

Επίδραση της PMLIV στον ετεροδιμερισμό Twist1/ Twist2

Βουσίνοσ Βασίλειος, Α.Μ. 1642

Υπεύθυνος καθηγητής: Παπαματθαϊάκης Ιωσήφ



Ηράκλειο 2012

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί αποτέλεσμα της συμβολής πολλών ανθρώπων, τους οποίους και επιθυμώ να ευχαριστήσω.

Αρχικά, ευχαριστώ τον κο Παπαματθαίακη για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του, άλλα και για την συμβολή του στην περαιτέρω οικοδόμηση της επιστημονικής μου σκέψης. Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσά μου Κωνσταντίνα και την Γιώτα για την πολύτιμη βοήθεια τους, με τη συνεισφορά της εργαστηριακής τους εμπειρίας, στην καθοδήγησή μου εντός του εργαστηρίου, αλλά και για την ανοχή και παροχή απαντήσεων στις πολλές ερωτήσεις και απορίες μου. Ευχαριστώ επίσης την Κατερίνα και την Χριστιάνα για την κατά καιρούς παροχή χρήσιμων εργαστηριακών συμβουλών. Σημαντικότερος στην εκπόνηση της ανά χείρας εργασίας, ήταν και ο κος Τάκης, ο οποίος με τις πολύτιμες γνώσεις και εμπειρία του με βοήθησε και με καθοδήγησε σε πολλά ζητήματα που προέκυψαν όλον αυτόν τον καιρό της εκπόνησης της συγκεκριμένης εργασίας. Τέλος, επιθυμώ να ευχαριστήσω και τον κο Βρέντζο για την πολύτιμη βοήθεια του με τις κυτταροκαλλιέργειες που κατά καιρούς χρειαζόμουν.

Κλείνοντας, θα ήθελα φυσικά να ευχαριστήσω και την οικογένεια μου, τόσο για την οικονομική, όσο και για την ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν κατά την διάρκεια του συνόλου των σπουδών αλλά και της ζωής μου γενικότερα.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	3
PML.....	3
Δομή PML.....	3
Λειτουργία PML.....	5
Twist	7
Δομή Twist	7
Λειτουργία Twist.....	9
Σκοπός της εργασίας	10
Υλικά και μέθοδοι	11
Ηλεκτροφοριστικός διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA.....	12
Εξαγωγή μπάντας DNA από gel αγαρόζης	12
Αντίδραση μοριακής συγκόλλησης DNA (ligation)	13
Μετασηματισμός βακτηρίων (Transformation).....	13
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλιμακας (Miniprep).....	13
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλιμακας (Maxiprep)	14
Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	14
Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων (Transfection).....	15
Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.....	15
Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών σε gel με SDS (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	16
Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη (Transfer).....	16
Στύπωμα Western (Western blot)	16
Συνανοσοκατακρήμνιση (Co- IP).....	17
Μικροσκοπία Confocal	17
Φορείς που χρησιμοποιήθηκαν:.....	18
Αποτελέσματα	21
Συνανοσοκατακρήμνιση Twist2- GFP, Twist1- JRed, PMLIV- myc	21
Εντοπισμός των Twist1, Twist2 και PMLIV στον πυρήνα 293T κυττάρων (μικροσκοπία confocal)	24
Συζήτηση	29
Βιβλιογραφία	31

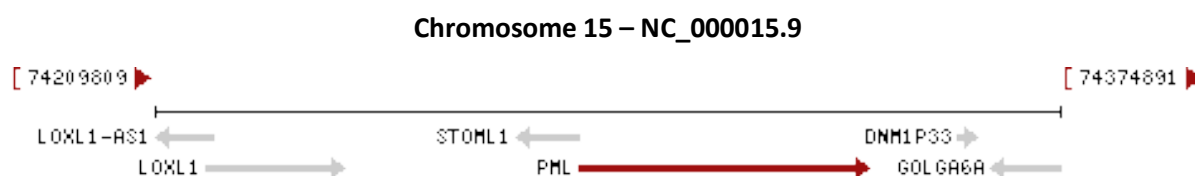
Εισαγωγή

PML

Η πρωτεΐνη PML (Promyelocytic Leukemia protein) πρωτοανακαλύφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 90' ως στοιχείο που συμμετέχει στην μετατόπιση t(15;17), και δημιουργεί το ογκογονικό σύντηγμα της PML με τον α υποδοχέα ρετινοϊκού οξέος (RARα: Retinoic Acid Receptor α) PML/RARα. Η υβριδική αυτή πρωτεΐνη παρουσιάζεται σε ασθενείς με οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (APL: Acute Promyelocytic Leukemia) [1, 2]. Η δημιουργία της διαταράσσει τη λειτουργία τόσο του RARα όσο και της PML, αναστέλλοντας μάλιστα τη δημιουργία των PML πυρηνικών σωματιδίων (PML- NBs: PML Nuclear Bodies), κάτι που συνεπάγεται αφύσικη επιβίωση και πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών προμυελοκυττάρων [3, 4]. Τα προαναφερθέντα καθώς και ακόλουθες έρευνες που ανέδειξαν περαιτέρω την σημασία της PML εστίασαν το επιστημονικό ενδιαφέρον στην μελέτη τόσο της λειτουργίας όσο και της δομής της.

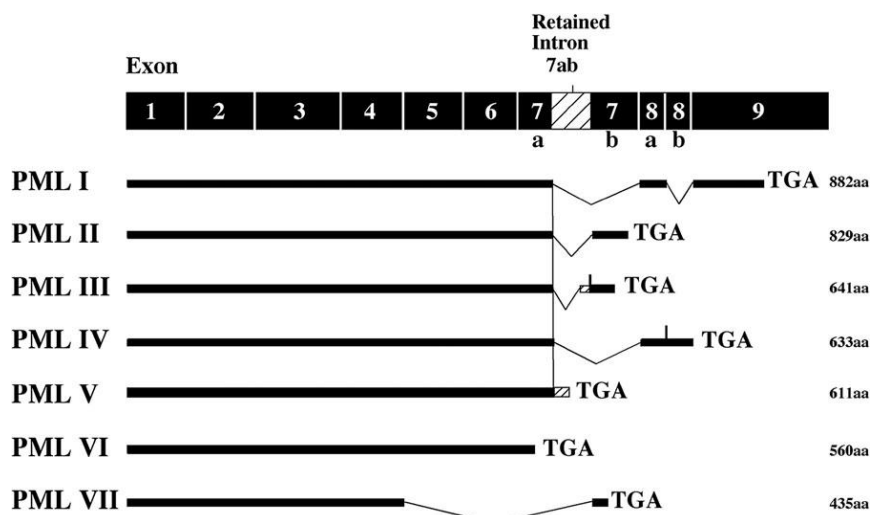
Δομή PML

Το γονίδιο της PML στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 15 (γενετικός τόπος 15q22) (εικόνα 1).



Εικόνα 1. Γενετικός τόπος της ανθρώπινης PML στο χρωμόσωμα 15. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Περιλαμβάνει 9 εξόνια που με τη μεσολάβηση του εναλλακτικού ματίσματος παράγουν διάφορες ισομορφές της PML με μεγέθη που κυμαίνονται μεταξύ 435aa και 882aa (εικόνα 2). [5]

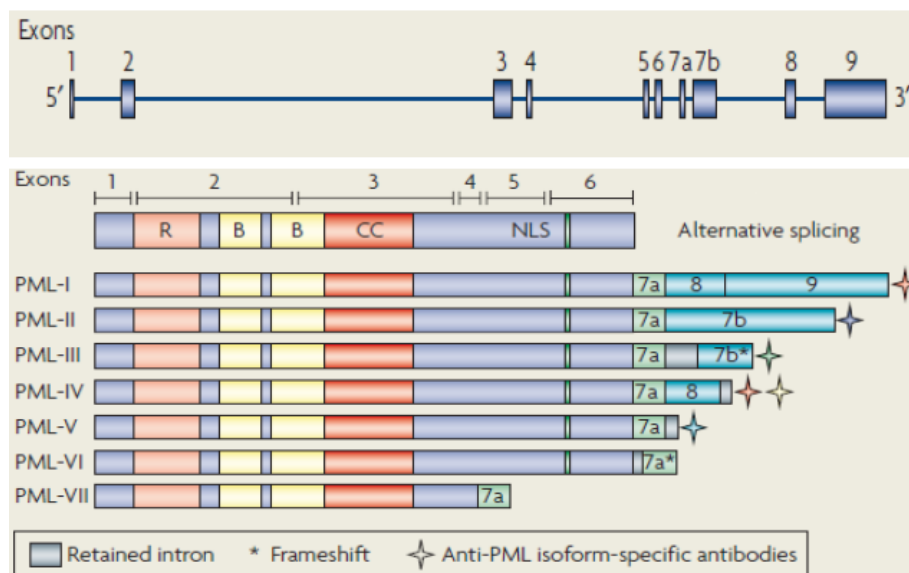


Εικόνα 2. Εξόνια του γονιδίου PML και ισομορφές της PML πρωτεΐνης με τα μεγέθη τους. (<http://www.nature.com>)

Οι ισομορφές της PML διαφέρουν ως προς το καρβοξυτελικό τους άκρο από το οποίο συχνά καθορίζονται οι αλληλεπιδράσεις της εκάστοτε ισομορφής με άλλες πρωτεΐνες και άρα η λειτουργία της. Αντίθετα, οι γνωστές ισομορφές της PML εκφράζουν ένα πανομοιότυπο αμινοτελικό άκρο, που κωδικοποιείται από τα τρία πρώτα εξώνια, και περιλαμβάνει ένα τριμερές μοτίβο (TRIM) . Το μοτίβο αυτό αποτελείται από μια Really Interesting New Gene (RING) επικράτεια, ένα B- box και μία α -helical coiled-coil επικράτεια (RBCC) [2].

Το TRIM/ RBCC έχει σχετιστεί με τον πολυμερισμό των PML και επομένως με τη δημιουργία των PML- NBs [2, 6]. Επιπρόσθετα, η επικράτεια RING, είναι μία πλούσια σε κυστεϊνικά κατάλοιπα περιοχή που προσδένει ψευδάργυρο, κάτι που αποτελεί την ιδανική δομή για δημιουργία μεγάλων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Το B- box εξασφαλίζει την σωστή κατεύθυνση και ευθυγράμμιση της CC επικράτειας, η οποία ούσα ορθώς τοποθετημένη είναι υπεύθυνη για τον όμο- ή έτερο- διμερισμό μεταξύ TRIM πρωτεϊνών [2].

Αξίζει να σημειωθεί πως το γονίδιο της PML φέρει και αλληλουχία που κωδικοεύει για το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS: Nuclear Localization Signal) (εξώνιο 6). Εξαιτίας αυτού οι περισσότερες γνωστές ισομορφές της PML εδράζονται στον πυρήνα, με εξαίρεση την PML1, η οποία μαζί με το NLS φέρει και σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (NES: Nuclear Export Signal) (εξώνιο 9) και άρα εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα, καθώς και της ισομορφές από τις οποίες αποκόπτεται με εναλλακτικό μάτισμα το NLS, με αποτέλεσμα να βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα [1, 2](**εικόνα 3**).



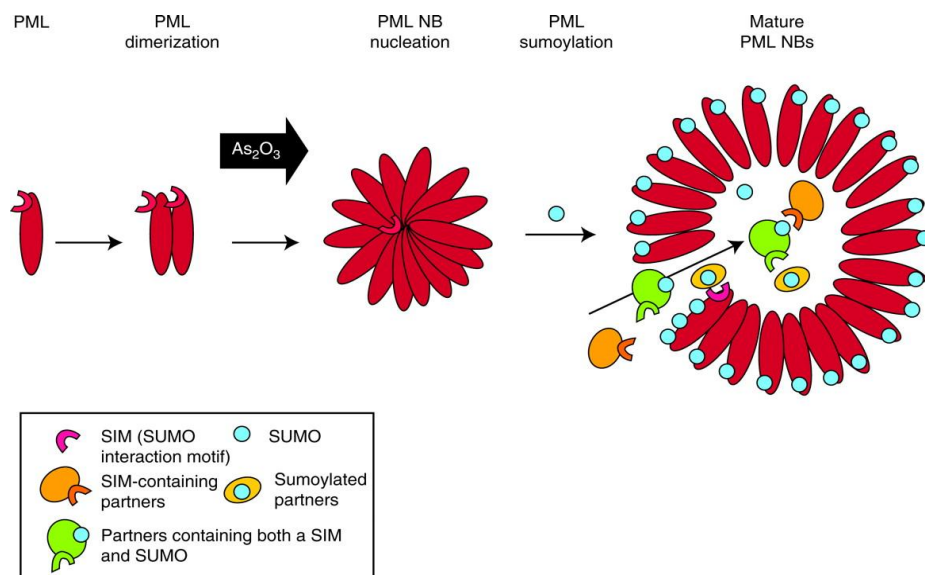
4 Εικόνα 3. Εξώνια PML γονιδίου και χαρακτηριστικές δομές των PML ισομορφών. (<http://www.nature.com>)

Λειτουργία PML

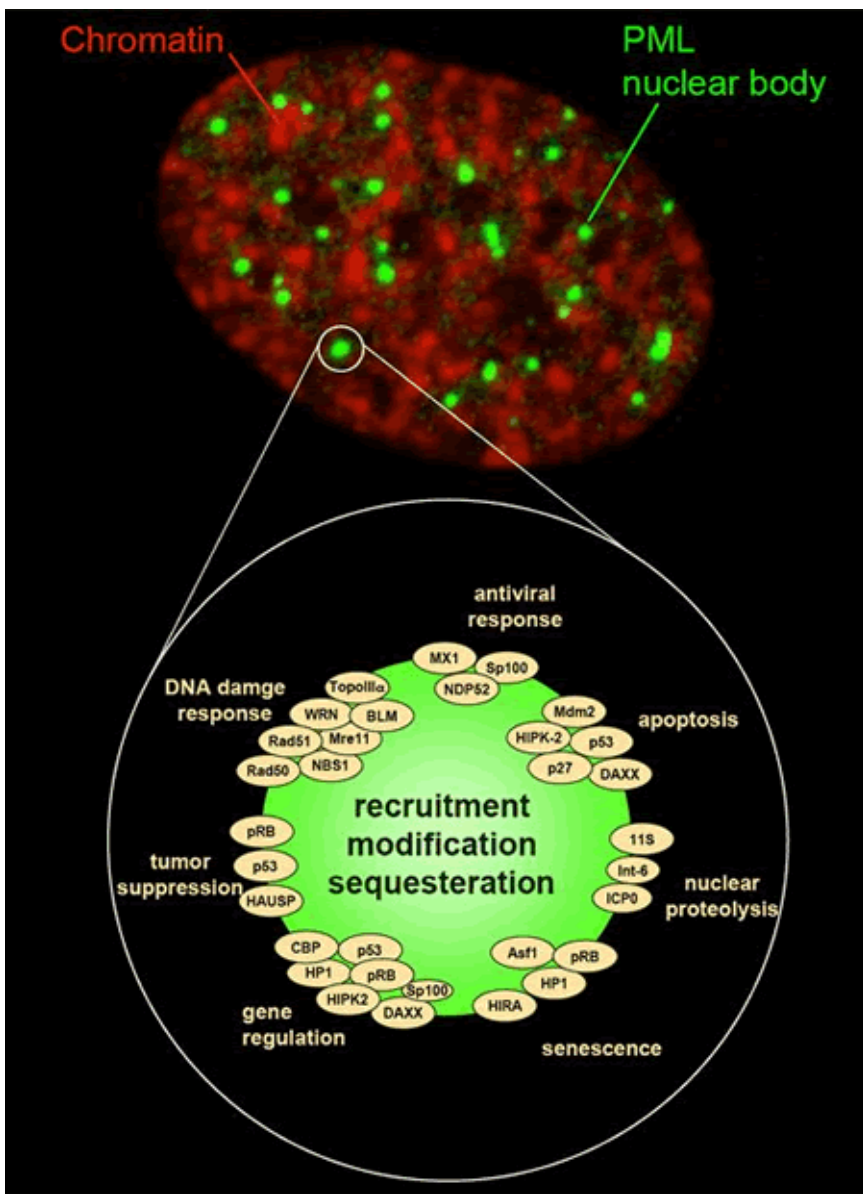
Η PML πρωτοαναγνωρίστηκε ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη σε περιπτώσεις λευχαιμίας, ωστόσο αργότερα η ιδιότητα της ογκοκατασταλτικότητας διαπιστώθηκε και για συμπαγείς όγκους ποικίλων ιστών [1, 2]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν κύτταρα από τον τραχήλο της μήτρας (HeLa cells) με σταθερή υπερέκφραση PML, στα οποία διαπιστώθηκε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και εκτεταμένη παραμονή των κυττάρων στη φάση G1 [7].

Η δράση της PML εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, αλλά και στον πυρήνα [1]. Ένα παράδειγμα κυτταροπλασματικής δράσης της, είναι η δράση της κυτταροπλασματικής PML (cPML) η οποία εντοπίζεται της μιτοχονδριακά σχετιζόμενες μεμβράνες (MAMs: Mitochondria Associated Membranes) και συμμετέχει στην επαγωγή απόπτωσης μέσω ρύθμισης του ρεύματος εισροής ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο στα μιτοχόνδρια, στην οποία διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο οι MAMs [1, 8]. Παράλληλα, η PML αποτελεί κυρίαρχο παράγοντα και στον πυρήνα, καθώς είναι η κεντρική πρωτεΐνη που συγκροτεί τα PML- NBs [1, 2, 4, 5, 7, 9].

Τα PML- NBs αποτελούν σφαιρικές δομές του πυρήνα (5-30 ανά κύτταρο) διαμέτρου 0,2-1 μm [1, 2, 9]. Η PML, όντας σουμοϋλιωμένη (η σουμοϋλίωση υποβοηθάται με από το As_2O_3) πολυμερίζεται και λειτουργεί ως ικρίωμα των μακρομοριακών αυτών δομών του πυρήνα (**εικόνα 4**). Εκεί στρατολογείται πληθώρα ποικίλων παραγόντων, που επιτελούν ένα μεγάλο εύρος λειτουργιών [2, 9, 10] (**εικόνα 5**).



Εικόνα 4. Αναπαράσταση του μηχανισμού σχηματισμού ενός PML NB. (Lallemand- Breitenbach V., Hugues de The' (2010), PML nuclear bodies. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2:a00061)



Εικόνα 5. Τα PML- NBs όπως φαίνονται με χρήση ανοσοφθορισμού και οι διάφοροι παράγοντες που επιστρατεύουν καθώς και οι λειτουργίες με τις οποίες αυτοί σχετίζονται. (<http://www.fli-leibniz.de>)

Έχουν προταθεί τρία μη αλληλοαποκλειόμενα μοντέλα σχετικά με την λειτουργία των PML- NBs. Το πρώτο προτείνει ότι τα PML- NBs λειτουργούν ως αποθηκευτικοί χώροι ή ως τόποι συγκράτησης πρωτεϊνών [1]. Ένα παράδειγμα της λειτουργίας αυτής αποτελεί η συγκράτηση της πρωτεΐνης Mdm2, σε περίπτωση βλάβης του DNA, η οποία είναι αναστολέας της p53, με αποτέλεσμα την ελεύθερη δράση αυτής [11]. Ένα άλλο μοντέλο για το μηχανισμό δράσης των PML- NBs περιγράφει τα εν λόγω σωματίδια ως περιοχές όπου λαμβάνει χώρα η μεταμεταφραστική τροποποίηση διαφόρων πρωτεϊνών. Πράγματι, τα PML- NBs έχουν εμπλακεί σε μία πλειάδα μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως είναι σουμοιλιώσεις, ακετυλιώσεις και απακετυλιώσεις, φωσφορυλιώσεις αλλά και ουβικιτινιλιώσεις [1, 2]. Είναι αξιοσημείωτο ότι η ίδια η PML φέρει το TRIM/RBCC μοτίβο που θεωρείται πως έχει ενεργότητα E3 λιγάσης ουβικιτίνης [6]. Επιπρόσθετα, η PML επιστρατεύει ακετυλοτρανσφεράσες όπως είναι η CBP, φωσφατάσες όπως οι PP1A και PP2A, κινάσες όπως η HIPK2, αλλά και άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Τέλος, έχει διατυπωθεί ακόμη μία θεωρία όσον αφορά την δράση των PML- NBs, η οποία

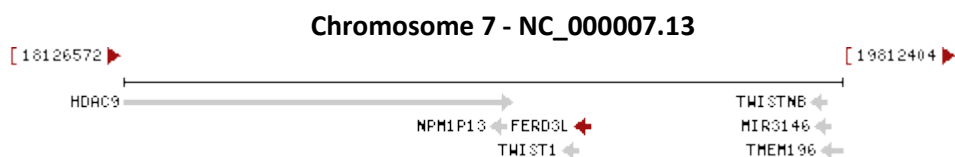
προτείνει την λειτουργία τους ως μεταγραφικοί ρυθμιστές [12]. Είναι γνωστό ότι τα PML- NBs εντοπίζονται κοντά σε ενεργούς μεταγραφικά γενετικούς τόπους όπως είναι αυτός του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης 1 (MHC1: Major Histocompatibility Class 1) και του p53. Επιπλέον, τα πυρινικά αυτά σωματίδια προσδένουν τροποποιητές ιστονών που ρυθμίζουν την μεταγραφή (π.χ. απακετυλάσες ιστονών) [1, 13]. Τέλος, έχει βρεθεί πως τα PML- NBs αλληλεπιδρούν άμεσα ακόμα και με σύμπλοκα τροποποίησης της χρωματινικής δομής (π.χ. SWI/SNF) [14].

Twist

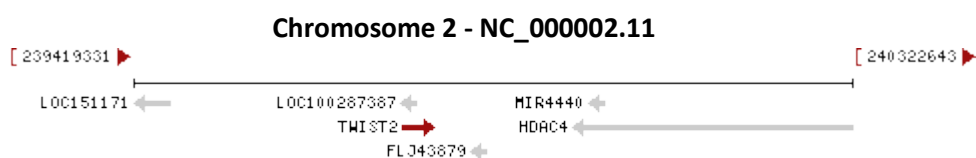
Η πρωτεΐνη Twist ανακαλύφθηκε στη *Drosophilla* ως απαραίτητος παράγοντας για την έναρξη της γαστριδίωσης και τον σχηματισμό του μεσοδέρματος. Ειδικότερα, μεταλλαγή του Twist στην *Drosophilla* οδηγεί σε αποτυχία ανάπτυξης οργάνων προερχομένων από το μεσόδερμα. Επιπλέον, προκαλεί ελαττωματική ανάπτυξη του κεφαλιού, ενώ το έμβρυο είναι στρεβλωμένο εντός του αυγού [15, 16].

Δομή Twist

Στον άνθρωπο υπάρχουν 6 ορθόλογα Twist γονίδια. Αυτά είναι τα εξής: Twist1, Twist2 (Dermo1), Hand1, Hand2, Paraxis και Scleraxis. Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία αφορά μόνο τις Twist1 και Twist2 πρωτεΐνες, των οποίων τα γονίδια βρίσκονται στις θέσεις 7p21.2 και 2q37.3 αντιστοίχως [16] **(εικόνες 6-7)**.

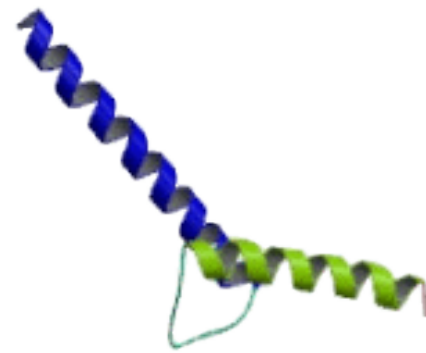


Εικόνα 6. Γενετικός τόπος του Twist1 στο χρωμόσωμα 7 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

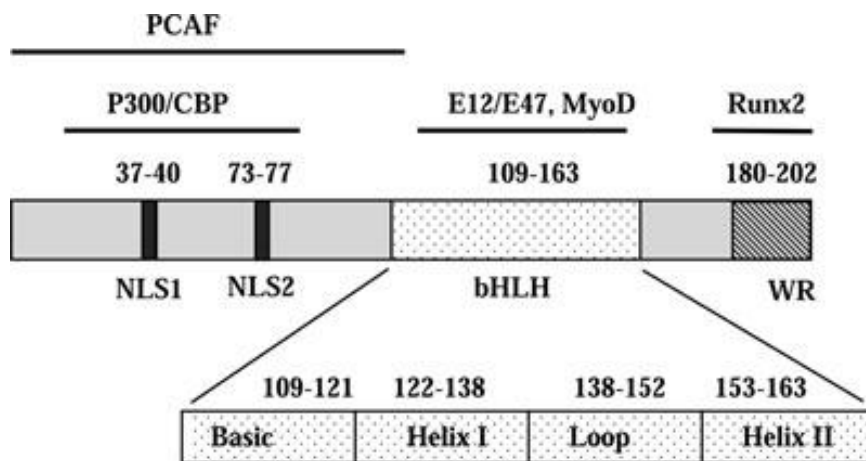


Εικόνα 7. Γενετικός τόπος του Twist2 στο χρωμόσωμα 2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Η δομές των δύο αυτών ορθόλογων πρωτεϊνών είναι παραπλήσιες. Στην **εικόνα 8** φαίνονται οι επικράτειες που φέρει η Twist1 και ως ορθόλογη της όμοιες επικράτειες περιλαμβάνονται και στη δομή της Twist2. Όπως φανερώνεται από την εικόνα οι Twist πρωτεΐνες διαθέτουν δύο σήματα εντοπισμού στον πυρήνα. Επιπλέον, στις επικράτειες των Twist συμπεριλαμβάνεται και η WR γνωστή και ως Twist- box επικράτεια. Ο ρόλος αυτής δεν είναι γνωστός, αν και έχει βρεθεί να συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις των Twist με διάφορες πρωτεΐνες. Τέλος, μία επικράτεια που χαρακτηρίζει τις Twist πρωτεΐνες είναι η basic Loop- Helix- Loop (bHLH) επικράτεια [17] (**εικόνα 9**).



Εικόνα 9. Η τρισδιάστατη δομή της bHLH επικράτειας.



Εικόνα 8. Η πρωτεΐνη Twist1 με τις βασικές επικράτειες που την χαρακτηρίζουν και τις διάφορες περιοχές πρόσδεσης με άλλους παράγοντες.

Η επικράτεια αυτή προσδιορίζει μία οικογένεια πρωτεϊνών, την οικογένεια των bHLH μεταγραφικών παραγόντων. Στην οικογένεια αυτή διακρίνονται 3 τάξεις παραγόντων. Αρχικά, στην τάξη A ανήκουν bHLH πρωτεΐνες που εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και είναι γνωστές και ως E πρωτεΐνες. Έπειτα, η τάξη B της bHLH οικογένειας περιλαμβάνει πρωτεΐνες ιστοειδικά εκφραζόμενες και σε αυτήν την τάξη ανήκουν και οι Twist πρωτεΐνες. Τέλος, υπάρχει και η τάξη C στην οποία ανήκουν πρωτεΐνες που έχουν ένα μοτίβο φερμουάρ λευκίνης προς το καρβοξυτελικό άκρο συγκριτικά με την bHLH επικράτεια. Αξίζει να σημειωθεί πως την επικράτεια HLH την φέρουν και οι πρωτεΐνες της οικογένειας Inhibitor of DNA binding (Id), οι οποίες στερούνται των βασικών καταλοίπων της basic επικράτειας

και δρουν ως αναστολείς των τάξης A και B bHLH μεταγραφικών παραγόντων [15, 16].

Η δράση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων έγκειται στην ικανότητα πρόσδεσης του DNA. Η πρόσδεση αυτή ωστόσο προϋποθέτει τον διμερισμό αυτών, ο οποίος επιτυγχάνεται μέσω της επικράτειας bHLH. Συγκεκριμένα, η επικράτεια αυτή αποτελείται από μία μικρή περιοχή βασικών αμινοξέων (b), και 2 α- έλικες οι οποίες διαχωρίζονται από μία λούπα (HLH). Οι α- έλικες είναι αυτές που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις με άλλες bHLH πρωτεΐνες, κάτι που συνεπάγεται την μετάθεση της βασικής επικράτειας με απόρροια την δημιουργία ενός μοτίβου πρόσδεσης DNA που προσδένει στην αλληλουχία γνωστή ως E- box (CANNTG) [16].

Λειτουργία Twist

Όπως προαναφέρθηκε οι Twist πρωτεΐνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη του εμβρύου στην *Drosophilla*, ενώ και στα ποντίκια και τον άνθρωπο δρουν στις διεργασίες της ανάπτυξης, άλλα και της διαφοροποίησης κυττάρων. Τα ετερόζυγα ποντίκια, αν και επιβιώνουν, παρουσιάζουν κраниοπροσωπικές ανωμαλίες, ελλιπή ανάπτυξη των ραφών του κεφαλιού, ασύμμετρο σκελετό του προσώπου, αλλά και προαξονική πολυδακτυλία στα πίσω άκρα. Τα ανωτέρω υποδεικνύουν ανασταλτική δράση των Twist στην διαφοροποίηση των οστεοβλαστών [16, 18]. Παράλληλα, στον άνθρωπο ετερόζυγες μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του *twist* γονιδίου έχουν σχετιστεί με μία αυτοσωμική επικρατή διαταραχή κраниοσυννοστέωσης, το σύνδρομο Saethre–Chotzen Syndrome (SCS). Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από πρόωρη σύντηξη των ραφών του κраниού, χαμηλή εμπρόσθια τριχοειδή γραμμή, ασύμμετρία προσώπου, βλεφαρόπτωση καθώς και ελαττωματικά άκρα που μπορεί να παρουσιάζουν πολυδακτυλία, βραχυδακτυλία ή και συνδακτυλία. Έχει προταθεί ότι τα συμπτώματα αυτά αποτελούν συνέπεια της επιτάχυνσης της ανάπτυξης των οστών και της αυξημένης διαφοροποίησης, κάτι που αποδίδεται στην ιδιότητα των μεταλλαγμένων στο γονίδιο *twist* κυττάρων να δημιουργούν οστεοειδείς κονδυλώδεις δομές και να εκφράζουν οστεοβλαστικούς δείκτες με αυξημένη απόδοση. Τέλος, οι Twist έχουν ανασταλτική δράση και στην διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs: Mesenchymal Stem Cells) σε μυοκύτταρα [15, 16].

Μία ακόμη λειτουργία των Twist που είναι άξια αναφοράς είναι η συμμετοχή τους στην επαγωγή και συντήρηση της μετάβασης των κεπιθυλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT: Epithelial- Mesenchymal Transition) [16, 19, 20]. Η EMT αναφέρεται στην διεργασία μετάβασης των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά, μία διαδικασία που μεσολαβείται από επαγωγή της έκφρασης μεσεγχυματικών χαρακτήρων (π.χ. N- cadherin) και καταστολή της έκφρασης

επιθηλιακών παραγόντων (π.χ. E- cadherin). Η EMT συμμετέχει σε ποικίλες φυσιολογικές λειτουργίες κατά το αναπτυξιακό κυρίως στάδιο, όπως στην μετανάστευση κυττάρων κατά την γαστρίδωση. Ωστόσο, η EMT εμπλέκεται και σε παθολογικής φύσης διεργασίες. Τέτοια είναι η επαγωγή βλαστικότητας και μεσεγχυματικότητας σε καρκινικά κύτταρα, κάτι που καθιστά τον σχηματιζόμενο όγκο πιο επιθετικό και του παρέχει την ιδιότητα της μετανάστευσης σε άλλα όργανα. Αυτή η ιδιότητα αποτελεί συνέπεια των διαφοροποιήσεων που προκαλεί το EMT σε επίπεδο κυτταροσκελετού (π.χ. αρνητική ρύθμιση της E- cadherin) και την συνεπακόλουθη εξασθένηση των διακυτταρικών συνδέσεων [20].

Οι προαναφερθείσες λειτουργίες των Twist επιτυγχάνονται χάρη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αυτών με ένα μεγάλο εύρος παραγόντων (**εικόνα 8**). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο κύριος οστεογονικός ρυθμιστής Runx2. Η Twist αλληλεπιδρά με αυτόν μέσω του Twist box και αναστέλλει την δράση του καθιστώντας λιγότερο αποδοτική την πρόσδεσή του στο DNA. Η ανασταλτική δράση του Twist στην διαφοροποίηση των MSCs προς μυϊκά κύτταρα, οφείλεται κυρίως στην πρόσδεση άλλων bHLH E πρωτεϊνών από αυτό και συνεπώς στην παρεμπόδιση της συνενεργοποίησης της MyoD από αυτές, που είναι μία πρωτεΐνη που συμμετέχει στην διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων. Επιπλέον, οι Twist αλληλεπιδρούν και άμεσα με την MyoD μέσω της bHLH επικράτειας αλλά και άλλων καρβοξυτελικών δομών παρεμποδίζοντας έτσι άμεσα την λειτουργία της ως μεταγραφικό παράγοντα [16]. Καταλήγοντας, ένα βαρύνουσα σημασία αποτέλεσμα προηγούμενων πειραμάτων στο εργαστήριο του κου Παπαμαθθαϊάκη αποτελεί η αλληλεπίδραση μέσω της bHLH επικράτειας της Twist2 με την πρωτεΐνη PMLIV, που πιθανά αποτελεί τον παράγοντα που στρατολογεί την Twist, ούτως ώστε αυτή να μπορεί να διατελέσει τις προαναφερθείσες λειτουργίες (π.χ. επαγωγή EMT).

Σκοπός της εργασίας

Με δεδομένο ότι οι Twist2 αλληλεπιδρά τόσο με την Twist1 όσο και με την PMLIV μέσω της bHLH επικράτειας, ανακύπτει ως ενδεχόμενο η ανασταλτική δράση της PMLIV στον διμερισμό Twst1/Twist2. Η μελέτη της ευστάθειας αυτού του ενδεχομένου αποτελεί και το αντικείμενο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας.

Για τον σκοπό αυτόν χρησιμοποιήθηκαν 293T κύτταρα, όπου υπερεκφράστηκαν παροδικά (transiently) οι PMLIV Twist1 και Twist2 σε διάφορους συνδυασμούς. Η ανίχνευση του διμερισμού έγινε με τη μέθοδο της συνανοσοκατακρήμνισης, ενώ με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας ανιχνεύθηκε ο εντοπισμός των τριών αυτών

πρωτεϊνών in vivo και βοήθησε στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την επίδραση της PMLIV στον διμερισμό Twist1/Twist2.

Υλικά και μέθοδοι

Ηλεκτροφοριστικός διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA

Ο διαχωρισμός γραμμικών κομματιών DNA κατέσται δυνατός υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σε gel αγαρόζης. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιούνται εντός TBE buffer και ως marker χρησιμοποιήθηκε το DNA του λ φάγου τεμαχισμένο με το περιοριστικό ένζυμο PstI. Η εμφάνιση των ζωνών του DNA έγινε με τη χρήση UV φωτός.

- Παρασκευή gel αγαρόζης: διάλυση υπό βρασμό κατάλληλης ποσότητας σκόνης αγαρόζης (εξαρτάται από τα μεγέθη των μπαντών που επιθυμείται να φανούν) σε απιονισμένο νερό και προσθήκη TBE 5x σε αναλογία 1/10

Εξαγωγή μπάντας DNA από gel αγαρόζης

Για την εξαγωγή μπάντας DNA από gel αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το Nucleospin kit της εταιρίας Macherey- Nagel

- Αποκοπή της επιθυμητής μπάντας DNA αφού αυτή έχει πρώτα ανιχνευθεί στο gel με τη βοήθεια φωτός UV και μεταφοράς του κομματιού gel σε erpendorf
- Προσθήκη NT buffer στο gel(200μL NT/100mg gel)
- Επώαση στους 55°C για 5min με συχνή ανακίνηση
- Τοποθέτηση της στήλης του kit σε tube συλλογής (2mL) και φόρτωση δείγματος
- Φυγοκέντρηση στήλης- tube συλλογής (11000rpm, RT, 1min)
- Απόρριψη διερχόμενου υγρού από το tube συλλογής και επανατοποθέτηση της στήλης σε αυτό
- Προσθήκη 700μL NT3 buffer στην στήλη
- Φυγοκέντρηση (11000rpm, RT, 1min), απόρριψη διερχόμενου υγρού
- Φυγοκέντρηση για στέγνωμα της στήλης (11000rpm, RT, 2min), απόρριψη διερχόμενου υγρού
- Μεταφορά στήλης σε erpendorf
- Έκλυση DNA με προσθήκη 15- 30μL (ανάλογα με την ποσότητα DNA) NE buffer
- Επώαση σε RT για 1min
- Φυγοκέντρηση (11000rpm, RT, 1min)

Αντίδραση μοριακής συγκόλλησης DNA (ligation)

Για την αντίδραση μοριακής συγκόλλησης (ligation) χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο λιγάση του βακτηριοφάγου T4 και το buffer αυτής από την εταιρία Minotech

- Τοποθέτηση ενθέματος και φορέα σε αναλογία 10 moles/1 mol (ένθεμα/φορέα)
- Προσθήκη H₂O
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας λιγάσης (1μL/10μL) και buffer λιγάσης + ATP (1μL/10μL)
- Επώαση στους 16°C για 3h όταν υπάρχουν sticky ends ή σε RT για 3h όταν τα άκρα είναι blunt

Μετασηματισμός βακτηρίων (Transformation)

Για τον βακτηριακό μετασηματισμό χρησιμοποιήθηκαν, επιλεκτικά στον μετασηματισμό (competent), κύτταρα *E. coli* του στελέχους DH5 που έχουν υποστεί ειδική επεξεργασία με CaCl₂.

- Προσθήκη πλασμιδίου σε erpendorf με τα βακτήρια και επώαση 30 min σε ξηρό πάγο
- Πραγματοποίηση θερμικού σοκ στους 42° C για 1,5 min (υδατόλουτρο)
- Επώαση 1min σε ξηρό πάγο
- Προσθήκη 900μL καθαρού θρεπτικού υλικού LB
- Επώαση στους 37°C για 30min
- Plating μίας αραιής 1/10 και μίας πυκνής 9/10 καλλιέργειας σε τρυβλία με στερεό LB με κατάλληλο αντιβιοτικό
- Ολονύκτια (O/N) επώαση στους 37°C
- Απομόνωση μοναδιαίων αποικιών και εμβολιασμός τους σε υγρό θρεπτικό υλικό με κατάλληλο αντιβιοτικό
- Επώαση των αποικιών στους 37°C (O/N)

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλιμακας (Miniprep)

Για τα minipreps χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα της εταιρίας Macherey- Nagel

- Φυγοκέντρηση 1ml από υγρή βακτηριακή (*E. coli*) καλλιέργεια (14000rpm, RT, 20sec)
- Άδειασμα υπερκειμένου διατήρηση βακτηριακής πελέτας.
- Επαναδιαλυτοποίηση πελέτας σε 100μL Resuspension buffer (περιέχει RNase)
- Προσθήκη 100μL Lysis buffer και ήπια ανακίνηση
- Προσθήκη 100μL Neutralization buffer και ανακίνηση

- Φυγοκέντρηση (14000rpm, RT, 10min)
- Λήψη υπερκειμένου και προσθήκη 2.5 x V αιθανόλης και ανακίνηση
- Φυγοκέντρηση (14000rpm, 4°C, 10min)
- Απομάκρυνση αιθανόλης και στέγνωμα
- Επαναδιαλυτοποίηση σε 100μL H₂O (αποθήκευση στους -20°C)

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλιμακας (Maxiprep)

Για τα maxipreps χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα της εταιρίας Macherey- Nagel

- Προσθήκη του επιθυμητού προς καλλιέργεια βακτηριακού κλώνου σε υγρή καλλιέργεια LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό σε συγκέντρωση 1/1000
- Επώαση O/N στους 37 °C
- Μεταφορά καλλιέργειας σε πλαστικά baquets και φυγοκέντρηση (5000rpm, 4°C, 10min)
- Άδειασμα υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση βακτηριακής πελέτας σε 8mL Resuspension buffer
- Προσθήκη 8mL Lysis buffer και ήπια ανακίνηση
- Προσθήκη 8mL Neutralization buffer και ανακίνηση
- Εξισορρόπηση κολώνας για απομόνωση DNA (ίδιας εταιρίας Nucleobond kit) με 12mL Equilibrium buffer
- Προσθήκη του διαλύματος με τα βακτήρια στην κολώνα
- Πλύση κολώνας με 5mL Equilibrium buffer
- Αφαίρεση του άνω φίλτρου
- Πλύση με 8mL Wash buffer
- Έκλουση πλασμιδίου με 5mL Elution buffer από την κολώνα σε ένα falcon
- Προσθήκη 3,5mL ισοπροπανόλης
- Φυγοκέντρηση (3000rpm, 4°C, 30min)
- Άδειασμα υπερκειμένου και στέγνωμα
- Επαναδιαλυτοποίηση πελέτας σε κατάλληλο TE βάσει του μεγέθους της πελέτας και άρα της ποσότητας DNA ≈ 600μL
- Αποθήκευση στους 4°C

Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Όποτε απαιτήθηκε πέψη DNA (π.χ. για σύνθεση επιθυμητού πλασμιδίου ή για έλεγχο σωστής ένθεσης ενθέματος σε πλασμίδιο) χρησιμοποιήθηκαν περιοριστικά ένζυμα σε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα με την παρουσία της σταθεροποιητικής πρωτεΐνης BSA σε συνθήκες που καθορίστηκαν βάσει των πρωτοκόλλων της εκάστοτε εταιρίας.

Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων (Transfection)

Στην συγκεκριμένη εργασία για την διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEK 293T καλλιεργημένα σε πλαστικά τρυβλία (10mL θρεπτικού) ή σε 6-well πιάτα (3mL θρεπτικού) με θρεπτικό DMEM

- Έλεγχος κατάστασης (υπερελικωμένα και όχι με εγκοπές) πλασμιδίων προς transfection και ποσοτικοποίηση τους με ηλεκτροφόρηση
- Παρασκευή διαλύματος με κατάλληλη ποσότητα DNA (ανάλογα με το μέγεθος της καλλιέργειας*), 1/2V Hebs και 1/2V CaCl₂ (το V εξαρτάται από το μέγεθος της καλλιέργειας: $V = 1/10V_{καλλιέργεια}$)
- Επώαση για 10min για τη δημιουργία ιζήματος
- Προσθήκη του διαλύματος στην καλλιέργεια των προς διαμόλυνση κυττάρων και ήπια ανακίνηση προς ομογενή κατανομή του ιζήματος
- Επώαση της καλλιέργειας με το ίζημα (O/N) σε incubator (37°C, 5% CO₂)

*20μg DNA για τρυβλία διαμέτρου 100mm και 3-6μg DNA για 6-well πιάτα

Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος

- Απόρριψη θρεπτικού (DMEM)
- Αποκόλληση κυττάρων καλλιέργειας με PBS και τοποθέτηση τους σε falcon
- Φυγοκέντρηση (1500rpm, 4°C, 5min)
- Απόρριψη υπερκειμένου
- Επαναδιαλυτοποίηση πελέτας κυττάρων σε 1mL PBS και μεταφορά σε erpendorf
- Φυγοκέντρηση (3000rpm, 4°C, 5min)
- Απόρριψη υπερκειμένου
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας RIPA buffer (ανάλογα με την ποσότητα κυττάρων) και PMSF (καταστολέας πρωτεασών) (1μL PMSF/ 100μL RIPA buffer) σε ξηρό πάγο
- Επώαση για 15min σε πάγο
- Φυγοκέντρηση (14000rpm, 4°C, 10min)
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέα erpendorfs (αποθήκευση στους -80°C)

Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών σε gel με SDS (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών βάσει του μεγέθους τους έγινε υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σε gel ακρυλαμίδης με SDS. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιούνταν σε Protein Running buffer και ως marker χρησιμοποιήθηκε ο marker της εταιρίας Bio- Rad

- Παρασκευή gel πολυακρυλαμίδης: για την Παρασκευή του gel παρασκευάζονται δύο επιμέρους gels το stacking gel και το running gel. Ανάλογα με την πυκνότητα του πηκτώματος (εξαρτάται από τα μεγέθη των πρωτεϊνών που είναι επιθυμητό να ανιχνευθούν) προστίθενται κατάλληλες ποσότητες από H₂O, ακρυλαμίδα 30%, Tris (pH 8,8 για running gel και pH 6,8 για stacking gel), SDS 20% , APS, TEMED.

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη (Transfer)

Για την μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη (Nitrocellulose Transfer Membrane) της εταιρίας Whatman Protran. Το transfer γινόταν σε Transfer buffer.

Στύπωμα Western (Western blot)

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για στύπωμα Western είναι τα εξής:

1. Anti- GFP: Minotech, rabbit polyclonal
 2. Anti- JellyRed: (α- KillerRed, Cat.# AB962) Evrogen, rabbit polyclonal
 3. Anti- myc: εκκρίθηκε από υβρίδωμα της κυτταρικής σειράς Myc-9E10.2 (38)
 4. Anti- rabbit: Peroxidase- conjugated AffiniPure Goat Anti- Rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch, 115-035-045
- Βάψιμο της μεμβράνης με Ponceau για επιβεβαίωση ύπαρξης πρωτεϊνών στην μεμβράνη
 - Πλύσιμο της μεμβράνης με TBST buffer ώσπου να ξεβάψει
 - Blocking με γάλα 5% για 1h
 - Επώαση για 1h με το κατάλληλο αντίσωμα (1^ο αντισωμα)σε κατάλληλη αραίωση, ειδικό για την προς ανίχνευση πρωτεΐνη
 - Πλύσιμο 3x 5min με TBST buffer
 - Επώαση 1h με το κατάλληλο αντίσωμα (2^ο αντισωμα) σε κατάλληλη αραίωση, ειδικό για το 1^ο αντισωμα
 - Πλύσιμο 3x 5min με TBST buffer

- Προσθήκη σε όλα τα σημεία της μεμβράνης κατάλληλης ποσότητας (εξαρτάται από το μέγεθος της μεμβράνης) μίγματος 1/2V west pico stable peroxide solution+ 1/2V west pico luminal/Enhancer solution.
- Αναμονή 5min με την μεμβράνη προστατευμένη από φως
- Εμφάνιση στο LAS (Fujifilm LAS 3000 εξοπλισμένο με CCD- Camera)

Συνανοσοκατακρήμνιση (Co- IP)

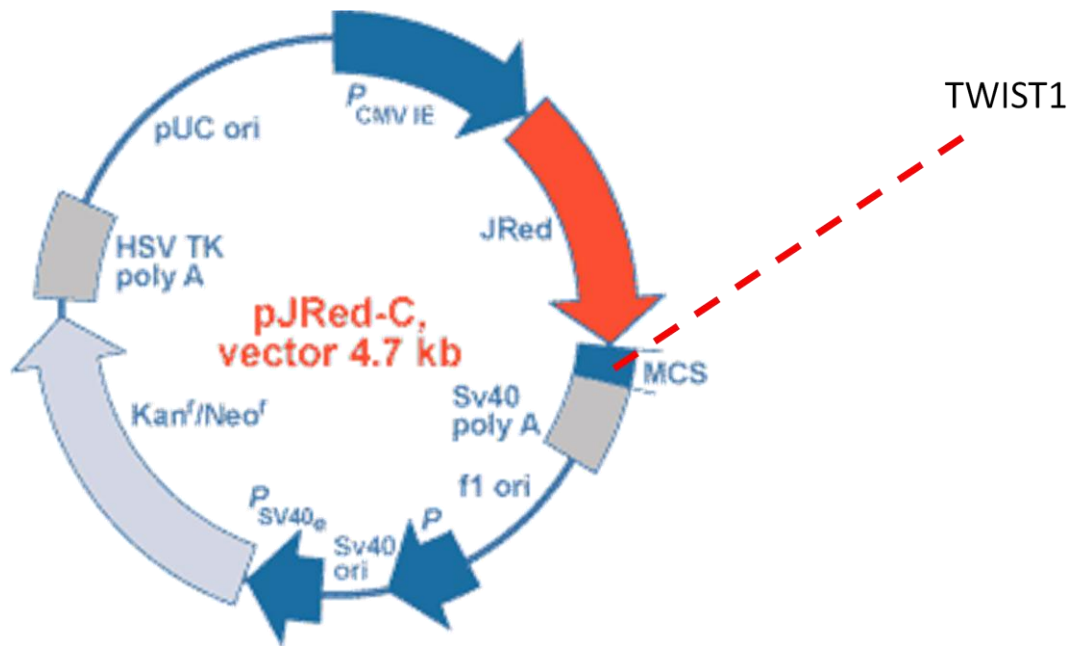
Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για Co- IP είναι το anti- GFP (Minotech, rabbit polyclonal)

- Καθαρισμός sepharose beads από αιθανόλη
 - 3x Προσθήκη 1mL Co- IP buffer και φυγοκέντρωση (3500 rpm, 4°C, 2min)
- Pre- clearing
 - Αφού έχουν ποσοτικοποιηθεί τα προς Co- IP δείγματα τοποθετείται κατάλληλη ποσότητα δείγματος σε erpendorfs, ώστε να είναι περίπου ίση η ποσότητα της προς κατακρήμνιση πρωτεΐνης για το κάθε δείγμα
 - Συμπλήρωση με RIPA buffer ώστε να αποκτήσουν όλα τα δείγματα ίσο όγκο
 - Προσθήκη στα δείγματα 1,5xV- 2xV Co- IP buffer
 - Προσθήκη 50μL beads (10μL beads+ 40μL Co- IP buffer)
 - Επώαση 1h στους 4°C σε rotator
 - Φυγοκέντρωση (3500 rpm, 4°C, 2min)
 - Απόρριψη beads
- IP
 - Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αντισώματος στα δείγματα
 - Επώαση στους 4°C O/N
 - Προσθήκη 50μL beads (10μL beads+ 40μL Co- IP buffer)
 - Επώαση 3h στους 4°C σε rotator
 - Απόρριψη υπερκειμένου
 - Πλύσιμο beads με προσθήκη 3x NETN buffer και φυγοκέντρωση (3500 rpm, 4°C, 2min)

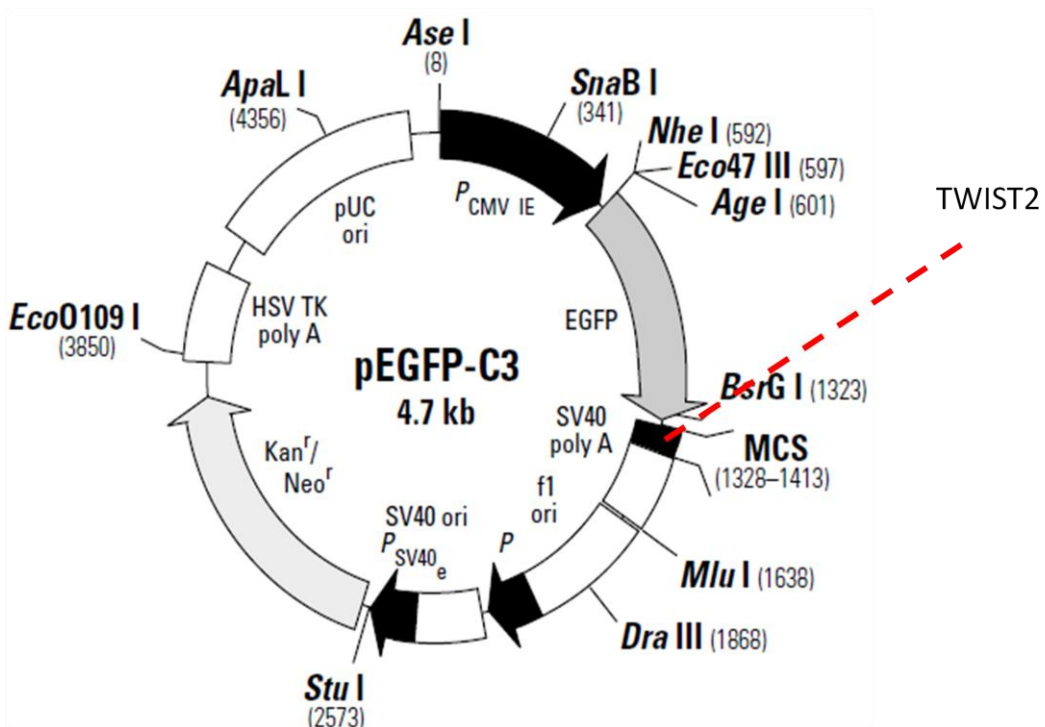
Μικροσκοπία Confocal

Για την μικροσκοπία σε συνεστιακό μικροσκόπιο έγιναν καλλιέργειες σε Lab- Teck chambers όπου έγιναν και το transfections με τα εκάστοτε πλαμίδια. Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε είναι το Zeiss Axioscope 2 plus που είναι εξοπλισμένο με το Bio- Rad Radiance 2100 laser scanning system και χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό LaserSharp 2000 imaging.

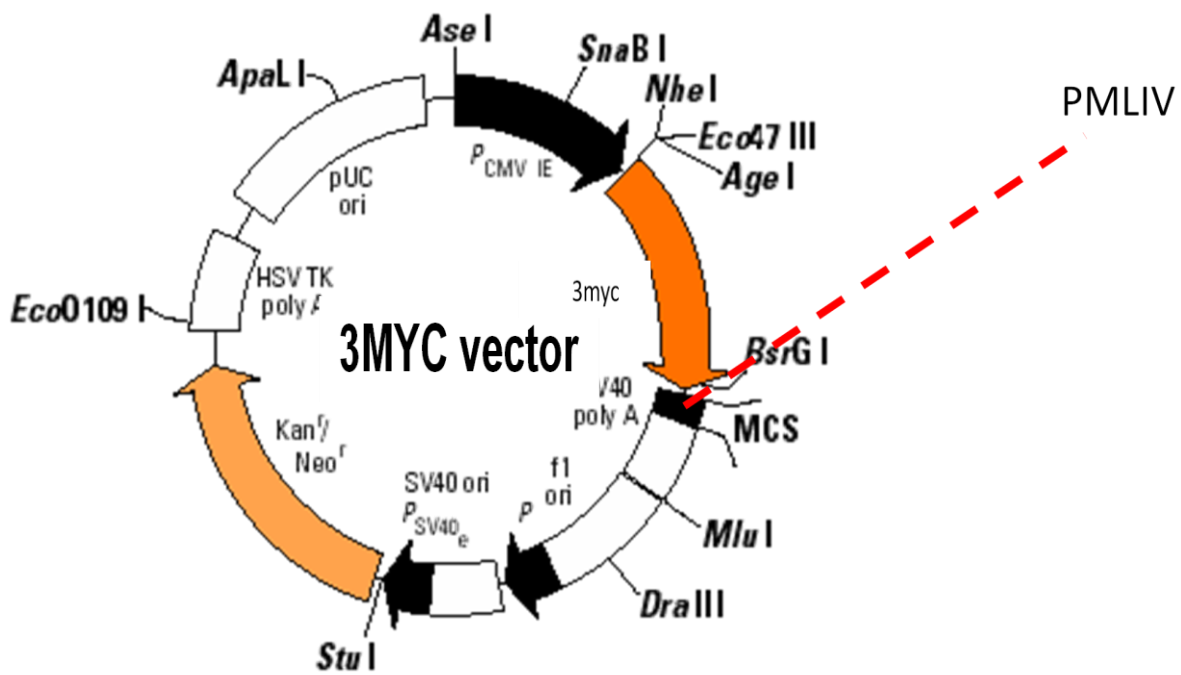
Φορείς που χρησιμοποιήθηκαν:



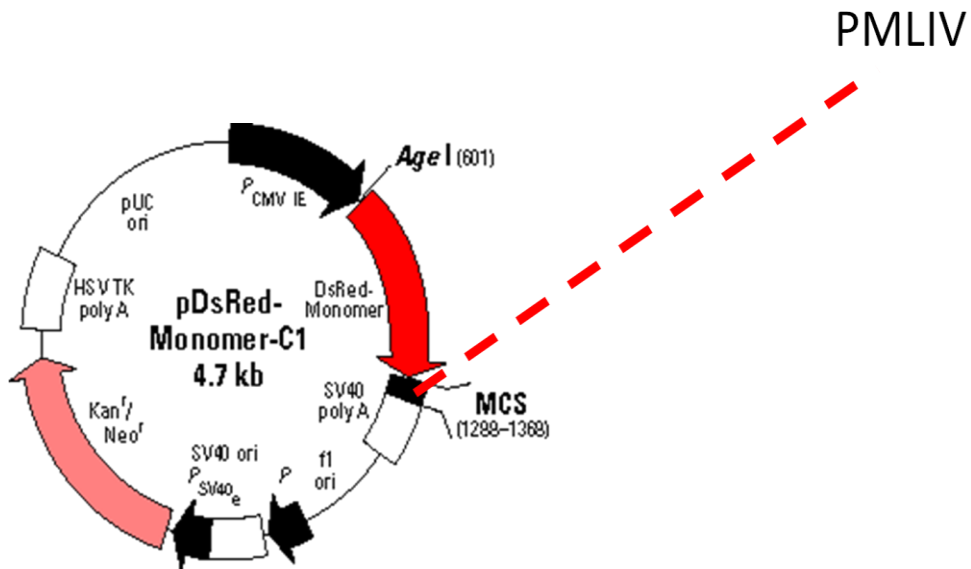
Εικόνα 10. Πλασμίδιο που φέρει την Twist1 in frame με την πρωτεΐνη Jelly- Red (φθορίζει κόκκινο υπό υπεριώδες φως).



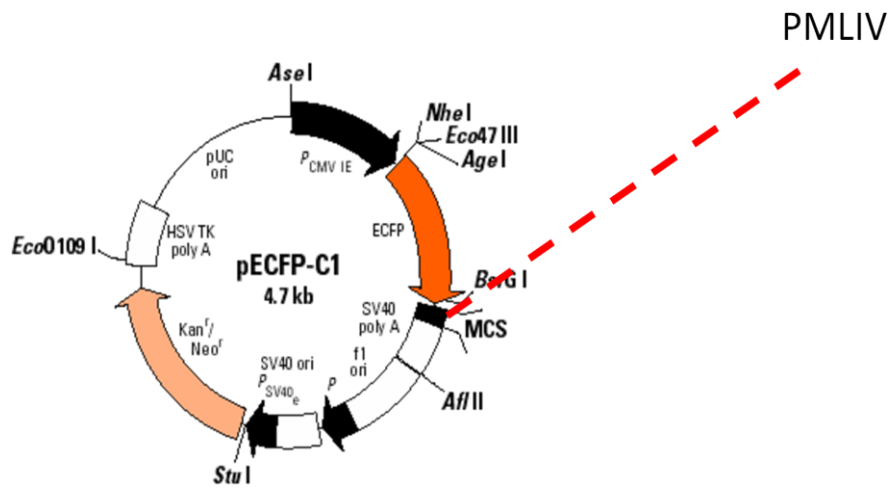
Εικόνα 11. Πλασμίδιο που φέρει την Twist2 in frame με την πρωτεΐνη Green Fluorescent Protein (GFP) (φθορίζει πράσινο υπό υπεριώδες φως).



Εικόνα 12. Πλασμίδιο που φέρει την PMLIV in frame με τον αντιγονικό επίτοπο myc.



Εικόνα 13. Πλασμίδιο που φέρει την PMLIV in frame με την πρωτεΐνη Monomeric Red (φθορίζει κόκκινο υπό υπεριώδες φως).

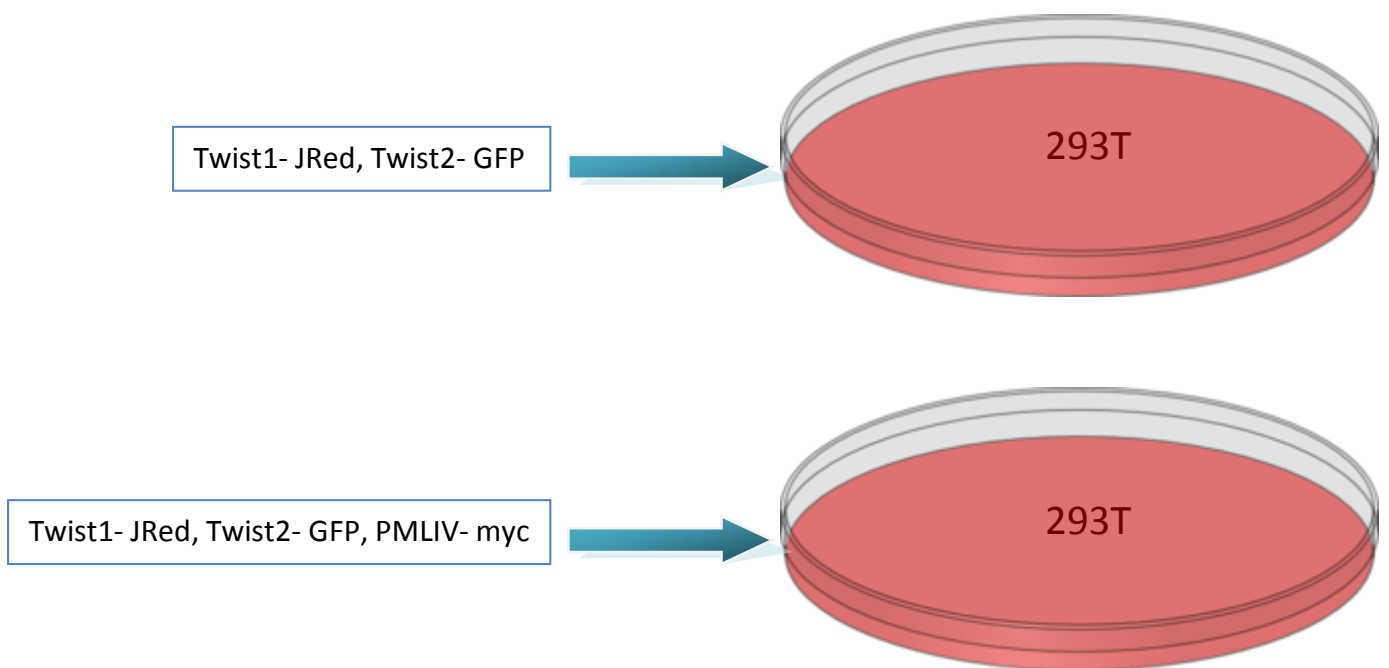


Εικόνα 14. Πλασμίδιο που φέρει την PMLIV in frame με την πρωτεΐνη Cyan Fluorescent Protein (φθορίζει γαλάζιο υπό υπεριώδες φως).

Αποτελέσματα

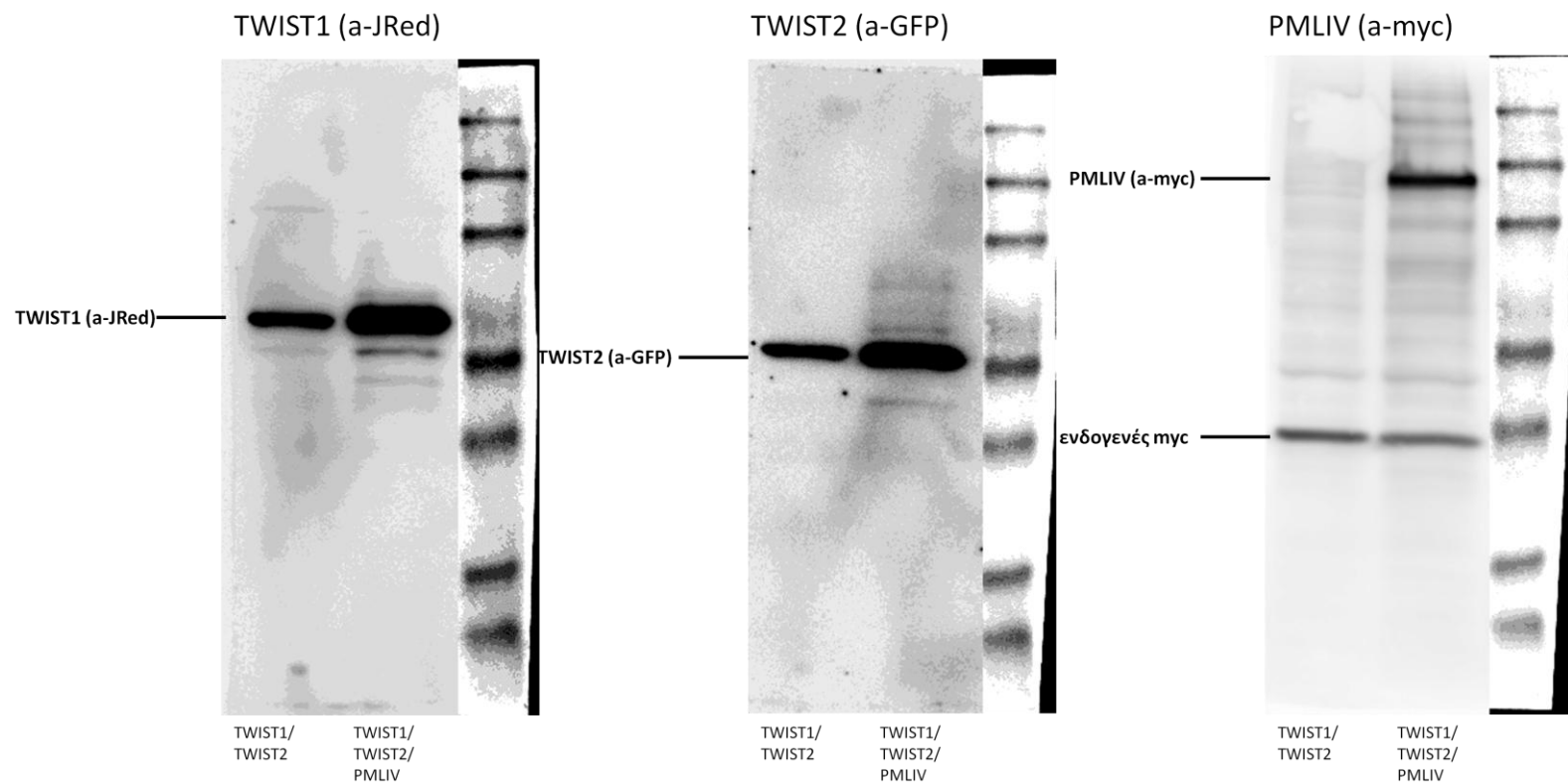
Συνανοσοκατακρήμιση Twist2- GFP, Twist1- JRed, PMLIV- myc

Για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή μη ανασταλτικής δράσης της PMLIV στον ετεροδιμερισμό Twist1/Twist2, έγινε διαμόλυνση κυττάρων 293T (καλλιεργημένα σε 10ml plates) με τα πλασμίδια που καταγράφηκαν στα υλικά και μέθοδοι (Twist1- JRed, Twist2- GFP, PMLIV- myc). Οι διαμολύνσεις έγιναν ως εξής:



Από τα διαμολυσμένα αυτά κύτταρα απομονώθηκε πρωτεϊνικό εκχύλισμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε για να πραγματοποιηθεί η συνανοσοκατακρήμιση (co- IP).

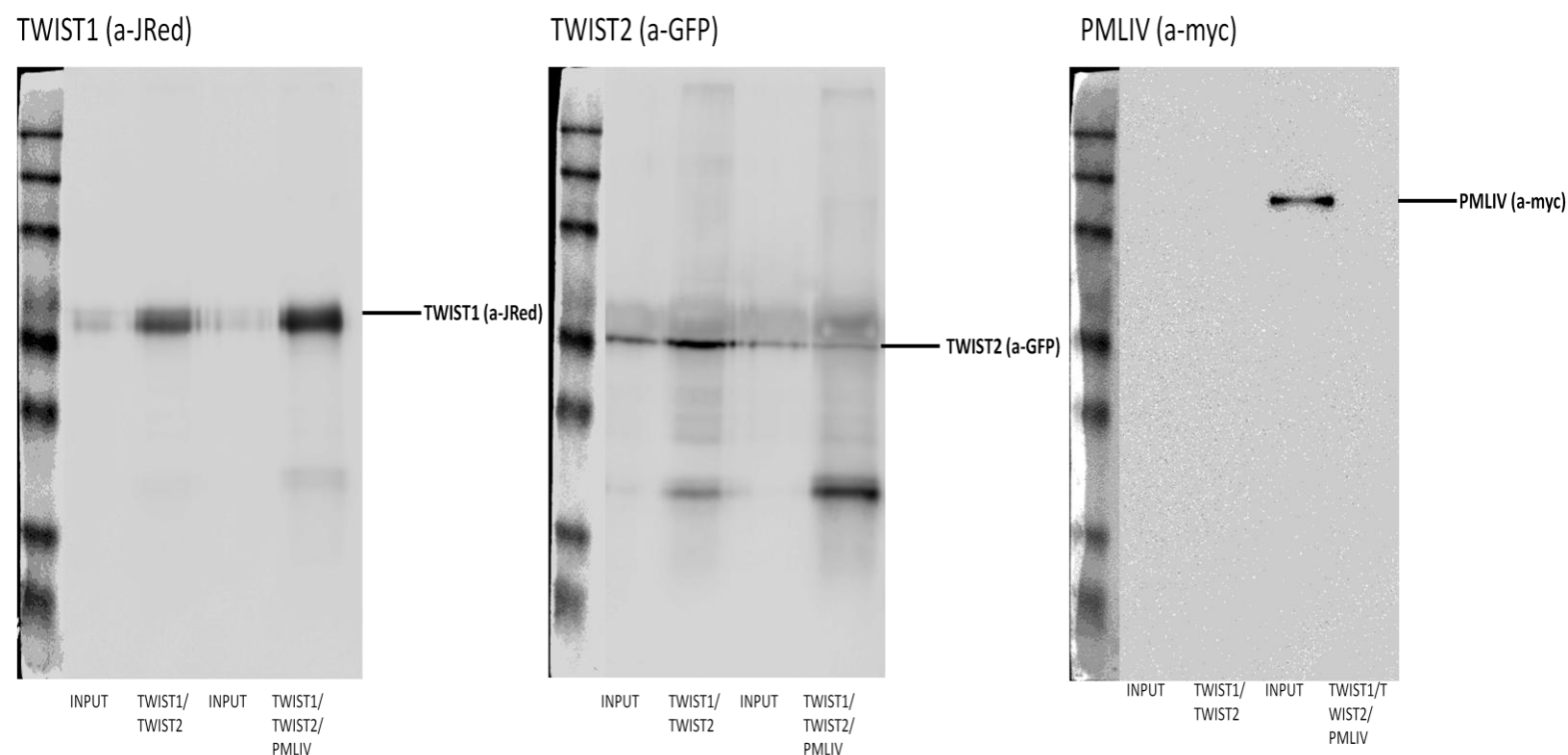
Προγενέστερα της co-IP ωστόσο πραγματοποιήθηκε ένα στύπωμα Western στα δείγματα προκειμένου να επιβεβαιωθεί η έκφραση των παροδικά (transiently) υπερεκφραζομένων πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα πλασμίδια, αλλά και για να ποσοτικοποιηθεί αυτή η έκφραση ούτως ώστε να χρησιμοποιηθεί κατάλληλη ποσότητα από το εκάστοτε δείγμα στην co-IP (εικόνα 15).



Εικόνα 15. Επιβεβαίωση, με στύπωμα Western, της έκφρασης και ποσοτικοποίηση των υπερεκφραζομένων πρωτεϊνών Twist1- JRed, Twist2- GFP, PMLIV- myc σε εκχύλισμα από κύτταρα που υπερεκφράζουν μόνο τις Twist1- JRed και Twist2- GFP (1^η lane) και σε εκχύλισμα κυττάρων που υπερεκφράζει τις Twist1- JRed, Twist2- GFP και την PMLIV (2^η lane).

Όπως φαίνεται από την **εικόνα 15** με τη χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων στο Western blot (α- GFP, α- JRed και α- myc) ανιχνεύθηκαν όλες οι πρωτεΐνες που ήταν επιθυμητό να υπερεκφραστούν (Twist2- GFP, Twist1- JRed και PMLIV- myc αντιστοίχως).

Στη συνέχεια, με τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που είχαν απομονωθεί πραγματοποιήθηκε η ανοσοκατακρήμιση. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την κατακρήμιση είναι το α- GFP, δηλαδή η πρωτεΐνη που κατακρημνίστηκε είναι η Twist2- GFP. Τα αποτελέσματα της co- IP ανιχνεύθηκαν με στύπωμα Western που φαίνεται στη **εικόνα 16**.



Εικόνα 16. Αποτελέσματα co- IP όπου κατακρημνίστηκε η Twist 2- GFP και ανιχνεύθηκε ενδεχόμενη συνανοσοκατακρήμιση της Twist1- JRed και της PMLIV σε στύπωμα Western. Τα δείγματα βρίσκονται στο 3^ο και 4^ο lane ενώ τοποθετήθηκε ως δείγμα ελέγχου (INPUT) το 1/10V του κάθε δείγματος πριν την co- IP και βρίσκεται στα αριστερά του εκάστοτε δείγματος.

Όπως φανερώνεται από την **εικόνα 16** η ποσότητα της Twist1- JRed που κατακρημνίζεται μαζί με την Twist2- GFP είναι περίπου ίση και στα δύο δείγματα όπου υπερεκφράζεται ή όχι η PMLIV και μάλιστα ίσως να είναι ελαφρώς

περισσότερη η συνκατακρήμιση της Twist1- JRed στην περίπτωση, όπου υπερεκφράζεται η PMLIV, παρόλο που η έκφρασή της στα δύο δείγματα είναι περίπου ίδια βάσει των INPUTS. Επιπλέον, στο δείγμα όπου υπερεκφράζεται η PMLIV φαίνεται να κατακρημνίζεται μικρότερη ποσότητα της Twist 2- GFP, κάτι που σε συνδυασμό με την συνκατακρήμιση της Twist1- JRed για το κάθε δείγμα, δείχνει αυξημένη κατακρήμιση της Twist1 από την Twist2 όταν υπερεκφράζεται η PMLIV. Παράλληλα, δεν φαίνεται να κατακρημνίζεται καθόλου PMLIV- myc, μολονότι σύμφωνα με το INPUT αλλά και την προηγηθείσα ποσοτικοποίηση εκφράζεται στα κύτταρα.

Εντοπισμός των Twist1, Twist2 και PMLIV στον πυρήνα 293T κυττάρων (μικροσκοπία confocal)

Για να προσδιοριστεί τελικά το ποιά είναι η επίδραση της PMLIV στον διμερισμό Twist1/Twist2, πέρα από την συνανοσοκατακρήμιση πραγματοποιήθηκε και μικροσκοπία 293T κυττάρων καλλιεργημένων σε 4-well chambers και διαμολυσμένων με τους εξής συνδυασμούς πλασμιδίων:

1. Twist1- JRed
2. Twist2- GFP
3. PMLIV- CFP
4. Twist1- JRed, Twist2- GFP, PMLIV- CFP



293T

1. Twist1- JRed, PMLIV- CFP
2. Twist2- GFP, PMLIV- MR
3. Twist1- JRed, Twist2- GFP
4. -



293T

Οι εικόνες που λήφθηκαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο παρουσιάζονται παρακάτω (**εικόνες 17- 19**). Τα χρώματα φθορισμού της εκάστοτε φθορίζουσας πρωτεΐνης υπό υπεριώδη ακτινοβολία είναι τα εξής:

Jelly Red (JRed)

Green Fluorescence Protein (GFP)

Cyan Fluorescent Protein (CFP)

Monomeric Red (MR)

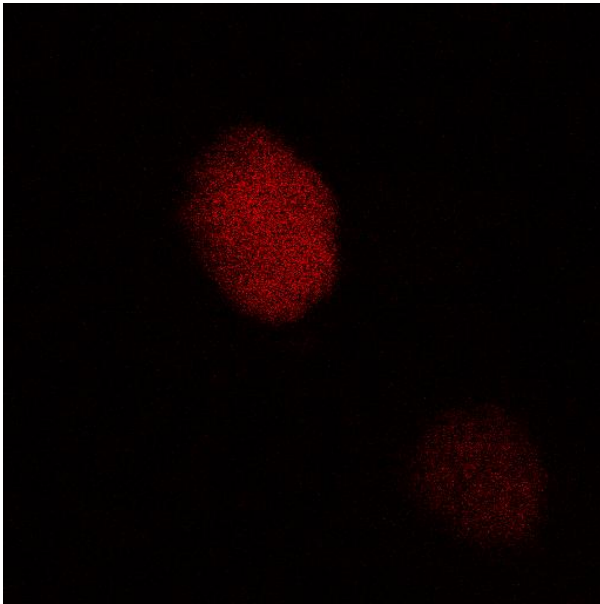
Κόκκινο

Πράσινο

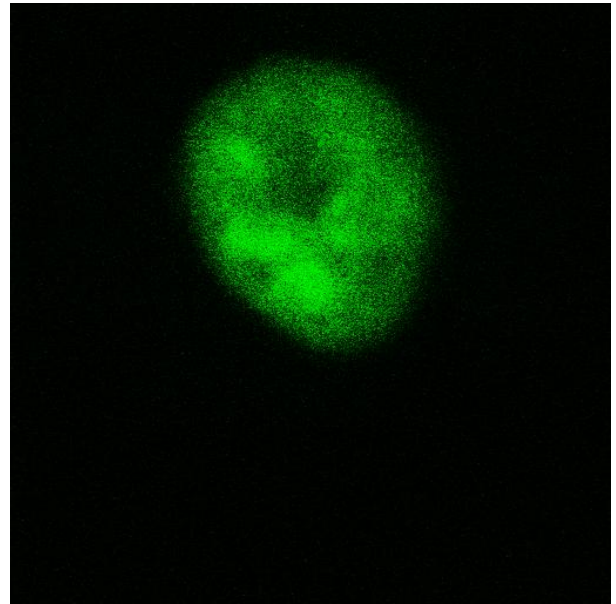
Γαλάζιο

Κόκκινο

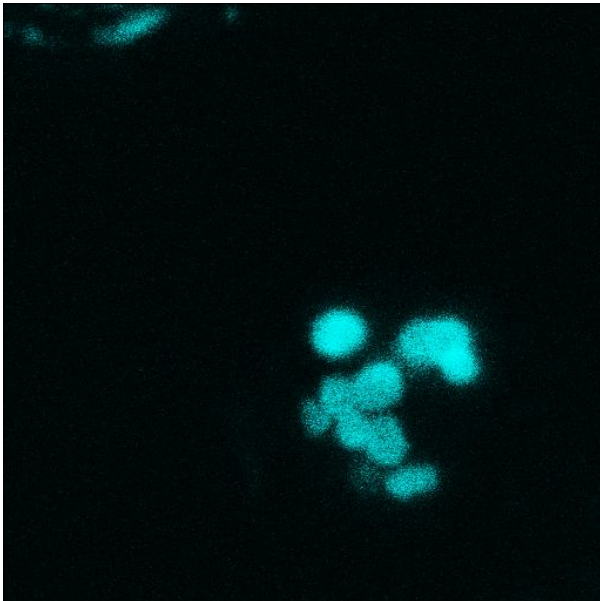
α)



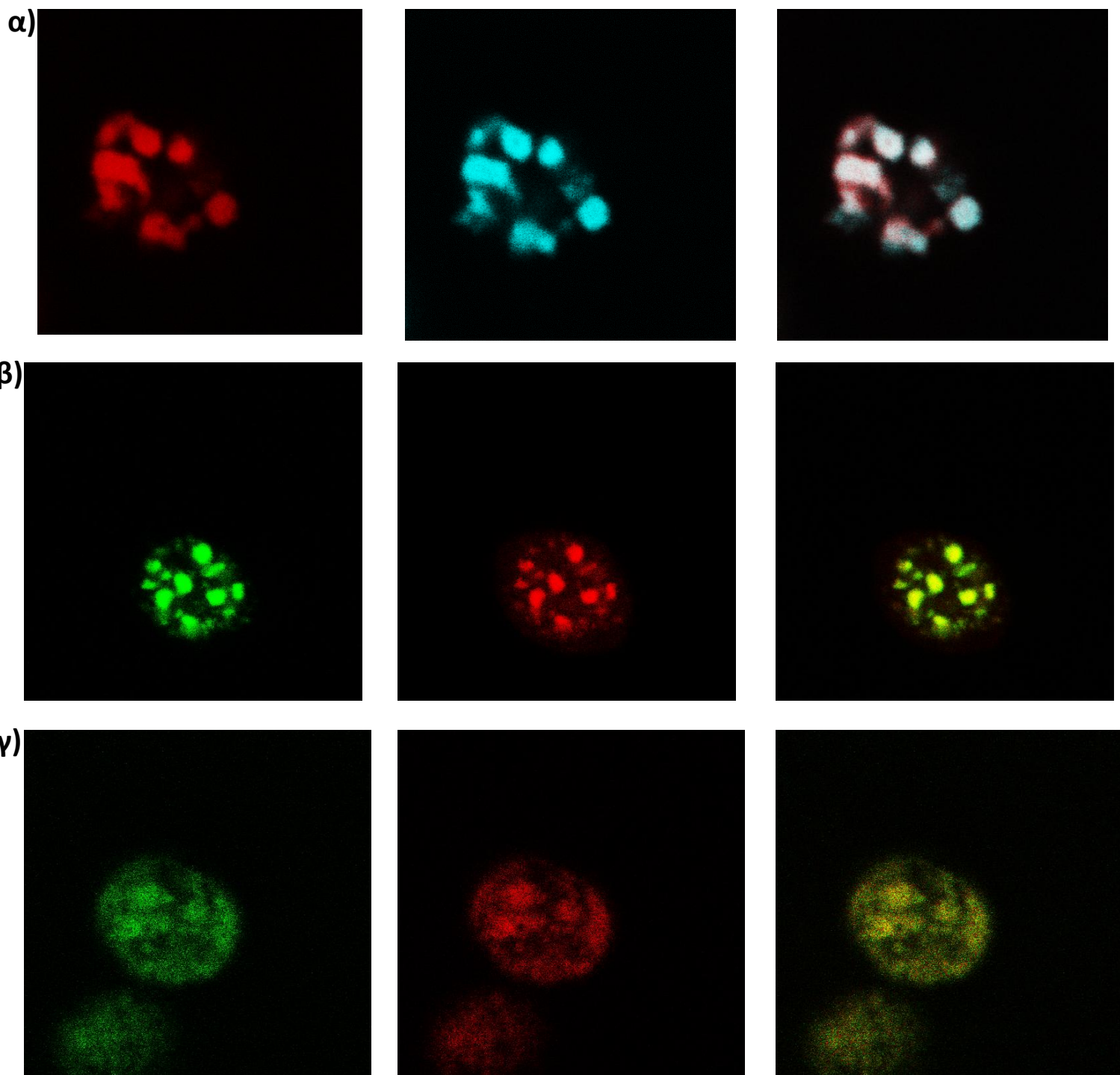
β)



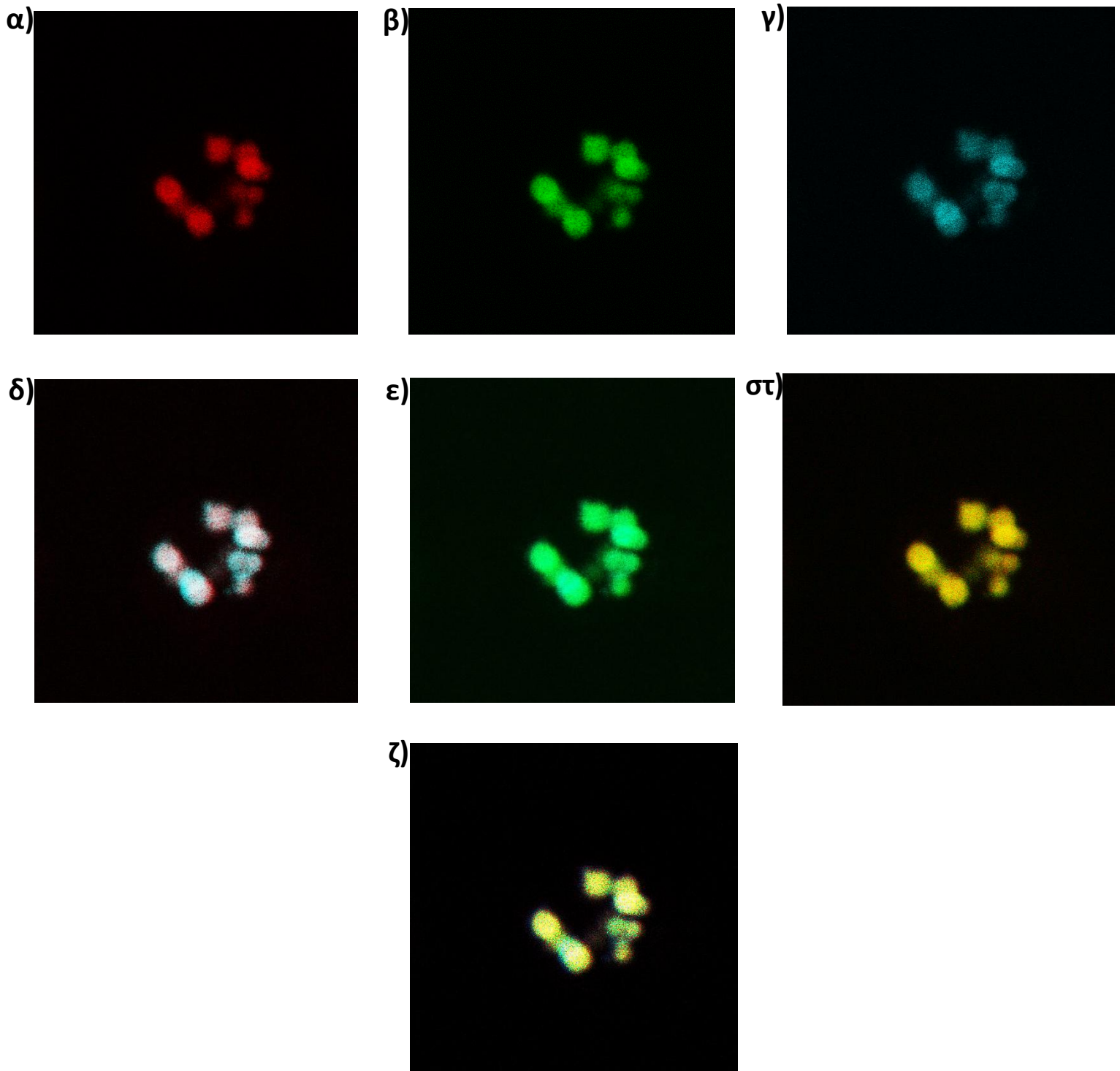
γ)



Εικόνα 17. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο. Πυρήνες 293T κυττάρων που υπερεκφράζουν α) Twist1- JRed, β) Twist2- GFP και γ) PMLIV- CFP.



Εικόνα 18. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο. Πυρήνες 293T κυττάρων που υπερεκφράζουν α) Twist1- JRed και PMLIV- CFP, β) Twist2- GFP και PMLIV- MR και γ) Twist1- JRed και Twist2- GFP. Στην τρίτη στήλη φαίνονται οι εικόνες των δύο πρώτων στηλών, συγχωνευμένες.



Εικόνα 19. Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο. Πυρήνας 293T κυττάρου που υπερεκφράζει Twist1- JRed, Twist2- GFP, PMLIV- CFP. Οι εικόνες α), β), γ) δείχνουν το εκάστοτε χρώμα χωριστά. Οι εικόνες δ), ε), στ) αφορούν συγχωνεύσεις εικόνων ανά δύο χρώματα: δ) Twist1- JRed, PMLIV- CFP, ε) Twist2- GFP, PMLIV- CFP, στ) Twist1- JRed, Twist2- GFP. Στην εικόνα ζ) φαίνεται η συγχώνευση των εικόνων και των τριών χρωμάτων.

Όπως γίνεται εμφανές από την **εικόνα 17 (α, β)**, οι πρωτεΐνες Twist όταν υπερεκφράζονται μόνες τους είναι διάχυτες μέσα στον πυρήνα και υπάρχει μόνο μία αχνή εμφάνιση κάποιων σφαιρικών δομών, που οφείλεται στην αλληλεπίδρασή τους με τις ενδογενείς PML πρωτεΐνες και κατ' επέκταση με τα PML- NBs που εμφανίζονται ως κηλίδες. Οι κηλίδες αυτές φανερώνονται καθαρά στην **εικόνα 17γ** που απεικονίζει πυρήνα κυττάρου που υπερεκφράζει την PMLIV και διακρίνονται καθαρά τα PML- NBs.

Στην **εικόνα 18 (α, β)** φαίνεται ότι η υπερέκφραση οποιασδήποτε Twist όταν συνδυάζεται και με υπερέκφραση της PMLIV προκαλεί τον εντοπισμό των Twist στα PML- NBs, καθώς παράγεται ικανή ποσότητα για να μπορεί να στρατολογήσει τις υπερεκφραζόμενες Twist στα NBs. Μάλιστα, όπως φανερώνεται από τις συγχωνευμένες εικόνες, υφίσταται συνεντοπισμός της PMLIV τόσο με την Twist1 όσο και με την Twist2. Αντίθετα, όταν υπερεκφράζονται μόνες οι Twist1 και Twist2 φαίνεται να συνεντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό, έχοντας ένα διάχυτο εντοπισμό μέσα στον πυρήνα. Τέλος, εμφανίζονται και πάλι αχνά κάποιες σφαιρικές δομές εξαιτίας της ύπαρξης ενδογενούς PML στα PML- NBs (**εικόνα 18γ**).

Καταλήγοντας από την **εικόνα 19** γίνεται σαφές ότι στην περίπτωση υπερέκφρασης και των τριών παραγόντων (Twist1, Twist2, PMLIV), υπάρχει συνεντοπισμός όλων στα PML- NBs.

Συζήτηση

Από προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο του κου Παπαματθαϊάκη αλλά και από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες Twist1 και Twist2 έχουν την ικανότητα να ετεροδιμερίζονται μεταξύ τους [21]. Η ιδιότητα αυτή καταλογίζεται στην επικράτεια bHLH μέσω της οποίας λαμβάνει χώρα ο διμερισμός. Με βάση προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου του κου Παπαματθαϊάκη, ωστόσο η ίδια επικράτεια (bHLH) φαίνεται να ευθύνεται και για την πρόσδεση της πρωτεΐνης Twist2 στην πρωτεΐνη PMLIV. Βάσει αυτού του δεδομένου, ανέκυψε ως ενδεχόμενο η πιθανή αναστολή του διμερισμού Twist1/Twist2 από την PMLIV.

Έτσι διενεργήθηκαν πειράματα προς μελέτη της επίδρασης της PMLIV στον εν λόγω ετεροδιμερισμό. Αρχικά, από την co- IP που διεξήχθη επιβεβαιώνεται ο διμερισμός Twist1/Twist2 αφού κατακρημνίζοντας την Twist2 κατακρημνίζεται και η Twist1 (**εικόνα 16**). Επιπλέον, η υπερέκφραση της PMLIV δεν φαίνεται να επηρεάζει τον διμερισμό αφού τα ποσοστά κατακρήμνισης Twist1, σε συνάρτηση με τα ποσοστά κατακρήμνισης Twist2 (πρωτεΐνη που κατακρημνίστηκε με τα beads), είναι όμοια μεταξύ των δειγμάτων όπου υπερεκφραζόταν ή μη η PMLIV. Μάλιστα, είναι πιθανό η PMLIV ακόμη και να ενισχύει τον διμερισμό Twist1/Twist2, καθώς βάσει του co- IP φαίνεται να είναι ελαφρά μεγαλύτερο το ποσοστό συνκατακρήμνισης της Twist1 στην περίπτωση υπερέκφρασης PMLIV, συγκριτικά με το δείγμα όπου αυτή δεν υπερεκφραζόταν (**εικόνα 16**). Τέλος, αν και ήταν αναμενόμενη συνκατακρήμνιση μίας ποσότητας PMLIV μαζί με την Twist2, αφού έχει βρεθεί ότι αυτές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, φαίνεται να μην υφίσταται. Το γεγονός αυτό μπορεί πιθανά να αποδοθεί στη μη ορθή λειτουργία του αντισώματος a- myc που αναγνωρίζει την PMLIV- myc, καθώς όπως φαίνεται στην **εικόνα 15** αλλά και στο INPUT υπάρχει έκφραση της PMLIV- myc.

Παράλληλα, οι εικόνες που πάρθηκαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο δίνουν επίσης κάποιες πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση των τριών πρωτεϊνών. Αρχικά, και αυτές μαρτυρούν τον διμερισμό των Twist καθώς όταν υπερεκφραζονται μόνες τους φαίνεται σε μεγάλο βαθμό να συνεντοπίζονται. Επιπλέον, από τις εικόνες του μικροσκοπίου είναι έκδηλη η αλληλεπίδραση των Twist με τα PML- NBs καθώς όταν υπερεκφράζεται η PMLIV φαίνεται να συνεντοπίζονται τόσο η Twist1 όσο και η Twist2 με αυτήν στα PML- NBs. Το γεγονός αυτό είναι κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα προηγούμενα ευρήματα του εργαστηρίου που αποδεικνύουν μέσω co- IP την αλληλεπίδραση της Twist2 με την PMLIV. Τέλος, στην περίπτωση που υπερεκφράστηκαν και οι τρεις πρωτεΐνες (Twist1, Twist2, PMLIV) μαζί παρουσιάζεται συνεντοπισμός και των τριών. Αυτό μπορεί να σημαίνει είτε ότι οι Twist1 και Twist2 προσδέονται ανεξάρτητα η κάθε μία στα PML- NBs, είτε ότι οι Twist1 και Twist2 βρίσκονται στα πυρηνικά αυτά σώματα ως διμερή και κατ' επέκταση σχηματίζουν τριμερές με την PMLIV.

Τα στοιχεία της συγκεκριμένης εργασίας παρέχουν ενδείξεις που στηρίζουν κυρίως την θεωρία του τριμερισμού των τριών παραγόντων. Ειδικότερα, εάν συνυπολογιστούν τα αποτελέσματα της co-IP με τις εικόνες που λήφθηκαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο τα αποτελέσματα εκ πρώτης όψεως φαίνεται να είναι αντιφατικά. Πράγματι, ενώ το συμπέρασμα που προκύπτει από την co-IP είναι ότι η PMLIV δεν επιδρά στον ετεροδιμερισμό Twist1/Twist2, ωστόσο στις εικόνες που πάρθηκαν από το μικροσκόπιο φανερώνεται συνεντοπισμός των τριών παραγόντων όταν και οι τρεις τους υπερεκφράζονται. Η αντιφατικότητα στα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έγκειται στο γεγονός ότι αν οι Twist πρωτεΐνες προσδένονταν ανεξάρτητα η κάθε μία στα PML- NBs τότε θα φαινόταν να επηρεάζεται έστω και λίγο ο διμερισμός στο co-IP κάτι που δεν ισχύει. Αντίθετα, το ενδεχόμενο οι Twist πρωτεΐνες να βρίσκονται στα PML- NBs ως διμερή και να δημιουργούν τριμερές μαζί με την PMLIV, είναι κάτι που θα εξηγούσε την έκβαση των προαναφερθέντων πειραμάτων.

Φυσικά, τα πειράματα αυτά παρέχουν μόνο ενδείξεις για πιθανό τριμερισμό των Twist1, Twist2, PMLIV. Συνεπώς, θα χρειαστούν περισσότερα και πιο καθοριστικά πειράματα για να αποδειχθεί μία τέτοια ενδεχόμενη αλληλεπίδραση. Μία μέθοδος που θα καθόριζε την σχέση μεταξύ των τριών παραγόντων είναι η ανάλυση Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC). Η μέθοδος αυτή λειτουργεί βάσει της συμπλήρωσης των δύο άκρων (C- και N- άκρο) μίας φθορίζουσας πρωτεΐνης (π.χ. GFP), τα οποία έχουν συνδεθεί in frame με δύο πρωτεΐνες για τις οποίες είναι επιθυμητό να ανιχνευτεί τυχόν διμερισμός. Εάν οι πρωτεΐνες όντως διαμερίζονται τότε τα δύο άκρα της φθορίζουσας πρωτεΐνης πλησιάζουν με αποτέλεσμα να λαμβάνουν κατάλληλη διαμόρφωση ώστε να φθορίζουν. Έτσι, αν αυτό εφαρμοστεί στην περίπτωση των Twist1/Twist2, τότε θα είναι δυνατή η ζωντανή in vivo παρακολούθηση του διμερισμού τους και αν αυτός υφίσταται και στα PML- NBs κάτι που θα καταδείκνυε με μεγαλύτερη βεβαιότητα την ύπαρξη τριμερισμού μεταξύ Twist1, Twist2, PMLIV.

Βιβλιογραφία

1. Carracedo, A., K. Ito, and P.P. Pandolfi, *The nuclear bodies inside out: PML conquers the cytoplasm*. *Curr Opin Cell Biol*, 2011. **23**(3): p. 360-6.
2. Li, W., T. Rich, and C.J. Watson, *PML: a tumor suppressor that regulates cell fate in mammary gland*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(17): p. 2711-7.
3. Fogal, V., et al., *Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform*. *EMBO J*, 2000. **19**(22): p. 6185-6195.
4. Bernardi, R. and P.P. Pandolfi, *Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death*. *Oncogene*, 2003. **22**(56): p. 9048-57.
5. Bischof, O., et al., *Deconstructing PML-induced premature senescence*. *EMBO J*, 2002. **21**(13): p. 3358-3369.
6. Meroni, G. and G. Diez-Roux, *TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases*. *Bioessays*, 2005. **27**(11): p. 1147-57.
7. Mu, Z.M., et al., *Stable overexpression of PML alters regulation of cell cycle progression in HeLa cells*. *Carcinogenesis*, 1997. **18**(11): p. 2063-9.
8. Giorgi, C., et al., *Mitochondria associated membranes (MAMs) as critical hubs for apoptosis*. *Commun Integr Biol*, 2011. **4**(3): p. 334-5.
9. Van Damme, E., et al., *A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics*. *Int J Biol Sci* 2010. **6**(1): p. 51-67
10. Reineke, E. and H. Kao, *Targeting Promyelocytic Leukemia Protein: A Means to Regulating PML Nuclear Bodies*. *Int J Biol Sci*, 2009. **5**(4): p. 366-376.
11. Ebrahimian, M., et al., *Transcript isoforms of promyelocytic leukemia in mouse male and female gametes*. *Cells Tissues Organs*, 2010. **192**(6): p. 374-81.
12. Kiesslich, A., A. von Mikecz, and P. Hemmerich, *Cell cycle-dependent association of PML bodies with sites of active transcription in nuclei of mammalian cells*. *J Struct Biol*, 2002. **140**(1-3): p. 167-79.
13. Hofmann, T.G., et al., *Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(1): p. 1-10.
14. Chuang, Y.S., et al., *Promyelocytic leukemia protein in retinoic acid-induced chromatin remodeling of Oct4 gene promoter*. *Stem Cells*, 2011. **29**(4): p. 660-9.
15. Barnes, R.M. and A.B. Firulli, *A twist of insight - the role of Twist-family bHLH factors in development*. *Int J Dev Biol*, 2009. **53**(7): p. 909-24.
16. Isenmann, S., et al., *TWIST family of basic helix-loop-helix transcription factors mediate human mesenchymal stem cell growth and commitment*. *Stem Cells*, 2009. **27**(10): p. 2457-68.
17. Qin, Q., et al., *Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms*. *Cell Res*, 2012. **22**(1): p. 90-106.
18. Yuen, H.F., et al., *TWIST modulates prostate cancer cell-mediated bone cell activity and is upregulated by osteogenic induction*. *Carcinogenesis*, 2008. **29**(8): p. 1509-18.

19. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-890.
20. Mani, S.A., et al., *The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells*. Cell, 2008. **133**(4): p. 704-715.
21. Castanon, I., et al., *Dimerization partners determine the activity of the Twist bHLH protein during Drosophila mesoderm development*. Development, 2001. **128**(16): p. 3145-59.