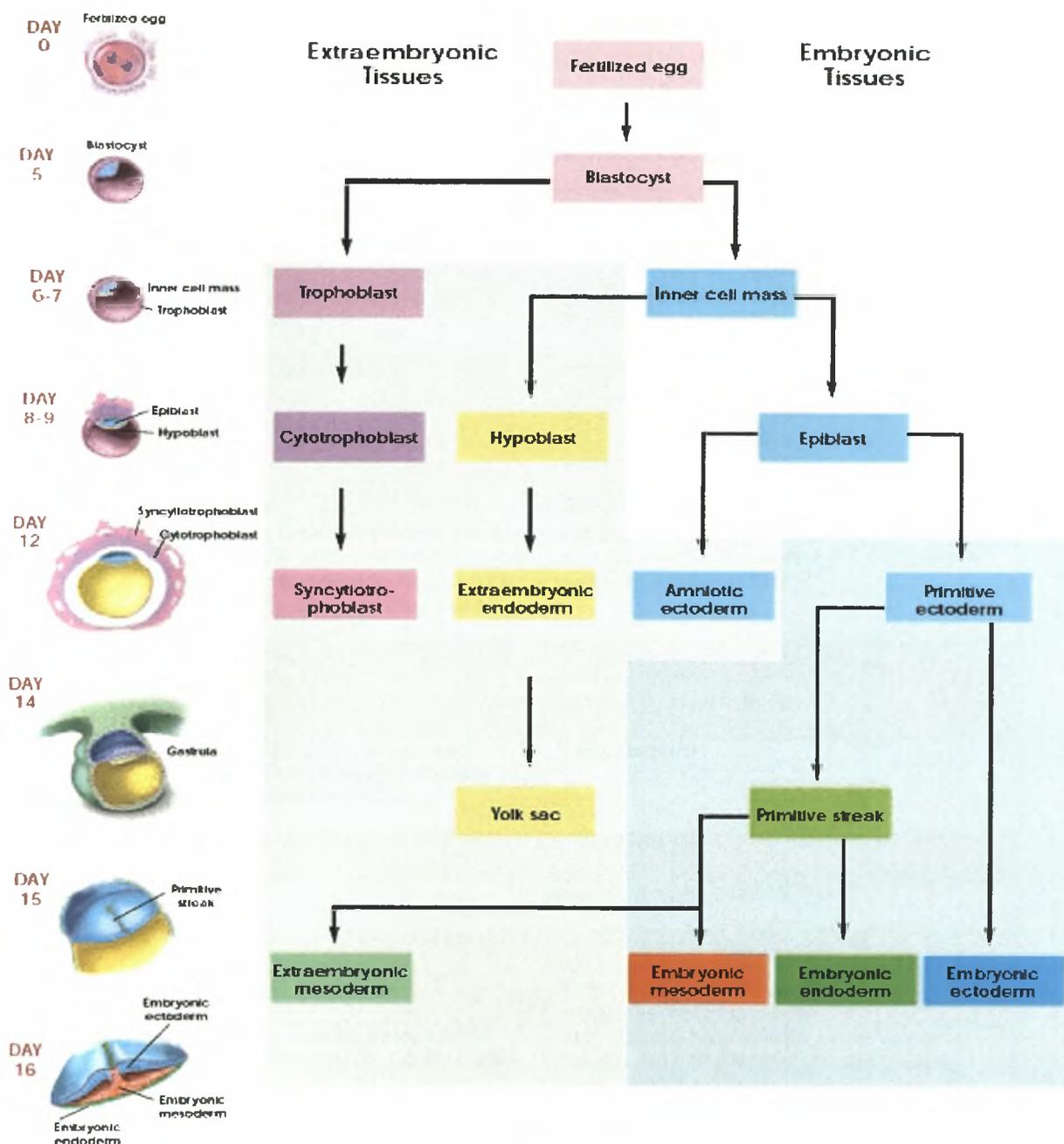


Προσδιορίστηκε ότι εκφράζονται 112 γονίδια αποκλειστικά στα EBK. Αντιστρόφως, υπάρχουν 158 γονίδια που εκφράζονται αποκλειστικά στα NBK. Αυτή η άμεση σύγκριση διασαφηνίζει την μοριακή βάση των λειτουργικών διαφορών μεταξύ πλειοδύναμων και πολυδύναμων NBK. Ο *Sox2* έχει ποικίλες ιδανικές ιδιότητες ώστε να χρησιμοποιηθεί στην σύγκριση EBK και NBK. Καταρχάς, ο *Sox2* είναι στενά συνδεδεμένος με τον πλειοδύναμο φαινότυπο, επειδή εκφράζεται στα EBK και η απαλοιφή του γονιδίου στον ποντικό επιφέρει εμβρυϊκή θνησιμότητα κατά την εμφύτευση.

Επιπλέον, είναι γνωστό ότι δρα συνεργειακά με τον Oct4 σε πολλούς εκκινητές γονιδίων και ο

Oct4 πιστεύεται ότι είναι ο κύριος καθοριστής της πλειοδύναμης κατάστασης, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Δεύτερον, εκτός των πλειοδύναμων κυττάρων το *Sox2* είναι ένα νευρικά καθορισμένο γονίδιο και συνεπώς μπορεί αναμφίβολα να ταυτοποιήσει την νευρική προέλευση ενός ιστού. Τρίτον, έχει περιγραφεί μια ρυθμιστική περιοχή του *Sox2* γονιδίου, η οποία είναι ενεργή τόσο σε EBK όσο και σε πρόδρομους νευρικούς πληθυσμούς.

Εικόνα 2: Πρώιμη ανάπτυξη στον άνθρωπο (<http://stemcells.nih.gov>)



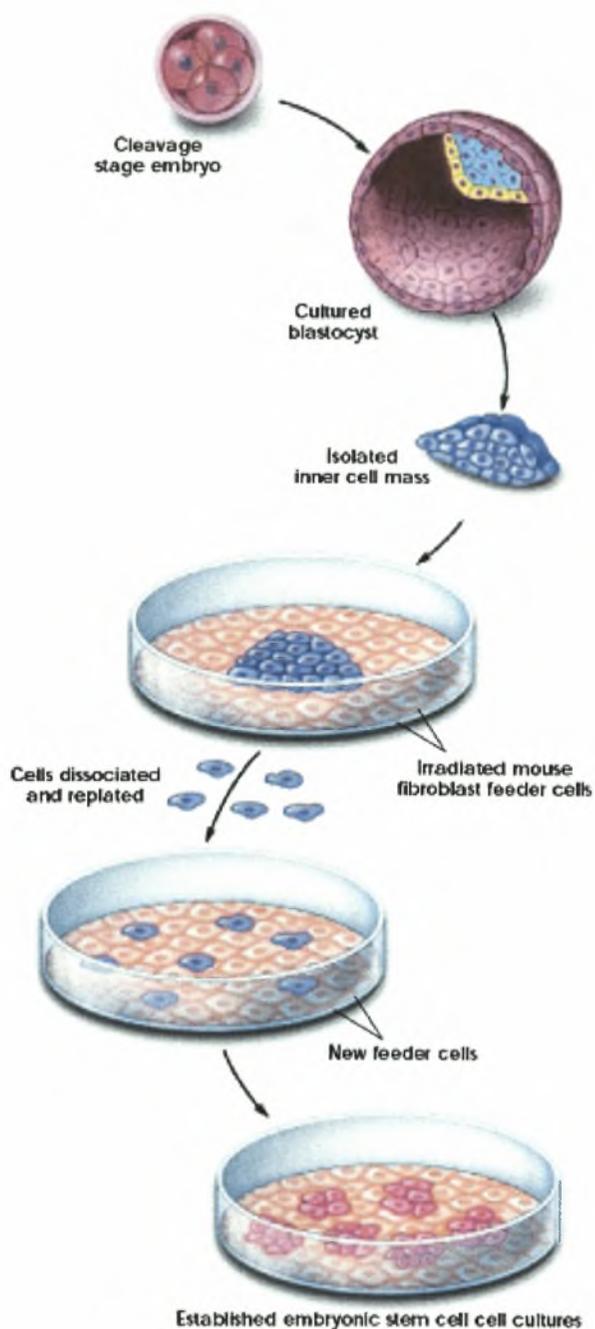
Πίνακας 3: Λίστα πλειοδύναμων και πολυδύναμων γονιδίων σε λειτουργικές κατηγορίες (Kevin A. D'Amour et al. PNAS 2003)

Category	<i>n</i> = 112 Pluripotent-specific	<i>n</i> = 158 Multipotent-specific
Transcriptional regulation	<i>Oct4, Utf1, Rex1/2, Klf2/5, Nr0b1, Ctr1, Pem, Stat6, Tcf7/15, Rarg, E1f2, Trim25, Tcea3, Aire, Gbx2,</i>	<i>Foxg1, Nr2f1, Myt1, Zic1, Sox3_4_11, Bm1_4, Mash1, Hes5, Hey1, Dlx1, Cut1, Cbx4, ArxGtf2h1, Jun, Lmyc1, Id4, mKF1</i>
Chromatin modulation	None detected	<i>Sirt2, ESTs highly similar to Snf2a</i>
RNA binding	<i>Esg1, Rbms1, Daz1,</i>	<i>RbmX, Cugbp2, ESTs moderately similar to Rbm4</i>
Growth factors	<i>Fgf4, Tdgf1, Ebf, Gdf3 2 Pleiotropin, Igfbp5 Receptors</i>	<i>F2r11 (thrombin R-like 1), Sdf2, Folate R1, EphA2, Tacstd18 Fgf2, Notch1, Gpr56, Ptpa_g_o_z, ESTs highly similar to thyroid hormone R alpha</i>
Transporters	None detected	<i>Bibp, Fabpe, Syt11, GluR-B (and splice variant), Gria2, Grik5, Clcn4-2, Kcnk2, Boct</i>
Kinases and phosphatases	<i>Jak3, Hck, ESTs moderately similar to dual specificity kinase, Inpp5d</i>	<i>Jak2, Ddr1, Hipk2, Tesk1, Ptk1, Snrk, Ptpn9, ESTs highly similar to PKC-ν, PTK, and PP2A-β</i>
Cell cycle	<i>Mkm3, Stag3, Gste1</i>	<i>cyclin D2, p21 activated kinase 3, Nfia_x, Gas1, Gadd45g, Septin 5, ESTs highly similar to Rgc32 and candidate mediator of p53-dependent G2 arrest</i>
Other signaling molecules	<i>Ptch2, Upp, Annexin 1_11, Cish3, Serpine1, Gjb3, Spint1, Tfp1, Ajs2, Ndr1, Ly75, Caplpactin (Calgizzarin), ESTs highly similar to Rsg5, ESTs moderately similar to interferon</i>	<i>Smo, Fzd2, Delta-like 1, Itgp, Pea15, Rgs2, Rab11a, Arhn, Doublecortin, Dab1, Pkia, Edr2, adenylate cyclase 6, Apha2_b1, ESTs highly similar to Zfp289_B7-H3</i>
Metabolism	<i>Slc2a3_7a3_7a7_27a2_29a1_38a4, Gfpt2, Pfkp, Cox7a1, Apoc1, Ddc, ESTs moderately similar to Slc39a4</i>	<i>Scp2, Pam, aSMase, Pafah1b2, dihydropyrimidinase-like (Dpysf) 3_4, ESTs moderately similar to Dpysf4</i>
Cytoskeleton	<i>Acta2, Tuba3, CD2-associated protein, Epb4, 114a, ESTs highly similar to Desmoyokin</i>	<i>Kif3a, Gephrit</i>
Toxic response	<i>Mdr1, Ephx2</i>	None detected
Vesicle traffic	<i>Stx3</i>	<i>Nsg1/2, Secretogranin 3, Sgne1</i>
Other	<i>B3gnt1, Fbxo15, Eif1a, Pcoice, Crip, Col18a1, Nidogen</i>	<i>B4gal2, Efnb1, Gdap1, Psap, Mfap2, UbA, ESTs highly similar to Ubp3, ESTs moderately similar to Stnp, ESTs weakly similar to protein disulfide isomerase</i>
Unknown	<i>Bcl3, Tcf1, Trap1a, Stra8, Mov10, Esau protein, Tex19, Tex20, Tcstv1, two EST clusters highly similar to Tcstv1, ESTs highly similar to CGI-83, ESTs moderately similar to Plackophilin2_NDP52_DC12, ESTs weakly similar to WAP, seven EST</i>	<i>Fjx1, Gpm6b, Neuroanatin, Lrrn1, Mpdz, Pard6a, Tm4sf2_sf6, Sez6_17, Aig1, Edp1, Lmo1, Sshp2, UGS148 protein, Eig180, Rnf42, ESTs highly similar to Tetraspan met2_Ptpz_KIAA0871_FLJ12750_MGC11034, ESTs weakly similar to Mucin2_Elastic</i>

1.3 Πειραματικά συστήματα που χρησιμοποιούνται για την μελέτη της εμβρυογένεσης:

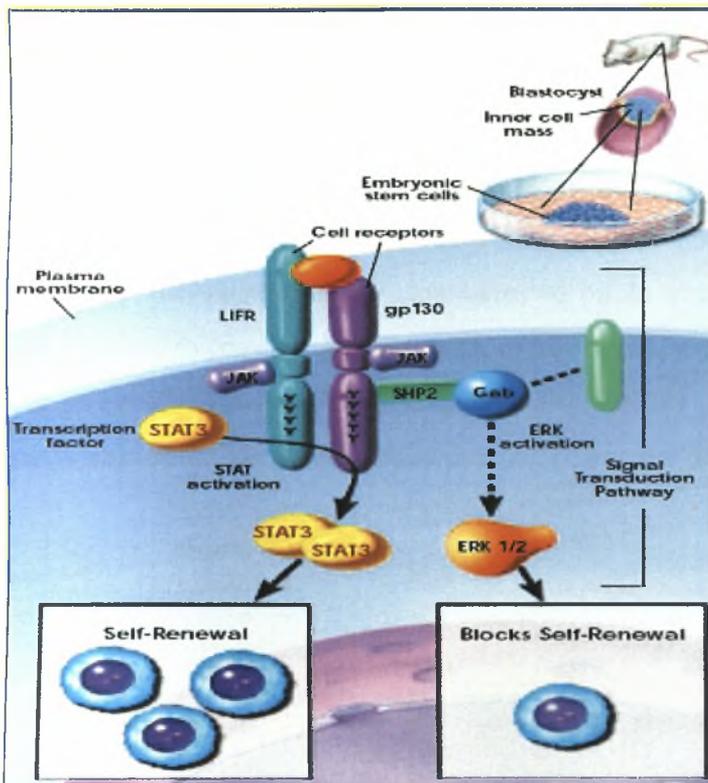
Έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά είδη πειραματικών συστημάτων για να κατανοηθεί το πως ένα γονιμοποιημένο ωάριο παράγει βλαστοκύστη, η πρώτη δομή κατά την οποία λαμβάνει χώρα κάθε κυτταρική εξειδίκευση, και το γαστρίδιο όπου εμφανίζονται τα τρία εμβρυικά στρώματα — ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα (εικόνα 2). Αυτά περιλαμβάνουν πειράματα σε κύτταρα μαγιάς, ασπόνδυλα, όπως *tinny*, *Caenorhabditis elegans*, και η μύγα των φρούτων *Drosophila melanogaster* και σπονδυλωτά, όπως αμφίβια (*Xenopus laevis*), έμβρυα **κοτόπουλου** και πιο πρόσφατα, **zebrafish** *Danio rerio*, τα οποία έχουν διάφανα αυγά και υπάρχει δυνατότητα λεπτομερούς παρακολούθησης της κυτταρικής διαφοροποίησης και της μετανάστευσης κατά την ανάπτυξη. Η πλειονότητα των μελετών σε θηλαστικά έχει πραγματοποιηθεί στα ποντίκια. Η ανάπτυξη στα ποντίκια διαφέρει σε πολλές σημαντικές απόψεις με αυτή του ανθρώπου. Για παράδειγμα, η εμβρυϊκή ανάπτυξη στα ποντίκια διαρκεί από 18 έως 20 ημέρες, ενώ στους ανθρώπους διαρκεί 9 μήνες. Ο πλακούντας σχηματίζεται και έχει διαφορετικές λειτουργίες ανάμεσα στα δυο είδη. Στους ανθρώπους, μετά την εμφύτευση στην μήτρα του θηλυκού αναπτύσσεται ένας εμβρυϊκός δίσκος, ενώ στα ποντίκια σχηματίζεται ένα κυλινδρικό αυγό. Ο λεκιθικός σάκος ενός εμβρύου ποντικού είναι λειτουργικός καθ' όλη την διάρκεια της κύησης, ενώ στους ανθρώπους μόνο κατά την πρώιμη εμβρυογένεση. Άλλες πηγές πληροφοριών για την ανάπτυξη του ανθρώπου περιλαμβάνουν *in vitro* μελέτες σε εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα (EKK) και ιστολογικές τομές ανθρώπινων εμβρύων.

Εικόνα 3: Στάδια κατά τα οποία λαμβάνονται από έμβryo βλαστικά κύτταρα
(<http://stemcells.nih.gov>)



1.4 Σηματοδότηση στα Εμβρυϊκά Βλαστικά Κύτταρα:

Τα EBK ποντικού μπορούν να παραμείνουν στην φάση πολλαπλασιασμού και μη διαφοροποίησης *in vitro* καλλιερώντας τα σε στρώματα από MEL υποβοηθητικά κύτταρα. Εναλλακτικά, της καλλιέργειας σε MEL κύτταρα είναι η προσθήκη στο μέσο ανάπτυξης του ανασταλτικού παράγοντα λευκαϊμίας (LIF), ενός μέλους της οικογένειας των κυτοκινών που σχετίζονται με την ιντερλευκίνη 6. Ο LIF παράγεται από υποβοηθητικά κύτταρα και παρουσία του τα EBK ποντικού συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται *in vitro* χωρίς να διαφοροποιούνται. Ο LIF ασκεί τις επιδράσεις του προσδεδεμένος σε έναν διμερή διαμεμβρανικό υποδοχέα που αποτελείται από τον υποδοχέα του LIF και τον gp130 υποδοχέα. Η πρόσδεση του LIF προκαλεί ενεργοποίηση του υποβόσκων μεταγραφικού παράγοντα STAT3. Ο STAT3 και ο Oct4 πιθανόν αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν την λειτουργία μιας κοινής ομάδας γονιδίων στόχων.



Εικόνα 4: Το LIF-STAT3 μεταδοτικό μονοπάτι προωθεί την αυτό-ανανέωση των EBK. ([http://http://stemcells.nih.gov/](http://stemcells.nih.gov/))

Έχουν ταυτοποιηθεί και άλλοι παράγοντες αυτό-ανανέωσης, εκτός από την gp130 κυτοκίνη. Η αυτό-ανανέωση ανθρωπίνων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων φαίνεται να μην διατηρείται μόνο από το LIF. Τέλος, η σηματοδότηση μέσω του gp130 δεν είναι απαραίτητη για τα πλειοδυναμικά κύτταρα στο έμβryo του ποντικού, και αυτό γιατί παρατηρείται η γαστριδιοποίηση και οργανογένεση στα knockout ποντίκια. Απαίτηση για gp130 παρατηρείται μόνο όταν καθυστερείτε η προγραμματισμένη εμφύτευση του εμβρύου. Έτσι το μονοπάτι του gp130 παρέχει μια μη αναγκαία λειτουργία *in vivo*, και δεν είναι θεμελιώδεις για την πλειοδυναμία..

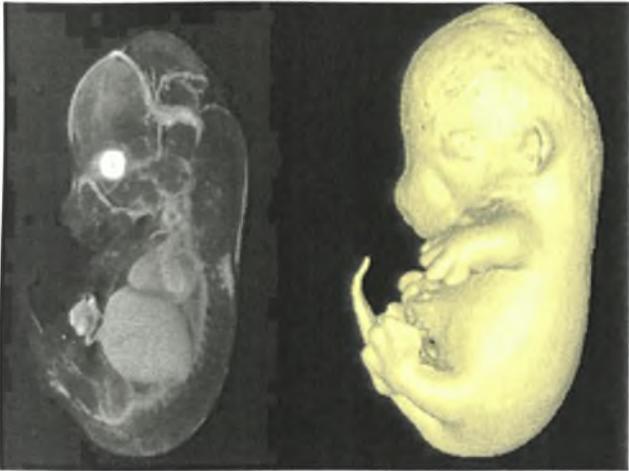
Πρόσφατες μελέτες καθορίζουν νέους παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρολό στην μεταγραφική ειδικότητα του φαινοτύπου EBK του ποντικού.

Η NANOG είναι μια πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Διαθέτει μια ομοιοτική περιοχή, γεγονός που την καθιστά υποψία για μεταγραφικό παράγοντα και εκφράζεται συγκεκριμένα σε πλειοδύναμα κύτταρα την εμβρύων ποντικού, πιθήκου και ανθρώπου πριν την εμφύτευση, σε EBK, σε EG κύτταρα. Μια κρίσιμη λειτουργία για το *Nanog* —η διατήρηση της πλειοδυναμίας— προτάθηκε λόγω της απώλειας πλειοδυναμίας σε *Nanog*-ανεπαρκή EBK και σε *Nanog*-null έμβρυα αμέσως μετά την εμφύτευση. Επιπροσθέτως, υπέρ-έκφραση του *Nanog* οδηγεί σε κλωνική επέκταση των EBK μέσω του LIF-STAT3 σηματοδοτικού μονοπατιού. Συνεπώς, το *Nanog* είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της πλειοδυναμίας και της αυτό-ανανέωσης των EBK και των πρώιμων εμβρυικών κυττάρων. Εντούτοις, παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστο το πώς η ελέγχεται εξειδικευμένη έκφραση του *Nanog* σε πλειοδύναμα κύτταρα και συνδέεται με άλλα γονίδια ειδικά για τα βλαστικά κύτταρα. Πρόσφατα πειράματα καταδεικνύουν ότι εντός της περιοχής του proximal εκκινητή του γονιδίου *nanog*, βρέθηκε ένα σύνθετο *cis*-ρυθμιστικό στοιχείο Sox-Oct θεμελιώδες για την μεταγραφή του *Nanog* σε πλειοδύναμα κύτταρα. Αυτές οι μελέτες διευρύνουν την κατανόησή μας για το πλειοδύναμο δίκτυο ρύθμισης, όπου το σύμπλοκο *Sox2/Oct4* βρίσκεται στην κορυφή της ιεραρχίας. Με ανάλυση γονιδιακών περιοχών βρεθήκαν εντυπωσιακά αποτελέσματα, τα οποία καταδεικνύουν ότι το *Nanog* μαζί με το *Sox2* και το *Oct4* συνεργάζονται στενά σε σημαντικό αριθμό των γονιδίων στόχων —σημαντικών για την ανάπτυξη. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν μια δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των παραγόντων και προσφέρουν μια εικόνα για την ρύθμιση της μεταγραφής στα EBK.



Εικόνα 5: Σύνθετο sox-oct *cis*-ρυθμιστικό στοιχείο θεμελιώδες για την μεταγραφή του *Nanog* σε πλειοδύναμα κύτταρα. (*Takao Kuroda et al. Mol and Cell Bio 2005*)

1.5 Ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και βλαστικά κύτταρα:



Εικόνα 6: 14 ημερών έμβρυο ποντικιού (www.emap.com)

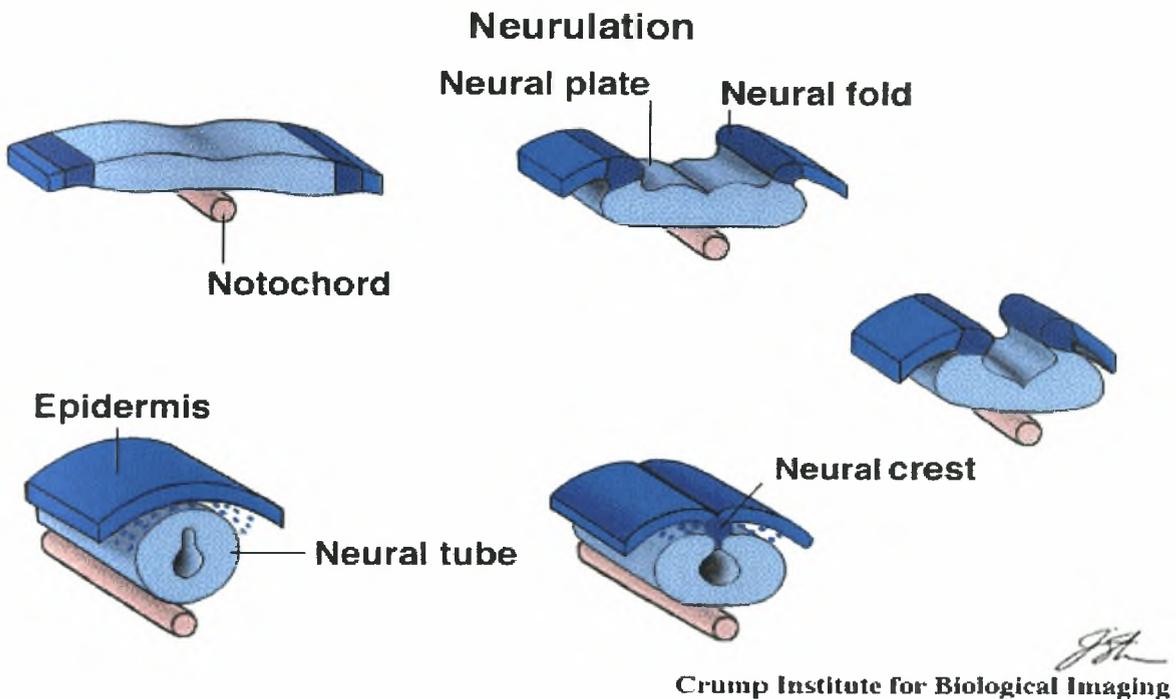
Το νευρικό σύστημα των σπονδυλωτών μπορεί να χωριστεί σε Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και σε Περιφερειακό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ). Το ΚΝΣ προέρχεται από το ραχιαίο εξώδερμα, το οποίο υπό την επίδραση της υποκείμενης

νωτοχορδής και του περιβάλλοντος επιδερμικού εξωδέρματος αναπτύσσεται σε νευρική πλάκα (εικόνα 7,8). Οι επακόλουθες κυτταρικές κινήσεις και μορφολογικές αλλαγές —συνολικά γνωστές ως νευριδιοποίηση— οδηγούν στον σχηματισμό του νευρικού σωλήνα. Η μεγέθυνση και δομική επεξεργασία του νευρικού σωλήνα δίνει γένεση στον εγκέφαλο και την σπονδυλική στήλη. Το ΠΝΣ προέρχεται από την νευρική ακρολοφία, ένας ιστός που συναντάτε μόνο στα σπονδυλωτά παροδικά κατά τη εμβρυογένεση [2]. Τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας προέρχονται από το εξώδερμα μεταξύ της νευρικής πλάκας και του επιδερμικού εξωδέρματος. Η νευρική ακρολοφία υφίσταται μια μετάβαση από επιθηλιακά σε μεσεγχηματικά κύτταρα και μεταναστεύουν στο σώμα και διαφοροποιούνται σε μια ποικιλία από κυτταρικούς τύπους. Ο ρόλος των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NBK) κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης είναι καλά καθορισμένος. Δομούν τους νευρικούς ιστούς και τα όργανα δρώντας ως μια πηγή κυττάρων. Στο ΚΝΣ, μπορεί να ανιχνευθεί ενεργός πολλαπλασιασμός κυττάρων στην υποκοιλιακή ζώνη (SVZ) δίπλα στις κοιλίες του εγκεφάλου και του κεντρικού καναλιού της σπονδυλικής στήλης —όπου αδιαφοροποίητα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται.

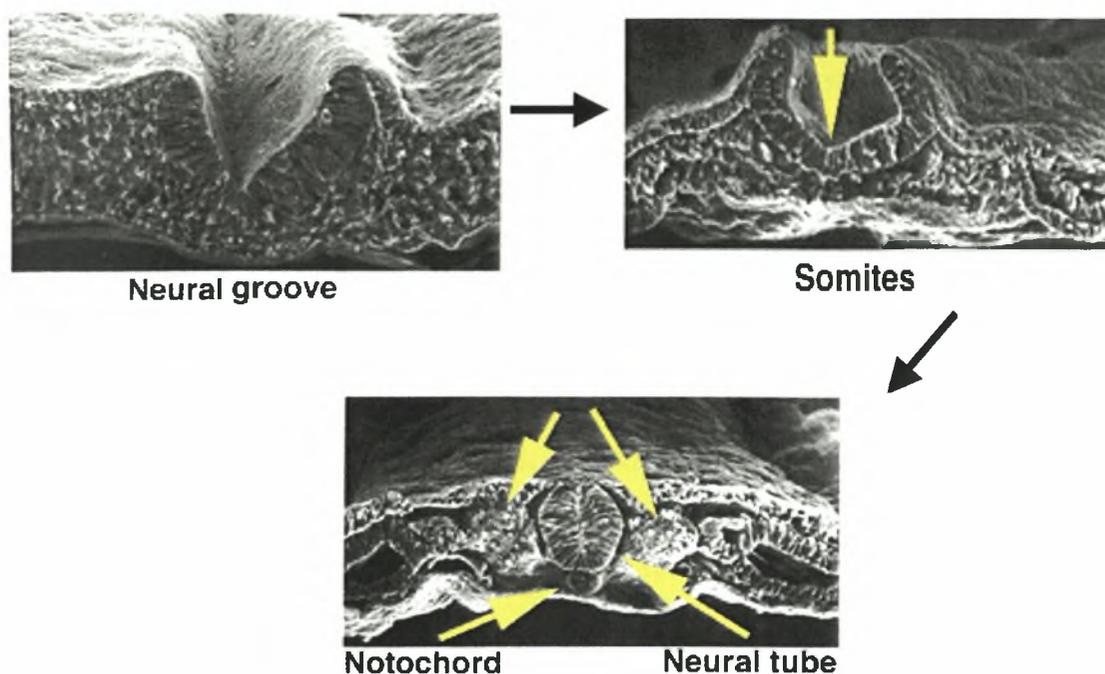
Αυτά τα κύτταρα δίνουν γένεση στους τρεις βασικούς κυτταρικούς τύπους που απαρτίζουν το ΚΝΣ: νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα. Το σχετικό μέγεθος της υποκοιλιακής ζώνης μεταξύ των περιοχών του εγκεφάλου σταδιακά μειώνετε σχετικά όπως συνεχίζεται η ανάπτυξη. Τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας συνεχίζουν να διαιρούνται μετά την αποκόλλησή τους από το εξώδερμα και μεταναστεύουν μέσω καθορισμένων μονοπατιών στην προκαθορισμένη θέση τους. Παράγουν νευρώνες και γλοιακά κύτταρα των οργάνων του ΠΝΣ, συμπεριλαμβανομένου κοιλιακά root γάγγλια, συμπαθητικά και παρασυμπαθητικά γάγγλια. Επίσης, διαφοροποιούνται σε μη-νευρικούς κυτταρικούς τύπους όπως μελανοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, ενδοκρινή κύτταρα και χονδροκύτταρα. Τα NBK πρέπει να διαθέτουν δυνατότητα αυτό-ανανέωσης και πολυδυναμία. Στο ΚΝΣ, αυτό συνεπάγεται ότι ένα βλαστικό κύτταρο μπορεί

να παράγει επιπλέον βλαστικά κύτταρα και να είναι ικανό να διαφοροποιηθεί σε νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα.

Το ενδιαφέρον για τα NBK είναι σε μεγάλο βαθμό στηριζόμενο στην ελπίδα ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτικούς σκοπούς. Υπάρχουν, όμως διάφοροι και σύνθετοι λόγοι — όπως η πηγή, η ασφάλεια, η δυνητικότητα και ηθικότητα— για την χρήση τους. Από επιστημονικής πλευράς, απαιτείται περαιτέρω πρόοδος όσο αφορά τον έλεγχο της επέκτασης τους πριν την μεταμόσχευση, συμπεριλαμβανομένου της διαφοροποίησης τους στον επιθυμητό νευρικό ή γλοιακό τύπο και της ένταξής τους στο νευρικό δίκτυο. Εν συντομία, απαιτείται να εμπλουτίσουμε τις γνώσεις μας περαιτέρω σε σχέση με τα NBK ειδικά σε μοριακό επίπεδο.



Εικόνα 7: Εγκάρσιες τομές κατά μήκος των ραγιαίων τμημάτων εμβρύων που δείχνουν πως η νευρική πλάκα σχηματίζει τον νευρικό σωλήνα (*Crump institute of biological imaging*)



Εικόνα 8: Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που δείχνουν την ανάπτυξη του νευρικού σωλήνα (*Dr. K. Tosney university of Michigan*)

1.7 Sox B1 & B2 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ:

Τα μέλη της οικογένειας *SoxB1* εκφράζονται σε πρόδρομους πληθυσμούς του αναπτυσσόμενου κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και φαινομενικά η έκφραση τους μειώνεται κατά την διάρκεια της τελικής διαφοροποίησης και της συνοδευμένης παύσης του κυτταρικού κύκλου. Τα μέλη της οικογένειας *SoxB2* επεμβαίνουν ειδικά στην *SoxB1*-εξαρτώμενη ενεργοποίηση και ως συνέπεια προωθούν την νευρογένεση στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ. Η τελική κρίση των νευρικών προδρόμων για αυτό-ανανέωση ή νευρική διαφοροποίηση εξαρτάται από τα επίπεδα των *SoxB1* and *SoxB2* πρωτεϊνών. Επάγοντας την έκφραση των *Sox21*, προνευρωνικές πρωτεΐνες επηρεάζουν αυτήν την ισορροπία και αναστέλλουν την δραστηριότητα των *SoxB1*. Σημαντικά, ακολουθώντας την πορεία ενός μοναδικού κυττάρου που εκφράζει *Sox2*, δείχθηκε ότι τουλάχιστον ο *Sox2* εκφραζόταν σε πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα τα οποία δίνουν γένεση σε νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα. Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις λειτουργίας από δύο ξεχωριστές ερευνητικές ομάδες, οι οποίες χρησιμοποίησαν ένα in ovo σύστημα έκφρασης όπου πλασμιδιακές κατασκευές έκφρασης εγχύθηκαν στο κοίλωμα της σπονδυλικής

στήλης κοτόπουλου και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροπόρωση στην μια πλευρά. Η επίπτωση της εισαγωγής Sox B1 παραγώνων εξετάστηκε συγκρίνοντας κύτταρα που ενσωμάτωσαν το πλασμίδιο (construct) με κύτταρα που δεν το ενσωμάτωσαν, συγκρίνοντας τις δύο πλευρές της σπονδυλικής στήλης (*M. Uchikawa et al. Mech. Dev. 1999*).

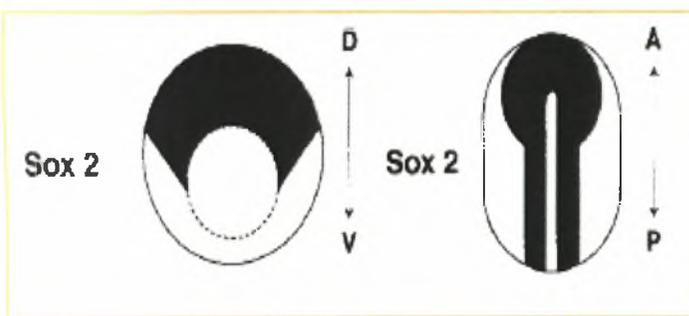
Η νευρογένεση, όπως παρατηρήθηκε από την έκφραση προνευρικών γενετικών δεικτών και δεικτών τελικής νευρικής διαφοροποίησης, αναστάληκε στα κύτταρα που εκφράζανε εξωγενή μέλη της οικογένειας SoxB1 πλήρους μεγέθους, υποδεικνύοντας ότι αυτά τα γονίδια δεν είναι απλώς γενετικοί δείκτες βλαστικών κυττάρων, αλλά αντιθέτως ενεργοί αναστολείς της νευρικής διαφοροποίησης (πίνακας1). Σημαντικά, ένα κύριο αρνητικό παράγωγο του Sox2, το οποίο δημιουργήθηκε ενώνοντας την κατασταλτική περιοχή του Engrailed μεταγραφικού παράγοντα στην HMG περιοχή του Sox2, όχι μόνο προκάλεσε πρόωρη νευρογένεση αλλά επίσης ελάττωσε σημαντικά την ενσωμάτωση BrdU. Επιπροσθέτως, η απώλεια της λειτουργίας του Sox2 μπορούσε να ανακτηθεί από τον Sox1, υποδηλώνοντας ότι ο Sox1 έχει παρόμοιες λειτουργίες και ότι και αυτοί οι δυο λειτουργούν με έναν εφεδρικό τρόπο. Συμπερασματικά, τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι τα SoxB1 γονίδια είναι κρίσιμοι καθοριστές της βλαστικότητας των νευρικών βλαστικών κυττάρων του ΚΝΣ διατηρώντας την φάση πολλαπλασιασμού και εμποδίζοντας την πρόωρη διαφοροποίηση τους σε νευρώνες (*Wenger et al Nucleic Acids Res. 1999*).

1.8 Οι γνώσεις μας για το Sox2 σε διαφορετικά μοντέλα ζώων:

Στο Xenopus, το γονίδιο *XeSox2* εκφράζεται στο νευροεξώδερμα του προχωρημένου γαστριδίου. Η έκφρασή του ρυθμίζεται από το Chd και τον BMP4. Η τρέχων γνώση μας για την μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 4 (BMP4) και τους σχετιζόμενους παράγοντες παρουσιάζει πληθώρα κενών και δεν υφίσταται μέχρι στιγμής καμία τελεσίδικη άποψη για το πώς αυτός ο παράγοντας εναρμονίζεται με το γενικό μοριακό σχήμα της πλειοδυναμίας. Όμοια του LIF, ο BMP4 θεωρείται να κατέχει βασικό ρόλο ως αντι-νευρωνικός παράγοντας του εμβρύου και η επιρροή σε καλλιέργεια EBK παρομοιάζει με αυτή του LIF, από την άποψη ότι απουσία του παρατηρείται διαφοροποίηση σε νευρώνες. Επιπρόσθετα, έμβρυα χωρίς BMP4 αναπτύσσονται πέραν της φάσης όπου τα EBK can be derived in a positive and negative manner, αντίστοιχα. Εν τούτοις, όταν ο οργανωτής του Spemann-Mangold αρχίζει να είναι λειτουργικός —στο στάδιο του πρώιμου γαστριδίου— το Sox2 παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο έκφρασης. Η έκφρασή του σε αυτό το στάδιο είναι περιορισμένη στο κοιλιακό εξώδερμα. Αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη δύο ξεχωριστών σηματοδοτικών μοντέλων για τον καθορισμό του νευροεξωδέρματος: το πρώτο είναι ήδη ενεργό κατά την πρώιμη γαστριδιοποίηση και το δεύτερο ενεργοποιείται κατά το μέσο της

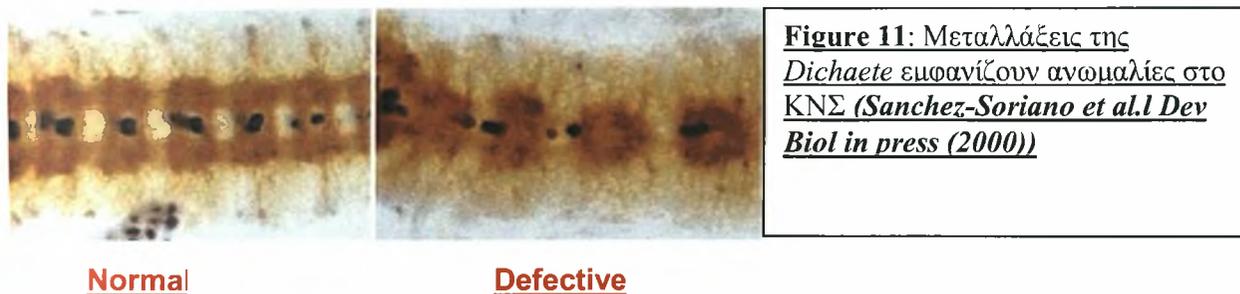
γαστριδιοποίησης. Ο *XeSox2* από μόνος του δεν είναι επαρκής ώστε να προκαλέσει νευρωνική διαφοροποίηση, αλλά δρα συνεργειακά με την FGF σηματοδότηση ώστε να αρχίσει η νευρική επαγωγή.

Αδιαφοροποίητο εξώδερμα ‘επιλεγεί’ αν θα διαφοροποιηθεί σε νεγρικό ή επιθηλιακό ιστό ανάλογα με την διαβάθμιση στην συγκέντρωση των BMP και σήματα νευρικών επαγωγέων του *Sox2* πιθανόν απαιτείται ως δευτερεύον παράγοντας στην νευρική διαφοροποίηση των πρόσθιων και οπίσθιων ιστών (*Yoshiki Sasai, Int. J. Dev. Biol 2001*)



Εικόνα 10: Έκφραση του *Sox2* στο πρώιμο εξώδερμα. Κατά τα πρώιμα στάδια της γαστριδιοποίησης (αριστερά), ο *Sox2* εκφράζεται στο κοιλιακό εξώδερμα. Στο στάδιο του νευριδίου (δεξιά), το γονίδιο εκφράζεται μέσω ενός νευρικού-καθορισμένου τρόπου. (*Yoshiki Sasai, Int J Dev Biol 2001*)

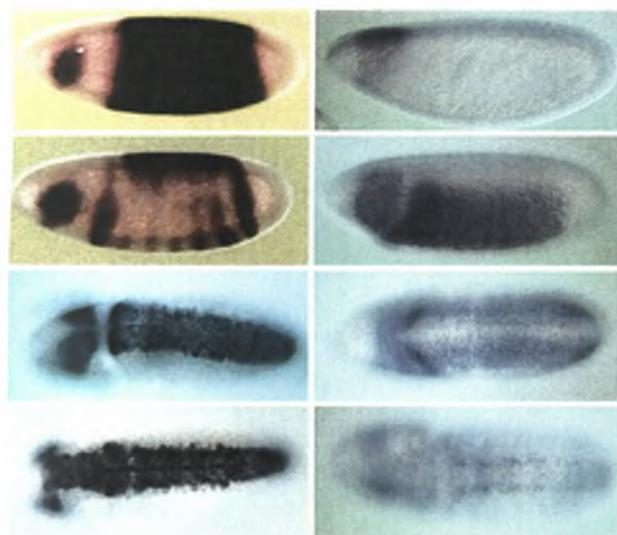
Στην *Drosophila* υπάρχουν 7 αντιπρόσωποι της οικογένειας των SOX πρωτεϊνών, *Dichaete*, *SoxNeuro*, *SOX50E*, *SOX60B*, *SOX96D*, *SOX100B*, and *SOX102D*. Η πρωτεΐνη *Dichaete* είναι μέλος της τάξης B Sox, στενά συγγενεύων με τα *Sox1* και *Sox2* των σπονδυλωτών. Οι πρωτεΐνες των θηλαστικών και της μύγας των φρούτων είναι λειτουργικά ισοδύναμες, επειδή μπορούν να αντικατασταθούν στο ΚΝΣ της μύγας. Η *Dichaete* εκφράζεται στο αναπτυσσόμενο midline, τα εξειδικευμένα μεσοεξωδερμικά κύτταρα, τα οποία διαχωρίζουν την αριστερή και την δεξιά πλευρά του νευροεξωδέρματος. Έχειδειχθεί ότι η ενδιάμεση γλοία χάνεται ή παρουσιάζει δυσμορφία σε μεταλλάξεις της *Dichaete* και αυτό οδηγεί σε διάρρηξη της φυσιολογικής δομής του εμβρυικού ΚΝΣ. Τέτοιοι φαινότυποι μπορούν να διασωθούν από το γονίδιο *Sox2* του ποντικού, προτείνοντας ότι αυτά τα γονίδια μπορεί να είναι λειτουργικά συντηρημένα. Στον ποντικό, το *Sox2* εκφράζεται νωρίς στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα με τρόπο ανάλογο με αυτόν της *Dichaete*. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι ο *Sox2* αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα Oct4. Στην *Drosophila*, βρέθηκε μια γενετική αλληλεπίδραση της *Dichaete* και POU μεταγραφικών παραγόντων.



Normal

Defective

Το SoxNeuro, επίσης γνωστό ως Sox29F, εντοπίζεται στο 2ο χρωμόσωμα. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της ομάδας B των Sox πρωτεϊνών με περιοχή πρόσδεσης στο DNA στενά συγγενική με αυτή των SOX1 and 2, όπως και της Dichaete. Ανάλυση της έκφρασης του SoxNeuro προτείνει ότι συν-εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό με την Dichaete στο ΚΝΣ. Η έκφραση του SoxNeuro ανιχνεύεται αρχικά στο στάδιο the blastoderm the entire πρόδρομου νευροεξωδέρματος (NE).



Dichaete

Sox29F

Εικόνα 12: Η Dichaete και το Sox29F συ εκφράζονται στο ΚΝΣ (Sanchez-Soriano et al. Dev Biol in press)

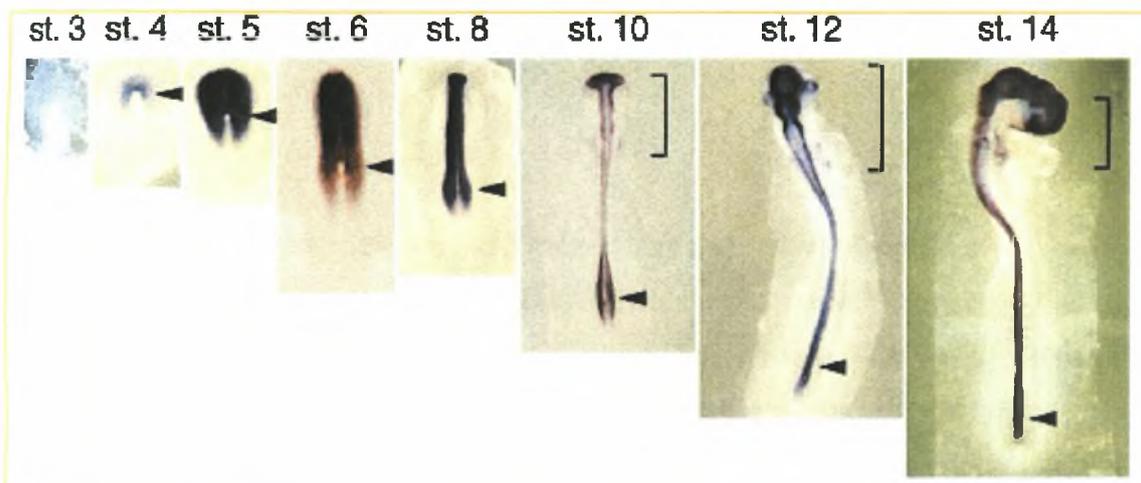
Μετά την γαστριδιοποίηση, και το SoxNeuro και η Dichaete εκφράζονται στα NE από τα στάδια 7 έως 12 καθολη την διάρκεια ανάπτυξης του νευροβλαστού (NB). Στην πραγματικότητα, ενώ το SoxNeuro εκφράζεται παντού στο νευροεξώδερμα, η Dichaete εκφράζεται μόνο στις κοιλιακές και ενδιάμεσες περιοχές των NE και στο κοιλιακό midline (εικόνα 12). Και τα δύο γονίδια συνεχίζουν να εκφράζονται στα όψιμα στάδια της εμβρυογένεσης, στον εγκέφαλο και τους νευρώνες. Η Dichaete είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό του NB στις κοιλιακές και ενδιάμεσες περιοχές, σύμφωνα με το πρότυπο

έκφρασής της. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός, ότι διπλά μεταλλάγματα για την Dichaete και την SoxN παρουσιάζουν more severe defects in ventral NBs, προτείνοντας ότι και τα δυο γονίδια δρουν μερικώς πλεονασματικά σε αυτή την περιοχή (Sanchez-Soriano et al. Dev Biol in press (2000)).

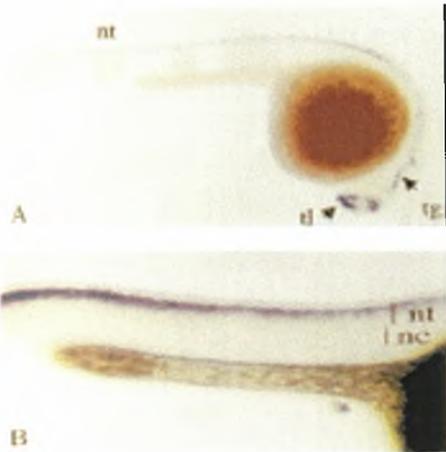
Στο Κοτόπουλο, ο Sox2 αναγνωρίστηκε ως ένας θεμελιώδης παράγοντας που ενεργοποιεί το γονίδιο της β-κρυσταλλίνης στα κύτταρα του φακού και αργότερα βρέθηκε να ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου FGF4 gene σε κύτταρα τερατοκαρκινώματος (Yuan et al., 1995).

Αναλύσεις σε πρώιμα έμβρυα αποκάλυψαν ότι ο *Sox2* εκφράζεται ευρέως στο νευρικό σύστημα του κοτόπουλου και η έκφραση του φαίνεται να σχετίζεται με την νευρική επάρκεια του εξωδέρματος.

Η έκφραση του *Sox2* σημαίνει νευρικά πρόδρομα κύτταρα σε σημαντικά στάδια της ανάπτυξης. Η έκφραση του *Sox2* στο ΚΝΣ αρχικά ενεργοποιείται από την νευρική επαγωγή που υποκινείται από σήματα του οργανωτή. Στα έμβρυα κοτόπουλου, η έκφρασή του ξεκινά στο αναπτυξιακό στάδιο 4 (st. 4) στην υποθετική εγκεφαλική νευρική πλάκα —οδοντωτή οπίσθια περιοχή, σχήματος πετάλου— που περιβάλλει τον κόμβο του Hensen (εικόνα 13). Καθώς ο κόμβος του Hensen κινείται οπίσθια, σχηματίζεται μια καινούργια περιοχή που εκφράζει *Sox2* και προστίθεται στην περιοχή όπου προηγουμένως ο *Sox2* είχε ενεργοποιηθεί (εικόνα 13, st. 5–8). Στα στάδια της νευροδιοποίησης όταν η επιφάνεια των κυττάρων που εκφράζουν *Sox2* συγκλίνει (εικόνα 13, st. 8) και σχηματίζει τον νευρικό σωλήνα, συνεχίζονται να πρωτοεμφανίζονται κύτταρα στην οπίσθια περιοχή που εκφράζουν *Sox2* (εικόνα 13, st. 8–14). (*Masanori Uchikawa, Dev. Cell, 2003*).



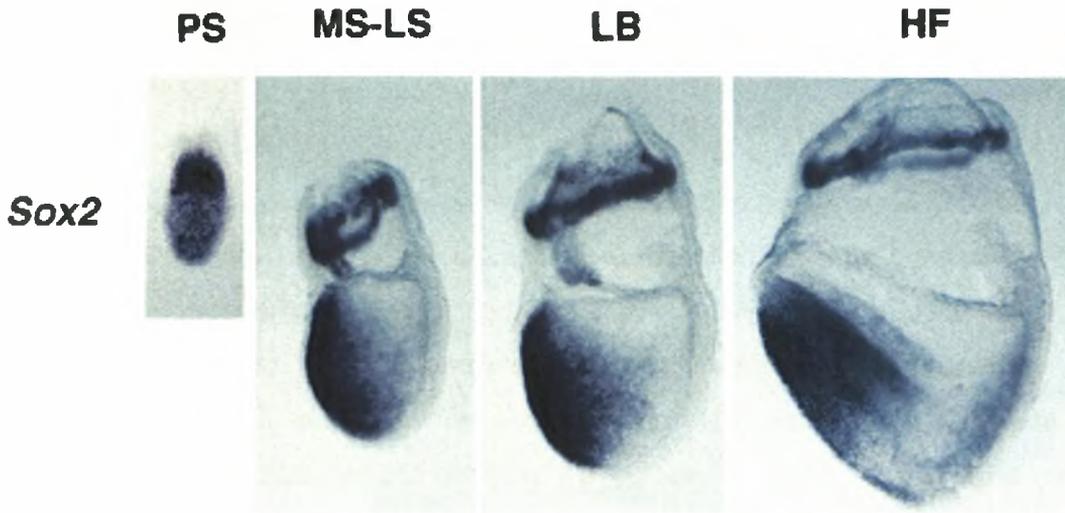
Εικόνα 13: Η έκφραση του *Sox2* σε πρώιμα έμβρυα κοτόπουλου. Η έκφραση του *Sox2* ξεκινά από την υποθετική εγκεφαλική νευρική πλάκα στο στάδιο 4 στην περιοχή που περιβάλλει τον κόμβο του Hensen (arrowhead). Η περιοχή έκφρασης του *Sox2* κινείται οπίσθια με οπισθοχώρηση του κόμβου. Μετά το στάδιο 10, η έκφραση του *Sox2* επάγεται στα cephalic placodes και τα παράγωγά τους υποδεικνύονται από τις γκύλες. (*Masanori Uchikawa, Dev. Cell, 2003*)



Εικόνα 15: Η έκφραση του *Sox31* τα όψιμα εμβρυικά στάδια. (A) 24 ωρών έμβρυο, πλευρική όψη. (B) Ύψηλότερη μεγέθυνση ενός μβρύου 24 ωρών, με περτονισμένη την *Sox31* χρώση την κοιλιακή περιοχή του ευρικού σωλήνα. *Franck Girard, Mech. Dev. 2000*

Στο Zebrafish έχει ανακαλυφθεί ένα νέο Sox γονίδιο, το Sox31, στενά συγγενικό με την ομάδα B των Sox γονιδίων στα θηλαστικά. Το γονίδιο έχει έκφραση μητρικής προελεύσεως. Η μεταγραφή στο ζυγωτό ξεκινά κατά την γαστριδιοποίηση, στο υποθετικό νευροεξώδερμα. Αργότερα, η έκφραση περιορίζεται στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένου του πρόσθιου εγκεφάλου, του μεσεγκεφάλου, του οπίσθιου εγκεφάλου και της σπονδυλικής στήλης. Η Sox31 πρωτεΐνη παρουσιάζει 58.6 και 45.9% ομοιότητα με την Sox19 στο zebrafish και την Sox2 στον άνθρωπο, αντίστοιχα. Το Sox 31 έχει έκφραση μητρικής προελεύσεως και είναι κατανεμημένο σε όλο το βλαστοδερμα κατά το στάδιο του βλαστιδίου. Κατά το πέρας της γαστριδιοποίησης, η έκφρασή του περιορίζεται στην νευρική πλάκα (*Franck Girard, Mech. Dev. 2000*).

Στο Ποντίκι, η έκφραση του *Sox2* ανιχνεύεται αρχικά καθ' ολοκλήρου στο επίβλαστο κατά την 6.5^η εμβρυονική μέρα (E6.5). Στην απαρχή του σχηματισμού της νευρικής πλάκας ο *Sox2* εκφράζεται σε μια περιοχή του πρόσθιου εξωδέρματος, η οποία δίνει γένεση σε νευροεξώδερμα και πρόσθιο επιδερμικό εξώδερμα. Κατά την δημιουργία της εγκεφαλικής πτυχής, ο *Sox2* παρουσιάζει πρόσθια διαβάθμιση συμπληρωματική της έκφρασης του στο εξώδερμα. Καθώς η ανάπτυξη του ΚΝΣ προχωρά περαιτέρω, η τοπική έκφραση του *Sox2* γίνεται περισσότερο ορατή, ειδικά στον εγκέφαλο. Ο μεταγραφικός παράγοντας *Sox2* έχει επίσης ενοχοποιηθεί για την γονιδιακή ρύθμιση του *Fgf4*. Επίσης ο *Sox2* χρειάζεται για την ανάπτυξη στο επίβλαστο και το εξωεμβρυικό εξώδερμα, και όλοι η πολυδύναμοι πρόδρομοι όλων των εμβρυικών και τροφοβλαστικών κυτταρικών τύπων αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, πρέπει να υφίσταται εντός της εσωτερικής κυτταρικής μάζας ένας πρωθύστερος ρόλος από την παρουσία της μητρικής πρωτεΐνης, αν και η έλλειψη του *Sox2* αρχίζει να γίνεται κρίσιμη μόνο στο χώριον (η εξωτερική εμβρυική μεμβράνη) μετά από 7.5 dpc. Τα δεδομένα μάς προτείνουν ότι μητρικά συστατικά θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην δημιουργία των αρχικών κυτταρικών αποφάσεων, και ότι ένας συνδυαστικός κώδικας, ο οποίος απαιτεί *Sox2* και *Oct4*, καθορίζει τις τρεις πρώτες κυτταρικές σειρές παρούσες κατά την εμφύτευση.



Εικόνα 14: Κατά την δημιουργία της αρχικής λουρίδας (E6.5), ο *Sox2* εκφράζεται σε όλη την περιοχή του επίβλαστου. Κατά τα πρώτα στάδια της γαστριδιοποίησης, η έκφραση στο έμβryo περιορίζεται στο πρόσθιο εξώδερμα, ενώ η εξωεμβρυϊκή έκφραση περιορίζεται στο γώριον. Στην απαρχή του σχηματισμού της νευρικής πλάκας (Εικόνα. late-streak stage, LB), ο *Sox2* εκφράζεται στο πρόσθιο εξώδερμα, το οποίο δίνει γένεση σε νευροεξώδερμα και πρόσθιο επιδερμικό εξώδερμα. Κατά την δημιουργία της εγκεφαλικής πτυχής, ο *Sox2* παρουσιάζει συμπληρωματική πρόσθια διαβάθμιση της έκφρασης του στο εξώδερμα. (Ariel A. Avilion, *Genes & Dev* 2003)

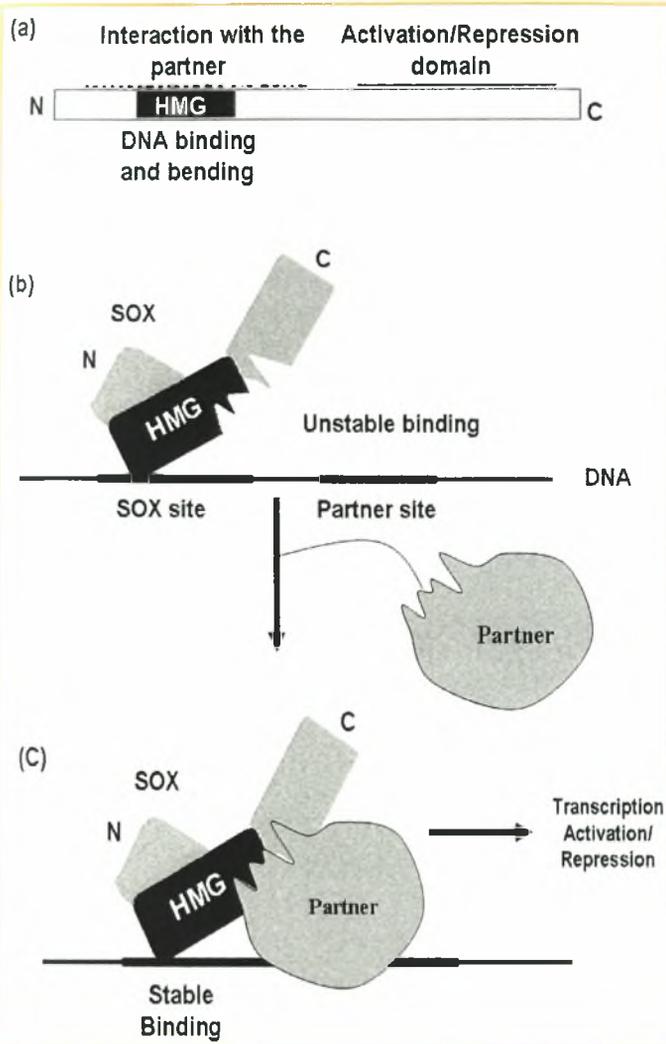
Στον Άνθρωπο, το *Sox2* εκφράζεται στους νευρικούς ιστούς και τα sensory epithelia από τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου της β-κρυσταλλίνης και ότι εμπλέκεται στην διαδικασία διαφοροποίησης του φακού και άλλων νευρικών ιστών. Η πρώτη διαπίστωση της σημαντικότητας του είναι η παθολογική κατάσταση που επιδείχθηκε μετά από deletion ή μεταλλαγή: αναλύσεις μεταλλάξεων σε 5 παιδιά που έπασχαν από αμφίπλευρη ανοφθαλμία οδήγησαν στην ανακάλυψη *de novo* σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο του *Sox2* που είχαν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελαττωματικής πρωτεΐνης or even its entire deletion να αποτελεί αίτιο της ασθένειας. Το *Sox2* είναι επίσης υπεύθυνο για την ανάπτυξη των hair cells και των στηρικτικών κυττάρων στο εσωτερικό του αυτιού —έχουν επίσης δημοσιευτεί περιπτώσεις όπου σημειακές μεταλλάξεις του *Sox2* προκαλούν κώφωση.

1.9 Πως κάθε SOX B πρωτεΐνη αναγνωρίζει το κατάλληλο γονίδιο στόχο της:

Οι ξεχωριστές HMG περιοχές των Sox πρωτεϊνών που έχουν μέχρι στιγμής εξεταστεί είναι όμοιες μεταξύ τους κατά προτίμηση σε επίπεδο αλληλουχίας και σε επίπεδο λυγίσματος του DNA. Επομένως δεν μπορούν από μόνες τους να αποτελέσουν τους κύριους (major) καθοριστές επιλογής του ειδικού στόχου πρόσδεσης. Οι Sox παράγοντες συνδυάζονται με διαφορετικές πρωτεΐνες-συνεργάτες (protein partners) ώστε να κατευθύνουν την έκφραση γονιδίων που απαιτούνται για κάθε συγκεκριμένο τύπο κυττάρου (Πίνακας 5). Τα τελευταία χρόνια έχουν συγκεντρωθεί αποδείξεις για το γεγονός ότι οι Sox πρωτεΐνες σχηματίζουν πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα σε εκκινητές ή ενισχυτές γονιδίων και ότι αυτά τα σύμπλοκα πιθανών παίζουν ρόλο στον καθορισμό της κυτταρικής εξειδίκευσης των Sox πρωτεϊνών. Έλεγχος δύο υβριδίων στην μαγιά και μελέτες ανάλυσης εκκινητών οδήγησαν στην ταυτοποίηση ποικίλων συν-παραγόντων που δεσμεύονται σε Sox πρωτεΐνες. Έχει δειχθεί ότι τα μέλη της οικογένειας Sox αλληλεπιδρούν με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, πρωτεΐνες προσαρμογής και παράγοντες που απαιτούνται για είσοδο στον πυρήνα. Αυτή η συνεργασία πιθανών επιτρέπει στις Sox πρωτεΐνες να δρουν με κυτταροειδικό τρόπο, ο οποίος είναι σημαντικός στην κυτταρική διαφοροποίηση. Η ίδια Sox πρωτεΐνη εμφανίζεται να ρυθμίζει διαφορετικές ομάδες γονιδίων-στόχων, γεγονός που εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο στον οποίο εκφράζεται.

Sox protein	Interactor	Gene regulated	Function
SOX1/2/3(chick)	OCT3/4	Fgf4,UTF1	Expression
		Osteopontin	Repression
	Brn	Nestin	Expression
	Pax6	δcrystallin	Expression
SOX14(chick)	Pax6	δcrystalline	Moderate repression
SOX21(chick)	Pax6	δcrystallin	Strong repression

Πίνακας 5: SoxB πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν στο κοτόπουλο (Uchikawa, M. et al. Mech. Dev.1999)



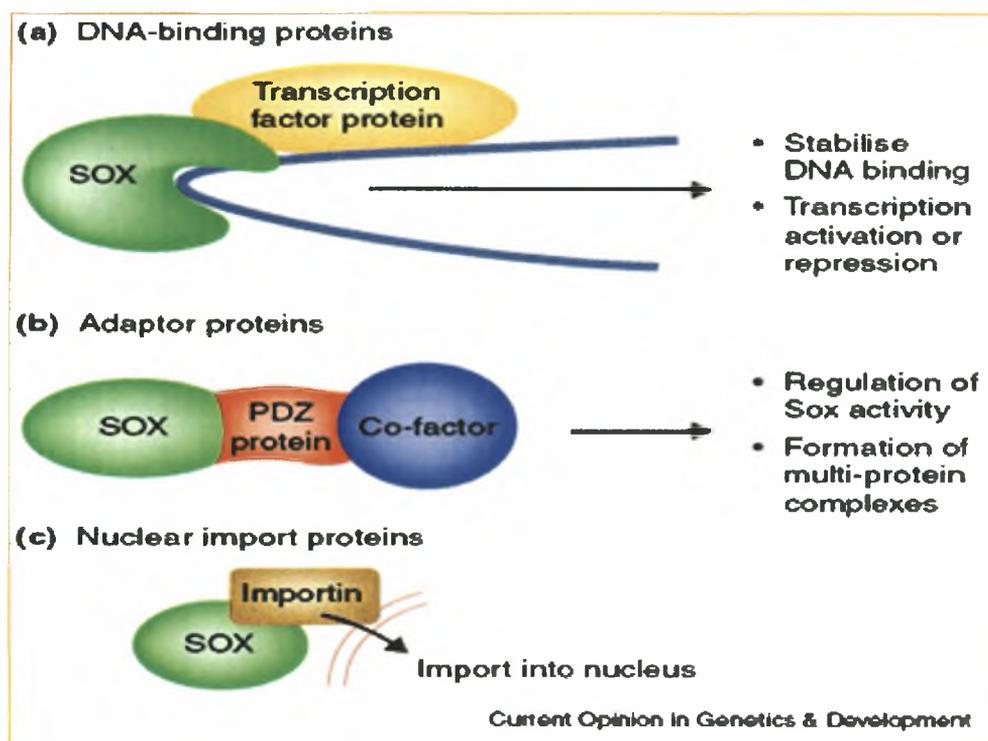
Μια τυπική Sox πρωτεΐνη έχει τρεις λειτουργικές περιοχές: μία HMG περιοχή ώστε να αλληλεπιδρά με το DNA, μια περιοχή η οποία μπορεί να περιλαμβάνει μέρος της HMG περιοχής ώστε να αλληλεπιδρά με παράγοντες με τους οποίους συνεργάζεται και μια περιοχή ενεργοποίησης ή καταστολής που συχνά βρίσκεται κοντά στο C-τελικό άκρο. Σε αυτό το μοντέλο, όταν μια Sox πρωτεΐνη δεσμεύεται μόνη της στην θέση πρόσδεσής της μέσω της HMG περιοχής, η πρόσδεση είναι πιθανών ασταθής. Όταν ένας παράγοντας που αλληλεπιδρά με την Sox πρωτεΐνη δεσμευτεί στο DNA δίπλα στην θέση Sox, τότε η Sox πρωτεΐνη θα σταθεροποιηθεί στο DNA και θα επιδείξει την δραστηριότητά της ως ενεργοποιητής ή καταστολέας της μεταγραφής. Για να ρυθμίσουν την γονιδιακή έκφραση, οι μεταγραφικοί παράγοντες πρέπει να εισέλθουν στον πυρήνα από το κυτταρόπλασμα. Αυτή η ενεργή διαδικασία μεσολαβείται από μεταφορικές πρωτεΐνες που ονομάζονται μπορτίνες, οι οποίες αναγνωρίζουν σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS). Αλληλουχίες NLS έχουν αναγνωριστεί και σε άμινο- και σε καρβόξυλ- τελικά άκρα της HMG περιοχής των SOX πρωτεϊνών (εικόνα 16).

Εικόνα 16: Μοντέλο για αλληλεπίδραση Sox-συνεργάτες (*Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H Trends Genet 2000*)

Τρία διαφορετικά μοντέλα των αλληλεπιδράσεων Sox-συνεργάτες

Η πρώτη τάξη περιλαμβάνει πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο DNA με συνέπεια την ενεργοποίηση ή την καταστολή της μεταγραφής. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι πιθανότατα ειδικές για διαφορετικές Sox πρωτεΐνες. Η δεύτερη τάξη είναι αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες προσαρμογής, οι οποίες δημιουργούν έναν σύνδεσμο μεταξύ Sox παραγόντων και άλλων πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την ρύθμιση της δραστηριότητας τους και τον σχηματισμό

πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων. Τέλος, αλληλεπίδραση με ιμφορτίνες μέσω σημάτων (σήματα πυρηνικού εντοπισμού), τα οποία περιέχονται στην HMG περιοχή για εισαγωγή στον πυρήνα, οδηγεί σε ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (εικόνα 17).



Εικόνα 17: Τρία διαφορετικά μοντέλα των αλληλεπιδράσεων Sox-πρωτεϊνών (Megan Wilson and Peter Koopman, *Current Opinion in Genetics & Development* 2002)

1.11 Συνεργάτες τον Sox2 :

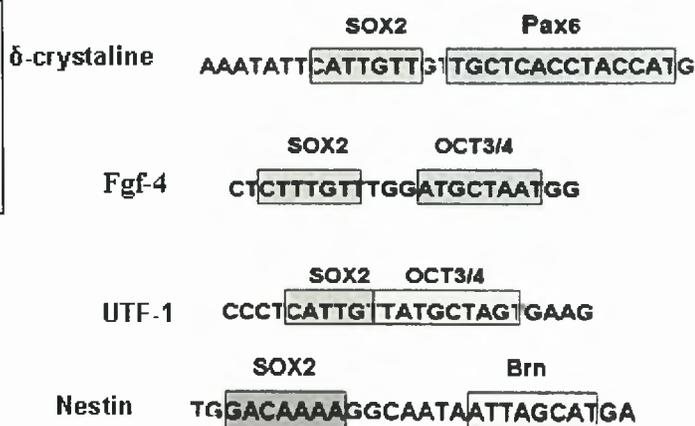
Ένα σημαντικό στοιχείο που βοήθησε στην ανακάλυψη των παραγόντων που αλληλεπιδρά ο Sox2 εξασφαλίστηκε από ανάλυση των θέσεων πρόσδεσης του Sox2 στις ρυθμιστικές περιοχές πραγματικών γονιδίων-στόχων [(δ-κρυσταλλίνη, Fgf4 και παράγοντας μεταγραφής αδιαφοροποίητων εμβρυικών κυττάρων 1 (UTF1)]. Ο πρώτος γνωστός στόχος του Sox2 είναι ο minimal ενισχυτής του γονιδίου της δ-κρυσταλλίνης στο κοτόπουλο, DC5, ο οποίος κατευθύνει την έκφραση του γονιδίου ειδικά στον φακό του ματιού (Εικ.7). Ο Sox2 δεσμεύεται στο 59 νουκλεοτιδιο (στο μισο) της αλληλουχίας του DC5 και ενεργοποιεί τον ενισχυτή στα κύτταρα του φακού με τρόπο που δεν εξαρτάται μόνο από την θέση πρόσδεσης του Sox2, αλλά από την

αλληλουχία του DNA στο 39 νουκλεοτιδίο (στο μισό) του DC5. Αυτή η 39 θέση έχει ανιχνευθεί *in vivo* μόνο στα κύτταρα του φακού και πιθανόν αντιπροσωπεύει την θέση πρόσδεσης ενός παράγοντα που αλληλεπιδρά με τον *Sox2* (partner), ο οποίος ονομάζεται Pax6. Ο *Sox2* φαίνεται να αλληλεπιδρά με ξεχωριστούς παράγοντες ανάλογα με τον τύπο κυττάρου. Στα EBK, ο *Sox2* αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Oct3/4 στους ενισχυτές των γονιδίων *Fgf4* και *UTF1*. Έχει δειχτεί ότι το σύμπλοκο *Sox2*-Oct3/4 σχηματίζεται ακόμα και απουσία του DNA στόχου.

Η ενεργοποίηση του DC5 ενίσχυτη στα κύτταρα του φακού είναι ένα μοναδικό χαρακτηριστικό των Sox πρωτεϊνών που ανήκουν στην ομάδα B1. Ο Sox9 δεσμεύεται *in vitro* στον ενισχυτή DC5 και προκαλεί λύγισμα του DNA δυσδιάκριτα από τους Sox1, 2 και 3, αλλά αποτυγχάνει να ενεργοποιήσει τον ενισχυτή στα κύτταρα του φακού, υποδεικνύοντας την έλλειψη συνεργασίας του Sox9 και του Pax6.

Η Nestin και η ομάδα των B1 Sox μεταγραφικών παραγόντων (Sox1/2/3) χρησιμοποιούνται συχνά ως γενετικοί δείκτες αρχέγονα νευρικά κύτταρα, υποδηλώνοντας την ρυθμιστική τους σύνδεση. Έχουν αναγνωριστεί θεμελιώδης γειτονικές θέσεις πρόσδεσης Sox and POU παραγόντων στον ενισχυτή του γονιδίου Nestin. Η αλληλουχία των 30-bp του ενισχυτή που περιλαμβάνει τις θέσεις πρόσδεσης (Nes30) εμφανίζει ειδικότητα για το νευρικό σύστημα και ενεργότητα που εξαρτάται από τους Sox και POU παράγοντες. Οι παράγοντες της τάξης III POU, Brn1, Brn2, Brn4 και Oct6 (επίσης γνωστός ως Tst1/SCIP), εκφράζονται ευρέως στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ, με εκτεταμένη τοπική επικάλυψη και πιθανώς μοιράζονται άφθονες λειτουργίες. Η παραπάνω παρατήρηση υποδηλώνει ότι ο *Sox2* συνεργάζεται με POU παράγοντες της τάξης III και ενεργοποιεί τον ενισχυτή του Nestin μέσω δέσμευσης στην αλληλουχία Nes30.

Εικόνα 18: Θέσεις δέσμευσης του *Sox2* και των παραγόντων που αλληλεπιδρά (*Uchikawa M. et al. H.Trends in genetics 2000*)



Σκοπός αυτής της εργασίας:

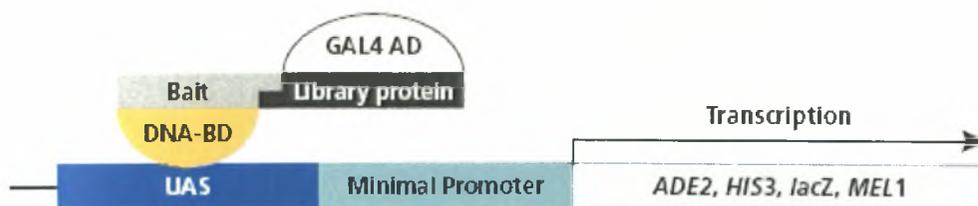
Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων του Sox2 με συνεργάτες του στο σύστημα δυο-υβριδίων σε κύτταρα θηλαστικών.

2 Πειραματική Προσέγγιση :

Έχει ήδη διεξαχθεί ανάλυση δύο υβριδίων με χρήση αλληλουχίας DNA που κωδικοποιεί για το Sox2 (αμινοξέα 35-280) και της E7 cDNA βιβλιοθήκης του *M. musculus*. Στην παρούσα εργασία μεταφέραμε τους κλώνους που απομονώσαμε σε πλασμίδια που θα χρησιμοποιηθούν για ανάλυση δύο υβριδίων σε κύτταρα θηλαστικών. Χρησιμοποιήσαμε το Mammalian Matchmaker™ Two-Hybrid Assay Kit και εκφράσαμε τις πρωτεΐνες σε Cos1 κύτταρα. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης των Cos1 κυττάρων σε συνδυασμό με Western blots για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων.

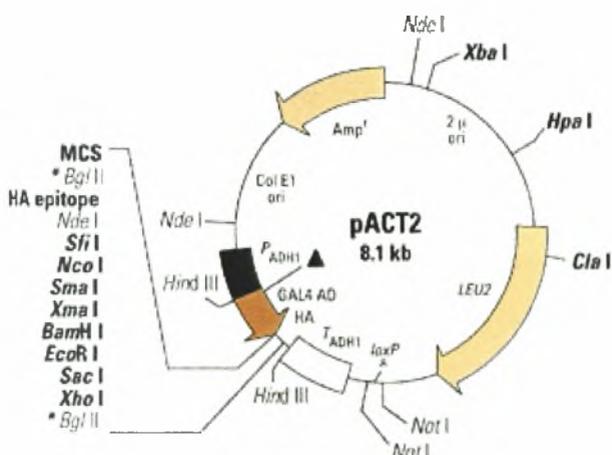
2.1 Έλεγχος δύο υβριδίων της cDNA βιβλιοθήκη σε μαγιά:

Η ανάλυση δύο υβριδίων βασίζεται σε ρυθμιστικές περιοχές που απαντώνται σε μερικούς μεταγραφικούς παράγοντες: μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA που εξαρτάται από την αλληλουχία και μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής που αλληλεπιδρά με τον βασικό μεταγραφικό μηχανισμό του κυττάρου. Η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής σε αλληλεπίδραση με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA θα προάγει την συγκρότηση των συμπλόκων της RNA πολυμεράσης II και την στρατολόγησή τους στο TATA box με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Στο σύστημα δύο υβριδίων η περιοχή πρόσδεσης στο DNA και η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής παράγονται από διαφορετικά πλασμίδια, όπου μία πρωτεΐνη X συγχωνεύεται με μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA και αλληλεπιδρά με μία πρωτεΐνη Y που έχει συγχωνευτεί με μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής. Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης X με την Y έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενός γονιδίου αναφοράς. Το Yeast Matchmaker™ Two-Hybrid Assay Kit παρέχει μια πλήρη σειρά από φορείς για εφαρμογή του συστήματος δύο υβριδίων σε κύτταρα μαγιάς.

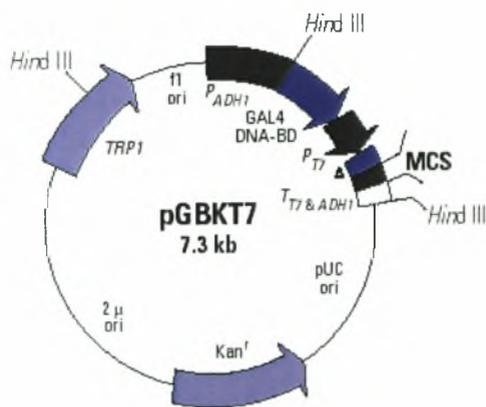


Εικόνα 19. Αλληλεπίδραση δύο υβριδίων

Πλήρους μεγέθους και τμηματισμένα cDNAs του *Sox2* προετοιμάστηκαν ως εκμαγεία για PCR ενίσχυση και κλωνοποιήθηκαν σε pGBKT7 φορείς, οι οποίοι περιλαμβάνουν την DNA θέση πρόσδεσης του GAL4. Για ανίχνευση, κατασκευάστηκε μια cDNA βιβλιοθήκη από έμβρυο ποντικού 7 ημερών στην θέση *EcoRI*, *XhoI* του φορέα pACT2, ο οποίος περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης του GAL4 (AD). Ανακτήθηκαν συνολικά 5×10^6 ανεξάρτητοι cDNA κλώνοι με ένθετο μέσου μεγέθους ~ 2.4 kb (range: 2.0-4.0 kbp). AH105 κύτταρα μαγιάς τα οποία είχαν προηγουμένως μετασχηματιστεί με τμήμα *Sox2* 35-209 aa, και επιλέχθηκαν σε μέσο χωρίς λευκίνη, τρυπτοφάνη, αδενίνη, παρουσία 3-AT και *Xgal* μετασχηματίστηκαν με 50 μ g από την προκύπτουσα cDNA βιβλιοθήκη. Ύστερα από επώαση 3-5 ημερών, επιλέχθηκαν οι θετικοί κλώνοι και το πλασμιδιακό DNA μεταφέρθηκε στην κυτταρική σειρά *E.coli* HB101 για περαιτέρω κλωνοποίηση και αλληλούχιση.



Εικόνα 20. Ο φορέας pACT2 εμπεριέχει την περιοχή GAL4 AD (αμινοξέα 768–881), ένα επίτοπο της πρωτεΐνης HA και μια πολλαπλή θέση για κλωνοποίηση του γονιδίου στόχου (MCS). Ο pACT2 διαθέτει μια μοναδική θέση κοπής για το *EcoR I* εντός της MCS. Η χιμαιρική πρωτεΐνη εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα εξαιτίας της παρουσίας του ιδιόσυστατα ενεργού ADHI προαγωγέα.



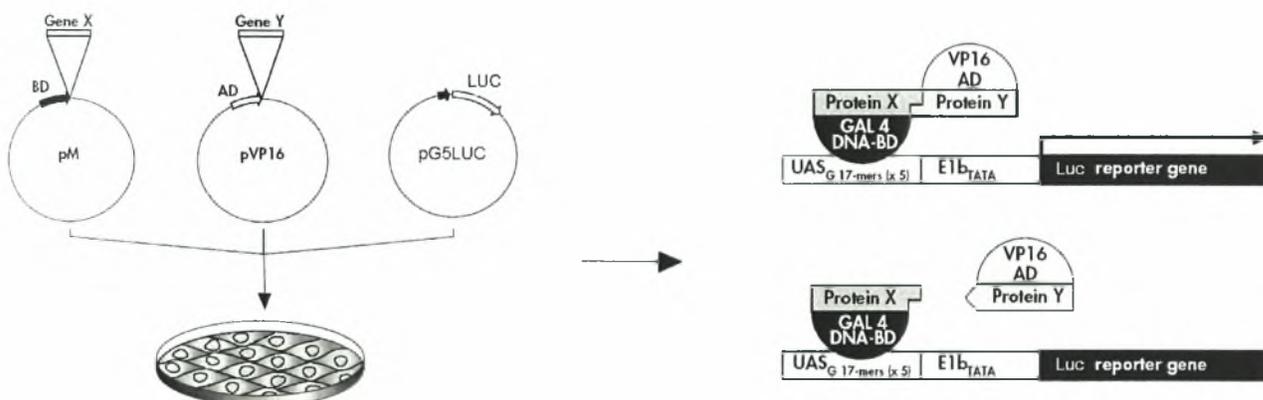
▲ c-Myc epitope tag

Εικόνα 21. Ο φορέας pGBKT7 περιέχει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του GAL4 (αμινοξέα 1-147). Στην μαγιά, οι χιμαιρικές πρωτεΐνες εκφράζονται μέσω του προαγωγέα *ADHI*. Περιέχει επίσης τον προαγωγέα *T*, έναν επίτοπο της c-Myc πρωτεΐνης και μια πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (MCS). Η μεταγραφή τερματίζεται από τα σήματα τερματισμού *T7* και *ADHI*. Ο pGBKT7 διπλασιάζεται αυτόνομα στα κύτταρα *E. coli* και *S. cerevisiae* από τα σημεία έναρξης της αντιγραφής *rUC* και *2μ ori*, αντίστοιχα.

2.2 Ανάλυση δύο υβριδίων σε θηλαστικά:

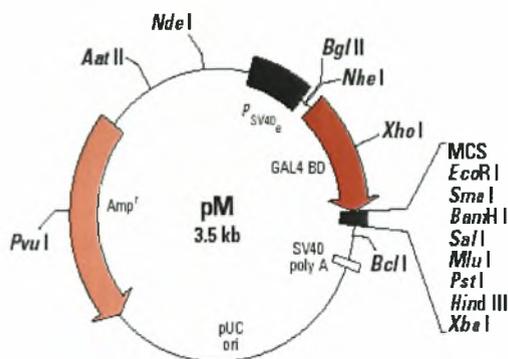
Το Mammalian Matchmaker™ Two-Hybrid Assay Kit παρέχει μια πλήρες σειρά από φορείς για εφαρμογή του συστήματος δύο υβριδίων σε κύτταρα θηλαστικών.

Στην Mammalian Matchmaker™ Two-Hybrid Assay (Εικόνα 1), ο φορέας κλωνοποίησης pM χρησιμοποιείται για την δημιουργία χμαιρικών πρωτεϊνών X—GAL4 DNA-BD. Παρομοίως, ο φορέας pVP16 χρησιμοποιείται για την κατασκευή χμαιρικών πρωτεϊνών Y—AD, όπου η περιοχή AD (activation domain) προέρχεται από την πρωτεΐνη VP16 του ερπητοϊού. Ο pG5LUC είναι ένα πλασμίδιο που φέρει 5 συντηρημένες θέσεις πρόσδεσης του GAL4, οι οποίες ακολουθούνται από το γονίδιο της Λουσιφεράσης, μια πρωτεΐνη αναφοράς.



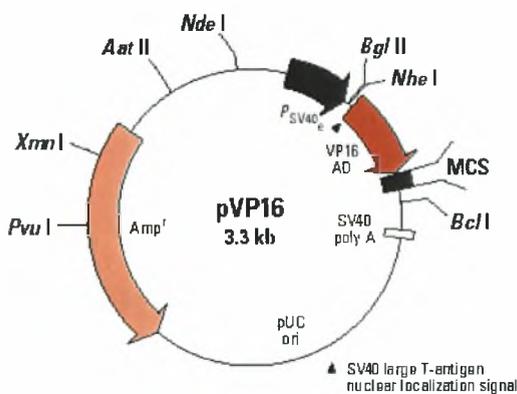
Εικόνα 22 . Περιγραφή του πειράματος:

1. Κλωνοποίηση επιθυμητών γονιδίων (Sox2 & κλώνος από cDNA βιβλιοθήκη) στους φορείς pM & pVP16.
2. Συν-μετασχηματισμός και των τριών πλασμιδίων στα κύτταρα ξενιστές (Cos1).
3. Επώαση για 48-72 ώρες και μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης.



Εικόνα 23. Ο φορέας pM [Matchmaker Mammalian Assay Kit 2 (#630305)] χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό χημεικής X—GAL4 DNA-BD (αμινοξέα 1–147). Η πρωτεΐνη υβρίδιο μετατοπίζεται στον πυρήνα εξ' αιτίας της ύπαρξης της αλληλουχίας πυρηνικής εντόπισης του GAL4. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις προς εξέταση πρωτεΐνες πρέπει να κλωνοποιηθούν, στην σωστή κατεύθυνση και το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης, εντός της πολλαπλής θέσης κλωνοποίησης στο 3' τελικό

άκρο του GAL4 DNA-BD. Η μεταγραφή ρυθμίζεται από τον ιδιόσυστατα ενεργό προαγωγέα SV40, ενώ τερματίζεται από το σήμα τερματισμού SV40 poly A.



Εικόνα 24. Ο φορέας pVP16 [Matchmaker Mammalian Assay Kit 2 (#630305)] χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό χημεικής Y—VP16 AD (αμινοξέα 411-455). Η πρωτεΐνη υβρίδιο μετατοπίζεται στον πυρήνα εξ' αιτίας της ύπαρξης της αλληλουχίας πυρηνικής εντόπισης του SV40. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις προς εξέταση πρωτεΐνες πρέπει να κλωνοποιηθούν, στην σωστή κατεύθυνση και το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης, εντός της πολλαπλής θέσης

κλωνοποίησης στο 3' τελικό άκρο του VP16 AD. Η μεταγραφή ρυθμίζεται από τον ιδιόσυστατα ενεργό προαγωγέα SV40, ενώ τερματίζεται από το σήμα τερματισμού SV40 poly A.

2.3 Διαδικασία υποκλωνοποίησης:

Όπως, αναφέρθηκε προηγουμένως, οι φορείς που χρησιμοποιούνται για ανάλυση δύο υβριδίων σε κύτταρα θηλαστικών είναι διαφορετικοί από αυτούς που χρησιμοποιούνται για τα κύτταρα μαγιάς. Αν' αυτού έπρεπε να μεταφέρουμε τα ένθετα για το *Sox2* γονίδιο από το φορέα pGBKT7 στον pM. Επίσης, οι κλώνοι από την cDNA βιβλιοθήκη που παρουσίασαν σημαντική αλληλεπίδραση έπρεπε να μεταφερθούν από τον φορέα pACT2 στον pVP16. Οι φορείς που εκφράζουν την *Sox2*-“δόλωμα” ονομάζονται pAA15-18 και κάθε ένας περιέχει διαφορετικό σε

μήκος τμήμα του *Sox2* γονιδίου. Οι κλώνοι από την cDNA βιβλιοθήκη ονομάζονται S2I 100-174 (*Sox2* Interactor).

pAA15 contains the full length <i>Sox2</i> gene fused with the GAL4 DNA binding domain. It is of length 1.6 kb. Plasmid total size is 8900 bp. It was cloned as an EcoRI/BamHI fragment.
pAA16 contains <i>Sox2</i> fragment fused with the GAL4 DNA binding domain and is of length 828 bp. Plasmid size is 8128 bp. It was cloned as an EcoRI/BamHI fragment.
pAA17 contains <i>Sox2</i> fragment fused with the GAL4 DNA binding domain and is of length 721 bp. Plasmid size is 8021 bp. It was cloned as an EcoRI/BamHI fragment.
pAA18 contains <i>Sox2</i> fragment fused with the GAL4 DNA binding domain and is of length 572 bp. Plasmid size is 7872 bp. It was cloned as an EcoRI/PstI fragment.

Οι δέκα κλώνοι που ανιχνεύτηκαν από την ανάλυση δύο υβριδίων στην μάγια, αλληλουχήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος NCBI blast για εύρεση ομοπαράθεσεων. Τα αποτελέσματα αναγράφονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Αλληλεπιδράσεις του *Sox2* (E7.0 cDNA βιβλιοθήκη, ανάλυση δύο υβριδίων). Αποτελέσματα της ανάλυσης μέσω του προγράμματος NCBI blast.

Για την απομόνωση των ενθεμάτων από τους φορείς έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν 5μg του πλασμιδιακού DNA. Οι φορείς pAA15-17 έχουν στα άκρα του κλωνοποιημένου τμήματος *Sox2* cDNA θέσεις κοπής για ένζυμα EcoRI και BamHI, ενώ ο pAA18 για τα ένζυμα EcoRI και PstI. Οι δέκα κλώνοι από την cDNA βιβλιοθήκη έχουν στα άκρα τους

Clone	Interactor (homology)	Description
110	Tdg (99%)	Thymine DNA glycosylase isoform
111	PIA1 (91.25%) (Pias1)	Protein inhibitor of activated STAT protein 1 (Dead/H Box binding protein 1)
114	Not determined	
124	Not determined	
149	PSA7 (90.91%) (PsmA7)	Proteasome subunit alpha type 7
151	PIASgamma (97.30%) (Piasy)	Protein inhibitor of activated STAT protein gamma (PIAS-gamma) (PIASY)
100	Tdg (97%)	Thymine DNA glycosylase isoform
123	Not determined	
157	Not determined	
174	Tdg (99%)	Thymine DNA glycosylase isoform

θέσεις κοπής για το ένζυμο BglII. Το πρωτόκολλο πέψης που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των ένθετων από τους φορείς, αναγράφεται παρακάτω.

Για την πέψη των pAA15-17 χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα κοπής EcoRI, BamHI (Takara), και PstI (Roche) , ενώ για τους κλώνους από την E7 cDNA βιβλιοθήκη χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο BglII (Takara). Επίσης, υπέστησαν πέψη οι φορείς από το Mammalian Matchmaker™ Two-Hybrid Assay Kit (ο pM με τα ένζυμα EcoRI/BamHI, &EcoRI/PstI και ο pVP16 με το BamHI). Τα προϊόντα πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε 0.8 % πηκτή αγαρόζης. Οι ζώνες που αναπαριστούσαν τα ένθετα εξάχθηκαν με χειρουργικό νυστέρι και τοποθετήθηκαν σε 1.5 mL erpendorf tubes. Η απομόνωση του DNA από την πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με χρήση του Qiagen Qiaquick gel extraction kit.

Πρωτόκολλο πέψης:

Για κάθε αντίδραση πέψης χρησιμοποιήσαμε τα εξής αντιδραστήρια:

Reagents:
10X Digest buffer
Restriction enzyme
DNA sample
Sterile water
10X BSA

Vector Digest (Insert isolation)	volume (ul)
Plasmid DNA (5-10ug)	5ul
10X reaction buffer	5ul
10x BSA (optional)	5ul
Sterile water	34ul
Restriction Enzymes (10-20 units)	1ul
Total Volume	50ul

Vector Digest (Mini prep digest)	volume (ul)
Plasmid DNA (1-3ug)	1ul
10X reaction buffer	2ul
10x BSA (optional)	2ul
Sterile water	14.5ul
Restriction Enzymes (10-20 units)	0.5ul
Total Volume	20ul

Η πέψη έλαβε χώρα στους 37° C για περίπου 1ώρα. Και ακολούθησε ανάλυση με ηλεκτροφόρηση.

Επειδή στον φορέα pVP16 είχαμε μια μονή θέση κλωνοποίησης (BamHI), έπρεπε να αποφωσφορυλιώσουμε τα άκρα του, ώστε να ελαχιστοποιήσουμε την πιθανότητα επανασύνδεσης του φορέα κατά την αντίδραση λιγάσης:

Πρωτόκολλο αποφωσφορυλίωσης:

Χρησιμοποιήθηκε αλκαλική φωσφατάση που έχει απομονωθεί από γαρίδα [(shrimp alkaline phosphatase-SAP (Roche)]. Η SAP καταλύει την αποφωσφορυλίωση των 5' φωσφορικών καταλοίπων του DNA και του RNA και κατέχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να απενεργοποιηθεί μη-αντιστρεπτά με επώαση 15 λεπτών στους 65°C. Συμπερασματικά, η διαδικασία της πέψης, της αποφωσφορυλίωσης και της αντίδρασης λιγάσης μπορεί να πραγματοποιηθεί στο ίδιο σωληνάκι προσθέτοντας απλά τα κατάλληλα αντιδραστήρια. Η αποφωσφορυλίωση έλαβε χώρα στους 16°C για 10 λεπτά. Ύστερα το προϊόν ηλεκτροφορήθηκε και απομονώθηκε με χρήση του Qiagen Qiaquick gel extraction kit.

Vector dephosphorylation components	volume (ul)
Plasmid DNA (1ug)	1ul
10X Dephosphorelation buffer	2ul
Sterile water	16ul
SAP (25 units)	1ul
Total Volume	20ul

Πρωτόκολλο για απομόνωση DNA με χρήση του Qiagen Qiaquick gel extraction kit:

1. Εξάγουμε το κομμάτι της πηκτής που περιέχει το DNA με ένα καθαρό χειρουργικό νυστέρι. Ελαχιστοποιούμε όσο το δυνατόν γίνεται το μέγεθος του εξαχθέντος τμήματος, ώστε να αποφύγουμε την περίσσεια αγαρόζης.
2. Ζυγίζουμε το εξαχθέν τμήμα. Προσθέτουμε 3 όγκους από Buffer QG σε 1 όγκο από πηκτή (100 mg ~ 100 μL).
3. Επιάζουμε στους 50°C για 10 λεπτά (ή μέχρι να διαλυθεί τελείως το τμήμα της πηκτής). Για να επιταχύνουμε την διαδικασία, αναδεύουμε με vortex κάθε 2–3 λεπτά κατά την διάρκεια της επώασης.
4. Προσθέτουμε 1 όγκο ισοπροπανόλης και αναδεύουμε.
5. Για να δεσμεύσουμε το DNA, μεταφέρουμε το δείγμα σε στήλες QIAquick και φυγοκεντρούμε.
6. Προσθέτουμε 0.75 mL από Buffer PE στην στήλη και φυγοκεντρούμε.

7. Μεταφέρουμε την στήλη σε καθαρά erpendorf σωληνάκια 1.5 mL και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό
στις 13,000 rpm (~17,900 g).
8. Μεταφέρουμε την στήλη σε καθαρά erpendorf σωληνάκια 1.5 mL.
9. Για να εκχυλίσουμε το DNA, προσθέτουμε 30 μ L αποστειρωμένο ddH₂O στο κέντρο της στήλης. Επωάζουμε για 1 λεπτό στον πάγο και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό.

Πρωτόκολλο για αντίδραση λιγάσης:

Χρησιμοποιήθηκε η λιγάση T4 από την εταιρεία TAKARA Co.

Components for ligation	volume (ul)
Plasmid DNA (100ng) + 1ug insert	10 ul
10X Ligation buffer	2ul
Sterile water	7ul
Ligase (10 units)	1ul
Total Volume	20ul

Η αντίδραση επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 ώρες και το προϊόν της χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό των HB101 κυττάρων.

Πρωτόκολλο μετασχηματισμού:

1. Βγάζουμε τα HB101 κύτταρα, τα οποία έχουν μεταχειριστεί έτσι ώστε να είναι ικανά να πάρουν πλασμίδιο, από τους -80°C και τα τοποθετούμε σε πάγο.
2. Ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο στους 42°C .
3. Προσθέτουμε 50 ng από το πλασμιδιακό DNA σε 50 μ L κυττάρων
4. Επωάζουμε στον πάγο για 10 λεπτά ή όσο χρειαστεί ώστε να ξεπαγώσουν τα κύτταρα.
5. Επωάζουμε για 45 δεύτερα στους 42°C .
6. Επωάζουμε στον πάγο για 2 λεπτά ώστε να ελαχιστοποιήσουμε την φθορά των κυττάρων από την υψηλή θερμοκρασία.
7. Προσθέτουμε 1 mL από LB- 5 gr yeast extract, 10 gr peptone, 5 gr NaCl/L- (ελεύθερο από αντιβιοτικά). Επωάζουμε για 45 λεπτά στους 37°C .
8. Λαμβάνουμε 100 μ L από την καλλιέργεια και τα επιστρώνουμε σε πιάτα petri που έχουν LB-αγαρόζη-αμπικιλίνη. Επωάζουμε στους 37°C για 12-16 ώρες.
9. Απομονώνουμε τις αποικίες, ώστε να τις χρησιμοποιήσουμε για mini preps.

Συγκομιδή και λύση των βακτηρίων

Συγκομιδή:

Μεταφέρουμε μια βακτηριακή αποικία σε 2 mL μέσου καλλιέργειας LB, το οποίο περιέχει αμπικιλίνη. Επωάζουμε την καλλιέργεια για 16 ώρες στους 37 °C υπό έντονη ανάδευση.

Μεταφέρουμε 1.5 mL της καλλιέργειας σε tube και φυγοκεντρούμε στα 12.000 g για 30 δεύτερα στους 4°C (το υπόλοιπο της καλλιέργειας φυλάσσεται στους 4°C).

Απομακρύνουμε όσο το δυνατό περισσότερο μέσο και αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει.

Αλκαλική λύση κυττάρων:

Solutions needed for Mini/Maxi preps	Components
Solution 1 (P1)	50mM glucose, 25mM Tris HCl (pH: 8.0), 10mM EDTA (pH:8.0)
Solution 2 (P2)	200mM NaOH, 1% SDS
Solution 3 (P3)	5M potassium acetate, 11.5% Glacial acetic acid ,H₂O

Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 100 μL παγωμένο Solution I με έντονο vortex.

Προσθέτουμε 150 μL φρέσκο Solution II. Αναμιγνύουμε χωρίς την χρήση vortex. Κρατάμε στον πάγο για 5 λεπτά.

Προσθέτουμε 200 μL χλωροφόρμιο και 115 μL από οξικό νάτριο 3M pH=5.2. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 14,000 rpm. Μεταφέρουμε την υδατική φάση (επάνω) σε καθαρό tube.

Προσθέτουμε 0.8 όγκους ισοπροπανόλης και φυγοκεντρούμε στις 14,000 rpm για 25 λεπτά. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

Πλένουμε το ίζημα με 70% αιθανόλη και την αφήνουμε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύουμε σε 40 μL ddH₂O.

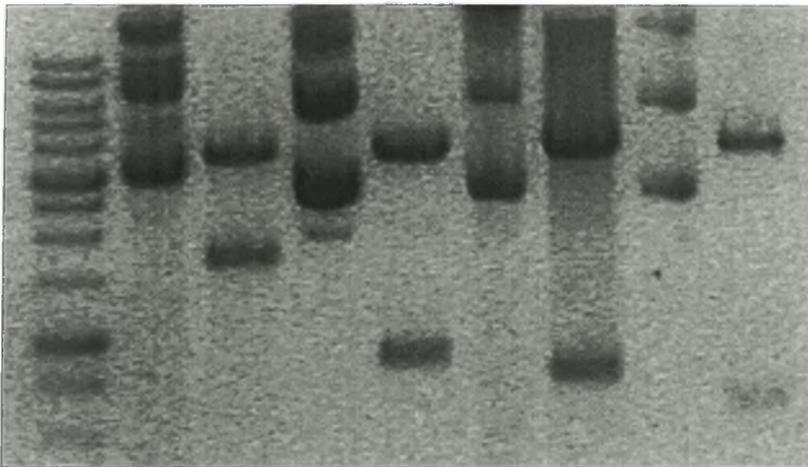
Για την ανάλυση των mini preps ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο που αναφέραμε για της πέψης .

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω Πίνακα . Η φορείς που εκφράζουν την πρωτεΐνη *Sox2*-“δόλωμα” ονομάζονται **pMM15-18**, και η φορείς που εκφράζουν τους κλώνους από την cDNA βιβλιοθήκη ονομάζονται **pVM 100-174**.

Εικόνα 25: Πέψη του DNA των mini preps από τους κλώνους pMM15-18.

**Digestion of pMM 15-17 with EcoRI/BamHI
& PMM18 with EcoRI/PstI**

1 2 3 4 5 6 7 8 9



1: 1kb Marker
2: pMM15
3: pMM15 digest with EcoRI/BamHI
4: pMM16
5: pMM16 digest with EcoRI/BamHI
6: pMM17
7: pMM17 digest with EcoRI/BamHI
8: pMM18
9: pMM18 digest with EcoRI/PstI

Clones digested	Restriction enzymes used
pMM15-17	EcoRI/BamHI
pMM18	EcoRI/PstI
pVM100-174	EcoRI

Αφού ανιχνεύσαμε τους θετικούς κλώνους, προχωρήσαμε στην παραγωγή maxi prep σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

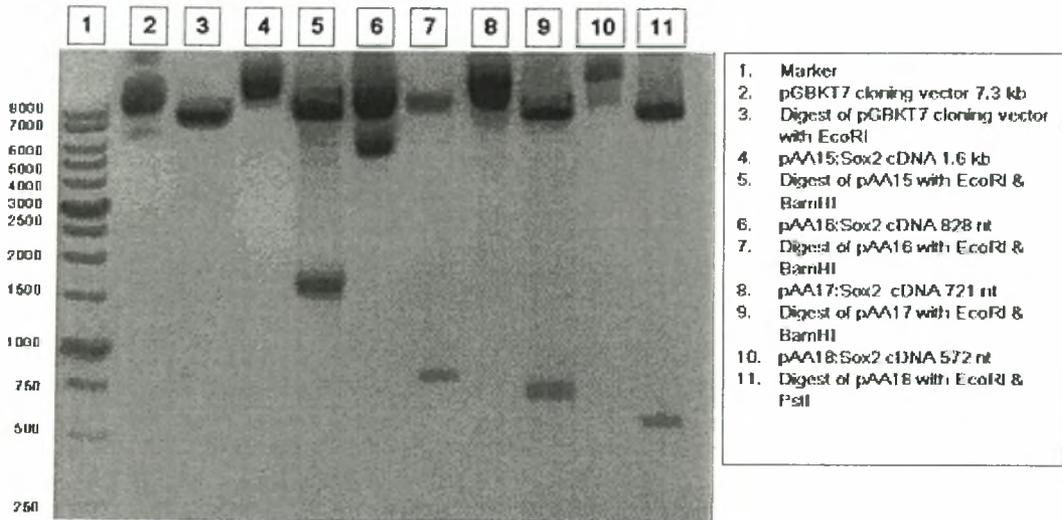
Αλκαλική λύση κυττάρων:

1. Απομονώνουμε μια μονή βακτηριακή αποικία και την καλλιεργούμε σε 250mL θρεπτικό μέσο LB στους 37°C για 16 ώρες, υπό έντονη ανάδευση.
2. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 4000 rpm στους 4 °C.
3. Επαναδιαλύουμε το ίζημα αναδεύοντας για 5 λεπτά σε 10 mL Solution P1.
4. Προσθέτουμε 20 mL από Solution P2.

5. Προσθέτουμε 15 mL από Solution P3.
6. Φιλτράρουμε το εκχύλισμα με Kimwipes
7. Προσθέτουμε 45 mL ισοπροπανόλης.
8. Φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm για 20λεπτά στους 4 °C.
9. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 3 mL ddH₂O.
10. Προσθέτουμε 4.5 gr καΐσιο.
11. Με χρήση αποστειρωμένης πιπέτας Pasteur εισάγουμε το δείγμα Beckman και 50μL βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/mL) σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρωσης.
12. Υπερφυγοκέντρουμε στις 78000 rpm για 4 ώρες στους 20° C.
13. Με χρήση σύριγγας ανοίγουμε μια τρύπα στο επάνω μέρος (ώστε να απομακρύνουμε τον αέρα) και μέσω μιας δεύτερης τρύπας λαμβάνουμε το DNA, το οποίο βρίσκεται ακριβώς επάνω από την ενδιάμεση φάση.
14. Κατόπιν, προσθέτουμε 500 μL διαλύματος ισοπροπανόλης κορεσμένης σε καΐσιο και αναδεύουμε (σε αυτό το βήμα απομακρύνεται το βρωμιούχο αιθίδιο από το δείγμα μας). Επαναλαμβάνουμε ακόμη μια φορά.
15. Επαναδιαλύουμε σε 1.5 όγκο αποστειρωμένο ddH₂O and 3 όγκους καθαρής αιθανόλης. Το πλασμιδιακό DNA καθιζάνει.
16. Φυγοκεντρούμε ή απομονώνουμε το DNA με μια πιπέτα Pasteur.
17. Διαλύουμε το DNA σε 300 μL ddH₂O.

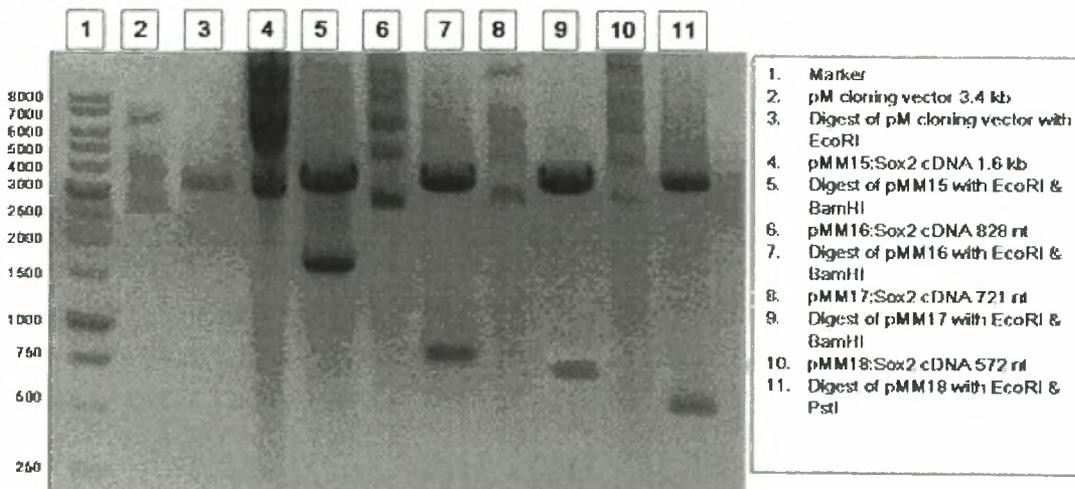
Εικόνα 26: Πέψη των πλασμιδίων pAA15-18 και pMM15-18. Αναπαράσταση της μεταφοράς των τμημάτων *Sox2* cDNA από τον φορέα pGBKT7 στον pM.

Digestion of pAA15-17 with EcoRI/BamHI & pAA18 with EcoRI/PstI



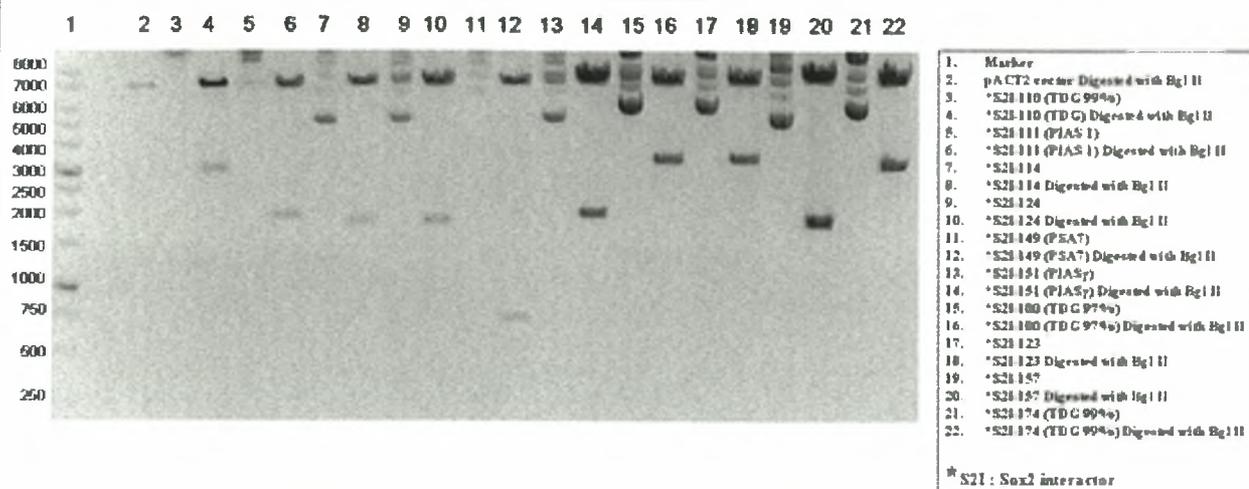
↓
Sox2 cDNA fragments cloned from the pGBKT7 vector (Yeast 2-hybrid) into pM vector (Mammalian 2-hybrid)

Digestion of pMM15-17 with EcoRI/BamHI & pMM18 with EcoRI/PstI



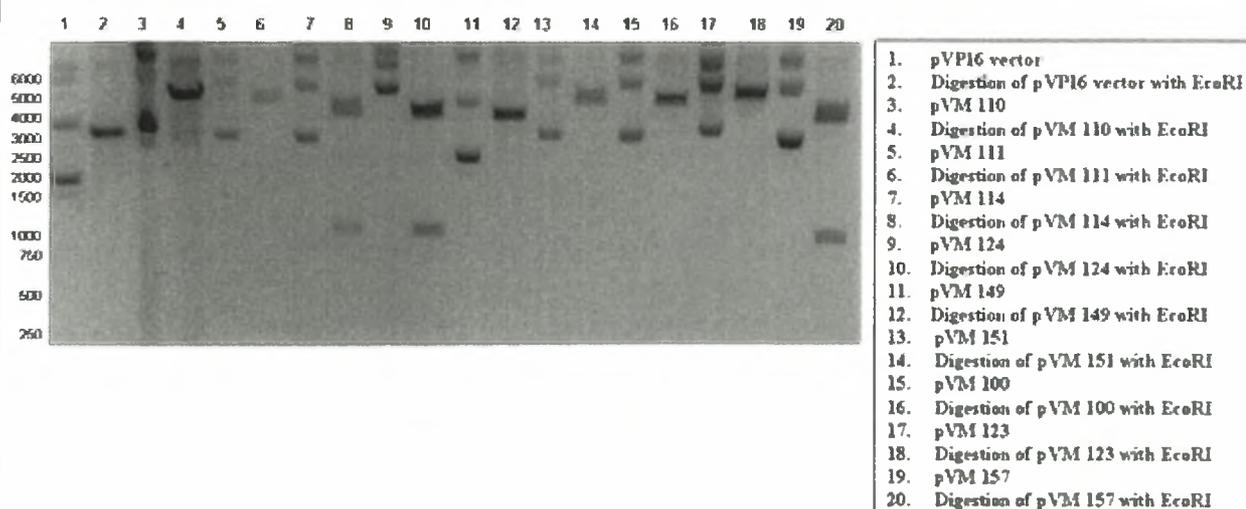
Εικόνα 27: Πέψη των πλασμιδίων S2I 100-174 και pVM 100-157. Αναπαράσταση της μεταφοράς των κλώνων της E7 cDNA βιβλιοθήκης από τον φορέα pACT2 στον pVP16.

Digestion of pACT2 clones with Bgl II



Sox2 interactors cloned from the pACT2
(yeast 2-hybrid) vector to the pVP16 vector
(mammalian 2-hybrid)

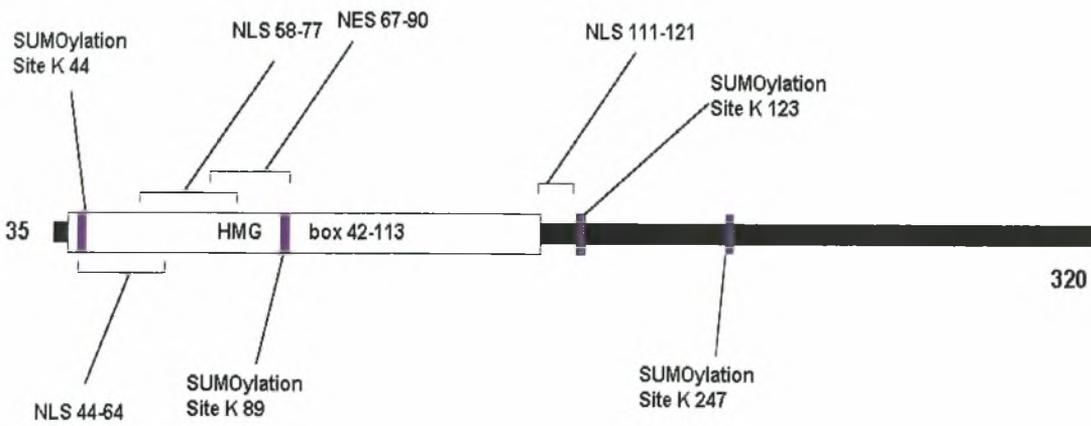
Digestion of pVP16 clones with EcoRI



2.4 Κλάσματα πρωτεϊνών Sox2:

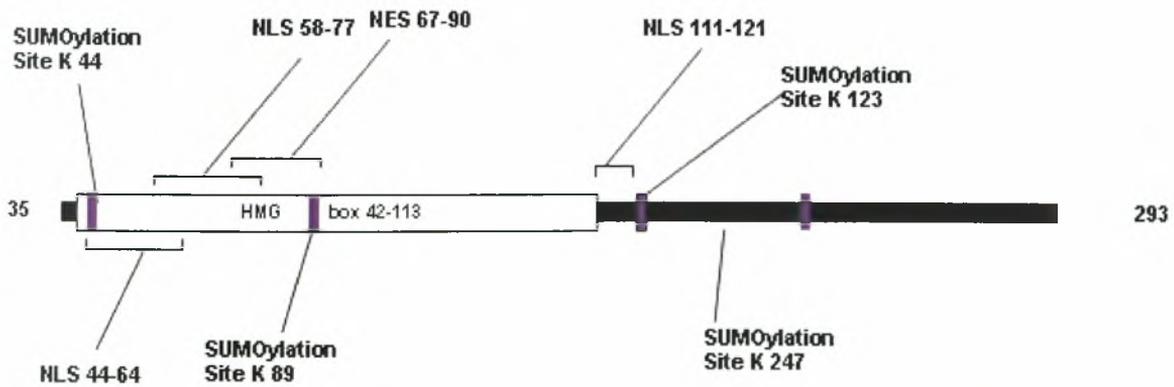
pAA 15
Yeast two hybrid system Vector (Sox2 35-320)

Sox2 35-320



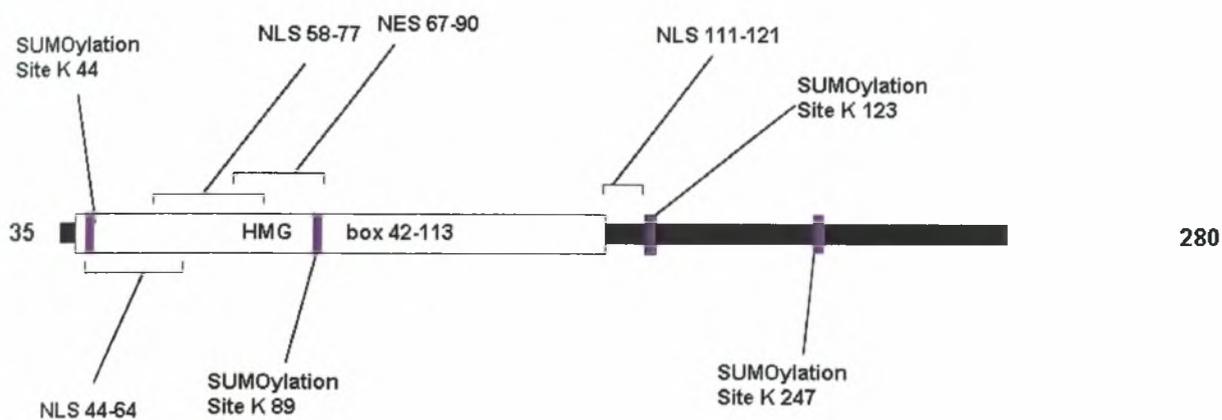
pAA 16
Yeast two hybrid system Vector (Sox2 35-293)

Sox2 35-293



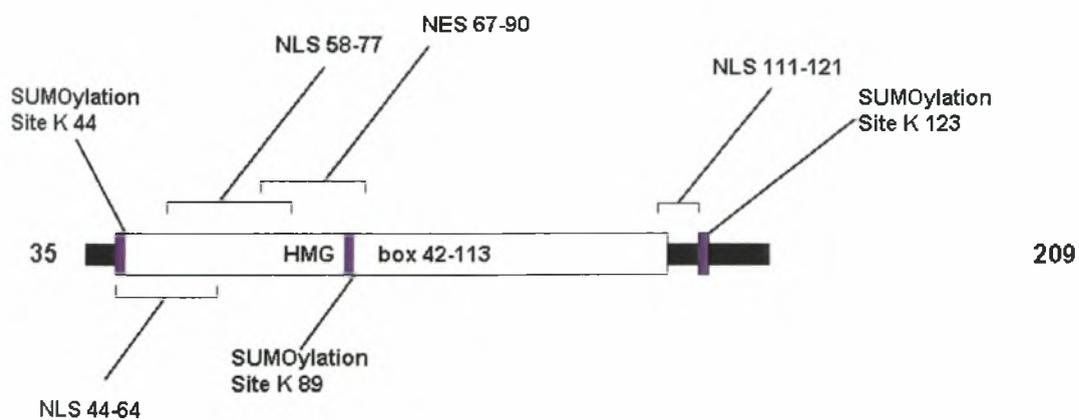
pAA 17
Yeast two hybrid system Vector (Sox2 35-280)

Sox2 35-280



pAA 18
Yeast two hybrid system Vector (Sox2 35-209)

Sox2 35-209



2.5 Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην σουμοϋλίωση:

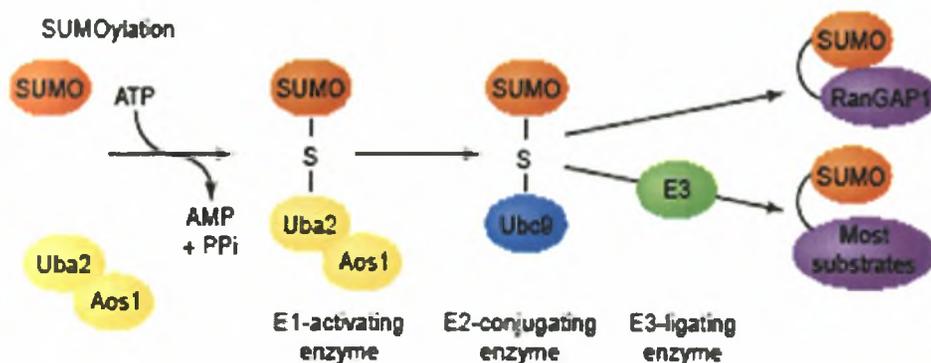
Από ανάλυση δύο υβριδίων σε πειράματα μαγιάς δείχθηκε ότι οι πρωτεΐνες PIASγ και PIAS1 αλληλεπιδρούν με το Sox2. Είναι πολύ ενδιαφέρον να ερευνήσουμε αν αυτή η αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα και σε κύτταρα θηλαστικών, αφού οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες κατέχουν κρίσιμο ρόλο στην διαδικασία της σουμοϋλίωσης.

Table 6: Τα προηγούμενα πέντε χρόνια περιγράφηκαν 3 τύποι SUMO E3 λιγασών (PIAS, RanBP2/Nup358, and Pc2). Η πρώτη κωδικοποιείται από την οικογένεια αναστολέων των ενεργοποιημένων μεταγωγών σήματος και ενεργοποιητών την μεταγραφής (PIAS). Περιέχουν μια αναμενόμενη RING-finger-like δομή απαραίτητη για την λειτουργικότητά τους ως E3 λιγασές, δεσμεύονται άμεσα στο Ubc9 και σε επιλεγμένους SUMO στόχους και διεγείρουν την τροποποίησή τους και in vivo και in vitro. Στον *S.cerevisiae* εκφράζονται 2 μέλη (Siz1 and Siz2). Τα θηλαστικά έχουν τουλάχιστον 5 μέλη: PIAS1, PIAS3, PIASxα, PIASxβ and PIASγ. Αν και οι PIAS πρωτεΐνες εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα, αυτή δεν είναι η μόνη λειτουργική τους θέση (*Frauke Melchior TRENDS in Biochemical Sciences, 2003*)

E3 ligase	Target ^a
PIAS1	p53 c-Jun AR Sp3 GRIP1 CtBP1
PIAS3	IRF-1
PIASxα/ARIP3	AR c-Jun STAT1 Smad4
PIASxβ/Miz1	p53 c-Jun CtBP1
PIASγ	LEF1 Tcf-4 cMyb C/EBPα Smad4
RanBP2/Nup358	Sp100 HDAC4
Pc2	CtBP1, CtBP2

Οι SUMO πρωτεΐνες (small ubiquitin-related modifier) εκφράζονται ευρέως στα ευκαριωτικά κύτταρα και είναι απαραίτητες για την ζωτικότητα σε είδη, όπως ο *S.cerevisiae*. Δεσμεύονται αντιστρεπτά σε ποικίλους κυτταρικούς στόχους, όπου τροποποιούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και πρωτεϊνών με το DNA, μεταβάλλουν την ενδοκυττάρια εντόπιση και προστατεύουν από αποικοδόμηση που μεσολαβείται από την ουβικουΐνη. Οι ανώτεροι οργανισμοί συχνά εκφράζουν αρκετά μέλη της οικογένειας SUMO: τρία (3) εκφράζονται στους ανθρώπους. Ειδικές πρωτεΐνες SUMO συνενώνονται σε διαφορετικούς στόχους υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης και μερικές υπό συνθήκες stress. Οι περισσότεροι από τους γνωστούς στόχους για σουμοϋλίωση μπορούν να συνδεθούν με ποικίλα ειδικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων μεταγωγής σήματος, μεταγραφής, ανακατασκευή χρωματίνης, επιδιόρθωση του DNA, κυτταρική διαίρεση, ιϊκή μετάδοση και πυρηνοπλασματική μεταφορά.

Όμοια με την φωσφορυλίωση, η σουμοϋλίωση των ειδικών στόχων μπορεί να πραγματοποιηθεί ταχύτατα και αντιστρεπτά, όντας ανιχνεύσιμη μόνο εντός των πρώτων λεπτών ενός εξωκυτταρικού ερεθίσματος ή λαμβάνοντας χώρα σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές του κυτταρικού κύκλου. Αυτή η δυναμική τροποποίηση προτείνει ένα υψηλού επιπέδου δίκτυο ρύθμισης από τροποποιητικά και αποτροποποιητικά ένζυμα (*Frauke Melchior TRENDS in Biochemical Sciences, 2003*).



Εικόνα 27: Η ταυτοποίηση της UBC9 και της SUMO-1 σαν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρών με SoxE πρωτεΐνες πρότεινε ένα μηχανισμό όπου η δραστηριότητα των παραγόντων αυτών μπορεί να ρυθμιστεί μεταμεταφραστικά και επιβεβαιώθηκε βιοχημικά ότι όλοι αυτοί οι παράγοντες υποβάλλονται σε σουμοϋλίωση σε έμβρυα *Xenopus*. (*Frauke Melchior TRENDS in Biochemical Sciences, 2003*)

2.6 Καλλιέργεια κυττάρων Cos1:

Τα κύτταρα Cos1 (κύτταρα από νεφρά πθήκου) διατηρήθηκαν σε μέσο κυτταροκαλλιέργειας DMEM (Dullbecco's modified Eagle's medium), το οποίο περιείχε 10% εμβρυϊκό ορό βοδιού (FBS), 100units/mL πενικιλίνη, 100mg/mL στρεπτομυκίνη, 292μg/mL γλουταμίνη.

2.7 Επιμόλυνση των Cos1 κυττάρων:

Μετά την επώαση των κυττάρων over night στους 37 °C έλαβε χώρα η ακόλουθη διαδικασία:

Διάλυμα A: 0.8 μg από κάθε πλασμίδιο σε 50 μL Optimem

Διάλυμα B: 2 μL λιποφεκταμίνης σε 50 μL Optimem.

Ο Πίνακας παρακάτω αναπαριστά τον συνδυασμό των πλασμιδίων που χρησιμοποιηθήκαν σε κάθε περίπτωση.

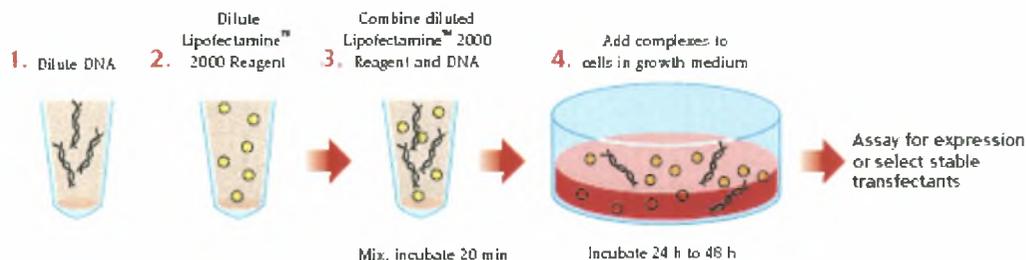
Πίνακας 7. Συνδυασμός των πλασμιδίων που χρησιμοποιηθήκαν σε κάθε περίπτωση.

Wells	S2 FL	S2 35-280	S2 35-209	PIAS1	PIASy	Luciferase	PM-PVP16 Positive control
1	+			+		+	
2	+				+	+	
3		+		+		+	
4		+			+	+	
5			+	+		+	
6			+		+	+	
7						+	
8						+	+
9				+		+	
10					+	+	
11	+					+	
12		+				+	
13			+			+	

*Όλα τα κύτταρα επιμολυνθήκαν με ένα επιπλέον πλασμίδιο, το οποίο περιέχει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, όπου θα χρησιμοποιηθεί η μέτρηση της δραστηριότητας της για την κανονικοποίηση των μετρήσεων της δραστηριότητας λουσιφεράσης (normalization).

Κατόπιν, τα δύο διαλύματα αναμίχθηκαν ελαφρώς και επώαστηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέσαμε διάλυμα opti-mem ώστε να επιτευχθεί όγκος 500 μ L. Απομακρύναμε το θρεπτικό μέσο από τα κύτταρα και προσθέσαμε το παραπάνω διάλυμα. Επώασαμε για 14 ώρες στους 37 °C και αναστέλλαμε την διαδικασία απομακρύνοντας το διάλυμα επιμόλυνσης και προσθέτοντας θρεπτικό μέσο DMEM που περιείχε 5% FBS. Έπειτα, επώασαμε τα κύτταρα για 24 ώρες στους 37 °C. Η εικόνα που ακολουθεί περιγράφει εν συντομία την διαδικασία επιμόλυνσης.

Outline of transfection procedure for Lipofectamine™ 2000 Reagent



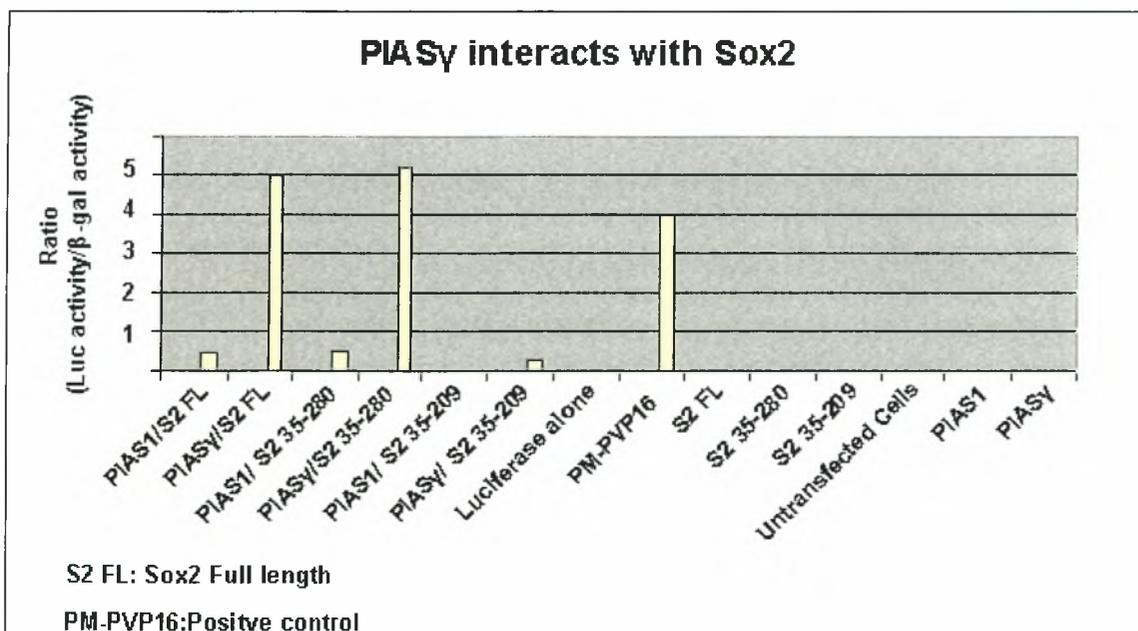
Εικόνα 28. Περιγραφή της διαδικασίας επιμόλυνσης θηλαστικών κυττάρων

2.8 Ποσοτική ανάλυση λουσιφεράσης:

Μετά την επώση 24 ωρών απομακρύνουμε το θρεπτικό μέσο και λύσαμε τα κύτταρα με την χρήση του Stratagene Luciferase assay kit Lysis buffer για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

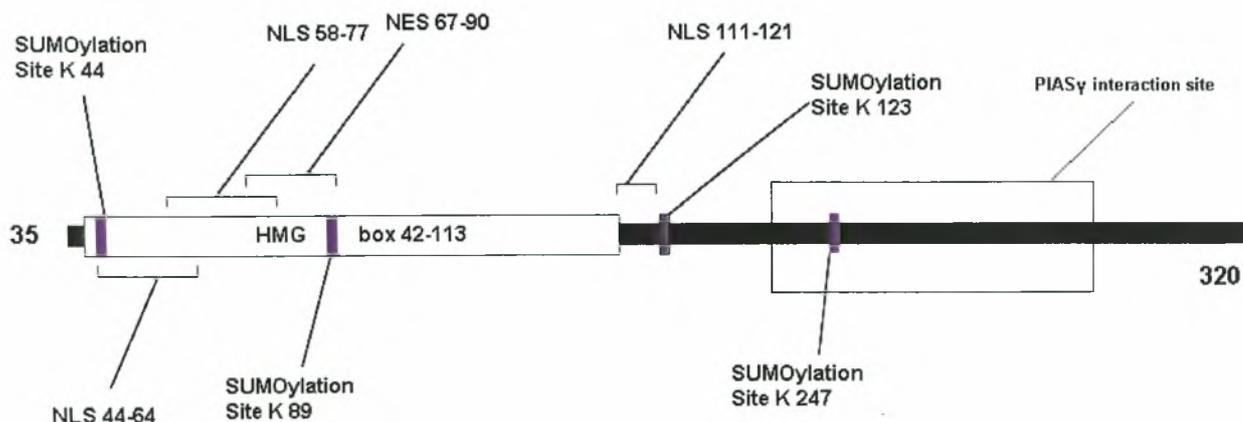
Περιμαζέψαμε τα λυμένα κύτταρα σε σωληνάκια erpendorf των 1,5 mL.

Η πρωτεϊνική συγκέντρωση από κάθε σωληνάκι μετρήθηκε με την μέθοδο Bradford. Χρησιμοποιήσαμε 5 µg πρωτεΐνης για μέτρηση της λουσιφεράσης με την βοήθεια ενός λουμινόμετρου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Εικόνα 29: Παρουσιάζει τα αποτελέσματα μετρήσεων λουσιφεράσης από μετασχηματισμό Cos1 κυττάρων με PIAS1, PIASy, Sox2 35-325, Sox2 35-280 & Sox2 35-209.

Τα αποτελέσματα προτείνουν ότι ο *Sox2* αλληλεπιδρά σε μεγάλο βαθμό με την πρωτεΐνη PIASγ, η οποία είναι μια SUMO-λιγάση που κατέχει κρίσιμο ρόλο στην διαδικασία της σουμοϋλίωσης. Η περιοχή που αλληλεπιδρά είναι μεταξύ των αμινοξέων 209-280. Συμπερασματικά, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η SOX2 μπορεί να σουμοϋλιωθεί σε κάποιο αναπτυξιακό στάδιο.



Εικόνα 30. Παρουσίαση της περιοχής αλληλεπίδρασης του PIAS γ με το Sox2.

Έπειτα, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα ποντικού με χρήση αντισώματος για την SOX2 (**Abcam**) και την PIASγ (**Santa cruz**). Ακολούθησε Western blotting χρησιμοποιώντας αντισώματα για την SOX2, την PIASγ και την SUMO (**Santa-Cruz**) ώστε να ερευνησουμε την πιθανότητα έκφρασης της PIASγ και της σουμοϋλίωσης της SOX2.

2.9 Πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης (IP) και Western blot ανάλυση:

Total cell extract lysis buffer
20 mM Tris-HCl pH 7.8
420 mM NaCl
0.2 mM EDTA
0.5 mM DTT
25% glycerol
0.5 mM PMSF
1.5 mM MgCl ₂

Εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε 10 cm πιάτα κυτταροκαλλιέργειας. Τα κύτταρα (10^6) συγκεντρώθηκαν σε σωληνάκι erpendorf 1.5 mL και φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 rpm για 1 λεπτό. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 200 μL lysis buffer και επώαστηκε για 15 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 15 λεπτών στις 13.000 rpm στους 4 °C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάκι erpendorf.

Διαδικασία IP:

IP buffer
50 mM Tris-HCl pH 7.8
150 mM NaCl
5 mM EDTA
0.5% mM NP-40

Προετοιμάστηκαν σφαίρες αγαρόζης (60 μ L slurry 50% για κάθε δείγμα), ώστε να επωαστούν με το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (preclearing of sample) και να απομακρυνθούν όλες οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την αγαρόζη. 30 μ L σφαίρες αγαρόζης (protein A ή G ανάλογα) προστέθηκαν και ο όγκος ρυθμίστηκε στα 200 μ L με προσθήκη IP buffer. Ακολούθησε επώαση στους 4 °C για 1 ώρα υπό ήπια ανάδευση και σύντομη φυγοκέντρηση. Φυλάξαμε το υπερκείμενο (Percleared extract). Πριν προσθέσουμε τις σφαίρες αγαρόζης στα δείγματα, κρατήσαμε 20 μ L (10%) τα οποία θα αποτελέσουν το δείγμα input για το Western blot.

2-5 μ g αντισώματος προστέθηκαν σε 30 μ L σφαίρες αγαρόζης (ο τελικός όγκος ρυθμίστηκε στα 500 μ L με προσθήκη IP buffer). Ακολούθησε επώαση στους 4 °C για 1 ώρα υπό ήπια ανάδευση και σύντομη φυγοκέντρηση.

- protein A για πολυκλωνικά αντισώματα (Sox2 50 μ L)
- protein G για μονοκλωνικά αντισώματα (PIAS γ 12 μ L)

Το Percleared extract προστέθηκε στις σφαίρες αγαρόζης, οι οποίες είχαν επωαστεί με τα αντισώματα και ακολούθησε επώαση overnight στους 4 °C. Μετά από φυγοκέντρηση κρατήσαμε τις σφαίρες αγαρόζης και προβήκαμε στην διαδικασία Western blot.

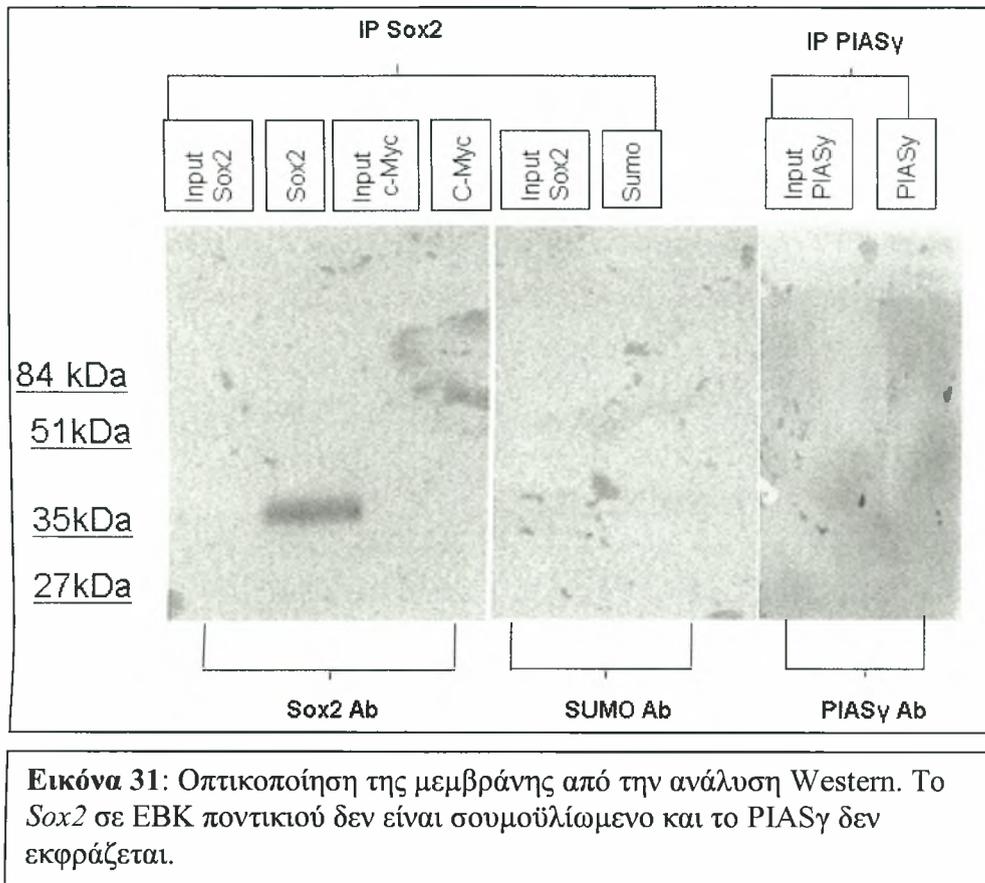
Πρωτόκολλο ανάλυσης Western:

Προστέθηκε ίσος όγκος από 2x Laemli buffer και ακολούθησε επώαση στους 95 °C για 5-10 λεπτά. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική πολυακρυλαμίδης.

Οι πρωτεΐνες ηλεκτρο-μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ανοσοανάλυση

Για να αναστείλουμε την μη-ειδική πρόσδεση, επώασαμε την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με 10% άπαχο γάλα για 30–60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



Η μεμβράνη κόπηκε και επώαστηκε με 2 μg από τα ανάλογα πρωτογενή αντισώματα διαλυμένα σε 10% άπαχο γάλα (το πρώτο κομμάτι με το δείγμα ανοσοκατακρήμνισης της SOX2 επώαστηκε με το αντί-SOX2 και το δεύτερο με το αντί-SUMO. Το δείγμα ανοσοκατακρήμνισης της PIASy επώαστηκε με αντί-PIASy). Η μεμβράνες ξεπλυθήκαν με TBST τρεις φορές για 5 λεπτά κάθε φορά. Η μεμβράνη επώαστηκε για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με horseradish δευτερογενές αντίσωμα δεσμευόμενο με υπεροξειδάση (HRP) με αραιώση 1:10000 σε άπαχο γάλα. Η μεμβράνες ξεπλυθήκαν με TBST.1 τρεις φορές για 5 λεπτά κάθε φορά. Ύστερα, επώαστηκε σε αντιδραστήριο Chemiluminescence Luminol ανάλογα με της οδηγίες του κατασκευαστή και οπτικοποιήθηκε με ECL. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 31.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το *Sox2* εκφράζεται στα EBK και ότι δεν είναι σουμοϋλιώμενο. Επίσης βλέπουμε ότι το PIASy δεν εκφράζεται. Οι πρωτεΐνες input δεν ανιχνεύθηκαν και αυτό πιθανόν γιατί χρησιμοποιήθηκαν λίγα κύτταρα και λόγω μη επαρκούς ευαισθησίας των αντισωμάτων. Αφού ο *Sox2* δεν σουμοϋλιώνεται στα EBK ποντικού, αυτό τα κάνει ιδανικά για την μελέτη της σουμοϋλίωσης του *Sox2* μέσω μετασχηματισμό των κυττάρων αυτών με φορείς

του γονιδίου της PIASγ & της SUMO. Μελετώντας της πιθανότητα αλλαγής στην λειτουργία και την κυτταρική εντόπιση του *Sox2*.

2.10 Υπολογιστική προσέγγιση της σουμοϋλίωσης σε πρωτεΐνες SoxB:

Αναγνωριστήκαν θεωρητικές περιοχές σουμοϋλίωσης του *Sox2* (NCBI Accession No: AAC31791) μέσο του λογισμικού προγράμματος SUMOPLLOT (Abgent, Inc., CA).

Ανάλυση της αλληλουχίας του *Sox2* του ποντικού αποκάλυψε την ύπαρξη 5 μοτίβων για πρόσδεση του SUMO-1. Τέσσερα μοτίβα υψηλής πιθανότητας σουμοϋλίωσης στις θέσεις K247, K44, K123, and K10, και ένα χαμηλής πιθανότητας μοτίβο στην θέση K89. Ανάλυση άλλων μελών της ομάδας SoxB1 και SoxB2 απέδειξαν σημαντική συντήρηση αυτών των περιοχών.

Πιθανές περιοχές σουμοϋλίωσης:

SoxB1 Subgroup

Sox1 gslvksepsg K319	Sox1 qdrvkrpmna K52
Sox2 gsvvkseass K247	Sox2 pdrvkrpmna K44
Sox3 gsvvksepsg K365	Sox3 qdrvkrpmna K131
Sox1 ktllkkdkys K131	Sox1 seaekrpfid K97
Sox2 ktllkkdkyt K123	Sox2 setekrpfid K123
Sox3 ktllkkdkys K210	Sox3 tdaekrpfid K176
Sox2 etelkppgpq K10	Sox3 gaaqks ganp K94
Sox3 etelknpvgp K71	

SoxB2 Subgroup

Sox14 knllkkdryv K250	Sox14 eegakeespa K46
Sox21 ktllkkdkfa K239	Sox14 alarklpshl K55
Sox14 sdhikrpnna K171	Sox14 saiqknqevp K313
Sox21 vdhvkrpnna K27	Sox21 fkalkteerg K27
Sox14 seaekrpyid K216	Sox21 hpalkagagl K263
Sox21 tesekrpfid K205	Sox21 tedkkaegrp K55

Αυτές η μελέτες δείχνουν ότι η σουμοϋλίωση πρέπει να παίζει έναν κεντρικό ρολό στην ρυθμισμό της λειτουργίας του Sox2, συνεπώς και στην ανάπτυξη. Η Sox πρωτεΐνες συμπεριφέρονται ως διακόπτες για την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση σημαντικών γονιδίων για την διαφοροποιημένη και αδιαφοροποίητη κατάσταση των κυττάρων. Έτσι η μελέτη των συνεργατών του Sox2 σε αυτό το επίπεδο ρύθμισης θα μας δώσει κάποια στοιχεία για τα γονίδια που ρυθμίζει. Πραγματοποιήσαμε την ανάλυση των 2-υβριδίων για τους συνεργάτες του Sox2, PIAS1 & PIASγ και παρατηρήσαμε ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ του Sox2 full length και του PIASγ. Δεν παρατηρήσαμε αλληλεπίδραση μεταξύ του Sox2 35-209 και PIASγ, γεγονός που σημαίνει ότι η περιοχή αλληλεπίδρασης βρίσκεται ανάμεσα στα αμινοξέα 209-280 και ότι υπάρχει εκεί μια θέση σουμοϋλίωσης στη K247. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν την σύνδεση ανάμεσα στην αλλαγή του τρόπου δράσης του Sox2 κατά την γαστριδιοποίηση και την πιθανή μετα-μεταφραστική τροποποίηση του από την PIASγ. Επόμενες μελέτες μετασχηματισμού φορέων με PIASγ & SUMO-1 σε EBK ποντικού θα μας βοηθήσουν να κατανοήσουμε την μεταβολή της λειτουργικής συμπεριφοράς και της κυτταρικής εντόπισης του Sox2.

Αναφορές:

1. **STEM CELLS: Scientific Progress and Future Research Directions, June 2001, Report Prepared by the National Institutes of Health)**
2. **Gilbert, S.F. (2000). Developmental biology. (Sunderland, MA: Sinauer Associates).**
3. **Jaesang K. (2004), Transcriptional regulation of neural stem cells by SOX gene family members**
4. **Michele Boiani & Hans R. Scholer. Regulatory Networks in Embryo-Derived Pluripotent Stem Cells. Nature Reviews Mol. Cell Biol(2005).vol.6,no.11, pp. 872-881 pic table**
5. **Kevin A. D'Amour and Fred H. Gage, Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. PNAS (2003) Vol. 100, pp. 11866-11872 table**
6. **Laurie A. Boyer, Tong Ihn Lee, Megan F. Cole, Sarah E. Johnstone, Stuart S. Levine, Jacob P. Zucker,3 Matthew G. Guenther, Roshan M. Kumar, Heather L. Murray, Richard G. Jenner, David K. Gifford, Douglas A. Melton, Rudolf Jaenisch, and Richard A. Young Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. Cell, (2005) Vol. 122, pp. 947–956 **NANOG****
7. **Takao Kuroda, Masako Tada, Hiroshi Kubota, Hironobu Kimura, Shin-ya Hatano, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, and Takashi Tada, , Octamer and Sox Elements Are Required for Transcriptional cis Regulation of Nanog Gene Expression. Mol and Cell Bio(2005), pp. 2475–2485 pic**
8. **Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat. (2000). Genet. 24, 372-376**
9. **Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L: Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. Genes Dev 1995, 9:2635-2645.**
10. **Megan Wilson and Peter Koopman, Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. Current Opinion in Genetics & Development, (2002) vol. 12:441–446 table, pic**
11. **Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H: Pairing SOX off with partners in the regulation of embryonic development. Trends Genet 2000, 16:182-187. pic**
12. **Michael Wegner and C. Claus Stolt, From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. TRENDS in Neurosciences (2005) Vol.28 No.11**

13. Wegner, M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.* (1999) vol. 27, pp. 1409–1420
14. Stolt, C.C. et al. The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. (2003) *Genes Dev.* Vol. 17, pp.1677–1689
17
15. Kamachi Y, Cheah KS, Kondoh H. Mechanism of regulatory target selection by the SOX high-mobility-group domain proteins as revealed by comparison of SOX1/2/3 and SOX9. *Mol Cell Biol.* (1999) Vol. 19: pp.107-20 sox 9 collagenII
16. Kamachi Y, Uchikawa M, Collignon J, Lovell-Badge R, Kondoh H: Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development*(1998),vol. 125:pp.2521-2532.
17. Savare, Jean, and Girard, Franck, The Sox gene family, from *Drosophila* to vertebrates: conserved functions in CNS development(2001)
18. Yoshiki Sasai, Roles of Sox factors in neural determination: conserved signaling in evolution? *Int J Dev Biol* (2001)vol. 45:321-326
19. Kishi, M., Mizuseki, K., Sasai, N., Yamazaki, H., Shiota, K., Nakanishi, S. and Sasai, Y. Requirement of Sox2-mediated Signaling for Differentiation of Early *Xenopus* Neuroectoderm. *Development*(2000) vol. 127: pp.791-800
20. Uchikawa, M. et al. Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mech. Dev.* (1999) 84, 103–120
21. Masanori Uchikawa, Yoshiko Ishida, 1 Tatsuya Takemoto, Yusuke Kamachi, and Hisato Kondoh, Functional Analysis of Chicken Sox2 Enhancers Highlights an Array of Diverse Regulatory Elements that Are Conserved in Mammals *Dev. Cell*, (2003) Vol. 4, pp. 509–519, chicken pics
22. Ariel A. Avilion, Silvia K. Nicolis, Larysa H. Pevny, Lidia Perez, Nigel Vivian and Robin Lovell-Badge, Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Dev* (2003). Vol. 17, pp. 126-140
23. Franck Girard, Frederic Cremazy, Philippe Berta, Armand Renucci, Expression pattern of the Sox31 gene during Zebrafish embryonic development. *Mechanisms of Development* (2000) vol.100 pp. 71-73 pic
24. Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., and Gottlieb, D.I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev. Biol.* 168, 342-357
25. Hisato Kondoh, Masanori Uchicawa and Yusuke Kamachi, Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation. *Dev. Biol.* (2004) Vol. 48: pp. 819-827

26. **Shinya Tanaka, Yusuke Kamachi, Aki Tanouchi, Hiroshi Hamada, Naihe Jing, and Hisato Kondoh, Interplay of SOX and POU Factors in Regulation of the Nestin Gene in Neural Primordial Cells. Mol. and Cell. Biol. (2004), p. 8834–8846**
27. **Kimberly M. Taylor and Carole LaBonne, Department of Biochemistry, Molecular Biology, and Cell Biology and Robert H. Lurie Comprehensive Cancer Center Northwestern University, SoxE Factors Function Equivalently during Neural Crest and Inner Ear Development and Their Activity Is Regulated by SUMOylation, Developmental Cell (2005), Vol. 9, pp. 593–603**
28. **Frauke Melchior, Marion Schergaut and Andrea Pichler, SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores, TRENDS in Biochemical Sciences (2003) Vol.28, pp. 612- 618**