

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

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

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Κλωνοποίηση και έκφραση της πρωτεΐνης FoxO1a σε ευκαρυωτικό  
σύστημα**

Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια : Ιερωνυμάκη Ελευθερία

Υπεύθυνος Καθηγητής : Γαρίνης Γεώργιος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια : Καραγωγέως Δόμνα

ΗΡΑΚΛΕΙΟ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2010

## *Ευχαριστίες.....*

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου Γιώργο Γαρίνη του οποίου ο ρόλος στην εκπόνηση αυτής της εργασίας και γενικότερα στη διαμόρφωση της όποιας επιστημονικής μου σκέψης, ήταν καθοριστικός και η προσφορά του ανεκτίμητη. Τον ευχαριστώ πολύ για τις συμβουλές, την κατανόηση και τη βοήθειά του σε ό, τι χρειαζόμουν όλο αυτόν τον χρόνο στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια Δόμνα Καραγωγέως, για την επιστημονική της καθοδήγηση ως συνεπιβλέπουσα καθηγήτρια της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Πολλά ευχαριστώ επίσης στους φίλους και συνεργάτες μου στο εργαστήριο Ειρήνη, Ισμήνη και Θοδωρή για τις δύσκολες αλλά και δημιουργικές στιγμές που περάσαμε μαζί. Σίγουρα το φιλικό και ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε με βοήθησε πολύ στην εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα φιλαράκια μου, Γεωργία, Νίκο, Ιωάννα, Γιάννη, Μεθόδιο, Παναγιώτη, Ελένη, Βούλα, Εύα και Αγάπη για την ηθική υποστήριξη αλλά και γιατί είναι πάντα κοντά μου στις όμορφες και τις δύσκολες στιγμές.

Πάνω απ' όλα ευχαριστώ την οικογένειά μου, τον πατέρα μου Κώστα, την μητέρα μου Αρετή και την αδερφή μου Μαρία, για την αμέριστη συμπαράσταση και την εμπιστοσύνη που μου δείχνει σε κάθε μου επιλογή.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ τον Άλμπερτ που με στηρίζει και είναι δίπλα μου όποτε τον χρειάζομαι.

## Περιεχόμενα

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ii</b>
<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Γήρανση και βλάβες στο DNA.....	1
1.2 Επιδιορθωτικά μονοπάτια.....	2
1.3 Ανικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA, μεταβολισμός και μακροβιότητα.....	5
1.4 Οι FoxO μεταγραφικοί παράγοντες.....	7
1.5 Ρύθμιση των FoxO μεταγραφικών παραγόντων.....	9
1.5.1 Φωσφορυλίωση των FoxO μεταγραφικών παραγόντων.....	10
1.5.2 Μονο-ουβικιτινυλίωση των FoxO σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες..	11
1.5.3 Ρύθμιση των FoxO μέσω της πρωτεόλυσης.....	11
1.5.4 Ρύθμιση της FoxO-εξαρτώμενης μεταγραφής: αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς.....	12
1.6 Ο ρόλος των FoxO στα θηλαστικά.....	15
<b>2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>16</b>
2.1 Προσδιορισμός γονοτύπου.....	16
2.2 Απομόνωση του επιθυμητού γονιδίου και κλωνοποίηση.....	18
2.3 Έκφραση του επιθυμητού γονιδίου σε κυτταρικές σειρές.....	24
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>29</b>
3.1 Κλωνοποιήσεις.....	29
3.1.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου FoxO1a σε φορέα προκαρυωτικής έκφρασης.....	29
3.1.2 Υποκλωνοποίηση του FoxO1a στον φορέα AnιTEV FLAG pBSSK....	31
3.1.3 Κλωνοποίηση του FoxO1a σε φορέα ευκαρυωτικής έκφρασης.....	32

3.1.4 Κλωνοποίηση του γονιδίου FoxO3a σε φορέα προκαρυωτικής έκφρασης.....	33
3.2 Έλεγχος έκφρασης του γονιδίου FoxO1a σε κυτταρικές σειρές HeLa.....	35
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>39</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>42</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αύξηση της ηλικίας δημιουργεί συνέχεια αλλοιώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, οδηγώντας στην προοδευτική μείωση της λειτουργικότητας όλων των συστημάτων του ανθρώπινου σώματος. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η γήρανση χαρακτηρίζεται από συντηρημένα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης, που εμπλέκονται κυρίως στην ανάπτυξη, την αντοχή στο στρες και το μεταβολισμό της ενέργειας. Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται στο επίπεδο της χρωματίνης, περιλαμβάνοντας μεταγραφικούς παράγοντες και αλλαγές στη δομή της χρωματίνης. Μια ομάδα τέτοιων μεταγραφικών παραγόντων είναι και οι FoxO πρωτεΐνες. Οι FoxO μεταγραφικοί παράγοντες λαμβάνουν μέρος σε μια πληθώρα βιολογικών διαδικασιών, όπως η συντηρημένη τους ικανότητα να αυξάνουν τη διάρκεια ζωής. Η αλληλεπίδραση των FoxO με πολύ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα πιθανό να ρυθμίζει τη δράση τους, αλλά και να διαφοροποιεί τη λειτουργία τους με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διαφορετικών τύπων γονιδίων καθορίζοντας την τύχη των κυττάρων με την αύξηση της ηλικίας. Στην παρούσα εργασία, περιγράφονται τα βήματα για την κατασκευή φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης FoxO1a. Ο φορέας αυτός χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη της *in vitro* βιοτινυλίωσης, μιας μεθόδου που εκμεταλλεύεται τον υψηλό βαθμό συγγένειας της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη/αβιδίνη και επιτρέπει την ευκολότερη απομόνωση πρωτεϊνικών συμπλόκων. Η πρωτεΐνη FoxO1a μαζί με μια πεπτιδική αλληλουχία 14 αμινοξέων, η οποία μπορεί να βιοτινυλωθεί, εκφράστηκε σε κυτταρικές σειρές επιμολυσμένες με μια λιγάση βιοτίνης (BirA). Με τη χρήση των τεχνικών Real-time PCR και ανοσοαποτύπωσης κατά Western φαίνεται ότι η πρωτεΐνη FoxO1a μπορεί να εκφραστεί σε μεγάλο βαθμό από τα κύτταρα, αποτελώντας το πρώτο βήμα για την ανάπτυξη της μεθόδου *in vitro* βιοτινυλίωσης.

## ABSTRACT

Ageing is inherently complex, involving multiple mechanisms at different levels. Recent evidence suggests that ageing is characterized by conserved patterns of adult-onset gene regulation predominantly involved in growth, stress resistance and energy metabolism. Nevertheless, it remains unknown how such universal networks are tightly orchestrated over the entire organismal lifespan and in animal species as evolutionary diverse as nematodes and mammals. Gene activity is regulated within the context of chromatin involving, among others, transcription factors and chromatin structure changes. One particular class of transcription factors are the Forkhead box O (FoxO) proteins. FoxOs are involved in a wide range of biological processes, including their conserved ability to increase lifespan. The interaction of FoxOs with multi-protein complexes likely regulates forkhead activity but also allows diversification of function efficiently coordinating distinct sets of genes with far-reaching consequences for cell fate with advancing age. In the present study, the cloning strategy of FoxO1a is described. An expression vector carrying the FoxO1a gene sequence was used to develop an *in vitro* biotinylation methodology. This methodology, takes advantage of the high affinity bonding between biotin and avidin/streptavidin and facilitates the isolation of protein complexes. FoxO1a was fused with an 14 aa biotinylation tag and expressed in mammalian cell lines, transfected with a BirA biotin ligase. By using Real-time PCR and Western blot analysis, it was clear that FoxO1a could be transcribed efficiently in cells, indicating the first step for the development of the *in vitro* biotinylation system.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με την πάροδο του χρόνου δημιουργούνται προοδευτικές φθορές στο ανθρώπινο σώμα, με παράλληλη μείωση της ικανότητας που έχει να επισκευάζει τις φθορές αυτές. Η φυσιολογική γήρανση χαρακτηρίζεται από τη βαθμιαία πτώση της λειτουργικότητας των συστημάτων του ατόμου καθώς και από την αυξημένη ευπάθεια σε ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση (για παράδειγμα καρκίνος, διαβήτης, καρδιαγγειακά νοσήματα, νευροεκφυλισμό), έχοντας τεράστιες συνέπειες στην ποιότητα ζωής των ατόμων και το συνολικό κόστος για την κοινωνία[1].

Η γήρανση δεν φαίνεται να υπόκειται στην εξελικτική επιλογή, καθώς συμβαίνει μετά την αναπαραγωγική φάση. Αυτό δείχνει ότι η γήρανση δεν προκαλείται από την ενεργοποίηση κάποιου γονιδιακού προγράμματος αλλά λόγω βαθμιαίας μείωσης της ικανότητας διατήρησης των οργανικών λειτουργιών που οδηγεί στη συσσώρευση ‘τυχαίων’ βλαβών[2].

### 1.1 Γήρανση και βλάβες στο DNA

Παρά την εκτεταμένη έρευνα παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστη η μοριακή βάση της γήρανσης. Ωστόσο, διάφορα στοιχεία δείχνουν ότι η συσσώρευση των βλαβών του DNA είναι μια σημαντική αιτία της γήρανσης. Κατά τη γήρανση συσσωρεύονται βλάβες στα κυτταρικά μακρομόρια όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, RNA και DNA[3]. Ενώ, όλα τα μακρομόρια είναι ανανεώσιμα, το πυρηνικό DNA, το πρωταρχικό μόριο της ζωής από το οποίο προέρχονται το RNA και οι πρωτεΐνες δεν αναγεννάται. Συνεπώς οποιαδήποτε ανεπανόρθωτη ζημιά προκύψει μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες για τον οργανισμό.

Η διατήρηση των γενετικών πληροφοριών είναι κεντρικής σημασίας καθ’ όλη τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού[4]. Αυτός είναι και ο λόγος που έχουν αναπτυχθεί αρκετά συστήματα συντήρησης, όπως η διόρθωση των βλαβών του DNA, η ανεκτικότητα στο στρες και τα σημεία ελέγχου ‘checkpoints’ του κυτταρικού κύκλου για να διασφαλιστεί η ακεραιότητα του γονιδιώματος[5-7].

Το γονιδίωμά μας ωστόσο εκτίθεται συνεχώς σε μια πληθώρα επιβλαβών παραγόντων. Κάθε κύτταρο στο ανθρώπινο σώμα είναι εκτεθειμένο καθημερινά τόσο σε ενδογενείς όσο και εξωγενείς γενοτοξικές πηγές όπως, το οξειδωτικό στρες, οι

ακτίνες X, η υπεριώδης ακτινοβολία και άλλες χημικές ενώσεις που προκαλούν χιλιάδες βλάβες στο DNA.

Άμεσες επιπτώσεις των βλαβών του DNA περιλαμβάνουν σταμάτημα της μεταγραφής και της αντιγραφής. Εφόσον οι βλάβες του DNA παρεμποδίζουν τη διαδικασία της μεταγραφής ενδέχεται να επηρεάζουν και την έκφραση των γονιδίων παρεμβαίνοντας σε ζωτικής σημασίας αποκρίσεις, πολύ σημαντικές για την κυτταρική επιβίωση έναντι επικίνδυνων απειλών[8, 9]. Διαφορετικοί τύποι βλάβης έχουν ανάλογες συνέπειες όσον αφορά την ικανότητά τους να αλλοιώνουν την έλικα, να αναστέλλουν ή να σταματούν την αντιγραφή του DNA και να μπλοκάρουν τη μεταγραφή που βρίσκεται σε εξέλιξη. Ανάλογα με το είδος της βλάβης του DNA, ορισμένοι τύποι αλλοιώσεων όπως η θραύση της διπλής έλικας (Double-Strand Breaks – DSBs), οι ενδοκλωνικές συνδέσεις (Intrastrand CrossLinks – ICLs), τα ακάλυπτα (uncapped) τελομερή και ορισμένες οξειδωμένες βάσεις θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης (κυτταροτοξική βλάβη) ή να προκαλέσουν αναδιπλασιαστική/αντιγραφική κυτταρική γήρανση (replicative senescence) (κυτταροστατική βλάβη)[10]. Άλλοι τύποι βλαβών όπως η αυθόρμητη απαμίνωση και η οξείδωση ορισμένων βάσεων μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις (μεταλλαξιγόνες βλάβες)[11]. Μακροπρόθεσμα και ανάλογα με το είδος της βλάβης τέτοιες αλλοιώσεις μπορούν να οδηγήσουν είτε σε σημειακές μεταλλάξεις και καρκίνο είτε σε φθορά του γονιδιώματος, συμβάλλοντας έτσι στη γήρανση. Για να γίνει δυνατή η αντιμετώπιση της αλλοίωσης του DNA, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μια σειρά αμυντικών μηχανισμών επιδιόρθωσης βλαβών του DNA με στόχο τον συνεχή έλεγχο, τον εντοπισμό και την επιδιόρθωση μιας πληθώρας γενετικών αλλοιώσεων που προκύπτουν στο γονιδίωμά μας με την ηλικία[7].

## **1.2 Επιδιορθωτικά μονοπάτια**

Λαμβάνοντας υπόψη τη μεγάλη ποικιλία των αλλοιώσεων που συμβαίνουν στο DNA, καταλαβαίνουμε ότι δεν θα μπορούσε να υπάρχει μόνο μια ενιαία διαδικασία που να είναι ικανή να αντιμετωπίσει αποτελεσματικά όλα τα είδη τους. Τα κύτταρα έχουν εξελίξει ένα σύνολο εν μέρει επικαλυπτόμενων μονοπατιών απόκρισης στη βλάβη του DNA που προκαλεί μπλοκάρισμα του κυτταρικού κύκλου, δίνοντας έτσι χρόνο για επιδιόρθωση[7].



Αλλοιώσεις που επηρεάζουν μόνο τη μια αλυσίδα της διπλής έλικας ενεργοποιούν συνήθως δύο σημαντικά επιδιορθωτικά μονοπάτια. Το μονοπάτι επιδιορθωτικής εκτομής βάσεων (Base Excision Repair – BER) και το μονοπάτι επιδιορθωτικής εκτομής νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair – NER).

Το BER μονοπάτι στοχεύει μικρές αλλαγές χημικών βάσεων που προκαλούνται κατά κύριο λόγο από ενδογενείς γενοτοξικές πηγές. Το NER αντίστοιχα εμπλέκεται στην επιδιόρθωση αλλοιώσεων που προκύπτουν στην έλικα του DNA και σχετίζονται με τη μη σωστή συμπληρωματικότητα των βάσεων, όπως προϊόντα UV ακτινοβολίας και ενδοκλωνικές συνδέσεις στο DNA (interstrand crosslinks - ICLs)[12, 13].

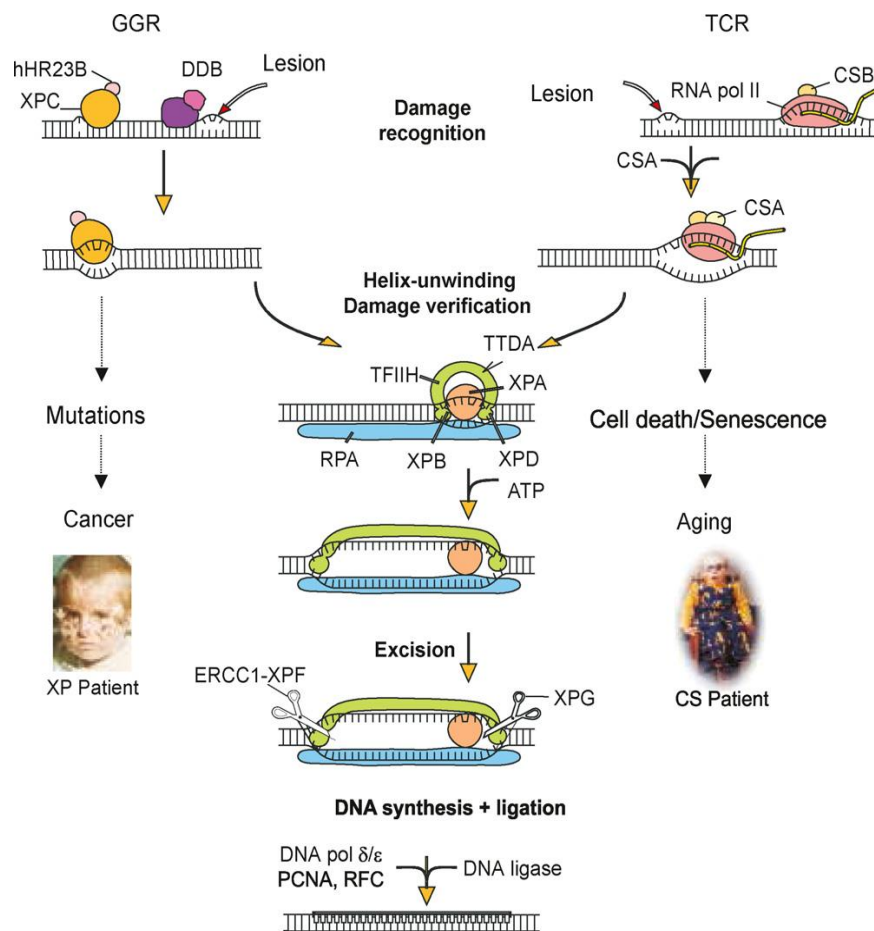
Το μονοπάτι NER απασχολεί περίπου 25 πρωτεΐνες που ‘προσλαμβάνονται’ για την αναγνώριση της βλάβης, την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, το τοπικό άνοιγμα της διπλής έλικας του DNA, την τομή της κατεστραμμένης αλυσίδας, την αποκοπή του 27-29μερούς ολιγονουκλεοτιδίου που φέρει τη βλάβη, τη σύνθεση του DNA για τη συμπλήρωση του κενού και τέλος τη συγκόλληση της αλυσίδας[14-17].

Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει δύο διακριτά μονοπάτια. Το ένα επιδιορθώνει τις βλάβες που συμβαίνουν κατά μήκος του γονιδιώματος (Global-Genome NER – GG-NER), ενώ το άλλο είναι εξειδικευμένο στην επιδιόρθωση βλαβών που υπάρχουν στις μεταγραφόμενες περιοχές και που εμποδίζουν τη μεταγραφή από την RNA πολυμεράση II (Transcription Coupled NER, TC-NER).

Στο GG-NER, τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα αναγνώρισης αλλοιώσεων στο DNA, UV-DDB και XPC-RD23B είναι απαραίτητα για τη σωστή στρατολόγηση των πρωτεϊνών που ακολουθούν[18]. Αντίθετα, στο TC-NER η αναγνώριση γίνεται μέσω της πρωτεΐνης CSB (Cockayne Syndrome group B) που προσδένεται στην RNA πολυμεράση II όταν αυτή ακινητοποιείται κατά τη διάρκεια της μεταγραφής λόγω κάποιας βλάβης. Η πρωτεΐνη CSB είναι μια DNA-εξαρτώμενη ATPάση και παράγοντας αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, μέλος της οικογένειας SWI/SNF2 των DNA-εξαρτώμενων ATPασών[19, 20]. Η πρωτεΐνη CSB είναι απαραίτητη στη συνέχεια για τη συγκρότηση ενός συμπλόκου, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη στρατολόγηση και των υπόλοιπων παραγόντων του μηχανισμού επιδιόρθωσης στην περιοχή της βλάβης[21, 22]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το CSB εξαρτάται από το CSA (Cockayne Syndrome group A) για την πρόσδεσή του στο σύμπλοκο του της RNA πολυμεράσης[23]. Εκτός από το CSA, το σύμπλοκο CSB/RNA πολυμεράση II

προσδένεται και με την πρωτεΐνη DDB1 (DNA-Damage Binding protein 1) και με υπομονάδες του συμπλόκου καζείνης (CSN)[24]. Το σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης II θα πρέπει να απομακρυνθεί κατά την επιδιόρθωση της βλάβης προκειμένου να συμβεί αποτελεσματική επιδιόρθωση. Κατά την απελευθέρωση της RNA πολυμεράσης μπορεί είτε να αποικοδομηθεί από το σύμπλοκο CSA-DDB1/CSN ή να ανακυκλωθεί μέσω της CTP φωσφατάσης (FCP1), υπομονάδα της ανθρώπινης φωσφατάσης[25].

Αφού γίνει η αναγνώριση της βλάβης, ο μεταγραφικός παράγοντας TFIIH είναι υπεύθυνος για το άνοιγμα της έλικας του DNA γύρω από την περιοχή της ζημιάς. Κυρίως οι πρωτεΐνες XPB (φέρει λειτουργία ΑΤΡάσης) και η πρωτεΐνη XPD (φέρει λειτουργία ελικάσης) αλλά και ο βασικός πυρήνας του TFIIH, p8/TTDA είναι απαραίτητος για το άνοιγμα της διπλής έλικας[26-28]. Η XPA υπομονάδα επαληθεύει



**Εικόνα 1:** Μονοπάτι νουκλεοτιδικής εκτομής (NER). Το GG-NER είναι υπεύθυνο για την επιδιόρθωση των αλλοιώσεων που εμφανίζονται κατά μήκος του γονιδιώματος και το TC-NER που επιδιορθώνει αλλοιώσεις στις ενεργά μεταγραφόμενες περιοχές. Ασθενείς που έχουν μεταλλάξεις σε παράγοντες του GG-NER μονοπατιού εμφανίζουν αυξημένη προδιάθεση για καρκίνο του δέρματος ενώ μεταλλάξεις σε παράγοντες του TC-NER οδηγούν σε σύνδρομο πρόωρης γήρανσης.

την ύπαρξη της βλάβης, ενώ η πρωτεΐνη RPA δεσμεύεται στη μη αλλοιωμένη αλυσίδα σταθεροποιώντας έτσι την ανοιχτή ενδιάμεση κατάσταση[29]. Τέλος, η περιοχή που φέρει τη βλάβη κόβεται και απομακρύνεται από την ERCC1-XPF και XPG ενδονουκλεάσες αφήνοντας ένα κενό μήκους ~30νουκλεοτιδίων. Στη συνέχεια, η μηχανή αντιγραφής του DNA (DNA πολυμεράση  $\epsilon$  ή  $\delta$ ) συμπληρώνουν το κενό χρησιμοποιώντας τον άθικτο κλώνο ως μήτρα για τη σύνθεση του DNA, ενώ ο κλώνος σφραγίζεται από την DNA λιγάση I.

Μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος στο GG-NER μονοπάτι μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη προδιάθεση για καρκίνο, ενώ μεταλλάξεις σε παράγοντες του TC-NER έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση συνδρόμων πρόωρης γήρανσης όπως η μελαγχρωματική ξηροδερμία (Xeroderma Pigmentosum), το σύνδρομο Cockayne και η τριχοθιουστροφία (Trichothiodystrophy - TTD) τα οποία εμφανίζουν ευαισθησία στο φως του ήλιου[30-33].

### **1.3 Ανικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA, μεταβολισμός και μακροβιότητα**

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι σε πολλά συστήματα οργανισμών η γήρανση υπόκειται σε ρύθμιση από εξελικτικά συντηρημένα μοριακά μονοπάτια[34-36]. Στα ποντίκια πρόσφατα βρέθηκε ότι η γήρανση θα μπορούσε να επιταχυνθεί ή να επιβραδυνθεί εξαιτίας μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις σε μηχανισμούς συντήρησης του γονιδιώματος μπορούν να οδηγήσουν σε μια ποικιλία φαινοτύπων πρόωρης γήρανσης που μιμούνται αξιόπιστα ανθρώπινες διαταραχές[37].

Από τα πιο γνωστά παραδείγματα αποτελούν ποντίκια που φέρουν ομόζυγη σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο XPD και παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με εκείνα που έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με TTD, συμπεριλαμβανομένου των εύθραυστων μαλλιών, της οστεοπόρωσης, της οστεοσκλήρυνσης, της κύφωσης της καχεξίας και της μείωσης της διάρκειας ζωής[38-40]. Παρομοίως, μοντέλα ποντικών με μεταλλάξεις στα CSA και CSB γονίδια μιμούνται την ευαισθησία στην υπεριώδη ακτινοβολία του ασθενούς του συνδρόμου Cockayne και εμφανίζουν επιταχυνόμενη απώλεια του φωτο-υποδοχέα του αμφιβληστροειδούς, μείωση του σωματικού βάρους και ήπιο νευροεκφυλισμό[41-44]. Αξίζει να σημειωθεί ότι πλήρης απενεργοποίηση

του NER (με ταυτόχρονη αδρανοποίηση του γονιδίου XPA) ενισχύει σημαντικά τη σοβαρότητα των χαρακτηριστικών των TTD ή CSB ποντικών που φέρουν μεταλλάξεις σε παράγοντες του TC-NER.

Διπλά μεταλλαγμένα  $Xpd^{TTD/TTD}/Xpa^{-/-}$  ποντίκια εμφανίζουν δραματική εξασθένηση της ανάπτυξης μετά τη γέννηση, κύφωση, αταξία, διαταραχές της κινητικής δραστηριότητας καθώς και σταδιακή απώλεια βάρους ενώ, πεθαίνουν πρόωρα πριν τον απογαλακτισμό[40]. Επίσης,  $Csb^{m/m}/Xpa^{-/-}$  ποντίκια πεθαίνουν σε ένα μήνα περίπου, υποδηλώνοντας ότι η αυξημένη συσσώρευση βλαβών στη μεταγραφόμενη αλυσίδα ενεργών γονιδίων είναι κυτταροτοξική και προκαλεί πρόωρη γήρανση στα ζώα που έχουν απενεργοποιημένο TC-NER[45, 46].

Ποντίκια που έχουν έλλειψη του γονιδίου  $ERCC1^{-/-}$  εμφανίζουν όμοια συμπτώματα με τους XFE ασθενείς και γερνούν πρόωρα[32]. Τα ποντίκια αυτά παρουσιάζουν τα περισσότερα από τα χαρακτηριστικά πρόωρης γήρανσης που περιγράφονται παραπάνω αλλά και κάποια διαφορετικά από τα ποντίκια που φέρουν ανεπάρκεια μόνο στο TC-NER, όπως η δραματική παθολογία στο ήπαρ, στα νεφρά και στο μυελό των οστών.

Από την άλλη πλευρά, μακρόβια μοντέλα ποντικών παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη βιολογία της επιβραδυνόμενης γήρανσης και επισημαίνουν τον σημαντικό ρόλο του άξονα αυξητικής ορμόνης/αυξητικού παράγοντα 1 της ινσουλίνης (GH/IGF1) στον καθορισμό της ζωής[47, 48].

Τα μακρόβια ποντίκια – νάνοι Snell και Ames, εμφανίζουν δυσλειτουργίες στην υπόφυση που προκαλούνται από μεταλλάξεις στα γονίδια Pit-1 και Prop-1 αντίστοιχα[48]. Τέτοιες δυσλειτουργίες μειώνουν την έκκριση των σωματοτροφικών, θυροτροφικών και λακτοτροφικών ορμονών[49]. Η σωματική αυξητική ορμόνη (GH) ρυθμίζει την έκφραση του IGF1 μέσω σηματοδότησης από τον υποδοχέα της GH (GHR) σε διάφορους ιστούς – στόχους[50]. Τα ποντίκια με έλλειψη του GHR εκφράζουν χαμηλά επίπεδα του IGF1, εμφανίζουν μειωμένο σωματικό μέγεθος και ζουν περισσότερο[51, 52]. Ομοίως, διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν την ορμόνη Klotho εμφανίζουν μια παρατεταμένη διάρκεια ζωής λόγω της αναστολής της σηματοδότησης του IGF1[53]. Ο IGF-1 δίνει σήμα μέσω του υποδοχέα του (Igf1R): η πλήρης απώλεια του Igf1R είναι θανατηφόρα, ενώ τα ετερόζυγα  $Igf1r^{+/-}$  είναι μακρόβια[54]. Όλα τα παραπάνω μοντέλα προτείνουν ότι η καταστολή του GH/IGF1

σήματος μπορεί να οδηγήσει σε νανισμό και σημαντικά αυξημένη διάρκεια ζωής σε σύγκριση με τα φυσιολογικά/αγρίου τύπου ποντίκια.

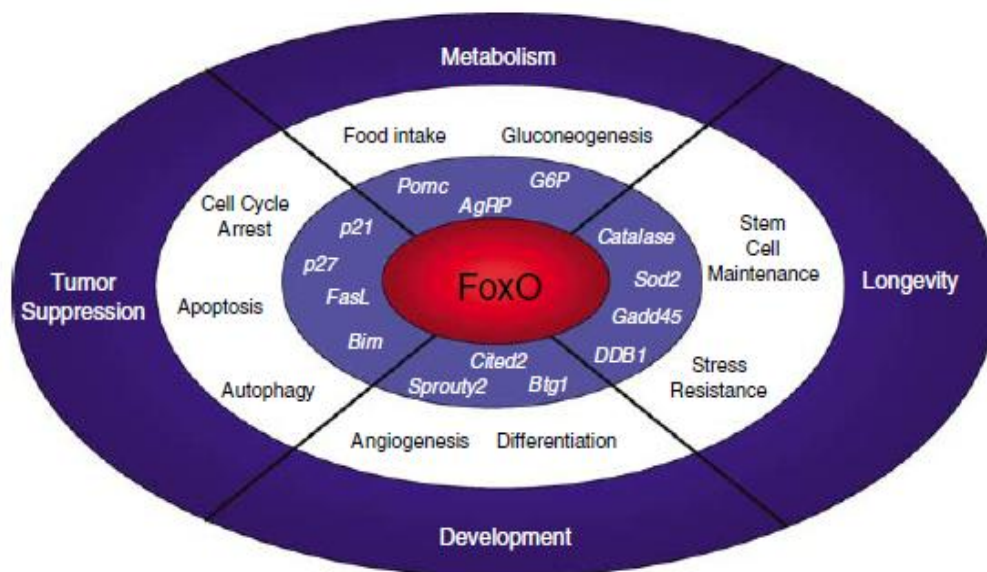
Όμοια αποτελέσματα έχει και η δίαιτα χαμηλή σε θερμίδες (Calorie Restriction – CR). Η μειωμένη παρουσία θερμίδων στην τροφή οδηγεί σε μειωμένη σηματοδότηση του άξονα ινσουλίνης/IGF1, παρατεταμένη διάρκεια ζωής και καθυστέρηση εμφάνισης πολλών ασθενειών που σχετίζονται με τη γήρανση στα θηλαστικά. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι η εξασθένιση του σωματοτροφικού άξονα και του οξειδωτικού μεταβολισμού εμφανίζονται και σε ποντίκια που γερνούν φυσιολογικά[32, 45, 55].

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι υπάρχει μια άμεση σχέση μεταξύ της συσσώρευσης των αλλοιώσεων στο DNA με την καταστολή του ρυθμιστικού άξονα GH/IGF1 και του οξειδωτικού μεταβολισμού[32, 56]. Φαίνεται επίσης, ότι αυτή η σχέση επαληθεύεται στα ποντίκια που γερνούν πρόωρα στα μακρόβια, αλλά και στα ποντίκια που γερνούν φυσιολογικά[37, 55]. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ποντίκια με μεταλλάξεις στην υπόφυση έχουν παρόμοια πρότυπα έκφρασης με ποντίκια που γερνούν πρόωρα και ποντίκια που υποβάλλονται σε δίαιτα χαμηλή σε θερμίδες καταλαβαίνουμε ότι η καταστολή των γονιδίων που σχετίζονται με τον σωματοτροφικό, λακτοτροφικό και θυροειδικό άξονα και η αυξημένη έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με το στρες και με αμυντικές αποκρίσεις χαρακτηρίζουν τη στροφή του οργανισμού από την ανάπτυξη στη συντήρηση του σώματος[2].

Αυτή η αλλαγή θα μπορούσε να έχει εξελιχθεί ως ένας μηχανισμός για την αντιμετώπιση καταστάσεων κρίσης, όπως η έλλειψη τροφής, λοίμωξη ή άλλες ασθένειες. Για παράδειγμα η δημιουργία μακρόβιων προνυμφών – νάνων του *C.elegans* γίνεται σε περιόδους έλλειψης τροφής, καταστέλλοντας τη σηματοδότηση του άξονα ινσουλίνης/IGF1[57]. Στα θηλαστικά, η μετάβαση από την ανάπτυξη στη σωματική διατήρηση μπορεί να λειτουργεί και ως μηχανισμός ογκοκαταστολής[58, 59].

#### **1.4 Οι FoxO μεταγραφικοί παράγοντες**

Σε απόκριση της αλλοίωσης του DNA, ειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούνται για την έναρξη της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων. Η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA σηματοδοτεί κλιμάκωση διάφορων διαδικασιών που οδηγούν σε αλλαγές των νουκλεοσωμάτων (τοπικά) και στη δομή



**Εικόνα 2:** Λειτουργίες των FoxO μεταγραφικών παραγόντων στα κύτταρα και στον οργανισμό. Οι FoxO ρυθμίζουν μια σειρά κυτταρικών διαδικασιών υπερεκφάζοντας διάφορα γονίδια-στόχους (με πλάγιους χαρακτήρες). Οι FoxO επηρεάζουν μια ποικιλία λειτουργιών του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένου της ογκοκαταστολής, της μακροζωίας, της ανάπτυξης και του μεταβολισμού. Ορισμένες κυτταρικές διεργασίες δεν ανήκουν αποκλειστικά σε μια λειτουργία του οργανισμού (π.χ. σύλληψη του κυτταρικού κύκλου).

της χρωματίνης (σε όλο το γονιδίωμα) συμπεριλαμβανομένης της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης των ιστονών που δίνει το σήμα τελικά για τη μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή των γονιδίων.

Μια τέτοια κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων είναι οι πρωτεΐνες Forkhead Box O (FoxO). Οι FoxO εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών όπως το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση, η επιδιόρθωση του DNA, ο μεταβολισμός της γλυκόζης και το οξειδωτικό στρες (εικόνα 2)[60, 61]. Επιπρόσθετα, μια από τις πιο ενδιαφέρουσες λειτουργίες του μεταγραφικού παράγοντα FoxO είναι η συντηρημένη ικανότητά του να αυξάνει το προσδόκιμο ζωής, καθώς συνδέεται με την απενεργοποίηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS) και τη διόρθωση των βλαβών του DNA[62, 63]. Η ρύθμιση των FoxO έχει σημαντικό ρόλο, βοηθώντας τους να επιτελούν διαφορετικές ακόμα και αντίθετες λειτουργίες όπως για παράδειγμα αντοχή στο οξειδωτικό στρες και απόπτωση.

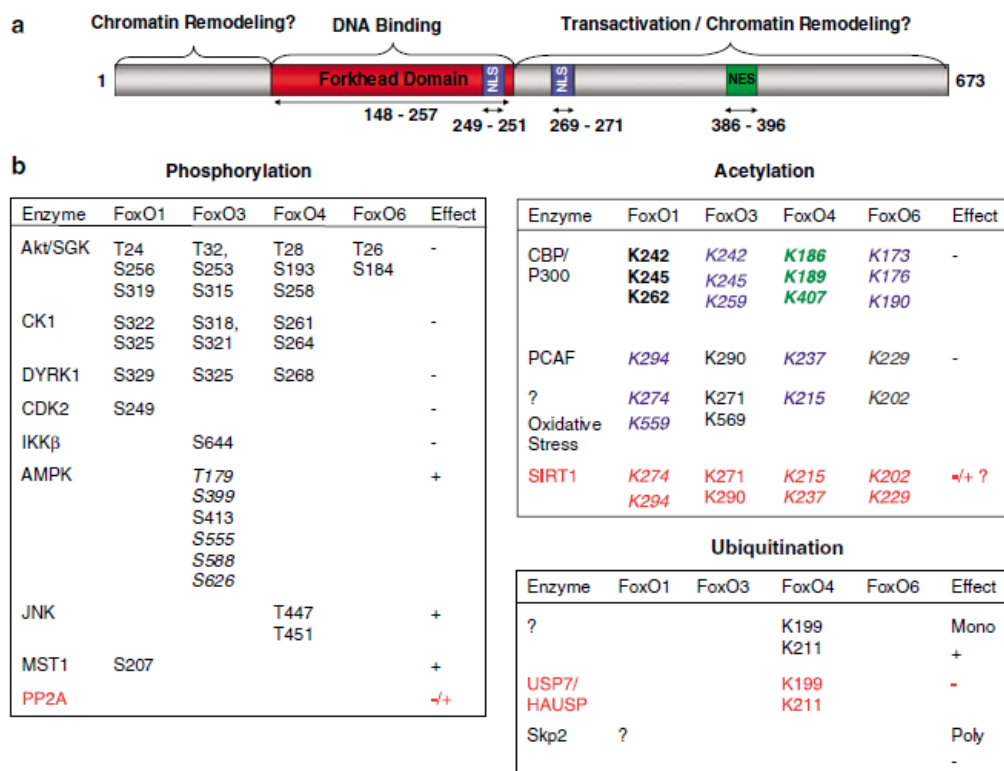
Οι FoxO μεταγραφικοί παράγοντες ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών Forkhead, μια οικογένεια ρυθμιστών της μεταγραφής που χαρακτηρίζεται από μια δομή που δεσμεύεται στο DNA και ονομάζεται 'Forkhead box'. Οι πρωτεΐνες FoxO περιλαμβάνουν τέσσερα μέλη (FoxO1, FoxO3, FoxO4 και FoxO6). Οι πρωτεΐνες FoxO1, FoxO3 και FoxO4 εκφράζονται σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών[64-66]. Το FoxO1 εμφανίζεται ιδιαίτερα υψηλό στον λιπώδη ιστό, το FoxO3 στον

εγκέφαλο και το FoxO4 στην καρδιά. Το FoxO6 εκφράζεται κυρίως κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου διαδραματίζοντας έναν σημαντικό ρόλο στο νευρικό σύστημα[67].

Οι πρωτεΐνες FoxO, μέσω της Forkhead box δομής τους, προσδένονται στο DNA αναγνωρίζοντας το μοτίβο TTGTTTAC (γνωστό ως DBE – DAF16 Binding Element) και δρουν ως δυναμικοί ενεργοποιητές της μεταγραφής[65, 68, 69]. Αναλύσεις γονιδιακών προφίλ όμως, δείχνουν ότι οι FoxO μπορούν να δράσουν και ως καταστολείς της μεταγραφής[70]. Συνεπώς, ανάλογα με τον υποκινητή και διάφορους εξωτερικούς παράγοντες μπορούν να ενεργοποιηθούν ή να καταστείλουν τη μεταγραφή.

### 1.5 Ρύθμιση των FoxO μεταγραφικών παραγόντων

Η ρύθμιση των FoxO γίνεται από ένα ευρύ φάσμα εξωτερικών ερεθισμάτων, όπως η ινσουλίνη, ο αυξητικός παράγοντας (IGF-1), άλλοι παράγοντες ανάπτυξης, θρεπτικές



**Εικόνα 3:** Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στους FoxO. (a) Σχηματική απεικόνιση του ανθρώπινου FoxO3, NLS:σήμα πυρηνικού εντοπισμού, NES:αλληλουχία για έξοδο από τον πυρήνα. (b) Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των FoxO. (-) Καταστολή των FoxO, (+) ενεργοποίηση των FoxO. Μαύρο: τροποποίηση που έχει χαρακτηριστεί στα κύτταρα, μπλε: αναμενόμενη θέση μετά από στοίχιση με άλλα μέλη της οικογένειας, πράσινο: τροποποίηση που έχει βρεθεί σε κύτταρα για τους FoxO στο ποντίκι, στοίχιση με τους FoxO στον άνθρωπο, κόκκινο: αφαίρεση της τροποποίησης, πλάγιοι χαρακτήρες: τροποποιήσεις που έχουν χαρακτηριστεί *in vitro* αλλά όχι σε κύτταρα.

ουσίες, κυτοκίνες και οξειδωτικό στρες. Αυτά τα ερεθίσματα ελέγχουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης, τον υποκυτταρικό εντοπισμό της, τη δέσμευσή της στο DNA και τη μεταγραφική της δραστηριότητα. Η ρύθμιση των FoxO επιτυγχάνεται με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωσης της μόνο- και πολύ-ουβικιτινυλίωσης, της ακετυλίωσης και ενδεχομένως άλλων τροποποιήσεων[71].

#### 1.5.1 Φωσφορυλίωση των FoxO μεταγραφικών παραγόντων

Ο κύριος μηχανισμός ρύθμισης των παραγόντων μεταγραφής FoxO, σε απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα, είναι οι μεταβολές στον υποκυτταρικό εντοπισμό τους. Ο έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού των FoxO επιτυγχάνεται μέσω πολλαπλών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και κυρίως μέσω της φωσφορυλίωσης και μονο-ουβικιτινυλίωσης.

Οι FoxO μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν υπόστρωμα της πρωτεϊνικής κινάσης Akt σε απόκριση κυτταρικής διέγερσης με παράγοντες ανάπτυξης ή ινσουλίνη. Δέσμευση αυξητικών παραγόντων ή ινσουλίνης από τους υποδοχείς της κινάσης τυροσίνης ενεργοποιεί και στρατολογεί την κινάση PI3 (PI3K) που με τη σειρά της επάγει αρκετές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, συμπεριλαμβανομένης της κινάσης Akt και της σχετικής κινάσης SGK (serum and glucocorticoid inducible kinase) [72].

Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν τους FoxO σε τρεις ρυθμιστικές περιοχές με διαφορετικές προτιμήσεις, όπως φαίνεται στην εικόνα 3[73]. Επίσης, πρόσθετες ρυθμιστικές θέσεις φωσφορυλιώνονται από κινάσες όπως η CK1, η CDK2 και η DYRK1, μέλος της οικογένειας των MAP κινασών(εικόνα 3)[74-76].

Η φωσφορυλίωση των FoxO προκαλεί την άμεση μετατόπισή τους από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια της πρωτεΐνης – σαπερόνης 14-3-3, η οποία αναγνωρίζει και προσδένεται στα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης. Η 14-3-3 αλλάζει πιθανώς τη διάταξη των FoxO, προβάλλοντας το NES(Nuclear export signal) και βοηθώντας την αλληλεπίδρασή τους με το σύστημα Exportin/Crm1 (chromosomal region maintenance protein 1)[69, 77]. Επίσης, η φωσφορυλίωση των FoxO, σε απόκριση αυξητικών παραγόντων, επάγει την μετατόπισή τους στο κυτταρόπλασμα μέσω της αλληλεπίδρασής τους με το σύστημα εξόδου από τον πυρήνα (Ran και Exportin/Crm1)[75, 78]. Σε συνθήκες όπου οι κινάσες Akt και SGK



είναι ανενεργές, όπως για παράδειγμα απουσία αυξητικών παραγόντων, οι FoxO βρίσκονται στον πυρήνα.

Στο κυτταρόπλασμα οι φωσφορυλιωμένες FoxO μπορούν να αποφωσφορυλιωθούν με τη βοήθεια φωσφατάσων. Η πρωτεϊνική φωσφατάση 2A έχει βρεθεί ότι προσδένεται στην FoxO3, γεγονός που υποδηλώνει ότι η 2A φωσφατάση μπορεί να συμμετέχει στην αποφωσφορυλίωση των FoxO[79]. Επίσης, σε σκουλήκια ο SMK-1, που είναι ένας συν-ενεργοποιητής του FoxO/DAF-16, κωδικοποιεί τη ρυθμιστική υπομονάδα της PPH-4.1 (protein phosphatase 4), προτείνοντας τη συμμετοχή του στη ρύθμιση των FoxO στα σκουλήκια και σε άλλα είδη[80]. Ο ρυθμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η αποφωσφορυλίωση μπορεί να επηρεάζει και τη μετατόπιση αυτών των παραγόντων.

Οι FoxO, πέρα από την ινσουλίνη και τους αυξητικούς παράγοντες, ρυθμίζονται σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες[81-83]. Μια σειρά στρεσογόνων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του οξειδωτικού στρες, θερμικού σοκ και υπερϊόδους ακτινοβολίας επάγουν την φωσφορυλίωση των FoxO από τις ενεργές κινάσες MST1 (mammalian Ste20-like kinase) και JNK (c-Jun kinase) με την ακόλουθη μετατόπισή τους από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Τα μονοπάτια MST1 και JNK που ενεργοποιούνται σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες αντιτίθενται στο PI3K-Akt/SGK μονοπάτι που ενεργοποιείται από την ινσουλίνη και τους αυξητικούς παράγοντες. Οι κινάσες Akt / SGK μετατοπίζουν τους FoxO στο κυτταρόπλασμα σε κύτταρα θηλαστικών και αναστέλλει την παράταση ζωής σε σκουλήκια, ενώ οι κινάσες JNK και MST1 προωθούν την πυρηνική μετατόπιση των FoxO σε κύτταρα θηλαστικών και επεκτείνουν τη διάρκεια ζωής σε σκουλήκια[84, 85].

### 1.5.2 Μονο-ουβικιτινυλίωση των FoxO σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες

Σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες, προκαλείται μονο-ουβικιτινυλίωση του FoxO4 επάγοντας την πυρηνική μετατόπισή του και τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του[86]. Μετά τη μονο-ουβικιτινυλίωση, το οξειδωτικό στρες έχει επίσης ως αποτέλεσμα την απο-ουβικιτινυλίωση της FoxO4 από το ένζυμο USP7. Καθώς η μονο-ουβικιτινυλίωση συμβαίνει σε κατάλοιπα λυσίνης που θα μπορούσαν να ακετυλιωθούν, η σχέση μεταξύ μονο-ουβικιτινυλίωσης και άλλων μετα-

μεταφραστικών τροποποιήσεων μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του εντοπισμού των FoxO[86].

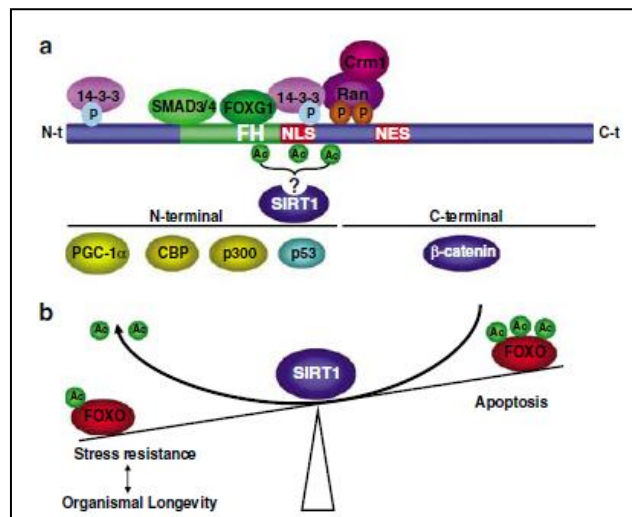
### 1.5.3 Ρύθμιση των FoxO μέσω της πρωτεόλυσης

Οι πρωτεΐνες FoxO ρυθμίζονται και στο επίπεδο σταθερότητάς τους. Ενώ οι FoxO παράγοντες είναι σχετικά σταθερές πρωτεΐνες, μπορούν να πρωτεολυθούν μέσω του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεάσης σε απόκριση της ινσουλίνης και άλλων αναπτυξιακών παραγόντων[87-91]. Η πρωτεόλυση προκύπτει από τη φωσφορυλίωση μέσω της Akt[87-90]. Συνεπώς, το μονοπάτι ινσουλίνης-PI3K-Akt ρυθμίζει τόσο τον υποκυτταρικό εντοπισμό, όσο και την πρωτεόλυση των FoxO. Ο τρόπος με τον οποίο η ινσουλίνη επηρεάζει την ισορροπία μεταξύ μετατόπισης και πρωτεόλυσης δεν είναι ακόμα γνωστός, αλλά είναι πιθανό η ισορροπία αυτή να επηρεάζεται από το πόσο ήπια ή ισχυρή είναι η σηματοδότηση.

### 1.5.4 Ρύθμιση της FoxO-εξαρτώμενης μεταγραφής: αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η φωσφορυλίωση έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των FoxO, αλλά δεν είναι από μόνη της αρκετή να ελέγξει όλες τις διαφορετικές λειτουργίες τους. Ένα επιπλέον επίπεδο ρύθμισης των FoxO ορίζεται μέσω της αλληλεπίδρασής τους με άλλους παράγοντες (συνενεργοποιητές ή συγκαταστολείς) καθώς και τις αλλαγές στην ακετυλίωσή τους.

Οι μεταγραφικοί συνενεργοποιητές CBP (CREB Binding protein), p300 και PCAF προσδέονται στους FoxO προκαλώντας την ακετυλίωσή τους[81, 92]. Αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίηση των FoxO μπορεί να επιφέρει αντίθετα αποτελέσματα στη λειτουργία τους. Ενώ η ακετυλίωση μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή



**Εικόνα 4:** (a) Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις των FoxO. (b) Αλληλεπίδραση με την απακετυλάση SIRT1 η οποία ελέγχει τις λειτουργίες των FoxO αυξάνοντας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αντοχή στο στρες.

εμποδίζοντας την πρόσδεση των FoxO στο DNA[93] (αρκετές θέσεις ακετυλίωσης υπάρχουν στην περιοχή πρόσδεσης των FoxO στο DNA), η αλληλεπίδραση με τους CBP/p300 επιτρέπει τη στρατολόγηση συνενεργοποιητικού συμπλόκου στους υποκινητές συγκεκριμένων γονιδίων επάγοντας την trans-ενεργοποίησή τους. Συνεπώς, η ακετυλίωση μπορεί να ελέγχει τη λειτουργικότητα των FoxO με διαφορετικό τρόπο σε διαφορετικούς υποκινητές ρυθμίζοντας την ειδικότητά τους.

Σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες, οι FoxO δεσμεύονται με τον παράγοντα συν-ενεργοποίησης β-κατενίνη, που λειτουργεί κανονικά στο Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι δεσμεύοντας και ενεργοποιώντας τον TCF (T-cell factor) παράγοντα μεταγραφής. Η αλληλεπίδραση β-κατενίνης και TCF είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Σε διάφορες οστεοβλαστικές κυτταρικές σειρές στα θηλαστικά υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες εμφανίζεται μια αυξημένη FoxO-εξαρτώμενη μεταγραφική δραστηριότητα σε βάρος της TCF-εξαρτώμενης μεταγραφής, προτείνοντας ότι οι FoxO προσδένονται και απομακρύνουν την β-κατενίνη από τον TCF[94, 95]. Καθώς ορισμένα γονίδια-στόχοι των FoxO υπερεκφράζονται ενώ γονίδια-στόχοι του Wnt μονοπατιού υποεκφράζονται κατά τη γήρανση στα ποντίκια, ο μηχανισμός αυτός θα μπορούσε να σχετισθεί, εν μέρει, με τη χαρακτηριστική μείωση της οστικής πυκνότητας που συμβαίνει κατά τη γήρανση[96]. Ομοίως, ο FoxO4 προσδένεται στον μεταγραφικό συν-ενεργοποιητή μυοκαρδίνη και καταστέλλει τη δράση του, παρεμποδίζοντας τη διαφοροποίηση των λείων μυών[97]. Επίσης, ο FoxO1 προσδένεται με τον παράγοντα PGC-1 (peroxisome proliferative activated receptor-γ co-activator) ενεργοποιώντας την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τη γλυκονεογένεση[98].

FoxO αλληλεπιδρά με την απακετυλάση ιστονών κατηγορίας III SIRT-1 σε απόκριση σε ερεθίσματα οξειδωτικού στρες[81, 99]. Η SIRT-1 φαίνεται να ρυθμίζει κατά διαφορετικό τρόπο γονίδια-στόχους των FoxO. Για παράδειγμα, η SIRT-1 αυξάνει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου και της αντοχής στο στρες, ενώ αναστέλλει την ικανότητα των FoxO να επάγουν αποπτωτικά γονίδια[81, 92, 99]. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στη διπλή ικανότητα της SIRT-1 να συνδέεται και να απακετυλιώνει τους FoxO. Η πρόσδεση της SIRT-1 θα μπορούσε να προκαλέσει την αποσιώπηση της χρωματίνης που γειτνιάζει με τις θέσεις δέσμευσης των FoxO στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων, λόγω της απακετυλίωσης των ιστονών, αυξάνοντας παράλληλα την πρόσδεση τους σε

άλλους υποκινητές. Είναι επίσης πιθανό ο αριθμός των ακετυλιωμένων θέσεων να ελέγχει την πρόσδεση των FoxO σε διαφορετικούς υποκινητές-στόχους και/ή σε διαφορετικά συμπλέγματα πρωτεϊνών στους υποκινητές. Καθώς η αυξημένη αντίσταση στο στρες συνάδει με τη μακροβιότητα[100], η ικανότητα της SIRT-1 να ελέγχει τις λειτουργίες των FoxO αυξάνοντας την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την αντοχή στο στρες, ίσως εξηγεί το γιατί οι Sir2 επιμηκύνουν τη ζωή στις μύγες και τα σκουλήκια. Είναι γνωστό ότι η ικανότητα της Sir2 να επιμηκύνει τη ζωή εξαρτάται από τον DAF-16[101]. Κατά συνέπεια, μια σύνδεση μεταξύ SIRT-1 και FoxO ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ζωής.

Οι FoxO αλληλεπιδρούν με μια σειρά συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων τους και μπορούν να καθορίζουν την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τέτοιες αλληλεπιδράσεις ευνοούνται από την εγγύτητα FoxO-θέσεων δέσμευσης και άλλων στοιχείων που απαντώνται τους υποκινητές συγκεκριμένων γονιδίων.

Μερικοί από αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες είναι ο RUNX3, ο οποίος συνεργάζεται με τους FoxO για την υπερέκφραση του προ-αποπτωτικού γονιδίου *BIM* και επάγει την απόπτωση στα γαστρικά κύτταρα[102]. Επίσης, αλληλεπίδραση με τους παράγοντες SMAD3 και SMAD4, σε απόκριση του TGF- $\beta$  σήματος, προκαλεί την υπερέκφραση του γονιδίου αναστολής του κυτταρικού κύκλου *p21<sup>cip1</sup>* και άλλων παρόμοιων στόχων[103, 104]. Αυτή η υπερέκφραση μπορεί να σταματήσει μετά από αλληλεπίδραση με το FoxG παράγοντα που δρα σαν καταστολέας της μεταγραφής[103]. Ο FoxO3 αλληλεπιδρά με τον STAT5 και προκαλεί την υπερέκφραση του Cited 2 (CBP/p300-interacting transactivator with ED-rich tail 2), το οποίο επάγει τη διαφοροποίηση[105].

Μετά την αλληλεπίδραση των FoxO με παράγοντες που καταστέλλουν τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων μπορούν να προκαλέσουν την υπερέκφραση αυτών των γονιδίων[106]. Για παράδειγμα, ο p53 καταστέλλει την έκφραση της SIRT-1, όμως σε συνθήκες έλλειψης τροφής οι FoxO προσδένονται στον p53 επιτρέποντας την υπερέκφραση της SIRT-1.

Οι FoxO επίσης αλληλεπιδρούν με διάφορα μέλη της οικογένειας των στεροειδικών και ορμονικών υποδοχέων όπως για παράδειγμα ο PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ )[107] και ο ER $\alpha$  (estrogen receptor)[108], προκαλώντας

καταστολή της FoxO-εξαρτώμενης μεταγραφής. Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση των FoxO με τον ERα καταστέλλει τη FoxO-εξαρτώμενη μεταγραφή ενώ αντίθετα επάγει την ER-εξαρτώμενη μεταγραφή[108].

Άλλοι παράγοντες μεταγραφής, όπως Myc[62], NF-κB (nuclear factor κB)[62], Csi[109] και C/EBPs[104, 110] εμπλέκονται στη ρύθμιση των FoxO και των γονιδίων-στόχων τους καθορίζοντας τις κυτταρικές λειτουργίες.

## **1.6 Ο ρόλος των FoxO στα θηλαστικά**

Από διάφορες μελέτες έχει δειχθεί ότι μια από τις πιο ενδιαφέρουσες λειτουργίες του μεταγραφικού παράγοντα FoxO είναι η συντηρημένη ικανότητά του να αυξάνει τη διάρκεια ζωής στα ασπόνδυλα. Προσπαθώντας να ξεκαθαρίσουμε το ρόλο των FoxO στα θηλαστικά, δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά ποντίκια με ελλείψεις στα γονίδια FoxO1, FoxO3 και FoxO4.

Τα ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου FoxO1 πεθαίνουν κατά την εμβρυϊκή μέρα 10,5 λόγω ελαττωματικής αγγειογένεσης[111, 112]. Τα ετερόζυγα ποντίκια ωστόσο, είναι βιώσιμα και είναι ικανά να αντιστρέψουν το διαβητικό φαινότυπο των ποντικών που φέρουν μεταλλάξεις στον υποδοχέα της ινσουλίνης[113]. Φαίνεται κατά συνέπεια ότι ο FoxO1 αποτελεί υπόστρωμα του IIS μονοπατιού.

Τα ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου FoxO3 είναι βιώσιμα[114]. Τα θηλυκά εμφανίζουν στειρότητα[114], λόγω της πρόωρης ενεργοποίησης των ωοθυλακίων. Εμφανίζουν επίσης δυσκολία στην πρόσληψη της γλυκόζης[114], υποδεικνύοντας το ρόλο του FoxO3 στον μεταβολισμό της γλυκόζης.

Τα FoxO4 ελλειμματικά ποντίκια είναι βιώσιμα, χωρίς κάποιο εμφανή φαινότυπο[112], ενώ τα ποντίκια με έλλειψη του FoxO6 γονιδίου είναι υπό δημιουργία.

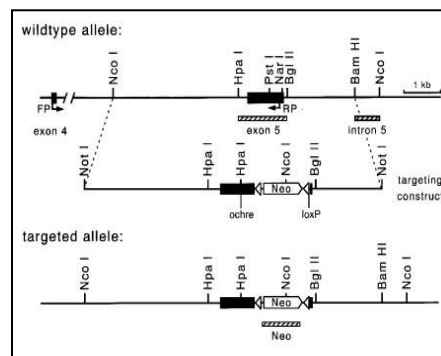
Με βάση τα παραπάνω μοντέλα φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες FoxO μπορούν να έχουν διαφορετικές αλλά και επικαλυπτόμενες λειτουργίες στον οργανισμό. Αποκαλύπτοντας το ρόλο των FoxO όσον αφορά το στρες και τη μακροβιότητα, στα θηλαστικά, θα μπορούσαν να δώσουν ένα πολύ εξελιγμένο σύνολο μοντέλων ποντικών για να μπορέσει να μελετηθεί η σχέση τους με τη γήρανση.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν:

- Ποντίκια B1/6, φυσιολογικά για την CSB.
- Ποντίκια B1/6 μεταλλαγμένα ώστε να μην εκφράζουν μια μεταλλαγμένη μορφή της CSB. Συγκεκριμένα έχει αντικατασταθεί μια περιοχή του εξωνίου 5 με το γονίδιο ανθεκτικότητας νεομυκίνη και ένα MURFI ochre stop κωδικόνιο που τερματίζει τη μεταγραφή πρόωρα και δημιουργεί μια μεταλλαγμένη πρωτεΐνη που μοιάζει με αυτή των CSB ασθενών CS1AN[115].



Εικόνα 1: Ομόλογος ανασυνδυασμός για την μεταλλαγμένη μορφή της CSB.

Για τον προσδιορισμό του γονοτύπου των ζώων που εξετάστηκαν, έγινε αρχικά απομόνωση του γενωμικού τους DNA από τμήμα της ουράς τους:

#### Απομόνωση γενωμικού DNA

##### Tail lysis buffer

200mM NaCl

100mM TrisHCl pH 8.0

5mM EDTA pH 8.0

0.2% SDS

H<sub>2</sub>O

Κάθε ουρά επωάζεται σε 500μl διαλύματος Tail lysis buffer + 25μl Proteinase K (100μg/ml) O/N στους 55°C. Την επόμενη μέρα, ακολουθεί γρήγορο ανακάτεμα και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 30min. Το υπερκείμενο εισάγεται σε νέο eppendorf που περιέχει 500μl ισοπροπανόλης και αναμειγνύουμε με το χέρι έως ότου κατακρημνιστεί το DNA. Στη συνέχεια ψαρεύουμε το DNA με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου και ξεπλένουμε σε 1ml 70% αιθανόλη. Αφήνουμε το DNA να στεγνώσει και επαναδιαλύουμε σε 200μl TE (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA).

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την πραγματοποίηση PCR για την ανίχνευση του γονοτύπου των ζώων, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές, σύμφωνα με τον. Οι συνθήκες του προγράμματος είναι οι εξής:

Πρόγραμμα της PCR		
1	94°C	3min
2	94°C	40sec
3	59°C	30sec
4	72°C	40sec
5	Go to step 2	30x
6	72°C	5min
7	14°C	hold

Σε κάθε αντίδραση (συνολικού όγκου 50μl) προσθέτουμε τα παρακάτω:

<u>Συστατικά</u>	<u>Δείγμα</u>
ddH <sub>2</sub> O	33μl
10x buffer	5μl
MgCl <sub>2</sub>	3μl
10mM dNTPs	1μl
Εκκινητής CSBFex5(25pmoles/μl)	2μl
Εκκινητής CSBRex5(25pmoles/μl)	2μl
Εκκινητής CSBNeo-1(25pmoles/μl)	2μl
Taq polymerase	0,5μl
Γενωμικό DNA	1,5μl

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση είναι:

CSBFex5 5' – GTCTTCTGATGACGTTAGCTATGAG – 3'

CSBNeo-1 5' – ATCTGCGTGTTCGAATTCGCCAATG – 3'

CSBRex5 5' – GCTGCTTATAATAATCCTCATCTCC – 3'

Μετά το τέλος της PCR, πραγματοποιούμε ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1% σε διάλυμα TAE (50X TAE: 2M Tris-HCl pH 7.5, 2mM EDTA). Οι ζώνες που ανιχνεύουμε με τη βοήθεια EtBr κατά την έκθεση του gel σε υπεριώδη ακτινοβολία, είναι μεγέθους 500bp για το μεταλλαγμένο γονίδιο της CSB και 200bp για το φυσιολογικό γονίδιο.

## **2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΘΥΜΗΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ**

### **Απομόνωση RNA από ιστό**

Ιστοί: Συκώτι από αγρίου τύπου ποντικό 15 ημερών

Αρχικά, απομονώνουμε τον ιστό και τον τοποθετούμε σε σωλήνα falcon 7ml. Στη συνέχεια προσθέτουμε 1ml Trizol και ομογενοποιούμε καλά με τη χρήση ηλεκτροκίνητου ομογενοποιητή. Μεταφέρουμε το ομοιογενές δείγμα σε σωλήνα erpendorf 1,5ml και αφήνουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προσθέτουμε 200μl χλωροφόρμιο και ανακινούμε τα δείγματα για 15 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 12,000 x g στους 4°C. Κατά τη φυγοκέντριση δημιουργούνται μια (κόκκινη) κάτω φάση που περιέχει τη φαινόλη-χλωροφόρμιο, μια μεσόφαση και μία υδατική (διάφανη) πάνω φάση που περιέχει το RNA. Μεταφέρουμε την πάνω φάση σε καινούριο erpendorf και προσθέτουμε 500μl ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση του RNA. Αναμειγνύουμε τα δείγματα 3-4 φορές και αφήνουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, φυγοκεντρούμε στις 12,000 x g για 10 λεπτά στους 4°C, αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε την πελέτα με 70% αιθανόλη. Τέλος, επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 50-100μl ddH<sub>2</sub>O και μετράμε την ποσότητα και την καθαρότητα ( $A_{260}/A_{280} \approx 2$ ) του RNA στο nanodrop.

### **Σύνθεση cDNA**

Ετοιμασία των RNA/εκκινητών δειγμάτων σε 0,2ml σωλήνες.

<u>Συστατικά</u>	<u>Δείγμα</u>
1μg ολικού RNA	1 μl
Oligo(dT) (0.5 μg/μl)	1 μl
ddH <sub>2</sub> O	9,5μl



Επωάζουμε τα δείγματα στους 70°C για 10λεπτά, και στη συνέχεια αφήνουμε για 2λεπτά στους 4°C. Εν τω μεταξύ προετοιμάζουμε το ακόλουθο μείγμα

<u>Συστατικά</u>	<u>Για κάθε αντίδραση</u>
5X RT buffer	4 μl
0.1 M DTT	2 μl
10mM dNTP mix	1 μl
RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (40u/μl)	1 μl
SuperScript® II RT (50units)	0.5 μl

Στη συνέχεια προσθέτουμε τα παραπάνω συστατικά στην αντίδραση, αναδεύουμε ελαφρά με την πιπέτα και φυγοκεντρούμε σύντομα για να συλλέξουμε το δείγμα μας. Αφήνουμε το δείγμα να επωαστεί για 1 ώρα στους 42°C και έπειτα αραιώνουμε το δείγμα μας 10φορές(10x) προσθέτοντας 180μl ddH<sub>2</sub>O και το παγώνουμε στους -20°C.

#### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Για την πολλαπλή αντιγραφή των γονιδίων FOXO1a και FOXO3a χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με υπόστρωμα cDNA που παρασκευάστηκε από RNA από σκώτι αγρίου τύπου ποντικού. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της Phusion High Fidelity DNA πολυμεράση (Finzymes) και εκκινητών οι οποίοι σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να εισάγουν τις θέσεις περιορισμού XhoI και BamHI στο 5' και στο 3' άκρο αντίστοιχα της κωδικοποιούσας περιοχής του FOXO1a (~1,9kb):

FOXO1F 5' – CCGCTCGAGCGGGCCGAAGCGCCCCAGGTGGTGGAG – 3'

FOXO1R 5' – CGGGATCCCGTTAGCCTGACACCCAGCTGTGTTG – 3'

Ενώ για το γονίδιο FOXO3a (~2kb) σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών:

FOXO3 F4 5'-GCAGAGGCACCAGCCTCCCCGGTC-3'

FOXO3 R2 5'-ATCCAGCTCCGTGCTTGCCAGGAT-3'

και

FOXO3 F3 5'-AATTCCAACGCCAGCACCGTGA-3'

FOXO3 R3 5'-TCAGCCTGGTACCCAGCTTTGAGA-3'

Δίνοντας έτσι δύο ίσα τμήματα του γονιδίου (~1kb), καθώς οι εκκινητές FOXO3 F3 και FOXO3 R2 αναγνωρίζουν περιοχές που βρίσκονται στη μέση της αλληλουχίας.

Σε κάθε αντίδραση PCR(συνολικού όγκου 50μl) προσθέτουμε τα παρακάτω:

<u>Συστατικά</u>	<u>Δείγμα</u>
ddH <sub>2</sub> O	30,1μl
5x HF buffer	10μl
10mM dNTPs	1μl
Εκκινητής F(25pmoles/μl)	0,8μl
Εκκινητής R(25pmoles/μl)	0,8μl
cDNA(10x)	5μl
DMSO	1,5μl
Phusion DNA polymerase	0,8μl

Οι συνθήκες του προγράμματος είναι οι εξής:

Πρόγραμμα της PCR		
1	98°C	2min
2	98°C	15sec
3	64°C	30sec
4	72°C	1min 30sec
5	Go to step 2	35x
6	72°C	10min
7	14°C	hold

### **Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης**

Τα τμήματα DNA που προέκυψαν από την PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζης 1% και οι επιθυμητές ζώνες αποκόπηκαν. Το DNA απομονώθηκε με τη βοήθεια του Nucleospin extract II kit της εταιρίας MACHEREY-NAGEL σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### **Κλωνοποίηση**

Η κλωνοποίηση DNA σε πλασμιαδικούς φορείς πραγματοποιήθηκε μετά από πέψη του πλασμιαδικού DNA σε συγκεκριμένες θέσεις περιορισμού και συνδέθηκε με το

ξένο τμήμα DNA που έχει υποστεί την ίδια κατεργασία με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού που καταλύει μια λιγάση. Το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο μπορεί να μεταφερθεί σε κύτταρα και να αναπτυχθεί παρουσία αντιβιοτικών (καθώς φέρει ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά) επιτρέποντας την επιλογή τους σε σχέση με τα κύτταρα που δεν περιέχουν το πλασμίδιο.

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι ο pBluescript SK(+), το pcDNA3.1(+), το AviTEV FLAG pBS SK και το 3xHA NLS BirA pBUDNeo (τα πλασμίδια αυτά παραχωρήθηκαν από το εργαστήριο του κ. Στρουμπούλη, Ινστιτούτο Fleming).

- Ο pBluescript SK(+) είναι ένας πλασμιδιακός φορέας που περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη για τη θετική επιλογή του και το γονίδιο που κωδικοποιεί για το lacZ πεπτίδιο επιτρέποντας την επιλογή των κλώνων που φέρουν το κλωνοποιημένο τμήμα DNA με τη δράση της β-γαλακτοσιδάσης. Για την ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης χρησιμοποιείται το X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside), που αποτελεί χρωμογόνο υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης και η διάσπασή του από αυτή προσδίδει μπλε χρώμα στις βακτηριακές αποικίες.
- Ο AviTEV FLAG pBS SK είναι ένας πλασμιδιακός φορέας που έχει προκύψει από τον pBluescript SK(+), με την ένθεση της αλληλουχίας Avi TEV FLAG (Avi: περιοχή που κωδικοποιεί για την αβιδίνη (14aa), TEV(Tobacco Etch Virus): περιοχή αναγνώρισης από την TEV πρωτεάση (7aa), FLAG: περιοχή που κωδικοποιεί ένα στοιχείο αναγνώρισης (8aa)) στην πολυκλωνική περιοχή του.
- Ο pcDNA3.1(+) είναι ένας πλασμιδιακός φορέας της εταιρίας Invitrogen, ο οποίος φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη για τη θετική επιλογή του στα βακτήρια, όπως και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην νεομυκίνη για την θετική επιλογή του σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Φέρει επίσης τον υποκινητή CMV του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού για την αποτελεσματική υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, καθώς και ένα σήμα πολυαδενυλίωσης BGH (Bovine growth hormone) polyA για τον σωστό τερματισμό και την αποτελεσματική μεταγραφή του mRNA. Τέλος, για το σωστή έκφραση του

γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη περιέχει τον SV40 υποκινητή και το σήμα πολυαδενυλίωσης SV40 poly A.

- Ο 3xHA NLS BirA pBUDNeo είναι ένας πλασμιδιακός φορέας που προέρχεται από τον pBUDCE4.1 της εταιρίας Invitrogen. Ο υποκινητής αυτός φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας για τη ζεοσύνη για τη θετική επιλογή του στα βακτήρια, ενώ έχει εισαχθεί και μια αλληλουχία που προσδίδει ανθεκτικότητα στην νεομυκίνη για την θετική επιλογή του στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Επίσης, φέρει υποκινητές όπως ο CMV, EF-1a (Elongation Factor – 1a) για την αποτελεσματική υπερέκφραση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης και SV40 για τη σωστή έκφραση των γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Επιπρόσθετα, περιέχει σήματα πολυαδενυλίωσης BGH polyA και SV40 polyA για τον σωστό τερματισμό και την αποτελεσματική μεταγραφή του mRNA. Τέλος, στον φορέα έχει εισαχθεί μια αλληλουχία που κωδικοποιεί για τη βακτηριακή λιγάση BirA που βοηθάει για τη βιοτινυλίωση των πρωτεϊνών κάτω από τη ρύθμιση του CMV υποκινητή.

Η κλωνοποίηση των επιθυμητών cDNAs στους φορείς αυτούς χρησιμοποιήθηκε ως ενδιάμεσο στάδιο για τη δημιουργία ανασυνδυσμένων φορέων και την τελική παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα.

Τα προς μελέτη cDNAs που προήλθαν από την PCR κλωνοποιήθηκαν αρχικά στον φορέα pBluescript SK (+) ο οποίος είχε υποστεί πέψη με το ένζυμο EcoRV, δημιουργώντας τυφλά (blunt) άκρα. Κατά την αντίδραση της PCR τα τμήματα που προέκυψαν από την Phusion DNA πολυμεράση είχαν κι αυτά τυφλά άκρα. Ακολούθησε συγκόλληση φορέα και ενθέματος χρησιμοποιώντας την T4 λιγάση (Minotech). Κατά την αντίδραση συγκόλλησης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

<u>Συστατικά</u>	<u>Δείγμα</u>
pBluescript SK(+) vector	1μl
FOXO1a cDNA	6μl
dH <sub>2</sub> O	1μl
T4 λιγάση	1μl
10x buffer T4 λιγάσης	1μl

Η αντίδραση έγινε στους 37°C για 16h.

Τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό ήταν τα E.coli XL-1 κύτταρα. Κατά την αντίδραση μετασχηματισμού 10μl της αντίδρασης συγκόλλησης προσθέτονται σε 250μl εναιωρήματος βακτηρίων και τοποθετούνται για 30min στον πάγο. Έπειτα, τα κύτταρα επωάζονται για 1min και 45sec στους 42°C για να υποστούν θερμικό σοκ (heat-shock) και επανατοποθετούνται στον πάγο για 2-3min. Στη συνέχεια προσθέτουμε 800μl LB (1lt: 10g trypton, 5g Yeast-extract, 5g NaCl, H<sub>2</sub>O, pH7.5) και επωάζουμε στους 37°C για 1h. Φυγοκεντρούμε στις 3000rpm για 6min και αφαιρούμε το υπερκείμενο. Επαναδιαλύουμε την πελλέτα σε τελικό όγκο 150μl LB και επιστρώνουμε σε πιάτο 10cm<sup>2</sup> που περιέχει στερεό LB (υγρό LB + άγαρ) και αμπικιλίνη. Στην περίπτωση που θέλουμε να κάνουμε επιλογή μπλε και λευκών αποικιών, πριν προσθέσουμε τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιστρώνουμε το πιάτο με 40μl X-Gal(20mg/ml) και 20μl IPTG(100mM) και το αφήνουμε να στεγνώσει για 30min. Τέλος, αφήνουμε το πιάτο ολονύκτια στους 37°C και την επόμενη μέρα απομονώνονται οι αποικίες που είναι ανθεκτικές σε αμπικιλίνη και εμφανίζουν λευκό χρώμα. Η πιστοποίηση του μετασχηματισμού γίνεται με απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA από τις εν λόγω αποικίες.

Πλασμιδιακό DNA μπορεί να απομονωθεί από βακτηριακές καλλιέργειες κατόπιν επεξεργασίας με αλκαλικό διάλυμα και SDS. Από την υγρή καλλιέργεια τοποθετούμε 1,5ml σε eppendorf και φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 20sec. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε την πελλέτα σε 100μl TE. Αφήνουμε για 5min σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα προσθέτουμε 200μl διαλύματος NaOH/SDS, αναδεύουμε και αφήνουμε στον πάγο για 5min. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 150μl διαλύματος οξικού καλίου, αναμειγνύουμε και τοποθετούμε στον πάγο για 15min. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 1min και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καινούριο eppendorf. Προσθέτουμε 500μl 100% αιθανόλη και αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2min. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 1min, αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε την πελλέτα με 70% αιθανόλη. Τέλος, επαναδιαλύουμε την πελλέτα σε 20μl dH<sub>2</sub>O.

Για την ταυτοποίηση των θετικών κλώνων πραγματοποιήθηκαν πένψεις με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού που αναγνωρίζουν θέσεις τόσο μέσα στην αλληλουχία όσο και

στο φορέα στον οποίο εντέθηκε. Στις πέψεις τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα XhoI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NotI, HindIII (Minotech) και η Asp718I (Roche) με τα κατάλληλα διαλύματα. Η κάθε αντίδραση περιέχει: 6μl DNA, 2μl buffer, ≤1μl ένζυμο και χμl H<sub>2</sub>O μέχρι τα 20μl. Οι αντιδράσεις ηλεκτροφορήθηκαν σε 1%gel αγαρόζης και οι θετικοί κλώνοι επιλέχθηκαν για απομόνωση μεγάλης κλίμακας πλασμιδιακού DNA. Η απομόνωση έγινε με τη βοήθεια του Nucleobond x-tra midi kit της Qiagen σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Τα θετικά δείγματα στάλθηκαν για sequencing, ώστε να επαληθευθεί η σωστή αλληλουχία του ενθέματος.

Στα διάφορα βήματα υποκλωνοποίησης το ένθεμα κόβεται με τα ένζυμα XhoI και BamHI από τον pBluescript SK(+) και κλωνοποιείται στον AviTEV FLAG pBS SK. Στη συνέχεια ο AviTEV FLAG pBS SK κόβεται με τα ένζυμα Asp718I και BamHI και απομονώνεται αλληλουχία που περιέχει το επιθυμητό cDNA μαζί με το Avi TEV FLAG η οποία κλωνοποιείται τελικά στον pcDNA3.1(+) φορέα ή στον 3xHA NLS BirA pBUDNeo που έχουν υποστεί ίδια επεξεργασία.

### **2.3 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΘΥΜΗΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ**

#### **Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με CaCl<sub>2</sub>**

##### Κυτταρικές σειρές

**HEK 293** (human embryonic kidney cells) και **HeLa** είναι οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα διαμόλυνσης. Κρίθηκαν κατάλληλες γιατί προσδίδουν μεγάλο ποσοστό διαμόλυνσης και επειδή η έκφραση του FoxO που εισήχθη ήταν ακριβής καθώς δεν επηρεαζόταν από την ενδογενή έκφραση. Το θρεπτικό στο οποίο καλλιεργήθηκαν οι κυτταρικές σειρές αποτελείται από: DMEM, 10% FBS, 1% P/S.

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση των κυττάρων ήταν τα:

- pcDNA3.1 + AviTEV FLAG FOXO1a, πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1 στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί η αλληλουχία AviTEV FLAG και το FOXO1a
- 3xHANLSBirA EF1apolyA PGK-puro\_pBS, πλασμιδιακός φορέας που προέρχεται από τον pBluescript στον οποίο έχει εισαχθεί ένας EF1a

υποκινητής, μία αλληλουχία polyA, το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην πουρομυκίνη και η αλληλουχία που κωδικοποιεί για το BirA.

Για τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, κύτταρα HEK 293 και HeLa καλλιιεργήθηκαν σε τρυβλία 10cm<sup>2</sup> και αφέθηκαν να αναπτυχθούν στους 37°C φτάνοντας 70-80% πληρότητα. Πραγματοποιήθηκε διπλή διαμόλυνση οπότε για κάθε τρυβλίο φωτομετρήθηκε ποσότητα 30μg ανασυνδυασμένου πλασμιδίου συνολικά (15μg+15μg) και προστέθηκε σε μείγμα φωσφορικών το οποίο περιείχε ίσους όγκους από 0.25M CaCl<sub>2</sub> και 2x HEBS διαλύματος pH 7,05 (για 1lt: 16,4g NaCl, 11,9g HEPES, 0,21g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και ddH<sub>2</sub>O). Το μείγμα με το DNA αναδεύτηκε και αφέθηκε για περίπου 10λεπτά ώστε να σχηματιστεί ίζημα. Στη συνέχεια βάλαμε τα δείγματα με το ίζημα του DNA στα αντίστοιχα τρυβλία που περιέχουν τις καλλιέργειες των ευκαρυωτικών κυττάρων. Ο όγκος της κάθε καλλιέργειας είναι δεκαπλάσιος του όγκου του δείγματος του DNA, οπότε για 10ml θρεπτικού προσθέτουμε 1ml δείγματος DNA. Τα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν στους 37°C για 16h. Αφού τα κύτταρα αναπτύχθηκαν, ξεπλύθηκαν 2 φορές με 1xPBS για να φύγει το ίζημα του ασβεστίου και συλλέχθηκαν για την εκχύλιση των πυρηνικών πρωτεϊνών ή για την απομόνωση RNA.

#### **Απομόνωση πυρηνικού εκχυλίσματος**

Τα κύτταρα μετά τη διαμόλυνση συλλέγονται σε Falcon και φυγοκεντρούνται στις 1500rpm για 5λεπτά στους 4°C. Ξεπλένουμε την πελλέτα με 1xPBS και φυγοκεντρούμε υπό τις ίδιες συνθήκες. Προσθέτουμε το διάλυμα A (10mM HEPES pH 7,9, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0,5mM DTT) 5φορές τον όγκο της πελλέτας και αναδεύουμε ώστε να επαναδιαλυθεί η πελλέτα. Φυγοκεντρούμε στις 1500rpm για 5λεπτά στους 4°C. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε την πελλέτα σε 5όγκους διαλύματος A. επωάζουμε για 10-15λεπτά στο πάγο ώστε να δράσει το υποτονικό διάλυμα και φυγοκεντρούμε στις 2000rpm για 5λεπτά στους 4°C. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε σε ίσο όγκο διαλύματος A. Μεταφέρουμε το δείγμα σε ομογενοποιητή Dounce και ομογενοποιούμε τα δείγματα για να προκαλέσουμε τη λύση των κυττάρων. Φυγοκεντρούμε στις 4000rpm για 10λεπτά στους 4°C. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε αντίστοιχο όγκο διαλύματος C (20mM HEPES pH 7,9, 25% glycerol, 0,42M KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM EDTA, 0,5mM PMSF, 0,5mM DTT) + 10μg/ml aprotinin. Για παράδειγμα σε

πελλέτα όγκου 0,2ml προσθέτουμε 0,5ml διαλύματος C. Τοποθετούμε τα δείγματα σε περιστρεφόμενη βάση και τα αφήνουμε για 45λεπτά στο cold room. Έπειτα, φυγοκεντρούμε στις 14000rpm για 15λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριο erpendorf και φυλάσσεται στους -20°C.

Στην πελλέτα προσθέτουμε 1x διάλυμα DNase μαζί με MNase και DNase ανάλογα με τον όγκο της πελλέτας (50u MNase/500μg DNA και 50u DNase/500μg DNA). Επιάζουμε στους 4°C για 16h. Απενεργοποιούμε τα ένζυμα προσθέτοντας 1μl 25mM EDTA /10μl αντίδρασης. Στη συνέχεια, φυγοκεντρούμε στις 11000rpm για 15λεπτά στους 4°C και φυλάσσουμε το υπερκείμενο στους -20°C.

Τα δείγματα ποσοτικοποιούνται με τη μέθοδο Bradford σύμφωνα με το πρωτόκολλο και τα αντιδραστήρια της εταιρίας BioRad.

### **Ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)**

#### **Διαλύματα:**

#### **1. Αποδιατακτικό διάλυμα μετουσίωσης 2x (Sample buffer 2x) 50ml:**

2gr SDS, 10ml γλυκερόλης, 10ml 0.5M Tris, 0.10gr κυανούν της βρωμοφανόλης (pH 6,8)

**Working concentration:** 450μl 2x αποδιατακτικού διαλύματος, 50μl β-μερκαπτοαιθανόλης.

#### **2. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10x 500ml (pH 8.3):**

Tris 15gr, Γλυκίνη 71gr, SDS 5gr

**Working concentration:** 100ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης, 900ml απεσταγμένου νερού.

#### **3. Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών 10x 500ml (pH 8.3):**

Tris 15gr, Γλυκίνη 71gr, SDS 0.5gr

**Working concentration:** 100ml διαλύματος μεταφοράς πρωτεϊνών, 200ml μεθανόλης, 700ml απεσταγμένου νερού.

#### **4. Διάλυμα TBS-T 1X 500ml (pH 7.6)**

50ml 10X TBS, 500μl Tween

#### **Αντισώματα:**

- i) HRP-conjugated anti-mouse antibody (1:1.000.000)
- ii) Streptavidin-HRP conjugated antibody (1:1.000)
- iii) Mouse anti-FoxO (1:200) (Millipore)



Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αφού ποσοτικοποιηθούν με Bradford, αναμειγνύονται με 2x SDS loading buffer και αφήνονται για αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους 100ο C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε 8% πήκτωμα SDS – ακρυλαμίδης. Το πήκτωμα μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ίσου μεγέθους μεταφέρεται σε ειδική συσκευή μεταφοράς με την ηλεκτροφόρηση της οποίας επιτυγχάνεται η μεταφορά και υβριδοποίηση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Η μεμβράνη μετά την ηλεκτροφόρηση αφήνεται σε διάλυμα TBST με 5% γάλα για 1 ώρα για να εμποδιστεί η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Ακολουθούν 3 ξεπλύματα της μεμβράνης με διάλυμα TBST και η επώαση με το πρώτο αντίσωμα για όλο το βράδυ σε διάλυμα 1% γάλα /TBST. Στη συνέχεια η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές με διάλυμα TBST και επωάζεται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το δεύτερο αντίσωμα διαλυμένο σε 1% γάλα /TBST. Ακολουθούν 3 ξεπλύματα με διάλυμα TBST και η μεμβράνη επωάζεται για 2 λεπτά με αντιδραστήριο ECL. Τέλος η μεμβράνη εκτίθεται σε φιλμ. Η ένταση της κάθε ζώνης είναι ανάλογη της ποσότητας της συγκεκριμένης κάθε φορά πρωτεΐνης και η ποσοτικοποίηση τους έγινε με τη χρήση του προγράμματος ImageJ.

### **Αντίδραση Real-time PCR**

Μετά την απομόνωση του RNA και τη σύνθεση cDNA πραγματοποιήθηκε αντίδραση Real-time PCR. Σε κάθε αντίδραση PCR(συνολικού όγκου 25μl) προσθέτουμε τα παρακάτω:

<u>Συστατικά</u>	<u>Δείγμα</u>
ddH <sub>2</sub> O	13,5μl
10x Platinum Taq buffer	2,5μl
50mM MgCl <sub>2</sub>	1,25μl
10mM dNTPs	0,4μl
Εκκινητής F(1,25pmoles/μl)	2μl
Εκκινητής R(1,25pmoles/μl)	2μl
cDNA(10x)	5μl
SYBRI (1/2000)	0,75μl
Platinum Taq polymerase	0,1μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πρόγραμμα της Real time PCR		
1	94°C	5min
2	94°C	15sec
3	60°C	25sec
4	72°C	25sec
5	78°C	1sec
6	Go to step 2	38x
7	72°C	2min
8	15°C	1sec

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση ήταν:

FOXO1a ex F 5' – AAGAGCGTGCCCTACTTCAA – 3'

FOXO1a ex R 5' – CTCTTCTCCGGGGTGATTTT – 3'

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την Real-time PCR επεξεργάστηκαν στο Excel και τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν σύμφωνα με τον τύπο :

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{Ct target (control-treated)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct ref (control-treated)}}$$

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Κλωνοποιήσεις

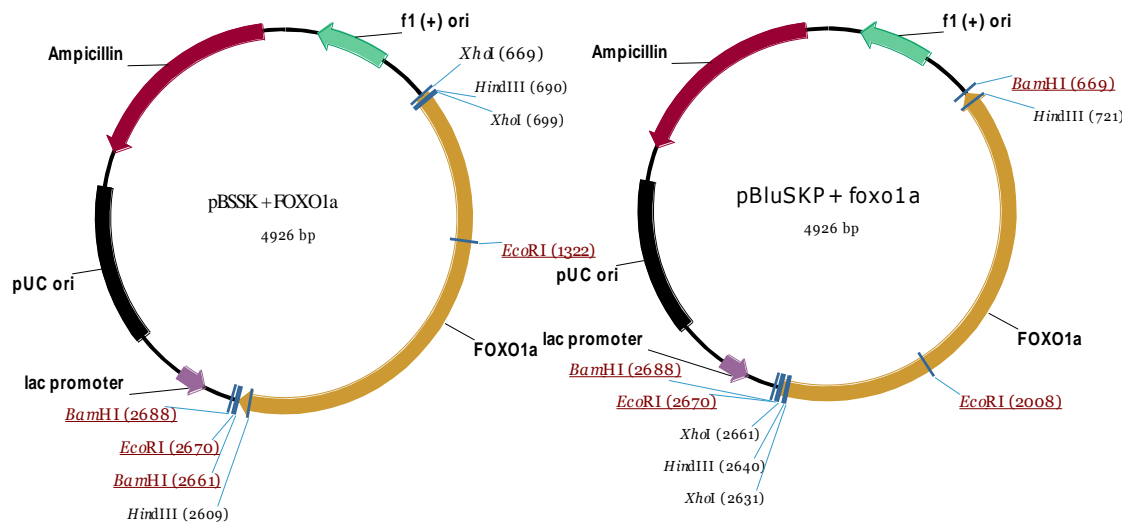
Κλωνοποίηση των γονιδίων FoxO1a και FoxO3a σε φορείς προκαρυωτικής έκφρασης.

Τα cDNA των γονιδίων FoxO1a και FoxO3a απομονώθηκαν από cDNA που προέκυψε από απομόνωση RNA από σκώτι ποντικού μετά από αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Χρησιμοποιώντας αυτό το cDNA ως υπόστρωμα πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση με τη χρήση της Phusion DNA πολυμεράσης, η οποία φέρει δράση 5' → 3' DNA πολυμεράσης και 3' → 5' εξωνουκλεάσης και παράγει μεγάλα σε μήκος προϊόντα DNA με τυφλά (blunt) άκρα.

##### 3.1.1 Κλωνοποίηση του γονιδίου FoxO1a σε φορέα προκαρυωτικής έκφρασης

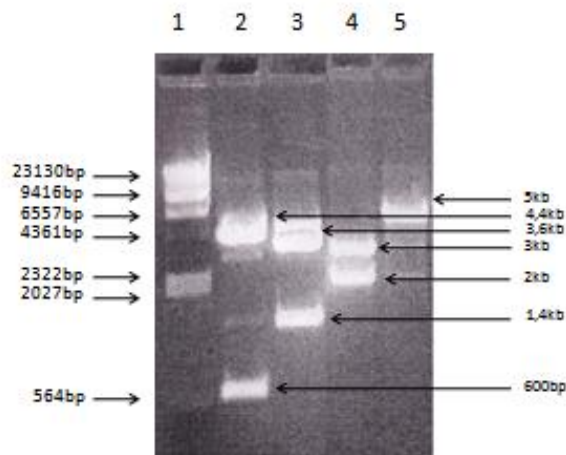
Για την απομόνωση του συνολικού μήκους του cDNA για το γονίδιο FoxO1a (~2kb) πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR. Κατά την αντίδραση της PCR οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν εισήγαγαν περιοριστικές θέσεις XhoI και BamHI στο 5' και 3' άκρο του cDNA αντίστοιχα. Έπειτα, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και έγινε αποκοπή των επιθυμητών ζωνών. Μετά την απομόνωση του cDNA που φέρει τυφλά άκρα πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα pBluescript που είχε υποστεί πέψη με EcoRV δημιουργώντας τυφλά άκρα. Κατάλληλες ποσότητες των φορέα και ενθέματος αναμείχθηκαν σε αντίδραση συγκόλλησης και ποσότητα 10μl της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό 250μl επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* του στελέχους XL-1. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε τρυβλία LB με αμικικιλίνη στα οποία είχαν προηγηθεί επιστρώσεις με X-Gal που αποτελεί υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης που φέρει ο pBluescript και IPTG για την επαγωγή του γονιδίου. Στη συνέχεια έγινε επιλογή των λευκών αποικιών που αναπτύχθηκαν και εμβολιάστηκαν σε υγρή καλλιέργεια με ακόλουθη απομόνωση του πλασμιδίου. Ακολούθησαν πέψεις των πλασμιδίων, ώστε να επιβεβαιωθεί τόσο η εισαγωγή του ενθέματος στον φορέα όσο και ο προσανατολισμός της εισδοχής. Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τον σκοπό αυτό ήταν τα BamHI και EcoRI. Περιοριστική ανάλυση της κατασκευής pBluescript – FoxO1a με BamHI δίνει είτε

μια ζώνη 5kb (φορέας 3kb και ένθεμα 2kb) είτε δύο ζώνες 3kb και 2kb ανάλογα με τον προσανατολισμό του ενθέματος. Πέψη με *EcoRI* δίνει δύο ζώνες είτε 1,4kb και 3,6kb είτε 600bp και 4,4kb (εικόνα 6). Οι δύο διαφορετικοί προσανατολισμοί καθώς και οι περιοριστικές θέσεις απεικονίζονται στην εικόνα 5.



**Εικόνα 5:** Κλωνοποίηση του FOXO1a στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript. Διαφορετικοί προσανατολισμοί του ενθέματος FOXO1a και περιοριστικές θέσεις του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.

Από δύο θετικούς κλώνους έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα *BamHI*, *HindIII*, *EcoRI*, *XhoI* και διπλή πέψη με *XhoI/BamHI* ενώ και οι δύο κλώνοι στάλθηκαν για sequencing με T7/T3 εκκινητές για την επαλήθευση της σωστής αλληλουχίας του cDNA.



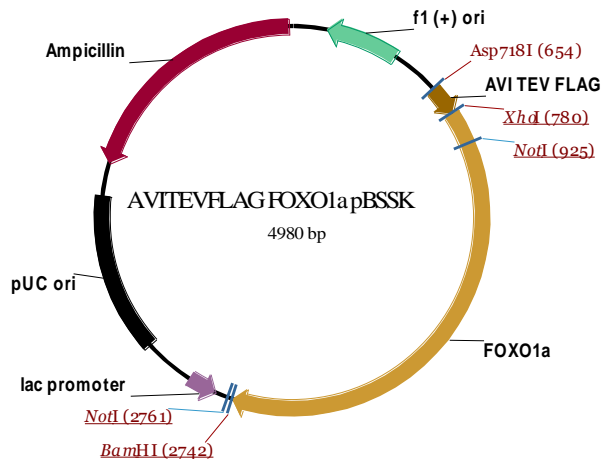
**Εικόνα 6:** Κλωνοποίηση του FoxO1a στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% πέσεων πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από καλλιέργεια μικρής κλίμακας μετασηματισμένων κυττάρων XL-1. (1): λDNA/*HindIII* ladder. Πέψη της κατασκευής pBluescript – FoxO1a με: (2) + (3) *EcoRV*, (4) + (5) *BamHI*

### 3.1.2 Υποκλωνοποίηση του FoxO1a στον φορέα ΑνιTEV FLAG pBSSK

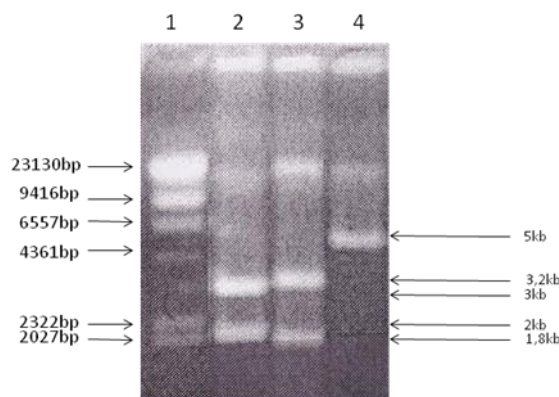
Επειδή η αλληλουχία του FoxO1a cDNA θα θέλαμε να εκφράζεται σαν συνέχεια του Ανι TEV FLAG, παράγοντας έτσι μια χμαιρική πρωτεΐνη που θα μπορεί να βιοτινυλιωθεί όταν εκφράζεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το FoxO1a υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα ΑνιTEV FLAG pBSSK. Παρόμοια με την παραπάνω διαδικασία το FOXO1a αφού κόπηκε με τα ένζυμα XhoI και BamHI εντέθηκε στον φορέα ΑνιTEV FLAG pBSSK ο οποίος είχε πρώτα υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα.

Οι πέψεις ηλεκτροφορήθηκαν και οι επιθυμητές ζώνες αποκόπηκαν, καθαρίστηκαν και ακολούθησε αντίδραση συγκόλλησης και μετασχηματισμός του στελέχους XL-1 του *E.coli*. Η εισαγωγή του προς κλωνοποίηση cDNA στις θέσεις XhoI και BamHI του ΑνιTEV FLAG

pBSSK επιτρέπει να βρίσκεται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης (in frame) με την αλληλουχία ΑνιTEV FLAG που υπάρχει στον φορέα. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB



**Εικόνα 7:** Κλωνοποίηση του FoxO1a στον φορέα ΑνιTEV FLAG pBSSK και θέσει περιορισμού του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.



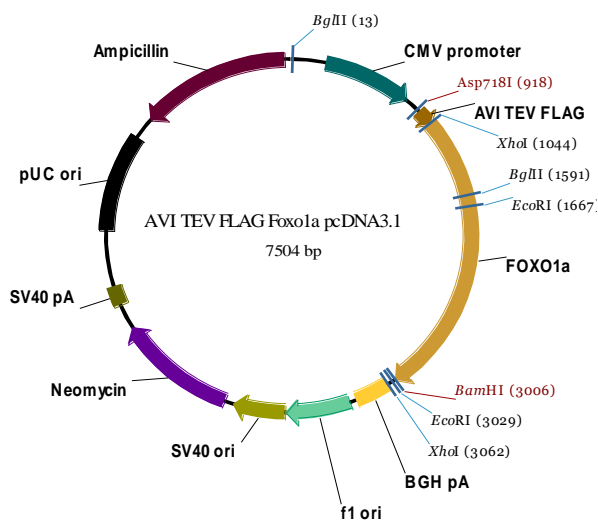
**Εικόνα 8:** Κλωνοποίηση του FoxO1a στον πλασμιδιακό φορέα ΑνιTEV FLAG pBSSK. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% πέσεων πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από καλλιέργεια μικρής κλίμακας μετασχηματισμένων κυττάρων XL-1. (1) : λDNA/*HindIII* ladder. Πέψη της κατασκευής ΑνιTEV FLAG pBSSK + FoxO1a με: (2) *XhoI* και *BamHI*, (3) *NotI* και (4) *BamHI*.

με αμπικιλίνη. Από τους κλώνους που αναπτύχθηκαν απομονώθηκαν πλασμιδιακό DNA και ακολούθησαν περιοριστικές πέψεις με τα ένζυμα XhoI/BamHI, BamHI και

NotI. Περιοριστική ανάλυση της κατασκευής AnιTEV FLAG pBSSK + FoxO1a με XhoI/BamHI δίνει δύο ζώνες, 2kb και 3kb. Πέψη με BamHI δίνει μια ζώνη 5kb (γραμμικό πλασμίδιο) και πέψη με NotI δίνει δύο ζώνες, 1,8kb και 3,2kb (εικόνα 8). Από τον θετικό κλώνο έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα.

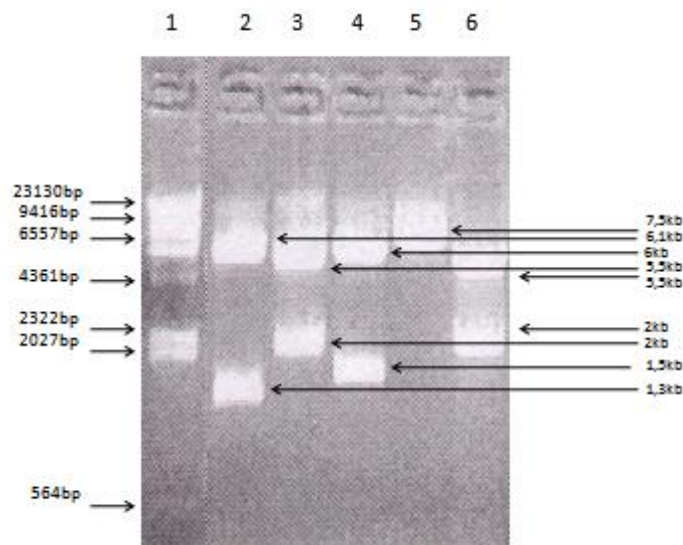
### 3.1.3 Κλωνοποίηση του FOXO1a σε φορέα ευκαρυωτικής έκφρασης

Η διαδικασία κλωνοποίησης στον φορέα pcDNA3.1(+) είναι παρόμοια με αυτή που περιγράφεται παραπάνω. Η εισαγωγή του AnιTEV FLAG-FoxO1a στις θέσεις Asp718I και BamHI του MCS (multiple cloning site) του pcDNA3.1(+) έχει ως αποτέλεσμα την απευθείας κλωνοποίηση του cDNA στο σωστό προσανατολισμό για την ορθή έκφρασή του (εικόνα 9). Το AnιTEV FLAG-FoxO1a (με άκρα Asp718I και BamHI όπως απομονώθηκε με εκτομή της ζώνης από πήκτωμα αγαρόζης και καθαρισμό του DNA) εντέθηκε στον pcDNA3.1(+) ο οποίος είχε υποστεί πέψη με τα ένζυμα στις Asp718I και BamHI. Ακολούθησε αντίδραση συγκόλλησης και



**Εικόνα 9:** Κλωνοποίηση του FoxO1a στον φορέα pcDNA3.1(+) και θέσεις περιορισμού του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.

μετασχηματισμός στο στέλεχος XL-1 του *E.coli*. Από κλώνους που αναπτύχθηκαν σε τρυβλία LB με αμικικιλίνη, έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα. Η επιβεβαίωση της ένθεσης του AnιTEV FLAG-FoxO1a έγινε με πέψη με τα ένζυμα EcoRI, XhoI, BglII, BamHI και διπλή πέψη με Asp718I και BamHI. Οι αναμενόμενες ζώνες μετά από την πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με τα παραπάνω ένζυμα φαίνονται στην εικόνα 10. Από το θετικό κλώνο έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας.

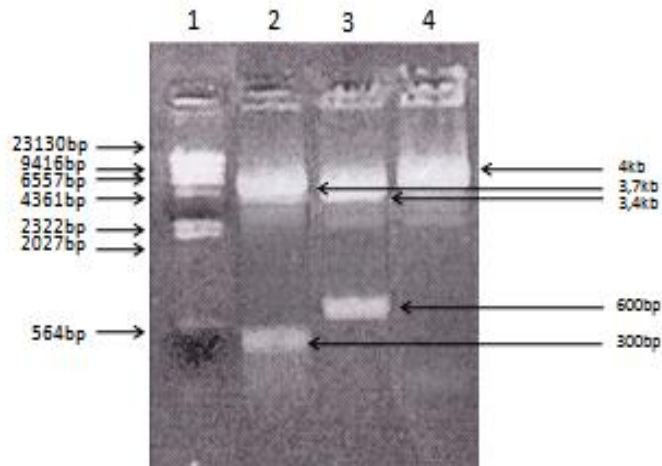


**Εικόνα 10:** Κλωνοποίηση του ΑνιTEV FLAG+FoxO1a στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1(+). Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% πέσεων πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από καλλιέργεια μικρής κλίμακας μετασηματισμένων κυττάρων XL-1. (1) : λDNA/*HindIII* ladder. Πέψη της κατασκευής ΑνιTEV FLAG+ FoxO1a pcDA3.1 με: (2) *EcoRI*, (3) *XhoI*, (4) *BglIII*, (5) *BamHI*, (6) *Asp718I* και *BamHI*.

### 3.1.4 Κλωνοποίηση του FOXO3a γονιδίου σε φορέα προκαρυωτικής έκφρασης.

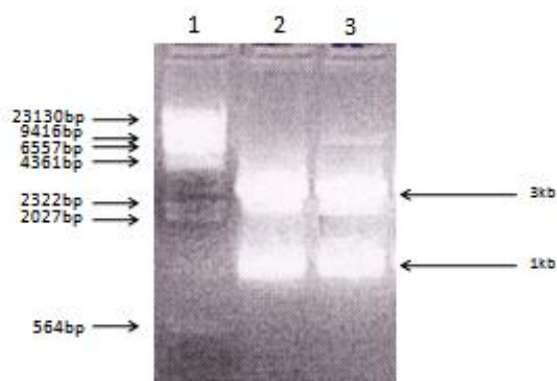
Το συνολικό μήκος του cDNA του γονιδίου FoxO3a είναι περίπου 2kb. Κατασκευάζοντας στην αρχή εκκινητές για τα 5' και 3' άκρα του cDNA δεν ήταν δυνατό να πάρουμε ολόκληρη την αλληλουχία οπότε επιλέχθηκε μια διαφορετική στρατηγική κλωνοποίησης. Σχεδιάστηκαν εκκινητές που περιλαμβάνουν μια θέση περιορισμού για τη NotI που βρίσκεται περίπου στη μέση της αλληλουχίας. Συνεπώς, μετά την PCR με δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών προκύπτουν δύο τμήματα ~1kb που το ένα φέρει στο 3' άκρο την περιοριστική θέση για το ένζυμο NotI ενώ το άλλο φέρει την αντίστοιχη θέση στο 5' άκρο του. Μετά την αντίδραση της PCR τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν και οι επιθυμητές ζώνες αποκόπηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και καθαρίστηκαν. Το κάθε τμήμα κλωνοποιήθηκε χωριστά σε pBluescript SK(+) που έχει υποστεί πέψη με EcoRV. Ακολούθησε μετασηματισμός του στελέχους XL-1 του *E.coli* και έπειτα τα μετασηματισμένα βακτήρια επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB με αμπικιλίνη, X-Gal και IPTG. Από τις μπλε και λευκές αποικίες που αναπτύχθηκαν επιλέχθηκαν οι λευκές που εμβολιάστηκαν σε υγρή καλλιέργεια με την ακόλουθη απομόνωση του πλασμιδίου. Για την επιβεβαίωση της εισαγωγής και του προσανατολισμού του ενθέματος πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις. Για το πλασμίδιο στο οποίο κλωνοποιήθηκε το πρώτο μισό του cDNA του FoxO3a

έγιναν πέψεις με τα ένζυμα XhoI, NotI και NcoI. Οι αναμενόμενες ζώνες από την περιοριστική ανάλυση του θετικού κλώνου με τα παραπάνω ένζυμα φαίνονται στην εικόνα 11.



**Εικόνα 11:** Κλωνοποίηση του πρώτου τμήματος του FoxO3a στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript SK(+). Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% πέσεων πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από καλλιέργεια μικρής κλίμακας μετασηματισμένων κυττάρων XL-1. (1) : λDNA/*HindIII* ladder. Πέψη της κατασκευής pBluescript SK+ FOXO3a με: (2) *XhoI*, (3), *NcoI* και (4) *NotI*.

Για το πλασμίδιο στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί το δεύτερο μισό του FoxO3a έγιναν πέψεις με τα ένζυμα NotI και KpnI. Η περιοριστική ανάλυση του θετικού κλώνου με τα παραπάνω ένζυμα απεικονίζεται παρακάτω.



**Εικόνα 12:** Κλωνοποίηση του δεύτερου τμήματος του FoxO3a στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript SK(+). Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% πέσεων πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από καλλιέργεια μικρής κλίμακας μετασηματισμένων κυττάρων XL-1. (1) : λDNA/*HindIII* ladder. Πέψη της κατασκευής pBluescript SK+ FoxO3a με: (2) *NotI*, (3) *KpnI*.



Από τους θετικούς κλώνους έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα.

Στη συνέχεια θα πρέπει να γίνει sequencing για την επαλήθευση της αλληλουχίας του ενθέματος και υποκλωνοποίηση σε φορέα ευκαρυωτικής έκφρασης.

### 3.2 Έλεγχος έκφρασης του γονιδίου FoxO1a σε κυτταρικές σειρές HeLa

Για να ελέγξουμε αν το γονίδιο του FoxO1a είναι ικανό να μεταγραφεί σε ευκαρυωτικά κύτταρα έγινε επιμόλυνση της κυτταρικής σειράς HeLa με τον φορέα ευκαρυωτικής έκφρασης AviTEV FLAG+ FoxO1a pcDNA3.1. για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας 10cm<sup>2</sup> όπου τα HeLa αφέθηκαν να μεγαλώσουν φτάνοντας 70-80% πληρότητα. Στη συνέχεια τα δύο τρυβλία επιμολύνθηκαν με 30μg συνολικά πλασμιδιακού DNA (15μg AviTEV FLAG+ FoxO1a pcDA3.1 και 15μg 3xHANSBIR A EF1apolyA PGK-puro\_pBS), όπως περιγράφεται στα υλικά-μεθόδους, και τα άλλα δύο δεν υπέστησαν διαμόλυνση. Στη συνέχεια συλλέχθηκε το RNA από τα κύτταρα και μετατράπηκε σε cDNA με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής. Το cDNA χρησιμοποιήθηκε για Real-time PCR. Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για το γονίδιο του FoxO1a του ποντικού αναγνωρίζουν και προσδέονται και στο ανθρώπινο γονίδιο δίνοντας προϊόν και στα μη μετασχηματισμένα κύτταρα. Κατά την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές και για το ανθρώπινο γονίδιο gapdh (housekeeping γονίδιο) σαν γονίδιο ελέγχου. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης έδειξαν ότι το γονίδιο FoxO1a υπερεκφράζεται στα μετασχηματισμένα κύτταρα έχοντας μέχρι και 10 κύκλους διαφορά από τα μη μετασχηματισμένα, ενώ το γονίδιο gapdh είχε την ίδια έκφραση και στις δύο συνθήκες. Σύμφωνα με τον τύπο για το fold change βρήκαμε ότι:

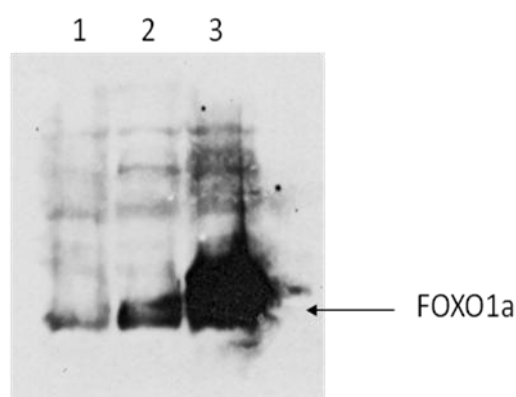
$$\text{Fold change} = 1,8^{\Delta C_t \text{ target (control-treated)}} / 1,8^{\Delta C_t \text{ ref (control-treated)}} = 1,8^{18-11} / 1,8^{17-18} = 111$$

Έχουμε συνεπώς μια υπερέκφραση της τάξης των 111 φορές του FOXO1a στα μετασχηματισμένα σε σχέση με τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα HeLa.

Για τον έλεγχο της έκφρασης της πρωτεΐνης FoxO1a (~80kD) στα ευκαρυωτικά κύτταρα έγινε επιμόλυνση κυττάρων HeLa με το πλασμίδιο AviTEV FLAG+ FoxO1a pcDA3.1. χρησιμοποιήθηκαν εννιά τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας 10cm<sup>2</sup> από τα

οποία τρία επιμολύνθηκαν με 15μg AviTEV FLAG+ FoxO1a pcDNA3.1 και 15μg 3xHANLSBirA EF1apolyA PGK-puro\_pBS το καθένα, τρία με 15μg bioGATApDNA3.1(+) και 15μg 3xHANLSBirA EF1apolyA PGK-puro\_pBS και τα υπόλοιπα με 15μg 3xHANLSBirA EF1apolyA PGK-puro\_pBS ως αρνητικό control. Αφέθηκαν να μεγαλώσουν στους 37°C για 18h και έπειτα συλλέχθηκαν για την απομόνωση του πυρηνικού εκχυλίσματος σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Μετά τη συλλογή του υπερκειμένου που περιέχει το συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα ακολούθησε ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford. Η πελλέτα που προέκυψε κατά τη διαδικασία απομόνωσης φυλλάχθηκε στους -20°C για περαιτέρω επεξεργασία.

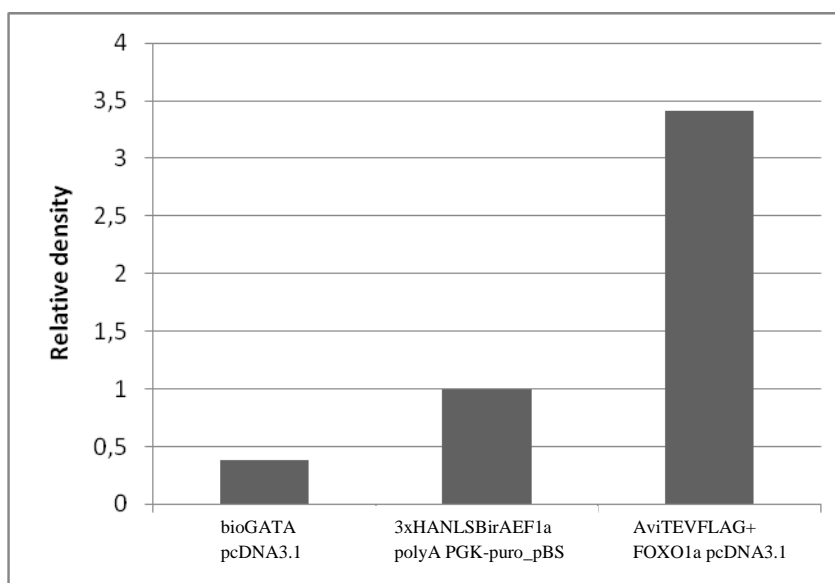
Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για την ύπαρξη της FoxO1a πρωτεΐνης σε πήκτωμα 8,5% SDS-πολυακρυλαμιδίου, ανοσοαποτύπωση κατά Western και ανοσοανίχνευση έναντι του FoxO1a. Για το πήκτωμα χρησιμοποιήθηκαν 30μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα, ενώ παράλληλα φορτώθηκε και μέρος της πελλέτας μετά από βρασμό στους 100°C. Όπως φαίνεται από την εικόνα 13 η πρωτεΐνη FoxO1a δεν εντοπίστηκε στο υπερκείμενο αλλά στην πελλέτα του δείγματος συνδεδεμένη με τη χρωματίνη.



**Εικόνα 13:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western και ανοσοανίχνευση έναντι της πρωτεΐνης FoxO1a (~80kD). Πρωτεϊνικό εκχύλισμα (πελλέτα) από μετασηματισμένα HeLa με (1) bioGATApDNA3.1(+) και 3xHANLSBirA EF1apolyA PGK-puro\_pBS, (2) 3xHANLSBirA EF1apolyA PGK-puro\_pBS και (3) AviTEV FLAG+ FoxO1a pcDNA3.1 και 3xHANLSBirA EF1apolyA PGK-puro\_pBS

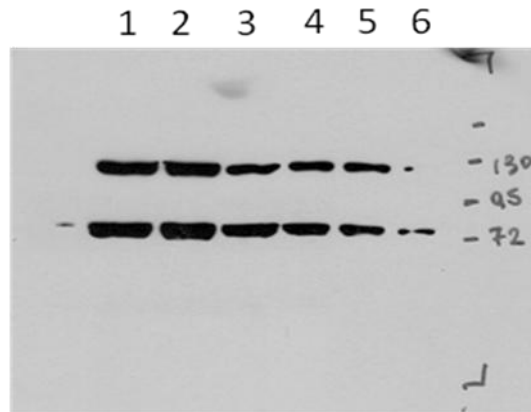
Όπως παρατηρείται από την εικόνα 13 η πρωτεΐνη FoxO1a εκφράζεται πιο έντονα στα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με AviTEV FLAG+ FoxO1a pcDNA3.1 και 3xHANLSBirA EF1apolyA PGK-puro\_pBS σε σύγκριση με τα άλλα δύο δείγματα. Επίσης σύμφωνα με τις μετρήσεις της έντασης των ζωνών από το πρόγραμμα ImageJ

και μετά από επεξεργασία στο Excel τα αποτελέσματα αναπαρίστανται στο παρακάτω σχήμα.



Βλέπουμε λοιπόν ότι στα κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί με το AviTEV FLAG+ FoxO1a pcDNA3.1 η ένταση είναι 3,4 φορές περισσότερη σε σχέση με το control, υποδηλώνοντας την αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης στα κύτταρα αυτά. Επίσης, φαίνεται ότι στα κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί με το bioGATApcDNA3.1(+) έχουν μειωμένη έκφραση σε σχέση με το control, πράγμα που δεν θα έπρεπε να συμβαίνει και ίσως οφείλεται σε τεχνικό λάθος κατά το φόρτωμα του δείγματος.

Στη συνέχεια, θέλοντας να δούμε αν η πρωτεΐνη FoxO1a βιοτινυλιώνεται έγινε έκλουση του αντισώματος anti-FoxO1a (stripping) και η μεμβράνη επώαστηκε με αντίσωμα έναντι της βιοτίνης streptavidin-HRP. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε η υπόλοιπη ποσότητα της πελλέτας από μετασχηματισμένα κύτταρα η οποία υπέστη επεξεργασία με DNase και MNase. Από την ποσότητα των πρωτεϊνών που προέκυψε 30μg φορτώθηκαν σε πήκτωμα 8,5% SDS-πολυακρυλαμιδίου. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western και ανοσοανίχνευση έναντι της βιοτίνης με streptavidin-HRP. Στο πήκτωμα επίσης φορτώθηκε και η πελλέτα που προέκυψε μετά από βρασμό. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 14.



**Εικόνα 13:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western και ανσοανίχνευση έναντι της βιοτίνης. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα από πελλέτα μετασηματισμένων HeLa με (1) AniT<sub>EV</sub> FLAG+ FoxO1a pcDNA3.1 και 3xHANLSBirA EF1apolyA PGK-puro\_pBS, (2) 3xHANLSBirA EF1apolyA PGK-puro\_pBS και (3) bioGATApDNA3.1(+) και 3xHANLSBirA EF1apolyA PGK-puro\_pBS. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά από επεξεργασία πελλέτας μετασηματισμένων HeLa με (4) AniT<sub>EV</sub> FLAG+ FoxO1a pcDNA3.1 και 3xHANLSBirA EF1apolyA PGK-puro\_pBS, (5) 3xHANLSBirA EF1apolyA PGK-puro\_pBS και (6) bioGATApDNA3.1(+) και 3xHANLSBirA EF1apolyA PGK-puro\_pBS.

Οι μπάντες που εμφανίζονται στην εικόνα είναι καρβοξυλάσες που πάντα βιοτινυλιώνονται στα κύτταρα. Συνεπώς, φαίνεται ότι ενώ η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη FoxO1a εκφράζεται στα μετασηματισμένα κύτταρα, το σύστημα βιοτινυλίωσης δεν λειτουργεί καθώς δεν πήραμε κανένα διαφορετικό αποτέλεσμα και για τα κύτταρα που έχουν μετασηματιστεί με bioGATApDNA3.1(+), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σαν θετικό control βιοτινυλίωσης.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη του πρωτεώματος αποτελεί σημαντικό βήμα για την κατανόηση των λειτουργιών διαφόρων πρωτεϊνών. Έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι καθαρισμού πρωτεϊνικών συμπλόκων οι οποίες είναι πολύ αποτελεσματικές. Προκειμένου λοιπόν να μελετηθούν οι διάφορες λειτουργίες των πρωτεϊνών FoxO1a και FoxO3a, προσπαθήσαμε να αναπτύξουμε ένα σύστημα βιοτινυλίωσης για τον καλύτερο καθαρισμό και απομόνωση των πρωτεϊνών και των συμπλόκων τους.

Η βιοτινυλίωση είναι μια διαδικασία όπου η βιοτίνη επισυνάπτεται ομοιοπολικά σε μόρια ή υποστρώματα. Η βιοτίνη είναι ένας φυσικός συμπαράγοντας για τα μεταβολικά ένζυμα, ο οποίος είναι ενεργός μόνο όταν επισυνάπτεται ομοιοπολικά με αυτά υπό τη δράση ειδικών λιγασών βιοτίνης.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει σαν απώτερο στόχο την ανάπτυξη ενός συστήματος βιοτινυλίωσης που θα βοηθήσει στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών FoxO με άλλες πρωτεΐνες και στην αποσαφήνιση του ρόλου τους στην μακροζωία.

Συγκεκριμένα απομονώθηκε το cDNA των γονιδίων FoxO1a και FoxO3a και κλωνοποιήθηκε σε φορείς προκαρυωτικής έκφρασης (pBluescript SK(+)). Στη συνέχεια, το FoxO1a κόπηκε με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και εισήχθη στον φορέα AniTEV FLAG pBSSK in frame με την αλληλουχία AniTEV FLAG, μια αλληλουχία 14 αμινοξέων που μπορεί να βιοτινυλιωθεί, είναι αρκετά μικρή και έχει βρεθεί ότι δεν επηρεάζει τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Έπειτα, ολόκληρο το τμήμα AniTEV FLAG+ FoxO1a υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα ευκαρυωτικής έκφρασης pcDNA3.1(+) κάτω από τον CMV υποκινητή. Η αλληλουχία αυτή όταν εκφραστεί παράγει μια χμιαϊκή πρωτεΐνη που είναι ικανή να βιοτινυλιωθεί στο αμινοτελικό της άκρο. Το γεγονός αυτό καθιστά εφικτή την απομόνωση των χμιαϊκών πρωτεϊνών, καθώς η πρόσδεση βιοτίνης/αβιδίνης είναι μια από τις ισχυρότερες προσδέσεις στη φύση ( $K_d = 10^{-15}M$ ), πολύ πιο ισχυρή από εκείνες των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται συχνά ή άλλων στοιχείων συνάφειας. Με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων στρεπταβιδίνης μπορούμε να απομονώσουμε τις επιθυμητές πρωτεΐνες από το προϊόν λύσης των μετασχηματισμένων ευκαρυωτικών κυττάρων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι το FoxO1a μεταγράφεται και μεταφράζεται κατά την επιμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο AviTEV FLAG+ FoxO1a pcDNA3.1, όμως η βιοτινυλίωση δεν φαίνεται να είναι αποτελεσματική. Ίσως αυτό ευθύνεται στο γεγονός ότι η λιγάση της βιοτίνης BirA είναι μια βακτηριακή πρωτεΐνη που όταν παραχθεί και σε μεγάλες ποσότητες σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς αποδομείται. Ίσως να οφείλεται και στο ότι η επιμόλυνση των κυττάρων με δύο πλασμίδια δεν είναι τόσο αποτελεσματική, οπότε και η ένθεση του AviTEV FLAG+ FoxO1a σε ένα πλασμδιακό φορέα που φέρει και την αλληλουχία που κωδικοποιεί για το BirA (3xHANLSBirA CMV\_pBUDNeo) καθιστά πιο εύκολη τη διαδικασία. Επίσης το γεγονός ότι το FOXO1a βρέθηκε στην πελλέτα μαζί με τη χρωματίνη και όχι στο υπερκείμενο δυσκολεύει την παραπέρα διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού, οπότε και οι συνθήκες για τη λήψη του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος θα πρέπει να γίνουν πιο αυστηρές.

Η ανάπτυξη του συστήματος βιοτινυλίωσης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε *in vitro* αλλά και *in vivo* πειράματα.

Η ρύθμιση των FoxO όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η δημιουργία κυτταρικών σειρών που εκφράζουν βιοτινυλιωμένο FoxO προσφέρει τη δυνατότητα ανίχνευσης των πρωτεϊνών που συγκροτούν FoxO-σύμπλοκα μέσω πρόσδεσής τους σε σφαιρίδια στρεπταβιδίνης και στη συνέχεια ανάλυση των εν λόγω συμπλόκων με φασματομετρία μάζας. Αυτή η μεθοδολογία δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης μιας ποικιλίας πρωτεϊνικών FoxO-συμπλόκων συμπεριλαμβανομένου και αυτών που σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και/ή ενζύμων τροποποίησης των ιστονών αλλά και πολλών άλλων νέων παραγόντων.

Φαίνεται ότι η SIRT1 επηρεάζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που βρίσκονται υπό τη ρύθμιση των FoxO. Διαφορετικό μοτίβο ακετυλίωσης των FoxO φαίνεται να έχει διαφορετικό ρόλο στη ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο είτε με την απόκριση στο στρες. Πέρα όμως από τη SIRT1 ίσως υπάρχουν κι άλλοι παράγοντες που ρυθμίζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα των FoxO. Ο p53 είναι ένας παράγοντας που επίσης υφίσταται πολλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που ελέγχουν τη δράση του. Η SIRT1 είναι ένας παράγοντας που φαίνεται να καταστέλλει τη δράση του. Σε συνθήκες υποξίας, ο p53 φαίνεται να ρυθμίζεται και

από αλληλεπίδραση με τη CSB πρωτεΐνη καταστέλλοντας τη μεταγραφή προ-αποπτωτικών γονιδίων, καθώς υπάρχει μια ανταγωνιστική πρόσδεση με τον παράγοντα p300. Αυτός ο παράγοντας ακετυλίωσης φαίνεται να αλληλεπιδρά και με τους FoxO ρυθμίζοντας τη δράση του. Οπότε, πιθανή αλληλεπίδραση των FoxO με την CSB πρωτεΐνη που σχετίζεται με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης ίσως προσανατολίζει τους FoxO στην κυτταρική επιβίωση κάτω από συνθήκες στρες. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης μπορούν να επιβεβαιώσουν μια τέτοια υπόθεση.

Θα μπορούσαν να δημιουργηθούν διάφορες κυτταρικές σειρές που εκφράζουν βιοτινυλιωμένο FoxO από ποντίκια που γερνούν φυσιολογικά σε διάφορες φάσεις της ηλικίας τους. Μονιμοποίηση της χρωματίνης και ακόλουθη απομόνωση των βιοτινυλιωμένων FoxO μετά από πρόσδεση στα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης θα μπορούσαν να δώσουν πολύ σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τα γονίδια-στόχους των FoxO. Πειράματα ChIP on chip στο προϊόν που λαμβάνεται από τα σφαιρίδια στρεπτιβιδίνης θα μπορούσαν να αποκαλύψουν τους στόχους των FoxO σε διαφορετικά στάδια, ποια νέα γονίδια-στόχοι ενεργοποιούνται και ποια αποσιωπούνται κατά τη γήρανση.

Η κατανόηση λοιπόν της ρύθμισης των FoxO αλλά και το πώς αυτές ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση θα είναι ένα κρίσιμο βήμα στην κατανόηση της γήρανσης, καθώς και των ασθενειών που εμφανίζονται κατά τη γήρανση.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Johnson, F.B., D.A. Sinclair, and L. Guarente, *Molecular biology of aging*. Cell, 1999. **96**(2): p. 291-302.
2. Kirkwood, T.B., *Understanding the odd science of aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 437-47.
3. Rossi, D.J., C.H. Jamieson, and I.L. Weissman, *Stem cells and the pathways to aging and cancer*. Cell, 2008. **132**(4): p. 681-96.
4. Schumacher, B., J.H. Hoeijmakers, and G.A. Garinis, *Sealing the gap between nuclear DNA damage and longevity*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **299**(1): p. 112-7.
5. d'Adda di Fagagna, F., S.H. Teo, and S.P. Jackson, *Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response*. Genes Dev, 2004. **18**(15): p. 1781-99.
6. Harper, J.W. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: ten years after*. Mol Cell, 2007. **28**(5): p. 739-45.
7. Hoeijmakers, J.H., *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 366-74.
8. Jans, J., et al., *Differential role of basal keratinocytes in UV-induced immunosuppression and skin cancer*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(22): p. 8515-26.
9. Garinis, G.A., et al., *Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks*. Embo J, 2005. **24**(22): p. 3952-62.
10. Mitchell, J.R., J.H. Hoeijmakers, and L.J. Niedernhofer, *Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(2): p. 232-40.
11. Hoeijmakers, J.H., *Genome maintenance mechanisms are critical for preventing cancer as well as other aging-associated diseases*. Mech Ageing Dev, 2007. **128**(7-8): p. 460-2.
12. Hanawalt, P.C., *Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation*. Oncogene, 2002. **21**(58): p. 8949-56.
13. Batty, D.P. and R.D. Wood, *Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA*. Gene, 2000. **241**(2): p. 193-204.
14. Hoeijmakers, J.H., *Human nucleotide excision repair syndromes: molecular clues to unexpected intricacies*. Eur J Cancer, 1994. **30A**(13): p. 1912-21.
15. Wood, R.D., *DNA repair in eukaryotes*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 135-67.
16. de Laat, W.L., N.G. Jaspers, and J.H. Hoeijmakers, *Molecular mechanism of nucleotide excision repair*. Genes Dev, 1999. **13**(7): p. 768-85.
17. Scharer, O.D., *A molecular basis for damage recognition in eukaryotic nucleotide excision repair*. Chembiochem, 2008. **9**(1): p. 21-3.
18. Tang, J. and G. Chu, *Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein*. DNA Repair (Amst), 2002. **1**(8): p. 601-16.
19. Citterio, E., et al., *ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(20): p. 7643-53.
20. Henning, K.A., et al., *The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH*. Cell, 1995. **82**(4): p. 555-64.
21. van den Boom, V., et al., *DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery*. J Cell Biol, 2004. **166**(1): p. 27-36.
22. Proietti-De-Santis, L., P. Drane, and J.M. Egly, *Cockayne syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation*. EMBO J, 2006. **25**(9): p. 1915-23.
23. Foustieri, M., et al., *Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo*. Mol Cell, 2006. **23**(4): p. 471-82.



24. Schwechheimer, C., *The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1695**(1-3): p. 45-54.
25. Archambault, J., et al., *FCP1, the RAP74-interacting subunit of a human protein phosphatase that dephosphorylates the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(42): p. 27593-601.
26. Riedl, T., F. Hanaoka, and J.M. Egly, *The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA*. *EMBO J*, 2003. **22**(19): p. 5293-303.
27. Coin, F., et al., *p8/TTD-A as a repair-specific TFIIH subunit*. *Mol Cell*, 2006. **21**(2): p. 215-26.
28. Giglia-Mari, G., et al., *A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A*. *Nat Genet*, 2004. **36**(7): p. 714-9.
29. Laine, J.P. and J.M. Egly, *When transcription and repair meet: a complex system*. *Trends Genet*, 2006. **22**(8): p. 430-6.
30. Ramirez, C.L., et al., *Human progeroid syndromes, aging and cancer: new genetic and epigenetic insights into old questions*. *Cell Mol Life Sci*, 2007. **64**(2): p. 155-70.
31. Jaspers, N.G., et al., *First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure*. *Am J Hum Genet*, 2007. **80**(3): p. 457-66.
32. Niedernhofer, L.J., et al., *A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis*. *Nature*, 2006. **444**(7122): p. 1038-43.
33. Lehmann, A.R., *The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases*. *Genes Dev*, 2001. **15**(1): p. 15-23.
34. Guarente, L. and C. Kenyon, *Genetic pathways that regulate ageing in model organisms*. *Nature*, 2000. **408**(6809): p. 255-62.
35. Kenyon, C., *The plasticity of aging: insights from long-lived mutants*. *Cell*, 2005. **120**(4): p. 449-60.
36. Partridge, L. and D. Gems, *Mechanisms of ageing: public or private?* *Nat Rev Genet*, 2002. **3**(3): p. 165-75.
37. Schumacher, B., G.A. Garinis, and J.H. Hoeijmakers, *Age to survive: DNA damage and aging*. *Trends Genet*, 2008. **24**(2): p. 77-85.
38. Vermeulen, W., et al., *A temperature-sensitive disorder in basal transcription and DNA repair in humans*. *Nat Genet*, 2001. **27**(3): p. 299-303.
39. Botta, E., et al., *Reduced level of the repair/transcription factor TFIIH in trichothiodystrophy*. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(23): p. 2919-28.
40. de Boer, J., et al., *Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription*. *Science*, 2002. **296**(5571): p. 1276-9.
41. Nance, M.A. and S.A. Berry, *Cockayne syndrome: review of 140 cases*. *Am J Med Genet*, 1992. **42**(1): p. 68-84.
42. van der Horst, G.T., et al., *Defective transcription-coupled repair in Cockayne syndrome B mice is associated with skin cancer predisposition*. *Cell*, 1997. **89**(3): p. 425-35.
43. van der Horst, G.T., et al., *UVB radiation-induced cancer predisposition in Cockayne syndrome group A (Csa) mutant mice*. *DNA Repair (Amst)*, 2002. **1**(2): p. 143-57.
44. Gorgels, T.G., et al., *Retinal degeneration and ionizing radiation hypersensitivity in a mouse model for Cockayne syndrome*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(4): p. 1433-41.
45. van der Pluijm, I., et al., *Impaired genome maintenance suppresses the growth hormone--insulin-like growth factor 1 axis in mice with Cockayne syndrome*. *PLoS Biol*, 2007. **5**(1): p. e2.
46. Murai, M., et al., *Early postnatal ataxia and abnormal cerebellar development in mice lacking Xeroderma pigmentosum Group A and Cockayne syndrome Group B DNA repair genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(23): p. 13379-84.
47. Bartke, A. and H. Brown-Borg, *Life extension in the dwarf mouse*. *Curr Top Dev Biol*, 2004. **63**: p. 189-225.

48. Liang, H., et al., *Genetic mouse models of extended lifespan*. *Exp Gerontol*, 2003. **38**(11-12): p. 1353-64.
49. Heiman, M.L., et al., *Body composition of prolactin-, growth hormone, and thyrotropin-deficient Ames dwarf mice*. *Endocrine*, 2003. **20**(1-2): p. 149-54.
50. Carter, C.S., M.M. Ramsey, and W.E. Sonntag, *A critical analysis of the role of growth hormone and IGF-1 in aging and lifespan*. *Trends Genet*, 2002. **18**(6): p. 295-301.
51. Zhou, Y., et al., *A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(24): p. 13215-20.
52. Bonkowski, M.S., et al., *Long-lived growth hormone receptor knockout mice show a delay in age-related changes of body composition and bone characteristics*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2006. **61**(6): p. 562-7.
53. Kurosu, H., et al., *Suppression of aging in mice by the hormone Klotho*. *Science*, 2005. **309**(5742): p. 1829-33.
54. Holzenberger, M., et al., *IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice*. *Nature*, 2003. **421**(6919): p. 182-7.
55. Schumacher, B., et al., *Delayed and accelerated aging share common longevity assurance mechanisms*. *PLoS Genet*, 2008. **4**(8): p. e1000161.
56. van de Ven, M., et al., *Extended longevity mechanisms in short-lived progeroid mice: identification of a preservative stress response associated with successful aging*. *Mech Ageing Dev*, 2007. **128**(1): p. 58-63.
57. Lin, K., et al., *daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans**. *Science*, 1997. **278**(5341): p. 1319-22.
58. Hursting, S.D., et al., *Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans*. *Annu Rev Med*, 2003. **54**: p. 131-52.
59. Longo, V.D. and C.E. Finch, *Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians?* *Science*, 2003. **299**(5611): p. 1342-6.
60. Accili, D. and K.C. Arden, *FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation*. *Cell*, 2004. **117**(4): p. 421-6.
61. Barthel, A., D. Schmoll, and T.G. Unterman, *FoxO proteins in insulin action and metabolism*. *Trends Endocrinol Metab*, 2005. **16**(4): p. 183-9.
62. Greer, E.L. and A. Brunet, *FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression*. *Oncogene*, 2005. **24**(50): p. 7410-25.
63. Morris, B.J., *A forkhead in the road to longevity: the molecular basis of lifespan becomes clearer*. *J Hypertens*, 2005. **23**(7): p. 1285-309.
64. Anderson, M.J., et al., *Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily*. *Genomics*, 1998. **47**(2): p. 187-99.
65. Furuyama, T., et al., *Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues*. *Biochem J*, 2000. **349**(Pt 2): p. 629-34.
66. Biggs, W.H., 3rd, W.K. Cavenee, and K.C. Arden, *Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse*. *Mamm Genome*, 2001. **12**(6): p. 416-25.
67. Jacobs, F.M., et al., *FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(38): p. 35959-67.
68. Xuan, Z. and M.Q. Zhang, *From worm to human: bioinformatics approaches to identify FOXO target genes*. *Mech Ageing Dev*, 2005. **126**(1): p. 209-15.
69. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. *Cell*, 1999. **96**(6): p. 857-68.
70. Ramaswamy, S., et al., *A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR*. *Cancer Cell*, 2002. **2**(1): p. 81-91.
71. Calnan, D.R. and A. Brunet, *The FoxO code*. *Oncogene*, 2008. **27**(16): p. 2276-88.
72. Cantley, L.C., *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. *Science*, 2002. **296**(5573): p. 1655-7.

73. Brunet, A., et al., *Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a)*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(3): p. 952-65.
74. Woods, Y.L., et al., *The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site*. Biochem J, 2001. **355**(Pt 3): p. 597-607.
75. Rena, G., et al., *Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion*. EMBO J, 2002. **21**(9): p. 2263-71.
76. Huang, H., et al., *CDK2-dependent phosphorylation of FOXO1 as an apoptotic response to DNA damage*. Science, 2006. **314**(5797): p. 294-7.
77. Brunet, A., et al., *14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport*. J Cell Biol, 2002. **156**(5): p. 817-28.
78. Van Der Heide, L.P., M.F. Hoekman, and M.P. Smidt, *The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 2): p. 297-309.
79. Rinner, O., et al., *An integrated mass spectrometric and computational framework for the analysis of protein interaction networks*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(3): p. 345-52.
80. Wolff, S., et al., *SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity*. Cell, 2006. **124**(5): p. 1039-53.
81. Brunet, A., et al., *Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase*. Science, 2004. **303**(5666): p. 2011-5.
82. Frescas, D., L. Valenti, and D. Accili, *Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20589-95.
83. Kitamura, Y.I., et al., *FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction*. Cell Metab, 2005. **2**(3): p. 153-63.
84. Lehtinen, M.K., et al., *A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span*. Cell, 2006. **125**(5): p. 987-1001.
85. Oh, S.W., et al., *JNK regulates lifespan in Caenorhabditis elegans by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(12): p. 4494-9.
86. van der Horst, A., et al., *FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(10): p. 1064-73.
87. Matsuzaki, H., et al., *Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11285-90.
88. Plas, D.R. and C.B. Thompson, *Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 12361-6.
89. Aoki, M., H. Jiang, and P.K. Vogt, *Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13613-7.
90. Huang, H., et al., *Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1649-54.
91. Hu, M.C., et al., *IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a*. Cell, 2004. **117**(2): p. 225-37.
92. Motta, M.C., et al., *Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors*. Cell, 2004. **116**(4): p. 551-63.
93. Furuyama, T., et al., *Effects of aging and caloric restriction on the gene expression of Foxo1, 3, and 4 (FKHR, FKHRL1, and AFX) in the rat skeletal muscles*. Microsc Res Tech, 2002. **59**(4): p. 331-4.
94. Almeida, M., et al., *Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription*. J Biol Chem, 2007. **282**(37): p. 27298-305.
95. Glass, D.A., 2nd and G. Karsenty, *In vivo analysis of Wnt signaling in bone*. Endocrinology, 2007. **148**(6): p. 2630-4.

96. van der Vos, K.E. and P.J. Coffey, *FOXO-binding partners: it takes two to tango*. *Oncogene*, 2008. **27**(16): p. 2289-99.
97. Liu, Z.P., et al., *Phenotypic modulation of smooth muscle cells through interaction of Foxo4 and myocardin*. *Dev Cell*, 2005. **9**(2): p. 261-70.
98. Puigserver, P., et al., *Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction*. *Nature*, 2003. **423**(6939): p. 550-5.
99. van der Horst, A., et al., *FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1)*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(28): p. 28873-9.
100. Kirkwood, T.B. and S.N. Austad, *Why do we age?* *Nature*, 2000. **408**(6809): p. 233-8.
101. Tissenbaum, H.A. and L. Guarente, *Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans**. *Nature*, 2001. **410**(6825): p. 227-30.
102. Yamamura, Y., et al., *RUNX3 cooperates with FoxO3a to induce apoptosis in gastric cancer cells*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(8): p. 5267-76.
103. Seoane, J., et al., *Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation*. *Cell*, 2004. **117**(2): p. 211-23.
104. Gomis, R.R., et al., *A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(34): p. 12747-52.
105. Bakker, W.J., et al., *FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1*. *J Cell Biol*, 2004. **164**(2): p. 175-84.
106. Nemoto, S., M.M. Fergusson, and T. Finkel, *Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway*. *Science*, 2004. **306**(5704): p. 2105-8.
107. Dowell, P., et al., *Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Foxo1 signaling pathways*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(46): p. 45485-91.
108. Schuur, E.R., et al., *Ligand-dependent interaction of estrogen receptor-alpha with members of the forkhead transcription factor family*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(36): p. 33554-60.
109. Kitamura, T., et al., *A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(9): p. 2477-85.
110. Sekine, K., et al., *Foxo1 links insulin signaling to C/EBPalpha and regulates gluconeogenesis during liver development*. *EMBO J*, 2007. **26**(15): p. 3607-15.
111. Furuyama, T., et al., *Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(33): p. 34741-9.
112. Hosaka, T., et al., *Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(9): p. 2975-80.
113. Nakae, J., et al., *Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1*. *Nat Genet*, 2002. **32**(2): p. 245-53.
114. Castrillon, D.H., et al., *Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a*. *Science*, 2003. **301**(5630): p. 215-8.
115. Berg, R.J., et al., *Impact of global genome repair versus transcription-coupled repair on ultraviolet carcinogenesis in hairless mice*. *Cancer Res*, 2000. **60**(11): p. 2858-63.