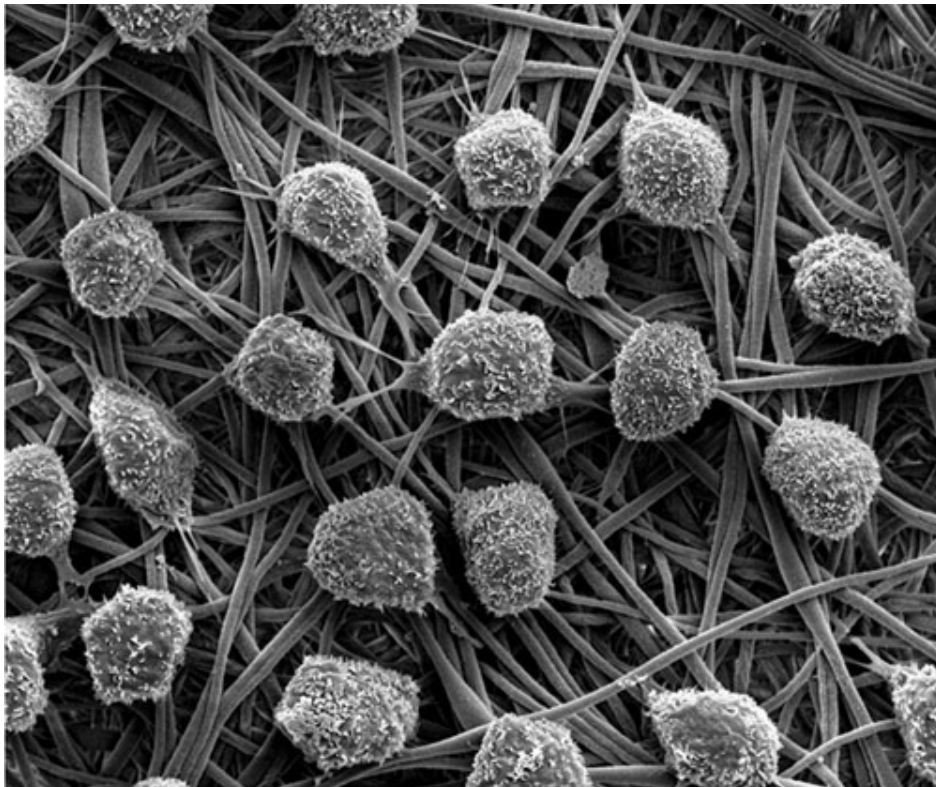


ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

<<Μελέτη της δράσης της πρωτεΐνης Sall1 και των microRNAs στη
ρύθμιση της διαφοροποίησης των εμβρυικών βλαστικών
κυττάρων>>



Όνοματεπώνυμο: Ευαγγελία Μπόλλη
Υπεύθυνος Καθηγητής: κ^{ος} Παπαματθαϊάκης Ιωσήφ
Υπεύθυνη Ερευνήτρια: κ^α Κρετσόβαλη Ανδρονίκη
Τμήμα Βιολογίας
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ευχαριστώ...

Ολοκληρώνοντας την πτυχιακή μου εργασία αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όσους με βοήθησαν και με στήριξαν στην πρώτη μου εργαστηριακή προσπάθεια.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Νίκη Κρετσόβαλη και το κύριο Ιωσήφ Παπαματθαϊάκη που με δέχτηκαν στο εργαστήριό τους και με βοήθησαν όλο αυτό το καιρό να αναπτύξω την κριτική μου σκέψη και τις βιολογικές μου γνώσεις. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον κύριο Τάκη Μακατουνάκη που ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει σε ό,τι χρειαζόμουν και έδινε λύσεις σε οποιοδήποτε πρόβλημα εμφανιζόταν. Αποτελεί έναν από τους ανθρώπους που θα θυμάμαι με εκτίμηση. Τέλος, ευχαριστώ τον κύριο Γιώργο Βρέτσο που φρόντιζε και ετοίμαζε τα κύτταρά μας.

Στη συνέχεια, θέλω να ευχαριστήσω την Χριστιάνα Χατζημιχαήλ, τη supervisor μου, η οποία αποτέλεσε το πρώτο άτομο που με δίδαξε πως να δουλεύω σε εργαστήριο και επί 6 μήνες με βοηθούσε ώστε να γίνω καλύτερη. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα γιατί με στήριξε και με βοήθησε ηθικά μέσα και έξω από το εργαστήριο όταν την χρειαζόμουν (ελπίζω να έκανα το ίδιο και εγώ). Αισθάνομαι μεγάλη χαρά που την γνώρισα αλλά και μεγάλη λύπη που η συνεργασία μας έφθασε στο τέλος της καθώς απέκτησα μια καλή φίλη. Έπειτα, την Κατερίνα Τσουρούλα που από την πρώτη στιγμή έγινε φίλη μου, φρόντιζε να διευρύνει τις βιολογικές μου γνώσεις και με στήριξε πολύ όλους αυτούς τους μήνες. Μετά, την Γιώτα Αραμπατζή και την Κωνσταντίνα Λυρώνη από τις οποίες έχω μόνο ευχάριστες αναμνήσεις και δημιουργούσαν ένα θετικό περιβάλλον στο εργαστήριο, καθώς και την Αμαλία Ζαμπουλάκη με την οποία ενώ συναναστράφηκα για μικρό χρονικό διάστημα, αναπτύξαμε μια ευχάριστη σχέση. Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους συμφοιτητές μου, Βιολέττα (σε ευχαριστώ για όλα αυτά τα τέσσερα χρόνια φιλίας και στήριξης), Δέσποινα (θα μου λείψουν οι 'τσακωμοί μας'), Αγγελική (με τις ευχάριστες καθημερινές μεταφορές μας) και Βασίλη με τους οποίους μοιράστηκα κοινούς προβληματισμούς και στηρίξαμε ο ένας τον άλλον.

Θα ολοκληρώσω με την οικογένειά μου στην οποία οφείλω ότι έχω καταφέρει μέχρι σήμερα και την ευχαριστώ πολύ για την ανεκπλήρωτη στήριξη (ηθική και οικονομική) που μου προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια.

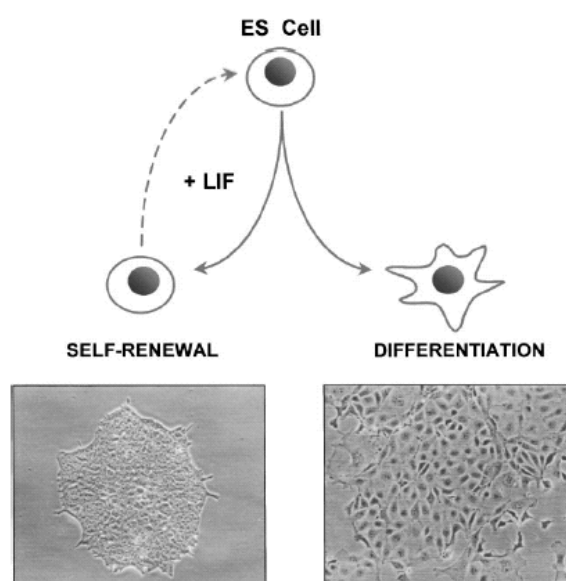
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- ✓ **Εισαγωγή:** Σελίδες.....4-23
- ✓ **Υλικά και μέθοδοι:** Σελίδες.....24-36
- ✓ **Σκοπός:** Σελίδες.....37
- ✓ **Αποτελέσματα:** Σελίδες.....38-51
- ✓ **Συμπεράσματα-Συζήτηση:** Σελίδες.....52
- ✓ **Βιβλιογραφία:** Σελίδες.....53-57

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η βιολογία των βλαστικών κυττάρων (stem cells)

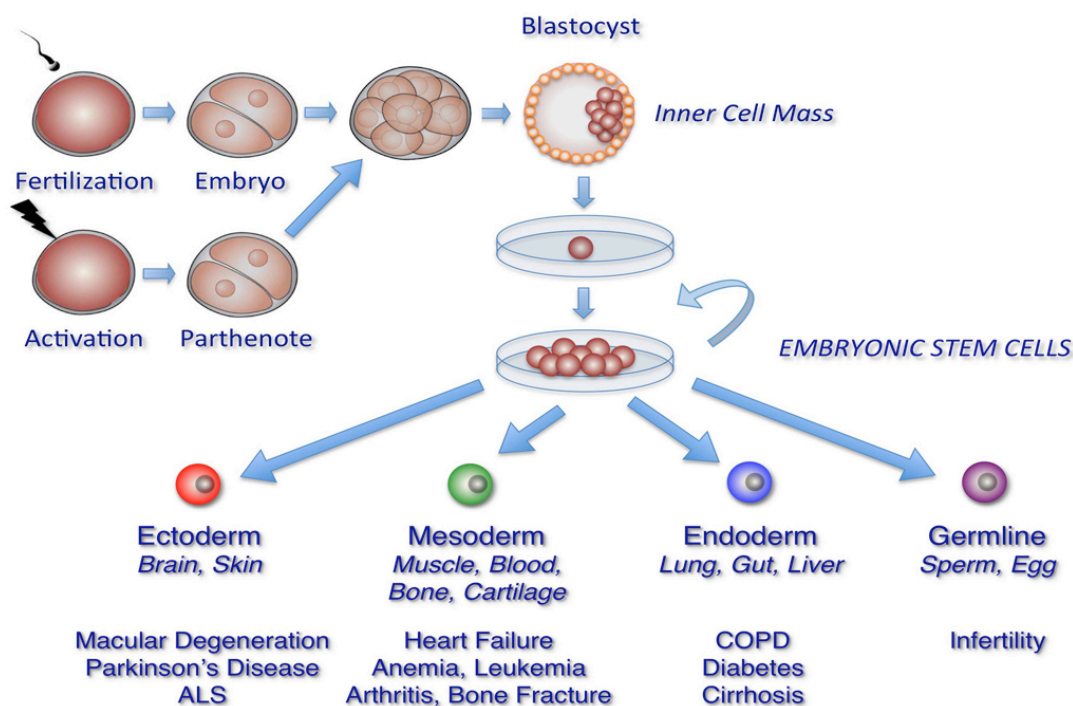
Τα βλαστικά κύτταρα διακρίνονται σε 2 κύριες τάξεις: τα ενήλικα (adult stem cells) και τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ESCs). Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να αυτοανανεώνονται απεριόριστα σε συνθήκες καλλιέργειας (self-renew). Η ικανότητα αυτοανανέωσης οδηγεί στο σχηματισμό ενός θυγατρικού κυττάρου που μπορεί να διαφοροποιηθεί και ενός που παραμένει βλαστικό κύτταρο. Τα θυγατρικά κύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν έχουν ισότιμες αναπτυξιακές δυνατότητες. Ταυτόχρονα, τα ES κύτταρα είναι πλειοδύναμα, λόγω της ικανότητάς του να αναπτύσσονται σχεδόν σε οποιοδήποτε είδος κυττάρου αν τοποθετηθούν στο κατάλληλο περιβάλλον (**Boiani and Scholer, 2005**). Αυτό σημαίνει ότι αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιούνται σε κύτταρα από οποιαδήποτε από τις τρεις βλαστικές στιβάδες (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα) σε καλλιέργεια κυττάρων (**Keller et al., 1993; Kennedy and Keller, 2003**), δίνοντας όλους τους κυτταρικούς τύπους του ενήλικου οργανισμού, αλλά όχι εξωεμβρυικούς ιστούς (**εικόνα 2**). Δηλαδή, χαρακτηρίζονται από το γεγονός ότι πολλαπλασιάζονται αεναώς σε μια καλλιέργεια διατηρώντας ταυτόχρονα την πλειοδυναμία τους και τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν ανά πάσα στιγμή προς όλες τις κατευθύνσεις (**εικόνα 1**).



Εικόνα 1: Οι βασικές ιδιότητες των ES κυττάρων είναι η αυτοανανέωση και η πλειοδυναμία. Φαίνεται η μορφολογία τόσο των διαφοροποιημένων όσο και των ES κυττάρων σε συνθήκες καλλιέργειας.

Ο βαθμός πλειοδυναμίας ενός κυττάρου κρίνεται από την ικανότητά του να ενσωματωθεί, μετά από μεταμόσχευση, στην εσωτερική κυτταρική μάζα μιας E3.5 βλαστοκύστης και από την έκφραση παραγόντων όπως η αλκαλική φωσφατάση, η E-καντερίνη, το σταδιο-ειδικό εμβρυικό αντιγόνο-1 (SSEA1), τον παράγοντα Oct3/4

και μια σειρά άλλων παραγόντων ειδικών για τα βλαστοκύτταρα. Τα πλειοδύναμα ESCs προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα εμβρύου στο στάδιο της βλαστοκύστης (Martin, 1981; Rossant, 2001) (εικόνα 2). Τα πρώτα ESCs απομονώθηκαν από μια βλαστοκύστη ποντικού (Evans and Kaufman, 1981), ενώ ανθρώπινα απομονώθηκαν το 1988 (Pan *et al.*, 2007).



Εικόνα 2: Στο στάδιο της βλαστοκύστης εμφανίζονται τα πλειοδύναμα βλαστοκύτταρα από τα οποία θα προκύψουν οι 3 βλαστικές στιβάδες, ενδόδερμα, μεσόδερμα και εκτόδερμα. Αυτές θα δώσουν όλους τους εμβρυικούς ιστούς. Από την εσωτερική μάζα της βλαστοκύστης τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα μπορούν να απομονωθούν και να διατηρηθούν αδιαφοροποίητα σε καλλιέργεια.

Παράλληλα, πληθυσμοί βλαστικών κυττάρων έχουν ταυτοποιηθεί και σε πολλούς ιστούς ενηλίκων (ενήλικα βλαστικά κύτταρα), όπως αναφέρθηκε, τα οποία είναι πολυδύναμα (multipotent). Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα είναι σχεδόν αδιαφοροποίητα κύτταρα που κατοικούν σε μικροπεριβάλλοντα (γνωστά ως niches) και παράγουν ένα αδιαφοροποίητο βλαστικό κύττρο και ένα θυγατρικό κύτταρο που μπορεί δυνητικά να διαφοροποιηθεί (Fuchs and Whartenby, 2004). Πρόσφατα δεδομένα αναφέρουν ότι τα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα (hESCs), σε κάποιες περιπτώσεις, είναι ικανά να παράγουν το δικό τους μικροπεριβάλλον (niche). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η *in vitro* παραγωγή ινοβλαστών από ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα (hdFs, human ESC-derived fibroblasts), οι οποίοι αποκρίνονται σε αυξητικούς παράγοντες ινοβλαστών και περιβάλλουν τα hESCs από τα οποία διαφοροποιούνται αυθόρμητα. Εντούτοις, υπάρχουν συνθήκες στις οποίες το μικροπεριβάλλον δεν παρατηρείται ή απαιτείται για την ανάπτυξη των hESCs, όπως στην περίπτωση των ανθρώπινων εμβρυικών καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν hESC δείκτες (πχ Oct4, Sox2 και Nanog) και, όμοια με τα hESCs, παρουσιάζουν

αυτοανανέωση και πλειοδυναμία (Greber *et al.*, 2007). Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα είναι καθοριστικά για την διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού του ενήλικου. Παραδείγματα αποτελούν τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (Goodman and Hodgson, 1962) από τα οποία προέρχονται όλα τα κύτταρα του αίματος και τα νευρικά βλαστικά κύτταρα (Williams *et al.*, 1991; Kilpatrick and Bartlett, 1993; Morshead *et al.*, 1994) από τα οποία προέρχονται οι νευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα του νευρικού συστήματος.

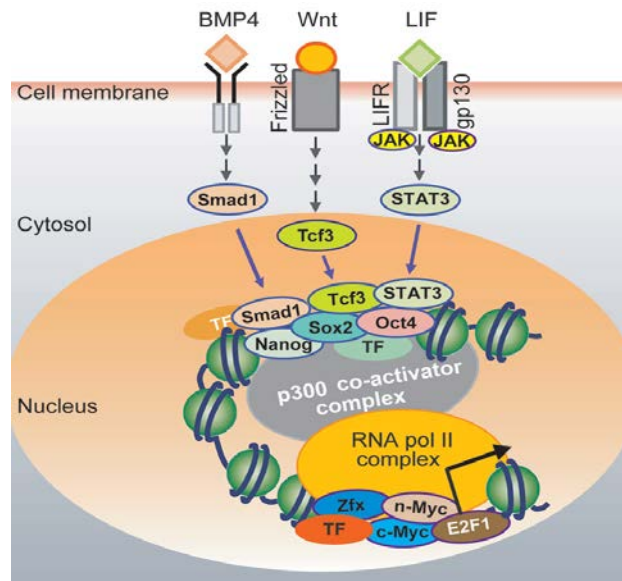
Βλαστικά κύτταρα διαφορετικών τάξεων παρουσιάζουν ομοιότητες που μπορούν να μελετηθούν σε συστήματα μοντέλων-οργανισμών, προκειμένου να ενισχύσουν τις γνώσεις μας στο τομέα της βιολογίας των βλαστικών κυττάρων. Τέτοια είναι τα ES κύτταρα ποντικού ή ES κύτταρα της γαμετικής σειράς (GSCs) της *Drosophila melanogaster*. Έτσι, τόσο ο σχηματισμός των εμβρυικών ιστών όσο και η αναγέννηση των ενήλικων ιστών στο βασίλειο των ζώων εξαρτώνται από τα βλαστοκύτταρα.

Για τη διατήρηση των δύο θεμελιωδών ιδιοτήτων τους (αυτοανανέωση και πλειοδυναμία), τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα ποντικού καλλιεργούνται αρχικά πάνω σε στρώμα μιτωτικά απενεργοποιημένων εμβρυικών ινοβλαστών που δρουν ως τροφοδοτικά κύτταρα (Evans and Kaufman, 1981). Ο παράγοντας που παρέχεται από τα τροφοδοτικά κύτταρα (ινοβλάστες) και ευθύνεται για την διατήρηση των ιδιοτήτων των ES κυττάρων είναι η κυτοκίνη LIF (παράγοντας αναστολής της λευχαιμίας). Η LIF είναι μέλος της οικογένειας της IL-6 (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988) και μπορεί να προσδένεται στο ετεροδιμερές σηματοδοτικό σύμπλοκο υποδοχέων LIFR-gp130, ενεργοποιώντας-μεταξύ άλλων-το μονοπάτι Jak-STAT3. Η δράση του παράγοντα LIF παρατηρείται μόνο παρουσία ορού καλλιέργειας, γεγονός που δείχνει πως από μόνος του δεν είναι αρκετός για τη διατήρηση της ταυτότητας των βλαστοκυττάρων. Επιπλέον, ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως η LIF δεν μπορεί να διατηρήσει την πλειοδυναμία των ανθρώπινων εμβρυικών βλαστοκυττάρων, καθώς έχουμε διαφοροποίηση ακόμα και αν η LIF είναι παρόν (Humphrey *et al.*, 2004). Τα επίπεδα παραγόντων που θεωρούνται ρυθμιστές της αδιαφοροποίητης κατάστασης (Oct-3/4) μειώνονται και τα κύτταρα οδηγούνται προς μονοπάτια διαφοροποίησης (Sato *et al.*, 2004).

Αντίθετα με άλλους τύπους κυττάρων, πολλοί πληθυσμοί βλαστικών κυττάρων διατηρούν την ικανότητα να διαιρούνται καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού. Όμως, αυτή η ικανότητα διαίρεσης πρέπει να ρυθμίζεται προσεχτικά γιατί πολλοί λίγες διαιρέσεις οδηγούν στην απώλεια της ιστολογικής ομοιόστασης, ενώ πάρα πολλές διαιρέσεις μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρκίνου. Τα βλαστικά κύτταρα ρυθμίζονται από εξωτερικά σήματα προερχόμενα από το ρυθμιστικό μικροπεριβάλλον τους (niche) και από εσωτερικούς παράγοντες, όπως μεταγραφικοί και επιγενετικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου της υπερδυναμικής πλαστικότητας των χρωμοσωμικών πρωτεϊνών (Xi and Xie 2005; Meshorer *et al.* 2006). Πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ότι τα βλαστικά κύτταρα έχουν μια ιδιαίτερη, δυσθενή, χρωματινική κατάσταση που παραμένει σιγισμένη και

που κανονικά επάγει τη διαφοροποίηση. Αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες επηρεάζουν αυτή την κατάσταση της χρωματίνης στα ES κύτταρα (εικόνα 3). Οι παράγοντες Nanog, Oct4 και Sox2 επάγονται ελαφρά μετά τη γονιμοποίηση και απαιτούνται για τη διαφοροποίηση σε εσωτερική κυτταρική μάζα και για τον καθορισμό των ES κυττάρων (Niwa, 2007). Οι τρεις αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες διαθέτουν διακριτές επικράτειες δέσμησης στο DNA, καθώς και επικράτειες trans-ενεργοποίησης. Με τεχνικές γονιδιωματικής ανάλυσης έχουν βρεθεί θέσεις συνασφάλξης και από τους τρεις παράγοντες σε ρυθμιστικά γονίδια, όπως σε μερικά γονίδια Hox (Boyer *et al.*, 2005; Bernstein *et al.*, 2006). Επιπλέον, τέσσερις μεταγραφικοί παράγοντες, γνωστοί ως OSKM (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc), μπορούν να μετατρέψουν εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού σε κύτταρα που μοιάζουν με ES κύτταρα ή σε ανταγωνιστικά γαμετικών πλειοδύναμα κύτταρα (Takahashi and Yamanaka, 2006; Okita *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007).

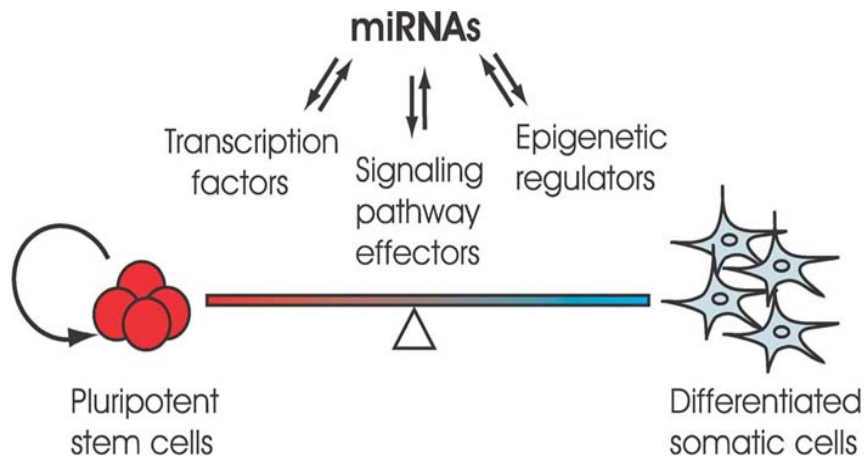
Ερευνητές έχουν ανακαλύψει συνδυαστικά μοτίβα έκφρασης γονιδίων που χρησιμοποιούνται για να επιβεβαιώσουν τη βλαστική ταυτότητα. Στα hESCs, οι μεταγραφικοί παράγοντες Nanog, Sox2 και Oct4 (Nichols *et al.*, 1998; Velkey and O'Shea, 2003; Moorthy *et al.*, 2005; Mossman *et al.*, 2005; Tai *et al.*, 2005; Loh *et al.*, 2006; Babaie *et al.*, 2007) εκφράζονται στα hESCs και όχι στα διαφοροποιημένα θυγατρικά τους κύτταρα. Όμοια, η έκφραση του Sca-1 και του c-Kit απουσία έκφρασης των Flk-2, Lin και CD48 είναι καθοριστική για την ανάπτυξη των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (Flk-2⁻ Lin⁻ CD48⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺; Wiles and Keller, 1991; Li and Johnson, 1995; McKinstry *et al.*, 1997; Phillips *et al.*, 2000; Donnelly and Krause, 2001; Sitnicka *et al.*, 2003). Ιδιαίτερα αξιόλογη είναι και μια άλλη διαπίστωση στην οποία κατέληξαν οι Kim *et al.* (2008). Παρατήρησαν πως υπάρχει μια ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται στον εκάστοτε υποκινητή και της πιθανότητας του γονιδίου που αυτός ρυθμίζει να είναι ενεργό σε αγρίου τύπου ES κύτταρα και να καταστέλλεται κατά τη διαφοροποίηση. Γονίδια που καταλαμβάνονται από ένα παράγοντα είναι κατασταλμένα στην αδιαφοροποίητη κατάσταση, ενώ όσα στρατολογούν έξι ή περισσότερους παράγοντες είναι ενεργά (εικόνα 3).



Εικόνα 3: Ρύθμιση της αυτοανανέωσης και πλειοδυναμίας των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων μέσω συμπλόκου μεταγραφικών παραγόντων. Ο πυρήνας του συμπλόκου αποτελείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες Nanog, Sox2 και Oct4. Επίσης, τα ενεργά γονίδια διαθέτουν πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες συνδεδεμένους στα ρυθμιστικά τους στοιχεία (Chambers *et al.*)

Εκτός από τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω μεταγραφικών παραγόντων, οι επιγενετικοί μηχανισμοί φαίνεται ότι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της ES ταυτότητας (Ng *et al.*, 2008) (εικόνα 4). Τα ES κύτταρα εμφανίζουν υψηλά επίπεδα τριμεθυλίωσης της λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3K4me3). Αντίθετα, η πρόοδος των προγραμμάτων διαφοροποίησης συνδέεται με αύξηση των κατασταλτικών επιγενετικών τροποποιήσεων όπως η τριμεθυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης 3 (H3K9me3). Μια άλλη επιγενετική τροποποίηση, η τριμεθυλίωση της λυσίνης 27 της ιστόνης 3 (H3K27me3) καταλύεται από το σύμπλοκο PRC2 (Eed, Suz2, Ezh2) και σχετίζεται με τη γονιδιακή σίγηση. Ωστόσο, παρά την αντικρουόμενη φύση των τροποποιήσεων H3K27me3 και H3K4me3, οι δύο τους εντοπίζονται από κοινού σε μη κωδικεύουσες περιοχές στα ποντικίσια ESCs. Έχει προταθεί ότι ο ρόλος αυτού του αμφιλεγόμενου συνδυασμού τροποποιήσεων είναι να κρατά τα αναπτυξιακά γονίδια της διαφοροποίησης αφενός ανενεργά, αφετέρου έτοιμα προς ενεργοποίηση ύστερα από ένα εξωγενές σήμα. Παράλληλα, η πλειοψηφία των γονιδίων που είναι μεθυλιωμένα στο DNA έχει φανεί ότι σχετίζονται με αναπτυξιακά μονοπάτια και σηματοδοτικά μονοπάτια που καταστέλλονται στα ESCs (Fouse *et al.*, 2008).

Ένας ακόμα σημαντικός καθοριστής της ρύθμισης των ESCs είναι τα microRNAs (εικόνα 4). Η λεπτομερής κατανόηση και γνώση κάθε πληθυσμού βλαστικών κυττάρων και της διαφοροποίησης των θυγατρικών τους κυττάρων είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό αποτελεσματικών θεραπειών βασιζόμενων στο κύτταρο.

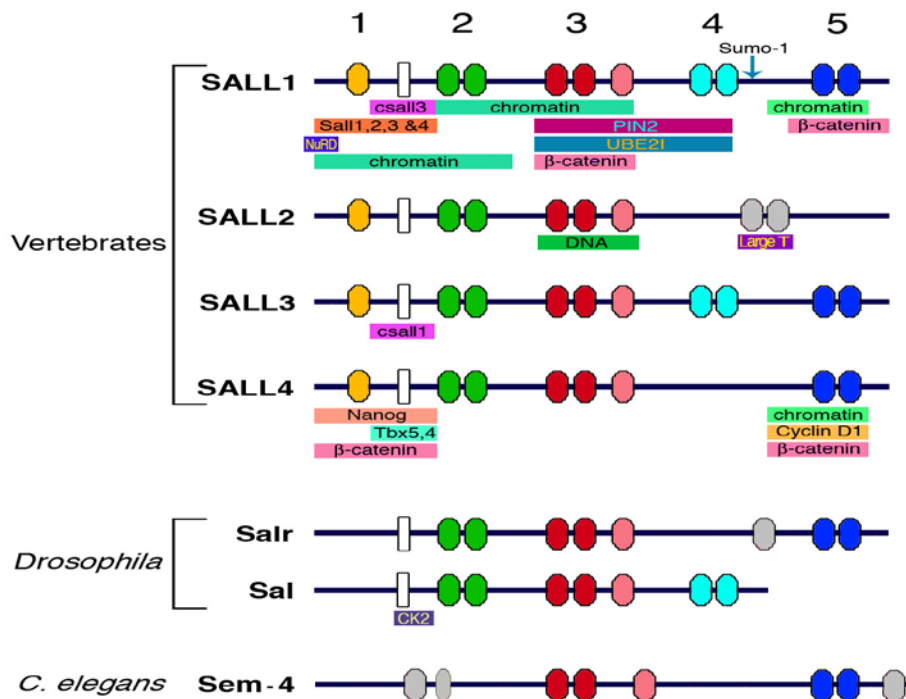


Εικόνα 4: Τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα ρυθμίζονται από επιγενετικούς παράγοντες, μεταγραφικούς παράγοντες και από μικρά RNAs γνωστά ως microRNAs. Οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν κατά τη ρύθμιση.

Η πρωτεΐνη Sall1

Η πρωτεΐνη Sall1 ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών Sall. Τα γονίδια spalt (sal) απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τη *Drosophila*. Στο ποντίκι και τον άνθρωπο έχουν χαρακτηριστεί τέσσερα συνολικά γονίδια sal τα οποία ονομάζονται sall1,sall2,sall3,sall4 και SALL1,SALL2,SALL3 και SALL4 αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες Sall θεωρούνται μεταγραφικοί ρυθμιστές καθώς η αλληλουχία τους περιλαμβάνει πολλαπλά μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου (ZFM-zink finger motifs) που διαμεσολαβούν στην πρόσδεση στο DNA και αυτή η δομή είναι συντηρημένη σε όλα τα μέλη της οικογένειας Sall (εικόνα 5). Η πρωτεΐνη sal της *Drosophila* φέρει 7 C2H2 ZFM τα οποία είναι διατεταγμένα σε 3 ομάδες. Κάθε μια από αυτές αποτελείται από διπλά ZFM με ομοιότητες στην αλληλουχία, ενώ ένα επιπλέον ZFM είναι συνδεδεμένο στην δεύτερη ομάδα. Το ίδιο πρότυπο ακολουθεί και η πρωτεΐνη Sall1 με τη διαφορά ότι αυτή περιλαμβάνει ένα επιπλέον ζευγάρι ZFM στο καρβοξυτελικό άκρο και ένα C2HC ZFM στο αμινοτελικό (Kohlhase *et al.*, 1996). Την ίδια δομή ακολουθεί και η Sall1 στο ποντίκι. Το δεύτερο μοτίβο κάθε ζεύγους περιλαμβάνει την συντηρημένη αλληλουχία F(T/S)TGKNLK, γνωστή ως κουτί Sal (Kuhnlein *et al.*,1994). Αυτή η αλληλουχία θεωρείται ότι προσδένεται σε περιοχές πλούσιες σε A/T και εντοπίζεται στην περιοχή α-έλικας του ZFM (Barrio *et al.*,1999;Pabo and Sauer, 1992).Το πιο αμινοτελικό C2HC ZFM ίσως να μην συμμετέχει τόσο στην πρόσδεση στο DNA, όσο να διαμεσολαβεί σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Laity *et al.*, 2001). Υπάρχουν και άλλες συντηρημένες περιοχές εκτός των μοτίβων που περιλαμβάνουν κατάλοιπα γλουταμίνης, αλανίνης, προλίνης και σερίνης. Η επικράτεια πλούσια σε γλουταμίνη (polyQ), εμφανής από τη *Drosophila* μέχρι και τον άνθρωπο, βρίσκεται στο N-τελικό άκρο και είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση της Sall1 με όλα τα μέλη Sall καθώς και με άλλες πρωτεΐνες. Οι περιοχές αυτές έχουν παρατηρηθεί σε πολλούς άλλους μεταγραφικούς

ρυθμιστές (οικογένεια SP1 και *egr*) που έχουν ZFM (Courey and Tjian, 1998; Gashler *et al.*,1993), γεγονός που ενισχύει την υπόθεση παρόμοιου ρόλου για την SALL1 & Sall1.



Εικόνα 5: Μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων Sall έχουν βρεθεί σε πληθώρα οργανισμών μοντέλων. Οι χρωματιστοί κύκλοι είναι τα μοτίβα των δακτυλίων Zn. Εικονίζονται επίσης οι περιοχές αλληλεπίδρασης κάθε μέλους με άλλες πρωτεΐνες.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι πρωτεΐνες Sall είναι μεταγραφικοί ρυθμιστές και θεωρούνται κυρίως καταστολείς ενώ έχει επιβεβαιωθεί και ο ρόλος τους ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές σε κάποιες περιπτώσεις. Η Sall1 έχει εντοπιστεί στην περικεντρική ετεροχρωματίνη (Kiefer *et al.*, 2002; Netzer *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2007), μία εξαιρετικά συμπαγή χρωματινική δομή που εμφανίζεται κοντά στην περιοχή των κεντρομερών (Horz and Altenburger, 1981; Wong and Rattner, 1988). Μετά από ανάλυση των τμημάτων της πρωτεΐνης αποδείχθηκε ότι το ακραίο αμινοτελικό άκρο που περιλαμβάνει το πρώτο ZFM (αα 2-435) έχει κατασταλτική ικανότητα η οποία είναι ίδια με το πλήρες μόριο και εντοπίζεται στην ετεροχρωματίνη. Κατασταλτική δράση αποδείχθηκε ότι έχει και η μεσαία περιοχή με τις 3 ομάδες ZFM (αα 43-1103) (Kiefer *et al.*, 2002; Netzer *et al.*, 2006), η οποία επίσης εντοπίζεται στην ετεροχρωματίνη. Η διαφορά των δύο αυτών περιοχών υπόκειται στο γεγονός ότι το ακραίο N-άκρο αλληλεπιδρά με παράγοντες του συμπλόκου NuRD (HDAC1,2, RbAp46, RbAp48, MTA1, MTA2) το οποίο έχει δράση απακετυλάσης ιστονών. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να τροποποιηθεί με φωσφορυλίωση της Sall1 (Lauberth *et al.*, 2007). Επίσης, η Sall1 μπορεί να αλληλεπιδρά με την PIN2, μια ισομορφή του παράγοντα δέσμευσης στις τελομερικές επαναλήψεις (TRF1) (Netzer *et al.*, 2001). Το σύμπλοκο TRF1/PIN2 συνδέεται στα τελομερή, προτείνοντας ένα μηχανισμό καταστολής για τη Sall1 μέσω

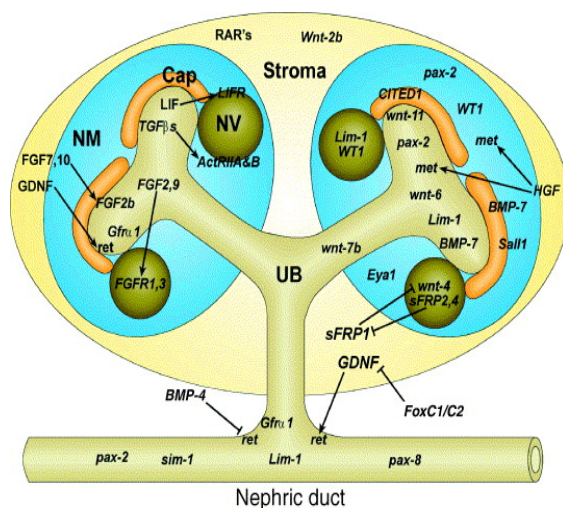
αλληλεπίδρασης με την περικεντρική ετεροχρωματίνη. Μία ακόμα περιοχή της πρωτεΐνης που βρίσκεται στους καρβοξυτελικούς δακτύλους (C-τελικό άκρο) έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση με την ετεροχρωματίνη. Αυτή η επικράτεια είναι καλά συντηρημένη από την *Drosophila* μέχρι τον άνθρωπο και έχει βρεθεί ότι δεσμεύεται σε δορυφορικό DNA (Yamashita *et al.*,2007) και όχι σε πρωτεΐνες.

Η σύγκριση των αμινοτελικών άκρων των Sall πρωτεϊνών αποκάλυψε ένα συντηρημένο μοτίβο 12 αα στην αρχή του άκρου, το οποίο υπάρχει και σε άλλους παράγοντες που διαθέτουν ZFM και είναι μεταγραφικοί καταστολείς. Το ίδιο μοτίβο αναγνωρίστηκε και σε ορθόλογα μόρια άλλων σπονδυλωτών όπως *Homo sapiens*, *Bos Taurus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis* και *Danio rerio* (Lauberth and Rauchman, 2006). Έλλειψη του μοτίβου αυτού μειώνει σημαντικά την ικανότητα καταστολής των μορίων αλλά και παρεμποδίζει την αλληλεπίδρασή τους με τα μέλη του συμπλόκου NuRD (Lauberth and Rauchman, 2006; Netzer *et al.*,2006). Όταν το μοτίβο αυτό απομονώθηκε, δείχθηκε ότι ακόμα και μόνο του μπορούσε να προκαλέσει μεταγραφική καταστολή αλλά και να αλληλεπιδράσει με το σύμπλοκο NuRD (Lauberth and Rauchman,2006). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται μεταξύ του NuRD και τμημάτων της Sall1 (πλήρες αμινοτελικό άκρο 1-435, ελάχιστο N-άκρο 1-136 και μοτίβο καταστολής 1-12) εμφάνισαν σημαντική δράση απακετυλάσης ιστονών. Έτσι, τα πρώτα 12 αα της πρωτεΐνης Sall1 είναι αναγκαία και ικανά για μεταγραφική καταστολή μέσω αλληλεπίδρασης με το σύμπλοκο NuRD και αποτελεί ενδιαφέρον η υπόθεση ότι η Sall πρωτεΐνες στρατολογούν παράγοντες αναδιαμόρφωσης στην ετεροχρωματίνη. Αυτή η περιοχή δεν υπάρχει στα ασπόνδυλα όπως η *Drosophila* και γι'αυτό θεωρείται πως η Sall1 δρά μέσω κάποιας άλλης περιοχής και όχι μέσω απακετυλασών ιστονών (Kiefer *et al.*,2002).

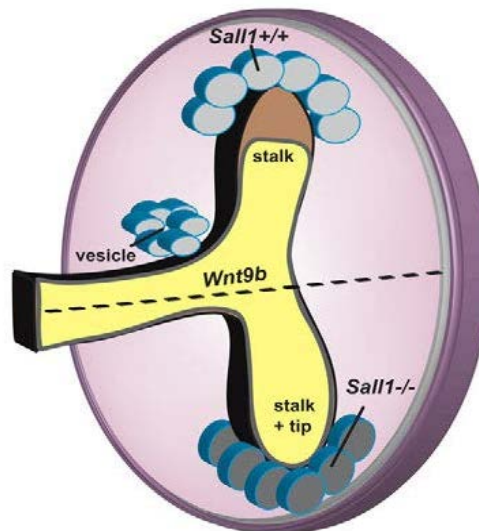
Όσον αφορά τη δράση τους, τα γονίδια της οικογένειας *sall* παίζουν καθοριστικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη του οργανισμού όσο και στη ρύθμιση των βλαστικών κυττάρων. Υπάρχουν αρκετές ομοιότητες μεταξύ των Sall δραστηριοτήτων σε διαφορετικούς οργανισμούς, όπως η λειτουργία τους κατά την εμβρυική ανάπτυξη σε ποικίλες δραστηριότητες συμπεριλαμβανομένου της οργανογένεσης, του σχηματισμού των άκρων, του καθορισμού της κυτταρικής τύχης και την νευρική ανάπτυξη. Τα μοτίβα έκφρασης της οικογένειας των γονιδίων *sall* και η ανάλυση της έκφρασής τους υποδεικνύουν ότι η δράση των Sall δεν μπορεί να ενταχθεί καθολικά σε ένα συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι, αλλά περισσότερο ότι οι Sall έχουν υιοθετηθεί από διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια σε διαφορετικά αναπτυξιακά πλαίσια. Η ποντική Sall4 είναι ένας βασικός μεταγραφικός παράγοντας της πρώιμης ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών προερχόμενων από την εσωτερική κυτταρική μάζα (συμμετέχει στη διαφοροποίηση μεταξύ εσωτερικής κυτταρικής μάζας και τροφοβλάστη και καθορίζει τη διαφοροποίηση προς εσωτερική κυτταρική μάζα) και απαιτείται για την διατήρηση της πλειοδυναμίας και του πολλαπλασιασμού των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων

καθώς αλληλεπιδρά με τον παράγοντα Nanog και επάγει την έκφραση του Sox2 & Oct4. Το mRNA της Sall4 κληρονομείται μητρικά και τα μετάγραφα αποικοδομούνται μετά το στάδιο των 2 κυττάρων. Σε μεταγενέστερα στάδια της ανάπτυξης η Sall4 αλληλεπιδρά με τη Sall1 για το σχηματισμό των άκρων, του πρωκτού, της καρδιάς και τη νεφρογένεση. Το knockout ποντίκι πεθαίνει λόγω έλλειψης πολλαπλασιασμού της εσωτερικής κυτταρικής μάζας. Η υπερέκφρασή της οδηγεί σε καρκινογένεση λόγω επαγωγής των ιδιοτήτων των βλαστικών κυττάρων, όπως την υπέρμετρη επαγωγή του πολλαπλασιασμού, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη για παράδειγμα λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων. Αντίθετα, η απουσία της οδηγεί σε καρκινογένεση λόγω αποσταθεροποίησης της χρωματίνης. Η ετερόζυγη μεταλλαγή του *sall4* οδηγεί στην εμφάνιση του Okihiro syndrome (OS) με ανωμαλίες στα άκρα, τα αυτιά, τα νεφρά, την καρδιά και τον πρωκτό. Η Sall3 δρα, όπως και η Sall4, στον καθορισμό σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (εσωτερική κυτταρική μάζα) αντί για τροφοβλάστη. Η μεταλλαγμένη Sall3 σχετίζεται επίσης με δυσμορφίες στα όργανα που είναι απαραίτητα για τη θρέψη. Οι ομοζυγώτες ως προς το μεταλλαγμένο *sall3* πεθαίνουν καθώς δεν τρέφονται, ενώ οι ετεροζυγώτες επιβιώνουν. Η Sall2 θεωρείται ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη. Συμβάλλει στην μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ υπάρχουν αναφορές υπερέκφρασής της σε περιπτώσεις καρκινώματος. Παρ'όλο που εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στον εγκέφαλο, η μεταλλαγμένη Sall2 δεν προκαλεί εγκεφαλικές βλάβες ούτε επιδρά στην κανονική ανάπτυξη ή την ογκογένεση. Η πρωτεΐνη Sall1 δρα ως μεταγραφικός καταστολέας και έχει βασικό ρόλο στην οργανογένεση. Συμμετέχει στο σχηματισμό των άκρων (χέρια, πόδια), των αυτιών, της καρδιάς, στην ορθοπρωκτική, στη νευρική ανάπτυξη και κυρίως στη νεφρογένεση. Συγκεκριμένα, η ποντικίσια Sall1 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση δεικτών των νεφρικών μεσεγχυμάτων. Η ενεργοποίηση δεν γίνεται με πρωτεϊνική αλληλεπίδραση, αλλά με τον εντοπισμό της στην ετεροχρωματινική περιοχή και δρα έμμεσα μέσω του Wnt μονοπατιού (εικόνα 6A). Η Sall1 εκφράζεται στο μετανεφρικό μεσέγχυμα γύρω από τον ουρητηρικό οφθαλμό (ουρητηρικό εκβλάστημα). Ομόζυγες ελλείψεις της Sall1 οδηγούν σε ατελή απόφυση του ουρητηρικού οφθαλμού. Έτσι, η Sall1 είναι απαραίτητη για την εισβολή του ουρητηρικού οφθαλμού, το πρωταρχικό στάδιο-κλειδί για την μετανεφρική ανάπτυξη. Σε ποντίκια Sall1-ΔZn η αμφίδρομη μορφογενετική σηματοδότηση μεταξύ του εκβλαστήματος του ουρητήρα και του μεσεγγύματος του μετάνεφρου διαταράσσεται. Το εκβλάστημα επεκτείνεται φυσιολογικά και εισβάλλει στο παρακείμενο μεσέγχυμα. Ωστόσο, η πρώτη T-διακλάδωση (T-branch) δεν δημιουργείται. Η έκφραση του Sall1 στο μεσέγχυμα οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του Wnt9b. Η ικανότητα σχηματισμού του T-branch αποκαθίσταται με μείωση του μεταγραφικού παράγοντα-στόχου της Wnt σηματοδότησης β-κατενίνης. Άρα, υποστηρίζεται ότι η ανωμαλία στα ποντίκια Sall1-ΔZn οφείλεται στην αύξηση της έντασης της Wnt σηματοδότησης στην περιοχή των μελλοντικών διακλαδώσεων, λόγω της αδυναμίας του Sall1 να την περιορίσει (εικόνα 6B) (Kiefer *et al.*, 2010). Μειωμένα επίπεδα έκφρασης της Sall1 οδηγούν σε νεφροπαθήσεις/νεφρική δυσπλασία. Μεταλλαγμένη μορφή της Sall1 που οδηγεί στη δημιουργία κομματιασμένης πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση του συνδρόμου TBS το οποίο παρουσιάζει σοβαρότερα συμπτώματα από τη null-

Sall1. Επιπλέον, βασικός είναι ο ρόλος των Sall πρωτεϊνών στη νευρική ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, Sall2-null μεταλλαγμένα ποντίκια απέδειξαν το καθοριστικό ρόλο της Sall2 στη νευρογένεση. Τα έμβρυα Sall2^{-/-}, παρουσιάζουν ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα που αυξάνονται δραματικά σε Sall2/4 σύνθετες μεταλλάξεις. Όμοια με τις Sall2/4, και οι Sall1/4 μεταλλάξεις παρουσιάζουν ανωμαλίες νευρικού σωλήνα, αποδεικνύοντας έναν in vivo πλεοναστικό ρόλο των Sall γονιδίων κατά τη ποντικίσια νευριδίωση. Είναι γεγονός ότι οι Sall1, Sall2 και Sall4 συνεντοπίζονται στον πυρήνα, σχηματίζουν ομο/ετεροδιμερή και η δράση της μίας αποζημιώνει την άλλη, πράγμα που φαίνεται να ισχύει και στην ανάπτυξη του ανθρώπου. Παρ'όλα αυτά φαίνεται ότι οι Sall1-Sall2 δεν αλληλεπιδρούν. Είναι λογικό ότι σύνθετες μεταλλάξεις στις SALL1, SALL2 και SALL4 ίσως να οδηγούν σε ελαττωματικό κλείσιμο του νευρικού αγωγού και στον άνθρωπο. Εντούτοις, τέτοιος σοβαρός φαινότυπος οδηγεί σε εμβρυική θνησιμότητα και έτσι διαφεύγει της κλινική διάγνωσης των συνδρόμων TBS και Okihiro. Μεταλλάξεις στη Sall2 δεν έχουν ακόμα συσχετιστεί με κάποια ανθρώπινη ασθένεια, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στον αποζημιωτικό χαρακτήρα των άλλων Sall γονιδίων ή στο ότι είναι θνησιγόνες.



Εικόνα 6A



Εικόνα 6B

Εικόνα 6: A) Συμμετοχή της Sall1 στη μορφογένεση του νεφρού μέσω Wnt μονοπατιού. B) Μοντέλο για την επίδραση της έλλειψης Sall1 στη νεφρογένεση. Η Wnt σηματοδότηση και η ενεργοποίηση της β-κατενίνης (κίτρινο) μειώνονται στο άκρο του εκβλαστήματος αλλά συνεχίζουν να εκφράζονται στο μίσχο του. Όταν το Sall1 δεν εκφράζεται, η Wnt σηματοδότηση συνεχίζεται ακόμα και στα άκρα του εκβλαστήματος (κάτω μισό) και T-branches δεν σχηματίζονται.

Στη *Drosophila*, η Sall1 απαιτείται για τον καθορισμό της ταυτότητας της οπίσθιας κεφαλής και της πρόσθιας ουράς (Jürgens, 1988) του συστήματος τραχείας των προνυμφών (Köhnlein and Schuh, 1996) και της ανάπτυξης των φτερών των ενηλίκων (Sturtevant et al., 1997). Στους εμβρυικούς δίσκους των φτερών, το sal ενεργοποιείται ως απόκριση στη σηματοδότηση hedgehog μέσω της TGFβήτα όμοιας-πρωτεΐνης DPP (de Celis et al., 1996; Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996).

Επιπρόσθετα, η ποντικήσια Sall1 συμμετέχει και στη διατήρηση της ταυτότητας (κυτταρική πλειοδυναμία και πολλαπλασιασμός) των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων όπου λειτουργεί κυρίως ως μεταγραφικός ενεργοποιητής και όχι ως καταστολέας. Η λειτουργία της αυτή έχει αποδειχθεί από το εργαστήριό μας ότι επιτυγχάνεται μέσω θετικής της αλληλεπίδρασης με τους μεταγραφικούς παράγοντες Nanog και Sox2, οι οποίοι αποτελούν κύριους ρυθμιστές της πλειοδυναμίας των ES κυττάρων. Πολλαπλές επικράτειες της Sall1 στο αμινο-, κέντρο- και καρβοξυτελικό άκρο συμμετέχουν στις αλληλεπίδρασεις με Nanog και Sox2, υποδηλώνοντας ότι ίσως να δεσμεύεται ταυτόχρονα και στους δύο παράγοντες. Αναλύσεις αλληλουχίας DNA έδειξαν ότι η Sall1 δεσμεύεται στα ES κύτταρα σε περιοχές που υπακούουν το συντηρημένο μοτίβο ATTCCNAC και όχι στις δορυφορικές αλληλουχίες πλούσιες σε AT που έχουν ήδη ταυτοποιηθεί ως θέσεις πρόσδεσής της. Έτσι, η Sall1 είναι ένας παράγοντας δέσμευσης στο DNA διττής ειδικότητας, όπου η μία της μορφή προσδένεται στην ετεροχρωματίνη σε περιοχές πλούσιες σε AT και η άλλη στρατολογείται σε ευχρωματινικές περιοχές των γονιδιακών υποκινητών στο μοτίβο ATTCCNAC. Παρ'ότι θεωρείται μεταγραφικός καταστολέας, στα αδιαφοροποίητα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα στοχεύει υποκινητές τόσο σιγησμένων όσο και ενεργών γονιδίων σε σύμπλοκο με τους Nanog και Sox2. Φαίνεται λοιπόν ότι η Sall1 δρα με τρόπο εξαρτώμενο από την αλληλουχία είτε ως μεταγραφικός ενεργοποιητής είτε ως καταστολέας. Επιπλέον, η Sall1 ρυθμίζει την έκφραση του Nanog και πιθανόν να συνεργάζεται με αυτόν στη μεταγραφική ρύθμιση και καταστέλλει τη διαφοροποίηση προς μεσόδερμα και εξώδερμα. Αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι πρόκειται για έναν παράγοντα βλαστικότητας. Επιπρόσθετα, και η Sall4 φαίνεται ότι έχει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των ESCs. Αποτελεί το πρώτο μέλος της οικογένειας των spalt γονιδίων που φαίνεται ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της πλειοδυναμίας των ESCs. Αλληλεπιδρά και ρυθμίζει τον Nanog για την διατήρηση της πλειοδυναμίας και αποτελεί μέλος του Oct4, Sox2 και Nanog διασυνδεδεμένου ρυθμιστικού κυκλώματος. Παρά το γεγονός ότι ετεροδιμερίζεται με τη Sall1, δεν εμφανίζουν πλεοναστική λειτουργία στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα και στοχεύουν τόσο διαφορετικές όσο και κοινές ομάδες γονιδίων. Υπερέκφραση της Sall1 οδηγεί στην ανάπτυξη όγκων.

Η κομματιασμένη Sall1 (Sall1DN)

Μεταλλάξεις της SALL1 προκαλούν την εμφάνιση κυρίαρχων πολυοργανικών συγγενών ανωμαλιών που ορίζουν το σύνδρομο Townes-Brocks (TBS). Η πλειονότητα αυτών των μεταλλάξεων οδηγούν σε πρόωρα κωδικόνια λήξης που είναι υπεύθυνα για την έκφραση κομματιασμένης-μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Η κομματιασμένη SALL1 ευθύνεται για την εμφάνιση του TBS και περιλαμβάνει τη Ν-τελική επικράτεια ικανή για μεταγραφική καταστολή (**Lauberth and Rauchman, 2006**) και την επικράτεια αλληλεπίδρασης Sall-Sall (**Sweetman et al., 2002**).

Ένας πιθανός μηχανισμός για την παθογένεια του TBS υποστηρίζει ότι η κομματιασμένη Sall1 δρα με επικρατώς αρνητικό τρόπο (dominant negative, DN), δηλαδή αλληλεπιδρά με όλες τις πρωτεΐνες Sall και με άλλους παράγοντες και όχι

μόνο δεν δρα η ίδια αλλά αναστέλλει και τη λειτουργία των άλλων παραγόντων. Πιο αναλυτικά, δεσμεύεται στις αγρίου τύπου Sall πρωτεΐνες (**Kiefer et al., 2003**) και αλλάζει την τοποθέτησή τους στον πυρήνα (**Sakaki-Yumoto et al., 2006; Sweetman et al., 2002**). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η φυσιολογική μεταγραφική καταστολή μεσολαβούμενη από Sall και να οδηγούμαστε σε εκτοπική έκφραση των γονιδίων στόχων (**Koshiba-Takeuchi et al., 2006**), για παράδειγμα την εκτοπική ενεργοποίηση δύο καθοδικών γονιδίων, του Nrpa και Shox2, στην αναπτυσσόμενη καρδιά και άκρα αντίστοιχα. Άρα, η κομματιασμένη Sall1 προκαλεί αποκαταστολή των φυσιολογικών γονιδίων στόχων των Sall. Ο φαινότυπος TBS θεωρείται ότι οφείλεται στην επικρατώς αρνητική δράση της κομματιασμένης Sall1 καθώς αυτή παρουσιάζει πιο σοβαρά ελαττώματα από την έλλειψή της. Συγκεκριμένα, η κομματιασμένη SALL1 αλληλεπιδρά με την SALL4 μέσω άμεσης πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης (**Kiefer et al., 2003; Sakaki-Yumoto et al., 2006**). Η κομματιασμένη Sall1 έχει αποδειχθεί ότι αλλάζει την ετεροχρωματινική θέση της Sall4 σε μελέτες καλλιέργειας κυττάρων (**Sakaki-Yumoto et al., 2006**) κι εκεί οφείλεται η απώλεια της Sall4- διαμεσολαβούμενης καταστολής του Nrpa. Σε άλλους ιστούς οι Sall1 και η Sall4 δε φαίνεται να συνεκφράζονται στα ίδια κύτταρα προτείνοντας ότι ένας άλλος μηχανισμός ανεξάρτητος από τη Sall4 διαταράσσεται. Αυτό παρατηρείται στο σχηματισμό των άκρων όπου τα Shox2 και Runx2 υπερεκφράζονται σε Sall1DN μεταλλάγματα αλλά όχι σε Sall4 μεταλλαγμένα ποντίκια. Έτσι, τα Sall1/4 διπλά ετερόζυγα ποντίκια δεν εμφανίζουν ελαττώματα στα άκρα (**Sakaki-Yumoto et al., 2006**) υποστηρίζοντας την ιδέα ότι οι δύο πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν κατά την ανάπτυξη των άκρων. Άρα, οι αναπτυξιακές ανωμαλίες στο TBS είναι πιθανόν αποτέλεσμα διαφορετικών παθογενετικών μηχανισμών σε διαφορετικούς ιστούς. Η κομματιασμένη Sall1 ίσως διαταράσσει τις λειτουργίες κι άλλων μεταγραφικών ρυθμιστών που μοιράζονται το ίδιο μοτίβο καταστολής (e.g., Sall2/3 or Gata/Fog [**Hong et al., 2005; Lauberth and Rauchman, 2006**]) ή χωρίζει συνρρυθμιστικά στοιχεία όπως αυτά του συμπλόκου αναδιοργάνωσης του νουκλεοσώματος (NuRD). Συμπερασματικά, ο φαινότυπος TBS οφείλεται στην κομματιασμένη Sall1 που διαταράσσει τη γονιδιακή ρύθμιση μέσω Sall4 στην καρδιά και μπορεί όμοια να επηρεάζει τη γονιδιακή ρύθμιση και σε άλλους ιστούς.

Το μεταλλαγμένο μετάγραφο Sall1 του TBS διαφεύγει του προστατευτικού μονοπατιού NMD για την παραγωγή κομματιασμένης πρωτεΐνης Sall1 στο ποντίκι και τον άνθρωπο. Οι μεταλλάξεις SALL1 απροσδόκητα δεν υπόκεινται στην καταστροφή NMD (**Asselta et al., 2001; Danckwardt et al., 2002; Romao et al., 2000**) κι έτσι φαίνεται ότι ο καθορισμός αυτής της διαφυγής προτείνει μια νέα μέθοδο θεραπείας που θα περιορίζει τις TBS ανωμαλίες. Η αποτελεσματικότητα του NMD ποικίλει μεταξύ των ατόμων και είναι ιστοειδική (**Bateman et al., 2003; Kerr et al., 2001**) γεγονός που υποδηλώνει ότι η λειτουργία αυτού του μονοπατιού ίσως επίσης να συμβάλλει στη φαινοτυπική ποικιλότητα συνδρόμων όπως το TBS. Εντούτοις, υπάρχουν και άλλοι πιθανοί μηχανισμοί που θα μπορούσαν να επηρεάζουν τη σοβαρότητα του φαινοτύπου που παρατηρείται όπως η αυξανόμενη μεταφραστική αποτελεσματικότητα και η πρωτεϊνική σταθερότητα.

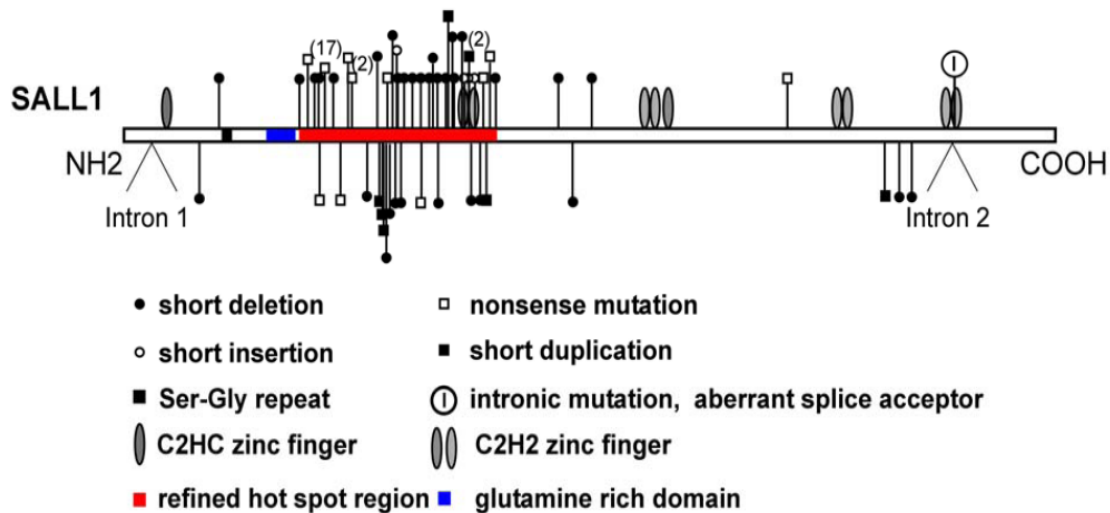
Δεκαοχτώ διαφορετικές μεταλλάξεις της SALL1 (Kohlhase *et al.*, 1998; Kohlhase *et al.*, 1999; Marlin *et al.*, 1999; Blanck *et al.*, 2000; Salerno *et al.*, 2000) έχουν καταγραφεί σε ασθενείς με TBS. Μία ακόμα μετάλλαξη έχει βρεθεί σε μία οικογένεια όπου οι παθόντες δεν υπέφεραν από TBS αλλά εμφάνιζαν φαινότυπο που μοιάζει με το σύνδρομο Branchio-Oto-Renal (Engels *et al.*, 2000). Επιπλέον, μία μετάλλαξη χαρακτηρίστηκε σε νεαρή γυναίκα που εμφάνιζε αλληλεπικαλυπτόμενα χαρακτηριστικά του συνδρόμου TBS και του συνδρόμου Goldenhar (Kohlhase *et al.*, 1999), οδηγώντας συνολικά στις 20 καταγραφόμενες μεταλλάξεις SALL1 (πίνακας 1):

TABLE 1. SALL1 Mutations

Base change	Amino acid change	Position	Phenotype ^a	Reference
419delC	Frameshift	Exon 2	TBS	Kohlhase <i>et al.</i> [1999]
817delG	Frameshift	Exon 2	TBS	Salerno <i>et al.</i> [2000]
826C>T	R276X	Exon 2	TBS	Kohlhase <i>et al.</i> [1999] Marlin <i>et al.</i> [1999]
840delC	Frameshift	Exon 2	TBS	Blanck <i>et al.</i> [2000]
1115C>A	S372X	Exon 2	TBS	Kohlhase <i>et al.</i> [1999]
1115C>G	S372X	Exon 2	TBS	Kohlhase <i>et al.</i> [1998]
1146delT	Frameshift	Exon 2	TBS	Kohlhase <i>et al.</i> [1999]
1200-1206del7	Frameshift	Exon 2	TBS	Kohlhase <i>et al.</i> [1999]
1268delC	Frameshift	Exon 2	TBS	Kohlhase <i>et al.</i> [1998]
1277-1278delGA	Frameshift	Exon 2	TBS/Goldenhar	Kohlhase <i>et al.</i> [1999]
1291-1300del10	Frameshift	Exon 2	TBS	Kohlhase <i>et al.</i> [1999]
1347-1348delCA	Frameshift	Exon 2	TBS	Marlin <i>et al.</i> [1999]
1411-1412insA	Frameshift	Exon 2	TBS	Marlin <i>et al.</i> [1999]
1479-1480insAG	Frameshift	Exon 2	TBS	Marlin <i>et al.</i> [1999]
1509C>A	Y503X	Exon 2	TBS	Blanck <i>et al.</i> [2000]
1565delC	Frameshift	Exon 2	TBS	Marlin <i>et al.</i> [1999]
1819delG	Frameshift	Exon 2	BOR syndrome-like	Engels <i>et al.</i> [2000]
1966-2005del10	Frameshift	Exon 2	TBS	Marlin <i>et al.</i> [1999]
1487del562	Frameshift	Exon 2	TBS	Marlin <i>et al.</i> [1999]
2065del588				
IVS2-19T>A	Aberrant splicing, frameshift	Intron 2	TBS	Blanck <i>et al.</i> [2000]

^aPhenotype: TBS, Townes-Brocks syndrome; BOR, Branchio-Oto-Renal syndrome.

Παρ'ότι οι μεταλλάξεις της SALL1 που οδηγούν στο TBS φαίνεται να συμβαίνουν σε όλο το μήκος του γονιδίου, είναι γεγονός ότι οι περισσότερες από αυτές βρίσκονται στο 5' της περιοχής που κωδικοποιεί το πρώτο διπλό μοτίβο δακτύλων ψευδαργύρου αποδεικνύοντας ότι πρόκειται για θέση επιρρεπή σε μεταλλάξεις (εικόνα 7). Μέχρι σήμερα δεν έχουν καταγραφεί παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense mutations) της SALL1. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι σημειακές μεταλλάξεις, εκτός από τα σημεία όπου συσσωρεύονται πολλές μεταλλάξεις (hot spots), είναι πιο σπάνιες από τα μικρά ελλείματα. Παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις στο TBS θα μπορούσαν μόνο να αναμένονται σε θέσεις σημαντικές για την λειτουργία της SALL1 που θα οδηγούσαν σε απλοανεπάρκεια. Τα μόνα αμινοξέα των οποίων η αντικατάσταση αναμένεται να είναι επιβλαβής είναι τα τοποθετημένα στις επικράτειες δακτύλων ψευδαργύρου. Έτσι, οι περισσότερες μεταλλάξεις της SALL1 που έχουν ανιχνευτεί σε ασθενείς με TBS οδηγούν σε πρόωρα κωδικώνια λήξης.



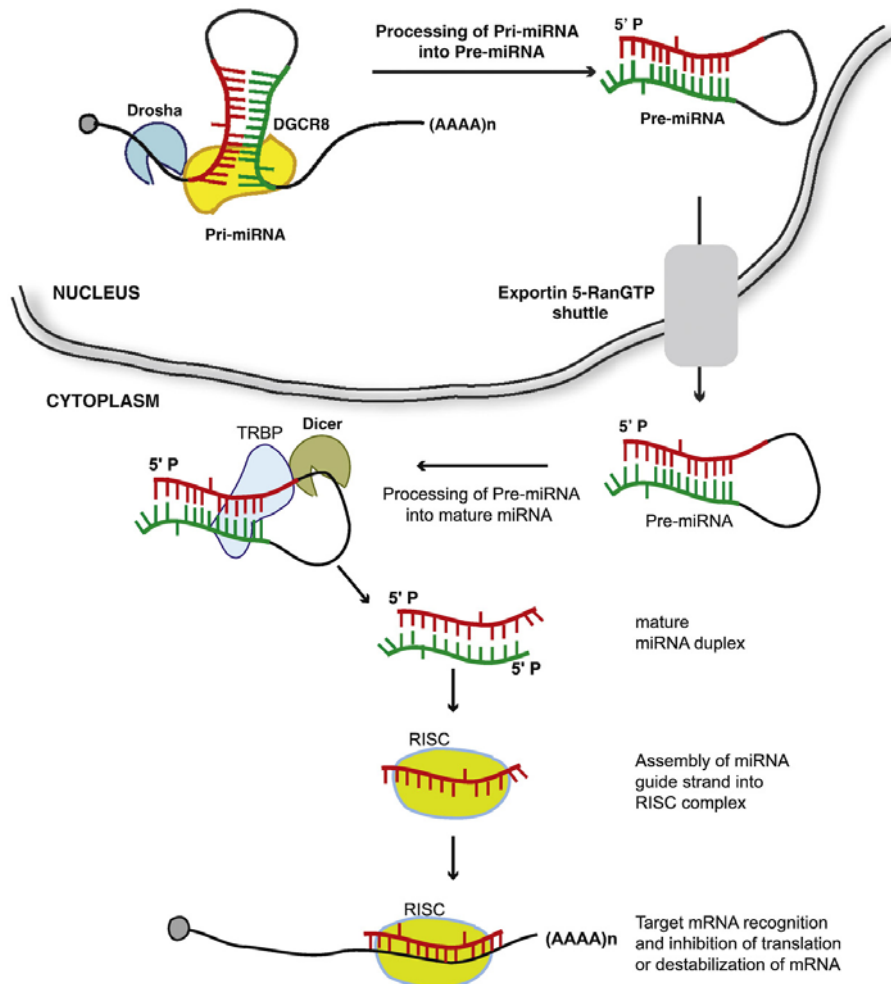
Εικόνα 7: Αναπαράσταση του πλήρους πρωτεϊνικού μορίου που παράγεται από το γονίδιο Sall1 και τοποθέτηση των γνωστών μεταλλάξεων. Η μεγάλη πλειοψηφία των γνωστών μεταλλάξεων συσσωρεύεται στο αμινοτελικό τμήμα του μορίου (hot spot region), δίπλα στη περιοχή που είναι πλούσια σε κατάλοιπα γλουταμίνης.

Η ρύθμιση μέσω microRNAs

Όπως αναφέρθηκε, τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα ρυθμίζονται από επιγενετικούς παράγοντες, από μεταγραφικούς παράγοντες καθώς και από microRNAs (miRNAs). Τα μικρά-RNAs είναι σημαντικοί ρυθμιστές που δρουν στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης και θεωρούνται καθοριστικά για την διατήρηση της βλαστικής ταυτότητας και λειτουργίας των φυτών (**Williams and Fletcher, 2005; Zhao et al., 2007**) και των ζώων (**Cao et al., 2008; Gu et al., 2008; Marson et al., 2008**). Συγκεκριμένα, πρόσφατες έρευνες στη *Drosophila* προτείνουν ότι τα miRNAs είναι σημαντικοί ρυθμιστές της αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων (**Hatfield et al., 2005; Kanellopoulou et al., 2005; Murchison et al., 2005**). Εμπλέκονται επίσης σε μία ποικιλία άλλων βιολογικών διαδικασιών, όπως στο καρκίνο (**Dalmay and Edwards, 2006; Zhang et al., 2007**) όπου δρουν είτε ως ογκοκαταστολείς είτε ως ογκογονίδια, στην εμφύτευση (**Chakrabarty et al., 2007**), στη διαφοροποίηση, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην ανάπτυξη των άκρων (**Harfe et al., 2005; Hornstein et al., 2005**), του πνεύμονα (**Harris et al., 2006**) και του αιμοποιητικού συστήματος (**Chen et al., 2004**).

Τα miRNAs είναι μονοκλωνικά, μη κωδικά RNAs μεγέθους 21-25 νουκλεοτίδια και ρυθμίζουν το mRNA σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Τα miRNAs των μεταζώων κωδικοποιούνται από γονίδια που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II (σε κάποιες σπάνιες περιπτώσεις και από την RNA πολυμεράση III). Πολλά από αυτά μεταγράφονται από την ιντρονική περιοχή των mRNAs (**Rodriguez et al., 2004**) και αποκόβονται ως πρωτογενή miRNAs (primary miRNAs, pri-miRNAs), που έχουν μήκος 400-500 νουκλεοτίδια. Στη συνέχεια, επεξεργάζονται

στον πυρήνα από ένα σύμπλοκο γνωστό ως σύμπλοκο μικροεπεξεργαστής. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από τη πυρηνική ριβονουκλεάση τύπου III, Drosha (Lee *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004) και από τη πρωτεΐνη DiGeorge syndrome Critical Region 8 (DGCR8/Pasha) και μέσω αυτής της επεξεργασίας προκύπτουν φουρκέτες RNA μήκους 70 νουκλεοτιδίων που περιέχουν δομές φουρκέτας γνωστές ως πρόδρομα miRNAs (pre-miRNAs).



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της βιογένεσης των miRNAs και δράσης τους στη γονιδιακή σίγηση.

Επιπλέον, μερικά miRNAs, γνωστά ως mirtrons (Ruby *et al.*, 2007) προσπερνούν την επεξεργασία Drosha μόνο στην *Drosophila*. Μετέπειτα, τα premiRNAs μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα μέσω της Exportin-5. Εκεί η κυτταροπλασματική RNάση τύπου III Dicer (Bernstein *et al.*, 2001) επεξεργάζεται τα pre-miRNAs σε ώριμα miRNAs των 22 νουκλεοτιδίων (εικόνα 8). Η μια από τις 2 αλυσίδες του miRNA είναι η οδηγός. Αυτή ενσωματώνεται στο σύμπλοκο Αργοναύτη (σε μία από τις πρωτεΐνες Αργοναύτη) σχηματίζοντας το ενεργό σύμπλοκο RISC το οποίο καθορίζει τη σίγηση μέσω miRNAs. Η δεύτερη ονομάζεται επιβάτης η οποία απελευθερώνεται και αποικοδομείται. Στη *Drosophila* υπάρχουν 2 γνωστά

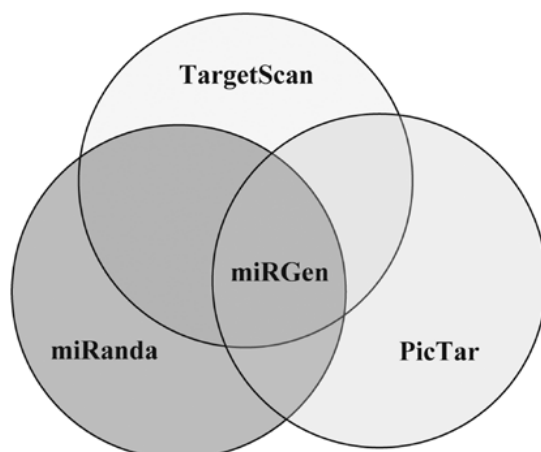
ισοένζυμα Dicer (**Lee et al., 2004**): Dicer-1 που ειδικεύεται στην παραγωγή των miRNAs αλλά έχει επιπλέον μικρή ικανότητα παραγωγής siRNAs και η Dicer-2 που ειδικεύεται στα siRNAs και δεν έχει κανένα ρόλο στη βιογένεση των miRNAs. Στα ποντίκια και τον άνθρωπο έχει χαρακτηριστεί μόνο ένα Dicer ένζυμο.

Το μονοπάτι δράσης των miRNAs αποτελεί μια μορφή μετα-μεταγραφικής γονιδιακής σίγησης που χρησιμοποιεί RNAs μήκους 21-23 νουκλεοτίδια από το γονιδίωμα (π.χ miRNAs) για τη σίγηση συγκεκριμένων γονιδίων, στοχεύοντας το 3'UTR των mRNAs τους (**Elbashir et al., 2001; Lai, 2002**). Άρα, αυτός ο μηχανισμός γονιδιακής σίγησης χρησιμοποιεί μικρά δίκλινα RNAs (dsRNAs) τα οποία δεσμεύονται στο σύμπλοκο πρωτεϊνών γνωστό ως RISC (RNA-induced silencing complex) για τη στόχευση μορίων RNA με συμπληρωματικές αλληλουχίες (**Hammond et al., 2000,2001**) (εικόνα 8). Στο πυρήνα του RISC βρίσκεται ένα μέλος πρωτεϊνών της οικογένειας Αργοναύτη, οι οποίες είναι πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο RNA (**Hammond et al., 2001; Liu et al., 2004**) και σε αυτές ενσωματώνεται η αλληλουχία οδηγός του miRNA (σχηματισμός RISC) προκειμένου να προσδεθεί στο 3'UTR του γονιδίου-στόχου και να πραγματοποιήσει σίγηση. Ο ενδογενής μηχανισμός που εφαρμόζει το μονοπάτι miRNA μπορεί επιπλέον να ενεργοποιηθεί με την εισαγωγή αντισημαίνων RNA συμπληρωματικών με τα ενδογενή είδη mRNA ή με εισαγωγή μακρικών δίκλωνων RNA ομόλογων με ενδογενή ή εξωγενή (πχ ιικά) mRNAs. Όταν μικρά δίκλινα RNAs (πχ siRNAs) παρουσιάζουν τέλεια συμπληρωματικότητα με τους στόχους τους, τότε το σύμπλοκο RISC δρά κόβοντας το mRNA-στόχο με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων του μεταγράφου, ενώ η ατελής συμπληρωματικότητα (όπως στην περίπτωση των miRNAs) δεν επιτρέπει την αποκοπή του μεταγράφου αλλά οδηγεί σε καταστολή της μετάφρασης και/ή υποβάθμιση του mRNA χωρίς απαραίτητα να προκαλεί μείωση στα επίπεδα του μεταγράφου (εικόνα 8). Η αφαίρεση της πολυαδενυλικής (poly-A) ουράς των μεταγράφων στόχων αποτελεί παράδειγμα υποβάθμισης του mRNA μέσω δράσης των miRNAs καθώς με την αφαίρεση της poly-A ουράς τα μετάγραφα γίνονται πιο ευαίσθητα σε ριβονουκλεάσες. Στα ζώα, η φύση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του RISC και των mRNA στόχων εξαρτάται από το ποιά πρωτεΐνη Αργοναύτης (AGO1 ή AGO2) βρίσκεται στο RISC (**Okamura et al., 2004**). Έτσι, είναι φανερό ότι τα miRNAs με τη βοήθεια του συμπλόκου RISC ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο μέσω της πρόσδεσής τους στο 3'UTR των μεταγράφων-στόχων και προκαλώντας είτε καταστολή της μετάφρασης είτε αναστολή της σταθερότητας των μεταγράφων (degradation).

Εκτός από τη μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση, το μονοπάτι των miRNAs παίρνει μέρος και σε άλλες τρεις σημαντικές διαδικασίες: την ιογενή άμυνα, την αναδιοργάνωση της χρωματινής και τη σίγηση των τρανσποζονίων.

Για την πρόβλεψη των γονιδίων στόχων συγκεκριμένων miRNAs χρησιμοποιείται συνήθως η βάση δεδομένων miRGen, η οποία δίνει πρόσβαση σε ευρέως χρησιμοποιούμενα προγράμματα όπως το miRBase, το miRanda, το

TargetScan και το PicTar (εικόνα 9). Με βάση αυτή τη βάση δεδομένων έχει βρεθεί ότι τα περισσότερα miRNAs στοχεύουν πολύριθμα γονίδια.



Εικόνα 9: Η βάση δεδομένων miRGen χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη των γονιδίων στόχων των miRNAs. Η πρόβλεψή του προκύπτει από το αποτέλεσμα που δίνουν τα miRanda, TargetScan και PicTar.

Όσον αφορά τη διατήρηση της βλαστικότητας, έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 32 miRNAs που συμμετέχουν στη ρύθμιση των ιδιοτήτων των βλαστικών ή προγονικών κυττάρων μέσω αυτών των προγραμμάτων (πίνακας 2).

Πίνακας 2: miRNAs σχετιζόμενα με τις ιδιότητες βλαστικών κυττάρων

Table I. miRNAs associated with stem cell-like properties.

miRNA	MDA-MB-231 vs. MCF-7 cells	SUM1315 vs. MCF-7 cells	Function description	Representative target genes
miR-375			Regulates human ES cell differentiation (15)	RLF, OTP, INSM1
miR-203			Tumor suppressor, and regulates stem cell differentiation (16,17)	EDN1
miR-200c			Suppresses the ability of normal mammary stem cells to form mammary ducts and tumors (18)	FN1, ZFHX1B
miR-7			Regulates differentiation of germline stem cell lineage (19)	COL2A1, GLI3, KLF4
miR-98			Regulates differentiation of bronchoalveolar stem cells (20)	E2F5, HOXA9, SEMA4C
miR-183			Suppresses expression of stem cell factors in cancer and mouse ES cells (21)	ABCA1, LRP6, ITGB1
miR-26b			Significantly decreased in human ES cells (22)	JAG1, NLK, Ezh2
miR-21			Suppresses the self-renewal of ES cells (23)	SATB1, RHOB, PITX2
miR-148b			Regulates human mesenchymal stem cell differentiation (24)	CANX, CSF1, DNMT1
miR-93			Depleted in mammary progenitor cells (25)	LATS2, TXNIP, ARID4B
miR-125a			Regulates neural differentiation of stem cells (26)	TAZ, GPC4, PLAGL2
miR-106b			Altered expression in bronchoalveolar stem cells (27)	ARID4B, BCL2L2, EPHA4
miR-103			Modulates the self-renewal of mesenchymal stem cells (28)	BTG2, CDK6
miR-107			Modulates the self-renewal of mesenchymal stem cells (28)	OGT, RBM24, CDK6
miR-128			Promotes neural stem cell self-renewal (29)	BMI-1
miR-26a			Modulates the osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells (30)	SMAD1, HOXA5, JAG1
miR-20a			Differentially expressed in developing mouse embryos, and controls differentiation of stem cells (31)	ABCA1, BCL11B, CD69
miR-23b			Regulates liver stem cell differentiation by targeting Smads (32)	PKNOX1, SRC1, ZIC1
miR-23a			Increased during replication and senescence of human cord blood-derived multipotent stem cells (33)	ELF5, SRC1
miR-92b			Controls the G1/S checkpoint gene p57 in human ES cells (34)	p57
miR-24			Inhibits endodermal differentiation of human ES cells (35)	CDX2
miR-22			Highly expressed in mammary progenitor cells (25)	LGALS1, PLAGL2, MECP2
miR-19a			Up-regulated by activin A in human ES cells (36)	CD164, ARHGAP1, WNT3
miR-27a			Reduces the differentiation of human mesenchymal stem cells (24)	HOXB8, APRIN, SEMA4C
miR-19b			Down-regulated by activin A in human ES cells (36)	NEUROD1, WNT3, CCNT2
miR-29c			Up-regulated in the course of replicative senescence of mesenchymal stem cells (37)	RLF, TRAF4, PHC1
miR-99a			Differentially expressed in human mesenchymal stem cells (38)	HOXA1
miR-29a			Highly expressed in hematopoietic stem cells and down-regulated in hematopoietic progenitors (39)	RLF, GDF8, TRAF4
miR-125b			Critical for the suppression of human U251 glioma stem cell proliferation (40)	GPC4, TAZ, MSI1

Table I. Continued.

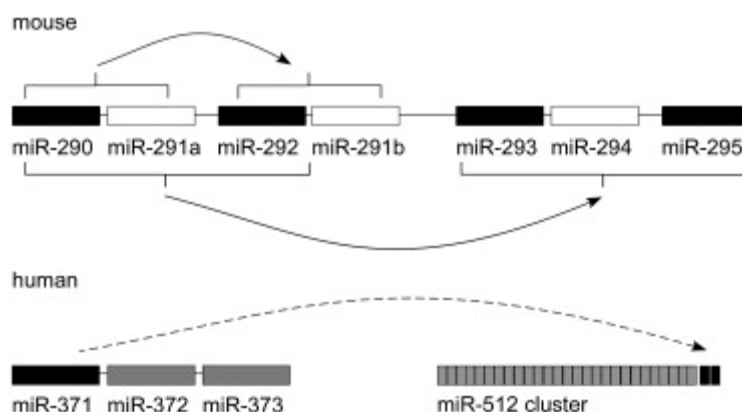
miRNA	MDA-MB-231 vs. MCF-7 cells	SUM1315 vs. MCF-7 cells	Function description	Representative target genes
miR-100			Modulates differentiation of mouse ES cells (41)	SMARCA5, HOXA1
miR-222			Highly expressed at early developmental stages in the embryonic retina (42)	MAP3K10, PBX3
miR-221			Controls proliferation and differentiation of CD34-positive hematopoietic progenitor cells (43)	MAP3K10, CTCF

Fold changes: |||||, -512 to -256; |||||, -256 to -128; |||||, -128 to -64; |||||, -64 to -32; |||||, -32 to -16; |||, -16 to -8; ||, -8 to -4; |, -4 to -2; ↑, 2 to 4; ↑↑, 4-8; ↑↑↑, 8-16; ↑↑↑↑, 16-32; ↑↑↑↑↑, 32-64; ↑↑↑↑↑↑, 64-128; ↑↑↑↑↑↑↑, 128-256; ↑↑↑↑↑↑↑↑, 256-512; ↑↑↑↑↑↑↑↑↑, 512-1024.

Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η οικογένεια miR-290-295 κωδικοποιεί μια οικογένεια microRNAs (miRNAs) τα οποία εκφράζονται de novo κατά την πρώιμη εμβρυογένεση και είναι ειδικά για τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα ποντικού (ESC) και τα εμβρυικά καρκινικά κύτταρα (ECC). Τα μέλη αυτής της ομάδας έχει

αποδειχθεί παλαιότερα από το εργαστήριό μας ότι εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα ESCs. Είναι λοιπόν τα λειτουργικά επικρατή miRNAs που καθορίζουν τις ιδιότητες των ES κυττάρων του ποντικού (**Sinkkonen et al., 2008**). Η ομάδα miR-290-295 φαίνεται να είναι συντηρημένη μεταξύ του ανθρώπου, του χιπατζή, του αρουραίου, του ποντικού, του σκύλου και της αγελάδας, παρ'ότι η δομή της είναι υψηλά ποικιλόμορφη (**Houbaviy et al., 2005**). Στο ποντίκι μεταγράφεται σε ένα πρόδρομο miRNA μήκους 3.2 kb, το οποίο επεξεργάζεται σε 10 διαφορετικά ώριμα miRNAs. Η de novo έκφραση αυτών των miRNAs συμβαίνει αρκετά νωρίς, κατά το στάδιο των δύο και τεσσάρων κυττάρων, γεγονός που υποδεικνύει ότι πρόκειται για τα πρώτα και πιο άφθονα miRNAs που εκφράζονται κατά την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη του ποντικού.

Η ομάδα miR-290-295 του ποντικού αποτελείται από 7 miRNAs: miR-290, miR-291a, miR-291b, miR-292, miR-293, miR-294 και miR-295, καθοδικά του γονιδίου Nlrp12. Παρόμοια θέση έχει χαρτογραφηθεί και για τα ανθρώπινα ομόλογά του: miR-371, miR-372 και miR-373 (ομάδα miR-371-373). Επιπλέον, μέσα από αναλύσεις στοίχισης αλληλουχιών έχει βρεθεί ότι ο πρόγονος της ομάδας miR-290-295 στο ποντίκι και miR-371-373 στον άνθρωπο είναι το miR-290 και miR-371, αντίστοιχα (**εικόνα 10**). Έτσι, η ομάδα miR-290-295 προήλθε από επαναλαμβανόμενους διπλασιασμούς ενός μόνο miRNA: του miR-290.



Εικόνα 10: Η ποντικίσια ομάδα pre-miR-290-295 περιλαμβάνει 7 προκατόχους miRNA, οι οποίοι πιθανόν να προέρχονται εξελικτικά από γεγονότα διπλασιασμού της κωδικής αλληλουχίας του miR-290-291a.

Η υπερέκφραση της ειδικής αυτής ομάδας για τα βλαστικά κύτταρα προκαλεί καταστολή των γονιδίων-μαρτύρων της πρώιμης διαφοροποίησης (και προς τις τρεις βλαστικές στοιβάδες) ενώ δεν επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων πλειοδυναμίας, υποδεικνύοντας ότι ίσως διατηρεί τα κύτταρα στην πλειοδύναμη κατάσταση και ταυτόχρονα αποτρέπει την πρώιμη διαφοροποίηση για τη διατήρηση της πλειοδυναμίας. Εντούτοις, σειρές εμβρυικών κυττάρων με υπερέκφραση των miR-290-295 εμφανίζουν εκτεταμένη διαφοροποίηση, αποδεικνύοντας ότι σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια δεν μπορεί πλέον να αποτρέψει τη διαφοροποίηση. Άρα, η αυξανόμενη έκφρασή τους μπορεί να καθυστερήσει αλλά όχι

να παρεμποδίσει τη διαφοροποίηση των ESCs. Συνεπώς, τα miR-290-295 έχουν εξελιχθεί για τη διατήρηση την πλειοδυναμία της εσωτερικής κυτταρικής μάζας για ένα περιορισμένο και καθορισμένο χρονικό διάστημα και δρουν μέσω άμεσης αναστολής ρυθμιστών των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο σε πολλαπλά σημεία, ενισχύουν την μετάβαση από τη φάση G1 στην S και έτσι κατέχουν καθοριστικό ρόλο στην εγκαθίδρυση των ειδικών χαρακτηριστικών του ESC κυτταρικού κύκλου και δημιουργούν μία θετική αλληλεπίδραση μεταξύ του κυτταρικού κύκλου και της διατήρησης των βλαστικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, η δράση τους επιφέρει ένα γενικότερο αποτέλεσμα στη βλαστικότητα/διαφοροποίηση και όχι την καταστολή της διαφοροποίησης προς ένα συγκεκριμένο μονοπάτι. Άρα, τα miRNAs είναι πλέον τα πιο κατάλληλα μόρια για τη ρύθμιση της πρώιμης διαφοροποίησης καθώς όχι μόνο εμφανίζουν υψηλή προσαρμοστικότητα αλλά μπορούν ακόμα να ρυθμίζουν πολλαπλούς στόχους την ίδια στιγμή γεγονός που τα καθιστά ικανά για αποτελεσματική ρύθμιση μιας βιολογικής διαδικασίας σε πολλαπλά σημεία.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ- MAXIPREP

Η τεχνική αυτή αφορά μετασχηματισμούς βακτηρίων που έχουν επωαστεί σε φλάσκες ή κωνικές φιάλες όγκου >200mL.

- Προσθέτουμε αντιβιοτικό σε καθαρό θρεπτικό LB σε τελική συγκέντρωση 1/1000.
- Παίρνουμε μια σταγόνα από την υγρή καλλιέργεια που θέλουμε να μεγαλώσουμε και την προσθέτουμε στο θρεπτικό με το αντιβιοτικό.
- Αφήνουμε την καλλιέργειά μας να επωαστεί overnight (O/N) στους 37°C υπό ανάδευση για να εξασφαλίσουμε τις αναγκαίες απαιτήσεις αερισμού για τα βακτήριά μας.
- Την επόμενη μέρα μεταφέρουμε την καλλιέργειά μας σε πλαστικά baquets και φυγοκεντρούμε στις 5000rpm για 10min ώστε να πάρουμε τη βακτηριακή πελέτα.
- Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιούμε ειδικές κολώνες
- Εξισσορόπηση της κολώνας προσθέτοντας 12mL equilibrium buffer.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο (θρεπτικό) από τα baquets και προσθέτουμε 8mL παγωμένου equilibration buffer S₁ που περιέχει RNase προσπαθώντας να επαναδιαλυτοποιήσουμε όσο γίνεται καλύτερα την βακτηριακή πελέτα.
- Προσθέτουμε 8mL lysis buffer S₂ για να λύσουμε τα κύτταρα.
- Εξισσορούμε προσθέτοντας 8mL neutralization buffer S₃, καθώς το S₂ μπορεί να καταστρέψει το DNA αν παραμείνει σε επαφή με τα κύτταρα για χρόνο μεγαλύτερο των 5min.
- Περνάμε από την κολώνα το μείγμα μας και το πλασμιδιακό DNA συγκεντρώνεται στο κάτω φίλτρο.
- Μόλις περάσει ολόκληρο το διάλυμά μας πραγματοποιούμε δύο πλύσεις. Αρχικά πλένουμε την κολώνα μας με 5mL equilibrium buffer και ακολούθως αφού αφαιρέσουμε το πάνω φίλτρο (όπου έχουν συγκεντρωθεί κυτταρικά υπολείμματα και το γενωμικό DNA) ξεπλένουμε το κάτω φίλτρο με 8mL wash buffer.

- Προσθέτουμε 5mL elution buffer και συγκεντρώνουμε το πλασμιδιακό DNA σε falcon που τοποθετούμε κάτω από την κολώνα.
- Κατακρημνίζουμε το DNA με προσθήκη 3,5mL ισοπροπανόλης και φυγοκέντρωση στις 3000rpm για 30min. Πετάμε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε την πελέτα μας σε νερό ή TE buffer σε όγκο που εξαρτάται από το μέγεθος της πελέτας μας.
- Αποθηκεύουμε στους -20°C.
- Είναι καλό να τρέξουμε το DNA που απομονώσαμε σε gel αгарόζης 1% για να το ποσοτικοποιήσουμε αλλά και για να δούμε την ποιότητα του απομονωμένου πλασμιδίου (αν είναι στην πλειοψηφία του nicked ή ακέραιο).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ- MINIPREP

Η τεχνική αυτή αφορά μετασχηματισμούς βακτηρίων που έχουν επωαστεί σε φλάσκες ή κωνικές φιάλες όγκου <50mL.

- Μεταφέρουμε σε σωληνάκια τους κλώνους που προέκυψαν από την επώαση στο τριβλίο. Κάθε σωληνάκι περιέχει 2mL θρεπτικό LB και αντιβιοτικό 1/1000.
- Επιάζουμε τα σωληνάκια O/N (~18h) στους 37°C με ανακίνηση.
- Την επόμενη μέρα, παίρνουμε 1mL από κάθε καλλιέργεια σε καθαρό erpendorf πάντα κάτω από λυχνία και φυγοκεντρούμε για 1min στις 6000rpm.
- Αδειάζουμε το υπερκείμενο με το θρεπτικό μέσο και διατηρούμε τη βακτηριακή πελέτα.
- Επαναδιαλυτοποιούμε με vortex σε 100μL διαλύματος S1 που περιέχει RNase.
- Προσθέτουμε 100μL S2 για να λύσουμε τα κύτταρα ανακινώντας καλά με την πιπέτα για να πάει παντού το S2.
- Προσθέτουμε 100μL S3 για να εξουδετερώσουμε το S2, ανακινούμε καλά με το χέρι και φυγοκεντρούμε στις 14000rpm για 10min σε RT.
- Παίρνουμε το υπερκείμενο (~300μL) και προσθέτουμε δύο όγκους αιθανόλης για να κατακρημνιστεί το DNA. Ανακινούμε καλά και φυγοκεντρούμε στις 14000rpm για 10min στους 4°C.
- Απομακρύνουμε την αιθανόλη και στεγνώνουμε πολύ καλά την πελέτα.

- Επαναδιαλυτοποιούμε σε 100μL ddH₂O και αποθηκεύουμε στους -20°C.

ΕΞΑΓΩΓΗ ΜΠΑΝΤΑΣ ΑΠΟ GEL ΑΓΑΡΟΖΗΣ-GEL EXTRACTION

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση της επιθυμητής από ένα σύνολο μπαντών σε gel αγαρόζης. Το υλικό που παίρνουμε μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετά για να εντεθεί σε κάποιον επιθυμητό φορέα.

- Κόβουμε την επιθυμητή μπάντα από το gel μας με ξυραφάκι αφού το έχουμε φωτίσει με UV.
- Ζυγίζουμε το κομμάτι αγαρόζης και DNA που κόψαμε
- Για κάθε 100 mg βάρους προσθέτουμε 200μL NT buffer του kit Nucleospin extract II (Macherey Nagel).
- Επωάζουμε το eppendorf με το δείγμα μας στους 55°C και ανακινούμε καλά ανά 5min μέχρι να λιώσει πλήρως η αγαρόζη.
- Τοποθετούμε την στήλη του kit σε ένα tube συλλογής των 2mL και φορτώνουμε το δείγμα μας.
- Φυγοκεντρούμε για 1min στα 11000g. Πετάμε ό,τι διέρχεται από τη στήλη (flow-through) και κάνουμε την ίδια διαδικασία μέχρι να περάσει όλο το δείγμα μας από την στήλη κατακράτησης του DNA.
- Προσθέτουμε 700μL NT3 buffer που περιέχει αιθανόλη στη στήλη και φυγοκεντρούμε στα 11000g για 1min ώστε να πλύνουμε την κολώνα μας. Απομακρύνουμε εκ νέου ό,τι περνάει.
- Στεγνώνουμε την μεμβράνη της κολώνας μας φυγοκεντρώντας στα 11000g για 2min.
- Εκλούουμε το DNA μας προσθέτοντας 15-50μL NE buffer, αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 1min και φυγοκεντρούμε για 1min στα 11000g.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται όταν θέλουμε να συνενώσουμε ένα επιθυμητό ένθεμα (insert) με ένα πλασμιδιακό φορέα. Ο υπολογισμός των ποσοτήτων που προστίθενται γίνεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$\mu\text{g insert} \geq \mu\text{g φορέα} \times 10 \times \frac{\text{MB insert}}{\text{MB φορέα}}$$

(Τα μg τόσο του φορέα όσο και του insert υπολογίζονται αφού τρέξουμε αμφότερα σε gel αγαρόζης).

Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 20 μL . Εκτός από τον φορέα και το ένθεμα που διαθέτουν τα κατάλληλα άκρα ή διαθέτουν και τα δύο τυφλά (blunt) άκρα, πρέπει να προστεθεί buffer λιγάσης (+ATP) 2 μL καθώς και ένζυμο λιγάσης που προέρχεται από το φάγο T4.

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ-TRANSFORMATION

Η τεχνική αυτή βρίσκει χρήση όταν θέλουμε να εισάγουμε σε βακτηριακά κύτταρα ένα πλασμίδιο που φέρει το επιθυμητό ένθεμα ύστερα από μοριακή συγκόλληση (ligation).

- Χρησιμοποιούμε κύτταρα *E.coli* του στελέχους DH5 τα οποία έχουν καταστεί προηγουμένως επιδεκτικά στον μετασχηματισμό ύστερα από ειδική επεξεργασία με CaCl_2 .
- Προσθέτουμε την ligation μας ή το πλασμίδιο μας, ώστε το DNA να έρθει σε επαφή με τα βακτηριακά κύτταρα, και επωάζουμε για 30min σε ξηρό πάγο.
- Πραγματοποιούμε θερμικό σοκ στους 42°C για 1,5min ακριβώς, ώστε να υποβοηθήσουμε την είσοδο του πλασμιδίου μας στα επιδεκτικά κύτταρα.
- Αφήνουμε για 1min στον πάγο.
- Προσθέτουμε στο erpendorf με τα βακτήρια 900 μL καθαρό θρεπτικό LB χωρίς αντιβιοτικό και επωάζουμε στους 37°C για 30min-1h ώστε τα βακτήριά μας να καταφέρουν να ανακάμψουν ύστερα από το θερμικό σοκ.
- Παίρνουμε τα 100 μL και τα βάζουμε σε καθαρό erpendorf (1/10) και φυγοκεντρούμε την υπόλοιπη ποσότητα (9/10) στις 6000rpm για 5min.
- Αφού αφαιρέσουμε την μεγαλύτερη ποσότητα του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποιήσουμε την πελέτα, απλώνουμε τα κύτταρα σε τριβλία με στερεό θρεπτικό LB μέσο και το κατάλληλο αντιβιοτικό. Μόνο όσα βακτήρια έχουν ενσωματώσει το πλασμίδιο μας που διαθέτει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό θα καταφέρουν να επιβιώσουν.

- Αφήνουμε τα τριβλία στους 37°C για όλο το βράδυ (O/N) ώστε να αναπτυχθούν τα βακτήρια με το πλασμίδιό μας και να σχηματίσουν αποικίες.
- Την επόμενη μέρα, παίρνουμε κατά το δυνατόν μοναδιαίες αποικίες από το τριβλίο μας και μεγαλώνουμε την αποικία μας σε θρεπτικό υλικό με αντιβιοτικό (σε κωνική φιάλη ανάλογα με το πόσο μεγάλη καλλιέργεια θέλουμε να έχουμε). Η επώαση γίνεται ξανά O/N στους 37°C.

ΕΞΑΓΩΓΗ RNA ΑΠΟ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (RNA EXTRACTION)

- Συλλέγουμε τα κύτταρά μας με την ειδική ξύστρα και τα τοποθετούμε σε eppendorf.
- Φυγοκεντρούμε με 6000rpm για 5min ώστε να κατακρημνίσουμε την κυτταρική πελέτα.
- Ξεπλένουμε με 500μL 1x PBS και φυγοκεντρούμε εκ νέου στις 6000rpm για 5min.
- Προσθέτουμε 250μL Trizol® Reagent (Invitrogen) και επαναδιαλυτοποιούμε με vortex. Το Trizol είναι ένα μονοφασικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη και τον χαστροπικό παράγοντα guanidinium isothiocyanate. Το διάλυμα αυτό έχει την ικανότητα να λύει τα κύτταρα, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει τη ακεραιότητα του RNA.
- Προσθέτουμε 50μL χλωροφόρμιο και ομογενοποιούμε με vortex.
- Φυγοκεντρούμε στις 14000rpm για 10min σε RT.
- Κρατάμε την πάνω φάση που περιέχει το RNA μας σε νέο eppendorf (**ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ**: Δεν πρέπει να πάρουμε από την μεσόφαση διότι εκεί κρατιέται το γενωμικό DNA)
- Κατακρημνίζουμε προσθέτοντας 125μL ισοπροπανόλης (δηλαδή τον μισό όγκο του αρχικού αντιδραστηρίου Trizol που προσθέσαμε).
- Ανακινούμε πολύ καλά με το χέρι.
- Επιάζουμε για 10min στον εργαστηριακό πάγκο, δηλαδή σε RT.
- Φυγοκεντρούμε στις 14000rpm για 10min στους 4°C.
- Το RNA κατακρημνίζεται στην πελέτα και αφαιρούμε προσεχτικά το υπερκείμενο.
- Επαναδιαλυτοποιούμε την πελέτα σε 20μL ddH₂O.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ DNAσης:

Για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιούμε και τα 20μL του επαναδιαλυτοποιημένου RNA. Επίσης, βάζουμε 3μL DNase buffer και 3μL DNase enzyme, ενώ σταθεροποιούμε τον τελικό όγκο στα 30μL μετά από προσθήκη 4μL ddH₂O.

Επωάζουμε στους 37°C για 1/2h, ώστε να λάβει χώρα αποτελεσματικά η αντίδραση.

- Αμέσως μετά, αυξάνουμε τον όγκο των δειγμάτων στα 150μL προσθέτοντας 120μL ddH₂O.
- Προσθέτουμε ίσο όγκο (150μL) παγωμένης φαινόλης και ομογενοποιούμε με vortex.
- Φυγοκεντρούμε στις 14000rpm για 10min σε RT.
- Απομονώνουμε την πάνω φάση (RNA) σε νέο eppendorf.
- Προσθήκη ίσου όγκου (150μL) χλωροφορμίου και vortex.
- Φυγοκέντρωση στις 14000rpm για 10min σε RT.
- Απομόνωση της πάνω φάσης.
- Κατακρήμνιση με ίσο όγκο (150μL) ισοπροπανόλης.
- Ανακίνηση με το χέρι και επώαση σε RT για 10min.
- Φυγοκέντρωση στις 14000rpm για 10min στους 4°C.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση σε όγκο που εξαρτάται από την πελέτα.
- Φωτομέτρηση του RNA.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ:

Στην αντίδραση χρησιμοποιούμε συνολικά 2γ (2000ng=2μg) ολικού RNA από το κάθε δείγμα. Στο πρώτο μείγμα (mix 1) για κάθε δείγμα προσθέτουμε 10μL ddH₂O και 2μL μείγματος τυχαίων εξαμερών που μπορούν να υβριδοποιούνται σε πολλά διαφορετικά μετάγραφα. Μετά την προσθήκη του πρώτου μείγματος τα δείγματα παραμένουν στους 65°C, ώστε να ευνοηθεί η στοχαστική υβριδοποίηση των εξαμερών. Στο δεύτερο δείγμα (mix 2), για κάθε δείγμα προσθέτουμε 4μL 10x buffer, 2μL dNTPs (10mM), 0,25μL placental RNAsin (RNase inhibitor), 6.15μL ddH₂O, 0.2μL αντίστροφη μεταγραφάση. Τα δείγματα επωάζονται για 2h στους 37°C για να

γίνει η αντίδραση. Ακολούθως, τα βάζουμε στους -80°C μέχρι να κάνουμε real-time PCR.

Μείγμα 1(mix 1)	Μείγμα 2 (mix 2)
10μL ddH ₂ O	4μL 10x buffer
2μL random hexamers	2μL dNTPs
	0.25μL RNAsin
	6.15μL H ₂ O
	0.2 μL Reverse Transcriptase Enzyme

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (DNA EXTRACTION)

- Φυγοκέντρωση των κυττάρων στις 6000rpm για 5min στους 4°C για να πάρουμε το σύνολό τους σε μορφή πελέτας.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης και κρατάμε μόνο την πελέτα.
- Προσθήκη 0.5mL 1x PBS για πλύση της πελέτας.
- Φυγοκέντρωση στις 6000rpm για 5min στους 4°C .
- Στην πελέτα προσθέτουμε 100μL digestion buffer (100mM NaCl, 10mM TrisCl pH=8.0, 25mM EDTA pH=8.0, 0.5% SDS) στο οποίο έχουμε προσθέσει προηγουμένως και πρωτεϊνάση K σε τελική συγκέντρωση 0.1mg/mL (από stock 10mg/mL).
- Αφήνουμε τα δείγματά μας O/N στους 55°C ώστε να καταφέρει να δράσει η πρωτεϊνάση.
- Προσθέτουμε 1μL RNase ώστε να απομακρύνουμε τα υπολείμματα RNA. Για να δράσει η RNase αφήνουμε για 1h στους 37°C .
- Προσθέτουμε ίσο όγκο (100μL) παγωμένη φαινόλη-χλωροφόρμιο. Φυγοκεντρούμε σε RT για 10min στις 14000rpm.
- Απομονώνουμε την υδατική (πάνω) φάση και προσθέτουμε 1V (100μL) χλωροφόρμιο. Φυγοκεντρούμε σε RT για 10min στις 14000rpm.
- Απομονώνουμε ξανά την πάνω φάση και προσθέτουμε 1/10V (10μL) CH₃COONa pH=5.2 καθώς και 2-2.5V (250μL) EtOH 100% προκειμένου να κατακρημνίσουμε το γενωμικό DNA.

- Φυγοκεντρούμε στις 14000rpm για 10min στους 4°C.
- Επαναδιαλυτοποιούμε την πελέτα μας με TE buffer (ποσότητα ανάλογα με το μέγεθος) και διατήρηση των δειγμάτων στους -20°C μέχρι την μέρα που θα διεξαχθεί συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ-PCR

Η μέθοδος αυτή βρίσκει χρήση όταν θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε in vitro σε εκατομμύρια αντίγραφα ένα επιθυμητό τμήμα DNA. Για κάθε δείγμα μας χρησιμοποιούμε τα ακόλουθα συστατικά (Vτελ=20μL):

- 2μL γενωμικού DNA αραιωμένου ώστε να έχει συγκέντρωση 50-100ng
- 2μL 10x buffer Taq
- 2μL 25mM MgCl₂ (το Mg είναι απαραίτητο για την κατάλυση από την DNA πολυμεράση)
- 0.2μL 10mM dNTPs
- 1μL 5' (forward) primer
- 1μL 3' (reverse) primer
- 11.7μL ddH₂O
- 0.1μL Taq polymerase enzyme

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ- REAL TIME PCR

Η μέθοδος αυτή βρίσκει χρήση όταν θέλουμε να ποσοτικοποιήσουμε την ποσότητα ενός τμήματος cDNA (και εμμέσως του μεταφράφου από το οποίο προκύπτει μέσω αντίγραφης μεταγραφής-πρωτόκολλο 6). Η διαφορά με την κλασική PCR είναι η χρήση της χρωστικής SybrGreen, η οποία έχει την ικανότητα να εισχωρεί (intercalate) σε δίκλιωνα τμήματα DNA σε ποσότητα ανάλογη με το πλήθος των τμημάτων DNA που περιέχονται σε ένα δείγμα. Επίσης στην αντίδραση πραγματικού χρόνου, βρίσκουν χρήση και standards γνωστής συγκέντρωσης που περιέχουν κλωνοποιημένο σε φορέα το τμήμα που πολλαπλασιάζουν οι primers μας. Έτσι καταφέρνουμε να έχουμε μια πρότυπη καμπύλη από standards και να μετράμε το προϊόν μας με βάση τα προϊόντα αυτά

που είναι γνωστής συγκέντρωσης. Για κάθε δείγμα, χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα συστατικά:

- 2μL template
- 2μL 10x buffer Taq
- 2μL 25mM MgCl₂
- 0.2μL 10mM dNTPs
- 0.2μL 5' (forward) primer
- 0.2μL 3' (reverse) primer
- 1μL SybrGreen
- 12.2μL ddH₂O
- 0.2μL Taq DNA polymerase enzyme

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ (LUC ASSAY)

Η δοκιμασία αυτή μετράει τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης. Το ένζυμο αυτό έχει την δυνατότητα κατάλυσης της οξειδωσης του υποστρώματος λουκιφερίνη σε οξυλουκιφερίνη. Κατά την αντίδραση αυτή ελευθερώνεται φως, το οποίο μπορεί ακολούθως να μετρηθεί με τη χρήση ειδικού οργάνου (λουμινόμετρο).

- Quickspin του διαλύματος που περιέχει τα κύτταρά μας.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου της φυγοκέντρωσης.
- Προσθέτουμε στις κυτταρικές πελέτες 100-150μL Tris 0.25M, pH=7.8.
- Λύουμε τα κύτταρά μας με χρήση υπερήχων για ελάχιστο διάστημα.
- 20μL από κάθε κυτταρικό εκχύλισμα τοποθετείται σε νέο eppendorf.
- Προσθέτουμε ίσο όγκο (20μL) Luc υποστρώματος λίγο πριν την είσοδο του δείγματος στο λουμινόμετρο για μέτρηση.
- Μέτρηση της φωταύγειας της λουσιφεράσης.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΔΑΣΗΣ (LacZ ASSAY)

Η δοκιμασία αυτή μετράει τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης. Χρησιμοποιείται όταν τα πλασμίδια που χρησιμοποιούμε για διαμόλυνση (transfection) εκφράζουν το ένζυμο αυτό (π.χ CMV-LacZ), για να

κανονικοποιήσουμε τα αποτελέσματα του Luc assay, επειδή ο δείκτης διαμόλυνσης των κυττάρων δεν είναι ο ίδιος.

- Βάζουμε σε microtiter 20μL κυτταρικού εκχυλίσματος που έχει προκύψει από χρήση υπερήχων, όπως και στην περίπτωση του Luc assay.
- Προσθέτουμε το υπόστρωμα της β-γαλακτοζιδάσης ONPG, 30μL για κάθε δείγμα.
- Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 170μL LacZ buffer.
- Αφήνουμε μέχρι να αρχίσουν να κιτρινίζουν τα πηγαδάκια και μετράμε στο κατάλληλο όργανο.

ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ (TRANSFECTION) ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΑΛΑΤΑ ΚΑΙ CaCl₂

Αποτελεί ένα γρήγορο, φθινό και αποτελεσματικό τρόπο διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων με μια ή περισσότερες πλασμιδιακές κατασκευές. Η αρχή της μεθόδου είναι ότι το DNA που είναι φορτισμένο αρνητικά συσσωματώνεται με τα θετικά ιόντα ασβεστίου και στην συνέχεια κατακάθεται πάνω στα κύτταρα λόγω της προσκόλλησης σε αρνητικά φωσφορικά άλατα μεγάλου μοριακού βάρους. Η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο που χρησιμοποιούμε για τα πειράματά μας (π.χ κύτταρα HeLa διαμολύνονται πιο δύσκολα σε σχέση με τα 293 HEK). Ο συνολικός όγκος ο οποίος προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι είναι το 1/10 του όγκου του θρεπτικού που αυτό περιέχει. Η ποσότητα του πλασμιδίου που προσθέτουμε διαφέρει ανάλογα με το μέγεθος του πηγαδιού (π.χ σε μια 6-well plate βάζουμε περί τα 5μg πλασμιδίου και σε μια 12-well plate 2.5μg).

- Ελέγχουμε αν τα πλασμίδια μας είναι σε καλή κατάσταση (υπερελικωμένα και όχι με εγκοπές) και τα ποσοτικοποιούμε τρέχοντάς τα σε gel αγαρόζης.
- Το πρώτο μίγμα που χρησιμοποιούμε (μισός από τον συνολικό όγκο) περιέχει CaCl₂ 2.5M (20x) αραιωμένο 10 φορές, τα πλασμίδιά μας και ddH₂O ώστε να συμπληρωθεί ο μισός όγκος.
- Προσθέτουμε άλλο μισό όγκο φωσφορικά άλατα Hebs (2x). Έτσι, τελικά φτάνουμε να έχουμε 1x CaCl₂, 1x Hebs και τα DNA μας.

- Αφήνουμε να επωαστεί το διάλυμά μας για 15min στον απαγωγό μέχρι να σχηματιστεί το ίζημα και το προσθέτουμε με προσοχή στα κύτταρα.
- Τα κύτταρα τα επωάζουμε στους 37°C O/N ώστε να αναπτυχθούν.
- Την επόμενη μέρα ξεκολλάμε τα κύτταρα με προσθήκη 1mL PBS-EDTA και τα μαζεύουμε.

ΣΤΥΠΩΜΑ WESTERN (WESTERN BLOT)

Η τεχνική αυτή βρίσκει χρήση όταν θέλουμε να ανιχνεύσουμε την παρουσία της επιθυμητής πρωτεΐνης σε ένα κυτταρικό εκχύλισμα μέσω ενός αντισώματος (πολυκλωνικού ή μονοκλωνικού) που το αναγνωρίζει. Αρχικά, τρέχουμε τις πρωτεΐνες μας σε gel ακρυλαμίδης πυκνότητας που εξαρτάται από το μέγεθος της πρωτεΐνης μας σε kD. Ακολούθως, το περιεχόμενο του gel μεταφέρεται (στυπώνεται) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης η οποία βάφεται ακολούθως με το επιθυμητό αντίσωμα. Το στύπωμα, πραγματοποιείται ως εξής:

- Κόβουμε την μεμβράνη μας με προσοχή ακριβώς δίπλα στο αποτύπωμα που έχει αφήσει το gel πάνω της.
- Πετάμε το gel, τα απορροφητικά χαρτιά Whatmann και κρατάμε μόνο τη μεμβράνη.
- Βάφουμε τη μεμβράνη με χρωστική Ponceau για να δούμε αν οι πρωτεΐνες μας έχουν μεταφερθεί επαρκώς πάνω της.
- Κάνουμε 3 πλυσίματα με TBST 1x 5min έκαστο, (stack 10x: 200mL Tris pH=7.5, 180mL NaCl 5M, 5mL Tween 100%, $V_f=1000\text{mL}$) ώστε να απομακρύνουμε την χρωστική.
- Αφήνουμε για 1h σε γάλα (2,5gr σκόνη γάλακτος και το υπόλοιπο μέχρι τα 50mL 1x TBST) το οποίο κάνει blocking στην μεμβράνη και δεν επιτρέπει στο αντίσωμά μας να προσδεθεί σε μη ειδικά σημεία.
- Επωάζουμε 1h στο επιθυμητό πρώτο αντίσωμα (π.χ πολυκλωνικό anti-Sall1 το οποίο αραιώνουμε 1:1000) υπό ανακίνηση σε ειδική ζελατίνη ώστε το αντίσωμα να μπορεί να προσεγγίσει όλα τα σημεία πάνω στη μεμβράνη.
- Ξεπλένουμε 3 φορές με 1x TBST ώστε να απομακρύνουμε την περίσσεια του πρώτου αντισώματος
- Αφήνουμε για 1h στο δεύτερο αντίσωμα (π.χ rabbit anti-mouse σε αραιώση 1:10000) το οποίο περιέχει πάνω του συνδεδεμένο το ένζυμο HRP.

- Ξεπλένουμε 3 φορές με 1x TBST για να απομακρύνουμε την περίσσεια του δεύτερου αντισώματος.
- Προσθήκη σε όλα τα σημεία της μεμβράνης μίγματος 750μL west pico stable peroxide solution+ 750μL west pico luminal/Enhancer solution. Αφήνουμε για 5min σε RT προστατεύοντας από το φως και εμφανίζουμε.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ (NUCLEAR EXTRACTS)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται όταν θέλουμε να απομονώσουμε πρωτεϊνικό εκχύλισμα από τον πυρήνα των κυττάρων μας. Με αυτό τον τρόπο καταφέρνουμε να πάρουμε ένα πιο συμπυκνωμένο εκχύλισμα, το οποίο θα περιέχει μόνο τις πυρηνικές και όχι τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες.

- Αφαιρούμε τα 10mL του θρεπτικού μέσου από τις μεγάλες φλάσκες και ξεπλένουμε με 10mL PBS.
- Αφαιρούμε το PBS και προσθέτουμε άλλο τόσο.
- Ξύνουμε τα κύτταρα στο πιάτο και τα μεταφέρουμε σε falcon tube.
- Φυγοκεντρούμε στις 1500rpm για 5min στους 4°C.
- Προσθέτουμε 5 φορές της ποσότητας της πελέτας buffer A (10mM HEPES pH=7.9, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT) για κυτταρική λύση και επαναδιαλυτοποιούμε την κυτταρική πελέτα.
- Φυγοκεντρούμε στις 1500rpm για 5min στους 4°C.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε σε 2V της πελέτας buffer A, ανακινώντας ελαφρά με το χέρι.
- Επωάζουμε 10-15min στον πάγο.
- Μεταφέρουμε το υγρό σε ομογενοποιητή. Ελέγχουμε στο μικροσκόπιο (Βάζουμε μια σταγόνα εκχυλίσματος και μια σταγόνα χρωστικής Trypan Blue που βάφει τους πυρήνες)
- Όταν δούμε ότι τα κύτταρα έχουν λυθεί, μεταφέρουμε το εκχύλισμα σε καθαρό eppendorf και φυγοκεντρούμε στις 2000rpm, 10min στους 4°C.
- Αφαιρούμε το περισσότερο υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε το υπόλοιπο ανακινώντας με το χέρι.

- Προσθέτουμε 0.5mL υποτονικό buffer C (20mM Hepes pH=7.9, 25% glycerol, 0.42M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA) και ανακινούμε για 45min στο cold room.
- Φυγοκεντρούμε στις 14000rpm, 15min, 4°C.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε eppendorfs σε μικρά aliquots και αποθηκεύουμε στους -80°C μέχρι τη στιγμή της χρήσης. Σημείωση: Τόσο στο διάλυμα A όσο και στο C προσθέτουμε τους αναστολείς πρωτεασών PMSF (1:100), Ar (1:1000), Leu (1:1000).

EKKINHTEΣ (PRIMERS)

- 3'UTR Sall1 forward:5'-AATCTCGAGCTGCCAGAGTGCTTC-3'
- 3'UTR Sall1 reverse:5'-ATTGGATCCTGTTGCAAAAAAAT-3'
- pri-miRNA-291a forward:5'-AATAGATCTCCACGTTCTTTCCTCC-3'
- pri-miRNA-291a reverse:5'-TTAGTCGACTCACGACTGCCTTACATCC-3'
- pri-miRNA-291b forward:5'-ATTAGATCTGTTTGGAGAAAAGGAAA-3'
- pri-miRNA-291b reverse:5'-AATGTCGACCTCCAGCCTGTGATACTCA-3'

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της δράσης της πρωτεΐνης Sall1 και των microRNAs στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων.

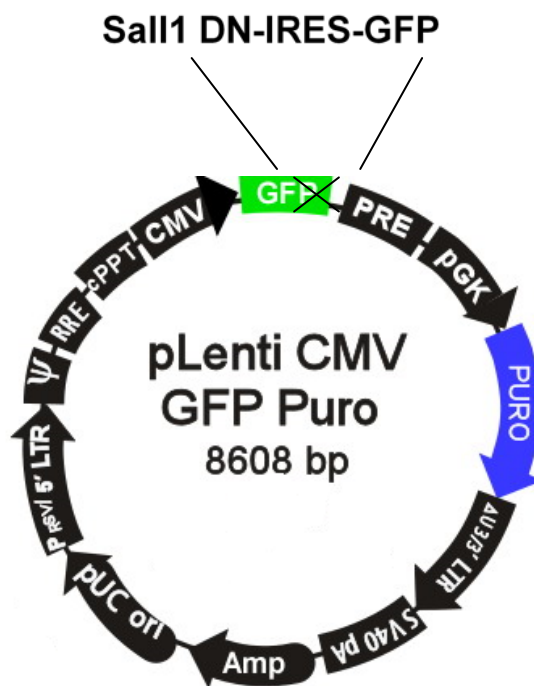
Στο πρώτο σκέλος της πτυχιακής , προσπαθήσαμε να πραγματοποιήσουμε σταθερή επιμόλυνση σε εμβρυικά βλαστοκύτταρα με τη χρήση λεντιϊκού φορέα που εκφράζει το κομματιασμένο 1/3 του πλήρους μορίου Sall1 (το αμινο-τελικό 1/3), το οποίο μπορεί να δράσει με τρόπο επικρατώς αρνητικό (dominant negative) τόσο όσο και προς το ενδογενές προϊόν Sall1 όσο και στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας Sall (Sall2,Sall3,Sall4). Στη συνέχεια, θέλαμε να απομονώσουμε κλώνους εμβρυικών βλαστοκυττάρων CGR8 τα οποία θα εκφράζουν σταθερά τη κομματιασμένη πρωτεΐνη Sall1 και να πραγματοποιήσουμε διαφοροποίηση των κλώνων αυτών με τη μέθοδο των εμβρυικών σωματίων (embryoid bodies). Αργότερα, θα ελέγχαμε και τα επίπεδα έκφρασης του mRNA (RT-PCR) και της πρωτεΐνης (Western Blot) γονιδίων διαφοροποίησης.

Στο δεύτερο σκέλος, με τη χρήση βιοπληροφορικών συστημάτων διεξήχθει στο εργαστήριο υπολογιστική ανάλυση από την οποία προέκυψε ότι το γονίδιο Sall1 στοχεύεται από αρκετά microRNAs και κυρίως από το mir-291b. Έτσι, για να μελετήσουμε αν το mir αυτό όντως στοχεύει το Sall1, κλωνοποιήσαμε τη 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του Sall1 (3'UTR) καθοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης σε 293T κύτταρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες της λουσιφεράσης (Luc assays) που έμμεσα αποτιμούν το βαθμό επίδρασης των miRNA, δηλαδή μειωμένα επίπεδα λουσιφεράσης θα καταδείξουν αλληλεπίδραση μεταξύ της 3'UTR του γονιδίου στόχου και του miRNA.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επίδραση του Sall1DN

Χρησιμοποιήθηκε ο λεντιϊκός φορέας που εκφράζει σταθερά το Sall1DN. Ο φορέας αυτός είναι ο Lenti-Sall1DN-IRES-GFP ο οποίος λόγω του IRES μεταγράφεται και μεταφράζεται και από τις δύο κατευθύνσεις εκατέρωθεν του IRES, με αποτέλεσμα να παράγονται 2 πρωτεΐνες: η Sall1DN και η GFP. Έτσι, η ύπαρξη φθορισμού αποδεικνύει ότι είναι πολύ πιθανόν να έχει εκφραστεί και το Sall1DN. Απεικονίζεται ο φορέας Lenti-Sall1DN-IRES-GFP:

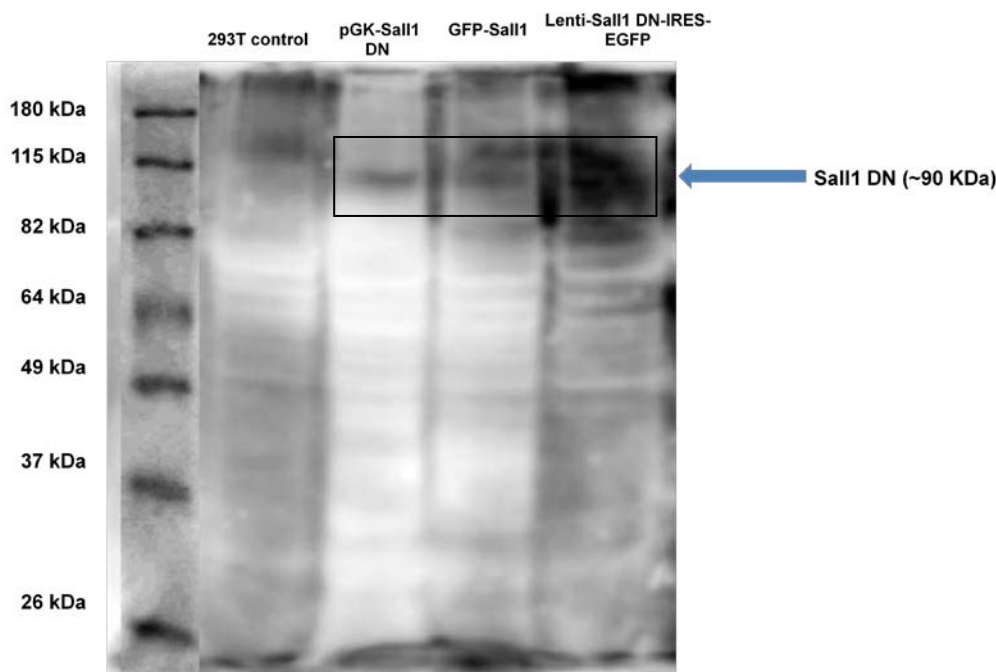


Στη συνέχεια, ο Lenti-Sall1DN-IRES-GFP μαζί με τον PSPAX (packaging plasmid) και τον MD2G (envelope plasmid) εισήχθησαν με παροδική διαμόλυνση (transfection) με τη χρήση φωσφορικών αλάτων σε 293T κύτταρα, τα οποία είναι ανθρώπινα κύτταρα εμβρυϊκά νεφρού, για την παραγωγή ιού που να εκφράζει σταθερά το Sall1DN. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρατηρήθηκε ελάχιστος φθορισμός των κυττάρων γεγονός που υποδηλώνει ότι το trasfection ίσως να μην είναι καλό και τα κύτταρα να μην εκφράζουν GFP άρα και Sall1DN. Για την παραγωγή του ιού χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες:

12μg PSPAX, 6μg MD2G, 20μg Lenti-Sall1DN-IRES-GFP

Μαζέψαμε τον ιό (υπερκείμενο) και προκειμένου να ταυτοποιήσουμε αν εκφράζεται το Sall1DN και να συνεχίσουμε το πείραμα, μαζέψαμε τα 293T κύτταρα και πραγματοποιήσαμε στύπωμα Western σ'αυτά. Το Western έγινε με

μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Sall1 αλλά η μεμβράνη δεν έδωσε κανένα αποτέλεσμα. Έτσι, πραγματοποιήθηκε ξανά παροδική διαμόλυνση με Lenti-Sall1DN-IRES-GFP (10μgr), PGK-Sall1DN-IRES-GFP (10μgr, θετικός έλεγχος), GFP-Sall1 (10μgr, θετικός έλεγχος) και 293T κύτταρα (αρνητικός έλεγχος) σε 293T κύτταρα. Το στύπωμα Western πραγματοποιήθηκε με μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Sall1 και το αποτέλεσμα που πάρθηκε φαίνεται στην [εικόνα Α](#).

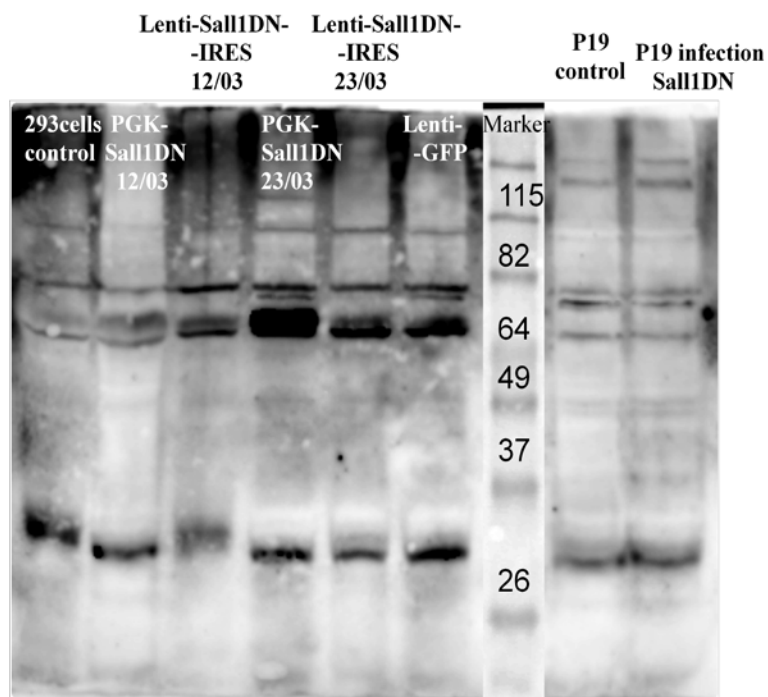


Εικόνα Α: Στύπωμα Western με anti-Sall1 για τον χαρακτηρισμό της έκφρασης του Sall1DN μετά από διαμόλυνση σε 293T κύτταρα. Η Sall1DN αναμένεται στα ~90kDa και όπως φαίνεται στην εικόνα παρατηρείται ζώνη 90kDa τόσο στα θετικά control (PGK-Sall1DN, GFP-Sall1) όσο και στο δείγμα (Lenti-Sall1DN-IRES-GFP) αλλά όχι στο αρνητικό control (293T control).

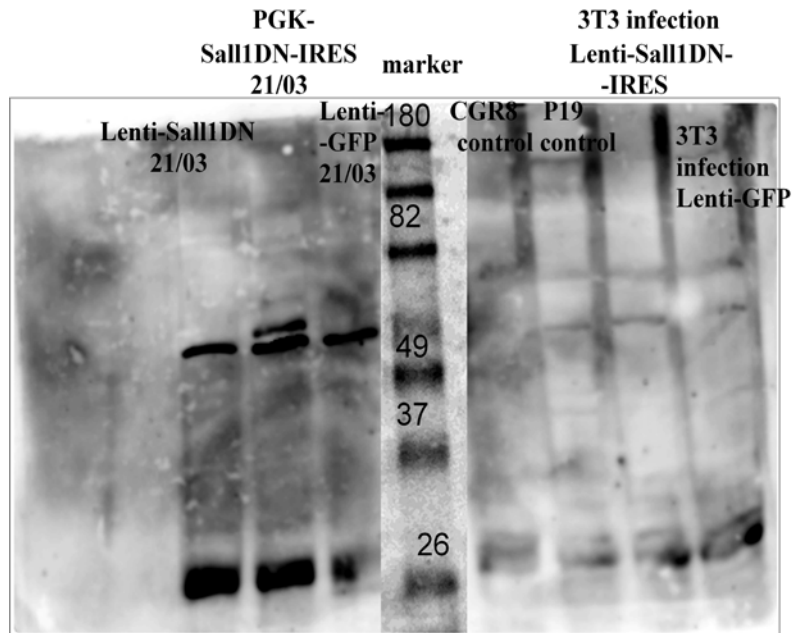
Βιβλιογραφικά το Sall1DN αναμένεται στα ~45-50kDa και η Sall1 στα ~145kDa ([Susan M. Kiefer et al., 2008](#)), όμως λόγω του φορτίου του πεπτιδίου και άλλων παραγόντων αναμένουμε το Sall1DN στα ~90kDa. Από την εικόνα Α φαίνεται ότι στο φορέα μας και στα θετικά controls υπάρχει ζώνη στα ~90kDa όπου βρίσκεται το Sall1DN. Για εξακρίβωση του αποτελέσματος επαναλάβαμε τη διαδικασία στυπώματος Western με τα ίδια δείγματα, χωρίς όμως να πάρουμε κάποιο αποτέλεσμα.

Έτσι, ξανακάνουμε το πείραμα ([εικόνα Β](#) και [εικόνα Γ](#)) αλλάζοντας διάφορες παραμέτρους όπως την ποσότητα των δειγμάτων, τα δείγματα και το είδος του αντισώματος (από μονοκλωνικό σε πολυκλωνικό, νέο αντίσωμα). Πλέον, χρησιμοποιείται κάθε δείγμα σε ποσότητα 4μgr για την παροδική διαμόλυνση 293T κυττάρων και το στύπωμα γίνεται με πολυκλωνικό αντίσωμα anti-Sall1. Ταυτόχρονα, πραγματοποιούνται και σταθερές επιμολύνσεις P19 (εμβρυϊκά καρκινικά ποντικού), 3T3 (ινοβλάστες ποντικού) και CGR8 (εμβρυϊκά βλαστικά ποντικού) κυττάρων με τον ιό που παρήχθη και θα έπρεπε να εκφράζει Sall1DN. Όπως φανερώνεται και από τα αποτελέσματα των [εικόνων Β,Γ](#), δεν εκφράζεται το

Sall1DN (~45kDa βιβλιογραφικά, εμείς αναμένουμε στα ~90kDa) στα κύτταρα που διαμολύνουμε ή μολύνουμε.



Εικόνα B: Επανάληψη στρώματος Western με anti-Sall1 για τον χαρακτηρισμό της έκφρασης του Sall1DN μετά από διαμόλυνση σε 293T κύτταρα και επιμόλυνση σε P19. Η Sall1DN αναμένεται στα ~90kDa στα αναμενόμενα θετικά δείγματα 2,3,4,5 και 8. Όπως φαίνεται στην εικόνα δεν παρατηρείται έκφραση στα θετικά δείγματα 2,3,4,5 που διαμολύνθηκαν σε 293T κύτταρα και ούτε στο 8 όπου έχουμε μόλυνση σε P19 κύτταρα. Η έντονη ζώνη που παρατηρείται κοντά στα ~70 kDa δεν είναι η επιθυμητή, καθώς παρατηρείται και στο αρνητικό δείγμα 6 (Lenti-GFP). Το δείγμα 1 (293T κύτταρα) είναι το αρνητικό control, ενώ το δείγμα 7 (P19 κύτταρα) είναι το θετικό control.



Εικόνα Γ: Επανάληψη στρώματος Western με anti-Sall1 για τον χαρακτηρισμό της έκφρασης του Sall1DN μετά από διαμόλυνση σε 293T κύτταρα και επιμόλυνση σε 3T3 κύτταρα. Η Sall1DN ίσως βρίσκεται στα ~90kDa στα αναμενόμενα θετικά δείγματα 1,2,6. Εντούτοις, όπως φαίνεται στην εικόνα δεν παρατηρείται έκφραση στα θετικά δείγματα 1,2 που διαμολύνθηκαν σε 293T κύτταρα και ούτε στο 6 όπου έχουμε μόλυνση σε 3T3 κύτταρα. Η έντονη ζώνη που παρατηρείται κοντά στα ~50 kDa δεν είναι η επιθυμητή, καθώς παρατηρείται και στο αρνητικό δείγμα 3 (Lenti-GFP). Τα δείγματα 3 (διαμόλυνση Lenti-GFP σε 293T κύτταρα) και 7 (επιμόλυνση Lenti-GFP σε 3T3 κύτταρα) είναι τα αρνητικά control, ενώ τα δείγματα 4 (CGR8 κύτταρα) και 5 (P19 κύτταρα) είναι τα θετικά control.

Για το λόγο αυτό ελέγχεται ο φορέας Lenti-Sall1DN-IRES-GFP. Πραγματοποιήθηκε μια σειρά από πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα BglI, PSTI, EcoRI (κόβει στο εσωτερικό του Sall1DN) και PSTI-EcoRI στο φορέα Lenti-Sall1DN-IRES-GFP, από τις οποίες ταυτοποιήθηκε ότι λείπει ένα κομμάτι ~150bp στην αρχή του Sall1DN, ενώ το υπόλοιπο ένθεμα (IRES-GFP) υπάρχει. Επομένως, ήταν ανάγκη να δημιουργηθεί νέος φορέας Lenti-Sall1DN-IRES-GFP.

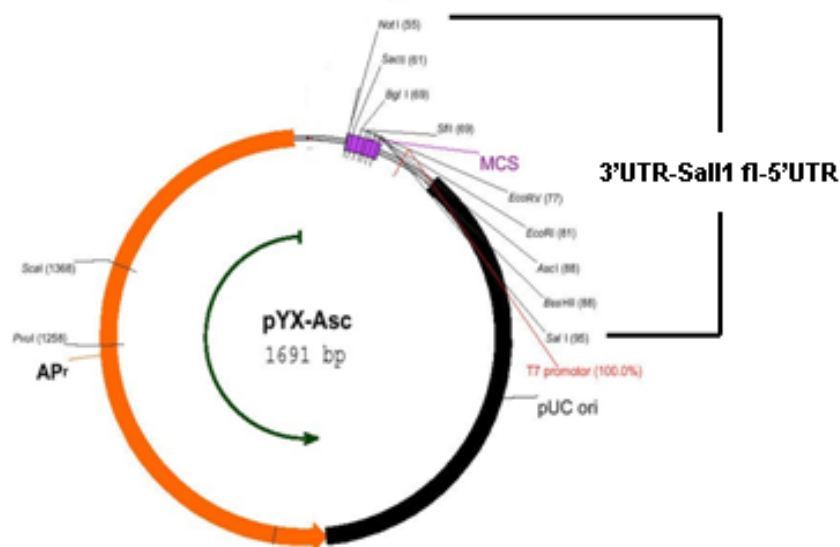
Για το σκοπό αυτό, από το πλασμίδιο pLenti-GFP Puro αφαιρείται το GFP μέσω των περιοριστικών ενζύμων BamHI-Sall1 και πραγματοποιείται Klenow στο φορέα για να αποκτήσει λεία άκρα. Αντίστοιχα, απομονώνεται το κομμάτι-ένθεμα Sall1DN-IRES-GFP από το πλασμίδιο PGK με XhoI-NotI και πραγματοποιείται Klenow στο ένθεμα για να αποκτήσει λεία άκρα και να εισέλθει στο φορέα. Έπειτα, το ένθεμα κλωνοποιείται στο φορέα μέσω της αντίδρασης μοριακής συγκόλλησης (ligation), με αποτέλεσμα να δημιουργείται ο Lenti-Sall1DN-IRES-GFP. Πραγματοποιείται μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων(transformation) με το νέο φορέα, απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας και διαγνωστική πέψη του DNA με EcoRI για να βεβαιωθούμε ότι υπάρχει ολόκληρο το Sall1DN στο φορέα Lenti-Sall1DN-IRES-GFP και δεν λείπει κάποιο κομμάτι. Βρέθηκε ένας κλώνος που φαίνεται να περιέχει όλο το ένθεμα Sall1DN-IRES-GFP και να είναι ο

σωστός, οπότε τον μεγαλώνουμε και πραγματοποιούμε παροδική διαμόλυνση 293T κυττάρων με το νέο φορέα Lenti-Sall1DN-IRES-GFP. Παρατηρήθηκε ελάχιστος φθορισμός των κυττάρων και δημιουργήθηκε νέος ιός (εκφράζει Sall1DN) για σταθερή επιμόλυνση CGR8 κυττάρων.

Sall1-miRNA291a/b

Μέσα από υπολογιστικές μεθόδους (miRANDA, TargetScan και PicTar) βρέθηκε ότι τα pri-miRNA-291a και pri-miRNA-291b έχουν μεγάλη αντιστοιχία με το 3'UTR της Sall1 και μπορεί να την καταστέλλουν. Ειδικότερα, το pri-miRNA-291b εμφανίζει τη μεγαλύτερη αντιστοιχία στο 3'UTR της Sall1. Αυτά τα pri-miRNAs ανήκουν στην οικογένεια των miRNA-290-295, τα οποία έχει βρεθεί παλαιότερα από το εργαστήριό μας ότι εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Έτσι, για την απόδειξη του *in silico* αποτελέσματος πραγματοποιήθηκαν τα εξής πειράματα:

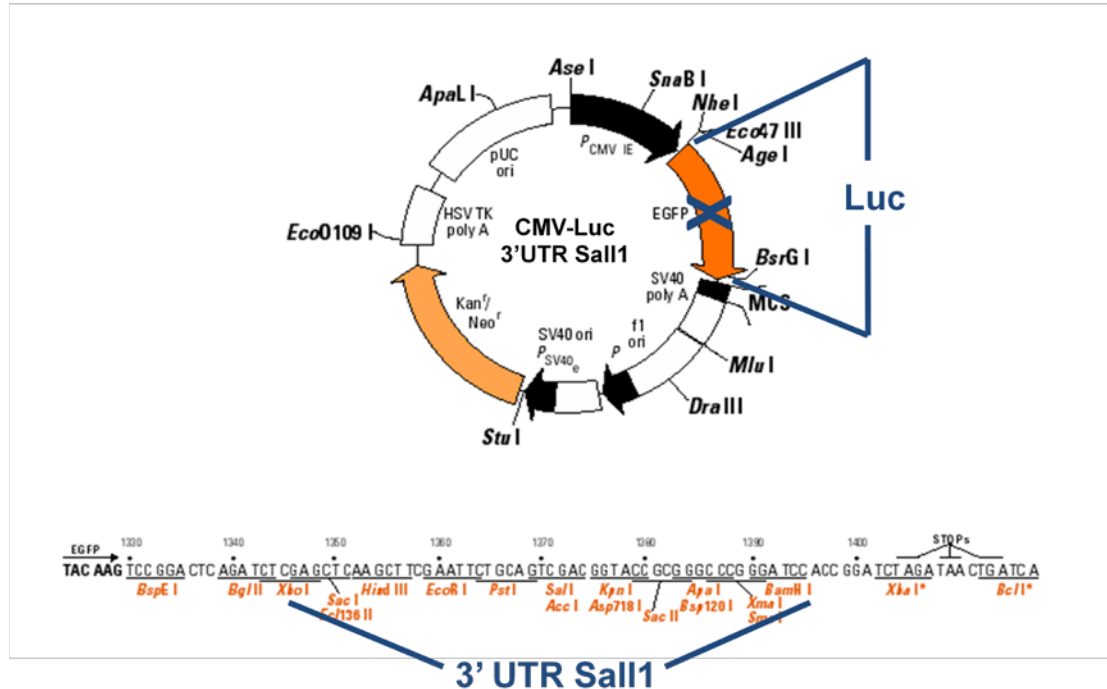
Απομονώθηκε το 3'UTR της Sall1 από το φορέα pYX-Asc που περιέχει ολόκληρη τη Sall1 (Sall1 full length) . Ο φορέας pYX-Asc απεικονίζεται παρακάτω:



Η απομόνωση έγινε μέσω συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με εκκινητές (primers) που έχουν άκρα περιοριστικές θέσεις για τα ένζυμα XhoI και BamHI (υλικά και μέθοδοι). Έτσι, το 3'UTR Sall1 που πολλαπλασιάζεται μέσω PCR έχει περιοριστικές θέσεις γι'αυτά τα ένζυμα. Φορτώνεται το προϊόν της PCR σε gel αγαρόζης 1% και απομονώνεται το 3'UTR Sall1 που έχει μήκος ~1155bp μέσω gel

extraction. Πραγματοποιήθηκε πέψη του 3'UTR Sall1 με XhoI και BamHI που δημιουργούν κολλώδη (sticky) άκρα έτοιμα να κολλήσουν στο φορέα CMV-Luc.

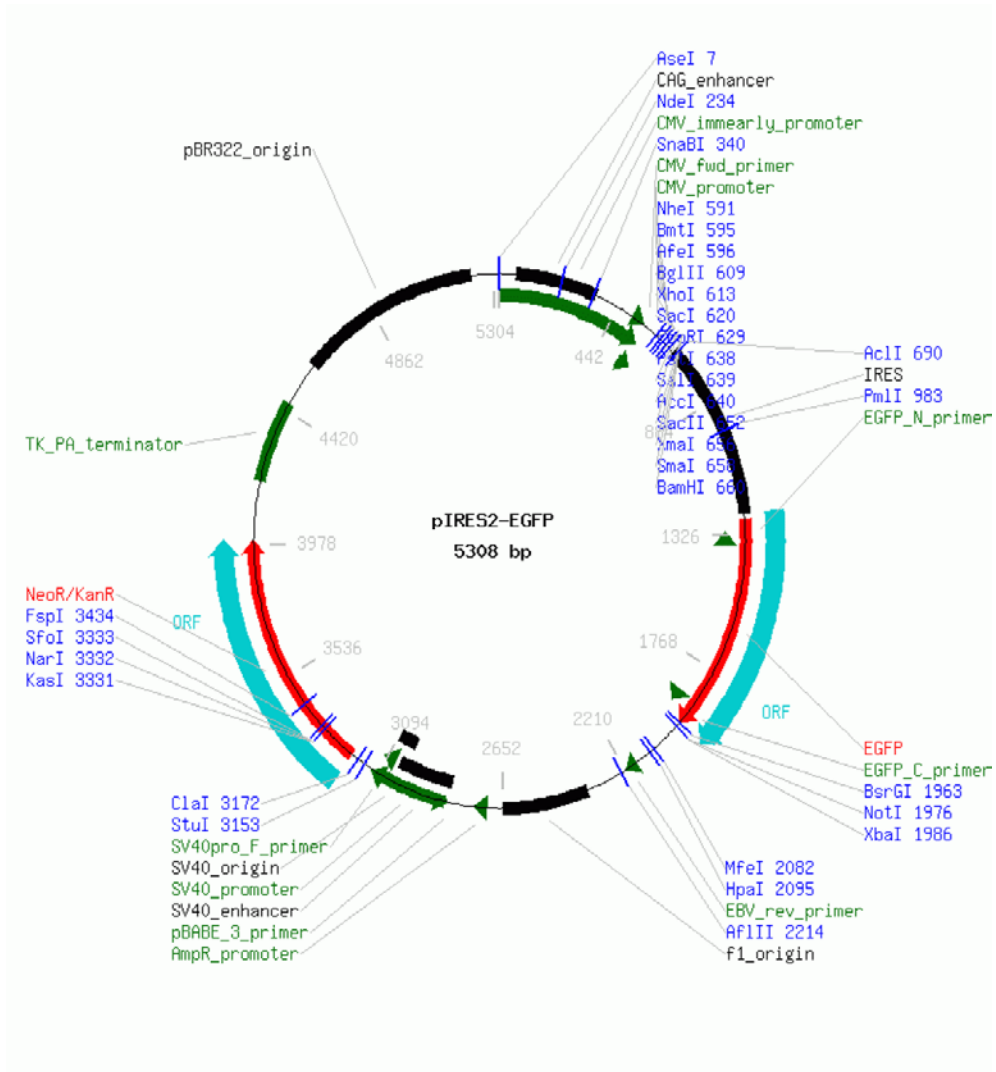
Ο φορέας CMV-Luc κόπηκε και αυτός με XhoI και BamHI καθοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται τα κατάλληλα κολλώδη άκρα. Τελικά, έγινε μοριακή συγκόλληση του φορέα CMV-Luc με το 3'UTR Sall1 μέσω των ίδιων κολλώδων ακρών τους και το 3'UTR Sall1 εισήλθε καθοδικά του γονιδίου της λουσιφεράσης. Δημιουργήθηκε λοιπόν το πρώτο πλασμίδιο (CMV-Luc-3'UTR-Sall1) απαραίτητο για το πείραμα το οποίο και απεικονίζεται παρακάτω:



Ο πλασμιδιακός φορέας CMV-Luc-3'UTR Sall1 στάλθηκε για αλληλούχιση (sequencing) προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι έχει σχηματιστεί σωστά. Το sequencing απέδειξε ότι έχει δημιουργηθεί ο σωστός φορέας.

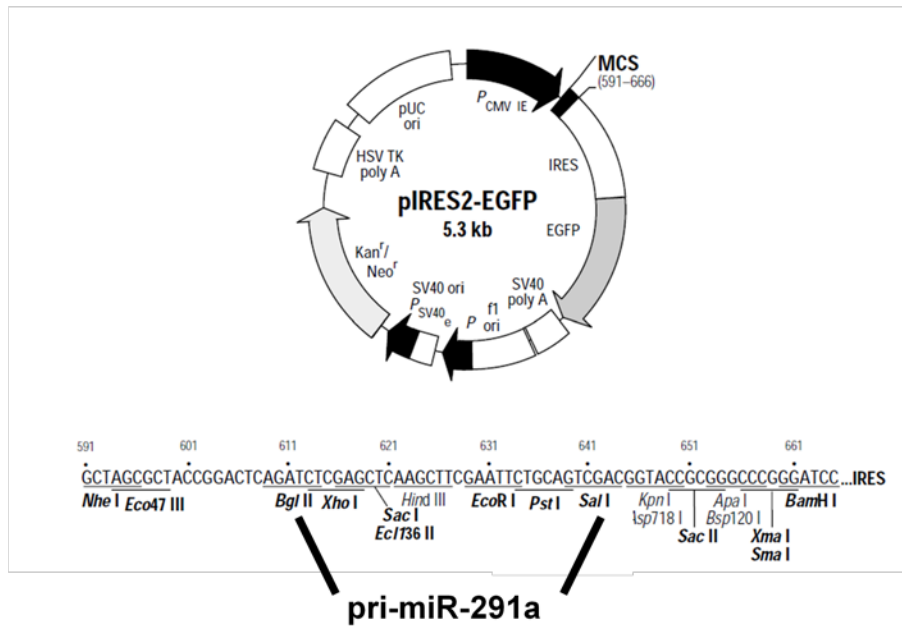
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε συμβατική PCR για την απομόνωση των pri-miRNA-291a και pri-miRNA-291b από γενωμικό DNA CGR8 κυττάρων με εκκινητές που περιέχουν στα άκρα τους περιοριστικές θέσεις των ενζύμων BglII και SalI (υλικά και μέθοδοι).

Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα pIRES2-EGFP με τα ίδια ένζυμα (BglII και SalI) τα οποία κόβουν λίγες βάσεις ανοδικά του IRES. Ο φορέας pIRES2-EGFP απεικονίζεται παρακάτω:

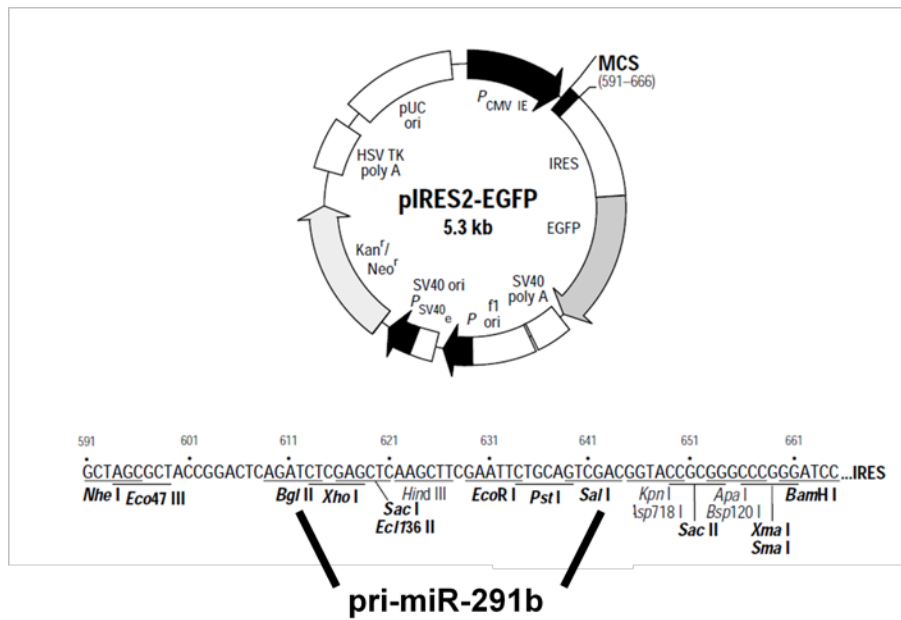


Τελικά, έγινε μοριακή συγκόλληση του pri-miRNA-291a στον IRES-EGFP και του pri-miRNA-291b στον IRES-EGFP ανοδικά του IRES στη θέση του πολυσυνδέτη (MCS), όπου τα πρωτογενή miRNA εισήλθαν ανοδικά του IRES. Σχηματίστηκαν λοιπόν και τα υπόλοιπα δύο πλασμίδια (pri-miRNA-291a-IRES-GFP, pri-miRNA-291b-IRES-GFP) απαραίτητα για το πείραμά μας, τα οποία και απεικονίζονται:

pri-miRNA-291a-IRES-GFP



pri-miRNA-291b-IRES-GFP

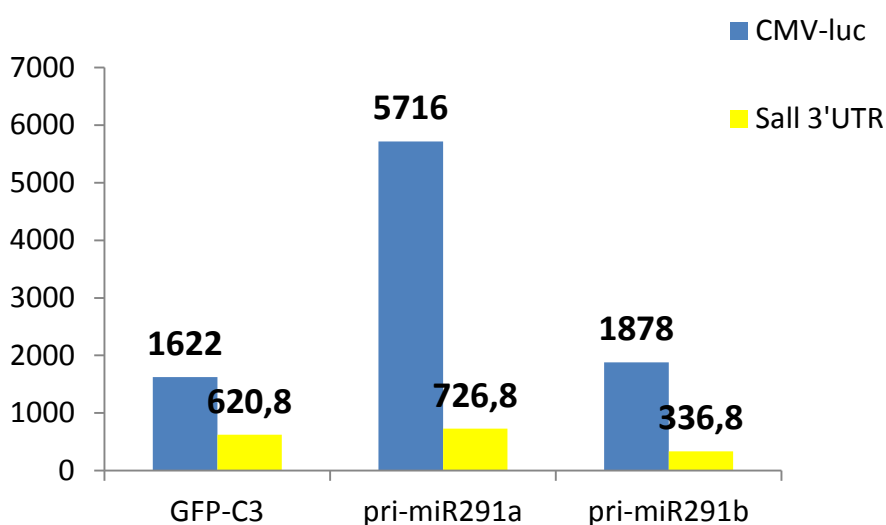


Μετάπειτα, έγινε πείραμα co-transfection του CMV-Luc-3'UTR Sall1 με τον pri-miRNA-291a-IRES-GFP και του CMV-Luc-3'UTR Sall1 με τον pri-miRNA-291b-IRES-GFP σε 293T κύτταρα. Η παροδική συνδιαμόλυνση πραγματοποιήθηκε σε 293T κύτταρα για αποφυγή ενδογενούς έκφρασης των miRNA-291a και miRNA-291b. Το πρώτο πείραμα co-transfection έγινε σε 12-well plate, τα κύτταρα ήταν σε μέτρια κατάσταση και τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

1. CMV-luc(0.5μg) + GFP(1μg)
2. CMV-luc(0.5μg)+pri-miR291a(1μg)
3. CMV-luc(0.5 μg)+pri-miR291b(1 μg)
4. CMV-luc-3'UTR Sall1(0.5 μg)+GFP(1 μg)
5. CMV-luc-3'UTR Sall1(0.5 μg)+pri-miR291a(1 μg)
6. CMV-luc-3'UTR Sall1(0.5 μg)+pri-miR291b(1 μg)
7. CMV-luc-3'UTR Sall1(0.5 μg)

Μετά τη διαμόλυνση παρατηρήθηκε φθορισμός όπως και αναμένονταν λόγω της έκφρασης του GFP. Έπειτα, ακολούθησε δοκιμασία λουσιφεράσης (LUC ASSAY) για να δούμε αν όντως τα συγκεκριμένα miRNAs στοχεύουν την Sall1. Τα αποτελέσματα (εικόνα Δ) παρατίθενται χωρίς κανονικοποίηση λόγω αρνητικών τιμών της δοκιμασίας β-γαλακτοζιδάσης (lacZ ASSAY).

293T cells - Luc assay (w/o normalization)



Εικόνα Δ: Αποτελέσματα χωρίς κανονικοποίηση από τη δοκιμασία λουσιφεράσης μετά από συνδιαμόλυνση μόνο του φορέα CMV-luc με GFP-C3, pri-miRNA-291a ,pri-miRNA-291b (χρώμα μπλέ) και του κλωνοποιημένου φορέα CMV-luc-3'UTR Sall1 με GFP-C3, pri-miRNA-291a ,pri-miRNA-291b (χρώμα κίτρινο). Η συνδιαμόλυνση με GFP-C3 αποτελεί το αρνητικό control για καταστολή της Sall1 από τα miRNAs. Φαίνεται ότι το pri-miRNA-291b στοχεύει και καταστέλλει το 3'UTR Sall1 σε σχέση με τον αρνητικό έλεγχο, ενώ το pri-miRNA-291a όχι.

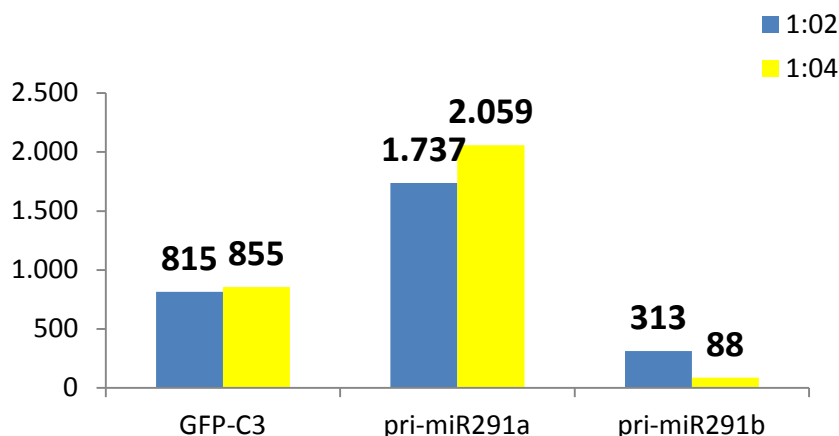
Η δοκιμασία λουσιφεράσης έδειξε (χρώμα κίτρινο) ότι το pri-miRNA-291b καταστέλλει τη Sall1 (336.8<620.8), ενώ το pri-miRNA-291a (726.8>620.8) όχι. Η τιμή του GFP-C3 (620.8) αποτελεί τον αρνητικό έλεγχο με τον οποίο κρίνουμε το αποτέλεσμα. Με μπλέ χρώμα φανερώνεται η συνδιαμόλυση με φορέα CMV-Luc χωρίς το 3'UTR Sall1, οπότε δεν αναμένεται να παρατηρηθεί εκεί καταστολή όπως και αποδεικνύεται.

Το δεύτερο πείραμα co-transfection έγινε για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων του πρώτου και πραγματοποιήθηκε πάλι σε 293T κύτταρα, σε 12-well plate και τα κύτταρα ήταν σε καλή κατάσταση. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

1. CMV-luc-3'UTR Sall1(0.5 μg)+GFP(1 μg)
2. CMV-luc-3'UTR Sall1(0.5 μg)+GFP(2μg)
3. CMV-luc-3'UTR Sall1(0.5 μg)+pri-miR291a(1 μg)
4. CMV-luc-3'UTR Sall1(0.5 μg)+pri-miR291a(2 μg)
5. CMV-luc-3'UTR Sall1(0.5 μg)+pri-miR291b(1 μg)
6. CMV-luc-3'UTR Sall1(0.5 μg)+pri-miR291b(2 μg)

Μετά τη διαμόλυση παρατηρήθηκε φθορισμός όπως αναμένονταν και έγινε δοκιμασία λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα (χωρίς κανονικοποίηση) φαίνονται στην [εικόνα E](#) και επιβεβαιώνουν το πρώτο πείραμα. Συγκεκριμένα, είναι φανερό ότι το pri-miRNA-291b στοχεύει και καταστέλλει το 3'UTR Sall1 (313<815, 88<855) ενώ το pri-miRNA-291a δεν έχει ως στόχο του τη Sall1(1737>815, 2059>855) σε σχέση με το αρνητικό control GFP-C3 (815,855). Τα διαφορετικά χρώματα, μπλέ και κίτρινο, απεικονίζουν διαφορετικές ποσότητες των δεύτερων φορέων με τα οποία έγινε η συνδιαμόλυση. Ο πρώτος φορέας είναι σε όλες τις περιπτώσεις ο κλωνοποιημένος φορέας CMV-luc-3'UTR Sall1.

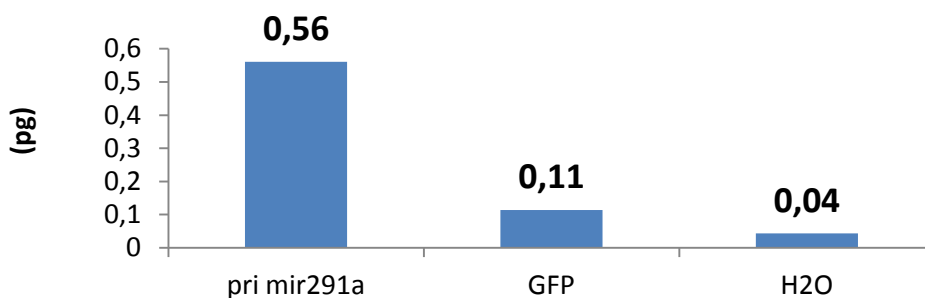
293T cells - Luc assay (w/o normalization)
3'UTR Sall1



Εικόνα E: Αποτελέσματα από τη δοκιμασία λουσιφεράσης. Όλες οι συνδιαμολύνσεις έγιναν με το φορέα CMV-luc-3'UTR Sall1. Το χρώμα μπλε και κίτρινο απεικονίζουν διαφορετική ποσότητα του δεύτερου φορέα με τον οποίο έγινε η συνδιαμολύνηση. Φαίνεται ότι το pri-miRNA-291b καταστέλλει τη Sall1, ενώ το pri-miRNA-291a όχι. Ο GFP-C3 αποτελεί το αρνητικό control.

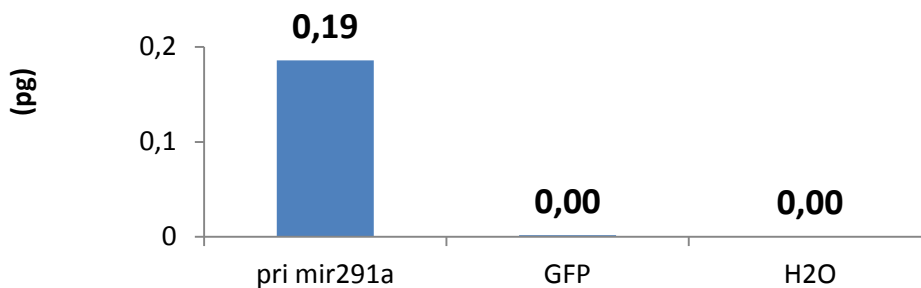
Ταυτόχρονα με τις παραπάνω συνδιαμολύνσεις (δεύτερο πείραμα), έγινε και παροδική διαμολύνηση μόνο με τα δείγματα: pri-miRNA-291a(2μg), pri-miRNA-291b(2μg) και GFP(2μg). Οι διαμολύνσεις αυτές προορίστηκαν για ποσοτική PCR (qRT-PCR) προκειμένου να δούμε αν όντως εκφράστηκαν τα miRNAs στα κύτταρα και κυρίως σε ποίο ποσοστό. Τα αποτελέσματα από την qRT-PCR με εκκινητές ειδικούς για τα miRNAs, φαίνονται στις παρακάτω εικόνες (εικόνες ΣΤ,Z,H,Θ,I,K,Λ,M):

miR-291a-5p raw results



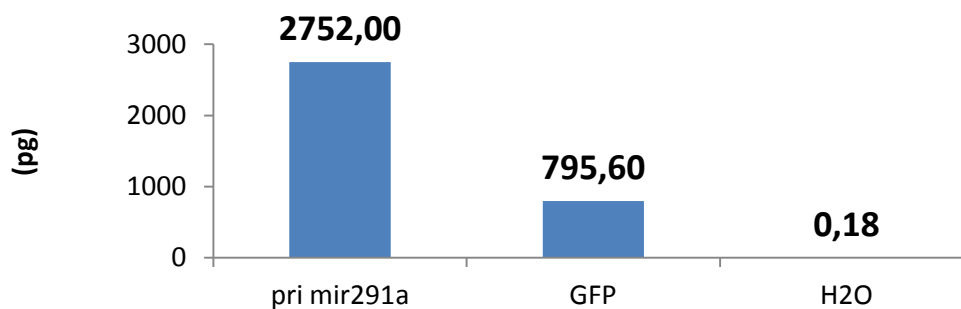
Εικόνα ΣΤ: Αποτελέσματα από την qRT-PCR με εκκινητές ειδικούς μόνο για το miR-291a-5p. Το αποτέλεσμα αυτό είναι χωρίς κανονικοποίηση και φανερώνεται ότι έχουμε υψηλά επίπεδα έκφρασης του miR-291a-5p σε σχέση με τα αρνητικά controls (GFP,H₂O)

miR-291a-3p raw results



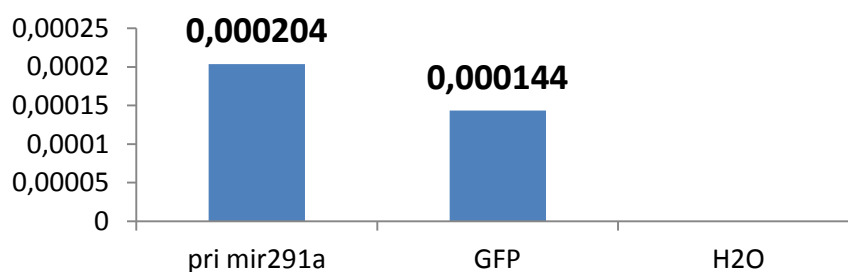
Εικόνα Z: Αποτελέσματα από την qRT-PCR με εκκινητές ειδικούς μόνο για το miR-291a-3p. Το αποτέλεσμα αυτό είναι χωρίς κανονικοποίηση και φανερώνεται ότι το miR-291a-3p εκφράζεται υψηλά στα κύτταρα σε σχέση με τα αρνητικά controls (GFP,H₂O).

U6 raw results

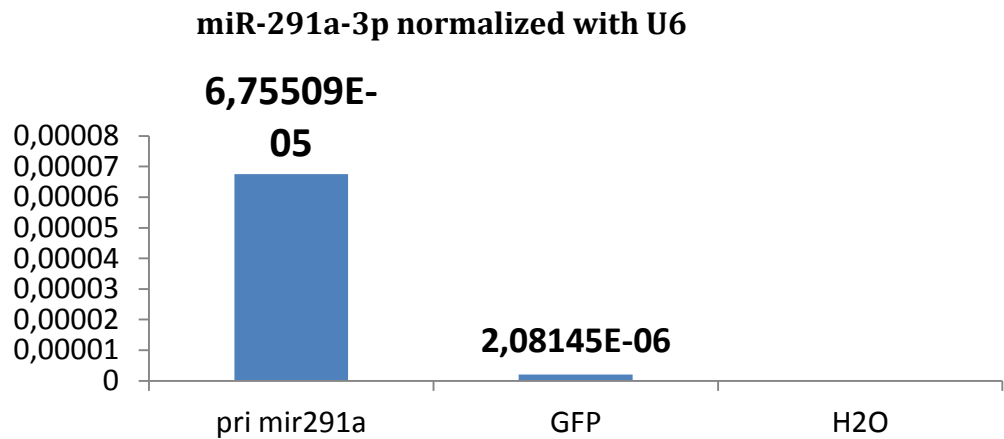


Εικόνα Η: Αποτελέσματα από την qRT-PCR με εκκινητές ειδικούς μόνο για τον παράγοντα κανονικοποίησης U6. Τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το pri-miRNA-291a εκφράζουν U6 σε υψηλά επίπεδα σε σχέση με τα αρνητικά control, όπως αναμένεται.

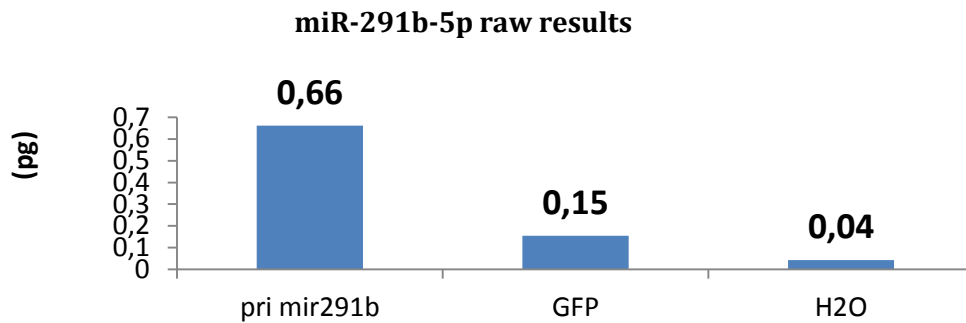
miR-291a-5p normalized with U6



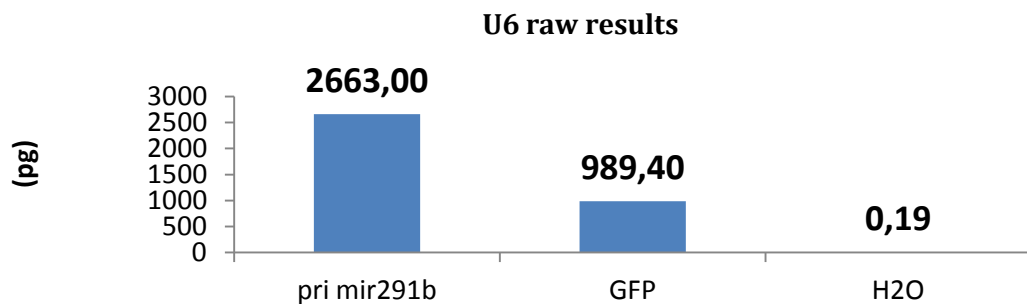
Εικόνα Θ: Αποτελέσματα από την qRT-PCR με εκκινητές ειδικούς για το miRNA-291a-5p κανονικοποιημένα με τον παράγοντα κανονικοποίησης U6.



Εικόνα Ι: Αποτελέσματα από την qRT-PCR με εκκινητές ειδικούς για το miRNA-291a-3p κανονικοποιημένα με τον παράγοντα κανονικοποίησης U6.

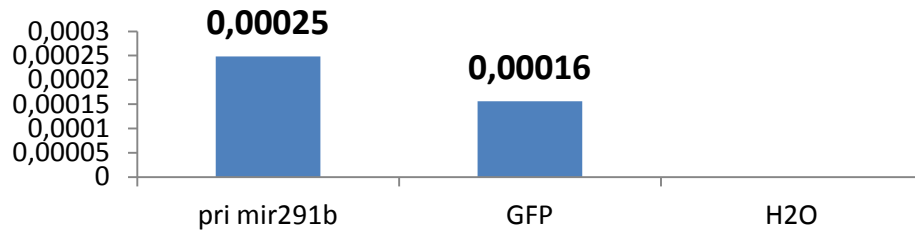


Εικόνα Κ: Αποτελέσματα από την qRT-PCR με εκκινητές ειδικούς μόνο για το miR-291b-5p. Το αποτέλεσμα αυτό είναι χωρίς κανονικοποίηση και φανερώνεται ότι έχουμε υψηλά επίπεδα έκφρασης του miR-291b-5p στα κύτταρα σε σχέση με τα αρνητικά controls (GFP,H₂O)



Εικόνα Λ: Αποτελέσματα από την qRT-PCR με εκκινητές ειδικούς μόνο για τον παράγοντα κανονικοποίησης U6. Τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το pri-miRNA-291b εκφράζουν U6 σε υψηλά επίπεδα σε σχέση με τα αρνητικά control, όπως αναμένεται.

mir-291b-5p normalized with U6



Εικόνα Μ: Αποτελέσματα από την qRT-PCR με εκκινητές ειδικούς για το miRNA-291b-5p κανονικοποιημένα με τον παράγοντα κανονικοποίησης U6.

Επομένως, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο έγινε φανερό ότι τα ώριμα miRNA-291a-3p, miRNA-291a-5p και miRNA-291b-5p εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα 293T κύτταρα που διαμολύνθηκαν. Άρα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι όντως **το ώριμο miRNA-291b-5p οφείλεται για τη καταστολή του 3'UTR Sall1** που αποδείχθηκε με δοκιμασίες λουσιφεράσης.

Τα miRNA-291a-3p και miRNA-291a-5p είναι τα ώριμα miRNAs που προκύπτουν μετά από επεξεργασία από το πρωτογενές pri-miRNA-291a. Όμοια, τα miRNA-291b-5p και miRNA-291b-3p προκύπτουν από το πρωτογενές pri-miRNA-291b. Ωστόσο, μόνο για το miRNA-291b-5p ήταν δυνατή η εύρεση και χρήση ειδικών εκκινητών και γι'αυτό παρατίθενται αποτελέσματα μόνο γι'αυτό. Ο παράγοντας κανονικοποίησης U6 είναι ένα snRNA (small nuclear RNA), δηλαδή ένα μη κωδικό μικρό πυρηνικό RNA. Πρόκειται για τμήμα του U6 snRNP (small nuclear ribonucleoprotein), ενός συμπλόκου που αποτελείται από snRNAs, pre-miRNAs και πρωτεΐνες. Το σύμπλοκο αυτό πραγματοποιεί μάτισμα των pre-miRNAs, μια μετα-μεταγραφική διαδικασία που λαμβάνει μέρος μόνο στον πυρήνα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι πλέον γνωστό ότι στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης βασικό ρόλο εκτός των άλλων παραγόντων κατέχουν και μικρά μη κωδικά μόρια RNA, γνωστά ως miRNAs. Τα μόρια αυτά συμμετέχουν σε διάφορες διαδικασίες και έχουν πολλαπλούς στόχους όπου δρουν καταστέλλοντας τα μετάγραφα-στόχους τους. Αυτό που μέχρι σήμερα μελετάται είναι η ταυτοποίηση των πολλαπλών στόχων των ίδιων ή διαφορετικών miRNAs. Συγκεκριμένα, ο τομέας των microRNAs και η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών μέσω ρύθμισης από miRNAs αποτελεί πλέον ελκυστικό πεδίο έρευνας.

Εμείς ασχοληθήκαμε με τη πρωτεΐνη Sall1 και προσπαθήσαμε να βρούμε αν αποτελεί στόχο κάποιου miRNA που ελέγχει την έκφρασή της. Αρχικά, βρήκαμε *in silico* ότι τα miRNA-291a και miRNA-291b στοχεύουν την Sall1 και μάλιστα ότι το miRNA-291b φαίνεται να έχει μεγαλύτερη συμπληρωματικότητα άρα και να στοχεύει καλύτερα τη Sall1 σε σχέση με το miRNA-291a. Για να αποδειχθεί το υπολογιστικό αποτέλεσμα πραγματοποιήθηκε η πειραματική διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω. Τελικά, αποδείχθηκε ότι το miRNA-291b στοχεύει το 3'UTR της Sall1, ενώ το miRNA291a δεν την στοχεύει. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι η Sall1 είναι στόχος του miRNA-291b και ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής (Sall1), η οποία κατέχει καθοριστικό ρόλο τόσο στη διαφοροποίηση όσο και στη διατήρηση της βλαστικής ταυτότητας, μπορεί να ρυθμίζεται από microRNAs (miRNA-291b). Έτσι, τα αποτελέσματά μας αποτελούν μια πρώτη ένδειξη ότι η καθοριστική πρωτεΐνη της βλαστικότητας ρυθμίζεται από microRNAs γεγονός που δίνει έδαφος για περαιτέρω μελέτη.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006;125:315–326. [PubMed:16630819]
- Boiani M, Scholer HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:872–884. [PubMed: 16227977]
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005;122:947–956. [PubMed: 16153702]
- Böhm Johann, Anja Buck, Wiktor Borozdin, Ashraf U. Mannan, Uta Matysiak-Scholze, Ibrahim Adham, Walter Schulz-Schaeffer, Thomas Floss, Wolfgang Wurst, Jürgen Kohlhase and Francisco Barrionuevo. Sall1, Sall2 and Sall4 are required for neural tube closure in mice. *The American Journal of Pathology*, Vol.173, No 5, November 2008.
- de Celis JF, Barrio R, Kafatos FC. 1996. A gene complex acting downstream of *dpp* in *Drosophila* wing morphogenesis. *Nature* 381:421–424.
- Engels S, Kohlhase J, McGaughan J. 2000. A *SALL1* mutation causes a branchio-oto-renal syndrome-like phenotype. *J Med Genet* 37:458–460.
- Evans, M. & Kaufman, M. 1981 Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156. (doi:10.1038/292154a0)
- Fuchs EJ, Whartenby KA. Hematopoietic stem cell transplant as a platform for tumor immunotherapy. *Curr Opin Mol Ther.* 2004;6:48–53.
- Goodman JW, Hodgson GS. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood*.1962;19:702–714.
- Greber B, Lehrach H, Adjaye J. Silencing of core transcription factors in human EC cells highlights the importance of autocrine FGF signaling for self-renewal. *BMC Dev Biol* 2007;7:46. [PubMed:17506876]
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000;404:293–296. [PubMed:10749213]
- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 2001a;293:1146–1150. [PubMed: 11498593]
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2001b;2:110–119. [PubMed: 11253050]
- Harfe, B.D., McManus, M.T., Mansfield, J.H., Hornstein, E., Tabin, C.J., 2005. The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 10898-10903.
- Harris, K.S., Zhang, Z., McManus, M.T., Harfe, B.D., Sun, X., 2006. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 2208-2213.

- Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Nakahara K, Carthew RW, Ruohola-Baker H. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* 2005;435:974–978. [PubMed: 15944714]
- Hatfield Steven, Hannele Ruohola-Baker. MicroRNA and stem cell function. Department of Biochemistry, Institute for Stem Cell and Regenerative Medicine, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA. *Cell Tissue Res.*, 2010.
- Houbavity, H.B., Dennis, L., Jaenisch, R., Sharp, P.A., 2005. Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene. *RNA* 11, 1245-1257.
- Houbavity, H.B., Murray, M.F., Sharp, P.A., 2003. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev. Cell* 5, 351-358.
- Humphrey, R.K., Beattie, G.M., Lopez, A.D., Bucay, N., King, C.C., Firpo, M.T., Rose-John, S. and Hayek, A. (2004) Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells*, **22**, 522-530
- JOSE F. DE CELIS and ROSA BARRIO. Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *Int.J.Dev.Biol.*53:1385-1398 (2009).
- Jürgens G. 1988. Head and tail development of the *Drosophila* embryo involves *spalt*, a novel homeotic gene. *EMBO J* 7:189–196.
- Jürgen Kohlhase. Sall1 mutations in Townes-Brocks and related disorders. *Human Mutation* 16:460-466 (2000).
- Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM, Rajewsky K. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 2005;19:489–501. [PubMed: 15713842]
- Karantzali Efthimia, Vassilios Lekakis, Marilia Ioannou, Christiana Hadjimichael, Joseph Papamatheakis and Androniki Kretsovali, Sall1 regulates embryonic stem cell differentiation in association with Nanog. *The journal of Biological Chemistry* Vol 286, No.2, pp. 1037-1045, January 14, 2011.
- Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol.* 1993;13:473–486
- Kennedy M, Keller GM. Hematopoietic commitment of ES cells in culture. *Methods Enzymol.*2003;365:39–59.
- Kiefer S.M., Ohlemiller K.K., Yang J., McDill B.W., Kohlhase J. and Rauchman M. (2003): Expression of a truncated Sall1 transcriptional repressor is responsible for Townes-Brocks syndrome birth defects. *Human Molecular Genetics*, **12(7)**, 2221-2227
- Kiefer S.M., Robbins L., Barina A., Zhang Z. and Rauchman M. (2008): SALL1 truncated protein expression in Townes-Brocks syndrome leads to ectopic expression of downstream genes. *Human Mutation*, **29(9)**, 1133-1140
- Kiefer S.M., Robbins L., Stumpff K.M., Lin C., Ma L. and Rauchman M. (2010): Sall1-dependent signals affect Wnt signaling and ureter tip fate to initiate kidney development. *Development*, **137**, 3099-3106
- Kohlhase J, Wischermann A, Reichenbach H, Froster U, Engel W. 1998. Mutations in the *SALL1* putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nat Genet* 18:81–83.
- Kohlhase J, Taschner PEM, Burfeind P, Pasche B, Newman B, Blanck C, Breuning MH, tenKate LP, Maaswinkel-Mooy P, Mitulla B, Seidel J, Kirkpatrick SJ, Pauli

- RM, Wargowski DS, Devriendt K, Proesmans W, Gabrielli O, Coppa GV, WesbyvanSwaay E, Trembath RC, Schinzel AA, Reardon W, Seemanova E, Engel W. 1999. Molecular analysis of *SALL1* mutations in Townes-Brocks syndrome. *Am J Hum Genet* 64:435–445.
- Kühnlein RP, Frommer G, Friedrich M, Gonzalez-Gaitan M, Weber A, Wagner-Bernholz JF, Gehring W, Jäckle H, Schuh R. 1994. *spalt* encodes an evolutionary conserved zinc finger protein of novel structure which provides homeotic gene function in the head and tail region of the *Drosophila* embryo. *EMBO J* 13:168–179.
 - Kühnlein RP, Schuh R. 1996. Dual function of the region specific homeotic gene *spalt* during *Drosophila* tracheal system development. *Development* 122:2215–2223.
 - Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3'UTR sequence motifs that mediate negative posttranscriptional regulation. *Nat Genet* 2002;30:363–364. [PubMed: 11896390]
 - Lauberth S.M and Rauchman M. (2006): A conserved 12-amino acid motif in Sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex. *The Journal of Biological Chemistry*, **281(33)**, 23922-23931
 - Lauberth S.M., Bilyeu A.C., Firulli B.A., Kroll K.L. and Rauchman M. (2007): A phosphomimetic mutation in the Sall1 repression motif disrupts recruitment of the nucleosome remodeling and deacetylase complex and repression of Gbx2. *Journal of Biological Chemistry*, **282(48)**, 34858-34868
 - Lecuit T, Brook WJ, Ng M, Calleja M, Sun H, Cohen SM. 1996. Two distinct mechanisms for long-range patterning by *Decapentaplegic* in the *Drosophila* wing. *Nature* 381:387–393
 - Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 2004;117:69–81. [PubMed: 15066283]
 - Lichner Zsuzsanna, Eموke Pall, Andrea Kerekes, Eva Pallinger, Pouneh Maraghechi. The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells. *Differentiation* 81 (2011) 11-24.
 - Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004;305:1437–1441. [PubMed: 15284456]
 - Marlin S, Blanchard S, Slim R, Lacombe D, Denoyelle F, Alessandri J-L, Calzolari E, Drouin-Garraud V, Ferraz FG, Fourmaintraux A, Philip N, Toubanc JE, Petit C. 1999. Townes-Brocks syndrome: detection of a *SALL1* mutation hotspot and evidence for a position effect in one patient. *Hum Mutat* 14:377–386.
 - Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7634–7638. [PubMed: 6950406]
 - Nellen D, Burke R, Struhl G, Basler K. 1996. Direct and longrange action of a DPP morphogen gradient. *Cell* 85:357–368
 - Netzer C., Rieger L., Brero A., Zhang C-D., Hinzke M., Kohlhase J. and Bohlander S.K. (2001): *SALL1* the gene mutated in Townes-Brocks syndrome encodes a

- transcriptional repressor which interacts with TRF1/PIN2 and localizes to pericentromeric heterochromatin. *Human Molecular Genetics*, **10(26)**, 3017-3024
- Netzer C., Bohlander S.K., Rieger L., Müller S. and Kohlhase J. (2002): Interaction of the developmental regulator SALL1 with UBE2I and SUMO-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **296**, 870-876
 - Netzer C., Bohlander S.K., Hinke M., Chen Y. and Kohlhase J. (2006): Defining the heterochromatin localization and repression domains of Sall1. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1762**, 386-391
 - Ng J-H., Heng J-C .D, Loh Y-H. and Ng H-H. (2008): Transcriptional and epigenetic regulations of embryonic stem cells. *Mutation Research*, **647**, 52-58
 - Nishinakamura Ryuichi and Minoru Takasato. Essential roles of Sall1 in kidney development. *Kidney International*, Vol.68 (2005), pp. 1948-1950.
 - Niwa H. How is pluripotency determined and maintained? *Development*. 2007;134:635–646.
 - Sakaki-Yumoto M., Kobayashi C., Sato A., Fujimura S., Matsumoto Y., Takasato M., Kodama T., Aburatani H., Asashima M., Yoshida N. and Nishinakamura R. (2006): The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okhiro syndrome, is essential in embryonic stem cell proliferation and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development*, **133**, 3005-3013
 - Shinya Yamanaka, Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells, Shinya Yamanaka, Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan, 2CREST-JST, Kawaguchi 332-0012, Japan, DOI 10.1016/j.Stem.2007.05.012
 - Steven Hatfield, Hannele Ruohola-Baker, MicroRNA and stem cell function, Department of Biochemistry, Institute for Stem Cell and Regenerative Medicine, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA Published in final edited form as: *Cell Tissue Res*. 2008 January ; 331(1): 57–66. doi:10.1007/s00441-007-0530-3.
 - Sturtevant MA, Biehs B, Marin E, Bier E. 1997. The *spalt* gene links the A/P compartment boundary to a linear adult structure in the *Drosophila* wing. *Development* 124:21–32.
 - S. Rodriguez-Perales Z F. Cano Z M. N. Lobato Z T. H. Rabbitts, MLL gene fusions in human leukaemias: in vivo modeling to recapitulate these primary tumorigenic events, Received: 10 July 2007 / Accepted: 10 August 2007 / Published online: 17 November 2007, The Japanese Society of Hematology 2007, *Int J Hematol* (2008) 87:3–9 DOI 10.1007/s12185-007-0001-3
 - Takahashi K., Yamanaka S.2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676 (doi:10.1016/j.cell.2006.07.024)
 - Thiagarajan Rathi D*, Nicole Cloonan, Brooke B Gardiner, Tim R Mercer, Gabriel Kolle, Ehsan Nourbakhsh, Shivangi Wani, Dave Tang, Keerthana Krishnan, Kylie M Georgas, Bree A Rumballe, Han S Chiu, Jason A Steen, John S Mattick, Melissa H Little and Sean M Grimmond*. Refining transcriptional programs in kidney development by integration of deep RNAsequencing and array-based spatial profiling. *BMC Genomics* 2011, 12:441
 - Wang Lixin, Daoqiang Zhang, Changwen Zhang, Shuping Zhang, Zhe Wang, Chen Qu and Sijin Liu. A microRNA expression signature characterizing the properties of tumor-initiating cells for breast cancer. *Oncology Letters* 3: 119-124, 2012

- Wiles MV, Keller G. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 1991;111:259–267. [PubMed: 1893864]
- Williams BP, Read J, Price J. The generation of neurons and oligodendrocytes from a common precursor cell. *Neuron*. 1991;7:685–693.
- Xi R, Xie T. Stem cell self-renewal controlled by chromatin remodeling factors. *Science* 2005;310:1487–1489. [PubMed: 16322456].