

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΝΙΚΟΛΑΟΥ ΚΩΣΤΑΣ

**Τίτλος : Μελέτη της έκφρασης του Olig1 γονιδίου.
Χαρτογράφηση του Olig1 υποκινητή και μελέτη της
κατασταλτικής δράσης του ERF στο Olig1 γονίδιο.**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005-2007

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθ. κ. Μαυροθαλασσίτη που δέχτηκε να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του. Τον ευχαριστώ πολύ για την υπομονή του και τις πολύτιμες κατευθύνσεις του στα πρώτα μου σοβαρά βήματα στην έρευνα. Είναι πραγματικός «δάσκαλος» και πάνω από όλα άνθρωπος με κατανόηση και πολύ υπομονή και επιμονή. Έχει τον τρόπο του εύκολα και γρήγορα να κατευθύνει τους φοιτητές του ώστε να επιλύουν από μόνοι τους τα βιολογικά ερωτήματα και πάνω απ' όλα να τα κατανοούν εις βάθος. Δεν θα ξεχάσω ποτέ τις εργαστηριακές του μεθοδολογίες και συμβουλές διότι είναι κάτι παραπάνω από πολύτιμες. Ήμουν πολύ τυχερός που είχα την ευκαιρία να περάσω από το εργαστήριο αυτό. Ευχαριστώ επίσης και τον Μιχάλη Βερυκοκάκη, διδακτορικό του εργαστηρίου, για τις πολύτιμες συμβουλές και κατευθύνσεις του, που για εμένα ήταν ο «μικρός δάσκαλός» μου. Οφείλω να ευχαριστήσω και την Έλενα Βοργιά, διδακτορικό επίσης, για την όποια βοήθεια της. Δεν θα μπορούσα σε καμία περίπτωση να μην ευχαριστήσω και τον δεύτερο εξεταστή της εργασίας μου, τον Καθ. κ. Παπαματθαϊάκη για τις πολύτιμες συμβουλές του και για την βοήθεια του. Τον ευχαριστώ πολύ που διέθεσε κάποτε λίγο από τον πολύτιμο χρόνο του ώστε να με κατευθύνει και να με συμβουλευσει στα πρώτα σοβαρά βήματα μου. Εύχομαι σε όλους επαγγελματικές επιτυχίες και για άλλη μια φορά σας ευχαριστώ πολύ.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1. Οικογένεια των ETS μεταγραφικών παραγόντων.....	7
1.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας ERF (ETS-2 repressor factor) και η βιολογική λειτουργία του.....	9
1.2 Ενδοκυτταρικό σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK/ERK.....	11
1.3 Τα Olig γονίδια και η βιολογική λειτουργία τους.....	13
1.3.1 Έλεγχος των Olig γονιδίων από τις Id πρωτεΐνες.....	14
1.3.2. Olig γονίδια και ασθένειες.....	15
1.4. Σύνοψη.....	16
1.5 Συσχετισμός του ERF και Olig1 γονιδίου.....	16
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	19
2.1 Τεχνικές ανασυνδυασμού DNA.....	19
2.1.1 Ενζυματικοί χειρισμοί του DNA.....	19
2.1.2 Διαχωρισμός νουκλεϊκών οξέων μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής αгарόζης.....	19
2.1.3 Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών DH5a, DH10b της E.coli.....	19
2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	19
2.2.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης...19	
2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα με την μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης σε κλίση με χλωριούχο καΐσιο και βρωμιούχο αιθίδιο.....	20
2.3 Παρασκευή ηλεκτροδεκτικών κυττάρων.....	21
2.4 Μετασχηματισμός ηλεκτροδεκτικών κυττάρων με electroporation.....	21
2.5 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αгарόζης.....	22
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	22
3.1 Ανάπτυξη κυττάρων.....	22
3.2 Τρυψινοποίηση κυττάρων.....	23
3.3 Παροδική διαμόλυνση πλασμιδίων σε καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων.....	23
3.4 Πάγωμα κυττάρων και αποθήκευσή τους στους -80°C.....	24
3.5 Απομόνωση πρωτογενών ινοβλαστικών κυττάρων από έμβρυα ποντικού.....	24
4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ.....	24
4.1 Μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης.....	25
4.2 Μέτρηση ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης.....	25
5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	25
6. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	26
7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ.....	26
7.1 Μέθοδος Bradford.....	26
7.2 Αποτύπωμα κατα Western Blot.....	27
7.2.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης...27	
7.2.2 Υβριδοποίηση με αντίσωμα.....	27
8. ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ (CHIP) ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΣΩ ΑΛΥΣΙΑΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ (Real-Time PCR).....	28
8.1 Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης.....	28
8.2 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.....	29
9. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ RNA ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΥΤΟΥ ΜΕ ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ.....	30
9.1 Παραγωγή cDNA από ολικό RNA.....	30
9.2 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.....	31
10. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ (PRIMERS).....	31
11. ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ ΜΕ poly-L-Lys ΤΡΥΒΑΙΩΝ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	32

12. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ PC12 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΣΕ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	32
13. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ P19 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΣΕ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΥΤΤΑΡΑ	33
14. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ.....	34
14.1 Κατασκευή pGL3b_Olig1_wt (Verykokakis).....	34
14.2 Κατασκευή πλασμιδιακής κατασκευής pGL3b_Olig1_Mu1(ApaInew).....	36
14.3 Μετάλλαγή της ETS περιοχής πρόδεσης που βρίσκεται στη συντηρημένη περιοχή του Olig1 υποκινητή του ποντικού κλωνοποιημένου στην πλασμιδιακή κατασκευή pGL3b_Olig1_wt.....	37
14.4 Κλωνοποίηση της συντηρημένης (αγρίου τύπου και μεταλλαγμένης) με τον άνθρωπο περιοχής του ποντικίσου Olig1 υποκινητή που βρίσκεται 125 βάσεις ανοδικά του σημείου έναρξης του mRNA.....	39
14.5 Σχηματική σύνοψη όλων των πλασμιδιακών κατασκευών που φέρουν τμήματα του Olig1 υποκινητή.....	43
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
15. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ Olig1 ΓΟΝΙΔΙΟΥ.....	44
15.1 Διαφοροποίηση των PC12 κυττάρων με NGF και μελέτη της Olig1 έκφρασης στις 2 συνθήκες.....	44
15.2 Διαφοροποίηση των P19 με RA και μελέτη της Olig1 έκφρασης στις 2 συνθήκες.....	45
15.3 Απομόνωση πρωτογενών ποντικίσων ινοβλαστών (MEFs) ημέρας 10.5 και 13.5 κατά την εμβρυική ανάπτυξη και έλεγχος της Olig1 έκφρασης.....	46
15.3.1 Έλεγχος της Olig1 έκφρασης σε πρωτογενείς ποντικίσους ινοβλάστες MEFs από κεφάλια εμβρύου ποντικού κατά την 13,5 ημέρα εμβρυικής ανάπτυξης.....	47
15.3.2 Έλεγχος της Olig1 έκφρασης σε ποντικίσους ινοβλάστες MEFs εμβρύου ποντικού κατά την 10,5 ημέρα εμβρυικής ανάπτυξης.....	51
15.4 Έλεγχος της Olig1 έκφρασης σε διαφοροποιημένα με RA νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs).....	55
15.5 Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης σε πρωτογενείς ποντικίσους ινοβλάστες από κεφάλια εμβρύου ημέρας E13,5 P3.....	57
16.ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ Olig1 ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΟ Olig1 ΓΟΝΙΔΙΟ.....	59
16.1 Μελέτη της κατασταλτικής δράσης του ERF στον Olig1 υποκινητή επί παρουσία και απουσία τριχοστατίνης.....	57
16.2 Μελέτη της κατασταλτικής δράσης του ERF στις πλασμιδιακές κατασκευές που φέρουν κλωνοποιημένα τρία διαφορετικά κομμάτια του Olig1 υποκινητή με διαμόλυνση σε REF1 κύτταρα και έλεγχο της ενεργότητας λουσιφεράσης.....	61
16.3 Μελέτη της πιθανής συνεργατικής δράσης του ERF με τις HIPK στην καταστολή του Olig1 υποκινητή.....	64
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	66
ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	69
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

Περίληψη

Ο ERF (ETS-2 Repressor factor) αποτελεί παράγοντα της ETS οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων με ισχυρή κατασταλτική δράση. Φωσφορυλιώνεται από την ενεργή ERK (pERK) μέσω δυο FxF μοτίβων που διατηρεί στο κεντρικό κομμάτι του. Η λειτουργία του είναι άμεσα εξαρτώμενη από την τοπολογία του στο κύτταρο. Σε πρωτογενής ινοβλάστες ποντικού η αποφωσφορυλιωμένη μορφή του ERF είναι αποκλειστικά πυρηνική ενώ όταν φωσφορυλιώνεται από την ERK μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα όπου και παύει να καταστέλλει. Ένα πιθανό γονίδιο στόχος του ERF φαίνεται να είναι το Olig1 γονίδιο. Το Olig1 γονίδιο σχετίζεται με την διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων και εμπλέκεται στους μηχανισμούς μυελινοποίησης των αξόνων στους νευρώνες. Επίσης υπερεκφράζεται σε όλους τους καρκίνους της γλοίας. Πειράματα μικροσυστοιχιών έδειξαν ότι το Olig1 γονίδιο υπερεκφράζεται στους ελλειμματικούς ως προς τον ERF ινοβλάστες κατά την 9,5 ημέρα εμβρυικής ανάπτυξης. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε πρωτογενής ινοβλάστες ποντικού (MEFs) έχουν δείξει ότι ο ERF σε συνθήκη έλλειψης ορού προσδένεται με μεγαλύτερη συνάφεια στον Olig1 υποκινητή. Το ίδιο συμβαίνει και σε ποντικίστους ινοβλάστες από κεφάλια εμβρύων ποντικών ημέρας 13,5 όπου φάνηκε ότι σε συνθήκη έλλειψης ορού για 4 ώρες ο ERF προσδένεται με υψηλότερη συνάφεια κατά 1,8 φορές συγκριτικά με την κανονική συνθήκη, παράλληλα τα mRNA επίπεδα του Olig1 δεν φάνηκαν να επηρεάζονται αισθητά. Η έκφραση του Olig1 γονιδίου παρουσίασε διαφορά μεταξύ ποντικίστιων ινοβλαστών από έμβρυα ποντικού 10,5 και 13,5 ημέρας εμβρυικής ανάπτυξης, κατά την πρόοδο της ανάπτυξής τους σε *in vitro* καλλιέργεια. Στους πρωτογενής ινοβλάστες από κεφάλια εμβρύου ποντικού 13,5 ημέρας εμβρυικής ανάπτυξης φάνηκε ότι κατά το πρώτο πέρασμα των κυττάρων σε καλλιέργεια η έκφραση του Olig1 μειώθηκε σε συνθήκη έλλειψης ορού για 4 ώρες συγκριτικά με την κανονική συνθήκη. Αντιθέτως στα ίδια κύτταρα κατά το τρίτο πέρασμα τους η έκφραση του Olig1 σε συνθήκη έλλειψης ορού για 4 ώρες οριακά αυξήθηκε συγκριτικά με την κανονική συνθήκη. Στα MEFs κατά την 10,5 ημέρα εμβρυικής ανάπτυξης φαίνεται να συμβαίνει το ακριβώς αντίθετο συγκριτικά με αυτά της 13,5 ημέρας. Κατά το πρώτο πέρασμά τους σε συνθήκη έλλειψης ορού για 4 ώρες η έκφραση του Olig1 είναι υψηλότερη συγκριτικά με αυτή της κανονικής συνθήκης ενώ κατά το τρίτο πέρασμα μικρότερη. Πειράματα διαμόλυνσεων σε REF1 κύτταρα έδειξαν ότι ο ERF καταστέλλει το γονίδιο αναφοράς στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί ο Olig1 υποκινητής. Ο μεταλλαγμένος ERF σε όλα τα σημεία φωσφορυλίωσης και αποκλειστικά πυρηνικός καταστέλλει σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό. Επι παρουσία τριχοστατίνης η κατατολή διατηρείται αλλά σε μικρότερο βαθμό. Πειράματα διαμόλυνσης ίδιου τύπου σε 3 διαφορετικά τμήματα του Olig1 υποκινητή έδειξαν πως μια πολύ υψηλά συντηρημένη περιοχή με τον άνθρωπο μήκους 245 βάσεων ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής παρουσιάζει την ίδια ακριβώς ενεργότητα συγκριτικά με ολόκληρο τον υποκινητή. Ταυτόχρονα σε όλα τα τμήματα του υποκινητή που κλωνοποιήθηκαν η καταστολή του ERF και M1-7 παρουσιάστηκε στην ίδια αναλογία. Μεταλλαγή της μοναδικής ETS αλληλουχίας που υπάρχει εντός της συντηρημένης με τον άνθρωπο περιοχής διατήρησε την ίδια ακριβώς καταστολή συγκριτικά με τον αγρίου τύπου υποκινητή. Η μεταλλαγή αυτή ανεξάρτητα από το ότι δεν επηρέασε καθόλου την καταστολή από τον ERF, ελάττωσε την ενεργότητα του υποκινητή κατά 30-50% περίπου.

Summary

ERF (ETS-2 Repressor factor) is a ubiquitously expressed protein, member of the ETS family of transcription factors with strong transcriptional repressor activity. ERF is regulated by MAPK/ERK signalling pathway. There are 2 FxF motifs on ERF that mediate the specific interaction with ERKs, both in vivo and in vitro. The phosphorylation determines its subcellular localization and biological function. Upon mitogenic stimulation, ERF is phosphorylated and exported to the cytoplasm. In contrast, upon growth factor deprivation ERF is immediately dephosphorylated and transported into the nucleus.

Olig1 is a member of the oligodendrocyte lineage genes and encodes a bHLH protein which is expressed in neural progenitor cells. It is strongly related with the oligodendrocyte differentiation and maturation. Also involved in the mechanisms of myelination of neurons, and overexpressed in all glial cancers.

Microarray experiment in primary MEFs carrying homozygous deletion of the ERF gene, have shown overexpression of Olig1 gene. Chromatin IP experiments (CHIP) in primary fibroblasts (MEFs) have shown that ERF binds to the Olig1 promoter with a higher affinity in a 4 hours growth factor deprivation comparing with the exponential condition.

In vitro culturing E10,5 and E13,5 primary MEFs, have shown obvious differences in Olig1 expression. In 4 hours serum deprived E13,5 primary fibroblasts, the Olig1 expression have been decreased over the passages in the culture comparing with the exponential condition. In contrast in the E10,5 primary MEFs at the same condition Olig1 expression was increased in progress of in vitro culturing.

Transfection experiments in REF1 cells have shown that ERF represses Olig1 gene. Mutated form of ERF at all possible phosphorylation sites (M1-7) represses in much higher degree compare with wild type ERF. At the same experiment in the presence of trichostatin the repression seems to be maintained but in a smaller degree. In aim to map the Olig1 promoter activity, we have been three different parts of the Olig1 promoter. We observed that in all cases the ERF and M1-7 repression was maintained. We also observed, that a very highly conserved region with the human Olig1 promoter, 145 bases upstream the transcription start site, presents the same promoter activity as the entire promoter. Mutation at the unique ETS sequence existing inside the conserved region with the human Olig1 promoter, maintained the same precisely repression comparing with the wild type promoter. This mutation only decreased the Olig1 promoter activity about 30-50% roughly.

Εισαγωγή

1. Οικογένεια των ETS μεταγραφικών παραγόντων.

Οι ETS μεταγραφικοί παράγοντες εμπλέκονται στην ανάπτυξη, κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρική διαφοροποίηση, απόπτωση και καρκινικό μετασχηματισμό. Απορύθμιση των ETS γονιδίων οδηγεί σε καρκινογένεση καθώς ρυθμίζουν γονίδια καρκινικής καταστολής (tumor suppressor genes), ογκογονίδια και γονίδια σχετιζόμενα με την αγγειογένεση (Oikawa et.al 2004).

Στα θηλαστικά η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει περίπου 30 γονίδια. Κάποια από τα μέλη της οικογένειας αυτής είναι ευρέως εκφραζόμενα σε όλους τους κυτταρικούς τύπους (Ets-2, ERF, TEL) ενώ άλλα αποκλειστικά εκφραζόμενα σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (**Πίνακας 1**).

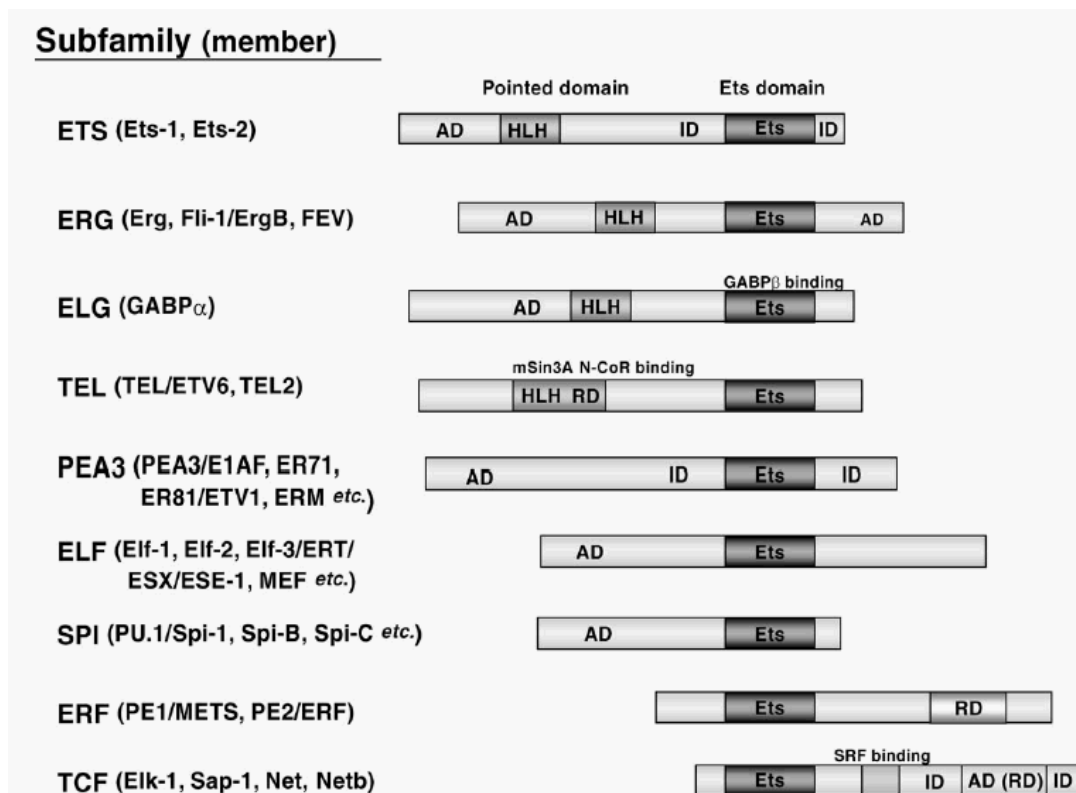
Οι ETS πρωτεΐνες έχουν τμηματική δομή. Αποτελούνται από μία καλά συντηρημένη κατά την εξέλιξη ETS επικράτεια (ETS domain) και από δύο ακόμη επικράτειες, ενεργοποίησης (activation domain) και καταστολής (repression domain). Η ETS επικράτεια χαρακτηρίζει τα μέλη της ETS οικογένειας. Αναγνωρίζει την αλληλουχία GGAA(G/A)(T/G) στο DNA και προσδένεται σε αυτήν. Σε κάποια μέλη εντοπίζεται στο καρβόξυτελικό άκρο ενώ σε κάποια άλλα στο αμινοτελικό. Η δομή της ETS επικράτειας έχει αναλυθεί μέσω NMR και αποτελείται από 85 αμινοξέα που σχηματίζουν 3 α -έλικες και 4 β -πτυχωτές επιφάνειες. Η σειρά δόμησης είναι $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ και σχηματίζουν μια δομή έλικας-στροφής-έλικας (Helix-turn-helix, HTH). Στη δομή αυτή η $\alpha 3$ έλικα ευθύνεται για την πρόσδεση στη μεγάλη αύλακα του DNA. Συνήθως οι ETS πρωτεΐνες αποτελούνται από μια επικράτεια ενεργοποίησης ή καταστολής, μέσω της οποίας καθορίζεται και η λειτουργία τους. Υπάρχουν όμως μέλη της οικογένειας αυτής που περιέχουν περισσότερες από μια επικράτειες (**εικόνα 1**). Για παράδειγμα το Fli-1 έχει 2 επικράτειες ενεργοποίησης της μεταγραφής, μια στο καρβόξυτελικό και μια στο αμινοτελικό άκρο. Η επικράτεια που εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο παρουσιάζει πιο ισχυρή δράση ενεργοποίησης της μεταγραφής. Επιπρόσθετα κάποια από τα μέλη της οικογένειας έχουν μια ακόμη καλά συντηρημένη επικράτεια στο αμινοτελικό τους άκρο, το λεγόμενο PNT domain. Η επικράτεια αυτή ευθύνεται για την δημιουργία της δομής έλικας-βρόχος-έλικας (Helix-loop-helix, HLH), μέσω της οποίας διαμεσολαβούνται πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (**εικόνα 1**). Η αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, για κάποια από τα μέλη της οικογένειας είναι απαραίτητη για την διεκπεραίωση της λειτουργίας τους. Για παράδειγμα τα Ets-1, Ets-2 και Elk-1 αλληλεπιδρούν με τον συν-ενεργοποιητή CBP/p300 και έπειτα ενεργοποιούν την μεταγραφή.

Τα περισσότερα από τα μέλη της ETS οικογένειας είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές, ωστόσο τέσσερα μέλη (YAN, ERF, NET, TEL) είναι μεταγραφικοί καταστολείς. Για τους NET και TEL η καταστολή έχει δείχθει ότι μεσολαβεί από την στρατολόγηση ιστονικών απακετυλασών (HDACs). Ωστόσο και οι τέσσερις καταστολείς ρυθμίζονται από το MAPK μονοπάτι, ενώ τα μέλη YAN και ERF μέσω της ERK (Mavrothalassitis, Oncogene 2000).

Tissue distribution of major Ets family proteins

Member	Expressing organs and tissues
Ets-1	Lymphoid organs, brain, vascular endothelial cells
Ets-2	Ubiquitous
Erg	Vascular endothelial cells, hematopoietic cells, kidney, etc.
Fli-1	Hematopoietic cells, vascular endothelial cells
GABP α	Ubiquitous
TEL	Ubiquitous
PEA3/E1AF	Epidermis, mammary gland, brain, etc.
Elf-1	Hematopoietic cells, liver, kidney, intestine, etc.
ESE-1/ESX	Epithelial cells
PU.1	B cells, macrophages, neutrophils
TCFs	Ubiquitous

Πίνακας 1. Πίνακας στον οποίο φαίνεται η τοπολογία της έκφρασης ορισμένων μελών της ETS οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων. (Oikawa et.al)



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της δομής ορισμένων μελών της ETS οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων. Φαίνεται η παρουσία της συντηρημένης κατά την εξέλιξη ETS επικράτειας (HTH), η οποία και χαρακτηρίζει όλα τα μέλη της οικογένειας. Το συντηρημένο PNT domain (HLH) μέσω του οποίου επιτυγχάνουν τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, η επικράτεια ενεργοποίησης (AD) και καταστολής (RD). (Oikawa et.al)

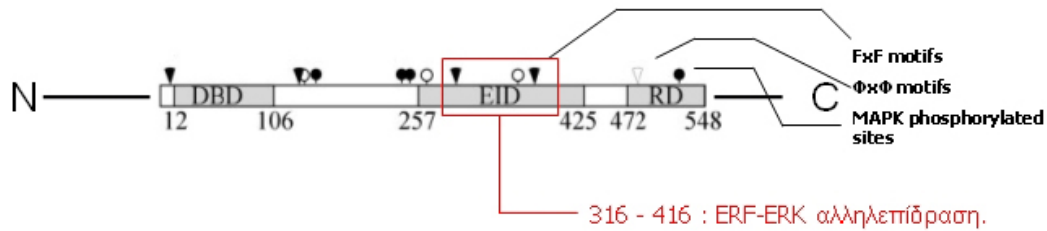
Οι ETS μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν πυρηνικούς στόχους ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως Ras/MAPK/ERK και JNK. Κατά την φωσφορυλίωσή τους κάποιοι ενεργοποιούνται, ενώ κάποιοι άλλοι αλλάζουν την κυτταρική τοπολογία τους. Για παράδειγμα ένα μέλος, το NET, μετά από στρεσογόνο ερέθισμα μέσω του JNK σηματοδοτικού μονοπατιού φωσφορυλιώνεται και εξάγεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Η φωσφορυλίωση του NET λαμβάνει χώρα στο πυρηνικό σήμα εισόδου του (NES) που περιέχεται στο αμινοτελικό του άκρο (Oikawa et.al. 2003, Oikawa et.al.2004). Ο ERF αποτελεί ένα ακόμη παράδειγμα ελέγχου της κυτταρικής τοπολογίας και άμεσα λειτουργίας του, μέσω το MAPK-ERK μονοπατιού έπειτα από μιτογόνο ερέθισμα. Θα υπάρξει εκτενής αναφορά σε αυτό το παράδειγμα παρακάτω (βλ. παράγραφο 1.1).

1.1 Ο μεταγραφικός παράγοντας ERF (ETS-2 repressor factor) και η βιολογική λειτουργία του.

Ο ERF αποτελεί μέλος της οικογένειας των ETS μεταγραφικών παραγόντων (Sgouras et al. 1998). Είναι ένας ευρέως εκφραζόμενος μεταγραφικός παράγοντας, με ισχυρή κατασταλτική δράση. Αρχικά απομονώθηκε ως ένας παράγοντας που προσδένεται στην ETS περιοχή πρόσδεσης του υποκινητή του *Ets2* γονιδίου (Mavrothalasitis et al.). Η ομολογία που παρουσιάζει με τα υπόλοιπα μέλη της ETS οικογένειας περιορίζεται αποκλειστικά στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA (ETS binding domain). Εξάίρεση αποτελεί ο PE-1/METS, ο οποίος είναι επίσης μεταγραφικός καταστολέας της ίδιας οικογένειας και παρουσιάζει πολύ υψηλή ομολογία με τον ERF.

Το ERF γονίδιο στον άνθρωπο αλλά και στο ποντίκι αποτελείται από 4 εξόνια τα οποία καταλαμβάνουν μια περιοχή 10Kb στο γονιδίωμα. Η θέση του γονιδίου ERF στον άνθρωπο είναι στο χρωμόσωμα 19q13.1, ενώ στο ποντίκι στο χρωμόσωμα 7. Η ομολογία μεταξύ ανθρώπινου και ποντικίσου ERF γονιδίου είναι αρκετά υψηλή περίπου 90% συμπεριλαμβανομένου και της κωδικής περιοχής και του υποκινητή. Η ομολογία μεταξύ της ανθρώπινης και ποντικίσιας ERF πρωτεΐνης είναι πολύ υψηλότερη αγγίζοντας το 98%. Μεταξύ των δυο πρωτεϊνών υπάρχει και μια διαφορά στον αριθμό των αμινοξέων που τις αποτελούν. Η ανθρώπινη ERF πρωτεΐνη αποτελείται από 551 αμινοξέα έναντι 548 της ποντικίσιας (Liu et al. 1997). Το mRNA του έχει μήκος 2,8Kb στο ποντίκι και κωδικοποιεί μια φωσφοπρωτεΐνη 548 αμινοξέων με πολύ ισχυρή κατασταλτική δράση. Στο αμινοτελικό άκρο της εμπεριέχεται η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD), κεντρικά βρίσκονται τα μοτίβα μέσω των οποίων αλληλεπιδρά με τις ERK και στο καρβοξυτελικό άκρο της η περιοχή μεταγραφικής καταστολής. Η λειτουργικότητα του ERF ρυθμίζεται από μιτογόνα ερεθίσματα μέσω του μονοπατιού Ras/Raf/MAPK/EPK (Sgouras et al. 1995). Ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού οδηγεί στην φωσφορυλίωσή του ERF από την ERK. Ο ERF φωσφορυλιώνεται *in vivo* και *in vitro* από την ERK. Πρόσφατα δείχθηκε ότι ο ERF αλληλεπιδρά με την ERK2 μέσω 2 FxF μοτίβων που έχει στο κεντρικό κομμάτι του, στις θέσεις 303-305 και 375-377. Ο ERF αλληλεπιδρά και με τις δυο μορφές της ERK, την ενεργή pERK και την ανενεργή ERK. Κατά την αλληλεπίδραση με την ενεργή μορφή της ERK συμμετέχουν και τα δυο FxF μοτίβα του ERF, ενώ στην αλληλεπίδραση με την ανενεργή ERK μόνο το ένα FxF μοτίβο. Με την

ενεργή ERK ο ERF αλληλεπιδρά με 5 φορές μεγαλύτερη συγγένεια απ' ότι με την ανενεργή μορφή της. Οι θέσεις στις οποίες ο ERF φωσφορυλιώνεται είναι οι S161, S246, S284, S251, T526. (Polychronopoulos et al. 2006) (Εικόνα 2.).

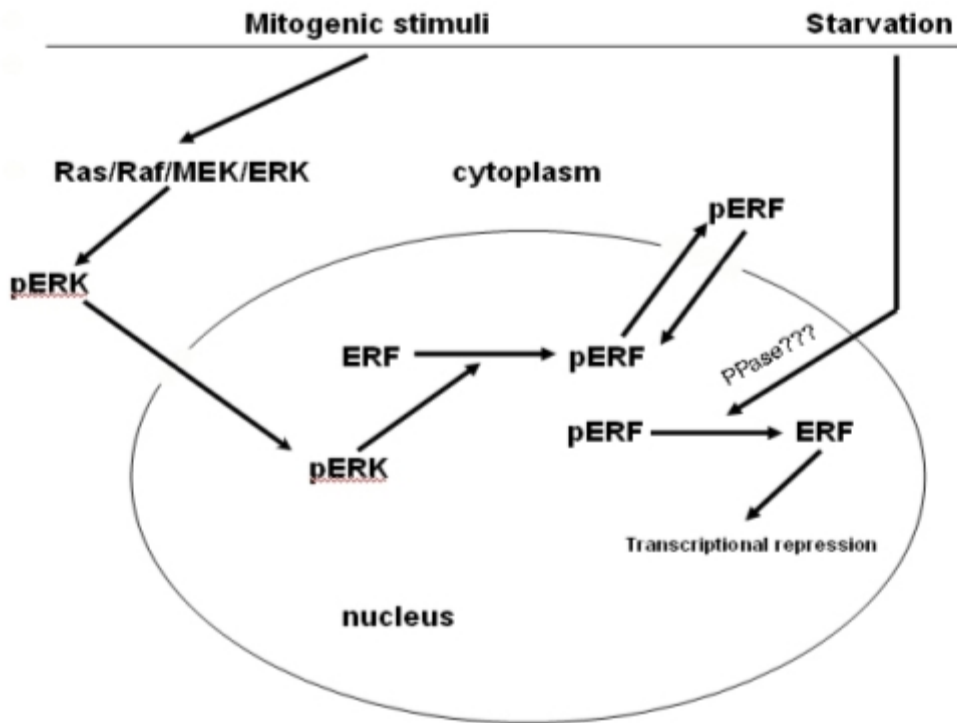


Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του ERF μεταγραφικού παράγοντα. Με μαύρο κύκλο απεικονίζονται τα σημεία in vivo φωσφορυλίωσης και με μαύρο τρίγωνο τα δυο Fx/F μοτίβα με τα οποία αλληλεπιδρά με την ERK.

Η φωσφορυλίωση του ERF από την ERK, καθορίζει την κυτταρική θέση του και εμμέσως την λειτουργία του. Κατά την φωσφορυλίωση του ο ERF μεταναστεύει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Με αναστολείς της ERK η μετανάστευση αυτή αναστέλλεται. Χαρακτηριστικό είναι ότι ο ERF δεν εμπεριέχει NES (πυρηνικό σήμα εξόδου) και η πυρηνική έξοδος του είναι CRM1 εξαρτώμενη. Αντίστοιχα σε συνθήκη έλλειψης ορού ο ERF αποφωσφορυλιώνεται μεταναστεύει στον πυρήνα όπου και παραμένει (εικόνα 3.).

Σε μελέτη ποντικών που έφεραν το ελλειμματικό γονίδιο ERF δείχθηκε ότι ο ERF σχετίζεται με εκτοδερμική εξωεμβρυική διαφοροποίηση. Από την μελέτη αυτή φάνηκε ότι ο ERF έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων που σχετίζονται με την δημιουργία του πλακούντα (τροφοβλαστικά αρχέγονα, βλαστικά εξωεμβρυικά και εξωπλακουντικά κύτταρα) (Paradaki et al. 2007). Μεταλλαγμένη μορφή του ERF (M1-7) σε όλα τα σημεία φωσφορυλίωσης απέδειξε ότι μπορεί να αναστείλει την Ras επαγόμενη καρκινογένεση και να οδηγήσει τα κύτταρα στη φάση ηρεμίας G0 του κυτταρικού κύκλου αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε πειράματα του εργαστηρίου που τώρα είναι υπό δημοσίευση αποδείχθηκε ότι μέρος της αναστολής αυτής επιτυγχάνεται μέσω της καταστολής του c-myc γονιδίου από τον ERF. Επίσης δείχθηκε ότι η καταστολή αυτή είναι Rb εξαρτώμενη, διότι σε ελλειμματικά ως προς την Rb κύτταρα ο ERF έπαψε να προσδένεται και να καταστέλλει το c-myc (προς δημοσίευση αποτελέσματα).

Φαίνεται λοιπόν πως ο ERF μεταγραφικός παράγοντας έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο και κατέχει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της φάσης G0-G1 του κυτταρικού κύκλου (Lionel Le Gallie et. al. 1999).

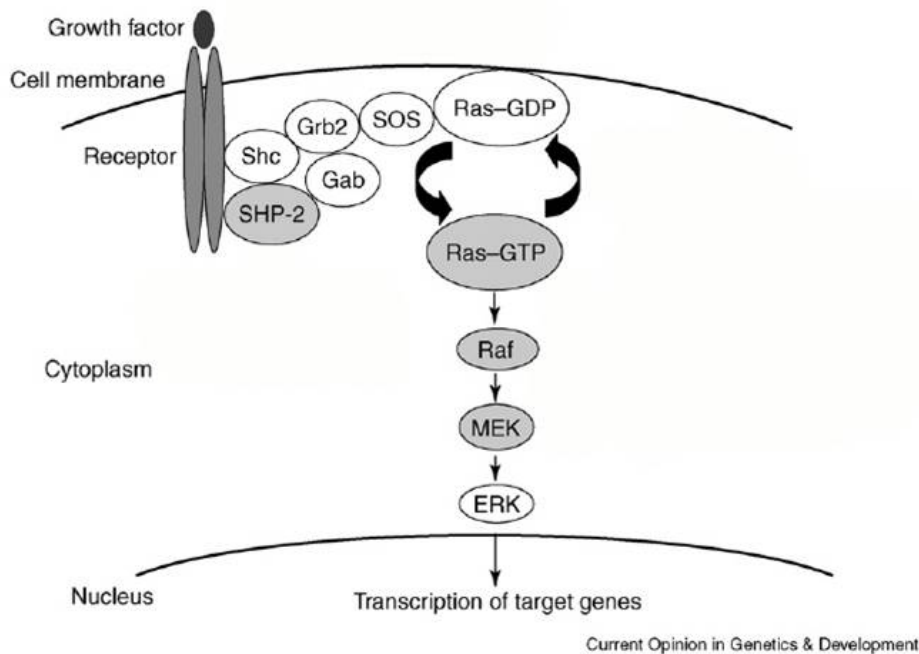


Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της κυτταρικής τοπολογίας του ERF. Έπειτα από μιτογόνο ερέθισμα σε συνθήκη παρουσίας ορού, ο ERF φωσφορυλιώνεται από την pERK και μεταναστεύει στο κυτταρόπλασμα. Αντίστοιχα σε συνθήκη έλλειψης ορού ο ERF αποφωσφορυλιώνεται στον πυρήνα όπου και παραμένει.

1.2 Ενδοκυτταρικό σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK/ERK.

Βιολογικές διαδικασίες όπως κυτταρικός πολλαπλασιασμός, απόπτωση και διαφοροποίηση διαμεσολαβούνται μέσω ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα μονοπάτια αυτά αναλαμβάνουν τον συντονισμό των βιολογικών αυτών διεργασιών μέσω της μεταγωγής του σήματος καθοδικά, από τον υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης στον πυρήνα. Οι αυξητικοί παράγοντες αποτελούν ενεργοποιητές των υποδοχέων της κινάσης τυροσίνης (RTK, Receptor tyrosine kinase) που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου. Οι RTK υποδοχείς δομικά χαρακτηρίζονται από μια διαμεμβρανική περιοχή, μια εξωκυτταρική περιοχή μέσω της οποίας γίνεται η πρόσδεση των συνδετών (αυξητικοί παράγοντες) και τέλος μια ενδοκυτταρική περιοχή που διαθέτει την ενεργότητα κινάσης. Κατά την σύνδεση των αυξητικών παραγόντων στον υποδοχέα επάγεται ο διμερισμός του στην κυτταρική μεμβράνη όπου και αυτόφωσφορυλιώνεται στα κατάλοιπα τυροσίνης του. Έπειτα το φωσφορυλιωμένο ενδοκυτταρικό κομμάτι του υποδοχέα στα κατάλοιπα τυροσίνης αναγνωρίζεται και αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο προσαρμογής SHC-Grb2-SOS. Μετα την πρόσδεση του συμπλόκου ο συνδέτης SOS μετατρέπει την ανενεργή Ras (Ras-GDP) στην ενεργή μορφή της (Ras-GTP). Η μετατροπή αυτή γίνεται μέσω της αποδέσμευσης από την Ras

του GDP και αλληλεπίδρασης της πλέον με GTP. Η συνάφεια της ελεύθερης Ras οσον αφορά την πρόσδεση GTP εναντι GDP είναι 10 φορές μεγαλύτερη. Η ενεργή πλέον Ras-GTP φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την Raf κινάση, η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την MEK κινάση και αυτή με την σειρά της την ERK κινάση. Η φωσφορυλιωμένη και ενεργή μορφή της ERK μεταναστεύει στον πυρήνα όπου και φωσφορυλιώνει μεταγραφικούς παράγοντες υπεύθυνους για την ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Στόχοι της φωσφορυλιωμένης μορφής της ERK αποτελούν και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, της μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος. (Kolch Nature 2005, Yang et.al. Gene 2003). Αρνητικοί ρυθμιστές του μονοπατιού αυτού αποτελούν τα ένζυμα φωσφατάσες (**Εικόνα 4**).



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού Ras/Raf/MEK/ERK. (Schubbert et.al)

Σημαντική είναι η διάρκεια μεταγωγής του σήματος μέσω Ras/Raf/MEK/ERK μονοπατιού. Πειράματα σε κύτταρα PC12 φεοχρωμοκυττώματος αρρουαίου, έχουν δείξει ότι παροδική ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού οδηγεί τα κύτταρα σε πολλαπλασιασμό ενώ μόνιμη ενεργοποίηση οδηγεί τα κύτταρα αυτά σε διαφοροποίηση (Murphy et.al. 2006).

1.3 Τα Olig γονίδια και η βιολογική λειτουργία τους.

Η οικογένεια των Olig γονιδίων περιλαμβάνει 3 μέλη, το Olig1, Olig2, Olig3. Το Olig3 ανακαλύφθηκε πολύ πρόσφατα και ελάχιστα πράγματα είναι γνωστά γι αυτό. Οστόσο τα Olig1 και Olig2 αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες και αρχικούς μάρτυρες της ολιγοδενδροκυτταρικής σειράς. Είναι παράγοντες με δομή έλικας-βρογχου-έλικας (bHLH) και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση και διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων. Τα Olig1 και Olig2 γονίδια βρίσκονται αντικριστά στο χρωμόσωμα 16 στο ποντίκι και στο χρωμόσωμα 21 στον άνθρωπο. Η απόσταση που τα χωρίζει και στις δυο περιπτώσεις είναι περίπου 40Kb. Τα Olig1 και Olig2 εκφράζονται από την ημέρα 8,5 στην ποντικίσια σπονδυλική στήλη (Lu et al. Cell 2002). Εκφράζονται και στα πρόδρομα νευρικά αλλά και στα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα.

Το Olig2 είναι δομικά πολύ καλά συντηρημένο από τον άνθρωπο έως την δροσόφουλα και τα νηματώδη σκουλίκια. Το Olig1 φαίνεται να είναι εξελικτικά πιο πρόσφατο και να έχει προέλθει από γονιδιακό διπλασιασμό του Olig2. Δεν έχει βρεθεί ορθόλογο του Olig1 στα πουλερικά (chicken) και στο zebrafish. Οι παρατηρήσεις αυτές υποθέτουν ότι το Olig2 είναι το αρχεγονο Olig γονίδιο. Οι ανθρώπινες OLIG1 και OLIG2 πρωτεΐνες παρουσιάζουν 80% ομολογία στην επικράτεια που διαμορφώνει την δομή έλικας-βρογχου-ελίκας (bHLH domain),(Zhou et al. 2002, Takebayashi et al. 2002b, Lu et al 2001, Lu et al. 2002).

Τα Olig γονίδια στον εμβρυϊκό νευρικό σωλήνα ρυθμίζονται από την γλυκοπρωτεΐνη Shh. Η τελευταία παράγεται από την κοιλιακή μεσογραμμή και πιο συγκεκριμένα από την νοτοχορδή και floorplate. Τα Olig1 και 2 επάγουν την έκφραση του Sox10, ενός μεταγραφικού παράγοντα απαραίτητου για την ωρίμανση και τελική διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων. Ο Sox10 εκφράζεται στα πρόδρομα κύτταρα της γλοίας αλλά και στα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα. (Stolt et al. 2002, Kuhlbrodt et al. 1998).

Το Olig1 ευθύνεται για την διαμόρφωση των ολιγοδενδροκυττάρων στον εγκεφαλικό φλοιό στα ποντίκια (Lu et al. 2001). Τα Olig1 ελλειμματικά ποντίκια είναι βιώσιμα και γονιμα και παρουσιάζουν μόνο καθυστέρηση στην ωρίμανση των ολιγοδενδροκυττάρων. Αυτό σημαίνει ότι το γονίδιο αυτό δεν είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του υγιούς νευρικού συστήματος. Ο μεταγραφικός παράγοντας Olig2 είναι απαραίτητος για την εξειδίκευση των ολιγοδενδροκυττάρων αλλά και των κινητικών νευρώνων κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης των θηλαστικών. Ελλειμματικά ποντίκια ως προς το Olig2 πεθαίνουν κατά την γέννηση εξαιτίας των παθητικών κινητικών νευρώνων. Μελέτες στα ελλειμματικά ως προς το Olig2 έδειξαν ότι το γονίδιο αυτό είναι απαραίτητο για την ολιγοδενδρογιογένεση στην σπονδυλική στήλη ενώ το Olig1 για την διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων στον εγκέφαλο. Το Olig2 εμπλέκεται και στην εξειδίκευση των κινητικών νευρώνων ενώ το Olig1 δεν σχετίζεται καθόλου με αυτούς. Επίσης κανένα από τα Olig γονίδια δεν είναι απαραίτητα για τα αστροκύτταρα. Τα πρόδρομα των ολιγοδενδροκυττάρων μπορούν να διαφοροποιηθούν εκτός από ολιγοδενδροκύτταρα και σε νευρώνες αλλά όχι σε αστροκύτταρα. (Lu et al 2001, 2002, Takebayashi et al. 2002, Zhou and Anderson 2002). Τα Olig1 και 2 συνεκφράζονται στα κύτταρα της ολιγοδενδροκυτταρικής σειράς. Επίσης τα γονίδια αυτά συνεχίζουν να εκφράζονται στα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα, υπονοώντας ότι έχουν

λειτουργία και στον ενήλικο εγκέφαλο και σπονδυλική στήλη ανεξάρτητα από τον ρόλο τους στην ανάπτυξη.

Με ανοσοιστοχημικές μεθόδους έχει ταυτοποιηθεί ότι η Olig2 πρωτεΐνη βρίσκεται στον πυρήνα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης αλλά και στο ενήλικο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ενώ η Olig1 πρωτεΐνη στα ολιγοδενδροκύτταρα και στα πρόδρομα αυτών στο ποντίκι, είναι πυρηνική κατά την P1 ημέρα (νεογέννητο) και έπειτα από 2 εβδομάδες γίνεται κυρίως κυτταροπλασματική, ενώ στον ενήλικο εγκέφαλικό φλοιό είναι αποκλειστικά κυτταροπλασματική. In vitro μελέτες σε κυτταρικές σειρές νεογέννητων ολιγοδενδροκυττάρων έδειξαν ότι κατά την διαφοροποίηση και ωρίμανση των πρόδρομων κυττάρων σε ολιγοδενδροκύτταρα η Olig1 πρωτεΐνη γίνεται όλο και περισσότερο κυτταροπλασματική. Στα πρόδρομα ολιγοδενδροκυτταρικά τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας η OLIG1 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ τα ίδια κύτταρα όταν στρατολογούνται σε κομβικά σημεία προς μυελινοποίηση η OLIG1 πρωτεΐνη είναι πυρηνική (Glia 2006). Η διαφορετική τοποθεσία των Olig1 και 2 έχει επιβεβαιωθεί και στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Παρόλο που τα ελλειμματικά ποντίκια ως προς το Olig1 γονίδιο αναπτύσσουν υγιές νευρικό σύστημα, το olig1 είναι απαραίτητο για την επαναμυελινοποίηση των αξόνων στους νευρώνες. Η απουσία του Olig1 δεν εμποδίζει την μετανάστευση και στρατολόγηση των πρόδρομων κυττάρων, ούτε και την έκφραση του Olig2 γονιδίου. Εμποδίζει όμως την διαφοροποίησή τους σε ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα και την μυελινοποίηση των αξόνων κατά την επιδιόρθωση και όχι κατά την ανάπτυξη (Arnett et.al. 2004).

Σε μια πιο πρόσφατη αναφορά υποστηρίζεται ότι τα ελλειμματικά ως προς το Olig1 γονίδιο ποντίκια, παρουσιάζουν διάφορα νευρολογικά προβλήματα, όπως τρέμουλο και μειωμένη αντίληψη και πεθαίνουν κατα την P14 ημέρα μετά την γέννησή τους. Στον εγκέφαλο των ελλειμματικών αυτών ποντικών ενώ δεν εκφράζονται γονίδια χαρακτηριστικά για την μυελινογένεση (Mbp, Plp1, Mag) δεν επηρεάζεται η δημιουργία των πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων. Τα ολιγοδενδροκύτταρα δεν στρατολογούνται στους άξονες των νευρώνων και για τον λόγο αυτό οι νευρώνες εκφυλίζονται και το ποντίκι πεθαίνει. Αντίθετα όμως στην σπονδυλική στήλη στα ελλειμματικά αυτά ποντίκια, τα ολιγοδενδροκύτταρα στρατολογούνται στους άξονες, η μυελινική καλύπτρα διαμορφώνεται αλλά η επαναμυελινοποίηση των αξόνων είναι μειωμένη. Το Olig1 γονίδιο επίσης, αναστέλλει την έκφραση του Gfap γονιδίου, που αντιπροσωπεύει τον κύριο αστροκυτταρικό μάρτυρα. Στα διπλά ελλειμματικά Olig1/Olig2 ποντίκια, δεν υπάρχουν ολιγοδενδροκύτταρα σε κανένα σημείο του εγκέφαλου. Αυτό υποδεικνύει την σπουδαιότητα των γονιδίων αυτών κατά την διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων κατά την ανάπτυξη (Xin et.al. 2005).

1.3.1 Έλεγχος των Olig γονιδίων από τις Id πρωτεΐνες.

Στα πρόδρομα κύτταρα OPCs, οι Olig1 και Olig2 παράγοντες εκφράζονται αλλά βρίσκονται σε ανενεργή μορφή υπο την μορφή συμπλόκου με τις Id πρωτεΐνες. Οι Id είναι πρωτεΐνες με δομή έλικας-βρογχου-έλικας και αλληλεπιδρούν με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες με την ίδια δομή αναστέλλοντας την πρόσδεσή τους στους υποκινητές στο DNA και επομένως την μεταγραφή των γονιδίων. Κατά την έναρξη της διαφοροποίησης οι Id πρωτεΐνες παύουν να αλληλεπιδρούν και να αναστέλλουν τις Olig 1 και 2 πρωτεΐνες. Υπάρχουν 4 ισομορφές των Id πρωτεϊνών (1,2,3,4), αλλά μόνο οι 2

και 4 έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρούν με τις Olig πρωτεΐνες. Η έκφραση της Id4 είναι πολύ υψηλή στα πρόδρομα OPCs και εξαφανίζεται ολοκληρωτικά όταν αυτά ωριμάζουν κατά την διαφοροποίηση. Η αλληλεπίδραση της Id4 με τις Olig1 και Olig2 μεσολαβεί στον πυρήνα (Samanta et al. 2004). Άλλες αναφορές δείχνουν ότι η Id2 πρωτεΐνη όταν βρίσκεται στον πυρήνα αποτελεί πολύ ισχυρό αναστολέα της ωρίμανσης των ολιγοδενδροκυττάρων ενώ κατά την έναρξη της διαφοροποίησης μεταναστεύει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Wang, et al. 2001).

1.3.2. Olig γονίδια και ασθένειες.

Τα γλοιώματα αποτελούν καρκίνους των κυττάρων της γλοίας ή των προδρόμων αυτής. Κατατάσσονται σε αστροκυττώματα, ολιγοδενδρογλοιώματα και μια πρόσμιξη των δυο που είναι τα ολιγοαστροκυττώματα.

Σε όλα τα γλοιώματα η έκφραση των Olig γονιδίων είναι υψηλότερη συγκρινόμενη με την φυσιολογική. Οστόσο στα ολιγοδενδρογλοιώματα έχει παρατηρηθεί η υψηλότερη έκφραση των mRNA επιπέδων Olig1 και Olig2, συγκρινόμενη με εκείνη του αστροκυττώματος και του ολιγοαστροκυττώματος. Εξαιτίας της υψηλής έκφρασης σε όλα τα γλοιώματα δεν μπορούν τα γονίδια αυτά από μόνα τους να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες προσδιορισμού του καρκινικού τύπου.

Η σκλήρυνση είναι μια ακόμη ασθένεια που πιθανώς να σχετίζεται με τα γονίδια αυτά. Τα ελλειμματικά ως προς το Olig1 είναι ανίκανα να επαναμυελινοποιήσουν την σπονδυλική στήλη ενήλικου ποντικού (Ligon et al. 2006). Τα ολιγοδενδροκυτταρα είναι κύτταρα του εγκεφάλου που περιβάλλουν τους άξονες των νευρώνων και διαμορφώνουν το μυελινικό περίβλημα (myelin sheath). Το μυελινικό περίβλημα έχει ως λειτουργία την αύξηση του βαθμού μεταγωγής του νευρικού τόνου. Σε ασθένειες όπως η σκλήρυνση, τα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα πεθαίνουν και το μυελινικό περίβλημα καταστρέφεται. Για την επιδιόρθωση του στρατολογούνται πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα (OPCs) τα οποία διαφοροποιούνται σε ώριμα και δημιουργούν εκ νεου το περίβλημα. Η επαναμυελινοποίηση αρχίζει με τον πολλαπλασιασμό, την στρατολόγηση και μετανάστευση των πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων στα σημεία της βλάβης όπου θα γίνει η επιδιόρθωση. Τα πρόδρομα στα σημεία αυτά ωριμάζουν σε ολιγοδενδροκύτταρα και διαμορφώνουν το περίβλημα στους άξονες των νευρώνων. Στην περίπτωση της σκλήρυνσης το νέο περίβλημα είναι λεπτότερο και μικρότερο απ'ότι το φυσιολογικό. Η αιτία της μη φυσιολογική επαναμυελινοποίησης των νευρώνων είναι άγνωστη, πιστεύεται όμως ότι οφείλεται στο ότι τα πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα δεν ωριμάζουν πλήρως (Wegner et al. 2001, Wegner et al. 2000, Xin et al. 2005)

Σημαντικό είναι ότι περίπου 2,5 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από σκλήρυνση. Για να μπορέσει να εξυγιανθεί ο μηχανισμός μυελινοποίησης των αξόνων θα πρέπει αρχικά να διαλευκανθεί ο μηχανισμός δημιουργίας των ολιγοδενδροκυττάρων.

1.4. Σύνοψη.

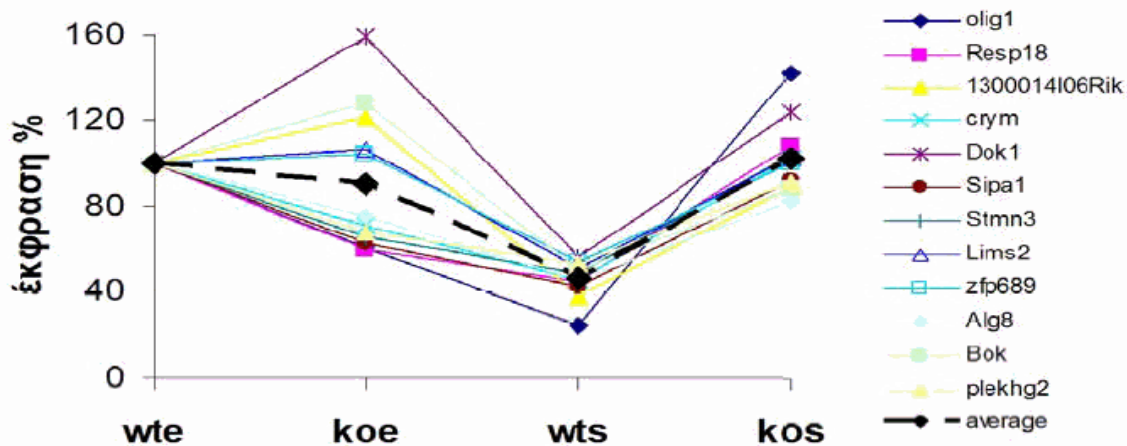
Ο μεταγραφικός παράγοντας ERF (ETS2 Repressor Factor) αποτελεί μέλος της οικογένειας των ETS πρωτεϊνών με ισχυρή κατασταλτική δράση (Sgouras et al., 1995). Εκφράζεται σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και η δράση του ρυθμίζεται από το μονοπάτι Ras/ERK, μέσω αλλαγής της υποκυτταρικής του κατανομής (Le Gallie et al., 1999; Sgouras et al., 1995). Η αλληλεπίδραση του με την ERK κινάση πραγματοποιείται μέσω δύο ειδικών FXF μοτίβων που βρίσκονται στην κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης (Polychronopoulos et al., 2006). Μεταλλαγμένες μορφές της ERF πρωτεΐνης, είτε στις θέσεις φωσφορύλιωσης, είτε στις θέσεις πρόσδεσης στην ERK οδηγούν σε πυρηνική κατανομή της και κατά συνέπεια τα μεταλλάγματα αυτά αποτελούν μονίμως ενεργές μορφές της. Τέτοιου τύπου τροποποιημένες πρωτεΐνες έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο ινοβλαστικών κυττάρων, καθώς και να αντιστρέφουν τον μετασχηματισμό ινοβλαστών που φέρουν μεταλλαγές για μονίμως ενεργό μονοπάτι Ras και παρεμποδίζουν την ανάπτυξη όγκων σε αθυμικά ποντίκια (Le Gallie et al., 1999; Polychronopoulos et al., 2006). Τα παραπάνω καθιστούν τον ERF ως μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη. Παράλληλα, *in vivo* μελέτες σε ποντίκια, έδειξαν ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για την επιβίωση των εμβρύων, αφού έλλειψή της οδηγεί στο θάνατό τους κατα τη μέρα 10 της εμβρυογένεσης. Ανάλυση των ελλειμματικών ως προς τον ERF εμβρύων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη του πλακούντα είναι ελαττωματική και πως η διαφοροποίηση των πρώιμων τροφοβλαστικών κυττάρων δεν είναι πλήρης.

Αντίστοιχα το Olig1 αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα με δομή έλικας-βρόχου-έλικας. Σχετίζεται με την διαφοροποίηση και ωρίμανση των ολιγοδενδροκυττάρων από πρόδρομα ολιγοδενδροκυτταρικά. Επιπρόσθετα φαίνεται πως έχει σημαντικό ρόλο στην μυελινοποίηση των αξόνων των νευρώνων. Ελλειμματικά ως προς το γονίδιο αυτό ποντίκια είναι ανίκανα να μυελινοποιήσουν τους νευρώνες και πεθαίνουν κατά την P14 ημέρα μετά την γέννησή τους. Επίσης το Olig1 είναι απαραίτητο και για την διαφοροποίηση των πρόδρομων νευρικών σε ολιγοδενδροκύτταρα, στο ενήλικο ποντίκι. Επίσης η κυτταρική τοπολογία της OLIG1 πρωτεΐνης είναι διαφορετική ανάλογα το στάδιο διαφοροποίησης. Κυτταροπλασματική σε κατάσταση ηρεμίας και πυρηνική κατά την έναρξη της διαφοροποίησης των πρόδρομων νευρικών και κατά την μυελινοποίηση.

1.5. Συσχετισμός του ERF και Olig1 γονιδίου.

Τα γονίδια αυτά συσχετίζονται βάση πειραμάτων του εργαστηρίου (διδασκαρικό Βερυκοκάκη) που δείχνουν πως ο ERF προσδένεται και καταστέλλει το Olig1 γονίδιο. Οι πειραματισμοί που υποστηρίζουν την υπόθεση αυτή είναι οι εξής :

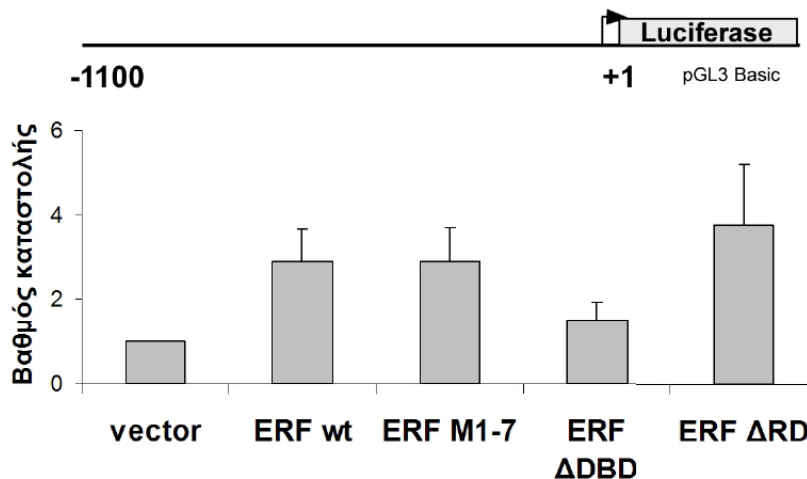
Έγινε πείραμα cDNA υβριδοποίησης μικροσυστοιχιών, αγρίου τύπου και ελλειμματικών ως προς τον ERF πρωτογενών ποντικίστων ινοβλαστών (MEFs E9.5), και ακολούθησε σύγκριση των μεταγραφικών προτύπων των δυο αυτών κυτταρικών πληθυσμών. Μετά από ανάλυση προέκυψαν πιθανά γονίδια στόχοι του ERF. Ένα από τα γονίδια φάνηκε να είναι και το Olig1, καταλαμβάνοντας μάλιστα την πρώτη υποψήφια θέση γονιδίου στόχου (εικόνα 5.)



Εικόνα 5. Ανάλυση των αποτελεσμάτων και συγκριτική μελέτη των γονιδίων των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται ανάλογα την συνθήκη σύμφωνα με το πείραμα των cDNA μικροσυστοιχιών. Φαίνεται πως σε συνθήκη έλλειψης ορού στους ελλειμματικούς ως προς τον ERF πρωτογενής ποντικίστους ινοβλάστες ημέρας 9,5 εμβρυϊκής ανάπτυξης το Olig1 παρουσιάζει την υψηλότερη έκφραση, ενώ στα αγρίου τύπου στην ίδια συνθήκη παρουσιάζει την μικρότερη έκφραση σε σχέση με τα φυσιολογικά.

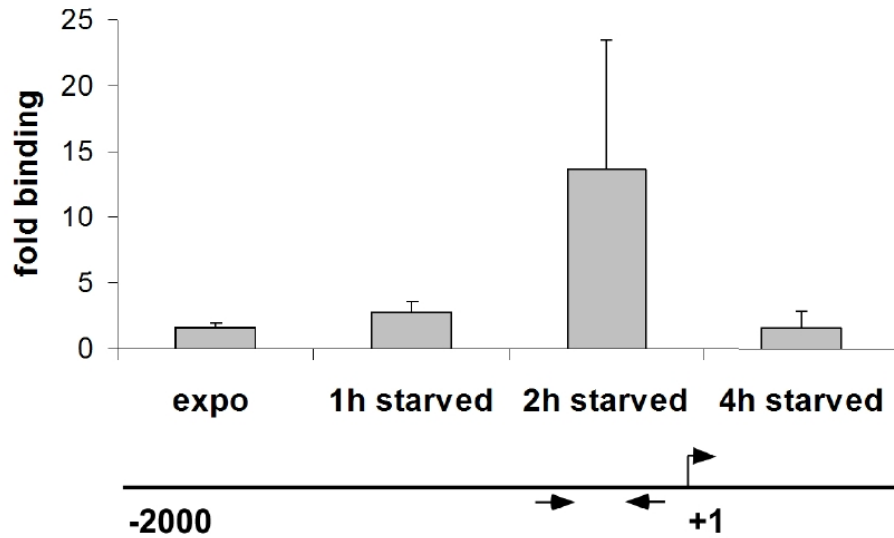
Το αποτέλεσμα των μικροσυστοιχιών επιβεβαιώθηκε και με ποσοτικοποίηση των Olig1 mRNA επιπέδων (QPCR) όπου και φάνηκε πως στους ελλειμματικούς ως προς τον ERF ινοβλάστες ανεξαρτήτως συνθήκης, η έκφραση του olig1 γονιδίου ήταν υψηλότερη συγκριτικά με τα αγρίου τύπου σε συνθήκη έλλειψης ορού.

Σε πειράματα παροδικών διαμολυνσεων σε REF1 κύτταρα και έλεγχο της ενεργότητας λουσιφεράσης, χρησιμοποιήθηκε ένα τμήμα μήκους 1100 περίπου βάσεων της 5' περιοχής του Olig1 γονιδίου. Σε συνθήκη παρουσίας ορού φάνηκε ότι ο ERF αγρίου τύπου προσδένεται στον υποκινητή του olig1 και καταστέλλει το γονίδιο αναφοράς. Αντίστοιχα ο μεταλλαγμένος σε όλες τις θέσεις φωσφορυλίωσης M1-7 και αποκλειστικά πυρηνικός καταστέλλει σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό. Η καταστολή φάνηκε να διατηρείται στο μετάλλαγμα στο οποίο έλλειπε το κατασταλτικό κομμάτι του ERF, ενώ απουσία της DNA δεσμευμένης περιοχής η καταστολή καταργήθηκε (εικόνα 6).



Εικόνα 6. Επίδραση του ERF και των μεταλλαγών του στην ενεργότητα του Olig1 υποκινητή.

Σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε πρωτογενείς καλλιέργειες ινοβλαστών ποντικού, φαίνεται πως ο ERF προσδένεται στον *Olig1* υποκινητή στο μέγιστο βαθμό μετά από 2 ώρες ελλείψεως ορού, ενώ τα επίπεδα του μειώνονται ύστερα από 4 ώρες (εικόνα 7.).



Εικόνα 7. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με anti-ERF αντίσωμα σε κανονικές συνθήκες ή μετά από 1, 2 ή 4 ώρες απουσίας ορού. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνεται σχηματικά η γενωμική περιοχή του *Olig1* και τα βέλη αντιπροσωπεύουν το ζευγάρι των εκκινητών. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό λάθος.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.1 Τεχνικές ανασυνδυασμού DNA

2.1.1 Ενζυματικοί χειρισμοί του DNA:

Οι ενζυματικοί χειρισμοί έγιναν σύμφωνα τα εργαστηριακά εγχειρίδια Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 2nd Edition (Sambrook et al. 1989), Molecular cloning-Maniatis και σύμφωνα με τις οδηγίες των εταιριών που διέθεσαν τα ένζυμα.

- Πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα – ενδονουκλεάσες. Τα ένζυμα διατέθηκαν από τις εταιρίες NEB-Biolabs, Minotech, Bohremingher.
- Υδρόλυση των 5' ελεύθερων φωσφορικών ομάδων του DNA με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Η αλκαλική φωσφατάση ήταν της εταιρίας Roche (cat. No 11 758 250 001)
- Τροποποίηση των DNA άκρων με Klenow DNA Pol I , διατέθηκε από την εταιρία Minotech.
- Αντίδραση συγκόλλησης των συνεκτικών άκρων του DNA με το ένζυμο T4 DNA λιγάση, διατέθηκε από την εταιρία Minotech.

2.1.2 Διαχωρισμός νουκλεϊκών οξέων μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής αγαρόζης.

2.1.3 Μετασηματισμός βακτηριακών στελεχών DH5a, DH10b της E.coli

2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

2.2.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης.

Με αποστειρωμένο ξυλάκι παίρνουμε μια βακτηριακή αποικία από το LB πιάτο με το αντίστοιχο απαραίτητα αντιβιοτικό. Πριν εμβολιάσουμε σε υγρή καλλιέργεια χαράσσουμε 2 γραμμές στο αντίστοιχο αριθμημένο σημείο του πιάτου που αντιπροσωπεύει την ανάλογη υγρή και το επωάζουμε ολονύκτια. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να διατηρήσουμε τους πιθανούς κλώνους για πάρα πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα στους 4°C χωρίς να μολυνθούν. Ταυτόχρονα γίνονται και οι αντίστοιχοι εμβολιασμοί σε γυάλινα σωληνάκια που περιέχουν LB και το αντίστοιχο αντιβιοτικό. Μετά την ολονύκτια επώαση μεταφέρουμε 1,5ml από την υγρή καλλιέργεια σε σωληνάκι erppendorf και φυγοκεντρούμε στις 13.000rpm για ένα λεπτό. Επαναδιαλύουμε το ίζημα

των κύτταρων με την συσκευή vortex σε 200μl διαλύματος P1 στο οποίο έχει προστεθεί νουκλεάση για RNA (RNase I) σε τελική συγκέντρωση 0,1mg/ml. Μετά την πλήρη επαναδιάλυση προστίθενται 200μl διαλύματος P2, ακολουθεί προσεκτική ανακίνηση και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 λεπτά. Μετά την πάροδο των τεσσάρων λεπτών προστίθενται 200μl παγωμένου διαλύματος P3, ανακινείται έντονα και αφήνεται στον πάγο για 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 10 λεπτά. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf και προσθήκη 500μl διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου. Ακολουθεί καλή ανακίνηση με vortex και 10 λεπτά φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και προστίθενται 1/10 του όγκου οξικό νάτριο και 2,5 όγκοι απόλυτη αιθανόλη. Αφήνεται το DNA να κατακρημνιστεί για τουλάχιστον μισή ώρα στους -80°C, και έπειτα φυγοκεντρείται για 30 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4°C στη μέγιστη ταχύτητα. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα πλένεται 2 φορές με 70% αιθανόλη. Τέλος το ίζημα που αποτελεί το πλασμίδιο επαναδιαλύεται σε 50μl TE.

TE , pH=8

10mM Tris Cl , pH=8

1mM EDTA, pH=8

P1 Buffer (Resuspension Buffer) : 50mM Tris-HCl pH=8, 10mM EDTA, 100μg/ml RNase A

P2 Buffer (Lysis Buffer) : 200mM NaOH, 1% SDS

P3 Buffer (Neutralization buffer) : 3M Potassium acetate, pH=5,5

2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα με την μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης σε κλίση με χλωριούχο καίσιο και βρωμιούχο αιθίδιο.

Εμβολιασμός σε 400ml υγρής καλλιέργειας LB με το απαραίτητο αντιβιοτικό ανα την περίπτωση και ολονύκτια επώαση στους 37°C. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 5000 στροφές για 10 λεπτά. Το ίζημα επαναδιαλύεται πλήρως σε 5ml διαλύματος P1. Προσθήκη 10ml διαλύματος P2, ήπια ανακίνηση και αφήνεται για 4-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετα την πάροδο αυτή προστίθενται 7,5ml παγωμένου διαλύματος P3 και ανακινείται έντονα. Αφήνεται στον πάγο για 10 λεπτά. Φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Sorvall για 15 λεπτά στις 10.000 στροφές. Το υπερκείμενο έπειτα φιλτράρεται με γυαλοβάμβακα σε χωνί για να κατακρατηθούν τα υπολείμματα. Προστίθενται 0,7 όγκοι ισοπροπανόλης ανακινείται έντονα και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 2000 στροφές. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει. Τέλος επαναδιαλύεται σε 10ml TE. Για κάθε ml TE προστίθεται 1 γραμμάριο χλωριούχο καίσιο. Το διάλυμα ανακινείται έντονα στην συσκευή vortex. Σε ειδικό φιαλίδιο για υπερφυγοκέντρωση μέσω σύριγγας προστίθενται 300μl βρωμιούχο αιθίδιο και το διάλυμα των νουκλεϊκών οξέων με το χλωριούχο καίσιο. Το στόμιο του φιαλιδίου σφραγίζεται προσεκτικά και οδηγείται για υπερφυγοκέντρωση στις 50.000 στροφές για 40 ώρες στους 20 βαθμούς

κελσίου. Για την υπερφυγοκέντρωση χρησιμοποιήθηκε η κεφαλή 70,1 TI. Μετά την υπερφυγοκέντρωση των 2 ημερών διακρίνονται 2 δαχτυλίδια και ένα έντονο ίζημα. Κατά σειρά από πάνω προς τα κάτω του φιαλιδίου, το πρώτο δαχτυλίδι αποτελεί το γενωμικό DNA του βακτηρίου, το δεύτερο δαχτυλίδι το πλασμιδιακό DNA και το ίζημα αποτελεί το RNA. Ακολουθεί απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με σύριγγα τρυπώντας το φυαλίδιο πρώτα στην κορυφή του για να εισχωρήσει αέρας και έπειτα μερικά χιλιοστά κάτω από το δεύτερο δακτύλιο. Αναροφάτε όλος ο δακτύλιος και οδηγείται σε διαδοχικές εκχυλίσεις με κορεσμένη ισοπροπανόλη σε χλωριούχο καΐσιο. Οι πλύσεις συνεχίζονται έως οτου πάψει η άνω φάση καθώς και η οργανική να είναι χρωματισμένες, πλήρη απομάκρυνση βρωμιούχου καΐσιου. Έπειτα προστίθεται μέχρι τα χείλος του erppendorf 70% αιθανόλη και αφήνεται στους -80°C έως ότου παγώσει. Έπειτα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να ξεπαγώσει. Ανακινείται για να επαναδιαλυθεί πλήρως το χλωριούχο καΐσιο και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στη πλήρη ταχύτητα. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα πλένεται 2 φορές με 70% αιθανόλη. Τέλος μετά την πλήρη απομάκρυνση των ατμών αιθανόλης από το ίζημα, επαναδιαλύεται σε 150μl TE.

2.3 Παρασκευή ηλεκτροδεκτικών κυττάρων

200ml θρεπτικού διαλύματος LB* εμβολιάστηκαν με τόσα ml ολονύκτιας καλλιέργειας ώστε η αρχική OD στα 600nm να γίνει 0.05 και επώαστηκαν στους 37°C μέχρι τελικής OD = 0.8. Η καλλιέργεια τοποθετήθηκε στον πάγο για 20 λεπτά και στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 στροφές, στους 4°C , για 15 λεπτά. Ακολουθεί μία σειρά από 4 πλυσίματα των κυττάρων με αποστειρωμένο νερό διπλής απόσταξης με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν στους 4°C . Στο τέλος τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 10% διάλυματος γλυκερόλης, καταψύχθηκαν άμεσα σε μέρη των 50μl σε ξηρό πάγο και φυλάχθηκαν στους -80°C .

Διάλυμα LB* :

10gr Tryptone

5gr εκχυλίσματος ζύμης

2gr NaCl

2.4 Μετασχηματισμός ηλεκτροδεκτικών κυττάρων με electroporation

Τα ηλεκτροδεκτικά κύτταρα αναμίχθηκαν με 1μl από την αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (ligation) ή 1-100ng υπερελικωμένου πλασμιδίου και μεταφέρθηκαν σε ειδική κυβέτα. Το electroporation πραγματοποιήθηκε στα 1800 volts στον electroporator BTX ECM 399. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες στους 37°C , φυγοκεντρήθηκαν στις 2500 στροφές για 5 λεπτά και απλώθηκαν σε βακτηριολογικό τρυβλίο με θρεπτικό υλικό, παρουσία του αντιβιοτικού επιλογής.

2.5 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε είτε με το αντιδραστήριο QX1 της Qiagen, ακολουθώντας τις οδηγίες της εταιρείας, είτε μετά από ψύξη σε φαινόλη. Αφού διαχωρίστηκαν τα προϊόντα του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώθηκε η ζώνη που αντιστοιχεί στο επιθυμητό προϊόν και αναμίχθηκε με ίσο όγκο φαινόλης. Το μίγμα επωάστηκε στους -80°C μέχρι να παγώσει και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 13000 στροφές για 20 λεπτά. Το μίγμα αναμίχθηκε ξανά και η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλη μία φορά. Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο και σε αυτή προστέθηκε ίσος όγκος από φαινόλη/χλωροφόρμιο και 1/10 του όγκου 3M CH_3COONa pH 5.5. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά και στη συνέχεια το DNA κατακρημνίστηκε με 2.5 όγκους αιθανόλης και ξεπλύθηκε με 70% αιθανόλη. Το ίζημα του DNA επαναδιαλύθηκε σε 10μl TE και η ποσότητα του εκτιμήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης. Σε κάθε περίπτωση, η ταυτοποίηση του μεγέθους, καθώς και η ποσοτικοποίηση, έγινε χρησιμοποιώντας ως δείκτη 500ng DNA από το βακτηριοφάγο λ που έχει υποστεί ενζυμική πέψη με την ενδονουκλεάση HindIII ή με 500ng DNA από το φάγο ΦΧ που έχει υποστεί ενζυμική πέψη με την ενδονουκλεάση HaeIII.

10X,TBE 1lt:

108gr Tris, 55gr Boric Acid, 40ml EDTA)

10x TAE, 1lt:

242gr Tris, 57.1gr glacial acetic acid, 100ml EDTA)

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

3.1 Ανάπτυξη κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές Ref1 και P19 αναπτύχθηκαν σε DMEM υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, 4.5mg/L (Gibco, DMEM Glutamax I, cat. No 31966-021) με 10% εμβρυϊκό ορό βοδιού (Fetal bovine serum – FBS, Biochrom AG, cat. No S0115), ενώ τα πρωτεύοντα εμβρυϊκά ινοβλαστικά κύτταρα του ποντικού (primary MEFs) αναπτύχθηκαν στο ίδιο θρεπτικό υλικό παρουσία 100μM β-μερκαπτοαιθανόλης. Αντίστοιχα η κυτταρική σειρά PC12 αναπτύχθηκε σε DMEM υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης με 5% εμβρυϊκό ορό βοδιού και 10% ορό αλόγου (Horse serum, Gibco, cat. No 16050-130).

Σε όλα τα παραπάνω θρεπτικά υλικά προστέθηκε μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Gibco, cat. No 15140-122) σε συγκέντρωση 100μg/ml. Στα πειράματα στέρησης ορού, το πλήρες θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και, αφού πραγματοποιήθηκαν 2 πλυσίματα με 1X PBS, αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, και παρουσία 10mM HEPES. Η καλλιέργεια όλων των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37°C και συγκέντρωση 5% CO_2 σε ειδικό επωαστήριο για κυτταροκαλλιέργειες.

Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό απαγωγό κυτταροκαλλιεργειών.

3.2 Τρυψινοποίηση κυττάρων

Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν μία φορά με 1X PBS και επώστηκαν με 25-50μl/cm² τρυψίνης (Gibco, cat. No 25200-056) σε θερμοκρασία δωματίου ή 37C μέχρι να αποκολληθούν (~1,5ml / T75 flask). Η τρυψίνη απενεργοποιήθηκε με την προσθήκη 4 όγκων πλήρους θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα αραιώθηκαν 5-10 φορές σε καινούρια φλάσκα ή τρυβλίο και προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό μέχρι τελικού όγκου 250μl/ cm².

3.3 Παροδική διαμόλυνση πλασμιδίων σε καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων.

Η παροδική διαμόλυνση των κυττάρων Ref1 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου. 10⁵ κύτταρα ανά πηγάδι (6 well plate) μεγάλωσαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό, ολονύκτια. Την επόμενη μέρα αλλάχθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκαν 3 ml πλήρους θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με 10mM HEPES pH 7, 1-4 ώρες πριν τη διαμόλυνση.

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν ως εξής: 3μg συνολικού πλασμιδιακού DNA αναμίχθηκαν με νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 75μl. Προστέθηκαν άλλα 75μl 0.5M προσφάτως παρασκευασμένου χλωριούχου ασβεστίου και το μείγμα προστέθηκε στάγδην σε 150μl παγωμένου διαλύματος H που βρίσκονται σε ένα τρυβλίο ενός 24-well πιάτου. Το ίζημα αφέθηκε να σχηματιστεί για 20-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκε στάγδην στα κύτταρα. Ύστερα από ολονύκτια επώαση του ιζήματος με τα κύτταρα, το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με 1X PBS. Εν συνεχεία, προστέθηκαν 3 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν για 24-30 ώρες.

Σε όλα τα πειράματα διαμολυνσεων χρησιμοποιήθηκαν 2μg από τα effector plasmids (PSG5, PSG5-ERF, PSG5-M1-7). 0,1μg πλασμιδίου που φέρει τον Olig1 υποκινητή ή κομμάτι αυτού και 1μg πλασμιδίου που φέρει κλωνοποιημένο τον υποκινητή της ακτίνης για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Διάλυμα 10X HBSS

1.37M NaCl

0.05M KCl

0.007M Na₂HPO₄·7H₂O

0.06M Δεξτρόζη

Αποθηκεύεται στους -20°C.

Διάλυμα H

38 ml H₂O

10 ml 10X HBSS

2 ml HEPES pH 7

το pH ρυθμίζεται στο 7-7,15 με HCl

όλα τα διαλύματα είναι φιλτραρισμένα σε 0.22μm φίλτρα.

Αποθηκεύεται στους -20°C.

Διάλυμα 2M CaCl₂

1M=147gr CaCl₂·2H₂O , SIGMA

ddH₂O

φιλτράρισμα με 0.22μm φίλτρο και αποθήκευση στους -20°C.

3.4 Πάγωμα κυττάρων και αποθήκευσή τους στους -80°C.

Μετά την τρυψινοποίηση, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 3-5 λεπτά στις 1000-1300 rpm (200-300g). Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν και ξαναφυγοκεντρήθηκαν σε 1xPBS. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό. Προστέθηκε κατόπιν στάγδην ίσος όγκος από 2X θρεπτικού υλικού παγώματος. Τα κύτταρα μοιράστηκαν σε ειδικά σωληνάρια σε ποσότητες του 1ml και τοποθετήθηκαν σε ειδικά δοχεία στους - 80°C, προκειμένου να παγώσουν σταδιακά, -1°C/h (Cryo boxes – Nalgene, cat. No 5100-0001).

2X Θρεπτικό υλικό παγώματος

60% πλήρες θρεπτικό υλικό

20% εμβρυϊκός ορός βοδιού

20% DMSO (προστίθεται στάγδην)

3.5 Απομόνωση πρωτογενών ινοβλαστικών κυττάρων από έμβρυα ποντικού.

Θηλυκά ποντίκια, που βρίσκονταν στη δέκατη και 13η μέρα της εγκυμοσύνης τους θυσιάστηκαν ακαριαία με αποκόλληση του νωτιαίου μυελού και στη συνέχεια τα έμβρυα χωρίστηκαν από τον πλακούντα με την βοήθεια στερεοσκοπίου. Στα έμβρυα της δέκατης μέρας αφαιρέθηκαν το κεφάλι και η καρδιά και το υπόλοιπο έμβρυο τοποθετήθηκε σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Αντίστοιχα στα έμβρυα της 13η μέρας αφαιρέθηκε η καρδιά και το σώμα και τοποθετήθηκαν σε καλλιέργεια μόνο τα κεφάλια τους. Τα μέλη του εμβρύου διαμελίστηκαν με πιπέτα Pasteur και τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε κανονικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας. Τα έμβρυα που θανατώθηκαν και για τις δυο ημέρες εμβρυϊκής ανάπτυξης ήταν αγρίου τύπου. Επιπρόσθετα για την ημέρα 10,5 εμβρυϊκής ανάπτυξης θανατώθηκαν και έμβρυα ετερόζυγα ως προς τον ERF.

4. Μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης.

10⁵ κύτταρα Ref1 διαμολύνθηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω σε πιάτο 6 θέσεων (6 well plate). Μετά το πέρας της διαδικασίας, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με 2 ml διαλύματος 1X PBS και εν συνεχεία επώαστηκαν με 1 ml διαλύματος 1X PBS/0.5mM EDTA για 1 περίπου λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Αναμίχθηκαν με πιπέτα και μεταφέρθηκαν σε 1.5ml μικροσωληνάρια erpendorf. Φυγοκεντρήθηκαν για μισό λεπτό

στις 13000 rpm και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε 100 μl διαλύματος λύσης (Promega, Reporter lysis buffer, 5x, 30ml, cat. No E327A). Το διάλυμα επώαστηκε στους -80°C για 20-30 λεπτά (σε αυτό το σημείο, το δείγμα μπορεί να κρατηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα) και μεταφέρθηκε κατευθείαν στους 37°C για ένα λεπτό, μέχρι να ξεπαγώσει. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, στις 13000rpm και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε άλλο μικροσωληνάριο.

4.1 Μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης.

Σε 20 μl του παραπάνω εκχυλίσματος κυττάρων προστέθηκαν 20 μl αντιδραστηρίου λουσιφεράσης (Promega) και το δείγμα μετρήθηκε αμέσως σε ειδικό όργανο (illuminometer).

4.2 Μέτρηση ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης.

Σε 80 μl από το κυτταρικό εκχύλισμα προστέθηκαν 550 μl διαλύματος αντίδρασης (LacZ reaction buffer), 100 μl διαλύματος ONPG (ο-νιτρο-φαινυλο-β-D-γαλακτο-πυρανοσίδιο, stock 4mg/ml) και 1.25 μl β-μερκαπτοαιθανόλης (stock 14.3M). Το διάλυμα επώαστηκε στους 37°C μέχρι να κιτρινίσει και η αντίδραση τερματίστηκε με 200 μl διαλύματος 1M Na_2CO_3 . Τέλος, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 420 nm.

Διάλυμα αντίδρασης β-GAL (LacZ reaction buffer)

60mM Na_2HPO_4
40mM NaH_2PO_4
10mM KCl
1mM MgSO_4

5. Απομόνωση γενωμικού DNA από κυτταρικές σειρές θηλαστικών.

Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με 1X PBS και προστέθηκαν 500μl διαλύματος λύσης. Ύστερα από ολονύκτια επώαση στους 55°C , προστέθηκαν 500μl φαινόλης και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 5-10min στις 5000rpm (όχι στην μέγιστη ταχύτητα φυγοκέντρησης για να μην θρυματιστεί το γενωμικό DNA) , σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε άλλο μικροσωληνάριο και προστέθηκαν 500μl φαινόλης/χλωροφορμίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 10min, 5000rpm, θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε άλλο μικροσωληνάριο. Το δείγμα κατακρημνίστηκε με 2,5 όγκους 100% αιθανόλης και ξεπλύθηκε σε 70% αιθανόλη. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50μl TE.

Διάλυμα λύσης

50mM Tris pH 8.0
100mM NaCl
100mM EDTA
1% SDS
0.5mg/ml Proteinase K

6. Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικές σειρές.

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε με το αντιδραστήριο Trizol της εταιρείας INVITROGEN σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το RNA επαναδιαλύθηκε σε 15μl διπλά απεσταγμένου νερού, που έχει κατεργαστεί με DEPC και η συγκέντρωσή του μετρήθηκε σε μήκος κύματος 260nm σε UV φως αφού προηγουμένως είχε αραιωθεί 500 φορές. Η κατεργασία του νερού με DEPC γίνεται ως εξής: στο νερό προστέθηκε DEPC σε αναλογία 1/1000 και πραγματοποιήθηκε ολονύκτια επώαση. Την επόμενη μέρα το νερό βράζεται για 30-60 λεπτά και εν συνεχεία αποστειρώνεται στον αυτόκαυστο στους 120 βαθμούς για 30 λεπτά.

7. Απομόνωση ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος.

Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν και αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 4. Φυγοκεντρήθηκαν για μισό λεπτό και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο διαλύματος RIPA (30-50μl/well) με συμπλήρωμα μίγματος αναστολέων πρωτεϊνολύσεων. Αφέθηκε στον πάγο για 10 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000rpm, στους 4°C, για 15min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε μικροσωληνάριο και η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20C ή στους -80C.

Διάλυμα RIPA

50 mM Tris pH 8.0

150 mM NaCl

1% NP40

0.5% DOC

0.5% SDS

7.1 Μέθοδος Bradford

1. 2μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αραιώνονται σε 800μl H₂O
2. Προσθήκη 200μl αντιδραστηρίου Bradford, έντονη ανακίνηση
3. Φωτομέτρηση στα 595nm
4. Υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης μέσω πρότυπης καμπύλης

7.2 Αποτύπωμα κατά Western Blot.

7.2.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικού εκχύλισματος και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση 5-30 μg ολικού κυτταρικού εκχύλισματος σε αποδιατακτικό πήκτωμα 10% SDS-πολυακρυλαμίδης.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για 1.30h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης PROTRAN 0.45mm σε συσκευή μεταφοράς της εταιρείας Hoeffler Scientific. Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε σε ένταση ρεύματος 0.8mA/cm² της μεμβράνης και διήρκεσε 1.30h.

7.2.2 Υβριδοποίηση με αντίσωμα

1. Blocking της μεμβράνης με 5% γάλα διαλυμένο σε 1X TBST για 30min σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Ξέπλυμα 1 φορά με TBST
3. Προσθήκη αντισώματος στην κατάλληλη συγκέντρωση σε 1X TBST για 1h σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονύκτια επώαση στους 4°C.
4. Ξεπλύματα 4 φορές για 10min σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Προσθήκη του κατάλληλου δεύτερου αντισώματος συζευγμένου με περοξειδάση του ραδικιού και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1h.
6. Ξεπλύματα 4 φορές για 10min σε θερμοκρασία δωματίου
7. Επώαση της μεμβράνης με το αντιδραστήριου ECL της εταιρείας PIERCE ή AMERSHAM σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και αυτοραδιογραφία.

Πρώτα αντισώματα

Rabbit S17S a-ERF, 1:2000 1X TBST/5% γάλα
Rabbit α -ERK (Cell Signaling), 1:2500 1X TBST
Mouse α -pERK (Sigma), 1:5000 1X TBST

Δεύτερα αντισώματα

a-rabbit, a-mouse, a-rat 1:5000 1X TBST

1X TBST:

50mM Tris-HCl pH 8.0
138mM NaCl
27mM KCl
0.05% Tween

8. Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (CHIP) από κυτταρικές σειρές και ποσοτικοποίηση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR).

8.1 Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης

5×10^6 κύτταρα/150mm πιάτο μονιμοποιήθηκαν για 10min σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37°C με 1% φορμαλδεύδη σε 1X PBS. Η φορμαλδεύδη εξουδετερώθηκε με 0.125M διαλύματος γλυκίνης. Τα πιάτα τοποθετήθηκαν στον πάγο και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με παγωμένο 1X PBS. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το πιάτο με ειδικό scraper και μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο όγκου 50ml. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 2500rpm, σε θερμοκρασία 4°C , για 5min και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 1ml swelling buffer, το οποίο περιείχε επιπλέον 1mM DTT και αναστολείς πρωτεασών. Πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων στον πάγο για 10min και ομογενοποίησή τους σε γυάλινο ομογενοποιητή του 1ml με 20 “κτυπήματα” στον πάγο. Με τη διαδικασία αυτή απομονώθηκαν ακέραιοι πυρήνες. Οι πυρήνες μεταφέρθηκαν σε μικροσωληνάρια και φυγοκεντρήθηκαν ήπια στις 5000rpm, για 5min, σε θερμοκρασία 4°C . Το ίζημα των πυρήνων επαναδιαλύθηκε σε 1ml διαλύματος ηχοβολισμού (sonication buffer) συμπληρωμένου με αναστολείς πρωτεασών. Ο ηχοβολισμός πραγματοποιήθηκε σε 6 κύκλους των 20sec με ενδιάμεσες παύσεις των 90sec με ένταση 50%. Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15min, στις 13000rpm, στους 4°C , το υπερκείμενο συλλέχθηκε και επαναφυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες. Στο παραπάνω πυρηνικό εκχύλισμα προστέθηκε $1\mu\text{g/ml}$ ηχοβολισμένου λ φαγού DNA και 1mg/ml BSA και επώαστηκε με 20 μl εξισορροπημένων σφαιριδίων protein A (SIGMA) για 2h, στους 4°C , υπό ανακίνηση. Τα σφαιρίδια φυγοκεντρήθηκαν στις 5000rpm, για 30sec, στους 4°C και το υπερκείμενο επώαστηκε ολονύκτια με το κατάλληλο αντίσωμα, στους 4°C , υπό ανακίνηση. Πριν την προσθήκη του αντισώματος φυλάχθηκε το 1/10 του δείγματος (100 μl) σε θερμοκρασία -20°C (input). Την επόμενη μέρα προστέθηκαν 20 μl εξισορροπημένων σφαιριδίων protein A, και επώαστηκαν για 1h, στους 4°C υπό ανακίνηση. Τα δείγματα ξεπλύθηκαν από δύο φορές κατά σειρά με 500 μl sonication buffer, διαλύματος ξεπλύματος A και B και TE. Το κάθε ξέπλυμα πραγματοποιήθηκε για 10min, 4°C , υπό ανακίνηση και τα σφαιρίδια φυγοκεντρήθηκαν για 30sec, στους 4°C με 5000rpm. Τέλος, το σύμπλεγμα αντισώματος-πρωτεϊνών-DNA εκλούστηκε από τα σφαιρίδια με επώαση με 200 μl διαλύματος έκλουσης, στους 65°C , για 10min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε μικροσωληνάριο και η διαδικασία της έκλουσης επαναλήφθηκε και οι δύο εκλούσεις ενώθηκαν. Παράλληλα στο input προστέθηκαν 300 μl διαλύματος έκλουσης. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί απομονοποίηση των δειγμάτων, προστέθηκε 0.2M NaCl, και τα δείγματα επώαστηκαν ολονύκτια στους 65°C . Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε κατεργασία των δειγμάτων με $10\mu\text{g}$ RNAase A, στους 37°C , για 1h. Η επίδραση της RNAase εξουδετερώθηκε με την προσθήκη 5mM EDTA και τα δείγματα επώαστηκαν $50\mu\text{g}$ πρωτεΐνης K για 1.30h στους 37°C . Τέλος, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του DNA με εκχύλιση μια φορά με φαινόλη/χλωροφόρμιο και μία φορά με χλωροφόρμιο, κατακρήμιση με 100% αιθανόλη και προσθήκη 1/10 του όγκου οξικού νατρίου και 10-20 μg γλυκογόνου και πλύσιμο με

70% αιθανόλη. Τα ανοσοκατακρημνισμένα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε 25μl TE και τα input σε 50μl. Σημείωση: Τα σφαιρίδια της protein A εξισορροπήθηκαν πριν τη χρήση τους με ξέπλυμα τρεις φορές με διάλυμα ηχοβολισμού και εν συνεχεία επώασή τους με αυτό το διάλυμα για 1h, 4C υπό ανακίνηση παρουσία 1μg/ml ηχοβολισμένου λ φάγου DNA και 1mg/ml BSA.

Swelling buffer

25mM HEPES pH7.9

1.5mM MgCl₂

10mM KCl

0.1% NP40

Πριν από τη χρησιμοποίησή του, προστίθενται 1mM DTT, 0.5mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών (SIGMA)

Sonication buffer

50mM HEPES pH7.9

140mM NaCl

1mM EDTA

1% Triton x-100

0.1% Na-deoxycholate

0.1% SDS

Πριν από τη χρησιμοποίησή του, προστέθηκαν 0.5mM PMSF και αναστολείς πρωτεασών (SIGMA)

Washing buffer A

Έχει την ίδια σύσταση με το sonication buffer με τη διαφορά ότι περιέχει 500mM NaCl.

Washing buffer B

20mM Tris pH 8.0

1mM EDTA

250mM LiCl

0.5% NP40

0.5% Na-deoxycholate

Elution buffer

50mM Tris pH 8.0

1mM EDTA

1% SDS

8.2 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, χρησιμοποιήθηκε το 2X μίγμα SYBR-Green της εταιρίας Stratagene (cat No: 600548) στο μηχάνημα ABI Prism 7000 με το αντίστοιχο λειτουργικό πρόγραμμα –

λογισμικό για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Η τελική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Excel της Microsoft. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20μl, η οποία αναλυτικά περιέχει:

10μl 2X SYBR Green Kit

0.25μM από τον κάθε εκκινητή (Primer)

0.325μl ROX

1μl από το δείγμα της ανοσοκατακρήμνισης ή 0.1 μl από τα αντίστοιχα input.

Οι εκκινητές αραιώνονται με τρόπο τέτοιο ώστε να προστίθενται στο πηγάδι όγκοι των 5μl, το ίδιο ισχύει και για το DNA δείγμα.

Η αντίδραση πραγματοποιείται για 40 κύκλους σε δύο βήματα:

1. Θερμοκρασία αποδιάταξης 95°C

2. Επαναδιάταξη των εκκινητών σε θερμοκρασία 56-58°C ανάλογα την περίπτωση.

3. Στάδιο επιμήκυνσης σε θερμοκρασία 72°C.

95°C	10min
95°C	30sec
56-58°C	30sec
72°C	30sec

Στο τέλος της αντίδρασης σχηματίστηκε η καμπύλη αποδιάταξης των προϊόντων σε σχέση με τη θερμοκρασία, προκειμένου να φανεί η ύπαρξη παραπροϊόντων και με την βοήθεια του λογισμικού γίνεται η ποσοτικοποίηση.

9. Αντίστροφη μεταγραφή RNA απομονωμένου από κυτταρικές σειρές και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

9.1 Παραγωγή cDNA από ολικό RNA

Η παραγωγή cDNA από ολικό RNA απομονωμένου από κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκε με το ειδικό μείγμα της εταιρείας Amersham (cat No: 27-9261-01) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο αναλυτικά, 5μg από το RNA αραιώθηκαν σε νερό, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 8μl. Τα δείγματα ζεστάθηκαν στους 65°C για 10 λεπτά και σε αυτά προστέθηκαν 5μl από το ειδικό μείγμα (που περιέχει την αντίστροφη μεταγραφάση και τα νουκλεοτίδια), 1μl DTT (stock 100mM) και 1μl από όλιγο(dT) αραιωμένου 1:25. Τέλος, τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C και μετά φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία -80°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Αντίστοιχα με το μείγμα της εταιρείας Stratagene (Affinity Script multiple temperature cDNA synthesis Kit, #200436) 1ng-5μg ολικού RNA διαλύθηκαν σε 15,7 μl RNase free νερό και προστέθηκε 1μl από τους oligo-dT εκκινητές της εταιρείας. Το μίγμα αυτό επώαστηκε στους 65°C για

5 λεπτά και έπειτα αφέθηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε οι εκκινητές να προσδεθούν στο RNA (primer annealing). Στο μίγμα προστέθηκαν κατά σειρά, 2μl από το 10x ρυθμιστικό διάλυμα της εταιρίας, 0,8μl μίγμα dNTPs, 0,5μl αναστολέα των ριβονουκλεασών και 1μl από την αντίστροφη μεταγραφή της εταιρίας. Ακολουθεί επώαση στους 42°C για μια ώρα και έπειτα θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου για 15 λεπτά στους 70°C.

9.2 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 8.2. Χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι εκκινητές κατά περίπτωση, βλέπε κεφάλαιο 10.

10. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν (primers)

- Για CHIP στην 5'-proximal upstream περιοχή του ποντικίσου *Olig1* γονιδίου:
ol1628F : TGCTTCAGTAGTTCGCCAGCG
ol1757R : TTCTAGTTCAGCTGGTCAGG

ol623F : CTCAGATCCACACCAGTGC
ol803R : TCAGGCTTCATCCATGTCAG

Το ζευγάρι ol623 και ol803 δεν χρησιμοποιήθηκε λόγω έλλειψης χρόνου.

- Για RT-PCR στην 3'UTR περιοχή του ποντικίσου *Olig1* γονιδίου:

ol3512F : TTTCCGAGCTGGATGTTA
ol3693R : AGCTACCTTTAGGGAAGTGG

- Για RT-PCR στην 3'UTR περιοχή του *Olig1* γονιδίου αρουραίου:

rOlig1_3UTR_Fwd : TTCCAGACTTCTCACCCAGA
rOlig1_3UTR_Rev : TCTAGAATCCCAGGCAACTG

rOlig1_3UTR_Fwd1 : AGTGGAGAAGTTCCTCTGGC
rOlig1_3UTR_Rev1 : CTACGACATGCCTTG

- Σχετικά με την κωδική περιοχή του ποντικίσου *Gapdh*, που χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς:

GAPDH_Fwd:CCAGTATGACTCCACTCAGC
GAPDH_Rev:GACTCCACGACATACTCAGC

- Σχετικά με την κωδική περιοχή του ποντικίσιου *Cph*, που χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς:

mCPH a : GGAAAATATGGAACCCAAAG

mCPH s : AGACCAGCAAGAAGATCACC

11. Επίστρωση με poly-L-Lys τρυβλίων για κυτταροκαλλιέργειες.

Η poly-L-Lys που χρησιμοποιήθηκε ήταν της Sigma (P-6282) σε συγκέντρωση 2mg/ml – 100x (stock solution). Η τελική συγκέντρωση σύμφωνα με την οποία γίνεται η επίστρωση είναι 20-50μg/ml (Working solution). Αφου επιστρωθεί η PLL στο τρυβλίο σε ddH₂O (0,5ml/well, 3ml/60mm plate) ακολουθεί επώαση για μια ώρα στον επωαστήρα στους 37°C. Μετα την πάροδο της ώρας αυτής, το υπερκείμενο αφαιρείται και η επιφάνεια αφήνεται να στεγνώσει στην απαγωγό κυτταροκαλλιεργειών. Εξαιτίας της PLL που είναι φωτοευαίσθητη, το τρυβλίο πρέπει να στεγνώσει χωρίς την έντονη παρουσία φωτός. Τα τρυβλία μπορούν να αποθηκευθούν στους 4°C για 3 μήνες. Πριν την προσθήκη των κυττάρων το τρυβλίο πλένεται 3 φορές με 1xPBS.

12. Πρωτόκολλο διαφοροποίησης της PC12 κυτταρικής σειράς σε νευρικού τύπου κύτταρα.

Τα PC12 αντιπροσωπεύουν μια κυτταρική σειρά φεοχρωμοκυττώματος επινεφριδίου αρουραίου η οποία επι παρουσία NGF προσδίδει νευρικό φαινότυπο παρόμοιο με αυτό των συμπαθητικών νευρωνων. Τα κύτταρα αυτά, συνθέτουν και αποθηκεύουν κατεχολαμίνες, νορεπινεφρίνη και ντοπαμίνη. Έχουν την τάση να μην προσκολλώνται στα τρυβλία και δημιουργούν έντονα συσσωματώματα. Διαιρούνται κάθε 48-92 ώρες και τα θρεπτικά τους ανανεώνονται 3 φορές την εβδομάδα. (ECACC). Κατά την διαφοροποίησή τους φθάνουν σε μήκος τα 500-1000μm, ενώ τα αγρίου τύπου αδιαφοροποίητα είναι εξαιρετικά μικρά 6-15μm. Ο φαινότυπος των διαφοροποιημένων κυττάρων υπο την απουσία NGF είναι αντιστρέψιμος μέσα σε 24 ώρες, και μετά από 72 ώρες έχουν τα χαρακτηριστικά των αγρίου τύπου κυττάρων. (Greene et al. PNAS 1976, Fujita et. al. 1989). Κατά την νευρική διαφοροποίηση έχει παρατηρηθεί ότι αλλάζουν τα μεταγραφικά πρότυπα σε ~600 γονίδια, μέσα σε αυτά είναι και τα neurofilament-L και M που αποτελούν μάρτυρες για συμπαθητικούς νευρώνες (Lee et. Al. PNAS 1995). Σε πείραμα με cDNA μικροσυστοιχίες διαφοροποιημένων και αδιαφοροποιητών PC12 κυττάρων που περιείχαν 5088 cDNA κλώνων βρέθηκαν 46 γονίδια τα παρουσιάζουν διαφορά στα πρότυπα έκφρασης τους, εκ των οποίων 33 γονίδια μετά από διαφοροποίηση υπερεκφράζονταν ενώ σε 13 γονίδια ελαττώθηκε η έκφρασή τους (Lee et. Al. Neurochemical Research 2005).

Τα κύτταρα αυτά επιλέχθηκαν διότι αποτελούν ένα πολύ καλό μοντέλο για την μελέτη της νευρικής διαφοροποίησης, είναι ευρέως διαδεδομένα και εύκολα στον χειρισμό τους. Ένας ακόμη λόγος για τον οποίο επιλέχθηκε αυτή η κυτταρική σειρά είναι γιατί έχει

χαρακτηριστεί η ενεργοποίηση του MAPK-ERK μονοπατιού κατά την νευρική διαφοροποίηση τους (Leppa et al EMBO 1998, Vaudry et al Science 2002) και ο ERF αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος ελέγχεται και ρυθμίζεται από το μονοπάτι αυτό.

Για την διαφοροποίηση τα κύτταρα στρώνονται σε πιάτα για κυτταροκαλλιέργειες (SARSDT) επιστρωμένα με poly-L-Lys (βλέπε κεφάλαιο 11) στους ανάλογους πληθυσμούς ανα περίπτωση ($2-4 \times 10^4$ κύτταρα/cm²). Στην παρούσα περίπτωση σε 60mm τρυβλία προστέθηκαν 200.000 κύτταρα PC12, τα οποία είχαν επεξεργασθεί με 0.25% τρυψίνη ώστε να αποτελούν ατομικούς πληθυσμούς. Προστέθηκαν 5ml θρεπτικού για PC12 κύτταρα (βλέπε κεφάλαιο 2.1) και 50ng/ml NGF. Το NGF ήταν της εταιρίας Peprotech (cat. No. 450-01). Η συγκέντρωση αποθήκευσής του ήταν 5μg/ml (stock) και διατηρήθηκε στους -80°C. Κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης τα θρεπτικά υλικά και ο NGF ανανεώνονται κάθε 2 ημέρες.

Κατά την προσθήκη NGF στο θρεπτικό, ακόμη και μετά την πάροδο 2 μόλις ωρών υπήρχαν εμφανής μορφολογικές διαφορές στα κύτταρα σε σχέση με τα αδιαφοροποίητα αγρίου τύπου. Υπήρξε εμφανής δημιουργία νευρικών απολήξεων μετά την πάροδο 24 ωρών και κατά την δεύτερη μέρα είχαν διαφοροποιηθεί το 30% των κυττάρων σε νευρώνες.

Μετά την πάροδο 5 ημερών διαφοροποίησης παρατηρήθηκε ότι φαινοτυπικά δεν υπήρξε περαιτέρω διαφοροποίηση των κυττάρων. Είχαν διαφοροποιηθεί πλήρως σε νευρώνες το ~60-70% των κυττάρων που είχαν επιστρωθεί. Αρκετά από τα κύτταρα έφθασαν σε γιγαντιαίες διαστάσεις με ιδιαίτερα επιμήκης άξονες.

13. Πρωτόκολλο διαφοροποίησης της P19 κυτταρικής σειράς σε νευρικού τύπου κύτταρα.

Τα P19 είναι πολυδύναμα εμβρυϊκά βλαστικά από τερατοκαρκίωμα ποντικού. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι τα κύτταρα αυτά επι παρουσία ρετινοϊκού οξέως διαφοροποιούνται σε νευρώνες και κύτταρα της γλοίας (αστρογλοία και μικρογλοία), με αναφορά και σε ολιγοδενδροκύτταρα. Ανάλογα με την χημική ουσία με την οποία τα P19 επάγονται η διαφοροποίησή τους είναι διαφορετική. Επι παρουσία ρετινοϊκού οξέως διαφοροποιούνται σε κυτταρικούς τύπους νευροεκτοδέρματος, όπως προαναφερθηκε παραπάνω. Ενώ επι παρουσία διμέθυλο-σουλφονικού οξέως (DMSO) διαφοροποιούνται σε κυτταρικούς τύπους ενδοδέρματος και μεσοδέρματος -καρδιακούς και σκελετικούς τύπους – (McBurney et al. Int J Dev Biol. 1993). Διαφοροποιημένα P19 κύτταρα με ρετινοϊκό που έχουν μορφολογία νευρώνων εκκρίνουν και συνθέτουν ακετυλοχολίνες και όχι κατεχολαμίνες, αυτό προδίδει ότι κάποια από τα κύτταρα αυτά έχουν χολινεργικό χαρακτήρα (McBurney et al The journal of neuroscience 1988).

Το πρωτόκολλο διαφοροποίησης έχει ως εξής :

Αρχικά 10^6 P19 κύτταρα επιστρώνονται σε ατομικούς πληθυσμούς σε βακτηριολογικά πετρί και αφήνονται για 24 ώρες στον επωαστήρα σε συνθήκες για τα P19 (βλέπε κεφ.

2.1). Ο στόχος της 24ωρης επώασης είναι να επιλεγθούν τα κύτταρα που δεν έχουν επικολληθεί στον πάτο του βακτηριολογικού πετρί. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν αδιαφοροποίητα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα. Τα κύτταρα επομένως που βρίσκονται στο υπερκείμενο μεταφέρονται και επιστρώνονται σε τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες. Μετά την πάροδο 48 ωρών, όπου τα κύτταρα έχουν αυξήσει τον πληθυσμό τους, τρυψινοποιούνται και επιστρώνονται σε βακτηριολογικά πετρί και πάλι, σε πληθυσμούς 10^5 κύτταρα/ml. Στο πετρί για διαφοροποίηση προστίθεται ρετινοϊκό οξύ (all trans-RA, SIGMA) σε συγκέντρωση $0,5-1 \times 10^{-6}M$, ενώ για την σύγκριση (control) σε ένα άλλο πετρί με τον ίδιο πληθυσμό προστίθεται 95% αιθανόλη. Επωάζονται σε συνθήκες για τα P19 για 4 ημέρες και τα θρεπτικά με το ρετινοϊκό οξύ ανανεώνονται κάθε 2 ημέρες. Κατά την διάρκεια των τεσσάρων αυτών ημερών τα κύτταρα επάγονται για διαφοροποίηση και δημιουργούν έντονα συσσωματώματα σε σχήμα σφαίρας, τα λεγόμενα “embroid bodies”. Έπειτα τρυψινοποιούνται και επιστρώνονται σε τρυβλία για κυτταροκαλλιέργειες σε ατομικούς πληθυσμούς και αφήνονται να διαφοροποιηθούν για εύλογο χρονικό διάστημα. Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για την ύπαρξη ολιγοδενδροκυτταρικών πληθυσμών μετά την 12-14^η μέρα διαφοροποίησης.

14. Πλασμιδιακές κατασκευές

Στο εργαστήριο είχε ήδη κλωνοποιηθεί τμήμα μήκους περίπου 1100 βάσεων της 5' περιοχής του Olig1 γονιδίου του ποντικού – (βλέπε 14.1, Διδακτορικό Βερυκοκάκη) :

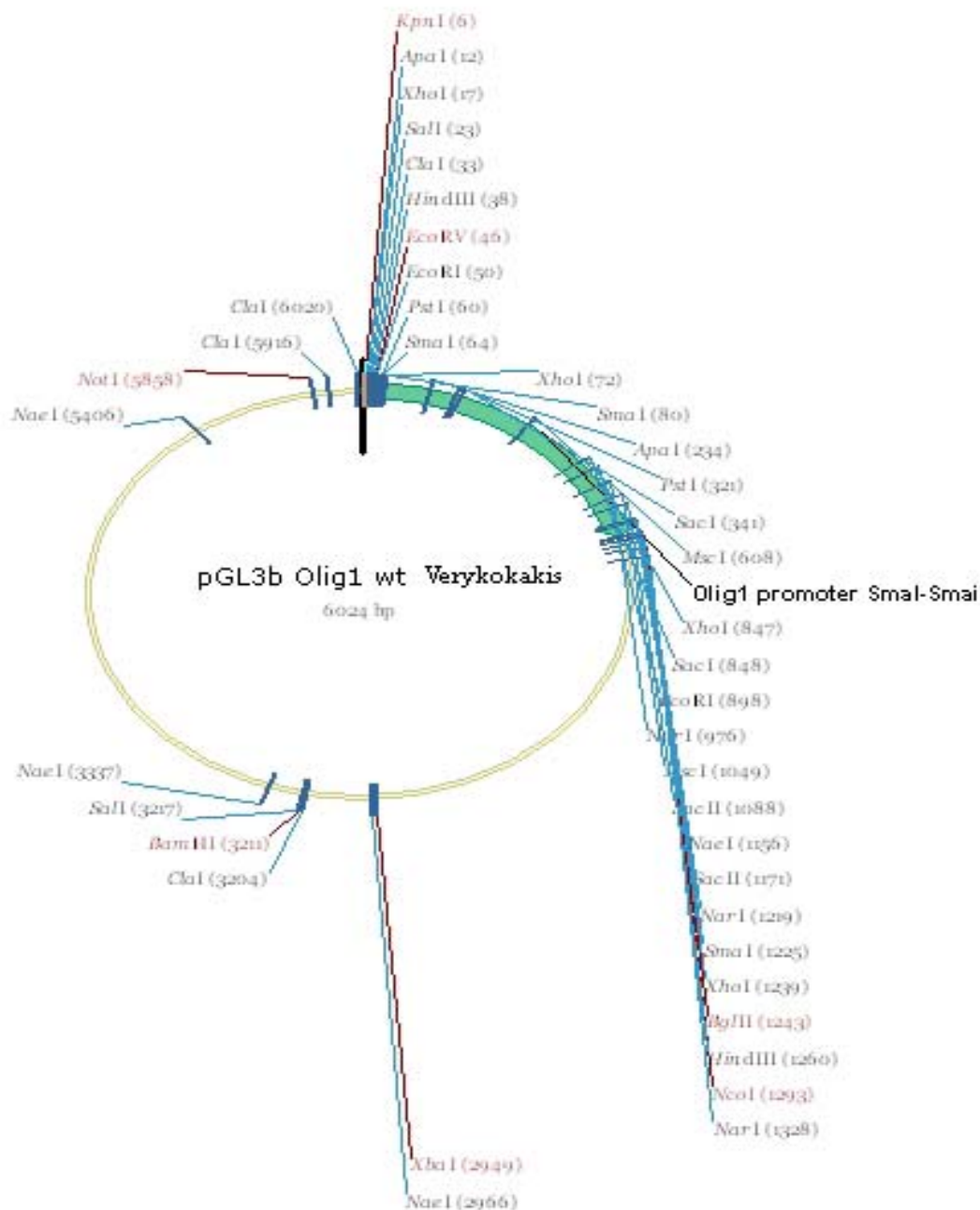
14.1 Κατασκευή pGL3b_Olig1_wt (Verykokakis)

Μια περιοχή 1442 βάσεων που βρίσκεται στο 5' άκρο του γονιδίου πολλαπλασιάστηκε με PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα 50ng ποντικίσου γενωμικού DNA, με τους εξής εκκινητές:

olpromF AGAGACAAGGAGGATCTTAAG

olpromR GAAATCGCATAGTACATCTGG

Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε απο πήκτωμα αγαρόζης και ακολούθησε πέψη με SmaI. Το κομμάτι των 1164 βάσεων που προκύπτει, και αντιστοιχεί στην 5' περιοχή του γονιδίου Olig1, κλωνοποιήθηκε στη θέση SmaI του πλασμιδίου pGL3 basic (Promega). Ωστόσο, η εισαγωγή του SmaI κομματιού στο πλασμίδιο-φορέα πραγματοποιούνταν με ανάποδο προσανατολισμό, οπότε η κατασκευή δεν ήταν λειτουργική. Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα, η παραπάνω κατασκευή κόπηκε με NheI και BglII και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις BamHI/XbaI του πλασμιδίου pBlueScript (Stratagene). Η καινούρια κατασκευή κόπηκε εκ νέου με NotI, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία με Klenow DNA πολυμεράση, κατόπιν κόπηκε με KpnI και τελικά επανεισήχθη στις θέσεις KpnI/XhoI (η οποία προηγουμένως είχε επίσης επεξεργαστεί με Klenow DNA πολυμεράση, για να είναι συμβατή με τη NotI θέση του ενθέματος) του πλασμιδίου pGL3 basic, με το σωστό πλέον προσανατολισμό.



Εικόνα 8. Χάρτης του pGL3b_Olig1_wt, όπου φαίνεται το κομμάτι SmaI των 1164 βάσεων που έχει κλωνοποιηθεί στη θέση SmaI του pSK+ και έχει υποκλωνοποιηθεί όπως αναφέρθηκε παραπάνω στις θέσεις KpnI/NotI του pGL3b. Ο σχεδιασμός έγινε με το πρόγραμμα Vector NTI της Informax.

Παρακάτω φαίνεται η γενωμική αλληλουχία του Olig1 υποκινητή, περιοχή SmaI/SmaI, που χρησιμοποιήθηκε κατά την παραπάνω κλωνοποίηση :

SmaI

cccagagaaa acaaagtcac gcagacacac ccc**accggg** gtgatattta ccaaggtgga gaagtgggtg tttgtcaact ggatatactt
gaaaagaggg aacctcaaat gagaacactg acgtcaccag atcagcctgg tggactcctc gctgatgcat tttctttatt aataattgat
gtgggagggc ccagcgcact gcgagctggc accattccca gcaggtgggc ctgtgctcta taagaaaggf aaccgatcc tgcgatcctg
cgctgcaga aggaagcagg ttagagctcc ctcagttgg ctactcttgg ttcttgctc tgtgctgct aacttctga gttctgagc
taactttcca cagtgaggag ctgtgattgg caggtgtcag ccaaggaac tccccccct cagttcttt tggttccagt gcttatcaca
gcagtgagaa ctaagacaag cagagggggg tttctctta atgettacca agagftagag ttgctgttt gatggttaa gggtttaagt
tttgcaaaaa gcaacaagt cctggccatc tgttgcaaaa tctgtcaac agtcaggcgt ttaacgact gaactgcga ctctgggatg
gttacgttc atgttatgaa tattagactg cattttata acagccaacc tctcatttg gagcccagat tggcctcctc tecttctgc
Chip primer for
ttcagtagtt ccagcagatg ggattactgg ctgatccat ttacaagga caaatgtaac tataaaaagg gatggcaata gagctcgaga
Chip primer rev
gataaagggg ggcaaaagcc attttagct **gaccagctga actagaattc** ggaaggaaca atgttttgc ctaaagctcc ctccttggc
ctcccagggc gggcgtgtg gcacccgcgc aggcgccca cgataacct ctctggcaac tetggetgta cctctgetca ggcgaccaat
gaacactgc ctgtggcca getcaagcct cattggetg cacc**cgcca accgggtcc tegeaggttc ccaagcggg** tttaaaggtg
mRNA start **SacII** **mutolig1F**
tcaggcgcgc acggcccctc **actgtcatcc** gccggcagc aggt**ccggg** ggagggcgat ctgccgaccg gccaccct gggcgttagt
SmaI
gaagggcgcc **ccggg**tcgcc ccacagcccc

14.2 Κατασκευή πλασμιδιακής κατασκευής pGL3b_Olig1_Mu1(ApaInew). Μεταλλαγή της μοναδικής ETS περιοχής πρόδεσης στη συντηρημένη με τον άνθρωπο περιοχή του ποντικίσιου Olig1 υποκινητή που βρίσκεται κλωνοποιημένη στην πλασμιδιακή κατασκευή pGL3b_Olig1_wt.

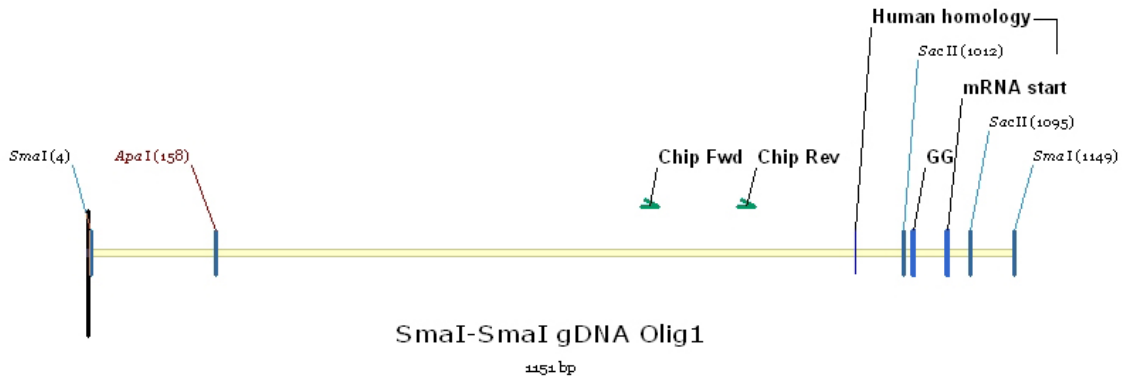
Περίπου 125 βάσεις ανοδικά του σημείου έναρξης του mRNA του *Olig1* γονιδίου του ποντικού, υπάρχει μια υψηλά συντηρημένη περιοχή με το ανθρώπινο *Olig1* γονίδιο. Η περιοχή αυτή στο 5' άκρο του υποκινητή περιέχει μια μονο ETS αλληλουχία στην οποία πιθανώς ο ERF θα μπορούσε να προσδεθεί. Ο στόχος ήταν να μεταλλαχθεί η αλληλουχία αυτή και να εκλεχθεί μέσω διαμόλυνσης αν ο ERF μπορεί να καταστείλει το γονίδιο αναφοράς που βρίσκεται υπο τον έλεγχο του μεταλλαγμένου Olig1 υποκινητή.

Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε μεταλλαγμένος εκκινητής για την συγκεκριμένη ETS περιοχή και με PCR έγινε μετατροπή της TTCC σε GGCC 43 βάσεις ανοδικά του σημείου έναρξης του Olig1 mRNA. Στην θέση αυτή μετά την μεταλλαγή δημιουργήθηκε μια νέα περιοριστική θέση για το ένζυμο ApaI (αναγνωρίζει την αλληλουχία GGGCCC). Το προϊόν από την PCR που προέκυψε με την μεταλλαγή, οδηγήθηκε σε πέψη με SacII και κλωνοποιήθηκε στην SacII θέση στην πλασμιδιακή κατασκευή pGL3b_Olig1_wt (βλέπε εικόνα 8.). Με τον τρόπο αυτό έγινε αντικατάσταση του SacII κομματιού αγρίου

τύπου με το μεταλλαγμένο SacII κομμάτι και η κατασκευή ονομάστηκε **pGL3b_Olig1_Mu1(ApaI new)**. Ο χάρτης της κατασκευής αυτής είναι ίδιος με την εικόνα 8 με την διαφορά ότι φέρει την μεταλλαγή GG στην θέση 1100-1102, όπου έχει δημιουργηθεί μια νέα περιοριστική θέση για το ApaI ένζυμο (εικόνα 9).

Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για την μεταλλαγή είχε ήδη σχεδιασθεί από το εργαστήριο και είναι ο εξής:

Mutolig1F – 5'-CCGCCAACCGCGGTCCTCGCAGGGGCCCAAGCCGG-3'



Εικόνα 9. Στην εικόνα απεικονίζεται το SmaI γενωμικό κομμάτι του Olig1 υποκινητή. Φαίνεται το σημείο όπου έχει γίνει η μεταλλαγή των δυο TT με GG, το SacII κομμάτι που περιέχει την μεταλλαγή, το σημείο έναρξης του mRNA και οι εκκινητές με τους οποίους έχει γίνει ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης και έχει δείχθει ότι ο ERF προσδένεται in vivo σε πρωτογενή MEF κύτταρα. Ο σχεδιασμός έγινε με το πρόγραμμα Vector NTI της Informax.

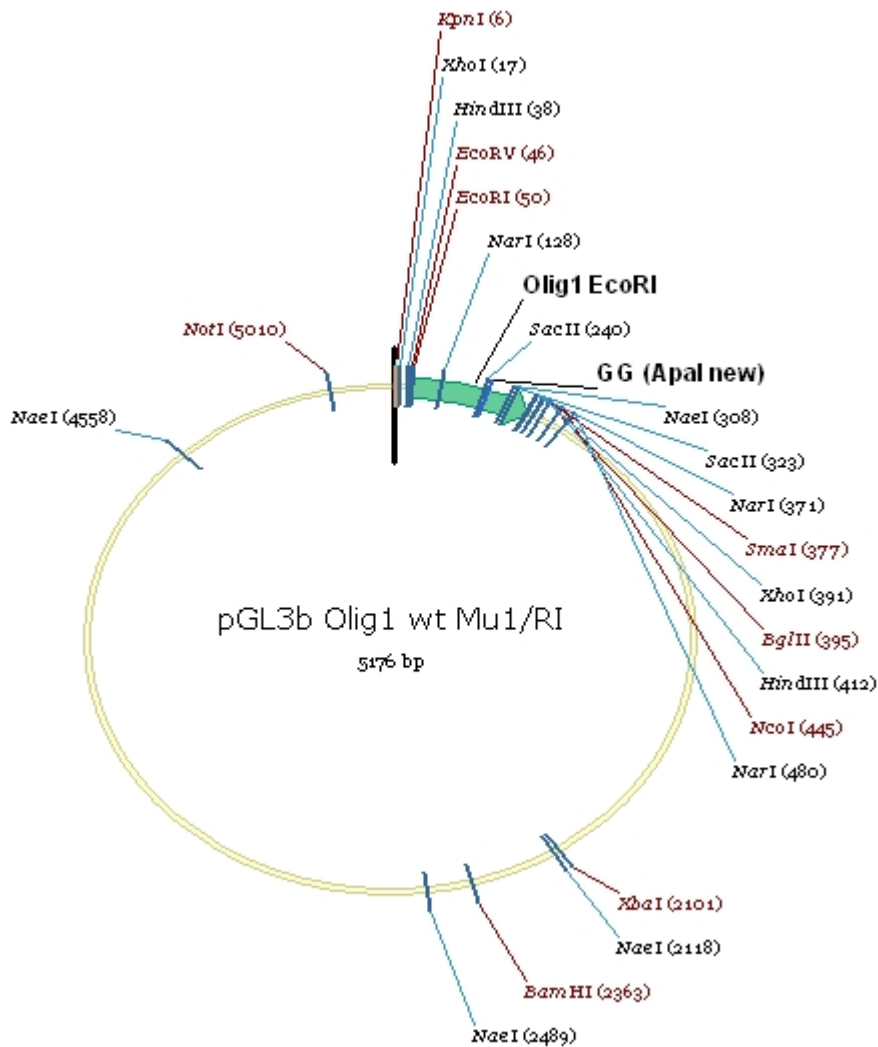
Για να ελεγχθεί ο σωστός προσανατολισμός και ο αριθμός εισαγωγής των SacII κομματιών έγιναν διαγνωστικές πέψεις. Πέψη με ApaI δίνει δυο πιθανές ζώνες, μια 870 βάσεων που αντιπροσωπεύει τον σωστό προσανατολισμό και μια με 923 βάσεων που αντιπροσωπεύει τον ανάποδο προσανατολισμό. Για τον έλεγχο του αριθμού κομματιών που εισήχθησαν έγινε πέψη με SmaI, όπου 1100 βάσεις κομμάτι αντιπροσωπεύει μια φορά εισαγωγή, 1020 βάσεις ζώνη προδίδει την μη εισαγωγή του κομματιού και ζώνη μεγαλύτερη των 1100 βάσεων προδίδει την εισαγωγή πολλών κομματιών στην SacII θέση.

14.3 Διαγραφή του κομματιού EcoRI από τα πλασμίδια pGL3b_Olig1_wt και pGL3b_Olig1_Mu1.

Η 5' περιοχή του υποκινητή του ποντικίσιου Olig1 γονιδίου που έχει κλωνοποιηθεί (βλ. εικόνα 8.) περιέχει περίπου 13 πιθανά σημεία πρόσδεσης για τον ERF, με εξαίρεση το μεταλλαγμένο που περιέχει 12 λόγω της μεταλλαγής. Με πέψη EcoRI έγινε διαγραφή ενός κομματιού 848 βάσεων (από θέση 50 έως 898, βλέπε εικόνα 8.) που περιείχε τα 11 από τα 13 πιθανά σημεία πρόσδεσης του ERF. Η μία EcoRI θέση βρίσκεται ανοδικά του

SacII κομματιού εντός της περιοχής του υποκινητή, ενώ η δεύτερη EcoRI βρίσκεται ανοδικά της πρώτης στον πολυσυνδέτη του pSK+ όπου κλωνοποιήθηκε το SmaI κομμάτι του Olig1 υποκινητή (βλέπε 15.1).

Έγινε πέψη με EcoRI και στα δυο πλασμίδια (αγρίου τύπου και μεταλλαγμένο) και έπειτα οι πέψεις αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης όπου έδωσαν δυο ζώνες, μία ~5200 βάσεων που αποτελεί τον πλασμιδιακό φορέα και μια ~850 βάσεων που αποτελεί το EcoRI κομμάτι. Ο κομμένος πλασμιδιακός φορέας απομονώθηκε από την πηκτή αγαρόζης, καθαρίστηκε και οδηγήθηκε σε συγκόλληση των συνεκτικών του άκρων (βλέπε κεφάλαιο 1.1). Οι πλασμιδιακές κατασκευές ονομάστηκαν **pGL3b_Olig1_wt/RI** και **pGL3b_Olig1_Mu1/RI (εικόνα 10)**. Με την διαγραφή αυτή στον αγρίου τύπου υποκινητή μένουν δυο πιθανά σημεία πρόσδεσης για τον ERF ενώ στον μεταλλαγμένο μόνο ένα.



Εικόνα 10. Χάρτης πλασμιδιακής κατασκευής στον οποίο φαίνεται η διαγραφή του EcoRI κομματιού στην θέση 50-598 στα πλασμίδια αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου της εικόνας 8. Ο σχεδιασμός έγινε με το πρόγραμμα Vector NTI της Informax.

14.4 Κλωνοποίηση της συντηρημένης (αγρίου τύπου και μεταλλαγμένης) με τον άνθρωπο περιοχής του ποντικίσιου Olig1 υποκινητή που βρίσκεται 125 βάσεις ανοδικά του σημείου έναρξης του mRNA.

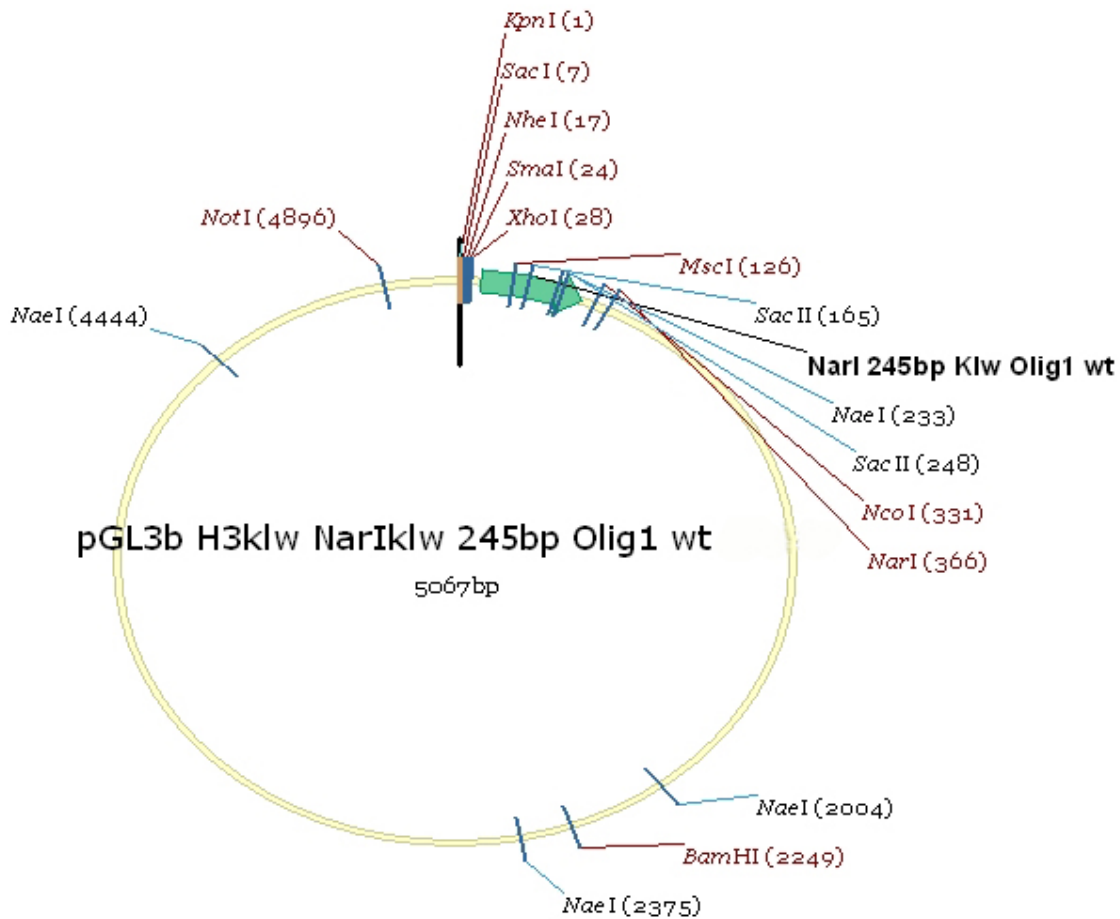
Ο στόχος της συγκεκριμένης κλωνοποίησης ήταν να μελετηθεί αν για την καταστολή είναι απαραίτητος ολόκληρος ο υποκινητής του Olig1 ή αποκλειστικά η συντηρημένη περιοχή, και αν το μοναδικό μεσα στην περιοχή αυτή του υποκινητή πιθανό σημείο πρόσδεσης για τον ERF είχε κάποιο ρόλο στην καταστολή.

Για τον σκοπό αυτό, έγινε πέψη των πλασμιδίων αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου με το ένζυμο NarI. Κατά την πέψη αυτή παράγονται τρεις ζώνες. Μια 355 βάσεων που περιλαμβάνει την NarI θέση 170 βάσεις ανοδικά του σημείου έναρξης του mRNA και της NarI θέσης εντός του pGL3b πλασμιδιακού φορέα (πιο συγκεκριμένα 70 βάσεις μετά την HindIII περιοριστική θέση του pGL3b πολυσυνδέτη). Μία ζώνη 243 βάσεων που περιλαμβάνει το συντηρημένο κομμάτι του Olig1 υποκινητή, το οποίο και επιθυμούμε, και τέλος μια ζώνη 112 βάσεων που αποτελεί την NarI θέση στον υποκινητή και NarI θέση του πλασμιδίου. Στην πέψη αυτή πραγματοποιήθηκε επεξεργασία με Klenow πολυμεράση, έπειτα αναλύθηκε σε παρασκευαστικό gel αгарόζης όπου απομονώθηκε και καθαρίστηκε η ζώνη των ~245 βάσεων (βλέπε 1.1). Ακολούθησε πέψη του πλασμιδιακού φορέα pGL3b στη θέση HindIII, έγινε επεξεργασία αυτής με Klenow πολυμεράση για να είναι συμβατή με την NarI/Klenow και έπειτα αποφωσφορυλιώθηκαν τα άκρα του φορέα με την φωσφατάση της Roche (βλέπε κεφ.1.1). Στην θέση αυτή κλωνοποιήθηκαν τα NarI κομμάτια από τον φυσικό και μεταλλαγμένο υποκινητή αντίστοιχα. Ακολούθησαν διαγνωστικές πέψεις για να οριοθετηθεί ο προσανατολισμός και ο αριθμός των κομματιών που εισήχθησαν. Με SacII πέψη έγινε η διάγνωση του αριθμού των κομματιών και με SacI/MscI έγινε διάγνωση του προσανατολισμού. Οι κλώνοι με τον σωστό προσανατολισμό έδιναν ζώνη στις 116 βάσεις, ενώ με τον ανάποδο προσανατολισμό 214 βάσεις.

Από όλους του κλώνους που διαγνώστηκαν μόνο ένας κλώνος με το αγρίου τύπου συντηρημένο κομμάτι του υποκινητή είχε εισαχθεί μια φορά και με τον σωστό προσανατολισμό, όλοι οι υπόλοιποι στην συντριπτική πλειοψηφία είχαν εισαχθεί με τον ανάποδο προσανατολισμό ή είχαν εισαχθεί πάνω από μια φορές. Ο κλώνος αυτός λόγω της μοναδικότητάς του επιβεβαιώθηκε με μια ακόμη διαγνωστική πέψη με NotI/MscI. Για να έχει τον σωστό προσανατολισμό έπρεπε να δώσει 291 βάσεις ενώ με τον ανάποδο 391 βάσεις. Επιβεβαιώθηκε ο σωστός προσανατολισμός. Αντίστοιχα στην κατασκευή που έφερε την μεταλλαγή το NarI κομμάτι σε όλες τις περιπτώσεις είχε εισαχθεί με τον ανάποδο προσανατολισμό ή πολλές φορές.

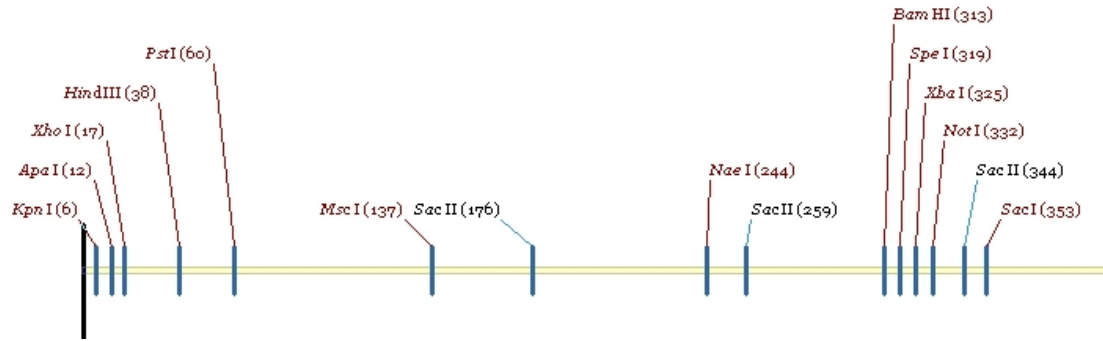
Επομένως με την συγκεκριμένη στρατηγική κλωνοποίησης καταφέραμε να κλωνοποιήσουμε μόνο το αγρίου τύπου NarI κομμάτι στη H3 θέση του pGL3b.

Η κατασκευή αυτή ονομάστηκε **pGL3b/H3K1w_NarI_245bK1w_Olig1_wt (εικόνα 11.)**.



Εικόνα 11. Χάρτης πλασμιδιακής κατασκευής που φέρει την συντηρημένη περιοχή 245 βάσεων του Olig1 υποκινητή αγρίου τύπου. Ο σχεδιασμός έγινε με το πρόγραμμα Vector NTI της Informax.

Για να μπορέσουμε να κλωνοποιήσουμε με τον σωστό τρόπο και την συντηρημένη περιοχή που φέρει την μεταλλαγή ακολουθήσαμε διαφορετική στρατηγική. Η στρατηγική περιελάμβανε κλωνοποίηση του NarI κομματιού που είχε ήδη επεξεργασθεί με Klenow πολυμεράση στην SmaI περιοριστική θέση του pSK+ (promega). Έπειτα ακολούθησε διαγνωστική πέψη για τον προσδιορισμό του αριθμού και του προσανατολισμού και έγινε υποκλωνοποίηση στον pGL3b πλασμιδιακό φορέα με τον ορθό προσανατολισμό. Πιο συγκεκριμένα μετά την κλωνοποίηση του NarI/klenow κομματιού στην SmaI του pSK+, έγινε διάγνωση με SacII. Υπάρχουν δυο SacII εντός του κομματιού του υποκινητή σε απόσταση 84 βάσεων και υπάρχει και άλλη μια SacII θέση στον πολυσυνδέτη του pSK σε απόσταση 124 βάσεων (**εικόνα 12**).



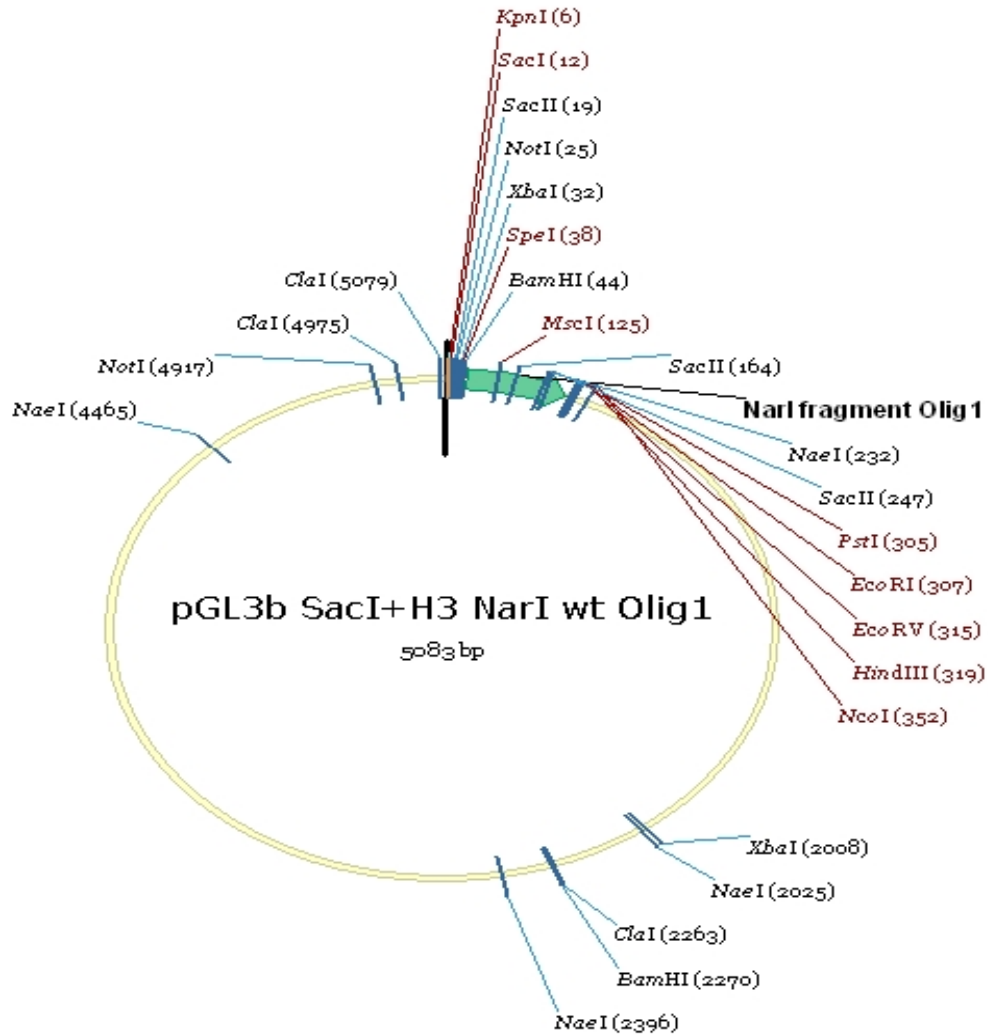
Εικόνα 12. Στην εικόνα απεικονίζεται ο pSK+ πολυσυνδέτης με το NarI κομμάτι του Olig1 υποκινητή. Ο σχεδιασμός έγινε με το πρόγραμμα Vector NTI της Informax.

Για να οριοθετηθεί τώρα ο προσανατολισμός έγινε διαγνωστική πέψη με NaeI. Υπάρχει μια NaeI θέση εντός του κομματιού του υποκινητή και μια NaeI θέση στον pSK+ ανοδικά πριν την SmaI θέση στον πολυσυνδέτη (εικόνα 12.). Αν η ζώνη κατά την διάγνωση είναι 562 βάσεις τότε θα πρέπει να υποκλωνοποιηθεί στον pGL3b πλασμιδιακό φορέα στις θέσεις KpnI/BglIII, ενώ αν η ζώνη είναι 453 βάσεις θα πρέπει να υποκλωνοποιηθεί ως SacI/H3 για να έχει τον σωστό προσανατολισμό. Ο τρόπος υποκλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε και για το φυσικό αλλά και για το μεταλλαγμένο συντηρημένο κομμάτι του Olig1 υποκινητή ήταν ο δεύτερος (εικόνα 13.).

Οι κατασκευές ονομάστηκαν :

pGL3b/SacI+H3_NarI245klw_Olig1_wt_pSK+

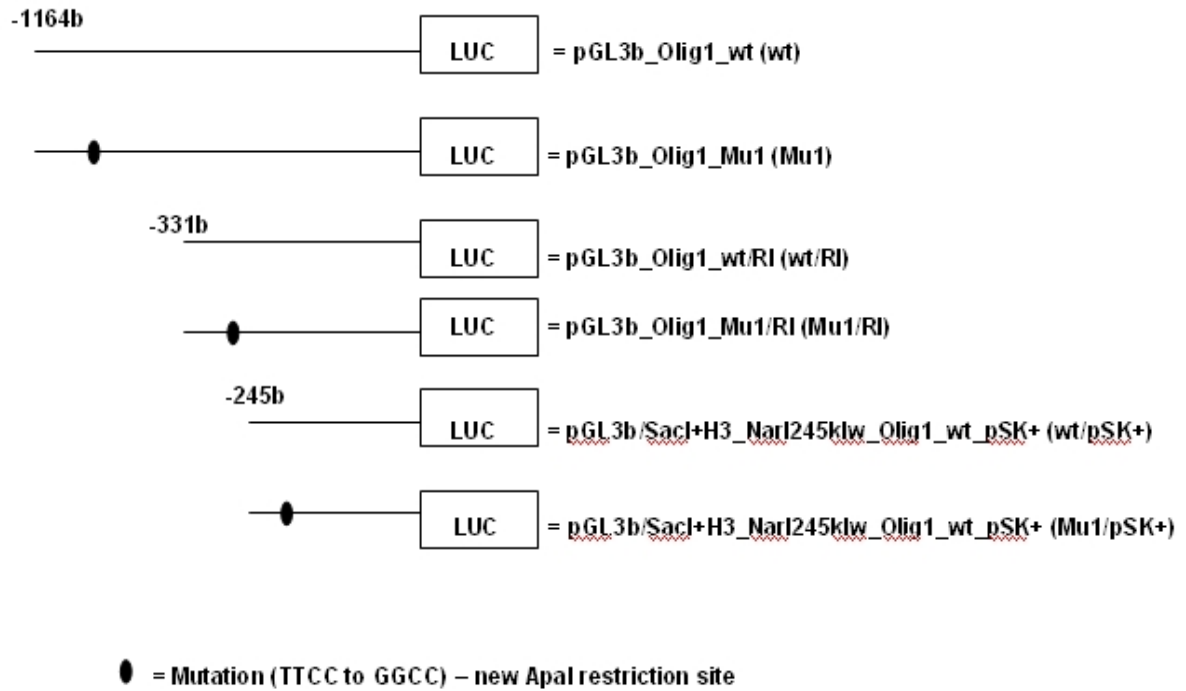
pGL3b/SacI+H3_NarI245klw_Olig1_Mu1_pSK+



Εικόνα 13. Χάρτης πλασμιδιακής κατασκευής που φέρει την συντηρημένη περιοχή 245 βάσεων του Olig1 υποκινητή γονιδίου φυσικού και μεταλλαγμένου αντίστοιχα. Το κομμάτι των 245 βάσεων κλωνοποιήθηκε πρώτα στην θέση SmaI του pSK+ λαο έπειτα υποκλωνοποιήθηκε στις θέσεις SacI/H3 του pGL3b ώστε να φέρει τον σωστό προσανατολισμό. Ο σχεδιασμός έγινε με το πρόγραμμα Vector NTI της Informax.

14.5 Σχηματική σύνοψη όλων των πλασμιδιακών κατασκευών που φέρουν τμήματα του Olig1 υποκινητή.

Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνονται σχηματικά σε συνοπτική μορφή οι πλασμιδιακές κατασκευές και τα τμήματα του Olig1 υποκινητή που είναι κλωνοποιημένα σε αυτά. Φαίνονται και οι αντίστοιχες μεταλλαγμένες μορφές τους.



Εικόνα 14. Συνοπτική σχηματική αναπαράσταση όλων των πλασμιδιακών κατασκευών στα οποία φαίνονται τα τμήματα του Olig1 υποκινητή που είναι κλωνοποιημένα. Η μαύρη κουκίδα αντιπροσωπεύει το αντίστοιχο σημείο όπου έχει γίνει η μεταλλαγή της μοναδικής ETS αλληλουχίας εντός της συντηρημένης περιοχής με τον άνθρωπο.

Αποτελέσματα

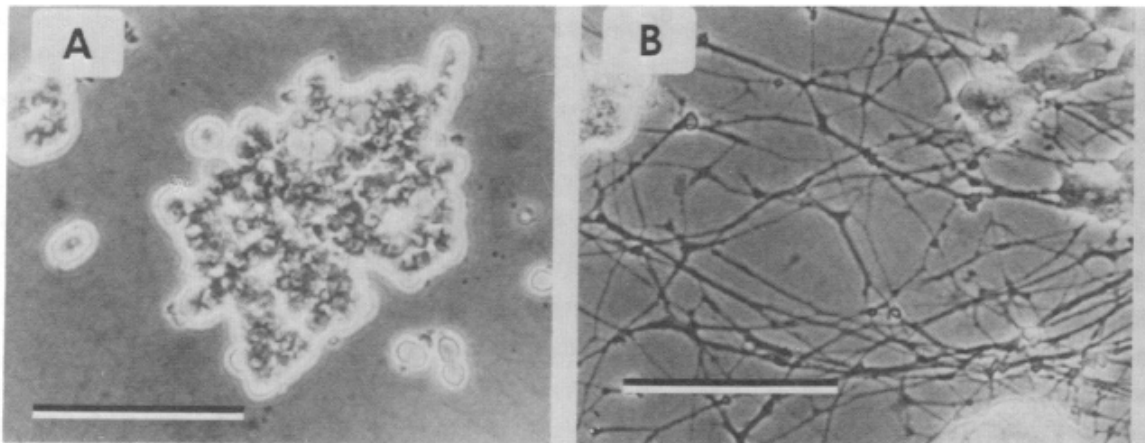
15. Μελέτη της έκφρασης του Olig1 γονιδίου.

Για να μελετηθεί η λειτουργία του ERF στο Olig1 γονίδιο, αρχικά έπρεπε να βρεθεί μια κυτταρική σειρά η οποία να εκφράζει σταθερά το Olig1 γονίδιο. Δεδομένου από την βιβλιογραφία ότι το Olig1 γονίδιο σχετίζεται με την διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων στον ποντικό θεωρήθηκε σκόπιμο ότι η έκφραση του γονιδίου αυτού θα έπρεπε να αυξάνεται κατά την νευρική διαφοροποίηση και ειδικά κατά την διαφοροποίηση σε ολιγοδενδροκύτταρα. Για το λόγο αυτό έγιναν οι παρακάτω διαφοροποιήσεις (βλ. 15.1, 15.2).

15.1 Διαφοροποίηση των PC12 κυττάρων με NGF και μελέτη της Olig1 έκφρασης στις 2 συνθήκες.

Η διαφοροποίηση έχει περιγραφεί αναλυτικά στην παρ.12. Μετά την 5^η ημέρα διαφοροποίησης παρατηρήθηκε φαινοτυπικά ότι τα κύτταρα PC12 δεν διαφοροποιούνται περαιτέρω. Έγινε απομόνωση RNA από τα διαφοροποιημένα για 5 ημέρες με NGF και αδιαφοροποίητα PC12 και 5μg ολικού RNA οδηγήθηκαν για παρασκευή cDNA (βλέπε 10.1). Τέλος έγινε PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR – βλέπε 10.2) ώστε να ταυτοποιηθεί η έκφραση του Olig1 και η διαφορά μεταξύ των δυο συνθηκών.

Το πείραμα επαναλήφθηκε δυο φορές και ελέγχθηκε με δυο διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών στο 3'UTR του Olig1 γονιδίου αρουραίου (βλέπε κεφάλαιο11). Τα αποτελέσματα σε όλες τις περιπτώσεις ήταν ίδια και δεν υπήρχε καμία έκφραση Olig1. Επομένως η κυτταρική αυτή σειρά αν και διαφοροποιείται σε νευρικού τύπου κύτταρα, εφόσον δεν εκφράζει το απαραίτητο για εμάς Olig1 γονίδιο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τους πειραματισμούς μας.



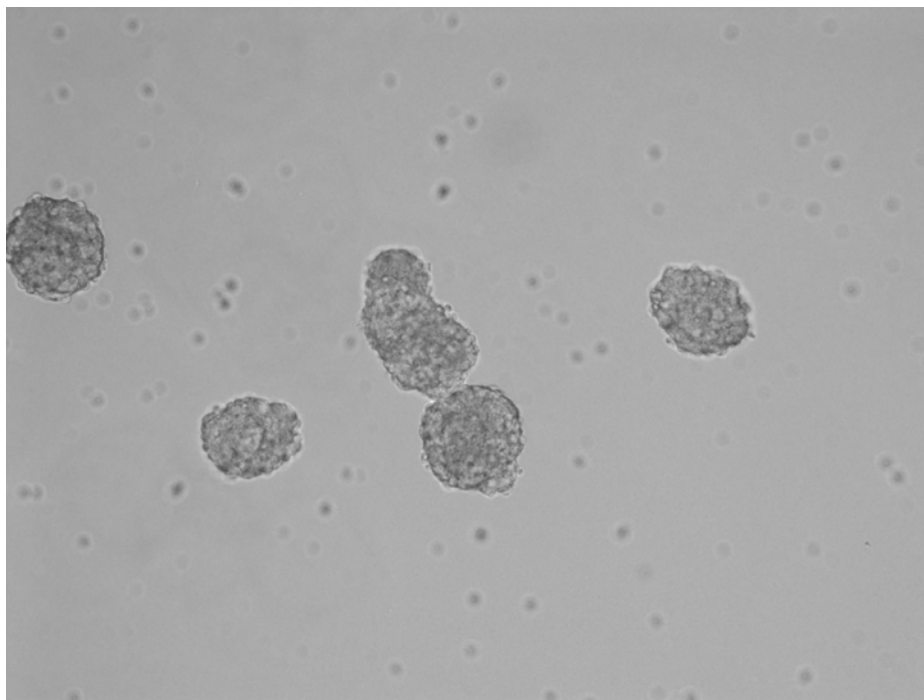
Εικόνα 15. Μικρογραφίες από ανάστροφο μικροσκόπιο των κυττάρων της PC12 κυτταρικής σειράς σε αδιαφοροποίητη μορφή (A) και υπο παρουσία NGF για 14 ημέρες (B). Green et al. 1976

15.2 Διαφοροποίηση των P19 με RA και μελέτη της Olig1 έκφρασης στις 2 συνθήκες.

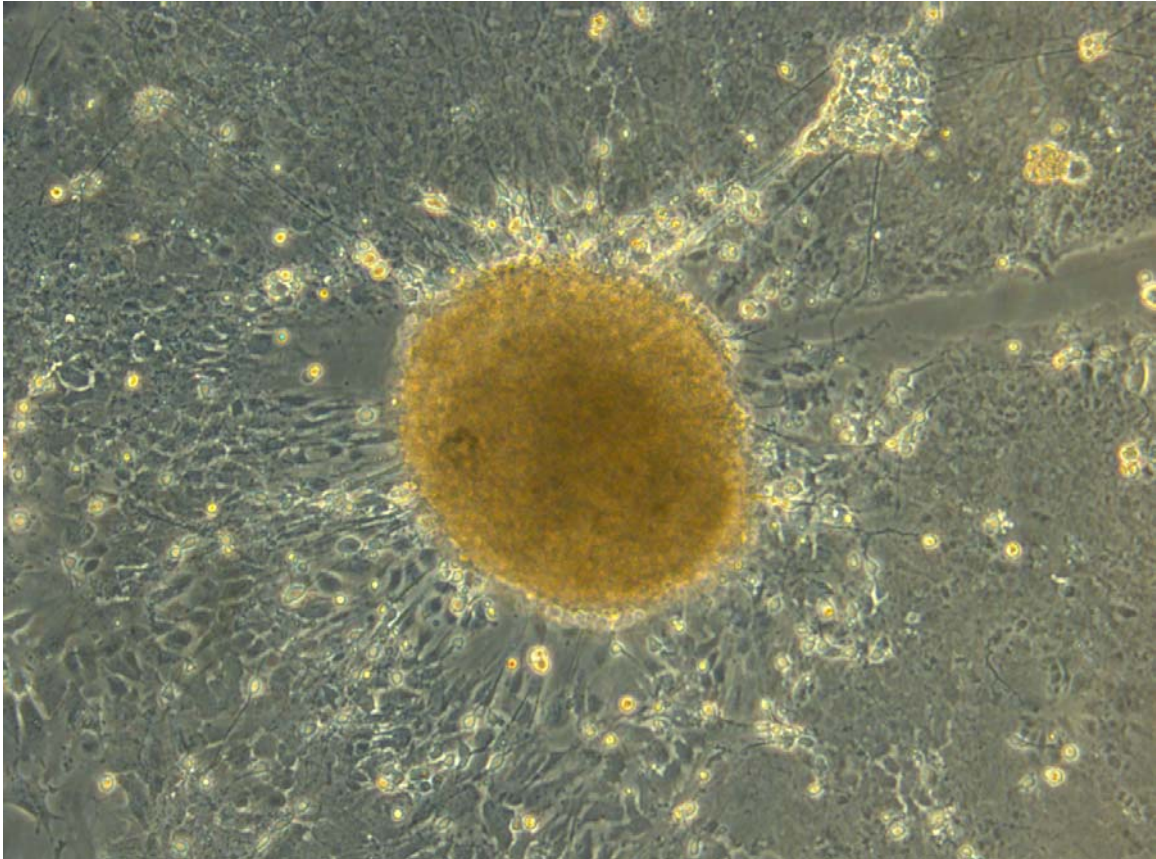
Εφόσον τα PC12 δεν εξέφραζαν Olig1 και στις 2 συνθήκες, στραφήκαμε σε μια άλλη κυτταρική σειρά, την P19. Η διαφοροποίηση έχει περιγραφεί αναλυτικά στην παράγραφο 13. Έγιναν πολλοί πειραματισμοί με βακτηριολογικά πετρί από τρεις διαφορετικές εταιρίες ώστε να επιλεγεί ο κατάλληλος συνδυασμός που θα κάνει την καλύτερη δυνατή επιλογή των αδιαφοροποίητων κυττάρων. Αρχικά κατά την επιλογή στο πρώτο 24ωρο επιλέχθηκε η χρήση του βακτηριολογικού πετρί της SARSD EDT στο οποίο παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα είχαν την τάση να προσκολλώνται σε μεγαλύτερο ποσοστό. Έπειτα στρώθηκαν σε τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας της SARSD EDT και έπειτα επάχθηκαν με ρετινικό οξύ σε βακτηριολογικό πετρί της GREINER. Στο πετρί της Greiner παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα είχαν την τάση να προσκολλούνται σε μικρότερο ποσοστό. Με την χρήση του βακτηριολογικού αυτού πετρί, τα κύτταρα εξαναγκάστηκαν να επαχθούν σε μεγαλύτερο ποσοστό λόγω της ασθενέστερης προσκόλλησής τους σε αυτό. Έπειτα επιστρώθηκαν σε τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας της SARSD EDT και αφέθηκαν να διαφοροποιηθούν για 16 ημέρες.

Απομονώθηκε RNA μετά την επαγωγή με RA (4^η μέρα), κατά την διαφοροποίηση την 16^η μέρα και για την σύγκριση απομονώθηκε RNA και από τα P19 που είχαν επωαστεί με 95% αιθανόλη (control). Κατασκευάστηκε cDNA και έγινε PCR πραγματικού χρόνου όπως έχει ήδη προαναφερθεί παραπάνω με τους αντίστοιχους εκκινητές για το 3'UTR ποντικίσου Olig1 γονιδίου.

Και σε αυτή την κυτταρική σειρά δεν παρατηρήθηκε καμία απολύτως έκφραση του Olig1 γονιδίου σε καμία από τις 3 συνθήκες.



Εικόνα 16. Μικρογραφία από ανάστροφο μικροσκόπιο κατά την φάση της επαγωγής σε βακτηριολογικό petri με 1μM RA για 4 ημέρες. Φαίνεται η χαρακτηριστική δομή των embryoid bodies – συσσωματώματα P19 κυττάρων που δημιουργούνται κατά την διάρκεια της επαγωγής.



Εικόνα 17. Μικρογραφία από ανάστροφο μικροσκόπιο κατά την 14^η μέρα διαφοροποίησης των P19 εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Παρουσιάζεται ένας ετερογενής πληθυσμός από διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους εντός των οποίων διακρίνονται συσσωματώματα κυττάρων με σφαιρική δομή. Στα συσσωματώματα αυτά δημιουργούνται άφθονες νευρικές απολήξεις οι οποίες δημιουργούν ένα δίκτυο. Οι απολήξεις εκτείνονται μεταξύ των κυττάρων στα συσσωματώματα καθώς επίσης και σε γειτονικούς κυτταρικούς τύπους. Οι απολήξεις αυτές είχαν πολύ συχνά μεγάλο μήκος.

15.3 Απομόνωση πρωτογενών ποντικίστων ινοβλαστών (MEFs) ημέρας 10.5 και 13.5 κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και έλεγχος της Olig1 έκφρασης.

Επειδή κατά την διαφοροποίηση των κυτταρικών σειρών PC12 και P19 σε νευρικού τύπου κύτταρα δεν εκφράστηκε το Olig1 γονίδιο, το ενδιαφέρον στράφηκε σε πρωτογενή κύτταρα από έμβρυα ποντικών, γύρω από την ημέρα 12 εμβρυϊκής ανάπτυξης που είναι γνωστό ότι ξεκινά η διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων. Πρωτογενής ινοβλάστες απομονώθηκαν από έμβρυα ποντικών στις αντίστοιχες ημέρες όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην παράγραφο 3.5 .

15.3.1 Έλεγχος της Olig1 έκφρασης σε πρωτογενής ποντικίστους ινοβλάστες MEFs από κεφάλια εμβρύου ποντικού κατά την 13,5 ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στην παρ.3.5 απομονώθηκαν ποντικίσιοι ινοβλάστες MEFs από κεφάλια εμβρύων αγρίου τύπου κατά την 13,5 ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης. Τα κεφάλια αφού διαμελίστηκαν με την πιπέτα, αναπτύχθηκαν σε συνθήκες που έχουν περιγραφεί στο κεφ. 3.1. Σε περίπου ένα εκατομμύριο κύτταρα κατά το πρώτο πέρασμα τους (P1) έγινε απομόνωση RNA σε κανονικές συνθήκες και σε συνθήκη για 4 ώρες έλλειψης ορού, όπως έχει περιγραφεί στο κεφ.6. Έπειτα ακολούθησε κατασκευή cDNA και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του Olig1 γονιδίου όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στο κεφ.9.

E13,5 wt MEFs P1, only heads	5/12/2006	CT	Quantity
E13,5 P1 Expo cDNA Olig1	Unknown	26,44	6,86E-04
E13,5 P1 Expo RNA Olig1	Unknown	Undetermined	
E13,5 P1 Starv. cDNA Olig1	Unknown	26,75	5,73E-04
E13,5 P1 Starv. RNA Olig1	Unknown	Undetermined	
E13,5 P1 Expo cDNA GAPDH	Unknown	18,21	7,88E-02
E13,5 P1Starv. cDNA GAPDH	Unknown	17,25	1,38E-01
std1 GAPDH	Standard	13,9	1
std0.1 GAPDH	Standard	17,62	1,00E-01
std0.01 GAPDH	Standard	21,89	1,00E-02

Πίνακας 2. Πίνακας όπου φαίνονται τα αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση μέσω PCR πραγματικού χρόνου του Olig1 και GAPDH γονιδίου, στους ποντικίστους ινοβλάστες από κεφάλια εμβρύων ποντικίων 13,5 ημέρας εμβρυϊκής ανάπτυξης κατά το πρώτο πέρασμα τους (P1), στις 2 συνθήκες σε in vitro καλλιέργεια.

		Olig1 / GAPDH
E13,5 P1 MEFs_ only heads	EXPO	8,71E-03
	4h Starvation	4,15E-03

Πίνακας 3. Πίνακας στον οποίο έχει γίνει κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του Olig1 γονιδίου σύμφωνα με το σταθερά εκφραζόμενο GAPDH γονίδιο, στις 2 συνθήκες κατά το πρώτο πέρασμά τους σε in vitro καλλιέργεια. Η κανονικοποίηση γίνεται με τον υπολογισμό του λόγου του γονιδίου στόχου (Olig1) προς το σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο, στο ίδιο πάντα δείγμα. Οι τιμές αυτές αντιπροσωπεύουν τις απόλυτες τιμές έκφρασης του Olig1 γονιδίου.

Το πείραμα επαναλήφθηκε με τα ίδια κύτταρα κατά το πρώτο (P1) και τρίτο (P3) πέρασμα τους στην καλλιέργεια. Ο στόχος ήταν να δούμε κατά πόσο διατηρείται σε συνθήκες in vitro καλλιέργειας η έκφραση του Olig1 γονιδίου στους πρωτογενής ινοβλάστες εμβρύων ποντικού κατά την 13,5 ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης.

E13,5 wt MEFs P1+P3 only heads 10/1/2007

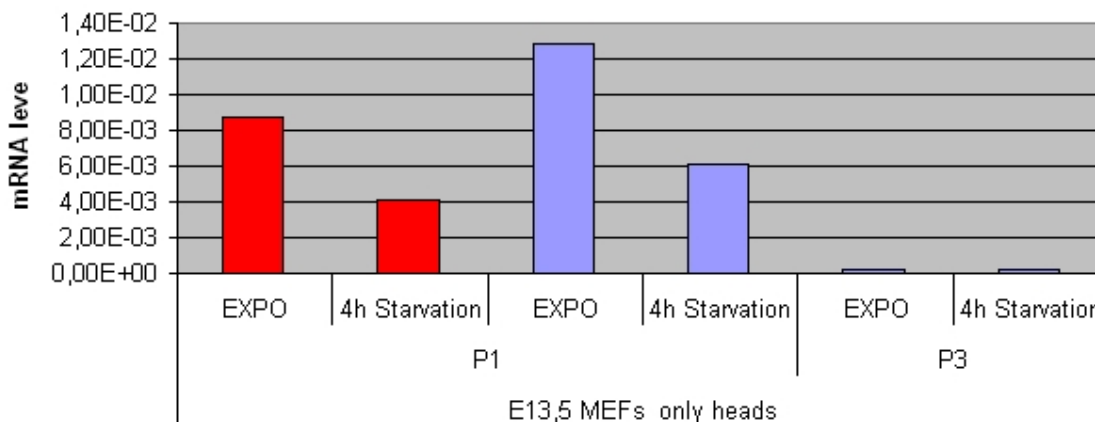
P1 cDNA Expo13.5 Olig1	Unknown	26,36	4,35E-04
P1 RNA Expo13.5 Olig1	Unknown	Undetermined	
P3 cDNA Expo13.5 Olig1	Unknown	29,68	5,63E-05
P3 RNA Expo13.5 Olig1	Unknown	Undetermined	
P1 cDNA Starv13.5 Olig1	Unknown	26,36	4,34E-04
P1 RNA Starv13.5 Olig1	Unknown	Undetermined	
P3 cDNA Starv13.5 Olig1	Unknown	30,97	2,53E-05
P3 RNA Starv13.5 Olig1	Unknown	Undetermined	
P1 cDNA Expo13.5 GAPDH	Unknown	19,29	3,40E-02
P1 cDNA Starv13.5 GAPDH	Unknown	18,08	7,15E-02
P3 cDNA Expo13.5 GAPDH	Unknown	15,86	2,82E-01
P3 cDNA Starv13.5 GAPDH	Unknown	17,53	1,01E-01
std1 GAPDH	Standard	13,91	1
std0.1 GAPDH	Standard	17,33	1,00E-01
std0.01 GAPDH	Standard	21,38	1,00E-02

Πίνακας 4. Πίνακας όπου φαίνονται τα αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση μέσω PCR πραγματικού χρόνου του Olig1 και GAPDH γονιδίου, στους ποντικίστους ινοβλάστες από κεφάλια εμβρύων ποντικών 13,5 ημέρας εμβρυϊκής ανάπτυξης κατά το πρώτο και τρίτο πέρασμα τους (P1 + P3), στις 2 συνθήκες σε in vitro καλλιέργεια.

			Olig1 / GAPDH
E13,5 MEFs_only heads	P1	EXPO	1,28E-02
		4h Starvation	6,07E-03
	P3	EXPO	2,00E-04
		4h Starvation	2,50E-04

Πίνακας 5. Πίνακας στον οποίο έχει γίνει κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του Olig1 γονιδίου σύμφωνα με το σταθερά εκφραζόμενο GAPDH γονίδιο, στους πρωτογενείς ποντικίστους ινοβλάστες από κεφάλια εμβρύων ποντικών κατά την 13,5 ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης, στις 2 συνθήκες κατά το πρώτο και τρίτο πέρασμά τους σε in vitro καλλιέργεια. Οι τιμές αυτές αντιπροσωπεύουν τις απόλυτες τιμές έκφρασης του Olig1 γονιδίου.

Olig1 / GAPDH mRNA levels - MEFs E13,5 only heads

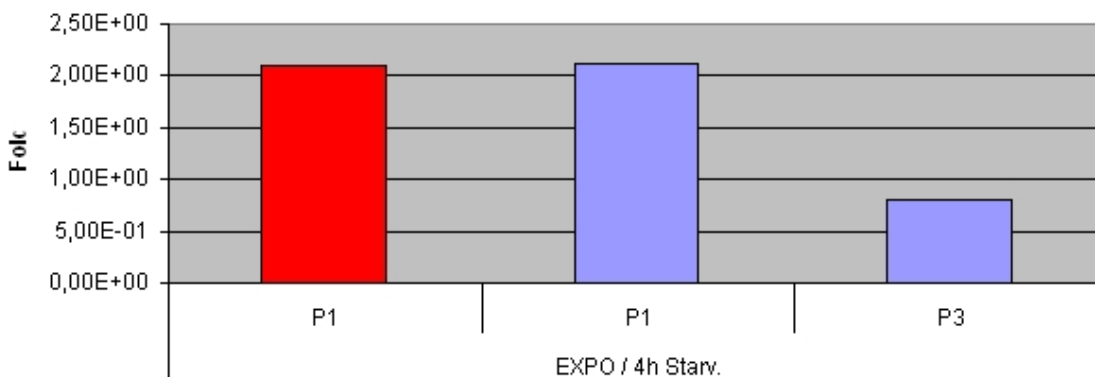


Γράφημα 1. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η απόλυτη έκφραση του Olig1 (έπειτα από κανονικοποίηση με το σταθερά εκφραζόμενο GAPDH γονίδιο) όπως φαίνεται στον πίνακα 3, ενώ με μπλε απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης σύμφωνα με τον πίνακα 5.

	P1	2,10E+00
	P1	2,11E+00
EXPO / 4h Starv.	P3	7,97E-01

Πίνακας 6. Πίνακας στον οποίο φαίνεται ο λόγος της κανονικής συνθήκης προς την συνθήκη έλλειψης ορού κατά το πρώτο και τρίτο πέρασμα των κυττάρων στην καλλιέργεια. Το αποτέλεσμα που προκύπτει αντιπροσωπεύει το βαθμό καταστολής του Olig1 γονιδίου στη συνθήκη έλλειψης ορού.

EXPO / 4h Starvation - Fold repression

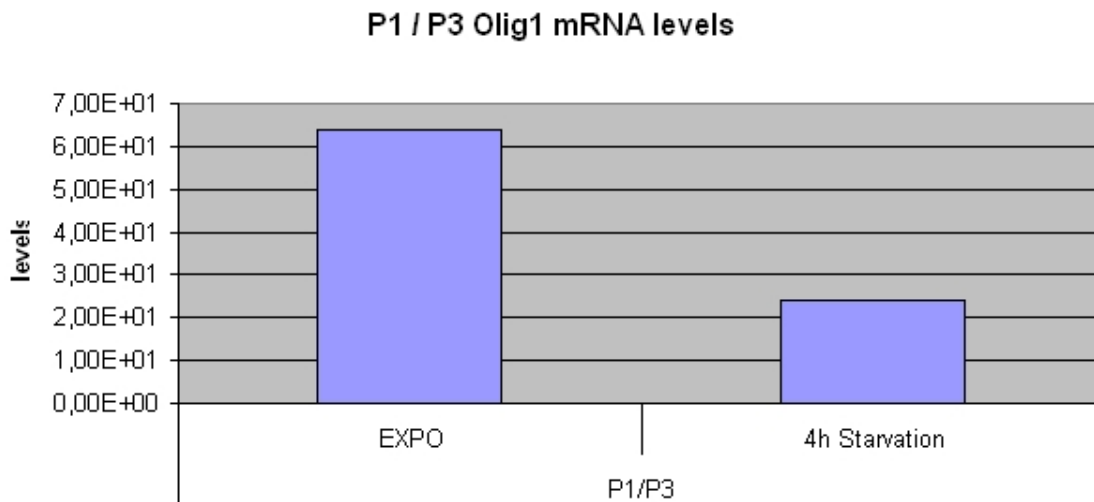


Γράφημα 2. Απεικονίζεται ο λόγος της απόλυτης έκφρασης του Olig1 της κανονικής συνθήκης ως προς την συνθήκη έλλειψης ορού. Με κόκκινο απεικονίζεται ο λόγος του Olig1 σύμφωνα με τον πίνακα 3, ενώ με μπλε σύμφωνα με τον πίνακα 5. Κατά το πρώτο πέρασμα των κυττάρων στην καλλιέργεια και στις δυο περιπτώσεις η έκφραση του Olig1 ελαττώνεται κατά 2,11 φορές σε συνθήκη έλλειψης ορού για 4 ώρες συγκριτικά με την κανονική συνθήκη. Αντιθέτως κατά το τρίτο

πέρασμά τους στην καλλιέργεια η έκφραση του *Olig1* σε συνθήκη έλλειψης ορού οριακά αυξάνεται συγκριτικά με την κανονική συνθήκη. Φαίνεται λοιπόν ότι κατά το πρώτο πέρασμα των κυττάρων σε καλλιέργεια ενώ η έκφραση του *Olig1* μειώνεται σε συνθήκη έλλειψης ορού κατά 2,1 φορές, κατά το τρίτο πέρασμα των κυττάρων η έκφραση αυξάνεται κατά 1,25 φορές.

P1/P3	EXPO	6,41E+01
	4h Starvation	2,42E+01

Πίνακας 7. Απεικονίζεται ο λόγος των απόλυτων επιπέδων έκφρασης του *Olig1* κατά το πέρασμα των κυττάρων από το πρώτο στο τρίτο και στις δυο συνθήκες.



Γράφημα 3. Σχηματική αναπαράσταση στην οποία απεικονίζεται ο λόγος των απόλυτων επιπέδων έκφρασης κατά το πέρασμα των κυττάρων από το πρώτο στο τρίτο πέρασμα και στις δυο συνθήκες σύμφωνα με τον πίνακα 7. Η έκφραση του *Olig1* μειώνεται από το πρώτο στο τρίτο πέρασμα κατά 64 φορές στην κανονική συνθήκη και κατά 24 φορές στη συνθήκη έλλειψης ορού.

Αρχικά φαίνεται πως κατά το πρώτο πέρασμα των κυττάρων στην καλλιέργεια τα επίπεδα έκφρασης του *Olig1* σε συνθήκη έλλειψης ορού ελαττώνονται κατά 2,1 φορές συγκριτικά με αυτά της κανονικής συνθήκης. Αντίθετα κατά το τρίτο πέρασμα των κυττάρων παρουσιάζεται μια μικρή αύξηση, κατά 1,25 φορές, στην έκφραση του *Olig1* σε συνθήκη έλλειψης ορού συγκριτικά με αυτήν της κανονικής συνθήκης (**Γράφημα 2.**). Σε κανονική συνθήκη τα επίπεδα έκφρασης του *Olig1* κατά το πρώτο πέρασμα (P1) των κυττάρων στην καλλιέργεια είναι 64 φορές περισσότερα συγκρινόμενα με αυτά του τρίτου. Αντίστοιχα σε συνθήκη έλλειψης ορού η έκφραση του γονιδίου κατά το πρώτο πέρασμα είναι 24 φορές υψηλότερη από ότι στο τρίτο (**Γράφημα 3.**).

Οι πρωτογενής ινοβλάστες από κεφάλια εμβρύων ποντικών 13,5 ημέρας εμβρυϊκής ανάπτυξης φαίνεται πως σε *in vitro* καλλιέργεια αδυνατούν να διατηρήσουν την έκφραση του *Olig1* γονιδίου. Ίσως κατά τα περάσματα των κυττάρων στην καλλιέργεια τα κύτταρα που αρχικά εκφράζουν το γονίδιο αυτό δεν επιβιώνουν ή παύουν στις συνθήκες όπου τα καλλιεργήσαμε να διαφοροποιούνται.

15.3.2 Έλεγχος της *Olig1* έκφρασης σε ποντικίσσιους ινοβλάστες MEFs εμβρύου ποντικού κατά την 10,5 ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στην παρ. 3.5 απομονώθηκαν ποντικίσσιοι ινοβλάστες MEFs από έμβρυα αγρίου τύπου και ετερόζυγα ως προς τον ERF, κατά την 10,5 ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης. Στα έμβρυα απουσίαζαν τα κεφάλια και η καρδιά, διαμελίστηκαν με την πιπέτα και αναπτύχθηκαν σε συνθήκες που έχουν περιγραφεί στο κεφ. 3.1. Σε περίπου ένα εκατομμύριο κύτταρα κατά το πρώτο πέρασμα τους (P1) έγινε απομόνωση RNA σε κανονικές συνθήκες και σε συνθήκη έλλειψης ορού για 4 ώρες, όπως έχει περιγραφεί στο κεφ.6. Έπειτα ακολούθησε κατασκευή cDNA και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του *Olig1* γονιδίου όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στο κεφ.9.

MEFs E10,5 P3, ERF(+/-) heterozygous, w/o heads		Ct	Quantity
E10.5 P3 cDNA Expo <i>Olig1</i>	Unknown	28,33	2,63E-06
E10.5 P3 RNA Expo <i>Olig1</i>	Unknown	Undetermined	
E10.5 P3 cDNA Starv <i>Olig1</i>	Unknown	27,82	3,81E-06
E10.5 P3 RNA Starv <i>Olig1</i>	Unknown	Undetermined	
E10.5 P3 cDNA Expo GAPDH	Unknown	15,26	4,19E-02
E10.5 P3 cDNA Starv GAPDH	Unknown	16,18	2,13E-02
std0.1 GAPDH	Standard	14,08	1,00E-01
std0.01 GAPDH	Standard	17,19	1,00E-02
Control Water GAPDH	NTC	Undetermined	

Πίνακας 8. Πίνακας όπου φαίνονται τα αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση μέσω PCR πραγματικού χρόνου του *Olig1* και GAPDH γονιδίου, στους ποντικίσσιους ινοβλάστες εμβρύων ποντικών ετερόζυγων ως προς τον ERF (ERF +/-) κατά την 10,5 ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης κατά το τρίτο πέρασμα τους (P3), στις 2 συνθήκες σε in vitro καλλιέργεια. Το ένα από τα τρία standards δεν ήταν γραμμικό και δεν συμπεριλήφθηκε στην ανάλυση.

		<i>Olig1</i> /GAPDH
E10,5 P3 MEFs_ ERF(+/-), w/o heads	EXPO	6,28E-05
	4h Starvation	1,79E-04

Πίνακας 9. Πίνακας στον οποίο έχει γίνει κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του *Olig1* γονιδίου σύμφωνα με το σταθερά εκφραζόμενο GAPDH γονίδιο, των MEFs ERF (+/-) κατά την 10,5 ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης στις 2 συνθήκες κατά το τρίτο πέρασμά τους σε in vitro καλλιέργεια. Οι τιμές αυτές αντιπροσωπεύουν τις απόλυτες τιμές έκφρασης του *Olig1* γονιδίου. Στον πίνακα φαίνεται πως η έκφραση του *Olig1* γονιδίου κατά το τρίτο πέρασμα τους στην καλλιέργεια αυξάνεται σε συνθήκη έλλειψης ορού κατά 2,85 φορές συγκριτικά με την κανονική συνθήκη.

E10,5 MEFs, wt, P1+P3 w/o heads Dissection 1		cDNA/RNA	
E10.5 wt P1 Expo cDNA <i>Olig1</i>	Unknown	28,71	1,42E+00
E10.5 wt P1 Starved 4h cDNA <i>Olig1</i>	Unknown	28,21	7,67E+00
E10.5 wt P3 Expo cDNA <i>Olig1</i>	Unknown	27,1	8,74E+00
E10.5 wt P3 starved 4h cDNA <i>Olig1</i>	Unknown	27,07	8,95E+00
E10.5 wt P1 Expo cDNA GAPDH	Unknown	15,99	6,15E+03

E10.5 wt P1 Starved 4h cDNA GAPDH	Unknown	17,22	5,11E+03
E10.5 wt P3 Expo cDNA GAPDH	Unknown	14,63	1,21E+03
E10.5 wt P3 starved 4h cDNA GAPDH	Unknown	13,93	2,61E+04
std1 GAPDH	Standard	18,41	1
std0.1 GAPDH	Standard	21,24	1,00E-01
std0.01 GAPDH	Standard	24,06	1,00E-02

Πίνακας 10. Πίνακας όπου φαίνονται τα αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση μέσω PCR πραγματικού χρόνου του Olig1 και GAPDH γονιδίου, στους ποντικίστους ινοβλάστες εμβρύων ποντικών αγρίου τύπου κατά την 10,5 ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης στο πρώτο και τρίτο πέρασμα τους (P1 + P3), στις 2 συνθήκες σε in vitro καλλιέργεια.

			Olig1/GAPDH
E10,5 MEFs_w/o heads	P1	EXPO	2,30E-04
		4h Starvation	1,50E-03
	P3	EXPO	7,21E-03
		4h Starvation	3,43E-04

Πίνακας 11. Πίνακας στον οποίο έχει γίνει κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του Olig1 γονιδίου σύμφωνα με το σταθερά εκφραζόμενο GAPDH γονίδιο, σε MEFs αγρίου τύπου 10,5 ημέρας εμβρυϊκής ανάπτυξης στις 2 συνθήκες κατά το πρώτο και τρίτο πέρασμά τους σε in vitro καλλιέργεια. Οι τιμές αυτές αντιπροσωπεύουν τις απόλυτες τιμές έκφρασης του Olig1 γονιδίου. Φαίνεται πως η έκφραση του Olig1 γονιδίου κατά το πρώτο πέρασμα των κυττάρων σε καλλιέργεια αυξάνεται 6,52 φορές σε συνθήκη έλλειψης ορού συγκριτικά με την κανονική συνθήκη, ενώ αντίστοιχα κατά το τρίτο πέρασμά τους η έκφραση του Olig1 μειώνεται στην συνθήκη έλλειψης ορού συγκριτικά με την κανονική συνθήκη.

Η PCR πραγματικού χρόνου του πίνακα 10 επαναλήφθηκε άλλη μια φορά ώστε να επιβεβαιωθεί (πίν.12).

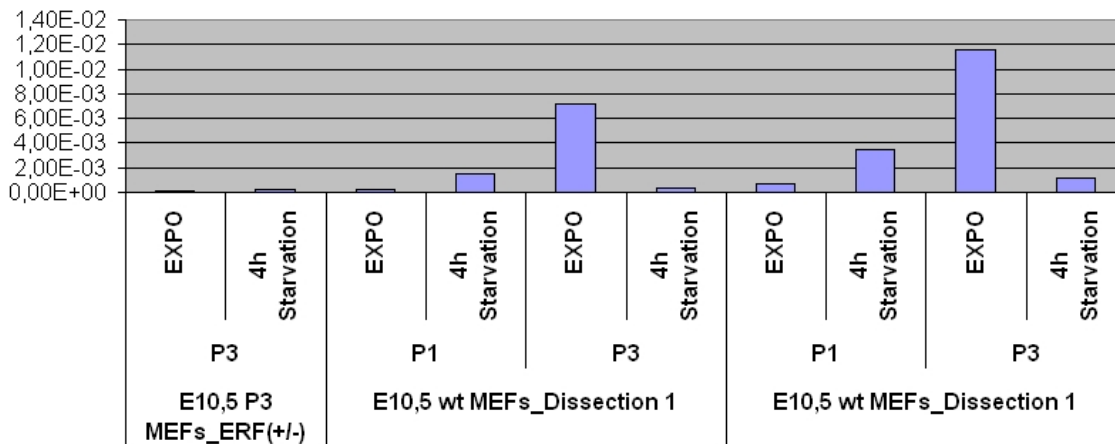
E10,5 MEFs wt P1+P3 w/o heads Dissection 1			cDNA/RNA
E10.5 wt P1 Expo cDNA Olig1	Unknown	27,4	4,25E+00
E10.5 wt P1 Starved 4h cDNA Olig1	Unknown	27,21	1,78E+01
E10.5 wt P3 Expo cDNA Olig1	Unknown	26,54	1,40E+01
E10.5 wt P3 Starved 4h cDNA Olig1	Unknown	25,61	2,95E+01
std1 GAPDH	Standard	18,16	
std0.1 GAPDH	Standard	21,53	
std0.01 GAPDH	Standard	23,88	
Negative	NTC		Undetermined

Πίνακας 12. Πίνακας όπου φαίνονται τα αποτελέσματα από την ποσοτικοποίησης μέσω PCR πραγματικού χρόνου του Olig1 και GAPDH γονιδίου, στους ποντικίστους ινοβλάστες εμβρύων ποντικών αγρίου τύπου κατά την 10,5 ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης στο πρώτο και τρίτο πέρασμα τους (P1 + P3), στις 2 συνθήκες σε in vitro καλλιέργεια. Το πείραμα επαναλήφθηκε με τα ίδια κύτταρα όπως στον πίνακα 10.

			Olig1/ GAPDH
E10,5 MEFs_w/o heads	P1	EXPO	6,90E-04
		4h Starvation	3,48E-03
	P3	EXPO	1,16E-02
		4h Starvation	1,13E-03

Πίνακας 13. Πίνακας στον οποίο έχει γίνει κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του Olig1 γονιδίου σύμφωνα με το σταθερά εκφραζόμενο GAPDH γονίδιο από τον πίνακα 12, σε MEFs αγρίου τύπου 10,5 ημέρας εμβρυϊκής ανάπτυξης στις 2 συνθήκες κατά το πρώτο και τρίτο πέρασμά τους σε *in vitro* καλλιέργεια. Οι τιμές αυτές αντιπροσωπεύουν τις απόλυτες τιμές έκφρασης του Olig1 γονιδίου. Στην προκειμένη περίπτωση φαίνεται η έκφραση του Olig1 γονιδίου κατά το πρώτο πέρασμα των κυττάρων σε καλλιέργεια να αυξάνεται σε συνθήκη έλλειψης ορού συγκριτικά με την κανονική συνθήκη, ενώ αντίστοιχα κατά το τρίτο πέρασμά τους η έκφραση του Olig1 μειώνεται στην συνθήκη έλλειψης ορού συγκριτικά με την κανονική συνθήκη.

Olig1/GAPDH - MEFs E10,5 w/o heads



Γράφημα 4. Σχηματική αναπαράσταση στην οποία απεικονίζεται η απόλυτη τιμή έκφρασης του Olig1 (ως προς GAPDH κανονικοποίηση) κατά το πρώτο και τρίτο πέρασμα για τα αγρίου τύπου και κατά το τρίτο για τα ετερόζυγα ως προς τον ERF, και στις δυο συνθήκες σύμφωνα με τους πίνακες 9,11,13. Για τους ετερόζυγους ως προς τον ERF ινοβλάστες MEFs η έκφραση του Olig1 αυξάνεται στην συνθήκη έλλειψης ορού συγκριτικά με την κανονική συνθήκη, κατά το τρίτο πέρασμά τους στην καλλιέργεια. Αντίστοιχα στα αγρίου τύπου έχουν γίνει δυο πειράματα με τα ίδια RNA απο ινοβλάστες απομονωμένους από τα ίδια έμβρυα. Και στις δυο περιπτώσεις κατά το πρώτο πέρασμα των κυττάρων στην καλλιέργεια σε συνθήκη έλλειψης ορού η έκφραση του Olig1 αυξήθηκε συγκριτικά με την κανονική συνθήκη, ενώ αντίστοιχα κατά το τρίτο πέρασμα η έκφραση του Olig1 μειώθηκε.

Για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα του γραφήματος 4, απομονώθηκαν και πάλι πρωτογενείς ινοβλάστες (MEFs) αγρίου τύπου από έμβρυα ποντικών ημέρας 10,5 εμβρυϊκής ανάπτυξης. Από τα κύτταρα αυτά απομονώθηκε RNA, και στις 2 συνθήκες, κατά το δεύτερο και τέταρτο πέρασμά τους σε καλλιέργεια και ακολούθησε PCR πραγματικού χρόνου (πιν. 14).

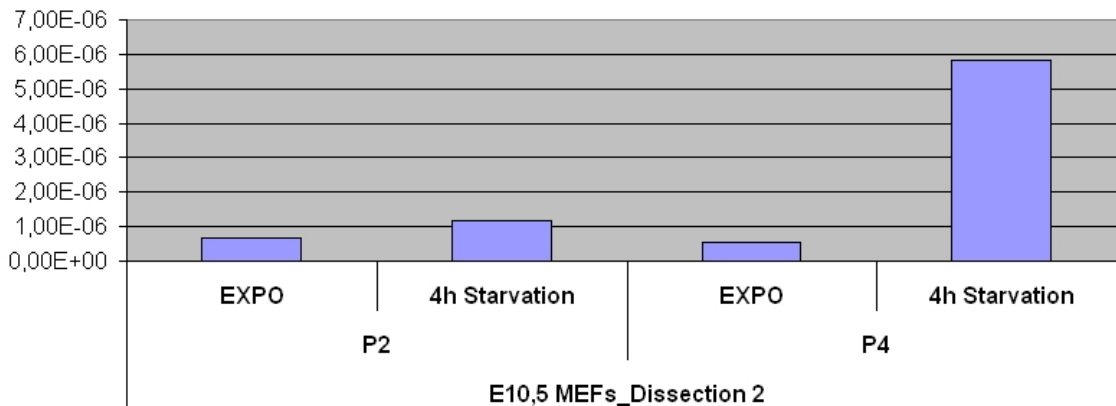
E10,5 wt P2+P4 w/o heads, Dissection2		Ct	Quantity
E10.5 wt P2 EXPO Olig1	Unknown	33,04	3,26E-06
E10.5 wt P2 STARV 4h Olig1	Unknown	31,22	1,52E-05
E10.5 wt P4 EXPO Olig1	Unknown	32,04	7,57E-06
E10.5 wt P4 STARV 4h Olig1	Unknown	28,96	1,02E-04
E10.5 wt P2 EXPO CPH	Unknown	16,22	4,76
E10.5 wt P2 STARV 4h CPH	Unknown	15,04	12,89
E10.5 wt P4 EXPO CPH	Unknown	14,97	13,63
E10.5 wt P4 STARV 4h CPH	Unknown	14,68	17,5
CPH std1	Standard	20,92	1,00E-01
CPH std0.1	Standard	23,28	1,00E-02
CPH std0.01	Standard	26,38	1,00E-03
CPH H2O	NTC	Undetermined	

Πίνακας 14. Πίνακας όπου φαίνονται τα αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση μέσω PCR πραγματικού χρόνου του Olig1 και CPH γονιδίου, στους ποντικίστους ινοβλάστες εμβρύων ποντικών αγρίου τύπου κατά την 10,5 ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης στο δευτερο και τέταρτο πέρασμα τους (P2 + P4), στις 2 συνθήκες σε in vitro καλλιέργεια.

		Olig1/ CPH	
E10,5 MEFs_w/o heads	P2	EXPO	6,85E-07
		4h Starvation	1,18E-06
	P4	EXPO	5,55E-07
		4h Starvation	5,83E-06

Πίνακας 15. Πίνακας στον οποίο έχει γίνει κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του Olig1 γονιδίου σύμφωνα με το σταθερά εκφραζόμενο CPH γονίδιο, σε MEFs αγρίου τύπου 10,5 ημερών εμβρυϊκής ανάπτυξης στις 2 συνθήκες κατά το δευτερο και τέταρτο πέρασμά τους σε in vitro καλλιέργεια. Οι τιμές αυτές αντιπροσωπεύουν τις απόλυτες τιμές έκφρασης του Olig1 γονιδίου. Στην προκειμένη περίπτωση φαίνεται η έκφραση του Olig1 γονιδίου κατά το δεύτερο και τέταρτο πέρασμα των κυττάρων σε καλλιέργεια αυξάνεται σε συνθήκη έλλειψης ορού συγκριτικά με την κανονική συνθήκη.

Olig1/ CPH - MEFs E10,5 w/o heads



Γράφημα 5. Σχηματική αναπαράσταση στην οποία απεικονίζεται η απόλυτη τιμή έκφρασης του Olig1 (ως προς CPH κανονικοποίηση) κατά το δεύτερο και τέταρτο πέρασμα στα αγρίου τύπου

E10,5 MEFs, και στις δυο συνθήκες σύμφωνα με τον πίνακα 15. Και στις δυο περιπτώσεις κατά το δεύτερο και τέταρτο πέρασμα των κυττάρων στην καλλιέργεια σε συνθήκη έλλειψης ορού η έκφραση του Olig1 αυξήθηκε συγκριτικά με την κανονική συνθήκη.

Τα αποτελέσματα των γραφημάτων 4 και 5 δεν είναι συγκρίσιμα διότι οι τιμές του Olig1 στο γράφημα 4 έχουν κανονικοποιηθεί σύμφωνα με το GAPDH σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο ενώ οι τιμές στο γράφημα 5 ως προς το CPH. Παραταυτα και στις δυο περιπτώσεις φαίνεται πως κατά το πρώτο και αντίστοιχα δεύτερο πέρασμα τους οι πρωτογενείς ινοβλάστες 10,5 ημέρας εμβρυϊκής ανάπτυξης, σε συνθήκη έλλειψης ορού για 4 ώρες αυξάνουν την έκφραση του Olig1 γονιδίου συγκριτικά με την κανονική συνθήκη. Αυτό έρχεται σε απόλυτη αντίθεση με τους ποντικίσιους ινοβλάστες από κεφάλια εμβρύων ποντικού ημέρας 13,5 εμβρυϊκής ανάπτυξης όπου στην ίδια συνθήκη ελαττώνουν την Olig1 έκφραση τους. Παράλληλα κατά την εξέλιξη της καλλιέργειας τα αποτελέσματα διαφέρουν, όπου στην πρώτη περίπτωση (P3) σε συνθήκη έλλειψης ορού οι τιμές του Olig1 φθίνουν ενώ στην δεύτερη περίπτωση (P4) αυξάνουν. Ασφαλές συμπέρασμα για την περίπτωση αυτή δεν μπορεί να βγει μιας και οι τιμές δεν είναι συγκρίσιμες.

15.4 Έλεγχος της Olig1 έκφρασης σε διαφοροποιημένα με RA νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs).

Από το εργαστήριο του καθ. Ι.Παπαμαθθαϊάκη και της κ. Κρετσόβαλη δόθηκε cDNA από μη διαφοροποιημένα και διαφοροποιημένα με ρετινικό οξύ νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs). Ο στόχος ήταν να ελεγχθεί στα νευρικά βλαστικά κύτταρα αν υπήρχε έκφραση του Olig1 γονιδίου, και σε τι ποσοστό.

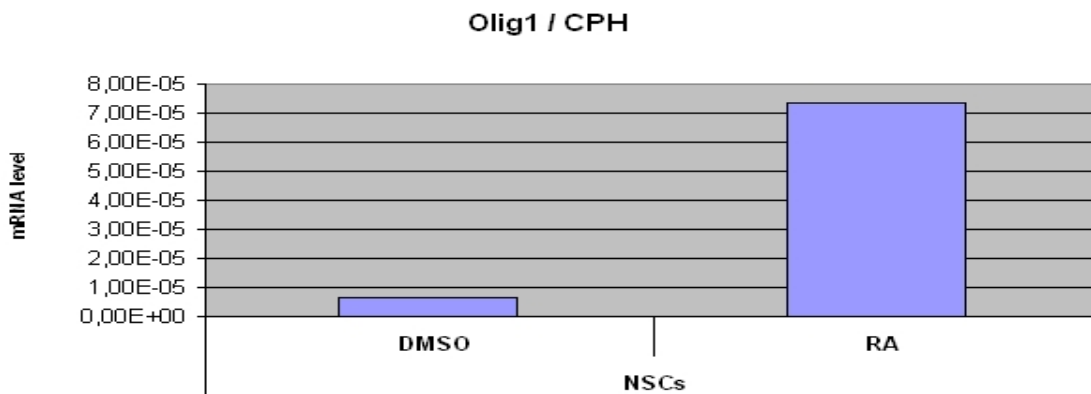
Τα cDNA ποσοτικοποιήθηκαν με PCR πραγματικού χρόνου (βλ. κεφ.10.2) όπου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για 3'UTR ποντικίσιου Olig1 (βλ. κεφ. 11). Η έκφραση του Olig1 στα διαφοροποιημένα NSCs ήταν μια τάξη μεγαλύτερη συγκριτικά με τα αδιαφοροποίητα. Η κανονικοποίηση έγινε μέσω του σταθερά εκφραζόμενου CPH γονιδίου.

NSCs DMSO Olig1	Unknown	34,41	1,02E-06
NSCs RA different. Olig1	Unknown	29,13	8,85E-05
NSCs DMSO CPH	Unknown	20,23	1,62E-01
NSCs RA different. CPH	Unknown	17,85	1,2
CPH std1	Standard	20,92	1,00E-01
CPH std0.1	Standard	23,28	1,00E-02
CPH std0.01	Standard	26,38	1,00E-03
CPH H2O	NTC	Undetermined	

Πίνακας 16. Πίνακας όπου φαίνονται τα αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση μέσω PCR πραγματικού χρόνου του Olig1 και CPH γονιδίου, σε αδιαφοροποίητα και διαφοροποιημένα με ρετινικό οξύ εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα.

	Olig1/CPH
NSCs DMSO	6,30E-06
NSCs RA	7,38E-05

Πίνακας 17. Πίνακας στον οποίο έχει γίνει κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του Olig1 γονιδίου σύμφωνα με το σταθερά εκφραζόμενο CPH γονίδιο, στα αδιαφοροποίητα και διαφοροποιημένα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού.

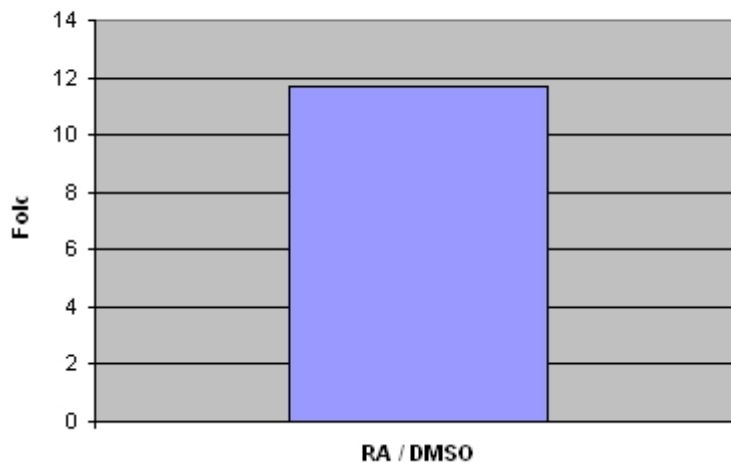


Γράφημα 6. Σχηματική αναπαράσταση στην οποία απεικονίζεται η απόλυτη τιμή έκφρασης του Olig1 (ως προς CPH κανονικοποίηση) σύμφωνα με τον πίνακα 17. Είναι εμφανές ότι κατά την διαφοροποίηση των ποντικίσιων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων η Olig1 έκφραση αυξάνεται κατά 12 φορές περίπου.

RA / DMSO	1,17E+01
-----------	----------

■

HSCs RA /DMSO



Γράφημα 7. Σχηματική αναπαράσταση στην οποία απεικονίζεται η διαφορά της Olig1 έκφρασης, μεταξύ των διαφοροποιημένων και αδιαφοροποίητων βλαστικών κυττάρων. Η διαφορά έχει υπολογισθεί μέσω του λόγου της Olig1 έκφρασης των διαφοροποιημένων με ρετινικό οξύ κυττάρων ως προς τα αδιαφοροποίητα. Η έκφραση στα διαφοροποιημένα με ρετινικό οξύ ποντικίσια εμβρυϊκά βλαστικά είναι 12 φορές υψηλότερη συγκριτικά με αυτή των αδιαφοροποίητων.

15.5 Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης σε πρωτογενής ποντικίστους ινοβλάστες από κεφάλια εμβρύου ημέρας E13,5 P3.

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 15.3 και πιο αναλυτικά στην παράγραφο 3.5 απομονώθηκαν ποντικίσιοι ινοβλάστες MEFs από κεφάλια εμβρύων κατά την 13,5 ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης. Τα κεφάλια αφού διαμελίστηκαν με την πιπέτα, αναπτύχθηκαν στις συνθήκες που έχουν περιγραφεί στο κεφάλαιο 3.1.

Κατά το τρίτο πέρασμα τους σε in vitro καλλιέργεια, περίπου 7-8 εκατομμύρια κύτταρα οδηγήθηκαν σε ανασοκατακρήμιση χρωματίνης με αντίσωμα ειδικό για την ERF πρωτεΐνη. Από τα ίδια κύτταρα έχει γίνει απομόνωση RNA κατά το τρίτο πέρασμά τους σε κανονική συνθήκη και συνθήκη έλλειψης ορού (βλ. 15.3.1, πίνακα 4+5).

Sample Name	Task	CT	Quantity
E13,5 P3 Olig1 IP EXPO	Unknown	22,12	6,95E-06
E13,5 P3 Olig1 INPUT EXPO	Unknown	26,59	2,28E-07
E13,5 P3 Olig1 IP STARV	Unknown	20,09	3,27E-05
E13,5 P3 Olig1 INPUT STARV	Unknown	25,73	4,38E-07
GAPDH E13,5 P3 IP EXPO	Unknown	17,42	2,52E-04
GAPDH E13,5 P3 INPUT EXPO	Unknown	20,24	2,92E-05
GAPDH E13,5 P3 IP STARV	Unknown	18,2	1,38E-04
GAPDH E13,5 P3 INPUT STARV	Unknown	21,44	1,16E-05
1000pg pGL3bOlig1	Standard	7,31	1
100pg pGL3bOlig1	Standard	8,23	1,00E-01
10pg pGL3bOlig1	Standard	13,1	1,00E-02
1pg pGL3bOlig1	Standard	15,73	1,00E-03

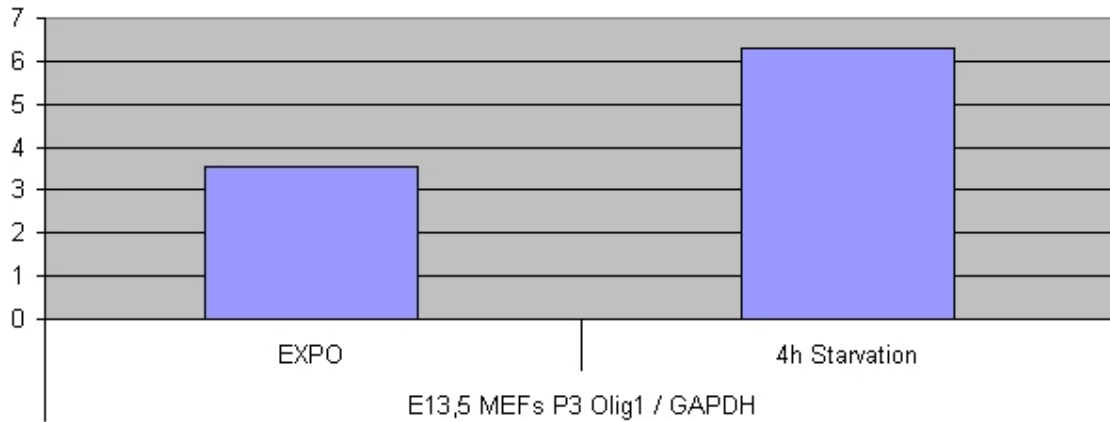
	Olig1 / GAPDH
E13,5 P3 IP EXPO	2,76E-02
E13,5 P3 INPUT EXPO	7,81E-03
E13,5 P3 IP STARV	2,37E-01
E13,5 P3 INPUT STARV	3,78E-02

Πίνακας 18. Πίνακας όπου φαίνονται τα αποτελέσματα από την ποσοτικοποίησης μέσω PCR πραγματικού χρόνου του Olig1 και GAPDH γονιδίου για τα IP και INPUT αντίστοιχα, στους ποντικίστους ινοβλάστες εμβρύων ποντικών αγρίου τύπου κατά την 13,5 ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης κατά το τρίτο πέρασμα τους (P3), στις 2 συνθήκες σε in vitro καλλιέργεια. Στον ίδιο πίνακα φαίνεται και η κανονικοποίηση ως προς το GAPDH του Olig1 για τα IP και INPUT και στις 2 συνθήκες αντίστοιχα.

	IP/INPUT
EXPO E13,5 P3 Olig1/GAPDH	3,53E+00
4h Starv. E13,5 P3 Olig1/GAPDH	6,28E+00

Πίνακας 19. Πίνακας στον οποίο έχει γίνει κανονικοποίηση των απόλυτων τιμών του Olig1, τα IPs ως προς τα INPUT στις δυο συνθήκες.

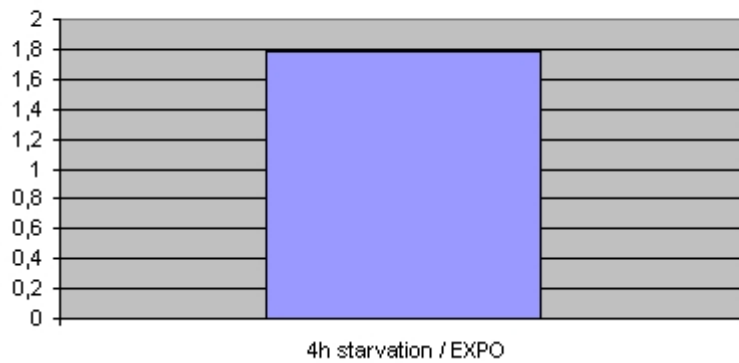
IP/INPUT - E13,5P3 mouse embryo heads



Γράφημα 8. Γραφική παράσταση στην οποία απεικονίζεται η πρόσδεση του ERF στον Olig1 υποκινητή στις δυο συνθήκες, σύμφωνα με τους πίνακες 18 και 19. Στην περιοχή -380/-260 από το σημείο έναρξης της μεταγραφής του Olig1, ο ERF προσδένεται περίπου 3,5 φορές σε κανονικές συνθήκες ενώ σε συνθήκη έλλειψης ορού η πρόσδεση αυξάνεται σε περίπου 6,5 φορές.

4h starvation / EXPO	1,78
----------------------	------

4h starvation / EXPO - Fold binding



Γράφημα 9. Γραφική παράσταση στην οποία απεικονίζεται η διαφορά πρόσδεσης του ERF στις δυο συνθήκες, μέσω του λόγου των τιμών IP/INPUT της συνθήκης έλλειψης ορού ως προς την κανονική συνθήκη. Φαίνεται πως ο ERF προσδένεται κατά 1,78 φορές περισσότερο στην συνθήκη έλλειψης ορού συγκριτικά με την κανονική συνθήκη στην περιοχή -380/-260 του Olig1.

Από το γράφημα 8 φαίνεται πως στην περιοχή -380/-260, από το σημείο έναρξης της μεταγραφής του Olig1, ο ERF προσδένεται ~3,5 φορές σε κανονικές συνθήκες ενώ σε συνθήκη έλλειψης ορού ~6,5 φορές.

Επομένως στην περιοχή -380/-260 σε συνθήκη έλλειψης ορού ο ERF προσδένεται ~1,8 φορές περισσότερο συγκριτικά με την κανονική συνθήκη (Γράφημα 9).

16. Χαρτογράφηση του Olig1 υποκινητή και μελέτη της κατασταλτικής δράσης του ERF στο Olig1 γονίδιο.

Στο εργαστήριο είχε ήδη κλωνοποιηθεί ο Olig1 υποκινητής (-1150 βάσεις από το σημείο έναρξης της μεταγραφής του Olig1 γονιδίου) και είχε μελετηθεί η κατασταλτική δράση του ERF αγρίου τύπου και μεταλλαγμένου M1-7 μέσω ενεργότητας λουσιφεράσης. Παρατηρήθηκε πως ο ERF καταστέλλει το γονίδιο αναφοράς στον υποκινητή του Olig1 γονιδίου, ενώ η καταστολή επι παρουσία M1-7 ήταν υψηλότερη (διδασκατορικό Βερικοκάκη).

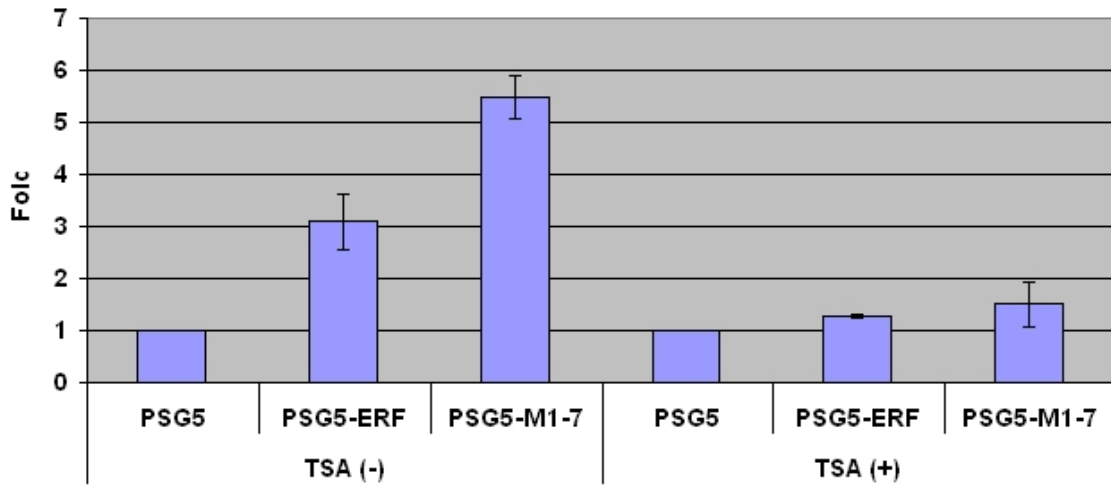
16.1 Μελέτη της κατασταλτικής δράσης του ERF στον Olig1 υποκινητή επι παρουσία και απουσία τριχοστατίνης.

Δεδομένου ότι η τριχοστατίνη αποτελεί αναστολέα των απακετυλασών των ιστονών, επι παρουσία αυτής σε πειράματα διαμολυνσης θα μπορούμε να έχουμε μια ένδειξη για το αν η καταστολή του Olig1 υποκινητή μέσω ERF σχετίζεται με μηχανισμό απακετυλίωσης.

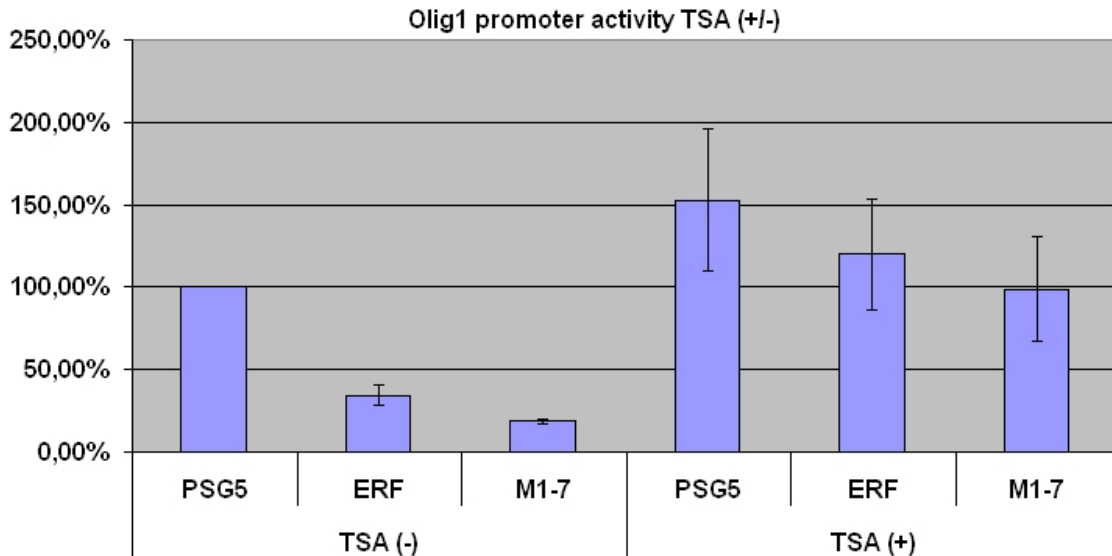
	LUC/LACZ	Fold repression	Prom. Activity
PSG5-TSA-	1948818,7	1	1,000000015
PSG5-ERF-TSA-	630761,8	3,089627087	0,323663661
PSG5-M1-7-TSA-	355909,05	5,475608781	0,182628098
PSG5-TSA+	2655396	1	1,362566966
PSG5-ERF-TSA+	2087798,1	1,271864372	1,071314675
PSG5-M1-7-TSA+	1761434,3	1,507519169	0,903847191

Πίνακας 20. Μέσοι όροι από 4 πειράματα διαμολύνσεων σε Ref1 κύτταρα και προσμέτρηση της ενεργότητας λουσιφεράσης. Στο γονίδιο αναφοράς είναι κλωνοποιημένος ο υποκινητής του Olig1 1150 βάσεις ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής. Η κανονικοποίηση έγινε μέσω του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης υπο τον έλεγχο του υποκινητή της ακτίνης. Η προσμέτρηση της β-gal ενεργότητας έγινε στο φωτόμετρο στα 420nm μετά την πάροδο 1,5 ώρας στους 37 βαθμούς κελσιου (αναλυτικά βλέπε 4.2). Στον πίνακα φαίνονται τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν επι παρουσία και απουσία τριχοστατίνης.

ERF repression to Olig1 Promoter TSA+/- conditions



Γράφημα 10. Φαίνεται η κατασταλτική δράση του ERF σε ολόκληρο τον Olig1 υποκινητή (πλασμιδιακή κατασκευή εικόνα 8.) επι παρουσία και απουσία τριχοστατίνης. Είναι εμφανές πως η κατασταλτική δράση του ERF επι παρουσία τριχοστατίνης βρίσκεται στα βασικά επίπεδα, ενώ επι απουσία τριχοστατίνης ο ERF καταστέλλει περίπου 3 φορές περισσότερο από τα βασικά επίπεδα, ενώ αντίστοιχα ο M1-7 περίπου 5 φορές περισσότερο. Ο ERF λοιπόν επι παρουσία τριχοστατίνης παύει να καταστέλλει τον Olig1 υποκινητή. Από τα πειράματα διαμολύνσεων μπορούμε να υποθέσουμε πως η κατασταλτική δράση του ERF στον υποκινητή του Olig1 γονιδίου εξαρτάται από μηχανισμό απακετυλίωσης.



Γράφημα 11. Γραφική παράσταση στην οποία απεικονίζεται η ενεργότητα του Olig1 υποκινητή σε συνθήκη παρουσίας και απουσίας τριχοστατίνης και ο συνδυασμός των δυο αυτών συνθηκών με την παρουσία ERF και μεταλλαγμένου M1-7. Επι απουσία τριχοστατίνης φαίνεται πως ο ERF ελαττώνει την ενεργότητα του Olig1 υποκινητή στο 32% ενώ ο M1-7 στο 18% . Ο ERF ελαττώνει κατά 3 φορές ενώ ο M17 κατά 5,5 φορές την δράση του Olig1 υποκινητή επι απουσία τριχοστατίνης. Αντίστοιχα

επι παρουσία τριχοστατίνης η ενεργότητα του Olig1 υποκινητή αυξάνεται κατά 1,36 φορές συγκριτικά με αυτήν όπου η τριχοστατίνη απουσιάζει. Παράλληλα η καταστολή φαίνεται να διατηρείται και στην συνθήκη παρουσίας της τριχοστατίνης αλλά σε πολύ μικρότερα επίπεδα συγκριτικά με την συνθήκη απουσίας τριχοστατίνης. Πιο συγκεκριμένα επί παρουσία ERF η ενεργότητα ελαττώνεται κατά 36% ενώ επί παρουσία M1-7 κατά 40%.

Από τα αποτελέσματα των διαμολύνσεων και βασιζόμενοι στα γραφήματα 10 και 11, μπορούμε να υποθέσουμε πως ο Olig1 υποκινητής επηρεάζεται από τα επίπεδα ακετυλίωσης όσον αφορά την ενεργότητα του. Θεωρώντας ότι η καταστολή επί παρουσία τριχοστατίνης διατηρείται αλλά σε μικρότερο βαθμό υποθέτουμε πως η καταστολή μέσω ERF σχετίζεται με μηχανισμό απακετυλίωσης.

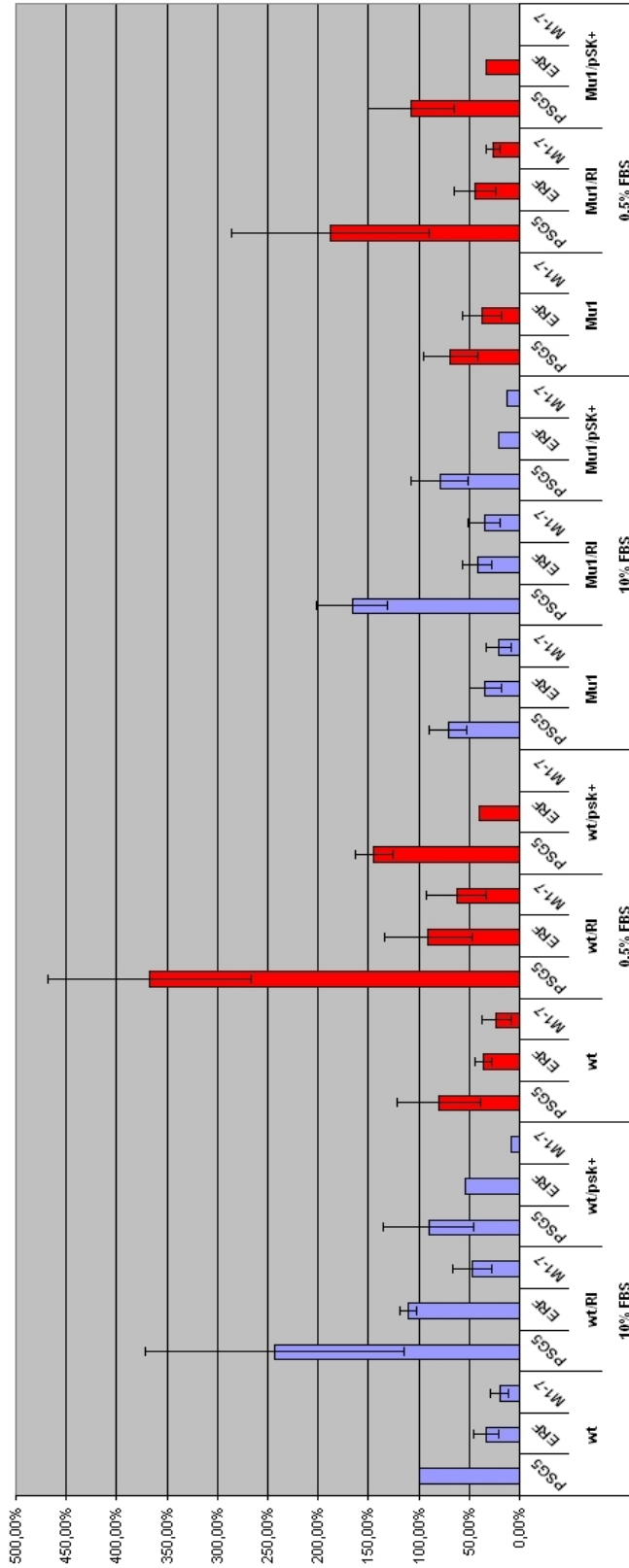
16.2 Μελέτη της κατασταλτικής δράσης του ERF στις πλασμιδιακές κατασκευές που φέρουν κλωνοποιημένα τρία διαφορετικά κομμάτια του Olig1 υποκινητή με διαμόλυνση σε REF1 κύτταρα και έλεγχο της ενεργότητας λουσιφεράσης.

Έγιναν πειράματα διαμολύνσεων σε Ref1 κύτταρα όλων των πλασμιδιακών κατασκευών που έχουν κατασκευασθεί (βλ. 14.1, 14.2, 14.3, 14.4) ώστε να συγκριθεί η ενεργότητα του υποκινητή και η καταστολή του ERF στα διαφορετικά κομμάτια του Olig1 υποκινητή αγρίου τύπου και των αντίστοιχων μεταλλαγών τους στην μοναδική ETS περιοχή πρόσδεσης που βρίσκεται εντός της συντηρημένης περιοχής με τον άνθρωπο μήκους 245 βάσεων. Ως «wt» συμβολίζεται ολόκληρος ο αγρίου τύπου υποκινητής που έχει κλωνοποιηθεί προηγούμενος στο εργαστήριο (διδασκαλικό Βερυκοκάκη, βλ. 14.1). Με «Mu1» συμβολίζεται η αντίστοιχη πλασμιδιακή κατασκευή που φέρει την μεταλλαγή στην μοναδική ETS περιοχή εντός της συντηρημένης περιοχής (βλ. 14.2). Με «wt/RI» συμβολίζεται η πλασμιδιακή κατασκευή που φέρει όλο τον Olig1 υποκινητή και στην οποία έχει γίνει διαγραφή του κομματιού EcoRI το οποίο περιλαμβάνει 11 από τις 13 ETS περιοχές (βλ. 14.3). Με «Mu1/RI» συμβολίζεται η αντίστοιχη πλασμιδιακή κατασκευή που φέρει την μεταλλαγή (βλ. 14.3). Τέλος ως «wt/pSK+» συμβολίζεται το συντηρημένο με τον άνθρωπο κομμάτι του Olig1 υποκινητή αγρίου τύπου, μήκους 245 βάσεων το οποίο πρώτα κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pSK+ και έπειτα υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα pGL3b ώστε να έχει την ορθή κατεύθυνση (βλ. 14.4). Αντίστοιχα η μεταλλαγμένη του μορφή συμβολίζεται με «Mu1/pSK+».

			Promoter activity Average	Stddev
10% FBS	wt	PSG5	1	
		ERF	0,334978429	0,123682
		M1-7	0,196723938	0,090441
	wt/RI	PSG5	2,430362069	1,288696
		ERF	1,10163303	0,08284
		M1-7	0,466391055	0,194056
	wt/psk+	PSG5	0,904018915	0,450689
		ERF	0,540845455	#ΔΙΑΙΡ/0!
		M1-7	0,088978255	#ΔΙΑΙΡ/0!
0,5% FBS	wt	PSG5	0,803181654	0,417665
		ERF	0,358310087	0,08867
		M1-7	0,231178836	0,1435
	wt/RI	PSG5	3,672626255	1,00524
		ERF	0,905073954	0,436816
		M1-7	0,626640768	0,294607
	wt/psk+	PSG5	1,44816186	0,188247
		ERF	0,406553481	#ΔΙΑΙΡ/0!
		M1-7
10% FBS	Mu1	PSG5	0,709389259	0,182912
		ERF	0,343165832	0,160264
		M1-7	0,206941122	0,130687
	Mu1/RI	PSG5	1,659861762	0,353945
		ERF	0,417982596	0,148635
		M1-7	0,348448819	0,160512
	Mu1/pSK+	PSG5	0,791173689	0,283392
		ERF	0,20321044	#ΔΙΑΙΡ/0!
		M1-7	0,118161777	#ΔΙΑΙΡ/0!
0,5% FBS	Mu1	PSG5	0,688757625	0,269467
		ERF	0,375415052	0,191931
		M1-7
	Mu1/RI	PSG5	1,877625343	0,983098
		ERF	0,442027661	0,204521
		M1-7	0,263052562	0,064315
	Mu1/pSK+	PSG5	1,074972943	0,425464
		ERF	0,328153246	#ΔΙΑΙΡ/0!
		M1-7

Πίνακας 21. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι της ενεργότητας του Olig1 υποκινητή όλων των πλασμιδίων που έχουν κατασκευαστεί (βλ. 14.1, 14.2, 14.3, 14.4) από 24 πειράματα διαμόλυνσεων, 12 πειράματα σε συνθήκη 10% ορού και 12 σε συνθήκη 0,5% ορού αντίστοιχα. Στον πίνακα συμπεριλαμβάνεται και η μέση απόκλιση των αποτελεσμάτων στα διάφορα πειράματα διαμόλυνσης. Στην περίπτωση που η μέση απόκλιση δεν παρουσιάζεται οφείλεται στο γεγονός ότι το πείραμα έχει γίνει μια μόνο φορά.

Promoter activity - Average (ως προς wtIPSG5 10%FBS=100%)



Γράφημα 12. Σχηματική αναπαράσταση όπου φαίνονται οι μέσοι όροι της ενεργότητας του Olig1 υποκινητή σύμφωνα με τον πίνακα 19. Στο γράφημα έχει ληφθεί υπόψη και η μέση απόκλιση των τιμών.

Αρχικά είναι εμφανές πως σε συνθήκη 10% ορού μεταξύ της κατασκευής που φέρει ολόκληρο τον υποκινητή και της κατασκευής που φέρει αποκλειστικά την συντηρημένη με τον άνθρωπο περιοχή του υποκινητή μήκους 245 βάσεων ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής, όσον αφορά την ενεργότητα του Olig1 υποκινητή δεν υπάρχει καμία διαφορά. Αντίστοιχα στη κατασκευή όπου έχει γίνει διαγραφή του EcoRI κομματιού, η ενεργότητα του υποκινητή αυξάνεται 2,5 με 3,5 φορές. Από τα δεδομένα αυτά μπορούμε να υποθέσουμε πως για την δράση του ο υποκινητής χρειάζεται αποκλειστικά την συντηρημένη με τον άνθρωπο περιοχή και όχι ολόκληρο το κομμάτι του υποκινητή. Επίσης το κομμάτι EcoRI που διαγράφηκε έχει ρυθμιστική δράση στην ενεργότητα του υποκινητή, καταστέλλοντας τον. Επιπρόσθετα στην συνθήκη 0,5% ορού τα αποτελέσματα είναι ακριβώς τα ίδια με την διαφορά πως επί απουσία του EcoRI κομματιού η αύξηση της ενεργότητας είναι 1,5 φορά υψηλότερη συγκριτικά με την αντίστοιχη σε 10% ορό και κατά 3,5 με 4 φορές υψηλότερη συγκριτικά με αυτή ολόκληρου του υποκινητή.

Ο ERF φαίνεται πως καταστέλλει και στα 3 διαφορετικά κομμάτια του Olig1 υποκινητή. Η καταστολή σε ολόκληρο τον υποκινητή και στην συντηρημένη με τον άνθρωπο περιοχή είναι ίδια, ενώ στην περίπτωση όπου έχει διαγραφεί το EcoRI κομμάτι ο ERF συνεχίζει να καταστέλλει αλλά η τιμή της ενεργότητας του υποκινητή μετά την καταστολή είναι 2 φορές υψηλότερη συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές ολόκληρου του υποκινητή και της κατασκευής που φέρει μόνο την συντηρημένη περιοχή. Αντίστοιχα σε συνθήκη 0,5% ορού η καταστολή του ERF παρουσιάζεται να είναι ίδια με αυτή σε 10% ορό. Σε όλες τις περιπτώσεις η καταστολή του μεταλλαγμένου ERF και μόνιμα πυρηνικού M1-7 γίνεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με την διαφορά ότι η καταστολή επί παρουσία M1-7 είναι υψηλότερη.

Στις μεταλλαγμένες μορφές των κομματιών του Olig1 υποκινητή η καταστολή μέσω ERF και M1-7 ήταν ακριβώς ίδια συγκριτικά με αυτή των αντίστοιχων αγρίου τύπου. Φαίνεται πως η μεταλλαγή της ETS περιοχής στην συντηρημένη με τον άνθρωπο περιοχή του Olig1 υποκινητή δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στην καταστολή και πιθανώς ο ERF να μην προσδέεται στην συγκεκριμένη αλληλουχία, ίσως η πρόσδεση του να είναι έμμεση μιας και η καταστολή συνεχίζει να υφίσταται στον ίδιο βαθμό. Η μεταλλαγή φαίνεται όμως να παίζει κάποιο ρόλο στην ενεργότητα του υποκινητή. Υπάρχει μια μείωση της ενεργότητας κατά 30-50% στους μεταλλαγμένους υποκινητές συγκριτικά με τους αντίστοιχους αγρίου τύπου.

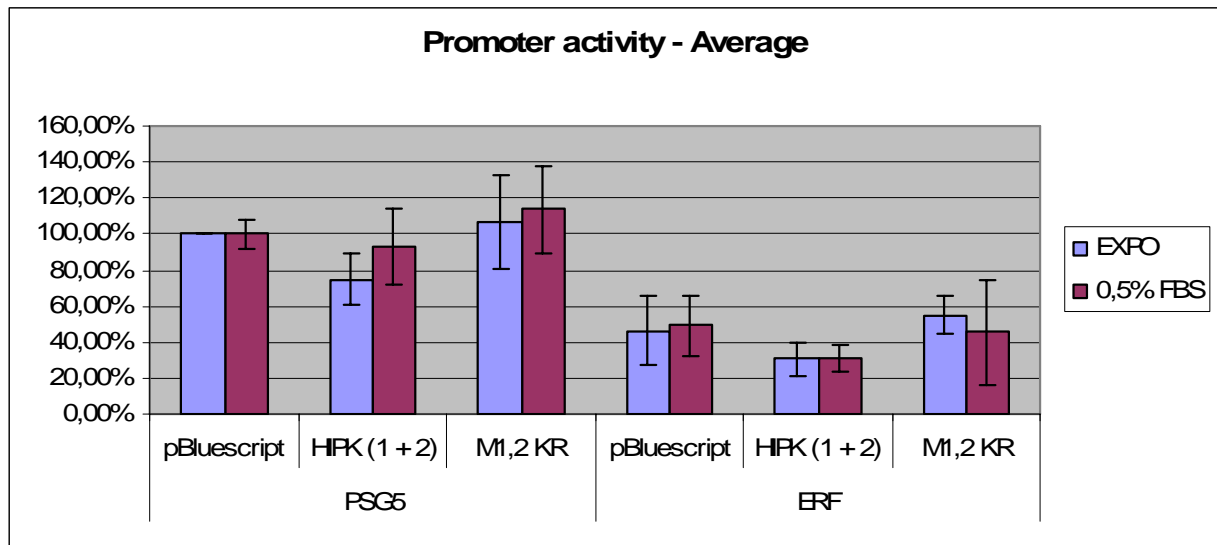
16.3 Μελέτη της πιθανής συνεργατικής δράσης του ERF με τις HIPK στην καταστολή του Olig1 υποκινητή.

Από παλαιότερα πειράματα του εργαστηρίου είναι γνωστό πως ο ERF και ο M1-7 αλληλεπιδρούν με την κινάση-συγκαταστολέα HIPK1 καθώς και με ένα κυρίαρχα αρνητικό μετάλλαγμα της την HIPKR1 (δεν φέρει ενεργότητα κινάσης). Χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης έχει δείξει ότι το αμινοτελικό τμήμα του ERF και πιο συγκεκριμένα η περιοχή 100-202aa είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με την HIPK1. Επίσης, η HIPK1 και HIPK2 έχει δειχθεί πως φωσφορυλιώνουν τον ERF in

vitro. Για να δουμε τώρα αν μέσω της αλληλεπίδρασης αυτής υπάρχει κάποια συνεργατική ιδιότητα οσον αφορά την κατασταλτική δράση του ERF, έγιναν πειράματα διαμολύνσεων σε REF1 κύτταρα.

		EXPO	Starved 0,5%
PSG5	pBluescript	253295,94	269184,2888
	HIPK (1 + 2)	189340,41	250526,2123
	M1,2 KR	269190,04	306129,3672
ERF	pBluescript	117725	132648,4781
	HIPK (1 + 2)	78164,586	83363,91353
	M1,2 KR	139343,47	122075,2369
PSG5	pBluescript	1,0000002	1
	HIPK (1 + 2)	0,7475068	0,930686607
	M1,2 KR	1,0627493	1,137248272
ERF	pBluescript	0,4647726	0,492779421
	HIPK (1 + 2)	0,30859	0,309690859
	M1,2 KR	0,5501213	0,453500601

Πίνακας 22. Μέσοι όροι από τέσσερα πειράματα διαμολύνσεων στα οποία ελέγχθηκε η ενεργότητα του υποκινητή *Olig1* επι παρουσία των κινασών *HIPK1,2* και των αντιστοιων αρνητικών μεταλλαγμάτων τους σε απουσία και παρουσία *ERF* στις 2 συνθήκες.



Γράφημα 13. Απεικονίζεται η ενεργότητα του *Olig1* υποκινητή επι παρουσία των κινασών *HIPK1,2* και των αντιστοιων αρνητικών μεταλλαγμάτων τους σε απουσία και παρουσία *ERF* στις 2 συνθήκες. Συμπεριλαμβάνονται και οι αντίστοιχες αποκλίσεις τους σύμφωνα με τον πίνακα 22.

Σε φυσιολογικές συνθήκες η παρουσία των κινασών-συγκатаστολέων *HIPK1,2* ελαττώνει την ενεργότητα του *Olig1* υποκινητή κατά ένα 25%, ενώ αντίστοιχα τα κυρίαρχα αρνητικά μεταλλάγματα τους δεν μεταβάλλουν την ενεργότητά του. Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι στην περίπτωση του *Olig1* υποκινητή η ενεργότητα κινάσης των *HIPK1,2* παρουσιάζει κατασταλτική δράση σε αυτόν. Επιπρόσθετα στην ίδια συνθήκη ο *ERF* καταστέλλει τον *Olig1* υποκινητή και επι παρουσία *HIPK1,2* η καταστολή αυξάνεται κατά ένα 35% επιπλέον. Στην κανονική συνθήκη λοιπόν φαίνεται

πως ο ERF και οι HIPK1,2 καταστέλλουν τον Olig1 υποκινητή και πως η καταστολή του ERF από μόνη της είναι πολύ μεγαλύτερη απ' ότι των HIPK1 και 2 μόνο. Δεν μπορούμε να πούμε με ασφάλεια πως υπάρχει συνεργατικότητα μεταξύ των δυο στην καταστολή του Olig1 υποκινητή, διότι η αυξήση της καταστολής που παρουσιάζεται στην περίπτωση της ταυτόχρονης παρουσίας ERF και HIPK1,2 μπορεί να είναι αποτέλεσμα του άθροισματος της καταστολής των HIPK1,2 που παρουσιάζουν από μόνα τους. Στην περίπτωση της συνθήκης μειωμένης παρουσίας ορού στο 0,5% δεν υπήρξε καμία ουσιαστική μεταβολή των αποτελεσμάτων.

Συζήτηση

Στόχος της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η διερεύνηση της λειτουργίας του ERF μεταγραφικού καταστολέα στην έκφραση και ρύθμιση του Olig1 γονιδίου. Για τον σκοπό αυτό αρχικά έπρεπε να βρεθεί μια πηγή κυττάρων που να εκφράζει σταθερά το Olig1 γονίδιο ώστε να μελετηθεί η κατασταλτική δράση του ERF στο γονίδιο αυτό. Οι κυτταρικές σειρές PC12 και P19 δεν αποτέλεσαν πηγή έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σε καμία από τις δυο συνθήκες, ακόμη και μετά την διαφοροποίηση τους σε νευρικού τύπου κύτταρα. Το ενδιαφέρον έπειτα στράφηκε στους πρωτογενείς ποντικίστους ινοβλάστες (MEFs) όπου από παλαιότερα πειράματα του εργαστηρίου είναι γνωστό ότι το Olig1 γονίδιο εκφράζεται. Η συγκεκριμένη πηγή κυττάρων δεν επιλέχθηκε εξ αρχής διότι δεν αποτελούσε ευέλικτο σύστημα για την μελέτη μας. Για κάθε πειραματισμό θα έπρεπε να απομονώνονται νέοι ινοβλάστες από νέα έμβρυα και αυτό γιατί αποτελούν πρωτογενείς πληθυσμούς κυττάρων που αδυνατούν να επιβιώσουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε *in vitro* καλλιέργεια. Ένα άλλο μειονέκτημα του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού είναι η ετρογένεια που παρουσιάζει, εξαιτίας των πολλών διαφορετικών πληθυσμών που προκύπτουν κατά την απομόνωση τους από τα έμβρυα.

Σε παλαιότερα πειράματα του εργαστηρίου στους ποντικίστους ινοβλάστες έχει αποδειχθεί πως η κυτταρική τοπολογία του ERF έχει αμεσο αντίκτυπο στην λειτουργία του. Σε συνθήκη απουσίας ορού, λόγω έλλειψης μιτογόνου ερεθίσματος, τα επίπεδα της pERK ελαττώνονται και ο ERF στον πυρήνα αποφωσφορυλιώνεται, όπου και παραμένει. Αντίθετα σε συνθήκη παρουσίας ορού ο ERF φωσφορυλιώνεται και εξάγεται στο κύτταρόπλασμα όπου και παύει να καταστέλλει. Εκμεταλλευόμενοι τις δυο αυτές συνθήκες, μελετήσαμε την κατασταλτική δράση του ERF στο Olig1 γονίδιο σε πρωτογενείς ποντικίστους ινοβλάστες που απομονώθηκαν από έμβρυα ποντικού κατά τις ημέρες εμβρυικής ανάπτυξης, 10,5 και 13,5. Οι ινοβλάστες που απομονώθηκαν από τα έμβρυα ημέρας εμβρυικής ανάπτυξης 13,5 ήταν αποκλειστικά και μόνο από κεφάλια εμβρύου, ενώ τα αντίστοιχα της 10,5 ημέρας ήταν από ολόκληρα έμβρυα. Στα κύτταρα αυτά μελετήθηκε η έκφραση του Olig1 γονιδίου σε συνθήκη παρουσίας και απουσίας ορού σε δυο διαφορετικά διαστήματα *in vitro* καλλιέργειας τους. Ο στόχος της διαφορικής μελέτης των ίδιων κυττάρων σε αρχικό στάδιο καλλιέργειας και σε κάποιο μετέπειτα στάδιο ήταν να μελετηθεί η σταθερότητα της Olig1 έκφρασης στις δυο

συνθήκες σε *in vitro* καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως κατά το πρώτο πέρασμά τους τα MEFs ημέρας 13,5 ελάττωναν την έκφραση του Olig1 γονιδίου σε συνθήκη έλλειψης ορού ενώ ταυτόχρονα διατηρούσαν μια αρκετά υψηλή έκφραση του γονιδίου αυτού. Σε μετέπειτα όμως στάδιο *in vitro* καλλιέργειας και μόλις έπειτα από δυο περάσματα η έκφραση του γονιδίου αυτού και στις δυο συνθήκες ελαττώθηκε κατά πολύ. Για το λόγο αυτό ο συγκεκριμένος κυτταρικός πληθυσμός ήταν πολύ δύσκολο να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μελέτη. Αντίθετα στα MEFs ημέρας 10,5 σε συνθήκη έλλειψης ορού κατά το πρώτο πέρασμα φάνηκε η Olig1 έκφραση να αυξάνεται ενώ σε μετέπειτα στάδιο καλλιέργειας συνέβη το αντίθετο. Πολύ σημαντική παρατήρηση είναι πως τα MEFs ημέρας 10,5 έδειξαν να αυξάνουν κατά πολύ την έκφραση του Olig1 σε μετέπειτα στάδιο *in vitro* καλλιέργειας συγκρινόμενα με τα αρχικού σταδίου κύτταρα, ανεξάρτητα από την συνθήκη. Από την παρατήρηση αυτή μπορούμε να υποθέσουμε πως τα 10,5 κατά την *in vitro* καλλιέργεια τους διαφοροποιούνται σε κύτταρικούς τύπους που εκφράζουν Olig1 ενώ αντίθετα τα 13,5 αδυνατούν να εκφράσουν σε μετέπειτα στάδιο καλλιέργειας το γονίδιο αυτό. Το γεγονός αυτό ίσως να συμβαίνει διότι τα 10,5 είναι πιο πρώιμα κύτταρα (προ της 12^{ης} μερας εμβρυικής ανάπτυξης όπου τα ολιγοδενδροκύτταρα ξεκινούν να διαφοροποιούνται) και ίσως διατηρούν την ικανότητα διαφοροποίησής τους σε κυτταρικούς τύπους που εκφράζουν Olig1 ενώ αντίθετα τα 13,5 είναι μάλλον διαφοροποιημένα κύτταρα που σε *in vitro* καλλιέργεια αδυνατούν να επιβιώσουν. Για τους λόγους αυτούς και οι δυο κυτταρικοί τύποι ινοβλαστών δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μελέτη της κατασταλτικής ιδιότητας του ERF στο Olig1 γονίδιο.

Επιπρόσθετα σε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με ειδικό αντίσωμα για τον ERF στα MEFs της ημέρας 13,5 από κεφάλια εμβρύων ποντικών κατά το τρίτο πέρασμά τους σε καλλιέργεια φάνηκε ότι σε συνθήκη έλλειψης ορού για 4 ώρες ο ERF είχε την τάση να προσδένεται κατά 1,8 φορές με υψηλότερη συνάφεια από ότι στην περίπτωση της κανονικής συνθήκης. Ταυτόχρονα όμως τα mRNA επίπεδα του Olig1 δεν μεταβλήθηκαν αισθητά. Για να βγεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα όμως θα πρέπει το πείραμα να επαναληφθεί διότι έγινε μόνο μια φορά.

Στην προσπάθεια να βρεθεί μια σταθερή πηγή έκφρασης του Olig1 ελέγχθηκε η έκφραση του σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (ESCs) που είχαν διαφοροποιηθεί σε νευρικά βλαστικά (NSCs). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπήρχε έκφραση του Olig1 στα αδιαφοροποίητα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα και πως έπειτα από διαφοροποίησή τους η έκφραση του Olig1 αυξήθηκε κατά 12 φορές. Παρά το γεγονός όμως ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα αποτελούν σταθερή πηγή έκφρασης του γονιδίου αυτού δεν γνωρίζουμε ποια είναι η έκφραση του γονιδίου αυτού σε συνθήκη έλλειψης ορού και ποια είναι η κυτταρική τοπολογία του ERF μεταγραφικού παράγοντα στη συνθήκη αυτή. Δεν γνωρίζουμε αν ο ERF στο συγκεκριμένο κυτταρικό πλυθησμό συμπεριφέρεται κατά τον ίδιο τρόπο όπως και στους πρωτογενείς ποντικίστιους ινοβλάστες. Για το σκοπό αυτό θα πρέπει οι μετέπειτα πειραματισμοί του εργατηρίου να στραφούν προς την επίλυση του συγκεκριμένου ερωτήματος. Αν φανεί πως στα NSCs σε συνθήκη έλλειψης ορού η έκφραση του Olig1 ελαττώνεται, ο ERF είναι αποκλειστικά πυρηνικός και πως τα επίπεδα της pERK ταυτόχρονα ελαττώνονται, τότε ο συγκεκριμένος κυτταρικός τύπος θα αποτελέσει ένα ιδανικό σύστημα μελέτης της κατασταλτικής δράσης του ERF στο Olig1.

Παράλληλα με την μελέτη της Olig1 έκφρασης έπρεπε να χαρτογραφηθεί ο υποκινητής του Olig1 γονιδίου ώστε να έχουμε μια σαφή εικόνα για την λειτουργικότητα

του. Κλωνοποιώντας διαφορετικά κομμάτια του Olig1 υποκινητή σε πλασμιδιακό φορέα που έφερε ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της λουσιφεράσης (εικ.14) και κάνοντας έλεγχο της ενεργότητάς του μέσω διαμολύνσεων σε REF1 κύτταρα μπορούμε να υποθέσουμε πως για την δράση του ο υποκινητής χρειάζεται αποκλειστικά την συντηρημένη με τον άνθρωπο περιοχή (125 βάσεις ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής) και όχι ολόκληρο το κομμάτι του υποκινητή (μήκους περίπου 1150 βάσεων). Παράλληλα κάνοντας διαγραφή με πέψη EcoRI μια περιοχή 850 βάσεων ανοδικά της συντηρημένης με τον άνθρωπο περιοχής παρατηρήθηκε μια μεγάλη αύξηση στην ενεργότητα του Olig1 υποκινητή. Με μια πιο προσεκτική παρατήρηση μπορούμε να συμπεράνουμε πως η περιοχή του υποκινητή που διαγράφηκε μήκους 850 βάσεων ρυθμίζει κατασταλτικά μια μικρή περιοχή μήκους 100 βάσεων η οποία βρίσκεται ανοδικά της συντηρημένης με τον άνθρωπο περιοχής. Αυτό μπορούμε να το συμπεράνουμε διότι στην πλασμιδιακή κατασκευή που είναι κλωνοποιημένη αποκλειστικά η συντηρημένη με τον άνθρωπο περιοχή του Olig1 υποκινητή και το κομμάτι των 100 βάσεων ανοδικά αυτής απουσιάζει, η ενεργότητα του Olig1 υποκινητή είναι όμοια με αυτή ολόκληρου του υποκινητή. Άρα η περιοχή των 100 αυτών βάσεων ανοδικά της συντηρημένης περιοχής έχει την τάση να ενεργοποιεί σε υψηλά επίπεδα τον Olig1 υποκινητή ενώ παράλληλα ανοδικά αυτής η υπόλοιπη περιοχή του Olig1 υποκινητή φαίνεται να ελέγχει κατασταλτικά την μικρή αυτή περιοχή των 100 βάσεων.

Από πειράματα ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης είναι γνωστό πως ο ERF προσδένεται στον Olig1 υποκινητή γύρω από την περιοχή -380/-260. Δεν είναι όμως γνωστό σε ποιο ακριβώς σημείο. Ένας άλλος στόχος ήταν να χαρακτηριστεί το ακριβές σημείο πρόσδεσης του ERF στον Olig1 υποκινητή και να μελετηθεί αν η καταστολή σχετίζεται με την άμεση πρόσδεσή του ERF παράγοντα. Παρατηρώντας την αλληλουχία του ποντικίσιου Olig1 γονιδίου, περίπου 1150 βάσεις ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής, υπάρχουν 13 πιθανά σημεία πρόσδεσης του ERF (ETS αλληλουχίες πρόσδεσης). Διαγραφώντας με πέψη την EcoRI περιοχή του υποκινητή διαγράφηκαν τα 11 από τα 13 πιθανά σημεία πρόσδεσης. Τέλος η κατασκευή που έφερε αποκλειστικά και μόνο την συντηρημένη με τον άνθρωπο περιοχή έφερε μόνο ένα πιθανό σημείο πρόσδεσης του ERF εντός αυτής. Έγιναν πειράματα διαμόλυνσης σε REF1 κύτταρα και τα αποτελέσματα έδειξαν πως σε όλες τις περιπτώσεις ο ERF διατηρούσε την κατασταλτική του δράση. Το ίδιο συνέβη και στην περίπτωση της μεταλλαγμένης και αποκλειστικά πυρηνικής μορφής του (M1-7) με ασφαλώς μεγαλύτερη κατασταλτική δράση. Δεν φάνηκε λοιπόν η απουσία κάποιου κομματιού από τον υποκινητή να επηρεάζει την πρόσδεση ή την κατασταλτική δράση του ERF. Το ενδιαφέρον έπειτα στράφηκε στο υψηλά συντηρημένο κομμάτι που έφερε μόνο ένα πιθανό σημείο πρόσδεσης του ERF. Έγινε μεταλλαγή του σημείου αυτού και ακολούθησαν πειράματα διαμόλυνσης στα οποία και πάλι ο ERF διατηρούσε την κατασταλτική του δράση στα ίδια επίπεδα με το φυσιολογικό κομμάτι. Συγκρίνοντας τις φυσιολογικές περιοχές του υποκινητή με τις μεταλλαγμένες παρατηρήθηκε ότι εξαιτίας της μεταλλαγής αυτής υπήρξε μόνο μια μείωση στην ενεργότητα του υποκινητή κατά 30%, ενώ ταυτόχρονα η καταστολή από τον ERF διατηρήθηκε στα ίδια επίπεδα με τα αντίστοιχα φυσιολογικά σε όλες τις περιπτώσεις. Επιπρόσθετα στην περίπτωση της συνθήκης με μειωμένη παρουσία ορού στο 0,5% τα αποτελέσματα ήταν ακριβώς ίδια συγκριτικά με αυτά του 10% ορού που περιγράφησαν παραπάνω. Διαφορά υπήρξε μόνο στην περίπτωση της κατασκευής που έφερε την διαγραφή της EcoRI περιοχής του υποκινητή. Στην περίπτωση αυτή η

αύξηση της ενεργότητας του Olig1 υποκινητή ήταν 1,5 φορά υψηλότερη συγκριτικά με την αντίστοιχη σε 10% ορό και κατά 3,5 με 4 φορές υψηλότερη συγκριτικά με αυτή της κατασκευής που έφερε κλωνοποιημένο ολόκληρο τον υποκινητή. Η καταστολή σε όλες τις περιπτώσεις μεταξύ των μεταλλαγμένων και φυσιολογικών κομματιών και στην περίπτωση του 0,5% ορού ήταν ίδια με αυτή του 10%. Δεν σταθηκε λοιπόν δυνατό να απομονώσουμε την αλληλουχία που ο ERF προσδέεται και αυτό γιατί ίσως η πρόσδεση του είναι έμμεση. Για τον σκοπό αυτό θα πρέπει να ακολουθήσουν πειράματα που να αποδείξουν ίσως την έμμεση πρόσδεσή του ERF στον Olig1 υποκινητή.

Ένα άλλο ερώτημα που προσπαθήσαμε να επιλύσουμε ήταν αν υπάρχει συνεργατική δράση του ERF και των HIPK1,2 στην καταστολή του Olig1 υποκινητή. Σε παλαιότερα πειράματα του εργαστηρίου έχει δείχθει πως ο ERF αλληλεπιδρά με την HIPK1. Η HIPK1 είναι μια κινάση που έχει δείχθει ότι ενεργεί ως συγκαταστολέας. Για να επιλυθεί το ερώτημα αυτό έγιναν πειράματα διαμολύνσεων σε REF1 κύτταρα σε συνθήκη 10% και 0,5% ορό και φάνηκε πως οι HIPK1,2 από μόνες τους καταστέλλουν κατά ένα 25% τον Olig1 υποκινητή. Επιπρόσθετα στη περίπτωση συνύπαρξης των ERF και HIPK1,2 η καταστολή αυξήθηκε κατά 35%. Δεν μπορούμε με ασφάλεια να συμπεράνουμε όμως πως υπάρχει συνεργατική δράση μεταξύ των δυο, διότι αυτή η αύξηση ίσως οφείλεται στην άθροιση της κατασταλτικής δράσης των HIPK1,2 που παρουσιάζουν από μόνες τους. Σίγουρα όμως η κατασταλτική δράση των HIPK οφείλεται στην ενεργότητα κινάσης που φέρουν μιας και τα κυρίαρχα αρνητικά μεταλλάγματα τους που έφεραν ελατωματική την ενεργότητα αυτή δεν παρουσίασαν καμία απολύτως καταστολή στον Olig1 υποκινητή.

Επίλογος

Αναφέρθηκε στην εισαγωγή πως το Olig1 γονίδιο εμπλέκεται στους μηχανισμούς μυελινοποίησης των αξόνων στους νευρώνες και στην ωρίμανση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων. Γνωρίζοντας ότι το Olig1 γονίδιο υπερεκφράζεται στους καρκίνους της γλοίας και πως στη σκλήρυνση (multiple sclerosis) οι νευρώνες δεν μυελινοποιούνται και εκφυλίζονται, φαίνεται ότι το Olig1 γονίδιο έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ασθενειών αυτών.

Είναι πολύ σημαντικό να διαλευκανθεί ο μηχανισμός ρύθμισης και λειτουργίας του Olig1 γονιδίου. Ήδη γνωρίζουμε ότι η τοπολογία της Olig1 πρωτεΐνης διαφέρει ανάλογα την λειτουργία της. Δεδομένου ότι ο ERF εμπλέκεται στην καταστολή του Olig1, είναι σαφές ότι θα πρέπει να διαλευκανθεί εις βάθος ο μηχανισμός καταστολής του. Δεδομένου και της αποδεδειγμένης ογκοκατασταλτικής δράσης που έχει ο ERF, είναι πιθανό να αποδειχθεί σημαντική η συμβολή του ERF στην εξέλιξη των καρκίνων μέσω του Olig1 γονιδίου.

Βιβλιογραφία

- Greene et. Al .- PNAS 1976, Jul;73(7):2424-8. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.
- Fujita et. al. - Environmental Health Perspectives 1989, Mar;80:127-42. Review. Regulation of the differentiation of PC12 Pheochromocytoma cells.
- Leppa et. al. - EMBO 1998, Aug 3;17(15):4404-13. Regulation of c-jun by ERK during PC12 differentiation.
- Lee et al. - PNAS 1995, Aug 29;92(18):8303-7. Comparative EST analysis of differential gene expression profiles in PC-12 cells before and after NGF differentiation.
- Lee et. al. - Neurochemical Research 2005, Apr;30(4):533-40. cDNA microarray analysis of NGF regulated gene expression profile in Rat PC12 cells.
- Vaudry et al. - Science 2002, May 31;296(5573):1648-9. Signaling pathways for PC12 cell differentiation : Making the right connections.
- McBurney et al. - Int J Dev Biol. 1993, Mar;37(1):135-40. Review. P19 embryonal carcinoma cells.
- McBurney et al. - The journal of neuroscience 1988, Mar;8(3):1063-73. Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture.
- Oikawa et al. - Gene 2003, Jan 16;303:11-34. Molecular biology of the ETS family of transcription factors.
- Oikawa et al. - Cancer Sci. 2004, Aug;95(8):626-33. ETS transcription factors : possible targets for cancer therapy.
- Mavrothalassitis – Oncogene 2000 19: 6524-6532 – Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity.
- Sgouras et al. – EMBO J. 1995, 14 :4781-4793 – ERF: an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress at5-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation.
- Lionel le Gallic et al. - June 1999, MCB pp. 4121-4233 – Transcriptional repressor ERF is a Ras/Mitogen-activated protein kinase target that regulates cellular proliferation.
- Lionel le Gallic et al. - Feb.2004, MCB pp. 24:1206-1218 – ERF nuclear shuttling a continuous monitor of Erk activity that links it to cell cycle progression.
- Polychronopoulos et al. – JBC 2006 281:25601-25611 – The transcriptional ETS2 Repressor factor associates with active and inactive Erks through distinct FXF motifs.
- Papadaki et al. - Mol Cell Biol. 2007 Jul;27(14):5201-13. Epub 2007 May 14. - Transcriptional Repressor Erf Determines Extraembryonic Ectoderm Differentiation.
- Kolch - Nature Rev Mol Biol. 2005 Nov;6(11):827-37 – Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors.
- Murphy et.al. - Trends in biochemical science, May;31(5):268-75. Epub 2006 Apr 17 – MAPK signal specificity the right place at the right time.
- Schubbert et al. - Current opinion in Genetics & Development 2007 Feb;17(1):15-22 – Deregulated Ras signaling in developmental disorders.
- Yang et.al - Gene 2003 Nov 27;320:3-21 – Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades.
- Zhou et al. - Cell 2002 Apr 5;109(1):61-73 - The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification.

Takebayashi et al. - *Curr Biol* 2002b, Jul 9;12(13):1157-63. - The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages

Lu et al. - *Nat. Neuroscience* 2001 Oct;4(10):973-4 - Ectopic expression of Olig1 promotes oligodendrocyte formation and reduces neuronal survival in developing mouse cortex.

Lu et al. - *Cell* 2002 Apr 5;109(1):75-86 - Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection

Stolt et al. - *Genes & Development* 2002 Jan 15;16(2):165-70 - Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10.

Kuhlbrodt et al. - *Journal of Neuroscience Research* 1998 - Sox10, a novel transcription modulator in glial cells.

Arnett et al. - *Science* 2004 Dec 17;306(5704):2111-5- bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS.

Xin et.al. - 2005, *The Journal of Neuroscience* Feb 9;25(6):1354-65 – Myelinogenesis and axonal recognition by oligodendrocytes in brain are uncoupled in Olig1 null mice.

Samanta J, Kessler JA. - *Development* 2004 Sep;131(17):4131-42. Epub 2004 Jul 27. - Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation.

Wang, S.; Scrulla, A.; Johnson, J. E.; Yokota, Y.; Barres, B. A. - *Neuron* 2001 Mar;29(3):603-14. - A roll for the helix-loop-helix protein Id2 in the control of oligodendrocyte development.

Ligon et al. - *Glia* 2006 Jul;54(1):1-10. – Olig gene function in CNS development and disease.

Wegner, M. - *Microscopy Research and Technique* 2001 Mar 15;52(6):746-52. Expression of transcription factors during oligodendroglial development.

Wegner, M. - *Glia* 2000 Jul;31(1):1-14. - Transcriptional control in myelinating glia: flavors and spices.