

Πανεπιστήμιο Κρήτης  
Σχολή Θετικών Επιστημών  
Τμήμα Βιολογίας

## Μεταπτυχιακή Διατριβή

### Θέμα

Ο ρόλος των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών και της πρόλινο  
ισομεράσης Pin1 στη ρύθμιση των γονιδίων των  
απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου.

Νικολαΐδου-Νεοκοσμίδου Βαρβάρα

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Δημήτριος Καρδάσης  
Αναπ. Καθηγητής Βιοχημείας  
Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ηράκλειο 2004

Ολοκληρώνοντας την μεταπτυχιακή μου διατριβή θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Δημήτρη Καρδάση, ο οποίος όχι μόνο μου προσέφερε την δυνατότητα να πραγματοποιήσω την εργασία αυτή, αλλά με βοήθησε με τις γνώσεις και την εμπειρία του σε κάθε βήμα της δουλειάς που πραγματοποιήθηκε. Η καθοδήγησή του ήταν, είναι και θα είναι σημαντική σε όλη τη διάρκεια της επιστημονικής μου πορείας και για τον λόγο αυτό τον ευχαριστώ ιδιαίτερα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου Βέτα, Βίκυ, Christine και Γιώργο Κουτσοδόνη, που με βοήθησαν στα πρώτα «εργαστηριακά» μου βήματα. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη Βέτα που με την υπομονή της, με «μύησε» στις μεθόδους και τις τεχνικές του εργαστηρίου μας. Εκτός από αυτό όμως η Βέτα και η Βίκυ αποτελούν και σημαντικό κομμάτι της προσωπική μου ζωής. Με έχουν στηρίξει σε κρίσιμες στιγμές τις ζωής μου και γι' αυτό τις ευχαριστώ πολύ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα παιδιά του εργαστηρίου μας, το Γιώργο Κούκο, τον Κώστα Δροσάτο, το Θωμά Βρεκούση, την Ελευθερία, την Έφη και τη Σόφη, τον Κώστα Χαριτάκη και τα παιδιά από το εργαστήριο του κ. Ανάγνου (Σμάρω, Γιάννη, Μιχάλη και Μαρία) για την πολύ καλή συνεργασία εντός του εργαστηριακού χώρου, αλλά και την παρέα τους εκτός εργαστηρίου.

Φυσικά και δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τις φίλες μου στη Θεσσαλονίκη, Μαρία, Χρύσα και Κατερίνα για την ηθική υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια που είμαστε μακριά. Κάθε φορά που τις ακούω, παίρνω κουράγιο για να συνεχίσω να προσπαθώ για το καλύτερο.

Όσο για τις φίλες μου στη Κρήτη, Αλεξάνδρα, Γεωργία, Δάφνη, Κατερίνα, Τερέζα...όσα ευχαριστώ και να πω θα είναι λίγα! Οι στιγμές που μου χάρισαν, η βοήθεια που μου προσέφεραν και η τεράστια ανοχή που έδειξαν (όσοι με γνωρίζουν καλύτερα, καταλαβαίνουν τι θέλω να πω!), ήταν, είναι και θα είναι πολύτιμη, έστω και αν κάποια στιγμή πάψουμε να είμαστε μαζί. Ευχαριστώ κορίτσια μου...δεν ξέρω πώς θα τα κατάφερνα χωρίς εσάς.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου την οικογένεια μου, τον πατέρα μου Αντώνη, την γιαγιά μου Μαριγίτσα και τον αδελφούλη μου Στράτο για όλα τα πράγματα, υλικά και πνευματικά, που μου έχουν προσφέρει. Το τελευταίο ευχαριστώ είναι για τους ανθρώπους που δεν έχω πια δίπλα μου, τη μητέρα μου Νανά και τον παππού μου Στράτο. Η ανάμνησή τους μένει πάντα ζωντανή μέσα μου. Με βοηθά να ξεπερνάω τα εμπόδια που βρίσκονται στο δρόμο μου και να κοιτάω πάντα μπροστά...Η αγάπη της οικογένειάς μου είναι το πολυτιμότερο δώρο και η κινητήριος δύναμη για όλα όσα έχω καταφέρει μέχρι τώρα και για όλα όσα θέλω να κατακτήσω.

# **Στην οικογένειά μου**

## Περιεχόμενα

◆ <b>Περίληψη</b> .....	5
◆ <b>Abstract</b> .....	6
◆ <b>Εισαγωγή</b> .....	7
◆ Παρουσίαση του συστήματος των ανθρώπινων γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών.....	8
◆ Απολιποπρωτεΐνη CIII (apoCIII).....	10
◆ Απολιποπρωτεΐνη A-I.....	12
◆ Πρωτεΐνες που ελέγχουν την μεταγραφή ηπατοειδικών γονιδίων.....	13
◆ Ορμονικός πυρηνικός υποδοχέας HNF-4.....	15
◆ Ορμονικός πυρηνικός υποδοχέας RXR $\alpha$ (Retinoid X Receptor).....	19
◆ Ισομεράση Pin1.....	22
◆ <b>Σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας</b> .....	25
◆ <b>Συντμήσεις</b> .....	26
◆ <b>Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	27
◆ Υλικά.....	27
◆ Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB για την ανάπτυξη στελεχών του βακτηρίου E.coli.....	28
◆ Βακτηριακή μεταμόρφωση (transformation).....	28
◆ Πηκτή αγαρόζης για την ηλεκτροφόρηση DNA.....	29
◆ Πέψεις DNAs με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών.....	29
◆ Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	30
◆ Αποφωσφορυλίωση DNA.....	30
◆ Ligation (αντίδραση σύνδεσης του φορέα (πλασμίδιο) με το κομμάτι του DNA που θέλουμε να ενθέσουμε).....	30
◆ Ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας για τη διάγνωση σωστά κλωνοποιημένων ενθεμάτων (minipreps) και την απομόνωση πλασμιδίων (midipres).....	31
◆ Πλασμιδιακές κατασκευές (constructions).....	32
◆ Πλασμιδιακή κατασκευή του HNF4Bio.....	33
◆ Πλασμιδιακή κατασκευή του Gal4-RXR $\alpha$ (human).....	34
◆ Πλασμιδιακή κατασκευή του RXR $\alpha$ -Bio.....	35
◆ Πηκτή πολυακρυλαμίδης για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	36
◆ Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης με ανοσοαποτύπωση (Western Blot).....	36
◆ Το σύστημα της in vivo βιοτινυλίωσης πρωτεϊνών και η συνκατακρήμιση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών (in vivo biotinylation).....	37
◆ Κυτταροκαλλιέργειες.....	38
◆ Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections).....	39
◆ Μέθοδος κανονικοποίησης $\beta$ -gal ( $\beta$ -gal assay).....	40
◆ Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay).....	41
◆ Μέθοδος ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης (ChIP).....	41
◆ <b>Αποτελέσματα</b> .....	47
◆ In vivo ανίχνευση πρόσδεσης του ορμονικού πυρηνικού υποδοχέα HNF4 στους υποκινητές των απολιποπρωτεϊνών AI και CIII.....	47

◆ Επίδραση της ισομεράσης προλίνης Pin1 στην μεταγραφική δραστηριότητα του ορμονικού πυρηνικού υποδοχέα RXRa και έλεγχος της επίδρασής της σε υποκινητές των απολιποπρωτεϊνών.....	49
◆ Επίδραση του Pin1 στη μεταγραφική δραστηριότητα των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων ορμονών HNF4 και RXRa.....	49
◆ Επίδραση του Pin1 στη μεταγραφική δραστηριότητα του HNF4.....	50
◆ Επίδραση του Pin1 στη μεταγραφική δραστηριότητα του RXRa.....	50
◆ Επίδραση του Pin1 στη μεταγραφική ενεργοποίηση διαφόρων υποκινητών των απολιποπρωτεϊνών.....	57
◆ Δημιουργία υβριδικών μορίων των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών HNF4 και RXRa με το πεπτίδιο Bio, με σκοπό την χρήση τους σε αντιδράσεις βιοτινυλίωσης <i>in vivo</i> .....	59
◆ Ανίχνευση της βιοτινυλιωμένης Bio-HNF4 υβριδικής πρωτεΐνης κατά την παραγωγή της σε ευκαρυωτικά κύτταρα.....	59
◆ Λειτουργική ανάλυση της επίδρασης της βιοτινυλίωσης στην μεταγραφική δραστηριότητα της πρωτεΐνης HNF4.....	60
◆ Ανίχνευση της βιοτινυλιωμένης Bio-RXRa υβριδικής πρωτεΐνης κατά την παραγωγή της σε ευκαρυωτικά κύτταρα.....	62
◆ <b>Συζήτηση</b> .....	64
◆ Ο ορμονικός πυρηνικός υποδοχέας HNF4 προσδένεται <i>in vivo</i> στους υποκινητές των απολιποπρωτεϊνών AI και CIII.....	64
◆ Η ισομεράση Pin1 καταστέλλει τη δράση του RXRa.....	65
◆ <b>Βιβλιογραφία</b> .....	68

### Εικόνες, Πίνακες

◆ Εικόνα 1: Το μονοπάτι μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών.....	6
◆ Εικόνα 2: Η θέση του γονιδίου της apoCIII μέσα στο cluster γονιδίων apoA-I/apoCIII/apoA-IV. ....	9
◆ Εικόνα 3: Κοντινά και μακρινά στοιχεία του υποκινητή της apoCIII. Παράγοντες που προσδένονται στα στοιχεία αυτά.....	10
◆ Εικόνα 4: Ο υποκινητής της απολιποπρωτεΐνης A-I με τα ρυθμιστικά στοιχεία πάνω στα οποία προσδένονται ορμονικοί υποδοχείς.....	11
◆ Εικόνα 5: Σχηματική παρουσίαση των πρωτεϊνών που ελέγχουν την μεταγραφή ηπατοειδικών γονιδίων.....	13
◆ Εικόνα 6: Παρουσίαση των κατηγοριών των πυρηνικών υποδοχέων.....	14
◆ Εικόνα 7: Ομολογίες μεταξύ των HNF4 διαφόρων ειδών. Ομολογία με τον RXRa.....	15
◆ Εικόνα 8: Παρουσίαση των διαφόρων domains και εν δυνάμει στόχων φωσφορυλίωσης του πυρηνικού υποδοχέα HNF-4.....	16
◆ Εικόνα 9: Η δράση των πυρηνικών υποδοχέων ρετινοειδών.....	18
◆ Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών και των θέσεων φωσφορυλίωσης των πυρηνικών υποδοχέων ρετινοειδών.....	19
◆ Εικόνα 11: Ικανότητα ισομερίωσης φωσφορυλιωμένων καταλύπων προλίνης από την ισομεράση Pin1 και πρωτεΐνες στόχοι της.....	22
◆ Εικόνα 12: Περιοριστικός χάρτης του ευκαρυωτικού φορέα έκφρασης pcDNAIII.....	33
◆ Εικόνα 13: Η πρωτεΐνη HNF-4 που φέρει στο N-άκρο της το πεπτίδιο Bio	

για <i>in vivo</i> βιοτινυλίωση.....	33
◆ Εικόνα 14: Η πρωτεΐνη hRXRa που φέρει στο N-άκρο της το DBD του Gal4.....	34
◆ Εικόνα 15: Η πρωτεΐνη hRXRa που φέρει στο N-άκρο της το πεπτίδιο Bio για <i>in vivo</i> βιοτινυλίωση. ....	35
◆ Πίνακας 1: ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των διαφόρων περιοχών του apoAI και apoCIII υποκινητών/ενισχυτή.....	46
◆ Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης.....	47
◆ Εικόνα 17: Η <i>in vivo</i> πρόσδεση του HNF4 στους υποκινητές και στον κοινό ενισχυτή των γονιδίων apoAI και apoCIII.....	48
◆ Εικόνα 18: Θέσεις φωσφορυλίωσης της RXRa από διάφορες κινάσες...	49
◆ Εικόνα 19: Ανίχνευση της έκφρασης της ισομεράσης Pin1.....	50
◆ Εικόνα 20: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα της HNF4 πρωτεΐνης, μέσω της δράσης του στον υποκινητή της apoCIII.....	51
◆ Εικόνα 21: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα της RXRa πρωτεΐνης, μέσω της δράσης της στον υποκινητή της apoAII.....	52
◆ Εικόνα 22: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα της RXRa πρωτεΐνης, μέσω της δράσης της στον υποκινητή της apoCII.....	53
◆ Εικόνα 23: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα της RXRa πρωτεΐνης.....	54
◆ Εικόνα 24: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα της RXRa πρωτεΐνης.....	55
◆ Εικόνα 25: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 και του μεταλλάγματός της Pin1-W34A στη μεταγραφική ενεργότητα της RXRa πρωτεΐνης.....	56
◆ Εικόνα 26: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 και του μεταλλάγματός της Pin1-W34A στη μεταγραφική ενεργότητα της HNF4 πρωτεΐνης.....	57
◆ Εικόνα 27: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ικανότητα υποκινητών των απολιποπρωτεϊνών.....	58
◆ Εικόνα 28: Το σύστημα της <i>in vivo</i> βιοτινυλίωσης.....	59
◆ Εικόνα 29: Χρήση του συστήματος της <i>in vivo</i> βιοτινυλίωσης για την ανίχνευση της υβριδικής πρωτεΐνης Bio-HNF4.....	60
◆ Εικόνα 30: <i>In vivo</i> βιοτινυλίωση και ανάλυση της επίδρασης της βιοτινυλίωσης στην μεταγραφική δραστηριότητα της HNF4 πρωτεΐνης.	61
◆ Εικόνα 31: Χρήση του συστήματος της <i>in vivo</i> βιοτινυλίωσης για την ανίχνευση της υβριδικής πρωτεΐνης Bio-RXRa.....	63

## Περίληψη

Η εργασία αυτή πραγματεύεται την μελέτη του ρόλου των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών στους μοριακούς μηχανισμούς που ελέγχουν την μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών A-I και C-III. Η αποA-I αποτελεί το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο κατά της αθηροσκλήρυνσης ενώ η αποCIII σχετίζεται με τον καταβολισμό λιποπρωτεϊνών πλούσιων σε τριγλυκερίδια.

Στο πρώτο μέρος της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας μελετήσαμε την στρατολόγηση του ορφανού πυρηνικού υποδοχέα HNF-4 στους υποκινητές και τον κοινό ενισχυτή των γονιδίων αποA-I και αποC-III χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης *in vivo*. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας διερευνήσαμε τον πιθανό ρόλο που παίζει η προλινο-ισομεράση Pin1 στη μεταγραφική δραστικότητα δύο πολύ σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών, που ανήκουν στην οικογένεια των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων, του HNF4 και του RXRa (υποδοχέας του 9-cis ρετινοϊκού οξέος). Επίσης ελέγχθηκε και η πιθανή επίδραση της ισομεράσης Pin1 στην έκφραση διαφόρων γονιδίων απολιποπρωτεϊνών. Τέλος, στο τρίτο μέρος της παρούσης εργασίας θελήσαμε να εκμεταλλευτούμε ένα σύγχρονο και ευαίσθητο σύστημα μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που βασίζεται στην *in vivo* βιοτινυλίωση με απώτερο σκοπό να μελετήσουμε πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πυρηνικών υποδοχέων και άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών όπως η ισομεράση Pin1, οι πρωτεΐνες Smad του σηματοδοτικού μονοπατιού του μετασχηματίζοντα αυξητικού παράγοντα β (TGFβ) και οι πρωτεΐνες της οικογένειας AP1 (c-jun, JunB, junD, ATF2). Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν χμιαϊκές πρωτεΐνες του HNF4 και του RXRa που στο N-τερματικό τους άκρο φέρουν ένα πεπτίδιο 22 αμινοξέων που αποτελεί στόχο βιοτινυλίωσης από την λιγάση βιοτίνης BirA.

Ο απώτερος στόχος της παρούσης έρευνας είναι η σε βάθος κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους ρυθμίζονται τα γονίδια των απολιποπρωτεϊνών A-I και C-III η οποία θα οδηγήσει στην δημιουργία νέων φαρμάκων για την καταπολέμηση των υπερτριγλυκεριδαιμιών στον άνθρωπο. Η κατανόηση του ρόλου της ισομεράσης Pin1 στην δραστικότητα των πυρηνικών υποδοχέων αναμένεται να έχει σημαντικές εφαρμογές σε ασθένειες που προκαλούνται από την απορύθμιση αυτών των σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων όπως ο καρκίνος.

## **Abstract**

The focus of the present work is the role of hormone nuclear receptors in the transcriptional regulation of the genes coding for apolipoprotein A-I and C-III. ApoA-I is the main protein component of high density lipoproteins (HDL) and plays an important protective role against the development of atherosclerosis whereas apoC-III is involved in the catabolism of triglyceride-rich lipoprotein particles.

In the first part of the present work we studied *in vivo* the recruitment of the orphan nuclear receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4 (HNF-4) to the promoters and the common enhancer of the apoA-I and apoC-III genes using chromatin immunoprecipitations. In the second part, we investigated the possible role of prolyl isomerase Pin1 in the transcriptional activity of the hormone nuclear receptors HNF-4 and RXR (Retinoid X Receptor). We also studied the involvement of Pin1 in the transcriptional regulation of various apolipoprotein promoters. Finally, in the third part of the present work, we took advantage of a recently described sensitive system for protein-protein interactions which is based on protein biotinylation *in vivo* in order to study the physical interactions between hormone nuclear receptors and various regulatory factors such as the isomerase Pin, the Transforming Growth Factor  $\beta$  regulated Smad proteins as well as members of the AP1 family of transcription factors (c-jun, junB, junD, ATF-2). For this purpose we constructed hybrid proteins of HNF-4 and RXR $\alpha$  bearing a short 22 amino acid peptide tag at their N-terminus. This peptide is recognized and biotinylated at a specific lysine residue by the bacterial protein ligase BirA *in vivo*.

The ultimate goal of this work is to understand in depth the mechanisms by which the apolipoprotein genes are regulated. This knowledge may lead in the future to the development of novel drugs for the treatment of hyperlipidemias in humans. Understanding the role of Pin1 on the activity of nuclear receptors may also have wider implications for the treatment of diseases that are caused by the deregulation of this important class of transcription factors such as cancer.



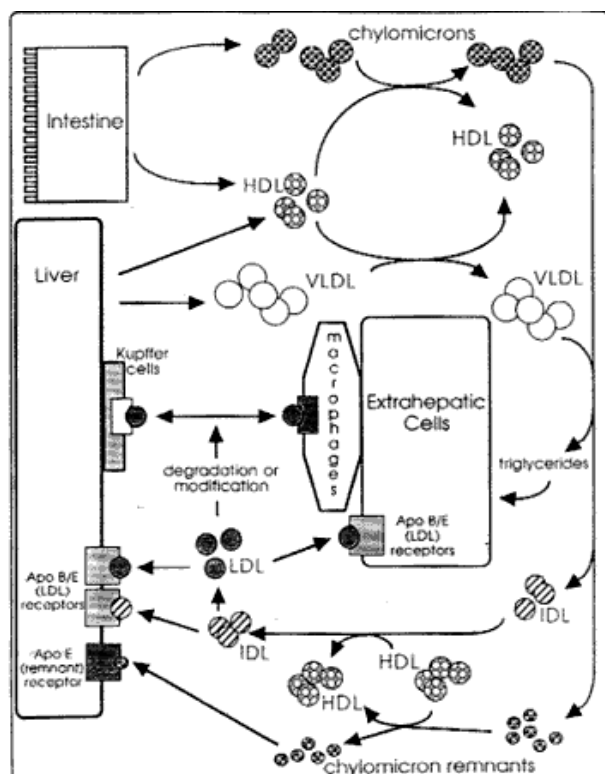
## Εισαγωγή

Η μεταγραφή των ευκαρυωτικών γονιδίων αποτελεί ένα πολύπλοκο βιολογικό γεγονός, το οποίο απαιτεί τη παρουσία μίας πλειάδας πρωτεϊνών όπως: της RNA πολυμεράσης II, των παραγόντων της βασικής μεταγραφικής μηχανής (π.χ. TFIIs, TBP, TAFs κ.α.), των μεταγραφικών παραγόντων, των συνενεργοποιητών και των συνκαταστολέων, αλλά και διαφόρων βοηθητικών παραγόντων. Η σωστή, όμως, μεταγραφή των ευκαρυωτικών γονιδίων (όσον αφορά τον τόπο και το χρόνο έκφρασή τους), πέρα από τη παρουσία των πρωτεϊνών που προαναφέρθηκαν, απαιτεί και τη παρουσία διαφόρων ρυθμιστικών στοιχείων (αλληλουχίες DNA), τα οποία εντοπίζονται στους υποκινητές των γονιδίων (*cis*-ρυθμιστικά στοιχεία). Μέσα από τις μελέτες που έχουν γίνει, μέχρι σήμερα, πάνω στη μεταγραφική ρύθμιση των ευκαρυωτικών γονιδίων, έχει χαρακτηριστεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός *cis*-ρυθμιστικών στοιχείων και πρωτεϊνών που παίρνουν μέρος στη μεταγραφή. Αυτό που φαίνεται να ισχύει είναι ότι οι ίδιες πρωτεΐνες και τα ίδια *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία παρουσιάζουν διαφορετική βαρύτητα στη μεταγραφική ρύθμιση συγκεκριμένων υποκινητών.

Ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον σύστημα, για τη μελέτη της μεταγραφικής πολυπλοκότητας των ευκαρυωτικών γονιδίων, αποτελούν τα γονίδια των απολιποπρωτεϊνών, των οποίων η έκφραση εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ, αλλά και στο έντερο. Η πρόοδος που έχει επιτευχθεί στον δομικό, αλλά και λειτουργικό χαρακτηρισμό ηπατο-ειδικών (π.χ. HNF4), αλλά και γενικών μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. οικογένεια ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων ορφανών και μη, οικογένεια AP-1, NF-kB) έχει βοηθήσει πολύ στη κατανόηση της μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων αυτών. Στη κατανόηση αυτή συνέβαλε και ο χαρακτηρισμός διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία οδηγούν είτε στην ενεργοποίηση, είτε στην καταστολή των ηπατο-ειδικών, αλλά και των γενικών μεταγραφικών παραγόντων, με αποτέλεσμα την μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών (π.χ. μονοπάτια προφλεγμονωδών κυτοκινών (TNF $\alpha$ , IL-1), αντιφλεγμονωδών κυτοκινών (TGF- $\beta$ ), χυμοκινών, αυξητικών παραγόντων, μηχανικού στρες κ.α.) (1).

## Παρουσίαση του συστήματος των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου.

Οι απολιποπρωτεΐνες, μαζί με πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων, ένζυμα του πλάσματος και τους υποδοχείς των λιποπρωτεϊνών, συμμετέχουν στη βιογένεση, αλλά και στον καταβολισμό τριών διαφορετικών τάξεων λιποπρωτεϊνών: α) των χυλομικρών (παράγονται από το έντερο), β) της ομάδας VLDL/IDL/LDL (παράγονται από το ήπαρ) και γ) της ομάδας HDL (παράγονται επίσης από το ήπαρ) (εικόνα 1).



**Εικόνα 1:**  
**Το μονοπάτι μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών.**

Περιμένει, λοιπόν, κανείς ότι αλλαγές στη δομή των απολιποπρωτεϊνών, ικανές να αλλάξουν τη λειτουργία τους, ή αλλαγές στη ρύθμιση της σύνθεσής τους, θα επηρεάσουν τα επίπεδα λιπιδίων-λιποπρωτεϊνών του πλάσματος και, σε ορισμένες περιπτώσεις, θα συμβάλουν στη παθογένεση της αθηροσκλήρυνσης (2). Αυτός είναι και ο κύριος λόγος για τον οποίο πραγματοποιούνται όλες οι μελέτες σχετικά με τη μεταγραφική ρύθμιση των απολιποπρωτεϊνών.

Στις πιο καλά μελετημένες ανθρώπινες απολιποπρωτεΐνες, τόσο από άποψη φυσιολογίας, όσο και μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων τους, ανήκουν οι:

- **Απολιποπρωτεΐνη Α-II (apoA-II)**, το γονίδιο της οποίας εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 (θέση 1q21-1q23). Η apoA-II, αποτελεί το βασικό πρωτεϊνικό συστατικό των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) (3). Εκφράζεται

κυρίως στο ήπαρ και σε πολύ μικρότερο ποσοστό στο έντερο. Ο υποκινητής της apoA-II (-911/+29) φέρει *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία, τόσο για ορμονικούς πυρηνικούς υποδοχείς (π.χ. HNF4), όσο και για γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. USF, SREBP-1, SREBP-2 κ.α.) (4, 5, 6).

- **Απολιποπρωτεΐνη Β (apoB)**, το γονίδιο της οποίας εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2 (θέση 2p24). Η apoB, αποτελεί βασικό συστατικό των χυλομικρών και των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητα (LDL). Εκφράζεται αποκλειστικά και μόνο στο ήπαρ και στο έντερο (7), με ελάχιστη έκφραση σε κάποιους άλλου ιστούς (8). Η ηπατο-ειδική έκφραση ελέγχεται από δύο ρυθμιστικές αλληλουχίες οι οποίες εντοπίζονται 5kb upstream και 1.5kb downstream του υποκινητή της apoB, ενώ η έκφρασή της στο έντερο ελέγχεται από έναν ενισχυτή που εντοπίζεται 56kb upstream του γονιδίου της apoB (9). Σημαντικοί παράγοντες έκφρασης του γονιδίου της apoB είναι οι HNF-4, HNF-3 και C/EBP για τους οποίους υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης κατά μήκος όλων των ρυθμιστικών στοιχείων της ApoB.
- **Απολιποπρωτεΐνες E, CI, CIV, CII (apoE/apoCI/apoCIV/apoCII)**, οι οποίες αποτελούν ένα σύμπλεγμα (cluster) γονιδίων που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19 (θέση 19q13.2). Η apoE, αποτελεί συστατικό των χυλομικρών και των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL). Εκφράζεται στο ήπαρ και στους περισσότερους από τους περιφερικούς ιστούς και κύτταρα, όπως στα μονοκύτταρα/μακροφάγα, στα αστροκύτταρα και τη μικρογλία (8, 10, 11). Οι apoCI και apoCII, αποτελούν, σε μεγάλο ποσοστό, συστατικά των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), και σε πολύ μικρότερο ποσοστό των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL). Μαζί με την apoCIV, οι apoCI και apoCII, εκφράζονται στο ήπαρ (8, 12), ενώ η apoCII και η apoCI εκφράζονται, επιπλέον, στο έντερο και στο δέρμα, αντίστοιχα (13). Τα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία που περιέχονται στο γονιδιακό αυτό σύμπλεγμα είναι: α) δύο ομόλογα HCR (Hepatic Control Regions), τα HCR-1 και HCR-2, τα οποία ρυθμίζουν την ηπατο-ειδική έκφραση των γονιδίων του συμπλέγματος (13, 14, 15) και β) τα multienhancer 1 και 2, τα οποία επίσης παρουσιάζουν ομολογία και ρυθμίζουν την έκφραση της apoE στα μακροφάγα και τα αδιποκύτταρα (16). Σημαντικοί παράγοντες έκφρασης της apoE είναι ο SP1, ο HNF3, ο C/EBP και πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών, ενώ για την έκφραση της apoCII, ο HNF4, ο ARP-1 και το σύμπλοκο RXRα/T3Rβ (1).

➤ **Απολιποπρωτεΐνες A-I, CIII, A-IV (apoA-I/apoCIII/apoA-IV)**, οι οποίες αποτελούν, επίσης, ένα σύμπλεγμα γονιδίων, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 (θέση 11q23). Η apoA-I, αποτελεί το κύριο συστατικό των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) και εκφράζεται σε μεγάλα ποσά στο ήπαρ και το έντερο, ενώ σε μικρότερα σε άλλους ιστούς (1). Η apoA-IV, είναι συστατικό των χυλομικρών και των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL), ενώ εκφράζεται, κατά κύριο λόγο στο έντερο και σε μικρότερο ποσοστό στο ήπαρ (7). Τέλος, η apoCIII, αποτελεί συστατικό των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), και σε πολύ μικρότερο ποσοστό των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL). Στον άνθρωπο, η apoCIII εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και σε πολύ μικρότερο βαθμό, παρατηρείται έκφρασή της και στο έντερο (1). Έχει δειχτεί πως η μεταγραφική ρύθμιση του συμπλέγματος γίνεται μέσω ενός κοινού ενισχυτή που εντοπίζεται 590-790 νουκλεοτίδια στο 5' του γονιδίου της apoCIII και ο οποίος αποτελεί ουσιαστικά τμήμα του υποκινητή της apoCIII (μακρινός υποκινητής) (17, 18, 19). Σημαντικοί παράγοντες για την ενεργότητα του ενισχυτή είναι ο SP1, ο HNF4 και πιθανόν, άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς, ενώ για την *in-vitro* ενεργότητα των υποκινητών των τριών γονιδίων, απαιτείται ο HNF4 και άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς (17, 18, 19, 20).

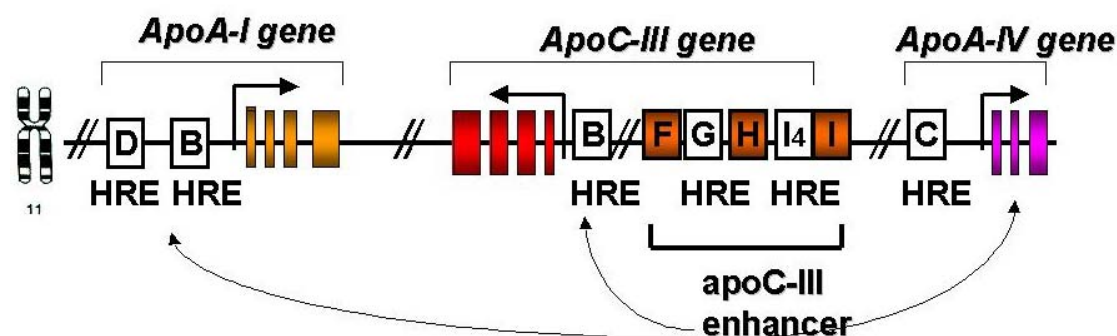
Ακολουθεί μία πιο λεπτομερής περιγραφή σχετικά με τα όσα είναι γνωστά για τις πρωτεΐνες apoCIII και apoAI και τη μεταγραφική τους ρύθμιση, για τους ορμονικούς πυρηνικούς υποδοχείς HNF4 και RXRa και την επίδρασή τους στην μεταγραφή των δύο λιποπρωτεϊνών και τέλος μία περιγραφή για το τι γνωρίζουμε για την ισομεράση Pin1.

#### **Απολιποπρωτεΐνη CIII (apoCIII)**

Η ανθρώπινη apoCIII είναι μία πρωτεΐνη 79 αμινοξέων, η οποία απαντάται στο πλάσμα. Τόσο η γονιδιακή (22), όσο και η αμινοξική (23) της αλληλουχία μας είναι γνωστές. Η apoCIII, αποτελεί το κύριο συστατικό των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), και σε πολύ μικρότερο ποσοστό των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) (24). Έχει δειχτεί πως η apoCIII αναστέλλει την πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών στους κυτταρικούς τους υποδοχείς, με αποτέλεσμα τη καταστολή του καταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών (25, 26, 27) και την εμφάνιση υπερτριγλυκεριδαιμίας. Αυτό συνεπάγεται ότι αυξημένα ποσά apoCIII οδηγούν σε συσσώρευση λιπιδίων πλούσιων σε τριγλυκερίδια στο πλάσμα

(υπερτριγλυκεριδαιμία), πράγμα που αποτελεί ένα σοβαρό παράγοντα παθογένεσης της αθηροσκλήρυνσης.

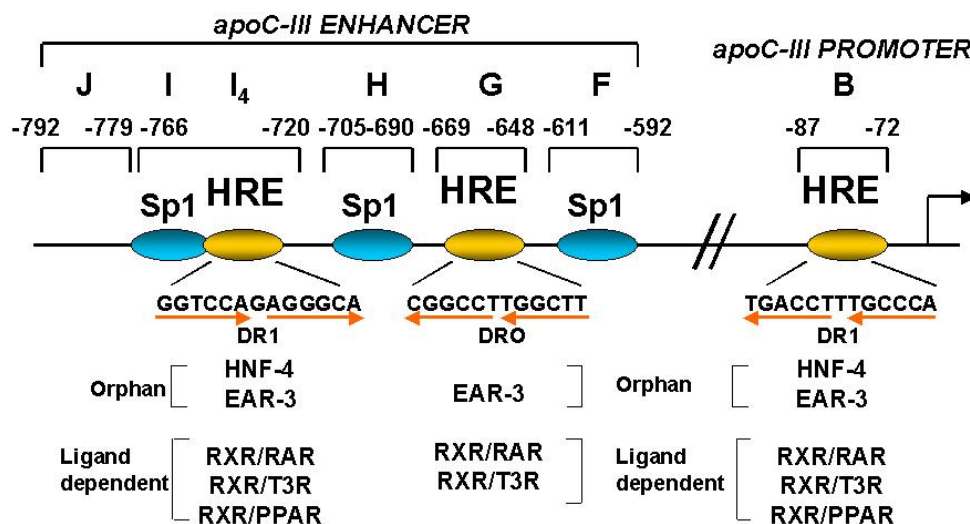
Όπως έχει είδη αναφερθεί, μαζί με τα γονίδια των apoA-I και apoA-IV, αποτελούν ένα σύμπλεγμα γονιδίων (εικ.2) το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11.



**Εικόνα 2:** Η θέση του γονιδίου της apoCIII μέσα στο cluster γονιδίων apoA-I/apoCIII/apoA-IV. Τα βέλη υποδεικνύουν τη φορά μεταγραφής των γονιδίων.

Η έκφραση της apoCIII είναι τόσο ιστοειδική (28), όσο και ρυθμιζόμενη κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του οργανισμού (29). Ειδικότερα, η apoCIII εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και σε πολύ μικρότερο βαθμό, παρατηρείται και έκφρασή της στο έντερο (1). Ο υποκινητής της ανθρώπινης apoCIII, περιέχει 4 κοντινά (A-D) και 6 μακρινά (E-J) ρυθμιστικά στοιχεία μεταξύ των νουκλεοτιδίων -792 και -25 (εικ. 3) (19, 30). Τα μακρινά ρυθμιστικά στοιχεία F-J (μεταξύ των νουκλεοτιδίων -592 και -792) αποτελούν ένα κοινό ενισχυτή, ο οποίος αυξάνει τη μεταγραφική ικανότητα των υποκινητών όλων των γονιδίων του συμπλέγματος (30, 17, 18).

Ο κοντινός υποκινητής της apoCIII, περιέχει ένα στοιχείο ορμονικής απόκρισης (Hormone Response Element, HRE), με απόσταση ενός νουκλεοτιδίου μεταξύ των επαναλήψεων (Direct Repeat 1, DR1), πάνω στο οποίο προσδένεται κυρίως ο πυρηνικός ορμονικός υποδοχέας HNF4, αλλά και άλλοι ορμονικοί πυρηνικοί υποδοχείς, και το οποίο είναι υπεύθυνο για την *in vivo* ηπατοειδική έκφραση της apoCIII (17, 18,19, 31). Ο μακρινός υποκινητής της apoCIII, περιέχει 3 θέσεις πρόσδεσης του γενικού παράγοντα SP1, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την *in vivo* έκφραση της apoCIII στο έντερο, αλλά και για την ενίσχυση της ηπατο-ειδικής της μεταγραφής (17). Ο μακρινός υποκινητής, περιέχει, επίσης, μία θέση πρόσδεσης του παράγοντα ARP-1 και 2 HREs πάνω στα οποία προσδένονται ο HNF4 και άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς, ορφανοί και μη, όπως ο RXRa ως ομοδιμερές ή ως ετεροδιμερές με τους T3R $\beta$  και PPAR $\alpha$  (17, 19) (εικ. 3).

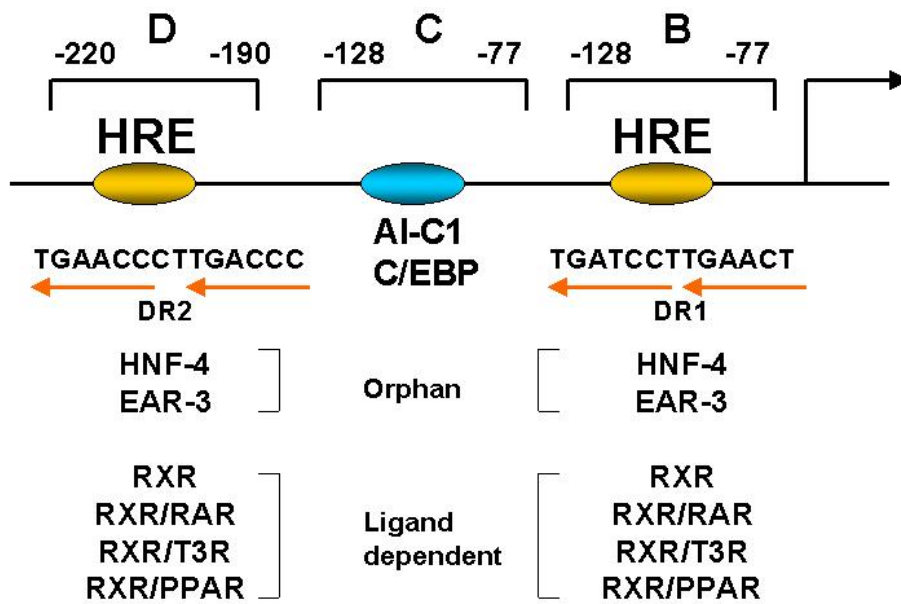


**Εικόνα 3:** Κοντινά (proximal) και μακρινά (distal) ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή της apoCIII καθώς και παράγοντες που προσδένονται στα στοιχεία αυτά.

### Απολιποπρωτεΐνη A-I:

Αποτελεί κύριο συστατικό των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL). Απουσία της δεν σχηματίζεται HDL. Στον άνθρωπο, εκφράζεται κυρίως στο έντερο και στο ήπαρ. Τα επίπεδα του mRNA της στους ιστούς ελέγχονται από ορμονικούς και διατροφικούς παράγοντες, ενώ ρυθμίζονται στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης. Η apoA-I αποτελεί των συνδέτη του υποδοχέα scavenger BI (SR-BI) και δραστικό συμπαράγοντα για την ενεργότητα του ενζύμου LCAT, υποκινώντας την έξοδο της χοληστερόλης από τα κύτταρα των περιφερικών ιστών (μονοπάτι της ανάστροφης μεταφοράς χοληστερόλης). Για τον λόγο αυτό, η apoA-I παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ποσότητας σε χοληστερόλη των περιφερικών ιστών.

Πειραματικές αναλύσεις με ελλείμματα, αντικατάσταση νουκλεοτιδίων και DNase I footprinting του υποκινητή της apoA-I καθώς και αναλύσεις ενεργότητας CAT, έχουν δείξει ότι πάνω στον apoA-I υποκινητή, και μεταξύ των θέσεων -250 και -30, εντοπίζονται ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία απαιτούνται για την ηπατοειδική μεταγραφή της apoA-I σε κυτταροκαλλιέργειες. Τρία είναι τα πιο σημαντικά ρυθμιστικά στοιχεία της περιοχής αυτής, τα B, C και D. Με αναλύσεις πρόσδεσης σε DNA (EMSA), συναγωνισμού και υπερανύψωσης ζώνης (supershift), δείχθηκε ότι τα ρυθμιστικά στοιχεία B και D προσδένουν ορφανού και εξαρτώμενους από συνδέτες ορμονικούς υποδοχείς (εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ο υποκινητής της απολιποπρωτεΐνης A-I με τα ρυθμιστικά στοιχεία πάνω στα οποία προσδένονται πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών.

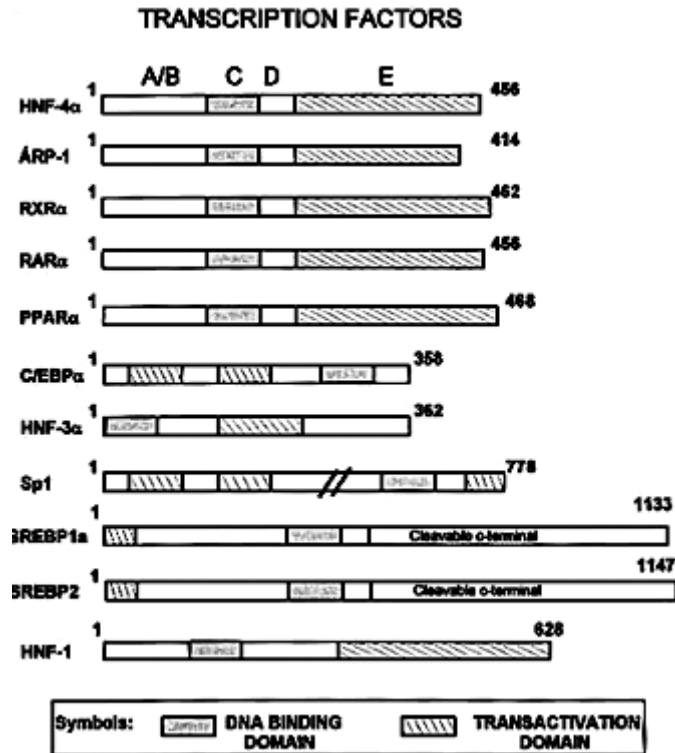
#### Πρωτεΐνες που ελέγχουν την μεταγραφή ηπατοειδικών γονιδίων

Είναι γνωστό ότι το σύνολο των απολιποπρωτεϊνών, όπως και η apoCIII, παρουσιάζουν κυρίως ηπατο-ειδική έκφραση. Οι πρωτεΐνες που ελέγχουν την έκφρασή τους, όπως και την έκφραση άλλων ηπατοειδικών γονιδίων, αν και όχι πολυάριθμες, κατορθώνουν, μέσω της πολυπλοκότητας των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που εμφανίζουν, να ρυθμίζουν σε υψηλό βαθμό εξειδίκευσης, την μεταγραφή των ηπατοειδικών γονιδίων. Οι μέχρι τώρα, λοιπόν, γνωστές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή των ηπατοειδικών γονιδίων είναι (εικ.5):

- Ο **HNF-4**, ο οποίος αποτελεί μέλος της οικογένειας των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων. Για τον HNF-4 δεν έχει βρεθεί, μέχρι πρόσφατα, κάποιος συνδέτης, γι' αυτό το λόγο είχε καταταγεί στους ορφανούς πυρηνικούς υποδοχείς. Ο HNF-4 είναι θετικός μεταγραφικός παράγοντας των ηπατοειδικών γονιδίων.
- Ο **HNF-1**, είναι ένας ηπατοειδικός παράγοντας που ενεργοποιεί τη μεταγραφή ηπατοειδικών γονιδίων που φέρουν στους υποκινητές τους στοιχεία HNF-1 (στοιχεία πάνω στα οποία προσδέεται ο HNF-1), ενώ καταστέλλει ηπατοειδικά γονίδια που φέρουν στοιχεία για τη πρόσδεση του HNF-4.
- Ο **HNF-3**, ο οποίος εκτός από ηπατοειδικός παράγοντας, είναι και ιστοειδικός παράγοντας των γονιδίων που εκφράζονται αποκλειστικά στους πνεύμονες. Ο HNF-3 παρουσιάζει ομολογία με τη δροσοφιλική πρωτεΐνη forkhead ως προς τον τρόπο αναγνώρισης του DNA (μέσω μοτίβου πτερωτής έλικας).

- **Ο παράγοντας C/EBP**, είναι η πρωτεΐνη που προσδένεται στο *cis*-ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT. Πρόκειται για μία θερμοσταθερή πρωτεΐνη η οποία ρυθμίζει γονίδια σε κατάσταση οξείας φάσης. Εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και στη μυελομονοκυτταρική σειρά του αιματοποιητικού συστήματος.
- **Ο Sp1**, είναι μεταγραφικός παράγοντας που υπάρχει σε όλους τους τύπους κυττάρων και ενεργοποιεί υποκινητές που φέρουν τη συντηρημένη περιοχή πρόσδεσής του.
- **Οι ARP-1 και EAR-3**, είναι ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών με μεγάλη ομολογία και κοινή εξειδίκευση, ως προς την θέση πρόσδεσης στο DNA, με τον HNF-4. Πρόσδεση του ARP-1 σε στοιχεία πρόσδεσης του HNF-4, προκαλεί αναστολή της μεταγραφής. Σε περίπτωση όμως πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης με τον HNF-4, ο οποίος βρίσκεται είδη προσδεδεμένος σε ρυθμιστικό στοιχείο, μπορεί να προκαλέσει σημαντική ενίσχυση της δραστηριότητας του HNF-4.
- **Οι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών (RAR, RXR, T3R, PPAR)**, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν μία υπεροικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιούνται από ορμόνες όπως: ρετινοειδή, στεροειδή, θυρεοειδείς ορμόνες, πολλαπλασιαστές υπεροξισώματος και βιταμίνη D. Η λειτουργία τους σχετίζεται με τη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης, ανάπτυξης, ομοιόστασης και αναπαραγωγής. Τα ομο- και ετεροδιμερή των πυρηνικών υποδοχέων προσδένονται σε στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (HREs) που εμφανίζουν συντηρημένες αλληλουχίες. Συντηρημένη εμφανίζεται και η δομή των πυρηνικών υποδοχέων, με πιο συντηρημένη την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (περιέχει 2 δακτυλίους ψευδαργύρου).





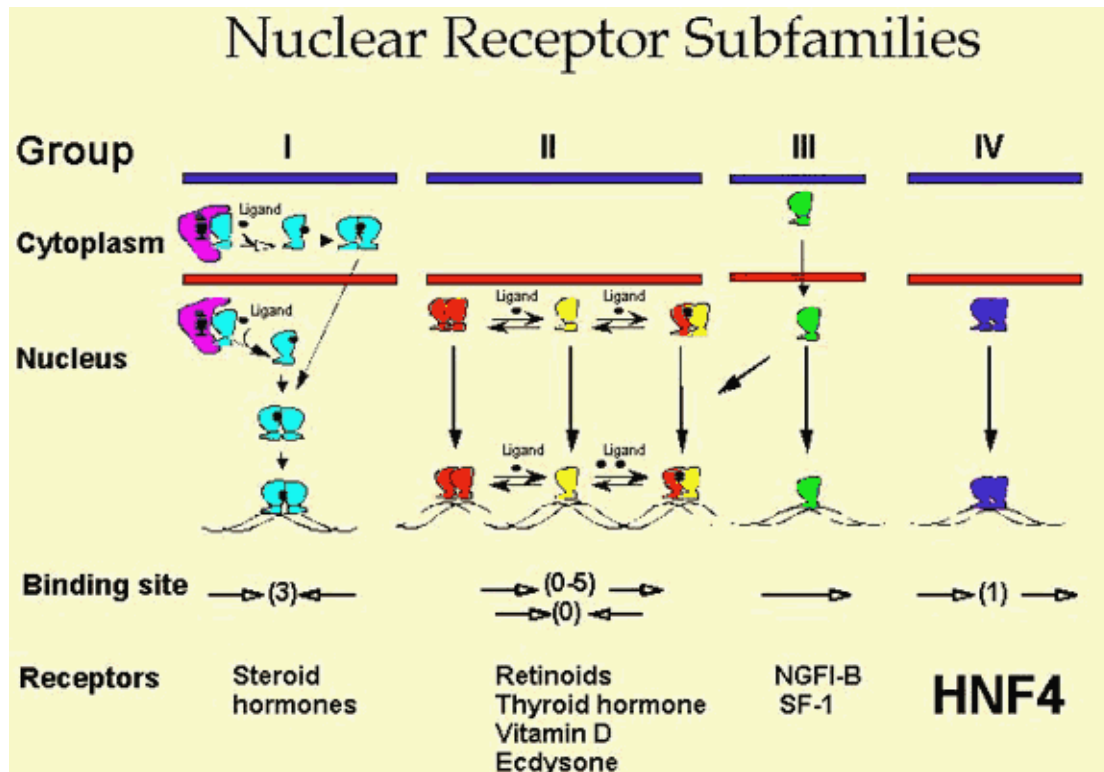
**Εικόνα 5.** Σχηματική παρουσίαση των πρωτεϊνών που ελέγχουν την μεταγραφή ηπατοειδικών γονιδίων

Ο κυριότερος, όμως, θετικός ρυθμιστής των απολιποπρωτεϊνών είναι, σύμφωνα με όλες τις ενδείξεις, ο ορφανός πυρηνικός υποδοχέας HNF-4. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο στη συγκεκριμένη εργασία θελήσαμε να μελετήσουμε την *in vivo* παρουσία του στους υποκινητές και στον κοινό ενισχυτή των apoCIII και apoAI γονιδίων

### **Ορμονικός πυρηνικός υποδοχέας HNF-4 (Hepatic Nuclear Factor-4)**

Ο HNF-4 είναι μέλος της οικογένεια των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων, πρωτεϊνών που ελέγχουν τη μεταγραφή σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια. Ο HNF-4 εκφράζεται στα ηπατικά κύτταρα, όπου και παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγραφική ρύθμιση των ηπατοειδικών γονιδίων, αλλά και στα κύτταρα των νεφρών, του εντέρου, του παγκρέατος και σε χαμηλά ποσά, στα κύτταρα του δέρματος και του στομάχου (32).

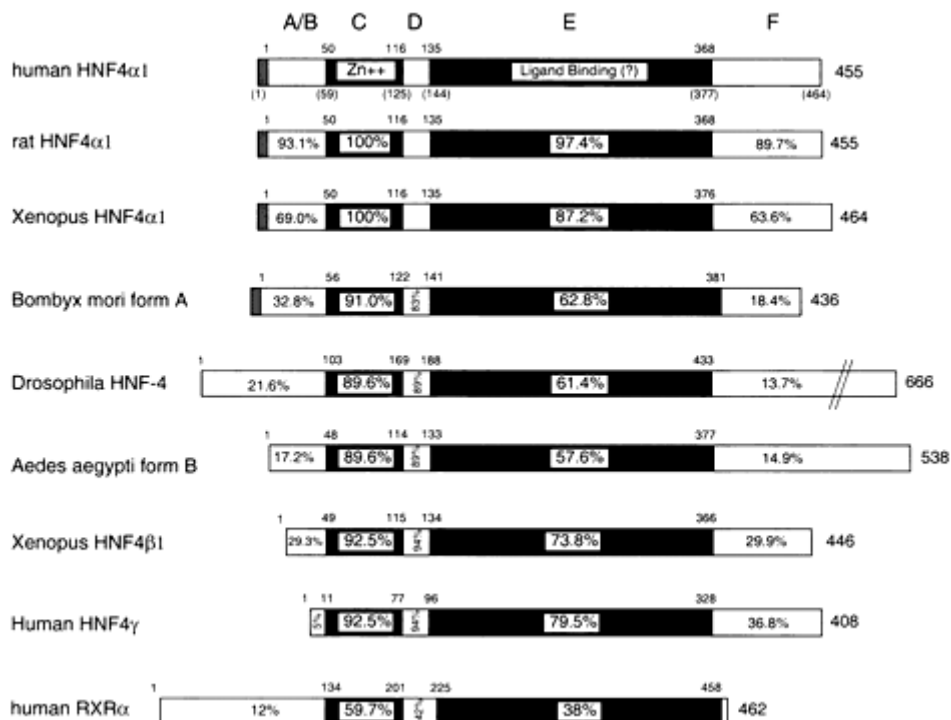
Ο HNF-4 παρουσιάζει σημαντικές αλληλουχικές και δομικές ομοιότητες με την τάξη των εξαρτημένων από συνδέτη μεταγραφικών παραγόντων, αρχικά γνωστοί και ως υποδοχείς στεροειδών/θυρεοειδών ορμονών (από τα πρώτα μέλη που εντοπίστηκαν). Σήμερα, οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες, έχουν καταταχτεί στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (**εικόνα 6**).



Εικόνα 6. Παρουσίαση των κατηγοριών των πυρηνικών υποδοχέων (Jiang G. et al., 1997)

Οι πυρηνικοί υποδοχείς χαρακτηρίζονται από 2 συντηρημένες περιοχές: α) την N-τελική, η οποία είναι υπεύθυνη για τη πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA και περιέχει 2 δακτυλίους ψευδαργύρου (Cys<sub>2</sub>/Cys<sub>2</sub>) και β) την C-τελική, η οποία είναι συντηρημένη σε μικρότερο βαθμό. Στη περιοχή αυτή εντοπίζονται επταμερείς υδροφοβικές περιοχές που παίζουν ρόλο στη πρόσδεση της ορμόνης, στο διμερισμό και τη μεταγραφική ρύθμιση (33, 34, 35, 36). Από τους ορμονικούς υποδοχείς, ο HNF-4 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομολογία με τον RXRα. Ο HNF4 προσδένεται στο DNA ως ομοδιμερές και ενώ αρχικά κατηγοριοποιήθηκε ως ορφανός πυρηνικός υποδοχέας (37), στη συνέχεια βρέθηκε ότι η ενεργότητά του ρυθμίζεται από την πρόσδεση λιπαρών θειοεστέρων του ακετυλο-συνενζύμου A (acety-Co-A) (38). Ο HNF4, όπως και άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς, φωσφορυλιώνεται σε Ser/Thr (39), και η φωσφορυλίωση από συγκεκριμένες κινάσες όπως η PKA επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσής του στο DNA (40) (εικόνα 8). Επίσης, ακετυλιώνεται από τον συνενεργοποιητή CBP και αυτή η τροποποίηση επάγει την πρόσδεση του HNF4 στο DNA, τον πυρηνικό εντοπισμό του, καθώς και την προσέλκυση άλλων συνενεργοποιητών (41).

Επίσης, ο HNF-4 είναι ένα πολύ συντηρημένο μόριο ανάμεσα στα διάφορα είδη, (εικόνα 7).

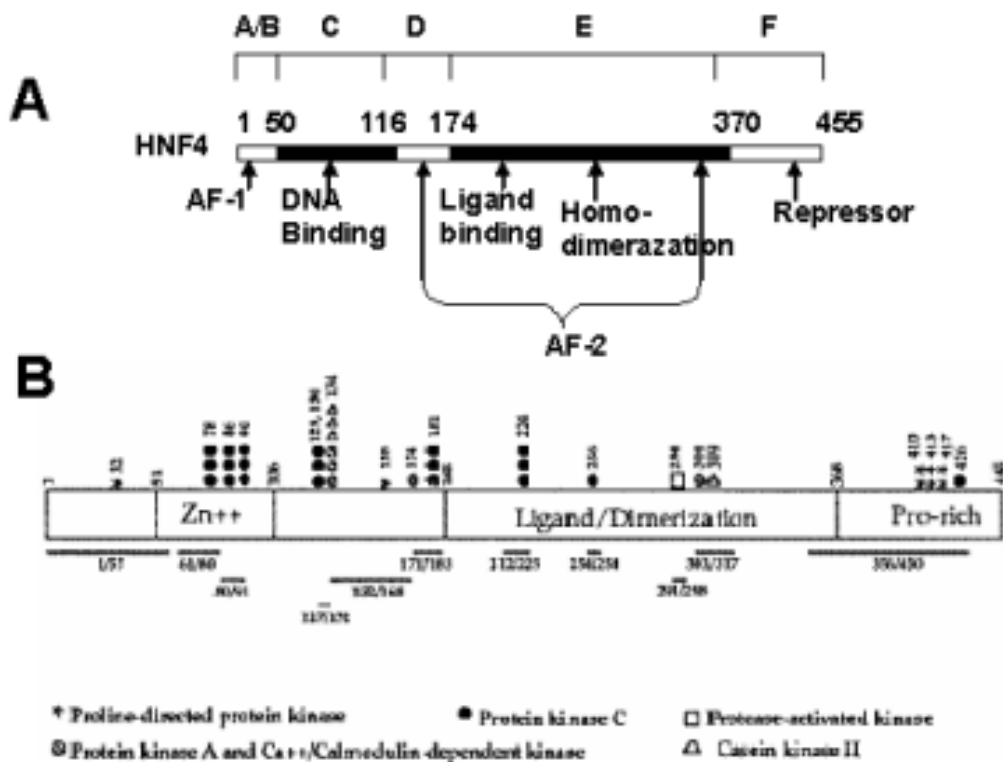


**Εικόνα 7. Ομολογίες μεταξύ των HNF4 διαφόρων ειδών και ομολογία του HNF4 με τον RXRα.**

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 3 μέλη της οικογένειας HNF-4: HNF-4α, β και γ καθώς και 7 συνδεδεμένες παραλλαγές του HNF-4α (37, 42,43). Ο HNF-4 παίζει ζωτικό ρόλο στην ανάπτυξη του οργανισμού και αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένων και αυτών της γλυκόζης, των αμινοξέων, των λιπιδίων και της ομοιόστασης της χοληστερόλης. Επίσης ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων όπως: των παραγόντων πήξης του αίματος (παράγοντες VII, IX, X), πρωτεϊνών του ορού (Τρανσφερρίνη, Τρανσθηρετίνη, Ερυθροποιητίνη), του κυτοχρώματος P450 και του ιού της ηπατίτιδας B (43). Όπως έχει είδη αναφερθεί, ο HNF-4 ρυθμίζει και την ιστοειδική έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών. Οι apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoB, apoCII και apoCIII, φέρουν στους υποκινητές τους πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης του HNF-4.

Τα τελευταία χρόνια, έχει πραγματοποιηθεί συστηματική έρευνα για την ανάλυση των διαφόρων λειτουργικών περιοχών (domains) του HNF-4 οι οποίες είναι υπεύθυνες α) για την πρόσδεσή του στο DNA, β) για τον σχηματισμό διμερών μορφών του, αλλά και γ) για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του ορφανού υποδοχέα (44, 45). Το αποτέλεσμα των ερευνών αυτών είναι ο προσδιορισμός της λειτουργίας όλων των domains του HNF-4, όπως φαίνεται και στην **εικόνα 8**. Βρέθηκε, λοιπόν, πως ο HNF-4 περιέχει δύο λειτουργίες ενεργοποίησης (Activation Functions, AFs), οι οποίες ονομάζονται AF-1 και AF-2 και εντοπίζονται στα domains A/B και D/E (128-

366), αντίστοιχα. Οι δύο αυτές περιοχές ενεργοποιούν την μεταγραφή με τρόπο ανεξάρτητο. Έχει βρεθεί πως η AF-1 και η AF-2, δρουν συνεργατικά στην ολική δραστηριότητα του HNF-4 (44). Η AF-1, όμως, που εντοπίζεται στα πρώτα 24 αμινοξέα του HNF-4 (N-άκρο), λειτουργεί ως ιδιοσύστατος αυτόνομος ενεργοποιητής της μεταγραφής. Αντίθετα, η AF-2, εμφανίζεται, λειτουργικά, πιο σύνθετη καταλαμβάνοντας την περιοχή D/E. Η περιοχή 360-366 του HNF-4 (AF-2 AD) έχει την ιδιότητα να επικρατεί, σε μεγάλο βαθμό, ανάμεσα σε μεταγραφικά ενεργούς πυρηνικούς υποδοχείς. Αυτό είναι πολύ βασικό για τη δραστηριότητα της AF-2. Αντίθετα με τις AF-2 περιοχές άλλων πυρηνικών υποδοχέων (RXRα, RAR κ.α.), η AF-2 περιοχή του HNF-4, δεν εμφανίζει αυτόνομη λειτουργία και για τη δραστηριότητά της απαιτείται όλη η περιοχή 128-366.



**Εικόνα 8: Παρουσίαση των διαφόρων domains και εν δυνάμει στόχων φωσφορυλίωσης του πυρηνικού υποδοχέα HNF-4.**

A) Περιγραφή των διαφόρων περιοχών του HNF4 και της λειτουργίας τους. B) Στην εικόνα περιγράφονται πιθανοί στόχοι φωσφορυλίωσης του HNF4, που προκύπτουν από αλληλουχίες τις οποίες αναγνωρίζουν διάφορες κινάσες (Jiang et al., 1997).

Στο domain C, υπάρχει η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding Domain), η οποία είναι συντηρημένη μεταξύ των πυρηνικών υποδοχέων και η οποία φέρει 2 δακτυλίου ψευδαργύρου. Στο domain E, εντοπίζουμε και δύο ακόμα σημαντικές λειτουργικές περιοχές: τη περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη (Ligand Binding Domain)

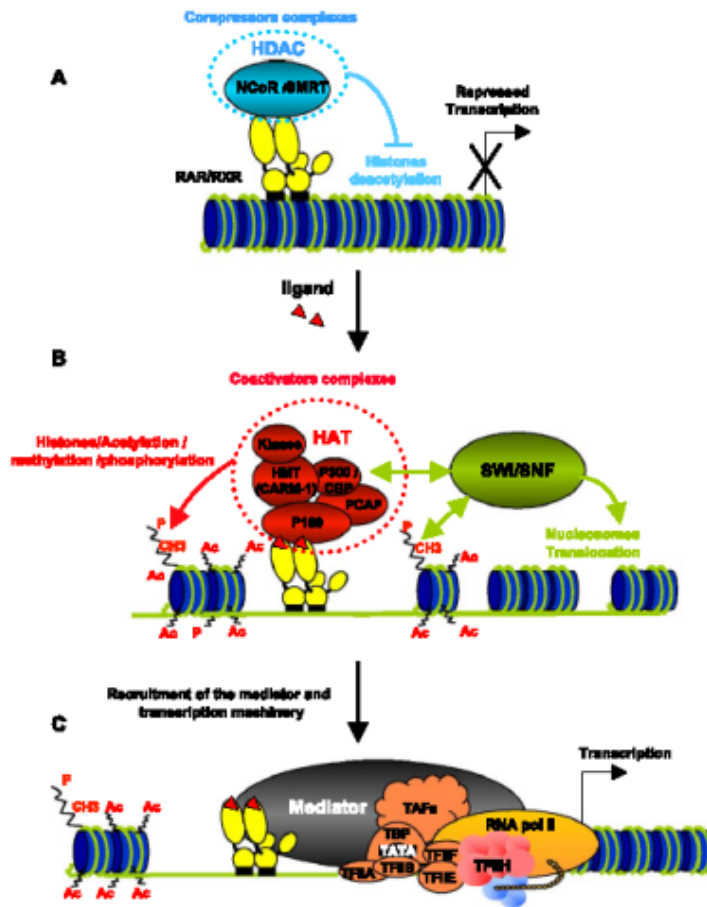
και τη περιοχή διμερισμού. Το domain E, είναι μία πολύ συντηρημένη περιοχή μεταξύ των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων. Μάλιστα η περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη του HNF-4, παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τις αντίστοιχες περιοχές άλλων ορμονικών υποδοχέων. Τέλος, ο HNF-4 φέρει στο domain F μία δραστικότητα η οποία είναι μοναδική για όλους τους, μέχρι στιγμής γνωστούς, πυρηνικούς υποδοχείς. Η περιοχή F έχει αρνητική επίδραση στη δραστικότητα της AF-2. Μία υπόθεση που έχει διατυπωθεί, σχετικά με τη κατασταλτική δράση του domain F πάνω στη δραστικότητα της AF-2, είναι πως η περιοχή F ενδεχομένως να αποκρύπτει κρίσιμα αμινοξέα από την μεταγραφική επιφάνεια της AF-2, είτε από το ίδιο το μόριο, είτε από αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Στη περίπτωση που η υπόθεση αυτή ισχύει, η πρόσδεση μία πρωτεΐνης στο ligand binding domain του HNF-4, θα μπορούσε να μεταβάλει την διαμόρφωση του domain F, αποτρέποντας τη κατασταλτική του δράση πάνω στην AF-2.

#### **Ορμονικός πυρηνικός υποδοχέας RXR $\alpha$ (Retinoid X Receptor)**

Η βιταμίνη A και τα παράγωγά της, τα οποία είναι γνωστά ως ρετινοειδή, είναι μη-στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καθώς και στην ομοίωση όλων, σχεδόν, των ιστών των θηλαστικών, ρυθμίζοντας κυτταρικές λειτουργίες όπως η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση (46, 47). Η επίδραση των ρετινοειδών στις παραπάνω κυτταρικές λειτουργίες, επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης της έκφρασης ομάδων γονιδίων στους διάφορους ιστούς. Η κατανόηση σχετικά με την δράση των ρετινοειδών, άρχισε να αυξάνει με την κλωνοποίηση των γονιδίων των πυρηνικών υποδοχέων ρετινοειδών και τον προσδιορισμό cis-ρυθμιστικών στοιχείων, που εντοπίζονται σε υποκινητές γονιδίων που αποκρίνονται σε ρετινοειδή, και για τα οποία οι υποδοχείς ρετινοειδών δείχνουν μεγάλη συγγένεια (48, 49).

Οι μελέτες γύρω από τους υποδοχείς ρετινοειδών, έχουν αποκαλύψει αρκετά πράγματα σχετικά με την δομή τους και τον τρόπο δράσης τους ως μεταγραφικοί παράγοντες. Μας είναι, λοιπόν, γνωστές οι αλληλουχίες βασικών δομών των υποδοχέων όπως το DNA- και Ligand – Binding Domain (DBD και LBD) (48), καθώς και οι τρισδιάστατες δομές του (50). Επίσης, γνωρίζουμε πως οι υποδοχείς ρετινοειδών έχουν την ικανότητα πρόσδεσης σε συμπυκνωμένη δομή χρωματίνης, προκειμένου να συμβάλουν στην ενεργοποίηση της έκφρασης ενός γονιδίου (51), μέσω της προσέλκυσης συν-ενεργοποιητικών παραγόντων (π.χ. HATs, CBP). Τα

παραπάνω πραγματοποιούνται παρουσία του συνδέτη, ενώ απουσία του συνδέτη οι υποδοχείς προσελκύουν συν-κατασταλτικούς παράγοντες (π.χ. HDACs) (εικόνα 9).



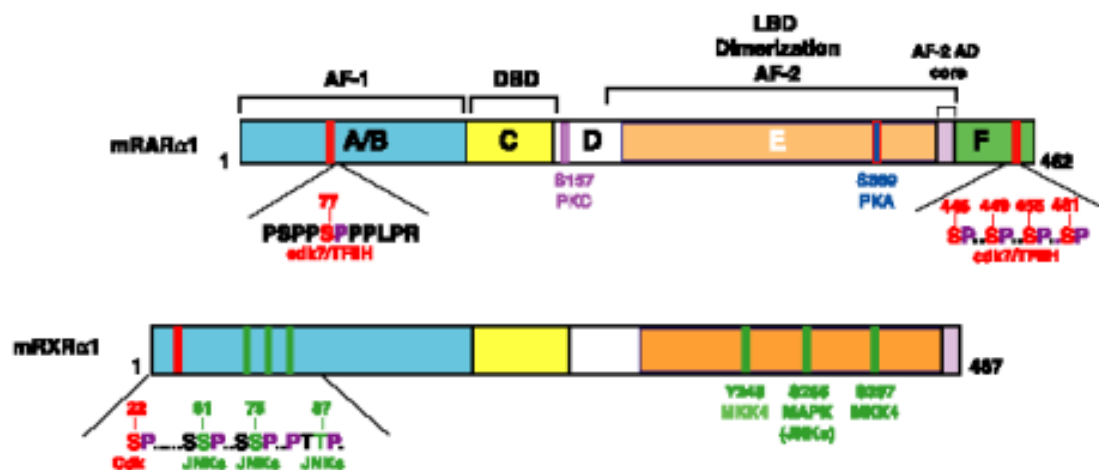
**Εικόνα 9: Η δράση των πυρηνικών υποδοχέων ρετινοειδών.**

A) Απουσία συνδέτη, οι υποδοχείς ρετινοειδών (YR) είναι προσδεσμένοι στις ρυθμιστικές περιοχές των υποκινητών των γονιδίων στόχων και αλληλεπιδρούν με συν-κατασταλείς μέσω των HDAC (histone deacetylase complexes) με αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής. B) Με την πρόσδεση του συνδέτη, οι συν-κατασταλείς αποδεσμεύονται και οι YR είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με συν-ενεργοποιητές που φέρουν ενεργότητες HAT (histone acetyltransferases), μεθυλοτρασφεράσης, κινάσης, ATP-εξαρτώμενα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης (SWI/SNF), με στόχο την χαλάρωση της συμπυκνωμένης χρωματίνης. C) Στη συνέχεια αποδεσμεύονται και οι συν-ενεργοποιητές και τη θέση τους παίρνει η βασική μεταγραφική μηχανή με σκοπό την έναρξη την μεταγραφής. (Julie Bastien et al., 2003)

Η ενεργοποίηση ενός γονιδίου από την επίδραση ενός υποδοχέα ρετινοειδών, φαίνεται να τερματίζεται μέσω του μηχανισμού αποικοδόμησης με τη βοήθεια του συστήματος συμπικουϊτινίωσης-πρωτεασώματος (52). Τέλος, από έρευνες των τελευταίων χρόνων, προκύπτει πως οι υποδοχείς ορμονών υπόκεινται την μετα-μεταγραφική τροποποίηση της φωσφορυλίωσης, η οποία επίσης ρυθμίζει την δράση τους (53) (εικόνα 10).

Το σήμα των ρετινοειδών μεταφέρεται μέσω δύο οικογενειών πυρηνικών υποδοχέων, των RARs (Retinoic Acid Receptors) και των RXRs (Retinoid X Receptors) από τις οποίες σχηματίζονται ομοδιμερή ή ετεροδιμερή (RXR/RXR και RAR/RXR) (54, 55). Κάθε οικογένεια αποτελείται από τρεις ισότυπους (α, β και γ) οι οποίοι κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (48). Για κάθε ισότυπο υπάρχουν τουλάχιστον 2 ισομορφές οι οποίες δημιουργούνται είτε από τη χρήση διαφορετικών υποκινητών ή/και από εναλλακτικό μάτισμα, με αποτέλεσμα να διαφέρουν στην N-τελική τους περιοχή. Οι RARs ενεργοποιούνται τόσο από το all trans-Ρετινοϊκό Οξύ (all trans RA) όσο και από το ισομερές του 9-cis RA, ενώ οι RXRs ενεργοποιούνται από το 9-cis RA. Σε αντίθεση με του υποδοχείς στεροειδών ορμονών οι οποίοι, απουσία της ορμόνης, εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, οι υποδοχείς των ρετινοειδών εντοπίζονται συνεχώς στον πυρήνα και προσδεδεμένοι στο DNA.

Όπως και οι περισσότεροι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών, έτσι και οι υποδοχείς των ρετινοειδών αποτελούνται από 6 διακριτές περιοχές (A-F) (εικόνα 10).



**Εικόνα 10:** Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών και των θέσεων φωσφορυλίωσης των πυρηνικών υποδοχέων ρετινοειδών.

Στο σχήμα παρουσιάζονται η θέση πρόσδεσης στο DNA (DBD), η θέση πρόσδεσης του συνδέτη (LBD), η περιοχή διμερισμού και οι λειτουργικές περιοχές AF-1 και AF-2. Παρουσιάζονται επίσης οι αλληλουχίες που αποτελούν στόχους φωσφορυλίωσης διαφόρων κινασών (MAPK= mitogen-activated protein kinase, MKK= MAPK kinase, JNK= Jun N-terminal kinase). (Julie Bastien et al., 2003)

Η πιο συντηρημένη περιοχή είναι αυτή του DBD (D domain), ενώ μετά έρχεται αυτή του LBD (E domain). Στην περιοχή του LBD απαντώνται και αρκετά συντηρημένα μοτίβα φωσφορυλίωσης. Στην A/B περιοχή εντοπίζεται και μία αλληλουχία η οποία έχει την δυνατότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης ανεξάρτητης από την παρουσία

συνδέτη, η AF-1 (Activation Function 1). Η AF-1 επίσης παρουσιάζει αρκετά συντηρημένα μοτίβα φωσφορυλίωσης (53) για κινάσες εξαρτώμενες-προλίνης (CDKs, Cyclin-dependent kinases και MAP κινάσες) (56). Το D domain φαίνεται να παίζει ρόλο συνδέτη μεταξύ DBD και LBD, ενώ δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός ο ρόλος του F domain ο οποίος απουσιάζει από τον RXR (57).

Μελέτες που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια μας δείχνουν πως οι φωσφορυλίώσεις των RXRs έχουν πολύ σημαντικούς φυσιολογικούς ρόλους. Η φωσφορυλίωση του RXRα στη Ser22 (AF-1) δείχνει να είναι σημαντική για ενεργοποίηση γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη αντι-πολλαπλασιαστική δράση των ρετινοειδών (58). Επίσης, έχει δείχτει πως η φωσφορυλίωση των Ser61, Ser75 και Thr87 (A/B domain) απαιτείται για μέγιστη μεταγραφική ενεργότητα τόσο των συμπλόκων RXR/RXR, όσο και RAR/RXR (59), ενώ η φωσφορυλίωση μέσω MAPK στο E domain καταστέλλει τη μεταγραφική ικανότητα των RAR/RXR συμπλόκων (60). Μία υπόθεση είναι το ότι, η φωσφορυλίωση αυτή προκαλεί κάποια αλλαγή της διαμόρφωσης μέσα στο LBD, με αποτέλεσμα την αδυναμία αλληλεπίδρασης με τους συν-ενεργοποιητές και μείωση της μεταγραφής. Τέλος, φαίνεται πως η ίδια φωσφορυλίωση κάνει τον RXRα πιο ανθεκτικό στη αποικοδόμηση, με αποτέλεσμα μία επικρατούσας αρνητικής καταστολής της μεταγραφής.

Ο RXRα φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο και στη ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών. Στους υποκινητές όλων σχεδόν των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών έχουν εντοπιστεί HREs στα οποία μπορεί να προσδεθεί, είτε ως ομοδιμερές (RXRα/RXRα), είτε ως ετεροδιμερές με τα RAR, T3R ή PPAR (RAR/RXRα, T3R/RXRα, PPAR/RXRα) (1). Όσον αφορά την δράση του RXRα στις apoAI και apoCIII, είναι γνωστό πως τα ομοδιμερή RXRα έχουν δυνατότητα ενεργοποίησης της apoAI, ενώ τα ετεροδιμερή RAR/RXRα φαίνεται να ενεργοποιούν τόσο την apoAI, όσο και την apoCIII. Αντιθέτως, τα ετεροδιμερή T3R/RXRα καταστέλλουν την έκφραση της apoAI.

### **Ισομεράση Pin1**

Η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης που προηγούνται κατάλοιπων προλίνης (Ser/Thr-Pro), που ονομάζεται και φωσφορυλίωση οδηγούμενη από προλίνη (Pro-directed phosphorylation, PDP), είναι μία πολύ σημαντική διαδικασία σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες (π.χ. πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση κ.α.) (61). Απορύθμιση της PDP μπορεί να



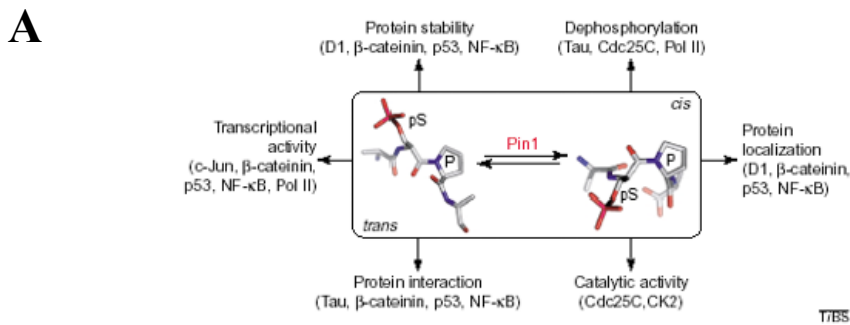
οδηγήσει σε πλήθος ασθενειών. Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια ρυθμίζονται και/ή ρυθμίζουν μονοπάτια που οδηγούν σε PDPs (62). Επίσης, αυξημένα επίπεδα PDPs έχουν περιγραφεί σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως στη νόσο του Alzheimer (63-65). Σήμερα γνωρίζουμε αρκετά πράγματα σχετικά με τα μονοπάτια, τις κινάσες και τις φωσφατάσες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της PDPs. Η δράση της PDPs φαίνεται πως έχει να κάνει με το γεγονός ότι επάγει αλλαγές στη διαμόρφωση της ίδιας της πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με την φύση της αλλαγής της διαμόρφωσης, όπως επίσης και για το αν αυτή ρυθμίζεται από κάποιο παράγοντα.

Στα ερωτήματα αυτά έρχεται να απαντήσει η ανακάλυψη της πεπτιδύλο-προλινό *cis/trans* ισομεράση (PPIase) Pin1 (18 KDa) (66-68) η οποία ισομεριώνει μόνο μοτίβα pSer/Thr-Pro. Οι έρευνες που ακολούθησαν είχαν ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη ενός νέου μηχανισμού ρύθμισης της δράσης των πρωτεϊνών, μέσω αλλαγής της διαμόρφωσής τους, που είχε να κάνει με την ισομερίωση συγκεκριμένων PDPs και ονομάστηκε μετα-φωσφορυλιωτικός μηχανισμός (62, 67) (εικόνα 11A). Τα μοτίβα Ser/Thr-Pro φωσφορυλιώνονται από διάφορες κινάσες που ανήκουν στην οικογένεια Pro-directed protein kinases (61,62). Τα μοτίβα αυτά απαντώνται είτε ως *cis*, είτε ως *trans* ισομερή και η αλλαγή της δομής τους επιτυγχάνεται με τη βοήθεια *cis* και *trans* PPIases. Η ισομερίωση των μοτίβων αυτών είναι απαραίτητη, γιατί η δράση αρκετών κινασών και φωσφατασών απαιτεί στερεοειδικότητα ως προς το υπόστρωμά τους (69).

Ο νέος αυτός μηχανισμός φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση διαφόρων διαδικασιών και απορύθμισή του οδηγεί σε διάφορες νόσους. Στην περίπτωση αρκετών καρκίνων, παρατηρείται υπερέκφραση της Pin1 (ρυθμίζει πολλά ογκογενετικά μονοπάτια). Αντιθέτως, στην περίπτωση νευροεκφυλισμού ασθενών με Alzheimer, παρατηρείται καταστολή της έκφρασης της Pin1 (61).

Η Pin1 είναι μία μικρή πρωτεΐνη και δεν φέρει κάποιο σινιάλο εισόδου ή εξόδου από τον πυρήνα. Αν και σε κυτταροκαλλιέργειες ανιχνεύτηκε αρχικά στον πυρήνα, σε αρκετούς κυτταρικούς τύπους, τόσο φυσιολογικούς, όσο και καρκινικούς, φαίνεται να εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα, αλλά και στο πυρήνα. Φέρει 2 domains, στα οποία οφείλει και την ειδικότητά της ως προς το υπόστρωμα. Στο N-άκρο φέρει ένα WW domain το οποίο περιλαμβάνει 2 συντηρημένα κατάλοιπα τρυπτοφάνης και στο C-άκρο φέρει ένα PPIase domain (61, 66-68). Το WW domain είναι αυτό που έχει τη δυνατότητα πρόσδεσης σε συγκεκριμένα μοτίβα pSer/Thr-Pro

(*trans* ισομορφή), στοχεύοντας μ' αυτόν τον τρόπο την Pin1 στο υπόστρωμά της, ενώ το PPIase domain καταλύει τη ισομερίωση (*cis* ισομορφή) του ίδιου του μοτίβου ή άλλου μοτίβου στο ίδιο υπόστρωμα (69). Τέλος, η Pin1 ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης, η οποία ρυθμίζεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και της καρκινογένεσης. Φωσφορυλίωση στη Ser16 (WW domain) καταστέλλει την ικανότητα πρόσδεσης σε υπόστρωμα, και ρυθμίζει τον υποκυτταρικό της εντοπισμό και την δράση της. Οι μέχρι στιγμής, γνωστοί στόχοι της ισομεράσης Pin1 φαίνονται στην **εικόνα 11 B**.



**B**

Pin1 substrates	Substrate function	Pin1 targeting sites
<b>Mitotic proteins</b>		
NIMA	Mitotic kinase	
Cdc25	Mitotic phosphatase	pThr48/67-Pro
Wee1	Mitotic kinase	
Plk1	Mitotic kinase	
Myt1	Mitotic kinase	
Cdc27	Anaphase-promoting complex	
CENP-F	Kinetochore protein	
Incenp	Inner centromere protein	
Rab4	G protein	
Bcl-2	Antiapoptotic protein	
NHERF-1	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger regulatory factor	
KRMP1	Kinesin-related protein	
CK2α	Casein kinase IIα	
TopIIα	Topoisomerase IIα	
Dab2	Endocytic adaptor molecule	
<b>Cytoskeleton proteins</b>		
tau	Microtubule-binding protein	pThr231-Pro
<b>Transcription factors or proteins</b>		
Pol II	RNA polymerase II	pSer5-Pro (in the repeat)
c-Jun	Transcriptional factor	pSer63/73-Pro
β-Catenin	Transcriptional factor	pSer246-Pro
P53	Transcriptional factor	pSer33/46-Pro, pSer33/315-Pro, pThr81-Pro
NF-κB	Transcriptional factor	pThr254-Pro
CF-2	Transcriptional factor	
NFAT	Transcriptional factor	
Sin3-Rpd3	Histone deacetylase complex	
hSpt5	Transcription elongation factor	G1-S proteins
Cyclin D1	G1/S cyclin	pThr286-Pro
Ki67	Proliferation-associated marker	pThr234-Pro
<b>Apoptotic proteins</b>		
Bcl-2	Antiapoptotic protein	
BimEL	Proapoptotic protein	Ser65-Pro

**Εικόνα 11: Ικανότητα ισομερίωσης φωσφορυλιωμένων καταλύπων προλίνης από την ισομεράση Pin1 και πρωτεΐνες στόχοι της (Kun Ping Lu, 2004). A) Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε κατάλοιπα Ser ή Thr σε μοτίβα Ser/Thr-Pro, από ειδική κατηγορία κινασών (Prolyn-directed kinases), έχει ως αποτέλεσμα την αναγνώρισή τους από την ισομεράση Pin1 και την ισομερίωση της *trans* σε *cis* (και το αντίστροφο) μορφής του μοτίβου, ανάλογα με την θέση φωσφορυλίωσης. Το αποτέλεσμα είναι η αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης που ισομεριώνεται. B) Πρωτεΐνες στόχοι της προλυν-ισομεράσης Pin1**

### **Σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας**

Η εργασία αυτή πραγματεύεται την μελέτη, με *in vivo* τεχνικές, του ρόλου του ορμονικού πυρηνικού υποδοχέα HNF4 στους μοριακούς μηχανισμούς που ελέγχουν την μεταγραφική ρύθμιση δύο, πολύ σημαντικών, λιποπρωτεϊνών: της απολιποπρωτεΐνης A-I (apoA-I), η οποία φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο κατά της αθηροσκλήρυνσης, και της απολιποπρωτεΐνης CIII (apoCIII), η οποία σχετίζεται με τον καταβολισμό λιποπρωτεϊνών πλούσιων σε τριγλυκερίδια. Ένας επιπλέον στόχος που τέθηκε, ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική δραστηριότητα δύο πολύ σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων των απολιποπρωτεϊνών, που ανήκουν στην οικογένεια των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων, του HNF4 και του RXRα. Επίσης ελέγχθηκε και πιθανή επίδραση της λιγάσης Pin1 στην έκφραση διαφόρων απολιποπρωτεϊνών. Τέλος, στα πλαίσια της εργασίας που παρουσιάζεται θελήσαμε να εκμεταλλευτούμε ένα σύγχρονο και ευαίσθητο σύστημα μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που βασίζεται στην *in vivo* βιοτινυλίωση (21). Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν οι χιμαιρικές πρωτεΐνες του HNF4 και του RXRα που στο N-τερματικό τους άκρο φέρουν ένα πεπτίδιο 22 αμινοξέων που αποτελεί στόχο βιοτινυλίωσης από την λιγάση βιοτίνης BirA.

## Συντμήσεις

Amp, Ampicillin  
AP-1, Activating Protein 1  
APS, Ammonium persulfate  
ARP-1, apoA-I Regulatory Protein-1  
BSA, Bovine Serum Albumin  
C/EBP, CCAAT Enhancer Binding Protein  
DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium  
DMSO, Dimethyl Sulfoxide  
DTT, dithiothreitol  
EDTA, Ethylene diamine tetra-acetic acid  
FBS, Fetal bovine serum  
HDL, High Density Lipoprotein  
HNF4, Hepatic Nuclear Factor-4  
HRE, Hormone Response Element  
HRP, horseradish peroxidase  
IDL, Intermediate Density Lipoproteins  
IPTG, Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside  
JNK, Jun N-terminal kinase  
LB, Luria Broth  
LDL, Low Density Lipoprotein  
MAPK, Mitogen-activated Protein Kinase  
NP40, Nonylphenyl-Polyethylene Glycol  
ONPG, O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside  
PBS, Phosphate-buffered saline  
PMSF, Phenylmethylsulfonyl Fluoride  
PPAR, Peroxisome Proliferator-Activating Receptor  
RXR $\alpha$ , Retinoid X Receptor  
SDS, sodium dodecyl sulfate  
SDS/PAGE, SDS polyacrylamide gel electrophoresis  
T3R $\beta$ , Thyroid Hormone Receptor  $\beta$   
TAE, Tris acetic EDTA  
TAFs, TATA box binding protein-Associated Factors  
TBP, TATA box binding protein  
TE, Tris-HCl, EDTA  
TEMED, Tetramethylethylenediamine  
TES, Tris-HCl, EDTA, NaCl  
TFIIs, Transcription Factors II  
TGF- $\beta$ , Transforming Growth Factor- $\beta$   
TGS, Tris/Glycine/SDS  
USF, Upstream Stimulator Factor  
VLDL, Very Low Density Lipoprotein

## **Υλικά και Μέθοδοι:**

### **Υλικά:**

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη πραγματοποίηση των πειραματικών μεθόδων προέρχονται από τις εξής πηγές: Τα χημικά που χρησιμοποιούμε είναι από τη MERCK ή τη Sigma. Η αγαρόζη αγοράστηκε από την εταιρεία EMS. Το θρεπτικό υλικό LB που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες βακτηρίων περιείχε bacto-agar, bacto-tryptone yeast extract της εταιρείας Difco. Τα ένζυμα περιορισμού, το ένζυμο αποφωσφορυλίωσης του DNA CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase), η Taq πολυμεράση, η T4 DNA λιγάση και τα ρυθμιστικά τους διαλύματα προέρχονται από τις εταιρίες Minotech, New England Biolabs ή Gibco-BRL. Τα δεόξυνουκλεοτίδια (dNTPs) που χρησιμοποιήθηκαν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCRs) αγοράστηκαν από την Pharmacia. Τα σφαιρίδια πρωτεΐνης G για το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, αγοράστηκαν από την εταιρεία Pharmacia Biotech. Η RnaseA και η λυσοζύμη αγοράστηκαν από τη Sigma. Για την απομόνωση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης και την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγάλης κλίμακας βακτηριακή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν τα QIAquick Gel Extraction Kit της QiaGen, CONCERT<sup>TM</sup> Rapid Gel extraction System και CONCERT<sup>TM</sup> High Purity Plasmid Midiprep System της Gibco-BRL. Για την κλωνοποίηση του HNF4 χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3amp της Invitrogen στον οποίο είχε κλωνοποιηθεί το 22 αμινοξέων πεπτίδιο Bio, στις θέσεις EcoRI και BamHI. Για την κλωνοποίηση του RXRa χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pBX-G1 (που φέρει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του GAL4 υπό τον έλεγχο του CMV υποκινητή). Ο δείκτης μοριακού βάρους λBstEII κατασκευάστηκε ύστερα από πέψη του DNA του λ βακτηριοφάγου που αγοράστηκε από το I.T.E. (Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο Κρήτης). Ο δείκτης μοριακού βάρους για τα πρωτεϊνικά gels είναι από την New England Biolabs. Οι αναστολείς πρωτεασών από την Sigma. Στα πειράματα βιοτυνιλίωσης χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια αγαρόζης που είναι επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη (Streptavidin beads) και στρεπταβιδίνη ομοιοπολικά συζευγμένη με HRP (horseradish peroxidase) που αγοράστηκαν από την Sigma. Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης Protran αγοράστηκαν από την εταιρεία Schleicher & Schuell. Τα αντισώματα α-HA (mouse), και α-mouse-HRP (2ο αντίσωμα) είναι των εταιριών Santa Cruz Biotechnology, Inc., και Chemicon αντίστοιχα. Το αντίσωμα α-HNF4a μας προσφέρθηκε από τον Κο Ι. Ταλιανίδη. Για την αυτοραδιογραφία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Super Signal®West

Pico Chemiluminescent Substrate), ειδικό για την ανίχνευση του HRP, είναι της εταιρίας PIERCE και το υπερευαίσθητο σύστημα ανοσοαποτύπωσης (Kodak-Scientific Imaging Film) της εταιρείας Kodak. Τα αντιδραστήρια για τις κυτταροκαλλιέργειες (DMEM {θρεπτικό υλικό}, FBS {ορός}, Τρυψίνη-EDTA {ένζυμο}, PBS {ρυθμιστικό διάλυμα}, Πενικιλίνη – Στρεπτομυκίνη {αντιβιοτικά}) είναι της Gibco-BRL. Το ONPG (ο-νιτροφαινυλογαλακτοπυρανοζίτης) που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης, αγοράστηκε από τη Sigma. Το υπόστρωμα για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης αγοράστηκε από την εταιρεία Promega.

### Μέθοδοι:

#### Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB για την ανάπτυξη στελεγών του βακτηρίου E.coli

- ✓ LB για υγρή καλλιέργεια: 1% bactotryptone, 0.5% bacto yeast extract, 1%NaCl. Αναδεύουμε το διάλυμα και αποστειρώνουμε το LB μέσα σε κωνική φιάλη.
- ✓ LB για στερεή καλλιέργεια: μετά την ανάδευση προσθέτουμε 1.5% άγαρ και μετά αποστειρώνουμε. Πριν στερεοποιηθεί το LB, το προσθέτουμε σε πιάτα Petri.

Για την επιλογή βακτηριακών αποικιών που φέρουν πλασμίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη, προσθέτουμε στο LB Amp 100μg/ml (τελική συγκέντρωση).

#### Βακτηριακό μετασχηματισμό (transformation)

Για το βακτηριακό μετασχηματισμό χρησιμοποιούμε δυο στελέχη της *E.coli*, το DH5α και το DH10β (κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν, competent cells). Η διαδικασία έχει ως εξής: Τα competent στελέχη διατηρούνται στους -80°C. Ξεπαγώνουμε τα κύτταρα στον πάγο και σε 100μl κυττάρων προσθέτουμε 1μl από το DNA που θέλουμε να μεγαλώσουμε. Αφήνουμε στον πάγο για 30min. Πραγματοποιούμε heat shock στους 42°C για 45sec και τοποθετούμε ξανά στο πάγο για 2-3min. Προσθέτουμε, κοντά σε φλόγα, 900μl LB. Επιδιώκουμε στους 37°C για 1h. Το τρυβλίο Petri με θρεπτικό LB-άγαρ και αντιβιοτικό αμπικιλίνη, όπου θα αναπτυχθεί η καλλιέργεια, έχει ήδη τοποθετηθεί σε επωαστήρα 37°C για να αποκτήσει την κατάλληλη θερμοκρασία. Σε στείρες συνθήκες, απλώνουμε στα τρυβλία, με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου, 100μl από τα

μετασχηματισμένα κύτταρα. Η επώαση γίνεται στους 37°C για 16 - 18 ώρες (over night).

### **Πηκτή αγαρόζης για την ηλεκτροφόρηση DNA**

Πηκτή αγαρόζης 1% (130ml τελικός όγκος): 1,3 gr αγαρόζης, 130ml TAE 1x. Αφού βράσουμε σε κωνική φιάλη το διάλυμα, αφήνουμε να κρυώσει και προσθέτουμε 5ml Βρωμιούχο αιθίδιο (χρωστική για το DNA).

Οι ηλεκτροφορήσεις γίνονται στα 50Volt (για την απομόνωση τμήματος DNA από παρασκευαστικό gel) και στα 100Volt. Το ρυθμιστικό διάλυμα μέσα στο οποίο τοποθετείται η πηκτή για την ηλεκτροφόρηση είναι TAE 1x {50xTAE : 2M Tris HCl pH 7.5, 2mM EDTA, οξικό οξύ για ρύθμιση του pH}. Ο δείκτης που χρησιμοποιούμε για να υπολογίσουμε τα μεγέθη των DNAs που ηλεκτροφορούμε, είναι το DNA του φάγου λ κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο BstII. Τα μοριακά μεγέθη που παίρνουμε είναι (bp):8458, 7242, 6369, 5686, 4822/4327, 3675, 2322/1929, 1371/1264, 702/224/114. Τα DNAs φορτώνονται στη πηκτή μαζί με 1x loading buffer (6x= 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol in H<sub>2</sub>O, 15% ficoll (type 400) in H<sub>2</sub>O).

### **Πέψεις DNAs με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών**

Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιούνται δοκιμαστικές πέψεις ως εξής: η ποσότητα DNA που κόβουμε είναι 1μg. Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιούμε είναι 10-12 u/μl και η συγκέντρωση ενζύμου που απαιτείται για αποτελεσματικό κόψιμο είναι 2x σε σχέση με τη ποσότητα του DNA. Τα ρυθμιστικά διαλύματα των ενζύμων είναι 10 φορές συγκεντρωμένα και η ποσότητα που χρησιμοποιούμε είναι ίση ή μεγαλύτερη με τα μl του ενζύμου. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 10 φορές τα μl του ρυθμιστικού διαλύματος και συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O. Οι αντιδράσεις, για τα περισσότερα ένζυμα πραγματοποιούνται στους 37°C για 2h.

Για τις πέψεις μεγάλης κλίμακας, οι ποσότητες των DNAs που κόβουμε είναι 17μg του φορέα στον οποίο θέλουμε να ενθέσουμε ένα κομμάτι DNA, και 30μg από τα ενθέματα. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται, στην απαιτούμενη θερμοκρασία, over night. Οι ποσότητες του ενζύμου και του ρυθμιστικού διαλύματος, υπολογίζονται με τον τρόπο που έχει είδη περιγραφεί.

(Τα ένζυμα πρέπει να διατηρούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας στο πάγο)

### **Καθαρισμός τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης**

Ηλεκτροφορούμε, μαζί με 1x loading buffer, τα κομμάτια DNA που θέλουμε να απομονώσουμε και να καθαρίσουμε. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 50Volt. Οι ζώνες αφαιρούνται από το πήκτωμα με τη βοήθεια χειρουργικής λεπίδας. Τοποθετούμε τις ζώνες σε erpendorf 2ml και ζυγίζουμε το καθαρό τους βάρος. Ο καθαρισμός πραγματοποιείται με τη βοήθειας κολώνας, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των μεθόδων QIAquick Gel Extraction Kit της QiaGen ή CONCERT™ Rapid Gel extraction System της GibcoBRL. Αφού καθαρίσουμε το DNA, ηλεκτροφορούμε μία ποσότητα σε πηκτή αγαρόζης, όπως έχουμε περιγράψει, για να δούμε τη ποσότητα DNA που έχουμε απομονώσει.

### **Αποφωσφορυλίωση DNA.**

Η αντίδραση που προετοιμάζουμε είναι η εξής :

20μl πλασμίδιο κομμένο με περιοριστικά ένζυμα (0,5-1 μg/μl)

3μl 10x CIAP buffer

3μl ένζυμο CIAP

2μl H<sub>2</sub>O

Στη συνέχεια ακολουθείται η εξής διαδικασία: Επωάζουμε την αντίδραση στους 37°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέτουμε 2μl ενζύμου CIAP και επωάζουμε την αντίδραση στους 37°C για 30 λεπτά. Προσθέτουμε 70μl H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί προσθήκη 50μl φαινόλης και 50μl χλωροφορμίου και ανάδευση. Φυγοκεντρούμε στις 12000 στροφές για 5 λεπτά και κατόπιν μεταφέρουμε την υδατική φάση σε καθαρό σωλήνα 1,5ml. Προσθέτουμε ίσο όγκου χλωροφόρμιο, αναδεύουμε και φυγοκεντούμε όπως προηγουμένως (προαιρετικό). Στη συνέχεια προσθέτουμε 1/10 του όγκου 3M οξικού νατρίου και 2,5 όγκων 100% αιθανόλης και τοποθετούμε για 5 λεπτά στους -80°C. Τέλος, φυγοκεντρούμε στις 12000 στροφές για 10 λεπτά και αφού ξεπλύνουμε 2 φορές την πελέττα με 70% αιθανόλη, τη στεγνώνουμε και επαναδιαλύουμε σε ddH<sub>2</sub>O.

### **Ligation (αντίδραση σύνδεσης του φορέα (πλασμίδιο) με το κομμάτι του DNA που θέλουμε να ενθέσουμε)**

Για την αντίδραση απαιτείται το ένθεμα του DNA να είναι 3 με 4 φορές περισσότερο από το φορέα (ένθεμα και φορέας είναι κομμένα με τα κατάλληλα ένζυμα). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι τα 15 μl. Προσθέτουμε 1μl T4 DNA λιγάσης και 1,5μl από το ρυθμιστικό διάλυμα της λιγάσης, το οποίο περιέχει και ATP.



Στη περίπτωση που το ρυθμιστικό διάλυμα έχει ξεπαγώσει πολλές φορές, θα πρέπει να προστίθεται επιπλέον φρέσκο ATP 5mM (1,5μl). Ο τελικός όγκος επιτυγχάνεται με τη προσθήκη ddH<sub>2</sub>O. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 16<sup>0</sup>C, over night.

### **Ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας για τη διάγνωση σωστά κλωνοποιημένων ενθεμάτων (minipreps) και την απομόνωση πλασμιδίων (midipres)**

Στο αρχικό στάδιο των διαδικασιών αυτών πραγματοποιείται βακτηριακός μετασχηματισμός (transformation). Στη περίπτωση που το πλασμίδιο που θέλουμε να μεγαλώσουμε προέρχεται από ligation χρησιμοποιούμε και τα 15μl της αντίδρασης. Επίσης απλώνουμε στα πιάτα το σύνολο των κυττάρων, αφού πρώτα τα φυγοκεντρήσουμε στα 4.000rpm για 4min και αφαιρέσουμε το μεγαλύτερο μέρος του LB ώστε να μείνουν σχεδόν 100μl. Και για στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιούμε το στέλεχος της *E.coli* DH10β.

*Minipreps*: Επιλέγουμε, από τα πιάτα με LB-Amp, έναν αριθμό αποικιών για να τις ελέγξουμε. Αυτό γίνεται με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας. Προσθέτουμε την κάθε αποικία σε αποστειρωμένα βακτηριολογικά σωληνάκια, μαζί με 2ml LB-Amp και επωάζουμε στους 37<sup>0</sup>C over night, υπό συνεχή ανάδευση. Την επόμενη μέρα, περνάμε μέρος της καλλιέργειας σε eppendorf των 1,5ml. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 1min και αναρροφούμε το υπερκείμενο με πιπέττα Pasteur υπό κενό. Επαναδιαλύουμε το κυτταρικό ίζημα σε 600μl διαλύματος λύσης για *E.coli* (lysis buffer : 8% sucrose, 5% Triton-100x, 500mM EDTA pH8.0, 50mM Tris-HCl pH 7.5). Προσθέτουμε 40μl λυσοζύμης (10 mg/ml), αναδεύουμε και αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.. Στη συνέχεια, βράζουμε τα δείγματα στους 100<sup>0</sup>C για 1,5min και αφήνουμε στο πάγο για 15min. Με τη μέθοδο αυτή παραμένει το πλασμιδιακό DNA εν διαλύσει, ενώ οι μεμβράνες, οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA του βακτηριακού κυττάρου είναι δυνατό να κατακρημνιστούν. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 15min. Το ίζημα απομακρύνεται με μια οδοντογλυφίδα. Το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται τη προσθήκη 600μl ισοπροπανόλης, αναδεύουμε και αφήνουμε στους -20<sup>0</sup>C για 30min. Φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 16min και αφαιρούμε το υπερκείμενο. Το DNA κατακρημνίζεται ως ίζημα, εκπλένεται με 500μl παγωμένης 75% αιθανόλης, αναδεύεται και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 5min. Αναρροφούμε το υπερκείμενο και τα δείγματα ξηραίνονται υπό κενό. Επαναδιαλύουμε σε 40μl TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8) που περιέχει 1/100 RNase A.

Για να ελέγξουμε τα DNAs ηλεκτροφορούμε 3μl από κάθε δείγμα σε πηκτή αγαρόζης, με τον τρόπο που προαναφέραμε, καθώς επίσης πραγματοποιούμε δοκιμαστικές πέψεις για να ελέγξουμε το πρότυπο του πλασμιδίου. Στη περίπτωση που εντοπισθεί θετικός κλώνος, απλώνουμε μέρος της θετικής καλλιέργειας σε πιάτο με LB-Amp και επωάζουμε στους 37°C over night.

*Midipreps*: Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για τον καθαρισμό DNA σε μεγάλη ποσότητα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούμε το CONCERT™ High Purity Plasmid Midiprep System της Gibco-BRL. Η αποικία που σηκώνουμε τοποθετείται αρχικά σε 2ml LB-Amp και επωάζεται στους 37°C για 7h. Στη συνέχεια περνάμε την καλλιέργεια σε 150ml LB-Amp. Η επώαση γίνεται 37°C over night. Την επόμενη μέρα εκτελούμε το πρωτόκολλο του Midiprep System. Εφόσον τα DNAs επαναδιαλυθούν καλά στο TE, προσθέτουμε σε μία κυψελίδα 5μl DNA και 1ml ddH<sub>2</sub>O και φωτομετρούμε στα 260nm (UV) για να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση του καθαρού DNA ( $C_{DNA}=A \times 10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

### **Πλασμιδιακές κατασκευές (constructions)**

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα πλασμίδια :

*Πλασμίδια αναφοράς (Reporter plasmids)* : pG5B-luc, pGL3 basic apoCIII(-890)-luc, pGL3basic apoAII-911 -luc, pGL3basic apoCII-550 HCR1 -luc, pGL3basic apoE-700 -luc.

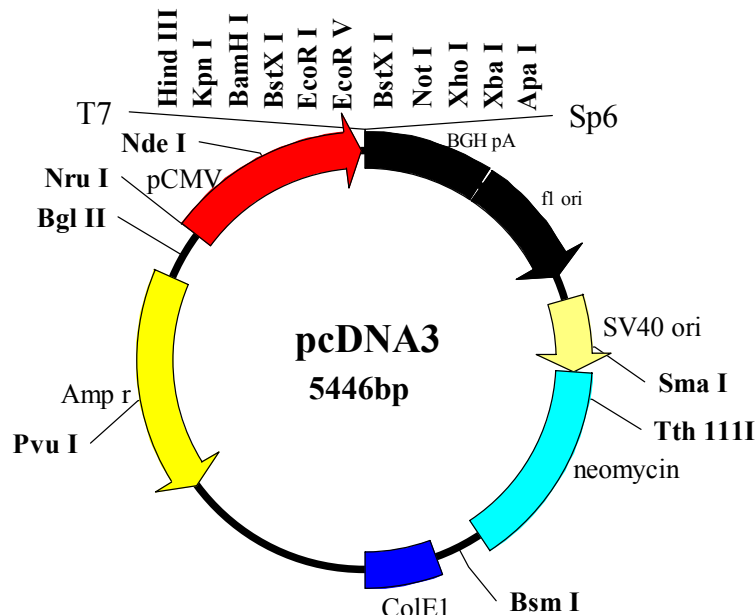
*Πλασμίδια συμπλήρωσης (Fill-up plasmids)*: ssDNA (salmon sperm DNA) της Gibco

*Πλασμίδια έκφρασης (Expression vectors)* :

- ❖ Θηλαστικών: pcDNAIII-Bio-HNF-4, pcDNAIII-Bio-RXRα, pcDNAIII-BirA-2xmyc, pHooK2-Pin1, pHooK2-Pin1-W34A, pMT2-HNF4, pMT2-RXRα, pMT2-T3Rβ, pBXG1-RXRα, pBXG1-RXRα(D/E) pBXG1-HNF4.

**Πλασμιδιακή κατασκευή του HNF4-Bio για πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης και μελλοντικά πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης.**

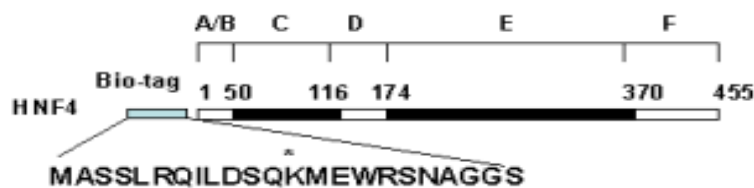
Δημιουργήσαμε τη πλασμιδιακή κατασκευή του HNF4 σε ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης (pcDNAIII/Amp). Στην **εικόνα 12** εμφανίζεται ο περιοριστικός χάρτης του φορέα pcDNAI/Amp.



**Εικόνα 12:** Περιοριστικός χάρτης του ευκαρυωτικού φορέα έκφρασης pcDNAIII.

Σε αυτόν τον φορέα κλωνοποιήθηκε το 22 αμινοξέων Bio πεπτίδιο, κατόπιν πέψης με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και EcoRI.

Ο pcDNA3 Bio υπέστη πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI. Σε αυτή τη θέση εντέθηκε το cDNA του HNF4 το οποίο επίσης έφερε άκρα κομμένα με EcoRI. Με αυτό τον τρόπο ο HNF4 φέρει στο N-τελικό του άκρο το πεπτίδιο Bio. Το πλασμίδιο που προέκυψε είναι το εξής:



**Εικόνα 13:** Η πρωτεΐνη HNF-4 που φέρει στο N-άκρο της το πεπτίδιο Bio για *in vitro* βιοτινυλίωση. Στην εικόνα παρουσιάζεται η αλληλουχία του πεπτιδίου Bio. Με αστερίσκο είναι το κατάλοιπο που βιοτινυλιώνεται

Η διαδικασία πέψης και απομόνωσης του ενθέματος (HNF-4/EcoRI) καθώς και η διαδικασία πέψης και απομόνωσης του φορέα ένθεσης (pcDNAIII-Bio/EcoRI), τόσο σε μικρή, όσο και σε μεγάλη κλίμακα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που έχουν παρουσιαστεί. Η επιλογή του κλώνου με την σωστή φορά τοποθέτησης

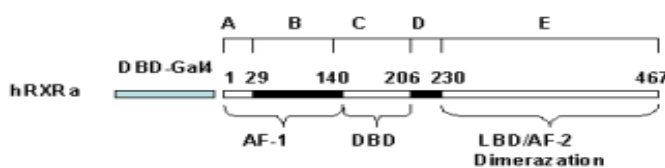
(orientation) του HNF4, για την απομόνωση και τον καθαρισμό από βακτηριακό στέλεχος του πλασμιδίου (pcDNAIII-Bio-HNF-4) έγινε με τη βοήθεια του περιοριστικού ενζύμου HindIII. Στο πλασμίδιο pcDNAIII-Bio-HNF-4 υπάρχουν δύο θέσεις περιορισμού για HindIII, μία αριστερά της EcoRI του φορέα και μία στο C-άκρο του HNF4. Ο κλώνος που μετά από πέψη με HindIII μας έδινε ένθεμα παρόμοιου μεγέθους με αυτό του cDNA του HNF4 επιλέχτηκε ως θετικός.

Έγινε streaking και ανάπτυξη του θετικού κλώνου της πλασμιδιακής κατασκευής σε πιάτα LB-Amp. Ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού του πλασμιδίου με τη μέθοδο midiprep, καθώς και η ποσοτικοποίηση του με φωτομέτρηση.

**Πλασμιδιακή κατασκευή του Gal4-RXRα (human) για πειράματα ενεργοποίησης συνθετικών υποκινητών που φέρουν θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης Gal4.**

Δημιουργήσαμε την πλασμιδιακή κατασκευή του hRXRα σε ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης (pBXG1). Ο φορέας αυτός φέρει τα πρώτα 147 αμινοξέα της βακτηριακής πρωτεΐνης Gal4 τα οποία έχουν την δυνατότητα πρόσδεσης σε κατάλληλες αλληλουχίες του DNA (DNA Binding Domain, DBD). Το DBD του Gal4 ακολουθείται από μία αλληλουχία που φέρει διάφορες θέσεις περιορισμού (poly linker).

Ο pBXG1 υπέστη πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI. Σε αυτή τη θέση εντέθηκε το cDNA του hRXRα το οποίο επίσης υπέστη πέψη με EcoRI για να μπορέσει να απομονωθεί από το πλασμίδιο pMT2-hRXRα. Με αυτό τον τρόπο ο hRXRα φέρει στο N-τελικό του άκρο το DBD του Gal4. Το πλασμίδιο που προέκυψε είναι το εξής:



**Εικόνα 14: Η πρωτεΐνη hRXRα που φέρει στο N-άκρο της το DBD του Gal4.**

Η διαδικασία πέψης και απομόνωσης του ενθέματος (hRXRα /EcoRI) καθώς και η διαδικασία πέψης και απομόνωσης του φορέα ένθεσης (pBXG1/EcoRI), τόσο σε μικρή, όσο και σε μεγάλη κλίμακα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που έχουν παρουσιαστεί. Η επιλογή του κλώνου με το σωστό orientation του hRXRα, για την απομόνωση και τον καθαρισμό από βακτηριακό στέλεχος του πλασμιδίου (pBXG1-hRXRα) έγινε με τη βοήθεια του περιοριστικού ενζύμου SmaI. Στο πλασμίδιο pBXG1-hRXRα υπάρχουν δύο θέσεις περιορισμού για SmaI, μία δεξιά της EcoRI του

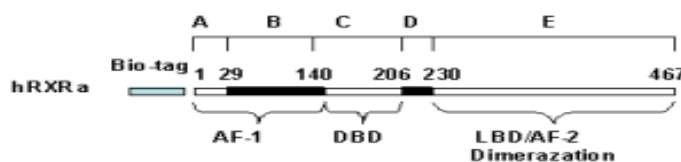
φορά και μία στο N-άκρο του hRXRa (θέση 203). Ο κλώνος που μετά από πέψη με SmaI μας έδινε τμήμα μεγέθους 1660bp είναι και ο θετικός.

Έγινε streaking και ανάπτυξη του θετικού κλώνου της πλασμιδιακής κατασκευής σε πιάτα LB-Amp. Ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού του πλασμιδίου με τη μέθοδο midiprep, καθώς και η ποσοτικοποίηση του με φωτομέτρηση.

### Πλασμιδιακή κατασκευή του RXRa-Bio για πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνικών μορίων.

Δημιουργήσαμε τη πλασμιδιακή κατασκευή του RXRa σε ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης (pcDNA3/Amp). Στον φορέα αυτό είναι κλωνοποιημένο το 22 αμινοξέων Bio πεπτίδιο με τον τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως.

Ο pcDNA3 Bio υπέστη πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI. Σε αυτή τη θέση εντέθηκε το cDNA του hRXRa το οποίο επίσης έφερε άκρα κομμένα με EcoRI. Με αυτό τον τρόπο ο hRXRa φέρει στο N-τελικό του άκρο το πεπτίδιο Bio. Το πλασμίδιο που προέκυψε είναι το εξής:



**Εικόνα 15:** Η πρωτεΐνη hRXRa που φέρει στο N-άκρο της το πεπτίδιο Bio για *in vivo* βιοτινυλίωση.

Η διαδικασία πέψης και απομόνωσης του ενθέματος (hRXRa /EcoRI) καθώς και η διαδικασία πέψης και απομόνωσης του φορέα ένθεσης (pcDNA3-Bio/EcoRI), τόσο σε μικρή, όσο και σε μεγάλη κλίμακα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που έχουν παρουσιαστεί. Η επιλογή του κλώνου με την σωστή φορά τοποθέτησης (orientation) του hRXRa, για την απομόνωση και τον καθαρισμό από βακτηριακό στέλεχος του πλασμιδίου (pcDNA3-Bio-HNF-4) έγινε με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων SmaI και NotI. Στο πλασμίδιο pcDNA3-Bio-hRXRa υπάρχει μία θέση περιορισμού για NotI που εντοπίζεται αριστερά της EcoRI του φορέα και δύο θέσεις περιορισμού για τη SmaI. Η μία στη θέση 203 του cDNA του hRXRa και η άλλη 1080 βάσεις αριστερά της ένθεσης του hRXRa. Ο κλώνος που μετά από διπλή πέψη με NotI και SmaI μας έδινε ενθέματα 1080 και 1660 βάσεων επιλέχτηκε ως θετικός.

Έγινε streaking και ανάπτυξη του θετικού κλώνου της πλασμιδιακής κατασκευής σε πιάτα LB-Amp. Ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού του πλασμιδίου με τη μέθοδο midiprep, καθώς και η ποσοτικοποίηση του με φωτομέτρηση.

### **Πηκτή πολυακρυλαμίδης για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών**

Η πηκτή πολυακρυλαμίδης αποτελείται από δύο φάσεις:

- ✓ το stacking gel (6ml) => 3,6ml ddH<sub>2</sub>O, 0,9ml 30% ακρυλαμίδη, 1.5ml stacking buffer, 60μl 10% APS, 6μl TEMED.
- ✓ το running gel (10ml) => 10,5% = 3,9ml ddH<sub>2</sub>O, 3,5ml 30% ακρυλαμίδη, 2,5ml running buffer, 160μl 10% APS, 8μl TEMED

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε συσκευή Bio-Rad Protean electroblot στα 200V. Το ρυθμιστικό διάλυμα-φορέας μέσα στο οποίο τοποθετείται η Πηκτή για την ηλεκτροφόρηση είναι το 1xTGS [10x TGS (1L) = 30.3gr Tris, 144.2gr Glycine, 10gr SDS, pH 8.3]

Ο δείκτης που χρησιμοποιούμε για να υπολογίσουμε τα μεγέθη των πρωτεϊνών είναι ο Prestained Protein Marker (PPM). Τα μοριακά μεγέθη (KD) που παίρνουμε από τον δείκτη είναι: PPM=175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25, 16.5, 6.5. Οι πρωτεΐνες φορτώνονται στη πηκτή μαζί με 2x SDS Loading Buffer (τελική συγκέντρωση 1x)

#### **Διαλύματα**

- 30% ακρυλαμίδη = σε 100ml ddH<sub>2</sub>O προσθέτουμε 29gr acrylamide, 1gr bis-acrylamide και φιλτράρουμε (0,45 ή 0,22 μm).
- stacking buffer = 0,5M Tris, 0,4% w/v SDS, pH 6.8 φιλτράρουμε με φίλτρο 0,45 ή 0,22 μm.
- running buffer = 1,5M Tris, 0,4% w/v SDS, pH 8.8 φιλτράρουμε με φίλτρο 0,45 ή 0,22 μm.
- APS 10% (10ml) = 1gr APS σε 1ml ddH<sub>2</sub>O.
- Sample buffer 2x (10ml) = 0,625ml Tris 2M, 4ml SDS 10%, 0,4ml β-mercaptoethanol, 1ml Glycerol, 2mg Bromophenol Blue, 100mM DTT, pH 6.8

### **Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης με ανοσοαποτύπωση (Western Blot)**

Ίσες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί, υπόκεινται σε SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση, με την μέθοδο που έχει ήδη περιγραφεί. Χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 10.5%. Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Ακολουθεί χρώση των πρωτεϊνών με χρωστική Ponceau S [(ponceau S (2%), trichloroacetic acid (30%), sulfosalicylic acid (30%)] και έκπλυση με διάλυμα TBS-T [1x TBS, 0.05% Tween-20]

[1 L 10x TBS: 90 gr NaCl, 250 ml Tris-HCl 2M pH 7.3] για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών μπλοκάρονται με έκπλυση σε διάλυμα TBB [1x TBS, 5% ημιαποβουτηρωμένο γάλα, 0.05% Tween-20] για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επωάζονται, αναδεδυόμενες, για 16-18 ώρες (over night) στους 4<sup>0</sup>C ή για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, με το αντίσωμα που ανιχνεύει τον επιθυμητό επίτοπο ή την πρωτεΐνη, σε κατάλληλη αραιώση σε διάλυμα TBB. Ακολούθως, οι μεμβράνες εκπλένονται 3 φορές με διάλυμα TBS-T, 10 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση των μεμβρανών σε κατάλληλο, αραιωμένο 1:15000 σε TBB, δευτερεύον αντίσωμα σε σύζευξη με την HRP, γίνεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν γίνονται 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών η κάθε μία με TBS-T (ανάλογα με το αντίσωμα χρησιμοποιούμε 0.05% Tween-20 ή 0.1% Tween-20), και 1 έκπλυση των 5 λεπτών σε TBS, όλες σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Super Signal®West Pico Chemiluminescent Substrate) και εκθέτοντας τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης σε Kodak-Scientific Imaging film για διάφορα χρονικά διαστήματα. Οι μεμβράνες μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για εκ νέου ανίχνευση διαφορετικού επίτοπου, αφού υποβληθούν σε διαδικασία stripping, με χρήση κατάλληλου διαλύματος (Stripping buffer : 100 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) και επώαση στους 50<sup>0</sup>C για 30 λεπτά, με παροδική ανάδευση. Στη περίπτωση που το δεύτερο αντίσωμα είναι διαφορετικό από το δεύτερο αυτό που γίνεται είναι το μπλοκάρισμα του HRP σε TBST 0,05% + NaN<sub>3</sub> 0,02% για 30 λεπτά και δύο ξεπλύματα της μεμβράνης με TBST για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν εκπλύσεις και επωάσεις των μεμβρανών, όπως περιγράφεται παραπάνω.

#### **Το σύστημα της in vivo βιοτινυλίωσης πρωτεϊνών και η συνκατακρήμιση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών (in vivo biotinylation).**

Κύτταρα HEK 293T ή COS-7 επιμολύνονται παροδικά με πλασμιδιακό φορέα έκφρασης έστω μιας πρωτεΐνης 1 σε σύζευξη με το πεπτίδιο Bio, 22 αμινοξέων, το οποίο υφίσταται βιοτινυλίωση με την συνέκφραση της λιγάσης BirA (βακτηριακής προέλευσης). Τα κύτταρα συνεπιμολύνθηκαν και με τον φορέα έκφρασης έστω της πρωτεΐνης 2. Περίπου 32 ώρες μετα την επιμόλυνση των κυττάρων, ακολουθεί έκπλυση με παγωμένο PBS διάλυμα, αναρρόφηση και προσθήκη 1 ml διαλύματος

λύσης (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton-X-100, 10 µl/ml 100 mM PMSF και 10 µl Benzamidin (αναστολέας της πρωτεόλυσης)). Τα τρυβλία αφήνονται σε ανακινούμενη πλατφόρμα για 20 λεπτά. Κατόπιν, τα κύτταρα αποκολλώνται με ξύστρο, φυγοκεντρώνται στις 13000 rpm για 3 λεπτά, στους 4<sup>0</sup> C. Από το υπερκείμενο κρατείται ποσότητα 100 µl που θα χρησιμοποιηθεί στην πρωτεϊνική ανάλυση. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστίθενται 40 µl 50% σφαιριδίων στρεπταβιδίνης που χαρακτηρίζονται από υψηλή συγγένεια και μεγάλη ειδικότητα πρόσδεσης σε βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες και που έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα TBS-T 0.1%. Στα σφαιρίδια αυτά προσκολλάται η βιοτινυλιωμένη πρωτεΐνη και η πρωτεΐνη 2 αν και εφ'όσον αυτή αλληλεπιδρά με την πρώτη. Τα δείγματα αφήνονται να περιστρέφονται overnight στους 4<sup>0</sup> C. Το επόμενο πρωί ακολουθεί στιγμιαία φυγοκέντρηση και έκπλυση με 1 ml παγωμένου διαλύματος λύσης για κάθε δείγμα, με περιστροφή στους 4<sup>0</sup> C και μετά από στιγμιαία φυγοκέντρηση η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές. Ακολουθεί προσθήκη 12.5 µl 4x SDS Loading Buffer. Μετά από βρασμό 5 λεπτών, αναλύεται η ηλεκτροφορητική ικανότητα των δειγμάτων σε 10.5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, και ανίχνευση της παρουσίας της πρωτεΐνης 2, με χρησιμοποίηση αντισώματος έναντι αυτής ή του επιτόπου της. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης 2 υποδηλώνει την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών 1 και 2. Η έκφραση των βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών ανιχνεύεται με χρήση ενός πολυμερούς που φέρει στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP. Η ανίχνευση αυτή επιτυγχάνεται με επώαση των μεμβρανών (μετά από stripping) με streptavidin-HRP σε αραιώση 1: 10000 TBS-T 0.1% για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν γίνονται 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών η κάθε μία με TBS-T 0.1%, και 1 έκπλυση των 5 λεπτών σε TBS, όλες σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL) όπως περιγράφεται παραπάνω.

### **Κυτταροκαλλιέργειες**

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές HEK 293T, COS-7 και HepG2 που είναι νεφρικά εμβρυϊκά κύτταρα ανθρώπου, νεφρικά κύτταρα πιθήκου και κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος αντίστοιχα. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φλάσκες 75 cm<sup>2</sup> και σε τρυβλία, 6-well και p-100 (διαμέτρου 30 και 100 mm αντίστοιχα), σε επωαστήρα 37C<sup>0</sup> και σε συνθήκες 5% CO<sub>2</sub> .



Αποθέματα καλλιιεργειών (stocks) φυλάσσονται σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$  σε θρεπτικό DMEM με 10% FBS και 10% DMSO. Τα κυτταρικά δείγματα εμβυπίζονται σε υδατόλουτρο ώστε να ξεπαγώσουν και μεταφέρονται σε φλάσκες με πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο ανανεώνεται την επόμενη μέρα προκειμένου να αποφευχθούν τυχούσες βλαβερές επιπτώσεις του DMSO. Το θρεπτικό υλικό στις φλάσκες ανανεώνεται κάθε 48-72h. Τα κύτταρα αραιώνονται (split) όταν σχηματίσουν μονοστιβάδα, με χρήση διαλύματος τρυψίνης (trypsin-EDTA), και στην κατάλληλη συγκέντρωση με προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού (τελική αραιώση στις φλάσκες 1 : 10).

Τα θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιούμε για τα HepG2 είναι το High Glucose 10% FBS [50ml=44ml DMEM (4500 Glucose), 1ml Penicillin /Streptomycin, 5ml FBS], ενώ για τα COS7 το Low Glucose 10% FBS [50ml=44ml DMEM (1000 Glucose), 1ml Penicillin /Streptomycin, 5ml FBS].

### **Παροδικές επιμόλυνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections)**

Οι παροδικές επιμόλυνσεις έγιναν με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  με τα εκάστοτε κατάλληλα και επιθυμητά πλασμίδια. Τα COS-7 κύτταρα καθώς και τα HEK 293T, αραιώνονται σε συγκέντρωση  $2.5 \times 10^5$  κύτταρων/well σε 6-well και σε  $5 \times 10^5$  κύτταρων ανά τρυβλίο p100, ενώ τα HepG2 κύτταρα σε  $5 \times 10^5$  κύτταρα/well στα 6-well και  $2 \times 10^6$  κύτταρα/well στα p100, την προηγούμενη μέρα της επιμόλυνσης. Τα κύτταρα μετρώνται με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, της εταιρείας Hauser Scientific. Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε 6-well (χρησιμοποιούνται στο luciferase assay) παρασκευάζεται μείγμα που περιέχει 4μg πλασμιδίου αναφοράς, 6μg πλασμιδίου έκφρασης ή/και πλασμιδίου συμπλήρωσης, 2μg πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, 31μl  $\text{CaCl}_2$  2M και 195μl ddH<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O for injections). Η ποσότητα του συνολικού DNA δεν υπερβαίνει τα 12μg.

Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε τρυβλίο p-100 το μείγμα περιέχει μέχρι 17μg πλασμιδίου έκφρασης, 17μg πλασμιδίου συμπλήρωσης (ssDNA), 31μl  $\text{CaCl}_2$  2M και ποσότητα ddH<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 250 μl. Σε κάθε περίπτωση, το μείγμα προστίθεται σε ίσο όγκο HEPES Buffered Saline (HBS) (2x HBS: 42 mM HEPES pH 7.1, 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 12 mM dextrose) και στη συνέχεια αναδεύεται. Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10min, για να προστεθεί ακολούθως στάγδην στο τρυβλίο με τα

κύτταρα. Στην περίπτωση συγκατακρήμνισης σε 6-well, κάθε δείγμα μοιράζεται ισόποσα σε δύο wells. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 16 ώρες, αλλαγή θρεπτικού και επώαση για άλλες 24 ώρες.

Στην περίπτωση των πειραμάτων σε 6-wells τα κύτταρα εκπλένονται με 1ml PBS και συλλέγονται με 300μl διαλύματος λύσης (lysis buffer) και στη συνέχεια συλλέγονται με 500μl TES (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA and 100 mM NaCl) 1x, φυγοκεντρώνονται στα 5000rpm για 5min, αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 100μl Tris pH 7,9 250mM, αναδεύουμε και εκτελούμε τη διαδικασία freeze (-80°C) and thaw (37°C) 3 φορές (για luc assays). Στην περίπτωση των πειραμάτων σε τρυβλία p-100 τα κύτταρα εκπλένονται με 5ml PBS 1x και συλλέγονται με 1ml διαλύματος λύσης (lysis buffer), μετά από επώαση σε αναδεύομενη πλατφόρμα στους 4°C (για Co-IP). Οι κυτταρικές μεμβράνες κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία - 80°C.

#### **Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal (β-gal assay)**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, καθώς και για την εξάλειψη του σφάλματος λόγω του διαφορετικού αριθμού κυττάρων κάθε τρυβλίου, σε πειράματα μέτρησης της αντίδρασης της λουσιφεράσης (luc-assay). Για τον σκοπό αυτό, το μείγμα συγκατακρήμνισης (βλ. παραπάνω) περιέχει και πλασμίδιο-φορέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης υπό τον υποκινητή του Cytomegalovirus (πλασμίδιο pCMVβ-gal). Σε 20μl κυτταρικού εκχυλίσματος προστίθενται 456μl Sodium Phosphate buffer (0.1M pH 7.3), 132μl ONPG (8 mg/ml σε 0.1M Sodium Phosphate buffer), και 6 μl 100x salt (3M KCl, 1M MgCl<sub>2</sub>, β-μερκαπτοαιθανόλη, dd H<sub>2</sub>O, τελικός όγκος 600μl). Τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο 37°C μέχρι να κιτρινίσουν. Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 200μl διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M που προκαλεί μεταβολή του pH. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των δειγμάτων γίνεται σε φωτόμετρο στα 410 nm. Η μεγαλύτερη τιμή που λαμβάνεται ανά πείραμα διαιρείται με τις υπόλοιπες, οπότε προκύπτει για κάθε τρυβλίο ο παράγοντας κανονικοποίησης (β-gal factor) με τον οποίο πολλαπλασιάζονται οι τιμές που προκύπτουν από την μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης.

### **Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay)**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης από τον υποκινητή του πλασμιδίου αναφοράς, ως αποτέλεσμα της επιμόλυνσης με πλασμίδια έκφρασης. Η εκτίμηση αυτή γίνεται με χρήση ενζυμικής αντίδρασης, όπου μετράται η δραστηριότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης που προέρχεται από την πυγολαμπίδα (fire fly) και που, επίσης, εκφράζεται στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 60μl από τα 100μl επαναδιαλυμένου σε Tris-HCl pH 7,9 250mM κυτταρικού εκχυλίσματος και 60μl υποστρώματος λουσιφεράσης. Η τιμή της μεταγραφικής ενεργοποίησης κάθε δείγματος δίνεται από το λουμινόμετρο (Illuminometer) σε RLU/s.

### **Μέθοδος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP)**

Ετοιμάστηκε 1 p-100 πιάτο με  $5 \times 10^6$  κύτ./πιάτο και 24 ώρες αργότερα ξεκίνησε η διαδικασία ως εξής :

- Απομάκρυνση θρεπτικού και ξέπλυμα με 7ml θρεπτικό για HepG2
- Προσθήκη 9ml θρεπτικό και 1ml formaldehyde (10%) σταγόνα-σταγόνα (γρήγορα). Ανακάτεμα και επώαση 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 1ml Glycine (1,375M) σταγόνα-σταγόνα (γρήγορα) και ανακάτεμα
- Αφαίρεση υπερκειμένου και 3 πλυσίματα με 10 ml 1xPBS/0,5mM PMSF σε κάθε p-100.
- Προσθήκη 7 ml 1xPBS/0,5% NP-40/0,5mM PMSF και ξύσιμο των κυττάρων με scraper.
- Φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 5min στους 4°C και επαναδιάλυση της πελέττας σε 5ml Swelling buffer. Επώαση στον πάγο για 10 λεπτά
- Σπάσιμο των κυττάρων με το μηχάνημα “Dounce”. 20 φορές για κάθε δείγμα
- Προσθήκη 5μl από το κάθε δείγμα σε 5μl Trypan Blue και έλεγχος με μικροσκόπιο για το αν έσπασαν τα κύτταρα και ελευθερώθηκαν οι πυρήνες
- Φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C και επαναδιάλυση πελέττας σε 2ml Sonication buffer
- 11 sonications των 30sec, με 5 λεπτά στον πάγο ανάμεσα σε κάθε sonication
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C και μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό tube. Επανάληψη του προηγούμενου σταδίου.
- Μεταφορά 40μl σε καθαρό tube. (Αποθήκευση του υπόλοιπου στους -80°C).

- Προσθήκη 160μl H<sub>2</sub>O και 20μl NaCl 4M. Επώαση 65°C o/n
- Καθάρισμα με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 25:24:1
- Καθάρισμα με χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 24:1
- Κατακρήμνιση με αιθανόλη
- Επαναδιάλυση σε 20μl H<sub>2</sub>O
- Έλεγχος σε πηκτή αγαρόζης 1,5%

Αν η χρωματίνη έχει σπάσει σε κομμάτια μικρότερα των 1000 βάσεων, μπορούμε να συνεχίσουμε την διαδικασία.

### Ετοιμασία των beads

Για το δείγμα μας χρειάστηκαν 200μl καθαρά protein G beads (50μl για το +HNF4 και 100μl για το preclearing).

- Προσθήκη 1,5ml sonication buffer+inhibitors
- Περιστροφή για 10 λεπτά στους 4°C
- Φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 3 λεπτά στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Επαναλαμβάνω 2 φορές τα 4 παραπάνω στάδια
- Προσθήκη 494μl dialysis buffer (+inhibitors) + 5μl BSA (100mg/ml) + 1μl λDNA (0,5μg/μl)
- Περιστροφή για 2 ώρες στους 4°C
- Μεταφορά από 180μl beads σε 2 καθαρά tubes και αποθήκευση στους 4°C
- Φυγοκέντρηση των υπόλοιπων beads (για preclearing) στις 6000 στροφές για 3 λεπτά στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκειμένου

Η διαδικασία συνεχίζεται ως εξής:

- Ξεπάγωμα των δειγμάτων από τους -80°C
- Φωτομέτρηση κάθε δείγματος στα 260nm και 280nm
- Διαίρεση της κάθε OD<sub>260</sub> με τη μικρότερη OD<sub>260</sub> (λόγος)
- Προσθήκη στα preclearing beads 1500μl από το δείγμα με τη μικρότερη OD<sub>260</sub> και 1500/λόγος μl για τα υπόλοιπα. Προσθήκη sonication buffer μέχρι τα 1500μl
- Προσθήκη 16μl BSA (100mg/ml) και 3,2μl λ DNA (0,5μg/μl)

- Περιστροφή για 2 ώρες στους 4°C
- Φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 3 λεπτά στους 4°C
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέα tubes
- Μέτρηση του όγκου του κάθε δείγματος
- Το δείγμα μας μοιράζεται εξίσου σε 2 νέα tubes, ενώ σε άλλο tube αποθηκεύεται στους -20°C το 1/10 του όγκου που μεταφέρθηκε σε κάθε tube (input)
- Στο πρώτο tube προστίθενται 5μl α-HNF4 (+HNF4) ενώ στο δεύτερο τίποτα (-ab)
- Περιστροφή για 2 ώρες στους 4°C
- Φυγοκέντρηση των beads από τους 4°C
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη των δειγμάτων (+ab, -ab) στα καθαρά beads
- Περιστροφή στους 4°C o/n
- 2 πλυσίματα με το Wash buffer A. Το κάθε πλύσιμο περιλαμβάνει 10 λεπτά περιστροφή στους 4°C και φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 3 λεπτά στους 4°C
- 2 πλυσίματα με το Wash buffer B
- 2 πλυσίματα με το Wash buffer C
- 2 πλυσίματα με το TE buffer + inhibitors
- Προσθήκη 150μl Elution buffer. Vortex
- Επώαση στους 65°C για 10 λεπτά. Vortex
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 1 λεπτό
- Μεταφορά υπερκειμένου (150μl) σε καθαρό tube
- Προσθήκη 150μl Elution buffer. Vortex
- Επώαση στους 65°C για 10 λεπτά. Vortex
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 1 λεπτό
- Μεταφορά υπερκειμένου στο tube του προηγούμενου υπερκειμένου (300μl τελικά)
- Προσθήκη 100μl H<sub>2</sub>O και 21μl NaCl 4M
- Για τα inputs προσθήκη μέχρι τα 300μl Elution buffer, 100μl H<sub>2</sub>O και 21μl NaCl 4M

- Ανάδευση, flash spin και επώαση στους 65°C για 5 ώρες
- Προσθήκη 1μl RNase A (10mg/ml, DNase-free)
- Επώαση στους 37°C για 1 ώρα
- Προσθήκη 2μl EDTA (0,5M) και 2μl Proteinase K (10mg/ml)
- Επώαση στους 42°C για 2 ώρες
- Προσθήκη 200μl H<sub>2</sub>O
- Προσθήκη 1/10 του όγκου CH<sub>3</sub>COONa 3M
- Καθάρισμα με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 25:24:1
- Καθάρισμα με χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 24:1
- Προσθήκη 1μl glycogen (20 mg/ml)
- Κατακρήμνιση με αιθανόλη o/n
- Επαναδιάλυση των inputs σε 100μl 10mM Tris (pH 7,5) και των δειγμάτων σε 50μl 10mM Tris (pH 7,5)

**Swelling buffer**

25mM Hepes pH 7,9  
1,5mM MgCl<sub>2</sub>  
10mM KCl  
0,5% NP-40  
1mM DTT  
0,5mM PMSF  
2μg/ml aprotinin

**Sonication buffer**

50mM Hepes pH 7,9  
140mM NaCl  
1mM EDTA  
1% Triton X-100  
0,1% Na-deoxycholate  
0,1% SDS  
0,5mM PMSF  
10μg/ml aprotinin

**TE**

+ inhibitors

**Elution buffer**  
**(prepare freshly)**

50mM Tris pH 8  
1mM EDTA  
1% SDS  
50mM NaHCO<sub>3</sub>  
no inhibitors

**Wash buffer A**

50 mM Hepes pH 7,9  
140 mM NaCl  
1mM EDTA  
1% Triton X-100  
0,1% Na-deoxycholate  
0,1% SDS  
0,5 mM PMSF  
2μg/ml aprotinin

**Wash buffer B**

Όπως το Wash  
buffer A αλλά με  
500mM NaCl

**Wash buffer C**

20 mM Tris pH 8  
1 mM EDTA  
250 mM LiCl  
0,5% NP-40  
0,5% Na-deoxycholate  
0,5mM PMSF  
2μg/ml aprotinin

## PCR για CHIP

### *Αντίδραση PCR*

Σε PCR tube αρχικά βάζω 10μl template (8μl η 6μl H<sub>2</sub>O και 2μl ή 4μl από το δείγμα μου).

Στη συνέχεια ετοιμάζω την υπόλοιπη αντίδραση :

10μM sense primer	2μl
10μM antisense primer	2μl
10mM dNTPs	1μl
25mM MgCl <sub>2</sub>	3μl
10x Taq buffer	5μl
Taq polymerase	0,5μl
H <sub>2</sub> O	26,5μl

### *Προγράμματα PCR που χρησιμοποιήθηκαν*

#### Για *PRO- apoC3-3S/A* και *apoAI-3S/A* εκκινητές

94°C για 3 λεπτά	} <b>35 κύκλοι</b>
94°C για 1 λεπτό	
Annealing (68 °C ) για 1:30min	
72°C για 2 λεπτά	
72°C για 5 λεπτά	

#### Για *apoC3-3S/A* εκκινητές

94°C για 3 λεπτά	} <b>35 κύκλοι</b>
94°C για 1 λεπτό	
Annealing (62 °C ) για 1:30min	
72°C για 2 λεπτά	
72°C για 5 λεπτά	

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των διαφόρων περιοχών του apoAI και apoCIII υποκινητή στο συγκεκριμένο πείραμα φαίνονται στον **πίνακα 1**

<b>Πίνακας 1: ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των διαφόρων περιοχών του apoAI και apoCIII υποκινητών/ενισχυτή</b>		
<b>όνομα ολιγονουκλεοτιδίου</b>	<b>ακολουθία</b>	<b>θέση</b>
apoC3-3A	5'- AGT TGC TCC CAC AGC CAG GGG GCA GT -3'	Ενισχυτής apoCIII (-906)
apoC3-3S	5'- TCT CAC AGC CCC TCC CAG CAC CTC CAT -3'	Ενισχυτής apoCIII (-543)
PRO apoC3-3A	5'- CAG GCC CAC CCC CAG TTC CTG AGC TCA -3'	Υποκινητής apoCIII (-256)
PRO apoC3-3S	5'- CCT GTT TTA TAT CAT CTC CAG GGC AGC AGG C -3'	Υποκινητής apoCIII (-45)
apoAI-3A	5'- AGA GTG ACC GGG GCA GGC AGC AGG AC -3'	Υποκινητής apoAI (+22)
apoAI-3S	5'- GGC AAC TGC CCA CAC ACT CCC ATG GAG G -3'	Υποκινητής apoAI (-315)



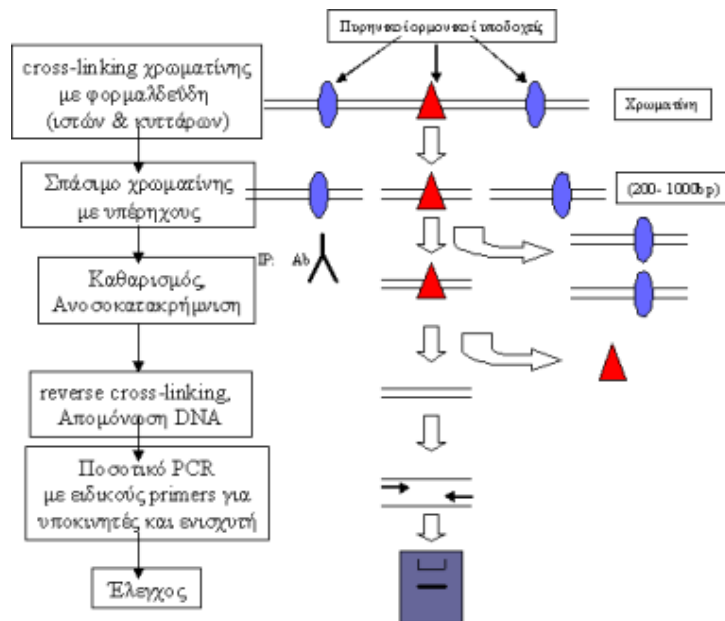
## Αποτελέσματα

### Μέρος 1<sup>ο</sup>:

#### In vivo ανίχνευση πρόσδεσης του ορμονικού πυρηνικού υποδοχέα HNF4 στους υποκινητές των απολιποπρωτεϊνών AI και CIII.

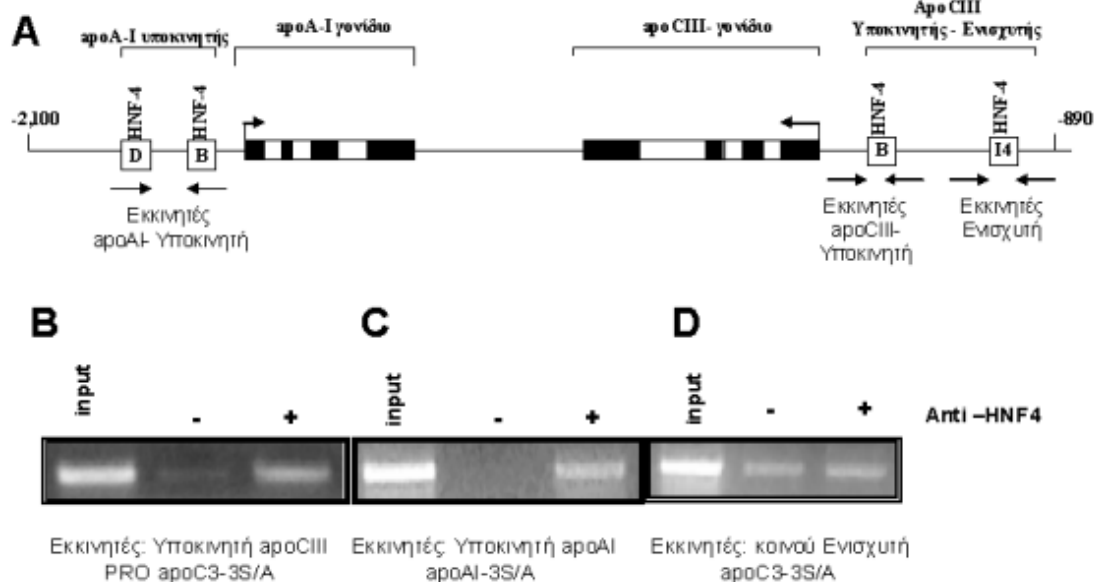
Έχουμε ήδη αναφέρει πως τα γονίδια των απολιποπρωτεϊνών AI και CIII, αποτελούν μαζί με την apoAIV, ένα σύμπλεγμα γονιδίων. Γνωρίζουμε, λοιπόν, η σωστή έκφραση των apoAI και apoCIII ρυθμίζεται όχι μόνο από τους κοντινούς υποκινητές των δύο γονιδίων, αλλά και από έναν μακρινό ενισχυτή ο οποίος εντοπίζεται μετά τον κοντινό υποκινητή της apoCIII. Από *in vitro*, αλλά και *in vivo* πειράματα γνωρίζουμε πως σημαντικός ρυθμιστικός μεταγραφικός παράγοντας, της σωστής έκφρασης των δύο γονιδίων είναι ο ορμονικός πυρηνικός υποδοχέας HNF4 (1). Με *in vitro* πειράματα (1) έχει αποδειχτεί πως ο HNF4 έχει τη δυνατότητα πρόσδεσης στα HREs (Hormone response elements) που εντοπίζονται τόσο στους υποκινητές, όσο και στον κοινό ενισχυτή των δύο γονιδίων (εικόνες 3 και 4).

Το ερώτημα που θελήσαμε να διερευνήσουμε είναι, το κατά πόσο ο HNF4 βρίσκεται συνεχώς προσδεμένος στα HREs των υποκινητών και του ενισχυτή των apoAI και apoCIII σε κύτταρα που φυσιολογικά εκφράζουν τα δύο γονίδια. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) σε κύτταρα HepG2 (ηπατικά) τα οποία εκφράζουν τόσο τον HNF4, όσο και τα γονίδια apoAI και apoCIII. Η βασική αρχή της τεχνικής ChIP παρουσιάζεται στην **εικόνα 16**.



**Εικόνα 16:** Σχηματική αναπαράσταση της τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης

Από τα δεδομένα του πειράματος, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως ενώ στους υποκινητές τόσο της apoAI, όσο και της apoCIII ο HNF4 φαίνεται να είναι συνεχώς προσδεδεμένος, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (εικόνα 17B και 17C), δεν φαίνεται να ισχύει το ίδιο και για τον μακρινό υποκινητή (εικόνα 17D) (το σήμα που παίρνουμε είναι τι ίδιο με το background). Παρόλα αυτά είναι γνωστό πως αν μεταλλάξουμε το ρυθμιστικό στοιχείο (HRE), πάνω στο οποίο έχει δυνατότητα πρόσδεσης ο HNF4, τότε δημιουργούνται προβλήματα ως προς την σωστή έκφραση των apoAI και apoCIII γονιδίων τόσο ήπαρ, όσο και στο έντερο, όπου φυσιολογικά εκφράζονται τα δύο γονίδια. Μένει λοιπόν να δούμε ποιος άλλος μεταγραφικός παράγοντας που έχει δυνατότητα πρόσδεσης στην περιοχή αυτή είναι αναγκαίος και απαραίτητος για τη σωστή έκφραση των δύο γονιδίων.



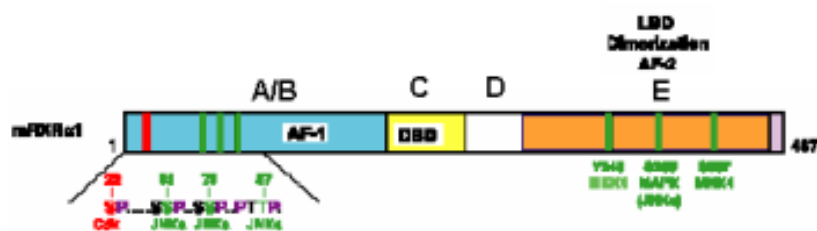
**Εικόνα 17: Η *in vivo* πρόσδεση του HNF4 στους υποκινητές και στον κοινό ενισχυτή των γονιδίων apoAI και apoCIII.** A) Σχηματική αναπαράσταση των υποκινητών και του κοινού ενισχυτή των γονιδίων apoAI και apoCIII, όπου φαίνονται οι περιοχές στις οποίες αντιστοιχούν τα ζευγάρια των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. Εμφανίζονται, επίσης, οι θέσεις όπου υπάρχει δυνατότητα πρόσδεσης του HNF4 ορμονικού πυρηνικού υποδοχέα. Για το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HepG2. B) Ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι του HNF4 και εκκινήτες που αντιστοιχούν στη θέση πρόσδεσής του στον κοινό ενισχυτή. C) Ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι του HNF4 και εκκινήτες που αντιστοιχούν στη θέση πρόσδεσής του στον υποκινητή της apoAI. D) Ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με αντίσωμα έναντι του HNF4 και εκκινήτες που αντιστοιχούν στην θέση πρόσδεσής του στον υποκινητή της apoCIII. Το Input αντιπροσωπεύει το 10% της χρωματίνης που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε ανοσοκατακρήμνιση, ενώ το (-) αντιστοιχεί στο πείραμα ελέγχου, όπου δε χρησιμοποιήθηκε καθόλου αντίσωμα.

## Μέρος 2<sup>ο</sup>:

### Επίδραση της ισομεράσης προλίνης Pin1 στην μεταγραφική δραστηριότητα του ορμονικού πυρηνικού υποδοχέα RXRa και έλεγχος της επίδρασής της σε υποκινητές των απολιποπρωτεϊνών.

#### Επίδραση του Pin1 στη μεταγραφική δραστηριότητα των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων ορμονών HNF4 και RXRa.

Γνωρίζοντας πως η έκφραση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών ρυθμίζεται θετικά ή αρνητικά από ένα πλήθος ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων θελήσαμε να ελέγξουμε με ποιον ακριβώς τρόπο επιτυγχάνεται αυτή η ρύθμιση. Γνωρίζουμε πως οι ορμονικοί πυρηνικοί υποδοχείς για να δράσουν ως μεταγραφικοί παράγοντες πρέπει να αλληλεπιδράσουν με τον συνδέτη τους, να ομο- ή ετερο-διμεριστούν και να αναγνωρίσουν τα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία πάνω στο DNA καθώς και να υποστούν διάφορες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, όπως ακετυλιώσεις ή φωσφορυλιώσεις. Τον τελευταίο καιρό έχει αρχίσει να επικρατεί μία θεωρία σύμφωνα με την οποία μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, όπως η φωσφορυλίωση, που επηρεάζουν την δραστηριότητα μεταγραφικών παραγόντων, αποτελούν υποστρώματα ισομερασών οι οποίες οδηγούν στην αλλαγή διαμόρφωσης, άρα και στην αλλαγή της δραστηριότητας των μεταγραφικών παραγόντων. Μία τέτοια ισομεράση είναι και η ισομεράση προλίνης Pin1 (163aa) η οποία προσδένεται σε φωσφορυλιωμένα μοτίβα Ser/Thr-Pro και στη συνέχεια ισομεριώνει τη διαμόρφωση της προλίνης. Επειδή τέτοια μοτίβα φαίνεται να υπάρχουν τόσο στην HNF4 (Jiang et al., 1997) (**εικόνα 8B**), όσο και στον RXRa (Bastien J, 2004) (**Εικόνα 18**) θελήσαμε να δούμε αν και με ποιον τρόπο μπορεί να επηρεάσει την μεταγραφική τους ενεργότητα η ισομεράση Pin1.



**Εικόνα 18:** Θέσεις φωσφορυλίωσης της RXRa από διάφορες κινάσες.

Αρχικά θελήσαμε να ανιχνεύσουμε την έκφραση της πρωτεΐνης Pin1 η οποία είναι κλωνοποιημένη στον ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης pHook2 και φέρει στο N-άκρο της τον επίτοπο HA. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τον φορέα έκφρασης της υβριδικής πρωτεΐνης HA-Pin1. Στο

ανοσοαποτύπωμα της **Εικόνας 19**, μπορούμε να παρατηρήσουμε την έκφραση της HA-Pin1.



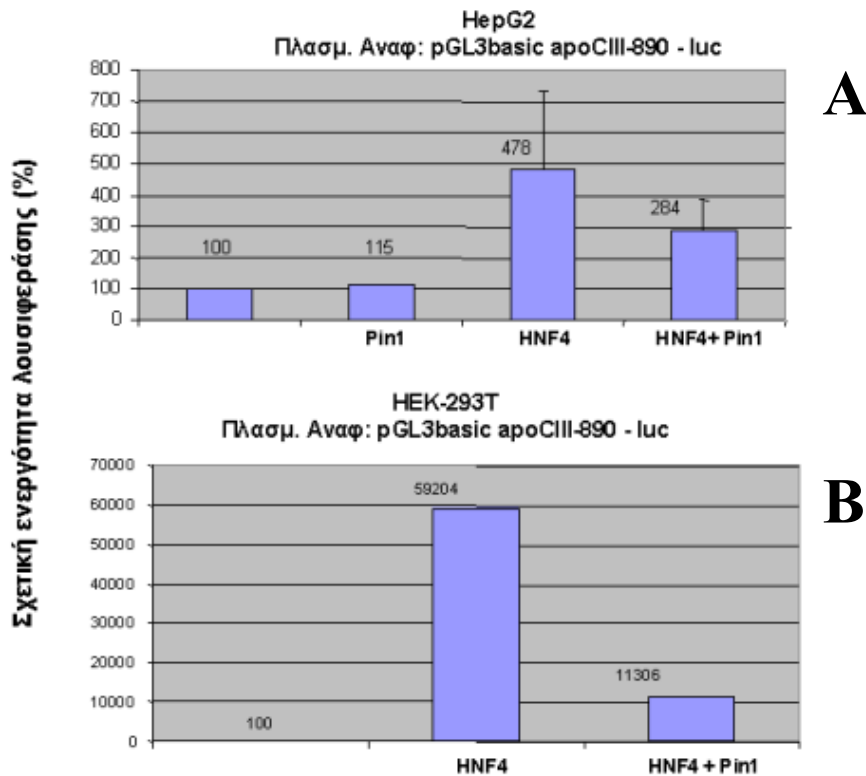
**Εικόνα 19: Ανίχνευση της έκφρασης της ισομεράσης Pin1.**

Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης HA-Pin1 σε ποσότητα 10 μg όπως υποδεικνύεται στο πάνω μέρος των ανοσοαποτυπωμάτων. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (Whole Cell Extract, WCE) ελέγχθηκαν με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε ως πρώτο αντίσωμα το α-HA (mouse) (1:2000) και ως δεύτερο αντίσωμα το α-mouse-HRP (1:15000). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ECL.

**Επίδραση του Pin1 στη μεταγραφική δραστηριότητα του HNF4.**

Εφόσον ελέγξαμε την έκφραση της ισομεράσης Pin1 σε κύτταρα θηλαστικών, ακολούθησαν πειράματα για τον έλεγχο της επίδρασή της σε ορμονικούς πυρηνικούς υποδοχείς. Αρχικά ελέγχθηκε η επίδρασή της στον ορμονικό πυρηνικό υποδοχέα HNF4 μέσω της επίδρασής του στον υποκινητή της απολιποπρωτεΐνης CIII.

Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII -890 -luc παρουσία του HNF4, απουσία και παρουσία της ισομεράσης Pin1. Το ίδιο ακριβώς πείραμα επαναλήφθηκε και στην κυτταρική σειρά HEK-293T, έτσι ώστε να ελέγξουμε αν το φαινόμενο που παρατηρούμε είναι ιστοειδικό ή όχι. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 20** η ισομεράση Pin1 προκαλεί καταστολή της έκφρασης του υποκινητή της apoCIII μέσω του υποδοχέα HNF4. Επίσης, η ισομεράση δεν φαίνεται να επιδρά στην μεταγραφική έκφραση του υποκινητή της apoCIII στη ηπατική κυτταρική σειρά



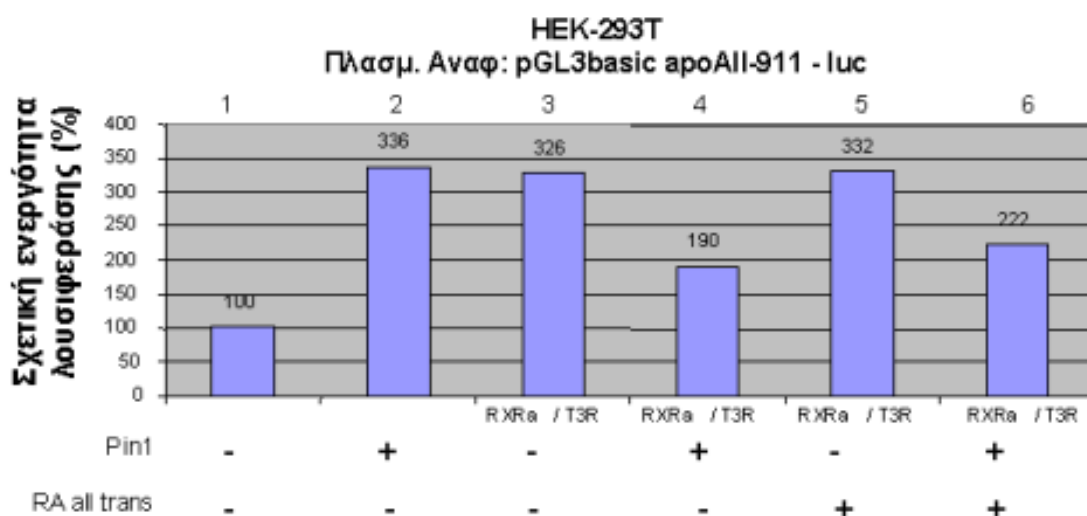
**Εικόνα 20: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα της HNF4 πρωτεΐνης, μέσω της δράσης του στον υποκινητή της apoCIII.** Α) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII-890 -Luc (2 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα pMT2-HNF4 (1 μg). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε παρουσία ή απουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης Pin1 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστικότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε. Β) Αναλόγως πραγματοποιήθηκε το πείραμα που παρουσιάστηκε προηγουμένως στη κυτταρική σειρά KEH-293T.

**Επίδραση του Pin1 στη μεταγραφική δραστικότητα του RXRa.**

Στη συνέχεια θελήσαμε να ελέγξουμε την δράση της ισομεράσης Pin1 στον ορμονικό πυρηνικό υποδοχέα RXRa. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια δύο υποκινητών λιποπρωτεϊνών οι οποίοι είναι γνωστό πως ενεργοποιούνται μέσω του RXRa, της apoAII και της apoCII (1). Ο υποκινητής της apoAII φέρει στο ρυθμιστικό στοιχείο AB ένα HRE που έχει ικανότητα πρόσδεσης του ετεροδιμερούς RXRa/T3Rβ, ενώ ο υποκινητής της apoCII έχει ικανότητα πρόσδεσης του ίδιο ετεροδιμερούς στο στοιχείο C.

Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα HEK-293T επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoAII-911 -luc παρουσία των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων RXRa και T3R, απουσία και παρουσία της ισομεράσης Pin1 (**Εικόνα 21**).

Για την μεταγραφική ενεργοποίηση του ετεροδιμερούς RXRα/T3R χρησιμοποιήθηκε το all trans ρετινοϊκό οξύ (all trans RA) (αποτελεί συνδέτη του T3R και ενεργοποιητή του συμπλόκου)

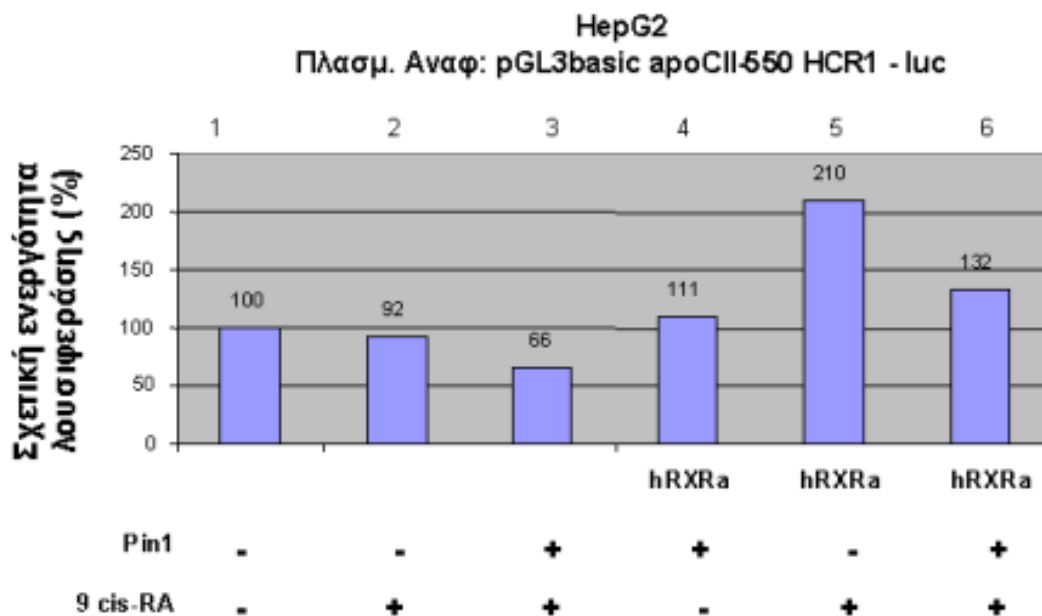


**Εικόνα 21: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα της RXRα πρωτεΐνης, μέσω της δράσης της στον υποκινητή της apoAII.** Κύτταρα HEK-293T επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoAII-911 -luc (2 μg) και τους πλασμδιακούς φορείς pMT2-RXRα (1 μg) και pMT2-T3Rβ (1 μg). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε παρουσία ή απουσία του πλασμδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης Pin1 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Για την ενεργοποίηση του συμπλόκου RXRα/T3Rβ χρησιμοποιήθηκε το all trans RA ( $10^{-2}M$ ) (σε 1/1000 αραίωση). Η % δραστηριότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Από τα αποτελέσματα μπορούμε να συμπεράνουμε, καταρχήν, πως τόσο το Pin1 όσο και το ετεροδιμερές RXRα/T3R, έχουν τη δυνατότητα ενεργοποίηση του υποκινητή της apoAII (στήλη 2 και 3), ενώ η κοινή παρουσία Pin1 και RXRα/T3R, έχει σαν αποτέλεσμα την καταστολή του υποκινητή. Προφανώς, λοιπόν, η ενεργοποίηση του υποκινητή της apoAII από την Pin1 γίνεται μέσω άλλων μεταγραφικών παραγόντων και όχι μέσω RXRα/T3R. Αν και στη στήλη 5 δεν παρατηρούμε κάποια αλλαγή (όπως θα περιμέναμε) στη δραστηριότητα του RXRα/T3R παρουσία του συνδέτη του all trans RA, η λιγάση Pin1 συνεχίζει να καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του συμπλόκου RXRα/T3R (στήλη 6).

Στη συνέχεια θελήσαμε να ελέγξουμε την δράση της Pin1 πάνω στο ομοδιμερές RXRα/RXRα. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCII-550 HCR1 -luc παρουσία του RXRα, απουσία και παρουσία της ισομεράσης Pin1 (**Εικόνα 22**). Για την μεταγραφική

ενεργοποίηση του ομοδιμερούς RXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  χρησιμοποιήθηκε το 9-cis ρετινοϊκό οξύ (9-cis RA) (αποτελεί συνδέτη και ενεργοποιητή του RXR $\alpha$ ).

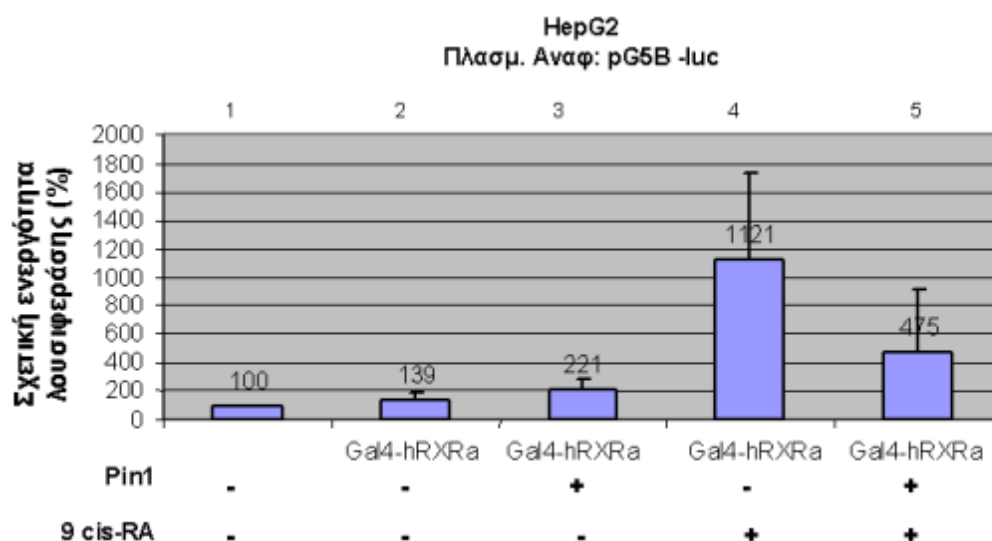


**Εικόνα 22: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα της RXR $\alpha$  πρωτεΐνης, μέσω της δράσης της στον υποκινητή της apoCII.** Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCII-550 HCR1 -luc (2  $\mu$ g) και τον πλασμιδιακό φορέα pMT2-RXR $\alpha$  (1  $\mu$ g). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε παρουσία ή απουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης Pin1 (1  $\mu$ g), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Για την ενεργοποίηση του συμπλόκου RXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  χρησιμοποιήθηκε το 9-cis RA ( $10^{-2}$ M) (σε 1/1000 αραιώση). Η % δραστηριότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMV $\beta$ -gal (1  $\mu$ g), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Από τα δεδομένα που προκύπτουν, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως ούτε η ισομεράση Pin1, αλλά ούτε και το ανενεργό ομοδιμερές του RXR $\alpha$ , μπορούν να ενεργοποιήσουν τον apoCII υποκινητή (στήλες 1-4). Αυτό που επίσης μπορούμε να παρατηρήσουμε είναι πως η Pin1 παρουσιάζει αρνητική επίδραση στην μεταγραφική ενεργότητα του ενεργοποιημένου RXR $\alpha$  (στήλη 6).

Στη συνέχεια θελήσαμε να μελετήσουμε περαιτέρω την επίδραση της Pin1, τόσο στον RXR $\alpha$ , όσο και στον HNF4 χρησιμοποιώντας το σύστημα Gal4. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε φορείς έκφρασης που φέρουν το DBD του Gal4 (pBXG1) σε σύντηξη τόσο με τον RXR $\alpha$ , όσο και με τον HNF4. Για τον έλεγχο της επίδρασης της Pin1 πάνω στο Gal4-RXR $\alpha$  κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-luc παρουσία του Gal4-RXR $\alpha$ , απουσία και παρουσία της ισομεράσης Pin1 (**Εικόνα 23**). Ο συνθετικός υποκινητής pG5B-luc

φέρει 5 θέσεις πρόσδεσης για το DBD του Gal4. Για την μεταγραφική ενεργοποίηση του Gal4-RXRα χρησιμοποιήθηκε το 9-cis ρετινοϊκό οξύ (9-cis RA).

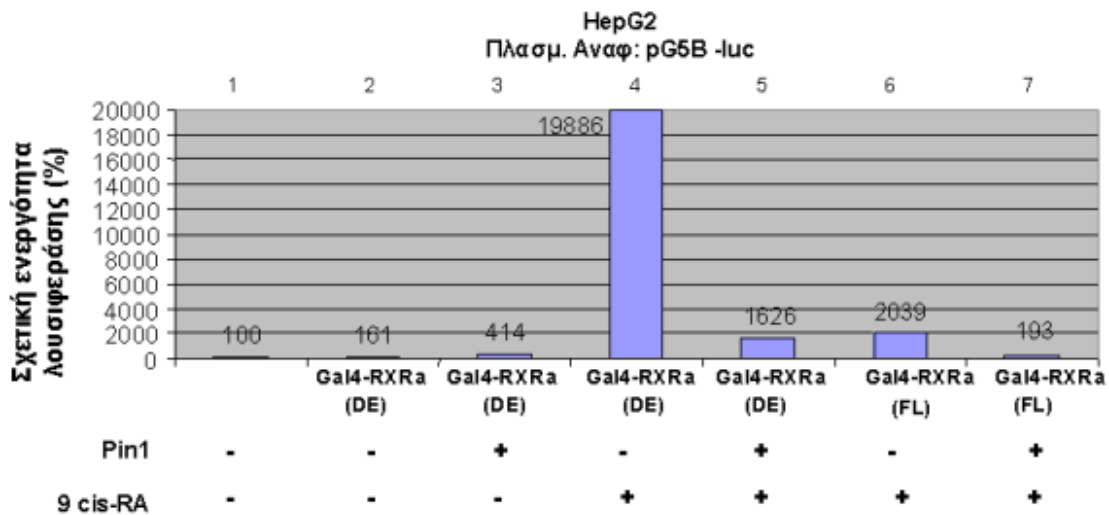


**Εικόνα 23: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα της RXRα πρωτεΐνης.** Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-luc (2 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα pBXG1-RXRα (1 μg). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε παρουσία ή απουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης Pin1 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Για την ενεργοποίηση του Gal4-RXRα χρησιμοποιήθηκε το 9-cis RA ( $10^{-2}M$ ) (σε 1/1000 αραιώση). Η % δραστηριότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Από το παραπάνω πείραμα γίνεται, ακόμη μία φορά εμφανής η κατασταλτική δράση της ισομεράσης Pin1 πάνω στον ορμονικό υποδοχέα RXRα (στήλη 5).

Επειδή, όμως, ο RXRα διαθέτει θέσεις φωσφορυλίωσης (μεταξύ των οποίων και μοτίβα Ser/Thr-Pro) τόσο στο A/B domain όσο και στο E domain, θελήσαμε να έχουμε μία εικόνα, σχετικά με το ποιο είναι εκείνο το domain το οποίο επηρεάζεται από τη δράση της ισομεράσης Pin1. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-luc παρουσία του Gal4-RXRα (full length, FL) ή παρουσία Gal4-RXRα (D/E), απουσία και παρουσία της ισομεράσης Pin1 (**Εικόνα 24**). Για την μεταγραφική ενεργοποίηση του Gal4-RXRα χρησιμοποιήθηκε το 9-cis ρετινοϊκό οξύ (9-cis RA).



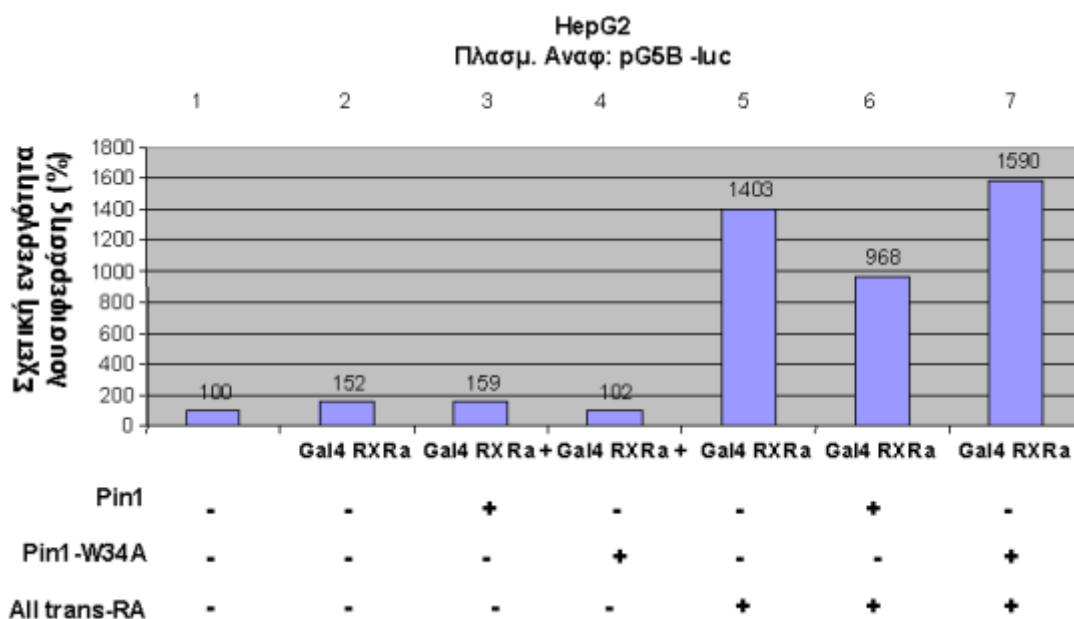


**Εικόνα 24: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ενεργότητα της RXRα πρωτεΐνης.** Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-luc (2 μg) και τους πλασμδιακούς φορείς pBXG1-RXRα (D/E) (1 μg) και pBXG1-RXRα (FL) (1 μg). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε παρουσία ή απουσία του πλασμδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης Pin1 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Για την ενεργοποίηση του Gal4-RXRα-D/E και Gal4-RXRα-FL χρησιμοποιήθηκε το 9-cis RA ( $10^{-2}M$ ) (σε 1/1000 αραιώση). Η % δραστηριότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Και στην περίπτωση του Gal4-RXRα-D/E, όπως και στην περίπτωση του Gal4-RXRα-FL που περιγράφηκε προηγουμένως, παρατηρείται μία αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας παρουσία της Pin1, όταν λυπεί ο συνδέτης (στήλη 3). Επίσης διακρίνουμε μία τεράστια αύξηση στην ενεργότητα του Gal4-RXRα-D/E παρουσία του συνδέτη του (στήλη 4) η οποία όμως καταστέλλεται δραστικά παρουσία της Pin1 (στήλη 5), πράγμα το οποίο ισχύει και για τον Gal4-RXRα-FL (στήλη 7). Αυτό σημαίνει πως ρόλο στην καταστολή του RXRα μέσω της λιγάσης Pin1, παίζουν σίγουρα μοτίβα φωσφορυλίωσης που εντοπίζονται domain D/E.

Τέλος, θελήσαμε να ελέγξουμε τη επίδραση ενός μεταλλάγματος της Pin1 στην μεταγραφική δραστηριότητα του Gal4-RXRα. Η πρωτεΐνη Pin1-W34A φέρει μία μεταλλαγή στην Τρυπτοφάνη 34 η οποία είναι η μία εκ των δύο συντηρημένων τρυπτοφανών στο WW domain της Pin1. Οι τρυπτοφάνες αυτές φαίνεται να παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση της Pin1 με τα υποστρώματά της. Μεταλλαγή τους σε ένα αμινοξύ όπως η αλανίνη έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας αλληλεπίδρασης της Pin1 με τα υποστρώματα της και ανικανότητα ισομερίωσής τους. Επομένως, το μετάλλαγμα αυτό δεν μπορεί να προκαλέσει καμία αλλαγή στην δραστηριότητα των υποστρωμάτων του. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα HepG2

επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-luc παρουσία του Gal4-RXRα, απουσία και παρουσία της ισομεράσης Pin1 ή του μεταλλάγματός της Pin1-W34A (Εικόνα 25). Για την μεταγραφική ενεργοποίηση του Gal4-RXRα χρησιμοποιήθηκε το all trans ρετινοϊκό οξύ (all trans RA) (ενεργοποιεί επίσης τον RXRα, αλλά όχι τόσο ισχυρά όσο το 9-cis RA).

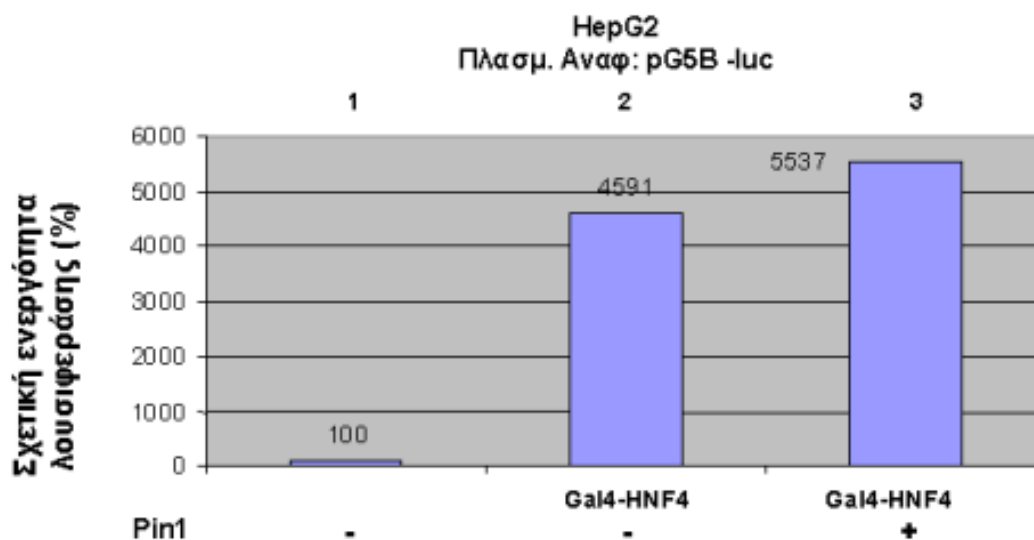


**Εικόνα 25: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 και του μεταλλάγματός της Pin1-W34A στη μεταγραφική ενεργότητα της RXRα πρωτεΐνης.** Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-luc (2 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα pBXG1-RXRα (1 μg). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε παρουσία ή απουσία των πλασμιδικών φορέων έκφρασης της λιγάσης Pin1 (1 μg) και του μεταλλάγματός της Pin1-W34A, όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Για την ενεργοποίηση του Gal4-RXRα χρησιμοποιήθηκε το all trans RA ( $10^{-2}$ M) (σε 1/1000 αραιώση). Η % δραστηριότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Από τα δεδομένα του πειράματος προκύπτει πως η μεταλλαγή του Pin1 στη θέση 34 από Τρυπτοφάνη (W) σε Αλανίνη (A) το καθιστά ανενεργό. Φαίνεται καθαρά από τα αποτελέσματα που προκύπτουν ότι τόσο απουσία, όσο και παρουσία συνδέτη του RXRα η μεταλλαγμένη μορφή της ισομεράσης δεν παρουσιάζει καμία δραστηριότητα πάνω στον RXRα (στήλες 4 και 6 αντίστοιχα).

Τα αντίστοιχα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του συστήματος Gal4 για τον ορμονικό πυρηνικό υποδοχέα HNF4 δεν έδωσαν

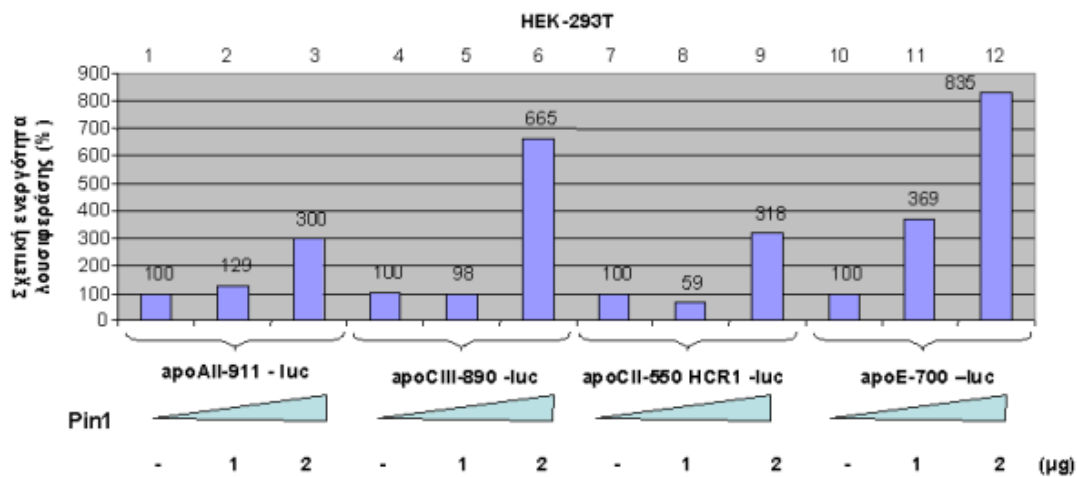
αποτελέσματα ανάλογα με την αρχική παρατήρηση, για καταστολή του HNF4, μέσω της λιγάσης Pin1 (εικόνα 26). Για τον σκοπό αυτό κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-luc παρουσία του Gal4-HNF4, απουσία και παρουσία της ισομεράσης Pin1.



**Εικόνα 26: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 και του μεταλλάγματός της Pin1-W34A στη μεταγραφική ενεργότητα της HNF4 πρωτεΐνης.** Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-luc (2 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα pBXG1-HNF4 (1 μg). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε παρουσία ή απουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης Pin1 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Για την ενεργοποίηση του Gal4-RXRα χρησιμοποιήθηκε το all trans RA ( $10^{-2}M$ ) (σε 1/1000 αραιώση). Η % δραστηριότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

### Επίδραση του Pin1 στη μεταγραφική ενεργοποίηση διαφόρων υποκινητών των απολιποπρωτεϊνών.

Στη συνέχεια θελήσαμε να δούμε ποια είναι η επίδραση της ισομεράσης Pin1 σε υποκινητές διαφόρων απολιποπρωτεϊνών. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα HEK-293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια αναφοράς apoAII-911 -luc, apoCIII-890 -luc, apoCII-550 HCR1 -luc και apoE-700 -luc, απουσία και παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης της ισομεράσης Pin1 (Εικόνα 27).



**Εικόνα 27: Επίδραση της ισομεράσης Pin1 στη μεταγραφική ικανότητα υποκινητών των απολιποπρωτεϊνών.** Κύτταρα HEK-293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3basic-apoAII-911 -luc (2 μg), pGL3basic-apoCIII-890 -luc (2 μg), pGL3basic-apoCII-550 HCR1 -luc (2 μg) και pGL3basic-apoE-700 -luc (2 μg). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε παρουσία ή απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης Pin1 (1 μg και 2 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστικότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

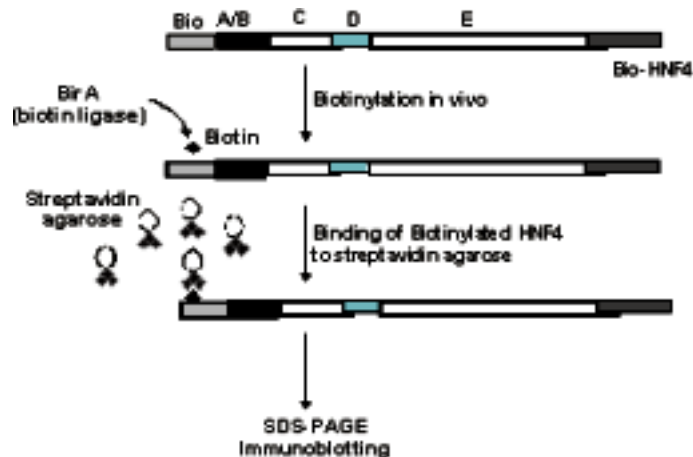
Από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι οι υποκινητές των apoAII, apoCIII και apoCII δεν επηρεάζονται μεταγραφικά από μικρές συγκεντρώσεις τις ισομεράσης Pin1 (στήλες 2, 5 και 8) . Αύξηση, όμως, της συγκέντρωσης της Pin1, έχει σαν αποτέλεσμα την μεταγραφική ενεργοποίηση των apoAII, apoCIII και apoCII υποκινητών (στήλες 3, 6 και 9). Ειδικότερα ο apoCIII φαίνεται να επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης Pin1 (στήλη 6). Ο υποκινητής, όμως, που παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι αυτό της apoE, ο οποίος φαίνεται να επηρεάζεται και από τις δύο συγκεντρώσεις της Pin1 και μάλιστα με τρόπο ανάλογο της αύξησης της συγκέντρωσής της (στήλες 11 και 12).

### Μέρος 3<sup>ο</sup>:

#### Δημιουργία υβριδικών μορίων των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών HNF4 και RXRα με το πεπτίδιο Bio, με σκοπό την χρήση τους σε αντιδράσεις βιοτινυλίωσης *in vivo*.

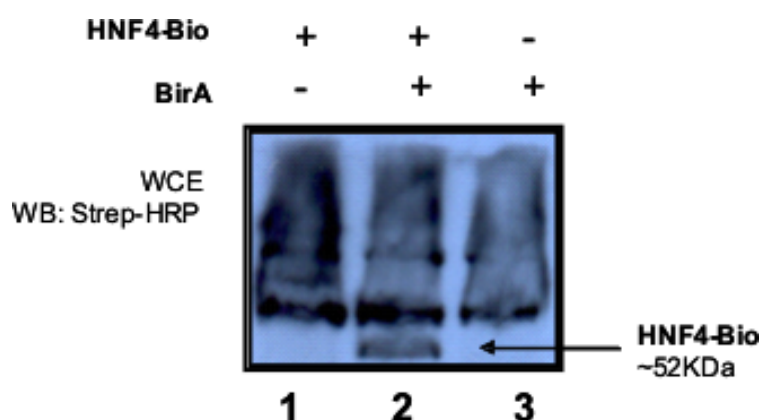
#### Ανίχνευση της βιοτινυλιωμένης Bio-HNF4 υβριδικής πρωτεΐνης κατά την παραγωγή της σε ευκαρυωτικά κύτταρα.

Η πρωτεΐνη HNF4 (455αα) αποτελεί μέλος της οικογένειας των ορμονικών πυρηνικών υποδοχέων. Ο HNF-4 παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση, τόσο του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης CIII, όσο και της απολιποπρωτεΐνης AI του ανθρώπου. Ο HNF-4 αποτελεί θετικό ρυθμιστικό παράγοντα της μεταγραφικής ρύθμισης των δύο απολιποπρωτεϊνών τόσο στο ήπαρ, όσο και στο έντερο, όπου φυσιολογικά εκφράζονται οι δύο πρωτεΐνες. Για να μπορέσουμε να μελετήσουμε τις *in vivo* πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του HNF4 με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, που απαιτούνται για την σωστή έκφραση των apoAI και apoCIII θα εκμεταλλευτούμε ένα σύγχρονο και ευαίσθητο σύστημα μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που βασίζεται στην *in vivo* βιοτινυλίωση (de Boer et al., 2003). Το σύστημα αυτό είναι πολύ πιο ειδικό και ευαίσθητο από το ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα συνκατακρήμνισης (co-Immunoprecipitation), λόγω της εξαιρετικά υψηλής συνάφειας και ειδικότητας της αλληλεπίδρασης της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη. Η βασική αρχή αυτής της τεχνικής παρουσιάζεται σχηματικά στην **Εικόνα 28**.



**Εικόνα 28: Το σύστημα της *in vivo* βιοτινυλίωσης.** Βασική αρχή του συστήματος *in vivo* βιοτινυλίωσης, που θα χρησιμοποιηθεί στην μελέτη των αλληλεπιδράσεων της Bio-HNF4 με άλλες πρωτεΐνες. Η HNF4 βιοτινυλιώνεται από την βακτηριακή λιγάση BirA και μπορεί κατόπιν να προσδεθεί σε αгарόζη επικαλυμμένη με στρεπταβιδίνη. Οποιαδήποτε πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την HNF4 συν-κατακρημνίζεται με την αгарόζη στρεπταβιδίνη στην οποία έχει προσδεθεί η Bio-HNF4.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του HNF4 στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3, με τέτοιο τρόπο, ώστε να φέρει στο N-τερματικό άκρο της ένα πεπτίδιο 22 αμινοξέων που αποτελεί στόχο βιοτινυλίωσης από την λιγάση βιοτίνης BirA, η οποία είναι βακτηριακής προέλευσης (**εικόνα 13**). Η Bio-HNF4 βιοτινυλιώνεται σε κύτταρα θηλαστικών όταν συνεκφράζεται στα κύτταρα αυτά η BirA. Η βιοτινυλίωση του HNF4 *in vivo* μπορεί εύκολα να διαπιστωθεί χρησιμοποιώντας στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον φορέα έκφρασης της υβριδικής πρωτεΐνης Bio-HNF4, απουσία, αλλά και παρουσία του φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA. Στο ανοσοαποτύπωμα της **Εικόνας 29**, η πρωτεΐνη Bio-HNF4 γίνεται ορατή μόνο κατά την συνέκφραση της BirA, η οποία και την βιοτινυλιώνει (στήλη 2), ενώ δεν είναι ορατή κατά την απουσία της λιγάσης. Στη στήλη 3 ανιχνεύονται οι διάφορες ενδογενείς βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες των κυττάρων COS-7.



**Εικόνα 29: Χρήση του συστήματος της *in vivo* βιοτινυλίωσης για την ανίχνευση της υβριδικής πρωτεΐνης Bio-HNF4.**

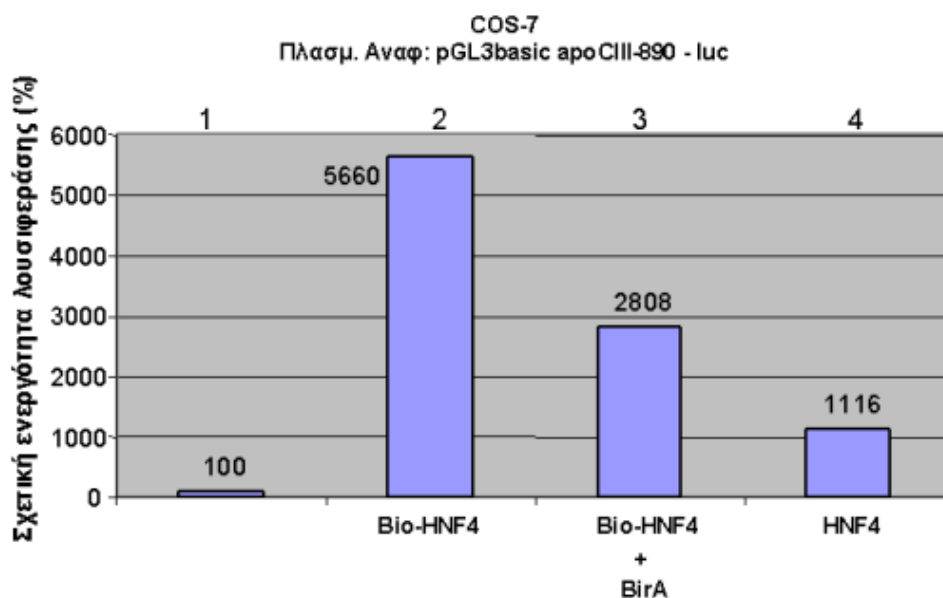
Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης Bio-HNF4 σε ποσότητα 10 µg όπως υποδεικνύεται στο πάνω μέρος των ανοσοαποτυπωμάτων. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (10 µg) στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο σχήμα. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (Whole Cell Extract, WCE) ελέγχθηκαν με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε HRP-συζευγμένη στρεπταβιδίνη (Strep-HRP) που προσδένεται στην Bio-HNF4 (1:5000). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ECL. Strep.:στρεπταβιδίνη.

#### Λειτουργική ανάλυση της επίδρασης της βιοτινυλίωσης στην μεταγραφική δραστηριότητα της πρωτεΐνης HNF4.

Εφόσον, λοιπόν ελέγξαμε την έκφραση και την βιοτινυλίωση της υβριδικής πρωτεΐνης HNF4-Bio, έπρεπε να προχωρήσουμε και στον έλεγχο της μεταγραφικής

της δραστηριότητας. Αυτό έγινε έτσι ώστε να είμαστε βέβαιοι πως η πρωτεΐνη μας είναι λειτουργική και πως η μεταγραφική της δραστηριότητα δεν επηρεάζεται από την βιοτινυλίωση.

Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII -890 -luc παρουσία της Bio-HNF4 ή του HNF4, απουσία και παρουσία της BirA. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 30** η Bio-HNF4 προκάλεσε ισχυρή μεταγραφική ενεργοποίηση στον υποκινητή της apoCIII (στήλη 2) η οποία επηρεάστηκε κατά ένα ποσοστό από την συνέκφραση της BirA και συνεπώς την βιοτινυλίωση της πρωτεΐνης (στήλη 3). Παρόλα αυτά, το Bio πεπτίδιο που έχει συζευχθεί στο N-τερματικό άκρο της HNF4, δεν φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τη μεταγραφική δραστηριότητα της πρωτεΐνης εφόσον τα επίπεδα ενεργότητάς της συνεχίζουν να είναι πολύ υψηλά (στήλη 4).



**Εικόνα 30: *In vivo* βιοτινυλίωση και ανάλυση της επίδρασης της βιοτινυλίωσης στην μεταγραφική δραστηριότητα της HNF4 πρωτεΐνης.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς apoCIII-890 -Luc (2 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα pDNA3-Bio-HNF4 ή pMT2-HNF4 (1 μg). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλοτήτας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Παρατηρώντας, λοιπόν, πως η μεταγραφική ικανότητα του HNF4 δεν επηρεάζεται δραστικά από την βιοτινυλίωσή του, είμαστε σε θέση να χρησιμοποιήσουμε, μελλοντικά την υβριδική αυτή πρωτεΐνη για να ανιχνεύσουμε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του HNF4 με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που

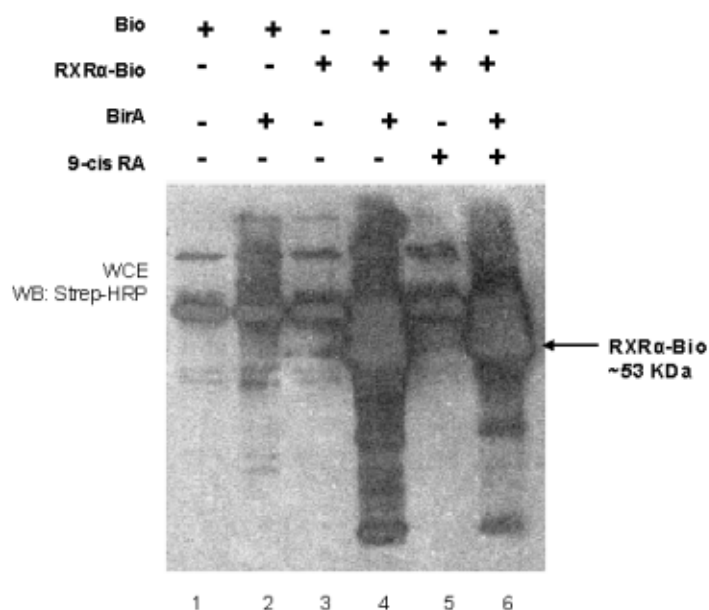
παίζουν ρόλο στην μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών του ανθρώπου. Η υβριδική αυτή πρωτεΐνη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και για πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης εξαιτίας της εύκολης απομόνωσής της με τη βοήθεια των σφαιριδίων στρεπταβιδίνης.

#### **Ανίχνευση της βιοτινυλιωμένης Bio-RXRα υβριδικής πρωτεΐνης κατά την παραγωγή της σε ευκαρυωτικά κύτταρα.**

Εκτός από τον HNF4, ένας ακόμη ορμονικός πυρηνικός υποδοχέας που παίζει σημαντικό ρόλο στη σωστή μεταγραφική ρύθμιση των απολιποπρωτεϊνών είναι και ο RXRα (462αα). Για να μπορέσουμε να μελετήσουμε τις *in vivo* πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του RXRα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, που απαιτούνται για την σωστή έκφραση των απολιποπρωτεϊνών, θελήσαμε να εκμεταλλευτούμε και πάλι το σύστημα που βασίζεται στην *in vivo* βιοτινυλίωση. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση του RXRα στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3, με τέτοιο τρόπο, ώστε να φέρει στο N-τερματικό άκρο του ένα πεπτίδιο 22 αμινοξέων που αποτελεί στόχο βιοτινυλίωσης από την λιγάση βιοτίνης BirA, η οποία είναι βακτηριακής προέλευσης. Η Bio-RXRα βιοτινυλιώνεται σε κύτταρα θηλαστικών όταν συνεκφράζεται στα κύτταρα αυτά η BirA. Η βιοτινυλίωση του RXRα *in vivo* μπορεί εύκολα να διαπιστωθεί χρησιμοποιώντας στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP.

Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα HEK-293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τον φορέα έκφρασης του πεπτιδίου Bio ή τον φορέα έκφρασης της υβριδικής πρωτεΐνης Bio-RXRα, απουσία, αλλά και παρουσία του φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και ο συνδέτης του RXRα, 9-cis RA για να παρατηρήσουμε πιθανή επίδραση στη βιοτινυλίωση του Bio-RXRα. Στο ανοσοαποτύπωμα της **Εικόνας 31**, η πρωτεΐνη Bio-RXRα γίνεται ορατή μόνο κατά την συνέκφραση της BirA, η οποία και την βιοτινυλιώνει (στήλες 4 και 6), ενώ δεν είναι ορατή κατά την απουσία της λιγάσης. Επίσης η παρουσία του συνδέτη δεν φαίνεται να επιδρά αρνητικά στην βιοτινυλίωση του Bio-RXRα (στήλη 6). Επίσης σε όλες τις στήλες ανιχνεύονται, μέσω της στρεπταβιδίνης-HRP, οι διάφορες ενδογενείς πρωτεΐνες των HEK-293T οι οποίες, είναι βιοτινυλιωμένες.





**Εικόνα 31: Χρήση του συστήματος της *in vivo* βιοτινυλίωσης για την ανίχνευση της υβριδικής πρωτεΐνης Bio-RXRα.**

Κύτταρα HEK-293 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης του πεπτιδίου Bio (10 µg) ή τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης Bio-RXRα (10 µg) όπως υποδεικνύεται στο πάνω μέρος των ανοσοαποτυπωμάτων. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (10 µg) στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο σχήμα. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και ο συνδέτης της RXRα, το 9-cis RA ( $10^{-2}$ M) (σε 1/1000 αραίωση) με τον τρόπο που φαίνεται στην εικόνα. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (Whole Cell Extract, WCE) ελέγχθηκαν με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε HRP-συζευγμένη στρεπταβιδίνη (Strep-HRP) που προσδένεται στην Bio-RXRα (1:5000). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ECL. Strep.:στρεπταβιδίνη.

## Συζήτηση

### Ο ορμονικός πυρηνικός υποδοχέας HNF4 προσδένεται *in vivo* στους υποκινητές των απολιποπρωτεϊνών AI και CIII.

Γνωρίζοντας τον σημαντικό ρόλο του HNF4 στην ρύθμιση και στη σωστή έκφραση των γονιδίων apoAI και apoCIII καθώς και την παρουσία των HREs, ικανών να προσδέσουν HNF4, στις ρυθμιστικές περιοχές των υποκινητών και του κοινού ενισχυτή των 2 γονιδίων, θελήσαμε να ελέγξουμε την *in vivo* παρουσία του HNF4 στις περιοχές αυτές. Με την χρήση της τεχνικής της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, μπορέσαμε και διαπιστώσαμε πως σε καλλιέργεια ηπατικών κυττάρων (HepG2 κύτταρα), όπου φυσιολογικά εκφράζονται και τα 2 γονίδια, ο HNF4 είναι συνεχώς προσδεδεμένος τόσο στον υποκινητή της apoCIII όσο και στον υποκινητή της apoAI (εικόνες 17B και 17C).

Δεν βρέθηκε, όμως, να ισχύει κάτι ανάλογο για την περιοχή του κοινού ενισχυτή που έχει την ικανότητα να προσδένει HNF4 (εικόνα 17D). Φαίνεται, λοιπόν, πως *in vivo* σε ηπατικά κύτταρα ο HNF4 δεν προσδένεται στο HRE του ενισχυτή. Παρόλα αυτά, γνωρίζουμε πως η παρουσία του HRE στον ενισχυτή είναι υψίστης σημασίας, για την σωστή έκφραση των 2 γονιδίων στο ήπαρ και στο έντερο. Μεταλλαγές στο HRE του κοινού ενισχυτή, εξαφανίζουν την έκφραση των apoA-I/apoCIII στο έντερο, ενώ στο ήπαρ η έκφραση της apoA-I μειώνεται στο 15-20% (σε σχέση με το αγρίου τύπου) και της apoCIII στο 1-2% (σε σχέση με το αγρίου τύπου) (1). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι στο στοιχείο HRE του κοινού ενισχυτή των γονιδίων AI και CIII προσδένονται, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών. Προηγούμενες, *in vitro*, μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι τέτοιοι πυρηνικοί υποδοχείς μπορεί να είναι ομοδιμερή του RXR και ετεροδιμερή του RXR με τους RAR, T3Rβ και PPAR καθώς και οι ορφανοί υποδοχείς ARP-1 και EAR-3 (19).

Αυτό, λοιπόν, που θα πρέπει να ελεγχθεί σε επόμενα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης είναι, το ποιος από τους υπόλοιπους ορμονικούς υποδοχείς που έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στο HRE του κοινού ενισχυτή, είναι αυτό που προσδένεται *in vivo* στο ρυθμιστικό αυτό στοιχείο και ποια η φυσιολογική του δράση στη ρύθμιση της έκφρασης των 2 γονιδίων.

Με παρόμοιες αναλύσεις σκοπεύουμε να μελετήσουμε την πρόσδεση, κάτω από *in vivo* συνθήκες, των μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται στα

υπόλοιπα ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή apoAI, του υποκινητή της apoCIII και του κοινού ενισχυτή των δύο γονιδίων.

### **Η ισομεράση Pin1 καταστέλλει τη δράση του RXRa.**

Γνωρίζοντας πως βασικοί ρυθμιστικοί παράγοντες της έκφρασης των apoA-I/apoCIII γονιδίων, όπως ο HNF4 και ο RXRa φέρουν μοτίβα φωσφορυλίωσης Ser/Thr-Pro και αποτελούν στόχους διαφόρων κινασών εξαρτώμενων από προλίνη, θελήσαμε να ελέγξουμε πιθανή επίδραση της πρωτεΐνης Pin1 πάνω στους 2 αυτούς πυρηνικούς υποδοχείς. Η Pin1 έχει ικανότητα ισομερίωσης μοτίβων pSer/Thr-Pro, με αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσής τους και την ρύθμιση της ενεργότητας των υποστρωμάτων της.

Από πειράματα έκφρασης που πραγματοποιήθηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες φάνηκε πως η Pin1 καταστέλλει την ενεργοποιητική δράση του HNF4, κατά την έκφραση γονιδίου αναφοράς που φέρει τον υποκινητή της apoCIII (εικόνα 20). Παρόλα αυτά, όταν χρησιμοποιήθηκε, για τον ίδιο σκοπό το σύστημα Gal4, η Pin1 φάνηκε να μην έχει καμία απολύτως επίδραση στην ενεργότητα της χμαιορικής πρωτεΐνης Gal4-HNF4 (εικόνα 26). Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η Pin1 πιθανόν να αλλάζει την διαμόρφωση του HNF4 και να επηρεάζει έτσι την φυσική και λειτουργική αλληλεπίδρασή του με άλλες πρωτεΐνες που προσδέονται στον υποκινητή ή/και στον ενισχυτή της apoCIII, όπως π.χ. ο παράγοντας Sp1. Κάτι τέτοιο δεν ισχύει στην περίπτωση της Gal4-HNF4 πρωτεΐνης η οποία έχει την ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης απουσία βοηθητικών παραγόντων.

Ανάλογα πειράματα πραγματοποιήθηκαν και για τον RXRa. Και στη περίπτωση αυτή η Pin1 φαίνεται να καταστέλλει την δράση του RXRa κατά την ενεργοποίηση υποκινητών όπως ο apoAII και ο apoCII (εικόνες 20 και 21). Και στη περίπτωση χρήσης του συστήματος Gal4, η Pin1 εξακολουθεί να καταστέλλει την μεταγραφική δράση του RXRa (εικόνα 22). Θέλοντας να εντοπίσουμε ποια από τις δύο περιοχές του RXRa που φέρουν μοτίβα Ser/Thr-Pro (A/B και E), ρυθμίζει η ισομερίωση μέσω Pin1, χρησιμοποιήθηκε η ελλειμματική μορφή του RXRa, RXRa-DE (δεν φέρει το A/B domain). Από τα δεδομένα μας προέκυψε πως η μορφή αυτή είναι ιδιαίτερα δραστική και πως η ισομεράση Pin1 καταστέλλει δραστικά την ενεργότητα αυτή (εικόνα 23) (πιθανότατα αναγνωρίζοντας το μοτίβο pSer/Thr-Pro που φωσφορυλιώνεται από την JNK κινάση-εξαρτώμενη από προλίνη (εικόνα 18)). Όλα τα παραπάνω έρχεται να επιβεβαιώσει το γεγονός πως η παρουσία της

μεταλλαγή W34A στην Pin1, που καθιστά το ένζυμο ανενεργό, δεν έχει καμία επίδραση στην ικανότητα μεταγραφής του RXRα (εικόνα 25). Μένει, λοιπόν, να ελέγξουμε αν η Pin1 δρα κατασταλτικά στον RXRα και μέσω του A/B domain, το ποια ακριβώς είναι τα pSer/Thr-Pro μοτίβα που ισομεριώνει καθώς και ποιες είναι οι κινάσες που είναι υπεύθυνες για την φωσφορυλίωσή τους.

Η αρνητική επίδραση της Pin1 στην ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων HNF4 και RXRα μας οδήγησε να διερευνήσουμε τον πιθανό ρόλο της Pin1 στη ρύθμιση των γονιδίων των απολιποπρωτεϊνών AII, CII, CIII και apoE. Σε πειράματα παροδικών επιμολύνσεων κυττάρων HepG2 με τους υποκινητές των ανωτέρων γονιδίων, απουσία και παρουσία Pin1, βρήκαμε ότι η Pin1 έχει μικρή θετική επίδραση στους υποκινητές των γονιδίων apoAII και apoCII και σημαντική θετική επίδραση στους υποκινητές των γονιδίων apoE και apoCIII. Μόνο στην περίπτωση της apoE, η επίδραση της Pin1 συνέβη κατά έναν δοσοεξαρτούμενο τρόπο. Ενδιαφέρων αποτελεί το εύρημα ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου της Pin1 στους ποντικούς οδηγεί σε επιλεκτική καταστροφή κυττάρων του εγκεφάλου και σε νόσο του Alzheimer (70). Επιδημιολογικά δεδομένα επίσης έχουν συσχετίσει την apoE4 με την νόσο του Alzheimer (AD). Συνεπώς, διαταραχές στην έκφραση της apoE στα κύτταρα του εγκεφάλου, οι οποίες θα μπορούσαν να προκληθούν από απενεργοποίηση ή μεταλλάξεις στο γονίδιο της Pin1, είναι πιθανόν να συμβάλλουν στην παθογένεση της νόσου AD. Αυτό θα μπορούσε να μελετηθεί με αναλύσεις των επιπέδων της apoE στα ζώα με Pin1 (-/-) γενότυπο. Αυξημένα επίπεδα Pin1 έχουν βρεθεί επίσης σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου (69). Τα ευρήματά μας όσον αφορά την αρνητική δράση της Pin1 σε δύο μέλη των πυρηνικών υποδοχέων (HNF4 και RXRα) προτείνουν ότι η αύξηση της Pin1 θα μπορούσε να επηρεάσει την ενεργότητα και άλλων μελών της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, τα οποία ρυθμίζονται μέσω φωσφορυλίωσης από κινάσες σερίνης-θρεονίνης οι οποίες στοχεύουν σε μοτίβα Ser/Thr-Pro (π.χ. MAP κινάσες). Η απενεργοποίηση των πυρηνικών υποδοχέων θα μπορούσε να αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα που συμβάλει στην καρκινογένεση.

## **Βιβλιογραφία**

**1) Zannis VI, Kan HY, Kritis A, Zanni EE, Kardassis D.**

Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo.

Curr Opin Lipidol. 2001 Apr;12(2):181-207.

**2) Zannis VI, Kardassis D, Zanni EE.**

Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes.

Adv Hum Genet. 1993;21:145-319.

**3) Hussain MM, Zannis VI.**

Intracellular modification of human apolipoprotein AII (apoAII) and sites of apoAII mRNA synthesis: comparison of apoAII with apoCII and apoCIII isoproteins.

Biochemistry. 1990 Jan 9;29(1):209-17.

**4) Ribeiro A, Pastier D, Kardassis D, Chambaz J, Cardot P.**

Cooperative binding of upstream stimulatory factor and hepatic nuclear factor 4 drives the transcription of the human apolipoprotein A-II gene.

J Biol Chem. 1999 Jan 15;274(3):1216-25.

**5) Pissios P, Kan HY, Nagaoka S, Zannis VI.**

SREBP-1 binds to multiple sites and transactivates the human ApoA-II promoter in vitro : SREBP-1 mutants defective in DNA binding or transcriptional activation repress ApoA-II promoter activity.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999 Jun;19(6):1456-69.

**6) Kan HY, Pissios P, Chambaz J, Zannis VI.**

DNA binding specificity and transactivation properties of SREBP-2 bound to multiple sites on the human apoA-II promoter.

Nucleic Acids Res. 1999 Feb 15;27(4):1104-17.

**7) Cladaras C, Hadzopoulou-Cladaras M, Nolte RT, Atkinson D, Zannis VI.**

The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms.

EMBO J. 1986 Dec 20;5(13):3495-507.

**8) Zannis VI, Kardassis D, Zanni EE.**

Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes.

Adv Hum Genet. 1993;21:145-319.

**9) Zannis VI, Kan HY, Kritis A, Zanni E, Kardassis D.**

Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes.

Front Biosci. 2001 Mar 1;6:D456-504.

**10) Ignatius MJ, Gebicke-Harter PJ, Skene JH, Schilling JW, Weisgraber KH, Mahley RW, Shooter EM.**

Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Feb;83(4):1125-9.

- 11) Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM.**  
Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system.  
J Clin Invest. 1985 Oct;76(4):1501-13.
- 12) Allan CM, Walker D, Segrest JP, Taylor JM.**  
Identification and characterization of a new human gene (APOC4) in the apolipoprotein E, C-I, and C-II gene locus.  
Genomics. 1995 Jul 20;28(2):291-300.
- 13) Simonet WS, Bucay N, Lauer SJ, Taylor JM**  
A far-downstream hepatocyte-specific control region directs expression of the linked human apolipoprotein E and C-I genes in transgenic mice.  
J Biol Chem. 1993 Apr 15;268(11):8221-9.
- 14) Simonet WS, Bucay N, Pitas RE, Lauer SJ, Taylor JM.**  
Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice.  
J Biol Chem. 1991 May 15;266(14):8651-4.
- 15) Allan CM, Walker D, Taylor JM.**  
Evolutionary duplication of a hepatic control region in the human apolipoprotein E gene locus. Identification of a second region that confers high level and liver-specific expression of the human apolipoprotein E gene in transgenic mice.  
J Biol Chem. 1995 Nov 3;270(44):26278-81.
- 16) Shih SJ, Allan C, Grehan S, Tse E, Moran C, Taylor JM.**  
Duplicated downstream enhancers control expression of the human apolipoprotein E gene in macrophages and adipose tissue.  
J Biol Chem. 2000 Oct 13;275(41):31567-72.
- 17) Talianidis I, Tambakaki A, Toursounova J, Zannis VI.**  
Complex interactions between SP1 bound to multiple distal regulatory sites and HNF-4 bound to the proximal promoter lead to transcriptional activation of liver-specific human APOCIII gene.  
Biochemistry. 1995 Aug 15;34(32):10298-309.
- 18) Kardassis D, Tzamelis I, Hadzopoulou-Cladaras M, Talianidis I, Zannis V.**  
Distal apolipoprotein C-III regulatory elements F to J act as a general modular enhancer for proximal promoters that contain hormone response elements. Synergism between hepatic nuclear factor-4 molecules bound to the proximal promoter and distal enhancer sites.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Jan;17(1):222-32.
- 19) Lavrentiadou SN, Hadzopoulou-Cladaras M, Kardassis D, Zannis VI.**  
Binding specificity and modulation of the human ApoCIII promoter activity by heterodimers of ligand-dependent nuclear receptors.  
Biochemistry. 1999 Jan 19;38(3):964-75.

- 20) Ktistaki E, Lacorte JM, Katrakili N, Zannis VI, Talianidis I.**  
Transcriptional regulation of the apolipoprotein A-IV gene involves synergism between a proximal orphan receptor response element and a distant enhancer located in the upstream promoter region of the apolipoprotein C-III gene.  
Nucleic Acids Res. 1994 Nov 11;22(22):4689-96.
- 21) de Boer, E., Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Katsantoni, E., Heck, A., Grosveld, F., & Strouboulis**  
Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 24;100(13):7480-5.
- 22) Brewer HB Jr, Shulman R, Herbert P, Ronan R, Wehrly K.**  
The complete amino acid sequence of alanine apolipoprotein (apoC-3), and apolipoprotein from human plasma very low density lipoproteins.  
J Biol Chem. 1974 Aug 10;249(15):4975-84.
- 23) Protter AA, Levy-Wilson B, Miller J, Bencen G, White T, Seilhamer JJ.**  
Isolation and sequence analysis of the human apolipoprotein CIII gene and the intergenic region between the apo AI and apo CIII genes.  
DNA. 1984 Dec;3(6):449-56.
- 24) Hadzopoulou-Cladaras M, Lavrentiadou SN, Zannis VI, Kardassis D.**  
Transactivation of the ApoCIII promoter by ATF-2 and repression by members of the Jun family. Biochemistry. 1998 Oct 6;37(40):14078-87.
- 25) Brown WV, Baginsky ML.**  
Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein.  
Biochem Biophys Res Commun. 1972 Jan 31;46(2):375-82.
- 26) Shelburne F, Hanks J, Meyers W, Quarfordt S.**  
Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat.  
J Clin Invest. 1980 Mar;65(3):652-8.
- 27) Windler E, Chao Y, Havel RJ.**  
Regulation of the hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat. Opposing effects of homologous apolipoprotein E and individual C apoproteins.  
J Biol Chem. 1980 Sep 10;255(17):8303-7.
- 28) Zannis VI, Cole FS, Jackson CL, Kurnit DM, Karathanasis SK.**  
Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages.  
Biochemistry. 1985 Jul 30;24(16):4450-5.

- 29) Haddad IA, Ordovas JM, Fitzpatrick T, Karathanasis SK.**  
Linkage, evolution, and expression of the rat apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV genes.  
J Biol Chem. 1986 Oct 5;261(28):13268-77.
- 30) Ogami K, Hadzopoulou-Cladaras M, Cladaras C, Zannis VI.**  
Promoter elements and factors required for hepatic and intestinal transcription of the human ApoCIII gene.  
J Biol Chem. 1990 Jun 15;265(17):9808-15.
- 31) Ginsburg GS, Ozer J, Karathanasis SK.**  
Intestinal apolipoprotein AI gene transcription is regulated by multiple distinct DNA elements and is synergistically activated by the orphan nuclear receptor, hepatocyte nuclear factor 4.  
J Clin Invest. 1995 Jul;96(1):528-38.
- 32) Sladek FM, Darnell JE.**  
Mechanisms of liver-specific gene expression.  
Curr Opin Genet Dev. 1992 Apr;2(2):256-9.
- 33) Evans RM.**  
The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.  
Science. 1988 May 13;240(4854):889-95.
- 34) Forman BM, Samuels HH.**  
Dimerization among nuclear hormone receptors.  
New Biol. 1990 Jul;2(7):587-94.
- 35) Freedman LP, Luisi BF.**  
On the mechanism of DNA binding by nuclear hormone receptors: a structural and functional perspective.  
J Cell Biochem. 1993 Feb;51(2):140-50.
- 36) Landers JP, Spelsberg TC.**  
New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression.  
Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 1992;2(1):19-63.
- 37) Sladek FM, Zhong WM, Lai E, Darnell JE Jr.**  
Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily.  
Genes Dev. 1990 Dec;4(12B):2353-65.
- 38) Hertz R, Magenheimer J, Berman I, Bar-Tana J.**  
Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha.  
Nature. 1998 Apr 2;392(6675):512-6.
- 39) Jiang G, Nepomuceno L, Yang Q, Sladek FM.**  
Serine/threonine phosphorylation of orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4. Arch Biochem Biophys. 1997 Apr 1;340(1):1-9.



- 40) B. Viollet, A. Kahn, M. Raymondjean**  
Protein Kinase A-Dependent Phosphorylation Modulates DNA-Binding Activity of Hepatocyte Nuclear Factor-4.  
Molecular and Cellular Biology (1997) 17, 4208-4219
- 41) E. Soutoglou, N. Katrakili, I. Tallianidis**  
Acetylation Regulates Transcription Factor Activity at Multiple Levels  
Molecular Cell (2000) 5, 745-751
- 42) Hata S, Tsukamoto T, Osumi T.**  
A novel isoform of rat hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4).  
Biochim Biophys Acta. 1992 Jun 15;1131(2):211-3.
- 43) Sladek, F.M.**  
"Hepatocyte Nuclear factor 4 (HNF-4)" chapter in Liver Gene Expression, 1994 (ed.s F. Tronche, M. Yaniv, R.G. Landes Co., Austin, TX).
- 44) Margarita Hadzopoulou-Cladaras, Elena Kistanova, Catherine Evagelopoulou, Shengyou Zeng, Christos Cladaras, and John A.A. Ladias**  
Functional Domains of the Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4  
J. Biol. Chem. 1997 272: 539-550.
- 45) Kistanova E, Dell H, Tsantili P, Falvey E, Cladaras C, Hadzopoulou-Cladaras M.**  
The activation function-1 of hepatocyte nuclear factor-4 is an acidic activator that mediates interactions through bulky hydrophobic residues.  
Biochem J. 2001 Jun 1;356(Pt 2):635-42.
- 46) Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., De Luca, L.M..**  
Retinoids in embryonal development. Physiol. Rev. (2000) 80, 1021–1054.
- 47) Altucci, L., Gronemeyer, H..**  
Nuclear receptors in cell life and death. Trends Endocrinol. Metab. 2001a 12, 460–468.
- 48) Chambon, P..**  
A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. FASEB J. 1996 10, 940–954.
- 49) Laudet, V., Gronemeyer, H..**  
Nuclear Receptor Factsbook Academic Press, London 2001.
- 50) Renaud, J.P., Moras, D.**  
Structural studies on nuclear receptors. Cell. Mol. Life Sci. 2000 57, 1748–1769.
- 51) Dilworth, F.J., Chambon, P.**  
Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. Oncogene 2001 20, 3047–3054.

- 52) Gianni, M., Bauer, A., Garattini, E., Chambon, P., Rochette-Egly, C.**  
Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA induced RAR $\gamma$  degradation and transactivation. EMBO J. 2002a 21, 3760– 3769.
- 53) Rochette-Egly, C.**  
Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. Cell Signal. 2003 15, 355– 366.
- 54) Kastner, P., Mark, M., Ghyselinck, N., Krezel, W., Dupe, V., Grondona, J.M., Chambon, P.**  
Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. Development 1997 124, 313– 326.
- 55) Mark, M., Ghyselinck, N.B., Wendling, O., Dupe, V., Mascrez, B., Kastner, P., Chambon, P.**  
A genetic dissection of the retinoid signalling pathway in the mouse. Proc. Nutr. Soc. 1999 58, 609–613.
- 56) Adam-Stitah, S., Penna, L., Chambon, P., Rochette-Egly, C.**  
Hyperphosphorylation of the retinoid X receptor alpha (RXRa) by activated c-Jun N terminal kinases (JNKs). J. Biol. Chem. 1999 274, 18932– 18941.
- 57) Bastien J, Rochette-Egly C.**  
Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. Gene. 2004 Mar 17;328:1-16. Review.
- 58) Bastien, J., Adam-Stitah, S., Plassat, J.L., Chambon, P., Rochette-Egly, C.**  
The phosphorylation site located in the A region of RXRa is required for the anti proliferative effect of retinoic acid and the activation of RA-target genes in F9 cells. J. Biol. Chem. 2002 277, 24.
- 59) Gianni, M., Tarrade, A., Nigro, E.A., Garattini, E., Rochette-Egly, C.**  
The AF-1 and AF-2 domains of RAR gamma 2 and RXR alpha cooperate for triggering the transactivation and the degradation of RAR gamma 2/RXR alpha heterodimers. J. Biol. Chem. 2003 278, 34458–34466.
- 60) Matsushima-Nishiwaki, R., Okuno, M., Adachi, S., Sano, T., Akita, K., Moriwaki, H., Friedman, S.L., Kojima, S.**  
Phosphorylation of retinoid X receptor alpha at serine 260 impairs its metabolism and function in human hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 2001 61, 7675– 7682.
- 61) Lu, K.P. et al.**  
Pinning down the proline-directed phosphorylation signaling. Trends Cell Biol.(2002) 12, 164–172
- 62) Lu, K.P.**  
Prolyl isomerase Pin1 as a molecular target for cancer diagnostics and therapeutics. Cancer Cell (2003) 4, 175–180

**63) Geschwind, D.H.**

Tau phosphorylation, tangles, and neurodegeneration: the chicken or the egg. *Neuron* (2003) 40, 457–460

**64) Lee, M.S. and Tsai, L.H.**

Cdk5: one of the links between senile plaques and neurofibrillary tangles? *J. Alzheimers Dis.* (2003) 5, 127–137

**65) Lu, K.P. et al.**

Proline-directed phosphorylation and isomerization in mitotic regulation and in Alzheimer's disease. *Bioessays* (2003) 25, 174–181

**66) Lu, K.P. et al.**

A human peptidyl–prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* (1996) 380, 544–547

**67) Yaffe, M.B. et al.**

Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* (1997) 278, 1957–1960

**68) Ranganathan, R. et al.**

Structural and functional analysis of the mitotic peptidyl–prolyl isomerase Pin1 suggests that substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* (1997) 89, 875–886

**69) Kun Ping Lu**

Pinning down cell signaling, cancer and Alzheimer's disease. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.29 No.4 April 2004

**70) Liou YC, Sun A, Ryo A, Zhou XZ, Yu ZX, Huang HK, Uchida T, Bronson R, Bing G, Li X, Hunter T, Lu KP.**

Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature*. 2003 Jul 31;424(6948):556-61.