

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ο ρόλος του παράγοντα TAF10 στη ρύθμιση της
μεταγραφής ηπατικών γονιδίων**

ΑΝΤΩΝΗΣ ΤΑΤΑΡΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2008

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε κατά το 1/3 της χρονικής της διάρκειας στο τμήμα Μοριακής Βιολογίας Θηλαστικών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας στα πλαίσια του διατμηματικού προγράμματος «Μοριακής Βιολογίας και Βιοϊατρικής» του τμήματος Βιολογίας και της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, ενώ κατά τα 2/3 στο Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Κέντρου Ιατροβιολογικών Ερευνών Αλ. Φλέμινγκ.

Επιβλέπων Ερευνητής: Ι. ΤΑΛΙΑΝΙΔΗΣ, Ερευνητής Α' (ΙΜΒΓ-Αλ. Φλέμινγκ)

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Δ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Ι. ΤΑΛΙΑΝΙΔΗΣ, Ερευνητής Α' (ΙΜΒΓ-Αλ. Φλέμινγκ)

Δ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Δ.ΚΑΡΔΑΣΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Ιατρική Σχολή)

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Ι. ΤΑΛΙΑΝΙΔΗΣ, Ερευνητής Α' (ΙΜΒΓ-Αλ. Φλέμινγκ)

Δ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Δ.ΚΑΡΔΑΣΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Ιατρική Σχολή)

Δ. ΚΑΡΑΓΩΓΕΩΣ, Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης (Ιατρική Σχολή)

Ι. ΠΑΠΑΜΑΤΘΑΙΑΚΗΣ, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Χ. ΣΑΒΒΑΚΗΣ, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Ιατρική Σχολή)

Γ. ΧΑΛΕΠΑΚΗΣ, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Ευχαριστίες

Με το τέλος της διδακτορικής μου διατριβής θα ήθελα καταρχήν να ευχαριστήσω θερμά τον ερευνητή κ. Γιάννη Ταλιανίδη για την επιστημονική του καθοδήγηση, τις συμβουλές του και την πολύτιμη βοήθεια του καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, αλλά και για το ενδιαφέρον του και τις συμβουλές του για το επόμενο βήμα.

Πολλά ευχαριστώ οφείλω και στα μέλη της τριμελούς και επταμελούς επιτροπής μου για την επιστημονική καθοδήγησή τους και τις συμβουλές τους.

Ευχαριστώ πολύ τον Θανάση Μαργαρίτη για την άψογη συνεργασία μας στην πραγματοποίηση των microarrays για την παραπάνω εργασία αλλά και τον κ. Δημήτρη Καφετζόπουλο.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ οφείλω στα παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου Αντιγόνη, Νίτσα, Ειρήνη, γιατί η βοήθεια τους να εγκλιματιστώ στο εργαστήριο ήταν πολύτιμη και η συμπαράστασή τους εξίσου. Επίσης όλα τα παιδιά με τα οποία συνεργαστήκαμε άψογα στο εργαστήριο Χαρούλα, Celia, Άννα, Κώστα, Ηρακλή, Αλέξη, Θοδωρή, Ειρήνη. Με τους έξι πρώτους από τους παραπάνω περάσαμε πολύ ωραίες στιγμές και εκτός εργαστηρίου, αφού βρεθήκαμε μαζί και στην Αθήνα για τα δύο τελευταία χρόνια της διατριβής μου. Ευχαριστώ (ιδιαίτερα) τη Φλώρα και τον Τάσο, γιατί η βοήθεια τους υπήρξε πέρα από πολύτιμη από την αρχή της παρουσίας μας στο Φλέμινγκ.

Ευχαριστώ πολύ τους φίλους μου Ανδρέα, Γιώργο, Χάρη, Άντα, Μαρία, Αντούλα για την πολύτιμη συμπαράστασή τους και τη φιλία τους. Μου έλειψαν τα δύο τελευταία χρόνια.

Ξεχωριστά ευχαριστώ τη Μαρίνα για την συμπαράσταση και την κατανόησή της, αλλά κυρίως για πολλούς άλλους λόγους που θα κρατήσω για μένα... Η παρουσία της μου είναι απαραίτητη σε ό,τι κάνω.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου σε αυτούς που είναι κοντά μου και σε αυτούς που "λείπουν", αλλά η σκέψη μου σε αυτούς με βοήθησε ανεκτίμητα πολύ. Η οικογένεια μου στήριζε και στηρίζει τις επιλογές μου με πολλές θυσίες και πάντα το ευχαριστώ μου θα μοιάζει λίγο.

Αφιερώνω το διδακτορικό μου στη μητέρα μου...

Στη μητέρα μου,

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	1
Summary	3
Εισαγωγή	5
Αρχιτεκτονική δομή και ανάπτυξη του ήπατος	5
Μεταγραφικοί παράγοντες με καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση του ηπατικού φαινοτύπου	9
Διαμόρφωση του PIC συμπλόκου	11
Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου TFIID	15
Οι λειτουργίες των παραγόντων TAFs στη μεταγραφή	19
Εναλλακτικές μορφές του συμπλόκου TFIID	20
Άλλα σύμπλοκα που περιέχουν TAFs	23
Παράγοντες ομόλογοι με το TBP (TBP-related factors)	24
Ο παράγοντας TAF10	27
Σκοπός της παρούσας εργασίας	28
Αποτελέσματα	30
Απενεργοποίηση του γονιδίου <i>TAF10</i> στα ηπατοκύτταρα	30
Ανάλυση του φαινοτύπου των ηπατοειδικών TAF10KO εμβρύων	31
Ανάλυση του φαινοτύπου των ηπατοειδικών TAF10KO ενήλικων ποντικών	33
Μελέτη της σταθερότητας του συμπλόκου TFIID	38
Ο ρόλος του TAF10 στη ρύθμιση της μεταγραφής των ηπατικών γονιδίων	43
Οι επιπτώσεις της εξάλειψης του TAF10 στη ρύθμιση της έκφρασης mic-RNAs στο ήπαρ	45
Οι επιπτώσεις της απουσίας του TAF10 σε γονίδια που είναι ήδη ενεργοποιημένα από τα εμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης	46
Οι επιπτώσεις της απουσίας του TAF10 σε γονίδια που ενεργοποιούνται μεταγεννητικά	50

Οι επιπτώσεις της απουσίας του TAF10 σε γονίδια που αποσιωπώνται μεταγεννητικά	52
Διερεύνηση της στρατολόγησης παραγόντων του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής στους υποκινητές γονιδίων της 1 ^{ης} κατηγορίας	53
Διερεύνηση της στρατολόγησης παραγόντων του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής στους υποκινητές γονιδίων της 2 ^{ης} κατηγορίας	59
Διερεύνηση της στρατολόγησης παραγόντων του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής στους υποκινητές γονιδίων της 4 ^{ης} κατηγορίας	61
Συζήτηση	65
Ηπατο-ειδικά TAF10KO ποντίκια και ανάλυση του φαινοτύπου τους	65
Το TAF10 (TFIID) δεν είναι απαραίτητο για τη συνέχιση της μεταγραφής ήδη ενεργοποιημένων γονιδίων	67
Το TAF10 (TFIID) είναι απολύτως απαραίτητο για την αρχική ενεργοποίηση των ηπατικών γονιδίων	70
Ο ρόλος του TAF10 (TFIID) στη μεταγεννητική αποσίωψη ηπατικών γονιδίων	72
Ο ρόλος του TAF10 (TFIID) στην «επικοινωνία» του υποκινητή με ρυθμιστικές αλληλουχίες άνωθεν του υποκινητή	74
Υλικά και Μέθοδοι	78
Παράρτημα	97
Βιβλιογραφία	112

Οι επιπτώσεις της απουσίας του TAF10 σε γονίδια που αποσιωπώνται μεταγεννητικά	52
Διερεύνηση της στρατολόγησης παραγόντων του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής στους υποκινητές γονιδίων της 1 ^{ης} κατηγορίας	53
Διερεύνηση της στρατολόγησης παραγόντων του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής στους υποκινητές γονιδίων της 2 ^{ης} κατηγορίας	59
Διερεύνηση της στρατολόγησης παραγόντων του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής στους υποκινητές γονιδίων της 4 ^{ης} κατηγορίας	61
Συζήτηση	65
Ηπατο-ειδικά TAF10KO ποντίκια και ανάλυση του φαινοτύπου τους	65
Το TAF10 (TFIID) δεν είναι απαραίτητο για τη συνέχιση της μεταγραφής ήδη ενεργοποιημένων γονιδίων	67
Το TAF10 (TFIID) είναι απολύτως απαραίτητο για την αρχική ενεργοποίηση των ηπατικών γονιδίων	70
Ο ρόλος του TAF10 (TFIID) στη μεταγεννητική αποσιώπηση ηπατικών γονιδίων	72
Ο ρόλος του TAF10 (TFIID) στην «επικοινωνία» του υποκινητή με ρυθμιστικές αλληλουχίες άνωθεν του υποκινητή	74
Υλικά και Μέθοδοι	78
Παράρτημα	97
Βιβλιογραφία	112

Περίληψη

Η μεταγραφική ενεργοποίηση ενός γονιδίου απαιτεί τη συνδυασμένη δράση διαφόρων πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, των οποίων η συναρμολόγηση πραγματοποιείται στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων και οδηγεί στο σχηματισμό ενός ενεργού προεναρκτηρίου συμπλόκου της μεταγραφής (PIC). Έτσι, στους υποκινητές των γονιδίων βρίσκονται πρωτεΐνες που προσδέονται ειδικά στο DNA, οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIH, TFIIF, το σύμπλοκο του διαμεσολαβητή, συνενεργοποιητές και σύμπλοκα που επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης. Το σύμπλοκο TFIID, το οποίο αποτελείται από την πρωτεΐνη TBP και 14 TBP-associated factors (TAFs), έχει κεντρικό ρόλο στη μεταγραφική μηχανή, εξαιτίας των ποικίλων λειτουργιών του.

Προκειμένου να μελετήσουμε σε βάθος το ρόλο της βασικής μεταγραφικής μηχανής στη ρύθμιση ιστο-ειδικών γονιδίων κατά την ανάπτυξη, πραγματοποιήσαμε ηπατοειδική απενεργοποίηση του TAF10, έναν από τους κύριους παράγοντες του TFIID συμπλόκου, στα στάδια της εμβρυϊκής και μεταγεννητικής ανάπτυξης του ποντικού. Η απενεργοποίηση του TAF10 οδηγεί σε αποσυναρμολόγηση του συμπλόκου TFIID, χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης των επιμέρους υπομονάδων του. Η αποδιοργάνωση του TFIID σχετίζεται με τη μείωση των επιπέδων έκφρασης της πλειονότητας των ηπατοειδικών γονιδίων στα TAF10KO έμβρυα και εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων, με συνέπεια την ανεπιτυχή οργανογένεση του ήπατος σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο. Αναπάντεχα, η απουσία του TAF10 δεν επηρέασε την μεταγραφή της πλειονότητας των ηπατοειδικών γονιδίων σε ενήλικα TAF10KO ποντίκια, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζει ούτε την αρχιτεκτονική δομή του ήπατος και τη μορφολογία των ηπατοκυττάρων, που παραμένουν φυσιολογικά για ένα αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, ακόμα και αν τα ποντίκια εμφανίζουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά συμβατά με νανισμό. Το μέγεθος των αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων, λόγω της απενεργοποίησης του TAF10 παρατηρήσαμε ότι εξαρτάται από το στάδιο της αρχικής ενεργοποίησής τους, σε σχέση με το χρονικό σημείο της εξάλειψης του TAF10. Επιπλέον, η αποδιοργάνωση του TFIID συμπλόκου προκαλεί

την εκ νέου ενεργοποίηση διαφόρων ηπατικών γονιδίων που είχαν σιγήσει μεταγεννητικά. Ανάλυση του προτύπου έκφρασης των ηπατικών γονιδίων και του προτύπου στρατολόγησης διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές αυτών των γονιδίων αποκάλυψε ότι το σύμπλοκο TFIID είναι απαραίτητο για την αρχική ενεργοποίηση των ηπατικών γονιδίων και την καταστολή ορισμένων μεταγεννητικά, αλλά δεν είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της μεταγραφής γονιδίων που έχουν ήδη ενεργοποιηθεί. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αναδεικνύουν τον ενεργό ρόλο του TAF10 (TFIID) στη ρύθμιση του προτύπου έκφρασης των ηπατικών γονιδίων κατά την ανάπτυξη του ήπατος του πονικού.

Summary

Accurate and efficient transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase II requires the combined activities of several protein complexes assembled at promoter regions. These include sequence-specific DNA-binding proteins, general transcription factors TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, and TFIIH, the Mediator complex and different coactivators. The TFIID complex composed of the TATA binding protein (TBP) and 14 TBP-associated factors (TAFs) is considered a central component of the transcription apparatus, owing to its multiple molecular functions.

In order to better understand the function of the core transcription machinery in the regulation of tissue-specific genes during development, we studied animal models in which TAF10, a key component of TFIID, was conditionally inactivated in embryonic or adult liver. We show that hepatocyte-specific inactivation of TAF10 leads to the dissociation of TFIID into individual components and to the down-regulation of most hepatocyte-specific genes during embryonic life, with parallel defects in hepatocyte differentiation and proliferation, culminating in the failure of liver organogenesis. Contrary to embryos, transcription of the majority of the genes in the adult liver was not affected by TAF10 inactivation and TFIID disassembly and liver architecture and hepatocyte morphology remained normal for a considerable length of time, although the animals displayed a dwarf phenotype. The extent of changes in transcription of the affected genes was dependent on the timing of their activation during liver development, relative to that of TAF10 inactivation. Furthermore, TFIID dissociation from promoters leads to the re-expression of several postnatally silenced hepatic genes. Promoter occupancy analyses, combined with expression profiling demonstrate that, after the initial activation of genes, TAF10 (TFIID) is dispensable for ongoing transcription and that, in addition to its pivotal role in the initial activation of hepatic genes, TAF10 (TFIID) is also required for the developmental stage-specific repression of previously active genes. These data suggest that TAF10 (TFIID) actively participates in the regulation of the temporal pattern of gene expression during liver development.

Εισαγωγή

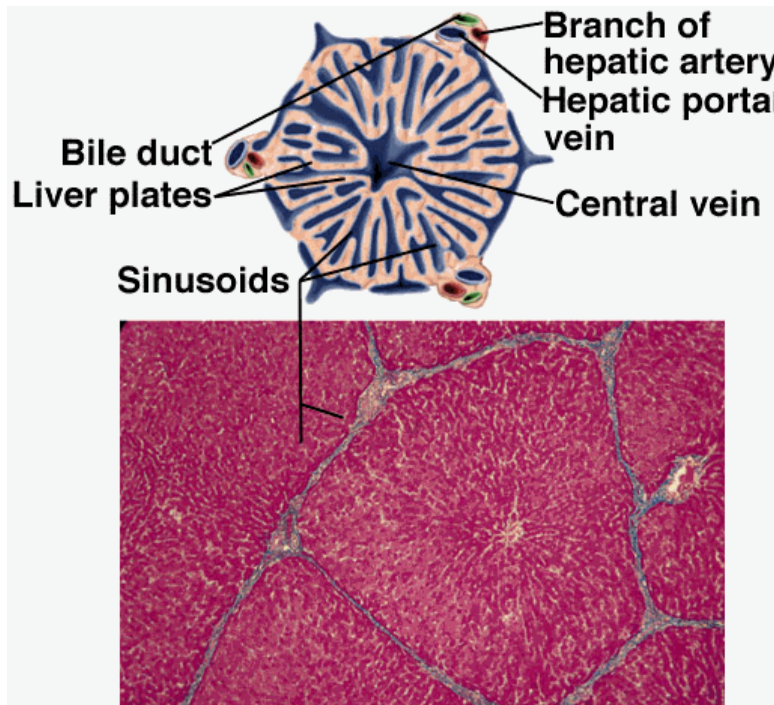
Αρχιτεκτονική δομή και ανάπτυξη του ήπατος

Το ήπαρ για πολλά χρόνια αποτελούσε ένα όργανο «μυστήριο», λόγω του μικρού αριθμού γενετικών δεδομένων, που αφορούσαν την ανάπτυξή του. Η παρουσία του στο εσωτερικό του οργανισμού των θηλαστικών καθιστούσε δύσκολη την ταυτοποίηση ποικίλων μορφολογικών διαφορών μεταξύ των ατόμων μίας πληθυσμιακής ομάδας οργανισμών.

Ο κύριος ρόλος του ήπατος συνίσταται στην αποτοξίνωση των ζημιογόνων παραπροϊόντων του μεταβολισμού, το μεταβολισμό υδατανθράκων, λιπών, στεροειδών και προσταγλαδινών, την αποθήκευση βιταμινών και σιδήρου, καθώς και την παραγωγή πρωτεϊνών του ορού. Επιπλέον, το ήπαρ έχει σημαντική ενδοκρινή και εξωκρινή δραστηριότητα. Η ενδοκρινής δραστηριότητά του συνίσταται στην έκκριση παραγόντων του ορού του αίματος, όπως η αλβουμίνη, προθρομβίνη και οι απολιποπρωτεΐνες. Η εξωκρινής λειτουργία των ηπατοκυττάρων βασίζεται στην έκκριση χολικών οξέων, βασικών προϊόντων του μεταβολισμού της χοληστερόλης, τα οποία μεταφέρονται στο έντερο με τα χοληφόρα σωληνάρια και βοηθούν στην εντερική απορρόφηση, διασφαλίζοντας την ομαλή λειτουργία της πέψης (Ceregini, 1996; Duncan, 2000). Στα εμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης του ποντικού το ήπαρ αποτελεί το βασικό αιμοποιητικό όργανο, ενώ αμέσως μετά την γέννηση του οργανισμού αποκτά τις παραπάνω σημαντικές λειτουργίες του.

Στα θηλαστικά αποτελεί το μεγαλύτερο σε μέγεθος εσωτερικό όργανο. Το ήπαρ του ανθρώπου αποτελείται από δύο μεγάλους λοβούς χωρισμένους σε μικρότερα τμήματα, ενώ το ήπαρ ενήλικων ποντικών αποτελείται από τέσσερις λοβούς. Η θέση που κατέχει στο σώμα για να προσλαμβάνει φλεβικό αίμα απευθείας από το έντερο και το πάγκρεας είναι ξεχωριστή. Χωρίζεται σε μικρές μονάδες εξαγωνικού σχήματος, που ονομάζονται λοβίδια, στις κορυφές των οποίων υπάρχουν οι πυλαίες τριάδες, καθεμία από τις οποίες απαρτίζεται από μία αρτηρία, μία φλέβα και έναν χοληφόρο σωληνίσκο (**Εικόνα 1**). Στο κέντρο κάθε τέτοιου λοβιδίου υπάρχει μία κεντρική φλέβα. Έτσι λοιπόν, στην περιφέρεια του λοβού το αίμα εισέρχεται από κλάδους της πυλαίας φλέβας και της ηπατικής αρτηρίας και εξέρχεται μέσω της κεντρολόβιας φλέβας (Duncan, 2000, Duncan, 2003). Με αυτό τον τρόπο το ήπαρ

ρυθμίζει το ρυθμό της κυκλοφορίας του αίματος από το έντερο και το πάγκρεας προς το υπόλοιπο σώμα. Η στενή επαφή του με το αίμα συντελεί στην ικανότητα του να το καθαρίζει αποτελεσματικά από ορισμένες κατηγορίες ουσιών.

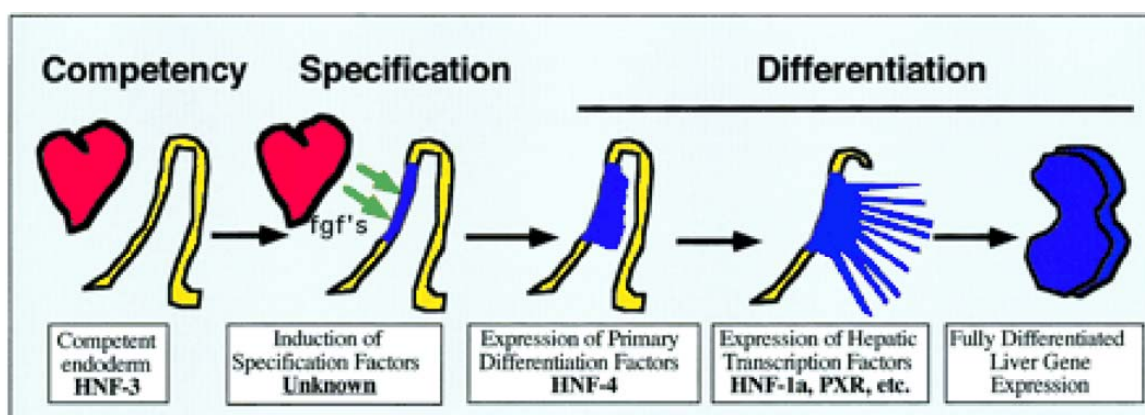


Εικόνα 1. Εγκάρσια τομή ήπατος. Φαίνεται η οργάνωση των ηπατοκυττάρων σε πλάκες και η διάταξη των ηπατικών φλεβών, αρτηριών και χοληφόρων σωληνίσκων στα λοβίδια.

Η εσωτερική δομή του ήπατος παρουσιάζει μία συγκεκριμένη αρχιτεκτονική δομή, που χαρακτηρίζεται από πλάκες ηπατοκυττάρων, των οποίων η βασική επιφάνεια έρχεται σε επαφή με ένα δίκτυο σινουσοειδών τριχοειδών αγγείων με την παρεμβολή του χώρου του Disse. Η επικοινωνία αυτή ανάμεσα στη βασική επιφάνεια των ηπατοκυττάρων και την παροχή του αίματος που προσάγεται είναι απαραίτητη, ώστε το ήπαρ να επιτυγχάνει την αποτοξίνωση του αίματος και την έκκριση παραγόντων του ορού. Από την άλλη πλευρά, η χολή που παράγεται στα ηπατοκύτταρα εκκρίνεται σε σωληνάκια, που ενώνονται σε χοληφόρους αγωγούς και οδηγούν τη χολή μέσω του ηπατικού αγωγού στη χοληδόχο κύστη.

Τα ηπατοκύτταρα είναι ο κύριος κυτταρικός τύπος του ήπατος, αφού αποτελούν το 80% των κυττάρων στο ήπαρ ενός ενήλικου ποντικού, όπου απαντώνται και άλλοι κυτταρικοί τύποι, όπως χολαγγειοκύτταρα, μακροφάγα (κύτταρα Kupffer),

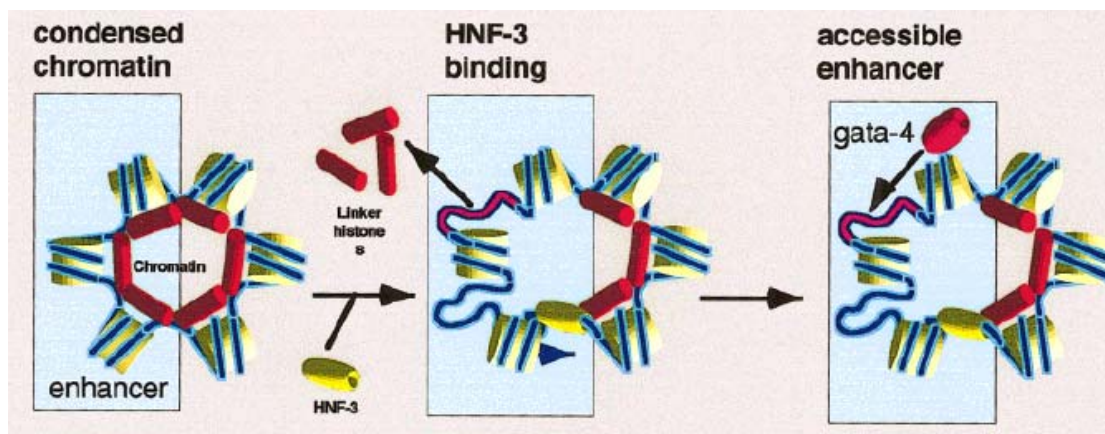
ινοβλάστες (κύτταρα Ito) και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα μακροφάγα κύτταρα Kupffer είναι σημαντικά στην εκκαθάριση της κυκλοφορίας του αίματος από κυτταρικά υπολείμματα. Τα παραπάνω μαζί με ενδοθηλιακά κύτταρα, συνιστούν τα τριχοειδή αγγεία, που απαντώνται ανάμεσα στα ηπατοκύτταρα. Οι ινοβλάστες (κύτταρα Ito) που υπάρχουν στο ήπαρ ευθύνονται για την αποθήκευση της βιταμίνης A και βρίσκονται στο χώρο του Disse. Το γεγονός ότι η πλειονότητα των κυττάρων που συνιστούν το ήπαρ ενός ενήλικου ποντικού είναι ηπατοκύτταρα καθιστά το συγκεκριμένο όργανο ένα πολύ καλό μοντέλο-σύστημα για τη μελέτη της οργανογένεσης και των μηχανισμών διαφοροποίησης των κυττάρων του.



Εικόνα 2. Τα στάδια της ηπατικής ανάπτυξης σε έμβρυα ποντικού. Στην εικόνα φαίνονται τα τρία διακριτά στάδια και οι ιστοί που ενέχονται στην ανάπτυξη του ήπατος. Με κόκκινο το καρδιακό μεσόδερμα και κίτρινο το πρόσθιο κοιλιακό τμήμα του ενδοδέρματος του προσεντέρου. (Duncan, 2000)

Η ανάπτυξη του ήπατος ξεκινάει την E8.25 ημέρα της γαστριδίωσης και είναι μία διαδικασία που περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια, τα οποία χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα γεγονότα, το στάδιο της επιδεκτικότητας (competence), του καθορισμού (specification), και της μορφογένεσης (morphogenesis), τα οποία ρυθμίζονται από την παρουσία μεταγραφικών παραγόντων (Duncan 2000; Li *et al.*, 2003; Zaret 2000; Zaret 2001) (**Εικόνα 2.**). Το στάδιο της επιδεκτικότητας που αποτελεί το πρώτο βήμα για το σχηματισμό του οργάνου, επιτελείται στο πρόσθιο κοιλιακό τμήμα του ενδοδέρματος του προσεντέρου (foregut endoderm), όπου και σχηματίζεται η κυτταρική ζώνη από την οποία θα προέλθει το ήπαρ. Στη

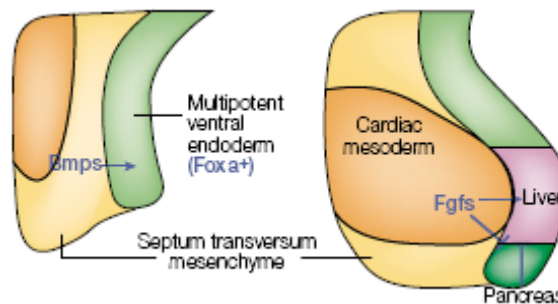
συγκεκριμένη περιοχή του ενδοδέρματος ήδη εκφράζονται κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες σημαντικοί για την επιδεκτικότητα της περιοχής (Foxa και GATA-4) (Εικόνα 3). Ο παράγοντας Foxa2, όπως έχουν δείξει και *in vitro* μελέτες, έχει την ιδιότητα να προσδένεται στη χρωματίνη ακόμα και σε ετεροχρωματινικές περιοχές, δημιουργώντας μία ανοικτή χρωματινική διαμόρφωση, προσβάσιμη σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Cirillo *et al.*, 2001). Οι παράγοντες Foxa2 και GATA-4 που εκφράζονται σε αυτό το κοιλιακό τμήμα του ενδοδέρματος, «μαρκάρουν» κατά κάποιο τρόπο τα ηπατικά γονίδια με την προοπτική αυτά να εκφραστούν σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια (Gualdi *et al.*, 1996, Cirillo *et al.*, 1998, Shim *et al.*, 1998).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση του μοριακού μηχανισμού εγκαθίδρυσης της επιδεκτικότητας στην έκφραση ηπατικών γονιδίων. Ο ρόλος του HNF-3 παράγοντα στο στάδιο της επιδεκτικότητας κατά την ανάπτυξη του ήπατος συνίσταται στην αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης. Η πρόσδεση του στη χρωματίνη έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση της ιστόνης H1 και με αυτό τον τρόπο την ενίσχυση της πρόσβασης και άλλων μεταγραφικών παραγόντων που δρούν συνεργητικά στην περιοχή, όπως του παράγοντα GATA-4 (Duncan, 2000).

Στο δεύτερο στάδιο του καθορισμού είναι σημαντικές και δύο άλλες περιοχές μεσοδερμικής προέλευσης, το καρδιακό μεσόδερμα και το μεσένγγυμα του septum transversum. Από τις περιοχές αυτές πραγματοποιείται παραγωγή των αυξητικών παραγόντων Fgfs (Fibroblast growth factors 1, 2, 8) και BMPs (Bone morphogenetic proteins 2, 4, 7), αντίστοιχα (Jung *et al.*, 1999) (Εικόνα 4.). Η απόκριση του

ενδοδέρματος σε αυτούς τους παράγοντες έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ηπατικών γονιδίων και την πυροδότηση του πολλαπλασιασμού των ηπατικών κυττάρων. Έπειτα, ακολουθεί η συγκέντρωση ηπατικών κυττάρων στο μεσένγγυμα του septum transversum, όπου και θα αναπτυχθεί το ήπαρ (**Εικόνα 4**).



Εικόνα 4. Τα σηματοδοτικά μόρια και οι ιστοί που ενέχονται στο στάδιο καθορισμού του ηπατικού φαινοτύπου.

Το τελικό στάδιο αφορά τη διαφοροποίηση αυτών των πολυδύναμων ενδοδερμικών κυττάρων, των ηπατοβλαστών, σε πλήρως διαφοροποιημένα ηπατοκύτταρα ή σε χολαγγειοκύτταρα (Li *et al.*, 2000).

Μεταγραφικοί παράγοντες με καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση του ηπατικού φαινοτύπου

Το στάδιο της διαφοροποίησης είναι η βαθμιαία μετάβαση σε έναν πολύ εξειδικευμένο κυτταρικό τύπο που εκφράζει μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών απαραίτητων για την τελική μορφολογία και λειτουργία του (Zaret, 2000). Η διαφοροποίηση του ηπατικού κυττάρου πιο συγκεκριμένα απαιτεί την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό, την αποτοξίνωση και την παραγωγή πρωτεϊνών του ορού. Παρόλο που έχουν βρεθεί πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες να ρυθμίζουν την έκφραση των παραπάνω γονιδίων στο ενήλικο ήπαρ, δεν έχει δοθεί σαφής απάντηση για το ποιος παράγοντας συγκεκριμένα δίνει το έναυσμα για την διαφοροποίηση των ηπατικών κυττάρων. Η δυσκολία στην απάντηση βρίσκεται στο γεγονός ότι η απενεργοποίηση καθενός από τους παραπάνω παράγοντες σε ποντίκι

οδηγεί στη δημιουργία ενός ζώου μη βιώσιμου προφανώς γιατί οι παράγοντες αυτοί διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια κατά την ανάπτυξη του ποντικού. Η διαφοροποίηση του ηπατικού κυττάρου συνοδεύεται από δραματική αύξηση του διπλασιασμού των κυττάρων που θα αποτελέσουν το τελικό όργανο.

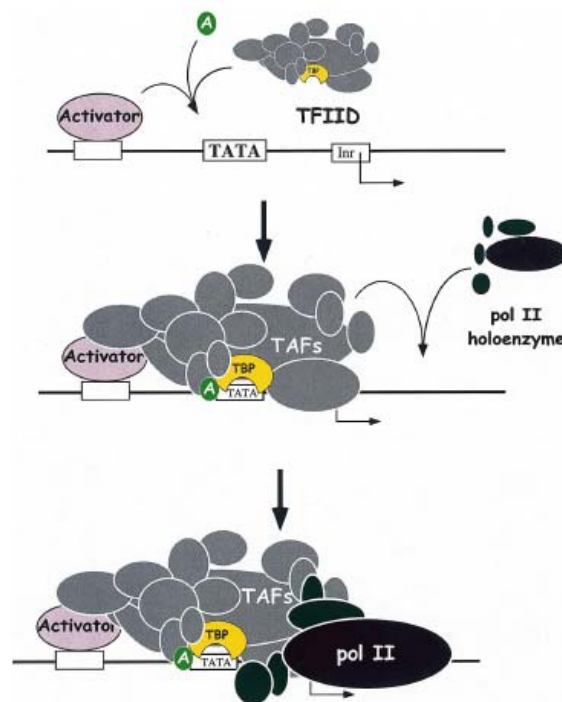
Μιτογόνοι καθώς και αυξητικοί παράγοντες των μεσεγχυματικών κυττάρων που περιβάλλουν τα ηπατικά κύτταρα αποτελούν τα σήματα τα οποία ενεργοποιούν γονίδια για τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ηπατικών κυττάρων (Duncan 2000; Zaret 2000; Zaret 2001). Στο ενήλικο πια ήπαρ η διατήρηση του ηπατικού φαινοτύπου συνίσταται στην έκφραση μιας συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες αναγκαίες για την ηπατική λειτουργία. Η ρύθμιση των παραπάνω γονιδίων γίνεται κύρια στο επίπεδο της μεταγραφής από ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες που παρόλο που δεν εκφράζονται αποκλειστικά στο ήπαρ, ο συνδυασμός τους και οι σχετικές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις φαίνεται πως είναι καθοριστικές.

Η μέχρι τώρα μελέτη στοιχείων των υποκινητών και ενισχυτών των γονιδίων αυτών ανέδειξε 6 οικογένειες πρωτεϊνών υπεύθυνες για τον καθορισμό και την διατήρηση του ηπατικού φαινοτύπου. Οι κύριοι λοιπόν ηπατικοί ρυθμιστές ανήκουν σε οικογένειες που χαρακτηρίζονται από τις δομικά σχετικές επικράτειες πρόσδεσης τους στο DNA (DNA-binding domains). Πρόκειται για παράγοντες της οικογένειας των HNF-1 πρωτεϊνών (HNF-1 α , -1 β) που διαθέτουν το μοτίβο «homeodomain», παράγοντες της HNF-3 οικογένειας (HNF-3 α , -3 β -3 γ) που ονομάζονται και FoxA (A1, A2, A3) και διαθέτουν το «winged helix» μοτίβο, μέλη της οικογένειας των ορφανών πυρηνικών υποδοχέων όπως οι HNF-4, COUP-TFII και LRH, τον παράγοντα C/EBP α που χαρακτηρίζεται από το «basic leucine zipper» μοτίβο, τον HNF-6 που ανήκει στην οικογένεια των «ONECUT homeodomain» πρωτεϊνών και τέλος την οικογένεια των GATA παραγόντων στην οποία ανήκει ο GATA-6.

Διαμόρφωση του PIC συμπλόκου

Η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων έχει ρόλο «κλειδί» στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων κατά την ανάπτυξη ενός οργανισμού, καθώς και στην απόκριση σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων λοιπόν διασφαλίζει το κατάλληλο πρότυπο έκφρασής τους για τη διεξαγωγή των διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών.

Για την ενεργοποίηση της μεταγραφής ενός γονιδίου απαιτείται η συνδυασμένη δράση διαφόρων πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, των οποίων η συναρμολόγηση πραγματοποιείται στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων και έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του προεναρκτηρίου συμπλόκου της μεταγραφής (PIC: Preinitiation Complex), που αποτελεί καθοριστικό βήμα στην ενεργοποίηση ενός γονιδίου. Έτσι, στους υποκινητές των γονιδίων απαντώνται πρωτεΐνες που προσδένονται ειδικά στο DNA, οι βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIH, TFIIF, το σύμπλοκο του διαμεσολαβητή (Mediator), συνενεργοποιητές και σύμπλοκα που επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης (Orphanides *et al.*, 1996; Lemon and Tjian, 2000).



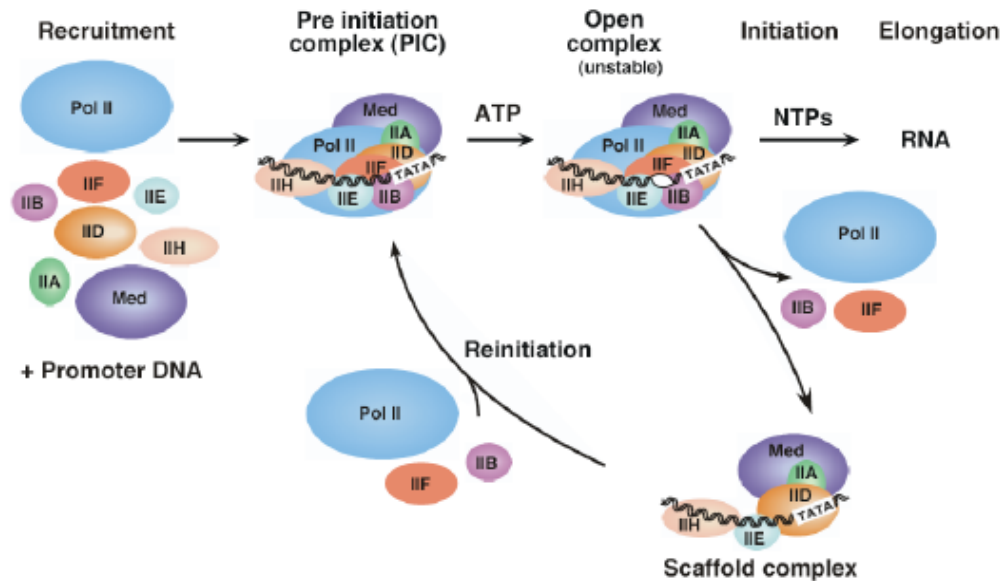
Εικόνα 5. Η μεταγραφική ενεργοποίηση ενός γονιδίου απαιτεί τη συνδυασμένη δράση διαφόρων πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων.

Η μεταγραφική ενεργοποίηση ενός γονιδίου ξεκινά τυπικά με την πρόσδεση ενός ή περισσοτέρων ενεργοποιητών σε ειδικές αλληλουχίες κοντά στον υποκινητή ενός γονιδίου. Οι ενεργοποιητές αυτοί μπορούν να δράσουν είτε έμμεσα στρατολογώντας παράγοντες που ευθύνονται για την αλλαγή της δομής της χρωματίνης (Chromatin modifying factors), είτε άμεσα αλληλεπιδρώντας με συστατικά της βασικής μεταγραφικής μηχανής. Στην απλούστερη εκδοχή της γονιδιακής ενεργοποίησης και οι δύο παραπάνω μηχανισμοί εμπλέκονται στη στρατολόγηση της μεταγραφικής μηχανής στην περιοχή του υποκινητή ενός γονιδίου. *In vitro* μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η συναρμολόγηση της βασικής μεταγραφικής μηχανής ξεκινά με την πρόσδεση του παράγοντα TFIIID στους υποκινητές των γονιδίων, που θα οριοθετήσει την περιοχή του υποκινητή (Albright and Tjian, 2000). Έπειτα, ακολουθεί η στρατολόγηση των παραγόντων TFIIA και TFIIB. Ο TFIIA που αποτελείται από τρεις υπομονάδες αλληλεπιδρά με τον TFIIID και ενισχύει την πρόσδεσή του στο DNA, ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι εμποδίζει την πρόσδεση μεταγραφικών καταστολέων στην περιοχή του υποκινητή (Buratowski *et al.*, 1989; Imbalzano *et al.*, 1994; Auble *et al.*, 1994). Ο παράγοντας TFIIB προσδένεται στο DNA, καθοδικά του πλαισίου «TATA», σε ειδικές αλληλουχίες (BRE: TFIIB responsive element), αλληλεπιδρά με τον παράγοντα TFIIID και ο βασικός του ρόλος είναι στην επιλογή του σημείου έναρξης της μεταγραφής, καθορίζοντας την απόσταση του από τον υποκινητή. Μεταλλαγές του παράγοντα TFIIB προκαλούν μετακίνηση στο σημείο έναρξης της μεταγραφής (Berroteran *et al.*, 1994). Στην περιοχή του υποκινητή στρατολογούνται και οι παράγοντες TFIIIF, TFIIE, TFIIH αλλά και το ένζυμο RNA Pol-II. Ο παράγοντας TFIIIF αποτελείται από ένα ετεροτετραμερές από δύο είδη υπομονάδων, προσδένεται στο ένζυμο της πολυμεράσης και σταθεροποιεί το προεναρκτήριο σύμπλοκο, ενώ η υπομονάδα του RAP74 έχει ενεργότητα ATP-εξαρτώμενης ελικάσης. Ο παράγοντας TFIIE με δύο υπομονάδες προσδένεται στον υποκινητή κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής και πιθανότατα βοηθά στη στρατολόγηση του TFIIH και στη διατήρηση του «ανοικτού συμπλόκου» (βλέπε παράκατω). Ο παράγοντας TFIIH που αποτελείται από 9 υπομονάδες έχει ενεργότητες κινάσης και ελικάσης. Οι δύο αυτές ενεργότητες του είναι σημαντικές

για τη φωσφορυλίωση της πολυμεράσης κατά την έναρξη της μεταγραφής και την τήξη του DNA.

Αρχικά, το σύμπλοκο PIC έχει μία ανενεργή διαμόρφωση («κλειστό σύμπλοκο»). Ο βασικός μεταγραφικός παράγοντας TFIIF είναι υπεύθυνος πιθανότατα για την τήξη του τμήματος του DNA που περιβάλλει το σημείο έναρξης της μεταγραφής, περίπου 11-15 βάσεις και στη συνέχεια η αλυσίδα του υποκινητή που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα τοποθετείται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου της RNA πολυμεράσης II, σχηματίζοντας το «ανοικτό σύμπλοκο» (Wang *et al.*, 1992). Η έναρξη της μεταγραφής γίνεται πραγματικότητα με τη σύνθεση του πρώτου φωσφοδιεστερικού δεσμού του RNA. Σε πολλές περιπτώσεις παράγονται μικρά μόρια RNA, με μήκος τρεις με δέκα βάσεις, πριν το ένζυμο της RNA πολυμεράσης ξεκινήσει τη σύνθεση πλήρως επιμηκυσμένων μορίων RNA (Luse *et al.*, 1987; Holstege *et al.*, 1998). Μετά τη σύνθεση των τριάντα πρώτων βάσεων του RNA, φωσφορυλιώνεται η καρβοξυτελική ουρά (CTD) του ενζύμου της RNA πολυμεράσης II από την υπομονάδα Cdk7 του παράγοντα TFIIF, το οποίο χάνει την επαφή του με τη βασική μεταγραφική μηχανή που βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου και εισέρχεται στο στάδιο της επιμήκυνσης του mRNA.

Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι μετά την έναρξη της μεταγραφής κάποιοι από τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες του προεναρκτηρίου συμπλόκου παραμένουν προσδεδεμένοι στην περιοχή του υποκινητή δημιουργώντας ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο (Yudkovsky *et al.*, 2000). Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από τους παράγοντες TFIIA, TFIID, TFIIE, TFIIF, Mediator, των οποίων δεν είναι απαραίτητη η *de novo* στρατολόγησή τους και φαίνεται να διευκολύνει τη στρατολόγηση του ολοενζύμου της RNA πολυμεράσης II στους επόμενους κύκλους της μεταγραφής (**Εικόνα 6.**), αυξάνοντας το ρύθμο της μεταγραφής.



Εικόνα 6. Το μονοπάτι έναρξης της μεταγραφής. Η στρατολόγηση των παραγόντων που συγκροτούν τη βασική μεταγραφική μηχανή πραγματοποιείται με σκοπό το σχηματισμό ενός σταθερού προεναρκτηρίου συμπλόκου PIC και οδηγεί στην έναρξη της μεταγραφής. Κάποιοι από τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες παραμένουν στον υποκινητή στους μεταγραφικούς κύκλους που ακολουθούν την έναρξη της μεταγραφής. (Βλέπε κείμενο για περισσότερες λεπτομέρειες) (Hahn, 2004).

Η σειριακή στρατολόγηση των βασικών μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή ενός γονιδίου, που περιγράφεται παραπάνω, βασίζεται σε αποτελέσματα *in vitro* πειραμάτων με ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών και σακχαρομύκητα οδήγησαν στην απομόνωση του συμπλόκου της υποφωσφορυλιωμένης μορφής του ενζύμου της RNA πολυμεράσης II με διάφορους παράγοντες, στους οποίους περιλαμβάνονται ο TFIIF, ο TFIIE, ο TFIIH και υπομονάδες του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου του διαμεσολαβητή. Έτσι, λοιπόν, *in vivo* είναι πολύ πιθανό το σύμπλοκο TFIID-TFIIA-TFIIB-DNA να αναγνωρίζεται από ένα ολοένζυμο της Pol-II, στο οποίο βασικό ρόλο έχει και το σύμπλοκο του διαμεσολαβητή και στη συνέχεια ακολουθεί η στρατολόγηση του στον υποκινητή του γονιδίου (Orphanides *et al.*, 1996; Malik and Roeder, 2000). Το σύμπλοκο του διαμεσολαβητή αποτελείται από 24 υπομονάδες και ο κύριος ρόλος του είναι να μεσολαβεί για την αλληλεπίδραση των ενεργοποιητών με τη βασική μεταγραφική μηχανή. Διάφορες μελέτες αποκαλύπτουν ότι η στρατολόγηση του στους υποκινητές

μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης έδειξαν ότι η υπομονάδα med220 (med1) του διαμεσολαβητή προσδένεται στον υποκινητή ενός γονιδίου, που επάγεται η έκφραση του από τον υποδοχέα του οιστρογόνου, τη χρονική στιγμή που ενεργοποιείται το γονίδιο (Shang *et al.*, 2000). Αντίθετα, στην περίπτωση του γονιδίου της α-αντιθρυψίνης σε εντεροκύτταρα πραγματοποιείται στρατολόγηση του σύμπλοκου του διαμεσολαβητή τέσσερις (4) ημέρες πριν από την ενεργοποίηση του γονιδίου (Soutoglou and Talianidis, 2002).

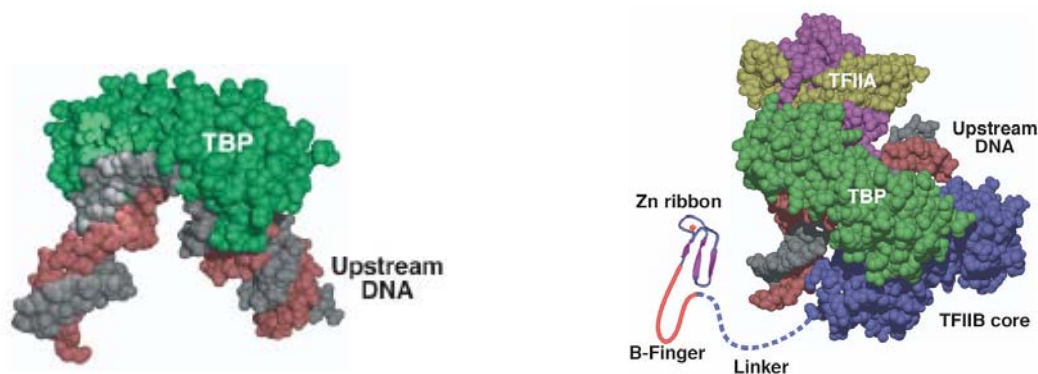
Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου TFIID

Ο βασικός μεταγραφικός παράγοντας TFIID είναι ένα σύμπλοκο που αποτελείται από την πρωτεΐνη TBP (TATA-Binding Protein), που αναγνωρίζει και προσδένεται στο πλαίσιο «TATA» του υποκινητή ενός γονιδίου και 14 άλλους παράγοντες, που συνδέονται με το TBP και ονομάζονται TAFs (TBP-associated factors), των οποίων η αμινοξική αλληλουχία είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένη από το σακχαρομύκητα ως και τον άνθρωπο (Πίνακας 1.).

New name	<i>S.cerevisiae</i>	<i>D.melanogaster</i>	<i>H.sapiens</i>
TAF1	Taf145/130p	TAF _{II} 230	TAF _{II} 250
TAF2	Taf150p or TSM1	TAF _{II} 150	TAF _{II} 150
TAF3	Taf47p	TAF _{II} 155 or BIP2	TAF _{II} 140
TAF4	Taf48p or MPT1	TAF _{II} 110	TAF _{II} 130/135
TAF5	Taf90p	TAF _{II} 80	TAF _{II} 100
TAF6	Taf60p	TAF _{II} 60	TAF _{II} 80
TAF7	Taf67p	(AAF54162)	TAF _{II} 55
TAF8	Taf65p	Prodos	(BAB71460)
TAF9	Taf17p	TAF _{II} 40	TAF _{II} 32/31
TAF10	Taf25p	TAF _{II} 24	TAF _{II} 30
TAF11	Taf40p	TAF _{II} 30β	TAF _{II} 28
TAF12	Taf61/68p	TAF _{II} 30α	TAF _{II} 20/15
TAF13	Taf19p or FUN81	(AAF53875)	TAF _{II} 18
TAF14	Taf30p		

Πίνακας 1. Ονοματολογία των παραγόντων TAFs. Η νέα ονοματολογία των TAFs βασίζεται στην ομολογία που παρουσιάζουν στους διάφορους οργανισμούς και όχι στο μοριακό τους βάρος, όπως συνέβαινε πριν γίνει ενιαία.

Το μεγάλο μέγεθος του συμπλόκου TFIID (~800KDa) και η πολυπλοκότητα της σύνθεσής του αποτέλεσαν εμπόδια στον χαρακτηρισμό της τρισδιάστατης δομής του, είτε με κρυσταλλογραφία με ακτίνες-X, είτε με ανάλυση NMR. Παρολαυτά έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικά βήματα από διαφορετικά εργαστήρια, που επικέντρωσαν τις προσπάθειές τους ξεχωριστά σε κάποιες υπομονάδες του TFIID. Ο παράγοντας TBP έχει κρυσταλλωθεί σε διαφορετικές συνθήκες, είτε μόνος του (Nikolon *et al.*, 1992; Nikolon and Burley, 1994), είτε προσδεδεμένος στο DNA (Kim *et al.*, 1993a,b; Kim and Burley, 1994), είτε σε σύμπλοκο με το DNA και τον TFIIA (Geiger *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1996), είτε σε σύμπλοκο με το DNA και τον παράγοντα TFIIIB (Nikolon *et al.*, 1995). Με βάση αυτές τις μελέτες το TBP περιβάλλει τη μία επιφάνεια του DNA, σχηματίζοντας μία μορφή «σέλας» (horseshoe-like) γύρω από αυτό. Η κοίλη επιφάνεια του έρχεται σε επαφή με το DNA, ενώ η κυρτή επιφάνεια είναι διαθέσιμη για την αλληλεπίδραση με τα TAFs (Nikolon *et al.*, 1995; Geiger *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1996) (**Εικόνα 7**). Ο TBP λοιπόν προσδένεται αρχικά στη μικρή αύλακα και στη συνέχεια κάμπτεται το DNA περίπου 80^o προς τη μεγάλη αύλακα, διευρύνοντας με αυτό τον τρόπο τη μικρή αύλακα. Η κάμψη που προκαλείται στο DNA αντιστοιχεί σε αφελίκωση του κατά 1/3 μιας στροφής.



Εικόνα 7. Κρυσταλλική δομή των συμπλόκων TBP-DNA και TFIIIB-TBP-TFIIA-DNA. Η δομή του TBP (πράσινο) προσδεδεμένου στο DNA (κόκκινο-γκρί) (αριστερά). Το δομικό μοντέλο του συμπλόκου TFIIIB-TBP-TFIIA-DNA (δεξιά). Με μπλέ το TFIIIB και μώβ-κίτρινο το TFIIA (Hahn, 2004).

Η αλλαγή που πραγματοποιείται στη δομή του DNA μετά την πρόσδεση του TBP είναι σημαντική, γιατί επιτρέπει στους διάφορους παράγοντες της μεταγραφικής μηχανής να έχουν μία πιο στενή επαφή και καλύτερη αλληλεπίδραση.

Περισσότερες πειραματικές ενδείξεις για τη δομή του TFIID προήλθαν από μελέτες με ηλεκτρονική μικροσκοπία χαμηλής ευκρίνειας. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι το σύμπλοκο TFIID συνίσταται από τρεις ή τέσσερις λοβούς που συνδέονται από στενότερες γέφυρες (Brand *et al.*, 1999; Andel *et al.*, 1999) (**Εικόνα 8.**). Οι λοβοί αυτοί είναι οργανωμένοι σε σχήμα «σέλας», όπως το TBP. Μάλιστα παρατηρούνται δύο διαφορετικοί πληθυσμοί μορίων, με λιγότερο ή περισσότερο κλειστή διαμόρφωση. Οι δύο διαφορετικές αυτές διαμορφώσεις, που ανιχνεύονται, αντανακλούν δομές του TFIID που προσδένονται λιγότερο ή περισσότερο στενά στο DNA. Ανοσοσήμανση με αντίσωμα που αναγνωρίζει το TBP έδειξε ότι τοποθετείται κεντρικά του συμπλόκου, στην περιοχή που είναι ειδικά διαμορφωμένη για την πρόσδεση στη διπλή έλικα του DNA, ενώ το TFIIA και το TFIIB βρίσκονται εκατέρωθεν αυτού (Brand *et al.*, 1999; Andel *et al.*, 1999) (**Εικόνα 7.**) (**Εικόνα 8.**).

Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των TAFs έχει δείξει ότι οι περισσότεροι από τους παράγοντες που υπάρχουν στο TFIID παρουσιάζουν περιοχή αναδίπλωσης όμοια με των ιστονών, γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι τα TAFs ετεροδιμερίζονται για να σχηματίσουν ζευγάρια όμοια με εκείνα των ιστονών H3-H4 και H2A-H2B, τα οποία δημιουργούν δομή «νουκλεοσώματος» στο TFIID (Gangloff *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 1996). Ορισμένες επιστημονικές ομάδες μάλιστα πρότειναν ότι η περιοχή του υποκινητή αναδιπλώνεται γύρω από το σύμπλοκο TFIID, όπως συμβαίνει και με τα νουκλεοσώματα (Oelgeschlager *et al.*, 1996; Hoffman *et al.*, 1997).

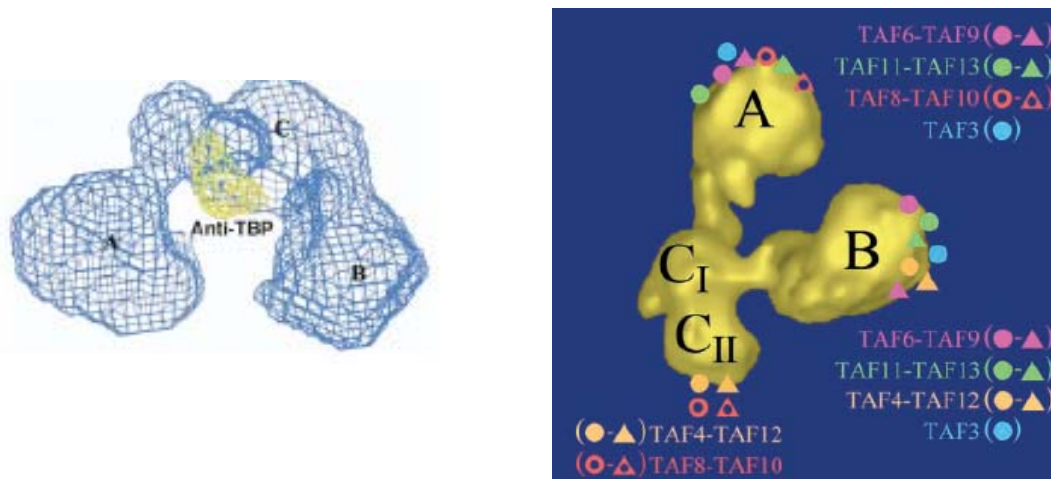
Οι πρωτεΐνες TAF6 και TAF9 παρουσιάζουν μοτίβο αναδίπλωσης όμοιο με εκείνο της ιστόνης 4 και της ιστόνης 3, αντίστοιχα και σχηματίζουν ένα ετεροτετραμερές *in vitro* (Xie *et al.*, 1996). Η παρατήρηση αυτή και το γεγονός ότι το σύμπλοκο TFIID έχει την ιδιότητα να προκαλεί αρνητική υπερελίκωση στο DNA στην περιοχή που προσδένεται στηρίζουν την υπόθεση ότι το TFIID προσομοιάζει στο οκταμερές των ιστονών (Oelgeschlager *et al.*, 1996). Οι πρωτεΐνες TAF11 και TAF13 θεωρείται ότι δημιουργούν ετεροδιμερές μέσω ενός μη κανονικού μοτίβου αναδίπλωσης (Birck *et*

al., 1998). Η πρωτεΐνη TAF12 έχει βρεθεί ότι έχει περιοχή μεγάλης ομολογίας με την ιστόνη H2B και ετεροδιμερίζεται με το TAF4 που φέρει μοτίβο αναδίπλωσης όμοιο με την H2A (Gangloff *et al.*, 2000). Επιπλέον, σε σακχαρομύκητα βρέθηκαν ότι σχηματίζονται και τα ζευγάρια TAF8-10 και TAF3-10 (Gangloff *et al.*, 2001) **(Εικόνα 8.)**.

Η μικρότερη περιοχή αναδίπλωσης ιστονών αποτελείται από τρεις α -έλικες ($\alpha 1$ - $\alpha 3$) που συνδέονται μεταξύ τους με δυο θηλίες (L1, L2), ενώ πολλές φορές παρατηρείται η παρουσία επιπλέον α έλικας στο N- ή C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Στη δημιουργία των ετεροδιμερών ιστονών οι δυο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με κατεύθυνση κεφάλι-ουρά, έτσι ώστε η $\alpha 1$ -L1 περιοχή της μιας πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά με την L2- $\alpha 3$ της άλλης. Η διευθέτηση αυτή των ιστονών στο χώρο έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δυο πρωτεϊνών και τη δημιουργία μιας σφιχτά πακεταρισμένης δομής (Luger *et al.*, 1997).

Πειράματα με ηλεκτρονική μικροσκοπία υψηλής ευκρίνειας και ταυτόχρονη χρήση αντισωμάτων για τις υπομονάδες του συμπλόκου TFIID του σακχαρομύκητα (Leurent *et al.*, 2002) έδειξαν ότι τα TAFs που θεωρείται ότι ετεροδιμερίζονται, βρίσκονται ως «ζευγάρια» σε δυο διακριτές περιοχές του συμπλόκου, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με δεδομένα που έχουν προκύψει από την κρυσταλλογραφική ανάλυση του ανθρώπινου TFIID από δύο ανεξάρτητες μελέτες (Brand *et al.*, 1999; Andel *et al.*, 1999). Μάλιστα κάθε ένα από τα TAFs που παρουσιάζουν ομολογία με ιστόνες εμφανίζεται σε δύο διαφορετικές περιοχές στο σύμπλοκο **(Εικόνα 8.)**. Παρολαυτά, δεν υπάρχει πειραματική απόδειξη της παρουσίας ενός οκταμερούς όμοιου με εκείνο του νουκλεοσώματος, είτε εντός, είτε εκτός του TFIID συμπλόκου, όπως είχε προταθεί. Επίσης, η υψηλής ευκρίνειας ανάλυση της δομής του πυρήνα των νουκλεοσωμάτων αποκάλυψε ότι οι ιστόνες προσδένονται στο DNA μέσω διαφόρων πλευρικών αλυσίδων αργινίνης (Luger *et al.*, 1997), που δεν είναι συντηρημένες στα TAFs.

Επομένως, η παρουσία αυτής της περιοχής αναδίπλωσης των TAFs πιθανότατα αντανακλά την ιδιότητα της να βοηθά στην ενίσχυση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και στη δημιουργία ενός σταθερού TFIID συμπλόκου.



Εικόνα 8. Αναπαράσταση της δομής του TFIIID συμπλόκου. Στην εικόνα αριστερά φαίνονται οι τρεις λοβοί του TFIIID συμπλόκου, ενώ το TBP (κίτρινο χρώμα) τοποθετείται κεντρικά. Δεξιά παρουσιάζονται οι περιοχές στο εσωτερικό του TFIIID, που τοποθετούνται τα ζευγάρια των TAFs που εμφανίζουν περιοχή αναδίπλωσης.

Οι λειτουργίες των παραγόντων TAFs στη μεταγραφή

Οι πρώτες ενδείξεις για το ρόλο των TAFs προήλθαν από μελέτη *in vitro* συστημάτων μεταγραφής σε *Drosophila* και ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, όπου φαίνεται ότι ο TBP μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή από «ελάχιστους» υποκινητές, που περιλαμβάνουν αυστηρά αλληλουχίες μόνο γύρω από το πλαίσιο «TATA». Η ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων που δεν περιλαμβάνουν το πλαίσιο «TATA» ή των γονιδίων εκείνων που η μεταγραφή τους πραγματοποιείται μετά την επίδραση ειδικού ενεργοποιητή χρειάζεται την παρουσία του συμπλόκου TFIIID (Pugh *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1994; Wieczorek *et al.*, 1998). Οι παρατηρήσεις αυτές ανέδειξαν την πιθανότητα τα TAFs να έχουν το ρόλο συνενεργοποιητή, αλληλεπιδρώντας έτσι με μεταγραφικούς παράγοντες που προσδέονται ειδικά στο DNA και επιπλέον να έχουν καθοριστικό ρόλο στην αναγνώριση της περιοχής του υποκινητή ειδικά στις περιπτώσεις υποκινητών που απουσιάζει το πλαίσιο «TATA». Πειραματικά δεδομένα, που προήλθαν από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων θηλαστικών, καταδεικνύουν ότι οι

παράγοντες TAFs λειτουργούν ως μεταγραφικοί συνενεργοποιητές, αφού βρέθηκε ότι η έκφραση συγκεκριμένων υπομονάδων του TFIID ενισχύει την ενεργοποίηση της μεταγραφής από διαφορετικούς πυρηνικούς υποδοχείς. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι ο παράγοντας TAF4 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της βιταμίνης D3, του ρετινοϊκού οξέος και της θυρεοειδικής ορμόνης (Mengus *et al.*, 1997), ο παράγοντας TAF11 με τον υποδοχέα RXR και ο TAF10 με τον υποδοχέα του οιστρογόνου (May *et al.*, 1996; Jacq *et al.*, 1994).

Βέβαια, είναι πιθανοί και άλλοι μηχανισμοί TAF-εξαρτώμενης ενεργοποίησης γονιδίων. Ο παράγοντας TAF1 για παράδειγμα παρουσιάζει τρεις ενζυμικές ενεργότητες που σχετίζονται άμεσα με τη ρύθμιση της έκφρασης κάποιων γονιδίων. Ο TAF1 λοιπόν έχει ενεργότητα κινάσης, αυτοφωσφορυλιώνεται και φωσφορυλιώνει την υπομονάδα RAP74 του παράγοντα TFIIF (Dikstein *et al.*, 1996). Η ενεργότητα κινάσης που παρουσιάζει είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή κάποιων γονιδίων *in vivo*, αλλά δεν είναι γνωστό αν οφείλεται στη φωσφορυλίωση του TFIIF ή άλλων υποστρωμάτων (O'Brien and Tjian, 2000). Επιπλέον, ο TAF1 έχει ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης ακετυλιώνοντας ιστόνες H3 και H4 *in vitro*, ενώ μονοουβικουτινιλιώνει ιστόνη H1 *in vitro* (Mizzen *et al.*, 1996; Pham Sauer *et al.*, 2000).

Τα TAFs έχουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση της περιοχής του υποκινητή και την εγκαθίδρυση του προεναρκτηρίου συμπλόκου. Εκτός από την πρόσδεση του TBP στο πλαίσιο «TATA», οι παράγοντες TAF1 και TAF2 έρχονται σε επαφή με την περιοχή του Εκκινητή (Initiator), ενώ οι TAF6 και TAF9 με το καθοδικό στοιχείο του υποκινητή (Downstream Promoter Element) (Verrijzer *et al.*, 1994; Verrijzer *et al.*, 1995; Burke and Kadonaga, 1997). Πρόσφατα, έγινε γνωστό ότι το TFIID και συγκεκριμένα η υπομονάδα του TAF3 μπορεί να προσδέεται σε ακετυλιωμένες ή μεθυλιωμένες στο κατάλοιπο λυσίνης K4 ιστόνες H3 (Vermeulen *et al.*, 2007).

Εναλλακτικές μορφές του συμπλόκου TFIID

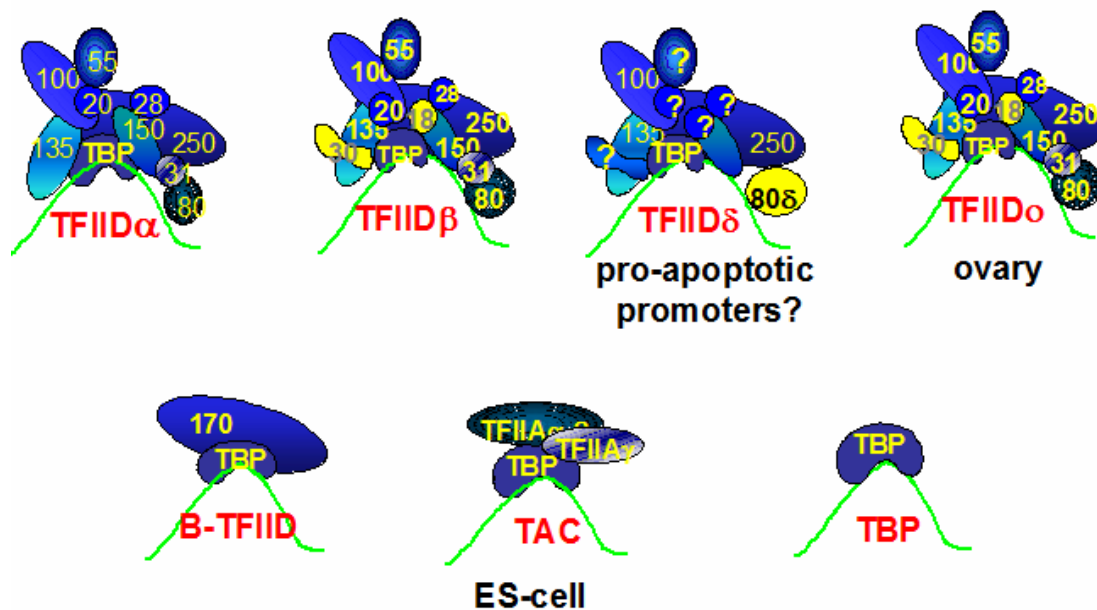
Η βελτίωση στη σύνθεση και αποτελεσματικότητά αντισωμάτων που αναγνωρίζουν το TBP και τα TAFs και η χρησιμοποίησή τους σε πειράματα

ανοσοκατακρήμνισης ήταν ένα σημαντικός λόγος που οδήγησε στην παρατήρηση ότι υπάρχουν εναλλακτικές μορφές του συμπλόκου TFIID. Διαφορετικής σύστασης TFIID σύμπλοκα μπορούν να υπάρχουν, είτε σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, είτε στον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό (**Εικόνα 9**).

Μελέτες *in vitro* αποκάλυψαν ότι υπάρχουν τουλάχιστον δυο σύμπλοκα TFIID στα ευκαρυωτικά κύτταρα, που απαρτίζονται από τις κοινές υπομονάδες TAF1, TAF4, TAF5, TAF6, TAF7, TAF9, TAF11, TAF12 (TFIID α) και επιπλέον τις υπομονάδες TAF10 και TAF13 που βρίσκονται στο TFIID β (Brou *et al.*, 1993; Jacq *et al.*, 1994).

Όμως επιπλέον υπάρχουν και σύμπλοκα TFIID που αποτελούνται από TAFs που εκφράζονται ειδικά σε κάποιους κυτταρικούς τύπους. Έτσι, έχει βρεθεί να εκφράζεται αποκλειστικά στα B λεμφοκύτταρα του ανθρώπου ο παράγοντας TAF4b, υπερέκφραση του οποίου είχε ως αποτέλεσμα αλλαγές στο επίπεδο μεταγραφικής ρύθμισης ορισμένων μόνο γονιδίων των κυττάρων (Dikstein *et al.*, 1996). Ένα σύμπλοκο TFIID που περιέχει τον παράγοντα TAF4b φαίνεται να ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων σημαντικών για την ανάπτυξη των ωθηκών (Freiman *et al.*, 2001). Σε μία ανάλογη διαδικασία, τη σπερματογένεση, καθοριστικό ρόλο έχει το TAF7L, παράλογο του παράγοντα TAF7 (Pointud *et al.*, 20003). Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί η παρατήρηση ότι σε κύτταρα που επάγονται σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης παρουσιάζεται ένα σύμπλοκο TFIID που φέρει την υπομονάδα TAF6 δ (Bell *et al.*, 2001). Στο σύμπλοκο αυτό που περιέχει το TAF6 δ δεν υπάρχει ο παράγοντας TAF9 που ετεροδιμερίζεται με το TAF6, το οποίο θεωρείται ότι είναι υπεύθυνο για την αλλαγή του προτύπου μεταγραφής ενός συνόλου γονιδίων του κυττάρου. Το γεγονός ότι μία επαγόμενη ισομορφή κάποιου TAF είναι δυνατόν να μεταβάλλει επιλεκτικά το πρότυπο έκφρασης κάποιων γονιδίων αναδεικνύει τη δυναμική σύνθεση του TFIID, που μπορεί να εξαρτάται από περιβαλλοντικά σήματα. Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί το σύμπλοκο B-TFIID, που δεν περιλαμβάνει κανένα από τους παράγοντες των TAFs του κλασικού TFIID, αλλά μια μόνο υπομονάδα το B-TAF1 (TAF $_{II}$ 170), που έχει ενεργότητα ATPάσης (Timmers *et al.*, 1992). Ο παράγοντας B-TAF1 αποτελεί έναν καταστολέα της μεταγραφής των γονιδίων που ενεργοποιούνται με την επίδραση του TBP, καθώς έχει βρεθεί ότι προσδένεται στο TBP και απομακρύνει τον παράγοντα από την αλληλουχία «TATA». Πρόσφατες

μελέτες όμως έχουν δείξει ότι ο μπορεί να συμμετέχει και στην μεταγραφική ενεργοποίηση ορισμένων γονιδίων B-TAF1 (Willy *et al.*, 2000). Επιπλέον, σε κύτταρα εμβρυϊκού καρκινώματος έχει απομονωθεί ένα σύμπλοκο που περιλαμβάνει TBP που αλληλεπιδρά με το πρόδρομο μόριο TFIIAαβ και TFIIAγ απουσία των υπόλοιπων TAFs, ενώ σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα δεν έχει ανιχνευτεί η παρουσία του TAC (Mitsiou *et al.*, 2000). Το σύμπλοκο εκείνο προσδένεται σε χρωματίνη *in vivo* και συμμετέχει στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων, όπως διαπιστώθηκε με πειράματα παροδικής διαμόλυνσης σε κύτταρα εμβρυϊκού καρκινώματος. Τέλος, πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα δείχνουν ότι στον υποκινητή ενός γονιδίου που δεν είναι ακόμα μεταγραφικά ενεργό αλλά έχει «δεσμευτεί» για ενεργοποίηση, υπάρχει προσδεμένο TBP απουσία των παραγόντων TAFs (Soutoglou *et al.*, 2002).



Εικόνα 9. Διαφορετικές εκδοχές του TFIIID συμπλόκου.

Οι διαφορετικοί τύποι του TFIIID συμπλόκου αναδεικνύουν την πιθανότητα να έχουν ειδικό ρόλο στην α) αναγνώριση διαφορετικών υποκινητών, β) την αλληλεπίδραση με διαφορετικούς βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες και γ) την απόκριση σε διαφορετικά περιβαλλοντικά σήματα.

Άλλα σύμπλοκα που περιέχουν TAFs

Οι παράγοντες TAFs (TBP-associated factors), όπως πολύ καθαρά φαίνεται από την ονομασία τους, για πολλά χρόνια πίστευαν ότι βρίσκονται αποκλειστικά σε σύμπλοκο με τον TBP. Παρολαυτά, τελευταία έχουν απομονωθεί διάφορα σύμπλοκα που περιέχουν TAFs, τόσο στο σακχαρομύκητα, όσο και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, στα οποία απουσιάζει ο TBP.

Έτσι, σε κύτταρα HeLa απομονώθηκε ένα σύμπλοκο που περιλαμβάνει TAFs αλλά όχι TBP και ονομάζεται TFTC (TBP-Free TAF-containing Complex) (Wieczorek *et al.*, 1998) (**Εικόνα 10.**). Το TFTC έχει δείξει ότι μπορεί να ενεργοποιήσει *in vitro* τη μεταγραφή γονιδίων που περιλαμβάνουν ή όχι αλληλουχία με το πλαίσιο «TATA» στον υποκινητή τους (Wieczorek *et al.*, 1998). Στο σύμπλοκο αυτό έχει βρεθεί ότι υπάρχουν το TAF4, TAF5, TAF6, TAF7, TAF9, TAF10 και TAF12, ενώ απουσιάζει η μεγάλη υπομονάδα του TFIID, TAF1 και οι TAF11 και TAF13. Το TFTC παρουσιάζει ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών, λόγω της παρουσίας της πρωτεΐνης GCN5 (Yanagisaga *et al.*, 2002), ενώ επίσης περιλαμβάνει την πρωτεΐνη TRRAP και πρωτεΐνες των οικογενειών Spt και Ada (Brand *et al.*, 1999).

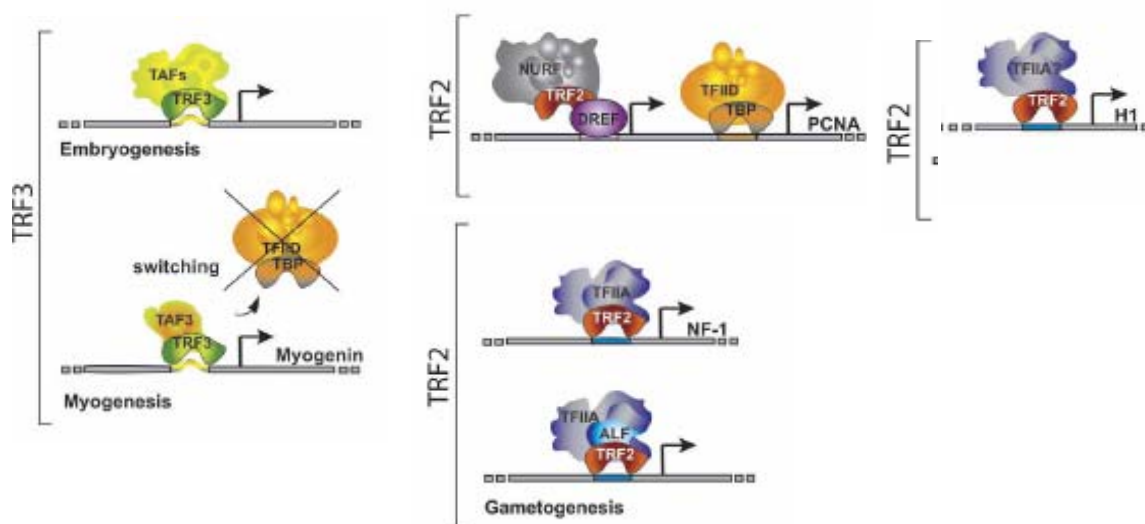
TAFs έχουν βρεθεί να υπάρχουν και σε δύο σύμπλοκα που εμφανίζουν ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης, το σύμπλοκο SAGA στο σακχαρομύκητα και το σύμπλοκο PCAF σε ανθρώπινα κύτταρα (Grant *et al.*, 1998; Ogryzko *et al.*, 1998). Το σύμπλοκο SAGA είχε αρχικά περιγραφεί να αποτελείται από τις πρωτεΐνες Gen5, από διάφορες πρωτεΐνες Ada (Ada1, Ada2, Ada3) και Spt (Spt3, Spt7, Spt8, Spt20) (Grant *et al.*, 1997). Εκτός όμως από αυτές τις πρωτεΐνες στο σύμπλοκο αυτό υπάρχουν και διάφορα TAFs (TAF5, TAF6, TAF9, TAF10 και TAF12). Το σύμπλοκο PCAF (p300/CBP associated factor complex) οφείλει την ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης στην καταλυτική υπομονάδα του, την ίδια την πρωτεΐνη PCAF, που είναι σε μεγάλο βαθμό ομόλογη με την πρωτεΐνη Gen5. Επιπλέον, περιέχει τα ανθρώπινα ομόλογα των πρωτεϊνών Ada2, Ada3 και Spt3 (Ogryzko *et al.*, 1998). Τα TAFs που είναι παρόντα σε αυτό το σύμπλοκο είναι τα TAF9, TAF10 και TAF12. Επίσης, ενώ δεν περιλαμβάνει τις υπομονάδες TAF5 και TAF6, περιέχει δύο παράλογα αυτών, τις

έναρξη κάποιων ομάδων γονιδίων μπορούν να καθοδηγήσουν και παράγοντες που εμφανίζουν ομοιότητα με τον παράγοντα TBP και ονομάζονται TRFs (TBP-related factors).

Στα σπονδυλωτά έχουν χαρακτηριστεί δύο TRFs, ο παράγοντας TRF2 ή TLF (TBP-Like factor) και ο παράγοντας TRF3. Αν και ο παράγοντας TRF2 εμφανίζει σε μεγάλο βαθμό ομοιότητα με το TBP, τα αμινοξικά κατάλοιπα του TBP που είναι απαραίτητα για την πρόσδεση στο DNA δεν είναι συντηρημένα στον TRF2, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν έχει την δυνατότητα πρόσδεσης στους υποκινητές των γονιδίων. Η αδυναμία του αυτή έχει επιβεβαιωθεί με *in vitro* πειράματα (Moore *et al.*, 1999). Παρολαυτά, αλληλεπιδρά με τον παράγοντα TFIIA σε καρκινικά κύτταρα HeLa, όπως επίσης και με τον παράγοντα ALF (TFIIA-like factor), που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο παράλογο του γονιδίου του TFIIA σε αρσενικά γαμετικά κύτταρα (Moore *et al.*, 1999; Teichmann *et al.*, 1999; Catena *et al.*, 2005). Το TRF2 δεν μπορεί να υποστηρίξει τη μεταγραφή γονιδίων *in vitro*, αντικαθιστώντας το TBP (Moore *et al.*, 1999). Τα πρώτα γονίδια στόχοι του TRF2 βρέθηκαν μετά από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε ασπόνδυλα και συγκεκριμένα στη Δροσόφιλα, όπου φάνηκε ότι το TRF2 συνδέεται με 18 πολυπεπτίδια, μεταξύ των οποίων κάποια από τα συστατικά του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης NURF, όπως η υπομονάδα ISWI που έχει ρόλο ΑΤΡασης και ο DREF (DNA replication-related factor) (Hochheimer *et al.*, 2002) **(Εικόνα 11.)**. Ο παράγοντας DREF ήταν γνωστό ότι έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και συγκεκριμένα του γονιδίου *PCNA*. Έτσι, αποκαλύφθηκε ότι ο TRF2 είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή του γονιδίου *PCNA* στη Δροσόφιλα, αφού προσδέεται σε ένα σημείο έναρξης της μεταγραφής ανωδικά ενός δεύτερου σημείου έναρξης στο οποίο φαίνεται να προσδέεται το σύμπλοκο TFIID (Hochheimer *et al.*, 2002). Επιπλέον, πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι ο παράγοντας TRF2 στη Δροσόφιλα ελέγχει τη μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την ιστόνη H1, στον υποκινητή του οποίου βρίσκεται προσδεμένο σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, καθώς και του γονιδίου NF-1 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. (Isogai *et al.*, 2007; Chong *et al.*, 2005) **(Εικόνα 11.)**.

Ο παράγοντας TRF3 έχει ήδη χαρακτηριστεί σε κύτταρα ανθρώπου, ποντικού και βατράχου, ενώ τμήματα της αλληλουχίας του έχουν βρεθεί και σε βάσεις δεδομένων με ESTs σε διάφορα είδη ιχθύων και άλλων σπονδυλωτών (Persengien *et al.*, 2003; Deato and Tjian, 2007; Jallow *et al.*, 2004). Ο TRF3 έχει την ιδιότητα να προσδένεται στο πλαίσιο «TATA», όπως ο TBP, να αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες TFIIA και TFIIIB και να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων *in vitro* (Bartfai *et al.*, 2004; Jallow *et al.*, 2004). Σε μία πρόσφατη μελέτη φαίνεται ότι ο TRF3 σχηματίζει σύμπλοκο με το TAF3 ελέγχοντας τη μεταγραφή γονιδίων καθοριστικών για τη διαφοροποίηση των σκελετικών μυών (Εικόνα 11.). Μάλιστα το σύμπλοκο αυτό αντικαθιστά το τυπικό σύμπλοκο TFIID σε πλήρως διαφοροποιημένα μυϊκά κύτταρα (Deato and Tjian, 2007).

Παρά το γεγονός ότι οι παράγοντες TRFs μπορούν να ελέγχουν τη μεταγραφή κάποιων ομάδων γονιδίων, μένει ακόμα να διασαφηνιστεί ο ακριβής μηχανισμός της λειτουργίας τους.



Εικόνα 11. Γονίδια στόχοι των παραγόντων TRFs στη Δροσόφιλα και σε σπονδυλωτά. Οι υποκινητές γονιδίων στους οποίους στρατολογούνται ο παράγοντας TRF3 (αριστερά) και ο παράγοντας TRF2 (δεξιά). Λεπτομέρειες στο κείμενο. (Reina and Hernandez, 2007).

Ο παράγοντας TAF10

Η μεταγραφική ενεργοποίηση ενός γονιδίου, όπως είδαμε και παραπάνω, απαιτεί τη συνδυασμένη δράση διαφόρων πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, που συναρμολογούν ένα ενεργό προεναρκτήριο σύμπλοκο (PIC) στον υποκινητή ενός γονιδίου. Βασικό ρόλο στην αναγνώριση της περιοχής του υποκινητή ενός γονιδίου και της συναρμολόγησης του PIC συμπλόκου σε αυτήν έχει ο βασικός μεταγραφικός παράγοντας TFIID, που είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών. Το σύμπλοκο TFIID στην πιο συνηθισμένη του μορφή αποτελείται από τον TBP και 14 TAFs. Ένας από τους παράγοντες του TFIID συμπλόκου είναι ο παράγοντας TAF10 (TAF_{II}30).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον παράγοντα TAF10 αποτελείται από πέντε (5) εξόνια και παρουσιάζει υψηλή ομολογία με το ορθόλογό του στον άνθρωπο (Sheer *et al.*, 1995). Η κωδική περιοχή του γονιδίου *TAF10* αποτελείται από 759 νουκλεοτίδια, που εμφανίζουν 89% ομολογία με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία σε ανθρώπινα κύτταρα και κωδικοποιεί για 218 αμινοξέα, που παρουσιάζουν 90.3% ομολογία με την αμινοξική αλληλουχία του γονιδίου στον άνθρωπο. Πειράματα ανοσοιστοχημείας έδειξαν ότι το γονίδιο TAF10 εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα των εμβρύων στο στάδιο της βλαστοκύστης (3.5 dpc), τόσο στα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, όσο και στα τροφοβλαστικά κύτταρα. Στις 5.5 ημέρες εμβρυϊκά το mRNA του *TAF10* φαίνεται να παράγεται επίσης σε όλα τα κύτταρα, αλλά παρατηρούνται ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα του εμβρυϊκού εκτοδέρματος, όπως παρατηρήθηκε με πειράματα υβριδοποίησης *in situ*. Αργότερα στις 7.5 ημέρες εμβρυϊκά τα επίπεδα του παραγόμενου mRNA είναι υψηλά στο εμβρυϊκό μεσόδερμα. Στις 12.5 ημέρες εμβρυϊκά το mRNA του *TAF10* συντίθεται σε υψηλά επίπεδα στους περισσότερους ιστούς. Έτσι, εκφράζεται στο επιθήλιο του εντέρου, στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, στο ήπαρ, στο πάγκρεας, στα νεφρά, στη σπλήνα, στις γονάδες, στους μύες, στη γλώσσα, στους σιελογόνους αδένες, στην περιοχή της κεφαλής και στους πνεύμονες, ενώ δεν εκφράζεται στην καρδιά και στο ουροποιητικό σύστημα (Mohan *et al.*, 2003).

Πειράματα σε εμβρυϊκά κύτταρα καρκινώματος F9 έχουν δείξει ότι ο παράγοντας TAF10 είναι απαραίτητος για την επιβίωση των κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους

σε ενδόδερμα, καθώς απενεργοποίηση του γονιδίου *TAF10* είχε ως αποτέλεσμα τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης (Metzger *et al.*, 1999). Επιπλέον, η απουσία του TAF10 σε κύτταρα F9 προκαλούσε αποσυναρμολόγηση του TFIIID συμπλόκου (Mohan *et al.*, 2003). Η απαλοιφή του κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη στο ποντίκι οδηγούσε στο θάνατο των εμβρύων, λόγω αυξημένου κυτταρικού θανάτου των κυττάρων της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (Mohan *et al.*, 2003). Επιπλέον, η απουσία του TAF10 στο δέρμα ποντικών έδειξε ότι είναι σημαντικό στην ανάπτυξη των κυττάρων του δέρματος στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, αλλά όχι και για τα κερατινοκύτταρα του δέρματος ενηλίκων ποντικών (Indra *et al.*, 2005). Όμως, εκτός από τις παραπάνω ενδείξεις για το διαφορετικό ρόλο του TAF10 σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς, δεν έχει μελετηθεί σε βάθος ο ρόλος του στη μεταγραφή γονιδίων *in vivo*.

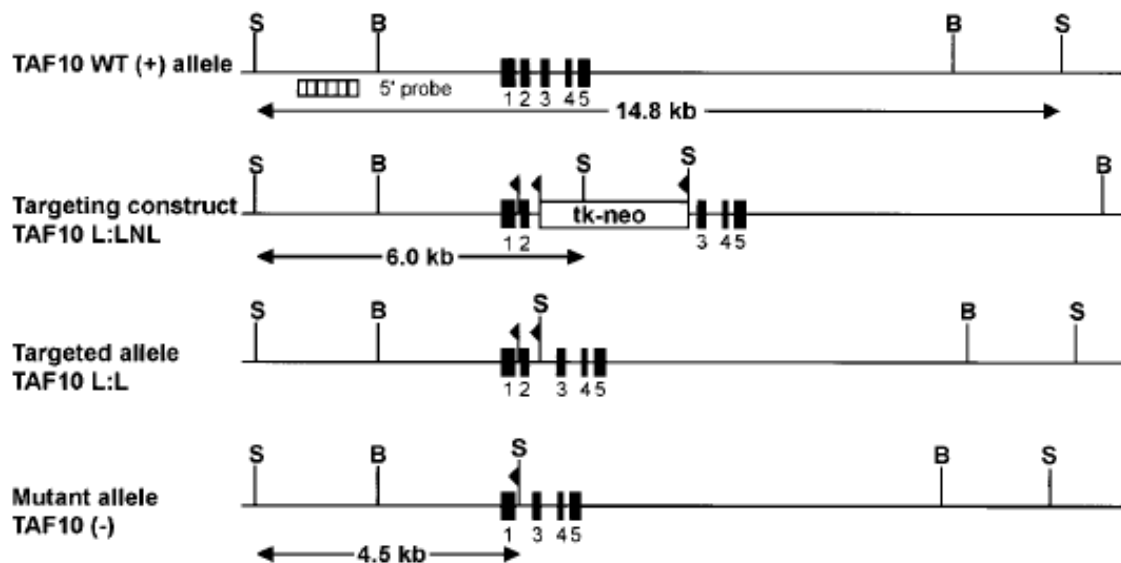
Σκοπός της παρούσας εργασίας

Το ήπαρ αποτελεί ένα πολύ καλό σύστημα για τη μελέτη του ρόλου ενός μεταγραφικού παράγοντα στη μεταγραφή, τόσο σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (ήπαρ εμβρύων), όσο και σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα (ήπαρ ενηλίκων ποντικών). Έτσι, προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της βασικής μεταγραφικής μηχανής στη ρύθμιση ιστο-ειδικών γονιδίων κατά την ανάπτυξη, πραγματοποιήσαμε ηπατοειδική απενεργοποίηση του *TAF10*, έναν από τους κύριους παράγοντες του TFIIID συμπλόκου, στα στάδια της εμβρυϊκής και μεταγεννητικής ανάπτυξης του ποντικού. Οι επιμέρους στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν: α) η διερεύνηση των επιπτώσεων της ηπατοειδικής απενεργοποίησης του *TAF10* στο φαινότυπο των ποντικών και στην αρχιτεκτονική δομή του ήπατος τους, καθώς και ο ρόλος του στην ανάπτυξη του ήπατος του ποντικού. β) Η μελέτη του ρόλου του TAF10 στη σταθερότητα του συμπλόκου TFIIID στο ήπαρ του ποντικού και τέλος γ) η μελέτη του ρόλου του TAF10 στη ρύθμιση της μεταγραφής των ηπατικών γονιδίων, τόσο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του ήπατος του ποντικού, όσο και σε πλήρως διαφοροποιημένα ηπατοκύτταρα στο ήπαρ ενηλίκων.

Αποτελέσματα

Απενεργοποίηση του γονιδίου *TAF10* στα ηπατοκύτταρα

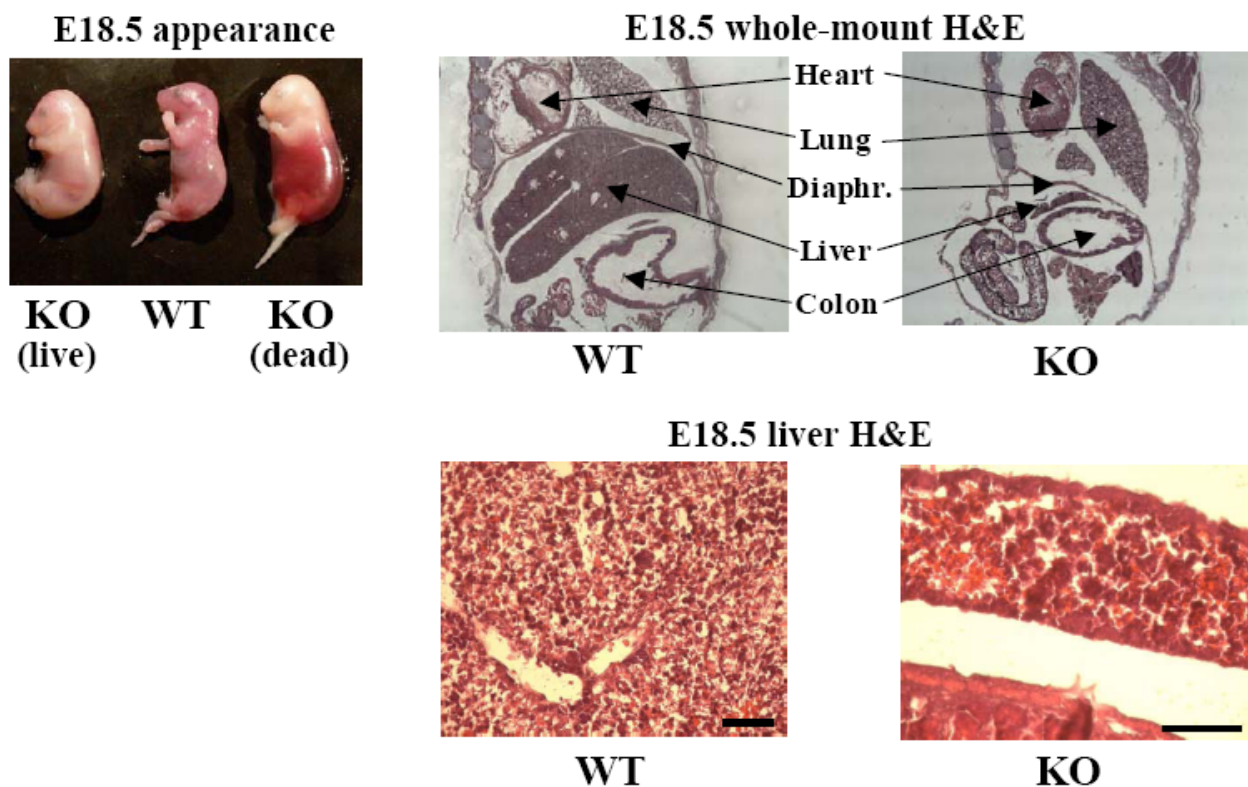
Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο του *TAF10* στη μεταγραφική ρύθμιση των ηπατικών γονιδίων πραγματοποιήθηκε ηπατοειδική εξάλειψη του γονιδίου *TAF10* χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του Cre-loxP ανασυνδυασμού. Έτσι, διασταυρώθηκαν ποντίκια με γονότυπο *TAF10^{loxP}*, τα οποία έχουν loxP θέσεις αναγνώρισης της Cre ρεκομπινάσης εκατέρωθεν του δευτέρου εξωνίου του γονιδίου *TAF10*, με διαγονιδιακά ποντίκια *Alb-Cre* (Hayhurst *et al.*, 2001) και *Alfp-Cre* (Coffinier *et al.*, 2002), στα οποία η έκφραση της Cre ρεκομπινάσης πραγματοποιείται σε ενήλικο και εμβρυϊκό στάδιο αντίστοιχα (**Εικόνα 1**). Σε ποντίκια με γονοτύπους *TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre* και *TAF10^{lox/lox}/Alfp-Cre* η απαλοιφή του εξωνίου 2 είναι πλήρης 15-22 ημέρες μεταγεννητικά και την εμβρυϊκή ημέρα 15.5 αντίστοιχα.



Εικόνα 1. Ηπατοειδική απενεργοποίηση του γονιδίου *TAF10* στο ποντίκι. Σχηματική αναπαράσταση της γενωμικής περιοχής του γονιδίου *TAF10* στο ποντίκι, ο φορέας για τη στόχευση του γονιδίου, η περιοχή του γονιδίου *TAF10* με τις loxP θέσεις και η περιοχή μετά την εξάλειψη του δευτέρου εξωνίου στα ηπατοκύτταρα, που πραγματοποιήθηκε με διασταύρωση με ποντίκια *Alb-Cre* και *Alfp-Cre* σε ενήλικο και εμβρυϊκό στάδιο αντίστοιχα. Τα εξώνια αναπαριστώνται με μαύρα κουτιά και οι θέσεις loxP με σημαίες. B: *Bam*HI, S: *Sac*I.

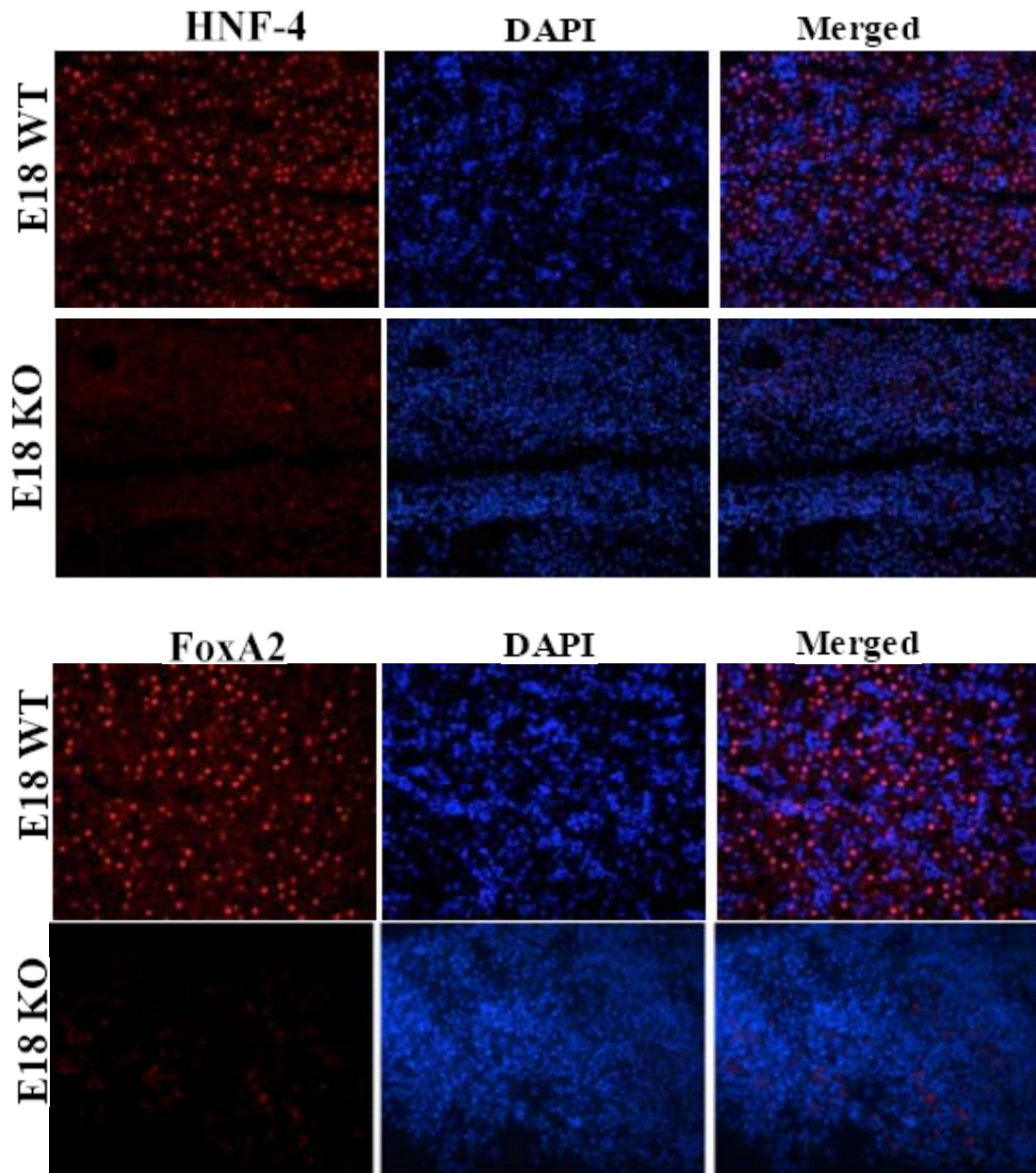
Ανάλυση του φαινοτύπου των ηπατοειδικών TAF10KO εμβρύων

Η απενεργοποίηση του γονιδίου *TAF10* την εμβρυϊκή ημέρα 15.5 είχε ως αποτέλεσμα τα έμβρυα να μη γεννιούνται. Ο μισός περίπου από τον αριθμό των *TAF10^{lox/lox}/Alfp-Cre* εμβρύων την εμβρυϊκή ημέρα 18.5 ήταν νεκρά με μαζική συγκέντρωση αίματος σε όλο το σώμα τους, ενώ τα υπόλοιπα ήταν ζωντανά, αλλά είχαν αναιμική εμφάνιση (**Εικόνα 2.**). Η μακροσκοπική και ιστολογική εξέταση των ζωντανών TAF10KO εμβρύων αποκάλυψε δραματική μείωση στο μέγεθος του ήπατός, ενώ τα υπόλοιπα όργανα τους είχαν φυσιολογική μορφολογία (**Εικόνα 2.**). Πραγματοποιώντας χρώσεις αιματοξυλίνης και ηωσίνης, που βάφουν τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα αντίστοιχα, σε τομές από το ήπαρ TAF10KO εμβρύων διαπιστώθηκε ότι η πλειονότητα των κυττάρων που ανιχνεύθηκαν δεν μοιάζουν με ηπατοκύτταρα, αλλά είναι μονοπυρηνικά κύτταρα ή ερυθροκύτταρα (**Εικόνα 2.**).

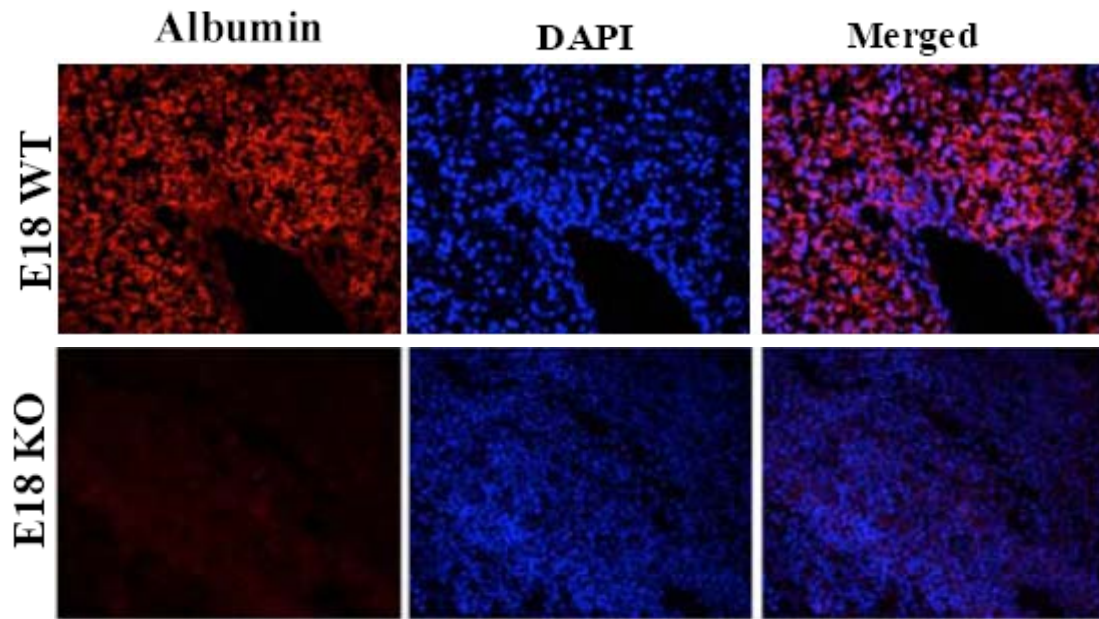


Εικόνα. 2. Φαινότυπος των ηπατοειδικών TAF10KO εμβρύων. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από έμβρυα την 18.5 εμβρυϊκή ημέρα (E18.5) και χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης σε τομές από ολόκληρα έμβρυα ή τομές από το ήπαρ εμβρύων με γονότυπο *TAF10^{lox/lox}/Alfp-Cre* και έμβρυα αγρίου τύπου.

Πειράματα ανοσοφθορισμού σε τομές από το ήπαρ αυτών των εμβρύων με αντισώματα που αναγνωρίζουν κλασικούς ηπατικούς μάρτυρες, όπως *HNF4a*, *FoxA2* (Εικόνα 3.), που εντοπίζονται φυσιολογικά στον πυρήνα και *ALB* (Εικόνα 4.), που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, έδειξαν την πλήρη απουσία των προϊόντων αυτών των γονιδίων από τα κύτταρα, επιβεβαιώνοντας την απουσία ηπατοκυττάρων από το ήπαρ των TAF10KO ποντικών.



Εικόνα 3. Απουσία των χαρακτηριστικών ηπατικών γονιδίων *HNF4a*, *FoxA2* από το ήπαρ TAF10KO εμβρύων. Χρώση ανοσοφθορισμού σε τομές από το ήπαρ *TAF10^{lox/lox}/Alfp-Cre* και αγρίου τύπου εμβρύων την 18.5 εμβρυϊκή ημέρα.



Εικόνα 4. Έκφραση του γονιδίου της αλβουμίνης (*ALB*) στο ήπαρ TAF10KO εμβρύων. Χρώση ανοσοφθορισμού σε τομές από το ήπαρ $TAF10^{lox/lox}/Alfp-Cre$ και αγρίου τύπου εμβρύων την 18.5 εμβρυϊκή ημέρα.

Τα αποτελέσματα αυτά λοιπόν αναδεικνύουν ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου *TAF10* εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων και οδηγεί στην ανεπιτυχή οργανογένεση του ήπατος και στη συσσώρευση άλλων κυτταρικών τύπων στο ήπαρ των TAF10KO εμβρύων (αναφορά και παρακάτω).

Ανάλυση του φαινοτύπου των ηπατοειδικών TAF10KO ενήλικων ποντικών

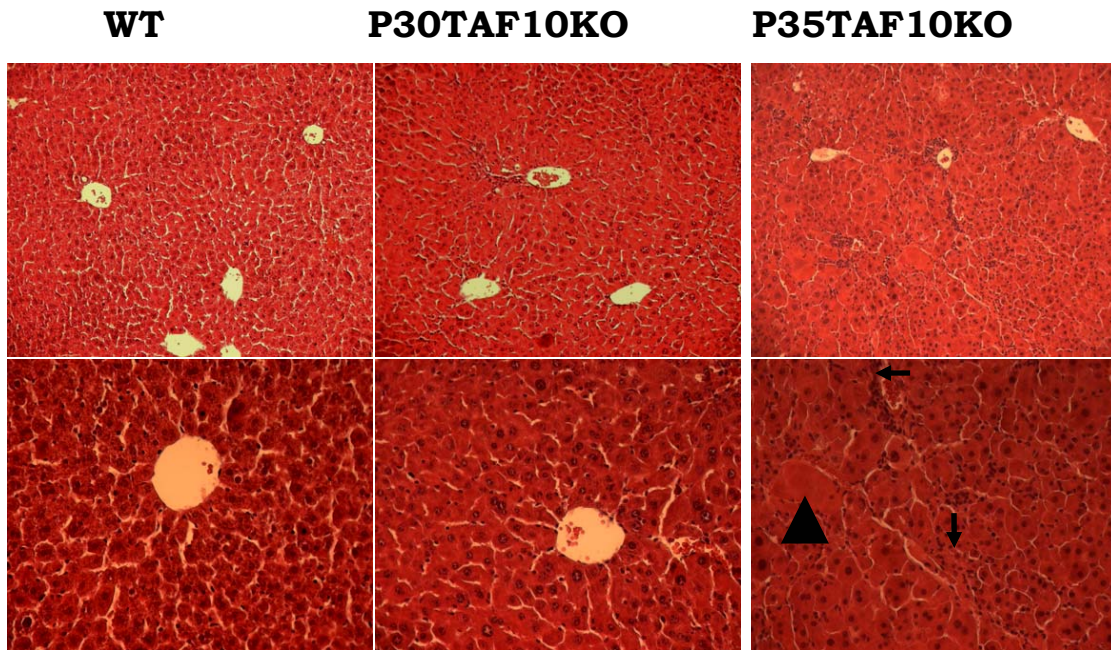
Τα ενήλικα TAF10KO ποντίκια παρουσίαζαν προβληματική ανάπτυξη από τη δεύτερη εβδομάδα μετά την γέννηση τους, γεγονός που οδηγούσε σε φαινότυπο συμβατό με νανισμό. Η μακροσκοπική ανάλυση τους αποκάλυψε ότι το μέγεθος των ποντικών με γονότυπο $TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre$ ήταν μειωμένο περίπου στο μισό αυτού των φυσιολογικών στις 30 ημέρες μεταγεννητικά, ενώ παρατηρήθηκε παράλληλη μείωση στο μέγεθος διαφόρων οργάνων, μεταξύ των οποίων και του ήπατος (**Εικόνα 5**). Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος του βάρους σώματος για τα ποντίκια αγρίου τύπου

που χρησιμοποιήσαμε ήταν 21.6 γραμ. (± 1.2) και για το ήπαρ τους 1.1 γραμ. (± 0.11), ενώ για ποντίκια $TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre$ ήταν 10.4 γραμ. (± 2.3) και για το ήπαρ τους 0.37 γραμ. (± 0.07).



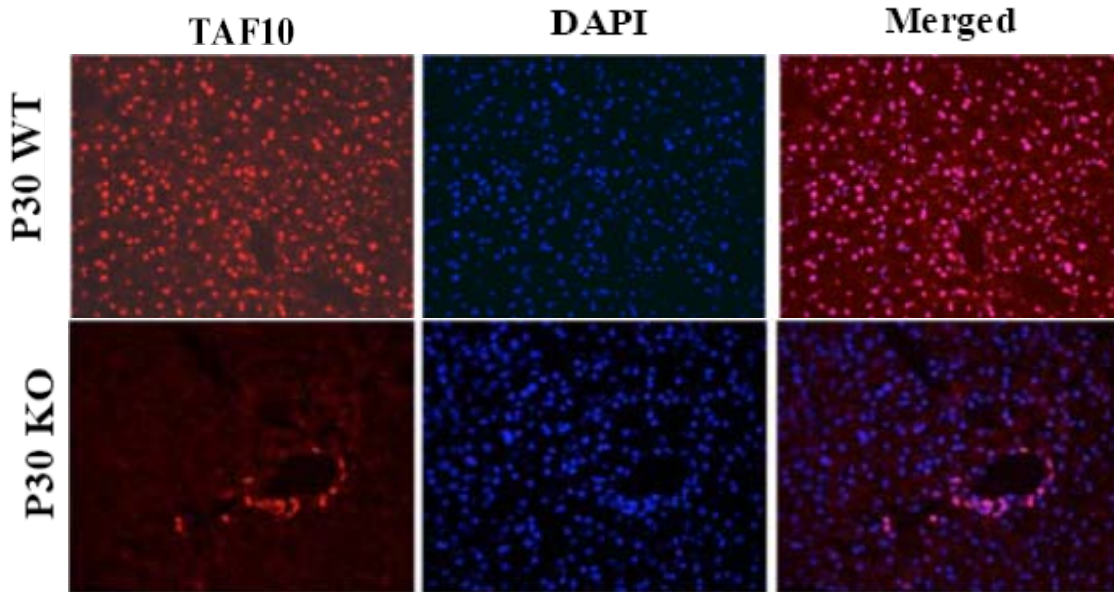
Εικόνα 5. Φαινότυπος των ηπατοειδικών TAF10KO ενήλικων ποντικών. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από ποντίκια αγρίου τύπου και $TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre$ ποντίκια την 30^η ημέρα μεταγεννητικά (P30) (αριστερά), καθώς και εικόνες από το ήπαρ τους (δεξιά).

Χρώσεις αιματοξυλίνης και ηωσίνης έδειξαν ότι δεν επηρεάζεται η αρχιτεκτονική δομή του ήπατος και η μορφολογία των ηπατοκυττάρων, αν και κάποια ηπατοκύτταρα έμοιαζαν σχετικά μεγαλύτερα του φυσιολογικού (**Εικόνα 7.**). Έτσι λοιπόν, τα ποντίκια $TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre$ έδειχναν φυσιολογικά στις 30 ημέρες μεταγεννητικά, με εξαίρεση τον νανισμό που παρουσίαζαν. Ξεκινώντας από την 34-35 ημέρα μεταγεννητικά παρατηρήθηκε μαζικός θάνατός τους, ενώ κανένα από τα ποντίκια δεν κατάφερε να επιβιώσει έως την 38 ημέρα μεταγεννητικά. Οι χρώσεις αιματοξυλίνης και ηωσίνης σε τομές από το ήπαρ ποντικών 35 ημερών έδειξαν ότι απουσία του TAF10 το ηπατικό παρέγχυμα παρουσίαζε μια εικόνα αποδιοργάνωσης σε σύγκριση με το ποντίκι ελέγχου (**Εικόνα 7.**). Επιπλέον, τα ηπατοκύτταρα είναι μεγαλύτερα, ενώ παρατηρείται συσσώρευση λεμφοκυττάρων στο ήπαρ TAF10KO ποντικών, που υποδηλώνει την συσσώρευση τοξικών ουσιών. Στα πειράματα της παρούσα εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα ποντίκια 30 ημερών, των οποίων τα ηπατοκύτταρα είναι ακόμα φυσιολογικά και δεν έχουν TAF10 πρωτεΐνη για 8-15 ημέρες.



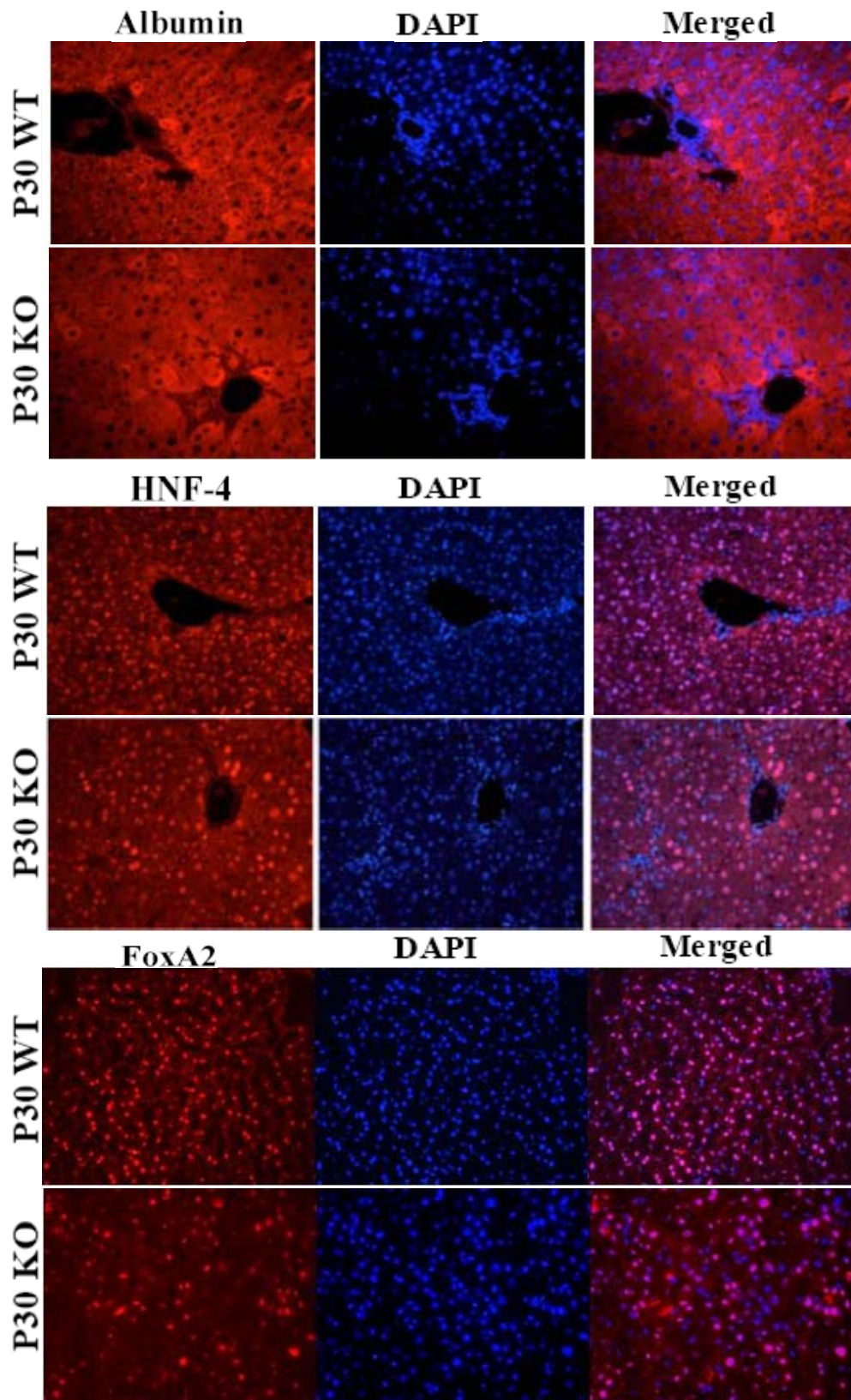
Εικόνα 7. Η μορφολογία του ήπατος $TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre$ ποντικών στις 30 και 35 ημέρες μεταγεννητικά. Χρώσεις αιματοξυλίνης και ηωσίνης σε τομές από το ήπαρ ενήλικων ποντικών με γονότυπο $TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre$ και ποντικών αγρίου τύπου. Φαίνεται χαρακτηριστικά η συσσώρευση λεμφοκυττάρων (βέλη) και τα υπερτροφικά ηπατοκύτταρα στις 35 ημέρες μεταγεννητικά (κεφαλή βέλους). 20x μεγέθυνση (πάνω) και 40x μεγέθυνση (κάτω).

Με πείραμα ανοσοφθορισμού σε τομές από το ήπαρ ενήλικων ποντικών 30 ημερών, χρησιμοποιώντας αντίσωμα που αναγνωρίζει τον παράγοντα TAF10 παρατηρήθηκε η επιλεκτική απουσία του από τα ηπατοκύτταρα σε TAF10KO ποντίκια, ενώ μπορούσε να ανιχνευθεί σε επιθηλιακά κύτταρα (**Εικόνα 8**). Με αυτό το πείραμα επιβεβαιώσαμε την ηπατοειδική απαλοιφή του δευτέρου εξωνίου του γονιδίου $TAF10$, που οφείλεται στην ηπατοειδική έκφραση της Cre ρεκομπινάσης. Η παρουσία της πρωτεΐνης του TAF10 στα επιθηλιακά κύτταρα επιβεβαίωσε και την παρατήρηση κάποιας μικρής ποσότητας mRNA, όπως φαίνεται παρακάτω, το οποίο οφείλεται στην παρουσία αυτών των κυττάρων στο ήπαρ.



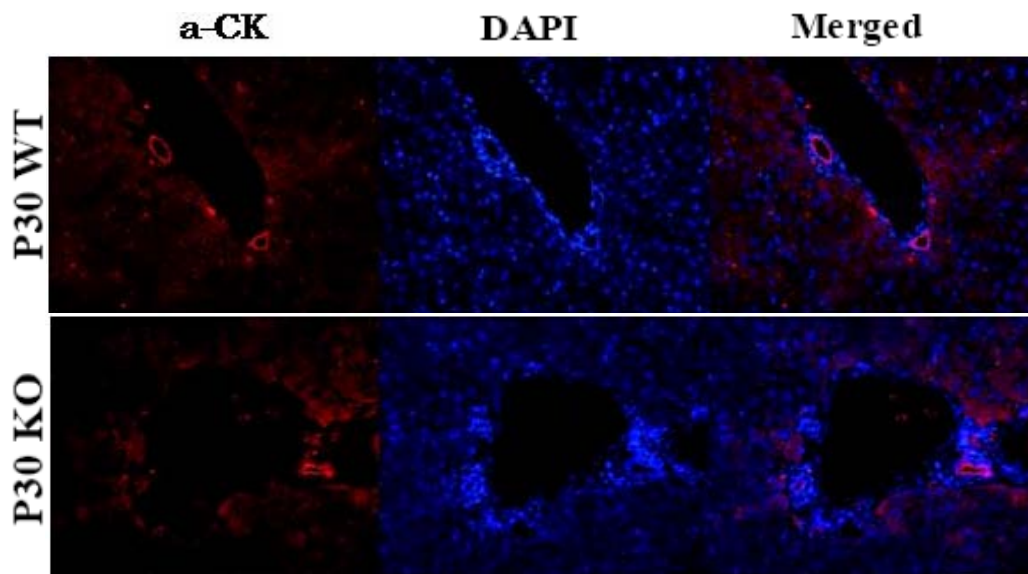
Εικόνα 8. Ηπατοειδική απαλοιφή του γονιδίου *TAF10*. Πείραμα ανοσοφθορισμού με αντίσωμα για τον παράγοντα *TAF10* σε τομές από το ήπαρ ενήλικων ποντικών με γονότυπο *TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre* και αγρίου τύπου, όπου φαίνεται η απουσία του μόνο από τα ηπατοκύτταρα, ενώ εξακολουθεί να εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που εκφράζουν πρωτεϊνικούς-δείκτες κυτταρικών τύπων του ήπατος και συγκεκριμένα ηπατοκυττάρων (*ALB*, *HNF4a*, *FoxA2*) και χολαγγειοκυττάρων (*CK-19*), με σκοπό να ελεγχθεί η πιθανότητα αλλαγής στην κυτταρική σύσταση του ήπατος, απουσία του *TAF10*. Έτσι, με χρώση ανοσοφθορισμού με κατάλληλα αντισώματα παρατηρήθηκε διατήρηση των επιπέδων έκφρασης των ηπατοειδικών γονιδίων *ALB*, *HNF4a*, *FoxA2* (**Εικόνα 9**). Η έκφραση της πρωτεΐνης της αλβουμίνης (*ALB*) ήταν ομογενής στο κυτταρόπλασμα όλων των ηπατοκυττάρων, ενώ απουσίαζε όπως είναι φυσιολογικό από τα επιθηλιακά κύτταρα, που απαντώνται στο ήπαρ. Επίσης, τα πρωτεϊνικά προϊόντα των γονιδίων *HNF4a* και *FoxA2* εντοπίζονται στον πυρήνα και η έκφρασή τους περιορίζεται στα ηπατοκύτταρα, έχοντας ανάλογο πρότυπο έκφρασης με τα ποντίκια αγρίου τύπου.



Εικόνα 9. Διατήρηση των επιπέδων έκφρασης χαρακτηριστικών ηπατικών γονιδίων *ALB*, *HNF4a*, *FoxA2* στο ήπαρ *TAF10*KO ενηλίκων. Χρώση ανοσοφθορισμού σε τομές από το ήπαρ *TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre* και αγρίου τύπου ποντικών.

Ανάλογη εικόνα παρατηρήσαμε και για το γονίδιο *CK-19* (Εικόνα 10.), το οποίο φαίνεται να εκφράζεται αυστηρά στα επιθηλιακά κύτταρα του τοιχώματος των σωληνίσκων που συνδέουν το ήπαρ με τη χοληδόχο κύστη ακόμα και μετά την απενεργοποίηση του TAF10. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει καμμία αλλαγή στη κυτταρική σύσταση του ήπατος των TAF10KO ποντικών και οι διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί στο ήπαρ ενηλίκων διατηρούν το χαρακτήρα τους αναλλοίωτο.

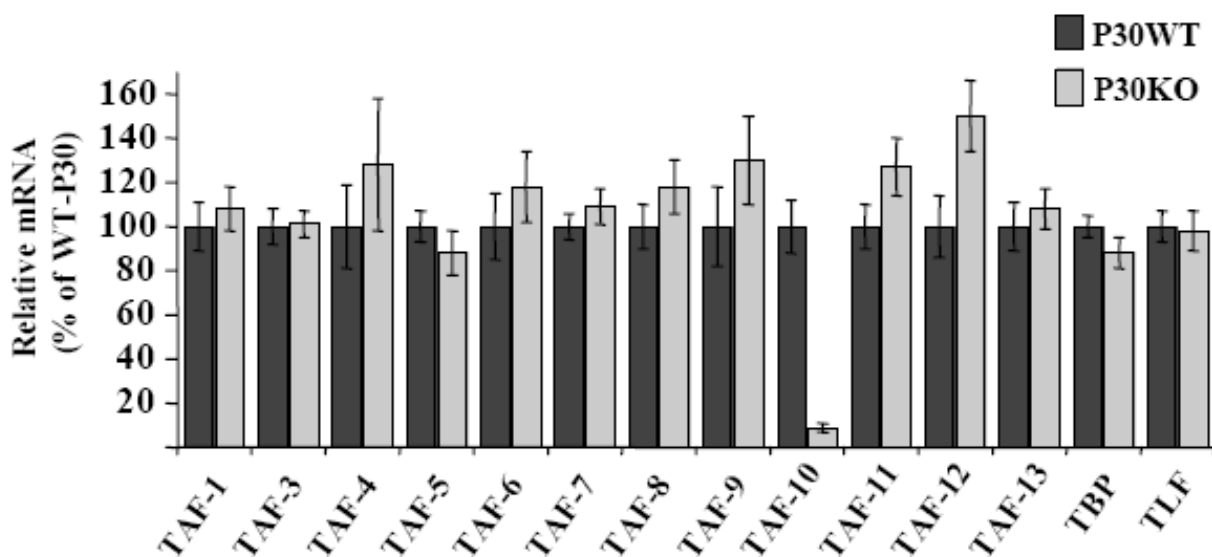


Εικόνα 10. Διατήρηση του χαρακτήρα των άλλων κυτταρικών τύπων που απαντώνται στο ήπαρ TAF10KO ενηλίκων. Χρώση ανοσοφθορισμού σε τομές από το ήπαρ *TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre* και αγρίου τύπου ποντικών.

Μελέτη της σταθερότητας του σύμπλοκου TFIID

Στη συνέχεια μελετήσαμε τις επιπτώσεις της εξάλειψης του TAF10 στη σταθερότητα του σύμπλοκου TFIID. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε cDNAs (ανάλυση RT-PCR) από δείγματα ολικού ηπατικού RNA, για να προσδιορίσουμε τις συνέπειες της απαλοιφής του *TAF10* στα επίπεδα του mRNA των διαφορετικών υπομονάδων του TFIID. Από τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων φάνηκε ότι δεν επηρεάζονται τα επίπεδα τους,

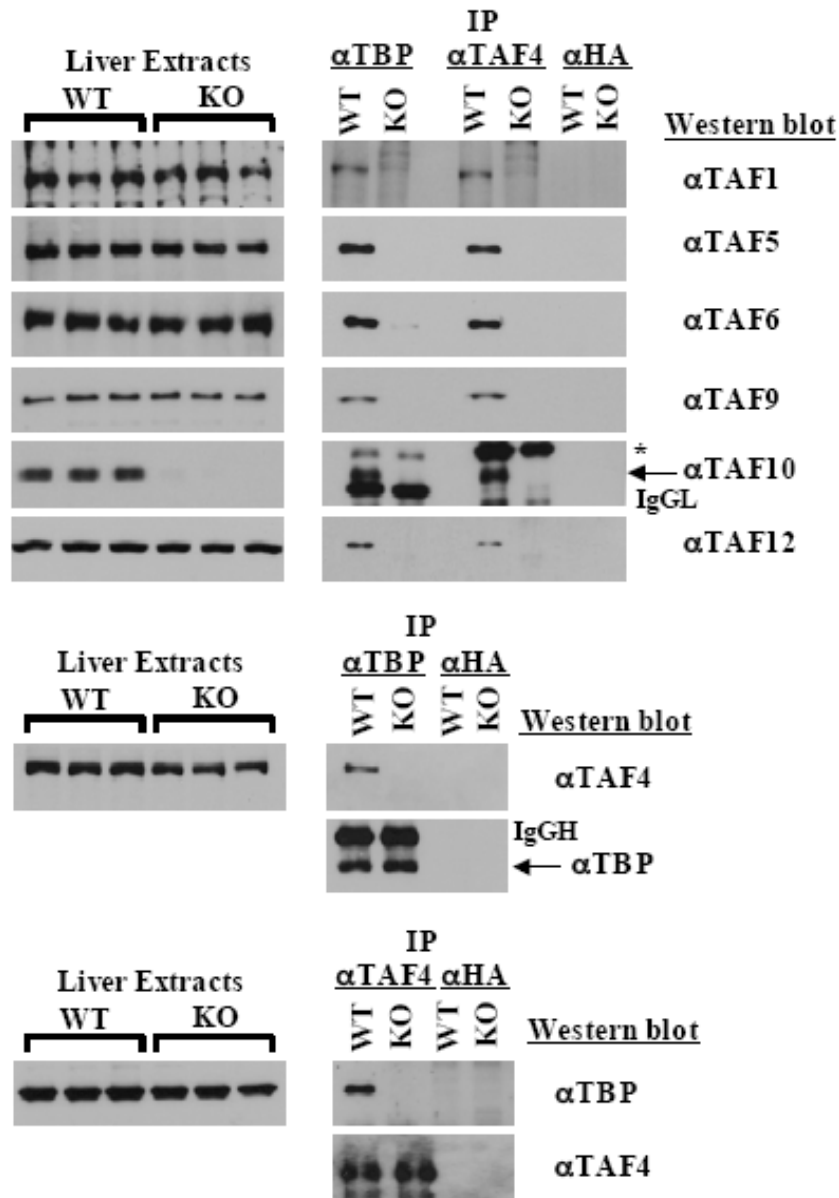
με εξαίρεση τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου *TAF10*, που μειώνονται δραματικά περίπου στο 10% των αντίστοιχων σε ποντίκια αγρίου τύπου (Εικόνα 11.). Τα χαμηλά επίπεδα mRNA του *TAF10* που ακόμα ανιχνεύονται οφείλονται στην παρουσία και άλλων κυτταρικών τύπων στο ήπαρ των TAF10KO ποντικών, εκτός από ηπατοκύτταρα στα οποία όπως είναι φυσικό δεν παρατηρείται απενεργοποίηση του. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με τις παρατηρήσεις που έγιναν στα πειράματα ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση του πρωτεϊνικού προϊόντος του *TAF10*, που φαίνεται να εκφράζεται ακόμα σε χολαγγειοκύτταρα.



Εικόνα 11. Η απενεργοποίηση του *TAF10* δεν επηρεάζει τα επίπεδα του mRNA των επιμέρους υπομονάδων του TFIIID συμπλόκου. Ανάλυση RT-PCR που πραγματοποιήθηκε με δείγματα ολικού RNA από το ήπαρ τόσο ποντικών αγρίου τύπου 30 ημερών (σκουρόχρωμες ράβδοι), όσο και ποντικών με γονότυπο *TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre* (γκρι ράβδοι). Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των τιμών που προσδιορίστηκαν με το mRNA του γονιδίου *GAPDH* και εκφράστηκαν ως ποσοστό του μέσου όρου των τιμών της έκφρασης σε αγρίου τύπου ποντίκια. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο των τιμών και το στατιστικό λάθος για 10 διαφορετικά άτομα σε κάθε περίπτωση.

Πειράματα ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας αντισώματα που αναγνωρίζουν διαφορετικές υπομονάδες του συμπλόκου TFIIID σε πυρηνικά εκχυλίσματα από *TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre* και ποντίκια αγρίου τύπου έδειξαν ότι δεν επηρεάζονται ούτε τα

πρωτεϊνικά επίπεδα των διαφόρων υπομονάδων του TFIID, με εξαίρεση τα πρωτεϊνικά επίπεδα του TAF10 παράγοντα, που εξαφανίζονται (Εικόνα 12.).

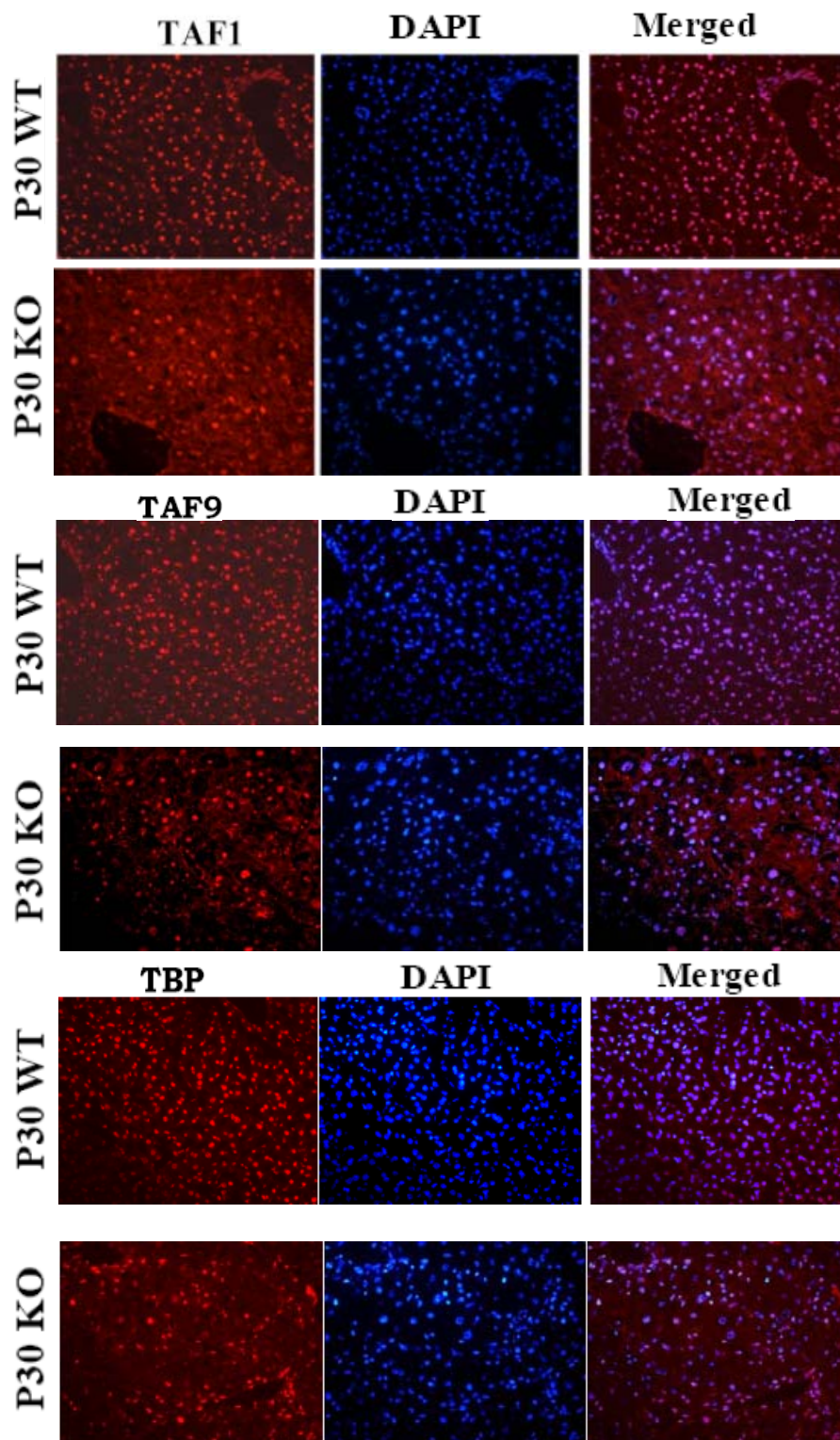


Εικόνα 12. Η απενεργοποίηση του TAF10 δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα των επιμέρους υπομονάδων του TFIID συμπλόκου, αλλά προκαλεί την αποσυναρμολόγησή του. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα από το ήπαρ τριών διαφορετικών ποντικών $TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre$ και αγρίου τύπου (αριστερά) ή αναμείχθηκαν και ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντίσωμα για TBP, TAF4 ή aHA (ελέγχου) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα ανοσοαποτύπωσης (δεξιά) με τα αντισώματα που υποδεικνύονται στην εικόνα.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμισης σε πυρηνικά εκχυλίσματα φυσιολογικών και TAF10KO ποντικών με αντίσωμα, που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη TBP έναν από τους βασικούς παράγοντες του σύμπλοκου TFIID. Από το συγκεκριμένο πείραμα αναμενόταν μαζί με τον παράγοντα TBP να κατακρημνιστούν και οι υπόλοιπες υπομονάδες του συμπλόκου, γεγονός που θα σήμαινε την παρουσία ενός σταθερού συμπλόκου TFIID. Με πειράματα ανοσοαποτύπωσης διαπιστώθηκε η απουσία των υπομονάδων, που εξετάστηκαν, TAF1, TAF4, TAF5, TAF6, TAF9, TAF10, TAF12, στα εκχυλίσματα των TAF10KO ποντικών, ενώ υπήρχαν στα εκχυλίσματα των φυσιολογικών (**Εικόνα 12.**). Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την απουσία σταθερού TFIID συμπλόκου στο ήπαρ των TAF10KO ποντικών. Ανεξάρτητα, έγιναν και πειράματα ανοσοκατακρήμισης με αντίσωμα που αναγνωρίζει έναν άλλο παράγοντα του συμπλόκου, την πρωτεΐνη TAF4. Και σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε ανοσοκατακρήμιση και των υπολοίπων υπομονάδων του συμπλόκου μαζί με τον TAF4, ενδεικτικό της απουσίας του TFIID στο ήπαρ TAF10KO ποντικών (**Εικόνα 12.**).

Πειράματα ανοσοφθορισμού σε τομές από ήπαρ φυσιολογικών και TAF10KO ποντικών, χρησιμοποιώντας αντισώματα που αναγνωρίζουν κάποιες από τις υπομονάδες του συμπλόκου επιβεβαίωσαν ότι δεν αλλάζουν τα επίπεδα έκφρασης των TAFs στα ηπατοκύτταρα (**Εικόνα 13.**). Η χρώση που εμφανιζόταν ήταν πυρηνική και ομογενής.

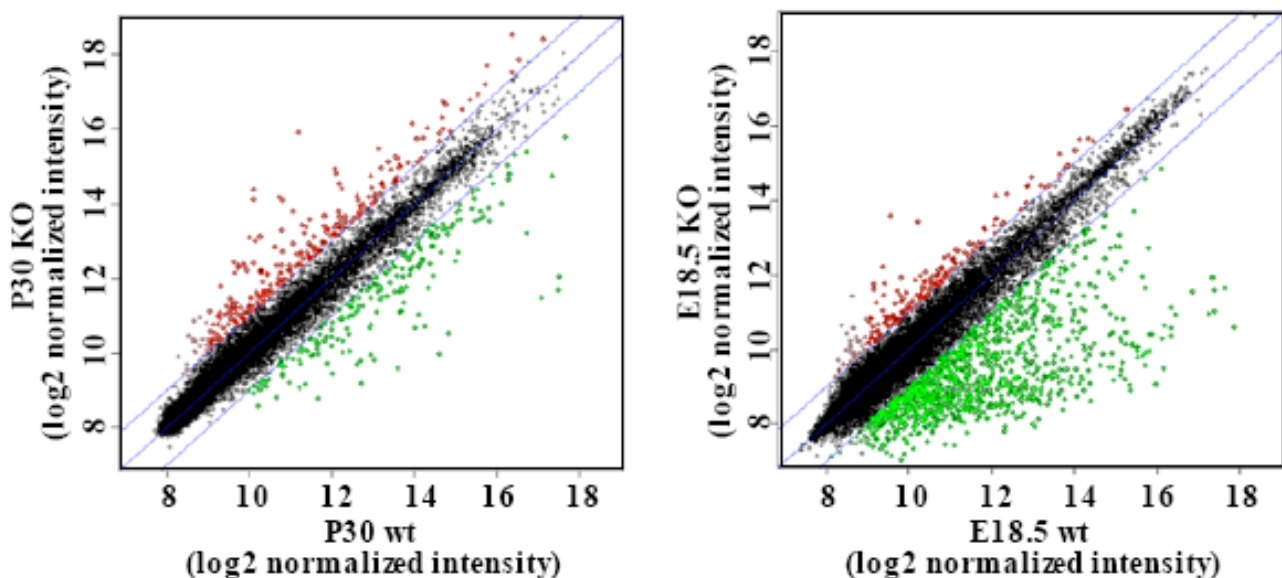
Τα παραπάνω αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι η απενεργοποίηση του TAF10 οδηγεί σε αποσυναρμολόγηση του συμπλοκου TFIID, χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης των επιμέρους υπομονάδων του.



Εικόνα 13. Τα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων του TFIID στα ηπατοκύτταρα παραμένουν αμετάβλητα. Ανοσοφθορισμός σε τομές από ήπαρ φυσιολογικών και *TAF10*KO ποντικών, χρησιμοποιώντας τα αντισώματα που υποδεικνύονται.

Ο ρόλος του TAF10 στη ρύθμιση της μεταγραφής των ηπατικών γονιδίων

Προκειμένου να αποκτήσουμε μία γενική εικόνα των επιπτώσεων της απενεργοποίησης του γονιδίου *TAF10* και επομένως της αποσυναρμολόγησης του συμπλόκου TFIID στη μεταγραφή των ηπατικών γονιδίων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του προτύπου γονιδιακής έκφρασης των TAF10KO ποντικών με DNA microarrays. Η ανάλυση αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στην ηπατοειδική απενεργοποίηση του *TAF10* μεταξύ εμβρύων και ενηλίκων, που αφορούν στον αριθμό των γονιδίων που παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση σε σύγκριση με τη φυσιολογική τους. Η εξάλειψη του *TAF10* διαφοροποίησε τα επίπεδα έκφρασης του 11% των γονιδίων που εκφράζονται στο ήπαρ TAF10KO εμβρύων, ενώ αναπάντεχα επηρέασε μόλις το 5% των ηπατικών γονιδίων στα ενήλικα ποντίκια, αυξάνοντας ή μειώνοντας τα επίπεδα τους περισσότερο από δύο φορές (Εικόνα 14.) (Πίνακας 1.).



Εικόνα 14. Ανάλυση ‘Scatter plot’ των DNA microarrays για τα ενήλικα και τα έμβρυα αντίστοιχα. Κανονικοποιημένα σήματα των διαφόρων γονιδίων που προέκυψαν από ηπατικά δείγματα RNA φυσιολογικών ποντικών προς TAF10KO ποντίκια. Με πράσινο τα γονίδια των οποίων η έκφραση μειώνεται, ενώ με κόκκινο αυτά των οποίων η έκφραση αυξάνεται περισσότερο από δύο φορές.

Μία πιο προσεκτική ματιά στα γονίδια που επηρεάζονται στα TAF10KO έμβρυα αποκάλυψε ότι η πλειονότητα των 972 γονιδίων, των οποίων η έκφραση μειώνεται, εκφράζονται ειδικά σε ηπατοκύτταρα. Επιπλέον, η συντριπτική πλειονότητα των 141 γονιδίων, των οποίων η έκφραση αυξάνεται, εκφράζονται ειδικά σε αιμοποιητικά και επιθηλιακά κύτταρα, που υπάρχουν στο ήπαρ εμβρύων. Η αύξηση της έκφρασης αυτών των γονιδίων οφείλεται στη συσσώρευση αιμοποιητικών και επιθηλιακών κυττάρων στο ήπαρ των TAF10KO εμβρύων, επιβεβαιώνοντας την παρατήρηση που είχε προηγηθεί από την ιστολογική ανάλυσή τους. Παράλληλα, για να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων σε έμβρυα και ενήλικα αγρίου τύπου, όπου το ποσοστό των ηπατοκυττάρων στο ήπαρ τους αυξάνεται από 40%-60% σε 70%-80% αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού RNA από φυσιολογικά ενήλικα και έμβρυα, υβριδοποιώντας στην ίδια αντικειμενοφόρο. Από την ανάλυση αυτή φάνηκε ότι η πλειονότητα (91%) των γονιδίων, των οποίων η έκφραση μειώνεται στα TAF10KO έμβρυα, έχουν ίσα ή αυξημένα επίπεδα έκφρασης μεταγεννητικά, στο ήπαρ ενήλικων ποντικών. Λαμβάνοντας υπόψη την αύξηση του αριθμού των ηπατοκυττάρων μεταγεννητικά μπορούμε να συνάγουμε ότι αυτά τα γονίδια είναι πιθανότατα ηπατοειδικά. Το ακριβώς αντίστροφο παρατηρήθηκε για τα γονίδια των οποίων η έκφραση αυξανόταν στα TAF10KO έμβρυα.

Total number of genes: 20539		
Postnatal day 30 liver		Embryonic E18.5 liver
9238 Expressed genes		11301 Silent genes
184 Down-regulated >2-fold in KO	213 Up-regulated >2-fold in KO	20 Up-regulated >2-fold in KO
9534 Expressed genes		
972* Down-regulated >2-fold in KO	141** Up-regulated >2-fold in KO	

Πίνακας 1. Σύγκριση του αριθμού των γονιδίων που επηρεάζονται από την ηπατοειδική εξάλειψη του TAF10 σε ενήλικα ποντίκια και σε έμβρυα. Παρουσιάζεται ο αριθμός των γονιδίων των οποίων τα επίπεδα επηρεάζονται κατά ένα συντελεστή 2. Με (*) συμβολίζονται τα ηπατοειδικά γονίδια, ενώ με (**) συμβολίζονται τα γονίδια που δεν εκφράζονται σε ηπατοκύτταρα.

Η πλειονότητα των γονιδίων που εκφράζονται στο ήπαρ ενήλικων ποντικών δεν επηρεάζονται από την απαλοιφή του γονιδίου *TAF10*. Επιπλέον, το ποσοστό αυτών που έδειχναν μείωση στην έκφραση τους ήταν περίπου ίσο με αυτό των γονιδίων των οποίων η έκφραση αυξανόταν. Τα γονίδια των οποίων η έκφραση μειωνόταν ήταν ως επί το πλείστον γονίδια σημαντικά για διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, όπως στη σύνθεση των λιπαρών οξέων, τον κύκλο της ουρίας, το μεταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπών, την αποτοξίνωση (**Παράρτημα-Πίνακας 2.**). Έτσι, η αδυναμία του ήπατος να επιτελέσει τη μεταβολική του λειτουργία και κυρίως η συσσώρευση τοξικών ουσιών στο ήπαρ των TAF10KO ενηλίκων είναι πιθανότατα ο λόγος του μαζικού θανάτου που παρατηρείται από την 34-35 ημέρα μεταγεννητικά.

Οι επιπτώσεις της εξάλειψης του TAF10 στη ρύθμιση της έκφρασης miRNAs στο ήπαρ

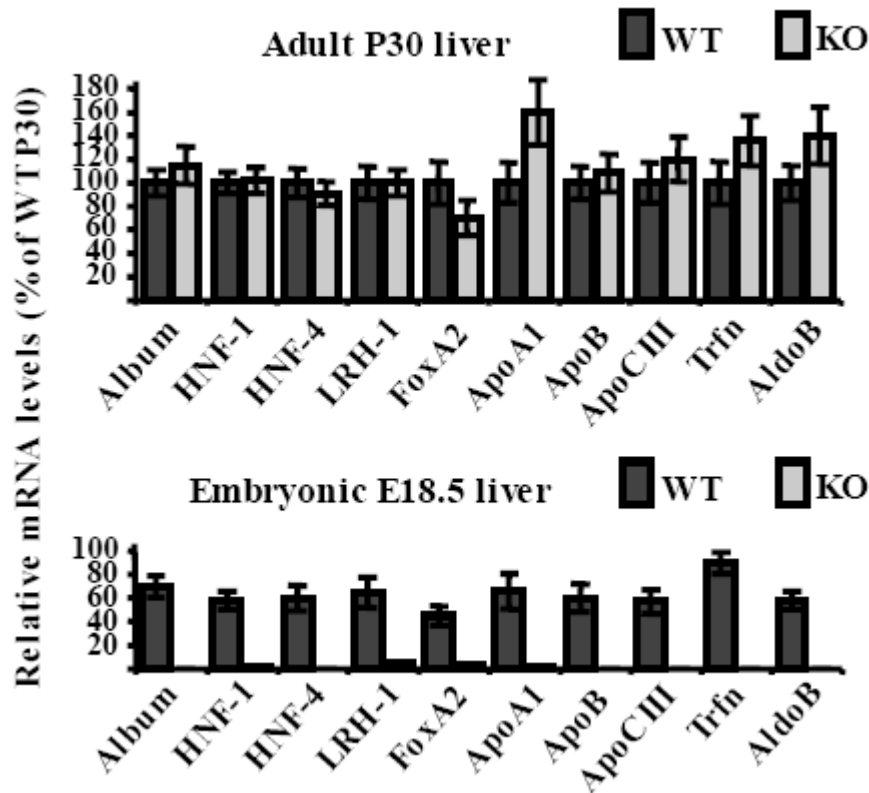
Ανεξάρτητα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του προτύπου έκφρασης miRNAs σε ενήλικα φυσιολογικά και TAF10KO ποντίκια και σε αγρίου τύπου έμβρυα. Σήμερα είναι γνωστό ότι η πλειονότητα των miRNAs μεταγράφονται από το ένζυμο της RNA πολυμεράσης II και τη βασική μεταγραφική μηχανή που ελέγχει και τη σύνθεση των μεταγράφων γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν αντικειμενοφόροι με εντοπισμένα ολιγονουκλεοτίδια για 672 miRNAs. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης έδειξαν ότι από τα 672 miRNAs στο ήπαρ ενήλικων ποντικών εκφράζονται τα 346. Η έκφραση για πέντε (5) από αυτά βρέθηκε να αυξάνεται περισσότερο από δύο φορές και να μειώνεται για άλλα πέντε (5), ενώ για την πλειονότητα αυτών που φαίνονται να εκφράζονται στο ήπαρ ενηλίκων δεν υπήρχε αλλαγή των επιπέδων τους. Η έκφραση για τα mmu-mir-207, mmu-mir-542, mmu-mir-508, mmu-mir-341, mmu-mir-542-5p αυξάνεται, ενώ για τα mmu-212, mmu-mir-22, mmu-mir-455, mmu-mir-384b και mmu-mir-487b μειώνεται. Επιπλέον, για τρία (3) miRNAs βλέπουμε ότι ενώ δεν εκφράζονταν σε φυσιολογικά ποντίκια, μετά την απενεργοποίηση του *TAF10* επανεκφράζονται. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα mmu-mir-213, mmu-mir-145, mmu-mir-376.

Παρατηρήσαμε επομένως, το ίδιο πρότυπο αλλαγών με αυτό που φαίνεται σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνη. Με την παραπάνω ανάλυση διαπιστώθηκε ότι η ρύθμιση της έκφρασής τους από τον παράγοντα TAF10 μοιάζει με αυτή των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνη, ενώ με αυτόν τον τρόπο αναγνωρίστηκαν mic-RNAs που εκφράζονται στα ηπατοκύτταρα.

Οι επιπτώσεις της απουσίας του TAF10 σε γονίδια που είναι ήδη ενεργοποιημένα από τα εμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης

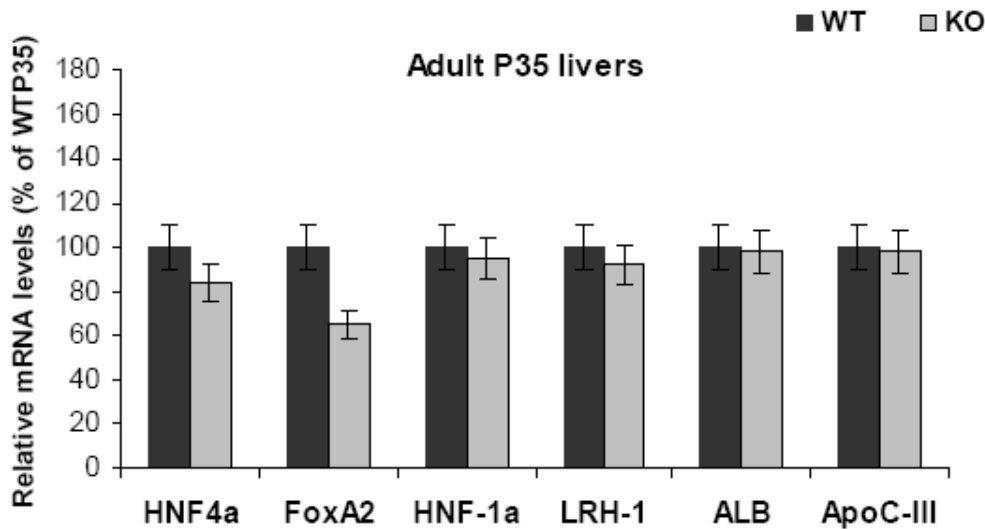
Η ανάλυση του πρότυπου γονιδιακής έκφρασης των TAF10KO ποντικών με DNA microarrays αποκάλυψε ότι ένας μικρός αριθμός γονιδίων επηρεάζεται από την εξάλειψη του TAF10 στα ηπατοκύτταρα ενήλικων ποντικών σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στα έμβρυα. Με σκοπό να μελετήσουμε καλύτερα τις επιπτώσεις της απενεργοποίησης του *TAF10* στην έκφραση ηπατοειδικών γονιδίων στα μεταγεννητικά στάδια ανάπτυξης διαμορφώσαμε τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες γονιδίων, ανάλογα με τη σχέση της έκφρασής τους στο ήπαρ εμβρύων (E18.5) με την έκφρασή τους σε ήπαρ ενήλικων ποντικών (P30).

Η πλειονότητα των γονιδίων που η έκφραση τους δεν επηρεάζεται από την απενεργοποίηση του *TAF10* σε ενήλικα TAF10KO ποντίκια, εκφράζονται ήδη από τα εμβρυϊκά στάδια της ανάπτυξης του ήπατος σε αγρίου τύπου ποντίκια. Τα γονίδια αυτά αποτελούν και την 1^η κατηγορία που μελετήσαμε. Επιλέξαμε τυχαία τα ηπατοειδικά γονίδια *Albumin*, *HNF-1*, *HNF-4*, *LRH-1*, *FoxA2*, *ApoA1*, *ApoB*, *ApoCIII*, *Transferrin*, *Aldolase B*, *ApoA2*, *ApoM*, *HNF-6* και με ανάλυση RT-PCR χρησιμοποιώντας RNA από το ήπαρ διαφορετικών εμβρύων και ενήλικων TAF10KO και αγρίου τύπου ποντικών επιβεβαιώθηκε ότι η έκφρασή τους μειώνεται στα TAF10KO έμβρυα, ενώ δεν επηρεάζεται σημαντικά στα ενήλικα (**Εικόνα 15.**)



Εικόνα 15. Η επίδραση της απενεργοποίησης του TAF10 στη μεταγραφή ηπατικών γονιδίων στο ήπαρ εμβρύων και ενήλικων ποντικών. Ανάλυση RT-PCR για την ποσοτικοποίηση των μεταγράφων ηπατοειδικών γονιδίων (κατηγορία 1). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού RNA από το ήπαρ τόσο ποντικών αγρίου τύπου 30 ημερών (σκουρόχρωμες ράβδοι), όσο και ποντικών με γονότυπο $TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre$ (γκρι ράβδοι) (πάνω), καθώς και εμβρύων E18.5WT (σκουρόχρωμες ράβδοι) ή $TAF10^{lox/lox}/Alfp-Cre$ εμβρύων (γκρι ράβδοι) (κάτω). Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των τιμών που προσδιορίστηκαν με το mRNA του γονιδίου GAPDH και εκφράστηκαν ως ποσοστό του μέσου όρου των τιμών της έκφρασης σε αγρίου τύπου ποντίκια 30 ημερών. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο των τιμών και το στατιστικό λάθος για 10 διαφορετικά άτομα σε κάθε περίπτωση.

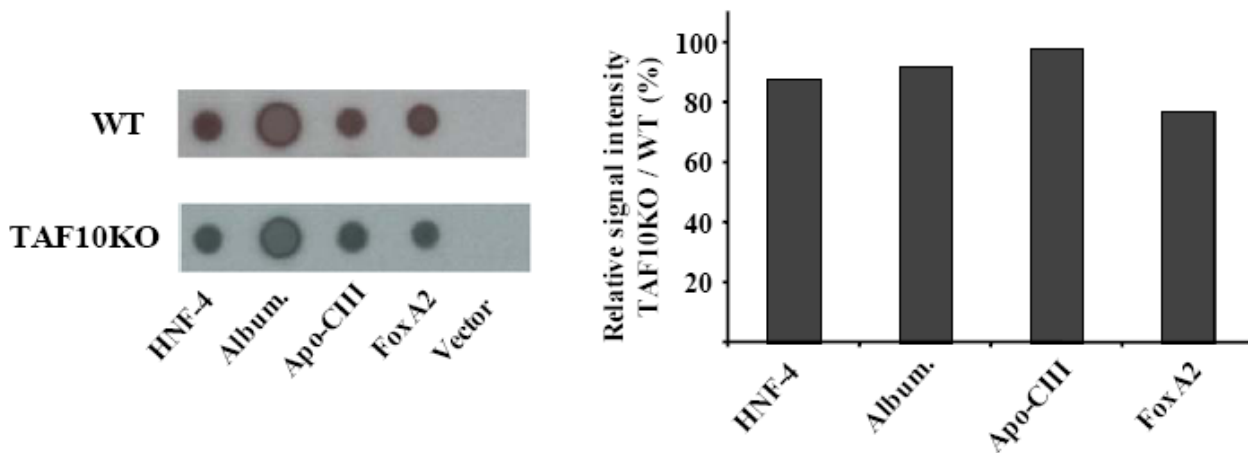
Επιπλέον, τα επίπεδα του mRNA γονιδίων που δεν αλλάζουν στις 30 ημέρες μεταγεννητικά, όπως *Albumin*, *HNF-1*, *HNF-4*, *LRH-1*, *FoxA2*, *ApoCIII*, παραμένουν αμετάβλητα ακόμα και στις 35 ημέρες, γεγονός που παρατηρήθηκε με ανάλυση RT-PCR, χρησιμοποιώντας δείγματα ολικού RNA από ποντίκια που κατάφεραν να επιβιώσουν έως την 35^η ημέρα μεταγεννητικά (**Εικόνα 16**).



Εικόνα 16. Τα επίπεδα του mRNA των ηπατικών γονιδίων της 1^{ης} κατηγορίας παραμένουν αμετάβλητα ακόμα και στις 35 ημέρες. Ανάλυση RT-PCR για την ποσοτικοποίηση των μεταγράφων ηπατοειδικών γονιδίων (κατηγορία 1) στις 35 ημέρες μεταγεννητικά.. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού RNA από το ήπαρ τόσο ποντικών αγρίου τύπου 35 ημερών (σκουρόχρωμες ράβδοι), όσο και ποντικών με γονότυπο *TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre* (γκρι ράβδοι). Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση όπως και παραπάνω και εκφράστηκαν ως ποσοστό του μέσου όρου των τιμών της έκφρασης σε αγρίου τύπου ποντίκια 35 ημερών. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο των τιμών και το στατιστικό λάθος για 5 διαφορετικά άτομα σε κάθε περίπτωση.

Προκειμένου, να εξετάσουμε αν τα μετάγραφα των γονιδίων που δεν άλλαξε η έκφρασή τους προέρχονται από νέα συμβάντα μεταγραφής την 30^η ημέρα μεταγεννητικά ή πρόκειται για σταθερά μετάγραφα, που έχουν παραχθεί νωρίτερα, πραγματοποιήσαμε *in vitro* nuclear run-on πειράματα. Χρησιμοποιήθηκαν πυρήνες από το ήπαρ ενήλικων *TAF10LivKO* και αγρίου τύπου ποντικών και έγινε *in vitro* μεταγραφή με τη χρήση ραδιενεργού ³²P-UTP. Έπειτα, υβριδοποιήσαμε το ραδιοσημασμένο RNA σε ανιχνευτές με την αλληλουχία του cDNA των γονιδίων *Albumin*, *HNF-4*, *FoxA2* και *ApoCIII* και παρατηρήσαμε ότι τα σήματά τους ήταν σχεδόν ίδια ανάμεσα σε *TAF10LivKO* και φυσιολογικά ποντίκια, δείχνοντας ότι τα

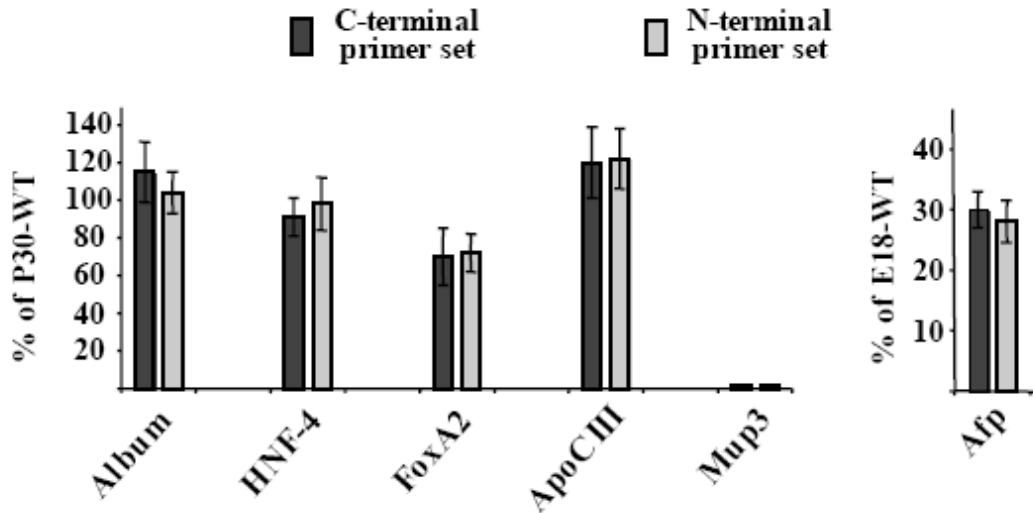
μετάγραφα αυτών των γονιδίων οφείλονται σε νέα μεταγραφικά γεγονότα (Εικόνα 17.). Από τα αποτελέσματα αυτά διαπιστώθηκε ότι ο παράγοντας TAF10 και επομένως το σύμπλοκο TFIIID δεν είναι απολύτως απαραίτητο για τη μεταγραφή ήδη ενεργοποιημένων γονιδίων. Τα γονίδια αυτά συνιστούν και την ευρύτερη κατηγορία των γονιδίων που δεν επηρεάζονται από την απαλοιφή του TAF10.



Εικόνα 17. Τα μετάγραφα των ηπατικών γονιδίων της 1^{ης} κατηγορίας προέρχονται από νέα συμβάντα μεταγραφής. *In vitro nuclear run-on* πειράματα. Χρησιμοποιήθηκαν πυρήνες από το ήπαρ ενήλικων TAF10KO και αγρίου τύπου ποντικών 30 ημερών και έγινε *in vitro* μεταγραφή με τη χρήση ραδιενεργού ³²P-UTP. Στην εικόνα φαίνονται τα ραδιενεργά σήματα (αριστερά) από το dot blot που ακολούθησε, τα οποία ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση του “phosphorimage analyzer”. Τα σήματα που προέκυψαν κανονικοποιήθηκαν με το background και εκφράστηκαν ως σχετικές τιμές TAF10KO/WT (δεξιά).

Ανεξάρτητα, έγινε RT-PCR ανάλυση με τη χρήση διαφορετικών εκκινητών που υβριδοποιούν ξεχωριστά στην αμινοτελική και καρβοξυτελική περιοχή των μεταγράφων γονιδίων της 1^{ης} κατηγορίας όπως *Albumin*, *HNF-4*, *FoxA2*, *ApoCIII*, αλλά και γονιδίων από τις άλλες κατηγορίες που αναφέρονται παρακάτω *Mur3* και *Afp*. Από την ανάλυση αυτή προσδιορίστηκαν ίδια επίπεδα mRNA και για τις δύο

περιοχές αποκλείοντας την πιθανότητα παρουσίας μεταγράφων που έχουν μερικώς αποδομηθεί ή δεν έχει ολοκληρωθεί η επιμήκυνσή τους.

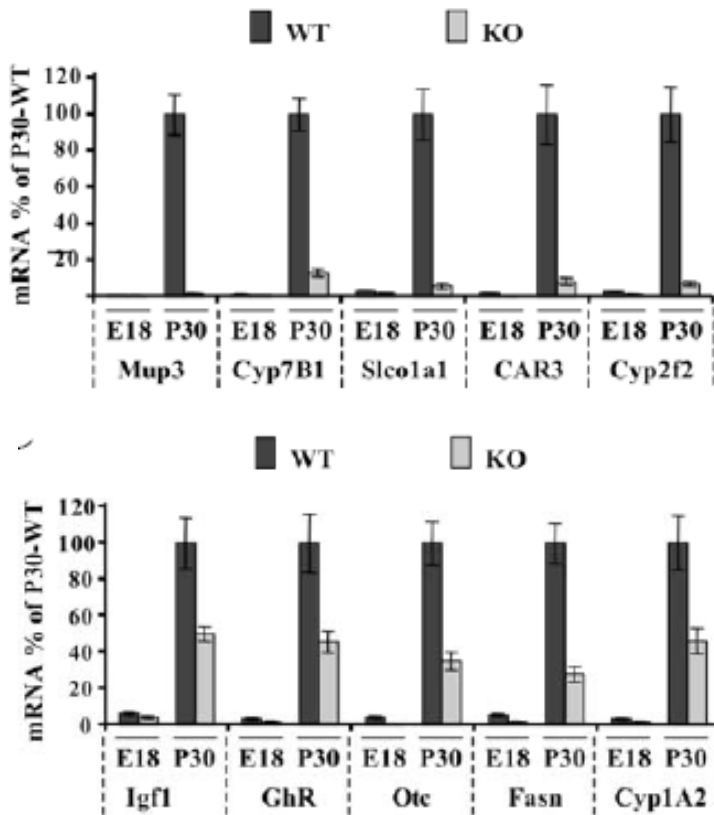


Εικόνα 18. Έλεγχος της παρουσίας μη ολοκληρωμένων ή μερικώς αποδομημένων μεταγράφων. Ανάλυση RT-PCR με τη χρήση εκκινητών που υβριδοποιούν στην αμινοτελική ή καρβοξυτελική περιοχή των μεταγράφων των γονιδίων που υποδεικνύονται.

Οι επιπτώσεις της απουσίας του TAF10 σε γονίδια που ενεργοποιούνται μεταγεννητικά

Τα γονίδια της 2^{ης} και 3^{ης} κατηγορίας, όπως ονομάστηκαν, είναι γονίδια που δεν είναι ενεργά σε έμβρυα, αλλά ενεργοποιούνται μεταγεννητικά. Με ανάλυση RT-PCR βρέθηκε ότι η απουσία του TAF10 σε ενήλικα ποντίκια δρά αρνητικά στην έκφραση των γονιδίων *Mup3*, *Cyp7B1*, *Slco1a1*, *CAR3*, *Cyp2f2*, *Igf1*, *GhR*, *Otc*, *Fasn* και *Cyp1A2* (**Εικόνα 19**). Για να εξηγήσουμε τη συγκεκριμένη εικόνα μελετήσαμε το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων αυτών. Χρησιμοποιώντας λοιπόν δεξαμενές με δείγματα ολικού RNA από το ήπαρ ποντικών διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων (E18, P1, P2, P4, P14, P21, P30, P40), διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια των οποίων η

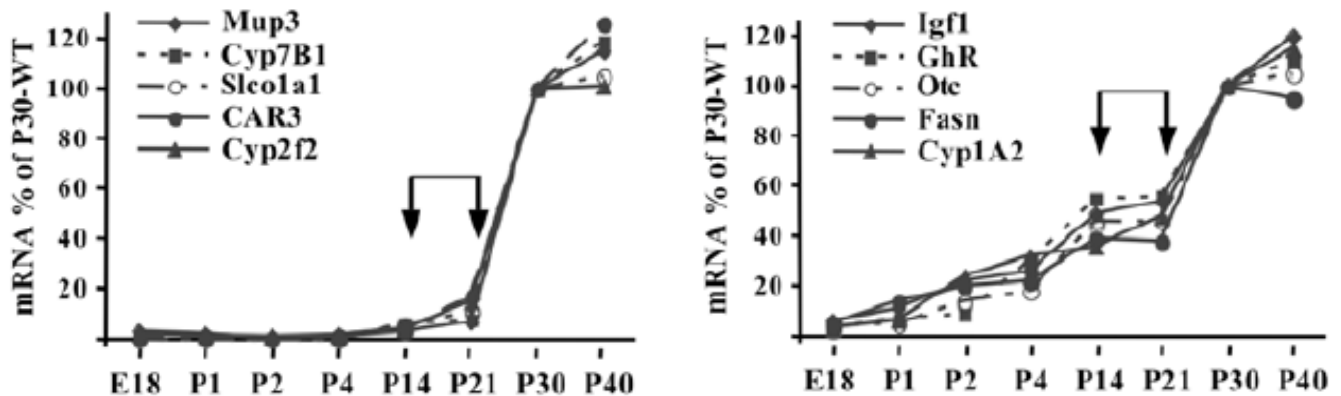
έκφραση μειωνόταν σε ενήλικα TAF10LivKO ποντίκια μπορούν να διαχωριστούν σε δύο διαφορετικές κατηγορίες.



Εικόνα 19. Η επίδραση της απενεργοποίησης του TAF10 στη μεταγραφή των ηπατικών γονιδίων στο ήπαρ εμβρύων και ενήλικων ποντικών. Ανάλυση RT-PCR για την ποσοτικοποίηση των μεταγράφων ηπατοειδικών γονιδίων της κατηγορίας 2 (πάνω) και της κατηγορίας 3 (κάτω). Η ανάλυση έγινε όπως και για την προηγούμενη κατηγορία γονιδίων στην εικόνα.15.

Η διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές κατηγορίες γονιδίων είναι ο βαθμός της μείωσης των επιπέδων έκφρασής τους, που συνδέεται άμεσα με το χρόνο της αρχικής ενεργοποίησής τους σε σχέση με το χρονικό σημείο της απενεργοποίησης του γονιδίου *TAF10*. Έτσι, η πρώτη κατηγορία είναι γονίδια, όπως *Mup3*, *Cyp7B1*, *Slco1a1*, *CAR3*, *Cyp2f2*, τα οποία ξεκινούν να εκφράζονται φυσιολογικά κατά την ανάπτυξη στο χρονικό σημείο της απενεργοποίησης του *TAF10*, στις 14-21 ημέρες μεταγεννητικά (Εικόνα 20.). Τα γονίδια αυτά δεν μεταγράφονται στο ήπαρ TAF10KO ενήλικων ποντικών. Η δεύτερη κατηγορία είναι γονίδια, όπως *Igf1*, *GhR*, *Otc*, *Fasn*, *Cyp1A2*, που ενεργοποιούνται νωρίτερα μεταγεννητικά και συγκεκριμένα πριν από το χρονικό σημείο της εξάλειψης του *TAF10* (Εικόνα 20.). Η έκφραση των τελευταίων αυτών γονιδίων στο χρονικό σημείο που το γονίδιο *TAF10* απενεργοποιείται δε φτάνει το μέγιστο της έκφρασής τους, αλλά ένα ποσοστό 35%-50% σε σχέση με την έκφρασή τους αργότερα, στις 30 ημέρες μεταγεννητικά. Η απενεργοποίηση του *TAF10* προκαλεί μικρότερη μείωση στην έκφρασή τους, σε ένα ποσοστό 30%-50%

της φυσιολογικής τους (Εικόνα 19). Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η εξάλειψη του TAF10 δεν επιτρέπει την ενεργοποίηση ή περαιτέρω ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών.

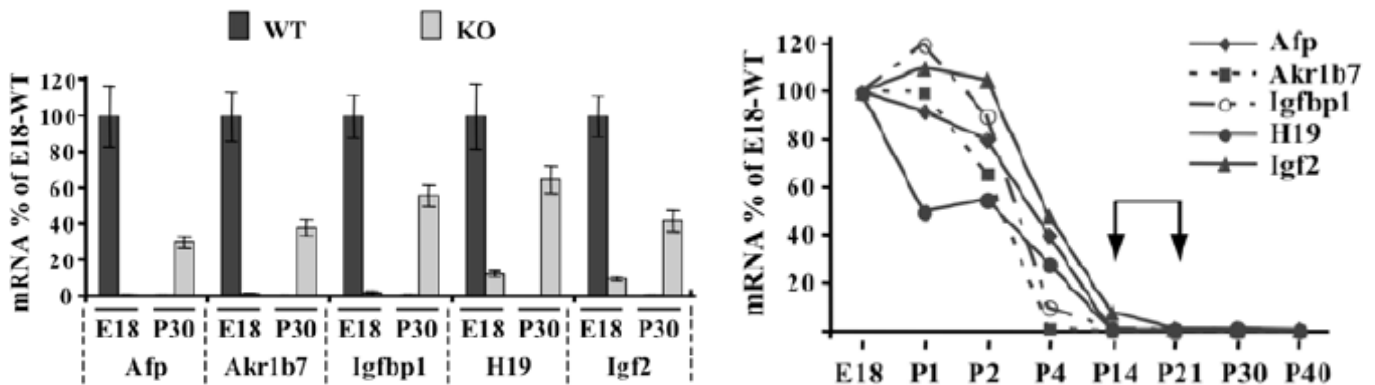


Εικόνα 20. Το πρότυπο έκφρασης των ηπατικών γονιδίων των οποίων τα επίπεδα έκφρασης μειώνονται λόγω της απουσίας του TAF10. Ανάλυση RT-PCR για τον προσδιορισμό των μεταγράφων ηπατοειδικών γονιδίων της κατηγορίας 2 (αριστερά) και της κατηγορίας 3 (δεξιά). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δεξαμενές δειγμάτων ολικού RNA από ποντίκια αγριού τύπου E18.5 και των ημερών μεταγεννητικά (P) που υποδεικνύονται. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε όπως και πριν. Τα βέλη υποδεικνύουν το χρόνο απενεργοποίησης του TAF10.

Οι επιπτώσεις της απουσίας του TAF10 σε γονίδια που αποσιωπώνται μεταγεννητικά

Τα γονίδια της 4^{ης} κατηγορίας παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Για τα γονίδια αυτά λοιπόν παρατηρήθηκε ότι εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στο ήπαρ των εμβρύων, αλλά αποσιωπώνται μεταγεννητικά και μάλιστα η έκφρασή τους είναι μηδενική στο στάδιο που συμπίπτει με το χρονικό σημείο απενεργοποίησης του TAF10 (P14-P21). Ο έλεγχος των μεταβολών στην ποσότητα του mRNA των

γονιδίων της 4^{ης} κατηγορίας αποκάλυψε ότι η απαλοιφή του TAF10 στα έμβρυα οδηγεί σε μείωση των επιπέδων του παραγόμενου mRNA τους, ενώ στα ενήλικα ποντίκια οδηγεί σε εκ νέου ενεργοποίησή τους. Τα γονίδια αυτής της κατηγορίας που μελετήσαμε ήταν το *Afp*, *Akr1b7*, *Igfbp1*, *H19* και *Igf2* (Εικόνα 21).



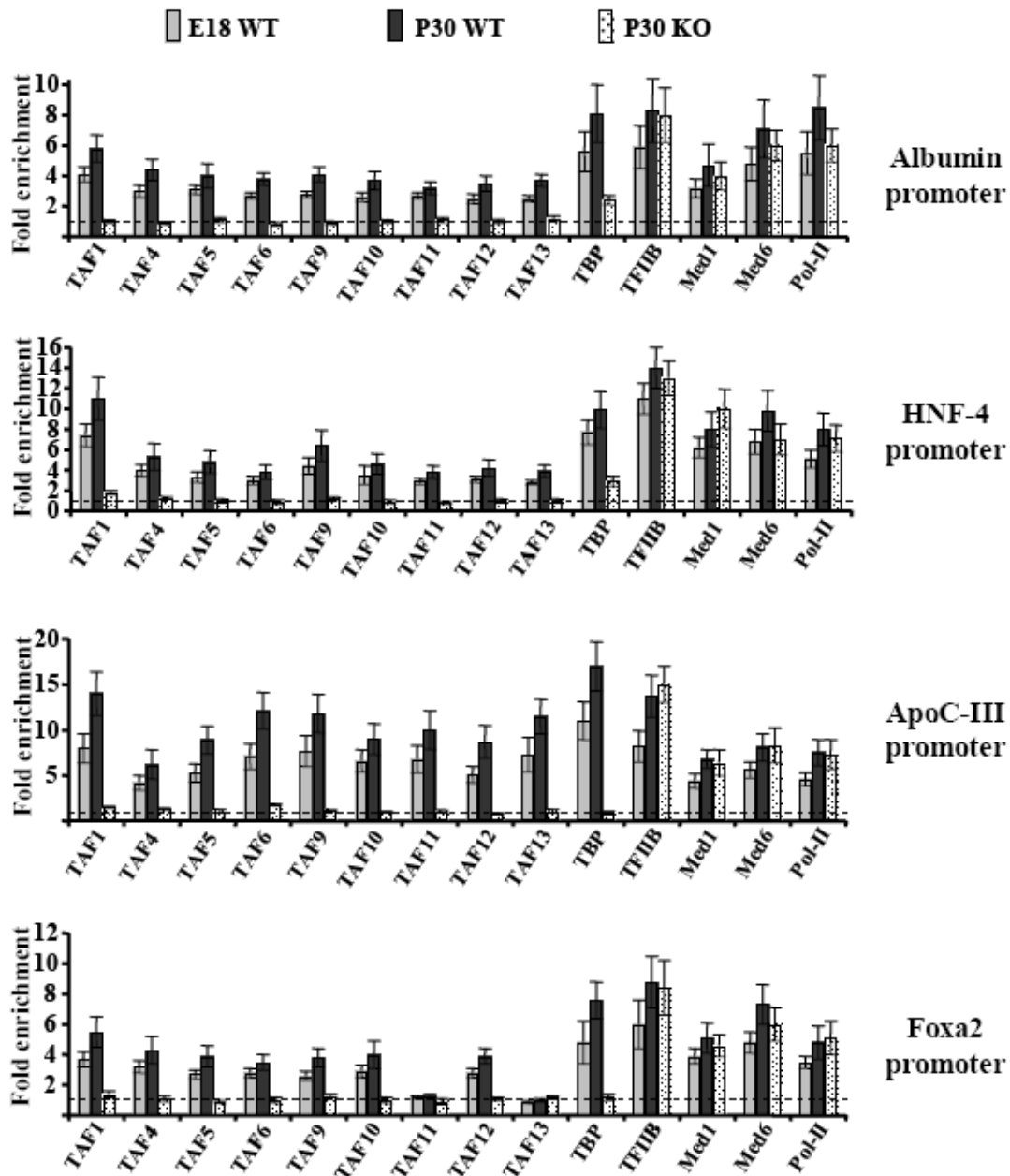
Εικόνα 21. Η επίδραση της απενεργοποίησης του TAF10 στη μεταγραφή των ηπατικών γονιδίων της 4^{ης} κατηγορίας και το πρότυπο έκφρασής τους. Ανάλυση RT-PCR για την ποσοτικοποίηση των μεταγράφων ηπατοειδικών γονιδίων της κατηγορίας 4. Η ανάλυση έγινε όπως και για τις προηγούμενες κατηγορίες γονιδίων. Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των τιμών που προσδιορίστηκαν με το mRNA του γονιδίου *GAPDH* και εκφράστηκαν ως ποσοστό του μέσου όρου των τιμών της έκφρασης σε έμβρυα E18.5.

Διερεύνηση της στρατολόγησης παραγόντων του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής στους υποκινητές γονιδίων της 1^{ης} κατηγορίας

Με σκοπό να διερευνήσουμε το μηχανισμό ρύθμισης των ηπατικών γονιδίων πριν και μετά την απενεργοποίηση του *TAF10* και επομένως την αποσυναρμολόγηση του TFIIID συμπλόκου πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (ChIP) σε πυρήνες από το ήπαρ εμβρύων 18.5 ημερών (E18.5WT), ενηλίκων αγρίου τύπου (P30WT) και ενηλίκων TAF10LivKO ποντικών (P30KO).

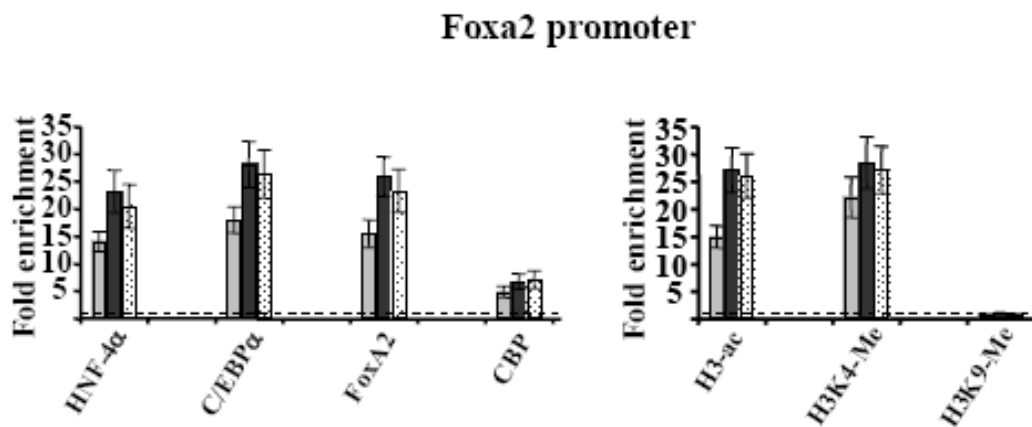
Συγκεκριμένα, διαλυτή χρωματίνη μονιμοποιημένη με φορμαλδεΰδη ανασοκατακρημνίστηκε με αντισώματα για διάφορους παράγοντες του σύμπλοκου TFIID, για τις υπομονάδες med1 και med6 του σύμπλοκου του διαμεσολαβητή (mediator), το βασικό μεταγραφικό παράγοντα TFIIB και το ένζυμο της RNA πολυμεράσης II (RNA Pol-II). Έπειτα, εξετάσαμε τη στρατολόγηση των παραπάνω παραγόντων στους υποκινητές των γονιδίων *Albumin*, *HNF-4*, *FoxA2* και *ApoCIII*, των οποίων η έκφραση δεν επηρεάζεται από την απαλοιφή του TAF10 σε ενήλικα ποντίκια, στους υποκινητές των γονιδίων *Mup3*, *Cyp7B1*, *Slco1a1*, *CAR3* που μειώνονται στα TAF10LivKO ποντίκια και στους υποκινητές των γονιδίων *Afp*, *Akr1b7*, *Igfbp1*, τα οποία εκ νέου ενεργοποιούνται. Η στρατολόγησή τους στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων τους ανιχνεύθηκε με πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και με χρήση ειδικών εκκινητών σχεδιασμένων στις αλληλουχίες των υποκινητών τους. Στη συνέχεια, τα σήματα που προέκυψαν και αντιστοιχούσαν στις στρατολογήσεις των διαφόρων παραγόντων στους υποκινητές, κανονικοποιήθηκαν ως προς το συνολικό ποσό της αρχικά χρησιμοποιούμενης χρωματίνης (input) και εκφράστηκαν με βάση το πόσες φορές μεγαλύτερο ήταν το σήμα τους από το σήμα ενός μη σχετικού αντισώματος.

Τα παραπάνω πειράματα στους υποκινητές των γονιδίων *Albumin*, *HNF-4*, *FoxA2* και *ApoCIII*, έδειξαν την παρουσία των διαφόρων TAFs, του TBP, του mediator και του ενζύμου RNA Pol-II, τόσο στο ήπαρ εμβρύων, όσο και στο ήπαρ ενηλίκων ποντικών αγρίου τύπου (**Εικόνα 22.**). Μία διαφοροποίηση σε αυτόν τον κανόνα αποτέλεσε η απουσία στρατολόγησης για το ζευγάρι TAF11/TAF13 στον υποκινητή του γονιδίου *FoxA2*, που υποδηλώνει την παρουσία ενός συμπλόκου TFIID με εναλλακτική σύσταση όσον αφορά τις υπομονάδες του. Σε TAF10LivKO ποντίκια δεν φαίνεται να επηρεάζεται η στρατολόγηση των med1, med6, TFIIB, RNA Pol-II, ενώ τα σήματα για όλες τις υπομονάδες του TFIID εξισώθηκαν με το σήμα του μη σχετικού αντισώματος (**Εικόνα 22.**).



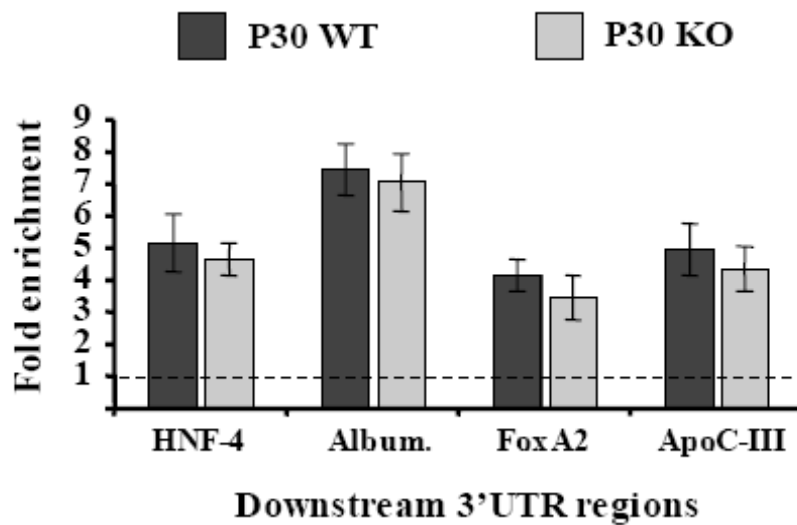
Εικόνα 22. Το πρότυπο στρατολόγησης βασικών μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές γονιδίων της 1^{ης} κατηγορίας. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντισώματα που αναγνωρίζουν TAFs, TBP, TFIIIB, Med1, Med6 και RNA Pol-II που πραγματοποιήθηκαν σε μονιμοποιημένη χρωματίνη από το ήπαρ εμβρύων 18.5 ημερών (E18.5WT)(γκρι ράβδοι), ενηλίκων αγρίου τύπου (P30WT)(σκουρόχρωμες ράβδοι) και ενηλίκων TAF10LivKO ποντικών (P30KO) (ράβδοι με τελείες). Οι τιμές που προέκυψαν από qPCR κανονικοποιήθηκαν με το input και εκφράστηκαν σε σχέση με το σήμα το αντισώματος ελέγχου αHA. Η γραμμή που τέμνει τον κάθετο άξονα στην τιμή 1 είναι το ChIP σήμα του αντισώματος ελέγχου.

Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι δεν μεταβάλλεται λόγω της απενεργοποίησης του *TAF10* και η στρατολόγηση άλλων παραγόντων του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής (PIC), όπως οι παράγοντες HNF-4, C/EBP α , FoxA2, CBP/p300, αλλά και τα επίπεδα ακετυλιωμένης ιστόνης H3 και τριμεθυλιωμένης ιστόνης H3K4 στον υποκινητή του γονιδίου *FoxA2* (Εικόνα 23.).



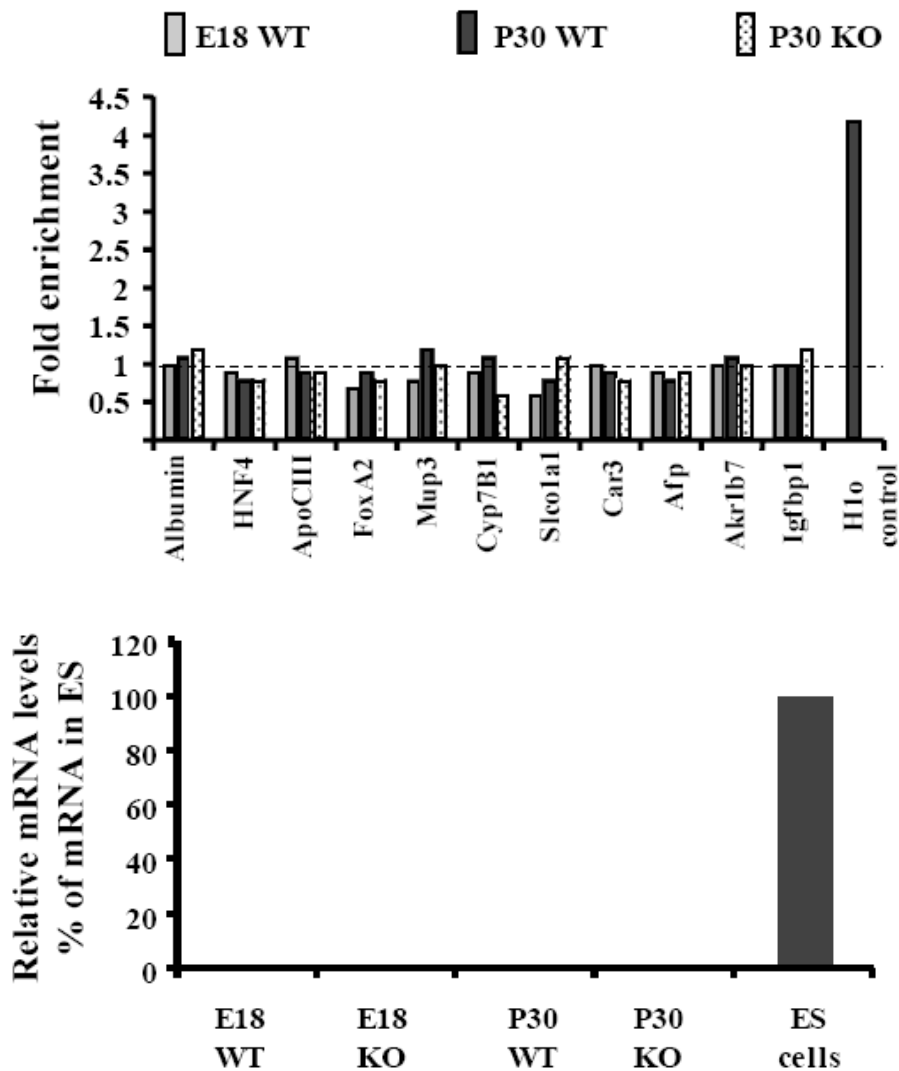
Εικόνα 23. Το πρότυπο στρατολόγησης μεταγραφικών παραγόντων και τα επίπεδα ακετυλίωσης και μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου *Foxa2*. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντισώματα που αναγνωρίζουν HNF4 α , C/EBP, *Foxa2*, CBP, H3-ac, H3K4-me, H3K9-me. Η ανάλυση έγινε όπως και στην εικόνα 22.

Έπειτα, εξετάστηκε η στρατολόγηση του ενζύμου της RNA πολυμεράσης II και στις κωδικές περιοχές των γονιδίων αυτών και διαπιστώθηκε η παρουσία της και σε αυτές τις περιοχές. Συγκεκριμένα τα επίπεδα της δέσμευσης της RNA Pol-II ήταν τα ίδια, τόσο στους υποκινητές των γονιδίων στο ήπαρ εμβρύων, όσο και στο ήπαρ ενηλίκων ποντικών αγρίου τύπου (Εικόνα 24.). Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί και με τα αποτελέσματα των *in vitro* nuclear πειραμάτων και αποδεικνύει ότι το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής είναι ενεργό και υπεύθυνο για την έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων αυτών στις 30 ημέρες μεταγεννητικά παρά την απουσία του συμπλόκου TFIID.



Εικόνα 24. Η πρόσδεση του ενζύμου της RNA πολυμεράσης II στην κωδική περιοχή γονιδίων της 1^{ης} κατηγορίας. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντισώματα που αναγνωρίζει *Pol-II*. Η ανάλυση έγινε όπως και στην εικόνα 22.

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην στρατολόγηση 10 διαφορετικών υπομονάδων του TFIIID συμπλόκου μεταξύ φυσιολογικών και TAF10LivKO ποντικών καταδεικνύουν ότι οι υποκινητές γονιδίων που είναι ήδη ενεργά μπορούν να διατηρήσουν μία ενεργή διαμόρφωση ακόμα και με απουσία του TFIIID συμπλόκου. Προκειμένου να εξετάσουμε την πιθανότητα αντικατάστασης του TFIIID από κάποιο άλλο παράγοντα αρχικά πραγματοποιήσαμε ανάλυση RT-PCR για τους παράγοντες TBP2/TRF3 και TLF/TRF2 (TBP-related factors), που αποτελούν παράγοντες πιθανούς να αντικαταστήσουν το σύμπλοκο TFIIID. Για τον TBP2/TRF3 δεν είδαμε να εκφράζεται σε καμμία από τις συνθήκες που ελέξαμε, σε έμβρυα και ενήλικα αγρίου τύπου και TAF10LivKO ποντίκια (**Εικόνα 25**). Για τον παράγοντα TLF/TRF2 εκφραζόταν, χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα του από την απενεργοποίηση του TAF10 (**Εικόνα 25**). Έπειτα, έγιναν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης για τον TLF/TRF2, αλλά δεν ανιχνεύσαμε την παρουσία του σε κανένα από τους υποκινητές που εξετάστηκαν (**Εικόνα 25**).

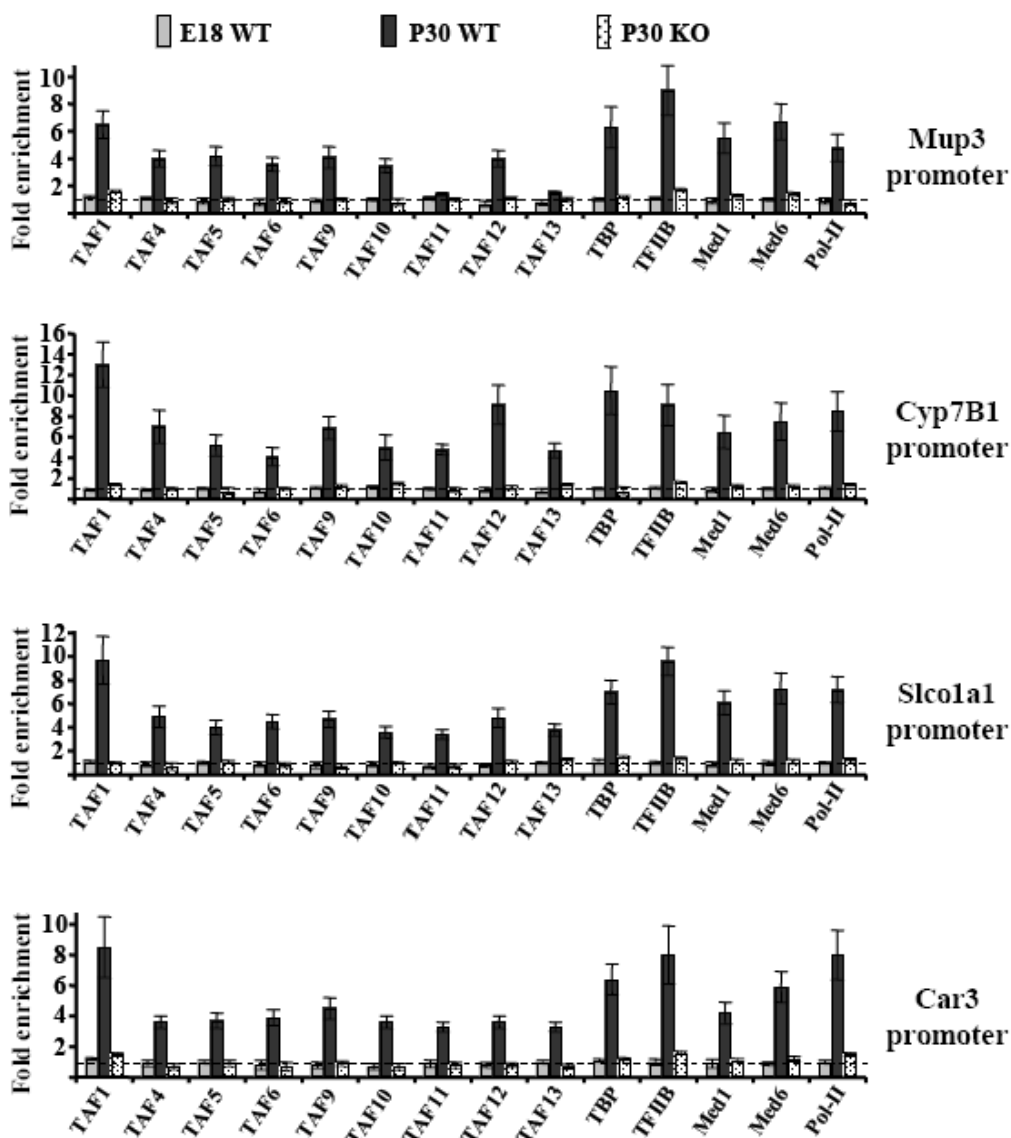


Εικόνα 25. Οι παράγοντες TLF και TRF3 δεν αντικαθιστούν το σύμπλοκο TFIIID μετά την αποσυναρμολογησή του σε TAF10KO ποντίκια. *ChIPs* για τον παράγοντα TLF, ο οποίος φαίνεται ότι δεν στρατολογείται στους υποκινητές των γονιδίων που ελέγχθησαν (πάνω) και *RT-PCR* για τον έλεγχο της έκφρασης του TRF3 που φαίνεται ότι δεν εκφράζεται στο ήπαρ ενήλικων ποντικών και εμβρύων (κάτω).

Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι δεν ήταν δυνατόν να ανιχνεύσουμε αντικατάσταση του TFIIID από κάποιο άλλο παράγοντα.

Διερεύνηση της στρατολόγησης παραγόντων του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής στους υποκινητές γονιδίων της 2^{ns} κατηγορίας

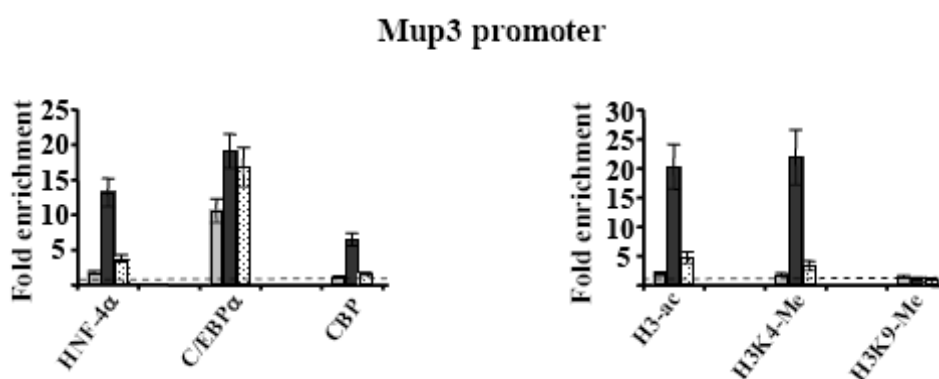
Στους υποκινητές των γονιδίων *Mup3*, *Cyp7B1*, *Slco1a1* και *CAR3*, των οποίων τα επίπεδα μειώνονται λόγω της απουσίας του TAF10, παρατηρήθηκε η παρουσία TFIIID, τόσο των TAFs, όσο και του TBP, μόνο στο ήπαρ ενήλικων ποντικών αγρίου τύπου (P30WT) (Εικόνα 26.).



Εικόνα 26. Το πρότυπο στρατολόγησης βασικών μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές γονιδίων της 2^{ns} κατηγορίας. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντισώματα που αναγνωρίζουν TAFs, TBP, TFIIIB, Med1, Med6 και RNA Pol-II που πραγματοποιήθηκαν σε μονιμοποιημένη χρωματίνη. Τα δεδομένα παρουσιάζονται όπως και στην εικόνα 22.

Η μόνη εξαίρεση είναι ότι στον υποκινητή του γονιδίου *Mur3* δεν φαίνεται να στρατολογείται το ζευγάρι TAF11/TAF13, όπως παρατηρήθηκε και στον υποκινητή του γονιδίου *FoxA2*. Επιπλέον, οι υποκινητές των παραπάνω γονιδίων είναι κατειλημμένοι και από τους παράγοντες med1, med6, TFIIIB και RNA Pol-II, γεγονός που συμφωνεί με τα υψηλά επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο (**Εικόνα 26.**). Σε αντίθεση με ό,τι παρατηρείται στο ήπαρ ενήλικων ποντικών αγρίου τύπου, στο ήπαρ εμβρύων και TAF10KO ενήλικων ποντικών παρατηρήθηκε η απουσία των παραπάνω παραγόντων του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής από τους παραπάνω υποκινητές.

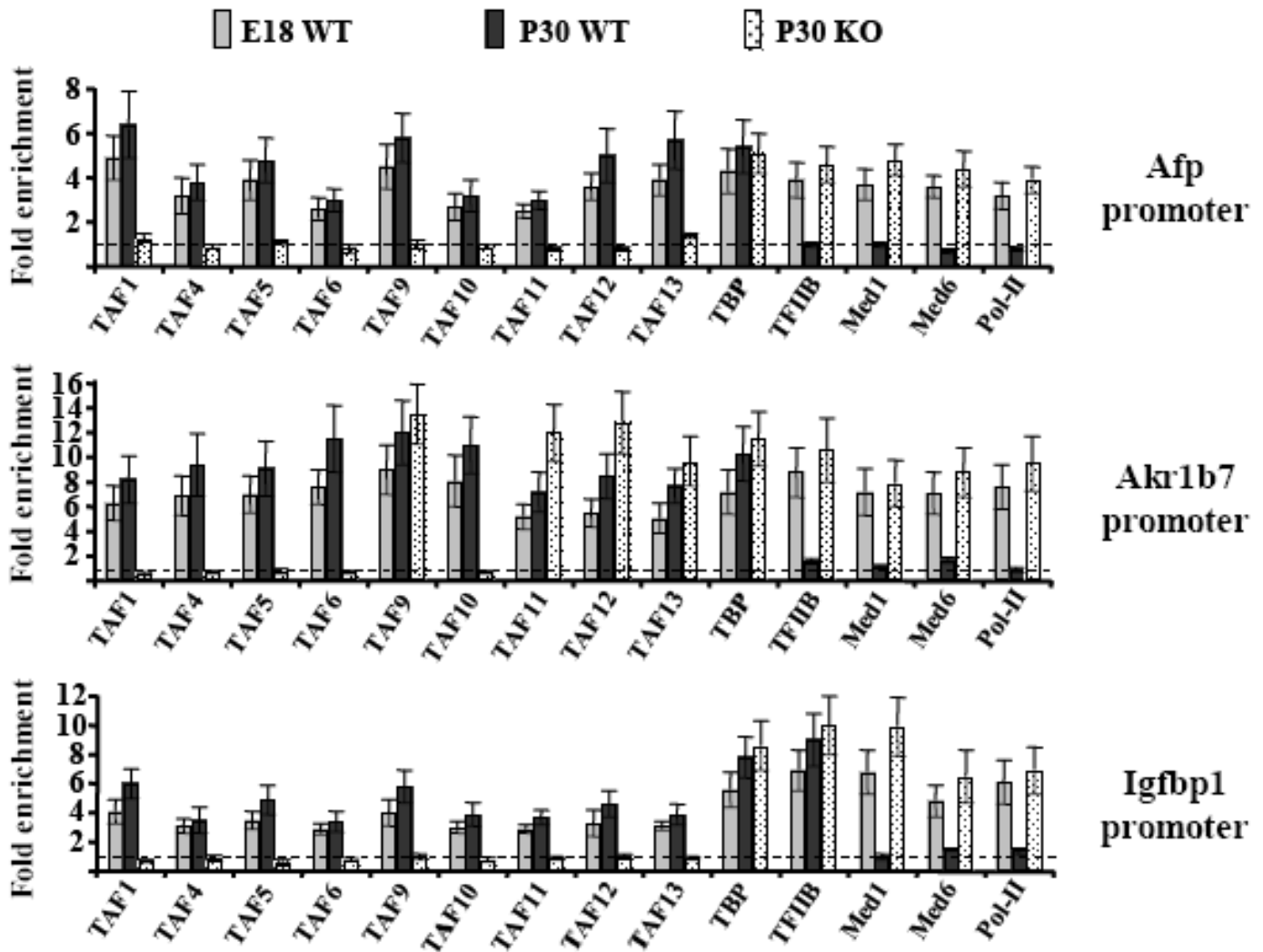
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης και για τους παράγοντες HNF-4, C/EBP α , CBP/p300, ακετυλιωμένη ιστόνη H3 και τριμεθυλιωμένη ιστόνη H3K4 στον υποκινητή του γονιδίου *Mur3*. Ο παράγοντας C/EBP α στρατολογείται στον υποκινητή του *Mur3* και στο εμβρυϊκό στάδιο, αλλά και στο ήπαρ ενήλικων (**Εικόνα 27.**). Η στρατολόγηση των HNF-4, CBP/p300 και η ακετυλίωση της ιστόνης H3 και τριμεθυλίωση της ιστόνης H3K4 είναι γεγονός μόνο στο ήπαρ ενήλικων αγρίου τύπου ποντικών, όταν το γονίδιο είναι ενεργό (**Εικόνα 27.**). Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι το σύμπλοκο TFIIID είναι απολύτως απαραίτητο για την αρχική συναρμολόγηση του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής και εξηγούν την αποτυχία ενεργοποίησης των παραπάνω γονιδίων.



Εικόνα 27. Το πρότυπο στρατολόγησης μεταγραφικών παραγόντων και τα επίπεδα ακετυλίωσης και μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου *Mur3*. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντισώματα που αναγνωρίζουν HNF4 α , C/EBP, CBP, H3-ac, H3K4-me, H3K9-me. Η ανάλυση έγινε όπως και στην εικόνα 22.

Διερεύνηση της στρατολόγησης παραγόντων του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής στους υποκινητές γονιδίων της 4^{ης} κατηγορίας

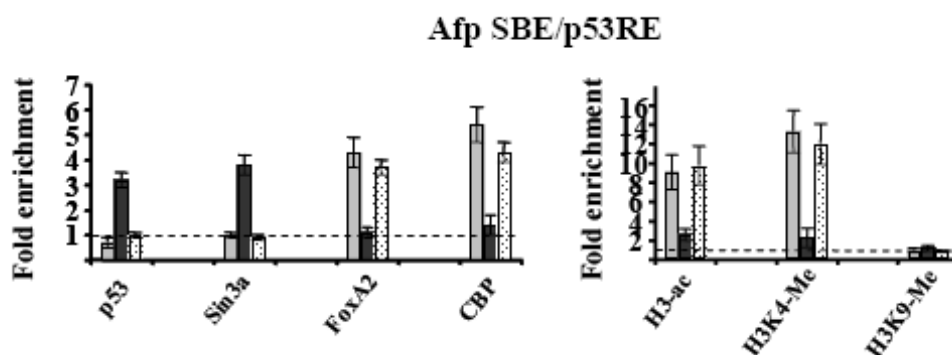
Στους υποκινητές της 4^{ης} κατηγορίας γονιδίων παρατηρήθηκε ένα πολύ ενδιαφέρον πρότυπο στρατολόγησης για τους παράγοντες που ελέχθησαν.



Εικόνα 28. Το πρότυπο στρατολόγησης βασικών μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές γονιδίων της 4^{ης} κατηγορίας. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντισώματα που αναγνωρίζουν TAFs, TBP, TFIIB, Med1, Med6 και RNA Pol-II που πραγματοποιήθηκαν σε μονιμοποιημένη χρωματίνη για τον έλεγχο της στρατολόγησης τους στους υποκινητές των γονιδίων *Afp*, *Akrlb7*, *Igfbp1*. Τα δεδομένα παρουσιάζονται όπως και στην εικόνα 22.

Στους υποκινητές λοιπόν των γονιδίων *Afp*, *Akr1b7*, *Igfbp1*, τα οποία εκ νέου ενεργοποιούνται στα TAF10KO ενήλικα ποντίκια, όπως αναμενόταν παρατηρήσαμε την παρουσία των TAFs, TBP, med1, med6, TFIIB, RNA Pol-II στο ήπαρ εμβρύων, γεγονός που συμφωνεί με τα υψηλά επίπεδα έκφρασης τους σε αυτό το στάδιο (**Εικόνα 28.**) Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε το γεγονός ότι στο ήπαρ ενήλικων ποντικών αγρίου τύπου διαπιστώθηκε η παραμονή του σύμπλοκου TFIID και στην περίπτωση του γονιδίου *Igfbp1* και ο TFIIB, ενώ οι παράγοντες med1, med6, RNA Pol-II ήταν απόντες. Σε TAF10KO ποντίκια διαπιστώθηκε η αποδέσμευση των TAFs από τους υποκινητές των γονιδίων, η επαναστρατολόγηση του TFIIB, του σύμπλοκου του διαμεσολαβητή και του ενζύμου της RNA πολυμεράσης II, τα οποία μαζί με την πρωτεΐνη TBP, που συνεχίσαμε να ανιχνεύουμε στους υποκινητές αυτών των γονιδίων, οδηγούν σε εκ νέου ενεργοποίησή τους (**Εικόνα 28.**) Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν έναν νέο ρόλο του TFIID, που έχει να κάνει με τη συμμετοχή του στην καταστολή ορισμένων ηπατικών γονιδίων.

Με σκοπό να έχουμε μία πιο λεπτομερή ανάλυση αυτού του ρόλου του TFIID πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντισώματα που αναγνωρίζουν τους ενεργοποιητές FoxA2 και CBP/p300, τους καταστολείς p53 και Sin3a, ακετυλιωμένη ιστόνη H3, τριμεθυλιωμένη ιστόνη H3K4 και διμεθυλιωμένη H3K9, εξετάζοντας τη στρατολόγησή τους στον υποκινητή του γονιδίου *AFP*.



Εικόνα 29. Το πρότυπο στρατολόγησης ενεργοποιητών και καταστολέων και τα επίπεδα ακετυλίωσης και μεθυλίωσης στη ρυθμιστική περιοχή SBE/p53 του γονιδίου *Afp*. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντισώματα που αναγνωρίζουν *p53*, *Sin3a*, *Foxa2*, *CBP*, *H3-ac*, *H3K4-me*, *H3K9-me*. Η ανάλυση έγινε όπως και στην εικόνα 22.

Τα πειράματα αυτά έδειξαν μία TFIIID-εξαρτώμενη ανταλλαγή ενεργοποιητών και καταστολέων στον υποκινητή του γονιδίου *Afp*. Σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές (Nguyen *et al.*, 2005), διαπιστώσαμε ότι στην περιοχή SBE/p53RE, που τοποθετείται 850 νουκλεοτίδια άνωθεν του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου *Afp*, έχει στρατολογηθεί ο ενεργοποιητής FoxA2 σε εμβρυϊκό ήπαρ, ο οποίος αντικαθίσταται από τους συγκαταστολείς p53 και Sin3a μεταγεννητικά (**Εικόνα 29.**). Οι αλλαγές, από το ένα στάδιο στο άλλο, στη στρατολόγηση του CBP/p300 και τα επίπεδα ακετυλίωσης και μεθυλίωσης της ιστόνης H3 συμφωνούν με τη μετάβαση του γονιδίου από ενεργή σε ανενεργή κατάσταση (**Εικόνα 29.**). Στα ενήλικα φυσιολογικά ποντίκια δεν ανιχνεύθηκε διμεθυλίωση της ιστόνης H3 στο κατάλοιπο λυσίνης 9 (K9), γεγονός που σημαίνει ότι δεν πραγματοποιείται ετεροχρωματινοποίηση της περιοχής του γονιδίου σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο (**Εικόνα 29.**). Σε TAF10KO ηπατοκύτταρα παρατηρήθηκε αποδέσμευση του συμπλόκου των συγκαταστολέων p53/Sin3a και επαναστρατολόγηση των ενεργοποιητών FoxA2/CBP, ενώ συγχρόνως υπήρξε επανεμφάνιση ακετυλιωμένης και μεθυλιωμένης ιστόνης H3, που συμφωνεί με την ενεργοποίηση του γονιδίου (**Εικόνα 29.**). Τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν το μηχανισμό που είναι υπεύθυνος για την εκ νέου ενεργοποίηση των γονιδίων της 4^{ης} κατηγορίας και καταδεικνύουν τον ενεργό ρόλο που μπορεί να έχει το σύμπλοκο TFIIID στην επιλεκτική πρόσδεση παραγόντων που βρίσκονται στον υποκινητή με ρυθμιστικές αλληλουχίες ενός γονιδίου, που βρίσκονται άνωθεν του σημείου έναρξης της μεταγραφής του.

Συζήτηση

Ηπατο-ειδικά TAF10KO ποντίκια και ανάλυση του φαινοτύπου τους

Ο παράγοντας TAF10 είναι ένα από τα 14 TAFs που συνιστούν το σύμπλοκο TFIID. Η απενεργοποίηση του TAF10 σε καρκινικά κύτταρα F9 προκαλούσε αποσυναρμολόγηση του TFIID συμπλόκου (Mohan *et al.*, 2003) και εμπόδιζε την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου κρατώντας τα κύτταρα στην G1 φάση. Στη συνέχεια τα κύτταρα F9 έδειχναν να οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, εξαιτίας της αρνητικής επίδρασης της απουσίας του TAF10 στην έκφραση γονιδίων-ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου (Metzger *et al.*, 1999). Σε άμεση συμφωνία με τα όσα συμβαίνουν σε F9 κύτταρα, η εξάλειψη του γονιδίου *TAF10* σε ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο των εμβρύων στο στάδιο της βλαστοκύστης, λόγω του κυτταρικού θανάτου των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (Mohan *et al.*, 2003). Οι μελέτες στα παραπάνω μοντέλα παρείχαν κάποιες ενδείξεις για τη διαφορετική ευαισθησία που παρουσιάζουν πολλαπλασιαζόμενα και διαφοροποιημένα κύτταρα στην απενεργοποίηση του *TAF10*: TAF10 ^{-/-} καρκινικά κύτταρα F9, τα οποία διαφοροποιούνται με την προσθήκη ρετινοϊκού οξέος ή τροφοβλαστικά κύτταρα στις *TAF10*^{-/-} βλαστοκύστες μπορούσαν να επιβιώσουν (Metzger *et al.*, 1999; Mohan *et al.*, 2003). Μάλιστα πιο άμεσες αποδείξεις προέκυψαν από μελέτες σε ποντίκια στα οποία είχε πραγματοποιηθεί απενεργοποίηση του TAF10 από τα κύτταρα του δέρματος. Η απώλεια του TAF10 στα κερατινοκύτταρα έδειξε ότι είναι σημαντικό στην ανάπτυξη των κυττάρων του δέρματος στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, αλλά όχι και για τα κερατινοκύτταρα του δέρματος ενηλίκων ποντικών (Indra *et al.*, 2005). Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε κάποιος φαινότυπος, λόγω της απαλοιφής του TAF10 σε πλήρως διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Οι τεχνικές δυσκολίες στην πραγματοποίηση βιοχημικής ανάλυσης σε δέρμα ποντικών, λόγω της ποικιλίας των διαφορετικών κυτταρικών τύπων, αλλά και η θνησιμότητα που εμφάνιζαν τα TAF10KO ποντίκια εμπόδιζε την σε βάθος μελέτη του ρόλου του TAF10 μέχρι σήμερα.

Στην παρούσα μελέτη αρχικά πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση του *TAF10* σε εμβρυϊκό ήπαρ (*TAF10*^{lox/lox}/*Alfp-Cre* ποντίκια), σε ένα αναπτυξιακό στάδιο που τα πολλαπλασιαζόμενα ηπατοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε ηπατοκύτταρα ή

χολαγγειοκύτταρα (Zaret, 2002). Τα ηπατοειδικά TAF10KO έμβρυα παρουσίαζαν ευρεία απώλεια έκφρασης ηπατικών γονιδίων και ελαττωματικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων, με αποτέλεσμα να παρατηρείται ανεπιτυχής οργανογένεση του ήπατος. Η απενεργοποίηση των ηπατοειδικών γονιδίων σε TAF10KO εμβρυϊκά ηπατοκύτταρα συμφωνεί με τον πολύ καλά μελετημένο ρόλο του TFIIID στην ενεργοποίηση γονιδίων, αφού το TAF10 συνιστά βασικό παράγοντα του TFIIID. Παρολαυτά, κανείς δεν μπορεί να αποκλείσει το ενδεχόμενο η απενεργοποίηση να επηρεάζει ένα μικρότερο αριθμό γονιδίων, που έχουν καθοριστικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων και η μείωση των μεταγράφων των γονιδίων, που παρατηρείται συνολικά, να είναι συνέπεια της απουσίας ηπατοκυττάρων από το ήπαρ των TAF10KO εμβρύων.

Προκειμένου, να ξεπεράσουμε το παραπάνω πρόβλημα απενεργοποιήσαμε το TAF10 στο ήπαρ ενηλίκων, όπου επικρατεί ένας κυρίως κυτταρικός τύπος, τα ηπατοκύτταρα που βρίσκονται στην G0 φάση του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα με ό,τι συμβαίνει στα έμβρυα, η εξάλειψη του TAF10 στα ηπατοκύτταρα ενηλίκων ποντικών (P15-P22) δεν επηρεάζει την αρχιτεκτονική δομή του ήπατος και τη μορφολογία των ηπατοκυττάρων, που παραμένουν φυσιολογικά για ένα αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, αν και τα ποντίκια παρουσιάζουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά συμβατά με νανισμό. Ο νανισμός που παρατηρείται οφείλεται στα μειωμένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *Igfl* και *Ghr*, καθώς παρόμοια μείωση στα επίπεδα τους έχει παρατηρηθεί και σε άλλα ελλειμματικά για κάποια γονίδια μοντέλα, που παρουσιάζουν προβληματική ανάπτυξη (Lee *et al.*, 1998).

Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι η βιοχημική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε έδειξε ότι η απενεργοποίηση του *TAF10* προκαλεί αποσυναρμολόγηση του TFIIID συμπλόκου στις επιμέρους υπομονάδες του. Η απουσία στρατολόγησης και των υπολοίπων υπομονάδων του TFIIID στους υποκινητές των γονιδίων που ελέγχθησαν υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει το τυπικό TFIIID σε κάποιον ή κάποιους τουλάχιστον υποκινητές που θα ήταν δυνατόν να μην προσδιοριστεί από τη βιοχημική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αυτά αποκλείουν και την πιθανότητα της παρουσίας των συμπλόκων TFIC (TFIIID-like) σε TAF10KO ηπατοκύτταρα, αφού έξι από τα TAFs, των οποίων η στρατολόγηση ελέγχθηκε, είναι

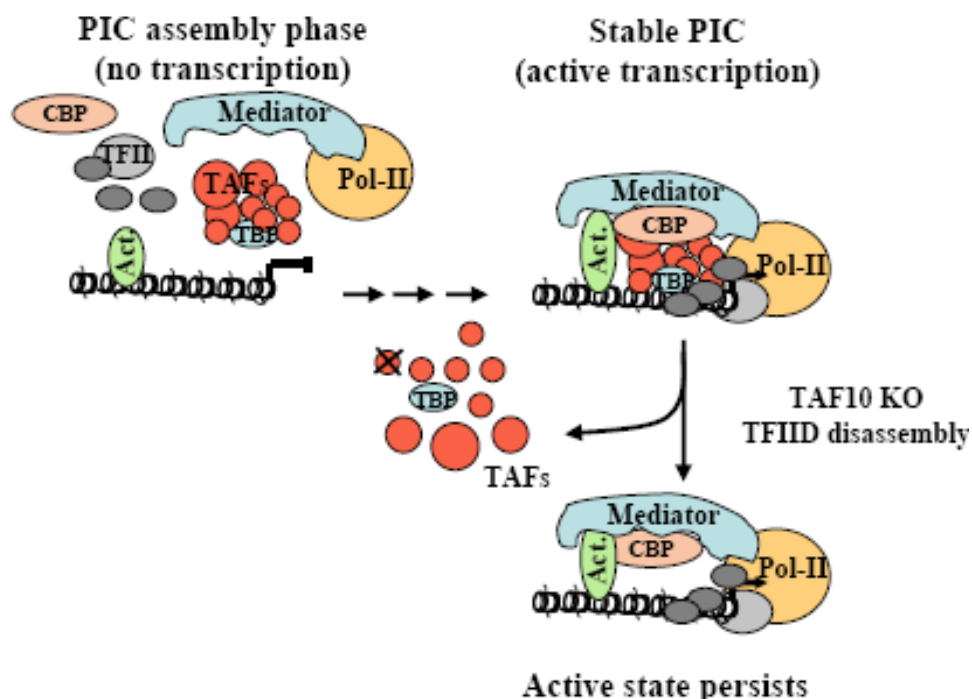
συστατικά και αυτών των συμπλόκων. Συμπερασματικά αναφέρουμε ότι τα ποντίκια *TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre* έχουν φυσιολογικά ηπατοκύτταρα, όσον αφορά τη μορφολογία τους, τα οποία δεν έχουν σταθερό και λειτουργικό TFIID σύμπλοκο.

Το TAF10 (TFIID) δεν είναι απαραίτητο για τη συνέχιση της μεταγραφής ήδη ενεργοποιημένων γονιδίων

Ένα από τα πιο απρόσμενα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι ο μικρός αριθμός γονιδίων που επηρεάζονται στο ήπαρ *TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre* ποντικών. Μία λογική εξήγηση για τη συγκεκριμένη παρατήρηση είναι η πιθανή αντικατάσταση του TFIID συμπλόκου από τους παράγοντες TBP2/TRF3 και TLF/TRF2 (TBP-related factors) στην πλειονότητα των υποκινητών. Πρόσφατα, έχει περιγραφεί μία τέτοια αντικατάσταση του TFIID από το σύμπλοκο TRF3/TAF3 στους υποκινητές γονιδίων, τα οποία είναι σημαντικά για τη διαφοροποίηση των σκελετικών μυών (Deato and Tjian, 2007). Επιπλέον, μία άλλη πιθανότητα είναι η ανταλλαγή του TFIID με τον παράγοντα TLF/TRF2, που επίσης θα μπορούσε να ελέγχει τη μεταγραφή των γονιδίων αυτών. Τόσο η πρώτη, όσο και η δεύτερη πιθανότητα αποκλείστηκαν με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Ο παράγοντας TBP2/TRF3 δεν είδαμε να εκφράζεται σε καμία από τις συνθήκες που ελέξαμε, έμβρυα και ενήλικα αγρίου τύπου και TAF10KO ποντίκια, ενώ για τον παράγοντα TLF/TRF2 αν και εκφραζόταν δεν ανιχνεύσαμε την παρουσία του σε κανένα από τους υποκινητές που εξετάστηκαν.

Το μέγεθος των αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων, λόγω της απενεργοποίησης του *TAF10* παρατηρήσαμε ότι εξαρτάται από το χρόνο της αρχικής ενεργοποίησης τους, σε σχέση με το χρονικό σημείο της εξάλειψης του *TAF10*. Η συντριπτική πλειονότητα των ηπατικών γονιδίων παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης πριν από την τρίτη εβδομάδα μεταγεννητικά, έχοντας ήδη υψηλά επίπεδα έκφρασης από τις 18.5 ημέρες εμβρυϊκά. Τα γονίδια των οποίων τα επίπεδα έκφρασης δεν αλλάζουν λόγω της απουσίας του TAF10 ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. Κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα λοιπόν αυτής της κατηγορίας γονιδίων αποτελεί ότι είναι

ήδη ενεργά στο χρονικό σημείο της απενεργοποίησης του *TAF10*. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης αποκάλυψαν την πλήρη αποδέσμευση των υπομονάδων του TFIIID συμπλόκου από τους υποκινητές τεσσάρων γονιδίων αυτής της κατηγορίας στο ήπαρ TAF10KO ποντικών, ενώ παρέμεναν προσδεδεμένοι άλλοι παράγοντες του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής, όπως συνενεργοποιητές, βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες και παράγοντες που προσδένονται ειδικά στο DNA. Επιπρόσθετα, το ένζυμο της πολυμεράσης RNA Pol-II διαπιστώθηκε ότι στρατολογείται στους υποκινητές αυτών των γονιδίων, γεγονός που συμφωνεί με τα υψηλά επίπεδα έκφρασης τους στο ήπαρ TAF10KO ποντικών στις 30 ημέρες μεταγεννητικά, ενώ το ίδιο συνέβαινε και στις 35 ημέρες. Όπως αναπαριστάται και στο σχήμα 1, τα παραπάνω αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι μετά το σχηματισμό ενός σταθερού και ενεργού συμπλοκου έναρξης της μεταγραφής (PIC), το σύμπλοκο TFIIID δεν είναι απαραίτητο για τη συνέχιση της μεταγραφής των γονιδίων και οι υπόλοιποι παράγοντες του PIC συμπλόκου είναι εφικτό να υποστηρίξουν τη μεταγραφή τους.



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση της στρατολόγησης παραγόντων του PIC συμπλόκου στους υποκινητές γονιδίων της 1^{ης} κατηγορίας. Η απώλεια του *TAF10* παράγοντα αν και οδηγεί σε αποσυναρμολόγηση του TFIIID συμπλόκου δεν επηρεάζει τη σταθερότητα του PIC συμπλόκου, το οποίο παραμένει ενεργό.

Το ίδιο πρότυπο αλλαγών παρατηρήσαμε και όταν ελέξαμε την έκφραση mic-RNAs, που παράγονται στο ήπαρ ποντικών, λόγω της απενεργοποίησης του *TAF10*. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αντιληπτό με διάφορες μελέτες ότι η έκφραση της πλειονότητας των mic-RNAs είναι Pol-II εξαρτώμενη. Τα πρόδρομα μόρια από τα οποία θα παραχθούν τα 21-23 νουκλεοτιδίων μικρά RNAs φαίνεται να υπόκεινται στις ίδιες διεργασίες με τα μετάγραφα των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, όπως τη διαδικασία του ματίσματος και την πολυαδενυλίωση (Tam, 2001; Aukerman and Sakai, 2003). Επιπλέον, ρυθμίζονται από τα ίδια ρυθμιστικά στοιχεία, όπως οι αλληλουχίες ενισχυτών, που ελέγχουν την έκφραση κάποιων mic-RNAs (Brennecke *et al.*, 2003). Πρόσφατα, μελέτες αποκάλυψαν επίσης ότι στον υποκινητή του mir-23a~27a~24-2 στρατολογείται το ένζυμο της RNA Pol-II (Lee *et al.*, 2004). Στη παρούσα εργασία φαίνεται ότι τα mic-RNAs που εκφράζονται στο ήπαρ ποντικών ακολουθούν και το ίδιο πρότυπο αλλαγών με τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Η πλειονότητα των mic-RNAs που εκφράζονται στο ήπαρ δε φαίνονται να αλλάζουν, ενώ είναι πολύ μικρός ο αριθμός αυτών που η έκφραση τους μεταβάλλεται με ένα συντελεστή μεγαλύτερο του δύο. Με την παρούσα εργασία επιβεβαιώνεται η Pol-II εξαρτώμενη έκφραση αυτών των RNAs και εμφανίστηκαν να επηρεάζονται κάποια mic-RNAs, που πιθανότατα εκφράζονται ειδικά στα ηπατοκύτταρα.

Σε μία πρόσφατη μελέτη είχε προταθεί η βαθμιαία εγκαθίδρυση ενός υψηλής πολυπλοκότητας δικτύου μεταγραφικών παραγόντων κατά την ανάπτυξη του ήπατος. Το δίκτυο αυτό διακρίνεται από ένα ασυνήθιστα υψηλό επίπεδο πλαστικότητας, όσον αφορά τις ρυθμιστικές επιδράσεις, το οποίο παρέχει τις μοριακές βάσεις για παρατηρήσεις που έχουν σχέση με κυρίαρχες ή δευτερεύουσες λειτουργίες των επιμέρους μεταγραφικών παραγόντων. Ο αυξανόμενος αριθμός των παραγόντων που στρατολογούνται στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων κατά την ανάπτυξη του ήπατος, θα μπορούσε εύκολα κανείς να σκεφτεί ότι έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού ανακύκλωσης του ενζύμου της RNA πολυμεράσης στους υποκινητές των γονιδίων και επομένως στη σύνθεση περισσότερων νέων μεταγράφων. Όμως, η παραπάνω μελέτη έδειξε ότι συνδέεται περισσότερο με τη δημιουργία πιο σταθερών συμπλόκων έναρξης της μεταγραφής, τα οποία είναι λιγότερο ευαίσθητα στην απουσία κάποιου σημαντικού παράγοντα για τη δομή τους (Kyrimizi *et al.* 2006).

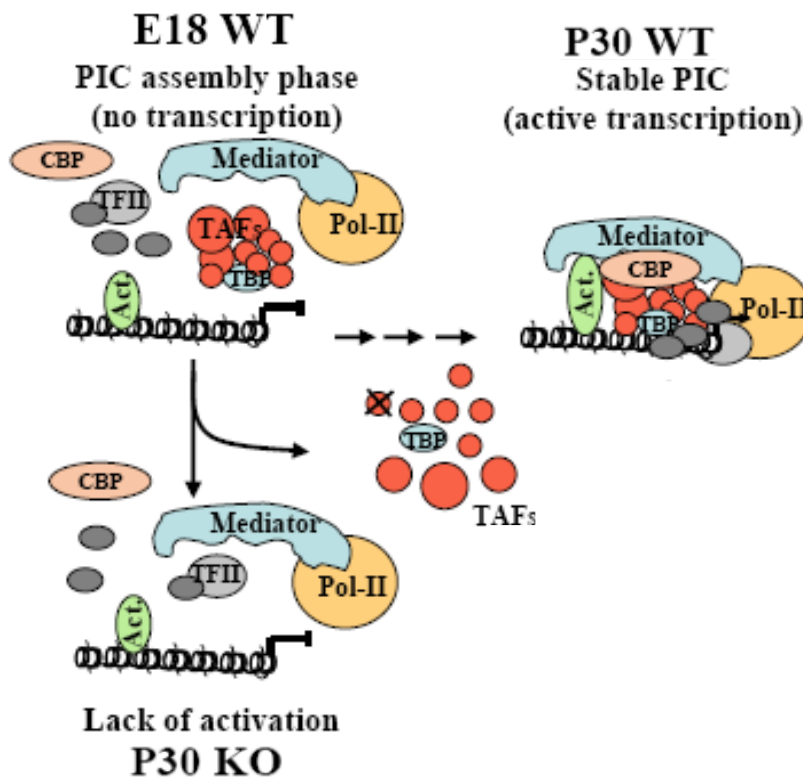
Στην παρούσα εργασία αποκαλύπτεται ότι η υψηλής πολυπλοκότητας οργάνωση που αποκτούν οι υποκινητές ιστο-ειδικών γονιδίων σε πλήρως διαφοροποιημένα ηπατοκύτταρα είναι εφικτό να διατηρήσει υψηλά επίπεδα μεταγραφής για ένα σημαντικό χρονικό διάστημα, ακόμα και όταν απουσιάζει το βασικό για την αναγνώριση των υποκινητών πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο TFIID. Υπάρχουν διάφορες σκέψεις που θα μπορούσε να κάνει κάποιος για το βιολογικό ρόλο του συγκεκριμένου φαινομένου. Ένα πολύπλοκο μεταγραφικό δίκτυο μπορεί να παρέχει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα, όπως το να διασφαλίζει την όσο γίνεται μειωμένη απόκριση στα διαφορετικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα, τα οποία είναι δυνατόν να μεταβάλλουν παροδικά τα επίπεδα έκφρασης ή την ενεργότητα ενός παράγοντα. Μ' αυτόν τον τρόπο, το δίκτυο συμβάλλει σημαντικά στη διατήρηση της ηπατικής ρύθμισης και λειτουργίας και κατ' επέκταση στη διατήρηση του συνολικού φαινοτύπου του ιστού.

Το TAF10 (TFIID) είναι απολύτως απαραίτητο για την αρχική ενεργοποίηση των ηπατικών γονιδίων

Η προσεκτική παρατήρηση και μελέτη των αποτελεσμάτων από την ανάλυση του προτύπου γονιδιακής έκφρασης των TAF10KO ποντικών, που πραγματοποιήθηκε με DNA-microarrays, οδήγησε σε ένα χρήσιμο συμπέρασμα για τη συνέχεια της εργασίας. Η πλειονότητα των ηπατοειδικών γονιδίων από τα 184 γονίδια, των οποίων τα επίπεδα του mRNA βρέθηκαν να επηρεάζονται αρνητικά από την απουσία του TAF10, δεν εκφράζονταν στο ήπαρ εμβρύων 18.5 ημερών αγρίου τύπου (E18.5WT). Έτσι, λοιπόν για γονίδια που επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό, όπως *Mur3*, *Cyp7B1*, *Slco1a1*, *CAR3* και *Cyp2f2*, το στάδιο της αρχικής ενεργοποίησής τους κατά την ανάπτυξη ταυτίζεται με το χρονικό σημείο της απενεργοποίησης του γονιδίου *TAF10* (ημέρες 14-21 μεταγεννητικά). Η μεταγραφή των συγκεκριμένων γονιδίων ήταν πολύ χαμηλή σε TAF10KO ποντίκια, σχεδόν μηδαμινή. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκε στρατολόγηση του ενζύμου της RNA Pol-II και άλλων παραγόντων του προεναρκτηρίου συμπλόκου της μεταγραφής στους υποκινητές αυτών των γονιδίων στο ήπαρ TAF10KO ποντικών. Η απουσία τους αυτή υποδηλώνει ότι χωρίς

την παρουσία του σύμπλοκου TFIIID στην περιοχή του υποκινητή ενός γονιδίου δεν σχηματίζεται ενεργό σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι τα γονίδια της παραπάνω κατηγορίας αποτυγχάνουν να ενεργοποιηθούν, λόγω της απουσίας του TFIIID συμπλόκου και υποστηρίζουν το μηχανιστικό μοντέλο που προτείνεται στο σχήμα 2., σύμφωνα με το οποίο το σύμπλοκο TFIIID είναι απολύτως απαραίτητο στην αρχική φάση σχηματισμού του PIC συμπλόκου.

Το 65% (2/3) περίπου των γονιδίων, που τα επίπεδα του mRNA τους βρέθηκαν να επηρεάζονται αρνητικά, έδειχναν ηπιότερη μείωση της έκφρασής τους φθάνοντας το 30%-50% σε σχέση με την έκφραση στο ήπαρ φυσιολογικών ποντικών (P30WT). Η ανάλυση που έγινε για πέντε γονίδια από αυτή την κατηγορία αποκάλυψε ότι η αρχική τους ενεργοποίηση πραγματοποιείται την πρώτη εβδομάδα μεταγεννητικά και τα επίπεδα των μεταγράφων τους, στο χρονικό σημείο της απενεργοποίησης του *TAF10*, φθάνουν ένα ποσοστό 40%-50% των μέγιστων, που κατέχουν σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια. Η βαθμιαία αύξηση των επιπέδων του mRNA ενός γονιδίου σε ένα κυτταρικό πληθυσμό μπορεί να οφείλεται, είτε στο γεγονός ότι το γονίδιο δεν έχει ενεργοποιηθεί ακόμα σε όλα τα κύτταρα, είτε δεν είναι ακόμα ενεργά και τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου σε ένα κύτταρο, στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο. Επομένως, ο μικρότερος βαθμός μείωσης της έκφρασής τους μπορεί να εξηγηθεί από την αδυναμία της περαιτέρω ενεργοποίησης των γονιδίων αυτών, που οφείλεται σε νέα μεταγραφικά γεγονότα.



Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση της στρατολόγησης παραγόντων του PIC συμπλόκου στους υποκινητές γονιδίων της 2^{ης} κατηγορίας. Η απώλεια του TAF10 παράγοντα οδηγεί σε αποσυναρμολόγηση του TFIID συμπλόκου και εμποδίζει το σχηματισμό ενός σταθερού και ενεργού PIC συμπλόκου στους υποκινητές των γονιδίων της 2^{ης} κατηγορίας.

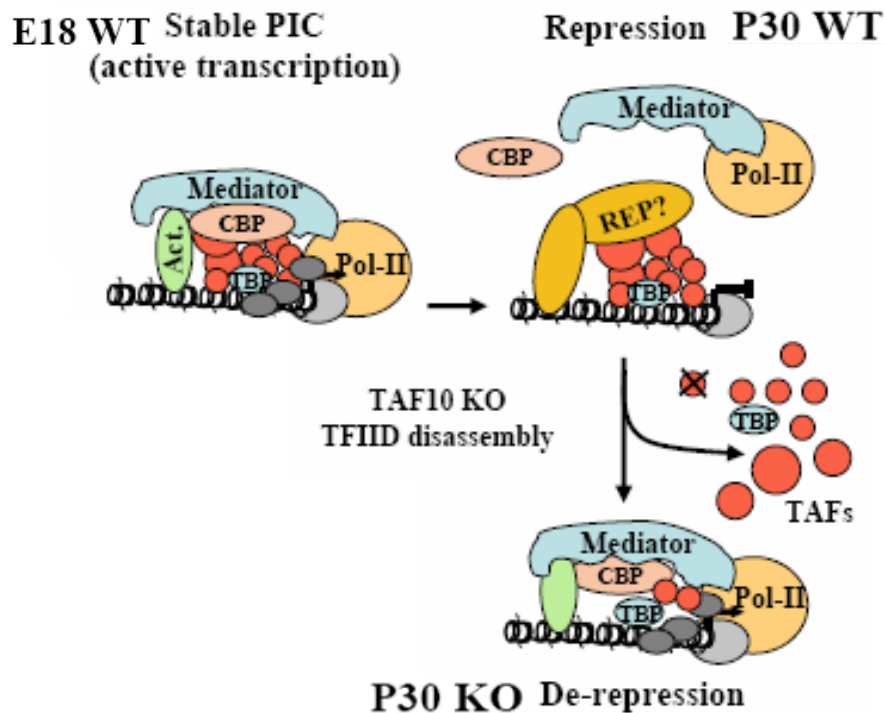
Ο ρόλος του TAF10 (TFIID) στη μεταγεννητική αποσιώπηση ηπατικών γονιδίων

Ο βασικός μεταγραφικός παράγοντας TFIID είναι ένα από τα καλύτερα μελετημένα συστατικά της βασικής μεταγραφικής μηχανής. Ο ρόλος του στη διαδικασία της μεταγραφής ήταν πάντα συνδεδεμένος με την ενεργοποίηση γονιδίων (Orphanides *et al.*, 1996; Dorris and Struhl, 2000). Έτσι, δεν ήταν αναμενόμενο να δει κανείς 233 γονίδια, των οποίων η έκφραση αυξάνεται σε TAF10KO ποντίκια. Μία λογική εξήγηση για αυτή την παρατήρηση, θα μπορούσε να αποτελεί ότι

επηρεάζονται έμμεσα από την αποσυναρμολόγηση του TFIIID και συνιστούν το σύνολο δευτερευουσών αλλαγών. Μία πιο προσεκτική μελέτη των ηπατικών γονιδίων αυτής της κατηγορίας και σύγκριση της έκφρασής τους στο ήπαρ εμβρύων και ενήλικων ποντικών αποκάλυψε ότι η πλειονότητα τους αποσιωπώνται μεταγεννητικά. Η λεπτομερής ανάλυση του προτύπου έκφρασης πέντε γονιδίων αυτής της κατηγορίας, *Afp*, *Akr1b7*, *Igfbp1*, *H19* και *Igf2*, έδειξε ότι τα επίπεδα του mRNA τους βαθμιαία μειώνονται στα μεταγεννητικά στάδια ανάπτυξης του ήπατος, φθάνοντας το κατώτερο όριο ευαισθησίας της μεθόδου RT-PCR τις ημέρες 14-21 μεταγεννητικά. Το ένζυμο της RNA πολυμεράσης II, ο βασικός μεταγραφικός παράγοντας TFIIIB και το σύμπλοκο του διαμεσολαβητή (Mediator) δεν ήταν να δυνατόν να προσδιοριστούν στους υποκινητές αυτών των γονιδίων στο ήπαρ ενήλικων ποντικών (P30WT), γεγονός που συνδέεται με την καταστολή τους μεταγεννητικά. Ωστόσο, ιδιαίτερα ενδιαφέρον ήταν ότι οι υπομονάδες του TFIIID συμπλόκου παραμένουν προσδεδεμένες στους υποκινητές των παραπάνω γονιδίων στο συγκεκριμένο στάδιο. Το ερώτημα που δημιουργείται στο σημείο αυτό είναι ποιός είναι ο ρόλος του TAF10 (TFIIID) στον υποκινητή ενός ανενεργού γονιδίου. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η στρατολόγηση του TFIIID εξυπηρετεί το μαρκάρισμα της περιοχής και διατηρεί τις ρυθμιστικές αλληλουχίες ικανές για εκ νέου ενεργοποίηση, φαινόμενο ανάλογο με ό,τι παρατηρείται κατά τη μίτωση σε καρκινικά κύτταρα HeLa (Christova and Oelgeschlager, 2002). Σε μία τέτοια περίπτωση το σύμπλοκο TFIIID θα διαδραμάτιζε σημαντικό ρόλο στη διατήρηση μιας ανοιχτής χρωματινικής δομής στη ρυθμιστική περιοχή, δεκτικής σε ενδεχόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση κάτω από συγκεκριμένες φυσιολογικές συνθήκες. Η παραπάνω πιθανότητα μπορεί να δικαιολογήσει και την άμεση ενεργοποίηση των γονιδίων *Afp* και *H19* σε ηπατοκαρκινικά κύτταρα (Spear, 1999; Ariel *et al.*, 1998).

Μία πιο πιθανή εξήγηση για τη στρατολόγηση του TFIIID στον υποκινητή ενός ανενεργού γονιδίου αποτελεί ότι μπορεί να συνεργάζεται με πρωτεΐνες καταστολείς και έτσι να προκαλεί την αποσιώπηση του γονιδίου. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας εργασίας υποστηρίζουν αυτή τη δεύτερη θεωρία. Συγκεκριμένα, στο ήπαρ TAF10KO ποντικών τα TAFs αποδεσμεύονται από τους υποκινητές των γονιδίων *Afp*, *Akr1b7* και *Igfbp1*, το TBP παραμένει προσδεδεμένο,

ενώ στρατολογούνται εκ νέου το σύμπλοκο του διαμεσολαβητή και το ένζυμο της RNA πολυμεράσης II. Η νέα διαμόρφωση που αποκτά ο υποκινητής των γονιδίων αυτών συνδέεται με την εκ νέου ενεργοποίησή τους. Το γεγονός ότι παρατηρήθηκε ενεργοποίηση ανενεργών γονιδίων, τα οποία ήταν ενεργά σε ένα προγενέστερο αναπτυξιακό στάδιο καταδεικνύει την αποκαταστολή των γονιδίων, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση της στρατολόγησης παραγόντων του PIC συμπλόκου στους υποκινητές γονιδίων της 4^{ης} κατηγορίας. Η απώλεια του TAF10 παράγοντα οδηγεί σε αποσυναρμολόγηση του TFIID συμπλόκου που βρισκόταν να αλληλεπιδρά με ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών-καταστολέων, το οποίο αποσταθεροποιείται και πραγματοποιείται αποκαταστολή των γονιδίων.

Ο ρόλος του TAF10 (TFIID) στην «επικοινωνία» του υποκινητή με ρυθμιστικές αλληλουχίες άνωθεν του υποκινητή

Ο μηχανισμός αποσιώπισης των ηπατικών γονιδίων της 4^{ης} κατηγορίας δεν είναι ιδιαίτερα γνωστός, με εξαίρεση για το γονίδιο *Afp*. Συγκεκριμένα είναι γνωστό ότι η πρόσδεση του παράγοντα p53 στη ρυθμιστική περιοχή SBE/p53 του γονιδίου *Afp*

διευκολύνει τη στρατολόγηση του mSin3a συμπλόκου συγκαταστολέων και αντικαθιστά τον κύριο ενεργοποιητή FoxA2 (Nguyen *et al.*, 2005). Ανεξάρτητες *in vitro* μελέτες περιγράφουν ότι ο παράγοντας NcoR, μέλος του συμπλόκου των συγκαταστολέων, μπορεί να αλληλεπιδράσει με το TAF9, συστατικό του συμπλόκου TFIID, επιδρώντας στη διαμόρφωση του με τέτοιο τρόπο, ώστε να μην είναι εφικτό να co-ductive (Muscat *et al.*, 1998). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι ακόμα και ο ίδιος ο παράγοντας p53 μπορεί να αλληλεπιδράσει με τους παράγοντες TAF1 και TAF9 (Buschmann *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007). Επομένως, είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι οι TAFs παράγοντες μπορούν να έχουν ενεργό ρόλο στη σίγηση ηπατικών γονιδίων μεταγεννητικά, παρέχοντας επιφάνειες αλληλεπίδρασης σε πρωτεΐνες-καταστολείς. Η αποδέσμευση των TAFs από τον υποκινητή του γονιδίου *Afp* σε TAF10KO ηπατοκύτταρα θα μπορούσε να προκαλεί την αποσταθεροποίηση του συμπλόκου των καταστολέων και να επιτρέπει κατα συνέπεια την στρατολόγηση εκ νέου του διαμεσολαβητή και της RNA πολυμεράσης II. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης που πραγματοποιήθηκαν στον υποκινητή του γονιδίου *Afp*, στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας, επιβεβαιώνουν την παραπάνω υπόθεση. Έτσι, στη ρυθμιστική περιοχή του *Afp* που βρίσκεται άνωθεν του σημείου έναρξης της μεταγραφής παρατηρήθηκε αποδέσμευση των πρωτεϊνών-καταστολέων p53/Sin3a και η αντικατάστασή τους από τους ενεργοποιητές FoxA2 και CBP μετά την αποσυναρμολόγηση του TFIID συμπλόκου. Από την άλλη πλευρά η αντίστροφη αντικατάσταση, των ενεργοποιητών από καταστολείς, που πραγματοποιείται φυσιολογικά κατα την ανάπτυξη του ήπατος από το εμβρυϊκό στάδιο σε μεταγεννητικό στάδιο ανάπτυξης, δεν εξαρτάται από το TFIID, καθώς είναι παρών στον υποκινητή του γονιδίου και στα δύο στάδια. Επομένως, στο μοντέλο που προτείνεται το σύμπλοκο TFIID εμπλέκεται χαρακτηριστικά στην «επικοινωνία» των δύο ρυθμιστικών αλληλουχιών για τη διατήρηση της ανενεργής κατάστασης του γονιδίου μεταγεννητικά.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν τον ενεργό ρόλο που έχει το σύμπλοκο TFIID στη σίγηση διαφόρων ηπατικών γονιδίων μεταγεννητικά και τη συνεισφορά του στη ρύθμιση κυτταρο-ειδικών προτύπων έκφρασης. Μάλιστα πρόσφατα σε μία μελέτη της στρατολόγησης του TAF1 και επομένως του TFIID στο γονιδίωμα των

ινοβλαστικών κυττάρων IMR90 βρέθηκε να είναι παρών στους υποκινητές του 4.5% των ανενεργών γονιδίων (Kim *et al.*, 2005). Η στρατολόγηση του TFIIID σε έναν τόσο μεγάλο αριθμό υποκινητών ανενεργών γονιδίων υποδηλώνει ότι ο ρόλος του στη σίγηση γονιδίων μπορεί να μην περιορίζεται σε ηπατοκύτταρα, αλλά να είναι γεγονός και σε άλλους κυτταρικούς τύπους.

Υλικά και Μέθοδοι

1. Μέθοδοι

Διασταυρώσεις και γονοτυπική ταυτοποίηση ποντικών

Αρχικά, ποντίκια με γονότυπο $TAF10^{loxP}$ διασταυρώθηκαν με ποντίκια με γενετικό υπόβαθρο CBA-CAxC57Bl/10 και μεγάλωσαν σε κατάλληλα διαμορφωμένα κλουβιά με ελεγχόμενη ρύθμιση της θερμοκρασίας και της υγρασίας, στα οποία ανά 12 ώρες υπήρχε αλλαγή της φωτεινότητας. Προκειμένου, να πραγματοποιήσουμε ηπατοειδική εξάλειψη του γονιδίου $TAF10$, διασταυρώθηκαν $TAF10^{loxP}$ ποντίκια (που είχαν δημιουργηθεί από το εργαστήριο του Laszlo Tora), τα οποία έχουν loxP θέσεις αναγνώρισης της Cre ρεκομπινάσης εκατέρωθεν του εξωνίου 2 του γονιδίου $TAF10$, με διαγονιδιακά ποντίκια $Alb-Cre$ και $Alfp-Cre$, στα οποία η έκφραση της Cre ρεκομπινάσης πραγματοποιείται σε ενήλικο και εμβρυϊκό στάδιο, αντίστοιχα. Με κατάλληλες διασταυρώσεις αποκτήθηκαν τα ποντίκια $TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre$ και $TAF10^{lox/lox}/Alfp-Cre$, στα οποία η εξακρίβωση της απαλοιφής του δευτέρου εξωνίου του γονιδίου $TAF10$ γινόταν με ανάλυση PCR σε γενωμικό DNA απομονωμένο από το ήπαρ τους και τη χρήση κατάλληλων εκκινητών, ενώ η ταυτοποίηση των γονοτύπων τους με ανάλυση PCR σε γενωμικό DNA προερχόμενο κάθε φορά από την ουρά τους.

Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών

Αρχικά κόβεται περίπου 0.5cm-1cm της ουράς του ποντικού και τοποθετείται σε eppendorf σωληνάκι με 700 μl tailing mix buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1% SDS και 100 mM EDTA) και 25 μl πρωτεΐνωση-K (10mg/ml), όπου αφήνεται όλη νύχτα στους 55°C για να δράσει το ένζυμο. Έπειτα, στο σωληνάκι προστίθενται 10μl RNase A (10mg/ml) και ακολουθεί 1 ώρα επώασης στους 37°C για την αποικοδόμηση του RNA. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται εκχυλίσεις φαινόλης/χλωροφορμίου, για να καθαρίσει το δείγμα DNA, που τελικά κατακρημνίζεται με ίσο όγκο ισοπροπανόλης. Το DNA, με τη μορφή νήματος που

αποκτά, ψαρεύεται με γυάλινη πιπέτα Pasteur με αγκιστροειδές τυφλό άκρο και αφού ξεπλυθεί σε 70% αιθανόλη, αφήνεται να στεγνώσει. Τέλος, το άκρο της πιπέτας με το DNA τοποθετείται σε καινούριο σωληνάκι με 200 μl νερό, για να διαλυθεί το DNA. Για κάθε PCR αντίδραση της γονοτύπισης χρησιμοποιούνται 2μl από το δείγμα που αντιστοιχεί σε 0.2-0.5 μg γενωμικού DNA. Το ίδιο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση γενωμικού DNA από το ήπαρ ποντικών, με μοναδική διαφοροποίηση την πραγματοποίηση περισσότερων εκχυλίσεων με διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου.

Απομόνωση ολικού RNA από το ήπαρ ποντικού

Τα δείγματα ολικού RNA απομονώθηκαν με τη μέθοδο της όξινης φαινόλης. Αρχικά το ήπαρ του ποντικού ξεπλένεται με PBS και τοποθετείται σε Solution D (4M θειοκυανικό γουανίδιο, 25mM κιτρικό νάτριο pH:7.0, 0.5% σαρκosύλιο, 0.72% β-μερκαπτοαιθανόλη 14.3M). Το ήπαρ ομογενοποιείται σε ομογενοποιητή (Polytron) και προστίθεται κατά σειρά 1/10 του όγκου 2M οξικό αμμώνιο, 1 όγκος φαινόλης pH:4.0 και 2 όγκοι Senva (χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24/1). Ακολουθεί επώαση 15 λεπτών στον πάγο και φυγοκέντρηση σε 3000 rpm για 40 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο εκχυλίζεται με ίσο όγκο ουδέτερης φαινόλης pH:7.5 και φυγοκεντρείται για άλλα 40 λεπτά στις 3000rpm, στους 4°C. Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και τοποθετείται στους -20°C για τουλάχιστον 12-14 ώρες. Κατόπιν, φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στους 4°C στις 14000 rpm, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και η πελέττα στεγνώνεται από τα υπολείμματα της αλκοόλης και επαναδιαλύεται σε 200-300 μl ενέσιμου H₂O. Μετά την πλήρη επαναιώρησή του το RNA ποσοτικοποιείται με φωτομέτρηση στα 260 nm και η ποιότητά του ελέγχεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

Μετά από την απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε ένας επιπλέον καθαρισμός του με τη χρήση του RNeasy Kit από την Qiagen, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Επώαση του RNA με DNάση

Αρχικά 15-20μg RNA επωάζονται με 1μl DNάση (10u/l χωρίς RNάση), 1x ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης (200mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 30 mM MgCl₂) για 30 λεπτά στους 25°C. Μετά την παραπάνω επώαση πραγματοποιείται εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25/24/1. Στο υπερκείμενο προστίθενται 2.5 όγκοι απόλυτης αιθανόλης και 1/10 όγκου οξικό νάτριο και αφήνεται στους -80°C για 1ώρα ή στους -20°C για 16 ώρες (O/N). Το δείγμα φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στις 14000 rpm και η πελέττα ξεπλένεται δύο φορές με 70% αιθανόλη. Απομακρύνεται η αιθανόλη, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε 30 μl ενέσιμο H₂O.

Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse-Transcription)

Για την αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιείται 1 μg RNA κατεργασμένου με DNάση. Σε αυτά προστίθενται 1.2μl ολιγομερείς εκκινητές που υβριδοποιούν σε polyA ουρές των μεταγράφων (oligodT 100ng/λ), 2μl μείγματος των τεσσάρων dNTPs (10mM), 4μl 5x ρυθμιστικό διάλυμα MMLV RT και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 19μl με ενέσιμο H₂O. Το μίγμα επωάζεται για 5 λεπτά στους 65°C και αφήνεται να κρυώσει για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, προστίθεται 1μl MMLV Reverse Transcriptase (200u/μl) και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1 ώρα.

Ανάλυση RT-PCR για τον προσδιορισμό των επιπέδων του mRNA διαφόρων γονιδίων με τη χρήση ραδιενεργών νουκλεοτιδίων (Hot-PCR)

Ο έλεγχος των μεταβολών στα επίπεδα έκφρασης των διαφόρων γονιδίων και η ποσοτικοποίηση τους στα δείγματα έγινε με ραδιενεργά PCR παρουσία 10 μCi [α -³²P] dCTP, των οποίων τα προϊόντα αναλύθηκαν σε μη αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 5%. Οι αντιδράσεις πολυμερισμού έγιναν σε τελικό όγκο 50μl, σε διάλυμα που περιείχε 50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH:8.5, 1.5mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.1mM dNTP, 0.5M betaine, 0.4μM από κάθε εκκινητή. Οι συνθήκες

της αντίδρασης ήταν οι ακόλουθες: 94°C/3min, [94°C/30sec, 50-65°C/30sec, 72°C/1min] x 20-30 cycles, 72°C/ 5min. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη χρήση του phosphoimage analyzer και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του μέσου όρου των τιμών από 10 διαφορετικά άτομα για κάθε περίπτωση σε ενήλικα 30 ημερών και έμβρυα E18.5 αγρίου τύπου και TAF10KO ποντίκια και από 5 σε κάθε περίπτωση για ενήλικα άτομα 35 ημερών. Κανονικοποίηση των τιμών με GAPDH είχε προηγηθεί της στατιστικής ανάλυσης, ενώ κανονικοποίηση και με Arbp έδωσε τα ίδια αποτελέσματα. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με την πραγματοποίηση t-test, όπου το p-value ήταν $p < 0.05$ ή $p < 0.01$ για τις περιπτώσεις των γονιδίων που φαίνονται να αλλάζουν. Για τον προσδιορισμό του προτύπου έκφρασης κατά την ανάπτυξη κάποιων γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν δεξαμενές με δείγματα RNA από περίπου 5 άτομα για κάθε στάδιο.

Απομόνωση πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από το ήπαρ ποντικών

Το ήπαρ των ποντικών αφού ξεπλυθεί με PBS τοποθετείται σε διάλυμα σουκρόζης A που περιέχει και 0.1% NP-40 [0.32M σουκρόζη, 15mM Hepes pH 7.9, 60mM KCl, 2mM EDTA, 0.5mM EGTA, 0.5% BSA, 0.5mM spermidine, 0.15mM spermine, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, 0.5mM aprotinin, protease inhibitor cocktail], όπου κόβεται σε μικρά κομμάτια και ομογενοποιείται σε Teflon dounce. Στη συνέχεια το δείγμα φιλτράρεται μέσα από γάζα και ακολουθεί δεύτερη ομογενοποίηση σε glass dounce με 10 επαναλήψεις, από το οποίο λαμβάνονται σε ένα μεγάλο ποσοστό αδιάρρηκτοι πυρήνες. Έπειτα, ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 5min/2.600rpm/4°C. Η πελέττα που σχηματίζεται επαναδιαλύεται σε Buffer A [25mM Hepes pH 7.9, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.1% NP40, 1mM DTT, 0.5mM PMSF, 10μg/ml aprotinin] και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 5min/2.600rpm/4°C. Η πελέττα που σχηματίζεται αυτή τη φορά επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο (3V) RIPA buffer [50mM Tris p.H 7.5, 1% NP-40, 0.25% Deoxycholate, 400mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glycerol, 0.5mM PMSF, 10μg/ml aprotinin and protease inhibitor cocktail

(Roche)]. Το δείγμα αναδεύεται για 20min στους 4°C και έπειτα φυγοκεντρείται για 15min/14.000rpm/4°C. Το υπερκείμενο αποτελεί το πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Το πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα, αραιώνεται κατάλληλα με Extract dilution Buffer [50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glycerol, 0.5mM PMSF, 10μg/ml aprotinin]. Το πυρηνικό εκχύλισμα υπόκειται σε καθαρισμό με επώαση με πρωτεΐνη G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) για 1h, 4°C υπό ανάδευση και τελικά υπόκειται σε ανοσοκατακρήμνιση για 5h, 4°C υπό ανάδευση, με τη χρήση του ειδικού για τον παράγοντα ή τον επίτοπο αντίσωμα (10μg) και πρόσδεση του σε πρωτεΐνη G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech). Τα σφαιρίδια αρχικά ξεπλένονται 4 φορές για 10 min στους 4°C με διάλυμα έκπλυσης [50mM Tris p.H 7.5, 0,1% NP-40, 300mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glycerol, 0.5mM PMSF, 10μg/ml aprotinin, protease inhibitor cocktail (Roche)] και στη συνέχεια συλλέγονται σε αποδιατακτικό διάλυμα 2X SDS-loading buffer και πραγματοποιούνται πειράματα ανοσοαποτύπωσης.

Πειράματα ανοσοαποτύπωσης

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αφού ποσοτικοποιηθούν με αντιδραστήριο Bradford και αναμειχθούν με ίσο όγκο 2X SDS-loading buffer, αφήνονται για αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους 100°C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα SDS-ακρυλαμίδης. Το πήκτωμα μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ίσου μεγέθους μεταφέρεται σε ειδική συσκευή μεταφοράς με την ηλεκτροφόρηση της οποίας επιτυγχάνεται η μεταφορά και υβριδοποίηση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Η μεμβράνη μετά την ηλεκτροφόρηση αφήνεται σε διάλυμα TBST [20mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0.1% Tween] με 5% γάλα όλη τη νύχτα στους 4°C, για να εμποδιστεί η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Ακολουθούν 3 ξεπλύματα της μεμβράνης για 10 λεπτά το καθένα με διάλυμα TBST και η επώαση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το πρώτο αντίσωμα σε διάλυμα 1% γάλα /TBST. Στη συνέχεια η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές, όπως παραπάνω με διάλυμα TBST και επωάζεται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το δεύτερο αντίσωμα διαλυμένο σε 1%

γάλα/TBST. Ακολουθούν 3 ξεπλύματα για 10 λεπτά με διάλυμα TBST και η μεμβράνη επωάζεται για 5 λεπτά με αντιδραστήριο ECL. Τέλος, η μεμβράνη εκτίθεται σε φιλμ.

Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (ChIP assays)

Το ήπαρ από το ενήλικο ζώο απομονώνεται, ξεπλένεται σε PBS και κόβεται σε μικρά κομματάκια σε τρυβλίο Petri με 10ml 1x PBS. Στη συνέχεια τα κομματάκια χωρίζονται σε 2 σωληνάκια των 14 ml και προστίθεται 1x PBS μέχρι ο τελικός όγκος στο καθένα να φτάσει τα 9 ml. Προστίθεται 1ml φορμαλδεΐδη 10% σε κάθε σωληνάκι και έπειτα τα δείγματα μεταφέρονται σε glass dounce και ομογενοποιούνται. Μετά το πέρασμα 10 λεπτών μονιμοποίησης ακολουθεί η εξουδετέρωση με γλυκίνη σε τελική συγκέντρωση 0.125M και η τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στους 1000rpm, 4°C για 5 λεπτά και ακολουθούν τρία πλυσίματα με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις: 1 με 1x PBS, 1 με διάλυμα B [0.25% triton-X, 10mM EDTA pH 8.0, 0.5mM EGTA pH 8.0, 20mM HEPES pH 7.6] για 10 λεπτά στους 4°C με περιστροφή και 1 πλύσιμο με διάλυμα C [0.15M NaCl, 1mM EDTA pH 8.0, 0.5mM EGTA pH 8.0, 20mM HEPES pH 7.6] για 10 λεπτά στους 4°C με περιστροφή. Η κάθε πελέττα επαναδιαλύεται σε 1x Sonication buffer [0.15M NaCl, 1mM EDTA pH 8.0, 0.5mM EGTA pH 8.0, 20mM HEPES pH 8.0, 1% triton-X, 0.1% SDS] τα δείγματα ενώνονται και μετά μοιράζονται σε σωληνάκια διαμόλυνσης. Ακολουθεί το σπάσιμο της χρωματίνης με υπερήχους (sonication), η μεταφορά των δειγμάτων σε erpendorf σωληνάκια και η φυγοκέντρησή τους για 30 λεπτά στους 14000 rpm, 4°C.

Τα υπερκείμενα ενώνονται και μεταφέρονται σε σωληνάκι 14 ml που περιέχει κολώνα με σφαιρίδια πρωτεΐνη G-Sepharose μαζί με 0.1% BSA, και το σωληνάκι αφήνεται να περιστρέφεται για 2 ώρες στους 4°C, με σκοπό να μειωθούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις (preclearing).

Στη συνέχεια αφού φυγοκεντρηθεί, μεταφέρεται και μοιράζεται σε erpendorf σωληνάκια, με 20μl σφαιριδίων πρωτεΐνη G-Sepharose το καθένα και ανάλογη

ποσότητα αντισώματος, τα οποία αφήνονται για τουλάχιστον 12 ώρες να περιστρέφονται στους 4°C.

Τα σφαιρίδια ξεπλένονται 2 φορές με το διάλυμα 1 [0.15M NaCl, 1mM EDTA pH:8.0, 0.5mM EGTA pH:8.0, 20mM HEPES pH:8.0, 1% triton-X, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate], 2 φορές με διάλυμα ίδιο με το διάλυμα 1 αλλά με 500mM NaCl (διάλυμα 2), 2 φορές με το διάλυμα 3 [1mM EDTA pH:8.0, 0.5mM EGTA pH:8.0, 20mM HEPES pH:8.0, 0.25M LiCl, 0.1% sodium deoxycholate και 0.5% NP-40] και 2 φορές με το διάλυμα 4 [1mM EDTA pH:8.0, 0.5mM EGTA pH:8.0, 20mM HEPES pH:8.0].

Τα ανοσοσύμπλοκα ελευθερώνονται από την κολώνα με επώαση, για 2 φορές από 10 λεπτά, με διάλυμα 1mM EDTA pH:8.0, 1% SDS, 50mM Tris pH:8.0, 10mM NaF, 0.1M NaHCO₃, στους 65°C. Έπειτα ακολουθεί η προσαρμογή της συγκέντρωσης των δειγμάτων σε NaCl στα 200mM και η επώαση στους 65°C για 5-12 ώρες με σκοπό να καταστραφούν οι διασυνδέσεις μεταξύ πρωτεϊνών και DNA. Τα δείγματα κατόπιν επωάζονται με 10μg RNase A για 1ώρα στους 37°C και με 20μg πρωτεϊνάση K για 2 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια εκχυλίζονται με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρημνίζονται με 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης και 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M pH:5.2. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται, ξεπλένονται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύονται σε 100μl 10mM Tris pH:7.5. Η ανίχνευση των στρατολογήσεων παραγόντων σε συγκεκριμένες αλληλουχίες γίνεται είτε με ραδιενεργό PCR σε συμβατικό μηχάνημα είτε με κανονικό PCR και χρήση Cyber Green σε Real-Time PCR μηχάνημα.

Ανάλυση νεοσυντιθέμενου RNA σε πυρήνες κυττάρων (*In vitro* nuclear run-on)

Απομονώνουμε πυρήνες με την μέθοδο που περιγράφηκε πιο πάνω (sucrose-gradient method). Μετράμε στο μικροσκόπιο (με τη χρήση του αιμοκυττόμετρου) τους πυρήνες και τους χωρίζουμε σε τόσα μέρη ώστε το καθένα να έχει 5×10^7 πυρήνες. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 1.000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C. Επαναδιαλύουμε την πελέττα με τους πυρήνες σε τελικό όγκο 400μl Glycerol Storage

Buffer (50mM Tris pH:8.3, 40% glycerol, 5mM MgCl₂, 0.1mM EDTA) σε αυτό το στάδιο οι πυρήνες μπορούν να παγώσουν. Προσθέτουμε αμέσως 150 μl 4X Complete transcription buffer [για 1ml διάλυμα [10mM Tris pH:8.0, 5mM MgCl₂, 0.3M KCl] με (10μl 100mM ATP + 10μl 100mM CTP + 10μl 100mM GTP + 5μl 1M DTT) και 50μl α-³²P-UTP(10mCi/ml). Επωάζουμε στους 30°C για 30 λεπτά, όπου πραγματοποιείται *in vitro* μεταγραφή.

Έπειτα, ακολουθεί απομόνωση ολικού RNA με το αντιδραστήριο Trizol σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Έτσι λοιπόν αφού φυγοκεντρήσουμε το μείγμα της αντίδρασης στις 5000rpm για 3 λεπτά απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 2ml Trizol στην πελέττα. Ομογενοποιούμε με «vortex» και αφήνουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 0.4ml χλωροφορμίου ανακατεύουμε και πάλι και αφήνουμε για 2-3 λεπτά. Φυγοκεντρούμε στις 10700rpm στους 4°C για 15 λεπτά. Στο υπερκείμενο προσθέτουμε 1μl γλυκογόνου, 2.5 όγκους απόλυτης αιθανόλης και 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M pH:5.2. Αφήνουμε όλη νύχτα στους -20°C και την επόμενη κατακρημνίζουμε και ξεπλένουμε την πελέττα με 80% αιθανόλη. Στη συνέχεια προσθέτουμε 0.5ml Dnase buffer [20mM Hepes pH:7.5, 5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂] και 5μl DNase I/RNase free (10u/μl) και επωάζουμε για 20 λεπτά στους 37°C. Ακολουθώς σταματάμε την αντίδραση με 5μl 0.5M EDTA και κάνουμε εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο. Στο υπερκείμενο προσθέτουμε 1μl γλυκογόνου, 2.5 όγκους απόλυτης αιθανόλης και 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M pH:5.2. Αφήνουμε όλη νύχτα στους -20°C και την επόμενη κατακρημνίζουμε και ξεπλένουμε την πελέττα με 80% αιθανόλη. Ακολουθεί υδρόλυση του δείγματος με την προσθήκη 4μl 10M NaOH για 10 λεπτά στον πάγο η οποία διακόπτεται μετά από προσθήκη 300μl 1M Hepes pH 7.5. Ακολουθεί κατακρήμνιση με την κλασσική διαδικασία. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100μl H₂O και μετριέται η περιεκτικότητα του σε cpm, όπου απαιτούνται ~5x10⁶cpm/ml. Έπειτα, το Hybridization buffer (50mM Hepes pH:7.5, 0.3M NaCl, 1% Na-PPi, 10mM EDTA, Denhardt's solution, 0.2% SDS, 125μg/ml salmon sperm DNA) που έχει προθερμανθεί στους 65°C. Αυτό χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής σε υβριδοποίηση με μεμβράνη νιτροκυταρίνης στην

οποία έχει προηγηθεί ακινητοποίηση (dot blot) πλασμιδίου που περιέχει το cDNA του γονιδίου, την έκφραση του οποίου θέλουμε να ελέγξουμε.

Η διαδικασία ακινητοποίησης των μη ραδιοσημασμένων ανιχνευτών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης έχει ως εξής: Αραιώνουμε 20μg του εν λόγω πλασμιδίου το οποίο έχουμε κάνει γραμμικό σε 40μl H₂O, προσθέτουμε 4μl διαλύματος [2M NaOH, 2mM EDTA] και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέτουμε 6μl CH₃COONa 3M pH:5.2, κάνουμε μία γρήγορη φυγοκέντρηση για 3 λεπτά και αφού αφήσουμε στον πάγο για 1-2 λεπτά προσθέτουμε 480μl 6X SSC. Διαβρέχουμε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με 6X SSC σε ειδική συσκευή dot-blot και στα πηγάδια αυτής τοποθετούμε 125μl από το παραπάνω δείγμα. Ξεπλένουμε τα ίδια πηγάδια μία φορά με 6X SSC και αφήνουμε την μεμβράνη να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια την τοποθετούμε σε φούρνο στους 80°C για δύο ώρες. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης (προϋβριδοποίηση) για 3-6 ώρες στους 65°C με Pre-Hybridization buffer (50mM Hepes pH:7.5, 0.3M NaCl, 1% Na-PPi, 10mM EDTA, 5X Denhardt's solution, 0.2% SDS, 125μg/ml salmon sperm DNA). Στη συνέχεια προστίθεται το παραπάνω βρασμένο δείγμα και ακολουθεί υβριδοποίηση στους 65°C για 36-52 ώρες. Η μεμβράνη ξεπλένεται με 2X SSC στους 65°C για 30 λεπτά και με 2X SSC, 0.1% SDS σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Ακολουθεί στέγνωμα της μεμβράνης και αυτοραδιογραφία.

Ανάλυση με DNA microarrays

Για την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων σε ενήλικα και έμβρυα TAF10KO και αγρίου τύπου ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν δεξαμενές από δείγματα ολικού ηπατικού RNA, που απομονώθηκαν όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Επιπλέον, υποβλήθηκαν σε ένα ακόμα στάδιο καθαρισμού με τη χρήση του RNeasy kit (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Παρασκευάστηκαν λοιπόν δύο μίγματα ολικού RNA από ενήλικα TAF10KO ποντίκια και δύο από ποντίκια αγρίου τύπου. Το ίδιο πραγματοποιήθηκε και για τα έμβρυα. Κάθε μίγμα προέκυψε από ανάμιξη ίσης

ποσότητας ηπατικού ολικού RNA πέντε αρσενικών ποντικών ή είκοσι εμβρύων αντίστοιχα.

Τα μίγματα χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή cDNA με αντίστροφη μεταγραφή και τη χρήση T7-oligo (dT) εκκινήτη και ακολούθησε *in vitro* μεταγραφή του cDNA με T7 πολυμεράση. Έπειτα, ίσες ποσότητες από το παραγόμενο RNA σημάθηκαν με Alexa-555 ή Alexa-647-‘succinimidil ester’. Μετά από ανάμιξη αντιθετικά σημασμένων δειγμάτων που προέρχονται από TAF10KO και αγρίου τύπου ποντίκια, δημιουργήθηκαν 4 συνδυασμοί για ενήλικα, 4 για έμβρυα και 2 για τη σύγκριση ενήλικων και εμβρύων αγρίου τύπου. Αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για την υβριδοποίηση με αντικειμενοφόρους που περιέχουν εντοπισμένα ολιγονουκλεοτίδια από 20.539 γονίδια γνωστής λειτουργίας του ποντικού (UMC Utrecht Mus musculus 35K Array Version 1.0). Μετά την υβριδοποίηση και τα πλυσίματα οι αντικειμενοφόροι διαβάστηκαν από τον ScanArray 5000 scanner (GSI Lumonics). Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με βάση την αναφορά Dudley et al., 2002, PNAS. Οι υβριδοποιήσεις και η ανάλυση των δεδομένων έγινε από τον Θανάση Μαργαρίτη στο εργαστήριο του Δημήτρη Καφετζόπουλου.

Για την ανάλυση του προτύπου έκφρασης των mi-RNAs χρησιμοποιήθηκαν δεξαμενές από δείγματα ολικού ηπατικού RNA, που απομονώθηκαν όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Επιπλέον, υποβλήθηκαν σε ένα ακόμα στάδιο καθαρισμού με τη χρήση του MiRvana Kit (Ambion), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Παρασκευάστηκαν λοιπόν δύο μίγματα ολικού RNA από ενήλικα TAF10KO ποντίκια, δύο από ποντίκια αγρίου τύπου και δύο μίγματα από φυσιολογικά έμβρυα. Κάθε μίγμα προέκυψε από ανάμιξη ίσης ποσότητας ηπατικού ολικού RNA πέντε αρσενικών ποντικών ή είκοσι εμβρύων αντίστοιχα.. Οι υβριδοποιήσεις και η ανάλυση των δεδομένων έγινε σε συνεργασία με το εργαστήριο του Γιώργου Γαρίνη.

Μονιμοποίηση ιστοτεμαχίων

Η μονιμοποίηση των ιστοτεμαχίων πραγματοποιήθηκε με σκοπό στη συνέχεια να ακολουθήσει χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης ή να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα ανοσοφθορισμού. Σε όλα τα ποντίκια και έμβρυα απομονώθηκε το ήπαρ και αφού ξεπλύθηκε σε 1x PBS στη συνέχεια μονιμοποιήθηκε με 4% φορμαλδεύδη/PBS στους 4°C για 16 ώρες. Έπειτα, ακολούθησε η διαδικασία έγκλεισης σε παραφίνη ή σε OCT. Εναλλακτικά, σε κάποιες περιπτώσεις, αφού έγινε έγκλειση των ιστοτεμαχίων σε OCT πάγωσαν σε υγρό άζωτο και έπειτα ακολούθησε μονιμοποίηση των τομών πάνω στην αντικειμενοφόρο.*

Προετοιμασία ιστοτεμαχίων ήπατος για έγκλειση σε παραφίνη

Ξέπλυμα των μονιμοποιημένων ιστοτεμαχίων με:

- PBS για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (5-6 αλλαγές)
- 0.86% saline 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (5-6 αλλαγές)

Βαθμιαία αφυδάτωση:

- 2 ώρες 30% αιθανόλη (2 αλλαγές)
- 2 ώρες 50% αιθανόλη (2 αλλαγές)
- Όλη νύχτα 70% αιθανόλη (1 αλλαγή)
- 2 ώρες 95% αιθανόλη (2 αλλαγές)
- 3 ώρες 100% αιθανόλη (2 αλλαγές)
- 3 ώρες ξυλένιο
- 24-48 ώρες παραφίνη
- Έγκλειση

Προετοιμασία ιστοτεμαχίων ολόκληρων εμβρύων για έγκλειση σε παραφίνη

Η μονιμοποίηση των ιστοτεμαχίων ολόκληρων εμβρύων (E18.5) πραγματοποιήθηκε με σκοπό να ακολουθήσει χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης. Τα έμβρυα αφού ξεπλύθηκαν σε 1x PBS στη συνέχεια αφαιρέθηκε το δέρμα που περιβάλλει τα έμβρυα. Η μονιμοποίηση πραγματοποιήθηκε με 4% φορμαλδεύδη/PBS στους 25°C για τουλάχιστον 48-65 ώρες. Έπειτα,

ακολούθησε αφαλάτωση σε διάλυμα Scheffer pH:7.0-7.2 [0.27M EDTA, 0.27M Tris] για 24 ώρες. Ακολούθησε αφυδάτωση των ιστών:

Βαθμιαία αφυδάτωση:

- 1 ώρα 80% αιθανόλη (2 αλλαγές)
- 1 ώρα 95% αιθανόλη (2 αλλαγές)
- 1 ώρα 100% αιθανόλη (3 αλλαγές)
- 1 ώρα ξυλένιο/αιθανόλη (1:1)
- 1 ώρα ξυλένιο (3 αλλαγές)
- 24-48 ώρες παραφίνη
- Έγκλειση

Προετοιμασία ιστών για κρυτομές:

- Πλυσίματα των μονιμοποιημένων ηπατικών ιστών με PBS για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (5-6 αλλαγές).
- 10% σακχαρόζη/PBS στους 4⁰C μέχρι ο ιστός να πέσει
- 30% σακχαρόζη/PBS στους 4⁰C όλη νύχτα.
- Έγκλειση σε OCT
- Πάγωμα σε υγρό άζωτο

* όπου έγινε πρώτα έγκλειση σε OCT και μετά πάγωμα η μονιμοποίηση έγινε με 2% φορμαλδεΰδη στους 4⁰C για 10 λεπτά ή μεθανόλη ή ακετόνη στους -20⁰C για 5-10 λεπτά.

Χρήση μικροτόμου ή κρυτοτόμου

Τα δείγματα που έχουν εγκλειστεί σε παραφίνη ή σε υγρό κρυοπροστασίας μπορούν να επεξεργαστούν αντίστοιχα είτε σε μικροτόμο, των οποίων το πάχος διατομής είναι 6-8μm, είτε σε κρυτοτόμο των οποίων το πάχος διατομής είναι 6-8μm. Στη συνέχεια οι τομές συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους.

Στην περίπτωση των τομών παραφίνης οι τομές απλώνονται πρώτα σε υδατόλουτρο στους 42⁰C και στη συνέχεια συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους, οι οποίες αφήνονται να στεγνώσουν στους 37⁰C όλη νύχτα. Για την περίπτωση των τομών από ολόκληρα έμβρυα χρησιμοποιήθηκε χαμηλότερη θερμοκρασία, στους 38⁰C για την καλύτερη διατήρηση της μορφολογίας των τομών. Οι κρυτομές και οι τομές παραφίνης φυλάσσονται στους -80⁰C και 4⁰C, αντίστοιχα.

Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης σε ιστοτεμάχια ήπατος και ολόκληρα έμβρυα

Η χρώση με αιματοξυλίνη βάφει το πυρηνικό DNA με σκούρο μπλε χρώμα, ενώ η ηωσίνη έχει την ιδιότητα να χρωματίζει το κυτταρόπλασμα και τα οργανίδια που περιέχονται σ' αυτό, με ροζ χρώμα. Οι τομές αφού κόπηκαν στο μικροτόμο στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε:

Ξέπλυμα:

- με Neoclear 15 λεπτά
- με Neoclear 15 λεπτά
- με 100% αιθανόλη για 5 λεπτά (δύο φορές)
- με 95% αιθανόλη για 2 λεπτά (δύο φορές)
- με 70% αιθανόλη για 2 λεπτά
- με 50% αιθανόλη για 2 λεπτά
- με 30% αιθανόλη για 2 λεπτά
- με ddH₂O για 2 λεπτά
- Χρώση με διάλυμα αιματοξυλίνης για 1,5 λεπτά (Sigma)
- με ddH₂O για 5 λεπτά (δύο φορές)
- Εμβάπτισμα σε διάλυμα 1% υδροχλωρικού οξέος (8 σταγόνες διαλύματος HCl συγκέντρωσης 1M σε 100ml διαλύματος αιθυλικής αλκόολης 70%) για 10 δευτερόλεπτα.
- με H₂O βρύσης για 10 λεπτά
- με 30% αιθανόλη για 2 λεπτά
- με 50% αιθανόλη για 2 λεπτά
- με 70% αιθανόλη για 2 λεπτά
- με 95% αιθανόλη για 5 δευτερόλεπτα
- Χρώση με ηωσίνη για 40 δευτερόλεπτα
- με 95% αιθανόλη για 3 λεπτά
- με 100% αιθανόλη για 3 λεπτά
- με 100% αιθανόλη για 3 λεπτά
- με Neoclear 30 λεπτά
- με Neoclear 30 λεπτά
- Στη συνέχεια οι τομές καλύπτονται με Entellan

Χρώσεις ανοσοφθορισμού σε τομές παραφίνης

Χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης πάχους 6-8 μm
- Στέγνωμα στους 37°C.

Αποπαραφίνωση

- για 5 λεπτά Neoclear
- για 5 λεπτά Neoclear

- για 5 λεπτά Neoclear

Ενυδάτωση

- για 5 λεπτά 100% αιθανόλη
- για 5 λεπτά 100% αιθανόλη
- για 5 λεπτά 90% αιθανόλη
- για 5 λεπτά 70% αιθανόλη
- για 5 λεπτά 50% αιθανόλη
- για 5 λεπτά 30% αιθανόλη
- για 5 λεπτά H₂O

Διαδικασία αποκάλυψης αντιγόνου

- Τοποθέτηση τομών σε γυάλινο δοχείο χωρητικότητας 2 λίτρων με 600 ml 10mM Sodium Citrate, pH 6.0 από 100mM αρχικό.
- Βράσιμο των τομών για 20 λεπτά με συμπλήρωση του εξατμιζόμενου νερού κάθε 5 λεπτά.
- Κρύωμα των τομών για 20 λεπτά αφήνοντας τις μέσα στο γυάλινο δοχείο, το οποίο αφήνεται πάνω στον πάγκο εργασίας σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4 x 3 λεπτά, πλυσίματα με dd H₂O.
- 3 x 5 λεπτά, πλυσίματα με PBST (PBST: PBS pH 7.4 με 0.15% Tween).
- Επώαση με διάλυμα PBS/0.1%Triton για 10 λεπτά.
- 3 x 5 λεπτά, πλυσίματα με PBST.
- Επώαση με 5% NGS (ή BSA)/PBST για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση με πρώτο αντίσωμα διαλυμένο σε 1% NGS (ή BSA)/PBST για όλη τη νύχτα στους 4°C.
- 3 x 5 λεπτά, πλυσίματα με PBST.
- Επώαση με δεύτερο φθορίζον αντίσωμα διαλυμένο σε 1% NGS (ή BSA)/PBST με για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι.
- 3 x 5 λεπτά, πλυσίματα με PBST.
- Επώαση με 1x αραιωμένη χρωστική DAPI για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι.
- 3 x 5 λεπτά, πλυσίματα με PBST.
- Κάλυψη με mowiol

Χρώσεις ανοσοφθορισμού σε κρυτομές

Χρησιμοποιήθηκαν κρυτομές πάχους 6-8 μm

* όπου έγινε μονιμοποίηση μετά τον τεμαχισμό του παγωμένου ιστοτεμαχίου ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα μετά την μονιμοποίηση

- 3 x 10 λεπτά, πλυσίματα με 0.1%Triton/PBS.

- 3 x 10 λεπτά, πλυσίματα με 0.1% Triton/PBS.
- Επώαση με 5% NGS (ή BSA)/0.1% Triton/PBS για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση με πρώτο αντίσωμα διαλυμένο σε 1% NGS (ή BSA)/0.1% Triton/PBS για όλη τη νύχτα στους 4°C.
- 3 x 10 λεπτά, πλυσίματα με 0.1% Triton/PBS.
- Επώαση με δεύτερο φθορίζον αντίσωμα διαλυμένο σε 1% NGS (ή BSA)/0.1% Triton/PBS με για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι.
- 3 x 10 λεπτά, πλυσίματα με 0.1% Triton/PBS.
- Επώαση με 1x αραιωμένη χρωστική DAPI για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι.
- 2 x 10 λεπτά, πλυσίματα με 0.1% Triton/PBS.
- Κάλυψη με mowiol.

2. ΥΛΙΚΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι προϊόντα των ακόλουθων εταιρειών: Sigma, Merck, Promega, New England Biolabs, Pharmacia, Stratagene, Boehringer Mannheim, BRL, Santa Cruz Biotechnology, Biorad, Calbiochem, Biomol, Roche. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της New England Biolabs, Stratagene, Promega, Invitrogen και της Minotech. Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μικροχημείας του IMBB και στην Invitrogen.

Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Santa-Cruz Biotechnology: anti-TAF-250 (L-20), anti-TAF-9 (N-16), anti-TFIIB (C-18), anti-TBP (SI-1), anti-TRAP220 (M-255), anti-Med6 (C-16), anti-HA (Y-11), anti-HNF-4α (C-19), anti-HNF3b (M-20), anti-Pol-II (H224), anti-p53 (DO-1), anti-CEBPa (14AA), anti-Sin3a (K-20), anti-CBP (A22).

Upstate Biotechnology: anti-Acetyl H3, anti-meK9, anti-meK4.

Eurogentec: anti-TAF-4 (2B9), anti-TAF-5 (1C2), anti-TAF-6 (2G7), anti-TAF-10 (2B11), anti-TAF-11 (2G2), anti-TAF-12 (22TA), anti-TAF-13 (16TA), anti-TBP (3G3) Bethyl Laboratories: anti-Albumin.

Τα δευτερεύοντα αντισώματα anti-goat, anti-mouse και anti-rabbit immunoglobulin G ήταν συνδεδεμένα με horseradish peroxidase στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης και ήταν από την Jackson Laboratories. Τα δευτερεύοντα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοφθορισμού ήταν anti-goat, anti-mouse ή anti-rabbit AlexaFluor-568 (Molecular probes).

Αλληλουχίες εκκινητών για RT-PCR

TAF-1	NM_001081008	5' CAGAGAAACCCAGAAGTAAGT 3' 5' CACAGTTTTCTCACCGTAAAT 3'
TAF-3	NM_027748	5' ACAAGAAGAGGAAGCACCGTG 3' 5' GGCAGATGTGTGGCGTCTTTA 3'
TAF-4	NM_001081092	5' AAGGAAGTGAGAGCCTAGGAA 3' 5' AGCCATTTTATGTTATGTGCC 3'
TAF-5	NM_177342	5' TGGGCTACCGATCACTATCAG 3' 5' CATCAAGCCGTGTCCAATATC 3'
TAF-6	NM_009315	5' CAAGCTCAGCAGGTCAACAGG 3' 5' TGATGAGGCACTGGAAGATGA 3'
TAF-7	NM_175770	5' GAGCCTCTGAAGCCCTAACTA 3' 5' TGTGCGGCTGGTAATACTATC 3'
TAF-8	NM_022015	5' CTCTCAAATGGTAGGCAATGA 3' 5' GAGGCTGGGGCTTACTTACTA 3'
TAF-9	NM_001015889	5' CACAGAATACAGCCGAGTCAG 3' 5' CATGCATCGTGGCTAGACTAC 3'
TAF-10	NM_020024	5' GAAGTGAAGCCCGTAGTGTCC 3' 5' ATTGATGCCATACTCGCTGAG 3'
TAF-11	NM_026836	5' TGCCTTCACTCAGTCATGGAC 3' 5' AACTTTCCCACACAGGTTGGA 3'
TAF-12	NM_025579	5' TTGAAGACACAGGGTGCATAG 3' 5' CAGAGAAAGTGCTCCAACCTCC 3'
TAF-13	NM_025444	5' ACTTTAATTGTGAGAACGGAG 3' 5' TTTCCCCAAGTACTGATTTAG 3'
TBP	NM_013684	5' GCCAAGAGTGAAGAACAATCC 3' 5' TAGCTACTGAACTGCTGGTGG 3'
TLF	NM_011603	5' TGCACTGGAGCAACAAGTGAAGAA 3' 5' AGATCTGTTCCACGGCAGTCGCCA 3'
ALB C-terminal	NM_009654	5' CTGTCTGCAATCCTGAACCG 3' 5' GCTTCACCAGCTCAGCAAGA 3'
ALB N-terminal	NM_009654	5' TTTCTCCTCCTCCTCTTCGTC 3' 5' CCAAATCATTATACCGATGGG 3'

HNF1a	NM_009327	5' TATCAGCAGCCTCTCATGCC 3' 5' TGAGGTGAAGACCTGCTTGG 3'
HFN4a C-terminal	NM_008261	5' TATGACGGGACCAAGTACAAG 3' 5' AGCTCTAGCAAAGGCAAGTAG 3'
HFN4a N-terminal	NM_008261	5' TGGGTAGGGGAGAATGCCACT 3' 5' CTTCAGATGGGGACGTGTCAT 3'
LRH-1	NM_030676	5' TGGTGGAAAGGTGTCCAAGAG 3' 5' GCAGCATCTCAATGAGGAGG 3'
FoxA2 C-terminal	NM_010446	5' CTCCGTGTCAGGAGCACAAG 3' 5' GTGGCTGTGGTGATGTTGCT 3'
FoxA2 N-terminal	NM_010446	5' TCACCTGAGTCCGAGTCTGA 3' 5' GTGATGAGCGAGATGTACGAGT 3'
ApoA1	NM_009692	5' AGCAACCCTACCTTGAACGAG 3' 5' AGCATGGGCATCAGACTATGG 3'
ApoB	NM_009693	5' AGCTGGCATAAGAACCAAGAC 3' 5' CCATCCTGAGTTGGACAAAAC 3'
ApoC-III C-terminal	NM_023114	5' CCAACCAACTCCAGCTATTGA 3' 5' AGGGACAGCATGTTTAGGTGA 3'
ApoC-III N-terminal	NM_023114	5' CCGAGCTGAAGAGGTAGAGGG 3' 5' GGGATCTGAAGTGATTGTCCA 3'
Trfn	NM_133977	5' GAGCGGAGTACATGCAATCTG 3' 5' ACAGCAGCGAAGACTACACCA 3'
AldoB	NM_144903	5' TCTTTTGGGGCTTCCTATATG 3' 5' TGCCAAGTCAGGTTTATCAAC 3'
Mup3 C-terminal	NM_001039544	5' GCGAGGAGCATGGAATCATTAGA 3' 5' TTGGCATGGGAGTCTGTATGGAT 3'
Mup3 N-terminal	NM_001039544	5' GGACAATTCTATTCCCTACCA 3' 5' GCTGCCATGTTCTTCTATCTT 3'
Cyp7B1	NM_007825	5' GCCTTCAATGGACAGTCTAAC 3' 5' TACCCTGGTGATGTAGACGTT 3'
Slco1a1	NM_013797	5' CCGCAGTCTTCATTCTAATCCT 3' 5' GCCAGTTGAAAACCTATTACAGC 3'
CAR3	NM_007606	5' GGAGGAGTATGCGGACCTTAC 3' 5' CAGGCAAACCTTGGTAGTAGGC 3'

Cyp2f2	NM_007817	5' CCTTTCCAGCTGTGTATGCAC 3' 5' GGTCCAAGATAGGCGGGGTAA 3'
Igf1	NM_010512	5' CCGAGGGGCTTTTACTTCAAC 3' 5' CTTCTGAGTCTTGGGCATGTC 3'
Ghr	NM_010284	5' CACCATAGGCTGACCACGTTT 3' 5' AACGGTGAATAACGGCTTGTG 3'
Otc	NM_008769	5' AAAGGACAATTTGCCCATACT 3' 5' CCCACAAAGGAGATCTATTCA 3'
Fasn	NM_007988	5' GTTCCCAGAGCCACTGACTTG 3' 5' GAACCAGCCCTCTCCATATCC 3'
Cyp1A2	NM_009993	5' TTCCAAGTGAAGATTGTGCGAG 3' 5' ACTAGATTAGCATGAGGTGCG 3'
Afp C-terminal	NM_007423	5' TCCAACAGGAGGCTATGCATC 3' 5' AACGCCCAAAGCATCACGAGT 3'
Afp N-terminal	NM_007423	5' TTAGATTCCTCCCAGTGCGTG 3' 5' GCAGCAGCCTGAGAGTCCATA 3'
Akr1b7	NM_009731	5' TCTGTGACACCCTCACGCATA 3' 5' GCATTGCCAGATGGTAGCCTA 3'
Igfbp1	NM_008341	5' CGGAAGCTTTCAGTGGGTTAG 3' 5' GGTTACACAATCAGCATCGGA 3'
H19	NR_001592	5' GTTTGGAGTCCCGGAGATAGC 3' 5' AGGGGCAAAGGATGAAGTAGG 3'
Igf2	NM_010514	5' CTACCTCTCAGGCCGTA CTTC 3' 5' GGCCTCTCTGAACTCTTTGAG 3'
GAPDH	NM_008084	5' GGTCATCATCTCCGCCCTTCTGC 3' 5' GACTGGGAGTTGCTGTTGAAGTGC 3'
TBP2/TRF3	NM_199059	5' ATCTGGCCTGTAAATTGGATCTGAG 3' 5' GAAGCCCAGAGATGCACTCAGACT 3'

Αλληλουχίες εκκινητών για ChIP assays

ALB promoter:	5' GTTAGAGGGGAACAGCTCCA 3' 5' CTGTGTGCAGAAAGACTCGC 3'
ALB 3' UTR:	5' GACATGAAGACTCAGGACTCA 3' 5' AGCACAGAGACAAGAAGTCAA 3'
HNF-4a promoter:	5' TCTGGGACGTGATTGGCTTAG 3' 5' TCCCTTCTCTGCCTTCCTCTC 3'
HNF-4a 3' UTR:	5' TATGACGGGACCAAGTACAAG 3' 5' AGCTCTAGCAAAGGCAAGTAG 3'
ApoC-III promoter:	5' TTCCTGTCTCACCGACCTCAT 3' 5' AGGGGCATTACCTGGAGTAGC 3'
ApoC-III 3' UTR:	5' CCAACCAACTCCAGCTATTGA 3' 5' AGGGACAGCATGTTTAGGTGA 3'
FoxA2 promoter:	5' CCTCCTGAAGTCATCCCACA 3' 5' CTTTCTGGCTACCCACCTCA 3'
FoxA2 3' UTR:	5' AGCCTTTGGTCTCCTCTATGT 3' 5' TAAAGCACGCAGAAACCATAA 3'
Mup3 promoter:	5' CACAGGGGTCAAAAGAAAGTAGGT 3' 5' GAAGTCAGAAGAAGGAGTCCGATTC 3'
Cyp7B1 promoter:	5' GGCTTCTTTCTGTGCTGTGC 3' 5' AGCAGTGAGCTCGCAGAAGA 3'
Slco1a1 promoter:	5' GGGTCTTGTTTGGTAGGTAGT 3' 5' GGATAGAGTGCCCTTAGTCAGA 3'
CAR3 promoter:	5' GGCTCCCAAACCGATTTTCATAGAC 3' 5' GCACCAAGGATACCCGAAGTTGA 3'
Afp promoter:	5' CATATGTTTGCTCACTGAAGGTTAC 3' 5' CGCAGCGAAATGTAGCAGGAGGA 3'
Igfbp1 promoter:	5' CCTGAAGCCTTCTTGGTCTAA 3' 5' GTCGTACCCAGAGCCTTATGA 3'
Akr1B7 promoter:	5' CTCTGATCCGCATACCCAATA 3' 5' GCATCTTGGCTTTGGTACTGA 3'
H1o promoter:	5' GGGGAAGGGACAAAGTTTGA3' 5' ACCACAGCTCCTCTGACACC 3'
Afp SBE/p53RE:	5' CACACAGGCATATGTTCAACC 3' 5' ATCCTCTCAAGCCCTAAGATG 3'

Παράρτημα-Πίνακας 2.

Genes Upregulated in Postnatal day 30 (P30) livers of TAF10^{lox/lox}-AlbCre mice

26-3.1 fold				3.1-2.4 fold			
Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT P30	FDR-adjusted	ENSMUSG		KO/WT P30	FDR-adjusted	ENSMUSG
H19	26.1819	0	00000000031	Krt19	3.1260	0.000006	0000020911
Ly6d	19.0643	0	00000034634	Mfge8	3.1042	0.000035	00000030605
Igf2	15.9181	0.000001	00000048583	Tuba8	3.0893	0.00059	00000030137
Hist1h4c	11.0005	0	00000060093	Apoc2	3.0883	0.002832	00000002992
Akr1b7	8.5250	0.000006	00000052131	Hist1h4c	3.0691	0.000039	00000060678
Igfbp1	7.2150	0.000316	00000020429	NR_002886.1	3.0308	0.002005	00000058426
Afp	7.1582	0.00699	00000054932	Marco	3.0247	0.000007	00000026390
Slpi	7.1231	0.000001	00000017002	Cps1	3.0174	0.00008	00000025991
Hist1h4c	6.9992	0	00000060639	Serpinb6a	2.9705	0.000052	00000060147
Hist1h1c	6.5796	0.000001	00000036181	Iigp2	2.9680	0.000497	00000069874
Gsta2	6.1156	0.000002	00000057933	Cdkn1c	2.9392	0.000014	00000037664
Lcn2	5.8054	0.000004	00000026822	NA	2.9272	0.00001	00000056506
Hist1h4c	5.7541	0.000003	00000060981	Tuba2	2.9184	0.008267	00000023004
Calm4	5.5794	0.000004	00000032246	Cib3	2.9112	0.000005	00000074200
Pogz	5.5612	0	00000029304	Gdf15	2.9009	0.000015	00000038508
Hist1h4c	5.5527	0.00001	00000069274	Myh1	2.8645	0.002343	00000056328
Tff3	5.0781	0.000014	00000024029	Cd14	2.8400	0.00001	00000051439
Oat	4.9674	0.000005	00000030934	Bex4	2.8320	0.000105	00000047844
Gsta2	4.9004	0.000002	00000074179	Hist1h3a	2.8263	0.000035	00000069310
Tnfrsf12a	4.8252	0.000005	00000023905	665937	2.7843	0.016559	00000058542
BC021614	4.6454	0.000008	00000058216	Ctla2b	2.7779	0.001603	00000074874
Defa1	4.5432	0.000003	00000060208	Mgp	2.7754	0.000533	00000030218
Ccbl2	4.5325	0.000084	00000040213	Tuba2	2.7622	0.000038	00000043091
Hpxn	4.4343	0.000049	00000030895	Dcn	2.7539	0.000009	00000019929
Gstm3	4.4211	0.000003	00000004038	Acta1	2.7488	0.000177	00000031972
Hist1h4c	4.3976	0.0009	00000064288	Stmn1	2.7362	0.000246	00000028832
Tgtp	4.3418	0.000009	00000048852	Kng1	2.7294	0.000729	00000022875
Lgals1	4.2898	0.000014	00000068220	NM_008211.3	2.7268	0.000089	00000016559
Ccl2	4.1986	0.000017	00000035385	Cirbp	2.7158	0.000017	00000045193
Clu	4.1290	0.000044	00000022037	Ftl1	2.7078	0.001995	00000050708
Srxn1	3.9395	0.000005	00000032802	Tubb2a	2.6790	0.000103	00000058672
Ahsg	3.8552	0.0097	00000022868	Tagln2	2.6612	0.000249	00000026547
Hist1h4c	3.7997	0.000667	00000069266	Ii17rb	2.6603	0.000052	00000015966
Ngfrap1	3.7743	0.000035	00000046432	Ang2	2.6440	0.000119	00000047894
Cd63	3.7698	0.000187	00000025351	Ftl2	2.6009	0.000093	00000062382
Lgals3	3.7482	0.000009	00000050335	Cth	2.6000	0.00048	00000028179
Krt18	3.7092	0.00002	00000023043	Ctgf	2.5998	0.000188	00000019997
NA	3.6399	0.000004	00000073088	NA	2.5973	0.000098	00000074978
NA	3.6155	0.000005	00000057800	Tnnt3	2.5890	0.000215	00000061723
NA	3.5998	0.000042	00000043889	Nqo1	2.5833	0.000026	00000003849
Defa1	3.5883	0.000004	00000064213	Tacstd1	2.5665	0.000015	00000045394
Tm4sf4	3.4675	0.000074	00000027801	XR_003722.1	2.5653	0.000086	00000044828
Prap1	3.4620	0.000014	00000025467	Hist1h3b	2.5615	0.000027	00000075032
Hamp2	3.3882	0.000009	00000056978	Egr1	2.5521	0.002667	00000038418
Scd2	3.3676	0.00002	00000025203	NA	2.5451	0.013386	00000066252
Acmsd	3.3489	0.000044	00000026348	XR_003734.1	2.5428	0.004041	00000059195
NA	3.3332	0.000073	00000063388	NA	2.5396	0.00003	00000051075
Krt8	3.3242	0.000123	00000049382	Anxa2	2.5389	0.000317	00000032231
Cxcl10	3.2921	0.000006	00000034855	Hist1h3b	2.5373	0.000454	00000059309
1810023F06Rik	3.2625	0.000802	00000021208	NP_444473.1	2.5327	0.001313	00000062751
Rnase4	3.2601	0.003592	00000021876	Tgm2	2.5324	0.000247	00000037820
Krt20	3.2230	0.000049	00000035775	Actb	2.5170	0.009037	00000042865
XR_003171.1	3.1970	0.000005	00000043379	Mmp14	2.5026	0.000538	00000000957
0610010C12Rik	3.1799	0.000207	00000046727	Ckap2	2.5008	0.000491	00000037725
Tubb2c	3.1780	0.000543	00000036752	Tia1	2.4700	0.003566	00000071337
Grb10	3.1775	0.000702	00000020176	Slc41a3	2.4666	0.000174	00000030089
Akr1c18	3.1610	0.000004	00000021214	Bicc1	2.4640	0.003566	00000014329
NA	3.1290	0.005982	00000070811	Abcc2	2.4560	0.003438	00000025194

2.4-2.2 fold

Gene Symbol	Fold Change	P-value	Ensembl Gene ID
	KO/WT P30	FDR-adjusted	ENSMUSG
Csrp2	2.4499	0.000035	00000020186
Bex1	2.4448	0.004032	00000050071
Cyp2a4	2.4427	0.002229	00000074254
Ddit3	2.4399	0.00003	00000025408
Serpina1a	2.4360	0.039246	00000071178
Ets2	2.4346	0.000697	00000022895
XR_002933.1	2.4272	0.000038	00000046436
Bgn	2.4260	0.004412	00000031375
Mgst3	2.4244	0.000454	00000026688
Btg2	2.4158	0.000022	00000020423
Igfbp7	2.4094	0.000112	00000036256
Qpct	2.4026	0.000247	00000024084
Ier3	2.3897	0.002957	00000003541
Jun	2.3799	0.000956	00000052684
Ppa1	2.3773	0.000171	00000020089
Nid1	2.3741	0.003357	00000005397
Lyzs	2.3651	0.003436	00000069516
Mylpf	2.3602	0.006795	00000030672
NA	2.3602	0.000379	00000044443
Cd9	2.3579	0.000076	00000030342
Tnnc2	2.3540	0.000036	00000017300
Spink3	2.3466	0.000713	00000024503
Hist2h3c2	2.3463	0.000035	00000064220
Mb	2.3452	0.00107	00000018893
NA	2.3413	0.000068	00000045099
Csf1r	2.3403	0.000328	00000024621
Ces2	2.3397	0.000125	00000061825
Kcnj8	2.3295	0.000044	00000030247
Tnni2	2.3274	0.000079	00000031097
Sh3yl1	2.3230	0.000083	00000020669
Id1	2.3219	0.00091	00000042745
Tgfb1	2.3103	0.000435	00000035493
Pygb	2.3094	0.000232	00000033059
Stat1	2.3033	0.002404	00000026104
Ugdh	2.2760	0.000107	00000029201
Akr1b3	2.2722	0.000049	00000001642
Uap1l1	2.2722	0.000029	00000026956
Anxa5	2.2695	0.000232	00000027712
Cd97	2.2614	0.000058	00000002885
Lzp-s	2.2611	0.000064	00000069515
Hist1h3b	2.2607	0.000834	00000070392
Dscr1	2.2589	0.000114	00000022951
XR_002982.1	2.2536	0.000444	00000058625
Fstl1	2.2423	0.000328	00000022816
Rgs18	2.2420	0.001251	00000026357
Ehhadh	2.2341	0.000591	00000022853
Nudt18	2.2321	0.000038	00000045211
Ctss	2.2313	0.000177	00000038642
Slc20a1	2.2309	0.000599	00000027397
Isyna1	2.2225	0.000595	00000019139
Cbr1	2.2221	0.000151	00000051483
Igfbp2	2.2219	0.001441	00000039323
Zfp11	2.2198	0.000608	00000051034
Tpm1	2.2156	0.000195	00000032366
S100g	2.2144	0.000073	00000040808
Lpl	2.2098	0.000426	00000015568
Emp3	2.2084	0.000078	00000040212
Hist1h2bf	2.2079	0.000082	00000069271
Myh1	2.2075	0.000146	00000033196
Eno3	2.2058	0.007017	00000060600
C3	2.2053	0.000907	00000024164
Dppa3	2.2015	0.024998	00000046323

2.2-2.00 fold

Gene Symbol	Fold Change	P-value	Ensembl Gene ID
	KO/WT P30	FDR-adjusted	ENSMUSG
Gsn	2.1915	0.000155	00000026879
Pla2g12a	2.1818	0.000584	00000027999
Myic2b	2.1635	0.000123	00000034868
Lrrc51	2.1635	0.000147	00000064307
Hist1h2bg	2.1601	0.0157	00000058385
Krt84	2.1558	0.001141	00000044294
Cd151	2.1555	0.000251	00000025510
NA	2.1535	0.000216	00000061444
Dynll1	2.1513	0.000155	00000009013
Tubb6	2.1492	0.000177	00000001473
Hamp1	2.1427	0.000869	00000050440
Tuba4	2.1421	0.000254	00000026202
Endog	2.1307	0.000191	00000015337
Cox6a2	2.1289	0.000044	00000030785
Cfd	2.1231	0.000155	00000061780
Ckm	2.1208	0.000611	00000030399
Hist1h2bf	2.1171	0.001014	00000069300
NA	2.1130	0.000781	00000067217
Dnahc7	2.1123	0.000246	00000041144
Actc1	2.1012	0.000188	00000068614
Icam1	2.0958	0.000834	00000037405
Tmsb4x	2.0925	0.016867	00000049775
Fsip1	2.0916	0.012443	00000027344
XR_003419.1	2.0914	0.005236	00000058854
Gsta4	2.0906	0.000281	00000032348
XR_003465.1	2.0875	0.000697	00000046993
Hist1h2bf	2.0815	0.007537	00000069314
Alas1	2.0770	0.000177	00000032786
NA	2.0751	0.008043	00000055795
NA	2.0741	0.003537	00000072395
C530008M17Rik	2.0730	0.003717	00000036377
Reg3a	2.0685	0.003909	00000071356
Sult1e1	2.0678	0.001762	00000029272
Ank3	2.0542	0.000801	00000069601
Sqstm1	2.0500	0.00014	00000015837
Cyba	2.0374	0.021073	00000006519
Kif20a	2.0341	0.004306	00000003779
Cdc20	2.0330	0.000096	00000006398
Hist3h2a	2.0317	0.001748	00000036964
Tmem176b	2.0316	0.001202	00000029810
Ddit4	2.0305	0.000098	00000020108
Cd5l	2.0299	0.000073	00000015854
Col1a2	2.0299	0.000251	00000029661
Actb	2.0293	0.006128	00000029580
Vcam1	2.0264	0.001995	00000027962
XR_002200.1	2.0260	0.011403	00000047627
Spint2	2.0255	0.000107	00000074227
Psmc8	2.0182	0.002832	00000030591
Gadd45b	2.0166	0.00271	00000015312
Lgals4	2.0159	0.000859	00000053964
Rerg	2.0150	0.005606	00000030222
Dhcr24	2.0131	0.003969	00000034926
Tmsb10	2.0050	0.000611	00000050347
Lgmn	2.0024	0.000216	00000021190
Cstb	2.0022	0.000794	00000050554

Genes Downregulated in Postnatal day 30 (P30) livers of TAF10^{lox/lox}-AlbCre mice

0.01-0.30 fold				0.30-0.41 fold			
Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT P30	FDR-adjusted	ENSMUSG		KO/WT P30	FDR-adjusted	ENSMUSG
Mup5	0.0178	0	00000058523	Cml1	0.3074	0.003295	00000057103
NP_001009550.1	0.0204	0	00000066153	Mcm10	0.3080	0.000044	00000026669
Mup3	0.0226	0.000001	00000066154	2810439F02Rik	0.3087	0.000005	00000024424
Hsd3b5	0.0396	0.000002	00000038092	Pnpla7	0.3092	0.000016	00000036833
Mup4	0.0504	0	00000041333	Cyp2c44	0.3115	0.000393	00000025197
Slco1a1	0.0614	0	00000041698	Ugt2b1	0.3165	0.000218	00000035836
AU018778	0.0852	0	00000031725	F11	0.3198	0.000119	00000031645
Q8VHJ3_MOUSE	0.0855	0.000001	00000041558	Akr1c6	0.3219	0.00014	00000021210
Car3	0.0857	0	00000027559	Tnfrsf23	0.3220	0.002035	00000037613
Thy1	0.0975	0.000012	00000032011	EG404195	0.3232	0.00121	00000067225
NP_653094.1	0.1068	0.000001	00000062181	Lipc	0.3253	0.00165	00000032207
Nudt7	0.1163	0	00000031767	Elovl6	0.3300	0.000033	00000041220
Dio1	0.1252	0.000002	00000034785	Cyp4v3	0.3332	0.000424	00000031640
Cyp7b1	0.1315	0.000005	00000039519	Baat	0.3374	0.000277	00000039653
2810007J24Rik	0.1338	0.000009	00000030378	Abcc6	0.3399	0.002363	00000030834
Elovl3	0.1342	0.000015	00000038754	Mbl1	0.3400	0.001951	00000037780
Cyp2f2	0.1641	0.000014	00000052974	Scp2	0.3433	0.000426	00000028603
Scd1	0.1648	0.000013	00000037071	Ces3	0.3459	0.003068	00000056973
Thrsp	0.1657	0.000014	00000035686	Otc	0.3460	0.003679	00000031173
Rgs16	0.1686	0.000016	00000026475	Csrp3	0.3462	0.000008	00000030470
Cml2	0.1701	0.000003	00000033634	C8a	0.3470	0.00022	00000035031
Es31	0.1719	0.000076	00000069922	Abca8a	0.3486	0.000659	00000041828
Cyp4a12b	0.1864	0.000003	00000066071	Glyat	0.3506	0.00003	00000063683
Slc10a1	0.1893	0.000004	00000021135	Ccbl1	0.3509	0.006038	00000039648
Leap2	0.1894	0.000002	00000036216	Cyp8b1	0.3523	0.000699	00000050445
Mod1	0.1922	0.000001	00000032418	Lpin1	0.3534	0.00005	00000020593
Mug1	0.2055	0.000019	00000059908	Acaca	0.3540	0.00131	00000020532
Il15ra	0.2062	0.000328	00000023206	Cyp2c70	0.3566	0.013085	00000060613
Ugt3a2	0.2091	0.000014	00000049152	Upp2	0.3579	0.007855	00000026839
Accn5	0.2146	0.000015	00000028008	Haao	0.3605	0.000019	00000000673
C9	0.2207	0.000002	00000022149	Mosc1	0.3641	0.000672	00000026621
Acacb	0.2239	0.000002	00000042010	Apon	0.3657	0.000372	00000051716
Pon1	0.2326	0.000061	00000002588	5830404H04Rik	0.3658	0.000033	00000045975
Slco1b2	0.2405	0.000055	00000030236	Akr1c14	0.3673	0.004562	00000033715
Hsd11b1	0.2439	0.000003	00000016194	Serpinf1	0.3679	0.004017	00000000753
Hod	0.2466	0.000005	00000059325	Cfhr1	0.3686	0.001894	00000057037
Inmt	0.2502	0.000053	00000003477	Slc27a2	0.3724	0.000424	00000027359
Aox3	0.2507	0.000015	00000064294	Gck	0.3727	0.000025	00000041798
Ugt2a3	0.2514	0.000035	00000035780	Slc3a1	0.3739	0.000125	00000024131
Mug4	0.2540	0.000584	00000030113	Adh4	0.3761	0.000415	00000037797
Orm1	0.2572	0.000016	00000039196	Uox	0.3777	0.009275	00000028186
Hsd3b2	0.2573	0.003673	00000063730	Phlda1	0.3793	0.000606	00000020205
Cyp2c50	0.2585	0.000595	00000054827	Rdh7	0.3800	0.002986	00000040134
Cyp2j5	0.2592	0.00131	00000052520	Slc17a3	0.3818	0.002345	00000036083
Fasn	0.2645	0.000006	00000025153	Acss2	0.3825	0.000533	00000027605
C8g	0.2676	0.000122	00000015083	Saa4	0.3845	0.003068	00000040017
C8b	0.2736	0.000037	00000029656	1200006F02Rik	0.3849	0.000306	00000029650
Serpina3k	0.2768	0.00084	00000058207	Ces6	0.3873	0.001459	00000055730
Lrrn6d	0.2771	0.000608	00000044505	Fgf21	0.3873	0.00271	00000030827
Comt	0.2832	0.000067	00000000326	Acaa1a	0.3911	0.012978	00000010651
Cant1	0.2834	0.000015	00000025575	Ghr	0.3946	0.000166	00000055737
AI317395	0.2853	0.000039	00000038522	Aacs	0.3969	0.000278	00000029482
NP_001013797.1	0.2897	0.000071	00000071204	Crp	0.4021	0.008043	00000037942
Slco2b1	0.2904	0.000143	00000030737	Tff2	0.4023	0.000145	00000024028
Rgn	0.2940	0.005086	00000023070	Orm3	0.4056	0.000241	00000028359
Khk	0.2968	0.000185	00000029162	Apcs	0.4090	0.003116	00000026542
Egfr	0.2991	0.000267	00000020122	Pank1	0.4095	0.000024	00000033610
Aqp8	0.2993	0.000003	00000030762	Ela2a	0.4122	0.000052	00000058579
Hsd3b3	0.3059	0.000088	00000062410	2310016F22Rik	0.4130	0.000106	00000057346

0.41-0.44 fold

Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT P30	FDR-adjusted	ENSMUSG
Prei4	0.4142	0.003165	00000027346
Zfp474	0.4160	0.002726	00000046886
Elovl5	0.4177	0.000022	00000032349
Slc27a5	0.4189	0.007437	00000030382
Serpina11	0.4197	0.00117	00000063232
Glo1	0.4209	0.001501	00000024026
G0s2	0.4211	0.000088	00000009633
Sult1b1	0.4216	0.000088	00000029269
Plg	0.4229	0.000725	00000059481
Fdps	0.4237	0.000362	00000059743
Slc2a2	0.4254	0.000797	00000027690
Slc22a1	0.4255	0.000109	00000023829
Serping1	0.4265	0.015119	00000023224
Pdk1	0.4270	0.000049	00000006494
Ugt3a1	0.4288	0.002053	00000072664
Kynu	0.4291	0.000027	00000026866
Itih1	0.4294	0.003138	00000006529
Bdh2	0.4318	0.001141	00000028167
Timd2	0.4320	0.015334	00000040413
Reg2	0.4325	0.001409	00000023140
1300017J02Rik	0.4347	0.016481	00000033688
Fabp2	0.4370	0.003399	00000023057
Ebpl	0.4384	0.00075	00000021928
Afm	0.4385	0.000675	00000029369
Slc17a2	0.4395	0.009275	00000036110
Rnf125	0.4399	0.000638	00000033107
104816	0.4400	0.002034	00000037686
Acsml1	0.4427	0.000462	00000033533
Bat3	0.4462	0.000053	00000024392
NA	0.4464	0.001894	00000074280
Bbox1	0.4473	0.000606	00000041660
Nrn1	0.4474	0.00079	00000039114
Tmem166	0.4489	0.001348	00000035104

0.45-0.49 fold

Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT P30	FDR-adjusted	ENSMUSG
B230342M21Rik	0.4508	0.001435	00000041132
Azgp1	0.4562	0.001136	00000037053
Pecr	0.4573	0.000597	00000026189
Fabp5	0.4593	0.002099	00000027533
NA	0.4608	0.000044	00000058401
Cat	0.4611	0.000692	00000027187
Gcgr	0.4621	0.001117	00000025127
Lect1	0.4635	0.000434	00000022025
2810055F11Rik	0.4650	0.006418	00000019718
Es22	0.4668	0.005291	00000061959
Dhdh	0.4673	0.004041	00000011382
1190003J15Rik	0.4693	0.015991	00000025481
Cyp2d13	0.4706	0.015119	00000057088
Hebp1	0.4747	0.000379	00000042770
Pygl	0.4760	0.000249	00000021069
Sec14l2	0.4762	0.000971	00000033585
Dpys	0.4767	0.000476	00000022304
Hrsp12	0.4783	0.000759	00000022323
BC026782	0.4783	0.010304	00000070594
2010305C02Rik	0.4789	0.000983	00000038217
Aadac	0.4800	0.002502	00000027761
Lims2	0.4811	0.000232	00000024395
Adipor2	0.4825	0.000236	00000030168
Uroc1	0.4840	0.000615	00000034456
Rarres1	0.4864	0.002094	00000049404
BC089597	0.4865	0.000791	00000074639
C730027J19Rik	0.4878	0.000547	00000030972
Igf1	0.4891	0.000219	00000020053
Ceacam2	0.4901	0.000992	00000054385
Cyp4f14	0.4909	0.000187	00000024292
1700019G17Rik	0.4934	0.002589	00000068299
Il17a	0.4985	0.034388	00000025929
XR_003900.1	0.4986	0.00371	00000070318

Genes Upregulated in the livers of 18.5 days TAF10^{lox/lox}-AlfpCre postcoitus embryos

16-3.18 fold

Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG
Ccl2	16.1112888	0	00000035385
Hbb-y	9.155254557	0	00000052187
Adm	7.117151765	0.000001	00000030790
Gdpd3	6.940309497	0.000002	00000030703
Cxcl1	5.431309211	0.000016	00000029380
Hba-x	5.08729939	0.000001	00000055609
Sftpc	4.758807181	0	00000022097
Ier3	4.296017886	0.000005	00000003541
Lilrb4	4.001663899	0.000002	00000043675
Marco	3.999722751	0	00000026390
Cxcl2	3.80131874	0.000094	00000058427
Il1b	3.789480282	0.000014	00000027398
Col6a2	3.587055333	0	00000020241
Lgals3	3.413377554	0.000002	00000050335
Tmem46	3.398033322	0.000011	00000044461
Actg2	3.272742284	0.000002	00000059430
Hist1h4c	3.251938559	0.000035	00000069274
Pdgfra	3.208279873	0.000017	00000029231
Serpina3g	3.180161428	0.000018	00000041481

3.17-2.76 fold

Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG
Q8BP09_MOUSE	3.172015894	0.000002	00000041913
Slc16a3	3.156662455	0.000006	00000025161
Emilin2	3.14792245	0.000001	00000024053
Hmox1	3.140077137	0.000062	00000005413
AY358078	3.090199543	0.000064	00000072735
Rgs1	3.062903683	0.000147	00000026358
Hist1h2ao	3.044277768	0.00001	00000061615
Acta2	3.036269815	0.000022	00000035783
Ifitm1	2.964728513	0.000398	00000025491
1810023F06Rik	2.960416167	0.000008	00000021208
Ptprs	2.928983366	0.000063	00000013236
Car1	2.921481189	0.000002	00000027556
Hist1h2ao	2.86493022	0.000064	00000069309
Dpagt1	2.85620593	0.000001	00000032123
Timp1	2.843957686	0.000014	00000001131
Itm2a	2.814541655	0.000038	00000031239
Hist1h4c	2.776755211	0.001451	00000069266
NP_001019883.1	2.765039327	0.000026	00000056940
Cxcl10	2.757383628	0.000003	00000034855

2.75-2.22 fold				2.22-2.03 fold			
Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG		KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG
Cd14	2.757192508	0.000002	00000051439	NA	2.22206343	0.000043	00000063025
Ccl7	2.7570014	0.000032	00000035373	Olfir695	2.216371929	0.00473	00000057832
Ctsc	2.728863062	0.000006	00000030560	Adam8	2.209163199	0.000005	00000025473
Emp2	2.723949581	0.000408	00000022505	Adams13	2.208397694	0.000323	00000014852
Mfap4	2.712268491	0.000085	00000042436	Stfa3	2.204879787	0.021578	00000071562
Hist1h4c	2.71170455	0.000048	00000060093	Hbq1	2.200604679	0.000125	00000020295
Oas1g	2.708886599	0.00025	00000052776	Hist1h3b	2.1894978	0.000022	00000075032
Antxr1	2.700450306	0.000001	00000033420	Ralgds	2.189042554	0.000523	00000026821
Fstl1	2.693346789	0.000086	00000022816	Tnip1	2.184798154	0.000009	00000020400
S100a4	2.671037073	0.000011	00000001020	Lum	2.179202102	0.000071	00000036446
Col5a1	2.654426142	0.000104	00000026837	S100a6	2.176183179	0.000132	00000001025
4933439C20Rik	2.646893229	0.000091	00000058140	Tfpi	2.174976782	0.000277	00000027082
Ms4a6d	2.630797127	0.000002	00000024679	Slc2a3	2.170157875	0.000055	00000003153
Col6a1	2.62606022	0.000015	00000001119	Fbxl10	2.169857048	0.000141	00000029475
Hist1h4c	2.611176539	0.005878	00000064288	Laptm5	2.165799964	0.000178	00000028581
Cd5l	2.605752391	0.000001	00000015854	Stfa21l	2.156811359	0.000184	00000059657
F830116E18Rik	2.604849463	0.000004	00000073063	Il10ra	2.149945368	0.000051	00000032089
Hbb-bh1	2.597277205	0.000008	00000052217	AB182283	2.147413471	0.000436	00000041073
Mthfd2	2.579872915	0.000454	00000005667	NP_001033011.1	2.144438587	0.00014	00000062687
Smc4	2.573978495	0.001798	00000034349	XR_005070.1	2.141764714	0.000048	00000044074
Clec4n	2.564539869	0.000007	00000023349	Kcne3	2.135538637	0.000086	00000035165
Ccdc80	2.562052431	0.000004	00000022665	Axin1	2.134058907	0.002338	00000024182
Ms4a6b	2.539949829	0.000192	00000024677	Plac8	2.133467303	0.000003	00000029322
Tgfb1	2.533444106	0.000052	00000035493	4631426J05Rik	2.132728027	0.000577	00000030930
Edg2	2.529759085	0.000015	00000038668	Metrn1	2.132432389	0.000093	00000039208
F730015K02Rik	2.521181532	0.000063	00000053641	Map3k7ip3	2.132284585	0.000008	00000035476
C3ar1	2.51925996	0.00002	00000040552	Leprel2	2.129921117	0.000156	00000023191
Ankrd1	2.493202389	0.000306	00000024803	Clec4d	2.128445279	0.000065	00000030144
Pfkfb	2.453089719	0.000003	00000021196	Aldoa	2.126823039	0.000066	00000030695
Rcn3	2.440031885	0.00001	00000019539	Pigv	2.126086066	0.000019	00000043257
Hk2	2.435469642	0.000066	00000000628	Dlk1	2.124612886	0.002333	00000040856
Loxl1	2.433613397	0.000015	00000032334	Spic	2.122993568	0.000009	00000004359
Adams2	2.416300693	0.002822	00000036545	Slc15a3	2.116235231	0.000128	00000024737
665536	2.416300693	0.000052	00000068631	Mpo	2.108036724	0.020645	00000009350
Tlr2	2.41011168	0.000008	00000027995	Il1r2	2.096089036	0.003561	00000026073
Alox5ap	2.406939702	0.00013	00000060063	Gypc	2.094781836	0.000468	00000024380
Leng4	2.390645145	0.000134	00000035596	Myi7	2.092024866	0.002471	00000020469
Syce2	2.384356569	0.00006	00000003824	Dbn1	2.09014061	0.000541	00000034675
Ccr1	2.382374142	0.000036	00000025804	Prnd	2.084642509	0.002141	00000027338
Dsc1	2.380393362	0.000025	00000044322	Stfa2	2.082476189	0.000053	00000022902
Jun	2.379073758	0.000306	00000052684	F830104D24Rik	2.079302992	0.001043	00000066372
Kcnj8	2.376601471	0.000007	00000030247	Hist1h4c	2.074264685	0.000252	00000060678
Esm1	2.371007128	0.000225	00000042379	Batf	2.070673371	0.000025	00000034266
Ltbp3	2.363623094	0.000442	00000024940	Aif1	2.067088274	0.000686	00000024397
1810007E14Rik	2.357078816	0.005354	00000046804	TCC2_MOUSE	2.066228775	0.000042	00000021316
Msc	2.350226824	0.000023	00000025930	NA	2.063223342	0.000164	00000060355
BC056923	2.338688961	0.000202	00000047443	Mgp	2.059936692	0.001933	00000030218
Thbs2	2.329467173	0.000009	00000023885	Vim	2.057368184	0.000302	00000026728
3830403N18Rik	2.313216022	0.001463	00000031125	Me2	2.056085131	0.000091	00000024556
Ctgf	2.306011967	0.000133	00000019997	Higd1a	2.052240772	0.000267	00000038412
Ankrd37	2.304094678	0.000818	00000050914	Stxbp1	2.051103083	0.00006	00000026797
Ccr2	2.296600631	0.000528	00000049103	Ifi204	2.05081876	0.001933	00000073489
XR_003029.1	2.293896025	0.004214	00000063954	Gmfg	2.050250231	0.000265	00000049365
Dcn	2.283584223	0.000007	00000019929	Hist1h4c	2.049539792	0.000042	00000060639
Icam1	2.281527432	0.00011	00000037405	Rbms3	2.048829598	0.000388	00000039607
Col16a1	2.281053051	0.000143	00000040690	Cdk2	2.046984247	0.001137	00000025358
Serpine1	2.266867395	0.00008	00000037411	Hist3h2a	2.046133107	0.000535	00000036964
Nfkbia	2.265139653	0.000011	00000021025	Crif3	2.043440165	0.000707	00000017561
Hist1h3a	2.246532604	0.000052	00000069310	Kcne4	2.035241509	0.00008	00000047330
Samhd1	2.24139979	0.003928	00000027639	Krt19	2.034959384	0.000043	00000020911
Sec23ip	2.224220781	0.000109	00000055319	Nfkbia	2.032703793	0.000065	00000035356
2310016C08Rik	2.223604181	0.000058	00000043421	Hist1h1b	2.029606437	0.000388	00000058773

2.02-2.01 fold				2.01-2.00 fold			
Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG		KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG
Krt18	2.029184436	0.000378	00000023043	Hist1h4c	2.016285591	0.000476	00000060981
Rassf4	2.02300516	0.000555	00000042129	1110033F04Rik	2.012515647	0.004688	00000044649
Klf5	2.021883679	0.000323	00000005148	2010005H15Rik	2.011399981	0.007328	00000051949
Ckb	2.020342657	0.000908	00000001270	Gf1b	2.011260566	0.00044	00000026815
Ddit3	2.019502595	0.000039	00000025408	1700023B02Rik	2.00346874	0.000048	00000041777
F13a1	2.018662882	0.000106	00000039109	Postn	2.002635694	0.002641	00000027750

Genes Downregulated in the livers of 18.5 days TAF10^{lox/lox}-AlfpCre postcoitus embryos

0.01-0.03 fold				0.03-0.05 fold			
Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG		KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG
Serpina1e	0.00646112	0	00000030287	Hpxn	0.031066424	0	00000058454
Serpina1a	0.008261961	0	00000038301	F2	0.032624509	0	00000027495
Pzp	0.009811572	0.000007	00000068085	Lipc	0.032999775	0	00000058357
NA	0.011341066	0	00000032420	Itih4	0.033109752	0	00000011382
ApoH	0.012197252	0	00000032883	Hsd17b13	0.033798429	0	00000045455
Afp	0.012565396	0.000001	00000001171	BC021608	0.034698089	0	00000030168
Serpina1d	0.012637895	0	00000003402	Angptl3	0.035087476	0	00000030378
Apcs	0.014049864	0	00000048076	1190003J15Rik	0.035243475	0	00000021000
Cpb2	0.015238873	0	00000038704	Apof	0.035405075	0	00000030522
Cep350	0.01556231	0	00000036503	Cfb	0.035996489	0	00000074807
Gc	0.015655355	0	00000063505	Slc27a5	0.03607392	0	00000027822
Cyp2d26	0.017207723	0	00000038213	Spp2	0.036625696	0	00000041132
Itih2	0.017531582	0	00000015714	Cps1	0.037118957	0	00000028064
Fga	0.017679239	0	00000032383	Es1	0.039882509	0	00000036833
Gsta3	0.017730782	0	00000000159	Azgp1	0.040777016	0	00000038024
Akr1b7	0.017736928	0	00000021620	Slco1b2	0.041990303	0	00000022136
Alb1	0.017988267	0.000001	00000040577	Uox	0.042247214	0	00000026623
Cyp2e1	0.018020714	0	00000026024	Apoc4	0.042346895	0.000001	00000018849
Aldob	0.018110874	0	00000039007	F13b	0.043248683	0	00000028980
Fgb	0.01823179	0	00000025130	Cyp3a41	0.043453012	0	00000068877
Serpina1a	0.01865492	0	00000051671	Adh1	0.043606893	0	00000055301
Cyp2c40	0.019324836	0	00000020553	Otc	0.043806841	0	00000028494
Apoa2	0.020563077	0	00000055137	Afm	0.043818989	0	00000018995
Igfbp1	0.021537581	0	00000027222	Rdh7	0.044129891	0	00000039865
Ttr	0.021549527	0	00000020857	Plg	0.044246281	0	00000037656
Fbp1	0.02160187	0	00000041355	Cth	0.045373696	0	00000021772
Crp	0.022256954	0	00000018459	Abcb11	0.046545968	0	00000038991
Apob	0.022366759	0	00000037095	Ttpa	0.047537176	0.000002	00000046153
Apoa1	0.022636583	0	00000028008	Bhmt2	0.047861187	0.000001	00000027649
Trf	0.023504813	0.000001	00000013622	Fah	0.048107312	0	00000061887
Kng1	0.023526002	0	00000040017	Acaa1a	0.048488956	0.000001	00000054328
Pon1	0.023624048	0	00000039176	Apom	0.048785628	0	00000043259
Slc27a2	0.024513155	0	00000025068	Pemt	0.049022912	0	00000057068
Serpinc1	0.024669974	0	00000026687	9430083G14Rik	0.049459793	0.000006	00000027187
Rgn	0.024723041	0	00000049152	Kng2	0.050046049	0	00000040731
Ambp	0.025209302	0	00000043162	Nrn1	0.050471053	0	00000062768
Akr1c6	0.025267032	0	00000037278	Cyp2d10	0.050670856	0	00000075113
Aadac	0.025432199	0	00000074265	Tff3	0.051685378	0	00000033701
Ahsg	0.026323589	0.000002	00000022546	Gnmt	0.051717631	0	00000020766
Vtn	0.026367416	0	00000030541	Cfi	0.053352512	0	00000022890
Serpina3k	0.028252062	0	00000025544	Cpn2	0.053448749	0	00000037573
Slc10a1	0.028702098	0	00000034575	674367	0.053574861	0	00000019879
A2m	0.028735939	0	00000032014	H2-Q10	0.054082288	0	00000024359
Itih3	0.029763748	0	00000028470	Apoc2	0.055245471	0	00000027544
Cyp2c70	0.029997789	0	00000047201	Hac1f	0.055306774	0	00000032080
Fgl1	0.03072379	0	00000025428	Ces6	0.05632425	0	00000046447

0.05-0.08 fold				0.08-0.12 fold			
Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG		KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG
Arg1	0.056723879	0	00000066040	Cp	0.089095724	0	00000026692
NA	0.056731743	0	0000002265	Akr1d1	0.089516659	0.000002	00000021838
Igfbp2	0.057059068	0	00000009281	Creb3l3	0.092795586	0	00000003555
Hpd	0.057066979	0	00000019478	Ugt2b34	0.092808452	0.000001	00000039508
Hmgcs2	0.057447981	0	00000005981	NA	0.093085483	0.000002	00000024085
C3	0.058822014	0	00000057074	Sult1d1	0.094032286	0	00000032265
Tm4sf4	0.059605943	0	00000045099	Gys2	0.094870279	0	00000024601
Hc	0.059833613	0	00000047238	Hsd3b3	0.09513368	0	00000020102
Ugt2b5	0.060249789	0	00000027406	Ces3	0.095961532	0.000002	00000048757
Abca8b	0.060521854	0	00000028706	Tat	0.09734158	0	00000021559
Pah	0.060782507	0.000036	00000072594	lyd	0.097355075	0	00000026617
Serpina10	0.061652363	0	00000000934	Amy1	0.09827035	0.000002	00000047844
Serpinf2	0.062669183	0	00000049036	Apoa5	0.098947015	0.000001	00000026270
Npal1	0.062764822	0	00000056131	Aoc3	0.099063678	0.000001	00000025980
Hao3	0.06379999	0	00000027952	Car3	0.099759635	0	00000038235
Apoc1	0.065493702	0	00000052392	Gstt1	0.100154559	0	00000026064
Prodh2	0.065821376	0	00000009863	0610038K03Rik	0.100279596	0	00000038170
Hao1	0.065990401	0	00000061740	Gulo	0.100307404	0.000001	00000024395
Cyp4a14	0.067265008	0	00000020917	Echdc3	0.100641693	0	00000044294
Hsd3b1	0.069093797	0	00000038217	Gstz1	0.102145673	0.000002	00000032349
Ugt1a6b	0.070604307	0	00000041698	Amacr	0.10318463	0	00000056313
Cyp2a12	0.071001829	0	00000038917	Asgr1	0.103715254	0	00000006395
Crtac1	0.071515511	0	00000044751	Itih1	0.104010422	0	00000020538
C8b	0.071565099	0	00000032092	Bex1	0.104509066	0.000001	00000004069
Sult1a1	0.072503779	0	00000026259	Tm7sf2	0.107068055	0	00000039246
Abca8a	0.073099229	0	00000038155	Glud1	0.107224017	0	00000073418
Ugt2b38	0.073571968	0	00000030800	Slc3a1	0.107767943	0	00000041548
Hgfac	0.073628086	0	00000030909	Qprt	0.107984788	0	00000040374
Mosc1	0.074366671	0	00000025453	Mbl1	0.108014732	0.000002	00000033105
Fn1	0.075976655	0	00000028743	Gucata	0.10820957	0.000012	00000028744
Serpinf1	0.076621868	0.000001	00000006736	Cyp2d9	0.108262086	0.000001	00000064220
Slc25a13	0.076637802	0	00000043629	Serpind1	0.108442336	0.000008	00000030098
Mat1a	0.07703191	0.000007	00000020080	Gcgr	0.109083137	0	00000118417
Spink3	0.077605354	0	00000048847	Mgst1	0.109151208	0.000018	00000038267
Aqp8	0.0778424	0	00000028271	Slc17a3	0.11002475	0.000001	00000038421
Acsmf1	0.077890976	0	00000031231	Cyp2j5	0.110123937	0.000008	00000049493
Leap2	0.078063935	0	00000021099	Aox3	0.111792864	0	00000028015
Proc	0.078302382	0.000001	00000028766	Phyh	0.112922118	0	00000039956
Plxdc1	0.078324095	0	00000062499	Tmprss6	0.11318071	0	00000042789
Pcbd1	0.078329524	0	00000000876	Acadm	0.113306301	0.000004	00000026535
Apoc3	0.078830624	0.000002	00000046027	Ephx2	0.113636641	0.000012	00000009614
Hgd	0.079400946	0	00000031812	Aadat	0.115302844	0	00000018770
Scd1	0.079489053	0	00000068653	Mst1	0.115470802	0	00000041717
Ddt	0.079814795	0	00000028399	2810459M11Rik	0.115984185	0	00000063235
Gckr	0.080704896	0	00000059570	Pla2g12b	0.116419126	0	00000025135
Acox2	0.081508821	0	00000028145	Rab3d	0.116701904	0.000002	00000025036
Fsip1	0.081593611	0	00000031938	Acat1	0.118150693	0.000003	00000022894
Agxt	0.081791799	0	00000038462	Grhpr	0.11835561	0	00000020629
Ass1	0.082195316	0.000013	00000029632	Nipsnap1	0.118363814	0	00000044443
Cldn1	0.082240908	0	00000023010	Rerg	0.11905499	0	00000018428
Csad	0.082876104	0	00000020205	Cyp2c50	0.120157616	0.000001	00000000154
Lect2	0.083782921	0	00000001100	1700054N08Rik	0.120165945	0	00000025745
Mbl2	0.084207935	0	00000045316	Timd2	0.120332646	0.000001	00000035191
Slc2a2	0.08467618	0	00000031641	Al132487	0.120792267	0	00000028199
Slc38a4	0.084734894	0	00000038195	NA	0.12106049	0.000004	00000035258
Pfkfb1	0.085011392	0	00000031767	Pter	0.121447105	0	00000044408
Agf	0.085194258	0	00000074665	Atf5	0.122232514	0	00000038375
F12	0.085294705	0	00000055116	Pla1a	0.122240987	0.000001	00000011305
Akr1c14	0.086102563	0.000001	00000030082	Apoe	0.122571885	0.000002	00000034171
Ccb12	0.087522636	0	00000041426	Ndrp2	0.122648373	0.000006	00000034918
C8g	0.088272019	0	00000001700	Akr1c12	0.122912198	0	00000032062
Akr1c20	0.08875671	0	00000015243	Cfh	0.12323637	0.000308	00000034108

0.12-0.15 fold				0.15-0.18 fold			
Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG		KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG
Pecr	0.124982673	0	00000021929	Cyp4f15	0.156713351	0.000003	00000040660
Lpin1	0.125008665	0	00000015970	Slc25a33	0.156919875	0	00000045658
Upb1	0.125060665	0	00000021670	Aldh6a1	0.156974269	0.000023	00000028223
Cyp2c44	0.125320992	0.000001	00000039131	Serpina11	0.158000387	0.000001	00000052151
Gpld1	0.126280169	0.000004	00000000903	Enpp2	0.158307334	0	00000060475
NA	0.126525493	0.002715	00000038522	Fxyd1	0.158450048	0.000149	00000035376
Bbox1	0.128087358	0	00000025494	Gjb1	0.160039508	0	00000068874
Errf1	0.128238379	0	00000020532	Ndg2	0.16007279	0	00000021273
Ehhadh	0.128808526	0	00000020986	Dgat2	0.160394881	0.000002	00000022707
Tcea1	0.130172806	0.000001	00000038781	Ghr	0.160405999	0	00000018042
F10	0.130425693	0	00000025795	Hp	0.16069534	0.000002	00000029545
Pdzk1	0.13091479	0	00000053329	Vnn3	0.161141501	0	00000028671
Maob	0.131023727	0.000001	00000025317	Hrsp12	0.161544104	0	00000050532
Dmgdh	0.131460383	0.000006	00000027869	NP_001027021.1	0.162961153	0.000001	00000036151
Pipox	0.131715771	0	00000051075	Tspan12	0.164333669	0	00000025937
Serpina3n	0.13178883	0	00000019494	Gamt	0.164755668	0	00000001247
H19	0.132347239	0	00000026473	Hnf4a	0.164789931	0	00000029384
Dbi	0.132512467	0	00000026388	Bex2	0.165236006	0.000004	00000046798
Lpl	0.133498922	0	00000070985	Serping1	0.165798171	0.000025	00000027282
8430408G22Rik	0.133582229	0.000029	00000032527	Elf4ebp3	0.166500683	0	00000029776
Dpys	0.134623297	0	00000041798	Sec14i4	0.167067151	0.000014	00000068876
Pou2af1	0.137471075	0.000001	00000042476	Acaa2	0.167623927	0.000001	00000015966
Cyp39a1	0.137547326	0	00000068011	C8a	0.168439219	0.000001	00000021636
Tfpi2	0.139168056	0	00000044646	C1s	0.168626128	0.000026	00000066150
Slc37a4	0.139980716	0	00000004270	Sc4mol	0.170270452	0	00000029311
Pck1	0.140068068	0.000008	00000039533	Pcolce2	0.171217254	0	00000036198
Tdo2	0.14011662	0.000003	00000044252	Asl	0.171217254	0.000002	00000024222
Acsf1	0.140223495	0	00000023333	Fetub	0.171656929	0.000036	00000021676
Scp2	0.140291548	0.000001	00000009566	Grb10	0.17185932	0	00000037710
Stard10	0.140642059	0	00000029455	Cyp3a13	0.171883147	0.000028	00000020386
Pank1	0.141492746	0	00000016534	Dhcr24	0.173078689	0.000001	00000033429
Rrbp1	0.141708677	0.000001	00000029759	Hsd11b1	0.173559231	0	00000028007
Col18a1	0.141954452	0	00000061322	Grin2c	0.174270466	0	00000071337
Agmat	0.141983974	0.000002	00000020621	Slc39a5	0.175105949	0	00000050777
H2-Q8	0.142043035	0	00000046115	Prkaca	0.175130225	0.000014	00000058672
Brp44l	0.142111972	0	00000033735	Hsd3b7	0.175385332	0.000007	00000035621
Gcat	0.142813078	0	00000037366	Cideb	0.176592992	0	00000038527
Rdh9	0.143826358	0	00000036932	Adhfe1	0.176629718	0	00000021411
Upp2	0.144305681	0.00016	00000027257	Bphl	0.177439609	0	00000027195
Tmem166	0.146340399	0	00000039286	Ugt2b35	0.177771998	0	00000061780
Drd1a	0.146533253	0	00000029810	Polm	0.178030953	0	00000036078
Proz	0.146797571	0	00000022656	9130022K13Rik	0.178265571	0.000009	00000040370
Defb1	0.147011406	0	00000024120	Hsd17b7	0.180203633	0	00000003559
Acsm3	0.147082754	0	00000036764	XR_003384.1	0.180453621	0.000002	00000031111
Bdh1	0.147082754	0	00000023832	2810451A06Rik	0.181092663	0	00000028517
Cmlf1	0.147869868	0.000027	00000046312	Sec14i2	0.181721371	0	00000024084
Rbp2	0.14869211	0	00000028716	Psd	0.183010712	0.000009	00000001123
Elovl6	0.148733342	0	00000020216	Uroc1	0.183824377	0	00000030671
Fmo1	0.149208331	0.000001	00000001211	BC013476	0.184117671	0.000004	00000028229
Sephs2	0.149363547	0	00000031482	Dpyd	0.184334754	0	00000007476
Akr1c13	0.149467114	0.000001	00000044018	Egfr	0.184424215	0	00000033377
Hadhsc	0.149498198	0	00000028527	Nalp6	0.185090147	0.000007	00000035133
Rpl7a	0.149601858	0.000001	00000034738	St6gal1	0.185539723	0.000001	00000062196
Slc36a2	0.14970559	0	00000020027	Crot	0.185900171	0	00000029314
Slc17a2	0.150684194	0.000006	00000048164	Ggt1	0.185913057	0	00000040584
Abcc2	0.151123508	0.000003	00000039653	Haao	0.186029072	0	00000021646
1300017J02Rik	0.152048132	0.000016	00000022613	Qk	0.18639047	0.000005	00000023921
Cpn1	0.152544281	0.000001	00000030342	A530016O06Rik	0.187712939	0.000005	00000042429
Cfhr1	0.152851223	0	00000072949	Ebpl	0.18829936	0.000001	00000028076
Mttp	0.153946396	0	00000021086	Gldc	0.188782901	0	00000001891
Aldh1b1	0.156648189	0.000001	00000041750	Krt18	0.188874521	0	00000002393
BC026782	0.156669907	0.000003	00000030113	Bckdhh	0.189398919	0.000012	00000017493

0.18-0.22 fold				0.22-0.25 fold			
Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG		KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG
Gls2	0.189977438	0.000001	00000042682	Por	0.222025917	0	00000037012
Cyp7a1	0.193164248	0.000001	00000048772	Etfdh	0.222580637	0.000003	00000044393
Serpina7	0.194346092	0	00000039706	Ahcy	0.224020086	0	00000063354
F7	0.195237217	0.000001	00000042073	Rgs16	0.224237582	0.000012	00000021376
Masp2	0.19548096	0.000001	00000037020	Q8VHJ3_MOUSE	0.2249537	0.000005	00000024640
9530008L14Rik	0.195643624	0.000038	00000044749	Igf2	0.22521893	0.000007	00000047109
Habp2	0.195725007	0.000001	00000058135	Mosc2	0.225672104	0.000002	00000026638
Epb4.115	0.196254821	0.000001	00000026304	Reep6	0.226989898	0.000044	00000041650
Gcdh	0.196704245	0.000001	00000026003	Kynu	0.227983291	0	00000028185
Cd302	0.198044975	0	00000061232	Ftcd	0.229266902	0.000001	00000033629
Ech1	0.198113624	0	00000049044	2810439F02Rik	0.229330477	0	00000020614
Gchfr	0.198526018	0.000004	00000046329	Cyp2j6	0.230062859	0	00000029195
Hadhb	0.198980644	0.00001	00000036377	Cyp27a1	0.230318148	0.000001	00000054676
Ccb1l1	0.19900823	0.000142	00000046352	Echdc2	0.230733598	0	00000021900
Trfr2	0.199906876	0.000005	00000031886	Cdh1	0.231229921	0	00000005677
Etfp	0.200073223	0.000002	00000003948	Sc5d	0.231470461	0.000001	00000040590
Cyp3a16	0.200156448	0.000002	00000010760	NA	0.233258248	0.000001	00000027173
Acox1	0.201241534	0.000007	00000025153	Ocln	0.233355277	0.000001	00000025791
Qscn6	0.201311291	0	00000024870	Foxa3	0.233581837	0.000011	00000018821
Aldh1l1	0.201436915	0.000001	00000022751	Qdpr	0.233776205	0	00000035473
Aldh8a1	0.201492773	0.000004	00000060376	Traf3	0.234360283	0.000015	00000022235
D14Erttd449e	0.202024196	0.000048	00000028691	Kmo	0.234392774	0	00000010663
Enpep	0.202486833	0	00000036292	Pgrmc1	0.235206527	0.000001	00000024785
Abcd2	0.203330705	0	00000047230	Fabp5	0.235598131	0.000005	00000033022
Depdc6	0.204220557	0	00000042797	Es31	0.236104918	0.000081	00000038422
Apon	0.20444717	0.000002	00000010122	Krt8	0.236334147	0.000006	00000020182
Hal	0.204475515	0.000001	00000043870	Fabp2	0.23720396	0.000016	00000067279
Cbs	0.204574751	0	00000028383	Got2	0.238192518	0.000005	00000032193
Pxmp2	0.204773368	0.000002	00000020741	Entpd8	0.238920078	0	00000031596
Perp	0.205726565	0	00000024900	Insig1	0.238953201	0.000001	00000004610
Sdc4	0.205983403	0	00000036073	Ppargc1a	0.239334453	0.000017	00000022037
EG624219	0.208424965	0.000001	00000063929	Abcd3	0.240265265	0.000001	00000028121
Hsd17b9	0.209831038	0.000008	00000026342	Hsd17b2	0.240581898	0.000003	00000017765
Tst	0.210763946	0.000001	00000025203	Decr2	0.240615252	0	00000028479
Cant1	0.210924707	0	00000025260	Rnf125	0.242087417	0.000005	00000025465
Fdps	0.211129489	0.000001	00000019718	BC021614	0.242742731	0.000002	00000074280
Cyb5	0.211774384	0	00000032348	Mdh1	0.24363613	0.000001	00000004071
Cyp2a4	0.211774384	0.000009	00000002504	Erbp3	0.244194058	0.000194	00000019232
Hpn	0.211862477	0.000008	00000046541	Clpx	0.244210985	0	00000029859
Cyp4a12b	0.211891849	0.000002	00000003355	Ppara	0.244380318	0.000001	00000045708
Mocs2	0.212141679	0	00000029998	Adh5	0.244549768	0	00000032558
1300002K09Rik	0.212435974	0.000001	00000055884	Grb14	0.246575267	0	00000021983
Rnase4	0.212494882	0.000171	00000072490	Uchl1	0.246763343	0.000004	00000035936
2310009E04Rik	0.213602435	0.000002	00000037583	Nr1i2	0.247328432	0.000008	00000049329
Gstm7	0.213987733	0.000003	00000038403	Abcc6	0.247345576	0.000027	00000020669
Mug1	0.214136109	0.000004	00000024150	Inhbe	0.247482771	0.000059	00000021136
Dbt	0.214492633	0	00000025812	Rora	0.247894815	0	00000034317
Sdc2	0.214507501	0.000001	00000009378	Akr1c18	0.249688278	0	00000025486
Nsdhl	0.214849749	0	00000045991	Spryd4	0.250103994	0.000001	00000031640
NA	0.215864813	0	00000019312	NA	0.250138668	0.000094	00000037025
Krt20	0.215924672	0.000001	00000021069	Akr1c19	0.250641984	0.000001	00000024665
Vkorc1	0.216164272	0.000004	00000027227	Tmem135	0.251215955	0.000001	00000028672
Vnn1	0.217924454	0	00000003721	Aass	0.251442426	0.000001	00000025350
Cyp51	0.218120912	0	00000015337	Slc38a3	0.251808694	0	00000041957
6230410P16Rik	0.21851436	0.000043	00000033318	Dsc2	0.251895979	0.000011	00000010025
C730027E14Rik	0.218878173	0.000001	00000025190	Ndrp1	0.252350351	0.000007	00000028405
Shmt1	0.219272987	0.000001	00000026568	Cyp8b1	0.255943984	0.000024	00000051483
Pde6c	0.21968374	0	00000041012	NA	0.256512316	0.000001	00000050390
EG231903	0.220385315	0.000029	00000025289	Sqle	0.256743561	0.000142	00000063730
D4Bwg0951e	0.221580066	0.000001	00000040808	Idh1	0.256832557	0.000001	00000019122
Dppa3	0.221626147	0.000118	00000024507	Acadvl	0.256868164	0.000012	00000061299
NA	0.221887454	0.000005	00000070644	F9	0.257028457	0.000001	00000032204

0.25-0.28 fold				0.28-0.32 fold			
Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG		KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG
Slc19a2	0.257831422	0.000034	00000024479	Cbr1	0.289091882	0.000001	00000050445
C4bp	0.258278597	0.000039	00000045141	Aco1	0.289292334	0	00000005125
1810014F10Rik	0.258493516	0.000001	00000021477	Aldh3a2	0.290860643	0.000001	00000024331
Ctla2b	0.259229175	0.000004	00000074825	Pkp2	0.290961465	0.000008	00000010064
Dci	0.259247144	0	00000031770	Rdh5	0.292012089	0	00000029695
Atp2c1	0.259750782	0.000008	00000032051	Hmgcl	0.292093063	0.000011	00000039428
Rbm35b	0.259750782	0	00000001604	Fads2	0.292822842	0.000003	00000071551
Dhrs4	0.260688708	0.000664	00000034424	Foxa2	0.293351038	0.000012	00000058492
NA	0.260779072	0.000714	00000001417	Cyp4v3	0.293737629	0.000048	00000051346
Pcp4l1	0.261158941	0	00000034308	Sirt3	0.294022813	0.00001	00000021214
Ebp	0.261430614	0	00000058258	Trim59	0.294655275	0.000007	00000032238
Abcg5	0.262338236	0.000005	00000047963	Sh3yl1	0.294777844	0.000001	00000047492
Gpam	0.263796988	0.000001	00000034371	Smoc1	0.294777844	0.000009	00000030834
Adk	0.263943309	0	00000041471	NA	0.295493848	0.000006	00000022809
Avpr1a	0.264639441	0.000041	00000050199	Aldh5a1	0.29569874	0.000005	00000029223
Pogz	0.265135177	0	00000026922	Atp8a2	0.295739735	0.000001	00000026888
Epb4.114b	0.266664928	0.000006	00000025176	Nphp3	0.295862755	0.000066	00000028138
BC048546	0.266979338	0.000001	00000066361	Olf447	0.296931077	0.000173	00000022383
Amdhd1	0.267312647	0.000141	00000042078	Epha1	0.297281172	0.000036	00000015357
XR_003171.1	0.270387432	0.000012	00000002475	Agxt2l1	0.297425449	0.000037	00000018166
Nags	0.270781297	0.000006	00000025137	5730403B10Rik	0.299182978	0.000005	00000020321
Lbp	0.270875159	0.000005	00000006777	NA	0.299909681	0.003085	00000058216
2810401C16Rik	0.270987836	0.000001	00000026579	Echs1	0.29993047	0.000003	00000033107
BC018285	0.271044192	0.000011	00000050440	Gne	0.30038819	0.000003	00000036775
Ddah1	0.27115694	0	00000027597	Slc12a4	0.300825756	0.000004	00000031844
Syne2	0.272286998	0.000005	00000052974	Bcar3	0.30101348	0.000003	00000028127
Klf15	0.272645831	0	00000026870	Clu	0.302351785	0.000035	00000029167
Zc3h12d	0.27283488	0.000179	00000030108	Etfb	0.302792211	0.000005	00000045294
Acsf5	0.273175499	0.000002	00000024981	Slc7a2	0.30333839	0.000002	00000036813
Slc6a13	0.273497585	0.000173	00000039981	Ldlr	0.303443537	0.000001	00000031672
D730039F16Rik	0.274028908	0	00000030087	Ppp1r3c	0.303590805	0.000001	00000023057
Cyp2f2	0.274599328	0.000035	00000054397	Ddc	0.303738144	0.000069	00000049382
Ahcy	0.275323565	0.000001	00000028194	Hdhd3	0.304750396	0.000001	00000069922
Hamp1	0.275342649	0.000004	00000062185	Cdo1	0.304856033	0.000002	00000027533
F5	0.27559087	0.000004	00000022763	Rcl1	0.305766021	0.000003	00000006373
Krt23	0.275858435	0.000017	00000016024	Fads1	0.306062883	0.000005	00000039783
Pcyt2	0.276662689	0.000001	00000048217	Cmb1	0.306360032	0.000004	00000021277
Abhd3	0.277969789	0.000004	00000043379	Galm	0.307040315	0.000003	00000015806
Svop	0.279244351	0.000154	00000015890	Avpi1	0.307168036	0.000035	00000040891
Serpina3c	0.279379874	0.002021	00000047228	Pgm2	0.309111664	0	00000021638
0610010D20Rik	0.279864422	0.00001	00000028434	Depdc7	0.310442934	0.000002	00000025744
Agpat2	0.279883821	0.000002	00000029304	633450	0.311283282	0.000822	00000032018
Lgr4	0.280349811	0.000006	00000020123	Nr1f3	0.312407285	0.000008	00000000303
3110001K24Rik	0.280874976	0.000045	00000039197	Btd	0.312775627	0.000004	00000028601
Dak	0.28155721	0.000011	00000024978	1600014C10Rik	0.312884045	0.000001	00000026170
D5Ert593e	0.281576727	0.000001	00000040505	Klb	0.313079294	0.000002	00000052914
Idi1	0.281635285	0.000001	00000031168	BC029169	0.313448428	0.000042	00000024424
4632417N05Rik	0.281654807	0	00000038370	Ptplad1	0.31355708	0.000007	00000001155
Rhbg	0.282632642	0.000001	00000070811	Dnase2b	0.313578815	0.000003	00000026866
Gcsh	0.282985493	0.000011	00000022210	Pcca	0.314972985	0.000002	00000035504
Tcea3	0.283024726	0	00000032570	Irf6	0.316746372	0.000026	00000073481
Fdx1	0.283044344	0	00000033824	Cldn14	0.317868068	0.000001	00000048583
Herpud1	0.283633531	0.000006	00000024132	Psat1	0.318353162	0.000082	00000041558
NA	0.283889225	0.000005	00000074874	Tpmt	0.319037961	0.000004	00000026475
Ctsl	0.284145151	0.027985	00000025466	Slc39a4	0.319126429	0.000002	00000048087
NA	0.284322465	0.000009	00000026405	Dsg2	0.320634151	0.000004	00000027809
Mal2	0.284361883	0	00000040918	Hk1	0.320834235	0.000003	00000005514
Aqp9	0.284776104	0.000005	00000031138	Etnk2	0.322774833	0.000002	00000035129
XR_005049.1	0.284855072	0	00000018574	Hsd17b4	0.322864338	0.000006	00000046323
Ccl9	0.287134781	0.000006	00000025950	S100g	0.323155399	0.000001	00000048706
Hsd3b2	0.287333876	0.000597	00000022351	Prdx4	0.324142478	0.000008	00000075543
C77080	0.287732482	0.000096	00000059447	Cmtm8	0.324592147	0.000108	00000024992

0.32-0.35 fold				0.35-0.38 fold			
Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG		KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG
Brp44	0.324907286	0.000026	00000020534	Mut	0.357347599	0.000006	00000062078
Got1	0.325673898	0.000106	00000046811	Mccc2	0.359135457	0.000073	00000000673
Gstt2	0.32585454	0.000052	00000020258	Abcb1a	0.35998283	0.000052	00000006345
Endog	0.32666867	0.000002	00000001467	A230097K15Rik	0.361834029	0.000001	00000003623
Insig2	0.327008491	0.000021	00000037440	NA	0.361859111	0.030261	00000022885
Sord	0.328530678	0.000002	00000030804	Arhgap5	0.361934365	0.000245	00000038745
Pygl	0.328553451	0.000002	00000035775	Palmd	0.362386219	0.000208	00000020122
Grb7	0.32894083	0.000005	00000058401	Phyh1	0.362914096	0.000377	00000033308
Onecut2	0.329146098	0.000011	00000031349	2410005O16Rik	0.364098323	0.000006	00000028712
Slc16a12	0.329283014	0.000007	00000022261	Pde3b	0.364174043	0.000007	00000034456
Pard3	0.329305839	0.000189	00000000340	Lgals9	0.365109218	0.000017	00000037126
Mcf2	0.329328666	0.000001	00000059908	Qpct	0.365387706	0.000004	0000003585
Hfe2	0.329488496	0.000027	00000004035	Ppap2b	0.365438363	0.000059	00000038009
Nr0b2	0.33008283	0.000005	00000028573	Igsf1	0.366402182	0.000014	00000070360
NA	0.330174361	0.000001	00000021876	As3mt	0.36645298	0.000443	00000026675
Fancm	0.330334601	0.000012	00000028327	Lyrn5	0.366630827	0.000466	00000010601
Pcyox1	0.330380399	0.000054	00000015536	Oprs1	0.36698678	0.000034	00000020474
Fkbp11	0.33118288	0	00000066071	Cfd	0.367776193	0.000563	00000035811
Zfp526	0.331274716	0.000006	00000001249	Hsd17b12	0.368107743	0.000236	00000038286
Slc9a3r2	0.331918282	0.000169	00000024646	1300014I06Rik	0.368541758	0.000011	00000025911
Gsta4	0.332194479	0.000003	00000074254	C1rl	0.36966747	0.000008	00000022219
2810055F11Rik	0.332447861	0.000044	00000059743	Midn	0.36971872	0.000036	00000042289
Hadh2	0.333602036	0.000001	00000025575	Tubb2a	0.369975079	0.000021	00000005469
Scd2	0.334273293	0.000008	00000044986	Tmem37	0.371285274	0.000056	00000039878
Slc35f5	0.33489947	0.000001	00000025396	Tia1	0.371413974	0.000664	00000020734
NA	0.335271092	0.000011	00000047822	Snx7	0.371826114	0.000011	00000016194
Galt	0.336365116	0.000067	00000017009	Mcee	0.372032355	0.000001	00000034926
Cpt1a	0.336855089	0.000015	00000019851	Sar1b	0.372496816	0.000019	00000029727
1300001I01Rik	0.337041933	0.000001	00000029499	Zcd1	0.373246335	0.000383	00000020176
Hsd12	0.337322393	0.000026	00000024039	Iqgap2	0.374568115	0.000645	00000022871
1300013J15Rik	0.338047996	0.000036	00000020017	Fkbp5	0.374671981	0.000004	00000015354
NA	0.338047996	0.000003	00000051716	75404	0.375321801	0.000051	00000025533
Aqp11	0.338188616	0.000021	00000022419	Dhrs8	0.375660153	0.000017	00000031604
Cldn2	0.338869101	0.000026	00000055782	Slc31a1	0.375946689	0.000003	00000038521
Gramd1c	0.339221614	0.000004	00000028024	Marvel2	0.377539631	0.000109	00000035031
Prdx1	0.339833504	0.000261	00000021867	Il17rb	0.377565801	0.000011	00000036880
Bckdha	0.340800652	0.00057	00000037542	Cgn	0.377749042	0.000001	00000019368
Nit2	0.341628443	0.000005	00000030088	Hibadh	0.378194425	0.000003	00000073595
Rab1b	0.342031238	0.00023	00000033684	Mtch2	0.378640333	0.000079	00000023224
Fasn	0.342838254	0.000005	00000020777	Cldn12	0.378955408	0.000013	00000042750
Phlda2	0.343504285	0.000003	00000038656	2010109A12Rik	0.379323327	0.000087	00000017950
Mmd	0.345079338	0.000009	00000032314	Lsr	0.379612657	0.000004	00000020150
Ces5	0.345270744	0.000034	00000029716	Lactb2	0.380033894	0.000005	00000029669
Gjb2	0.346469437	0.000051	00000039648	Tm6sf2	0.380402861	0.000269	00000005269
C530008M17Rik	0.347046287	0.000008	00000063684	NA	0.381221132	0.000002	00000022323
Slc25a23	0.347094401	0.000002	00000046814	Gale	0.381459025	0.000052	00000020010
Rapgef4	0.347142522	0.000036	00000053898	Acads	0.381855842	0.000002	00000031722
H2-K1	0.349290667	0.000352	00000060703	Cyb5r3	0.382067646	0.000032	00000055737
Acadl	0.349435963	0.000235	00000038009	Gbe1	0.382703765	0.000002	00000030747
Rab17	0.350284729	0.000008	00000026383	Fdft1	0.382889499	0.000334	00000049422
Gstm1	0.352647814	0.000002	00000025075	Selenbp1	0.383500403	0.000009	00000047797
Abca6	0.352672258	0.000048	00000058022	Ptplb	0.383952567	0.000007	00000036570
Wdr62	0.352745602	0.000001	00000028979	Wtap	0.384085658	0.000004	00000022425
Abhd14b	0.353014659	0.000041	00000031443	Ppap2c	0.384218795	0.000022	00000063232
Ldb2	0.353675944	0.000029	00000031271	Decr1	0.384938533	0.000048	00000021238
Tmem53	0.353823064	0.000122	00000028240	5033414K04Rik	0.385152048	0.000019	00000028982
Selk	0.354338467	0.000002	00000044005	Cyp2b13	0.386435623	0.000013	00000073424
Igfbp4	0.354633321	0.000005	00000032263	Mug4	0.386489199	0.002423	00000070594
Nr2f6	0.355420795	0.000172	00000023043	Cd1d2	0.386703573	0.001125	00000035561
Ugp2	0.35566724	0.000008	00000024827	4930403N07Rik	0.386837618	0.000027	00000028158
Cd1d1	0.35611127	0.000006	00000021928	NA	0.387427965	0.000005	00000057037
Adora1	0.357124743	0.000094	00000050103	Cd9	0.387535398	0.000007	00000025196

0.38-0.41 fold				0.41-0.44 fold			
Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Fold Change	P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG		KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG
Miox	0.388019214	0.000072	00000033688	Trp53inp2	0.412652704	0.000005	00000038539
Baat	0.38920442	0.000855	00000025194	1110002B05Rik	0.413167878	0.000012	00000026730
637273	0.390041625	0.071364	00000036110	Abi3bp	0.413253803	0.000003	00000070929
Socs2	0.3900957	0.000004	00000020264	Cryz	0.413454363	0.000019	00000048856
Ak3l1	0.390149782	0.000039	00000062647	Rfp14	0.414171446	0.000008	00000040413
Nostrin	0.390149782	0.000005	00000027984	Hadha	0.414717261	0.006153	00000031971
Mrpl50	0.39025797	0.000396	00000021213	Slc22a18	0.415206231	0.000036	00000054827
Slc25a15	0.39052857	0.000003	00000049091	Akap1	0.415811049	0.000008	00000030222
Agpat3	0.390799357	0.000022	00000040181	NA	0.415926352	0.000085	00000034285
Jsrp1	0.390934822	0.000007	00000041220	Adi1	0.418268136	0.000037	00000035637
Pdzk1ip1	0.391151662	0.000008	00000032454	Adamts5	0.418413121	0.000186	00000032047
AI464131	0.391830064	0.007774	00000057103	Sfxn2	0.418819349	0.000169	00000040883
NA	0.391965885	0.000024	00000030935	Anapc11	0.420419065	0.000269	00000009646
Dnajc12	0.392074576	0.000041	00000046598	Golt1a	0.420681418	0.000498	00000026227
Lrpprc	0.392101754	0.000202	00000044748	Ptpmt1	0.420681418	0.000008	00000032591
Pvrl3	0.393135895	0.000029	00000031445	Atp5g3	0.420943935	0.000859	00000057228
Tmem176b	0.393217654	0.000043	00000021478	Sardh	0.422551766	0.000003	00000022040
Fndc3b	0.393408491	0.000009	00000035104	Ifi202b	0.422815455	0.000262	00000062908
Pacsin3	0.393435761	0.000004	00000026839	232974	0.424106941	0.000066	00000016942
Pdcd8	0.393872337	0.000602	00000056148	Mrap	0.424224545	0.000049	00000026664
Pafah2	0.393899639	0.000109	00000006378	Ctso	0.425638336	0.000004	00000064294
Spr	0.39447342	0.000032	00000023861	AI427122	0.425962992	0.000017	00000052520
NA	0.395321959	0.000003	00000055413	Fcrla	0.426199262	0.000011	00000036083
Rdh14	0.395705768	0.000003	00000040706	3110004L20Rik	0.42658348	0.000058	00000008540
Dnaic1	0.396914452	0.000022	00000001435	Myo1b	0.427086441	0.000179	00000025127
Pon3	0.397382432	0.000026	00000027422	Grip2	0.429133966	0.002335	00000022766
Lamp2	0.398044049	0.000374	00000033610	Hist2h3c2	0.429312475	0.022017	00000068086
Aldh2	0.398154426	0.002597	00000030688	Pqlc2	0.429997447	0.000629	00000023982
Fpgs	0.398264833	0.000009	00000028603	Lss	0.43077308	0.000104	00000037780
Gcm1	0.398485739	0.000432	00000018796	Pxmp3	0.431430477	0.000028	00000030674
Osbpl1a	0.40000779	0.000023	00000028011	Hspb8	0.432028981	0.003733	00000024131
Mmd2	0.400174183	0.000071	00000027513	C4b	0.432268616	0.000084	00000021794
Mboat5	0.400201922	0.000536	00000032114	Lyplal1	0.433018329	0.000144	00000024799
Zbtb7c	0.400340645	0.000033	00000029664	Dnaja3	0.433078363	0.001136	00000050071
70291	0.402315716	0.001266	00000023963	Srebfl	0.433108382	0.000159	00000006529
Abcb4	0.402510968	0.000819	00000032053	Hyl	0.433228482	0.000537	00000020884
Gck	0.403264971	0.000009	00000022304	1810011O10Rik	0.433588981	0.000183	00000022244
Pccb	0.403656492	0.000008	00000048489	Elovl5	0.433799411	0.000005	00000021033
3110009E18Rik	0.403684472	0.000142	00000015568	Krt84	0.433829481	0.000191	00000039063
XR_002679.1	0.403684472	0.000013	00000026385	Lims2	0.434250676	0.000019	00000034450
Glul	0.403740439	0.004639	00000000031	Pde4dip	0.435154614	0.000001	00000020072
Cops6	0.403824403	0.000082	00000021091	Ptp4a1	0.435426163	0.001797	00000001663
NA	0.403852395	0.000007	00000017453	F11r	0.435728082	0.000017	00000027559
Hsd3b6	0.404440674	0.000012	00000042102	Hspd1	0.436272064	0.000923	00000019326
Car5a	0.404524784	0.000126	00000040147	Capn10	0.436423229	0.000044	00000032079
Rassf3	0.404805276	0.000222	00000038298	Bex4	0.436756173	0.000148	00000074264
D10Jhu81e	0.404805276	0.000706	00000031444	Bpnt1	0.437422701	0.000185	00000019762
AW049765	0.404861398	0.000193	00000051015	Dapk1	0.437756347	0.000329	00000001670
Sec23a	0.405535467	0.000017	00000022853	NA	0.437817037	0.001164	00000056973
Acaca	0.405760406	0.001184	00000028967	Slc16a7	0.438850057	0.001084	00000062410
Sigirr	0.405929192	0.000141	00000041660	Isoc1	0.439489316	0.000038	00000030244
AI317395	0.406802373	0.000116	00000060068	212943	0.439733089	0.000015	00000029273
Vpreb3	0.407394949	0.000016	00000021340	Man2a1	0.440892854	0.000025	00000070419
Gipc2	0.40801667	0.000072	00000025197	4732454E20Rik	0.441290318	0.001179	00000029260
Hmgcr	0.408809322	0.000047	00000033427	Cyp17a1	0.441535089	0.000047	00000035041
Chdh	0.409376445	0.000123	00000020593	Samd4	0.442055679	0.001362	00000038641
Kpna3	0.410626887	0.000482	00000026189	Fmo4	0.442331534	0.000172	00000003617
Ccs	0.411082539	0.000589	00000026365	Abca1	0.444236549	0.000093	00000054757
2310030G06Rik	0.411253539	0.000755	00000021211	Gramd3	0.444328935	0.000009	00000015083
BC040758	0.412138173	0.000018	00000004558	Hibch	0.444760324	0.000052	00000040213
Faah	0.412395358	0.000224	00000002985	Sec61a1	0.445655248	0.000021	00000033715
2310076L09Rik	0.412595502	0.000281	00000002847	Arntl	0.446087924	0.000451	00000021492

0.44-0.47 fold				0.47-0.48 fold			
Gene Symbol	Fold Change	P_value	Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Fold Change	P_value	Ensembl Gene ID
	KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG		KO/WT E18.5	FDR-adjusted	ENSMUSG
Gm1006	0.446366295	0.000893	00000031980	Tob1	0.470380448	0.001904	00000023176
Nudt7	0.44714046	0.000045	00000025271	Atp5j	0.470510884	0.0362	00000058952
Cbr4	0.447512535	0.000466	00000022464	Galk1	0.470739232	0.000027	00000002769
Riip	0.447512535	0.000139	00000027690	Acbd6	0.470902406	0.012927	00000024029
Fahd1	0.447543556	0.000165	00000024863	Olfrl209	0.471588355	0.00345	00000014372
Poldip2	0.447853877	0.000011	00000021539	NA	0.47204621	0.018757	00000039114
Phlda1	0.447884921	0.000727	00000023044	Wbscr1	0.472177107	0.00004	00000060459
Tegt	0.448040173	0.000047	00000022512	Cat	0.472242569	0.000263	00000025525
Ndufa4	0.448537341	0.001074	00000076441	Gm1381	0.473127197	0.001634	00000000301
Uqcrfs1	0.448661719	0.001265	00000026272	1200015N20Rik	0.473258394	0.003105	00000024391
4931406C07Rik	0.448879464	0.000116	00000027344	Igh-6	0.474144925	0.000013	00000010651
Them4	0.449128445	0.001242	00000021751	Ssbp3	0.47430928	0.0002	00000030630
Q61868_MOUSE	0.449471018	0.012911	00000059434	Ctnnb1	0.474342158	0.000034	00000042118
Ptprd	0.449657987	0.000022	00000001666	624814	0.474440805	0.000123	00000073988
NA	0.451031469	0.001685	00000037071	Txndc5	0.474572366	0.000038	00000027048
Map1lc3b	0.451187811	0.000046	00000022821	Nkiras1	0.474605262	0.000127	00000028179
Stard5	0.451907686	0.000707	00000032081	Slc20a2	0.47467106	0.000993	00000059481
Pxmp4	0.451970338	0.000544	00000020098	Slc44a3	0.474802685	0.000158	00000040134
433968	0.453005352	0.000175	00000017417	Nars2	0.475263661	0.000071	00000029369
Akp2	0.453350883	0.000094	00000024386	Adfp	0.475494316	0.000632	00000031173
Six6	0.45429458	0.000194	00000036216	Adh7	0.475527276	0.000142	00000074207
Cox7b	0.455934979	0.000094	00000033533	Selenbp2	0.475955962	0.002283	00000075551
Gtf2b	0.455966583	0.000254	00000030762	H6pd	0.475988954	0.000419	00000026368
671064	0.456061408	0.000671	00000024503	Wwc1	0.476153948	0.00007	00000074336
Hkdc1	0.456219494	0.000128	00000037798	Lpgat1	0.476285984	0.000036	00000028186
1700019D03Rik	0.45640927	0.000053	00000015112	Dnajc3	0.476418057	0.003445	00000030236
Tspan31	0.456979071	0.00003	00000000753	1700065A05Rik	0.477078971	0.000029	00000037053
Nnt	0.457295935	0.000968	00000026193	Pnpla7	0.477178187	0.000123	00000057400
Akr7a5	0.457295935	0.000071	00000026621	Sema4a	0.477211263	0.003524	00000025991
Anks4b	0.457422742	0.000087	00000029102	B230342M21Rik	0.477409771	0.000802	00000026295
Prss8	0.457771642	0.000057	00000061906	Slc33a1	0.477807035	0.010017	00000030382
GSTP2_MOUSE	0.457835107	0.000271	00000041828	Zc3h6	0.478105199	0.000024	00000024371
Ngef	0.459074436	0.001174	00000030711	BB128963	0.478270927	0.000073	00000047631
Eva1	0.459392752	0.002126	00000029656	Mgea6	0.478602554	0.001405	00000025481
NA	0.459966278	0.000377	00000042401	2810007J24Rik	0.478702087	0.00783	00000028553
3930402G23Rik	0.459998161	0.000028	00000060407	Adipor2	0.47880164	0.000053	00000039438
Slco1a1	0.460030047	0.000347	00000054545	Timm8a1	0.478901215	0.000993	00000034528
2010305C02Rik	0.460859853	0.000208	00000027871	Dhdh	0.480230853	0.001942	00000021922
Acly	0.461403227	0.001384	00000028715	Atp5g1	0.480397317	0.001101	00000032207
Cyp2d22	0.462267551	0.00043	00000027261	2010011I20Rik	0.480497224	0.000036	00000027249
Sdhb	0.462556018	0.00002	00000036892	Dhcr7	0.48053053	0.000853	00000030895
Acot4	0.462684284	0.00006	00000040564	Atp5a1	0.480597151	0.000073	00000031594
Pmvk	0.463069294	0.000089	00000027870	XR_002252.1	0.480630464	0.011318	00000060613
Pgm3	0.463294031	0.000134	00000067219	Hint2	0.480763742	0.000078	00000006522
Tmem121	0.463904582	0.000316	00000038224	Oaf	0.481263862	0.000044	00000030111
Top1mt	0.464001058	0.001259	00000061947	Pols	0.481330584	0.004255	00000021135
Bnip3	0.465482876	0.000013	00000020051	Tm9sf2	0.481464055	0.000206	00000058207
Nsun4	0.465708784	0.000009	00000020620	Idh2	0.481797897	0.000065	00000017344
Idh3b	0.466290195	0.000063	00000054630	Gpt1	0.481998312	0.000186	00000022868
Mageh1	0.467001795	0.000173	00000026874	Amy2	0.482432833	0.021306	00000027761
NA	0.467293217	0.000036	00000027801	Tmem97	0.482767345	0.005178	00000021210
Ces1	0.467358002	0.000862	00000024164	Pigy	0.48326955	0.000276	00000028356
Trap1	0.467649646	0.000022	00000027875	Ugt3a2	0.483671689	0.00106	00000023070
Rarres2	0.46771448	0.000436	00000029445	Aldh9a1	0.484174834	0.002121	00000026715
Rab4a	0.46771448	0.00247	00000039323	Gsto1	0.485586427	0.000019	00000027359
Peg3	0.468201026	0.000103	00000046687	Polg	0.485855767	0.000436	00000002588
Q6NXV5_MOUSE	0.46904557	0.000125	00000019987	Saa4	0.485923126	0.006896	00000022875
Camk2n1	0.469305736	0.001176	00000055730	0610007C21Rik	0.486158955	0.000467	00000032554
Apoa4	0.4695335	0.00008	00000021884	Accn5	0.486260059	0.0011	00000032083
Nfatc2	0.469956784	0.000184	00000002992	Lrg1	0.486496051	0.000033	00000020609
Hspa9a	0.470021938	0.000151	00000067235	Slc13a3	0.487069652	0.000095	00000037942
NA	0.470250049	0.000134	00000029376	Ssr2	0.48740738	0.000017	00000069805

0.48-0.49 fold

Gene Symbol	Fold Change		P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT E18.5	FDR-adjusted		
Nme2	0.487474953	0.000342		00000061808
Pex16	0.487779151	0.000547		00000020429
5033411D12Rik	0.488218883	0.009745		00000005681
Pctp	0.490185597	0.000066		00000025004
1810063B05Rik	0.490355512	0.000162		00000066366
P4hb	0.490389502	0.001619		00000033831
Pgcp	0.490967693	0.000219		00000028307
Als2	0.491682871	0.000054		00000025479
Rab9	0.492092011	0.000377		00000029368
Acot12	0.492774668	0.000063		00000052131
Jam4	0.493116352	0.000036		00000025934
Lass2	0.493218904	0.00057		00000028001
Ppib	0.493218904	0.00077		00000037254

0.49-0.49 fold

Gene Symbol	Fold Change		P.value	Ensembl Gene ID
	KO/WT E18.5	FDR-adjusted		
Tapbp1	0.493697758	0.000957		00000022445
XR_002559.1	0.494245591	0.000106		00000035540
Rnf13	0.495995866	0.000097		00000033671
0610012D14Rik	0.496408595	0.006654		00000021999
Prkcsb	0.496615088	0.000046		00000026542
Arf1	0.496615088	0.000027		00000071177
Sdhd	0.497166158	0.019638		00000054932
Utp14b	0.497890364	0.000514		00000000049
Nt5e	0.49816653	0.000127		00000066252
Cyp2d11	0.498650188	0.000426		00000030359
Snx10	0.498961359	0.000101		00000071178
Itpr2	0.499376557	0.000048		00000072849

Βιβλιογραφία

Albright, S. R., and Tjian, R. (2000). TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene* 242, 1-13.

Ariel, I., Miao, H. Q., Ji, X. R., Schneider, T., Roll, D., de Groot, N., Hochberg, A., and Ayesh, S. (1998). Imprinted H19 oncofetal RNA is a candidate tumour marker for hepatocellular carcinoma. *Mol. Pathol.* 51, 21-25.

Bartfai, R., Balduf, C., Hilton, T., Rathmann, Y., Hadzhiev, Y., Tora, L., Orban, L., and Muller, F. (2004). TBP2, a vertebrate-specific member of the TBP family, is required in embryonic development of zebrafish. *Curr. Biol.* 14, 593-598.

Bell, B., Scheer, E., and Tora, L. (2001). Identification of hTAF(II)80 delta links apoptotic signaling pathways to transcription factor TFIID function. *Mol. Cell* 8, 591-600.

Bell, B., and Tora, L. (1999). Regulation of gene expression by multiple forms of TFIID and other novel TAFII-containing complexes. *Exp. Cell Res.* 246, 11-19.

Birck, C., Poch, O., Romier, C., Ruff, M., Mengus, G., Lavigne, A. C., Davidson, I., and Moras, D. (1998). Human TAF(II)28 and TAF(II)18 interact through a histone fold encoded by atypical evolutionary conserved motifs also found in the SPT3 family. *Cell* 94, 239-249.

Brand, M., Leurent, C., Mallouh, V., Tora, L., and Schultz, P. (1999). Threedimensional structures of the TAFII-containing complexes TFIID and TFTC. *Science* 286, 2151-2153.

Brou, C., Chaudhary, S., Davidson, I., Lutz, Y., Wu, J., Egly, J. M., Tora, L., and Chambon, P. (1993). Distinct TFIID complexes mediate the effect of different transcriptional activators. *Embo J* 12, 489-499.

Buschmann, T., Lin, Y., Aithmitti, N., Fuchs, S. Y., Lu, H., Resnick-Silverman, L., Manfredi, J. J., Ronai, Z., and Wu, X. (2001). Stabilization and activation of p53 by the coactivator protein TAFII31. *J. Biol. Chem.* 276, 13852-13857.

Burke TW, Kadonaga JT. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev* 1997;11:3020–3031.

Butler, J. E., and Kadonaga, J. T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 16, 2583-2592.

Cereghini, S. 1996. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* 10: 267-282.

Chen, J. L., Attardi, L. D., Verrijzer, C. P., Yokomori, K., and Tjian, R. (1994). Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell* 79, 93-105.

Christova, R., and Oelgeschlager, T. (2002). Association of human TFIID-promoter complexes with silenced mitotic chromatin in vivo. *Nat. Cell Biol.* 4, 79-82.

Cirillo LA ,and Zaret KS. 1999. An early developmental transcription factor complex that is more stable on nucleosome core particles than on free DNA. *Mol Cell* 4: 961-969.

Coffinier, C., Gresh, L., Fiette, L., Tronche, F., Schutz, G., Babinet, C., Pontoglio, M., Yaniv, M., and Barra, J. 2002. Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. *Development* 129: 1829-1838.

Deato, M. D., and Tjian, R. (2007). Switching of the core transcription machinery during myogenesis. *Genes Dev.* 21, 2137-2149.

Dikstein, R., Ruppert, S., and Tjian, R. (1996). TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74. *Cell* 84, 781-790.

Dikstein, R., Zhou, S., and Tjian, R. (1996). Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII130. *Cell* 87, 137-146.

Dorris, D. R., and Struhl, K. (2000). Artificial recruitment of TFIID, but not RNA polymerase II holoenzyme, activates transcription in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4350-4358.

Duncan, S. A. 2000. Transcriptional regulation of liver development. *Dev. Dyn.* 219: 131-142.

Duncan S.A. 2003. Mechanisms controlling early development of the liver. *Mech Dev* 120: 19-33.

Gangloff, Y. G., Romier, C., Thuault, S., Werten, S., and Davidson, I. (2001). The 103 histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID. *Trends Biochem Sci* 26, 250-257.

Gangloff, Y. G., Werten, S., Romier, C., Carre, L., Poch, O., Moras, D., and Davidson, I. (2000). The human TFIID components TAF(II)135 and TAF(II)20 and the yeast SAGA components ADA1 and TAF(II)68 heterodimerize to form histonelike pairs. *Mol Cell Biol* 20, 340-351.

Freiman, R. N., Albright, S. R., Zheng, S., Sha, W. C., Hammer, R. E., and Tjian, R. (2001). Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development. *Science* 293, 2084-2087.

Hochheimer, A. and Tjian, R. 2003. Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissuespecific gene expression. *Genes & Dev.* 17: 1309–1320.

Hochheimer, A., Zhou, S., Zheng, S., Holmes, M.C., and Tjian, R. 2002. TRF2 associates with DREF and directs promotersselective gene expression in *Drosophila*. *Nature* 420: 439–445.

Huisinga, K. L., and Pugh, B. F. (2004). A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 13, 573-585.

Indra, A. K., Mohan, W. S., 2nd, Frontini, M., Scheer, E., Messaddeq, N., Metzger, D., and Tora, L. (2005). TAF10 is required for the establishment of skin barrier function in foetal, but not in adult mouse epidermis. *Dev. Biol.* 285, 28-37.

Isogai, Y., Keles, S., Prestel, M., Hochheimer, A., and Tjian, R. 2007a. Transcription of histone gene cluster by differential core-promoter factors. *Genes & Dev.*

Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P., and Tora, L. (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* 79, 107-117.

Jacobi, U. G., Akkers, R. C., Pierson, E. S., Weeks, D. L., Dagle, J. M., and Veenstra, G. J. (2007). TBP paralogs accommodate metazoan- and vertebrate-specific developmental gene regulation. *EMBO J.* 26, 3900-3909.

Kim, T. H., Barrera, L. O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M. A., Richmond, T. A., Wu, Y., Green, R. D., and Ren, B. (2005). A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436, 876-880.

Kim JL, Nikolov DB, Burley SK. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature* 1993;365:520–527

Kouskouti, A., Scheer, E., Staub, A., Tora, L., and Talianidis, I. (2004). Gene-specific modulation of TAF10 function by SET9-mediated methylation. *Mol. Cell* 14, 175-182.

Ktistaki, E., and Talianidis, I. (1997). Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* 277, 109-112.

Kyrmizi, I., Hatzis, P., Katrakili, N., Tronche, F., Gonzalez, F. J., and Talianidis, I. (2006). Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev.* 20, 2293-2305.

Lee, Y. H., Sauer, B., and Gonzalez, F. J. (1998). Laron dwarfism and non-insulindependent diabetes mellitus in the Hnf-1alpha knockout mouse. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3059-3068.

Lemon, B., and Tjian, R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* 14, 2551-2569.

Leurent, C., Sanders, S., Ruhlmann, C., Mallouh, V., Weil, P. A., Kirschner, D. B., Tora, L., and Schultz, P. (2002). Mapping histone fold TAFs within yeast TFIID. *Embo J* 21, 3424-3433.

Li, A. G., Piluso, L. G., Cai, X., Gadd, B. J., Ladurner, A. G., and Liu, X. (2007). An acetylation switch in p53 mediates holo-TFIID recruitment. *Mol. Cell* 28, 408-421.

Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.

Malik S, Roeder RG. Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci* 2000;25:277-283.

Martinez, E., Kundu, T. K., Fu, J., and Roeder, R. G. (1998). A human SPT3-TAFII31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID. *J Biol Chem* 273, 23781-23785.

Martinez, E., Palhan, V. B., Tjernberg, A., Lyman, E. S., Gamper, A. M., Kundu, T. K., Chait, B. T., and Roeder, R. G. (2001). Human STAGA complex is a chromatinacetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol Cell Biol* 21, 6782-6795.

May, M., Mengus, G., Lavigne, A. C., Chambon, P., and Davidson, I. (1996). Human TAF(II28) promotes transcriptional stimulation by activation function 2 of the retinoid X receptors. *Embo J* 15, 3093-3104.

Mengus, G., May, M., Carre, L., Chambon, P., and Davidson, I. (1997). Human TAF(II)135 potentiates transcriptional activation by the AF-2s of the retinoic acid, vitamin D3, and thyroid hormone receptors in mammalian cells. *Genes Dev* 11, 1381-1395.

Metzger, D., Scheer, E., Soldatov, A., and Tora, L. (1999). Mammalian TAF(II)30 is required for cell cycle progression and specific cellular differentiation programmes. *EMBO J.* 18, 4823-4834.

Mitsiou, D. J., and Stunnenberg, H. G. (2000). TAC, a TBP-sans-TAFs complex containing the unprocessed TFIIAalpha precursor and the TFIIAgamma subunit. *Mol Cell* 6, 527-537.

Mizzen, C. A., Yang, X. J., Kokubo, T., Brownell, J. E., Bannister, A. J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S. L., Kouzarides, T., et al. (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87, 1261-1270.

Mohan, W. S., Jr., Scheer, E., Wendling, O., Metzger, D., and Tora, L. (2003). TAF10 (TAF(II)30) is necessary for TFIID stability and early embryogenesis in mice. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4307-4318.

Muller, F., Lakatos, L., Dantonel, J., Strahle, U., and Tora, L. (2001). TBP is not universally required for zygotic RNA polymerase II transcription in zebrafish. *Curr. Biol.* 11, 282-287.

Muller, F., Demeny, M. A., and Tora, L. (2007). New problems in RNA polymerase II transcription initiation: matching the diversity of core promoters with a variety of promoter recognition factors. *J. Biol. Chem.* 282, 14685-14689.

Muscat, G. E., Burke, L. J., and Downes, M. (1998). The corepressor N-CoR and its variants RIP13a and RIP13Delta1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAFII32 and TAFII70. *Nucleic Acids Res.* 26, 2899-2907.

Nguyen, T. T., Cho, K., Stratton, S. A., and Barton, M. C. (2005). Transcription factor interactions and chromatin modifications associated with p53-mediated, developmental repression of the alpha-fetoprotein gene. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2147-2157.

Neuwald, A. F., and Landsman, D. (1997). GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends Biochem Sci* 22, 154-155.

Nikolov DB, et al. Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature* 1995;377:119–128.

O'Brien, T., and Tjian, R. (2000). Different functional domains of TAFII250 modulate expression of distinct subsets of mammalian genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2456-2461.

Ogryzko, V. V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R. L., Howard, T., Yang, X. J., Howard, B. H., Qin, J., and Nakatani, Y. (1998). Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* 94, 35-44.

Oelgeschlager, T., Chiang, C. M., and Roeder, R. G. (1996). Topology and reorganization of a human TFIID-promoter complex. *Nature* 382, 735-738.110

Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10, 2657-2683.

Persengiev, S. P., Zhu, X., Dixit, B. L., Maston, G. A., Kittler, E. L., and Green, M. R. (2003). TRF3, a TATA-box-binding protein-related factor, is vertebrate-specific and widely expressed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 14887-14891.

Pham, A. D., and Sauer, F. (2000). Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* 289,2357-2360.

Pointud, J. C., Mengus, G., Brancorsini, S., Monaco, L., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., and Davidson, I. (2003). The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation. *J. Cell Sci.* 116, 1847-1858.

Pugh, B. F. (2000). Control of gene expression through regulation of the TATA binding protein. *Gene* 255, 1-14.

Smale ST, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 2003;72:449–479.

Soutoglou, E., and Talianidis, I. (2002). Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* 295, 1901-1904.

Spear, B. T. (1999). Alpha-fetoprotein gene regulation: lessons from transgenic mice. *Semin. Cancer Biol.* 9, 109-116.

Veenstra, G. J., Weeks, D. L., and Wolffe, A. P. (2000). Distinct roles for TBP and TBP-like factor in early embryonic gene transcription in *Xenopus*. *Science* 290, 2312-2315.

Vermeulen, M., Mulder, K. W., Denissov, S., Pijnappel, W. W., van Schaik, F. M., Varier, R. A., Baltissen, M. P., Stunnenberg, H. G., Mann, M., and Timmers, H. T. (2007). Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* 131, 58-69.

Teichmann, M., Wang, Z., Martinez, E., Tjernberg, A., Zhang, D., Vollmer, F., Chait, B.T., and Roeder, R.G. 1999. Human TATA-binding protein-related factor-2 (hTRF2) stably associates with hTFIIA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:13720–13725.

Timmers, H. T., Meyers, R. E., and Sharp, P. A. (1992). Composition of transcription factor B-TFIID. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8140-8144.

Verrijzer, C. P., and Tjian, R. (1996). TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem. Sci.* 21, 338-342.

Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, X., and Tora, L. (1998). Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 393, 187-191.

Yudkovsky N, Ranish JA, Hahn S. A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* 2000;408:225–229

Zaret, K. S. 2000. Liver specification and early morphogenesis. *Mech.Dev.* 92: 83-88

Zaret, K. S. 2001. Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Curr. Opin. Gene.Dev.* 11: 568-574.

Zaret, K. S. (2002). Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 3, 499-512.

Dominant and Redundant Functions of TFIID Involved in the Regulation of Hepatic Genes

Antonis Tatarakis,¹ Thanasis Margaritis,² Celia Pilar Martinez-Jimenez,¹ Antigone Kouskouti,¹ William S. Mohan II,³ Anna Haroniti,¹ Dimitris Kafetzopoulos,² László Tora,³ and Iannis Talianidis^{1,*}

¹Biomedical Sciences Research Center Al. Fleming, 16672 Vari, Greece

²Institute of Molecular Biology and Biotechnology, FORTH, Herakleion 71110, Greece

³Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS UMR7104, 1 Rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France

*Correspondence: talianidis@fleming.gr

DOI 10.1016/j.molcel.2008.07.013

SUMMARY

To study the *in vivo* role of TFIID in the transcriptional regulation of hepatic genes, we generated mice with liver-specific disruption of the *TAF10* gene. Inactivation of TAF10 in hepatocytes resulted in the dissociation of TFIID into individual components. This correlated with the downregulation of most hepatocyte-specific genes during embryonic life and a defect in liver organogenesis. Unexpectedly, however, the transcription of less than 5% of active genes was affected by TAF10 inactivation and TFIID disassembly in adult liver. The extent of changes in transcription of the affected genes was dependent on the timing of their activation during liver development, relative to that of TAF10 inactivation. Furthermore, TFIID dissociation from promoters leads to the re-expression of several postnatally silenced hepatic genes. Promoter occupancy analyses, combined with expression profiling, demonstrate that TFIID is required for the initial activation or postnatal repression of genes, while it is dispensable for maintaining ongoing transcription.

INTRODUCTION

Accurate and efficient transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase II requires the combined activities of several protein complexes assembled at promoter regions. These include sequence-specific DNA-binding proteins; general transcription factors TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, and TFIIH; the Mediator complex; and different coactivators (Orphanides et al., 1996; Lemon and Tjian, 2000). The TFIID complex composed of the TATA-binding protein (TBP) and 14 TBP-associated factors (TAFs) is considered a central component of the transcription apparatus, owing to its multiple molecular functions. First of all, individual TAFs can recognize core promoter elements, such as Inr and DPE, which, in conjunction with TBP binding to TATA element, nucleate the assembly of other general transcription factors into a functional preinitiation complex (PIC) (Butler and Kadonaga, 2002; Pugh, 2000). TAFs also provide interaction surfaces targeted by the activation domains of several transcription fac-

tors (Verrijzer and Tjian, 1996). In addition, the TAF1 component of TFIID possesses enzymatic activities, including histone acetyltransferase, kinase, and ubiquitin ligase, which contribute to the activation of a specific subset of genes (Dikstein et al., 1996; O'Brien and Tjian, 2000; Pham and Sauer, 2000). Recent studies have also demonstrated a direct role of TFIID in targeting acetylated or lysine 4 trimethylated histone 3, which provides a molecular link between certain nucleosome modifications and active transcription (Vermeulen et al., 2007). While the above studies establish a pivotal role of TFIID in integrating diverse molecular signals for the formation of functional PIC, the general requirement of this complex for the transcription of all genes has been challenged by several findings. For example, the results of a recent genome-wide study in IMR90 fibroblasts showed that, although there is a strong correlation between TAF1 occupancy and the transcriptional activity of the majority of Pol II transcribed genes, TAF1 is not recruited to a considerable number of active promoters (Kim et al., 2005). The lack of detection of TAF1 occupancy in this second group of genes could be due to weak signals that fall below the sensitivity of the chromatin immunoprecipitation (ChIP) on chip method or due to the involvement of either TAF1-less TFIID-like complexes or other factors that can replace TFIID function. The latter two scenarios are supported by several recent findings. The isolation of the TAF1 and TBP-free TAF-containing complex TF1C provided a first demonstration for the existence of multiple functional TFIID-like complexes (Wieczorek et al., 1998). Subsequently, the identification of tissue-specific TAF-containing TFIID complexes (Freiman et al., 2001; Pointud et al., 2003) or the specialized forms of TFIID in apoptotic cells (Bell et al., 2001) highlighted a remarkable structural and functional diversity of the TFIID complex and its active role in mediating tissue and signal-specific gene expression patterns. An additional layer of complexity comes from the discovery and functional characterization of TBP-related factors that can replace TFIID function. In vertebrates, two TBP homologs, TBP2/TRF3 and TLF/TRF2, have been described that are able to support Pol II-mediated transcription. A crucial function of TBP homologs in zygotic transcription and early embryonic development has been demonstrated by genetic studies in several organisms (Veenstra et al., 2000; Muller et al., 2001; Persengiev et al., 2003; Bartfai et al., 2004; Jacobi et al., 2007). The diversified function of the different TFIID-like complexes establishes the view that general transcription factors not only are involved in executing transcriptional activation

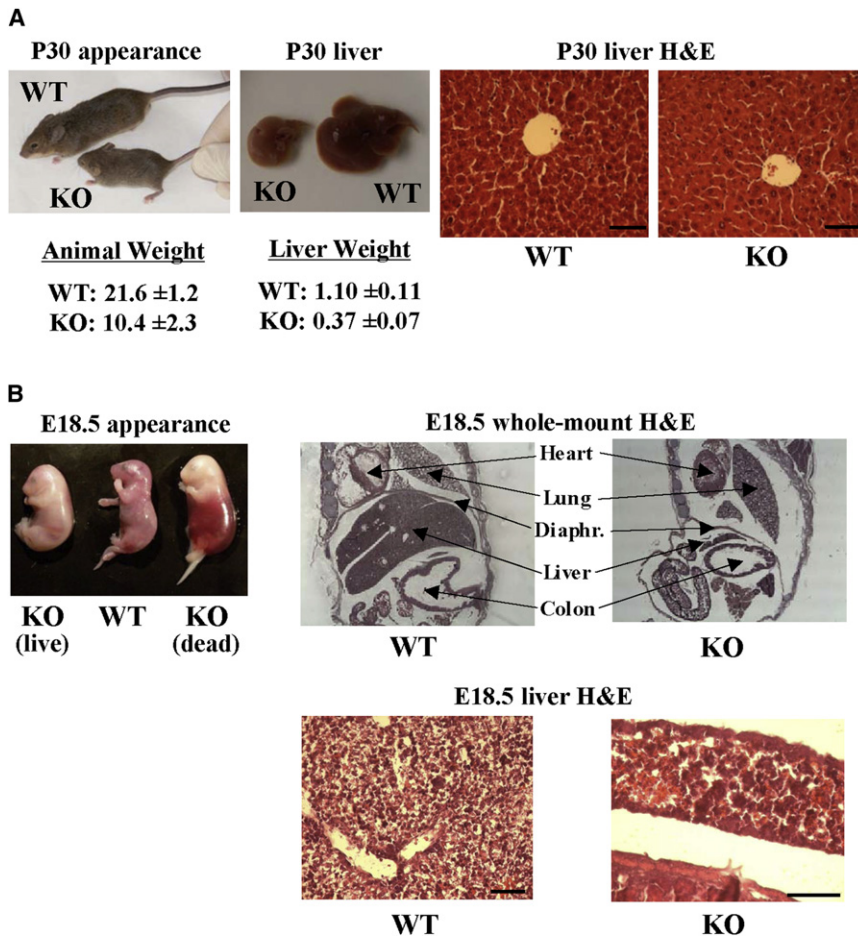


Figure 1. Phenotypes of Hepatocyte-Specific TAF10 KO Mice

(A) Representative pictures of individual animals and their livers and hematoxylin and eosin (H&E) staining of liver sections from postnatal day 30 (P30) wild-type (WT) and *TAF10^{lox/lox}-Alb-Cre* (KO) mice. (B) Representative pictures of embryos at 18.5 days postcoitum (E18.5) and hematoxylin and eosin (H&E) staining of whole-mount embryos or liver sections from WT and *TAF10^{lox/lox}-Alfp-Cre* mice. Living embryos were distinguished by heartbeat. Scale bars, 100 μ m.

that TFIID actively participates in the regulation of the temporal pattern of gene expression during liver development.

RESULTS

Conditional Inactivation of TAF10 in Embryonic and Adult Liver

We crossed *TAF10^{loxP}* mice (Mohan et al., 2003), in which exon 2 of the *TAF10* gene is flanked by loxP sites, with *Alfp-Cre* or *Alb-Cre* transgenic mice to obtain liver-specific TAF10-deficient mice in embryonic or adult stages, respectively. PCR analysis of genomic DNA prepared from hepatocytes revealed complete exon 2 excision at embryonic (E) day E15.5 in the livers of *TAF10^{lox/lox}/Alfp-Cre* mice and between postnatal (P) days P15 and P22 in the

livers of *TAF10^{lox/lox}/Alb-Cre* mice (Figure S1 available online). Both animal models exhibited interesting phenotypes. Adult stage-specific TAF10KO mice displayed attenuated growth from the second week after birth, resulting in dwarfism with an about 50% reduced body weight at day P30 (Figure 1A). Parallel reduction in the size of different organs, including liver, was observed. Hematoxylin and eosin (H&E) staining of liver sections revealed no gross morphological alterations in TAF10KO mice, although some of the hepatocytes seemed somewhat enlarged (Figure 1A). Apart from the dwarf phenotype, most of the mice looked normal until day P30. Starting from days P34–P35, massive death occurred, and no animal survived day P38. Growth retardation and the reduced expression of several key metabolic genes (see below), which should result in progressive liver dysfunction, are likely to represent the underlying causes of the observed mortality. Therefore, we performed all of our experiments in adult mice at day P30, a time point when hepatocytes are still normal and devoid of TAF10 protein for at least 8–15 days.

Inactivation of TAF10 in day E15.5 resulted in a mixed phenotype. None of the embryos reached birth. At day E18.5, about half of the embryos were dead, with massive blood infiltration throughout the body. The other embryos had an anemic, pale appearance but were alive (Figure 1B). Macroscopic and histological analysis of the living embryos revealed that liver size

determined by gene-specific activators but also are themselves gene-specific factors contributing to the generation of cell and pathway-specific expression patterns (Albright and Tjian, 2000; Bell and Tora, 1999; Muller et al., 2007). Perhaps the most striking evidence for this is the recent demonstration of a widespread loss of TFIID subunits during the terminal differentiation of myoblasts to myotubes and the replacement of TFIID by TAF3-containing TBP2/TRF3 complex on the promoters of muscle-specific genes (Deato and Tjian, 2007).

In order to better understand the function of the core transcription machinery in the regulation of tissue-specific genes during development, we studied animal models in which TAF10, a key component of TFIID, was conditionally inactivated in embryonic or adult liver. We show that hepatocyte-specific inactivation of TAF10 leads to the dissociation of TFIID into individual components and to the downregulation of most hepatocyte-specific genes during embryonic life, with parallel defects in liver organogenesis. In contrast, transcription of the majority of the genes in the adult liver was not affected by TAF10 inactivation and TFIID disassembly. We demonstrate that, after the initial activation of genes, TFIID is dispensable for ongoing transcription and that, in addition to its pivotal role in the initial activation of hepatic genes, TFIID is also required for the developmental stage-specific repression of previously active genes. These data suggest

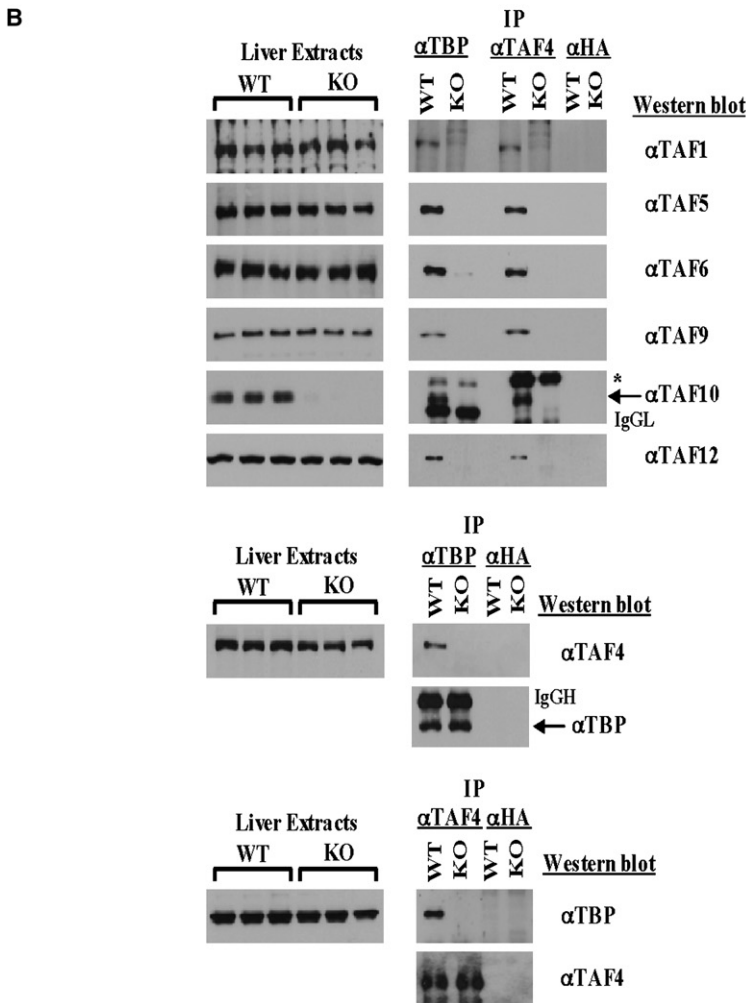
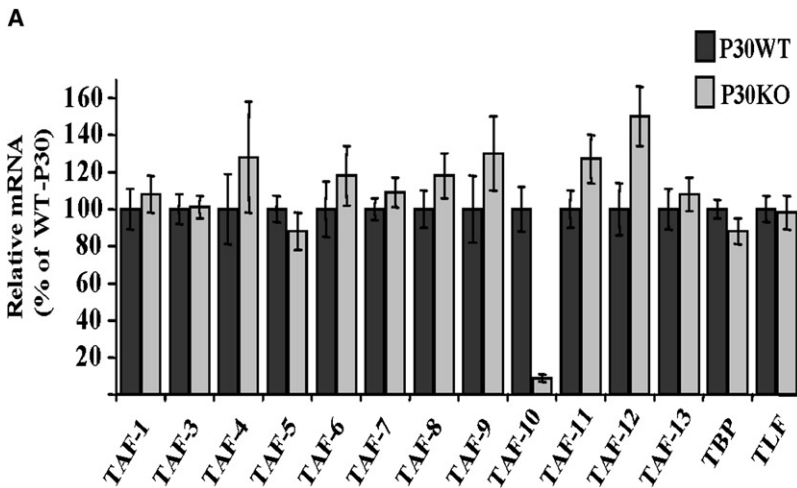


Figure 2. TAF10 Inactivation Does Not Affect the Expression of TFIID Subunits but Leads to the Disassembly of TFIID Complex

(A) Real-time PCR analysis was performed with total liver RNAs prepared from day P30 WT (dark bars) and *TAF10^{lox/lox}-Alb-Cre* (gray bars) male mice. The values obtained were normalized to GAPDH and are expressed as percentage of WT P30 data. Bars represent mean values and standard errors from RNA samples of ten individual mice. (B) Nuclear extracts from the livers of three individual day P30 WT and *TAF10^{lox/lox}-Alb-Cre* mice were analyzed in western blot assays (left panel) or mixed and immunoprecipitated with either α TBP, α TAF4, or α HA (control) antibodies and subjected to western blot analysis (right panel) with the indicated antibodies.

not resembling to hepatocytes (Figure 1B), suggesting that, in the absence of TAF10, hepatocyte differentiation is blocked and other cell types accumulate in the liver. This notion was further confirmed by gene expression profiling (see below).

The TFIID Complex Is Disassembled in TAF10 KO Mice

Earlier work on F9 carcinoma cells indicated that TAF10 is required for the stability of TFIID (Mohan et al., 2003). To assess the presence or absence of TFIID complex formation in TAF10KO livers, we first tested the expression of its different subunits by real-time PCR and western blot analysis. As shown in Figure 2, no significant changes were detectable in mRNA or protein levels of any of the tested subunits in TAF10-deficient livers. Next, we immunoprecipitated TFIID complexes using antibodies against TBP or TAF4. We could detect all of the tested TAFs in wild-type liver-derived extracts immunoprecipitated either by α TBP or α TAF4, but not in extracts prepared from TAF10-deficient livers (Figure 2B). Similar results were obtained when the same experiment was performed at low stringency. These results demonstrate that TAF10 inactivation does not affect the expression of TFIID subunits but leads to the disassembly of TFIID. Thus, the liver-specific TAF10KO mouse is considered a good model for studying TFIID function, as it is devoid of assembled TFIID complexes.

Global mRNA Profiling Identifies Four Classes of Genes with Different Requirements of TFIID for Transcription

In order to obtain a global view of the genes affected by TAF10 inactivation and TFIID dis-

assembly in hepatocytes, we performed transcript profiling using pools of RNAs prepared from E18.5 and P30 livers of wild-type and TAF10KO mice. Scatter plot analysis of the data shows

was dramatically reduced, while the other organs seemed intact (Figure 1B). Cells stained with H&E in sections from the strip of liver tissue were mostly mononuclear cells or red blood cells

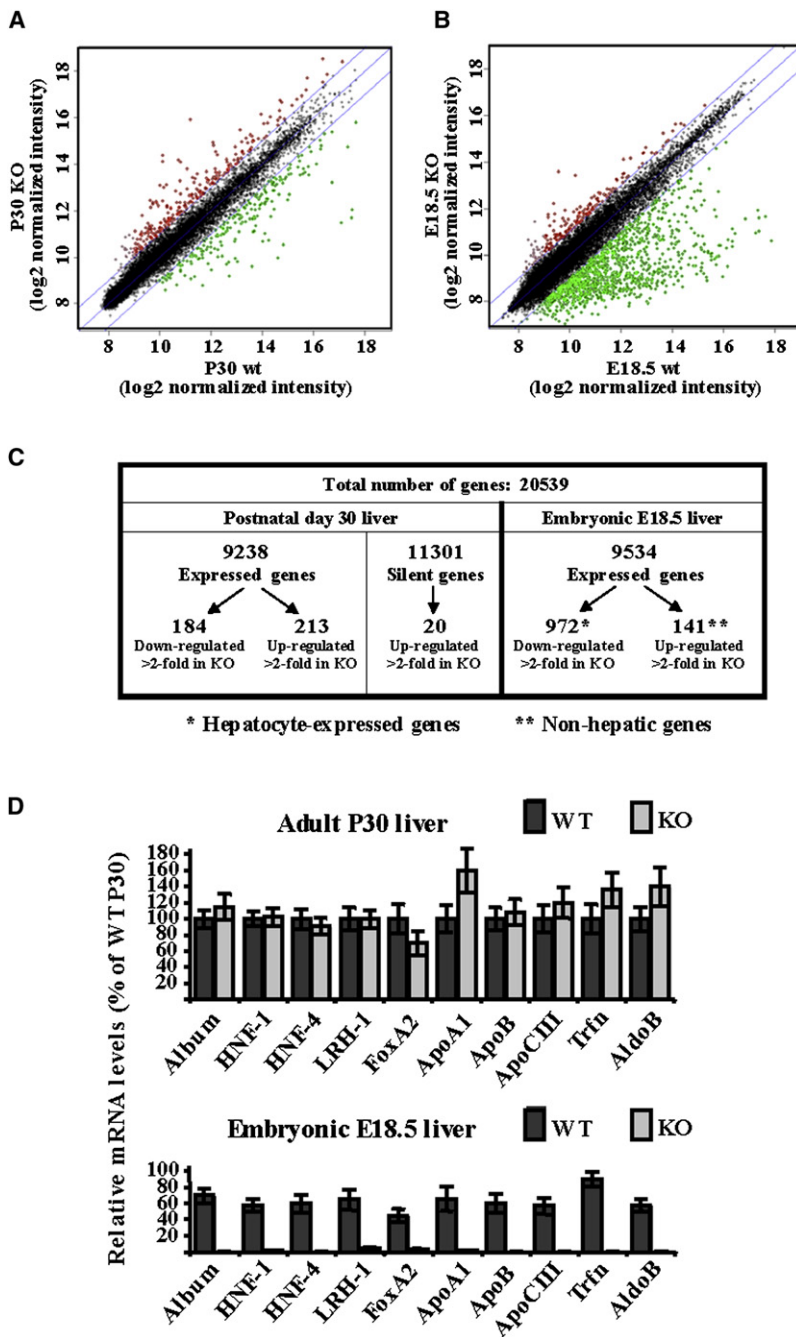


Figure 3. Global Gene Expression Profiling in Liver-Specific TAF10 KO Mice

(A) Scatter plots of normalized microarray hybridization signals obtained with liver RNA samples from day P30 WT versus *TAF10^{lox/lox}-Alb-Cre* mice.

(B) Scatter plots of normalized microarray hybridization signals obtained with liver RNA samples from day E18.5 WT versus *TAF10^{lox/lox}-Alfp-Cre* mice.

(C) Comparison of the number of genes affected by TAF10 inactivation in day P30 and day E18.5 livers. Transcripts with normalized intensities above 9 (log₂) were considered “expressed genes,” while those with normalized intensities below 9 (log₂) were considered “silent genes.” The number of genes changed >2-fold is shown for each group.

(D) Real-time PCR analysis for the indicated transcripts of hepatocyte-specific genes (category 1) was performed with total liver RNAs prepared from day P30 WT (dark bars) and *TAF10^{lox/lox}-Alb-Cre* (gray bars) male mice (upper panel) or day E18.5 WT (dark bars) and *TAF10^{lox/lox}-Alfp-Cre* (gray bars) embryos (lower panel). The values obtained were normalized to GAPDH and are expressed as percentage of wild-type P30 data. Bars represent mean values and standard errors from RNA samples of ten individual male adult mice or ten individual embryos.

major differences between embryonic and adult mouse livers with respect to the number of genes affected (Figures 3A and 3B). Using a cutoff value of 9 for relative spot intensity, we calculated the number of expressed genes and found that inactivation of TAF10 affected less than 5% of the expressed genes in adult livers and about 11% of those expressed in fetal livers (Figure 3C and Tables S1 and S2). Inspection of the list of annotated genes affected in embryonic TAF10KO liver strips suggested that the downregulated 972 transcripts correspond to genes specifically expressed in hepatocytes, while the majority of the 142 upregulated transcripts are characteristic to genes expressed in hemo-

poetic or other epithelial cell types, normally present in embryonic liver (Table S2). Apart from literature search, we also performed cross-comparison of gene expression levels in wild-type E18.5 and wild-type P30 livers, where hepatocytes correspond to about 40%–60% and 70%–80% of the total cell population, respectively (Kyrnizi et al., 2006). We found that the majority (91%) of the downregulated genes in E18.5 TAF10KO livers had equal or increased expression in wild-type adult versus wild-type embryonic liver, while an opposite relationship was evident for most of the upregulated genes (data not shown). We also confirmed the microarray data by analyzing the expression of ten widely used hepatocyte-specific marker genes with real-time PCR. As shown in Figure 3D, embryonic inactivation of TAF10 resulted in a dramatic decrease of all mRNA species examined. Furthermore, in immunostaining experiments, we observed a total absence of Albumin, HNF-4, and FoxA2 markers in cells populating

E18.5 TAF10KO livers (Figure S3B). Interestingly, expression of most of the genes that were found downregulated in E18.5 TAF10KO livers, including the tested hepatic markers (Figures 3D and S3A), were not significantly affected in adult stage-specific TAF10KO mice. The widespread loss of expression of hepatocyte-specific genes, together with the morphological data of Figure 1, demonstrates that TAF10 inactivation in fetal life leads to major defects in liver organogenesis.

In contrast to fetal liver, a surprisingly small number of genes were affected in adult stage-specific TAF10KO livers. According to their expression ratio in wild-type E18.5 and wild-type P30

livers, we set up four gene categories. Genes in the first category are highly expressed in fetal liver and continue to be active postnatally. TAF10 inactivation did not significantly affect the transcription of these genes in adult (P30) mice. Within this category are the *Albumin*, *HNF-1*, *HNF-4*, *LRH-1*, *FoxA2*, *ApoA1*, *ApoB*, *ApoCIII*, *Transferrin*, and *Aldolase B* genes, whose unchanged full-length transcript levels were verified by real-time PCR analysis (Figures 3D, 4A, and S2). Moreover, no significant alterations in the mRNA levels of these genes could be detected in animals surviving day P35 (Figure 4A). Importantly, in vitro nuclear run-on assays and RNA pol II occupancy analysis at the coding regions revealed that these genes are actively transcribed in TAF10KO hepatocytes at a rate similar to that observed in wild-type cells (Figures S4 and S5).

Genes in the second and third categories are not expressed in E18.5 livers but are induced postnatally. The expression of these genes was negatively regulated by TAF10 inactivation in adult mice (Figures 4B and 4C). In the above two categories, we observed a different extent of downregulation in TAF10 KO livers, which directly correlated with the time of the initial activation of the genes compared to the timing of TAF10 inactivation. Initial activation of “category 2” genes, such as *Mup3*, *Cyp7B1*, *Slco1a1*, *CAR3*, and *Cyp2f2*, occurs between days P14 and P21, which coincides with the time of complete loss of TAF10 from the hepatocytes of TAF10KO mice (Figure 4B). These genes were not transcribed in P30 livers of TAF10KO mice. *Igf1*, *GhR*, *Otc*, *Fasn*, and *Cyp1A2* belong to category 3 genes, which are induced in early postnatal life, and their expression levels reach 35%–50% of the maximum at the time of TAF10 inactivation (Figure 4C). In P30 TAF10KO livers, we could detect moderate decreases (to 30%–50% of wild-type) of their corresponding mRNA levels (Figure 4C). These results demonstrate that TAF10 and TFIID are required for the initial (category 2) or further (category 3) activation of genes, the latter of which likely depends on new initiation events. On the other hand, TFIID is dispensable for the transcription of already active genes (category 1), which comprise the largest group in the adult liver.

Our results concerning the genes belonging to the fourth category are of particular interest. In wild-type animals, *Afp*, *Akr1b7*, *Igfbp1*, *H19*, and *Igf2* are highly expressed in the fetal liver and silenced postnatally to barely detectable levels at days P14–P21 (Figure 4D). Inactivation of TAF10 leads to re-expression of these genes in adult hepatocytes (Figure 4D), suggesting that TFIID may play a repressive role in their postnatal regulation.

Gene-Specific Differential Effects of TFIID Disassembly on the Association of Pol II and General Transcription Factors with Promoters

In order to gain mechanistic insights into how TAF10 inactivation-mediated TFIID disassembly leads to differential transcriptional responses, we performed ChIP assays. ChIP data obtained in category 1 genes, such as *Albumin*, *HNF-4*, *ApoCIII*, and *FoxA2*, whose expression was unaltered by TAF10 inactivation, showed that all of the tested TAFs, as well as TBP, TFIIB, Mediator, and Pol II, occupied these promoters in wild-type E18.5 and P30 livers (Figure 5A). An exception to the above rule was the lack of recruitment of TAF11/TAF13 pair on *FoxA2* promoter, which points to the involvement of a TFIID complex

with altered subunit composition. In P30 TAF10KO livers, RNA pol II, Med1, Med6, and TFIIB occupancy was not significantly affected, while ChIP signals for all of the TFIID components were reduced to background levels (Figure 5A). The recruitment of other components of the PIC, such as DNA-binding factors (*HNF-4 α* , *C/EBP α* , *FoxA2*) or CBP/p300 to *FoxA2* promoter and the histone 3 acetylation or lysine 4 trimethylation levels, were not significantly changed in TAF10KO livers (Figure 5B). Due to limitations of the ChIP technique, one cannot entirely exclude the possibility of transient formation of unstable complexes or the involvement of so far unidentified complexes containing other components of TFIID, which were not included in our ChIP studies (TAF2, TAF3, TAF7, or TAF8). However, the differences observed with ten different TFIID subunits provide a strong indication that the active state of the promoters could be sustained without the stable association of the canonical TFIID on already active genes. The possibility of a switch from TFIID to other known complexes that can replace its function was excluded by the following observations. First, we were unable to detect any TBP2/TRF3 expression in wild-type or TAF10KO fetal and adult livers by real-time PCR (Figure S7) or western blot analysis, even at low stringency conditions (data not shown). Second, the occupancy of TLF/TRF2, which is expressed in hepatocytes (Figure 2), was investigated by ChIP but gave negative results on the promoters of all gene categories in all conditions (Figure S6).

On the promoters of *Mup3*, *Cyp7B1*, *Slco1a1*, and *Car3* genes, TFIID, including TBP and all tested TAFs, was detected only in wild-type P30 livers, except for *Mup3* promoter, where TAF11/TAF13 pair was absent (Figure 6A). Pol II, Med1, Med6, and TFIIB occupancy was also evident, consistent with the active transcription of the genes at this stage. None of the TFIID subunits, TFIIB, Mediator components, or RNA pol II occupied the above promoters in wild-type E18.5 embryonic livers and TAF10KO P30 adult livers. Recruitment of *C/EBP α* onto the *Mup3* promoter was detectable in embryonic stages when the gene is inactive, and its association with the promoter was not affected in P30 TAF10KO livers. *HNF-4 α* , CBP/p300 occupancy, H3 acetylation, or H3K4 trimethylation could only be detected in wild-type P30 livers (Figure 6B). Together with the data showing that, in fetal livers, these genes are yet to be activated, while in TAF10KO P30 livers, they fail to be activated (Figure 4B), the above results suggest that TFIID is required for the initial assembly of the Pol II machinery on these promoters.

We observed an interesting promoter occupancy pattern on category 4 genes, which are silenced during early postnatal periods of liver development. In wild-type fetal livers, TAFs, TBP, TFIIB, Mediator, and Pol II were readily detected on *Afp*, *Akr1b7*, and *Igfbp1* promoters, which is in agreement with the high-level expression of these genes at the embryonic stages (Figure 7A). As expected, RNA pol II and Mediator subunits were absent from the promoters in wild-type P30 livers, where these genes are not transcribed. Interestingly, however, TBP and TAFs and, in the case of *Igfbp1* promoter, TFIIB as well, remained associated with the regulatory regions at this stage (Figure 7A). In P30 TAF10KO livers, Pol II, Mediator, and TFIIB ChIP signals reappeared in all promoters, which correlates with the reactivation of these genes. TBP remained associated with

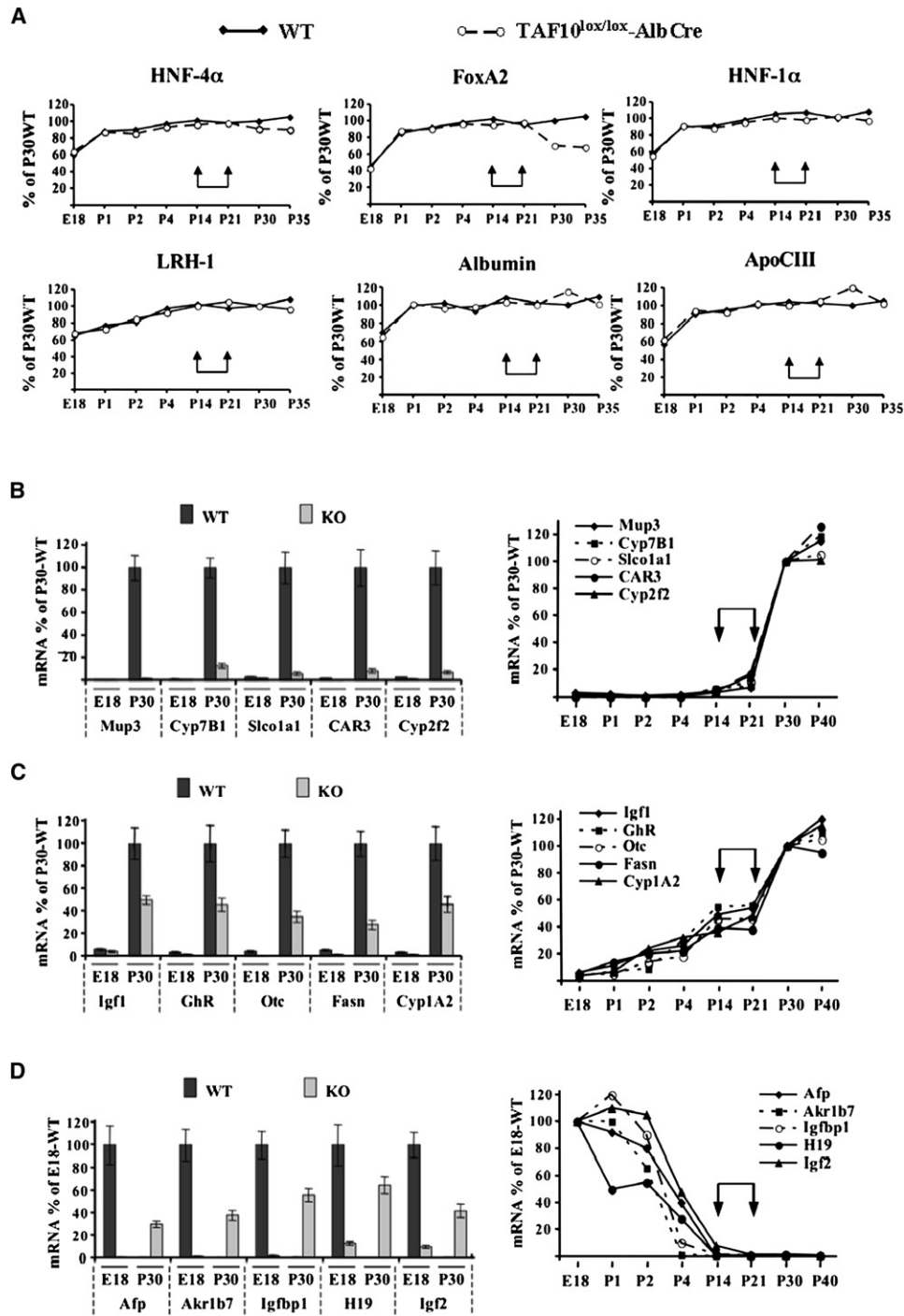


Figure 4. Effects of TAF10 Inactivation on the Transcription of Hepatic Genes

(A) Time course analysis of category 1 gene transcripts during postnatal liver development in WT (solid line) and TAF10^{lox/lox}-Alb-Cre mice (dashed line). Arrows indicate the time of complete loss of TAF10 from individual animals (P15 to P22).

(B) (Left) Real-time PCR analysis of Mup3, Cyp7B1, Slco1a1, CAR3, and Cyp2f2 transcripts (category 2) was performed with total liver RNAs prepared from day P30 WT (dark bars) and TAF10^{lox/lox}-Alb-Cre (gray bars) male mice or day E18.5 WT (dark bars) and TAF10^{lox/lox}-Alb-Cre (gray bars) embryos. The values obtained were normalized to GAPDH and are expressed as percentage of WT P30 data. Bars represent mean values and standard errors from RNA samples of ten individual male adult mice or ten individual embryos. (Right) Total liver RNAs from five to ten animals were prepared and pooled from WT mice at day E18.5 and the indicated days after birth (P). Real-time PCR values are expressed as percentages of the data obtained with day P30 samples. Arrows indicate the time of complete loss of TAF10 from individual animals (P15 to P22).

the promoters, while all TAFs were absent in *Afp* and *Igfbp1* promoters. In the case of *Akr1b7* promoter, TAF9, TAF11, TAF12, and TAF13 could still be detected in P30 TAF10KO livers, pointing to the retention of a partial or aberrant TFIID complex (Figure 7A). These data suggest that certain TAFs within the TFIID complex participate in the mechanism of postnatal silencing of the category 4 genes. More detailed analysis of transcription factors occupying the *Afp* promoter revealed a TFIID-dependent exchange of activator and repressor complexes. In agreement with previous reports (Nguyen et al., 2005), we found that the SBE/p53RE located at the -850 nt region of the *Afp* gene is occupied by FoxA2 activator in embryonic liver, which is replaced by p53 and Sin3a repressor proteins in postnatal stages (Figure 7B). Changes in CBP/p300 occupancy, H3 acetylation, and H3K4 trimethylation levels correlated with the transition from active to repressed state of the gene (Figure 7B). We could not detect any H3K9 dimethylation signal in wild-type P30 livers, indicating that, at least at this developmental period, heterochromatinization of the *Afp* gene does not take place. Importantly, we observed a dissociation of p53/Sin3a complex and a reassociation of FoxA2/CBP proteins with the upstream region in P30 TAF10KO hepatocytes, which coincided with the reappearance of active histone modifications (Figure 7B). These results provide a mechanistic explanation for the reactivation of the *Afp* gene in TAF10KO mice and demonstrate an active role of core promoter-bound TFIID in the selective association of regulators with upstream sequences.

DISCUSSION

TFIID is a key constituent of the transcription apparatus in the majority of active genes (Kim et al., 2005; Huisinga and Pugh, 2004). The main findings of this study indicate that TFIID function is restricted to the initial phase of PIC assembly, while it is dispensable at subsequent stages, when stable PIC has already been formed on the promoters of transcriptionally active genes. In addition, our study reveals an additional function of TFIID by demonstrating its importance in postnatal silencing of a number of hepatic genes.

Liver-Specific TAF10 KO Mice: A Model for Studying TFIID Function

TAF10 is one of the 14 TAFs within the TFIID complex. In TAF10 null F9 carcinoma cells, TFIID is disintegrated (Mohan et al., 2003), and the cells are blocked in G1 phase of the cell cycle and undergo apoptosis due to the deregulated expression of several cell-cycle regulators (Metzger et al., 1999). In agreement with its effect on genes regulating cell-cycle progression, *TAF10*^{-/-} mice display an early embryonic lethal phenotype at the blastocyst stage due to the death of pluripotent cells in the inner cell mass (Mohan et al., 2003). On the other hand, studies on the above models provided some indication for differential sensitivity to TAF10 inactivation between proliferating and differentiated cells: TAF10 null F9 carcinoma cells differentiated by retinoic acid treatment or trophoblast cells in *TAF10*^{-/-}

blastocysts were viable (Metzger et al., 1999; Mohan et al., 2003). More direct evidence for differential TAF10 sensitivity came from studies on skin-specific conditional TAF10 knockout mice. Ablation of TAF10 in fetal keratinocytes induced serious defects in the granular and cornified cell layers, which impaired skin barrier function (Indra et al., 2005). In contrast, no detectable phenotype was observed when TAF10 inactivation was induced in adult differentiated keratinocytes. The inherent technical difficulties of performing biochemical analysis with skin tissue, which contains many different cell types, and the early lethality of the standard TAF10 knockout mice precluded in-depth studies on TAF10 function.

In our first animal model, we inactivated TAF10 in embryonic liver (*TAF10*^{lox/lox}-*Alfp*-*Cre* mice) at a developmental stage when proliferating hepatoblasts differentiate into biliary epithelium and hepatocyte lineage (Zaret, 2002). Liver-specific TAF10 null embryos displayed a phenotype with widespread loss of expression of hepatocyte-specific genes and defects in hepatocyte differentiation and proliferation, culminating in the failure of liver organogenesis. Because TAF10 is an integral component of TFIID complex, inactivation of hepatocyte-specific genes in TAF10 KO embryonic hepatocytes is in agreement with the well-known transcription-activating function of TFIID. However, one cannot exclude the possibility that TAF10 inactivation may have affected only a small subset of genes required for proper hepatocyte proliferation or differentiation, and, thus, the observed reduction of hepatic transcripts could be a consequence of the associated loss of hepatocytes from the liver tissue.

In order to circumvent the above problems, we inactivated TAF10 in adult liver dominated by a single cell type (hepatocytes) in G0 nonproliferating phase. Contrary to embryos, when TAF10 is inactivated in adult stage (days P15–P22), liver architecture and hepatocyte morphology remained normal for a considerable length of time, although the animals displayed a dwarf phenotype. The observed dwarfism is attributed to the significant downregulation of growth hormone receptor (*GhR*) and insulin-like growth factor 1 (*Igf1*) genes since similar changes of their expression in other animal models have been directly linked to attenuated growth phenotype (Lee et al., 1998).

Importantly, our biochemical assays showed that inactivation of TAF10 at the adult stage results in a complete disassembly of TFIID complex into individual subunits. The lack of occupancy by other TFIID subunits on several individual promoters suggests that virtually no residual canonical TFIID complex exists in the cells, which could have been missed by our biochemical detection approach. These results also rule out the presence of known TFIID-like TAF-containing complexes (e.g., TF1TC) in TAF10-deficient hepatocytes. Taken together, *TAF10*^{lox/lox}-*Alb*-*Cre* mouse provides an animal model with morphologically normal hepatocytes, which lack assembled TFIID-type complexes.

TFIID Is Not Required for the Maintenance of Ongoing Transcription of Hepatic Genes

One of the most surprising findings of this study is the very small number of genes whose transcript levels were affected in the

(C) Real-time PCR analysis as in (A) for *Igf1*, *GhR*, *Otc*, *Fasn*, and *Cyp1A2* transcripts (category 3).

(D) Real-time PCR analysis as in (A) for *Afp*, *Akr1b7*, *Igfbp1*, *H19*, and *Igf2* transcripts (category 4). Here, values are expressed as percentage of E18 WT data.

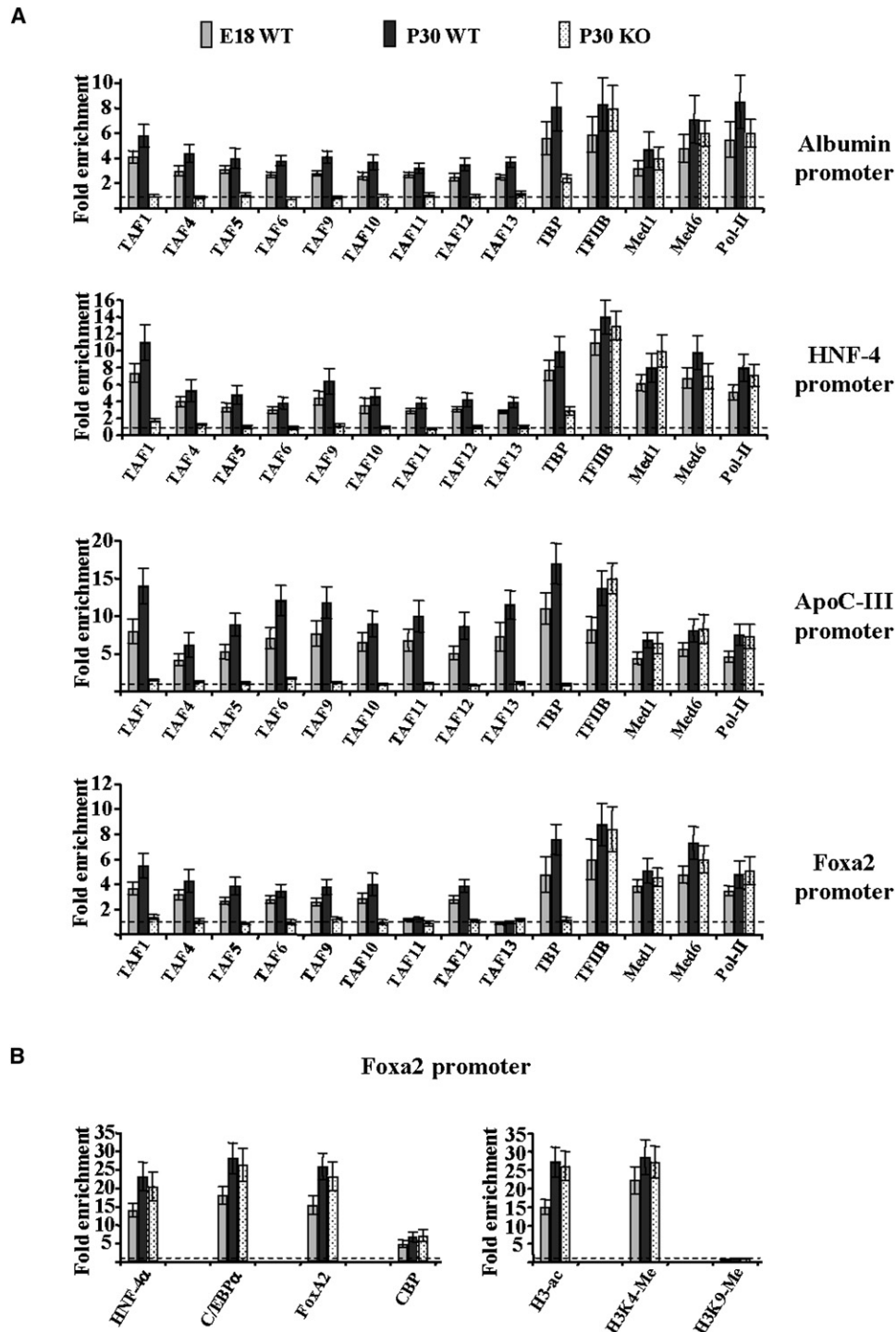


Figure 5. Transcription Factor Occupancy in the Promoter Regions of Category 1 Genes

(A and B) Chromatin immunoprecipitation assays with antibodies against TAFs, TBP, TFIIIB, Med1, Med6, and RNA pol II or HNF-4 α , C/EBP α , FoxA2, CBP, acetylated H3 tails (H3ac), trimethylated lysine 4 H3 tails (H3K4-Me), and dimethylated lysine 9 H3 tails (H3K9-Me) were performed in crosslinked chromatin prepared from the livers of WT embryos at day E18.5 (gray bars), WT adult animals at day P30 (dark bars), and *TAF10^{lox/lox}-Alb-Cre* mice at day P30 (dotted bars). The data from qPCR reactions with primers amplifying the promoter regions of the indicated genes were normalized to input and expressed as fold enrichment over those obtained with control antibody (α HA), which were set at 1 (dashed horizontal line). Scale bars show mean values and standard errors from three independent experiments.

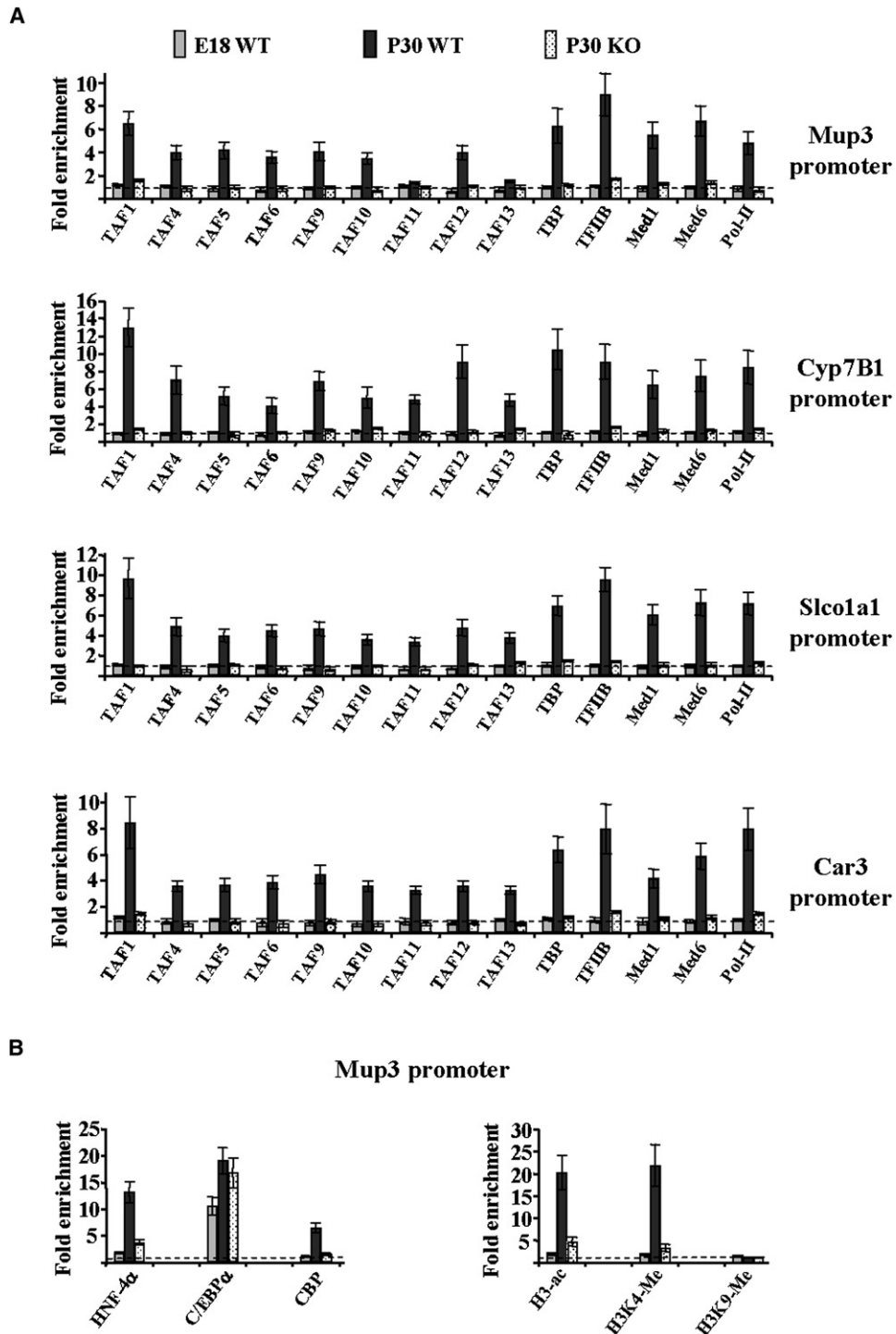
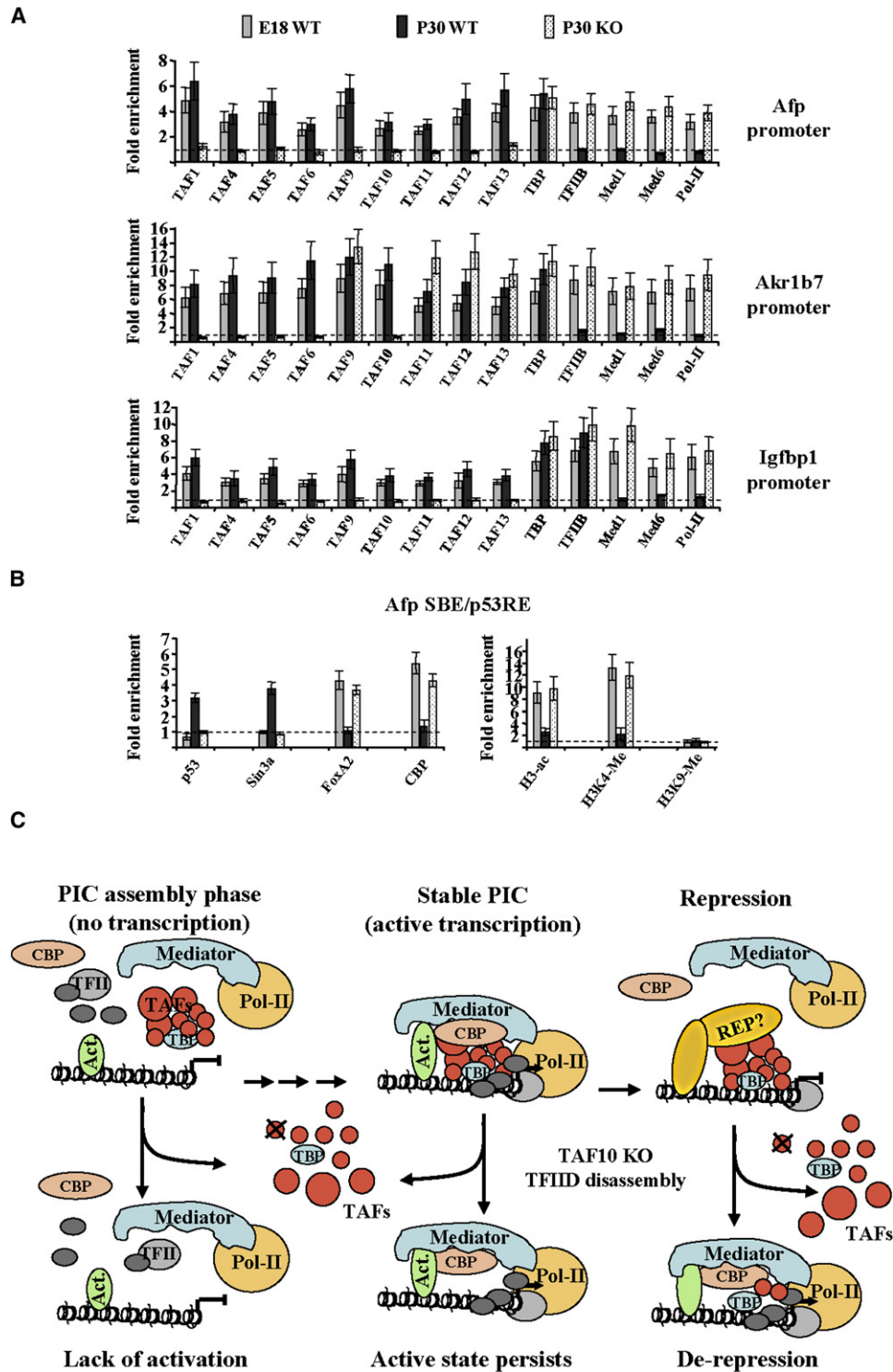


Figure 6. Transcription Factor Occupancy in the Promoter Regions of Category 2 Genes

(A and B) Chromatin immunoprecipitation assays analyzing the Mup3, Cyp7B1, Slco1a1, and Car3 promoters. The data are presented as in the legend of Figure 5.

livers of *TAF10^{lox/lox}-Alb-Cre* mice. One plausible explanation for this observation is that TFIID function could be replaced in the majority of the promoters by TBP-related factors, such as TBP2/TRF3 or TLF/TRF2, and associated proteins. Such switch-

ing of core promoter complexes from TFIID to TRF3/TAF3 complex on myogenic genes during skeletal muscle differentiation has been described recently (Deato and Tjian, 2007). A similar type of exchange between TFIID and TLF/TRF2, which is able



to drive transcription of specific genes, could also be considered. Both of the above possibilities are excluded by our findings, which showed that TBP2/TRF3 is not expressed in the liver and that TLF/TRF2 was not recruited to the promoters of studied genes.

A clue for the observed differential effects arose when we investigated the timing of the activation of genes during development, relative to the timing of TAF10 inactivation. The vast majority of hepatocyte-expressed genes are highly active long before the third postnatal week, reaching high expression levels in late embryonic stages. The genes whose transcript levels did not significantly change in adult TAF10KO mice belong to this category. Importantly, chromatin IP assays in TAF10KO livers revealed a complete dissociation of TFIID subunits from the promoters of four selected genes of this group, while DNA-binding factors, coactivators, or other general transcription factors, such as TFIIB and Mediator, were retained. RNA pol II was also observed on the promoters, consistent with the high transcript levels of these genes in the livers of 30-day-old (and also 35-day-old) TAF10 KO mice. As depicted in the scheme of Figure 7C, the results indicate that, once stable PIC is formed, TFIID is dispensable for transcription, and other PIC components can sustain a promoter architecture that allows efficient RNA pol II recruitment and transcription.

In a previous study, we demonstrated a progressive build-up of transcription factors on the promoters of target genes during liver development (Kyrmizi et al., 2006). The increasing number of factors occupying the genes during development had little correlation with increased rate of transcription but, rather, had an outcome of formation of more stable PICs that were less sensitive to the loss of one key regulator (Kyrmizi et al., 2006). Here, we demonstrate that the highly complex promoter architecture, formed on tissue-specific genes in terminally differentiated cells, can sustain transcription for a significant length of time even in the absence of the key core promoter complex TFIID. Multiple biological roles of this phenomenon can be envisioned. For example, reduced activity of the transcription apparatus in response to a variety of extracellular signals that influence the function of individual components may lead to global effects on a large repertoire of genes whose expression characterizes the identity of a given cell type. The ability of highly complex PICs to support transcription in the absence of one or more of its components may provide advantages to ensure reduced responses to such stimuli and prevent potential global changes that could alter the phenotype of the cell.

TFIID Is Required for the Initial Activation of Hepatic Genes

During the examination of the microarray data, we also noticed that, among the 184 downregulated genes in the livers of TAF10-deficient adult mice, the majority of the liver-specific genes were not expressed in wild-type E18.5 livers. The initial activation of the most affected genes, such as *MUP3*, *Cyp7B1*, *Slco1a1*, *Car3*, and *Cyp2f2*, coincided with the time of TAF10 inactivation (days P14–P21). Transcription of these genes was very low—close to detection limit—in TAF10KO mice. We also failed to detect recruitment of RNA pol II and other factors to their promoters in TAF10KO livers, suggesting that, without TFIID,

active preinitiation complex is not formed on these genes. These results demonstrate that the above genes failed to get activated in TAF10KO mice and support the mechanistic model (Figure 7C) according to which TFIID is absolutely required for the assembly of the transcription apparatus at the initial phase of PIC formation.

About two-thirds of the downregulated transcripts decreased less dramatically (to 30%–50% of wild-type) in TAF10KO livers. Our analysis of five selected liver-specific genes in this category revealed that their initial activation occurs during the first week after birth and their transcript levels reach 40%–50% of the maximum at the time of TAF10 inactivation. Gradual increases of mRNA levels in a given cell population may be a result of the fact that genes are not activated in all cells or both alleles in the same cell at the same developmental time. Therefore, the lower extent of TAF10 inactivation-mediated changes in this category of genes may be explained by the lack of their further activation coming from new initiation events.

Involvement of TFIID in the Mechanism of Postnatal Silencing of Hepatic Genes

The general transcription factor complex TFIID is one of the most studied components of the transcription apparatus. Its functions in the transcription process have always been linked to activation (Orphanides et al., 1996; Dorris and Struhl, 2000). Hence, it was surprising to see in our microarray list that, in adult TAF10KO mice, the transcript levels of several (233) genes were increased. An obvious explanation for this observation would be that loss of TFIID would indirectly affect the transcription of these genes. Inspection of the hepatocyte-specific genes within this list and comparison of their expression levels in wild-type E18.5 and adult P30 livers indicated that the majority of them are silenced postnatally. A detailed analysis of the five most affected liver-specific genes (*Afp*, *Akr1b7*, *Igfbp1*, *H19*, and *Igf2*) showed that, during postnatal liver development, the mRNA levels of these genes are gradually decreased, reaching essentially undetectable levels at days 14–21. In a good correlation with the postnatal repression of these genes in wild-type P30 livers, RNA pol II, Mediator, and TFIIB could not be detected on their promoters. Interestingly, however, TFIID components remained associated with the promoters during the repressed state. What could be the role of TFIID on an inactive promoter? One possibility is that TFIID occupancy serves a “bookmarking” role that keeps the regulatory regions competent for reactivation, analogous to that observed during mitosis in HeLa cells (Christova and Oelgeschlager, 2002). According to this scenario, TFIID would be inert with respect to transcriptional activity but would play an architectural role that prevents compaction of the underlying chromatin. This possibility gains some support from the reactivation potential of *Afp* and *H19* genes in hepatocellular carcinomas (Spear, 1999; Ariel et al., 1998).

A more likely scenario is that TFIID cooperates with repressor proteins for efficient silencing of the genes. Our findings directly support this hypothesis: in TAF10KO mice, TAFs dissociated from *Afp*, *Akr1b7*, and *Igfbp1* promoters, which coincided with the rerecruitment of Mediator and RNA pol II. This new promoter configuration, which also included TAF-less TBP, correlated with the re-expression of the corresponding transcripts. The fact that

we observed such activation on silent genes that were active in an earlier developmental period points to a derepression mechanism depicted in Figure 7C.

Role of TFIID in the Crosstalk between Core Promoter and Upstream Regulatory Regions

With the exception of *Afp*, the mechanism of postnatal repression of the category 4 genes is poorly understood. Association of p53 with the distal repressor region of the *Afp* gene facilitates the recruitment of mSin3A-containing corepressor complex and displaces the main activator, FoxA2 (Nguyen et al., 2005). Independent *in vitro* studies also demonstrated that the NcoR component of the corepressor complex can interact with TAF9 and can lock it into a nonfunctional conformation that is not conducive for transcription (Muscat et al., 1998). It has also been reported that p53 itself can directly interact with TAF9 and TAF1 (Buschmann et al., 2001; Li et al., 2007). Thus, we speculated that TAFs may play an active role in the postnatal repression of *Afp* gene by providing interaction surfaces to repressor proteins. Dissociation of TAFs from the promoter in TAF10-deficient hepatocytes could destabilize the repressor complex and allow the reassociation of Mediator and RNA pol II with it. The results in this paper confirm the above hypothesis. We observed a dissociation of the p53/Sin3a repressor proteins and their concomitant replacement by FoxA2 and CBP activators at the upstream regulatory region when TFIID binding to the core promoter was eliminated. On the other hand, the opposite switch (from activator to repressor complexes) occurring during normal development does not seem to be regulated by TFIID since it was associated with the promoter in both E18.5 and postnatal livers. Therefore, we propose that the involvement of TFIID in the crosstalk between the two regulatory regions is a characteristic for the repressed state of the *Afp* gene. While open questions still remain, our demonstration that TFIID is required for transcriptional repression of specific genes provides an example for an additional function of this complex, which contributes to the regulation of cell type-specific gene expression patterns. In this regard, we note that, in the recent genome-wide occupancy study conducted in IMR90 fibroblasts, TAF1 (and presumably TFIID) was also found in the promoters of about 4.5% of inactive genes (Kim et al., 2005). Association of TFIID with such a high number of inactive promoters implies that the repressive function described here may not be restricted to hepatocytes but could also operate in other cell types.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Liver-Specific TAF10 KO Mice and Histological Analysis

TAF10^{LoxP} mice containing floxed exon 2 allele of the *TAF10* gene (Mohan et al., 2003) were backcrossed to CBA-CAx57BI/10 background and maintained in grouped cages in a temperature-controlled virus-free facility on a 12 hr/12 hr light/dark cycle. *TAF10^{LoxP}* mice were crossed with *Alfp-Cre* and *Alb-Cre* transgenic mice (Kyrnizi et al., 2006) to obtain inactivation of *TAF10* gene in embryonic and adult hepatocytes, respectively. For histological analysis, livers were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin, and sections (6–8 μ m thick) were used for staining with H&E. For immunostaining, frozen liver sections were fixed in 2% formalin; blocked with 1% BSA in PBS, followed by incubation with α TAF10, α TAF1, α HNF-4, α FoxA2, or α Albumin primary; and Alexa Fluor 568-labeled (Molecular Probes) secondary antibodies as described (Ktistaki and Talianidis, 1997).

RNA Analysis and Expression Profiling

Total RNA was prepared by the guanidinium isothiocyanate extraction method and, after digestion with DNase I, was further purified by using the RNeasy kit from QIAGEN. Reverse transcription and quantitative real-time PCR assays were performed as described previously (Kyrnizi et al., 2006) with primer sets shown in Table S3.

For microarray analysis, two RNA pools were prepared from the livers of E18.5 days wild-type mice, E18.5 days *TAF10^{lox/lox}-Alfp-Cre* (embryonic KO) mice, P30 days wild-type mice, and P30 days *TAF10^{lox/lox}-Alb-Cre* (adult KO) mice. Each pool consisted of equal amounts of RNA samples from 20 embryos or from 5 adult male animals, respectively. cRNA synthesis, hybridizations of dye-swap replicates to UMC M. musculus 35K oligo Array Version 1.0, and data analysis are described in the Supplemental Experimental Procedures. The data can be accessed at <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> (experiment code E-IMBB-Mm-1).

Extract Preparation and Coimmunoprecipitation Assays

Liver tissue was minced to small pieces in a buffer containing 0.32 M sucrose, 15 mM HEPES (pH 7.9), 60 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5% BSA, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM spermine, and 0.5 mM DTT, supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche). After ten strokes of homogenization with Teflon pestle, the nuclei were layered over equal volume of a buffer containing 30% sucrose, 15 mM HEPES (pH 7.9), 60 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM spermine, and 0.5 mM DTT and centrifuged for 15 min at 3000 rpm. Pelleted nuclei were washed with PBS; resuspended in 50 mM Tris (pH 7.5), 1% NP40, 0.25% deoxycholate, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, and protease inhibitor cocktail (Roche); and incubated at 4°C for 20 min with constant agitation. After centrifugation at 18,000 rpm, the extracts were used for immunoprecipitation and western blot analysis as described (Kouskouti et al., 2004). The sources of the antibodies used are described in the Supplemental Experimental Procedures.

Chromatin Immunoprecipitation Assays

Chromatin immunoprecipitation assays were performed as described previously (Kyrnizi et al., 2006). The antibodies and primer sets used for chromatin immunoprecipitations and quantitative PCR are described in the Supplemental Experimental Procedures and Table S3. All of the amplification data were first normalized to input and expressed as fold enrichment over the values obtained with control antibody (anti-HA tag). The latter control values ranged between 0.1% and 0.14% of the input in the reactions amplifying the different promoter regions.

SUPPLEMENTAL DATA

The Supplemental Data include Supplemental Experimental Procedures, seven figures, and three tables and can be found with this article online at <http://www.molecule.org/cgi/content/full/31/4/531/DC1/>.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from GSRT (PENED-03ED542) and EU (MTKD-CT2005 029610; LSHM-CT2006 037498).

Received: November 16, 2007

Revised: April 18, 2008

Accepted: July 25, 2008

Published: August 21, 2008

REFERENCES

- Albright, S.R., and Tjian, R. (2000). TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene* 242, 1–13.
- Ariel, I., Miao, H.Q., Ji, X.R., Schneider, T., Roll, D., de Groot, N., Hochberg, A., and Ayesh, S. (1998). Imprinted H19 oncofetal RNA is a candidate tumour marker for hepatocellular carcinoma. *Mol. Pathol.* 51, 21–25.

- Bartfai, R., Balduf, C., Hilton, T., Rathmann, Y., Hadzhiev, Y., Tora, L., Orban, L., and Muller, F. (2004). TBP2, a vertebrate-specific member of the TBP family, is required in embryonic development of zebrafish. *Curr. Biol.* *14*, 593–598.
- Bell, B., and Tora, L. (1999). Regulation of gene expression by multiple forms of TFIID and other novel TAFII-containing complexes. *Exp. Cell Res.* *246*, 11–19.
- Bell, B., Scheer, E., and Tora, L. (2001). Identification of hTAF(II)80 delta links apoptotic signaling pathways to transcription factor TFIID function. *Mol. Cell* *8*, 591–600.
- Buschmann, T., Lin, Y., Aithmitti, N., Fuchs, S.Y., Lu, H., Resnick-Silverman, L., Manfredi, J.J., Ronai, Z., and Wu, X. (2001). Stabilization and activation of p53 by the coactivator protein TAFII31. *J. Biol. Chem.* *276*, 13852–13857.
- Butler, J.E., and Kadonaga, J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* *16*, 2583–2592.
- Christova, R., and Oelgeschlager, T. (2002). Association of human TFIID-promoter complexes with silenced mitotic chromatin in vivo. *Nat. Cell Biol.* *4*, 79–82.
- Deato, M.D., and Tjian, R. (2007). Switching of the core transcription machinery during myogenesis. *Genes Dev.* *21*, 2137–2149.
- Dikstein, R., Ruppert, S., and Tjian, R. (1996). TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74. *Cell* *84*, 781–790.
- Dorris, D.R., and Struhl, K. (2000). Artificial recruitment of TFIID, but not RNA polymerase II holoenzyme, activates transcription in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* *20*, 4350–4358.
- Freiman, R.N., Albright, S.R., Zheng, S., Sha, W.C., Hammer, R.E., and Tjian, R. (2001). Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development. *Science* *293*, 2084–2087.
- Huisinga, K.L., and Pugh, B.F. (2004). A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* *13*, 573–585.
- Indra, A.K., Mohan, W.S., 2nd, Frontini, M., Scheer, E., Messaddeq, N., Metzger, D., and Tora, L. (2005). TAF10 is required for the establishment of skin barrier function in foetal, but not in adult mouse epidermis. *Dev. Biol.* *285*, 28–37.
- Jacobi, U.G., Akkers, R.C., Pierson, E.S., Weeks, D.L., Dagle, J.M., and Veenstra, G.J. (2007). TBP paralogs accommodate metazoan- and vertebrate-specific developmental gene regulation. *EMBO J.* *26*, 3900–3909.
- Kim, T.H., Barrera, L.O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M.A., Richmond, T.A., Wu, Y., Green, R.D., and Ren, B. (2005). A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* *436*, 876–880.
- Kouskouti, A., Scheer, E., Staub, A., Tora, L., and Talianidis, I. (2004). Gene-specific modulation of TAF10 function by SET9-mediated methylation. *Mol. Cell* *14*, 175–182.
- Ktistaki, E., and Talianidis, I. (1997). Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* *277*, 109–112.
- Kyrmizi, I., Hatzis, P., Katrakili, N., Tronche, F., Gonzalez, F.J., and Talianidis, I. (2006). Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev.* *20*, 2293–2305.
- Lee, Y.H., Sauer, B., and Gonzalez, F.J. (1998). Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1alpha knockout mouse. *Mol. Cell Biol.* *18*, 3059–3068.
- Lemon, B., and Tjian, R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* *14*, 2551–2569.
- Li, A.G., Piluso, L.G., Cai, X., Gadd, B.J., Ladurner, A.G., and Liu, X. (2007). An acetylation switch in p53 mediates holo-TFIID recruitment. *Mol. Cell* *28*, 408–421.
- Metzger, D., Scheer, E., Soldatov, A., and Tora, L. (1999). Mammalian TAF(II)30 is required for cell cycle progression and specific cellular differentiation programmes. *EMBO J.* *18*, 4823–4834.
- Mohan, W.S., Jr., Scheer, E., Wendling, O., Metzger, D., and Tora, L. (2003). TAF10 (TAF(II)30) is necessary for TFIID stability and early embryogenesis in mice. *Mol. Cell Biol.* *23*, 4307–4318.
- Muller, F., Lakatos, L., Dantoni, J., Strahle, U., and Tora, L. (2001). TBP is not universally required for zygotic RNA polymerase II transcription in zebrafish. *Curr. Biol.* *11*, 282–287.
- Muller, F., Demyan, M.A., and Tora, L. (2007). New problems in RNA polymerase II transcription initiation: matching the diversity of core promoters with a variety of promoter recognition factors. *J. Biol. Chem.* *282*, 14685–14689.
- Muscat, G.E., Burke, L.J., and Downes, M. (1998). The corepressor N-CoR and its variants RIP13a and RIP13Delta1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAFII32 and TAFII70. *Nucleic Acids Res.* *26*, 2899–2907.
- Nguyen, T.T., Cho, K., Stratton, S.A., and Barton, M.C. (2005). Transcription factor interactions and chromatin modifications associated with p53-mediated, developmental repression of the alpha-fetoprotein gene. *Mol. Cell Biol.* *25*, 2147–2157.
- O'Brien, T., and Tjian, R. (2000). Different functional domains of TAFII250 modulate expression of distinct subsets of mammalian genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 2456–2461.
- Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* *10*, 2657–2683.
- Persengiev, S.P., Zhu, X., Dixit, B.L., Maston, G.A., Kittler, E.L., and Green, M.R. (2003). TRF3, a TATA-box-binding protein-related factor, is vertebrate-specific and widely expressed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 14887–14891.
- Pham, A.D., and Sauer, F. (2000). Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* *289*, 2357–2360.
- Pointud, J.C., Mengus, G., Brancorsini, S., Monaco, L., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., and Davidson, I. (2003). The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation. *J. Cell Sci.* *116*, 1847–1858.
- Pugh, B.F. (2000). Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* *255*, 1–14.
- Spear, B.T. (1999). Alpha-fetoprotein gene regulation: lessons from transgenic mice. *Semin. Cancer Biol.* *9*, 109–116.
- Veenstra, G.J., Weeks, D.L., and Wolffe, A.P. (2000). Distinct roles for TBP and TBP-like factor in early embryonic gene transcription in *Xenopus*. *Science* *290*, 2312–2315.
- Vermeulen, M., Mulder, K.W., Denissov, S., Pijnappel, W.W., van Schaik, F.M., Varier, R.A., Baltissen, M.P., Stunnenberg, H.G., Mann, M., and Timmers, H.T. (2007). Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* *131*, 58–69.
- Verrijzer, C.P., and Tjian, R. (1996). TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 338–342.
- Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, X., and Tora, L. (1998). Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature* *393*, 187–191.
- Zaret, K.S. (2002). Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 499–512.