



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΙΪΚΩΝ ΜΟΛΥΝΣΕΩΝ**

**ANALYSIS OF THE REGULATORY MECHANISMS THAT GOVERN GENE
EXPRESSION DURING VIRAL INFECTIONS**

ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ (I.I.B.E.A.A)

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Δρ. ΜΑΡΙΟΣ ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΣ, ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Δ΄
ΚΕΝΤΡΟ ΒΑΣΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ I.I.B.E.A.A.**

**ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΜΕΛΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:
ΜΑΡΙΑ ΚΟΝΤΟΥ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΜΑΡΙΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΒΑΣΙΛΟΓΙΑΝΝΗ

Σημείωμα: Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Κέντρου Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος «Decoding a human Antiviral Gene expression Program». Η εργασία αυτή, χρηματοδοτήθηκε από τον προϋπολογισμό του I.IB.E.A.A. και από το Ίδρυμα Fondation Santé, το οποίο έχει βραβεύσει το ερευνητικό πρόγραμμα «Decoding a human Antiviral Gene expression Program».

Ευχαριστίες: Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Δρος. Μάριου Αγγελόπουλου στο Κέντρο Βασικής Έρευνας του I.IB.E.A.A. , και διήρκησε 8 μήνες, από τον Φεβρουάριο του 2018, έως τον Σεπτέμβριο του 2018. Το γεγονός ότι είχα την μοναδική τύχη να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία σε αυτό το εξαιρετικό, από κάθε άποψη, περιβάλλον με κάνει να νιώθω ιδιαίτερα ευγνώμων.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τον επιβλέπων καθηγητή μου, Δρ. Μάριο Αγγελόπουλο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, ώστε να με δεχθεί ως μέλος της ερευνητικής του ομάδας. Θα θυμάμαι για πάντα την ευτυχία που ένιωσα όταν μου ανακοίνωσε πως δέχεται την αίτηση μου, να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του I.IB.E.A.A. υπό την επίβλεψη του. Επιπρόσθετα, οι γνώσεις και οι αρχές επαγγελματικής δεοντολογίας που μου μετέδωσε θα με ακολουθούν και θα είναι χρήσιμες για την μελλοντική πορεία μου ως επιστήμονας και ως άνθρωπος. Ένας επιπλέον λόγος για τον οποίο του είμαι ευγνώμων, είναι το μοναδικό και ειλικρινές ενδιαφέρον που δείχνει απέναντι στους φοιτητές του, καθώς και η προθυμία του να βοηθήσει σε κάθε περίπτωση, χαρακτηριστικά που τον κάνουν να ξεχωρίζει.

Με την ίδια θέρμη θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου απέναντι στον υποψήφιο διδάκτορα Σπύρο Φουταδάκη, η βοήθεια, η καθοδήγηση και οι συμβουλές του οποίου, ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Του είμαι ευγνώμων για την καλή του διάθεση να μου μεταδώσει τις γνώσεις του, να λύσει κάθε μου απορία και να με εμπνεύσει κάθε φορά που το είχα ανάγκη.

Είναι σημαντικό να ευχαριστήσω τον Ακαδημαϊκό, Πρόεδρο του Επιστημονικού Συμβουλίου και Αντιπρόεδρο του Δ.Σ. του I.IB.E.A.A. και Διευθυντή του Κέντρου Βασικής Έρευνας Δημήτριο Θάνο, για την τιμή που είχα να βρίσκομαι σε αυτό το καταπληκτικό περιβάλλον.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές της σχολής μου Νικόλαο Μπαλατσό, ως συνεπιβλέπων, και Μαρία Κοντού, ως μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής, οι οποίοι ήταν διαθέσιμοι να παρέχουν κάθε βοήθεια που τους ζητήθηκε, ενθάρρυναν την προσπάθειά μου και έδωσαν χρήσιμες συμβουλές για την βελτιστοποίηση της εργασίας αυτής.

Ακόμα θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στα μέλη του εργαστηρίου που συνέβαλαν στην δημιουργία και διατήρηση ενός υπέροχου εργαστηριακού-εργασιακού περιβάλλοντος και για τον τρόπο που με ενσωμάτωσαν και με έκαναν να νιώσω μέλος της ομάδας τους.

Τέλος, θέλω να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου Κωνσταντίνο Βασιλογιάννη και Χριστίνα Ζαχαρή οι οποίοι ενθαρρύνουν κάθε επιλογή μου και χωρίς τους οποίους τίποτα από όσα έχω πετύχει δεν θα ήταν δυνατό, την δίδυμη αδελφή μου, Ίρις, που στέκεται πάντα στο πλευρό μου, τον σύντροφο μου, Ραφαήλ, για την συνεχή του υποστήριξη καθώς και όλους τους υπόλοιπους φίλους που είναι πάντα εκεί σε οτιδήποτε χρειαστώ.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract	6
1. Εισαγωγή.....	7
1.1. DNA - Το γενετικό υλικό.....	7
1.2. Ευκαρυωτική Χρωματίνη.....	7
1.3. Μεταγραφή.....	9
1.4. Δομή της χρωματίνης και ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.....	10
1.5. Ίικη μόλυνση και επαγωγή της αντι-ϊικής απόκρισης.....	13
1.6. Γονιδιωματική και αλληλούχιση νέας γενιάς.....	17
1.7. Σκοπός της εργασίας	17
2. Πειραματικό μέρος	18
2.1. Κυτταροκαλλιέργεια ανθρώπινων κυτταρικών σειρών (human cell lines)	18
2.1.1. Προετοιμασία θρεπτικών μέσων.....	18
2.1.2. Ξεπάγωμα κυττάρων.....	19
2.1.3. Πάγωμα κυττάρων.....	19
2.1.4. Ανακαλλιέργεια κυττάρων – Ανάπτυξη καλλιέργειας σε μεγάλη κλίμακα.....	19
2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	20
2.2.1. Προετοιμασία πηκτής αгарόζης.....	20
2.2.2. Έναρξη της ηλεκτροφόρησης.....	21
2.3. Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP).....	22
2.3.1. Απομόνωση χρωματίνης.....	23
2.3.2. Κατακερματισμός της χρωματίνης με υπέρηχους (sonication).....	24
2.3.3. Έλεγχος ποιότητας της χρωματίνης.....	24
2.3.4. Κατεργασία με πρωτεΐνωση K.....	25
2.3.5. Καθαρισμός DNA με αντίδραση φαινόλης χλωροφορμίου και κατακρήμιση με αιθανόλη....	25
2.3.6. Καθαρισμός DNA με SPRI μαγνητικά σφαιρίδια (Solid Phase Reversible Immobilization beads).....	26
2.3.7. Καθαρισμός των μαγνητικών σφαιριδίων.....	27
2.3.8. Καθαρισμός της χρωματίνης πριν από τη χρησιμοποίηση της σε πείραμα ανοσοκατακρήμισης (preclearing).....	28
2.3.9. Ανοσοκατακρήμιση.....	28
2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	30
2.4.1. Αλυσιδωτή ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR).....	30
2.5. Προετοιμασία βιβλιοθηκών για αλληλούχιση	31

2.5.1. Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης (gel extraction).....	34
2.6. Starr -seq (self-transcribing active regulatory region sequencing)	34
2.6.1. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με χρήση λιποφεκταμίνης (transfection).....	35
2.6.2. Μάζεμα των κυττάρων και πάγωμα του ιζήματος.....	36
2.6.3. Απομόνωση RNA.....	36
2.6.4. Κατεργασία με DNaseI.....	37
2.6.5. Καθαρισμός των αντιδράσεων με RNeasy Mini Kit.....	37
2.6.6. Εμπλουτισμός των δειγμάτων RNA σε mRNA [poly(A)-selection].....	38
2.6.7. Δημιουργία cDNA- RT-PCR.....	40
2.6.8. Παρασκευή Starr cDNA βιβλιοθήκης.....	41
2.7. Ανάλυση αποτελεσμάτων	42
2.7.1. Ανάλυση αποτελεσμάτων της Real Time PCR.....	42
2.7.2. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης δειγμάτων από πειράματα ChIP.....	43
3. Αποτελέσματα.....	44
3.1. Μόλυνση Κυττάρων με ιό.....	44
ΜΕΡΟΣ Α.....	44
3.2. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης – Μελέτη και ταυτοποίηση επαγόμενων από ιϊκή μόλυνση cis-ρυθμιστικών στοιχείων.....	44
3.2.1. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης στην κυτταρική σειρά NAMALWA.....	44
3.2.2. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης στην κυτταρική σειρά HeLa.....	53
3.2.3. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης στην κυτταρική σειρά HCT116.....	56
3.3.3. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης.....	58
Αποτελέσματα αλληλούχισης STAT2 ChIP.....	58
Αποτελέσματα αλληλούχισης RNA Pol II ChIP σε κύτταρα HeLa.....	68
Αποτελέσματα αλληλούχισης RNA Pol II ChIP σε κύτταρα Namalwa.....	71
Αποτελέσματα αλληλούχισης Med1 ChIP σε HeLa.....	73
Αποτελέσματα αλληλούχισης H3K27ac ChIP σε Namalwa.....	81
Αποτελέσματα αλληλούχισης H3K27ac ChIP σε HeLa.....	86
Σύγκριση αποτελεσμάτων αλληλούχισης DNA από πειράματα ChIP με στόχο την H3K27ac σε HeLa και Namalwa.....	90
Αποτελέσματα αλληλούχισης RAD21 ChIP σε Namalwa	94
Σύγκριση αποτελεσμάτων.....	97
ΜΕΡΟΣ Β.....	104
3.3. Εναλλακτικό κυτταρικό σύστημα για πειράματα STARR-seq.....	104
3.3.1. Έλεγχος καταλληλότητας των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών K562 και HCT116 για χρήση σε πειράματα STARR-seq.....	104
3.3.2. Πείραμα Starr με χρήση κυττάρων HCT116.....	105

3.3.3. Transfection σε κύτταρα HeLa.....	110
4. Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	112
5. Βιβλιογραφία	115
6. Παράρτημα.....	117

Περίληψη

Οι ιϊκές μολύνσεις αποτελούν μία σοβαρή απειλή για την παγκόσμια υγεία, καθώς χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας. Λόγω αυτού του γεγονότος, καθίσταται αναγκαία η κατανόηση των μηχανισμών, σε μοριακό επίπεδο, με τους οποίους τα ανθρώπινα κύτταρα ανταποκρίνονται στις ιϊκές μολύνσεις. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, επιχειρείται η μελέτη των μηχανισμών ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια ιϊκών μολύνσεων. Πιο συγκεκριμένα, στοχεύεται η κατανόηση και αποκρυπτογράφηση της λειτουργίας των ρυθμιστικών στοιχείων τα οποία οδηγούν σε χωροχρονικά ορθή έκφραση αντι-ιϊκών γονιδίων. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η συστηματική ερευνητική μελέτη, έχει αποδείξει την ύπαρξη ενός ρυθμιστικού κώδικα, ο οποίος αποτελείται από την συνδυαστική λειτουργία cis και trans ρυθμιστικών στοιχείων, και είναι καθοριστικός για την επαγωγή της έκφρασης, και τον βαθμό αυτής, γονιδίων σε κοντινή ή απομακρυσμένη θέση στο γονιδίωμα. Ο ρυθμιστικός αυτός κώδικας διέπεται από μία μηχανιστική λογική, η αποκρυπτογράφηση της οποίας αποτελεί πρόκληση.

Σκοπός του προγράμματος «Decoding a human Antiviral Gene expression Program» και κατ' επέκταση της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η κατασκευή ενός Άτλαντα (Virus Induced Enhancer Atlas: Agelopoulos et al in preparation) ρυθμιστικών στοιχείων τα οποία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση της αντι-ιϊκής απάντησης των ανθρώπινων κυττάρων. Για την συμβολή στην επίτευξη του στόχου αυτού, στα πλαίσια αυτής της εργασίας, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ChIP-seq και συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών, μεταξύ τους αλλά και με προϋπάρχοντα δεδομένα του εργαστηρίου, που έδωσαν απάντηση για την κατανομή μεταγραφικών παραγόντων, ιστονικών τροποποιήσεων και ρυθμιστικών συμπλόκων κατά μήκος του γονιδιώματος, και κατέδειξαν πιθανούς μηχανισμούς αλληλεπίδρασης αυτών. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μία διαδικασία ελέγχου, για την εγκαθίδρυση ενός νέου κυτταρικού συστήματος σε πειράματα STARR-seq, που σκοπό έχει την βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου αυτού, που εφαρμόζεται στο εργαστήριο για την αξιολόγηση της δραστηριότητας πιθανών ενισχυτών.

Abstract

Viral infections pose a serious threat to global health, as they are characterized by high levels of morbidity and mortality. Because of this fact, it is necessary to understand the molecular mechanisms, that govern human cells' response to viral infections. This Diploma Thesis, attempts to study the regulatory mechanisms of gene expression during viral infections. Specifically the purpose of this thesis is to decipher and understand the function of the regulatory elements that lead to the temporospatially correct expression of anti-viral genes. During the last decades, fundamental studies, have proven the existence of a regulatory code, that comprises of the combinatorial function of cis- and trans- regulatory elements and determines the induction of adjacent, nearby and distal genes' expression, and the levels of it. This regulatory code is governed by a mechanistic logic that is hard to elucidate.

The goal of the program «Decoding a human Antiviral Gene expression Program» and consequently of this Diploma Thesis, is the construction of an atlas (Virus Induced Enhancer Atlas: Agelopoulos et al in preparation) of the regulatory elements that play a decisive role in the regulation of the human cells' anti-viral response. In order to contribute to the achievement of this goal, in the framework of this Diploma Thesis, ChIP-seq experiment were conducted, and the data were comparatively analyzed, with the data of previous experiments, giving an answer for the distribution of transcriptional factors, histone modifications and regulatory complexes across the genome, and also for the interaction between them. Finally, a procedure was performed in order to test a new cellular system that could be established in STARR-seq experiments, to improve this protocol that is used in the laboratory to evaluate the activity of putative enhancers.

1. Εισαγωγή

1.1. DNA - Το γενετικό υλικό

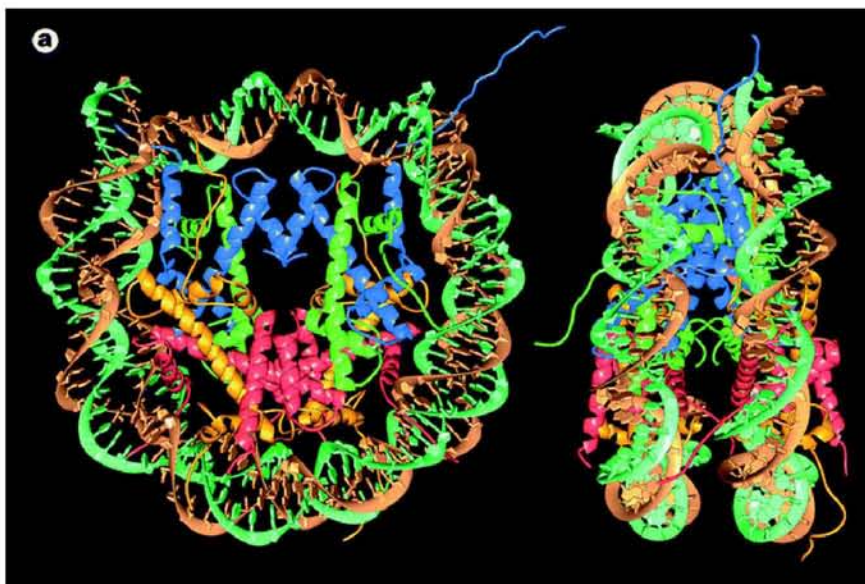
Τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των οργανισμών συνιστούν το φαινότυπο ο οποίος καθορίζεται από το γονότυπο και από το περιβάλλον. Η παραδοχή αυτή, έγινε περισσότερο κατανοητή με την ανακάλυψη και αποκωδικοποίηση των προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης (decoding gene expression programs). Η παραπάνω οπτική οδήγησε στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τα κυτταρικά φαινόμενα σε επίπεδο δομής και λειτουργίας και στη συνέχεια τη συντονισμένη λειτουργία ιστών και οργάνων σε επίπεδο πολυκύτταρου οργανισμού.

Ο όρος ‘γονότυπος’ αναφέρεται στο σύνολο της γενετικής πληροφορίας ενός οργανισμού, δηλαδή στο σύνολο των γονιδίων του. Αυτή η πληροφορία βρίσκεται αποθηκευμένη στο DNA το οποίο περιέχεται μέσα στα κύτταρα κάθε ευκαρυωτικού ή προκαρυωτικού οργανισμού ή στα καψίδια των ιών. Εξάιρεση αποτελούν οι RNA ιοί των οποίων η γενετική πληροφορία είναι αποθηκευμένη σε μόρια RNA. Η ανακάλυψη ότι το DNA είναι το μακρομόριο το οποίο φέρει τη γενετική πληροφορία, ήταν προϊόν δεκαετιών έρευνας, με σημαντική τη συμβολή πειραμάτων, όπως αυτά του βακτηριακού μετασχηματισμού του Fred Griffith (1928), και τα μεταγενέστερα πειράματα των Oswald Avery, Colin McLeod και Maclyn McCarty (1944), Rollin Hotchkiss (1949) και Erwin Chargaff (1950) (Burton E. Tropp, 2014).

Το DNA είναι ένα γραμμικό πολυμερές που αποτελείται από δεοξυριβονουκλεοτίδια, στην αλληλουχία των οποίων αποθηκεύεται η πληροφορία που αυτό φέρει. Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός πως στα ευκαρυωτικά κύτταρα το γενετικό υλικό οργανώνεται, διαμερισματοποιείται και λειτουργεί ορθά με τη συμβολή πρωτεϊνών συναποτελώντας μια δομή που ονομάζεται χρωματίνη (chromatin).

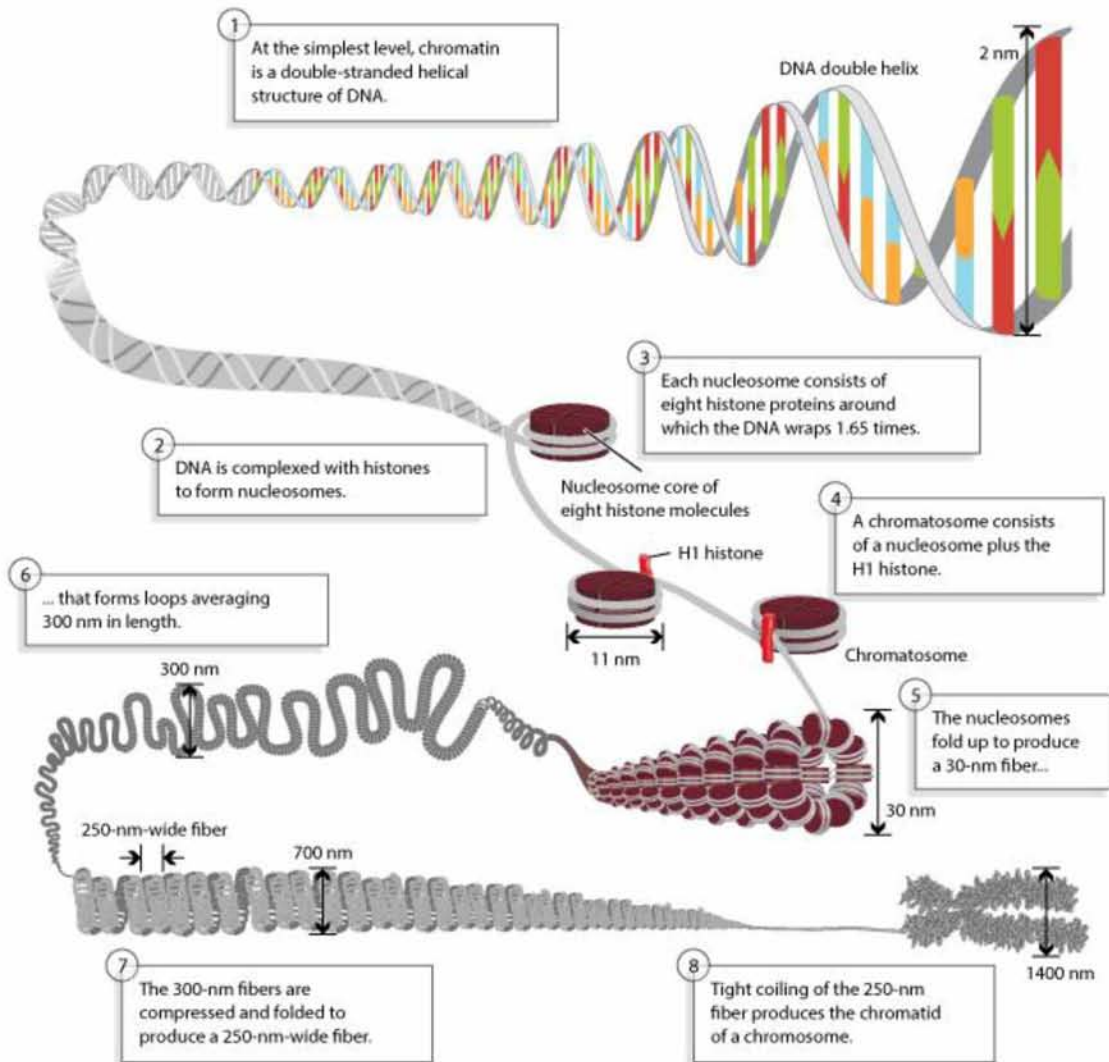
1.2. Ευκαρυωτική Χρωματίνη

Το μεγάλο μήκος του μορίου του DNA καθιστά απαραίτητη την ύπαρξη ενός μηχανισμού συσπείρωσης του, ώστε να μπορέσει να χωρέσει στον, μικρής διαμέτρου, πυρήνα του κυττάρου. Έτσι κατά μήκος κάθε μορίου DNA που περιέχεται στον πυρήνα ενός ευκαρυωτικού κυττάρου παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες που ονομάζονται ιστόνες, σχηματίζοντας ένα συμπυκνωμένο νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που ονομάζεται χρωματίνη. Στην ευκαρυωτική χρωματίνη εντοπίζονται 5 διαφορετικοί τύποι ιστονών, οι H1, H2A, H2B, H3, και H4 (Kornberg & Lorch, 1999). Οι ιστόνες σχηματίζουν οκταμερή γύρω από τα οποία περιελίσσεται το DNA δημιουργώντας δομές που ονομάζονται νουκλεοσώματα (Εικόνα 1). Το ιστονικό οκταμερές του νουκλεοσώματος περιλαμβάνει 2 μόρια H2A, H2B, H3 και H4, και το μήκος του δίκλωνου DNA που το περιβάλλει ανέρχεται στα 146 ζεύγη βάσεων (Noll, 1974).



Εικόνα 1: Κρυσταλλογραφική απεικόνιση του πυρηνικού σωματίου του νουκλεοσώματος. Ο φωσφοδιεστερικός σκελετός του DNA μήκους 146 ζ.β. αναπαριστάται με καφέ και πράσινο χρώμα. Οι πρωτεΐνες του οκταμερούς, στον πυρήνα του νουκλεοσώματος αναπαριστώνται με μπλε (H3), πράσινο (H4), πορτοκαλί (H2A) και φούξια (H2B). (Luger, Mäder, Richmond, Sargent, & Richmond, 1997)

Η ιστόνη H1 εμφανίζει προτίμηση πρόσδεσης στο συνδετικό DNA, το οποίο βρίσκεται ανάμεσα στα διαδοχικά νουκλεοσώματα (linker DNA) και συμβάλει στην περαιτέρω αναδίπλωση της χρωματίνης (Nguyen et al., 2014). Σε τελικό στάδιο, η έντονη αναδίπλωση της χρωματίνης καταλήγει στον σχηματισμό των χρωμοσωμάτων, δηλαδή συμπαγών δομών οι οποίες καθιστούν δυνατή την αποθήκευση της στον ευκαρυωτικό πυρήνα (Εικόνα 2). Επιπρόσθετα, υπάρχουν πολλά μόρια ιστονών με διαφορετική αλληλουχία από τις κλασσικές ιστόνες που ονομάζονται ιστονικές ποικιλομορφές (Histone variants). Τα μόρια αυτά, σε αντίθεση με τις κανονικές ιστόνες, οι οποίες εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά κατά τη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου, εκφράζονται καθ' όλη την διάρκεια της ζωής των κυττάρων. Οι ιστονικές ποικιλομορφές κατόπιν της έκφρασης τους μεταφέρονται και τοποθετούνται στην χρωματίνη με την βοήθεια ειδικών μορίων που ονομάζονται ιστονικές τσαπερόνες (Histone Chaperones). Το αποτέλεσμα της εισαγωγής των ιστονικών ποικιλομορφών στη χρωματίνη, είναι η δημιουργία νουκλεοσωμάτων με εξειδικευμένες δομές και ιδιότητες και κατ' επέκταση η τροποποίηση της λειτουργίας χρωματινικών περιοχών (Biterge & Schneider, 2014). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η macroH2A, η παρουσία της οποίας στα νουκλεοσώματα του υποκινητή του γονιδίου της ιντερλευκίνης 8 (IL-8) σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, αποτρέπει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων με συνέπεια την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου στα κύτταρα αυτά (Agelopoulos & Thanos, 2006).



Εικόνα 2: Αναδίπλωση και συσπείρωση της χρωματίνης. Το ευκαρυωτικό DNA περιελίσσεται γύρω από ένα οκταμερές ιστονών σχηματίζοντας το νουκλεόσωμα. Τα διαδοχικά νουκλεοσώματα αναδιπλώνονται σχηματίζοντας ένα νήδιο χρωματίνης, το οποίο θα συσπειρωθεί περαιτέρω για να σχηματίσει ένα χρωμόσωμα (Nature, education adapted from Pierce, Benjamin, 2006).

1.3. Μεταγραφή

Η γενετική πληροφορία που βρίσκεται αποθηκευμένη στην αλληλουχία του DNA μεταβιβάζεται στο RNA και τελικά στις πρωτεΐνες. Αυτή η ροή της γενετικής πληροφορίας, συνοψίζεται στο κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας, το οποίο προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Francis Crick το 1958.

Η μεταγραφή είναι η διαδικασία σύνθεσης ενός μορίου RNA με βάση την αλληλουχία ενός γονιδίου και καταλύεται από ένζυμα που ονομάζονται RNA πολυμεράσες. Στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων εντοπίζονται 3 είδη τέτοιων ενζύμων, οι RNA πολυμεράσες I, II και III. Κάθε ένα από αυτά τα ένζυμα έχει διακριτές λειτουργίες και συνθέτει μόρια RNA διαφορετικού τύπου. Είναι γνωστό, πως ένα μικρό κλάσμα του ανθρώπινου γονιδιώματος, της τάξης του 1%, κωδικοποιεί πρωτεΐνες (Collins, Lander, Rogers, & Waterson, 2004). Η μεταγραφή των γονιδίων αυτών πραγματοποιείται από το ένζυμο RNA πολυμεράση II και το προϊόν της είναι ένα πρόδρομο μόριο αγγελιαφόρου RNA (Pre-mRNA).

Η μεταγραφή ξεκινάει με την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης σε μία αλληλουχία που εντοπίζεται κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής και ονομάζεται υποκινητής. Η πρόσδεση της RNA πολυμεράσης στην αλληλουχία του υποκινητή, ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της μεταγραφής, διαμεσολαβείται από

ορισμένες πρωτεΐνες που ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες. Όλοι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν ορισμένους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες (general transcription factors, GTFs), οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την στρατολόγηση της RNA πολυμεράσης II στην αλληλουχία του υποκινητή και την απελευθέρωση της από αυτήν, για την έναρξη της μεταγραφής του εκάστοτε γονιδίου. Οι μεταγραφικοί παράγοντες ο οποίοι εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία είναι οι TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE και TFIIH. Η στρατολόγηση των μεταγραφικών παραγόντων σε συγκεκριμένες αλληλουχίες-μοτίβα του υποκινητή ξεκινάει με την πρόσδεση του παράγοντα TFIID. Ο παράγοντας αυτός διαθέτει μία πρωτεϊνική υπομονάδα πρόσδεσης στην αλληλουχία TATA (TATA box binding protein, TBP) και ορισμένους TBP σχετιζόμενους παράγοντες (TBP- Associated Factors, TAFs). Σε αντίθεση με την TBP, η οποία είναι απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση σε όλους τους υποκινητές, οι TAFs εμφανίζουν ειδικές αλληλεπιδράσεις με μία ποικιλία από αλληλουχίες υποκινητών, ενώ διευκολύνουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής σε υποκινητές όπου η αλληλουχία TATA που αναγνωρίζεται από την TBP δεν είναι παρούσα (Louder et al., 2016). Ο παράγοντας TFIID έχει σχήμα πετάλου και η πρόσδεση του στο DNA προκαλεί μία κάμψη 90° και ακολουθεί σταθεροποίηση του συμπλόκου DNA-TFIID μέσω της στρατολόγησης των TFIIA και TFIIB. Το σύμπλεγμα αυτό προσελκύει το σύμπλεγμα TFIIIF-Pol II, την πρόσδεση του οποίου ακολουθεί η πρόσδεση των παραγόντων TFIIIE και TFIIH. Με την πρόσδεση των τελευταίων δημιουργείται το προ-εναρκτήριο σύμπλοκο (pre-initiation complex, PIC) στην αλληλουχία του υποκινητή, με το δίκλωνο DNA να είναι κλειστό. Η δημιουργία του συμπλόκου αυτού οδηγεί στην αλλαγή της διαμόρφωσης αυτών των παραγόντων οι οποίοι αποκτούν την λειτουργική τους μορφή, και η παρουσία ATP προκαλεί άνοιγμα του δίκλωνου DNA στη θέση έναρξης της μεταγραφής (από την TFIIH) για τον σχηματισμό της μεταγραφικής φούσκας (transcriptional bubble) και έναρξη της σύνθεσης RNA (Sainsbury, Bernecky, & Cramer, 2015).

Εκτός από τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες, η μεταγραφική ενεργοποίηση βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην δράση μίας άλλης ομάδας μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι ονομάζονται μεταγραφικοί ενεργοποιητές (Transcriptional activators). Οι μεταγραφικοί ενεργοποιητές αναγνωρίζουν και συνδέονται σε ειδικές αλληλουχίες, οι οποίες ονομάζονται θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Transcriptional Factor Binding Sites, TFBSs) (Maston, Evans, & Green, 2006). Οι μεταγραφικοί ενεργοποιητές λειτουργούν ενισχύοντας την δημιουργία του προ-εναρκτηρίου συμπλόκου, μέσω της αλληλεπίδρασης της επικράτειας ενεργοποίησης τους με κάποιο από τους παράγοντες του PIC (Orphanides, Lagrange, & Reinberg, 1996, Ptashne & Gann, 1997) ή προωθώντας την επιμήκυνση της μεταγραφής (Lee & Young, 2000). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι οι ενεργοποιητές λειτουργούν μέσω της στρατολόγησης πρωτεϊνών, οι οποίες δρουν τροποποιώντας την δομή της χρωματίνης (Lemon & Tjian, 2000).

Η λειτουργικότητα των ενεργοποιητών ρυθμίζεται από μία τρίτη ομάδα μεταγραφικών παραγόντων, τους συνενεργοποιητές. Οι παράγοντες αυτοί δεν συνδέονται απευθείας στο DNA, αλλά στρατολογούνται μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών από έναν ή περισσότερους προσδεμένους στο DNA ενεργοποιητές. Οι μεταγραφικοί συνενεργοποιητές δρουν παρόμοια με τους ενεργοποιητές, μέσω προώθησης του σχηματισμού του PIC, ή μπορεί να διαθέτουν δράση ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών, προωθώντας με αυτό τον τρόπο το άνοιγμα της χρωματίνης και την πρόσδεση του PIC στον υποκινητή του γονιδίου (Brown, Lechner, Howe, & Workman, 2000).

1.4. Δομή της χρωματίνης και ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

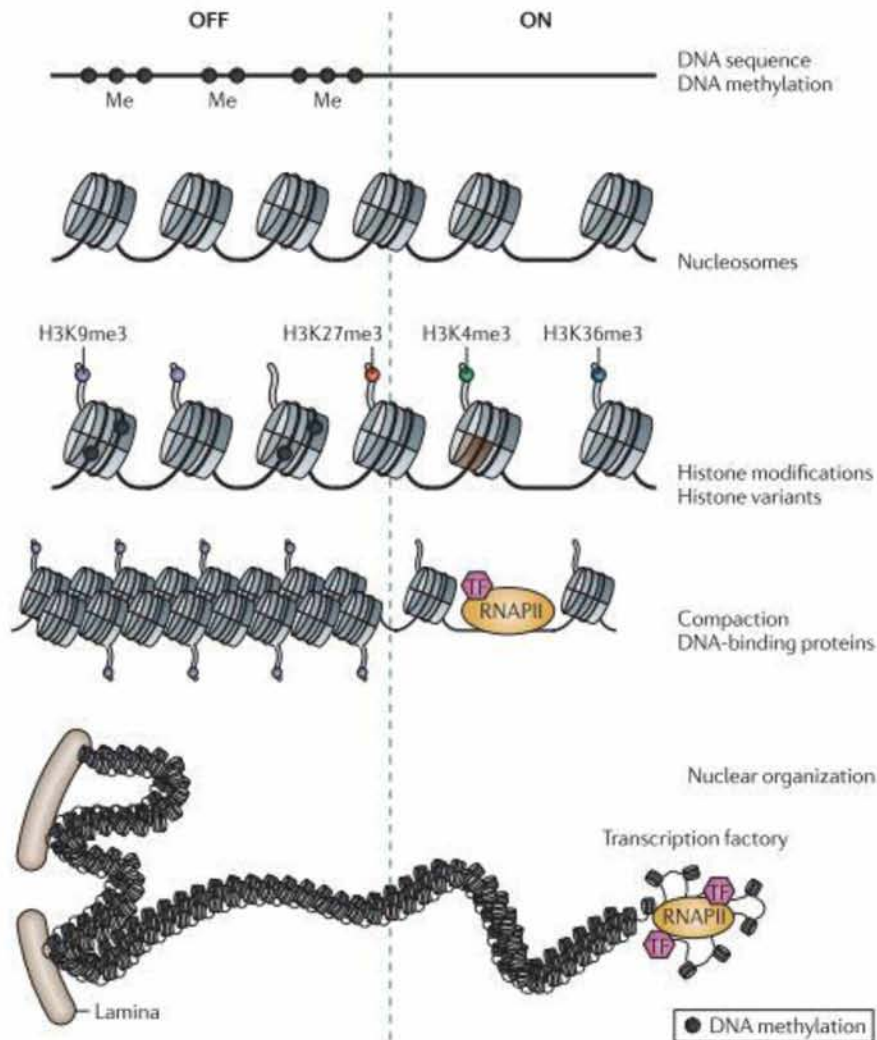
Όλα τα κύτταρα ενός πολυκύτταρου οργανισμού, όπως ο άνθρωπος, προέρχονται από ένα αρχικό κύτταρο (το ζυγωτό), και επομένως διαθέτουν στον πυρήνα τους το ίδιο γενετικό υλικό. Παρόλα αυτά, το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Τα κύτταρα των διαφορετικών κυτταρικών τύπων εμφανίζουν πολυάριθμες φαινοτυπικές διαφορές, οι οποίες προέρχονται από την εδραίωση και λειτουργία διαφορετικών προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης που οδηγεί στη σύνθεση

διαφορετικών δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών. Επομένως, η φαινοτυπική διαφορά ανάμεσα στα κύτταρα αυτά οφείλεται στον διαφορετικό χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης της γενετικής τους πληροφορίας.

Η μεταγραφή των γονιδίων αποτελεί το πρώτο βήμα για την έκφραση της πληροφορίας που αυτά περιέχουν κωδικοποιημένη στην αλληλουχία τους. Η μεταγραφή ρυθμίζεται μέσω της αλληλεπίδρασης cis- και trans- ρυθμιστικών στοιχείων. Ως cis-ρυθμιστικά στοιχεία χαρακτηρίζονται οι ρυθμιστικές περιοχές του DNA, όπως για παράδειγμα η αλληλουχία του υποκινητή, στην οποία προσδένονται οι βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες, για να ξεκινήσει η διαδικασία της μεταγραφής. Οι παράγοντες αυτοί αποτελούν τα trans-ρυθμιστικά στοιχεία. Επίσης, ρυθμιστικά στοιχεία έχουν ρόλο ενισχυτή ή αποσιωποητή της μεταγραφής και λειτουργούν ως ροοστάτες της γονιδιακής έκφρασης.

Όπως αναφέρεται παραπάνω, η RNA Pol II, είναι υπεύθυνη για την μεταγραφή των γονιδίων, η οποία επιτυγχάνεται μέσω του σχηματισμού του προ-εναρκτήριου συμπλόκου της μεταγραφής (PIC). Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου, όπως ειπώθηκε στην ενότητα 1.3 πραγματοποιείται σε ανοιχτές αλληλουχίες υποκινητών. Επομένως, για την σύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων στην αλληλουχία του υποκινητή είναι απαραίτητη η κατάλληλη διαμόρφωση της χρωματίνης, ώστε οι αλληλουχίες πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων πάνω στην αλληλουχία του υποκινητή να είναι προσβάσιμες σε αυτούς.

Επομένως η διαμόρφωση της χρωματίνης, συμβάλει στον καθορισμό των μεταγραφικά ενεργών περιοχών του γονιδιώματος σε ένα κύτταρο και κατ' επέκταση στον φαινότυπο του. Οι αλλαγές οι οποίες προκαλούνται από τροποποιήσεις της χρωματίνης οι οποίες δεν οφείλονται στην αλληλουχία του DNA ονομάζονται **επιγενετικές τροποποιήσεις** (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Οργάνωση της χρωματίνης στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την ανοιχτή ή κλειστή διαμόρφωση της χρωματίνης και κατ' επέκταση με ενεργή και ανενεργή μεταγραφή. Σε επίπεδο DNA η μεθυλίωση σε βάσεις κυτοσίνης οδηγεί σε αποσιώπηση των γονιδίων. Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών ή ποικιλομορφές ιστονών (H2A.Z με καφέ), σχετίζονται με μεταγραφικά ενεργές ή ανενεργές περιοχές του γονιδιώματος. Η χρωματίνη μπορεί να παραμένει ανοιχτή επιτρέποντας την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων και της πολυμεράσης ή να συμπυκνώνεται περαιτέρω, και να οδηγεί σε σχηματισμό δομών υψηλότερης οργάνωσης όπως μεταγραφικά εργοστάσια ή περιοχές πρόσδεσης σε πυρηνικά ελάσματα (Zhou, Goren, & Bernstein, 2011).

Η μεθυλίωση του DNA σε βάσεις κυτοσίνης αποτελεί έναν μηχανισμό γονιδιακής αποσιώπησης. Πολλοί υποκινητές γονιδίων στα σπονδυλωτά εντοπίζονται σε περιοχές όπου η συχνότητα εμφάνισης του δινουκλεοτιδίου GC είναι αυξημένη. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται νησίδες CpG (CpG islands) και οι υποκινητές των γονιδίων που εντοπίζονται σε αυτές είναι ανενεργοί. Η μεθυλίωση των κυτοσινών σε αυτές τις περιοχές οδηγεί στην αποσιώπηση των γονιδίων μέσω της αποτροπής της πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων είτε λειτουργώντας ως σήμα για τροποποίηση των ιστονών (Zhou et al., 2011).

Τα νουκλεοσώματα, γύρω από τα οποία περιελίσσεται το DNA, διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της πλαστικότητας τους, η οποία αποδίδεται στις ιστόνες. Επιπρόσθετα, στην ύπαρξη των ιστονικών ποικιλομορφών, η παρουσία των οποίων μπορεί να τροποποιήσει τη δομή και τη λειτουργία των χρωματινικών περιοχών στις οποίες εντοπίζονται νουκλεοσώματα που τις περιέχουν, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.2, οι βασικές ιστόνες επιδέχονται ομοιοπολικές τροποποιήσεις, μέσω της προσθήκης χημικών ομάδων στο μόριο τους. Οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις αυτές ονομάζονται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (καθώς επιτελούνται μετά την ολοκλήρωση της

σύνθεσης των ιστονών) και περιλαμβάνουν την μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, ADP ριβοζυλίωση ή ουβικουιτίνωση των N-τελικών και C-τελικών ουρών των ιστονών (Strahl & Allis, 2000). Αυτές οι τροποποιήσεις αλλάζουν την δομή της χρωματίνης, επηρεάζοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων των ιστονών καθώς και τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις ιστόνες και το DNA. Επιπλέον, το σύνολο των ιστονικών τροποποιήσεων στις ουρές των μορίων των ιστονών κωδικοποιούν μία «ιστονική γλώσσα», η οποία μπορεί να διαβαστεί από άλλες πρωτεΐνες και ονομάζεται Ιστονικός Κώδικας.

Την θεωρία της ύπαρξης του ιστονικού κώδικα υποστηρίζει το γεγονός ότι συγκεκριμένες μετα-μεταφραστικές ιστονικές τροποποιήσεις συνδέονται με *cis*-ρυθμιστικές περιοχές της μεταγραφής. Για παράδειγμα, οι ενεργοί υποκινητές γονιδίων χαρακτηρίζονται από παρουσία διμεθυλίωσης ή τριμεθυλίωσης στην λυσίνη 4 της ιστόνης 3 (H3K4me2/H3K4me3) καθώς και ακετυλίωση των ιστονών (Zhou et al., 2011).

Οι ενισχυτές διαθέτουν αρθρωτές αλληλουχίες οι οποίες αποτελούν θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ενεργοποιούν την μεταγραφή και ονομάζονται μεταγραφικοί ενεργοποιητές. Οι ενισχυτές διαθέτουν δύο χαρακτηριστικά τα οποία τους διαφοροποιούν από τις υπόλοιπες ρυθμιστικές αλληλουχίες. Πρώτον, η λειτουργικότητα τους είναι ανεξάρτητη από την απόσταση τους από την θέση έναρξης της μεταγραφής και μπορούν να ενεργοποιούν την μεταγραφή ακόμα και αν απέχουν αρκετές κιλοβάσεις από τον υποκινητή του γονιδίου. Δεύτερον, ένας ενισχυτής δρα ανεξάρτητα από την θέση του. Για παράδειγμα, ο ενισχυτής ενός γονιδίου μπορεί να εντοπίζεται ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου την μεταγραφή του οποίου ρυθμίζει, ή καθοδικά σε ένα ιντρόνιο αυτού του γονιδίου ή σε ακόμα μεγαλύτερη απόσταση μετά από το 3' άκρο του γονιδίου (Maston et al., 2006). Οι αλληλουχίες των ενισχυτών στο γονιδίωμα χαρακτηρίζονται μεταξύ άλλων από την παρουσία των ιστονικών τροποποιήσεων H3K4me1, H3K4me2 και H3K27ac (Zhou et al., 2011).

Μια αξιοσημείωτη ιδιότητα των ενεργοποιητών είναι η ιδιότητα τους να δρουν συνεργατικά. Ως αποτέλεσμα η ταυτόχρονη δράση πολλαπλών ενεργοποιητών έχει ισχυρότερο αποτέλεσμα από την λειτουργία ενός μοναδικού ενεργοποιητή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, συνεργαζόμενοι ενεργοποιητές σχηματίζουν ένα σταθερό νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που ονομάζεται **ενισχυόσωμα** (Thanos & Maniatis, 1995).

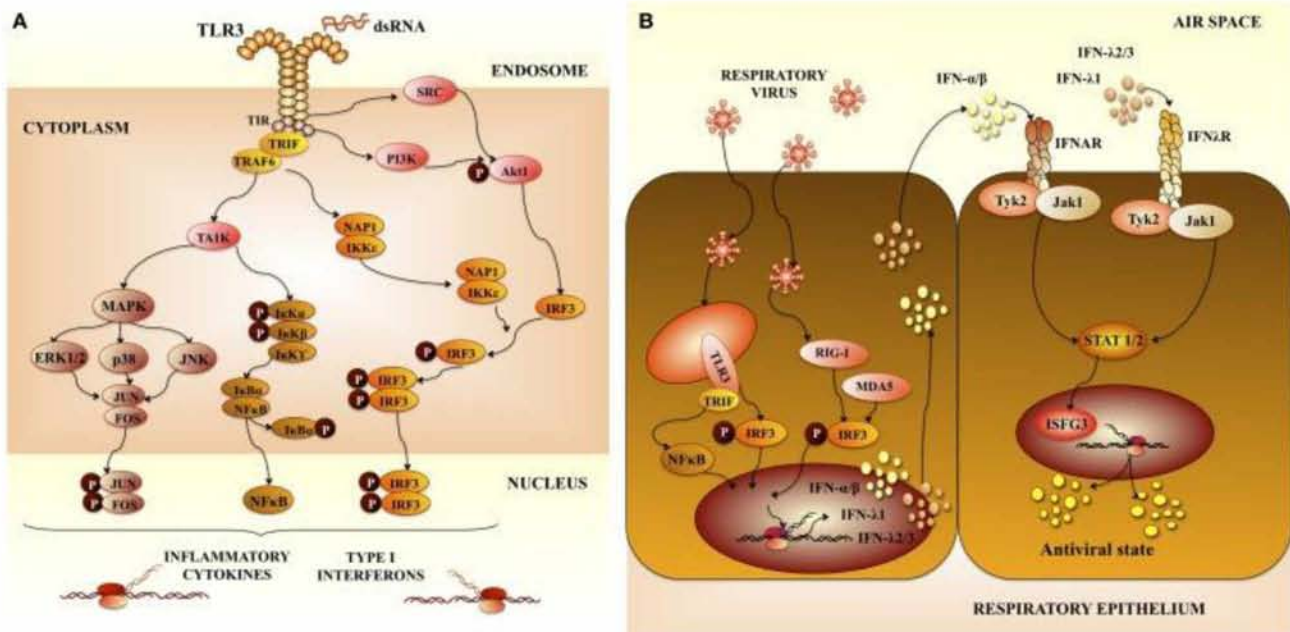
Οι αποσιωπητές (silencers) δρουν καταστέλλοντας την μεταγραφική ενεργοποίηση. Πρόκειται για θέσεις πρόσδεσης αρνητικών μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι ονομάζονται καταστολείς.

1.5. Ίική μόλυνση και επαγωγή της αντι-ϊικής απόκρισης

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να ελέγχεται και από περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Ένα περιβαλλοντικό ερέθισμα το οποίο μπορεί να αποτελέσει αιτία για την τροποποίηση του προγράμματος γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων είναι η μόλυνση τους από ιό. Οι ιοί είναι παθογόνα, τα οποία εντοπίζονται σε αφθονία στο περιβάλλον, εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία και χαρακτηρίζονται από ταχείς ρυθμούς εξέλιξης. Οι ιοί είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα και έχουν αναπτύξει τη ιδιότητα να εισέρχονται στα κύτταρα και να διαφεύγουν της ανοσολογική απόκρισης αυτών. Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε ο ιός Sendai. Ο ιός αυτός είναι ένας μονόκλωνος RNA ιός που αναγνωρίζεται και ενεργοποιεί την αντι-ϊική απόκριση.

Η μόλυνση από τους ιούς, συμπεριλαμβανομένου και του Sendai, οδηγεί στην συντονισμένη ενεργοποίηση τριών διαφορετικών ομάδων μεταγραφικών παραγόντων (Εικόνα 4). Οι μεταγραφικοί παράγοντες αυτοί είναι οι IRFs, ο NF-κB και το ετεροδιμερές ATF-2/c-Jun. Οι παράγοντες αυτοί, κατόπιν της ενεργοποίησής τους, η οποία λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα μεταφέρονται στον πυρήνα του κυττάρου, και δρουν ενεργοποιώντας την έκφραση γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ιντερφερόνες τύπου I (Thanos & Maniatis, 1995).

Οι ιντερφερόνες τύπου I είναι μια ομάδα κυττοκινών οι οποίες έχουν εξειδικευμένο ρόλο στην οργάνωση της ανοσολογικής απάντησης των κυττάρων έναντι σε ιούς και άλλα ερεθίσματα (Stetson & Medzhitov, 2006). Οι ιντερφερόνες τύπου I που ενεργοποιούνται από μολυσμένα με ιό κύτταρα, δρουν με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο, μέσω ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών, από την πρόσδεση των ιντερφερόνων σε υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων, και οδηγούν στην επαγόμενη έκφραση εκατοντάδων γονιδίων. Με την ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών εγκαθιδρύεται μία «αντι-ϊική κατάσταση» των κυττάρων που έχουν ενεργοποιηθεί από την ιντερφερόνη (Stark, 2007).



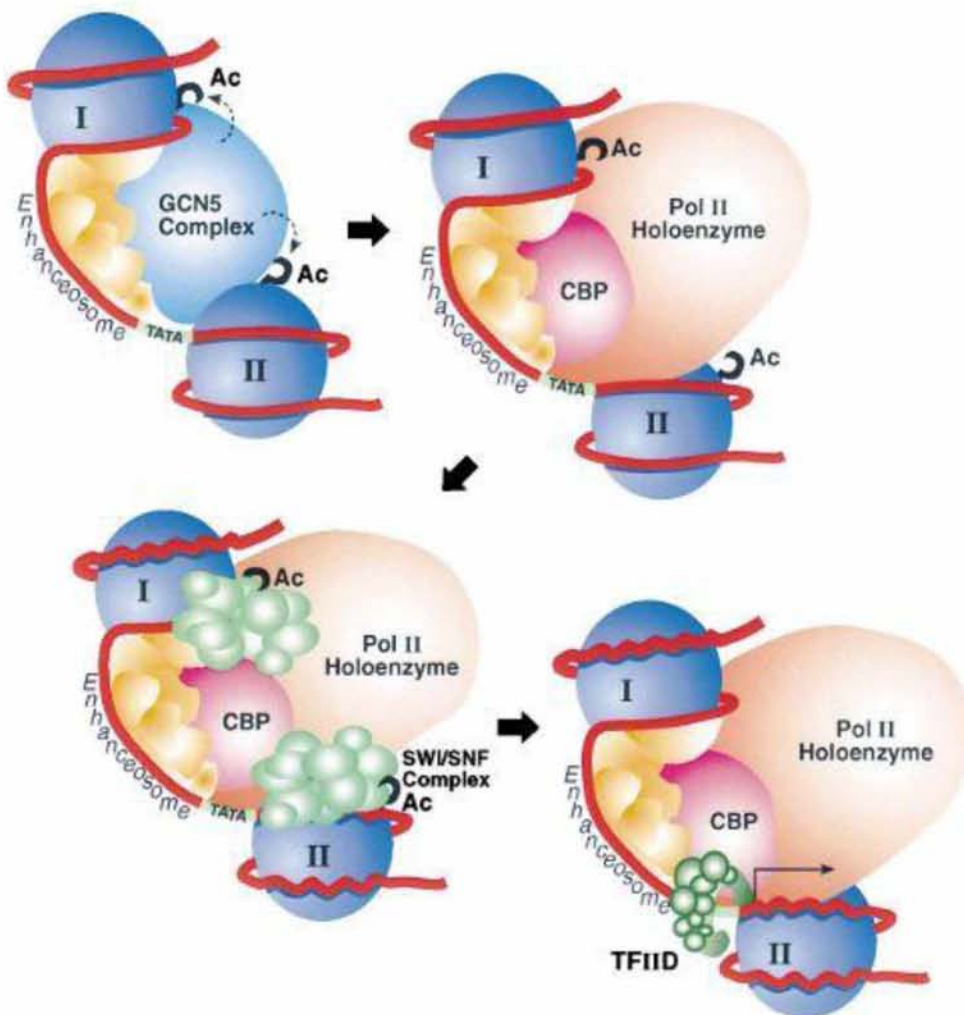
Εικόνα 4: **A)** Υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων και μονοπάτια ενεργοποίησης των παραγόντων **ATF-2/ c-Jun**, **NF-κB**, και **IRFs** οι οποίοι εισέρχονται στον πυρήνα και ελάγουν την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν ιντερφερόνες τύπου I και άλλων αντι-ϊικών γονιδίων. **B)** Έκκριση ιντερφερόνων από το μολυσμένο κύτταρο και επαγωγή αντι-ϊικής απόκρισης σε γειτονικά κύτταρα (Kitazawa & Villena, 2014).

Η ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου *IFNB1*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των ιντερφερόνων τύπου I, πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας ενός ενισχυσώματος στον ενισχυτή του γονιδίου ο οποίος εντοπίζεται ανοδικά του υποκινητή. Το ενισχυσώμα αυτό δημιουργείται στην ελεύθερη-νουκλεοσωμάτων περιοχή του υποκινητή και ενεργοποιεί την μεταγραφή μέσω στρατολόγησης γενικών μεταγραφικών παραγόντων και παραγόντων αναδόμησης της χρωματίνης. Το αποτέλεσμα αυτής της στρατολόγησης είναι η τροποποίηση και η αναδόμηση ενός στρατηγικά τοποθετημένου νουκλεοσώματος το οποίο μπλοκάρει το πλαίσιο TATA και την θέση έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου (Agalioti et al., 2000) (Εικόνα 5).

Πιο συγκεκριμένα το ενισχυσώμα αυτό δημιουργείται όταν στην αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου της ιντερφερόνης β, προσδεθούν οι τρεις ομάδες μεταγραφικών παραγόντων οι οποίες ενεργοποιούνται κατόπιν της ιϊκής μόλυνσης (IRFs, NF-κB και ATF-2/c-Jun) σε συνεργασία με την πρωτεΐνη HMG1(Y) (Maniatis et al., 1998). Ο ενισχυτής, αν και ελεύθερος νουκλεοσωμάτων, περιβάλλεται από 2 νουκλεοσώματα (νουκλεοσώματα I, II). Το ένα από τα δύο αυτά νουκλεοσώματα εμποδίζει, λόγω της θέσης του, την έναρξη της μεταγραφής. Κατόπιν της συναρμολόγησης του ενισχυσώματος, στρατολογείται το σύμπλοκο CGN5 το οποίο διαθέτει δράση ακετυλοτρανσφεράσης και ακετυλιώνει τα νουκλεοσώματα γύρω από την αλληλουχία του ενισχυτή και ακολουθεί στρατολόγηση του ολοενζύμου CBP/RNA Pol II. Τέλος, ακολουθεί η πρόσδεση του συμπλόκου αναδόμησης ης χρωματίνης SWI/SNF στον υποκινητή του γονιδίου,

το οποίο δρα πραγματοποιώντας αναδόμηση του νουκλεοσώματος II (η δράση αυτή διευκολύνεται από την ακετυλίωση που έχει πραγματοποιήσει το ένζυμο GCN5), η οποία καθιστά δυνατή την πρόσδεση του παράγοντα TFIIID στον υποκινητή του γονιδίου και την συναρμολόγηση του PIC για την έναρξη της μεταγραφής (Agalioti et al., 2000).

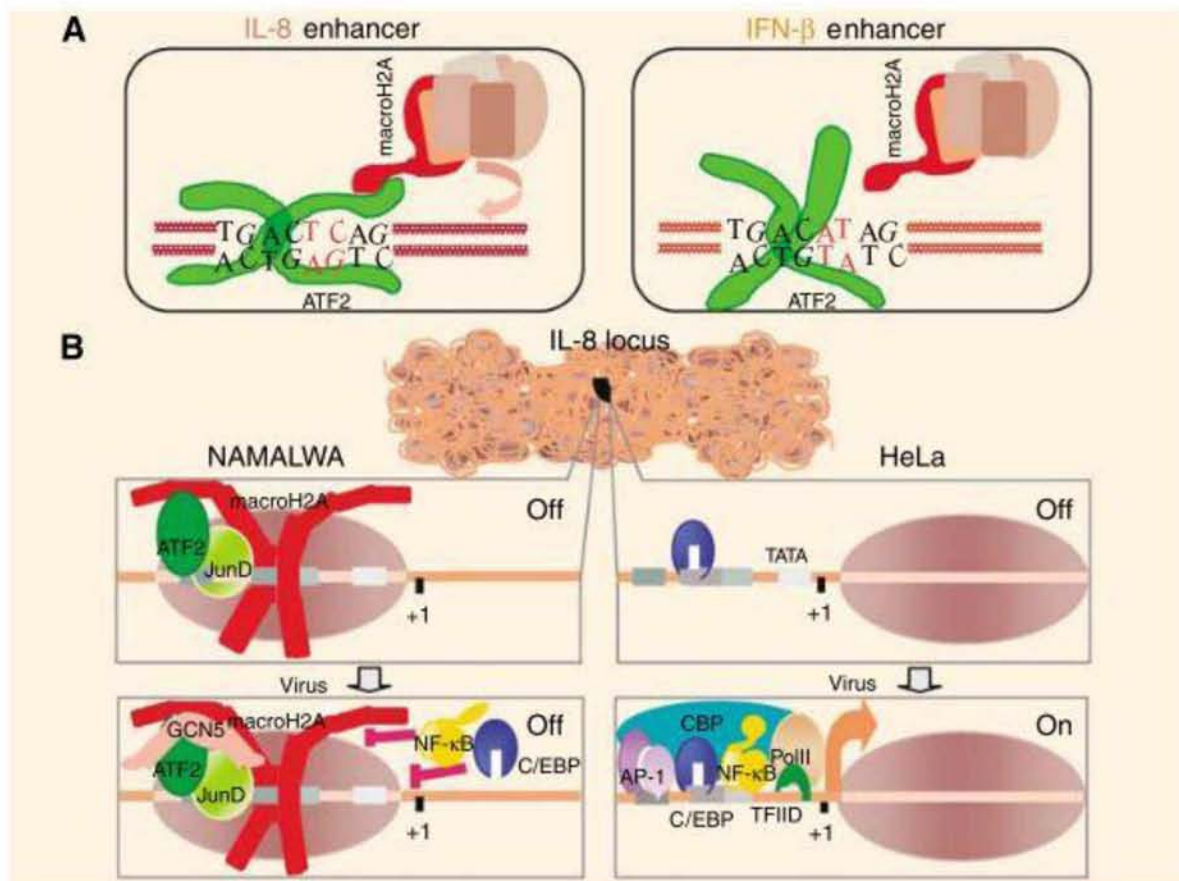
Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση του γονιδίου της ιντερφερόνης δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί αν μόνο ένας από τους παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την δημιουργία του ενισχυσώματος προσδεθεί στον ενισχυτή του γονιδίου. Η συναρμολόγηση του ενισχυσώματος και η επακόλουθη ενεργοποίηση του γονιδίου της ιντερφερόνης είναι αποτέλεσμα συνεργατικής δράσης του συνόλου των παραγόντων που αναφέρθηκαν προηγουμένως [IRFs, NF-κB, ATF-2/c-Jun και HMG1(Y)]. Η απουσία ενός από αυτούς τους παράγοντες είναι ικανή να μειώσει σημαντικά την αποδοτικότητα του ενισχυσώματος και επομένως όλοι είναι απαραίτητοι για την ενεργοποίηση του γονιδίου της ιντερφερόνης. Με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώνεται η ειδική ενεργοποίηση του γονιδίου της ιντερφερόνης ως απάντηση στην ιϊκή μόλυνση (Thanos & Maniatis, 1995), καθώς δεν είναι δυνατή η μεταγραφική ενεργοποίηση αυτού του γονιδίου με την δράση ενός μόνο από τους μεταγραφικούς παράγοντες, ο οποίος μπορεί να ενεργοποιείται από ποικίλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως για παράδειγμα ο NF-κB (Sieben, Franzoso, & Brown, 1994).



Εικόνα 5: Μοντέλο στο οποίο αποδίδεται η στρατολόγηση των παραγόντων αναδόμησης της χρωματίνης και των βασικών παραγόντων στον υποκινητή του γονιδίου της ιντερφερόνης B. Σε μικρό χρονικό διάστημα μετά την ιική μόλυνση δημιουργείται το ενισχυσώμα στον ελεύθερο νουκλεοσώματων ενισχυτή της IFNB, το οποίο μετά την συναρμολόγηση του στρατολογεί το σύμπλοκο GCN5. Το σύμπλοκο αυτό ακετυλιώνει τα αμινοτελικά άκρα των νουκλεοσωμάτων I και II που περιβάλλουν την αλληλουχία του ενισχυτή. Ακολούθως, το GCN5 απομακρύνεται και

η απομάκρυνση του ακολουθείται από στρατολόγηση του ολοενζύμου CBP/ RNA Pol II από το ενισχύσωμα. Κατόπιν το σύμπλοκο αναδόμησης της χρωματίνης SWI/SNF συνδέεται στον υποκινητή του γονιδίου μέσω της αλληλεπίδρασης του με το CBP, και η σύνδεση αυτή σταθεροποιείται από τα ακετυλιωμένα άκρα των νουκλεοσωμάτων. Τέλος, το σύμπλοκο SWI/SNF αναδομεί τα νουκλεοσώματα, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την πρόσδεση του γενικού μεταγραφικού παράγοντα TFIID, που έχει ως αποτέλεσμα την ολοκλήρωση της συναρμολόγησης του PIC και την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου της ιντερφερόνης Β (Agalioti et al., 2000).

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό παράδειγμα, το οποίο καταδεικνύει την σημασία της διαμόρφωσης της χρωματίνης στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, είναι αυτό του γονιδίου της ιντερλευκίνης 8 (IL-8). Η μεταγραφή του γονιδίου αυτού είναι δυνατό να επαχθεί σε επιθηλιακά κύτταρα (HeLa) μετά από ιϊκή μόλυνση, αλλά δεν είναι δυνατή σε Β-λεμφοκύτταρα (Namalwa) (Εικόνα 6). Η διαφορά αυτή οφείλεται στην παρουσία ενός νουκλεοσώματος που περιέχει την ιστονική ποικιλομορφή macroH2A, που καλύπτει ολόκληρη την ρυθμιστική περιοχή στα κύτταρα Namalwa και αποτρέπει την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων, το οποίο απουσιάζει από την αντίστοιχη περιοχή του γονιδιώματος των κυττάρων HeLa. Η στρατολόγηση του κατασταλτικού αυτού νουκλεοσώματος απαιτεί άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του παράγοντα ATF-2, ο οποίος βρίσκεται προσδεμένος γειτονικά, και της macroH2A υπομονάδας του νουκλεοσώματος. Η αλληλεπίδραση αυτή ρυθμίζεται μέσω αλλοστερικής τροποποίησης που πραγματοποιείται στον παράγοντα ATF-2 μετά από την πρόσδεση του, στις ειδικές θέσεις πρόσδεσης του στο DNA. Παρόλα αυτά η αλλοστερική τροποποίηση εξαρτάται από την αλληλουχία του DNA στην θέση πρόσδεσης του παράγοντα ATF-2 και επομένως, η στρατολόγηση του νουκλεοσώματος που περιέχει την macroH2A ποικιλομορφή πραγματοποιείται μόνο όταν η αλληλουχία της θέσης πρόσδεσης του παράγοντα ATF-2 οδηγεί σε συγκεκριμένη αλλοστερική τροποποίηση του παράγοντα (Agelopoulos & Thanos, 2006).



Εικόνα 6: Μοντέλο κυτταροειδικής έκφρασης του γονιδίου της ιντερλευκίνης 8 (IL-8). (A) Μοντέλο στο οποίο αποδίδονται οι διαφορετικές διαμορφώσεις του παράγοντα ATF-2 που προσδέεται στους ενισχυτές των γονιδίων IL-8 και IFN-β που σχετίζεται με την στρατολόγηση νουκλεοσωμάτων που περιέχουν την macroH2A ποικιλομορφή. (B)

Η εγγενής αρχιτεκτονική της χρωματίνης στην περιοχή του ενισχυτή/υποκινητή του IL-8 γονιδίου, διαφέρει ανάμεσα στους κυτταρικούς τύπους. Στα κύτταρα Namalwa είναι αδύνατη η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της ιντερλευκίνης 8, καθώς η macroH2A, η οποία περιέχεται στο νουκλεόσωμα, μπλοκάρει την θέση πρόσδεσης των ενεργοποιητών της IL-8. Η στρατολόγηση του νουκλεοσώματος αυτού πραγματοποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών ανάμεσα στο εγγενώς προσδεμένο διμερές ATF-2/JunD και την macro υπομονάδα της macroH2A. Εν αντιθέσει, στα κύτταρα HeLa είναι δυνατή η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της IL-8, καθώς δεν πραγματοποιείται στρατολόγηση του macroH2A νουκλεοσώματος λόγω της απουσίας πρόσδεσης του διμερούς ATF-2/JunD στην αλληλουχία του ενισχυτή-υποκινητή (Agelopoulos & Thanos, 2006).

1.6. Γονιδιωματική και αλληλούχιση νέας γενιάς

Στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος «Decoding a human Antiviral Gene expression Program», μέρος του οποίου αποτελεί η παρούσα εργασία, χρησιμοποιείται το σύνολο των σύγχρονων τεχνικών γονιδιωματικής. Στις τεχνικές αυτές περιλαμβάνονται πειράματα FAIRE-seq και DNaseI-seq, τα οποία στοχεύουν στην εύρεση των ανοιχτών περιοχών χρωματίνης, RNA-seq για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης και ChIP-seq για τον εντοπισμό των θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων αλλά και των θέσεων εντοπισμού συγκεκριμένων ιστονικών τροποποιήσεων κατά μήκος του γονιδιώματος. Η λειτουργικότητα των αλληλουχιών που ταυτοποιούνται μέσω των παραπάνω πειραμάτων ως πιθανοί ενισχυτές, ελέγχεται με την διενέργεια πειραμάτων STARR-seq.

Όλα τα πειράματα αυτά, ολοκληρώνονται με αλληλούχιση. Η μέθοδος αλληλούχισης που χρησιμοποιείται στα πλαίσια αυτής της εργασίας είναι αυτή της Illumina, η οποία αποτελεί μία από τις τεχνολογίες αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS). Οι τεχνολογίες αλληλούχισης νέας γενιάς, οι οποίες έχουν κάνει την εμφάνισή τους τα τελευταία χρόνια έχουν δώσει την δυνατότητα αλληλούχισης ολόκληρων γονιδιωμάτων σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα με μειωμένο κόστος (Thudi, Li, Jackson, May, & Varshney, 2012). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την αλληλούχιση του DNA αναλύονται με την χρήση του προγράμματος Galaxy. Το Galaxy είναι μία ανοιχτή διαδικτυακή πλατφόρμα και αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο ανάλυσης αποτελεσμάτων αλληλούχισης χωρίς να απαιτούνται εξειδικευμένες γνώσεις πληροφορικής (Afgan et al., 2018).

1.7. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός του ερευνητικού προγράμματος στα πλαίσια του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία, είναι η ολιστική μελέτη του φαινομένου της αντι-ϊικής κυτταρικής απόκρισης και η αποκωδικοποίηση του μεταγραφικού προγράμματος που τα ευκαρυωτικά κύτταρα ενορχηστρώνουν ώστε να ανταπεξέλθουν στην ιική μόλυνση.

Ο άνωτερος σκοπός είναι η ολοκλήρωση ενός Άτλαντα-καταλόγου ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδιώματος που οργανώνουν την αντι-ϊική απόκριση των ανθρώπινων κυττάρων που ανήκουν σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ChIP-seq για την εύρεση των θέσεων πρόσδεσης ενεργοποιητών της μεταγραφής και θέσεων εντοπισμού ιστονικών τροποποιήσεων που χαρακτηρίζουν cis-ρυθμιστικά στοιχεία, κατά μήκος ολόκληρου του γονιδιώματος, πριν και κατά τη διάρκεια της αντι-ϊικής απόκρισης.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε έλεγχος για τη βελτιστοποίηση του συστήματος STARR-seq, μιας σύγχρονης μεθόδου μαζικού ελέγχου της ενεργότητας, πιθανών ενισχυτών. Η τεχνική αυτή είναι προς το παρόν το μοναδικό διαθέσιμο εργαλείο αξιολόγησης της δράσης αλληλουχιών που ενδέχεται να λειτουργούν ως ρυθμιστικά στοιχεία (Arnold et al., 2013). Η πειραματική πορεία ολοκληρώθηκε με το

σχεδιασμό, την εκτέλεση, την αξιολόγηση και τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων με στρατηγικές μοριακής βιολογίας βιοχημείας και γονιδιωματικής, σε διαφορετικές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.

2. Πειραματικό μέρος

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Κυτταροκαλλιέργεια ανθρώπινων κυτταρικών σειρών (human cell lines)

Στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές κυτταρικές σειρές.

HeLa S3 (της ATCC)

Πρόκειται για επιθηλιακά, ανθρώπινα κύτταρα που προέρχονται από αδenoκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας. Τα κύτταρα αυτής της κυτταρικής σειράς είναι ανευπλοειδικά, όσον αφορά τον καρυότυπο τους, και έχουν την ιδιότητα να είναι προσκολλητικά. Η καλλιέργεια τους στο εργαστήριο γίνεται σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium από την Sigma-Aldrich), με 10% FBS και 1% αντιβιοτικά (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη) (από την gibco) ενώ η θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται βέλτιστα είναι 37°C.

NAMALWA (της ATCC)

Τα κύτταρα αυτής της κυτταρικής σειράς είναι ανθρώπινα β-λεμφοκύτταρα που προέρχονται από ένα τρίχρονο κορίτσι με λέμφωμα-Burkitt. Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων αυτών των κυττάρων είναι υποδιπλοειδής και τα κύτταρα είναι αιωρούμενα. Η ανάπτυξη τους στο εργαστήριο γίνεται σε θρεπτικό μέσο RPMI-1640 (από την Sigma-Aldrich) με 10% FBS και 1% αντιβιοτικά και σε θερμοκρασία 37°C.

HCT116 (της ATCC)

Τα κύτταρα αυτά είναι επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπινης προέλευσης που προέρχονται από καρκίνωμα του παχέος εντέρου. Πρόκειται για προσκολλητικά κύτταρα με διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων. Η καλλιέργεια των κυττάρων αυτών γίνεται σε συνθήκες ίδιες με αυτές που γίνεται η καλλιέργεια των HeLa κυττάρων.

K562 (της ATCC)

Τα κύτταρα της σειράς K562 είναι ανθρώπινα καρκινικά λευκοκύτταρα (λεμφοβλάστες). Προέρχονται από μία πενήντατριάχρονη γυναίκα με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (chronic myelogenous leukemia, CML) και έχουν τριπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων. Η καλλιέργεια τους πραγματοποιείται με χρήση του θρεπτικού RPMI-1640 (από την Sigma-Aldrich) με 10% FBS και 1% αντιβιοτικά και σε θερμοκρασία 37°C και τα κύτταρα αιωρούνται μέσα σε αυτή.

2.1.1. Προετοιμασία θρεπτικών μέσων

Για τελικό όγκο 500 mL

1. Προσθήκη αντιβιοτικού (πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη). Συγκέντρωση στο τελικό διάλυμα: 1%
→ Η προσθήκη των αντιβιοτικών αυτών στο θρεπτικό μέσο έχει ως σκοπό την προστασία των κυττάρων από βακτηριακές μολύνσεις.

2. Προσθήκη FBS (της gibco) . Συγκέντρωση στο τελικό διάλυμα: 10%
→ Το FBS (Fetal bovine serum) περιέχει μία σύνθετη σειρά από πρωτεΐνες, όπως παράγοντες ανάπτυξης, οι οποίες προωθούν την ανάπτυξη των κυττάρων in vitro, δρώντας με παρόμοιο τρόπο όπως το εξωκυτταρικό υγρό το οποίο περιβάλλει τα κύτταρα των ζωντανών ζωικών ιστών.
- Το FBS πριν προστεθεί στο θρεπτικό μέσο θα πρέπει να θερμανθεί ώστε να απενεργοποιηθούν ορισμένες πρωτεΐνες του συμπληρώματος που περιέχονται σε αυτό. Για την θερμική απενεργοποίηση αυτών των πρωτεϊνών το FBS επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 56°C για 30 λεπτά.

2.1.2. Ξεπάγωμα κυττάρων

1. Επώαση του vial των κυττάρων, που βρισκόταν αποθηκευμένο στους -80°C , σε υδατόλουτρο 37°C μέχρι να ξεπαγώσει το διάλυμα των κυττάρων
2. Μεταφορά του διαλύματος των κυττάρων στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο και επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία (37°C) για την ανάπτυξη τους.

2.1.3. Πάγωμα κυττάρων

Για το πάγωμα των κυττάρων γίνεται χρήση διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Το DMSO δρα ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας μειώνοντας το σημείο πήξης του διαλύματος των κυττάρων, και επιτρέποντας την ψύξη τους με πιο αργό ρυθμό, όταν αυτά μεταφερθούν στους -80°C. Με αυτό τον τρόπο μειώνεται σημαντικά η πιθανότητα δημιουργίας κρυστάλλων πάγου οι οποίοι μπορούν να βλάψουν τα κύτταρα και να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο.

Διαδικασία

1. απόρριψη του παλιού θρεπτικού μέσου
2. πλύση με PBS 1X
3. προσθήκη 5mL διαλύματος τρυψίνης σε PBS στην φλάσκα ή το πιάτο των κυττάρων και αναμονή για 5 λεπτά
4. συλλογή των κυττάρων σε ένα falcon
5. φυγοκέντρηση 1200 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
6. απόρριψη του υπερκειμένου
7. προσθήκη FBS (90% του τελικού όγκου) και διάλυση του ιζήματος των κυττάρων
8. αργή προσθήκη DMSO (10% του τελικού όγκου)
9. αποθήκευση σε vials 1mL και αποθήκευση τους στους -80 °C

2.1.4. Ανακαλλιέργεια κυττάρων – Ανάπτυξη καλλιέργειας σε μεγάλη κλίμακα

Διαλύματα :

1x PBS (ισοτονικό διάλυμα)

1x διάλυμα τρυψίνης

1. Απόρριψη του θρεπτικού μέσου από το πιάτο στο οποίο έχουν αναπτυχθεί τα κύτταρα
2. Πλύση με PBS (3-4mL) . Σκοπός αυτού του βήματος είναι η απομάκρυνση των υπολειμμάτων FBS που περιέχεται στο θρεπτικό μέσο, ώστε να αποφευχθεί η απενεργοποίηση την τρυψίνης από αυτό.
3. Προθήκη 3mL διαλύματος τρυψίνης και επώαση για 5 λεπτά

4. Προσθήκη μίας ποσότητας θρεπτικού μέσου στο πιάτο των κυττάρων και διακοπή της δράσης της τρυψίνης
5. Ανακάτεμα του διαλύματος που περιέχει τα κύτταρα και μοίρασμα του όγκου του διαλύματος των κυττάρων σε νέα πιάτα. Στα πιάτα αυτά έχει ήδη προστεθεί μια ποσότητα θρεπτικού μέσου, ώστε με την προσθήκη του διαλύματος των κυττάρων, ο τελικός όγκος του διαλύματος που περιέχεται σε αυτά να φτάσει μια επιθυμητή τιμή, ανάλογα με το μέγεθος του πιάτου.
6. Μεταφορά των πιάτων στον επωαστήρα (37°C) και ανάπτυξη των κυττάρων

2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού και ανάλυσης DNA. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην κίνηση των μορίων του DNA, διαμέσου των πόρων της πηκτής αγαρόζης. Η κίνηση αυτή ωθείται από την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου.

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που λαμβάνεται από θαλάσσια φύκη. Ο πολυσακχαρίτης αυτός χρησιμοποιείται για την παρασκευή μίας αδρανούς πηκτής σε συγκεντρώσεις συνήθως από 0,7% έως 2%. Η χρήση πηκτών με διαφορετικές συγκεντρώσεις εξυπηρετεί τον διαχωρισμό τμημάτων DNA με διαφορετικά μήκη. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης στην πηκτή, τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των πόρων αυτής, ενώ αντίθετα, μικρή συγκέντρωση αγαρόζης οδηγεί στην δημιουργία πόρων μεγαλύτερου μεγέθους. Επομένως, η χρήση πηκτής με μεγαλύτερη συγκέντρωση αγαρόζης είναι προτιμότερη για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA μικρού μήκους και η χρήση πηκτής με μικρότερη συγκέντρωση αγαρόζης προτιμάται για τον διαχωρισμό τμημάτων μεγαλύτερου μήκους. Για παράδειγμα, η χρήση πηκτής με συγκέντρωση 0,7% χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA από 5 έως 10kb, ενώ μία πηκτή με συγκέντρωση 2% εμφανίζει καλύτερη διαχωριστική ικανότητα για μικρότερα τμήματα DNA μήκους 0,2-1kb.

Για την ηλεκτροφόρηση η πηκτή της αγαρόζης βρίσκεται μέσα σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα (TBE), το οποίο παρέχει στο σύστημα ιόντα τα οποία είναι απαραίτητα για την διατήρηση της αγωγιμότητας.

Το μόριο του DNA έχει αρνητικό φορτίο, το οποίο οφείλεται στις φωσφορικές ομάδες του φωσφοδιεστερικού σκελετού του. Έτσι όταν το DNA βρεθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο κινείται προς τον θετικό πόλο. Η ταχύτητα της κίνησης κάθε μορίου DNA εξαρτάται από την ένταση του ρεύματος. Όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ταχύτητα με την οποία κινείται το DNA ανάμεσα από τους πόρους της πηκτής αγαρόζης. Εκτός από την ένταση, η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα μόρια του DNA, εξαρτάται και από το μέγεθος του κάθε μορίου και το μέγεθος των πόρων της πηκτής. Επομένως, τα μικρότερα μόρια DNA κινούνται με μεγαλύτερη ευκολία ανάμεσα από τους πόρους της πηκτής και κατ'επέκταση με μεγαλύτερη ταχύτητα από τα τμήματα DNA μεγαλύτερου μεγέθους.

Η παρατήρηση του DNA στην πηκτή καθίσταται δυνατή με τη χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ένας παράγοντας που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις των νουκλεϊκών οξέων. Όταν ο παράγοντας αυτός εκτεθεί σε υπεριώδες φως (UV) φθορίζει με πορτοκαλί χρώμα, καθιστώντας το DNA ορατό στην πηκτή αγαρόζης με την μορφή ζωνώσεων. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μεταλλαξιογόνο και για τον λόγο αυτό ο χειρισμός του πρέπει να γίνεται με πολύ προσοχή.

2.2.1. Προετοιμασία πηκτής αγαρόζης

Παρασκευή διαλύματος 5X TBE (4 L)

14,9g EDTA

110g Boric acid

216g Tris

Διαλύτης: ddH₂O

Λιαδικασία

Για παρασκευή 2% πηκτής αγαρόζης

1. Αρχικά γίνεται αραίωση του διαλύματος 5X TBE 5 φορές ώστε να γίνει 1X. Τελικός όγκος διαλύματος 1X TBE: 1L
2. Σε 100mL από το διάλυμα 1X TBE προστίθενται 2g αγαρόζης
3. Η φλάσκα που περιέχει τα παραπάνω ανακινείται ελαφρά και στη συνέχεια τοποθετείται στο φούρνο μικροκυμάτων όπου θερμαίνεται έως ότου να διαλυθεί η σκόνη της αγαρόζης και το διάλυμα να είναι διαφανές
4. Αφού το διάλυμα αφαιρεθεί από το φούρνο μικροκυμάτων προστίθενται 10μL βρωμιούχου αιθιδίου
5. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που έχει προετοιμαστεί. Στις ειδικές θέσεις της συσκευής αυτής, τοποθετούνται 2 'χτενάκια' και έτσι τελικά θα δημιουργηθούν δύο ισομεγέθεις πηκτές. Τα χτενάκια που χρησιμοποιούνται οδηγούν στη δημιουργία πηγαδιών με χωρητικότητα 20 μL

Παρατηρήσεις:

- Ο αρχικός όγκος του διαλύματος 1X TBE καθώς και το δοχείο που χρησιμοποιείται προσαρμόζονται ανάλογα με το επιθυμητό μέγεθος της πηκτής. Αναλόγως προσαρμόζεται και ο όγκος του βρωμιούχου αιθιδίου που προστίθεται στο διάλυμα της πηκτής.
- Παρομοίως μπορεί να τροποποιηθεί και η πυκνότητα της πηκτής, προσαρμόζοντας τη μάζα της σκόνης αγαρόζης που χρησιμοποιείται.
- Όταν η πηκτή προορίζεται για ηλεκτροφόρηση RNA τότε προστίθεται σε αυτή χλωρίνη (500μL χλωρίνη για 100mL πηκτής). Η προσθήκη αυτή γίνεται πριν το διάλυμα θερμανθεί στο φούρνο μικροκυμάτων.
- Η πηκτή της αγαρόζης είναι δυνατόν να αποθηκευτεί στους 4°C τυλιγμένη σε διαφανή μεμβράνη (saran) για μελλοντική χρήση.

→ Στα εναπομείναντα 900mL 1X TBE διαλύματος γίνεται προσθήκη 15μL βρωμιούχου αιθιδίου .

2.2.2. Έναρξη της ηλεκτροφόρησης

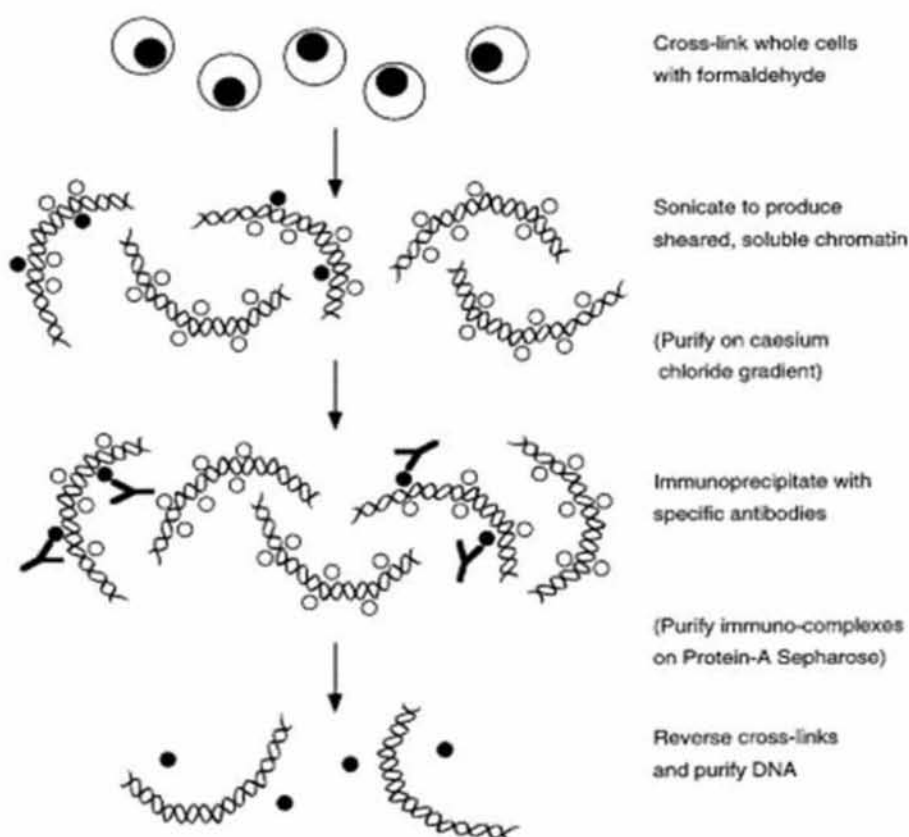
1. Πηκτή αγαρόζης του επιθυμητού μεγέθους τοποθετείται στην κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στην συνέχεια προστίθεται 1X TBE διάλυμα (με αιθίδιο) μέχρι να καλυφθεί η πηκτή και να γεμίσει η συσκευή (Η συσκευή διαθέτει ειδική σήμανση που υποδεικνύει το σημείο στο οποίο πρέπει να φτάνει το διάλυμα ώστε να είναι γεμάτη) .
2. Τα ηλεκτρόδια (κόκκινο και μαύρο) εισέρχονται στις αντίστοιχες θέσεις της συσκευής ηλεκτροφόρησης και της τροφοδοτικής συσκευής (κόκκινο: θετικός πόλος και μαύρο: αρνητικός πόλος) — Η τροφοδοτική συσκευή είναι απενεργοποιημένη.
3. Τα δείγματα, στα οποία προηγουμένως έχει προστεθεί η ανάλογη ποσότητα χρωστικής φόρτωσης (1/5 του όγκου τους), 'φορτώνονται' στα πηγαδάκια της πηκτής .
4. Σε ένα από τα πηγαδάκια (συνήθως στο πρώτο ή το τελευταίο) τοποθετείται ένα δείγμα αναφοράς (ladder) στο οποίο περιέχονται τμήματα DNA γνωστού μήκους. Τα τμήματα αυτά δημιουργούν ζώνες που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα μήκη, και με βάση αυτές υπολογίζεται το μήκος των τμημάτων DNA που περιέχουν τα προς ανάλυση δείγματα.
5. Τέλος ενεργοποιείται η τροφοδοτική συσκευή στην οποία η ένταση έχει ρυθμιστεί στα 80-120V

→ Η τιμή της έντασης του ρεύματος που εφαρμόζεται θα πρέπει να είναι περιορισμένη καθώς υπερβολικά αυξημένη ένταση μπορεί να οδηγήσει σε τήξη της πηκτής.

2.3. Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP)

Η ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης είναι μία μέθοδος η οποία εφαρμόζεται για την μελέτη της κατανομής πρωτεϊνών κατά μήκος εκτεταμένων χρωμοσωμικών περιοχών. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην μονιμοποίηση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε DNA και πρωτεΐνες μέσω της δημιουργίας σταυροσυνδέσμων (crosslinking) σε ζωντανά κύτταρα. Κατόπιν ακολουθείται μια στρατηγική ανοσοκατακρήμισης η οποία επιτρέπει την ταυτοποίηση των DNA αλληλουχιών-στόχων της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. (Orlando, Strutt, & Paro, 1997)

Πιο συγκεκριμένα τα ζωντανά κύτταρα υπόκεινται σε crosslinking μέσω της έκθεσης τους σε φορμαλδεΰδη. Η φορμαλδεΰδη είναι ένας ισχυρός και εύκολα αναστρέψιμος παράγοντας crosslinking, που διατηρεί αποτελεσματικά τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεϊνών, RNA-πρωτεϊνών καθώς και πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, επιτρέποντας λήψη ενός 'φωτογραφικού στιγμιότυπου' των αλληλεπιδράσεων στο εσωτερικό των κυττάρων τη χρονική στιγμή του crosslinking. Η μονιμοποίηση των αλληλεπιδράσεων ακολουθείται από απομόνωση και θραύση της χρωματίνης με την επίδραση υπερήχων (sonication). Η χρήση ειδικών αντισωμάτων ως προς την εκάστοτε πρωτεΐνη, της οποίας η κατανομή στην χρωματίνη πρόκειται να μελετηθεί, επιτρέπει την απομόνωση μέσω ανοσοκατακρήμισης των συμπλόκων της προς μελέτη πρωτεΐνης και του DNA. Η διαδικασία της ανοσοκατακρήμισης ακολουθείται από πέψη των πρωτεϊνών και αναστροφή του crosslinking. Τέλος τα τμήματα DNA που έχουν προκύψει από την παραπάνω διαδικασία υπόκεινται σε καθαρισμό και ακολούθως μπορούν να μελετηθούν περαιτέρω μέσω qPCR, δημιουργία βιβλιοθηκών και επακόλουθη αλληλούχιση.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας προετοιμασίας και ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης. Σε πρώτο στάδιο, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με την χρήση φορμαλδεΰδης και ακολουθεί απομόνωση της χρωματίνης η οποία θραυσατοποιείται μέσω υπερήχων. Κατόπιν, πραγματοποιείται ανοσοκατακρήμιση με χρήση ειδικών αντισωμάτων. Τέλος, γίνεται αναστροφή του cross-linking και καθαρισμός του DNA (Orlando et al., 1997).

2.3.1. Απομόνωση χρωματίνης

Διαλύματα

1) Fixing buffer (crosslinking):

11% φορμαλδεΰδη σε PBS 1x

→ η τελική συγκέντρωση της φορμαλδεΰδης στα κύτταρα είναι 1%

2) Quenching buffer (διακόπτει την αντίδραση του crosslinking) :

2,5M γλυκίνη Vtel=50mL

9,37g Glycine for Molecular biology σε ddH₂O

3) Lysis Buffer (λύση των κυττάρων)

Vτελ=50 mL

0,25% Triton x100 (0,125mL)

10mM Tris 1M pH 8 (0,5mL)

10mM EDTA 0,5 M pH 8 (1mL)

Διαλύτης: ddH₂O

4) Nuclei Buffer (λύση των πυρήνων)

Vτελ=50mL

10mM Tris 1M pH 8 (0,5mL)

200mM NaCl 5M (2mL)

1mM EDTA 0,5M (0,1mL)

Διαλύτης : ddH₂O

5) Sonication Buffer

Vτελ=50 mL

10mM Tris pH 8 (0,5 mL)

1mM EDTA 0,5M (0,1mL)

Διαλύτης : ddH₂O

Διαδικασία

1. Προσθήκη της απαραίτητης ποσότητας fixing buffer σε κάθε πιάτο ώστε η τελική συγκέντρωση της φορμαλδεΰδης να είναι 1%
2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά
3. Προσθήκη quenching buffer σε όγκο τέτοιο ώστε η τελική συγκέντρωση της γλυκίνης στα πιάτα να είναι 0,125M
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
5. Συλλογή του υλικού σε Falcons 50 mL
6. Φυγοκέντρηση 3.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
7. Απόρριψη υπερκειμένου

8. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 20mL PBS 1x
9. Φυγοκέντρηση 3.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
10. Απόρριψη υπερκειμένου και απομάκρυνση των υπολειμμάτων του υπερκειμένου γυρνώντας τα Falcon ανάποδα σε ένα χαρτί
11. Προσθήκη 15 mL παγωμένου Lysis Buffer και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος
12. Επώαση 10 λεπτά στον πάγο
13. Φυγοκέντρηση 3.500 rpm για 7 λεπτά στους 4°C
14. Απόρριψη υπερκειμένου
15. Προσθήκη 15 mL παγωμένου Nuclei Buffer και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος
16. Επώαση για 10 λεπτά στον πάγο
17. Φυγοκέντρηση 3.500rpm για 7 λεπτά στους 4°C.
18. Απόρριψη υπερκειμένου και απομάκρυνση των υπολειμμάτων του
19. Φύλαξη του υλικού στους -80 °C όπου μπορεί να διατηρηθεί για μέρες
20. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε sonication buffer

2.3.2. Κατακερματισμός της χρωματίνης με υπέρηχους (sonication)

Ο κατακερματισμός της χρωματίνης πραγματοποιείται με την χρήση του μηχανήματος Covaris S220. Το διάλυμα της χρωματίνης μεταφέρεται σε ειδικά φιαλίδια του 1 mL, τα οποία με την σειρά τους τοποθετούνται σε ειδική θέση στο μηχάνημα και ακολουθεί εκκίνηση του sonication.

Οι παράμετροι του μηχανήματος ορίζονται ως εξής: peak power 140, duty factor 5

Ακολουθεί ένας κύκλος sonication διάρκειας 20 λεπτών

Μετά από τον πρώτο κύκλο ακολουθούν οι εξής διαδοχικές φυγοκεντρήσεις με απόρριψη του ιζήματος στο τέλος της καθεμίας.

- 4.000 rpm για 10 λεπτά, 4°C
- 6.000 rpm για 10 λεπτά, 4°C
- 13.000 rpm για 10 λεπτά, 4°C

Ακολουθεί δεύτερος κύκλος sonication, διάρκειας 10 λεπτών, με τροποποιημένες παραμέτρους: peak power 170, duty factor 10

Μετά τον δεύτερο κύκλο πραγματοποιείται μία φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.

2.3.3. Έλεγχος ποιότητας της χρωματίνης

Για να ελεγχθεί η ποιότητα του κατακερματισμού της χρωματίνης ακολουθεί μία διαδικασία ελέγχου ποιότητας. Αυτή περιλαμβάνει κατεργασία με πρωτεϊνάση K, κατά την οποία αποδομούνται οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στο διάλυμα της χρωματίνης που έχει υποστεί sonication. Κατόπιν, το διάλυμα θερμαίνεται ώστε να αντιστραφεί η δημιουργία 'σταυροσυνδέσμων' (reverse του crosslinking) οι οποίοι δημιουργήθηκαν με την χρήση φορμαλεδεύδης. Τέλος το DNA θα υποστεί καθαρισμό και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

2.3.4. Κατεργασία με πρωτεΐνάση K

- **Κατεργασία με PK**

V_{τελ}=100μL

χρωματίνη 23 μL (50 μg)

PK 1μg/μL αντίδρασης

SDS 5μL (0,5%)

ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο

Επώαση για 1 ώρα στους 55°C ώστε να δράσει η πρωτεΐνάση K και ολονύκτια στους 65°C για να γίνει reverse του crosslinking.

2.3.5 Καθαρισμός DNA με αντίδραση φαινόλης χλωροφορμίου και κατακρήμνιση με αιθανόλη

Η μέθοδος καθαρισμού του DNA με φαινόλη απομακρύνει αποτελεσματικά τις πρωτεΐνες που περιέχονται σε ένα δείγμα DNA. Η μέθοδος βασίζεται στην διαφορά πυκνότητας και του φορτίου ανάμεσα στο νερό και την φαινόλη. Η φαινόλη έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από το νερό και όταν προστεθεί σε ένα υδατικό διάλυμα δεν αναμειγνύεται με αυτό. Η προσθήκη της φαινόλης σε ένα υδατικό διάλυμα, στο οποίο περιέχεται DNA οδηγεί στην δημιουργία δύο φάσεων, στην κατώτερη από τις οποίες εντοπίζεται η φαινόλη. Μετά από έντονη ανάμειξη προκύπτει ένα γαλάκτωμα, στο οποίο οι πρωτεΐνες στην υδατική φάση αναδιατάσσονται και διαχωρίζονται από το DNA παραμένοντας στην φάση της φαινόλης. Αντίθετα, το DNA, το οποίο διαθέτει αρνητικό φορτίο είναι περισσότερο διαλυτό στο νερό καθώς αυτό αποτελεί πολικότερο διαλύτη από την φαινόλη. Η διαδικασία διαχωρισμού των δύο φάσεων επιταχύνεται με την πραγματοποίηση φυγοκέντρωσης. Κατόπιν αυτής, στην κατώτερη φαινολική φάση εντοπίζεται το πρωτεϊνικό κλάσμα, ενώ στην ανώτερη υδατική φάση υπάρχει το DNA.

Το χλωροφόρμιο έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από αυτή του νερού και έτσι η προσθήκη στην έναρξη της διαδικασίας ίσου όγκου, με αυτόν της φαινόλης, χλωροφορμίου θα οδηγήσει στη μεταφορά της φαινόλης από την κατώτερη στην ανώτερη φάση. Με αυτό τον τρόπο διευκολύνεται ο διαχωρισμός των δύο φάσεων ενώ είναι ευκολότερη η απομάκρυνση της οργανικής φάσης που είναι πλέον η ανώτερη.

Κατόπιν πραγματοποιείται κατακρήμνιση με αιθανόλη. Βασικά στοιχεία αυτής της διαδικασίας είναι η προσθήκη άλατος και αιθανόλης στην υδατική φάση, στην οποία περιέχεται το DNA. Ο ρόλος του άλατος (COONa) είναι η εξουδετέρωση του αρνητικού φορτίου του DNA, καθιστώντας το αδιάλυτο στο νερό και αναγκάζοντας το να κατακρημνιστεί από το διάλυμα. Η αιθανόλη διευκολύνει την αλληλεπίδραση των ιόντων Na⁺ με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του DNA λόγω της διηλεκτρικής της σταθεράς η οποία είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή του νερού.

V_{δείγματος} = 100 μL

V_{τελ}=200 μL

100μL δείγματος

50 μL φαινόλη

50 μL χλωροφόρμιο

1. Προσθήκη στο δείγμα μισού όγκου φαινόλης και του μισού όγκου χλωροφορμίου
2. Vortex

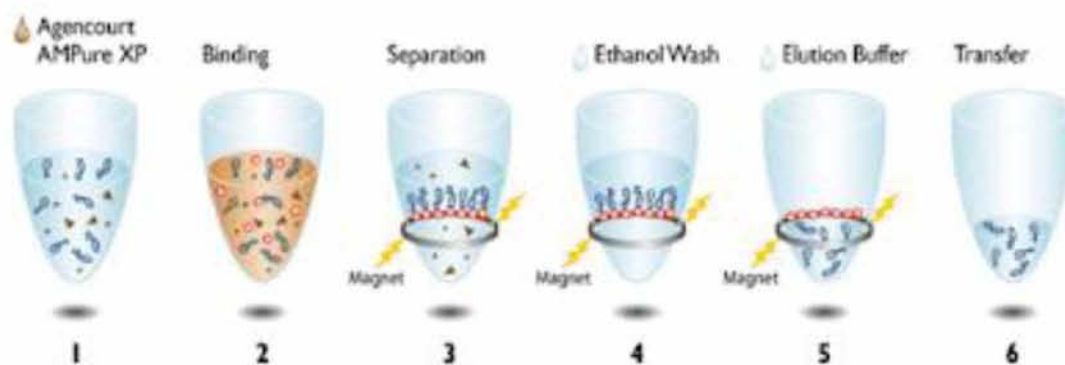
3. Φυγοκέντρηση: 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά
4. Προετοιμασία νέων erpendorfs τα οποία περιέχουν 1/10 του όγκου του αρχικού δείγματος COONa 3M pH 5,2 (10μL) και 1μL γλυκογόνο (20 mg) ~ το 1/100 του όγκου του δείγματος → το γλυκογόνο τοποθετείται στο καπάκι του erpendorf ώστε να μην αναμειχθεί με το COONa
5. Κατόπιν της φυγοκέντρησης έχουν σχηματιστεί 2 φάσεις και από αυτές η πάνω φάση μεταφέρεται στα καινούρια erpendorfs που προετοιμάστηκαν
6. Προσθήκη 3 όγκων 100% αιθανόλης και καλή ανάδευση
7. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους -80°C για 15 λεπτά
8. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4°C, 13.000 rpm για 15 λεπτά
9. Απόρριψη υπερκείμενου
10. Προσθήκη 500μL 70% αιθανόλη (για να απομακρυνθούν τα άλατα)
11. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 13.000 rpm για 5 λεπτά
12. Απόρριψη το υπερκείμενο και επώαση των erpendorfs σε θερμοκρασία δωματίου με ανοικτά καπάκια, ώστε να εξατμιστούν τα υπολείμματα της αιθανόλης
13. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 50 μL ddH₂O

2.3.6. Καθαρισμός DNA με SPRI μαγνητικά σφαιρίδια (Solid Phase Reversible Immobilization beads)

Ο καθαρισμός του DNA μπορεί να γίνει και με SPRI μαγνητικά σφαιρίδια. Αυτή η μέθοδος καθαρισμού συνήθως πραγματοποιείται για τον τελικό καθαρισμό που λαμβάνει χώρα την τρίτη ημέρα του πρωτοκόλλου ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης και όχι κατά το στάδιο ελέγχου ποιότητας του κατακερματισμού της χρωματίνης λόγω του υψηλού κόστους των σφαιριδίων αυτών.

Τα μαγνητικά σφαιρίδια που χρησιμοποιούνται είναι τα Ampure XP beads (από την Beckman). Κάθε σφαιρίδιο αποτελείται από έναν πυρήνα πολυστυρενίου, που καλύπτεται από ένα στρώμα μαγνητίτη (ένα ορυκτό σκούρου γκριζού χρώματος που αποτελείται από ένα οξείδιο του σιδήρου) στο εξωτερικό του οποίου υπάρχουν καρβοξυλικά μόρια. Πάνω στα μόρια αυτά, το DNA μπορεί να προσδεθεί με αντιστρεπτό τρόπο παρουσία πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) και άλατος (NaCl). Η πολυαιθυλενογλυκόλη προκαλεί την σύνδεση των αρνητικά φορτισμένων μορίων DNA στις καρβοξυλικές ομάδες των μορίων την επιφάνειας των σφαιριδίων, καθώς το χλωριούχο νάτριο μειώνει την διηλεκτρική σταθερά του DNA, όμως ο ακριβής μοριακός μηχανισμός αυτής της διαδικασίας δεν είναι πλήρως κατανοητός. Η συγκέντρωση της πολυαιθυλενογλυκόλης και του χλωριούχου νατρίου διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο για την επιτυχία της πρόσδεσης του DNA πάνω στα σφαιρίδια και επομένως η ογκομετρική αναλογία των σφαιριδίων προς το διάλυμα του DNA είναι καθοριστικής σημασίας. Ένας άλλος λόγος για τον οποίο η αναλογία αυτή είναι σημαντική, είναι το γεγονός ότι διαφορετική αναλογία όγκων οδηγεί και σε πρόσδεση τμημάτων DNA διαφορετικού μήκους πάνω στα μαγνητικά σφαιρίδια. Όσο μικρότερη είναι η αναλογία του όγκου των σφαιριδίων προς τον όγκο του διαλύματος του DNA, τόσο μεγαλύτερο είναι το μήκος των τμημάτων που θα προσδεθούν στα σφαιρίδια και τελικά θα εκλουθούν από αυτά.

Τα σφαιρίδια αυτά είναι παραμαγνητικά, δηλαδή εμφανίζουν την μαγνητική τους ιδιότητα μόνο όσο βρίσκονται σε κάποιο μαγνητικό πεδίο (μόνο παρουσία μαγνήτη). Το γεγονός αυτό καθιστά δυνατή την ομογενοποίηση του διαλύματος μέσα στο οποίο βρίσκονται τα σφαιρίδια και την αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων μεταξύ τους.



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας καθαρισμού ενός δείγματος DNA με SPRI σφαιρίδια. Κατόπιν της προσθήκης των σφαιριδίων στο δείγμα (1), γίνεται πρόσδεση των μορίων DNA στην επιφάνεια των σφαιριδίων (2). Με την έκθεση της αντίδρασης σε ένα μαγνητικό πεδίο τα σφαιρίδια στα οποία βρίσκονται προσδεμένα μόρια DNA δημιουργούν συσσωματώματα καθώς έλκονται από το μαγνητικό πεδίο και η υγρή φάση, στην οποία περιέχονται τα ανεπιθύμητα μόρια, απομακρύνεται (3). Ακολουθεί μια πλύση με αιθανόλη για την πλήρη απομάκρυνση των ανεπιθύμητων ουσιών (4). Έκλυση του DNA με ddH₂O (5) και μεταφορά του σε νέο eppendorf (6) (Beckman Coulter, 2013, οδηγός χρήσης AMPure beads).

2.3.7. Καθαρισμός των μαγνητικών σφαιριδίων

Για την ανοσοκατακρήμνιση και την απομόνωση των συμπλόκων αντισώματος, αντιγόνου και χρωματίνης χρησιμοποιούνται μαγνητικά σφαιρίδια, στον οποίων την επιφάνεια βρίσκονται ομοιοπολικά συνδεδεμένα πρωτεϊνικά μόρια (για τα πειράματα χρησιμοποιούνται Dynabeads Protein A/ Protein G από την Invitrogen). Οι πρωτεΐνες αυτές διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης για σταθερές περιοχές αντισωμάτων. Τα σφαιρίδια αυτά είναι παραμαγνητικά, και ομοίως με τα SPRI σφαιρίδια εμφανίζουν μαγνητικές ιδιότητες μόνο υπό την παρουσία μαγνητικού πεδίου.

Καθαρισμός των beads με 1X Wash Buffer (3 washes)

1. Μεταφορά 100 μL σφαιριδίων σε ένα eppendorf
2. Μεταφορά του eppendorf στο μαγνήτη και απόρριψη του διαλύματος
3. Προσθήκη 1mL wash buffer 1x
4. Ανάδευση έως ότου τα σφαιρίδια αιωρούνται στο διάλυμα
5. Επώαση για 3 λεπτά στον πάγο
6. Προαιρετικά γίνεται μία σύντομη φυγοκέντρηση (διάρκειας λίγων δευτερολέπτων) πριν το eppendorf που περιέχει το διάλυμα των σφαιριδίων μεταφερθεί στον μαγνήτη
7. Μεταφορά στον μαγνήτη και αναμονή για 3min
8. Απόρριψη υπερκευμένου και επανάληψη της διαδικασίας από το βήμα 2
9. Τέλος τα beads διαλύονται σε 1mL Wash Buffer

Παρατηρήσεις :

- Τα σφαιρίδια αυτά χρησιμοποιούνται για το preclearing καθώς και για την απομόνωση των συμπλόκων αντισώματος-αντιγόνου-χρωματίνης. Οι διαδικασίες αυτές περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.
- Ο αρχικός όγκος των σφαιριδίων ο οποίος λαμβάνεται από το stock δεν είναι απαραίτητα 100 μL, καθώς σε κάθε πείραμα μπορεί να υπάρχει διαφορετικός αριθμός αντιδράσεων ή να απαιτείται διαφορετική συγκέντρωση σφαιριδίων σε κάθε αντίδραση.

2.3.8. Καθαρισμός της χρωματίνης πριν από τη χρησιμοποίησή της σε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης (preclearing)

1. Προσθήκη ενός μικρού ποσοστού του όγκου του διαλύματος των σφαιριδίων στα eppendorfs που περιέχουν την χρωματίνη
2. Κατόπιν της προσθήκης των σφαιριδίων, προστίθεται στα δείγματα ίσος όγκος wash buffer 2x ώστε να αποκατασταθεί η αλατότητα του διαλύματος
3. Ακολουθεί προσθήκη Wash Buffer 1x (έως ότου ο τελικός όγκος του διαλύματος να φτάσει τα 800 μL) για καλύτερη ανάδευση
4. Τα δείγματα αναδεύονται στο rotator, στο coldroom (4°), 5rpm για 30 λεπτά

Παρατηρήσεις :

- Αυτή η διαδικασία δεν είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ώστε να προχωρήσει η ανοσοκατακρήμνιση.
- Αν προηγηθεί preclearing, τότε μετά από την ολοκλήρωση του και πριν προχωρήσει η πειραματική διαδικασία, θα πρέπει να αφαιρεθούν τα σφαιρίδια από το διάλυμα. Η αφαίρεση των σφαιριδίων γίνεται με επώαση των eppendorfs στο μαγνήτη για τρία λεπτά και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα eppendorfs.

2.3.9. Ανοσοκατακρήμνιση

- Η διαδικασία πραγματοποιείται σε 3 στάδια

Ημέρα 1^η

Επώαση της χρωματίνης με το αντίσωμα

Διαλύματα

2X RIPA Buffer (Vτελ = 50 mL)

1mL Triton X 100

1mL Tris pH 8

2,8 mL NaCl 5M

0,12 g DOC

Διαλύτης: dH₂O

Από αυτό το διάλυμα θα παρασκευαστεί και διάλυμα 1X

Παρατήρηση: Τα διαλύματα αυτά αφού παρασκευαστούν τοποθετούνται στον πάγο ώστε να είναι παγωμένα όταν θα χρησιμοποιηθούν.

Διαδικασία

- Σε μία ποσότητα από τη χρωματίνη (κυμαίνεται από 200 μg ως 500 μg στα διάφορα πειράματα), που έχει κατατηθεί με χρήση υπέρηχων, προστίθεται ίσος όγκος 2X RIPA Buffer ώστε η συγκέντρωση του τελικού διαλύματος να είναι 1X
- Σε αυτό το διάλυμα προστίθεται επιπλέον 1X RIPA Buffer μέχρι ο όγκος του διαλύματος να φτάσει τα 800 μL

- Προσθήκη του αντισώματος στις αντιδράσεις
- Τα eppendorfs τοποθετούνται σε rotator και αναδεύονται ολονύκτια με ταχύτητα 5rpm στο coldroom (4°C)

Παρατήρηση: Αν έχει προηγηθεί preclearing τότε παραλείπεται η προσθήκη ίσου όγκου 2X RIPA Buffer.

Ημέρα 2^η

Απομόνωση των συμπλόκων αντιγόνου αντισώματος

Διαλύματα

2x Wash buffer (Vτελ = 50mL)

1 mL Triton x100

1 mL Tris pH 8

5 mL NaCl 5M

0,14 g DOC

1 mL SDS 10%

Διαλύτης: ddH₂O

- 1) Σε καθένα από τα eppendorfs που επώαστηκε το αντίσωμα με την χρωματίνη προστίθενται protein G beads
 - 2) Επώαση στο rotator 5rpm, coldroom, για 3 ώρες
 - 3) Ακολουθούν 5 πλύσεις με 1x Wash Buffer
 - Τοποθέτηση στο μαγνήτη για 2 min και απόρριψη του διαλύματος
 - Προσθήκη 1mL 1X Wash Buffer
 - Ανάδευση στο rotator, 5rpm για 3 λεπτά και επιστροφή στο μαγνήτη
- ➔ Ακολουθεί κατεργασία με PK και reverse του crosslinking όπως περιγράφηκαν παραπάνω.

Παρατηρήσεις :

- Ο τελικός όγκος του δείγματος στην κατεργασία με πρωτεϊνάση K, εξαρτάται από τον τρόπο με τον οποίο θα γίνει ο καθαρισμός της χρωματίνης στη συνέχεια. Αν ο καθαρισμός γίνει με αντίδραση φαινόλης χλωροφορμίου, τότε ο τελικός όγκος της αντίδρασης θα είναι 100 μL. Αντίθετα, αν ο καθαρισμός πραγματοποιηθεί με την χρήση SPRI μαγνητικών σφαιριδίων, τότε ο όγκος της αντίδρασης θα είναι 50 μL. Αυτή η προσαρμογή γίνεται για λόγους οικονομίας, λόγω του κόστους των σφαιριδίων. Η διαδικασία καθαρισμού με αυτά τα σφαιρίδια περιγράφεται παρακάτω.
- Μετά από την τελευταία πλύση με 1X Wash buffer απορρίπτεται το διάλυμα και απομακρύνονται τα υπολείμματα του. Τα σύμπλοκα αντισώματος-αντιγόνου-DNA βρίσκονται συνδεδεμένα πάνω στα μαγνητικά σφαιρίδια. Για την αντίδραση PK ο όγκος που καταλαμβάνουν τα σφαιρίδια θεωρείται συμβατικά ως μηδενικός.

Ημέρα 3^η

Καθαρισμός με SPRI beads ή αντίδραση φαινόλης χλωροφορμίου ακολουθούμενος από κατακρήμνιση με αιθανόλη. Αφού ολοκληρωθεί και ο καθαρισμός του DNA, μέρος αυτού

χρησιμοποιείται σε Real Time qPCR με διάφορα ζεύγη εκκινητών και για την προετοιμασία βιβλιοθηκών για αλληλούχιση.

2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR), είναι μία μέθοδος ενζυμικού πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων τμημάτων DNA in vitro. Μέσω της PCR ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA μπορεί να πολλαπλασιαστεί δεκάδες φορές, γεγονός που δίνει την δυνατότητα περαιτέρω μελέτης ή χρήσης, σε άλλες πειραματικές πορείες, του τμήματος που έχει ενισχυθεί. Απαραίτητη προϋπόθεση για τον επιτυχημένο πολλαπλασιασμό ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA είναι η γνώση της αλληλουχίας του ή των αλληλουχιών οι οποίες το περιβάλλουν. Η γνώση αυτή χρησιμοποιείται για τον σχεδιασμό 2 εκκινητών, δηλαδή ολιγονουκλεοτιδίων, καθένα από τα οποία είναι συμπληρωματικό για έναν από τους δύο κλώνους του DNA που περιέχει την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί. Οι εκκινητές οριοθετούν τα άκρα του τμήματος DNA που θα πολλαπλασιαστεί και οι αλληλουχίες τους αποτελούν τις ακραίες αλληλουχίες των τμημάτων DNA που προκύπτουν από την PCR.

Το ένζυμο μέσω της δράσης του οποίου καθίσταται δυνατός ο πολλαπλασιασμός του επιθυμητού τμήματος DNA είναι μία DNA πολυμεράση. Οι DNA πολυμεράσες είναι ένζυμα τα οποία συναντώνται σε όλους τους οργανισμούς που είναι ικανοί να πραγματοποιήσουν αντιγραφή του DNA τους και αναλαμβάνουν τον ρόλο αυτό, δηλαδή την αντιγραφή του DNA. Για την αντιγραφή DNA οι DNA πολυμεράσες χρησιμοποιούν ως εκμαγείο ένα κλώνο DNA απέναντι από τον οποίο τοποθετούν νουκλεοτίδια με συμπληρωματικό τρόπο. Οι DNA πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται σε αντιδράσεις PCR είναι θερμοανθεκτικές, έχον δηλαδή την δυνατότητα να παραμένουν λειτουργικές ακόμα και μετά από έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες. Αυτή η ιδιότητα είναι απαραίτητη ώστε η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR να παραμένει λειτουργική καθ' όλη την διάρκεια της αντίδρασης.

Η PCR πραγματοποιείται σε μία συσκευή που ονομάζεται θερμικός κυκλοποιητής (Thermal Cycler) και φέρει μία θερμαινόμενη πλάκα η οποία εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Η εναλλαγή των θερμοκρασιών είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση των 3 βημάτων μίας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης τα οποία πραγματοποιούνται διαδοχικά και επαναλαμβανόμενα. Το πρώτο βήμα είναι η αποδιάταξη των δύο κλώνων του DNA, η οποία επιτυγχάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας στους 95°C. Επόμενο βήμα είναι η υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στις μητρικές αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται αυτό το βήμα κυμαίνεται ιδανικά από τους 55°C έως τους 65°C και είναι διαφορετική για κάθε ζεύγος εκκινητών. Παράμετροι που επηρεάζουν αυτήν την θερμοκρασία είναι το μήκος και η αλληλουχία των εκκινητών.

2.4.1. Αλυσιδωτή ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση του αρχικού δείγματος DNA. Η Real Time PCR πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικού μηχανήματος που ονομάζεται θερμικός κυκλοποιητής πραγματικού χρόνου και διαθέτει ένα ενσωματωμένο σύστημα ανίχνευσης φθορισμού. Ο φθορισμός αυτός εκπέμπεται από ειδικές χρωστικές οι οποίες ενσωματώνονται στο νεοσυντιθέμενο DNA. Η χρωστική που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο είναι η SYBR GREEN. Η χρωστική αυτή ενσωματώνεται στο δίκλωνο DNA καθώς αυτό συντίθεται και το σύμπλοκο SYBR GREEN-DNA που δημιουργείται απορροφά στο μπλε φως ($\lambda = 497\text{nm}$) και εκπέμπει πράσινο ($\lambda = 520\text{nm}$). Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας του DNA και η ποσοτικοποίηση του επιτρέπει την εκτίμηση της ποσότητας DNA που υπάρχει στο δείγμα. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από τις ειδικές χρωστικές που χρησιμοποιούνται στη Real Time PCR

συλλέγεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Ο θερμικός κυκλοποιητής κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης υπολογίζει την τιμή Ct κάθε δείγματος. Αυτή η τιμή αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο η ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται από τα προϊόντα της PCR ξεπερνάει τον 'θόρυβο' της αντίδρασης. Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη με την αρχική ποσότητα DNA του κάθε δείγματος. Τα δείγματα τα οποία περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό αρχικών μορίων DNA, που ενισχύονται από το ζεύγος εκκινήτων που χρησιμοποιείται στην εκάστοτε αντίδραση, χρειάζονται λιγότερους κύκλους πολλαπλασιασμού για να οδηγήσουν στην παραγωγή της κατάλληλης ποσότητας προϊόντων, ώστε ο φθορισμός που εκπέμπεται από αυτά να ξεπεράσει το 'κατώφλι' και επομένως, έχουν μικρότερη τιμή Ct από τα δείγματα με λιγότερα αντίγραφα του γονιδίου στόχου.

Real Time qPCR σε δείγματα DNA από πειράματα ChIP

Vτελ = 20μL

10 μL 2x SYBR mix

4 μL DNA (αντιστοιχεί σε μερικά ng)

1 μL forward primer (50ng/μL)

1 μL Reverse primer (50ng/μL)

4 μL ddH₂O

2.5. Προετοιμασία βιβλιοθηκών για αλληλούχιση

Η κατασκευή βιβλιοθήκης για αλληλούχιση δειγμάτων DNA που προέρχονται από πειράματα ChIP, με την τεχνολογία illumina, περιλαμβάνει την προσθήκη ανταπτόρων στα άκρα του DNA. Οι ανάπτορες επιτρέπουν τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό της βιβλιοθήκης μέσω PCR, την πρόσδεση των αλληλουχιών της βιβλιοθήκης στις αλληλουχίες που βρίσκονται καθηλωμένες στην συσκευή αλληλούχισης, ενώ περιέχουν και συγκεκριμένες αλληλουχίες (barcodes) οι οποίες επιτρέπουν την ταυτοποίηση του δείγματος από το οποίο προέρχεται κάθε αλληλουχία, μετά την ολοκλήρωση της αλληλούχισης. Για τον πολλαπλασιασμό της βιβλιοθήκης μέσω PCR χρησιμοποιούνται εκκινήτες οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί προς τις αλληλουχίες των ανταπτόρων που έχουν προστεθεί στα άκρα του DNA. Το πρώτο βήμα για την προετοιμασία μία τέτοιας βιβλιοθήκης, είναι η επιδιόρθωση των άκρων των τμημάτων DNA τα οποία προέρχονται από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και η προσθήκη αδερίνης σε αυτά, ώστε να είναι συμβατά με τους ανάπτορες, οι οποίοι θα προστεθούν στην συνέχεια και θα συνδεθούν με τα μόρια του DNA μέσω μίας αντίδρασης λιγάσης. Οι ανάπτορες αυτοί περιέχουν μια δομή φουρκέτας, η οποία δημιουργείται μέσω της παρουσίας ουρακίλης στην αλληλουχία τους, η οποία αποτρέπει την δημιουργία διμερών και συμβάλει στην αποτελεσματικότερη σύνδεση των ανταπτόρων στα μόρια DNA του δείγματος. Κατόπιν της κλωνοποίησης των ανταπτόρων στα μόρια του DNA γίνεται κατεργασία με το ενζυμο USER το οποίο αφαιρεί την ουρακίλη που είναι υπεύθυνη για την δημιουργία της φουρκέτας και αυτή αποδιατάσσεται.

Ακολουθεί μικρής έκτασης πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης που έχει δημιουργηθεί μέσω PCR (5 κύκλοι) και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης. Από την πηκτή της αγαρόζης απομονώνεται το κλάσμα του υλικού που έχει μήκος από 200bp έως 400bp, δηλαδή το ιδανικό μήκος για αλληλούχιση (illumina.com). Το υλικό αυτό πολλαπλασιάζεται περαιτέρω με χρήση του ίδιου ζεύγους εκκινήτων.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία προετοιμασίας και πολλαπλασιασμού των βιβλιοθηκών για την αλληλούχιση, μέρος του υλικού ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης, για τον έλεγχο της ποιότητας της βιβλιοθήκης και πραγματοποιείται Real Time qPCR με συγκεκριμένα ζεύγη εκκινήτων τα οποία θα

επιβεβαιώσουν πως οι βιβλιοθήκες περιέχουν τα ίδια επίπεδα εμπλουτισμού για τις αλληλουχίες-στόχους με τα αρχικά δείγματα που προέρχονται από ChIP.

1)Επιδιόρθωση των άκρων

Σε PCR σωληνάριο :

Vτελ=50 μL

~20 ng DNA (~ 25 μL)
5 μL T4 DNA ligase buffer
1 μL T4 DNA polymerase
1 μL Polynucleotide kinase
2 μL 10mM dNTPs
ddH₂O

Επώαση σε θερμικό κυκλοποιητή στους 20° C για 30 λεπτά.

- Ακολουθεί καθαρισμός με Ampure beads

Ο καθαρισμός γίνεται μεταξύ όλων των σταδίων για να καθαρίζονται τα δείγματα από τα παραπροϊόντα των αντιδράσεων

$V_{\text{beads}}/V_{\text{δείγματος}} = 2$

Επαναδιάλυση σε 36 μL ddH₂O

2) Προσθήκη A στα άκρα του DNA

Σε PCR σωληνάριο

Vτελ = 50μL

34 μL DNA από το προηγούμενο βήμα
5 μL (10x) NEB 2 buffer
10 μL dATP
1 μL Klenow Fragment (3' -> 5' exo-)

Επώαση σε θερμικό κυκλοποιητή στους 37°C για 30 λεπτά

- Ακολουθεί καθαρισμός με Ampure Beads

$V_{\text{beads}}/V_{\text{δείγματος}} = 2$

Επαναδιάλυση σε 11 μL ddH₂O

3) Αντίδραση λιγάσης για την προσθήκη ανταπτόρων στα άκρα του DNA

→ Σε PCR σωληνάριο

Vτελ = 30 μL

10 μL DNA από το προηγούμενο βήμα
15 μL Quick Ligation Reaction Buffer (NEB)
1 μL NEBNext Adaptor [(NEBNext ® Multiplex Oligos for illumina®) (index primera set 1/2)]
2 μL Quick T4 DNA ligase (NEB)
2 μL ddH₂O

Επώαση σε θερμικό κυκλοποιητή στους 20°C για 30 λεπτά

4) Προσθήκη 3μL USER™ enzyme Mix [(NEBNext® Multiplex oligos for illumina®) (index primers set 1)]

Επώαση σε θερμικό κυκλοποιητή στους 37°C για 30 λεπτά

- Ακολουθεί καθαρισμός με Ampure beads
Vbeads/Vδείγματος = 1,6
Επαναδιάλυση σε 22 μL ddH₂O

5) Πολλαπλασιασμός των δειγμάτων με PCR

- 45 sec 98°C
- 5 κύκλοι
 - 15 sec / 98°C
 - 30 sec / 63°C
 - 30 sec / 72°C
- 1 min 72°C
- Hold 4°C

Vτελ= 50 μL

22 μL DNA από το προηγούμενο βήμα

25 μL Kappa HiFi mix

1 μL (10μM) Universal primer

1 μL (10μM) index primer

ddH₂O

→ Ακολουθεί καθαρισμός με Ampure beads

Vbeads/Vδείγματος = 1,6

Επαναδιάλυση σε 10 μL ddH₂O

6) Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 2%

7) Απομόνωση από την πηκτή του DNA μήκους 200-400 ζ.β. (gel extraction)

8) Πολλαπλασιασμός της βιβλιοθήκης σε PCR

- 45 sec 98°C
- 18 κύκλοι
 - 15 sec / 98°C
 - 30 sec / 63°C
 - 30sec / 72°C
- 1min 72°C
- Hold 4°C

Vτελ = 50 μ L

Όλη η ποσότητα του δείγματος

25 μ L Kappa HiFi mix

2,5 μ L forward primer

2,5 μ L reverse primer

ddH₂O

2.5.1. Απομόνωση DNA από πηκτική αγαρόζης (gel extraction)

Η διαδικασία πραγματοποιείται με τη χρήση του NucleoSpin® Gel and PCR cleanup.

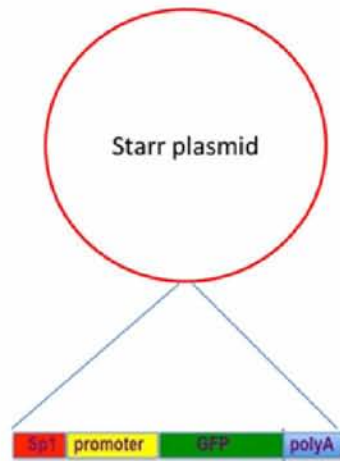
Διαδικασία

- 1) Κοπή της περιοχής της πηκτής στην οποία εντοπίζεται το επιθυμητό DNA και μεταφορά του κομματιού αυτού σε eppendorf
- 2) Ζύγισμα του κομματιού της πηκτής που λήφθηκε
- 3) Προσθήκη 4 όγκων NTI buffer
- 4) Επώαση στους 50°C και ελαφριά ανακίνηση ανά 3 λεπτά έως την ολοκληρωτική τήξη της πηκτής
- 5) Μεταφορά του διαλύματος που έχει προκύψει στην ειδική στήλη του kit
- 6) Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 30 δευτερόλεπτα
- 7) Απόρριψη του διηθήματος
- 8) Προσθήκη 700 μ L NT3 Buffer στην στήλη
- 9) Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 30 δευτερόλεπτα
- 10) Απόρριψη του διηθήματος
- 11) Φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου με ταχύτητα 13.000 rpm για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του NT3 buffer
- 12) Απόρριψη διηθήματος
- 13) Μεταφορά της στήλης σε νέο eppendorf
- 14) Προσθήκη στη στήλη 20 μ L ddH₂O θερμοκρασίας 55°C για την έκλυση του DNA από την στήλη
- 15) Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 16) Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου με ταχύτητα 13.000 rpm
- 17) Απόρριψη της στήλης και αποθήκευση του DNA στους -20°C

} 2X

2.6. Starr -seq (self-transcribing active regulatory region sequencing)

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει το μαζικό έλεγχο και την ταυτοποίηση της λειτουργικότητας περιοχών DNA ως ενισχυτές. Η ιδιότητα των ενισχυτών να λειτουργούν ανεξάρτητα από την σχετική τους θέση είναι βασική για την μέθοδο αυτή. Έτσι, αλληλουχίες DNA οι οποίες διαθέτουν χαρακτηριστικά ενισχυτών, όπως συγκεκριμένες ιστονικές τροποποιήσεις (για παράδειγμα H3K4me1 και H3K27ac) ή εντοπίζονται σε ανοιχτές χρωματοσωματικές περιοχές (σύμφωνα με πειράματα DHS), εισάγονται σε πλασμιδιακούς φορείς (Εικόνα 9), καθοδικά ενός απλού υποκινητή και ενός γονιδίου GFP, με τέτοιο τρόπο που επιτρέπει την ρύθμιση της μεταγραφής της ίδιας τους της αλληλουχίας. Οι φορείς αυτοί εισάγονται σε ευκαρυωτικά κύτταρα και τα κύτταρα τα οποία διαθέτουν πλασμίδιο στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί μια αλληλουχία ενισχυτή φθορίζουν, λόγω της έκφρασης της GFP πρωτεΐνης, ενώ με την απομόνωση RNA από αυτά τα κύτταρα, το polyA selection και τη δημιουργία βιβλιοθήκης για RNA sequencing μπορούν να αποκαλυφθούν αλληλουχίες του DNA περιοχών που δρουν ως ενισχυτές (Arnold et al., 2013).



Εικόνα 9: Συνδεσμολογία του πλασμιδιακού φορέα STARR

2.6.1. Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με χρήση λιποφεκταμίνης (transfection)

1. Σε 250 μ L θρεπτικού μέσου (DMEM χωρίς αντιβιοτικό και FBS) προστίθεται λιποφεκταμίνη (Lipofectamine 2000 της Invitrogen)
2. Σε άλλα 250 μ L θρεπτικού (χωρίς αντιβιοτικό και FBS) προστίθενται τα πλασμίδια
3. Αναμονή για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
4. Μεταφορά του θρεπτικού στο οποίο περιέχεται η λιποφεκταμίνη στο θρεπτικό μέσο στο οποίο περιέχονται τα πλασμίδια με χρήση κομμένων tips
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά
6. Απόρριψη του παλιού θρεπτικού μέσου από τα πηγαδάκια στα οποία βρίσκονται τα κύτταρα που θα διαμολυνθούν
7. Προσθήκη 1500 μ L νέου θρεπτικού μέσου (χωρίς αντιβιοτικό και FBS) σε κάθε πηγάδι κυττάρων
8. Προσθήκη του διαλύματος πλασμιδίου/λιποφεκταμίνης ($V = 500 \mu$ L)
 → Ο τελικός όγκος διαλύματος που θα υπάρχει ύστερα από αυτό το βήμα σε κάθε πηγάδι κυττάρων θα είναι 2 mL
9. Τα πιάτα στα οποία περιέχονται τα κύτταρα επιστρέφονται στον επωαστήρα
10. Ύστερα από ένα χρονικό διάστημα 4 ωρών γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου χωρίς αντιβιοτικό και FBS με θρεπτικό μέσο που περιέχει FBS πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη

Παρατηρήσεις :

- Το DMEM που χρησιμοποιείται για το transfection δεν περιέχει FBS διότι είναι τοξικό και δρα ανασταλτικά στην αντίδραση διαμόλυνσης με λιποφεκταμίνη. Επίσης δεν περιέχει αντιβιοτικά διότι αυτά κατά την δράση της λιποφεκταμίνης μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη και να εισέλθουν στο εσωτερικό των κυττάρων, όπου αν βρεθούν σε μεγάλη συγκέντρωση είναι τοξικά.
- Η παραπάνω πειραματική διαδικασία αναφέρεται σε transfection που πραγματοποιείται σε κύτταρα που περιέχονται σε πιάτο με 12 πηγάδια. Ο όγκος του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιείται είναι ανάλογος με το μέγεθος των πιάτων και των πηγαδιών στα οποία περιέχονται τα κύτταρα.
- Η αναλογία πλασμιδίου : λιποφεκταμίνης που χρησιμοποιείται γενικά είναι 1 : 2.
 Η ποσότητα αυτών των συστατικών προσαρμόζεται ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων (Πίνακας 1)

Πίνακας 1: Ποσότητες πλασμιδίου και λιποφεκταμίνης που πρέπει να χρησιμοποιηθούν για συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων.

Τύπος πιάτου	Αριθμός κυττάρων	Ποσότητα λιποφεκταμίνης (σε μL)	Ποσότητα πλασμιδίου (σε μg)
Πιάτο με 12 πηγάδια	400.000	5	2
Πιάτο με 6 πηγάδια	1.000.000 - 1.200.000	15	6
Πιάτο 10 cm	8.000.000 - 9.000.000	~100	~40
Πιάτο 15 cm	20.000.000	250	~100
—	1.000.000	12	~5

2.6.2. Μάζεμα των κυττάρων και πάγωμα του ιζήματος

1. Απόρριψη θρεπτικού μέσου
 2. Πλύση με PBS
 3. Προσθήκη 1 mL διαλύματος 2 mM EDTA σε PBS
 4. Αναμονή 5 λεπτά
 5. Πιπετάρισμα και μεταφορά του διαλύματος των κυττάρων σε eppendorfs
 6. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, με ταχύτητα 6.000 rpm, σε θερμοκρασία 4 °C
 7. Απόρριψη υπερκευμένου
 8. Προσθήκη 1ml PBS και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων
 9. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, με ταχύτητα 6.000 rpm, σε θερμοκρασία 4 °C
 10. Απόρριψη υπερκευμένου και απομάκρυνση των υπολειμμάτων του
 11. Αποθήκευση του ιζήματος των κυττάρων στους -80 °C
- } 2X

Παρατηρήσεις :

- Όταν πρόκειται για μη προσκολλητικά κύτταρα τότε τα βήματα 1-4 παραλείπονται
- Τα βήματα της παραπάνω διαδικασίας πραγματοποιούνται στον πάγο

2.6.3. Απομόνωση RNA

1. Προσθήκη 1ml TRI στο ίζημα των κυττάρων
2. Πιπετάρισμα και Vortex
3. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
4. Προσθήκη 200 μL χλωροφορμίου (1/5 του TRI)
5. Vortex και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
6. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στις 13.000rpm, σε θερμοκρασία 4°C
7. Μεταφορά της πάνω φάσης σε καινούρια eppendorfs
8. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης και ανάδευση
9. Επώαση στους -80°C για 15 λεπτά
10. Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά, στις 13.000 rpm, 4°C
11. Απόρριψη υπερκευμένου

12. Πλύση με 70% αιθανόλη (επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος, φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 3 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου)
13. Απομάκρυνση των υπολειμμάτων της αιθανόλης
14. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 50 μL ddH₂O με 1% αναστολέα RNase out inhibitor

Παρατηρήσεις :

- Πριν την έναρξη της διαδικασίας της απομόνωσης θα πρέπει ο πάγκος στον οποίο θα γίνει το πείραμα να έχει καθαριστεί πολύ καλά, πρώτα με χλωρίνη και ύστερα με 70% αιθανόλη. Το ίδιο ισχύει και για τις πιπέτες ενώ γίνεται αποκλειστική χρήση filter tips. Επίσης τα αντιδραστήρια θα πρέπει να είναι καινούρια. Όλα τα παραπάνω γίνονται ώστε να αποφευχθεί η ύπαρξη ενζύμων με δράση RNAase και ο ερχομός των δειγμάτων σε επαφή με αυτά.
- Από το έβδομο βήμα και ύστερα θα πρέπει οι εργασίες να γίνονται σε πάγο, διότι όσο το RNA βρίσκεται σε επαφή με το TRI προστατεύεται από αποδιάταξη από RNases. Αυτή η ιδιότητα του TRI να προστατεύει το RNA οφείλεται στη σύστασή του. Το αντιδραστήριο αυτό περιέχει ένα χαοτροπικό αλάτι, το οποίο αποδιατάσσει κυτταρικές μεμβράνες και πρωτεΐνες, καθώς επίσης και φαινόλη.

2.6.4. Κατεργασία με DNaseI

Κατόπιν της διαδικασίας απομόνωσης του RNA τα δείγματα που προκύπτουν υπόκεινται σε κατεργασία με DNaseI για την απομάκρυνση υπολειμμάτων DNA από αυτά.

Vτελ = 100 μL

50 μL διάλυμα RNA (από την διαδικασία απομόνωσης RNA)

10 μL RQ1 DNase Buffer

3 μL RQ1 DNase

37 μL ddH₂O

Επώαση στους 37°C για μισή ώρα

2.6.5. Καθαρισμός των αντιδράσεων με RNeasy Mini Kit

Σύμφωνα με τις οδηγίες του kit στα eppendorfs που προκύπτουν ύστερα από την αντίδραση με RNase πραγματοποιείται :

1. Προσθήκη 350 μL RLT Buffer και καλή ανάδευση με χρήση πιπέτας
2. Προσθήκη 250 μL 100% αιθανόλης, καλή ανάδευση με χρήση πιπέτας και άμεση μεταφορά στην ειδική στήλη που παρέχει το kit
3. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm, για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου
4. Απόρριψη του διηθήματος
5. 500 μL RPE Buffer προστίθενται στη στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (πλύση της στήλης)
6. Απόρριψη του διηθήματος
7. Επανάληψη της πλύσης με RPE Buffer – αυτή τη φορά η διάρκεια της φυγοκέντρηση είναι 2 λεπτά
8. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάκι συλλογής διηθήματος και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις ίδιες συνθήκες με τις προηγούμενες φυγοκεντρήσεις – σκοπός είναι η πλήρης απομάκρυνση των υπολειμμάτων του διαλύματος RPE, το οποίο περιέχει αιθανόλη, από την στήλη

9. Μεταφορά της στήλης σε erpendorf και προσθήκη 30μL ddH₂O απευθείας στη μεμβράνη της στήλης – για την έκλυση του RNA από την στήλη
10. Επώαση της στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
11. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου
12. Απόρριψη της στήλης
13. Προσθήκη 0,5 μL αναστολέα RNase (RNase out inhibitor)

Παρατήρηση : Το RNA αποθηκεύεται στους -80°C

2.6.6. Εμπλουτισμός των δειγμάτων RNA σε mRNA [poly(A)-selection]

→ Η διαδικασία πραγματοποιείται με την χρήση kit (Dynabeads® Oligo (dT)₂₅ από την Life Technologies®. Αριθμοί καταλόγου: 61002 , 61005)

Τα Dynabeads® Oligo (dT)₂₅ είναι σχεδιασμένα για την γρήγορη απομόνωση υψηλής καθαρότητας mRNA από συνολικό ευκαρυωτικό RNA ή ακόμα και από ακατέργαστο εκχύλισμα κυττάρων. Η χρήση αυτών των σφαιριδίων στηρίζεται στο ζευγάρωμα των βάσεων ανάμεσα στην πολύ-A ουρά του αγγελιαφόρου RNA και στις όλιγο-dT αλληλουχίες που βρίσκονται καθηλωμένες πάνω στην επιφάνεια τους. Κατόπιν της υβριδοποίησης των αλληλουχιών αυτών, το erpendorf στο οποίο περιέχονται τα σφαιρίδια και το RNA τοποθετείται σε μαγνήτη για την συμπύκνωση των σφαιριδίων και του mRNA, που βρίσκεται πλέον συνδεδεμένο σε αυτά, στο τοίχωμα του erpendorf εγγύτερο στον μαγνήτη. Το υπερκείμενο, στο οποίο περιέχονται ανεπιθύμητα προϊόντα, απομακρύνεται και τέλος το mRNA εκλύεται από τα σφαιρίδια.

Διαλύματα

Binding Buffer

20mM Tris-HCl pH 7,5
1M LiCl
2mM EDTA

Lysis/ Binding Buffer

100mM Tris-HCl pH 7,5
500mM LiCl
10mM EDTA
1% LiDS
5mM διθειοθρεϊτόλη (DTT)

Washing Buffer A

10mM Tris-HCl pH 7,5
0,15M LiCl
1mM EDTA
0,1% LiDS

Washing Buffer B

10mM Tris-HCl pH 7,5

0,15M LiCl

1mM EDTA

Reconditioning Buffer

0,1 M NaOH

Storage Buffer Oligo (dT)₂₅:

250mM Tris-HCl pH 7,5

20mM EDTA

0,1% Tween® -20

0,02% αζίδιο του νατρίου

Παρατηρήσεις :

- Σε όλα τα παραπάνω διαλύματα ο διαλύτης είναι ddH₂O
- Τα διαλύματα Binding Buffer, Washing buffer B, Reconditioning solution και Storage Buffer παρασκευάζονται εκ νέου πριν από την έναρξη του πειράματος, σε αντίθεση με το Lysis/Binding Buffer και το Washing Buffer A
- Τα Binding Buffer, Washing Buffer B και Storage Buffer αποστειρώνονται πριν την χρήση τους.
- Όλα τα διαλύματα θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου για να χρησιμοποιηθούν

Διαδικασία

Πλύση των σφαιριδίων:

1. Επαναιώρηση των σφαιριδίων στο διάλυμα στο οποίο περιέχονται μέσω χρήσης Vortex για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα
2. Μεταφορά του επιθυμητού όγκου διαλύματος σφαιριδίων σε νέο erpendorf
3. Προσθήκη ίσου όγκου Binding Buffer
4. Μεταφορά του erpendorf στον μαγνήτη , επώαση για 1 λεπτό και απόρριψη υπερκειμένου
5. Αφαίρεση του erpendorf που περιέχει τα σφαιρίδια από τον μαγνήτη, και επαναδιάλυση των σφαιριδίων σε όγκο Binding Buffer, ίσο με τον αρχικό όγκο του διαλύματος των σφαιριδίων

Διαδικασία καθαρισμού mRNA από ολικό RNA

1. Προσθήκη ίσου όγκου Binding Buffer στο διάλυμα του RNA
2. Θέρμανση του δείγματος στους 65°C για 2 λεπτά, για την διάσπαση των δευτεροταγών δομών και άμεση μεταφορά στον πάγο
3. Προσθήκη διαλύματος beads (ίσος όγκος με τον όγκο του διαλύματος RNA πριν την προθήκη Binding Buffer) στο διάλυμα του RNA και καλή ανάδευση
4. Επώαση υπό ήπια ανάδευση σε αναδευτήρα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
5. Μεταφορά του erpendorf στον μαγνήτη και επώαση για 1-2 λεπτά
6. Απομάκρυνση του υπερκειμένου
7. Απομάκρυνση του erpendorf που περιέχει το δείγμα από τον μαγνήτη και προσθήκη 200 μL Washing Buffer B. Προσεκτική ανάδευση με πιπετάρισμα 1-2 φορές

8. Επιστροφή στο μαγνήτη και απόρριψη υπερκλειμένου
9. Επανάληψη των βημάτων 8 και 9
10. Για την έκλυση του mRNA από τα σφαιρίδια, αφού αφαιρεθεί το Washing Buffer B, γίνεται προσθήκη 20 μL ddH₂O. Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά στους 75°C. Στη συνέχεια το eppendorf μεταφέρεται στον μαγνήτη και το διάλυμα του mRNA που έχει προκύψει μεταφέρεται σε νέο eppendorf.

Παρατήρηση:

Ο γενικός κανόνας για την αναλογία μαγνητικών σφαιριδίων προς RNA είναι 1 mg σφαιριδίων ανά 75 μg συνολικού RNA. Το 1 mg σφαιριδίων έχει προηγουμένως πλυθεί και επαναδιαλυτοποιηθεί σε 100 μL Binding Buffer σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω.

Ανασύσταση των σφαιριδίων

Τα μαγνητικά σφαιρίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό του mRNA με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω είναι δυνατό να φυλαχθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν σε μελλοντικό καθαρισμό εάν πρώτα υποβληθούν στην διαδικασία που περιγράφεται ακολούθως.

- 1) Επαναδιάλυση των σφαιριδίων σε 200 μL Reconditioning Buffer
 - 2) Μεταφορά στον μαγνήτη και απομάκρυνση του υπερκλειμένου
 - 3) Επαναδιάλυση σε 200 μL Reconditioning Buffer
 - 4) Επώαση στους 65°C για 2 λεπτά
 - 5) Μεταφορά στον μαγνήτη και απομάκρυνση του υπερκλειμένου
 - 6) Επαναδιαλυτοποίηση σε 100 μL Storage buffer
- } 2X

Παρατήρηση: Μετά από την λήξη της διαδικασίας αυτής τα σφαιρίδια αποθηκεύονται στους 4°C

2.6.7. Δημιουργία cDNA- RT-PCR

Η αντίστροφη μεταγραφή καταλύεται από ένα ένζυμο που ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση και προέρχεται από τους ρετροϊούς, οι οποίοι το χρησιμοποιούν για να μετατρέψουν το γενετικό του υλικό από μονόκλωνο RNA σε δίκλωνο DNA το οποίο στη συνέχεια μπορεί να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό του ξενιστή τους. Το ένζυμο αυτό, δρα συνθέτοντας έναν κλώνο DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το μονόκλωνο μόριο RNA, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία ενός υβριδικού RNA/DNA δίκλωνου μορίου. In vitro, η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται, όπως και η PCR, σε θερμικό κυκλοποιητή, και με την διενέργεια της προκύπτουν μόρια DNA συμπληρωματικά προς τα προς μελέτη μόρια RNA. Τα μόρια αυτά στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αρχικό υλικό σε μία κλασσική αντίδραση PCR. Ως εκκινητές σε αυτή την διαδικασία χρησιμοποιούνται ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης, τα οποία προσδένονται συμπληρωματικά στις πολύ-A ουρές των mRNAs.

Διαδικασία

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια. Και τα δύο στάδια πραγματοποιούνται με την χρήση θερμικού κυκλοποιητή.

1° Στάδιο (V = 10 μL)

1 μL dNTPs

0,5 μL Oligo dTs

2 μL RNA

6,5 μL ddH₂O

Τα δείγματα θερμαίνονται στον θερμικό κυκλοποιητή, στους 65°C για 5 λεπτά.

➔ Σκοπός αυτού του βήματος είναι να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA

2° Στάδιο (V = 20 μL)

10 μL υλικό από το πρώτο στάδιο

4 μL 5x SF buffer

1 μL DTT

1 μL Superscript 3

4 μL ddH₂O

Η αντίδραση πραγματοποιείται στο θερμικό κυκλοποιητή σε θερμοκρασία 50°C για 1h και στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C για 15 λεπτά. Σε αυτή την θερμοκρασία γίνεται απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης.

2.6.8. Παρασκευή Starr cDNA βιβλιοθήκης

Αρχικά γίνεται απομόνωση RNA από τα κύτταρα και ακολουθεί poly(A)-selection. Το mRNA αυτό χρησιμοποιείται ως μήτρα σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Η RT-PCR που πραγματοποιείται σε αυτό το στάδιο διαφέρει από το κλασσικό πρωτόκολλο, στο ότι σε αυτή την περίπτωση στο πρώτο στάδιο χρησιμοποιείται ειδικός εκκινητής για τον φορέα Start αντί για ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης.

Για τον πολλαπλασιασμό του cDNA που προκύπτει από την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής ακολουθείται ένα πρωτόκολλο Nested PCR. Στην πρώτη αντίδραση αυτού του πρωτοκόλλου, χρησιμοποιείται ένας εκκινητής που διασχίζει τη θέση ματίσματος του συνθετικού ιντρονίου mhc16, το οποίο εντοπίζεται ανοδικά της κωδικής αλληλουχίας GFP. Σκοπός είναι η καταστολή του πολλαπλασιασμού πιθανών υπολειμμάτων πλασμιδιακού DNA. Η δεύτερη αντίδραση πραγματοποιείται για την εισαγωγή αλληλουχιών Barcodes οι οποίες καθιστούν δυνατή την ταυτόχρονη αλληλούχιση διαφορετικών δειγμάτων.

1^η PCR (V_{τελ} = 50 μL)

25 μL Kara HiFi Hot start ready mix

1 μL 100μM GGGCCAGCTGTTGGGGTG*T*C*C*A*C

1 μL 100μM CTTATCATGTCTGCTCG*A*A*G*G*

ddH₂O μέχρι τα 50 μL

* = φωσφοθειϊκός δεσμός για προστασία από τη δράση νουκλεασών.

Τα eppendorfs μεταφέρονται στον θερμικό κυκλοποιητή και ακολουθείται το πρωτόκολλο:

98°C για 45 δευτερόλεπτα

98°C για 15 δευτερόλεπτα

65°C για 30 δευτερόλεπτα

72°C για 180 δευτερόλεπτα

} 17 κύκλοι

72°C για 180 δευτερόλεπτα

2^η PCR (Vτελ = 50 μL)

1/10 του συνολικού DNA από την πρώτη αντίδραση PCR

25 μL Kara HiFi Hot start ready mix

1 μL NEBNext Universal PCR Primer for Illumina [NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina®]

1 μL NEBNext Index Primer for Illumina [NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina®]

ddH₂O μέχρι τα 50 μL

Τα eppendorfs μεταφέρονται στον θερμικό κυκλοποιητή και ακολουθείται το πρωτόκολλο:

98°C για 45 δευτερόλεπτα

98°C για 15 δευτερόλεπτα

65°C για 30 δευτερόλεπτα

72°C για 120 δευτερόλεπτα

} 9 κύκλοι

72°C για 180 δευτερόλεπτα

Μετά την ολοκλήρωση της δεύτερης PCR μέρος του υλικού ηλεκτροφορεύεται σε πηκτή αγαρόζης 2% για να ελεγχθεί η ποιότητα της κατασκευής της βιβλιοθήκης.

2.7. Ανάλυση αποτελεσμάτων

2.7.1. Ανάλυση αποτελεσμάτων της Real Time PCR

Ανάλυση αποτελεσμάτων Real Time PCR από πειράματα ChIP

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από τα πειράματα Real Time PCR που πραγματοποιούνται, είναι η μέθοδος του ποσοστού ανάκτησης input (input percent method).

Στη μέθοδο αυτή, τα input δείγματα αντιπροσωπεύουν την ποσότητα της χρωματίνης που χρησιμοποιείται για την ανοσοκατακρήμνιση. Το περιεχόμενο των δειγμάτων αυτών είναι μία ποσότητα κατακερματισμένης χρωματίνης ορισμένες φορές αραιωμένη σε ddH₂O. Η χρωματίνη των input δειγμάτων δεν υπόκειται σε ανοσοκατακρήμνιση όμως έχει ακριβώς την ίδια αντιμετώπιση με την χρωματίνη η οποία θα υποστεί ανοσοκατακρήμνιση, δηλαδή θα υποβληθεί σε κατεργασία με πρωτεΐνωση K και καθαρισμό μέσω αντίδρασης φαινόλης χλωροφορμίου ή χρήση SPRI beads.

Η αραιώση την οποία έχει υποστεί η χρωματίνη των input δειγμάτων είναι καθοριστική για την ανάλυση. Η αραιώση που πραγματοποιήθηκε για τα πειράματα αυτής της εργασίας ήταν 1/250.

Το πρώτο βήμα για την ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι η προσαρμογή των τιμών των input στην αρχική ποσότητα χρωματίνης. Αρχικά υπολογίζεται η τιμή του $\log_2(250)$ η οποία ισούται με 7,96. Η τιμή αυτή στη συνέχεια αφαιρείται από την τιμή Ct (η οποία έχει υπολογιστεί από το πρόγραμμα με το ποίο συνδέεται η θερμικός κυκλοποιητής της Real Time PCR, Bio-Rad CFX Manager) καθενός από τα input, οδηγώντας στον υπολογισμό των προσαρμοσμένων τιμών των input δειγμάτων (Adjusted input).

Αφού ολοκληρωθεί η παραπάνω διαδικασία τότε το ποσοστό εμπλουτισμού των δειγμάτων ύστερα από την ανοσοκατακρήμνιση, με αλληλουχίες οι οποίες ενισχύονται από ένα συγκεκριμένο ζεύγος εκκινήτων υπολογίζεται με τον τύπο που ακολουθεί:

$$\text{Ποσοστό εμπλουτισμού δείγματος} = 100 \times 2^{(\text{Adjusted input} - \text{Ct δείγματος})}$$

2.7.2. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης δειγμάτων από πειράματα ChIP

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε με την χρήση του προγράμματος Galaxy (<https://usegalaxy.org>) (Afgan et al., 2018). Το πρόγραμμα αυτό αποτελεί μια διαδικτυακή πλατφόρμα βιοπληροφορικής για την χρήση της οποίας δεν απαιτούνται γνώσεις προγραμματισμού.

Τα δεδομένα που προκύπτουν από την διαδικασία της αλληλούχισης έχουν την μορφή αρχείων που περιέχουν μέρος της αλληλουχίας των τμημάτων DNA (reads) τα οποία περιέχονται στην βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε για την διαδικασία της αλληλούχισης.

Το πρώτο βήμα για την ανάλυση των δεδομένων αλληλούχισης είναι το ανέβασμα τους στο πρόγραμμα Galaxy. Στη συνέχεια για να μπορέσει να προσχωρήσει η διαδικασία της ανάλυσης θα πρέπει ο τύπος των αρχείων που περιέχονται τα δεδομένα της αλληλούχισης να μετατραπεί σε FASTQ μορφή.

Κατόπιν της μετατροπής των αρχείων στην κατάλληλη μορφή πραγματοποιείται ένας έλεγχος ποιότητας. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με την χρήση του εργαλείου FastQC Read Quality reports, από την ομάδα εργαλείων NGS QC and manipulation. Με την χρήση του εργαλείου αυτού προκύπτουν ορισμένες αναλύσεις που μπορούν να δώσουν μία πρώτη εικόνα για την ποιότητα των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης όπως για παράδειγμα το GC ποσοστό των reads, και πιθανά επαναλαμβανόμενα αντίγραφα αλληλουχιών.

Αφού ολοκληρωθεί ο έλεγχος ποιότητας των δεδομένων της αλληλούχισης απομακρύνονται reads τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλή ποιότητα. Η διαδικασία της απομάκρυνσης αυτών των αλληλουχιών πραγματοποιείται με το εργαλείο Trim Galore της ομάδας εργαλείων NGS QC and manipulation. Ύστερα από αυτή την διαδικασία επαναλαμβάνεται ο έλεγχος ποιότητας μέσω του FastQC.

Αφού οι διαδικασίες ελέγχου έχουν ολοκληρωθεί και η ποιότητα των δεδομένων έχει πιστοποιηθεί, πραγματοποιείται στοίχιση των reads στο γονιδίωμα, ώστε να βρεθούν οι θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα ή της ιστονικής τροποποίησης έναντι των οποίων πραγματοποιήθηκε πείραμα ChIP-seq. Σε αυτή την περίπτωση γίνεται στοίχιση στο γονιδίωμα του ανθρώπου (έκδοση hg19).

Ύστερα από την ολοκλήρωση της στοίχισης γίνεται απομάκρυνση των αντιγράφων που έχουν τις ίδιες ακραίες αλληλουχίες στο γονιδίωμα. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται με την χρήση του εργαλείου RmDum της ομάδας εργαλείων NGS: SAM Tools.

Πριν συνεχιστεί η διαδικασία της ανάλυσης και η εύρεση των θέσεων ενδιαφέροντος στο γονιδίωμα, θα πρέπει να γίνει κανονικοποίηση των αρχείων, που αντιστοιχούν σε καθένα από τα δείγματα που πρόκειται να συγκριθούν μεταξύ τους με βάση το βάθος της αλληλούχισης, δηλαδή, να προσαρμοστούν στο ίδιο μέγεθος ώστε το αποτέλεσμα να είναι αντικειμενικό. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με το εργαλείο NGS: Picard, Downsampling BAM/SAM.

Στη συνέχεια με την χρήση του εργαλείου MACS2 callpeak, της ομάδας εργαλείων NGS: Peak Calling, ταυτοποιούνται οι θέσεις του γονιδιώματος με εμπλουτισμένο σήμα, οι οποίες αποτελούν θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων, ή θέσεις εντοπισμού των ιστονικών τροποποιήσεων έναντι των οποίων πραγματοποιήθηκε το ChIP πείραμα.

Με το πρόγραμμα DeepTools Bamcoverage, δημιουργήθηκαν αρχεία bigwig στα οποία περιέχεται περιληπτικά η πληροφορία της αλληλούχισης και απεικονίστηκαν στο Browser του UCSC.

Επιπλέον, με το εργαλείο PlotHeatMap μπορούν να δημιουργηθούν τοπολογικοί χάρτες (Heat Maps) οι οποίοι παρέχουν μία οπτικοποίηση των βαθμολογιών (scores) που σχετίζονται με συγκεκριμένες γενωμικές περιοχές, όπως για παράδειγμα τιμές εμπλουτισμού από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματινής γύρω από θέσεις ενδιαφέροντος.

Για την εύρεση των μοτίβων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα MEME ChIP και RSAT Tools. Ενώ για την εύρεση των γονιδιακών οντολογιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GREAT.

Η σύγκριση των θέσεων πρόσδεσης από διαφορετικά πειράματα πραγματοποιήθηκε με την πλατφόρμα εργαλείων BEDTools. Για την σύγκριση λιστών γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Venny.

3. Αποτελέσματα

3.1. Μόλυνση Κυττάρων με ιό

Το πρώτο βήμα για την μελέτη της απόκρισης ευκαρυωτικών κυττάρων σε ένα ερέθισμα είναι η έκθεση ενός πληθυσμού κυττάρων σε αυτό. Επομένως, για την μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης των ανθρώπινων ευκαρυωτικών κυττάρων κατά την διάρκεια ιικών μολύνσεων απαιτείται η μόλυνση των κυττάρων που πρόκειται να μελετηθούν με ιό. Στο εργαστήριο καλλιεργήθηκαν 4 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (HeLa, Namalwa, HCT116, K562). Τα κύτταρα αυτά αφού αναπτύχθηκαν επαρκώς, σε κλίμακα ανάλογη των απαιτήσεων της εκάστης πειραματικής διαδικασίας που πραγματοποιήθηκε, και στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, υποβλήθηκαν σε μόλυνση με ιό Sendai, με συνολική διάρκεια 6 ωρών με ενδιάμεσο χρονικό σημείο τις 3 ώρες.

ΜΕΡΟΣ Α

3.2. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης – Μελέτη και ταυτοποίηση επαγόμενων από ιϊκή μόλυνση cis-ρυθμιστικών στοιχείων

Όπως έχει περιγραφεί παραπάνω (Ενότητα 2.3) σκοπός των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP) είναι η εύρεση των θέσεων, πάνω στο γονιδίωμα, στις οποίες εντοπίζονται συγκεκριμένες πρωτεΐνες που διαθέτουν θέση πρόσδεσης (binding site) ή δεν διαθέτουν αλλά αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια που είναι ήδη προσδεμένα. Τέτοια πειράματα, ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, πραγματοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι σχετίζονται με την απόκριση των κυττάρων στην ιϊκή μόλυνση, και ιστονικών τροποποιήσεων, οι οποίες είναι ενδεικτικές για την ύπαρξη συγκεκριμένων cis-ρυθμιστικών στοιχείων της μεταγραφής (π.χ. ενισχυτές). Τα πειράματα αυτά συνδυάστηκαν με αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing) για την ταυτοποίηση των θέσεων εντοπισμού των προς μελέτη πρωτεϊνών, σε ολόκληρο το γονιδίωμα.

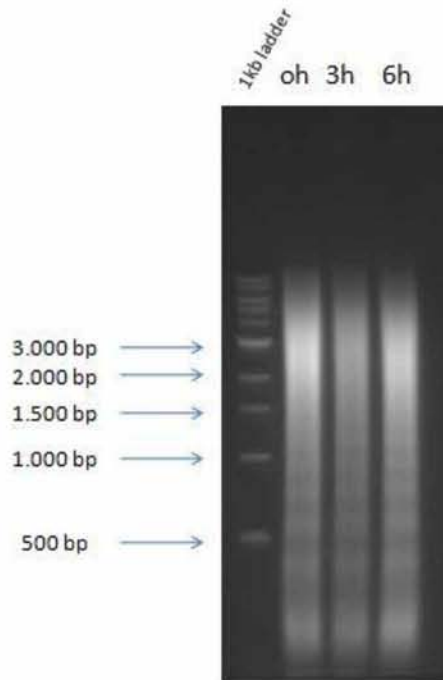
3.2.1. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης στην κυτταρική σειρά NAMALWA

Τα Β-λεμφοκύτταρα της κυτταρικής σειράς NAMALWA αφού καλλιεργήθηκαν σε επιθυμητή έκταση, χωρίστηκαν σε 3 διαφορετικές ομάδες (~700 εκατομμύρια κύτταρα ανά ομάδα). Οι δύο από τις τρεις ομάδες κυττάρων μολύνθηκαν με Sendai Virus για 3 και 6 ώρες αντίστοιχα, ενώ, η τρίτη ομάδα δεν υποβλήθηκε σε μόλυνση από τον ιό και αποτελεί το δείγμα ελέγχου (uninfected cells).

Τα κύτταρα αυτά μονιμοποιήθηκαν με την χρήση φορμαλδεΐδης και ακολούθησε απομόνωση της χρωματίνης τους. Κατόπιν η χρωματίνη αυτή υπέστη θραύση με υπερήχους, και τα τμήματα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Είναι σημαντικό το μήκος των τμημάτων του DNA που προκύπτουν από τον κατακερματισμό της χρωματίνης να μην υπερβαίνει τα 3.000 ζεύγη βάσεων, καθώς μεγαλύτερο μήκος δυσχεραίνει την ανοσοκατακρήμνιση (ενότητα 2.3). Επιπλέον το μήκος των τμημάτων της βιβλιοθήκης που θα προετοιμαστεί μετέπειτα για αλληλούχιση πρέπει να κυμαίνεται ιδανικά από 200bp έως 400bp, ώστε να είναι δυνατή η ανάγνωση τους από το μηχάνημα αλληλούχισης (illumina Nextseq 500).

Στη συνέχεια, ένα κλάσμα της χρωματίνης αυτής χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η ποιότητα της προετοιμασίας της. Στο τελικό στάδιο αυτού του ελέγχου, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος της εργασίας, πραγματοποιείται μία ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης αυτής παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 10), και όπως φαίνεται το μήκος του μεγαλύτερου ποσοστού των θραυσμάτων της χρωματίνης δεν υπερβαίνει τα 3.000 ζεύγη βάσεων. Επιπλέον,

η ηλεκτροφόρηση αποδεικνύει ότι τα τεμάχια κατανέμονται ομοιόμορφα από περίπου 250 έως 2.000 ζεύγη βάσεων.



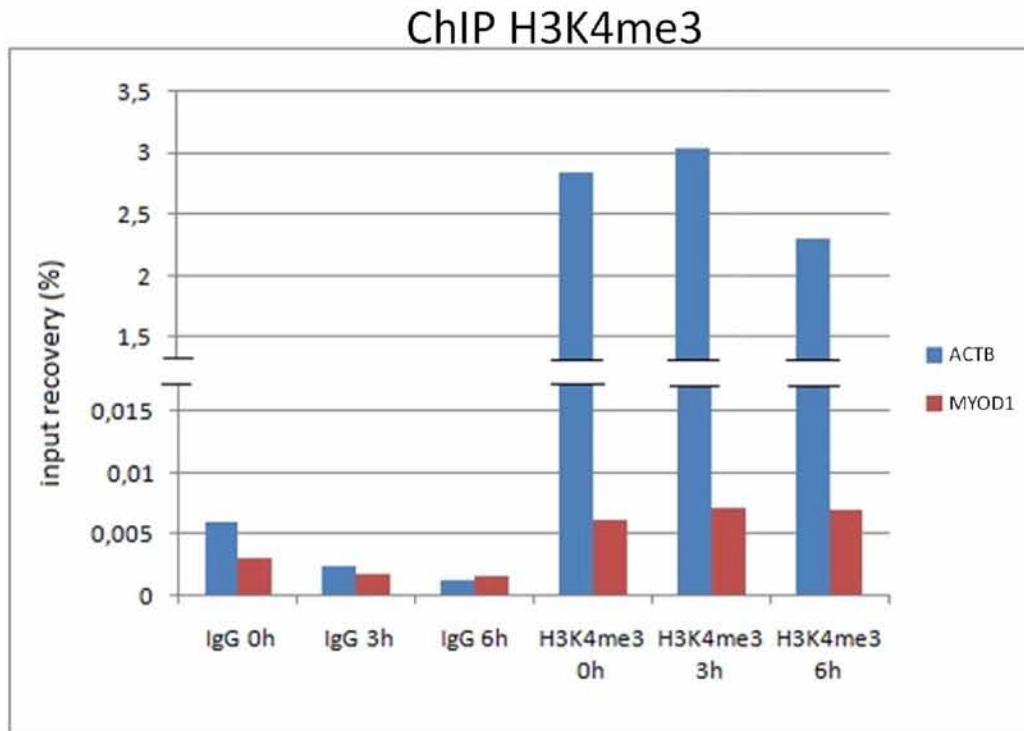
Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση της κατακερατισμένης, με χρήση υπερήχων, χρωματίνης από κύτταρα *Namalwa*. Από αριστερά προς τα δεξιά φαίνεται το δείγμα αναφοράς (ladder), η χρωματίνη που προέρχεται από κύτταρα που δεν έχουν μολυνθεί με ιό, και η χρωματίνη που προέρχεται από κύτταρα που μολύνθηκαν με ιό 3 και 6 ώρες πριν από την μονιμοποίηση τους με φορμαλδεΐδη. Οι αριθμοί στα αριστερά υποδεικνύουν το μήκος στο οποίο αντιστοιχούν οι ζωνώσεις του δείγματος αναφοράς.

Αφού επιβεβαιώθηκε πως η χρωματίνη έχει τμηματοποιηθεί στο επιθυμητό μέγεθος η πειραματική πορεία συνεχίστηκε με την διενέργεια ανοσοκατακρήμνισης. Πρώτο στόχο αποτέλεσε η τριμεθυλιωμένη, στην λυσίνη 4 ιστόνη H3 (H3K4me3). Η συγκεκριμένη ιστονική τροποποίηση εντοπίζεται κοντά στην θέση έναρξης γονιδίων και είναι ενδεικτική για την ύπαρξη ενεργών υποκινητών στις θέσεις εντοπισμού της. Εκτός από το αντίσωμα έναντι της συγκεκριμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ως control και IgG ανοσοσφαιρίνη, ένα αντίσωμα το οποίο δεν διαθέτει ειδικότητα για κάποιον επίτοπο.

Κατόπιν της ολοκλήρωσης της διαδικασίας της ανοσοκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκαν πειράματα Real Time qPCR, για να ελεγχθεί ο εμπλουτισμός των δειγμάτων της χρωματίνης, για γονδιακούς τόπους στους οποίους εντοπίζεται η ιστονική τροποποίηση H3K4me3 καθώς και αρνητικούς στόχους.

Σε ένα πρώτο πείραμα qPCR χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών. Ένα από τα δύο αυτά ζεύγη είναι ενισχύει περιοχή στον υποκινητή του γονιδίου της ακτίνης β (*ACTB*). Η ακτίνη β είναι ένα δομικό συστατικό του κυτταρικού σκελετού και το γονίδιο της εκφράζεται συνεχώς (housekeeping gene). Αυτός ο γενετικός τόπος αποτελεί θετικό στόχο για τον εντοπισμό της ιστονικής τροποποίησης H3K4me3, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τον υψηλό εμπλουτισμό του δείγματος για το συγκεκριμένο στόχο, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 11). Το δεύτερο ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιείται στοχεύει περιοχή εντός του γονιδίου *MYOD1* το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη MYOD1, έναν μεταγραφικό παράγοντα που εμπλέκεται στην ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης των μυϊκών κυττάρων. Ο γονιδιακός τόπος αυτός αποτελεί αρνητικό στόχο για τον εντοπισμό της ιστονικής τροποποίησης H3K4me3 και όπως είναι αναμενόμενο το σήμα που δίνεται από τις qPCR αντιδράσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκε αυτό το ζεύγος εκκινητών είναι χαμηλό.

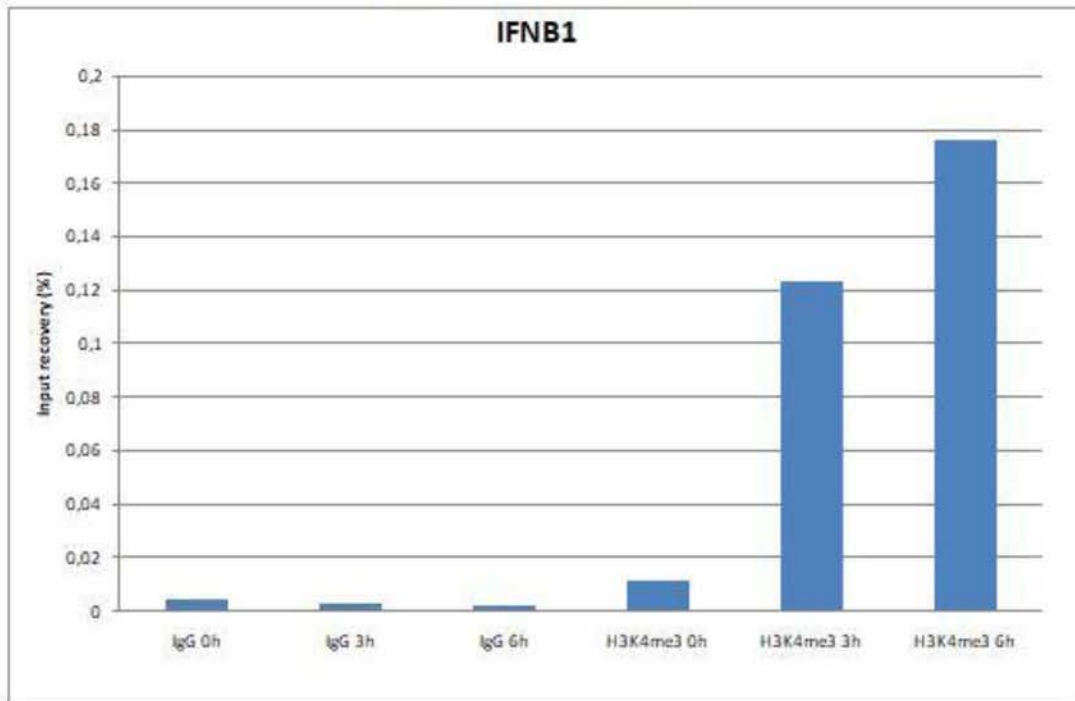
Επιπλέον, τα δείγματα στα οποία έχει πραγματοποιηθεί ανοσοκατακρήμνιση με χρήση IgG ανοσοσφαιρίνης, δεν φαίνεται να έχουν εμπλουτιστεί με κανέναν από τους δύο γενετικούς τόπους οι οποίοι ενισχύονται από τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την ποιότητα του πειράματος της ανοσοκατακρήμνισης.



Εικόνα 11: Εμπλουτισμός δειγμάτων χρωματίνης με αλληλουχίες που ενισχύονται από τους εκκινητές *ACTB* και *MYOD1*, ύστερα από πείραμα ChIP με στόχο την ιστονική τροποποίηση H3K4me3, όπως προκύπτει από την ανάλυση αποτελεσμάτων Real Time qPCR. Στον κάθετο άξονα φαίνεται το ποσοστό εμπλουτισμού των δειγμάτων με αλληλουχίες, οι οποίες αντιστοιχούν στους γενετικούς τόπους της ακτίνης β και του *MYOD1*. Στον οριζόντιο άξονα υποδεικνύεται το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοκατακρήμνιση καθώς και τα χρονικά σημεία (timepoints) της μόλυνσης με ιό που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα. Φαίνεται ότι ο θετικός στόχος (*ACTB*) παρουσιάζει υψηλό ποσοστό ανάκτησης ενώ ο αρνητικός (*MYOD1*) πολύ χαμηλό.

Στα ίδια δείγματα πραγματοποιήθηκε ομοίως Real Time qPCR με εκκινητές για τον ενισχυτή του γονιδίου της ιντερφερόνης β1 (*IFNβ1*) (Εικόνα 12). Η ιντερφερόνη είναι μία κυτοκίνη η οποία εκκρίνεται ως απάντηση του ενδογενούς ανοσοποιητικού συστήματος σε ιικές μολύνσεις. Η ιντερφερόνη αφού εκκριθεί δρα ως σηματοδοτικό μόριο σε γειτονικά κύτταρα, μέσω της πρόσδεσής της σε υποδοχείς της επιφάνειας αυτών, η οποία θα οδηγήσει στην ενεργοποίηση της έκφρασης φλεγμονώδων κυτοκίνων και χημειοκίνων (NCBI, gene).

ChIP H3K4me3

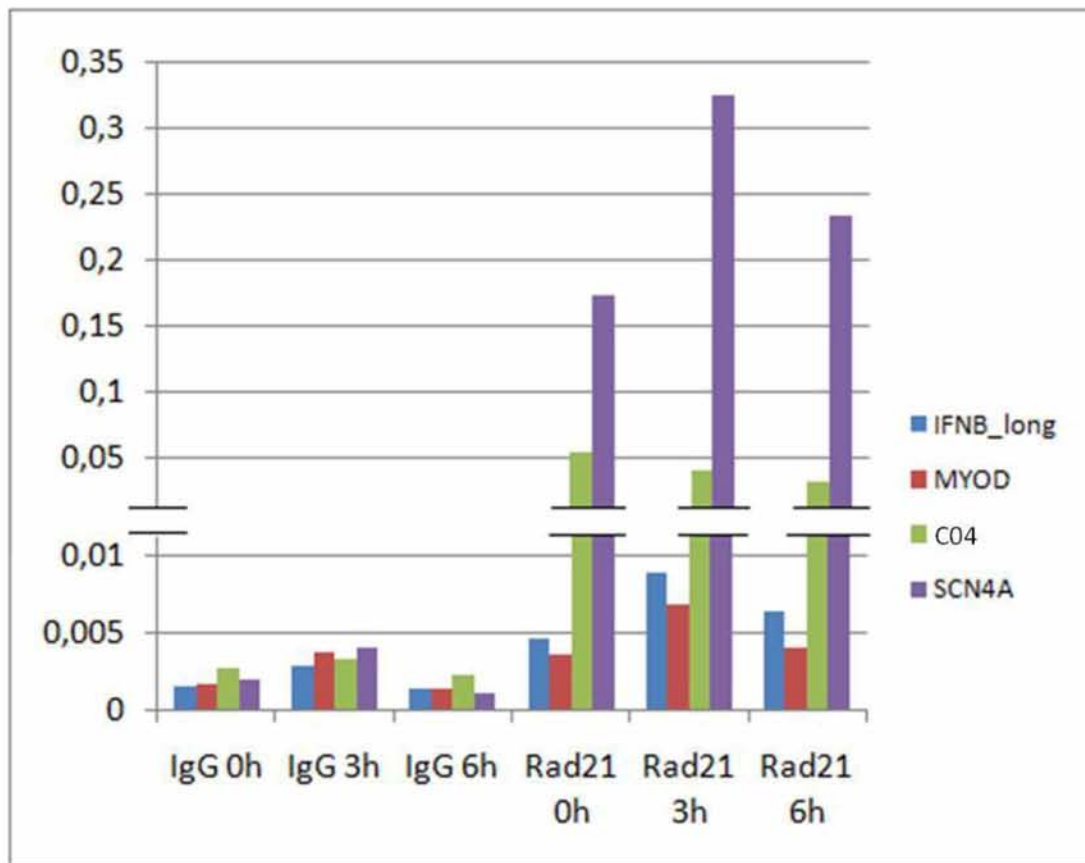


Εικόνα 12: Εμπλουτισμός δειγμάτων χρωματίνης με αλληλουχίες που αντιστοιχούν στον ενισχυτή της ιντερφερόνης β. Διάγραμμα που προκύπτει από την ανάλυση αποτελεσμάτων Real Time qPCR σε δείγματα DNA από πείραμα ανοσοκατακρήμνισης για την ιστονική τροποποίηση H3K4me3. Φαίνεται ότι ο εμπλουτισμός των δειγμάτων στα οποία χρησιμοποιήθηκε IgG για την ανοσοκατακρήμνιση είναι πολύ χαμηλός για τον ενισχυτή της IFNB1. Εν αντιθέσει, τα δείγματα στα οποία έγινε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K4me3 δείχνουν αυξανόμενα επίπεδα εμπλουτισμού κατά την πρόοδο της ιϊκής μόλυνσης.

Παρατηρήθηκε αυξανόμενος εμπλουτισμός για τον ενισχυτή της ιντερφερόνης κατά την πρόοδο της αντι-ϊκής απόκρισης. Το αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με το προοδευτικό πρότυπο επαγωγής της μεταγραφής του γονιδίου της ιντερφερόνης μετά την ιϊκή μόλυνση και το συνεχές πρότυπο μεταγραφής του γονιδίου *ACTB*. Το γεγονός ότι τα δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση με IgG, παρουσιάζουν χαμηλό εμπλουτισμό με την αλληλουχία η οποία ενισχύεται από το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών, σε σχέση με τα αντίστοιχα input, επιβεβαιώνει την ειδικότητα του πειράματος. Επομένως γίνεται αντιληπτό ότι η μεταγραφή του γονιδίου *IFNB* η οποία όπως είναι γνωστό απαιτεί το σχηματισμό ενισχυοσώματος και την πραγματοποίηση ιστονικών τροποποιήσεων στις οποίες συμπεριλαμβάνεται η H3K4me3.

Στη συνέχεια αποφασίστηκε να μελετηθεί η κατανομή της πρωτεΐνης Rad21, η οποία αποτελεί υπομονάδα της κοχεσίνης (Cohesin), ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου με δομή που μοιάζει με δαχτυλίδι, το οποίο είναι απαραίτητο για την σύνδεση των αδελφών χρωματίδων μεταξύ τους στο κεντρομερές. (Nasmyth & Haering, 2009). Η κοχεσίνη επίσης συμβάλει στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης φέρνοντας κοντά απομακρυσμένες χρωματοσωματικές περιοχές όπως για παράδειγμα υποκινητές και ενισχυτές γονιδίων (Merkenschlager & Nora, 2016). Επομένως, θεωρήθηκε σημαντικό να μελετηθεί αν το συγκεκριμένο μόριο εντοπίζεται σε περιοχές που δύναται να λειτουργούν ως ενισχυτές κατά την αντι-ϊκή απόκριση ή/και να βοηθά στην επικοινωνία αλληλουχιών με άλλα στοιχεία του γονιδιώματος.

Κατόπιν της ολοκλήρωσης της ανοσοκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκε Real Time qPCR με εκκινητές για τους γονιδιακούς τόπους της ιντερφερόνης B, του MYOD1, και δύο θετικών σύμφωνα με την βιβλιογραφία (ChIP atlas database) στόχων, των CO4 και του SCN4A (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Εμπλουτισμός δειγμάτων χρωματίνης με αλληλουχίες που ενισχύονται από τους εκκινητές *IFNB_long*, *MYOD*, *C04* και *SCN4A*. Διάγραμμα που προκύπτει από την ανάλυση αποτελεσμάτων Real Time qPCR σε δείγματα DNA από πείραμα ανοσοκατακρήμνισης για την πρωτεΐνη Rad21. Οι θετικοί στόχοι *C04* και *SCN4A* παρουσιάζουν υψηλό εμπλουτισμό της Rad21 σε αντίθεση με το γονίδιο της ιντερφερόνης B και το *MYOD1*.

Για την ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της υπομονάδας Rad21 του συμπλόκου της κοχεσίνης και IgG. Παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα εμπλουτισμού στους θετικούς στόχους *C04* και *SCN4A* και χαμηλά στους αρνητικούς στόχους *IFNB1* και *MYOD1*. Τα πολύ χαμηλά επίπεδα εμπλουτισμού στα δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση με IgG αντίσωμα υποδηλώνουν την ειδικότητα του πειράματος. Επομένως επιτύχαμε να απομονώσουμε από το σύνολο της χρωματίνης τις οποίες οι οποίες φιλοξενούν την Rad21/Cohesin και ενδεχομένως να βρίσκονται σε ζεύξη με άλλα ρυθμιστικά/λειτουργικά/κωδικά σημεία του γονιδιώματος.

Σε επόμενο στάδιο οι αλληλουχίες που κατακρημνίστηκαν με αντίσωμα έναντι της πρωτεϊνικής υπομονάδας Rad21 της κοχεσίνης χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή βιβλιοθηκών οι οποίες στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση για τον εντοπισμό των θέσεων πρόσδεσης της RAD21, σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος.

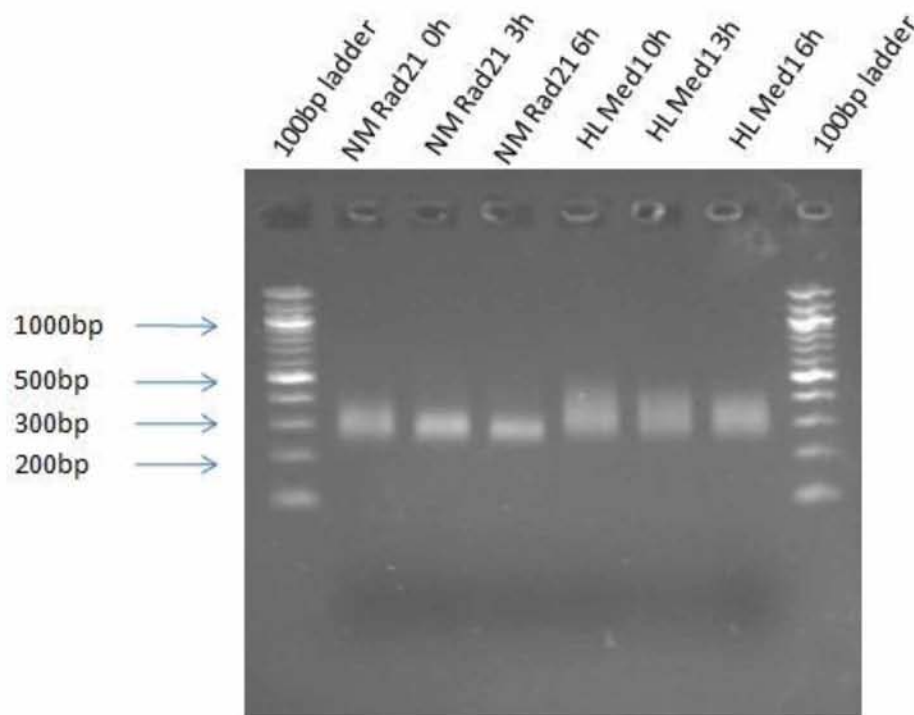
Η μελέτη επεκτάθηκε με την κατασκευή βιβλιοθήκης για τα πείραμα ChIP για RAD21, και επίσης για πείραμα ανοσοκατακρήμνισης με στόχο την πρωτεΐνη Med1 τα οποία είχαν στο παρελθόν ολοκληρωθεί στο εργαστήριο, σε χρωματίνη που προέρχεται από κύτταρα HeLa, που έχουν υποβληθεί σε μόλυνση από ιό για 0h, 3h και 6h. Η πρωτεΐνη Med1 αποτελεί υπομονάδα του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου του Mediator. Το σύμπλοκο αυτό συμμετέχει στην ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργοποίησης, διαμεσολαβώντας στην χωρική προσέγγιση των ρυθμιστικών περιοχών υποκινητών και ενισχυτών (Poss, Ebmeier, & Taatjes, 2013).

Όπως περιγράφηκε και στο πειραματικό μέρος (ενότητα 2.6.8) τα βασικά βήματα της προετοιμασίας μία βιβλιοθήκης για αλληλούχιση με την τεχνολογία illumina είναι η επιδιόρθωση των άκρων των τμημάτων DNA τα οποία προέρχονται από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και η προσθήκη αδενίνης σε αυτά,

ώστε να είναι συμβατά με τους αντάπτορες, οι οποίοι προστίθενται στη συνέχεια. Οι αντάπτορες αυτοί χρησιμεύουν τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό της βιβλιοθήκης μέσω PCR, επιπλέον στην πρόσδεση των αλληλουχιών της βιβλιοθήκης στις αλληλουχίες που βρίσκονται καθλωμένες στην συσκευή αλληλούχισης, ενώ περιέχουν και συγκεκριμένες αλληλουχίες (barcodes) οι οποίες θα χρησιμεύσουν στην ταυτοποίηση του δείγματος από το οποίο προέρχεται κάθε αλληλουχία. Στην διαδικασία πολλαπλασιασμού της βιβλιοθήκης μέσω PCR χρησιμοποιούνται εκκινητές οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί προς τις αλληλουχίες των ανταπτών στα άκρα του DNA.

Κατόπιν της ολοκλήρωσης του πρώτου πολλαπλασιασμού της βιβλιοθήκης (5 πρώτοι κύκλοι) γίνεται ηλεκτροφόρηση του υλικού και από την πηκτή της αγαρόζης απομονώνεται το κλάσμα του υλικού που έχει μήκος από 200bp έως 400bp, δηλαδή το ιδανικό μήκος για αλληλούχιση (illumina.com). Το υλικό αυτό πολλαπλασιάζεται περαιτέρω με χρήση του ίδιου ζεύγους εκκινητών.

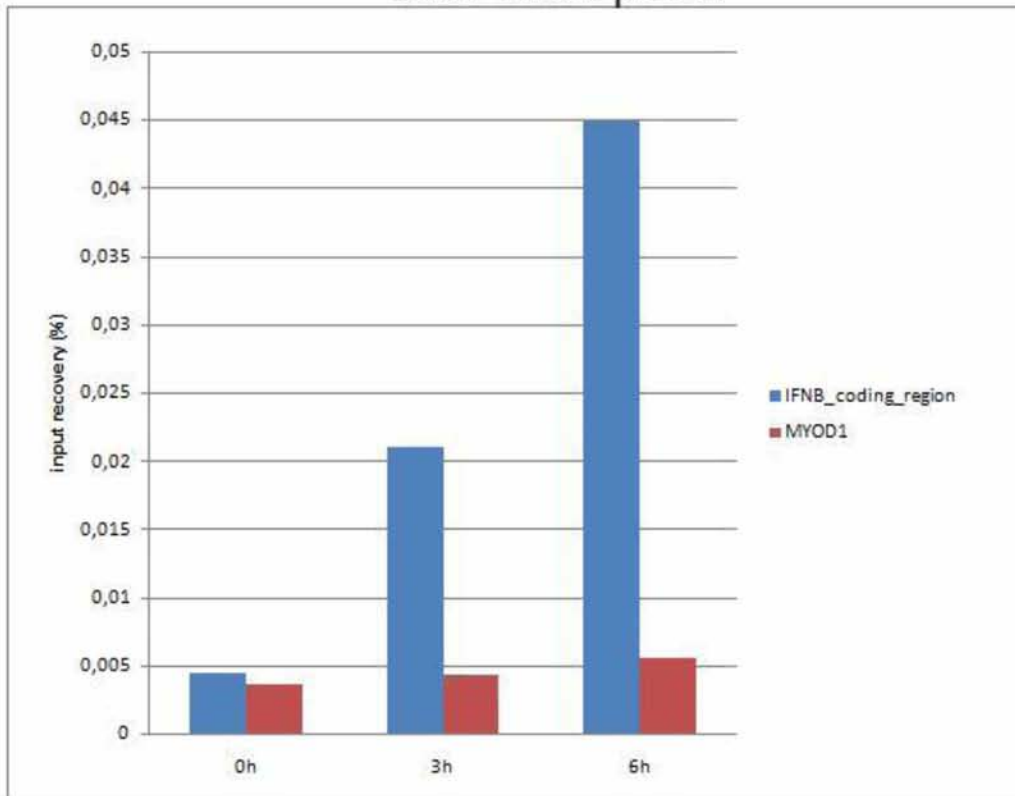
Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία προετοιμασίας και πολλαπλασιασμού των βιβλιοθηκών για την αλληλούχιση, μέρος του υλικού ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης (Εικόνα 14), για τον έλεγχο της ποιότητας της βιβλιοθήκης.



Εικόνα 14: Βιβλιοθήκη Rad21 και Med1 πριν την αλληλούχιση. Οι βιβλιοθήκες που προετοιμάστηκαν για την αλληλούχιση του υλικού που προέρχεται από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με στόχο τις πρωτεΐνες Rad21 και Med1 σε κύτταρα Namalwa και Hela αντίστοιχα, ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης 2%. Η ηλεκτροφόρηση δείχνει πως η προετοιμασία των βιβλιοθηκών ήταν επιτυχής, καθώς έχει γίνει πολλαπλασιασμός του υλικού, το μέσο μήκος του οποίου προσεγγίζει τις 300bp (ιδανικό μήκος για αλληλούχιση).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ακόμα ένα πείραμα ChIP σε χρωματίνη που προέρχεται από κύτταρα Namalwa, τα οποία έχουν μολυνθεί με SV για 0h, 3h και 6h, με στόχο την RNA πολυμεράση II. Το ένζυμο αυτό, όπως έχει ήδη αναφερθεί, πραγματοποιεί την σύνθεση των πρόδρομων μορίων mRNA. Ο εντοπισμός των θέσεων κατά μήκος του DNA στις οποίες βρίσκεται προσδεμένη αυτή η πρωτεΐνη, στα χρονικά σημεία της αντι-ϊικής απόκρισης, μπορεί να αποκαλύψει ποια γονίδια μεταγράφονται την δεδομένη στιγμή καθώς και πιθανούς ενισχυτές που μεταγράφονται. Μετά το τέλος της ανοσοκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, με εκκινητές που στοχεύουν τους γενετικούς τόπους του ενισχυτή της ιντερφερόνης Β και το γονίδιο *MYOD1* (Εικόνα 15).

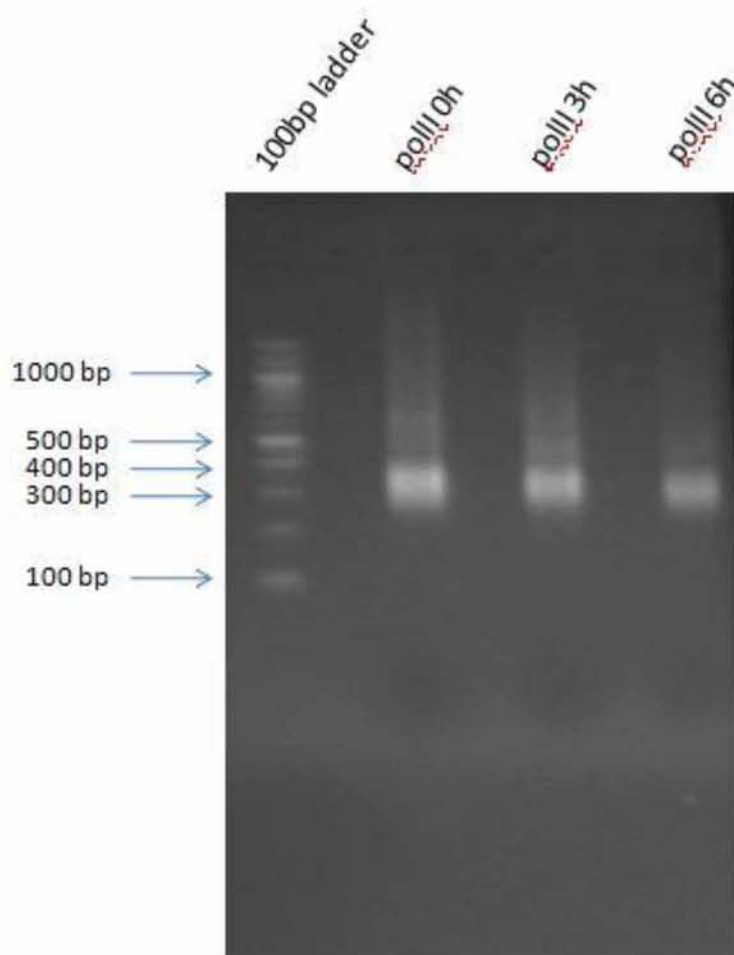
ChIP RNA pol II



Εικόνα 15: Εμπλουτισμός δειγμάτων χρωματίνης με αλληλουχίες που αντιστοιχούν στην κωδική περιοχή των γονιδίων *IFNB* και *MYOD1*. Διάγραμμα που προκύπτει από την ανάλυση αποτελεσμάτων Real Time qPCR σε DNA από πείραμα ανοσοκατακρήμνισης με στόχο την RNA pol II σε κύτταρα Namalwa. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν υβριδοποιούνται στο γονίδιο της ιντερφερόνης β και στη κωδική περιοχή του *MYOD1*, τα οποία αποτελούν θετικό και αρνητικό στόχο για την RNA πολυμεράση II αντίστοιχα, την δεδομένη χρονική στιγμή, σε αυτό τον τύπο κυττάρων. Τα δείγματα έχουν χαμηλό εμπλουτισμό στο *MYOD1* στόχο. Αντίθετα φαίνεται πως υπάρχει προοδευτικά αυξανόμενη πρόσδεση της RNA pol II σε αλληλουχίες που αντιστοιχούν στον γενετικό τόπο της ιντερφερόνης Β1, όσο προοδεύει η αντιϊκή απόκριση.

Το αποτέλεσμα της Real Time QPCR έδειξε πως η RNA pol II σε αυτά τα κύτταρα εμφανίζει αυξημένη πρόσδεση στον γονιδιακό τόπο της ιντερφερόνης Β στα χρονικά σημεία των 3 και 6 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση. Η προοδευτικά αυξανόμενη πρόσδεση της RNA πολυμεράσης συμβαδίζει με το πρότυπο έκφρασης της ιντερφερόνης το οποίο δείχνει αυξημένο συνεχώς τόσο στις 3 και πολύ περισσότερο στις 6 πρώτες ώρες μετά την μόλυνση των κυττάρων.

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η δημιουργία βιβλιοθηκών για αλληλούχιση, από τα δείγματα DNA που προέρχονται από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με στόχο την RNA pol II σε κύτταρα Namalwa. Αφού ολοκληρώθηκε η προετοιμασία της βιβλιοθήκης, όπως έχει περιγραφεί, έγινε ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 16) των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης για να ελεγχθεί η ποιότητα των βιβλιοθηκών.



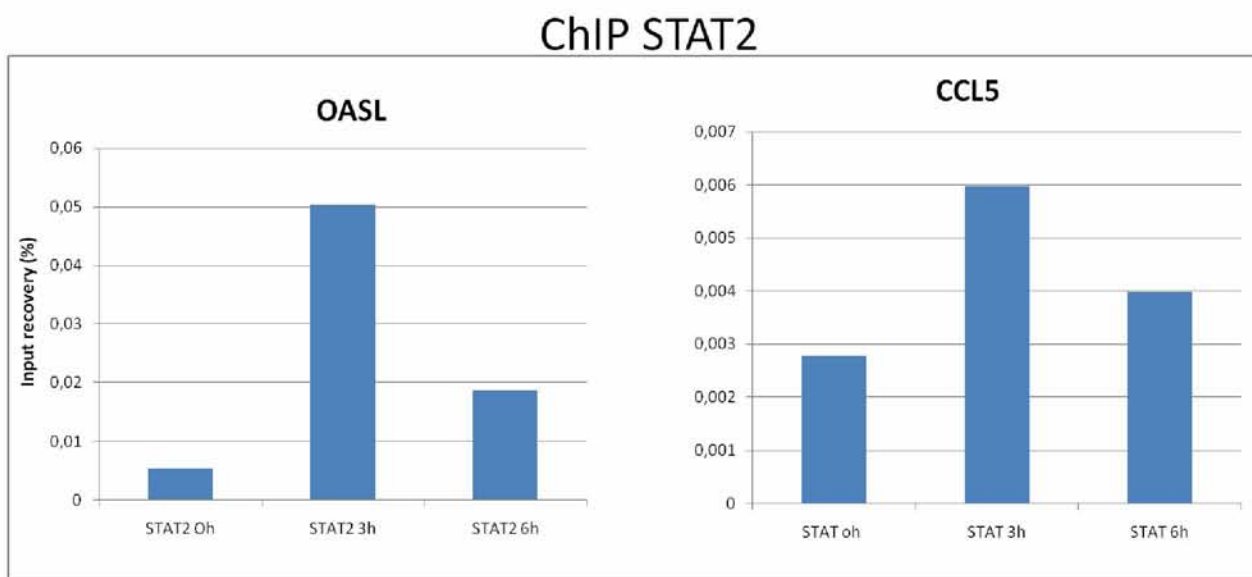
Εικόνα 16: Βιβλιοθήκη για αλληλούχιση από πείραμα ChIP με στόχο την RNA pol II σε κύτταρα Namalwa. Η προετοιμασία της βιβλιοθήκης είναι επιτυχημένη και το μήκος των τμημάτων DNA που περιέχει, προσεγγίζει τις 300bp.

Προκειμένου να αποκτηθεί περισσότερο ολοκληρωμένη εικόνα για τους μηχανισμούς αντι-ϊικής απόκρισης αποφασίστηκε να μελετηθεί η κατανομή ενός μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος συμμετέχει στα μονοπάτια ενεργοποίησης γνωστών αντι-ϊικών γονιδίων. Ένα ακόμα πείραμα ChIP πραγματοποιήθηκε σε χρωματίνη κυττάρων Namalwa μολυσμένων (για 3 και 6 ώρες) και μη με SV και αντίσωμα που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη STAT2 (Signal Transducer and Activator of transcription). Η πρωτεΐνη αυτή ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από τις πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης, της οικογένειας Janus, Jak1 και Tyk2, ως απάντηση στην πρόσδεση της ιντερφερόνης α και β , σε υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων. Μετά την ενεργοποίηση του ο παράγοντας STAT2 δημιουργεί ετεροτριμερή με τον παράγοντα STAT1 (ο οποίος ενεργοποιείται με τον ίδιο τρόπο με τον STAT2, αλλά και από την κινάση Jak2 ως απάντηση στην πρόσδεση της ιντερφερόνης γ) και την πρωτεΐνη p48 (IRF9) (Matsumoto et al., 1999). Τα ετεροτριμερή αυτά δεσμεύονται σε αλληλουχίες πρόσδεσης ISRE (IFN-stimulated response element) στο DNA και λειτουργούν ενεργοποιώντας την έκφραση γονιδίων που επάγονται από την ιντερφερόνη (IFN-inducible genes) (Bluyssen, Durbin, & Levy, 1996, Darnell, Kerr, & Stark, 1994).

Μετά την ολοκλήρωση της ανοσοκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκε Real Time qPCR με εκκινητές για την ιντερφερόνη β (IFNB_long και IFNB -20 Kb). Το ζεύγος εκκινητών IFNB_long ενισχύει την αλληλουχία του εγγύς ενισχυτή του γονιδίου της ιντερφερόνης β , ενώ το ζεύγος IFNB -20 Kb ενισχύει μία

αλληλουχία που βρίσκεται 20 κιλοβάσεις ανοδικά ως προς τον υποκινητή της ιντερφερόνης και αποκτά δραστικότητα ενισχυτή (για το γονίδιο της ιντερφερόνης) ύστερα από ιϊκή μόλυνση (Banerjee, Kim, & Kim, 2014). Επίσης χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εκκινητών έναντι του γενετικού τόπου του MYOD1 αλλά και εκκινητές για τα γονίδια *OASL* και *CCL5*, τα οποία αποτελούν γονίδια που επάγονται από την ιντερφερόνη (IFN-inducible genes). Τα αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, με εκκινητές για τον γενετικό τόπο της ιντερφερόνης β έδειξαν πώς η ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του παράγοντα STAT2 δεν οδήγησε σε σημαντικό εμπλουτισμό των δειγμάτων με αλληλουχίες του γονιδίου *IFNB*, αλλά και ούτε με αλληλουχίες που αντιστοιχούν στον ενισχυτή που βρίσκεται 20 κιλοβάσεις ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου. Επίσης δεν παρουσιάστηκε εμπλουτισμός των δειγμάτων με αλληλουχίες του γονιδίου *MYOD1*, το οποίο δεν εκφράζεται και αποτελεί αρνητικό στόχο πρόσδεσης του παράγοντα STAT2.

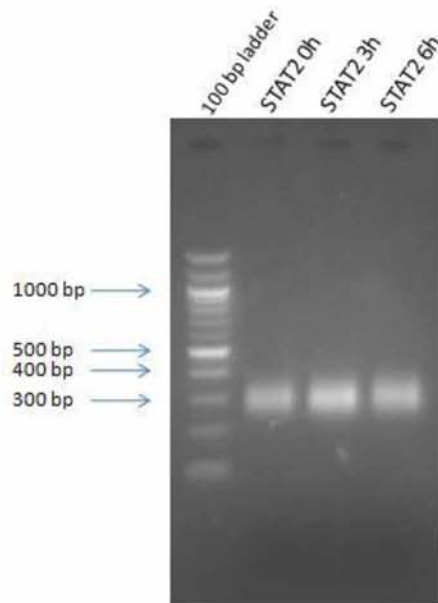
Σε επόμενες αντιδράσεις qPCR σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενισχύουν αλληλουχίες που αντιστοιχούν στον υποκινητή του επαγόμενου από την ιντερφερόνη γονιδίου *OASL* και εκκινητές για τον υποκινητή της χυμοκίνης *CCL5*.



Εικόνα 17: Εμπλουτισμός δειγμάτων χρωματίνης με αλληλουχίες που αντιστοιχούν στα επαγόμενα από την ιντερφερόνη γονίδια *OASL* και *CCL5*. Διαγράμματα που προκύπτουν από την ανάλυση αποτελεσμάτων Real Time qPCR, σε υλικό από πείραμα ChIP με στόχο την πρωτεΐνη STAT2. Τα δείγματα του DNA εμφανίζουν μεγαλύτερο ποσοστό εμπλουτισμού με αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο γονίδιο *OASL* συγκριτικά με το *CCL5*. Ο εμπλουτισμός μεγιστοποιείται στα δείγματα που αντιστοιχούν στο δεύτερο χρονικό σημείο της ιϊκής μόλυνσης (3h).

Τα αποτελέσματα αυτών των αντιδράσεων (Εικόνα 17) υποδεικνύουν ότι το γονίδιο *OASL* αποτελεί θετικό στόχο για την πρόσδεση του παράγοντα STAT2, μέγιστη αύξηση του σήματος να παρατηρείται 3 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση ενώ στο γονίδιο *CCL5* η πρόσδεση διατηρείται σε υψηλά επίπεδα και στις 6 ώρες.

Αφού επιβεβαιώθηκε η ποιότητα του πειράματος, επόμενο βήμα για την ολοκλήρωση του ChIP-seq αποτέλεσε η δημιουργία βιβλιοθήκης για αλληλούχιση. Η βιβλιοθήκη προετοιμάστηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο προετοιμασίας βιβλιοθηκών για αλληλούχιση με την τεχνολογία illumina, που έχει αναλυθεί παραπάνω. Η επιτυχία δημιουργίας της βιβλιοθήκης εξετάστηκε μέσω ηλεκτροφόρησης μέρους του τελικού υλικού της βιβλιοθήκης, σε πηκτή αγαρόζης 2% (Εικόνα 18).

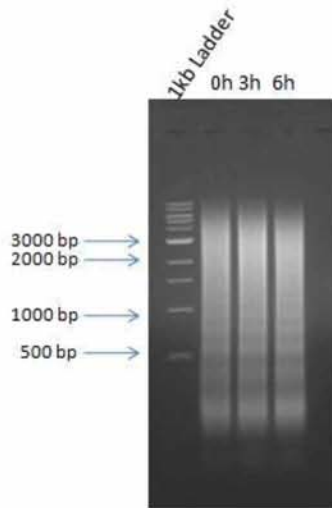


Εικόνα 18: Βιβλιοθήκη για αλληλούχιση DNA που προέρχεται από πείραμα ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι του STAT2. Η προετοιμασία της βιβλιοθήκης είναι πετυχημένη με το μέσο μέγεθος των τμημάτων DNA που περιέχει να προσεγγίζει τα 300 ζεύγη βάσεων.

Επομένως στη κυτταρική σειρά Namalwa πραγματοποιήθηκε μελέτη σε χρωματίνη από μη μολυσμένα και μολυσμένα με ιό κύτταρα και απομονώθηκαν στόχοι ιστονικών τροποποιήσεων (H3K4me3), μεταγραφικής μηχανής (RNA Pol II) και μεταγραφικών παραγόντων (STAT2). Με βάση την παραπάνω στρατηγική επιχειρούμε μια ολιστική προσέγγιση του μηχανισμού που διέπει την αντι-ϊική κυτταρική απόκριση μετά από τη μόλυνση.

3.2.2. Πειράματα ανοσοκατακρήμισης στην κυτταρική σειρά HeLa

Ομοίως με την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στα κύτταρα της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς Namalwa, κύτταρα HeLa αναπτύχθηκαν σε επιθυμητή κλίμακα υπό τις κατάλληλες συνθήκες. Τα κύτταρα αυτά, στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε μόλυνση με SV για 0, 3 και 6 ώρες και μονιμοποιήθηκαν με χρήση φορμαλδεΐδης. Ακολούθησε απομόνωση χρωματίνης και θραύση της με χρήση υπερήχων σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Κατόπιν της ολοκλήρωσης των διαδικασιών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ποιότητας κατακερατισμού της χρωματίνης (Εικόνα 19).

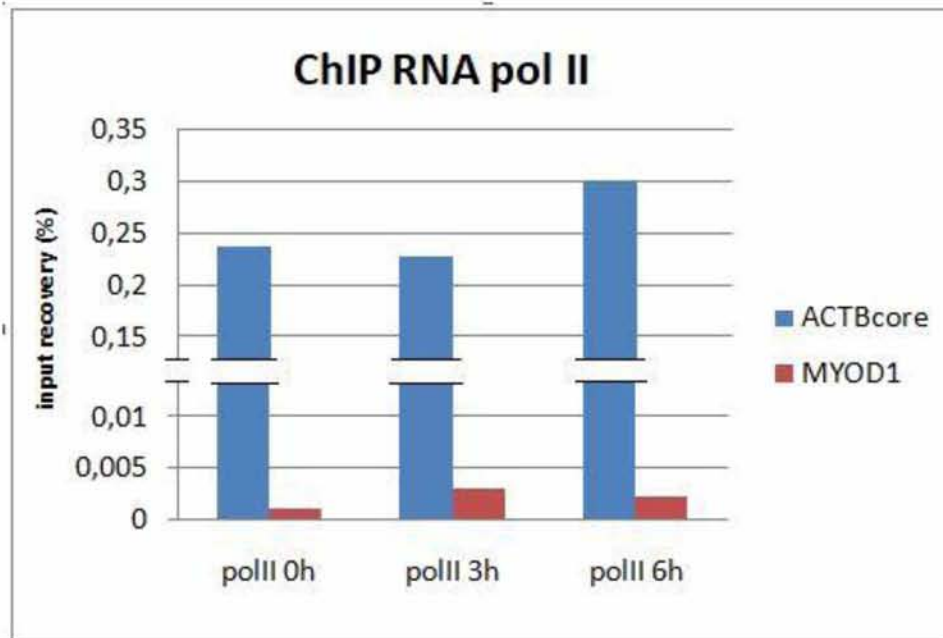


Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση κατακερματισμένης, με υπερήχους, χρωματίνης από κύτταρα HeLa. Από αριστερά προς τα δεξιά φαίνεται το δείγμα αναφοράς (ladder), η χρωματίνη που προέρχεται από κύτταρα που μονιμοποιήθηκαν χωρίς να έχουν μολυνθεί με ιό και από κύτταρα που μονιμοποιήθηκαν 3 και 6 ώρες μετά από μόλυνση με SV.

Από την ηλεκτροφόρηση της χρωματίνης σε πηκτή αγαρόζης διαπιστώθηκε πως η διαδικασία του Sonication ήταν επιτυχημένη, με το μεγαλύτερο κλάσμα της χρωματίνης να μην υπερβαίνει το μήκος των 3.000 ζευγών βάσεων. Η κατανομή των τεμαχίων της χρωματίνης είναι ομοιόμορφη και υπάρχει ικανοποιητική ποσότητα χρωματίνης με μήκη μικρότερα των 500 ζεύγη βάσεων.

Εφόσον διαπιστώθηκε πως η χρωματίνη έχει τμηματοποιηθεί σωστά και είναι κατάλληλη για την πραγματοποίηση πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, χρησιμοποιήθηκαν 500 μg από κάθε timepoint (0h, 3h και 6h) χρησιμοποιήθηκαν για πείραμα ChIP. Σε αυτό το πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν 8μg αντισώματος έναντι της RNA Pol II ανά timepoint το οποίο και επώαστηκε με την χρωματίνη ολονύκτια. Τα σύμπλοκα αντισώματος-αντιγόνου-χρωματίνης απομονώθηκαν με την χρήση Protein G μαγνητικών σφαιριδίων και στη συνέχεια έγινε reverse του crosslinking και το DNA υποβλήθηκε σε καθαρισμό με SPRI μαγνητικά σφαιρίδια.

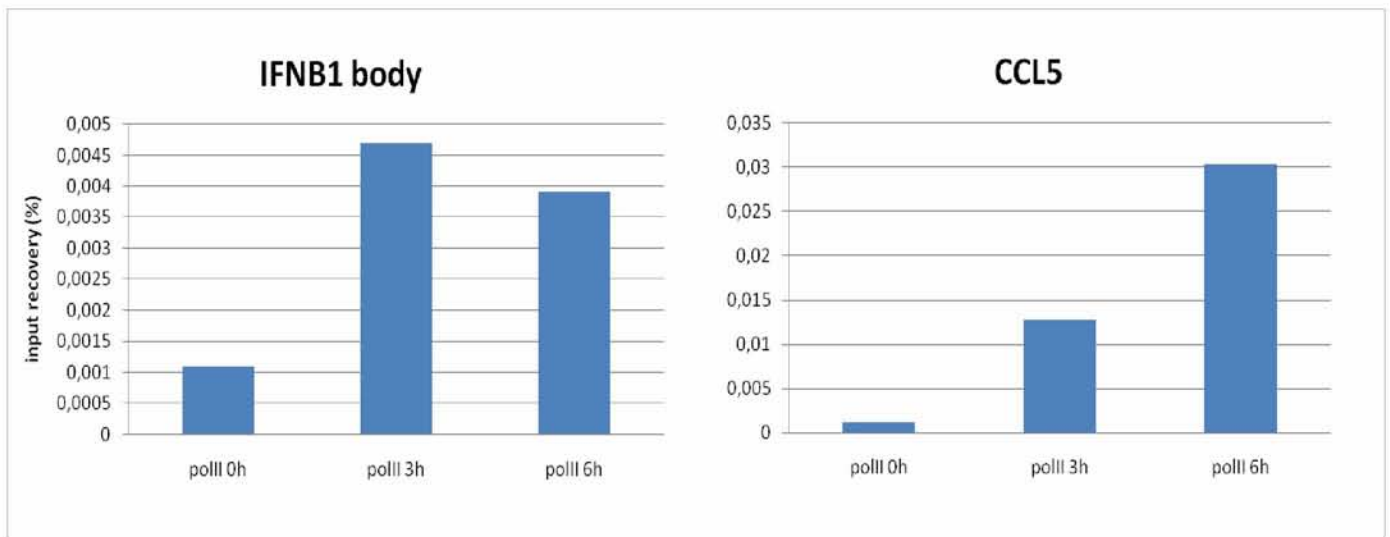
Το καθαρό πλέον DNA, χρησιμοποιήθηκε αρχικά σε Real Time qPCR, με 2 ζεύγη εκκινητών (Εικόνα 20). Το πρώτο ζεύγος ενισχύει περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της ακτίνης β και το δεύτερο ζεύγος είναι συμπληρωματικό προς μία περιοχή εντός του γονιδίου *MYO1*.



Εικόνα 20: Εμπλουτισμός δειγμάτων χρωματίνης από κύτταρα HeLa με αλληλουχίες που αντιστοιχούν στον υποκινητή του γονιδίου *ACTB* και στο γονίδιο *MYOD1*. Το διάγραμμα αυτό προκύπτει από την ανάλυση αποτελεσμάτων Real Time qPCR με μήτρα DNA που προέρχεται από πείραμα ChIP με στόχο την RNA pol II. Ο υποκινητής του γονιδίου της ακτίνης αποτελεί θετικό στόχο για την πρόσδεση της RNA pol II ενώ το γονίδιο *MYOD1* αρνητικό στόχο. Τα δείγματα μετά την ολοκλήρωση της ανοσοκατακρήμνισης έχουν εμπλουτιστεί με αλληλουχίες που ενισχύονται από τους εκκινητές της *ACTB*, ενώ παρατηρείται χαμηλός εμπλουτισμός των δειγμάτων με αλληλουχίες του γονιδίου *MYOD1*.

Η ανάλυση των τιμών Ct των δειγμάτων του πειράματος ChIP, έδειξε πως αυτά έχουν εμπλουτιστεί με αλληλουχίες που αντιστοιχούν στον υποκινητή του γονιδίου της *ACTB*. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με το γεγονός ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ACTB είναι θετικός στόχος για την πρόσδεση της RNA pol II καθώς εκφράζεται συνεχώς στα κύτταρα (housekeeping gene). Σε αντίθεση, από την ανάλυση προέκυψε πως τα δείγματα, καθένα από τα οποία αντιπροσωπεύει την χρωματίνη των HeLa κυττάρων 0, 3 και 6 ώρες μετά την ιική μόλυνση, δεν έχουν εμπλουτιστεί με αλληλουχίες του γονιδίου *MYOD1* μετά την ολοκλήρωση της ανοσοκατακρήμνισης. Το γονίδιο αυτό, δεν εκφράζεται σε αυτή την κυτταρική σειρά και επομένως είναι λογικό η RNA Pol II να μην το μεταγράφει.

Ακολούθησε αντίδραση Real Time qPCR με ένα ζεύγος εκκινητών που ενισχύει περιοχή κοντά στον υποκινητή του γονιδίου της ιντερφερόνης β και ένα που ενισχύει περιοχή του υποκινητή του επαγόμενου από την ιντερφερόνη γονιδίου *CCL5* (Εικόνα 21).

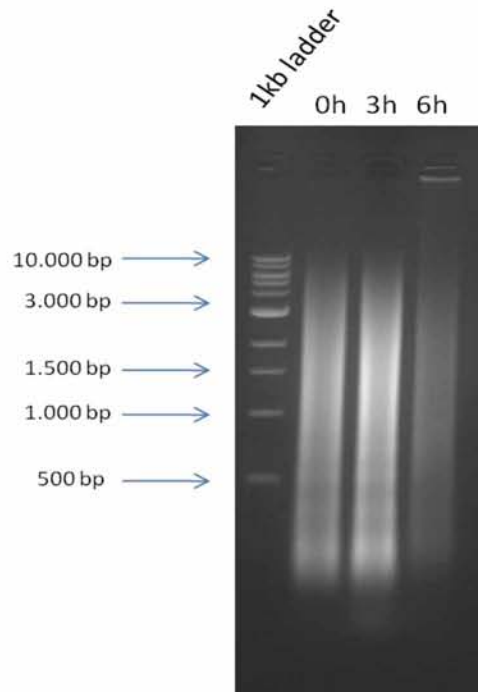


Εικόνα 21: Εμπλουτισμός των δειγμάτων της χρωματίνης που προέρχεται από κύτταρα HeLa με αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο γονίδιο της ιντερφερόνης β1 και το *CCL5*, ύστερα από πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με στόχο την RNA pol II. Τα δείγματα που αντιστοιχούν στις 3 και 6 ώρες μετά την μόλυνση εμπλουτίζονται σε μικρό βαθμό με αλληλουχίες του γονιδίου της ιντερφερόνης β και σε μεγαλύτερο βαθμό με αλληλουχίες του γονιδίου *CCL5*.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real Time PCR υπέδειξε πως τα δείγματα του DNA που προέρχονται από το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έχουν εμπλουτιστεί με αλληλουχίες του γονιδίου της ιντερφερόνης με αυξανόμενο εμπλουτισμό για τα δείγματα που προέρχονται από κύτταρα μολυσμένα με ιό για 3 και 6 ώρες συγκριτικά με το δείγμα που προέρχεται από κύτταρα HeLa που δεν έχουν μολυνθεί με ιό. Επίσης παρατηρείται αυξανόμενο ποσοστό εμπλουτισμού στα δείγματα των 3 και 6 ωρών μετά την ιϊκή μόλυνση για ο στόχο στο γονίδιο *CCL5*. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με το γεγονός πως η ιϊκή μόλυνση πυροδοτεί αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της ιντερφερόνης β και του *CCL5* στα κύτταρα της σειράς HeLa όσο προοδεύει η αντιϊκή απόκριση. Επίσης έχοντας επιτύχει την απομόνωση τεμαχίων που φιλοξενούν την RNA polymerase είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση των γονιδίων που εκφράζονται. Στο εργαστήριο υπάρχουν δεδομένα από πειράματα RNA-seq τα οποία μπορούν να επιβεβαιώσουν τα παραπάνω ευρήματα.

3.2.3. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης στην κυτταρική σειρά HCT116

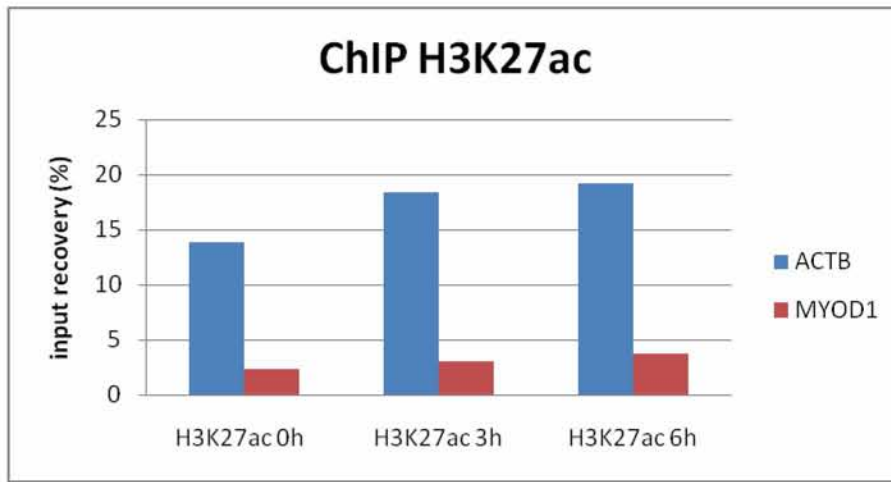
Κύτταρα της ανθρώπινης καρκινικής σειράς HCT116 καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο με τις κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης, σε κλίμακα αντίστοιχη των κυττάρων HeLa και Namalwa. Όταν η καλλιέργεια των κυττάρων αυτών έφτασε την επιθυμητή έκταση ακολούθησε μόλυνση με ιό. Τρεις ομάδες κυττάρων, μία με κύτταρα τα οποία δεν υποβλήθηκαν σε μόλυνση και 2 που είχαν μολυνθεί για 3 και 6 ώρες αντίστοιχα, όπως και τα κύτταρα των άλλων δύο σειρών υπέστησαν μονιμοποίηση με χρήση φορμαλδεύδης. Στη συνέχεια ακολούθησε η αντίστοιχη πειραματική διαδικασία απομόνωσης και θραύσης της χρωματίνης. Η ολοκλήρωση των διαδικασιών αυτών ακολούθηθηκε από έλεγχο της ποιότητας του κατακερματισμού μέσω ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 22) μέρους της χρωματίνης, όπως έχει περιγραφεί ήδη.



Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση κατακερματισμένης χρωματίνης κυττάρων HCT116, τα οποία έχουν μολυνθεί με SV για 0h, 3h και 6h. Από αριστερά προς τα δεξιά φαίνεται το δείγμα αναφοράς (ladder), η χρωματίνη που απομονώθηκε από κύτταρα HCT116 που δεν έχουν μολυνθεί με ιό και χρωματίνη από κύτταρα που μονιμοποιήθηκαν 3 και 6 ώρες μετά την έκθεση τους σε SeV.

Ο ποιοτικός έλεγχος του κατακερματισμού της χρωματίνης μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης φανέρωσε πως τα θραύσματα της χρωματίνης έχουν, κατά το μεγαλύτερο ποσοστό, μήκος μικρότερο από 3.000 ζεύγη βάσεων με ομοιόμορφη κατανομή των μηκών τους κάτω από αυτό το μέγεθος. Επίσης φαίνεται πως η συγκέντρωση της χρωματίνης που προέρχεται από κύτταρα που μονιμοποιήθηκαν 6 ώρες μετά την έκθεση τους σε SV είναι μικρότερη. Το γεγονός αυτό όμως δεν επηρεάζει τα ακόλουθα πειράματα καθώς, πριν από την έναρξη κάθε πειράματος ανοσοκατακρήμνισης τα δείγματα της χρωματίνης φωτομετρούνται και η διαδικασία ξεκινά με χρήση ίδιας ποσότητας χρωματίνης από κάθε δείγμα.

Στη συνέχεια 200 µg χρωματίνης από κάθε δείγμα (0h, 3h και 6h), χρησιμοποιήθηκαν σε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της ιστόνης 3 που φέρει ακετυλίωση στη λυσίνη 27. Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος της ανοσοκατακρήμνισης τα δείγματα DNA που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο με 2 ζεύγη εκκινητών (Εικόνα 23). Το πρώτο ζεύγος στοχεύει περιοχή κοντά στον υποκινητή του μεταγραφικά ενεργού γονιδίου της ακτίνης B και το δεύτερο ζεύγος το γονίδιο *MYOD1*.



Εικόνα 23: Εμπλουτισμός των δειγμάτων της χρωματίνης κυττάρων HCT116 με αλληλουχίες που ενισχύονται από τους εκκινητές ACTB και MYOD1, ύστερα από πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac. Τα δείγματα μετά την ολοκλήρωση της ανοσοκατακρήμνισης εμφανίζουν μεγαλύτερο εμπλουτισμό σε αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο γονίδιο της ακτίνης σε σχέση με τον εμπλουτισμό που παρατηρείται με αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο γονίδιο MYOD1.

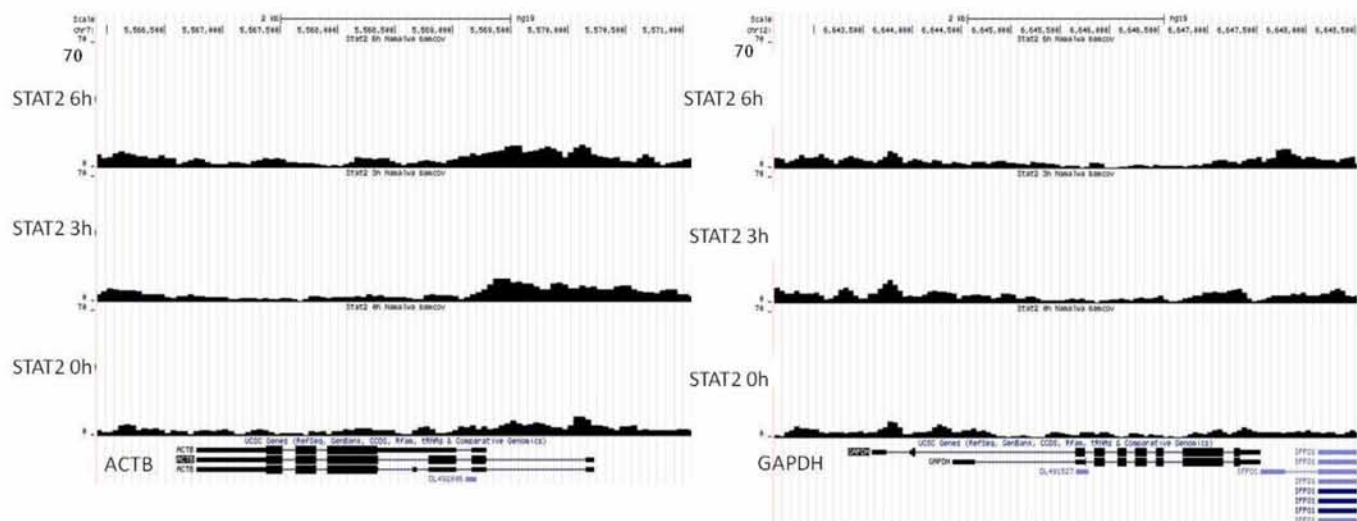
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την Real Time qPCR έδειξε πως τα δείγματα εμπλουτίστηκαν σε μεγάλο βαθμό με αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο γονίδιο της ACTB.

3.3.3. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης

Αποτελέσματα αλληλούχισης STAT2 ChIP

Μετά από την δημιουργία των βιβλιοθηκών από το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με στόχο τον παράγοντα STAT2 σε κύτταρα Namalwa, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση νέας γενιάς με την τεχνολογία της Illumina. Τα αποτελέσματα αυτά αναλύθηκαν, όπως έχει ήδη αναφερθεί, με το πρόγραμμα Galaxy και χρησιμοποιήθηκε ο UCSC browser για την οπτικοποίηση του σήματος σε συγκεκριμένες γονιδιακές περιοχές κατά μήκος του γονιδιώματος για τον έλεγχο επιτυχίας του πειράματος και την εξαγωγή νέας γνώσης.

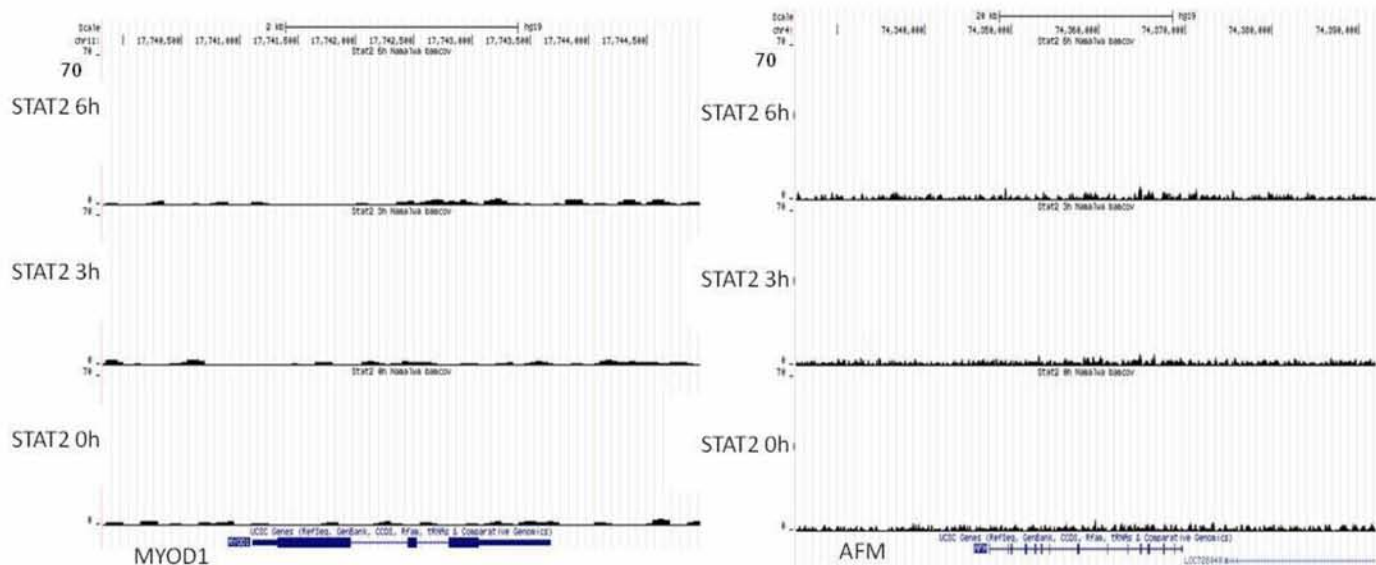
Στο UCSC browser αναζητήθηκαν αρχικά οι γονιδιακοί τόποι των housekeeping γονιδίων ACTB και GAPDH (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: Η ένταση της πρόσδεσης του STAT2 γύρω από τα γονίδια *ACTB* και *GAPDH*. Η ένταση του σήματος στην περιοχή των γονιδίων *ACTB* και *GAPDH*, τα οποία αποτελούν housekeeping γονίδια είναι πολύ χαμηλή, υποδεικνύοντας ότι τα γονίδια αυτά αποτελούν αρνητικούς στόχους για την πρόσδεση της πρωτεΐνης STAT2.

Το σήμα που εντοπίζεται σε αυτές τις περιοχές είναι πολύ χαμηλό και στα τρία χρονικά σημεία που μελετώνται και υποδεικνύει πως αποτελούν αρνητικούς στόχους για την πρόσδεση του παράγοντα STAT2. Το συμπέρασμα αυτό είναι συμβατό με την υπάρχουσα γνώση ότι ο παράγοντας STAT2 ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που επάγονται από την ιντερφερόνη (Matsumoto et al., 1999). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες ACTB και GAPDH αντίστοιχα δεν επάγονται από την ιντερφερόνη και επομένως δεν τυγχάνουν ρύθμισης από την πρωτεΐνη STAT2 μετά την ενεργοποίηση της από την ιντερφερόνη.

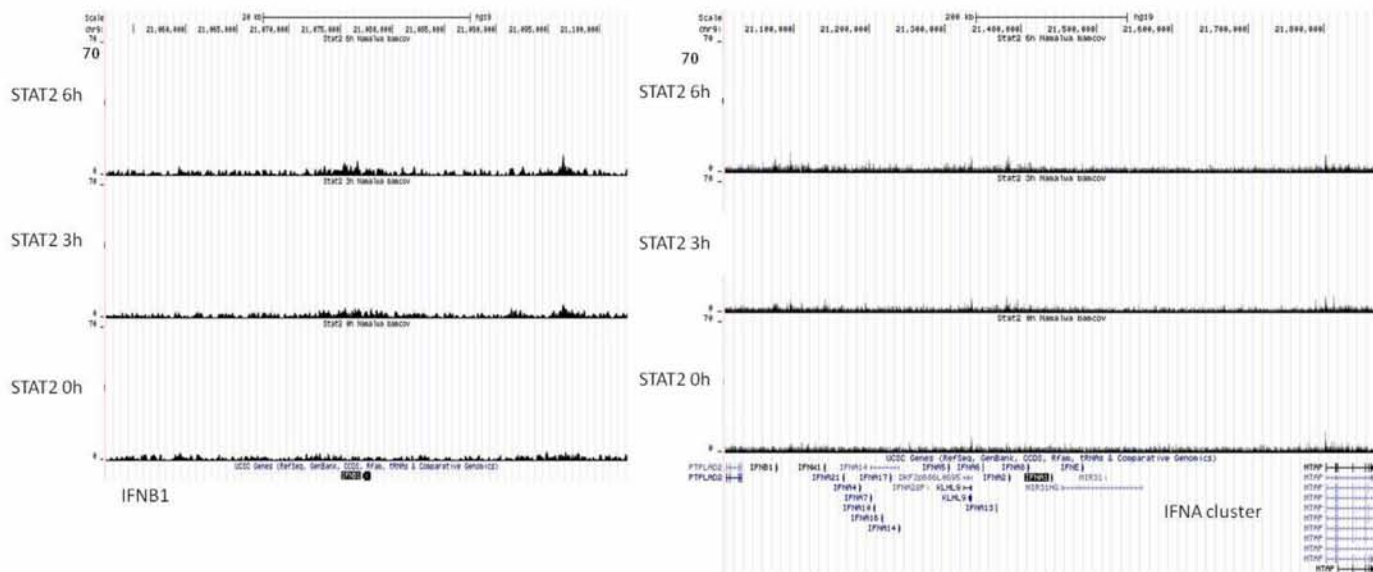
Επίσης αναζητήθηκαν τα γονίδια *MYOD1* και *AFM* (Εικόνα 25)Εικόνα , τα οποία δεν εκφράζονται στα κύτταρα Namalwa. Ο εμπλουτισμός του γονιδίου *MYOD1*, σε αυτό το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης έχει ελεγχθεί ήδη μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, και έχει δειχθεί ότι αποτελεί αρνητικό στόχο για τον παράγοντα STAT2.



Εικόνα 25: Η ένταση του σήματος STAT2 γύρω από τα γονίδια *MYOD1* και *AFM*. Τα γονίδια αυτά αποτελούν αρνητικούς στόχους για την πρόσδεση της πρωτεΐνης STAT2 ύστερα από την ενεργοποίηση της (μετά από ιική μόλυνση), ενώ δεν εντοπίζεται σήμα ούτε πριν την μόλυνση των κυττάρων με ιό.

Όπως είναι αναμενόμενο, φαίνεται πως τα δύο αυτά γονίδια αποτελούν αρνητικούς στόχους για τον παράγοντα STAT2, καθώς δεν εμφανίζεται σήμα σε κανένα δείγμα (0,3 και 6 ώρες μετά την ιική μόλυνση).

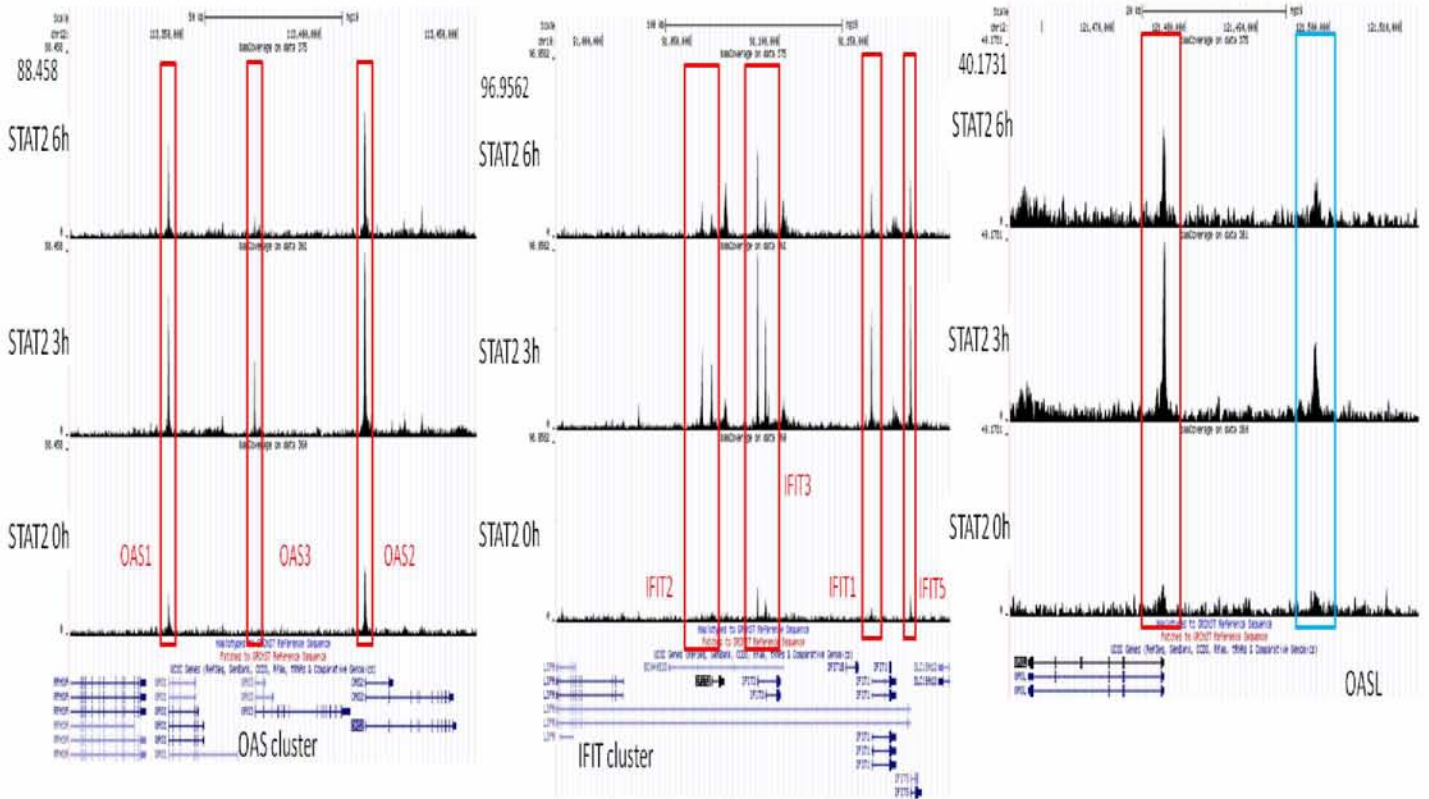
Σύμφωνα με την ανάλυση του αποτελέσματος της Real Time qPCR στο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης σε κύτταρα Namalwa με στόχο τον παράγοντα STAT2, το γονίδιο της ιντερφερόνης δεν αποτελεί θετικό στόχο για τον παράγοντα αυτό.



Εικόνα 26: Η ένταση του σήματος Stat2 στην περιοχή του γονιδίου IFNB1 και στα γονίδια της οικογένειας IFNA. Τα γονίδια που κωδικοποιούν ιντερφερόνες I δεν παρουσιάζουν πρόσδεση του παράγοντα STAT2, σε καμία κωδική ή ρυθμιστική περιοχή γύρω τους.

Από την ανάλυση του αποτελέσματος της αλληλούχισης, το παραπάνω εύρημα επιβεβαιώνεται καθώς δεν εμφανίζεται σήμα στην κωδική περιοχή του γονιδίου της ιντερφερόνης β, αλλά ούτε και σε κάποια ρυθμιστική περιοχή ανοδικά ή καθοδικά του γονιδίου (Εικόνα 26). Αυτό ισχύει και για τα τρία χρονικά σημεία ελέγχου (0, 3 και 6 ώρες μετά την ιική μόλυνση). Ομοίως, δεν εμφανίζεται πρόσδεση του παράγοντα σε κανένα από γονίδια της οικογένειας των ιντερφερονών α. Επομένως η έκφραση των γονιδίων ιντερφερόνης I δεν ενεργοποιείται από την πρόσδεση του παράγοντα STAT2 σε κάποιο ρυθμιστικό στοιχείο αυτών.

Το επαγόμενο από την ιντερφερόνη γονίδιο *OASL*, σύμφωνα με το αποτέλεσμα της Real Time qPCR για το συγκεκριμένο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης, αποτελεί θετικό στόχο για τον παράγοντα STAT2.

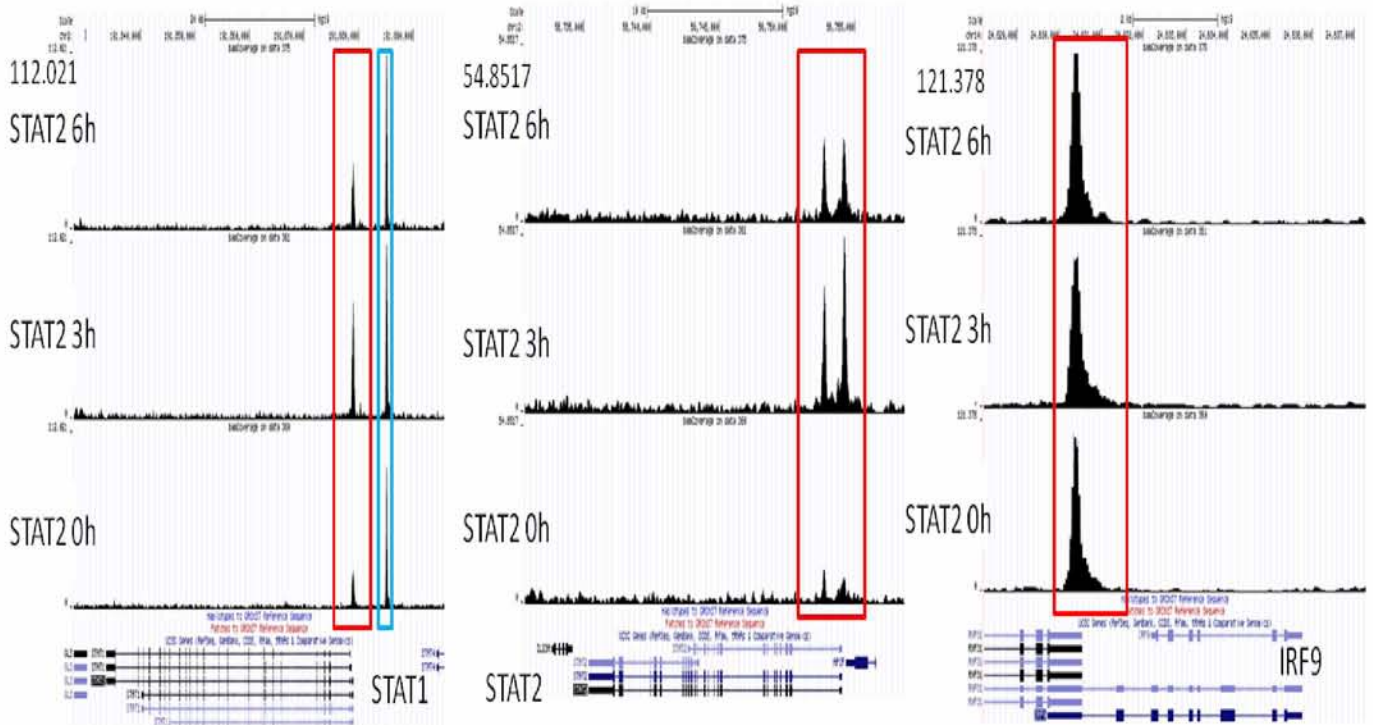


Εικόνα 27: Η ένταση της πρόσδεσης του STAT2 στις περιοχές των γονιδιακών οικογενειών *OAS* και *IFIT* και του γονιδίου *OASL*. Τα επαγόμενα από την ιντερφερόνη αυτά γονίδια εμφανίζουν επαγόμενη πρόσδεση του παράγοντα STAT2 σε ρυθμιστικές τους επικράτειες. Τα κόκκινα πλαίσια υποδεικνύουν το σήμα στην περιοχή των υποκινητών των γονιδίων, και το γαλάζιο πλαίσιο περιέχει το σήμα το οποίο αντιστοιχεί σε πιθανό ενισχυτή που εντοπίζεται 20 κιλοβάσεις ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου *OASL*.

Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με το αποτέλεσμα της αλληλούχισης. Ο υποκινητής του γονιδίου *OASL* εμφανίζει επαγόμενη πρόσδεση του παράγοντα STAT2 μετά την ιική μόλυνση, με το σήμα να είναι μέγιστο 3 ώρες μετά από την επαγωγή των κυττάρων. Παρομοίως εμφανίζεται επαγόμενη πρόσδεση του παράγοντα αυτού και σε μία αλληλουχία που εντοπίζεται σε απόσταση 20 κιλοβάσεων ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου αυτού (Εικόνα 27). Η περιοχή αυτή αποτελεί μία πιθανή αλληλουχία ενισχυτή, ο οποίος ρυθμίζει την επαγωγή της μεταγραφής του *OASL*.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης δείχνουν ότι ο παράγοντας STAT2 προσδένεται με επαγόμενο τρόπο σε υποκινητές και άλλων ISGs (Interferon inducible Genes), όπως τα γονίδια *OAS* και *IFIT*. Οι υποκινητές των γονιδίων *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3* και *IFIT5*, παρουσιάζουν έντονο σήμα 3 και 6 ώρες μετά την ιική μόλυνση. Παρόμοια είναι και η εικόνα στους υποκινητές των γονιδίων *OAS1*, *OAS2* και *OAS3*, με τον υποκινητή του γονιδίου *OAS3* να εμφανίζει το σήμα με την μεγαλύτερη ένταση ανάμεσα στα 3 γονίδια.

Η ένταση του σήματος και στις 3 ομάδες ISG γονιδίων (*OAS*, *IFIT* και *OASL*) μεγιστοποιείται 3 ώρες μετά την μόλυνση των κυττάρων με SeV. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να υποδηλώνει πως ο παράγοντας STAT2, ενεργοποιείται και συνδέεται σε ρυθμιστικές περιοχές των ISG γονιδίων σύντομα μετά την ανίχνευση της ιντερφερόνης από τους υποδοχείς των κυττάρων στο περιβάλλον τους, όπου δρα επάγοντας την μεταγραφή τους, και αποσυνδέεται από αυτά τα στοιχεία σε σύντομο χρονικό διάστημα.



Εικόνα 28: Πρόσδεση του *STAT2* γύρω από τα γονίδια *STAT1*, *STAT2* και *IRF9*. Παρατηρείται η πρόσδεση του παράγοντα *STAT2* σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου που τον κωδικοποιεί καθώς και των γονιδίων *STAT1* και *IRF9* (p48) τα οποία συμμετέχουν στο τριμερές σύμπλοκο που δημιουργείται μετά την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών αυτών. Τα επίπεδα του σήματος αυξάνονται μετά την ιική μόλυνση των κυττάρων ενώ εντοπίζεται σήμα και πριν από την μόλυνση (prebound από τις 0 ώρες).

Τα γονίδια *STAT1* και *STAT2* εμφάνισαν επίσης σήμα στις περιοχές των υποκινητών τους (Εικόνα 28). Η πρόσδεση του παράγοντα *STAT2* στους υποκινητές των δύο αυτών γονιδίων επάγεται μετά την ιική μόλυνση, αλλά παρατηρούνται κορυφές μικρής έντασης ακόμα και πριν την ιική μόλυνση σε αυτές τις θέσεις. Οι κορυφές αυτές υποδηλώνουν την προϋπάρχουσα πρόσδεση του παράγοντα *STAT2* στους υποκινητές των γονιδίων *STAT1* και *STAT2*. Το σήμα μεγιστοποιείται στο δεύτερο χρονικό σημείο που μελετάται, όπως παρατηρείται και στους υποκινητές των ISGs. Το γεγονός αυτό αποτελεί παράδειγμα αυτό-ρυθμισμού (autoregulatory loop).

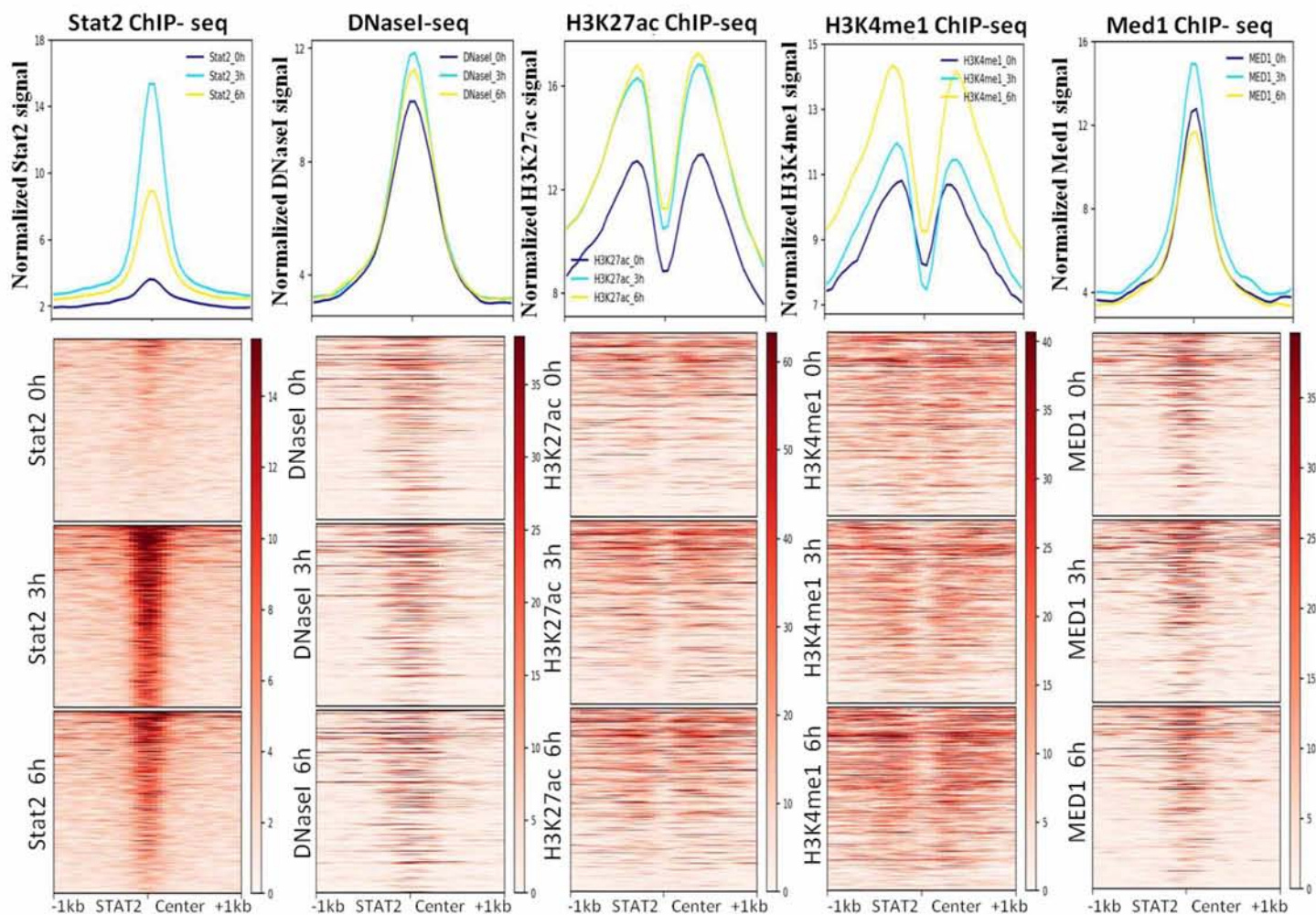
Η επαγόμενη πρόσδεση του παράγοντα *STAT2* στους υποκινητές των γονιδίων *STAT1* και *STAT2*, υποδεικνύει την πιθανή ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων αυτών, και κατ' επέκταση την πιθανή αυτό-ρύθμιση του παράγοντα *STAT2*. Τα γονίδια αυτά έχουν ισχυρά επίπεδα έκφρασης τα οποία αυξάνονται περαιτέρω μετά από την ενεργοποίηση του παράγοντα *STAT2*.

Εκτός από τον υποκινητή, ο παράγοντας *STAT2* προσδέεται και σε μία αλληλουχία ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου *STAT1*. Η ένταση του σήματος είναι ήδη αυξημένη από τις 0 ώρες όμως παρατηρείται μία μικρού βαθμού αύξηση της τιμής της στα 2 χρονικά σημεία μετά την ιική μόλυνση. Η αλληλουχία αυτή αποτελεί πιθανό ενισχυτή του γονιδίου, ο οποίος διαθέτει θέση πρόσδεσης του παράγοντα *STAT2*.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα *IRF9*, ο οποίος αποτελεί υπομονάδα του τριμερούς συμπλόκου που δημιουργείται μετά την ενεργοποίηση των παραγόντων *STAT* (Matsumoto et al., 1999), παρουσιάζει σχετικά σταθερό, και αυξημένης τιμής σήμα ανάμεσα στα τρία χρονικά σημεία που μελετούνται. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με το πρότυπο έκφρασης του παράγοντα, όπως έχει καταγραφεί από τα πειράματα RNA-seq του εργαστηρίου.

ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΝΙΣΧΥΤΕΣ

Για την πιο σφαιρική μελέτη των θέσεων πρόσδεσης του STAT2 σε πιθανά ρυθμιστικά στοιχεία πραγματοποιήθηκε δημιουργία τοπογραφικών χαρτών με βάση το κέντρο πρόσδεσης του παράγοντα STAT2, σε 1351 περιοχές που εντοπίζονται σε απομακρυσμένες από υποκινητές περιοχές (intergenic και intragenic), κατά μήκος του γονιδιώματος των κυττάρων Namalwa (Εικόνα 29). Οι τοπογραφικοί χάρτες απεικονίζουν την ένταση του σήματος, από πειράματα που έγιναν στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής εργασίας ή στα ευρύτερα πλαίσια του προγράμματος «Decoding a human Antiviral Gene expression Program». Συγκεκριμένα τα πειράματα με βάση τα οποία δημιουργήθηκαν αυτοί οι τοπολογικοί χάρτες περιλαμβάνουν πειράματα ChIP-seq για τις ιστονικές τροποποιήσεις H3K27ac και H3K4me1, τον μεταγραφικό παράγοντα MED1 καθώς και πείραμα DNaseI-seq, το οποίο μελετάει την προσβασιμότητα της χρωματίνης.

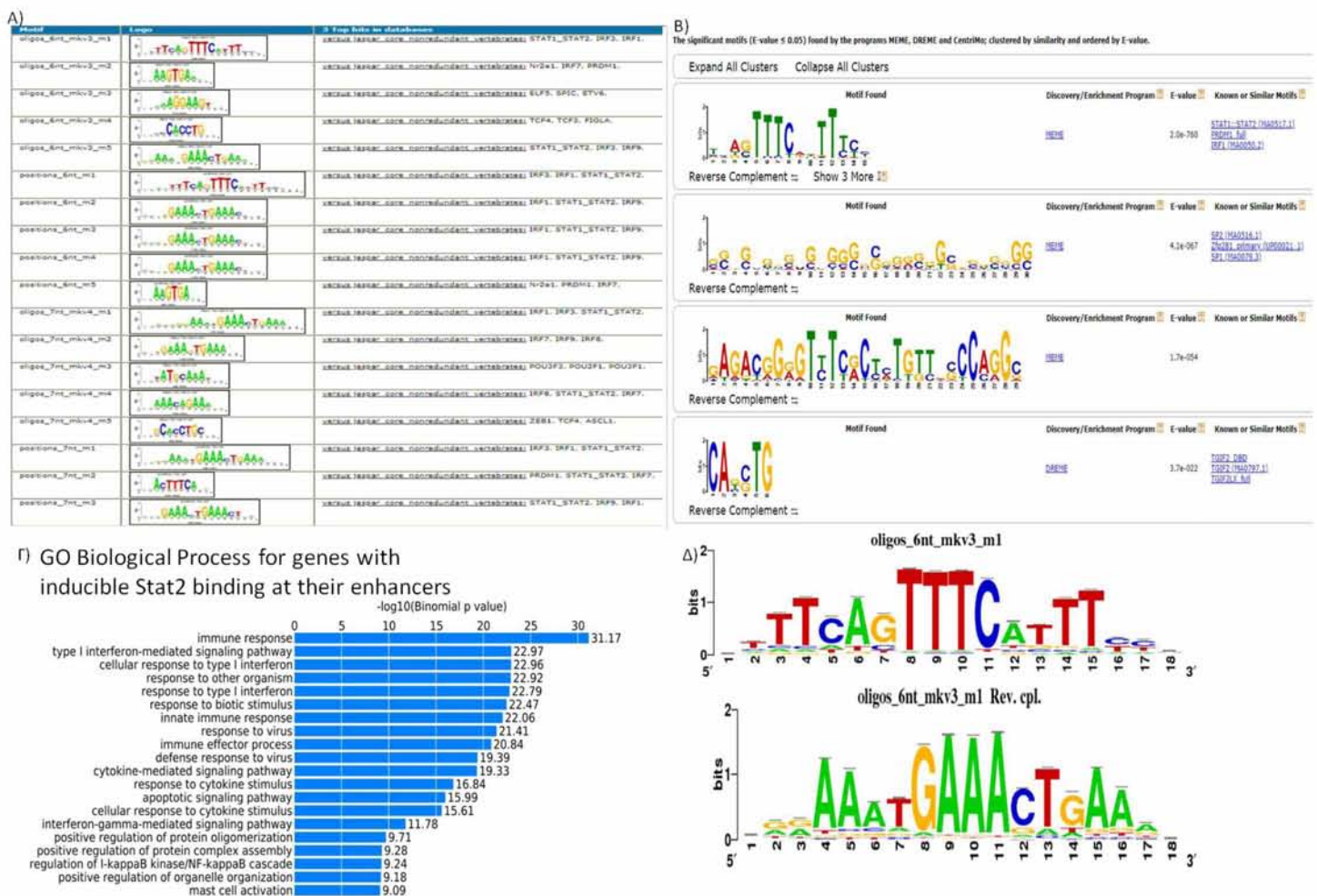


Εικόνα 29: Heat maps στους οποίους παρουσιάζεται η κατανομή του σήματος γύρω από τις 1351 θέσεις επαγόμενης πρόσδεσης του παράγοντα STAT2 σε περιοχές απομακρυσμένες από θέσεις έναρξης της μεταγραφής (πιθανοί ενισχυτές). Στις θέσεις αυτές παρατηρείται υψηλό σήμα από πείραμα πέψης DNaseI, μετά από την ιική μόλυνση αλλά και πριν από αυτή, και υψηλά επίπεδα πρόσδεσης του MED1. Επιπλέον, γύρω από τις περιοχές επαγόμενης πρόσδεσης του παράγοντα STAT2 παρατηρούνται υψηλά επίπεδα των ιστονικών τροποποιήσεων H3K27ac και H3K4me1.

Σύμφωνα με τον θερμικό χάρτη που δημιουργήθηκε με βάση το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης με στόχο τον παράγοντα STAT2 στα κύτταρα Namalwa, παρατηρείται επαγόμενη αύξηση της πρόσδεσης αυτού του παράγοντα σε 1351, απομακρυσμένες από θέσεις έναρξης της μεταγραφής, περιοχές κατά μήκος του γονιδιώματος και η πρόσδεση αυτή είναι μέγιστη 3 ώρες μετά την ιική μόλυνση. Η δημιουργία θερμικού

χάρτη με κέντρο την θέση πρόσδεσης του παράγοντα STAT2 σε αυτές τις περιοχές, από δεδομένα που προέρχονται από πείραμα DNaseI-seq, αποκαλύπτει πως οι θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα STAT2 εντοπίζονται σε περιοχές της χρωματίνης, οι οποίες είναι ανοιχτές ήδη πριν από την ιική μόλυνση. Οι τοπολογικοί χάρτες με βάση τα αποτελέσματα αλληλούχισης από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης για τις ιστονικές τροποποιήσεις H3K27ac και H3K4me1, οι οποίες σχετίζονται με περιοχές ενισχυτών, δείχνουν ότι οι θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα STAT2 σε περιοχές που ετοιάζονται εκτός γονιδίων, περιβάλλονται από νουκλεοσώματα οι ιστόνες των οποίων περιέχουν τις συγκεκριμένες ιστονικές τροποποιήσεις, ενισχύοντας την πεποίθηση ότι αυτές οι περιοχές αντιστοιχούν σε ενισχυτές γονιδίων. Παράλληλα κοντά στις θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα STAT2, εντοπίζονται και θέσεις πρόσδεσης του συνενεργοποιητή MED1, γεγονός που συνάδει με την ταύτιση αυτών των περιοχών με ενισχυτές γονιδίων και προτείνει την ύπαρξη κάποιου πιθανού μηχανισμού γονιδιακής ρύθμισης που βασίζεται από κοινού στους δύο αυτούς παράγοντες. Αξίζει να σημειωθεί σαν γενικό εύρημα ότι οι περισσότερες από τις περιοχές με απαγόμενη θέση πρόσδεσης του STAT2, βρίσκονται σε περιοχές που φέρουν δείκτες χαρακτηριστικούς των ενεργών ενισχυτών ήδη πριν από την ιική μόλυνση.

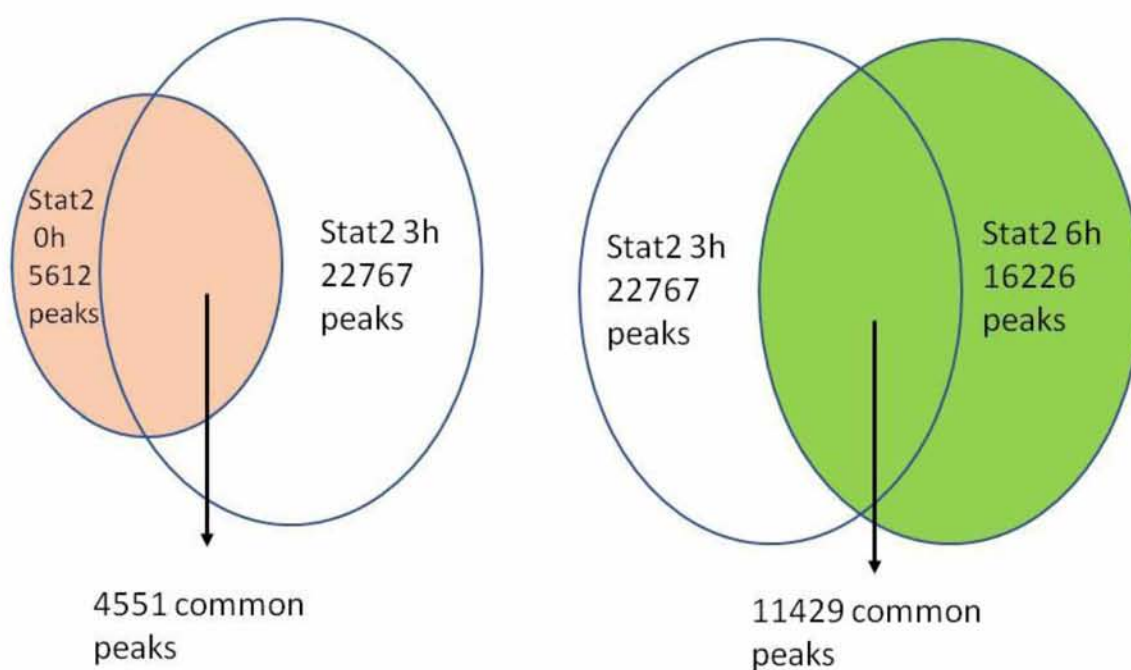
Με την χρήση των προγραμμάτων ανάλυσης μοτίβων RSAT Tools και MEME ChIP, πραγματοποιήθηκε εντοπισμός των μοτίβων σε αλληλουχίες που εντοπίζονται μακριά από υποκινητές και στις οποίες εντοπίζεται πρόσδεση του παράγοντα STAT2 και αποτελούν πιθανούς ενισχυτές γονιδίων, η έκφραση των οποίων τροποποιείται ύστερα από ιική μόλυνση (Εικόνα 30).



Εικόνα 30: (A,B) Μοτίβα πρόσδεσης STAT2 σε επαγόμενους ενισχυτές, όπως προκύπτουν από δύο διαφορετικά προγράμματα εύρεσης μοτίβων. (Γ) Κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται τα γονίδια που ρυθμίζονται από αυτούς τους ενισχυτές. (Δ) Τα μοτίβα με την μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης STAT2.

Από την ανάλυση αυτή προκύπτει πως το μεγαλύτερο ποσοστό των μοτίβων που εντοπίζονται στις αλληλουχίες των πιθανών ενισχυτών, ταυτίζονται με θέσεις πρόσδεσης των παραγόντων STAT καθώς και μεταγραφικών παραγόντων της ομάδας IRF. Μέσω του προγράμματος GREAT προσδιορίστηκαν οι κυτταρικές λειτουργίες με τις οποίες σχετίζονται τα γονίδια που βρίσκονται σε εγγύτερη θέση στους πιθανούς αυτούς ενισχυτές. Η εγγύτητα ανάμεσα στον ενισχυτή και το πιθανό γονίδιο, χρησιμοποιείται ως κριτήριο ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα της ρυθμιστικής σχέσης ανάμεσα στον ενισχυτή και το γονίδιο. Παρόλα αυτά είναι γνωστό πως η λειτουργικότητα ενός ενισχυτή είναι ανεξάρτητη από την θέση του σχετικά με το γονίδιο καθώς και από την απόσταση του από την θέση έναρξης της μεταγραφής αυτού. Από την ανάλυση αυτή προέκυψε πως τα γονίδια, η έκφραση των οποίων πιθανότατα ρυθμίζεται από τους ενισχυτές με θέση πρόσδεσης του παράγοντα STAT2 σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση και σχετικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης και της απάντησης των κυττάρων σε ιντερφερόνες τύπου I.

Για την πιο σφαιρική μελέτη της ανακατανομής του STAT2 κατά την πρόοδο της ιϊκής μόλυνσης πραγματοποιήθηκε σύγκριση των λιστών οι οποίες περιλαμβάνουν τις θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα STAT2, κατά μήκος του γονιδιώματος, που εντοπίζονται στα τρία χρονικά σημεία μελέτης (0, 3 και 6 ώρες μετά από την ιϊκή μόλυνση) (Εικόνα 31). Η σύγκριση αυτή πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα Venny.



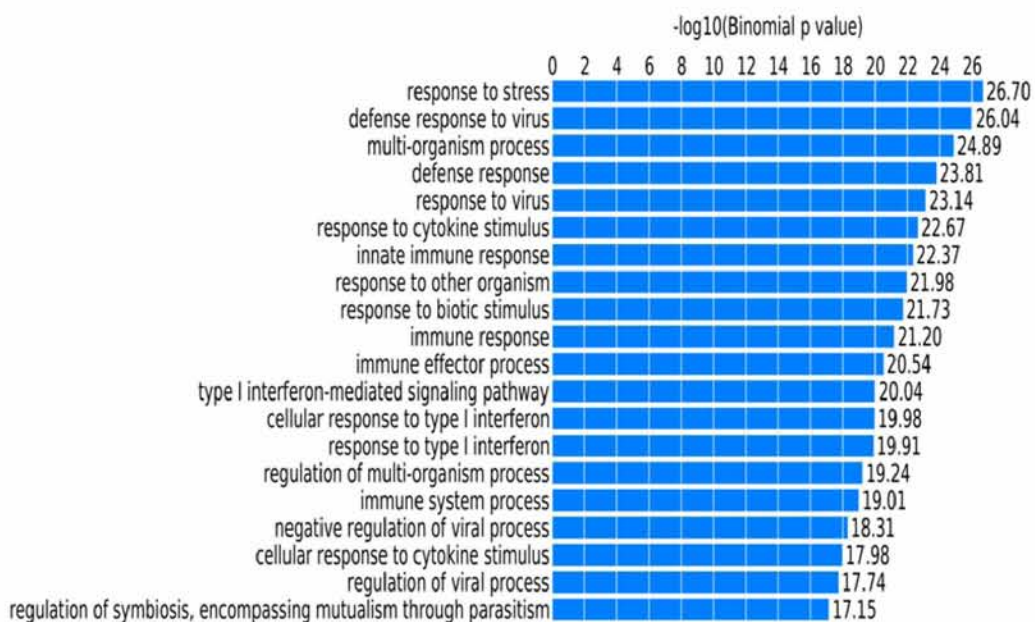
Εικόνα 31: Στο διάγραμμα εμφανίζεται ο αυξανόμενος αριθμός των θέσεων πρόσδεσης STAT2 στο γονιδίωμα των Namalwa κατά την ιϊκή απόκριση.

Στο πρώτο χρονικό στάδιο εντοπίζονται 5612 θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα STAT2, 3 ώρες μετά την μόλυνση οι θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα είναι 22767 και 6 ώρες μετά την μόλυνση ο αριθμός των θέσεων αυτών ανέρχεται στις 16226. Ανάμεσα στις θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα αυτού που εντοπίζονται κατά μήκος του γονιδιώματος των κυττάρων Namalwa, πριν αυτά μολυνθούν με ιό και 3 ώρες μετά την μόλυνση οι 4551 είναι κοινές. Από το σύνολο των θέσεων πρόσδεσης του παράγοντα STAT2, 3 ώρες μετά την έκθεση των κυττάρων στον SeV, οι 11429 εντοπίζονται και στη λίστα των συνολικά 16226 θέσεων πρόσδεσης του παράγοντα, 6 ώρες μετά την μόλυνση. Η προοδευτική αύξηση των θέσεων πρόσδεσης του STAT2 στο γονιδίωμα κατά τη διάρκεια της μόλυνσης είναι σε συμφωνία με το γεγονός ότι μετά την μόλυνση ο STAT2 φωσφορυλιώνεται και αυξάνεται ο χρόνος παραμονής του στον πυρήνα (Banninger & Reich, 2004).

ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΥΠΟΚΙΝΗΤΕΣ

Για να βρεθεί το κατά πόσο η πρόσδεση του STAT2 στο γονιδίωμα πριν τη μόλυνση είναι ειδική, πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοτίβων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, με την χρήση του προγράμματος RSAT tools, για τις 500 περιοχές υποκινητών γονιδίων που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη πρόσδεση του STAT2 πριν από την μόλυνση των κυττάρων με SeV (Εικόνα 32).

Motif	Logo	3 Top hits in databases
oligos_6nt_mkv2_m1		versus jasper_core_nonredundant vertebrates: STAT1_STAT2, IRF4, IRF7,
oligos_6nt_mkv2_m2		versus jasper_core_nonredundant vertebrates: SP1, KLF5, SP2,
oligos_6nt_mkv2_m3		versus jasper_core_nonredundant vertebrates: STAT1_STAT2, NFATC3, NFATC1,
oligos_6nt_mkv2_m4		versus jasper_core_nonredundant vertebrates: SREBF1, TBX15, TBX1,
oligos_6nt_mkv2_m5		versus jasper_core_nonredundant vertebrates: no match
oligos_7nt_mkv2_m1		versus jasper_core_nonredundant vertebrates: STAT1_STAT2, IRF1, IRF2,
oligos_7nt_mkv2_m2		versus jasper_core_nonredundant vertebrates: IRF9, STAT1_STAT2, IRF8,
oligos_7nt_mkv2_m3		versus jasper_core_nonredundant vertebrates: Arid3a, Arid3b,
oligos_7nt_mkv2_m4		versus jasper_core_nonredundant vertebrates: no match
oligos_7nt_mkv2_m5		versus jasper_core_nonredundant vertebrates: SP1, ETV6, SP2,

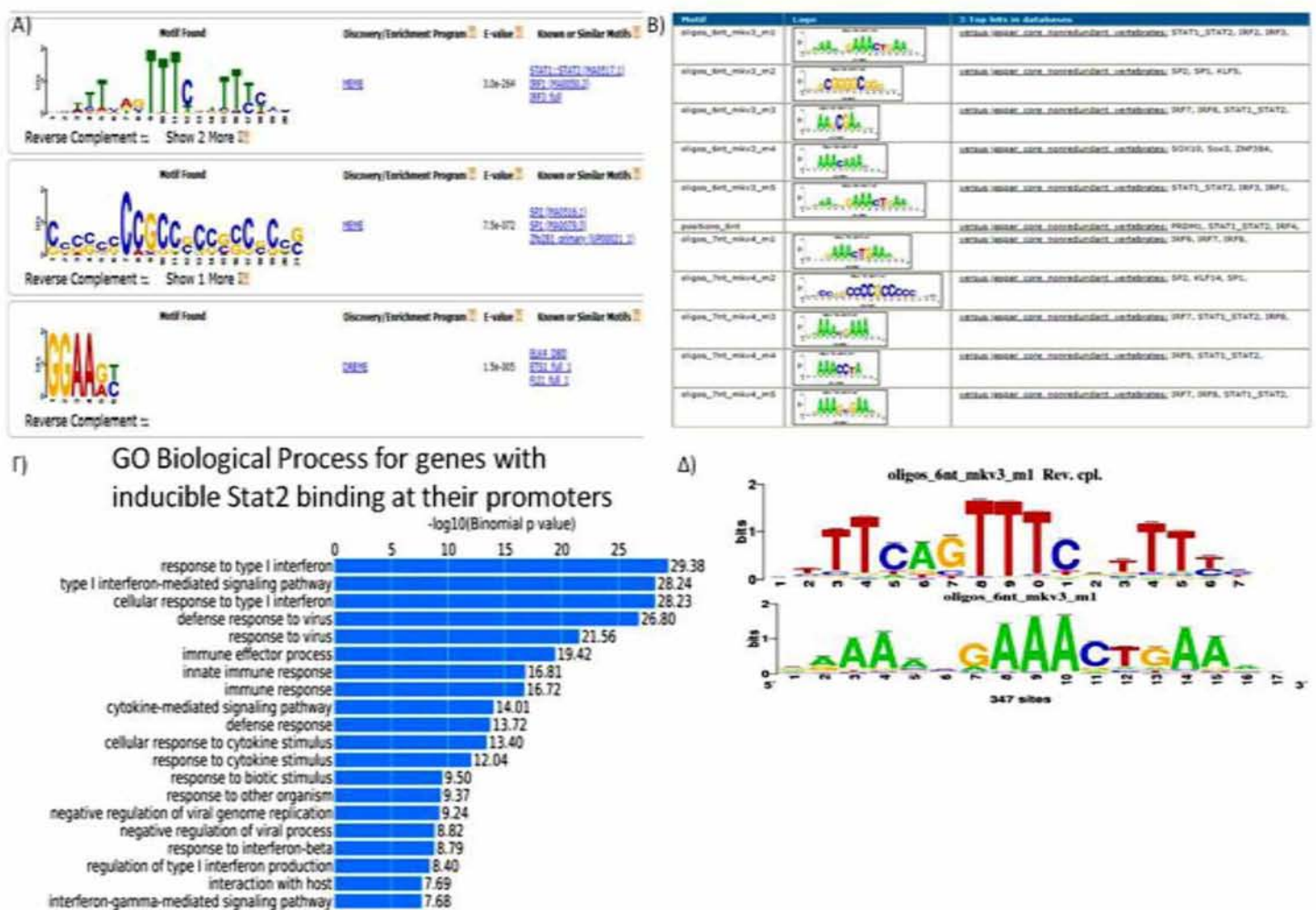


Εικόνα 32: Ανάλυση μοτίβων σε θέσεις υποκινητών που κατακρημνίσθηκαν μέσω του ChIP πειράματος με στόχο την πρωτεΐνη STAT2, πριν από την ιική μόλυνση και ταυτοποίηση των μοτίβων που αποτελούν θέσεις πρόσδεσης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων (πάνω). Κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται τα γονίδια που ρυθμίζονται από αυτούς τους υποκινητές, η πλειοψηφία των οποίων σχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση (κάτω).

Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι η πλειοψηφία των μοτίβων που εντοπίζονται σε αυτές τις περιοχές αποτελούν θέσεις πρόσδεσης παραγόντων της οικογένειας STAT.

Επιπλέον με την χρήση του προγράμματος GREAT, ταυτοποιήθηκαν οι κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται τα γονίδια που ρυθμίζονται από τους υποκινητές στους οποίους εντοπίζεται πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα STAT2 πριν από την ιική μόλυνση. Το πρόγραμμα αυτό υπέδειξε πως η πλειοψηφία των γονιδίων αυτών σχετίζεται με λειτουργίες απόκρισης στο στρες και μηχανισμούς άμυνας έναντι ιικής μόλυνσης. Παρατηρείται επομένως ότι ακόμα και πριν τη μόλυνση των κυττάρων ο STAT2 προσδένεται επιλεκτικά σε υποκινητές γονιδίων που επάγονται μετά τη μόλυνση, ρυθμίζοντας πιθανώς την έκφραση τους.

Παρόμοια ανάλυση μοτιβών έγινε και σε περιοχές υποκινητών στους οποίους εντοπίζεται επαγόμενη πρόσδεση του παράγοντα STAT2 (Εικόνα 33). Σε αυτή την περίπτωση η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με δύο προγράμματα ανάλυσης μοτιβών. Το πρώτο είναι το πρόγραμμα RSAT Tools, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και για την ανάλυση που αναφέρθηκε προηγουμένως και το δεύτερο είναι το πρόγραμμα MEME-ChIP.



Εικόνα 33: Μοτίβα πρόσδεσης STAT2 σε επαγόμενους υποκινητές, όπως προκύπτουν από δύο διαφορετικά προγράμματα εύρεσης μοτιβών. (Α,Β) Ανάμεσα στα πιο εμπλουτισμένα μοτίβα βρίσκονται θέσεις πρόσδεσης παραγόντων STAT αλλά και IRFs. **(Γ)** Κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται τα γονίδια που ρυθμίζονται από αυτούς τους υποκινητές. Οι πιο στατιστικά σημαντικές λειτουργίες σχετίζονται με αντιϊκή απόκριση μέσω του συστήματος ιντερφερονών τύπου Ι. **(Δ)** Τα μοτίβα με την μεγαλύτερη (συγγένεια) πρόσδεσης STAT2. Ένα από τα δύο μοτίβα αποτελεί θέση πρόσδεσης του STAT (πάνω) ενώ το δεύτερο αποτελεί θέση πρόσδεσης IRF (κάτω).

Από αυτή την ανάλυση προέκυψε, ότι τα μοτίβα που εντοπίζονται εντός των περιοχών των υποκινητών στους οποίους παρατηρείται επαγόμενη πρόσδεση του παράγοντα STAT2, αντιστοιχούν σε θέσεις

πρόσδεσης των παραγόντων STAT καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας IRF. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι στην επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων, η οποία ρυθμίζεται με την συμβολή του παράγοντα STAT2, συμμετέχουν και παράγοντες της οικογένειας IRF και συμφωνούν με την προϋπάρχουσα γνώση.

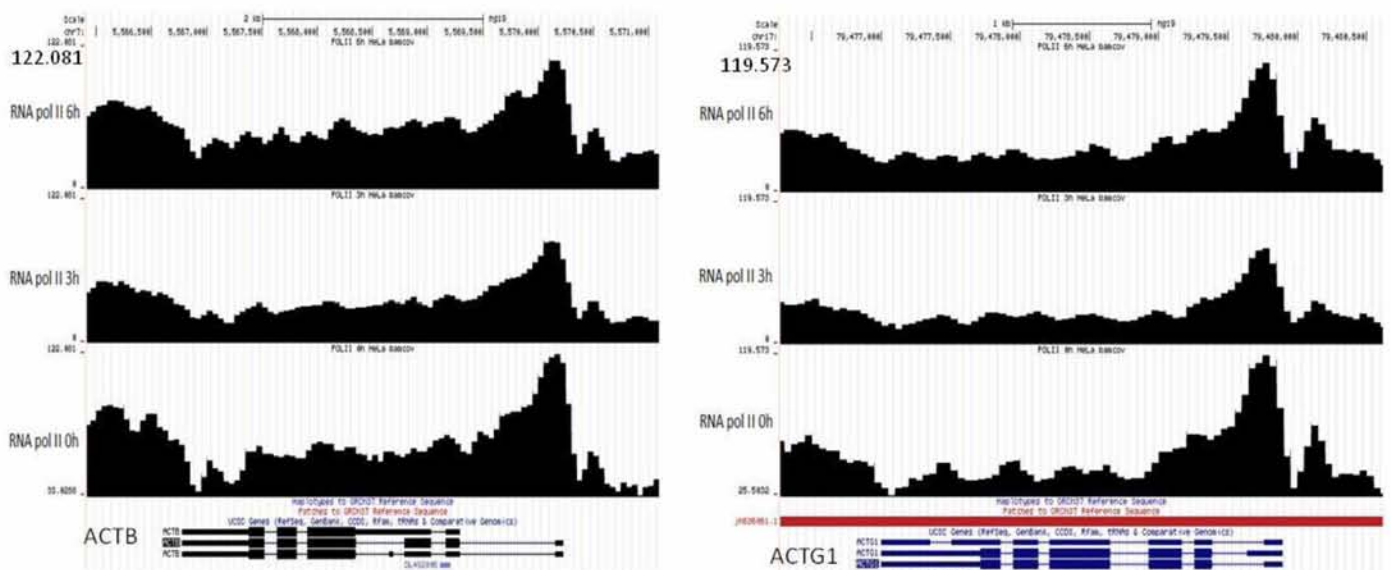
Επιπλέον τα γονίδια που ρυθμίζονται από αυτούς τους υποκινητές σχετίζονται, με την απόκριση σε ιντερφερόνες τύπου I και το σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από αυτές.

Αποτελέσματα αλληλούχισης RNA Pol II ChIP σε κύτταρα HeLa

Η αλληλούχιση των τμημάτων DNA που προέκυψαν ως αποτέλεσμα του πειράματος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, έναντι της RNA πολυμεράσης II σε κύτταρα HeLa, οδήγησε σε έναν όγκο δεδομένων, η ανάλυση του οποίου με τους τρόπους που έχουν ήδη αναφερθεί, κατέληξε στην εξαγωγή ορισμένων αποτελεσμάτων τα οποία παρουσιάζονται ακολούθως.

Κατόπιν της στοίχισης των αποτελεσμάτων στην αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος, αναζητήθηκαν ορισμένες γονιδιακές περιοχές για ένα πρώτο έλεγχο της ποιότητας των αποτελεσμάτων.

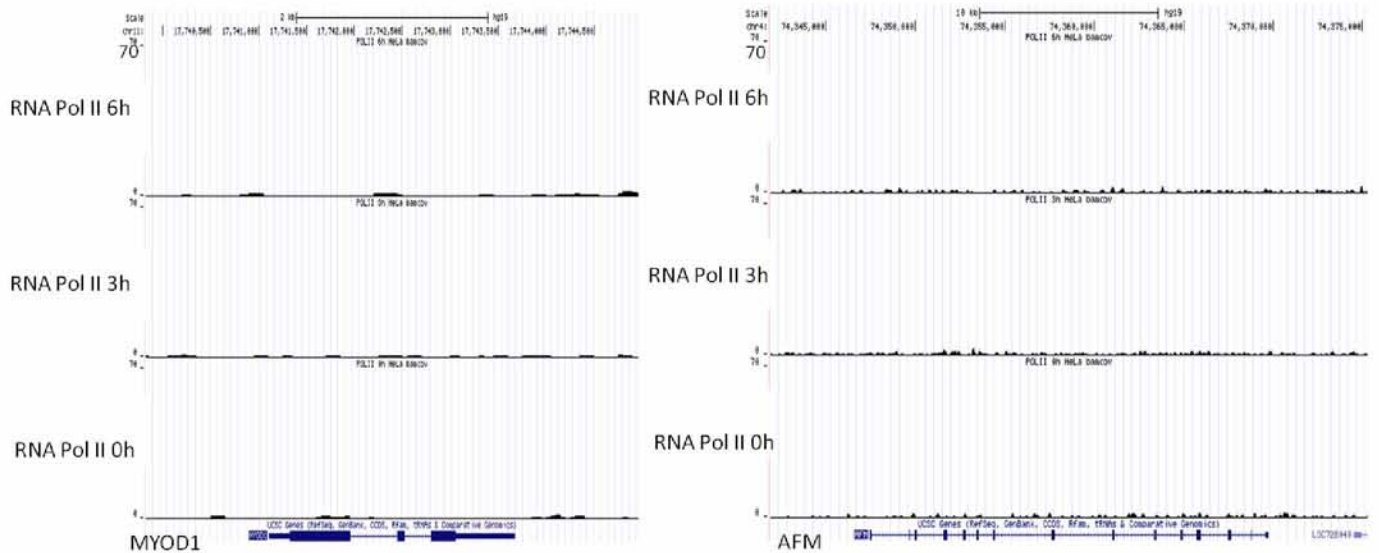
Αρχικά αναζητήθηκαν οι περιοχές των housekeeping genes *ACTB* και *ACTG1*.



Εικόνα 34: Η ένταση της πρόσδεσης της RNA Pol II γύρω από τις περιοχές των γονιδίων *ACTB* και *ACTG1*. Εντοπίζεται σήμα μεγάλης έντασης στις αλληλουχίες των υποκινητών, αλλά και κατά μήκος της κωδικής περιοχής των γονιδίων αυτών. Αυτή η εικόνα είναι αποτέλεσμα του γεγονότος της ολίσθησης της RNA Pol II κατά μήκος ενός γονιδίου στην διάρκεια της μεταγραφής του.

Τα γονίδια αυτά, καθώς εκφράζονται συνεχώς κατά τη διάρκεια ζωής των κυττάρων, κωδικοποιώντας την σύνθεση πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την εύρυθμη κυτταρική λειτουργία, είναι αναμενόμενο να εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα πρόσδεσης της RNA Pol II. Η αναμενόμενη αυτή πρόσδεση επιβεβαιώνεται από την υψηλή ένταση του σήματος στις περιοχές αυτών των γονιδίων ανεξάρτητα της ιικής μόλυνσης. Το αποτέλεσμα αυτό εκτός από το ότι είναι αναμενόμενο συνάδει και με το αποτέλεσμα της Real Time qPCR που πραγματοποιήθηκε (Εικόνα 20) με εκκινητές που ενισχύουν την αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου της *ACTB*.

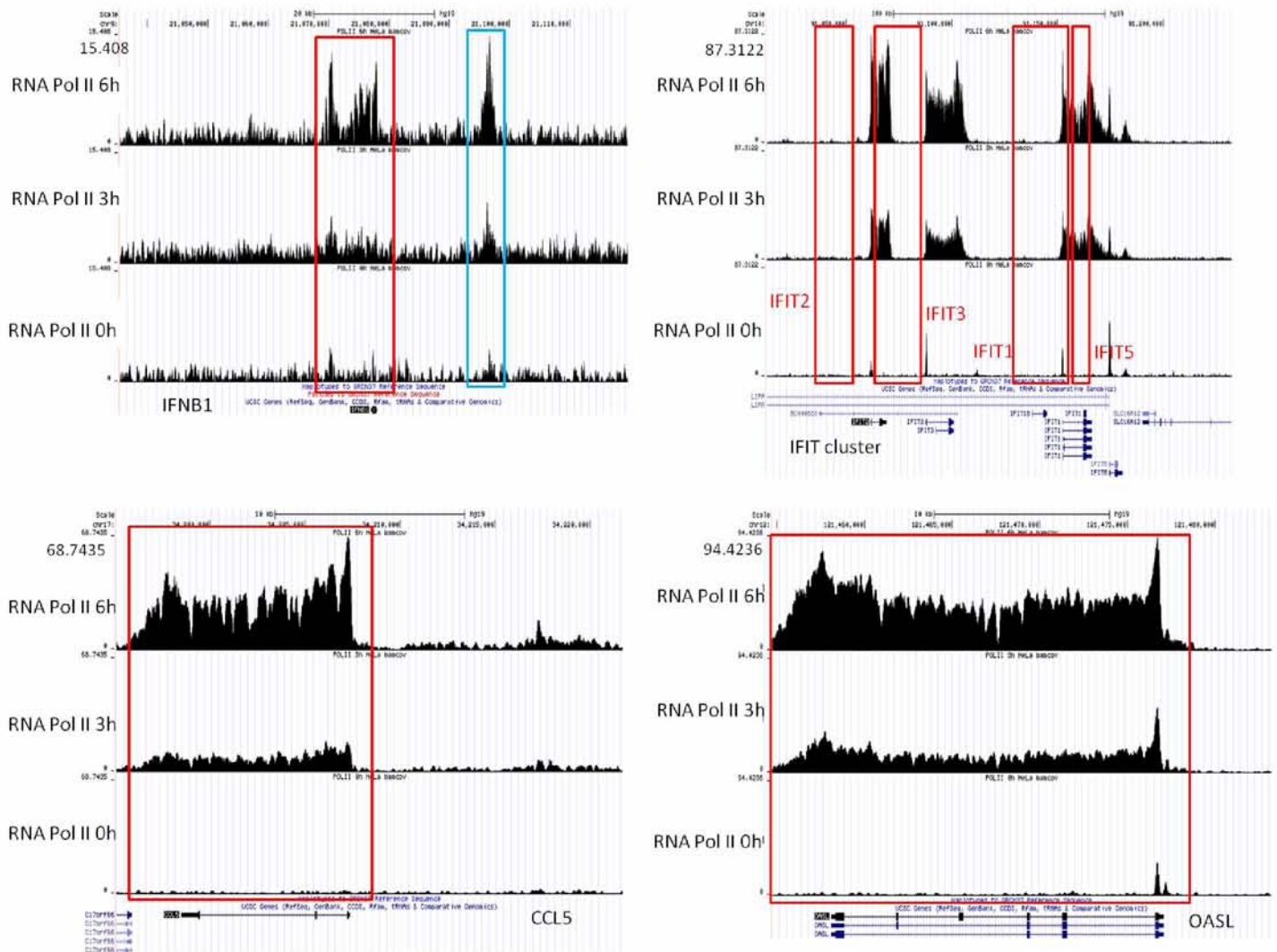
Στη συνέχεια αναζητήθηκαν τα γονίδια *MYOD* και *AFM*, τα οποία δεν εκφράζονται στα κύτταρα HeLa υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά ούτε και μετά από την έκθεση των κυττάρων σε ιό.



Εικόνα 35: Η ένταση της πρόσδεσης της RNA Pol II γύρω από τα γονίδια *MYOD1* και *AFM*. Τα γονίδια αυτά αποτελούν αρνητικούς στόχους για την πρόσδεση της RNA pol II σε όλα τα χρονικά σημεία που μελετώνται.

Στα γονίδια αυτά, δεν εντοπίζεται σήμα, γεγονός που συμφωνεί με την μη έκφραση των γονιδίων αυτών σε κανένα χρονικό σημείο πριν ή μετά την ιϊκή μόλυνση (Εικόνα 35).

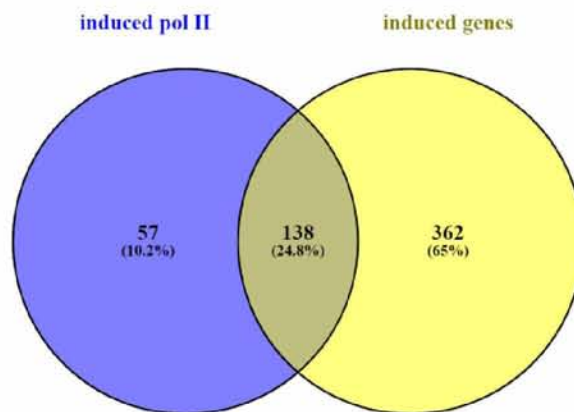
Ακολούθως μελετήθηκαν ορισμένα γονίδια τα οποία σχετίζονται άμεσα με την αντιϊκή απόκριση. Τα γονίδια αυτά συμπεριλαμβάνουν το γονίδιο της *ιντερφερόνης β*, τα επαγόμενα από την ιντερφερόνη γονίδια *IFIT* (1, 2, 3 και 5) και *OASL* αλλά και το γονίδιο της χημοκίνης *CCL5*.



Εικόνα 36: Ένταση της πρόσδεσης της RNA Pol II γύρω από τα γονίδια *IFNB1*, *IFIT*, *CCL5* και *OASL*. Η πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II αυξάνεται κατόπιν της ιϊκής μόλυνσης, στους υποκινητές αλλά και στην κωδική αλληλουχία των γονιδίων (περιοχές που περιβάλλονται από κόκκινα πλαίσια). Το γαλάζιο πλαίσιο ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί την *IFNB1* περιέχει την αλληλουχία ενός ενισχυτή του γονιδίου αυτού. Η πρόσδεση της RNA Pol II και σε αυτή την περιοχή εμφανίζει επαγόμενη αύξηση μετά από ιϊκή μόλυνση.

Στις αλληλουχίες των γονιδίων αυτών εντοπίζεται αύξηση της τιμής του κανονικοποιημένου RNA Pol II σήματος, κατά την πρόοδο της αντι-ιϊκής απόκρισης των κυττάρων HeLa. Επιπλέον ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου της ιντερφερόνης β σε απόσταση 20kb παρατηρείται αύξηση του σήματος με επαγόμενο από την ιϊκή μόλυνση τρόπο (Εικόνα 36). Η περιοχή αυτή αντιστοιχεί στον -20kb ενισχυτή της ιντερφερόνης β. Επομένως και σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία η RNA Pol II προσδένεται και σε αλληλουχίες πιθανών ενισχυτών ρυθμίζοντας σε πολλές περιπτώσεις την παραγωγή μεταγράφων από τους ίδιους τους ενισχυτές (eRNAs) (Banninger & Reich, 2004).

Επιπρόσθετα, μέσω του προγράμματος Venny, γίνεται σύγκριση ανάμεσα στην λίστα των γονιδίων στα οποία η RNA Pol II έχει επαγόμενη πρόσδεση 6 ώρες μετά τη μόλυνση και στα γονίδια των οποίων η έκφραση επάγεται 6 ώρες, σύμφωνα με πείραμα RNA-seq το οποίο έχει πραγματοποιηθεί στα πλαίσια του προγράμματος «Decoding a human Antiviral Gene expression Program».

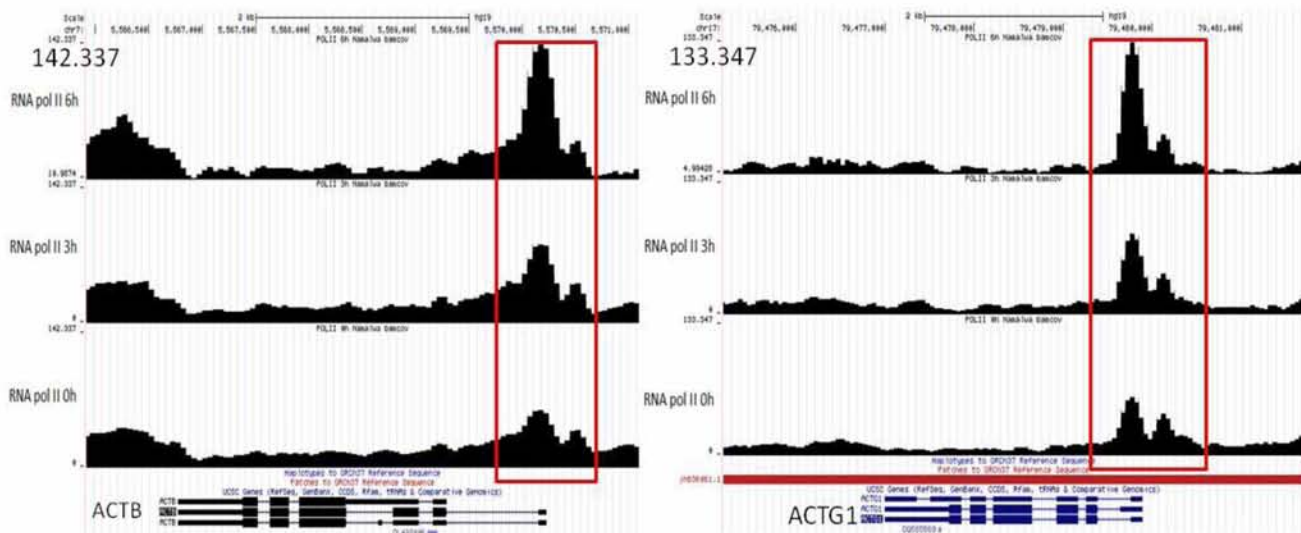


Εικόνα 37: Σύγκριση της λίστας των γονιδίων που επάγονται 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση, όπως προκύπτει από RNA-seq πείραμα (κίτρινο), με την λίστα των γονιδίων στα οποία εντοπίζεται επαγόμενη πρόσδεση RNA pol II (μπλέ) σε κύτταρα HeLa στο ίδιο χρονικό σημείο μετά την μόλυνση. Τα 138 από τα 195 συνολικά γονίδια στα οποία εντοπίζεται επαγόμενη πρόσδεση RNA pol II επάγονται μετά από τη μόλυνση.

Από τη σύγκριση αυτή προκύπτει ότι το μεγαλύτερο μέρος των γονιδίων στα οποία επάγεται η πρόσδεση της RNA Pol II (138/195) ταυτίζονται με γονίδια τα οποία ενεργοποιούνται μετά την μόλυνση (Εικόνα 37). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την ειδικότητα της ανακατανομής της RNA Pol II κατά την ιϊκή μόλυνση και επίσης επιβεβαιώνει την ιδέα που συνοδεύει την παρούσα μελέτη πως τα γεγονότα που ακολουθούν την ιϊκή μόλυνση είναι συχνά αυστηρώς επαγόμενα.

Αποτελέσματα αλληλούχισης RNA Pol II ChIP σε κύτταρα Namalwa

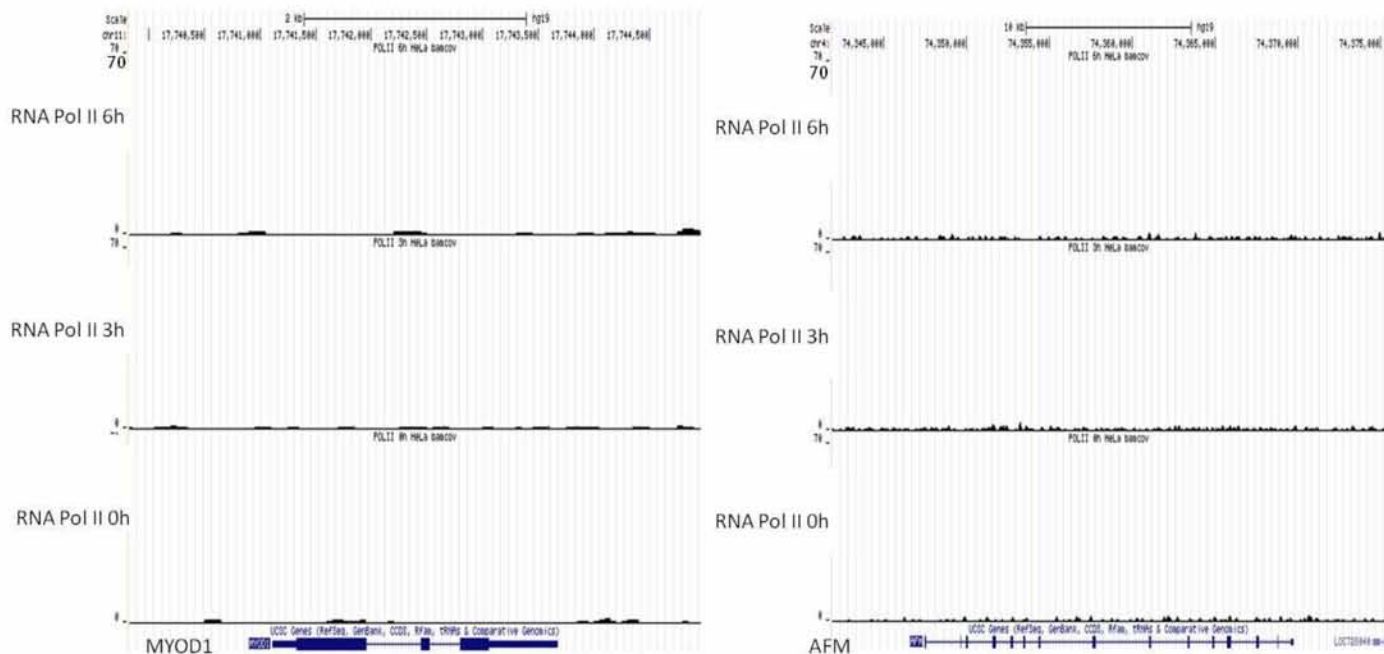
Μετά την αλληλούχιση των βιβλιοθηκών του πειράματος ChIP έναντι της RNA Pol II σε κύτταρα Namalwa, έγινε αναζήτηση του σήματος γύρω από τα διαρκώς εκφραζόμενα γονίδια *ACTB* και *ACTG1*. Σε αυτούς τους γονιδιακούς τόπους αναμένεται η παρουσία ισχυρού σήματος πρόσδεσης της RNA Pol II η οποία πραγματοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων αυτών.



Εικόνα 38: Η ένταση της πρόσδεσης της RNA Pol II γύρω από τις περιοχές των γονιδίων *ACTB* και *ACTG1*. Εντοπίζεται σήμα μεγάλης έντασης στις αλληλουχίες των υποκινητών, αλλά και κατά μήκος της κωδικής περιοχής των γονιδίων αυτών. Αυτή η εικόνα είναι αποτέλεσμα του γεγονότος της ολίσθησης της RNA Pol II κατά μήκος ενός γονιδίου στην διάρκεια της μεταγραφής του.

Πράγματι, στους υποκινητές των γονιδίων αυτών εντοπίζεται υψηλό και σταθερό έντασης σήμα και για τα τρία χρονικά σημεία που μελετώνται (Εικόνα 38).

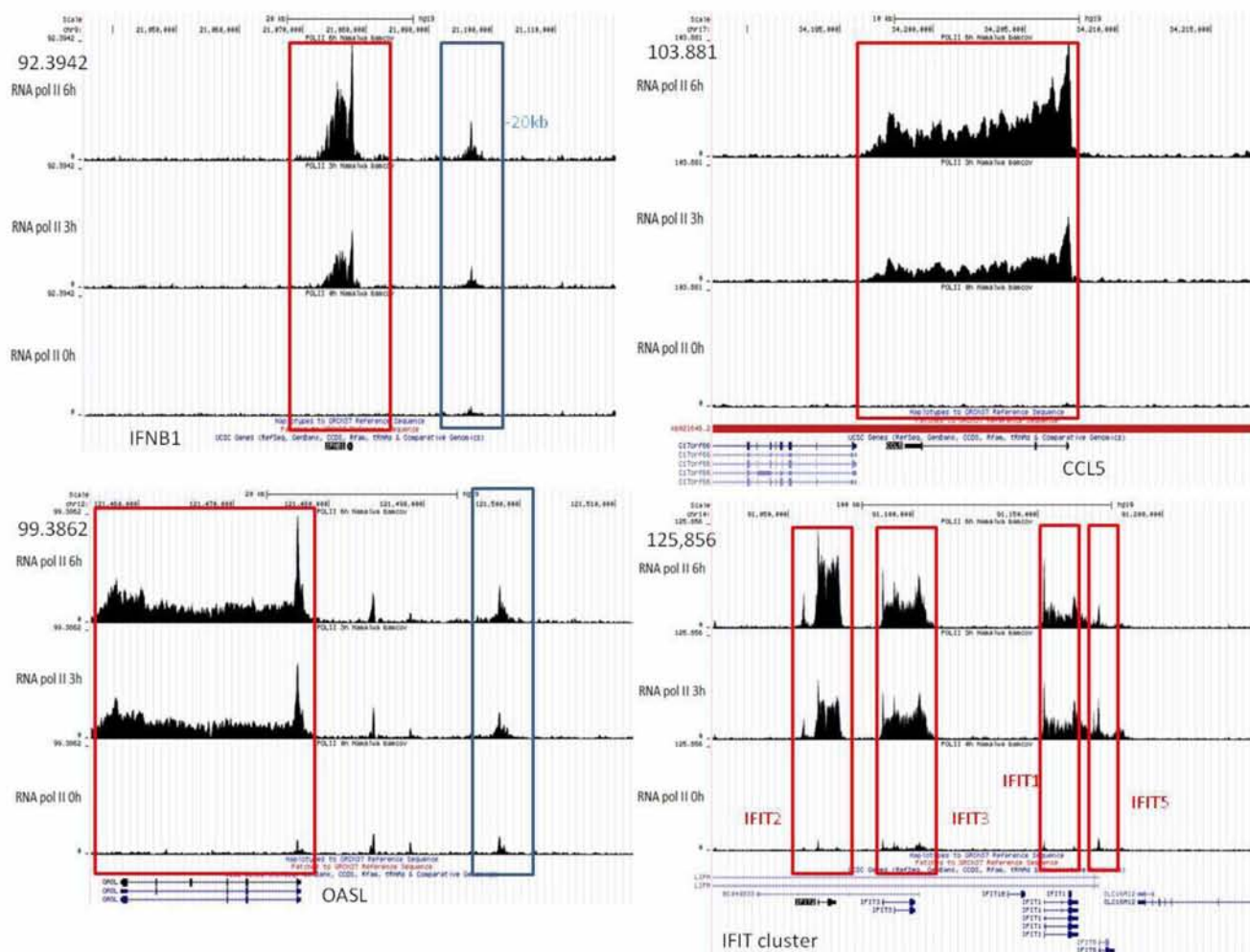
Επίσης πραγματοποιήθηκε μελέτη του σήματος γύρω από τα γονίδια *MYOD1* και *AFM*, τα οποία αποτελούν αρνητικούς στόχους της RNA Pol II στα κύτταρα της σειράς Namalwa.



Εικόνα 39: Η ένταση της πρόσδεσης της RNA Pol II γύρω από τα γονίδια *MYOD1* και *AFM*. Τα γονίδια αυτά αποτελούν αρνητικούς στόχους για την πρόσδεση της RNA pol II σε όλα τα χρονικά σημεία μελέτης.

Το αποτέλεσμα που προέκυψε καταδεικνύει την ειδικότητα του πειράματος καθώς δεν εντοπίζεται σήμα σε αυτές τις γονιδιακές περιοχές (Εικόνα 39). Επιπρόσθετα το γονίδιο *MYOD1* έχει ήδη επιβεβαιωθεί ως αρνητικός στόχος για την πρόσδεση της RNA Pol II, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο που πραγματοποιήθηκε μετά την ολοκλήρωση της ανοσοκατακρήμνισης.

Επιπλέον για να διαπιστωθεί εάν η RNA Pol II παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα πρόσδεσης σε ιικά επαγόμενα γονίδια κατά τη πρόοδο της αντι-ϊικής απόκρισης ελέγχθηκαν οι περιοχές των γονιδίων *IFNB1*, *CCL5*, *OASL* και της οικογένειας *IFIT*.



Εικόνα 40: Η ένταση της πρόσδεσης της RNA Pol II γύρω από τα γονίδια *IFNB1*, *CCL5*, *OASL* και της οικογένειας *IFIT*. Η πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II αυξάνεται κατόπιν της ιικής μόλυνσης, στους υποκινητές αλλά και στην κωδική αλληλουχία των γονιδίων (περιοχές που περιβάλλονται από κόκκινα πλαίσια). Το γαλάζιο πλαίσιο ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί την *IFNB1* περιέχει την αλληλουχία ενός ενισχυτή του γονιδίου αυτού. Ομοίως, με γαλάζιο πλαίσιο περιβάλλεται και η ένταση σε μία περιοχή ανοδικά του γονιδίου *OASL*, η οποία αποτελεί πιθανό ενισχυτή του γονιδίου αυτού. Η πρόσδεση της RNA Pol II και σε αυτή την περιοχή εμφανίζει επαγόμενη αύξηση μετά από την ιική μόλυνση.

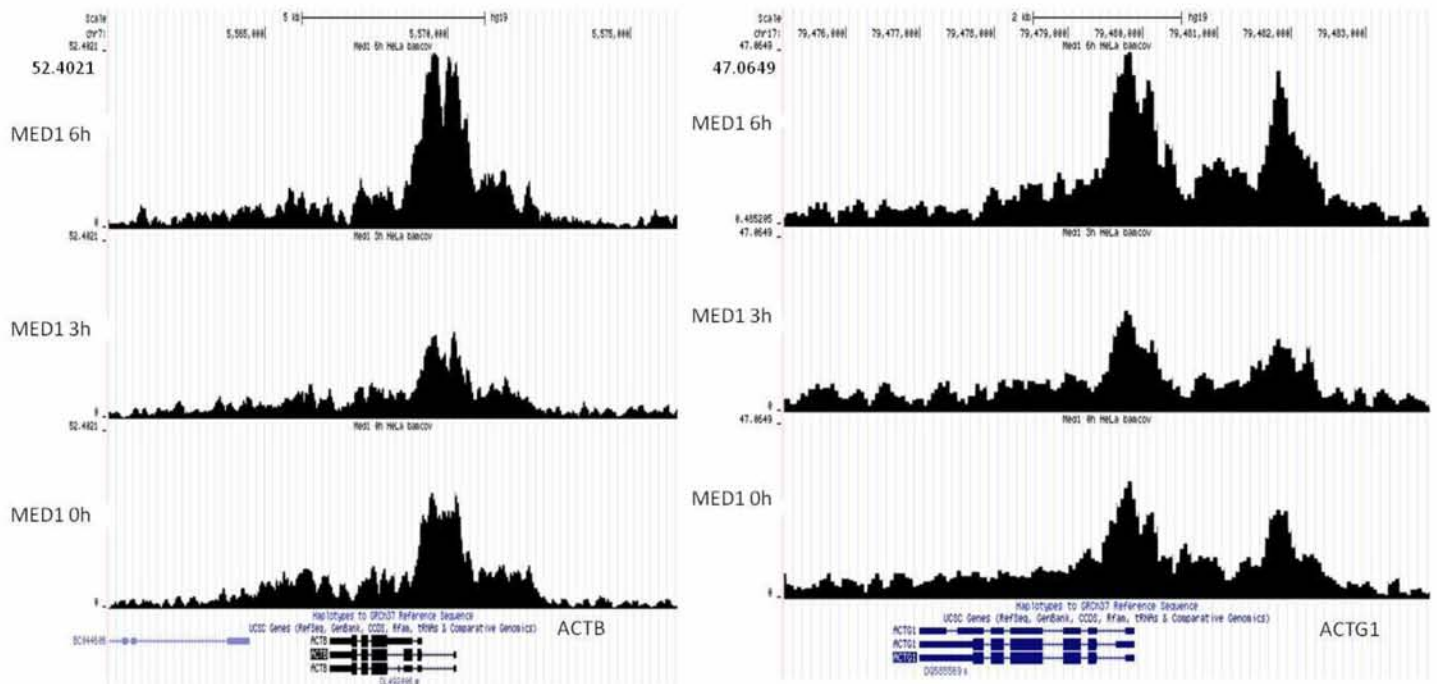
Η ένταση του σήματος σε αυτές τις περιοχές εμφανίζεται να επάγεται από την ιική μόλυνση των κυττάρων, με το σήμα να είναι αυξημένο 3 και 6 ώρες μετά την ιική μόλυνση. Το σήμα αυτό εκτός από την περιοχή των υποκινητών των γονιδίων εντοπίζεται σε όλο το μήκος της κωδικής περιοχής τους αλλά με μικρότερη ένταση. Η εικόνα αυτή είναι αποτέλεσμα της ολίσθησης του ενζύμου RNA Pol II κατά μήκος του γονιδίου όσο αυτό πραγματοποιεί την σύνθεση του μεταγράφου με μήτρα την αλληλουχία του γονιδίου (Εικόνα 40).

Αποτελέσματα αλληλούχισης Med1 ChIP σε HeLa

Εκτός από τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, όπως προαναφέρθηκε πραγματοποιήθηκε και ανάλυση

των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης στα ευρύτερα πλαίσια του προγράμματος μέρος του οποίου αποτελεί η εργασία αυτή. Ένα από τα πειράματα για τα οποία πραγματοποιήθηκε αυτή η διαδικασία είναι το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης με στόχο την υπομονάδα MED1 του συμπλόκου του συνενεργοποιητή Mediator.

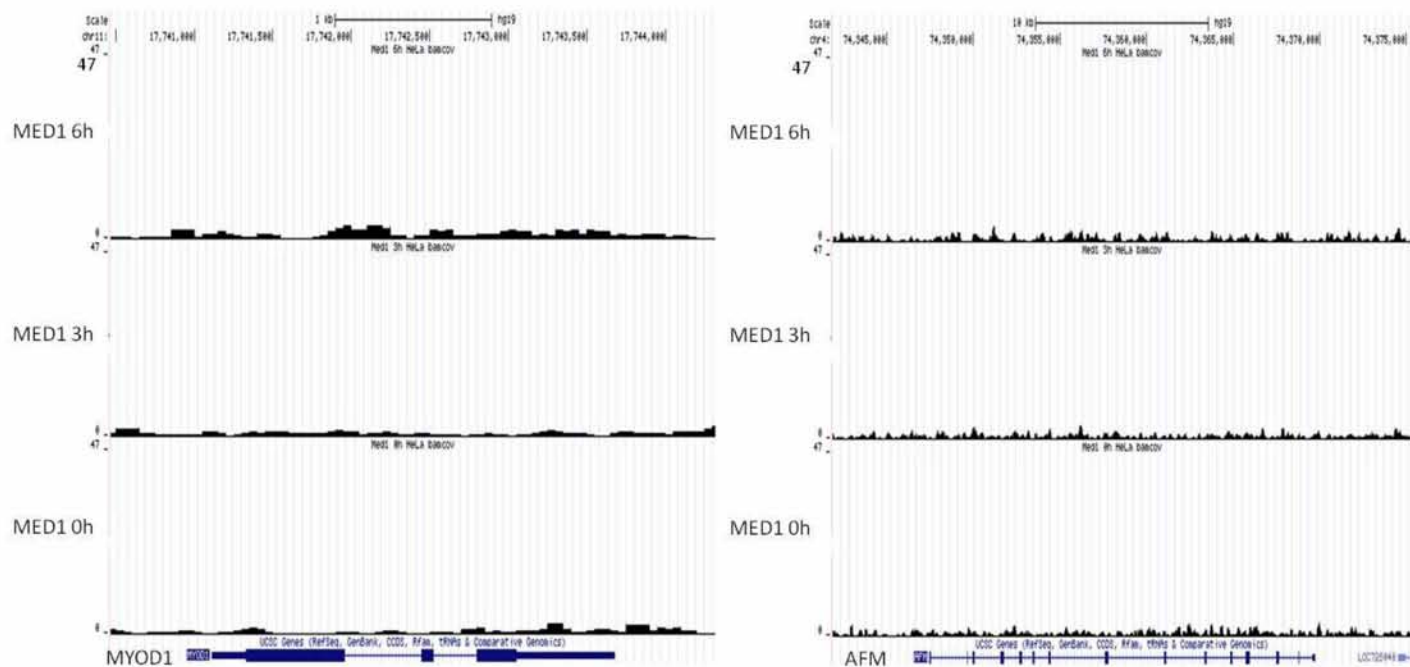
Αρχικά ελέγχθηκε η πρόσδεση του παράγοντα στις περιοχές των εκφραζόμενων γονιδίων *ACTB* και *ACTG1*.



Εικόνα 41: Η ένταση της πρόσδεσης του MED1 γύρω από τα γονίδια *ACTB* και *ACTG1*. Εντοπίζεται αυξημένο σήμα στις αλληλουχίες των υποκινητών αυτών των γονιδίων και ανοδικά από αυτές.

Από τον εντοπισμό και την παρατήρηση του σήματος σε αυτές τις περιοχές προκύπτει ότι τα housekeeping γονίδια *ACTB* και *ACTG1* αποτελούν θετικούς στόχους της υπομονάδας MED1 του συμπλόκου του Mediator. Παρατηρείται μία μικρή ανισορροπία ανάμεσα στις εντάσεις των σημάτων που αντιστοιχούν στα τρία χρονικά σημεία που μελετώνται γεγονός που υποδηλώνει μία μικρή διαβάθμιση ποιότητας ανάμεσα στο υλικό των τριών βιβλιοθηκών που δημιουργήθηκαν, με τις χαμηλότερες τιμές να αντιστοιχούν στο δείγμα των 3 ωρών μετά την ιική μόλυνση (Εικόνα 41).

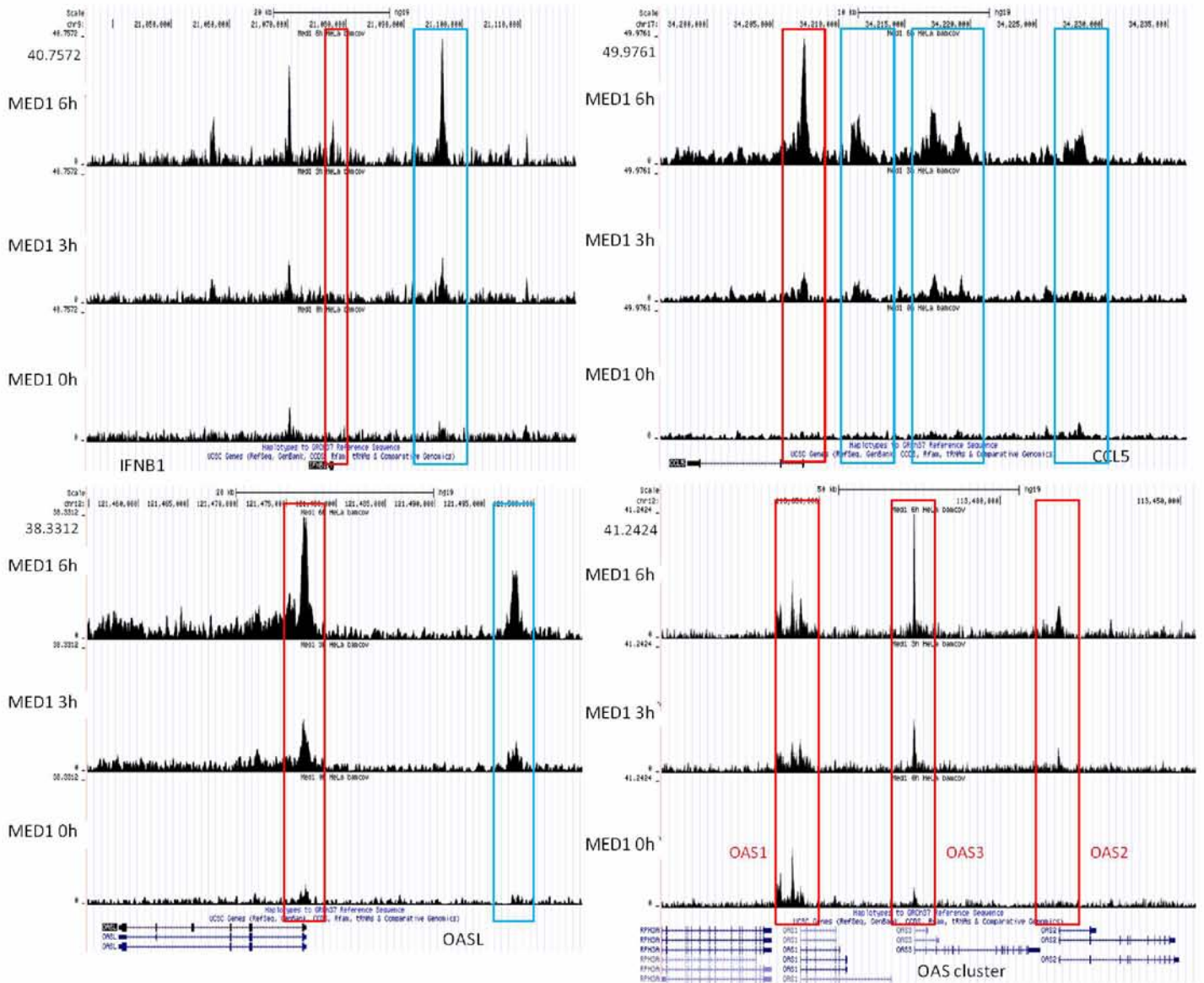
Επίσης παρατηρήθηκαν οι γονιδιακοί τόποι των μη εκφραζόμενων, στα κύτταρα HeLa γονιδίων, *MYOD1* και *AFM*. Στα γονίδια αυτά αναμένεται να μην εντοπίζεται σήμα πρόσδεσης της υπομονάδας *MED1*.



Εικόνα 42: Η ένταση της πρόσδεσης του MED1 γύρω από τα γονίδια *MYOD1* και *AFM*. Δεν εντοπίζεται σήμα σε αυτά τα γονίδια και αποτελούν αρνητικό στόχο για την πρόσδεση του MED1.

Σύμφωνα με το αναμενόμενο αποτέλεσμα, στις περιοχές αυτών των γονιδίων δεν εντοπίζεται σήμα (Εικόνα 42).

Στη συνέχεια μελετήθηκε το πρότυπο πρόσδεσης του MED1 σε συγκεκριμένα γονίδια που σχετίζονται με την απόκριση των κυττάρων στην ιϊκή μόλυνση, όπως η ιντερφερόνη β, το *CCL5*, το *OASL* και τα *OAS*.

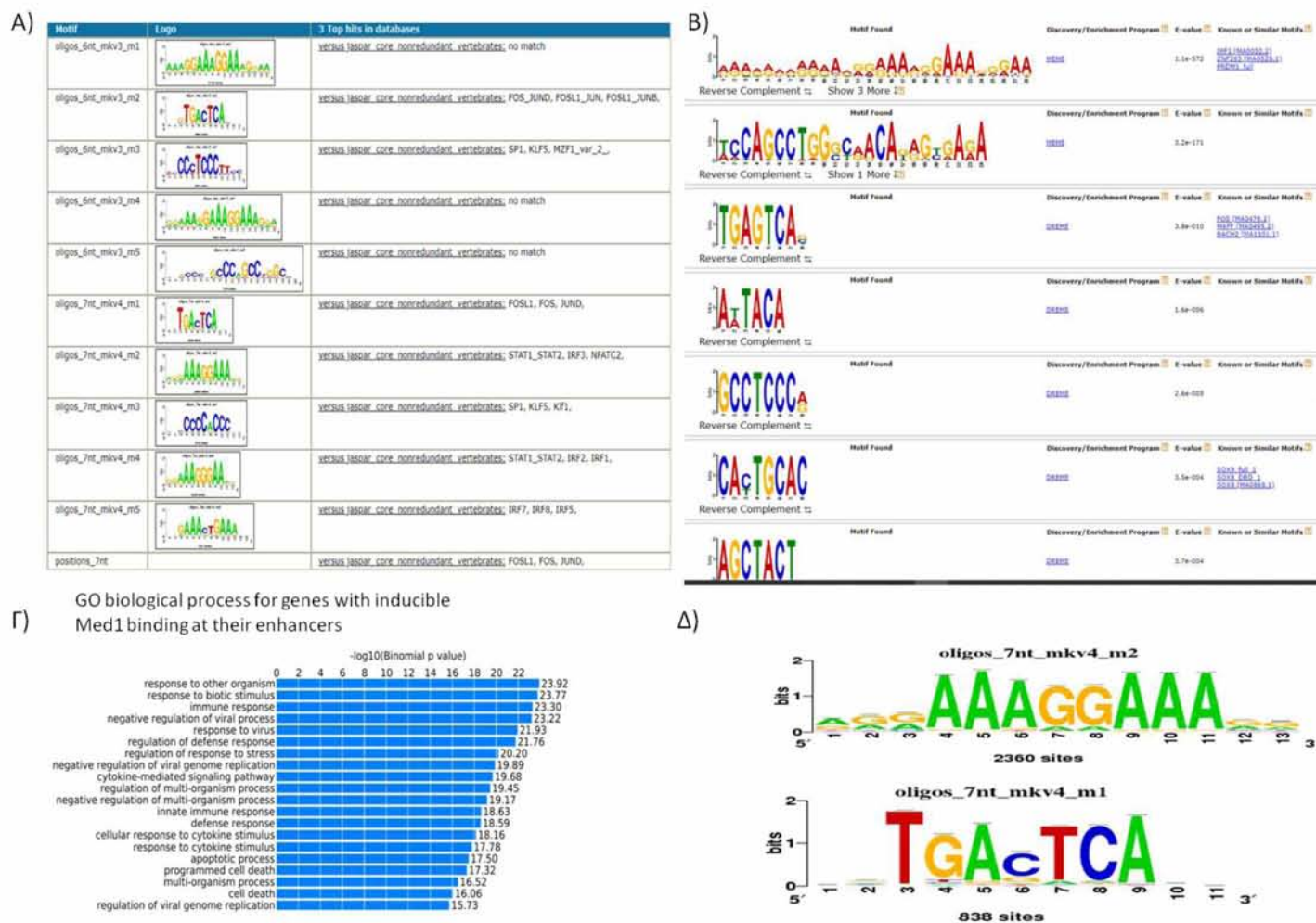


Εικόνα 43: Η ένταση της πρόσδεσης του MED1 γύρω από τα γονίδια *IFNB1*, *CCL5*, *OASL* και *OAS*. Παρατηρείται επαγόμενη πρόσδεση του παράγοντα MED1 στην περιοχή του υποκινητή (κόκκινο πλαίσιο) του γονιδίου της ιντερφερόνης β αλλά και 20 κιλοβάσεις ανοδικά από αυτόν στην περιοχή του απομακρυσμένου ενισχυτή. Παρόμοια εικόνα εμφανίζεται και στην ευρύτερη περιοχή του *OASL* με μία κορυφή να εντοπίζεται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου (κόκκινο πλαίσιο) και μία δεύτερη ανοδικά αυτής η οποία σηματοδοτεί μία περιοχή πιθανού ενισχυτή αυτού του γονιδίου. Στο γονίδιο *CCL5* εμφανίζεται μία κορυφή επαγόμενου σήματος στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου (κόκκινο πλαίσιο) και σε τρεις πιθανούς ενισχυτές και τέλος τα γονίδια *OAS1*, *OAS2* και *OAS3* εμφανίζουν επαγόμενη πρόσδεση του παράγοντα MED1 σε περιοχές των υποκινητών τους (εντός των κόκκινων πλαισίων).

Όλα αυτά τα γονίδια παρουσιάζουν επαγόμενη σύνδεση του παράγοντα στην αλληλουχία του υποκινητή τους ενώ το γονίδιο της ιντερφερόνης β και το γονίδιο *OASL* εμφανίζουν μία κορυφή ανοδικά του υποκινητή τους, η τιμή της οποίας αυξάνεται όσο προοδεύει η ιική μόλυνση. Στο γονίδιο της ιντερφερόνης αυτή η περιοχή αντιστοιχεί στον ενισχυτή του γονιδίου και αντίστοιχα η περιοχή ανοδικά του υποκινητή του *OASL* αποτελεί πιθανό ενισχυτή. Επιπλέον παρατηρείται η ύπαρξη τριών πιθανών ενισχυτών άνωθεν του *CCL5* (Εικόνα 43).

Σε επόμενο στάδιο της ανάλυσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοτίβων (Εικόνα 44) σε θέσεις πιθανών ενισχυτών στους οποίους εντοπίζεται επαγόμενη πρόσδεση της υπομονάδας MED1 με σκοπό τον εντοπισμό

θέσεων πρόσδεσης άλλων μεταγραφικών παραγόντων στα μοτίβα αυτά και πιθανούς μηχανισμούς ρύθμισης της μεταγραφικής ενεργοποίησης στην οποία συμμετέχουν περισσότεροι από ένας μεταγραφικοί παράγοντες.

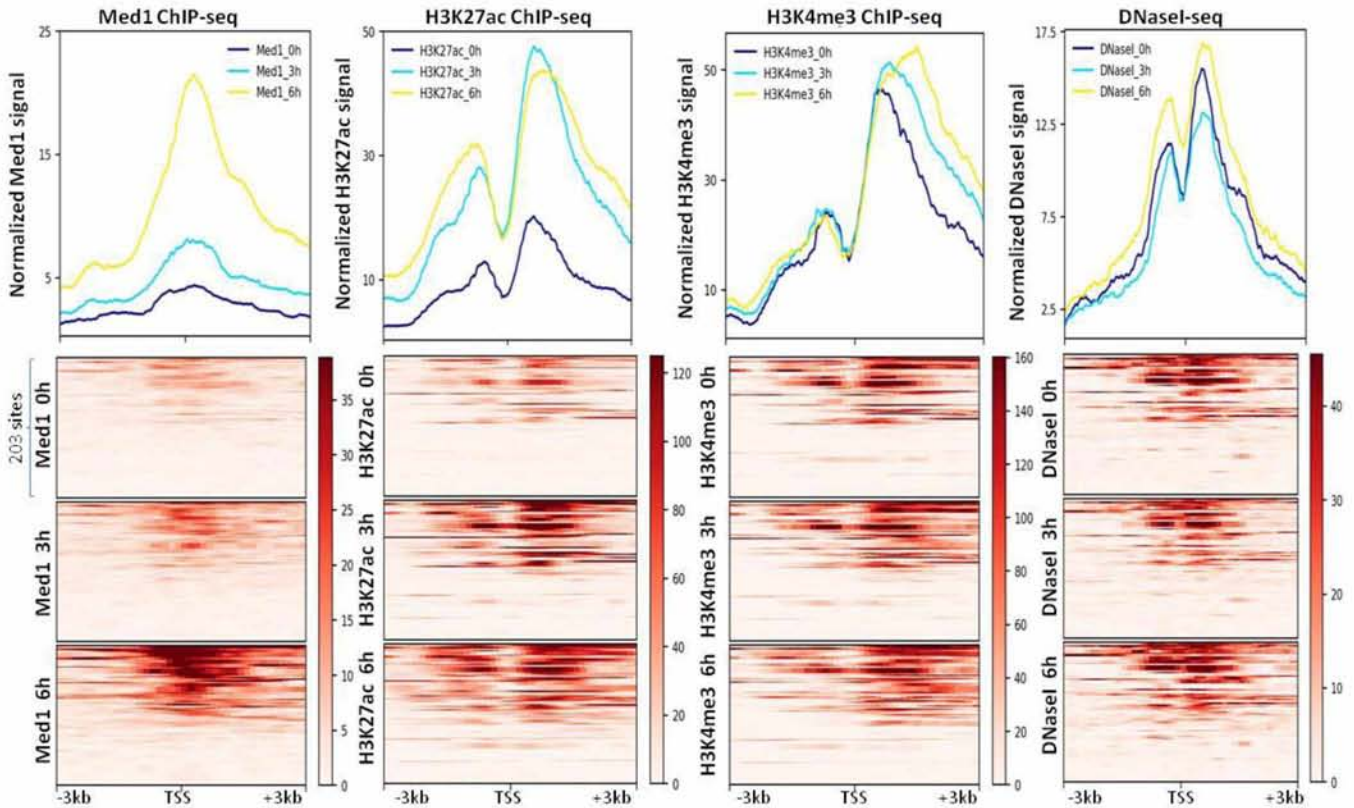


Εικόνα 44: (A,B) Μοτίβα πρόσδεσης MED1 σε επαγόμενους ενισχυτές όπως προκύπτει από δύο διαφορετικά προγράμματα ανάλυσης μοτίβων. (Γ) Κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται τα γονίδια που ρυθμίζονται από αυτούς τους ενισχυτές. (Δ) Τα μοτίβα πρόσδεσης των IRF παραγόντων (πάνω) και των παραγόντων STAT (κάτω) τα οποία παρουσιάζονται εμπλουτισμένα σε αυτές τις αλληλουχίες.

Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των μοτίβων που εντοπίζονται στις αλληλουχίες πιθανών ενισχυτών αποτελούν θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργοποίησης μετά την ιϊκή μόλυνση όπως FOS, JUN, IRFs και STAT. Τα εγγύτερα σε αυτούς τους ενισχυτές γονίδια, των οποίων η μεταγραφική ενεργοποίηση πιθανότατα ρυθμίζεται από τους ενισχυτές αυτούς, σχετίζονται, με μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα με λειτουργίες της ανοσολογικής απόκρισης.

Για την πιο σφαιρική μελέτη των θέσεων πρόσδεσης της υπομονάδας MED1 του συμπλόκου του μεταγραφικού συνενεργοποιητή Mediator πραγματοποιήθηκε δημιουργία τοπολογικών χαρτών γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής κοντά στις οποίες εντοπίζεται πρόσδεση του παράγοντα MED1 (Εικόνα 45). Οι τοπολογικοί χάρτες αυτοί κατασκευάστηκαν με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχησης από πειράματα ChIP-seq έναντι των ιστονικών τροποποιήσεων H3K27ac και H3K4me3 αλλά και από DNaseI-seq.

MED1 inducible promoters

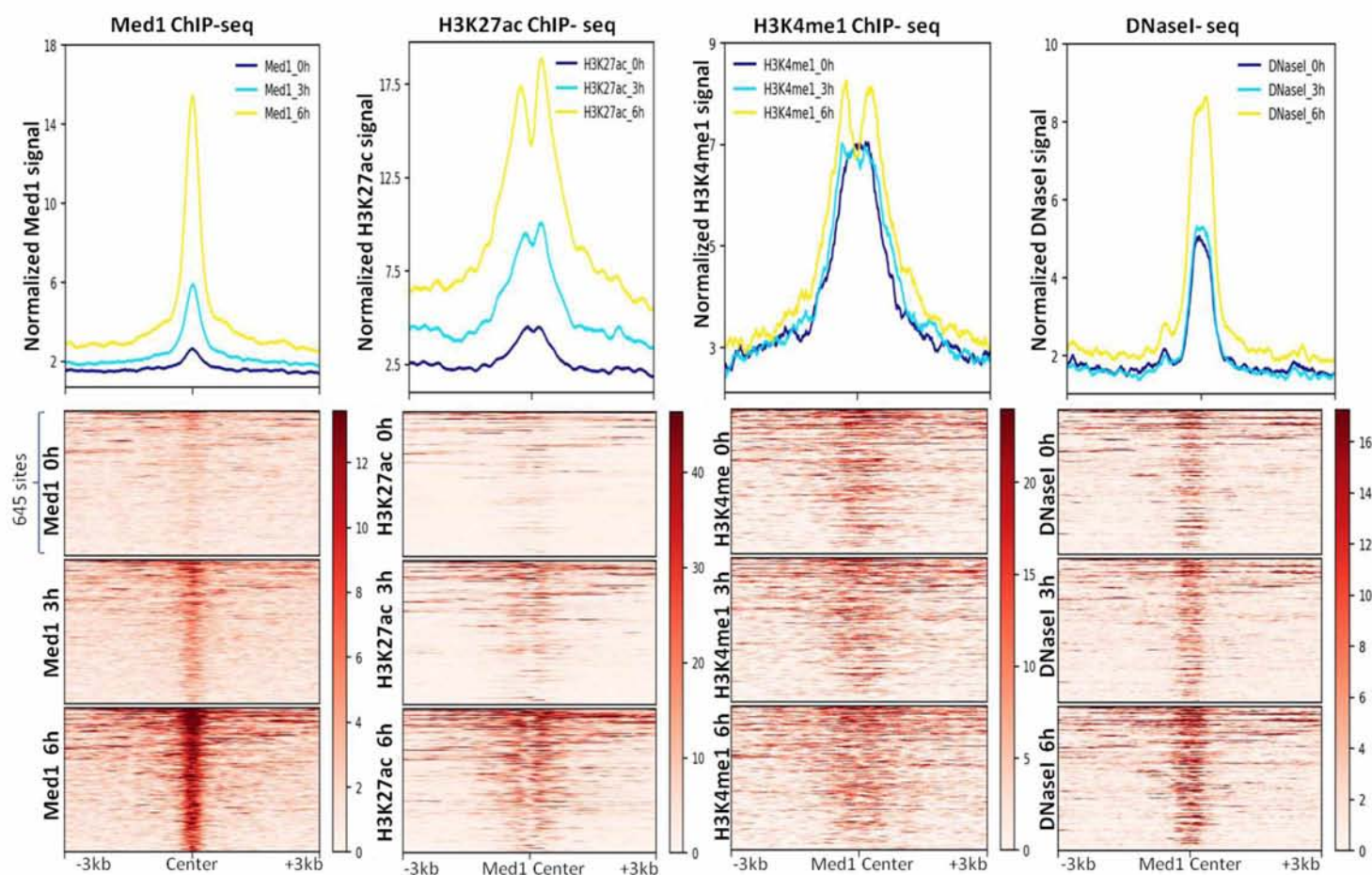


Εικόνα 45: Heat maps στους οποίους παρουσιάζεται η κατανομή του σήματος από πειράματα ChIP-seq για το παράγοντα MED1, τις ιστονικές τροποποιήσεις H3K27ac και H3K4me3 και πείραμα DNaseI, γύρω από 203 θέσεις έναρξης μεταγραφής κοντά στις οποίες εντοπίζεται επαγόμενη πρόσδεση του παράγοντα MED1. Παρατηρείται πως εκατέρωθεν των θέσεων αυτών εντοπίζονται νουκλεοσώματα τα οποία διαθέτουν ιστόνες H3 με ακετυλίωση στην λυσίνη 27 και τριμεθυλίωση στην λυσίνη 4. Επιπλέον οι θέσεις στις οποίες πραγματοποιείται η πρόσδεση του MED1 είναι χρωματινικές περιοχές με, προϋπάρχουσα της ιϊκής μόλυνσης, στις περισσότερες περιπτώσεις, ανοιχτή διαμόρφωση.

Τα αποτελέσματα της δημιουργίας των τοπολογικών αυτών χαρτών, υποδεικνύουν πως η πρόσδεση του παράγοντα MED1 σε υποκινητές, επάγεται μετά από την ιϊκή μόλυνση. Οι περιοχές στις οποίες εντοπίζεται η πρόσδεση του παράγοντα MED1 διαθέτουν νουκλεοσώματα τα οποία έχουν ιστόνες με τις τροποποιήσεις H3K27ac και H3K4me3 και είναι προσβάσιμες ήδη πριν από την ιϊκή μόλυνση. Αξίζει να σημειωθεί η αύξηση των επιπέδων H3K27ac κατά την εξέλιξη της αντιϊκής απόκρισης στους υποκινητές που παρουσιάζουν επαγόμενη MED1 πρόσδεση.

Επίσης κατασκευάστηκαν τοπολογικοί χάρτες για τις περιοχές εντός και εκτός γονιδίων, οι οποίες είναι απομακρυσμένες από θέσεις έναρξης της μεταγραφής, και στις οποίες εντοπίζεται πρόσδεση του παράγοντα MED1. Αυτοί οι χάρτες έχουν ως κέντρο τους την θέση πρόσδεσης του παράγοντα MED1 με βάση τα δεδομένα από την αλληλούχιση πειραμάτων ChIP-seq με στόχο τις ιστονικές τροποποιήσεις H3K27ac και H3K4me1, και πειραμάτων DNaseI-seq (Εικόνα 46).

MED1 inducible enhancers

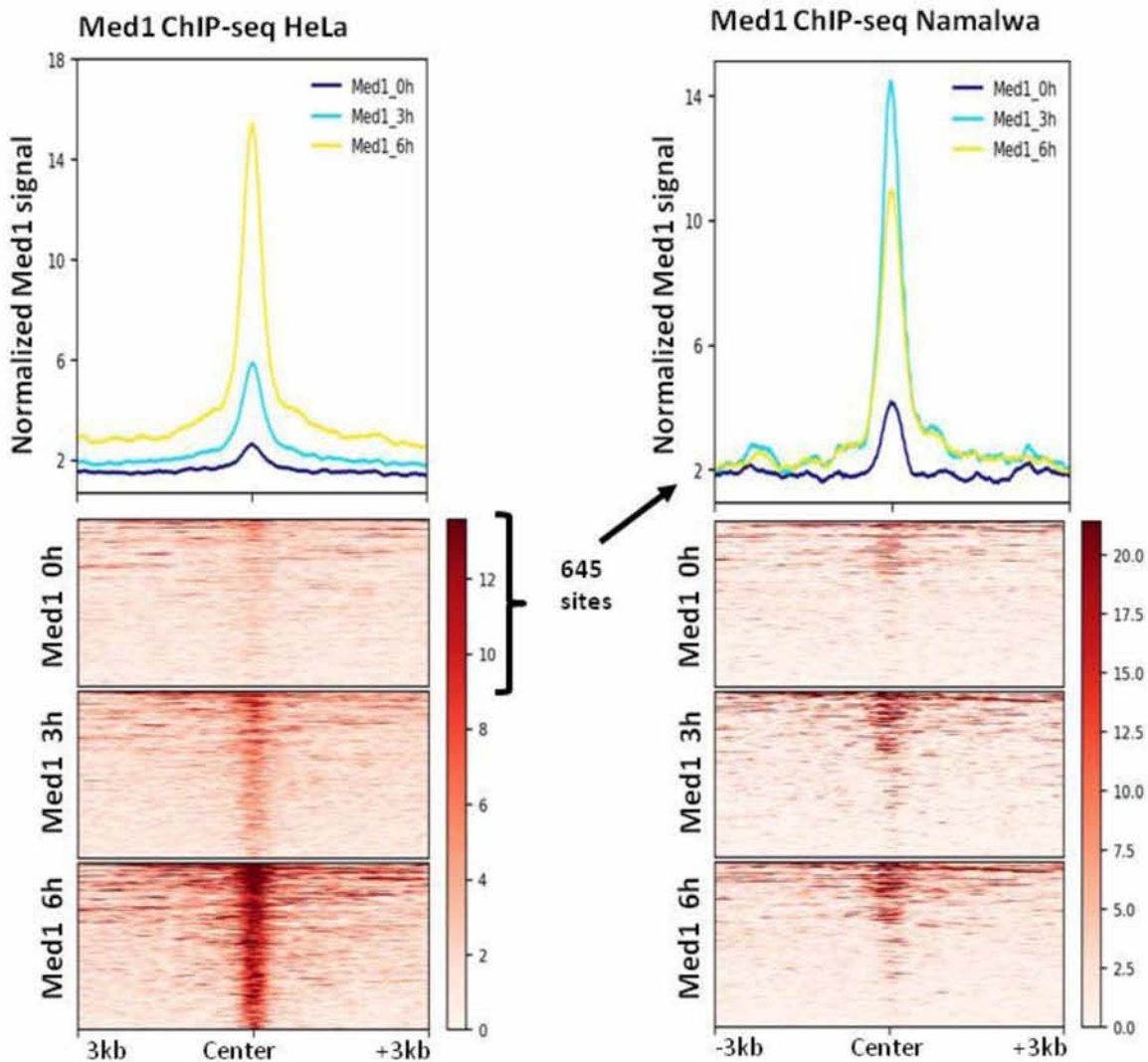


Εικόνα 46: Heat maps στους οποίους παρουσιάζεται η κατανομή του σήματος από πειράματα ChIP-seq για τον παράγοντα MED1, H3K27ac και H3K4me1 και πειράματα DNaseI-seq γύρω από τις θέσεις επαγόμενης πρόσδεσης του παράγοντα MED1. Η πρόσδεση του παράγοντα MED1 επάγεται μετά από την ιϊκή μόλυνση και οι θέσεις πρόσδεσης του περιβάλλονται από νουκλεοσώματα που περιέχουν ιστόνη H3 με ακετυλίωση στη λυσίνη 27, τα επίπεδα της οποίας αυξάνονται μετά την ιϊκή μόλυνση. Γύρω από αυτές τις θέσεις εντοπίζονται και νουκλεοσώματα που περιέχουν ιστόνη H3 με μεθυλίωση στη λυσίνη 4, η παρουσία των οποίων είναι σταθερή πριν και μετά την ιϊκή μόλυνση. Επιπλέον η προσβασιμότητα της χρωματίνης στις θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα MED1, παρουσιάζει αύξηση μετά την μόλυνση των κυττάρων.

Σύμφωνα με τον θερμικό χάρτη που δημιουργήθηκε με βάση τα δεδομένα από την αλληλούχιση του πειράματος ChIP-seq με στόχο τον παράγοντα MED1, η πρόσδεση αυτού επάγεται μετά την ιϊκή μόλυνση, σε 645 θέσεις που εντοπίζονται εντός και εκτός γονιδιακών περιοχών, απομακρυσμένες από υποκινητές γονιδίων, οι οποίες αποτελούν αλληλουχίες πιθανών ενισχυτών. Η υπόθεση ότι οι θέσεις επαγόμενης πρόσδεσης του παράγοντα MED1 εντοπίζονται σε αλληλουχίες ενισχυτών, ενισχύεται από το γεγονός ότι γύρω από αυτές εντοπίζονται νουκλεοσώματα που περιέχουν ιστόνες με τις τροποποιήσεις H3K27ac και H3K4me1, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για ενισχυτές γονιδίων. Η παρουσία των νουκλεοσωμάτων με ιστόνες που περιέχουν την μετα-μεταφραστική τροποποίηση H3K27ac αυξάνεται γύρω από τις περιοχές πρόσδεσης του παράγοντα MED1 μετά από την ιϊκή μόλυνση, ενώ εκείνων που περιέχουν ιστόνες με την τροποποίηση H3K4me1 είναι σταθερή πριν και μετά την μόλυνση. Επιπλέον, η προσβασιμότητα της χρωματίνης στις θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα MED1 είναι αυξημένη 6 ώρες μετά από την μόλυνση των κυττάρων με SeV, όπως προκύπτει από τον θερμικό χάρτη με βάση τα δεδομένα από το DNase-seq πείραμα, γύρω από τις θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα MED1.

Αρχικά για την πιο σφαιρική μελέτη των περιοχών, των πιθανών ενισχυτών, στους οποίους παρατηρείται επαγόμενη από την ιϊκή μόλυνση αύξηση της πρόσδεσης του παράγοντα MED1, πραγματοποιήθηκε δημιουργία θερμικού χάρτη με δεδομένα από πείραμα ChIP-seq έναντι του παράγοντα MED1 σε κύτταρα

Namalwa που είχε πραγματοποιηθεί παλαιότερα στο εργαστήριο (Εικόνα 47). Οι περιοχές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία αυτού του χάρτη ήταν οι 645 περιοχές πιθανών ενισχυτών κυττάρων HeLa, στους οποίους παρατηρείται αύξηση της πρόσδεσης του παράγοντα MED1, μετά από την ιϊκή μόλυνση.



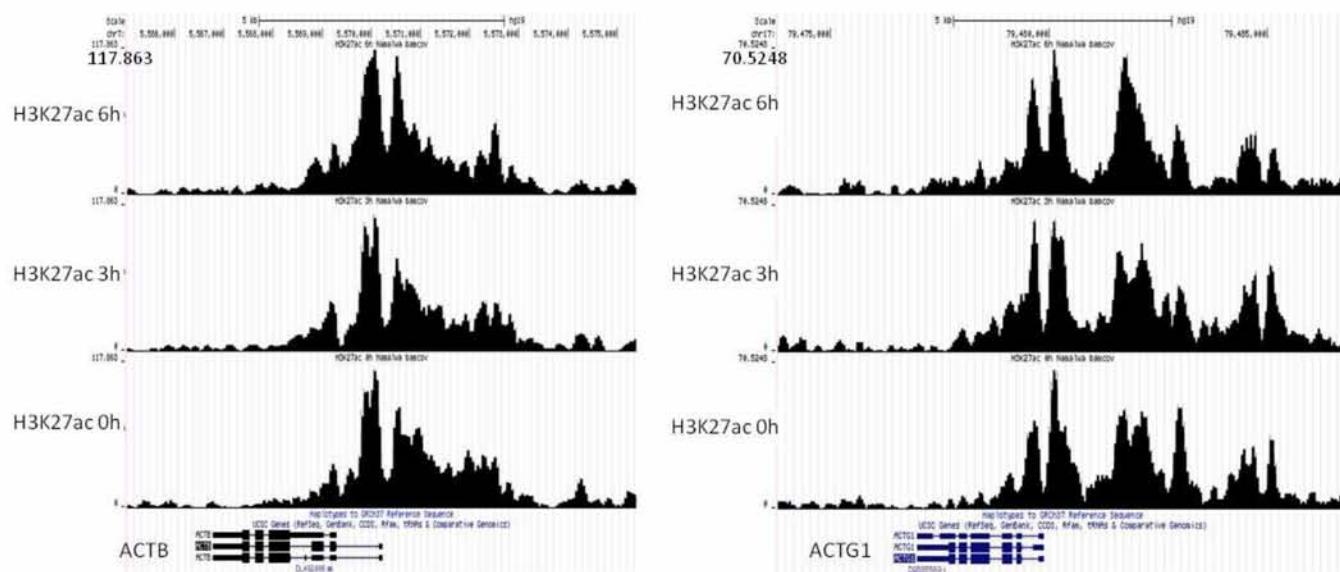
Εικόνα 47: Heat maps στους οποίους παρουσιάζεται η κατανομή του σήματος από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έναντι του παράγοντα MED1 γύρω από τους ενισχυτές με επαγόμενη από την ιϊκή μόλυνση αύξηση του εντοπισμού του MED1 σε κύτταρα HeLa και η ανακατανομή του σήματος στις ίδιες περιοχές σε κύτταρα Namalwa.

Από την ανάλυση αυτή προκύπτει ότι αρκετές περιοχές επαγόμενων MED1 ενισχυτών σε κύτταρα HeLa, εμφανίζουν επαγωγή της πρόσδεσης MED1 και στα κύτταρα Namalwa η οποία μεγιστοποιείται τρεις ώρες μετά από την μόλυνση των κυττάρων με SeV. Σημαντικό είναι να αναφέρουμε πως δεν υπάρχει πλήρης ομοιότητα αλλά μόνο ένα ποσοστό 10-15% είναι επαγόμενο και κοινό για τους δυο κυτταρικούς τύπους. Το εύρημα αυτό συνάδει με την ιδέα που συνοδεύει την παρούσα εργασία πως οι ρυθμιστικές περιοχές ενδέχεται να διαφέρουν για τα ίδια γονίδια σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται από τη συντονισμένη δράση αλληλουχιών και μεταγραφικών ρυθμιστών στο πλαίσιο συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου.

Αποτελέσματα αλληλούχισης H3K27ac ChIP σε Namalwa

Μετά την στοίχιση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης, του DNA που προέκυψε από το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, στο ανθρώπινο γονιδίωμα, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση ορισμένων γονιδίων για να ελεγχθεί η ποιότητα των αποτελεσμάτων.

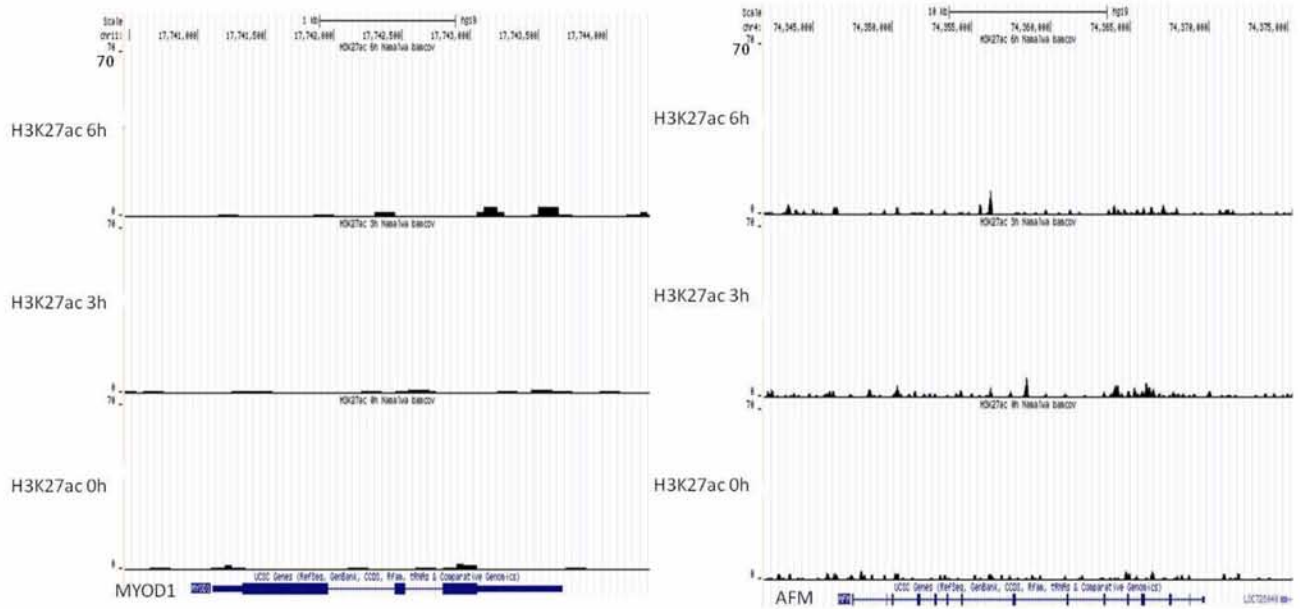
Αρχικά αναζητήθηκαν τα housekeeping γονίδια *ACTB* και *ACTG1*.



Εικόνα 48: Η ένταση του εντοπισμού της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac γύρω από τις περιοχές των γονιδίων *ACTB* και *ACTG1*. Τα γονίδια *ACTB* και *ACTG1* αποτελούν θετικούς στόχους για τον εντοπισμό της ιστονικής τροποποίησης και παρουσιάζεται υψηλή ένταση του σήματος H3K27ac στους υποκινητές αυτών των γονιδίων αλλά και ανοδικά αυτών.

Η ένταση του σήματος H3K27ac στην περιοχή των γονιδίων *ACTB* και *ACTG1* είναι αυξημένη στην περιοχή των υποκινητών τους και ανοδικά από αυτούς (Εικόνα 48). Αυτή η κατανομή του σήματος επιβεβαιώνει την ποιότητα του πειράματος εφόσον τα γονίδια αυτά εκφράζονται.

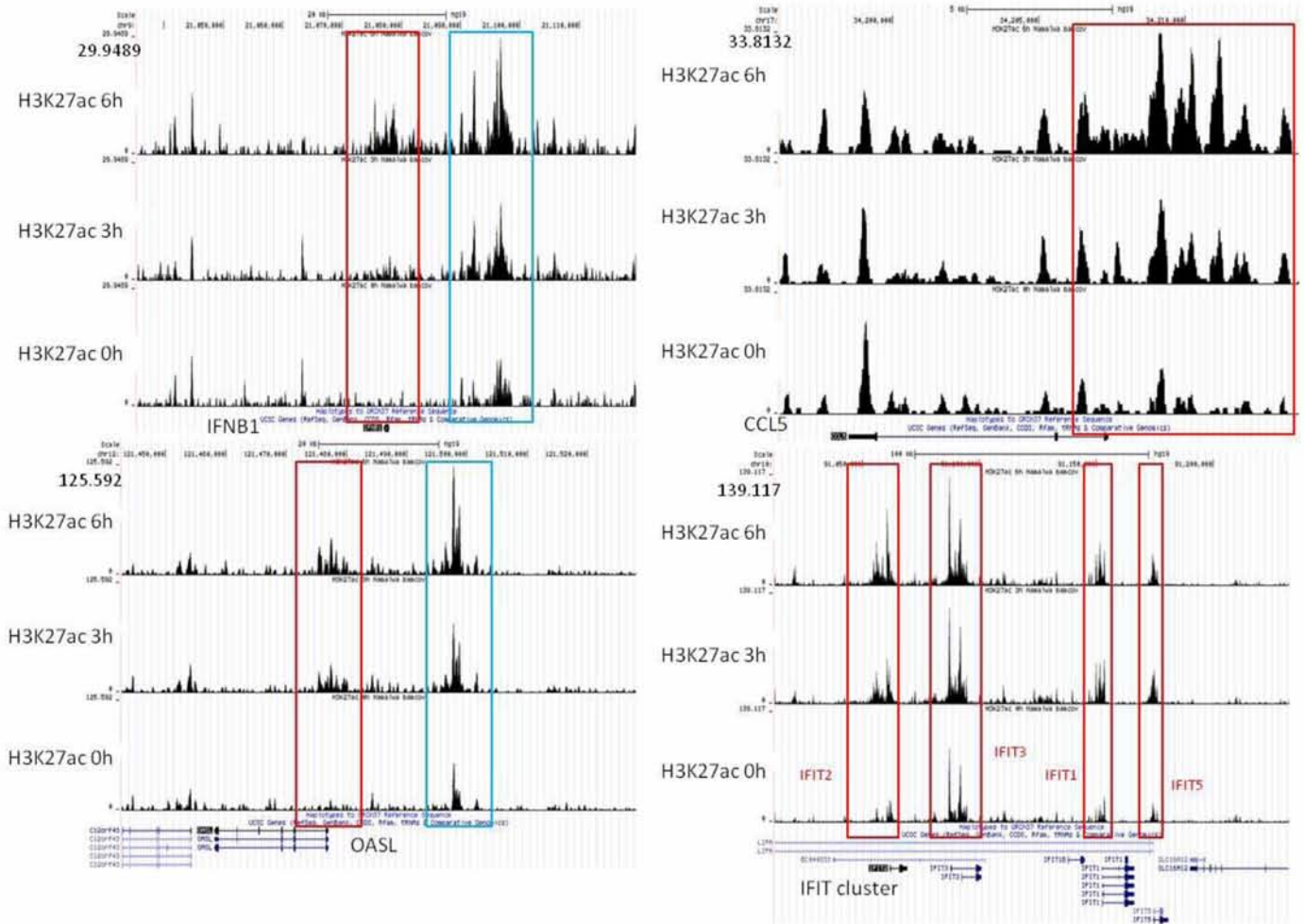
Στην συνέχεια αναζητήθηκαν τα γονίδια *MYOD1* και *AFM* τα οποία δεν εκφράζονται σε αυτά τα κύτταρα.



Εικόνα 49: Η ένταση του σήματος του εντοπισμού της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac γύρω από τα γονίδια *MYOD1* και *AFM*. Η συγκεκριμένη ιστονική τροποποίηση απουσιάζει από τις κωδικές και ρυθμιστικές περιοχές αυτών των γονιδίων.

Οι περιοχές των γονιδίων *MYOD1* και *AFM* δεν παρουσιάζουν σήμα της ιστόνης H3 με ακετυλίωση στην λυσίνη 27 (Εικόνα 49). Αυτή η έλλειψη σήματος συμφωνεί με το γεγονός ότι τα γονίδια *MYOD1* και *AFM* δεν εκφράζονται στα κύτταρα Namalwa και επιβεβαιώνει την ποιότητα του πειράματος.

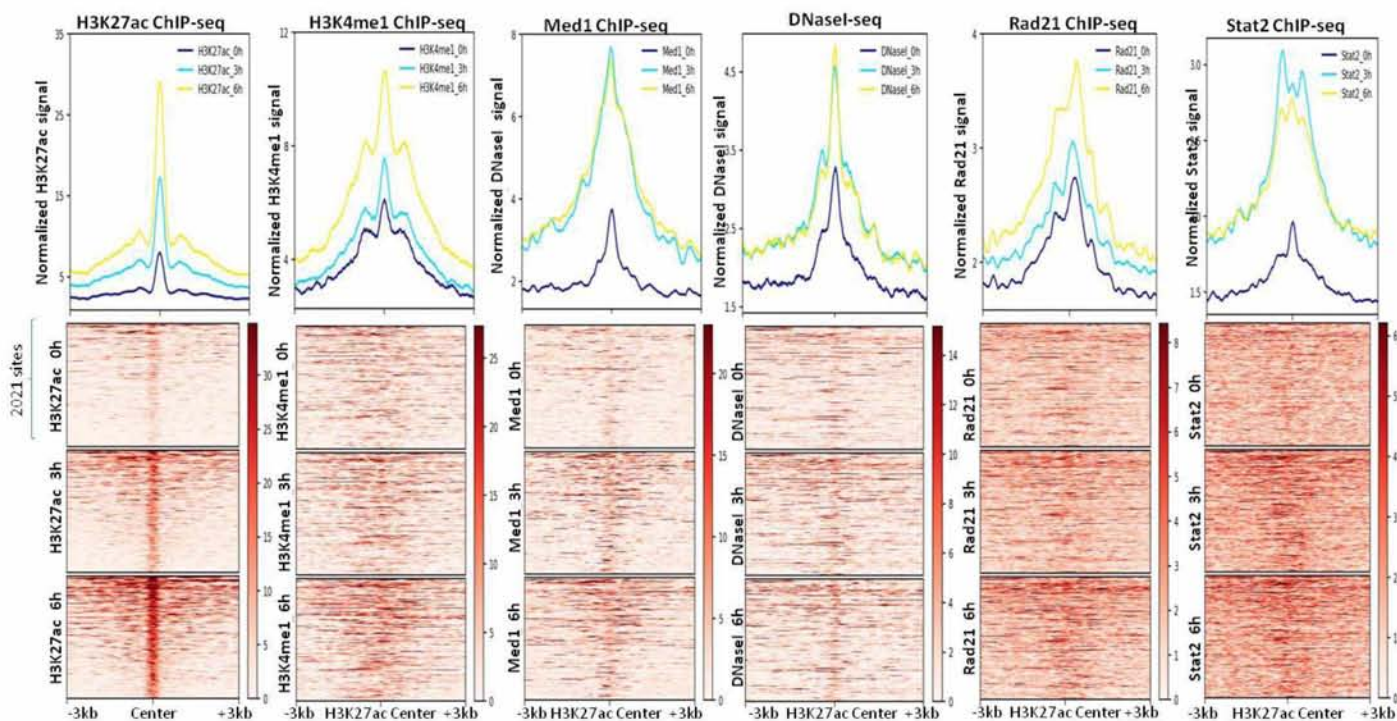
Κατόπιν αναζητήθηκαν γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην αντι-ιική απόκριση των κυττάρων για να ελεγχθεί η κατανομή του σήματος της ιστόνης H3 με ακετυλίωση στη λυσίνη 27.



Εικόνα 50: Επαγόμενη αύξηση της παρουσίας H3K27ac σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων *IFNB1*, *CCL5*, *OASL* και στην οικογένεια γονιδίων *IFIT* σε κύτταρα *Namalwa*. Παρουσιάζεται επαγόμενη αύξηση του σήματος H3K27ac στους υποκινητές των γονιδίων *IFNB*, *OASL*, *CCL5*, *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3* και *IFIT5* (κόκκινα πλαίσια). Αύξηση του σήματος παρουσιάζεται και στην περιοχή του ενισχυτή, που εντοπίζεται 20 κιλοβάσεις ανοδικά του υποκινητή, του γονιδίου της ιντερφερόνης β1. Ανοδικά του γονιδίου *OASL* εντοπίζεται επαγόμενη αύξηση του σήματος η οποία υποδηλώνει την παρουσία ενός πιθανού ενισχυτή (γαλάζιο πλαίσιο). Στο γονίδιο *CCL5* το επαγόμενο σήμα εκτείνεται και ανοδικά του υποκινητή και εμφανίζονται πολλαπλές κορυφές οι οποίες είναι ενδεικτικές της παρουσίας *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών.

Η παρατήρηση της εικόνας αυτών των περιοχών αυτών των γονιδίων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο εντοπισμός νουκλεοσωμάτων που περιέχουν ιστόνη H3 με ακετυλίωση στη λυσίνη 27, αυξάνεται στους υποκινητές των γονιδίων *IFNB*, *OASL*, *CCL5*, *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3* και *IFIT5*, μετά από την έκθεση των κυττάρων σε SeV (Εικόνα 50). Ο εντοπισμός της συγκεκριμένης ιστονικής τροποποίησης αυξάνεται στην περιοχή του -20kb ενισχυτή του γονιδίου της ιντερφερόνης. Το γονίδιο *OASL*, διαθέτει έναν πιθανό ενισχυτή ο οποίος εντοπίζεται σε απόσταση περίπου 20 κιλοβάσεων από την αλληλουχία του υποκινητή του. Τέλος για το γονίδιο *CCL5*, παρουσιάζεται επέκταση του σήματος ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου. Η μορφή του σήματος αυτού διαθέτει πολλαπλές κορυφές οι οποίες υποδεικνύουν την παρουσία *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων (ενισχυτών) ανοδικά του υποκινητή.

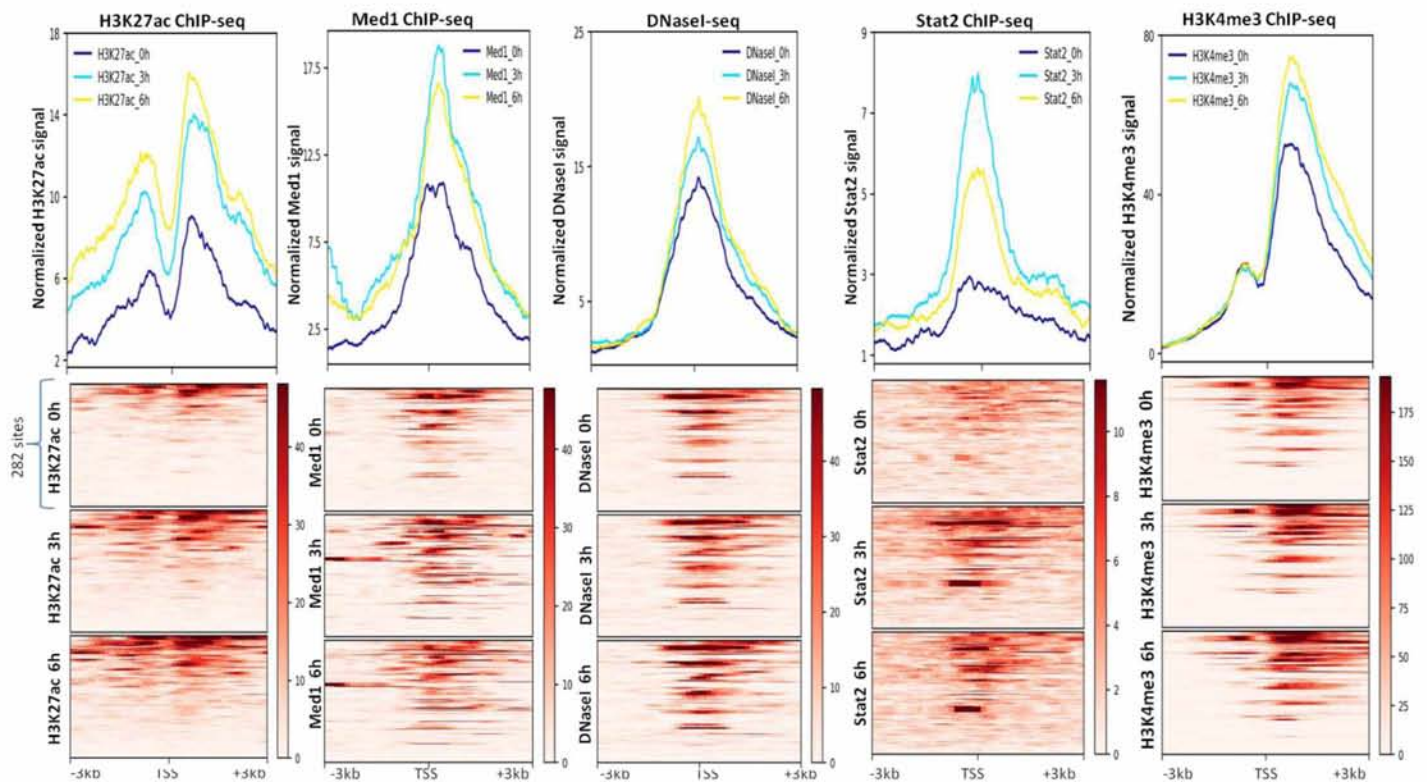
Για την πιο σφαιρική μελέτη των περιοχών, εντός και εκτός γονιδίων που είναι απομακρυσμένες από υποκινητές και στις οποίες εντοπίζεται επαγωγή του εντοπισμού νουκλεοσωμάτων που περιέχουν H3 με ακετυλίωση στη λυσίνη 27, και συνιστούν πιθανούς ενισχυτές, κατασκευάστηκαν τοπολογικοί χάρτες. Πιο συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν τοπολογικοί χάρτες με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχισης πειραμάτων ChIP έναντι των ιστονικών τροποποιήσεων H3K27ac και H3K4me1, των πρωτεϊνών MED1, RAD21 (παρουσιάζεται παρακάτω) και STAT2 και πειραμάτων DNaseI-seq.



Εικόνα 51: Heat maps με βάση δεδομένα από πειράματα ChIP-seq και DNaseI-seq γύρω από 2021 πιθανούς επαγόμενους, μετά από ιϊκή μόλυνση ενισχυτές, στους οποίους εντοπίζεται αυξανόμενος εντοπισμός H3K27ac.

Η σύγκριση αυτών των τοπολογικών χαρτών (Εικόνα 51), στους οποίους κέντρο αποτελεί η θέση εντοπισμού των νουκλεοσωμάτων που περιέχουν H3 με επαγόμενη ακετυλίωση στη λυσίνη 27 οδηγεί στα ακόλουθα συμπεράσματα. 1) Αρχικά γύρω από τις θέσεις εντοπισμού H3K27ac σε ακτίνα 3 κιλοβάσεων εντοπίζεται και η τροποποίηση H3K4me1. 2) Επιπλέον κοντά στις θέσεις αυτές παρατηρείται επαγόμενη πρόσδεση του παράγοντα MED1. 3) Επιπρόσθετα οι θέσεις στις οποίες παρουσιάζεται επαγόμενος εντοπισμός των νουκλεοσωμάτων που περιέχουν H3 με ακετυλίωση στη λυσίνη 27 βρίσκονται σε χρωματικές περιοχές με ανοιχτή διαμόρφωση, και 4) τέλος αρκετές από τις θέσεις αυτές βρίσκονται κοντά σε θέσεις επαγόμενης πρόσδεσης των RAD21 και STAT2.

Κατασκευάστηκαν επιπλέον τοπολογικοί χάρτες, με βάση αποτελέσματα πειραμάτων ChIP-seq έναντι της ιστόνης H3 με ακετυλίωση στη λυσίνη 27, της ιστόνης H3 με τριμεθυλίωση στη λυσίνη 4, τους παράγοντες MED1 και STAT2 και πείραμα DNaseI-seq, γύρω από περιοχές θέσης έναρξης της μεταγραφής που περιβάλλονται από νουκλεοσώματα που περιέχουν ιστόνη H3 με επαγόμενη ακετυλίωση στη λυσίνη 27.

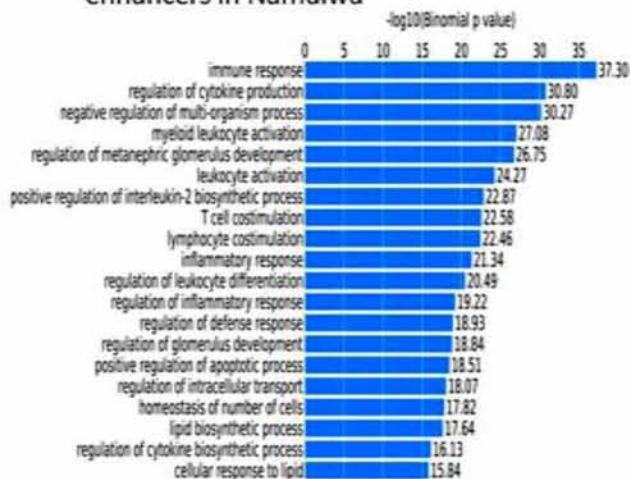


Εικόνα 52: Heat maps στους οποίους παρουσιάζεται η κατανομή του σήματος από πειράματα ChIP-seq έναντι της ιστόνης H3 με ακετυλίωση στη λυσίνη 27, της ιστόνης H3 με τριμεθυλίωση στη λυσίνη 4, τους παράγοντες MED1 και STAT2 και DNaseI-seq σε 282 υποκινητές κυττάρων *Namalwa*.

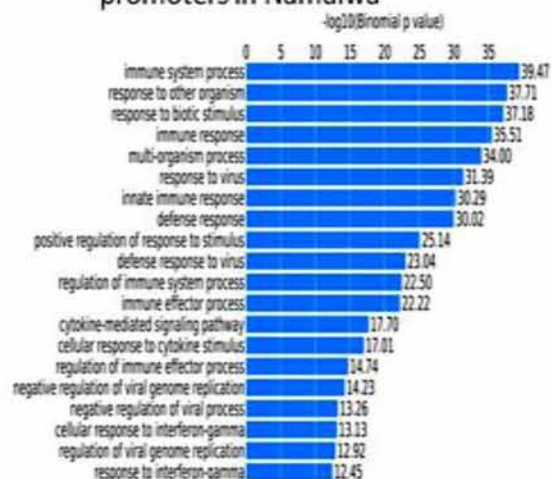
Από αυτούς τους τοπολογικούς χάρτες (Εικόνα 52) προκύπτει ότι αρκετοί από τους υποκινητές, στους οποίους εντοπίζεται επαγόμενος εντοπισμός της ιστόνης H3 με ακετυλίωση στη λυσίνη 27, διαθέτουν θέσεις επαγόμενης πρόσδεσης του παράγοντα MED1 και STAT2. Οι ίδιοι υποκινητές τοποθετούνται σε χρωματοσωματικές περιοχές με ανοιχτή διαμόρφωση χρωματίνης, όπως προκύπτει από τον θερμικό χάρτη με βάση τα δεδομένα από πείραμα DNase-seq. Τέλος, υποκινητές με επαγόμενη από την ιϊκή μόλυνση, αύξηση του εντοπισμού νουκλεοσωμάτων με ιστόνη H3 με ακετυλίωση στη λυσίνη 27, παρουσιάζουν επίσης έντονο σήμα H3K4me3.

Για να ελεγχθεί ο ρόλος των γονιδίων των οποίων η μεταγραφή ρυθμίζεται από υποκινητές και ενισχυτές, οι οποίοι παρουσιάζουν επαγόμενο από την ιϊκή μόλυνση εντοπισμό νουκλεοσωμάτων που περιέχουν ιστόνη H3 που έχει τροποποιηθεί μετα-μεταφραστικά με ακετυλίωση της λυσίνης 27, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GREAT.

A) Gene ontology for induced H3K27ac enhancers in Namalwa



B) Gene ontology for induced H3K27ac promoters in Namalwa



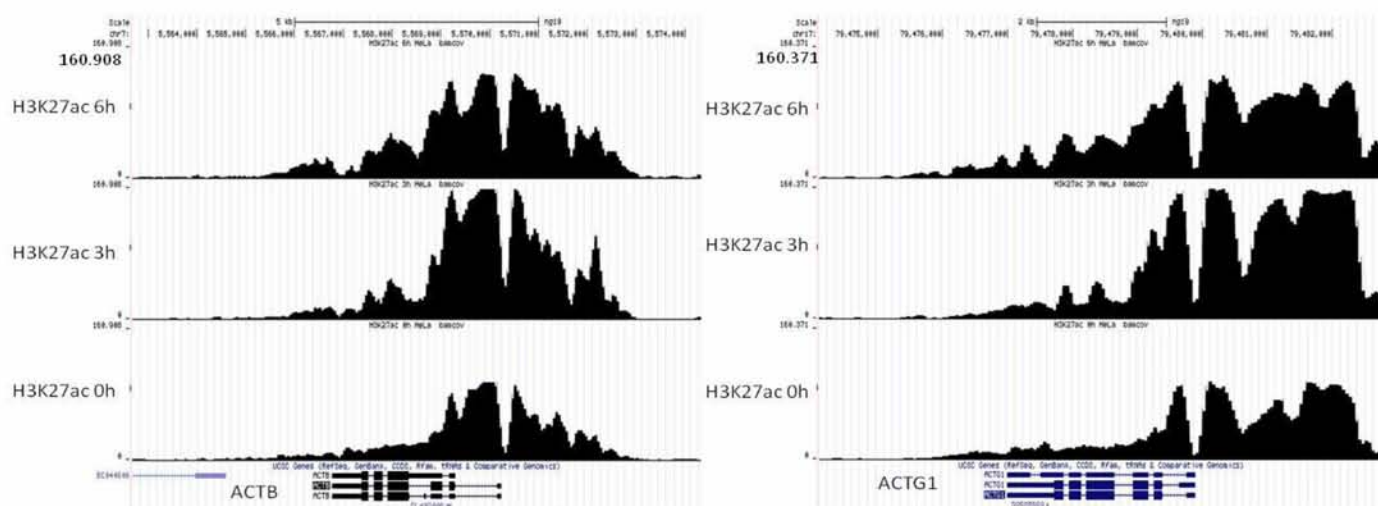
Εικόνα 53: Οντολογίες γονιδίων των οποίων η ρύθμιση ελέγχεται από (A) ενισχυτές και (B) υποκινητές στους οποίους ταυτοποιούνται απαγόμενες θέσεις H3K27ac. Τα γονίδια που ελέγχονται από αυτά τα ρυθμιστικά στοιχεία εμπλέκονται μεταξύ άλλων σε ανοσολογικές λειτουργίες.

Από την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι τα γονίδια των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από υποκινητές και ενισχυτές στους οποίους παρουσιάζεται επαγόμενο σήμα H3K27ac εμπλέκονται, με μεγάλη στατιστική σημαντικότητα, σε ανοσολογικές λειτουργίες (Εικόνα 53).

Αποτελέσματα αλληλούχισης H3K27ac ChIP σε HeLa

Μετά την στοίχιση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης, του DNA που προέκυψε από το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, σε κύτταρα HeLa που μολύνθηκαν με SeV για 0, 3 και 6 ώρες, στο ανθρώπινο γονιδίωμα, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση ορισμένων γονιδίων για να ελεγχθεί η ποιότητα των αποτελεσμάτων.

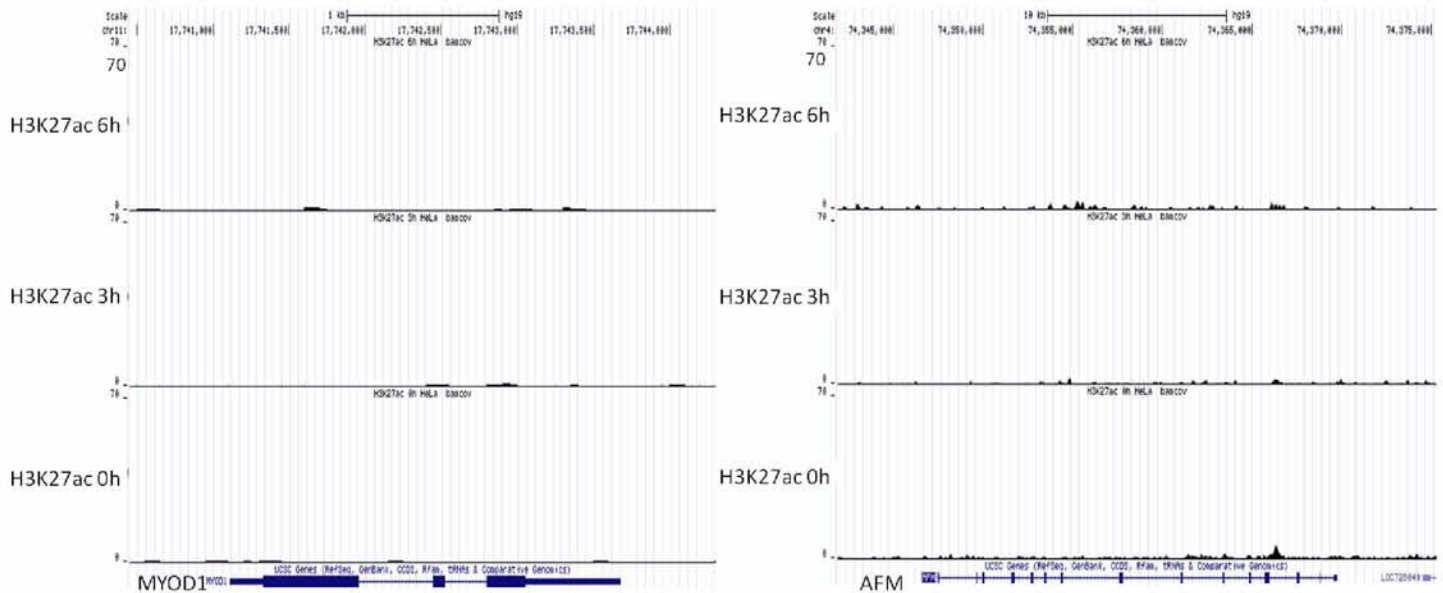
Αρχικά αναζητήθηκαν τα housekeeping γονίδια *ACTB* και *ACTG1*.



Εικόνα 54: Η ένταση του εντοπισμού της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac γύρω από τις περιοχές των γονιδίων *ACTB* και *ACTG1*. Τα γονίδια αυτά αποτελούν θετικούς στόχους για τον εντοπισμό της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac.

Η ένταση του σήματος H3K27ac είναι αυξημένη στις περιοχές των γονιδίων *ACTB* και *ACTG1* και πιο συγκεκριμένα στην περιοχή των υποκινητών τους. Αυτή η κατανομή του σήματος επιβεβαιώνει την ποιότητα του πειράματος μιας και τα γονίδια αυτά αναμένεται να έχουν αυξημένο σήμα αφού εκφράζονται ιδιосύστατικά. Σε αντίθεση με την εικόνα του σήματος αυτών των γονιδίων στα κύτταρα Namalwa, στα οποία το σήμα εκτείνεται ανοδικά από τον υποκινητή, το σήμα στα HeLa εκτείνεται και ανοδικά αλλά και καθοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής (Εικόνα 54).

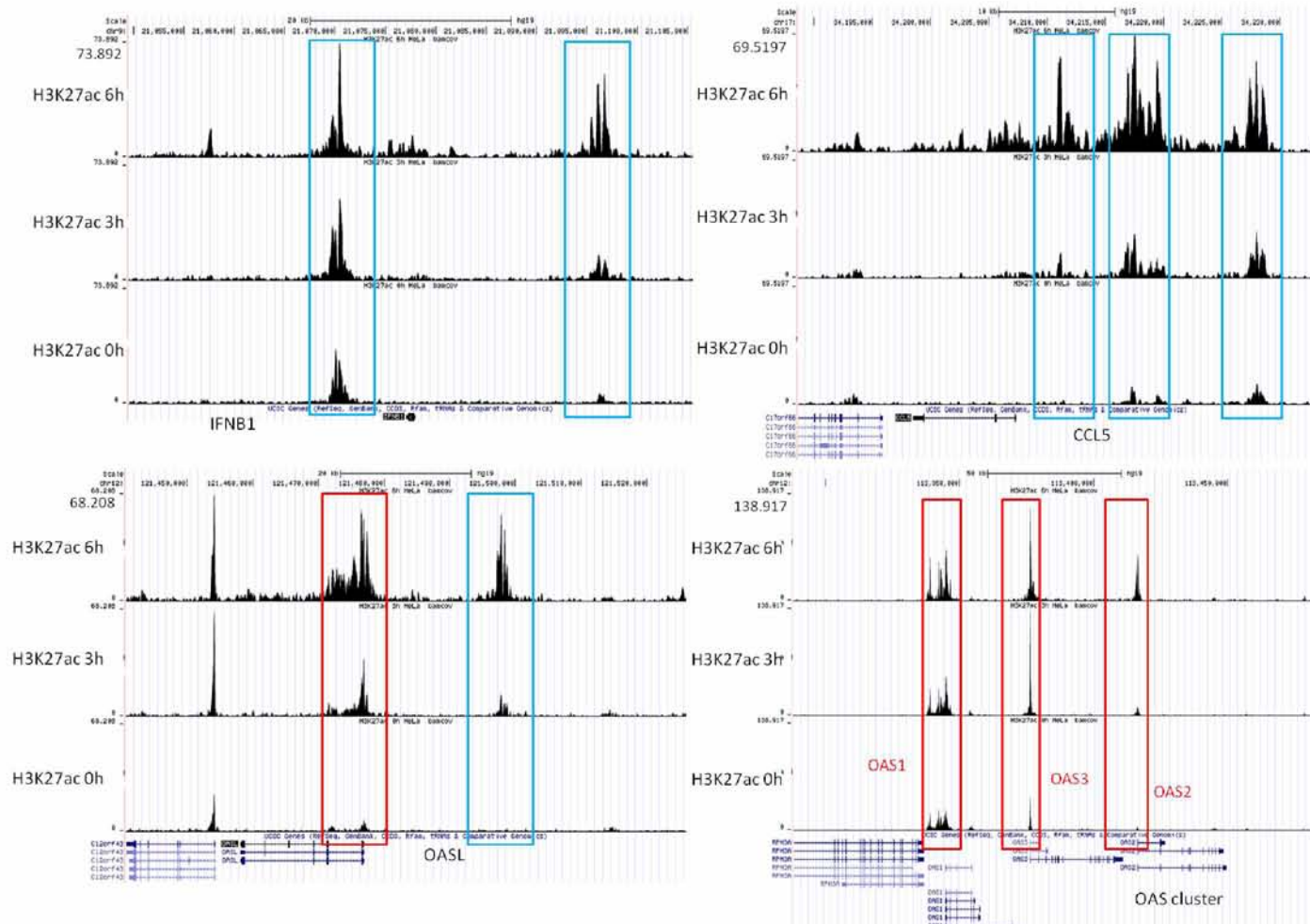
Στην συνέχεια αναζητήθηκαν τα γονίδια *MYOD1* και *AFM* τα οποία δεν εκφράζονται στα HeLa κύτταρα.



Εικόνα 55: Η ένταση του σήματος H3K27ac γύρω από τα γονίδια *MYOD1* και *AFM*. Η συγκεκριμένη ιστονική τροποποίηση απουσιάζει από τις κωδικές και ρυθμιστικές περιοχές αυτών των γονιδίων.

Οι περιοχές των γονιδίων *MYOD1* και *AFM* δεν παρουσιάζουν σήμα H3K27ac. Αυτή η εικόνα συμφωνεί με το γεγονός ότι τα γονίδια *MYOD1* και *AFM* δεν εκφράζονται στα κύτταρα αυτής της σειράς και επιβεβαιώνει την ποιότητα του πειράματος (Εικόνα 55).

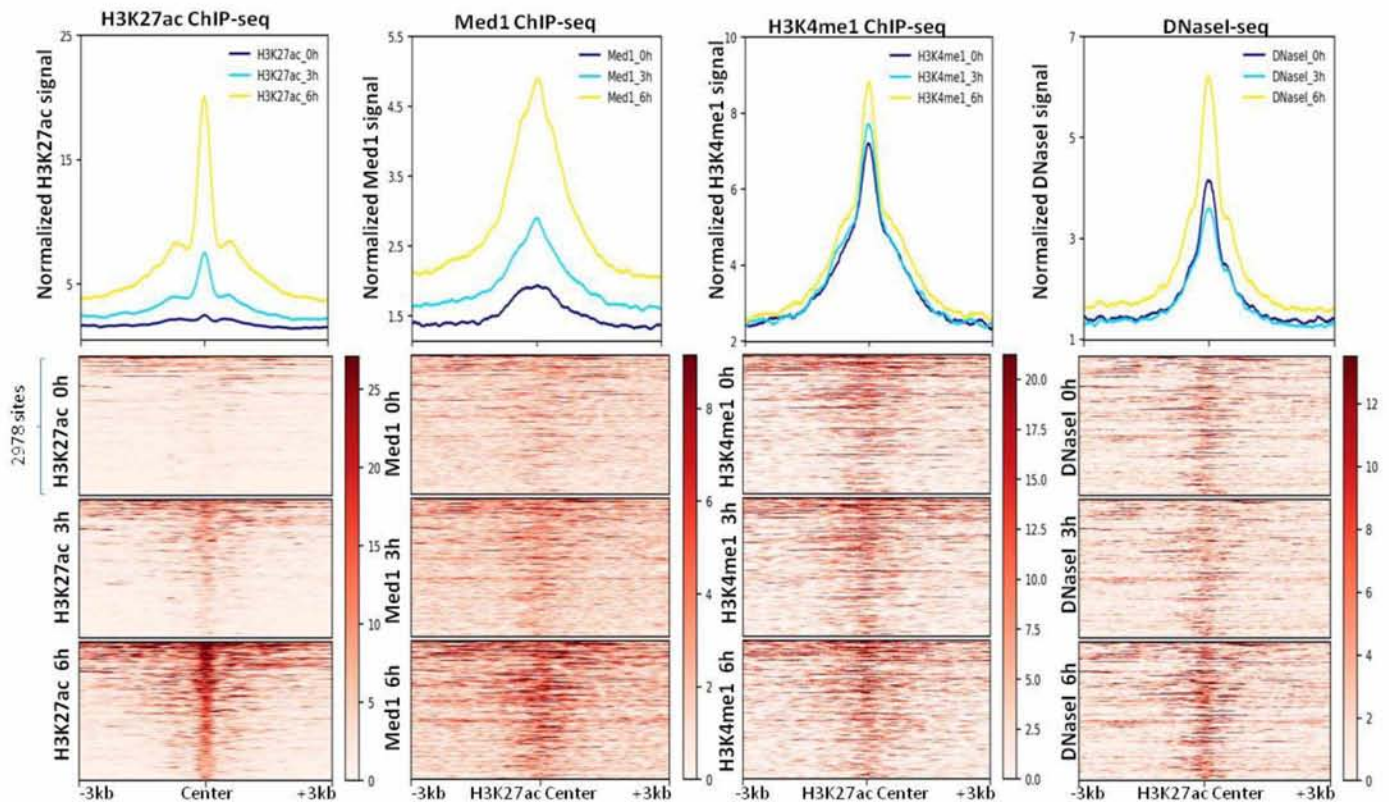
Κατόπιν, αναζητήθηκαν τα γονίδια *IFNB*, *CCL5*, *OASL* και *OAS*.



Εικόνα 56: Η ένταση του σήματος H3K27ac γύρω από τα γονίδια *IFNB*, *CCL5*, *OASL* και *OAS*. Η ένταση του σήματος αυξάνεται μετά από την ιική μόλυνση στον -20kb ενισχυτή της ιντερφερόνης β αλλά και σε μία περιοχή καθοδικά του γονιδίου η οποία αποτελεί έναν επιπλέον πιθανό ενισχυτή. Ανοδικά του γονιδίου *CCL5* εντοπίζονται 3 περιοχές στις οποίες παρατηρείται επαγωγή του σήματος και αποτελούν πιθανές αλληλουχίες ενισχυτών. Η παρουσία της H3K27ac αυξάνεται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *OASL* αλλά και σε μία περιοχή ανοδικά αυτού η οποία αποτελεί πιθανό ενισχυτή. Αύξηση του σήματος εντοπίζεται και στους υποκινητές των γονιδίων *OAS*. Οι υποκινητές των γονιδίων στους οποίους παρατηρείται αύξηση του σήματος μετά την ιική μόλυνση περιβάλλονται από κόκκινα πλαίσια και οι ενισχυτές με γαλάζια.

Από την παρατήρηση της εικόνας γύρω από την περιοχή καθενός από αυτά τα γονίδια προκύπτει πως ο εντοπισμός νουκλεοσωμάτων που περιέχουν ιστόνη H3 με ακετυλίωση στη λυσίνη 27 αυξάνεται μετά από την ιική μόλυνση στους υποκινητές και σε πιθανούς ενισχυτές αυτών των γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση του σήματος στον -20kb ενισχυτή της ιντερφερόνης β και σε ακόμα μία περιοχή που τοποθετείται καθοδικά του γονιδίου, η οποία αντιστοιχεί σε πιθανό ενισχυτή. Επιπλέον το γονίδιο *CCL5* διαθέτει ανοδικά του, 3 περιοχές στις οποίες παρατηρείται επαγωγή του σήματος, οι οποίες είναι πιθανό να αποτελούν αλληλουχίες ενισχυτών. Επίσης, η ιική μόλυνση οδηγεί σε αύξηση του εντοπισμού της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, στον υποκινητή του γονιδίου *OASL* και σε μία δεύτερη περιοχή ανοδικά αυτού, η οποία αποτελεί πιθανό ενισχυτή. Τέλος τα γονίδια *OAS* εμφανίζουν επαγόμενη αύξηση της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac στις αλληλουχίες των υποκινητών τους (Εικόνα 56).

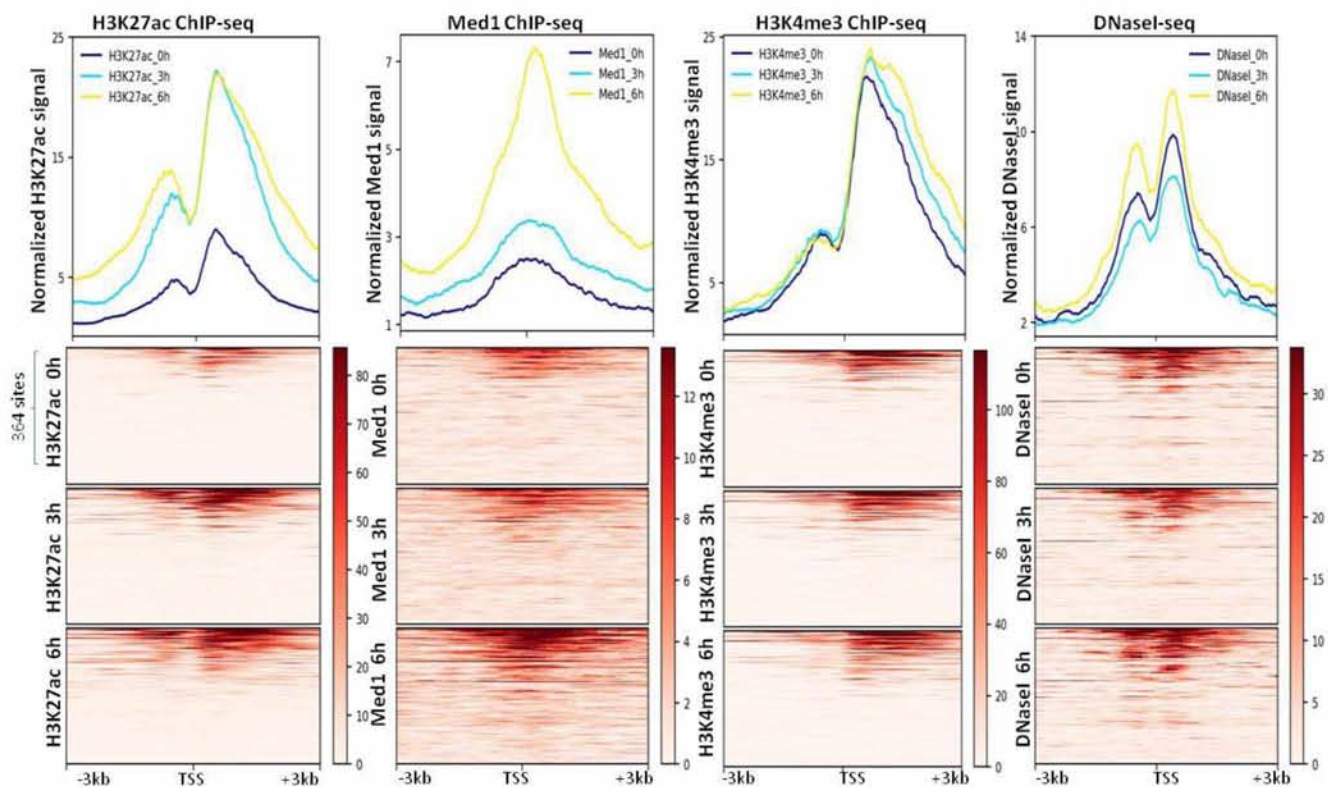
Στη συνέχεια, με στόχο την αναλυτικότερη μελέτη των περιοχών, στις οποίες εντοπίζεται επαγόμενη από την ιική μόλυνση αύξηση των επιπέδων H3K27ac και αποτελούν πιθανούς επαγόμενους ενισχυτές, δημιουργήθηκαν τοπολογικοί χάρτες με βάση τα δεδομένα από πειράματα H3K27ac ChIP-seq, MED1 ChIP-seq, H3K4me1 ChIP-seq και DNaseI-seq



Εικόνα 57: Heat maps στους οποίους παρουσιάζεται η κατανομή του σήματός από πειράματα H3K27ac ChIP-seq, MED1 ChIP-seq, H3K4me1 ChIP-seq και DNaseI-seq, γύρω από τις 2978 περιοχές που εντοπίζεται επαγόμενη αύξηση του σήματος H3K27ac και αποτελούν πιθανούς ενισχυτές. Οι περιοχές στις οποίες εμφανίζεται αύξηση του σήματος H3K27ac, εμφανίζουν επαγόμενη πρόσδεση του παράγοντα MED1 μετά από ιϊκή μόλυνση. Η επαγόμενη αύξηση του εντοπισμού της συγκεκριμένης ιστονικής τροποποίησης πραγματοποιείται σε προσβάσιμες περιοχές (DNaseI-seq) στις οποίες προϋπάρχει η ιστονική τροποποίηση H3K4me1.

Από την ανάλυση αυτή προκύπτει, ότι σε πολλές από τις 2978 περιοχές στις οποίες εντοπίζεται επαγόμενη, από την ιϊκή μόλυνση, αύξηση του εντοπισμού νουκλεοσωμάτων που περιέχουν ιστόνη H3 με ακετυλίωση στην λυσίνη 27, στα HeLa κύτταρα, συνεντοπίζεται επαγόμενη πρόσδεση και του παράγοντα MED1. Επιπλέον φαίνεται πως η επαγόμενη αύξηση του εντοπισμού της συγκεκριμένης ιστονικής τροποποίησης συμβαίνει σε χρωματισματικές θέσεις με ανοιχτή χρωματινική διαμόρφωση πολλές από τις οποίες είναι προσβάσιμες ήδη πριν από την ιϊκή μόλυνση και στις οποίες προϋπάρχει η ιστονική τροποποίηση H3K4me1 (Εικόνα 57).

Πραγματοποιήθηκε δημιουργία επιπρόσθετων τοπολογικών χαρτών με βάση δεδομένα από πειράματα ChIP-seq έναντι των ιστονικών τροποποιήσεων H3K27ac και H3K4me3 και της υπομονάδας MED1 του συμπλόκου Mediator και DNaseI-seq, για υποκινητές στους οποίους εντοπίζεται επαγόμενη, από την ιϊκή μόλυνση αύξηση του εντοπισμού νουκλεοσωμάτων που περιέχουν ιστόνη H3 με ακετυλίωση στην λυσίνη 27, κέντρο των οποίων αποτελούν οι θέσεις έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων που ρυθμίζονται από τους συγκεκριμένους υποκινητές.



Εικόνα 58: Heat maps στους οποίους παρουσιάζεται η κατανομή του σήματος από πειράματα H3K27ac ChIP-seq, MED1 ChIP-seq, H3K27ac ChIP-seq και DNaseI-seq, για υποκινητές γονιδίων στους οποίους εντοπίζεται αύξηση του σήματος H3K27ac με κέντρο την θέση έναρξης της μεταγραφής σε κύτταρα HeLa. Μαζί με την επαγόμενη αύξηση του σήματος H3K27ac εντοπίζεται σε αρκετές περιπτώσεις και επαγόμενη αύξηση του σήματος πρόσδεσης του παράγοντα MED1. Επιπλέον πολλές από τις θέσεις αυτές φέρουν H3K4me3 και εντοπίζονται σε προσβάσιμες χρωματινικές περιοχές, όπως προκύπτει από πείραμα DNaseI-seq.

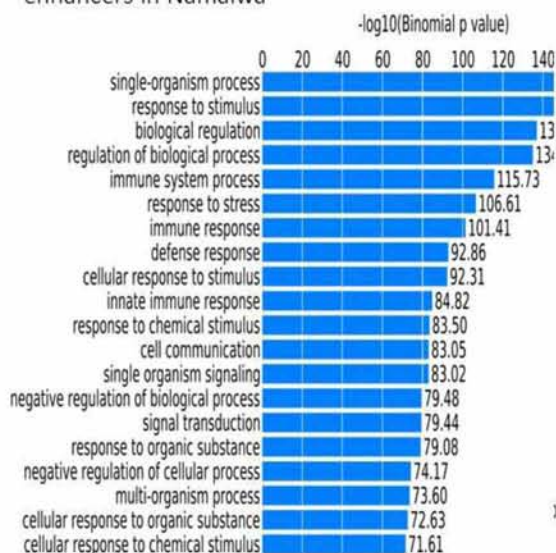
Από την ανάλυση αυτή προέκυψε πως αρκετές από τις θέσεις στις οποίες αυξάνεται η παρουσία H3K27ac χαρακτηρίζονται επίσης από αυξημένη πρόσδεση MED1 μετά από την ιϊκή μόλυνση. Οι ίδιες θέσεις διαθέτουν νουκλεοσώματα που περιέχουν ιστόνη H3 με τριμεθυλίωση στη λυσίνη 4 και αφορούν περιοχές στη χρωματίνη οι οποίες έχουν ανοιχτή διαμόρφωση και είναι προσβάσιμες ακόμα και πριν την μόλυνση των κυττάρων με ιό (Εικόνα 58).

Σύγκριση αποτελεσμάτων αλληλούχισης DNA από πειράματα ChIP με στόχο την H3K27ac σε HeLa και Namalwa

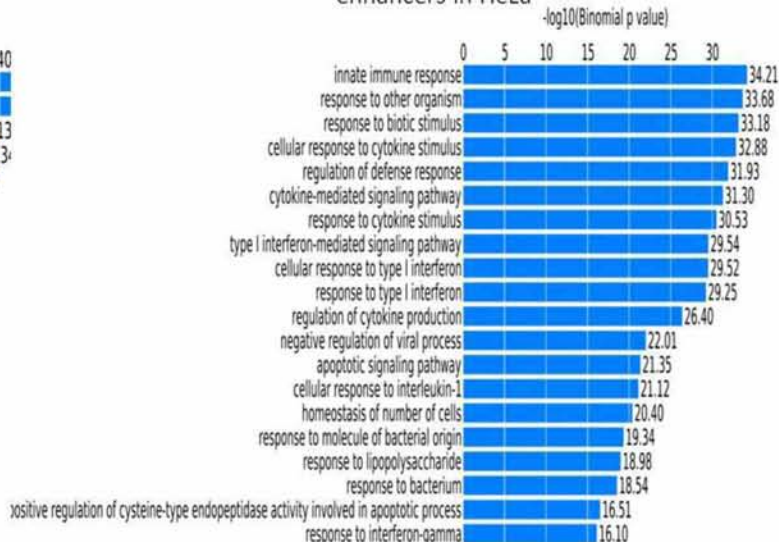
Κατόπιν της ολοκλήρωσης των αναλύσεων των δεδομένων που προκύπτουν από την αλληλούχιση των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με στόχο την ιστονική τροποποίηση H3K27ac σε κύτταρα των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών HeLa και Namalwa, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων για να ελεγχθεί ο βαθμός ομοιότητας του εντοπισμού νουκλεοσωμάτων με επαγόμενα επίπεδα H3K27ac, και κατ' επέκταση ο βαθμός ομοιότητας του προγράμματος των επαγόμενων ενισχυτών στους δύο κυτταρικούς τύπους.

Έτσι, σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε σύγκριση των λειτουργιών στις οποίες εμπλέκονται τα γονίδια που ελέγχονται από ενισχυτές οι οποίοι εμφανίζουν επαγόμενη, από την ιϊκή μόλυνση, αύξηση του εντοπισμού νουκλεοσωμάτων με H3K27ac.

Gene ontology for induced H3K27ac enhancers in Namalwa



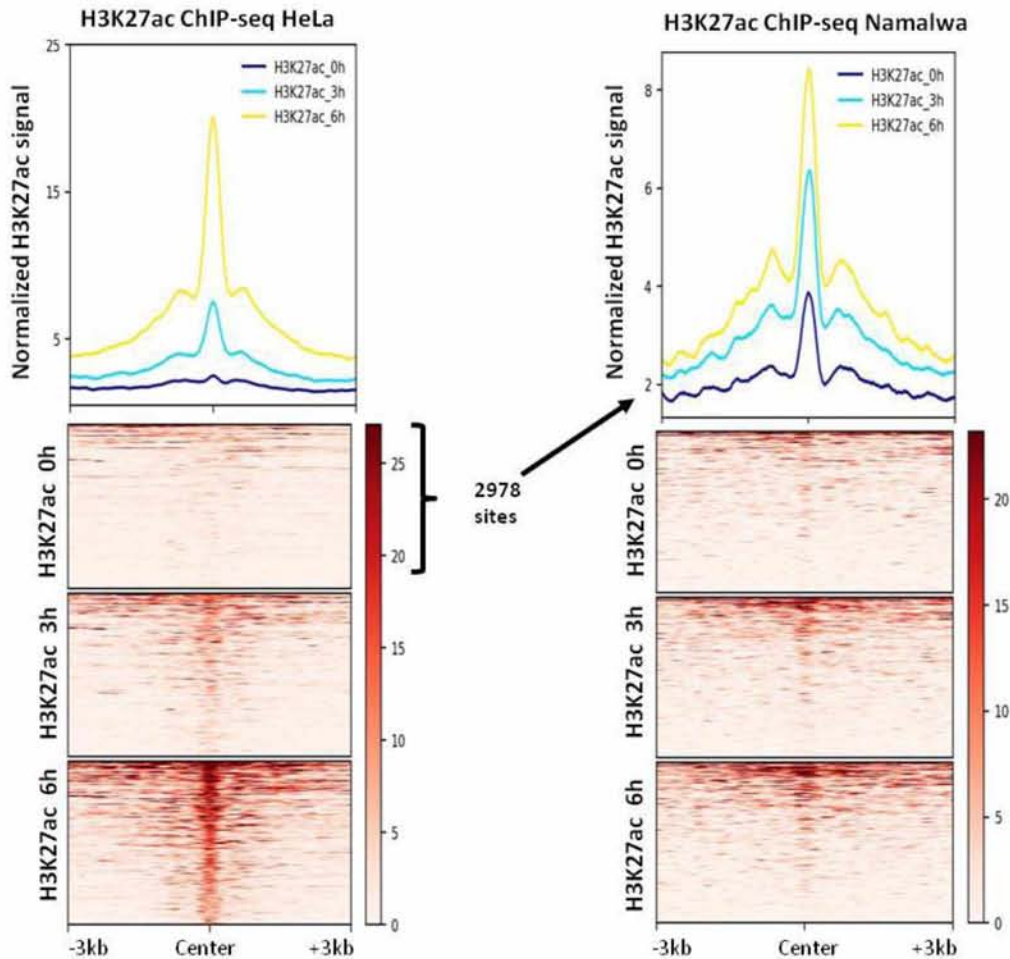
Gene ontology for induced H3K27ac enhancers in HeLa



Εικόνα 59: Οντολογίες γονιδίων που ελέγχονται από ενισχυτές στους οποίους εντοπίζονται επαγόμενα επίπεδα H3K27ac σε HeLa και Namalwa κύτταρα.

Από τα δεδομένα που προκύπτουν από αυτή την ανάλυση στο πρόγραμμα GREAT φαίνεται ότι στα κύτταρα και των δύο αυτών κυτταρικών σειρών, τα γονίδια που ελέγχονται από τους υποκινητές στους οποίους εντοπίζεται αύξηση του εντοπισμού της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, σχετίζονται με λειτουργίες ανοσολογικής απόκρισης (Εικόνα 59).

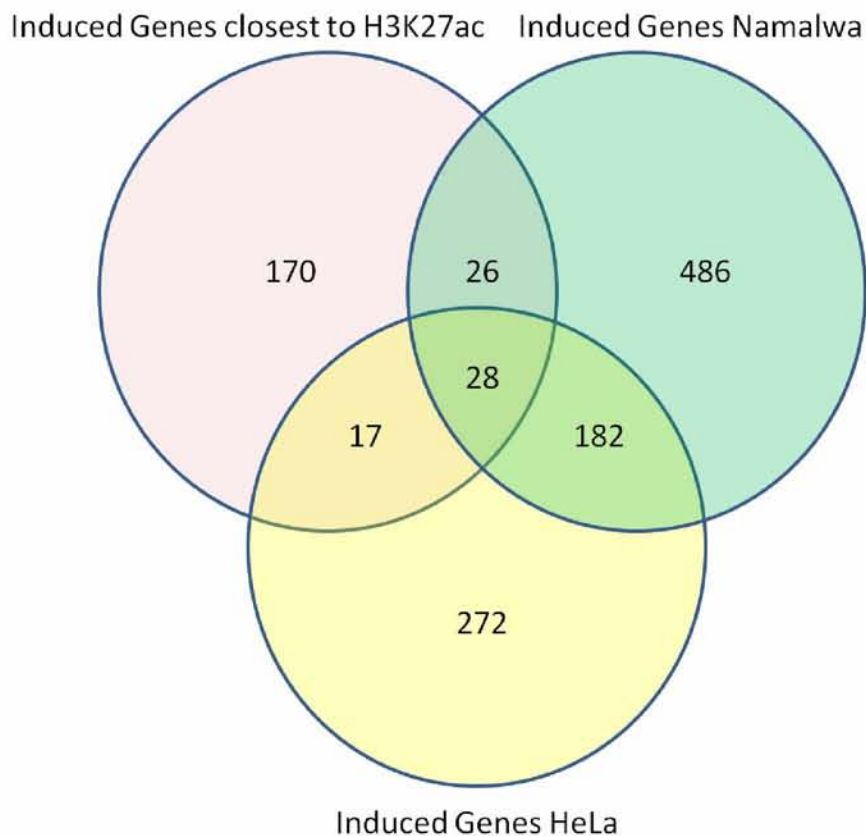
Για την πιο σφαιρική μελέτη των περιοχών, των πιθανών ενισχυτών, στους οποίους παρατηρείται επαγόμενη από την ιϊκή μόλυνση αύξηση του εντοπισμού της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, πραγματοποιήθηκε δημιουργία τοπολογικού χάρτη με δεδομένα από πείραμα ChIP-seq έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac σε κύτταρα Namalwa. Οι περιοχές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία αυτού του χάρτη ήταν οι 2978 περιοχές πιθανών ενισχυτών κυττάρων HeLa, στους οποίους παρατηρείται αύξηση του εντοπισμού της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, μετά από την ιϊκή μόλυνση.



Εικόνα 60: Heat maps στους οποίους παρουσιάζεται η κατανομή του σήματος από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, γύρω από τους ενισχυτές με επαγόμενη από την ιϊκή μόλυνση σε κύτταρα HeLa και η ανακατανομή του σήματος στις ίδιες περιοχές σε κύτταρα Namalwa.

Από την ανάλυση αυτή προκύπτει ότι αρκετές περιοχές επαγόμενων H3K27ac ενισχυτών σε κύτταρα HeLa, εμφανίζουν επαγωγή των επιπέδων H3K27ac και στα κύτταρα Namalwa. Σημαντικό είναι να αναφέρουμε πως δεν υπάρχει πλήρης ομοιότητα αλλά μόνο ένα ποσοστό 10-15% είναι επαγόμενο και κοινό για τους δυο κυτταρικούς τύπους. Το εύρημα αυτό συνάδει με την ιδέα που συνοδεύει την παρούσα εργασία, πως οι ρυθμιστικές περιοχές ενδέχεται να διαφέρουν για τα ίδια γονίδια σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται από τη συντονισμένη δράση αλληλουχιών και μεταγραφικών ρυθμιστών στο πλαίσιο συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου (Εικόνα 60).

Στη συνέχεια εντοπίστηκαν τα πιο κοντινά γονίδια σε αυτούς τους κοινούς ενισχυτές και συγκρίθηκαν με τις λίστες των επαγόμενων γονιδίων σε HeLa και Namalwa κύτταρα (Εικόνα 61).



Εικόνα 61: Σύγκριση των γονιδίων που επάγονται 6 ώρες μετά τη μόλυνση σύμφωνα με πείραμα RNA-seq σε HeLa και Namalwa και των γονιδίων τα οποία ρυθμίζονται από ενισχυτές με επαγόμενη από την ιϊκή μόλυνση αύξηση του εντοπισμού της H3K27ac κοινή σε HeLa και Namalwa

Από την σύγκριση αυτή προκύπτει ότι υπάρχουν 28 γονίδια των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από ενισχυτές στους οποίους αυξάνεται ο εντοπισμός νουκλεοσωμάτων που περιέχουν ιστόνη H3 με ακετυλίωση στην λυσίνη 27, και είναι κοινοί στις δύο κυτταρικές σειρές (HeLa και Namalwa).

Κοινά επαγώγιμα γονίδια που ρυθμίζονται από ενισχυτή με επαγόμενη αύξηση του εντοπισμού της H3K27ac

PIK3R3
RPS6KC1
OTUD1
SAR1A
IFIT2
NAV2
GRAMD1B
NEDD1
OASL
GCH1
CCL5
UBE2Z
PMAIP1
ZBTB32
B3GNT2
MAP4K4
B4GALT5
RBM38
CHEK2
NFKBIZ
ANKRD33B
GPBP1
IRF1
NEDD9
ADAP1
SRPK2
TTC39B
IFNB1

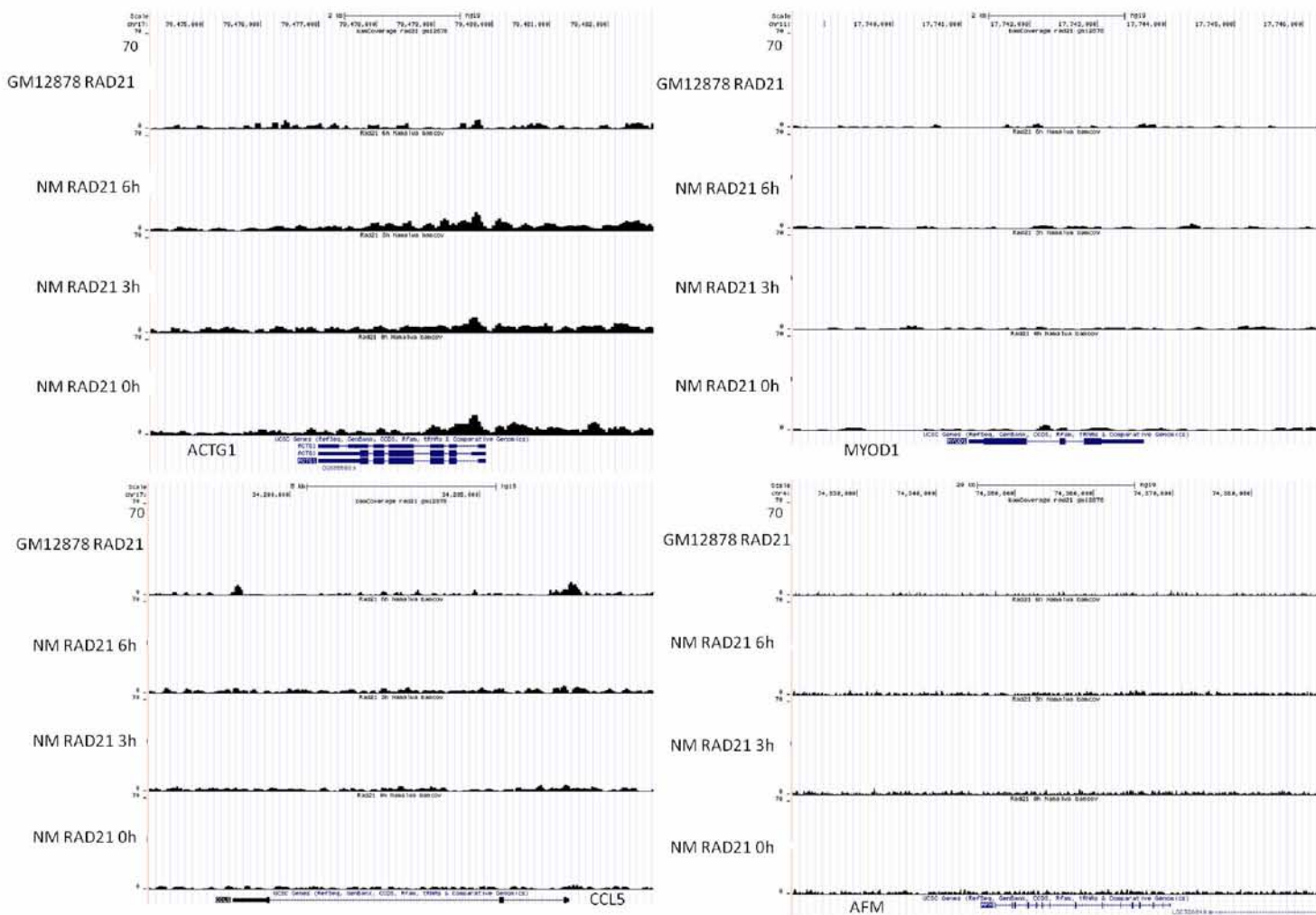
Εικόνα 62: Λίστα των κοινών επαγώγιμων γονιδίων που ρυθμίζονται από ενισχυτές στους οποίους παρατηρείται επαγόμενη από την ιϊκή μόλυνση αύξηση του εντοπισμού της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac τόσο σε HeLa όσο και σε Namalwa.

Στη λίστα αυτή περιλαμβάνονται τα γονίδια *IFNB1*, *CCL5*, *IFIT2*, *OASL*, *IRF1*, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιϊκή απόκριση των κυττάρων. Η λίστα περιλαμβάνει και μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο IRF1 γεγονός που συνάδει με την ιδέα που συνοδεύει την παρούσα εργασία πως η αντιϊκή απόκριση ελέγχεται αλλά και ελέγχει την έκφραση παραγόντων που ρυθμίζουν τη μεταγραφή (Εικόνα 62).

Αποτελέσματα αλληλούχισης RAD21 ChIP σε Namalwa

Μετά την στοίχιση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης, του DNA που προέκυψε από το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έναντι της υπομονάδας RAD21 του συμπλόκου της κοχεσίνης, στο ανθρώπινο γονιδίωμα, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση ορισμένων γονιδίων για να ελεγχθεί η ποιότητα των αποτελεσμάτων.

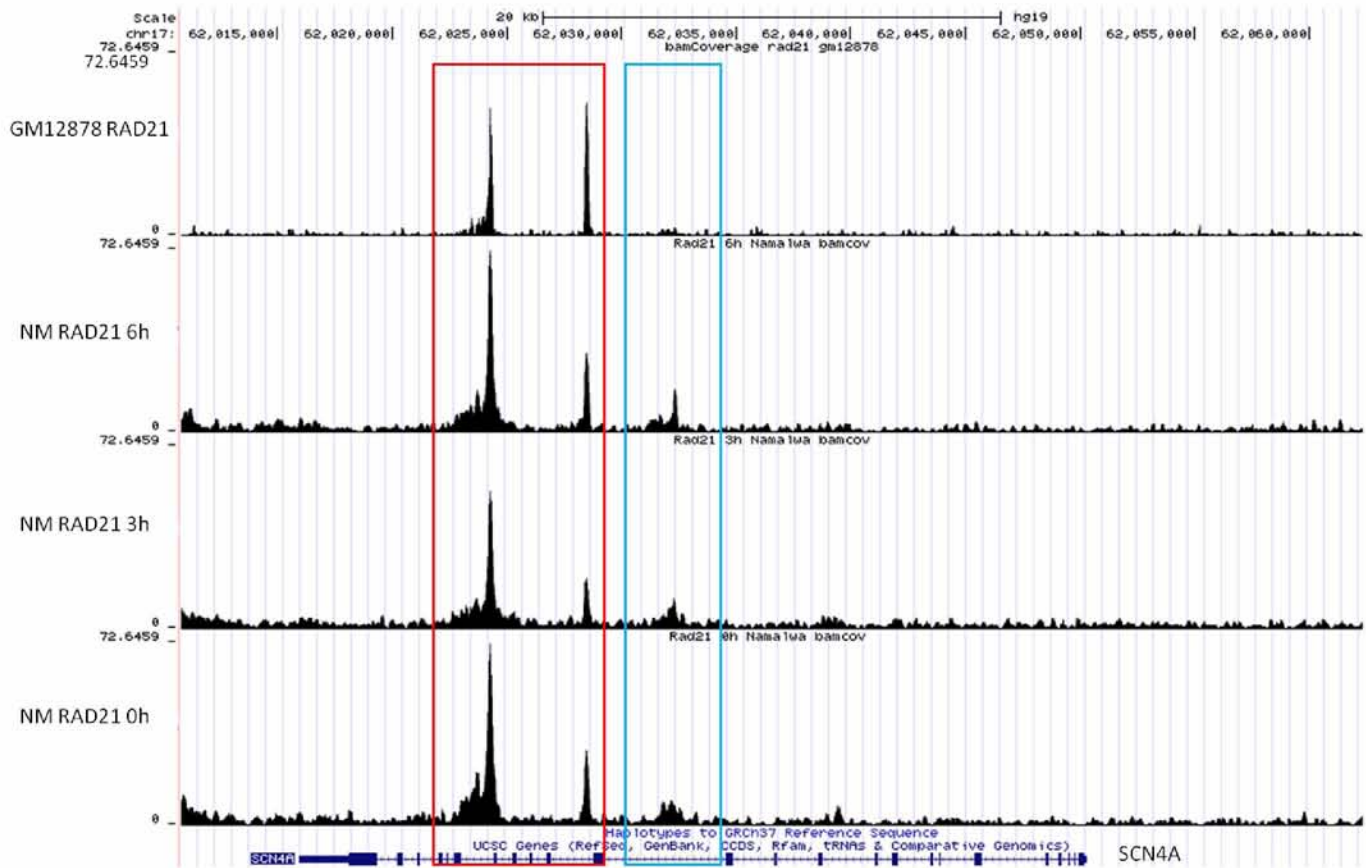
Αρχικά αναζητήθηκαν τα γονίδια *ACTB*, *MYOD*, *CCL5* και *AFM*.



Εικόνα 63: Η κατανομή του σήματος στις περιοχές των γονιδίων *ACTB*, *MYOD*, *CCL5* και *AFM*. Τα γονίδια αυτά αποτελούν αρνητικούς στόχους για την πρόσδεση της πρωτεΐνης RAD21.

Από την παρατήρηση της εικόνας της κατανομής του σήματος γύρω από αυτές τις περιοχές προκύπτει ότι τα γονίδια αυτά αποτελούν αρνητικούς στόχους για την πρόσδεση της RAD21 και κατ' επέκταση του συμπλόκου της κοχεσίνης. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με το αποτέλεσμα της ανάλυσης της Real Time PCR για το πείραμα της ανοσοκατακρήμνισης καθώς και εκείνη η ανάλυση έδειξε ότι το γονίδιο *MYOD1* αποτελεί αρνητικό στόχο για την πρωτεΐνη RAD21 (Εικόνα 63).

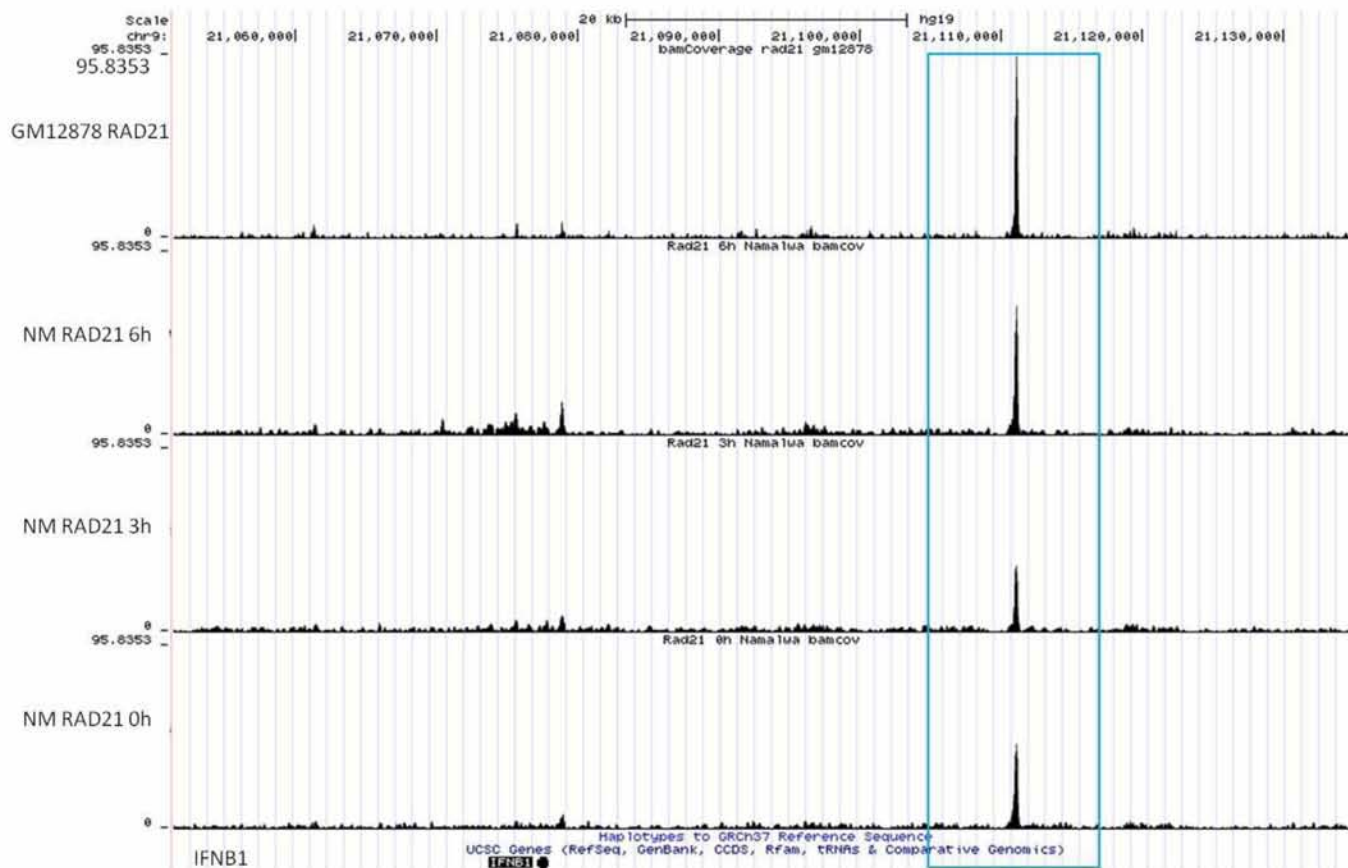
Στη συνέχεια αναζητήθηκε το γονίδιο *SCN4A*, οι αλληλουχίες του οποίου, όπως είχε δειχθεί στην Real Time PCR ανάλυση, είχαν εμπλουτιστεί μετά από το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έναντι της πρωτεΐνης RAD21. Η εικόνα της κατανομής του σήματος γύρω από το γονίδιο αυτό στα κύτταρα Namalwa συγκρίθηκε με την εικόνα του σήματος γύρω από το ίδιο γονίδιο σε αντίστοιχο πείραμα στην κυτταρική σειρά GM12878 (Ram et al., 2012). Τα κύτταρα αυτά προσομοιάζουν με τα Β-λεμφοκύτταρα.



Εικόνα 64: Η κατανομή του σήματος RAD21, γύρω από το γονίδιο *SCN4A*. Σύγκριση ανάμεσα στα κύτταρα Namalwa και GM12878. Κοινές κορυφές στις δύο κυτταρικές σειρές (κόκκινο πλαίσιο) και κορυφή η οποία εμφανίζεται μόνο στα κύτταρα Namalwa (γαλάζιο πλαίσιο).

Από την παρατήρηση της εικόνας γύρω από το γονίδιο *SCN4A* προέκυψε ότι εντός του γονιδίου υπάρχουν τρεις περιοχές στις οποίες εντοπίζεται αυξημένο σήμα πρόσδεσης της υπομονάδας RAD21 στα κύτταρα Namalwa. Οι δύο από αυτές τις περιοχές εντοπίζονται και στα κύτταρα της σειράς GM12878, ενώ η τρίτη κορυφή εντοπίζεται μόνο στα Namalwa. Παρόλα αυτά το σήμα είναι εμφανές πριν από την μόλυνση των κυττάρων και η ένταση του δεν διαφοροποιείται μετά την ιϊκή μόλυνση (Εικόνα 64).

Κατόπιν έγινε αναζήτηση του γονιδίου της ιντερφερόνης β. Το γονίδιο αυτό δεν παρουσίασε εμπλουτισμό στα δείγματα της χρωματίνης μετά από την πραγματοποίηση του πειράματος ChIP, όπως διαπιστώθηκε από την Real Time PCR. Επομένως αναμένεται να μην υπάρχει σήμα στην αλληλουχία αυτού του γονιδίου.

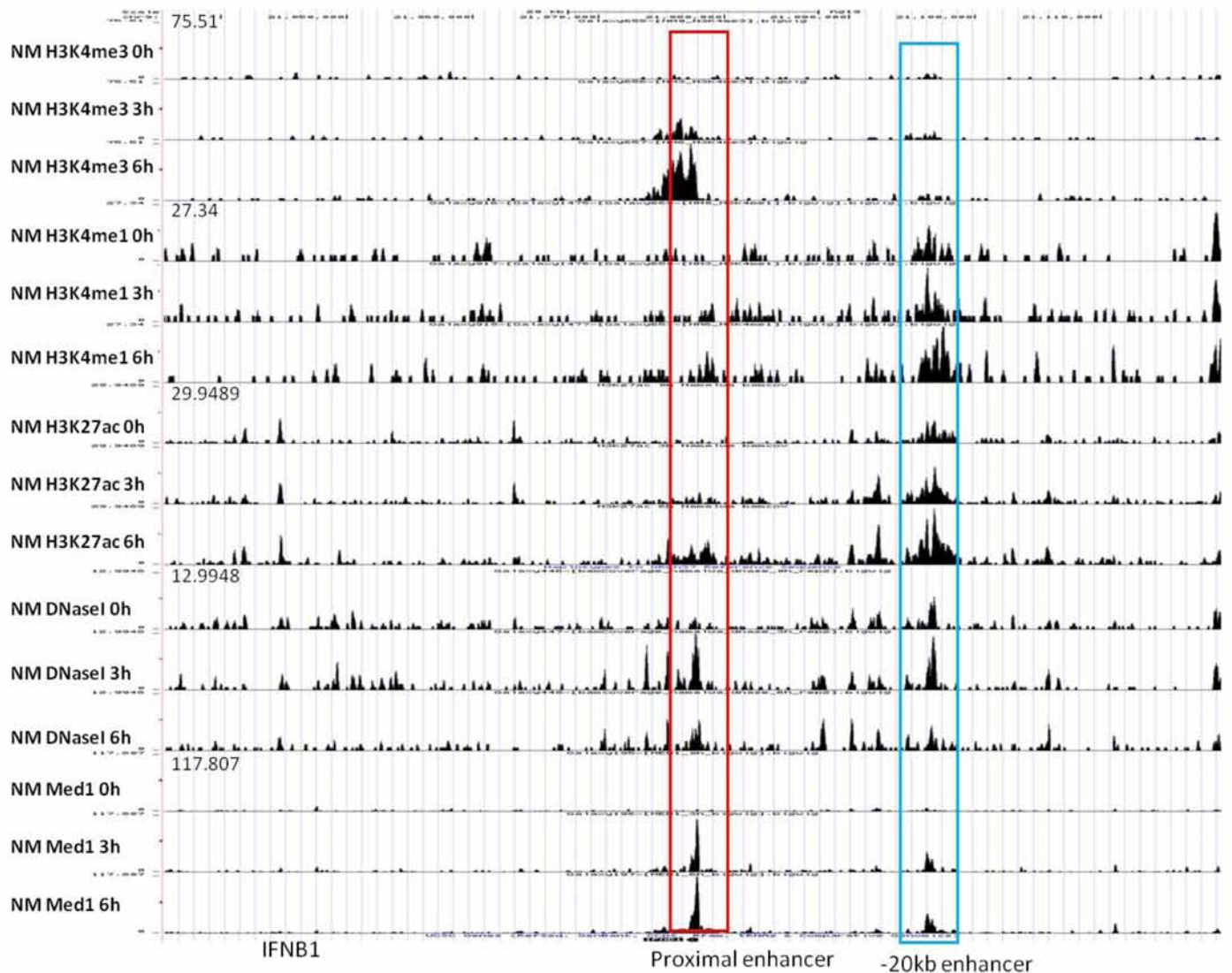


Εικόνα 65: Η κατανομή του σήματος γύρω από το γονίδιο της ιντερφερόνης β. Σύγκριση ανάμεσα σε κύτταρα Namalwa και κύτταρα της σειράς GM12878 (Ram et al., 2012).

Η εικόνα του σήματος γύρω από το γονίδιο της ιντερφερόνης β αποκαλύπτει πως το σήμα είναι αυξημένο σε μία περιοχή ανωδικά του γονιδίου σε απόσταση περίπου 35 κιλοβάσεων. Η κορυφή αυτή είναι εμφανής και στην κυτταρική σειρά GM12878 και η ένταση του σήματος σε αυτή την κορυφή παραμένει σταθερή και δεν τροποποιείται μετά την ιική μόλυνση (Εικόνα 65).

Σύγκριση αποτελεσμάτων

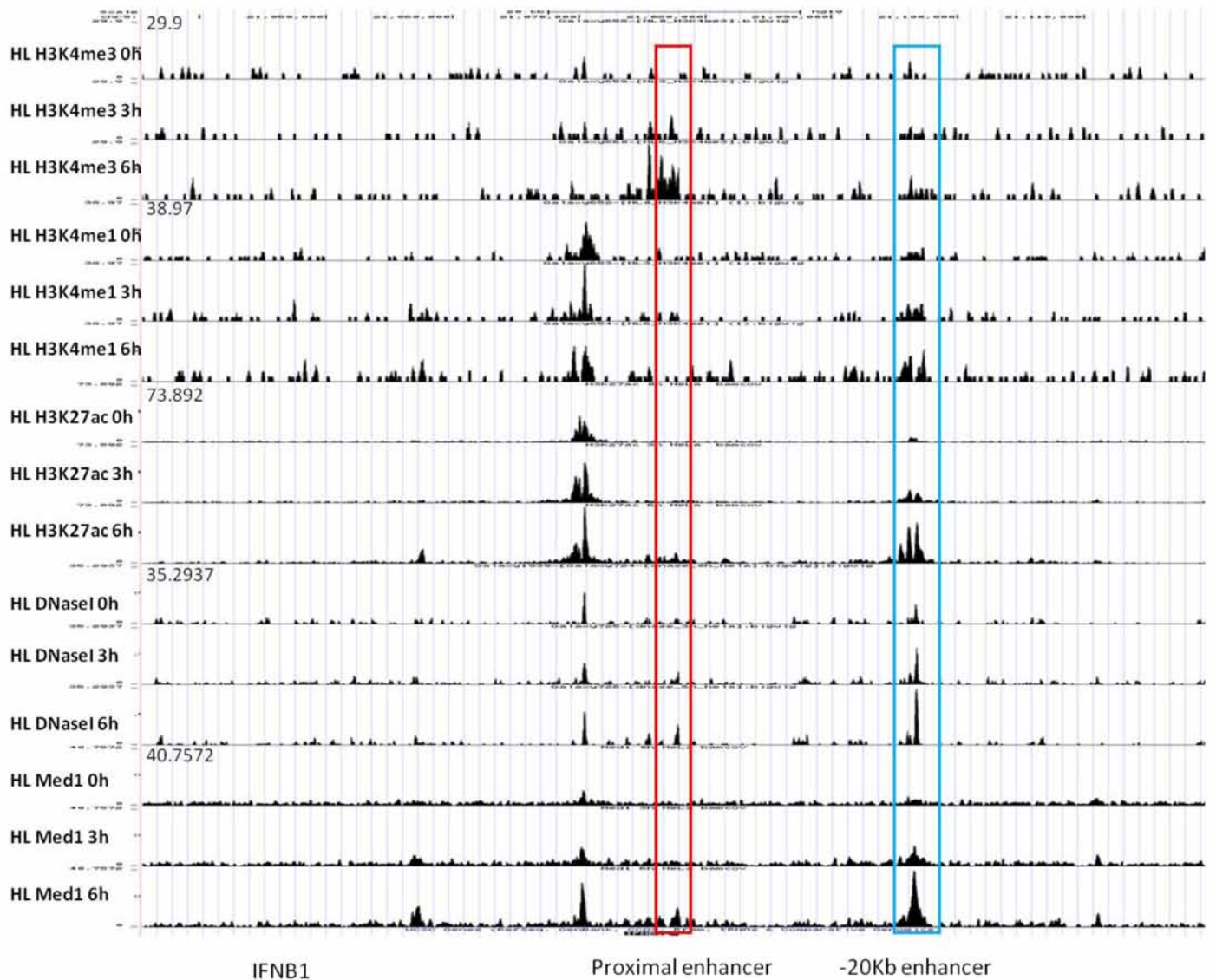
Τέλος πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων από το σύνολο των πειραμάτων ChIP για την εύρεση των ρυθμιστικών στοιχείων που φέρουν συνδυασμό ενεργών δεικτών και στη συνέχεια παρουσιάζονται κάποια μεμονωμένα παραδείγματα.



Εικόνα 66: Δείκτες χαρακτηριστικοί των ενεργών ρυθμιστικών στοιχείων γύρω από το γονίδιο της ιντερφερόνης β1 στα *Namalwa*

Για το γονίδιο της ιντερφερόνης B1 παρατηρήθηκε ότι, σε μία περιοχή ακριβώς ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου της ιντερφερόνης β, η οποία αντιπροσωπεύει τον εγγύς (proximal) υποκινητή του γονιδίου υπάρχει επαγόμενη από την ιϊκή μόλυνση αύξηση της παρουσίας των ιστονικών τροποποιήσεων H3K4me3 και H3K4me1 αλλά και της υπομονάδας MED1 του συμπλόκου του Mediator. Η προσβασιμότητα της χρωματίνης σε εκείνη την περιοχή αυξάνεται μετά από την μόλυνση των κυττάρων με SeV. Επιπλέον στην περιοχή του -20kb ενισχυτή της ιντερφερόνης παρουσιάζεται επαγόμενη από την ιϊκή μόλυνση αύξηση των ιστονικών τροποποιήσεων H3K4me1 H3K27ac, αλλά όχι της H3K4me3. Η πρόσδεση της υπομονάδας MED1 του συμπλόκου Mediator καθώς η προσβασιμότητα της χρωματίνης αυξάνεται μετά την ιϊκή μόλυνση (Εικόνα 66).

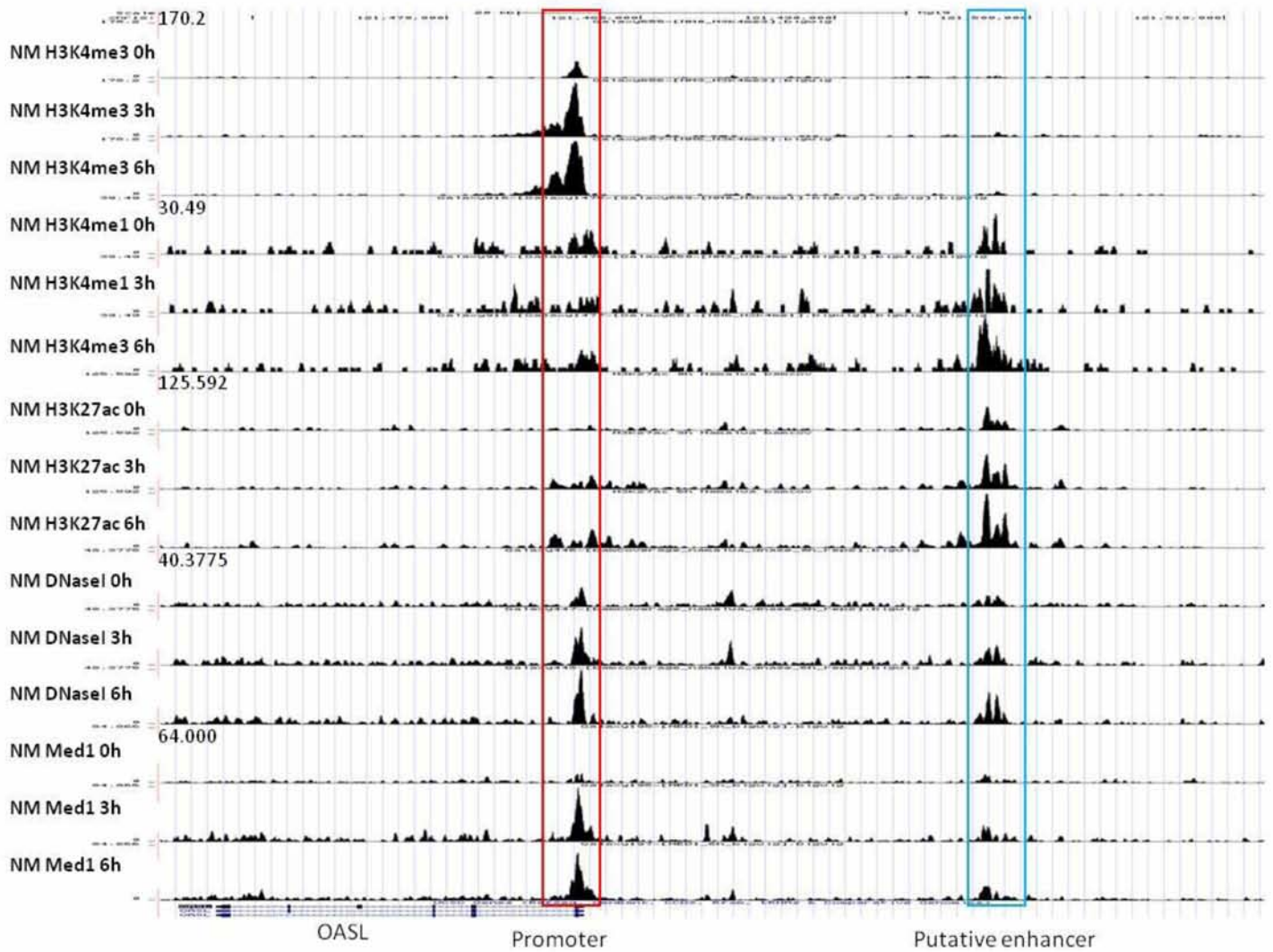
Ακολούθως πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία για το γονίδιο της ιντερφερόνης β1, με τα αντίστοιχα πειράματα, αυτή την φορά στα κύτταρα HeLa



Εικόνα 67: Δείκτες χαρακτηριστικοί των ενεργών ρυθμιστικών στοιχείων γύρω από το γονίδιο της ιντερφερόνης β1 στα HeLa.

Από την κατανομή του σήματος προέκυψε ότι στη περιοχή του εγγύς (proximal) υποκινητή του γονιδίου υπάρχει επαγόμενη από την ιϊκή μόλυνση αύξηση της παρουσίας των ιστονικών τροποποιήσεων H3K4me3 και H3K4me1 και της υπομονάδας MED1 του συμπλόκου του Mediator. Σε αυτή την περίπτωση η προσβασιμότητα της χρωματίνης σε εκείνη την περιοχή αυξάνεται μετά από την μόλυνση των κυττάρων με SeV. Επιπλέον στην περιοχή του ενισχυτή που εντοπίζεται 20 κιλοβάσεις ανοδικά του γονιδίου της ιντερφερόνης παρουσιάζεται επαγόμενη από την ιϊκή μόλυνση αύξηση και των τριών ιστονικών τροποποιήσεων (H3K4me3, H3K4me1 H3K27ac), της υπομονάδας MED1 του συμπλόκου Mediator καθώς η προσβασιμότητα της χρωματίνης αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό μετά την ιϊκή μόλυνση. Παρατηρείται επομένως ότι το πρόγραμμα της ενεργοποίησης των ρυθμιστικών στοιχείων για το γονίδιο *IFNB1* είναι κοινό σε HeLa και Namalwa (Εικόνα 67).

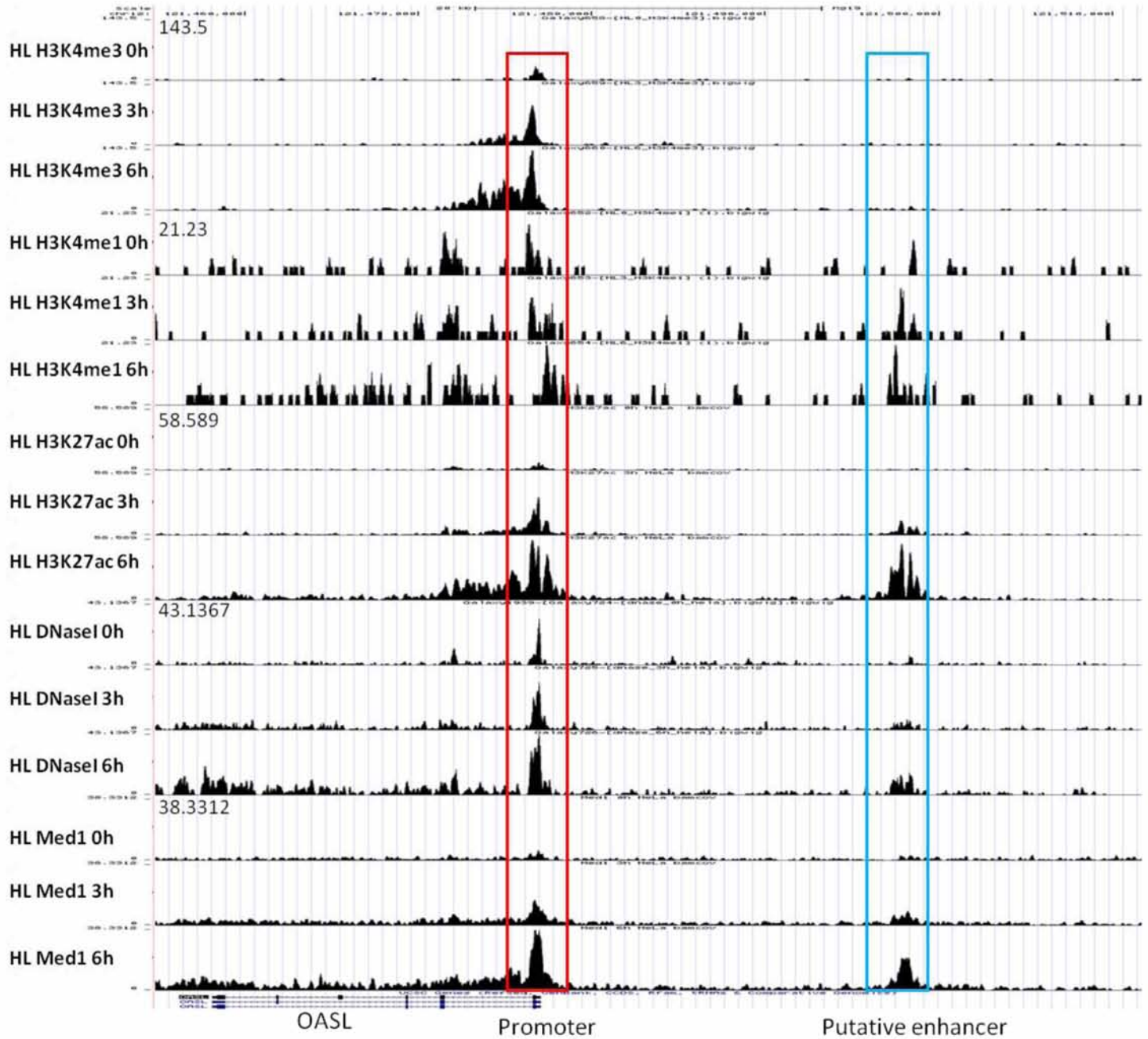
Παρόμοια είναι η εικόνα και για το γονίδιο *OASL*.



Εικόνα 68: Δείκτες χαρακτηριστικοί των ενεργών ρυθμιστικών στοιχείων γύρω από το γονίδιο *OASL* στα Namalwa

Από την παρατήρηση της κατανομής του σήματος προκύπτει ότι στην αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου πραγματοποιείται, επαγόμενη από την ιϊκή μόλυνση, αύξηση του εντοπισμού νουκλεοσωμάτων που περιέχουν τις ιστονικές τροποποιήσεις H3K4me1, H3K4me3 και H3K27ac. Στην ίδια περιοχή εντοπίζεται επαγόμενη αύξηση της πρόσδεσης του παράγοντα MED1 και αυξημένη προσβασιμότητα της χρωματίνης. Ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου εντοπίζεται μία περιοχή στην οποία παρατηρείται αύξηση, μετά την ιϊκή μόλυνση, του σήματος που αντιστοιχεί σε όλους του δείκτες αυτούς, με εξαίρεση την ιστονική τροποποίηση H3K4me3. Η περιοχή αυτή αντιστοιχεί σε έναν πιθανό ενισχυτή του γονιδίου του *OASL* (Εικόνα 68).

Κατόπιν πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία για το γονίδιο *OASL*, με τα αντίστοιχα πειράματα, στα κύτταρα HeLa.

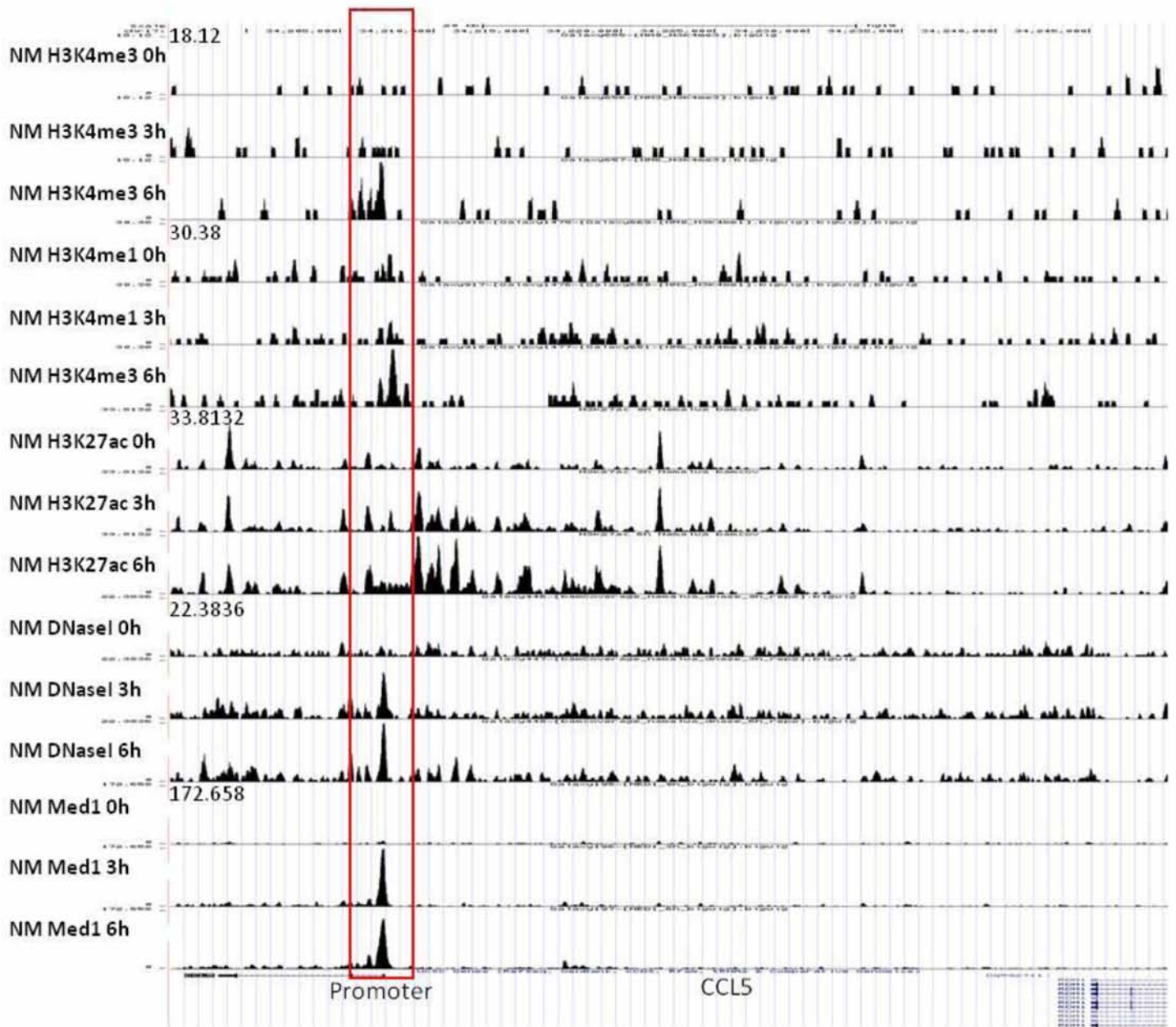


Εικόνα 69: Δείκτες χαρακτηριστικοί των ενεργών ρυθμιστικών στοιχείων γύρω από το γονίδιο *OASL* στα HeLa.

Από την εικόνα της κατανομής του σήματος προκύπτει ότι και σε αυτό τον τύπο κυττάρων στην αλληλουχία του υποκινητή πραγματοποιείται, επαγόμενη από την ιϊκή μόλυνση, αύξηση του εντοπισμού των ιστονικών τροποποιήσεων H3K4me1, H3K4me3 και H3K27ac, επαγόμενη αύξηση της πρόσδεσης του παράγοντα MED1 και αυξημένη προσβασιμότητα της χρωματίνης ήδη πριν την μόλυνση των κυττάρων με SeV. Στην περιοχή του πιθανού ενισχυτή ανοδικά του γονιδίου παρατηρείται επαγόμενη από την ιϊκή μόλυνση αύξηση του σήματος όλων των δεικτών με μοναδική εξαίρεση την ιστονική τροποποίηση H3K4me3, όπως και στα κύτταρα Namalwa. Σε αντίθεση όμως με τα κύτταρα της σειράς Namalwa, στα HeLa, παρατηρείται αύξηση του σήματος 6 ώρες μετά την μόλυνση και όχι από τις 3 ώρες. Το μόνο σήμα το οποίο είναι αυξημένο 3 ώρες μετά από την μόλυνση αντιστοιχεί στην ιστονική τροποποίηση H3K4me1 (Εικόνα 69).

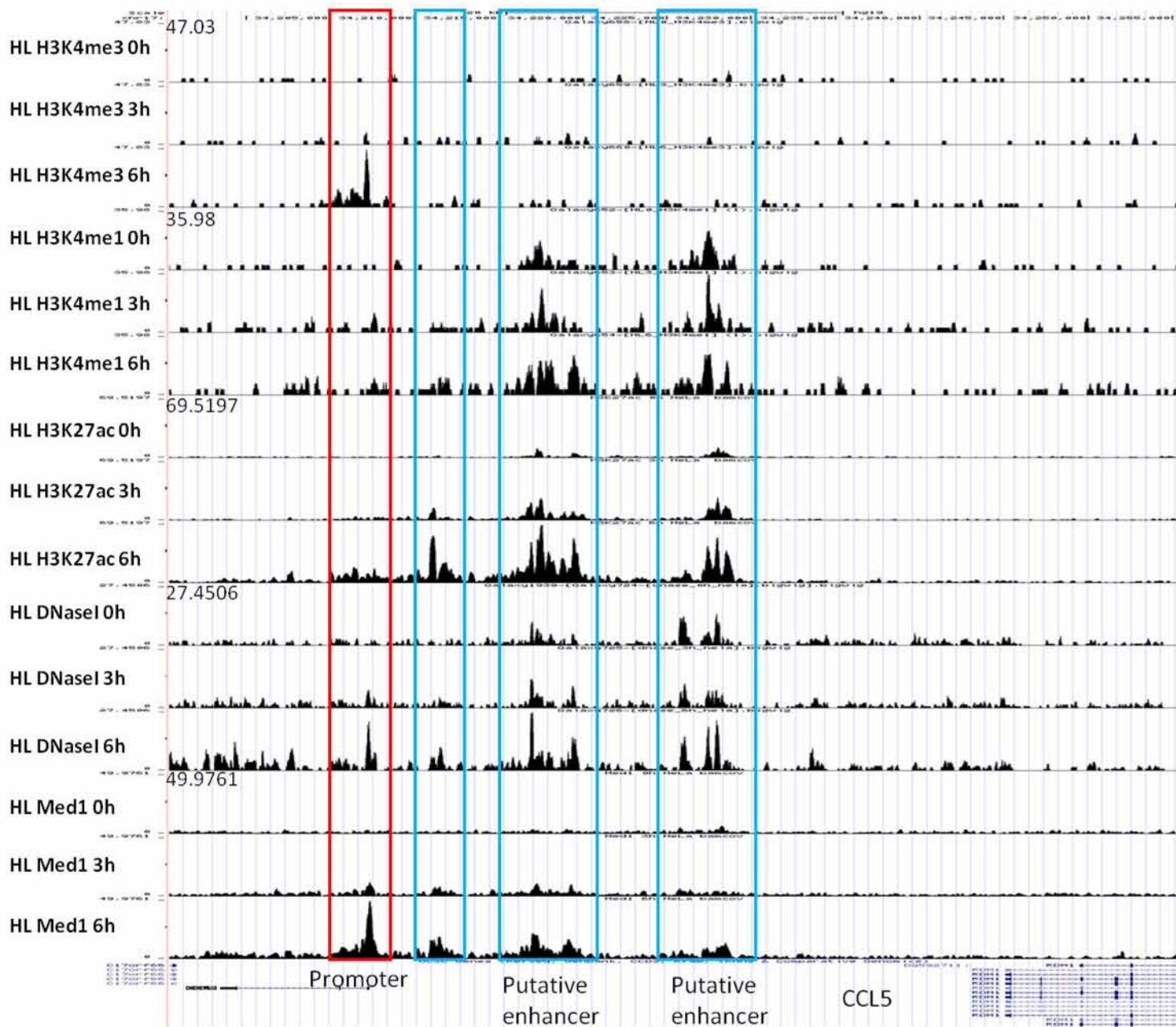
Ένα τρίτο γονίδιο για το οποίο πραγματοποιήθηκε η σύγκριση των αποτελεσμάτων από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έναντι των ιστονικών τροποποιήσεων H3K4me3, H3K4me1 και

H3K27ac και της υπομονάδας MED1 του συμπλόκου του Mediator σε κύτταρα HeLa και DNaseI-seq σε κύτταρα HeLa και Namalwa ήταν το γονίδιο *CCL5*.



Εικόνα 70: Δείκτες χαρακτηριστικοί των ενεργών ρυθμιστικών στοιχείων γύρω από το γονίδιο *CCL5* στα Namalwa

Από την παρατήρηση της εικόνας της κατανομής του σήματος από τα πειράματα ChIP-seq για τις ιστονικές τροποποιήσεις H3K4me3, H3K4me1 και H3K27ac και της υπομονάδας MED1 του συμπλόκου του Mediator και DNaseI-seq, προκύπτει ότι στον υποκινητή του γονιδίου *CCL5* στα κύτταρα Namalwa, η χρωματίνη αποκτά αυξημένη προσβασιμότητα μετά από την ιική μόλυνση. Επιπλέον οι ιστονικές τροποποιήσεις H3K4me3, H3K4me1 και H3K27ac εμφανίζουν μεγαλύτερη αντιπροσώπευση σε αυτή την περιοχή κατόπιν της ιικής μόλυνσης. Τέλος, η ιική μόλυνση επάγει σε μεγάλο βαθμό τη πρόσδεση του παράγοντα MED1 στον υποκινητή του γονιδίου *CCL5* (Εικόνα 70).



Εικόνα 71: Δείκτες χαρακτηριστικοί των ενεργών ρυθμιστικών στοιχείων γύρω από το γονίδιο *CCL5* στα HeLa

Από την παρατήρηση της κατανομής του σήματος γύρω από το γονίδιο *CCL5* στα κύτταρα HeLa, προκύπτουν τα παρακάτω. Αρχικά στον υποκινητή αυτού του γονιδίου παρατηρούνται οι ίδιες αλλαγές με εκείνες που παρατηρούνται και στον υποκινητή του γονιδίου στα κύτταρα Namalwa. Σε αντίθεση όμως με την εικόνα της κατανομής του σήματος γύρω από το γονίδιο *CCL5* στα Namalwa, εδώ παρατηρείται αύξηση των σημάτων από τα πειράματα ChIP-seq έναντι των H3K4me1 και H3K27ac και MED1 και του DNaseI-seq 3 και 6 ώρες μετά από την έκθεση των κυττάρων στον SeV, σε τρεις περιοχές ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου. Οι περιοχές αυτές αντιστοιχούν σε αλληλουχίες πιθανών ενισχυτών, οι οποίοι είναι παρόντες μόνο στα κύτταρα HeLa και όχι στα Namalwa (Εικόνα 71).

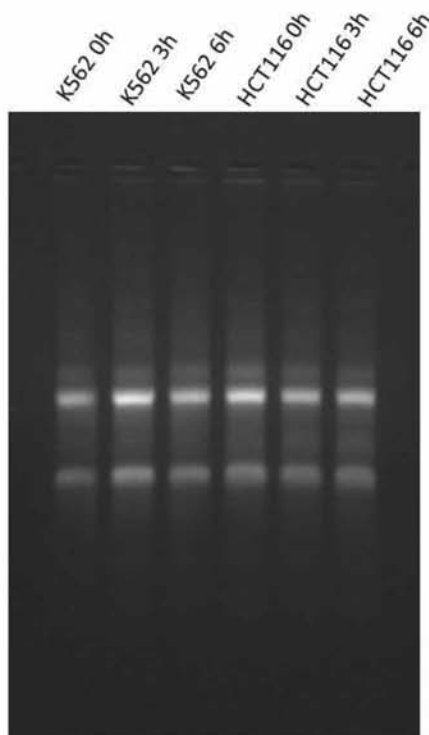
ΜΕΡΟΣ Β

3.3. Εναλλακτικό κυτταρικό σύστημα για πειράματα STARR-seq

Έρευνα έχει δείξει ότι η εισαγωγή STARR βιβλιοθήκης σε ευκαρυωτικά κύτταρα (Transfection) είναι ικανή να ενεργοποιήσει την αντι-ιϊκή απόκριση των κυττάρων χωρίς τα κύτταρα να εκτεθούν σε ιό (Muerdter et al., 2017).

3.3.1. Έλεγχος καταλληλότητας των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών K562 και HCT116 για χρήση σε πειράματα STARR-seq

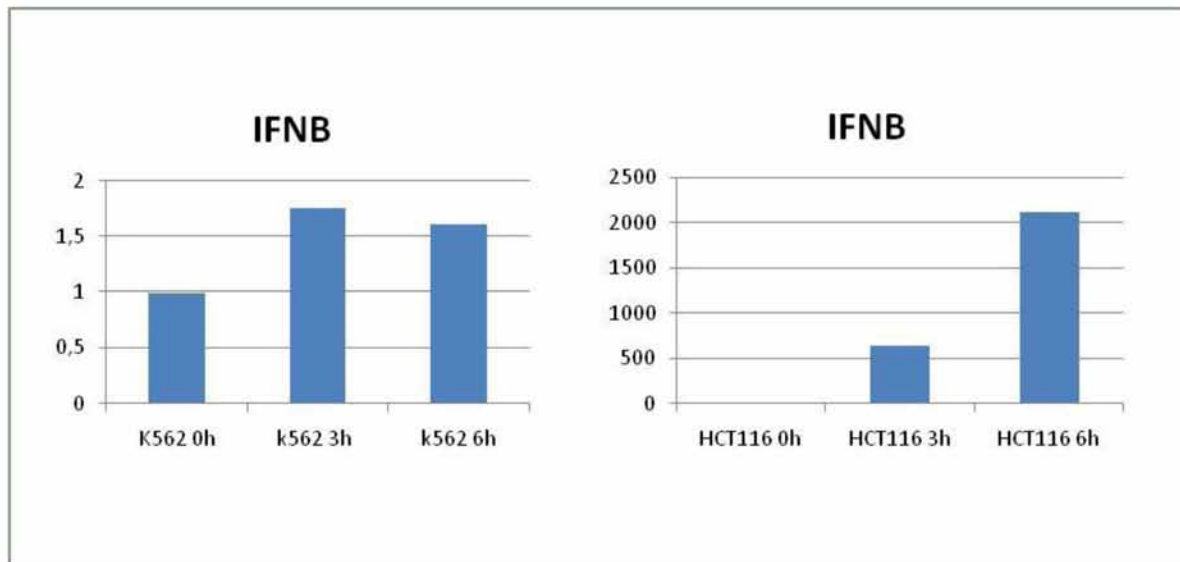
Πρώτο βήμα για τον έλεγχο της καταλληλότητας των κυτταρικών σειρών K562 και HCT116, για την χρήση σε πειράματα STARR-seq πειραμάτων, αποτέλεσε ο έλεγχος της απόκρισης των κυτταρικών αυτών σειρών σε μόλυνση με SeV. Για την πραγματοποίηση αυτού του ελέγχου κύτταρα K562 και HCT116 καλλιεργήθηκαν σε μικρή έκταση, κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες, και στη συνέχεια μολύνθηκαν με ιό για 0, 3 και 6 ώρες (~800.000 κύτταρα/timepoint). Κατόπιν πραγματοποιήθηκε απομόνωση του RNA των κυττάρων αυτών, από το οποίο δημιουργήθηκε cDNA. Το cDNA αυτό χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα Real Time qPCR ώστε να ελεγχθεί η επαγωγή της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων.



Εικόνα 72: Ηλεκτροφόρηση απομονωμένου RNA από κύτταρα K562 και HCT116 που έχουν μολυνθεί με ιό για 0h, 3h και 6h σε 1% πήκτωμα αγαρόζης. Διακρίνονται δύο μπάντες καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε μια από τις δύο ριβοσωμικές υπομονάδες.

Κατόπιν της απομόνωσης του RNA από τα κύτταρα, μέρος του υλικού αυτού ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% ώστε να ελεγχθεί η επιτυχία της διαδικασίας και η ποιότητα του υλικού (Εικόνα 72). Ο έλεγχος αυτός επιβεβαίωσε την ακεραιότητα του και στη συνέχεια ακολούθησε RT-PCR για την δημιουργία cDNA. Το cDNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε PCR αντίδραση πραγματικού χρόνου με 2 ζεύγη

εκκινητών, ένα από τα οποία ενισχύει αλληλουχίες cDNA που δημιουργήθηκαν από τα RNA της ιντερφερόνης και το δεύτερο αντίστοιχες αλληλουχίες από το γονίδιο *GAPDH*.



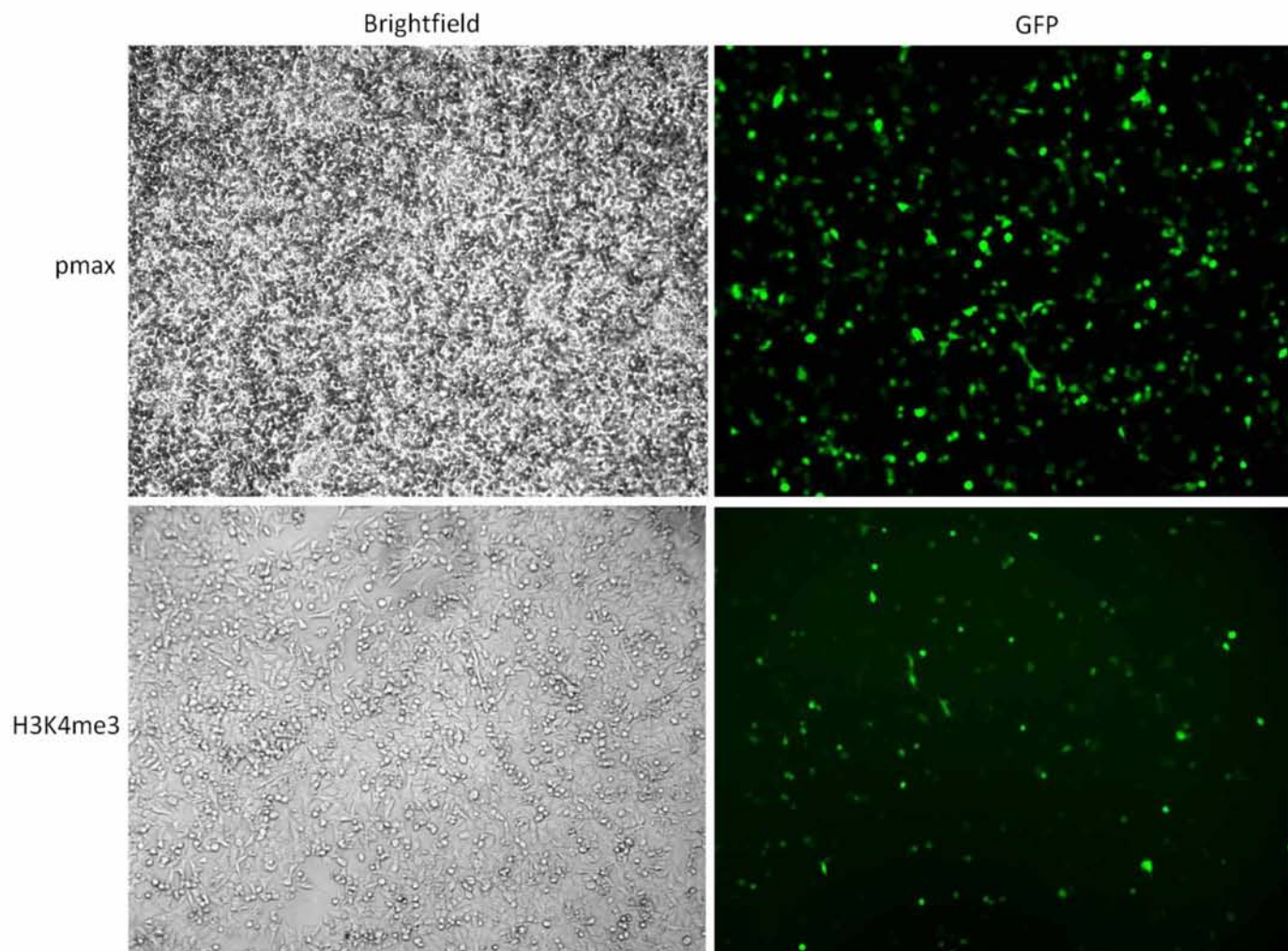
Εικόνα 73: Real Time qPCR σε cDNA που δημιουργήθηκε από RNA κυττάρων K562 και HCT116 που έχουν μολυνθεί με SeV για 0h, 3h και 6h με χρήση εκκινητών για την *IFNB* και το *GAPDH*. Μετά την ιϊκή μόλυνση τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου της ιντερφερόνης στα κύτταρα HCT116, αυξάνονται δραματικά με την ποσότητα των μεταγράφων του γονιδίου να έχει αυξηθεί 2000 φορές στις 6 ώρες μετά την ιϊκή μόλυνση σε σχέση με αυτή των 0 ωρών. Αντίθετα στα κύτταρα της σειράς K562 δεν παρουσιάζεται σημαντική επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου της ιντερφερόνης μετά την έκθεση των κυττάρων στον SeV.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real Time PCR έγινε με την μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$ και η κανονικοποίηση με βάση το γονίδιο *GAPDH* (Εικόνα 73). Από το αποτέλεσμα της Real Time PCR προκύπτει ότι στα κύτταρα της σειράς K562 δεν γίνεται επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της ιντερφερόνης από την μόλυνση των κυττάρων με SeV. Αντίθετα η μεταγραφή του γονιδίου της ιντερφερόνης Β αυξάνεται κατά πολύ μετά από την έκθεση των κυττάρων στον ιό. Έτσι τα κύτταρα K562 απορρίπτονται ως πιθανοί αντικαταστάτες των κυττάρων HeLa και Namalwa για πειράματα Starr-seq, καθώς σε αυτά δεν επάγεται η έκφραση του γονιδίου της ιντερφερόνης μετά από έκθεση τους σε SeV.

3.3.2. Πείραμα Starr με χρήση κυττάρων HCT116

Εφόσον επιβεβαιώθηκε η επιθυμητή απόκριση των κυττάρων HCT116 στην ιϊκή μόλυνση, αυτά αναπτύσσονται για να χρησιμοποιηθούν σε μία σειρά πειραμάτων τα οποία έχουν ως σκοπό να αποκαλύψουν αν στα κύτταρα αυτά επάγεται ή όχι η αντι-ιϊκή απόκριση μετά από transfection.

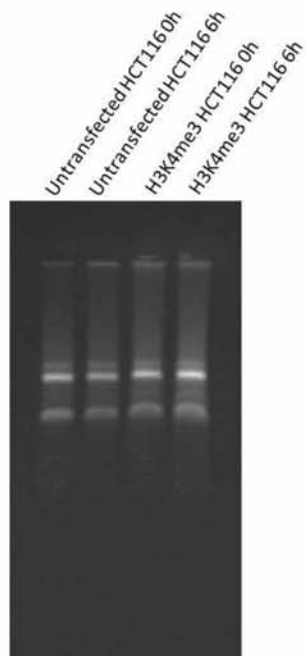
Αρχικά έγινε εισαγωγή μίας Starr H3K4me3 πλασμιδιακής βιβλιοθήκης (κομμάτια DNA που προέρχονται από πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της ιστονικής τροποποίησης H3K4me3 κλωνοποιημένα σε έναν Starr φορέα) σε κύτταρα HCT116. Επίσης πραγματοποιήθηκε transfection στα κύτταρα αυτά και με το πλασμίδιο pmax, το οποίο έπειτα από την εισαγωγή του στα κύτταρα οδηγεί σε έκφραση GFP, και χρησιμοποιείται ως θετικό control για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του transfection.



Εικόνα 74: Φωτογραφίες HCT116 κυττάρων στα οποία έχει γίνει εισαγωγή H3K4me3 Starr βιβλιοθήκης. Στο πάνω μέρος της εικόνας φαίνονται HCT116 κύτταρα τα οποία έχουν διαμολυνθεί με το πλασμίδιο pmax (αριστερά παρουσιάζεται το σύνολο των κυττάρων και δεξιά φαίνονται τα κύτταρα στα οποία έχει γίνει επιτυχής εισαγωγή του pmax). Στο κάτω μέρος της εικόνας εμφανίζονται κύτταρα HCT116 στα οποία έχει γίνει εισαγωγή της Starr βιβλιοθήκης H3K4me3 (αριστερά διακρίνεται το σύνολο των κυττάρων και δεξιά μόνο αυτά στα οποία εκφράζεται GFP).

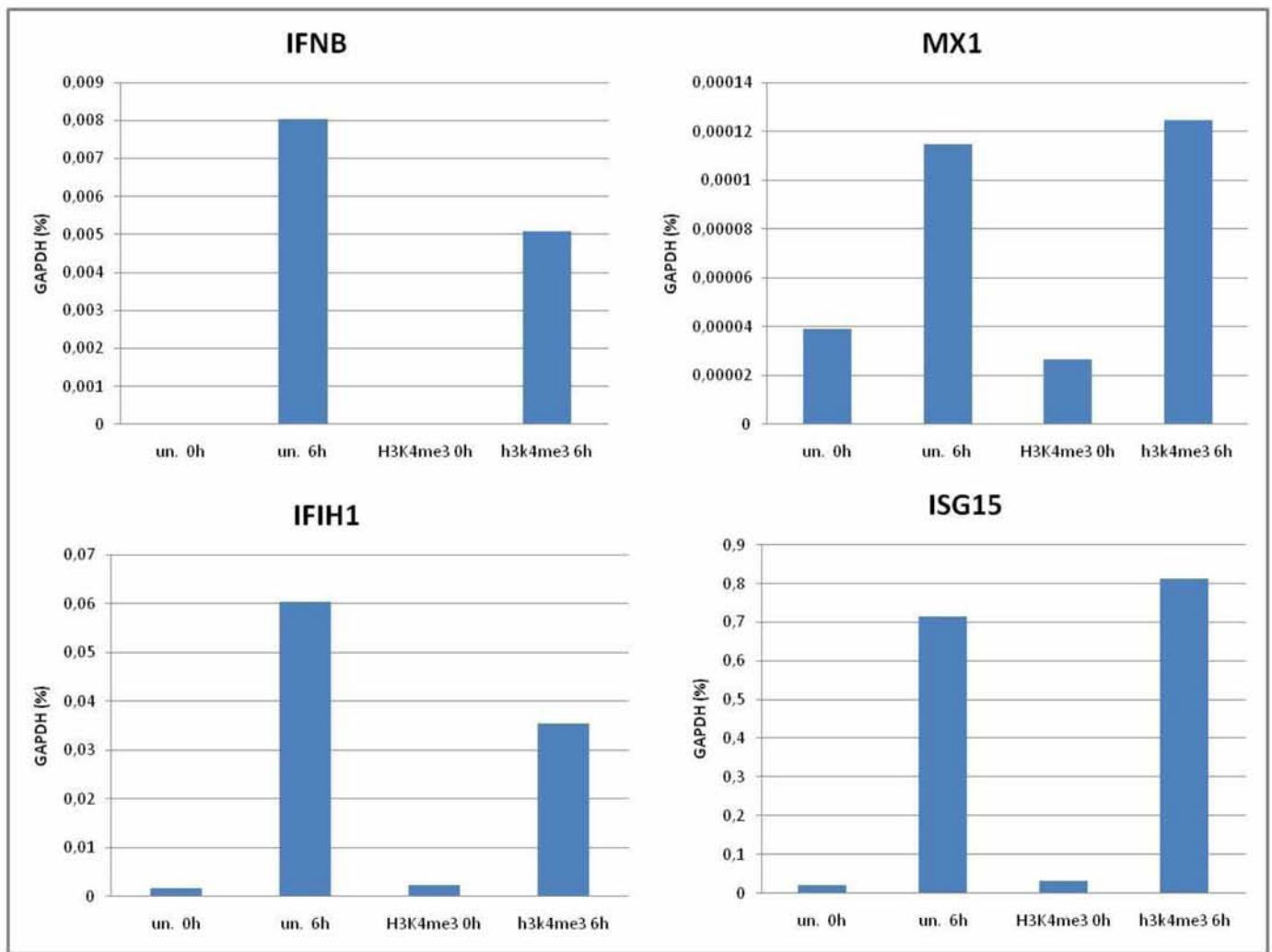
Εικοσιτέσσερις ώρες μετά το transfection τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Από την παρατήρηση των κυττάρων προκύπτει ότι ~40% των κυττάρων έχει δεχθεί το πλασμίδιο pmax και επομένως το πρωτόκολλο της διαμόλυνσης ήταν επιτυχές. Επίσης εντοπίζεται και ένας ικανοποιητικός αριθμός κυττάρων τα οποία έχουν δεχθεί πλασμίδια της H3K4me3 βιβλιοθήκης (Εικόνα 74).

Κατόπιν μολύνονται με Sendai ιό κύτταρα HCT116 τα οποία δεν έχουν υποβληθεί σε transfection και κύτταρα HCT116 στα οποία έχει γίνει εισαγωγή της Starr βιβλιοθήκης. Έξι ώρες μετά την πραγματοποίηση της μόλυνσης τα κύτταρα συλλέγονται και πραγματοποιείται απομόνωση RNA από αυτά.



Εικόνα 75: Ηλεκτροφόρηση RNA από κύτταρα HCT116 σε πηκτική αгарόζης. Τα δείγματα από αριστερά προς τα δεξιά προέρχονται από κύτταρα HCT116 που δεν έχουν υποστεί transfection και δεν έχουν μολυνθεί με ιό ή έχουν μολυνθεί για 6h αντίστοιχα, και από κύτταρα HCT116 στα οποία έχει πραγματοποιηθεί εισαγωγή Start βιβλιοθήκης H3K4me3, και δεν έχουν μολυνθεί με ιό ή έχουν μολυνθεί για 6 ώρες, με αυτή την σειρά.

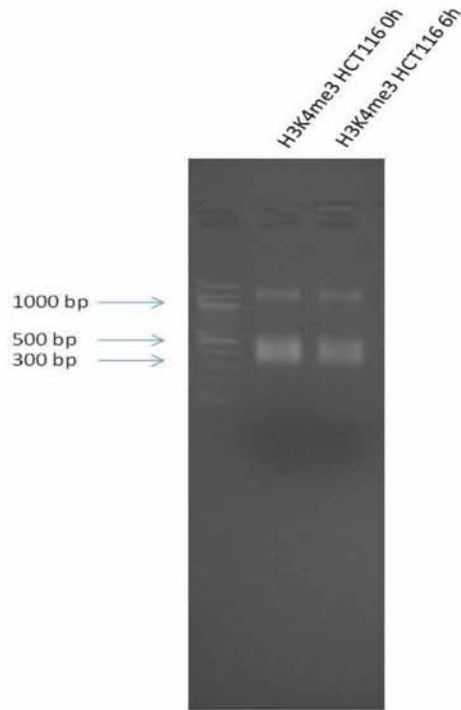
Ένα μέρος από το RNA αυτό χρησιμοποιείται ως μήτρα για την δημιουργία cDNA, το οποίο στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα σε Real Time qPCR για να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων (Εικόνα 75).



Εικόνα 76: Real Time qPCR σε κύτταρα HCT. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *IFNB1*, *MX1*, *IFIH1* και *ISG15*. Παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων αυτών 6 ώρες μετά από ιική μόλυνση στα κύτταρα που δεν έχουν δεχθεί πλασμίδιο αλλά και σε αυτά που έχει γίνει εισαγωγή της βιβλιοθήκης.

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιήθηκαν 4 ζεύγη εκκινητών τα οποία ενισχύουν αλληλουχίες cDNA που αντιστοιχούν στα μετάγραφα του γονιδίου της ιντερφερόνης και των επαγόμενων από την ιντερφερόνη γονιδίων *MX1*, *IFIH1* και *ISG15*. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real Time PCR έγινε με την μέθοδο $2^{-\Delta Ct}$ με βάση το γονίδιο *GAPDH*. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτή υποδεικνύουν πως τα επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων *IFNB1*, *MX1*, *IFIH1* και *ISG15* αυξάνονται μετά την ιική μόλυνση στα κύτταρα HCT116 είτε αυτά έχουν δεχθεί την Starr βιβλιοθήκη H3K4me3 είτε όχι (Εικόνα 76).

Μέρος του RNA που απομονώθηκε από τα HCT116 κύτταρα, στα οποία έχει γίνει εισαγωγή της βιβλιοθήκης H3K4me3 και δεν έχουν μολυνθεί ή έχουν μολυνθεί με ιό για 6 ώρες, υποβλήθηκε σε poly(A)-selection για τον εμπλουτισμό του σε mRNA καθώς αυτό θα χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία Starr βιβλιοθήκης και θα πρέπει να μην περιέχει rRNA το οποίο θα αλλοιώσει την πολυπλοκότητα της βιβλιοθήκης που πρόκειται να κατασκευαστεί. Ακολούθως το υλικό αυτό υποβλήθηκε σε κατεργασία με DNaseI για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα DNA και ακολούθησε καθαρισμός με τη χρήση του RNeasy Mini Kit. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο κατασκευής Starr βιβλιοθήκης που περιλαμβάνει τη δημιουργία cDNA και Nested PCR. Τέλος πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση μίας μικρής ποσότητας, από την βιβλιοθήκη που κατασκευάστηκε, με σκοπό την επιβεβαίωση της επιτυχίας του πρωτοκόλλου.

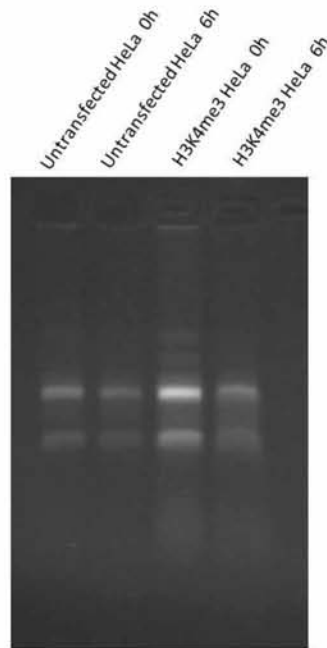


Εικόνα 77: Ηλεκτροφόρηση της Starr βιβλιοθήκης H3K4me3. Από αριστερά προς τα δεξιά εμφανίζονται , το δείγμα αναφοράς (ladder), η βιβλιοθήκη που κατασκευάστηκε από κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί transfection με H3K4me3 βιβλιοθήκη και η βιβλιοθήκη που κατασκευάστηκε από κύτταρα τα οποία έχουν δεχθεί την βιβλιοθήκη H3K4me3 και έχουν μολυνθεί με ιό 6 ώρες πριν την απομόνωση του RNA. Η ζώνωση με μήκος ~1000bp αντιστοιχεί στο προϊόν της πρώτης PCR του Nested πρωτοκόλλου και η δεύτερη ζώνη αντιστοιχεί στο προϊόν της δεύτερης PCR (βιβλιοθήκη).

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης επιβεβαιώνει την επιτυχία της κατασκευής της βιβλιοθήκης και υποδηλώνει πως στα HCT116 κύτταρα πραγματοποιείται μεταγραφή επισωμικού DNA (Εικόνα 77).

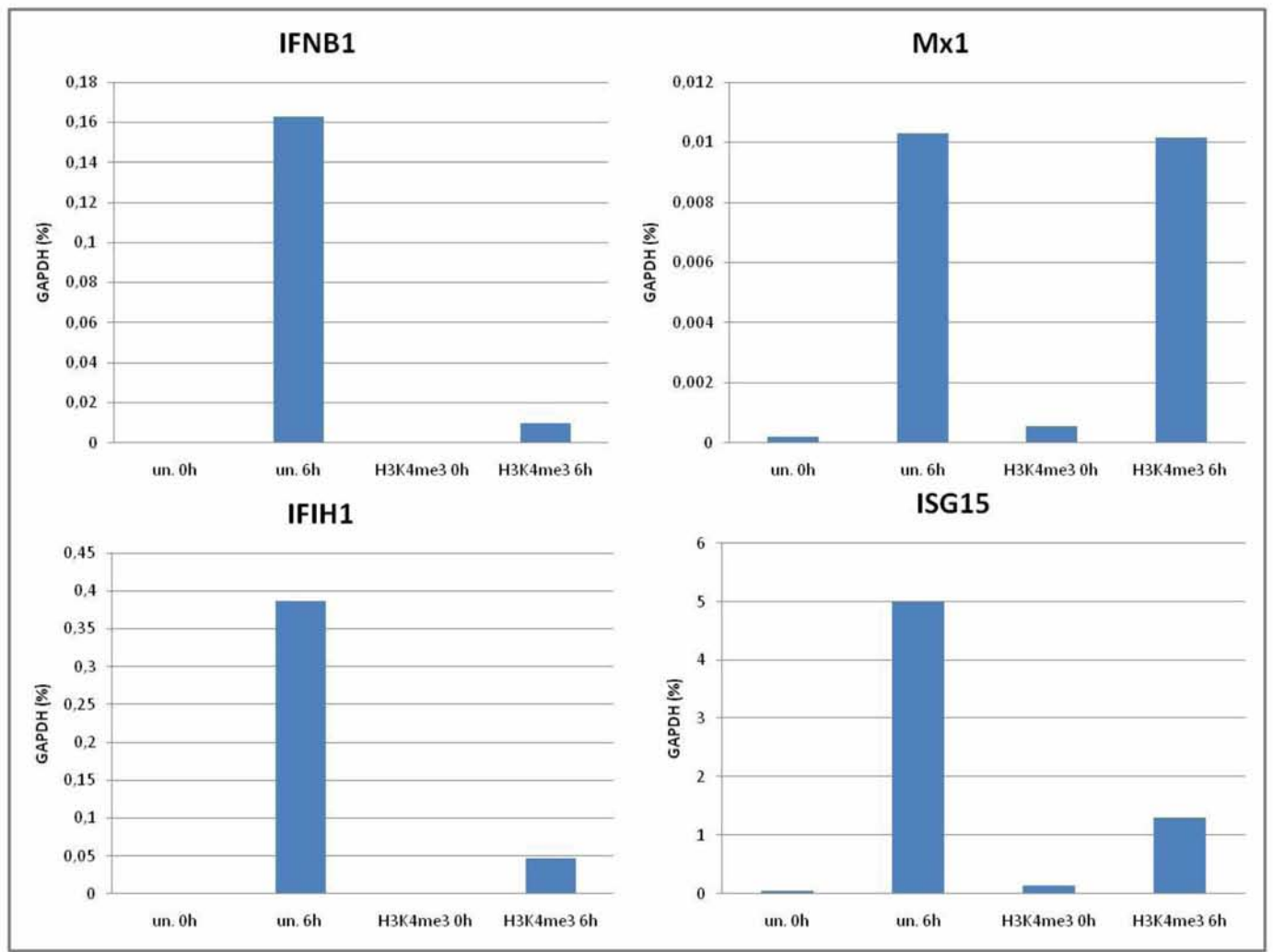
3.3.3. Transfection σε κύτταρα HeLa

Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με την βιβλιοθήκη H3K4me3, όπως και τα HCT116. Κατόπιν, τα κύτταρα μολύνθηκαν με SeV και ακολούθησε απομόνωση RNA από αυτά.



Εικόνα 78: Ηλεκτροφόρηση RNA υλικού που απομονώθηκε από κύτταρα HeLa τα οποία δεν έχουν μολυνθεί με ίο ή έχουν μολυνθεί για 6h και από HeLa στα οποία έχει γίνει εισαγωγή βιβλιοθήκης H3K4me3 και δεν έχουν έρθει σε επαφή με τον SeV ή έχουν μολυνθεί από αυτόν.

Το RNA αυτό χρησιμοποιήθηκε ως καλούπι για την δημιουργία cDNA σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και στην συνέχεια το cDNA που κατασκευάστηκε χρησιμοποιήθηκε σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για να ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης ορισμένων γονιδίων (Εικόνα 78).



Εικόνα 79: Real Time qPCR σε κύτταρα HeLa. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *IFNB1*, *MX1*, *IFIH1* και *ISG15*. Παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων αυτών 6 ώρες μετά από ιική μόλυνση στα κύτταρα που δεν έχουν δεχθεί πλασμίδιο αλλά και σε αυτά που έχει γίνει εισαγωγή της βιβλιοθήκης. Δεν παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης γονιδίου της ιντερφερόνης, στα κύτταρα που έχει γίνει εισαγωγή της βιβλιοθήκης αλλά δεν έχουν μολυνθεί με ιό.

Από το αποτέλεσμα της Real Time qPCR συμπεραίνουμε ότι παρά το γεγονός, ότι αναμένεται αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την αντι-ϊική απόκριση των κυττάρων μετά από το transfection, σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Muerdter et al., 2018), εδώ δεν παρατηρείται κάτι τέτοιο. Υποθέτουμε ότι η μη ενεργοποίηση της αντι-ϊικής απόκρισης των κυττάρων στην εισαγωγή της πλασμιδιακής βιβλιοθήκης μπορεί να σχετίζεται με το είδος των αλληλουχιών οι οποίες περιέχονται στη βιβλιοθήκη (εδώ βιβλιοθήκη H3K4me3) (Εικόνα 79).

4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Οι ιϊκές μολύνσεις έχουν ως χαρακτηριστικό τα υψηλά επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας και αποτελούν παγκόσμια απειλή για την ανθρώπινη υγεία, και κατ' επέκταση για την εύρυθμη λειτουργία των σύγχρονων κοινωνιών. Εκτός από τις άμεσες επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία, οι ιϊκές μολύνσεις μπορούν να ενεργοποιήσουν ή να προδιαθέσουν για την εκδήλωση διαφόρων ασθενειών όπως ο διαβήτης τύπου 1 και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα (Kallionpää et al., 2014). Οι ερευνητικές προσπάθειες σε επαγόμενα από ιούς συστήματα-μοντέλα έχουν οδηγήσει στη διαλεύκανση των βασικών φαινομένων ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, χωρίς όμως να έχει επιτευχθεί η κατανόηση της υποκείμενης ρυθμιστικής λογικής η οποία βρίσκεται αποθηκευμένη στο γονιδίωμα τους με τη μορφή ψηφιακού κώδικα. Οι ενισχυτές σε συνδυασμό με τους μεταγραφικούς παράγοντες και την τοπική αρχιτεκτονική των χρωματινικών επιφανειών συγκροτούν ένα ρυθμιστικό κώδικα ο οποίος καθορίζει το βαθμό επαγωγής παρακείμενων ή απομακρυσμένων γονιδίων και διέπεται από μηχανιστική λογική η οποία παραμένει δύσκολο να αποκρυπτογραφηθεί (Banos, Agelopoulos, & Thanos, 2013; Agelopoulos and Thanos, 2006; Agaloti et al., 2000).

Τα ρυθμιστικά στοιχεία χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες βιοχημικές ενεργότητες και δομικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για την ευρείας κλίμακας ταυτοποίησή τους στο γονιδίωμα (Calo and Wysocka, 2013). Οι ενισχυτές χαρακτηρίζονται από αυξημένη προσβασιμότητα της χρωματίνης και από μια σειρά τροποποιήσεων της H3 ιστόνης που υποδηλώνουν την ενεργοποίηση ή την αποσιώπησή τους, όπως οι H3K4me1 και H3K27ac (ενεργοποιητικές τροποποιήσεις) και η H3K9me3 (ανασταλτική τροποποίηση) (Dunham et al., 2012). Εκτός όμως από τη γραμμική τους διάσταση τα ευκαρυωτικά γονιδιώματα οργανώνονται στο χώρο σε μια πολύπλοκη, συμπαγή και πολυεπίπεδη αρχιτεκτονική (Rao et al., 2017). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, απομακρυσμένα μεταξύ τους γονίδια στη γραμμική αλληλουχία (cis) γειτνιάζουν στο χώρο (trans) οδηγώντας σε γενωμικούς/χρωματινικούς σχηματισμούς, όπου η πολυάριθμη συνάθροιση ρυθμιστικών μονάδων επιτρέπει τη συντονισμένη έκφρασή τους. Η υπόθεσή μας έγκειται στο ότι ο σχηματισμός αυτών των τρισδιάστατων χρωματινικών δομών επηρεάζεται από τα εξωκυττάρια ερεθίσματα με συνέπεια, φαινόμενα όπως η ιϊκή μόλυνση να οδηγούν στο σχηματισμό μοναδικών χρωματινικών δομών στον ευκαρυωτικό πυρήνα.

Η λειτουργία όλων των οργανισμών στηρίζεται στην αξιόπιστη χωροχρονική και ποσοτική έκφραση των γονιδίων. Στην περίπτωση του ανθρώπου, τα ~20.000 γονίδια ελέγχονται από περίπου 1.000.000 ρυθμιστικά στοιχεία DNA διεσπαρμένα στο ανθρώπινο γονιδίωμα τα οποία δρουν ως ροοστάτες της γονιδιακής έκφρασης με θετικό (ενισχυτές) ή αρνητικό (αποσιωποητές) ρόλο (ENCODE Project Consortium, 2012). Η διαπίστωση ότι άνω του 90% των γενετικών πολυμορφισμών που συνδέονται με ασθένειες χαρτογραφούνται σε μη κωδικές περιοχές ενισχύει περαιτέρω τον κρίσιμο ρόλο των ενισχυτών στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία των οργανισμών (Dunham et al., 2012). Η ανάπτυξη των νέων τεχνολογιών της γονιδιωματικής με επίκεντρο την αλληλούχιση DNA νέας γενιάς (Next Generation DNA sequencing, NGS), επιτρέπει πλέον τον ολιστικό χαρακτηρισμό των ενισχυτών και την απάντηση σε σημαντικά ερωτήματα τα οποία παραμένουν νεφελώδη για πολλά χρόνια όπως: α) πώς είναι δυνατόν ενισχυτές που εδράζονται χιλιάδες βάσεις μακριά από τα γονίδια στόχους να αλληλεπιδρούν με αυτά; β) υπάρχουν κανόνες οι οποίοι ελέγχουν τη σχετική θέση των ενισχυτών και των γονιδίων στόχων τους στον πυρήνα; γ) υπάρχουν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ ενισχυτών που ελέγχουν γονίδια τα οποία συν-εκφράζονται και συν-ρυθμίζονται; δ) έχουν οι κυτταρικές αποκρίσεις σχέση με συγκεκριμένες περιοχές του ρυθμιστικού τμήματος του γονιδιώματος. Το παραπάνω εννοιολογικό πλαίσιο οδήγησε στο σχεδιασμό και πραγματοποίηση ενός επιστημονικού προγράμματος στο εργαστήριο του Δρος. Μάριου Αγγελόπουλου στο I.I.B.E.A.Α μέρος του οποίου αποτελεί η παρούσα εργασία.

Η παρούσα διπλωματική εργασία περιλαμβάνει μια ολιστική προσέγγιση η οποία συμβάλει στη διαλεύκανση στοιχείων του μηχανισμού βάση του οποίου τα ανθρώπινα κύτταρα ενεργοποιούν συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματός τους ώστε να αποκριθούν ορθά στην ιϊκή μόλυνση, εκφράζοντας το κατάλληλο πλέγμα γονιδίων. Η εκτέλεση πειραμάτων βιοχημείας σε συνδυασμό με αλληλούχιση οδήγησε στην δημιουργία τοπογραφικών χαρτών που περιγράφουν τις ακριβείς θέσεις μέσα στο γονιδίωμα όπου ιστονικές τροποποιήσεις, μεταγραφικοί παράγοντες και η μεταγραφική μηχανή εντοπίζονται. Είναι αξιοσημείωτο, πως η συνδυαστική ανάλυση των αποτελεσμάτων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι σε πολλές περιπτώσεις υπάρχει συνεντοπισμός των παραπάνω δεικτών. Ως εκ τούτου μια υπόθεση που γεννάται, είναι πως η ύπαρξη συνεντοπισμού ίσως υποδηλώνει την ύπαρξη κάποιου συντονισμένου μηχανισμού ρυθμίσεως. Το παραπάνω συνάδει με τη σκέψη πως η αντι-ϊϊκή απόκριση είναι ένα χωροχρονικά οριοθετημένο φαινόμενο των ζωντανών κυττάρων και δεν χαρακτηρίζεται από άναρχη εξέλιξη και λειτουργία. Η υπόθεσή μας, είναι πως ο συντονισμός της ενεργοποίησης των ενισχυτών που είναι υπεύθυνοι για την μεταγραφική ενεργοποίηση των αντι-ϊϊκών γονιδίων πραγματοποιείται μέσω ζεύξης τους, σε συγκεκριμένα σημεία του ευκαρυωτικού πυρήνα με επακόλουθο σχηματισμό ρυθμιστικών κυκλωμάτων. Σε αυτό το φαινόμενο καθοριστική είναι η συμβολή μεταγραφικών παραγόντων και δομικών πρωτεϊνών.

Οι παραπάνω υποθέσεις βρίσκουν απαντήσεις μέσω των αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν. Αναλυτικά, σε Β-λεμφοκύτταρα ταυτοποιήθηκαν περίπου 2.000 πιθανοί ενισχυτές οι οποίοι είναι τυχαία διεσπαρμένοι μέσα στο γονιδίωμα και εμφανίζουν επαγόμενη παρουσία της H3K27ac. Οι αλληλουχίες αυτές φιλοξενούν στο σύνολο ή κατά μέρος επιπλέον δείκτες όπως προσβασιμότητα, STAT2, MED1 κ.λ.π. Επομένως γίνεται αντιληπτό πως η αντι-ϊϊκή απόκριση προκαλεί –αν όχι απαιτεί– τακτική αναδιοργάνωση της χρωματίνης και εμπλουτισμό των επιφανειών με μεταγραφικούς παράγοντες και τροποποιήσεις των νουκλεοσωμάτων, ώστε η υποκείμενη αλληλουχία DNA να ενεργοποιηθεί ως ενισχυτής κάνοντας χρήση των θέσεων πρόσδεσης που φιλοξενεί και πιθανότατα ερχόμενη σε επαφή με αντίστοιχα στοιχεία υποκινητών. Η παραπάνω παρατήρηση επιβεβαιώνεται και στα κύτταρα HeLa όπου περίπου 3.000 ενισχυτές ακολουθούν το πρότυπο της παρουσίας H3K27ac να συνοδεύεται επίσης από μεταγραφικούς παράγοντες και τροποποιήσεις. Το σημαντικό είναι πως ο μηχανισμός ομοιάζει στις δυο κυτταρικές σειρές αλλά οι αλληλουχίες που ταυτοποιούνται έχουν βαθμό ομοιότητας ως 15% και επομένως αποδεικνύεται πως οι δυο διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι ενεργοποιούν, με τον ίδιο μηχανισμό, διαφορετική μοίρα του μη κωδικού DNA προκειμένου να αποκριθούν ορθά. Το στοιχείο αυτό μας βοηθά να κατανοήσουμε πως η αλληλεπίδραση των κυττάρων με το περιβάλλον τους εξυπηρετείται από το γενετικό υλικό, χωρίς να ακολουθεί καθολικά μοτίβα ενεργοποίησης γονιδίων σε όλους τους κυτταρικούς τύπους από το ίδιο ερέθισμα, μέσω συγκεκριμένων ρυθμιστικών περιοχών. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με θεωρίες όπως αυτή των εναλλακτικών ενισχυτών, των κρυφών ενισχυτών και την παραδοχή πως κάθε ευκαρυωτικό γονίδιο διαθέτει πολλαπλούς ενισχυτές. Σημαντικό είναι να τονιστεί πως μέλη των κοινών ενισχυτών βρίσκονται κοντά σε κοινά εκφραζόμενα γονίδια στις δυο κυτταρικές σειρές.

Επιπλέον, σε επιθηλιακά κύτταρα, εντοπίστηκαν ~350 θέσεις υποκινητών με επαγόμενη από το ιϊκό ερέθισμα αύξηση του εντοπισμού της ιστονικής τροποποίησης H3K27ac, κλάσμα των οποίων παρουσιάζουν ταυτόχρονη επαγωγή της πρόσδεσης MED1, χαρακτηριστικών ιστονικών τροποποιήσεων κ.α, ενώ ταυτοποιήθηκαν ~300 υποκινητές με αντίστοιχη συμπεριφορά σε Β-λεμφοκύτταρα. Είναι σημαντικό να τονιστεί, πως τα παραπάνω φαινόμενα και η παρατήρησή τους, δεν αποτελούν τυχαίο γεγονός. Η ταυτοποίηση των οντολογιών των γονιδίων τα οποία ρυθμίζονται από την αλληλεπίδραση των προαναφερθέντων *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων, με πληθώρα *trans*-ρυθμιστικών στοιχείων, κατά την εξέλιξη της αντι-ϊϊκής απάντησης, επιβεβαιώνει πως η πειραματική πλατφόρμα που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο μας, δεν οδηγεί σε τυχαία αποτελέσματα.

Αν στοχοποιήσουμε με την ανάλυση γνωστά γονίδια, όπως για παράδειγμα τα *CCL5*, *OASL* με εξαίρετο ρόλο για την εξέλιξη της απόκρισης, παρατηρείται τόσο χρονικά όσο και βάση των συντεταγμένων του

γονιδιώματος συνεντοπισμός και πρότυπο εμφάνισης των δεικτών. Δηλαδή, παρόλο που οι χάρτες κατασκευάζονται από διαφορετικά πειράματα, τα σήματα που προκύπτουν στοχοποιούν συγκεκριμένες/ίδιες αλληλουχίες οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως πιθανοί ενισχυτές της αντι-ϊικής απόκρισης. Το αποτέλεσμα αυτό, υποδηλώνει, ότι η συνδυαστική πραγματοποίηση και ανάλυση πειραμάτων γονιδιωματικής προσφέρει τη δυνατότητα ορθής ανίχνευσης ευαίσθητων/σημαντικών περιοχών στο γονιδίωμα που ο πιθανός ρόλος τους συνδέεται με συγκεκριμένο εξωκυτταρικό ερέθισμα. Η άποψη αυτή αρχίζει και ωριμάζει και περιγράφει πως η μη κωδική μοίρα του γονιδιώματος είναι αυτή που του προσφέρει τη δυνατότητα να λειτουργεί και ως αισθητήρας του εξωκυττάρου περιβάλλοντος. Με βάση αυτό, ένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος που ξεκινά από το μεμβρανικό υποδοχέα και συνήθως καταλήγει στον πυρήνα με αποτέλεσμα την εδραίωση συγκεκριμένου προγράμματος γονιδιακής έκφρασης αποκωδικοποιείται μέσω της μη κωδικής μοίρας του γονιδιώματος. Καθώς ακόμα και αν πολυάριθμα μόρια ενός μεταγραφικού παράγοντα διασκορπίζονται στο γονιδίωμα είναι απαραίτητο να ισχύουν επιπλέον βιοχημικές προϋποθέσεις όπως προσβασιμότητα, ιστονικές τροποποιήσεις κ.τ.λ οι οποίες θα συνεντοπίζονται και θα οδηγούν μαζί με το παράγοντα τη μεταγραφή γονιδίων στόχων.

Στο τέλος δυο επιπλέον σημεία που πρέπει να τονιστούν 1) Η λίστα με τα γονίδια που ρυθμίζονται από ενισχυτές με κοινά χαρακτηριστικά και θέσεις και στους δυο κυτταρικούς τύπους περιλαμβάνει και μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο IRF1 γεγονός που συνάδει με την ιδέα που συνοδεύει την παρούσα εργασία πως η αντι-ϊική απόκριση ελέγχεται αλλά και ελέγχει την έκφραση παραγόντων που ρυθμίζουν τη μεταγραφή. Τέλος το στοιχείο ανοδικά του γονιδίου της *IFNB* που φιλοξενεί RAD21 αποτελεί μια πρώτη ένδειξη για την παρουσία μηχανισμού που περιλαμβάνει επικοινωνία μεταξύ γονιδίων και ρυθμιστικών στοιχείων.

Η παρούσα μελέτη ολοκληρώθηκε και αποτέλεσε σημαντικό κομμάτι της έρευνας του εργαστηρίου σχετικά με τη σημασία περιοχών με ρυθμιστικό ρόλο στο φαινόμενο της αντι-ϊικής απόκρισης. Τα δεδομένα που προκύπτουν επαληθεύουν την υπάρχουσα γνώση και διευρύνουν την αντίληψή μας για τον τρόπο με τον οποίο τα ανθρώπινα κύτταρα λειτουργούν υπό τις αντίξοες συνθήκες της μόλυνσης. Ίσως ο βαθμός στον οποίο οι μηχανισμοί λειτουργούν αποδοτικά καθορίζει και τη μοίρα του κυττάρου και κατ' επέκταση την ομοιόσταση του μολυσμένου οργανισμού. Για την πλήρη διαλεύκανση των μηχανισμών ρύθμισης της αντι-ϊικής απάντησης, απαιτείται μελέτη χρωματινικής διαμόρφωσης και ενεργότητας μέσω των μεθόδων Hi-C και STARR-seq, αντίστοιχα.

5. Βιβλιογραφία

- BURTON E. TROPP. 2014. Βασικές αρχές Μοριακής Βιολογίας . 1^η Ελληνική έκδοση .Αλεξανδρούπολη , Θράκη , Ελλάδα : Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Van Den Beek, M., Bouvier, D., Ech, M., ... Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W537–W544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T., & Thanos, D. (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN- β promoter. *Cell*, 103(4), 667–678. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00169-0)
- Agelopoulos, M., & Thanos, D. (2006). Epigenetic determination of a cell-specific gene expression program by ATF-2 and the histone variant macroH2A. *EMBO Journal*, 25(20), 4843–4853. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601364>
- Arnold, C. D., Gerlach, D., Stelzer, C., Boryn, L. M., Rath, M., Stark, A., ... Stark, A. (2013). Genome-Wide Quantitative Enhancer Activity Maps Identified by STARR-seq. *Science*, 339(6123), 1074–1077. <https://doi.org/10.1126/science.1232542>
- Banerjee, A. R., Kim, Y. J. ung, & Kim, T. H. oon. (2014). A novel virus-inducible enhancer of the interferon- β gene with tightly linked promoter and enhancer activities. *Nucleic Acids Research*, 42(20), 12537–12554. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1018>
- Banninger, G., & Reich, N. C. (2004). STAT2 nuclear trafficking. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39199–39206. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400815200>
- Banos, A., Agelopoulos, M., & Thanos, D. (2013). XStochastic responses are not left to pure “chance.” *Cell*, 155(3), 499–502. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.002>
- Birger, B., & Schneider, R. (2014). Histone variants: Key players of chromatin. *Cell and Tissue Research*, 356(3), 457–466. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1862-4>
- Bluyssen, H. A. R., Durbin, J. E., & Levy, D. E. (1996). ISGF3, 7(I), 11–17.
- Brown, C. E., Lechner, T., Howe, L. A., & Workman, J. L. (2000). The many HATs of transcription coactivators. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(1), 15–19. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01516-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01516-9)
- Collins, F. S., Lander, E. S., Rogers, J., & Waterson, R. H. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011), 931–945. <https://doi.org/10.1038/nature03001>
- Darnell, J. E. J., Kerr, I. M., & Stark, G. R. (1994). Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation to IFNs Response and Other Transcriptional Activation in Extracellular Signaling Proteins. *Science*, 264(5164), 1415–1421.
- Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S. F., Collins, P. J., Davis, C. A., Doyle, F., ... Lochovsky, L. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57–74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
- <https://www.illumina.com/>
- Kallionpää, H., Elo, L. L., Laajala, E., Mykkänen, J., Ricaño-Ponce, I., Vaarma, M., ... Lahesmaa, R. (2014). Innate immune activity is detected prior to seroconversion in children with HLA-conferred type 1 diabetes susceptibility. *Diabetes*, 63(7), 2402–2414. <https://doi.org/10.2337/db13-1775>

- Kitazawa, H., & Villena, J. (2014). Modulation of respiratory TLR3-anti-viral response by probiotic microorganisms: Lessons learned from *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. *Frontiers in Immunology*, 5(MAY), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00201>
- Kornberg, R. D., & Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98(3), 285–294. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458604>
- Lee, T. I., & Young, R. A. (2000). Transcription of Eukaryotic Protein-Coding Genes. *Annual Review of Genetics*, 34(1), 77–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.77>
- Lemon, B., & Tjian, R. (2000). Orchestrated response: A symphony of transcription factors for gene control. *Genes and Development*, 14(20), 2551–2569. <https://doi.org/10.1101/gad.831000>
- Louder, R. K., He, Y., Fang, J., Nogales, E., Biology, C., Division, I. B., & National, L. B. (2016). Structure of promoter-bound TFIID and insight into human PIC assembly. *Nature*, 531(5), 604–609. <https://doi.org/10.1038/nature17394>.Structure
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Maniatis, T., Falvo, J. V., Kim, T. H., Kim, T. K., Lin, C. H., Parekh, B. S., & Wathélet, M. G. (1998). Structure and function of the interferon-β enhanceosome. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 63, 609–620. <https://doi.org/10.1101/sqb.1998.63.609>
- Maston, G. A., Evans, S. K., & Green, M. R. (2006). Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7(1), 29–59. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.7.080505.115623>
- Matsumoto, M., Tanaka, N., Harada, H., Kimura, T., Yokochi, T., Kitagawa, M., ... Taniguchi, T. (1999). Activation of the transcription factor ISGF3 by interferon-gamma. *Biological Chemistry*, 380(6), 699–703. <https://doi.org/10.1515/BC.1999.087>
- Merkenschlager, M., & Nora, E. P. (2016). CTCF and Cohesin in Genome Folding and Transcriptional Gene Regulation. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17(1), 17–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022339>
- Muerdter, F., Boryn, Ł. M., Woodfin, A. R., Neumayr, C., Rath, M., Zabidi, M. A., ... Stark, A. (2018). Resolving systematic errors in widely used enhancer activity assays in human cells. *Nature Methods*, 15(2), 141–149. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4534>
- Muerdter, F., Boryń, Ł. M., Woodfin, A. R., Neumayr, C., Rath, M., Zabidi, M. A., ... Stark, A. (2017). Resolving systematic errors in widely used enhancer activity assays in human cells. *Nature Methods*, 15(2), 141–149. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4534>
- Nasmyth, K., & Haering, C. H. (2009). Cohesin: Its Roles and Mechanisms. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 525–558. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134233>
- Nguyen, G. D., Gokhan, S., Molero, A. E., Yang, S. M., Kim, B. J., Skoultchi, A. I., & Mehler, M. F. (2014). The role of H1 linker histone subtypes in preserving the fidelity of elaboration of mesendodermal and neuroectodermal lineages during embryonic development. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096858>
- Noll, M. (1974). Internal structure of the chromatin subunit. *Nucleic Acids Research*, 1(11), 1573–1578. <https://doi.org/10.1093/nar/1.11.1573>
- Orlando, V., Strutt, H., & Paro, R. (1997). Analysis of Chromatin Structure byin VivoFormaldehyde Cross-

- Linking. *Methods*, 11(2), 205–214. <https://doi.org/10.1006/METH.1996.0407>
- Poss, Z. C., Ebmeier, C. C., & Taatjes, D. J. (2013). The Mediator complex and transcription regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(6), 575–608. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.840259>
- Ptashne, M., & Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/386569a0>
- Ram, O., Goren, A., Amit, I., Shoshitaishvili, N., Yosef, N., Kellis, M., ... Chase, C. (2012). NIH Public Access, 147(7), 1628–1639. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.057>. Combinatorial
- Rao, S. S. P., Huntley, M. H., Durand, N. C., Elena, K., Bochkov, I. D., Robinson, J. T., ... Mathematics, A. (2017). HHS Public Access, 159(7), 1665–1680. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.021>. A
- Sainsbury, S., Bernecky, C., & Cramer, P. (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(3), 129–143. <https://doi.org/10.1038/nrm3952>
- Sieben, U., Franzoso, G., & Brown, K. (1994). STRUCTURE, REGULATION AND FUNCTION OF NF- κ B.
- Stark, G. R. (2007). How cells respond to interferons revisited: From early history to current complexity. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 18(5–6), 419–423. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.06.013>
- Stetson, D. B., & Medzhitov, R. (2006). Type I Interferons in Host Defense. *Immunity*, 25(3), 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.007>
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41–45. <https://doi.org/10.1038/47412>
- Thanos, D., & Maniatis, T. (1995). Virus induction of human IFN β gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell*, 83(7), 1091–1100. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90136-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90136-1)
- Thudi, M., Li, Y., Jackson, S. A., May, G. D., & Varshney, R. K. (2012). Current state-of-art of sequencing technologies for plant genomics research. *Briefings in Functional Genomics*, 11(1), 3–11. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elr045>
- Zhou, V. W., Goren, A., & Bernstein, B. E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics*, 12(1), 7–18. <https://doi.org/10.1038/nrg2905>

6. Παράρτημα

Πίνακας 2: Εκκλητές (Integrated DNA technologies) που χρησιμοποιήθηκαν για τις Real Time qPCR των πειραμάτων ChIP.

ACTB_core	F	5'-CGGCAAAGGCTAGGCTCTGT-3'
	R	5'-ATTCAGCGTGCGCCGTTCCGAA-3'
ACTB	F	5'-CCCCAACACCACACTCTACC-3'
	R	5'-CTGGGTTCTGTACGCTCCTG-3'
MYOD1	F	5'-GGACGACTTCTATGACGACCC-3'
	R	5'-TTGGTGGTCTTGCGCTTGC-3'
GAPDH PROMOTER	F	5'-GCCTCTCAGCCTTTGAAAGAAAGA-3'
	R	5'-ACGACTGAGATGGGGAATTGGAGC-3'
IFNB1 PROXIMAL ENHANCER	F	5'-GCTTTCCTTTGCTTCTCCCAAGT-3'
	R	5'-CCTTCTCCATGGGTATGGCC-3'
IFNB1 -20kb	F	5'-TCCCTCTGCTAGAAGCTCCA-3'
	R	5'-AGCTCAGAGAAATGCCTGGT-3'
IFNB_long	F	5'-GCTTTCCTTTGCTTCTCCCAAGTC-3'
	R	5'-CCTTCTCCATGGGTATGGCC-3'
IFNB_coding	F	5'-TCCTGTTGTGCTTCTCCACTAC-3'
	R	5'-GCAGTATTCAAGCCTCCATTC-3'
CCL5	F	5'-AGAGGATCAAGACAGCACGTGGAC-3'
	R	5'-AGCGCAGAGGGCAGTAGCAATGAG-3'
OASL	F	5'-CCCGTCACACCTGGTTTCCTCTCT-3'
	R	5'-CATCTCTGTCCCGAGAGTACCGCT-3'
C04	F	5'-GAAGGAGTGCTCTGAGGCTGA-3'
	R	5'-GAACGCCCAAGACCTTTTCC-3'
SCN4A	F	5'-GATTCGAGGGCATGAGGGTGG-3'
	R	5'-GTGGTGCCAAGCTCTCTGCTTC-3'

Πίνακας 3: Εκκινητές (Integrated DNA technologies) που χρησιμοποιήθηκαν σε Real Time qPCR για τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων για το πείραμα STARR

IFNB1	F	5'-TCCTGTTGTGCTTCTCCACTAC-3'
	R	5'-GCAGTATTCAAGCCTCCCATTC-3'
GAPDH	F	5'-AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT-3'
	R	5'-CCCCACTTGATTTTGGAGGGA-3'
MX1	F	5'-AAGCCCTGCAGAGAGAGAAGATC-3'
	R	5'-TATGTGTGATGAGCTCGCTGGTAAG-3'
IFIH1	F	5'-ATGACCCCAGAATTCAAGGAACT-3'
	R	5'-CCATCATTGTTCCCAAGCC-3'
ISG15	F	5'-GAGAGGCAGCGAACTCATCT-3'
	R	5'-CTTCAGCTCTGACACCGACA-3'