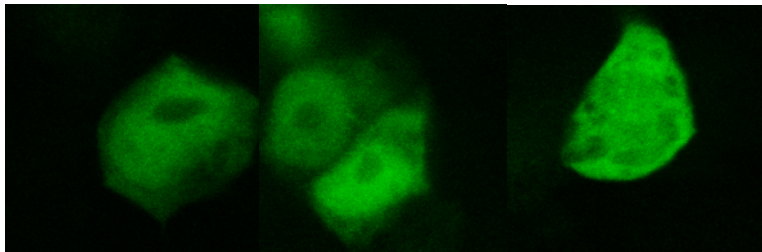


**Πανεπιστήμιο Κρήτης**  
**Τμήμα Βιολογίας & Ιατρικής**  
**Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα**  
**«Μοριακή Βιολογία – Βιοϊατρική»**

**Ιωάννου Μαρίλια**

**Μεταπτυχιακή διατριβή**

**« Μελέτη της συμβολής των μεταγραφικών παραγόντων Sall1 και Nr0b1 στην αυτό-ανανέωση και πολυδυναμικότητα των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων».**



**Υπεύθυνος ερευνητής: Ανδρονίκη Κρετσόβαλη**  
**Υπεύθυνος καθηγητής: Ιωσήφ Παπαματθαϊάκης**

**Κρήτη 2007**

**University of Crete**

***Medical School & Dept of Biology***

**Postgraduate Course  
“Molecular Biology and Biomedicine”**

**Ioannou Marilia**



**Supervisor : Androniki Kretsovali**

**Professor: Joseph Papamatheakis**

**Crete 2007**

## Πρόλογος

Ολοκληρώνοντας τη συγγραφή αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής, πολλοί είναι εκείνοι οι άνθρωποι που νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω και να τους αφιερώσω την προσπάθεια αυτή.

Κατ' αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω δυο εξίσου σημαντικούς ανθρώπους για μένα οι οποίοι έχουν παίξει καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση της μέχρι τώρα επιστημονικής μου σκέψης.

Νιώθω λοιπόν την ανάγκη να ευχαριστήσω αρχικά τον άνθρωπο που έγινε η αιτία να γνωρίσω και να αγαπήσω τη μοριακή βιολογία, έστω κι αν εκείνος δεν το γνωρίζει, όταν μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω για πρώτη φορά στο εργαστήριο του, το καλοκαίρι του 2002, δευτεροετής φοιτήτρια τότε, που δεν είχε ακόμα πιάσει πιπέτα στη ζωή της, τον καθηγητή μου, **Ιωσήφ Παπαματθαϊάκη**. Θέλω πολύ να του εκφράσω τον θαυμασμό και την εκτίμηση που τρέφω τόσα χρόνια στο πρόσωπο του, όχι μόνο γιατί είναι ένας εξαιρετος επιστήμονας αλλά και για την πλατύτητα της σκέψης του, για την συνεχή επιθυμία του να προσφέρει απλόχερα τις γνώσεις του στους φοιτητές του, να τους μεταδίδει τον ενθουσιασμό του για την επιστήμη της Βιολογίας και τη βασική έρευνα και να διαμορφώνει την επιστημονική τους συνείδηση.

Στη συνέχεια θέλω να ευχαριστήσω τη **Νίκη Κρετσόβαλη**, η οποία υπήρξε η βασική επιστημονική υπεύθυνος για τη χάραξη του προγράμματος αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής, αλλά και ο κυριότερος καθοδηγητής της επιστημονικής μου σκέψης. Νιώθω λοιπόν την ανάγκη να την ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω ένα θέμα που πραγματικά με ενδιέφερε πολύ και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το παραπάνω θέμα κάνοντας με μέλος της εργαστηριακής της ομάδας, αλλά και για τη συμπαράσταση της σε όλες τις δυσκολίες και τα διλήμματα που παρουσιάστηκαν κατά τη διεξαγωγή αυτής της εργασίας. Η Νίκη δεν είναι μόνο ένας ερευνητής που εκτιμώ βαθύτατα αλλά και ένας άνθρωπος που αγαπώ πολύ. Υπήρξε πάντα δίπλα μου, πρόθυμη να μου δώσει την πολύτιμη επιστημονική της καθοδήγηση και να μου προσφέρει τη βοήθεια και την κατανόηση της απλόχερα όσες φορές τη χρειάστηκα και για το λόγο αυτό της οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Σ' αυτή μου την προσπάθεια σημαντικό ρόλο έπαιξε η καθοδήγηση μου από τα μέλη του εργαστηρίου και η πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν λύνοντας τις απορίες μου και βοηθώντας με στις δυσκολίες των πειραμάτων μου αλλά και προσφέροντας μου την ηθική τους συμπαράσταση.

Νιώθω λοιπόν την ανάγκη να ευχαριστήσω έναν άνθρωπο ιδιαίτερης σημασίας για μένα, την καλή μου φίλη **Έφη Καράτζαλη**, για την πολύτιμη βοήθεια της σε ό,τι αφορά την εξοικείωση μου με τις τεχνικές που χρησιμοποίησα κατά την εκπόνηση της εργασίας αυτής, για το πραγματικό ενδιαφέρον που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή, για την άποψη συνεργασία μας, για τον κόπο που κατέβαλε και την πολύτιμη βοήθεια της καθ' όλη την διάρκεια πραγματοποίησης της μεταπτυχιακής αυτής διατριβής, για τις εύστοχες παρατηρήσεις και συμβουλές της σε ότι αφορούσε την διεξαγωγή των πειραμάτων μου, αλλά και για τη συμπαράσταση της σε όλες τις δυσκολίες που αντιμετώπισα, και πάνω από όλα για το γεγονός ότι με τίμησε με τη φιλία της, για όλες τις στιγμές που μοιραστήκαμε, και οι οποίες πραγματικά θα μου μείνουν αξέχαστες, για όλα όσα ζήσαμε μαζί.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τον **Τακη Μακατουνάκη**, το στήριγμα όλων μας στο εργαστήριο, ο οποίος πάντα με ευγένεια και υπομονή ήταν πρόθυμος να με ακούσει και να μου βρει τη λύση σε κάθε ερώτημα που του έθετα. Ομοίως θα ήθελα να ευχαριστήσω και το **Γιώργο Βρέτσο**, για την πολύτιμη βοήθεια του, η οποία υπήρξε καθοριστική για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας, αλλά και για την ηθική του συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Στη συνέχεια θέλω να ευχαριστήσω έναν πολύ σημαντικό άνθρωπο για μένα, την καλή μου φίλη **Γιώτα Αραμπατζή**, με την οποία δεθήκαμε από την πρώτη στιγμή και που πάντα μαζί, πρωί, βράδυ, εντός και εκτός εργαστηρίου μοιραζόμαστε τις ανησυχίες μας, τις δυσκολίες και τις χαρές μας. Η Γιώτα υπήρξε πάντα εκεί για μένα, οποιαδήποτε στιγμή και αν τη χρειάστηκα και η ηθική της συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου, καθώς και η φιλία της υπήρξε και θα παραμείνει ανεκτίμητη.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τη φίλη μου και συμφοιτήτρια μου **Χριστίνα Δοξάκη**, για την άψογη συνεργασία μας και για όλα όσα περάσαμε μαζί, όσα μοιραστήκαμε όλο αυτό το διάστημα της κοινής μας πορείας.

Ακόμα αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω το **Μανώλη Γιαλυτάκη** και τη **Φοίβη Σταβρίδη** για την πολύτιμες συμβουλές τους και τη βοήθεια τους κατά τη διεξαγωγή της εργασίας αυτής αλλά, και τα υπόλοιπα παιδιά του εργαστηρίου, τη **Χρύσα**, τον **Ανδρέα** και τη **Ρόζυ** για την άψογη συνεργασία.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, **τους γονείς μου**, που χωρίς την πολύτιμη συμβολή τους και τις αξίες που με δίδαξαν δε θα είχα φτάσει στο σημείο αυτό τη ζωή μου, όλους **τους καθηγητές – παιδαγωγούς μου**, από το δημοτικό μέχρι το πανεπιστήμιο, γιατί χωρίς αυτούς δε θα ήμουν ο άνθρωπος που είμαι σήμερα, το θείο μου **Σταύρο Φαράντο** που αποτελούσε πάντα για μένα πρότυπο σαν άνθρωπος και σαν ερευνητής, τη **Βάσω Τριανταφυλοπούλου** πρώην καθηγήτρια και νυν φίλη μου, που υπήρξε η αιτία να αγαπήσω τη Βιολογία και να ασχοληθώ με την επιστήμη αυτή, καθώς και όλους τους **φίλους** μου, που ήταν δίπλα μου στις χαρές αλλά και στις δυσκολίες αυτής της εργασίας όπως πάντα, και πάνω απ' όλους τον **Πέτρο Πετρίδη**, που είναι δίπλα μου δεκαπέντε ολόκληρα χρόνια, για τη βοήθεια του και τις συμβουλές του σε ό,τι αφορά τον χειρισμό προγραμμάτων στον Υ/Π, αλλά πολύ περισσότερο, γιατί μοιράστηκε μαζί μου τις αγωνίες αυτής της προσπάθειας, και γιατί όπως πάντα με την αγάπη του, την συμπαράσταση και την υποστήριξη του, αποτελεί την κινητήρια δύναμη μου.

Ηράκλειο  
Οκτώβριος 2007

## Περίληψη

Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων του ποντικού, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που ευθύνονται για την πολυδυναμία και την αυτό-ανανέωση των κυττάρων τους μειώνονται. Ανάμεσα στους παραπάνω παράγοντες, στους οποίους συγκαταλέγονται και οι τρεις σημαντικοί ρυθμιστές Nanog, Oct4 και Sox2, βρέθηκαν δυο γονίδια τα οποία παρουσιάζουν σημαντική ,καταστολή της έκφρασης τους το Sall1 και το Nrobl.

Το Sall1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που περιέχει πολλά δάκτυλα ψευδαργύρου, δρα ως ισχυρός καταστολέας της μεταγραφής πολλών γονιδίων στα κύτταρα των θηλαστικών και είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του νεφρού. Μεταλλαγές στο ανθρώπινο γονίδιο, ευθύνονται για το σύνδρομο Townes-Brocks.

Το γονίδιο Nrobl ή αλλιώς Dax1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων, που παρουσιάζει δράση συν καταστολέα της μεταγραφής πολλών γονιδίων. Και τα δυο γονίδια βρέθηκε ότι είναι στόχοι του Nanog στα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα.

Η ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων έκφρασης κατά τη διαφοροποίηση των Sall1 και Nrobl με αυτή των τριών σημαντικών ρυθμιστών Nanog, Oct4 και Sox2, αυξάνει την πιθανότητα να υπάρχει κάποια λειτουργική σχέση μεταξύ τους.

Στη μεταπτυχιακή αυτή διατριβή με τη εφαρμογή *in vitro* και *in vivo* τεχνικών δείξαμε, ότι το Sall1 και Nrobl αλληλεπιδρούν με τους τρεις σημαντικοί ρυθμιστές. Επίσης χρησιμοποιώντας την *in vitro* τεχνική GST pull-down, δείξαμε ότι πιθανά να αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα και με τους δυο παράγοντες Nanog, Sox2.

Στη συνέχεια προκειμένου να μελετήσουμε ποιες περιοχές των πρωτεϊνικών μορίων που ευθύνονται για αυτές τις πιθανές διπλές αλληλεπιδράσεις, χρησιμοποιήσαμε μόνο την αμινοτελική περιοχή του Sall1 (1-2024nt), και βρήκαμε ότι αυτή η περιοχή αλληλεπιδρά με τον Nanog αλλά όχι με τον Oct4 ή τον Sox2.

Τα αποτελέσματα μας υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το σύμπλοκο των μεταγραφικών παραγόντων που απαιτούνται για τη διατήρηση της πολυδυναμίας και την αυτό-ανανέωση των βλαστοκυττάρων, είναι πολύ πιθανό να περιλαμβάνει και τους παράγοντες Sall1 και Nrobl.

## Summary

During differentiation of mESCs, genes that are responsible for maintaining pluripotency such as Nanog, Oct4 and Sox2 are down regulated. Next to these factors we observed the suppression of two other genes, Sall1 and Nr0b1, which were not previously involved in the regulations of stem cell function.

Sall1 is a Zn-finger transcriptional repressor that is essential for kidney development and has been linked to human Townes-Brocks syndrome.

Nr0b1/Dax1 is an orphan nuclear receptor that is broadly expressed and has co-repressor activity. Both were found to be Nanog target genes in mESCs.

The concurrent down regulation of Sall1 and Nr0b1 with the three core pluripotency factors during differentiation raises the possibility that there is a functional interconnection among them. Employing *in vitro* and *in vivo* assays we have shown that Sall1 and Nr0b1 interact with the three core pluripotency factors Nanog, Oct4 and Sox2.

Moreover, using an *in vitro*/ GST pull-down assay, we showed that Sall1 can interact both with both Nanog and Sox2 at the same time. Furthermore in order to study which protein domains are responsible for this double interaction, we used only the N-terminal domain of Sall1 (aa 1-2024), and found that it can interact with Nanog but not with Sox2 or Oct4.

Our results suggest that the protein complex of transcription factors required to maintain self-renewal and to preserve the undifferentiated state of ES cells may also include Sall1 and Nr0b1.

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> Εισαγωγή

1.1 Βλαστικά κύτταρα.	10
1.2 Προέλευση των βλαστοκυττάρων.	12
1.3 Παράγοντες απαραίτητοι για την διατήρηση της αυτό-ανανέωσης και πολυδυναμικότητας των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων.	13
1.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια που καθορίζουν την αυτό-ανανέωση ή τη διαφοροποίηση.	13
1.4.1 Η σηματοδοτική ακολουθία του LIF μονοπατιού.	13
1.4.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι BMP4.	15
1.4.3 Το σηματοδοτικό μονοπάτι WNT	15
1.5 Ο μεταγραφικός παράγοντας Oct4.	17
1.6 Ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2.	17
1.7 Ο μεταγραφικός παράγοντας Nanog.	18
1.8 Το δίκτυο των σημαντικότερων μεταγραφικών παραγόντων που ευθύνονται για την πολυδυναμία των ESCs.	19
1.9 Ο μεταγραφικός παράγοντας Sall1.	20
1.10 Ο μεταγραφικός παράγοντας Sall1.	21
1.11 Σκοπός	21

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> Υλικά και μέθοδοι

Κυτταρικές σειρές	23
Βακτηριακές σειρές	23
Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας βακτηρίων και ευκαρυωτικών κυττάρων	23
Αντισώματα	23
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	24
Δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης.	24

Εξαγωγή DNA από πηκτώματος αγαρόζης (Gel extraction).	24
Πέψη και συγκόλληση τμημάτων DNA (Digest, Ligation)	25
Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων (Transformation)	25
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μετασχηματισμένων βακτηρίων	26
Δημιουργία αποθέματος γλυκερόλης (Glycerol stock)	27
Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων (Transient transfection)	28
Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ευκαρυωτικά κύτταρα (Protein extraction)	29
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.	29
Ανοσοαποτύπωση (Western blot)	31
Απομόνωση His σημασμένων πρωτεϊνών.	32
Απομόνωση GST-χμιαϊκών πρωτεϊνών.	34
Αλληλεπιδράσεις GST-χμιαϊκών πρωτεϊνών με His-σημασμένες πρωτεΐνες (GST-Pull down for protein-protein interaction)	35
Συν-ανοσοκατακρίμνηση (Co-IP)	36
<b>ΧΑΡΤΕΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ</b>	38
1. Κλωνοποίηση του γονιδίου Nr0b1 στους πλασμιδιακούς φορείς GFPC2 και CFPC2.	38
2. Κλωνοποίηση του γονιδίου Sall1 στους παρακάτω πλασμιδιακούς φορείς.	39
3. PGK Flag Nanog IRES EGFP.	42
4. Κλωνοποίηση του γονιδίου Sox2 στον pRSETC.	43
5. Κλωνοποίηση του γονιδίου Oct4 στον pRSETB.	44

### **Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> Αποτελέσματα – Συζήτηση**

3.1 Έλεγχος παραγωγής πρωτεϊνών από τις πλασμιδιακές κατασκευές.	45
3.2 <i>In vitro</i> αλληλεπιδράσεις των Sall1 και Nr0b1 με τους μεταγραφικούς παράγοντες Nanog, Sox2 και Oct4.	48



3.3 <i>In vitro</i> αλληλεπιδράσεις των Sall1 και Nr0b1 με τους μεταγραφικούς παράγοντες Nanog/Sox2 και Oct4/Sox2.	49
3.4 Έλεγχος των περιοχών αλληλεπίδρασης του Sall1 με τους μεταγραφικούς παράγοντες Nanog, Sox2 και Oct4.	50
3.5 <i>In vivo</i> αλληλεπιδράσεις των Sall1 και Nr0b1 με τους μεταγραφικούς παράγοντες Nanog, Sox2 και Oct4.	50
3.6 Συζήτηση	51
<b>Βιβλιογραφία</b>	54

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>

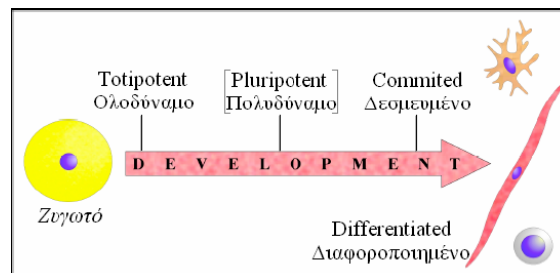
### Εισαγωγή

#### 1.1 Βλαστικά κύτταρα.

Τα βλαστικά κύτταρα, είναι αρχέγονα, πολυδύναμα κύτταρα των ζωικών οργανισμών, που έχουν την ικανότητα τόσο της αυτό-ανανέωσης, να διαιρούνται δηλαδή για απροσδιόριστες χρονικές περιόδους και να παραμένουν στην αδιαφοροποίητη κατάσταση, όσο και της πολυδυναμίας, της ικανότητας δηλαδή να παράγουν θυγατρικά κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους κάτω από κατάλληλες συνθήκες μπορούν να διαφοροποιηθούν, για να σχηματίσουν όλους τους κυτταρικούς τύπους, που συναντώνται στους ώριμους ιστούς. Τα βλαστικά κύτταρα ονομάζονται επίσης και γεναρχικά ή πολυδύναμα κύτταρα. Η αυτό-ανανέωση εξασφαλίζει τη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων που συντελούν στη μορφογένεση και επιδιόρθωση των ιστών, ενώ η διαφοροποίηση παράγει τα εξειδικευμένα κύτταρα, που σχηματίζουν κάθε όργανο και εξασφαλίζουν την φυσιολογική λειτουργία του.

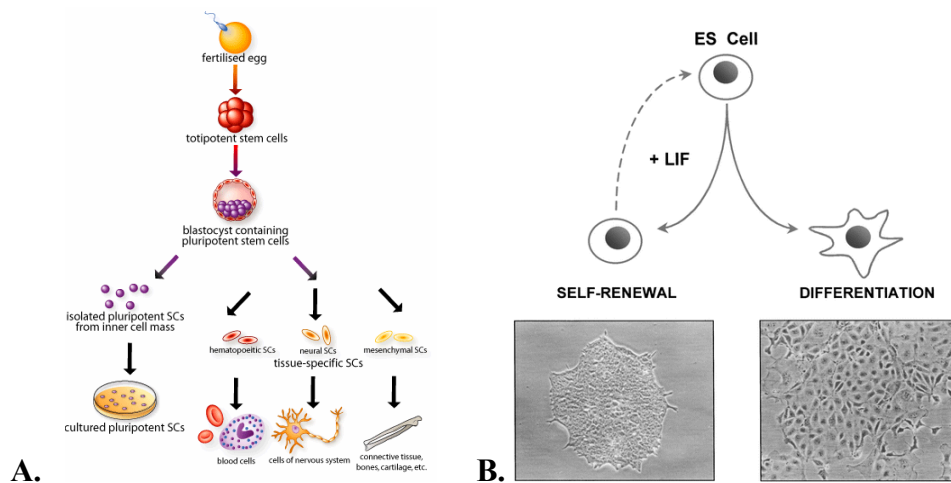
Τα βλαστικά κύτταρα χωρίζονται σε τρεις κυρίως κατηγορίες: τα εμβρυικά, τα γαμετικά και τα σωματικά ενήλικα βλαστικά κύτταρα.

Το πρώτο κύτταρο κάθε νέου οργανισμού είναι το γονιμοποιημένο ωάριο που οδηγεί στη δημιουργία ενός διπλοειδούς ζυγώτη, ο οποίος διαιρείται μειωτικά και δίνει έμβρυο δύο κυττάρων (Εικ1). 24 ώρες μετά, αρχίζει η αυλάκωση, δηλαδή μία σειρά γρήγορων κυτταρικών διαιρέσεων, κατά τη διάρκεια των οποίων αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων του εμβρύου χωρίς την παράλληλη αύξηση του μεγέθους του. Τα κύτταρα αυτά κατά την αυλάκωση ονομάζονται βλαστομερίδια και είναι ολοδύναμα (totipotent), μπορούν να δώσουν όλους τους δυνατούς τύπους κυττάρων που συνθέτουν έναν οργανισμό καθώς και εξωεμβρυικούς ιστούς (Εικ1).



**Εικ.1:** Η πορεία της διαφοροποίησης.

Στη συνέχεια, ακολουθεί η πρώτη φανερή διαφοροποίηση που οδηγεί στο σχηματισμό του τροφεκτοδέρματος και της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (ICM). Το τροφεκτόδεσμα είναι μία στιβάδα επιθηλιακών κυττάρων, που περικλείει μία κοιλότητα, το βλαστοκόιλο, γεμάτη με βλαστοκοιλιακό υγρό, στη μία πλευρά της οποίας βρίσκεται ένα συσσωμάτωμα κυττάρων, η εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM), που περιέχει πολυδύναμα κύτταρα (pluripotent) από τα οποία θα διαφοροποιηθούν όλες οι κυτταρικές σειρές του εμβρύου. Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα προέχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης, είναι πολυδύναμα, συνεισφέρουν και στις τρεις βλαστικές στιβάδες ενδόδεσμα, μεσόδεσμα, εξώδεσμα, και είναι πρόγονοι όλων των κυττάρων ενός οργανισμού (Εικ2). Έχουν απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού, που οφείλεται στην έκφραση της τελομεράσης και η παντοδυναμία τους περιορίζεται σταδιακά, κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του εμβρύου, στα κύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν στα ιστο-ειδικά κύτταρα.



**Εικ.2:** **A.** Πολυδυναμικότητα των ESCs. **B.** Αυτό-ανανέωση των ESCs

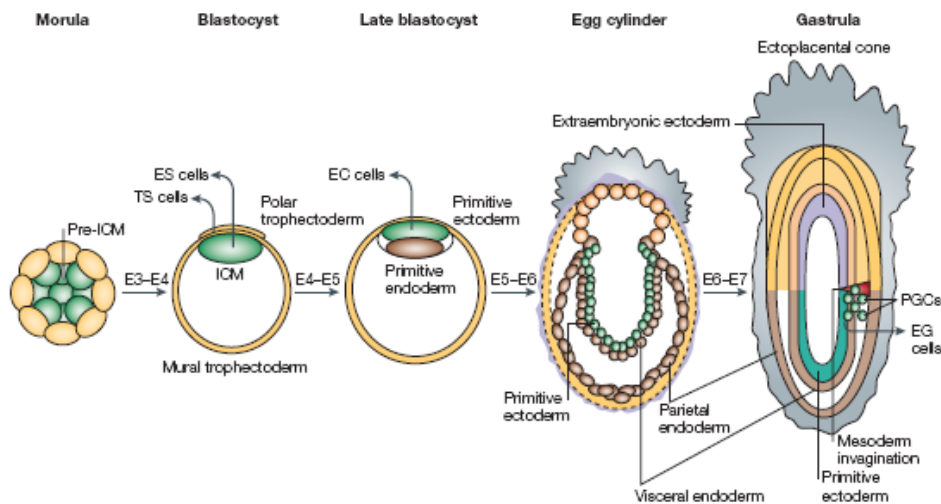
Σε σύγκριση με τα εμβρυϊκά, τα ενήλικα ιστο-ειδικά βλαστικά κύτταρα βρίσκονται στους ενήλικους ιστούς, έχουν μικρότερη ικανότητα αυτό-ανανέωσης και δεν είναι παντοδύναμα, αφού η διαφοροποίηση τους περιορίζεται στους κυτταρικούς τύπους κάθε ιστού. Αυτά χρησιμεύουν για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, καθώς συνεχώς παράγουν και αναγεννούν τους ώριμους ιστούς, ως μέρος της κανονικής φυσιολογίας ή ως αντίδραση σε μία βλάβη. Τα κύτταρα αυτά βέβαια, συγκριτικά με τα ESCs, έχουν περιορισμένη ικανότητα αυτό-ανανέωσης και πολυδυναμικότητας,

Τα γαμετικά βλαστικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των ωαρίων και των σπερματοζωαρίων.

## 1.2 Προέλευση των βλαστοκυττάρων.

Κατά την πορεία της εμβρυογένεσης σχηματίζεται η ΕΚΜ (ICM) μία προσωρινή δεξαμενή κυττάρων, τα οποία σύντομα διαφοροποιούνται κατά τη γαστριδίωση στις πρωτογενείς βλαστικές στιβάδες του αναπτυσσόμενου εμβρύου.

Από το τροφεκτόδερμα και την ΕΚΜ μπορούν να απομονωθούν *in vitro* τα τροφοβλαστικά (TSCs) και τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs) αντιστοίχως, ενώ από την επιβλάστη προκύπτουν τα εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα (ECCs). Αργότερα, κατά τη γαστριδίωση και το σχηματισμό του μεσοδέρματος μεταξύ εξωδέρματος και ενδοδέρματος, εμφανίζονται τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (PGCs), από τα οποία μπορούν να απομονωθούν *in vitro* τα εμβρυϊκά γεννητικά κύτταρα (EGCs), ενώ από τους όρχεις του νεογνού προκύπτουν τα βλαστικά κύτταρα που θα δώσουν τη γαμετική σειρά (GSCs) (Boiani and Scholer, 2005).



**Εικ.3.** Η προέλευση των βλαστικών κυττάρων σε έμβryo θηλαστικών

### **1.3 Παράγοντες απαραίτητοι για την διατήρηση της αυτό-ανανέωσης και πολυδυναμικότητας των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων.**

Η ανάπτυξη των θηλαστικών απαιτεί την εξειδίκευση περισσότερων από 200 κυτταρικών τύπων, από ένα μοναδικό ολοδύναμο κύτταρο. Είναι λοιπόν βασικής σημασίας η έρευνα και η μελέτη των μονοπατιών και των παραγόντων που ευθύνονται και ρυθμίζουν την πολυδυναμία των εμβρυικών βλαστοκυττάρων, αφού παρουσιάζουν ταυτόχρονα αναπτυξιακό ενδιαφέρον, που έγκειται στην κατανόηση των γεγονότων που συμβαίνουν κατά την πορεία της ανάπτυξης των θηλαστικών αλλά και ιατρικό ενδιαφέρον, αφού υπάρχει η προοπτική να χρησιμοποιήσουμε τις ιδιότητες τους για την δημιουργία νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, που θα βοηθούσαν στην αποτελεσματική αντιμετώπιση πολύ σοβαρών γενετικών ασθενειών.

Εξωτερικά σηματοδοτικά μονοπάτια και δεύτερα μηνύματα ρυθμίζουν τους κυριότερους ενδογενείς ρυθμιστές των κυττάρων αυτών, όπως είναι ο Oct4, ο Nanog και ο Sox2 σε ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλοεπηρεαζόμενων παραγόντων στο αναπτυξιακό αυτό κύκλωμα. Η κατανόηση του τρόπου δράσης των εξωτερικών και των εσωτερικών παραγόντων που καθορίζουν τις ιδιότητες των κυττάρων αυτών, θα μας βοηθήσουν στην κατανόηση και του ρόλου των γονιδίων στόχων τους και τελικά στην εύρεση όλων των παραγόντων που είναι σημαντικοί για την διατήρηση των ιδιοτήτων των εμβρυικών βλαστοκυττάρων.

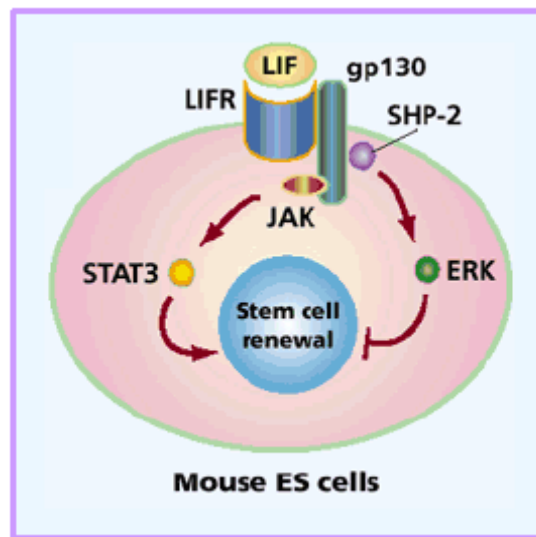
### **1.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια που καθορίζουν την αυτό-ανανέωση ή τη διαφοροποίηση.**

#### **1.4.1 Η σηματοδοτική ακολουθία του LIF μονοπατιού.**

Ένα μόριο κλειδί που ανήκει στην οικογένεια IL-6 των κυτοκινών είναι η πρωτεΐνη LIF (Leukemia inhibitory factor), η οποία είναι απαραίτητη για να διατηρηθούν τα mESCs στην αδιαφοροποίητη κατάσταση. Η πρωτεΐνη LIF ενεργοποιεί το μονοπάτι Jak/Stat3 και αναστέλλει την κυτταρική διαφοροποίηση προς μεσοδερμικά και ενδοδερμικά κύτταρα. Το σηματοδοτικό μονοπάτι, παρουσία LIF ξεκινά με το διμερισμό των υποδοχέων κυτοκίνης, LIFR και gp130 που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης

Jak (Burdon et al., 1999; Bouton et al., 1994; Zhang et al., 1997) (Εικ. 7). Πειράματα έδειξαν ότι ο υποδοχέας LIFR δεν είναι επαρκής στη μετάδοση του σήματος για την αυτό-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων, ενώ ο gp130 είναι (Starr et al., 1997; Niwa et al., 1998). Η κινάση Jak με την σειρά της φωσφορυλιώνει τους δύο υποδοχείς στα κατάλοιπα τυροσίνης, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται στον gp130 θέσεις πρόσδεσης για πρωτεΐνες που φέρουν Src-homology-2 (SH2) επικράτειες, όπως ο STAT3. Ακολουθεί διμερισμός του STAT3 και μετατόπιση του στον πυρήνα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. *In vitro*, ενεργοποίηση του STAT3, απουσία LIF είναι επαρκής για την αυτό-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων.

Στη συνέχεια, ενεργοποιείται μέσω του LIF και ένα δεύτερο κύριο μονοπάτι ενδοκυττάριας σηματοδότησης, το μονοπάτι Shp2/Erk (Εικ. 7). Το μονοπάτι αυτό ανταγωνίζεται μερικώς την αυτό-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων, εξαιτίας κυρίως της αρνητικής παλίνδρομης δράσης που ασκεί στην ενεργότητα του JAK. Έτσι μία ισορροπία της ενεργότητας μεταξύ Stat3, ERK1/2 και MAPKs ίσως καθορίζει την αποτελεσματικότητα της αυτό-ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων (Qi et al., 2004).



**Εικ.4.** Η πρωτεΐνη LIF και τα σηματοδοτικά μονοπάτια Jak/Stat3 και Shp2/Erk.

Πρόσφατα πειράματα, για την εύρεση μεταγραφικών στόχων του μονοπατιού LIF/Stat3, έδειξαν αύξηση της έκφρασης του γονιδίου Lefty1 κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Η εκκρινόμενη πρωτεΐνη Lefty1, της υπερικογένειας TGF-β, είναι ανταγωνιστής της σηματοδότησης μέσω Nodal,

εμπλέκεται στον ανταγωνισμό του TGF-β1, της BMP σηματοδότησης και του μονοπατιού Wnt και ενεργοποιεί το μονοπάτι MAPK. Επίσης, ο παράγοντας Nodal επηρεάζεται αρνητικά κατά τη νευρική διαφοροποίηση των ESCs. Έτσι, πιστεύεται ότι ο παράγοντας Stat3 συνεισφέρει στη διατήρηση μίας άριστης TGF-β/activin/nodal σηματοδότησης στα αδιαφοροποίητα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα

Ωστόσο, το LIF δεν είναι ικανό να αναστείλει την κυτταρική διαφοροποίηση υπό την απουσία ορού. Ο Ying et al. προσδιόρισαν στον ορό την παρουσία πρωτεϊνών της υπερικογένειας TGF-β, όπως μέλη των οικογενειών BMP (bone morphogenic protein) και GDF (growth and differentiation factor), οι οποίες μαζί με το LIF δρουν για να εξασφαλίσουν την διατήρηση της αυτό-ανανέωσης.

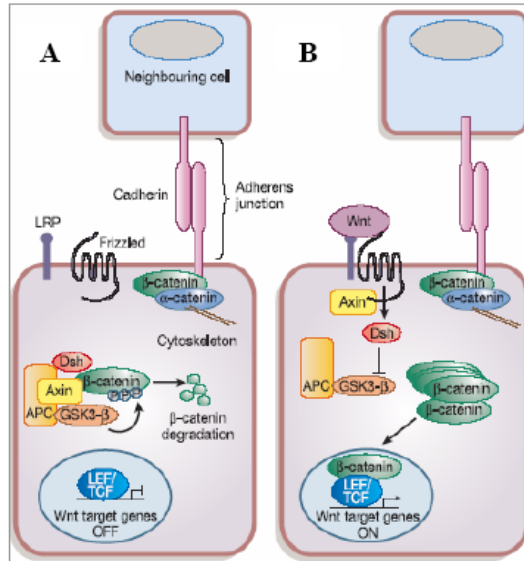
#### 1.4.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι BMP4.

Ομοίως με το LIF το BMP4 θεωρείται ένα μόριο κλειδί που η δράση του έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της διαφοροποίησης προς νευρικά κύτταρα. Παρουσία LIF το BMP4 συμβάλει στο μονοπάτι αυτό προωθώντας την αυτό-ανανέωση και την πολυδυναμία των ESCs με την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα SMAD4, ο οποίος στη συνέχεια επάγει την έκφραση των γονιδίων ID (Inhibitor of Differentiation). Αντιθέτως απουσία του LIF η BMP4 εμποδίζει την ενεργοποίηση του μονοπατιού του LIF, αλληλεπιδρώντας με διαφορετικούς SMAD μεταγραφικούς παράγοντες (SMAD 5 και 8), οι οποίοι έχουν κατασταλτική δράση στη μεταγραφή των ID γονιδίων. Οι πρωτεΐνες BMP είναι επίσης στόχοι ενός άλλου σηματοδοτικού μονοπατιού το οποίο ξεκινάει με τη πρόσδεση του WNT στον υποδοχέα του.

#### 1.4.3 Το σηματοδοτικό μονοπάτι WNT

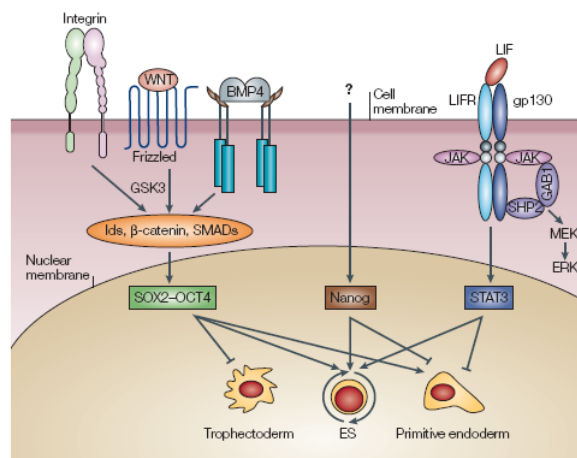
Οι πρωτεΐνες WNT είναι εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες που παρουσιάζουν ένα ευρύ τρόπο δράσης κατά τη διαφοροποίηση πολλών ιστών και την οργανογένεση. Όσον αφορά τον τρόπο λειτουργίας του μονοπατιού αυτού, απουσία σηματοδότησης μέσω Wnt, η β-catenin είναι προσδεμένη σε ένα σύμπλοκο μαζί με τους παράγοντες axin, APC και GSK3-β, όπου φωσφορυλιώνεται και οδηγείται προς αποικοδόμηση. Η β-catenin υπάρχει επίσης και σε δεσμούς καντερίνης, ρυθμίζοντας έτσι την κυτταρική προσκόλληση (Εικ. 8Α). Παρουσία όμως Wnt σηματοδότησης, και αφού η τελευταία

προσδεθεί στον υποδοχέα της Frizzled καταστέλει την GSK3-β και κατά συνέπεια συσσωρεύεται ελεύθερη β-catenin, η οποία και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου προσδένεται σε Lef/Tcf μεταγραφικούς παράγοντες, ενεργοποιώντας έτσι γονίδια στόχους.



**Εικ.5.** Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt. A) Απουσία Wnt, B) Παρουσία Wnt.

Η ενεργοποίηση του WNT μονοπατιού με τον φαρμακολογικό αναστολέα BIO είναι επαρκής για την διατήρηση της πολυδυναμικότητας και της αυτό-ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων του ανθρώπου και των τρωκτικών και ενισχύει την έκφραση των ειδικών μεταγραφικών παραγόντων που ευθύνονται για την πολυδυναμία τους όπως ο OCT4, ο NANOG και ο REX1 απουσία LIF/Wnt σηματοδότησης.



**Εικ.6.** Συνδυασμένη δράση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ευθύνονται για την διατήρηση της πολυδυναμίας των mESCs.



### 1.5 Ο μεταγραφικός παράγοντας Oct4.

Ο Oct4 (octamer binding protein 4), που προσδένεται στο οκταμερές ATGCAAAT, είναι μέλος της οικογένειας POU, κωδικοποιείται από το *Pou5f1* και είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος εκφράζεται από όλα τα πολυδύναμα κύτταρα. Η έκφρασή του παρατηρείται στο ωοκύτταρο, στα πρώτα στάδια της αυλάκωσης, στην EKM (ICM) της βλαστοκύστης, στο αρχέγονο εξώδερμα κατά το μεταεμφυτευτικό στάδιο και στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα. Επίσης, όταν ο Oct4 αφαιρεθεί από τα κύτταρα, αυτά διαφοροποιούνται προς κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος, ενώ κατά την διαφοροποίηση τα επίπεδα έκφρασής του πέφτουν. Τα γεγονότα αυτά αποδεικνύουν ότι ο Oct4 είναι συνεχώς απαραίτητος προκειμένου να διατηρηθεί η πολυδυναμικότητα των βλαστικών κυττάρων. Ωστόσο, υπερέκφραση του Oct4 πάνω από τα φυσιολογικά ενδογενή επίπεδα στα ESC οδηγεί στη διαφοροποίηση προς εξωεμβρυικό ενδοδερμα. Αυτά τα διαφορετικά αποτελέσματα της δράσης του Oct4 καταδεικνύουν ο τι ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που ελέγχουν διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες και η ποσότητα της πρωτεΐνης αυτής είναι καθοριστικής σημασίας για την μοίρα των κυττάρων.

### 1.6 Ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2.

Ο Sox2, ένας μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων που περιέχουν μια περιοχή HMG πρόσδεσης στο DNA. Ο Sox2 δημιουργεί σύμπλοκο με τον Oct4 ή τον πιο άφθονο Oct1, στον υποκινητή του *Fgf4*. Η σχέση αυτή υποδεικνύει ότι ο Sox2 να συμμετέχει στη ρύθμιση της ICM και των κυττάρων που προκύπτουν από αυτήν. Ο Sox2 εκτός από τα ESCs εκφράζεται και στα νευρικά βλαστικά κύτταρα. Από πειράματα που στοχεύουν στην απενεργοποίηση του έδειξαν ότι καταστολή της έκφρασης του οδηγεί σε ελαττωματικό εξώδερμα.

Οι δυο πρωτεΐνες Oct4 και Sox2 συνεργάζονται για να ενεργοποιήσουν την μεταγραφή αρκετών γονιδίων των οποίων οι υποκινητές έχει αποδειχθεί πως έχουν θέσεις πρόσδεσης γι' αυτές. Ένα τέτοιο γονίδιο είναι και αυτό του μεταγραφικού παράγοντα Nanog.

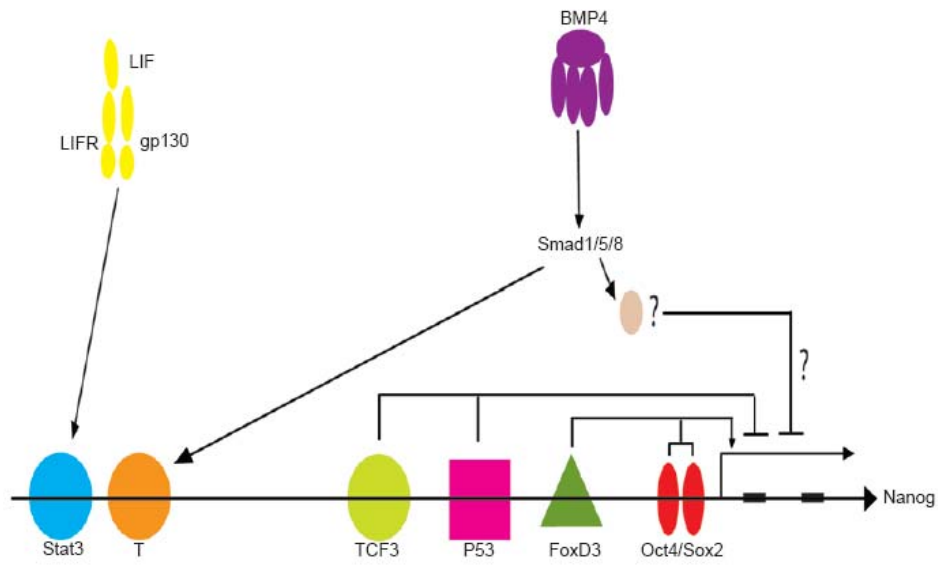
### 1.7 Ο μεταγραφικός παράγοντας Nanog.

Ο μεταγραφικός παράγοντας ο Nanog είναι ένα homeobox γονίδιο, και η έκφραση του είναι απαραίτητη για την διατήρηση των ιδιοτήτων των βλαστικών κυττάρων της αυτό-ανανέωσης και της πολυδυναμίας ακόμη και απουσία του LIF. Αρχικά ονομάστηκε *Enk* (early embryo specific expression NK family gene), αλλά αργότερα μετονομάστηκε σε *Nanog* από το μυθικό κέλτικο νησί της παντοτινής νεότητας «Tir nan Og».

Η έκφρασή του είναι ανύπαρκτη στο αγονιμοποίητο ωοκύτταρο και μέχρι το στάδιο των 2 και 8 κυττάρων. Έτσι, μετάγραφα του *Nanog* ανιχνεύονται για πρώτη φορά στο στάδιο του μοριδίου, υψηλά επίπεδα συναντώνται στο στάδιο της βλαστοκύστης, που περιορίζονται στο ICM, και εξαφανίζονται στο τροφοεκτόδερμα, ενώ μια πτώση των επιπέδων παρατηρείται πριν το στάδιο της εμφυτεύσεως του εμβρύου. Η συνεχής του έκφραση αναστέλλει την διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων, ενώ υπερέκφραση του υποκαθιστά την αναγκαιότητα των LIF και BMP, χωρίς να επηρεάζει την δράση του Stat3, που σημαίνει ότι δρα ανεξάρτητα του μονοπατιού LIF/Stat3. Ο Nanog δεν δρα μόνο ως καταστολέας γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη διαφοροποίηση, αλλά και ως επαγωγέας της έκφρασης γονιδίων ειδικών για τη διατήρηση των ιδιοτήτων των ESCs.

Παράγοντες που προωθούν τη μεταγραφή του Nanog είναι εκτός του Oct4 και Sox2, ο FoxD3 που ενώ αρχικά ήταν ένας γνωστός μεταγραφικός καταστολέας για τον Nanog είναι ενεργοποιητής.

Επίσης στον υποκινητή του *Nanog* υπάρχουν δύο θέσεις πρόσδεσης για την p53, μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που έχει την ικανότητα να εμποδίζει τον άσκοπο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο ή εγείροντας την απόπτωση. Η p53, προσδέεται στον υποκινητή του *Nanog*, καταστέλλοντας τη μεταγραφή και οδηγώντας τα βλαστικά κύτταρα προς διαφοροποίηση. Οι δύο θέσεις πρόσδεσης της p53 στον υποκινητή του *Nanog* αναφέρονται ως RE1 και RE2 και χαρτογραφούνται στις περιοχές -871/-849 και -611/-585 αντίστοιχα. Ωστόσο, τα ESCs με μεταλλαγμένη p53 εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα του Nanog και διαφοροποιούνται, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή επιπρόσθετων παραγόντων.



Εικ.7. Η ρύθμιση της έκφρασης του Nanog.

### 1.8 Το δίκτυο των σημαντικότερων μεταγραφικών παραγόντων που ευθύνονται για την πολυδυναμία των ESCs.

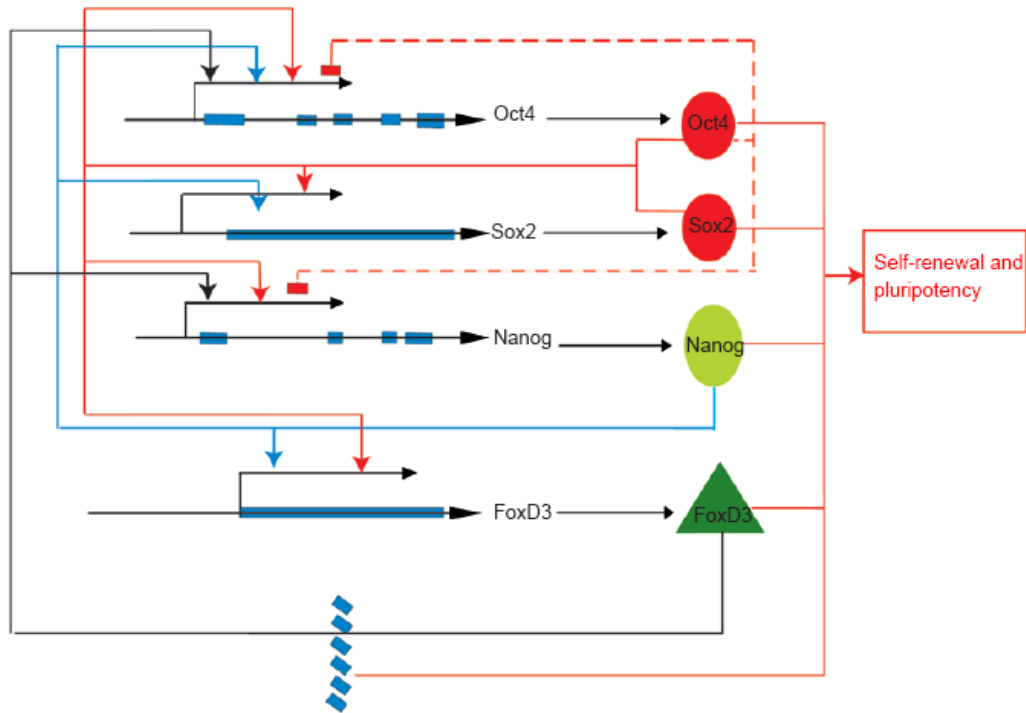
Μέχρι σήμερα πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες έχουν αναγνωρισθεί ως απαραίτητοι για τη διατήρηση της πολυδυναμίας και της αυτό-ανανέωσης των ESCs, συμπεριλαμβανομένων και των Nanog, Oct4 και Sox2. Το 50% των γονιδίων στα οποία προσδέεται ο Oct4 έχει βρεθεί ότι προσδέουν και τον Sox2. Επίσης περισσότερο από το 90% των υποκινητών που προσδέουν τους Oct4 και Sox2 προσδέουν και τον Nanog. Συνολικά 352 γονίδια είναι γνωστό ότι προσδέουν ταυτόχρονα και τους τρεις παράγοντες στα αδιαφοροποίητα ανθρώπινα ESCs.

Συνάμα οι τρεις αυτοί παράγοντες καθορίζουν και τη μεταγραφή του ίδιου τους του γονιδίου.

Ο Oct4 διατηρεί τα επίπεδα του Nanog με την απευθείας πρόσδεση του στο υποκινητή του τελευταίου αλλά τον καταστέλλει όταν τα επίπεδα του πρώτου αυξηθούν πάνω από το κανονικό, ομοίως όμως καταστέλλει και τη δική του έκφραση. Επίσης ο FoxD3 ρυθμίζει θετικά τον Nanog αντισταθμίζοντας την κατασταλτική δράση του Oct4.

Γενικότερα, οι τρεις σημαντικότεροι παράγοντες, Nanog, Oct4 και Sox2, συνεισφέρουν μαζί στη διατήρηση της πολυδυναμικότητας και της αυτό-ανανέωσης,

ενεργοποιώντας τα δικά τους γονίδια μέσω ενός αλληλοσυνδεόμενου αυτορυθμιστικού κυκλώματος. Προφανώς η ενεργότητα αυτών των τριών μεταγραφικών παραγόντων κλειδιών ελέγχεται επιπλέον από πρόσθετους συμπαράγοντες, από τα ακριβή επίπεδα των ίδιων και από μετα-μεταφαστικές τροποποιήσεις



**Εικ.8.** Το δίκτυο ρύθμισης της έκφρασης των σημαντικότερων παραγόντων που διατηρούν τα ESCs σε αδιαφοροποίητη κατάσταση.

### 1.9 Ο μεταγραφικός παράγοντας Sall1.

Το γονίδιο Sall1, ανήκει στην οικογένεια των spalt (sal) like γονιδίων. Το προϊόν του γονιδίου αυτού είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που περιέχει πολλά δάκτυλα ψευδαργύρου. Μεταλλαγές στο ανθρώπινο γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16q12.1, ευθύνονται για το σύνδρομο Townes-Brocks. Ο μεταγραφικός παράγοντας Sall1 δρα ως ισχυρός καταστολέας της μεταγραφής πολλών γονιδίων στα κύτταρα των θηλαστικών. Επίσης το Sall1 έχει βρεθεί ότι έχει δράση συν καταστολέα μαζί με το σύμπλοκο NuRD, ένα σύμπλοκο μεταγραφικών καταστολέων που περιλαμβάνει

απακετυλάσες ιστονών και παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (Yamashita et.al.)

Λίγα είναι γνωστά για τα γονίδια στόχους του Sall1. Στο ποντίκι έχει δειχθεί ότι ο Sall1 ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω του WNT καθώς και αλληλεπίδραση του με τη β-κατενίνη.

### **1.10 Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrobl.**

Το γονίδιο Nrobl ή αλλιώς Dax1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων. Η έκφραση του γονιδίου σε συγκεκριμένες δόσεις είναι πολύ σημαντική για την ανθρώπινη φυσιολογική ανάπτυξη. Ο Dax1 έχει ένα καλά καθορισμένο ρόλο στην στεροειδογένεση. Η πρωτεΐνη Dax1 παρουσιάζει ένα περιορισμένο πρότυπο έκφρασης σε ιστούς που εμπλέκονται άμεσα με την στεροειδογένεση και αναπαραγωγική λειτουργία, όπως φλοιό των επινεφριδίων, μήτρα, ωοθήκη και υπόφυση.

Πρόσφατη έρευνα αποδεικνύει ότι το πρότυπο αυτό έκφρασης αλληλεπικαλύπτεται με αυτό του υποδοχέα Nur77, πράγμα που σημαίνει ότι αυτοί οι υποδοχείς συνεργάζονται στους ιστούς αυτούς. Ο Song et al., υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη Dax1 είναι ένας μεταγραφικός συν-ρυθμιστής της ενεργοποίησης του Nur77 και συγκεκριμένα καταστέλλει την ενεργοποίησή του, μέσω της πρόσδεσής του στον συν-ενεργοποιητή του Nur77, SRC-1 (Song et al., 2004).

Επίσης οι Niakan και McCabe, έδειξαν χρησιμοποιώντας siRNA ότι το Dax1 έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της αυτό-ανανέωση και τη διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των ESCs, καθώς επίσης ότι καταστολή του Nr0b1 οδηγεί στη ενεργοποίηση γονιδίων, που οδηγούν σε διαφοροποίηση προς ενδόδερμα.

### **1.11 Σκοπός**

Από προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, ανάμεσα στα γονίδια που καταστέλλονται βρίσκονται και οι μεταγραφικοί παράγοντες Sall1 και Nr0b1. Η ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων έκφρασης των δύο αυτών παραγόντων και των 3 σημαντικότερων μεταγραφικών

παραγόντων, που ευθύνονται για τη διατήρηση της αυτό-ανανέωσης και της πολυδυναμικότητας των ESCs, Nanog, Sox2 και Oct4, αποτέλεσε το έναυσμα για τη διερεύνηση τυχόν σχέσεων και αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραπάνω παραγόντων.

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη του πιθανού ρόλου των μεταγραφικών παραγόντων Sall1 και Nr0b1 στην αυτό-ανανέωση και την πολυδυναμία των mESCs. Για το σκοπό αυτό επιχειρήθηκε η μελέτη των πιθανών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων τους με άλλες πολύ καλά μελετημένες και σημαντικές για τις προαναφερθείσες ιδιότητες των mESCs πρωτεΐνες, όπως είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες Nanog, Oct4 και Sox2.

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>

### Υλικά και μέθοδοι

#### Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα CGR8 και COS. Η CGR8 προήλθε από την εσωτερική μάζα κυττάρων ενός αρσενικού 3.5 ημερών εμβρύου ποντικού της σειράς 129 που βρισκόταν στο στάδιο της βλαστοκύστης και είναι εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, ενώ τα COS είναι επιθηλιακά κύτταρα πιθήκου.

#### Βακτηριακές σειρές

Για τις κλωνοποιήσεις, την κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA και την παραγωγή πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη DH5a και BL21 του βακτηρίου E.Coli.

#### Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας βακτηρίων και ευκαρυωτικών κυττάρων.

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των βακτηρίων είναι το LB το οποίο περιείχε 1% Bactotryptone, 0,5% yeast extract, 1% NaCl. Για τις στερεές καλλιέργειες χρησιμοποιείται επιπλέον 1,5% άγαρ.

Για τη δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων DH5a και BL21 χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό Psi broth το οποίο περιείχε 0,5% Bacto yeast extract, 2% Bacto tryptone, 0,5% MgSO<sub>4</sub>. Το pH του ρυθμίζονταν στο 7,6 με KOH.

Για την καλλιέργεια των εμβρυικών βλαστικών κυττάρων της κυτταρικής σειράς CGR8 το θρεπτικό υλικό περιείχε την εξής σύσταση: GMEM (45 ml), LIF (1000units), β-Mercaptoethanol 0,1M (25μl), L-glutamine (2mM), 10% FBS .

#### Αντισώματα.

anti Sall1: Santa Cruz biotechnology, rabbit, 1:500

anti GFP : Το αντίσωμα αυτό καθαρίστηκε και απομονώθηκε από ορό κουνελιού, rabbit, 1: 30000

anti His : Santa Cruz biotechnology, rabbit, 1:500.  
anti Nanog: Chemicon International, rabbit, 1:500.  
anti Oct4 : Santa Cruz biotechnology, rabbit, 1:500

- **Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι:

- TBE (5x)

Tris(Hydroxymethyl)-aminomethane 108gr, Boric acid 55gr, EDTA (Titriplex) 7,42gr, H<sub>2</sub>O μέχρι 2 lt.

- Running buffer (1lt)

1x T.B.E

- Loading Buffer 6x

30% Glycerol

0,25% Orange G Η τελική συγκέντρωση του Loading buffer στο διάλυμα που φορτώνεται είναι 1x.

- **Δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης.**

Για τη δημιουργία 1% πηκτώματος αγαρόζης βάζαμε 120 ml νερό με 50xTBE (δηλαδή στα 1000 ml νερό βάζαμε 20 ml TBE) και σε αυτό διαλύαμε 1,2 gr αγαρόζης και το ζεσταίναμε μέχρι βρασμού. Στη συνέχεια και αφού πρώτα κρυώναμε το παραπάνω διάλυμα προσθέταμε βρωμιούχο αιθίδιο 2 λ το οποίο δεσμεύεται στις βάσεις του DNA για να μπορούμε να δούμε τα δείγματα που θα ηλεκτροφορηθούν σε αυτό με την βοήθεια της υπεριώδους ακτινοβολίας.

- **Εξαγωγή DNA από πηκτώματος αγαρόζης (Gel extraction).**

Κόβουμε με μία λεπίδα το κομμάτι της πηκτής αγαρόζης που περιέχει το κομμάτι DNA που μας ενδιαφέρει και έπειτα εφαρμόζεται το πρωτόκολλο της εταιρείας NucoleSpin<sup>®</sup> Extract II .



- **Πέψη και συγκόλληση τμημάτων DNA (Digest, Ligation)**

Για τη δημιουργία ενός ανασυνδιασμένου πλασμιδίου, απαιτείται ένας πλασμιδιακός φορέας και το τμήμα DNA-ένθεμα που πρόκειται να εισαχθεί στο πλασμίδιο, των οποίων οι αλληλουχίες είναι γνωστές. Ο φορέας είναι απαραίτητο να διαθέτει αρχή (origin) έναρξης της μεταγραφής του, ένα γονίδιο-μάρτυρα ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό και έναν πολυσύνδετη (polylinker), δηλαδή ένα τμήμα στην αλληλουχία του με το ένθεμα που προκειμένου να ενωθούν πρέπει να κοπούν με τα κατάλληλα ένζυμα.

Τα περιοριστικά ένζυμα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες παλίνδρομες αλληλουχίες στο δίκλωνο μόριο του (DNA) 4-6 νουκλεοτιδίων βάσεων και τις κόβουν αφήνοντας είτε προεξέχοντα (cohesive), είτε τυφλά (blunt) άκρα. Τα ένζυμα αυτά για να δράσουν απαιτούν συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, συγκέντρωσης αλάτων και άλλων συστατικών και η καλύτερη διάρκεια κάθε πέψης θεωρείται η 1,5 h. Γι' αυτό τα ένζυμα συνοδεύονται πάντα και από το κατάλληλο για την ενεργότητά τους διάλυμα (buffer). Η ενεργότητα των περιοριστικών ενζύμων, μετριέται σε μονάδες (units) όπου: 1 unit είναι η απαιτούμενη ποσότητα ενζύμου για την πέψη 1μg DNA από τον φάγο λ σε μία ώρα.

Η συγκόλληση πραγματοποιείται με τη βοήθεια της δράσης του ενζύμου λιγάσης (T4 DNA ligase της Minotech), που ενώνει τα δίκλινα μόρια DNA με κατανάλωση ATP, για τη δημιουργία των φωσφοδιεστερικών δεσμών. Η ποσότητα της λιγάσης που χρησιμοποιείται για κάθε τέτοια αντίδραση είναι 10 units/ml. Για να είναι επιτυχημένη η συγκόλληση τα μόρια του ενθέματος στο διάλυμα, θα πρέπει να είναι 10 ή και 20 φορές περισσότερα από αυτά του φορέα που χρησιμοποιούμε.

Όλα τα ένζυμα και τα αντίστοιχα διαλύματα τους προέρχονταν από τις εταιρείες Minotech ή Biolabs.

- **Μετασηματισμός δεκτικών βακτηρίων. (Transformation)**

Από την αντίδραση της συγκόλλησης (ligation) προκύπτουν κάποιες πλασμιδιακές κατασκευές (constructs) που περιέχουν τα επιθυμητά τμήματα DNA. Οι κατασκευές αυτές για να πολλαπλασιαστούν πρέπει να εισαχθούν σε βακτήρια. Για να επιτευχθεί αυτό, ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Προσθήκη της ligation στα επιδεκτικά κύτταρα και αναμονή 30 min στον πάγο, 1min 42<sup>o</sup> C (θερμικό σοκ), 2min ξανά στον πάγο, προσθήκη 900 μl θρεπτικό υλικό (LB), επώαση στους 37<sup>o</sup> C για 45 λεπτά φυγοκέντρωση στις 14000rpm για 30sec, αφαιρείται μικρή ποσότητα θρεπτικού υλικού, άπλωμα σε τρυβλίο με κατάλληλο αντιβιοτικό και επώαση στους 37<sup>o</sup> C όλη νύχτα για να μεγαλώσουν οι αποικίες. Για φορείς κλωνοποίησης που περιέχουν το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (lacZ) απλώνουμε επιπλέον στο τρυβλίο το υπόστρωμα x-gal για την επιλογή μπλε και άσπρων αποικιών.

- **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες μετασχηματισμένων βακτηρίων**

Μεγάλης κλίμακας απομόνωση και καθαρισμού πλασμιδιακού DNA (maxi preps).

Οι πελλέτες των κυττάρων από ολονύκτιες καλλιέργειες επαναδιαλύονται σε συγκεκριμένο όγκο διαλύματος I που περιείχε 50mM γλυκόζη, 25mM Tris pH 8 και 10mM EDTA. Στη συνέχεια προστίθενται δύο όγκοι διαλύματος II (διάλυμα λύσης) που περιείχε 0,2N NaOH και 1% SDS και επωάζονται για 5 λεπτά. Έπειτα προστίθεται και 1,5 όγκος διαλύματος III (διάλυμα εξουδετέρωσης) που 3M οξικό κάλιο και 11,5% οξικό οξύ.

Ο τρόπος απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA διαφέρει ανάλογα με το σκοπό για τον οποίο αυτό προορίζεται. Όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί απλά για μια διαγνωστική πέψη ή σαν ενδιάμεσο βήμα πολλαπλασιασμού σε κάποια κλωνοποίηση, γίνεται απλά κατακρήμνιση με αιθανόλη και καθαρισμός με φαινόλη. Όταν όμως το DNA αυτό πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων γίνεται καθαρισμός με κολώνα σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Macherey-Nagel.

Μικρής κλίμακας απομόνωση και καθαρισμού πλασμιδιακού DNA (mini preps).

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αρχή της αλκαλικής λύσης. Η προετοιμασία για τα mini preps απαιτεί τα εξής :

- παίρνουμε το θρεπτικό LB και βάζουμε σε αυτό αμπικιλίνη με τελική συγκέντρωση 100μg/ml και ανακατεύουμε.

- Έπειτα σε αποστειρωμένα σωληνάκια βάζουμε 2 ml από το θρεπτικό LB με την αμπικιλίνη στο καθένα.
- Τέλος, με ένα αποστειρωμένο tip παίρνουμε από το τρυβλίο, στο οποίο έχει γίνει η επιλογή για ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη μετά την ligation, από μία αποικία και το τοποθετούμε στο κάθε ένα σωλήνα.

Αφού τα αφήσουμε για επώαση όλη την νύκτα στη συνέχεια από κάθε σωληνάκι βακτηριακής καλλιέργειας που προέκυψε μεταφέρουμε σε ένα erpendorf 1,5 ml από αυτή και φυγοκεντρώνται για 15'' (short). Έπειτα πετάμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 100  $\mu$ l Buffer E1 για να επαναδιαλυθούν τα κύτταρα (κάνουμε vortex). Στη συνέχεια προσθέτουμε 100  $\mu$ l Buffer E2 το οποίο περιέχει SDS και NaOH. Το SDS διαλύει την δουλπιδική στοιβάδα και τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της κυτταρικής μεμβράνης αφήνοντας το εσωτερικό του κυττάρου να απελευθερωθεί στο διάλυμα. Το NaOH αποδιατάσει το χρωμοσωμικό και το πλασμιδιακό DNA καθώς και τις πρωτεΐνες, αφού αυξάνει το pH. Αφού ανακινήσουμε τα tubes ελαφρά προσθέτουμε 100  $\mu$ l Buffer E3 το οποίο επαναφέρει το pH σε ουδέτερο μια και περιέχει οξικό κάλιο. Ανακινούμε ελαφρά και πάλι και έπειτα φυγοκεντρούμε στους 25°C full speed (14000 rpm/min) και παίρνουμε το υπερκείμενο υγρό στο οποίο υπάρχουν τα πλασμίδια και το μεταφέρουμε σε νέα tubes. (Το πλασμιδιακό DNA μαζί με της αποδιαταγμένες πρωτεΐνες και τα λιπίδια πέφτει ως συμπλόκο. Το SDS κατακρημνίζεται επίσης μια και μετά την εξουδετέρωση αυξάνεται η συγκέντρωση του αλατιού.) Στη συνέχεια προσθέτουμε 2,5  $\mu$ l 100% αιθανόλης για να κατακρημνιστεί το DNA και φυγοκεντρώνται ξανά στους 4°C για 20'. Τέλος πετάμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε με 200  $\mu$ l 70% αιθανόλης και βάζουμε 50  $\mu$ l νερό και είμαστε έτοιμοι να συνεχίσουμε με πέψεις να χρειάζεται, πριν τα τρέξουμε σε πήκτωμα αγαρόζης για να δούμε τα αποτελέσματα μας.

- **Δημιουργία αποθέματος γλυκερόλης.  
(Glycerol stock)**

Αφού πάρουμε τους κλώνους που μας ενδιαφέρουν, μπορούμε να τους διατηρήσουμε για μεγάλα χρονικά διαστήματα υπό μορφή. Για να φτιάξουμε ένα τέτοιο απόθεμα, ακολουθούμε την εξής διαδικασία: Βάζουμε μέρος από την καλλιέργεια του κλώνου που θέλουμε να διατηρήσουμε, προσθέτουμε 87% γλυκερόλη αποστειρωμένη έτσι ώστε η

συγκέντρωση της γλυκερόλης στον τελικό όγκο να είναι 25% και τέλος αναμιγνύουμε και φυλάσσουμε το απόθεμα στους  $-80\text{ C}^{\circ}$ .

- **Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων (Transient transfection)**

Η εισαγωγή πλασμιδιακού DNA στα CGR8 κύτταρα εξασφαλίζεται με τη μέθοδο διαμόλυνσης με τη χρήση *λιποφεκταμίνης*. Στο DNA κάθε δείγματος (σύνολο 1,5μg για 24άρα plate) προστίθεται optimem (ρυθμιστικό διάλυμα της λιποφεκταμίνης) μέχρι τελικό όγκο 25μl. Ακολουθεί δημιουργία μίγματος για όλα τα δείγματα με λιποφεκταμίνη και optimem σε αναλογία 1:25. Τέλος, ακολουθεί ανάμιξη των δύο μιγμάτων, αναμονή για 20 λεπτά και προσθήκη του συνολικού διαλύματος των 50μl στα κύτταρα.

Σε ότι αφορά τα COS η αποδοτικότερη διαμόλυνση των κυττάρων αυτών επιτυγχάνεται με τη χρήση *φωσφορικών*. Προετοιμασία δείγματος DNA-φωσφορικών: Το μίγμα πρέπει να έχει το 1/10 του όγκου της καλλιέργειας. Έτσι, για 0,5ml καλλιέργειας (πηγαδάκι 24άρας plate) φτιάχνουμε 50μl μίγματος. Οι ποσότητες που αναφέρονται παρακάτω είναι για 50μl μίγματος:

~ 2,5μg DNA

2,5μl  $\text{CaCl}_2$  2,5M (τελική συγκέντρωση 0,25M)

$\text{H}_2\text{O}$  μέχρι τα 25μl

25μl 2x HeBS (τελική συγκέντρωση 1x)

Το μίγμα του DNA με τα φωσφορικά ιόντα πρέπει να μείνει 20min σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα προστίθεται στην καλλιέργεια η οποία τοποθετείται κατόπιν στους  $37^{\circ}\text{C}$ .

Την επόμενη μέρα (μετά από 16 περίπου ώρες), αφαιρούμε το θρεπτικό και τα πλένουμε 2 φορές με PBS για να φύγει το ίζημα του ασβεστίου που δημιουργείται και έπειτα προσθέτομε ξανά την ίδια ποσότητα θρεπτικό για να αναπτυχθούν περαιτέρω.

- **Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ευκαρυωτικά κύτταρα (Protein extraction)**

Η απομόνωση των συνολικών πρωτεϊνών από τα κύτταρα πραγματοποιείται με τη χρήση του διαλύματος EBC. Έτσι επαναδιαλύουμε την πελλέτα των κυττάρων τα οποία είχαν πλυθεί με 1ml PBS σε 50μl EBC. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 10 λεπτά στους 4°C για κατακρήμνιση των μεμβρανών.

EBC buffer: 50mM Tris pH 8, 170mM NaCl, 0,5% NP40, 50mM NaF, 1mM PMSF (αναστολέας πρωτεασών, ανθεκτικό μόνο για 30 λεπτά στο EBC).

- **Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.**

Οι πηκτές ακρυλαμίδης αποτελούνται από δύο τύπους πηκτής: Το *running gel* που χρησιμεύει για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάση του μεγέθους και το *stacking gel* που χρησιμεύει για το πακετάρισμα του μείγματος των πρωτεϊνών.

- Running gel 10% (10ml)

H <sub>2</sub> O	4 ml
Acrylamide	3,3 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
20% SDS	50μl
APS	50μl
TEMED	20 μl

- Stacking gel (5ml)

H <sub>2</sub> O	3,4 ml
Acrylamide mix 30:0,8	0,830 ml
1,5M Tris (pH 6,8)	0,630ml
20% SDS	25μl
APS	25μl
TEMED	15 μl

Τα ammonium persulfate (APS) και TEMED είναι απαραίτητα για τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης. Όταν πήξει το gel το τοποθετούμε στη ειδική συσκευή που χρησιμοποιούμε για να φορτώσουμε τα δείγματα μας και να το τρέξουμε. Το πρωτεϊνικό τζέλ καλύπτεται από το running buffer

- 5x running buffer (1lt)

15,1 gr Tris

94 gr glycine

H<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 1lt

Τα δείγματα, προτού φορτωθούν και αφού τους έχουμε προσθέσει το κατάλληλο loading buffer (περιέχει γλυκερόλη, μερκαπτοαιθανόλη, Tris pH 6.8, χρωστική και SDS για σπάσιμο μεμβρανών), βράζονται για 5 λεπτά. Κατά την ηλεκτροφόρηση, η τάση μέχρι τα δείγματα να βγουν από το stacking gel είναι στα 100 volts, ενώ στη συνέχεια μπορούμε να αυξήσουμε την τάση μέχρι και 150 volts.

Το επόμενο βήμα είναι είτε η χρώση του gel με Coomassie για 20 περίπου λεπτά. Το gel ξεβάφεται με destaining buffer μέχρι να φανούν όλες οι πρωτεΐνες πάνω στο τζελ διαφορετικά ακολουθεί western blotting.

- Coomassie staining buffer (1lt)

Methanol 400ml

Acetic acid 100ml

Coomassie brilliant blue R250 2,5gr

H<sub>2</sub>O μέχρι 1lt

- Destaining buffer (1lt)

Methanol 400ml

Acetic acid 100ml

H<sub>2</sub>O 500 ml

- **Ανοσοαποτύπωση  
(Western blot)**

Μεταφορά των πρωτεϊνών από πρωτεϊνικό gel σε μεμβράνη PVDF.

Για να πραγματοποιηθεί το transfer, τοποθετούνται 3 χαρτιά Whatman κομμένα σε κατάλληλο μέγεθος Έπειτα, τοποθετείται η μεμβράνη και στη συνέχεια πάνω από αυτή το gel και προσέχουμε να μην υπάρχουν εγκλωβισμένες φυσαλίδες ανάμεσα τους. Τέλος πάνω από αυτά τοποθετούνται άλλα 3 χαρτιά Whatman. Με την χρήση ηλεκτρικού πεδίου, έτσι ώστε ο αρνητικός πόλος να είναι προς τη μεριά του gel και ο θετικός προς την μεμβράνη οι πρωτεΐνες αποτυπώνονται από το τζελ στη μεμβράνη. Η όλη διαδικασία γίνεται μέσα σε μια συσκευή που περιέχει transfer buffer όγκου 1lt. Για να πραγματοποιηθεί η μεταφορά αυτή απαιτείται ελάχιστος χρόνος 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή O/N στους 4°C.

Στη συνέχεια βγάζουμε τη μεμβράνη από τη συσκευή και τη βάζουμε με χρωστική ronseau ώστε να διευκρινιστεί αν πράγματι μεταφέρθηκαν οι πρωτεΐνες. Αν δεν έχουμε χρησιμοποιήσει prestained μάρτυρα σημειώνουμε τις ζώνες του μάρτυρα στο σημείο αυτό και ύστερα ξεβάζουμε ανακινώντας τη μεμβράνη σε νερό. Έπειτα ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με γάλα 5% διαλυμένο σε TBST για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος. Στη συνέχεια προσθέτουμε το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα για 1ώρα επίσης ακολουθούν 3 πλυσίματα των 10 λεπτών με TBST και προσθέτουμε το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα πάλι για μια ώρα. Ακολουθούν ξανά 3 πλυσίματα των 10 λεπτών με TBST και τέλος επώαζουμε τη μεμβράνη για 5 λεπτά με ECL για την ανίχνευση του σήματος με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας . Το σήμα ανιχνεύεται από ειδική κάμερα και απεικονίζεται στην οθόνη συνδεδεμένου υπολογιστή.

**Ρυθμιστικά Διαλύματα:**

- TBST (Tris Buffered Saline Twin) (0,5 lt )

Tris pH 7,5 10ml

NaCl 5M 9ml

Twin 2,5ml (από stock 10% ώστε τελικά 0,05% - 0,1%)

H<sub>2</sub>O μέχρι 0,5 lt.

- Blocking buffer

Γάλα (5%) διαλυμένο σε TBST.

Transfer buffer (1lt)

Running buffer 80%

Μεθανόλη 20%

PONCEAU

1 gr στα 2ml οξικού οξέος

H<sub>2</sub>O μέχρι 200ml

- **Απομόνωση His σημασμένων πρωτεϊνών.**

Από μία κορεσμένη ολονύκτια καλλιέργεια βακτηρίων που φέρουν την κατασκευή του γονιδίου σε pRSET πλασμίδιο χρησιμοποιούνται 10ml για την επιμόλυνση 500ml LB (αραίωση 1:50). Στη συνέχεια η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C, μέχρι να φτάσει η O.D<sub>600</sub> από 0,4-0,6. Για να το διαπιστώσουμε αυτό ανά τακτά χρονικά διαστήματα παίρνουμε δείγματα και μετράμε την O.D<sub>600</sub> τους. Όταν η καλλιέργεια μας φτάσει την επιθυμητή O.D<sub>600</sub> γίνεται **επαγωγή** της έκφρασης της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM (από αρχικό διάλυμα 100mM). Η επαγωγή γίνεται για 3 ώρες στους 30°C. Έπειτα οι καλλιέργειες φυγοκεντρούνται, στις 5000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C, απορρίπτεται το υπερκείμενο και κρατάμε τις πελλετες τις οποίες στο στάδιο αυτό μπορούμε είτε να τις αποθηκεύσουμε στους -80°C, είτε να προχωρήσουμε στον καθαρισμό τους. Δείγματα πριν και μετά την προσθήκη IPTG υπόκεινται σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και το πήκτωμα ακρυλαμίδης βάφεται με χρωστική Coomassie για να γίνει ορατή η έκφραση της His-πρωτεΐνης μετά την επαγωγή.

Υπάρχουν 2 τρόποι που ακολουθήθηκαν για τον καθαρισμό και την απομόνωση των His σημασμένων πρωτεϊνών.

Ο πρώτος τρόπος ακολουθεί το πρωτόκολλο της εταιρίας Macherey-Nagel (Protino® Ni-TED 1000). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (**native** conditions) το βακτηριακό



ίζημα επαναδιαλύεται ανάλογα το μέγεθος της πελλέτας, σε 1-3ml 1x LEW Buffer (50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 5mM imidazole, PH 8 με NaOH) στον πάγο. Προσθέτω 1mg/ml λυσοζύμη. Τα βακτήρια σπάνε με 3 παλμούς υπερήχων διάρκειας 30 δευτερολέπτων και το εκχύλισμα φυγοκεντρείται στις 10.000rpm, στους 4 °C για 30 λεπτά για να κατακρημνιστούν τα μεμβρανικά υπολείμματα. Η κολώνα νικελίου εξισορροπείται με 0,320ml 1x LEW Buffer, προστίθεται το υπερκείμενο και αφού περάσει μέσα από 0,45μm φίλτρο και από την κολώνα, ακολουθούν δύο πλύσεις με 0,320ml 1x LEW Buffer και τρεις εκλούσεις με 0,240ml 1x Elution buffer. Στα εκλούόμενα διαλύματα προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% και φυλάσσεται στους -80 °C. Σε φυσιολογικές (native) συνθήκες όμως εκλύεται μόνο η His-πρωτεΐνη που ήταν διαλυτή στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και όχι η υπόλοιπη που ήταν συγκεντρωμένη σε αδιάλυτα συσσωματώματα που λέγονται έγκλειστα σωματίδια (inclusion bodies). Έτσι, δουλεύουμε και κάτω από αποδιατακτικές (*denaturing*) συνθήκες, που περιλαμβάνει ακριβώς τα ίδια βήματα, με τη διαφορά ότι σε όλα τα διαλύματα (buffers) προστίθεται ουρία σε συγκέντρωση 8M και δεν χρησιμοποιούμε καθόλου πάγο επειδή η ουρία κατακρημνίζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η διαδικασία αυτή όμως, απαιτεί να επαναφέρει την εκλούσιμη πρωτεΐνη στη φυσιολογική της δομή (*renaturing*), προκειμένου να μπορεί να χρησιμοποιηθεί αργότερα σε πειράματα αλληλεπίδρασης με άλλη πρωτεΐνη. Η διαδικασία αυτή απαιτεί πρώτα την επώαση ειδικής ημιδιαπερατής μεμβράνης, σε νερό με 2mM EDTA στους 100 °C. Τα δείγματα (0,240ml) τοποθετούνται στις μεμβράνες όλη τη νύχτα ή για 3 ώρες σε 200ml διαλύματος διαπίδυσης (dialysis buffer: 20mM Tris pH 8, 10% glycerol, 100mM NaCl, 1mM DTT, 0,1% NP40, 4M Urea). Στη συνέχεια ακολουθούν διαδοχικές επώσεις της μίας ώρας στο ίδιο διάλυμα, το οποίο κάθε φορά αραιώνεται ώστε η συγκέντρωση της ουρίας να μειώνεται στο μισό, μέχρι να φτάσει 0,5mM. Μέχρι το διάλυμα μας να φτάσει τα 2M ουρία δουλεύουμε σε θερμοκρασία δωματίου για να αποφύγουμε την κρυστάλωση της ουρίας, αλλά από κει και έπειτα στους 4 °C. Τέλος το δείγμα της πρωτεΐνης φυγοκεντρείται στις 12000rpm για 5 λεπτά στους 4 °C και αποθηκεύεται στους -80 °C αφού πρώτα προσθέσουμε γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 15%.

Ο 2<sup>ος</sup> τρόπος ακολουθεί το εξής πρωτόκολλο:

Επωάζουμε αρχικά την πελλέτα της καλλιέργειας με 20-30ml buffer/lit καλλιέργειας, (το buffer περιέχει: 8M ουρία, 10mM Tris pH8, 100mM Na<sub>x</sub>PO<sub>4</sub> pH7, 10mM imidazole, 10mM Mercaptoethanol). Έπειτα κάνουμε sonication 3x30 δευτερόλεπτα, και φυγοκεντρούμε στις 8000rpm, στους 4<sup>ο</sup> C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια παίρνουμε 300λ beads Ni-NTA agarose resin, και τους κάνουμε 3 πλύσεις (φυγοκέντρωση στις 3000 rpm στους 4<sup>ο</sup> C για 2 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου) με την ίδια ποσότητα (300λ) buffer. Έπειτα χύνουμε το υπερκείμενο των δειγμάτων μας στα beads και τα βάζουμε να γυρίζουν σε rotator σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 3000 rpm στους 4<sup>ο</sup> C για 2 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου. Στη συνέχεια βάζουμε 2ml buffer και κάνουμε 3 πλύσεις και τέλος κάνουμε 3 εκλούσεις με τρία διαφορετικά elution buffer E<sub>1</sub> 100mM imidazole, E<sub>2</sub> 250mM imidazole, E<sub>3</sub> 1M imidazole.

Ανάμεσα στις εκλούσεις μεσολαβούν 20 λεπτά περιστροφή σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκέντρωση στις 3000 rpm στους 4<sup>ο</sup> C για 2 λεπτά και αποθήκευση του υπερκειμένου.

Το επόμενο βήμα και στις 2 περιπτώσεις είναι η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων και η ανίχνευση των πρωτεϊνών με χρώση coomassie ή ανοσοαποτύπωση.

- **Απομόνωση GST-χμιαϊρικών πρωτεϊνών.**

Από μία κορεσμένη ολονύκτια καλλιέργεια βακτηρίων που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει να απομονώσουμε, χρησιμοποιούνται 10ml για την επιμόλυνση 500ml LB (αραίωση 1:50). Στη συνέχεια η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C, μέχρι να φτάσει η O.D<sub>600</sub> από 0,4-0,6. Για να το διαπιστώσουμε αυτό ανά τακτά χρονικά διαστήματα παίρνουμε δείγματα και μετράμε την O.D<sub>600</sub> τους. Όταν η καλλιέργεια μας φτάσει την επιθυμητή O.D<sub>600</sub> γίνεται **επαγωγή** της έκφρασης της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM (από αρχικό διάλυμα 100mM). Η επαγωγή γίνεται για 3 ώρες στους 30°C. Έπειτα οι καλλιέργειες φυγοκεντρούνται, στις 5000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C, απορρίπτεται το υπερκείμενο και κρατάμε τις

πελλετες τις οποίες στο στάδιο αυτό μπορούμε είτε να τις αποθηκεύσουμε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , είτε να προχωρήσουμε στον καθαρισμό τους.

Για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης επαναδιαλύουμε την πελλέτα σε TEN/NP40/BSA(0,5mg/ml) και PMSF (1mM). Η σύσταση του TEN/NP40 είναι 50mM Tris pH8, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 1mM DTT, 0,5% NP40. Η ποσότητα του διαλύματος εξαρτάται από το μέγεθος της πελλέτας περίπου 2-3 ml για 500ml καλλιέργεια. Ακολουθεί sonication 3x30 δευτερολέπτων και φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 10 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Έπειτα κρατάμε το υπερκείμενο σε νέα eppendorffs, και είτε το αποθηκεύουμε με προσθήκη γλυκερόλης 15% στους  $-80^{\circ}\text{C}$  είτε ακολουθεί καθαρισμός. Στη συνέχεια παίρνουμε 20λ Glutathione sepharose beads, και κάνω 3 πλύσεις με 500λ TEN/NP40 (φυγοκέντρηση στις 3000 rpm στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 2 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου). Έπειτα προσθέτουμε τα δείγματα στα beads και για control χρησιμοποιούμε ήδη καθαρισμένη GST (3λ GST σε 500λ TEN/NP40). Ακολουθεί rotation για 1 ώρα στους  $4^{\circ}\text{C}$  και έπειτα φυγοκέντρηση στις 3000 rpm στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 2 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου καθώς και 3 πλύσεις με 500λ TEN/NP40 (φυγοκέντρηση στις 3000 rpm στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 2 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου). Τέλος προσθέτουμε loading buffer στα beads τα βράζουμε για 5 λεπτά και είμαστε έτοιμοι να φορτώσουμε το πρωτεϊνικό τζελ.

- **Αλληλεπιδράσεις GST-χμιαϊκών πρωτεϊνών με His-σημασμένες πρωτεΐνες (GST-Pull down for protein-protein interaction)**

Για κάθε His-σημασμένη πρωτεΐνη που εξετάζω χρειάζομαι τρία δείγματα: αλληλεπίδραση με τη GST-χμιαϊκή πρωτεΐνη (positive control), αλληλεπίδραση με σκέτη GST (negative control) και το 1/10 του όγκου της His-πρωτεΐνης ως αναφορά (input). Αρχικά γίνεται καθαρισμός της GST-χμιαϊκής πρωτεΐνης από το συνολικό βακτηριακό εκχύλισμα. Χρησιμοποιούνται για κάθε δείγμα περίπου 30μl σφαιρίδια σεφαρόζης που έχουν επάνω τους γλουταθειόνη (Glutathione Sepharose Beads). Αυτά πλένονται 3 φορές με 1ml TEN/NP40 (φυγοκέντρηση 2 λεπτών στις 3500rpm και απόρριψη υπερκειμένου). Μετά προστίθενται οι GST-χμιαϊκές πρωτεΐνες και επωάζονται για 1 ώρα υπό περιστροφή στο rotator στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Ακολουθούν 3 πλύσεις με

1ml TEN/NP40 και μια πλύση με 1ml GST wash buffer (150mM KCl, 20mM Hepes pH 7,9, 0.1% NP40, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM PMSF και Aprotinin, Pepstatin και Lew 1:1000). Μετά το τελευταίο πλύσιμο, τα σφαιρίδια με τη GST-χημική πρωτεΐνη επαναδιαλονται σε 200μl GST-interaction bufer (150mM KCl, 20mM Hepes, 0.1% NP40, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2% BSA, 0.5mM PMSF και Aprotinin 1:1000) και προστίθενται οι His-σημασμένες πρωτεΐνες. Η αντίδραση της αλληλεπίδρασης επωάζεται για 3 ώρες στους 4<sup>0</sup> C υπό περιστροφή. Ακολουθούν 3 πλυσίματα με 1ml GST-Wash buffer στις 3500rpm, 4<sup>0</sup> C για 2 λεπτά και προστίθεται 10μl 4x SDS protein loading buffer. Ακολουθεί βράσιμο στους 95<sup>0</sup> C για 5 λεπτά (μαζί και τα input), SDS-PAGE και Western blot με αντίσωμα a-His (1:500) σαν πρώτο και a-rabbit (1:10000) σαν δεύτερο.

- **Συν-ανοσοκατακρίμηση (Co-IP)**

Αρχικά γίνεται απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ευκαρυωτικά κύτταρα όπως αναφέρεται παραπάνω στην αντίστοιχη παράγραφο. Έπειτα παίρνουμε 10 λ G-beads, και κάνουμε 3 πλύσεις με EBC/PMSF. Στη συνέχεια βάζουμε τα δείγματά μας στα G-beads και τα αφήνουμε για 1 ώρα στους 4<sup>0</sup> C στο rotator. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000 rpm στους 4<sup>0</sup> C για 2 λεπτά και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο tube όπου προσθέτουμε το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα και το βάζουμε ξανά στους 4<sup>0</sup> C στο rotator O/N. Την επόμενη μέρα παίρνουμε 20λ G-beads για κάθε δείγμα, και κάνουμε 3 πλύσεις με EBC/PMSF. Έπειτα προσθέτουμε το υπερκείμενο με το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα που επωάζονταν O/N και τα βάζουμε για 3 ώρες στους 4<sup>0</sup> C στο rotator. Ακολουθούν 3 πλύσεις με NETN/PMSF με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις 2 λεπτών στις 3500rpm και απόρριψη υπερκειμένου. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών που αλληλεπέδρασαν με την πρωτεΐνη που δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια μέσω του πρώτου αντισώματος, πραγματοποιείται με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας το κατάλληλο αντίσωμα.

EBC buffer

50mM Tris pH8

NETN buffer

10mM Tris pH8

170mM NaCl

0,5% NP40

50mM NaF

1/100 PMSF

250mM NaCl

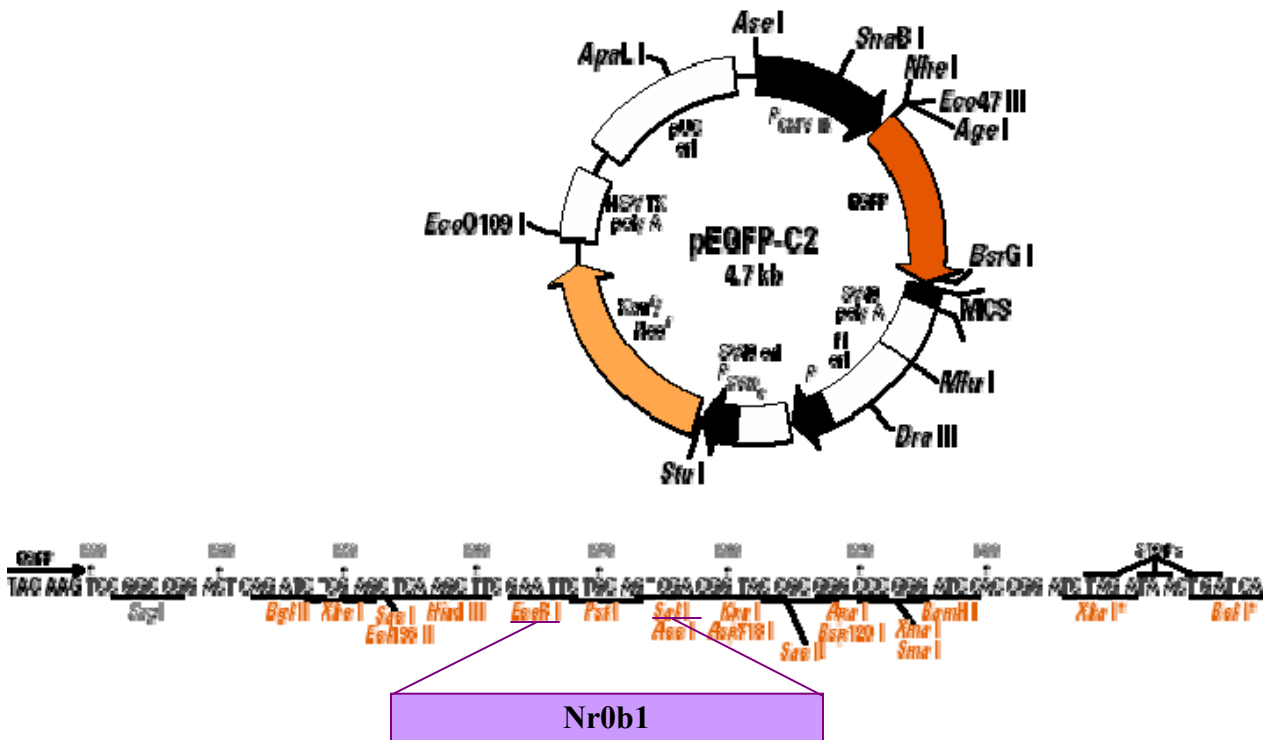
5mM EDTA

0,5% NP40

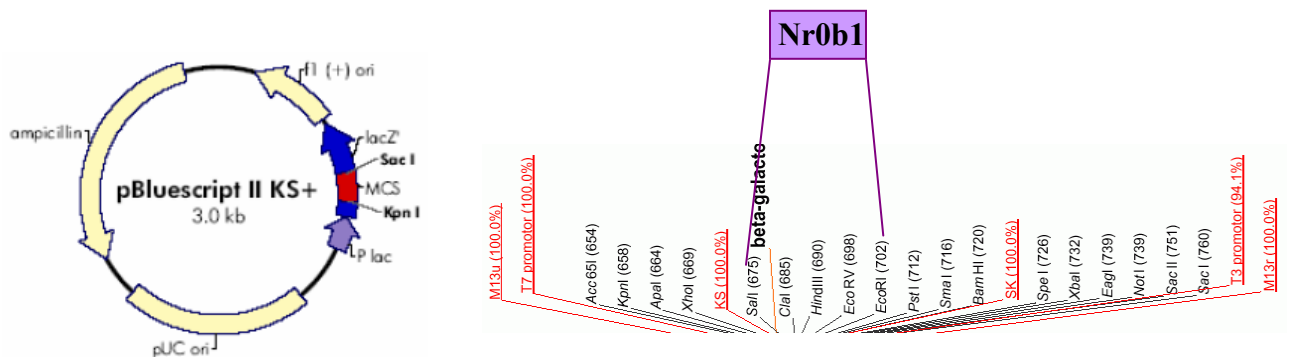
## ΧΑΡΤΕΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ

1. Κλωνοποίηση του γονιδίου Nr0b1 στους πλασμιαδικούς φορείς GFPC2 και CFPC2.

- Nr0b1- GFP C2
- Nr0b1- CFP C2

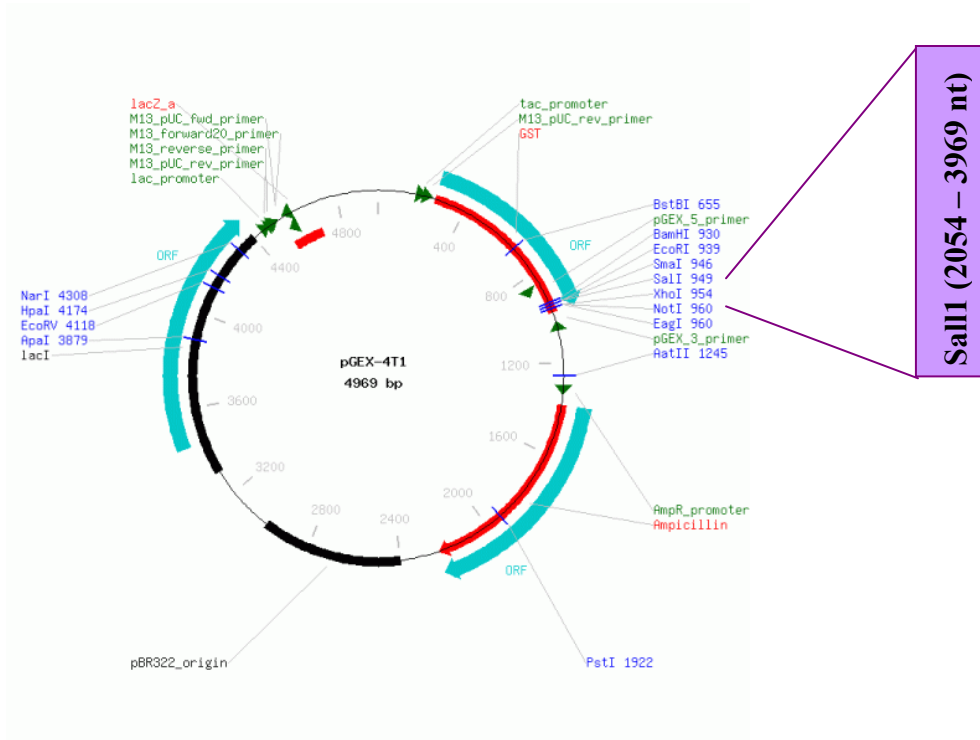


Για την εισαγωγή του Nr0b1 στον EGFP2 και στον ECFPC2, πρώτα απομονώθηκε από τον pBKS+ όπου είχε κλωνοποιηθεί με EcoRI και Sall και εισήχθη στους φορείς, οι οποίοι είχαν κοπεί με τα ίδια ένζυμα.

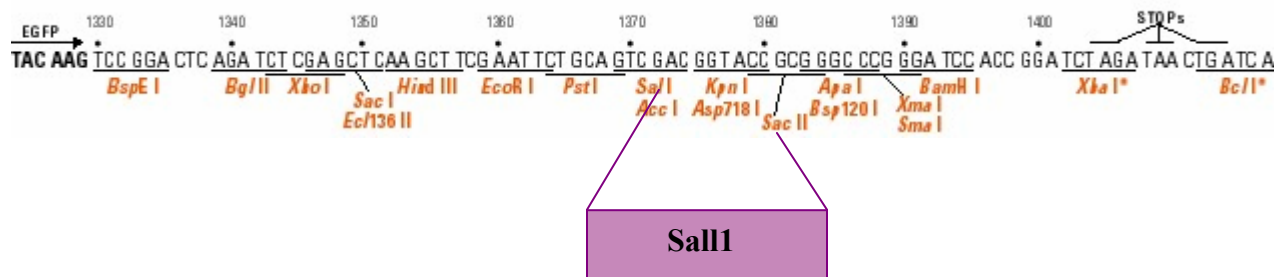
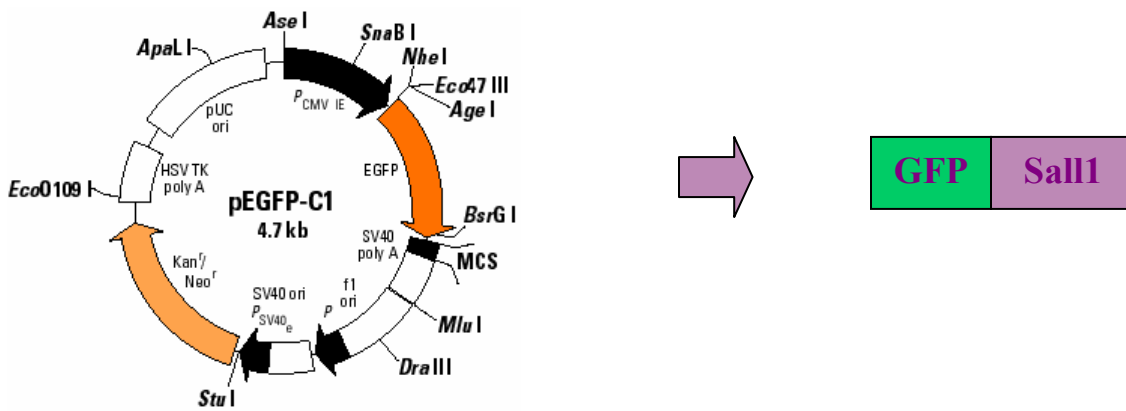
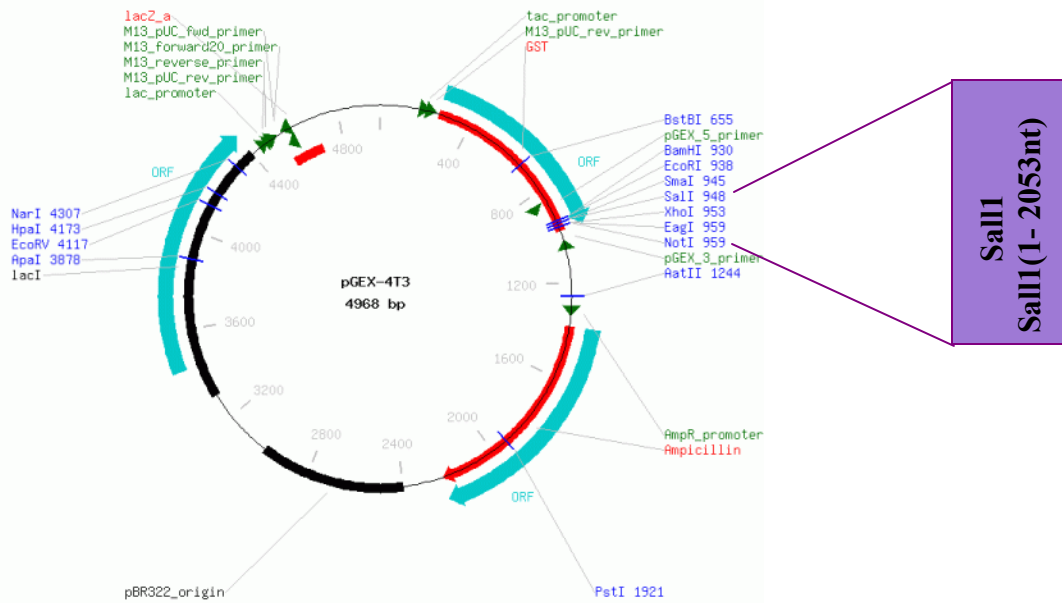


## 2. Κλωνοποίηση του γονιδίου Sall1 στους παρακάτω πλασμιδιακούς φορείς.

- Sall1 – PGEX4T3
- Sall1 (2054 – 3969 nt) – PGEX4T1
- Sall1 (1- 2053nt) - PGEX4T3
- Sall1 – GFPC1
- Sall1 – PGK IRES EGFP
- Flag Sall1 – PGK IRES EGFP
- Sall1 (1- 2053nt) -pRSET B

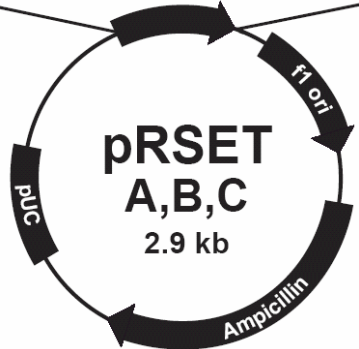
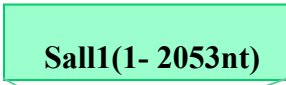
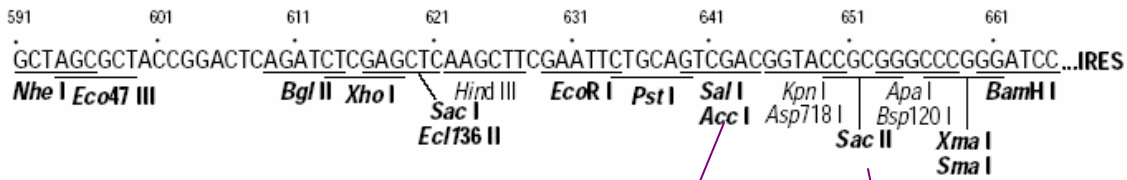
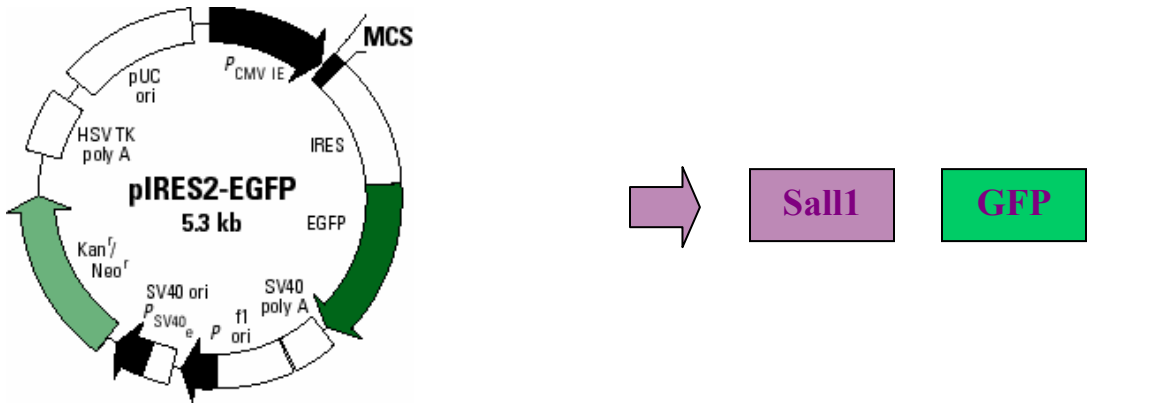


Στον PGEX4T1 και PGEX4T3 τα Sall1, Sall1(1- 2053nt) και Sall1(2054 – 3969 nt), κλωνοποιήθηκαν με SallI και NotI.

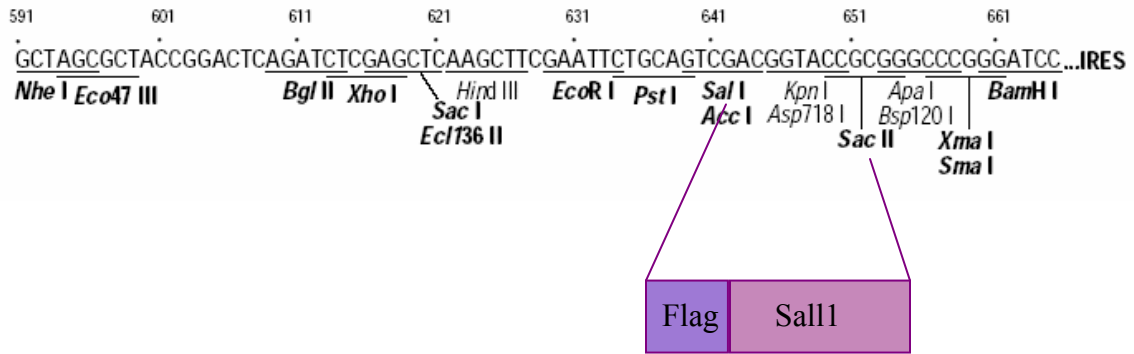
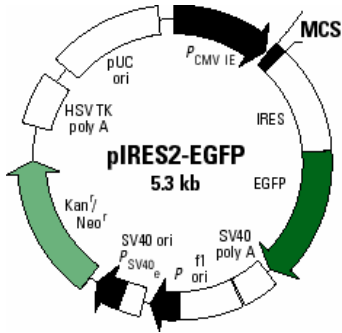




Το Sall1 βγήκε από τον pBKS+ με Sall1 και SacII και κλωνοποιήθηκε στις ίδιες περιοριστικές θέσεις στον EGFPc1 και στον PGK IRES EGFP. (Ο PGK υποκινητής έχει αντικαταστήσει τον CMV. Η κλωνοποίηση έγινε στις θέσεις AseI και BglII).

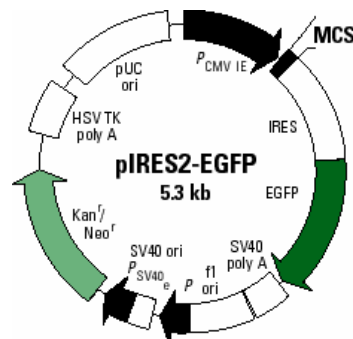


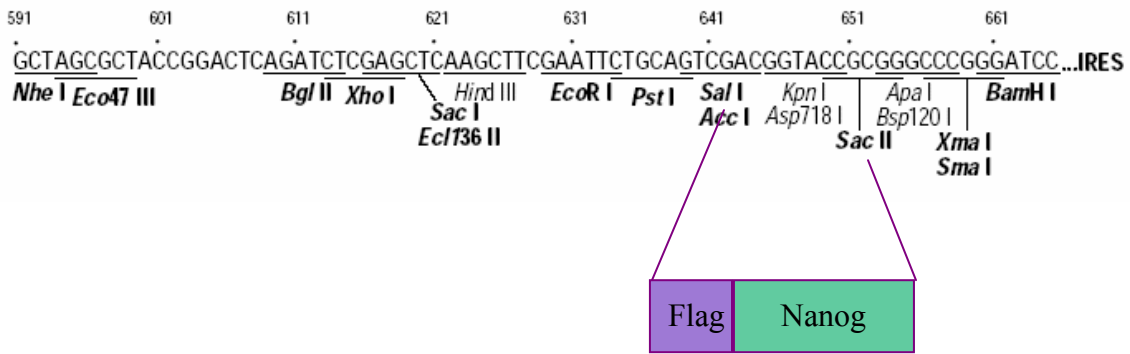
Το Sall1(1- 2053nt), απομονώθηκε από το pGEX Sall1(1- 2053nt) με BamHI και κλωνοποιήθηκε στον pRSET B στην BglIII.



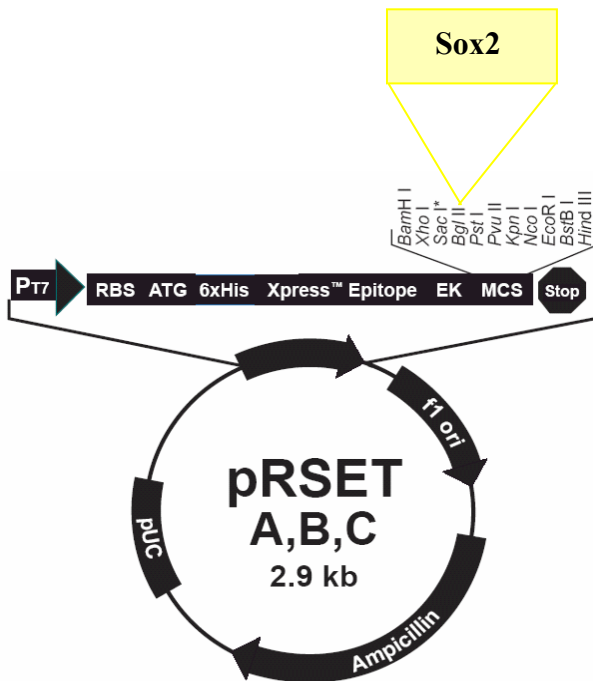
Για τη δημιουργία του Flag Sall1 – PGK IRES EGFP, σχεδιάσαμε το ολιγονουκλεοτίδιο Flag με άκρα SalI. Το Sall1 στον PGK IRES EGFP έχει κλωνοποιηθεί με SalII και SacII, οπότε κόπηκε με SalII για να πάρει το Flag και ξαναέκλεισε με ligation. Με τον ίδιο τρόπο με SalII και SacII, είχε κλωνοποιηθεί και το Nanog στον PGK IRES EGFP και έτσι ομοίως με το Sall1 δημιουργήθηκε και το Flag Nanog PGK IRES EGFP.

### 3. PGK Flag Nanog IRES EGFP.





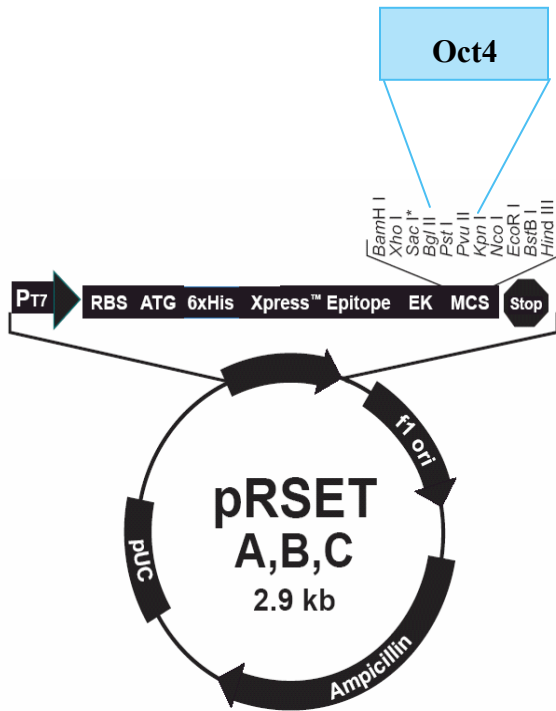
4. Κλωνοποίηση του γονιδίου Sox2 στον pRSETC.



Το Sox2 απομονώθηκε από τον SV40 με *Bam*HI (5') & *Bgl*III(3'). Ο pRSETC κόπηκε μόνο με *Bam*HI, γιατί η *Bam*HI κολλάει και στην *Bgl*III περιοριστική θέση.

## 5. Κλωνοποίηση του γονιδίου Oct4 στον pRSETB.

Το Oct4 απομονώθηκε από τον EGFPc1 με BglII(5') & KpnI(3') και με τα ίδια ένζυμα κόπηκε και ο pRSETB και κλωνοποιήθηκε σε αυτό το ένθεμα.



## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>

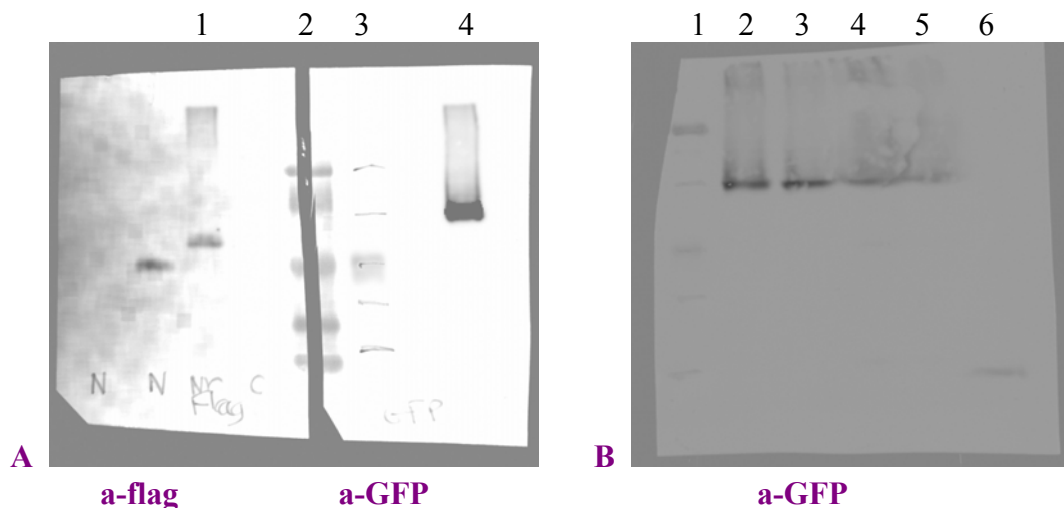
### Αποτελέσματα – Συζήτηση

#### 3.1 Έλεγχος παραγωγής πρωτεϊνών από τις πλασμιδιακές κατασκευές.

Όλες οι πλασμιδιακές κατασκευές που δημιουργήθηκαν κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής, πριν χρησιμοποιηθούν σε λειτουργικά πειράματα για την εξακρίβωση τυχόν αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών *in vitro* και *in vivo*, ελέγχθηκαν για την ικανότητα παραγωγής πρωτεϊνών. Η παραγωγή των πρωτεϊνών αυτών πραγματοποιήθηκε σε βακτήρια και σε ευκαρυωτικά κύτταρα και ανίχνευση της έκφρασης πραγματοποιήθηκε με χρώση coomassie και ανοσοαποτύπωση.

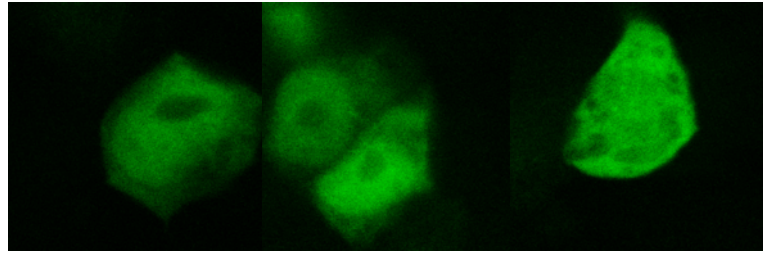
➤ GFPC2 - Nr0b1

➤ CFPC2 - Nr0b1



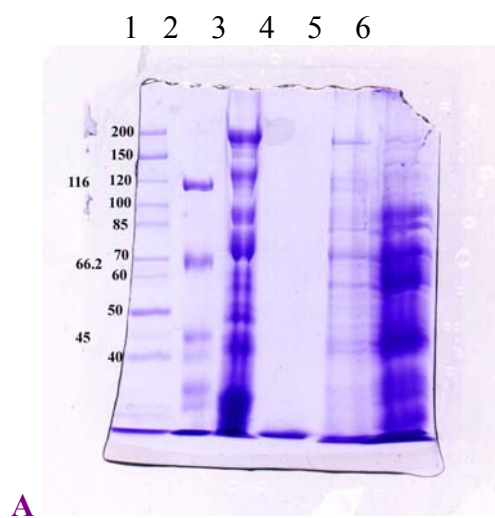
1. Flag Nr0b1
2. Prestained Marker
3. Marker
4. GFP-Nr0b1

1. Marker
2. CFPC2-Nr0b1 ES
3. GFPC2-Nr0b1 ES
4. CFPC2-Nr0b1 3T3
5. GFPC2-Nr0b1 3T3
6. GFPC2 3T3



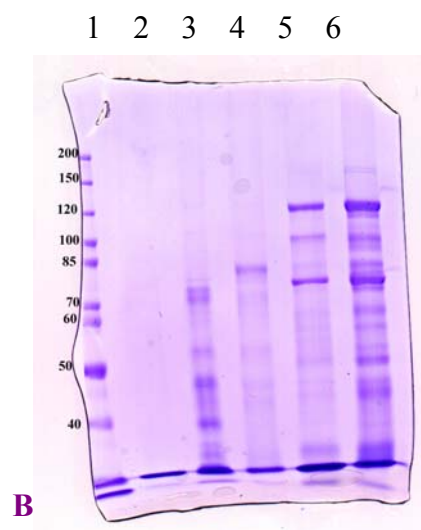
Transfection των κυττάρων Cgr8 με GFPC2-Nr0b1.

➤ Sall1 – PGEX4T3



**A**

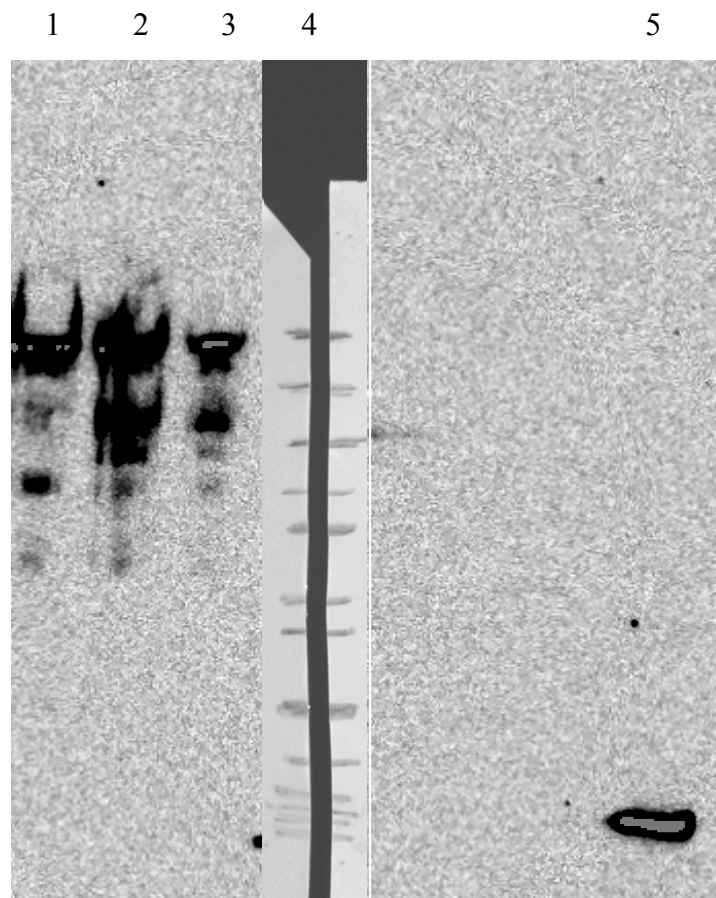
1. Marker
2. Marker
3. BL21 GST Sall1
4. GST
5. Sup
6. Pellet



**B**

1. Marker
2. GST
3. GST Nanog
4. GST Nr0b1
5. GST Sall1(nt 1-2024)
6. GST Sall1(nt 1-2024)

➤ Sall1 – PGEX4T3

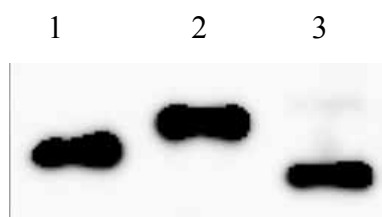


1. Cgr8 extract
2. PGK- GFP Sall1
3. GFP Sall1
4. Marker
5. GFP control

➤ His Nanog

➤ His Oct4

➤ His Sox2



1. His Nanog

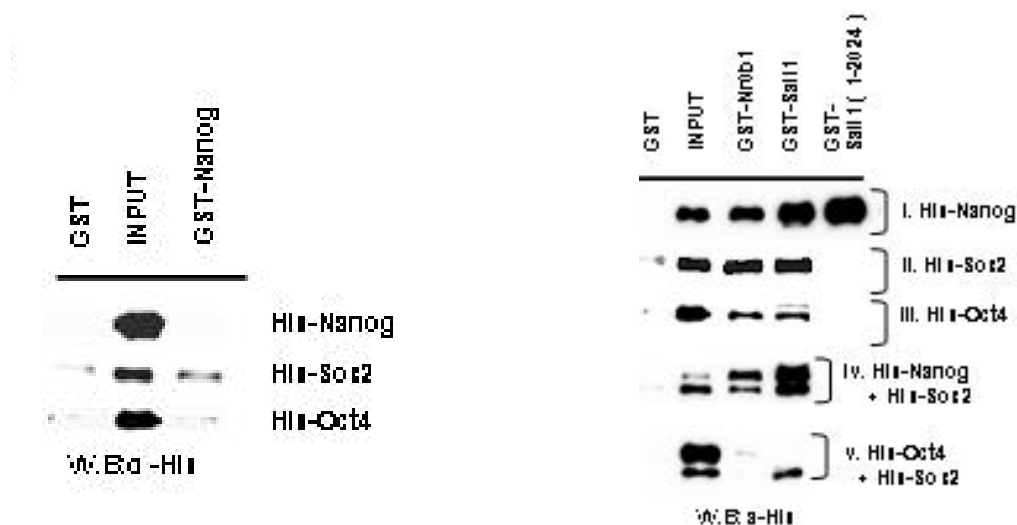
2. His Oct4
3. His Sox2

### 3.2 *In vitro* αλληλεπιδράσεις των Sall1 και Nr0b1 με τους μεταγραφικούς παράγοντες Nanog, Sox2 και Oct4.

Από προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, ανάμεσα στα γονίδια που καταστέλλονται βρίσκονται και οι μεταγραφικοί παράγοντες Sall1 και Nr0b1. Η ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων έκφρασης των δύο αυτών παραγόντων και των 3 σημαντικότερων μεταγραφικών παραγόντων, που ευθύνονται για τη διατήρηση της αυτό-ανανέωσης και της πολυδυναμικότητας των ESCs, Nanog, Sox2 και Oct4, αποτέλεσε το έναυσμα για τη διερεύνηση τυχόν σχέσεων και αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραπάνω παραγόντων.

Πρωταρχικός στόχος στη μελέτη αυτή ήταν η εξακρίβωση των πιθανών αλληλεπιδράσεων αυτών των παραγόντων με τη χρήση καθαρών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με την *in vitro* τεχνική του GST pull down.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες Nr0b1 και Sall1 αλληλεπιδρούν και με τους τρεις παράγοντες Nanog Sox2 και Oct4. Η πρωτεΐνη Sox2 αλληλεπιδρά με τις Nr0b1, Sall1 και Nanog, ενώ η Oct4 αλληλεπιδρά με τις Nr0b1, Sall1 και όχι με την Nanog. Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε η καθαρή GST (Εικ 3.1).



Εικ.3.1. Αποτελέσματα των πειραμάτων με την *in vitro* τεχνική του GST pull down.

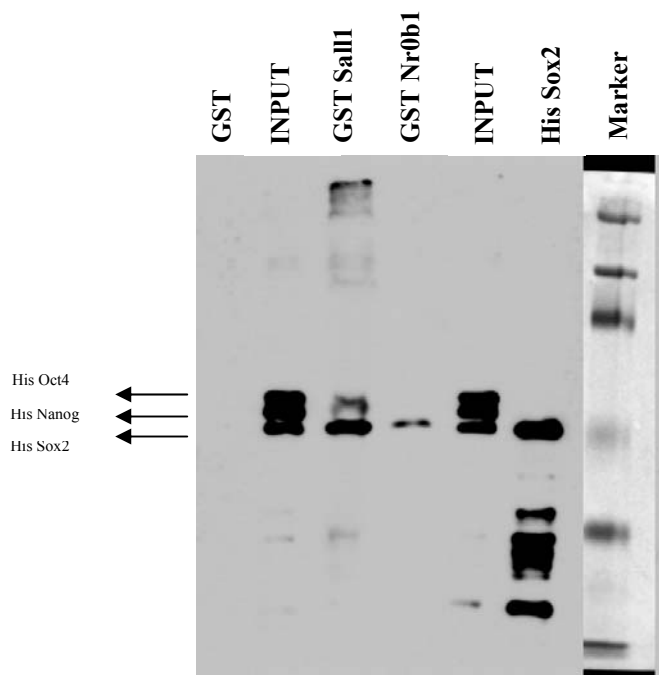


### 3.3 *In vitro* αλληλεπιδράσεις των Sall1 και Nr0b1 με τους μεταγραφικούς παράγοντες Nanog/Sox2 και Oct4/Sox2.

Αφού διαπιστώθηκε πως οι πρωτεΐνες Sall1 και Nr0b1 μπορούν να αλληλεπιδράσουν με κάθε ένα από τους τρεις παράγοντες ανεξάρτητα στη συνέχεια θελήσαμε να εξετάσουμε αν μπορούν να αλληλεπιδράσουν με περισσότερους από έναν την ίδια στιγμή.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε GST pull down χρησιμοποιώντας για αλληλεπίδραση τις GST Sall1 και GST Nr0b1 και τα ζευγάρια His Nanog/His Sox2 και His Oct4/His Sox2. Από το πείραμα αυτό προέκυψε ότι οι GST- Nr0b1 και GST-Sall1 αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα με τους παράγοντες Nanog και Sox2. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός His Oct4/His Sox2, είδαμε το Sall1 να αλληλεπιδρά μόνο με το Sox2 και όχι με το Oct4 και το Nr0b1 να αλληλεπιδρά ασθενώς με το Oct4 και όχι με το Sox2 (Εικ. 3. 1).

Επίσης πραγματοποιήθηκε παράλληλα και πείραμα αλληλεπίδρασης του Sall1 και Nr0b1 και με τις τρεις HisNanog/HisSox2/His Oct4 ταυτόχρονα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, επιβεβαιώνουν ξανά ότι το Sall1 αλληλεπιδρά με τους παράγοντες Nanog και Sox2 και όχι με το Oct4, ενώ το Nr0b1 μόνο με το Sox2 (Εικ.3.2).



W.B. a-His

Εικ.3.2. Αποτελέσματα των πειραμάτων με την *in vitro* τεχνική του GST pull down των αλληλεπιδράσεων των GST πρωτεϊνών και με τις τρεις HisNanog/HisSox2/His Oct4 ταυτόχρονα

Ένα ερώτημα που προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα του διπλού πειράματος είναι γιατί ενώ στις μεμονωμένες αλληλεπιδράσεις το Sall1 αλληλεπιδρά και με το Sox2 αλλά και με το Oct4, ενώ αντίθετα στο πείραμα που καλούνται να αλληλεπιδράσουν ταυτόχρονα αλληλεπιδρά μόνο με το Sox2. Μια πιθανή απάντηση μπορεί να είναι ότι το Sox2 και το Oct4, μπορεί να προσδένονται σε παρόμοιες ή γειτονικές αλληλουχίες και η πρόσδεση του ενός να εμποδίζει την πρόσδεση του άλλου.

### **3.4 Έλεγχος των περιοχών αλληλεπίδρασης του Sall1 με τους μεταγραφικούς παράγοντες Nanog, Sox2 και Oct4.**

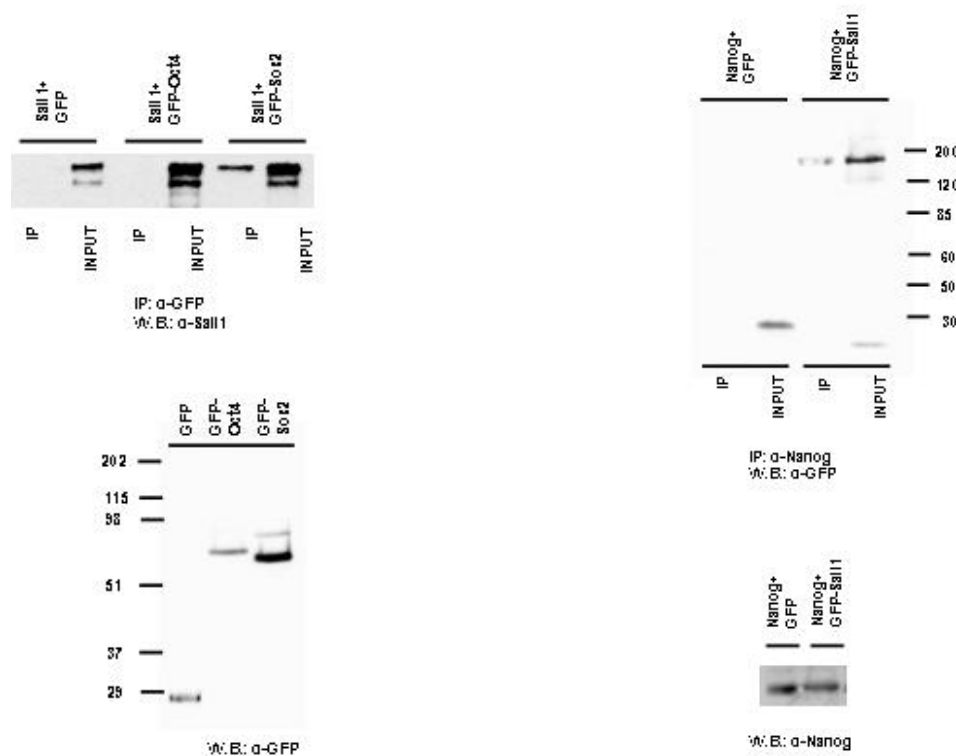
Για να μπορέσουμε να αξιολογήσουμε καλύτερα τα παραπάνω αποτελέσματα και να διαπιστώσουμε τις περιοχές που είναι υπεύθυνες για τις διπλές αλληλεπιδράσεις του Sall1, χρησιμοποιήσαμε μόνο το αμινοτελικό μισό κομμάτι της πρωτεΐνης (Sall1 nt 1-2024). Χρησιμοποιώντας ξανά την τεχνική GST pull down, μελετήσαμε πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της GST Sall1(1-2024 nt) και των πρωτεϊνών His Nanog, His Sox2 και His Oct4.

Από τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού προέκυψε ότι το Sall1(1-2024 nt) αλληλεπιδρά μόνο με το Nanog, ενώ δεν υπήρξε καμία αλληλεπίδραση με το Sox2 ή το Oct4, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι παράγοντες αυτοί πιθανά να απαιτούν την καρβοξυτελική περιοχή του Sall1 για να αλληλεπιδράσουν. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια ακόμα ενίσχυση της υπόθεσης ότι οι δύο αυτοί παράγοντες ανταγωνίζονται για την πρόσδεση στην ίδια περιοχή.

### **3.5 *In vivo* αλληλεπιδράσεις των Sall1 και Nr0b1 με τους μεταγραφικούς παράγοντες Nanog, Sox2 και Oct4.**

Στη συνέχεια προχωρήσαμε στη διερεύνηση *in vivo* αλληλεπιδράσεων μεταξύ της πρωτεΐνης Sall1 και των GFP Nr0b1, GFP Nanog, GFP Sox2 και GFP Oct4. Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε η σκέτη GFP. Για το σκοπό αυτό έγινε παροδική

διαμόλυνση COS κυττάρων με τα κατάλληλα ζευγάρια και έπειτα προχωρήσαμε σε πειράματα συν-ανοσοκατακρίμησης (Co-IP). Από τα πειράματα αυτά προέκυψε ότι ο Sall1 αλληλεπιδρά με τους Sox2 και Nanog αλλά όχι με τους υπόλοιπους παράγοντες (3.3).



**Εικ.3.3** Αποτελέσματα των πειραμάτων με την *in vivo* τεχνική της συν-ανοσοκατακρίμησης.

### 3.6. Συζήτηση

Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, ανάμεσα στα γονίδια που καταστέλλονται βρίσκονται και οι μεταγραφικοί παράγοντες Sall1 και Nr0b1. Το γεγονός ότι η μείωση των επιπέδων έκφρασης των δύο αυτών παραγόντων συμπίπτει με αυτή των 3 σημαντικότερων μεταγραφικών παραγόντων, που ευθύνονται για τη διατήρηση της αυτό-ανανέωσης και της πολυδυναμικότητας

των ESCs, Nanog, Sox2 και Oct4, εγείρει ερωτήματα για την πιθανή αλληλοσυσχέτιση μεταξύ των παραπάνω παραγόντων. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της μεταπτυχιακής αυτής διατριβής έδειξαν, ότι οι πρωτεΐνες Nr0b1 και Sall1 αλληλεπιδρούν και με τους τρεις παράγοντες Nanog Sox2 και Oct4. Η πρωτεΐνη Sox2 αλληλεπιδρά με τις Nr0b1, Sall1 και Nanog, ενώ η Oct4 αλληλεπιδρά με τις Nr0b1, Sall1 και όχι με την Nanog.

Στη συνέχεια από τα πειράματα των διπλών και τριπλών αλληλεπιδράσεων, προέκυψε ότι οι GST- Nr0b1 και GST-Sall1 αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα με τους παράγοντες Nanog και Sox2. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός His Oct4 και His Sox2, είδαμε το Sall1 να αλληλεπιδρά μόνο με το Sox2 και όχι με το Oct4 και το Nr0b1 να αλληλεπιδρά ασθενώς με το Oct4 και όχι με το Sox2 (Εικ. 3. 1).

Ομοίως και στο τριπλό πείραμα αλληλεπίδρασης του Sall1 και Nr0b1 και με τις τρεις HisNanog/HisSox2/His Oct4 ταυτόχρονα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το αυτό, επιβεβαιώνουν ξανά ότι το Sall1 αλληλεπιδρά με τους παράγοντες Nanog και Sox2 και όχι με το Oct4, ενώ το Nr0b1 μόνο με το Sox2.

Προκειμένου να αξιολογήσουμε καλύτερα τα παραπάνω αποτελέσματα και να διαπιστώσουμε τις περιοχές που είναι υπεύθυνες για τις διπλές αλληλεπιδράσεις του Sall1, χρησιμοποιήσαμε μόνο το αμινοτελικό μισό κομμάτι της πρωτεΐνης (Sall1 nt 1-2024). Από τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού προέκυψε ότι το Sall1(1-2024 nt) αλληλεπιδρά μόνο με το *Nanog*, ενώ δεν υπήρξε καμία αλληλεπίδραση με το Sox2 ή το Oct4, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι παράγοντες αυτοί πιθανά να απαιτούν την καρβοξυτελική περιοχή του Sall1 για να αλληλεπιδράσουν

Τέλος προχωρήσαμε σε πειράματα συν-ανοσοκατακρίμνησης (Co-IP) για να μελετήσουμε τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις και *in vivo*. Από τα πειράματα αυτά προέκυψε ότι το Sall1 αλληλεπιδρά με τις Sox2 και Nanog αλλά όχι με τους υπόλοιπους παράγοντες (3.3).

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι το σύμπλοκο των μεταγραφικών παραγόντων Nanog Sox2 και Oct4 σχετίζεται και με την ενεργοποίηση γονιδίων απαραίτητων για την διατήρηση της πολυδύναμης κατάστασης και της αυτό-ανανέωσης των βλαστοκυττάρων αλλά και με την καταστολή άλλων γονιδίων που οδηγούν στη διαφοροποίηση. Επίσης το Sall1 έχει βρεθεί ότι έχει δράση συν καταστολέα μαζί με το σύμπλοκο NuRD, ένα σύμπλοκο μεταγραφικών καταστολέων που περιλαμβάνει απακετυλάσες ιστονών και παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης.

Τα αποτελέσματα λοιπόν που προκύπτουν από τα πειράματα αλληλεπίδρασης του Sall1 με τους παράγοντες Nanog και Sox2 υποδεικνύουν ότι το Sall1 συμμετέχοντας σε ένα τριμερές σύμπλοκο μαζί με τους παράγοντες Nanog και Sox2, θα μπορούσε να ευθύνεται για την κατασταλτική δράση του συμπλόκου αυτού.

## Βιβλιογραφία

- Boiani M. and Scholer H.R.** (2005) Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 872-874.
- Booth, H. A., and Holland P. W.** (2004) Eleven daughters of NANOG. *Genomics* **84**, 229– 238.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G. et al.** (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, **122**, 947-956.
- Brook, F.A. and Gardner, R.L.** (1997) The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5709-5712.
- Burdon, T., Chambers, I., Stracey, C., Niwa, H and Smith, A.** (1999) Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs*, **165**, 131-143.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K. and Dalton, S.** (2005) LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, **132**, 885-896.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. and Smith, A.** (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, **113**, 643-655.
- Clipsham, R., Niakan, K. and McCabe, E.R** (2004) Nr0b1 and its network partners are expressed early in murine embryos prior to steroidogenic axis organogenesis. *Gene Expr Patterns*, **4**, 3-14.
- Cristian Netzer, Stefan K. Bohlander, Markus Hinzke, Ying Chen, Jurgen Kohlhase** (2006). Defining the heterochromatin localization and repression domains of Sall1. *Biochimics et Biophysics Acta* 1762, 386-391.
- Guangjin Pan, James A Thomson** (2007). Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research* 17 42-49.
- Jianlong Wang, Sridhar Rao, Jianlin Chu, Xiaohua Shen, Dana N. Levasseur, Thorold W. Theunissen and Stuart H. Orkin** (2006). A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*.
- Kazunari Yamashita, Akira Sato, Makoto Asashima, Pi-Chao Wang and Ryuichi Nishinakamura** (2007). Mouse homologue of Sall1, a causative gene for Townes-

Brocks syndrome, binds to A/T-rich sequences in pericentric heterochromatin via its C-terminal zinc finger domains. *Genes to Cells*, 12, 171-182.

**Mahendra Rao** (2004). Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. *Developmental Biology* 275, 269-286.

**Niakan and McCabe**, (2005) DAX1 origin, function, and novel role. *Mol. Genet. Metab.*, 86, 70-83.

**Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. and Smith, A.** (1998) Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, 12, 2048- 2060.

**O'Shea, K.S.** (2004) Self-renewal vs. differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 71, 1755–1765.

**Song, K.H., Park, Y.Y., Park, K.C., Hong, C.Y., Park, J.H., Shong, M., Lee, K. and Choi, H.S.** (2004) The atypical orphan nuclear receptor DAX-1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and represses its transactivation. *Mol Endocrinol*, 18, 1929-1940.

**Starr, R., Novak, U., Wilson, T.A., Inglese, M., Murphy, V., Alexander, W.S., Metcalf, D., Nicola, N.A., Hilton, D.J., and Ernst, M.** (1997) Distinct roles for leukemia inhibitory factor receptor  $\alpha$ -chain and gp130 in cell type-specific signal transduction. *J. Biol Chem.*, 272, 19982-19986.

**Susan McLeskey Kiefer, Bradley W. McDill, Jing Yang, and Michael Rauchman** (2002). Murine Sall1 represses transcription by recruiting a histone deacetylase complex. *The Journal of Biology Chemistry*, vol. 277, 14869-14876.

**Zhang, H., Thomsen, J.S., Johansson, L., Gustafsson, J.A. and Treuter, E.** (2000) DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. *J Biol Chem*, 275, 39855-39859.

**Zhang, J.G., Owczarek, C.M., Ward, L.D., Howlett, G.J., Fabri, L.J., Roberts, B.A. and Nicola N.A.** (1997) Evidence for the formation of a heterotrimeric complex of leukaemia inhibitory factor with its receptor subunits in solution. *Biochem J*, 325 (P3), 693-700.