Βιολογικό Τμήμα, Σχολής Θετικών Επιστημών Ιατρικό Τμήμα, Σχολής Επιστημών Υγείας Πανεπιστημίου Κρήτης

# ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ (HCR1) ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ αροΕ/C-I/C-IV/C-II ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΗΝF-4.

Επιβλέπων Καθηγητής: Βασίλειος Ζαννής

Διατριβή Μ.Τ.Ε. Ρούσσου Αναστασία

Ηράκλειο Σεπτέμβριος 2000

Ο επιβλέπων Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Σχολής Επιστημών Υγείας Πανεπιστημίου Κρήτης Ο επιβλέπων Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Σχολής Επιστημών Υγείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Βασίλης Ζαννής

Γιώργος Μαυροθαλασσίτης

1

Η διατριβή αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του Καθηγητή της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης Δρ. Β Ζαννή, του τομέα Βασικών Επιστημών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά το χρονικό διάστημα 1998-2000.

Ευχαριστώ πολύ τον υπεύθυνο της εργασίας μου, τον άξιο για 2 δεκαετίες στην επιστημονική κοινότητα Δρ Βασίλη Ζαννή, για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε αναθέτοντάς μου την εργασία αυτή. Παρά τις πολλές του ασχολίες πάντα μου παρείχε τις συμβουλές και την καθοδήγησή του όποτε την χρειάστηκα.

Παραπάνω από ένα ευχαριστώ οφείλω στον εξαίρετο άνθρωπο και ταλαντούχο επιστήμονα, Επίκουρο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης Δρ Δημήτρη Καρδάση. Η σχεδόν καθημερινή καθοδήγησή και συμπαράστασή του καθώς, η διακριτική παρουσία του όποτε ήταν απαραίτητο και ο χρόνος που μου αφιέρωσε για την διόρθωση της παρούσας εργασίας, ήταν πολύ σημαντική.

Πολύ σημαντική ήταν και η βοήθεια της τεχνικού του εργαστηρίου, Βέτας Παπακώστα. Λειτούργησε καταλυτικά για την κατασκευή 6 εκ των κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του HCR.

Ευχαριστώ πολύ και όλους τους συνεργάτες μου, τους εκκολαπτόμενους ερευνητές Γιώργο Κουτσοδόντη, Βίκυ Προκόβα και Γιώργο Κούκο, για την άψογη συνεργασία τους.

Τέλος, ευχαριστώ την διδάκτορα Άννα Τσαπάρα για τις συμβουλές της σε Θέματα τεχνικών πρωτεινών και για την ευγενή προσφορά του πλασμιδίου που φέρει κλωνοποιημένη την β-ακτίνη του ανθρώπου και αντισώματος για την ανοσοανίχνευση αυτής. At last (but not at least) την Λίνα Βαρδούλη για την ψυχική συμπαράσταση και αν(τ)οχή της απέναντί μου και την Βασιλική Κωνσταντινοπούλου για τις συντακτικές παρατηρήσεις της κατά τη διάρκεια της συγγραφής της εργασίας αυτής (και όχι μόνο).

Αναστασία Ρούσσου

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε έλεγχος της περιοχής ηπατικού ελέγχου HCR-1 και απαλοιφών αυτής, για ενίσχυση της μεταγραφής του υποκινητή της απολιποπρωτείνης CII και του ετερόλογου υποκινητή TK και μελετήθηκε ο ρόλος του πυρηνικού υποδοχέα HNF4, με χρήση μόνιμης κυτταρικής σειράς που εκφράζει συμπληρωματικό RNA για το mRNA αυτού.

Επιβεβαιώθηκε η σημαντική ενεργοποίηση της απολιποπρωτείνης CII και του ετερόλογου υποκινητή TK, και κατέστη φανερή η ύπαρξη ενός κατασταλτικού στοιχείου ηπατικής ενεργότητας, αλλά ενεργοποιητικού προκειμένου για νεφρική ενεργότητα, στην περιοχή ηπατικού ελέγχου 260-325. Η ελάχιστη περιοχή 10\_185 σε συνεργασία με τον υποκινητή της απολιποπρωτείνης CII παρουσιάζει πολύ ισχυρή ηπατοειδική ενεργότητα.

Χρησιμοποιώντας μόνιμη κυτταρική σειρά που εκφράζει συμπληρωματικό RNA για το mRNA του HNF4 αποδείχθηκε ότι ο παράγοντας αυτός εμπλέκεται περισσότερο στην περιοχή 10\_206 όταν η περιοχή HCR-1 έχει συντηχθεί με τον υποκινητή της apoCII.

Με τεχνικές υστέρησης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας DNA δείχθηκε η πρόσδεση HNF4 στο στοιχείο 5 της περιοχής ηπατικού ελέγχου καθώς και T3R στο στοιχείο 4, ενώ αποκλείστηκε η πρόσδεση EAR3 στα στοιχεία 3,4 και 5.

Τέλος δείχθηκε η ενεργοποίηση ενεργότητας των απαλοιφών HCR-1 σε σύντηξη με τον υποκινητή TK σε κύτταρα COS-7 από T3R, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της τεχνικής υστέρησης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας DNA και με αντίστοιχα πειράματα σε κύτταρα HepG2 αλλά χρησιμοποιώντας EAR3, υπογραμμίστηκε ο ρόλος του στην καταστολή ενεργότητας στην περιοχή 10\_185, της περιοχής ηπατικού ελέγχου.

1

# TIEPIEXOMENA

<u>1 El</u>	1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ		
1.1	ΟΙ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	5	
1.1.1	ΓΕΝΙΚΑ	5	
1.1.2	ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	6	
1.1.3	ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΗΣΕΙΣ	8	
1.2	ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ	9	
1.2.1	ΓΕΝΙΚΑ	9	
1.2.2	ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	10	
1.2.3	ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΡΜΟΝΩΝ	11	
1.3	HEPATOCYTE NUCLEAR FACTOR 4	13	
1.3.1	ΓΕΝΙΚΑ	13	
1.3.2	ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΗΝF4	14	
1.2.3	ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΗΝF4	16	
1.4	Ο ΗΝF4 ΚΑΙ ΟΙ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	16	
1.2.1	Ο ΕΓΓΥΣ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΗΣ CII	17	
1.5	ΟΙ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΤΟ ΗΠΑΡ (HCR)	18	
1.6	ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΩΝ RNA	21	
1.2.1	ΓΕΝΙΚΑ	21	
1.2.2	ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ	21	
1.2.3	ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΩΝ RNA	22	
<u>2. Y</u>	ΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	26	
2.1	ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ	26	
2.2	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	26	
2.3	Αντίδραση Λιγάσης	26	
2.4	ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	27	
2.5	Απομονώστη DNA	27	
2.5.1	Απομονώση DNA σε μικρή κλιμακά (μινιρπέρ)	27	
2.5.2	Απομονώση DNA σε μεγαλή κλιμακά (maxiprep)	28	

2.6	ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	28
2.6.1	ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΑΙ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	28
2.6.2	ΑΡΑΙΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	29
2.6.3	ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΑΠΟΘΕΜΑΤΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ	29
2.7	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA	29
2.8	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ	30
2.9	ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΔΟΚΙΜΗ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ	32
2.10	Δοκιμή Ακετύλοτρανσφεράσης της Χλώραμφαινικολής	32
2.11	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA (ΤΟΤΑL RNA)	33
2.12	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	34
2.13	Αλύδιδωτη αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR)	34
2.14	ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΝΣΗ DNA	35
2.14.1	ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ	35
2.14.2	ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΝΣΗ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ	36
2.14.3	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΜΕΝΟΥ DNA	36
2.15	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ RNA ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΟΥΣ ΣΕ ΦΙΛΤΡΟ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ	36
2.16	ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑ NOTHERN	37
2.17	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΟΥΣ ΣΕ ΦΙΛΤΡΟ	38
2.18	ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΦΙΛΤΡΟ (WESTERN BLOT)	39
2.19	ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ PCDNAINEO"ΑΝΤΙ-ΗΗΝF4"	39
2.20	ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΣΤΕΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ DNA ΣΕ	
	ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (BAND SHIFT ASSAY)	41
<u>з ап</u>	ΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	<u>43</u>
2.1		12
3.1		43
3.Z		40 10
3.3 2.4		40
3/1		49
5.4.1		10
310		49
5.1.2		53
35	ΕΛΕΓΧΩΣ ΓΙΔ ΠΙΘΔΝΕΣ ΘΕΣΕΙΣ ΠΡΩΣΛΕΣΗΣ ΤΩΥ ΜΕΤΔΓΡΔΦΙΚΩΥ	00
0.0		лот
DEFINI		
3.6	 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΝ ΠΡΟΤΕΙΝΙΚΟΝ ΑΠΟΤΥΠΟΜΑΤΟΝ 3.4 ΚΑΙ 5 ΤΟΥ ΗCR	
DEFINE 3.6	ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΗΝF4 ΣΤΑ ΕΛΛΕΙΜΑΤΑ HCR-1 ERROR! BOOKMARK MED. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΩΝ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΩΝ 3,4 ΚΑΙ 5 ΤΟΥ HCR	ЮТ

	ΩΣ ΔΥΝΗΤΙΚΩΝ HRE.	59
3.7	ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΠΙΘΑΝΕΣ ΘΕΣΕΙΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ Τ3R ΣΤΑ ΕΛΛΕΙΜΑΤΑ	
	HCRTK	65
3.8	ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΠΙΘΑΝΕΣ ΘΕΣΕΙΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ EAR3 ΣΤΑ ΕΛΛΕΙΜΑΤΑ	
	HCRTK	66
<u>5.Σ</u> Υ	ΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	67
6.AN	ΙΑΦΟΡΕΣ	70

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

# 1.1 ΟΙ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

### 1.1.1 **FENIKA**

Οι απολιποπρωτείνες αποτελούν μία οικογένεια πρωτεϊνών που συνιστούν το πρωτεϊνικό μέρος των λιποπρωτεινών του πλάσματος.

Οι λιποπρωτείνες συμμετέχουν στην μεταφορά των λιπιδίων, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, στα διάφορα όργανα, για τον μεταβολισμό ή την αποθήκευσή τους,. Πρόκειται για σφαιρικά σωματίδια που στο εσωτερικό τους φέρουν μη πολικά ουδέτερα λιπίδια (εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια) ενώ η επιφάνειά τους αποτελείται από πολικά λιπίδια (φωσφολιπίδια), χοληστερόλη και πρωτείνες (απολιποπρωτείνες) (1). Υπάρχουν 4 τάξεις λιποπρωτεινών ανάλογα με την πυκνότητά τους: οι HDL (High density lipoproteins), LDL (Low density lipoproteins), IDL (Indermediate density lipoproteins), VLDL (Very low density lipoproteins) και τα χυλομικρά (2). Κάθε μία από τις τάξεις παρουσιάζει συγκεκριμένη σύνθεση σε απολιποπρωτείνες και λιπίδια (Πίνακας 1) και μάλιστα η σύστασή τους σε απολιποπρωτείνες αυξάνει από τα χυλομικρά στις HDL.

	HDL	LDL	VLDL	ΧΥΛΟΜΙΚΡΑ
Μεγεθος	50 έως 120	180 έως 300	300 έως 700	750 έως 12000
ПУКNOTHTA (g/ml)	1,063 - 1,21	1,019 έως 1,063	0,94 έως 1,006	0,94
<b>ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ (% w/t)</b>	2 έως 7	4 έως 8	45 έως 65	80 έως 95
ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ (%w/t)	26 έως 32	18 έως 24	15 έως 20	3 έως 6
XOΛHΣTEPINH (% w/t)	3 έως 5	6 έως 8	4 έως 8	1 έως 3
ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	AI, AII, E	BI	B, E, CI, CII, CIII	AI, AIV, BI, CI, CIII F

Πίνακας 1. Στοιχεία των τάξεων των λιποπρωτεινών.

Comment [a1]: Zannis V. I. et al, 1993. Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors and their enzymes. Advances in Human Genetics, 21: 145–319

Comment [a2]:

Mahley R. W. et al, 1984. Plasma lipoproteins: apolipoproteins structure and function. J.Lipid. Res, 25:1277-1294.

### 1.1.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Οι απολιποπρωτείνες κωδικοποιούνται από γονίδια που εδρεύουν σε δύο ομάδες γενετικών τόπων που βρίσκονται μάλιστα σε διαφορετικά χρωμοσώματα και από δύο γονίδια ανεξάρτητα από τις δύο αυτές ομάδες.

Συγκεκριμένα, το ένα γονιδιακό σύμπλεγμα περιλαμβάνει τα γονίδια των απολιποπρωτεινών AI, AIV και CIII και εδρεύει στο χρωμόσωμα 11 του ανθρώπου (3). Αυτά που κωδικοποιούν τις απολιποπρωτείνες Ε, CI, CIV και CII (μαζί με το ψευδογονίδιο CI'), συνιστούν το δεύτερο γονιδιακό σύμπλεγμα που εδρεύει στο χρωμόσωμα 19 του ανθρώπου (Εικόνα 1) (4). Τέλος, οι απολιποπρωτείνες Β και AII κωδικοποιούνται από γενετικούς τόπους στα χρωμοσώματα 2 και 1 του ανθρώπου αντίστοιχα (5,6).

Η σύνθεση όλων των απολιποπρωτεινών είναι ιστοειδική (7). Όπως παρατηρούμε στον Πίνακα 2, οι περισσότερες από αυτές εκφράζονται στο ήπαρ και στο έντερο.

Μετά τη σύνθεσή τους οι απολιποπρωτείνες υφίστανται μετα-μεταφραφικές τροποποιήσεις, κυρίως γλυκοσυλιώσεις, τόσο πριν από την έξοδό τους από το κύτταρο όσο και μετά από αυτήν (8).

ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΗ	ΤΟΠΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ
AI	ήπαρ, έντερο, άλλοι ιστοί	243
AII	Ήπαρ	77
AIV	έντερο, ήπαρ	376
В	ήπαρ, έντερο	4536
CI	ήπαρ, έντερο	57
CII	ήπαρ, έντερο	79
CIII	ήπαρ, έντερο	79
E	ήπαρ, περιφερειακοί ιστοί	299

Πίνακας 2. Αναφορά του αριθμό των αμινοξέων των απολιποπρωτεινών και οι ιστοί στους οποίους εκφράζονται.

Comment [a3]: Karathanasis S. K., 1985. Apolipoprotein multigene family: Tandem organization of human apolipoprotein AI, CIII and AIV genes. PNAS USA, 82: 6374-6378

Comment [a4]: Smit M. Et al, 1988. Apolipoprotein gene cluster on chromosome 19. Human Gen, 78:90-93

Comment [a5]: Deeb S. S. Et al, 1986. Chromosome localization of the human apolipoprotein B gene and detection of homologous RNA in Monkey intestine. PNAS USA, 83:419-422

Comment [a6]: Moore M.N. et al, 1986. Human apolipoprotein AII: Nucleotide sequence of a cloned cDNA and localization of its structural gene in human chromosome 1. Bioch. BiopH. Res. Commun, 123:1-7

Comment [a7]: Lenich C. Et al, 1988. Apolipoprotein gene expression in the rabbit: Abundance, size and distribution of apolipoprotein mRNA species. J. Lipid. Res. 29: 755-764

Comment [a8]: Hussain M. M and Zannis V. I, 1990. Intracellular modification of human apoAII and sites in of apoAII mRNA synthesis: Comparison of apoAII with apoCII and apoCIII isoproteins. Biochemistry, 29:209-217

### Γονιδιακό σύμπλεγμα αροΑΙ/CIII/AIV



**Εικόνα 1**. Σχηματική αναπαράσταση των δύο γονιδιακών συμπλεγμάτων στα χρωμοσώματα 11 και 19 αντίστοιχα.

#### 1.1.3 ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

Εφόσον ο ρόλος των απολιποπρωτεινών είναι ο σχηματισμός των λιποπρωτεινών και αφού αυτές παίζουν μείζονα ρόλο στη μεταφορά των λιπιδίων στο αίμα, είναι αναμενόμενο μεταλλάξεις στα γονίδια των πρωτεϊνών αυτών να σχετίζονται με ανωμαλίες στη μεταφορά και το μεταβολισμό των λιπιδίων. Πράγματι, μεταλλαγές των γονιδίων αυτών που επηρεάζουν όχι μόνο τη σύνθεση αλλά και τη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα, συνδέονται πολύ συχνά με διαταραχές του λιποπρωτεινικού προφίλ και συμβάλλουν στην παθογένεση της αθηρωμάτωσης (9).

Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι κυρίως οι απολιποπρωτείνες AI, AII, AIV και σε μικρότερο βαθμό η CI ενεργοποιούν την LCAT (lecithin cholesterol acyltransferase). Η δυσλειτουργία τους οδηγεί στην εμφάνιση της προαναφερθείσας νόσου. Η απολιποπρωτείνη Β φαίνεται να παίζει ρόλο στον καταβολισμό των LDL, μέσω του υποδοχέα τους, και όταν αυτή μεταλλαχθεί (περιπτώσεις αβηταλιποπρωτειναιμίας ή υποβηταλιποπρωτειναιμίας), τα σωματίδια LDL δεν μπορούν να απομακρυνθούν και συσσωρεύονται στις αρτηρίες, οδηγώντας σε αθηρωματικό αποτέλεσμα.

Η απολιποπρωτείνη CII είναι βασικός συμπαράγοντας της λιποπρωτεινικής λιπάσης και γι'αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση των τριγλυκεριδίων (10). Ανωμαλίες στην έκφρασή της έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση οικογενούς υπερλιποπρωτειναιμίας τύπου Ι. Η αροCI φαίνεται να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της απομάκρυνσης των υπολειμμάτων των απολιποπρωτεινών από τα κύτταρα μέσω της αροΕ (11). Η αροΕ είναι βασική για την απομάκρυνση των χυλομικρών μέσω υποδοχέα από τα κύτταρα και συμμετέχει την ανακατανομή της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ. Μόρια της πρωτεΐνης αυτής που είναι ανίκανα να προσδεθούν στους υποδοχείς τους (αλληλόμορφο Ε2 της αροΕ), θεωρούνται υπεύθυνα για εμφάνιση οικογενούς υπερλιποπρωτειναιμίας τύπου ΙΙΙ (12).

Ακόμη, η εμφάνιση του αλληλόμορφου Ε4 της απολιποπρωτείνης Ε σχετίζεται με την εκδήλωση της νόσου Alzheimer, μίας νευροεκφυλιστικής ασθένειας όπου παρουσιάζεται σταδιακή απώλεια μνήμης και τελικά καταστολή ολόκληρου του κεντρικού νευρικού συστήματος και οδηγεί στο θάνατο (13). Comment [a9]: Breslow J. L et al, 1993. Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. PNAS USA, 90: 8314–8318

Comment [a10]: Breckenbridge W C, Little J A, Steiner G, Chow A and Poapst M, 1978. N. Engl. J. Med, 298:1265-1273

Comment [a11]: Sehayek E and Eisenberg S, 1991. 266:18259-18267

Comment [a12]: Mahler R W et al, 1984. J. Lipid Res, 25:1277-1294

Comment [a13]: Saunders A M et al, 1993. Neurology, 43:1467-1472

### 1.2 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ

#### **1.2.1 FENIKA**

Οι φαινοτυπικές διαφορές των κυττάρων διαφορετικών ιστών των ανωτέρων οργανισμών, οφείλονται κατά ένα μεγάλο μέρος στη διαφορετική έκφραση γονιδίων διαφόρων πρωτεϊνών. Γενικά η έκφραση των γονιδίων μπορεί να ρυθμιστεί σε πολλά διαφορετικά επίπεδα. Μπορούμε να διακρίνουμε τουλάχιστον πέντε στάδια δυνητικού ελέγχου έκφρασης γονιδίου (14):

Comment [a14]: Lewin B, 1997. Genes VI. Oxford University Press



Αναλυτικότερα, αρχικά γίνεται ενεργοποίηση των γενετικών τόπων που πρόκειται να μεταγραφούν στα συγκεκριμένα κύτταρα. Αυτό γίνεται κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης του οργανισμού και με τον τρόπο αυτό κάποιες περιοχές του γενώματος καθίστανται ικανές προς μεταγραφή. Το βασικότερο όμως στάδιο ρύθμισης έκφρασης είναι η έναρξη της μεταγραφής, που πραγματοποιείται με πρόσδεση στον υποκινητή της RNA πολυμεράσης. Για να γίνει αυτό είναι απαραίτητη η παρουσία ενός ή και περισσότερων μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι ουσιαστικά αυξάνουν την συγγένεια της πολυμεράσης για το σημείο έναρξης, ενισχύοντας την μεταγραφή. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι πολλές φορές ενώ το γονίδιο ικανότητα του κυττάρου να μην επιτρέπει την μετάφραση των mRNA των γονιδίων που έχουν ήδη μεταγραφεί, έκανε τους επιστήμονες να ενδιαφέρονται για το πως αυτό μπορεί να συμβαίνει με στόχο να μπορούν στο μέλλον να καταστέλλουν την μετάφραση προβληματικών γονίδιων.

### 1.2.2 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, οι περισσότερες εκ των οποίων παρουσιάζουν ιστοειδική έκφραση. Κοινό τους χαρακτηριστικό είναι η παρουσία δύο λειτουργικών δομών στα μόριά τους, ένα για την πρόσδεσή τους στο DNA (DNA binding domain) και ένα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής (activation domain) (14). Παρόλο που οι μεταγραφικοί παράγοντες γενικά παίζουν ρόλο στην ενίσχυση της έκφρασης ενός γονιδίου, δεν είναι σπάνιο το φαινόμενο ένας μεταγραφικός παράγοντας να εμπλέκεται στην ελάττωση της και αρκετές φορές ενεργοποιητές και αποσιωπητές ανταγωνίζονται για την ίδια ρυθμιστική θέση ενός υποκινητή.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες ανάλογα με τη δευτεροταγή δομή της περιοχής πρόσδεσής τους στο DNA κατατάσσονται σε 3 κύριες κατηγορίες (15):

Α. Μεταγραφικοί παράγοντες που φέρουν δάκτυλο ψευδαργύρου. Εδώ κατατάσσονται και οι πυρηνικοί υποδοχείς. Η συντηρημένη αλληλουχία του δακτύλου ψευδαργύρου είναι της μορφής: Cys-X<sub>2-4</sub>-Cys-X<sub>3</sub>-PHe-X<sub>5</sub>-Leu-X<sub>2</sub>-His-X<sub>5</sub>-His, όπου Χοποιοδήποτε αμινοξύ.

Β. Μεταγραφικοί παράγοντες που φέρουν έλικα-στροφή-έλικα. Εδώ κατατάσσονται οι πρωτείνες που φέρουν homeodomain και οι πρωτείνες με dHLH.

Γ. Μεταγραφικοί παράγοντες που φέρουν φερμουάρ λευκίνης.

Η ενεργότητα ενός μεταγραφικού παράγοντα μπορεί να ελέγχεται είτε με ιστοειδική έκφραση του γονιδίου του ίδιου του παράγοντα, είτε με μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτείνης του παράγοντα (όπως φωσφορυλίωση, πχ Jun-Fos), είτε τέλος μπορεί να απαιτείται η πρόσδεση δεσμευτή για την ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα (πχ Υποδοχείς Γλυκοκορτικοειδών) (14). Άλλες φορές, ο μεταγραφικός παράγοντας αρχικά είναι μέρος μιας πρωτείνης η **Comment [a15]:** Alberts B et al, 1995. Molecular Biology of the Cell. 3<sup>rd</sup> edition,

### 1.2.3 ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΡΜΟΝΩΝ

Μία πολύ σημαντική υπεροικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που περιλαμβάνει πάνω από 150 μέλη, αποτελούν οι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών. Γενικά πρόκειται για ευέλικτα μόρια τα οποία δέχονται μηνύματα από το περιβάλλον και προσδένόμενα στον δεσμευτή τους εισέρχονται στον πυρήνα και ενεργοποιούν ή αποσιωπούν την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με βιολογικές λειτουργίες όπως η ανάπτυξη, η αύξηση και η ομοιόσταση του οργανισμού (17, 18, 19).

Φέρουν δομή δακτύλου ψευδαργύρου (Zn finger) στην λειτουργική τους περιοχή πρόσδεσης στο DNA, μία περιοχή πρόσδεσης δεσμευτή (ligand binding domain) και την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (Εικόνα 2). Οι περισσότεροι από αυτούς λειτουργούν σαν ετεροδιμερή ή ομοδιμερή και προσδένονται σε συγκεκριμένης αλληλουχίας θέσεις πρόσδεσης που ονομάζονται HREs (Hormone Responce Elements) Τα HREs αποτελούν παλίνδρομες αλληλουχίες με υψηλά συντηρημένο το μοτίβο *PuG(G/T)TCA (20)*. Παρουσιάζουν ποικιλότητα όμως ως προς την αλληλουχία, την απόσταση και την κατεύθυνσή του προαναφερθέντος μοτίβου (21). Ανάλογα με το εάν σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή και ανάλογα με τον τρόπο παλινδρόμησης της αλληλουχίας πρόσδεσής τους οι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών κατατάσσονται σε τέσσερεις κατηγορίες:

Α. Πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών που σχηματίζουν ομοδιμερή και προσδένονται σε ανεστραμμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA. Εδώ ανήκουν οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών (γλυκοκορτικοειδών, οιστρογόνων κ.τ.λ)

Β. Πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών που σχηματίζουν ετεροδιμερή με το RXR και προσδένονται σε ευθείες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA (RXR/T3R, RXR/PPAR κ.o.κ.)

Γ. Πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών που σχηματίζουν ομοδιμερή και προσδένονται σε ευθείες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA (πχ HNF4). Comment [a17]: Evans R M et al, 1988. Science, 240: 889-895

Comment [a18]: Evans R M et al, 1995. Cell, 83: 859-869

**Comment [a19]:** Le Blanc B P and Stunnenberg H G, 1995. **Genes Dev, 9: 1811-1816** 

Comment [a20]: Gronemeyer H & Laudet V 1995 Transcription factor 3: nuclear receptors. Protein Profile 2 1173–1308.

Comment [a21]: Mangelsdorf D J and Evans R M, 1995. The RXR heterodimers and orpHan receptors. Cell, 83: 841-850

Comment [a16]: SREBP

Δ. Πυρηνικούς υποδοχείς που λειτουργούν ως μονομερή (DAX-1).

Ανάλογα με το είδος του δεσμευτή τους διακρίνονται σε υποδοχείς με γνωστό δεσμευτή (πχ υποδοχείς ρετινοικών, στεροειδών και βιταμινών), και σε ορφανούς. Στην κατηγορία των ορφανών υποδοχέων κατατάσσονται όλοι οι μεταγραφικοί παράγοντες που παρουσιάζουν ομολογία με τους πυρηνικούς υποδοχείς, αλλά ο δεσμευτής τους δεν είναι γνωστός (22).

Η πρόσδεσή τους έχει δειχθεί ότι γίνεται στη μικρή αύλακα του DNA όπως, φαίνεται στη εικόνα 3, ενώ φαίνεται ότι ενργοποιούν την έναρξη της μεταγραφής απευθείας μέσω του TF<sub>II</sub>B (Transcription Factor II B), βασικού παράγοντα της βασικής μεταγραφικής μηχανής (23). Θεωρείται ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες δεν βρίσκονται σε 2 μορφές (ενεργή και ανενεργή) σε μόνιμη βάση αλλά αυτό γίνεται μετά την παρουσία του δεσμευτή τους. Σε πιο πρωτόγονες μορφές πυρηνικών υποδοχέων ορμονών (24) η φωσφορυλίωση έπαιζε αυτό το ρόλο (25).



**Εικόνα 2**. Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών ενός τυπικού πυρηνικού υποδοχέα ορμονών

**Comment [a22]:** Blumberg B and Evans R, 1998. OrpHan nuclear receptors-new ligands and new possibilities. **Gen Dev, 12: 3149-3155** 

**Comment [a23]:** Baniahmad A, Eggert M and Renkawitz R, 1997. Transcription factors in Eukaryotes. Chapter 6: 97-121

Comment [a24]: V Laudet ,1997.Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orpHan receptor, J. Mol. End. 19: 207–226

Comment [a25]: Wurtz J-M et al, 1997. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. Nature Structural Biology 3 87–94.



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της στερεοδιάταξης ενός πυρηνικού υποδοχέα ορμονών και του πώς αυτός αλληλεπιδρά με την μικρή αύλακα του DNA.

## **1.3 HEPATOCYTE NUCLEAR FACTOR 4**

### **1.3.1 FENIKA**

Πρόκειται για ορφανό πυρηνικό υποδοχέα, που εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, τα νεφρά, το πάγκρεας και το έντερο (26). Θεωρείται μαζί με τους ΗΝF1, C/EBP και ΗΝF3 ως ένας από τους κύριους υπεύθυνους για την ηπατοειδική έκφραση των γονιδίων (27).

Φέρει θέσεις πρόσδεσης στο DNA, θέση πρόσδεσης δεσμευτού και 2 περιοχές ενεργοποίησης (activation domains) (Εικόνα 4). Τελευταία έχει βρεθεί και μία δομική περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο του που αναφέρεται ως περιοχή καταστολής (18). Σχηματίζει ομοδιμερή αλληλεπιδρώντας με περιοχή στη θέση πρόσδεσης δεσμευτή, που προσδένονται σε ευθείες επαναληπτικές αλληλουχίες της μορφής: *AGGTCANAGGTCA*. Ο HNF4 εντοπίζεται πάντα στον πυρήνα (19).

Παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπιδίων (30), καθώς και των γονιδίων της αντιθρομβίνης (31), της τρανσθηρετίνης (32) και του HNF1a (33). Comment [a26]: Sladek F, 1990. Liver enriched transcription factor HNF4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. Genes Dev, 4:2353-2365

Comment [a27]: Frain, 1989, baumhueter, 1990, De Simone, 1991

**Comment [a28]:** Iyemere V P, Davies N H and Brownlee G G, 1998. The activation function 2 domain of hepetic nuclear factor 4 is regulated by a short C-terminal proline-rich repressor domain. **Nuc. Ac. Res, 26:2098-2104** 

Comment [a29]: Guopiang J et al, 1995. Exclusive homodimerization of the orpHan receptor hepatocyte nuclear factor 4defines a new subclass of nuclear receptors. Molecular and Cellular Biology, 15:5131-5143.

**Comment [a30]:** Taylor D, Haubenwalher S and Leff T, (1990). Characterization of a dominant negative mutant form of the HNF4 orpHan receptor. Nuc. Ac. Res, 24: 2930-2935

Comment [a31]: Fernandez-Rachubinski F A, Weiner J H, and Blajchman M A, 1996. Regions flanking exon 1 regulate constitutive expression of the human antithrombin gene. J Biol. Chem, 271: 29502-29512

Comment [a32]: Costa, R. H., D. R. Grayson, and J. E. Darnell, Jr. 1989. Multiple hepato-cyteenriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and al-antitrypsin genes. Mol. Cell. Biol. 9:1415–1425.

Comment [a33]: Kuo C J et al, 1992. Nature, 355:457Λόγω αυτού του τελευταίου Θεωρείται σαν βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη του ήπατος, των νεφρών και των εντέρων.

### 1.3.2 MOPIAKH FENETIKH TOY HNF4

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον ΗΝF4, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 20 του ανθρώπου, και συγκεκριμένα στην περιοχή 20q12-13 (On line Mendelian Inheritance in Man database). Δίνει εναλλακτικά προϊόντα και μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί πλήρως οι ισομορφές ΗΝFa1, ΗΝF4a2, ΗΝF4a3 και ΗΝF4a4. Πληροφορίες για τις ισομορφές αυτές αναφέρονται στον Πίνακα 4, ενώ στην εικόνα 5 φαίνονται οι διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία των εναλλακτικών μορφών μεταξύ τους (Transcription Factor's database).

Η περιοχή ενεργοποίησης AF-1 έχει βρεθεί ότι αποτελεί συνεχώς περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής ενώ κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει για την περιοχή AF-2. Αυτή φαίνεται ότι είναι δυνητικά ενεργοποιητής (34)

Κάποιες ισομορφές του δεν είναι ενεργές και γίνονται υποθέσεις ότι με το εναλλακτικό splicing μπορεί και γίνεται πολύ λεπτή ρύθμιση στην έκφραση των γονιδίων. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι παρατηρήθηκε ελάττωση της ενεργότητας υποκινητού μέχρι 4 φορές όταν έγινε συνεπιμόλυνση HNF4a2 και HNF4a4 σε κύτταρα που δεν εκφράζουν HNF4a (35).

Είναι επίσης γεγονός ότι ο ΗΝF4 φωσφορυλιώνεται και μάλιστα σε αμινοξικά κατάλοιπα τυροσίνης. Γίνεται ακόμη λόγος ότι αυτή του η φωσφορυλίωση ίσως να παίζει ρόλο στον πυρηνικό του εντοπισμό (36).

Η αφαίρεση του γονιδίου του HNF4 (knock out) σε ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα τον θάνατο του εμβρύου, γεγονός που αποδεικνύει τον σημαντικό του ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη. Συγκεκριμένα τα έμβρυα που δεν εξέφραζαν καθόλου HNF4 (HNF4-/-), δεν πραγματοποιούσαν καν γαστριδιοποίηση και φυσικά δεν αναπτύσσονταν πέραν αυτού του σταδίου (37). Comment [a34]: Hadzopoulou-Cladaras M et al, 1997. Functional Domains of the Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4. J. Biol. Chem. 272: 539–550, 1997

**Comment [a35]:** Thorsten Drewes, Sabine Senkel, Beatrix Holewa αnd Gerhart U. Ryffel, 1996. Human Hepatocyte Nuclear Factor 4 usoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. Mol. Cel. Biol. 19(3):925-931

Comment [a36]: ΗΝF4 φωσφ.

Comment [a37]: Chen, W. S., K. Manova, D. C. Weinstein, S. A. Duncan, A. S. Plump, V. R. Prezioso, R. F. Bachvarova, and J. E. Darnell. 1994. Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. Genes Dev.

8:2466-2477.



Θέση καταστολής

Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση την δομικών περιοχών του HNF4a.



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση των cDNAs των ισομορφών HNF4a1, HNF4a2, HNF4a3 και HNF4a4. Οι διαφορετικές σκιάσεις αναπαριστούν τις διαφορές λόγω του εναλλακτικού splicing.

ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (ΚDa)
HNF4a1	464	51.6
HNF4a2	465	51.8
HNF4a3	408	45.6
HNF4a4	504	56.1

Πίνακας 4. Πληροφορίες σχετικά με τα μεγέθη των cDNAs και των πρωτεϊνών των ισομορφών του HNF4a.

### 1.3.3 ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΗΝF4

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτή η βαρύτητα του μεταγραφικού αυτού παράγοντα, τόσο στον μεταβολισμό, όσο και στην ανάπτυξη του οργανισμού. Έχει βρεθεί ότι μεταλλαγές στο γονίδιό του (TCF14), ευθύνονται για τον επικρατή κληρονομούμενο μη εξαρτώμενο από ινσουλίνη διαβήτη τύπου I (Dominant Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Type I ή MODY-I), που εμφανίζεται στα άτομα. πριν τα 25 τους χρόνια. Η ασθένεια αυτή συνοδεύεται από βαριάς μορφής ανεπάρκεια έκκρισης ινσουλίνης και σοβαρή υπεργλυκαιμία.

### 1.4 Ο ΗΝΓ4 ΚΑΙ ΟΙ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Ο HNF4 παίζει ρόλο στην μεταγραφική ενεργοποίηση όλων των απολιποπρωτεινών. Έχει δειχθεί ότι οι εγγύς υποκινητές αυτών φέρουν μία ή και περισσότερες θέσεις πρόσδεσης του HNF4.

Συγκεκριμένα ο εκκινητής της απολιποπρωτείνης Β φέρει Θέση πρόσδεσης του ΗΝF4 στη Θέση -88/-62 του εγγύς υποκινητού, της AII στη Θέση -739/-715, της CIII στις Θέσεις -92/-67 και -736/-714 (38). Όσον αφορά τον υποκινητή της αροΑΙV φέρει Θέση πρόσδεσης ΗΝF4 στη Θέση -148/-92 και της AI στις -220/-190 και -132/-119 αντίστοιχα (39).

**Comment [a38]:** Ladias J A A et al, 1992. Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes apoB, apoCIII and apoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF4, ARP-1, EAR-2 and EAR-3. J. Biol. Chem, 267:15849-15860

**Comment [a39]:** Kardassis D et al. 1996. Transcriptional regulation of the genes involved in lipoprotein transport. **Hypertension**, **27:980-1008** 

### 1.4.1 Ο ΕΓΓΥΣ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΗΣ CII

Η μόλις 550bp περιοχή μεταξύ των γονιδίων των απολιποπρωτεινών CIV και CII, αποτελούν έναν πολύ ισχυρό ηπατοειδικό υποκινητή η ενεργότητα του οποίου αυξάνει από αλληλεπίδραση με την περιοχή ελέγχου έκφρασης στο ήπαρ. Στην περιοχή αυτή έχουν ταυτοποιηθεί 5 πυρηνικά αποτυπώματα τα CIIA, CIIB, CIIC, CIID και CIIE (Εικόνα 6). Υπάρχει Θέση πρόσδεσης C/EBP στο στοιχείο CIID, ενώ έχει αποδειχθεί ότι ο HNF4 ενεργοποιεί τη μεταγραφή με πρόσδεσή του στο αποτύπωμα CIIB, ενώ οι ARP-1 και EAR3 την καταστέλουν από το CIIIB. Ανταγωνιζόμενοι για τις Θέσεις αυτές οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες ρυθμίζουν τα σωστά επίπεδα έκφρασης της απολιποπρωτείνης στον οργανισμό. Υπάρχουν ενδείξεις πρόσδεσης στο ρυθμιστικό στοιχείο CIIIC ετεροδιμερών RXR/T3R(40). Τα ετεροδιμερή RXR/T3R ενεργοποιούν τον υποκινητή του γονιδίου της απολιποπρωτείνης CII μόνο παρουσία της ορμόνης Τριϊωδιοθυρονίνη.

**Comment [a40]:** Kardassis D, Sacharidou E and Zannis V, 1998. Transactivation of the human apolipoprotein CII promoter by orpHan and ligand dependent nuclear receptors. J. Biol. Chem, 273: 17810-17816



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση του υποκινητή της απολιποπρωτείνης CII και των στοιχείων που υπάρχουν σε αυτόν.

### 1.5 ΟΙ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΤΟ ΗΠΑΡ (HCR)

Για την ηπατοειδική έκφραση του γονιδιακού συμπλέγματος Ε/CI/CIV/CII, είναι υπεύθυνη μία ρυθμιστική περιοχή (distal promoter), 19Kb μετά τον υποκινητή της απολιποπρωτείνης Ε και 9kb μετά τον υποκινητή της CI, που καλείται Περιοχή Ελέγχου Έκφρασης στο Ήπαρ (Hepatic Control Region ή HCR).

Ανακαλύφθηκε από τους Simonet W. S. et al (41), οι οποίοι έδειξαν ότι αφαιρώντας την περιοχή αυτή, οι απολιποπρωτείνες Ε και CI δεν εκφράζονται στο ήπαρ. Αργότερα οι ίδιοι ερευνητές περιόρισαν την απαιτούμενη περιοχή για ηπατική έκφραση σε ένα τμήμα 774bp (42).

Το 1995, βρέθηκε άλλη μία περιοχή 10 kb μετά το HCR, που παρουσιάζει 85% ομολογία με αυτή την περιοχή, η οποία ονομάστηκε HCR-2 (43), ενώ αυτή που είχε ανακαλυφθεί πρώτη ονομάστηκε HCR-1. Φαίνεται ότι υπάρχει ηπατοειδική έκφραση των απολιποπρωτεινών του γονιδιακού συμπλέγματος, όταν είναι παρόν είτε το HCR-1, είτε το HCR-2, αλλά η ηπατική έκφραση είναι μηδενική όταν αφαιρεθούν και τα δύο, παρά το γεγονός ότι οι εγγύς υποκινητές των γονιδίων παραμένουν άθικτοι (44, 39).

Σχηματική αναπαράσταση των θέσεων των HCR-1 και HCR-2 στο γονιδιακό σύμλεγμα E/CI/CIV/CII δίνεται στην εικόνα 7.

Με DNAse I footprinting, αποδείχθηκε η ύπαρξη 6 πρωτεϊνικών αποτυπωμάτων στο HCR-1, εκ των οποίων κάποια παρουσιάζονταν ενισχυμένα όταν χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ηπατικών κυττάρων (45). Έγινε ανάλυση ελλειμάτων της αρχικής περιοχής σε διαγονιδιακά ποντίκια και ορίστηκε ως ελάχιστη περιοχή ηπατικής έκφρασης οι 319 βάσεις από το 5 άκρο του αρχικού HCR. Με in vivo footprinting στην περιοχή των 319bp παρατηρήθηκε η ύπαρξη 7 πρωτεϊνικών ηπατοειδικών αποτυπωμάτων. Η αλληλουχία του HCR και οι θέσεις πρωτεϊνικών αποτυπωμάτων φαίνονται στην Εικόνα 8A (46). Στην εικόνα 8B αναπαρίσταται σύγκριση των αποτελεσμάτων από τις in vivo και in vitro αναλύσεις του HCR-1, Comment [a41]: Simonet W S, Bucay N, Pitas R E, Laner S J, Taylor J M, 1991. J. Biol. Chem 266:8651-8654

Comment [a42]: Simonet W S et al, 1993. J. Biol. Chem 268:8221-8229

Comment [a43]: Allan C M, Walker D and Taylor J M, 1995. J. Biol. Chem 270:26278-26281

**Comment [a44]:** Allan C, Taylor S and Taylor J, (1997). Two hepatic enhancers, HCR.1 and HCR.2, coorporate the liver expression of the entire human apolipoprotein E/CI/EIV/CII gene cluster. J. Biol. Chem, 272: 29113-29119

Comment [a45]: Dang Q, Walker D, Taylor S, Allan C, Chin P, Fan J, Taylor J, 1995. Structure of the hepatic control region of the human apolipoprotein E/CI gene locus. J. Biol. Chem 280:22577-22585

**Comment [a46]:** Dang Q and Taylor J, 1996. In vivo footprinting analysis of the hepatic control region of the human apolipoprotein E/CI/CIV/CII gene locus. J. Biol. Chem, 271:28667-28676

καθώς και οι παράγοντες που έχουν προταθεί από τους Taylor et al, ότι συνδέονται στις περιοχές αυτές.

Οι θέσεις υπερευαισθησίας σε DNAseI καθώς και τα TGTTTGC motifs που παρουσιάζονται στην Εικόνα 8 συγκλίνουν στην υπόθεση ότι τα πρωτεϊνικά αποτυπώματα 4, 5 και 6 ενώνονται με high mobility group proteins, πρωτείνες που είναι γνωστές για την εισαγωγή κλίσης στα μόρια DNA. Όλα αυτά είναι ενδείξεις ότι αυτή η περιοχή λυγίζει και φτάνει τους εγγύς υποκινητές των γονιδίων του γονιδιακού αυτού συμπλέγματος (47), ένα μοντέλο δηλαδή παρόμοιο με αυτό που προτείνεται για τον εγγύς υποκινητή του γονιδίου της αλβουμίνης (48).

Ελλειματικές κατασκευές σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι για την ηπατοειδικότητα της απολιποπρωτείνης Ε απαιτείται ολόκληρη η περιοχή 10\_325HCR, ενώ οι περιοχές 10\_185, 10\_206 και 72\_260 της περιοχής HCR-1 ελάττωναν την ηπατοειδικότητα (αυξάνοντας την έκφραση στα νεφρά) ενώ η περιοχή 6\_118 δεν έδινε καθόλου προιόν στο ήπαρ (45). **Comment [a47]:** Vorgia P et al, 1997. A short proximal promoter and the distal hepatic control region –1 (HCR-1) contribute to the liver specificity of the human apolipoprotein CII gene. **J. Biol. Chem, 273: 4188-4196** 

Comment [a48]: McPHerson C E, Shim E Y, Friedman D S and Zaret K S, 1993. Cell, 75: 387-398



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση των Θέσεων των HCR-1 και HCR-2 στο γονιδιακό σύμλεγμα E/CII.

Α	L .							
	-55	1a				5	1b	
60	CCAGGGATGGAGAGAAA	GAGATGAGAGTGGTTTG	GGGGCTTGGT	GACTTAGAC	GAACAGAGCTG	CAGGCTCAGAGG	CACACAGGAGTTTCTGGGC	TCACCCTGCCC
	GGTCCCTACCTCTCTT	CTCTACTCTCACCAAAC	CCCCGAACCA	CTGAATCTC	<u>CTTGTCTC</u> GAC	GTCCGAGTCTCC	GTGTGTCCTCAAAGACCCG	AGTGGGACGGG
	55	2	<b>→</b>		99	3	131	4
	CCTTCCAACCCCTCAGT	TCCCATCCTCCAGCAGC	TGTTTGTGTG	CTGCCTCT	AAGTCCACAC	TGAACAAACTTC	AGCCTACTCATGTCCCTAA	AATGGGCAAAC
	GGAAGGTTCGGGAGTCA	AGGGTAGGAGGTCGTCG	ACAAACACAC	GACGGAGA	CTTCAGGTGTG	TCTTGTTTGAAG	<u>TCGGATGA</u> GTACAGG <u>GATT</u>	TTACCCGTTTG
				-			<i>r</i>	-
			<u>190</u>	5	209		00	
	ATTGCAAGCAGCAAACA	GCAAACACACAGCCCTC	сствертвел	GACCTTGG?	AGCTEGEGCAG	AGGTCAGAGACC	TCTCTGGGCCCATGCCACC	TCCAACATCCA
	TAACGTTCGTCGTTTGT	CGTTTGTCTGTCGGGAG	GGACGGACGA	CTGGAACCT	ICGACCCGTC	TCCAGTCTCTGG	AGAGACCCGGGTACGGTGG	AGGTTGTAGGT
		<b>↓</b>						
		275 <b>7</b>						
	CTCGACCCCTTGGAATT	TOGGTGGAGAGGAGCAG	AGGTTGTCCT	GCCCTCCT	FTAGGTAGTGT	GAGAGGG 325		
	GAGCTOGGGAACCTTAA	ACCCACCTCTCCTCGTC	TCCAACAGGA	CCGCACCA	AATCCATCACA	CTCTCCC		

В

.

IN VIVO	IN VITRO	ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
ft1b (5-55) ft2 (55-97) ft3 (99-128) ft4 (131-180) ft5 (190-207) ft6 (209-262) ft7 (275-300)	f†A (134-166) f†B (198-205) f†Γ (209-250) f†Δ (388-408) f†E (421-442) f†ΣT (524-544)	HNF3a TF-LF2 HNF4 GATA/binding factor C/EBP

Εικόνα 8Α. Η αλληλουχία του HCR. Οι θέσεις των πρωτεϊνικών αποτυπωμάτων που προέκυψαν από in vivo footprinting δίνονται με τα τετράγωνα, ενώ τα βέλη αναπαριστούν τις θέσεις υπερευαισθησίας με DNAse I στο ήπαρ. Β. Σύγκριση in vivo και in vitro footprinting. Αντιστοιχία μεταγραφικών παραγόντων που θεωρούνται ότι προσδένονται στα στοιχεία από τους Taylor et al (45,46).

# 1.6 ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΩΝ RNA

### 1.6.1 **FENIKA**

Είναι δυνατή η καταστολή έκφρασης γονιδίων με χρήση μορίων RNA, που είτε φέρουν μία καταλυτική περιοχή είτε απλώς πρόκειται για συμπληρωματικές αλληλουχίες ενός συγκεκριμένου mRNA.

Τα καταλυτικά RNA είναι μόρια RNA τα οποία παίρνοντας συγκεκριμένη στεροδιάταξη, υδρολύουν τον φωσφοδιεστερικό δεσμό σε συγκεκριμένους στόχους τρινουκλεοτιδίων. Τα συμπληρωματικά RNA (antisense RNA) αποτελούν μόρια RNA τα οποία ζευγαρώνοντας με το mRNA δεν αφήνουν τη μεταγραφική μηχανή να δράσει.

#### 1.6.2 ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΡΙΒΟΕΝΖΥΜΩΝ

Τα καταλυτικά RNA είναι ενδοριβονουκλεάσες. Αυτά παίρνοντας κατάλληλη διάταξη έχουν την ικανότητα να διασπούν τον φωσφοδιεστερικό δεσμό σε συγκεκριμένες θέσεις στο μόριό τους, είτε σε άλλα μόρια RNA. Διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον τον τρόπο που διασπούν τον φωσφοδιεστερικό δεσμό, όπως τα αυτοδιαιρούμενα ιντρόνια τύπου Ι και τύπου II, η RNAse P και μορφές όπως το ριβοένζυμο με μορφή κεφαλής σφυριού και αυτό με μορφή φουρκέτας. Ο μηχανισμός διάσπασης φωσφοδιεστερικού δεσμού από τις διάφορες τάξεις ριβοενζύμων φαίνεται στην εικόνα 9. (49).

Μελέτες κινητικής για τα ριβοένζυμα έχουν δείξει ότι οι αντιδράσεις τους ακολουθούν κινητική Michaelis-Menten. Πρόκειται δηλαδή για τυπικές ενζυματικές αντιδράσεις. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ριβοένζυμο είναι το ριβοένζυμο με μορφή κεφαλής σφυριού (hammerhead). Αυτό έχει βρεθεί ότι παίρνοντας μια στερεοδιάταξη που μοίαζει με Γ (50), διασπά (χωρίς υδρόλυση), μόρια RNA σε θέση της μορφής NUH↓ (όπου N= οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο και H= A, C, U). Τα ιόντα Μα είναι απαραίτητα για την αντίδραση αυτή που καταλήγει στο σχηματιζμό δύο **Comment [a49]:** James H A, Gibson I, 1998. The therapeutic potential of Ribozymes. **Blood, 92:371-382** 

Comment [a50]: 3-Δ ριβο

μορίων RNA, ενός 5' με 2,3-κυκλικό φωσφορικό δακτύλιο και ενός 3' με υδροξυλικό άκρο (Εικόνα 10).

Ριβοένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί για να αντιμετωπιστεί η ανθεκτικότητα σε χημικές ουσίες (Drug Resistance) που παρουσιάζουν τα κύτταρα πολλών όγκων. Το αντίστοιχο γονίδιο (MDR-1) έχει κατασταλεί επιτυχώς ελαττώνοντας την ανθεκτικότητα προβληματικών κυττάρων μέχρι και 200 φορές!!! (51) Άλλη εφαρμογή τους αφορά την αναστροφή καρκινικού φαινοτύπου. Σαν γονίδια στόχοι έχουν χρησιμοποιηθεί μεταξύ άλλων τα H-ras και bcr-abl. Οι Kashani-Sabet et al, χρησιμοποιώντας ριβοένζυμο το οποίο αναγνώριζε μόνο την μεταλλαγμένη μορφή της H-ras κατόρθωσαν και εξάλειψαν το καρκινικό φαινότυπο σε ποντίκι (52). Όσο αφορά το bcr-abl, και πάλι έγινε δυνατή η αποσιώπηση της μετάφρασης της προβληματικής πρωτείνης και αναστροφή του λευχαιμικού φαινοτύπου (53).

Όμως τα ριβοένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί και για την αντιμετώπηση ιών όπως ο ιός του AIDS (54) και της Ηπατίτιδας Β (55), καθώς και για καταστολή άλλων γονιδίων με στόχο τη μελέτη τους.

# 1.6.3 ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΩΝ RNA

Πρόκειται για μόρια RNA με αλληλουχία συμπληρωματική του mRNA στόχου τους. Αρχικά η αποτελεσματικότητά τους θεωρούνταν ελλειπής σε σχέση με αυτή των ριβοενζύμων. Όμως πολύ σύντομα παρατηρήθηκε ότι τα antisense πολλές φορές είναι πιο δραστικά από τα ριβοένζυμα αλλά αλλά η εξήγηση του φαινομένου αποτελούσε μυστήριο.

Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι τα πράγματα όσο αφορά τα μόρια αυτά είναι κάπως πιο περίπλοκα, αφού ανακαλύφθηκε ότι τέτοιου είδους μόρια αποτελούν μυνήματα έναρξης κυτταρικών σηματοδοτικών μηχανισμών. Comment [a51]: Kobayashi H et al, 1994. Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR-1 (PGY1) ribozyme. Cancer Res, 54: 1271-

Comment [a52]: Kashani-Sabet M et al, 19994. Supression of the neoplastic pHenotype in vivo by anti-rag ribozyme. Cancer Res, 54: 900-

**Comment [a53]:** Snyder D S et al, 1993. Ribozyme-mediated inhibition of bcr-abl gene expression in a PHiladelpHia chromosome-positive cell line. **Blood, 82: 600-**

**Comment [a54]:** Zhou C et al, 1994. Inhibition of HIV-1 human TlympHocytes by retrovirally transduced anti-tat and rev hammerhead ribozymes. **Gene, 149: 33** 

**Comment [a55]:** Beck J and Nassal M, 1995. Efficient hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the structured hepatitis B virus encapsidation signal in vitro and in cell extracts, but not in intact cells. **Nucl Ac Res, 23: 4954-**



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων μηχανισμών διάσπασης του φωσφοδιεστερικού δεσμού στις διάφορες κατηγορίες ριβοενζύμων.

![](_page_26_Figure_0.jpeg)

Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση της διάσπασης του φωσφοδιεστερικού δεσμού ενός μορίου RNA. Ο διπλός δεσμός P=O διασπάται με νουκλεοφιλική προσβολή από την προσκείμενη -OH Θέση, σχηματίζοντας κυκλικό δακτύλιο Το μόριο αυτό είναι ασταθές και τελικά σπάει σε δύο τμήματα όπως φαίνεται στην εικόνα πάλι με νουκλεόφιλη επίθεση όπως δείχνει το βέλος.

Έχει βρεθεί ότι δίκλωνα RNA στον πυρήνα, αφαμινώνονται σε αδενοσύνες από την ADAR (Adenosine Deaminase that acts on ds RNA). Με αυτόν τον τρόπο το δίκλωνο RNA εμποδίζεται να βγει από τον πυρήνα και μάλλον αποικοδομείται. Πάντως στην περίπτωση ακόμη που αυτό καταφέρει να βγει από τον πυρήνα, έχει βρεθεί ότι στο κυτταρόπλασμα υπάρχει μία κινάση που ενεργοποιείται από δίκλωνο RNA, η PKR (Protein Kinase activated by ds RNA). Αυτή αφού ενεργοποιηθεί από dsRNA, φωσφορυλιώνει τον eIF2a και αυτός με τη σειρά του εμποδίζει τον eIF2b να αρχίσει τη μετάφραση του συγκεκριμένου RNA. Η κινάση αυτή δεν απαιτεί πρόσδεση συγκεκριμένης αλληλουχίας ούτε και μεγέθους RNA, για την ενεργοποίησή της (56).

Comment [a56]: Kumar M and Carmichael G, 1998. Antisense RNA: Function and fate of duplex RNA in cells of higher Eukaryotes. Micr. Mol. Biol. Rev, 62: 1415-1434

### ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος της περιοχής ηπατικού ελέγχου HCR-1 και απαλοιφών αυτής, στην ενίσχυση της ενεργότητας του εγγύ υποκινητή της απολιποπρωτείνης CII του γονιδιακού συμπλέγματος apoE/CI/CIV/CII και ενός ετερόλογου υποκινητή (TK). Έγινε προσδιορισμός της ιστοειδικότητας της ενεργότητας του αγρίου τύπου HCR-1 και των απαλοιφών του σε σύντηξη με τον εγγύς υποκινητή της apoCII με επιμολύνσεις κυττάρων HepG2, COS-7 kai Hek293.

Μελετήθηκε ο ρόλος του ΗΝF4 στην ενεργότητα της περιοχής HCR-1 και των ελλειματικών κατασκευών της HCR-1, με χρήση μόνιμων κυτταρικών σειρών που εκφράζουν συμπληρωματικό RNA για τον μεταγραφικό αυτόν παράγοντα και με συνεπιμολύνσεις του HNF4 με την αγρίου τύπου και των κατασκευών της HCR-1. Η πρόσδεση του HNF4 στην HCR-1 δείχθηκε με τεχνική υστέρησης της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας DNA.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος διαφόρων στοιχείων από in vivo footprinting με τεχνική υστέρησης της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας DNA και με συνεπιμολύνσεις κυττάρων COS-7 και HepG2, ως προς την πρόσδεση και την μεταγραφική ενεργοποίηση από διάφορα μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων όπως ARP-1, EAR-3, RXR, T3R και PPAR.

25

# 2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα

Οι πέψεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο ανάλογο της αρχικής ποσότητας DNA, ούτως ώστε να υπάρχουν 0.5μg DNA/μl αντίδρασης. Προστίθονταν το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα για το κάθε περιοριστικό ένζυμο σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρίας του ενζύμου και 3 φορές περίσσεια αυτού (για 1μg DNA προστίθονται 3U ενζύμου). Η επώαση γίνεται στους 37°C για 2-4 ώρες κατά περίπτωση.

### 2.2 Απομόνωση DNA μετά από ηλεκτροφόρηση

Το DNA απομονώθηκε από πέψεις ή από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Έπειτα από ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης 0.7%, η επιθυμητή ζώνη αφαιρέθηκε από το πήκτωμα με καθαρό νυστέρι για να τεμαχιστεί στη συνέχεια σε πολύ μικρά κομμάτια και να τοποθετηθεί στη στήλη G10, μαζί με 200μl ΤΕ. Η στήλη αυτή κατασκευάστηκε σε σωλήνα eppendorf 0.5ml ο πάτος του οποίου είχε τρυπηθεί με καυτηριασμένη βελόνα, και μέσα είχε τοποθετηθεί μικρή ποσότητα αποστειρωμένου και καλά πακεταρισμένου υαλοβάμβακα. Μέσα στον σωλήνα και πάνω από τον υαλοβάμβακα, τοποθετήθηκαν 100μl διαλύματος G10,τα οποία πακεταρίστηκε από την αγαρόζη με φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 12000 στροφές. Το DNA καθαρίστηκε από την αγαρόζη με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12000 στροφές. Το DNA στη συνέχεια συμπυκνώθηκε σε μικρότερο όγκο με κατακρήμνιση με 0.3M οξικού νατρίου PH5.2 και 2.5 όγκους αιθανόλης.

### 2.3 Αντίδραση Λιγάσης

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20μl, παρουσία 400U Λιγάσης (T4 DNA Ligase), 1x αραίωση του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος (New England Biolabs), 100ng πλασμιδιακού φορέα και ανάλογη ποσότητα ενθέματος σύμφωνα με τη σχέση:

#### (500\*ζεύγη βάσεων ενθέματος/ζεύγη βάσεων φορέα)ng

Η αντίδραση επωάζεται 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή 16 ώρες στους 14°C.

### 2.4 Μετασχηματισμός βακτηρίων

Για την επιλογή θετικών κλώνων που φέρουν τους ανασυνδιασμένους πλασμιδιακούς φορείς για την κατασκευή pcDNAIneo"antisense hHNF4" χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E.coli* MC1061 (με γονότυπο: F- mcrA (mrr-hsdRMSmcrBC), 80lacZM15, lacX74, deoR recA1, araD139, (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG {P3: Kan<sup>R</sup> Amp<sup>R</sup> (amber) Tet<sup>R</sup> (amber)), αφού για την επιλογή κατασκευών pcDNAIneo είναι απαραίτητη η παρουσία του επισώματος P<sub>3</sub>. Στους υπόλοιπους μετασχηματισμούς χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E.coli* DH10β.

Η διαδικασία έχει ως εξής: σε 100μl ειδικά επεξεργασμένων κυττάρων (competent cells) ικανότητας 10<sup>9</sup>, προστέθηκε το μίγμα της αντίδρασης λιγάσης και αφού επωάστηκαν στον πάγο 15 λεπτά στον πάγο, υπέστησαν θερμικό σοκ για 45 δευτερόλεπτα στους 42<sup>o</sup>C. Μετά από επώασή τους στους 37<sup>o</sup>C για 45 λεπτά, φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 3000 στροφές και απλώθηκαν σε τρυβλίο LB που φέρει ανάλογη ποσότητα του επιθυμητού αντιβιοτικού.

### 2.5 Απομόνωση DNA

### 2.5.1 Απομόνωση DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep)

Χρησιμοποιήθηκε μέθοδος βρασμού.

Η κάθε αποικία τοποθετείται σε 2ml LB και του κατάλληλου αντιβιοτικού στη σωστή αραίωση σε αποστειρωμένους γυάλινους σωλήνες και επωάζεται 16 ώρες στους 37°C σε επωαστήρα με κίνηση. Στη συνέχεια 1.5ml της καλλιέργειας τοποθετείται σε σωλήνα eppendorf 1.5ml και φυγοκεντρείται 1 λεπτό στις 12000 στροφές. Η βακτηριακή πάστα επαναδιαλύεται σε 600μl διαλύματος λύσης (8% σουκρόζη, 5% TritonX-100, 50mM EDTA PH8, 50mM Tris-HCl PH7.5) και 25μl διαλύματος 10mg/ml λυσοζύμης. Μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά το δείγμα βράζεται για 90 δευτερόλεπτα και μεταφέρεται στον πάγο για άλλα 5 λεπτά. Με φυγοκέντρηση 30 λεπτά στις 12000 στροφές οι πρωτείνες συλλέγονται στον πάτο του σωλήνα. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλη και χλωροφόρμιο και κατακρύμνηση προσθέτοντας 600μl ισοπροπανόλης. Το DNA επαναδιαλύεται σε 50μl ΤΕ όπου έχουν προστεθεί 10mg/ml RNAse A.

### 2.5.2 Απομόνωση DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxiprep)

Πραγματοποιήθηκε με χρήση κολώνας Qiagen (Qiagen-tip 500), σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

### 2.6 Κυτταροκαλλιέργειες

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποίηθηκαν οι κυτταρικές σειρές του Πίνακα 6.

HepG2	Κυτταρική σειρά ανθρώπινου ηπατώματος
COS-7	Κυτταρική σειρά νεφρικών αθανατοποιημένων κυττάρων πιθήκου (φέρουν τον ιό SV40)
Hek293	Κυτταρική σειρά νεφρικών κυττάρων εμβρύου ανθρώπου

Πίνακας 6. Στοιχεία κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

### 2.6.1 Απόψυξη και εγκατάσταση κυτταροκαλλιεργειών

Ο σωλήνας με τα αποθέματα της εκάστοτε κυτταρικής σειράς εμβαπτίζεται αμέσως μετά την έξοδό του από τον υπερκαταψύκτη σε ζεστό νερό η θερμοκρασία του οποίου δεν υπερβαίνει τους 45°C. Τα κύτταρα στη συνέχεια μεταφέρονται σε σωλήνα 15ml που περιέχει 10ml πλήρες θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιεργειών (DMEM 10% FBS 0.2mg/ml Penicillin/Streptomycin) και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 1000 στροφές. Αφαιρείται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10ml πλήρες Θρεπτικό μέσο και τοποθετούνται σε φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας επιφάνειας 50cm<sup>2</sup>. Οι φλάσκες επωάζονταν σε επωαστήρα 37<sup>0</sup>C και γίνονταν αλλαγή Θρεπτικού κάθε 72 ώρες. Η εκτίμηση της ανάπτυξης των κυττάρων γίνονταν με παρατήρησή τους σε στερεομικροσκόπιο Olympus CK2.

### 2.6.2 Αραίωση κυττάρων

Η αραίωση πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα φτάσουν να παρουσιάζουν πληρότητα στην επιφάνεια της φλάσκας τουλάχιστον 90%. Όταν τηρούν αυτή τη συνθήκη τα κύτταρα αποσύρονται από τον επωαστήρα και αφαιρείται το θρεπτικό μέσο. Αφού ξεπλυθεί αυτό από τον πάτο της φλάσκας, προστίθονται 2ml διαλύματος 1x Τρυψίνης/EDTA (Gibco BRL) και μετά από επώασή τους 5 λεπτά στους 37°C, τα κύτταρα αποκολλώνται από τον πάτο της φλάσκας και αφού πραγματοποιηθεί αραίωση ο αριθμός τους προσδιορίζεται με μέτρησή τους σε κυτταρόμετρο (Chemocytometer-Neubauer, Hauser Scientific). Η αραίωσή τους γίνονταν σε θρεπτικό.

### 2.6.3 Αποθήκευση αποθέματος κυτταρικής σειράς

Αφού δημιουργηθεί εναιώρημα κυττάρων όπως αναφέρεται παραπάνω αυτά μεταφέρονται σε σωλήνα 15ml και φυγοκεντρούνται 5 λεπτά στις 1000 στροφές. Αφαιρείται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε επιθυμητό όγκο θρεπτικού που έχει προστεθεί DMSO σε τελική αραίωση 10%. Το νέο εναιώρημα τοποθετείται σε ειδικά σωληνάρια και φυλάσσονται στον υπερκαταψύκτη το πολύ για ένα χρόνο.

### 2.7 Επιμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με πλασμιδιακό DNA

Πραγματοποιήθηκαν παροδικές και μόνιμες επιμολύνσεις. Τόσο για τις μεν όσο και για τους δεν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος συγκατακρήμνησης Ca και DNA. Για να γίνει αυτό τα κύτταρα έχουν τοποθετηθεί σε ειδικό για κάθε περίσταση τρυβλίο ή πιάτο από την προηγούμενη μέρα ούτως ώστε την επόμενη τα κύτταρα να καταλαμβάνουν 50 με 60% την επιφάνειάς τους. Έτσι προκειμένου για πιάτο 6 θέσεων τοποθετούνταν από την προηγούμενη μέρα 500000 κύτταρα ανά θέση προκειμένου για HepG2 ενώ 250000 κύτταρα προκειμένου για COS-7. Την επομένη γίνεται η συγκατακρύμνηση, ως εξής :

Παρασκευάζεται πρώτα το μίγμα DNA σε σωλήνα eppendorf 1.5ml, χρησιμοποιώντας 5μg του πλασμιδίου αναφοράς, 2μg του πλασμιδίου που εκφράζει β-γαλακτοσιδάση, 2-4μg του πλασμιδίου που εκφράζει μεταγραφικό παράγοντα και 124mM CaCl<sub>2</sub>, σε τελικό όγκο 250ml. Εάν στο πείραμα δεν χρησιμοποιείτο μεταγραφικός παράγοντας προστίθετο ένα πλασμίδιο όπως το pBluescript ούτως ώστε πάντοτε το μίγμα DNA να περιέχει πάντα 10μg DNA. Το μίγμα αυτό μεταφέρεται στάγδην σε ανακινούμενο σωλήνα 15ml όπου έχει προστεθεί πρώτα 250ml διαλύματος 2xHBS (42mM Hepes PH7.1, 270mM NaCl, 1mM KCl, 0.14mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% δεξτρόζη). Το τελικό μίγμα επωάζεται 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τελικά τοποθετείται στάγδην σε 1 θέση από πιάτο 6 θέσεων.

Τα κύτταρα στη συνέχεια επωάζονται στους 37°C για 6-15 ώρες οπότε και γίνεται αλλαγή του θρεπτικού με νέο και η επώαση συνεχίζεται για 24 ακόμη ώρες.

Προκειμένου για μόνιμη επιμόλυνση, κατά την αλλαγή του Θρεπτικού στο νέο προστίθεται 0.5mg/ml G418 (Gibco BRL). Η αρχική κυτταρική σειρά δεν παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό και έτσι τα κύτταρα που δεν έχουν ενσωματώσει την επιθυμητή πλασμιδιακή κατασκευή, αποθνήσκουν. Μετά από μία εβδομάδα έχουν επιβιώσει μόνο τα επιθυμητά κύτταρα τα οποία αποσύρονται από το αρχικό πιάτο και μεταφέρονται σε νέα φλάσκα 25 cm<sup>2</sup> όπου και καλλιεργούνται πάντα με παρουσία 0.5mg/ml G418 στο στάνταρτ Θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας.

### 2.8 Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα

Χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικές μέθοδοι κατά περίπτωση.

Για πρωτείνες που χρησιμοποιούνται για δοκιμή Ακετυλοτρανσφεράσης της Χλωραμφαινικόλης, αρχικά αφαιρείται το Θρεπτικό από τα κύτταρα και αφού αυτά ξεπλυθούν με 1xPBS, προστίθεται στο πιάτο 1ml διαλύματος TES (40mM Tris-HCl PH7.5, 1mM EDTA PH8, 150mM NaCl) και τα κύτταρα αποκολλώνται με ειδικό ξύστρο. Το εναιώρημα τοποθετείται σε σωλήνα eppendorf 1.5ml και τα κύτταρα παραλαμβάνονται καθαρά με φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 5 λεπτά. Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 80μl 250mM Tris-HCl PH7.5 και πραγματοποιούνται 3 θερμικά σοκ από τους -80°C στους 37°C. Τέλος φυγοκεντρείται το δείγμα 5 λεπτά στις 12000 στροφές και συλλέγεται το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα eppendorf 1.5ml, όπου και φυλάσσεται σε υπερκαταψύκτη.

Στην περίπτωση που οι πρωτείνες πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε ανοσοανίχνευση ή σε τεχνική υστέρησης της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και πάλι τα κύτταρα ξεπλένονται με 1xPBS αλλά το εναιώρημα των κυττάρων παραλαμβάνεται σε 1xPBS. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 1 λεπτό στις 12000 στροφές και η κυτταρική πάστα επαναδιαλύεται σε 100μl διαlύματος λύσης (50mM Hepes PH7.5, 10mM NaCl, 1% TritonX-100, 10% γλυκερόλη, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 2mM PMSF και 10μg/ml καταστολείς πρωτεασών). Τέλος το μίγμα τοποθετείται σε ρότορα 45 λεπτά στους 4<sup>o</sup>C και το υπερκείμενο που προκύπτει μετά από φυγοκέντρηση 5 λεπτά στις 12000 στροφές φυλάσσεται σε υπερκαταψύκτη.

Στην ειδική περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν εκχύλισμα πρωτεϊνών του πυρήνα τα κύτταρα μετά από το ξέπλυμα περισυλλέγονται σε 2.5ml διαλύματος λύσης (20mM Hepes PH7.6, 10mM NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM EDTA, 0.1mM DTT, 0.1% TritonX-100, 20% γλυκερόλη, 1.mM PMSF, 10µg/ml από καθένα από τα leupeptin, pepstatin, και 100µg/ml aprotinin), Τα κύτταρα συγκεντρώνονται με φυγοκέντρηση 5 λεπτών στις 2000 στροφές σε ψυχόμενη φυγόκεντρο, για να επαναδιαλυθούν στο διάλυμα εκχύλησης πυρήνων (20mM Hepes PH7.6, 500mM NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM EDTA, 0.1mM DTT, 0.1% TritonX-100, 20% γλυκερόλη, 1.mM PMSF, 10µg/ml από καθένα από τα leupeptin, pepstatin, και 100µg/ml aprotinin) σε τελική αραίωση πυρήνων 2.5 x 10<sup>7</sup> πυρήνες/ml. Αφού αφεθούν σε ρότορα για μία ώρα στους 4<sup>0</sup>C, το πυρηνικό εκχύλισμα λαμβάνεται ως υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12000 στροφές σε ψυχόμενη φυγόκεντρο.

### 2.9 Κανονικοποίηση με δοκιμή β-γαλακτοσιδάσης

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 600μl, όπου 6μl εκχυλίσματος πρωτεϊνών επωάστηκαν με 132μl διαλύματος 4mg/ml O-Nitro-PHenylgalactosidase σε 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> PH7.3, 456μl P-buffer (0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> PH7.3) 30mM MgCl<sub>2</sub>, 33.6mM β-μερκαπτοαιθανόλη και 76mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> PH7.3 στους 37<sup>0</sup>C έως ότου λάβουν ικανοποιητική αλλαγή χρώματος. Όταν συμβεί αυτό, η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 200μl 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Το προϊόν μεταφέρεται σε κυβέτα μιας χρήσης και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 410nm σε φασματοφωτόμετρο lambda 15UV/Vis Perkin Elmer. Η κανονικοποίηση πραγματοποιείται επί των τιμών της φωτομέτρησης, διαιρώντας όλες τις τιμές της σειράς με την μεγαλύτερη και Θεωρώντας το αντίστροφο αυτής ως την τιμή κανονικοποίησης. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με έναν παράγοντα παίρνουμε τα μl του εκχυλίσματος που θα χρησιμοποιηθούν στην δοκιμή Ακετυλοτρανσφεράσης της Χλωραμφαινικόλης.

### 2.10 Δοκιμή Ακετυλοτρανσφεράσης της Χλωραμφαινικόλης

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα επωάζονται στους 37°C και σε τελικό όγκο 50µl, παρουσία 250mM Tris-HCl PH8, 1mM Ακετυλοσυνένζυμο και 2µCi <sup>14</sup>C-Χλωραμφαινικόλη για 1 ώρα. Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 200µl Ethyl-Acetate. Πρόκειται για έναν οργανικό διαλύτη που παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με την Χλωραμφαινικόλη από ότι το νερό και έτσι μετά από φυγοκέντρηση 1 λεπτού στις 12000 στροφές αφαιρώντας το υπερκείμενο έχουμε την Χλωραμφαινικόλη και τις Ακετυλιωμένες μορφές της, προϊόντα της δοκιμής. Αυτό στεγνώνεται και η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 20µl Ethyl-Acetate τα οποία μεταφέρονται σε στήλη χρωματογραφίας διήθησης TLC. Οι ακετυλιωμένες μορφές διαχωρίζονται από τις μη ακετυλιωμένες με ανιούσα χρωματογραφία διήθησης όπου ως μέσο ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε μίγμα χλωροφορμίου/μεθανόλης (95/5). Αφού η στήλη αναπτύχθηκε πλήρως στεγνώνεται στον αέρα και εκτίθεται 16 ώρες σε φιλμ αυτοραδιογραφίας σε θερμοκρασία δωματίου.

### 2.11 Απομόνωση ολικού RNA (total RNA)

Τα μόρια του RNA είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην αποικοδόμησή τους και επιπλέον οι ριβονουκλεάσες είναι άφθονες σε στα χέρια, τα μαλλιά, τα ρούχα μας και κατά συνέπεια σε οτιδήποτε ακουμπάμε. Για αυτό το λόγο κατά την «συναναστροφή» μας με το συγκεκριμένο ευγενές μόριο θα πρέπει να τηρούμε όλες τις απαραίτητες προφυλάξεις. Τα γυαλικά θα πρέπει να είναι πλυμένα με DEPC απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό και να έχουν αποστειρωθεί σε κλίβανο 1 ώρα. Απαραίτητα πρέπει να χρησιμοποιούνται γάντια τα οποία δεν ακουμπάμε οπουδήποτε και που πρέπει να τα αλλάζουμε συχνά. Όπου γίνεται χρησιμοποιούμε συσκευασμένα υλικά ειδικά για κυτταροκαλλιέργειες. Τέλος, χρησιμοποιούμε πιπέτες που τις έχουμε πλύνει και αποστειρώσει και που τις διατηρούμε καθαρές για την ενασχόλησή μας με το RNA.

Τα κύτταρα που προορίζονται για απομόνωση RNA ξεπλένονται 2 φορές με 35ml συσκευασμένου 1xPBS (Gibco BRL). Στη συνέχεια προστίθενται 20ml του ιδίου PBS και τα κύτταρα αφαιρούνται από το τρυβλίο με καθαρό ξύστρο και μεταφέρονται σε σωλήνα Falkon 50ml. Το εναιώρημα φυγοκεντρείται 5 λεπτά στις 1500 στροφές και αφού αφαιρέσουμε το υπερκείμενο, επαναδιαλύουμε την πελλέτα σε 1 ml διαλύματος D (για 14ml διαλύματος: 6.62g Guanidine Isothiocyanate, 0.35ml 1M Κιτρικού Νατρίου PH7, 0.07g Lauryl Sarcosin, 100μl β-μερκαπτοαιθανόλη). Στη συνέχεια προστίθενται αλληλοδιαδόχως με ανάδευση μεταξύ των προστιθεμένων υλικών, 100μl 2M Οξικού Νατρίου PH4,1ml φαινόλης PH4 και 0.2ml μίγματος χλωροφορμίου, ισοαμυλικής αλκοόλης 24:1. Ακολουθεί επώαση 15 λεπτών στον πάγο και φυγοκέντρηση 20 λεπτών στις 10000 στροφές, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Με τον τρόπο αυτό διαχωρίζονται οι φάσεις και περισυλλέγεται η πάνω φάση η οποία μεταφέρεται σε σωλήνα eppendorf των 2ml, όπου προστίθεται 1ml μίγματος ουδέτερης φαινόλης : χλωροφόρμιο : ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25 : 24 : 1.
Ακολουθεί φυγοκέντρηση πάντα σε ψυχόμενη φυγόκεντρο 5 λεπτά στις 10000 στροφές και συλλέγεται και πάλι την πάνω φάση. Προστίθεται σε αυτή ίσος όγκος ισοπροπανόλης και το μίγμα φυλάσσεται έτσι σε κατάσταση κατακρίμνησης στους μείον 20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του RNA μετά την κατακρίμνηση φωτομετρείται το δείγμα στα 260nm ενώ για την εκτίμηση της καθαρότητάς του στα 280nm.

## 2.12 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στην αντίδραση αυτή χρησιμοποιούνται 1ng πλασμιδιακού ή 1μg γενωμικού DNA, 25pmol από τον κάθε εκκινητή, 1x αραίωση μίγματος dNTPs 20mM, 1x αραίωση του ανάλογου ρυθμιστικού διαλύματος της Vent πολυμεράσης και 1U Vent πολυμεράσης, σε τελικό όγκο 25μl.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα

5 λεπτά στους 94°C 25 κύκλους των επόμενων 3 σταδίων 1 λεπτό αποδιάταξη στους 94°C 30 δευτερόλεπτα ζευγάρωμα των εκκινητών με το DNA στους 61°C 2 λεπτά επιμήκυνση στους 72°C Τελική επιμήκυνση 10 λεπτά στους 72°C

# 2.13 Αλυσιδωτή αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR)

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το SuperScript<sup>TM</sup>One-Step<sup>TM</sup>RT-PCR System των Life Technologies. Για την αντίδραση χρειάστηκαν 1μg ολικού RNA από το κάθε δείγμα, 50pmol από τον κάθε εκκινητή, 1x αραίωση του 2x Reaction mix, και 1μl μίγματος RT-Taq mix σε τελικό όγκο 50μl. Το θερμικό πρόγραμμα είχε ως εξής:

Αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε DNA με επώαση 30 λεπτών στους 50°C

Ενίσχυση του σήματος με 40 κύκλους ως εξής:

Αποδιάταξη για 1 λεπτό στους 94°C

Ζευγάρωμα των εκκινητών με το DNA για 30 δευτερόλεπτα στους 61°C

Επιμήκυνση του προιόντος για 2 λεπτά στους 72°C

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε RT-PCR αναφέρονται στον Πίνακα 7.

1824	5'-AGA <b>GAA TTC</b> AGC ACT CGA AGG TCA AGC TAT-3'
cat_dom	5'-CCT GAT GAG GCC TCG AGG CCG AAA-3'
ribo3	5'-CG <b>C TCG AG</b> G CCG AAA TGA CGT TGG TTC
ribo5	3'-G <b>GA ATT C</b> AT CAA GCT CTT CG

Πίνακας 7. Οι αλληλουχίες των εκκινητών για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης των ριβοενζύμων.

## 2.14 Ραδιοσήμανση DNA

Ραδιοσήμανση πραγματοποιήθηκε για σήμανση ανιχνευτή ο οποίος θα χρησιμοποιούνταν σε υβριδισμό DNA/RNA ή ολιγονουκλεοτιδίου για χρήση σε τεχνική υστέρησης της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

#### 2.14.1 Ραδιοσήμασνη ανιχνευτή

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος τυχαίας εκκίνησης.

Για τελικό όγκο αντίδρασης 25μl, 100ng DNA που έχουν πρώτα αποδιαταχθεί με βρασμό 5 λεπτών και έχουν τοποθετηθεί σε πάγο 1 λεπτό τουλάχιστον, προστίτονται σε 11.5μl διαλύματος 2xLS [25μl 1M Hepes PH6.6, 25μl DTM {0.1mM από το καθένα εκ των dGTP και δTTP σε TM (250mM Tris-HCl PH8, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM β-μερκαπτοαιθανόλη)}, 7μl από διάλυμα 90ng/ml ολιγονουκλεοτιδίων διαλυμένων σε OL (1mM Tris-HCl PH7.5, 1mM EDTA PH7.5)]. Στη συνέχεια προστίθονται 10μg BSA, 2μl από καθένα από τα α-dATP<sup>\*</sup> και α-dCTP<sup>\*</sup>, και 5U T<sub>4</sub> DNA Πολυμεράσης (Klenow), και το μίγμα επωάζεται 16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση τερματίζεται με αραίωση της σε τελικό όγκο 100μl.

### 2.14.2 Ραδιοσήμανση ολιγονουκλεοτιδίων

Σε 100ng δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου, προστίθονται 2μl a-dATP<sup>\*</sup> ή a-dCTP<sup>\*</sup> κατά περίπτωση, 1x αραίωση του ρυθμιστικού διαλύματος της T<sub>4</sub> DNA Πολυμεράσης και 5U T<sub>4</sub> DNA Πολυμεράσης (Klenow), σε τελικό όγκο αντίδρασης 25μl. Η αντίδραση επωάζεται 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τερματίζεται με αραίωσή της στα 100μl.

#### 2.14.3 Καθαρισμός ραδιοσημασμένου DNA

Η αντίδραση ραδιοσήμανσης τοποθετείται σε αυτοσχέδια κολώνα καλά πακεταρισμένης G50, η οποία έχει κατασκευαστεί σε σύριγγα ινσουλίνης με ανάλογο τρόπο όπως και η κολώνα G10 (*βλ 2.2 Απομόνωση DNA μετά από ηλεκτροφόρηση*). Ακολουθούν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 2000 στροφές για 30 δευτερόλεπτα και περισυλλέγονται κλάσματα. Τέλος τα πιο ραδιενεργά χρησιμοποιούνται, ενώ τα υπόλοιπα ρίπτονται σε ειδικό δοχείο υγρών ραδιενεργών απορριμάτων.

# 2.15 Ηλεκτροφόρηση RNA και μεταφορά τους σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης

10μg ολικού RNA αρχικά ηλεκτροφορούνται σε αποδιατακτικό πήκτωμα 1% σε αγαρόζη, 1x διαλύματος ηλεκτροφόρησης (5x formaldehyde running buffer PH7: 0.1M MOPS, 40mM Οξικό Νάτριο, 5mM EDTA) και 16.9% φορμαλδεύδη. Στα δείγματα RNA έχουν προηγουμένως προστεθεί 1x αραίωση του διαλύματος ηλεκτροφόρησης, 17.5% φορμαλδεύδη, 50% φορμαμίδη και μετά από επώαση 15 λεπτών στους 70°C η προετοιμασία τους ολοκληρώνεται με προσθήκη 1x αραίωσης διαλύματος φόρτωσης και 0.4μg βρωμιούχου αιθυδίου.

Στη συνέχεια το πήκτωμα φωτογραφίζεται και ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και φτιάχνοντας με εφαρμογή διαφοράς ιοντικής ισχύος 20x→2xSSC τα μόρια RNA μεταφέρονται σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης. Το φίλτρο στη συνέχεια με προσοχή ακτινοβολείται σε υπεριώδη ακτινοβολία για 15 δευτερόλεπτα και αφού στεγνώσει καλά σε θερμοκρασία δωματίου ψήνεται 1.5 ώρα στους 80°C.

## 2.16 Υβριδισμός κατά Nothern

Αρχικά το προς υβριδισμό φίλτρο βρέχεται με απιονισμένο νερό και αφαιρούνται τα κατάλοιπα βρωμιούχου αιθυδίου και πρωτεϊνών με επώασή του 30 λεπτά στους 55°C σε διάλυμα 0.1×SSC και 0.1%SDS. Ακολουθεί προετοιμασία του φίλτρου που σκοπό έχει να μειώσει τους μη ειδικούς στόχους του ανιχνευτή, με επώασή του 6 -12 ώρες στους 50°C με διάλυμα προυβριδοποίησης (10× Denhart's, 5×SSC, 1% SDS) όπου έχουν προστεθεί 0.5mg/ml «κρύο» γενωμικό DNA σολομού το οποίο έχει αποδιαταχθεί με 10 λεπτά βρασμό.

Στη συνέχεια γίνεται ο υβριδισμός αφαιρώντας το υγρό που προαναφέρθηκε και προσθέτοντας το υγρό προυβριδοποίησης (1x Denhart's, 5x SSC, 1% SDS, 50% φορμαμίδη, 10% Dextran\*SO<sub>4</sub>), όπου προστίθενται 0.1mg/ml «κρύο» γενωμικό DNA σολομού και τουλάχιστον 10<sup>6</sup>cpm ανιχνευτή ανά ml διαλύματος υβριδοποίησης που έχουν αποδιαταχθεί πρώτα με 10 λεπτά βρασμό. Ακολουθεί επώαση 16 ώρες στους 42<sup>°</sup>C.

Τελικά το φίλτρο καθαρίζεται από τις επιπλέον κρούσεις με διαδοχικές πλύσεις διαλυμάτων SSC/SDS, ελαττώνοντας την ιονική ισχύ και αυξάνοντας βαδμιδόν την θερμοκρασία πλύσης. Συγκεκριμένα ακολουθείται το παρακάτω πρόγραμμα πλύσεων:

2 φορές πλύσιμο στους 42°C με 2x SSC/0.5% SDS για 15 λεπτά η καθεμία

2 φορές πλύσιμο στους 50°C με 1x SSC/0.5% SDS για 15 λεπτά η καθεμία

2 φορές πλύσιμο στους 55°C με 0.5x SSC/0.5% SDS για 15 λεπτά η καθεμία (Προαιρετικά) 2 φορές πλύσιμο στους 60°C με 0.2x SSC/0.5% SDS για 15 λεπτά η

### καθεμία

Ακολούθως το φίλτρο εκτίθεται 16-48 ώρες στους -80°C σε φιλμ αυτοραδιογραφίας(Kodak), σε κασέτα αυτοραδιογραφίας που φέρει ειδική οθόνη ενίσχυσης σήματος. Προκειμένου να γίνει ανίχνευση διαφορετικού mRNA το παλαιό σήμα αφαιρείται από το φίλτρο με 3 φορές πλύσιμό του με βραστό διάλυμα 10mM Tris-HCl PH8 και 0.1% SDS.

## 2.17 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και μεταφορά τους σε φίλτρο

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12.5%. Αυτό παρασκευάζεται σε 2 στάδια. Πρώτα στρώνεται το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης (running gel) το οποίο περιέχει για τελικό όγκο 5ml, 2.1ml διαλύματος ακρυλαμίδηςbis-ακρυλαμίδης 29:1 και 1.25ml separating buffer (1.5M Tris-HCl PH 8.8, 0.4% w/v SDS), και αφού αυτό πήξει στρώνεται το πήκτωμα καθυστέρησης (stacking gel) το οποίο περιέχει 0.45ml διαλύματος ακρυλαμίδης-bis-ακρυλαμίδης 29:1 και 0.75ml stacking buffer (0.5M Tris-HCl PH 6.8, 0.4% w/v SDS). Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται με προσθήκη 0.1% APS και 0.001% TEMED.

Στο πήκτωμα φορτώνονται 75μg συνολικής πρωτείνης από κάθε δείγμα και τυποποιημένος προχρωματισμένος μάρτυρας πρωτεϊνών διαφόρων μεγεθών (Prestained protein marker, New England Biolabs). Τα δείγματα πριν φορτωθούν έχουν αποδιαταχθεί με προσθήκη σε αυτά 1x αραιωμένου διαλύματος φόρτωσης () και με επώασή τους 5 λεπτά στους 95°C, ενώ ο προσδιορισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών γίνεται με Bradford.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 200V με 1x αραίωση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Για 1lt διαλύματος 1x χρησιμοποιούνται 3.03g Tris, 14.42g Γλυκίνη, 1g SDS) στη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini protean II cell apparatus, BioRad.

Στη συνέχεια γίνεται ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε φίλτρο με τη βοήθεια ειδικής συσκευής (Mini trans-blot transfer cell, BioRad) και με χρήση του ιδίου ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο όμως έχει προστεθεί μεθανόλη σε τελική συγκέντρωση 20%. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στο φίλτρο ελέγχεται με χρώση αυτού με Poinceau αραιωμένη 1:10 με νερό.

Το φίλτρο φυλάσσεται πάντα στους 4°C.

## 2.18Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών σε φίλτρο (Western Blot)

Το φίλτρο πλένεται 10 λεπτά ανακινούμενο συνεχώς, με 1χ αραίωση διαλύματος TBS-T (Για 11t 10x διαλύματος TBS-T: 90g NaCl, 0.5M Tris-HCl PH 7.3, 0.5% Tween20) και ακολουθούν 3 πλυσίματα 20 λεπτών έκαστο με 1x αραίωση διαλύματος TBB (1x TBS-1, 5% w/v γάλα με ελαττωμένα λιπαρά), για να ελαττωθεί η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Ακολουθεί η προσθήκη του πρώτου αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει την πρωτείνη που ενδιαφερόμαστε να ανιχνεύσουμε. Αυτό προστίθεται σε αραίωση 1/10000 σε 1χ αραίωση διαλύματος TBB και επωάζεται 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή 16 ώρες στους 4°C. Το μη δεσμευμένο ή το ασθενώς δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνεται με 3 πλύσεις των 10 λεπτών με 1x αραίωση διαλύματος TBS-T και ακολουθεί η προσθήκη του δεύτερου αντισώματος το οποίο ανιχνεύει την μακριά αλυσίδα του πρώτου αντισώματος και φέρει Horse Raddish Peroxidase (HRP). Η προσθήκη γίνεται σε αραίωση 1/10000 σε 1x αραίωση διαλύματος TBS-T και επωάζεται 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 πλυσίματα 20 λεπτών έκαστο με 1χ αραίωση διαλύματος TBS-Τ και εφαρμογή ειδικού διαλύματος για να γίνει η αντίδραση. Τέλος το φίλτρο εκτίθεται σε φιλμ για ECL και παραλαμβάνονται διαφορετικές εκθέσεις χρονικής διάρκειας από 1 λεπτό έως μία ώρα.

## 2.19 Κατασκευή του πλασμιδίου pcDNAIneo"anti-hHNF4"

Το ένθεμα για την κατασκευή του πλασμιδίου pcDNAIneo"anti-hHNF4" προήρθε από πέψη του pBluescript"hHNF4Rz#2" (Ε. Σαχαρίδου, MTE, 1998). Ο πλασμιδιακός αυτός φορέας φέρει κλωνοποιημένο τμήμα του cDNA του hHNF4a από 401 εως 1201 bp και μέρος της καταλυτικής υπομονάδας των ριβοενζύμων στις θέσεις περιορισμού *EcoRI* και *XhoI*. Το ένθεμα για την κατασκευή pcDNAIneo"anti-hHNF4" προέκυψε από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *XbaI* και *XhoI*. Αφού πραγματοποιήθηκε καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης, έγινε αντίδραση λιγάσης με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNAIneo (Εικόνα 11) και ακολούθησε μετασχηματισμός με χρήση ειδικού στελέχους *E.coli* που φέρει το επίσωμα P<sub>3</sub>. Η επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων πραγματοποιήθηκε σε πιάτα LB-agar παρουσία 35µg/ml αμπικιλίνης και 15µg/ml τετρακυκλίνης, ενώ ο έλεγχος των κλώνων έγινε με πέψη DNA που προέρχονταν από miniprep, με τα περιοριστικά ένζυμα *XbaI* και *XhoI*. Όταν ο θετικός κλώνος επιλέχθηκε ακολούθησε απομόνωση DNA με maxiprep (Εικόνα 12).



Εικόνα 11. Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNAI neo.



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής του pcDNAIneo"antisensehHNF4".

# 2.20 Τεχνική υστέρησης της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Band Shift Assay)

Σε ειδικό μίγμα που περιλαμβάνει 1x αραίωση Bindshift buffer (10x: 50mM MgCl<sub>2</sub>) και 60% D-buffer (0.1mM EDTA, 40mMKCl, 25mM Hepes PH7.6, 8% Ficoll 400, 1mMDTT), όπου έχουν προστεθεί 3μg oligo dI/dC, επωάζεται το πρωτεινικό εκχύλισμα για 10 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια προστίθονται οι ανταγωνιστές ή τα αντισώματα (αν χρησιμοποιούμε τέτοια στο πείραμα) και το μίγμα επωάζεται και πάλι για 10 λεπτά στον πάγο. Τέλος προστίθονται περίπου 50000cpm/αντίδραση ραδιοσημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου και μετά από επώαση 30 λεπτών στον πάγο τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή ακρυλαμίδης-bis ακρυλαμίδης (29:1) 6%,

0.5xTBE, στα 150V για 5 ώρες υπό ψύξη. Το πήκτωμα στεγνώνεται και μετά από έκθεση στους -80°C 16 ώρες σε Kodak φιλμ η μέθοδος ολοκληρώνεται.

Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον Πίνακα 8.

Ft 5	AAA TGC CTG CTG ACC TTG GAG CTG
Ft 4	AAG CTT GTC CCT AAA ATG GGC AAA CAT TGC AAG
	CAG CAA ACA GCA AACA
Ft 3	AAG CTT AAG TCC ACA CTG AAC AAA CTT CAG CCT
	ACA
BA1	CCC GGG AGG CGC CCT TTG GAC CTT TTG
CIIC	AGC TTG ACG TGA CCT TGG GGG ACG TCA TTG CCC
	TTT CTG TCC CCA CCC A

Πίνακας 8 Αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν σε τεχνική υστέρησης της ηλεκτροφορητικής ικανότητας DNA.

## 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 3.1 KATA $\Sigma$ KEYH EAAEIMAT $\Omega$ N HCR-1

Στα πλαίσια της μελέτης μας πάνω στην δομή και την λειτουργία της περιοχής ηπατικού ελέγχου HCR-1, σχεδιάσαμε μία σειρά από ελείματα στην HCR-1, βασιζόμενοι στα δεδομένα της in vivo footprinting ανάλυσης των Taylor J et al (Εικόνα 13) (26).

Τα ενθέματα για την κατασκευή των ελλειμάτων HCR-1 προέκυψαν από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας σαν εκμαγείο το πλασμίδιο HCR-AdmLCAT που ευγενώς προσέφερε ο Επίκουρος Καθηγητής Δημήτρης Καρδάσης. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 9.

Τα προιόντα του PCR (Εικόνα 14), μετά από καθαρισμό τους επωάστηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα *XbaI* και *KpnI*, και ακολούθησε κλωνοποίησή τους στον πλασμιδιακό φορέα -545CIICAT, ο οποίος φέρει ολόκληρο τον υποκινητή της απολιποπρωτείνης CII, από +18 έως -545 (Vorgia et al), και στον TKCAT, που φέρει κλωνοποιημένο τον ετερόλογο υποκινητή TK (Εικόνα 15).

Η επιλογή των ανασυνδυασμένων κλώνων έγινε σε πιάτα LB-agar παρουσία 50μg/ml αμπικιλίνης, ενώ οι Θετικοί κλώνοι επελέγησαν με πέψη DNA, με τα περιοριστικά ένζυμα *XbaI* και *KpnI*.

HCR1	5'-GGG <b>TCT AGA</b> GGC ACA CAG GAG TTT CTG GGC TCA-3'
10_260rev	5'-GG <b>G GTA CC</b> T CGA GTG GAT GTT GGA GGT GGC AT-3'
10_206rev	5'-GG <b>G GTA CC</b> A GCT CCA AGG TCA GCA GGC AGG-3'
10_185rev	5'-GG <b>G GTA CC</b> G GAG GGC TGT GTG TTT GCT GTT TGC-3'
10_118rev	5'-GG <b>G GTA CC</b> G ATA TCG TTT GTT CTG TGT GGA CTT CAG
	AGG CAG CA-3'
118_260	5'-GGG <b>TCT AGA</b> GCC TCT GAA GTC CAC ACT GAA CAA ACT
	TCA GC-3'

Πίνακας 9. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των ελλειμάτων του HCR1.







44

**Εικόνα 14**. Σχηματική αναπαράσταση των προιόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την κατασκευή των ελλειμάτων HCR.



45

Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση των κατασκευών ελλειμάτων HCR σε σύντηξη με τον υποκινητή της απολιποπρωτείνης CII (A) και του ετερόλογου υποκινητή TK (B).

## 3.2 MEAETH EAAEIMAT $\Omega$ N HCR $\Sigma$ E KYTTAPA HEPG2

Για να μελετήσουμε την μεταγραφική ενεργότητα των ελλειμάτων HCR, πραγματοποιήθηκαν επιμολύνσεις σε κύτταρα HepG2 του αγρίου τύπου HCR-1 και των ελλειμάτων αυτού σε σύντηξη με τον υποκινητή της απολιποπρωτείνης CII ή τον ετερόλογο υποκινητή TK (Εικόνες 16 και 17).

Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 16, ο υποκινητής της αροCII γίνεται 5 φορές πιο ενεργός παρουσία ολόκληρης της αλληλουχίας του HCR-1 σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις μας (28). Η αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή της αροCII από το HCR-1, φτάνει τις 9 φορές όταν αφαιρούνται οι αλληλουχίες 260-325, 206-325 ή 185-325. Η ελάχιστη περιοχή 10-118 καθώς και η ενδιάμεση 118-260, παρουσιάζει την ίδια ενεργότητα με το αρχικό HCR1. Τα αποτελέσματα της εικόνας 16 δείχνουν ότι η ελάχιστη περιοχή του HCR-1 που απαιτείται για την βέλτιστη μεταγραφική ενεεργοποίηση του υποκινητή της απολιποπρωτείνης CII, είναι η περιοχή 10\_185.

Για να ελεγχθεί το κατά πόσο η περιοχή HCR-1 αποτελεί ένα γενικής φύσης ενισχυτή, έγιναν επιμολύνσεις του αγρίου τύπου HCR-1 και των ελλειμάτων του σε σύντηξη με τον ετερόλογο υποκινητή TK σε κύτταρα HepG2 (Εικόνα 17). Το αγρίου τύπου HCR-1 ενίσχυσε την ενεργότητα του ελέχιστου υποκινητή TK κατά 8 φορές, ενώ οι κατασκευές 10\_260TK, 10\_185TK κατά 6.2 και 5.8 αντοίστοιχα. Η περιοχή 10\_118 δεν φαίνεται να συμβάλει καθόλου στην ενεργοποίηση του TK. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι το HCR-1 μπορεί να αποτελέσει γενικής φύσεως ενισχυτή της μεταγραφής σε ετερόλογο σύστημα, σε ηπατικά κύτταρα, και η ελάχιστη περιοχή που απαιτείται για τέτοιου είδους ενίσχυση είναι η 10\_185.



Εικόνα 16. Μετγραφική ενεργότητητα του αγρίου τύπου και των μεταλαγμένων μορφών της περιοχής ηπατικού ελέγχου HCR1. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με πλασμίδια (3 μg) που περιέχουν τον υποκινητή του γονιδίου της αποC-II σε σύντηξη ή μη με την αγρίου τύπου περιοχή HCR-1 ή απαλοιφές αυτής όπως αναγράφονται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Το μείγμα επιμόλυνσης περιείχε επίσης 1 μg από το πλασμίδιο CMV-βgal. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα από δύο διαφορετικά πειράματα παρουσιάζονται υπό την μορφή ραβδογράμματος.



Εικόνα 17. Μεταγραφική ενεργότητητα του αγρίου τύπου και των μεταλαγμένων μορφών της περιοχής ηπατικού ελέγχου HCR1. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με πλασμίδια (3 μg) που περιέχουν τον ετερόλογο ελάχιστο υποκινητή TK σε σύντηξη ή μη με την αγρίου τύπου περιοχή HCR-1 ή απαλοιφές αυτής όπως αναγράφονται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Το μείγμα επιμόλυνσης περιείχε επίσης 1 μg από το πλασμίδιο CMV-βgal. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα από δύο διαφορετικά πειράματα παρουσιάζονται υπό την μορφή ραβδογράμματος.

## 3.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΟΕΙΔΙΚΌΤΗΤΑΣ ΕΛΛΕΙΜΑΤΩΝ HCR-550CII

Για να μελετηθεί κατά πόσο ο ισχυρός υποκινητής HCR-550CII διατηρεί την ηπατοειδικότητά του στις διάφορες ελλειματικές κατασκευές, έγιναν παροδικές επιμολύνσεις σε νεφρικά κύτταρα COS-7 και Hek293. Όπως φαίνεται στην εικόνα 18 παρατηρείται μία μικρή αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή της απολιποπρωτείνης CII, από την αγρίου περιοχή HCR-1 στα νεφρικά κύτταρα COS-7 και Hek293 (2 φορές), ενώ καμία αύξηση δεν παρατηρείται από τις απαλοιφές της περιοχής HCR-1. Με τα πειράματα αυτά επιβεβαιώνεται η ιστοειδικότητα της περιοχής HCR-1 στα ηπατικά κύτταρα και υποστηρίζεται η υπόθεση ότι στην περιοχή 260-325 πιθανώς υπάρχει θέση πρόσδεσης κάποιου μεταγραφικού παράγοντα που υπάρχει και στα νεφρικά κύτταρα.



Εικόνα 18. Σύγκριση μετγραφικής ενεργότητητας του αγρίου τύπου και των μεταλαγμένων μορφών της περιοχής ηπατικού ελέγχου HCR1 σε κύτταρα HepG2, COS-7 και Hek293. Κύτταρα HepG2, COS-7 και Ηεκ293 επιμολύνθηκαν με πλασμίδια (3 μg) που περιέχουν τον υποκινητή της απολιποπρωτείνης CII σε σύντηξη ή μη με την αγρίου τύπου περιοχή HCR-1 ή απαλοιφές αυτής όπως αναγράφονται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Το μείγμα επιμόλυνσης περιείχε επίσης 1 μg από το πλασμίδιο CMV-βgal. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται υπό την μορφή ραβδογράμματος.

# 3.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΗΝΓ4 ΣΤΗΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ HCR1

## 3.4.1 ΜΕ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΣΕ ΜΟΝΙΜΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΕΙ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΗΝΓ4

Για να μελετηθεί ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα HNF4 στη λειτουργία της περιοχής HCR1, κατασκευάστηκαν μόνιμοι κλώνοι κυττάρων HepG2, που εκφράζουν ριβοένζυμα (ένα μεγάλο, το Rz2 και ένα μικρό, το Rz1) ή ένα συμπληρωματικό RNA για το mRNA του HNF4a.

Αρχικά κατασκευάστηκε η πλασμιδιακή κατασκευή pcDNAIneo"antisensehHNF4" και πραγματοποιήθηκε μόνιμη επιμόλυνση σε κύτταρα της κυτταρικής σειράς HepG2. Μετά από επιλογή με G418 διάρκειας μιας εβδομάδας, διακρίθηκαν 2 κλώνοι κυττάρων ανθεκτικών στο αντιβιοτικό G418 οι οποίοι ονομάστηκαν antinew#1 και antinew#2. Από αυτούς τελικά αναλύθηκε ο antinew#2 ο οποίος ονομάστηκε antinew.

Στη συνέχεια έγινε σύγκριση της νέας κυτταρικής σειράς με αντίστοιχες μόνιμες κυτταρικές σειρές που είχαν κατασκευαστεί προηγουμένως στο εργαστήριό μας (Ε. Σαχαρίδου, ΜΤΕ, 1998).

Για να προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητα της καταστολής της μετάφρασης του HNF4, έγινε επιμόλυνση των κλώνων αυτών με πλασμίδια αναφορές CATπου περιέχουν υποκινητές διαφόρων απολιποπρωτεινών (AI, B, CII, CIII), και προσδιορίστηαν τα επίπεδα ενεργότητάς τους με δοκιμή ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφαινοκόλης, σε σχέση με την αρχική κυτταρική σειρά HepG2. Επιμολύνθηκαν κύτταρα HepG2 και κλώνων που εκφράζουν μόνιμα τις κατασκευές: Rz1 (Rz1/12), Rz2 (Rz2/1) και antinew με τους παραπάνω υποκινητές. Χρησιμοποιήθηκαν ακόμη δύο υποκινητές γονιδίων στην ενεργοποίησή των οποίων δεν εμπλέκεται ο HNF4, οι p21/WAF(-143/+18) και SV40.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 19, η ενεργότητα του υποκινητή της apoCII ελλατώνεται στο 25% στην κυτταρική σειρά RZ1/12, στο 50% στην κυτταρική σειρά Rz2/1 και στο 20% στην κυτταρική σειρά antinew. Η ενεργότητα του υποκινητή της αροCIII ελαττώνεται στο 30% στην κυτταρική σειρά RZ1/12, στο 10% στην κυτταρική σειρά Rz2/1 και στο 20% στην κυτταρική σειρά antinew. Η ενεργότητα του υποκινητή της apoAI ελαττώνεται στο 20% στην κυτταρική σειρά RZ1/12, στο 15% στην κυτταρική σειρά Rz2/1 και στο 10% στην κυτταρική σειρά antinew. Η ενεργότητα του υποκινητή της αροΒ ελαττώνεται στο 10% στην κυτταρική σειρά RZ1/12, στο 40% στην κυτταρική σειρά Rz2/1 και στο 35% στην κυτταρική σειρά antinew. Δεν παρουσιάζεται σημαντική μεταβολή στην ενεργότητα των υποκινητών των p21/WAF(-143/+18) και SV40 σε κανέναν από τους κλώνους. Επομένως η καταστολή έκφρασης του HNF4 στα κύτταρα Rz1/12, Rz2/1 και antinew, προκαλεί ελάττωση στα επίπεδα ενεργότητας των υποκινητών όλων των σημαντική απολιποπρωτεινών που δοκιμάστηκαν και που περιέχουν θέση πρόσδεσης του ΗΝF4, ενώ δεν παρουσιάζεται καμμία ελάττωση στη ενεργότητα των WAF και SV40.

Για να επιβεβαιωθεί η πτώση της μεταγραφής των απολιποπρωτεινών σε επίπεδο mRNA στους συγκεκριμένους κλώνους, πραγματοποιήθηκε υβριδισμός κατά Nothern σε ολικό RNA των κυτταρικών σειρών HepG2, Rz1/12, Rz2/1 και antinew, με χρήση ανιχνευτών για το mRNA της απολιποπρωτείνης AI και της CII. Στην Εικόνα 20 παρατηρείται σημαντική ελάττωση της μεταγραφής του mRNA τόσο της αροCII, όσο και της αροAI στον κλώνο antinew. Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στις ποσότητες του mRNA της β-ακτίνης (που ευγενώς προσέφερε η Δρ. Άννα Τσαπάρα). Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν απόλυτα μεταξύ τους.

Η έκφραση των RNA-καταστολέων στις κυτταρικές σειρές Rz1/12, Rz2/1 και antinew επιβεβαιώθηκε με ανάλυση RT-PCR, ενώ κανένα προιόν δεν φαίνεται στα κύτταρα HepG2 όπου χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι εκκινητές (Εικόνα 21).

50



Εικόνα 19. Μεταγραφική ενεργότητητα υποκινητών απολιποπρωτεινών σε κύτταρα HepG2 και στους κλώνους που εκφράζουν μόνιμα RNA-καταστολείς για τον μεταγραφικό παράγοντα HNF4. Κύτταρα HepG2, Rz1/12, Rz2/1 και antinew επιμολύνθηκαν με πλασμίδια (2.5 μg) που περιέχουν τους υποκιντές apoCII, apoCIII, apoAI, apoB, χρησιμοποιώντας σαν μάρτυρες τους υποκινητές WAF και SV40. Το μείγμα επιμόλυνσης περιείχε επίσης 1 μg από το πλασμίδιο CMV-βgal. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα από δύο διαφορετικά πειράματα παρουσιάζονται υπό την μορφή ραβδογράμματος.



Εικόνα 20. Σύγκριση έκφρασης mRNA των απολιποπρωτεινών στους κλώνους Rz1/12, Rz2/1 και antinew, σε σχέση με την αρχική κυτταρική σειρά HepG2. Χρησιμοποιήθηκαν 10μg συνολικού RNA από το κάθε δείγμα. Πραγματοποιήθηκε υβριδισμός κατά Nothern (Nothern Blot), με χρήση DNA ανιχνευτή για το mRNA της απολιποπρωτείνης AI (A), για το mRNA της απολιποπρωτείνης CII (B) και έγινε έλεγχος της ποιότητας του RNA στα δείγματα με χρήση ανιχνευτή για το mRNA της β-ακτίνης του ανθρώπου (Γ).



Εικόνα 21. RT-PCR ανάλυση για ανίχνευση της επιτυχούς έκφρασης των καταλυτικών ή συμπληρωματικών RNA. Χρησιμοποιήθηκαν 1 μg συνολικού RNA από κάθε δείγμα. Lane1. Λ/BstE II, Lane2. PCR ανάλυση χρησιμοποιώντας την πλασμιδιακή κατασκευή pcDNAIneoRz1 και εκκινητές τους ribo5 και cat\_dom. Lane 3. PCR ανάλυση χρησιμοποιώντας την πλασμιδιακή κατασκευή pcDNAIneoRz2 και εκκινητές τους 1824 και cat\_dom. Lanes 4-7. RT-PCR ανάλυση από συνολικό RNA κυττάρων HepG2, Rz1/12, Rz2/1, antinew αντίστοιχα. Lane8. Αντίδραση PCR μάρτυρας απουσίας γενωμικού DNA στα δείγματα και χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 1824 και cat\_dom. Για να γίνει γνωστό το ποσοστό ελάττωσης της ενδογενούς ποσότητας του μεταγραφικού παράγοντα HNF4 στον κλώνο antinew σε σχέση με τα κύτταρα HepG2, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση. Όπως φαίνεται στην εικόνα 22 παρατηρείται ελάττωση κατά 35% στα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς HNF4. Επομένως η πτώση στην ποσότητα του HNF4 προσδιορίζοντάς την με χρήση του προγράμματος Scion Image Analysis, είναι γεγονός αλλά δεν πραγματοποιείται παντελής εξάλειψη της πρωτείνης αυτού.

Με βάση τα παραπάνω αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί ο κλώνος antinew για την μελέτη των ελλειμάτων HCR1.



Εικόνα 22. Έλεγχος ενδογενούς πρωτείνης ΗΝF4 σε κύτταρα HepG2 και antinew. Χρησιμοποιήθηκον 75μg συνολικής πρωτείνης από κάθε δείγμα και έγινε ανίχνευση με αντίσωμα για τον ΗΝF4α (Α) και για την β-ακτίνη (Β).

## 3.4.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΛΛΕΙΜΑΤΩΝ HCR ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HEPG2 KAI ANTINEW

Για να ελεγθεί η ενεργότητα των ελλειμάτων της περιοχής HCR-1 σε κύτταρα antinew, και να την συγκρίνουμε με αυτή των HepG2, πραγματοποιήθηκαν επιμολύνσεις σε κύτταρα HepG2 και antinew. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα και στις δύο κυτταρικές σειρές, χρησιμοποιώντας το ίδιο μίγμα για επιμόλυνση και η κανονικοποίηση με β-gal έγινε χρησιμοποιώντας τα κύτταρα και από τις 2 κυτταρικές σειρές.

Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 23 στα κύτταρα antinew, όλες οι κατασκευές HCR-550CII δείχνουν ελαττωμένη ενεργότητα σε σχέση με την αντίστοιχη στα HepG2. Η ενεργότητα κυμαίνεται από 35-50% σε σχέση με αυτή των κυττάρων HepG2, με μοναδική εξαίρεση την κατασκευή 118\_260HCR550CIICAT στην οποία η ενεργότητα είναι 80% σε σχέση με τα κύτταρα HepG2.



Εικόνα 23. Σύγκριση μετγραφικής ενεργότητητας του αγρίου τύπου και των μεταλαγμένων μορφών της περιοχής ηπατικού ελέγχου HCR1 σε κύτταρα HepG2 και antinew. Κύτταρα HepG2 και antinew επιμολύνθηκαν με πλασμίδια (3 μg) που περιέχουν τον υποκινητή της απολιποπρωτείνης CII σε σύντηξη ή μη με την αγρίου τύπου περιοχή HCR-1 ή απαλοιφές αυτής όπως αναγράφονται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Το μείγμα επιμόλυνσης περιείχε επίσης 1 μg από το πλασμίδιο CMV-βgal. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται υπό την μορφή ραβδογράμματος.

Τα αποτελέσματα της επιμόλυνσης με τις κατασκευές HCR-TK παρουσιάζονται στην εικόνα 24, όπου όλες οι κατασκευές παρουσιάζουν πτώση ενεργότητας στα κύτταρα antinew σε σύγκριση με τα κύτταρα HepG2, που κυμαίνεται από 40 έως 60%. Καμία πτώση δεν παρατηρείται στην ενεργότητα του ελάχιστου υποκινητή TK.



Εικόνα 24. Σύγκριση μετγραφικής ενεργότητητας του αγρίου τύπου και των μεταλαγμένων μορφών της περιοχής ηπατικού ελέγχου HCR1 σε κύτταρα HepG2 και antinew. Κύτταρα HepG2 και antinew επιμολύνθηκαν με πλασμίδια (3 μg) που περιέχουν τον ελάχιστο ετερόλογο υποκινητή TK σε σύντηξη ή μη με την αγρίου τύπου περιοχή HCR-1 ή απαλοιφές αυτής όπως αναγράφονται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Το μείγμα επιμόλυνσης περιείχε επίσης 1 μg από το πλασμίδιο CMV-βgal. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται υπό την μορφή ραβδογράμματος.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται ανωτέρω (Εικόνες 23 και 24), συμπεραίνουμε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας ΗΝF4 παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργότητα της περιοχής HCR-1 σε ηπατικά κύτταρα.

# 3.5 ΜΕΤΑΓΡΑΞΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΗCR-1 ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΗΝF4

Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα HNF4 στην μεταγραφική ενεργοποίηση της περιοχής HCR-1 επιβεβαιώθηκε με συνεπιμολύνσεις κυττάρων COS-7 με τις ελλειματικές κατασκευές HCR-1 απουσία ή παρουσία πλασμιδίου υπερέκφρασης του HNF4 του ανθρώπου, pMT2hHNF4 (που ευγενώς προσέφερε ο Επίκουρος Καθηγητής Δημήτρης Καρδάσης). Παρατηρείται 2.5 φορές αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή HCR-TK, ενώ η αύξηση αγγίζει τις 6 φορές όταν αφαιρείται η αλληλουχία 185-325 του HCR. Τέλος δεν παρατηρείται ενεργοποίηση του 10\_118HCR-TK από HNF4 (Εικόνα 25).

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο HNF4 ενεργοποιεί την HCR-1 και η περιοχή η υπεύθυνη για την ενεργοποίηση θεωρείται η 119-260, αλλά υποψιαζόμαστε την ύπαρξη και κάποιου ρυθμιστικού στοιχείου καταστολής της μεταγραφής στην περιοχή 260-325.

Όταν πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση με τις ίδιες συνθήκες όπως και παραπάνω αλλά χρησιμοποιώντας τις κατασκευές ελλειμάτων HCR550CII (Εικόνα 26), παρατηρήθηκε ότι ο παράγοντας HNF4 ενεργοποίησε όλες τις ελλειματικές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν. Η μεγαλύτερη αύξηση (10 φορές) παρατηρήθηκε χρησιμοποιώντας την κατασκευή 10\_260HCR550CII.

56



Εικόνα 25. Μελέτη αύξησης μετγραφικής ενεργότητητας του αγρίου τύπου και των μεταλαγμένων μορφών της περιοχής ηπατικού ελέγχου HCR1 από συνεπιμόλυνση του μεταγραφικού παράγοντα hHNF4 σε κύτταρα COS-7. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με πλασμίδια (3 μg) που περιέχουν τον ετερόλογο υποκινητή TK σε σύντηξη ή μη με την αγρίου τύπου περιοχή HCR-1 ή απαλοιφές αυτής όπως αναγράφονται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Χρησιμοποιήθηκαν 2μg από το πλασμίδιο pMT2-hHNF4 στα δείγματα που υποδεικνύονται. Το μείγμα επιμόλυνσης περιείχε επίσης 1 μg από το πλασμίδιο CMV-βgal. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται υπό την μορφή ραβδογράμματος.



Εικόνα 26. Μελέτη αύξησης μετγραφικής ενεργότητητας του αγρίου τύπου και των μεταλαγμένων μορφών της περιοχής ηπατικού ελέγχου HCR1 από συνεπιμόλυνση του μεταγραφικού παράγοντα hHNF4 σε κύτταρα COS-7. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με πλασμίδια (3 μg) που περιέχουν τον υποκινητή της απολιποπρωτείνης CII σε σύντηξη ή μη με την αγρίου τύπου περιοχή HCR-1 ή απαλοιφές αυτής όπως αναγράφονται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Χρησιμοποιήθηκαν 2μg από το πλασμίδιο pMT2-hHNF4 στα δείγματα που υποδεικνύονται. Το μείγμα επιμόλυνσης περιείχε επίσης 1 μg από το πλασμίδιο CMV-βgal. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται υπό την μορφή ραβδογράμματος.

# 3.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΩΝ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΩΝ 3,4 ΚΑΙ 5 ΤΟΥ HCR ΩΣ ΔΥΝΗΤΙΚΩΝ HRE.

Έχει γίνει στο παρελθόν επιτυχής προσπάθεια ανίχνευσης πρωτεινικών αποτυπωμάτων στην περιοχή HCR-1 (46). Με in vivo footprinting ανάλυση σε ηπατικά κύτταρα, οι Taylor et al έδειξαν την ύπαρξη 7 αποτυπωμάτων στην περιοχή 10\_325 της HCR-1 (Εικόνα 8).

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τεχνική υστέρησης της ηλεκτοφορητικής κινητικότητας DNA (band shift) αρχικά του πρωτεινικού αποτυπώματος 5 (Εικόνα 8) με πρωτεινικά εκχυλίσματα από κύτταρα COS-7 όπου έχουν υπερεκφραστεί διάφοροι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών. Φαίνεται ότι το αποτύπωμα 5 προσδένει αρκετά ισχυρά HNF4 και λιγότερο ισχυρά EAR2 και ARP1, ενώ δεν παρουσιάζει πρόσδεση για RXR ή RXR/T3R. Η πρόσδεση του HNF4 είναι ασθενέστερη από αυτή στο στοιχείο BA1. Το ίδιο συμβαίνει και για τους ARP-1 και EAR-2 σε σχέση με το στοιχείο CIIC (Εικόνα 27). Το αποτύπωμα 5 (ft5) όμως ανταγωνίζεται πολύ ισχυρά το BA1 για HNF4 (Εικόνα 28). Το αποτύπωμα 4 παρουσιάζεται να προσδένει αποκλειστικά τον υποδοχέα T3R (Εικόνα 29), ενώ κανένας από τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF4, RXR, RXR/T3R, T3R, RXR/PPAR και RAR, δεν εμφανίζεται να προσδένεται στο αποτύπωμα 3 (Εικόνα 29).

Το αποτύπωμα 4 ανταγωνίζεται το ρυθμιστικό αποτύπωμα BA1 που θεωρείται πρότυπο HRE χρησιμοποιώντας πυρηνικό πρωτεινικό εκχύλισμα από ήπαρ αρουραίου (ευγενική χορηγία του Επίκουρου Καθηγητή Δημήτρη Καρδάση). Το αποτύπωμα 5 φαίνεται να ανταγωνίζεται το BA1 λιγότερο ισχυρά. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούμε και μετά από χρήση πυρηνικών πρωτεινικών εκχυλισμάτων κυττάρων HepG2 (Εικόνα 30). Τέλος, τα αποτυπώματα 4 και 5 δεν φαίνεται να ανταγωνίζονται το BA1 όσο αφορά την πρόσδεση του EAR3, ενώ υπάρχει ένδειξη ανταγωνισμού του από το αποτύπωμα 5 για τον HNF4 (Εικόνα 31).

Επομένως το ft5 προσδένει τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF4, APR-1 και EAR-2, το ft4 τον υποδοχέα T3R, αλλά δεν έχουμε καμία ένδειξη για το ποιός μεταγραφικός παράγοντας προσδένεται στο ft3. Πάντως κανένα από τα στοιχεία ft4 και ft5 δεν φαίνεται να προσδένει EAR3.



Εικόνα 27. Έλεγχος με τεχνική υστέρησης της ηλεκτοφόρησης μορίων DNA του πυρηνικού αποτυπώματος 5 (ft5) της περιοχής HCR-1. Το αποτύπωμα 5 αρχικά ραδιοσημάνθηκε και στα δείγματα προστέθηκαν πρωτεινικά εκχυλίσματα COS-7 όπου είχαν υπερεκφραστεί πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών όπως αναφέρονται στην εικόνα. Σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια BA1 για τον HNF4 και CIIC για τους υπόλοιπους μεταγραφικούς παράγοντες.



Εικόνα 28. Έλεγχος με τεχνική υστέρησης της ηλεκτοφόρησης μορίων DNA του πυρηνικού αποτυπώματος 5 (ft5) της περιοχής HCR-1 για ανταγωνισμό έναντι του BA1 για τον παράγοντα HNF4. Το αποτύπωμα BA1 αρχικά ραδιοσημάνθηκε και στα δείγματα προστέθηκε πρωτεινικό εκχυλίσμα COS-7 όπου είχε υπερεκφραστεί HNF4. Χρησιμοποιήθηκε σαν ανταγωνιστής το 5ο πυρηνικό αποτύπωμα τοης περιοχής HCR-1 (ft5).



Εικόνα 29. Έλεγχος με τεχνική υστέρησης της ηλεκτοφόρησης μορίων DNA των πυρηνικών αποτυπωμάτων 4 (ft4) και 3 (ft3) της περιοχής HCR-1 για πρόσδεση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων. Το αποτυπώματα ft3 και ft4 αρχικά ραδιοσημάνθηκαν και στα δείγματα προστέθηκαν πρωτεινικό εκχυλίσμα COS-7 όπου είχαν υπερεκφραστεί οι μεταγραφικοί παράγοντες που αναγράφονται στην εικόνα.



Εικόνα 30. Έλεγχος με τεχνική υστέρησης της ηλεκτοφόρησης μορίων DNA για ομοιότητα των πυρηνικών αποτυπωμάτων 4 (ft4) και 5 (ft5) της περιοχής HCR-1 για ανταγωνισμό έναντι του BA1. Το αποτύπωμα BA1 αρχικά ραδιοσημάνθηκε και στα δείγματα προστέθηκε πρωτεινικό εκχυλίσμα πυρήνων από ήπαρ αρουραίου (RLNE) ή Πρωτεινικό εκχύλισμα από κύτταρα HepG2. Χρησιμοποιήθηκαν σαν ανταγωνιστές το 4ο πυρηνικό αποτύπωμα της περιοχής HCR-1 (ft4) ή το 5° (ft5).





Εικόνα 31. Έλεγχος με τεχνική υστέρησης της ηλεκτοφόρησης μορίων DNA των πυρηνικών αποτυπωμάτων 4 (ft4) και 5 (ft5) της περιοχής HCR-1 για ανταγωνισμό έναντι του BA1 για τον παράγοντα EAR3. Το αποτύπωμα BA1 αρχικά ραδιοσημάνθηκε και στα δείγματα προστέθηκε πρωτεινικό εκχυλίσμα COS-7 όπου είχε υπερεκφραστεί EAR3. Χρησιμοποιήθηκε σαν ανταγωνιστής το 4ο ή το 5ο πυρηνικό αποτύπωμα της περιοχής HCR-1 αντίστοιχα.

# 3.7 ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΠΙΘΑΝΕΣ ΘΕΣΕΙΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ Τ3R ΣΤΑ ΕΛΛΕΙΜΑΤΑ HCRTK

Αναλύσαμε την ενεργότητα της περιοχής HCR-1 παρουσία του υποδοχέα T3R με παροδική επιμόλυνση σε κύτταρα COS-7 χρησιμοποιώντας πλασμιδιακές κατασκευές ελλειμάτων HCRTK και το πλασμίδιο υπερέκφρασης του T3R του ανθρώπου, pMT2hT3Rβ. Παρατηρείται αρκετά σημαντική αύξηση της αρχικής ενεργότητας CAT όταν προσθέτουμε T3R και ορμόνη T3 στην κατασκευή 10\_185HCRTK (3 φορές). Η ενεργότητα αυτή χάνεται όταν αφαιρεθεί το πρωτεινικό αποτύπωμα 4, το οποίο προσδένει ο T3R (29), ενώ η ενεργοποίηση αυτή από τον T3R φαίνεται να καταστέλλεται σημαντικά από την περιοχή 185-260 του HCR-1 (Εικόνα 32).



Εικόνα 32. Μελέτη αύξησης μεταγραφικής ενεργότητητας του αγρίου τύπου και των μεταλαγμένων μορφών της περιοχής ηπατικού ελέγχου HCR1 από συνεπιμόλυνση του μεταγραφικού παράγοντα T3R σε κύτταρα COS-7. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με πλασμίδια (3 μg) που περιέχουν τον ετερόλογο υποκινητή TK σε σύντηξη ή μη με την αγρίου τύπου περιοχή HCR-1 ή απαλοιφές αυτής όπως αναγράφονται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Χρησιμοποιήθηκαν 2μg από το πλασμίδιο pMT2-T3Rβ στα δείγματα που υποδεικνύονται. Το μείγμα επιμόλυνσης περιείχε επίσης 1 μg από το πλασμίδιο CMV-βgal. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται υπό την μορφή ραβδογράμματος.

# 3.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΠΙΘΑΝΕΣ ΘΕΣΕΙΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ EAR3 ΣΤΑ ΕΛΛΕΙΜΑΤΑ HCRTK

Τέλος, μελετήσαμε την ενεργοποίηση της περιοχής HCR-1 παρουσία του καταστολέα EAR3. Πραγματοποιήθηκε παροδική επιμόλυνση σε κύτταρα HepG2 χρησιμοποιώντας 8μg από την κάθε πλασμιδιακή κατασκευή ελλειμάτων HCRTK και το πλασμίδιο υπερέκφρασης του EAR3 του ανθρώπου, pMT2hEAR3. Παρατηρείται πτώση στο 50% της αρχικής ενεργότητας CAT όταν προσθέτουμε EAR3 στην κατασκευή HCR-TK, ενώ η πτώση αγγίζει το 85% αυτής όταν αφαιρείται η αλληλουχία 185-325 του HCR. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την πιθανότητα ύπαρξης ενός στοιχείου ορμονικής απόκρισης στην περιοχή 10\_185. Δεν παρατηρείται σημαντική πτώση της ενεργότητας των 10\_260TK και 10\_118HCR-TK (Εικόνα 33).



Εικόνα 33. Μελέτη αύξησης μετγραφικής ενεργότητητας του αγρίου τύπου και των μεταλαγμένων μορφών της περιοχής ηπατικού ελέγχου HCR1 από συνεπιμόλυνση του μεταγραφικού παράγοντα EAR3 σε κύτταρα COS-7. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν με πλασμίδια (3 μg) που περιέχουν τον ετερόλογο υποκινητή TK σε σύντηξη ή μη με την αγρίου τύπου περιοχή HCR-1 ή απαλοιφές αυτής όπως αναγράφονται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Χρησιμοποιήθηκαν 2μg από το πλασμίδιο pMT2-EAR3 στα δείγματα που υποδεικνύονται. Το μείγμα επιμόλυνσης περιείχε επίσης 1 μg από το πλασμίδιο CMV-βgal. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται υπό την μορφή ραβδογράμματος.

## 5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι περιοχές ελέγχου HCR είναι περιοχές που ευθύνονται κατά κύριο λόγο για την ηπατική έκφραση των απολιποπρωτεινών του γονιδιακού συμπλέγματος των απολιποπρωτεινών apoE, apoCI, apoCIV και apoCII. Πρόκειται για ενισχυτικές περιοχές της μεταγραφής, απώλεια των οποίων δεν επηρεάζει την έκφραση των προαναφερθέντων στα νεφρά και σε άλλους ιστούς.

Οι Taylor et al (46) πραγματοποίησαν in vivo πειράματα χρησιμοποιώντας κατασκευές που έφεραν το γονίδιο της απολιποπρωτείνης αροΕ και διαφόρων απαλοιφών της περιοχής HCR-1, και είχαν καταλήξει στο συμπέρσσμα ότι η ελάχιστη περιοχή για ενεργότητα της περιοχής είναι η αλληλουχία 6-325. Παρατήρησαν την διατήρηση της ηπατοειδικής έκφρασης αλλά την σημαντική ελάττωσή της όταν χρησιμοποιούνταν οι περιοχές 6-209, 6-185 και 72-260, για το γονίδιο της απολιποπρωτείνης Ε. Η περιοχή 6-118 εμφανίζεται να μην είναι σε θέση να ενισχύσει την μεταγραφή του γονιδίου.

Είναι η πρώτη φορά που γίνονται απαλοιφές της περιοχής αυτής για την μελέτη του κατά πόσο αυτή παίζει ρόλο στην ενίσχυση της μεταγραφής της απολιποπρωτείνης CII και επίσης η πρώτη φορά που μελετάται η ικανότητά της σαν ηπατοειδικού ενισχυτή ετερόλογου υποκινητή. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η περιοχή HCR-1 αποτελεί ισχυρό ηπατοειδικό ενισχυτή σε ετερόλογο σύστημα. Η ελάχιστη περιοχή που απαιτείται για 6 φορές ενεργοποίηση ενός τέτοιου υποκινητή είναι η 10\_260.

Από παρατηρήσεις σε κύτταρα HepG2 είναι γεγονός ότι το στοιχείο 7 είναι καταστολέας της ενίσχυσης μεταγραφής της απολιποπρωτείνης CII. Το στοιχείο αυτό έχει παρατηρηθεί ότι γινεται πιο έντονο όταν τα πρωτεινικά αποτυπώματα σχηματίζονται με χρήση πυρηνικών εκχυλισμάτων από νεφρα. Εμείς δείχνουμε ότι απώλεια του στοιχείου αυτού (10\_260HCR-550CII) σχεδόν εξαφανίζει την μεταγραφική ενεργότητα σε νεφρικά κύτταρα πιθήκου (COS-7) και σε νεφρικά κύτταρα ανθρώπινου εμβρύου (Hek293).

67

Οι περιοχές 10\_118 και 118\_260 παρουσιάζονται ισοδύναμες με την αγρίου τύπου HCR-1 (10\_325), ενώ η περιοχή 118\_260 είναι περιοχή που ενισχύει ιδιαιτέρως την μεταγραφή της συγκεκριμένης απολιποπρωτείνης.

Η χρήση RNA-καταστολέων για τη μελέτη διαφόρων πρωτεινών είναι πολύ προσοδοφόρα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση με την κατασκευή μόνιμης κυτταρικής σειράς που υπερεκφράζει συμπληρωματικό RNA για το mRNA του μεταγραφικού παράγοντα HNF4 είναι πολύ χρήσιμη αφού με τον τρόπο αυτό μπορούμε να μελετήσουμε τον τρόπο δράσης αυτού όχι σε ετερόλογο σύστημα αλλά στο ίδιο το σύστημα δράσης του. Από σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταγραφικής ενεργότητας σε ετερόλογο υποκινητή και στο σύστημα της απολιποπρωτείνης CII παρατηρούμε ότι η κατασκευή 118\_260 δεν επηρεάζεται καθόλου από την απουσία HNF4, ενώ στο ετερόλογο σύστημα TK όλες οι κατασκευές επηρεάζονται. Μάλλον έχουμε να αντιμετωπίσουμε 2 διαφορετικούς μηχανισμούς ενίσχυσης της μεταγραφής. Όταν υπάρχει θέση πρόσδεσης HNF4 στον εγγύς υποκινητή (CIIB), άλλοι παράγοντες μπορούν να βοηθήσουν την μεταγραφή με την ίδια επιτυχία. Όταν όμως αυτό δεν συμβαίνει (TK), η μη παρουσία HNF4 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο.

Πάντως οι πιο πιθανοί στόχοι για τον HNF4 φαίνεται να είναι τα στοιχεία 3,4,5. Οι Taylor et al (46) υποστηρίζουν ότι υπάρχει θέση πρόσδεσης για τον μεταγραφικό αυτό παράγοντα στο στοιχείο 6. Εμείς δείχνουμε πρόσδεσή του και στο στοιχείο 5. Αποδεικνύεται ακόμη ότι το στοιχείο 5 ανταγωνίζεται πολύ ισχυρά για την πρόσδεση του HNF4 με το BA1 το οποίο είναι πρότυπο HRE. Το στοιχείο 4 φαίνεται να προσδένει T3R και μάλιστα επιμόλυνση κυττάρων αποδεικνύει την ενεργοποίηση που μπορεί να προκαλέσει στην κατασκευή 10\_185TK (Εικόνα 31). Το στοιχείο όμως 4 μάλλον είναι HRE πολύ όμοιο με το BA1 αφού το ανταγωνίζεται ισχυρότερα από ότι το 5 όταν χρησιμοποιούνται πυρηνικά εκχυλίσματα από ήπαρ αρουραίου ή HepG2.

Το στοιχείο 3 δεν φαίνεται να είναι HRE αφού δεν προσδένεται σε κανέναν από τους πυρηνικούς υποδοχείς που δοκιμάσαμε. Στο συγκεκριμένο στοιχείο πάντως οι Taylor et al υποστηρίζουν την παρουσία στοιχείου πρόσδεσης HNF3a. Κανένα από τα στοιχεία 4 και 5 δεν ανταγωνίζονται το BA1 για τον καταστολέα EAR3. Συνεπιμόλυνση αυτού στις απαλοιφές HCR1 σε σύντηξη με τον ετερόλογο ελάχιστο υποκινητή TK υποδεικνύουν πρόσδεση αυτού στα στοιχεία 3 ή/και 7.

Τιποτα όμως δεν μπορούμε να υποστηρίξουμε με ακρίβεια καθώς το μοντέλο αυτό είναι ακόμη λίγο μελετημένο και από ότι φαίνεται αρκετά περίπλοκο. Το μόνο που είναι σίγουρο είναι ότι ο υποκινητής 10\_260HCR-550CII αποτελεί έναν ισχυρότατο ηπατοειδικό υποκινητή, κάτι που θα μπορούσε να χρησιμεύσει στο μέλλον σε στόχευση γονιδίων στο ήπαρ. Και αυτό είναι πολύ σημαντικό αφού η εύρεση αυστηρά ιστοειδικών υποκινητών αποτελεί το πρώτο βήμα για γονιδιακή θεραπεία νοσημάτων του ήπατος.

Ο αμέσως επόμενος στόχος μας θα είναι να χαρτογραφήσουμε με μεγάλη ακρίβεια όλους τους παράγοντες που προσδένονται στα στοιχεία 4-7 της περιοχής HCR-1 με μελέτες ηλεκτροφορητικής κινητικότητας, ανταγωνισμού με γνωστά ολιγονουκλεοτίδια και χρήση αντισωμάτων. Η πρόσδεση γνωστών παραγόντων θα επιβεβαιωθεί και με αναλύσεις CHIP (Chromatin Immunoprecipitation Assays). Η περιοχή 10\_260 της HCR-1 η οποία παρουσιάζει την μεγαλύτερη ενεργότητα σε συνδυασμό με τον υποκινητή της apoCII, θα μεταφερθεί σε ανασυνδυασμένους αδενοιούς και θα ελεγθεί η ικανότητα της κατασκευής αυτής να προσδίδει υψηλά επίπεδα ηπατικής έκφρασης γνωστού γονιδίου (apoE), σε σύγκριση με άλλους ηπατοειδικούς υποκινητές (π.χ. αλβουμίνη). Με τον τρόπο αυτό ευελπιστούμε να δημιουργήσουμε ένα σημαντικό εργαλείο γονιδιακής θεραπείας ηπατικών νοσημάτων.
## 6. ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- 1. Zannis V. I. et al, 1993. Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors and their enzymes. Advances in Human Genetics, 21: 145-319
- Mahley R. W. et al, 1984. Plasma lipoproteins: apolipoproteins structure and function. J.Lipid. Res, 25:1277-1294.
- **3.** Karathanasis S. K., 1985. Apolipoprotein multigene family: Tandem organization of human apolipoprotein AI, CIII and AIV genes. **PNAS USA**, **82**: **6374-6378**
- Smit M. Et al, 1988. Apolipoprotein gene cluster on chromosome 19. Human Gen, 78:90-93
- 5. Deeb S. S. Et al, 1986. Chromosome localization of the human apolipoprotein B gene and detection of homologous RNA in Monkey intestine. **PNAS USA**, 83:419-422
- Moore M.N. et al, 1986. Human apolipoprotein AII: Nucleotide sequence of a cloned cDNA and localization of its structural gene in human chromosome 1. Bioch. BiopH. Res. Commun, 123:1-7
- Lenich C. Et al, 1988. Apolipoprotein gene expression in the rabbit: Abundance, size and distribution of apolipoprotein mRNA species. J. Lipid. Res. 29: 755-764
- Hussain M. M and Zannis V. I, 1990. Intracellular modification of human apoAII and sites in of apoAII mRNA synthesis: Comparison of apoAII with apoCII and apoCIII isoproteins. Biochemistry, 29:209–217
- 9. Breslow J. L et al, 1993. Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. PNAS USA, 90: 8314-8318

- Breckenbridge W C, Little J A, Steiner G, Chow A and Poapst M, 1978. N. Engl. J. Med, 298:1265-1273
- 11. Sehayek E and Eisenberg S, 1991.Mechanism of inhibition by apoC of apoEdependentmcellular metabolism of human triglyceride-rich lopoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. J. Biol. Chem, 266:18259-18267
- Mahler R W et al, 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function.
   J. Lipid Res, 25:1277-1294
- 13. Saunders A M et al, 1993. Association of apoE allele epsilon 4 with late onset familiar and sporadic Alzheimer's disease. Neurology, 43:1467-1472
- 14. Lewin B, 1997. Genes VI. Oxford University Press
- 15. Alberts B et al, 1995. Molecular Biology of the Cell. 3<sup>rd</sup> edition,
- 16. Jackson SM et al, 1997. Signalling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. **Subcell. Biochem, 28:1–21**
- 17. Evans R M et al, 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.Science, 240: 889-895
- Evans R M et al, 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. Cell, 83: 859-869
- 19. Le Blanc B P and Stunnenberg H G, 1995. 9-cis retinoic acid and signaling: changing partners cause some excitement. Genes Dev, 9: 1811-1816
- 20. Gronemeyer H & Laudet V 1995 Transcription factor 3: nuclear receptors. Protein
   Profile 2 1173–1308.

- Mangelsdorf D J and Evans R M, 1995. The RXR heterodimers and orpHan receptors.
   Cell, 83: 841-850
- 22. Blumberg B and Evans R, 1998. OrpHan nuclear receptors-new ligands and new possibilities. *Gen Dev*, 12: 3149-3155
- 23. Baniahmad A, Eggert M and Renkawitz R, 1997. Transcription factors in Eukaryotes. Chapter 6: 97-121
- 24. Laudet, 1997. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orpHan receptor, J. Mol. End. 19: 207-226
- 25. Wurtz J-M et al, 1997. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. Nature Structural Biology 3 87-94.
- 26. Sladek F, 1990. Liver enriched transcription factor HNF4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. Genes Dev, 4:2353-2365.
- 27. Frain, 1989. Alpha-fetoprotein gene expression in human lymphoblastoid cells and in PHA-stimulated normal lymphocytes. Biochem. Biophys. Res.Commun. 159:112-118
- 28. Iyemere V P, Davies N H and Brownlee G G, 1998. The activation function 2 domain of hepetic nuclear factor 4 is regulated by a short C-terminal proline-rich repressor domain. Nuc. Ac. Res, 26:2098–2104
- 29. Guopiang J et al, 1995. Exclusive homodimerization of the orpHan receptor hepatocyte nuclear factor 4defines a new subclass of nuclear receptors. Molecular and Cellular Biology, 15:5131–5143.
- Taylor D, Haubenwallner S and Leff T, (1990). Characterization of a dominant negative mutant form of the HNF4 orpHan receptor. Nuc. Ac. Res, 24: 2930-2935

- Fernandez-Rachubinski F A, Weiner J H, and Blajchman M A, 1996. Regions flanking exon 1 regulate constitutive expression of the human antithrombin gene. J Biol. Chem, 271: 29502-29512
- 32. Costa, R. H., D. R. Grayson, and J. E. Darnell, Jr. 1989. Multiple hepato-cyteenriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and a1antitrypsin genes. Mol. Cell. Biol. 9:1415-1425.
- **33**. Kuo C J et al, 1992. A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. **Nature**, **355:457-461**
- Hadzopoulou-Cladaras M et al, 1997. Functional Domains of the Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4. J. Biol. Chem. 272: 539–550
- 35. Thorsten Drewes, Sabine Senkel, Beatrix Holewa and Gerhart U. Ryffel, 1996. Human Hepatocyte Nuclear Factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. Mol. Cel. Biol. 19(3):925-931
- Guopiang J et al, 1997. Serine/threonine phosphorylation of orphan receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4. Arch. Bioch. Bioph, 340:1–9
- 37. Chen, W. S et al, 1994. Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. Genes Dev. 8:2466-2477.
- 38. Ladias J A A et al, 1992. Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes apoB, apoCIII and apoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF4, ARP-1, EAR-2 and EAR-3. J. Biol. Chem, 267:15849-15860
- **39**. Kardassis D et al. 1996. Transcriptional regulation of the genes involved in lipoprotein transport. **Hypertension**, **27:980-1008**

- 40. Kardassis D, Sacharidou E and Zannis V, 1998. Transactivation of the human apolipoprotein CII promoter by orpHan and ligand dependent nuclear receptors. J.
  Biol. Chem, 273: 17810-17816
- 41. Simonet W S, Bucay N, Pitas R E, Laner S J, Taylor J M, 1991. Multiple tissuespecific elements control the apoE/CI gene locus in transgenic mice. J. Biol. Chem 266:8651-8654
- 42. Simonet W 5 et al, 1993. A far downstream hepatocyte-specific control region directs expression of the linked human apoE and CI genes in transgenic mice. J.
  Biol. Chem 268:8221-8229
- **43**. Allan C M, Walker D and Taylor J M, 1995. Evolutionary duplication of a hepatic control region in the human apolipoprotein E gene locus. Identification of a second region that confers high level and liver-specific expression of the human apoE gene in transgene mice. J. Biol. Chem 270:26278-26281
- 44. Allan C, Taylor S and Taylor J, (1997). Two hepatic enhancers, HCR.1 and HCR.2, coorporate the liver expression of the entire human apolipoprotein E/CI/EIV/CII gene cluster. J. Biol. Chem, 272: 29113-29119
- 45. Dang Q, Walker D, Taylor S, Allan C, Chin P, Fan J, Taylor J, 1995. Structure of the hepatic control region of the human apolipoprotein E/CI gene locus. J. Biol. Chem 280:22577-22585
- 46. Dang Q and Taylor J, 1996. In vivo footprinting analysis of the hepatic control region of the human apolipoprotein E/CI/CIV/CII gene locus. J. Biol. Chem, 271:28667-28676
- 47. Vorgia P et al, 1997. A short proximal promoter and the distal hepatic control region
  -1 (HCR-1) contribute to the liver specificity of the human apolipoprotein CII gene.
  J. Biol. Chem, 273: 4188-4196

- 48. McPHerson C E, Shim E Y, Friedman D S and Zaret K S, 1993. An active tissue specific enhancer and bound transcription factors excisting in a precisely positioned nucleosomal array. Cell, 75: 387-398
- 49. James H A, Gibson I, 1998. The therapeutic potential of Ribozymes. Blood, 92:371– 382
- 50. Verma S et al, 1997. Structure-function studies of the hammerhead ribozyme. *Curr*. *Opin. Chem. Biol, 4:536*
- 51. Kobayashi H et al, 1994. Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR-1 (PGY1) ribozyme. Cancer Res, 54: 1271-1275
- 52. Kashani-Sabet M et al, 1994. Supression of the neoplastic pHenotype in vivo by antirao ribozyme. **Cancer Res, 54: 900-902**
- 53. Snyder D S et al, 1993. Ribozyme-mediated inhibition of bcr-abl gene expression in a PHiladelpHia chromosome-positive cell line. Blood, 82: 600-605
- **54**. Zhou C et al, 1994. Inhibition of HIV-1 human T-lympHocytes by retrovirally transduced anti-tat and rev hammerhead ribozymes. *Gene*, **149**: **33**
- **55**. Beck J and Nassal M, 1995. Efficient hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the structured hepatitis B virus encapsidation signal in vitro and in cell extracts, but not in intact cells. **Nucl Ac. Res, 23: 4954-**
- 56. Kumar M and Carmichael G, 1998. Antisense RNA: Function and fate of duplex RNA in cells of higher Eukaryotes. Micr. Mol. Biol. Rev, 62: 1415-1434