

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Συμβολή στη μελέτη της δράσης του μεταγραφικού  
παράγοντα NSCL-1**

**ΚΑΤΙΔΟΥ ΜΑΡΚΕΛΛΑ**

Υπεύθυνη καθηγήτρια: Καραγωγέως Δόμνα  
Επιβλέπων καθηγητής: Δελιδάκης Χρήστος

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Φυσικά, πρώτη από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Δόμνα Καραγωγέως όχι μόνο για την ευκαιρία που μου προσέφερε να πραγματοποιήσω στο εργαστήριό της τη μεταπτυχιακή μου διατριβή, αλλά και γιατί παλεύει διαρκώς για την πρόοδο όλων μας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου, πρώτο και καλύτερο τον Κώστα με τον οποίο μοιραζόμαστε πολλές κοινές ανησυχίες, τη Μαρίνα, τον Αλέξανδρο, τον Γιώργο, την Έλενα που με βοήθησε ιδιαίτερα στα πειράματα, τις Μαρίες καθώς και τους Νίκο, Σέβη, Ελένη και Δήμητρα.

Ευχαριστώ θα ήθελα να πω και στα μέλη των εργαστηρίων των κ.Μαυροθαλασσίτη, Θεοδωρόπουλου και Σαββάκη που με διάφορους τρόπους διευκολύνουν την εργασία μας.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Δελιδάκη όχι μόνο για τα πλασμίδια 8Ebox-luc και pUAS-tk-luc που μας προσέφερε, αλλά γιατί με υπομονή θα διορθώσει αυτό το Master's. Ευχαριστώ θα ήθελα να πω και στον κ.Καρδάσση ο οποίος με βοήθησε να ξεκαθαρίσω τα μπερδεμένα αποτελέσματα των luc-assays καθώς και για το πλασμίδιο pG5B-luc που μας χάρισε.

Κάθε επιστημονική προσπάθεια χρειάζεται τη συμπαράσταση των αγαπημένων μας προσώπων. Γι αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ιανό, τον Τίμη, τη Βασιλική, τη Ροδή, την αδερφή μου Φαίη και ιδιαίτερα τους γονείς μου, που εκτός ότι με στηρίζουν διαρκώς, χρηματοδότησαν μαζί με τον «Πυθαγόρα» αυτήν την προσπάθεια!

Φυσικά δε μπορώ να παραλείψω από τις ευχαριστίες όλους τους μπουρλοτιέρηδες για τις πολλές ώρες ψυχοθεραπείας!

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
Πρωτεΐνες της οικογένειας bHLH (basic helix-loop-helix).....	5
<i>NSCL-1</i> .....	6
<i>Έκφραση του NSCL-1</i> .....	8
<i>Φαινότυπος του knock-out ποντικού του NSCL-1</i> .....	9
<i>Πειράματα misexpression του NSCL-1</i> .....	9
<b>ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b> .....	10
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
Τροποποιητικά και περιοριστικά ένζυμα.....	11
Annealing ολιγονουκλεοτιδίων.....	11
Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	11
Δημιουργία και μετασχηματισμός ηλεκτρο-δεκτικών (electrocompetent) κυττάρων.....	12
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (miniprep).....	13
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxiprep).....	14
Κυτταρικές σειρές.....	15
Παροδική διαμόλυνση (transfection) ευκαρυωτικών κυττάρων.....	15
Προετοιμασία κυτταρικών εκχυλίσματα.....	16
Τεχνική λουσιφεράσης.....	17
Τεχνική β-γαλακτοσιδάσης.....	17
Επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	18
Φορείς που χρησιμοποιήθηκαν.....	19
Προϋπάρχοντα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν.....	19
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
Σύστημα 1 <sup>ο</sup> : GAL4-UAS.....	21
Σύστημα 2 <sup>ο</sup> : 8Ebox luc reporter, ME1a.....	24
Σύστημα 3 <sup>ο</sup> : 6Ebox-luc reporter, ME1a.....	25
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	33
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	39

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας των bHLH (basic helix-loop-helix) μεταγραφικών παραγόντων συμμετέχουν σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος τους στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, της καρδιάς, των μυών και του αίματος.

Οι bHLH μεταγραφικοί παράγοντες δρουν σχηματίζοντας ομοδιμερή ή και ετεροδιμερή και προσδένονται στην αλληλουχία CANNTG του DNA που ονομάζεται E-box. Οι παράγοντες αυτοί διακρίνονται σε επτά τάξεις. Η πρώτη τάξη περιλαμβάνει πρωτεΐνες που εκφράζονται συνεχώς και σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή, όπως οι ME1, E2, daughterless. Η δεύτερη τάξη περιλαμβάνει μόρια που έχουν ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης όπως οι Mash-1, Math-1, NeuroD και NSCL-1 και σχηματίζουν ετεροδιμερή με μόρια της πρώτης κατηγορίας.

Το NSCL-1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 133 αμινοξέων που εκφράζεται σε ζώνες μετα-μιτωτικών (postmitotic) κυττάρων στο αναπτυσσόμενο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Σχηματίζει ομοδιμερή, και ετεροδιμερή με το E12 (εναλλακτικό μετάγραφο του E2) και το ME1a.

Στην παρούσα μελέτη διερευνάται η μεταγραφική δραστηριότητα του NSCL-1, και γίνεται προσπάθεια για τη γενική χαρτογράφηση της ενεργοποιητικής περιοχής του, χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς τη λουσιφεράση.

Μελετώνται τρία συστήματα με διαφορετικά πλασμίδια αναφοράς εκ των οποίων τα δύο, φέρουν διαφορετικά E-boxes ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης. Εξετάζεται αν το NSCL-1 ή ελλειπτικές κατασκευές του, σε συνδυασμό με το ME1a μπορούν να ενεργοποιήσουν το γονίδιο αναφοράς. Στο τρίτο σύστημα εξετάζεται αν ελλειπτικές κατασκευές του NSCL-1 σε σύντηξη με την DNA binding περιοχή του GAL4 μπορούν να ενεργοποιήσουν πλασμίδιο αναφοράς που φέρει την περιοχή UAS ανοδικά από το γονίδιο της λουσιφεράσης.

## **ABSTRACT**

The basic helix-loop-helix (bHLH) family of transcription factors is involved in the regulation of multiple developmental processes, such as neurogenesis, cardiac muscle development, myogenesis and hematopoiesis.

bHLH proteins bind to a common DNA sequence (CANNTG) called E-box sequence through the basic domain. Typically they function as homo- or heterodimers. HLH domain is involved in dimerization.

bHLH proteins were divided in seven different groups according to their tissue distribution, dimerization capacities or DNA-binding preferences. Class I proteins like ME1, E2 and Da, are ubiquitously expressed and they form homodimers or they heterodimerize with bHLH proteins of class II. Class II proteins, like MASH-1, MATH-1, NeuroD and NSCL-1, have a tissue specific expression pattern.

NSCL-1 is expressed mostly in post-mitotic cells, in the developing nervous system. NSCL-1 forms homodimers, but it also heterodimerize with E12 and ME1a.

In this study, we investigate the role of NSCL-1 as a transcriptional activator and we try to identify a possible activating domain using the luciferase system.

Three versions of the luciferase system have been used. Two of them include a reporter plasmid that has different E-boxes upstream of the luciferase gene. ME1a and truncated forms of NSCL-1 have been used in order to activate the luciferase gene. The third system includes a reporter plasmid that has the UAS region upstream of the luciferase gene. Truncated forms of NSCL-1 fused to the GAL4 domain were tested in order to identify a possible activating domain of NSCL-1.

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **Πρωτεΐνες της οικογένειας bHLH (basic helix- loop- helix)**

Οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας bHLH (basic helix- loop- helix) παίζουν σπουδαίο ρόλο σε διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η νευρογένεση, η ανάπτυξη αιμοποιητικών κυττάρων, η ανάπτυξη του καρδιακού μυός και του σκελετού και η διαφοροποίηση δερματικών κυττάρων (Lee JE, 1997).

Οι bHLH πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από μια καλά συντηρημένη βασική περιοχή η οποία είναι απαραίτητη για την πρόσδεσή τους στο DNA. Η περιοχή αυτή περιέχει θετικά φορτισμένα αμινοξέα και καθορίζει την εξειδίκευση της σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA αναγνωρίζοντας τη συντηρημένη αλληλουχία CANNTG που ονομάζεται E-box (Murdoch *et al.*, 1999). Σημαντικές στην εξειδίκευση της πρόσδεσης είναι και οι αλληλουχίες που περιβάλλουν το E-box.

Οι bHLH πρωτεΐνες δρουν σχηματίζοντας ομοδιμερή ή ετεροδιμερή μέσω της περιοχής HLH . Κατά το διμερισμό, προκύπτει μια παράλληλη δεσμίδα από τέσσερις έλικες η οποία αφήνει τη βασική περιοχή να έρθει σε επαφή με τη μεγάλη αύλακα του DNA. Επιπρόσθετα με τη βασική περιοχή, αμινοξέα από τη θηλιά (loop) και την έλικα 2 έρχονται σε επαφή με το DNA (Ellenberger *et al.*, 1994). Η σταθεροποίηση των ελίκων επιτυγχάνεται με δεσμούς van der Waals που δημιουργούνται μεταξύ συντηρημένων υδρόφοβων αμινοξέων (Ellenberger *et al.*, 1994).

Οι πρωτεΐνες HLH έχουν μέχρι στιγμής κατηγοριοποιηθεί σε επτά βασικές τάξεις (Massari and Murre, 2000). Στην τάξη I ( ή αλλιώς E-πρωτεΐνες) ανήκουν οι πρωτεΐνες E12, E47, HEB, E2-2 και Daughterless. Οι πρωτεΐνες της τάξης αυτής εκφράζονται διαρκώς και σχηματίζουν όμο- και ετεροδιμερή. Η τάξη II περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες MyoD, myogenin, Atonal, NeuroD/Beta2 και το achaete-scute σύμπλοκο. Οι πρωτεΐνες αυτής της τάξης χαρακτηρίζονται από έναν ιστοειδικό τύπο έκφρασης και με λίγες εξαιρέσεις σχηματίζουν ετεροδιμερή με E-πρωτεΐνες. Η τάξη III περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας Myc, τον TFE3, τον SREBP-1 και τον Mi. Οι μεταγραφικοί παράγοντες αυτής της τάξης περιέχουν ένα

φερμουάρ λευκίνης δίπλα στο HLH μοτίβο. Οι πρωτεΐνες των τάξεων II και III, με εξαίρεση τις πρωτεΐνες Tal1, ABF1 και Mist1 της τάξης II που αναστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων, είναι γενικά ενεργοποιητές της μεταγραφής. Η τάξη IV περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς παράγοντες Mad, Max, Mxi οι οποίοι διμερίζονται με τις πρωτεΐνες της οικογένειας myc ή μεταξύ τους. Όταν οι πρωτεΐνες Mad και Mxi1 ετεροδιμερίζονται με την πρωτεΐνη Max και συνδέονται σε E-box στοιχεία αναστέλλουν τη μεταγραφή. Η τάξη V αποτελείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες Id και emc, από τους οποίους λείπει η βασική περιοχή. Έχοντας dominant negative δράση αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές των πρωτεϊνών που ανήκουν στις τάξεις I και II. Οι πρωτεΐνες HLH της τάξης VI είναι αναστολείς της μεταγραφής και έχουν προλίνη στη βασική τους περιοχή. Η τάξη αυτή περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Hairy, E(spl) και HES. Τέλος, οι HLH πρωτεΐνες της τάξης VII ξεχωρίζουν από την παρουσία της bHLH-PAS περιοχής και περιλαμβάνει τον υποδοχέα των αρωματικών υδρογονανθράκων (Aromatic Hydrocarbon Receptor, AHR), τον παράγοντα 1α που επάγει την υποξία και τις πρωτεΐνες της *Drosophila* Singleminded και Period (Massari and Murre, 2000).

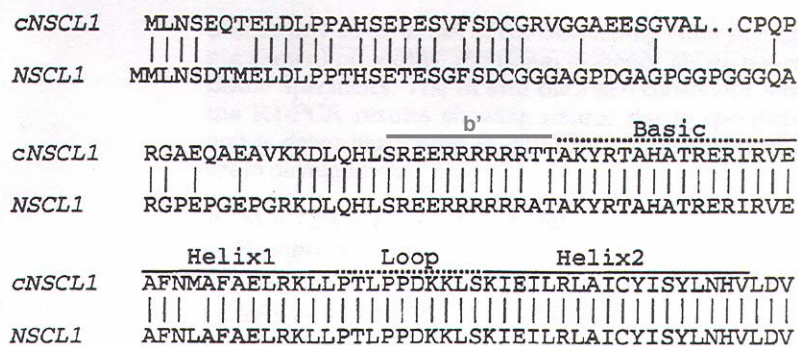
Ένας άλλος διαχωρισμός που αναφέρεται κυρίως στις πρωτεΐνες της τάξης II και αφορά τη λειτουργία τους, είναι σε παράγοντες καθορισμού (determination factors) και παράγοντες διαφοροποίησης (differentiation factors). (Lee JE, 1997). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν πρωτεΐνες που εκφράζονται στις βλαστικές ζώνες όπως οι MASH-1, MATH-1, MATH-4A και Ngns. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκει το NeuroD το οποίο εκφράζεται σε πολλές περιοχές του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος αλλά και στο ενήλικο. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν ακόμη τα *neuroD2*, *MATH-2*, *NSCL-1* και *NSCL-2*.

### **NSCL-1**

Το γονίδιο *NSCL-1* ταυτοποιήθηκε βάση της ομολογίας του με το ανθρώπινο αιμοποιητικό γονίδιο *SCL-1* (stem cell leukemia), σε μια προσπάθεια απομόνωσης του ορθόλογου του *SCL-1* στον ποντικό (Brown *et al*, 1992). Παρουσιάζει 61% ομοιότητα στην bHLH περιοχή με το *SCL-1*. Κατά τον ίδιο τρόπο απομονώθηκε και το *NSCL-2* το οποίο παρουσιάζει πολύ

μεγάλη ομολογία (98%) με το *NSCL-1* στην bHLH περιοχή (Gobel *et al*, 1992).

Το *NSCL-1* αποτελείται από 2 εξόνια και το ανοικτό πλαίσιο διαβάσματος βρίσκεται εξολοκλήρου στο δεύτερο εξόνιο, κάτι που συναντάται σε bHLH πρωτεΐνες. Δεν έχει εναλλακτικές ισομορφές και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 133 αμινοξέα (Murdoch *et al*, 1999). Ανοδικά της βασικής του περιοχής το *NSCL-1* διαθέτει μια περιοχή, άγνωστης λειτουργίας, πλούσια σε αργινίνες η οποία ονομάζεται b'. Τόσο η περιοχή αυτή, όσο και η bHLH περιοχή είναι πολύ συντηρημένες στην όρνιθα και τον άνθρωπο (98% ομοιότητα) σε αντίθεση με την αμινοτελική περιοχή η οποία παρουσιάζει αρκετές διαφορές. Παρακάτω φαίνεται η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας του *NSCL-1* της όρνιθας και του ανθρώπου.



**Εικ.1.** Σύγκριση αμινοξικής αλληλουχίας του *NSCL-1* σε όρνιθα και άνθρωπο

Το *NSCL-1* παρά το γεγονός ότι ανήκει στις τάξεις II bHLH πρωτεΐνες μπορεί και σχηματίζει ομοδιμερή τα οποία προσδένονται στο E-box (CAGCTG) απαιτώντας συγκεκριμένες αλληλουχίες που να το περιβάλλουν 5' και 3' (Brown *et al*, 1994). Τα ομοδιμερή αυτά δεν φαίνεται να έχουν σημαντική ενεργοποιητική δράση. Αντίθετα όταν το *NSCL-1* ετεροδιμερίζεται με το ME1a προκαλεί ενεργοποίηση γονιδίου αναφοράς, ανοδικά του οποίου βρίσκεται το E-box CAGCTG (Uittenbogaard *et al*, 1999). Το *NSCL-1* αλληλεπιδρά επιπλέον με τις δυο εναλλακτικές μορφές της E2A πρωτεΐνης E12 και E47, με την «LIM only» LMO-1 (Bao *et al*, 2000) και με τις LMO-2, LMO-4, (Manetoroulos *et al*, 2003). Φαίνεται μάλιστα ότι η LMO-4 δρα ανασταλτικά στη λειτουργία του *NSCL-1* όπως προκύπτει από πειράματα συνδιαμόλυνσης κυτταρικής σειράς νευροβλαστώματος.



Στο *Xenopus* φαίνεται ότι το διμερές XNSCL-1/ XLMO-3 παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση, επάγοντας τη νευρωνική μοίρα επιδερμικών κυττάρων. Το διμερές αυτό λειτουργεί ως ενεργοποιητής, ξεκινώντας ένα καταρράκτη έκφρασης άλλων bHLH γονιδίων, όπως των *XNeuroD* και *XNGN-1* (Bao *et al*, 2000). Οι LMO πρωτεΐνες δε διαθέτουν περιοχή πρόσδεσης στο DNA, περιέχουν όμως περιοχές LIM οι οποίες είναι πλούσιες σε κυστεΐνες και παίζουν ρόλο σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.

Το NSCL-1 όπως και οι E-πρωτεΐνες ME1 και το ME2 φαίνεται να ρυθμίζουν την έκφραση του Id2, μέλος της τάξης V της οικογένειας των bHLH πρωτεϊνών. Ωστόσο το ίδιο το Id2 σε συνδυασμό με τις παραπάνω πρωτεΐνες έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της δράσης τους (Neuman *et al*, 1995). Παρόλα αυτά δεν υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση NSCL-1 και Id2 (Manetopoulos *et al*, 2003)

#### Έκφραση του NSCL-1

Το *NSCL-1* εκφράζεται στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα. Η έκφρασή του στον ποντικό ξεκινά το εμβρυϊκό στάδιο E 9.5, και συνεχίζεται μέχρι και το P10 στην αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα. Πιο συγκεκριμένα στο στάδιο E9.5 εκφράζεται παραπλευρώς της κοιλιακής ζώνης του νευρικού σωλήνα κοιλιακά, αλλά όχι στο εδαφιαίο πέταλο. Στο στάδιο E10.5 εκφράζεται και σε περιορισμένο τμήμα της ραχιαίας πλευράς του νευρικού σωλήνα όχι όμως και στο οροφιαίο πέταλο. Στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο εκφράζεται και σε γάγγλια ραχιαίας ρίζας (DRG) και στο πνευμονογαστρικό νεύρο (*vagus nerve*) (Murdoch *et al*, 1999). Επιπλέον εκφράζεται στο οσφρητικό επιθήλιο (Suzuki *et al*, 2003), σε κρανιακά γάγγλια, στον αναπτυσσόμενο ιππόκαμπο, σε θαλαμικούς πυρήνες και μέρος της υπόφυσης (Kruger and Braun, 2002).

Στο στάδιο E10.5 το *NSCL-1* εκφράζεται σε όλη την πρόδρομη παρεγκεφαλίδα. Σε επόμενα αναπτυξιακά στάδια εκφράζεται στην κοιλιακή ζώνη της παρεγκεφαλίδας από την οποία προέρχονται οι πυρήνες της παρεγκεφαλίδας και τα κύτταρα Purkinje, και στην εξωτερική κοκκώδη στιβάδα από την οποία προέρχονται τα κοκκώδη κύτταρα. Το *NSCL-1* δεν εκφράζεται στο ρομβικό χείλος από το οποίο προέρχεται η εξωτερική κοκκώδης στιβάδα αλλά εντοπίζεται και στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα η οποία δημιουργείται από τα κύτταρα της εξωτερικής κοκκώδους στιβάδας που

είναι μεταμιτωτικά και έτοιμα να μεταναστεύσουν. Η έκφραση στο σημεία αυτό παρατηρείται στο στάδιο P10, αλλά όχι στο ενήλικο.

#### Φαινότυπος του knock-out ποντικού του *NSCL-1*

Το knock-out ποντίκι του *NSCL-1* ζει κανονικά και δεν παρουσιάζει κάποια νευρολογική δυσλειτουργία. Τα κρανιακά γάγγλια, ο φλοιός και η παρεγκεφαλίδα στα οποία εκφράζεται φυσιολογικά το *NSCL-1*, αναπτύσσονται χωρίς πρόβλημα (Kruger and Braun, 2002). Ωστόσο τα ζώα αυτά έχουν πιο σύντομη διάρκεια ζωής και παρουσιάζουν προδιάθεση για αρρυθμία λόγω δυσλειτουργίας του αυτόνομου νευρικού συστήματος (Cogliati *et al* 2002). Το διπλό όμως για τα *NSCL-1* και *NSCL-2* knock out ποντίκια πεθαίνουν στη γέννηση παρουσιάζοντας απώλεια των GnRH-1 (gonadotropin releasing hormone) νευρώνων στα οπίσθια μέρη του εγκεφάλου, και ανώμαλη ανάπτυξη τους στα πρόσθια μέρη του εγκεφάλου (Kruger *et al.*, 2004).

#### Πειράματα misexpression του *NSCL-1*

Αντίθετα, misexpression του *NSCL-1* στην όρνιθα με ρετροϊούς, προκαλεί το θάνατο μετά το εμβρυϊκό στάδιο E12. Πριν το στάδιο αυτό, οι όρνιθες παρουσιάζουν σημαντική καταστολή στην ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας και μεγέθυνση του καλύπτρα (tectum). Παρά τη μεγέθυνση της καλύπτρας δεν παρατηρούνται αλλαγές στη μορφολογία του. Παρατηρείται αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων στο στάδιο E9, ωστόσο αυτή μάλλον είναι δευτερογενής συνέπεια του αυξημένου ελεύθερου χώρου και της μειωμένης πίεσης. Misexpression του *cNSCL-1* στην εξωτερική κοκκώδη στιβάδα της παρεγκεφαλίδας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Li CM *et al*, 1999). Επίσης, misexpression του *cNSCL-1* έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρών οφθαλμών στην όρνιθα, μειωμένο πολλαπλασιασμό κυττάρων και μαζικό κυτταρικό θάνατο στον αμφιβληστροειδή στο εμβρυϊκό στάδιο E8 (Li CM *et al*, 1999). Μια ευρύτερη έκφραση του *cNSCL-1* στην όρνιθα προκαλεί δραματικές αλλαγές στη ανάπτυξη, με παραμορφώσεις στο κρανίο και το σκελετό (Yan and Wang, 2001). Τα παραπάνω αποτελέσματα δε φαίνεται να προκύπτουν από γενικότερη αλλαγή της ισορροπίας έκφρασης των bHLH πρωτεϊνών εφόσον πειράματα του *cNSCL-2* δεν έχουν ανάλογους δραματικούς φαινοτύπους.

## **ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Οι bHLH μεταγραφικοί παράγοντες εμπλέκονται σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες, ρυθμίζοντας την έκφραση διαφόρων γονιδίων. Υπάρχουν πρωτεΐνες σε αυτήν την οικογένεια που δρουν είτε ως ενεργοποιητές είτε ως καταστολείς της μεταγραφής. Στόχος της μελέτης αυτής, είναι να εξετάσει αν το NSCL-1 λειτουργεί ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας, εντοπίζοντας παράλληλα την αντίστοιχη περιοχή του μορίου που ευθύνεται για τη δράση αυτή.

Για τη διερεύνηση των παραπάνω ερωτημάτων, κύτταρα HEK 293 συνδιαμολύνθηκαν με το NSCL-1 ή ελλειπτικές κατασκευές του, καθώς και με πλασμίδια αναφοράς της λουσιφεράσης και της β-γαλακτοσιδάσης. Η β-γαλακτοσιδάση χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της απόδοσης της διαμόλυνσης έτσι ώστε σε κάθε πείραμα η τιμή της ενεργοποίησης να είναι ανεξάρτητη από την επιτυχία της διαμόλυνσης κάθε δείγματος.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά συστήματα λουσιφεράσης – β γαλακτοσιδάσης. Στο πρώτο σύστημα εξετάστηκε, αν διαφορετικές ελλειπτικές κατασκευές του cNSCL-1 που εκφράζονται σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του παράγοντα GAL4, μπορούν να ενεργοποιήσουν πλασμίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης που φέρει ανοδικά την περιοχή UAS.

Η αρχή του δεύτερου και του τρίτου συστήματος συνίσταται στο γεγονός ότι το NSCL-1 σχηματίζει ομοδιμερή με το ME1a τα οποία φαίνεται να λειτουργούν ως ενεργοποιητές της μεταγραφής (Uittenbogaard *et al*, 1999). Χρησιμοποιήθηκαν δυο πλασμίδια αναφοράς, τα οποία περιείχαν ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης διαφορετικά E-boxes. Το πρώτο πλασμίδιο έφερε 8 φορές το E-box CACCTG και το δεύτερο έφερε 6 φορές το E-box CAGCTG. Η αδυναμία λειτουργίας του συστήματος με το πρώτο πλασμίδιο αναφοράς, οδήγησε στη δημιουργία του δεύτερου πλασμιδίου αναφοράς το οποίο σύμφωνα με προηγούμενα αποτελέσματα (Uittenbogaard *et al*, 1999) έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το ετεροδιμερές NSCL-1/ME1a. Και στα δύο αυτά συστήματα, χρησιμοποιήθηκαν ελλειπτικές κατασκευές του cNSCL-1 οι οποίες έφεραν την περιοχή διμερισμού HLH των bHLH πρωτεϊνών.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **Τροποποιητικά και περιοριστικά ένζυμα**

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των προμηθευτριών εταιριών (New England Biolabs –περιοριστικά ένζυμα, Promega -λιγάση, Roche -φωσφατάση, Minotech- T4 κινάση)

### **Annealing (υβριδοποίηση) ολιγονουκλεοτιδίων**

Ισομοριακή ποσότητα των δυο συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων με συγκέντρωση 1μg/μl, 10x ligase buffer (Promega) και νερό σε τελικό όγκο 50μl, τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 95<sup>0</sup> C και αφέθηκε να κρυώσει σταδιακά.

### **Απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.**

Η απομόνωση του DNA έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροέκλουσης σε μεμβράνες διαπίδωσης και ο καθαρισμός με κολώνα sephadex G50, φαινόλης-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη και άλας οξικού νατρίου.

Μετά την ηλεκτροφόρηση του DNA σε παρασκευαστικό gel αγαρόζης 1% απομονώνεται η επιθυμητή ζώνη και τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδωσης με απιονισμένο νερό. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση για 1h και 30min στα 100V και στη συνέχεια αλλαγή της πολικότητας για 30 sec ώστε να απομακρυνθεί από τη μεμβράνη το DNA που πιθανόν έχει κολλήσει.

Το υγρό μεταφέρεται από τη μεμβράνη και υπόκειται σε εκχυλίσσεις με 2-βουτανόλη ώστε να συμπυκνωθεί ο όγκος του υγρού όπου είναι διαλυμένο το DNA.

Για τον καθαρισμό του DNA δημιουργείται στήλη από Sephadex G50 σε σύριγγα του 1ml. Το διάλυμα περνά από τη στήλη με φυγοκέντρηση στις 2500rpm για 5min. Ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου ισομοριακού μίγματος φαινόλης-χλωροφόρμιου στο DNA, ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5min στις 13000rpm. Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος χλωροφόρμιου και μετά από ανάδευση και φυγοκέντρηση το νέο υπερκείμενο κατακρημνίζεται προσθέτοντας 1/10 του όγκου οξικό νάτριο και 2 όγκους 100% αιθανόλη.

Ακολουθεί επώαση για 10min στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και φυγοκέντρηση για 15min στις 13000 rpm στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Η πελέτα του DNA αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται στον επιθυμητό όγκο νερού.

### **Δημιουργία και μετασχηματισμός ήλεκτρο-δεκτικών (electrocompetent) κυττάρων**

Καλλιέργεια 3ml εμβολιάζεται με αποικία κυττάρων *E.coli* στελέχους DH10B και αφήνεται να αναπτυχθεί για ~16h στους  $37^{\circ}\text{C}$  σε θρεπτικό μέσο LB (για 1lt, 5gr yeast extract, 10gr bacto-tryptone, 10gr NaCl, ρύθμιση του pH στο 7.0).

Την επόμενη ημέρα εμβολιάζονται 200ml θρεπτικού LB \* (για 1lt, 5gr yeast extract, 10gr bacto-tryptone, 2gr NaCl, ρύθμιση του pH στο 7.0) με 2ml καλλιέργειας DH10B κυττάρων και επωάζονται στους  $37^{\circ}\text{C}$  έως ότου η οπτική πυκνότητα των κυττάρων να είναι 0,6. Ακολουθεί:

- Επώαση των κυττάρων στον πάγο για 15 min
- Φυγοκέντρηση στις 4000rpm στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 15min
- Επαναδιάλυση πελέτας σε ίσο όγκο κρύο παρορισε νερό
- Φυγοκέντρηση στις 4000rpm στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 15min
- Επαναδιάλυση πελέτας σε 1/2 όγκου κρύο παρορισε νερό
- Φυγοκέντρηση στις 4000rpm στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 15min
- Επαναδιάλυση πελέτας σε 1/4 όγκου κρύο παρορισε νερό
- Φυγοκέντρηση στις 4000rpm στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 15min
- Επαναδιάλυση πελέτας σε 1/10 όγκου κρύο παρορισε νερό
- Φυγοκέντρηση στις 3500rpm στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 15min
- Επαναδιάλυση σε ~1ml κρύα 10% γλυκερόλη
- Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται αμέσως ή φυλάσσονται σε aliquots των 80μl στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Όλες οι παραπάνω διαδικασίες γίνονται όσο το δυνατό στον πάγο χρησιμοποιώντας πάντα κρύες πιπέτες, falcons, tips. Για το μετασχηματισμό των κυττάρων, προστίθενται 1-2μl της αντίδρασης ligation στα κύτταρα τα οποία στη συνέχεια τοποθετούνται σε ειδική κρύα κυψελίδα για να γίνει το electroporation (1800V για 4ms).

Στα κύτταρα προστίθενται ~800μl θρεπτικό μέσο LB και αφήνονται να επωαστούν για 1h στους 37<sup>0</sup> C. Τα κύτταρα στη συνέχεια απλώνονται σε τρυβλίο με θρεπτικό LB που φέρει το κατάλληλο αντιβιοτικό.

### **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini-prep).**

Για την παρασκευή σε μικρή κλίμακα (mini-prep) υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης. Εμβολιάζονται 3ml θρεπτικού μέσου LB σε βακτηριολογικό σωληνάριο με μία αποικία μετασχηματισμένων βακτηρίων και επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση για ~16h.

Την επομένη μέρα 1.5 ml από την καλλιέργεια μεταφέρεται σε erpendorf του 1.5 ml και το υπόλοιπο της καλλιέργειας φυλάσσεται στους 4°C). Ακολουθεί:

- Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 30 sec.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού
- Επαναδιάλυση της βακτηριακής πελέτας σε 100 μl κρύο Solution #1 ή GTE (Glucose: 50mM, Tris pH 8: 25mM, EDTA pH8: 10mM).
- Προσθήκη 200 μl φρεσκοφτιαγμένου Solution #2 (0,2N NaOH, 1% SDS) και άμεση γρήγορη ανάδευση.
- Επώαση στον πάγο για 5 min.
- Προσθήκη 150 μl κρύο Solution #3 (60ml 5M potassium acetate, 11,5ml glacial acetic acid, 28,5ml H<sub>2</sub>O) και άμεση έντονη ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στους 4°C στις 12000 rpm για 5 min.
- Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erpendorf και προσθήκη ίσου όγκου ισομοριακού μίγματος φαινόλης:χλωροφόρμιου.
- Ανάμειξη και φυγοκέντρηση στους 4°C στις 12000 rpm για 3 min.
- Κατακρήμνιση υπερκείμενου με 2 όγκους αιθανόλη 100%
- Επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση στους 4°C στις 12000 rpm για 10 min
- Αφαίρεση αιθανόλης και στέγνωμα πελέτας
- Προσθήκη 50-100 μl διαλύματος RNase A σε H<sub>2</sub>O (10mg/ml)

## Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα.

Για την παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (maxiprep) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης. Ο καθαρισμός έγινε με διαβάθμιση χλωριούχου καισίου (CsCl) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Εμβολιάζεται καλλιέργεια 800ml και αφήνεται να αναπτυχθεί στους 37°C για 20 περίπου ώρες. Ακολουθεί:

- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στους 4°C, στις 4000 rpm για 15 min σε έναν Sorvall GS3 ρότορα (ή ισοδυναμο του) και απομάκρυνση του υπερκείμενου
- Επαναδιάλυση της βακτηριακής πελέτας σε 20 ml Solution #1.
- Προσθήκη 1 ml διαλύματος λυσοζύμης συγκέντρωσης 10 mg/ml σε 10 mM Tris·Cl [pH 8.0].
- Προσθήκη 40 ml φρέσκου Solution #2 και ήπια ανάδευση
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 min.
- Προσθήκη 30 ml κρούου Solution #3 και καλή ανάμειξη ώστε να δημιουργηθεί ομοιογενές μίγμα
- Επώαση στον πάγο για 10 min
- Φυγοκέντρηση στους 4°C, στις 4000 rpm για 15 min σε έναν Sorvall GS3 ρότορα
- Φιλτράρισμα του υπερκείμενου μέσα από υαλοβάμβακα και προσθήκη 60% του όγκου ισοπροπανόλη
- Ανάμειξη και επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
- Φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Αφαίρεση του υπερκείμενου και πλύση με 70%αιθανόλη
- Στέγνωμα πελέτας και επαναδιάλυση σε 3ml H<sub>2</sub>O
- Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία καθαρισμού η οποία αποτελείται από τα παρακάτω βήματα:
- Υπολογισμός του όγκου του διαλύματος του DNA με ακρίβεια
- Προσθήκη 1.1 gr στερεού CsCl για κάθε ml διαλύματος και ανάδευση
- Προσθήκη 150μl EtBr (συγκέντρωσης 10mg/ml σε H<sub>2</sub>O)

- Μεταφορά του μίγματος σε ένα quick seal centrifuge tube και προσθήκη διαλύματος CsCl 1 gr/ml H<sub>2</sub>O για τη συμπλήρωση του επιθυμητού όγκου
- Κλείσιμο του σωληναρίου και τοποθέτηση σε υπερφυγόκεντρο BECKMAN στις 55000 rpm στους 18°C για ~20h

Μετά την υπερφυγοκέντρηση εμφανίζονται δύο ζώνες στο κέντρο περίπου του tube. Η κάτω ζώνη περιέχει το πλσμιδιακό DNA ενώ η πάνω ζώνη, αν υπάρχει, είναι λεπτή και αποτελείται από γραμμικό DNA καθώς και από κομμένο κυκλικό πλασμιδιακό DNA. Κατά μήκος του tube υπάρχει μία έντονα κόκκινη ζώνη που περιέχει σύμπλοκα EtBr/RNA.

Το πλασμιδιακό DNA αφαιρείται με σύριγγα. Ακολουθούν αρκετές εκχυλίσεις με ισοπροπανόλη κορεσμένη σε CsCl και νερό ώστε να απομακρυνθεί το EtBr. Στο DNA προστίθενται δυο όγκοι απιονισμένου νερού και δυο (επί του συνολικού) όγκοι αιθανόλη 100%. Κατά την ανάμειξη του παραπάνω μίγματος δημιουργείται υψηλής ποιότητας συσσωμάτωμα του πλασμιδιακού DNA το οποίο «ψαρεύεται», ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και μετά το στέγνωμα επαναδιαλύεται στον επιθυμητό όγκο νερού.

## **Κυτταρικές σειρές**

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEK293 (human embryonic kidney). Για την καλλιέργειά τους χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο DMEM (SIGMA) με προσθήκη 10% FCS, 1μg/ml πενικιλίνη /στρεπτομυκίνη και 2mM γλουταμινικό (GIBCO). Η επώαση των κυττάρων γίνεται στους 37°C με 5% CO<sub>2</sub>

## **Παροδική διαμόλυνση (transfection) ευκαρυωτικών κυττάρων**

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στην ανάμειξη του DNA με CaCl<sub>2</sub> και διαλύματος φωσφορικού αλατιού η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ιζήματος DNA-Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Η τοποθέτηση των κυττάρων στα τρυβλία γίνεται 5 περίπου ώρες πριν τη διαμόλυνση. Στα 6-well plates, τοποθετούνται ~4x10<sup>5</sup> κύτταρα και 2 ml θρεπτικού, ενώ στα 12-well plates τοποθετούνται ~2x10<sup>5</sup> κύτταρα και 1ml θρεπτικού.



Οι ποσότητες των διαλυμάτων που αναφέρονται παρακάτω αφορούν τη διαμόλυνση κυττάρων σε 6-well plates. Στα 12-well plates οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται είναι το ήμισυ των πρώτων.

Σε erpendorf που περιέχει το μίγμα των DNAs (1-6μg) προστίθενται 15.5 μl CaCl<sub>2</sub> 2M και αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 125 μl. Το μίγμα μεταφέρεται στάγδην σε νέο erpendorf που περιέχει 125 μl 2xHBS (280mM NaCl, 10mM KCl, 1,5mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 12mM dextrose, 50mM HEPES) και αφήνεται για 15-20 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστεί το ίζημα. Στη συνέχεια το μίγμα αναδεύεται και τοποθετείται στάγδην στα κύτταρα.

Μετά από επώαση 12-16 ώρες τα κύτταρα ξεπλένονται δυο φορές με θρεπτικό DMEM (χωρίς πρόσθετα) και αφού προστεθεί θρεπτικό καλλιέργειας επωάζονται στους 37°C/ 5% CO<sub>2</sub> για τουλάχιστον 24 ώρες.

### **Προετοιμασία κυτταρικών εκχυλισμάτων**

Διαλύματα που χρησιμοποιούνται:

- 1x PBS
- 1x lysis buffer (RLB, Promega)

Μετά την αφαίρεση του θρεπτικού από τα κύτταρα, γίνονται δυο πλύσεις με 1x PBS. Ακολουθεί:

- Προσθήκη lysis buffer, τόσο ώστε να καλύψει την επιφάνεια του πιάτου ( για παράδειγμα 150μl για τα 6-well plates, 75μl για τα 12-well plates)
- 1-2 κύκλοι μεταφοράς από τους -80 °C στους 37 °C ώστε να σπάσουν τα κύτταρα
- μεταφορά όλων των κυττάρων από τα πιάτα σε erpendorf και επώαση στον πάγο
- σύντομο vortex
- φυγοκέντρηση στους 4 °C στις 12000rpm για 2min
- μεταφορά υπερκείμενου σε νέο erpendorf
- φύλαξη στους -80 °C

## Τεχνική λουσιφεράσης (luc assays)

Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας χρησιμοποιείται ευρέως ως γονίδιο αναφοράς. Καταλύει την αντίδραση:



Το εκχύλισμα των κυττάρων που εκφράζουν το γονίδιο της λουσιφεράσης επωάζεται με το υπόστρωμα, δείχνοντας ,μέσω της παραγωγής φωτός, τη μεταγραφική δραστηριότητα που συμβαίνει σε δεδομένες συνθήκες.

Για την τεχνική χρησιμοποιούνται:

- κυτταρικό εκχύλισμα
- υπόστρωμα λουσιφεράσης (Promega)

Σε ένα erpendorf τοποθετούνται 60μl υποστρώματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 50 μl lysis buffer (επίσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος) και 10μl κυτταρικού εκχυλίσματος. Αμέσως μετά την ανάμειξη το erpendorf τοποθετείται στο λουμινόμετρο καθώς η αντίδραση ανιχνεύεται μόλις για 1 λεπτό.

## Τεχνική β-γαλακτοσιδάσης

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι:

- -Sodium Phosphate Buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 0.1 M, pH= 7.3 (προσαρμόζεται με 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )

- 100x Salt buffer:

3M KCl	333 μl
1M $\text{MgCl}_2$	100 μl
β-mercaptoethanol	352 μl
$\text{H}_2\text{O}$	215 μl
ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	1000μl

- - $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M

- -OPNG 8mg/ml σε διάλυμα 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Για την αντίδραση, προστίθενται διαδοχικά σε erpendorf:

- 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  456μl

- OPNG 132μl
- 100x Salt buffer 6μl
- εκχύλισμα κυττάρων 6μl
- ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ 600μl

Η ακριβής ποσότητα του κυτταρικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιείται κάθε φορά εξαρτάται από την επιτυχία της διαμόλυνσης και κυμαίνεται από 1-6μl. Τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C μέχρι να αποκτήσουν κιτρινωπή απόχρωση. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 200μl 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> τηρώντας τη σειρά των δειγμάτων με την οποία ξεκίνησε η αντίδραση. Στη συνέχεια μετράται η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων στα 410nm. Οι τιμές πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 0,1-1.

### **Επεξεργασία αποτελεσμάτων**

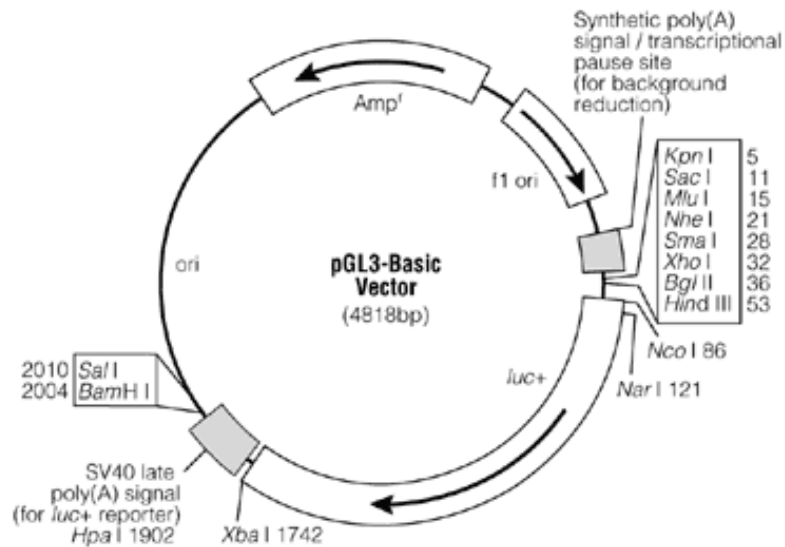
Τα αποτελέσματα των τιμών της τεχνικής της β-γαλακτοσιδάσης είναι απαραίτητα για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την τεχνική της λουσιφεράσης. Ουσιαστικά με τη β-γαλακτοσιδάση μπορούμε να μετρήσουμε το ποσοστό των επιτυχώς διαμολυσμένων κυττάρων και να αποκλείσουμε από τις τελικές τιμές τον παράγοντα της επιτυχίας της διαμόλυνσης που είναι διαφορετικός σε κάθε πηγάδι.

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Από όλα τα δείγματα τα οποία έχουν διαμολυνθεί με το ίδιο πλασμίδιο που κωδικοποιεί το γονίδιο της λουσιφεράσης σε ένα πείραμα, επιλέγουμε αυτό με τη μεγαλύτερη τιμή οπτικής πυκνότητας από τη β-γαλακτοσιδάση.
- Η τιμή αυτή διαιρείται στη συνέχεια με τις τιμές οπτικής πυκνότητας των υπόλοιπων δειγμάτων. Έτσι προκύπτει για κάθε δείγμα ένας παράγοντας μεγαλύτερος του 1, εκτός από αυτό με τη μεγαλύτερη τιμή που είναι ίσο με 1.
- Η τιμή κάθε δείγματος από την τεχνική της λουσιφεράσης πολλαπλασιάζεται με τον αντίστοιχο παράγοντα που προέκυψε από τη β-γαλακτοσιδάση και έτσι δημιουργείται η κανονικοποιημένη τιμή.
- Επειδή σε κάθε πείραμα κάθε δείγμα πραγματοποιείται εις διπλούν, η τελική τιμή προκύπτει από το μέσο όρο αυτών.

- Σύμφωνα με τις τελικές τιμές δημιουργείται η γραφική παράσταση.

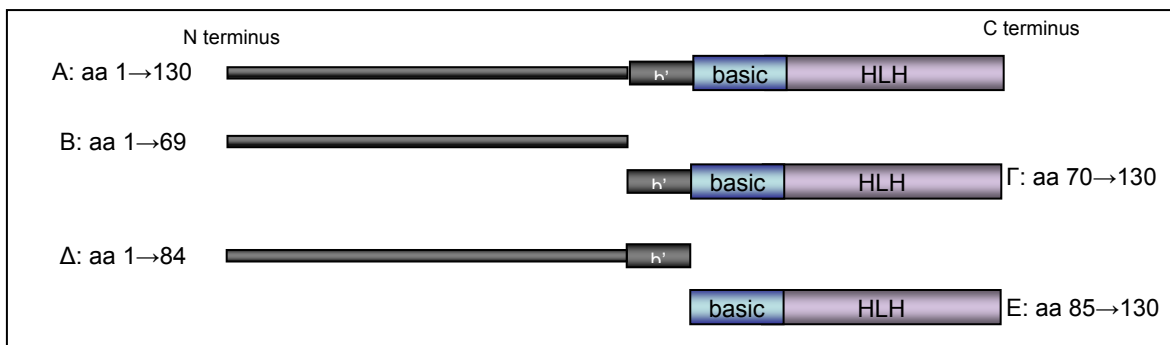
## Φορείς που χρησιμοποιήθηκαν



## Προϋπάρχοντα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν

- Ελλειπτικές κατασκευές του *cNSCL-1*

Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ελλειπτικές μορφές του γονιδίου *cNSCL-1* της όρνιθας κλωνοποιημένες στο φορέα pBxGI στις θέσεις EcoRI/BamHI έτσι ώστε τα τμήματα του *cNSCL-1* να είναι σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού ενεργοποιητή GAL4 (GAL4 DNA binding domain).



**Εικόνα 1.** Ελλειπτικές κατασκευές της κωδικής περιοχής του γονιδίου *cNSCL1* (Ονομάζονται Α-Ε).

- pG5B-luc : πλασμίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης που φέρει ανοδικά την αλληλουχία UAS (upstream activating signal), θέση πρόσδεσης του GAL4
- pUAS-tk-luc: εκτός από το UAS το συγκεκριμένο πλασμίδιο ,ανοδικά από το γονίδιο της λουσιφεράσης, φέρει θέσεις SP1 από τη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου της κινάσης της θυμιδίνης.
- pCMV-lacZ: πλασμίδιο έκφρασης της β-γαλακκοσιδάσης υπό τον CMV υποκινητή που εκφράζεται σε κύτταρα θηλαστικών.
- RSV-lacZ: πλασμίδιο έκφρασης της β-γαλακκοσιδάσης υπό τον RSV υποκινητή που εκφράζεται σε κύτταρα θηλαστικών.
- pBxGI: Φορέας που φέρει το DNA binding domain του μεταγραφικού παράγοντα GAL4.
- ME1a in PCMV-SPORT6
- 8E-box luc reporter: τετραμερές ολιγονουκλεοτιδίου που φέρει 2 E-boxes (CACCTG) καθοδικά του hsp70 υποκινητή, στο φορέα pGL3
- cNSCL-1 in pcDNA3

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η διερεύνηση του ρόλου του NSCL-1 και η χαρτογράφηση της ενεργοποιητικής περιοχής του, γίνεται μέσω τριών διαφορετικών συστημάτων όπου χρησιμοποιούνται τα γονίδια αναφοράς της λουσιφεράσης και της β-γαλακτοσιδάσης. Παρακάτω αναλύονται τα συστήματα, καθώς και τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτά.

### Σύστημα 1<sup>ο</sup>: GAL4-UAS

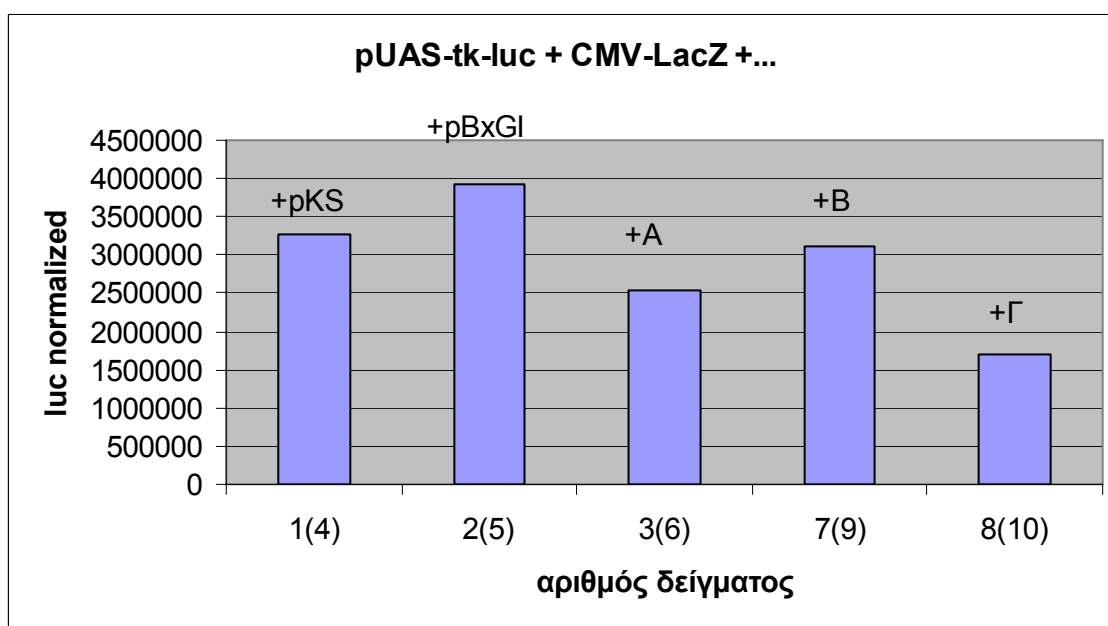
Στο σύστημα αυτό, χρησιμοποιείται πλασμίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης που φέρει ανοδικά, την αλληλουχία πρόσδεσης UAS του μεταγραφικού ενεργοποιητή GAL4 του σακχαρομύκητα. Θεωρητικά, αν ένα μόριο έχει ενεργοποιητική δράση και είναι σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης του GAL4 (GAL4 DNA binding domain), θα πρέπει να προκαλέσει ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης

### Πείραμα 1<sup>ο</sup>

Τα παρακάτω αποτελέσματα προκύπτουν από το μέσο όρο δυο ανεξάρτητων πειραμάτων τα οποία πραγματοποιήθηκαν σε τρυβλία 6 θέσεων. Για τη διαμόλυνση κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκε 1 μg από το κάθε πλασμίδιο, αλλά η συνολική ποσότητα DNA διατηρήθηκε σταθερή στα 3μg προσθέτοντας το πλασμίδιο pBluescript. Παρακάτω φαίνεται πίνακας με τις ποσότητες και το είδος των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα.

Δείγμα	pUAS-tk-luc	CMV-LacZ	pBluescript	A	B	Γ	pBxGI
1(4)	1μg	1μg	1μg	-	-	-	-
2(5)	1μg	1μg	-	-	-	-	1μg
3(6)	1μg	1μg	-	1μg	-	-	-
7(9)	1μg	1μg	-	-	1μg	-	-
8(10)	1μg	1μg	-	-	-	1μg	-

Ο αριθμός μέσα και έξω από την παρένθεση που φαίνεται στον παραπάνω πίνακα αντιπροσωπεύει δυο όμοια δείγματα ενός πειράματος. Στο διάγραμμα που ακολουθεί φαίνονται οι «κανονικοποιημένες» τιμές ενεργοποίησης του γονιδίου της λουσιφεράσης για τα παραπάνω δείγματα.



Όπως προκύπτει από το διάγραμμα, η διαμόλυνση με οποιαδήποτε κατασκευή του NSCL-1 (A, B ή Γ) προκαλεί μείωση της ενεργοποίησης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, όπου χρησιμοποιείται ο φορέας pBxGI. Η μεγαλύτερη μείωση ( 57%) παρατηρείται με την προσθήκη της κατασκευής Γ (περιλαμβάνει τις b', basic, HLH περιοχές του cNSCL-1 στον pBxGI) ενώ η μικρότερη μείωση (20%) συμβαίνει με την προσθήκη της κατασκευής B (περιλαμβάνει το αμινοτελικό μόνο τμήμα του cNSCL-1 στον pBxGI). Η διαμόλυνση με την κατασκευή A (πλήρες cDNA του cNSCL-1 στον pBxGI) προκαλεί μείωση της ενεργοποίησης συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου κατά 35%.

### Πείραμα 2<sup>ο</sup>

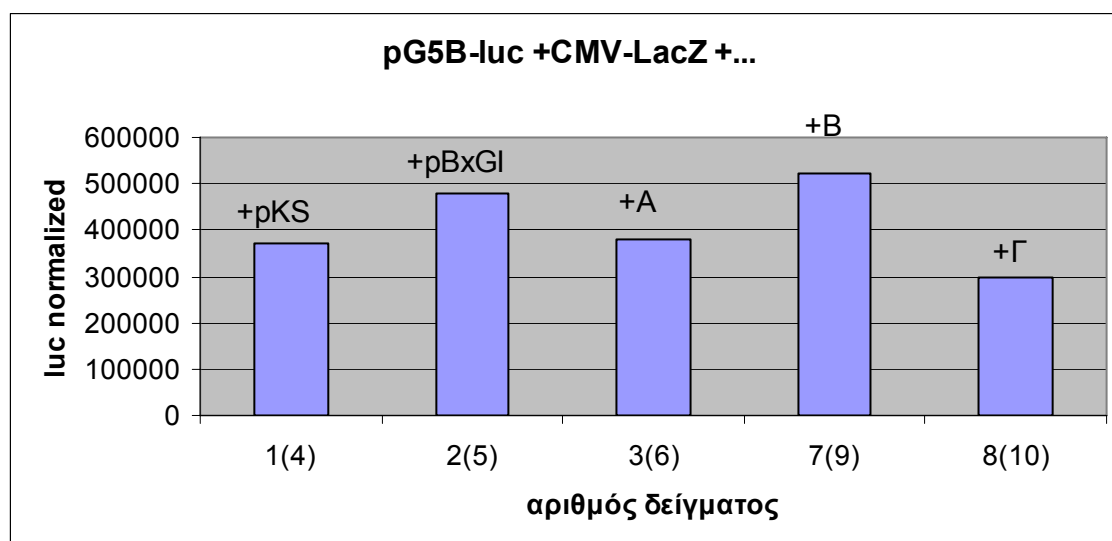
Η διαφορά του πειράματος αυτού σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα είναι ότι χρησιμοποιείται το πλασμίδιο pG5B-luc το οποίο σε αντίθεση με το

ρUAS-tk-luc δε φέρει ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης περιοχή ρύθμισης του γονιδίου της κινάσης της θυμιδίνης. Οι διαμολύνσεις έγιναν σε τρυβλία 6 θέσεων.

Ακολουθεί πίνακας με τις ποσότητες και το είδος των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα.

δείγμα	ρG5B-luc	CMV-LacZ	ρBluescript	A	B	Γ	ρBxGI
1(4)	1μg	1μg	1μg	-	-	-	-
2(5)	1μg	1μg	-	-	-	-	1μg
3(6)	1μg	1μg	-	1μg	-	-	-
7(9)	1μg	1μg	-	-	1μg	-	-
8(10)	1μg	1μg	-	-	-	1μg	-

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το μέσο όρο δυο ανεξάρτητων πειραμάτων.



Στο πείραμα αυτό, φαίνεται ότι η προσθήκη των κατασκευών A και Γ μειώνουν την ενεργοποίηση σε σχέση με το δείγμα ελέγχου 2(5) κατά 21 και 37% αντίστοιχα. Αντίθετα, η διαμόλυνση με την κατασκευή B προκαλεί μικρή αύξηση στην ενεργοποίηση, περίπου 8% σε σχέση με το δείγμα 2(5).



## Σύστημα 2<sup>ο</sup> : 8Ebox luc reporter, ME1a

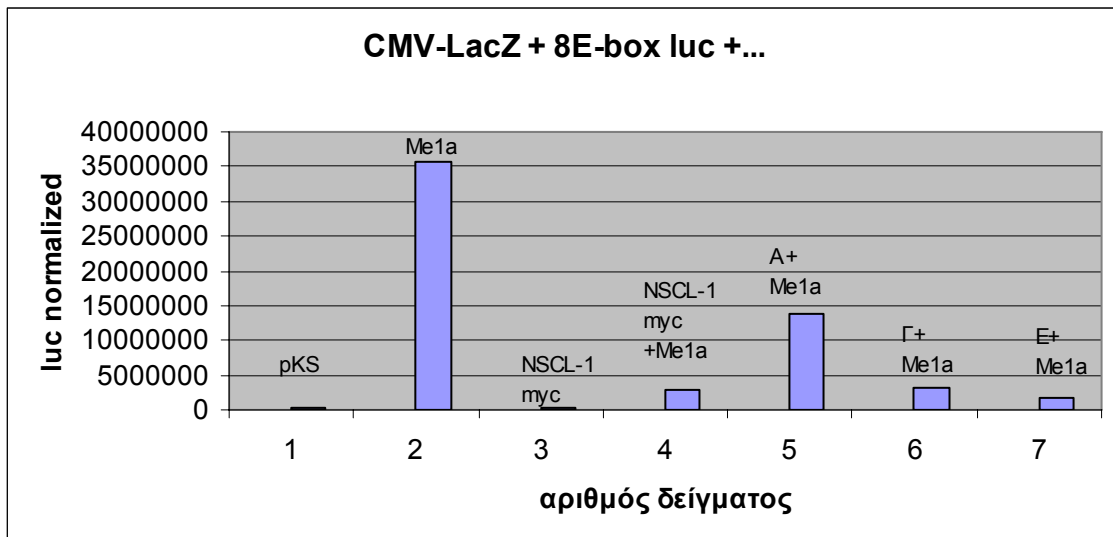
Στο σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο αναφοράς που έφερε 8 E-boxes ( CACCTG) ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης. Η διαμόλυνση έγινε σε συνδυασμό με τις κατασκευές A, Γ , E, και το πλασμίδιο *Me1a in pCMV-sport6*. Το ME1a είναι γνωστό ότι σχηματίζει διμερή με το NSCL-1 (Uittenbogaard, *et al*). Για το λόγο αυτό, στο συγκεκριμένο σύστημα χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι κατασκευές A, Γ , E του NSCL-1 οι οποίες φέρουν την περιοχή διμερισμού helix-loop-helix των bHLH πρωτεϊνών.

### Πείραμα 1<sup>ο</sup>

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιούνται τα πλασμίδια αναφοράς 8Ebox-luc και CMV-LacZ σε συνδυασμό με τις κατασκευές A, Γ, E και το ME1a. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε μια μόνο φορά σε τρυβλία 12 θέσεων. Ο πίνακας που ακολουθεί δείχνει τις ποσότητες και το είδος των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα.

	1 (8)	2 (9)	3 (10)	4(11)	5 (12)	6 (13)	7 (14)
CMV-lacZ	1μg	1μg	1μg	1μg	1μg	1μg	1μg
8Ebox-luc	1μg	1μg	1μg	1μg	1μg	1μg	1μg
pKS	2μg	1μg	1μg	1μg			
ME1a		1μg			1μg	1μg	1μg
cNSCL-1 myc			1μg				
«Α»					1μg		
«Γ»						1μg	
«Ε»							1μg

Ακολουθεί το διάγραμμα στο οποίο φαίνονται οι τιμές ενεργοποίησης του γονιδίου της λουσιφεράσης μετά από κανονικοποίηση.



Χαρακτηριστικό του παραπάνω πειράματος αποτελεί η μεγάλη ενεργοποίηση που προκαλεί το ME1a στο συγκεκριμένο πλασμίδιο αναφοράς, γεγονός που σημαίνει ότι έχει μεγάλη συγγένεια για το συγκεκριμένο E-box (CACCTG). Η συνδιαμόλυνση όμως του Me1a με το cNSCL-1myc ή τα A, Γ, E έχει ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση της ενεργοποίησης. Η μικρότερη μείωση (61%) συμβαίνει με την προσθήκη της κατασκευής A και η μεγαλύτερη μείωση (95%) με την προσθήκη της κατασκευής E (περιλαμβάνει μόνο την bHLH περιοχή του cNSCL-1). Πιθανώς το συγκεκριμένο E-box δεν είναι κατάλληλο για την πρόσδεση των ετεροδιμερών ME1a/ NSCL-1. Η μείωση της ενεργοποίησης ίσως οφείλεται σε dominant negative δράση του NSCL-1 και των ελλειπτικών κατασκευών A, Γ, E.

### **Σύστημα 3<sup>ο</sup>: 6Ebox-luc reporter, ME1a**

Το διμερές NSCL-1/ME1a προσδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια στην αλληλουχία CAG**CAGCTG**GCA σε σχέση με άλλα E-boxes ή αλληλουχίες που τα περιβάλλουν (Uittenbogaard, *et al.*). Για το λόγο αυτό, και λόγω της αποτυχίας ενεργοποίησης του προϋπάρχοντος πλασμιδίου αναφοράς που έφερε τα E-boxes CACCTG (σύστημα 2<sup>ο</sup>) δημιουργήθηκε μια κατασκευή που φέρει την αλληλουχία CAG**CAGCTG**GCA ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης.

Το νέο αυτό πλασμίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με το Me1a και τις κατασκευές A, Γ, E του cNSCL-1, οι οποίες περιλαμβάνουν την περιοχή διμερισμού HLH. Δοκιμάστηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί στις

ποσότητες του DNA επειδή φαίνεται ότι η αναλογία των μορίων ME1a και NSCL-1 επηρεάζει την ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς (Uittenbogaard, *et al.*).

Κατασκευή πλασμιδίου αναφοράς που φέρει E-boxes μπροστά από το γονίδιο της λουσιφεράσης.

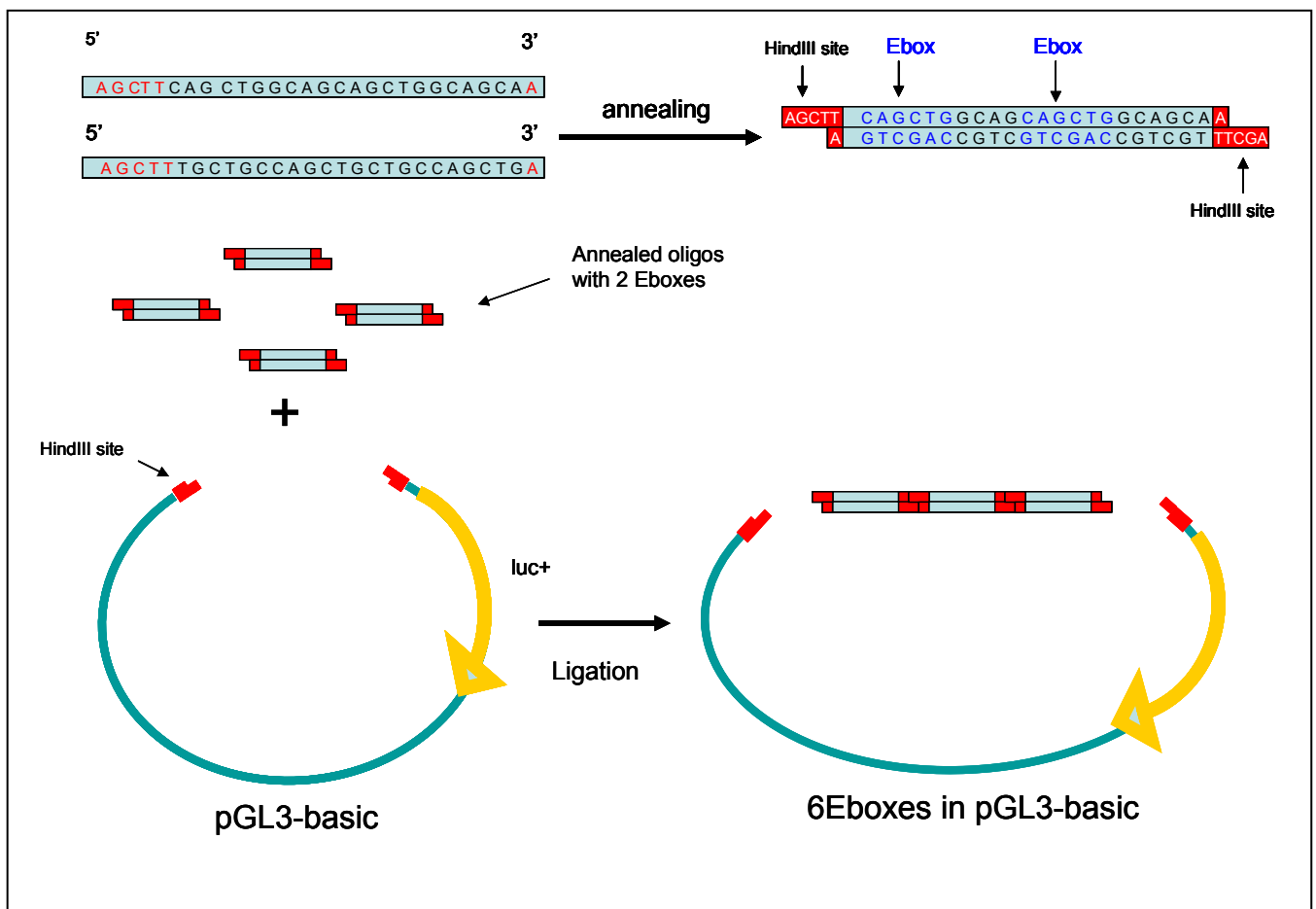
Για την κατασκευή του συγκεκριμένου πλασμιδίου αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν δυο συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία περιέχουν δυο E-boxes (CAGCTG).

Η πλήρης αλληλουχία τους είναι:

5' AGCTT**CAGCTGGCAGCAGCTGGCAGCAA** 3'

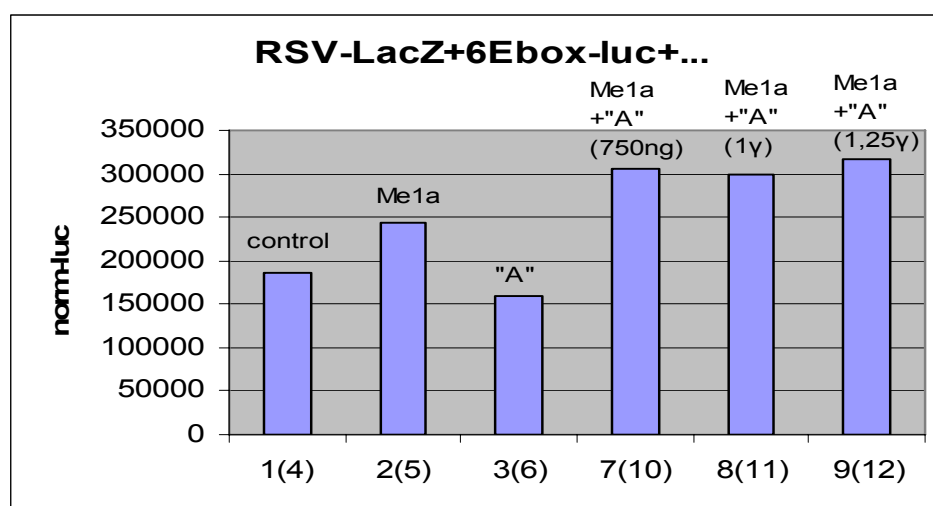
5' AGCTTTGCTGCC**CAGCTGCTGCCAGCTGA** 3'

Τα ολιγονουκλεοτίδια είναι έτσι σχεδιασμένα, ώστε μετά την υβριδοποίησή τους να σχηματίζονται άκρα HindIII. Τα ολιγομερή που δημιουργούνται φωσφορυλιώνονται με κινάση T4 και στη συνέχεια συνδέονται με το φορέα pGL3basic ο οποίος προηγουμένως έχει κοπεί με HindIII και στη συνέχεια έχει αποφωσφορυλιωθεί. Τελικά δημιουργείται ένα πλασμίδιο που φέρει 3 επαναλήψεις του ολιγομερούς, και συνεπώς 6 E-boxes. Παρακάτω φαίνεται σχηματικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε.

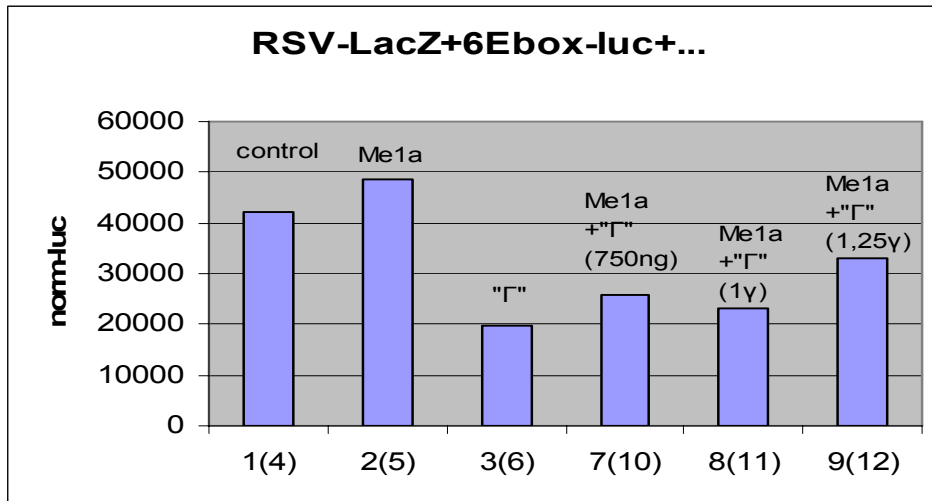


## Πείραμα 1<sup>ο</sup>

Στο παρακάτω πείραμα εξετάζεται πως τροποποιείται η ενεργοποίηση του νέου πλασμιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης 6Ebox-luc από την προσθήκη των πλασμιδίων A, Γ και Ε και από το συνδυασμό τους με το ME1a . Το πείραμα πραγματοποιήθηκε μόνο μια φορά σε τρυβλία 6 θέσεων. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 500ng από τα πλασμίδια RSV-LacZ, 6Ebox-luc και ME1a ενώ η ποσότητες των A, Γ και Ε που χρησιμοποιήθηκαν, αναγράφονται πάνω στα ξεχωριστά για το καθένα, διαγράμματα που ακολουθούν. Η συνολική ποσότητα του DNA διατηρήθηκε σταθερή προσθέτοντας όπου χρειάζεται ρBluescript.

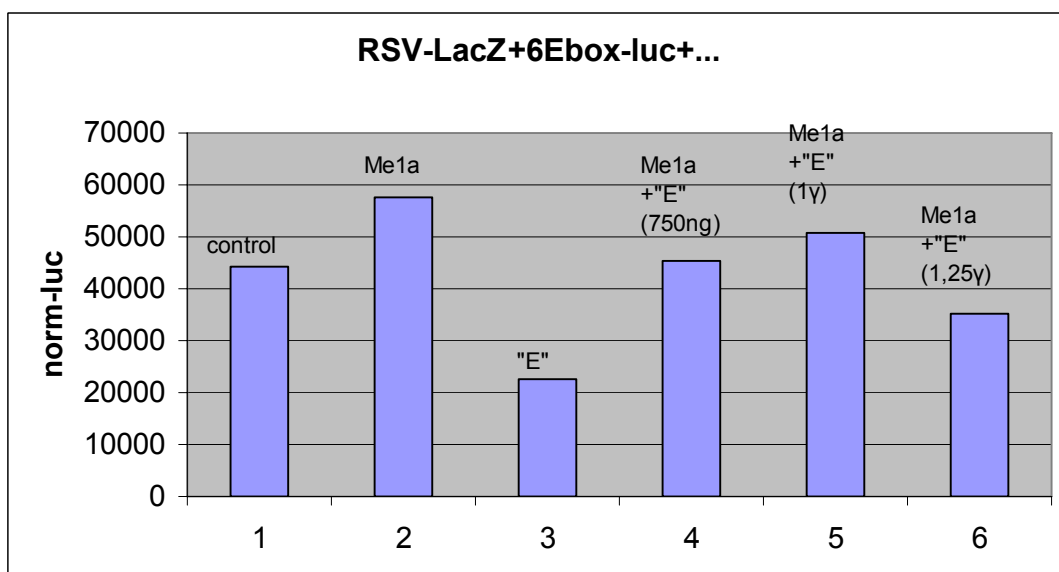


Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι το ME1a προκαλεί ενεργοποίηση του γονιδίου της λουσιφεράσης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, το οποίο έχει διαμολυνθεί μόνο με τα πλασμίδια αναφοράς RSV-LacZ και 6Ebox-luc. Αντίθετα η προσθήκη της κατασκευής A προκαλεί μικρή καταστολή της έκφρασης, 14% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου 1(4). Ωστόσο, η ταυτόχρονη προσθήκη ME1a και A προκαλεί αύξηση της ενεργοποίησης η οποία σύμφωνα με το παρόν πείραμα δε φαίνεται να επηρεάζεται, με συγκεκριμένο πρότυπο, από την ποσότητα του A. Η μέγιστη αύξηση που παρατηρείται είναι περίπου 64% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και 25% σε σχέση με το ME1a.



Στο δεύτερο διάγραμμα του πειράματος αυτού, παρουσιάζεται η μεταβολή στην ενεργοποίηση του γονιδίου της λουσιφεράσης που οφείλεται στην προσθήκη των κατασκευών ME1a, Γ ή και των δυο μαζί. Όπως και στο πρώτο διάγραμμα, η προσθήκη του ME1a προκαλεί μικρή αύξηση της ενεργοποίησης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Η κατασκευή Γ αντίθετα, προκαλεί αισθητή μείωση, 52% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου 1(4). Ο συνδυασμός των κατασκευών ME1a και Γ έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ενεργοποίησης, η οποία ελαττώνεται όταν χρησιμοποιείται η μέγιστη ποσότητα από το Γ (1,25μg) όπως φαίνεται στο δείγμα 9(12).

Στο τρίτο διάγραμμα που ακολουθεί, φαίνεται πως επηρεάζει η προσθήκη του E τη μεταβολή της ενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς.

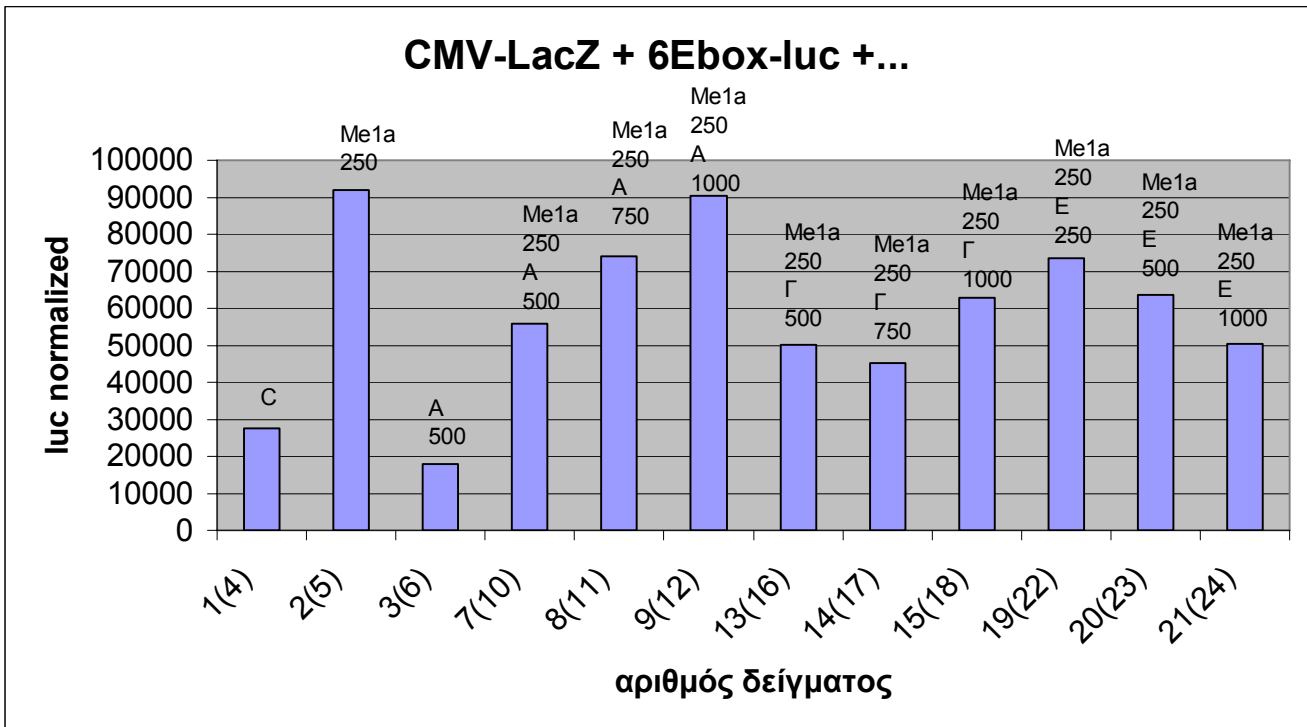


Όπως προκύπτει από τα παραπάνω διάγραμμα, η προσθήκη του ME1a προκαλεί αύξηση της ενεργοποίησης κατά 30% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ενώ η προσθήκη του E προκαλεί μείωση της ενεργοποίησης 48% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Η ταυτόχρονη προσθήκη ME1a και E προκαλεί επίσης μείωση της ενεργοποίησης η οποία μεγιστοποιείται όταν χρησιμοποιείται η μεγαλύτερη ποσότητα από το E. Έτσι, στο δείγμα 6 η μείωση είναι 40% σε σχέση με το ME1a (δείγμα 2) και 20% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

### Πείραμα 2<sup>ο</sup>

Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού προκύπτουν από το μέσο όρο δυο ανεξάρτητων πειραμάτων. Παρακάτω, απεικονίζεται σε ένα διάγραμμα πως μεταβάλλεται η ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς από το συνδυασμό διαφορετικών ποσοτήτων των A, Γ και E με το ME1a. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία 12 θέσεων. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται οι ποσότητες και το είδος των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα.

	1 (4)	2 (5)	3 (6)	7 (10)	8 (11)	9 (12)	13 (16)	14 (17)	15 (18)	19 (22)	20 (23)	21 (24)
6Ebox-luc	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng
RSV-LacZ	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng
pBlue-script	1,25 μg	1 μg	0,75 μg	500 ng	250 ng	-	500 ng	250 ng	-	500 ng	250 ng	-
Me1a	-	250 ng	-	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng	250 ng
«Α»	-	-	500 ng	500 ng	750 ng	1 μg	-	-	-	-	-	-
«Γ»	-	-	-	-	-	-	500 ng	750 ng	1 μg	-	-	-
«Ε»	-	-	-	-	-	-	-	-	-	500 ng	750 ng	1 μg



Στο συγκεκριμένο πείραμα, παρατηρείται μεγάλη αύξηση της ενεργοποίησης του γονιδίου της λουσιφεράσης που προκαλείται από το ME1a, 2,3 φορές μεγαλύτερη από το δείγμα ελέγχου. Το ίδιο επίπεδο περίπου ενεργοποίησης παρατηρείται στο δείγμα 9(12) το οποίο έχει συν-διαμολυνθεί με το ME1a και 1μg από την κατασκευή A. Η ενεργοποίηση που προκαλείται από την ταυτόχρονη προσθήκη του ME1a και του πλασμιδίου A φαίνεται να είναι ανάλογη από την ποσότητα του δευτέρου που χρησιμοποιείται. Έτσι ενώ στο δείγμα 7(10) όπου χρησιμοποιούνται 500ng από το A υπάρχει μείωση της ενεργοποίησης σε σχέση με το ME1a κατά 40%, η διαφορά στο δείγμα 8(11) όπου χρησιμοποιούνται 750ng A είναι 20% και στο δείγμα 9(12) όπου χρησιμοποιείται 1μg A, 1%.

Το πρότυπο αυτό είναι αντίστροφο με αυτό που παρατηρείται κατά την ταυτόχρονη προσθήκη ME1a και κατασκευής E. Έτσι, όσο αυξάνεται η ποσότητα του E, αυξάνεται και η μείωση της ενεργοποίησης σε σχέση με αυτή που προκαλεί το Me1a από μόνο του. Πιο συγκεκριμένα η μείωση που παρατηρείται στο δείγμα 19(22), του 20(23) και του 21(24) σε σχέση με το 2(5) είναι 20, 30 και 45% αντίστοιχα.

Όσον αφορά τη συνδιαμόλυνση του πλασμιδίου Γ με το ME1a, το πρότυπο δεν είναι απόλυτα ανάλογο. Όταν εφαρμόζεται η μεγαλύτερη ποσότητα του Γ, τότε η μείωση της ενεργοποίησης σε σχέση με το ME1a είναι η μικρότερη

(30%). Η μεγαλύτερη διαφορά ωστόσο εντοπίζεται στο δείγμα 14(17) ,όπου χρησιμοποιούνται 750ng από το Γ, και είναι της τάξης του 50%.

Αξίζει να σημειωθεί ότι και σε αυτό το πείραμα το πλασμίδιο Α προκαλεί μείωση της ενεργοποίησης σε σχέση με το ME1a και το δείγμα ελέγχου κατά 80 και 35% αντίστοιχα.



## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Οι bHLH μεταγραφικοί παράγοντες επηρεάζουν ένα μεγάλο αριθμό αναπτυξιακών διαδικασιών, επηρεάζοντας τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων, μέσω της πρόσδεσης τους σε συντηρημένες αλληλουχίες που ονομάζονται E-boxes. Για πρώτη φορά οι αλληλουχίες αυτές ταυτοποιήθηκαν στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (Staudt and Lenardo, 1991). Στη συνέχεια βρέθηκαν E-boxes σε υποκινητές και ενισχυτές ιστοειδικών γονιδίων που εκφράζονται στους μύες, στους νευρώνες και στο πάγκρεας. Η ανάμειξη των bHLH μεταγραφικών παραγόντων σε τόσες αναπτυξιακές διαδικασίες, καθιστά αναπόφευκτη την εμπλοκή τους σε σοβαρές ασθένειες, προσδίδοντας ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην έρευνα της λειτουργίας τους.

Το SCL-1 σχετίζεται με την ανάπτυξη T-ALL (T-cell acute lymphoblastic) λευχαιμίας. Το NSCL-1, το οποίο ταυτοποιήθηκε βάση της ομολογίας του με το SCL-1, εκφράζεται στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα. Το NSCL-1 *-/-* ποντίκι ωστόσο, δε παρουσιάζει καμία νευρολογική δυσμορφία αλλά παρουσιάζει προδιάθεση για αρρυθμία, λόγω κάποιας δυσλειτουργίας του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Το γεγονός ότι ο φαινότυπος του knock out του NSCL-1 δεν είναι ιδιαίτερα σοβαρός, οφείλεται στο ότι δρα συνεργατικά με το NSCL-2, με το οποίο παρουσιάζει μεγάλη ομολογία και παραπλήσιο πρότυπο έκφρασης με το NSCL-1. Πράγματι, τα διπλά για τα γονίδια NSCL-1 και NSCL-2 knock out ποντίκια πεθαίνουν στη γέννηση έχοντας πολύ μειωμένο αριθμό GnRH-1 (gonadotropin releasing hormone) νευρώνων (Kruger *et al.*, 2004).

Η παρούσα εργασία συμβάλλει στη διερεύνηση του ρόλου του NSCL-1. Στο παρελθόν έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις για το σκοπό αυτό, όπως ανάλυση του προτύπου έκφρασης, πειράματα miss-expression, ανίχνευση των μορίων με τα οποία προσδένεται και μελέτη της ενεργοποίησης που προκαλεί.

Το NSCL-1, όπως και όλες οι bHLH πρωτεΐνες της τάξης II, αλληλεπιδρά με E-πρωτεΐνες, τις E12, E47 και ME1a. Επιπλέον αλληλεπιδρά με τις LIM-only LMO-1, LMO-2, LMO-4 και το CBP (Bao *et al.*, 2000, Manetopoulos *et al.*, 2003, Uittenbogaard *et al.*, 1999). Φαίνεται ότι η πρόσδεση του NSCL-1

με τα παραπάνω μόρια, τροποποιεί τη δράση του, προκαλώντας άλλες φορές καταστολή και άλλες φορές ενεργοποίηση της μεταγραφής.

Αν και το NSCL-1 είναι ίσως το μόνο μόριο της τάξης II των bHLH πρωτεϊνών που σχηματίζει ομοδιμερή, παρουσιάζει από μόνο του φτωχή ενεργοποιητική δράση (Manetopoulos *et al*, 2003). Διαθέτει εξειδίκευση μόνο για μια αλληλουχία πρόσδεσης στο DNA, η οποία αποτελείται από 18 νουκλεοτίδια και περιλαμβάνει το E-box CAGCTG (Brown *et al.*, 1994).

Το NSCL-1 όταν συν-εκφράζεται με το E47, προκαλεί μείωση της ενεργοποίησης σε σχέση με αυτή που προκαλεί το E47 μόνο του, όταν χρησιμοποιείται πλασμίδιο αναφοράς που φέρει εις τριπλούν το ολιγομερές πρόσδεσης του NSCL-1 ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης (Manetopoulos *et al*, 2003). Αντίθετα, το διμερές ME1a/NSCL-1 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για το ολιγομερές CAG**CAGCTG**GCA (διαφορετικό από αυτό που προσδένεται το ομοδιμερές NSCL-1) και προκαλεί σημαντική ενεργοποίηση ενός γονιδίου αναφοράς που βρίσκεται καθοδικά του παραπάνω ολιγομερούς. Το σύμπλοκο NSCL-1/ME1a προκαλεί μεγαλύτερη ενεργοποίηση σε σχέση με αυτή που προκαλεί το ME1a μόνο του (Uittenbogaard *et al.*, 1999).

Σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα έχειδειχθεί, ότι η δράση του NSCL-1 καταστέλλεται από το LMO-4 στο ποντίκι. Αντίθετα, το LMO-3 ενισχύει τη δράση του XNSCL-1 στο *Xenopus* (Bao *et al.*, 2000). Η αλληλεπίδραση των LIM-only παραγόντων και bHLH πρωτεϊνών έχει μελετηθεί διεξοδικά στην περίπτωση του SCL-1, με βάση το οποίο ταυτοποιήθηκε το NSCL-1. Η αλληλεπίδραση του SCL-1 με τα LMO-1 και LMO-2 παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω του σημαντικού τους ρόλου στην αιμοποίηση και τη δημιουργία λευχαιμίας T λεμφοκυττάρων. Οι πρωτεΐνες LMO δεν προσδένονται στο DNA, αλλά λειτουργούν ως γέφυρες δημιουργίας πολυμερών πρωτεϊνικών συμπλόκων (Wadman *et al.*, 1996).

Παρά την πληθώρα των μελετών που έχουν γίνει μέχρι στιγμής για το NSCL-1, δεν υπάρχουν ξεκάθαρα δεδομένα για τον ακριβή τρόπο δράσης του ο οποίος διαφοροποιείται, ανάλογα με το σύστημα που χρησιμοποιείται. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η μεταγραφική δραστηριότητα του NSCL-1, και έγινε προσπάθεια για τη γενική χαρτογράφηση της ενεργοποιητικής περιοχής του.

Χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά συστήματα που βασίζονται στη ενεργοποίηση του γονιδίου της λουσιφεράσης της *Renilla*. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων τα κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν με πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης.

### **Σύστημα 1<sup>ο</sup>: GAL4- UAS**

Στο σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε το cNSCL-1 και 2 ελλειπτικές μορφές του (B και Γ), σε σύντηξη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα του σακχαρομύκητα GAL4. Οι κατασκευές αυτές συνδιαμολύνθηκαν σε κύτταρα HEK 293 με δυο διαφορετικά πλασμίδια αναφοράς που έφεραν το γονίδιο της λουσιφεράσης καθοδικά της περιοχής UAS. Στο πρώτο πείραμα, όπου χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο αναφοράς pUAS-tk-luc παρατηρούμε ότι η ενεργοποίηση που προκύπτει σε όλα τα δείγματα είναι γενικότερα πολύ μεγαλύτερη από την ενεργοποίηση που προκύπτει στο δεύτερο πείραμα, όπου χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pG5B-luc. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το πρώτο πλασμίδιο φέρει SP1 θέσεις, με αποτέλεσμα το γονίδιο της λουσιφεράσης να εκφράζεται σε κύτταρα θηλαστικών.

Ωστόσο, το πρότυπο της ενεργοποίησης που προκύπτει από τα δυο πειράματα ομοιάζει αρκετά. Παρατηρούμε ότι ολόκληρο το μόριο cNSCL-1 (κατασκευή A) προκαλεί μικρή καταστολή στην ενεργοποίηση σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Η κατασκευή Γ, που αποτελείται από τις b', basic και HLH περιοχές του cNSCL-1, προκαλεί ακόμη μεγαλύτερη καταστολή σε σχέση με ολόκληρο το cNSCL-1. Η μόνη διαφορά των δυο πειραμάτων βρίσκεται στη συνδιαμόλυνση με την κατασκευή B (περιλαμβάνει την αμινοτελική περιοχή του cNSCL-1) η οποία στο πρώτο πείραμα δίνει μεγαλύτερη ενεργοποίηση από τα A και Γ αλλά όχι από το δείγμα ελέγχου, ενώ στο δεύτερο πείραμα δίνει ενεργοποίηση μεγαλύτερη από όλα τα δείγματα. Παρόλα αυτά το πρότυπο ενεργοποίησης των A,B και Γ μεταξύ τους είναι όμοιο και στα δυο πειράματα. Η διαφορά που προκύπτει μπορεί αν οφείλεται στο γεγονός ότι το πρώτο πλασμίδιο δίνει είδη μεγάλη ενεργοποίηση από μόνο του. Για τη διερεύνηση του θέματος θα πρέπει να γίνουν περισσότερα πειράματα.

Στο σύστημα αυτό, φαίνεται ότι το cNSCL-1 έχει μικρή κατασταλακτική δράση. Κάτι τέτοιο ωστόσο, δε συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες όπου το NSCL-1 αναφέρεται ως φτωχός ενεργοποιητής (Manetopoulos *et al*, 2003). Η διαφορά στα αποτελέσματα ίσως να οφείλεται στη χρήση διαφορετικού συστήματος αλλά ίσως και στο γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται το NSCL-1 της όρνιθας και όχι του ποντικού. Παρά τη μεγάλη ομολογία των δυο ορθόλογων στην bHLH περιοχή (98%) υπάρχει διαφορά στην αμινοτελική περιοχή, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετική συμπεριφορά. Φαίνεται ότι για την κατασταλακτική δράση του cNSCL-1, προϋπόθεση είναι ο σχηματισμός διμερούς αφού και η κατασκευή Γ που φέρει την περιοχή διμερισμού, προκαλεί καταστολή σε αντίθεση με την κατασκευή Β. Η κατασταλακτική δράση του cNSCL-1 στο σύστημα αυτό έχει επιβεβαιωθεί και από παλαιότερα πειράματα σε διαφορετική κυτταρική σειρά (HEPG2). Η δημιουργία ομοδιμερών ή ετεροδιμερών των κατασκευών Α και Γ με ενδογενείς πρωτεΐνες, μπορεί να προκαλεί την επιστράτευση άλλων παραγόντων που να έχουν κατασταλακτική δράση.

## **Σύστημα 2<sup>ο</sup>: 8Ebox-luc reporter, Me1a**

Σε προηγούμενη μελέτη (Uittenbogaard *et al.*, 1999), αναφέρεται ότι το σύμπλοκο ME1a/NSCL-1 έχει ενεργοποιητική δράση, και διαθέτει μεγαλύτερη συγγένεια για το ολιγονουκλεοτίδιο CAG**CAGCTGG**CA. Παρά το γεγονός αυτό, στο δεύτερο σύστημα της μελέτης αυτής, δοκιμάστηκε ένα προϋπάρχων πλασμίδιο αναφοράς που έφερε 8 φορές το Ebox CACCTG ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης. Στο πείραμα αυτό, έγινε συνδιαμόλυνση του πλασμιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης, με το cNSCL-1 και τις ελλειπτικές κατασκευές του Γ και Ε που φέρουν την περιοχή διμερισμού HLH, και το ME1a. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε επιπλέον η κατασκευή cNSCL-1myc in pcDNA3 επειδή σε αντίθεση με τις άλλες κατασκευές του cNSCL-1 δε φέρει την περιοχή GAL4.

Το πείραμα αυτό έδειξε πολύ μεγάλη ενεργοποίηση που προκαλεί η διαμόλυνση με το ME1a. Αυτό σημαίνει ότι το ομοδιμερές της πρωτεΐνης αυτής διαθέτει πολύ μεγάλη συγγένεια για το E-box CACCTG. Η συνδιαμόλυνση των κατασκευών ME1a και cNSCL-1myc, Α, Γ ή Ε,

προκάλεσε πολύ μεγάλη μείωση στην ενεργοποίηση συγκρίνοντας με την ενεργοποίηση που προκαλεί το ME1a μόνο του. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται πιθανότατα σε dominant negative δράση των κατασκευών του cNSCL-1 τα οποία ενώ διμερίζονται με το ME1a δε μπορούν να προσδεθούν στο DNA στο συγκεκριμένο E-box.

### **Σύστημα 3<sup>ο</sup>: 6E-box luc reporter, ME1a**

Η αποτυχία ενεργοποίησης του προηγούμενου συστήματος οδήγησε στην ανάγκη δημιουργίας ενός νέου πλασμιδίου αναφοράς που να φέρει ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης την αλληλουχία CAGCAGCTGGCA. Το πλασμίδιο που τελικά δημιουργήθηκε από κλωνοποίηση του κατάλληλου ολιγονουκλεοτιδίου στον φορέα pGL3-basic, έφερε 6E-boxes CAGCTG ανοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης. Η παραπάνω κατασκευή χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με το ME1a και το cNSCL-1 ή τις ελλειπτικές κατασκευές του Γ και Ε για τη διαμόλυνση κυττάρων HEK 293.

Στο πρώτο πείραμα του συστήματος αυτού, παρουσιάζονται σε διαφορετικά διαγράμματα οι ενεργοποιήσεις που προκαλούν οι κατασκευές Α, Γ και Ε με ή χωρίς το ME1a. Στο πείραμα αυτό, οι κατασκευές Α, Γ και Ε προκαλούν καταστολή της ενεργοποίησης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα του πρώτου συστήματος GAL-4/UAS που χρησιμοποιήθηκε. Τη μεγαλύτερη καταστολή προκαλεί η κατασκευή Γ και τη μικρότερη η κατασκευή Α. Παρά την ομοιότητα με τα προηγούμενα αποτελέσματα, σε αυτό το σύστημα, η μείωση της ενεργοποίησης θα μπορούσε να οφείλεται σε dominant negative δράση των κατασκευών Α, Γ και Ε που μπορεί να δεσμεύονται σε ενδογενείς bHLH πρωτεΐνες και να εμποδίζουν την ενεργοποίηση του γονιδίου της λουσιφεράσης. Η εκδοχή αυτή είναι πιθανότερο να ισχύει για τις κατασκευές Γ και Ε όπου βλέπουμε ότι με προσθήκη του ME1a υπάρχει πάλι καταστολή της ενεργοποίησης και συνεπώς οι Γ και Ε κατασκευές έχουν dominant negative δράση και για το ME1a. Αντιθέτως, ο συνδυασμός του Α (cNSCL-1 in pBxGI) με το ME1a προκαλεί μικρή αύξηση της ενεργοποίησης, γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενα αποτελέσματα (Uittenbogaard et al., 1999). Παρόλα αυτά η ενεργοποίηση δεν είναι τόσο μεγάλη, πιθανώς γιατί

συνδυάζονται πρωτεΐνες που προέρχονται από διαφορετικούς οργανισμούς, το Me1a του ποντικού και το NSCL-1 της όρνιθας. Άλλωστε, η διαφορετική συμπεριφορά των κατασκευών Α και Γ, Ε οφείλεται στην απουσία από τα δεύτερα της αμινοτελικής περιοχής, η οποία παρουσιάζει και τη μεγαλύτερη διαφορά συγκρίνοντας το NSCL-1 του ποντικού και της όρνιθας.

Στο δεύτερο πείραμα του συστήματος παρουσιάζεται στο ίδιο διάγραμμα, πως μεταβάλλεται η ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς συνδυάζοντας διαφορετικές ποσότητες των Α,Γ και Ε με το ME1a. Παρά το γεγονός ότι στο συγκεκριμένο πείραμα ο συνδυασμός Α και ME1a δε ξεπερνά την ενεργοποίηση που προκαλεί το Me1a από μόνο του, ακολουθεί ένα συγκεκριμένο πρότυπο: όσο αυξάνεται η ποσότητα του Α τόσο αυξάνεται η ενεργοποίηση που προκαλεί μαζί με το ME1a. Ανάλογα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και παλαιότερα (Uittenbogaard et al., 1999). Αντίστροφα, όσο αυξάνεται η ποσότητα του Ε, τόσο μειώνεται η ενεργοποίηση του γονιδίου της λουσιφεράσης όταν αυτό συνδυάζεται με το ME1a αποτέλεσμα που επιβεβαιώνει τη dominant negative της κατασκευής Ε. Η συνδιαμόλυνση της κατασκευής Γ με το ME1a, δεν ακολουθεί κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο που να εξαρτάται από την ποσότητα του Γ, προκαλεί ωστόσο μείωση της ενεργοποίησης. Το γεγονός ότι η μικρότερη μείωση ενεργοποίησης συμβαίνει στο δείγμα με τη μεγαλύτερη ποσότητα Γ, μπορεί να σημαίνει ότι η b' περιοχή (η οποία δεν περιλαμβάνεται στην κατασκευή Ε) μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην ενεργοποίηση.

Από τα παραπάνω δεδομένα είναι προφανές ότι υπάρχει κάτι στην αμινοτελική περιοχή του cNSCL-1 (αν και δεν έχει αναγνωριστεί μέχρι στιγμής κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο) που να προκαλεί την ενεργοποίηση όταν συνδυάζεται με το ME1a. Φαίνεται ότι η b'HLLH περιοχή έχει *in vitro* κατασταλτική δράση η οποία στο τρίτο σύστημα μπορεί να εξηγηθεί ως dominant negative φαινόμενο αλλά όχι και στο σύστημα Gal4/UAS όπου οι ενδογενείς bHLLH πρωτεΐνες δεν μπορούν να προκαλέσουν ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς. Ίσως ο σχηματισμός ομοδιμερών ή ετεροδιμερών των κατασκευών Γ και Ε με ενδογενείς πρωτεΐνες να προκαλεί την επιστράτευση καταστολέων που να εμποδίζουν τη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς.

Αναμφισβήτητα για τη διερεύνηση του ρόλου του NSCL-1 ως μεταγραφικό ενεργοποιητή ή καταστολέα απαιτούνται περαιτέρω πειράματα. Διαφορετικές

ελλειπτικές κατασκευές του NSCL-1 του ποντικού πρέπει να δοκιμαστούν σε συνδυασμό με το ME1a και το E47. Η εύρεση γονιδίων στόχων του NSCL-1 και η in vivo μελέτη τους σε knock out ποντίκια του NSCL-1 ίσως αποτελεί μια εναλλακτική προσέγγιση για τη μελέτη της λειτουργίας του ως ενεργοποιητή ή καταστολέα.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Bao, J., Talmage, DA., Role, LW. Gautier, J. Regulation of neurogenesis by interactions between HEN1 and neuronal LMO proteins. *Development* (2000) 127;425-435
- 2) Brown, L., Baer, R. *Hen1* encodes a 20-kilodalton phosphoprotein that binds an extended E-box motif as a heterodimer. *Molecular and Cell Biology* (1994) 14;1245-1255
- 3) Brown, L., Espinosa, R., Le Beau, M., Siciliano, MJ., Baer, R. *HEN1* and *HEN2* : A subgroup of basic helix-loop-helix genes that are co-expressed in human a neuroblastoma. *PNAS USA* (1992) 89;8492-8496
- 4) Cogliati, T., Good, DJ., Haigney, M., Delgado-Romero, P., Eckhaus, MA., Koch, W., Kirsch, IR. Predisposition to arrhythmia and autonomic dysfunction in *Nhlh-1* deficient mice. *Molecular and Cellular Biology* (2002) 22;4977-4983
- 5) Ellenberger, T., Fass, M. Arnaud and S. Harrison. Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region Helix-loop-helix dimer. *Genes Dev.* 8;970-980 (1994)
- 6) Gobel, V., Lipkowitz, S., Kozak, CA., Kirsch, IR. *NSCL-2*: a basic helix-loop-helix gene expressed in early neurogenesis. *Cell Growth and differentiation.* (1992) 3;143-148
- 7) Kruger, M., Braun, T. The neuronal basic helix-loop-helix transcription factor NSCL-1 is dispensable for normal neuronal development. *Molecular and Cellular Biology* (2002) 22;792-800
- 8) Kruger, M., Ruschke, K., Braun, T. NSCL-1 and NSCL-2 synergistically determine the fate of GnRH-1 neurons and control *neocdin* gene expression. *EMBO journal* (2004) 1-12
- 9) Lee, JE. Basic helix-loop-helix genes in neuronal development. *Cur. Opin. In Neurobiol.* (1997) 7;13-20
- 10) Li, CM., Yan, RT., Wang, SZ. Misexpression of a bHLH gene, *cNSCL-1*, results in abnormal brain development. *Developmental Dynamics* (1999) 215;238-247
- 11) Li, CM., Yan, RT., Wang, SZ. Misexpression of *cNSCL-1* disrupts retinal development. *Molecular and Cellular Neuroscience* (1999) 14;17-27



- 12) Lipkowitz, S., Gobel, V., Varterasian, ML., Nakahara, K., Tchorz, K., Kirsch, IR. A comparative structural characterization of the human *NSCL-1* and *NSCL-2* genes. *The Journal Of Biological Chemistry* (1992) 267;21065-21071
- 13) Manetopoulos, C., Hansson, A., Karlsson, J., Jonsson, JI., Axelson, H. The Lim-only protein LMO4 modulates the transcriptional activity of HEN-1. *Biochem. Biophys. Research Commun.* (2003) 307;891-899
- 14) Massari, M.E. and Murre, C. Helix-loop-helix proteins: Regulators of transcription in eukaryotic organisms. *Mol.Cell.Biol.* 20;429-440 (2000)
- 15) Murdoch, JN., Eddleston, J., Leblond-Bourget, N., Stanier, P., Copp, A. Sequence and expression analysis of *Nhlh1*: A basic helix-loop-helix gene implicated in neurogenesis. *Developmental genetics* (1999) 24;165-177
- 16) Neuman, K., Nornes, Ho., Neuman, T. Helix-loop-helix transcription factors regulate Id2 gene promoter activity. *FEBS* (1995) 374;279-283
- 17) Staudt, L., and Lonardo, M. Immunoglobulin gene transcription. *Annu. Rev. Immunol.* 9:373-398.
- 18) Suzuki, Y., Tsugura, E., Yajima, T., Takede, M. Expression of bHLH factors *NSCL-1* and *NSCL-2* in the mouse olfactory system. *Chem. Senses* (2003) 28;603-608
- 19) Uittenbogaard, M., Peavy, DR., Chiaramello, A. Expression of the bHLH gene *NSCL-1* suggests a role in regulating cerebellar granule cell growth and differentiation. *Journal of Neuroscience Research* (1999) 57;770-781.
- 20) Wadman, A.J., Osada, H., Grutz, G.G., Agulnick, A.D., Westphal, H., Foster, A. and Rabbits, T.H. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL-1, E47, GATA-1 and Ldb1/NL1 proteins. *EMBO J.* 16;3145-3157 (1994)
- 21) Yan, RT., Wang, SZ. Embryonic abnormalities from misexpression of *cNSCL-1*. *Biochem. Biophys. Research Commun.* (2001) 287;949-955