

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ**

**“Μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών
Mox και Pax”**

ΔΕΣΠΟΙΝΑ Γ. ΣΤΑΜΑΤΑΚΗ

Υπεύθυνη καθηγήτρια: Δόμνα Καραγωγέως
Υπεύθυνος καθηγητής: Γεώργιος Χαλεπάκης

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ
Σεπτέμβριος 2000**

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Νευροεπιστημών του Τομέα Βασικών Επιστημών της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη των αναπληρωτών καθηγητών Καραγωγέως Δόμνας και Χαλεπάκη Γεώργιου τους οποίους και ευχαριστώ θερμά.

Επίσης ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια που ο καθένας μου έχει προσφέρει, και δεν ήταν λίγη.

Ευχαριστώ τους Καρδάση Δημήτρη, Ταλιανίδη Γιάννη και τα μέλη των εργαστηρίων τους για τα πλασμίδια, τα πρωτόκολλα και τις συμβουλές που μου έδωσαν.

Τέλος ευχαριστώ τον Dr. Baljinder Mankoo για τις αδημοσίευτες πληροφορίες σχετικά με τα *mox1*^{-/-} και *mox1*^{-/-};*mox2*^{-/-} ποντίκια και για τις συζητήσεις σχετικά με τα πειράματά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

SUMMARY

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. Σωματογένεση

B. *Pax* γονίδια

- Το *Pax1* γονίδιο
- Το *Pax3* γονίδιο

Γ. *Mox* γονίδια

- Το *Mox1* γονίδιο
- Το *Mox2* γονίδιο

Δ. Διερεύνηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με το σύστημα των δύο υβριδίων στον σακχαρομύκητα.

E. Σκοπός της παρούσας εργασίας

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των *Mox1-Pax1* και *Mox2-Pax3* σε παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα.

- Προετοιμασία των κατασκευών που εκφράζουν τις epitope tagged πρωτεΐνες
- Κυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών
- Συνανοσοκατακρήμιση και western ανάλυση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

B. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των *Mox1-Pax1* και *Mox2-Pax3* *in vitro*

- Προετοιμασία των κατασκευών που χρησιμοποιήσαμε για τις *in vitro* αλληλεπιδράσεις
- Δοκιμή πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων *in vitro*

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα *Mox* γονίδια (*Mox-1* και *Mox-2*) αποτελούν μια υποοικογένεια homeobox γονιδίων που δεν οργανώνονται σε συστάδες και εκφράζονται σε ιστούς και όργανα μεσοδερμικής προέλευσης. Τα *Pax* γονίδια εμπλέκονται, όπως και τα *Mox*, στην εμβρυική ανάπτυξη και περιέχουν μια συντηρημένη δομική περιοχή με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, την paired domain. Τα γονίδια *Mox1*, *Mox2*, *Pax1* και *Pax3* εκφράζονται κατά την εμβρυική ανάπτυξη του ποντικού, του ανθρώπου και άλλων οργανισμών. Η έκφρασή τους εντοπίζεται στους αναπτυσσόμενους σωματίτες και παρουσιάζει επικαλύψεις ως προς το χρόνο και τις περιοχές έκφρασης. Τα ζώα που φέρουν μεταλλάξεις αδρανοποίησης είτε του *Mox1* είτε του *Pax1* παρουσιάζουν αλλοιώσεις στον αξονικό σκελετό. Όσον αφορά τα *Mox2* και *Pax3* τα μεταλλαγμένα ζώα παρουσιάζουν ανωμαλίες στην ανάπτυξη των μυών στα άκρα. Θεωρώντας ότι τα παραπάνω γονίδια εμπλέκονται σε κοινούς μηχανισμούς διαμόρφωσης του αξονικού σκελετού (*Pax1*, *Mox1*) και των σκελετικών μυών του άκρου (*Pax3*, *Mox2*) θελήσαμε να εξετάσουμε αν υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν. Αρχικά με το σύστημα των δυο υβριδίων στον σακχαρομύκητα και στη συνέχεια με *in vitro* αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει δυνατότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ των *Mox1-Pax1* και *Mox2-Pax3*. Η απόπειρα να συνανοσοκατακρημνίσουμε τις πρωτεΐνες από εκχυλίσματα παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων δεν απέδωσε. Ο βιολογικός ρόλος των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που αναφέρουμε παραπάνω δεν είναι γνωστός.

Summary

Mox genes constitute a subfamily of non-clustered, antenapedia-like homeobox genes that are expressed in a wide range of mesodermal tissues and organs. *Pax* genes are implicated in developmental processes and contain a conserved DNA binding domain, the paired domain. *Mox1*, *Mox2*, *Pax1* and *Pax3* genes are expressed during embryonic development of mouse, human and other organisms. Their expression patterns in the developing somite are not identical but have great similarities regarding the time and regions of expression. *Mox1* null mice and *Pax1* mutants show major malformations in their axial skeleton. *Mox2* null mice and *Pax3* mutants show defects in the limb myogenesis. Considering that the genes mentioned above are involved in common mechanisms of axial skeleton development (*Pax1*, *Mox1*) or formation and differentiation of limb musculature (*Pax3*, *Mox2*), we examined if they act in the same developmental pathway through protein-protein interaction. We investigated this hypothesis using three experimental approaches: 1. The yeast two hybrid system, 2. *In vitro* protein-protein interactions and 3. Coimmunoprecipitation from nuclear extracts of transiently transfected cells. Although the coimmunoprecipitation did not succeed the results from the other two experiments showed that *Mox1* can interact with *Pax1* and *Mox2* with *Pax3*. The role of these interactions is not known yet.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. ΣΩΜΙΤΟΓΕΝΕΣΗ

Οι σωμίτες είναι οι πρώτες δομές που φανερώνουν τη μεταμερική ανάπτυξη των σπονδυλωτών. “Εγκαθιστούν” αυτό το πρότυπο σχηματίζοντας σπονδύλους, πλευρά, χόνδρο, σκελετικούς μύες, τη δερμίδα της πλάτης και “επιβάλλοντας” στο περιφερικό νευρικό και στα νεοσχηματισμένα αγγεία μεταμερική διάταξη.

Κάθε σωμίτης προέρχεται από το παραξονικό (paraxial) μεσόδερμα, συγκεκριμένα το πρόσθιο άκρο της μεταμερικής πλάκας (segmental plate) (Christ and Ordahl, 1995). Ο σωμίτης όταν ωριμάζει δίνει τρία μεσεγχυματικά μέρη που υιοθετούν χονδρογενή, μυογενή και δερμική κυτταρική τύχη.

Ο νεοσχηματισμένος σωμίτης αποτελείται από μια σφαίρα από κυλινδρικά επιθηλιακά κύτταρα που περικλείει μεσεγχυματικά κύτταρα μέσα σε μια κεντρική κοιλότητα, το κοιλώμα του σωμίτη (Σχήμα 1-I). Κάθε σωμίτης περιβάλλεται από εξωκυττάριο υλικό που τον συνδέει με τις γειτονικές δομές.

Η διαμερισματοποίηση του σωμίτη γίνεται υπό τον έλεγχο σημάτων που προέρχονται από τους περιβάλλοντες ιστούς και συνοδεύονται από διαφοροποιημένα πρότυπα έκφρασης των *Pax* γονιδίων μέσα στο σωμίτη. Το πρώτο μοριακό στοιχείο διαφοροποίησης κατά μήκος του νωτιαίο-κοιλιακού άξονα είναι η καταστολή της έκφρασης του *Pax3* στο κοιλιακό ήμισυ του επιθηλιακού σωμίτη (Goulding et al., 1994). Οι σωμίτες είναι επίσης εξειδικευμένοι ώστε να σχηματίζουν διαφορετικές σκελετικές δομές σε διαφορετικά επίπεδα του προσθιοπίσθιου άξονα του σώματος. Αυτή η εξειδίκευση αντικατοπτρίζεται από την έκφραση των *Hox* γονιδίων (Kessel 1991).

Νωρίς κατά την ωρίμανση το κοιλιακό τοίχωμα του σωμίτη μετατρέπεται από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό και μαζί με τα κύτταρα του κοιλώματος του σωμίτη σχηματίζουν το σκληροτόμιο (Christ and Ordahl, 1995) (Σχήμα 1-II). Το σκληροτόμιο αργότερα υποδιαιρείται σε πρόσθιο και οπίσθιο. Το πλευρικό τμήμα του οπίσθιου μισού του σκληροτομίου σχηματίζει κυρίως τα πλευρά, τα τόξα και τις αποφύσεις των σπονδύλων. Τα κύτταρα του σκληροτομίου που μεταναστεύουν προς τη μεσαία γραμμή σχηματίζουν το περινωτοχορδικό κάλυμμα και αργότερα τα σώματα των σπονδύλων και τους μεσοσπονδύλιους δίσκους.

Το νωτιαίο ήμισυ του σωματίτη παραμένει επιθηλιακό και ονομάζεται δερμομυοτόμιο γιατί θα σχηματίσει την δερμίδα της πλάτης και τους σκελετικούς μύες. Τα κύτταρα που βρίσκονται στο πλευρικό (lateral) άκρο του δερμομυοτομίου είναι οι πρόγονοι των μυών της υποαξονικής (hyraxial) περιοχής του εμβρύου ενώ αυτά στο άκρο του δερμομυοτομίου που βρίσκεται προς τη μεσαία γραμμή (medial) είναι πρόγονοι των επιαξονικών (eraxial) μυών. Επιθηλιακά κύτταρα στο πρόσθιο και μεσαίο (cranio-medial) άκρο του δερμομυοτομίου επιμηκύνονται με κατεύθυνση προς τα πίσω κάτω από το δερμομυοτόμιο και αγκυροβολούν στην οπίσθια παρυφή του. Αυτά τα κύτταρα είναι μεταμιτωτικά, εκφράζουν μυικές πρωτεΐνες και σχηματίζουν το μυοτόμιο (Σχήμα 1-III). Στα επίπεδα των άκρων οι πρόγονοι των υποαξονικών μυών μετατρέπονται από επιθήλιο σε μεσέγγυμα και μεταναστεύουν στο σωματικό μεσόδερμα που σχηματίζει το εκβλάστημα του άκρου όπου πολλαπλασιάζονται και αργότερα διαφοροποιούνται.

B. Pax ΓΟΝΙΔΙΑ

Τα *Pax* γονίδια είναι μία οικογένεια γονιδίων που ελέγχουν την εμβρυική ανάπτυξη και κωδικοποιούν πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη του *paired domain*, ενός συντηρημένου αμινοξικού μοτίβου με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (Treisman et al., 1991; Chalepakis et al., 1991). Αρχικά, γονίδια που περιείχαν *paired box* εντοπίστηκαν στην *Drosophila melanogaster* και κατέχουν λειτουργίες κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Στα σπονδυλωτά τα *Pax* γονίδια επίσης εμπλέκονται στην εμβρυογένεση. Μεταλλάξεις σε 4 από τα 9 *Pax* γονίδια που έχουν κλωνοποιηθεί συνδέονται με εκ γενετής ασθένειες στον άνθρωπο οι οποίες σχετίζονται με ανωμαλίες κατά την ανάπτυξη. Αναλύσεις μεταλλαγμάτων (τυχαίων ή σε διαγονιδιακά ποντίκια) έδειξαν ότι τα *Pax* γονίδια είναι ρυθμιστές κλειδιά στην οργανογένεση του νεφρού, των ματιών, του αυτιού, της μύτης, του εγκεφάλου, της σπονδυλικής στήλης και των μυών του άκρου (Dahl et al., 1997).

Στον άνθρωπο και στο ποντίκι έχουν κλωνοποιηθεί εννιά *Pax* γονίδια, τα *PAX1*→9 και *Pax1*→9 αντίστοιχα και διαχωρίζονται σε τέσσερις ομάδες (Gruss and Walther, 1992; Dahl et al., 1997). Τα μέλη της κάθε ομάδας χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη συγκρότηση τριών δομικών μοτίβων: των *paired domain*, *homeodomain* και

του οκταπεπτιδίου. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν τα *Pax1* και *Pax9* που δεν έχουν το paired τύπου homeodomain. Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν τα *Pax2*, *Pax5* και *Pax8* τα οποία περιέχουν τμήμα του homeodomain που περιλαμβάνει την πρώτη του α-έλικα. Στην τρίτη ομάδα ανήκουν τα *Pax3* και *Pax7* που περιέχουν και τα τρία δομικά μοτίβα. Στην τέταρτη ομάδα ανήκουν τα *Pax4* και *Pax6* τα οποία δεν περιέχουν το οκταπεπτίδιο.

Το *Pax1* γονίδιο

Η έκφραση του *Pax1* γονιδίου ξεκινά στους νεοσχηματισμένους σωματίτες, λίγο πριν αρχίσουν να απο-επιθηλιοποιούνται, στο κοιλιακό τους τμήμα και στον μεσεγγυματικό πυρήνα τους. Μετά την αποεπιθηλιοποίηση το *Pax1* εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα του σκληροτομίου και ιδιαίτερα σε αυτά που μεταναστεύουν προς τη νωτοχορδή και σχηματίζουν το περινωτοχορδικό κάλυμμα (Wallin J. et al. 1994, Christ and Ordahl 1995). Η έκφραση του *Pax1* παραμένει ισχυρή στα κύτταρα του περινωτοχορδικού καλύμματος που αρχίζουν να συμπυκνώνονται και αργότερα θα σχηματίσουν τους μεσοσπονδύλιους δίσκους (Wallin J. et al. 1994). Η έκφραση του *Pax1* μειώνεται δραματικά καθώς το μεσέγγυμα συνεχίζει να συμπυκνώνεται για να σχηματίσει υαλώδη χόνδρο.

Έχειδειχθεί ότι η νωτοχορδή είναι απαραίτητη για την επαγωγή της έκφρασης του *Pax1* στα κύτταρα του σκληροτομίου (Koseki H. et al. 1993, Ebensperger C. et al. 1995) και το κάνει αυτό εκκρίνοντας sonic hedgehog (SHH), ένα διαχυτό παράγοντα που μεταβιβάζει σήμα επαγωγής (Fan and Tessier-Lavigne 1994; Johnson et al, 1994). Το *Pax1* δεν είναι απαραίτητο για τη μετατροπή του κοιλιακού μέρους του επιθηλιακού σωματίτη σε μεσέγγυμα και το σχηματισμό του σκληροτομίου, όμως αν τα κύτταρα του σκληροτομίου δεν εκφράζουν *Pax1* τότε δεν είναι ικανά να σχηματίσουν κοιλιακές δομές του αναπτυσσόμενου σπονδύλου (Koseki et al, 1993). Σε ποντίκια που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *Pax1* (undulated) υπάρχει βλάβη στην ανάπτυξη της σπονδυλικής στήλης, δεν σχηματίζονται ή είναι παραμορφωμένα τα σώματα των σπονδύλων, οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι και τα μέρη των πλευρών που βρίσκονται προς τη μεσαία γραμμή του σώματος (Wallin et al, 1994).

Το *Pax3* γονίδιο

Η έκφραση του *Pax3* γονιδίου εντοπίζεται και στο μη μεταμεριδιωμένο παραξονικό μεσόδερμα και στον νεοσχηματισμένο σωμίτη. Αρχικά η έκφρασή του δεν περιορίζεται κατά μήκος του νωτιαιοκοιλιακού άξονα. Όταν ο επιθηλιακός σωμίτης αποχωριστεί από το μη μεταμεριδιωμένο παραξονικό μεσόδερμα η έκφραση του *Pax3* περιορίζεται στα κύτταρα του νωτιαίου σωμίτη (αυτό συμβαίνει πριν να δημιουργηθεί σκληροτόμιο και δερμομυοτόμιο). Σε πιο ώριμους σωμίτες το *Pax3* περιορίζεται στο δερμομυοτόμιο και εκφράζεται περισσότερο στο πλευρικό (lateral) δερμομυοτόμιο από όπου ξεκινούν κύτταρα μυοβλαστών την μετανάστευσή τους προς το εκβλάστημα του άκρου. Στο άκρο η έκφραση παρατηρείται στις προ-μυϊκές μάζες στην κοιλιακή περιοχή του άκρου καθώς και στη νωτιαία (Goulding et al, 1994,1993). Πριν την παρατήρηση του προτύπου έκφρασης του *Pax3* δεν είχε βρεθεί μόριο που να εκφράζεται στα μεταναστεύοντα κύτταρα προς το εκβλάστημα του άκρου (Goulding et al, 1994; Williams and Ordahl, 1994; Rawls and Olson, 1997). Το *Pax3* εκφράζεται σε αυτούς τους πληθυσμούς πριν ακόμα εκφραστεί κάποιος μυογενετικός παράγοντας καθορισμού. Φαίνεται πως το *Pax3* είναι απαραίτητο για την μετανάστευση αυτών των κυττάρων (Dastone et al, 1996). Σε μεταλλάγματα του *Pax3* στο ποντίκι (splotch mutants) δεν παρατηρούνται μεταναστεύοντες πληθυσμοί προς το εκβλάστημα του άκρου (είτε γιατί δεν υπάρχει μετανάστευση, είτε γιατί το *Pax3* είναι ανενεργό και δεν μπορούν να παρατηρηθούν) (Bober et al, 1994). Σε αυτά τα ζώα το *Pax3* δεν εκφράζεται στο εκβλάστημα του άκρου καθόλου και απουσιάζουν εντελώς οι μύες των άκρων. Οπότε είτε δεν μεταναστεύουν κύτταρα, είτε δεν ενεργοποιούνται μυογενετικοί παράγοντες καθορισμού.

Το *Pax3* αναστέλλεται από σήματα της νωτοχορδής (Tremblay et al, 1996). *In vitro*, σε καλλιέργειες μυοβλαστών, επάγει τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την διαφοροποίησή τους (Epstein et al, 1995), ενώ σε *in vivo* πειράματα όπου το *Pax3* εκφράζεται εκτοπικά σε μια ποικιλία μη μυϊκών κυτταρικών τύπων, κάτω από ορισμένες συνθήκες, οδηγεί στην ενεργοποίηση της έκφρασης του *MyoD* και στην μυϊκή διαφοροποίηση (Maroto et al, 1997; Rawls et al, 1997).

Γ. *Mox* ΓΟΝΙΔΙΑ

Τα *Mox* γονίδια (*Mox1* και *Mox2*) είναι μια υποοικογένεια homeobox γονιδίων. Εκφράζονται σε ιστούς και όργανα μεσοδερμικής προέλευσης και ο δυναμικός τους ρόλος στην διαφοροποίηση αυτών των δομών έχει δειχθεί από γενετικές και μοριακές μελέτες σε έμβρυα θηλαστικών. Η έκφρασή τους υποδεικνύει έναν ρυθμιστικό ρόλο στον αρχικό καθορισμό του εμβρυικού μεσοδέρματος των σπονδυλωτών (Candia et al, 1992). Αν και τα ομόλογα των *Mox* γονιδίων έχουν βρεθεί σε αρκετά σπονδυλωτά (αρουραίος, *Xenopus*, άνθρωπος), λίγα είναι γνωστά για την έκφρασή τους σε οργανισμούς πέρα από το ποντίκι. Πρόσφατα κλωνοποιήθηκε το chick *Mox2* ενώ το *Mox1* δεν έχει κλωνοποιηθεί ακόμα σε αυτό τον οργανισμό.

Το *Mox1* γονίδιο

Κατά τη διάρκεια της σωμιτογένεσης το *Mox1* εκφράζεται στο πλευρικό μεσόδερμα, σε όλους τους νεοσχηματισμένους σωμίτες και στο προσωμιτικό μεσόδερμα πίσω από αυτούς (Candia et al, 1992; Candia and Wright, 1996). Καθώς ο σωμίτης ωριμάζει, η έκφραση του *Mox1* εξακολουθεί στο δερμομυοτόμιο και το σκληροτόμιο, όχι όμως και στο μυοτόμιο. Αργότερα το *Mox1* εκφράζεται σε χαλαρούς μεσεγχυματικούς ιστούς, σε θέσεις σχηματισμού οστών και παράθεσης σκελετικών μυών και συνδετικού ιστού. Στο θώρακα το *Mox1* εκφράζεται γύρω από τα σώματα των σπονδύλων, το στέρνο, τα πλευρά, την ωμοπλάτη και το βραχιόνιο οστό. Το πρότυπο της έκφρασης στο κεφάλι και τον αυχένα είναι πιο σύνθετο και συνδέεται με θέσεις μυογένεσης /ακριβέστερα, σύνδεσης μεταξύ μυών (μύες της γλώσσας, της σιαγόνας, του οφθαλμού).

Η δίοδος εκροής από την καρδιά των σπονδυλωτών αρχικά είναι ένας απλός σωλήνας που στη συνέχεια διαχωρίζεται σε αορτή και πνευμονική αρτηρία. Ο διαχωρισμός αυτός συμβαίνει με το μετασχηματισμό κυττάρων του ενδοκαρδίου από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά. Το *Mox1* εκφράζεται στα αποεπιθηλιοποιημένα κύτταρα αλλά όχι στο επιθήλιο (Candia et al, 1992; Candia and Wright, 1996).

Οι μύες που φέρουν μεταλλαγή αδρανοποίησης (knock out) του γονιδίου *Mox1* παρουσιάζουν ανωμαλίες στη σπονδυλική στήλη. Έχουν ετερόπλευρους και

ενωμένους σπονδύλους. Το πιο δραματικό εύρημα είναι ότι ο πρώτος σπόνδυλος (άτλας) είναι ενωμένος με το ινιακό οστό του κρανίου. Τα έμβρυα έχουν παραμορφωμένη σπονδυλική στήλη και ουρά και δεν καταφέρνουν να επιβιώσουν ως τη γέννηση.

Το *Mox2* γονίδιο

Κατά τη διάρκεια της σωματογένεσης το *Mox2* εκφράζεται στους σωμαίτες από την ένατη μέρα της κύησης και μετά. Εντοπίζεται στον πυρήνα των επιθηλιακών σωματιών και αργότερα καθώς ωριμάζουν στο σκληροτόμιο (Candia et al, 1992; Candia and Wright, 1996). Επιπλέον το *Mox2* εκφράζεται στα κύτταρα του πλευρικού χείλους του δερμομυοτομίου (στο ύψος των άκρων) μόλις αυτά αποεπιθηλιοποιηθούν και αρχίζουν να μεταναστεύουν προς το εκβλάστημα του άκρου (Mankoo et al, 1999). Τα κύτταρα αυτά είναι μυοβλάστες που θα αποικήσουν το εκβλάστημα του άκρου και θα συνεισφέρουν στο σχηματισμό των προμυικών μαζών στη νωτιαία καθώς και στην κοιλιακή περιοχή του. Οι μύες που φέρουν μεταλλαγή αδρανοποίησης (knock out) του γονιδίου *Mox2* δεν παρουσιάζουν θνησιμότητα ως έμβρυα (Mankoo et al, 1999). Τα άκρα τους έχουν ανώμαλη θέση (σα να βρίσκονται σε έκταση) και μειωμένη κινητικότητα. Ένα ποσοστό των εμβρύων παρουσιάζουν σχισμή στη δευτερογενή υπερώα όπου φυσιολογικά εκφράζεται το *Mox2* (Candia et al, 1992; Grigoriou et al, 1995). Επιπλέον παρατηρείται συνολική μείωση της μάζας των σκελετικών μυών των άκρων και απουσία ορισμένων μυών. Η έκφραση του *Pax3* μειώνεται καθώς οι μυοβλάστες αποεπιθηλιοποιούνται και η μείωση είναι πιο έντονη καθώς τα κύτταρα μεταναστεύουν. Δεν φαίνεται να υπάρχει ανωμαλία στη μετανάστευση των μυοβλαστών αλλά το *Mox2* πιθανώς είναι απαραίτητο για τη διατήρηση του φυσιολογικού προτύπου γονιδιακής έκφρασης των μεταναστευόντων μυοβλαστών.

Το *Mox2* ή *Gax* (για τον αρουραίο) εκφράζεται επίσης σε κύτταρα του μυοκαρδίου, όχι στην αρχή της ανάπτυξης της καρδιάς αλλά όταν ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων του μυοκαρδίου έχει αρχίσει να μειώνεται (Fisher et al, 1997). Υπερεκφράζοντας το *Gax* σε καρδιές εμβρύων όρνιθας πρωιμότερα από τη φυσιολογική του έκφραση μειώθηκε δραματικά ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων του μυοκαρδίου και σχηματίστηκαν καρδιές με μη-φυσιολογική μορφολογία (μικρές κοιλίες και άλλες παραμορφώσεις) (Fisher et al, 1997). Επιπλέον έχειδειχθεί ότι η έκφραση του *Gax* μειώνεται (σε μεταγραφικό επίπεδο) όταν τα λεία μυικά κύτταρα

των αγγείων μεταπίπτουν από τη G0 στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου (Gorski et al, 1993). Τα παραπάνω υποδεικνύουν ένα πιθανό ρόλο του *Mox2* ή *Gax* στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τουλάχιστον στους κυτταρικούς τύπους που έχει μελετηθεί (κύτταρα της κοιλότητας του μυοκαρδίου και λεία μυικά).

Οι σειρές των μυών που φέρουν μεταλλαγές αδρανοποίησης και για τα δύο *Mox* γονίδια δεν έχουν αξονικό σκελετό. Έχουν μερικές υποτυπώδεις λωρίδες χόνδρου με μεταμερική διάταξη, αλλά καθόλου πλευρά και σπονδύλους. Επίσης παρουσιάζουν δραματική έλλειψη σκελετικών μυών στο θώρακα και στα άκρα. Οι σωμίτες τους είναι εντελώς ανώμαλοι. Δεν είναι επιθηλιακοί και τα όρια τους είναι ελαττωματικά. Ο προσθιοπίσθιος καθορισμός του κοιλιακού σωμίτη έχει επίσης επηρεαστεί με αποτέλεσμα τα DRG's (Dorsal Root Ganglia) να μη διαφοροποιούνται σωστά, να είναι "συντηγμένα" και οι κινητικοί νευρώνες εξέρχονται από το νωτιαίο μυελό με τυχαίο τρόπο. Επιπλέον δε σχηματίζεται δερμομυοτόμιο. Η ανάλυση με ανιχνευτές (markers) της διαφοροποίησης του σωμίτη έδειξε τα εξής: το *Pax1* γονίδιο δεν εκφράζεται καθόλου, ενώ έχει μειωθεί η έκφραση των *Pax9*, *Pax3*, *Pax7*. Πιθανώς η μείωση της έκφρασης αυτών των *Pax* (απουσία στην περίπτωση του *Pax1*) οφείλεται στη δραματική αλλοίωση της μορφολογίας του σωμίτη και όχι στην άμεση ρύθμιση της μεταγραφής των *Pax* από τα *Mox*.

Οι πληροφορίες για το *Mox1* και για το διπλό (*Mox1*^{-/-};*Mox2*^{-/-}) knock out προέρχονται από προσωπική επικοινωνία με τον Dr. Baljinder Mankoo.

Δ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΒΡΙΔΙΩΝ

Οι περιοχές έκφρασης των γονιδίων *Mox1* και *Mox2* παρουσιάζουν εκτενή επικάλυψη με τις περιοχές που εκφράζονται τα *Pax1* και *Pax3*. Ειδικότερα, το *Mox1* εκφράζεται σε ολόκληρο τον σωμίτη, το *Mox2* στο σκληροτόμιο και στους πρόδρομους μυοβλάστες του άκρου, το *Pax1* στο σκληροτόμιο και το *Pax3* στο δερμομυοτόμιο και στους πρόδρομους μυοβλάστες του άκρου (η διαμερισματοποίηση του σωμίτη φαίνεται στο σχήμα1-II και 1-III). Επιπλέον οι φαινότυποι μυών που φέρουν μεταλλαγές αδρανοποίησης των *Mox1*, *Pax1* καθώς και

του διπλού μεταλλάγματος *Mox1*^{-/-};*Mox2*^{-/-} δείχνουν ότι τα γονίδια αυτά παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του αξονικού σκελετού. Μάλιστα έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι τα *Mox2*^{-/-} δεν εμφανίζουν ανωμαλία στον αξονικό σκελετό εξαιτίας της συμπλήρωσης της λειτουργίας του *Mox2* από το *Mox1*. Εξάλλου η έκφραση του *Mox2* στο σκληροτόμιο υποδεικνύει ένα πιθανό ρόλο του στην ανάπτυξη του αξονικού σκελετού. Ακόμα τα *Mox* και ιδιαίτερα το *Mox2* φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στη μυογένεση, όπως και το *Pax3*. Θεωρήθηκε λοιπόν ότι τα *Pax1* και *Pax3* πιθανώς συνεργάζονται με τα *Mox1* και *Mox2* για να επιτελέσουν το βιολογικό τους ρόλο και ίσως αυτή η συνεργασία να γίνεται μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

Η υπόθεση αυτή αρχικά ελέγχθηκε με το σύστημα των δυο υβριδίων στο σακχαρομύκητα. Χρησιμοποιήθηκε όλη η αλληλουχία του *Pax3* συγκολλημένη με την DNA δεσμευόμενη περιοχή του μεταγραφικού παράγοντα της ζύμης *Gal4*. Για το *Pax1* χρησιμοποιήθηκε ένα μεγάλο μέρος της κωδικής του αλληλουχίας που όμως δεν περιέχει την αμινοτελική του περιοχή, αλλά περιέχει από την τρίτη έλικα της paired domain και την υπόλοιπη αλληλουχία ως το καρβοξυτελικό άκρο. Το *Pax1* ήταν επίσης συγκολλημένο με *Gal4*. Ολόκληρες οι *Mox1* και *Mox2* αλληλουχίες και ελλείψεις τους (Εικόνα 1) χρησιμοποιήθηκαν συγκολλημένες με την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης του βακτηριακού παράγοντα *VP16*.

Τα αποτελέσματα (Εικόνες 2.1 & 2.2) είναι τα εξής:

Η *Pax1* φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με τη *Mox1* και λιγότερο ή καθόλου με τη *Mox2*. Η αλληλεπίδραση εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό ήμισυ όπου βρίσκεται η homeodomain.

Η *Pax3* φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με τη *Mox2* και λιγότερο ή καθόλου με τη *Mox1*. Εδώ η αλληλεπίδραση επίσης εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό ήμισυ του *Mox2* όπου βρίσκεται η homeodomain.

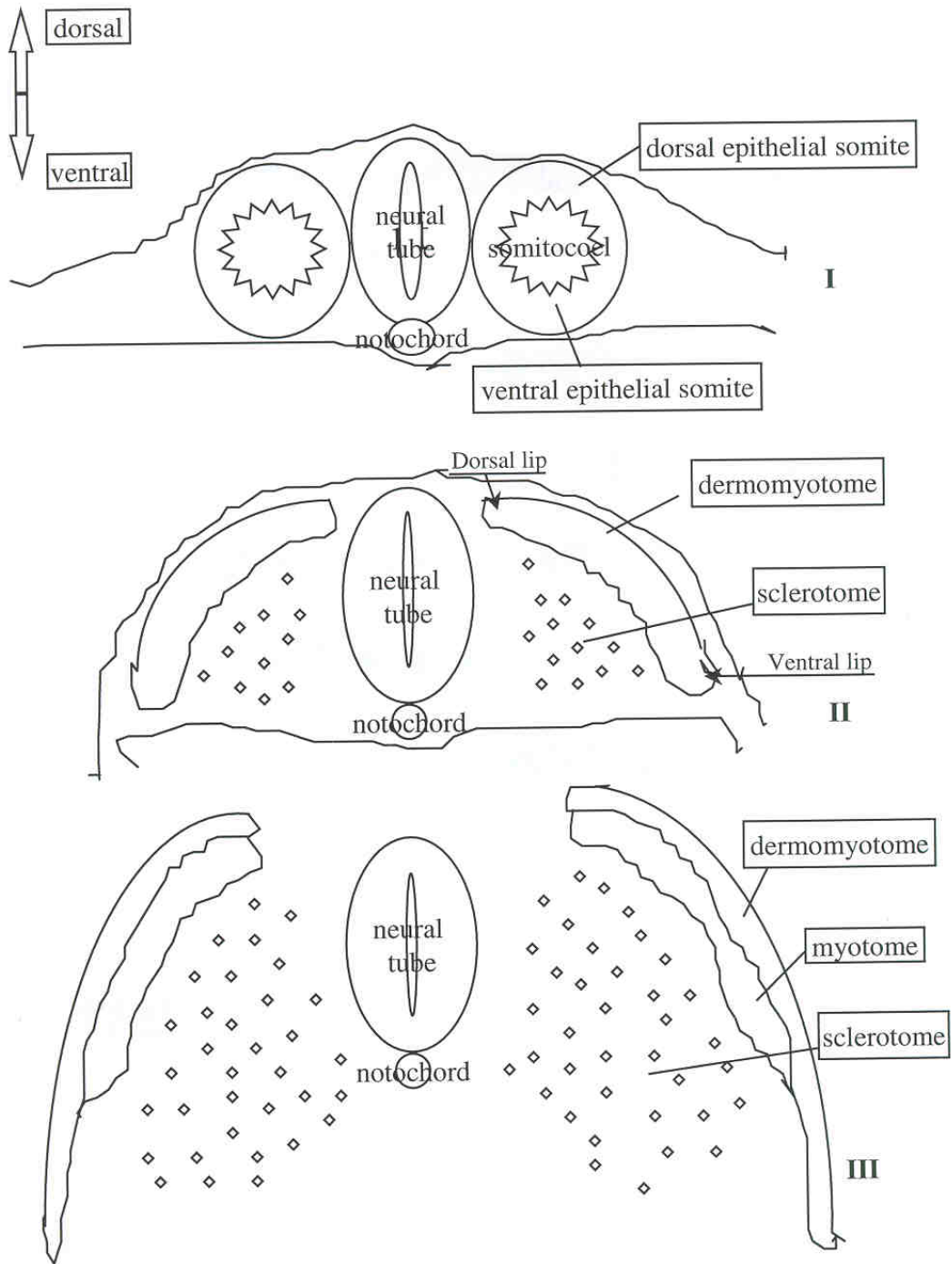
Τη δοκιμή των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με το σύστημα των δύο υβριδίων έκανε η Μαρία Χριστίνα Καστρινάκη.

E. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

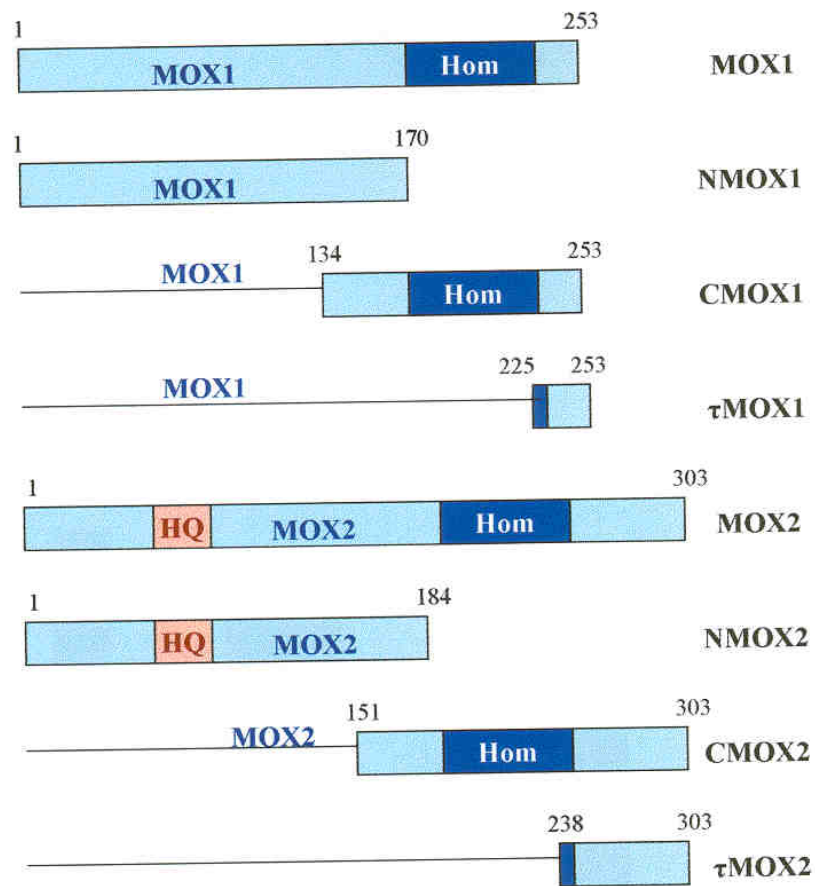
Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να επιβεβαιωθούν ή όχι τα αποτελέσματα του συστήματος των δύο υβριδίων. Δοκιμάσαμε δυο πειραματικές προσεγγίσεις:

A) Συνανοσοκατακρήμνιση των πρωτεϊνών από εκχυλίσματα όπου υπερεκφράζονται, με χρήση epitope tagged πρωτεϊνών και συγκεκριμένα myc tagged Mox1 & Mox2, his tagged Pax1 & Pax3. Στην πορεία λόγω τεχνικών προβλημάτων αλλάξαμε το σχεδιασμό του πειράματος και χρησιμοποιήσαμε Flag tagged Pax1 & Pax3.

B) *In vitro* αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών ως εξής: παραγωγή σε βακτήρια των Mox1 & Mox2 πρωτεϊνών και ελλείψεών τους συγκολλημένων με τη βακτηριακή πρωτεΐνη GST (Glutathione-S-Transferase). Στη συνέχεια δοκιμή της αλληλεπίδρασής τους με τις Pax1 & Pax3 που έχουν παραχθεί *in vitro* και σημανθεί με ^{35}S μεθειονίνη.



Σχήμα1: σχηματική απεικόνιση σωματίων διαφόρων σταδίων ωρίμανσης
 I: επιθηλιακός σωματίτης, II: έχουν σχηματιστεί δερμομυοτόμιο και σκληροτόμιο, III: πιο ώριμος σωματίτης από του σχήματοςII έχει σχηματιστεί και το μυοτόμιο.

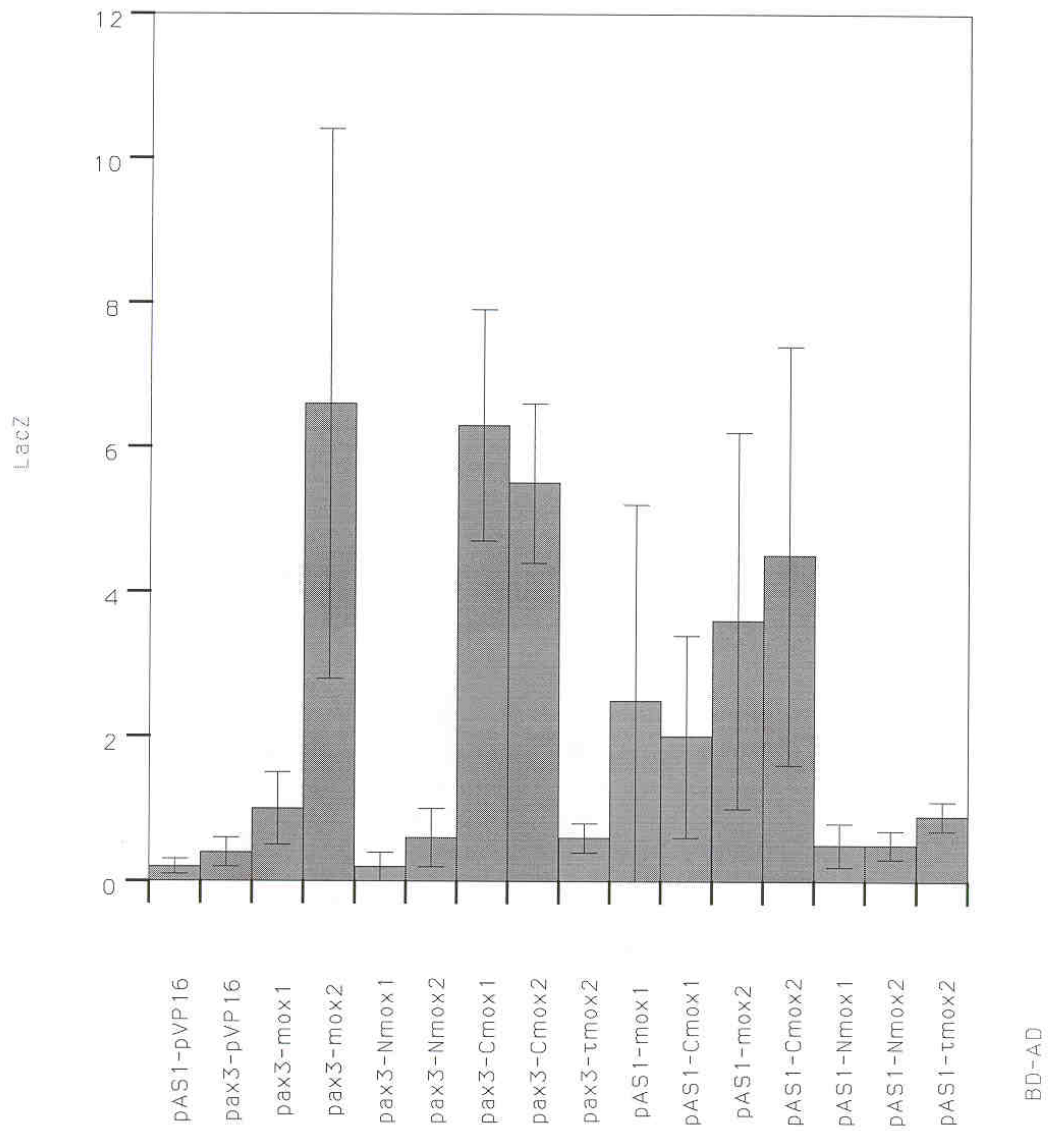


Hom : Homeodomain

HQ : Polyhistidine/polyglutamine stretch

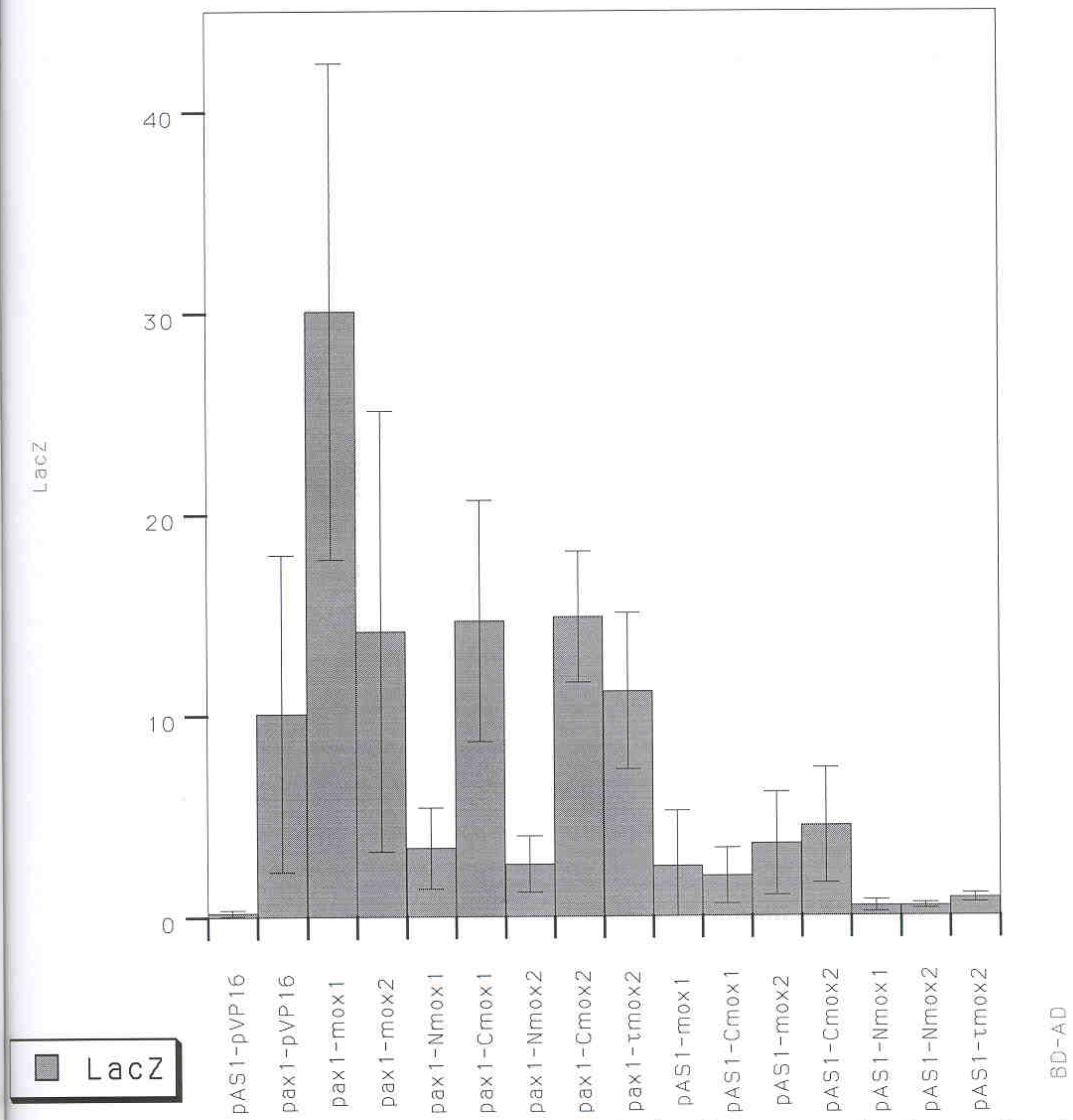
Εικόνα 1: Οι Mox1, Mox2 πρωτεΐνες και οι ελλείψεις τους που χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημα των δυο υβριδίων “συντηγμένες” στο αμινοτελικό τους άκρο με VP16. Η αρίθμηση αναφέρεται στα αμινοξέα των Mox πρωτεϊνών.

Pax3



Εικόνα 2.2: Τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης του Pax3 με τα Mox1, Mox2 και τις ελλείψεις τους.

Pax1



Εικόνα 2.1: Τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης του Pax1 με τα Mox1, Mox2 και τις ελλείψεις τους.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΥΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν τα προμηθευτήκαμε από τις εταιρίες: SIGMA, MERCK, PROMEGA, NEW ENGLAND BIOLABS, UBI, BOEHRINGER MANNHEIM, BRL, BIORAD, PHARMACIA-AMERSHAM, SANTA CRUZ, STRATAGENE, QIAGEN.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν παρασκευής NEW ENGLAND BIOLABS, CLONTECH, BOEHRINGER MANNHEIM, MINOTECH.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών SIGMA, SANTA CRUZ, JACKSON, AMERSHAM, BOEHRINGER MANNHEIM.

Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μικροχημείας του IMBB-FORTH.

Η ραδιοσημασμένη [S^{35}] μεθειονίνη που χρησιμοποιήθηκε για την *in vitro* σήμανση πρωτεϊνών ήταν παραγωγής AMERSHAM.

Τα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας (LB, 2xYT) για τα βακτηριακά στελέχη παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται από τους Shambrook et al. Τόσο στη στερεά όσο και στην υγρή μορφή τους. Ανάλογα με την κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των βακτηρίων, έγινε και η προσθήκη σε κατάλληλες συγκεντρώσεις των απαιτούμενων αντιβιοτικών (αμπικιλίνη, τετρακυκλίνη).

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν E.coli (DH5α, X11Blue) για τις κλωνοποιήσεις ενώ για την έκφραση πρωτεϊνών μόνο τα DH5α.

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια της ευκαρυωτικής κυτταρικής σειράς ήταν DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) παραγωγής GIBCO εμπλουτισμένο με απενεργοποιημένο ορό εμβρύου βοός (FCS: fetal calf serum) σε περιεκτικότητα 10% και με αντιβιοτικά (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη).

Η ευκαρυωτική σειρά που χρησιμοποιήθηκε ήταν η COS1. Προέρχεται από νεφρικά κύτταρα πιθήκου μετασχηματισμένα από SV40.

B. ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

- Σε μικρή κλίμακα

Ακολουθήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης όπως περιγράφεται από τους Shambrook et al. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώνεται με αυτή τη μέθοδο επιτρέπει, λόγω της υψηλής του καθαρότητας, την περαιτέρω μελέτη του με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων και την ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας.

- Σε μεγάλη κλίμακα

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη ποσότητα και υψηλής καθαρότητας χρησιμοποιήσαμε δύο μεθόδους:

- ♦ την αλκαλική λύση των βακτηρίων και στη συνέχεια υπερφωγοκέντρηση σε διαβάθμιση χλωριούχου καισίου όπως περιγράφεται από τους Shambrook et al.

- ♦ την απομόνωση με το plasmid midiprep σύστημα της Biorad, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΚΟΜΜΑΤΙΩΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Χρησιμοποιήθηκαν δυο μέθοδοι:

- ♦ ηλεκτροέκλυση μέσα σε μεμβράνη διαπίδυσης σύμφωνα με τους Shambrook et al.

- ♦ απομόνωση με κολώνα Sephadex G10 σύμφωνα με τους Wang & Rossman 1994, Nucleic Acids Research Vol.22 No.14 2862-2863

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Χρησιμοποιήθηκαν είτε Taq DNA polymerase της Qiagen, είτε το Expand High Fidelity PCR system της Boehringer Mannheim σύμφωνα με τις οδηγίες των εταιριών.

ΧΡΗΣΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ENZYMΩΝ

(φωσφατάση, λυγάσες, πολυμεράσες και περιοριστικές ενδονουκλεάσες)

Η χρήση των παραπάνω ενζύμων έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (NEW ENGLAND BIOLABS, PROMEGA, GIBCO, CLONTECH, USB, PHARMACIA, MINOTECH) παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος και στη θερμοκρασία και χρονική διάρκεια που προβλέπεται για το καθένα.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ

Χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση ως μήτρες οι αντίστοιχες κατασκευές που περιείχαν την προς εξέταση αλληλουχία και οι αντιδράσεις τερματισμού της επιμήκυνσης της αλυσίδας έγιναν παρουσία α^[35S] dATP, κατάλληλων εκκινητών (primers), διδεοξυ-νουκλεοτιδίων (A,C,T,G) και του ενζύμου sequenase. Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες των κατασκευαστών (USB: sequenase TM kit, version 2).

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας ορισμένων από τις κατασκευές έγινε από την ομάδα του Slava Bolshakov στο IMBB.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΙΚΑΝΩΝ ΝΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΖΟΝΤΑΙ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥΣ

Ο μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων έγινε με τη μέθοδο LB-PEG.

Η μέθοδος αυτή δίνει συχνότητα μετασχηματισμού κυττάρων μεγαλύτερη από 1×10^7 και περιλαμβάνει σε συντομία τα παρακάτω βήματα :

1)Μεταφορά μιάς βακτηριακής αποικίας E.coli από ένα φρέσκο 2xYT-άγαρ τρυβλίο σε υγρή καλλιέργεια μικρού όγκου (2-3ml) και επώαση O/N στους 37°C.

2)Εμβολιασμός 250 ml 2xYT με 2,5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια. Επώαση έως ότου η οπτική πυκνότητα των κυττάρων στα 600 nm να φτάσει 0,7.

3)Τοποθέτηση στον πάγο για 10 λεπτά.

4)Φυγοκέντρηση των κυττάρων στους 4°C, στις 5000 rpm, για 15 λεπτά.

5)Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 2,5 ml κρύο 2xYT

6)Προσθέτουμε 12,5 ml διάλυμα LB-PEG.

Διάλυμα LB-PEG

Γλυκερόλη	36 ml
PEG 8000	12 g
1 M MgSO ₄	1,2 ml
LB θρεπτικό	μέχρι 100 ml

7)Ανακατεύουμε καλά, αλλά όχι απότομα.

8)Μοιράζουμε τα βακτήρια σε μικρές ποσότητες και τα φυλάμε στους -80 °C.

9)Ξεπαγώνουμε τα βακτήρια (όσα δε χρησιμοποιηθούν αμέσως).

10)Αμέσως αναμιγνύουμε 90 μl βακτήρια με 5-10 μl DNA από την ligation ή με μικρή ποσότητα πλασμιδίου.

11)Αφήνουμε στον πάγο για 15 λεπτα.

12)Μεταφέρουμε τα βακτήρια στους 42 °C για 1 λεπτό και μετά ξανά στον πάγο για 5 λεπτα.

13)Προσθέτουμε 900 μl 2x YT και επωάζουμε στους 37 °C για 1 ώρα.

14)Απλώνουμε τα βακτήρια σε τρυβλία 2xYT.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΟΛΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

(whole cell extract) ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αφαιρούμε το θρεπτικό μέσο από τα πιάτα καλλιέργειας και πλένουμε τα κύτταρα δύο φορές με 1xPBS. Προσθέτουμε διάλυμα λύσης (5mM Tris-HCl pH7,2 , 5mM EGTA, 2% NP-40, 1mMPMSF, 2μg/ml Leupeptin, 2μg/ml Aprotinin) και επωάζουμε στον πάγο για 30 min. Συλλέγουμε τα κύτταρα με τη βοήθεια ειδικής

σπάτουλας (cell scraper) και τα συνθλίβουμε με τη βοήθεια μικρού πλαστικού ομογενοποιητή κατάλληλου για 1,5 ml πλαστικά σωληνάρια (eppendorf tubes). Επωάζουμε για 30 min στον πάγο. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 15.000rpm, στους 4°C για 30 min. Κρατάμε το υπερκείμενο και υπολογίζουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο εκχύλισμα με Biorad Protein Assay (Bradford). Στη συνέχεια προσθέτουμε ¼ του όγκου του εκχυλίσματος 4x sample buffer το φυλάμε στους μείον 80°C.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΑΝΟ- ΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

Αφαιρούμε το θρεπτικό μέσο από τα πιάτα καλλιέργειας και πλένουμε τα κύτταρα τρεις φορές με 1xPBS. Συλλέγουμε τα κύτταρα με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας (cell scraper) και φυγοκεντρούμε στις 1000rpm για πέντε λεπτά.. Επαναδιαλύουμε τις πελέτες σε 5x όγκους bufferA (25mM Hepes pH 7,9 , 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,1% NP-40, 1mM DTT, 0,5mM PMSF, 10μg/ml Aprotinin) και τοποθετούμε για 10 λεπτά στον πάγο. Ομογενοποιούμε σε γυάλινο ομογενοποιητή (dounce) και φυγοκεντρούμε στις 2000rpm για 5 λεπτά..Επαναδιαλύουμε τις πελέτες σε 50μl BufferA. Μετρούμε τον όγκο και προσθέτουμε ίσο όγκο NLB-800 (25mM Hepes pH 7,9, 0,8M KCl, 0,2mM EDTA, 0,1% NP-40, 10% glycerol, 1mM DTT, 0,5mM PMSF, 10μg/ml Aprotinin, 10mM NaF). Αναδεύουμε για 30 λεπτά.,στους 4°C. Φυγοκεντρούμε στις 14.000rpm για 30min. Αφαιρούμε το υπερκείμενο, μετρούμε τον όγκο του και προσθέτουμε 3x όγκους Extract Dilution Buffer (25mM Hepes pH 7,9, 2mM EDTA, 0,1% NP-40, 1mM DTT, 0,5mM PMSF, 10μg/ml Aprotinin, 10mM NaF). Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο εκχύλισμα με Biorad Protein Assay (Bradford). Προσθέτουμε 40μl Protein A Sepharose (πραγματικό όγκο κολώνας, χωρίς το υγρό) εξισορροπημένης με Wash Buffer (1 όγκος NLB-800 και 7 όγκοι Extract Dilution Buffer). Αναδεύουμε για 30min στους 4°C. Φυγοκεντρούμε στις 14.000rpm για 2min και κρατάμε 4% του όγκου του εκχυλίσματος για το western. Στο υπόλοιπο εκχύλισμα προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα αντισώματος και αναδεύουμε για 30min στους 4°C. Προσθέτουμε 40μl Protein A Sepharose και αναδεύουμε στους 4°C για 5 ή 6 ώρες. Φυγοκεντρούμε στις 5.000rpm για 3min. Πλένουμε τα beads με 1ml Wash Buffer και

δεκάλεπτη ανάδευση. Επαναλαμβάνουμε 4 φορές. Τέλος φυγοκεντρούμε στις 14.000rpm για 3min, προσθέτουμε στα beads 40μl 2x sample buffer, θερμαίνουμε στους 100°C για 4min και φυλάμε στους -20°C.

IN VITRO ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Η έκφραση των πρωτεϊνών Mox1, Mox2 και των μεταλλαγμάτων τους από φορείς έκφρασης GST (pGEX-4T-1, pGEX-4T-2) έγινε σε βακτήρια DH5α, όπως περιγράφεται από τους Smith & Johnson, 1988. Οι πρωτεΐνες Pax1, Pax3 και Mox2 από τις αντίστοιχες κατασκευές σε pcDNA3 (INVITROGEN), παράχθηκαν και ραδιοσημάνθηκαν από το σύστημα TNT της Promega σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Πρωτεΐνη συγκολλημένη σε GST, προσδέθηκε κάθε φορά σε κολώνα Glutathione-Sepharose (Pharmacia), η οποία είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με 0,1% Triton, 1mM PMSF, 1xPBS. Στη συνέχεια κάθε κολώνα ξεπλύθηκε τρεις φορές με PBS και μια φορά με wash buffer (150mM KCl, 20mM Hepes pH7,9, 5mM MgCl₂, 0,1% NP-40, 1mM PMSF, 1mM DTT). Κατόπιν προστέθηκε στην κολώνα interaction buffer (150mM KCl, 20mM Hepes pH7,9, 5mM MgCl₂, 0,1% NP-40, 0,2% BSA, 1mM PMSF, 1mM DTT, 2μg/ml Leupeptin, 2μg/ml Aprotinin) και ακολούθησε η αντίδραση αλληλεπίδρασης στους 4°C για 5 ώρες υπό συνεχή ανακίνηση. Μετά από εκτεταμένο ξέπλυμα της κολώνας με το διάλυμα έκπλυσης (wash buffer) την επαναδιαλύουμε σε 20μl SDS loading buffer και αναλύσαμε τα δείγματα σε SDS πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η κυτταρική σειρά Cos1 αναπτύχθηκε σε DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) με περιεκτικότητα σε ορό 10%. Η διαδικασία της παροδικής διαμόλυνσης πραγματοποιήθηκε κάθε φορά σε κύτταρα που είχαν καλύψει το 50-70% του πιάτου καλλιέργειας.

Ακολουθήσαμε δύο μεθόδους παροδικής διαμόλυνσης:

◆ Όταν σκοπός της παροδικής διαμόλυνσης ήταν η απομόνωση ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων ή πυρηνικών εκχυλισμάτων διαμολύναμε τα κύτταρα με τη μέθοδο της συνκατακρήμνισης νουκλεϊκών οξέων με φωσφορικό ασβέστιο όπως περιγράφεται από τους Graham et al, 1973

◆ Όταν ο σκοπός της παροδικής διαμόλυνσης ήταν ο ανοσοεντοπισμός πρωτεϊνών *in situ* ή σε ορισμένες περιπτώσεις η απομόνωση ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων ακολουθήθηκε η μέθοδος της διαμόλυνσης με το σύστημα FugeneTM 6 Transfection Reagent (BOEHRINGER MANNHEIM).

ΕΜΜΕΣΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Τα κύτταρα που προορίζονται για ανοσοφθορισμό απλώνονται σε πιάτο καλλιέργειας που περιέχει καλυπτρίδα καλυμμένη με διάλυμα ζελατίνης 0,1%. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται η παροδική διαμόλυνση. Μετά από 12 ώρες αλλάζουμε το θρεπτικό μέσο και 24 με 48 ώρες μετά την αλλαγή του θρεπτικού ξεπλένουμε τις καλυπτρίδες με 1xPBS. Μονιμοποιούμε τα κύτταρα με 4% παραφορμαλδεϋδη για 7min, ξεπλένουμε δύο φορές με 1xPBS και προσθέτουμε 0,1% Triton για 10-15min. Επωάζουμε με το πρώτο αντίσωμα (στην κατάλληλη αραιώση σε 0,1% Triton, 0,1% BSA, 1xPBS) για μια ώρα , σε θερμοκρασία δωματίου. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνεται με τρεις διαδοχικές πεντάλεπτες πλύσεις με 1xPBS και ακολουθεί η επώαση με 1/300 αραιώση του fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse δεύτερου αντισώματος για μια ώρα , σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ξεπλένουμε τις καλυπτρίδες τρεις φορές με 1xPBS και τις τοποθετούμε ανεστραμένες πάνω σε αντικειμενοφόρο, πάνω σε μια σταγόνα Mowiol.

Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε είτε σε μικροσκόπιο εφοδιασμένο με φωτογραφική μηχανή για τη φωτογράφιση δειγμάτων φθορισμού, είτε σε μικροσκόπιο συνεστίασης (confocal).

ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ MEMBRANE ΚΑΙ ΑΝΟΣΟ-ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΟΥΣ (ΑΝΑΛΥΣΗ WESTERN)

Τρέχουμε τα δείγματα σε SDS PAGE gel πυκνότητας 12% και στη συνέχεια αναλύουμε όπως περιγράφεται από τους Dodd et al, 1988 και Karagozeos et al, 1991, εκτός από τη μέθοδο ECL (Amersham) που χρησιμοποιήθηκε για την εμφάνιση των μπαντών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΡΟΣ Α: Μελέτη της αλληλεπίδρασης των *Mox1-Pax1* και *Mox2-Pax3* σε παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα .

Η πρώτη προσέγγιση για να επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών *Mox1-Pax1* και *Mox2-Pax3*, μετά το yeast two hybrid σύστημα, έγινε από τη Μαρία Χριστίνα Καστρινάκη (όπως και το yeast two hybrid) και ήταν η συνανοσοκατακρήμνισή τους από πυρηνικά εκχυλίσματα εμβρύων μύος. Η απόπειρα αυτή δεν είχε επιτυχία και πιθανώς οφείλεται στην μικρή ποσότητα των εξεταζόμενων πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα.

Εξαιτίας αυτού αλλά και της περιορισμένης ποσότητας διαθέσιμων anti-*Mox1*, anti-*Mox2*, anti-*Pax1*, anti-*Pax3* αντισωμάτων η πειραματική προσέγγιση άλλαξε ως εξής. Οι πρωτεΐνες “σημάνθηκαν” με επίτοπους που αναγνωρίζονται από αντισώματα διαθέσιμα στο εμπόριο. Ειδικότερα, οι *Mox1* και *Mox2* με τον myc επίτοπο, οι *Pax1* και *Pax3* με αλληλουχία έξι ιστιδινών (his). Λόγω τεχνικών προβλημάτων που περιγράφονται παρακάτω με τις his*Pax1* και his*Pax3* τελικά “σημάναμε” τις *Pax1* και *Pax3* με το συνθετικό επίτοπο Flag.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΙΣ ΕΡΙΤΟΠΕ TAGGED ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

MYCMOX1: Με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σχηματίστηκαν δίκλιωνα μόρια DNA που περιέχουν την κωδική αλληλουχία του *Mox1*. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές περιέχουν αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες ώστε τα άκρα του προϊόντος της PCR να μπορούν να αποκοπούν. Ο Forward περιέχει θέση αναγνώρισης από την *EcoRI*, ενώ ο Reverse περιέχει θέση αναγνώρισης από την *XhoI*. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το cDNA του *Mox1* κλωνοποιημένο σε pBluescript (Stratagene). Η *Mox1* αλληλουχία κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *EcoRI* και *XhoI* του ευκαρυωτικού

φορέα έκφρασης pcDNA1.1, ο οποίος περιέχει έξι επαναλήψεις της αλληλουχίας του myc επίτοπου μεταξύ των θέσεων *BamHI* και *EcoRI*.

MYCMOX2: Με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σχηματίστηκαν δίκλινα μόρια DNA που κωδικοποιούν τον επίτοπο myc. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές περιέχουν αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες ώστε τα άκρα του προϊόντος της PCR να μπορούν να αποκοπούν. Ο Forward περιέχει θέση αναγνώρισης από την *HindIII*, ενώ ο Reverse περιέχει θέση αναγνώρισης από την *EcoRI*. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pcDNA3 (invitrogen) στον polylinker του οποίου έχουν προστεθεί τρεις επαναλήψεις του myc επίτοπου. Η myc αλληλουχία κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *HindIII* και *EcoRI* του ευκαρυωτικού φορέα έκφρασης pcDNA3, στον οποίο είναι κλωνοποιημένη η κωδική αλληλουχία του *Mox2* στη θέση *EcoRV*.

Το αποτέλεσμα των δυο κλωνοποιήσεων που περιγράφονται παραπάνω είναι ότι στο αμινοτελικό άκρο των *Mox1* και *Mox2* έχουν προστεθεί από έξι και τρεις επαναλήψεις αντίστοιχα του myc επίτοπου, ώστε οι παραγώμενες πρωτεΐνες να αναγνωρίζονται από a-myc αντίσωμα .

HISPAX1: Την κατασκευή αυτή μας πρόσφερε ο συνεργάτης μας Dr. Baljinder Mankoo. Στο HISPAX1 η αλληλουχία των έξι ιστιδινών έχει “συγκολληθεί” στο καρβοξυτελικό άκρο της *Pax1* και ο φορέας της κατασκευής είναι ο pcDNA3.

HISPAX3: Με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σχηματίστηκαν δίκλινα μόρια DNA που περιέχουν την κωδική αλληλουχία του *Pax3*. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές περιέχουν αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες ώστε τα άκρα του προϊόντος της PCR να μπορούν να αποκοπούν. Ο Forward περιέχει θέση αναγνώρισης από την *BamHI*, ενώ ο Reverse περιέχει θέση αναγνώρισης από την *XhoI*. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε η κωδική αλληλουχία του *Pax3* κλωνοποιημένη στον φορέα έκφρασης pcDNA3, στη θέση *EcoRV*. Η *Pax3* αλληλουχία κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *BamHI* και *XhoI* του ευκαρυωτικού φορέα έκφρασης pcDNA3 HisC, ο οποίος περιέχει στην 5' πλευρά της *BamHI* έξι κωδικόνια ιστιδίνης.

Το αποτέλεσμα της κλωνοποίησης αυτής είναι η προσθήκη στο αμινοτελικό άκρο της Pax3 μιας αλληλουχίας από έξι ιστιδίνες, ώστε η παραγόμενη πρωτεΐνη να αναγνωρίζεται από το a-his αντίσωμα.

FLAGPAX1: Με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σχηματίστηκαν δίκλιωνα μόρια DNA που περιέχουν την κωδική αλληλουχία του Pax1. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές περιέχουν αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες ώστε τα άκρα του προϊόντος της PCR να μπορούν να αποκοπούν. Ο Forward περιέχει θέση αναγνώρισης από την *EcoRI*, ενώ ο Reverse περιέχει θέση αναγνώρισης από την *XbaI*. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε η κωδική αλληλουχία του Pax1 (με τα έξι κωδικώνια ιστιδίνης) κλωνοποιημένη στον φορέα έκφρασης pcDNA3, στη θέση *EcoRV*. Η Pax1 αλληλουχία κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *EcoRI* και *NheI* του ευκαρυωτικού φορέα έκφρασης pCMX-Flag, ο οποίος περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί για τον Flag επίτοπο μεταξύ των θέσεων *NcoI* και *HindIII* του polylinker του.

FLAGPAX3: Με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σχηματίστηκαν δίκλιωνα μόρια DNA που περιέχουν την κωδική αλληλουχία του Pax3. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές περιέχουν αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες ώστε τα άκρα του προϊόντος της PCR να μπορούν να αποκοπούν. Ο Forward περιέχει θέση αναγνώρισης από την *EcoRI*, ενώ ο Reverse περιέχει θέση αναγνώρισης από την *NheI*. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε η κωδική αλληλουχία του Pax3 κλωνοποιημένη στον φορέα έκφρασης pcDNA3, στη θέση *EcoRV*. Η Pax3 αλληλουχία κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *EcoRI* και *NheI* του ευκαρυωτικού φορέα έκφρασης pCMX-Flag, ο οποίος περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί για τον Flag επίτοπο μεταξύ των θέσεων *NcoI* και *HindIII* του polylinker του.

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

COS1 κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με τις κατασκευές που περιγράφονται παραπάνω και μια ή δυο μέρες μετά πραγματοποιούμε έμμεσο ανοσοφθορισμό. Οι mycMox1, mycMox2, hisPax3, FlagPax1, FlagPax3 πρωτεΐνες

εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων (Εικόνα 3). Ειδικά η mycMox2 και εντονότερα η FlagPax1 παρουσιάζουν έντονα κοκκώδη κατανομή στον πυρήνα (όχι σε όλα τα κύτταρα). Τη hisPax1 δεν καταφέραμε να την ανιχνεύσουμε με ανοσοφθορισμό.

ΣΥΝΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΚΑΙ WESTERN ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Αρχικά δουλέψαμε με τις mycMox1, mycMox2, hisPax1 και hisPax3 πρωτεΐνες. Με ηλεκτροφόρηση και ανάλυση western ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων από παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα ανιχνεύσαμε τις mycMox1, mycMox2, hisPax3. Τη hisPax1 δεν καταφέραμε να την ανιχνεύσουμε. Προχωρήσαμε λοιπόν με το ένα ζευγάρι μορίων (mycMox2, hisPax3) σε παροδική διαμόλυνση κυττάρων και με τα δύο ταυτοχρόνως και ανοσοκατακρήμνιση στο ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα με μονοκλωνικό anti-his αντίσωμα. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση και ανάλυση western των πρωτεϊνών που κατακρημνίστηκαν. Δυστυχώς διαπιστώσαμε ότι οι mycMox2 και hisPax3 (κυρίως η δεύτερη) μεταναστεύουν με τέτοιο τρόπο στο gel ώστε βρίσκονται πολύ κοντά οι μπάντες τους με αυτή της βαριάς αλυσίδας του IgG. Τα πρώτα αντισώματα στο western είναι anti-myc και anti-his μονοκλωνικά, ενώ το δεύτερο αντίσωμα anti-mouse peroxidase. Το αποτέλεσμα είναι ότι τα σήματα από τις πρωτεΐνες, αν έχουν κατακρημνιστεί, καλύπτονται από αυτό του IgG και δεν είναι δυνατό να ανιχνευθούν.

Εξαιτίας α) των πολύ κοντινών μοριακών βαρών των hisPax3 και IgG, β) του γεγονότος ότι δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε τη hisPax1 (αν και η αλληλουχία ελέγχθηκε με sequencing και είναι σωστή) και γ) της ύπαρξης αλληλουχίας πολυϊστιδίνης στη Mox2 πρωτεΐνη, η οποία είναι δυνατό να προκαλέσει κατακρήμνιση της πρωτεΐνης που δεν οφείλεται στην αλληλεπίδρασή της με την Pax3 (αν και δεν αναγνωρίζεται από το anti-his αντίσωμα ούτε σε ανοσοφθορισμό, ούτε σε western) αποφασίσαμε να αλλάξουμε το σχεδιασμό του πειράματος ως εξής: Χρησιμοποιήσαμε άλλο επίτοπο για να σημάνουμε τις Pax1 και Pax3 και συγκεκριμένα τον συνθετικό επίτοπο Flag. Επίσης χρησιμοποιήσαμε πολυκλωνικό anti-myc αντίσωμα για την ανοσοκατακρήμνιση

Αρχικά ανιχνεύσαμε τις FlagPax1 και FlagPax3 με ανοσοφθορισμό και με western σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα. Κατόπιν πραγματοποιήσαμε ταυτόχρονη παροδική διαμόλυνση σε κύτταρα με MYCMOX1 και FLAGPAX1 καθώς και με MYCMOX2 και FLAGPAX3. Παρασκευάσαμε πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα διαμολυσμένα κύτταρα και ακολούθησε ανοσοκατακρήμιση με πολυκλωνικό anti-myc αντίσωμα. Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση και ανάλυση western των πρωτεϊνών που κατακρημνίστηκαν είτε με anti-myc, είτε με anti-Flag μονοκλωνικά αντισώματα (Εικόνα 4). Από το πείραμα αυτό δε φαίνεται να αλληλεπιδρούν η mycMox1 με την FlagPax1, ούτε η mycMox2 και FlagPax3. Εδώ πρέπει να τονίσουμε ότι δεν είχαμε θετικό control στο πείραμα, οπότε ίσως το αρνητικό αποτέλεσμα να οφείλεται στην πειραματική διαδικασία.

ΜΕΡΟΣ Β: Μελέτη της αλληλεπίδρασης των Mox1-Pax1 και Mox2-Pax3 *IN VITRO*.

Για να διαπιστώσουμε αν οι πρωτεΐνες Mox1, Mox2, Pax1 και Pax3 έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδράσουν *in vitro* κλωνοποιήσαμε τις Mox1 και Mox2 καθώς και τμήματά τους (Εικόνα 5) σε βακτηριακούς φορείς έκφρασης που περιέχουν την κωδική αλληλουχία της Glutathione-S-Transferase (GST). Οι ελλείψεις των μορίων που χρησιμοποιήσαμε αντιστοιχούν ακριβώς σε αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για το σύστημα των δυο υβριδίων από τη Μαρία Χριστίνα Καστρινάκη. Η κλωνοποίηση έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να παράγονται πρωτεΐνες συγκολλημένες με τη GST, για να μπορούμε να τις απομονώσουμε εύκολα από βακτηριακό εκχύλισμα και να τις ακινητοποιήσουμε σε κολώνα Glutathione Sepharose. Οι Pax1 και Pax3 παρασκευάστηκαν με *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση και ραδιοσημάνθηκαν με ³⁵S μεθειονίνη.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΑΜΕ ΓΙΑ ΤΙΣ *IN VITRO* ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

GSTMox1: Από τη MYCMox1 κατασκευή αποκόψαμε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI* και *XhoI* την κωδική αλληλουχία του *Mox1* και την κλωνοποιήσαμε στις θέσεις *EcoRI* και *XhoI* του polylinker του βακτηριακού φορέα έκφρασης pGEX-4T-1 (Amersham).

GSTMox2: Από τη MYCMox2 κατασκευή αποκόψαμε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI* και *XhoI* την κωδική αλληλουχία του *Mox2* και την κλωνοποιήσαμε στις θέσεις *EcoRI* και *XhoI* του polylinker του βακτηριακού φορέα έκφρασης pGEX-4T-1 (Amersham).

GSTNMOX1, GSTCMOX1, GSTNMOX2, GSTCMOX2, GSTτMOX2: Από τις κατασκευές που περιέχουν αυτές τις ελλείψεις των Mox πρωτεϊνών κλωνοποιημένες *in frame* με την transactivation δομική περιοχή του VP16 σε φορέα έκφρασης της ζύμης αποκόψαμε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NotI* και *EcoRI*

τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν τις ελλείψεις. Στη συνέχεια μετατρέψαμε τα άκρα των δίκλωνων μοριών DNA σε λεία (fill-in αντίδραση με T4 DNA πολυμεράση). Ο φορέας που κλωνοποιήσαμε τις παραπάνω ελλείψεις είναι ο pGEX-4T-2 τον οποίο κόψαμε με *Sall*, μετατρέψαμε τα άκρα του σε λεία και τα αποφωσφορυλιώσαμε πριν την αντίδραση σύνδεσης (ligation).

GSTτMOX1: Από την κατασκευή που περιέχει αυτή την έλλειψη κλωνοποιημένη in frame με την DNA προσδεδεμένη δομική περιοχή του GAL4 σε φορέα έκφρασης της ζύμης αποκόψαμε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NcoI* και *Sall* την αλληλουχία που κωδικοποιεί την έλλειψη αυτή. Στη συνέχεια μετατρέψαμε τα άκρα των δίκλωνων μοριών DNA σε λεία (fill-in αντίδραση με T4 DNA πολυμεράση). Ο φορέας που κλωνοποιήσαμε την *τMox1* αλληλουχία είναι ο pGEX-4T-1 τον οποίο κόψαμε με *SmaI* και αποφωσφορυλιώσαμε τα άκρα του.

PAX1: Χρησιμοποιήσαμε το ίδιο ένθεμα (insert) με αυτό της προετοιμασίας του FLAGPAX1, το οποίο κλωνοποιήσαμε στις θέσεις *EcoRI* και *XbaI* του φορέα έκφρασης pcDNA3. Αυτή η κατασκευή ήταν απαραίτητη γιατί δεν διαθέταμε μόνη της την *Pax1* αλληλουχία για να τη χρησιμοποιήσουμε για in vitro μεταγραφή και μετάφραση παρά μόνο συγκολλημένη με αλληλουχία ιστιδινών.

ΔΟΚΙΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ IN VITRO

Δοκιμάσαμε τις παρακάτω αλληλεπιδράσεις:

I) Pax1 με GSTMox1, GSTNMox1, GSTCMox1, GSTτMox1

Η Pax1 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τις GSTMox1 και GSTCMox1 όχι όμως και με τις GSTNMox1 και GSTτMox1 (Εικόνες 5&6).

II) Pax3 με GSTMox1, GSTNMox1, GSTCMox1, GSTτMox1

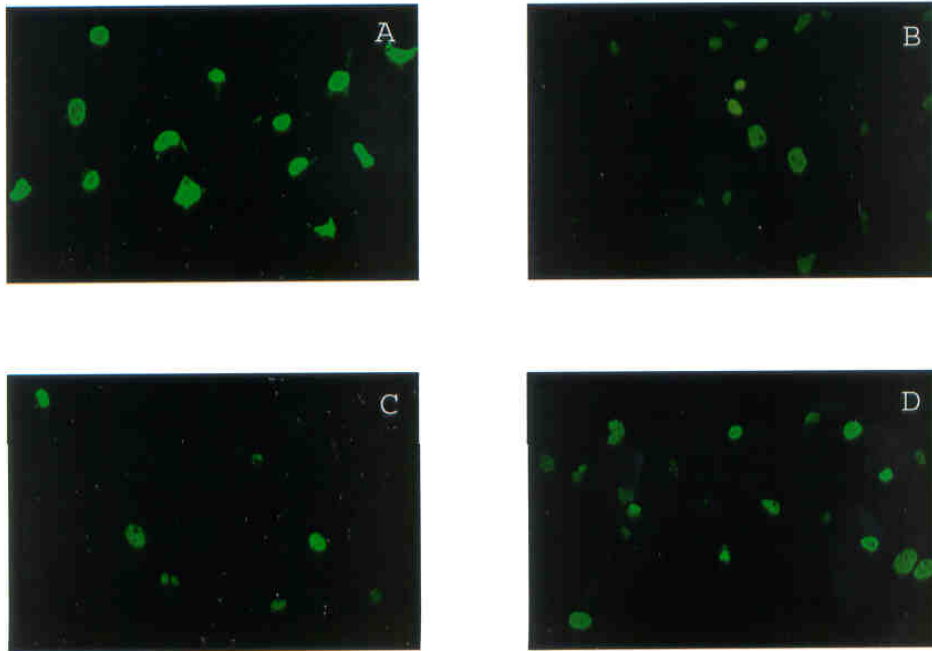
Η Pax3 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τις GSTMox1 και GSTCMox1 όχι όμως και με τις GSTNMox1 και GSTτMox1 (Εικόνες 5&6).

III) Pax1 με GSTMox2, GSTNMox2, GSTCMox2, GSTτMox2

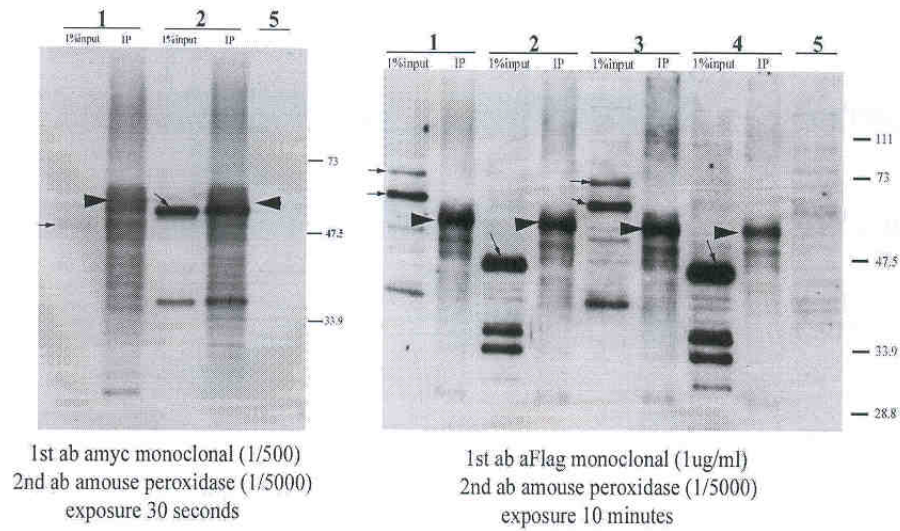
Η Pax1 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τις GSTMox2 και GSTCMox2 όχι όμως και με τις GSTNMox2 και GSTτMox2 (Εικόνες 5&6).

IV) Pax3 με GSTMox2, GSTNMox2, GSTCMox2, GSTτMox2

Η Pax3 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τις GSTMox2 και GSTCMox2 όχι όμως και με τις GSTNMox2 και GSTτMox2 (Εικόνες 5&6).



Εικόνα 3: Ανοσοφθορισμός σε παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα COS1 με A. MYCMOX1, B. MYCMOX2, C. FLAGPAX1, D. FLAGPAX3. Και στις τέσσερις περιπτώσεις η χρώση εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων.



Εικόνα 4: Ανοσοκατακρήμιση σε πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων παροδικά διαμολυσμένων με: 1) MYCMOX2 & FLAGPAX3

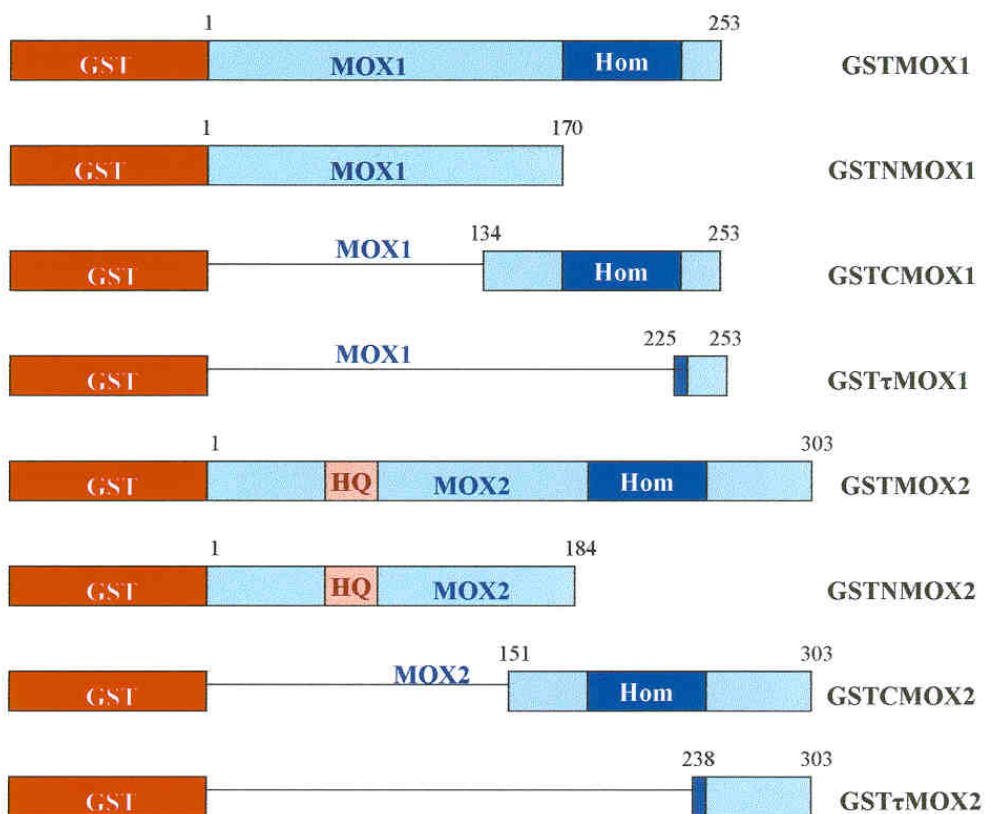
2) MYCMOX1 & FLAGPAX1

3) FLAGPAX3

4) FLAGPAX1

5) pcDNA3

Τα βέλη δείχνουν τις ζώνες των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών. Τα ισοσκελή τριγωνάκια δείχνουν τη ζώνη IgG του αντισώματος που χρησιμοποιήσαμε για την ανοσοκατακρήμιση.

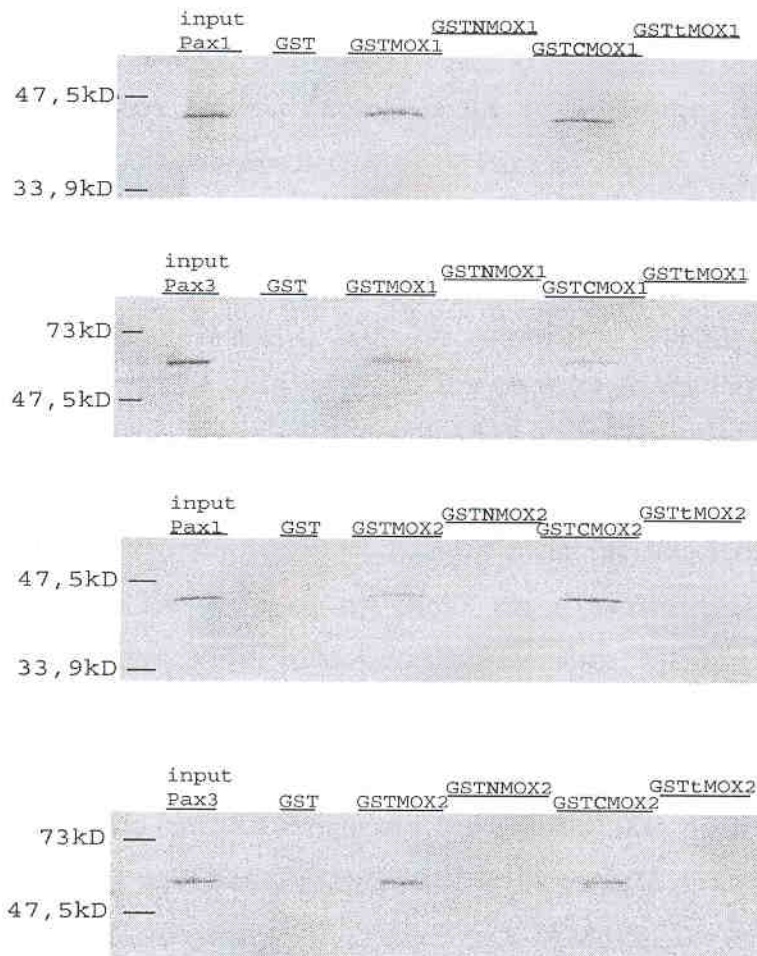


GST : Glutathione-S-Transferase

Hom : Homeodomain

HQ : Polyhistidine/polyglutamine stretch

Εικόνα 5: Οι GST χμαιοτικές MOX1, MOX2 πρωτεΐνες και οι ελλείψεις τους που χρησιμοποιήθηκαν στις *in vitro* πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Η αρίθμηση αναφέρεται στα αμινοξέα των MOX πρωτεϊνών, όχι της GST.



Εικόνα 6: In vitro αλληλεπίδραση των Pax1 & Pax3 με τα Mox1, Mox2 και τις ελλείψεις τους.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με την παρούσα εργασία επιβεβαιώσαμε τη δυνατότητα των πρωτεϊνών Mox1 και Mox2 να αλληλεπιδρούν *in vitro* με τις Pax1 και Pax3.

Συγκεκριμένα η **Mox1** μέσω της καρβοξυτελικής της περιοχής που περιλαμβάνει την homeodomain αλληλεπιδρά με τις Pax1 και Pax3 (*in vitro*). Από τα αποτελέσματα του συστήματος των δύο υβριδίων θεωρούμε ότι η Mox1 αλληλεπιδρά με την Pax1. Η αλληλεπίδραση που φαίνεται με την Pax3 στο *in vitro* πείραμα πιθανώς δεν είναι πραγματική. Στα αποτελέσματα του συστήματος των δύο υβριδίων βλέπουμε ότι η Pax3 αλληλεπιδρά εξίσου καλά με τις **CMox1** και **CMox2**. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι η homeodomain της Mox1 έχει εξαιρετικά υψηλή ομοιότητα (98,3%) με αυτή της Mox2 και η υπόλοιπη αλληλουχία και διαμόρφωση της πρωτεΐνης Mox1 καθορίζει τελικά τις ειδικές αλληλεπιδράσεις.

Ανάλογες παρατηρήσεις μπορούμε να κάνουμε και για τις αλληλεπιδράσεις της **Mox2**. Ενώ στο *in vitro* πείραμα φαίνεται να αλληλεπιδρά με τις Pax1 και Pax3 αυτό δεν επιβεβαιώνεται από το σύστημα των δύο υβριδίων. Στο τελευταίο βλέπουμε και πάλι ότι οι **CMox1** και **CMox2** αλληλεπιδρούν εξίσου καλά με την Pax1, ενώ δε συμβαίνει το ίδιο με ολόκληρες τις Mox1 και Mox2. Η Mox2 αλληλεπιδρά μόνο με την Pax3. Και πάλι υποθέτουμε ότι η *in vitro* αλληλεπίδραση Mox2 με Pax1 πιθανώς δε συμβαίνει *in vivo*, αλλά μόνο *in vitro* και αυτό εξαιτίας της μεγάλης ομοιότητας (98,3%) μεταξύ των homeodomain των Mox1 και Mox2.

Το συμπέρασμα στο οποίο καταλήγουμε είναι ότι πιθανώς η Mox1 αλληλεπιδρά με την Pax1, ενώ η Mox2 αλληλεπιδρά με την Pax3.

Η υπόθεση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών Mox και Pax, τουλάχιστον με τις πειραματικές προσεγγίσεις που εφαρμόσαμε, φαίνεται ότι είναι σωστή. Όμως *in vivo* τι πραγματικά συμβαίνει; Είναι λογικό να αλληλεπιδρούν αυτές οι πρωτεΐνες και αν ναι ποιος ο βιολογικός τους ρόλος;

Mox1-Pax1

Τα δύο αυτά γονίδια εκφράζονται ταυτόχρονα στο σκληροτόμιο. Από τις μεταλλαγές απενεργοποίησής τους (*Pax1*: undulated, *Mox1*: αδρανοποίηση με ομόλογο ανασυνδυασμό) φαίνεται ότι και τα δυο παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του αξονικού σκελετού. Σε ποντίκια που φέρουν μεταλλαγές στο γονίδιο *Pax1* (undulated) υπάρχει βλάβη στην ανάπτυξη της σπονδυλικής στήλης, δεν σχηματίζονται ή είναι παραμορφωμένα τα σώματα των σπονδύλων, οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι και τα μέρη των πλευρών που βρίσκονται προς τη μεσαία γραμμή του σώματος (Wallin et al, 1994). Ποντίκια που φέρουν μεταλλαγή αδρανοποίησης (knock out) του γονιδίου *Mox1* παρουσιάζουν κι αυτά ανωμαλίες στη σπονδυλική στήλη. Έχουν ετερόπλευρους και ενωμένους σπονδύλους. Το πιο δραματικό εύρημα είναι ότι ο πρώτος σπόνδυλος (άτλας) είναι συγκολλημένος με το ινιακό οστό του κρανίου. Τα έμβρυα έχουν παραμορφωμένη σπονδυλική στήλη και ουρά.

Όταν στο σωματίτη σχηματίζεται το μυοτόμιο η έκφραση του *Mox1* εξακολουθεί στο δερμομυοτόμιο και το σκληροτόμιο αλλά αποκλείεται από το μυοτόμιο (Candia and Wright, 1996) το οποίο αποτελείται από μεταμιτωτικούς μυοβλάστες (Christ and Ordahl, 1995). Έχει συνδεθεί λοιπόν το *Mox1* με κύτταρα που δεν έχουν διαφοροποιηθεί και πολλαπλασιάζονται (Candia and Wright, 1996). Όσον αφορά το *Pax1* έχει δειχθεί ότι μαζί με το *Pax9*, το οποίο επίσης εκφράζεται στο σκληροτόμιο, είναι απαραίτητα για τη διατήρηση υψηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού στα κύτταρα του σκληροτομίου (Peters et al., 1999). Πιθανώς *Mox1* και *Pax1* να αλληλεπιδρούν και το ετεροδιμερές να επάγει τη μεταγραφική ρύθμιση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και συγκεκριμένα με τον καθορισμό του ρυθμού των κυτταρικών διαιρέσεων.

Θα είχε ενδιαφέρον να δημιουργηθούν διαγονιδιακά ποντίκια με αδρανοποιημένα τα *Mox1* και *Pax1* και να αναλυθεί ο φαινότυπός τους και ως προς την ακεραιότητα του αξονικού σκελετού και ως προς τη μιτωτική δραστηριότητα των κυττάρων του σκληροτομίου. Επιπλέον θα πρέπει να ελεγχθεί η δυνατότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ των *Mox1* και *Pax9*, γιατί τα *Pax1* και *Pax9* έχουν παραπλήσιες λειτουργίες και το *Pax9* σώζει ως ένα βαθμό το φαινότυπο στα ζώα με μεταλλαγές στο *Pax1*.

Mox2-Pax3

Τα δύο αυτά γονίδια εκφράζονται μαζί στους πρόδρομους μυοβλάστες που μεταναστεύουν από το κοιλιακό χείλος του δερμομυοτομίου προς το εκβλάστημα του άκρου. Στον σωμίτη του εμβρύου της όρνιθας συνεκφράζονται και στο νωτιαίο και κοιλιακό χείλη του δερμομυοτομίου. Τα *Mox2* και *Pax3* παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη των μυών του άκρου.

Το *Pax3* είναι απαραίτητο για την μετανάστευση των πρόδρομων μυοβλαστών (Dastone et al, 1996). Σε μεταλλάγματα του *Pax3* στο ποντίκι (splotch mutants) δεν παρατηρούνται μεταναστεύοντες πληθυσμοί προς το εκβλάστημα του άκρου (Bober et al, 1994). Στα ίδια μεταλλάγματα χάνεται η κοντινή προς το σώμα (proximal) έκφραση του *Mox2* στο εκβλάστημα του άκρου (Mankoo et al., 1999). Ίσως κάποιοι πρώιμοι μυοβλάστες να μεταναστεύουν από το σωμίτη προς το άκρο και λόγω της απουσίας *Pax3* δεν καταλήγουν στις σωστές θέσεις ούτε επάγεται σ'αυτούς η έκφραση μυογενετικών παραγόντων καθορισμού· στα splotch δεν σχηματίζονται μύες στα άκρα.

Στους μύες που φέρουν μεταλλαγή αδρανοποίησης (knock out) του γονιδίου *Mox2* παρατηρείται συνολική μείωση της μάζας των σκελετικών μυών των άκρων και απουσία ορισμένων μυών (Mankoo et al., 1999). Η έκφραση του *Pax3* μειώνεται καθώς οι μυοβλάστες αποεπιθηλιοποιούνται και η μείωση είναι πιο έντονη καθώς τα κύτταρα μεταναστεύουν. Δεν φαίνεται να υπάρχει ανωμαλία στη μετανάστευση των μυοβλαστών συνολικά αλλά το *Mox2* πιθανώς είναι απαραίτητο για τη διατήρηση του φυσιολογικού προτύπου γονιδιακής έκφρασης των μεταναστευόντων μυοβλαστών. Ίσως η αλληλεπίδραση των *Mox2* και *Pax3* να έχει λειτουργικό ρόλο στην επαγωγή πρωτεϊνών απαραίτητων για τη μετανάστευση σε ένα υποσύνολο πρόδρομων μυοβλαστών, αυτών που φυσιολογικά εκφράζουν *Myf5* στο άκρο (στα *mox*-/- δεν παρατηρείται έκφραση του *Myf5* στο άκρο).

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Bober E., Franz T., Hans-Henning A., Gruss P. and Tremblay P. (1994) Pax3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development*.**120**: 603-612

Candia A.F. and Wright C.V.E. (1996) Differential localization of Mox-1 and Mox-2 proteins indicates distinct roles during development. *Int. J. Dev. Biol.* **40**: 1179-1184

Candia A.F., Hu J., Crosby J., Lalley P.A., Noden D., Nadeau J.H and Wright C.V.E. (1992) Mox-1 and Mox-2 define a novel homeobox gene subfamily and are differentially expressed during early mesodermal patterning in mouse embryos. *Development*.**116**: 1123-1136

Chalepakis, G., Fritsch, R., Fickenscher, H., Deutsch, U., Goulding, M., and Gruss, P. (1991). The molecular basis of the undulated Pax-1 mutation. *Cell* **66**, 873-884

Christ B., Ordahl O. P. (1995). Early stages of chick somite development. *Anat Embryol* **191**:381-396

Dahl E., Koseki H. and Balling R. (1997). Pax genes and organogenesis. *Bioessays*. **19**: 755-765

Dastone G., Lamar E., Olivier M. and Goulding M. (1996) Pax3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse. *Development*.**122**: 1017-1027

Dodd J., S.B. Morton, D. Karagogeos, M. Yamamoto, and T.M. Jessell. (1988). Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron*. **1**:105-16.

Ebensperger C., Wilting J., Brand-Saberi B., Mizutani Y., Christ B., Balling R. and Koseki H. (1995). Pax1, a regulator of sclerotome development is induced by notochord and by floor plate signals in avian embryos. *Anat. Embryol.* **191**: 297-310

Epstein J., Lam P., Jepeal L., Maas R.L. and Shapiro D.N. (1995) Pax3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblast cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **27**: 11719-11722

Fan C.M. and Tessier-Lavigne M. (1994). Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell*.**79**: 1175-1186

Fisher, S., Siwik, E., Branellec, D., Walsh, K. and Watanabe, M. (1997). Forced expression of the homeodomain protein Gax inhibits cardiomyocyte proliferation and perturbs heart morphogenesis. *Development*. **124**, 4405-4413.

Gorski, D.H., LePage, D.F., Patel, C.V., Copeland, N.G., Jenkins, N.A and Walsh, K. (1993). Molecular cloning of a diverged homeobox gene that is rapidly down-regulated during the G0/G1 transition in vascular smooth muscle cells. *Mol. Cell Biol.* **13(6)**, 3722-3733.

Goulding M., Lumsden A., and Paquette A. J. (1994). Regulation of Pax3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* **120**, 957-971.

Goulding M., Sterrer S., Fleming J., Balling R., Nadeau J., Moore K.J., Brown S.D.M., Steel K.P. and Gruss P. (1993) Analysis of Pax3 gene in mouse mutant splotch. *Genomics*. **17**: 355-367

Graham F., Van der Eb A. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. **52**: 456-467

Grigoriou M., Kastriaki M.C., Modi W.S., Theodorakis K., Mankoo B., Pachnis V. and Karagozeos D. (1995) Isolation of the Human MOX2 homeobox gene and localization to chromosome 7p22.1-p21.3 *Genomics*.**22**: 550-555

Gruss P. and Walther C. (1992). Pax in Development. *Cell*. **69**: 719-722

Johnston R.L., Laufer E., Riddle R.D. and Tabin C. (1994) Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. *Cell*.**79**: 1165-1173

Karagozeos, D., S.B. Morton, F. Casano, J. Dodd, and T.M. Jessell. (1991). Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1: differential regulation by central and peripheral neurons in vitro. *Development*. **112**:51-67.

Kessel M (1991) Molecular coding of axial positions by Hox genes. *Semin Dev Biol* **2**:367-373

Koseki H., Wallin J., Wilting J., Mizutani Y., Kispert A., Ebensperger C., Hermann B.G., Christ B. and Balling R. (1993). A role for Pax1 as a mediator of notochordal signals during the dorsoventral specification of vertebrae. *Development*.**119**: 649-660

Mankoo B.S., Collins N.S., Ashby P., Grigorieva E., Pevny L.H., Candia A.F., Wright C.V.E., Rigby P.W.J. and Pachnis V. (1999) Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development. *Nature*. **400**: 69-73

Maroto M., Reshef R., Munsterberg A.E., Koester S., Goulding M. and Lassar A.B. (1997) Ectopic pax3 activates myoD and myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue. *Cell*.**89**: 139-148

Peters H., Wilm B., Sakai N., Imai K., Maas R. and Balling R. (1999) Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. *Development*. **126**: 5399-5408

Rawls A. and Olson E.N. (1997) MyoD meets its maker. *Cell*. **89**: 5-8

Smith D., Johnston K. (1988). Single step purification of polypeptides expressed in
Escherichia coli as fusions with glutathione-S-transferase. *Gene*. **67**: 31-40

Treisman, J., Harris, E., and Desplan, C. (1991). The paired box encodes a second DNA binding domain in the paired homeodomain protein. *Genes Dev*. **5**: 594-604

Tremblay P., Pituello F. and Gruss P. (1996) Inhibition of floor plate differentiation by Pax3: evidence from ectopic expression in transgenic mice. *Development*. **122**: 2555-2567

Wallin J., Wilting J., Koseki H., Fritsch R., Christ B. and Balling R. (1994). The role of Pax1 in axial skeleton development. *Development*. **120**: 1109-1121

Williams B.A. and Ordahl C.P. (1994) Pax3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development*. **120**: 785-796