

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΩΝ
ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΤΣΑΚΙΡΗ

Υπεύθυνος ερευνητής : Ι.ΤΑΛΙΑΝΙΔΗΣ

Υπεύθυνος καθηγητής : Δ.ΜΠΟΥΜΠΑΣ

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν να ολοκληρώσω αυτή την εργασία. Αρχικά τον ερευνητή Ιωάννη Ταλιανίδη , την Αντιγόνη Κουσκούτη και την Ειρήνη Κυρμιζή. Ακόμη τον καθηγητή Δημήτρη Μπούμπα. Τον καθηγητή Βασίλη Ζαννή. Την γραμματέα του μεταπτυχιακού Μαίρη Αδαμάκη. Όλο το εργαστήριο:τη Νίτσα Κατρακίλη, την Αγγελική Χαλκιαδάκη , τον Κώστα Μπούλια, τον Παντελή Χατζή , την Γιάννα ? και την Μαριάννα ?. Το εργαστήριο του Γιώργου Χαλεπάκη. Τον λέκτορα Πρόδρομο Σιδηρόπουλο. Τις αδερφές μου Ελίζα και Γεωργία Τσακίρη και τον γαμπρό μου Διονύση Κωτσάκη. Τις γιαγιάδες μου Καλλιόπη Πονηράκου και Ελίζα Τσακίρη. Τους φίλους μου Εύα Σιδηροπούλου και Τάσο Χαρίτο, Δημήτρα Τσούβαλου, Βίκυ Φλέγγα, Νίκο Μιχαηλίδη , Παναγιώτη Τάταρη, Μαρία Χριστάνη, Νατάσα Πανταζίδου, Άκη Τσιτλακίδη, Ανέστη Δημητριάδη, Μιρέλλα Αμπαζίδου, την Όλγα Καραπάνου και τον Διονύση Δρακόπουλο, την Αμαλία Ραπποπούλου, τη Χρύσα Σαμαρά, την Κατερίνα Τσικουδή . Το εργαστήριο της Ρευματολογίας στην ιατρική σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης, την κλινική της Ρευματολογίας στο ΠΕΠΑΓΝΗ . Τις δικηγόρους και αγαπημένες φίλες Χριστίνα Κοκκινάκη και Μαρία Τσιριγωτάκη. Τον πατέρα Μανώλη από τον Αγ. Τίτο και τον πατέρα Αστέριο. Όλα τα παιδιά από το μεταπτυχιακό. Όλα τα ξαδέρφια μου :τον Νίκο Μαγκλαβέρα και Διονύση Καυκόπουλο, τον Μανόλη και Τάσο Σινάκο, την Ελίζα, Νικολέτα και Σταυρούλα Μαγκλαβέρα, τον Γιώργο και την Καλλιόπη Καυκοπούλου. Τις θείες μου Ελένη Μαγκλαβέρα, Αγγελική Σινάκου και Λίτσα Καυκοπούλου. Την οικογένεια Φρασιώλα και ειδικά τον Βαγγέλη Φρασιώλα. Επιπλέον, την Αντιγόνη Παρόλα και την νονά μου Άννα Παρόλα.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω αυτή την εργασία στον πατέρα μου Δημήτρη Τσακίρη και στην μητέρα μου Χρυσούλα Τσακίρη.

Περίληψη

Θέμα Α

A. **Τίτλος** : Ρόλος της λυσίλ οξειδάσης στις μετά μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών

A.1.Εισαγωγή

A.1.1. Λυσίλ οξειδάση

A.1.2. Μετα – μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών

A.2.Αντικείμενο μελέτης

A.3.Υλικά και μέθοδοι

A.3.1. Κλωνοποίηση της λυσίλ οξειδάσης σε φορείς έκφρασης

A.3.2. Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια

A.3.2. Απομόνωση ιστονών από ευκαρυωτικά κύτταρα

A.3.3 In vitro αντιδράσεις ιστονών με λυσίλ οξειδάση

- Ιστόνες και λυσίλ οξειδάση
- Λυσίλ οξειδάση /ιστόνες και ακετυλίωση – μεθυλίωση

A.4.Αποτελέσματα

A.5. Συμπεράσματα

Θέμα Β

B. **Τίτλος** : Έκφραση του Lac z στο διαγονιδιακό ποντίκι για το Lac z γονίδιο υπό ολόκληρη τη ρυθμιστική περιοχή του hHNF4a

B.1. Εισαγωγή

B.1.1. HNF4a

B.1.2. Ρύθμιση της έκφρασης του HNF4a

B.2. Αντικείμενο μελέτης

B.3.Υλικά και μέθοδοι

B.3.1. Ανάλυση κατά Southern

B.3.2. Απομόνωση mRNA και ανάστροφη μεταγραφή

B.3.3. Ημιποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

B.3.4. Διασταυρώσεις και Lac Z χρώση εμβρύων και ιστών ενήλικων ζώων

B.4. Αποτελέσματα

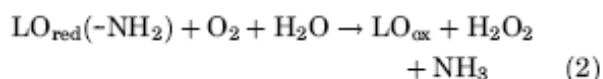
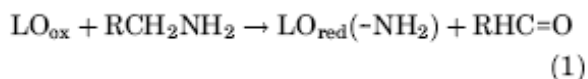
B.5. Συμπεράσματα

Βιβλιογραφία

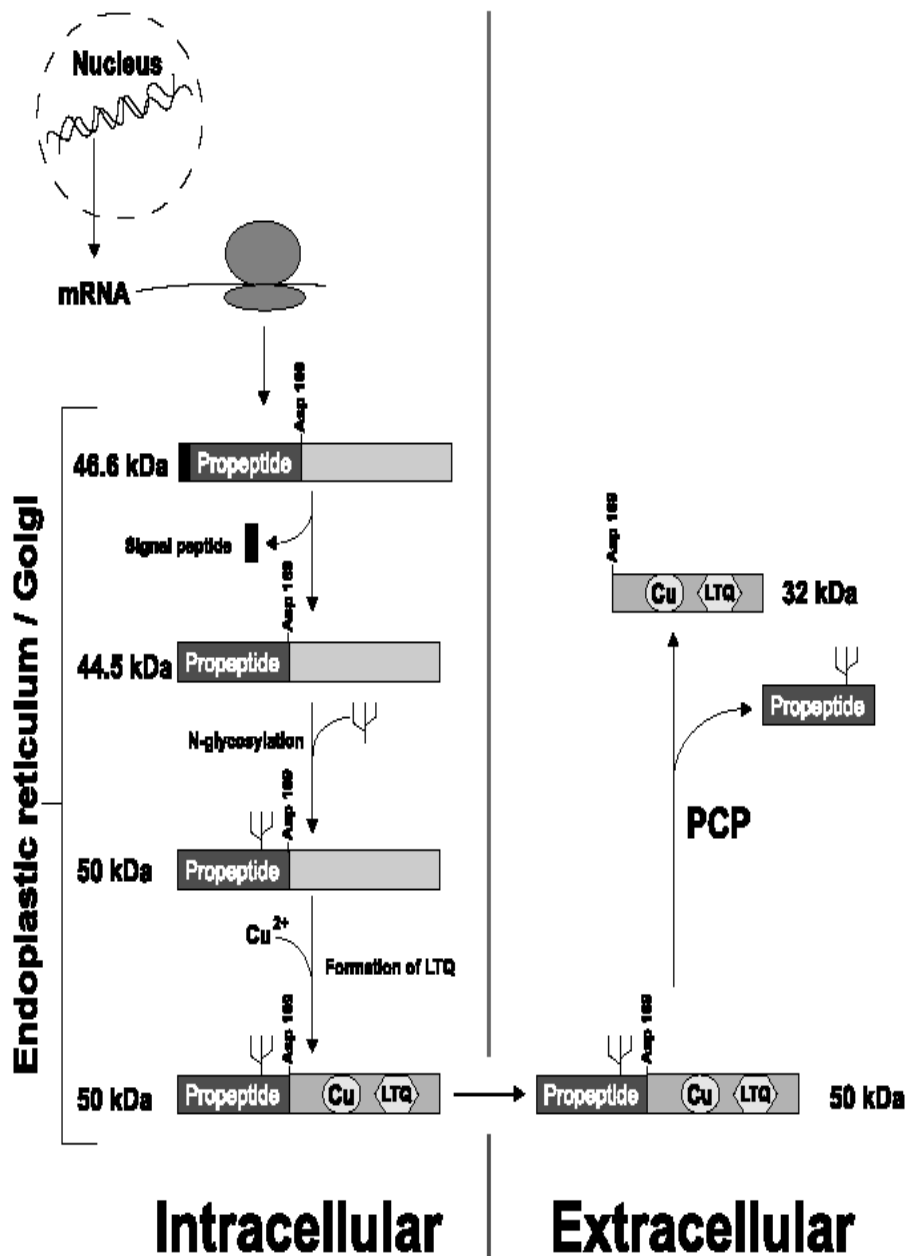
A.1.Εισαγωγή

A.1.1. Λυσίλ οξειδάση

Η λυσίλ οξειδάση (ΛΟ) είναι μια αμινοξειδάση που χρησιμοποιεί ως υποστρώμα τις λυσίνες διαφόρων πεπτιδίων. Η δράση της οδηγεί σε απαμίνωσή τους και ταυτόχρονα τις μετατρέπει σε αλδεύδες. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια και έχει ως εξής:

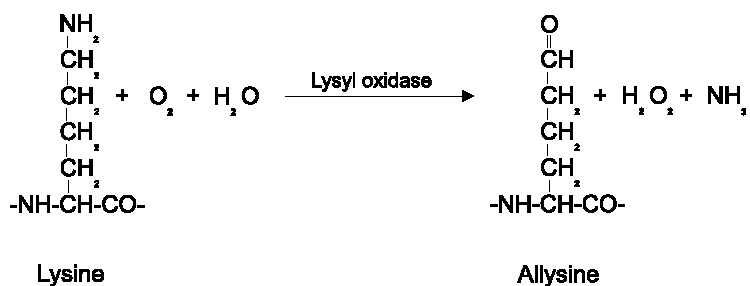


Στη πρώτη φάση απαμινώνεται η λυσίνη και σχηματίζεται ένα αλδευδικό της παράγωγο ενώ στη δεύτερη φάση μέσω υδρόλυσης ελευθερώνεται αμμωνία και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η ΛΟ έχει ένα ιόν χαλκού στο ενεργό της κέντρο. Η πρωτεΐνη συντίθεται αρχικά σαν ένα μόριο 48kDa (prepro-protein). Ακολουθεί αποχωρισμός του αμινοτελικού άκρου της prepro-protein και γλυκοζυλίωση στο αμινοτελικό άκρο του υπολειπόμενου πεπτιδίου. Σε αυτή τη μορφή εκκρίνεται η πρωτεΐνη για να ακολουθήσει διαχωρισμός του αμινοτελικού άκρου από μία μεταλλοπρωτεϊνάση ώστε να προκύψει το ενζυμικά ενεργό πεπτίδιο των 32kDa. (1)



Μονοπάτι βιοσύνθεσης της ΛΟ. (2)

Η κύρια λειτουργία της ΛΟ αφορά στη δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ της ελαστίνης και του κολλαγόνου στα νεοσχηματιζόμενα ινίδια στον εξωκυττάριο χώρο. Καταλύει τη μετατροπή της ε-αμινομάδας της λυσίνης σε αλδεύδη. Στη συνέχεια τα αλδευδικά παράγωγα δύο καταλοίπων λυσίνης υφίστανται αλδολική συμπύκνωση. (3)



Με αυτό τον τρόπο η ΛΟ έχει σημαντικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη του συνδετικού ιστού σε διάφορα σημεία του σώματος όσο και στην επιδιόρθωσή του. Ελαττωμένη δράση του ενζύμου παρατηρείται στη νόσο του Menkes - φυλοσύνδετη νόσους κληρονομούμενη με τον υπολειπόμενο χαρακτήρα -, (4) σε έλλειψη χαλκού από τη διατροφή και στον λαθουρισμό (σπαστική παραπάρεση από την τοξίνη βήτα-(N)-οξαλιλαμινο-L-αλανίνη ένας μη αναστρέψιμος αναστολέας της ΛΟ). (3) Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρούνται ανωμαλίες του συνδετικού ιστού.

Επίσης, διάφορες μελέτες αποδίδουν στην πρωτεΐνη αντι-ογκογονικές ιδιότητες. Έτσι έκφραση της ΛΟ σε κυτταρικές σειρές που έχουν διαμολυνθεί με p21 Ha-Ras καταστέλλει την επαγόμενη καρκινογένεση καταδεικνύοντας τον κατασταλτικό της ρόλο στη δημιουργία όγκων. (5) Η έκφραση της ΛΟ σε αυτές τις κυτταρικές σειρές καθώς και σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές είναι σημαντικά μειωμένη. Η αντι-ογκογονική δράση της ΛΟ ενισχύεται και από πειράματα σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές νεφρικών ινοβλαστών από αρουραίους. Σε αυτά τα κύτταρα εξάλειψη της ΛΟ οδηγεί σε ανώμαλο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, χαλάρωση της επαφής τους με το τρυβλίο και αύξηση της έκφρασης του p21-Ras. (6) Παρόμοια σε πειραματικό μοντέλο καρκίνου του προστάτη η έκφραση της ΛΟ ήταν σε φυσιολογικά επίπεδα ενώ σταδιακά ελαττωνόταν από τις πρώιμες μορφές καρκίνου στις μεταστατικές βλάβες. (7) Η σταδιακή απώλεια της έκφρασης της ΛΟ κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του όγκου φαίνεται να είναι άμεσο αποτέλεσμα σωματικών μεταλλάξεων και να έχει σημασία και στην παθογένεια του καρκίνου του παχέος εντέρου. (8)

Έχει ισχυρή χυμοτακτική δράση για τα μονοκύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων πιθανά μέσω του H₂O₂ που παράγεται κατά τη διάρκεια της οξειδωσης. (9) Σε μοντέλο αθηροσκλήρωσης σε κουνέλι είναι χαρακτηριστικό ότι παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της ΛΟ από τη εμφάνιση των πρώιμων ακόμα βλαβών. (10) Άλλες ενδείξεις για εμπλοκή της ΛΟ στην παθογένεια της δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας προέρχονται από την παρατήρηση ότι οι LDL λιποπρωτεΐνες -που είναι αθηρωγενετικός παράγοντας- ελαττώνουν την έκφραση τη ΛΟ στο ενδοθήλιο των αγγείων. (11)

Νεότερα δεδομένα θέλουν την ΛΟ να εντοπίζεται και στον πυρήνα του κυτάρου και να έχει ρόλο στο πακετάρισμα της χρωματίνης και την έκφραση των διαφόρων γονιδίων.

Συγκεκριμένα, σε μία μελέτη βρέθηκε ότι μπλοκάροντας την ΛΟ σε NIH 3T3 κυτταρικές σειρές παρατηρείται αλλαγή στη δομή της χρωματίνης από μία «χαλαρή» σε μία πιο «δεμένη» κατάσταση. (12)

Επιπρόσθετα, η ΛΟ εντοπίστηκε με ανοσοιστοχημεία και Western ανοσοαποτύπωση στον πυρήνα αγγειακών λείων μυϊκών ινών από αρουραίους σε κυτταρικές σειρές και με δοκιμασίες λειτουργικότητας του ενζύμου βρέθηκε να είναι ενεργό σε αυτούς τους πυρήνες. (13). Στην ίδια μελέτη η ΛΟ ήταν παρούσα και στον πυρήνα 3T3 ινοβλαστών από κυτταρικές καλλιέργειες ενώ με πειράματα παροδικής σε COS-7 κύτταρα είχε πυρηνική εντόπιση. Επίσης, μαρκάροντας την ΛΟ ροδαμίνη είδαν ότι το μόριο έμπαινε στο κυτταρόπλασμα και γρήγορα συγκεντρωνόταν στον πυρήνα του κυτάρου. (14) Τέλος, η περιοχή αλληλεπίδρασης της τροποελαστίνης με την ΛΟ παρουσιάζει ομολογία με την ιστόνη 1 (H1) και με πειράματα χρωματογραφίας συγγένειας η ΛΟ αντιδρά τόσο με την H1 όσο και με την ιστόνη 2 (H2). Σε αυτή την μελέτη καταλήγουν πως πιθανά η αλληλεπίδραση μεταξύ H1 και ΛΟ γίνεται μέσω διαφορετικής καταλυτικής περιοχής σε σχέση με την H2 και ΛΟ. Έτσι ώστε η πρόσδεση της H1 με την ΛΟ να επιτρέπει την ταυτόχρονη αλληλεπίδραση της ΛΟ και με την H2. (15)

Αυτές οι παρατηρήσεις γενούν ερωτήματα για τη λειτουργία της ΛΟ στον πυρήνα του κυτάρου και κατά πόσο έχει ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων.

A.1.2. Μετα – μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το DNA βρίσκεται μαζί με πρωτεΐνες σε ένα σύμπλοκο που ονομάζεται χρωματίνη. Η αναλογία μάζας πρωτεΐνης : DNA στη χρωματίνη είναι ίση με 2. Η χρωματίνη είναι οργανωμένη σε βασικές επαναλαμβανόμενες μονάδες, τα νουκλεοσώματα. Κάθε νουκλεόσωμα αποτελείται από ένα οκταμερές ιστονών γύρω από το οποίο 147bp DNA είναι τυλιγμένο σε 1.65 στροφές-, το τμήμα του DNA που συνδέει δύο συνεχόμενα οκταμερή (linker) και μια κατηγορία ιστονών που προσδέονται τόσο στον πυρήνα του νουκλεοσώματος όσο και στο linker DNA (H1).

Κάθε οκταμερές ιστονών σχηματίζεται από δύο μόρια από τους τύπους ιστονών H2A, H2B, H3 και H4. Οι αμινοτελικές ουρές των ιστονών προεξέχουν από τον νουκλεοσωμικό πυρήνα και υφίστανται διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση ή ουβικοτινιλίωση. Συγκεκριμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις συνδέονται με ενεργοποίηση ή καταστολή όσον αφορά στη μεταγραφή, στο διπλασιασμό του

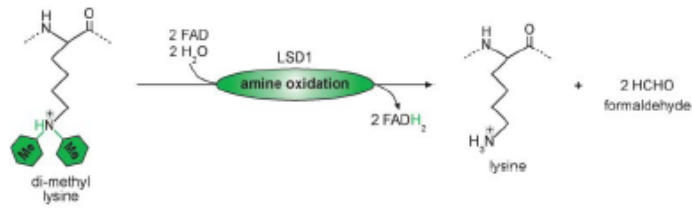
DNA και αλλαγές στη δομή της χρωματίνης. Αυτό οφείλεται στο ότι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στα αμινοτελικά άκρα των ιστονών είτε επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης μέσω της αλληλεπίδρασης ιστόνης-ιστόνης είτε προσελκύουν ρυθμιστικές πρωτεΐνες της μεταγραφής που αναγνωρίζουν αυτές τις τροποποιήσεις (κώδικας των ιστονών).(16,17) Παρόμοιες τροποποιήσεις παρατηρούνται και στον πυρήνα του νουκλεοσώματος (globular nucleosome core) και επηρεάζουν άμεσα τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του DNA και του οκταμερές των ιστονών. (18)



Σχήμα: Γνωστές τροποποιήσεις ιστόνης 3 (H3). Πράσινο: μεθυλίωση, μπλε: ακετυλίωση, κόκκινο: φωσφορυλίωση (βλέπε σε www.upstate.com)

Η πρόσθεση και η αφαίρεση μικρών χημικών ομάδων όπως είναι το ακετύλιο, το μεθύλιο και η φωσφορική ομάδα σε συγκεκριμένα αμινοξέα των των ιστονών επιτυγχάνεται με την δράση διαφόρων ενζύμων. Έτσι κατά αναλογία ακετυλοτρανσφεράσες, μεθυλοτρανσφεράσες και φωσφορυλάσες καταλύουν αυτές τις αντιδράσεις ενώ ένας άλλος μηχανισμός που πιθανά ελέγχει αυτές τις τροποποιήσεις έχει να κάνει με την απομάκρυνση ολόκληρου του μορίου της ιστόνης και την αντικατάστασή του από άλλο μη τροποποιημένο (histone exchange). (19)

Σε αντίθεση με την ακετυλίωση και τη φωσφορυλίωση που είναι δυναμικά χαρακτηριστικά των ιστονών και αναιρούνται με τη δράση απακετυλασών και φωσφατασών αντίστοιχα, η μεθυλίωση φαίνεται να είναι μία πολύ σταθερή τροποποίηση στις ιστόνες. Διάφοροι μηχανισμοί για αφαίρεση της μεθυλομάδας έχουν προταθεί – histone exchange, cleavage of N-termini, επίδραση με ακτινοβολία ή μέσω υπεροξειδωσής- χωρίς εμπλοκή ενζυματικής δράσης. Εν τούτοις, πρόσφατα βρέθηκε ότι η μεθυλίωση της ιστόνης 3 στη λυσίνη 4 (H3-K4) , τροποποίηση που σχετίζεται με ενεργοποίηση της μεταγραφής, απομεθυλιώνεται από το ένζυμο LSD1.(20) Στην περίπτωση του LSD1 η δράση του είναι ειδική, αφορά σε μόνο και διμεθυλιωμένες λυσίνες της ιστόνης 3 και όχι σε τριμεθυλιωμένες λυσίνες, κατά την αντίδραση απελευθερώνεται φορμαλδεΐδη ενώ το τελικό προϊόν παραμένει λυσίνη. (21)



Παράλληλα, και η μεθυλίωση της αργινίνης βρέθηκε να είναι μία αντιστρεπτή τροποποίηση. Μέσα από μία αντίδραση απαμίνωσης το ένζυμο PAD4 (peptidyl arginine deiminase -4) μετατρέπει τόσο τη μη μεθυλιωμένη αργινίνη όσο και τη μονομεθυλιωμένη αργινίνη της H3 και της H4 σε κιτρουλλίνη ανταγωνιζόμενο τη δράση της μεθυλοτρανσφεράσης CARM1. (22,23)



A.2. Αντικείμενο μελέτης

Οι παραπάνω παρατηρήσεις γεννούν ερωτήματα για τη λειτουργία της ΛΟ στον πυρήνα του κυττάρου και κατά πόσο έχει ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων.

Αρχική υπόθεση στα πλαίσια αυτής της εργασίας είναι ότι η ΛΟ με την καταλυτική της δράση απομεθυλιώνει τις λυσίνες της H3.

Μια δεύτερη υπόθεση αφορά στο ότι η αλληλεπίδραση της ΛΟ με τις ιστόνες εμποδίζει την μετέπειτα ακετυλίωσή τους ή τη μεθυλίωσή τους από ακετυλοτρανσφεράσες ή μεθυλοτρανσφεράσες, αντίστοιχα.

A.3. Υλικά και μέθοδοι

A.3.1. Κλωνοποίηση της λυσίλ οξειδάσης σε φορείς έκφρασης

Τα cDNAs της ΛΟ (αλληλουχία για ολόκληρη την πρωτεΐνη-full length- και το ενεργό αμινοτελικό άκρο-163D) απομονώθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης από το cDNA κυτταροκαλλιέργειας ανθρώπινων ινοβλαστών MH3T3 . Για τη κλωνοποίηση στο πλασμίδιο προκαρυωτικής έκφρασης pRSETA και τη δημιουργία πρωτεϊνών που φέρουν τον επίτοπο ιστιδίνης (6 His) στο αμινοτελικό τους άκρο όπως και για την κλωνοποίηση στο

προκαρυωτικής προέλευσης πλασμίδιο pGEX6P2 και τη δημιουργία ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών που φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο τη βακτηριακή πρωτεΐνη μεταφοράς της S γλουταθειόνης χρησιμοποιήθηκαν οι υποκινητές CGGATATCGCTAGCCGTTTCGCCTGGGCTGTGCTCC (5' lox FL), CGGATATCGCTAGCGACGCCCTACAATCCCTAC (5' 163D lox) και CGAGATCTGAGCTCTAATACGGTCAAATTGTGCAGC (3'LOX) . Για την κλωνοποίηση στο πλασμίδιο ευκαρυωτικής έκφρασης PCMVtag1 και τη δημιουργία ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών που φέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο τον επίτοπο flag και στο αμινοτελικό τους άκρο τον επίτοπο myc χρησιμοποιήθηκαν οι υποκινητές 5' lox FL , 5' 163D lox και CGTCTAGACTCGAGATACGGTCAAATTGTGCAGCC (3' loxXhoI).

A.3.2. Έκφραση και καθαρισμός ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια

Η έκφραση των πρωτεϊνών έγινε στο βακτηριακό στέλεχος E.coli που ονομάζεται BL21plys. Το στέλεχος αυτό έχει το χαρακτηριστικό ότι η έκφραση της T7 πολυμεράσης από την οποία εξαρτάται η μεταγραφή και επομένως και η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης , βρίσκεται κάτω από αυστηρό έλεγχο και επάγεται μόνο με την προσθήκη IPTG (συναγωνιστής της δράσης του lacI καταστολέα). Σε καλλιέργεια οπτικής πυκνότητας (OD₆₀₀) 0.6 προστίθεται IPTG τελικής συγκέντρωσης 0.2 mM ή 0.1 mM. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 3 ώρες ή στους 20°C για 6 ώρες . Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται και φυγοκεντρούνται για 20 λεπτά σε 6.000 rpm στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε Sonication buffer ή φυλάσσεται στους -80°C Ακολουθεί διάρρηξη των κυττάρων και σπάσιμο του DNA με υπέρηχους και φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 30 min. Το υπερκείμενο αποτελεί το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που περιέχει υπερεκφρασμένη την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει . Ακολουθεί καθαρισμός της πρωτεΐνης με Glutathione Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia) στην περίπτωση των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών που φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο τη βακτηριακή πρωτεΐνη μεταφοράς της S γλουταθειόνης . Οι πρωτεΐνες που προσδένονται μη ειδικά στην κλώνα απομακρύνονται με 4 ξεπλύματα με διάλυμα Wash Buffer (10 φορές ο όγκος της κλώνας) για 10 λεπτά το καθένα , στους 4°C υπό ανάδευση . Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες εκλούνται από την κλώνα με την προσθήκη ίσου όγκου Elution Buffer. Η διαδικασία της έκλουσης επαναλαμβάνεται 5 έως 8 φορές στους 4°C ή σε θερμοκρασία δωματίου και τα προϊόντα συλλέγονται . Προσθήκη 20% γλυκερόλης στον τελικό όγκο και φύλαξη στους -80°C ή φύλαξη στον πάγο για άμεση χρήση της πρωτεΐνης. Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε για τις ΛΟ πρωτεΐνες με τον επίτοπο GST. Τα διαλύματα που

χρησιμοποιήθηκαν : Sonication Buffer (1x PBS, 1% Triton x 100, 0.5 mg/ml BSA, 1mM PMSF), Wash Buffer (1x PBS , 1mM PMSF, 5μM CuCl₂ *), Elution Buffer (20mM Glutathione, 50mM Tris pH =8.0, 5μM CuCl₂ *). * προσθήκη που αφορά μόνο στις Iox πρωτεΐνες.

Για τον καθαρισμό των ΛΟ πρωτεϊνών σημασμένων με τον επίτοπο 6His χρησιμοποιήθηκε ο αποδιατακτικός παράγοντας ουρία (urea). Η διαδικασία έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου εκτός από τη μέθοδο της διαπίδυσης που πραγματοποιήθηκε στους 4°C. Συλλογή της καλλιέργειας , φυγοκέντρηση και επαναδιάλυση σε Buffer A (50 mM Tris pH =8.0, 1mM EDTA pH =8.0, 100mM NaCl, 1mM PMSF). Υπέρηχοι, φυγοκέντρηση και επαναδιάλυση σε Buffer B (2M Urea, 10mM K₂HPO₄ pH =8.2). Φυγοκέντρηση, επαναδιάλυση σε Buffer C (8M Urea , 10mM K₂HPO₄ pH =8.2, 3mM β-Me-OH, 1mM PMSF, 10 mM Tris pH =8.0) και ανάδευση για 12 ώρες. Ο καθαρισμός έγινε με τη με χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου, Talon (Clonetech). Ακολούθησαν ξεπλύματα με Wash Buffer (100mM KH₂PO₄, 10 mM Tris pH =6.8, 3mM β-Me-OH, 1mM PMSF, 8M Urea) ,έκλουση της πρωτεΐνης με Elution1 (100mM K₂HPO₄, 10 mM Tris , 8M Urea και HCl έως pH=5.9) και διαδοχικά Elution 2 Buffer (100mM K₂HPO₄, 10 mM Tris , 8M Urea και HCl έως pH=4.5). Για τη διαδικασία της διαπίδυσης χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα Buffer E (10mM K₂HPO₄ pH=9.6 , 200μM CuCl₂, 2% sodium N- laurosylsarcosinate) Buffer F (10mM K₂HPO₄ pH=9.6, 5μM CuCl₂), Buffer D(10mM K₂HPO₄ pH=7). Ακολούθησε λυοφιλοποίηση των πρωτεϊνών, φύλαξη στους -20°C και επαναδιάλυση σε 10mM K₂HPO₄ pH=7 πριν τη χρήση.

A.3.3. Απομόνωση ιστονών από ευκαρυωτικά κύτταρα

Για την απομόνωση των ιστονών από καλλιέργεια HEK293 κυττάρων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Όταν τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τα πιάτα σε διάλυμα PBS και φυγοκεντρήθηκαν για 5min στις 1000rpm και σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια επαναδιαλύθηκαν σε Lysis Buffer (10mM HEPES pH=7.9 ,1.5mM MgCl₂ , 10mM KCl, 0.5mM DTT, 1.5mM PMSF), φυγοκεντρήθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε 5 όγκους Lysis Buffer με προσθήκη H₂SO₄ 0.2M. Ανάδευση , φυγοκέντρηση και διαπίδυση σε 0,1M Acetic Acid και ddH₂O. Φύλαξη στους -20°C.

A.3.4 In vitro αντιδράσεις ιστονών με λυσίλ οξειδάση

- Μη τροποποιημένες ιστόνες και λυσίλ οξειδάση

Οι αντιδράσεις ιστονών και ΛΟ σημασμένης με 6 x His πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα που περιείχε αποστειρωμένο νερό, 10x buffer α (100mM K_2HPO_4 pH=7), ιστόνες 10μgr και 10x πρωτεΐνη (επαναδιάλυση της λυοφιλοποιημένης πρωτεΐνης σε 10mM K_2HPO_4 pH=7). Οι αντιδράσεις ιστονών και ΛΟ σημασμένης με GST πραγματοποιήθηκαν πάνω στη στήλη πρόσδεσης της πρωτεΐνης με την πρωτεΐνη προσδεμένη . Το διάλυμα αποτελείται από νερό, 10x buffer α, 50μM $CuCl_2$, 10μgr ιστόνες . Ο τελικός όγκος των αντιδράσεων ήταν 20μl -40 μl και η επώαση έγινε στους 37°C με συνεχή ανάδευση. Η επίδραση του ενζύμου στις ιστόνες ελέγχθηκε με ανάλυση κατά Western έναντι των αντισωμάτων για τρι, δι και μόνο μεθυλιωμένη ιστόνη 3(H3) στη λυσίνη 9 (K9), τρι, δι και μόνο μεθυλιωμένη H3 σε K4, μεθυλιωμένη H3K79, K36, δι μεθυλιωμένη H3K27, ακετυλιωμένη H3(upstate) και H3 σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας κατασκευής των αντισωμάτων .

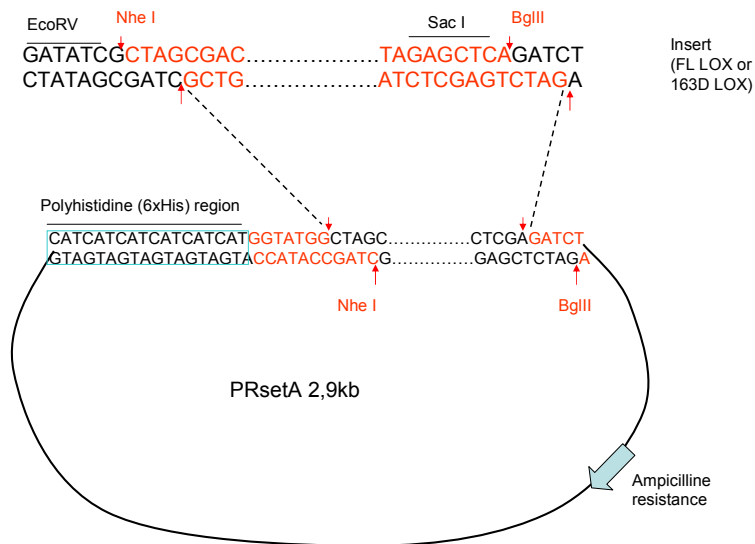
- Λυσίλ οξειδάση /ιστόνες και ακετυλίωση –μεθυλίωση

Οι αντιδράσεις ακετυλίωσης ιστονών (οι οποίες προηγούμενα είχαν αντιδράσει με τη 10x σύμφωνα με τα παραπάνω) πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα 50mM Tris pH 8.0, 0.1 mM EDTA ,1mM dithiothreitol, 10% γλυκερόλη στους 37°C για 1 ώρα παρουσία της ακετυλοτρανσφεράσης CBP ή PCAF και 3H -CoA. Οι αντιδράσεις μεθυλίωσης πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα 50mM Tris pH 8.0, 100mM KCl, 4mM EDTA, 0.5mM dithiothreitol παρουσία 1 μC [3 H- Me]-S-adenosyl methionine (Amersham) και της μεθυλ-τρανσφεράση hSET7/SET9 στους 30°C . Ακολούθησε ανάλυση κατά Western όπως αναφέρθηκε.

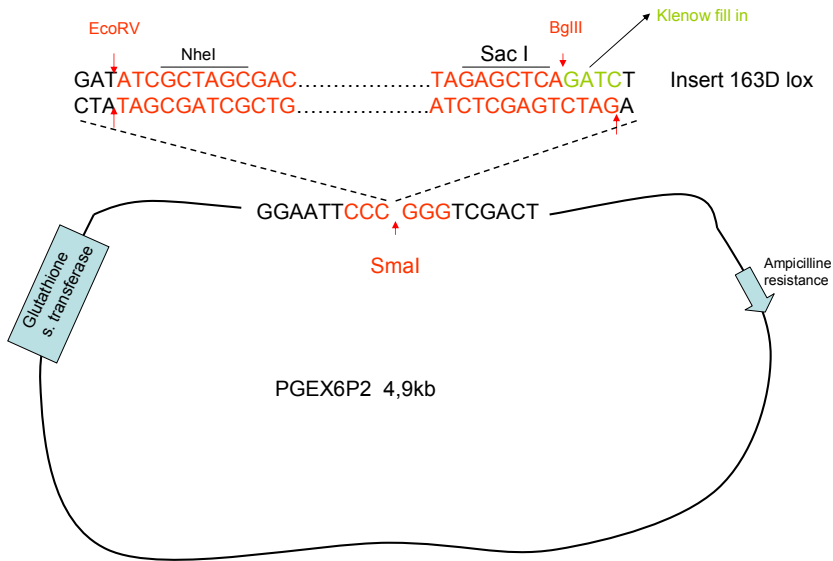
A.4.Αποτελέσματα και συμπεράσματα

A.4.1. Κλωνοποίηση της ΛΟ

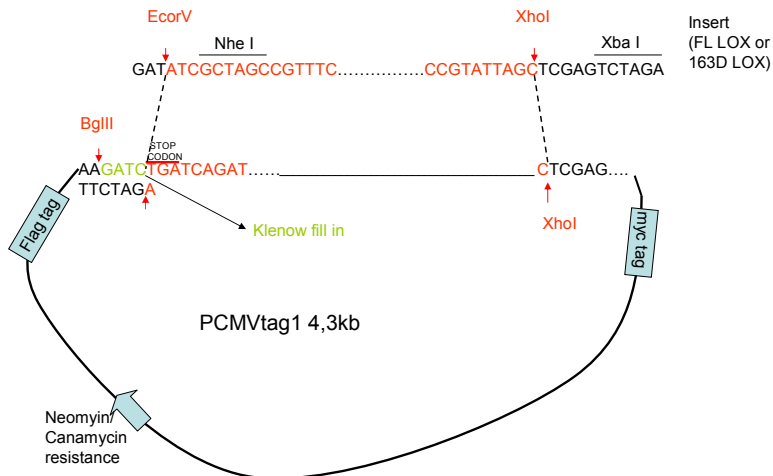
A.4.1.α.Κλωνοποίηση της ΛΟ σε PRsetA φορέα:



A.4.1.β. Κλωνοποίηση της ΛΟ σε pGEX6P2 φορέα:

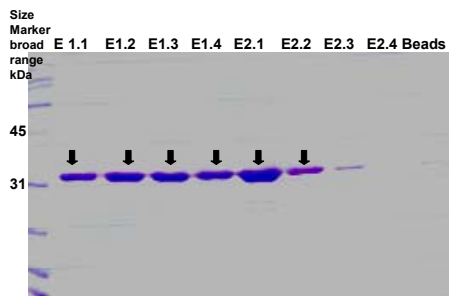


A.4.1.γ. Κλωνοποίηση της ΛΟ σε PCMVtag1 φορέα:



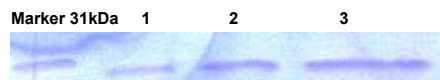
A.4.2. Έκφραση της πρωτεΐνης

A.4.2.α. Έκφραση της 6xHis ΛΟ 163D (32kDa)



Έκφραση της 6xHis ΛΟ 163D και καθαρισμός της με ουρία. **E1.1-1.4**: πρώτη έως τέταρτη έκλουση με Elution buffer1, **E2.1-2.4**: πρώτη έως τέταρτη έκλουση με Elution buffer2, **beads**: κολώνα πρόσδεσης

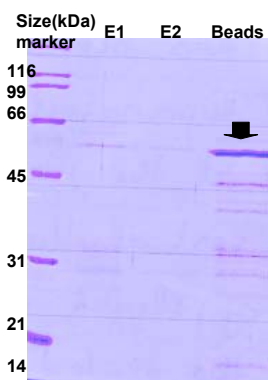
της πρωτεΐνης. Τα βέλη αντιστοιχούν στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη διαπύδηση και λυοφιλοποίηση.



Επαναδιάλυση της λυοφιλοποιημένης πρωτεΐνης σε 100 μl 10mM K_2HPO_4 pH=7.

1 : 5 μl, **2** : 10μl, **3** : 15 μl εναιωρήματος. Δείγματα σε 12% SDS αποδιατακτικό πρωτεϊνικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Χρώση με Coomassie Brilliant blue.

A.4.2.β. Έκφραση της GST- ΛΟ 163D (60kDa)



Κατά τον καθαρισμό της GST- ΛΟ 163D

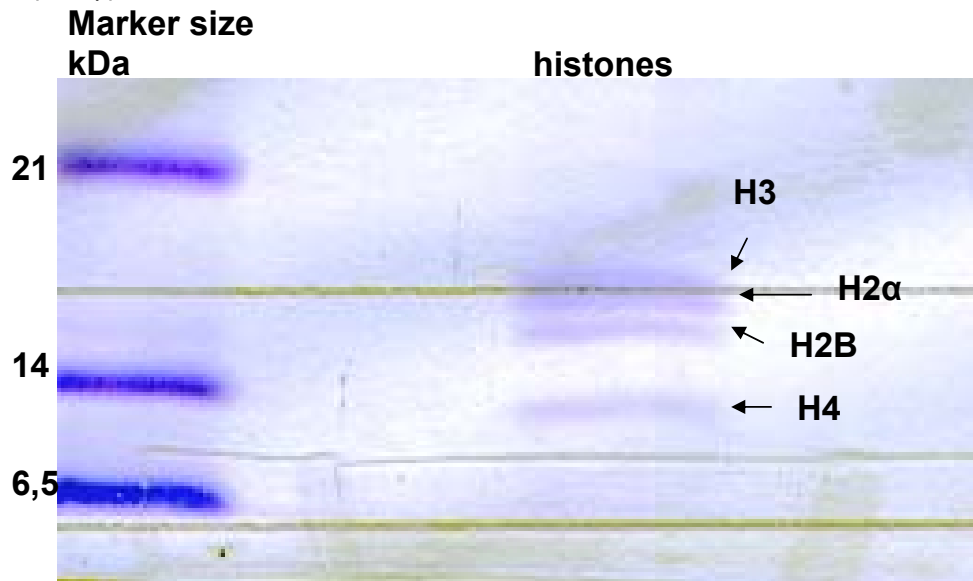
δεν ήταν εφικτή η έκλουση της πρωτεΐνης από την κολώνα πρόσδεσής της παρότι το πρωτόκολλο τροποποιήθηκε αρκετές φορές (παρασκευή κολώνας, έκλουση σε θερμοκρασία δωματίου ή σε 4°C, με ή χωρίς $CuCl_2$). **E1**: ένατη έκλουση και **E2**: δέκατη έκλουση. **Beads**: κολώνα.

Το βέλος αντιστοιχεί στην προσδεμένη πρωτεΐνη.

Έτσι όλες οι in vitro αντιδράσεις της GST- ΛΟ 163D πραγματοποιήθηκαν με την πρωτεΐνη προσδεμένη στην κολώνα.

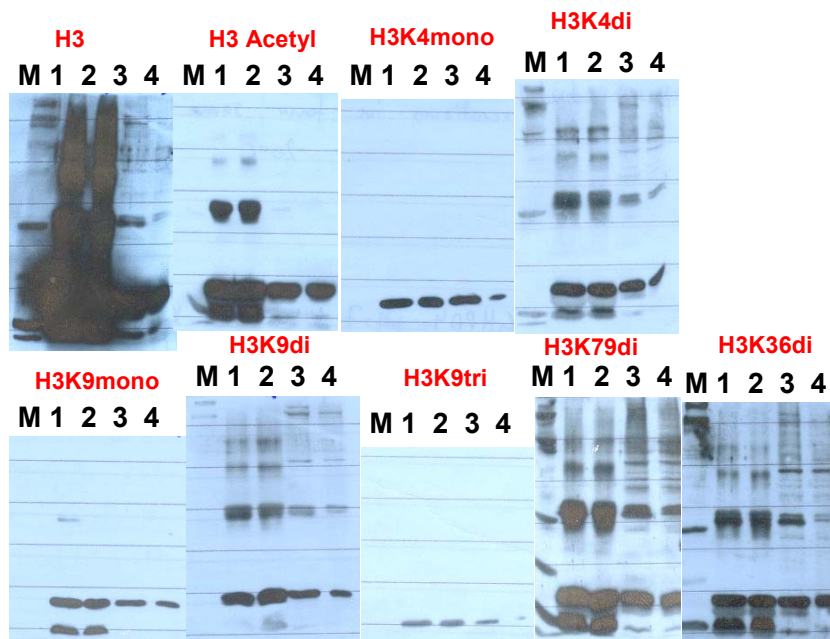
A.4.3. Απομόνωση ιστονών από 293 κυτταρικές καλλιέργειες

Δείγμα σε 12% SDS πολυακρυλαμίδα ,πρωτεϊνικό ,αποδιατακτικό πήκτωμα.
Χρώση με Coomassie brilliant blue.



A.4.4. In vitro αντιδράσεις ιστονών με ΛΟ

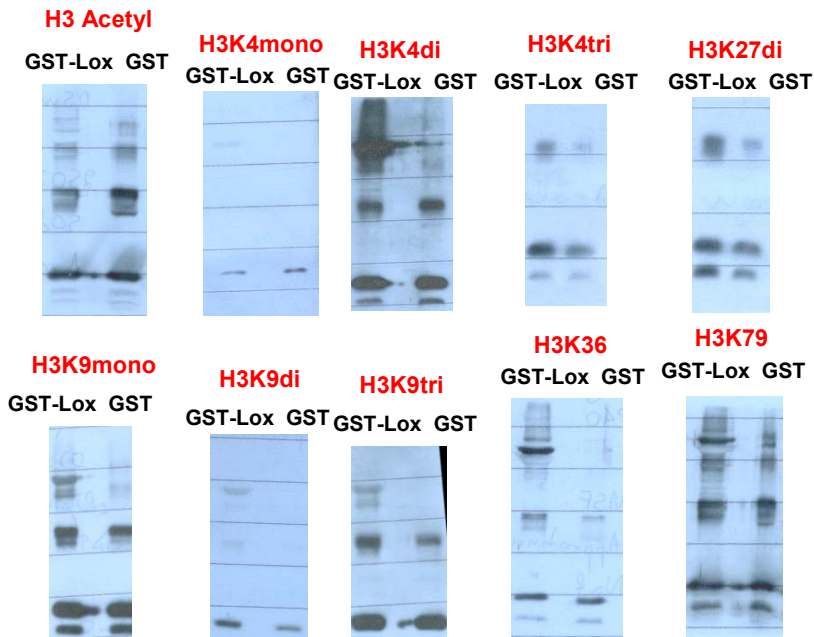
A.4.4.α. Αντίδραση λυοφιλοποιημένης 6xHis ΛΟ 163D με ιστόνες και έλεγχος για τροποποιήσεις σε λυσίνες H3.



Western

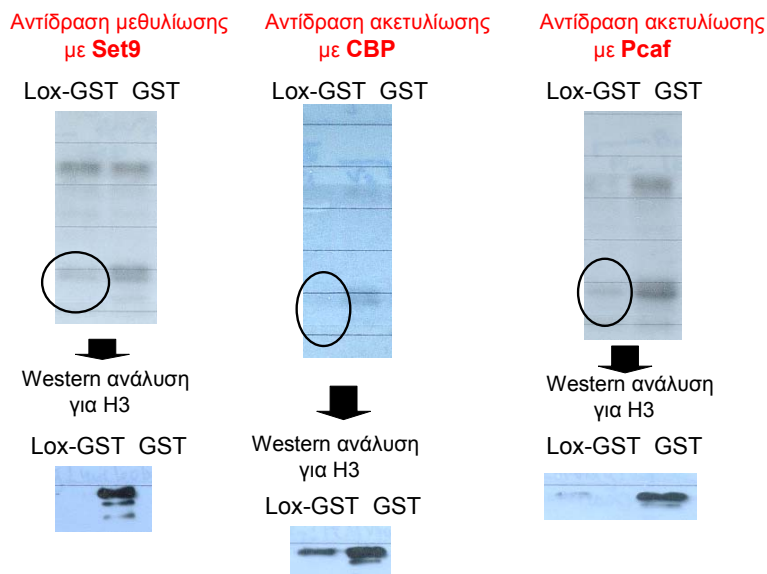
ανοσοαποτύπωση σε ιστόνες που αντέδρασαν με ΛΟ. **M**: marker, **1**: Ιστόνες (Boehringer) και ΛΟ, **2**: Ιστόνες (Boehringer) σε αντίδραση χωρίς ΛΟ, **3**: 293 ιστόνες και ΛΟ, **4** : 293 ιστόνες σε αντίδραση χωρίς ΛΟ . Σε όλες τις περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στις τροποποιήσεις των ιστονών μετά την αντίδραση τους με τη ΛΟ.

Α.4.4.β. Αντίδραση GST ΛΟ 163D με ιστόνες και έλεγχος για τροποποιήσεις σε λυσίνες H3.



Σε όλες τις περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στις τροποποιήσεις των ιστονών μετά την αντίδραση τους με τη GST- ΛΟ.

A.4.4.γ. Λυσίλ οξειδάση /ιστόνες και ακετυλίωση –μεθυλίωση



Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ελάττωση του σήματος είτε ακετυλίωσης είτε μεθυλίωσης όταν οι ιστόνες είχαν πρώτα αντιδράσει με τη GST-ΛΟ. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα έγινε στα ίδια δείγματα μία ανάλυση κατά Western με αντίσωμα έναντι της H3. Με αυτό το πείραμα φάνηκε ότι η ελάττωση στις αντιδράσεις μεθυλίωσης ή

ακετυλίωσης δεν ήταν ένα πραγματικό γεγονός αλλά οφειλόταν σε μικρότερη ποσότητα ιστονών που πήραν μέρος στην αντίδραση.

A.5. Συμπεράσματα

Μέσα από την παρούσα εργασία δεν παρατηρήθηκε κάποια ειδική δράση της ΛΟ όσον αφορά στις μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις των λυσινών της H3.

Συγκεκριμένα κατά την αντίδραση της 6xHis ΛΟ με τις ιστόνες η αποθσία ειδικής αντίδρασης της ΛΟ είναι δυνατό να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες πέρα από έλλειψη ειδικότητας του ενζύμου για αυτές τις αντιδράσεις. Έτσι πιθανά να διαταράχθηκε η δραστικότητά της κατά την διαδικασία καθαρισμού της πρωτεΐνης με ουρία. Παρόλο που το συγκεκριμένο πρωτόκολλο οδηγεί σε λήψη δραστικού ενζύμου έναντι του υποστρώματος benzylamine (24) στην περίπτωση άλλων υποστρωμάτων όπως των ιστονών είναι δυνατό αυτό να μην ισχύει. Επίσης οι περιορισμοί που τίθενται εξ ορισμού σε *in vitro* μελέτες όπως η απουσία συμπαραγόντων ή άλλων δραστικών μορίων πιθανά να ερμηνεύει τα αυτά αποτελέσματα.

Παράλληλα, η αδυναμία έκλουσης της GST-ΛΟ από την κλώνα και η πραγματοποίηση των αντιδράσεων πάνω σε αυτή είναι δυνατό να εμποδίζει την αλληλεπίδρασή της με τις λυσίνες της ιστόνης 3 και να μην επιτρέπει την τροποποίησή τους.

Τέλος, τα δεδομένα των αντιδράσεων μεθυλίωσης/ακετυλίωσης δεν αποκλείουν την πιθανότητα η δράση της ΛΟ να επηρεάζει την περαιτέρω τροποποίηση των ιστονών. Στην περίπτωση αυτή οι περισσότερες ιστόνες παρέμειναν προσδεδεμένες με την ΛΟ πάνω στην κλώνα και δεν ήταν εφικτό να απομακρυνθούν με αυτό το πρωτόκολλο. Έτσι τελικά στις αντιδράσεις μεθυλίωσης/ακετυλίωσης συμμετείχε μικρότερο ποσοστό ιστονών σε σχέση με το πείραμα ελέγχου (ιστόνες που είχαν αλληλεπιδράσει μόνο με GST).

Επιπλέον, πέρα από την *in vitro* μελέτη της δράσης του ενζύμου, *in vivo* προσέγγιση σε κυτταρικές καλλιέργειες θα μπορούσε να δώσει περισσότερες πληροφορίες για τις αλλαγές που πιθανά επιφέρει η υπερέκφραση της ΛΟ στις ιστόνες και το ρόλο της στη μεταγραφή. Εν τούτοις ένα πρώτο πείραμα παροδικής διαμόλυνσης 3T3 NIH κυτταρικών σειρών με ευκαριωτικό φορέα για έκφραση της ΛΟ με σημασμένο τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό της άκρο δεν επιβεβαίωσαν την πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης (τα δεδομένα δεν παρατίθενται).

B.1. Εισαγωγή

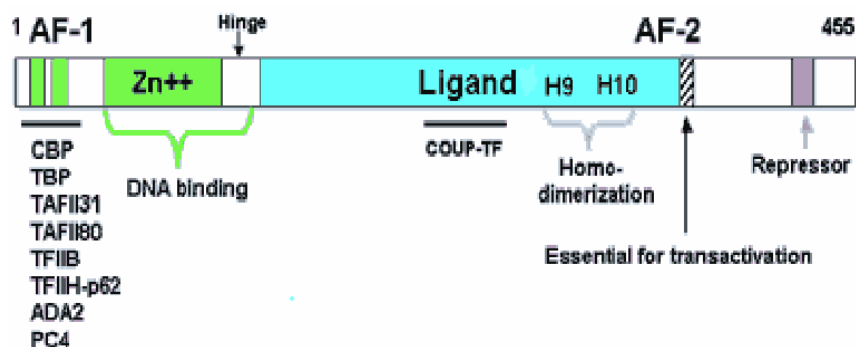
B.1.1. HNF4a

Ο HNF4a (Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας μέλος της οικογένειας των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων και προσδέτες του είναι οι λιπαρό ακετυλ-CoA θειοεστέρες.(25) Το ανθρώπινο γονίδιο του HNF4a βρίσκεται στο χρωμόσωμα 20 q13.1-13.2 , αποτελείται από 12 εξόνια και η συνολική του έκταση είναι 30 kbs. Εναλλακτικές μορφές ματίσματος είτε στο αμινοτελικό είτε στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης οδηγούν σε εννέα διαφορετικές ισομορφές του HNF4a.

Προσδένεται στο DNA ως διμερές σε αντίθεση με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς που σχηματίζουν ετεροδιμερή με άλλα μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων όπως είναι ο RXRa (retinoid X receptor α). Ο HNF4a περιέχει δύο περιοχές την AF1 και την AF2 που ενεργοποιούνε την μεταγραφή. Έλλειψη της AF1 έχει ως αποτέλεσμα ελάττωση της μεταγραφικής ενεργότητας του μορίου κατά 40% ενώ διάφοροι συνεργιστικοί προσδένονται σε αυτή την περιοχή. Επιπλέον, η ενεργότητά του μπορεί να επηρεαστεί από ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, ή πρόσδεσή του με τις SMADS 3 και 4. (26)

Εικόνα από ιστοσελίδα <http://www.hnf4.ucr.edu/Sladek> laboratory

Σχηματική απεικόνιση των λειτουργικών περιοχών του HNF4a



Εκφράζεται στο ήπαρ, στο νεφρό, στο γαστρεντερικό σωλήνα (λεπτό και παχύ έντερο και λιγότερο στο στομάχι) και στο πάγκρεας. (26) Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης στο έμβryo mRNA του HNF4a εντοπίζεται την 4.5 εμβρυϊκή ημέρα (E) ενώ η πρωτεΐνη ανιχνεύεται στον ηπατικό δίσκο και στο έντερο την E8.5 και στο πάγκρεας και νεφρό την E10. (27)

Ο HNF4a συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων τα οποία εμπλέκονται σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια (ομοίωση χοληστερόλης, γλυκόζης και λιπαρών οξέων), στη σύνθεση παραγόντων πήξης του αίματος αλλά και στον καταβολισμό φαρμάκων ή άλλων εξωγενών χημικών ουσιών από το ήπαρ. Ο HNF4a έχει βασικό ρόλο στη μορφολογική και λειτουργική διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων και στη δημιουργία του ηπατικού επιθηλίου. Επιπλέον, ο HNF4a φαίνεται να καταλαμβάνει το 12% (1.575 γονίδια) των Hu13K μικροσυστοιχιών (ρυθμιστικές περιοχές -700bps έως +200 bps 13.000 ανθρώπινων γονιδίων) που υβριδοποιήθηκαν με DNA από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης ηπατοκυττάρων για τον HNF4a και το 11% όταν η ανοσοκατακρήμνιση έγινε σε νησίδα. Συγκρίνοντας με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες τα ποσοστά για τον HNF1a σε ηπατοκύτταρα ήταν 1,6% και σε β-κύτταρα του παγκρέατος 0,8% ενώ για τον HNF6 1,7% και 1,4% αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν τον κεντρικό ρόλο του HNF4a στη λειτουργία του ηπατοκυττάρου αλλά και των β-κυττάρων του παγκρέατος. (28)

Μεταλλάξεις στον περιοχή που κωδικοποιεί για τον HNF4a και ελατώνουν τη δραστηριότητα του μορίου ή στη ρυθμιστική του περιοχή και επηρεάζουν την έκφρασή του σχετίζονται με MODY τύπου I (Mature Onset Diabetes of the Young). Σε μια προσπάθεια να βρεθεί ο

μοριακός μηχανισμός βάσει του οποίου μεταλλάξεις στον HNF4a οδηγούν σε διαβήτη βρέθηκε ότι διάφορα γονίδια που παίρνουν μέρος στην έκκριση ινσουλίνης από τα β- κύτταρα του παγκρέατος μετά ερέθισμα με γλυκόζη (περιλαμβανομένων glucose transporter 2, γλυκολυτικό ένζυμο αλδολάση Β , γλυκεραλδεύδη -3-φωσφορική αφυδρογονάση και ηπατική πυρουβική κινάση) ρυθμίζονται από τον HNF4a .(26) Επιπρόσθετα ιστοειδική απαλοιφή του HNF4a από τα β- κύτταρα του παγκρέατος σε ποντίκια οδήγησε σε ελαττωμένη ανοχή στη γλυκόζη και σε υπερινσουλιναιμία. Στην ίδια μελέτη καταδεικνύεται η σημασία του HNF4a για τη έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα μέσω K_{ATP} καναλιών. (29)

Απαλοιφή του HNF4a σε πειραματικό ζωικό μοντέλο οδηγεί σε εμβρυικό θάνατο λόγω αδυναμίας σχηματισμού του σπλαχνικού ενδοδέρματος στο έμβρυο. Με πειράματα τετραπλοειδούς διάσωσης (tetraploid rescue) για το σπλαχνικό επιθήλιο τα έμβρυα έζησαν μέχρι την 12^η εμβρυική ημέρα (E12) και μελετώντας το ρόλο του HNF4a βρέθηκε ότι η παρουσία του δεν ήταν απαραίτητη στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του ήπατος. (30,31) Εν τούτοις απαλοιφή του HNF4a από την E15,5 ειδικά στα ηπατοκύτταρα καταδεικνύεται η σημασία του στη μορφολογική και λειτουργική διαφοροποίηση του ήπατος , στην αποθήκευση γλυκογόνου και στην δημιουργία του ηπατικού επιθηλίου. (32) Σε άλλο πειραματικό ζωικό μοντέλο όπου ο HNF4a εξαλείφεται από την 45 ημέρα μετά τη γέννηση ειδικά στο ήπαρ παρατηρήθηκαν διαταραχές στην ομοιόσταση της χοληστερόλης και των λιπιδίων. (33)

B.1.2. Ρύθμιση της έκφρασης του HNF4a

Προκειμένου να αναλυθεί και να μελετηθεί η ρύθμιση της έκφρασης του HNF4a κλωνοποιήθηκαν και αναλυθηκαν 12,1kbs πάνω από την περιοχή που κωδικοποιεί το γονίδιο. Τα σημεία τοθ DNA στα οποία προσδένονται πρωτείνες προσδιορίστηκαν με δοκίμια υπερευεσθησίας σε DNaseI. Έτασι, εντοπίστηκαν θέσεις τόσο στον εγγύς υποκινητή και στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου, όσο και στην 5'περιοχή, στις θέσεις -6,6, -8,0 και -8,8kb 5' του σημείου έναρξης της μεταγραφής. Πειράματα ανάλυσης αποτυπωμάτων μεταγραφικών παραγόντων σε DNA (DNaseI footprinting) και μεταβολής της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του DNA (EMSA) αποκάλυψαν θέσεις πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF1α και β,Sp1, GATA6 και HNF6 στην περιοχή του εγγύς υποκινητή ενώ στη μεταγραφή σε ανθρώπινη ηπατική κυτταρική σειρά, πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έδειξαν ότι, οι παράγοντες HNF1α, HNF6 ,Sp1 και COUPTFII αλληλεπιδρούνε σταθερά με τον υποκινητή. Ο COUPTFII καταστέλλει τη δράση του υποκίνητη μέσω ενός στοιχείου απόκρισης σε ορμόνες (hormone response element). (34)

Σε μια άλλη μελέτη παρουσιάζεται ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η στρατολόγηση παραγόντων και των μεταβολών της χρωματίνης στον εγγύς υποκινητή και σε έναν 5' ενισχυτή του HNF4a -6,6kbs από το σημείο έναρξης της μεταγραφής κατά την αρχική ενεργοποίηση του γονιδίου στη διάρκεια της διαφοροποίησης ανθρώπινων εντερικών κυττάρων (CaCo-2). Με τον τρόπο αυτό η ρυθμιστική περιοχή του HNF4a λειτούργησε ως μοντέλο για την κατανόηση της ρύθμισης της έναρξης της μεταγραφής ενός γονιδίου από τοπολογικά απομακρυσμένες περιοχές μεταξύ τους (ενισχυτή-υποκινητή). (35)

Παράλληλα, έχει ταυτοποιηθεί και ένας εναλλακτικός υποκινητής για το HNF4a γονίδιο, ο οποίος εντοπίζεται 46kbs 5' του γνωστού υποκινητή. Πειράματα RT-PCR έδειξαν ότι αυτός ο υποκινητής είναι ο κύριος ενεργοποιητής της μεταγραφής στα β κύτταρα του παγκρέατος ενώ έχει ρόλο και στα ηπατοκύτταρα. (36)

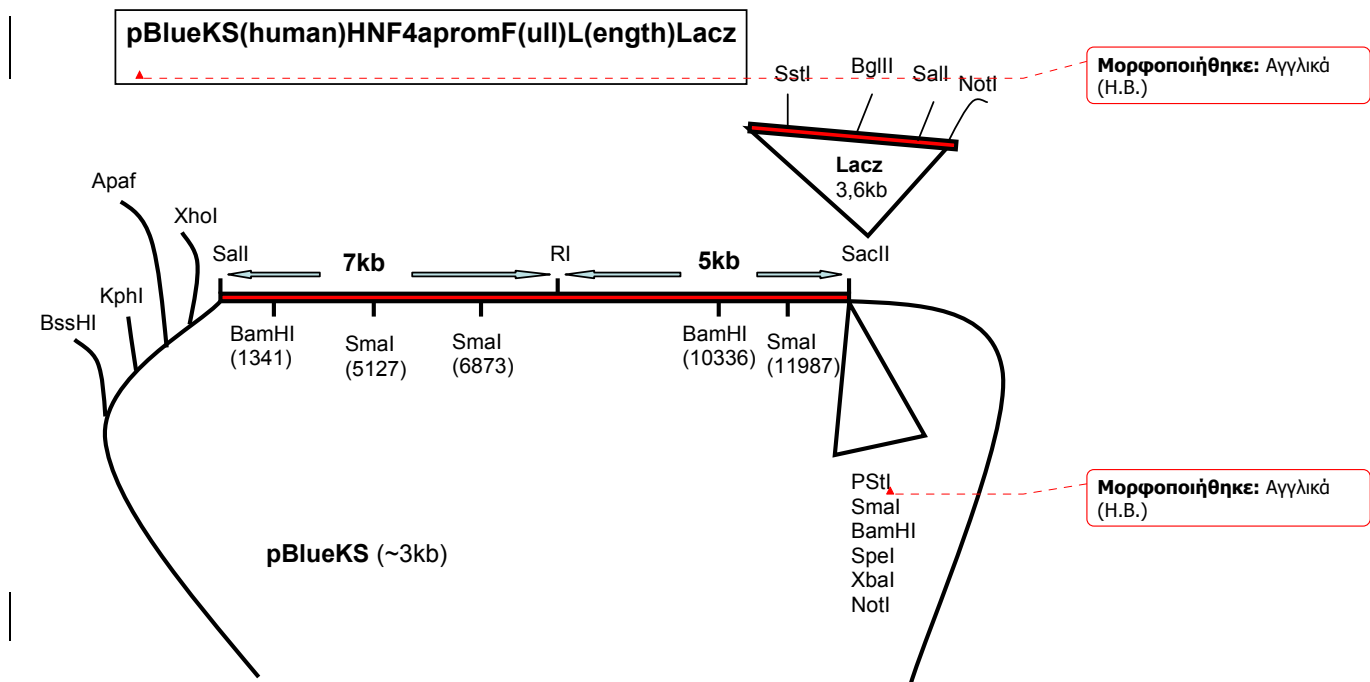
B.2. Αντικείμενο μελέτης

Το αντικείμενο μελέτης αυτής της εργασίας αφορά στο διαγονιδιακό ποντίκι που εκφράζει το γονίδιο αναφοράς LacZ υπό ολόκληρη τη ρυθμιστική περιοχή του ανθρώπινου HNF4a.

Συγκεκριμένα το διαγονιδιακό ζώο προέκυψε από ένεση γραμμικού τμήματος DNA στον προπυρήνα (απλοειδής πυρήνας που προέρχεται από μείωση) γονιμοποιημένου ωαρίου και εμφύτευση σε μήτρα δεκτικού θηλυκού ποντικού.

Αρχικά προσδιορίσαμε τον αριθμό των ενθέσεων στο γένωμα του ποντικού σε δύο ζώα που προέκυψαν από διαφορετικές ενέσεις. Στη συνέχεια αναλύσαμε το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου αναφοράς LacZ σε διάφορους ιστούς σε ποντικό στο γένωμα του οποίου το DNA εντέθηκε μία φορά.

Σχηματική απεικόνιση του τμήματος που εντέθηκε- κόκκινο χρώμα- κλωνοποιημένο σε βακτηριακό φορέα



B.3.Υλικά και μέθοδοι

B.3.1. Ανάλυση κατά Southern

Αρχικά, 6μgr DNA από το κάθε δείγμα κόβεται με τα αντίστοιχα περιοριστικά ένζυμα για κάθε ανίχνευτή. Στη συνέχεια γίνεται διαχωρισμός των τμημάτων του DNA με ηλεκτροφόρηση σε 1% πηκτή αγαρόζης. Η πηκτή μεταφέρεται σε διάλυμα Α αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA (NaOH 0,5N, NaCl 1,5M) και έπειτα σε διάλυμα Β (Tris pH=7.4 0,5M, NaCl 1.5M). Ακολουθεί μεταφορά των τμημάτων σε νιτροκυταρίνη με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων (2x και 20x) διαλύματος SSC (κιτρικό νάτριο, NaCl). Μετά προϋβριδοποίηση της μεμβράνης με molecular crowders and herring testis στους 65°C για τουλάχιστον 2 ώρες. Κατόπιν υβριδοποίηση με ανιχνευτή DNA σημασμένο με P³² στους 65°C για 14-18 ώρες. Έπειτα, ξεπλένουμε τη μεμβράνη με διαδοχικές συγκεντρώσεις SSC (3x, 0,3x, 0,1x) και εκθέτουμε τη μεμβράνη σε φίλμ για 2 ώρες και στους -80°C.

B.3.2. Απομόνωση mRNA και ανάστροφη μεταγραφή

Για την απομόνωση mRNA χρησιμοποιήθηκαν ιστοί (ήπαρ, λίπος, εγκέφαλο, καρδιακός μυς, σκελετικός μυς, έντερο, πάγκρεας, σπλήνα και νεφρό) από δύο αρσενικά ποντίκια τριών μηνών διαγονιδιακά για το lac z. Και τα δύο προήλθαν από την πρώτη ένεση. Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν μηχανικά σε διάλυμα D (4M guanidium thiocyanate, 25mM Sodium Citrate pH 7, 0,5% sarcosyl, 0,1M 2-μερκαπτοαιθανόλη) και προστέθηκε 2M Sodium Acetate. Ακολούθησαν πλυσίματα με χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη και με φαινόλη: χλωροφόρμιο. Προστέθηκε ίσος όγκος ισοπροπανόλης και φύλαξη στους -20°C. Μετά την κατακρήμνιση ξέπλυμα με 75% αιθανόλη, ποσοτικοποίηση με μέτρηση οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος φωτός 260nm αλλά και με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%. Έπειτα αντίδραση με DNAase (20μg RNA και 1μl DNAase) στους 30°C, πλυσίματα με φαινόλη: χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με 100% αιθανόλη και Sodium acetate, πλυσίματα με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση σε νερό. Ύστερα έγινε η αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής με 1μg RNA και 1μl ένζυμο ανάστροφη μεταγραφή στους 37°C. Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης που ακολούθησε χρησιμοποιήθηκαν υποκινητές για το GAPDH γονίδιο αλλά και για το lac z γονίδιο. Οι υποκινητές για το lac z γονίδιο: GCAAACCATCG AAGTGACCAG (5') και CGCTTATTACCCAGCTCGATG (3').

B.3.3. Ημιποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Προκειμένου να προσδιοριστεί ποσοτικά η μεταγραφή του lac z γονιδίου σε κάθε ιστό πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με σημασμένα με ραδιενεργό φώσφορο νουκλεοτίδια (α - P^{32} ATP και α - P^{32} CTP). Η αντίδραση έγινε τόσο στους 25 όσο και στους 22 κύκλους. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 5% πηκτή ακρυλαμίδης και στη συνέχεια εκτέθηκαν για μέτρηση των κρούσεων.

B.3.4. Διασταυρώσεις και Lac Z χρώση εμβρύων και ιστών ενήλικων ζώων

Για τη μελέτη της έκφρασης του LacZ γονιδίου αναφοράς έγινε χρώση με τη βοήθεια ενός αναλόγου της λακτόζης το X-Gal (5-bromo-4-chloroindolyl- β , D-γλακτοσίδη). Το Lac z γονίδιο κωδικοποιεί το ένζυμο β -γαλακτοσιδάση στο E.coli βακτήριο το οποίο διασπάει το X-Gal (5-bromo-4-chloroindolyl- β , D-γλακτοσίδη) σε 5-bromo-4-chloroindigo το οποίο έχει έντονο μπλε χρώμα.

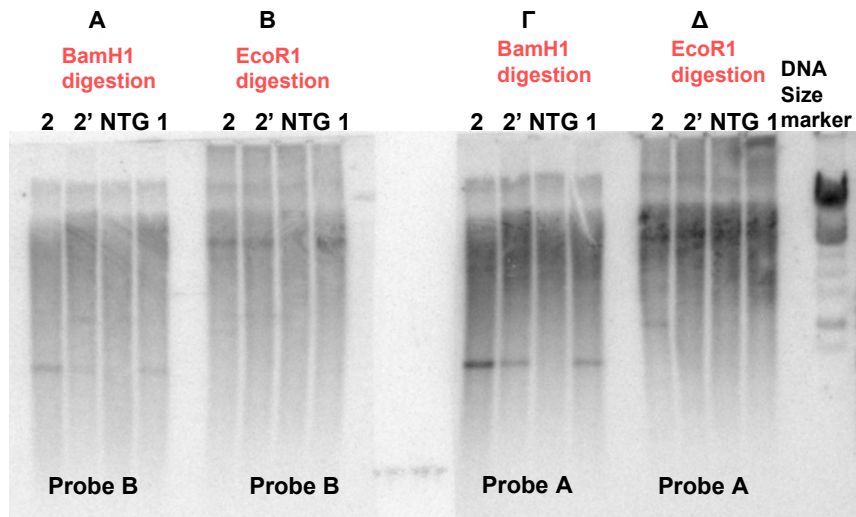
Χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα έμβρυα 12,5 και 18,5 ημερών αλλά και ιστοί (ήπαρ, πάγκρεας, λίπος, σπλήνας, μυς, νεφρό, τμήμα του παχέος εντέρου και του λεπτού εντέρου) ενήλικων διαγονιδιακών ποντικών. Διασταυρώθηκαν ετερόζυγα αρσενικά με ομόζυγα θηλυκά ενώ τα

πειράματα ελέγχου έγιναν σε F1 γένος ποντικών αγρίου τύπου. Αρχικά έγινε μονιμοποίηση στους 4°C των ιστών σε διάλυμα μονιμοποίησης (PBS 1x, 1% Φορμαλδεύδη, 0,2% Γλουταραλδεύδη, 0,2% NP40, 0,1% Deoxycholate) για 50 λεπτά της ώρας (E12,5 και ιστοί ενήλικων ζώων) ή για 60 λεπτά της ώρας (E18,5 : 30 λεπτά, έπειτα τομή εμβρύου και ακόλουθα άλλα 30 λεπτά στο ίδιο διάλυμα). Ακολούθησαν τρία ξεπλύματα με PBS 1x σε θερμοκρασία δωματίου διάρκειας 15 λεπτών το καθένα. Έπειτα εμβύθυνση των ιστών σε διάλυμα χρωστικής (PBS 1x, 0,1% Deoxycholate, 1mg/ml X-Gal, 5mM K₃Fe(CN)₆ , 5mM K₄Fe(CN)₆ , 0,2mM MgCl₂) για 4 ώρες ή 16 ώρες και φύλαξη στους 30°C. Στη συνέχεια ξεπλύματα με PBS 1x σε θερμοκρασία δωματίου. Καθαρισμός από μη ειδική χρώση γίνεται σταδιακά με την τοποθέτηση του ιστού σε διαλύματα 30%, 50%, 80% γλυκερόλη σε PBS 1x και μετά πάλι σε 80%, 50% και 30% γλυκερόλη σε PBS 1x. Η διαδικασία γίνεται στους 4°C, κάθε ξέπλυμα έχει διάρκεια μίας ημέρας ή δύο για τα E18,5 και τα δείγματα βρίσκονται σε κινούμενο δάπεδο. Προκειμένου να τοποθετηθεί το δείγμα σε παραφίνη και να γίνουν τομές για παρατήρηση στο μικροσκόπιο ακολουθεί η παρακάτω διαδικασία. Ξεπλύματα με PBS 1x και μονιμοποίηση σε 4% παραφορμαλδεύδη σε PBS στους 4°C. Καθένα από αυτά τα στάδια είναι για μια ημέρα. Έπειτα σε PBS 1x σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες, σε NaCl 86% για 3 ώρες, σε 30% αιθανόλη για 3 ώρες (1.5 x 2), 50% αιθανόλη για 3 ώρες (1.5 x 2) και σε 70% αιθανόλη για τη διάρκεια της νύχτας. Την επομένη, 95% αιθανόλη για 3 ώρες (1.5 x 2), 100% αιθανόλη για 4 ώρες (2 x 2) και σε ξυλένιο για 2 ώρες. Όλα τα παραπάνω σε θερμοκρασία δωματίου. Τοποθέτηση σε παραφίνη στους 65°C για 48 ώρες (με δύο αλλαγές) και εγκλεισμός σε παραφίνη.

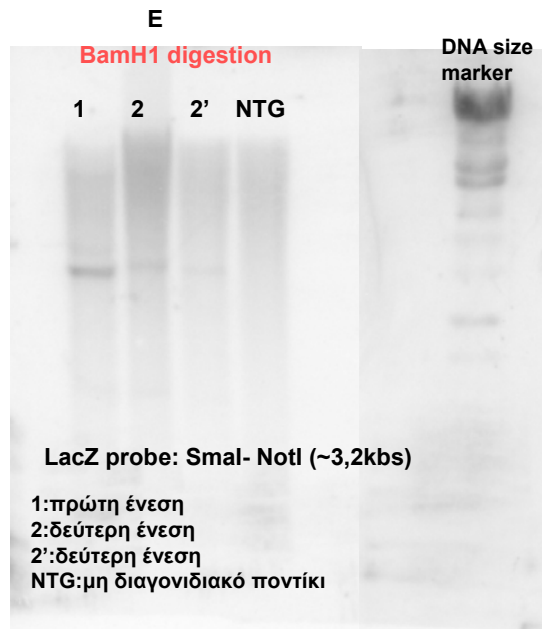
B.4. Αποτελέσματα

B.4.1.Ανάλυση κατά Southern

Προκειμένου να διαπιστώσουμε τον αριθμό των ενθέσεων στο διαγονιδιακό ζώο αναλύθηκε κατά Southern το γενετικό υλικό ποντικών που προήλθαν τόσο από την πρώτη όσο και από τη δεύτερη ένεση.



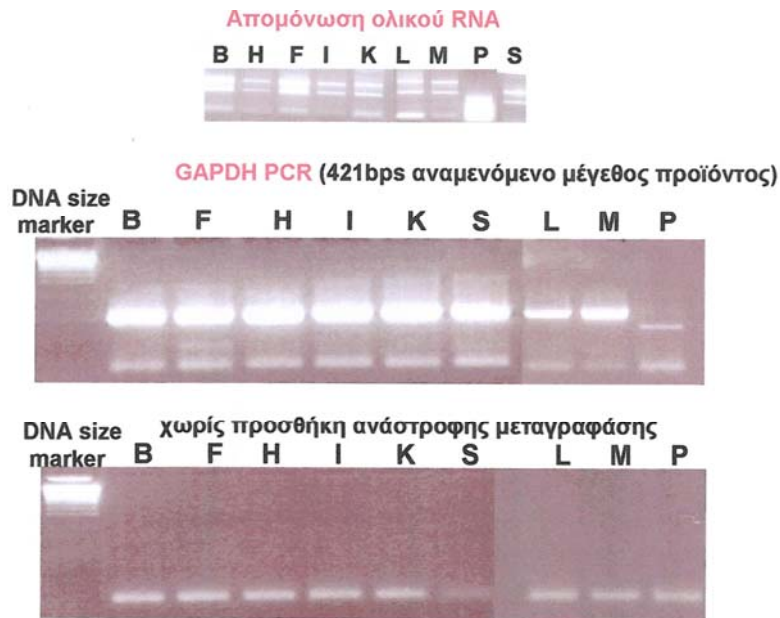
Probe A: SalI- BamH1(1,34 kb)
Probe B: SalI- EcoR1 (7kb)



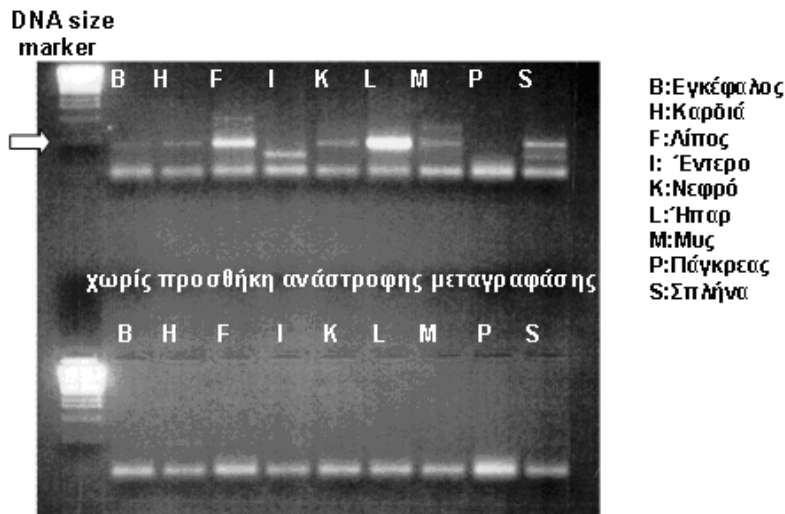
Το αναμενόμενο μέγεθος των κομματιών DNA στα οποία θα υβριδοποιηθεί ο ανιχνευτής (probe) εάν το κάθε ζώο φέρει ένα αντίγραφο του γενετικού υλικού που εντέθηκε για κάθε ανάλυση είναι το ακόλουθο : A (>ή=1,34kb και 9kb), B (>ή=7kb), Γ(>ή=1,34kb), Δ(>ή=7kb), E(3,2kb). Σε όλες τις περιπτώσεις (1, 2, 2') τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα ώστε το DNA να έχει εντεθεί μόνο μία φορά στο γένωμα.

B.4.2. Απομόνωση mRNA και ανάστροφη μεταγραφή

Στην ανάστροφη μεταγραφή για μελέτη της έκφρασης του LacZ γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι ελέγχου. Τόσο το γονίδιο ελέγχου GAPDH που εκφράζεται σε όλους τους ιστούς – επιβεβαιώνει την δημιουργία cDNA όσο και αντιδράσεις χωρίς την προσθήκη ανάστροφης μεταγραφάσης- αποκλείει επιμόλυνση από γενωμικό DNA.

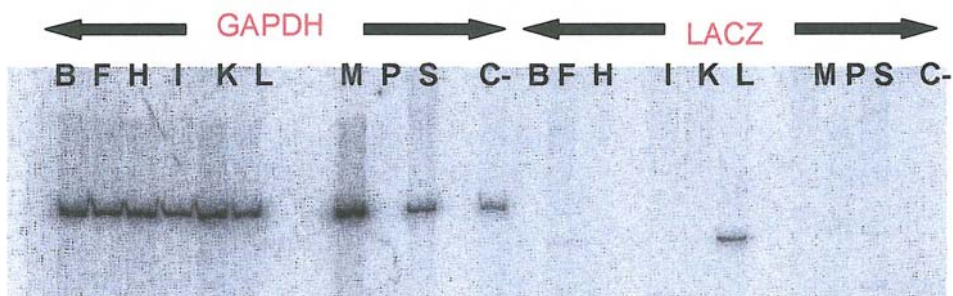


LacZ PCR (366bps αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος)



B.4.3. Ημιποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Ημιποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με P³²

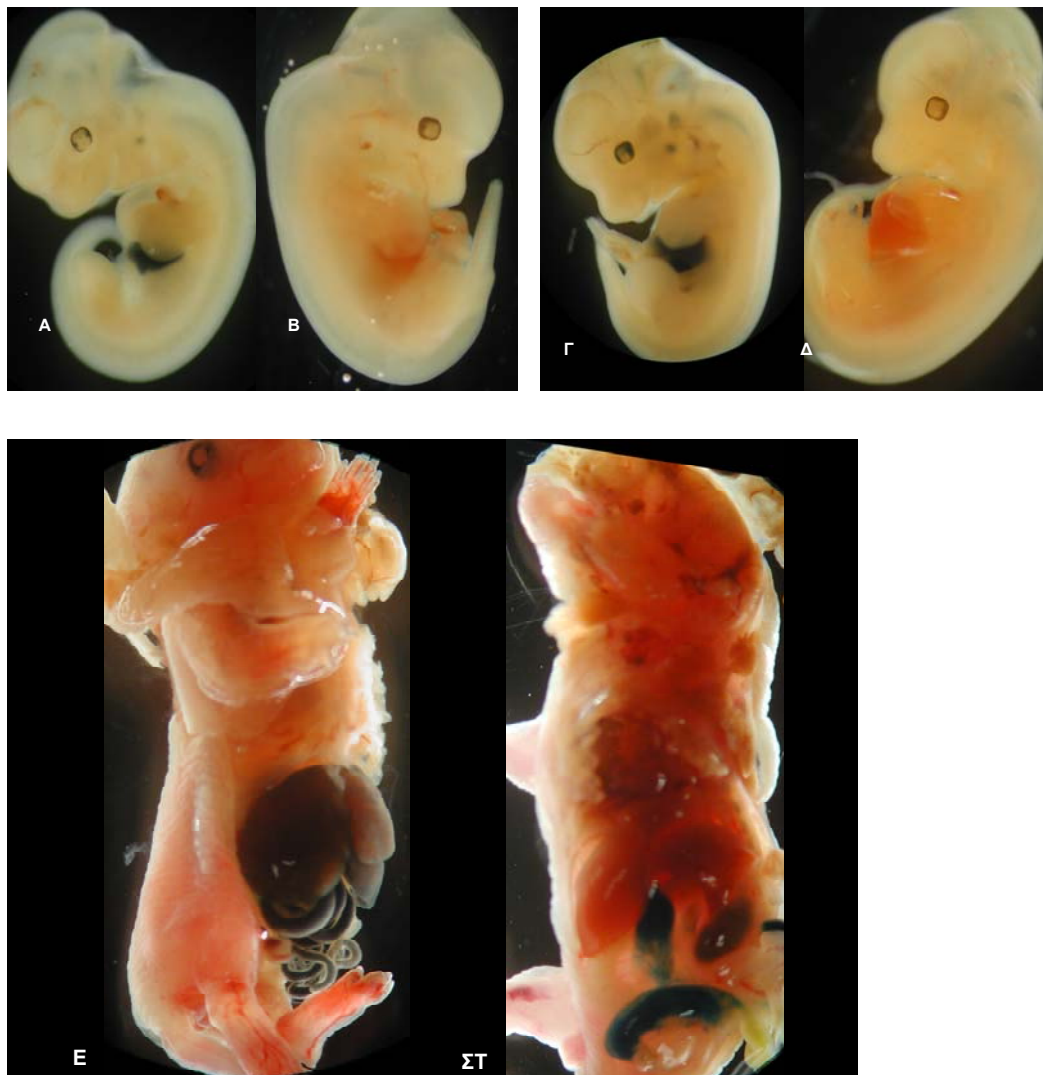


Έκφραση του LacZ γονιδίου σε διάφορους ιστούς. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση των προϊόντων σε σχέση με το GAPDH.

Brain	0,15
Fat	2,18
Heart	0,14
Intestine	-0,35
Kidney	0,56
Liver	214,01
Muscle	-0,07
Spleen	5,02
Negative control	-0,52

Οι παραπάνω τιμές είναι αυθαίρετες και δεν αναφέρονται σε κάποιες τιμές παρά προκύπτουν ως αναλογίες.

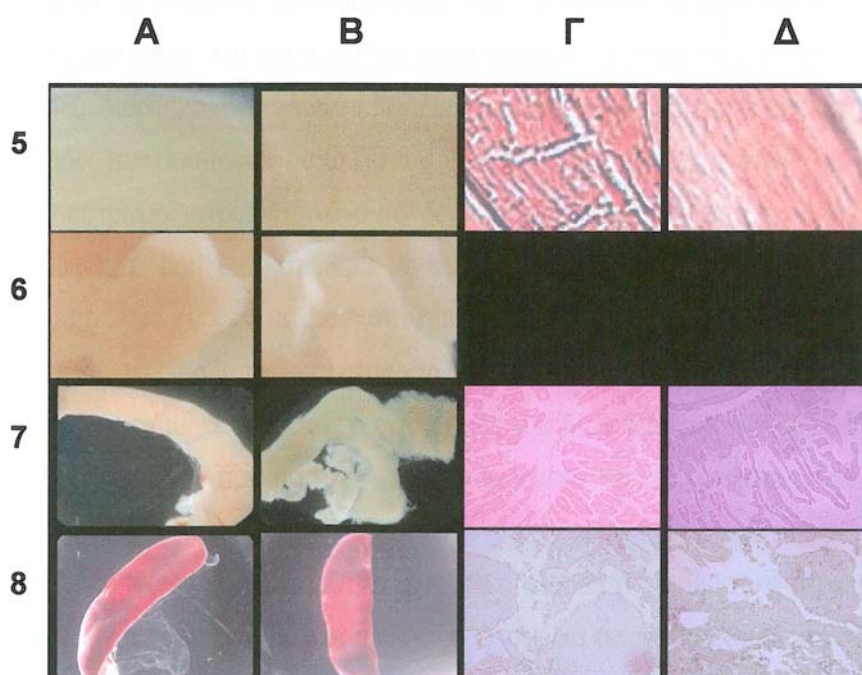
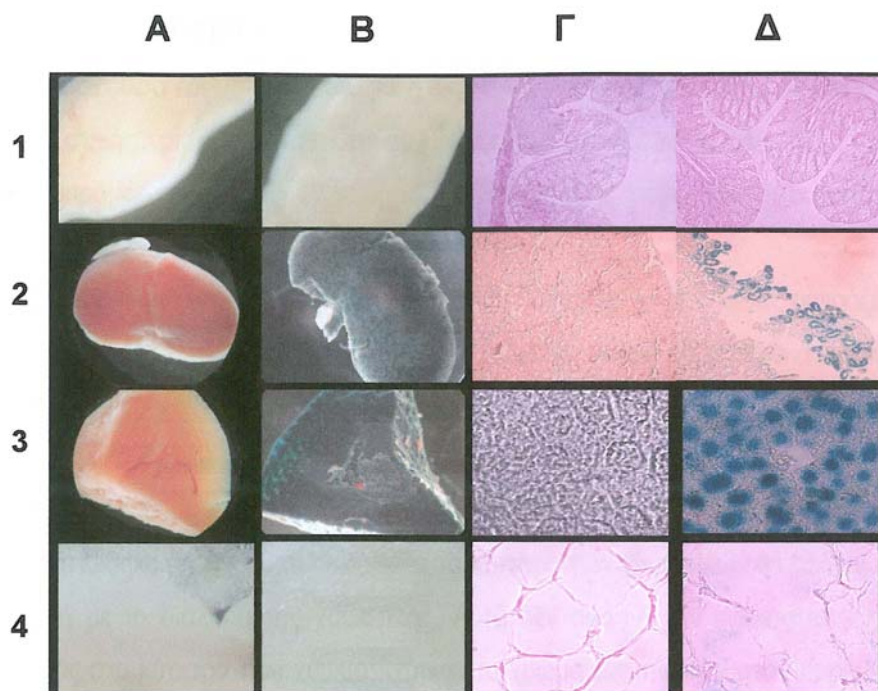
B.4.4. Lac Z χρώση εμβρύων και ιστών ενήλικων ζώων



A ,Γ : Διαγονιδιακά E12,5 με Lac Z χρώση για 4 και 14 ώρες αντίστοιχα

B,Δ: Αγρίου τύπου E12,5 Lac Z χρώση για 4 και 14 ώρες αντίστοιχα

E,ΣΤ: Διαγονιδιακό E18,5 Lac Z χρώση για 4 ώρες και αγρίου τύπου αντίστοιχα



1. Τμήμα παχέος εντέρου 2.Νεφρού 3.Ήπαρ 4.Λίπος 5.Μυς 6.Πάγκρεας 7.Τμήμα λεπτού εντέρου 8. Σπλήνας

Λήψη στο στερεοσκόπιο - αγρίου τύπου ζώα (A) διαγονιδιακά ζώα (B)

Λήψη στο μικροσκόπιο - αγρίου τύπου ζώα (Γ) διαγονιδιακά ζώα (Δ)

B.5.Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου αναφοράς Lacz υπό ολόκληρη την ρυθμιστική περιοχή του ανθρώπινου HNF4a σε διαγονιδιακό ποντίκι.

Με πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης παρατηρείται έκφραση στο ήπαρ και στο λίπος.

Η χρώση ιστών και εμβρύων με X-GAL έδειξε ότι το γονίδιο αναφοράς εκφράζεται την E12,5 στο ήπαρ ενώ την E18,5 εντοπίστηκε χρώση σε ήπαρ νεφρά και έντερο. Τα αποτελέσματα αυτά προήλθαν από παρατήρηση στο στερεοσκόπιο.

Στο ενήλικο ζώο το ήπαρ και το νεφρό χρωματίστηκαν έντονα- στεροσκοπική παρατήρηση- μετά την βάπτισή τους στο διάλυμα x-gal, εντούτοις μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο διαπιστώθηκε ότι η χρώση αφορούσε τα κύτταρα των εξωτερικών στιβάδων που έρχονταν σε επαφή με το διάλυμα της χρωστικής. Αυτό δεν αναιρεί την ειδικότητα της χρώσης καθώς αφενός στα κύτταρα που χρωματίστηκαν το χρώμα εντοπιζόταν στον πυρήνα του κυττάρου όπως και το ένζυμο β-γαλακτοσειδάση που κωδικοποιεί το συγκεκριμένο Lacz γονίδιο που χρησιμοποιήθηκε – και αφετέρου δεν παρατηρήθηκε σε όλους τους ιστούς. Πιθανά έκθεση για χρονικά διάστημα πέραν των 4 ωρών να επέτρεπε την χρώση και σε βαθύτερες στιβάδες των συμπαγών αυτών ιστών. Παρότι μακροσκοπικά το έντερο φάνηκε να αντιδρά με το υπόστρωμα , μικροσκοπικά αυτό δεν επιβεβαιώθηκε. Επίσης, η αυξημένη έκφραση στον λιπώδη ιστό που διαπιστώθηκε με πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης δεν παρατηρήθηκε ούτε σε μακροσκοπική ούτε σε μικροσκοπική παρατήρηση. Όσον αφορά στο πάγκρεας στερεοσκοπική παρατήρηση δεν έδειξε κάποια αλλαγή μετά την χρώση ενώ σε τομές παραφίνης ήταν αδύνατος ο εντοπισμός νησιδίων του Langerhans- όπου βρίσκονται και τα β κύτταρα του παγκρέατος- και έτσι δεδομένα από την μικροσκοπική παρατήρηση δεν παρατίθενται.

Τελικά, σύμφωνα με την παραπάνω μελέτη η ανθρώπινη ρυθμιστική περιοχή τοθ HNF4a στο ποντίκι είναι λειτουργική και παρουσιάζει ιστοειδική ενεργότητα όπως και στον άνθρωπο. Το διαγονιδιακό αυτό ποντίκι αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την σε βάθος μελέτη της μεταγραφικής ενεργοποίησης ή μεταγραφικής αποσιώπησης ιστοειδικών γονιδίων.

Βιβλιογραφία

1. Kagan, H. M., and W. Li. 2003. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* 88:660-72.
2. Trackman, P. C., D. Bedell-Hogan, J. Tang, and H. M. Kagan. 1992. Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *J Biol Chem* 267:8666-71.
3. Smith-Mungo, L. I., and H. M. Kagan. 1998. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol* 16:387-98.
4. Gacheru, S., C. McGee, J. Y. Uriu-Hare, T. Kosonen, S. Packman, D. Tinker, S. A. Krawetz, K. Reiser, C. L. Keen, and R. B. Rucker. 1993. Expression and accumulation of lysyl oxidase, elastin, and type I procollagen in human Menkes and mottled mouse fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 301:325-9.
5. Contente, S., K. Kenyon, D. Rimoldi, and R. M. Friedman. 1990. Expression of gene *rrg* is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c-H-ras. *Science* 249:796-8.
6. Giampuzzi, M., G. Botti, M. Cilli, R. Gusmano, A. Borel, P. Sommer, and A. Di Donato. 2001. Down-regulation of lysyl oxidase-induced tumorigenic transformation in NRK-49F cells characterized by constitutive activation of ras proto-oncogene. *J Biol Chem* 276:29226-32.
7. Ren, C., G. Yang, T. L. Timme, T. M. Wheeler, and T. C. Thompson. 1998. Reduced lysyl oxidase messenger RNA levels in experimental and human prostate cancer. *Cancer Res* 58:1285-90.
8. Csiszar, K., S. F. Fong, A. Ujfalusi, S. A. Krawetz, E. P. Salvati, J. W. Mackenzie, and C. D. Boyd. 2002. Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1 in colorectal tumors. *Int J Cancer* 97:636-42.
9. Li, W., G. Liu, I. N. Chou, and H. M. Kagan. 2000. Hydrogen peroxide-mediated, lysyl oxidase-dependent chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 78:550-7.
10. Kagan, H. M., J. Raghavan, and W. Hollander. 1981. Changes in aortic lysyl oxidase activity in diet-induced atherosclerosis in the rabbit. *Arteriosclerosis* 1:287-91.
11. Rodriguez, C., B. Raposo, J. Martinez-Gonzalez, L. Casani, and L. Badimon. 2002. Low density lipoproteins downregulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1409-14.
12. Mello, M. L., S. Contente, B. C. Vidal, W. Planding, and U. Schenck. 1995. Modulation of ras transformation affecting chromatin supraorganization as assessed by image analysis. *Exp Cell Res* 220:374-82.

13. Li, W., K. Nellaiappan, T. Strassmaier, L. Graham, K. M. Thomas, and H. M. Kagan. 1997. Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12817-22.
14. Nellaiappan, K., A. Risitano, G. Liu, G. Nicklas, and H. M. Kagan. 2000. Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth-muscle cells. *J Cell Biochem* 79:576-82.
15. Giampuzzi, M., R. Oleggini, and A. Di Donato. 2003. Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones H1 and H2: definition of the regions involved. *Biochim Biophys Acta* 1647:245-51.
16. Jenuwein, T., and C. D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074-80.
17. Zhang, Y., and D. Reinberg. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15:2343-60.
18. Cosgrove, M. S., J. D. Boeke, and C. Wolberger. 2004. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol* 11:1037-43.
19. Sarma, K., and D. Reinberg. 2005. Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:139-49.
20. Kubicek, S., and T. Jenuwein. 2004. A crack in histone lysine methylation. *Cell* 119:903-6.
21. Shi, Y., F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstine, P. A. Cole, R. A. Casero, and Y. Shi. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119:941-53.
22. Cuthbert, G. L., S. Daujat, A. W. Snowden, H. Erdjument-Bromage, T. Hagiwara, M. Yamada, R. Schneider, P. D. Gregory, P. Tempst, A. J. Bannister, and T. Kouzarides. 2004. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118:545-53.
23. Wang, Y., J. Wysocka, J. Sayegh, Y. H. Lee, J. R. Perlin, L. Leonelli, L. S. Sonbuchner, C. H. McDonald, R. G. Cook, Y. Dou, R. G. Roeder, S. Clarke, M. R. Stallcup, C. D. Allis, and S. A. Coonrod. 2004. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination. *Science* 306:279-83.
24. Jung, S. T., M. S. Kim, J. Y. Seo, H. C. Kim, and Y. Kim. 2003. Purification of enzymatically active human lysyl oxidase and lysyl oxidase-like protein from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expr Purif* 31:240-6.
25. Hertz, R., J. Magenheimer, I. Berman, and J. Bar-Tana. 1998. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* 392:512-6.

26. Schrem, H., J. Klempnauer, and J. Borlak. 2002. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol Rev* 54:129-58.
27. Sladek, F. M., W. M. Zhong, E. Lai, and J. E. Darnell, Jr. 1990. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* 4:2353-65.
28. Odom, D. T., N. Zizlsperger, D. B. Gordon, G. W. Bell, N. J. Rinaldi, H. L. Murray, T. L. Volkert, J. Schreiber, P. A. Rolfe, D. K. Gifford, E. Fraenkel, G. I. Bell, and R. A. Young. 2004. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303:1378-81.
29. Gupta, R. K., M. Z. Vatamaniuk, C. S. Lee, R. C. Flaschen, J. T. Fulmer, F. M. Matschinsky, S. A. Duncan, and K. H. Kaestner. 2005. The MODY1 gene HNF-4alpha regulates selected genes involved in insulin secretion. *J Clin Invest* 115:1006-15.
30. Chen, W. S., K. Manova, D. C. Weinstein, S. A. Duncan, A. S. Plump, V. R. Prezioso, R. F. Bachvarova, and J. E. Darnell, Jr. 1994. Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev* 8:2466-77.
31. Duncan, S. A., A. Nagy, and W. Chan. 1997. Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development* 124:279-87.
32. Parviz, F., C. Matullo, W. D. Garrison, L. Savatski, J. W. Adamson, G. Ning, K. H. Kaestner, J. M. Rossi, K. S. Zaret, and S. A. Duncan. 2003. Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet* 34:292-6.
33. Hayhurst, G. P., Y. H. Lee, G. Lambert, J. M. Ward, and F. J. Gonzalez. 2001. Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* 21:1393-403.
34. Hatzis, P., and I. Talianidis. 2001. Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4alpha gene expression. *Mol Cell Biol* 21:7320-30.
35. Hatzis, P., and I. Talianidis. 2002. Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol Cell* 10:1467-77.
36. Thomas, H., K. Jaschowitz, M. Bulman, T. M. Frayling, S. M. Mitchell, S. Roosen, A. Lingott-Frieg, C. J. Tack, S. Ellard, G. U. Ryffel, and A. T. Hattersley. 2001. A distant upstream promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet* 10:2089-97.