

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΣΕΡΙΝΗΣ ΤΗΣ BACH1 ΟΡΙΖΕΙ
ΤΟΝ ΥΠΟΠΥΡΗΝΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΗΣ»



ΜΠΑΚΟΓΙΑΝΝΗ ΣΟΦΙΑ

Α.Μ.: 1690

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ Γ. ΣΠΗΛΙΑΝΑΚΗΣ

ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2012
ΗΡΑΚΛΕΙΟ

*Στους γονείς μου και στον αδερφό μου,
στους οποίους χρωστάω όλα όσα έχω καταφέρει μέχρι σήμερα...*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς όλους όσους ήταν κοντά μου κάθε ένας με τον τρόπο του όχι μόνο κατά την συγγραφή αυτής της πτυχιακής εργασίας αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου στην Κρήτη.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Σπηλιανάκη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του, για τις συμβουλές του, τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο και κυρίως για τη διάθεση που είχε πάντα να με ακούσει. Ο δυναμισμός, η εργατικότητα και η επιμονή στην λεπτομέρεια είναι στοιχεία της προσωπικότητάς του που με γοητεύουν και με προκαλούν να γίνω όλο και καλύτερη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον άμεσο επόπτη μου και διδακτορικό φοιτητή Πέτρο Τζέρπο, με τον οποίο περνούσα τον περισσότερο χρόνο της ημέρας κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την καθοδήγηση, τις συμβουλές, την υπομονή, την επιμονή και τις γνώσεις που μου μετέδωσε σε όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την ευχάριστη συνεργασία και για τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Πιο συγκεκριμένα θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην κ. Μ. Καφετάκη, στην Καλλίνα Στρατήγη, στη Χρύσα Δεληγιάννη, στον Ταξιάρχη Παπακωνσταντίνου και στη Στέλλα Μπάλιου.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τη συμβολή του Γιώργου Παναγόπουλου, ο οποίος μπορεί να μην ήταν από την αρχή της παρουσίας μου στο εργαστήριό μας, αλλά από την πρώτη κιόλας μέρα έδωσε μία άλλη ζωντάνια στο εργαστήριο και με το χιούμορ του μας έδινε δύναμη και διάθεση. Ο Γιώργος Παναγόπουλος και η Σοφία Γιαλεσάκη, τα δύο άτομα που γνώρισα κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, είναι άνθρωποι με τους οποίους δέθηκα ιδιαίτερα το τελευταίο διάστημα και ήθελα να τους ευχαριστήσω από καρδιάς για την ευχάριστη παρέα τους καθώς και για τις συμβουλές τους.

Επίσης ευχαριστώ τη Δέσποινα Μπαρμπούρη για την αυθεντικότητα, την αντοχή καθώς και την πολύτιμη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κατερίνα Τσουρούλα και τον κ. Γ. Βρέντζο για τη βοήθεια και την παροχή κυττάρων όποτε τα χρειαζήθηκα.

Ιδιαίτερη μνεία οφείλω στην Καλλιόπη Γκούσκου για το ενδιαφέρον της, τις καθοριστικές συμβουλές της και τον πολύτιμο χρόνο που μου διέθετε πάντα.

Υπάρχουν κάποιοι άνθρωποι που η πορεία τους στο χώρο της επιστήμης είναι παραδειγματική. Εξοπλισμένοι με αγάπη, αφοσίωση, υπομονή και επιμονή, έχουν προάγει τον επιστημονικό τομέα. Για μένα αποτελεί ευτύχημα που βρέθηκα στον δρόμο μου και είχα την τιμή να τους γνωρίσω. Ο κ. Ε. Μυλωνάκης, η κ. Β. Πανουτσακοπούλου, ο κ. Χ. Τσατσάνης, ο κ. Δ. Ηλιόπουλος, ο κ. Γ. Νασιούλας και ο κ. Π. Κοσμίδης έχουν καταφέρει μέσω των επιστημονικών και ερευνητικών τους ενδιαφερόντων να μου μεταβιβάσουν αυτή τους την αγάπη για την επιστήμη και να με προτρέψουν να «δοκιμαστώ» σε αυτό το χώρο.

Η συμβολή των καθηγητών μου κ. Ζ. Κοκκινάκη, κ. Σ. Πουλόπουλου, κ. Π. Κόλλια και κ. Χ. Μαυρίκη ήταν καθοριστική της βασικής μου εκπαίδευσης. Τους ευχαριστώ πραγματικά για ό,τι έχουν κάνει για μένα, αλλά και για τη στήριξη που μου παρέχουν ακόμα.

Ακόμα, θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμησή μου σε όλους τους φίλους μου, εντός και εκτός Ελλάδας και τους συγγενείς μου, οι οποίοι με στηρίζουν, με συμβουλεύουν και είναι δίπλα μου ο καθένας με το δικό του μοναδικό τρόπο.

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου και στον αδερφό μου, χωρίς την στήριξη των οποίων δεν θα είχα καταφέρει να υλοποιήσω τα όνειρά μου και τους στόχους μου. Η αδιάλειπτη αγάπη τους, η φροντίδα, οι συμβουλές, η κατανόηση και η παρότρυνσή τους ήταν χαρακτηριστικά καίριας σημασίας για τη μέχρι τώρα πορεία μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
1. ABSTRACT	6
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
2.1 CD4 ⁺ T λεμφοκύτταρα	7
2.2 Πυρηνική οργάνωση	9
2.2.1 Πυρηνική διαμερισματοποίηση	9
2.2.2 Διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις	10
2.3 Διαφοροποίηση των T κυττάρων βοηθών	12
2.3.1 Μοριακοί μηχανισμοί διαφοροποίησης των T _H 1/ T _H 2 κυττάρων	12
2.3.2 Ρυθμιστικά στοιχεία του γενετικού τόπου T _H 2	14
2.3.3 Οι ρυθμιστικές περιοχές RHS6 και CNS1	15
2.3.4 Χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις στα CD4 ⁺ T βοηθητικά κύτταρα	15
2.4 Απομόνωση πρωτεϊνών που προσδέονται στο γενετικό στοιχείο RHS6	18
2.4.1 Αναγνώριση φωσφορυλιωμένων καταλοίπων στις πρωτεΐνες SATB1 και BACH1	18
2.4.2 Η πρωτεΐνη SATB1	20
2.4.3 Η πρωτεΐνη BACH1	24
2.5 Σκοπός της εργασίας	28
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
3.1 Υλικά	29
3.2 Μέθοδοι	29
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
4.1 Η πρωτεΐνη BACH1	38
4.2 Η πρωτεΐνη SATB1	43
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	52

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πολυεπίπεδη οργάνωση του γονιδιώματος και ανώτερες δομές της χρωματίνης είναι καίρια χαρακτηριστικά του πυρήνα ανώτερων οργανισμών. Πρόσφατες έρευνες καταδεικνύουν ότι τόσο η υποπυρηνική τοποθέτηση των γενετικών τόπων όσο και οι χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις του γονιδιώματος (ενδοχρωμοσωμικές & διαχρωμοσωμικές) μέσα στον πυρήνα παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Παρόλο που η ύπαρξη διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων, ήταν γνωστή από την απενεργοποίηση του X-χρωμοσώματος στα θηλυκά άτομα θηλαστικών, άρχισε να γίνεται ευρέως αποδεκτή το 2005, όταν εντοπίστηκε στα παρθένα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα. Σημαντικός κρίθηκε ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών συμπλόκων που επάγουν ή/και σταθεροποιούν διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις σε CD4⁺ κύτταρα ποντικού. Για το λόγο αυτό έγινε επιλογή μιας περιοχής που έχει δείχτει ότι συμμετέχει σε διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις: της RHS6 εντός του ρυθμιστικού στοιχείου LCR του Th2 γενετικού τύπου, και πιο συγκεκριμένα μιας περιοχής 151 βάσεων DNA εντός αυτής, η οποία παρουσιάζει συντήρηση μεταξύ ανθρώπου και ποντικού καθώς και υπερευαισθησία στην πέψη με DNAάση. Μέσω χρωματογραφίας συγγένειας DNA για την περιοχή αυτή και φασματοσκοπίας μάζας έχει βρεθεί ότι από τις πρωτεΐνες που προσδέθηκαν, αυτές που ταυτοποιήθηκαν και δύναται να μεσολαβούν σε μεγάλης κλίμακας DNA αλληλεπιδράσεις ήταν οι πρωτεΐνες SATB1 και BACH1, στις οποίες μάλιστα αναγνωρίστηκε και μία μη χαρακτηρισμένη φωσφορυλίωση στην κάθε μία. Μία φωσφορυλίωση αναγνωρίστηκε στο κατάλοιπο Ser635 της πρωτεΐνης SATB1 και μία στο κατάλοιπο Ser448 της BACH1. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας προσπαθήσαμε να διαλευκάνουμε αν αυτή η θέση της φωσφορυλίωσης που εντοπίστηκε σε κάθε μία από τις δύο πρωτεΐνες, ευθύνεται για την υποκυτταρική της τοποθέτηση. Για τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των κωδικών περιοχών των γονιδίων (cDNA) και μετάλλαξη του καταλοίπου σερίνης σε αλανίνη και στη συνέχεια σύντηξη του υπό μελέτη γονιδίου (αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου) με το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) σε ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης (pEGFP-c3). Ακολούθως, έγινε διαμόλυνση HEK 293 T κυττάρων με φορέα έκφρασης (pEGFP-c3) που εκφράζει την αγρίου τύπου BACH1 πρωτεΐνη σε σύντηξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (EGFP) όπως επίσης και με φορέα έκφρασης (pEGFP-c3) που εκφράζει τη μεταλλαγμένη BACH1 πρωτεΐνη (Ser448A) σε σύντηξη με την EGFP. Σε κάθε περίπτωση μελετήθηκε η υποκυτταρική τοποθέτηση των χημικών πρωτεϊνών με τη χρήση μικροσκοπίας και βρέθηκε ότι, ενώ η μεν αγρίου τύπου BACH1 πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, η δε μεταλλαγμένη BACH1 πρωτεΐνη παρουσιάζει κυρίως κυτταροπλασματική κατανομή, υποδεικνύοντας ότι αυτό το αμινοξύ είναι κρίσιμος παράγοντας για τον πυρηνικό εντοπισμό της BACH1. Παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες που έγιναν για την κλωνοποίηση του γονιδίου *SATB1*, αυτές δεν κατέστησαν δυνατές χωρίς την παρουσία μεταλλάξεων, με συνέπεια να μην επιτευχθεί και η μετάλλαξή του. Παρόλα αυτά εντοπίσαμε μία νέα ισομορφή *SATB1*

που περιέχει ένα επιπλέον εξόνιο 91 βάσεων και ομοιάζει με μία αντίστοιχη ισομορφή του ανθρώπου.

1. ABSTRACT

Genome organization and high order chromatin structure are key features in the highly compartmentalized and dynamic environment of the eukaryotic cell nucleus. Recent investigations have indicated that gene positioning and chromosomal interactions (*cis* & *trans*) in the nucleus may play an important role in the regulation of gene expression. Although, interchromosomal interactions are a well-characterized phenomenon from the X-chromosome inactivation in female mammals, it is widely accepted since 2005, when detected in naive CD4⁺ T lymphocytes. Therefore, it was of great importance to identify and characterize protein complexes that induce and/or stabilize interchromosomal interactions in mouse CD4⁺ T cells. For this reason, RHS6, which is a regulatory region within the T_H2 locus and was recently found to participate in interchromosomal interactions, was chosen as a candidate region for study. Moreover, we focused on 151 bases within RHS6, which show considerable conservation between human and mouse. By utilizing DNA affinity chromatography coupled with Mass Spectrometry, we identified two specific DNA binding factors, namely SATB1 and BACH1 and mapped one phosphorylation site for each of them. The phosphorylated residues identified were S635 and S448, corresponding to proteins SATB1 and BACH1. In the frame of this study, we tried to elucidate whether serine phosphorylation, detected in each one of the two proteins was responsible for the subcellular localization of these proteins. Therefore, we made efforts for gene cloning and site-directed mutagenesis of serine residues to alanine, followed by fusion of the genes of interest (wild type and mutant) with the reporter gene of green fluorescent protein (EGFP) to an expression vector. Subsequently, we performed transfection of HEK 293 T cells with the expression vector pEGFP-c3 that expresses wild-type BACH1 protein in fusion with green fluorescent protein (EGFP), as well as with pEGFP-c3 that expresses the mutant BACH1 protein (Ser448A) in fusion with EGFP. In each case, we studied the subcellular localization of the chimeric proteins by using fluorescence microscopy and found that while the wild type BACH1 protein localized mainly in the nucleus, the mutant BACH1 exhibited mostly a cytoplasmic distribution, indicating that serine phosphorylation is a potential determinant for the nuclear localization of BACH1 protein. Despite repeated efforts for the initial cloning of the *SATB1* gene, this was not possible due to missense mutations incorporated into the cDNA although a proofreading polymerase was used. However, we identified a new isoform of SATB1 containing an additional exon of about 100 bases, which resembles with a corresponding human SATB1 isoform.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 CD4⁺ T λεμφοκύτταρα

Όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από έναν τύπο κυττάρων που ονομάζονται αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (Hematopoietic Stem Cells, HSC). Τα αρχέγονα κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε ποικίλους τύπους κυττάρων, να αυτοανανεώνονται αυτόματα και να διατηρούν σταθερά τα πληθυσμιακά τους επίπεδα, μέσω κυτταρικών διαιρέσεων. Η αιμοποίηση ορίζεται ως η παραγωγή και η ανάπτυξη ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων (Kuby, 2002).

Τα λεμφοκύτταρα, υποδιαιρούνται σε τρεις πληθυσμούς- B κύτταρα, T-κύτταρα και φυσικούς φονιάδες- με βάση τη λειτουργία τους και τα μόρια που φέρουν στην επιφάνεια της μεμβράνης τους. Οι φυσικοί φονιάδες (Natural Killer cells, NK) είναι μεγάλα, κοκκιώδη λεμφοκύτταρα, που δεν εκφράζουν τους χαρακτηριστικούς επιφανειακούς δείκτες των B και T λεμφοκυττάρων. Τα διαφοροποιημένα B και T λεμφοκύτταρα είναι μικρά, κινητικά κύτταρα, χωρίς φαγοκυτταρικές ιδιότητες και δεν είναι δυνατό να διακριθούν με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά (Kuby, 2002).

Τα B και T λεμφοκύτταρα που δεν έχουν αλληλεπιδράσει με κάποιο αντιγόνο αναφέρονται ως παρθένα (naive). Καθώς τα λεμφοκύτταρα προχωρούν στον κυτταρικό κύκλο, αυξάνουν το μέγεθός τους και μετατρέπονται σε λεμφοβλάστες (lymphoblasts). Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλότερο λόγο κυτταροπλάσματος/πυρήνα και από μεγαλύτερη πολυπλοκότητα στη δομή των οργανιδίων σε σχέση με τα μικρά λεμφοκύτταρα. Οι λεμφοβλάστες πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε δραστικά κύτταρα (effector cells)- με απώτερο στόχο την εξάλειψη του αντιγόνου- ή σε κύτταρα μνήμης (memory cells). Τα δραστικά κύτταρα της T λεμφοειδούς σειράς, περιλαμβάνουν τα T βοηθητικά (T_H) κύτταρα που εκκρίνουν κυτταροκίνες και τα T κυτταροτοξικά (T_C) κύτταρα. Τα διαφορετικά στάδια ωρίμανσης των λεμφοκυττάρων, διακρίνονται από την έκφραση μεμβρανικών μορίων που αναγνωρίζονται από συγκεκριμένα μονοκλωνικά αντισώματα. Το σύνολο των μονοκλωνικών αντισωμάτων που αντιδρούν με ένα συγκεκριμένο μεμβρανικό μόριο, ομαδοποιούνται σε ένα σύμπλεγμα διαφοροποίησης (Cluster of Differentiation, CD) (Kuby, 2002).

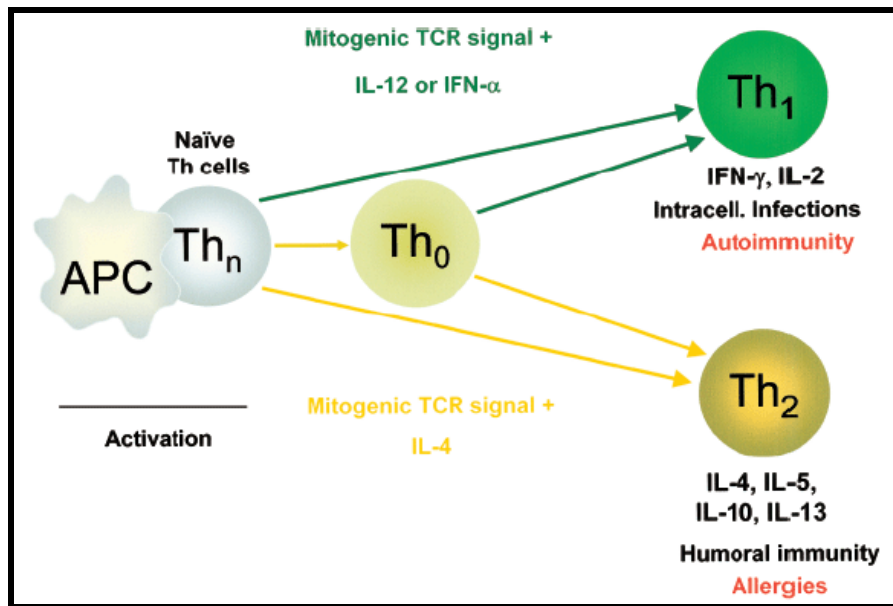
Τα T κύτταρα ή T λεμφοκύτταρα προέρχονται από το μυελό των οστών αλλά μεταναστεύουν στο θύμο αδένι για να ωριμάσουν και να διαφοροποιηθούν. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, το T κύτταρο εκφράζει στη μεμβράνη του ένα μοναδικό μόριο για πρόσδεση σε αντιγόνο, που ονομάζεται υποδοχέας T κυττάρου (T Cell Receptor, TCR). Ο υποδοχέας αυτός είναι ικανός να αναγνωρίζει μόνο τα αντιγόνα που είναι προσδεδεμένα σε μεμβρανικές πρωτεΐνες που ονομάζονται μόρια του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC), τα οποία παρουσιάζουν εξειδίκευση για την αντιγονοπαρουσίαση. Δύο είναι οι κύριοι τύποι μορίων MHC: τα μόρια τάξης I, που εκφράζονται σχεδόν σε όλα τα εμπύρινα

κύτταρα των σπονδυλωτών, και τα μόρια MHC τάξης II που εκφράζονται μόνο στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells, APCs) (Kuby, 2002).

Όλοι οι υποπληθυσμοί των T κυττάρων εκφράζουν τον TCR, ένα σύμπλεγμα πολυπεπτιδίων που περιλαμβάνει και το μόριο CD3, ενώ η πλειοψηφία τους διακρίνεται από την παρουσία του CD4 ή του CD8 επιφανειακού μορίου. Τα T_H κύτταρα χαρακτηρίζονται από τη μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη CD4, ενώ τα T_C χαρακτηρίζονται από τη μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη CD8. Για το λόγο αυτό και χάριν συντομίας θα αναφερόμαστε σ' αυτά με τους όρους CD4⁺ και CD8⁺ αντίστοιχα. Τα CD4⁺ περιορίζονται στην αναγνώριση αντιγόνων που συνδέονται με μόρια MHC τάξης II, ενώ τα CD8⁺ περιορίζονται στην αναγνώριση αντιγόνων που συνδέονται με μόρια MHC τάξης I (Kuby, 2002).

Όταν ένα παρθένο CD4⁺ κύτταρο αναγνωρίσει και αλληλεπιδράσει με ένα σύμπλοκο αντιγόνου-MHC τάξης II, ενεργοποιείται, καθίσταται δραστικό και εκκρίνει ποικίλους αυξητικούς παράγοντες γνωστούς ως κυτταροκίνες (cytokines). Διαφορές στο πρότυπο των κυτταροκινών που παράγονται από τα ενεργοποιημένα CD4⁺ κύτταρα οδηγούν σε διαφορετικούς τύπους ανοσολογικής απόκρισης. Επομένως, τα παρθένα CD4⁺ κύτταρα διαφοροποιούνται σε T_{H1} ή T_{H2} δραστικά T κύτταρα μέσω αντιγονικής διέγερσης από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs). Η απόκριση τύπου T_{H1} (T_{H1} response), παράγει ένα πρότυπο κυτταροκινών, που υποστηρίζει την ανάπτυξη φλεγμονής και ενεργοποιεί κυρίως συγκεκριμένα T κύτταρα και μακροφάγα, ενώ η απόκριση τύπου T_{H2} (T_{H2} response) ενεργοποιεί κυρίως B κύτταρα και ανοσοαπόκριση που εξαρτάται από αντισώματα (Kuby, 2002).

Αξίζει να αναφερθεί ότι μέχρι πρόσφατα, οι κλώνοι των CD4⁺ κυττάρων στο ποντίκι διακρίνονταν σε δύο κύριες υποκατηγορίες που ονομάστηκαν T_{H1} και T_{H2} (Εικόνα 1), με βάση την αποκλειστική παραγωγή ιντερφερόνης γ (IFN γ) ή των ιντερλευκινών 4, 5 και 13 (IL-4, IL-5, IL-13) αντίστοιχα (Mosmann *et al.*, 1986). Τα T_{H1} κύτταρα μπορεί να είναι υπεύθυνα για αυτοάνοσα νοσήματα, ενώ τα T_{H2} κύτταρα συμμετέχουν σε αλλεργικές αντιδράσεις και μεσολαβούν στη χυμική ανοσία. Πρόσφατα, όμως χαρακτηρίστηκαν και άλλες υποομάδες CD4⁺ T κυττάρων, όπως τα T_{H17} κύτταρα που παράγουν IL-17 και τα Th9 που παράγουν IL-9 (Amsen *et al.*, 2009), αλλά το κατά πόσο αποτελούν διακριτές κυτταρικές γενεαλογίες δεν έχει διαλευκανθεί ακόμα. Στη συνέχεια αποσαφηνίστηκε η σημασία των T_{H1} κυττάρων στην άμυνα έναντι στους ξενιστές και τα ενδοκυτταρικά παθογόνα αλλά και των T_{H2} κυττάρων για την άμυνα ενάντια στους νηματώδεις και τα παράσιτα (Heinzel *et al.*, 1989). Τα T_{H17} κύτταρα παράγουν επίσης IL-17F, IL-21, IL-22 κυτταροκίνες και συνεισφέρουν στην άμυνα ενάντια στα εξωκυττάρια βακτήρια και στους μύκητες (Wilson *et al.*, 2009).



Εικόνα 1. Η διαφοροποίηση των T_H1 και T_H2 κυριαρχείται από κυτταροκίνες.

2.2 Πυρηνική οργάνωση

2.2.1 Πυρηνική διαμερισματοποίηση

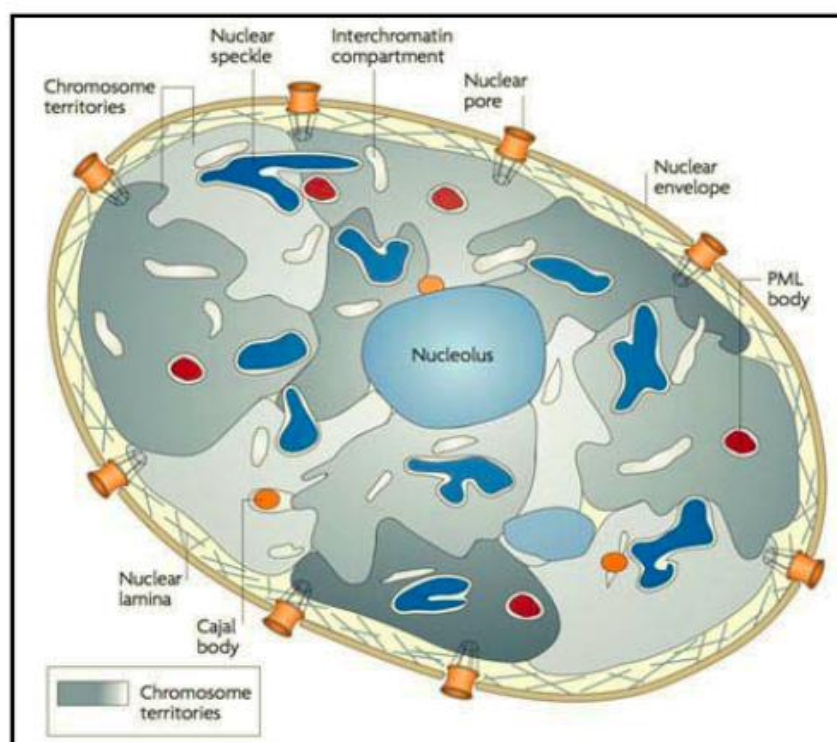
Ο μεσοφασικός πυρήνας των ανώτερων οργανισμών είναι ένα πολύ καλά οργανωμένο και διαμερισματοποιημένο οργανίδιο (Spector, 2001) (Εικόνα 2). Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη υποπυρηνικών δομών, εξαιρετικά δυναμικών που χαρακτηρίζονται από γρήγορη ανταλλαγή πρωτεϊνών που πραγματοποιείται μεταξύ αυτών και του πυρηνοπλάσματος (nucleoplasm) (Misteli, 2001).

Ο πυρήνας οριοθετείται από τον πυρηνικό φάκελο, μια δομή διπλής μεμβράνης. Η εξωτερική μεμβράνη συνδέεται με το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ συντήξεις της εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης σε ποικίλα σημεία διαμορφώνουν τους πυρηνικούς πόρους (nuclear pores), οι οποίοι χρησιμεύουν για τη μεταφορά υλικών μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα (Stoffler *et al.*, 1999). Εσωτερικά του πυρηνικού φακέλου βρίσκεται το περιφερικό πυρηνικό έλασμα (peripheral nuclear lamina), το οποίο θεωρείται ότι παίζει ρόλο στη ρύθμιση της δομής του πυρηνικού φακέλου, καθώς και στην τοποθέτηση της χρωματίνης στην περιφέρεια του πυρήνα κατά τη μεσόφαση.

Μέσα στο πυρηνόπλασμα, τα χρωμοσώματα διευθετούνται σε διακριτές περιοχές, τις λεγόμενες χρωμοσωμικές επικράτειες (chromosome territories) (Εικόνα 2). Ενεργά γονίδια βρίσκονται συνήθως στην περιφέρεια αυτών των περιοχών ενώ γονιδιοματικές περιοχές που σχετίζονται με την ετεροχρωματίνη βρίσκονται συνήθως εντός των χρωμοσωμικών επικρατειών. Οι χρωμοσωμικές επικράτειες έχειδειχτεί ότι

είναι μη τυχαία κατανεμημένες στο πυρηνόπλασμα το οποίο περιβάλλεται από τον πυρηνικό φάκελο (Cremer *et al.*, 2006).

Επιπρόσθετα, έχουν παρατηρηθεί αρκετά υποπυρηνικά σωμάτια (nuclear bodies) (Εικόνα 2) με διακριτές κατά τεκμήριο λειτουργίες. Για παράδειγμα, 25-50 σωμάτια με στικτό πρότυπο (nuclear speckles) παρατηρούνται μέσα στον πυρήνα και αποτελούνται από πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μάτισμα πρώιμων mRNAs (pre-mRNA). Επίσης διακριτά σωμάτια μεταγραφής (transcription factories) παρατηρούνται σε μεγάλο αριθμό (5.000-10.000 ανά πυρήνα) και θεωρείται ότι αποτελούν προσυγκροτημένα σημεία μεταγραφής όπου γενετικοί τόποι κινούνται προς αυτά για να μεταγραφούν (Sexton *et al.*, 2007; Schneider and Grosschedl, 2007). Επιπλέον, έχουν χαρακτηριστεί και άλλα υποπυρηνικά σωμάτια με ποικίλες λειτουργίες όπως ο πυρηνίσκος (σύνθεση rRNA) (Spector, 1993), τα σωμάτια Cajal (βιογένεση snRNPs), τα σωμάτια PML (μεταγραφική ρύθμιση, στόχος ιϊκής μόλυνσης) και άλλα.



Εικόνα 2. Παρατήρηση της πυρηνικής διαμερισματοποίησης καθώς και των υποπυρηνικών δομών.

2.2.2 Διαχρωσωμικές αλληλεπιδράσεις

Οι ενδοχρωσωμικές αλληλεπιδράσεις (intrachromosomal interactions) μεταξύ ρυθμιστικών στοιχείων DNA (DNA regulatory elements), που βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα, πχ. μεταξύ υποκινητών και ενισχυτών ενός γονιδίου, έχουν περιγραφεί και χαρακτηριστεί εκτενώς κατά το παρελθόν. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις φαίνεται ότι συνεισφέρουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, μέσω της διαμόρφωσης ανώτερων δομών χρωματίνης. Χαρακτηριστικό αποτελεί το

παράδειγμα του μοντέλου βρόχου που προτείνεται ως το επικρατέστερο για την αλληλεπίδραση του ενισχυτή με τον υποκινητή του ίδιου γονιδίου (Nolis *et al.*, 2009). Η χρησιμοποίηση νέων τεχνικών, όπως των 3C (Chromosome conformation capture) και 4C (Circularized Chromosome Conformation Capture), έχει ανοίξει νέους ορίζοντες στο χαρακτηρισμό νέων ενδοχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων στην κλίμακα ολόκληρου του γονιδιώματος. Έτσι, φαίνεται ότι οι ενδοχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις σχηματίζονται σε μεγάλη συχνότητα και υποδεικνύουν ένα γενικευμένο μηχανισμό διαμόρφωσης ανώτερων δομών χρωματίνης (Sexton *et al.*, 2009). Γεγονός είναι, ότι χρησιμοποιώντας αυτές τις τεχνικές έχουν χαρακτηριστεί και διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις (interchromosomal interactions), δηλαδή αλληλεπιδράσεις γονιδίων ή/και ρυθμιστικών περιοχών, που εδράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα (Spilianakis *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006; Ohlsson *et al.*, 2007; Simonis *et al.*, 2007). Παρακάτω αναφέρονται μερικά παραδείγματα από πρόσφατα μελετημένες διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις σε θηλαστικά.

Η απενεργοποίηση του X-χρωμοσώματος στα θηλυκά κύτταρα κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, γίνεται με τυχαίο τρόπο και αποτελεί ίσως το παλαιότερα μελετημένο παράδειγμα διαχρωμοσωμικής αλληλεπίδρασης. Λίγο πριν την τυχαία επιλογή του X-χρωμοσώματος που θα απενεργοποιηθεί, παρατηρείται η διαχρωμοσωμική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο X-χρωμοσωμάτων, μια αλληλεπίδραση γνωστή ως «καταμέτρηση και επιλογή» (count and choice) (Xu *et al.*, 2006; Bacher *et al.*, 2006). Οι γονιδιοματικές περιοχές που αλληλεπιδρούν είναι οι περιοχές που ελέγχουν και την έναρξη της απενεργοποίησης του X-χρωμοσώματος. Αυτή η αλληλεπίδραση θεωρείται ότι παίζει ρόλο στην «καταμέτρηση» των X-χρωμοσωμάτων από το κύτταρο και στην τυχαία επιλογή της έναρξης της απενεργοποίησης ενός εκ των δύο X χρωμοσωμάτων. Έχει δειχθεί ότι η αλληλεπίδραση αυτή εξαρτάται από τις πρωτεΐνες CTCF (Xu *et al.*, 2007) και OCT4 (Donohoe *et al.*, 2009) ενώ και ενεργή μεταγραφή είναι απαραίτητη για αυτή την αλληλεπίδραση (Xu *et al.*, 2007).

Στην προσπάθεια να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός της επιλογής και έκφρασης ενός μόνο οσφρητικού υποδοχέα ανά νευρικό κύτταρο (στο οσφρητικό επιθήλιο), χρησιμοποιώντας την τεχνική 4C, βρέθηκε ότι ο ενισχυτής H αλληλεπιδρά με διαφορετικούς υποκινητές γονιδίων οσφρητικών υποδοχέων (OR genes) τόσο *in cis* όσο και *in trans*, αλλά μόνο με ένα γονίδιο οσφρητικού υποδοχέα ανά οσφρητικό νευρώνα (Lomvardas *et al.*, 2006). Με τη χρησιμοποίηση της τεχνικής DNA-FISH επιβεβαιώθηκε ότι ο ενισχυτής H αλληλεπιδρά με ένα αλληλόμορφο ενός γονιδίου οσφρητικού υποδοχέα (από τα 1300 που υπάρχουν) ανά κύτταρο. Με DNA/RNA-FISH, δείχτηκε ότι αλληλεπίδραση του ενισχυτή H συσχετίζεται άμεσα με την έκφραση του αλληλεπιδρώντος γονιδίου του οσφρητικού υποδοχέα, καθώς εκεί εντοπιζόταν και το εν τη γενέσει μετάγραφο. Έτσι, φαίνεται ότι μέσω διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων του ενισχυτή H επιλέγεται και καθορίζεται το ένα γονίδιο οσφρητικού υποδοχέα που θα εκφραστεί σε ένα μόνο κύτταρο του οσφρητικού επιθηλίου (one odorant gene-one neuron). Στη συνέχεια δείχτηκε ότι δεν πρόκειται για ένα μόνο γονίδιο οσφρητικού υποδοχέα ανά νευρικό κύτταρο αλλά για

περισσότερα (5-6), και ότι δεν είναι μόνο το στοιχείο H που ενεργοποιεί τα γονίδια αλλά και άλλοι ενισχυτές παρόμοιας δράσης.

Πρόσφατα δείχτηκε ότι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις συμμετέχουν και στη ρύθμιση της έκφρασης της IFN- β σε HeLa κύτταρα μετά από ιϊκή μόλυνση (Apostolou & Thanos, 2008). Ο υποκινητής της IFN- β αλληλεπιδρά με τρεις γενετικούς τόπους που έχουν θέση πρόσδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα NF- κ B. Αυτοί οι γενετικοί τόποι περιέχουν επίσης επαναλαμβανόμενο DNA τύπου Alu. Αυτές οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις φαίνεται ότι επηρεάζουν την κινητική σχηματισμού του ενισχυοσώματος (enhanceosome) και την έκφραση της IFN- β από ένα αλληλόμορφο κατά τα πρώτα στάδια μετά από ιϊκή μόλυνση.

Τέλος, γονίδια που επάγονται από οιστρογόνο αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθώς μεταγράφονται. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές παρουσιάζουν εξάρτηση από μεταγραφικούς παράγοντες καθώς και από τη δράση της πυρηνικής ακτίνης και μυσίνης, δείχνοντας ότι συμμετέχουν στην ενεργή μεταφορά γονιδιοματικών περιοχών. Επίσης, οι αλληλεπιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα σε υποπυρηνικά σωματίδια που υπάρχουν παράγοντες ματίσματος (nuclear speckles) (Hu *et al.*, 2008; Nunez *et al.*, 2009).

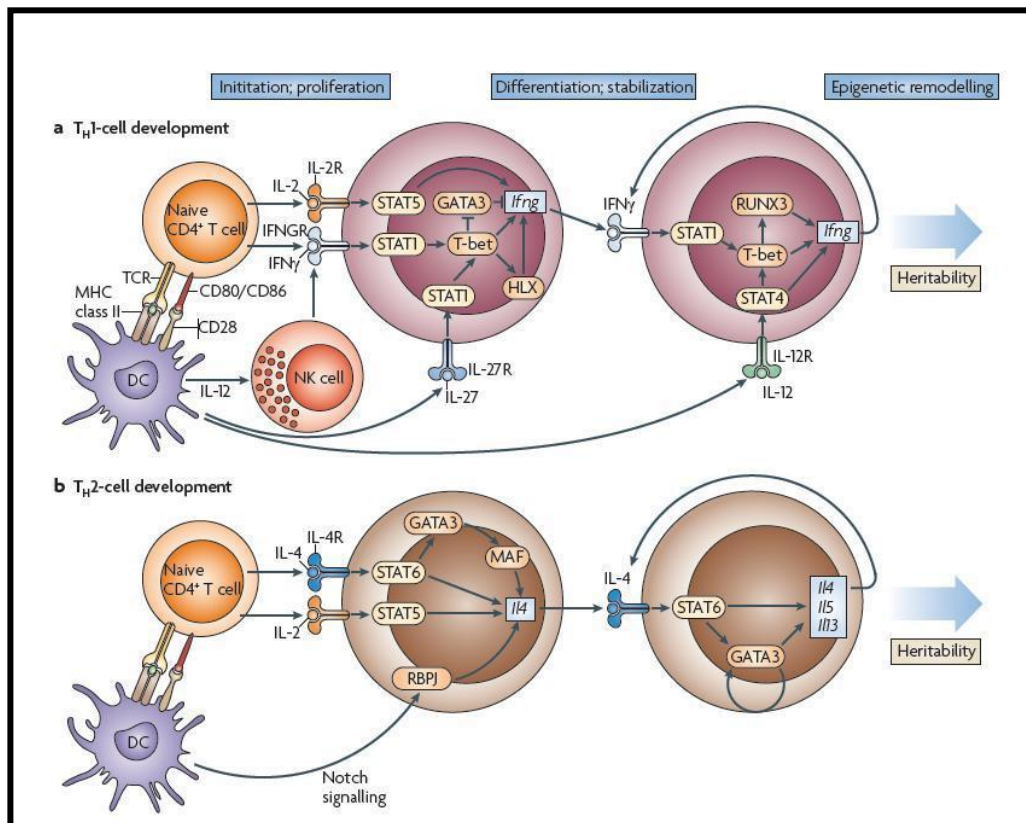
2.3 Διαφοροποίηση των T κυττάρων βοηθών

2.3.1 Μοριακοί μηχανισμοί διαφοροποίησης των T_{H1}/ T_{H2} κυττάρων

Η ανάπτυξη των T_{H1} κυττάρων (Εικόνα 3) αρχίζει με την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT1 από την ιντερφερόνη- γ (IFN- γ) και την ιντερλευκίνη-27 (IL-27) που παράγονται από τα NK κύτταρα και αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, αντίστοιχα. Η STAT1, μαζί με επαγόμενους μεταγραφικούς παράγοντες από την ενεργοποίηση του TCR, επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα T-bet, ο οποίος είναι καθοριστικός για τη διαφοροποίηση των T_{H1} κυττάρων. Ο T-bet με τη σειρά του επάγει την έκφραση της IFN- γ , του υποδοχέα IL-12R β 2 και των μεταγραφικών παραγόντων HLX και RUNX3, ενώ δρα ανταγωνιστικά στη δράση του GATA3, του καθοριστικού ρυθμιστή της T_{H2} κυτταρικής μοίρας. Μετά την επαγωγή της έκφρασής του, ο υποδοχέας IL-12R β 2 ετεροδιμερίζεται με τον υποδοχέα IL-12R β 1 και σχηματίζει το λειτουργικό υποδοχέα IL-12R, ο οποίος επιτρέπει στην παραγόμενη από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα IL-12 να ενεργοποιήσει το μεταγραφικό παράγοντα STAT4. Η STAT4, ο T-bet, ο HLX και ο RUNX3 προσδένονται στο γενετικό τόπο της IFN- γ (IFN- γ locus) και ενεργοποιούν την έκφρασή της, η οποία με τη σειρά της θα ενδυναμώνει τη διαφοροποίηση σε T_{H1} κύτταρα μέσω της ενεργοποίησης της STAT1 μέσω ενός κύκλου θετικής ανάδρασης (positive feedback loop). Παράλληλα, ο T-bet και ο RUNX3 προσδένονται στο γενετικό τόπο της IL-4 και καταστέλλουν την έκφραση της, παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τη διαφοροποίηση σε T_{H2} κύτταρα (Wilson *et al.*, 2009; Rowell *et al.*, 2008). Όμως δεν απαιτούν όλες οι T_{H1} αποκρίσεις σηματοδότηση μέσω IL-12 υποδοχέα. Εναλλακτικά καθοδηγητικά σήματα πρέπει να

υπάρχουν. Τέτοια σήματα αποτελούν σηματοδοτικά μόρια (ligands) για το Notch μονοπάτι. Γεγονός είναι ότι, η ύπαρξη ασφαλιστικών δικλείδων εντείνει τη δέσμευση στην κυτταρική γενεαλογία που έχει επιλεγθεί (cell fate commitment).

Η ανάπτυξη των T_H2 κυττάρων (Εικόνα 3) αρχίζει με την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT6 από την IL-4, η οποία μαζί με επαγόμενους μεταγραφικούς παράγοντες από την ενεργοποίηση του TCR, προσδέεται στο γενετικό τόπο και επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα GATA3, ο οποίος είναι καθοριστικός για τη διαφοροποίηση των T_H2 κυττάρων. Ο GATA3 εμποδίζει τη διαφοροποίηση προς την T_H1 κυτταρική μοίρα, εμποδίζοντας την έκφραση του υποδοχέα IL-12Rβ2 και του *Stat4* γονιδίου. Εναλλακτικά, η σηματοδότηση μέσω 'Notch' μπορεί να ενεργοποιήσει τον GATA3 με ένα τρόπο μη εξαρτώμενο από STAT6. Ο GATA3 επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα MAF που συνεργεί στην ενεργοποίηση της IL-4, ενώ μαζί με το μεταγραφικό παράγοντα STAT6, ο GATA3 ενεργοποιεί την έκφραση των κυτταροκινών IL-4, IL-5 και IL-13. Η διαφοροποίηση σε T_H2 κύτταρα σταθεροποιείται από την αυτοενεργοποίηση του GATA3 (positive feedback loop), την αυτοκρινή και παρακρινή ενεργοποίηση της IL-4 από τη STAT6 και την ανταγωνιστική δράση της STAT6 και του GATA3 στην έκφραση της IFN-γ και στη διαφοροποίηση σε T_H1 κύτταρα (Wilson *et al.*, 2009).

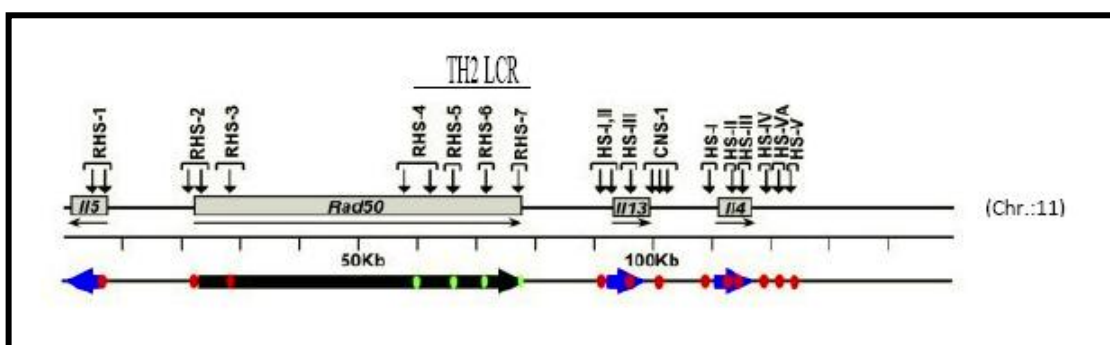


Εικόνα 3. Απεικόνιση των μοριακών μηχανισμών της διαφοροποίησης των: a. T_H1 κυττάρων, και b. T_H2 κυττάρων.

2.3.2 Ρυθμιστικά στοιχεία του γενετικού τόπου T_H2

Ο γενετικός τόπος T_H2 (Εικόνα 4) εκφράζεται στα T_H2 κύτταρα, ενώ ο γενετικός τόπος IFN- γ εκφράζεται στα T_H1 κύτταρα. Τα γονίδια *Il-4*, *Il-5* και *Il-13* του ποντικού βρίσκονται μαζί σε μια γονιδιοματική περιοχή (“γενετικός τόπος T_H2”) του χρωμοσώματος 11 συνολικού μήκους 120 κιλοβάσεων (120 kb). Ανάμεσα στα γονίδια *Il-5* και *Il-13* βρίσκεται το γονίδιο *Rad50*, το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA (DNA repair machinery) και εκφράζεται συστατικά, ενώ η ρύθμιση της έκφρασης του είναι ανεξάρτητη από αυτή των γονιδίων των *Il-4*, *Il-5* και *Il-13* (Amsen *et al.*, 2009). Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων *Il-4*, *Il-5* και *Il-13* εξαρτάται από τους υποκινητές τους, αλλά και από πολλά ρυθμιστικά στοιχεία DNA. Αυτά τα ρυθμιστικά στοιχεία έχουν καθοριστεί πειραματικά με την ανακάλυψη περιοχών που δείχνουν υπερευαισθησία σε DNase I, με τη μελέτη επιγενετικών τροποποιήσεων ιστονών και DNA μεθυλίωσης σε περιοχές του γενετικού τόπου T_H2, με τη χρήση διαγονιδιακών ποντικών καθώς και με την πρόβλεψη συντηρημένων περιοχών ανάμεσα στα είδη με τη χρήση υπολογιστικών μεθόδων.

Αρκετά ρυθμιστικά στοιχεία βρίσκονται γειτονικά των γονιδίων *Il-4* και *Il-13* και ελέγχουν την έκφραση διαγονιδιακών κατασκευών-μαρτύρων (reporter transgenes) στα T_H2 κύτταρα. Ανάμεσα σε αυτά είναι το ρυθμιστικό στοιχείο HS5 το οποίο είναι εξαρτώμενο από σηματοδότηση Notch. Επίσης, αρκετά ρυθμιστικά στοιχεία βρίσκονται πιο μακριά από τις κωδικές περιοχές των γονιδίων. Επίσης, τέσσερα ρυθμιστικά στοιχεία: RHS4, RHS5, RHS6 και RHS7 αποτελούν την περιοχή ελέγχου του γενετικού τόπου T_H2 (Locus Control Region, LCR), η οποία εδράζεται στο 3' άκρο του γονιδίου *Rad50* (Fields *et al.*, 2004). Η λειτουργία των ρυθμιστικών στοιχείων ως LCR αποδείχτηκε με την δημιουργία διαγονιδιακού ποντικού για την συγκεκριμένη περιοχή, η οποία μπορούσε να επάγει την έκφραση γειτονικών γονιδίων ανεξάρτητα από την περιοχή ένθεσής της στο γονιδίωμα (Lee *et al.*, 2006).



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση του γενετικού τόπου T_H2, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11.

Η LCR αποτελεί ρυθμιστικό στοιχείο που έχει ιδιότητες τόσο ενισχυτή (enhancer) όσο και μονωτή (insulator). Μία περιοχή LCR μπορεί να ρυθμίζει μια χρωμοσωμική επικράτεια που περιέχει περισσότερα από ένα γονίδια, ενώ η ρύθμιση που επιφέρει στα γύρω γονίδια έχει κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Αρχικά, είναι ιστοειδική (tissue-specific), δηλαδή ρυθμίζει με διαφορετικό τρόπο γονίδια που εντοπίζονται σε διαφορετικούς ιστούς. Παράλληλα είναι εξαρτώμενη από τον αριθμό των επαναλήψεων της (copy number-dependent). Τέλος, η ρύθμιση της LCR είναι ανεξάρτητη της θέσης και του προσανατολισμού (position and orientation independent) των γονιδίων, δηλαδή αυξάνει την έκφραση γονιδίων ανεξάρτητα από τον προσανατολισμό ή την πιθανή τους θέση εντός ετεροχρωματινικών περιοχών.

2.3.3 Οι ρυθμιστικές περιοχές RHS6 και CNS1

Τα ρυθμιστικά στοιχεία RHS4, RHS5, RHS6 και RHS7 στοιχειοθετούν την LCR του γενετικού τύπου T_H2 . Οι περιοχές αυτές παρουσιάζουν υπερευαισθησία σε DNase I μόνο στα T_H2 κύτταρα, ενώ η περιοχή RHS6 είναι υπερευαίσθητη σε DNase I τόσο στα παρθένα T κύτταρα, όσο και στα T_H2 και T_H1 κύτταρα. Από το γεγονός αυτό, γίνεται κατανοητή η ιδιαίτερη σημασία της RHS6 περιοχής κατά την αρχική ενεργοποίηση του T_H2 γενετικού τύπου, καθώς φαίνεται να είναι η μόνη προσβάσιμη περιοχή της T_H2 LCR σε μεταγραφικούς παράγοντες. Επίσης, η RHS6 είναι η μόνη περιοχή της T_H2 LCR που συμμετέχει σε διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις. Ωστόσο, η σημασία αυτής της περιοχής μένει να αποδειχτεί με γενετική εκτομή της (knock out) (Donohoe *et al.*, 2009).

Η πιο συντηρημένη περιοχή του T_H2 γενετικού τύπου είναι η CNS1 (Conserved Noncoding Sequence 1). Βρίσκεται ανάμεσα στα γονίδια *Il-4* και *Il-13* και περιέχει δύο υπερευαίσθητες σε DNase I περιοχές (HSS1 και HSS2) στα T_H2 κύτταρα. Ακετυλίωση της ιστόνης H3 στην CNS1 συσχετίζεται με αυξημένη δραστηριότητα έκφρασης της *IL-4*. Η σημασία της περιοχής αυτής στη ρύθμιση της έκφρασης των *IL-4* και *IL-13* διαφάνηκε όταν εκτομή της (CNS1 knock out) μείωσε την έκφραση της *IL-4* και *IL-13* ενώ και η *in vivo* ανοσολογική απόκριση των T_H2 κυττάρων μειώθηκε. Επίσης, η περιοχή αυτή συμμετέχει σε ενδοχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις με αρκετά ρυθμιστικά στοιχεία του T_H2 γενετικού τύπου, ενώ προσδένονται σε αυτή πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην διαμόρφωση ανώτερης δομής της χρωματίνης, όπως η SATB1 και η RAD21 (cohesin) (Ansel *et al.*, 2006).

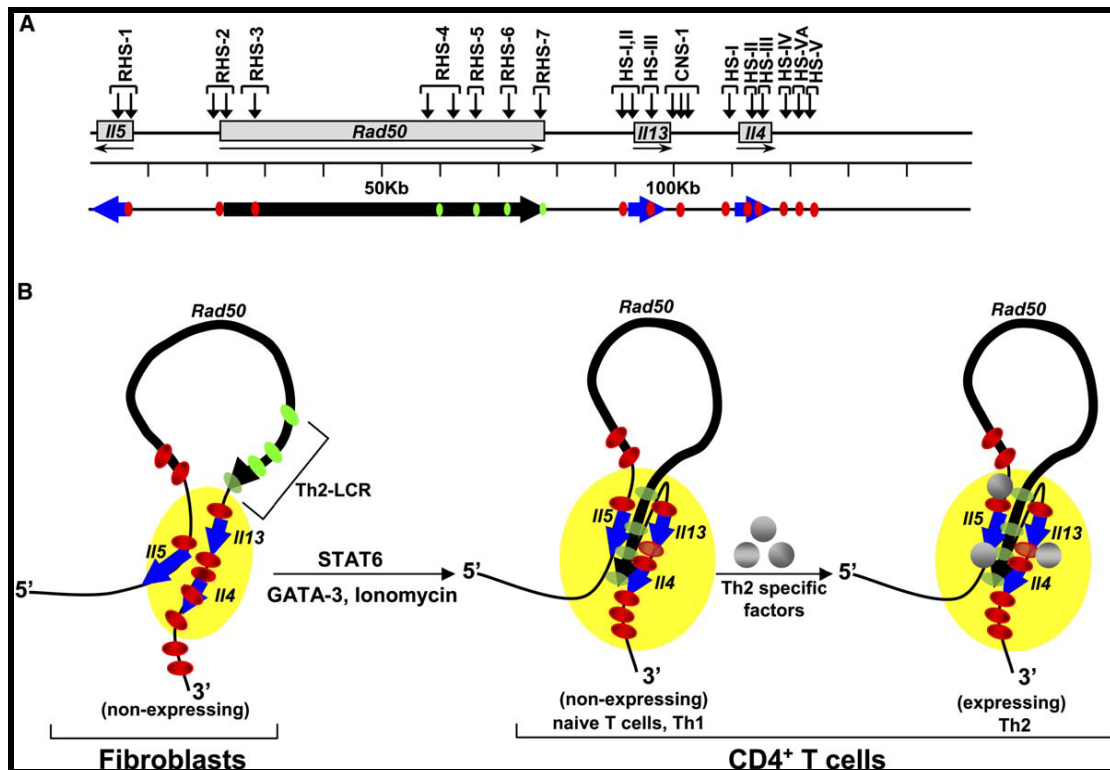
2.3.4 Χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις στα $CD4^+$ T βοηθητικά κύτταρα

Πολλά από τα ρυθμιστικά στοιχεία του T_H2 γενετικού τύπου (Εικόνα 5A), βρίσκονται μακριά από τις κωδικές περιοχές των γονιδίων *Il-4*, *Il-5* και *Il-13*. Η δράση τους σε αυτές φαίνεται να εξαρτάται από την τρισδιάστατη δομή της χρωματίνης. Ανάλυση της χωρικής οργάνωσης των χρωμοσωμάτων αποκαλύπτει το σχηματισμό σύνθετων τρισδιάστατων δικτύων χρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων

(Dekker, 2008). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις ενέχουν επίδραση στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Με τη χρήση της τεχνικής 3C (Miele and Dekker, 2008), δείχτηκε ότι πολλά από αυτά τα ρυθμιστικά στοιχεία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα βρόχο χρωματίνης (chromatin loop).

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι υποκινητές των γονιδίων των κυτταροκινών του T_H2 γενετικού τόπου έρχονται σε στενή εγγύτητα για να σχηματίσουν μία προετοιμασμένη (prepoised) χρωματινική διαμόρφωση σε κύτταρα της T κυτταρικής γενεαλογίας, τα οποία είτε εκφράζουν (T_H2 κύτταρα) είτε όχι (παρθένα T κύτταρα, T_H1 κύτταρα) τα γονίδια αυτών των κυτταροκινών. Αυτή η διαμόρφωση επίσης εντοπίστηκε σε NK, B κύτταρα και σε ινοβλάστες. Βρέθηκε επιπλέον, ότι στα $CD4^+$ T κύτταρα, οι υποκινητές και ενισχυτές των γονιδίων αλληλεπιδρούν με το ρυθμιστικό στοιχείο T_H2 LCR, δημιουργώντας μια περίπλοκη προσχηματισμένη (poised) μεταγραφικά ανενεργή χρωματινική δομή (Spilianakis & Flavell, 2004). Πιο συγκεκριμένα, στα T_H2 κύτταρα με την έκφραση διαφόρων κυτταροειδικών μεταγραφικών παραγόντων, τη στρατολόγησή τους στο προσχηματισμένο χρωματινικό σύμπλοκο καθώς και με την παρουσία μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων των αμινοτελικών ουρών των ιστονών, παρατηρείται ενδυνάμωση της έκφρασης των T_H2 κυτταροκινών. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι, η T_H2 LCR ενέχεται στη συντονισμένη ρύθμιση και έκφραση τριών γονιδίων των κυτταροκινών στα T_H2 κύτταρα, χωρίς να επηρεάζεται το συστατικά εκφραζόμενο *Rad50* γονίδιο το οποίο εξέχει από την δομή βρόχου (Εικόνα 5B) (Lee *et al.*, 2006). Σε ποντίκι με γενετική αφαίρεση της *RHS7* (*RHS7^{-/-}*), τόσο οι αλληλεπιδράσεις των ρυθμιστικών στοιχείων όσο και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *Il-4*, *Il-5* και *Il-13* ήταν μειωμένα (Lee *et al.*, 2005).

Παράλληλα με τις ενδοχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις, παρατηρήθηκε ότι 3 ρυθμιστικά στοιχεία του T_H2 γενετικού τόπου (*RHS1*, *RHS2* και *RHS6*) που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 αλληλεπιδρούν στα παρθένα $CD4^+$ T βοηθητικά κύτταρα (naive T κύτταρα) με τον υποκινητή της *IFN-γ* που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10 (Εικόνα 6). Αυτές οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μειώνονται κατά τη διαφοροποίηση τόσο σε T_H1 όσο και σε T_H2 κύτταρα. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν και με πειράματα DNA-FISH, που έδειξαν με ανάλυση ανά κύτταρο, ότι λαμβάνουν χώρα σε 36,3 % των κυττάρων και αφορούν μόνο ένα αλληλόμορφο των γενετικών τόπων. Σε ποντίκι με γενετική αφαίρεση της *RHS7*, τόσο οι αλληλεπιδράσεις των δύο γενετικών τόπων όσο και τα επίπεδα έκφρασης της *IFN-γ* ήταν μειωμένα. Επειδή τα παρθένα $CD4^+$ T βοηθητικά κύτταρα δεν εκφράζουν ούτε *IFN-γ* αλλά ούτε και *IL-4*, *IL-5* και *IL-13*, προτάθηκε ότι αυτές οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις διατηρούν τους δύο γενετικούς τόπους σε μια διαμόρφωση έτοιμη για άμεση ενεργοποίηση (poised conformation) (Spilianakis *et al.*, 2005).

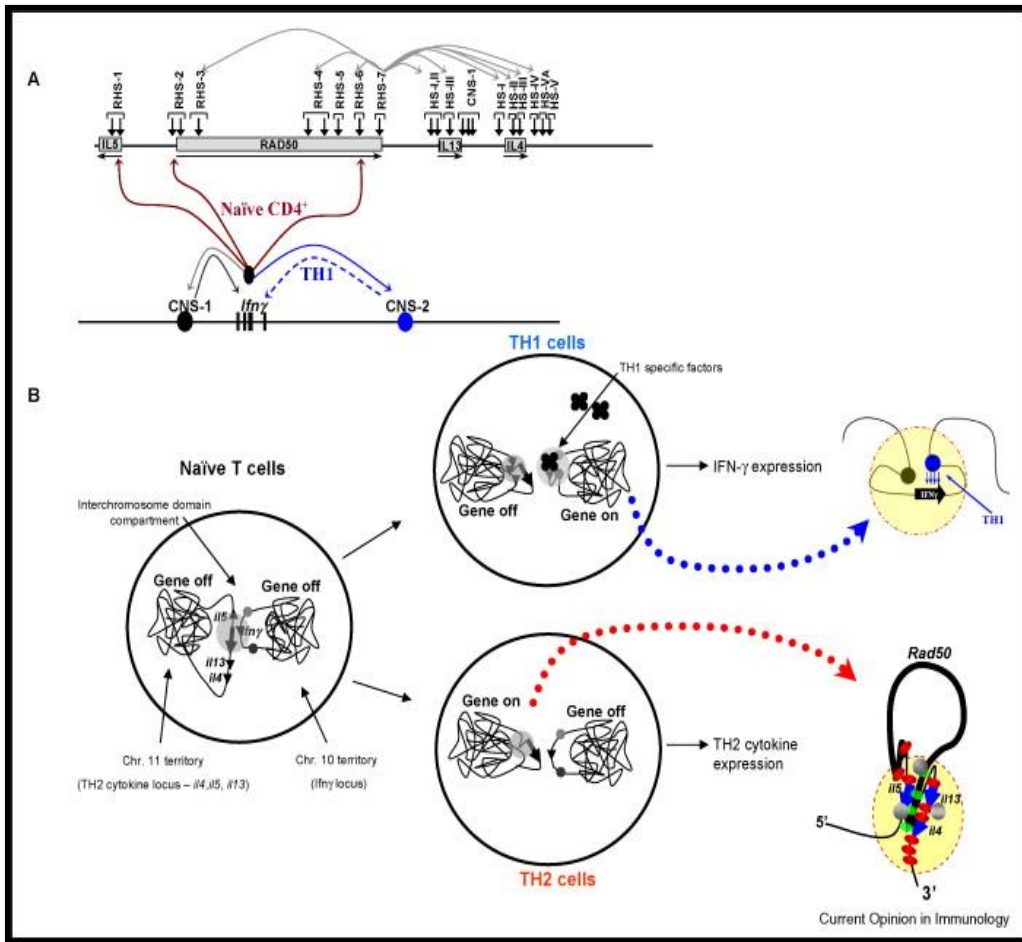


Εικόνα 5. (Α). Σχηματική αναπαράσταση του γενετικού τόπου T_H2 . Όλες οι DNase I υπερευαίσθητες θέσεις υποδεικνύονται με βέλη.

(Β). Μια αρχική διαμόρφωση χρωματίνης εντοπισμένη σε ινοβλάστες (αριστερά). Επιπροσθέτως σε $CD4$ T κύτταρα, σε αυτή την προσχηματισμένη χρωματινική διαμόρφωση, η T_H2 LCR παρέχει τις ρυθμιστικές επιδράσεις της είτε σε κύτταρα που εκφράζουν (T_H2 , δεξιά) είτε σε κύτταρα που δεν εκφράζουν (παρθένα T κύτταρα και T_H1 , μέση) κυτταροκίνες. Η έκφραση διαφόρων κυτταροειδικών μεταγραφικών παραγόντων καθώς και η στρατολόγησή τους στο προσχηματισμένο χρωματινικό σύμπλοκο ενδυναμώνει την έκφραση των T_H2 κυτταροκινών στα T_H2 κύτταρα.

Τα παρθένα $CD4^+$ T κύτταρα παράγουν μικρές ποσότητες $IFN\gamma$ και $IL-4$ αμέσως μετά το σχηματισμό του TCR. Απαραίτητη προϋπόθεση για αυτή τη μικρή αλλά άμεση μεταγραφική ενεργοποίηση είναι η κατάσταση προ-ετοιμότητας (pre-poised) της χρωματινικής δομής των γενετικών τόπων της $IFN\gamma$ και του T_H2 στα παρθένα $CD4^+$ T κύτταρα. Αυτοί οι γενετικοί τόποι δε φέρουν τροποποιήσεις ιστονών που να σχετίζονται με μεταγραφόμενα γονιδιακά τμήματα. Ωστόσο, το DNA των περιοχών των υποκινητών των γονιδίων *Ifng* και *Il-4* είναι μη-μεθυλωμένο στα κύτταρα του ποντικού, και έτσι είναι άμεσα προσβάσιμο από τη μεταγραφική μηχανή.

Έχει δείχτει ότι το γονίδιο της *Ifng* και ο γενετικός τόπος T_H2 είναι τοποθετημένοι ο ένας απέναντι από τον άλλο, γεγονός που επιτρέπει σ'αυτές τις γονιδιακές περιοχές να ανταγωνίζονται για την πρόσβαση μεταγραφικών παραγόντων, κατά τη διάρκεια λήψης της απόφασης κυτταρικής μοίρας (Janson *et al.*, 2009).



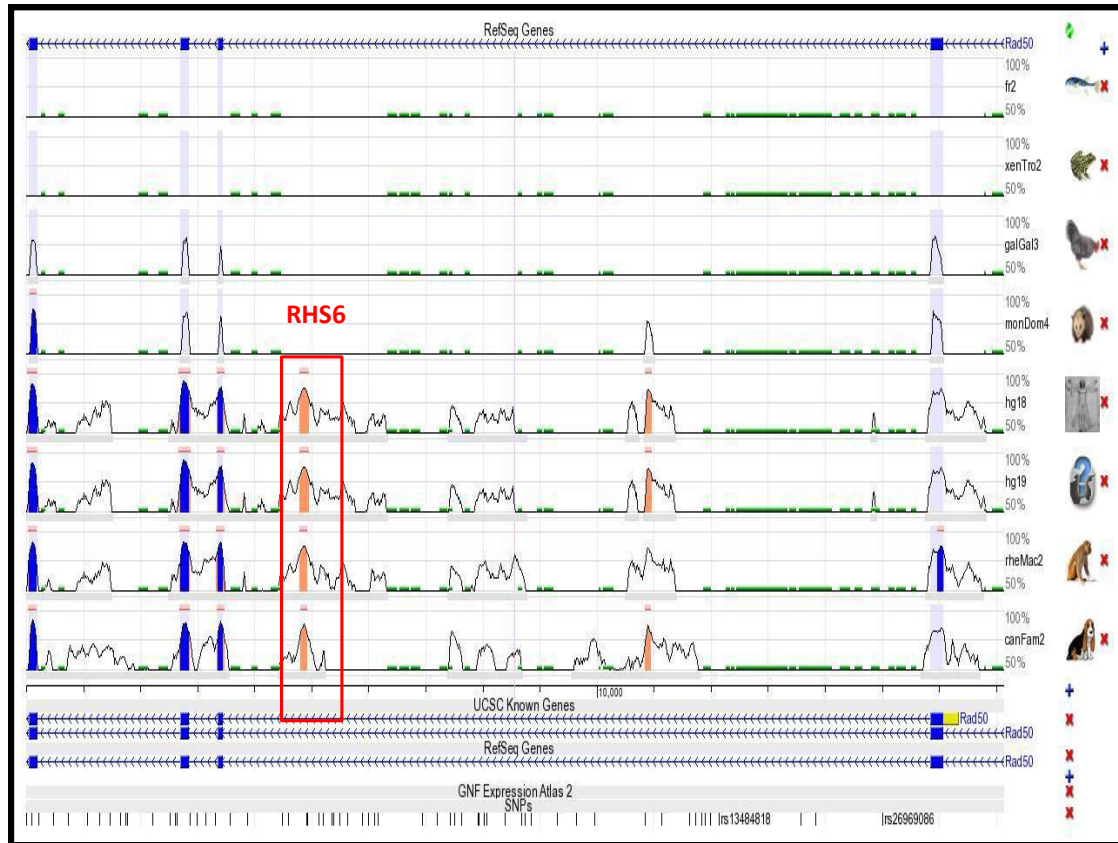
Εικόνα 6. Απεικόνιση της δυναμικότητας των χρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων στον πυρήνα των T κυττάρων. (Α). Βέλη πάνω από τον TH₂ γενετικό τόπο αντιπροσωπεύουν τις ενδοχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της RRS7 DNase I υπερευαίσθητης θέσης της TH₂ LCR και διαφόρων άλλων γονιδιοματικών περιοχών του TH₂ γενετικού τόπου σε TH₂ κύτταρα. Τα βέλη στην κορυφή του τόπου της IFN γ απεικονίζουν τόσο ενδοχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις (μπλε βέλη) καθώς και τις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις (κόκκινα βέλη), οι οποίες συλλαμβάνονται μεταξύ των γενετικών τόπων της IFN γ -TH₂. (Β). Σχηματική αναπαράσταση των χρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων (ενδοχρωμοσωμικών και διαχρωμοσωμικών) για τα χρωμοσώματα 10 και 11 του ποντικού στα CD4⁺ T βοηθητικά κύτταρα.

2.4 Απομόνωση πρωτεϊνών που προσδένονται στο γενετικό στοιχείο RRS6

2.4.1 Αναγνώριση φωσφορυλιωμένων καταλοίπων στις πρωτεΐνες SATB1 και BACH1

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η περιοχή RRS6, που είναι ρυθμιστικό στοιχείο του TH₂ γενετικού τόπου, έχει δείχτει να συμμετέχει σε διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των γενετικών τόπων TH₂-IFN- γ . Με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας DNA και

φασματοσκοπίας μάζας έχουν προσδιοριστεί και ταυτοποιηθεί τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που προσδένονται ειδικά στην περιοχή RHS6, και συγκεκριμένα σε 151 ζεύγη βάσεων (bps) εντός της RHS6 που ανήκει στον T_H2 γενετικό τόπο. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων “ECR browser” αυτή η περιοχή των 151 βάσεων, εμφανίζει 90% ομολογία μεταξύ ανθρώπου και ποντικού (Εικόνα 7).

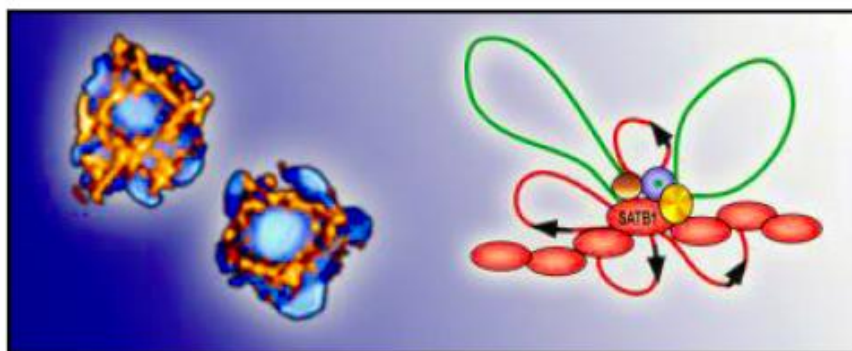


Εικόνα 7. Η συντηρημένη περιοχή των 151bps εντός της RHS6 μεταξύ των ειδών. Στο μαύρο πλαίσιο επισημαίνεται η RHS6, ενώ με πορτοκαλί απεικονίζεται η περιοχή των 151bps εντός της RHS6, η οποία εμφανίζει συντήρηση 90% μεταξύ ανθρώπου και ποντικού (“ECR browser”).

Μέσω πρωτεϊνωματικής ανάλυσης, δείχθηκε ότι οι πρωτεΐνες SATB1 και BACH1, προσδένονται στην RHS6 και πιο συγκεκριμένα σε 151 ζεύγη βάσεων (bps) εντός αυτής, η οποία παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις. Παράλληλα, εκτός από την ταυτοποίηση των δύο πρωτεϊνών, χαρακτηρίστηκαν και δύο φωσφορυλίωσεις. Μία φωσφορυλίωση αναγνωρίστηκε στη SATB1 στο κατάλοιπο σερίνης S635, και μία φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο σερίνης S448 της BACH1. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι γνωστές πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA, με υποεπικράτειες ομοδιμερισμού και έχουν ενοχοποιηθεί για τη συμμετοχή τους σε ανώτερη οργάνωση της δομής της χρωματίνης.

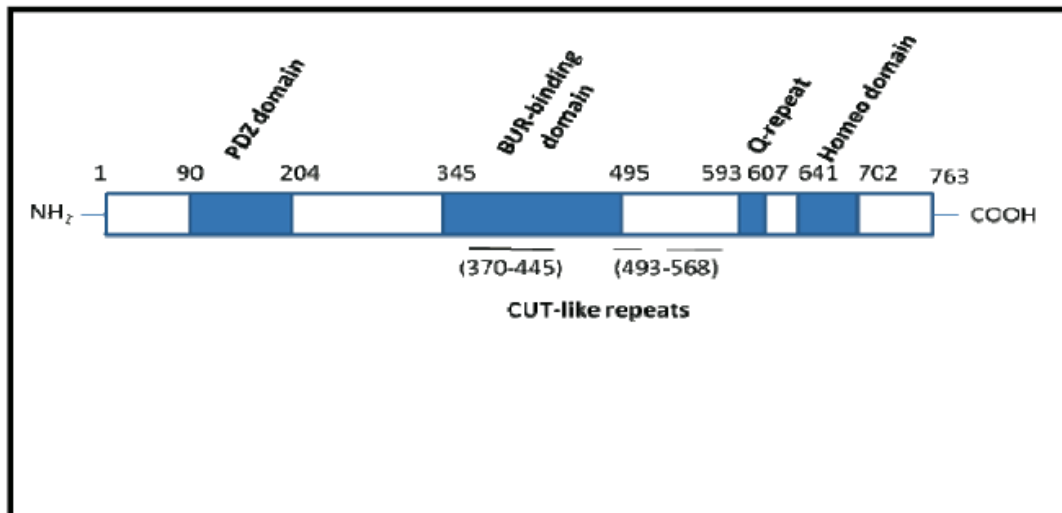
2.4.2 Η πρωτεΐνη SATB1

Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη SATB1 (Special AT-rich Binding protein 1) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην οργάνωση ανώτερης δομής χρωματίνης. Συμμετέχει στην κυτταρική ανάπτυξη και στην κυτταρική διαφοροποίηση. Είναι γνωστό ότι η SATB1 είναι μία ιστοειδικά εκφραζόμενη πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα στο θύμο αδένα (Krangel 2007). Η πρωτεΐνη αποτελείται από 764 αμινοξέα. Η SATB1 εκφράζεται κυρίως στα θυμοκύτταρα, έχοντας μοριακό βάρος 115 kDa, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι σχηματίζει ένα πρωτεϊνικό δίκτυο που ομοιάζει με κλωβό (cage-like pattern), το οποίο περιβάλλει την ετεροχρωματίνη. Η SATB1 πακετάρει την χρωματίνη σε πολλές μικρές θηλιές συμβάλλοντας έτσι στη διαμόρφωση ανώτερης δομής της χρωματίνης (Εικόνα 8). Η πρωτεΐνη SATB1 αναγνωρίστηκε και περιγράφηκε από το εργαστήριο της Kohwi-Shigematsu το 1992 (Dickinson, 1992).



Εικόνα 8. Η SATB1 σχηματίζει ένα πρωτεϊνικό δίκτυο που ομοιάζει με κλωβό μέσα στον πυρήνα (αριστερά), προσδένεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA μέσα στα γονίδια, πακετάρει τη χρωματίνη σε θηλιές και στρατολογεί ένζυμα για την έκφραση ή την καταστολή των γονιδίων (δεξιά).

Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί οι εξής πρωτεϊνικές επικράτειες (Εικόνα 9) στην SATB1: BUR-επικράτεια πρόσδεσης (BUR-binding domain), μία μη τυπική ομοεπικράτεια (homeodomain), δύο επαναλήψεις CUT (CUT repeats), και μία PDZ επικράτεια (Nakagomi *et al.*, 1994; Dickinson *et al.*, 1997; Galande *et al.*, 2001). Η BUR-επικράτεια πρόσδεσης, ένα πολυπεπίδιο 150 αμινοξέων μερικώς αλληλεπικαλυπτόμενο με τις επαναλήψεις CUT, είναι απαραίτητη ώστε η SATB1 να ξεχωρίσει τα BUR από DNA αλληλουχίες πλούσιες σε AT. Όταν 21 αμινοξέα από οποιοδήποτε άκρο αυτής της επικράτειας απαλειφθούν, τότε χάνεται η δραστηριότητα πρόσδεσης στο DNA (DNA binding activity) (Nakagomi *et al.*, 1994).



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση των χαρακτηρισμένων επικρατειών της SATB1.

Αν και η BUR-επικράτεια πρόσδεσης (αμινοξικά κατάλοιπα 346-495) είναι από μόνη της πλήρως λειτουργική και μπορεί να αναγνωρίσει ειδικά αλληλουχίες DNA, από την άλλη μεριά η ομοεπικράτεια (αμινοξικά κατάλοιπα 641-702) της SATB1 δεν είναι από μόνη της επαρκής για την πρόσδεση στο DNA. Ενώ ο συνδυασμός αυτών των δύο είναι που αυξάνει την ειδικότητα πρόσδεσης, ώστε η SATB1 να αναγνωρίσει με εξειδίκευση συγκεκριμένα στοιχεία εντός των σωστών αλληλουχιών (Dickinson *et al.*, 1997). Η SATB1 πρέπει να διμεριστεί με σκοπό να προσδεθεί στο DNA και ο ομοδιμερισμός αυτός μεσολαβείται από την PDZ επικράτεια (αμινοξικά κατάλοιπα 90-204) (Galande *et al.*, 2001). Σε αρχικό στάδιο της απόπτωσης η SATB1 διασπάται από την κασπάση 6, η οποία διαχωρίζει την PDZ επικράτεια από την BUR-επικράτεια και την ομοεπικράτεια, οδηγώντας στην ταχεία απομάκρυνση της SATB1 από τη χρωματίνη. Η επικράτεια PDZ είναι μια αρκετά καλά χαρακτηρισμένη επικράτεια που μεσολαβεί για αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών (protein-protein interaction) (Galande *et al.*, 2001). Οι περισσότερες πρωτεΐνες που περιέχουν PDZ επικράτεια και έχουν χαρακτηριστεί μέχρι πρότινος, σχετίζονται με την πλασματική μεμβράνη και εμπλέκονται στην πρόσληψη πρωτεϊνών σηματοδότησης σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα στη μεμβράνη (Fanning *et al.*, 1996). Από την άλλη μεριά η SATB1 αποτελεί μια από τις ελάχιστες πυρηνικές πρωτεΐνες με PDZ επικράτεια, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι σχηματίζει πρωτεϊνικά σύμπλοκα με πολλές πυρηνικές πρωτεΐνες.

Η χρωματινική δομή διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής λειτουργίας. Υπάρχουν ειδικές γονιδιοματικές περιοχές που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για πρόσδεση στο πυρηνικό πλέγμα. Αυτές οι περιοχές του DNA ονομάζονται περιοχές πρόσδεσης στο πυρηνικό πλέγμα (Matrix Attachment Regions, MAR) και είναι πλούσιες σε βάσεις AT. Χρησιμοποιούνται με έναν επιλεκτικό και δυναμικό τρόπο για πρόσδεση χρωματινικών βρόχων *in vivo* (Heng *et al.*, 2004). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η σύνδεση της χρωματίνης σε ένα πυρηνικό πλέγμα είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή και την αντιγραφή του DNA.

Όταν αφαιρεθούν οι περισσότερες πρωτεΐνες από τον πυρήνα, τότε το DNA προβάλλει με τη μορφή βρόχων από μία δομή που συγκροτείται από τις πρωτεΐνες που απέμειναν. Για να αναλυθούν οι υπάρχουσες περιοχές MAR, οι χρωμοσωμικοί βρόχοι αποσυμπυκνώνονται με εκχύλιση και απομάκρυνση των πρωτεϊνών. Η αφαίρεση των βρόχων DNA με χρήση περιοριστικών ενζύμων αφήνει συνδεδεμένες στο πλέγμα μόνο τις (πιθανές) *in vivo* αλληλουχίες MAR.

Η SATB1 αναγνωρίζει ειδικά μια συγκεκριμένη περιοχή DNA (Base Unpairing Region, BUR), που εντοπίζεται εντός των MARs. Η BUR περιοχή είναι ιδιαίτερα επιρρεπής σε ξετύλιγμα του DNA και αποτελεί σήμα κατατεθέν των MARs. Η SATB1 αποτελεί ίσως την πιο καλά χαρακτηρισμένη MAR-προσδεδόμενη πρωτεΐνη (MAR-binding protein, MBP), η οποία συμμετέχει στη διατήρηση και συμπύκνωση της χρωματινικής δομής. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω οργάνωσης της χρωματίνης σε διακριτές θηλιές και μέσω περιοδικής αγκυροβόλησης των MARs στο πυρηνικό πλέγμα (Cai *et al.*, 2003). Οι περιοχές MAR εμπλέκονται στη μεταγραφή αλλάζοντας την οργάνωση των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων και αυξάνοντας τη δυνατότητα των ενισχυτών να δρουν από μακρινές αποστάσεις. Σύμφωνα με αυτή την αντίληψη, έχειδειχτεί ότι η SATB1 ρυθμίζει μακρινά γονίδια μέσω επιλεκτικής πρόσδεσης των MARs στο πυρηνικό πλέγμα, οδηγώντας στο σχηματισμό του χαρακτηριστικού τρισδιάστατου δικτύου που ομοιάζει με κλουβί ('cage-like' network).

Εκτός από τον αρχιτεκτονικό ρόλο που κατέχει η SATB1 στη διαμόρφωση της χρωματινικής δομής, μέσω αγκυροβόλησής της στη βάση των χρωματινικών βρόχων, έχειδειχτεί ότι λειτουργεί και ως μεταγραφικός ρυθμιστής, στρατολογώντας σύμπλοκα αναδιοργάνωσης της χρωματίνης (Chromatin Remodeling Complexes), όπως είναι το NURD σύμπλοκο. Επίσης οι θέσεις πρόσδεσής της αποτελούν το επίκεντρο (hot spots) για επιγενετικές τροποποιήσεις, συνδέοντας έτσι τη λειτουργία της με τον κώδικα των ιστονών. Η στρατολόγηση των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που επιτελείται από τη SATB1 σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος, χρησιμεύει για τη συντονισμένη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης ακόμη και 50 kb από τις θέσεις πρόσδεσής της, καθώς και για τη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης, ελέγχοντας και τροποποιώντας τη διαμόρφωση και την προσβασιμότητα της χρωματίνης (Yasui *et al.* 2002; Cai *et al.* 2006).

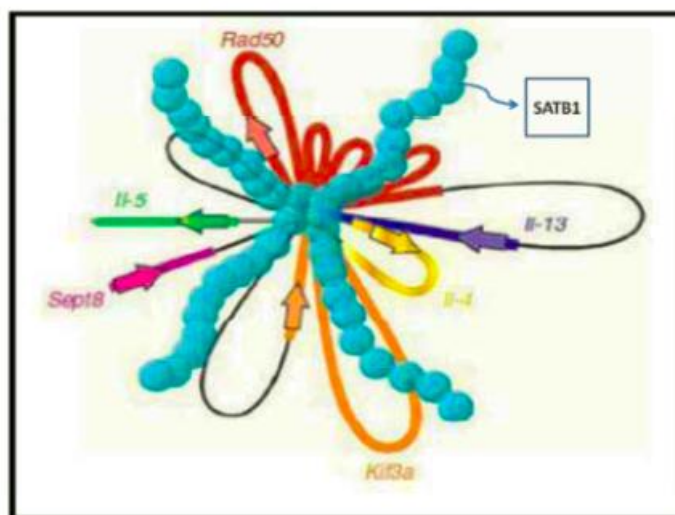
Η SATB1 παρουσιάζει διττό ρόλο σαν μεταγραφικός παράγοντας. Λειτουργεί τόσο σαν μεταγραφικός καταστολέας (repressor), όσο και σαν μεταγραφικός ενεργοποιητής (activator) διαφόρων γονιδίων. Αυτό εξαρτάται από τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της, καθώς και από τις πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά (Kumar *et al.*, 2006). Γονίδια που απορρυθμίζονται από εκτομή της SATB1 εκτείνονται γύρω από τις γονιδιοματικές περιοχές πρόσδεσής της, σε μήκος 4-60 kb, ενώ ολόκληροι οι γενετικοί τόποι των γονιδίων αυτών μπορούν να εκτείνονται ως και 100 kb από τις θέσεις πρόσδεσής της.

Θυμοκύτταρα στα οποία έχει γίνει εκτομή του γονιδίου της *Satb1*, δεν αναπτύσσονται πέρα από το στάδιο των διπλά θετικών θυμοκυττάρων (DP, CD4⁺CD8⁺), ενώ τα ποντίκια δεν ζουν περισσότερο από τρεις εβδομάδες. Επιπλέον, έλλειψη της SATB1 οδηγεί σε απορύθμιση των γονιδίων των κυτταροκινών,

υπογραμμίζοντας τη σπουδαιότητά της στην ανάπτυξη των T κυττάρων (Cai *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2000). Έχει επίσης αναφερθεί, ότι αποτελεί στόχο του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt, αλληλεπιδρώντας με τη β-κατενίνη και επηρεάζοντας την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των T κυττάρων βοηθών (Notani *et al.*, 2010). Πρόσφατα, η SATB1 αναγνωρίστηκε σαν εναρκτήριο παράγοντας αδρανοποίησης των γονιδίων μέσω Xist σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ESC) (Agrelo *et al.*, 2009). Επιπρόσθετα, η έκφραση της SATB1 σε ανθρώπινους όγκους μαστού σχετίζεται με την πρόκληση μεταστάσεων. Μελέτες έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση της SATB1 συσχετίζεται με βραχύτερη επιβίωση, αποκαλύπτοντας ότι η έκφραση της SATB1 αποτελεί φτωχό προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του μαστού (Han *et al.*, 2008).

Για την SATB1 είναι επίσης γνωστό ότι επάγεται ραγδαία μετά την ενεργοποίηση των T_H2 κυττάρων και ότι αλληλεπιδρά με πολλαπλές θέσεις στο γενετικό τόπο T_H2 μεσολαβώντας σε ενδοχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις του γενετικού τόπου T_H2 (Εικόνα 10). Η SATB1 πιθανώς συντονίζει τη μεταγραφή των γονιδίων των κυτταροκινών, σταθεροποιώντας και διευκολύνοντας τις φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενισχυτή, που εντοπίζεται εσωτερικά του *Rad50* LCR,

και των υποκινητών των γονιδίων των ιντερλευκινών (Gondor and Ohlsson, 2006). RNAi πειράματα έδειξαν ότι η SATB1 απαιτείται τόσο για τη διαμόρφωση του τόπου T_H2, όσο και για την επαγωγή των γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροκίνες. Οι ρυθμιστικές και οι διαμορφωτικές λειτουργίες της SATB1 μπορεί να εξυπηρετούν ένα και μόνο σκοπό: τη στρατολόγηση απομακρυσμένων περιοχών DNA σε κοινές περιοχές στις οποίες εντοπίζονται παράγοντες



Εικόνα 10. Μοντέλο χωροταξικής διαμόρφωσης της SATB1 που προσδέεται στον γενετικό τόπο T_H2, και ευνοεί τις ενδοχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις του τόπου επάγοντας έτσι την έκφραση των κυτταροκινών που τον απαρτίζουν.

αναδιοργάνωσης χρωματίνης. Η επαγόμενη διαμορφωμένη κατάσταση είναι επίσης πιθανό να ανοίγει το δρόμο για σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ άλλων απομακρυσμένων *cis* ρυθμιστικών στοιχείων (Cai *et al.*, 2006).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της SATB1 μπορούν να ελέγχουν τις αλληλεπιδράσεις και να τη μετατρέπουν από καταστολέα σε ενεργοποιητή. Η φωσφορυλιωμένη SATB1, σε συγκεκριμένες θέσεις, αλληλεπιδρά με την απακετυλάση HDAC1 και λειτουργεί σαν καταστολέας, ενώ αν είναι αποφωσφορυλιωμένη στην ίδια θέση αλληλεπιδρά με την ακετυλοτρανσφεράση

(Histone acetyltransferase, HAT) PCAF με αποτέλεσμα να χάνει την ικανότητα πρόσδεσής της στις MARs περιοχές. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι ο ανθρώπινος υποκινητής της IL-2 καταλαμβάνεται και καταστέλλεται από τη φωσφορυλιωμένη SATB1 και την HDAC1 σε μη ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα (παρθένα CD4⁺) (Kumar *et al.*, 2005). Αντίθετα στα ενεργοποιημένα κύτταρα, η αποφωσφορυλιωμένη SATB1 σε συνδυασμό με την PCAF οδηγεί στην αποκαταστολή του υποκινητή της IL-2, συνεπώς και στην ενεργοποίησή του (Kumar *et al.*, 2006). Κατόπιν, η SATB1 και η HDAC1 απομακρύνονται από τον υποκινητή (Kumar *et al.*, 2007).

2.4.3 Η πρωτεΐνη BACH1

Η BACH1 (BTB and CNC homology 1 transcription factor) είναι μία πρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA και ανήκει στις πρωτεΐνες με βασική περιοχή cap 'n' collar της ομάδας των μεταγραφικών παραγόντων τύπου φερμουάρ λευκίνης (CNC-bZip). Συγκεκριμένα ανήκει στην οικογένεια bZip πρωτεϊνών. Η βασική πρωτεΐνη αποτελείται από 739 αμινοξέα στο ποντίκι και φέρει δύο βασικές υποεπικράτειες: BTB επικράτεια και τη βασική περιοχή του φερμουάρ λευκίνης (basic region leucine zipper, bZip domain) (Εικόνα 11). Σε αντίθεση με άλλα μέλη της οικογένειας CNC, η BACH1 διαθέτει BTB/POZ επικράτεια (“*Broad complex, Tramtrack, Bric-a-brac*/rochvirus and zinc finger”) στο αμινοτελικό (N-τελικό) της άκρο. Οι επικράτειες BTB/POZ επιτρέπουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, καθώς και το σχηματισμό όμοιο- και έτερο- ολιγομερών (Oyake *et al.*, 1996).



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση των χαρακτηρισμένων επικρατειών της BACH1.

Μελέτες έχουν δείξει ότι σχηματίζει ετεροδιμερές με την MAFK, που είναι μέλος της οικογένειας των μικρών πρωτεϊνών MAF (MAFF, MAFG, MAFK) και λειτουργεί σαν καταστολέας της μεταγραφής, αναγνωρίζοντας ειδικές αλληλουχίες DNA των γονιδίων που ρυθμίζει, οι οποίες λέγονται στοιχεία αναγνώρισης Maf (Maf Recognition Element, MARE). Η έκφραση της BACH1 είναι καθολική (ubiquitous), ενώ επίσης προσδένεται *in vitro* σε NF-E2 θέσεις πρόσδεσης, στοιχεία απόκρισης για τη μεταγραφή κατά την αιμοποίηση, δημιουργώντας ετεροδιμερή με την MAFK. Επιπλέον, σημαντικό είναι το γεγονός ότι τόσο η BACH1 όσο και η MAFK εκφράζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους (Abate *et al.*, 2007).

Σε περίπτωση οξειδωτικού στρες επάγεται η έκφραση της οξυγενάσης της αίμης-1 (HO-1), η οποία έχει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα επίπεδα έκφρασης της HO-1 είναι αρκετά χαμηλά, ενώ επάγονται δραματικά σε περίπτωση οξειδωτικού στρες (Ishikawa *et al.*, 2005). Οι ρυθμιστικές περιοχές του υποκινητή και των ενισχυτών της *HO-1* περιέχουν MARE αλληλουχίες αναγνώρισης, οι οποίες αναγνωρίζονται από την bZip οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων όπως είναι η NRF2 ή η BACH1 που σχηματίζουν ετεροδιμερή με την MAFK (Igarashi and Sun, 2006). Μάλιστα, η ανταλλαγή εταίρου κατά το διμερισμό της MAFK λειτουργεί ως διακόπτης για τη μετατροπή από την ανενεργή στην ενεργή κατάσταση.

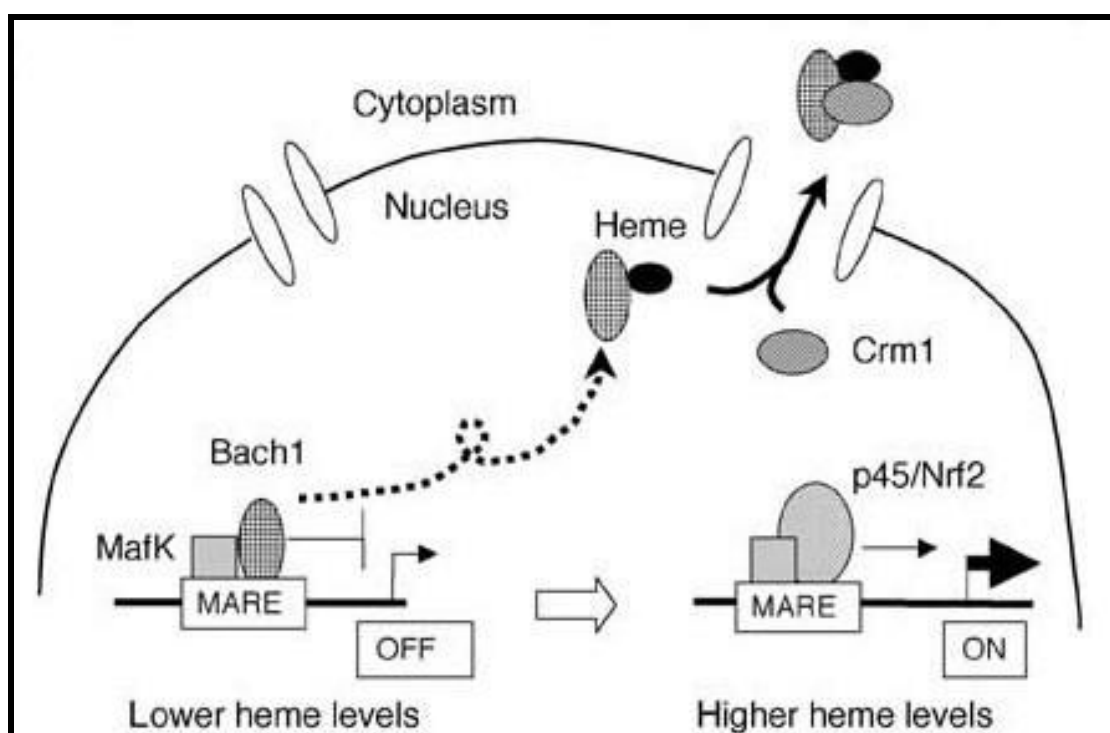
Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα του ρόλου που κατέχει η BACH1, φαίνεται στη ρύθμιση της έκφρασης της HO-1. Η έκφραση της HO-1 προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτικό στρες. Η BACH1 δρα ως μεταγραφικός καταστολέας της οξυγενάσης της αίμης-1, καθώς σχηματίζει ετεροδιμερές με τις μικρές MAF πρωτεΐνες, όπως με την MAFK και ως ετεροδιμερές προσδένεται σε MARE αλληλουχίες καταστέλλοντας έτσι τη μεταγραφή του *HO-1*. Αντίθετα τα ετεροδιμερή των μικρών MAF πρωτεϊνών με την NRF2 ενεργοποιούν τη μεταγραφή. Η κατασταλτική δράση της BACH1 είναι επικρατής έναντι της δραστηριότητας της NRF2, εμποδίζοντας αποτελεσματικά την έκφραση της HO-1 υπό φυσιολογικές συνθήκες (Sun *et al.*, 2002). Αυτό υποδηλώνει ότι η ρύθμιση της *HO-1* συνεπάγεται τον ανταγωνισμό μεταξύ της BACH1 και της NRF2 για αλληλεπίδραση με τις μικρές MAF πρωτεΐνες.

Μια παρόμοια ανταγωνιστική ρύθμιση από MAF ετεροδιμερή έχει περιγραφεί κατά την διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων των ερυθρών αιμοσφαιρίων (erythroid differentiation) κατά την οποία, η έκφραση του γονιδίου της β-σφαιρίνης ρυθμίζεται από την LCR. Ανάλυση δομής-λειτουργίας έχει δείξει ότι η LCR περιέχει εσωτερικά επαναλαμβανόμενα στοιχεία αναγνώρισης MAF (MAF Recognition Element, MARE), τα οποία αναγνωρίζονται από το μεταγραφικά ενεργό σύμπλοκο NRF2, ένα ετεροδιμερές των p45/MAFK, ή από το μεταγραφικά ανενεργό σύμπλοκο BACH1/ MAFK. Βρέθηκε ότι πριν τη διαφοροποίηση η MAFK αλληλεπιδρά με την BACH1, και ως ετεροδιμερές προσδένεται στα στοιχεία MARE, μέσα στην LCR της β-σφαιρίνης σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα ποντικού (Murine Erythroid Leukemia, MEL), όπου το γονίδιο της β-σφαιρίνης είναι ανενεργό (Igarashi *et al.*, 1998). Μετά τη διαφοροποίηση των κυττάρων, όπου το γονίδιο της β-σφαιρίνης μεταγράφεται, η MAFK αλληλεπιδρά με την p45 σχηματίζοντας το πρωτεϊνικό σύμπλοκο NF-E2 (Igarashi *et al.*, 1994; Brand *et al.*, 2004).

Έρευνες δείχνουν ότι η αίμη (heme) προσδένεται στο μεταγραφικό καταστολέα BACH1, εμποδίζοντας την πρόσδεσή του στα στοιχεία MARE (Ogawa *et al.*, 2001). Για το λόγο αυτό γεννήθηκε το ερώτημα αν η ανταλλαγή παραγόντων που συμβαίνει στους ενισχυτές του γονιδίου *HO-1* πριν και μετά τη μεταγραφική ενεργοποίηση οφείλεται στην πρόσδεση της αίμης στην BACH1. Στη συνέχεια, επιβεβαιώθηκε η υπόθεση αυτή πειραματικά, αποδεικνύοντας ότι η αίμη ρυθμίζει τη δυναμική ανταλλαγή των MAF ετεροδιμερών (Sun *et al.*, 2004). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η αίμη επάγει την έξοδο της BACH1 από τον πυρήνα με έναν Crm1-εξαρτώμενο τρόπο, αλλά ο λειτουργικός ρόλος αυτής της κυτταροπλασματικής

της παρακράτησης παραμένει αδιευκρίνιστος (Suzuki, 2004). Επομένως, η BACH1 προσδένεται σε στοιχεία MARE για να καταστείλει τη μεταγραφή όταν τα επίπεδα της αίμης είναι χαμηλά. Ενώ αντίθετα, αυξημένα επίπεδα αίμης εκτοπίζουν την BACH1 από ενισχυτές και επάγουν την πυρηνική της έξοδο, αφήνοντας τα στοιχεία MARE διαθέσιμα για πρόσδεση ενεργών MAF συμπλόκων, συμπεριλαμβανομένου και του NF-E2 (Εικόνα 12).

Επιπρόσθετα, η υποκυτταρική τοποθεσία της BACH1 ελέγχεται και από άλλο έναν παράγοντα, το κάδμιο. Το κάδμιο, όπως και η αίμη είναι επαγωγείς του *HO-1* και επάγουν την έξοδο της BACH1 από τον πυρήνα (Suzuki, 2003).



Εικόνα 12. Μοντέλο που περιγράφει τη ρύθμιση του *HO-1* ή άλλων γονιδίων-στόχων της BACH1 παρουσία χαμηλών ή υψηλών επιπέδων αίμης (heme).

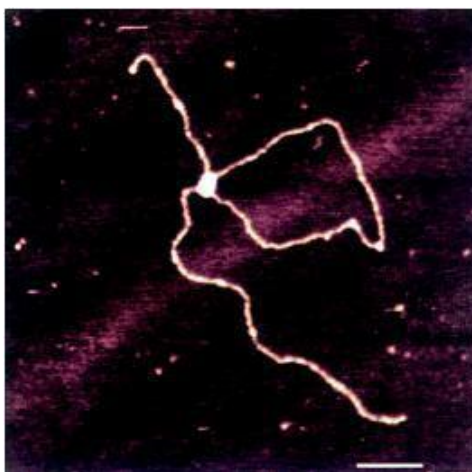
Αξίζει να τονιστεί ότι, το miR-155 είναι ένα TNFα-επαγόμενο ενδοθηλιακό microRNA (miRNA), το οποίο προσδένεται στο mRNA της *Bach1*. Ολιγονουκλεοτίδια που μιμούνται αποτελεσματικά το miR-155, εμποδίζουν τη μετάφραση του *Bach1*, με αποτέλεσμα αυτό να συνεπάγεται την αύξηση της συγκέντρωσης των mRNA επιπέδων της *HO-1* και συνεπώς την έκφρασή της σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επομένως, η αυξημένη έκφραση της *HO-1* στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω TNFα, προκύπτει από επαγόμενη καταστολή της BACH1 από miR-155, το οποίο δρα ως κυτταροπροστατευτικό κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, αυξάνοντας την έκφραση *HO-1* στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Pulkkinen *et al.*, 2011).

Επίσης όπως προκύπτει από μία πρόσφατη έρευνα, η BACH1 ρυθμίζει την παραγωγή των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs), ειδικά των μακροφάγων

και των δενδριτικών κυττάρων (DCs), στα ποντίκια. Η διαταραχή της ανάπτυξης των APCs στα ποντίκια $BACH1^{-/-}$ συνοδεύτηκε από ελαττώματα στις μετέπειτα αποκρίσεις των T- κυττάρων και από μερική προστασία από Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE). Μέσω γονιδιωματικής ανάλυσης μεγάλης κλίμακας αναγνωρίστηκαν γονίδια που αποτελούν στόχο της $BACH1$ (π.χ $HO-1$) και μπορεί να είναι σημαντικά στην ανάπτυξη των APCs. Κατά την εκτομή της $BACH1$ στα APCs παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα μεταγραφής της $HO-1$. Σε $Bach1^{-/-} HO-1^{-/-}$ ποντίκια παρατηρήθηκαν σχεδόν ελάχιστα έως καθόλου μακροφάγα και λιγότερα δενδριτικά κύτταρα, σε σύγκριση με τα $Bach1^{-/-}$ ποντίκια, τονίζοντας τη σημασία του $BACH1:HO-1$ μονοπατιού στην ανάπτυξη των APCs (So *et al.*, 2011).

Σχετικά με την $BACH1$ και τις χρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις, είναι γνωστό ότι η $BACH1$ προσδένεται στην LCR του ανθρώπινου γενετικού τόπου της β-σφαιρίνης και μεσολαβεί στη δημιουργία μεγάλων βρόχων στο DNA (Εικόνα 13). Αποδείχτηκε ότι ο σχηματισμός των βρόχων του DNA απαιτεί τη λειτουργικότητα της $BACH1$ και συγκεκριμένα της επικράτειας BTB/POZ που μεσολαβεί στις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Yoshida *et al.*, 1999).

Εφόσον έχει δείχτεί ότι οι πρωτεΐνες SATB1 και $BACH1$ μεσολαβούν σε ενδοχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις, είναι πιθανό να μπορούν να μεσολαβήσουν και σε διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις, όπως για παράδειγμα των τόπων $T_H2-IFN\gamma$. Ωστόσο η συμμετοχή των συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις είναι κάτι το οποίο μένει να αποδειχτεί.



Εικόνα 13. Το ετεροδιμερές MAFK- $BACH1$ φέρνει κοντά 2 διαφορετικά ρυθμιστικά στοιχεία (MAREs) εντός της LCR του ανθρώπινου γενετικού τόπου της β-σφαιρίνης, με το σχηματισμό θηλιάς.

2.5 Σκοπός της εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να ερευνησουμε αν η φωσφορυλίωση των καταλοίπων S635 και S448 των πρωτεϊνών SATB1 και BACH1 αντίστοιχα, ευθύνεται για την υποκυτταρική τους τοποθέτηση. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των κωδών περιοχών των γονιδίων (cDNA) και μετάλλαξη του καταλοίπου σερίνης σε αλανίνη και στη συνέχεια σύντηξη του υπό μελέτη γονιδίου (αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου) με το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) σε ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης (pEGFP-c3). Ακολούθως, έγινε διαμόλυνση HEK 293 T κυττάρων με φορέα έκφρασης (pEGFP-c3) που εκφράζει την αγρίου τύπου BACH1 πρωτεΐνη σε σύντηξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (EGFP) όπως επίσης και με φορέα έκφρασης (pEGFP-c3) που εκφράζει τη μεταλλαγμένη BACH1 πρωτεΐνη (Ser448A) σε σύντηξη με την EGFP. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η υποκυτταρική τοποθέτηση των χιμαιρικών πρωτεϊνών με τη χρήση μικροσκοπίας.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

Τα στελέχη *Escherichia coli* που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων μετασχηματισμού ήταν τα DH5a.

Ο πλασμιδιακός φορέας pCR II, που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου *Satb1* ήταν της εταιρείας Invitrogen. Ο φορέας έκφρασης pEGFP-C3 μας παραχωρήθηκε από το εργαστήριο του κ. Παπαματθαϊάκη και ήταν της εταιρείας BD Biosciences Clontech.

Για τον καθαρισμό τμημάτων DNA μετά από αντίδραση PCR και για την εκχύλιση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα: PCR Purification Combo Kit και PureLink™ Quick Gel Extraction Kit, αντίστοιχα, της εταιρείας Invitrogen. Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας έγινε χρήση του πακέτου υλικών (midi-preparation, QIAGEN R Plasmid Purification kit).

Τα περιοριστικά ένζυμα και τα αντίστοιχα διαλύματα δράσης τους ήταν από τις εταιρείες MINOTECH biotechnology και New England Biolabs. Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια της εφαρμογής Oligos και παρασκευάστηκαν από το εργαστήριο Μικροχημείας (IMBB, ITE).

Το θρεπτικό υλικό DMEM, που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων ήταν της εταιρείας Gibco®. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού HEK293T (Human Embryonic Kidney) τα οποία ανήκουν στην κυτταρική σειρά 293T (cell line), η οποία είναι παράγωγη της 293 κυτταρικής σειράς μέσα στην οποία έχει εισαχθεί το ευαίσθητο στην θερμοκρασία γονίδιο που κωδικοποιεί για το SV40 T-antigen. Έγινε επιλογή αυτών των κυττάρων γιατί διαμολύνονται πολύ εύκολα.

Η εξελικτική συντήρηση των γενετικών περιοχών μελετήθηκε με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων ECR Browser.

3.2 Μέθοδοι

Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (Site directed mutagenesis)

Για την κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση χρησιμοποιήθηκε το QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA).

Στόχος ήταν η μετάλλαξη του γονιδίου *Bach1* στις θέσεις 1342-1344 ζευγών βάσεων (base pairs, bp) που αντιστοιχούν στο κατάλοιπο σερίνης 448 (Ser448) για τη μετατροπή του σε αλανίνη (Ser448A).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μετάλλαξη του *Bach1* είναι τα ακόλουθα ολιγονουκλεοτίδια (Εικόνα 14):

Bm- FOR: 5' - CTG GCC TGG CTC GGG GGC CTC ACT GAT CC-3' και

Bm- REV: 5'-GG ATC AGT GAG GCC CCC GAG CCA GGC CAG-3'.

Οι εκκινητές έχουν μήκος 29 νουκλεοτίδια. Στους εκκινητές έχει υπογραμμιστεί η θέση της μετάλλαξης.

Η επιθυμητή μεταλλαγή επιβεβαιώθηκε μέσω νουκλεοτιδικής αλληλούχισης.

Επιθυμητή μεταλλαγή	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')
S448A	Bm- FOR	CTGGCCTGGCTCGGGGG <u>GCC</u> CTCACTGATCC
	Bm-REV	GATCAGTGAGG <u>GCC</u> CCCCGAGCCAGGCCAG

Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση της επιθυμητής μεταλλαγής στο κατάλοιπο σερίνης 448 καθώς και των αλληλουχιών των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για τη μεταλλαξιγένεση

Τα συστατικά των αντιδράσεων της PCR που εκτελέστηκαν ήταν:

Μήτρα DNA	50ng
10x Pfu Ultra ρυθμιστικό διάλυμα	5μl
dNTPs 10mM	1μl
DMSO 5%	2.5μl
Εκκινητής Forward (5ng/μl)	1.3μl
Εκκινητής Reverse (5ng/μl)	1.3μl
Pfu Ultra HF DNA πολυμεράση (2.5 U/μl)	1μl
ddH ₂ O	Προσθήκη μέχρι τελικό όγκο 50μl

Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το παρακάτω:

1. 95°C για 5 λεπτά
2. 95°C για 1 λεπτό
3. 68°C για 1 λεπτό
4. 72°C για 10 λεπτά
5. Τα στάδια 2-4 επαναλήφθηκαν για άλλες 18 φορές
6. 72°C για 9 λεπτά
7. 4°C επ' αόριστον

Πέψη του προϊόντος της PCR με DpnI

Προσθέτουμε 1μl DpnI (10U/μl), στο προϊόν της PCR. Μετά την προσθήκη ανακατεύουμε καλά το μείγμα της αντίδρασης και φυγοκεντρούμε για 10 δευτερόλεπτα. Μετά επωάζουμε τα δείγματα στους 37°C, για μία ώρα. Έτσι το πατρικό μη μεταλλαγμένο πλασμίδιο θα υποστεί πέψη, ενώ το νεοσυντιθέμενο μεταλλαγμένο πλασμίδιο θα παραμείνει άθικτο. Το ένζυμο DpnI αναγνωρίζει μεθυλιωμένο και ημιμεθυλιωμένο DNA (αλληλουχία στόχος: 5'-Gm⁶ATC-3').

Μετασχηματισμός πλασμιδίου σε βακτήρια E.coli

Επώαση δεκτικών βακτηριακών κυττάρων (competent cells) από τους -80°C στον πάγο για 5 λεπτά. Προσθήκη 5μl από την αντίδραση συγκόλλησης (κατά τη διάρκεια της μετάλλαξης η προσθήκη έγινε από το προϊόν της PCR που είχε υποστεί κατεργασία με DpnI) ποτέ δεν γίνεται προσθήκη άνω των 200ng DNA. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Επώαση στους 42 °C για 90 δευτερόλεπτα. Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά. Προσθήκη 1 ml θρεπτικού LB και επώαση στους 37 °C για 1 ώρα. Φυγοκέντρηση κυττάρων στις 14.000 rpm για 30 δευτερόλεπτα. Απομάκρυνση θρεπτικού με χρήση φλόγας, ώστε να μείνουν περίπου 100μl. Επαναδιαλυτοποίηση και στρώσιμο των κυττάρων σε τρυβλίο petri το οποίο περιέχει θρεπτικό με το κατάλληλο αντιβιοτικό.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από E.coli μικρής κλίμακας (miniprep)

Μετά το μετασχηματισμό των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων με τους ανασυνδυασμένους φορείς, 5-10 αποικίες από την επιφάνεια των τρυβλίων επιλογής ενοφθαλμίστηκαν, κάθε μια ξεχωριστά, σε 3-5ml LB το οποίο περιείχε το αντιβιοτικό αμικικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100μg/μl. Ακολούθησε επώαση για 12 ώρες υπό ανάδευση στους 37°C. Την επόμενη ημέρα 1.5ml από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε σωληνάριο και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (14.000 rpm για 30 δευτερόλεπτα). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 200μl διαλύματος P1 (P1:

50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A) και στο εναίωρημα προστέθηκαν σε ίσες ποσότητες διαδοχικά τα διαλύματα P2 (P2: 0.2N NaOH, 1% SDS), γίνεται επώαση για 5 λεπτά όχι παραπάνω και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη του P3 (P3: 3 M οξικό κάλιο, pH 5.5). Μετά από ήπια ανάδευση τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (14.000 rpm, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου). Το ίζημα, που αποτελείται από το χρωμοσωμικό DNA και τα κυτταρικά υπολείμματα, απομακρύνθηκε. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καινούργιο σωληνάριο. Το πλασμιδιακό DNA καταβυθίστηκε με την προσθήκη στο υπερκείμενο, 0.7 όγκων ισοπροπανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 14.000 rpm, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται 100µl 70% αιθανόλης και ακολούθησε φυγοκέντρωση (14.000 rpm για 5 λεπτά). Στη συνέχεια γίνεται επαναίωρηση του ιζήματος σε 30-50µl ddH₂O. Η καθαρότητα και η συγκέντρωσή του υπολογίστηκαν φωτομετρικά, λαμβάνοντας δύο μετρήσεις, στα 260 nm και στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε με βάση τη σχέση: οπτική πυκνότητα (OD₂₆₀= 1) αντιστοιχεί σε 50 µg δίκλωνου DNA/ml διαλύματος. Η καθαρότητα του διαλύματος του DNA προσδιορίστηκε με βάση το λόγο OD₂₆₀/OD₂₈₀ και θεωρήθηκε καθαρό για OD₂₆₀/OD₂₈₀ =1,8-2.1.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από E.coli μεσαίας κλίμακας (midiprep) με κολώνα

Γίνεται φυγοκέντρωση 200ml από κάθε καλλιέργεια για 10 λεπτά στις 3.000 rpm και στους 4 °C. Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας (ίζημα) σε 8 ml διαλύματος επαναδιαλυτοποίησης (Resuspension Buffer). Ακολουθεί προσθήκη 8 ml διαλύματος λύσης (Lysis Buffer) και επώαση για 5 λεπτά. Γίνεται ήπια ανακίνηση. Έπειτα προστίθενται 12 ml διαλύματος εξισορρόπησης (Equilibration Buffer) στη περιφέρεια της κολώνας, ώστε αυτή να ενεργοποιηθεί. Μετά γίνεται προσθήκη 8 ml διαλύματος εξουδετέρωσης (Neutralization Buffer) στα κύτταρα και ακολουθεί ήπια ανακίνηση. Το διάλυμα των κυττάρων μεταφέρεται στην κολώνα. Η κολώνα ξεπλένεται με 5 ml Equilibration Buffer. Γίνεται προσθήκη 8 ml διαλύματος πλύσης (Wash Buffer) και το διάλυμα να περνάει με τη φυσική ροή της βαρύτητας (flow-through). Ακολουθεί προσθήκη 5 ml διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer) καθώς και η έκλυση πλασμιδιακού DNA σε νέο σωληνάριο. Προστίθενται 3.5 ml ισοπροπανόλης, γίνεται επώαση για 2 λεπτά. Γίνεται φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στις 3.000 rpm στους 4 °C και απομάκρυνση υπερκειμένου. Στη συνέχεια προστίθενται 2 ml 70% αιθανόλης, αναδεύουμε προσεκτικά και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 3.000 rpm στους 4 °C. Τέλος, γίνεται απομάκρυνση αιθανόλης, στέγνωμα και επαναδιαλυτοποίηση του DNA σε 100µl ddH₂O.

Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Σε ένα καθαρό σωλήνα προστίθενται τα ακόλουθα:

1. Επιθυμητή ποσότητα δείγματος DNA.
2. Κατάλληλο ανά περίπτωση ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10x) σε τελική συγκέντρωση 1x.
3. Κατάλληλη ποσότητα ενζύμου περιοριστικής ενδονουκλεάσης (έως 10% του συνολικού όγκου της αντίδρασης).

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 37 °C για 1-2 ώρες.

Καθαρισμός τμημάτων DNA μετά από PCR αντίδραση

1. Προσθήκη 200μl NT3 buffer ανά 100mg πηκτώματος αγαρόζης.
2. Προσθήκη διαλύματος σε κολώνα (Quick gel extraction column) και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11.000 rpm (επανάληψη έως ότου περάσει όλο το διάλυμα από την κολώνα).
3. Πλύσιμο με 600μl NT3 buffer και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11.000 rpm.
4. Φυγοκέντρωση και πάλι για 2 λεπτά στις 11.000 rpm για εκτενή αποστράγγιση.
5. Έκλουση DNA με προσθήκη 50 μl NE buffer το οποίο έχει προθερμανθεί στους 37 °C και προστίθεται στο κέντρο της κολώνας. Γίνεται επώαση για 1 λεπτό και μετά φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στις 14.000 rpm.

Εκχύλιση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

1. Επιλογή και επεξεργασία της περιοχής του πηκτώματος που περιέχει το επιθυμητό κομμάτι DNA, ελαχιστοποιώντας την ποσότητα αγαρόζης που το περιβάλλει.
2. Μέτρηση της μάζας του κομματιού αυτού με τη χρήση ευαίσθητης ζυγαριάς.
3. Προσθήκη 3 όγκων του πηκτώματος διαλύματος διαλυτοποίησης L3 για κάθε ένα όγκο του πηκτώματος.
4. Τοποθέτησή τους στους 50 °C για τουλάχιστον 10 λεπτά. Ανά 3 λεπτά γίνεται καλή ανάδευσή τους.
5. Μετά τη διαλυτοποίηση του πηκτώματος γίνεται επώαση για επιπλέον 5 λεπτά.
6. Προσθήκη 1 όγκου του πηκτώματος ισοπροπανόλης.
7. Μετά ακολουθεί ο καθαρισμός των τμημάτων DNA με τη χρήση του προηγούμενου πρωτοκόλλου (καθαρισμός των τμημάτων DNA μετά από αντίδραση PCR).

Κλωνοποίηση του γονιδίου *Satb1*

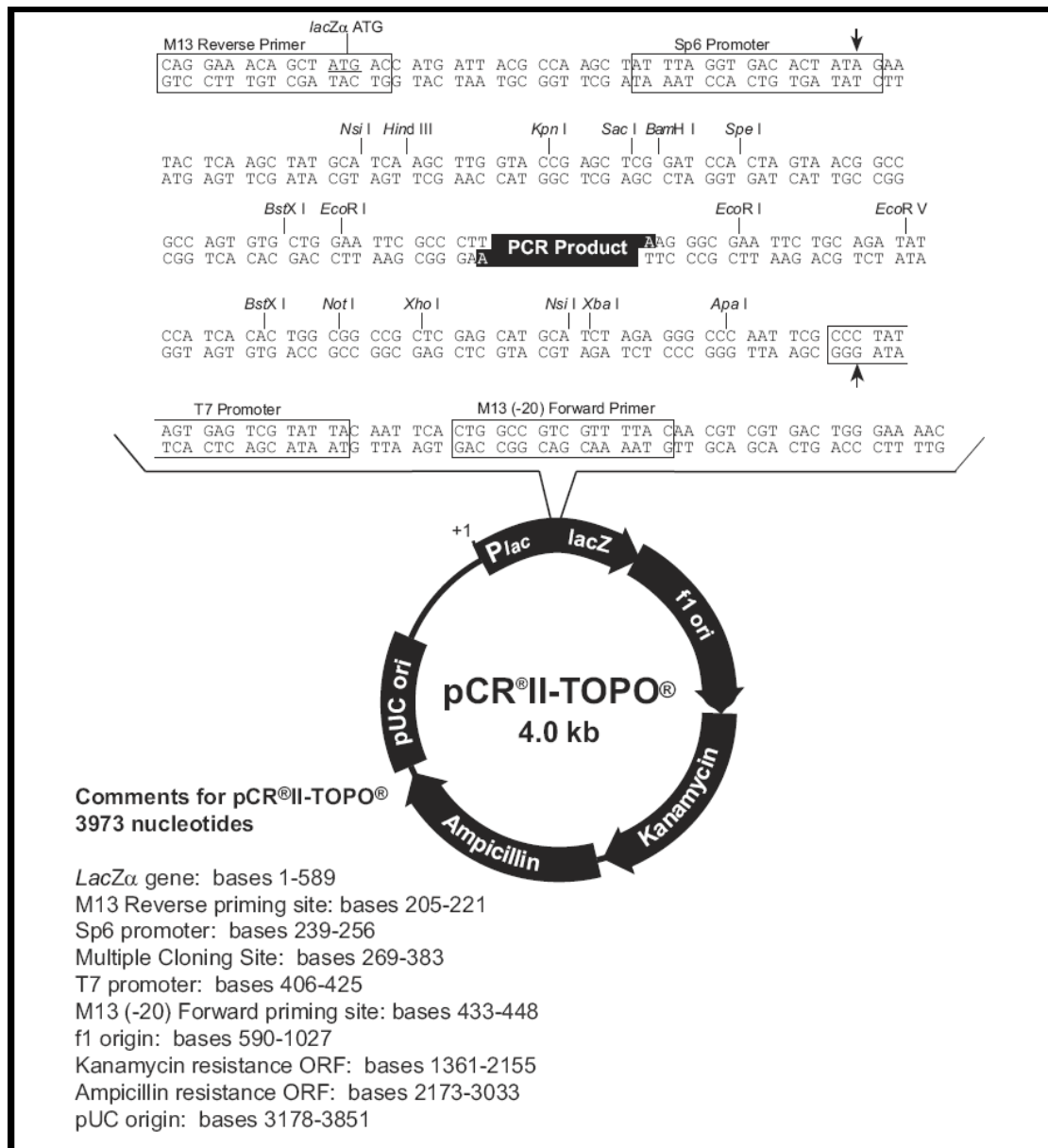
Χρησιμοποιώντας εκμαγείο cDNA από θυμοκύτταρα και ως εκκινητές τα ολιγονουκλεοτίδια SATB1-FOR (5' -GCC AGA TCT ATG GAT CAT TTG AAC GAGGC-3', με ενσωματωμένη την περιοριστική θέση BgIII η οποία υποδηλώνεται με την υπογράμμιση) και SATB1-REV (5' - GCC CTG CAG TCA GTC TTT CAA GTC GGCAT-3', με ενσωματωμένη την περιοριστική θέση PstI η οποία υποδηλώνεται με την υπογράμμιση) πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με τη χρήση του ενζύμου *TaKaRa LA Taq* DNA Polymerase, το οποίο προσθέτει επιλεκτικά ένα επιπλέον νουκλεοτίδιο αδενίνης ("A" nucleotide) στο 3' άκρο κατά τη διάρκεια της δημιουργίας του προϊόντος.

Στη συνέχεια έγινε εισαγωγή του PCR προϊόντος σε TOPO TA φορέα (pCR™ II-TOPO®) με τη χρήση του TOPO TA Cloning kit, ώστε να ακολουθήσει στη συνέχεια μετασχηματισμός σε DH5α κύτταρα. Ο γραμμικός φορέας που παρέχεται από το kit έχει 3' προεξέχοντα δεοξυθυμιδικά άκρα ("T" nucleotide). Επομένως αυτό επιτρέπει την αποτελεσματική ένωση του PCR προϊόντος με το γραμμικό φορέα, και βασίζεται στη συμπληρωματικότητα των βάσεων αδενίνης (A) με τη θυμίνη (T) στα δύο διαφορετικά κομμάτια DNA.

Ακολούθησε απομόνωση μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA και πέψη με περιοριστικά ένζυμα για τον καθορισμό του προσανατολισμού του γονιδίου *Satb1*, καθώς και για να ελεγχθεί η εισαγωγή και ο προσανατολισμός του γονιδίου. Τέλος, η πλασμιδιακή κατασκευή υποβλήθηκε σε νουκλεοτιδική αλληλούχιση στην εταιρία Macrogen.

Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης

Επιλέχθηκε ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης TOPO TA vector (pCR™ II-TOPO®) με μέγεθος 3.973 ζεύγη βάσεων (4kb) για την κλωνοποίηση της κωδικής περιοχής του γονιδίου *Satb1* (full length cDNA *Satb1*). Ο χάρτης του πλασμιδίου απεικονίζεται παρακάτω. Είναι εμφανείς οι θέσεις των εκκινητών M13 και T7, οι θέσεις περιορισμού συγκεκριμένων περιοριστικών ενζύμων καθώς και η θέση ένθεσης της αλληλουχίας ενδιαφέροντος. Ο φορέας προσδίδει επίσης ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αμικικιλίνη και καναμυκίνη (Εικόνα 15).



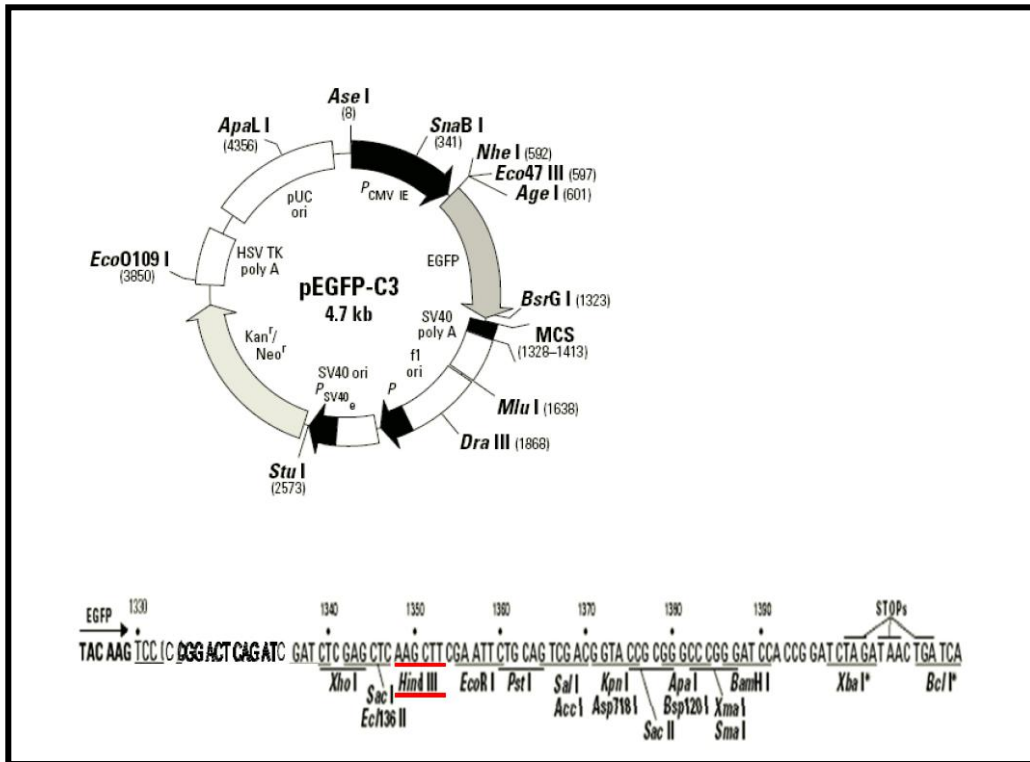
Εικόνα 15. Πλασμιδιακός φορέας pCR™ II-TOPO®.

Φορέας έκφρασης pEGFP-C3

Επιλέχθηκε ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pEGFP-C3 (που χρησιμοποιείται για έκφραση σε θηλαστικά) με μέγεθος 4.727 ζεύγη βάσεων (4.7kb) για την υποκλωνοποίηση της κωδικής περιοχής του αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου γονιδίου *Bach1* (wild type and mutated full length cDNA *Bach1*). Το υπό μελέτη γονίδιο εκφράζεται σε σύντηξη με το καρβοξυτελικό άκρο της EGFP. Ο ανασυνδυασμένος EGFP φορέας χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση των HEK293T κυττάρων καθώς και για την έκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνών και τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους. Ο χάρτης του πλασμιδίου απεικονίζεται παρακάτω.

Είναι εμφανείς, οι θέσεις περιορισμού συγκεκριμένων περιοριστικών ενζύμων στον πολυσυνδέτη (Multiple Cloning Site, MCS) καθώς και η θέση HindIII που χρησιμοποιήθηκε για την ένθεση του γονιδίου *Bach1* (υπογράμμισι με κόκκινο χρώμα) . Ο φορέας προσδίδει επίσης ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά νεομυκίνη και καναμυκίνη (Εικόνα 16).

Τα γονίδια *Bach1* (wild type and mutated) είναι κλωνοποιημένα στο φορέα κλωνοποίησης pCR 2.1 με μέγεθος 3.929 ζεύγη βάσεων, και περιέχουν δύο θέσεις αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου HindIII. Η μία βρίσκεται στον πολυσυνδέτη του πλασμιδίου και η άλλη εισήχθη με την PCR κατά την κλωνοποίηση του αγρίου τύπου γονιδίου. Επίσης στην εικόνα 15 φαίνεται η θέση περιορισμού HindIII που φέρει ο pEGFP-C3. Για το λόγο αυτό έγινε πέψη τόσο του pEGFP-C3 όσο και των κλωνοποιημένων γονιδίων *Bach1* (wild type and mutated) με το ένζυμο HindIII, ώστε να αποκτήσουν συμβατά άκρα. Τέλος, έγινε ένθεση των γονιδίων (full length cDNA *Bach1*) στον pEGFP-C3.



Εικόνα 16. Φορέας έκφρασης pEGFP-C3.

Μοριακή συγκόλληση τμημάτων DNA

Σε σωλήνα προστίθενται τα παρακάτω:

1. Κατάλληλη ποσότητα πλασμιδιακού DNA και τμήματος DNA ένθεσης, η οποία υπολογίζεται ακολούθως:

$$\text{ng of insert} = N * \frac{(\text{ng of vector}) * (\text{kb size of insert})}{(\text{kb size of vector})}, \text{ με } 3 < N < 10$$

2. Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης 10x.
3. Το ένζυμο T4 DNA λιγάση σε ποσότητα 1-3 units.
4. Νερό (ddH₂O) έως τον τελικό όγκο των 10-20 μl.

Στη συνέχεια η αντίδραση επωάζεται στους 16 °C για 1-2 ώρες (ή overnight).

Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με ίζημα φωσφορικού ασβεστίου

Το ίζημα για κάθε καλλιέργεια είναι το 1/10 του όγκου του θρεπτικού. Το DNA αναμιγνύεται με χλωριούχο ασβέστιο σε τελική συγκέντρωση 0.25M και στη συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος 2xHeBS (1.64% NaCl, 1.19% HEPES acid, 0.221% Na₂HPO₄ σε pH 7.05 με 5N NaOH). Το μίγμα αναμιγνύεται και επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να σχηματιστεί το ίζημα φωσφορικού ασβεστίου και έπειτα προστίθεται στην καλλιέργεια των κυττάρων. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες στους 37 °C, πλένονται 2 φορές με PBS και ξαναεπωάζονται για 24 ώρες στους 37 °C προτού συλλεχθούν. Στην προκειμένη περίπτωση προστέθηκε 1μg DNA από τα: pEGFP-C3- *bach1_wt* και pEGFP-C3- *bach1_mutated*.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Η πρωτεΐνη BACH1

Κατά τον προσδιορισμό των SATB1 και BACH1, ως πρωτεΐνες που προσδένονται στο γενετικό στοιχείο RHS6 του γενετικού τύπου T_H2, αναγνωρίστηκαν και δύο μη χαρακτηρισμένες φωσφορυλιώσεις. Μία φωσφορυλίωση αναγνωρίστηκε στη SATB1 στο κατάλοιπο σερίνης S635, και μία φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο σερίνης S448 της BACH1 (Π. Τζέρπος- Θ. Σαββίδης, αδημοσίευτα δεδομένα). Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να ερευνήσουμε αν αυτή η θέση φωσφορυλίωσης που εντοπίστηκε σε κάθε μια από τις δύο πρωτεΐνες, ευθύνεται για την υποκυτταρική της τοποθέτηση.

Αρχικά όσον αφορά την πρωτεΐνη BACH1, το γονίδιό της ήταν ήδη κλωνοποιημένο στο φορέα κλωνοποίησης pCR 2.1 με μέγεθος 3.929 ζεύγη βάσεων (Π. Τζέρπος- Θ. Σαββίδης, αδημοσίευτα δεδομένα). Κατά το σχεδιασμό των εκκινητών για την απομόνωση του cDNA αγρίου τύπου *Bach1* είχαν προστεθεί δύο αλληλουχίες που αποτελούν θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων KpnI και HindIII. Ο εκκινητής Forward περιείχε στο 5' άκρο του την αλληλουχία που αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο KpnI, ενώ ο εκκινητής Reverse περιείχε στο 3' άκρο του την αλληλουχία που αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο HindIII. Επόμενο βήμα ήταν η πραγματοποίηση μετάλλαξης του φωσφορυλιωμένου καταλοίπου σερίνης S448 που αντιστοιχεί στα ζεύγη βάσεων 1.342- 1.344 του cDNA αγρίου τύπου *Bach1*, με μέγεθος 2.220 ζεύγη βάσεων.

Στόχος ήταν η σερίνη να μεταλλαχθεί σε αλανίνη. Η αλανίνη χρησιμοποιείται λόγω της μη ογκώδους, χημικά αδρανούς, μεθυλικής λειτουργικής της ομάδας, η οποία παρόλα αυτά μιμείται δευτεροταγείς δομές που πολλά από τα άλλα αμινοξέα κατέχουν. Παρόλο που προσπαθήσαμε να δημιουργήσουμε αλληλουχία αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου εισάγοντας τη μετάλλαξη με όλους τους δυνατούς τρόπους των κωδικονίων που κωδικοποιούν για αλανίνη αυτό δεν ήταν εφικτό, επομένως εγκαταλείφθηκε αυτή η προσπάθεια. Η σερίνη (S448) που μας ενδιαφέρει να τροποποιηθεί κωδικοποιείται από το κωδικόνιο AGC (1.342- 1.344 ζ.β).

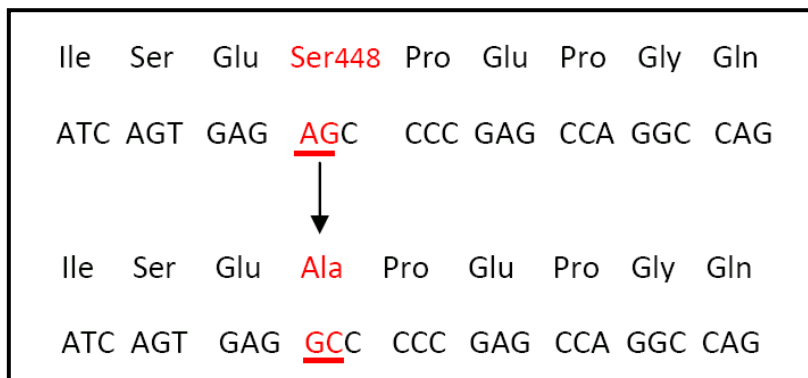
Ο γενετικός κώδικας χαρακτηρίζεται ως εκφυλισμένος και επομένως τα περισσότερα αμινοξέα κωδικοποιούνται από περισσότερα από ένα διαφορετικά κωδικόνια. Τα κωδικόνια που κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ ονομάζονται συνώνυμα. Αφού υπάρχουν παραπάνω από ένα κωδικόνια που κωδικοποιούν για ένα αμινοξύ, ερευνήσαμε ποιο από τα κωδικόνια που κωδικοποιούν για αλανίνη θα επέφερε τη μικρότερη αλλαγή στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *Bach1*. Τα κωδικόνια που κωδικοποιούν για αλανίνη είναι τα εξής: GCU, GCC, GCA και GCG. Τελικά καταλήξαμε στο κωδικόνιο GCG (Εικόνα 17).

Συνεπώς για την εισαγωγή της μετάλλαξης έπρεπε να επέμβουμε στη φάση σχεδιασμού των εκκινητών.

Η επιθυμητή μεταλλαγή έπρεπε να περιέχεται στη μέση της αλληλουχίας των εκκινητών. Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν ήταν οι ακόλουθοι:

Bm- FOR: 5' - CTG GCC TGG CTC GGG GGC CTC ACT GAT CC-3'

Bm- REV: 5'-GG ATC AGT GAG GCC CCC GAG CCA GGC CAG-3'



Εικόνα 17. Μετάλλαξη της σερίνης (S448) σε αλανίνη (κόκκινο χρώμα). Είναι εμφανής τόσο η αμινοξική αλληλουχία όσο και η νουκλεοτιδική καθώς και η αλλαγή μόνο δύο βάσεων (AG προς GC).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα το πλασμίδιο pCR 2.1 στο οποίο είχε κλωνοποιηθεί το *Bach1* (pCR 2.1- *Bach1*). Στην PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση Pfu Ultra HF, λόγω της υψηλής της πιστότητας. Κατά την αντίδραση PCR το πλασμίδιο υπέστη αποδιάταξη και οι εκκινητές που φέρουν την επιθυμητή μεταλλαγή υβρίδισαν στις σωστές αλληλουχίες. Μετά το τέλος της PCR, το προϊόν περιείχε τόσο το αρχικό μη μεταλλαγμένο πλασμίδιο, όσο και το νεοσυντιθέμενο μεταλλαγμένο πλασμίδιο.

Έπειτα, το προϊόν υπέστη πέψη με DpnI, ένα περιοριστικό ένζυμο που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-Gm⁶ATC-3' και πέπτει μόνο μεθυλιωμένο και ημιμεθυλιωμένο DNA. Το DNA που απομονώνεται από όλα σχεδόν τα *E.coli* στελέχη είναι μεθυλιωμένο dam και συνεπώς επιρρεπές σε πέψη με DpnI. Για το λόγο αυτό υπέστη πέψη μόνο το πατρικό μη μεταλλαγμένο πλασμίδιο, ενώ το μεταλλαγμένο θα παραμείνει άθικτο.

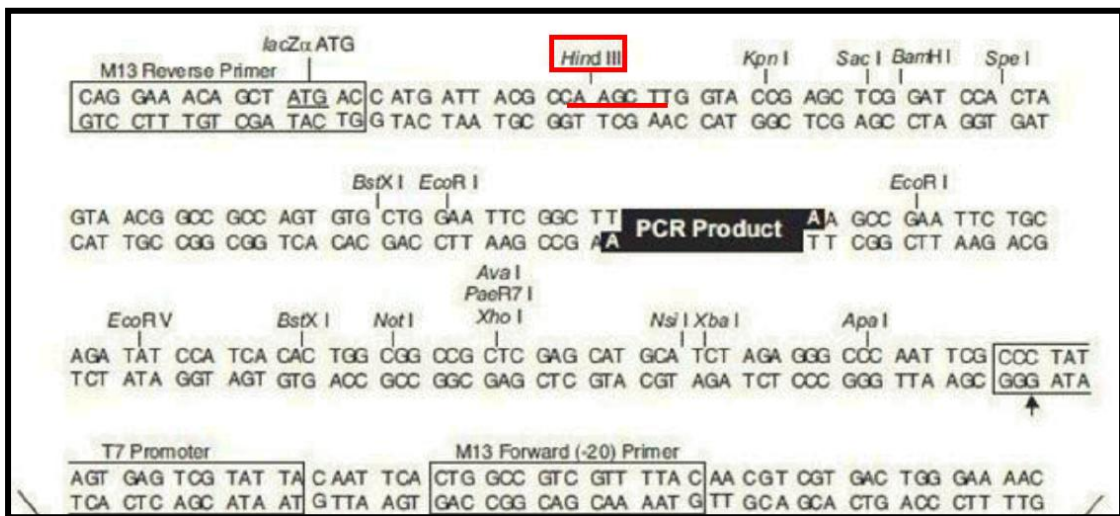
Στη συνέχεια ακολούθησε μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* του στελέχους DH5a. Μετά από 12 ώρες περίπου, αφού εμφανίστηκαν οι αποικίες, τοποθετήθηκαν καλλιέργειες με αυτές τις αποικίες στους 37°C και την επόμενη μέρα έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Μετά έπρεπε να επιβεβαιωθεί η εισαγωγή μετάλλαξης με αλληλούχιση DNA.

Έπειτα, μεταφέρθηκε το μεταλλαγμένο γονίδιο *Bach1*, αλλά και αυτό του αγρίου τύπου από το φορέα κλωνοποίησης pCR 2.1 (3.929 ζ.β) στον φορέα έκφρασης pEGFP-C3 (4.727 ζ.β). Οπότε αρχικά έγινε πέψη των πλασμιδιακών κατασκευών pCR 2.1-*Bach1* (αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου) με το περιοριστικό ένζυμο HindIII. Η αντίδραση επωάστηκε στους 37°C. Η μία θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου αντιστοιχεί στο φορέα, ενώ η άλλη αντιστοιχεί στο ένθεμα *Bach1* (wild type και mutant) (Εικόνα 18). Επομένως το νέο ένθεμα θα αποτελείται

από το *Bach1* και από 59 επιπλέον βάσεις (απόσταση *Bach1* μέχρι την θέση αναγνώρισης του ενζύμου *HindIII*). Άρα το νέο ένθεμα θα έχει μέγεθος 2.279 ζ.β (base pairs, bp).

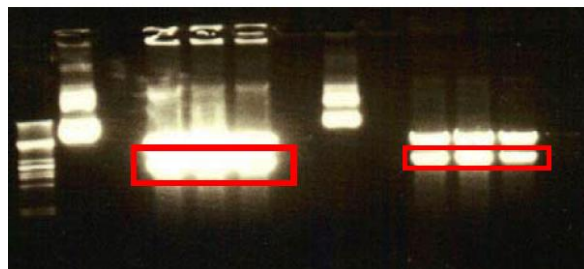
Παράλληλα έγινε πέψη του φορέα pEGFP-C3 με το ίδιο ένζυμο. Στη συνέχεια έγινε απομόνωση του γονιδίου *Bach1* (wild type και mutant) από 1% πήκτωμα αγαρόζης και καθαρισμός με το PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Εικόνα 19). Η σειρά με την οποία φορτώσαμε τα δείγματα είναι η ακόλουθη:

1. μάρτυρας: DNA φάγου λ κομμένος με *PstI*.
2. pCR 2.1-*Bach1* (wild type) χωρίς να υποστεί πέψη με *HindIII*.
- 4-6. pCR 2.1-*Bach1* (wild type) / *HindIII*.
8. pCR 2.1-*Bach1* (μεταλλαγμένο)/ χωρίς να υποστεί πέψη με *HindIII*.
- 10-12. pCR 2.1-*Bach1* (μεταλλαγμένο)/ *HindIII*.



Εικόνα 18. Πλασμιδιακός φορέας του pCR 2.1. Με κόκκινο χρώμα φαίνεται η θέση αναγνώρισης του ενζύμου *HindIII*.

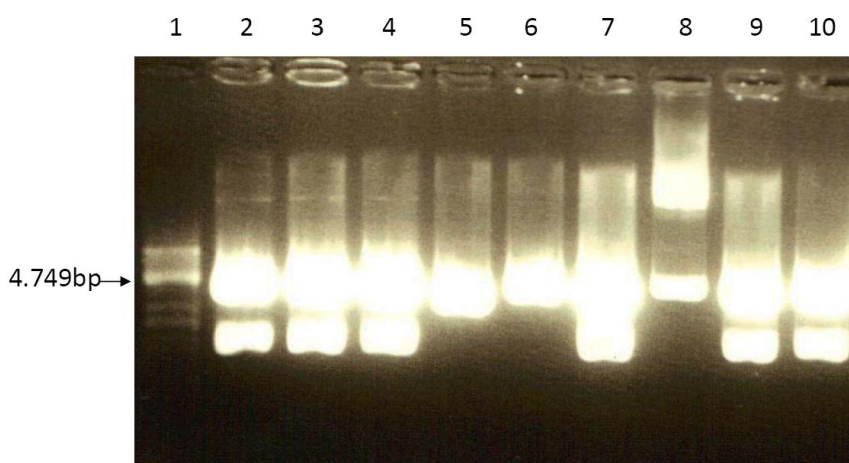
1 2 4 5 6 8 10 11 12



Εικόνα 19. Πέψη του pCR 2.1-*Bach1* (αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου) με *HindIII*. Με κόκκινο πλαίσιο φαίνονται οι ζώνες που αποσπάστηκαν.

Ο κομμένος φορέας pEGFP-C3 αποφωσφορυλιώθηκε για να μην επανασυνδεθούν τα συμβατά άκρα του και καθαρίστηκε με Ethanol precipitation. Ακολούθησε αντίδραση συγκόλλησης του αγρίου τύπου *Bach1* και του φορέα pEGFP-C3 καθώς και συγκόλληση του μεταλλαγμένου *Bach1* (S448) και του φορέα pEGFP-C3, χρησιμοποιώντας την T₄ λιγάση στους 16 °C, ενώ μετά έγινε βακτηριακός μετασχηματισμός σε κύτταρα *E.coli* του στελέχους DH5a. Συλλέξαμε 7 αποικίες που περιείχαν το μεταλλαγμένο γονίδιο και 2 αποικίες που περιείχαν το γονίδιο αγρίου τύπου. Τοποθετήθηκαν καλλιέργειες και έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

Μέρος του DNA χρησιμοποιήθηκε για πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HindIII (Εικόνα 20). Τα αναμενόμενα μεγέθη είναι η εμφάνιση δύο ζωνών σε 1,5% πήκτωμα αγαρόζης και για τις δύο πλασμιδιακές κατασκευές. Η μία έχει μέγεθος 4.727 ζ.β και αντιστοιχεί σε ολόκληρο το μέγεθος του φορέα, ενώ η άλλη έχει μέγεθος 2.279 ζ.β και αντιστοιχεί στο ένθεμα. Η σειρά με την οποία φορτώθηκαν τα δείγματα είναι η ακόλουθη: **1:** μάρτυρας, DNA φάγου λ κομμένος με PstI, **2-8:** Πέψη pEGFP-C3-μεταλλαγμένου *Bach1* με το ένζυμο HindIII, **9-10:** Πέψη pEGFP-C3-αγρίου τύπου *Bach1* με το ένζυμο HindIII. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω:

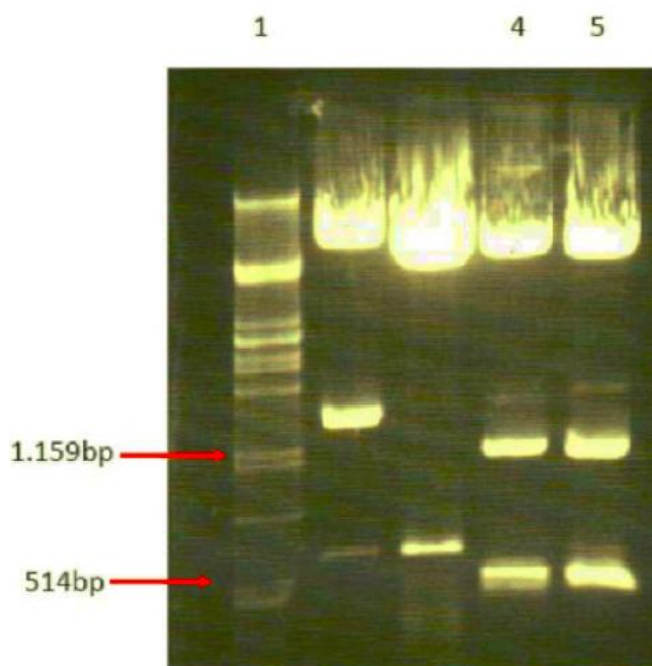


Εικόνα 20. Πέψη του pEGFP-c3-Bach1 αγρίου τύπου (9,10) και μεταλλαγμένου (2-8) με HindIII.

Παρατηρούμε ότι τα δείγματα (2), (3), (4), (7), (9) και (10) δίνουν τα αναμενόμενα πρότυπα. Από τα δείγματα που φαίνονται στη φωτογραφία επιλέχτηκε μόνο τα: (2) και (9) για περαιτέρω ανάλυση.

Στη συνέχεια αφού έγινε νέα απομόνωση πλασμιδιακού DNA, έγινε επανέλεγχος των δειγμάτων 2 και 9 με χρήση άλλου ενζύμου. Το δείγμα 2 αντιστοιχεί στο pEGFP-C3-μεταλλαγμένο *Bach1*, ενώ το δείγμα 9 αντιστοιχεί στο pEGFP-C3-μεταλλαγμένο *Bach1*. Επιλέξαμε ένα ένζυμο, του οποίου η αλληλουχία αναγνώρισης περιέχεται αρκετές φορές μέσα στο ένθεμα. Από την πέψη των αλληλουχιών αναγνώρισης από το συγκεκριμένο ένζυμο προκύπτουν διαφορετικά μεγέθη ζωνών.

Συγκεκριμένα έγινε επιλογή του ενζύμου HincII το οποίο όταν πέψει τα pEGFP-C3-*Bach1* (wild type και mutant) θα δώσει ζώνες μεγέθους: 4.928 bp, 1.077bp, 446bp, 408bp, 147bp. Η σειρά με την οποία φορτώθηκαν τα δείγματα είναι η εξής: **1:** μάρτυρας, DNA φάγου λ κομμένος με PstI, **4:** Πέψη pEGFP-C3-μεταλλαγμένο *Bach1* με το ένζυμο HincII, **5:** Πέψη pEGFP-C3-αγρίου τύπου *Bach1* με το ένζυμο HincII. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 21.

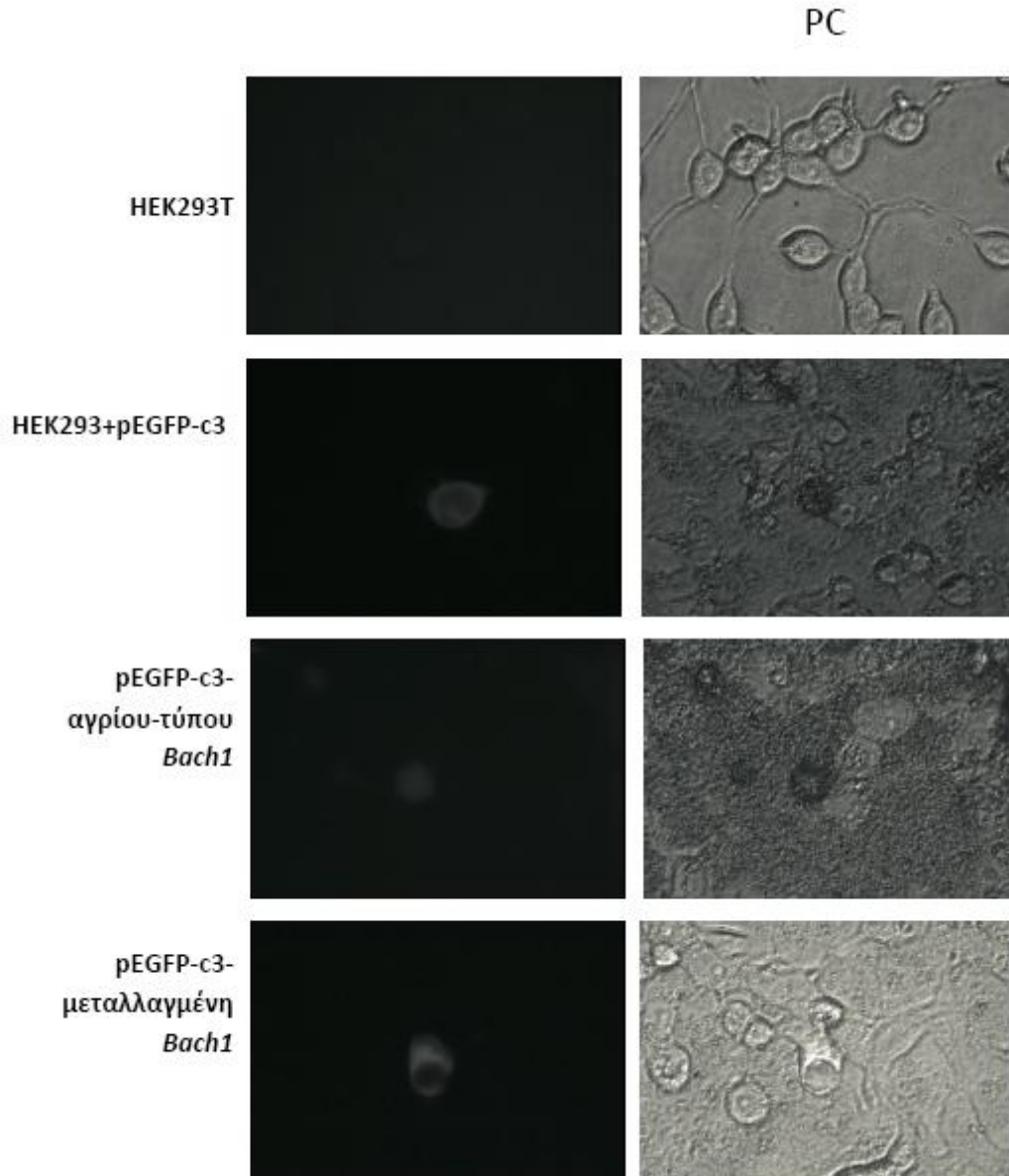


Εικόνα 21. Πέψη του pEGFP-C3-*Bach1* αγρίου τύπου (5) και μεταλλαγμένου (4) με HincII.

Επομένως, παρατηρούμε ότι ύστερα από τις πέψεις και την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, προκύπτουν τα αναμενόμενα μεγέθη ζωνών τόσο στην πέψη του αγρίου τύπου όσο και του μεταλλαγμένου *Bach1*.

Έπειτα συνεχίσαμε με την έκφραση των κατασκευών αυτών στα HEK 293 T κύτταρα και την παρατήρηση της υποκυτταρικής τους τοποθεσίας. Εκτός όμως από τη διαμόλυνση των κυττάρων αυτών με pEGFP-C3-αγρίου τύπου *Bach1* και με pEGFP-C3-μεταλλαγμένο *Bach1*, έγινε διαμόλυνση των HEK 293 T κυττάρων και με φορέα pEGFP-C3, χωρίς να περιέχει κάποιο ένθεμα. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν HEK 293 T κύτταρα, ως αρνητικό δείκτη, χωρίς να γίνει παροδική διαμόλυνση σ'αυτά. Στα κύτταρα που έγινε παροδική διαμόλυνση μόνο με το φορέα pEGFP-C3 παρατηρείται διάχυτη έκφραση της EGFP.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρατήρηση, ότι ενώ η αγρίου τύπου BACH1 πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, η μεταλλαγμένη BACH1 πρωτεΐνη παρουσιάζει κυρίως κυτταροπλασματική κατανομή (Εικόνα 22). Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι το αμινοξύ αυτό είναι κρίσιμος παράγοντας για τον πυρηνικό εντοπισμό της BACH1.



Εικόνα 22. Υποκυτταρική τοποθεσία της BACH1: αγρίου τύπου και μεταλλαγμένης (Ser448A). HEK 293 T κύτταρα έχουν διαμολυνθεί με τους φορείς έκφρασης: pEGFP-C3-*Bach1* (αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου) και pEGFP-C3.

4.2 Η πρωτεΐνη SATB1

Παρ'όλες τις προσπάθειες που έγιναν για κλωνοποίηση της κωδικής περιοχής του γονιδίου *Satb1*, αυτές δεν κατέστησαν δυνατές χωρίς την παρουσία μεταλλάξεων. Μάλιστα έγιναν προσπάθειες με τη βοήθεια δύο διαφορετικών DNA πολυμερασών, της *TaKaRa LA Taq* DNA πολυμεράσης, και της *Pfu Ultra HF* πολυμεράσης. Το μέγεθος της κωδικής περιοχής του γονιδίου *Satb1*(cDNA) είναι 2.295 bp. Η

μετάλλαξη που θέλαμε να κάνουμε εντοπίζεται στη περιοχή 1.903-1.905 bp. Η πρωτεΐνη SATB1 αποτελείται από 764 αμινοξέα.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα cDNA από θυμοκύτταρα, γιατί στα θυμοκύτταρα η SATB1 εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθοι:

SATB1-FOR: 5' -GCC AGA TCT ATG GAT CAT TTG AAC GAGGC-3'

Η αλληλουχία αυτή περιέχει ενσωματωμένη την περιοριστική θέση αναγνώρισης BglIII (η οποία υποδηλώνεται με την υπογράμμιση) και επιπλέον νουκλεοτιδικές βάσεις στα άκρα, για την αναγνώριση της συγκεκριμένης αλληλουχίας από το περιοριστικό ένζυμο.

SATB1-REV: 5' - GCC CTG CAG TCA GTC TTT CAA GTC GGCAT-3'

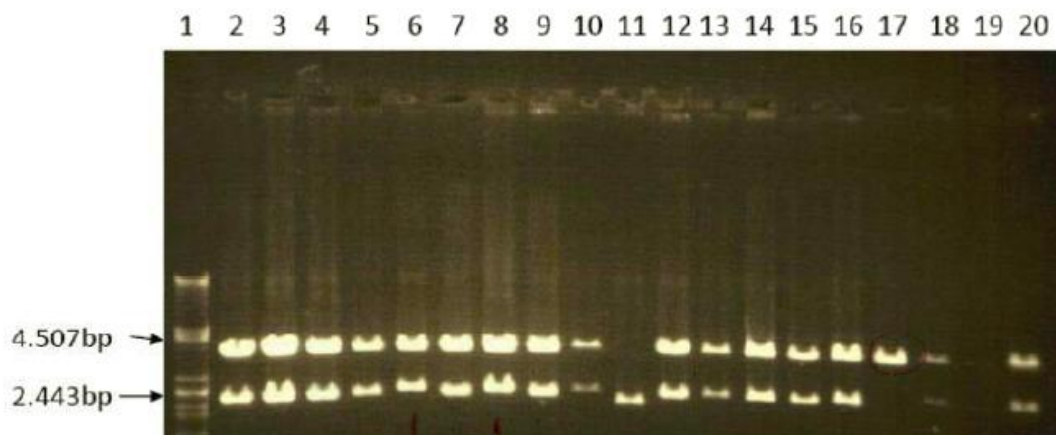
Η αλληλουχία αυτή περιέχει ενσωματωμένη την περιοριστική θέση αναγνώρισης PstI (η οποία υποδηλώνεται με την υπογράμμιση) και επιπλέον νουκλεοτιδικές βάσεις στα άκρα, για την αναγνώριση της συγκεκριμένης αλληλουχίας από το περιοριστικό ένζυμο. Το προϊόν της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% (Εικόνα 23). Το μέγεθος της κωδικής περιοχής του γονιδίου *Satb1* (cDNA) είναι 2.295 bp. Κατά την PCR όμως προστέθηκαν και επιπλέον αλληλουχίες αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων, οπότε το μέγεθος της ζώνης που αναμέναμε ήταν 2.313 bp. Όπως φαίνεται στο πήκτωμα το δείγμα 1 αντιστοιχεί στο μάρτυρα λ/ PstI, ενώ το δείγμα 2 είναι το προϊόν της PCR το οποίο φαίνεται να έχει το σωστό μέγεθος (2.3 kb).

Στη συνέχεια έγινε εισαγωγή του προϊόντος της PCR στο φορέα κλωνοποίησης pCRII-TOPO, χωρίς τη χρήση λιγάσης. Ακολούθησε μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5a. Μετά το σχηματισμό των αποικιών έγινε επιλογή τους για ανάπτυξη καλλιιεργειών και ακολούθως απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Το πλασμιδιακό αυτό DNA υπέστη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Εσωτερικά του ενθέματος δεν περιέχεται κάποια αλληλουχία αναγνώρισης αυτού του ενζύμου. Το συνολικό μέγεθος της πλασμιδιακής κατασκευής pCRII- *Satb1* θα είναι 6.286 bp. Στην περίπτωση που το *Satb1* είχε κλωνοποιηθεί περιμέναμε να δούμε τα εξής μεγέθη ζωνών: 3.955 bp και 2.331 bp (Εικόνα 24). Το δείγμα 1 αντιστοιχεί στον μάρτυρα λ/



Εικόνα 23. Προϊόν PCR αντίδρασης για την κλωνοποίηση του *Satb1*.

PstI, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα (2-20) αντιστοιχούν στους διαφορετικούς κλώνους που συλλέξαμε και μεγαλώσαμε.



Εικόνα 24. Πέψη του pCRII- *Satb1* με το ένζυμο EcoRI.

Όπως φαίνεται από το πήκτωμα τα δείγματα (2-10), (12-16), (18) και (20) έχουν λάβει το ένθεμα και δίνουν τα αναμενόμενα πρότυπα. Παρατηρούμε επίσης ότι στα δείγματα 6 και 8 υπάρχει μια διαφορά στα μεγέθη των ζωνών (2.331 bp) σε σχέση με τα άλλα δείγματα (π.χ.: σε σύγκριση με τα δείγματα 7 και 9).

Στην συνέχεια ακολούθησε περαιτέρω πέψη των δειγμάτων (2-4) και (7-9) με τα εξής ένζυμα : BglIII/PstI, BamHI και BamHI/EcoRI και ηλεκτροφόρησή τους με την εξής σειρά: το περιεχόμενο του 1^{ου} πηγαδιού αντιστοιχεί στο μάρτυρα λ/ PstI, του 2^{ου} αντιστοιχεί σε άκοπο pCRII- *Satb1*, τα περιεχόμενα των πηγαδιών 3-8 αντιστοιχούν σε πέψη του pCRII- *Satb1* των δειγμάτων (2-4) και (7-9) με BglIII/PstI, τα πηγαδάκια 9-14 αντιστοιχούν σε πέψη του pCRII- *Satb1* των δειγμάτων (2-4) και (7-9) με BamHI, ενώ τα περιεχόμενα των πηγαδιών 15-20 αντιστοιχούν σε πέψη του pCRII- *Satb1* των δειγμάτων (2-4) και (7-9) με τα ένζυμα BamHI/EcoRI (Εικόνα 25).

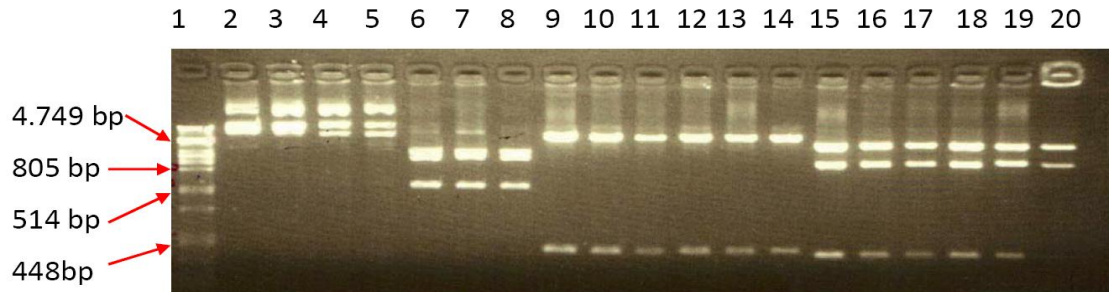
Τα ένζυμα BglIII/PstI τα επιλέξαμε επειδή οι αλληλουχίες των ενζύμων αυτών περιέχονται στα άκρα του PCR προϊόντος. Το ένζυμο BamHI το επιλέξαμε επειδή πέπτει εσωτερικά το ένθεμα, καθώς αλληλουχία αναγνώρισης του συγκεκριμένου ενζύμου περιέχεται εσωτερικά του ενθέματος και έτσι μπορεί να βρεθεί ο προσανατολισμός της ένθεσης.

Από την πέψη pCRII- *Satb1* των δειγμάτων (2-4) και (7-9) με τα ένζυμα BglIII/PstI και στην περίπτωση που το *Satb1* είχε κλωνοποιηθεί με την κατεύθυνση 5' προς 3', αναμέναμε ύστερα από ηλεκτροφόρηση τους τα εξής μεγέθη ζωνών: 2.771 bp, 2.305 bp, 973 bp και 217 bp. Αν είχε κλωνοποιηθεί με την αντίθετη κατεύθυνση τότε αναμένονταν οι ζώνες: 2.775 bp, 2.297 bp, 973 bp και 217 bp.

Αντίστοιχα από την πέψη με BamHI, αν το *Satb1* είχε κλωνοποιηθεί με την κατεύθυνση 5' προς 3' τότε αναμέναμε τα εξής μεγέθη ζωνών: 4.262 bp και 2.24 bp.

Αν είχε κλωνοποιηθεί με την αντίθετη κατεύθυνση τότε αναμένονταν οι εξής ζώνες: 5.917 bp και 369 bp.

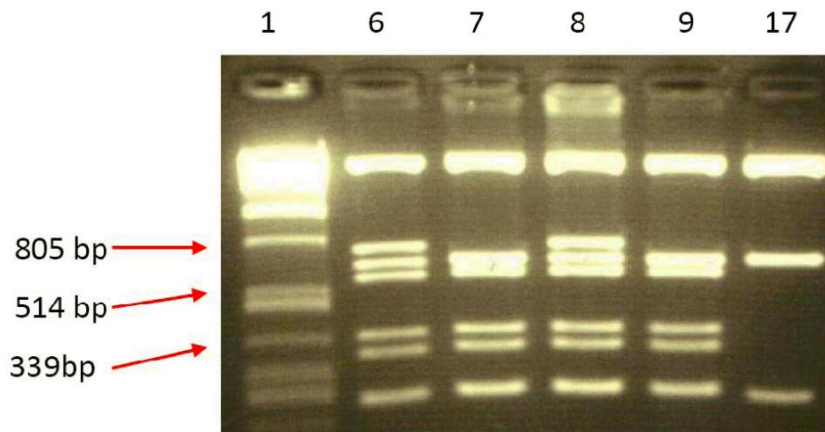
Τέλος από την πέψη με BamHI/EcoRI, αν το *Satb1* είχε κλωνοποιηθεί με την κατεύθυνση 5' προς 3' τότε αναμέναμε τα εξής μεγέθη ζωνών: 3.955 bp και 2.331 bp. Αν είχε κλωνοποιηθεί με την αντίθετη κατεύθυνση τότε αναμένονταν οι ζώνες: 3.924 bp, 1.993 bp, και 338 bp. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω:



Εικόνα 25. Πέψη του pCRII- *Satb1* με τα ένζυμα BglII/PstI, BamHI και BamHI/EcoRI που αντιστοιχούν στα πηγαδάκια 3-8, 9-14 και 15-20.

Από το πήκτωμα αгарόζης και σύμφωνα με όσα προαναφέραμε γίνεται κατανοητό ότι στα δείγματα (2-4) και (7-9) το γονίδιο *Satb1* έχει κλωνοποιηθεί με κατεύθυνση 3' προς 5'. Άρα το ένθεμα έχει antisense προσανατολισμό.

Έπειτα έγινε πέψη με το ένζυμο AroI των αρχικών δειγμάτων 6,7,8,9 και 17, τα οποία είχαν υποστεί πέψη με EcoRI. Αλληλουχίες αναγνώρισης του ενζύμου αυτού περιέχονται εσωτερικά του ενθέματος αρκετές φορές (Εικόνα 26). Ήδη με την πέψη με το ένζυμο EcoRI παρατηρήσαμε μία διαφορά στα μεγέθη των ζωνών των δειγμάτων 6 και 8 σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Έτσι με την πέψη με το AroI ελέγξαμε αν αυτή η παρατήρηση οφείλεται σε εναλλακτικό μάτισμα. Από την πέψη με AroI αναμέναμε τα εξής μεγέθη ζωνών: 3.274 bp, 662 bp, 659 bp, 587 bp, 359 bp, 309 bp και 211 bp.



Εικόνα 26. Πέψη με AroI των δειγμάτων 6,7,8,9,και 16. Η αρίθμηση των δειγμάτων αυτών είναι με βάση την αρχική πέψη που είχε γίνει με EcoRI.

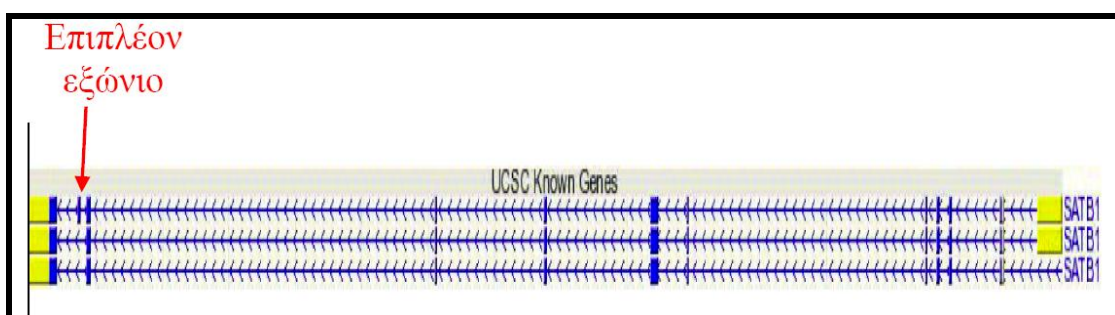
Από το πήκτωμα παρατηρούμε ότι ενώ από τα δείγματα (7) και (9) ύστερα από πέψη με AroI και ηλεκτροφόρηση τους, εμφανίζονται τα αναμενόμενα μεγέθη ζωνών, αντίθετα στα δείγματα (6) και (8) εμφανίζεται μία επιπλέον ζώνη μεγέθους ~100 bp. Ενώ στα δείγματα (7) και (9) εμφανίζεται μία διπλή μπάντα των 662 bp και 659 bp, στα δείγματα (6) και (8) παρατηρούμε ότι η μπάντα με μέγεθος 659 bp διατηρείται καθώς ανήκει στον φορέα pCRII, ενώ το μέγεθος της μπάντας των 662 bp αυξάνεται κατά ~100 bp. Για το λόγο αυτό έγινε αλληλούχιση DNA των δειγμάτων 8 και 9.

Ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης μέσω του Nucleotide BLAST για εύρεση ομοιοτήτων μεταξύ αλληλουχιών, έδειξε την ύπαρξη 91 επιπλέον βάσεων στο δείγμα 8 (Εικόνα 27). Το αποτέλεσμα αυτό διαπιστώθηκε τόσο κατά την σύγκριση της αλληλουχίας του δείγματος 8 με την κωδική αλληλουχία του *Satb1*, όσο και κατά τη σύγκριση της αλληλουχίας του δείγματος 8 με όλο το γονιδίωμα του ποντικού. Συνεπώς, διαπιστώθηκε ότι έγινε κλωνοποίηση μίας νέας ισομορφής SATB1 με ένα επιπλέον εξόνιο που προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα. Αυτή η νέα ισομορφή SATB1 στο ποντίκι, που περιέχει ένα επιπλέον εξόνιο 91 βάσεων ομοιάζει με μία αντίστοιχη ισομορφή του ανθρώπου.

Με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων ECR browser βρήκαμε ότι αυτό το επιπλέον εξόνιο εντοπίζεται στον άνθρωπο δίπλα από το τελευταίο εξόνιο στην 5'-αμετάφραστη περιοχή (5'- Untranslated Region, 5'-UTR) (Εικόνα 28).

```
5'-CCTCTCTCCCAGCACCCCTTGGGAAAGGAGAGTCTAGAGGCGTTTTCTTA  
CCAAGCCTGCTGACCCCTGCACCATGGCCCCATGCTGCCCC-3'
```

Εικόνα 27. Αλληλουχία νέου εξωνίου αποτελούμενη από 91 βάσεις. Προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα.



Εικόνα 28. Η ύπαρξη του επιπλέον εξωνίου είναι καταχωρημένη στον άνθρωπο, σύμφωνα με την βάση δεδομένων 'ECR Browser'.

Αν και ακολούθησαν αρκετές ακόμα προσπάθειες για την κλωνοποίηση της κωδικής περιοχής του γονιδίου *Satb1*, αυτό δεν ήταν εφικτό και επομένως δεν μπορέσαμε να πραγματοποιήσουμε την κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση για την μελέτη της υποκυτταρική τοποθεσίας της SATB1.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, μέσω πρωτεϊνωματικής ανάλυσης βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες BACH1 και SATB1 προσδένονται σε 151 βάσεις εντός της περιοχής RHS6, η οποία εμφανίζει 90% ομολογία μεταξύ ανθρώπου και ποντικού. Η RHS6 είναι μία περιοχή που ανήκει στην LCR του γενετικού τόπου T_H2 και έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται σε διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις, όπως για παράδειγμα συμβαίνει μεταξύ των γενετικών τόπων T_H2-IFN γ . Εκτός όμως από την ταυτοποίηση αυτών των δύο περιοχών, χαρακτηρίστηκε και μία φωσφορυλίωση για την κάθε πρωτεΐνη. Μια φωσφορυλίωση χαρακτηρίστηκε στη SATB1 στο κατάλοιπο σερίνης S635, και μια φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο σερίνης S448 της BACH1 (Π. Τζέρπος- Θ. Σαββίδης, αδημοσίευτα δεδομένα).

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας θέλαμε να διερευνήσουμε αν αυτή η θέση της φωσφορυλίωσης στα δύο κατάλοιπα σερίνης S635, S448, των πρωτεϊνών SATB1 και BACH1 αντίστοιχα, ευθύνονται για την υποκυτταρική τους τοποθέτηση. Για το λόγο αυτό επιχειρήσαμε να κλωνοποιήσουμε τις κωδικές περιοχές των δύο γονιδίων και στη συνέχεια να επέμβουμε με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση των καταλοίπων σερίνης σε κάθε μία από τις δύο πρωτεΐνες. Τέλος μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους σε HEK293T κύτταρα.

Όσον αφορά την πρωτεΐνη SATB1, δεν καταφέραμε να κλωνοποιήσουμε το γονίδιο της χωρίς την παρουσία μεταλλάξεων και αυτό αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα για τη μετάλλαξη της και συνεπώς και την μελέτη της υποκυτταρικής της τοποθέτησης. Όμως παρ' όλα αυτά, ιδιαίτερα σημαντική είναι η εύρεση μίας νέας ισομορφής της SATB1 στο ποντίκι, η οποία διαθέτει ένα επιπλέον εξώνιο 91 βάσεων. Η νέα ισομορφή που περιέχει το νέο αυτό εξώνιο δεν είναι καταχωρημένη στην βάση δεδομένων ECR browser. Αντίθετα στον άνθρωπο φαίνεται να είναι γνωστή η ύπαρξη ενός τέτοιου εξωνίου και εντοπίζεται στην 5'-αμετάφραστη περιοχή (5'-UTR). Στο ποντίκι υπάρχουν 4 χαρακτηρισμένες ισομορφές, ενώ στον άνθρωπο υπάρχουν 5 ισομορφές. Επομένως μέσω εναλλακτικού ματίσματος προκύπτει αυτή η νέα ισομορφή που φαίνεται να διαθέτει ένα επιπλέον εξώνιο (91 βάσεων). Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των 91 αυτών βάσεων υποδεικνύεται στην εικόνα 27. Εικάζουμε ότι αυτή η νέα ισομορφή παρουσιάζει μια νέα λειτουργική ιδιότητα, η οποία μένει να αποδειχθεί.

Όμως για την εξακρίβωση της αρχικής μας υπόθεσης κρίνεται αναγκαία η επιτυχής κλωνοποίηση και μετάλλαξη του γονιδίου *Satb1*, ώστε να γίνει εφικτή η μελέτη της υποκυτταρικής τοποθεσίας τόσο της αγρίου τύπου πρωτεΐνης, όσο και της μεταλλαγμένης.

Όσον αφορά την άλλη πρωτεΐνη που δείχτηκε ότι προσδέεται στην RHS6 περιοχή, την BACH1, επιτεύχθηκε μετάλλαξη του καταλοίπου σερίνης, που βρέθηκε ότι φωσφορυλιώνεται, προς αλανίνη. Συγκεκριμένα αυτό το κατάλοιπο σερίνης (S448) κωδικοποιείται από το κωδικόνιο AGC (1.342- 1.344 ζ.β) και μεταλλάχτηκε σε αλανίνη (GCC). Παρόλο που υπάρχουν 4 κωδικόνια που κωδικοποιούν για αλανίνη (GCC, GCG, GCA, GCU) η επιλογή αυτού του κωδικονίου έγινε με βάση

την εισαγωγή των λιγότερο διαφορετικών βάσεων. Η αλανίνη χρησιμοποιείται λόγω της μη ογκώδους, χημικά αδρανούς, μεθυλικής λειτουργικής της ομάδας, η οποία παρόλα αυτά μιμείται δευτεροταγείς δομές που πολλά από τα άλλα αμινοξέα κατέχουν. Το μέγεθος του cDNA του *Bach1* είναι 2.295 bp, ενώ η πρωτεΐνη BACH1 αποτελείται από 739 αμινοξέα.

Η μετάλλαξη έγινε με αντίδραση PCR με τον σχεδιασμό εκκινητών που περιείχαν ενδιάμεσα την μεταλλαγμένη αλληλουχία. Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε το ήδη υπάρχον κλωνοποιημένο γονίδιο αγρίου τύπου που περιείχε την πλήρη αλληλουχία cDNA *Bach1* στον φορέα pCR2.1 (pCR2.1- *Bach1_wt*).

Έπειτα ακολούθησε υποκλωνοποίηση τόσο του αγρίου τύπου γονιδίου, όσο και του μεταλλαγμένου *Bach1*, στο φορέα έκφρασης pEGFP-C3. Η BACH1 εκφράζεται σε σύντηξη με το καρβοξυτελικό άκρο της EGFP. Το γονίδιο *Bach1* κλωνοποιήθηκε στον pEGFP-c3, με τέτοιο τρόπο ώστε να βρίσκεται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με την κωδική αλληλουχία της EGFP (*in frame*) και χωρίς να παρεμβάλλονται κωδικόνια λήξης.

Τελικά πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση των HEK293T κυττάρων με τις κατασκευές pEGFP-c3- *Bach1_wt* και pEGFP-c3- *Bach1_mutated* και μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους. Αξίζει να αναφερθεί, ότι η αγρίου τύπου BACH1 πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, ενώ η μεταλλαγμένη BACH1 πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, δείχνοντας ότι αυτή η σερίνη είναι κρίσιμος παράγοντας για τον πυρηνικό εντοπισμό της BACH1.

Παρατηρήθηκε επίσης, ότι στις 24 πρώτες ώρες μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων, η έκφραση της μεταλλαγμένης BACH1 είναι αμιγώς κυτταροπλασματική, ενώ μετά από 48 ώρες από τη διαμόλυνση των κυττάρων η έκφρασή της είναι διάχυτη αλλά πάλι κυρίως κυτταροπλασματική. Επομένως δείχτηκε ότι αυτή η σερίνη καθορίζει την υποκυτταρική τοποθεσία της BACH1.

Υπάρχουν διάφορες μελέτες (Suzuki *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004). που δείχνουν ότι η υποκυτταρική τοποθεσία της BACH1 μπορεί να αλλάξει ανά πάσα στιγμή, γεγονός που εξαρτάται από διάφορους παράγοντες που επάγουν αυτή την αλλαγή. Αυτό επιφέρει αλλαγή και στη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών αυτών.

Ένα τέτοιο παράδειγμα έχει αναφερθεί και προηγουμένως, όπου σε υψηλά επίπεδα αίμης, αυτή προσδένεται στον μεταγραφικό καταστολέα BACH1, εμποδίζοντας την πρόσδεσή του στα στοιχεία MARE και επάγοντας την έξοδο της BACH1 από τον πυρήνα με ένα Ctm1-εξαρτώμενο τρόπο. Έτσι, τα στοιχεία MARE είναι ελεύθερα και διαθέσιμα για πρόσδεση ενεργών MAF συμπλόκων, συμπεριλαμβανομένου και του NF-E2 τα οποία επάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου που ρυθμίζουν (Suzuki, 2004). Αντίθετα, σε χαμηλά επίπεδα αίμης, η BACH1 προσδένεται στα MARE για να καταστείλει τη μεταγραφή.

Ένας άλλος παράγοντας, το κάδμιο έχει δείχτεί ότι ρυθμίζει την υποκυτταρική τοποθεσία της BACH1 (Suzuki, 2003). Το κάδμιο, όπως και η αίμη είναι επαγωγείς του *HO-1* και επάγουν την έξοδο της BACH1 από τον πυρήνα. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που προκαλούν αλλαγή της υποκυτταρικής τοποθεσίας της BACH1 πρωτεΐνης, γεγονός που οδηγεί και σε αλλαγή της δράσης τους.

Επίσης η φωσφορυλίωση διαφόρων πρωτεϊνών έχει δείξει ότι επάγει πυρηνική μεταφορά. Η φωσφορυλίωση είναι κύριος ρυθμιστής σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία συμμετέχουν σε κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση, και ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ποικίλα γεγονότα φωσφορυλίωσης καθορίζουν την υποκυτταρική τοποθεσία πρωτεϊνών, καθώς και τη λειτουργία τους στο κύτταρο (Nardozi *et al.*, 2010)

Ο χαρακτηρισμός αυτής της φωσφορυλίωσης του καταλοίπου σερίνης 448 (S448) έγινε μέσω πρωτεϊνωματικής ανάλυσης, από προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου (Π. Τζέρπος- Θ. Σαββίδης, αδημοσίευτα δεδομένα). Η ύπαρξη αυτής της φωσφορυλίωσης δεν ήταν γνωστή και συνεπώς δεν ήταν καταχωρημένη στη βάση δεδομένων 'PHOSHIDA', η οποία περιέχει ποικίλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών, όπως φωσφορυλίωσεις και ακετυλίωσεις.

Με τη μελέτη αυτού του θέματος γεννιούνται διάφορα ερωτήματα. Αρχικά, θα έπρεπε να μελετηθεί ποια κινάση είναι αυτή που φωσφορυλιώνει την BACH1 σ' αυτό το κατάλοιπο σερίνης καθώς και κάτω από ποιες συνθήκες συμβαίνει αυτή η φωσφορυλίωση. Δηλαδή αν υπάρχει κάποιο ερέθισμα στα κύτταρα και μέσω αυτού να επάγεται η φωσφορυλίωση, η οποία με τη σειρά της καθορίζει την τοπολογία και την δράση της BACH1 (σαν μεταγραφικού παράγοντα) σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους.

Παράλληλα πρέπει να γίνει περαιτέρω μελέτη της υποκυτταρικής τοποθεσίας της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Για παράδειγμα, το γεγονός ότι παρατηρούμε τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη στο κυτταρόπλασμα, δεν απαγορεύει την ύπαρξή της στον πυρήνα. Αντίθετα, μπορεί να συνεπάγεται ότι ο ρυθμός εισόδου της στον πυρήνα είναι μικρότερος από το ρυθμό εξόδου της. Επομένως για τη μελέτη της πυρηνικής μεταφοράς (υποκυτταρικής τοποθεσίας) τα κύτταρα πρέπει να υποστούν κατεργασία με λεπτομυκίνη B (Leptomycin B, LMB), αντιβιοτικό το οποίο αναστέλλει την έξοδο της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης BACH1 από τον πυρήνα. Αυτό συμβαίνει γιατί η Leptomycin B (LMB) δεσμεύει την CRM1 (exportin 1), η οποία προσδένεται στο σήμα πυρηνικής εξαγωγής (NES) των εξαγόμενων πρωτεϊνών. Η λεπτομυκίνη B σχηματίζει ομοιοπολικό σύμπλοκο με τη CRM1, εμποδίζοντάς την να αλληλεπιδράσει με το NES των πρωτεϊνών που πρόκειται να εξαχθούν. Η CRM1, δρα ως μεσολαβητής της πυρηνικής εξόδου και η λειτουργία της εμποδίζεται λόγω της δράσης της LMB.

Επομένως με την προσθήκη LMB, αναστέλλεται η πυρηνική έξοδος και αυτό μπορεί να επιφέρει ενδεχομένως αλλαγή της υποκυτταρικής της τοποθεσίας. Πιο συγκεκριμένα, αν με την προσθήκη LMB η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη εντοπιστεί στον πυρήνα τότε σημαίνει ότι μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα αλλά ο ρυθμός εξόδου της είναι πιο γρήγορος από τον ρυθμό εισόδου της (Nucleocytoplasmic shuttling). Ενδεχομένως όμως, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη να μην εισέρχεται καθόλου στον πυρήνα, συνεπώς με την προσθήκη LMB δεν θα παρατηρηθεί πυρηνική κατανομή, αλλά κυτταροπλασματική.

Ένα άλλο ερώτημα που τίθεται είναι, στην περίπτωση που βρεθεί ότι ποσότητα μεταλλαγμένης πρωτεΐνης BACH1 μπορεί να υπάρξει στον πυρήνα, τότε αν την οδηγήσουμε στον πυρήνα, θα μπορούσε αυτή να προσδεθεί στο DNA και

συγκεκριμένα στην περιοχή πρόσδεσης της, στην RHS6; Η εισαγωγή της πρωτεΐνης στον πυρήνα γίνεται παρουσία ενός SV40-NLS (Simian Vacuolating Virus 40 TAg-Nuclear localization signal) στο αμινοτελικό της άκρο. Η ίδια διαδικασία θα μπορούσε να γίνει και για την αγρίου τύπου πρωτεΐνη, ώστε να υπάρχει σύγκριση. Στη συνέχεια, θα μελετούσαμε αν η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη προσδενόταν στο DNA, εφαρμόζοντας την τεχνική “Ανοσοκατακρήμνιση Χρωματίνης” (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP).

Τέλος, ένα *in vitro* πείραμα που θα μπορούσε να υλοποιηθεί, εφόσον βρεθεί ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη εισέρχεται στον πυρήνα, είναι η *in vitro* παραγωγή των πρωτεϊνών BACH1, αγρίου τύπου και μεταλλαγμένης, ραδιοσημασμένες με S^{35} και έπειτα εφαρμογή της τεχνικής EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), στην περιοχή πρόσδεσης της RHS6. Με τον τρόπο αυτό, θα μπορούσαμε να παρατηρήσουμε ίσως κάποια διαφορά μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, στην πρόσδεση τους στην RHS6 περιοχή.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A. Επιστημονικά εγχειρίδια

Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. Immunology, 5th edition (November 29, 2002), ISBN-10: 0716749475, 603 p.

B. Άρθρα

Abate A, Zhao H, Wong RJ, Stevenson DK. 2007. The role of Bach1 in the induction of heme oxygenase by tin mesoporphyrin. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 757-763.

Agrelo R, Souabni A, Novatchkova M, Haslinger C, Leeb M, Komnenovic V, Kishimoto H, Gresh L, Kohwi-Shigematsu T, Kenner L, Wutz A. 2009. SATB1 defines the developmental context for gene silencing by Xist in lymphoma and embryonic cells. *Dev Cell* 16: 507–516.

Alvarez JD, Yasui DH, Niida H, Joh T, Loh DY, Kohwi-Shigematsu T. 2000. The MAR-binding protein SATB1 orchestrates temporal and spatial expression of multiple genes during T-cell development. *Genes Dev* 14: 521-535.

Amsen D, Spilianakis CG, Flavell RA. 2009. How are T_H1 and T_H2 effector cells made? *Curr Opin Immunol* 21: 153-160.

Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A. 2006. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* 24: 607-656.

Apostolou E, Thanos D. 2008. Virus Infection Induces NF-kappaB-dependent interchromosomal associations mediating monoallelic IFN-beta gene expression. *Cell* 134: 85-96.

Bacher CP, Guggiari M, Brors B, Augui S, Clerc P, Avner P, Eils R, Heard E. 2006. Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. *Nat Cell Biol* 8: 293-299.

Brand M, Ranish JA, Kummer NT, Hamilton J, Igarashi K, Francastel C, Chi TH, Crabree GR, Aebersold R, Groudine M. 2004. Dynamic changes in transcription factors complexes during erythroid differentiation revealed by quantitative proteomics. *Nat Struct Mol Biol* 11: 73–80.

- Cai S, Han HJ, Kohwi-Shigematsu T. 2003. Tissue-specific nuclear architecture and gene expression regulated by SATB1. *Nat Genet* 34: 42-51.
- Cai S, Lee CC, Kohwi-Shigematsu T. 2006. SATB1 packages densely looped, transcriptionally active chromatin for coordinated expression of cytokine genes. *Nat Genet* 38: 1278-1288.
- Cremer T, Cremer C. 2006. Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective Part I. The rise of Chromosome Territories. *Eur. J. Histochem* 50: 161–176.
- Dekker J. Gene regulation in the third dimension. 2008. *Science* 319: 1793-1794.
- Dickinson LA, Joh T, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T. 1992. A tissue-specific MAR/SAR binding protein with unusual binding site recognition. *Cell* 70: 631–645.
- Dickinson LA, Dickinson CD, Kohwi-Shigematsu T. 1997. An atypical homeodomain in SATB1 promotes specific recognition of the key structural element in a matrix attachment region. *J. Biol. Chem* 272: 11463–11470.
- Donohoe ME, Silva SS, Pinter SF, Xu N, Lee JT. 2009. The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctfc and also controls X-chromosome pairing and counting. *Nature* 460: 128-132.
- Fanning AS, Anderson JM. 1996. Protein-protein interactions: PDZ domain networks. *Curr Biol* 6: 1385-1388.
- Fields PE, Lee GR, Kim ST, Bartsevich VV, Flavell RA. 2004. Th2-specific chromatin remodeling and enhancer activity in the Th2 cytokine locus control region. *Immunity* 21: 865–876.
- Galande S, Dickinson LA, Mian IS, Sikorska M, Kohwi-Shigematsu T Galande S, Dickinson LA, Mian IS, Sikorska M, Kohwi-Shigematsu T. 2001. SATB1 cleavage by caspase 6 disrupts PDZ domain-mediated dimerization, causing detachment from chromatin early in T-cell apoptosis. *Mol. Cell Biol* 21: 5591–5604.
- Göndör A, Ohlsson R. *Nat Genet*. 2006. Transcription in the loop. *Nat Genet* 38: 1229-1230.
- Han HJ, Russo J, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T. 2008. SATB1 reprogrammes gene expression to promote breast tumour growth and metastasis. *Nature* 452: 187-193.

Heng HH, Goetze S, Ye CJ, Liu G, Stevens JB, Bremer SW, Wykes SM, Bode J, Krawetz SA. 2004. Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J. Cell Science* 117: 999-1008.

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 169: 59-72.

Hu Q, Kwon YS, Nunez E, Cardamone MD, Hutt KR, Ohgi KA, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG, Fu XD. 2008. Enhancing nuclear receptor-induced transcription requires nuclear motor and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 19199-204.

Igarashi K, Kataoka K, Itoh K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. 1994. Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NFE2 p45 with small Maf proteins. *Nature* 367: 568–572.

Igarashi K, Hoshino H, Muto A, Suwabe N, Nishikawa S, Nakauchi H, Yamamoto M. 1998. Multivalent DNA binding complex generated by small Maf and Bach1 as a possible biochemical basis for beta-globin locus control region complex. *J Biol Chem* 273: 11783-1190.

Igarashi K, Sun J. 2006. The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation. *Antioxid Redox Signal* 8: 107–118.

Ishikawa M, Numazawa S, Yoshida T. 2005. Redox regulation of the transcriptional repressor Bach1. *Free Radic Biol Med* 38: 1344-1352.

Janson PC, Winerdal ME, Winqvist O. 2009. At the crossroads of T helper lineage commitment-Epigenetics points the way. *Biochim Biophys Acta* 1790: 906-919.

Krangel MS. 2007. T cell development: better living through chromatin. *Nat Immunol* 8: 687-694.

Kumar, PP, Purbey PK, Ravi DS, Mitra D, Galande S. 2005. Displacement of SATB1-bound histone deacetylase 1 corepressor by the human immunodeficiency virus type 1 transactivator induces expression of interleukin-2 and its receptor in T cells. *Mol. Cell Biol* 25: 1620–1633.

- Kumar PP, Purbey PK, Sinha CK, Notani D, Limaye A, Jayani RS, Galande S. 2006. Phosphorylation of SATB1, a global gene regulator, acts as a molecular switch regulating its transcriptional activity in vivo. *Mol Cell* 22: 231–243.
- Kumar PP, Bischof O, Purbey PK, Notani D, Urlaub H, Dejean A, Galande S. 2007. Functional interaction between PML and SATB1 regulates chromatin loop architecture and transcription of the MHC class I locus. *Nat Cell Biol* 9: 45-56.
- Lee GR, Spilianakis CG, Flavell RA. 2005. Hypersensitive site 7 of the TH2 locus control region is essential for expressing TH2 cytokine genes and for long-range intrachromosomal interactions. *Nat Immunol* 6: 42-48.
- Lee GR, Kim ST, Spilianakis CG, Fields PE, Flavell RA. 2006. T helper cell differentiation: regulation by cis elements and epigenetics. *Immunity* 24: 369-379.
- Lomvardas S, Barnea G, Pisapia DJ, Mendelsohn M, Kirkland J, Axel R. 2006. Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell* 126: 403-413.
- Miele A, Dekker J. 2008. Long-range chromosomal interactions and gene regulation. *Mol Biosyst* 4: 1046-1057.
- Misteli T. 2001. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* 291: 843-847.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-2357.
- Nakagomi K, Kohwi Y, Dickinson L A, Kohwi-Shigematsu T. 1994. A Novel DNA-Binding Motif in the Nuclear Matrix Attachment DNA-Binding Protein SATB1. *Mol. Cell. Biol* 14: 1852–1860.
- Nardozzi J, Lott K, Cingolani G. 2010. Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Commun Signal* 8:32
- Nolis IK, McKay DJ, Mantouvalou E, Lomvardas S, Merika M, Thanos D. 2009. Transcription factors mediate long-range enhancer-promoter interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20222-20227.
- Notani D, Gottimukkala KP, Jayani RS, Limaye AS, Damle MV, Mehta S, Purbey PK, Joseph J, Galande S. 2010. Global Regulator SATB1 Recruits b-Catenin and regulates TH2 Differentiation in Wnt-Dependent Manner. *PLoS Biol* 8(1): e1000296.

Nunez E, Fu XD, Rosenfeld MG. 2009. Nuclear organization in the 3D space of the nucleus - cause or consequence? *Curr Opin Genet Dev* 19: 424-36.

Ogawa K, Sun J, Taketani S, Nakajima O, Nishitani C, Sassa S, Hayashi N, Yamamoto M, Shibahara S, Fujita H, Igarashi K. 2001. Heme mediates de-repression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J* 20: 2835–2843.

Ohlsson R, Göndör A. 2007. The 4C technique: the 'Rosetta stone' for genome biology in 3D? *Curr Opin Cell Biol* 19: 321-325.

Oyake T, Itoh K, Motohashi H, Hayashi N, Hoshino H, Nishizawa M, Yamamoto M, Igarashi K. 1996. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol Cell Biol* 16: 6083–6095.

Pulkkinen KH, Ylä-Herttuala S, Levonen AL. 2011 Heme oxygenase 1 is induced by miR-155 via reduced BACH1 translation in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 51: 2124-2131.

Rowell E, Merckenschlager M, Wilson CB. 2008. Long-range regulation of cytokine gene expression. *Curr Opin Immunol* 20: 272-280.

Schneider R, Grosschedl R. 2007. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev* 21: 3027–3043.

Sexton T, Schober H, Fraser P, Gasser SM. 2007. Gene regulation through nuclear organization. *Nat. Struct. Mol. Biol* 14: 1049–1055.

Sexton T, Umlauf D, Kurukuti S, Fraser P. 2007. The role of transcription factories in large-scale structure and dynamics of interphase chromatin. *Semin Cell Dev Biol* 18: 691-697.

Simonis M, Kooren J, de Laat W. 2007. An evaluation of 3C-based methods to capture DNA interactions. *Nat Methods* 4: 895-901.

So AY, Garcia-Flores Y, Minisandram A, Martin A, Taganov K, Boldin M, Baltimore D. 2012. Regulation of APC development, immune response, and autoimmunity by Bach1:HO-1 pathway in mice. *Blood*, doi: 10.1182/blood-2012-04-426247.

Spector DL. 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol* 9: 265-315.

- Spector DL. 2001. Nuclear domains. *J Cell Sci* 114: 2891-2893.
- Spilianakis CG, Flavell RA. 2004. Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus. *Nat Immunol* 5: 1017-1027.
- Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA. 2005. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* 435: 637-645.
- Stoffler D, Fahrenkrog B, Aebi U. 1999. The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol* 11: 391-401.
- Spector DL. 2003. The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu. Rev. Biochem* 72: 573-608.
- Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A, Suzuki H, Tashiro S, Takahashi S, Shibahara S, Alam J, Taketo MM, Yamamoto M, Igarashi K. 2002. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* 21: 5216-5224.
- Sun, J, Brand M, Zenke Y, Tashiro S, Groudine M, Igarashi K. 2004. Heme regulates the dynamic exchange of Bach1 and NF-E2-related factors in the Maf transcription factor network. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1461-1466.
- Suzuki, H, Tashiro S, Sun J, Doi H, Satomi S, Igarashi K. 2003. Cadmium induces nuclear export of Bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem* 278: 49246-49253.
- Suzuki H, Tashiro S, Hira S, Sun J, Yamazaki C, Zenke Y, Ikeda-Saito M, Yoshida M, Igarashi K. 2004. Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. *EMBO J* 23: 2544-2553.
- Wilson CB, Rowell E, Sekimata M. 2009. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 9: 91-105.
- Xu N, Tsai CL, Lee JT. 2006. Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. *Science* 311: 1149-1152.
- Xu N, Donohoe ME, Silva SS, Lee JT. 2007. Evidence that homologous X-chromosome pairing requires transcription and Ctfp protein. *Nat Genet* 39: 1390-1396.

Yasui D, Miyano M, Cai S, Varga-Weisz P, Kohwi-Shigematsu T. 2002. SATB1 targets chromatin remodelling to regulate genes over long distances. *Nature* 419: 641-645.

Yoshida C, Tokumasu F, Hohmura KI, Bungert J, Hayashi N, Nagasawa T, Engel JD, Yamamoto M, Takeyasu K, Igarashi K. 1999. Long range interaction of cis-DNA elements mediated by architectural transcription factor Bach1. *Genes Cells* 4: 643-655.

Zhao Z, Tavosidana G, Sjölander M, Göndör A, Mariano P, Wang S, Kanduri C, Lezcano M, Sandhu KS, Singh U, Pant V, Tiwari V, Kurukuti S, Ohlsson R. 2006. Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat Genet* 38:1341-1347.