Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας

Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Γονιδιακής Ρύθμισης σε Πλειοδύναμα Βλαστοκύτταρα

Πτυχιακή εργασία

Ο ρόλος της πρωτεΐνης PML στη ρύθμιση της πλειοδυναμίας βλαστοκυττάρων μέσω σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών

Στέλλα Μπαρτζιώκα
Α.Μ.: 3194

Επιστημονικά υπεύθυνη: Ανδρονίκη Κρετσόβαλη, Ερευνήτρια Α΄, IMBB/ITE
Ακαδημαϊκός υπεύθυνος: Χαράλαμπος Σπηλιανάκης, Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας & Επιγενετικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ηράκλειο, Οκτώβριος 2023

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας στο τέλος της πρώτης εργαστηριακής-ερευνητικής μου εμπειρίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη κυρία **Ανδρονίκη Κρετσόβαλη**, την επιστημονικά υπεύθυνη της πτυχιακής μου εργασίας, που με επέλεξε ως μέλος του εργαστηρίου της και με εμπιστεύτηκε έναν ολόκληρο χρόνο, δίνοντας μου την ευκαιρία να γνωρίσω τον ερευνητικό χώρο και να πραγματοποιήσω τα πρώτα βήματα στην ακαδημαϊκή μου καριέρα. Καθημερινά παρούσα στο εργαστήριο, πάντα μας πρόσεχε όλους και φρόντιζε να κρατάει την ομάδα ενωμένη (διοργανώνοντας διάφορα events κατά καιρούς). Θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ και τον κύριο **Σήφη Παπαματθαιάκη** για όλες τις «απλές» ερωτήσεις και τους «κοινούς» προβληματισμούς που μου έθετε σε κάθε lab meeting. Χάρη σε αυτόν, συνειδητοποίησα πως τα μεγαλύτερα ζητήματα της Βιολογίας απαντώνται, θέτοντας απλά και όχι πολύπλοκα ερωτήματα. Ευχαριστώ τον κύριο **Χαράλαμπο Σπηλιανάκη**, τον ακαδημαϊκά υπεύθυνο της πτυχιακής εργασίας μου, που συνέβαλε μέσω της διδασκαλίας του στο να αγαπήσω τον κόσμο της Επιγενετικής, καθώς και για όλες τις συμβουλές που μας έδινε στα μαθήματα του για όσους επιθυμούν να συνεχίσουν ακαδημαϊκά τη πορεία τους. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κύριο **Τάκη Μακατουνάκη**, τον τεχνικό του εργαστηρίου μας (και γκουρού του IMBB), που μου δίδαξε όλες τις βασικές μοριακές τεχνικές και συνεργαστήκαμε τόσο πολύ για να καταφέρουμε αυτό το δύσκολο cloning στο τέλος. Τα φρέσκα φρούτα και λαχανικά που έφερνε καθημερινά στο εργαστήριο (συνδυασμός ερευνητή και κηπουρού) νομίζω θα μείνουν στη μνήμη μου χαρακτηριστικά.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» ίσως να μην είναι αρκετό για την υποψήφια διδακτορικό του εργαστηρίου μας, τη **Συραγώ Σπανού**. Η Συραγώ, πάντα δυναμική και ακούραστη, αποτελεί πρότυπο για εμένα, όσον αφορά την οργάνωση της, τη συνέπεια της και το πόση δουλειά κατάφερνε να βγάζει παρά το βεβαρυμμένο πρόγραμμα της. Την ευχαριστώ, γιατί αυτή μου έμαθε πως να συμπεριφέρομαι σε έναν εργαστηριακό χώρο, πως να αξιολογώ τα αποτελέσματα μου, πως «να μην κρύβω» λάθη που προκύπτουν, καθώς και για όλες τις αστείες στιγμές και τα inside jokes που είχαμε μεταξύ μας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη που πέρασαν από το εργαστήριο, όσο βρισκόμουν εκεί. Για αρχή, τους Post-docs μας, τον **Fabien Moretto**, που με έκανε πάντα να χαμογελάω, καθώς και την **Αμαλία Βογιατζόγλου**, η οποία μου μετέδιδε τη θετική της ενέργεια κάθε φορά που μας επισκεπτόταν. Ευχαριστώ, επίσης, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές, την **Ιωάννα Σούκουλη**, για τις ανησυχίες που μοιραζόμασταν, αλλά κυρίως τον **Αλέξανδρο Μηνακάκη** για όλη τη συμπαράσταση, καθώς αποτελούσε το στήριγμα μου στις δυσκολίες. Τέλος, ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στον προπτυχιακό φοιτητή, πριν από εμένα, τον **Στάθη Φαντίδη**, που με υποδέχτηκε στο εργαστήριο, βοήθησε στη προσαρμογή μου και με έκανε να γελάω με τα inside jokes μας (iconic). Ευχαριστώ, επιπλέον, τη προπτυχιακή φοιτήτρια Erasmus, την **Inés Barbaut**, καθώς ήταν το πρώτο άτομο που εκπαίδευσα (σε ό,τι τεχνική γνώριζα προφανώς), καθώς και για τη παρέα της όλους τους μήνες που ήμασταν μαζί. Να ευχαριστήσω, όμως, και τα νέα μέλη του εργαστηρίου, την **Άντζελα Ζγουρού** και τον **Γιώργο Δουγαλή**, που ελάφρυναν το κλίμα στο εργαστήριο, παρά το άγχος που είχα, καθώς πλησίαζε το τέλος της πτυχιακής μου.

Τέλος, ένα τεράστιο «ευχαριστώ» για τους φίλους μου και κυρίως για τον **Νίκο Βουζουνεράκη** και την **Αθανασία Βούλγαρη**, που ήταν καθημερινά εκεί για εμένα (ευχαριστώ που με «ανεχτήκατε» και τα 4 χρόνια, αλλά κυρίως το τελευταίο). Η στήριξη τους ήταν πραγματικά σημαντική και πολύτιμη, ώστε να μη τα παρατάω, ακόμη και όταν δυσκολεύουν πολύ οι καταστάσεις, και να συνεχίζω ακάθεκτη (όπως λέει και η αγαπημένη κυρία Αλεξανδράκη). Ευχαριστώ όμως και τις φίλες μου **Μαρία Νάζου**, **Χριστίνα Περράκη** και **Ζωή Δογάνη**, που μοιραζόμασταν τις εμπειρίες μας από την εργαστηριακή μας ζωή (σχεδόν κάθε Σάββατο βράδυ) και προσπαθούσαμε να ενθαρρύνουμε η μία την άλλη. Μακάρι να διασταυρωθούν οι δρόμοι μας ξανά παιδιά…

Εύχομαι σε όλους σας τα καλύτερα!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ – ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ – ΠΙΝΑΚΩΝ **4**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ **6**

ABSTRACT **7**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ **8**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ **9**

1. Τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα **9**
- **1.1 Τα χαρακτηριστικά εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων** 9
- **1.2 Οι κατηγορίες εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων** 9
- **1.3 Η ρύθμιση της πλειοδυναμίας εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων** 10

2. Η πρωτεΐνη προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας – PML **12**
- **2.1 Η δομή της πρωτεΐνης PML** 12
- **2.2 Οι ισομορφές της πρωτεΐνης PML** 12
- **2.3 Τα πυρηνικά σωμάτια PML (PML nuclear bodies)** 12
- **2.4 Ο ρόλος της πρωτεΐνης PML στη πλειοδυναμία** 13

3. Η μετα-μεταφραστική τροποποίηση σουμοϋλίωσης **14**
- **3.1 Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών** 14
- **3.2 Τα χαρακτηριστικά της σουμοϋλίωσης** 15
- **3.3 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στη πλειοδυναμία** 15
- **3.4 Ο ρόλος της πρωτεΐνης PML στη σουμοϋλίωση** 16

4. Η πρωτεΐνη Spalt homology 1 (SALL1) **17**
- **4.1 Τα γονίδια των πρωτεϊνών SALL** 17
- **4.2 Η δομή και οι ισομορφές των πρωτεϊνών SALL** 17
- **4.3 Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης SALL1** 17
- **4.4 Ο ρόλος της πρωτεΐνης SALL1 στη πλειοδυναμία** 18

5. Συσχέτιση πρωτεϊνών PML και SALL1 ..... **19**

6. Σκοπός πτυχιακής εργασίας **20**

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ **21**

1. Μοριακή Κλωνοποίηση (Molecular cloning) **21**
- **Πέψη (Digest) DNA δειγμάτων** 21
- **Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης** 21
- **Εξαγωγή μπάντας DNA από πηκτή αγαρόζης** 22
- **Χρήση αλκαλικής φωσφατάσης για αποφωσφορυλίωση πλασμιδίου-φορέα** 22
- **Καθαρισμός DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο** 23
- **Δοκιμασία μεταλλαξιγένεσης με έναν μόνο εκκινητή (Single primer site-directed mutagenesis method)** 23
- **Συγκόλληση τμημάτων DNA (Ligation)** 25
- **Μετασχηματισμός βακτηρίων (Transformation)** 25
- **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Miniprep)** 25
- **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας (Maxiprep)** 26

2. Κυτταρική σειρά HEK293T **27**

3. Σπάσιμο και στρώσιμο κυττάρων (Cell splitting) 28
4. Παροδική διαμόλυνση κυτταρικής σειράς HEK293T (Transient Transfection) 29
5. Πείραμα ελέγχου της πρωτεϊνοσύνθεσης 29
6. Απομόνωση πρωτεϊνών ευκαρυωτικών κυττάρων (Protein Extraction) 30
7. Δοκιμασία προσδιορισμού ποσότητας πρωτεΐνης (Bradford assay) 31
8. Δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blot) 32
SDS-Page Gel ηλεκτροφόρηση 33
Transfer 34
Χρώση με Ponceau 34
Blocking 34
Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα 35
Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα 35
Έκθεση – Εμφάνιση αποτελεσμάτων 35
9. Δοκιμασία συν-ανοσοκατακρήμνισης (co-immunoprecipitation assay) 36
10. Δοκιμασία ανοσοκυτταροχημείας (Immunocytochemistry assay) 37
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 39
1. Δημιουργία μεταλλάξεων στο γονίδιο mSall1 στο τμήμα που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1-704 με τη μέθοδο μεταλλαξιγένεσης με έναν μόνο εκκινητή 39
2. Ένωση του τμήματος των αμινοξικών καταλοίπων 1-704 με το τμήμα που περιέχει το αμινοξύ K1085R στο γονίδιο mSall1 44
3. Σύντηξη του μεταλλαγμένου γονιδίου mSall1 με το γονίδιο Gfp 49
4. Μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης GFP-SALL1 και των πρωτεϊνών SOX2 και NANOG 52
5. Μελέτη της πρωτεϊνικής σταθερότητας των πρωτεϊνών SALL1 54
6. Μελέτη εντοπισμού των πρωτεϊνών SALL1 και PML στον πυρήνα 55
ΣΥΖΗΤΗΣΗ 56
1. Κατασκευή πλασμιδίου με μεταλλαγές στο Sall1 γονίδιο 56
2. Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης SALL1 57
3. Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στη σταθερότητα της πρωτεΐνης SALL1 57
4. Μερικός συνεντοπισμός των πρωτεϊνών PML και SALL1 στον πυρήνα 58
5. Περιορισμοί και μελλοντικές προοπτικές 58
ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ 59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 60

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ – ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ – ΠΙΝΑΚΩΝ

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1. Συμμετρική και ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση βλαστοκυττάρων (προέλευση εικόνας από Chen et al., 2015) 10
Εικόνα 2. Δομή πρωτεΐνης PML (προέλευση τροποποιημένης εικόνας από Corpet et al., 2020) 12
Εικόνα 3. Οι περιπτώσεις mRNA που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα και παράγουν τις επτά διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης PML (προέλευση εικόνας από Jin et al., 2014) 13
Εικόνα 4. Μηχανισμός βιογένεσης πυρηνικών σωματίων PML (Υποσημείωση: Η χημική ομάδα SUMO1 προστίθεται κυρίως στο εξωτερικό μέρος των πυρηνικών σωματίων, ενώ η χημική αλυσίδα πολύ-SUMO2/3 προστίθεται κυρίως στο εσωτερικό μέρος των πυρηνικών σωματίων) (προέλευση εικόνας από Corpet et al., 2020) 14
Εικόνα 5. Μηχανισμός σουμοϋλίωσης και αποσουμοϋλίωσης (Υποσημείωση: Το ένζυμο ενεργοποίησης Ε1 εμφανίζεται ως διμερές – SAE1 και SAE2.) (προέλευση εικόνας από Mandel and Agarwal, 2022) 16
Εικόνα 6. Δομές των ισομορφών των πρωτεϊνών SALL (ZF: Zinc-Finger domain / επικράτεια δακτύλου ψευδαργύρου, Q-rich: Glutamine rich / επικράτεια πλούσια σε αμινοξέα γλουταμίνης, RD: Repression Domain / επικράτεια καταστολής, DBD: DNA Binding Domain / επικράτεια πρόσδεσης στο DNA, NLS: Nuclear Localization Signal / σήμα για μεταφορά στον πυρήνα) (προέλευση εικόνας από Álvarez et al., 2021) 19
Εικόνα 7. Πλασμίδιο mSall1_pBlueSK με τις θέσεις κοπής για τα ένζυμα BamHI και HindIII 39
Εικόνα 8. Πέψη του πλασμιδίου mSall1_pBlueSK με τα ένζυμα BamHI και HindIII και διαγνωστική ηλεκτροφόρηση για επιβεβαίωση της κοπής του τμήματος 1-704 (αναμενόμενες μπάντες: 1013 bp, 2114 bp, 3208 bp) 40
Εικόνα 9. Πλασμίδιο pBluescript II SK(+) με τις θέσεις κοπής για τα ένζυμα BamHI και HindIII 40
Εικόνα 10. Πέψη του PCR προϊόντος με τη μετάλλαξη K672R και του πλασμιδίου mSall1_pBlueSK (control) με το ένζυμο DpnI, απεικόνιση και του άκοπου πλασμιδίου mSall1_pBlueSK (αναμενόμενες μπάντες: 6897 bp, 5031 bp) 42
Εικόνα 11. Πλασμίδιο mSall1-704pBlueSK με τις θέσεις κοπής για τα ένζυμα BamHI και HindIII 42
Εικόνα 12. Διαγνωστική πέψη του πλασμιδίου mSall1-704pBlueSK που περιέχει τη μετάλλαξη K672R με τα ένζυμα BamHI και HindIII (αναμενόμενες μπάντες: 2917 bp, 2114 bp) 43
Εικόνα 13. Πέψη του PCR προϊόντος με τη μετάλλαξη K593R με το ένζυμο DpnI (αναμενόμενη μπάντα: 5031 bp) 44
Εικόνα 14. Διαγνωστική πέψη του πλασμιδίου mSall1-704pBlueSK που περιέχει τη μετάλλαξη K672R με τα ένζυμα BamHI και HindIII (αναμενόμενες μπάντες: 2917 bp, 2114 bp) 44
Εικόνα 15. Πλασμίδιο mSall1-704pBlueSK με τη θέση κοπής για το ένζυμο BamHI 45
Εικόνα 16. Πλασμίδιο mSall1_pBlueSK με τις θέσεις κοπής για το ένζυμο BamHI 46
Εικόνα 17. Πλασμίδιο mSall(1-890)pBlueSK με τις θέσεις κοπής για το ένζυμο BglII 46
Εικόνα 18. Διαγνωστική πέψη του πλασμιδίου mSall(1-890)pBlueSK με το ένζυμο BglII για επιβεβαίωση ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο Sall1 έχει τη σωστή κατεύθυνση (αναμενόμενες μπάντες: 5359 bp, 524 bp) 47
Εικόνα 19. Πλασμίδιο mSall(1-890)pBlueSK με θέσεις κοπής για τα ένζυμα NotI και XhoI 48
Εικόνα 20. Πλασμίδιο mSall1_pBlueSK με θέσεις κοπής για τα ένζυμα NotI και XhoI 48
Εικόνα 21. Πέψη των πλασμιδίων mSall1_pBlueSK και mSall(1-890)pBlueSK με τα ένζυμα NotI και XhoI για απομόνωση επιθυμητών μπαντών, συγκόλλησή τους και δημιουργία πλήρους μεταλλαγμένου cDNA Sall1 (αναμενόμενες μπάντες: 1414 bp, 5383 bp) 49
Εικόνα 22. Διαγνωστική πέψη του πλασμιδίου mSall1_pBlueSK με το ένζυμο BamHI (αναμενόμενες μπάντες: 562 bp, 1013 bp και 5322 bp) 49

Εικόνα 23. Πλασμίδιο mSall1_pBlueSK πλήρως μεταλλαγμένο με θέσεις κοπής για τα ένζυμα HindIII και SacII 50
Εικόνα 24. Πλασμίδιο pEGFP-c3 με θέσεις κοπής για τα ένζυμα HindIII και SacII 51
Εικόνα 25. Πέψη του πλήρως μεταλλαγμένου πλασμιδίου mSall1_pBlueSK και του πλασμιδίου pEGFP-c3 με τα ένζυμα HindIII και SacII για συγκόλληση μεταξύ τους και δημιουργία του μεταλλαγμένου γονιδίου mSall1 συντηγμένο με το γονίδιο Gfp (αναμενόμενες μπάντες: 4709 bp, 4003 bp, 2894 bp) 51
Εικόνα 26. Διαγνωστική ανοσοαποτύπωση κατά Western για επιβεβαίωση έκφρασης των πρωτεϊνών GFP-SALL1 wt, GFP-SALL1 mut, SOX2 και RED-NANOG, καθώς και της ποσότητας στην οποία βρίσκονται 52
Εικόνα 27. Συν-ανοσοκατακρήμνιση για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων GFP-SALL1 wt/mut με SOX2 και NANOG (ανοσοκατακρήμινση με το αντίσωμα GFP, ανοσοαποτύπωση κατά Western με το αντίσωμα Sox2 ή Nanog, αντίστοιχα), απεικόνιση της πρωτεΐνης IgG που κατακρημνίστηκε ως control του πειράματος 53
Εικόνα 28. Απεικόνιση της 12-well plate και των 8 διαφορετικών συνθηκών με τους αναστολείς σουμοϋλίωσης (ML792) και πρωτεϊνοσύνθεσης (CHX) για τη μελέτη της σταθερότητας της αγρίου τύπου πρωτεΐνης GFP-SALL1 (wt) και της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης GFP-SALL1 (mut) 54
Εικόνα 29. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τα δείγματα που εκφράζουν τις πρωτεΐνες GFP-SALL1 wt και GFP-SALL1 mut υπό την επίδραση του αναστολέα σουμοϋλίωσης ML792 και του αναστολέα πρωτεϊνοσύνθεσης CHX 55
Εικόνα 30. Μερικός συνεντοπισμός των πρωτεϊνών GFP-SALL1 (πράσινο) και PML-RED (κόκκινο) 55

Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Κανονικοποίηση των πρωτεϊνών SOX2 και NANOG ως προς τη πρωτεΐνη GFP-SALL1 σε κάθε δείγμα 53
Διάγραμμα 2. Κανονικοποίηση των πρωτεϊνών SOX2 και NANOG ως προς τη πρωτεΐνη IgG σε κάθε δείγμα 54

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1. Μετατροπή κωδικονίων που κωδικοποιούν το αμινοξύ λυσίνη σε κωδικόνια που κωδικοποιούν το αμινοξύ αργινίνη κατά τη κατασκευή των εκκινητών 41

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεΐνη προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (Promyelotic Leukemia protein – PML) είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που συμμετέχει σε πλήθος διαδικασιών. Η πρωτεΐνη PML μπορεί να σουμοϋλιώνει άλλες πρωτεΐνες-στόχους μέσω των πυρηνικών σωματίων που σχηματίζει. Πρότερη πρωτεϊνωματική ανάλυση των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών από εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα, μετά την απαλοιφή του Pml γονιδίου, έδειξε ότι υποσουμοϋλιώνονται σημαντικά πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη πλειοδυναμία των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, όπως η πρωτεΐνη Spalt Homology 1 (SALL1). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έχει δύο ρόλους στα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα – λειτουργεί και ως μεταγραφικός καταστολέας και ως μεταγραφικός συν-ενεργοποιητής. Το ερευνητικό ερώτημα που τίθεται προς μελέτη είναι η σημασία της σουμοϋλίωσης στις λειτουργίες της πρωτεΐνης *SALL1*. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης *SALL1* με άλλους παράγοντες πλειοδυναμίας, καθώς και η σταθερότητα της πρωτεΐνης *SALL1*. Για αυτό, κατασκευάστηκε ένα πλασμίδιο που περιλαμβάνει το cDNA της πρωτεΐνης *SALL1*. Σε αυτό, με τη μέθοδο της μεταλλαξιγένεσης με έναν μόνο εκκινητή, μεταλλάχθηκαν τα κωδικόνια που αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα λυσίνης και είναι στόχοι σουμοϋλίωσης. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης, για να εξεταστούν οι αλληλεπιδράσεις της μη σουμοϋλιωμένης πρωτεΐνης GFP-*SALL1* με τις πρωτεΐνες *SOX2* και *NANOG*. Η σταθερότητα της πρωτεΐνης *SALL1* εξετάστηκε με πειράματα ελέγχου της πρωτεϊνοσύνθεσης. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν είναι ότι η σουμοϋλίωση της πρωτεΐνης *SALL1* δεν ρυθμίζει την αλληλεπίδραση της με τη πρωτεΐνη *SOX2*, ενώ η σουμοϋλίωση ρυθμίζει αρνητικά την αλληλεπίδραση της με τη πρωτεΐνη *NANOG*. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η σουμοϋλίωση συμβάλλει στη σταθερότητα της πρωτεΐνης *SALL1*. Η κατανόηση της σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης *SALL1* είναι σημαντική, καθώς μπορεί να παρέχει πληροφορίες για το πως η πρωτεΐνη *SALL1* συνεισφέρει στη διατήρηση της πλειοδυναμίας των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων και άρα πως αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής.

Λέξεις-κλειδιά: PML, SALL1, σουμοϋλίωση, πλειοδυναμία, εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα

ABSTRACT

Promyelotic Leukemia protein (PML) is a tumor suppressor protein that is involved in several processes. The PML protein can sumoylate other target proteins through the nuclear bodies it forms. Previous proteomic analysis of sumoylated proteins from embryonic stem cells, after deletion of the Pml gene, showed that proteins that regulate embryonic stem cell pluripotency, such as Spalt Homology 1 (SALL1) protein, are significantly undersumoylated. The SALL1 protein has two roles in embryonic stem cells – it is both a transcriptional repressor and a transcriptional co-activator. The aim of this thesis is to study the importance of sumoylation in the functions of the *SALL1* protein. In particular, the interactions of *SALL1* protein with other pluripotency factors and the stability of *SALL1* protein were studied. For this reason, a plasmid containing the cDNA of the *SALL1* protein was constructed. Using the single-primer site-directed mutagenesis method, the codons that corresponded to lysine amino acid residues, which are usually sumoylated, were mutated. Co-immunoprecipitation experiments were conducted to observe the interactions of the non-sumoylated GFP-*SALL1* protein with *SOX2* and *NANOG* proteins. The stability of the *SALL1* protein was studied by protein synthesis control experiments. The conclusions were that sumoylation of *SALL1* protein does not regulate its interaction with *SOX2* protein, whereas sumoylation negatively regulates its interaction with *NANOG* protein. Furthermore, it was observed that sumoylation contributes to the stability of *SALL1* protein. Understanding *SALL1* sumoylation is significant, as it may provide insights into how *SALL1* protein contributes to the maintenance of embryonic stem cell pluripotency and thus how it can be exploited in the field of regenerative medicine.

Keywords: PML, SALL1, sumoylation, pluripotency, embryonic stem cells

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ

Η πρωτεΐνη *SALL1* κατέχει αξιοσημείωτο ρόλο στη ρύθμιση της πλειοδυναμίας των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορεί να δρα στην ετεροχρωματίνη ως μεταγραφικός καταστολέας, αφού αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο NuRD, απακετυλιώνοντας ιστόνες και καταστέλλοντας τη γονιδιακή έκφραση. Η πρωτεΐνη *SALL1* μπορεί να λειτουργεί τόσο ως μεταγραφικός συν-ενεργοποιητής όσο και ως μεταγραφικός καταστολέας, όταν αλληλεπιδρά με τη πρωτεΐνη *NANOG*. Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης επάγεται η έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τη πλειοδυναμία, ενώ καταστέλλεται η έκφραση των γονιδίων που οδηγούν στη διαφοροποίηση. Μια από τις σημαντικότερες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που δέχεται η πρωτεΐνη *SALL1* είναι η σουμοϋλίωση. Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία προσπαθεί να απαντήσει ένα κύριο ερώτημα: γιατί η πρωτεΐνη *SALL1* δέχεται τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της σουμοϋλίωσης και πως η σουμοϋλίωση καθορίζει αλληλεπιδράσεις, όπως και τη σταθερότητα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Η απάντηση σε αυτό το ερώτημα μπορεί να συμβάλλει στη κατανόηση της βιολογίας της πρωτεΐνης *SALL1*, καθώς και των μηχανισμών που διέπουν τη πλειοδυναμία των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα

1.1 Τα χαρακτηριστικά εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων

Δύο σημαντικές ιδιότητες των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων είναι η αυτο-ανανέωση και η διαφοροποίηση. Η αυτό-ανανέωση είναι η ικανότητα των βλαστοκυττάρων να διαιρούνται, παράγοντας ένα ή δύο θυγατρικά βλαστοκύτταρα. Η διαφοροποίηση είναι μια διαδικασία, μέσω της οποίας προκύπτουν διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι (He et al., 2009).

1.2 Οι κατηγορίες εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων

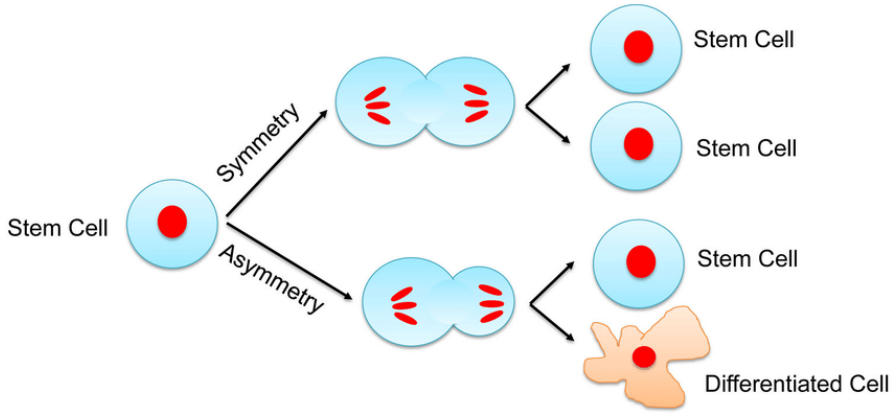
Τα βλαστοκύτταρα διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες βάσει της προέλευσης τους: τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα και τα ενήλικα βλαστοκύτταρα. Τα εμβρϋικά βλαστοκύτταρα (Embryonic Stem Cells – ESCs) προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης – του προεμφυτευτικού εμβρύου – και είναι ικανά να διαφοροποιηθούν προς οποιαδήποτε κυτταρική σειρά του ενήλικου οργανισμού (Hayashi et al., 2011). Αντίθετα, δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν προς εξωεμβρυϊκά κύτταρα (Boiani and Schöler, 2005). Αυτή η ικανότητα της διαφοροποίησης προς πολλούς κυτταρικούς τύπους, αλλά όχι όλους, ονομάζεται πλειοδυναμία (pluripotency) και για αυτό και τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα ονομάζονται πλειοδύναμα (pluripotent). Τα ποντικίσια εμβρυϊκά πλειοδύναμα βλαστοκύτταρα παρουσιάζονται στη βλαστοκύστη θηλυκών ποντικών κατά την εμβρυϊκή μέρα 3.5-4.5 (Embryo day – E3.5-4.5) (Hayashi et al., 2011). Τα ενήλικα βλαστοκύτταρα (Adult Stem cells – ASCs) είναι μη διαφοροποιημένα κύτταρα που εντοπίζονται σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών. Παρόλο που αυτά τα κύτταρα συνήθως είναι αδρανή, έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται, αντικαθιστώντας νεκρά κύτταρα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα μελετώνται στο πλαίσιο της γήρανσης και της θεραπείας εκφυλιστικών ασθενειών, λόγω της ικανότητάς τους να αναγεννούν ιστούς και να πολλαπλασιάζονται ταχέως (Cable et al., 2019).

Η πλειοδυναμία των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων κατηγοριοποιείται περαιτέρω στην «ανώριμη» - naïve πλειοδυναμία και στην «ώριμη» - primed πλειοδυναμία. Η κατηγοριοποίηση αυτή στηρίζεται στο αναπτυξιακό στάδιο, δηλαδή στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που διέπουν τη κάθε ομάδα εμβρυϊκών κυττάρων. Σε naïve κατάσταση θεωρείται ότι βρίσκονται τα πλειοδύναμα βλαστοκύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν προς οποιαδήποτε κυτταρική σειρά (Pfeuty et al., 2018). Τέτοια κύτταρα είναι τα ποντικίσια εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (Hassani et al., 2014). Σε primed κατάσταση θεωρείται ότι βρίσκονται κύτταρα που αρχίζουν να εκφράζουν ορισμένους παράγοντες διαφοροποίησης, εξειδικευμένους για κάποια συγκεκριμένη γενεαλογία (Pfeuty et al., 2018). Κύτταρα με χαρακτηριστικά primed πλειοδυναμίας είναι τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα και τα βλαστοκύτταρα από επιβλάστη ποντικού (mouse Epiblast Stem Cells – mEpiSCs) (Hassani et al., 2014).

Τα βλαστοκύτταρα διακρίνονται επίσης σε άλλες τέσσερις κατηγορίες, ανάλογα με την ικανότητα διαφοροποίησης τους: ολοδύναμα (totipotent), πλειοδύναμα (pluripotent), πολυδύναμα (multipotent) και μονοδύναμα (unipotent) (Sobhani et al., 2017). Ειδικότερα, το ζυγωτό και το βλαστομερές – στάδιο των δύο κυττάρων – είναι τα μοναδικά ολοδύναμα βλαστοκύτταρα ενός οργανισμού. Η ξεχωριστή ιδιότητα αυτών των κυττάρων είναι ότι συμβάλλουν στη δημιουργία ενός ολόκληρου οργανισμού, αφού μπορούν να διαφοροποιηθούν και προς εμβρυϊκούς και προς εξωεμβρυϊκούς ιστούς (Hu et al., 2022). Τα πλειοδύναμα βλαστοκύτταρα αποτελούν τη βάση για διαφοροποίηση προς εμβρυϊκούς ιστούς, αλλά όχι προς εξωεμβρυϊκούς ιστούς. Τα πολυδύναμα κύτταρα είναι ικανά να

διαφοροποιούνται και να παράγουν όλους τους κυτταρικούς τύπους μιας συγκεκριμένης γενεαλογίας (Sobhani et al., 2017). Για παράδειγμα, ένα βλαστοκύτταρο του αίματος (blood stem cell) μπορεί να διαφοροποιηθεί πλήρως προς οποιοδήποτε κύτταρο του αίματος – είτε σε ερυθρό αιμοσφαίριο είτε σε λευκό αιμοσφαίριο είτε σε αιμοπετάλλιο. Πολυδύναμα κύτταρα είναι τα περισσότερα ενήλικα βλαστοκύτταρα. Τα μονοδύναμα κύτταρα είναι αυτά που διαφοροποιούνται προς έναν μόνο κυτταρικό τύπο, όπως τα σπερματογόνια στους όρχεις που διαφοροποιούνται μόνο προς σπέρμα.

Τα βλαστοκύτταρα μπορούν να διαιρούνται, παραμένοντας αδιαφοροποίητα (Boiani and Schöler, 2005). Η κυτταρική τους διαίρεση δύναται να είναι είτε συμμετρική είτε ασύμμετρη (Εικόνα 1). Κατά τη συμμετρική διαίρεση προκύπτουν δύο νέα βλαστοκύτταρα πανομοιότυπα μεταξύ τους και με το αρχικό. Κατά την ασύμμετρη διαίρεση προκύπτουν δύο νέα κύτταρα διαφορετικά μεταξύ τους. Το ένα κύτταρο διαφοροποιείται προς μια συγκεκριμένη γενεαλογία, ενώ το άλλο διατηρεί τη ταυτότητα των βλαστοκυττάρων για αυτο-ανανέωση και παραμένει αδιαφοροποίητο (Berika et al., 2014).



Εικόνα 1. Συμμετρική και ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση βλαστοκυττάρων (προέλευση εικόνας από Chen et al., 2015)

1.3 Η ρύθμιση της πλειοδυναμίας εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων

Η πλειοδυναμία των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων ελέγχεται από τρεις κύριους μεταγραφικούς παράγοντες: OCT4, SOX2 και NANOG.

Ο μεταγραφικός παράγοντας OCT4 (Octameric binding protein 4) ανήκει στην οικογένεια Pit-Oct-Unc (POU) και αποτελείται από 3 κύριες επικράτειες: την αμινοτελική περιοχή διαενεργοποίησης (transactivation domain), τη κεντρική περιοχή POU για πρόσδεση στο DNA και τη καρβοξυτελική περιοχή (Sohn et al., 2021). Εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα πλειοδύναμα βλαστοκύτταρα, αλλά η έκφραση του μειώνεται σημαντικά μετά από διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών. Ο παράγοντας OCT4 είναι σημαντικός κατά τα πρώτα χρόνια της ανάπτυξης, καθώς απαλοιφή αυτού του γονιδίου φέρει θνησιγόνο αποτέλεσμα για τη βλαστοκύστη. Το γονίδιο Oct4 εμφανίζει πολλές παραλλαγές και ισομορφές σε επίπεδο μεταγραφικών προϊόντων, πρωτεϊνών και ψευδογονιδίων. Το συγκεκριμένο γονίδιο εκφράζεται σε ενήλικα βλαστοκύτταρα, σε μη-πλειοδύναμα κύτταρα και σε καρκινικά κύτταρα (Mehravar et al., 2021). Η σταθερότητα του παράγοντα OCT4 ρυθμίζεται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και συγκεκριμένα από την ουβικιτινίωση (ubiquitination) και τη σουμοϋλίωση (sumoylation). Αν σταματήσει η ουβικιτινίωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, αυξάνεται η σταθερότητα του παράγοντα OCT4 και ενισχύεται η πλειοδυναμία του κυττάρου. Η σουμοϋλίωση του παράγοντα αυτού βελτιώνει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης, τη πρόσδεσή του στο DNA, και κατ' επέκταση τη μεταγραφική του ενεργότητα, και επομένως διατηρείται η ικανότητα αυτό-ανανέωσης των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων (Sohn et al., 2021).

Ο μεταγραφικός παράγοντας SOX2 (SRY-box containing gene 2) αποτελεί μέλος της οικογένειας SRY και διαθέτει μια επικράτεια υψηλά συντηρημένη, που αποκαλείται περιοχή HMG (High Mobility Group) – μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η πρόσδεσή του στο DNA. Το γονίδιο Sox2 αρχίζει να εκφράζεται στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης, ενώ έκφραση του παρατηρείται και αργότερα τόσο σε εμβρυϊκούς όσο και σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς (Rizzino and Wuebben, 2016). Το γονίδιο *Sox2* εκφράζεται ακόμη και μετά τη γέννηση στα ενήλικα ποντίκια, συμβάλλοντας στην αναγέννηση των ιστών μετά από τραυματισμό (Arnold et al., 2011). Απαλοιφή του γονιδίου Sox2 επιτρέπει στο έμβρυο να αναπτυχθεί ως το στάδιο της βλαστοκύστης, αλλά αποτρέπει την επιβίωση του μετά την εμφύτευση. Ο παράγοντας SOX2 δεν δρα μόνος του αλλά τείνει να σχηματίζει ένα μεγαλύτερο πρωτεϊνικό σύμπλοκο με τους παράγοντες OCT4 και NANOG και άλλους παράγοντες που ελέγχουν την πλειοδυναμία (Rizzino and Wuebben, 2016). Το σύμπλοκο αυτό είναι μοναδικό στα θηλαστικά (Keramari et al., 2010). Μελέτες που αφορούν το φαινόμενο της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της σουμοϋλίωσης του παράγοντα SOX2 δείχνουν ότι αυτή η τροποποίηση εμποδίζει την ικανότητα του παράγοντα SOX2 να προσδένεται στο DNA, μειώνοντας τη σταθερότητά του. Η προσθήκη της SUMO-ομάδας πραγματοποιείται σε αμινοξέα που βρίσκονται εκτός της περιοχής HMG. Με βάση τα παραπάνω, η σουμοϋλίωση του παράγοντα SOX2 επάγει αλλαγές στη διαμόρφωσή του και επομένως η πρωτεΐνη χάνει την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (Tsuruzoe et al., 2006).

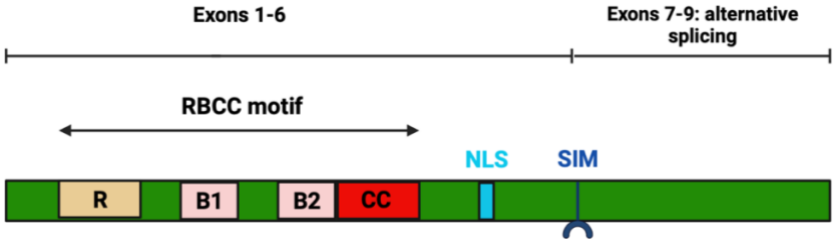
Ο μεταγραφικός παράγοντας NANOG προκύπτει από δύο αλληλόμορφα, αλλά πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν και 11 ψευδογονίδια που σχετίζονται με αυτόν (Saunders et al., 2013). Η έκφραση του περιορίζεται στην επιβλάστη και καταστέλλει την οδό διαφοροποίησης προς το πρωτογενές ενδόδερμα. Έμβρυα με απαλοιφή του γονιδίου Nanog αποτυγχάνουν να αναπτυχθούν πέρα από το στάδιο της βλαστοκύστης (Pan and Thomson, 2007). Ο παράγοντας *NANOG*, στα ποντίκια, τείνει να σχηματίζει διμερή μέσω μιας επικράτειάς του που είναι πλούσια σε αμινοξέα τρυπτοφάνης. Τα διμερή *NANOG* αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες, επάγοντας τη πλειοδυναμία των βλαστοκυττάρων. Η έκφραση του γονιδίου *Nanog*, στα ποντικίσια εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα, ελέγχεται κυρίως από τους παράγοντες *OCT4* και *SOX2*, αλλά και η έκφραση των γονιδίων *Oct4* και *Sox2* ελέγχεται από τον παράγοντα *NANOG*. Η αμοιβαία ρύθμιση είναι κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ των κύριων παραγόντων πλειοδυναμίας (Saunders et al., 2013). Βάσει βιβλιογραφίας έχει παρατηρηθεί ότι μετά από απαλοιφή των γονιδίων Sumo1 και Ubc9 – πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον μηχανισμό σουμοϋλίωσης – αυξάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης NANOG. Η σουμοϋλίωση του παράγοντα OCT4 ενισχύει την έκφραση του παράγοντα NANOG, ενώ η σουμοϋλίωση του SOX2 αποτρέπει την έκφραση του NANOG. Συνεπώς, η σουμοϋλίωση των κύριων παραγόντων πολυδυναμικότητας OCT4 και SOX2 αποτελεί έναν εναλλακτικό μηχανισμό για τη ρύθμιση της έκφρασης του παράγοντα NANOG στα κύτταρα και κατ’ επέκταση για τη ρύθμιση της πλειοδυναμίας (Wu et al., 2012).

Τα εμβρυϊκά πλειοδύναμα βλαστοκύτταρα, σε συνδυασμό με τα επαγόμενα πλειοδύναμα βλαστοκύτταρα (induced Pluripotent Stem Cells – iPSCs), αποτελούν εξαιρετικά μοντέλα για τη μελέτη της Αναπτυξιακής Βιολογίας (Ding et al., 2022). Τα επαγόμενα πλειοδύναμα βλαστοκύτταρα προέρχονται από σωματικά κύτταρα. Μετά από επαγωγή έκφρασης των παραγόντων OSKM (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) που σχετίζονται με τη πλειοδυναμία, τα «επαναπρογραμματισμένα» κύτταρα συμπεριφέρονται σαν τα εμβρυϊκά πλειοδύναμα βλαστοκύτταρα. Και οι δύο κατηγορίες κυττάρων παρέχουν πληροφορίες για τη πλειοδυναμία, ενώ παράλληλα συμβάλλουν στη κατανόηση της ανάπτυξης όλων αυτών των κυτταρικών τύπων που προκύπτουν μετά από διαφοροποίηση (Karagiannis et al., 2019).

2. Η πρωτεΐνη προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας – PML

2.1 Η δομή της πρωτεΐνης PML

Η πρωτεΐνη προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (Promyelotic Leukemia protein – PML) ανήκει στις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες και συμμετέχει σε διάφορους μηχανισμούς σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, όπως είναι η γήρανση, η άμυνα εναντίων ιών (Lallemand-Breitenbach and de Thè, 2018), η απόπτωση, η ογκογένεση, η εξέλιξη ενός καρκίνου ή η διατήρηση της πλειοδυναμίας (Hadjimichael et al., 2017). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη περιγράφηκε πρώτη φορά κατά τη μελέτη της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (Acute Promyelotic Leukemia – APL). Στην APL παρατηρείται μια αμοιβαία χρωμοσωματική μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 15 και 17. Συγκεκριμένα, το γονίδιο που εκφράζει τη πρωτεΐνη PML είναι συντηγμένο με το γονίδιο που εκφράζει τον υποδοχέα (α – άλφα) ρετινοϊκού οξέος (Retinoic Acid alpha Receptor – RARa) και έτσι παράγεται η πρωτεΐνη PML-RARa, που προκαλεί όγκους και εμφανίζεται σε περισσότερο από το 98% των περιπτώσεων APL (Guan and Kao, 2015). Η πρωτεΐνη PML ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών που περιέχουν τριμερή μοτίβα (tripartite motif – TRIM). Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούνται από μια συντηρημένη περιοχή, που αποκαλείται RBCC. Πρόκειται για μια επικράτεια δακτυλίου (RING finger domain (R)), για δύο επικράτειες B πλούσιες σε αμινοξέα κυστεΐνης-ιστιδίνης (cysteine-histidine-rich B-box domains (B)) και μια επικράτεια άλφα ελικοειδούς (alpha helical coiled-coil domain (CC)) (Corpet et al., 2020). Το Pml γονίδιο αποτελείται από εννιά εξώνια, με το εξώνιο 6 να κωδικοποιεί ένα σήμα που επιτρέπει στη πρωτεΐνη να οδηγείται στον πυρήνα (Nuclear Localization Signal – NLS) (Jin et al., 2014). Το συντηρημένο μοτίβο RBCC εμφανίζεται στο αμινοτελικό άκρο κάθε πρωτεΐνης PML (Lallemand-Breitenbach and de Thé, 2018). Επιπλέον, η πρωτεΐνη διαθέτει μια επικράτεια που αποκαλείται SIM (SUMO interacting motif), η οποία περιλαμβάνει τα αμινοξέα 556-562 και επιτρέπει στη πρωτεΐνη να αλληλεπιδρά με άλλες σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες (Εικόνα 2) (Corpet et al, 2020).



Εικόνα 2. Δομή πρωτεΐνης PML (προέλευση τροποποιημένης εικόνας από Corpet et al., 2020)

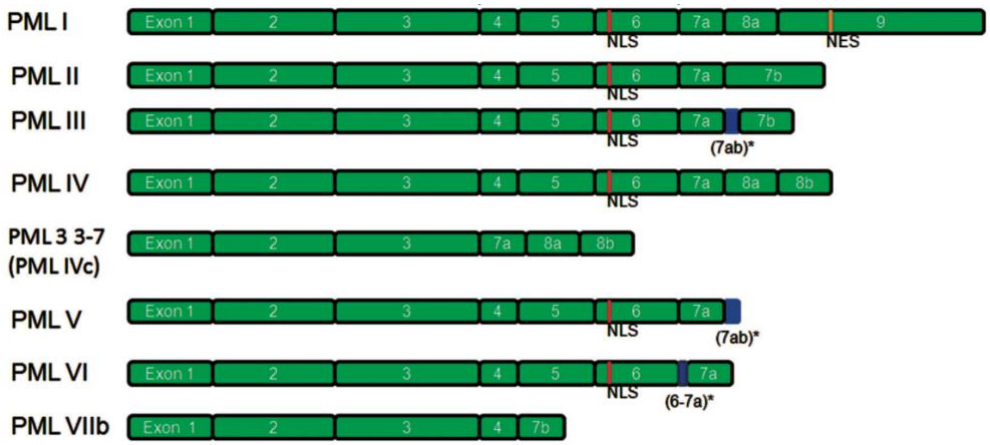
2.2 Οι ισομορφές της πρωτεΐνης PML

Η πρωτεΐνη PML έχει επτά ισομορφές, λόγω εναλλακτικού ματίσματος που επιδέχεται το mRNA στο τμήμα που αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης – εξώνια 7,8 και 9 (Lallemand-Breitenbach and de Thé, 2018). Οι ισομορφές PML II έως PML VI συνήθως εντοπίζονται στον πυρήνα, καθώς περιέχουν το σήμα NLS. Η ισομορφή PML VIIb παραμένει στο κυτταρόπλασμα, αφού δεν διαθέτει το σήμα NLS που της επιτρέπει να εισέλθει στον πυρήνα. Η ισομορφή PML I συναντάται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, καθώς περιέχει και το σήμα NLS και το σήμα NES (Nuclear Export Sequence), που της επιτρέπει να εξέλθει του πυρήνα (Εικόνα 3) (Jin et al., 2014).

2.3 Τα πυρηνικά σωμάτια PML (PML nuclear bodies)

Η πρωτεΐνη PML στον πυρήνα σχηματίζει υποκυτταρικές δομές που δεν έχουν μεμβράνη και συντάσσουν τα πυρηνικά σωμάτια PML (PML nuclear bodies). Συνήθως, τα πυρηνικά σωμάτια είναι από πέντε έως τριάντα σε κάθε πυρήνα. Παρόλα αυτά, ο αριθμός τους εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και τη φάση του κυτταρικού κύκλου που μελετάται κάθε φορά (Corpet et al., 2020). Τα πυρηνικά σωμάτια περιέχουν, συνήθως, πρωτεΐνες και είτε χρωματίνη είτε RNA που παράγεται εκείνη τη στιγμή

από τη RNA πολυμεράση (nascent RNA) (Boisvert et al., 2000). Τα πυρηνικά σωμάτια της PML, όμως, αποτελούνται σχεδόν εξ ολοκλήρου από πρωτεΐνες – 170 πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν είτε μόνιμα είτε παροδικά – και εντοπίζονται στο νουκλεόπλασμα των περισσότερων πυρήνων των κυττάρων θηλαστικών (Corpet et al., 2020).



Εικόνα 3. Οι περιπτώσεις mRNA που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα και παράγουν τις επτά διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης PML (προέλευση εικόνας από Jin et al., 2014)

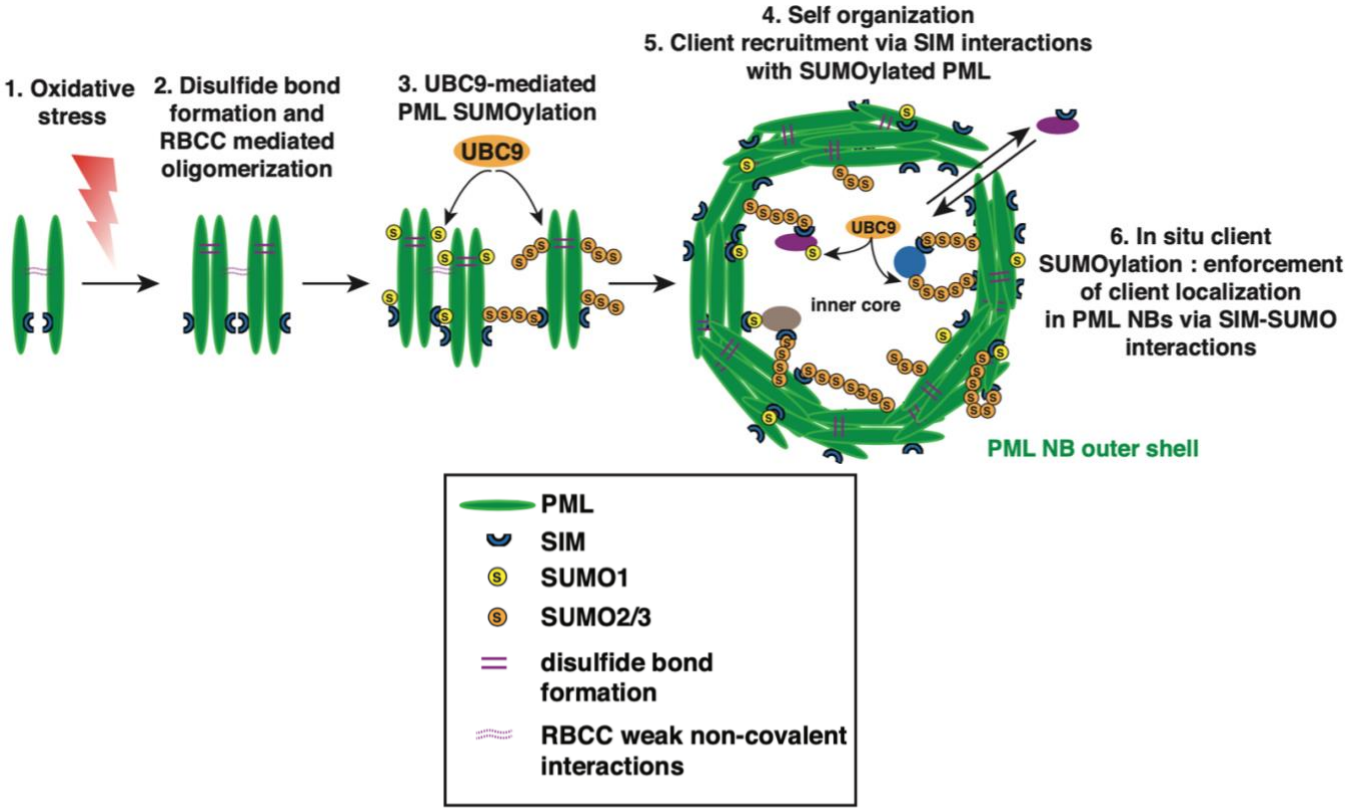
Έχει παρατηρηθεί πως το ποια πρωτεΐνη PML συμμετέχει στη σύσταση των πυρηνικών σωματίων, καθορίζει εν τέλει τη λειτουργία του συγκεκριμένου πυρηνικού σωματίου, αφού το καρβοξυτελικό άκρο κάθε πρωτεΐνης PML είναι υπεύθυνο για μια διαφορετική λειτουργία. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη PML II, που εντοπίζεται στον πυρηνικό φάκελο, συμβάλλει μέσω των πυρηνικών σωματίων, στο σχηματισμό πυρηνικών λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα (Lallemand-Breitenbach and de Thè, 2018).

Η βιογένεση των πυρηνικών σωματίων PML βασίζεται στον μηχανισμό διαχωρισμού φάσεων υγρού-υγρού (Liquid-Liquid Phase Separation – LLPS). Ο μηχανισμός LLPS ενεργοποιείται μετά από κάποιο ερέθισμα (Alberti et al., 2020). Κατά τον σχηματισμό των πυρηνικών σωματίων PML, το ερέθισμα είναι το οξειδωτικό στρες. Μετά από την επαγωγή οξειδωτικού στρες, μόρια PML συνδέονται ομοιοπολικά μεταξύ τους, σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς, λόγω κάποιων τροποποιήσεων στα αμινοξέα κυστεΐνης της επικράτειας B2. Παράλληλα, δημιουργούνται ασθενείς μη ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των επικρατειών RBCC, γεγονός που προκαλεί τη συγκέντρωση αρκετών μορίων PML. Έπειτα, το ένζυμο UBC9 πολυσουμοϋλιώνει τις PML πρωτεΐνες, ώστε να προκύψουν πολλαπλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επικρατειών SIM των πρωτεϊνών PML και των SUMO ομάδων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι ικανές να σταθεροποιούν το εξωτερικό μέρος των πυρηνικών σωματίων, ενεργοποιώντας τον μηχανισμό LLPS. Πρωτεΐνες – «πελάτες» (client proteins), που βρίσκονται στα πυρηνικά σωμάτια είτε μόνιμα είτε παροδικά, στρατολογούνται είτε στο εξωτερικό μέρος των πυρηνικών σωματίων είτε στο εσωτερικό, αναπτύσσοντας δεσμούς μεταξύ της SIM επικράτειάς τους και των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών PML. Αυτοί οι δεσμοί επιτρέπουν στις πρωτεΐνες – «πελάτες», σε χρονικό διάστημα λεπτών, να ενσωματωθούν στα πυρηνικά σωμάτια (Εικόνα 4) (Corpet et al., 2020).

2.4 Ο ρόλος της πρωτεΐνης PML στη πλειοδυναμία

Η πρωτεΐνη PML διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη διατήρηση της πλειοδυναμίας των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, όσο και στον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων, τα οποία μετατρέπονται σε επαγόμενα πλειοδύναμα βλαστοκύτταρα. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη PML εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα μη διαφοροποιημένα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα. Ωστόσο, η απουσία της προκαλεί αλλαγές όχι μόνο στη συνολική γονιδιακή έκφραση ή στη μορφολογία των κυττάρων, αλλά και στο ποιο μονοπάτι διαφοροποίησης θα ακολουθήσουν τελικά τα συγκεκριμένα κύτταρα

(Hadjimichael et al., 2017). Η πρωτεΐνη PML μπορεί να ρυθμίζει τη πλειοδυναμία μέσω ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου Oct4. Η πρωτεΐνη PML διατηρεί «ανοιχτή» τη χρωματίνη στο σημείο που βρίσκεται ο υποκινητής του γονιδίου Oct4, με αποτέλεσμα ο παράγοντας OCT4 να παράγεται συνεχώς στα βλαστοκύτταρα (Chuang et al., 2011). Πειράματα ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου δείχνουν ότι η πρωτεΐνη PML είναι ικανή να ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο, καθώς σε κύτταρα με απαλοιφή του Pml γονιδίου παρατηρείται ότι αυτά βρίσκονται περισσότερο στη φάση G1 και λιγότερο στη φάση S. Καμία σημαντική αλλαγή δεν παρατηρείται στις φάσεις G2/M. Επομένως, η απουσία της PML οδηγεί σε καθυστερημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, έλλειψη του Pml γονιδίου ωθεί τα κύτταρα σε primed κατάσταση, αφού απορρυθμίζεται η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA ή την οργάνωση της χρωματίνης. Παράλληλα, η παρουσία της PML επιτρέπει την έκφραση γονιδίων σε κύτταρα που διαφοροποιούνται προς το τελικό ενδόδερμα, ενώ η απουσία της ενισχύει την έκφραση γονιδίων σε κύτταρα που διαφοροποιούνται προς μεσόδερμα. Επιπροσθέτως, η πρωτεΐνη PML συμβάλλει στα πρώτα στάδια επαναπρογραμματισμού των επαγόμενων πλειοδύναμων βλαστοκυττάρων, καθώς μπορεί να ρυθμίζει διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη πλειοδυναμία, όπως το μονοπάτι TGF-β (Vogiatzoglou et al., 2022).



Εικόνα 4. Μηχανισμός βιογένεσης πυρηνικών σωματίων PML (*Υποσημείωση: Η χημική ομάδα SUMO1 προστίθεται κυρίως στο εξωτερικό μέρος των πυρηνικών σωματίων, ενώ η χημική αλυσίδα πολύ-SUMO2/3 προστίθεται κυρίως στο εσωτερικό μέρος των πυρηνικών σωματίων*) (προέλευση εικόνας από Corpet et al., 2020)

3. Η μετα-μεταφραστική τροποποίηση σουμοϋλίωσης

3.1 Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι χημικές ομάδες που προστίθενται στα αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών, αμέσως μετά τη διαδικασία της μετάφρασης. Οι πιο κοινές είναι η φωσφορυλίωση, η μεθυλίωση, η ακετυλίωση, η γλυκοζυλίωση και η ουβικιτινίωση (Ramazi and Zahiri,

2021). Οι τροποποιήσεις αυτές καθορίζουν τη σταθερότητα, τη λειτουργία, τη τοπολογία και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο (Hannoun et al., 2010).

3.2 Τα χαρακτηριστικά της σουμοϋλίωσης

Η σουμοϋλίωση (SUMOylation) είναι μια ακόμα μετα-μεταφραστική τροποποίηση που επιδέχονται ορισμένες πρωτεΐνες. Κατά τη διαδικασία της σουμοϋλίωσης προστίθεται, στη θέση «ε» του αμινοξέος λυσίνη, ένα μικρό πολυπεπτίδιο που μοιάζει με τη χημική ομάδα ουβικιτίνης (small ubiquitin-like modifier / SUMO) (Tahmasebi et al., 2014). Η ομάδα SUMO είναι μέλος μιας υπεροικογένειας μικρών πρωτεϊνών που προσδένονται ομοιοπολικά στις πρωτεΐνες-στόχους. Η πρόσδεση αυτή είναι παροδική. Στα θηλαστικά εντοπίζονται τρεις ομάδες SUMO: SUMO1, SUMO2, SUMO3. Στον άνθρωπο, οι ομάδες SUMO2 και SUMO3 εμφανίζουν 97% ομοιότητα στην αλληλουχία τους, για αυτό και αναφέρονται ως μία ομάδα με το όνομα SUMO2/3 (Barroso-Gomila et al., 2021). Η χημική ομάδα SUMO προστίθεται συνήθως σε κάποιο αμινοξύ λυσίνης που βρίσκεται σε μια συντηρημένη αλληλουχία, την ψKxD/E, όπου ψ: υδρόφοβο αμινοξύ, K: λυσίνη όπου προστίθεται η SUMO ομάδα, x: οποιοδήποτε αμινοξύ, D: ασπαρτικό οξύ ή E: γλουταμικό οξύ (Hannoun et al., 2010). Οι σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες συμμετέχουν ενεργά σε ποικίλους μηχανισμούς του κυττάρου, όπως είναι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η μεταγραφή γονιδίων, η υποκυτταρική τοποθέτηση καθώς και η οργάνωση της χρωματίνης (Hannoun et al., 2010).

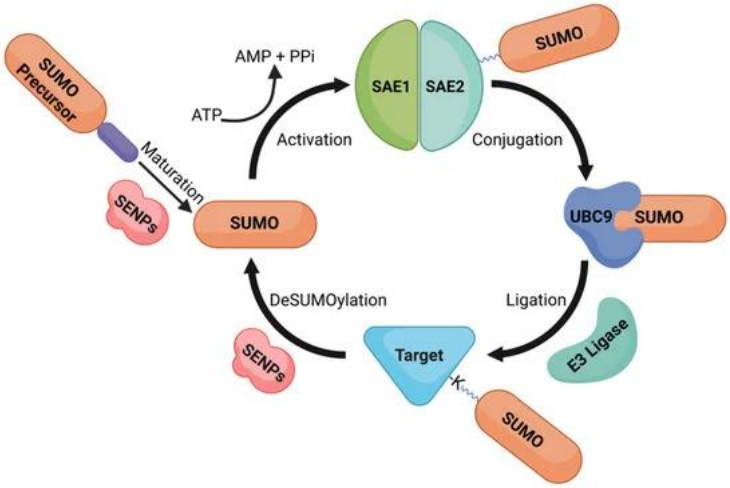
3.3 Ο μηχανισμός της σουμοϋλίωσης

Η σουμοϋλίωση είναι μια αναστρέψιμη διαδικασία, στην οποία συμμετέχουν πολλά ένζυμα. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός παρουσιάζει ομοιότητες με τη διαδικασία της ουβικιτινίωσης. Η σουμοϋλίωση εκτελείται κυρίως από τρία ένζυμα: το ένζυμο ενεργοποίησης (E1), το ένζυμο σύζευξης (E2) και τη λιγάση (E3) (Hannoun et al., 2010). Η SUMO ομάδα βρίσκεται αρχικά σε μια πρώιμη ανενεργή μορφή που χρειάζεται να κοπεί, ώστε να μετατραπεί σε «ώριμη» και να προσδεθεί στη πρωτεΐνη-στόχο (Mojsa et al., 2021). Η διαδικασία επιτελείται από ισοπεπτιδάσες που ονομάζονται SENP (sentrin-specific proteases). Τα ένζυμα SENP χρησιμοποιούνται, επίσης, για την απομάκρυνση των SUMO ομάδων από τις πρωτεΐνες-στόχους, αφού διασπούν τους ισοπεπτιδικούς δεσμούς μέσω του καρβοξυτελικού τμήματός τους (Hannoun et al., 2010). Στην αρχή, το ένζυμο ενεργοποίησης E1 αδενυλιώνει, με τη βοήθεια του ATP, το καρβοξυτελικό άκρο της ομάδας SUMO, ώστε να μπορεί αυτό να σχηματίσει έναν δεσμό θειοεστέρα υψηλής ενέργειας με το ένζυμο E1 (Mojsa et al., 2021). Το ένζυμο E1 δρα ως ετεροδιμερές, αφού τα μονομερή του δεν είναι ικανά να δρουν μόνα τους και ανεξάρτητα. Έπειτα, η ομάδα SUMO μεταφέρεται στο ένζυμο σύζευξης E2, όπου προσδένεται από ένα αμινοξύ κυστεΐνης που υπάρχει στο ενεργό κέντρο του ενζύμου E2. Το πιο κοινό ένζυμο E2 είναι το ένζυμο UBC9. Στο τέλος, η λιγάση E3 δρα, φέρνοντας κοντά το ένζυμο UBC9 και τη πρωτεΐνη-στόχο, ώστε να προστεθεί η ομάδα SUMO στη πρωτεΐνη-στόχο (Εικόνα 6). Μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου της ομάδας SUMO και του αμινοξέος λυσίνη της πρωτεΐνης-στόχου αναπτύσσεται ένας ισοπεπτιδικός δεσμός (Hannoun et al., 2010). Όταν τα ένζυμα SENP αφαιρούν τις SUMO ομάδες κατά την αποσουμοϋλίωση, οι ομάδες αυτές ανακυκλώνονται και μεταφέρονται σε νέα υποστρώματα (Barroso-Gomila et al., 2021).

3.3 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στη πλειοδυναμία

Η σουμοϋλίωση μπορεί να καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τη ταυτότητα των κυττάρων. Οι κυριότεροι στόχοι της σουμοϋλίωσης στα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες και οι πρωτεΐνες-οργανωτές της χρωματίνης (Cossec et al., 2018). Συγκεκριμένα, η σουμοϋλίωση αποτρέπει τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, καθώς καταστολή της σε ολόκληρο το γονιδίωμα ωθεί τα συγκεκριμένα κύτταρα προς εξειδικευμένη γενεαλογία (Theurillat et al., 2020).

Πειράματα με τον αναστολέα ML792 του ενεργοποιητικού ενζύμου E1 δείχνουν πως η σουμοϋλίωση κατέχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πλειοδυναμίας των ανθρώπινων επαγόμενων πλειοδύναμων βλαστοκυττάρων, αφού παρουσία του αναστολέα μειώνονται σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα NANOG, ενώ μικρή μείωση παρατηρείται και στα επίπεδα έκφρασης των παραγόντων OCT4 και SOX2 (Mojsa et al., 2021). Αντίθετα, η σουμοϋλίωση της πρωτεΐνης SATB2, που αποτελεί οργανωτή της χρωματίνης, έχει ως αποτέλεσμα τη πρόσδεση του συγκεκριμένου παράγοντα σε γονίδια που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση τους. Η σουμοϋλίωση σε αυτή τη περίπτωση επάγει τη διαφοροποίηση (Antonio Urrutia et al., 2021). Με βάση τις παραπάνω μελέτες, η σουμοϋλίωση ρυθμίζει το όριο μεταξύ πλειοδυναμίας και διαφοροποίησης (Cossec et al., 2018). Το τελικό αποτέλεσμα της σουμοϋλίωσης στο κύτταρο εξαρτάται από το ποια πρωτεΐνη δέχεται τη συγκεκριμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση, αν στη πρωτεΐνη προστίθεται η SUMO1 ή η SUMO2/3 ομάδα και αν η πρωτεΐνη σε ένα συγκεκριμένο αμινοξύ της δέχεται μια SUMO ομάδα ή πολλαπλές ή μια αλυσίδα από SUMO ομάδες (Zhu et al., 2022).



Εικόνα 5. Μηχανισμός σουμοϋλίωσης και αποσουμοϋλίωσης (*Υποσημείωση: Το ένζυμο ενεργοποίησης E1 εμφανίζεται ως διμερές – SAE1 και SAE2.) (*προέλευση εικόνας από Mandel and Agarwal, 2022*)*

3.4 Ο ρόλος της πρωτεΐνης PML στη σουμοϋλίωση

Μελέτες έχουν δείξει πως τα ένζυμα που πραγματοποιούν τη σουμοϋλίωση, καθώς και πρωτεΐνες που σουμοϋλιώνονται, συνήθως εντοπίζονται σε πυρηνικές δομές, όπως τα πυρηνικά σωμάτια Polycomb και PML (Zhao, 2018). Μετά την επαγωγή οξειδωτικού στρες, μόρια PML πρωτεϊνών συσσωρεύονται και σχηματίζουν τα πυρηνικά σωμάτια PML (PML nuclear bodies). Στα σωμάτια αυτά στρατολογούνται αργότερα και πρωτεΐνες-«πελάτες», οι περισσότερες των οποίων σουμοϋλιώνονται από τα πυρηνικά σωμάτια PML. Ορισμένες από τις πιο συνήθεις πρωτεΐνες-«πελάτες» είναι οι SP100, DAXX και p53. Κατά τη διαδικασία της σουμοϋλίωσης, μια λιγάση (ένζυμο E3) φέρνει κοντά το ένζυμο UBC9 (ένζυμο E2) με τη πρωτεΐνη-στόχο, ώστε το ένζυμο UBC9 να προσθέσει την ομάδα SUMO στη πρωτεΐνη-στόχο. Οι λιγάσες που συμμετέχουν στον μηχανισμό της σουμοϋλίωσης φέρουν συνήθως μια επικράτεια RING, όπως η πρωτεΐνη PML. Παρόλα αυτά, μελέτες δείχνουν πως η πρωτεΐνη PML χρησιμοποιεί την επικράτεια B1, είτε μόνη της είτε σε συνεργασία με την επικράτεια RING, για να αλληλεπιδράσει με το ένζυμο UBC9. Παράλληλα, η συγκεκριμένη B1 επικράτεια της πρωτεΐνης PML φαίνεται να μεταφέρει την ομάδα SUMO από το ένζυμο E1 στο ένζυμο UBC9. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η πρωτεΐνη PML να είναι απαραίτητη στα πυρηνικά σωμάτια, ώστε να μπορέσει να πραγματοποιηθεί ανεμπόδιστα η διαδικασία της σουμοϋλίωσης (Bregnard et al., 2022).

4. Η πρωτεΐνη Spalt homology 1 (SALL1)

4.1 Τα γονίδια των πρωτεϊνών SALL

Η πρωτεΐνη Spalt homology 1 (SALL1) ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών SALL – οικογένεια τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων (SALL1, SALL2, SALL3, SALL4) που φέρουν την επικράτεια δακτύλου ψευδαργύρου C2H2 (C2H2 zinc finger domain) (Álvarez et al., 2021). Τα γονίδια Sall1 περιγράφηκαν πρώτη φορά στον οργανισμό-μοντέλο *Drosophila melanogaster* (de Celis et al., 1996). Τα γονίδια Sall συναντώνται και στα σπονδυλωτά, με το ποντίκι και τον άνθρωπο να φέρουν στο γονιδίωμά τους και τα τέσσερα γονίδια (Karantzali et al., 2011). Στον άνθρωπο, μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεΐνης SALL1 προκαλούν το σύνδρομο Townes-Brocks (Wang et al., 2023), ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεΐνης SALL4 προκαλούν το σύνδρομο Okihiro (Watson et al., 2023). Η πρωτεΐνη SALL2 δεν είναι απαραίτητη για την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Sato et al., 2003), αλλά δρα σαν ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, ρυθμίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Απαλοιφή του *Sall3* γονιδίου σε έμβρυα ποντικιών δεν τα επιτρέπει να αναπτύξουν τα όργανα/δομές που χρειάζονται, για να προσλάβουν τη τροφή, όπως είναι η γλώσσα ή τα αντίστοιχα κρανιακά νεύρα. Συνεπώς, τα ομόζυγα ποντίκια, που δεν έχουν το *Sall3* γονίδιο, πεθαίνουν σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά τη γέννησή τους, καθώς δεν είναι ικανά να τραφούν, ωστόσο τα ετερόζυγα ποντίκια επιβιώνουν (de Celis and Barrio, 2009).

4.2 Η δομή και οι ισομορφές των πρωτεϊνών SALL

Η κάθε πρωτεΐνη SALL, εκτός από τη πρωτεΐνη SALL3, εμφανίζεται με αρκετές ισομορφές. Όλες οι πρωτεΐνες περιέχουν από 1-5 επικράτειες με δακτύλους ψευδαργύρου, ενώ αρκετές περιέχουν και μια επικράτεια πλούσια σε αμινοξέα γλουταμίνης (glutamine rich / poly-Q region), η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Οι κύριοι δάκτυλοι ψευδαργύρου C2H2 εντοπίζονται συνήθως στις επικράτειες 2-5, ενώ η επικράτεια 1 είναι αυτή που δίνει το σήμα για μεταφορά και τοποθέτηση των πρωτεϊνών SALL στον πυρήνα, όπου και δρουν. Ορισμένες ισομορφές, όπως η SALL2-E1, η SALL4-A και η SALL4-B, περιέχουν και το σήμα NLS για μεταφορά στον πυρήνα (Álvarez et al., 2021). Γενικότερα, οι δάκτυλοι ψευδαργύρου προσδένονται σε δεκάδες ζεύγη βάσεων σε ρυθμιστικά στοιχεία του DNA, όπως είναι οι υποκινητές, ενισχυτές, μονωτές. Με αυτόν τον τρόπο, καταφέρνουν να ρυθμίζουν αποτελεσματικά τη γονιδιακή έκφραση (Fedotova et al., 2017). Επιπλέον, ορισμένες πρωτεΐνες SALL διαθέτουν μια συντηρημένη περιοχή 12 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο, η οποία αποκαλείται επικράτεια καταστολής (repression domain) και αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα αναδιαμόρφωσης νουκλεοσώματος και απακετυλάσης (Nucleosome Remodeling and Deacetylase complex – NuRD complex) (Εικόνα 5) (Álvarez et al., 2021). Το σύμπλεγμα NuRD επάγει τη μεταγραφική καταστολή. Χωρίς την κρίσιμη περιοχή των 12 αμινοξέων, η οποία φέρει το μοτίβο *RRKQXK-PXXF*, η πρωτεΐνη SALL1 χάνει την ικανότητα της να δρα ως μεταγραφικός καταστολέας, αφού δεν μπορεί πλέον να αλληλεπιδράσει με το σύμπλεγμα NuRD (Lauberth and Rauchman, 2006).

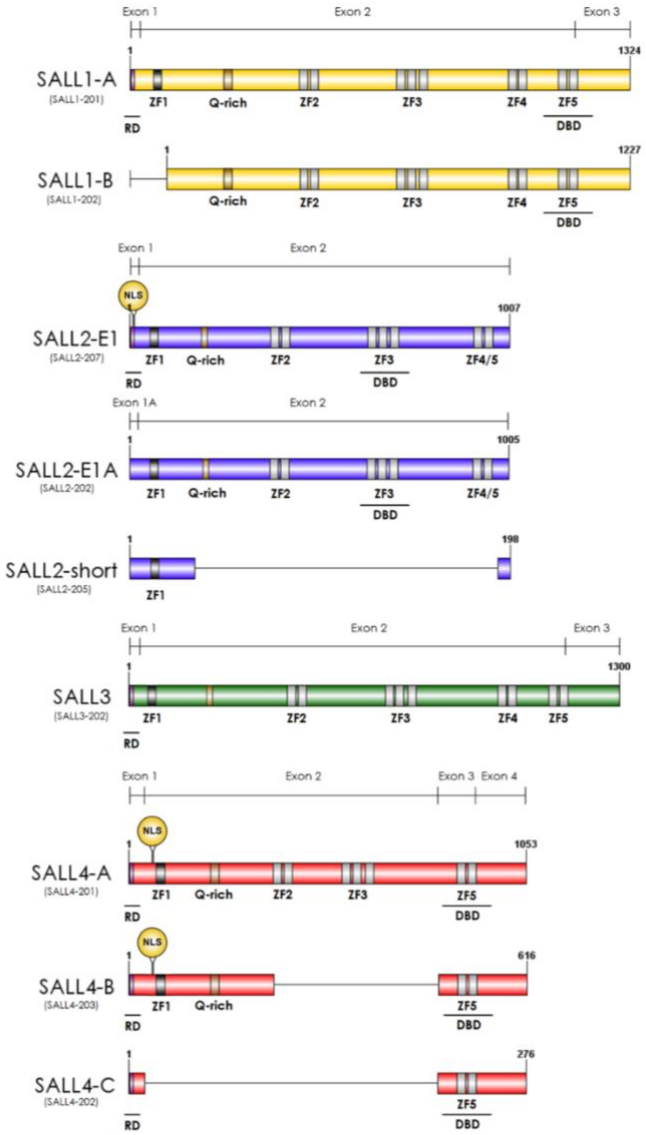
4.3 Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης SALL1

Η πρωτεΐνη SALL τείνει να τροποποιείται μετα-μεταφραστικά – μια ιδιότητα που καθορίζει τόσο την υποκυτταρική της τοποθέτηση όσο και τη μεταγραφική της ικανότητα (de Celis and Barrio, 2009). Η ανθρώπινη πρωτεΐνη SALL1 αλληλεπιδρά με το ένζυμο UBE2I, το οποίο προσθέτει SUMO-ομάδες στις πρωτεΐνες-στόχους, και άρα και στη πρωτεΐνη SALL1 (Netzer et al., 2002). Φυσιολογικά στον οργανισμό τα επίπεδα συμμοϋλίωσης της πρωτεΐνης SALL1 είναι αρκετά χαμηλά. Ωστόσο, παρατηρείται πως, μετά τη πρόσδεση της SALL1 στο σύμπλοκο NuRD, η συμμοϋλίωση της πρωτεΐνης SALL1 σταθεροποιεί την συγκεκριμένη αλληλεπίδραση, αφού αναπτύσσονται επιπλέον

δεσμοί μεταξύ των SUMO ομάδων της SALL1 και των SIM επικρατειών που εντοπίζονται σε αρκετές υπομονάδες του συμπλόκου NuRD. Συνεπώς, η σουμοϋλίωση ενισχύει την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης SALL1 με το σύμπλοκο NuRD, με αποτέλεσμα να απακετυλιώνονται αποτελεσματικά οι ιστόνες των γονιδίων-στόχων της SALL1 (Barroso-Gomila et al., 2021). Η απακετυλίωση ιστονών επάγει καταστολή της γονιδιακής έκφρασης στη συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος, όπου λαμβάνει χώρα. Η απακετυλίωση συμβαίνει συνήθως στην ετεροχρωματίνη, όπου έχει εντοπιστεί και η πρωτεΐνη SALL1 (Netzer et al., 2001). Επομένως, όταν η πρωτεΐνη SALL1 βρίσκεται στην ετεροχρωματίνη, δρα ως μεταγραφικός καταστολέας, γεγονός που υποστηρίζεται και από την αλληλεπίδραση της με το σύμπλοκο NuRD. Από πειράματα πρωτεωμικής ανάλυσης βρέθηκε πως τα αμινοξέα λυσίνης της ποντικίσιας πρωτεΐνης *SALL1* που σουμοϋλιώνονται κυρίως σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα είναι πέντε και είναι τα εξής: K204, K593, K672, K689 και K1085. Τα συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα φέρουν τα αντίστοιχα ποσοστά σουμοϋλίωσης: 5,5%, 7,8%, 4,7%, 0,3% και 81,88% (Barroso-Gomila et al., 2021). Ωστόσο, μόνο τα αμινοξέα K593 και K1085 ακολουθούν τη συντηρημένη αλληλουχία για σουμοϋλίωση. Μια ακόμη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που επιδέχεται η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι η φωσφορυλίωση. Συγκεκριμένα, φωσφορυλίωση του αμινοξέος σερίνη 2, που βρίσκεται στην επικράτεια καταστολής, από τη πρωτεϊνική κινάση C επιτρέπει στη πρωτεΐνη SALL1 να αλληλεπιδράσει αποτελεσματικά με το σύμπλοκο NuRD (Lauberth et al., 2007).

4.4 Ο ρόλος της πρωτεΐνης SALL1 στη πλειοδυναμία

Η πρωτεΐνη SALL1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πλειοδυναμίας εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων. Αναλυτικότερα, σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά, ενώ όταν αρχίζει η οδός διαφοροποίησης, η έκφραση της στο κύτταρο μειώνεται σημαντικά (de Celis and Barrio, 2009). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη SALL1 είναι ικανή να ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου Nanog, καθώς προσδένεται στον ενισχυτή του. Αντιθέτως, απαλοιφή του Sall1 γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης NANOG. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης δείχνουν ότι η πρωτεΐνη SALL1 αλληλεπιδρά με τα καρβοξυτελικά τμήματα – υπεύθυνα για τη μεταγραφή γονιδίων – των κύριων μεταγραφικών παραγόντων SOX2 και NANOG, που ρυθμίζουν τη πλειοδυναμία. Οι αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται να πραγματοποιούνται κυρίως στο καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης SALL1 (αμινοξέα 1106-1323), με τον τελευταίο δάκτυλο ψευδαργύρου να έχει ενεργό ρόλο στις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις. Παρόλα αυτά, και άλλες επικράτειες της πρωτεΐνης SALL1 συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες SOX2 και NANOG. Αυτές οι επικράτειες περιέχουν τα αμινοξέα λυσίνης που τείνουν να σουμοϋλιώνονται. Κατά την αλληλεπίδραση με τη πρωτεΐνη NANOG, το σύμπλοκο SALL1-NANOG είναι ικανό να ενεργοποιεί αλλά και να απενεργοποιεί τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων που διατηρούν ή όχι τη πλειοδυναμία, αντίστοιχα. Για παράδειγμα, ενεργοποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων Nanog, Oct4, Nr0b1 και Sall4, καθώς πρόκειται για παράγοντες που συμβάλλουν στη πλειοδυναμία, αλλά απενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση, όπως τα γονίδια Hox, το γονίδιο T Brachyury και το γονίδιο Otx2. Συνεπώς, η πρωτεΐνη SALL1 δεν λειτουργεί μόνο ως μεταγραφικός καταστολέας αλλά και ως μεταγραφικός συν-ενεργοποιητής κατά την αλληλεπίδρασή της με τη πρωτεΐνη NANOG, παρόλο που δεν περιέχει κάποια επικράτεια, με την οποία να προσδένεται άμεσα στο DNA και να επάγει τη μεταγραφική ενεργοποίηση (Karantzali et al., 2011). Ωστόσο, η σημασία της σουμοϋλίωσης στις λειτουργίες της πρωτεΐνης SALL1, κυρίως ως μεταγραφικός συν-ενεργοποιητής, δεν έχει μελετηθεί μέχρι στιγμής.



Εικόνα 6. Δομές των ισομορφών των πρωτεϊνών SALL (*ZF: Zinc-Finger domain / επικράτεια δακτύλου ψευδαργύρου, Q-rich: Glutamine rich / επικράτεια πλούσια σε αμινοξέα γλουταμίνης, RD: Repression Domain / επικράτεια καταστολής, DBD: DNA Binding Domain / επικράτεια πρόσδεσης στο DNA, NLS: Nuclear Localization Signal / σήμα για μεταφορά στον πυρήνα*) (προέλευση εικόνας από Álvarez et al., 2021)

5. Συσχέτιση πρωτεϊνών PML και SALL1

Η πρωτεΐνη PML είναι ικανή να σουμοϋλιώνει άλλες πρωτεΐνες μέσω των PML πυρηνικών σωματίων που δημιουργεί. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη κατέχει ενεργό ρόλο στη ρύθμιση της πλειοδυναμίας των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, καθώς ελέγχει την έκφραση κύριων μεταγραφικών παραγόντων πλειοδυναμίας. Βάσει αυτής της θεωρίας, στο εργαστήριο μας πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα αγρίου τύπου (wild type – wt) και σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα μετά την απαλοιφή του Pml γονιδίου για αναζήτηση των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών. Παρατηρήθηκε πως απουσία της πρωτεΐνης PML μειώνεται κυρίως η έκφραση των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών που φέρουν την ομάδα SUMO-1. Μικρότερη μείωση παρατηρήθηκε στην έκφραση των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών που φέρουν την ομάδα SUMO2/3 (μη δημοσιευμένα δεδομένα).

Ακολούθησαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών και στα δύο είδη εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων και έπειτα μέσω πειραμάτων πρωτεϊνωματικής ανάλυσης ταυτοποιήθηκαν οι σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες (SUMOylomics). Από τα αποτελέσματα ανάλυσης λειτουργικού εμπλουτισμού με metascape φάνηκε πως τα υψηλότερα σκορ υποσουμοϋλίωσης σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα, που δεν εκφράζουν τη πρωτεΐνη PML, σημειώνουν πρωτεΐνες-οργανωτές της χρωματίνης και πρωτεΐνες-ρυθμιστές της πλειοδυναμίας (μη δημοσιευμένα δεδομένα).

Δύο κατηγορίες πρωτεϊνών – οι ρυθμιστές πλειοδυναμίας και οι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου – αναλύθηκαν περαιτέρω με volcano plots, ώστε να ταυτοποιηθούν με ακρίβεια οι πρωτεΐνες που υποσουμοϋλιώνονται απουσία της πρωτεΐνης PML. Μια πρωτεΐνη που εμφανίζει αυξημένα επίπεδα υποσουμοϋλίωσης είναι η πρωτεΐνη SALL1 (μη δημοσιευμένα δεδομένα).

6. Σκοπός πτυχιακής εργασίας

Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι να διασαφηνιστεί ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσει η πρωτεΐνη *SALL1* με άλλες πρωτεΐνες, καθώς και στη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Για τη πλαισίωση αυτής της προσέγγισης κατασκευάστηκε ένα πλασμίδιο που περιείχε το cDNA του *Sall1* γονιδίου και σε αυτό μεταλλάχθηκαν τα 4 αμινοξέα που συγκεντρώνουν τα υψηλότερα ποσοστά σουμοϋλίωσης (K204, K593, K672, K1085). Με εργαλείο αυτή τη πλασμιδιακή κατασκευή είναι εφικτό να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων πλειοδυναμίας *SOX2* και *NANOG* και της μεταλλαγμένης (μη σουμοϋλιωμένης) πρωτεΐνης *SALL1*. Επιπλέον, με πειράματα ελέγχου της πρωτεϊνοσύνθεσης εξετάστηκε η σταθερότητα της μη σουμοϋλιωμένης πρωτεΐνης συγκριτικά με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη *SALL1*. Μέσω αυτών των πειραμάτων επιχειρήσαμε να εξετάσουμε, αν η σουμοϋλίωση ενισχύει ή αποτρέπει τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσει η πρωτεΐνη *SALL1* με άλλους παράγοντες πλειοδυναμίας, καθώς και αν η σουμοϋλίωση συμβάλλει στη σταθερότητα της πρωτεΐνης *SALL1*.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Μοριακή Κλωνοποίηση (Molecular cloning)

Η μέθοδος αυτή, γνωστή και ως DNA cloning, αφορά την απομόνωση της επιθυμητής αλληλουχίας DNA από έναν οργανισμό, την ένθεση της σε πλασμιδιακό φορέα και τη παραγωγή της σε μεγάλες ποσότητες.

Πέψη (Digest) DNA δειγμάτων

Με τη τεχνική αυτή επιτυγχάνεται η πέψη του DNA σε συγκεκριμένες γνωστές αλληλουχίες με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων.

Υλικά	Ποσότητες
DNA εκμαγείο	~1000 ng
διάλυμα Κ/Α (10x assay buffer)	2 μl
ένζυμο 1^{ο}	1 μl
ένζυμο 2^{ο}	1 μl
ddH_2O	μέχρι το $V_{τελ}$
($V_{τελ}$)	20 μl

- Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν:

Ένζυμα	Κωδικοί	Αποθήκευση	Εταιρεία
BamHI	#103	-20°C	Minotech
BglII	#106	-20°C	Minotech
HindIII	#116	-20°C	Minotech
NotI	#124	-20°C	Minotech
SgrBI (SacII)	#133	-20°C	Minotech
SlaI (XhoI)	#134	-20°C	Minotech

- Επώαση στους 37°C για 1,5 h

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η συγκεκριμένη ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των DNA δειγμάτων, με βάση το μέγεθός τους (μήκος σε ζεύγη βάσεων). Το αρνητικά φορτισμένο DNA αρχίζει να κινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο της πηκτής. Τα μικρότερου μεγέθους τμήματα DNA κινούνται ταχύτερα. Με τη βοήθεια ενός marker (DNA ladder) μπορεί να προσδιοριστεί το μήκος ενός τμήματος DNA.

Διαλύματα:

Διάλυμα για πηκτή αγαρόζης 0,8% σε κωνική φιάλη των 200 ml

50 ml ddH_2O

0,4 gr αγαρόζη *(Agarose BioReagent, for molecular biology, low EEO, #A9539-500G, Sigma-Aldrich)*

Running buffer (700 ml)

630 ml ddH2O

70 ml TBE (5x) + EthBr (το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται σε αραίωση 1:10)

Πρωτόκολλο:

- Συναρμολόγηση συσκευής ηλεκτροφόρησης
- Παρασκευή διαλύματος για πηκτή αγαρόζης και θέρμανση του στο φούρνο μικροκυμάτων για 1 min
- Έλεγχος, αν έχει διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη
- Προσθήκη 5 ml TBE (5x) + EthBr στη κωνική φιάλη
- Τοποθέτηση της κωνικής φιάλης κάτω από τρεχούμενο H_2O, για να ψυχθεί ελάχιστα το διάλυμα
- Προσθήκη της πηκτής στη συσκευή και αναμονή για πήξη της περίπου 20-30 min
- Φόρτωμα δειγμάτων DNA με loading buffer 5x (+ marker 10 μl – *Lambda DNA PstI Digest, #405, Minotech*)
- Ρύθμιση της συσκευής στα 120 V (Διάρκεια: 30 min συνήθως, εξαρτάται από τις μπάντες που αναμένονται)

Εξαγωγή μπάντας DNA από πηκτή αγαρόζης

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την εξαγωγή μιας συγκεκριμένης μπάντας DNA. Το πρωτόκολλο που ακολουθεί προέρχεται από το Kit – *PCR clean-up, Gel extraction, User manual NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel.*

Πρωτόκολλο:

- Αφαίρεση με νυστέρι της μπάντας DNA από τη πηκτή αγαρόζης και τοποθέτησή της σε eppendorf
- Ζύγιση του eppendorf. Για κάθε 100 mg, προστίθενται 200 μl διαλύματος NTI (διάλυμα πρόσδεσης DNA).
- Επώαση των δειγμάτων για 5-10 min στους 50°C
- Τοποθέτηση μιας κολώνας *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* σε eppendorf των 2 ml
- Προσθήκη 600 μl από το δείγμα στη κολώνα
- Φυγοκέντρηση στα 11000 g για 30 sec
- Απομάκρυνση flow-through και επαναφορά της κολώνας στο eppendorf
- Επανάληψη διαδικασίας σε περίπτωση περίσσειας δείγματος
- Προσθήκη 600 μl διαλύματος NT3 (διάλυμα πλύσης) στη κολώνα
- Φυγοκέντρηση στα 11000 g για 30 sec
- Απομάκρυνση flow-through και επαναφορά της κολώνας στο eppendorf
- Επανάληψη πλυσίματος
- Φυγοκέντρηση στα 11000 g για 1 min για πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος πλύσης
- Επώαση της κολώνας για 2-5 min στους 70°C πριν την έκλουση
- Θέρμανση του διαλύματος NE (διάλυμα έκλουσης) στους 70°C για 5 min
- Τοποθέτηση της κολώνας σε νέο 1,5 ml eppendorf και προσθήκη 25 μl διαλύματος NE
- Επώαση για 1 min σε RT (Room Temperature – θερμοκρασία δωματίου)
- Φυγοκέντρηση στα 11000 g για 1 min

Χρήση αλκαλικής φωσφατάσης για αποφωσφορυλίωση πλασμιδίου-φορέα

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Πρόκειται για ένα ένζυμο ικανό να απομακρύνει τις 5΄φωσφορικές ομάδες από έναν πλασμιδιακό φορέα που μόλις έχει υποστεί πέψη. Έτσι, αποτρέπεται η επανασυγκόλληση του πλασμιδίου και επιτρέπεται η συγκόλληση του φορέα με κάποιο πιθανό ένθεμα.

Υλικά	Ποσότητες
εκμαγείο DNA	~50 ng
διάλυμα δράσης αλκαλικής φωσφατάσης (10x)	2 μl
αλκαλική φωσφατάση	2 μl
ddH_2O	μέχρι το $V_{τελ}$
($V_{τελ}$)	20 μl

- Επώαση στους 37ºC για 1 h
- Απενεργοποίηση αλκαλικής φωσφατάσης με επώαση στους 80ºC για 2 min

Καθαρισμός DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των νουκλεϊκών οξέων, τόσο μεταξύ τους (DNA / RNA) όσο και από τις πρωτεΐνες σε ένα συγκεκριμένο δείγμα. Στο τέλος, το DNA βρίσκεται στην υδατική φάση, οι πρωτεΐνες βρίσκονται στη μεσόφαση (διακριτή φάση), ενώ το RNA και τα λιπίδια συναντώνται στην οργανική φάση στο κάτω μέρος του eppendorf.

Πρωτόκολλο:

- Προσθήκη διπλάσιου όγκου Tris-EDTA και φαινόλη (παίρνεται από το βάθος του μπουκαλιού χωρίς ανακίνηση) συγκριτικά με τη ποσότητα του διαλύματος, όπου περιέχεται το DNA στο eppendorf
- Φυγοκέντρηση στα 13000 g για 10 min
- Μεταφορά υδατικής φάσης σε νέο eppendorf
- Προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου και μικρό spin-down
- Φυγοκέντρηση στα 13000 g για 3 min
- Μεταφορά 200 μl σε νέο eppendorf
- Προσθήκη 20 μl CH_3COONa 3 M, pH 5.2
- Προσθήκη 400 μl αιθανόλης 100%
- Φυγοκέντρηση στα 14000 g για 3 min στους 4ºC
- Απομάκρυνση αιθανόλης και επαναδιαλυτοποίηση σε 30 μl ddH_2O ή Tris-EDTA

Δοκιμασία μεταλλαξιγένεσης με έναν μόνο εκκινητή (Single primer site-directed mutagenesis method)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ένθεση μεταλλάξεων (point mutations, insertions, deletions) σε DNA αλληλουχίες. Πραγματοποιούνται δύο αντιδράσεις PCR με εκκινητές (primers). Η μία αντίδραση πραγματοποιείται με τον forward εκκινητή, ενώ η άλλη αντίδραση με τον reverse εκκινητή. Οι εκκινητές φέρουν την επιθυμητή μεταλλαγή στο κέντρο των ολιγονουκλεοτιδίων. Στο τέλος, για την επιλογή του επιθυμητού πλασμιδίου, χρησιμοποιείται το ένζυμο DpnI.

Διάλυμα K mix

Αποτελείται από το διάλυμα δράσης (10x) της Taq πολυμεράσης, από $MgCl_2$ 25 mM (#11, Minotech), από dNTP mix 10 mM (#6, Minotech) και από Taq πολυμεράση (#203, Minotech).

Πρωτόκολλο:

- **Εκκινητές PCR**

Μεταλλάξεις	Εκκινητής forward	Εκκινητής reverse
K672R	5'CAGTTCAAGGCCAG GTTTCCTTTTGGG3'	5'CCCAAAAGGAAACC TGGCCTTGAACTG3'
K593R	5'CAAGGCTCAGTCAG AAGTGACTCCGGG3'	5'CCCGGAGTCACTTC TGACTGAGCCTTG3'
K204R	5'CTCCAGAGCACCAG GGTAGCGGTGGCC3'	5'GGCCACCGCTACCC TGGTGCTCTGGAG3'

- **Αντιδράσεις PCR**

Αντίδραση 1η	Αντίδραση 2η	Ποσότητες
DNA εκμαγείο	DNA εκμαγείο	~ 1 ngr
διάλυμα K mix (2x)	διάλυμα K mix (2x)	25 μl
εκκινητής forward	-	1 μl (100 pmol)
-	εκκινητής reverse	1 μl (100 pmol)
ddH_2O	ddH_2O	μέχρι το $V_{τελ}$
-	-	($V_{τελ}$ 50 μl)

- Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τις συγκεκριμένες αντιδράσεις PCR:
  - ◊ 94ºC για 2 min
  - ◊ ***94ºC για 40 sec***
  - ◊ ***55ºC για 40 sec***
  - ◊ ***72ºC για 3 min (επανάληψη των bold γραμμάτων άλλες 30 φορές – σύνολο 31 κύκλοι)***
  - ◊ 72ºC για 5 min
- Μικρό spin-down και ένωση των δύο αντιδράσεων
- Πρόγραμμα για αποδιάταξη και τυχαία υβριδοποίηση (annealing) των PCR προϊόντων με τα αρχικά μόρια DNA
  - ◊ 95ºC για 5 min
  - ◊ 90ºC για 1 min
  - ◊ 80ºC για 1 min
  - ◊ 70ºC για 30 sec
  - ◊ 60ºC για 30 sec
  - ◊ 50ºC για 30 sec
  - ◊ 40ºC για 30 sec
  - ◊ 30ºC για 30 sec
  - ◊ 20ºC για 30 sec
- Προετοιμασία 2 eppendorfs για πέψη με DpnI

Υλικά	1ο eppendorf – control	2ο eppendorf
εκμαγείο από PCR	1 μl	1 μl
ένζυμο DpnI	-	1 μl
ddH_2O	19 μl	18 μl
($V_{τελ}$)	20 μl	20 μl

- Επώαση των eppendorfs O/N (overnight – ολονύκτια) στους 37ºC

Συγκόλληση τμημάτων DNA (Ligation)

Με τη τεχνική αυτή ενώνονται τμήματα DNA μέσω της δημιουργίας φωσφοδιεστερικών δεσμών. Τα ενθέματα και ο φορέας χρησιμοποιούνται σε αναλογία 3:1. Μάλιστα, τα ng του ενθέματος υπολογίζονται με βάση τη παρακάτω εξίσωση:

*Ένθεμα (ng) = (ng φορέα * Kb ενθέματος) / (Kb φορέα * αναλογία 3:1)*

Υλικά	**1º eppendorf – control (religation)**	**2º eppendorf (ligation)**
φορέας	~50 ng	~50 ng
ένθεμα	-	(προκύπτει από εξίσωση)
διάλυμα δράσης της λιγάσης (10x)	2 μl	2 μl
ATP 10 mM (#10, Minotech)	1 μl	1 μl
T4 DNA λιγάση (#202, Minotech)	1 μl	1 μl
ddH_2O	μέχρι το $V_{τελ}$	μέχρι το $V_{τελ}$
($V_{τελ}$)	20 μl	20 μl

- Επώαση των eppendorfs O/N στους 16ºC

Μετασχηματισμός βακτηρίων (Transformation)

Η μέθοδος αυτή αφορά την εισαγωγή ξένου DNA σε βακτηριακά κύτταρα. Το ξένο DNA είναι ο πλασμιδιακός φορέας που φέρει το επιθυμητό ένθεμα. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται είναι *Escherichia coli* του στελέχους DH5a.

Πρωτόκολλο:

- Ξεπάγωμα 2 eppendorfs με βακτήρια στον πάγο
- Προσθήκη όλου του πλασμιδιακού DNA από τη ligation και τη religation στα 2 eppendorfs
- Επώαση στον πάγο για 30 min, ώστε να επιτραπεί στο πλασμιδιακό DNA να εισέλθει στα βακτήρια.
- Επώαση των eppendorfs για 2 min στους 42ºC (heat-shock), ώστε να κλείσουν οι πόροι της πλασματικής μεμβράνης των βακτηρίων
- Ξεπάγωμα 4 τρυβλίων με αντιβιοτικό (2 για κάθε eppendorf)
- Επώαση των eppendorfs για 5 min στον πάγο, ώστε τα βακτήρια να επανέλθουν στη φυσιολογική κατάσταση μετά από το heat-shock.
- Προσθήκη 1 ml θρεπτικού (από 50 ml καλλιέργεια χωρίς αντιβιοτικό) σε κάθε eppendorf
- Επώαση των eppendorfs στους 37ºC για 30 min, ώστε να πολλαπλασιαστούν τα βακτήρια
- Άπλωμα 100 μl από κάθε αντίδραση στο κάθε τρυβλίο κάτω από λυχνία
- Φυγοκέντρηση των eppendorfs για 10 sec (φυγόκεντρος KUBOTA 3300)
- Αφαίρεση υπερκειμένου και καλό up-and-down, μέχρι να διαλυθεί η πελέτα
- Άπλωμα του περιεχομένου των eppendorfs στα άλλα δύο τρυβλία κάτω από λυχνία
- Επώαση των τρυβλίων O/N στους 37ºC

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (Miniprep)

Η μέθοδος αυτή αφορά μετασχηματισμούς βακτηρίων που έχουν επωαστεί σε σωληνάκια < 50 ml.

Διαλύματα:
Τα ακόλουθα διαλύματα προέρχονται από Kit.

Διάλυμα επαναιώρησης – Resuspension buffer

RNAse
Tris-HCl (pH 8.0)
EDTA (δέσμευση δισθενών κατιόντων για αποσταθεροποίηση της μεμβράνης και αναστολή DNAσων)

Διάλυμα λύσης – Lysis buffer (μπλε)

SDS
NaOH
Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για το σπάσιμο των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων.

Διάλυμα εξουδετέρωσης – Neutralization buffer

CH_3COOK (pH 5.1)
CH_3COOH
Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την εξουδετέρωση του διαλύματος λύσης, επομένως για αποφυγή καταστροφής του DNA.

Πρωτόκολλο:

- Προσθήκη αντιβιοτικού Amp (Ampicillin – Αμπικιλλίνη για το πλασμίδιο pBluescript) ή Kan (Kanamycin – Καναμυκίνη για το πλασμίδιο EGFP-c3) σε καθαρό θρεπτικό LB σε 50 ml καλλιέργεια σε τελική συγκέντρωση 1:1000
- Προσθήκη σε κάθε γυάλινο σωλήνα 1,5 ml θρεπτικού LB με αντιβιοτικό από την 50 ml καλλιέργεια
- Μεταφορά στους σωλήνες τους κλώνους που έχουν προκύψει από την επώαση σε τρυβλίο.
- Επώαση O/N στους 37°C υπό ανάδευση
- Μεταφορά 1 ml καλλιέργειας από κάθε γυάλινο σωλήνα σε ένα διαφορετικό eppendorf κάθε φορά (πραγματοποιείται κάτω από λυχνία)
- Φυγοκέντρηση στις 11400 rpm για 12 sec (φυγόκεντρος KUBOTA 3300)
- Απόρριψη υπερκειμένου και διατήρηση της βακτηριακής πελέτας
- Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 100 μl διαλύματος επαναιώρησης και vortex
- Προσθήκη 100 μl διαλύματος λύσης και ανακίνηση
- Προσθήκη 100 μl διαλύματος εξουδετέρωσης και καλή ανακίνηση
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min σε RT (φυγόκεντρος KUBOTA 3300)
- Μεταφορά υπερκειμένου (~ 300 μl) σε νέα eppendorfs
- Προσθήκη 750 μl (διπλάσιου όγκου) 100% αιθανόλης και καλή ανακίνηση
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 min (φυγόκεντρος KUBOTA 3300)
- Απομάκρυνση αιθανόλης με παστέρ και στέγνωμα πελέτας
- Επαναδιαλυτοποίηση σε 100 μl ddH2O και αποθήκευση στους -20°C

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας (Maxiprep)

Η μέθοδος αυτή αφορά μετασχηματισμούς βακτηρίων που έχουν επωαστεί σε κωνικές φιάλες όγκου > 200 ml.

Διαλύματα:
Τα ίδια διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και για τα minipreps.

Πρωτόκολλο:

- Προσθήκη αντιβιοτικού Amp (για το πλασμίδιο pBluescript) ή Kan (για το πλασμίδιο EGFP-c3) σε καθαρό θρεπτικό LB σε 200 ml καλλιέργεια σε τελική συγκέντρωση 1:1000
- Στη 200 ml καλλιέργεια που περιέχει το θρεπτικό με το αντιβιοτικό προστίθεται ό, τι έχει απομείνει από την υγρή καλλιέργεια.
- Επώαση της καλλιέργειας O/N στους 37ºC υπό ανάδευση, για να εξασφαλιστούν οι αναγκαίες απαιτήσεις αερισμού για τα βακτήρια.
- Μεταφορά του περιεχομένου της φιάλης σε 4 falcons των 50 ml
- Φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 10 min στους 4ºC (φυγόκεντρος KUBOTA 5910), ώστε να απομονωθεί η βακτηριακή πελέτα.
- Για την απομόνωση του κάθε πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιείται ειδική κολώνα, στην οποία αρχικά προστίθενται 12 ml διαλύματος εξισορρόπησης (Equilibration buffer) πάνω κυκλικά, ώστε να υγρανθεί και να είναι έτοιμη για καθαρισμό.
- Αφαίρεση υπερκειμένου από τα falcons και προσθήκη σε ένα από αυτά 8 ml παγωμένου διαλύματος επαναιώρησης.
- Καλό vortex και ανακίνηση, μέχρι να διαλυθεί η πελέτα.
- Τοποθετείται το υγρό στο επόμενο falcon, πάλι vortex και ανακίνηση. Αυτό επαναλαμβάνεται, μέχρι να μείνει ένα falcon στο τέλος.
- Επώαση για 5 min σε RT, ώστε να δράσει το ένζυμο RNAse και να καταστρέψει το RNA.
- Προσθήκη 8 ml διαλύματος λύσης και ήπια ανακίνηση (επώαση όχι πάνω από 5 min)
- Προσθήκη 8 ml διαλύματος εξουδετέρωσης
- Φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 5 min στους 4ºC (φυγόκεντρος KUBOTA 5910)
- Προσεκτική μεταφορά υπερκειμένου στη κολώνα
- Μόλις το υπερκείμενο απομακρυνθεί από τη κολώνα, προστίθενται 5 ml διαλύματος εξισορρόπησης, ώστε να κατακρατηθούν τα κυτταρικά υπολείμματα και το γενωμικό DNA.
- Απομάκρυνση φίλτρου και προσθήκη μόνο στη κολώνα 8 ml διαλύματος πλύσης (Wash buffer)
- Τοποθέτηση 15άρι falcon κάτω από τη κολώνα και προσθήκη 5 ml διαλύματος έκλουσης (Elution buffer)
- Προσθήκη στο falcon 4,5 ml ισοπροπανόλης, ώστε να κατακρημνιστεί το DNA.
- Φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 20 min στους 4ºC (φυγόκεντρος KUBOTA 5910)
- Προσεκτική απομάκρυνση υπερκειμένου
- Προσθήκη 300-500 μl Tris-EDTA (εξαρτάται από τη ποσότητα του DNA) και ήπιο up-and-down με τη πιπέτα, για να διαλυθεί το DNA.
- Μεταφορά σε eppendorf και αποθήκευση στους 4ºC

2. Κυτταρική σειρά HEK293T

Η κυτταρική σειρά HEK293 (Human Embryonic Kidney cells) αποτελείται από ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά μετατράπηκε σε αθανατοποιημένη μετά από εισαγωγή σε αυτή των γονιδίων E1A και E1B του αδενοϊού 5 (Adenovirus 5 – Ad5), τα οποία εμποδίζουν την απόπτωση. Τα κύτταρα HEK293T, παράγωγο της κυτταρικής σειράς HEK293, εκφράζουν το SV40 μεγάλο T αντιγόνο, το οποίο ενισχύει την αντιγραφή των πλασμιδιακών φορέων, οι οποίοι έχουν διαμολυνθεί στα συγκεκριμένα κύτταρα (Reus et al., 2020), επιτρέποντας τους να παράγουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες με τη βοήθεια του υποκινητή SV40. Η κυτταρική σειρά HEK293T διπλασιάζεται αρκετά γρήγορα, περίπου κάθε 34-36 h. Για την ανάπτυξή τους χρησιμοποιείται ένα μέσο πλούσιο σε γλυκόζη, συγκεκριμένα το Dulbecco's Eagle's Medium (DMEM) που περιέχει και Fetal Bovine Serum (FBS) σε συγκέντρωση 10%. Στο θρεπτικό προστίθενται τα

αντιβιοτικά Gentamicin και Pen-Strep (Penicillin and Streptomycin) για την αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών κατά τη χρήση της κυτταροκαλλιέργειας. Το μέσο ανάπτυξης στη καλλιέργεια αντικαθίσταται κάθε 3-4 μέρες, εξαρτάται κάθε φορά από το πόσο πυκνή είναι η καλλιέργεια. Τα κύτταρα HEK293T αναπτύσσονται σε φλάσκα σε επωαστήρα της εταιρείας Thermoscientific στους 37°C με 5% CO_2. Τα κύτταρα HEK293T χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή πρωτεϊνών μεγάλης κλίμακας, για τη μελέτη μεταγωγής σήματος, για τη μελέτη γονιδιώματος σε συνδυασμό με το σύστημα CRISPR, καθώς και για τη μελέτη του καρκίνου (https://www.synthego.com/hek293).

Για τα πειράματα μελέτης της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν πιάτα των 100 mm, ώστε να αναπτυχθούν πολλά κύτταρα και επομένως να παραχθούν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών. Για τα πειράματα ελέγχου της σταθερότητας της μη σουμοϋλιωμένης πρωτεΐνης *SALL1* χρησιμοποιήθηκαν 12-well plates, καθώς δεν απαιτούνται μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών και άρα πολλά κύτταρα. Για το πείραμα ελέγχου του συνεντοπισμού των πρωτεϊνών *PML* και *SALL1* χρησιμοποιήθηκε μια 24-well plate.

3. Σπάσιμο και στρώσιμο κυττάρων (Cell splitting)

Τα κύτταρα, που καλλιεργούνται σε φλάσκα, τείνουν να συσσωρεύονται, σχηματίζοντας δεσμούς τόσο μεταξύ τους όσο και με την επιφάνεια της φλάσκας. Το «σπάσιμο» είναι η διαδικασία αποκόλλησης των κυττάρων από τη καλλιεργητική φλάσκα αλλά και μεταξύ τους, ώστε να απομονωθούν αποτελεσματικά και να χρησιμοποιηθούν για τη διεξαγωγή πειράματος. Το «σπάσιμο» πραγματοποιείται, όταν η φλάσκα είναι πυκνή με κύτταρα σε ποσοστό 90-100% (90-100% confluency). Μετά το «σπάσιμο» τα κύτταρα μετρούνται, ώστε να μοιραστούν ισόποσα στα πιάτα ή στις plates, όπου θα πραγματοποιηθεί η διαμόλυνση. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται «στρώσιμο» κυττάρων και πραγματοποιείται για τη δημιουργία νέας καλλιέργειας. Το παρακάτω πρωτόκολλο αφορά τα κύτταρα HEK293T, καθώς οι χειρισμοί διαφέρουν, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο που χρησιμοποιείται κάθε φορά.

Πρωτόκολλο:

- Απομάκρυνση θρεπτικού από την άκρη της φλάσκας με την αντλία κενού
- Προσθήκη 2 ml τρυψίνης 1x (Trypsin), χωρίς να ακουμπήσει η άκρη του tip τη φλάσκα.
- Επώαση της φλάσκας για 2-3 min στον επωαστήρα με 37°C και 5% CO_2
- Δυνατό χτύπημα της φλάσκας με το χέρι και έλεγχος στο μικροσκόπιο, αν έχουν αποκολλήσει τα κύτταρα από τη φλάσκα και μεταξύ τους
- Προσθήκη 3 ml θρεπτικού DMEM + FBS 10% για απενεργοποίηση της τρυψίνης και καλό up-and-down με τη πιπέτα, ώστε να υπάρχουν μεμονωμένα κύτταρα (single cells).
- Μεταφορά 1 ml από τη φλάσκα σε eppendorf
- Από αυτό το 1 ml τοποθετούνται 10 μl στη καλυπτρίδα (δηλαδή το 1/100).
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο ότι στα τετράγωνα γύρω από τον σταυρό τα κύτταρα έχουν κατανεμηθεί ισόποσα.
- Μέτρηση των κυττάρων και στα 4 μεγάλα τετράγωνα (δεν μετρούνται τα κύτταρα που είναι πάνω στις γραμμές). Υπολογίζεται ο μέσος όρος και πολλαπλασιάζεται με το 10^4. Αυτός ο αριθμός δείχνει πόσα κύτταρα υπάρχουν σε 1 ml της φλάσκας.
- Σε κάθε πιάτο των 100 mm μοιράζονται 10^6 κύτταρα/ml, σε κάθε πηγάδι της 12-well plate μοιράζονται 10^5 κύτταρα/ml, ενώ σε κάθε πηγάδι της 24-well plate μοιράζονται $5*10^4$ κύτταρα/ml. Με βάση τον νόμο της αραίωσης υπολογίζεται πόσος όγκος θρεπτικού θα χρησιμοποιηθεί από τη φλάσκα, για να στρωθεί το κάθε πιάτο ή το κάθε πηγάδι των plates.

- Προσθήκη θρεπτικού, ώστε ο τελικός όγκος ανά πιάτο να είναι 10 ml, ενώ για κάθε πηγάδι της 12-well ή 24-well plate ο τελικός όγκος να είναι 1 ml.
- Έλεγχος με το μικροσκόπιο ότι ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε πιάτο ή σε κάθε πηγάδι είναι περίπου ίσος.

4. Παροδική διαμόλυνση κυτταρικής σειράς HEK293T (Transient Transfection)

Η διαμόλυνση αφορά την εισαγωγή νουκλεϊκών οξέων σε ευκαρυωτικά κύτταρα, μέσω φυσικών, βιολογικών ή χημικών μεθόδων, δηλαδή χωρίς τη χρήση ιών. Η συγκεκριμένη διαμόλυνση είναι παροδική, καθώς τα νουκλεϊκά οξέα που εισάγονται δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα και επομένως δεν μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά. Λόγω του αρνητικού φορτίου του DNA αλλά και λόγω του αρνητικού φορτίου των κυτταρικών μεμβρανών, δεν καθίσταται δυνατή η είσοδος του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Για αυτό, το DNA σχηματίζει συσσωματώματα με τα θετικά ιόντα ασβεστίου (Ca^+) και έτσι καθιζάνει πάνω στα κύτταρα μέσω της προσκόλλησης.

Ο συνολικός όγκος του διαλύματος αντίδρασης είναι το 1/10 του όγκου του θρεπτικού, οπότε για κάθε πιάτο των 100 mm που έχει 10 ml θρεπτικό, ο συνολικός όγκος της αντίδρασης διαμόλυνσης είναι 1 ml. Για κάθε πηγάδι της 12-well ή 24-well plate που έχει 1 ml θρεπτικό, ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 100 μl. Για κάθε πιάτο χρειάζονται συνολικά 30 μg DNA και επειδή τα κύτταρα διαμολύνονται με δύο πλασμίδια, από το κάθε πλασμίδιο χρησιμοποιούνται 15 μg DNA. Για το κάθε πηγάδι της 12-well plate χρειάζονται 2 μg DNA, ενώ για το κάθε πηγάδι της 24-well plate χρειάζεται 1 μg DNA. Ο μισός όγκος κάθε αντίδρασης αποτελείται από DNA και $CaCl_2$, ενώ ο υπόλοιπος όγκος αποτελείται από το Hepes-Buffered Saline Solution 2x (HEBS 2x) με βέλτιστο pH για διαμόλυνση μεταξύ 7.05-7.12.

Συγκεντρώσεις πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν:
GFP-Sall1 wt (0,5 μg / μl)
GFP-Sall1 mut (x4) (0,4 μg / μl)
Red-Nanog (0,5 μg / μl)
Sox2 (0,6 μg / μl)

Πρωτόκολλο:
- Αραίωση $CaCl_2$ με ddH_2O από 2,5 M σε 0,25 M (working solution)
- Υπολογισμός της ποσότητας κάθε πλασμιδίου που χρειάζεται
- Προσθήκη υλικών με την ακόλουθη σειρά: ddH_2O, DNA (πλασμίδια), $CaCl_2$ και HEBS 2x
- Επώαση των eppendorfs στη hood για 15 min (RT), ώστε να σχηματιστεί το ίζημα
- Με τη κατάλληλη τεχνική προστίθεται το περιεχόμενο στο πιάτο/well.
- Επώαση των πιάτων ή των plates O/N σε επωαστήρα με 37°C και 5% CO2
- Παρατήρηση της διαμόλυνσης με το μικροσκόπιο φθορισμού – *Olympus IX70 Inverted Fluorescence Phase Contrast Microscope Pred IX73*.
- Την επόμενη μέρα, ξανά παρατήρηση της διαμόλυνσης με το μικροσκόπιο φθορισμού και μάζεμα των κυττάρων

5. Πείραμα ελέγχου της πρωτεϊνοσύνθεσης

Το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιείται, για να ελεγχθεί η σταθερότητα μιας πρωτεΐνης. Για τη διεξαγωγή αυτού του πειράματος χρησιμοποιείται το κυκλοεξιμίδιο (Cycloheximide – CHX #01810, Sigma-Aldrich) που είναι αναστολέας της πρωτεϊνοσύνθεσης. Όσο μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αφήνεται να δράσει το κυκλοεξιμίδιο, τόσο ταχύτερα αναμένεται να αποικοδομούνται οι πρωτεΐνες

των κυττάρων. Το κυκλοεξιμίδιο διαλύεται σε DMSO (Dimethyl Sulfoxide #A3672, PanReac Applichem) και αποθηκεύεται στους -20°C.

Τα κύτταρα που βρίσκονται στη 12-well plate χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή αυτού του πειράματος. Αμέσως μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων προστίθεται στα μισά πηγάδια ο αναστολέας σουμοϋλίωσης ML792 σε συγκέντρωση 1 μM (stock: 1mM), αραιωμένος με θρεπτικό DMEM που δεν περιέχει κάποιον αυξητικό παράγοντα. Την επόμενη μέρα προστίθενται σε κάθε πηγάδι 100 μg/ml κυκλοεξιμιδίου, αραιωμένο με θρεπτικό DMEM που δεν περιέχει κάποιον αυξητικό παράγοντα. Το κυκλοεξιμίδιο αφήνεται να δράσει για χρονικό διάστημα 6 ωρών στα κύτταρα. Τα διαφορετικά δείγματα συλλέγονται όλα μαζί, αφού ολοκληρωθούν οι 6 ώρες επώασης με το CHX.

6. Απομόνωση πρωτεϊνών ευκαρυωτικών κυττάρων (Protein Extraction)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση του συνόλου των πρωτεϊνών ύστερα από τη λύση ευκαρυωτικών κυττάρων. Κατά τη λύση των κυττάρων απελευθερώνονται ενδογενείς πρωτεάσες και πρωτεΐνες που αποσουμοϋλιώνουν τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος μας. Για αυτό χρησιμοποιούνται και αναστολείς πρωτεασών και αναστολείς αποσουμοϋλίωσης.

Διαλύματα:

Διάλυμα για συλλογή κυττάρων

1x PBS
1 mM EDTA
20 mM NEM

Διάλυμα 1x RIPA

25 mM Tris pH 7.5
150 mM NaCl
1 % NP40
0,5 % Doc
0,1 % SDS
1 mM PMSF
20 mM NEM
ddH_2O

Διάλυμα για απομόνωση πρωτεϊνών για Co-Ip

50 mM Tris pH 7.5
1 % NP40
0,25 % Doc
150 mM NaCl
1 mM EDTA pH 8
10 % Glycerol
1 mM PMSF
20 mM NEM
ddH_2O

Πρωτόκολλο:

- Απομάκρυνση του θρεπτικού από τα πιάτα ή τα πηγάδια

- Προσθήκη 8-10 ml του διαλύματος για συλλογή των κυττάρων από τα πιάτα ή προσθήκη 1 ml σε κάθε πηγάδι της 12-well plate. Καλό up-and-down με τη πιπέτα
- Μεταφορά του περιεχομένου των πιάτων σε αποστειρωμένα 15 ml falcons ή του περιεχομένου των πηγαδιών σε eppendorfs
- Φυγοκέντρηση στις 1200 rpm για 5 min σε RT (φυγόκεντρος KUBOTA 5910) για τα falcons των 15 ml. Φυγοκέντρηση στις 5500 rpm για 5 min σε RT (φυγόκεντρος KUBOTA 3300) για τα eppendorfs.
- Απομάκρυνση υπερκειμένου. Αν δεν χρησιμοποιηθούν άμεσα, τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C.
- Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε διάλυμα RIPA 1x ή διάλυμα για Co-Ip (προσθήκη διαλύματος ανάλογα με το μέγεθος της πελέτας)
- Sonication με amplitude 30 για 1-2 sec, ώστε να επιτευχθεί το σπάσιμο των κυττάρων
- Επώαση των δειγμάτων για 30 min στον πάγο
- Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 15 min στους 4°C (φυγόκεντρος KUBOTA 3500)
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέα eppendorfs και αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C

7. Δοκιμασία προσδιορισμού ποσότητας πρωτεΐνης (Bradford assay)

Η χρωματομετρική αυτή μέθοδος βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie blue G250 από τις πρωτεΐνες. Το αντιδραστήριο Bradford αποτελεί την όξινη κατιονική μορφή της χρωστικής Coomassie. Η κατιονική μορφή εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 470 nm. Ωστόσο, στην ανιονική μορφή της, όταν η χρωστική δεσμεύεται στη πρωτεΐνη, εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 595 nm. Επομένως, η ποσότητα της χρωστικής που δεσμεύεται στη πρωτεΐνη – και άρα η ποσότητα της πρωτεΐνης – μπορεί να ποσοτικοποιηθεί, μετρώντας την απορρόφηση των δειγμάτων στα 595 nm σε συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών (Asys UVM 340). Η πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται ως πρότυπη είναι η λευκωματίνη ορού βοοειδών (BSA – Bovine Serum Albumin).

Υλικά:
1x διάλυμα Bradford
0,1 μg/μl BSA
1 μg/μl BSA

Πρωτόκολλο:
- Καλό ξεπάγωμα των BSA δειγμάτων και vortex πριν τη χρήση τους
- Σε κάθε πηγαδάκι της 96αρας plate μικροτιτλοδότησης ο τελικός όγκος είναι 200 μl.
- Προσθήκη των υλικών με τη σειρά που αναγράφεται σε κάθε πηγαδάκι (B: διάλυμα Bradford)

Blank	**0,5 μg**	**1 μg**	**1 μg**	**2 μg**
10 μl dH2O 190 μl B -	5 μl dH2O 190 μl B 5 μl (0,1 μg/μl BSA)	- 190 μl B 10 μl (0,1 μg/μl BSA)	9 μl dH2O 190 μl B 1 μl (1 μg/μl BSA)	8 μl dH2O 190 μl B 2 μl (1 μg/μl BSA)
Blank	**0,5 μg**	**1 μg**	**1 μg**	**2 μg**
10 μl dH2O 190 μl B -	5 μl dH2O 190 μl B 5 μl (0,1 μg/μl BSA)	- 190 μl B 10 μl (0,1 μg/μl BSA)	9 μl dH2O 190 μl B 1 μl (1 μg/μl BSA)	8 μl dH2O 190 μl B 2 μl (1 μg/μl BSA)
Sample 1 8 μl dH2O	**Sample 2** …	…	…	…

190 μl B 2 μl sample				

- Μέτρηση της απορρόφησης της plate στα 595 nm στη συσκευή Asys UVM 340
- Αντί να σχεδιαστεί η πρότυπη καμπύλη για την εξαγωγή των συμπερασμάτων, μπορούν να γίνουν οι ακόλουθοι υπολογισμοί:
  - ◊ Υπολογισμός μέσου όρου των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων blank
  - ◊ Υπολογισμός μέσου όρου των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων με 0,5 μg BSA
  - ◊ Υπολογισμός μέσου όρου των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων με 1 μg BSA
  - ◊ Υπολογισμός μέσου όρου των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων με 2 μg BSA
- Από τους παραπάνω μέσους όρους αφαιρείται ο μέσος όρος των blank δειγμάτων.
- Από τις τιμές απορρόφησης των δειγμάτων αφαιρείται ο μέσος όρος των blank και το αποτέλεσμα διαιρείται με τον αριθμό 2.
- Οι τιμές των δειγμάτων που προκύπτουν διαιρούνται με τον μέσο όρο των 1 μg δειγμάτων (από το οποίο έχει αφαιρεθεί ο μέσος όρος των blank). Έτσι, υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε 1 μl του δείγματος.
- Στο SDS-Page Gel της ανοσοαποτύπωσης κατά Western φορτώνονται 20 μg πρωτεΐνης ανά πηγάδι, οπότε διαιρείται ο αριθμός 20 με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης κάθε δείγματος στο 1 μl.

8. Δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blot)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε ένα δείγμα από κύτταρα, ιστό ή αίμα. Με την ηλεκτροφόρηση σε SDS-Page τζελ επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στην επιφάνεια μιας μεμβράνης, η οποία επωάζεται με ένα συγκεκριμένο αντίσωμα το οποίο θα προσδεθεί στη πρωτεΐνη-στόχο. Με την έκθεση της μεμβράνης στο UV φως εντοπίζεται η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος.

Διαλύματα - Υλικά για ανοσοαποτύπωση κατά Western:

30% Acrylamide + 0,8% N,N methyl

60 gr Acrylamide
1,6 gr N, N' – Methylenediacrylamide (#1.10897.0050, Merck)
Διαλύονται σε 200 ml ddH_2O

APS

1 gr Ammonium peroxodisulfate (#1.01201.0100, Merck)
Διαλύεται σε 5 ml ddH_2O

6x loading buffer (8 ml)

4,7 ml Glycerol (#141339.1211, PanReac Applichem)
1,2 ml Tris-HCl pH 6.8
1,2 gr SDS
6 mg Bromophenol Blue
Διαλύονται σε 8 ml ddH_2O
Σε κάθε alliquot με τελικό όγκο 1 ml θα υπάρχουν 800 μl loading buffer + 200 μl β-mercaptoethanol

5x Tris-Glycine (1 litre)

15,1 gr Tris ultrapure (#A1086,1000, PanReac Applichem)

94 gr Glycine (#A1067,1000, PanReac Applichem)
Διαλύονται σε 1 litre ddH_2O

Running Buffer (1 litre)
800 ml ddH_2O
200 ml 5x Tris-Glycine
5 ml SDS 20%

Marker – αποθήκευση στους -20ºC
Color Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa) – 150 gel lanes
Κωδικός: P7719S, Εταιρεία: New England Biolabs GmbH

Transfer Buffer (1 litre) – αποθήκευση στους 4ºC
600 ml ddH_20
200 ml 5x Tris-Glycine
200 ml methanol/ethanol
5 ml SDS 20%

Ponceau S
1 gr Ponceau S powder
2 ml Acetic acid
Διαλύεται σε 200 ml ddH_2O

10x TBST (1 litre)
620 ml ddH_2O
200 ml Tris pH 7.5, 1 M
180 ml NaCl 5 M
5 ml Tween 100% (λόγω μεγάλου ιξώδους, πρώτα θερμαίνεται, για να διαλυθεί)

1x TBST (1 litre)
900 ml ddH_2O
100 ml TBST 10x

5% BSA
1,5 gr Albumin (BSA) Fraction V (pH 7.0) διαλύεται σε 30 ml TBST 1x
Vortex

Γάλα 5%
1 gr αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη Régilait διαλύεται σε 20 ml TBST 1x

SDS-Page Gel ηλεκτροφόρηση

Gels:

Running Gel 8%	***Stacking Gel 5%***
4,6 ml ddH_2O	3,4 ml ddH_2O
2,7 ml 30% Acrylamide + 0,8% N,N methyl	830 μl 30% Acrylamide + 0,8% N,N methyl
2,5 ml Tris 1,5 M pH 8.8	630 μl Tris 1,5 M pH 8.8

50 μl SDS 20%	25 μl SDS 20%
50 μl APS	25 μl APS
13 μl TEMED	13 μl TEMED

Πρωτόκολλο:

- Παρασκευή του τζελ
- Συναρμολόγηση συσκευών ηλεκτροφόρησης και τοποθέτηση του τζελ
- Γέμισμα της συσκευής με Running Buffer και καθαρισμός πηγαδιών
- Προσθήκη της επιθυμητής συγκέντρωσης δείγματος σε ένα νέο eppendorf + 6 μl loading buffer 6x
- Θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C στο heatblock, spin-down και φόρτωση τους στο τζελ (+ marker 1,5 μl)
- Ρύθμιση της συσκευής στα 90 V και μόλις τα δείγματα περάσουν στο running τζελ, ρύθμιση στα 120 V

Transfer

- Σε δισκάκι με Transfer Buffer ενυδατώνονται 4 σφουγγαράκια, 4 χαρτιά Whatman και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.
- Στη μία κασέτα τοποθετούνται τα 2 σφουγγαράκια, κλείνει και ενσωματώνεται στη συσκευή.
- Στη δεύτερη κασέτα τοποθετούνται σε κάθε πλευρά 1 σφουγγαράκι και 2 χαρτιά Whatman.
- Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, κόβεται και απομακρύνεται το stacking τζελ.
- Τοποθέτηση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης πάνω στο τζελ, κόψιμο της γωνίας της μεμβράνης πάνω από το πρώτο δείγμα (ώστε να ορίζεται εκεί η αρχή) και αποκόλληση της μεμβράνης με το τζελ από το τζαμάκι της ηλεκτροφόρησης, με την μεμβράνη να ακουμπά στη λευκή όψη της κασέτας.
- Απομάκρυνση φουσκαλών και κλείσιμο κασέτας
- Τοποθέτηση της κασέτας στη συσκευή με τη λευκή όψη προς το εξωτερικό της. Τοποθετούνται μαζί και παγοκύστη και μαγνητάκι, ενώ προστίθεται και το Transfer Buffer.

Η διαδικασία γίνεται O/N στο cold room (4°C) στα 100 mA και <50 V.

Χρώση με Ponceau

Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται, για να επιβεβαιωθεί ότι οι πρωτεΐνες έχουν περάσει από το τζελ στη μεμβράνη.

- Ανακίνηση της μεμβράνης με τη χρωστική Ponceau για 7 min σε RT
- Επιστροφή της χρωστικής στο μπουκάλι
- Μικρό ξέπλυμα της μεμβράνης με ddH_2O και παρατήρηση μπαντών (επιβεβαίωση ότι οι πρωτεΐνες έχουν περάσει στη μεμβράνη)
- Καλό ξέπλυμα με ddH_2O και TBST 1x

Blocking

Με τη διαδικασία του Blocking η πρωτεΐνη BSA συμβάλλει στο να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων. Έτσι, το αντίσωμα θα καταφέρει αργότερα να προσδεθεί με μεγαλύτερη συγγένεια στη πρωτεΐνη-στόχο.

- Προσθήκη Blocking στη μεμβράνη και ανακίνηση για 1 h σε RT

Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα

Το αντίσωμα που χρησιμοποιείται προσδένεται στη πρωτεΐνη-στόχο. Σε eppendorf με 2,5 % BSA (αραιωμένη BSA 5% σε TBST 1x) τοποθετείται η κατάλληλη ποσότητα αντισώματος, με βάση την αραίωση που αναγράφεται στο αντίστοιχο datasheet.

- Τοποθέτηση των μεμβρανών σε διάφανα σακουλάκια και προσθήκη περιεχομένου eppendorf με αντίσωμα
- Περιστροφή της μεμβράνης στον ρότορα για 1,5 h σε RT
- Αφαίρεση αντισώματος και αποθήκευση του στους -20ºC για επόμενη χρήση
- Πλύσιμο της μεμβράνης με TBST 1x τρεις φορές με τη κάθε πλύση να διαρκεί 5 min (απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος που δεν προσδέθηκε)

Αντισώματα - Κωδικοί	**Πηγή**	**Αραίωση**	**Αποθήκευση**	**Εταιρεία**
GFP (polyclonal antibody)	Rabbit	1:1000	-20ºC	Minotech Biotecnology
Nanog (D2A3) XP® Rabbit mAb #8822	Rabbit	1:1000	-20ºC	Cell Signaling Technology
Sox2 Antibody #2748	Rabbit	1:1000	-20ºC	Cell Signaling Technology

Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα

Το δευτερογενές αντίσωμα χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του πρωτογενούς αντισώματος. Το δευτερογενές αντίσωμα φέρει και ένα μόριο αναφοράς (reporter molecule), το οποίο είναι το ένζυμο HRP (Horseradish Peroxidase). Χρησιμοποιείται πάντα σε αραίωση 1:5000.

- Προσθήκη δευτερογενούς αντισώματος στη μεμβράνη και ανακίνηση για 1 h σε RT
- Απομάκρυνση αντισώματος και αποθήκευση του στους -20ºC για επόμενη χρήση
- Πλύσιμο της μεμβράνης με TBST 1x τρεις φορές με τη κάθε πλύση να διαρκεί 5 min (απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος που δεν προσδέθηκε)

Αντίσωμα – Κωδικός	**Πηγή**	**Αραίωση**	**Αποθήκευση**	**Εταιρεία**
Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) #111-035-003	Goat	1:5000	-20ºC	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) #115-035-003	Goat	1:5000	-20ºC	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.

Έκθεση – Εμφάνιση αποτελεσμάτων

- Παρασκευή ECL Buffer 1 ml (0,5 ml West Pico Stable Peroxide Solution και 0,5 ml West Pico Luminal Enhancer Solution)

- Ρίψη του ECL Buffer προσεκτικά πάνω στη μεμβράνη, ώστε να γίνει ομοιόμορφα η αντίδραση χημειοφωταύγειας.
- Επώαση της μεμβράνης για 5 min με ECL στο σκοτάδι
- Εμφάνιση αποτελεσμάτων στη συσκευή CHEMIDOC (Biorad)

9. Δοκιμασία συν-ανοσοκατακρήμνισης (co-immunoprecipitation assay)

Χρησιμοποιείται για τη ταυτοποίηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Συγκεκριμένα, ένα εξειδικευμένο αντίσωμα προσδένεται στη πρωτεΐνη-στόχο και την κατακρημνίζει μαζί με όλες τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά. Με ένα πείραμα ανοσοαποτύπωσης κατά Western μπορεί να ελεγχθεί με αντίσωμα, αν όντως έχει αλληλεπιδράσει η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος με την αρχική πρωτεΐνη-στόχο. Τα κύτταρα που καλλιεργούνται στα πιάτα των 100 mm χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή αυτού του πειράματος.

Διαλύματα:

Διάλυμα Co-Ip

25 mM Tris pH 7.5
150 mM NaCl
ddH_2O

Διάλυμα Wash

10 mM Hepes pH 7.9 (ρύθμιση με KOH)
300 mM KCl
0,3 % NP40
1,5 mM $MgCl_2$
0,25 mM EDTA
20 % Glycerol

Πρωτόκολλο:

- Απομόνωση πρωτεϊνών ευκαρυωτικών κυττάρων, χρησιμοποιώντας το ειδικό διάλυμα για Co-Ip
- Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικού δείγματος με τη δοκιμασία Bradford
- Διαγνωστική ανοσοαποτύπωση κατά Western (8% SDS Page Gel), ώστε να ελεγχθεί ότι στο δείγμα υπάρχουν οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος, καθώς και σε τι ποσότητα έχουν παραχθεί.
- Για τη δοκιμασία συν-ανοσοκατακρήμνισης χρειάζονται συνήθως 600-800 μg πρωτεΐνης. Αυτό διαιρείται με τη συγκέντρωση του πρωτεϊνικού δείγματος (που είχε υπολογιστεί προηγουμένως με τη δοκιμασία Bradford), ώστε να υπολογιστεί πόσα μl πρωτεΐνης θα χρησιμοποιηθούν για τη δοκιμασία Co-Ip.
- Το 5% της ποσότητας που χρησιμοποιείται για Co-Ip κρατείται από το συνολικό πρωτεϊνικό δείγμα ως input. Σε αυτό προστίθενται 6 μl loading buffer (6x) και αποθηκεύεται στους -20°C, καθώς θα χρησιμοποιηθεί σύντομα.
- Τα δείγματα για Co-Ip τοποθετούνται σε eppendorfs του 0,5 ml μαζί με τη κατάλληλη ποσότητα GFP αντισώματος. Για να φτάσει στο eppendorf ο όγκος στα 400 μl και να γίνει σωστή ανάδευση, προστίθεται διάλυμα Co-Ip και 25x protease inhibitors.
- Επώαση O/N των eppendorfs με τα δείγματα Co-Ip στον ρότορα στους 4°C (cold room)
- Ήπια ανάδευση (με το χέρι) του falcon που περιέχει τα πρωτεϊνικά G beads (αποθηκευμένα σε αιθανόλη στους 4°C)

- Με κομμένο tip λαμβάνονται 25 μl beads (για κάθε δείγμα) και τοποθετούνται σε τόσα eppendorfs όσα και τα δείγματα για Co-Ip.
- 3 πλύσεις των beads, ώστε να απομακρυνθεί η αιθανόλη:
    - ◊ 800 μl διάλυμα Co-Ip σε κάθε eppendorf
    - ◊ Επώαση στον ρότορα στους 4ºC για 5 min
    - ◊ Φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 5 min στους 4ºC (φυγόκεντρος KUBOTA 3500)
    - ◊ Προσεκτικά αφαίρεση υπερκειμένου, ώστε να μην απομακρυνθούν τα beads
- Μετά τη 3η πλύση, προσθήκη των δειγμάτων Co-Ip στα eppendorfs με τα beads
- Σε ορισμένη ποσότητα Co-Ip διαλύματος προστίθενται 25x inhibitors και NEM 20 mM. Με αυτό το διάλυμα γεμίζονται τα eppendorfs που περιέχουν τα beads και τα δείγματα Co-Ip, ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει το 1 ml και να γίνεται σωστή ανάδευση.
- Επώαση των eppendorfs στον ρότορα για 3 h στους 4ºC
  Φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 5 min στους 4ºC (φυγόκεντρος KUBOTA 3500)
- Το υπερκείμενο (flow-through) φυλάσσεται σε νέο eppendorf στους -80ºC, καθώς μπορεί να υπάρχει και εκεί πρωτεΐνη που δεν αλληλεπίδρασε επαρκώς με τα beads.
- 3 πλύσεις με το διάλυμα Wash (σε ορισμένη ποσότητα αυτού προστίθενται 25x inhibitors και NEM 20 mM):
    - ◊ 800 μl διάλυμα Wash σε κάθε eppendorf
    - ◊ Επώαση στον ρότορα στους 4ºC για 5 min
    - ◊ Φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 5 min στους 4ºC (φυγόκεντρος KUBOTA 3500)
    - ◊ Προσεκτικά αφαίρεση υπερκειμένου, ώστε να μην απομακρυνθούν και beads
- Προσθήκη 15 μl loading buffer (2x) σε κάθε δείγμα
- Θέρμανση των δειγμάτων στους 95ºC, spin-down και φόρτωση τους στο τζελ (+ marker 1,5 μl)
- Ανοσοαποτύπωση κατά Western με τα δείγματα Inputs και των Co-Ips (8% SDS Page Gel)
- Στην ανοσοαποτύπωση κατά Western, το πρωτογενές αντίσωμα χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των πρωτεϊνών *SOX2* και *NANOG*, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τη πρωτεΐνη *GFP-SALL1*, η οποία αρχικά κατακρημνίστηκε με το αντίσωμα GFP.

10. Δοκιμασία ανοσοκυτταροχημείας (Immunocytochemistry assay)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται, για να μελετηθεί η τοπολογία μιας πρωτεΐνης εντός των κυττάρων. Ένα εξειδικευμένο πρωτογενές αντίσωμα αναγνωρίζει και προσδένεται στη πρωτεΐνη-στόχο. Ένα δευτερογενές αντίσωμα, που είναι συνδεδεμένο με ένα φθοροφόρο, αναγνωρίζει, στη συνέχεια, το πρωτογενές αντίσωμα. Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η 24-well plate. Αρχικά, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που εκφράζουν τις πρωτεΐνες GFP-*SALL1* και τη *PML*-RED. Μετά από δύο μέρες, τα δείγματα παρατηρήθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού *Olympus IX70 Inverted Fluorescence Phase Contrast Microscope Pred IX73* και ανάλυση των εικόνων με το πρόγραμμα ImageJ.

Συγκεντρώσεις πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν:
GFP-Sall1 wt (0,5 μg / μl)
Pml-Red (0,6 μg / μl)

Υλικά:
- Παραφορμαλδεΰδη 4% (διαλυμένη σε PBS 1x – PFA)
- Triton 0,1% (διαλυμένο σε PBS 1x)

- BSA 1% (διαλυμένη σε PBS 1x)

Πρωτόκολλο (όλα τα βήματα γίνονται σε RT):

- Αφαίρεση θρεπτικού από τα πηγάδια της 24-well plate με την αντλία κενού
- Μονιμοποίηση των κυττάρων με παραφορμαλδεϋδη 4% και επώαση 15 min
- Πλύσιμο των κυττάρων με PBS 1x δύο φορές με τη κάθε πλύση να διαρκεί 5 min
- Επώαση των κυττάρων με Triton 0,1% για 7 min
- Πλύσιμο των κυττάρων με PBS 1x δύο φορές με τη κάθε πλύση να διαρκεί 5 min
- Blocking των δειγμάτων με 1% BSA για 30 min
- Επώαση των δειγμάτων με το πρωτογενές αντίσωμα διαλυμένο σε BSA 0,1% για 1 h

Αντισώματα - Κωδικοί	**Πηγή**	**Αραίωση**	**Αποθήκευση**	**Εταιρεία**
PML	Mouse	1:400	-20ºC	MERCK

- Πλύσιμο των κυττάρων με PBS 1x δύο φορές με τη κάθε πλύση να διαρκεί 5 min
- Επώαση των δειγμάτων με το δευτερογενές αντίσωμα διαλυμένο σε BSA 0,1% για 45 min στο σκοτάδι

Αντισώματα - Κωδικοί	**Πηγή**	**Αραίωση**	**Αποθήκευση**	**Εταιρεία**
Alexa488	Mouse	1:500	-20ºC	abcam

- Πλύσιμο των κυττάρων με PBS 1x δύο φορές με τη κάθε πλύση να διαρκεί 5 min
- Επώαση των δειγμάτων με DAPI, ώστε να βαφτούν οι πυρήνες, για 15 min στο σκοτάδι

	Αραίωση	**Αποθήκευση**	**Εταιρεία**
DAPI (ab228549)	1:1000	-20ºC	abcam

- Πλύσιμο των κυττάρων με PBS 1x δύο φορές με τη κάθε πλύση να διαρκεί 5 min
- Παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο φθορισμού και λήψη εικόνων

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου, απομονώθηκε το ποντικίσιο γονίδιο *Sall1* (murine *Sall1* – m*Sall1*) και κατασκευάστηκε το cDNA του, το οποίο εντέθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pBluescript-SK. Σε αυτό το cDNA μεταλλάχθηκε το αμινοξύ λυσίνη 1085 σε αργινίνη (K1085R), το οποίο συμφωνεί με τη συντηρημένη αλληλουχία σουμοϋλίωσης και συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ποσοστό σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης. Η μετάλλαξη του συγκεκριμένου αμινοξέος πραγματοποιήθηκε με την ίδια διαδικασία που περιγράφεται και παρακάτω για την επίτευξη των μεταλλάξεων K672R, K593R και K204R.

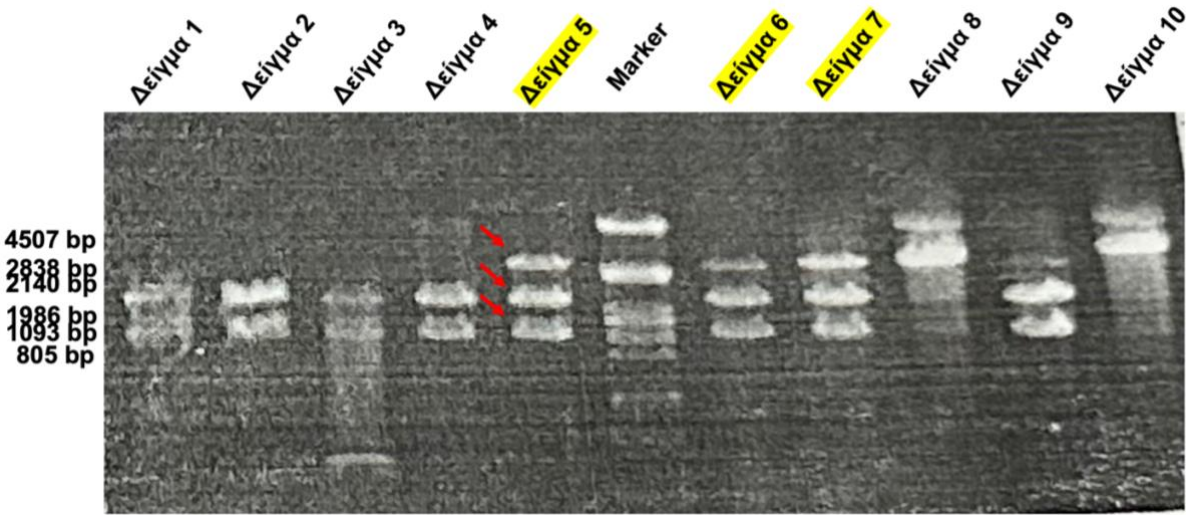
1. Δημιουργία μεταλλάξεων στο γονίδιο m*Sall1* στο τμήμα που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1-704 με τη μέθοδο μεταλλαξιγένεσης με έναν μόνο εκκινητή

Επειδή τα αμινοξέα, που μεταλλάχθηκαν, βρίσκονται σχετικά κοντά και επειδή η πρωτεΐνη m*SALL1* αποτελείται από 1324 αμινοξέα (3983 ζεύγη βάσεων), απομονώθηκε με πέψη το τμήμα DNA που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1-704 (2119 ζεύγη βάσεων) της πρωτεΐνης *SALL1*, ώστε ο χειρισμός του να είναι πιο εύκολος. Το τμήμα αυτό εντέθηκε σε έναν νέο πλασμιδιακό φορέα pBluescript II SK(+).

Για να συμβεί αυτό, το αρχικό πλασμίδιο mSall1_pBlueSK υπέστη πέψη με τα ένζυμα BamHI και HindIII. Το πρώτο ένζυμο έχει 3 θέσεις κοπής, ενώ το δεύτερο έχει 1 θέση κοπής (Εικόνα 7), οπότε αναμένονται τα 4 παρακάτω τμήματα: 2114 bp, 562 bp, 1013 bp και 3208 bp.

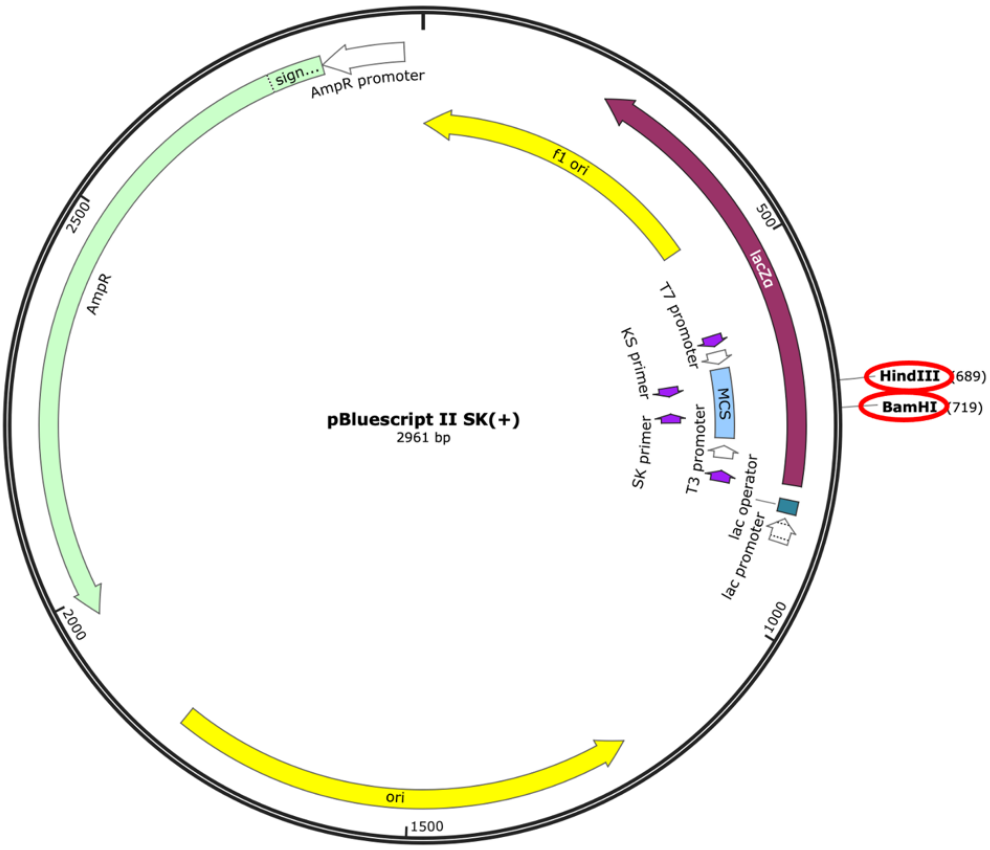
Εικόνα 7. Πλασμίδιο mSall1_pBlueSK με τις θέσεις κοπής για τα ένζυμα BamHI και HindIII

Το τμήμα που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1-704 είναι αυτό που αποτελείται από 2114 bp. Η μπάντα των 562 bp δεν απεικονίζεται στην εικόνα. Τα δείγματα 5, 6 και 7 είναι αυτά που φέρουν τις επιθυμητές μπάντες και άρα κόπηκαν σωστά από τα συγκεκριμένα ένζυμα (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Πέψη του πλασμιδίου mSal1_pBlueSK με τα ένζυμα BamHI και HindIII και διαγνωστική ηλεκτροφόρηση για επιβεβαίωση της κοπής του τμήματος 1-704 (αναμενόμενες μπάντες: 1013 bp, 2114 bp, 3208 bp)

Στη συνέχεια, πέψη υπέστη και ο πλασμιδιακός φορέας pBluescript II SK(+) με τα ένζυμα BamHI και HindIII (δεν απεικονίζεται η διαγνωστική ηλεκτροφόρηση), ώστε να μπορεί να προσλάβει το κομμάτι του πλασμιδίου mSal1_pBlueSK που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1-704 (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Πλασμίδιο pBluescript II SK(+) με τις θέσεις κοπής για τα ένζυμα BamHI και HindIII

Για την πραγματοποίηση της κάθε μετάλλαξης στο πλασμίδιο mSal1-704pBlueSK χρησιμοποιήθηκαν ολιγονουκλεοτίδια που ήταν τροποποιημένα σε ένα μόνο κωδικόνιο, ώστε να κωδικοποιούν αργινίνη και όχι λυσίνη, όταν «διαβάζονται». Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνεται ποια κωδικόνια μεταβλήθηκαν κατά τη κατασκευή των εκκινητών (Πίνακας 1).

Κωδικόνιο	Αμινοξύ	Νέο κωδικόνιο	Νέο αμινοξύ
5’AAG3’	Λυσίνη 204 (K)	5’AGG3’	Αργινίνη 204 (R)
5’AAA3’	Λυσίνη 593 (K)	5’AGA3’	Αργινίνη 593 (R)
5’AAG3’	Λυσίνη 672 (K)	5’AAG3’	Αργινίνη 672 (R)

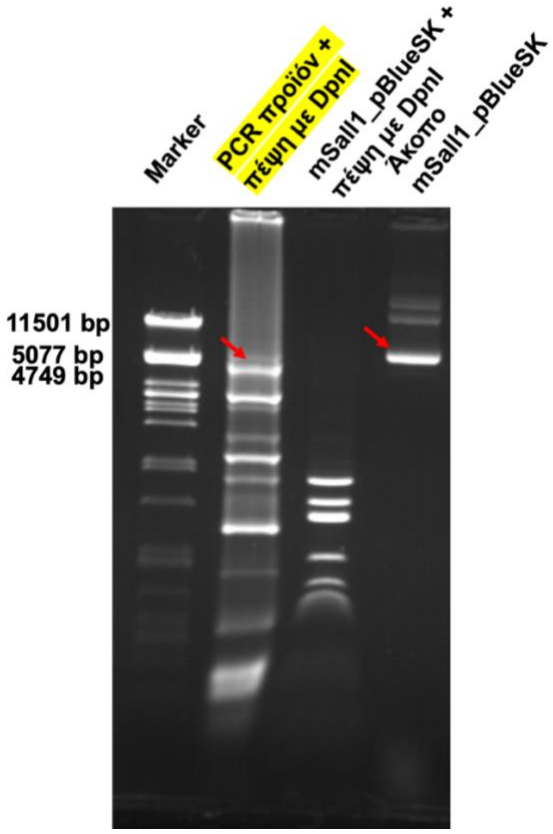
Πίνακας 1. Μετατροπή κωδικονίων που κωδικοποιούν το αμινοξύ λυσίνη σε κωδικόνια που κωδικοποιούν το αμινοξύ αργινίνη κατά τη κατασκευή των εκκινητών

Κάθε φορά χρησιμοποιούταν μόνο ένα ζεύγος μεταλλαγμένων εκκινητών, ώστε να επαχθεί μια μεταλλαγή. Μετά από 31 κύκλους PCR και ένωση των δύο αντιδράσεων, το PCR προϊόν υπέστη πέψη με το ένζυμο DpnI. Το DNA που απομονώνεται από στελέχη *Escherichia coli* είναι μεθυλιωμένο και επομένως είναι ευαίσθητο στη πέψη με το ένζυμο DpnI. Χρησιμοποιώντας αυτό το ένζυμο, δεν πέπτεται τελικά μόνο το μη-μεθυλιωμένο νεοσυντιθέμενο πλασμίδιο που περιέχει τις μεταλλαγές και στις δύο αλυσίδες.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η μετάλλαξη K672R. Με το ένζυμο DpnI επωάστηκε το PCR προϊόν, στο οποίο αναμένεται μία μπάντα των 5031 bp, καθώς αυτό είναι το συνολικό μήκος του πλασμιδίου mSall1-704pBlueSK. Η μετάλλαξη, που πραγματοποιείται, δεν μεταβάλλει το συνολικό μήκος του πλασμιδίου. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο mSall1_pBlueSK, καθώς ως μεθυλιωμένο θα πρέπει να δίνει αρκετές μπάντες μετά από πέψη με το ένζυμο DpnI. Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο mSall1_pBlueSK, χωρίς να κοπεί από κάποιο ένζυμο, για επιβεβαίωση ότι εμφανίζεται μόνο μια μπάντα των 6897 bp και ότι το πλασμίδιο δεν περιέχει εγκοπές (Εικόνα 10).

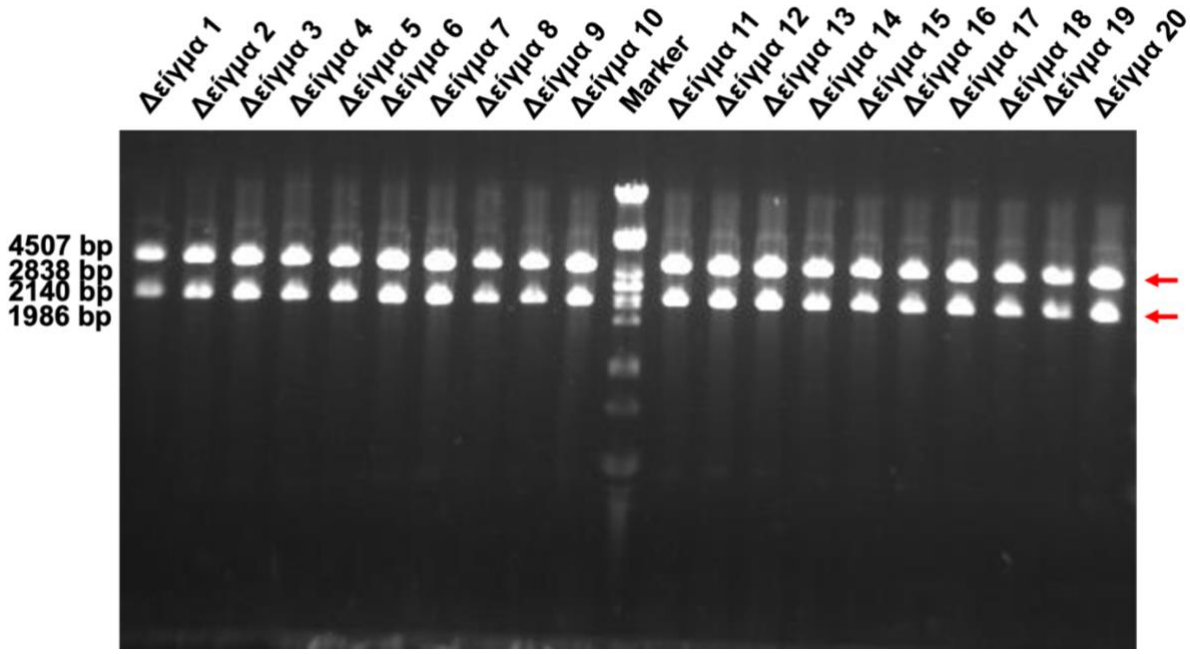
Έπειτα, το PCR προϊόν χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό βακτηρίων *Escherichia coli*. Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και τα δείγματα επωάστηκαν με τα ένζυμα BamHI και HindIII (Εικόνα 11).

Με διαγνωστική ηλεκτροφόρηση, μετά από πέψη με τα συγκεκριμένα ένζυμα, επιβεβαιώνεται ότι το πλασμίδιο κόβεται μόνο σε δύο σημεία, δίνοντας μπάντες των 2917 bp και 2114 bp, και δεν προκύπτουν άλλα μη ειδικά τμήματα. Ορισμένα από τα παρακάτω δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι περιέχουν τη μετάλλαξη K672R (Εικόνα 12).



Εικόνα 10. Πέψη του PCR προϊόντος με τη μετάλλαξη K672R και του πλασμιδίου mSalI1_pBlueSK (control) με το ένζυμο DpnI, απεικόνιση και του άκοπου πλασμιδίου mSalI1_pBlueSK (αναμενόμενες μπάντες: 6897 bp, 5031 bp)

Εικόνα 11. Πλασμίδιο mSalI1-704pBlueSK με τις θέσεις κοπής για τα ένζυμα BamHI και HindIII

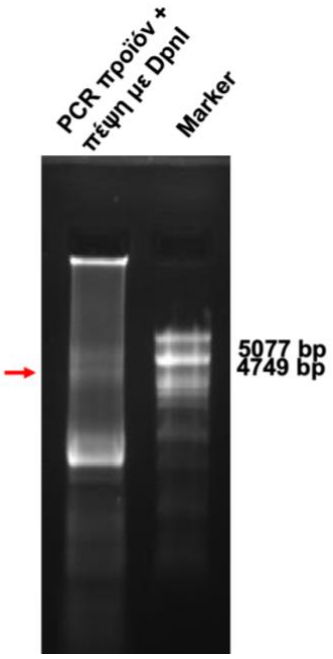


Εικόνα 12. Διαγνωστική πέψη του πλασμιδίου mSall1-704pBlueSK που περιέχει τη μετάλλαξη K672R με τα ένζυμα BamHI και HindIII (αναμενόμενες μπάντες: 2917 bp, 2114 bp)

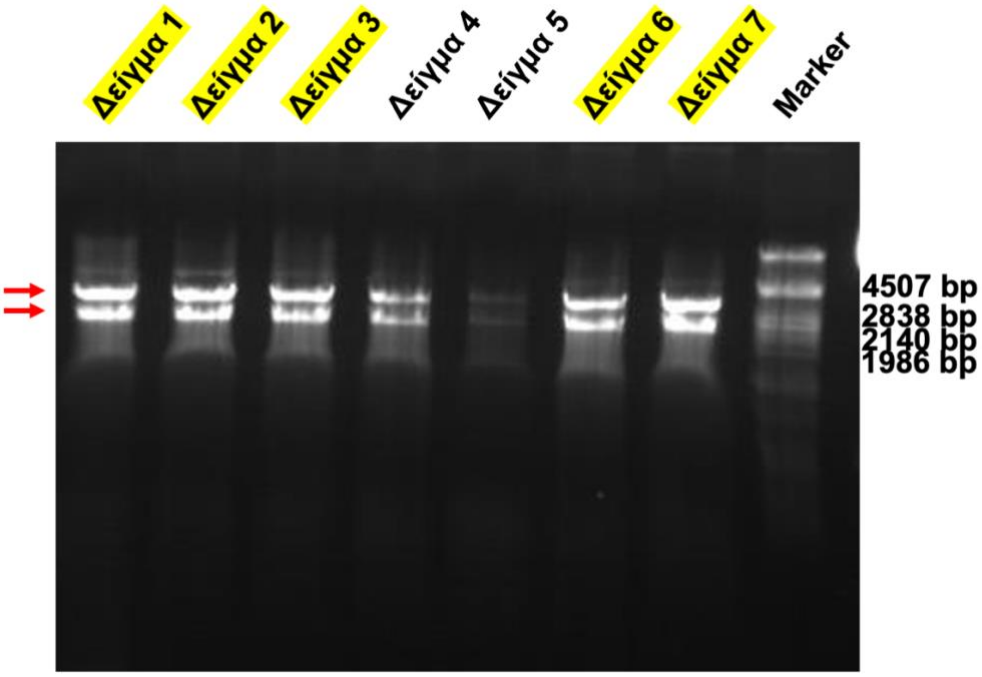
Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την επόμενη μετάλλαξη, την K593R, που πραγματοποιήθηκε στο πλασμίδιο mSall1-704pBlueSK. Πραγματοποιήθηκε ξανά PCR με μεταλλαγμένους εκκινητές για την εγκαθίδρυση της νέας μετάλλαξης και έπειτα το PCR προϊόν υπέστη πέψη με το ένζυμο DpnI. Αναμένεται μία μπάντα των 5031 bp (Εικόνα 13).

Ακολούθησε μετασχηματισμός των βακτηρίων με το συγκεκριμένο πλασμίδιο, απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και επώαση των δειγμάτων με τα ένζυμα BamHI και HindIII. Μετά από διαγνωστική ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα 1, 2, 3, 6 και 7 επιλέχθηκαν να σταλθούν για αλληλούχιση, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι περιέχουν τη μετάλλαξη K593R (Εικόνα 14).

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε ακόμη μια φορά και για την τελευταία μετάλλαξη, την K204R, που πραγματοποιήθηκε στο πλασμίδιο mSall1-704pBlueSK. Πραγματοποιήθηκε ξανά PCR με μεταλλαγμένους εκκινητές για την εγκαθίδρυση της νέας μετάλλαξης και έπειτα το PCR προϊόν υπέστη πέψη με το ένζυμο DpnI. Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων με το συγκεκριμένο πλασμίδιο, απομόνωσή του και πέψη με τα ένζυμα BamHI και HindIII. Μετά από διαγνωστική ηλεκτροφόρηση ορισμένα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση. Δεδομένα για το συγκεκριμένο πείραμα δεν απεικονίζονται.



Εικόνα 13. Πέψη του PCR προϊόντος με τη μετάλλαξη K593R με το ένζυμο DpnI (αναμενόμενη μπάντα: 5031 bp)



Εικόνα 14. Διαγνωστική πέψη του πλασμιδίου mSall1-704pBlueSK που περιέχει τη μετάλλαξη K672R με τα ένζυμα BamHI και HindIII (αναμενόμενες μπάντες: 2917 bp, 2114 bp)

2. Ένωση του τμήματος των αμινοξικών καταλοίπων 1-704 με το τμήμα που περιέχει το αμινοξύ K1085R στο γονίδιο m*Sall1*

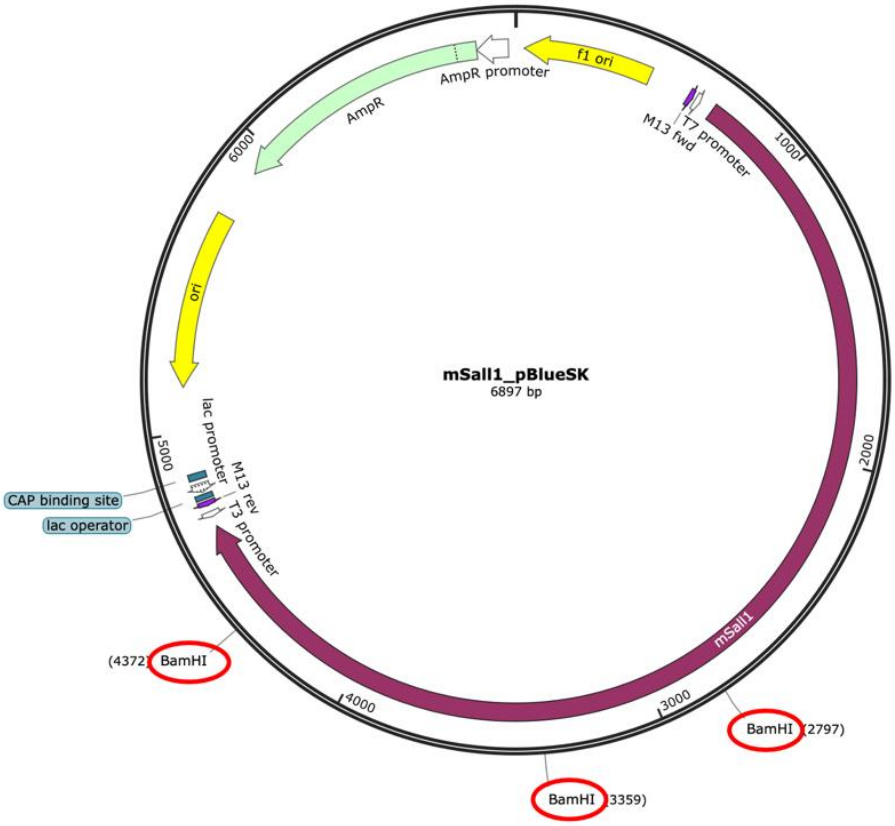
Ο κύριος στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι να μελετηθεί η πλήρως μεταλλαγμένη (μη σουμοϋλιωμένη) πρωτεΐνη *SALL1*, συγκριτικά με τη πρωτεΐνη *SALL1* αγρίου τύπου. Για αυτό, το τμήμα του cDNA που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1-704 ενώθηκε με το υπόλοιπο τμήμα του cDNA σε 2 βήματα, ώστε το γονίδιο να είναι ολοκληρωμένο.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε πέψη και του πλασμιδίου mSall1-704pBlueSK και του πλασμιδίου mSall1_pBlueSK με το ένζυμο BamHI. Δεδομένα για το συγκεκριμένο πείραμα δεν απεικονίζονται. Στο πρώτο πλασμίδιο, το ένζυμο συναντά 1 θέση κοπής, με αποτέλεσμα να αναμένεται μια μπάντα των 5031 bp (Εικόνα 15). Στο δεύτερο πλασμίδιο, το ένζυμο συναντά 3 θέσεις κοπής, οπότε αναμένονται μπάντες των 562 bp, των 1013 bp και των 5322 bp (Εικόνα 16).

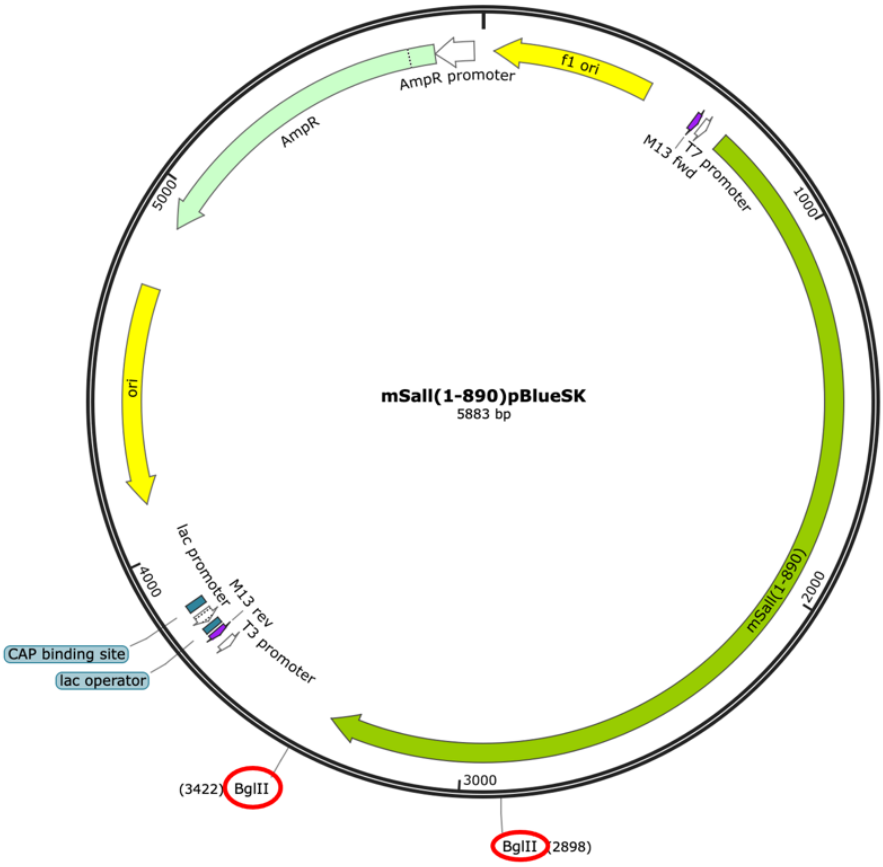
Τα δείγματα επιβεβαιώνονται ότι έχουν κοπεί σωστά, ηλεκτροφορώντας μια ποσότητα τους σε πηκτή αγαρόζης (δεδομένα δεν απεικονίζονται). Έπειτα, απομονώνεται από τη πηκτή αγαρόζης η μπάντα των 562 bp και με μια αντίδραση συγκόλλησης δημιουργείται τελικά το πλασμίδιο mSall(1-890)pBlueSK, το οποίο περιέχει το τμήμα του cDNA που κωδικοποιεί τα αμινοξέα 1-890 της πρωτεΐνης *SALL1*. Κατά την αντίδραση συγκόλλησης, το control είναι ένα eppendorf, στο οποίο περιέχονται όλα τα υλικά εκτός από το ένθεμα (religation). Με μετασχηματισμό βακτηρίων σε τρυβλία Petri μπορεί να ελεγχθεί, αν αναπτύσσονται αποικίες στο δείγμα με τη religation. Υπό κανονικές συνθήκες, δεν θα πρέπει να αναπτύσσονται, καθώς ο φορέας δεν έχει δεχθεί σε αυτή τη συγκεκριμένη αντίδραση κάποιο ένθεμα, για να «κλείσει» και να μπορέσει να μετασχηματίσει βακτήρια, τα οποία θα πολλαπλασιαστούν και θα δώσουν αποικίες στο τρυβλίο Petri.

Το πλασμίδιο mSall(1-890)pBlueSK επωάζεται με το ένζυμο BglII. Μέσω αυτής της πέψης ελέγχεται, αν το τμήμα των 562 bp εισήλθε στο πλασμίδιο mSall1-704pBlueSK με τη σωστή φορά ή ανάποδα. Το ένζυμο BglII συναντά 2 θέσεις κοπής στο πλασμίδιο mSall(1-890)pBlueSK, οπότε αν το τμήμα βρίσκεται με τη σωστή φορά, αναμένονται τμήματα των 524 bp και των 5359 bp (Εικόνα 17).

Εικόνα 15. Πλασμίδιο mSall1-704pBlueSK με τη θέση κοπής για το ένζυμο BamHI

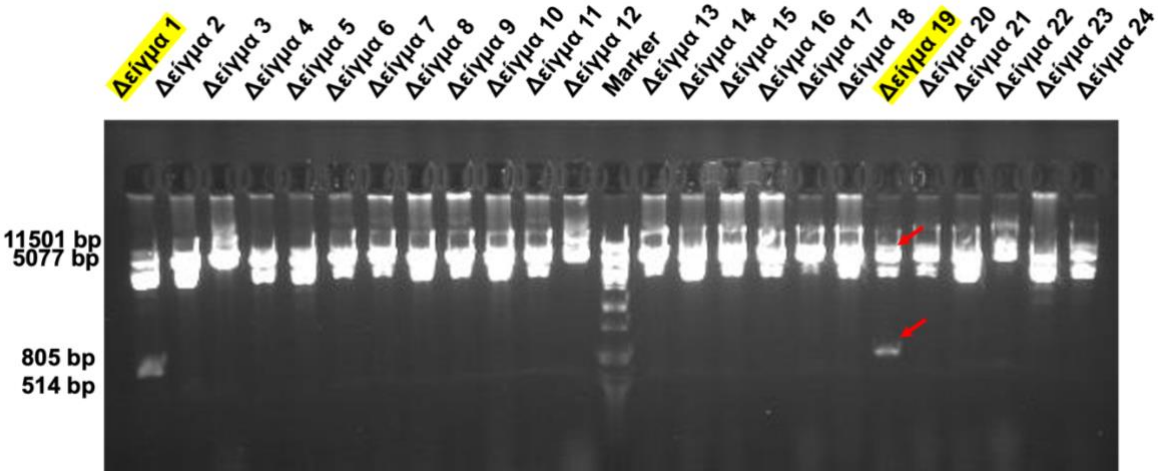


Εικόνα 16. Πλασμίδιο mSalI1_pBlueSK με τις θέσεις κοπής για το ένζυμο BamHI



Εικόνα 17. Πλασμίδιο mSalI(1-890)pBlueSK με τις θέσεις κοπής για το ένζυμο BglII

Αν όμως το τμήμα αυτό έχει εντεθεί με τη λανθασμένη κατεύθυνση και βρίσκεται ανάποδα, δεν μπορεί να παραχθεί η πρωτεΐνη. Η θέση κοπής της BglII με τη θέση κοπής της BamHI, που προέρχονται από το τμήμα των 562 bp, απέχουν 101 bp. Αν το τμήμα έχει ενσωματωθεί λανθασμένα, η θέση κοπής της BamHI βρίσκεται πιο κοντά στη δεύτερη θέση κοπής της BglII, με αποτέλεσμα να απέχουν 63 bp. Σε αυτή τη περίπτωση, οι δύο θέσεις κοπής του ενζύμου BglII απέχουν μεταξύ τους 164 bp. Επομένως, αναμένονται τμήματα των 164 bp και των 5719 bp. Μετά από διαγνωστική ηλεκτροφόρηση επιβεβαιώνεται ότι στα δείγματα 1 και 19 το νέο τμήμα έχει εντεθεί με τη σωστή φορά. Με αυτά τα δείγματα συνεχίζεται η διαδικασία. Η μπάντα των 164 bp δεν εμφανίζεται στη συγκεκριμένη εικόνα (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Διαγνωστική πέψη του πλασμιδίου mSall(1-890)pBlueSK με το ένζυμο BglII για επιβεβαίωση ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο *Sall1* έχει τη σωστή κατεύθυνση (αναμενόμενες μπάντες: 5359 bp, 524 bp)

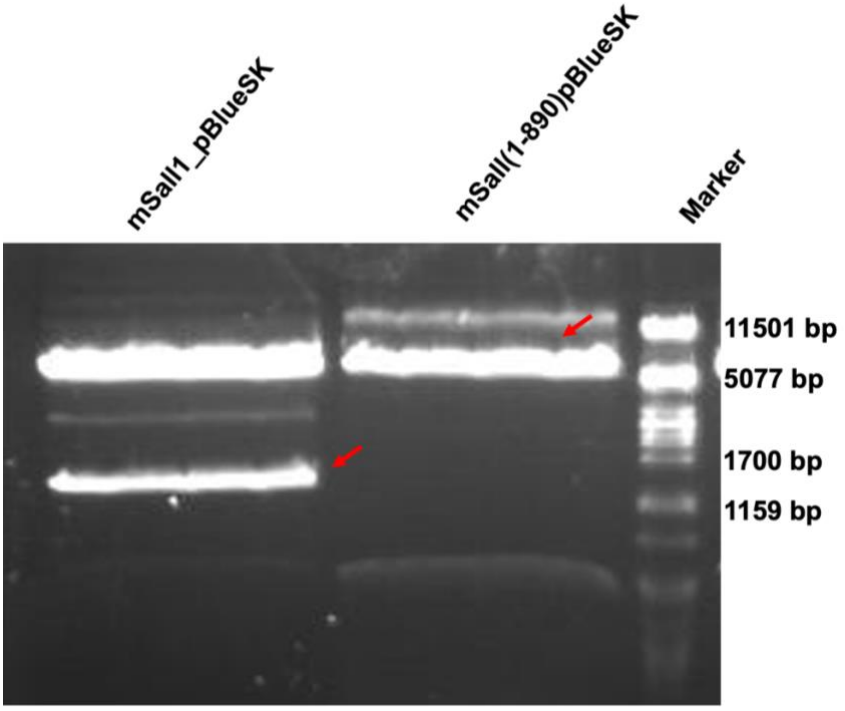
Ακολούθως, τα πλασμίδια mSall(1-890)pBlueSK και mSall1_pBlueSK πέπτονται με τα ένζυμα XhoI και NotI, ώστε να ενωθεί και το τελευταίο κομμάτι cDNA, που περιέχει τη μετάλλαξη K1085R, με το υπόλοιπο cDNA του γονιδίου m*Sall1* που βρίσκεται στον πλασμιδιακό φορέα mSall(1-890)pBlueSK. Και στα δύο πλασμίδια υπάρχει μόνο μία θέση κοπής για τα συγκεκριμένα ένζυμα (Εικόνες 19-20).

Μετά από πέψη με τα συγκεκριμένα ένζυμα, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης και απομονώνονται οι επιθυμητές μπάντες. Για το πλασμίδιο mSall(1-890)pBlueSK αναμένονται τμήματα των 400 bp και 5483 bp (περιέχει το τμήμα που κωδικοποιεί τα αμινοξέα 1-890), ενώ για το πλασμίδιο mSall1_pBlueSK αναμένονται τμήματα των 1414 bp (το τμήμα που περιέχει τη μετάλλαξη K1085R) και 5483 bp. Η μπάντα των 400 bp δεν εμφανίζεται στη συγκεκριμένη εικόνα (Εικόνα 21).

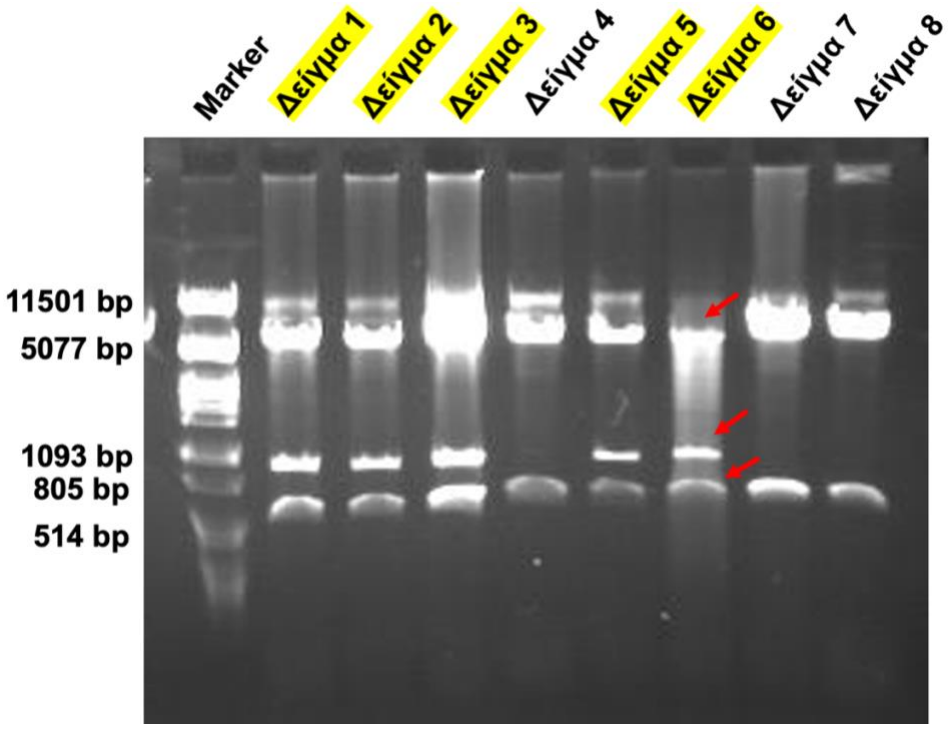
Ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός των μπαντών των 1414 bp από το mSall1_pBlueSK και των 5483 bp από το mSall(1-890)pBlueSK. Με μια αντίδραση συγκόλλησης, δημιουργήθηκε το πλήρως μεταλλαγμένο cDNA *Sall1*. Για να επιβεβαιωθεί ότι το πλασμίδιο περιέχει όλα τα τμήματα, πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο BamHI, το οποίο συναντά 3 θέσεις κοπής στο συγκεκριμένο πλασμίδιο. Οι αναμενόμενες μπάντες είναι των 562 bp, 1013 bp και 5322 bp. Τα δείγματα 1, 2, 3, 5 και 6 είναι τα σωστά και επιλέγονται για τη συνέχεια των πειραμάτων (Εικόνα 22).

Εικόνα 19. Πλασμίδιο mSalI(1-890)pBlueSK με θέσεις κοπής για τα ένζυμα NotI και XhoI

Εικόνα 20. Πλασμίδιο mSalI1_pBlueSK με θέσεις κοπής για τα ένζυμα NotI και XhoI



Εικόνα 21. Πέψη των πλασμιδίων mSall1_pBlueSK και mSall(1-890)pBlueSK με τα ένζυμα NotI και XhoI για απομόνωση επιθυμητών μπαντών, συγκόλλησή τους και δημιουργία πλήρους μεταλλαγμένου cDNA *Sall1* (αναμενόμενες μπάντες: 1414 bp, 5383 bp)



Εικόνα 22. Διαγνωστική πέψη του πλασμιδίου mSall1_pBlueSK με το ένζυμο BamHI (αναμενόμενες μπάντες: 562 bp, 1013 bp και 5322 bp)

3. <u>Σύντηξη του μεταλλαγμένου γονιδίου m*Sall1* με το γονίδιο Gfp</u>

Το πλασμίδιο που κατασκευάστηκε και περιέχει τις μεταλλάξεις της πρωτεΐνης *SALL1* διαμόλυνε παροδικά κύτταρα HEK293T, ώστε να εκφραστεί η συγκεκριμένη πρωτεΐνη σε μεγάλες ποσότητες. Για να γίνει αντιληπτή η επιτυχής διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο που εκφράζει τη

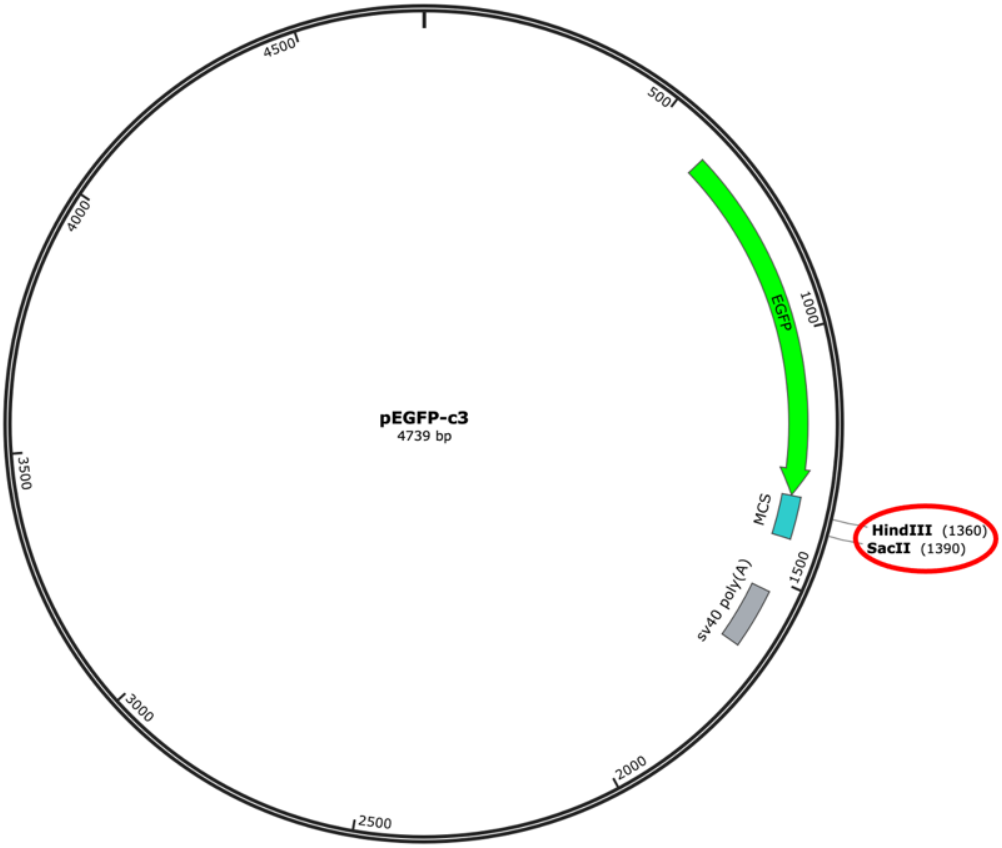
μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *SALL1*, το μεταλλαγμένο cDNA ενώθηκε με το γονίδιο eGfp (σύντηξη – fusion). Όταν είναι επιτυχής η διαμόλυνση, εκφράζεται η συντηγμένη πρωτεΐνη GFP-*SALL1*, η οποία φθορίζει, εκπέμποντας πράσινο χρώμα.

Για να είναι δυνατό αυτό, το cDNA της μεταλλαγμένης *SALL1* πρωτεΐνης μεταφέρθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pBluescriptSK στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-c3. Και τα δύο πλασμίδια επωάστηκαν με τα ένζυμα HindIII και SacII. Και στα δύο πλασμίδια το κάθε ένζυμο έχει μόνο μία θέση κοπής (Εικόνες 23-24).

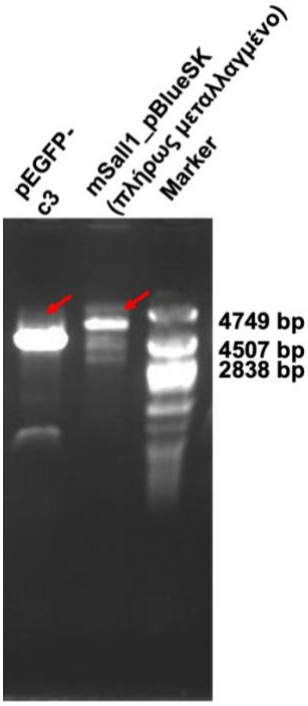
Από το πλασμίδιο mSall1_pBlueSK αναμένονται τμήματα των 4003 bp (περιέχει το μεταλλαγμένο cDNA) και των 2894 bp. Από το πλασμίδιο pEGFP-c3 αναμένονται τμήματα των 30 bp και των 4709 bp (περιέχει το γονίδιο eGfp). Η μπάντα των 30 bp δεν εμφανίζεται στη συγκεκριμένη εικόνα (Εικόνα 25).

Το πλασμίδιο pEGFP-c3, μετά τη πέψη, επωάστηκε με αλκαλική φωσφατάση, ώστε να εξασφαλιστεί ότι το πλασμίδιο δεν θα «κλείσει», χωρίς να λάβει το ένθεμα του, δηλαδή το cDNA που κωδικοποιεί τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *SALL1*. Με μια αντίδραση συγκόλλησης κατασκευάστηκε τελικά το πλασμίδιο που περιλαμβάνει το μεταλλαγμένο cDNA του γονιδίου m*Sall1*, συντηγμένο με το γονίδιο Gfp.

Εικόνα 23. Πλασμίδιο mSall1_pBlueSK πλήρως μεταλλαγμένο με θέσεις κοπής για τα ένζυμα HindIII και SacII



Εικόνα 24. Πλασμίδιο pEGFP-c3 με θέσεις κοπής για τα ένζυμα HindIII και SacII

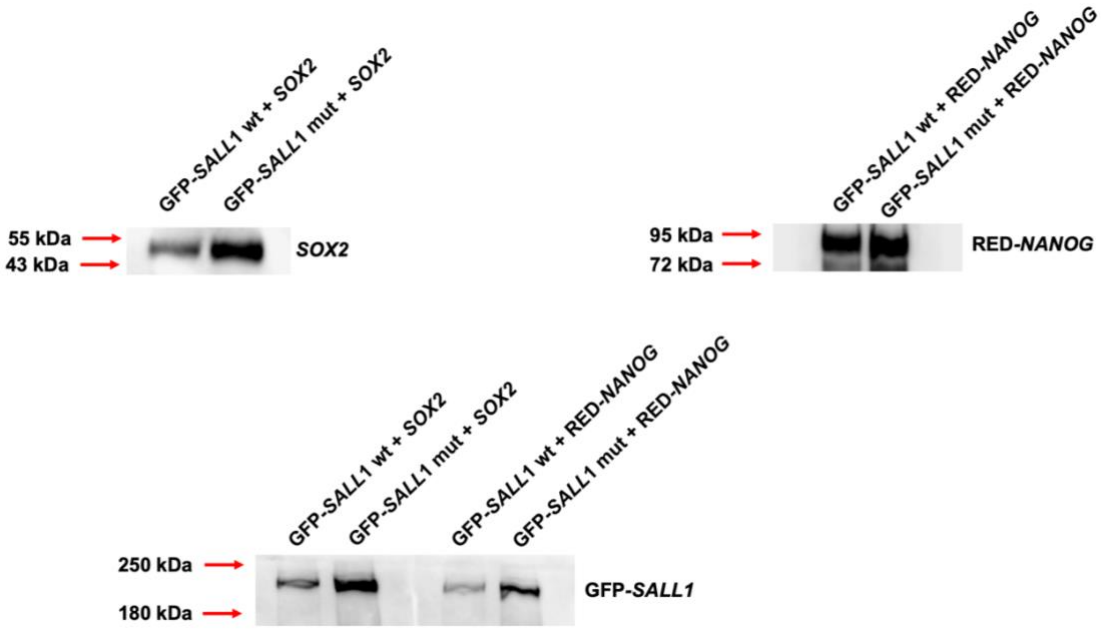


Εικόνα 25. Πέψη του πλήρως μεταλλαγμένου πλασμιδίου mSalI1_pBlueSK και του πλασμιδίου pEGFP-c3 με τα ένζυμα HindIII και SacII για συγκόλληση μεταξύ τους και δημιουργία του μεταλλαγμένου γονιδίου m*SalI1* συντηγμένο με το γονίδιο Gfp (αναμενόμενες μπάντες: 4709 bp, 4003 bp, 2894 bp)

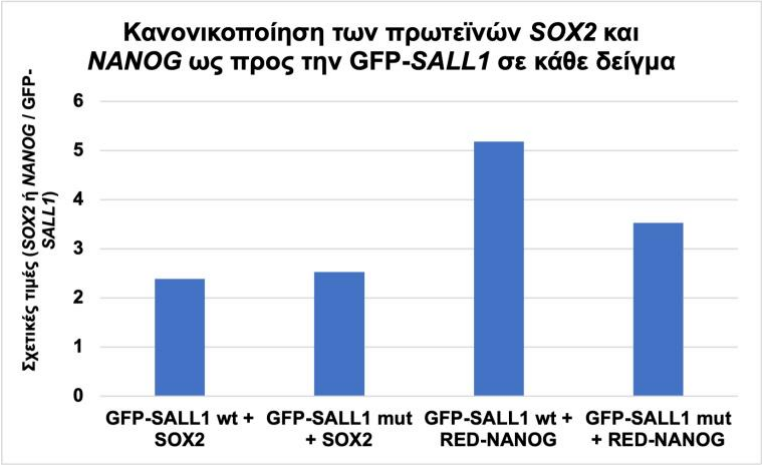
4. Μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης GFP-*SALL1* και των πρωτεϊνών *SOX2* και *NANOG*

Τέσσερις κυτταρικές καλλιέργειες HEK293T σε πιάτα των 100 mm διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που εκφράζουν τις πρωτεΐνες GFP-*SALL1* wt (αγρίου τύπου) + *SOX2*, GFP-*SALL1* mut (μη σουμοϋλιωμένη σε 4 αμινοξέα λυσίνης) + *SOX2*, GFP-*SALL1* wt + RED-*NANOG* και GFP-*SALL1* mut + RED-*NANOG*. Με το μικροσκόπιο φθορισμού ελέγχθηκε ότι οι πρωτεΐνες έχουν εκφραστεί, καθώς η πρωτεΐνη *SALL1* είχε πράσινο φθορισμό, ενώ η πρωτεΐνη *NANOG* είχε κόκκινο φθορισμό – για την πρωτεΐνη *SOX2* δεν υπήρχε κάποιο ενδεικτικό στοιχείο ότι έχει εκφραστεί, παρόλα αυτά επιβεβαιώνεται η έκφραση της με ανοσοαποτύπωση κατά Western αργότερα. Μετά από απομόνωση και καθαρισμό του συνολικού πρωτεϊνικού δείγματος κάθε κυτταρικής καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικά πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, για να επιβεβαιωθεί ξανά ότι έχουν εκφραστεί οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος αλλά και σε τι ποσότητα έχουν εκφραστεί (Εικόνα 26).

Με βάση τα αποτελέσματα της διαγνωστικής ανοσοαποτύπωσης κατά Western κατασκευάζεται το παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 1). Για κάθε δείγμα κανονικοποιείται η ποσότητα της πρωτεΐνης *SOX2* ή *NANOG* ως προς τη ποσότητα της πρωτεΐνης GFP-*SALL1*. Ειδικότερα, παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη *SOX2* εκφράζεται περίπου το ίδιο και στη συν-διαμόλυνση που έγινε με το πλασμίδιο που εκφράζει τη πρωτεΐνη GFP-*SALL1* wt και στη συν-διαμόλυνση που έγινε με το πλασμίδιο που εκφράζει τη πρωτεΐνη GFP-*SALL1* mut. Έτσι, στο πείραμα που ακολουθεί για μελέτη της αλληλεπίδρασης χρησιμοποιήθηκαν περίπου ίσες ποσότητες της πρωτεΐνης GFP-*SALL1*, για να κατακρημνίσουν την αντίστοιχη ποσότητα πρωτεΐνης *SOX2* και να μελετηθούν συγκριτικά οι αλληλεπιδράσεις. Όσον αφορά τα δείγματα με τη πρωτεΐνη *NANOG*, παρατηρείται ήδη από το πείραμα ανοσοαποτύπωσης κατά Western ότι η πρωτεΐνη GFP-*SALL1* wt δεν έχει εκφραστεί τόσο πολύ όσο η GFP-*SALL1* mut στο άλλο δείγμα. Η πρωτεΐνη *NANOG* φαίνεται ότι έχει εκφραστεί εξίσου αποτελεσματικά και στα δύο δείγματα. Συνεπώς, με βάση και τα αποτελέσματα του διαγράμματος (Διάγραμμα 1), για τα πειράματα αλληλεπίδρασης θα χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης GFP-*SALL1* wt συγκριτικά με τη GFP-*SALL1* mut, ώστε να κατακρημνιστεί η αντίστοιχη ποσότητα πρωτεΐνης *NANOG* και να μπορούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων αλληλεπίδρασης να είναι συγκρίσιμα. Για τις ποσοτικοποιήσεις χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή ImageJ.

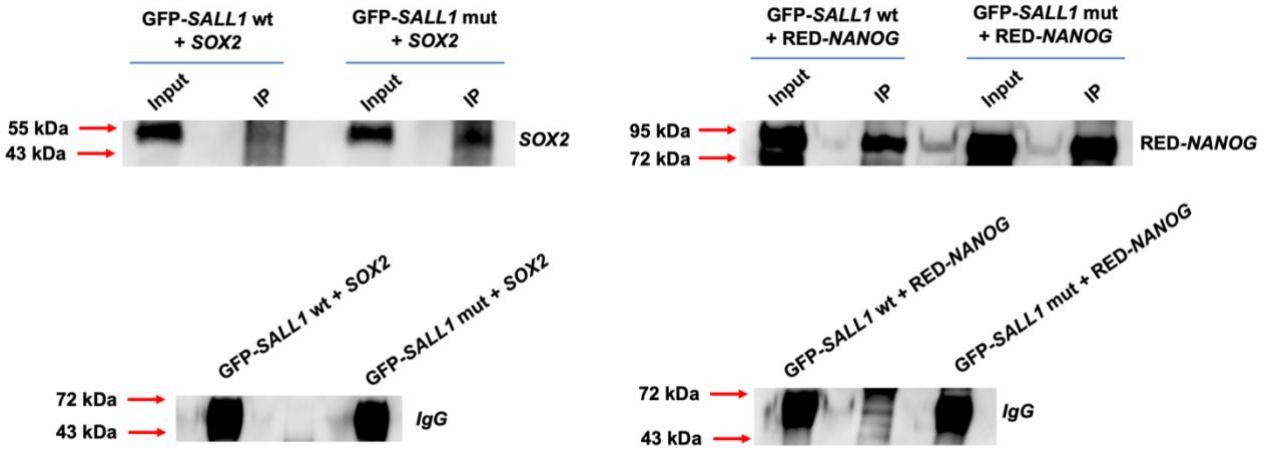


Εικόνα 26. Διαγνωστική ανοσοαποτύπωση κατά Western για επιβεβαίωση έκφρασης των πρωτεϊνών GFP-*SALL1* wt, GFP-*SALL1* mut, *SOX2* και RED-*NANOG*, καθώς και της ποσότητας στην οποία βρίσκονται



Διάγραμμα 1. Κανονικοποίηση των πρωτεϊνών *SOX2* και *NANOG* ως προς τη πρωτεΐνη GFP-*SALL1* σε κάθε δείγμα

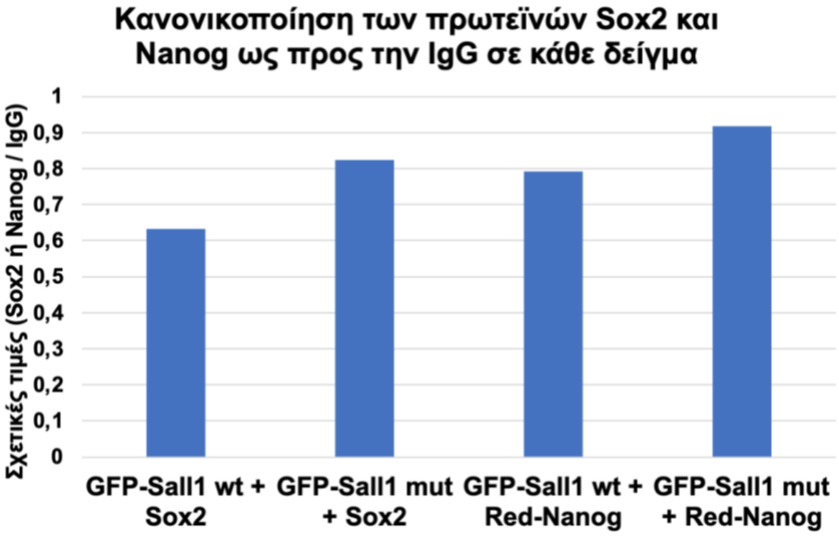
Στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης που ακολουθούν, η πρωτεΐνη-«δόλωμα» (bait) είναι η GFP-*SALL1*. Αυτή η πρωτεΐνη αναγνωρίζεται από ένα εξειδικευμένο αντίσωμα, το αντίσωμα GFP. Με την O/N επώαση, το αντίσωμα αναγνωρίζει και προσδένεται στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Την επόμενη μέρα προστίθενται μαγνητικά σφαιρίδια (beads), τα οποία προσδένουν το αντίσωμα GFP και άρα και τη πρωτεΐνη GFP-*SALL1* και την απομονώνουν – κατακρημνίζουν μαζί με όλες τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα από τα πειράματα αλληλεπίδρασης με ανοσοαποτύπωση κατά Western, φαίνεται ότι η πρωτεΐνη GFP-*SALL1* mut αλληλοεπιδρά με τη πρωτεΐνη *SOX2* περίπου το ίδιο αποτελεσματικά, όπως και η πρωτεΐνη GFP-*SALL1* wt με τη *SOX2*. Ωστόσο, η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών GFP-*SALL1* mut και *NANOG* φαίνεται να είναι ισχυρότερη συγκριτικά με την αλληλεπίδραση GFP-*SALL1* wt με *NANOG*. Στην εικόνα που ακολουθεί απεικονίζεται και η ποσότητα της πρωτεΐνης *IgG* που κατακρημνίστηκε, μιας πρωτεΐνης που εκφράζεται γενικώς στα κύτταρα, και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως control ότι το αντίσωμα είναι ικανό να κατακρημνίσει ικανοποιητική ποσότητα πρωτεΐνης (Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Συν-ανοσοκατακρήμνιση για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων GFP-*SALL1* wt/mut με *SOX2* και *NANOG* (ανοσοκατακρήμινση με το αντίσωμα GFP, ανοσοαποτύπωση κατά Western με το αντίσωμα Sox2 ή Nanog, αντίστοιχα), απεικόνιση της πρωτεΐνης IgG που κατακρημνίστηκε ως control του πειράματος

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα παρακάτω, οι ποσότητες των πρωτεϊνών *SOX2* και *NANOG* που κατακρημνίστηκαν μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τη πρωτεΐνη GFP-*SALL1* κανονικοποιήθηκαν ως προς τη ποσότητα της *IgG* πρωτεΐνης που κατακρημνίστηκε επίσης (μη ειδική πρόσδεση από το αντίσωμα GFP) (Διάγραμμα 2). Όσον αφορά τα δείγματα με τη πρωτεΐνη *NANOG*, δεν υπάρχει μεγάλη απόκλιση μεταξύ των δύο δειγμάτων, οπότε τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα. Δηλαδή, η ποσότητα των πρωτεϊνών *IgG* και *NANOG* που κατακρημνίστηκε στο δείγμα με τη GFP-*SALL1* wt

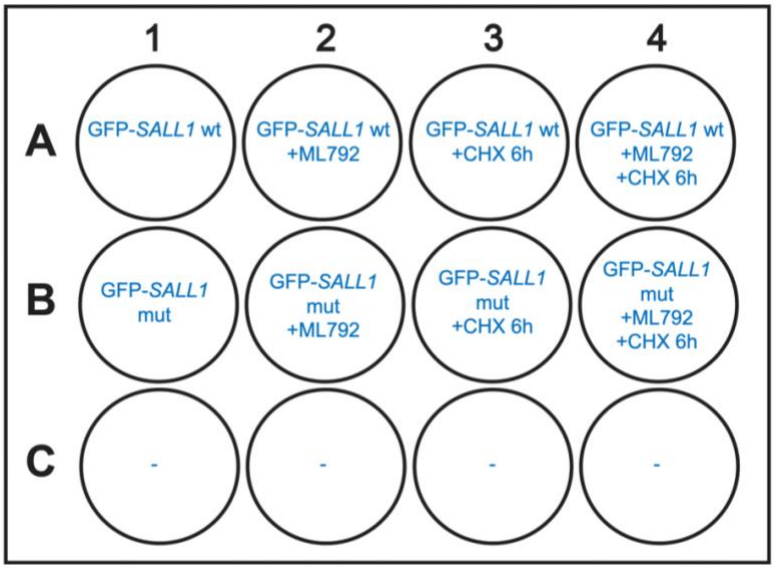
συμφωνεί με τη ποσότητα των πρωτεϊνών *IgG* και *NANOG* που κατακρημνίστηκε στο δείγμα με τη GFP-*SALL1* mut. Όσον αφορά τα δείγματα με τη πρωτεΐνη *SOX2*, υπάρχει κάποια απόκλιση μεταξύ των δύο δειγμάτων αλλά δεν φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική, οπότε τα αποτελέσματα είναι και πάλι συγκρίσιμα.



Διάγραμμα 2. Κανονικοποίηση των πρωτεϊνών *SOX2* και *NANOG* ως προς τη πρωτεΐνη *IgG* σε κάθε δείγμα

5. Μελέτη της πρωτεϊνικής σταθερότητας των πρωτεϊνών *SALL1*

Στη 12-well plate, που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος, υπάρχουν 8 διαφορετικές συνθήκες που απεικονίζονται παρακάτω (Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Απεικόνιση της 12-well plate και των 8 διαφορετικών συνθηκών με τους αναστολείς σουμοϋλίωσης (ML792) και πρωτεϊνοσύνθεσης (CHX) για τη μελέτη της σταθερότητας της αγρίου τύπου πρωτεΐνης GFP-*SALL1* (wt) και της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης GFP-*SALL1* (mut)

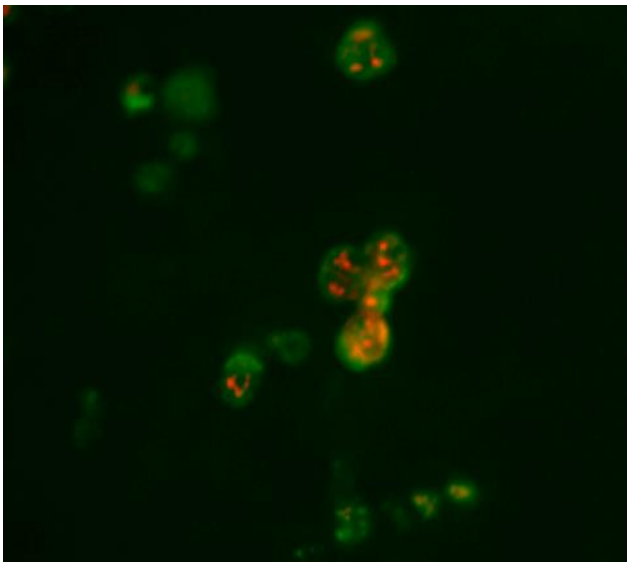
Τα δείγματα μαζεύτηκαν όλα μαζί μετά την επώαση των 6 ωρών με το κυκλοεξιμίδιο. Μετά από απομόνωση και καθαρισμό των πρωτεϊνικών δειγμάτων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Με βάση αυτά τα πειράματα εξετάστηκε πόση πρωτεΐνη GFP-*SALL1* είχε εκφραστεί υπό κάθε συνθήκη, δηλαδή πως οι αναστολείς επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης τόσο της αγρίου τύπου όσο και της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης *SALL1* και άρα τη σταθερότητα τους.

Με βάση το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Εικόνα 29) παρατηρείται ότι παρουσία του αναστολέα σουμοϋλίωσης ML792 μειώνεται ελάχιστα η έκφραση της πρωτεΐνης GFP-*SALL1* wt, αλλά αυξάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης GFP-*SALL1* mut. Μετά από επώαση των δειγμάτων 6 ώρες με τον αναστολέα πρωτεϊνοσύνθεσης, το κυκλοεξιμίδιο, φαίνεται πως η έκφραση της πρωτεΐνης GFP-*SALL1* wt μειώνεται ακόμη περισσότερο. Παρουσία και των δύο αναστολέων, η έκφραση της πρωτεΐνης GFP-*SALL1* wt ελαχιστοποιείται. Αντίθετα, η έκφραση της πρωτεΐνης GFP-*SALL1* mut αυξάνεται ελάχιστα τόσο κατά την επώαση με το κυκλοεξιμίδιο όσο και κατά την επώαση και με τους δύο αναστολείς.

Εικόνα 29. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τα δείγματα που εκφράζουν τις πρωτεΐνες GFP-*SALL1* wt και GFP-*SALL1* mut υπό την επίδραση του αναστολέα σουμοϋλίωσης ML792 και του αναστολέα πρωτεϊνοσύνθεσης CHX

6. Μελέτη εντοπισμού των πρωτεϊνών *SALL1* και *PML* στον πυρήνα

Για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιήθηκε η 24-well plate. Αρχικά, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τις πρωτεΐνες GFP-*SALL1* και *PML*-RED. Μετά από δύο μέρες, πραγματοποιήθηκε χρώση ανοσοκυτταροχημείας, όπου προστέθηκε στα κύτταρα πρωτογενές αντίσωμα που αναγνωρίζει τη πρωτεΐνη *PML*. Από την εικόνα που λήφθηκε με το μικροσκόπιο φθορισμού (Εικόνα 30) φαίνεται πως υπάρχει μερικός συνεντοπισμός των πρωτεϊνών *PML* και *SALL1* στον πυρήνα. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη *PML* παρατηρείται να σχηματίζει τα πυρηνικά σωμάτια (PML nuclear bodies), ενώ η πρωτεΐνη *SALL1* φαίνεται να είναι διάχυτη στο πυρηνόπλασμα.



Εικόνα 30. Μερικός συνεντοπισμός των πρωτεϊνών GFP-*SALL1* (πράσινο) και *PML*-RED (κόκκινο)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο τελικός σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης της σουμοϋλίωσης στη σταθερότητα και στις λειτουργίες της ποντικίσιας πρωτεΐνης *SALL1*. Ειδικότερα, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της μη σουμοϋλιωμένης πρωτεΐνης *SALL1* με τους μεταγραφικούς παράγοντες *SOX2* και *NANOG*, που διατηρούν τη πλειοδυναμία των εμβρϋικών βλαστοκυττάρων (Karantzali et al., 2011). Η σταθερότητα της πρωτεΐνης *SALL1*, τόσο της αγρίου τύπου όσο και της μη σουμοϋλιωμένης, μελετήθηκε με τη χρήση των αναστολέων ML792 και του κυκλοεξιμιδίου.

Από προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου μεταλλάχθηκε το αμινοξικό κατάλοιπο λυσίνης 1085 σε αργινίνη (K1085R), ώστε η ποντικίσια πρωτεΐνη *SALL1* να μη μπορεί να σουμοϋλιωθεί σε αυτή τη θέση. Το αμινοξύ 1085 είναι αυτό που συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ποσοστό σουμοϋλίωσης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης, που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των πρωτεϊνών *SOX2* και της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης *SALL1* και της πρωτεΐνης *SALL1* αγρίου τύπου, έδειξαν πως η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *SALL1* αλληλεπιδρά λιγότερο με τη πρωτεΐνη *SOX2*, συγκριτικά με την αλληλεπίδραση που παρατηρείται στη περίπτωση της πρωτεΐνης *SALL1* αγρίου τύπου. Πειράματα ενεργοποίησης της μεταγραφής μέσω του συστήματος Gal4-luciferase reporter, όπου μπορεί να ελεγχθεί η συνέργεια μεταξύ των πρωτεϊνών Gal4-*NANOG* και *SALL1*, έδειξαν πως η συγκεκριμένη μεταλλαγή εμποδίζει τη συνέργεια μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να μειώνεται η μεταγραφική ενεργότητα της πρωτεΐνης *NANOG*. Τα παραπάνω αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η σουμοϋλίωση του αμινοξικού καταλοίπου K1085R ωθεί τη πρωτεΐνη *SALL1* να υιοθετήσει μια ευνοϊκή στερεοδιάταξη που της επιτρέπει να αλληλεπιδρά αποτελεσματικά με τους μεταγραφικούς παράγοντες *SOX2* και *NANOG*. Επιπρόσθετα, η σουμοϋλίωση του συγκεκριμένου αμινοξέος συμβάλλει στη σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών *SALL1* και *NANOG*, με συνέπεια να αυξάνεται η αποδοτικότητα της συνέργειας τους. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψε το ερευνητικό ερώτημα της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας. Η υπόθεση εργασίας, λοιπόν, είναι ότι η πρωτεΐνη *SALL1*, μεταλλαγμένη σε σχεδόν όλους τους στόχους-αμινοξέα σουμοϋλίωσης, δεν θα αλληλεπιδρά καθόλου ή θα αλληλεπιδρά πολύ λιγότερο με τις πρωτεΐνες *SOX2* και *NANOG*, από ότι αλληλεπιδρά η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *SALL1* K1085R ή η πρωτεΐνη *SALL1* αγρίου τύπου.

1. Κατασκευή πλασμιδίου με μεταλλαγές στο *Sall1* γονίδιο

Τα αμινοξικά κατάλοιπα λυσίνης που μετατράπηκαν σε αργινίνη ήταν τα K204, K593 και K672. Στη τελική πρωτεΐνη *SALL1*, που μελετήθηκε, μεταλλαγμένο ήταν και το αμινοξύ K1085. Για αυτό, οι νέες μεταλλαγές πραγματοποιήθηκαν στο πλασμίδιο που περιείχε ήδη το cDNA της πρωτεΐνης *SALL1* με τη μετάλλαξη K1085R. Κάθε φορά που πραγματοποιούνταν μια μεταλλαγή, η αλληλουχία του πλασμιδίου στελνόταν για αλληλούχιση (sequencing), ώστε να επαληθεύεται κάθε φορά ότι η αλληλουχία του συγκεκριμένου κωδικονίου έχει αλλάξει σωστά και άρα πράγματι το αμινοξύ λυσίνη θα μετατραπεί σε αργινίνη. Έπειτα, το cDNA της πρωτεΐνης *SALL1* μεταφέρθηκε σε έναν πλασμιδιακό φορέα που περιείχε το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP. Η ένωση των δύο γονιδίων στόχευε στη παραγωγή μιας πρωτεΐνης *SALL1* που φθορίζει, λόγω του GFP τμήματος, και επομένως φέρει πράσινο φθορισμό κατά την έκφραση της και έπειτα από παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Μέσω της παρατήρησης του φθορισμού, ήταν εφικτό να επιβεβαιωθεί ότι η διαμόλυνση των κυττάρων με το συγκεκριμένο πλασμίδιο ήταν επιτυχής και ότι η ποσότητα της πρωτεΐνης *SALL1* που εκφράστηκε είναι ικανοποιητική, ώστε να συνεχιστεί η διαδικασία με τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Από παλαιότερη δουλειά το γονίδιο *Nanog* είναι συντηγμένο με το γονίδιο Red. Επομένως, η πρωτεΐνη *NANOG* φέρει κόκκινο φθορισμό κατά την έκφραση της και έπειτα από παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Για τη πρωτεΐνη *SOX2* δεν υπήρχε κάποιο

πλασμίδιο, όπου όταν παράγεται να είναι συντηγμένη με τη πρωτεΐνη *RED*, ωστόσο, η έκφρασή της επιβεβαιώνεται και αργότερα με διαγνωστικό πείραμα ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

2. Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης *SALL1*

Για τα πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης με τη πρωτεΐνη *SOX2* φαίνεται πως η πρωτεΐνη GFP-*SALL1* mut αλληλοεπιδρά με τη πρωτεΐνη *SOX2* περίπου το ίδιο ικανοποιητικά, όπως και η πρωτεΐνη GFP-*SALL1* wt με τη *SOX2*. Αυτό το αποτέλεσμα, ωστόσο, έρχεται σε αντίθεση με τη μειωμένη αλληλεπίδραση που παρατηρείται στη περίπτωση της πρωτεΐνης GFP-*SALL1* K1085R. Όσον αφορά τα πειράματα με τη πρωτεΐνη *NANOG*, σημειώνεται ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τη πλήρως μεταλλαγμένη μη σουμοϋλιωμένη πρωτεΐνη GFP-*SALL1* mut, συγκριτικά με την αλληλεπίδραση με τη πρωτεΐνη GFP-*SALL1* wt. Και αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε αντιπαράθεση με το αποτέλεσμα που είχε προκύψει από τη μελέτη της GFP-*SALL1* K1085R πρωτεΐνης στο σύστημα Gal4-luciferase reporter, καθώς η πρωτεΐνη με τη μία μεταλλαγή παρουσίαζε μικρότερη συνέργεια με το σύμπλοκο Gal-*NANOG* και άρα μειωμένη έκφραση γονιδίων, τα οποία ελέγχονται από το σύμπλοκο Gal-*NANOG*.

Τα κύρια αποτελέσματα αποκλίνουν από την αρχική υπόθεση, σύμφωνα με την οποία η σουμοϋλίωση ενισχύει τις αλληλεπιδράσεις που έχει η πρωτεΐνη *SALL1* με άλλες πρωτεΐνες. Σύμφωνα με την αρχική υπόθεση, μια πλήρως μη σουμοϋλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης *SALL1* δεν θα είναι ικανή να εκτελέσει επιτυχώς της λειτουργίες της και να αλληλεπιδράσει με άλλες πρωτεΐνες-στόχους. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως η σουμοϋλίωση της *SALL1* δεν διαδραματίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της με τη πρωτεΐνη *SOX2*, αφού τόσο η αγρίου τύπου όσο και η πλήρως μεταλλαγμένη αλληλεπιδρούν εξίσου ικανοποιητικά με τη πρωτεΐνη *SOX2*. Αντίθετα, η σουμοϋλίωση της πρωτεΐνης *SALL1* φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά την αλληλεπίδραση της με τη πρωτεΐνη *NANOG*, αφού η πλήρως μεταλλαγμένη μορφή αλληλεπιδρά ισχυρότερα, συγκριτικά με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Η απόκλιση των αποτελεσμάτων από την αρχική υπόθεση μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η πλήρως μη σουμοϋλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης *SALL1* αποκτά μια εντελώς διαφορετική διαμόρφωση στον χώρο. Επομένως, αυτή η αλλαγή στη στερεοτακτική δομή της πρωτεΐνης μπορεί να μην αφήνει το περιθώριο να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τη «συμπεριφορά» της και τη δυναμική της στον πυρήνα. Αν η διαμόρφωση της μη σουμοϋλιωμένης πρωτεΐνης *SALL1* μεταβάλλεται στον χώρο ή όχι, μπορεί να ελεγχθεί με πρωτεϊνικά εργαλεία-προγράμματα, όπως τα Alphafold και PyMOL, τα οποία προβλέπουν τη τρισδιάστατη (3D) δομή της πρωτεΐνης με βάση την αμινοξική αλληλουχία.

3. Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στη σταθερότητα της πρωτεΐνης *SALL1*

Για τον έλεγχο της σταθερότητας της πρωτεΐνης *SALL1*, και άρα της εύρεσης του χρόνου ημιζωής της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου της πρωτεϊνοσύνθεσης. Με τη χρήση του κυκλοεξιμιδίου, που είναι αναστολέας της πρωτεϊνοσύνθεσης, αναμένεται να μειώνεται η έκφραση της πρωτεΐνης *SALL1*. Πράγματι, η έκφραση της πρωτεΐνης GFP-*SALL1* wt μειώνεται σημαντικά μετά από 6 ώρες δράσης του κυκλοεξιμιδίου. Παρόλα αυτά, η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ελαχιστοποιείται, όταν εκτός από κυκλοεξιμίδιο, υπάρχει και ο αναστολέας σουμοϋλίωσης ML792 στη καλλιέργεια. Η έκφραση της πρωτεΐνης GFP-*SALL1* mut παρατηρείται να αυξάνεται τόσο παρουσία κυκλοεξιμιδίου όσο παρουσία και των δύο αναστολέων. Συμπεραίνεται, λοιπόν, πως η μεταλλαγμένη μη σουμοϋλιωμένη πρωτεΐνη δεν επηρεάζεται από τη δράση των συγκεκριμένων αναστολέων. Αντίθετα, η σουμοϋλίωση της πρωτεΐνης *SALL1* αγρίου τύπου συμβάλλει στη σταθερότητα της πρωτεΐνης, καθώς δεν αποικοδομείται παρά τις 6 ώρες δράσης του κυκλοεξμιδίου. Η μη σουμοϋλιωμένη πρωτεΐνη *SALL1* αγρίου τύπου, λόγω χρήσης του αναστολέα ML792, σταματά να

παράγεται σε πολύ μεγάλο ποσοστό μετά και από χρήση κυκλοεξιμιδίου, καθώς δεν διαθέτει τη συγκεκριμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που θα της παρέχει σταθερότητα και θα αποτρέψει τη ταχεία αποικοδόμηση της.

4. Μερικός συνεντοπισμός των πρωτεϊνών *PML* και *SALL1* στον πυρήνα

Έπειτα από παρατήρηση μικροσκοπίας φθορισμού φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες *PML* και *SALL1* στον πυρήνα συνεντοπίζονται μερικώς. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη *PML* φαίνεται να σχηματίζει τα πυρηνικά σωμάτια PML (PML nuclear bodies) και γύρω από αυτά να συσσωρεύονται μόρια πρωτεϊνών *SALL1*. Με βάση τη βιβλιογραφία, το γεγονός ότι οι δύο πρωτεΐνες δεν συνευρίσκονται στα PML πυρηνικά σωμάτια έχει αποδειχθεί και προηγουμένως (Giordano et al., 2021).

5. Περιορισμοί και μελλοντικές προοπτικές

Η παραπάνω μελέτη πραγματοποιήθηκε με αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά HEK293T, καθώς η διαμόλυνση καθίσταται εύκολη και γρήγορη στα συγκεκριμένα κύτταρα. Ωστόσο, αυτά τα κύτταρα λειτουργούν σαν περιοριστικός παράγοντας, καθώς δεν είναι εμβρυϊκά, και συνεπώς, δεν μπορεί να ελεγχθεί ο πραγματικός ρόλος της πρωτεΐνης *SALL1*. Για αυτόν τον λόγο, σε μελλοντική διατριβή, στόχος είναι να μελετηθεί ο ρόλος της σουμοϋλίωσης της πρωτεΐνης *SALL1* στη πλειοδυναμία ποντικίσιων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, τα οποία ονομάζονται CGR8. Συγκεκριμένα, θα κατασκευαστεί μια κυτταρική σειρά CGR8, στην οποία θα γίνει απαλοιφή του *Sall1* γονιδίου. Έπειτα, τα συγκεκριμένα κύτταρα θα διαμολυνθούν με τα πλασμίδια που εκφράζουν τις πρωτεΐνες GFP-*SALL1* wt, GFP-*SALL1* K1085R και GFP-*SALL1* mut. Με αυτόν τον τρόπο, είναι εφικτό να απαντηθούν ορισμένα ερωτήματα:

- Καθορίζει η σουμοϋλίωση της πρωτεΐνης *SALL1* τη πλειοδυναμία και τη ταυτότητα των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων;
- Συνεχίζουν οι μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης *SALL1* να αλληλεπιδρούν με τους μεταγραφικούς παράγοντες πλειοδυναμίας *SOX2* και *NANOG*;
- Επηρεάζει η σουμοϋλίωση τη λειτουργία της πρωτεΐνης *SALL1* ως μεταγραφικός συν-ενεργοποιητής ή ως μεταγραφικός καταστολέας;.

Με τη διεξαγωγή πειραμάτων σε ποντικίσια εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα για την απάντηση των παραπάνω ερωτημάτων μπορεί να διασαφηνιστεί ο λειτουργικός ρόλος της σουμοϋλίωσης στη πρωτεΐνη *SALL1*.

ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία είχε ως σκοπό τη μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης *PML* στη ρύθμιση της πλειοδυναμίας εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων μέσω του μηχανισμού της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα με απαλοιφή του *Pml* γονιδίου έδειξαν ότι η πρωτεΐνη *SALL1*, που συμμετέχει στη ρύθμιση της λειτουργίας των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, υποσουμοϋλιώνεται σημαντικά. Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε η σημασία της σουμοϋλίωσης στις λειτουργίες και τη σταθερότητα της πρωτεΐνης *SALL1*. Πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης, που πραγματοποιήθηκαν με τη πλήρως μη σουμοϋλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης *SALL1*, έδειξαν ότι η σουμοϋλίωση δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών *SALL1* και *SOX2*, ενώ η σουμοϋλίωση φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών *SALL1* και *NANOG*. Πειράματα ελέγχου της πρωτεϊνοσύνθεσης έδειξαν πως η μετα-μεταφραστική τροποποίηση της σουμοϋλίωσης προσδίδει σταθερότητα στην αγρίου τύπου πρωτεΐνη GFP-*SALL1*, με συνέπεια να έχει σχετικά μεγάλο χρόνο ημιζωής και να μην αποικοδομείται ταχέως. Περαιτέρω πειράματα σε ποντικίσια εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα θα μπορέσουν να αποκαλύψουν, αν η σουμοϋλίωση της πρωτεΐνης *SALL1* συμβάλλει στη διατήρηση της αυτό-ανανέωσης και της πλειοδυναμίας των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων. Απώτερος σκοπός είναι να διερευνηθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης *SALL1* στη γονιδιακή ρύθμιση, καθώς και η εμπλοκή της σε μηχανισμούς αυτό-ανανέωσης βλαστοκυττάρων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alberti, S., Gladfelter, A., & Mittag, T. (2019). Considerations and challenges in studying Liquid-Liquid phase separation and biomolecular condensates. *Cell*, *176*(3), 419–434. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.035

Álvarez, C., Quiroz, A., Benítez-Riquelme, D., Riffo, E., Castro, A. F., & Pincheira, R. (2021). SALL proteins; Common and antagonistic roles in cancer. *Cancers*, *13*(24), 6292. https://doi.org/10.3390/cancers13246292

Arnold, K., Sarkar, A., Yram, M. A., Polo, J. M., Bronson, R. T., Sengupta, S., Seandel, M., Geijsen, N., & Hochedlinger, K. (2011). SOX2+ adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell*, *9*(4), 317–329. https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.09.001

Barroso-Gomila, O., Trulsson, F., Muratore, V., Canosa, I., Merino-Cacho, L., Cortázar, A. R., Pérez, C., Azkargorta, M., Iloro, I., Carracedo, A., Aransay, A. M., Elortza, F., Mayor, U., Vertegaal, A. C., Barrio, R., & Sutherland, J. D. (2021). Identification of proximal SUMO-dependent interactors using SUMO-ID. *Nature Communications*, *12*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-021-26807-6

Berika, M., Elgayyar, M. E., & El-Hashash, A. (2014). Asymmetric cell division of stem cells in the lung and other systems. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *2*. https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00033

Boiani, M., & Schöler, H. R. (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(11), 872–881. https://doi.org/10.1038/nrm1744

Boisvert, F., Hendzel, M. J., & Bazett-Jones, D. P. (2000). Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *Journal of Cell Biology*, *148*(2), 283–292. https://doi.org/10.1083/jcb.148.2.283

Bregnard, T., Ahmed, A., Семенова, И. В., Weller, S., & Bezsonova, I. (2022). The B-box1 domain of PML mediates SUMO E2-E3 complex formation through an atypical interaction with UBC9. Biophysical Chemistry, 287, 106827. https://doi.org/10.1016/j.bpc.2022.106827

Cable, J., Fuchs, E., Weissman, I. L., Jasper, H., Glass, D. J., Rando, T. A., Blau, H. M., Debnath, S., Oliva, A. A., Park, S., Passegué, E., Kim, C. F., & Krasnow, M. A. (2019). Adult stem cells and regenerative medicine—a symposium report. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1462*(1), 27–36. https://doi.org/10.1111/nyas.14243

Chen, X., Ye, S., & Ying, Q. (2015). Stem cell maintenance by manipulating signaling pathways: past, current and future. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 48(12), 668–676. https://doi.org/10.5483/bmbrep.2015.48.12.215

Chuang, Y. S., Huang, W., Park, S. W., Persaud, S. D., Hung, C. H., Ho, P. C., & Wei, L. (2011). Promyelocytic Leukemia Protein in Retinoic Acid-Induced Chromatin Remodeling of Oct4 Gene Promoter. Stem Cells, 29(4), 660–669. https://doi.org/10.1002/stem.623

Corpet, A., Kleijwegt, C., Roubille, S., Juillard, F., Jacquet, K., Texier, P., & Lomonte, P. (2020). PML nuclear bodies and chromatin dynamics: catch me if you can! *Nucleic Acids Research*, *48*(21), 11890–11912. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa828

Cossec, J., Theurillat, I., Chica, C., Aguín, S. B., Gaume, X., Andrieux, A., Iturbide, A., Jouvion, G., Li, H., Bossis, G., Seeler, J., Torres-Padilla, M., & Dejean, A. (2018). SUMO safeguards somatic and pluripotent cell identities by enforcing distinct chromatin states. *Cell Stem Cell*, *23*(5), 742-757.e8. https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.10.001

De Celis, J. F., & Barrio, R. (2009). Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *The International Journal of Developmental Biology*, *53*(8-9–10), 1385–1398. https://doi.org/10.1387/ijdb.072408jd

De Celis, J. F., Barrio, R., & Kafatos, F. C. (1996). A gene complex acting downstream of dpp in Drosophila wing morphogenesis. *Nature*, *381*(6581), 421–424. https://doi.org/10.1038/381421a0

Ding, Y., Yuan, X., Zou, Y., Gao, J., Xu, X., Sun, H., Zuo, Q., & Zhang, Y. (2022). OCT4, SOX2 and NANOG co-regulate glycolysis and participate in somatic induced reprogramming. *Cytotechnology*, *74*(3), 371–383. https://doi.org/10.1007/s10616-022-00530-6

Fedotova, A., Bonchuk, A., Mogila, V., & Georgiev, P. (2017). C2H2 zinc finger proteins: the largest but poorly explored family of higher eukaryotic transcription factors. *Acta Naturae*, *9*(2), 47–58. https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-2-47-58

Giordano, I., Pirone, L., Muratore, V., Landaluze, E., Pérez, C., Lang, V. S., Garde-Lapido, E., Gonzalez-Lopez, M., Barroso-Gomila, O., Vertegaal, A. C., Aransay, A. M., Rodríguez, J. A., Rodríguez, M. S., Sutherland, J. D., & Barrio, R. (2021). SALL1 modulates CBX4 stability, nuclear bodies, and regulation of target genes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.715868

Guan, D., & Kao, H. Y. (2015). The function, regulation and therapeutic implications of the tumor suppressor protein, PML. Cell & Bioscience, 5(1). https://doi.org/10.1186/s13578-015-0051-9

Hadjimichael, C., Chanoumidou, K., Nikolaou, C., Klonizakis, A., Theodosi, G., Makatounakis, T., Papamatheakis, J., & Kretsovali, A. (2017). Promyelocytic leukemia protein is an essential regulator of stem cell pluripotency and somatic cell reprogramming. *Stem Cell Reports*, *8*(5), 1366–1378. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.03.006

Hannoun, Z., Greenhough, S., Jaffray, E., Hay, R. T., & Hay, D. C. (2010). Post-translational modification by SUMO. *Toxicology*, *278*(3), 288–293. https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.07.013

Hassani, S., Totonchi, M., Gourabi, H., Schöler, H. R., & Baharvand, H. (2014). Signaling roadmap modulating naive and primed pluripotency. *Stem Cells and Development*, *23*(3), 193–208. https://doi.org/10.1089/scd.2013.0368

Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., & Saitou, M. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, *146*(4), 519–532. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.052

He, S., Nakada, D., & Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell Self-Renewal. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 25(1), 377–406. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113248

Hu, Y., Yang, Y., Tan, P., Zhang, Y., Han, M. K., Yu, J., Zhang, X., Jia, Z., Wang, D., Li, Y., Ma, T., Liu, K., & Ding, S. (2022). Induction of mouse totipotent stem cells by a defined chemical cocktail. *Nature*, *617*(7962), 792–797. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04967-9

Jin, G., Gao, Y., & Lin, H. K. (2014). Cytoplasmic PML: From molecular regulation to biological functions. *Journal of Cellular Biochemistry*, *115*(5), 812–818. https://doi.org/10.1002/jcb.24727

Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M. K., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A., Inoue, H., Yamashita, J., Todani, M., Nakagawa, M., Osawa, M., Yashiro, Y., Yamanaka, S., & Osafune, K. (2019). Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development. *Physiological Reviews*, *99*(1), 79–114. https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2017

Karantzali, E., Lekakis, V., Ioannou, M., Hadjimichael, C., Papamatheakis, J., & Kretsovali, A. (2011). Sall1 Regulates Embryonic Stem Cell Differentiation in Association with Nanog. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(2), 1037–1045. https://doi.org/10.1074/jbc.m110.170050

Keramari, M., Razavi, J., Ingman, K. A., Patsch, C., Edenhofer, F., Ward, C. M., & Kimber, S. J. (2010). SOX2 is essential for formation of trophectoderm in the preimplantation embryo. *PLOS ONE*, *5*(11), e13952. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013952

Lallemand-Breitenbach, V., & De Thé, H. (2018). PML nuclear bodies: from architecture to function. *Current Opinion in Cell Biology*, *52*, 154–161. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.03.011

Lauberth, S., Bilyeu, A., Firulli, B. A., Kroll, K. L., & Rauchman, M. (2007). A phosphomimetic mutation in the SALL1 repression motif disrupts recruitment of the nucleosome remodeling and deacetylase complex and repression of GBX2. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(48), 34858–34868. https://doi.org/10.1074/jbc.m703702200

Lauberth, S., & Rauchman, M. (2006). A conserved 12-Amino acid motif in SALL1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(33), 23922–23931. https://doi.org/10.1074/jbc.m513461200

Mandel, N., & Agarwal, N. (2022). Role of SUMOylation in neurodegenerative diseases. *Cells*, *11*(21), 3395. https://doi.org/10.3390/cells11213395

Mehravar, M., Ghaemimanesh, F., & Poursani, E. M. (2021). An Overview on the Complexity of OCT4: at the Level of DNA, RNA and Protein. *Stem Cell Reviews and Reports*, *17*(4), 1121–1136. https://doi.org/10.1007/s12015-020-10098-3

Mojsa, B., Tatham, M. H., Davidson, L. S. P., Liczmanska, M., Branigan, E., & Hay, R. T. (2021). Identification of SUMO targets associated with the pluripotent state in human stem cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, *20*, 100164. https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2021.100164

Netzer, C., Bohlander, S. K., Rieger, L., Müller, S., & Kohlhase, J. (2002). Interaction of the developmental regulator SALL1 with UBE2I and SUMO-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *296*(4), 870–876. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02003-x

Netzer, C., Rieger, L., Brero, A., Zhang, C., Hinzke, M., Kohlhase, J., & Bohlander, S. K. (2001). SALL1, the gene mutated in Townes-Brocks syndrome, encodes a transcriptional repressor which interacts with TRF1/PIN2 and localizes to pericentromeric heterochromatin. *Human Molecular Genetics*, *10*(26), 3017–3024. https://doi.org/10.1093/hmg/10.26.3017

Pan, G., & Thomson, J. A. (2007). Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research*, *17*(1), 42–49. https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310125

Pfeuty, B., Kress, C., & Pain, B. (2018). Network features and dynamical landscape of naive and primed pluripotency. *Biophysical Journal*, *114*(1), 237–248. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.10.033

Ramazi, S., & Zahiri, J. (2021). Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. Database, 2021. https://doi.org/10.1093/database/baab012

Reus, J. B., Trivino-Soto, G. S., Wu, L. I., Kokott, K., & Lim, E. S. (2020). SV40 large T antigen is not responsible for the loss of STING in 293T cells but can inhibit CGAS-STING interferon induction. *Viruses*, *12*(2), 137. https://doi.org/10.3390/v12020137

Rizzino, A., & Wuebben, E. L. (2016). Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1859*(6), 780–791. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2016.03.006

Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M., & Nishinakamura, R. (2003). Zinc finger protein SAIL2 is not essential for embryonic and kidney

development. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(1), 62–69. https://doi.org/10.1128/mcb.23.1.62-69.2003

Saunders, A., Faiola, F., & Wang, J. (2013). Concise Review: Pursuing Self-Renewal and Pluripotency with the Stem Cell Factor Nanog. *Stem Cells*, *31*(7), 1227–1236. https://doi.org/10.1002/stem.1384

Sobhani, A., Khanlarkhani, N., Baazm, M., Mohammadzadeh, F., Najafi, A., Mehdinejadiani, S., & Aval, F. S. (2017). Multipotent stem cell and current application. *PubMed*, *55*(1), 6–23. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28188938

Sohn, E. J., Moon, H. J., Lim, J. K., Kim, D. S., & Kim, J. H. (2021). Regulation of the protein stability and transcriptional activity of OCT4 in stem cells. *Advances in Biological Regulation*, *79*, 100777. https://doi.org/10.1016/j.jbior.2020.100777

Tahmasebi, S., Ghorbani, M., Savage, P., Gocevski, G., & Yang, X. (2014). The SUMO conjugating enzyme UBC9 is required for inducing and maintaining stem cell pluripotency. *Stem Cells*, *32*(4), 1012–1020. https://doi.org/10.1002/stem.1600

Theurillat, I., Hendriks, I. A., Cossec, J., Andrieux, A., Nielsen, M. L., & Dejean, A. (2020). Extensive SUMO Modification of Repressive Chromatin Factors Distinguishes Pluripotent from Somatic Cells. *Cell Reports*, *32*(11), 108146. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108146

Tsuruzoe, S., Ishihara, K., Uchimura, Y., Watanabe, S., Sekita, Y., Aoto, T., Saitoh, H., Yuasa, Y., Niwa, H., Kawasuji, M., Baba, H., & Nakao, M. (2006). Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *351*(4), 920–926. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.130

Urrutia, G. A., Ramachandran, H., Cauchy, P., Boo, K., Ramamoorthy, S., Boller, S., Doğan, E., Clapes, T., Trompouki, E., Torres-Padilla, M., Palvimo, J. J., Pichler, A., & Grosschedl, R. (2021). ZFP451-mediated SUMOylation of SATB2 drives embryonic stem cell differentiation. Genes & Development, 35(15–16), 1142–1160. https://doi.org/10.1101/gad.345843.120

Vogiatzoglou, A. P., Moretto, F., Makkou, M., Papamatheakis, J., & Kretsovali, A. (2022). Promyelocytic leukemia protein (PML) and stem cells: from cancer to pluripotency. The International Journal of Developmental Biology, 66(1-2–3), 85–95. https://doi.org/10.1387/ijdb.210154av

Wang, Z., Sun, Z., Diao, Y., Wang, Z., Yang, X., Jiang, B., Wu, Y., & Liu, G. (2023). Identification of two novel SALL1 mutations in chinese families with townes-brocks syndrome and literature review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *18*(1). https://doi.org/10.1186/s13023-023-02874-4

Watson, J. A., Pantier, R., Jayachandran, U., Chhatbar, K., Alexander-Howden, B., Kruusvee, V., Prendecki, M., Bird, A., & Cook, A. G. (2023). Structure of SALL4 zinc finger domain reveals link between AT-rich DNA binding and Okihiro syndrome. *Life Science Alliance*, *6*(3), e202201588. https://doi.org/10.26508/lsa.202201588

Wu, Y., Guo, Z., Wu, H., Wang, X., Yang, L., Shi, X., Du, J., Tang, B., Li, W., Yang, L., & Zhang, Y. (2012). SUMOylation represses naNOG expression via modulating transcription factors OCT4 and SOX2. *PLOS ONE*, *7*(6), e39606. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039606

Zhao, X. (2018). SUMO-Mediated Regulation of Nuclear Functions and Signaling Processes. Molecular Cell, 71(3), 409–418. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.027

Zhu, Q., Liang, P., Chu, C., Zhang, A., & Zhou, W. (2022). Protein sumoylation in normal and cancer stem cells. Frontiers in Molecular Biosciences, 9. https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1095142